

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2012 年 1 月 19 日(19.01.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/008585 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/20 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/066253
- (22) 国際出願日: 2011 年 7 月 15 日(15.07.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-162227 2010 年 7 月 16 日(16.07.2010) JP
特願 2011-020593 2011 年 2 月 2 日(02.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 10 番 1 号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 園元 謙二 (SONOMOTO, Kenji) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 10 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 善籐 威史(ZENDO, Takeshi) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 10 番 1 号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 小野 新次郎, 外(ONO, Shinjiro et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第 21 条(3))
— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示(規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則 5.2(a))

(54) Title: NOVEL LACTOBACILLUS AND METHOD FOR PRODUCING L-LACTIC ACID USING SAME

(54) 発明の名称: 新規乳酸菌及びそれを用いた L-乳酸の生産方法

(57) Abstract: During L-lactic acid fermentation of non-food biomass, in order to achieve simultaneous saccharification and fermentation, a lactobacillus is needed that is suitable to fermentation with a starting material of a mixture comprising mixed sugars or oligosaccharides formed by enzymatically processing cellulose or hemicellulose. Also, it is necessary to keep in mind that when the starting material is a pentose such as xylose derived from non-food biomass, lactic acid and the same number of moles of acetic acid are formed, and so the molar yield of lactic acid is halved, as well as that high concentrations of L-lactic acid cause inhibition of fermentation, making it difficult to produce high yields of L-lactic acid. In order to resolve such problems, disclosed is a novel lactobacillus. By means of the lactobacillus, with a mixture of glucose and cellobiose as the starting material, it is possible to efficiently produce L-lactic acid at a high optical purity of at least 99.9% without substrate inhibition and with almost no generation of by-products. The disclosed method can be applied to efficient production of L-lactic acid from a non-food biomass starting material.

(57) 要約: 非食用バイオマスの L-乳酸発酵に際しては、同時糖化・発酵ができるように、セルロースやヘミセルロースを酵素的に処理してできるオリゴ糖や混合糖からなる混合物を原料とする発酵に適した乳酸菌が必要である。また、非食用バイオマスに由来するキシロースなどの 5 単糖を原料とすると、乳酸と共に当モルの酢酸ができ、乳酸のモル収率が半減することや、高濃度の L-乳酸が発酵阻害を引き起こし、L-乳酸を高収率で生産することが困難であることにも留意する必要がある。本発明は、このような問題点を解決しうる新規乳酸菌を提供する。本発明の乳酸菌により、グルコースとセロビオースの混合物を原料に、99.9%以上の高い光学純度の L-乳酸菌を、基質阻害なく、また副生物の生成がほとんどなく、効率的に製造することができる。本発明の方法は、非食用バイオマス原料からの L-乳酸の効率生産に適用できる。

WO 2012/008585 A1

明 細 書

発明の名称 : 新規乳酸菌及びそれを用いたL-乳酸の生産方法

技術分野

[0001] 本発明は新規な乳酸菌に関する。本発明の乳酸菌を用いて、非食用バイオマス由来の混合糖から、高純度のL-乳酸を効率よく製造することができる。

背景技術

[0002] ポリ乳酸（PLA）は、生分解性のみならず、最近では、バイオマスを原料として製造できるという特性から、持続的な社会における基礎材料として期待されている。

[0003] ポリ乳酸の原料となる乳酸モノマーは、商業的には化学合成又は微生物発酵により製造される。乳酸の化学合成は常にラセミ混合物をもたらすが、微生物発酵では、選択した微生物に応じて、光学的に純度の高いL-又はD-乳酸が生産できる。原料乳酸の光学純度は、ポリ乳酸の物理的特性に大きな影響を与える。L体のみを重合させたポリ-L-乳酸（PLLA）、D体のみを重合させたポリ-D-乳酸（PDLA）は、D-乳酸、L-乳酸のランダムな重合体であるポリ-DL-乳酸（poly-DL-lactic acid, PDLLA）より結晶性が高く、耐熱性も高い。そのため光学純度の高い乳酸の発酵生産が重視されている。

[0004] 一方、種々の発酵生産に用いられるバイオマス原料は、主としてトウモロコシやサトウキビであるが、いずれも食用部分（デンプン、ショ糖）を使用している。非食用作物や木質バイオマス、稲わら等の非食用バイオマス原料が発酵生産に適用できれば、食料・飼料生産と競合することもなく、望ましい。

[0005] 非食用バイオマスを利用する場合、デンプンではなく、セルロースやヘミセルロースが主な発酵原料（炭素源）となる。しかし、セルロースやヘミセルロースは、乳酸菌による乳酸発酵には直接的には利用できず、乳酸発酵に際しては、前処理（液化や糖化）が必要である。

[0006] 前処理方法は、酸・アルカリなどを用いる物理化学的な方法と、微生物や

酵素を用いる生化学的な方法とに大別できる。しかしながら、前者に関しては、セルロースを単糖にまで分解しようとするれば比較的強烈な条件で処理しなければならない、その際にフルフラールなどの発酵阻害物質が副生する。一方、比較的穏和な条件で処理すると、セルロース由来のオリゴ糖（セロオリゴ糖）が混在した処理物となり、セロオリゴ糖はほとんどの発酵微生物が資化できないので、発酵収率が低くなるという不利益を生じる。後者の生化学的な方法では、セルロースを分解する酵素そのものの研究開発が進行中ではあるが、酵素により、セルロースをすべてを単糖にするには、多種・多量の酵素の使用と長い時間を要する。さらに、これらのセルロース分解酵素の製造コストは極めて高く、また加水分解生成物であるグルコース（C6糖）及びセロビオース（C6二糖）は、CBH及びBGLの強力な阻害物質でもある（非特許文献1～3）。

[0007] 他方、ヘミセルロースを加水分解すると、キシロース（C5糖）やそのオリゴ糖（C5オリゴ糖）が得られるが、それらを乳酸発酵に用いると、C6糖を用いた場合と比較して、乳酸のモル収率が通常半減する（非特許文献4～7）。

[0008] 非食用バイオマスからの乳酸生産に関しては、ヘテロ乳酸発酵、D-乳酸発酵については複数の報告がある（非特許文献4～10）。しかしながら、ポリL-乳酸の原料であるL-乳酸に関しては、非食用バイオマスを原料とした混合糖からの発酵生産の例は極めて少なく、また実用的な菌がこれまでに見出されていない。

先行技術文献

非特許文献

- [0009] 非特許文献1: Romero-Garcia S, Hernandez-Bustos C, Merino E, Gosset G, Martinez A (2009) Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories* 8:23 doi:10.1186/1475-2859-8-23, <http://www.microbialcellfactories.com/content/8/1/23>
非特許文献2: Okano K, Zhang Q, Yoshida S, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A (2010) D-lactic acid production from cellooligosaccharides a

nd s-glucan using L-LDH gene-deficient and endoglucanase-secreting *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:643-650

非特許文献3: Joshi DS, MS Singhvi MS, Khire JM, Gokhale DV (2010) Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D-lactic acid production. *Biotechnol Lett* 32:1573-6776

非特許文献4: キシロースからの乳酸発酵: K. Tanaka, A. Komiyama, K. Sonomoto, A. Ishizaki, S.J. Hall and P.F. Stanbury.: Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* I0-1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60(1-2), 160-167 (2002.10)

非特許文献5: キシロオリゴ糖からの乳酸発酵: Hitomi Ohara, Michiko Owaki & Kenji Sonomoto.: Xylooligosaccharide fermentation with *Leuconostoc lactis*, *J. Biosci. Bioeng.*, 101(5), 415-420 (2006.5.25)

非特許文献6: キシロースからの乳酸発酵: Hitomi Ohara, Michiko Owaki & Kenji Sonomoto.: Calculation of metabolites from xylose in *Lactococcus lactis*, *J. Biosci. Bioeng.*, 103(1), 92-94 (2007.1.25)

非特許文献7: キシロースからの乳酸発酵: Mugihito Oshiro, Hideaki Shinto, Yukihiro Tashiro, Noriko Miwa, Tatsuya Sekiguchi, Masahiro Okamoto, Ayaaki Ishizaki & Kenji Sonomoto.: Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in *Lactococcus lactis* I0-1, *J. Biosci. Bioeng.*, 108(5), 376-384 (2009.11.25)

非特許文献8: 同時糖化発酵によるセルロースからの乳酸生産: S. Abe and M. Takagi.: Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid, *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 93-96 (1991)

非特許文献9: 同時糖化発酵によるセルロースからの乳酸生産: K. V. Venkatesh.: Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid, *Bioresour. Technol.*, 62, 91-98 (1997)

非特許文献10：キシランを直接資化する乳酸菌について：M. Ishikawa, K. Nakajima, Y. Itamiya, S. Furukawa, Y. Yamamoto and K. Yamasato.: *Halolactibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in *Bacillus* rRNA group 1., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 2427-2439 (2005)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 非食用バイオマスのL-乳酸発酵に際しては、同時糖化・発酵ができるように、セルロースやヘミセルロースを酵素的又は物理・化学的に処理してできるオリゴ糖（C6オリゴ糖、C5オリゴ糖など）や混合糖（C6糖、C5糖など）からなる混合物を原料とする発酵に適した乳酸菌が必要である。また、非食用バイオマスに由来するキシロースなどの5単糖（C5糖）を原料とすると、乳酸と共に当モルの酢酸ができ、乳酸のモル収率が半減することや、高濃度のL-乳酸が発酵阻害を引き起こし、L-乳酸を高収率で生産することが困難であることにも留意する必要がある。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、今般、種々の天然源から得た微生物をスクリーニングすることにより、糖混合物から光学純度の高いL-乳酸を効率的に製造可能な、新規な乳酸菌を得た。そして培養条件について種々検討し、本願発明を完成した。本発明は以下を提供する：

[1] (1) 光学純度が99.0%以上（好ましくは99.5%以上、より好ましくは99.75%以上、更に好ましくは99.9%以上）であるL-乳酸を生産可能であり；かつ

(2) 20g/Lのセロビオースを含む培地で、pH 7.0、43℃で20時間以上培養したときに、20g/LのL-乳酸を生産可能である、

エンテロコッカス・ムンヅティ (*Enterococcus mundtii*) に属する乳酸菌。

[2] 下記の菌学的性質を有する、乳酸菌：

1. 形態：球菌である。
2. 生化学的性質：カタラーゼ陰性である。
3. 運動性：なし
4. 酸素要求性：通性嫌気性である。
5. グルコースを基質としてホモ乳酸発酵によりL-乳酸を産生する。
6. 下記の糖資化性を有する。

[0012] [表1-1]

Sugar		Sugar	
Glycerol	+	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
D-Ribose	+	Melobiose	+
D-Xylose	+	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
α -Methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Starch	$\pm$
Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	α -Gentibiose	+
Rhamnose	+	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α -Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α -Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-glucoamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	+	2-Keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-Keto-gluconate	-
Esculine	+		

+ 資化する、一資化しない

[3] 配列表の配列番号：1で示されるヌクレオチド配列、又はそれと99.5%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる16SrRNA遺伝子を有する、[1]又は[2]に記載の乳酸菌。

[4] Enterococcus mundtii NITE ABP-965である、[1]～[3]のいずれかーに記載の乳酸菌。

[5] バイオマス原料を炭素源とし、[1]～[4]のいずれかーに記載の乳

酸菌により、乳酸を生産する工程を含む、L-乳酸の製造方法。

[6] バイオマス原料が、非食用バイオマスである、[5] に記載の製造方法。

[7] [2] に定義した乳酸菌を、グルコース及びセロビオースを基質として含む環境 (medium) で培養して、L-乳酸を発酵生産させる工程を含む、L-乳酸の製造方法。

[8] 環境が、キシロースを含むものである、[7] に記載の製造方法。

[9] 環境のpHを、6.0以上7.5未満に制御しながらL-乳酸を培養する、[7] 又は [8] に記載の製造方法。

[10] グルコース、セロビオース及び／又はキシロースが、非食用バイオマスの酵素による糖化により生成したものであり、酵素による糖化と乳酸菌による発酵とを同時に実施するものである、[9] に記載の製造方法。

[11] [5] ～ [10] のいずれかーに定義されたL-乳酸の製造のための工程、及び L-乳酸を重合する工程を含む、ポリL-乳酸の製造方法。

[A1] セルロース及び／又はヘミセルロース由来の、セロビオース、セロオリゴ糖類、キシロース、アラビノース、グルコースからなる群より選択されるいずれかを基質として含む環境 (medium) で、L-乳酸を生産可能な乳酸菌を培養し、L-乳酸を得る工程を含む、L-乳酸の生産方法。

[A2] 乳酸菌が、エンテロコッカス・ムンヅティ (Enterococcus mundtii) に属する乳酸菌である、[A1] に記載の生産方法。

[A3] 環境がセロオリゴ糖類を基質として含み、セロオリゴ糖類が、セロトリオース及びセロテトラオースを含む、[A1] 又は [A2] に記載の生産方法。

[A4] 環境がキシロースを基質として含み、さらにグルコース及び／又はセロビオースを基質として含み、キシロースの濃度が、10 g/L～150 g/Lである、[A1] ～ [A3] のいずれかーに記載の生産方法。

[A5] 開放系、及び／又は非滅菌の環境で実施される、[A1] ～ [A4] のいずれかーに記載の生産方法。

[A6] 回分式で繰り返し実施される、[A5]に記載の生産方法。

[A7] バイオマス原料が、非食用バイオマス原料である、[A1]～[A6]のいずれかに記載の生産方法。

[8] [A1]～[A7]のいずれかに定義されたL-乳酸の生産のための工程、及びL-乳酸を重合する工程を含む、ポリL-乳酸の生産方法。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]QU25を改変MRS培地（pH制御したもの/制御しないもの）中で回分培養した際の、セロビオースを用いた細胞増殖（A）及び乳酸形成（B）のプロファイル。記号：（◇）、pH非制御；（■）、pHを5.5に設定；（▲）、pHを6.0に設定；（×）、pHを6.5に設定；（●）、pHを7.0に設定；（△）、pHを7.5に設定。

[図2]種々のpH値に設定したQU25によるセロビオースからのL-（+）-乳酸産生の収率、光学純度、及び最大生産率。白色バー、乳酸収率%；灰色バー、光学純度%；◆、最大乳酸生産速度。

[図3]QU25によるグルコース/セロビオース混合物からのL-乳酸生産のタイムコース。発酵は、200 rpm、pH 7.0及び43℃で、1LのmMRS培地を入れた0.4 L容のジャーファーマンター内において、回分発酵で実施された。記号：○, dry cell weight ●, lactic acid; □, cellobiose; ■, glucose。データ点は、3回の独立した実験からの結果の平均及び標準偏差を表わす。誤差バーが見えない場合、その標準偏差は記号のサイズ未満である。

[図4]セロビオース濃度150gを用いたQU25による発酵に際しての、乳酸生産、セロビオース利用、酢酸、エタノール、及び増殖のプロファイル。発酵は、200 rpm、pH 7.0及び43℃で、0.2 Lの培地を入れたジャーファーマンターで実施された。記号：○, dry cell weight ●, lactic acid; ■, acetic acid; ▲, ethanol; □, cellobiose。データ点は、3回の独立した実験からの結果の平均及び標準偏差を表わす。誤差バーが見えない場合、その標準偏差は記号のサイズ未満である。

[図5]QU25によるキシロースを用いた乳酸発酵のプロファイル。発酵は、1 L

の培地を用い、0.4 L容のジャーファーマンターを使用し、43°C、pH 7.0、200 rpmで実施した。キシロースの初濃度は334 mM (A)、480 mM (B)及び691 mM (C)であった。○はキシロース濃度、●は乳酸濃度、△は酢酸濃度、▲はギ酸濃度、□はエタノール濃度、■は乾燥菌体重量を表す。データは、3つの独立した実験からの結果の平均値と標準偏差を示す。エラーバーがない箇所はシンボルのサイズより標準偏差が小さい。

[図6]QU25における、予想されるキシロース代謝経路。重要な酵素、LDH及びPFLを下線で示した。発酵生産物、乳酸、ギ酸、酢酸及びエタノールを囲んだ。ピルビン酸からのギ酸、酢酸、及びエタノールのための経路を破線矢印で示した。Pはリン酸基、FBPはフルクトース1,6-二リン酸、GAPはグリセルアルデヒド3-リン酸、DHAPはジヒドロキシアセトンリン酸を示す。

[図7]QU25によるグルコース-キシロース混合物を用いた乳酸生産。DCW; Dry Cell Weight。発酵は、200 rpm、pH 7.0、43°Cで実施された。

[図8]QU25によるグルコース-キシロース-セロビオース混合物を用いた乳酸生産。DCW; Dry Cell Weight。発酵は、200 rpm、pH 7.0、43°Cで実施された。

[図9]QU25による、グルコース-キシロース混合物を用いた乳酸生産、及びグルコース-キシロース-セロビオース混合物を用いた乳酸生産における副産物（酢酸、ギ酸、エタノール）のまとめ。

[図10]L-乳酸生産のためのEnterococcus mundtii QU25を用いた開放反復回分発酵の時間経過。(A) グルコースを含む回分番号1~11 (B) 混合グルコース及びキシロースを含む回分番号12。記号：▲、グルコース (g/L) ; △、キシロース (g/L) ; ○、乳酸 (g/L) 。矢印の上の数字は回分番号を示す。2つ組測定より、標準誤差を計算した。

[図11]L-乳酸生産のためのEnterococcus mundtii QU25を用いた開放反復回分発酵の細胞増殖プロファイル (DCW、g/L)。(A) グルコースを含む回分番号1~11 (B) 混合グルコース及びキシロースを含む回分番号12。矢印の上の数字は回分番号を示す。2つ組測定より、標準誤差を計算した。

[図12]MRS (A及びB)、及びmMRS (C ; 10 g/Lペプトン/8 g/L牛肉エキス/4 g/

L酵母エキスの代わりに5 g/L酵母エキスを入れた貧栄養培地) 中で増殖させた*E. mundtii* QU25を用いた開放反復回分発酵の (A) 1番目の回分培養、(B) 6番目の回分培養、及び (C) 7番目の回分培養、の動力学。それぞれの初発グルコース濃度は100 g/Lであった。記号：▲、グルコース (g/L)；○、乳酸 (g/L)；●；DCW (g/L)。

[図13]貧栄養MRS (A及びB) (10 g/Lペプトン/8 g/L牛肉エキス/4 g/L酵母エキスの代わりに5 g/L酵母エキス (A) 及び10 g/L酵母エキス (B) のみを入れた貧栄養培地)、及び完全MRS (C) 中で増殖させた*E. mundtii* QU25を用いた開放反復回分発酵の (A) 8番目の回分培養、(B) 9番目の回分培養、及び (C) 10番目の回分培養、の動力学。それぞれの初発グルコース濃度は130 g/Lであった。記号：▲、グルコース (g/L)；○、乳酸 (g/L)；●；DCW (g/L)。

[図14]*E. mundtii* QU25を用いた開放反復回分発酵の (A) 11番目の流加培養、及び (B) 12番目の混合糖回分培養、の動力学。(A) 初期グルコース濃度は100 g/Lであり、そして発酵開始4時間後にグルコース濃度が50 g/L増加するようにグルコースを供給した。(B) 初期グルコース及びキシロースは、それぞれ、45及び37.5 g/Lであった。記号：▲、グルコース (g/L)；△、キシロース、○、乳酸 (g/L)；●；DCW (g/L)。

[図15]QU25の16SrRNA遺伝子のヌクレオチド配列。

発明を実施するための形態

[0014] 1.新規乳酸菌

本発明者らは、本明細書の実施例1に詳細に示したスクリーニングによって、新規な乳酸菌株QU25を単離した。この菌株は、本発明者らが、日本国福岡市動物園 (日本国福岡県福岡市中央区南公園1番1号) で集められた羊の糞試料から単離したものであり、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8) へ、2010年7月15日付で受託番号NITE BP-965として寄託されている。本明細書では、この菌株をQU25と称することがある。

[0015] この菌株は、下記の菌学的性質を有することから、エンテロコッカス・ムンヅティ (*Enterococcus mundtii*) に属する乳酸菌であると同定された。

1. 形態：球菌である。
2. 生化学的性質：カタラーゼ陰性である。
3. 運動性：なし
4. 酸素要求性：通性嫌気性である。
5. グルコースを基質としてホモ乳酸発酵によりL-乳酸を産生する。
6. 下記の糖資化性（本発明で「糖資化性」に言及するときは、特に記載した場合を除き、本明細書の実施例Aで用いた方法により確認される糖資化に関する特性をいう。）を有する。

[0016] [表1-2]

Sugar		Sugar	
Glycerol	+	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
D-Ribose	+	Melobiose	+
D-Xylose	+	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
α -Methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Starch	$\pm$
Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	α -Gentibiose	+
Rhamnose	+	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α -Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α -Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-glucoamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	+	2-Keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-Keto-gluconate	-
Esculine	+		

+ 資化する、一資化しない

[0017] このQU25は、乳酸発酵に関し、下記の性質を有する：

- (1) 光学純度が99.0以上（好ましくは99.5%以上、より好ましくは99.75%

以上、更に好ましくは99.9%以上)であるL-乳酸を生産可能であり;かつ

(2) 20g/Lのセロビオースを含む培地で、pHを 7.0に制御し、43℃で20時間以上培養したときに、20g/LのL-乳酸を生産可能である。

[0018] 本発明で乳酸を「生産可能」というときは、特に記載した場合を除き、特定の範囲であることが規定された条件項目（例えば、温度、時間）については、その範囲で、また特定されていない条件項目（例えば、攪拌速度、通気の有無・程度）については発酵生産に適する条件とした場合に、その純度及び濃度で生産できることをいう。また基質濃度をいうときは、特に記載した場合を除き、培養開始時の培地の基質濃度（初発濃度ということもある。）をいう。

[0019] またQU25の16S rRNA遺伝子の大腸菌のポジション8-1510に対応する部分について、同一性を解析した結果、既存のEnterococcus mundtiiの株と高い同一性があることが示された（実施例1参照）。QU25の16S rRNA遺伝子の部分配列を、配列表の配列番号:1及び図15に示した。

[0020] 本願は、QU25のみならず、それと均等な微生物、具体的には下記の微生物を提供するものでもある:

[1] 下記の性質を有するEnterococcus mundtiiに属する乳酸菌:

(1) 光学純度が99.0以上（好ましくは99.5%以上、より好ましくは99.75%以上、更に好ましくは99.9%以上）であるL-乳酸を生産可能であり;かつ

(2) 20g/Lのセロビオースを含む培地で、pH 7.0、43℃で20時間以上培養したときに、20g/LのL-乳酸を生産可能であるもの;

[2] 上述したQU25と同じ菌学的性質を有する、乳酸菌;

[3] 配列表の配列番号:1で示されるヌクレオチド配列と99.5%以上（3個以内の差異がある。）の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる16SrRNA遺伝子を有する乳酸菌。なお、ヌクレオチド配列に関する配列同一性は、BLASTアルゴリズムを用いて計算することができる。このための手法は当業者にはよく知られている。

[0021] QU25と均等な微生物は、当業者であれば、本明細書の実施例1を参考に、適

当な天然源から単離した微生物をスクリーニングすることにより、獲得することができる。なお本発明における乳酸発酵に関する各種の値（例えば、pH、糖濃度、光学純度）は、慣用な方法で適宜測定可能であるが、測定法により値が異なる場合は、特に記載した場合を除き、本明細書の実施例の項に記載した方法により測定した値である。また本発明における乳酸発酵に関する各種の発酵パラメータは、当業者にはよく知られているが、特に記載した場合を除き、本明細書の実施例の項に定義されたものを指す。

[0022] QU25及びその均等微生物は、蒸留水1L中に、ペプトンを10g、牛肉エキスを8g、酵母エキスを4g、グルコースを20g、Tween80を1g、 K_2HPO_4 を2g、酢酸ナトリウム三水和物を5g、クエン酸水素二アンモニウムを2g、 $MgSO_4 \cdot H_2O$ を0.2g、 $MnSO_4 \cdot nH_2O$ を0.05g含むMRS培地（又はその改変培地）にグルコース、セロビオース等の基質を適切な濃度になるように添加したものをを用いて良好に培養することができる。

[0023] 2. L-乳酸の生産方法

本発明により、乳酸菌を用いた高純度L-乳酸の効率的な生産方法が提供される。

[0024] なお、本明細書においては、本発明をQU25を用いた場合を例に説明することがあるが、特に記載した場合を除き、その説明は、QU25の均等微生物を含む他の好適な乳酸菌を用いた場合にも当てはまる。

[0025] [乳酸菌]

本発明で「乳酸菌」というときは、特に記載した場合を除き、多量に乳酸を生産(炭水化物を発酵し、生成する酸の50%以上)すると共に、炭水化物を含む培地によく繁殖し、グラム陽性で、運動性がなく、孢子をつくらぬ菌群をいう。本発明でいう乳酸菌は、エンテロコッカス(Enterococcus) 属に属する微生物、ラクトバシラス(Lactobacillus) 属に属する微生物、ビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)属に属する微生物、ラクトコッカス (Lactococcus) 属に属する微生物、ペディオコッカス (Pediococcus)属に得する微生物、及びロイコノストック(Leuconostoc)属に属する微生物を含む。

[0026] 本発明に用いるのに適した乳酸菌は、天然源から得た試料から、次のようにスクリーニングすることにより、得ることができる。少量の試料を改変MRS培地（例えば、MRS培地に、セロビオース又はグルコースを各2% [wt/vol]濃度で添加したもの）に加え、30℃で3日又は7日間、嫌氣的条件で培養し、培養物の一部を段階的に希釈し、CM-セロビオース寒天プレートに広げ、コロニーの採取、希釈、画線培養を適宜行い、単一のコロニー群を得る。単離菌は、定法により、カタラーゼについて試験し、カタラーゼ陰性のものについて、CM-セロビオース寒天培地を用いてさらに選抜し、乳酸の収率及び光学純度が高いものを選択する。

[0027] 本発明には、エンテロコッカス・ムンツティ (Enterococcus mundtii) に属する乳酸菌を好適に用いることができる。特に、Enterococcus mundtii NI TE BP-965を好適に用いることができる。

[0028] [pHの影響]

QU25は、pHを5.5～6.0に低く制御した場合、pH6.5～7.5にpH制御した場合に比較して、細胞増殖が阻害されうる。低いpHで増殖できないのは遊離酸 (H⁺) に対する抵抗性が低いことに起因すると思われる。pH 5.5～6.0では、糖消費はきわめて低速で進行し、完全に消費されない場合がある。最大乳酸生産速度は、pHが高いほど大きくなり得、pH7.5付近で最大となり得る。pH制御により、制御しない場合に比較して、数倍高い最大乳酸生産速度が得られうる。

[0029] したがって、生産効率の観点からは、本発明においては、環境のpHは、6.0以上、より好ましくは6.5以上、さらに好ましくは6.7以上であることが好ましい。pHの上限値は、いずれの場合も、7.5未満であることが好ましく、7.4未満であることがより好ましく、7.3未満であることがさらに好ましい。至適なpHの一例は、7.0である。このような環境pHの範囲は、生成乳酸の光学純度の観点からも好ましいであろう。

[0030] [温度の影響]

QU25は、乳酸産生及び乳酸収率に関して30～45℃の広い温度範囲にわたっ

て良好な生物活性を保ちうる。特に、40～44℃において、最大増殖速度及び最大乳酸生産速度を発揮しうる。45℃を超える高い温度では、QU25は良好な細胞増殖も高い乳酸産生も示さない場合がある。

[0031] したがって、効率的にL-乳酸を生産するとの観点からは、本発明においては、温度は、30℃以上、より好ましくは35℃以上、さらに好ましくは40℃以上であることが好ましい。温度の上限値は、いずれの場合も、45℃未満であることが好ましく、44℃未満であることがより好ましいであろう。至適な温度の一例は、43℃である。

[0032] [基質（炭素源）の影響]

本発明において、乳酸菌のための環境に含まれる成分に関し、「基質として」というときは、特に記載した場合を除き、その微生物が資化可能な量(濃度)で、その成分が含まれていることをいう。

[0033] QU25は、様々な濃度のセロビオースをグルコースと同じように消費しうる。糖消費速度に関しては、グルコースとセロビオースとでは近似しうる。

[0034] したがって、本発明によれば、グルコースとセロビオースの糖混合物を用いて、高純度、高濃度のL-乳酸を、高収率で生産することができる。

[0035] リグノセルロースからの一般的な糖化プロセスでは、多種類の糖を含有する原料が得られる。そのため、リグノセルロース由来の糖化物原料を用いて生成物収率及び生産性を最大にするためには、混合糖を完全利用することができれば望ましい。一方、大部分の微生物がグルコースを他の糖より優先的に利用するため、混合糖を乳酸生産に用いる場合、糖類の逐次利用のために、生産性が低下することが多い。しかしながら本発明によれば、セロビオースを効率的に利用するだけでなく、セロビオースとグルコースを同時に消費することができ、これによりセルロース系材料から糖化により生成する糖類を、高効率・高速度で完全に利用することが期待できる。本発明は、微生物による乳酸生産のためのグルコースとセロビオースの同時利用に関する最初の発明である。

[0036] 本発明における環境のグルコース濃度、セロビオース濃度は、当業者であ

れば基質の総量が、培地に対して0.5～50%（重量）の範囲内で適宜設計することができる。典型的には、初発の、又は培養期間を通じてのグルコース濃度及びセロビオース濃度は、それぞれ独立して、5 g/L以上とすることができ、20 g/L以上とすることが好ましく、50 g/L以上とすることがより好ましく、100 g/L以上とすることがさらに好ましい。いずれの場合においても、グルコース濃度及びセロビオース濃度は、それぞれ独立して、400 g/L以下とすることができ、300 g/L以下とすることもでき、250 g/L以下とすることもできる。

[0037] 環境のグルコース濃度及びセロビオース濃度はまた、グルコース：セロビオースの重量比が1:0.01～100、より特定すると1:0.1～10となるように決定することができる。

[0038] なお本発明において、成分の濃度又は比について値を示す場合は、特に記載した場合を除き、その値は重量に基づく値である。また環境中の濃度又は比について示した値は、特に記載した場合を除き、初発（培養開始時）の、又は培養期間を通じての値である。

[0039] 本発明者らの検討によると、本明細書の実施例の条件では、QU25の増殖挙動は、環境のセロビオース濃度が150g/Lの場合であっても、より低濃度である場合と類似していた。増殖挙動が高糖濃度においても変わらないことは、QU25の増殖に対する基質阻害がほとんどないことを示唆している。しかしながら、乳酸収率に関しては、セロビオース濃度が上昇するのに伴って低下した。このことは、基質濃度は一般には収率及び生産量に対しては大きな作用をもたないと報告されていることから、生成物阻害若しくは乳酸生成のために必要な栄養素の枯渇、又はそれらの組み合わせによるものと考えられる。一方、乳酸生産において高い糖濃度を使用することは、経済的な側面からは望ましい。本発明におけるセロビオース濃度の上限値は、このような観点からも設計することができる。本発明においては、環境のセロビオースの濃度の上限を、100g/Lとしてもよい。

[0040] 本発明者らの検討によると、QU25はキシロースの濃度によって発酵収率が

変化しうる。詳細には、キシロースのみを基質とする場合、キシロースが比較的低濃度の場合は、副産物が生成され、乳酸の収率は低くなる場合があるが、キシロースが比較的高濃度である場合は、副産物はほとんど生産されず、高収率で乳酸が得られうる。その一方で、キシロースに関しては、さらに高い濃度においては、生産速度や収率が減じる場合がある。これは高い基質濃度による阻害によるものと理解される。参考のため、QU25における、予想されるキシロース代謝経路を図6に示した。

[0041] したがって、このような観点からは、本発明におけるキシロースの濃度は、20 g/L以上であることが好ましく、40 g/L以上であることがより好ましい。いずれの場合においても、150 g/L以下であることが好ましく、103 g/L以下 (691 mM以下) であることがより好ましい。

[0042] 本発明によれば、キシロースがよく消費され、またキシロースを用いる場合も、グルコースやセロビオースを用いる場合と同様、pH 7.0、43°C付近で乳酸を生産することができる。

[0043] 本発明によれば、グルコース及びキシロースの混合物を基質として、乳酸を生産することができる。混合物が用いられる場合、典型的には、初発のグルコース濃度及びキシロース濃度は、それぞれ独立して、5~250 g/Lとすることができる。また、環境のグルコース濃度及びキシロース濃度は、それぞれ独立して決定してもよく、グルコース1重量部に対し、キシロースが1重量部未満、より特定すると0.75重量部未満となるように決定してもよい。このような重量比であれば、いずれの濃度においても、同じように糖が消費されうる。

[0044] 本発明においては、グルコース、キシロース及びセロビオースの混合物を基質として、乳酸を生産することができる。この場合のそれぞれの濃度は、独立して決定してもよく、グルコース1重量部に対し、キシロース及びセロビオースが、それぞれ独立して、1重量部未満、より特定すると0.75重量部未満となるように決定してもよい。このような態様においては、まず、グルコース及びセロビオースが迅速に消費されうる。有力なセルラーゼインヒビター

でもあるセロビオースの迅速な消費は、リグノセルロース系バイオマスからの商業的な乳酸生産において、非常に有利であると考えられる。

[0045] 上述したように、本発明においては、キシロースを、そのみを基質として比較的低い濃度で用いる場合に、少量の副産物が生成しうるが、グルコース、セロビオースと混合してキシロースを用いる場合には、副産物の生成が減少しうる。総じて、本発明において他の糖とともにキシロースを用いる場合、キシロースの濃度は、5 g/L以上とすることができ、10 g/Lとすることが好ましく、15 g/Lとすることがより好ましい。いずれの場合も、上限値は150 g/Lとすることができ、103 g/Lとすることが好ましい。

[0046] QU25は、セロオリゴ糖類、すなわちセロトリオース（C6三糖）、セロテトラロース（C6四糖）及びセロペントース（C6五糖）を資化しうる。特に、セロトリオース及びセロテトラロースから、約100%の収率でL-乳酸（光学純度、100%）を生産することができる。

[0047] したがって、本発明によれば、次の効果が期待できる：

- (1) 非食用バイオマスの前処理工程の簡便化・コストダウン；
- (2) 非食用バイオマスからのL-乳酸収率の実質的な向上；
- (3) 前処理工程に酵素分解反応を用いる場合、オリゴ糖による酵素反応阻害を考慮する必要性の低下。

[0048] 非食用バイオマスは、主としてセルロース、ヘミセルロース、リグニンより構成される。物理化学的に分解する場合、単糖までの分解は可能であるが、厳しい条件を必要とし、その場合はコスト・労力がかかる上、単糖がさらに分解してしまう恐れがある。一方、やや穏やかな条件で処理を行うこと、単糖以外に、大量のオリゴ糖が生じることとなる。本発明によれば、キシロオリゴ糖及びセロオリゴ糖が、有効に資化されうる。

[0049] 混合糖、キシロース、セロオリゴ糖に対する特性から、本発明は、バイオマス原料からの同時糖化発酵に適用可能であるといえる。特に、非食用バイオマスを用いた同時糖化発酵への適用が期待できる。同時糖化発酵については、前掲の非特許文献8及び9を参照することができる。

[0050] L-乳酸を生産するための基質としては、効率（速度、収率の両方で、副産物は作らない。）の観点からは、グルコースである。しかしながら、非食用バイオマスを原料とする場合、グルコース単独の炭素源はあり得ず、セルロースやヘミセルロースの前処理によってできてくるグルコースのようなヘキソースのほか、キシロースやアラビノースのようなペントース、さらにはそれらのオリゴ糖等の混合物が、現実の炭素源となる。それらの炭素源に対応可能であり、かつL-乳酸を効率よく（速度、収率の両方で、副産物は作らない。）生産でき、基質・生成物阻害が少なく、カタボライト抑制が少ない、等の種々の特性を備えた菌株があるとよい。本発明の好ましい態様においては、このような菌株としてQU25を用いることができる。

[0051] [開放系培養]

本発明による乳酸生産は、開放系として、又は非滅菌条件下で、実施することができる。「開放系」又は「非滅菌」は、生産のために用いる培地を滅菌しないこと、回分式で乳酸を生産する場合に、ある回分培養から次の回分培養への引き継ぎの無菌条件下での実施を要しないことを含む。

[0052] 本発明による乳酸生産は、反復回分式で、実施することができる。

[0053] 開放又は非滅菌生産系は（i）滅菌中のメイラード反応が回避可能であり；（ii）装置の必要性及びエネルギー消費を低下させることも可能であり；そして（iii）工程を単純化し、そして労力を省くことも可能であるため、好ましい（Bioresource Technology 101 (2010) 6494-6498）。

[0054] さらに、反復回分（repeated batch）操作は、回分式と比較して、時間及び労力両方の点で節約につながる。これらには、発酵槽の洗浄及び滅菌に必要な時間がより少ないこと、シードを調製する時間が省略できること、増殖率が高いこと、そして初期の菌体接種体積が大きいため、本培養時間が短いことが含まれる。

[0055] 開放系及び反復回分操作を組み合わせることによって、さらにエネルギー効率が優れ、労力及び時間が節約された操作戦略を確立することも可能である。

[0056] 開放反復回分系は、乳酸菌に関しては報告されてきていない。開放反復回分系は、L-乳酸産生を、はるかにより取り扱いやすくそしてエネルギー効率の優れたものにすると考えられる。一方、この系に用いる株は頑強である必要があり、特に光学的に非常に純粋な乳酸を産生するとの観点からは、開放反復中の汚染の可能性増加に抵抗するものでなければならない。

[0057] なお、現在まで、細菌による乳酸の開放発酵産生に関して公表された論文は1報のみである（前掲Bioresource Technology 101 (2010) 6494-6498）。この論文の著者らは、乳酸菌である*Lactobacillus casei*の株及び非乳酸菌である*Bacillus*属の株を用いている。しかし、彼らの報告においては、*Bacillus*属の株については、種々のデータ及び動力学パラメータが示されているが、96～98.4%の光学純度を除いては、*Lactobacillus*属の株に関するデータには言及されていない。本発明者らの見解としては、ここでの乳酸濃度は低く、そしてまた残存グルコース濃度が高いようであり（ほとんどの場合、約30～50 g/Lである）、また、発酵時間が長く（～37-47時間）、そして本発明者らのデータに比較して生産性が低い。

[0058] 本発明は、乳酸菌を用いた開放反復回分式の乳酸生産を初めて報告するものであり、また本発明の開放反復回分式の態様によれば、光学純度の高いL-乳酸を、14.1 g/L/hという高い生産速度で生産しうる。

[0059] [バイオマス原料]

本発明で「バイオマス(原料)」というときは、特に記載した場合を除き、再生可能な、生物由来の有機性資源で化石資源を除いたものをいう。本発明には、発生場所、現在の利用状況及び形態に制限されず、乳酸発酵のための原料として用いることができるあらゆるバイオマス原料を用いることができる。バイオマス原料の例は、さとうきび、米、とうもろこし、さつまいも、菜種、落花生、大豆、バカス、葉茎、稲わら、もみ殻、籾殻、麦わら、ゴルフ場などで大量に発生する刈芝、林地残材、間伐材、オイルパーム樹木、製材所の廃材(例えば、端材、おが屑、樹皮)、建設廃材(木屑)、古紙、畜糞尿、屠場残渣、水産加工残渣、廃棄物として発生するバイオマス有機汚泥、パ

ルプ廃液、食品加工残渣、使用済み食用油、生ごみ、下水汚泥、魚貝類、昆布類、植物プランクトンが含まれる。

[0060] 本発明で「食用バイオマス(食糧バイオマス、食料バイオマスということもある。)(原料)」というときは、特に記載した場合を除き、ヒト又は家畜食糧とすることもできるバイオマス原料をいう。食用バイオマスは、さとうきび、米、とうもろこし、さつまいもを含む。

[0061] 本発明で「非食用バイオマス(原料)」というときは、特に記載した場合を除き、食用以外のバイオマス原料をいう。本発明には、非食用バイオマス原料を適用することが好ましい。

[0062] [用途]

本発明を用いて産生したL-乳酸は、ポリL-乳酸の原料として用いることができる。また、ポリL-乳酸とポリD-乳酸とのステレオコンプレックスを製造するための原料として用いることができる。このようなステレオコンプレックスは、耐熱性が高い生分解性プラスチックとなり得る。

[0063] 光学的に純粋なL- (+) -乳酸は、重合して繊維及び配向フィルムの製造に適した高結晶ポリマーになり、液晶の製造にも有用であると期待される。

[0064] さらに、ポリL-乳酸は現在、多数の医療用途に用いられている。例えば、縫合糸、ステント、透析媒体、及び薬物送達デバイスである。それは組織工学のための材料としても評価されつつある。それは生分解性であるのでバイオプラスチックの製造にも使用でき、ルーズフィル (loose-fill) パッケージング、コンポストバッグ、食品パッケージング、及び使い捨て食器の製造に有用である。したがってポリL-乳酸は、将来の持続的な社会システムにおいて使用するのに適切な資源リサイクル材料としての可能性をもつ。

[0065] なお、本発明はL-乳酸の生産に関するが、本明細書では便宜上、本発明による生産物を単に「乳酸」と表現している場合がある（例えば、「乳酸生産速度」という場合、等）。当業者であれば、文脈から、「乳酸」がL-乳酸を指すものであることは適宜理解できる。

実施例

[0066] [分析法]

実施例全体を通じて、特に記載した場合を除き、下記の方法又はそれと同等の分析方法を用いた。

[0067] 細胞密度は、波長562nmにおける細胞懸濁液の光学濃度 (OD_{562}) を分光光度計 (UV-1600可視光線分光光度計、Bio-spec、島津、日本、東京) で測定することにより分析した。 OD_{562} -対-乾燥重量に関する予め決定した標準曲線から乾燥細胞重量を計算した。

[0068] pHは、卓上pHメーター (HM-25R) で測定した。

[0069] セロビオース及び発酵生成物は、SUGAR SH-1011カラム (Shodex、日本、東京) を備えたHPLC (US HPLC-1210、Jasco、日本、東京) の使用により測定した。1mlの試料培養物を卓上遠心機 (Tomy、マイクロ遠心機、モデルMX-300) の使用により2000gで10分間、4℃において遠心した後、上清を超純水で希釈し、Dismic 13-HP045フィルター (Advantec、日本、東京) で濾過し、次いで下記の条件下でクロマトグラフに注入した：カラム温度50℃、移動相としての流速1.0ml/分の3mM $HClO_4$ 、及び注入容量20 μ l。標準溶液から求めた検量曲線を用いて、残留糖類及び発酵生成物の濃度を計算した。

[0070] 乳酸の光学純度は、BF-5バイオセンサー (王子計測器、日本、兵庫) により製造業者のプロトコルに従って測定した。

[0071] [発酵パラメーター]

実施例で評価した発酵パラメーターは、特に記載した場合を除き、以下のものであった。

[0072] (1)比増殖速度 (μ)

下記のように計算した。

[0073] [数1]

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = \ln (x_2/x_1) / (t_2-t_1)$$

[0074] ここで (x) は OD_{562} であり、(t) はサンプリング時間 (h) である。

[0075] (2)消費された基質を基準とした乳酸の収率 (Y, g/g)

消費された糖 (g/L) に対する生成した乳酸 (g/L) の比率として定義した。

[0076] (3) 乳酸生産速度

発酵時間 (h) に対する生成した乳酸濃度 (g/L) の比率として計算した (各サンプリング期間の間で計算)。

[0077] (4) L-乳酸の純度

下記のように評価した。

[0078] [数2]

$$\% \text{光学純度} = (\text{L-乳酸濃度} - \text{D-乳酸濃度}) / (\text{L-乳酸濃度} + \text{D-乳酸濃度}) \times 100$$

[0079] (5) 発酵の全糖類取込み (q_s) 及び比乳酸生産率 (q_p)

次式により計算した。

[0080] [数3]

$$q_s = (1/x_{av}) (\Delta s / \Delta t) \text{ 及び } q_p = (1/x_{av}) (\Delta p / \Delta t)$$

[0081] ここで Δs 及び Δp はそれぞれ、期間 Δt にわたる糖濃度及び乳酸濃度の変化であり； x_{av} は Δt にわたる細胞密度の平均である。

[0082] [培地]

特に記載した場合を除き、mMRS培地を用いた。これは、下記のものを含んでいた (リットル当たり)：10 gのペプトン (Difco、ミシガン州デトロイト)、8 gの牛肉エキス (Nacalai Tesque、日本、京都)、4 gの酵母エキス (Nacalai Tesque)、2 gの K_2HPO_4 (Nacalai Tesque)、5 gの $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ (Nacalai Tesque)、2 gのクエン酸三アンモニウム (Nacalai Tesque)、0.2 gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Nacalai Tesque)、0.05 gの $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (Nacalai Tesque)、1 mlのTween 80 (Nacalai Tesque)。特に示した場合を除き、リフレッシュ及び前培養のためには10 g/L (1%)、主発酵のためには20 g/Lのグルコースを含んでいた。また、場合により、D-セロビオース (Sigma)、グルコース、アラビノース等を所定の濃度で含んでいた。

[0083] [実施例A：新規乳酸菌の単離及び同定]

(1) 材料及び方法

(A) 新規乳酸菌の単離とスクリーニング

福岡市内の種々の天然源から、30の試料を得た。それぞれ5gを100mlのNaCl溶液（0.85%[wt/vol]）に懸濁した。この懸濁液の10mlを、250 ml容フラスコ中の100 mlの改変MRS培地（MRS培地に、セロビオース又はグルコースを各2% [wt/vol]濃度で添加したもの）に加え、30℃で3日又は 7日間、嫌氣的条件で培養した。培養物の一部を 10^6 まで段階的に希釈し、0.1 mlを、0.5% [wt/vol]となるようにCaCO₃を加えたCM-セロビオース寒天プレートに広げた。プレートを、72時間、30℃でインキュベートした。形成されたコロニーを個別に採取し、希釈し、別のプレートに画線培養し、単一のコロニー群を得た。この操作を、菌を純化するために繰り返した。単離菌は、即時使用用にmMRS-セロビオース（1% [wt/vol]）培地に、又は-80℃保存用に30% [vol/vol]のグリセロールに保存した。各々の単離菌は、最初に、細胞上に3%の過酸化水素水の滴を置くことにより、カタラーゼについて試験した。直ちに気泡が形成されることにより細胞中のカタラーゼの存在を示すが、カタラーゼ陰性のものを、さらなる分析のために選択した。細胞の形態は、1000x位相差顕微鏡（Nikon Eclipse 80i, Tokyo, Japan）を用いて観察した。

[0084] 単離菌は、乳酸生産のための初期スクリーニングとして、発酵プロファイル、収率、光学純度、増殖能、及びグルコース、セロビオースの発酵能のような数種の特性について試験した。最初に、1mlのグリセロール保存培養物を、15mlスクリーキャップ試験管に9mlの糖（sugar）添加（2% [wt/vol]）mMRS培地を充填したものに接種して培養した。これをセロビオース添加（1% [wt/vol]）mMRS培地に10% [vol/vol] となるように接種し、30℃で24時間インキュベートした後、発酵プロファイルを決定した。サンプリングは、0時点及び24時間の時点で行った。

[0085] (B) 特性及び同定

API 50 CHLキット（BioMerieux、フランス）を用いて、糖類資化性試験を

行なった。詳細は本キットのマニュアルに従った。30℃でインキュベートし、24時間と48時間培養後の糖類資化性パターンをManero及びBlanch (1999)にしたがって記載した。

[0086] 分離した株の16SrRNA遺伝子の部分配列、具体的には大腸菌のポジション8-1510に対応する部分、について解析した。ゲノム抽出キット (MagExtractor Genome、Seikagaku、Japan) を用いて分離株のDNAを抽出し、それを鋳型としてプライマーとTaq DNA polymerase (Promega, USA) を用いてPCRを行った。PCR産物を精製し、DNA配列解析を行った (FASMAC, Japanに依頼)。

[0087] (2) 結果

A. 単離とスクリーニング

30の異なる天然源から631の微生物を得て、そのうちカタラーゼ陰性の275の単離菌について、CM-セロビオース寒天培地を用いてさらに選抜した。24時間の発酵プロファイルなどから、QU25が、他の菌株に比較して、乳酸の収率及び光学純度が高い (それぞれ約1g/g-消費糖、>99.1%) ことが分かったので、この菌株をさらなる検討に用いた。

[0088] (B) 特性及び同定

API50CHキットを用いた糖類資化性試験の結果を、下に示す。QU25の糖発酵パターンは、Manero及びBlanch (1999)による腸球菌属の種の糖発酵パターンのち、E. mundtii及びE. casseliflavusのものに最も近かった。D-タガトースを除いたすべての糖についての資化性が、E. mundtiiと同じであった。他の特徴、球菌、カタラーゼ陰性、45℃で増殖し、グルコースからホモL-乳酸発酵する等は、Enterococcus属菌種の基準 (Manero及びBlanch (1999)) と一致した。

[0089]

[表1-3]

QU25、 <i>E. mundtii</i> 及び <i>E. casseliflavus</i> の糖資化性パターン(API CHL)							
Sugar	QU25	<i>E. mundtii</i>	<i>E. casseliflavus</i>	Sugar	QU25	<i>E. mundtii</i>	<i>E. casseliflavus</i>
Glycerol	+	d	V	Salicine	+	+	+
Erythritol	-	-	-	Cellobiose	+	+	+
D-Arabinose	-	ND	ND	Maltose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	Lactose	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	Melobiose	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	Sucrose	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	Trehalose	+	+	+
Adonitol	-	-	-	Inulin	-	d	(+)
α -Methyl-D-xyloside	-	-	-	Melezitose	-	d	d
Galactose	+	+	+	D-Raffinose	-	(+)	d
D-Glucose	+	+	+	Starch	±	d	V
Fructose	+	+	+	Glycogen	-	(-)	-
D-Mannose	+	+	+	Xylitol	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	α -Gentibiose	+	ND	ND
Rhamnose	+	+	(+)	D-Turanose	-	-	V
Dulcitol	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-
Inositol	-	ND	ND	D-Tagatose	+	-	-
Mannitol	+	+	+	D-Fucose	-	-	-
Sorbitol	+	d	d	L-Fucose	-	-	-
α -Methyl-D-mannoside	-	(+)	V	D-Arabitol	-	-	-
α -Methyl-D-glucoside	-	-	+	L-Arabitol	-	-	-
N-Acetyl-glucoamine	+	+	+	Gluconate	-	-	+
Amygdalin	+	+	+	2-Keto-gluconate	-	-	-
Arbutine	+	+	+	5-Keto-gluconate	-	-	-
Esculine	+	+	+				

+, positive; (+), 75 to 89 % are positive; V, 26 to 74 % are positive; (-), 11 to 25 % are positive; -, negative; d, discrepancies among reference studies; ND, No data.

[0090] 16SrRNA遺伝子配列解析の結果、ポジション8-519に対応する部分はNCBIデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)において供給されるデータとのBLASTアルゴリズムを用いた比較により、Enterococcus mundtiiと同一性が高かった。以上の結果から、QU25は、Enterococcus mundtiiと同定された。

[0091] なお得られたQU25の16S rRNA遺伝子のヌクレオチドの部分配列を、配列表の配列番号：1と図15に示した。

[0092] [実施例1：培養条件の検討]

(1) 材料及び方法

QU25をこの研究に用いた。

[0093] A. フラスコ培養

1 mlのグリセロール保存培養物を、15mlスクリーキャップ試験管に9 mlのmMRS-糖（1% [wt/vol]）を入れた試験管に接種し（10% [vol/vol]）、30℃で24時間インキュベートした。得られた培養物の一部を、200 ml容フラ

スコ中の100 mlのmMRS-セロビオース (2% [wt/vol]) 培地に接種し (10% [vol/vol])、30℃で72時間培養した。培養開始時のpHは6.5であった。

[0094] B. ジャーファーマンター培養

フラスコ培養の場合と同様にリフレッシュして得た培養物4 mlを、同じ培地36mlを入れた50 mlスクリュウキャップ試験管中の新たな増殖培地へ移した。接種物を30℃で8時間インキュベートした後、(10% [vol/vol]) でジャーファーマンターへ接種した。

[0095] 発酵は、200 rpmの攪拌速度で、1L容のジャーファーマンター (Biott、日本、東京) 内において、種々の量の糖を補充したmMRSを用い、0.4 Lスケールで (ただし、糖濃度150 g/L培養では0.2 Lスケールで) 実施した。糖溶液を独立してオートクレーブ処理し、そして残りのmMRS培地と混合した。

[0096] 各サンプリング時点で5 mlの培養物を無菌的に各ジャーから分離し、その後の分析のために-20℃で凍結した。乾燥細胞重量 (dry cell weight) (DCW)、残留糖類及び発酵生成物をアッセイした。

[0097] 最適pHを調べるために、発酵中に自動pH制御装置 (PH C2201、Biott) に接続した蠕動ポンプで5 M NaOHを添加することによりpHを制御し、及び制御せずに、アッセイを実施した。pHをそれぞれ5.5、6.0、6.5、7.0及び7.5に制御した。この菌株の発酵プロファイルを30℃で24時間の増殖後に測定した。

[0098] 乳酸生産に対する温度の作用を調べるために、それぞれ30、37、43、45、47及び50℃に制御した種々の温度で、5 M NaOHの自動添加により7.0に設定したpH制御発酵においてアッセイを実施した。発酵はmMRS-セロビオース (2.0 % [wt/vol]) 中で実施した。

[0099] 糖混合物の作用を、発酵培地に比率1 : 1のグルコース/セロビオースをそれぞれ10、15及び20 g/Lの濃度で補充することにより調べた。基質濃度の作用を、セロビオース濃度50、100 g若しくは150 g/L、又はグルコース濃度150 g/LのmMRS培地を用いて調べた。発酵はいずれも、43℃、pH 7.0に制御下 (10M又は15MのNaOHの自動添加) で実施した。糖濃度150 g/Lの培養では、酵母エキスを培養8時間、60時間、96時間の時点で、それぞれ1%、0.25%、0.25%[wt/

vol]で補った。

[0100] (2) 結果

A. タイムコース試験からの増殖及び乳酸産生プロファイル

フラスコ培養によりタイムコース試験を実施して、pHを制御しない条件下でのQU25の増殖及び乳酸プロファイルを作成した。この回分発酵において、セロビオース消費の速度（容量当たり）はきわめて低速で起きた。DCW測定に基づくと、QU25は速やかに増殖し、約0.91 g/Lで水平になった（図1）。21時間後にpHが4.85に落ちた。L-（+）-乳酸の最大生産濃度は、60時間後、7.04 g/Lであった。副生産物の生成はなかった。

[0101] B. pH制御条件下での乳酸発酵

結果を下表に示した。

[0102] [表2]

Effects of pH of culture medium on lactic acid fermentation from cellobiose by *Enterococcus mundtii* QU25^a.

pH	μ_{max}^b (h ⁻¹)	Maximum cell mass (g/l)	Maximum L-lactic acid produced (g/l) at indicated time	L-lactic acid yield ^c (%)	Maximum L-lactic acid productivity (g/l/h)
No control	0.415	0.71	3.90 ± 0.09 (24 h)	65.7	0.47
5.5	0.368	1.38	13.9 ± 0.76 (24 h)	87.0	0.82
6.0	0.610	1.89	14.8 ± 0.89 (24 h)	84.0	1.48
6.5	0.672	2.37	14.7 ± 0.00 (20 h)	86.6	1.81
7.0	0.635	3.04	18.7 ± 2.04 (20 h)	94.4	2.10
7.5	0.575	3.17	16.4 ± 0.25 (20 h)	83.0	2.20

^aFermentations were carried out at 30°C and the indicated pH with initial cellobiose concentration 20 g/L. Averages with standard deviations are based on three independent fermentations.

^bMaximum specific growth rate; ^cProduced lactic acid (g/L) per consumed sugar (g/L)

[0103] HPLC分析により、本発酵はホモ乳酸発酵であり、わずかな量の酢酸の生成があったほかは、他の副生産物のピークは見られなかった。図2に、収率、光学純度及び最大生産速度を示した。

[0104] pHを5.5～6.0に低く制御した場合、pH6.5～7.5にpH制御した場合に比較して、細胞増殖が明らかに阻害された。pH 5.5～6.0では、セロビオース消費はきわめて低速で進行し、発酵の終了時まで枯渇しなかった。最大乳酸生産速度は、pHが高いほど大きく、pH 7.0で2.1 g/L/hと高い値が得られた。これはpH制御しない発酵で得られたものより4倍高い数値であった。表2に示した結果より、乳酸収率なども考慮した結果、最適pHは7であると考えられる。このpHではセロビオースの完全枯渇に要したのはわずか16～20時間であった。

[0105] C. 種々の温度下での乳酸発酵

結果を下表に示した。

[0106] [表3]

Effects of culture temperature on lactic acid fermentation from cellobioses by batch culture of *Enterococcus mundtii* QU25^a

Temperature (°C)	$\mu_{\max}^b$ (h ⁻¹)	Maximum cell mass (g/L)	Maximum L-lactic produced (g/L) at indicated time	L-lactic acid yield (%)	Maximum lactate productivity (g/L/h)
30	0.640	3.17	20.3 ± 0.57 (20 h)	104	2.54
37	0.662	2.88	20.2 ± 0.76 (20 h)	102	3.07
43	0.675	2.64	20.4 ± 0.63 (20 h)	104	3.44
45	0.400	1.72	17.9 ± 0.17 (16 h)	93.0	1.77
47	0.200	0.52	5.80 ± 0.02 (16 h)	103	0.46
50	0.136	0.36	3.05 ± 0.09 (24 h)	60.0	0.30

^aFermentations were carried out with pH-controlled at 7.0 with initial cellobiose concentration 20 g/L. Averages with standard deviations are based on three independent fermentations.

^bMaximum specific growth rate; ^cProduced lactic acid (g/L) per consumed sugar (g/L)

[0107] QU25は、乳酸産生及び乳酸収率に関して30～45℃の広い温度範囲にわたって良好な生物活性を示した。43℃において、20時間の培養ですべてのセルビオースが消費された。しかし、乳酸濃度は30～43℃でほぼ同じであったが、最大乳酸生産率は20℃での2.54 g/L/hから43℃での3.44 g/L/hまで、温度とともに上昇した。同様に、最大増殖速度も温度の上昇に伴って43℃での0.675 h⁻¹まで上昇した。細胞増殖は、高い温度ではセロビオース基質が枯渇した直後に死滅期に入り、一方、より低い温度では長い定常期を示した。45℃を超える高い温度では、QU25は良好な細胞増殖も高い乳酸産生も示さなかった。したがって、最適温度は43℃であると考えられる。

[0108] D. グルコース/セロビオース混合物からの乳酸発酵

結果を下表に示した。

[0109] [表4]

Lactic acid fermentation with mixture of glucose and cellobiose by *Enterococcus mundtii* QU25^a

Carbon source (g/L)	$\mu_{\max}^b$ (h ⁻¹)	$X_{\max}^c$ (g/L)	Maximum L-lactic acid (g/L) at indicated time	Yield of L-lactic acid to cell mass ^d (g/L/g _{DCW})	L-lactic acid yield (%)	Average volumetric productivity ^e (g/L/h)
Glucose Cellobiose						
10 10	0.668	3.04	18.9 ± 0.26 (6 h)	6.20	97.0 ± 0.036	3.15
15 15	0.850	3.40	26.9 ± 0.02 (10h)	8.14	96.0 ± .0007	2.58
20 20	0.620	3.62	35.02 ± 0.1 (15h)	10.1	93.0 ± 0.004	2.99

^a Fermentations were carried out at 43°C and pH 7.0. Averages with standard deviations are based on three independent fermentations.

^bMaximum specific growth rate; ^cMaximum produced lactic acid (g/L) per cell mass (g/L) at the indicated time; ^d Produced lactic acid (g/L) per consumed sugar (g/L); ^eDuring the exponential growth

[0110] 図3に、グルコース及びセロビオース濃度が各10 g/Lの場合の糖消費と乳酸生産を示した。QU25はセロビオースをグルコースと同じように消費し、発酵

は6時間以内に終了した。糖消費速度は、グルコース及びセロビオースについてそれぞれ1.69 g/L/h及び1.53 g/L/hで、ほぼ類似していた。

[0111] 糖混合物に関して、高濃度の乳酸が高収率で生産された。これらのデータは、QU25が糖混合物を単一の炭素源と同じように同時利用することを示唆している。

[0112] E. セロビオース濃度の影響

結果を下表に示した。

[0113] [表5]

Effect of sugar concentrations on lactic acid fermentation by <i>Enterococcus mundtii</i> QU25 ^a						
Initial sugar concentration (g/L)	μ_{max} (h ⁻¹)	Maximum cell mass (g/L)	Maximum L-lactic acid produced (g/L) at indicated time	L-lactic acid yield ^c (%)	Maximum L-lactic acid productivity (g/L/h)	Optical purity of L-lactic acid (%)
Cellobiose						
50.8	0.785	2.89	50.1±0.82 (20 h)	102	3.53	99.9
101	0.777	2.88	89.8±1.00 (72 h)	91.3	3.69	99.9
150.9	0.740	5.47	119±3.70 (106 h)	83.0	4.50	99.9
Glucose						
150	0.582	4.18	124±0.82 (120 h)	83.6	5.36	99.9

^aFermentations were carried out at 43°C and pH 7.0. Averages with standard deviations are based on three independent fermentations.

^bMaximum specific growth rate; ^cProduced lactic acid (g/L) per consumed sugar (g/L)

[0114] 図4にセロビオース濃度が150 g/Lである場合のプロファイルを示した。プロファイルは、基質濃度に伴って延長する発酵時間以外は、基質濃度が異なっても全般的に類似していた。興味深いことに、きわめて短い誘導期があり、その後、対数期においては細胞増殖速度は多かれ少なかれ同じであった。増殖挙動は、QU25の増殖に対する基質阻害作用がないことを示唆している。細胞増殖曲線は短い静止期を経過し、次いで死滅期に入った。

[0115] 50 g/Lのセロビオースについて、発酵は20時間でほぼ完了したが、100 g/Lを消費するにはさらに約50時間、150 g/Lを消費するには約76時間を要した。また、150 g/Lのグルコースについても150 g/Lのセロビオースとほぼ同様の発酵プロファイルを示した。

[0116] 以上から、乳酸発酵における基質阻害作用は無視しうると結論できる。

[0117] [実施例2：キシロースの影響]

(1) 方法

培地として、前述の実施例において使用したmMRS培地において、糖として

キシロースを補充したものを用いた。キシロース濃度は、リフレッシュの際は10 g/Lとした。また、pH制御及び温度の影響の検討の際には、ジャーファーマンター（1 L容のものを使用）を用い、最終キシロース濃度は166 mM（25 g/L）とした。また、334 mM（50.1 g/L）、480 mM（72.0 g/L）及び691 mM（103 g/L）の3つのレベルの最終キシロース濃度で発酵プロファイルを検討した。QU25の培養条件は、実施例1に準じた。

(2) 結果

A. pH制御及び温度の影響

結果を下表に示した。

[0118] [表6]

pH controlled	Temperature (°C)	X _{max} (g/L)	Maximum lactic acid production at the indicated time		Lactic acid yield (mol/mol) ^b	Lactic acid productivity ^c (mM/L/h)
			(mM) ± SD	(h)		
-	30	1.00	35.0 ± 0.07	24	1.05	1.45
6.0	30	1.60	66.0 ± 7.60	24	1.30	2.75
6.5	30	2.95	126 ± 15.0	24	0.89	5.25
7.0	30	3.27	131 ± 1.57	24	0.82	5.45
7.5	30	3.60	87.0 ± 1.17	24	0.54	3.62
7.0	37	3.27	141 ± 20.0	24	0.82	5.87
7.0	41	3.30	155 ± 2.90	24	0.82	6.45
7.0	43	3.22	200 ± 3.10	16	1.13	12.5
7.0	45	2.87	168 ± 0.70	16	1.04	10.5
7.0	47	0.33	15.0 ± 0.11	24	0.88	0.63

^aXylose concentration at the beginning of fermentation is 166 mM. Averages with standard deviations are based on three independent fermentations.

^bLactic acid produced (mole)/ consumed xylose (mole)

^cMaximum lactic acid produced/ the indicated time

[0119] 30℃では、pH 7.0で最も高い乳酸生産速度が観察された。pHを7.0とした場合には、30℃～43℃の範囲においては、温度が上昇するに従い、乳酸生産速度が高くなった。QU25は、キシロースをよく消費し、またキシロース消費の観点からも、pH 7.0、43℃付近での培養条件が適することが分かった。

[0120] B. キシロース濃度の影響

結果を下表及び図5に示した。

[0121]

[表7]

Lactic acid fermentation with high concentration of xylose by <i>Enterococcus mundtii</i> QU25 ^a								
Initial xylose concentration (mM)	Maximum cell mass (g/L)	Maximum lactic acid produced (mM)	Yield of products (mol-product/mol-consumed xylose)				Maximum specific productivity ^c (mmol/g [DCW] of cells per h)	Lactate/acetate (mol/mol)
			Lactic acid ^b	Acetic acid	Formic acid	Ethanol		
334	5.24	490	1.51±0.18	0.08±0.01	0.03±0.01	0.1±0.03	16.4	18.3
480	4.47	668	1.47±0.06	0.01±0.004	0.04±0.03	0.03±0.02	17.7	134
691	3.56	964	1.41±0.09	0.00	0.02±0.01	0.009±0.001	16.4	unlimited

^a Fermentations were done at 43°C and pH 7. Averages with standard deviations are based on three independent fermentations.

^b The maximum theoretical yield for lactic acid by pentose phosphate/glycolytic pathway (1.67 mol of lactic acid per mol of xylose).

^c Maximum specific productivity for lactic acid

^d Maximum lactic acid produced/ production time

[0122] 334 mM (50.1 g/L) (図5A)、480 mM (72.0 g/L) (図5B)及び691 mM (103 g/L) (図5C)の3つのレベルのキシロース濃度で発酵プロファイルを検討した。わずかな量の酢酸 (≦ 17 mM)、ギ酸 (≦13 mM)、及びエタノール (≦ 34 mM) の生成が観察されたに過ぎなかった。この現象はC5糖からの野生株を用いた乳酸発酵としてはきわめて珍しく、C5糖から高効率で乳酸が得られることを示している。

[0123] キシロース濃度が691 mMでは、生産速度や収率が減じた（データ示さず）。これは高い基質濃度による阻害によるものと理解された。高い糖濃度で発酵を行うことは、経済的な観点からは望ましいが、QU25による乳酸生産における現実的なキシロース濃度は、691 mMであると考えられた。

[0124] [実施例3：発酵様式に与えるキシロース濃度の検討]

当初の研究で、キシロース濃度がその発酵特性、すなわち乳酸などの生産物の割合に影響を与えていることが明らかとなっていたので、ここではその詳細を調べた。

(1) 方法

最適発酵条件であるpH 7.0、43°Cにおいて、キシロース濃度を変え、QU 25の回分培養を行った。

(2) 結果

結果を下表に示した。

[0125] [表8]

Effect of xylose concentration on lactate production by QU25

Initial concentration of xylose (g/l)	Products (g/l)				Yield coefficient of lactate (mol/mol-xylose consumed)
	Lactate	Acetate	Formate	Ethanol	
6.18	0.89	1.50	2.60	1.32	0.25
11.6	2.99	1.97	3.75	2.28	0.44
15.1	5.51	2.40	4.48	2.90	0.63
18.5	8.26	2.43	4.54	3.42	0.78
27.5	18.0	1.15	2.99	3.08	1.17
39.6	29.5	1.41	3.45	3.01	1.26
51.4	46.9	1.70	0.00	1.89	1.51
71.5	61.1	0.29	0.00	1.08	1.47
103	89.6	0.00	0.00	1.47	1.41
150	86.6	0.22	0.00	0.15	1.16

Culture condition: pH 7.0, 43°C

[0126] QU 25は基質濃度によって発酵収率が変化することが明らかとなった。すなわち、キシロース低濃度下では、副産物が生成され、乳酸の収率は低くなるが、キシロース高濃度下では、酢酸やギ酸といった副産物はほとんど生産されず、乳酸の収率は高い値を示した。

[0127] この結果より、QU 25を用いて、キシロース高濃度仕込みから高濃度のL-乳酸を副産物をほとんど伴わずに高収率で生産することができることが明らかとなった。

[0128] [実施例4：セロオリゴ糖の資化性試験]

(1) 方法

培地として、前述の実施例において使用したmMRS培地において、糖としてセロオリゴ糖 (Cellotriose 4.23 g/L、Cellotetraose 2.67 g/L、又は Cell opentose 3.64 g/L) を用いた。QU25は、mMRS-cellobiose培地で培養したものを、10%接種することにより培養を開始した。培養は、43 °C、初発 pH 7.0 (未制御)で行った。

(2) 結果

結果を下表に示した。

[0129]

[表9]

Utilization of celooligosaccharides by *Enterococcus mundtii* QU 25

	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	$X_{\max}$ (g/L)	Initial sugar (g/L)	Residual sugar (g/L)	Lactic acid produced (g/L)	Time of sampling (h)	Lactic acid yield (g/g)	Optical purity of lactic acid(%)
Cellotriose	0.44	0.96	4.23	0.90	3.30	14	0.99	100
Cellotetraose	0.38	0.56	2.67	0.75	2.03	6	1.05	100
Cellopentoase	0.16	0.26	3.64	3.12	0.55	14	0.80	99
Medium components	0.16	0.23	0.94	0.65	0.43	14		99

[0130] Medium componentsは糖源なしの培地を用いた系、 $\mu_{\max}$ は最大比増殖速度、 $X_{\max}$ は最大菌体量を表す。

[0131] 上表に示すように、セロトリオース（C6三糖）、セロテトラロース（C6四糖）及びセロペントース（C6五糖）を用いて資化性試験を行った結果、セロトリオース及びセロテトラロースから、約100%の収率でL-乳酸（光学純度、100%）を生産した。QU 25は、セロオリゴ糖を効率よく代謝し、L-乳酸を生産することが示された。

[0132] [実施例4：アラビノースの資化性実験]

QU 25株の、キシロースと同様のペントース（C5単糖）であるアラビノースの発酵特性について検討した。

[0133] 4-1. アラビノースから乳酸生産に及ぼすpHの影響

(1)方法

培地として、mMRSにアラビノース（200 mM）を添加したものをを用いた。培地に、mMRS-アラビノース培地で培養した増殖期にあるQU25を10%接種し、43℃で、培養開始時のpH 7.0でその後は制御せず、又はpH 6.0、6.5、7.0若しくは7.5に制御（10 M又は15 MのNaOHの自動添加による）して、培養した。

(2)結果

結果を下表に示した。

[0134]

[表10]

Batch fermentation with arabinose by *Enterococcus mundtii* QU25

pH	X _{max} (g/l)	μ _{max} (h ⁻¹)	Arabinose consumed (mM)	Lactate (mM)	Acetate (mM)	Formate (mM)	Ethanol (mM)	Yield coefficient of products (mol/mol)				P _{max} (mM/h)	Time (h)
								Lactate	Acetate	Formate	Ethanol		
No control	1.13	0.354	46.13	72.49±1.34	6.6±2.6	0	0	1.57±0.029	0.143	0	0.000	11.21	24
6	2.02	0.394	134.25	193.6±0.24	2.06±0.56	0	0	1.44±0.002	0.015	0	0.000	9.94	28
6.5	3.93	0.455	195.5	224.39±2.43	30.175±0.47	56.65±1.20	0	1.147±0.007	0.154	0.290	0.000	19.21	24
7	4.15	0.559	201.88	190.29±0.36	28.44±0.346	76.37±0.70	69.6±6.94	0.94±0.0003	0.141	0.378	0.345	17.94	24
7.5	3.60	0.536	199.1	149.73±1.01	64.42±0.75	136.7±0.52	70.8±7.48	0.75±0.003	0.324	0.687	0.687	17.22	24

[0135] pHを制御せず、43 °Cで培養した結果、アラビノースを約46 mM資化して約72 mMの乳酸を生産した。乳酸収率は1.57 mol/molであった。この高い乳酸収率は、PP/解糖系経路を経由する最大理論収率（1.67 mol/mol）に近い結果となった。また、ギ酸、酢酸などの副産物が少ないことから、低コストで乳酸精製を行うことができると考えられる。

[0136] pH 6.0で制御しながら培養すると、副産物が最も少なく、約193 mMの乳酸を生産した。このときの乳酸収率は、1.44 mol/molであった。最大菌体量は、pH 6.5から7.5までで得られた量より少なかった。一方、pH 6.5で培養した結果、乳酸生産量は、224 mMであり、最も高かったが、同時に高い濃度の副産物も生産された。さらに、pH 7.0以上での培養では、副産物の産生が多くなり、乳酸収率が大きく低下した。このような観点から、pH 6.0又は6.5に制御するとよいと考えられる。

[0137] 4-2. アラビノース濃度の検討

(1) 方法

4-1と同様、mMRS-アラビノース培地で培養した増殖期にあるQU25を10%接種し、43 °Cで、pHを6.5又は6.0に制御して培養した。培地のアラビノース濃度は、107.6、199.55、202.14、326、477.02、606.93 mMとした。

(2)結果

pHを6.5に制御した場合の結果を下表に示した。

[0138] [表11]

Effect of arabinose concentration on lactate production by QU 25 (pH-controlled at 6.5)

Arabinose Conc. (mM)	X _{max} (g/l)	μ _{max} (h ⁻¹)	Arabinose consumed (mM)	Lactate (mM)	Acetate (mM)	Formate (mM)	Ethanol (mM)	Yield coefficient of products(mol/mol)				P _{max} (mM/h)	Time (h)
								Lactate	Acetate	Formate	Ethanol		
107.6	2.16	0.41 ₄	101.42	111.03	19.67±0.27	0	0	1.09	0.196	0	0	5.75	36
199.55	3.24	0.58 ₇	192.26	248.6±4.38	17.42±1.41	27.82±0.37	0	1.29	0.09	0.14	0	16.18	36
202.14	3.93	0.45 ₅	195.5	224.39±2.43	30.175±0.47	56.65±1.20	0±0.00 ₇	1.147	0.154	0.290	0.000	19.21	24
326	3.76	0.68 ₉	318.3	452.3	9.58±0.12	38.91±0.307	0	1.41	0.03	0.12	0	30.4	31
477.02	3.59	0.37 ₈	455.7	593.2	0	0	0	1.32	0	0	0	26.77	72
606.93	3.61	0.34 ₄	590.73	763.1	0	0	0	1.29	0	0	0	29.48	96

[0139] pH 6.5で培養を行った結果、初発濃度606.9 mMのアラビノースから763 mMの乳酸を生産した。副産物を生産せず、乳酸の対アラビノース収率は1.29 mol/molであった。しかしながら、326 mM以下のアラビノース濃度では、副産物が生産された。主に、ギ酸が副生されたことから、PP/解糖系経路がアラビノースの主な代謝経路であることを示唆された。

[0140] この結果から、QU 25株での代謝とその制御は同じペントースであるキシロースとアラビノースでは異なることが予想される。

[0141] pH 6.0で培養を行った結果を下表に示した。

[0142]

[表12]

Effect of arabinose concentration on lactate production by QU 25 (pH-controlled at 6.0)

Arabinose Conc. (mM)	X _{max} (g/l)	μ _{max} (h ⁻¹)	Arabinose consumed (mM)	Lactate (mM)	Acetate (mM)	Formate (mM)	Ethanol (mM)	Yield coefficient of products(mol/mol)				P _{max} (mM/h)	Time (h)
								Lactate	Acetate	Formate	Ethanol		
208.82	2.02	0.394	134.25	193.6±0.24	2.06±0.56	0	0	1.44±0.002	0.015	0	0.000	9.94	28
211.82	2.09	0.374	204.96	278.3	0.07	0	0	1.36	0.07	0	0	12.15	72
329.4	4.04	0.668	318	445.14	0	0	0	1.39	0.000	0.000	0.000	37.81	32
478.53	0.98	0.121	95.86	109.55	0	0	0	1.14	0.000	0.000	0.000	8.66	72
604.53	0.498	0.081	100.5	120.66	0	0	0	1.20	0.000	0.000	0.000	5.6	108

[0143] 初発濃度329.4 mMのアラビノースから445.14 mMの乳酸を生産した。副産物を生産せず、1.39 mol/molの収率であった。しかし、より高いアラビノース濃度 (>329 mM) では、基質阻害により、アラビノース消費と乳酸生産の両方に著しい減少が見られた。Table 2-5のpH 6.5での培養挙動と明らかに異なるものであり、6.0と6.5という僅かに異なるpH制御値によって大きく代謝が変化する興味深い発酵現象であった。

[0144] [実施例5:糖混合物からの乳酸生産]

A. グルコース/キシロース混合物

グルコース:キシロースの重量比2:1の混合物からの乳酸発酵について検討した。発酵はいずれも、43℃、pH7.0に制御下 (10 M又は15 MのNaOHの自動添加) で実施した。

[0145] 結果を下表に示した。また、初発グルコース濃度40 g/Lにおける培養結果を図7に示した。

[0146]

[表13]

Lactate Production from Glucose/Xylose Mixture

Carbon source		μ_{max}^a	X_{max}^b	Lactic acid (g/l)	Lactate	Maximum	$C_{acetate}$	$C_{ethanol}$
(g/l)		(h ⁻¹)	(g/l)	at indicated	yield	P_{LA}	$C_{formate}$	(g/l)
Glucose	Xylose			time (h)	(g/g)	(g/l/h)		
20	10	0.481	2.38	25.3 (48h)	0.842	3.57	1.01, 1.01, 0.0	
30	15	0.571	3.11	37.6 (48h)	0.830	3.60	0.00	
40	20	0.550	2.86	47.9 (72h)	0.750	3.50	0.00	

^a Maximum specific growth rate;^b Maximum cell mass

[0147] QU 25は、いずれの濃度においても、同じように糖を消費した。副産物はなく、光学純度も高かった。

[0148] B. グルコース/キシロース/セロビオース混合物

本実施例のAと同様に、ただしさらにセロビオースを添加して、混合物からの乳酸発酵について検討した。

[0149] 結果を図8に示した。グルコース及びセロビオースが迅速に消費された。有力なセルラーゼインヒビターでもあるセロビオースの迅速な消費は、セルロースやヘミセルロースを多く含むバイオマスからの商業的な乳酸生産において、非常に有利であると考えられる。

[0150] また、キシロースのみを炭素源として、低い濃度 (<25 g/L) 用いた場合には、少量の副産物の生成がみられたが、他の糖と混合して用いた場合には、副産物の生成が顕著に減少した (図9)。

[0151] [実施例6: QU25による非滅菌反復発酵]

本発明者らの検討によると、他の乳酸菌と比較して、QU25は熱耐性株であり、非滅菌発酵において使用可能であることが分かっている。

[0152] 本実施例では、QU25を用いて、非滅菌条件下で、反復回分発酵を試みた。

[0153] (1)方法

リフレッシュし、そして前培養 (MRS-20 g/Lグルコース) したQU25を、43 °Cで、培養した。pHは7.0に制御した。中和には、1~7回分に関しては、10 N NaOH、8~12回分に関しては、15 N NaOHを用いた。

[0154] 12回分すべてで、培地を滅菌しなかった。各回分 (実行/周期) 終了時に遠

心分離によって細胞を収集し、そして次の回分（実行）に10%接種したが、例外として、回分6では接種は14%とした。

[0155] 開放反復発酵を12周期行った。周期1～10、及び12は回分培養であり；周期11のみ流加培養とした。各回分の培養時間は、培養条件次第で多様であった。

[0156] 最初の5回の実行では、100 g/Lグルコースを含むmMRS培地を用いて、L-乳酸産生に対する回分反復の影響を調べた。回分6では、14%より高い細胞密度を用いて、最初の5回の回分で用いたのと同じ栄養が、より高い初期細胞密度の増殖を補助しうるかどうかを試験した。

[0157] 回分7～10では、5、10、及び各実行で言及するような多様なグルコース濃度を用いることによって、栄養必要条件を研究した。回分11では、流加回分を行って、より高い基質濃度を用いた。回分12では、混合糖発酵を行った。

[0158] [表14]

培養条件の要約	
回分1～6:	mMRS培地に、100 g/Lグルコースを添加
回分7:	貧栄養mMRS; 5 g/L酵母エキス（ペプトン不含、牛肉エキス不含）及び100 g/Lグルコースを添加
回分8:	貧栄養mMRS; 5 g/L酵母エキス（ペプトン不含、牛肉エキス不含）及び130 g/Lグルコースを添加
回分9:	貧栄養mMRS; 10 g/L酵母エキス（ペプトン不含、牛肉エキス不含）及び130 g/Lグルコースを添加
回分10:	mMRS培地に、130 g/Lグルコースを添加
流加培養11:	mMRS流加培養; 初期グルコース、100 g/L; 発酵開始4時間後、50 g/L増加となるようにグルコースを供給
回分12:	45 g/Lグルコース及び37.5 g/Lキシロース（当モル比）による、混合糖発酵

[0159] (2) 結果

結果を下表に示した。

[0160]

[表15]

Kinetic parameters of open fermentative production of lactic acid with *E. mundtii* QU 25

Batch number	Initial sugar (g/L)	Maximum DCW (g/l)	L- lactic acid (g/l)	Time (h)	L-Lactic acid Yield (g/g)	Productivity $P(g/h)^*$	Maximum productivity $P_{max}(g/h)$	Optical purity (%)	Residual sugar (g/l)
Glucose									Glucose
1	100	3.49±0.006	79.4±0.27	36	0.84	2.21	3.01	99.4	4.69
2	100	5.23±0.006	80.2±0.49	24	0.78	3.34	3.99	99.0	0.00
3	100	9.56±0.012	82.6±0.17	10	0.78	8.26	9.33	99.3	0.00
4	100	13.6±0.037	81.6±0.47	6	0.77	13.6	16.6	99.5	2.32
5	100	15.4±0.037	84.1±0.81	6	0.83	14.0	12.3	99.9	3.60
6	100	17.6±0.012	84.5±1.04	6	0.76	14.1	16.7	99.6	2.16
7	100	13.0±0.012	84.9±0.91	8	0.81	10.61	14.5	99.4	4.98
8	130	11.3±0.012	105.9±0.18	20	0.88	5.29	13.2	99.3	12.5
9	130	12.1±0.025	115.8±0.13	19	0.91	6.09	8.49	99.5	2.79
10	130	13.1±0.00	114.7±0.14	14	0.90	8.19	9.95	99.5	4.54
11	150	13.5±0.24	131.6±1.34	17	0.85	7.74	12.6	99.5	5.50
Glucose/xylose									Glu/Xylose
12	45/37.5	13.9±0.024	69.7±.40	15	0.82	4.64	15.2	99.1	0.0/12.3

*These data is depending on real glucose concentration that was added to the medium (i.e. 100 or 130 or 150 g/l), and depending on at real lactic acid concentration at o time (0 g/l)

*Note that, the lactate concentration appeared at zero time is due to high speed consumption of glucose and its conversion to lactic acid in the first few minutes during the preparation of each batch until sampling time (Just Few minutes)

[0161] 最初の6回分では、乳酸生産性は、細胞密度が増加するにつれて次第に増加した（図10）。乳酸生産性は、第一の回分の2.21 g/L/時間から、回分番号6の14.1 g/L/時間まで有意に増加した。乳酸収率は～80%でほぼ同じであった（上表）。

[0162] 回分7では、5 g/Lの酵母エキスのみ（mMRS培地の4 g/L酵母エキス+10 g/Lペプトン+8 g/L牛肉エキスの代わりに）を用いることによって、乳酸産生及び生産性に対する栄養条件の影響を研究した。興味深いことに、初期細胞密度が先の回分（すなわち回分4～6）より低いにもかかわらず、先の回分と同じ収率で、わずかにより高いレベルの乳酸が産生された（図12）。

[0163] さらに興味深いことに、先の回分と同じ培地（5 g/Lの酵母エキスのみを添加）とともに、より高い濃度の基質を添加することによって（回分8）、乳酸収率及び産生レベルが改善された。対照的に、乳酸生産性は有意に半分まで減少した（すなわち10.61 g/L/h～5.29 g/L/h）（上表及び図13）。

- [0164] 回分9において、同じ初期グルコース濃度（130 g/L）で、10g /Lの酵母エキスを（5g/Lの代わりに）を用いた。乳酸濃度、収率、及び生産性がわずかに改善されることが見出された（上表）。
- [0165] 窒素供給源として少量の酵母エキスのみ（5g/L）を用いた場合、発酵中に細胞密度が次第に減少する一方、MRS培地の4g/L酵母エキス+10g/Lペプトン+8g/L牛肉エキスでは、細胞密度が増加することがわかった（図11）。
- [0166] 回分10において、130g/Lグルコースを含むMRSを用いた。すべての発酵パラメータが増加した（上表）。0.90 g/gの収率及び8.19 g/L/hの高い生産性で、114.7 g/Lの乳酸を得ることができた（図13）。
- [0167] 発酵様式を周期（実行）番号11で流加培養に変更した。それぞれ、7.74 g/L/h及び0.85 g/gの高い生産性及び収率で、144.5 g/Lグルコースから131.6 g/Lの乳酸を得ることができた（図14）。
- [0168] 最後に、当モル比で、混合糖（グルコース及びキシロース）を用いた。興味深いことに、乳酸は、0.82 g/gの高収率及び4.64 g/L/hの高生産性で、ホモ発酵的に産生された。
- [0169] 乳酸の光学純度は、すべての培養区で高く維持された（ $\geq 99\%$ ）（上表）。
- [0170] 本実施例のデータは、光学的に純粋な乳酸産生に関する、乳酸菌を用いた反復開放回分の能力を立証する最初の報告である。QU25を用いた開放反復回分は、発酵能のいかなる喪失も伴わずに、12周期に関して、成功裡に実行された。

請求の範囲

- [請求項1] (1) 光学純度が99.0%以上（好ましくは99.5%以上、より好ましくは99.75%以上、更に好ましくは99.9%以上）であるL-乳酸を生産可能であり；かつ
- (2) 20g/Lのセロビオースを含む培地で、pH 7.0、43℃で20時間以上培養したときに、20g/LのL-乳酸を生産可能である、
エンテロコッカス・ムンヅティ (Enterococcus mundtii) に属する乳酸菌。
- [請求項2] 下記の菌学的性質を有する、乳酸菌：
1. 形態：球菌である。
 2. 生化学的性質：カタラーゼ陰性である。
 3. 運動性：なし
 4. 酸素要求性：通性嫌気性である。
 5. グルコースを基質としてホモ乳酸発酵によりL-乳酸を産生する。
 6. 下記の糖資化性を有する。
- [表1]

Sugar		Sugar	
Glycerol	+	Salicine	+
Erythriol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
D-Ribose	+	Melobiose	+
D-Xylose	+	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
α -Methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Starch	$\pm$
Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	α -Gentibiose	+
Rhamnose	+	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α -Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α -Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	+	2-Keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-Keto-gluconate	-
Esculine	+		

+ 資化する、一資化しない

- [請求項3] 配列表の配列番号：1で示されるヌクレオチド配列、又はそれと99.5%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる16SrRNA遺伝子を有する、請求項1又は2に記載の乳酸菌。
- [請求項4] Enterococcus mundtii NITE ABP-965である、請求項1～3のいずれか1項に記載の乳酸菌。
- [請求項5] バイオマス原料を炭素源とし、請求項1～4のいずれか1項に記載の乳酸菌により、乳酸を生産する工程を含む、L-乳酸の製造方法。
- [請求項6] バイオマス原料が、非食用バイオマスである、請求項5に記載の製造方法。
- [請求項7] 請求項2に定義した乳酸菌を、グルコース及びセロビオースを基質として含む環境（medium）で培養して、L-乳酸を発酵生産させる工程を含む、L-乳酸の製造方法。
- [請求項8] 環境が、キシロースを含むものである、請求項7に記載の製造方法

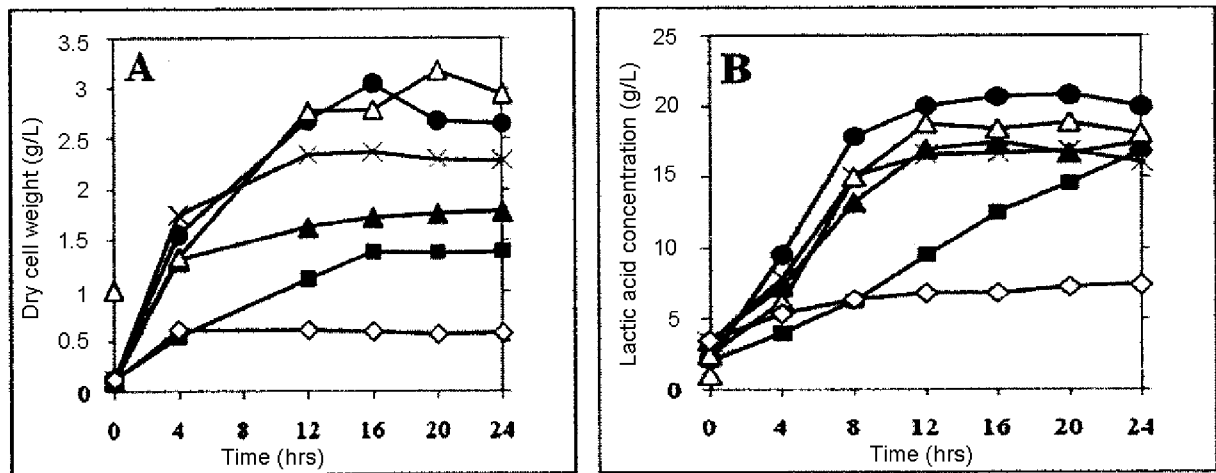
。

[請求項9] 環境のpHを、6.0以上7.5未満に制御しながらL-乳酸を培養する、請求項7又は8に記載の製造方法。

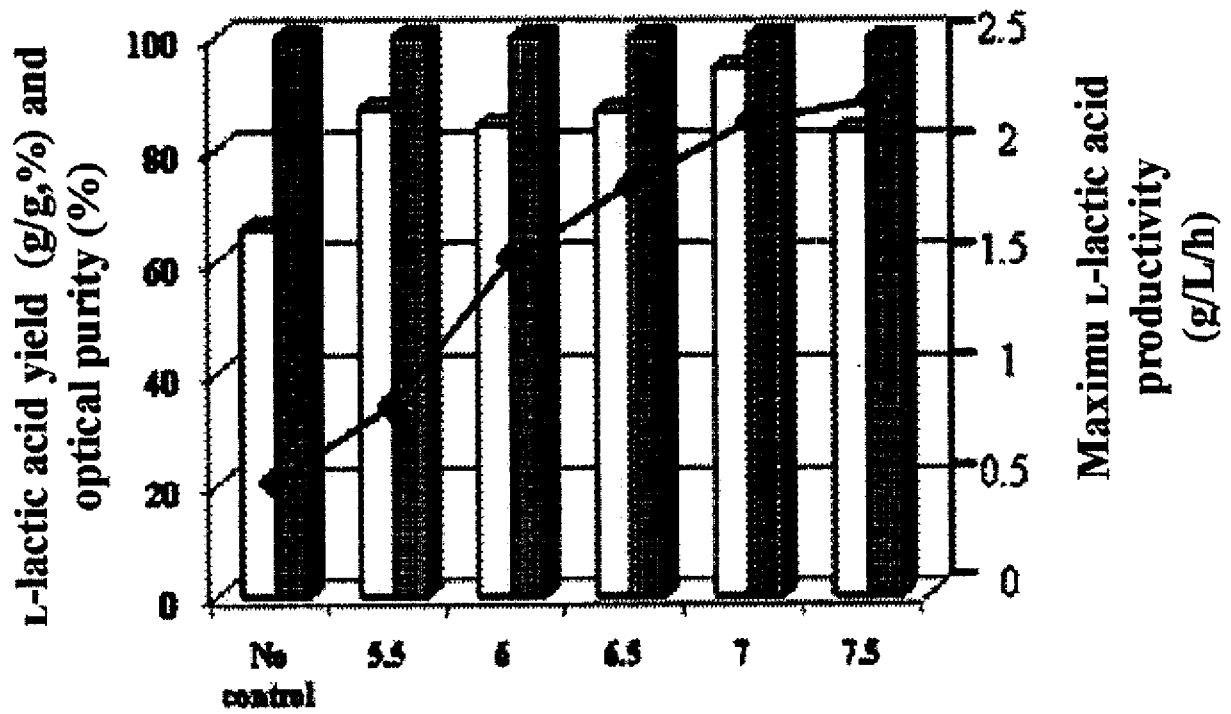
[請求項10] グルコース、セロビオース及び／又はキシロースが、非食用バイオマスの酵素による糖化により生成したものであり、酵素による糖化と乳酸菌による発酵とを同時に実施するものである、請求項9に記載の製造方法。

[請求項11] 請求項5～10のいずれか1項に定義されたL-乳酸の製造のための工程、及びL-乳酸を重合する工程を含む、ポリL-乳酸の製造方法。

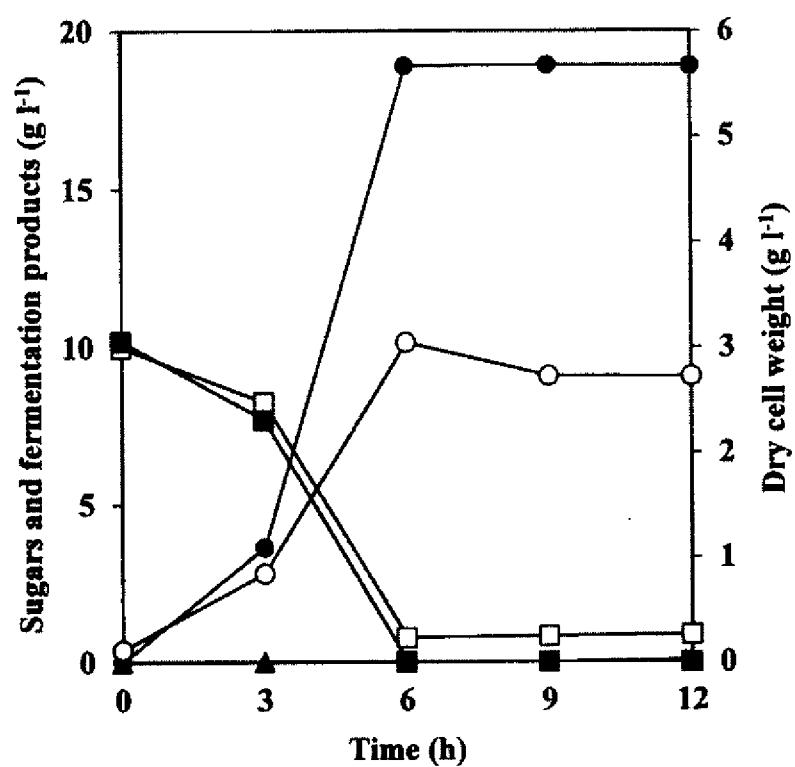
[図1]



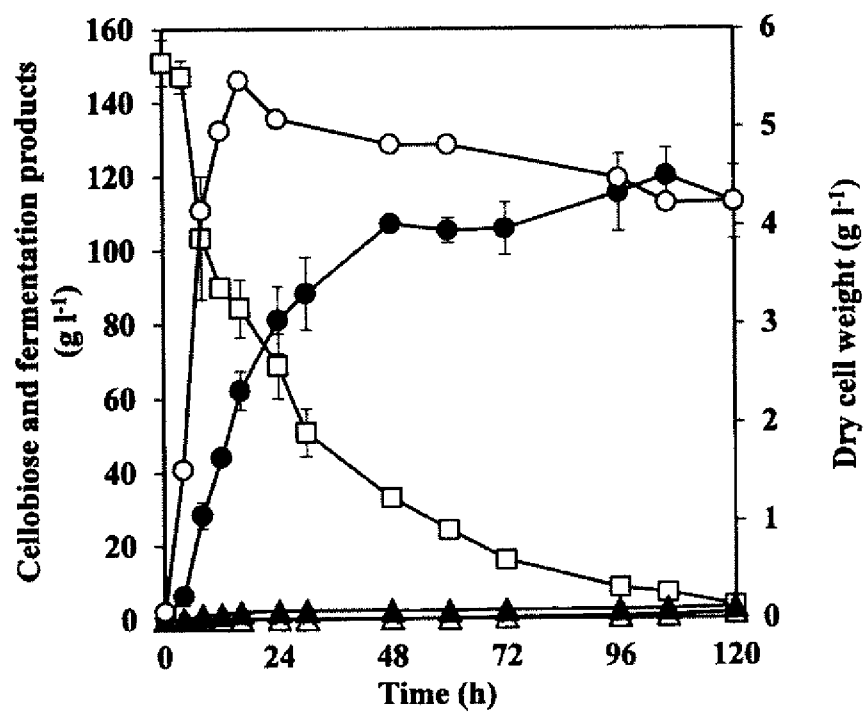
[図2]



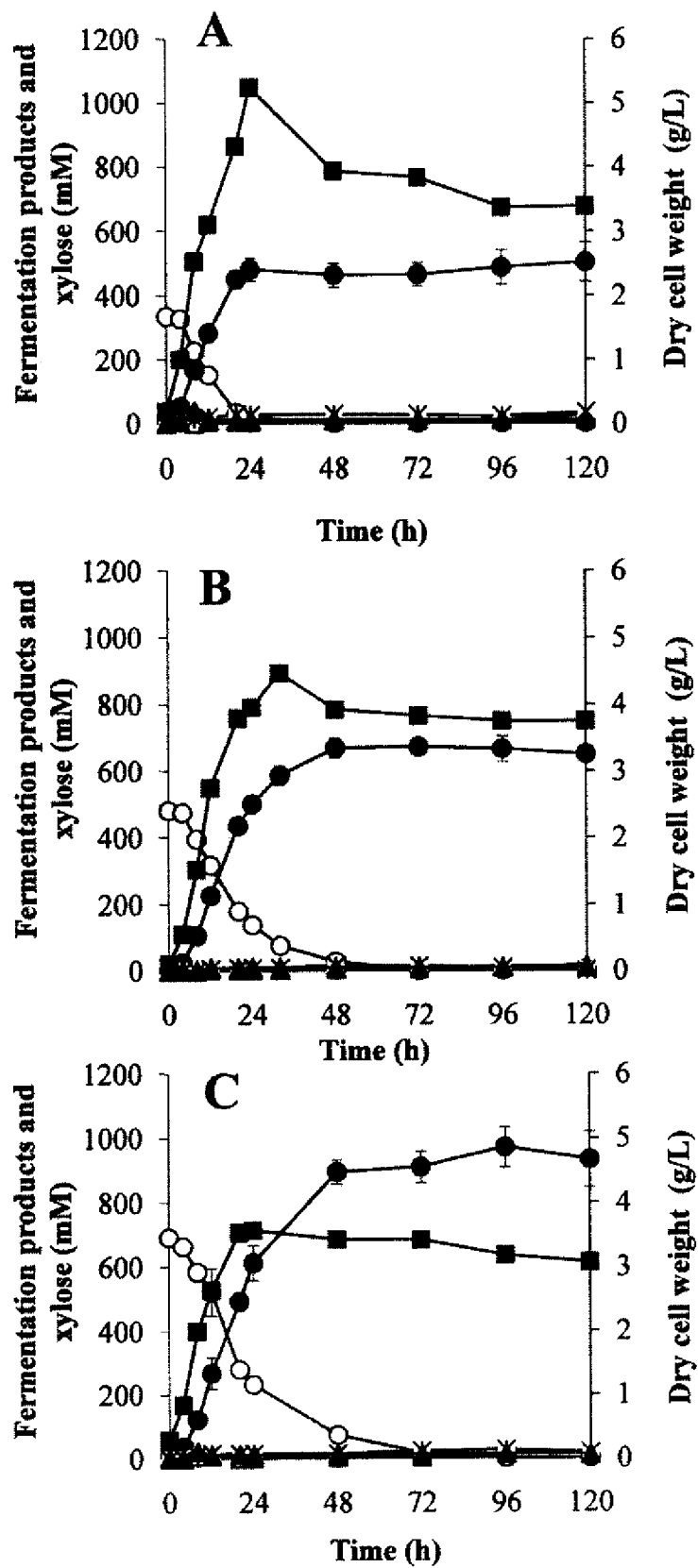
[図3]



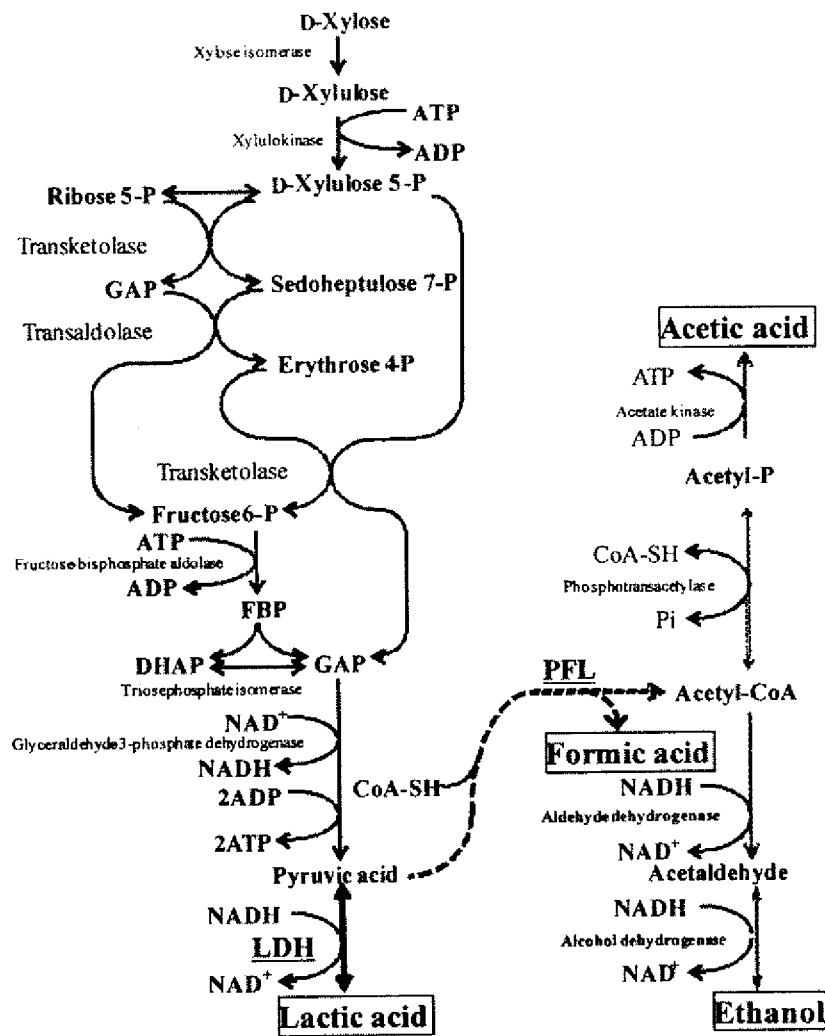
[図4]



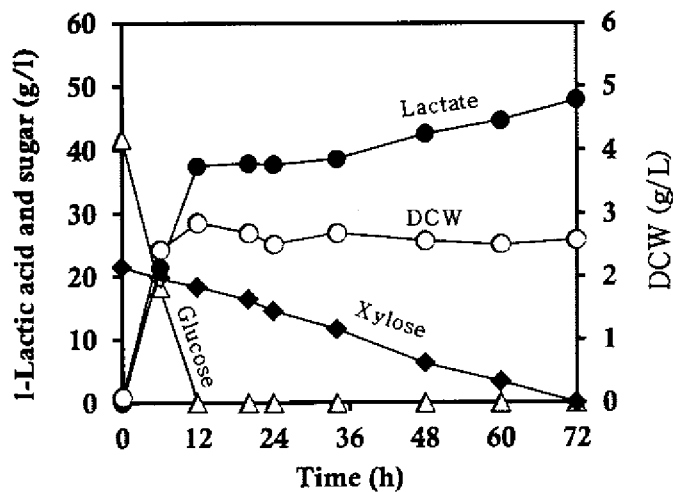
[図5]



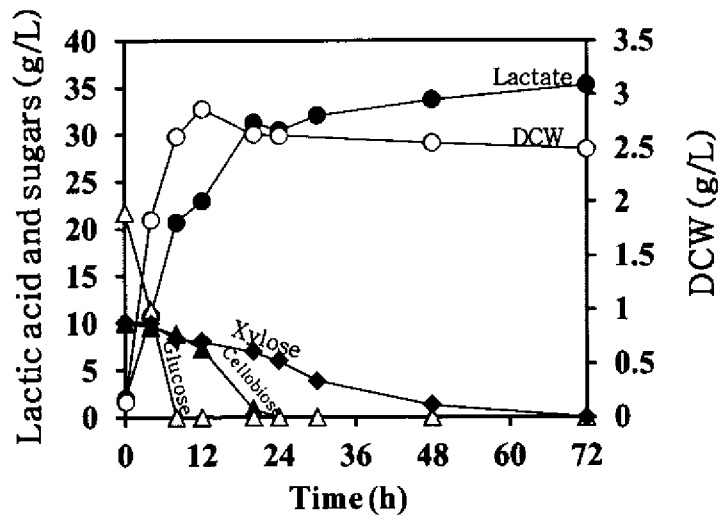
[図6]



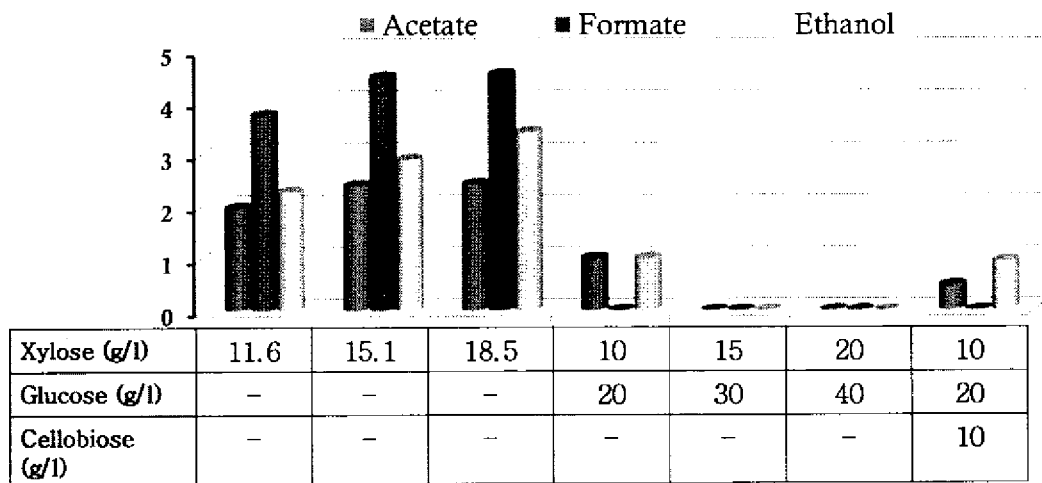
[図7]



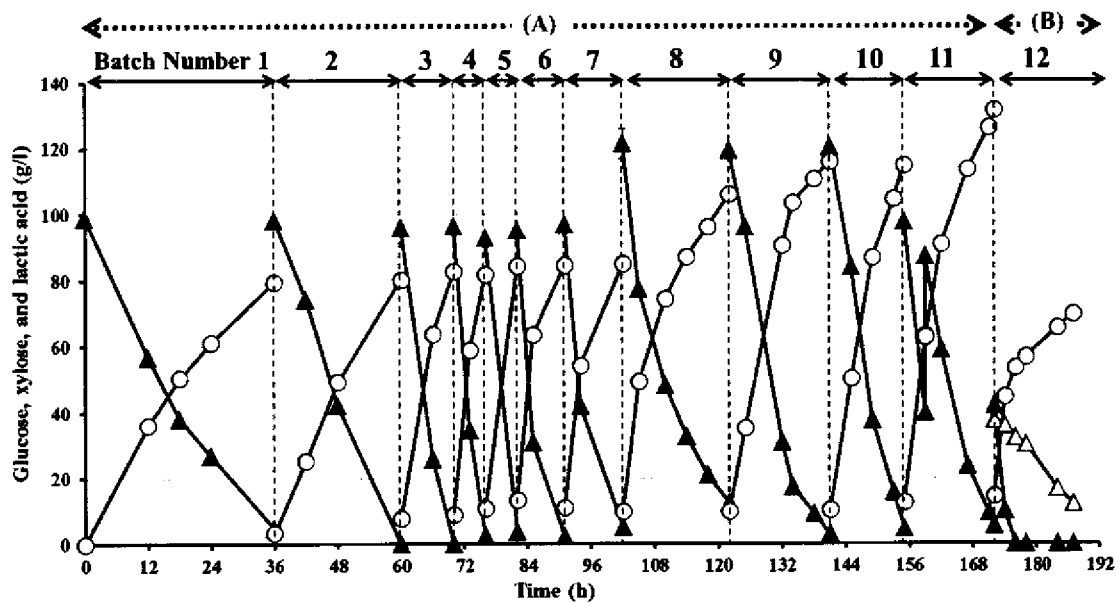
[図8]



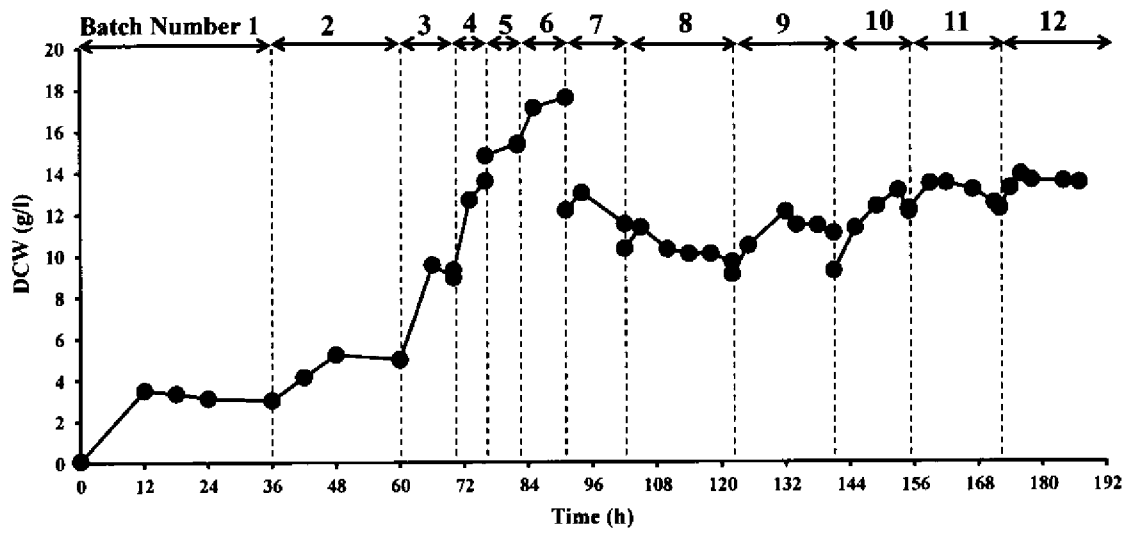
[図9]



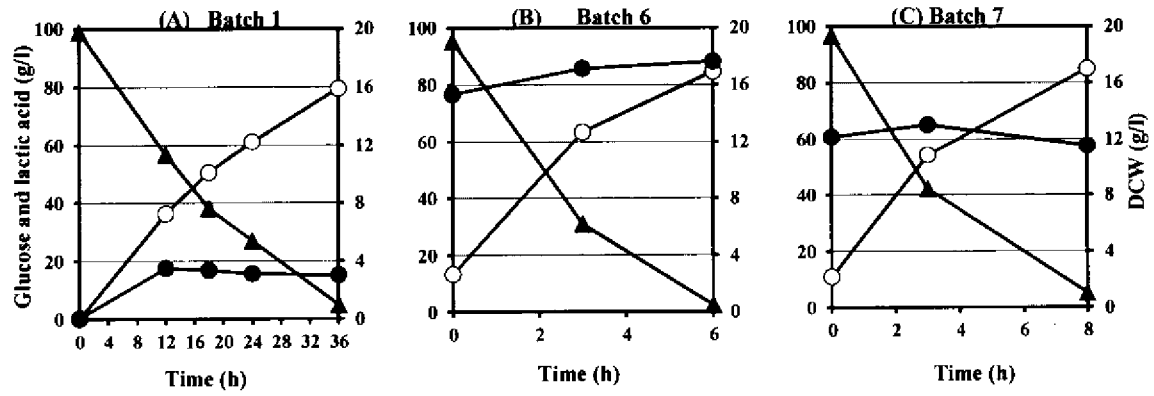
[図10]



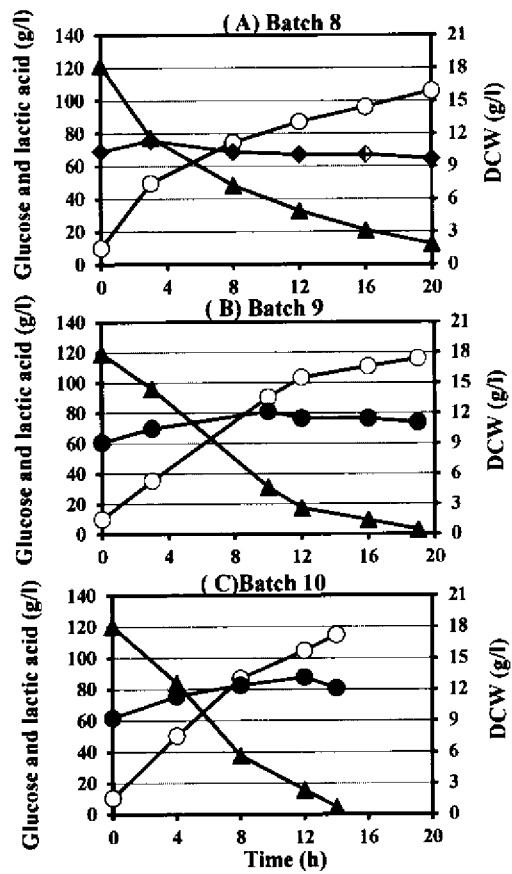
[図11]



[図12]

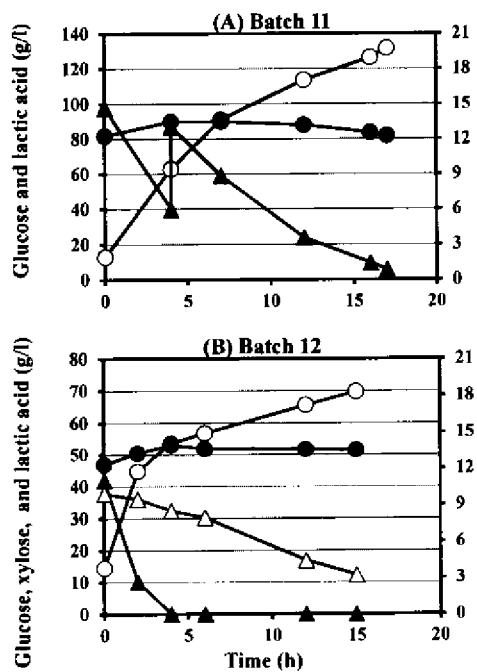


[Fig. 13]



7

[Fig. 14]



[図15]

配列番号: 1

TGGCGAACGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTT
TCGTTTTGAAAGGCGCTTTACGGTGCCGCTGATGGATGGACCCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCG
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCG
AGCAACGCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAGAGAAGAACAGGGTGAGAGTAACTGTTCACCCCTTGACGGTATCTAA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATAAGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTC
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT
GAAATCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACAGCTGAGGCTCGAAACCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGG

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/20(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/56(2006.01)i, C12P7/62
(2006.01)i, C12R1/01(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/20, C12N15/09, C12P7/56, C12P7/62, C12R1/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAI, Y., Identification and characterization of Enterococcus species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation., J. Dairy Sci., 1999.11, Vol.82, No.11, pp.2466-71, ABSTRACT/TABLE 2	1-11
A	JP 9-135681 A (San-Ei Sucrochemical Co., Ltd.), 27 May 1997 (27.05.1997), paragraphs [0012], [0032] (Family: none)	1-11
P, X	ABDEL-RAHMAN, M.A. et al., Isolation and characterisation of lactic acid bacterium for effective fermentation of cellobiose into optically pure homo L-(+)-lactic acid., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011.02, Vol.89, No.4, pp.1039-49, entire text	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 October, 2011 (06.10.11)

Date of mailing of the international search report
18 October, 2011 (18.10.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066253

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	ABDEL-RAHMAN, M.A. et al., Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, <i>Enterococcus mundtii</i> QU 25., <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 2011.03, Vol.77, No.5, pp.1892-5, entire text	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/20(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/56(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i, C12R1/01(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/20, C12N15/09, C12P7/56, C12P7/62, C12R1/01

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	CAI, Y., Identification and characterization of Enterococcus species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation., J. Dairy Sci., 1999.11, Vol.82, No.11, pp.2466-71, ABSTRACT/TABLE 2	1-11
A	JP 9-135681 A (サンエイ糖化株式会社) 1997.05.27, 【0012】【0032】 (ファミリーなし)	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 1 0 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

1 8 . 1 0 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

幸田 俊希

4 N

4 6 7 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	ABDEL-RAHMAN, M. A. et al., Isolation and characterisation of lactic acid bacterium for effective fermentation of cellobiose into optically pure homo L-(+)-lactic acid., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011.02, Vol.89, No.4, pp.1039-49, 全文	1-11
P, X	ABDEL-RAHMAN, M. A. et al., Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, Enterococcus mundtii QU 25., Appl. Environ. Microbiol., 2011.03, Vol.77, No.5, pp.1892-5, 全文	1-11