

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5130826号
(P5130826)

(45) 発行日 平成25年1月30日(2013.1.30)

(24) 登録日 平成24年11月16日(2012.11.16)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 P 7/56 (2006.01) C 1 2 P 7/56
 C 1 2 R 1/19 (2006.01) C 1 2 P 7/56
 C 1 2 R 1:19

請求項の数 6 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2007-213681 (P2007-213681)	(73) 特許権者	000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(22) 出願日	平成19年8月20日(2007.8.20)	(72) 発明者	澤井 秀樹 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内
(65) 公開番号	特開2008-263945 (P2008-263945A)	(72) 発明者	耳塚 孝 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内
(43) 公開日	平成20年11月6日(2008.11.6)	(72) 発明者	山田 勝成 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究所内
審査請求日	平成22年8月6日(2010.8.6)	審査官	鶴 剛史
(31) 優先権主張番号	特願2007-84476 (P2007-84476)		
(32) 優先日	平成19年3月28日(2007.3.28)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 連続発酵による乳酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

乳酸を生産する能力を有する大腸菌の発酵培養液を分離膜で濾過し、濾液から生産物を回収するとともに未濾過液を前記の発酵培養液に保持または還流し、かつ、その大腸菌の発酵原料を前記の発酵培養液に追加する連続発酵により乳酸を製造する方法であって、前記の分離膜として平均細孔径が0.01 μm以上1 μm未満の細孔を有する多孔性膜を用い、その膜間差圧を0.1から20 kPaの範囲にして濾過処理することを特徴とする連続発酵による乳酸の製造方法。

【請求項2】

多孔性分離膜の純水透過係数が、 $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以上 $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以下である請求項1記載の連続発酵による乳酸の製造方法。 10

【請求項3】

多孔性膜の平均細孔径が0.01 μm以上0.2 μm未満であり、かつ、該平均細孔径の標準偏差が0.1 μm以下である請求項1または2記載の連続発酵による乳酸の製造方法。

【請求項4】

多孔性膜の膜表面粗さが0.1 μm以下である請求項1から3のいずれかに記載の連続発酵による乳酸の製造方法。

【請求項5】

多孔性膜が多孔性樹脂層を含む多孔性膜である請求項1から4のいずれかに記載の連続 20

発酵による乳酸の製造方法。

【請求項6】

多孔性膜の膜素材がポリフッ化ビニリデン系樹脂である請求項1から5のいずれかに記載の連続発酵による乳酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸を生産する能力のある大腸菌の発酵培養液から、目詰まりが生じにくい多孔性膜を通して乳酸を含む液を効率よく濾過・回収すること、および未濾過液を前記の発酵培養液に戻すことにより発酵に關与する微生物濃度を向上させ、高い生産性を得ることができる連続発酵による乳酸の製造方法に関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

微生物や培養細胞の培養を伴う物質生産方法である発酵法は、大きく(1)回分発酵法(Batch発酵法)および流加発酵法(Fed-Batch発酵法)と、(2)連続発酵法とに分類することができる。

【0003】

上記(1)の回分発酵法および流加発酵法は、設備的には簡素であり短時間で培養が終了し、雑菌汚染による被害が少ないという利点がある。しかしながら、時間経過とともに発酵培養液中の生産物濃度が高くなり、浸透圧あるいは生産物阻害等の影響により生産性および収率が低下してくる。そのため、長時間にわたり安定して高収率かつ高生産性を維持することが困難である。一方、上記(2)の連続発酵法は、発酵反応槽内で目的物質が高濃度に蓄積されることを回避することによって、長時間にわたって高収率でかつ高生産性を維持することができるという利点がある。

20

【0004】

次に、乳酸の製造方法に関する技術背景について説明する。乳酸は、主に、酸味料として従来のクエン酸や酒石酸の代替品として用いられており、酸性の洗浄剤としての用途にも用いられる。また、乳酸には、医薬品として局方品の酸薬や皮膚腐触薬などの用途がある。また、乳酸には、誘導体としてナトリウム塩(化粧品や食品などの保湿剤用途)やカルシウム塩(カルシウム剤や強壮剤用途)などの用途もある。その他、乳酸には、メチルエステルやエチルエステルなどのエステルとして、フロンやトリクロロエタンなどのオゾン層破壊性溶剤の代替品としての用途もある。最近では、ポリ乳酸樹脂の原料としての用途が大きく広がっている。ここで実用的なポリ乳酸樹脂の原料としては、乳酸の光学純度が高いことが必要であることが知られており、光学純度の高い乳酸を生産することが重要である。

30

【0005】

現在、乳酸は、主に乳酸菌と呼ばれる原核微生物あるいはリゾパス属(Genus Rhizopus)のカビによる回分発酵法で工業的に生産されているが、乳酸の対糖収率は、乳酸菌を用いる方が高いことが知られている(非特許文献1参照)。しかしながら、乳酸菌による乳酸発酵から得られる乳酸の光学純度としては、実用的なポリ乳酸樹脂の原料として用いる光学純度を満足できない場合が多く、光学純度の高い乳酸を生産する微生物の昨出に関する検討もなされている(特許文献1参照)。

40

【0006】

一方、更に乳酸の生産性を向上させるため発酵プロセスに関する検討も行われている。連続的な乳酸発酵に関する検討が行われている。例えば、小林らは、セラミックス製フィルターを用いた乳酸菌による連続的な乳酸発酵の検討を行っているが、乳酸菌の濾過において、十分な透過性能を確保するためには、濾過圧力として、約90kPaの高い膜間差圧と逆洗浄が必要であることを報告している。また、膜表面の循環速度を早くすることにより透過性は向上するが、同時に膜表面での剪断力によって、微生物の活性低下や破裂な

50

どの不具合が生じることを開示している（非特許文献2参照。）。

【0007】

同様に、セラミックス製フィルターを用いた連続的な乳酸発酵を行うための装置が開示されているが、この装置では、セラミックス製フィルターの逆洗浄のために、空気や窒素などの気体や、水や濾過膜透過水などの液体を培養液の中に加えることになるため、微生物や培養細胞の物質生産能力が変化し培養の状態を最適に維持することが難しいことに加えて、菌体分離のための濾過膜装置が複雑になるという課題があった（特許文献2参照。）。更に、濾過膜を用いた乳酸菌の培養法の技術も開示されているが、上記の装置と同様に逆洗浄操作に伴う不具合があり、また濾過時にポンプによる吸引が必要で、濾過膜装置の複雑化が課題であった（特許文献3参照。）。 10

【0008】

すなわち、乳酸の連続発酵法において、微生物や細胞を分離膜で濾過し、濾液から生産物を回収すると同時に濾過された微生物や細胞を培養液に還流させ、培養液中の微生物や細胞濃度を向上させ、かつ、高く維持させることにより高い物質生産性を得ることは依然として困難であり、技術の革新が望まれていた。

【非特許文献1】財団法人バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究会編、「発酵ハンドブック」、64 - 65、共立出版（2001）

【非特許文献1】小林猛ら、ケミカル・エンジニア、12、49（1988）

【特許文献1】特開2005 - 102625号公報

【特許文献2】特開昭62 - 138184号公報 20

【特許文献3】特開平2 - 174674号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

そこで本発明の目的は、簡便な操作方法で、長時間にわたり安定して高生産性を維持することができる連続発酵法による乳酸の製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、鋭意研究の結果、微生物や細胞の分離膜内への侵入が少なく、微生物や細胞を膜間差圧が低い条件で発酵培養液を濾過した場合に、分離膜の目詰まりが著しく抑制されることを見出し、分離膜を用いた連続発酵を行うことにより、課題であった乳酸の発酵生産性能が飛躍的に向上することを発見し、本発明を完成するに至った。 30

【0011】

本発明の乳酸の製造方法は、乳酸を生産する能力を有する大腸菌の発酵培養液を分離膜で濾過し、濾液から生産物を回収するとともに未濾過液を前記の発酵培養液に保持または還流し、かつ、その大腸菌の発酵原料を前記の発酵培養液に追加する連続発酵により乳酸を製造する方法であって、前記の分離膜として平均細孔径が $0.01\mu\text{m}$ 以上 $1\mu\text{m}$ 未満の細孔を有する多孔性膜を用い、その膜間差圧を 0.1 から 20kPa の範囲にして濾過処理することを特徴とする連続発酵による乳酸の製造方法である。

【0012】 40

具体的に本発明は、発酵培養液を分離膜によって濾液と未濾過液に分離し、その濾液から所望の発酵生産物である乳酸を回収するとともに、その未濾過液を発酵培養液に保持または還流させる連続発酵方法による乳酸の製造方法であって、高い透過性と高い細胞阻止率を持ち閉塞しにくい上記特定の多孔性膜を利用すると共に上記特定の低い膜間差圧で濾過処理することにより、安定に低コストで、発酵生産効率を著しく向上させる乳酸の製造方法を提供するものである。

【0013】

本発明の連続発酵による乳酸の製造方法の好ましい態様によれば、前記の多孔性膜の純水透過係数は、 $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{ m}^2 / \text{ s} / \text{ pa}$ 以上 $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3 / \text{ m}^2 / \text{ s} / \text{ pa}$ 以下である。 50

【0014】

本発明の連続発酵による乳酸の製造方法の好ましい態様によれば、前記の多孔性膜の平均細孔径は $0.01\ \mu\text{m}$ 以上 $0.2\ \mu\text{m}$ 未満であり、その平均細孔径の標準偏差は $0.1\ \mu\text{m}$ 以下であり、その膜表面粗さは $0.1\ \mu\text{m}$ 以下である。

【0015】

本発明の連続発酵による乳酸の製造方法の好ましい態様によれば、前記の多孔性膜は多孔性樹脂層を含む多孔性膜であり、多孔性樹脂層は有機高分子膜からなるものである。

【0016】

本発明の連続発酵による乳酸の製造方法の好ましい態様によれば、前記の多孔性膜の素材にポリフッ化ビニリデン系樹脂が用いられることである。

10

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、簡便な操作条件で、長時間にわたり安定して所望の発酵生産物の高生産性を維持する連続発酵が可能となり、広く発酵工業において、発酵生産物である乳酸を低コストで安定に生産することが可能となる。本発明の連続発酵による乳酸の製造方法により得られた乳酸は、例えば、酸味料、洗浄剤および医薬品、更にはポリ乳酸樹脂の原料として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明は、乳酸を生産する能力のある大腸菌の発酵培養液を、分離膜で濾過して濾液と未濾過液に分離し濾液から生産物を回収すると共に未濾過液を前記培養液に保持または還流し、かつ、その大腸菌の発酵原料を前記の培養液に追加する連続発酵であって、前記の分離膜として平均細孔径が $0.01\ \mu\text{m}$ 以上 $1\ \mu\text{m}$ 未満の細孔を有する多孔性膜を用い、その膜間差圧を 0.1 以上 $20\ \text{kPa}$ 未満にして濾過処理することを特徴とする連続発酵による乳酸の製造方法である。

20

【0021】

本発明において分離膜として用いられる多孔性膜は、発酵に使用される大腸菌による目詰まりが起りにくく、かつ、濾過性能が長期間安定に継続する性能を有するものであることが望ましい。そのため、本発明で使用される多孔性膜は、その平均細孔径が $0.01\ \mu\text{m}$ 以上 $1\ \mu\text{m}$ 未満であることが重要である。

30

【0022】

次に、本発明で分離膜として用いられる多孔性膜の構成について説明する。本発明における多孔性膜は、被処理水の水質や用途に応じた分離性能と透水性能を有するものであり、阻止性能および透水性能や耐汚れ性という分離性能の点からは、多孔質樹脂層を含む多孔性膜であることが好ましい。このような多孔性膜は、多孔質基材の表面に、分離機能層として作用とする多孔質樹脂層を有している。多孔質基材は、多孔質樹脂層を支持して分離膜としての多孔性膜に強度を与えるものである。

【0023】

多孔質基材の材質は、有機材料および/または無機材料等からなり、中でも有機繊維が望ましく用いられる。好ましい多孔質基材は、セルロース繊維、セルローストリアセート繊維、ポリエステル繊維、ポリプロピレン繊維およびポリエチレン繊維などの有機繊維を用いてなる織布や不織布であり、中でも、密度の制御が比較的容易であり製造も容易で安価な不織布が好ましく用いられる。

40

【0024】

また、多孔質樹脂層は、上述したように分離機能層として作用するものであり、有機高分子膜を好適に使用することができる。有機高分子膜の材質としては、例えば、ポリエチレン系樹脂、ポリプロピレン系樹脂、ポリ塩化ビニル系樹脂、ポリフッ化ビニリデン系樹脂、ポリスルホン系樹脂、ポリエーテルスルホン系樹脂、ポリアクリロニトリル系樹脂、セルロース系樹脂およびセルローストリアセート系樹脂などが挙げられる。有機高分子膜は、これらの樹脂を主成分とする樹脂の混合物からなるものであってもよい。ここで主

50

成分とは、その成分が50重量%以上、好ましくは60重量%以上含有することをいう。中でも、多孔性膜を構成する多孔質樹脂層の素材としては、溶液による製膜が容易で物理的耐久性や耐薬品性にも優れているポリ塩化ビニル系樹脂、ポリフッ化ビニリデン系樹脂、ポリスルホン系樹脂、ポリエーテルスルホン系樹脂およびポリアクリロニトリル系樹脂が好ましく、ポリフッ化ビニリデン系樹脂またはそれを主成分とする樹脂が最も好ましく用いられる。

【0025】

ここで、ポリフッ化ビニリデン系樹脂としては、フッ化ビニリデンの単独重合体が好ましく用いられるが、その他、フッ化ビニリデンと共重合可能なビニル系単量体との共重合体も好ましく用いられる。フッ化ビニリデンと共重合可能なビニル系単量体としては、テトラフルオロエチレン、ヘキサフルオロプロピレンおよび三塩化フッ化エチレンなどが例示される。

10

【0026】

本発明で用いられる多孔性膜の作成法の概要を説明する。まず、上述した多孔質基材の表面に、上述した樹脂と溶媒とを含む原液の被膜を形成するとともに、その原液を多孔質基材に含浸させる。しかる後、被膜を有する多孔質基材の被膜側表面のみを、非溶媒を含む凝固浴と接触させて樹脂を凝固させると共に多孔質基材の表面に多孔質樹脂層を形成する。原液にさらに非溶媒を含ませることもできる。原液の温度は、製膜性の観点から、通常、15～120の範囲内で選定することが好ましい。

【0027】

ここで、上記の原液には、開孔剤を添加することもできる。開孔剤は、凝固浴に浸漬された際に抽出されて、樹脂層を多孔質にする作用を持つものである。開孔剤を添加することにより、平均細孔径の大きさを制御することができる。開孔剤は、凝固浴に浸漬された際に抽出されて、樹脂層を多孔質にする作用を持つものである。開孔剤は、凝固浴への溶解性の高いものであることが好ましい。開孔剤としては、例えば、塩化カルシウムや炭酸カルシウムなどの無機塩を用いることができる。また、開孔剤として、ポリエチレングリコールやポリプロピレングリコールなどのポリオキシアルキレン類や、ポリビニルアルコール、ポリビニルブチラールおよびポリアクリル酸などの水溶性高分子化合物や、グリセリンを用いることができる。

20

【0028】

また、溶媒は、樹脂を溶解するものである。溶媒は、樹脂および開孔剤に作用してそれらが多孔質樹脂層を形成するのを促す。このような溶媒としては、N-メチルピロリジノン(NMP)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMAc)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、アセトンおよびメチルエチルケトンなどを用いることができる。なかでも、樹脂の溶解性の高いNMP、DMAc、DMFおよびDMSOを好ましく用いられる。

30

【0029】

さらに、上記の原液には、非溶媒を添加することもできる。非溶媒は、樹脂を溶解しない液体である。非溶媒は、樹脂の凝固の速度を制御して細孔の大きさを制御するように作用する。非溶媒としては、水やメタノールおよびエタノールなどのアルコール類を用いることができる。中でも、価格の点から水やメタノールが好ましい。非溶媒は、これらの混合物であってもよい。

40

【0030】

本発明で用いられる多孔性膜は、平膜であっても中空糸膜であっても良い。多孔性膜が平膜の場合、その平均厚みは用途に応じて選択されるが、好ましくは20μm以上5000μm以下であり、より好ましくは50μm以上2000μm以下の範囲で選択される。

【0031】

上述のように、本発明で分離膜として用いられる多孔性膜は、多孔質基材と多孔質樹脂層とから形成されている多孔性膜であることが望ましい。その際、多孔質基材に多孔質樹脂層が浸透していても、多孔質基材に多孔質樹脂層が浸透していなくてもどちらでも良く

50

、用途に応じて選択される。多孔質基材の平均厚みは、好ましくは50 μm以上3000 μm以下の範囲で選択される。また、多孔性分離膜が中空系膜の場合、中空系の内径は好ましくは200 μm以上5000 μm以下の範囲で選択され、膜厚は好ましくは20 μm以上2000 μm以下の範囲で選択される。また、有機繊維または無機繊維を筒状にした織物や編物を中空系膜の内部に含んでいても良い。

【0032】

本発明で用いられる多孔性膜は、支持体と組み合わせることによって分離膜エレメントとすることができる。多孔性膜を有する分離膜エレメントの形態は特に限定されないが、支持体として支持板を用い、その支持板の少なくとも片面に、本発明で用いられる多孔性膜を配した分離膜エレメントは、本発明で用いられる多孔性膜を有する分離膜エレメントの好適な形態の一つである。この形態で、膜面積を大きくすることが困難な場合には、透水量を大きくするために、支持板の両面に多孔性膜を配することも好ましい態様である。

10

【0033】

分離膜としての多孔性膜の平均細孔径が上記のように0.01 μm以上1 μm未満の範囲内にあると、菌体が入り込むことのない高い排除率と、高い透水性を両立させることができ、さらに目詰まりをしにくく、透水性を長時間保持することが、より高い精度と再現性を持って実施することができる。大腸菌として細菌類を用いた場合、多孔性膜の平均細孔径は好ましくは0.4 μm以下であり、平均細孔径は0.2 μm未満であればなお好適に実施することが可能である。平均細孔径は、小さすぎると透水量が低下することがあるので、本発明では、平均細孔径は0.01 μm以上であり、好ましくは0.02 μm以上

20

【0034】

ここで、平均細孔径は、倍率10,000倍の走査型電子顕微鏡観察における、9.2 μm × 10.4 μmの範囲内で観察できる細孔すべての直径を測定し、平均することにより求めることができる。

【0035】

また、本発明では上記の平均細孔径の標準偏差は、0.1 μm以下であることが好ましい。更に、平均細孔径の標準偏差が小さい、すなわち細孔径の大きさが揃っている方が均一な透過液を得ることができ、発酵運転管理が容易になることから、平均細孔径の標準偏差は小さければ小さい方が望ましい。

30

【0036】

平均細孔径の標準偏差は、上述の9.2 μm × 10.4 μmの範囲内で観察できる細孔数をNとして、測定した各々の直径をX_kとし、細孔直径の平均をX(ave)とした下記の(式1)により算出される。

【0037】

【数1】

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^N (X_k - X(\text{ave}))^2}{N}} \quad \dots \text{(式1)}$$

40

【0038】

本発明で用いられる多孔性膜においては、発酵培養液の透過性が重要点の一つであり、透過性の指標として、使用前の多孔性膜の純水透過係数を用いることができる。本発明において、多孔性膜の純水透過係数は、逆浸透膜による25℃の温度の精製水を用い、ヘッド高さ1mで透水量を測定し算出したとき、 $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以上であることが好ましい。純水透過係数が $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以上 $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以下であれば、実用的に十分な透水量が得られる。より好ましい純水透過係数は、 $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以上 $1 \times 10^{-7} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} /$

50

p a 以下である。

【 0 0 3 9 】

本発明で用いられる多孔性膜の膜表面粗さは、分離膜の目詰まりに影響を与える因子である。好ましくは膜表面粗さが $0.1 \mu\text{m}$ 以下のときに分離膜の剥離係数や膜抵抗を好適に低下させることができ、より低い膜間差圧で連続発酵が実施可能である。従って、目詰まりを抑えることにより安定した連続発酵が可能になることから、表面粗さは小さいほど好ましい。

【 0 0 4 0 】

また、多孔性分離膜の膜表面粗さを低くすることにより、大腸菌の濾過において、膜表面で発生する剪断力を低下させることが期待でき、大腸菌の破壊が抑制され、多孔性分離膜の目詰まりも抑制されることにより、長期間安定な濾過が可能になると考えられる。

【 0 0 4 1 】

ここで、膜表面粗さは、下記の原子間力顕微鏡装置 (A F M) を使用して、下記の装置と条件で測定することができる。

・装置：原子間力顕微鏡装置(Digital Instruments (株) 製Nanoscope IIIa)

・条件：探針 SiNカンチレバー(Digital Instruments (株) 製)

：走査モード コンタクトモード(気中測定)

水中タッピングモード(水中測定)

：走査範囲 $10 \mu\text{m}$ 、 $25 \mu\text{m}$ 四方(気中測定)

$5 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ 四方(水中測定)

：走査解像度 512×512

・試料調製 測定に際し膜サンプルは、常温でエタノールに15分浸漬後、RO水中に24時間浸漬し洗浄した後、風乾し用いた。RO水とは、濾過膜の一種である逆浸透膜(RO膜)を用いて濾過し、イオンや塩類などの不純物を排除した水を指す。RO膜の孔の大きさは、概ね 2nm 以下である。

【 0 0 4 2 】

また、膜表面粗さ d_{rough} は、上記 A F M により各ポイントの Z 軸方向の高さから、下記の(式2)により算出する。

【 0 0 4 3 】

【数2】

$$d_{\text{rough}} = \sum_{n=1}^N \frac{|Z_n - \bar{Z}|}{N} \quad \dots\dots(\text{式}2)$$

d_{rough} : 表面粗さ (μm)

Z_n : Z 軸方向の高さ (μm)

\bar{Z} : 走査範囲の平均高さ(μm)

N : 測定サンプルの数

【 0 0 4 4 】

本発明において、大腸菌を分離膜で濾過処理する際の膜間差圧は、大腸菌および培地成分が容易に目詰まりしない条件であればよいが、膜間差圧を 0.1kPa 以上 20kPa 以下の範囲にして濾過処理することが重要である。膜間差圧は好ましくは 0.1kPa 以上 10kPa 以下の範囲であり、さらに好ましくは 0.1kPa 以上 5kPa 以下の範囲である。上記の膜間差圧 0.1kPa 以上 20kPa 以下の範囲を外れた場合、大腸菌および培地成分の目詰まりが急速に発生し、透過水量の低下を招き、連続発酵運転に不具合を生じることがある。

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

50

濾過の駆動力としては、発酵培養液と多孔性膜処理水の液位差（水頭差）を利用したサイホンにより多孔性膜に膜間差圧を発生させることが可能である。また、濾過の駆動力として多孔性膜処理水側に吸引ポンプを設置してもよいし、多孔性膜の発酵培養液側に加圧ポンプを設置することも可能である。膜間差圧は、発酵培養液と多孔性膜処理水の液位差を変化させることにより制御することができる、また、膜間差圧を発生させるためにポンプを使用する場合には、吸引圧力により膜間差圧を制御することができ、更に発酵培養液側の圧力を導入する気体または液体の圧力によっても膜間差圧を制御することができる。これら圧力制御を行う場合には、発酵培養液側の圧力と多孔性膜処理水側の圧力差をもって膜間差圧とし、膜間差圧の制御に用いることができる。

【 0 0 4 6 】

10

また、本発明において使用される多孔性膜は、濾過処理する膜間差圧として、0.1 kPa以上20 kPa以下の範囲で濾過処理することができる性能を有するものであることが好ましい。また、本発明で使用される多孔性膜は、上述のように、使用前の純水透過係数が、逆浸透膜による25℃の温度の精製水を用い、ヘッド高さ1mで透水量を測定し算出したとき、 $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以上の範囲であることが好ましく、更に $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以上 $6 \times 10^{-7} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以下の範囲にあることが好ましく、更に好ましくは $2 \times 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以上 $1 \times 10^{-7} \text{ m}^3 / \text{m}^2 / \text{s} / \text{pa}$ 以下の範囲にある

本発明で使用される大腸菌の発酵原料は、発酵培養する大腸菌の生育を促し、目的とする発酵生産物である乳酸を良好に生産させ得るものであれば良い。発酵原料としては、例えば、炭素源、窒素源、無機塩類、および必要に応じてアミノ酸、およびビタミンなどの有機微量栄養素を適宜含有する液体培地等が好ましく用いられる。

20

【 0 0 4 7 】

上記の炭素源としては、例えば、グルコース、シュークロース、フラクトース、ガラクトースおよびラクトース等の糖類、これら糖類を含有する澱粉糖化液、甘藷糖蜜、甜菜糖蜜、ハイテストモラセス、サトウキビ搾汁、更には酢酸、フマル酸等の有機酸、エタノールなどのアルコール類、およびグリセリン等が使用される。ここで糖類とは、多価アルコールの最初の酸化生成物であり、アルデヒド基またはケトン基をひとつ持ち、アルデヒド基を持つ糖をアルドース、ケトン基を持つ糖をケトースと分類される炭水化物のことを指す。

30

【 0 0 4 8 】

また、上記の窒素源としては、例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンステープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用される。

【 0 0 4 9 】

また、上記の無機塩類としては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩およびマンガン塩等を適宜添加使用することができる。

【 0 0 5 0 】

40

本発明で使用される大腸菌が生育のために特定の栄養素を必要とする場合には、その栄養物を標品もしくはそれを含有する天然物として添加することができる。また、消泡剤も必要に応じて添加使用することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明において、発酵培養液とは、発酵原料と大腸菌を接触させることで増殖した結果得られる液のことを言う。追加する発酵原料の組成は、培養開始時の発酵原料組成から適宜変更しても良い。発酵原料組成から追加する発酵原料の組成に変更する場合、目的とする乳酸の生産性が高くなるような変更が好ましい。例えば、上記炭素源に対する窒素源、無機塩類、アミノ酸およびビタミンなどの有機微量栄養素の重量比率を低下させることにより、乳酸の生産コストの低減、すなわち広義で乳酸の生産性の向上が実現できる場合も

50

ある。一方、上記炭素源に対する窒素源、無機塩類、アミノ酸およびビタミンなどの有機微量栄養素の重量比率を増加させることにより、乳酸の生産性を向上させることができる場合もある。

【0052】

本発明では、発酵培養液中の糖類など発酵原料の濃度は、5 g / l 以下に保持されるようにすることが好ましい。その理由は、発酵培養液の引き抜きによる発酵原料の流失を最小限にするためである。そのため発酵原料の濃度は、可能な限り小さいことが望ましい。

【0053】

微生物の発酵培養は、通常、pHが4～8で温度が20～40の範囲で行われることが多い。発酵培養液のpHは、無機の酸または有機の酸、アルカリ性物質、さらには尿素、炭酸カルシウムおよびアンモニアガスなどによって、上記範囲内のあらかじめ定められた値に調節される。

10

【0054】

大腸菌の培養において、発酵培養液中の溶存酸素濃度は乳酸の生産性を高くできるように制御することができる。発酵培養液中の溶存酸素の制御には供給する気体の供給速度を変化させることによって行うことができる。また、発酵培養液中の溶存酸素の制御は供給する気体の成分比率を変更することでも行うことができる。例えば、酸素の供給速度を上げる必要があれば、空気に酸素を加えて酸素濃度を例えば21%以上に保つ、発酵培養液を加圧する、攪拌速度を上げる、あるいは通気量を上げるなどの手段を用いることができる。逆に、酸素の供給速度を下げる必要があれば、炭酸ガス、窒素およびアルゴンなど酸素を含まないガスを空気に混合して供給することが可能である。

20

【0055】

本発明においては、培養初期に回分培養または流加培養を行って大腸菌濃度を高くした後連続培養（引き抜き）を開始しても良いし、高濃度の大腸菌をシードし、培養開始とともに連続培養を行っても良い。適当な時期から、発酵原料液の供給および培養物の引き抜きを行うことが可能である。発酵原料液供給と培養物の引き抜きの開始時期は、必ずしも同じである必要はない。また、発酵原料液の供給と培養物の引き抜きは連続的であってもよいし、間欠的であってもよい。発酵原料液には、上記に示したような菌体増殖に必要な栄養素を添加し、菌体増殖が連続的に行われるようにすればよい。

【0056】

発酵培養液中の大腸菌の濃度は、効率よい生産性を得る上で、発酵培養液の環境が微生物の増殖にとって不適切となって死滅する比率が高くない範囲で、高い状態で維持することが好ましい。一例として、濃度を乾燥重量として2 g / l 以上に維持することにより、より良好な生産効率を得られる。また、連続発酵装置の運転上の不具合や生産効率の低下を招かなければ、大腸菌の濃度の上限値は特に限定されない。

30

【0057】

発酵生産能力のあるフレッシュな大腸菌を増殖させつつ行う連続培養操作は、培養管理上、通常、単一の発酵反応槽で行うことが好ましい。しかしながら、菌体を増殖しつつ生産物を生成する連続培養法であれば、発酵反応槽の数は問わない。発酵反応槽の容量が小さい等の理由から、複数の発酵反応槽を用いることもあり得る。この場合、複数の発酵反応槽を配管で並列または直列に接続して連続培養を行っても、発酵生産物の高生産性は得られる。

40

【0058】

本発明においては、別の培養槽で乳酸を生産する能力のある大腸菌を培養し、培養されたフレッシュな大腸菌を含む培養液を発酵反応槽に供給しながら連続発酵することができる。このように、発酵能力が高い状態の大腸菌を含む培養液を培養槽から発酵反応槽に供給することにより、常に高い乳酸の生産性能を維持させることができる。

【0059】

また本発明においては、発酵反応槽から大腸菌を適宜抜き出しながら連続発酵することができる。このようにすることで、高い乳酸の生産性能を維持できる場合がある。例えば

50

、発酵培養液中の大腸菌濃度が高くなると乳酸の生産性能が低下したり、ある一定の大腸菌濃度を維持することにより高い乳酸の生産性能を維持する場合に有効な方法である。

【0060】

更に本発明においては、大腸菌を発酵反応槽に維持したままで、発酵反応槽からの発酵培養液の連続的かつ効率的な抜き出しが可能となることから、大腸菌を連続的に培養し、十分な増殖を確保した後に発酵原料液組成を変更し、目的とする化学品を効率よく製造することも可能である。

【0061】

本発明で使用される大腸菌は、乳酸を生産する能力を持つ大腸菌である。使用される大腸菌は、自然環境から単離されたものでもよく、また、突然変異や遺伝子組換えによって一部性質が改変されたものであってもよい。

10

【0062】

本発明で使用される大腸菌は、乳酸の生産能力が高いものが好ましい。元来乳酸の生産能力が高いものを自然界から分離してもよいし、人為的に生産能力を高めた大腸菌であってもよい。具体的には、突然変異や遺伝子組換えによって一部性質が改変されたものであってもよい。

【0063】

ここで、大腸菌の一部性質の改変に関して説明する。乳酸を効率よく生産するためには、乳酸を生合成して蓄積し、生体外に放出する必要がある。そのため、乳酸の生合成系路に関与する酵素の増強、乳酸の分解路に関与する酵素活性低下、また乳酸を生体外放出に関わるタンパク質、あるいは生体膜組成等の改変など、大腸菌の性質を変えることによって効率的に乳酸を生産する大腸菌を作出し、用いることができる。

20

【0064】

また、乳酸以外の化学品（不純物）の生産能力が低い大腸菌を好ましく用いることができる。具体的な不純物としては、ピルビン酸、酢酸、蟻酸、コハク酸、リンゴ酸およびエタノール等が挙げられる。不純物が少ないと、発酵培養液からの乳酸の精製が容易になる。元来乳酸以外の化学品の生産能力の低い大腸菌を自然界から分離してもよいし、人為的に生産能力を高めた大腸菌であってもよい。具体的には、突然変異や遺伝子組換えによって一部性質が改変されたものであってもよい。

【0065】

30

更に、本発明で用いられる大腸菌としては、光学純度の高い乳酸を生産する能力の高い大腸菌も好ましく用いることができる。ポリ乳酸樹脂の原料として光学純度の高い乳酸を用いることが好ましいことから、ポリ乳酸樹脂の原料として乳酸を製造する場合、光学純度の高い乳酸を生産する能力の高い大腸菌を用いることが好ましい。例えば、元来大腸菌は、ピルビン酸をD-乳酸に変換するD-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を有している。本発明において、乳酸としてD-乳酸を製造する場合、元来大腸菌が有するD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子に代わって、更に効率的にピルビン酸からD-乳酸に変換できるD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した大腸菌を用いることができる。一方、L-乳酸を製造する場合には、元来大腸菌が有するD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を突然変異や、該遺伝子を欠失させることでD-乳酸デヒドロゲナーゼ活性を消滅せしめた上で、L-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を導入した大腸菌を用いることができる。例えば、D-乳酸を製造する場合には、特開2005-102625号公報で開示されているように遺伝子工学的方法を用いてD-乳酸生産大腸菌を作出し、その大腸菌を用いることができる。また、L-乳酸を製造する場合にはディエンらの報告（J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27: 259-264、2001参照）で開示されているように遺伝子工学的方法を用いてL-乳酸生産大腸菌を作出し、その大腸菌を用いることができる。本発明では、これら大腸菌を選択して、本発明の連続発酵による乳酸の製造方法に用いることができる。

40

【0066】

本発明の連続発酵による乳酸の製造方法により製造された濾過・分離発酵液に含まれる

50

乳酸の分離・精製は、従来知られている濃縮、蒸留および晶析などの方法を組み合わせて行うことができる。例えば、濾過・分離発酵液のpHを1以下にしてからジエチルエーテルや酢酸エチル等で抽出する方法、イオン交換樹脂に吸着洗浄した後に溶出する方法、酸触媒の存在下でアルコールと反応させてエステルとし蒸留する方法、およびカルシウム塩やリチウム塩として晶析する方法などが挙げられる。好ましくは、濾過・分離発酵液の水分を蒸発させた濃縮D-乳酸溶液を蒸留操作にかけることができる。ここで、蒸留する際には、蒸留原液の水分濃度が一定になるように水分を供給しながら蒸留することが好ましい。乳酸水溶液の留出後は、水分を加熱蒸発することにより濃縮し、目的とする濃度の精製乳酸を得ることができる。留出液としてエタノールや酢酸等の低沸点成分を含む乳酸水溶液を得た場合は、低沸点成分を乳酸濃縮過程で除去することが好ましい態様である。蒸留操作後、留出液について必要に応じて、イオン交換樹脂、活性炭およびクロマト分離等による不純物除去を行い、さらに高純度の乳酸を得ることもできる。

10

【0067】

本発明の連続発酵による乳酸の製造方法は、分離膜として平均細孔径が $0.01\mu\text{m}$ 以上 $1\mu\text{m}$ 未満の多孔性分離膜を使用し、濾過圧力である膜間差圧が 0.1 から 20kPa の範囲で濾過処理することを特徴としている。そのため、特別に発酵反応槽内を加圧状態に保つ必要がないことから、濾過分離装置と発酵反応槽間で発酵培養液を循環させる動力手段が不要となる。多孔性分離膜を備えた分離膜エレメントは、発酵反応槽の外側に設置しても良いし、発酵反応槽内部に設置して発酵装置をコンパクト化することもできる。

20

【0068】

本発明の連続発酵による乳酸の製造方法で用いられる膜分離型の連続発酵装置のうち、分離膜エレメントが、発酵反応槽の外部に設置された代表的な一例を図1の概要図に示す。図1は、本発明で用いられる連続発酵装置の一つの実施の形態を説明するための概略側面図である。

【0069】

図1において、連続発酵装置は、大腸菌を発酵培養させるための発酵反応槽1と、その発酵反応槽1に発酵培養液循環ポンプ11を介して接続され内部に分離膜エレメント2を備えた膜分離槽12と、発酵反応槽1の内の発酵培養液の量を制御するための水頭差制御装置3で基本的に構成されている。ここで、分離膜エレメント2には、多孔性分離膜が組み込まれている。この多孔性分離膜としては、例えば、国際公開第2002/064240号パンフレットに開示されている分離膜、および分離膜エレメントを使用することが好適である。

30

【0070】

図1において、培地供給ポンプ7によって培地を発酵反応槽1に投入し、必要に応じて、攪拌機5で発酵反応槽1内の発酵培養液を攪拌することができる。また必要に応じて、気体供給装置4によって必要とする気体を供給することができる。このとき、供給した気体を回収リサイクルして再び気体供給装置4で供給することができる。また、必要に応じて、pHセンサ・制御装置9およびpH調整溶液供給ポンプ8によって発酵培養液のpHを調整することができる。また必要に応じて、温度調節器10によって発酵培養液の温度を調節することにより、生産性の高い発酵生産を行うことができる。さらに、装置内の発酵培養液は、発酵培養液循環ポンプ11によって発酵反応槽1と膜分離槽12の間を循環する。発酵生産物を含む発酵培養液は、分離膜エレメント2によって大腸菌と発酵生産物に濾過・分離され、装置系から取り出すことができる。

40

【0071】

また、濾過・分離された大腸菌は、装置系内に留まることにより装置系内の大腸菌濃度を高く維持することができ、生産性の高い発酵生産を可能としている。ここで、分離膜エレメント2による濾過・分離は膜分離槽12の水面との水頭差圧によって行なうことができ、特別な動力を必要としない。また、必要に応じて、レベルセンサ6および水頭差圧制御装置3によって、分離膜エレメント2の濾過・分離速度および装置系内の発酵培養液量を適当に調節することができる。また、必要に応じて、気体供給装置4によって必要とす

50

る気体を膜分離槽 1 2 内に供給することができる。

【 0 0 7 2 】

上記のように、本発明で用いられる連続発酵装置では、分離膜エレメント 2 による濾過・分離は水頭差圧によって行うことができるが、必要に応じて、ポンプや、液体や気体等による吸引濾過あるいは装置系内を加圧することにより濾過・分離することもできる。このような手段により、膜間差圧を調整制御することができる。

【 0 0 7 3 】

次に、本発明の連続発酵による乳酸の製造方法で用いられる連続発酵装置のうち、分離膜エレメントが発酵反応槽の内部に設置された代表的な一例を図 2 に示す。図 2 は、本発明で用いられる他の連続発酵装置の一つの実施の形態を説明するための概略側面図である

10

【 0 0 7 4 】

図 2 において、連続発酵装置は、大腸菌を発酵培養させるための発酵反応槽 1 と、その発酵反応槽 1 の内の発酵培養液の量を制御するための水頭差制御装置 3 で基本的に構成されている。発酵反応槽 1 内には分離膜エレメント 2 が配設されており、その分離膜エレメント 2 には、多孔性膜が組み込まれている。この多孔性膜としては、例えば、国際公開第 2 0 0 2 / 0 6 4 2 4 0 号パンフレットに開示されている分離膜、および分離膜エレメントを使用することができる。分離膜エレメントに関しては、追って詳述する。

【 0 0 7 5 】

次に、図 1 の膜分離型連続発酵装置による連続発酵の形態について説明する。培地供給ポンプ 7 によって、培地を発酵反応槽 1 に連続的もしくは断続的に投入する。培地については、発酵反応槽 1 に投入する前に、必要に応じて加熱殺菌、加熱滅菌あるいはフィルターを用いた滅菌処理を行うことができる。発酵生産時には、必要に応じて、発酵反応槽 1 内の攪拌機 5 で発酵反応槽 1 内の発酵培養液を攪拌することができる。また必要に応じて、気体供給装置 4 によって必要とする気体を発酵反応槽 1 内に供給することができる。このとき、供給した気体を回収リサイクルして再び気体供給装置 4 によって供給することができる。また必要に応じて、pH センサ・制御装置 9 および pH 調整溶液供給ポンプ 8 によって発酵反応槽 1 内の発酵液の pH を調整することができる。また必要に応じて、温度調節器 1 0 によって発酵反応槽 1 内の発酵培養液の温度を調節することにより生産性の高い発酵生産を行うことができる。

20

30

【 0 0 7 6 】

ここでは、計装・制御装置による発酵培養液の物理化学的条件の調節に、pH および温度の調節を例示したが、必要に応じて、発酵培養液の溶存酸素や酸化還元電位 (ORP) の制御を行うことができ、更にはオンラインケミカルセンサーなどの分析装置により発酵培養液中の乳酸の濃度を測定し、それを指標とした物理化学的条件の制御を行うことができる。また、培地の連続的もしくは断続的投入の形態に関しては、特に限定されるものではないが、上記計装装置による発酵培養液の物理化学的環境の測定値を指標として、培地投入量および速度を適宜調節することができる。

【 0 0 7 7 】

発酵培養液は、発酵反応槽 1 内に設置された分離膜エレメント 2 によって、大腸菌と発酵生産物に濾過・分離され装置系から取り出される。また、濾過・分離された大腸菌は装置系内に留まることにより装置系内の大腸菌濃度を高く維持することができ、生産性の高い発酵生産を可能としている。ここで、分離膜エレメント 2 による濾過・分離は発酵反応槽 1 の水面との水頭差圧によって行い、特別な動力を必要としない。また、必要に応じて、レベルセンサ 6 および水頭差圧制御装置 3 によって、分離膜エレメント 2 の濾過・分離速度および発酵反応槽 1 内の発酵液量を適当に調節することができる。上記の分離膜エレメント 2 による濾過・分離は水頭差圧によって行うことができるが、必要に応じて、ポンプや、液体や気体等による吸引濾過あるいは装置系内を加圧することにより、濾過・分離することもできる。

40

【 0 0 7 8 】

50

本発明で用いられる分離膜エレメントの形態は特に、好適な形態の例である国際公開第2002/064240号パンフレットに開示されている分離膜および分離膜エレメントを、以下に図面を用いてその概略を説明する。図3は、本発明で用いられる分離膜エレメントの一つの実施の形態を説明するための概略斜視図である。

【0079】

分離膜エレメントは、図3に示すように、剛性を有する支持板13の両面に、流路材14と前記の分離膜15をこの順序で配し構成されている。支持板13は、両面に凹部16を有している。分離膜15は、発酵培養液をろ過する。流路材14は、分離膜15で濾過された透過水を効率よく支持板13に流すためのものである。支持板13に流れた透過水は、支持板13の凹部16を通り、排出手段である集水パイプ17を介して連続発酵装置外部に取り出される。

10

【0080】

図4は、本発明で用いられる別の分離膜エレメントの他の実施の形態を説明するための概略斜視図である。分離膜エレメントは、図4に示すように、中空系膜（多孔性膜）で構成された分離膜束18と上部樹脂封止層19と下部樹脂封止層20によって主に構成されている。分離膜束18は、上部樹脂封止層19および下部樹脂封止層20によって束状に接着・固定化されている。下部樹脂封止層20による接着・固定化は、分離膜束18の中空系膜（多孔性膜）の中空部を封止しており、培養液の漏出を防ぐ構造になっている。一方、上部樹脂封止層19は、分離膜束18の中空系膜（多孔性膜）の内孔を封止しておらず、集水パイプ22に濾液が流れる構造となっている。この分離膜エレメントは、支持フレーム21を介して連続発酵装置内に設置することが可能である。分離膜束18によって濾過された発酵生産物を含む濾液は、中空系膜の中空部を通り、集水パイプ22を介して連続発酵装置外部に取り出される。濾液を取り出すための動力として、水頭差圧、ポンプ、液体や気体等による吸引濾過、あるいは装置系内を加圧するなどの方法を用いることができる。

20

【0081】

本発明の乳酸の製造方法で用いられる連続発酵装置の分離膜エレメントを構成する部材は、高压蒸気滅菌操作に耐性の部材であることが好ましい。連続発酵装置内が滅菌可能であれば、連続発酵時に好ましくない微生物による汚染の危険を回避することができ、より安定した連続発酵が可能となる。分離膜エレメントを構成する部材は、高压蒸気滅菌操作の条件である、121で15分間に耐性であることが好ましい。分離膜エレメント部材には、例えば、ステンレスやアルミニウムなどの金属、ポリアミド系樹脂、フッ素系樹脂、ポリカーボネート系樹脂、ポリアセタール系樹脂、ポリブチレンテレフタレート系樹脂、P V D F、変性ポリフェニレンエーテル系樹脂およびポリサルホン系樹脂等の樹脂を好ましく選定することができる。

30

【0082】

本発明の乳酸の製造方法で用いられる連続発酵装置では、分離膜エレメントは、図1のように発酵反応槽内に設置しても良いし、図2のように発酵反応槽外に設置しても良い。分離膜エレメントを発酵反応槽外に設置する場合には、別途、膜分離槽を設けてその内部に分離膜エレメントを設置することができ、発酵反応槽と膜分離槽の間を培養液を循環させながら、分離膜エレメントにより培養液を連続的に濾過することができる。

40

【0083】

本発明の乳酸の製造方法で用いられる連続発酵装置では、膜分離槽は、高压蒸気滅菌可能であることが望ましい。膜分離槽が高压蒸気滅菌可能であると、雑菌による汚染回避が容易である。

【0084】

本発明の連続発酵による乳酸の製造方法に従って連続発酵を行った場合、従来の回分式の発酵と比較して、高い体積生産速度が得られ、極めて効率のよい発酵生産が可能となる。ここで、連続培養における発酵生産速度は、次の(式3)で計算される。

・発酵生産速度 (g / L / hr) = 抜き取り液中の生産物濃度 (g / L) × 発酵培養液抜

50

き取り速度 (L / h r) ÷ 装置の運転液量 (L) (式 3)

また、回分式培養による発酵生産速度は、原料炭素源をすべて消費した時点の生産物量 (g) を、炭素源の消費に要した時間 (h) とその時点の発酵培養液量 (L) で除して求められる。

【 0 0 8 5 】

本発明の連続発酵による乳酸の製造方法で得られる乳酸は、主に、酸味料として従来のクエン酸や酒石酸の代替品として用いられており、酸性の洗浄剤としての用途にも用いられる。また、乳酸には、医薬品として、局方品の酸薬や皮膚腐触薬などの用途がある。また、乳酸には、誘導体として、ナトリウム塩 (化粧品や食品などの保湿剤用途) や、カルシウム塩 (カルシウム剤や強壮剤用途) などの用途もある。乳酸には、その他、メチルエステルやエチルエステルなどのエステルとして、フロンやトリクロロエタンなどのオゾン層破壊性溶剤の代替品としての用途もある。最近では、乳酸は、ポリ乳酸樹脂の原料としての用途が大きく広がっている。本発明の連続発酵による乳酸の製造方法を用いることにより、これら幅広い用途のある乳酸を効率的に製造することができることから、より安価に乳酸を提供することが可能となる。

10

【 実施例 】

【 0 0 8 6 】

以下、本発明の連続発酵による乳酸の製造方法をさらに詳細に説明するために、図 1 および図 2 に示す連続発酵装置を用いることによる、連続的な乳酸の発酵生産について、実施例を挙げて説明する。本発明はこれらの実施例に限定されない。

20

【 0 0 8 7 】

下記の乳酸の製造方法に関する実施例においては、乳酸の例として L - 乳酸および D - 乳酸を用い、糖類の例としてグルコースを用いて乳酸の製造を行った。

【 0 0 8 8 】

下記の実施例において、培地、発酵培養液および透過液に含まれる発酵原料であるグルコースと L - 乳酸および D - 乳酸の濃度は、下記のようにして測定した。グルコース濃度の測定には、“グルコーステストワコー C” (登録商標) (和光純薬社製) を用いた。L - 乳酸および D - 乳酸は、下記に示す条件で H P L C 法により乳酸量を測定することにより確認した。

・カラム : Shim - Pack SPR - H (島津社製)

30

・移動相 : 5 m M p - トルエンシルホン酸 (流速 0 . 8 m L / m i n)

・反応液 : 5 m M p - トルエンシルホン酸、2 0 m M ビストリス、および 0 . 1 m M E D T A ・ 2 N a (流速 0 . 8 m L / m i n)

・検出方法 : 電気伝導度

・温度 : 4 5 。

【 0 0 8 9 】

また、L - 乳酸の光学純度測定は、次の条件で H P L C 法により測定した。

・カラム : T S K - g e l E n a n t i o L 1 (東ソー社製)

・移動相 : 1 m M 硫酸銅水溶液

・流速 : 1 . 0 m l / m i n

40

・検出方法 : U V 2 5 4 n m

・温度 : 3 0

また、L - 乳酸の光学純度は次式で計算される。

・光学純度 (%) = 1 0 0 × (L - D) / (L + D)

(ここで、L は L - 乳酸の濃度、D は D - 乳酸の濃度を表す。) 。

【 0 0 9 0 】

次に本発明の連続発酵による乳酸の製造方法に用いる乳酸を生産する能力を有する大腸菌、ならびに分離膜は、発明を実施するための最良の形態に記載の公知技術を参考して下記参考例のごとく作成した。

【 0 0 9 1 】

50

(参考例1: L - l d h 遺伝子発現ベクターの作製)

ラクトバチラス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) の L - l d h 遺伝子 (Accession No. X70926) をクローニングし大腸菌での発現ベクターを作製した。L - l d h 遺伝子は、全てPCR法によりクローニングを行い、同様の方法で発現ベクターに導入している。PCRの鋳型とするDNAの調製方法を、以下に示す。

【0092】

ラクトバチラス・プランタラムを培養し遠心回収後、UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO社製) を用いてゲノムDNAの抽出を行った。詳細な操作方法は、付属のプロトコールに従った。得られたゲノムDNAを続くPCRの鋳型とした。

【0093】

PCR増幅反応には、Taq DNA Polymeraseの50倍の正確性を持つとされるKOD-Plus polymerase (東洋紡社製) を用い、反応バッファー、dNTP mixなどは付属のものを使用した。上記のDNAの調整方法で得られたゲノムDNA、ファージミドDNA、およびcDNAをそれぞれ50ng/サンプル、プライマーを50pmol/サンプル、およびKOD-Plus polymeraseを1ユニット/サンプルになるように50μlの反応系に調製した。反応溶液をPCR増幅装置iCycler (BIO-RAD社製) により94の温度で5分熱変成させた後、94 (熱変成): 30秒、55 (プライマーのアニール): 30秒、68 (相補鎖の伸張): 1分を1サイクルとして30サイクルを行い、その後40の温度に冷却した。L - l d h 遺伝子増幅用プライマー (配列番号1, 2) には、5'末端側にはEcoRI認識配列、3'末端側にはBamHI認識配列がそれぞれ付加されるようにして作製した。

【0094】

各PCR増幅断片を精製し末端をT4 Polynucleotide Kinase (タカラバイオ社製) によりリン酸化後、pUC19ベクター (制限酵素EcoRIおよびBamHIで切断したものにライゲーションした。ライゲーションは、DNA Ligation Kit Ver.2 (タカラバイオ社製) を用いて行った。大腸菌DH5αに形質転換し、プラスミドDNAを回収することによりL - l d h 遺伝子発現ベクター得られた。この発現ベクターをpLLDHとした。

【0095】

(参考例2: バシラス・ラエボラクティカス JCM2513の染色体DNAの調製)
バシラス・ラエボラクティカス JCM2513をGYP培地 (特開2003-088392号公報) 100mlに接種し、温度30で24時間培養し、培養物を得た。この培養物を3000rpmで15分間、遠心分離処理し湿潤菌体0.5gを得た後、該菌体から斎藤、三浦の方法 (Biochem. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)) により染色体DNAを得た。次いで、この染色体DNA60μg及び制限酵素Sau3AI、3ユニットを10mMトリス - 塩酸緩衝液 (50mM NaCl、10mM MgSO₄および1mM ジチオスレイトール含有 (pH 7.4)) におのおのの混合し、温度37の温度で30分間反応させた。反応終了液を常法により、フェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理してSau3AIで消化されたバシラス・ラエボラクティカスJCM2513の染色体DNA断片50μgを得た。

【0096】

(参考例3: プラスミドベクターDNAを利用したバシラス・ラエボラクティカス JCM2513の遺伝子ライブラリーの作製)

エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) で自律複製可能なプラスミドベクターDNA (pUC19) 20μgおよび制限酵素BamHI 200ユニットを50mMトリス - 塩酸緩衝液 (100mM NaClおよび10mM硫酸マグネシウム含有 (pH 7.4)) に混合し、温度37の温度で2時間反応させて消化液を得、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱処理した。

【0097】

この後、プラスミドベクター由来のDNAフラグメントが再結合することを防止するためバクテリアルアルカリホスファターゼ処理により、DNA断片の脱リン酸化を行い、常

10

20

30

40

50

法によりフェノール抽出処理し、更にエタノール沈澱処理を行った。

【0098】

このBamHIで消化されたpUC19を1 μ g、参考例2で得られたSau3AIで消化されたバシラス・ラエボラクティカス JCM2513の染色体DNA断片を1 μ g、および2ユニットのT4DNAリガーゼ(宝酒造(株)製)を、66mM塩化マグネシウム、10mMジチオスレイトール及び10mMATPを含有する66mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に添加し、温度16 $^{\circ}$ Cで16時間反応し、DNAを連結させた。次いで該DNA混合物で、常法によりエシェリヒア・コリJM109を形質転換し、これを50 μ g/mlのアンピシリンナトリウムを含むLB寒天培地上にまき、約20,000個のコロニーを得、遺伝子ライブラリーとした。約20,000個のコロニーより、組換えDNAの回収を行なった。回収の方法は上記に示した斎藤、三浦の方法に従った。

10

【0099】

(参考例4：D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のスクリーニング用宿主の作製)

バシラス・ラエボラクティカス JCM2513株のD-LDH遺伝子のスクリーニングを機能相補によって行った。その原理の詳細は(DOMINIQUE, G., Appl Environ Microbiol, United States (1995) 61 266-272)に記載されている。すなわち、エシェリヒア・コリのD-乳酸デヒドロゲナーゼ酵素活性およびピルビン酸ギ酸リアーゼ酵素活性を欠失した株を作製する必要がある。

【0100】

キリルらの方法(Kirill, A., PNAS, United States (2000) 97 6640-6645)によってエシェリヒア・コリのD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(ldhA)およびピルビン酸ギ酸リアーゼ遺伝子(pf1Bおよびpf1D)を破壊欠失した株を作製した。この作製した株をエシェリヒア・コリ TM33株(E. coli ldhA pf1B::Km^r pf1D::Cm^r)と命名し、D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のスクリーニング用宿主とした。

20

【0101】

(参考例5：D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のスクリーニング)

エシェリヒア・コリ TM33株を50 μ g/mlのカナマイシン硫酸塩および15 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB培地100mlに接種し、温度37 $^{\circ}$ Cの温度で24時間培養し、培養物を得た。この培養物を3,000r.p.m.で15分間、遠心分離処理し湿潤菌体0.8gを得た。この湿潤菌体を10%グリセロール溶液10mlで3度洗浄した後、10%グリセロール溶液0.1mlにけん濁しコンピテントセルとした。このコンピテントセルに参考例3で得たバシラス・ラエボラクティカス JCM2513株の遺伝子ライブラリーを1 μ l加え、電気穿孔法の常法に従い導入した株を50 μ g/mlのアンピシリンナトリウムを含むM9GP寒天培地(M9培地+0.4%グルコース+0.2%ペプトン)上にまき、嫌気条件下で生育可能であった株を数株得た。

30

【0102】

(参考例6：D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含有するDNAの塩基配列の解析)

上記で得られた組換えDNAを含有するエシェリヒア・コリ TM33/pBL2から常法に従いプラスミドを調製し、得られた組換えDNAを用い塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオケミカル社製)を用いSangerの方法に従って行った。得られたD-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含有するDNAの塩基配列は2,995塩基対であった。この配列についてGenetyx(ソフトウェア開発株式会社製)を用いてオープン・リーディング・フレーム検索を行い、本発明のDNA配列(配列番号3)を決定した。

40

【0103】

(参考例7：D-Ldh遺伝子発現ベクターの作製)

上記の参考例6で決定したバシラス・ラエボラクティカスのD-Ldh遺伝子をクローニングし大腸菌での発現ベクターを作製した。D-Ldh遺伝子は、全てPCR法によりクローニングを行い、同様の方法で発現ベクターに導入している。PCRの鋳型とするD

50

NAの調製方法を、次に示す。

【0104】

バシラス・ラエボラクティカスを培養し遠心回収後、UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO社製)を用いてゲノムDNAの抽出を行った。詳細な操作方は、付属のプロトコールに従った。得られたゲノムDNAを続くPCRの鋳型とした。

【0105】

PCR増幅反応には、Taq DNA Polymeraseの50倍の正確性を持つとされるKOD-Plus polymerase (東洋紡社製)を用い、反応バッファー、dNTP mixなどは付属のものを使用した。上記のDNAの調整方法で得られたゲノムDNA、ファージミドDNA、およびcDNAをそれぞれ50ng/サンプル、プライマーを50pmol/サンプル、およびKOD-Plus polymeraseを1ユニット/サンプルになるように50μlの反応系に調製した。反応溶液をPCR増幅装置iCycler (BIO-RAD社製)により94の温度で5分熱変成させた後、94(熱変成):30秒、55(プライマーのアニール):30秒、68(相補鎖の伸張):1分を1サイクルとして30サイクル行い、その後40の温度に冷却した。D-ldh遺伝子増幅用プライマー(配列番号4,5)には、5末端側にはBamHI認識配列、3末端側にはSphI認識配列がそれぞれ付加されるようにして作製した。

【0106】

各PCR増幅断片を精製し末端をT4 Polynucleotide Kinase (タカラバイオ社製)によりリン酸化後、pUC19ベクター(制限酵素BamHIおよびSphIで切断したもの)にライゲーションした。ライゲーションは、DNA Ligation Kit Ver.2(タカラバイオ社製)を用いて行った。大腸菌DH5αに形質転換し、プラスミドDNAを回収することによりD-ldh遺伝子発現ベクターが得られた。この発現ベクターをpDLDHとした。

【0107】

(参考例8)L-乳酸生産大腸菌およびD-乳酸生産大腸菌の作製

上記の参考例1および7で得られたldh発現ベクターを、上記の参考例4で得られたTM33株に導入した。こうして得られたL-乳酸生産大腸菌(TM33/pLLDH)をTM100株と命名し、D-乳酸生産大腸菌(TM33/pDLDH)をTM200株と命名し、本発明に用いる乳酸の生産能力のある大腸菌とした。

【0108】

(参考例9)多孔性膜の作製

樹脂としてポリフッ化ビニリデン(PVDF)樹脂を、また溶媒としてN,N-ジメチルアセトアミド(DMAc)をそれぞれ用い、これらを90の温度下に十分に攪拌し、次の組成を有する原液を得た。

- ・PVDF:13.0重量%
- ・DMAc:87.0重量%

次に、上記の原液を25の温度に冷却した後、あらかじめガラス板上に貼り付けて置いた、密度が0.48g/cm³で、厚みが220μmのポリエステル繊維製不織布(多孔質基材)に塗布し、直ちに次の組成を有する25の温度の凝固浴中に5分間浸漬して、多孔質基材に多孔質樹脂層が形成された多孔性分離膜を得た。

- ・水:30.0重量%
- ・DMAc:70.0重量%

この多孔性分離膜をガラス板から剥がした後、80の温度の熱水に3回浸漬してDMAcを洗い出し、分離膜を得た。多孔質樹脂層表面の9.2μm×10.4μmの範囲内を、倍率10,000倍で走査型電子顕微鏡観察を行ったところ、観察できる細孔すべての直径の平均は0.1μmであった。次に、上記分離膜について純水透水透過係数を評価したところ、50×10⁻⁹m³/m²/s/Paであった。純水透水量の測定は、逆浸透膜による25の温度の精製水を用い、ヘッド高さ1mで行った。また、平均細孔径の標準偏差は0.035μmで、膜表面粗さは0.06μmであった。

【0109】

10

20

30

40

50

(参考例10)多孔性膜の作製(その2)

重量平均分子量41.7万のフッ化ピニリデンホモポリマーと ϵ -ブチロラクトンとを、それぞれ38重量%と62重量%の割合で170℃の温度で溶解し、原液を作製した。この原液を、 ϵ -ブチロラクトンを中空部形成液体として随拌させながら口金から吐出し、温度20℃の ϵ -ブチロラクトン80重量%水溶液からなる冷却浴中で固化して中空系膜を作製した。

【0110】

次いで、重量平均分子量28.4万のフッ化ピニリデンホモポリマーを14重量%、セルロースアセテートプロピオネート(イーストマンケミカル社、CAP482-0.5)を1重量%、N-メチル-2-ピロリドン(77重量%)、ポリオキシエチレンヤシ油脂肪酸ソルビタン(三洋化成株式会社製、商品名“イオネットT-20C”(登録商標))を5重量%、および水を3重量%の割合で95℃の温度で混合溶解して、原液を調整した。この原液を、上記で得られた中空系膜の表面に均一に塗布し、すぐに水浴中で凝固させて本発明で用いる中空系膜(多孔性膜)を製作した。得られた中空系膜(分離膜)の被処理水側表面の平均細孔径は、0.05 μ mであった。次に、上記の分離膜である中空系膜について純水透水量を評価したところ、 $5.5 \times 10^{-9} \text{ m}^3 / \text{ m}^2 \cdot \text{ s} \cdot \text{ Pa}$ であった。透水量の測定は、逆浸透膜による25℃の温度の精製水を用い、ヘッド高さ1mで行った。また、平均細孔径の標準偏差は0.006 μ mであった。

【0111】

(実施例1)大腸菌を用いた連続発酵によるL-乳酸の製造(その1)

図1の連続発酵装置と表1に示す組成の乳酸発酵培地を用い、L-乳酸の製造を行った。培地は、121℃の温度で15分間高圧蒸気滅菌して用いた。分離膜エレメント部材には、ステンレスおよびポリサルホン樹脂の成形品を用いた。分離膜には上記の参考例9で作製した多孔性膜を用いた。実施例1における運転条件は、特に断らない限り次のとおりである。

- ・発酵反応槽容量：2(L)
- ・膜分離槽容量：0.5(L)
- ・使用分離膜：ポリフッ化ピニリデン濾過膜
- ・膜分離エレメント有効濾過面積：60平方cm
- ・温度調整：37(℃)
- ・発酵反応槽通気量：0.05(L/min)
- ・膜分離槽通気量：0.3(L/min)
- ・発酵反応槽攪拌速度：100(rpm)
- ・pH調整：1N NaOHによりpH7に調整
- ・乳酸発酵培地供給速度：50~300ml/hr.の範囲で可変制御
- ・発酵培養液循環装置による循環液量：0.1(L/min)
- ・膜透過水量制御：膜間差圧による流量制御

(連続発酵開始後~100時間：0.1kPa以上5kPa以下で制御
100時間~200時間：0.1kPa以上2kPa以下で制御
200時間~300時間：0.1kPa以上20kPa以下で制御)。

【0112】

微生物に上記の参考例8で造成したL-乳酸生産大腸菌TM100株を用い、培地に表1に示す組成の乳酸発酵培地を用い、生産物である乳酸の濃度および光学純度の評価には前記HPLC方法を用い、グルコース濃度の測定には“グルコーステストワコーC”(登録商標)(和光純薬社製)を用いた。

【0113】

10

20

30

40

【表 1】

【表 1】 乳酸発酵培地

グルコース	70	g/L
ペプトン	10	g/L
チアミン塩酸塩	3	mM
塩化カルシウム・2水和物	0.1	mM
塩化マグネシウム・6水和物	2	mM
リン酸一水素ナトリウム	48	mM
リン酸二水素カリウム	22	mM
塩化ナトリウム	8.6	mM
塩化アンモニウム	19	mM
アンピシリンナトリウム	50	mg/L
IPTG	1	mM

10

【0114】

まず、TM100株を試験管で5mlの乳酸発酵培地で一晩振とう培養し培養液を得た（前々々培養）。得られた培養液を新鮮な乳酸発酵培地100mlに植菌し、500ml容坂口フラスコで24時間、30℃の温度で振とう培養した（前々々培養）。前々々培養液を、図1に示す連続発酵装置の1.5Lの乳酸発酵培地に植菌し、発酵反応槽1を付属の攪拌機5によって攪拌し、発酵反応槽1の通気量の調整、温度の調整、pHの調整を行い、発酵培養液循環ポンプ10を稼働させることなく、24時間培養を行った（前培養）。前培養完了後直ちに、発酵培養液循環ポンプ10を稼働させ、前培養時の運転条件に加え、膜分離槽2を通気し、乳酸発酵培地の連続供給を行い、膜分離型の連続発酵装置の発酵培養液量が2Lとなるように膜透過水量の制御を行いながら連続培養し、連続発酵によるL-乳酸の製造を行った。連続発酵試験を行うときの膜透過水量の制御は、水頭差制御装置3により水頭差を膜間差圧として測定し、上記膜透過水量制御条件で変化させることで行

20

30

【0115】

300時間の連続発酵試験を行った結果を表2に示す。また、前記HPLC方法を用い、光学純度を測定した結果、L-乳酸の光学純度は98.5%e.e.であった。図1に示す連続発酵装置を用いた本発明の乳酸の製造方法により、安定したL-乳酸の連続発酵による製造が可能であった。連続発酵の全期間中の膜間差圧は、2kPa以下で推移した。

【0116】

（実施例2）大腸菌を用いた連続発酵によるL-乳酸の製造（その2）

L-乳酸生産大腸菌TM100株を用い、分離膜として参考例10で作成した多孔性膜を用い、その他は実施例1と同じ条件、評価法によりL-乳酸の連続発酵試験を行った。

40

【0117】

（実施例3）大腸菌を用いた連続発酵によるL-乳酸の製造（その3）

図2の連続発酵装置と表1に示す組成の乳酸発酵培地を用い、L-乳酸の製造を行った。培地は、121℃の温度で15分間高圧蒸気滅菌して用いた。分離膜エレメント部材には、ステンレスおよびポリサルホン樹脂の成形品を用いた。分離膜には、上記の参考例9で作製した多孔性膜を用いた。この実施例3における運転条件は、特に断らない限り以下のとおりである。

- ・発酵反応槽容量：2（L）
- ・使用分離膜：ポリフッ化ビニリデン濾過膜
- ・膜分離エレメント有効濾過面積：120平方cm

50

- ・ 温度調整：37 ()
- ・ 発酵反応槽通気量：0.05 (L/min)
- ・ 乳酸発酵培地供給速度：50～300 ml/hr. の範囲で可変制御
- ・ 発酵反応槽攪拌速度：800 (rpm)
- ・ pH調整：1N NaOHによりpH7に調整
- ・ 膜透過水量制御：膜間差圧による流量制御
 - (連続発酵開始後～80時間：0.1kPa以上5kPa以下で制御)
 - 80時間～160時間：0.1kPa以上2kPa以下で制御)
 - 160時間～240時間：0.1kPa以上20kPa以下で制御)
- ・ 滅菌：分離膜エレメントを含む培養槽、および使用培地は総て121 の温度で20分間のオートクレーブにより高圧蒸気滅菌。

【0118】

微生物に上記の参考例8で造成したL-乳酸生産大腸菌TM100株を用い、培地に表1に示す組成の乳酸発酵培地を用い、生産物である乳酸の濃度および光学純度の評価には前記HPLC方法を用い、グルコース濃度の測定には“グルコーステストワコーC”(登録商標)(和光純薬社製)を用いた。

【0119】

まず、TM100株を試験管で5mlの乳酸発酵培地で一晚振とう培養し培養液を得た(前々々培養)。得られた培養液を新鮮な乳酸発酵培地100mlに植菌し、500ml容坂口フラスコで24時間、30 の温度で振とう培養した(前々々培養)。前々々培養液を、図2に示した膜分離型の連続発酵装置の1.5Lの乳酸発酵培地に植菌し、発酵反応槽1を付属の攪拌機5によって400rpmで攪拌し、発酵反応槽1の通気量の調整、温度の調整、pHの調整を行い、24時間培養を行った(前培養)。前培養完了後直ちに、乳酸発酵培地の連続供給を行い、膜分離型の連続発酵装置の発酵培養液量が1.5Lとなるように膜透過水量の制御を行いながら連続培養し、連続発酵によるL-乳酸の製造を行った。連続発酵試験を行うときの膜透過水量の制御は、水頭差制御装置3により水頭差を膜間差圧として測定し、上記膜透過水量制御条件で変化させることで行った。適宜、濾液中の生産されたL-乳酸濃度および残存グルコース濃度を測定した。また、該L-乳酸、及びグルコース濃度から算出された投入グルコースから算出されたL-乳酸対糖収率、L-乳酸生産速度を表2に示した。また、前記HPLC方法を用い、光学純度を測定した結果、L-乳酸の光学純度は98.5%e.e.であった。

【0120】

図2に示す連続発酵装置を用いた本発明の乳酸の製造方法により、安定したL-乳酸の連続発酵による製造が可能であった。連続発酵の全期間中の膜間差圧は、2kPa以下で推移した。

【0121】

(実施例4)大腸菌を用いた連続発酵によるL-乳酸の製造(その4)

L-乳酸生産大腸菌TM100株を用い、分離膜として参考例10で作成した多孔性分離膜を用い、その他は実施例3と同じ条件、評価法によりL-乳酸の連続発酵試験を行った。

【0122】

(比較例1)回分発酵によるL-乳酸の製造

微生物を用いた発酵形態として最も典型的な回分発酵を行い、そのL-乳酸生産性を評価した。表1に示す乳酸発酵培地を用い、図1の膜分離型連続発酵装置の発酵反応槽1のみを用いた回分発酵試験を行った。培地は、121 の温度で15分間高圧蒸気滅菌して用いた。比較例1においても、上記の参考例8で造成したL-乳酸生産大腸菌TM100株を用い、生産物である乳酸の濃度および光学純度の評価には、前記HPLC方法を用い、グルコース濃度の測定には“グルコーステストワコーC”(登録商標)(和光純薬社製)を用いた。比較例1の運転条件を次に示す。

- ・ 発酵反応槽容量(乳酸発酵培地量)：1(L)

- ・温度調整：37 ()
- ・発酵反応槽通気量：0.05 (L/min)
- ・発酵反応槽攪拌速度：100 (rpm)
- ・pH調整：1N NaOHによりpH7に調整。

【0123】

まず、TM100株を試験管で5mlの乳酸発酵培地で一晩振とう培養した(前々培養)。前々培養液を新鮮な乳酸発酵培地100mlに植菌し、500ml容坂口フラスコで24時間振とう培養した(前培養)。前培養液を膜分離型連続発酵装置の1.5Lの乳酸発酵培地に植菌し、発酵反応槽1を付属の攪拌機5により100rpmで攪拌し、発酵反応槽1を通気した。温度の調整とpHの調整を行い、発酵培養液循環ポンプ10を稼働させることなく、回分発酵培養を行った。このときの菌体増殖量は、600nmでの吸光度で14であった。回分発酵の結果を表2に示す。

10

【0124】

【表2】

		(比較例1)	(実施例1)	(実施例2)	(実施例3)	実施例4)
発酵時間	(hr)	54	300	300	240	240
投入グルコース	(g)	70	1880	2075	1025	
生成乳酸	(g)	48.9	1260	1325	685	
未利用グルコース	(g)	0	40	50	32	40
収率	(g/g)	69.9	68.5	65.4	69.2	66.5
生産速度	(g/L/hr)	0.8	2.1	2.2	1.9	2.1

20

【0125】

図1および図2に示す連続発酵装置を用いた本発明の乳酸の製造方法により、L 乳酸の生産速度が大幅に向上した。

【0126】

(実施例5)大腸菌を用いた連続発酵によるD-乳酸の製造(その1)

図1の連続発酵装置と表1に示す組成の乳酸発酵培地を用い、D-乳酸の製造を行った。培地は、121の温度で15分間高圧蒸気滅菌して用いた。分離膜エレメント部材には、ステンレスおよびポリサルホン樹脂の成型品を用いた。分離膜には上記の参考例9で作製した多孔性膜を用いた。実施例5における運転条件は、特に断らない限り次のとおりである。

30

- ・発酵反応槽容量：2 (L)
- ・膜分離槽容量：0.5 (L)
- ・使用分離膜：ポリフッ化ビニリデン濾過膜
- ・膜分離エレメント有効濾過面積：60平方cm
- ・温度調整：37 ()
- ・発酵反応槽通気量：0.05 (L/min)
- ・膜分離槽通気量：0.3 (L/min)
- ・反応槽攪拌速度：100 (rpm)
- ・pH調整：1N NaOHによりpH7に調整
- ・乳酸発酵培地供給速度：50~300ml/hr.の範囲で可変制御
- ・発酵培養液循環装置による循環液量：0.1 (L/min)
- ・膜透過水量制御：膜間差圧による流量制御

40

(連続発酵開始後~100時間：0.1kPa以上5kPa以下で制御
100時間~200時間：0.1kPa以上2kPa以下で制御
200時間~300時間：0.1kPa以上20kPa以下で制御)。

【0127】

50

微生物に上記の参考例 8 で造成した D - 乳酸生産大腸菌 T M 2 0 0 株を用い、培地に表 1 に示す組成の乳酸発酵培地を用い、生産物である乳酸の濃度および光学純度の評価には前記 H P L C 方法を用い、グルコース濃度の測定には“グルコーステストワコー C”（登録商標）（和光純薬社製）を用いた。

【 0 1 2 8 】

まず、T M 2 0 0 株を試験管で 5 m l の乳酸発酵培地で一晩振とう培養し培養液を得た（前々々培養）。得られた培養液を新鮮な乳酸発酵培地 1 0 0 m l に植菌し、5 0 0 m l 容坂口フラスコで 2 4 時間、3 0 の温度で振とう培養した（前々々培養）。前々々培養液を、図 1 に示す連続発酵装置の 1 . 5 L の乳酸発酵培地に植菌し、発酵反応槽 1 を付属の攪拌機 5 によって攪拌し、発酵反応槽 1 の通気量の調整、温度の調整、p H の調整を行い、発酵培養液循環ポンプ 1 0 を稼働させることなく、2 4 時間培養を行った（前培養）。前培養完了後直ちに、発酵培養液循環ポンプ 1 0 を稼働させ、前培養時の運転条件に加え、膜分離槽 2 を通気し、乳酸発酵培地の連続供給を行い、膜分離型の連続発酵装置の発酵培養液量が 2 L となるように膜透過水量の制御を行いながら連続培養し、連続発酵による D - 乳酸の製造を行った。連続発酵試験を行うときの膜透過水量の制御は、水頭差制御装置 3 により水頭差を膜間差圧として測定し、上記膜透過水量制御条件で変化させることで行った。適宜、濾液中の生産された D - 乳酸濃度および残存グルコース濃度を測定した。

【 0 1 2 9 】

3 0 0 時間の連続発酵試験を行った結果を、表 3 に示す。また、前記の H P L C 方法を用い、光学純度を測定した結果、D - 乳酸の光学純度は 9 9 . 5 % e . e . であった。図 1 に示す連続発酵装置を用いた本発明の乳酸の製造方法により、安定した D - 乳酸の連続発酵による製造が可能であった。連続発酵の全期間中の膜間差圧は、2 k P a 以下で推移した。

【 0 1 3 0 】

（実施例 6）大腸菌を用いた連続発酵による D - 乳酸の製造（その 2）

D - 乳酸生産大腸菌 T M 2 0 0 株を用い、分離膜として参考例 1 0 で作成した多孔性膜を用い、その他は実施例 5 と同じ条件、評価法により D - 乳酸の連続発酵試験を行った。

【 0 1 3 1 】

（実施例 7）大腸菌を用いた連続発酵による D - 乳酸の製造（その 3）

図 2 の連続発酵装置と表 1 に示す組成の乳酸発酵培地を用い、D - 乳酸の製造を行った。培地は、1 2 1 の温度で 1 5 分間高圧蒸気滅菌して用いた。分離膜エレメント部材には、ステンレスおよびポリサルホン樹脂の成形品を用いた。分離膜には上記の参考例 9 で作製した多孔性膜を用いた。この実施例 7 における運転条件は、特に断らない限り次のとおりである。

- ・発酵反応槽容量：2 (L)
- ・使用分離膜：ポリフッ化ビニリデン濾過膜
- ・膜分離エレメント有効濾過面積：1 2 0 平方 c m
- ・温度調整：3 7 ()
- ・発酵反応槽通気量：0 . 0 5 (L / m i n)
- ・乳酸発酵培地供給速度：5 0 ~ 3 0 0 m l / h r . の範囲で可変制御
- ・発酵反応槽攪拌速度：8 0 0 (r p m)
- ・p H 調整：1 N N a O H により p H 7 に調整
- ・膜透過水量制御：膜間差圧による流量制御

（連続発酵開始後 ~ 8 0 時間：0 . 1 k P a 以上 5 k P a 以下で制御

8 0 時間 ~ 1 6 0 時間：0 . 1 k P a 以上 2 k P a 以下で制御

1 6 0 時間 ~ 2 4 0 時間：0 . 1 k P a 以上 2 0 k P a 以下で制御）。

・滅菌：分離膜エレメントを含む培養槽、および使用培地は総て 1 2 1 、2 0 m i n のオートクレーブにより高圧蒸気滅菌。

【 0 1 3 2 】

微生物に上記の参考例 8 で造成した D - 乳酸生産大腸菌 T M 2 0 0 株を用い、培地に表

1 に示す組成の乳酸発酵培地を用い、生産物である乳酸の濃度および光学純度の評価には前記 H P L C 方法を用い、グルコース濃度の測定には“グルコーステストワコー C”（登録商標）（和光純薬社製）を用いた。

【 0 1 3 3 】

まず、T M 2 0 0 株を試験管で 5 m l の乳酸発酵培地で一晚振とう培養し培養液を得た（前々々培養）。得られた培養液を新鮮な乳酸発酵培地 1 0 0 m l に植菌し、5 0 0 m l 容坂口フラスコで 2 4 時間、3 0 の温度で振とう培養した（前々々培養）。前々々培養液を、図 2 に示した膜分離型の連続発酵装置の 1 . 5 L の乳酸発酵培地に植菌し、発酵反応槽 1 を付属の攪拌機 5 によって 4 0 0 r p m で攪拌し、発酵反応槽 1 の通気量の調整、温度の調整、p H の調整を行い、2 4 時間培養を行った（前培養）。前培養完了後直ちに、10
 乳酸発酵培地の連続供給を行い、膜分離型の連続発酵装置の発酵培養液量が 1 . 5 L となるように膜透過水量の制御を行いながら連続培養し、連続発酵による D 乳酸の製造を行った。連続発酵試験を行うときの膜透過水量の制御は、水頭差制御装置 3 により水頭差を膜間差圧として測定し、上記膜透過水量制御条件で変化させることで行った。適宜、濾液中の生産された D - 乳酸濃度および残存グルコース濃度を測定した。また、D - 乳酸およびグルコース濃度から算出された投入グルコースから算出された D - 乳酸対糖収率と D - 乳酸生産速度を表 3 に示した。また、前記 H P L C 方法を用い、光学純度を測定した結果、D - 乳酸の光学純度は 9 9 . 5 % e . e . であった。

【 0 1 3 4 】

図 2 に示す連続発酵装置を用いた本発明の乳酸の製造方法により、安定した D - 乳酸の連続発酵による製造が可能であった。連続発酵の全期間中の膜間差圧は、2 k P a 以下で推移した。20

【 0 1 3 5 】

（実施例 8）大腸菌を用いた連続発酵による D - 乳酸の製造（その 4）

D - 乳酸生産大腸菌 T M 2 0 0 株を用い、分離膜として参考例 1 0 で作成した多孔性膜を用い、その他は実施例 7 と同じ条件、評価法により D 乳酸の連続発酵試験を行った。

【 0 1 3 6 】

（比較例 2）回分発酵による D - 乳酸の製造

微生物を用いた発酵形態として最も典型的な回分発酵を行い、その D - 乳酸生産性を評価した。表 1 に示す乳酸発酵培地を用い、図 1 の連続発酵装置の反応槽 1 のみを用いた回分発酵試験を行った。培地は、1 2 1 の温度で 1 5 分間高圧蒸気滅菌して用いた。この比較例 2 でも、上記の参考例 8 で造成した D - 乳酸生産大腸菌 T M 2 0 0 株を用い、生産物である乳酸の濃度および光学純度の評価には前記 H P L C 方法を用い、グルコース濃度の測定には“グルコーステストワコー C”（登録商標）（和光純薬社製）を用いた。比較例 2 の運転条件を次に示す。30

- ・発酵反応槽容量（乳酸発酵培地量）：1（L）
- ・温度調整：3 7（ ）
- ・発酵反応槽通気量：0 . 0 5（L / m i n）
- ・発酵反応槽攪拌速度：1 0 0（r p m）
- ・p H 調整：1 N N a O H により p H 7 に調整。

【 0 1 3 7 】

まず、T M 2 0 0 株を試験管で 5 m l の乳酸発酵培地で一晚振とう培養した（前々々培養）。前々々培養液を新鮮な乳酸発酵培地 1 0 0 m l に植菌し、5 0 0 m l 容坂口フラスコで 2 4 時間振とう培養した（前培養）。前培養液を膜分離型の連続発酵装置の 1 . 5 L の乳酸発酵培地に植菌し、発酵反応槽 1 を付属の攪拌機 5 により 1 0 0 r p m で攪拌し、発酵反応槽 1 を通気した。温度の調整と p H の調整を行い、発酵培養液循環ポンプ 1 0 を稼働させることなく、回分発酵培養を行った。この時の菌体増殖量は、6 0 0 n m での吸光度で 1 3 であった。回分発酵の結果を表 3 に示す。

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

【表 3】

		(比較例 2)	(実施例 5)	(実施例 6)	(実施例 7)	(実施例 8)
発酵時間	(hr)	50	300	300	240	240
投入グルコース	(g)	70	1860	1850	965	1115
生成乳酸	(g)	45.4	1385	1318	722	793
未利用グルコース	(g)	0	35	30	20	40
収率	(g/g)	78.1	75.5	72.5	76.5	73.5
生産速度	(g/L/hr)	0.9	2.3	2.2	2.0	2.2

10

【0139】

図1および図2に示す連続発酵装置を用いた本発明の乳酸の製造方法により、D 乳酸の生産速度が大幅に向上した。

【図面の簡単な説明】

【0140】

【図1】図1は、本発明で用いられる連続発酵装置の一つの実施の形態を説明するための概略側面図である。

【図2】図2は、本発明で用いられる他の連続発酵装置の一つの実施の形態を説明するための概略側面図である。

20

【図3】図3は、本発明で用いられる分離膜エレメントの一つの実施の形態を説明するための概略斜視図である。

【図4】図4は、本発明で用いられる他の分離膜エレメントの一つの実施の形態を説明するための概略斜視図である。

【符号の説明】

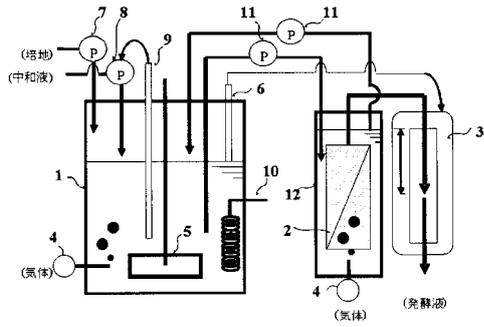
【0141】

- 1 発酵反応槽
- 2 分離膜エレメント
- 3 水頭差制御装置
- 4 気体供給装置
- 5 攪拌機
- 6 レベルセンサ
- 7 培地供給ポンプ
- 8 pH調整溶液供給ポンプ
- 9 pHセンサ・制御装置
- 10 温度調節器
- 11 発酵培養液循環ポンプ
- 12 膜分離槽
- 13 支持板
- 14 流路材
- 15 分離膜
- 16 凹部
- 17 集水パイプ
- 18 分離膜束
- 19 上部樹脂封止層
- 20 下部樹脂封止層
- 21 支持フレーム
- 22 集水パイプ

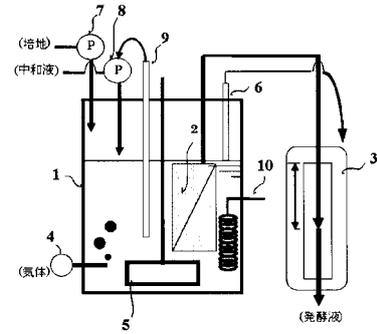
30

40

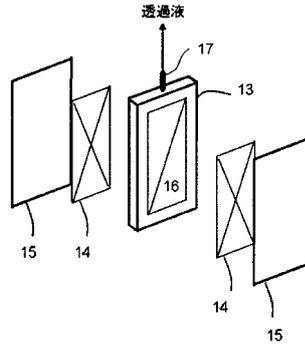
【 図 1 】



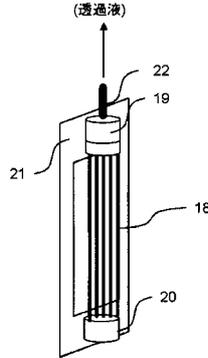
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配 列 表 】

0005130826000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2005-028339(JP,A)
特開2003-053164(JP,A)
特開2005-111326(JP,A)
国際公開第02/064240(WO,A1)
特開2002-085083(JP,A)
特開2005-073549(JP,A)
特開平05-328983(JP,A)
特開2005-102625(JP,A)
特開2002-136293(JP,A)
特表2005-528112(JP,A)
特開平11-113587(JP,A)
特開平10-323543(JP,A)
特開昭63-248396(JP,A)
特開2007-252367(JP,A)
特開2008-131931(JP,A)
特開2008-104451(JP,A)
ケミカル・エンジニアリング, 1991年, Vol.36, No.6, p.69-72

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 7/56
C12R 1/19
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
WPI