

称号及び氏名	博士（工学） 耳塚 孝
学位授与の日付	2014年9月30日
論文名	「D-乳酸のメンブレン発酵プロセスに関する研究」
論文審査委員	主査 荻野 博康
	副査 小西 康裕
	副査 武藤 明德

#### 論文要旨

化石資源に依存しないバイオマスから製造されるポリマー（バイオベースポリマー）としてポリ乳酸（PLA）に関する研究開発が行われている。PLAは、乳酸（2-ヒドロキシプロピオン酸）を脱水重縮合することで得られ、生分解性プラスチックの原料となる。脱水重縮合において反応阻害がなく高重合度のPLAを得るために、99.9%以上の化学純度かつ99.8% e. e. (enantiomeric excess) の光学純度の乳酸が必要である。ホモポリマーのポリL-乳酸（PLLA）やポリD-乳酸（PDLA）の融点は170℃であるが、PLLAとPDLAを熔融状態で混合、冷却して形成されるステレオコンプレックスPLA（sc-PLA）の融点はホモポリマーよりも50℃ほど高く、アイロンがけが可能な繊維として用途の拡大が期待されている。sc-PLAの製造には高純度のL-乳酸やD-乳酸が必要であり、特に、高化学純度かつ高光学純度のD-乳酸を安価に製造する技術が求められている。化石資源由来の原料であるナフサから生成される乳酸ニトリル（ラクトニトリル）を加水分解してD-乳酸を化学的に製造することも可能であるが、化石資源を利用せずにバイオマスを発酵原料とし、微生物を用いた発酵プロセスで高い光学純度のD-乳酸を製造するプロセスの構築が求められている。しかしながら、発酵プロセスの単位体積あたりの生産速度は、微生物濃度に依存しているため、化学プロセスに比較して著しく低い。発酵プロセスに経済的な競争力を持たせるためには、単位体積あたりの生産速度を高めることが重要であり、微生物濃度や増殖速度に影響を及ぼす増殖阻害物質（代謝副産物など）の蓄積および生産物阻害を避ける必要がある。培養液中からそれら物質を取り除くには、分離膜と発酵槽を組み合わせたメンブレンバイオリアクターが有効であり、メンブレンバイオリアクターに新たな発酵原料を供給することで微生物の長時間使用や微生物濃度を高めることが可能になる。このようにメンブレンバイオリアクターを用いて発酵原料供給

と生産物のろ過分離を連続的に行い、微生物濃度を高めることができるプロセスをメンブレン発酵プロセスと総称されている。

これまでの乳酸のメンブレン発酵プロセスの研究では、バッチ発酵プロセスとは培養環境が異なることから、微生物のタンパク質発現状態（代謝状態）が大幅に異なることが示唆されているが、十分な解析がされていない。また、メンブレン発酵プロセスを長期間安定して運転するためには、微生物濃度の制御、最適な分離膜の選定および操作条件の最適化など、D-乳酸のメンブレン発酵プロセスの技術確立が必要である。そこで、本研究ではバッチ発酵プロセスとメンブレン発酵プロセスを比較し、メンブレン発酵プロセスの有用性を明らかにするとともに、長期間安定したメンブレン発酵プロセスを実証することを目的として、（１）D-乳酸を高蓄積濃度かつ高光学純度で生産できる乳酸菌の取得、（２）乳酸菌を用いたメンブレン発酵プロセスの光学純度向上メカニズムの解明、（３）乳酸菌を用いたメンブレン発酵プロセスによる副原料削減の検討、（４）乳酸のメンブレン発酵プロセスの比較、（５）D-乳酸生産酵母を用いたメンブレン発酵プロセスのD-乳酸カーボン収率向上メカニズムの解明を試みたものであり、以下に示す5章から構成される。

第一章では、本博士論文の研究領域の背景をまとめた。

第二章では、D-乳酸を高濃度かつ高光学純度で生産できる微生物を選択するために種々の乳酸菌のD-乳酸生産能力を評価したところ、*Sporolactobacillus inulinus*、*Sporolactobacillus laevolacticus*、および*Sporolactobacillus terrae*の3種の有孢子乳酸菌が70 g/L以上の高いD-乳酸濃度、かつ98% e. e.以上の高い光学純度でD-乳酸を生産する能力を有していることを見出した。これら3種の有孢子乳酸菌は、バッチ発酵プロセスにおいて、誘導期および対数増殖期前期は光学純度が低く、対数増殖期中期以降に光学純度が増加した。*S. inulinus* および*S. laevolacticus*を用いたバッチ発酵プロセスの発酵終了後の光学純度は、それぞれ96.4% e. e. および98.0% e. e.であった。また、*S. inulinus* および*S. laevolacticus*を用いたメンブレン発酵プロセスのD-乳酸の光学純度は、それぞれ98.8% e. e. および99.8% e. e.に向上した。一方、*S. inulinus* および*S. laevolacticus*を用いたメンブレン発酵プロセスの単位体積あたりのD-乳酸生産速度は、いずれもバッチ発酵プロセスに比較して、10倍以上向上した。バッチ発酵プロセスに比べ、メンブレン発酵プロセスでは、D-乳酸の生産速度および光学純度が向上し、メンブレン発酵プロセスの有用性が明らかとなった。

さらに、これら3種の有孢子乳酸菌の乳酸デヒドロゲナーゼおよび乳酸イソメラーゼ活性を評価した結果、すべての有孢子乳酸菌がL-およびD-乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有し、L-乳酸をD-乳酸に変換する乳酸イソメラーゼ活性を有することが示唆された。*S. inulinus* および*S. laevolacticus*を用いたメンブレン発酵プロセスでは、乳酸イソメラーゼ活性が高い対数増殖期後期の状態が長く継続されるため、バッチ発酵プロセスよりも光学純度が向上すると考えられ

る。

第三章では、*S. laevolacticus* を用いたメンブレン発酵プロセスを長期間安定して運転するためのメンブレン発酵プロセスの技術確立を目指し、発酵培地成分の影響を検討した。まず、種々の濃度の酵母エキスを含む発酵培地を用いて、*S. laevolacticus* を用いたバッチ発酵プロセスを検討したところ、酵母エキス濃度が低いほど、単位体積あたりのD-乳酸生産速度が低下し、酵母エキス濃度がD-乳酸生産に重要な因子であることを見出した。一方、*S. laevolacticus* を用いたメンブレン発酵プロセスでは、微生物が十分生育した後、酵母エキス濃度が低下しても良好な乳酸生産性を示し、代謝産物によるメンブレンの目詰まりが抑制された。1 g/L の酵母エキスを含む発酵培地を用い、ろ過運転条件を限界フラックス以下に設定したメンブレン発酵プロセスでは、ろ過分離されるD-乳酸濃度は64.4~69.5 g/L であり、収率93.3~100.5%の良好なD-乳酸生産を約1ヶ月の長期間にわたって継続することに成功した。本操作条件では、単位体積あたりのD-乳酸生産速度は10.9~12.1 g/L/h に達しており、膜面積あたりの乳酸生産量は既往のメンブレン発酵プロセスよりも6.3倍向上し、分離膜のコストを削減できることが示唆された。分離膜のろ過性能を最大限に発揮させるという運転条件に加え、発酵培地成分を制限することにより、微生物濃度や微生物代謝を必要以上に生じさせないことで、長期間、高効率にD-乳酸を生産できるメンブレン発酵プロセスの操作条件を確立することができた。

第四章では、ピルビン酸から乳酸を合成する乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え酵母 (D-乳酸生産酵母) を用いたメンブレン発酵プロセスのD-乳酸カーボン収率がバッチ発酵プロセスよりも向上する理由について検討した。D-乳酸生産酵母を用いた微好気条件でのバッチ発酵プロセスでは、D-乳酸のカーボン収率は39.0%であったが、メンブレン発酵プロセスでは74.6%に向上した。バッチ発酵プロセスと比べ、メンブレン発酵プロセスではD-乳酸生産酵母の細胞構成に消費されるカーボンが少なく、D-乳酸の生産に用いられるカーボンが4.8%向上したと考えられる。メンブレン発酵プロセスでは酵母細胞を長期間利用しているためであると考えられる。しかしながら、細胞構成に消費されるカーボン効率改善以上にD-乳酸カーボン収率が向上している。

そこで、バッチ発酵プロセスを誘導期、増殖期、定常期前期、定常期後期の4つのPhaseに分類して解析したところ、誘導期の乳酸カーボン収率が26.0%であるのに対し、増殖期、定常期前期および定常期後期ではそれぞれ、40.9%、47.6%および76.8%であり、各Phaseで乳酸カーボン収率が大きく異なることを見出した。バッチ発酵プロセスにおける定常期後期の乳酸カーボン収率はメンブレン発酵プロセスの乳酸カーボン収率と同等であることから、メンブレン発酵プロセスはバッチ発酵プロセスの糖濃度が低い定常期後期の状態が維持されるプロセスであると考えられる。

発酵培地中の糖濃度が高いと、酵母は酸素を用いた代謝が抑制され、エタノールの合成

が促進される（クラブツリー効果）。D-乳酸生産酵母において、バッチ発酵プロセスの定常期後の低い糖濃度で代謝がどのように変化するかを確認するために、低い希釈率で連続発酵プロセスを操作し、微好気条件下で糖濃度がゼロに近い状態を継続したところ、代謝状態がエタノール生産から乳酸生産に変化していくことが確認された。低い糖濃度（150 mg/L 以下）ではD-乳酸生産酵母のクラブツリー効果が薄れ、通常の微生物のように通気条件によって解糖系やトリカルボン酸（TCA）サイクルの代謝が促進されるようになり、乳酸生成のために必要なエネルギー（ATP）供給が促進されると共に、細胞内の酸化還元バランス（NADH/NAD<sup>+</sup>）を保つことができるようになったためであることが示唆された。

第五章では、本論文の各章の研究成果をまとめた。

### 審査結果の要旨

本論文は、耐熱性の高いステレオコンプレックス型のポリ乳酸の製造に必要な高純度の D-乳酸を生産するバイオプロセスに関し、最適な微生物の選択から、D 乳酸生産用培養液成分の検討、発酵槽の操作条件の検討、高純度の D-乳酸が得られる生体内のメカニズム、および膜を用い長時間運転可能なメンブレン発酵システムの開発に関する研究をまとめたものであり、以下の成果を得ている。

- (1) 種々の微生物から D-乳酸を高濃度かつ高光学純度で生産できる乳酸菌をスクリーニングし、有孢子乳酸菌が高い光学純度で D-乳酸を生産する能力を有していることを見出した。また、メンブレン発酵プロセスを用いることにより、バッチ発酵プロセスよりも光学純度が向上することを明らかにした。さらに、メンブレン発酵プロセスでは乳酸イソメラーゼ活性が高い状態が長く継続されるために光学純度が向上することを見出した。
- (2) 乳酸菌を用いたメンブレン発酵プロセスにおいて、長期間安定して運転するための培養液成分について検討し、必要以上の増殖や代謝を抑制する培養液を用いることにより、高効率に D-乳酸を生産できるメンブレン発酵プロセスを開発し、長期間運転できる操作条件を確率した。本条件では収率 97.7%、単位体積あたりの生産速度 11.2 g/L/h で D-乳酸生産を約 1 ヶ月間継続して生産することが可能であり、既往より、膜面積あたりの乳酸生産性が 6.3 倍向上した。
- (3) D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え酵母を用いた D-乳酸生産システムについて検討し、微好気状態、かつ糖濃度の低くなる低い希釈率条件でメンブレン発酵プロセスを操作することにより、高い収率で D-乳酸が得られることを見出した。また、そのような操作条件下では解糖系や TCA サイクルが促進され、エタノールを生産する代謝が抑制されるため、D-乳酸の生産性が向上することを明らかにした。

以上の結果は、最適条件下でメンブレン発酵プロセスを操作することにより、高純度のD-乳酸を高効率に生産できることを実証するとともに、その代謝メカニズムを解析したものであり、産業的だけでなく、学術的にも価値が高い。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。