

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4197754号  
(P4197754)

(45) 発行日 平成20年12月17日(2008.12.17)

(24) 登録日 平成20年10月10日(2008.10.10)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 P 7/46 (2006.01)**  
**C 1 2 P 7/56 (2006.01)**  
**C 1 2 R 1/13 (2006.01)**  
 C 1 2 P 7/46  
 C 1 2 P 7/56  
 C 1 2 P 7/46  
 C 1 2 R 1:13  
 C 1 2 P 7/56

請求項の数 3 (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-276944	(73) 特許権者	000005968
(22) 出願日	平成9年10月9日(1997.10.9)		三菱化学株式会社
(65) 公開番号	特開平11-113588		東京都港区芝4丁目14番1号
(43) 公開日	平成11年4月27日(1999.4.27)	(74) 代理人	100103997
審査請求日	平成14年6月20日(2002.6.20)		弁理士 長谷川 暁司
審判番号	不服2006-76(P2006-76/J1)	(72) 発明者	後藤 誠
審判請求日	平成18年1月4日(2006.1.4)		茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号
			三菱化学株式会社筑波研究所内
微生物の受託番号	FERM BP-1497	(72) 発明者	小林 幹
微生物の受託番号	FERM BP-1498		茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号
			三菱化学株式会社筑波研究所内
		(72) 発明者	寺沢 真人
			茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号
			三菱化学株式会社筑波研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳酸又はコハク酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

炭酸塩又は重炭酸塩を添加して調製した反応液であって、これらの塩から炭酸イオン又は重炭酸イオンが供給される反応液中で、プレバクテリウム属又はコリネバクテリウム属に属する好気性コリネ型細菌又はその処理物を、溶存酸素濃度0～0.1ppmの嫌気的条件下でグルコースに作用させることを特徴とする乳酸又はコハク酸の製造方法。

【請求項2】

反応液を密閉容器に収容し、かつ無通気とすることにより、コリネ型細菌又はその処理物を嫌気的条件下でグルコースに作用させることを特徴とする請求項1記載の乳酸又はコハク酸の製造方法。

【請求項3】

反応液を密閉容器に収容し、かつ不活性ガスを供給することにより、コリネ型細菌又はその処理物を嫌気的条件下でグルコースに作用させることを特徴とする請求項1記載の乳酸又はコハク酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は乳酸又はコハク酸の製造方法に関する。詳しくは、好気性コリネ型細菌又はその処理物を用いて、乳酸又はコハク酸を製造する方法に関する。

【0002】

## 【従来の技術】

従来より、好気性コリネ型細菌は、アミノ酸、有機酸等の有用物質の製造に広く用いられている。これらの有用物質の製造においては、微生物を増殖させる発酵法や、培養後に菌体を回収し、反応させる菌体反応方法、或いは菌体を破碎して得られた酵素を用いる酵素反応方法等いろいろな方法が用いられている。

好気性コリネ型細菌を利用して有用物質を製造する場合、例えば発酵法によるグルタミン酸の生産等のように、発酵槽内に、空気又は酸素を供給しながら、即ち、いわゆる好気的条件下で反応が行われている。

## 【0003】

## 【発明が解決しようとする課題】

好気性コリネ型細菌を好気的条件下で用いる従来の方法は、多くのアミノ酸、有機酸等の生産には有効であるが、乳酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸等の或る種の有機酸の製造においては必ずしも有効ではなく、好気性コリネ型細菌を用いてこれらの化合物を効率よく製造する方法は今まで知られていない。

本発明は、好気性コリネ型細菌を用いて乳酸又はコハク酸を効率よく且つ高収率で製造する方法を提供することを目的とする。

## 【0004】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、好気性コリネ型細菌又はその処理物を嫌氣的に有機原料に作用せさせることにより、乳酸又はコハク酸を迅速に効率よく生産することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0005】

即ち、本発明の要旨は、炭酸塩又は重炭酸塩を添加して調製した反応液であって、これらの塩から炭酸イオン又は重炭酸イオンが供給される反応液中で、ブレビバクテリウム属又はコリネバクテリウム属に属する好気性コリネ型細菌又はその処理物を、溶存酸素濃度0～0.1ppmの嫌氣的条件下でグルコースに作用させることを特徴とする乳酸又はコハク酸の製造方法、にある。

## 【0006】

## 【発明の実施の形態】

本発明に用いられる好気性コリネ型細菌又はその処理物については、通常の好気的条件下で増殖可能なコリネ型細菌又はその処理物であれば特に限定はされない。

その具体例としては、例えば、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属等のコリネ型細菌又はその処理物が挙げられる。これらの中、特にブレビバクテリウム フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (受託番号 FERM BP-1497)、同 MJ-233-AB-41 (受託番号 FERM BP-1498)、ブレビバクテリウム アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC 6872、コリネバクテリウム グリタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831、ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869 等のコリネ型細菌又はその処理物が好適に用いられる。

## 【0007】

また、その処理物とは、例えば、菌体をアクリルアミド、カラギーナン等で固定化した固定化菌体、菌体を破碎した破碎物を指す。

なお、好気性コリネ型細菌を本発明の方法に用いるためには、先ず菌体を通常の好気的条件下で培養した後用いることが好ましい。培養に用いる培地は、通常微生物の培養に用いられる培地を用いることができる。例えば、硫酸アンモニウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム等の無機塩からなる組成に、肉エキス、酵母エキス、ペプトン等の天然栄養源を添加した一般的な培地を用いることができる。

培養後の菌体は、遠心分離、膜分離等によって回収し、次に示す反応に用いられる。

10

20

30

40

50

## 【0008】

反応液としては、水、緩衝液、培地等が用いられるが、適当な無機塩を含有した培地が最も好ましい。培地には、例えばグルコース、エタノール等の有機原料と、炭酸塩又は重炭酸塩を含有させ、これらから供給される炭酸イオン、重炭酸イオンの存在下に、嫌気の条件で反応させることが特徴である。本発明に用いられる有機原料としては、特に限定されることなく、目的とする有機酸に応じて一般的な有機原料から選択することができる。具体的には、安価であり、目的の有機酸の生成速度の速いグルコースやエタノールが好適に用いられる。この場合、グルコースの添加濃度は、 $0.5 \sim 500 \text{ g/l}$  が好ましく、エタノール添加濃度は、 $0.5 \sim 30 \text{ g/l}$  が好ましい。

## 【0009】

炭酸塩又は重炭酸塩の具体例としては、例えば炭酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等が挙げられる。これらの塩は、炭酸イオン、重炭酸イオンが、 $1 \sim 500 \text{ mM}$ 、好ましくは $2 \sim 300 \text{ mM}$ 、さらに好ましくは $3 \sim 200 \text{ mM}$ の濃度となるように添加する。

## 【0010】

また、本発明にいう嫌気的条件とは、溶液中の溶存酸素濃度を低く抑えて反応させることを指す。この場合、溶存酸素濃度として $0 \sim 2 \text{ ppm}$ 、好ましくは $0 \sim 1 \text{ ppm}$ 、さらに好ましくは $0 \sim 0.5 \text{ ppm}$ で反応させることが望ましい。そのための方法としては、例えば容器を密閉して無通気で反応させる、窒素ガス等の不活性ガスを供給して反応させる、炭酸ガス含有の不活性ガスを通気する等が用いられる。

反応の温度は、通常 $15 \sim 45$ 、好ましくは $25 \sim 37$ で行う。pHは、 $5 \sim 9$ 、好ましくは $6 \sim 8$ の範囲で行う。反応は、通常5時間から120時間行う。反応に用いる菌体の量は、特に規定されないが、 $1 \sim 700 \text{ g/l}$ 、好ましくは $10 \sim 500 \text{ g/l}$ 、さらに好ましくは $20 \sim 400 \text{ g/l}$ が用いられる。

## 【0011】

以上の様な方法で製造した乳酸又はコハク酸は、必要に応じて、反応液から通常の分離、精製方法で分離、精製することができる。具体的には、限外ろ過膜分離、遠心分離等により菌体及びその処理物と分離した後、カラム法、晶析法等の公知の方法で精製し、乾燥させることにより、結晶として採取する方法等が挙げられる。これらの化合物は、酸素含有雰囲気では、好気性コリネ細菌又はその処理物で効率的に製造できない化合物である。

## 【0012】

## 【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明の方法を具体的に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限りこれらの実施例に限定されるものではない。

## 【0013】

## 実施例1

尿素： $4 \text{ g}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ： $14 \text{ g}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ： $0.5 \text{ g}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ： $0.5 \text{ g}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ： $0.5 \text{ g}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ： $20 \text{ mg}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ： $20 \text{ mg}$ 、D-ビオチン： $200 \mu\text{g}$ 、塩酸チアミン： $100 \mu\text{g}$ 、酵母エキス $1 \text{ g}$ 、カザミノ酸 $1 \text{ g}$ 及び蒸留水： $1000 \text{ ml}$  (pH $6.6$ )の培地を $100 \text{ ml}$ ずつ $500 \text{ ml}$ 容の三角フラスコに分注し、 $120$ 、 $15$ 分間滅菌処理したものに滅菌済み $50\%$ グルコース水溶液 $4 \text{ ml}$ を加え、プレバクテリウム フラバム AB-41菌株を植菌し、 $33$ にて $24$ 時間振盪培養した(好気的培養)。培養終了後、遠心分離( $8000 \text{ g}$ 、 $20$ 分)により菌体を回収した。得られた菌体全量を以下の反応に供試した。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ： $23 \text{ g}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ： $0.5 \text{ g}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ： $0.5 \text{ g}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ： $0.5 \text{ g}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ： $20 \text{ mg}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ： $20 \text{ mg}$ 、D-ビオチン： $200 \mu\text{g}$ 、塩酸チアミン： $100 \mu\text{g}$ 、炭酸ナトリウム $20 \text{ g/l}$ 、蒸留水： $1000 \text{ ml}$ の培地を $2 \text{ L}$ 容のジャーファーメンターに入れ、上記菌体とグルコース $50\%$ 液 $120 \text{ ml}$ を添加し、密閉した状態で(溶存酸素濃度 $0.1 \text{ ppm}$ )、これを $30$ にて $24$ 時間ゆるく( $200 \text{ rpm}$ )攪拌し、反応させた。得

られた培養液を遠心分離（8000rpm、15分、4℃）して得られた上清液を分析したところ、乳酸が33.5g/lと酢酸が5g/l、コハク酸が10g/l、リンゴ酸が0.5g/l生成していた。

#### 【0015】

##### 比較例1

炭酸イオン無添加以外は実施例1と同様に反応を行った。

即ち、実施例1と同様に培養した菌体を、以下の反応に供試した。

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 23g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.5g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0.5g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O : 0.5g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O : 20mg、MnSO<sub>4</sub>・nH<sub>2</sub>O : 20mg、D-ピオチン : 200μg、塩酸チアミン : 100μg、蒸留水 : 1000mlの培地を2L容のジャーファーマンターに入れ、上記菌体とグルコース50%液120mlを添加し、密閉した状態で（溶存酸素濃度0.1ppm）、30℃で24時間ゆるく（200rpm）攪拌し、反応させた。得られた培養液を遠心分離（8000rpm、15分、4℃）して得られた上清液を分析したところ、乳酸が15g/lと酢酸が3g/l、コハク酸が2g/l生成していた。

10

#### 【0016】

##### 比較例2

好気的条件以外は実施例1と同様に反応を行った。

即ち、実施例1と同様に培養した菌体を、以下の反応に供試した。

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 23g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.5g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0.5g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O : 0.5g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O : 20mg、MnSO<sub>4</sub>・nH<sub>2</sub>O : 20mg、D-ピオチン : 200μg、塩酸チアミン : 100μg、炭酸ナトリウム20g/l、蒸留水 : 1000mlの培地を2L容のジャーファーマンターに入れ、上記菌体とグルコース50%液120mlを添加し、30℃で24時間ゆるく（1000rpm）攪拌し、空気を0.1vvmの速度で供給しながら（溶存酸素濃度3.0ppm）反応させた。得られた培養液を遠心分離（8000rpm、15分、4℃）して得られた上清液を分析したところ、乳酸が5g/lと酢酸が1g/l、コハク酸が0.5g/l生成していた。

20

#### 【0017】

##### 【発明の効果】

30

本発明の方法によれば、培養法或いは酵素法により、効率よく、且つ高収率で乳酸、又はコハク酸を製造することができる。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 R 1:13

(72)発明者 湯川 英明  
茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号 三菱化学株式会社筑波研究所内

合議体  
審判長 平田 和男  
審判官 鵜飼 健  
審判官 光本 美奈子

(56)参考文献 アミノ酸・核酸集談会, アミノ酸発酵(下) 各論, 共立出版, 初版, 昭和47年4月5日発行  
, 24 - 28頁

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)  
C12P7/40-66  
BIOSIS(DIALOG)