

遺伝子組換え酵母を用いた乳酸抽出発酵の検討

Investigation of Extractive Fermentation of Lactic Acid using Genetically Engineered Yeast

前田 裕介¹, 梅本 真司¹, 打味奈緒子¹, 福間 真一¹, 本田 孝祐¹, 大政 健史^{1*},
長森 英二², 石田 亘広², 嶋村 隆², 高橋 治雄², 大竹 久夫¹
YUSUKE MAEDA, SHINJI UMEMOTO, NAOKO UTUMI, SHINICHI FUKUMA, KOSUKE HONDA, TAKESHI OMASA, EIJI NAGAMORI, NOBUHIRO
ISHIDA, TAKASHI SHIMAMURA, HARUO TAKAHASHI and HISAO OHTAKE

¹ 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

² 豊田中央研究所 〒480-1192 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道 41 番地の 1

* TEL: 06-6879-7437 FAX: 06-6879-7439

* E-mail: omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

¹ Dep. of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

² Biotechnology Lab, Dep. Materials, Toyota Central R&D labs., Inc. 41-1, Aza Yokomichi, Oaza Nagakute, Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi-ken, 480-1192, Japan

キーワード: 遺伝子組換え酵母, 抽出発酵, L-乳酸発酵

Key words: Genetically engineered yeast, Extractive fermentation, L-lactic acid fermentation

(原稿受付 2007 年 10 月 30 日 / 原稿受理 2007 年 11 月 1 日)

1. 緒 言

近年, 石油資源の枯渇への危機感や環境問題に対する関心の高まりからバイオプラスチックが注目されている。その中でもポリ乳酸 (PLA) はポリカーボネートと比較されるほど強靱かつ, 透明性, 生体への安全性が高く, 最も期待されている材料のひとつである。石油を原料として合成される汎用プラスチックと比べ, ポリ乳酸の原料である乳酸はバイオマスを原料として発酵法を用いて生産が可能である。よって, カーボンニュートラルの概念が成り立ち, 環境に優しい素材であると言える。しかし, ポリ乳酸は汎用プラスチックに比べて高価格であり, 本格的な普及には至っていない。すなわち, 乳酸を安価に大量生産可能なシステムの構築が普及には必須の条件であると考えられる。

L-乳酸を生産する微生物としては *Lactobacillus* 属に代表される乳酸菌が一般的に知られている。しかし, 乳酸菌は低 pH 耐性が弱く, 複雑な栄養要求性を持つことや高密度培養が難しいといった課題があり, 発酵プロセスが高コストとなる問題点がある。また, 車体材料としてポリ乳酸を使用する場合, 高品質, 高結晶性のポリ乳酸を用いる必要があり, 原料として 99%以上という高光学純度の L-乳酸が必要となる⁶⁾。しかし, 多くの乳酸菌は L-乳酸生産時に D-乳酸が副産物として混入する場合がある²⁾, 発酵の段階で高光学純度の L-乳酸を得ることが困難であり, 乳酸精製時において光学分割の

工程を要し^{5,9)}, さらにコスト増大の要因となっている。一方, *Saccharomyces cerevisiae* に代表される酵母は, 高密度培養が可能であると同時に乳酸菌に比べて低 pH 耐性が強く, 栄養要求性も複雑でない等の利点があるが, 一般的に酵母は L-乳酸脱水素酵素 (L-LDH) 遺伝子を持たないことから乳酸生産を行わない¹¹⁾。しかし, 遺伝子組換え技術を利用して L-LDH 遺伝子を細胞内で発現させることにより, 酵母においても乳酸生産が可能である。本研究では乳酸発酵に使用する菌株として(株)豊田中央研究所とトヨタ自動車(株)が構築した遺伝子組換え酵母を使用した。本研究で使用した菌株はエタノール生産に関与しているピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) に着目し, PDC をコードする主遺伝子を破壊してプロモーターのすぐ下流に L-LDH 遺伝子を導入することによって 99.9% 以上という高光学純度の L-乳酸を生産可能である³⁾。

遺伝子組換え酵母を用いた発酵を用いた L-乳酸生産プロセスを行う際には, 最終生産物である乳酸による菌体への影響が問題となる。その回避策として, 炭酸カルシウム中和発酵とカルシウム沈殿法が用いられてきた¹²⁾。しかし, このプロセスは精製工程が複雑で, 廃棄物の発生や加熱操作が必要であることからコスト面でまだ問題を抱えている。また, 近年, アンモニア中和発酵とエステル蒸留法を組み合わせたプロセスも検討及び実用化がなされている^{1,12)}。しかし, このプロセスも精製工程が複雑で多数の加熱工程を含む為に, 精製コストや加熱操作に伴う乳酸の光学純度及び収率の低下が問題となる。

そこで、我々はこれらの問題を回避する為に抽出発酵を用いた乳酸生産プロセスの構築を目指した。抽出発酵は培養液に直接抽出溶媒を重層し、抽出を行いながら同時に発酵を行う手法で、常温常圧で行えることが特徴である。この方法で培養液から乳酸を取り除くことにより、乳酸による最終生産物阻害が回避でき、また培養液から直接乳酸を抽出することから加熱による精製工程を簡略化可能である。その為、コストの削減とともに、収率や光学純度の低下の回避も期待できる。

これまでの研究において、抽出発酵後半の 40 g/L 程度（水相中）の高乳酸濃度条件下において、その生産が停止する現象が得られている。現在、その阻害要因として抽出剤の毒性、乳酸自体の毒性、乳酸生産による pH 低下の影響が考えられている。そこでフローサイトメーターを用いて抽出発酵時における菌体生存率を測定し、生産阻害要因を探るとともに、発酵後抽出も含めた生産性向上の可能性について検討した。

2. 非中和発酵および中和発酵

前々培養として 500 mL 容バフフル付フラスコに用意した YPD 培地 100 mL に *S. cerevisiae* T165R 株⁵⁾ のグリセロールストック 500 μ L を植菌して 30°C, 170 rpm で 24 時間巡回培養を行った。前培養として 5 L 容ジャーフェーマンターに用意した菌体増殖用培地 1 L に前々培養液全量を植菌して 30°C, pH 7, 通気量 1 vvm, 300 rpm で培養を 8 時間行った。培養終了後は培養液を遠心機を用いて 7,700 \times g で遠心分離を 10 分間行い、菌体を回収した。本培養として 5 L 容ジャーフェーマンター (MDL-500, 丸菱バイオエンジニア) に用意したスクロース-糖蜜培地 2 L に集菌した菌体を OD₆₆₀=10 程度になるように植菌して 30°C, 50 rpm で培養を行った。中和発酵では培養開始 60 時間後から NaOH による中和を行い、pH を 5 に維持した。非中和発酵においては pH の低下に伴い、残糖が存在する状態での乳酸生産の停止が見られた (図 1)。培養終了時の pH は 2.5 であった。一方、中和発酵においては、グルコースを完全に消費し、乳酸生産量も 70 g/L と高い値を示した (図 1)。次に、この中和発酵後の上清を用いて抽出実験を行なった。7 mL 容のスクリーバイアル瓶に水相として 2 mL の培養後上清と有機相として 1 mL の抽出溶媒を添加し、適宜回数攪拌しながら、30 分間 30°C で静置することにより抽出を行った。なお、有機相に関しては有機酸の抽出に有効性が示されている 3 種類の抽出溶媒¹³⁾ (TDA, Alamine336 および TBP) を使用した。操作後の水相中の乳酸濃度を測定し、抽出溶媒 (有機相) への乳酸の抽出の割合を示す抽出度 (%)¹³⁾ を算出した。

3. 抽出発酵

上記と同様の方法で前々培養、前培養を行い、本培養においては培養開始 60 時間目から 30% (v/v) TDA/オレイルアルコール (オレイルアルコールに容積比で 30% となる様に TDA を溶かした液) 1 L を重層し、抽出発酵を行なった。抽出発酵を行なうことによって乳酸が有機相中に抽出されるため、非中和発酵よりも水相の

pH を高く、水相中の乳酸濃度を低く維持できた。その結果、60 g/L 程度と中和発酵には劣るものの非中和発酵時よりも高い乳酸生産が実現した (図 1)。なお、抽出発酵における乳酸濃度 C_{cal} は、次式を用いて水 1 L 当りに換算して示した。

$$C_{cal} = \frac{(V_{oil} C_{oil} + V_{aq} C_{aq})}{(V_{oil} + V_{aq})} \dots\dots\dots (1)$$

そこで、主な要因として考えられる抽出発酵中の溶媒毒性について検討する為、抽出剤として TDA, TOA および Alamine336 の 3 種をそれぞれ用いた抽出発酵中の菌体に対し、フローサイトメーターを用いた細胞の生存率測定を行なった^{4,7,8,10)}。抽出発酵の場合、抽出溶媒の重層により培養液中の乳酸濃度が減少し pH も上昇するため、菌体の生存率は溶媒を重層しない非中和発酵より高く維持されると予想されたが、実際は非中和発酵時よりも生存率が低くなる結果となった (図 2)。これは抽出溶媒による菌体毒性の影響と考えられる。一方、乳酸生産量は抽出発酵が非中和発酵より増加した。今後 TDA よりも毒性の低い抽出溶媒を探索することが、抽出発酵をさらに高生産なものとするための重要な検討項目

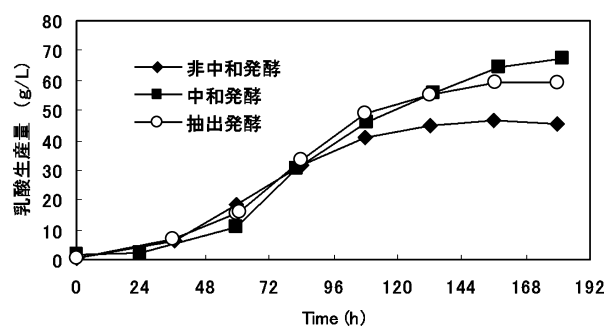


図 1. 乳酸濃度の経時変化。

5 L ジャーフェーマンターを用いて、2 L の培養液に対し中和を行わない場合 (非中和発酵) (◆), 培養開始 60 時間後から 5N NaOH にて pH 5 に維持した場合 (中和発酵) (■), 培養開始 60 時間後に 30% (v/v) TDA/オレイルアルコール 1 L を重層し、抽出発酵を行なった場合 (○) における乳酸生産量の経時変化を比較した。抽出発酵での乳酸濃度は本文中の (1) 式を用いて換算した。

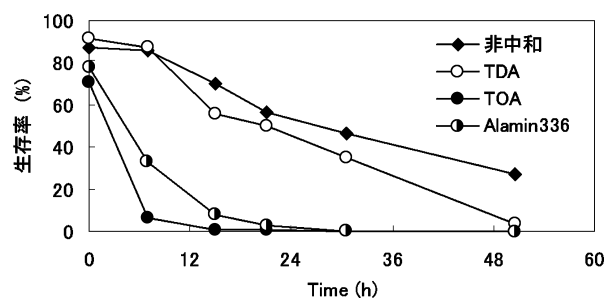


図 2. 抽出発酵時における菌体生存率の経時変化。

100 mL 容三角フラスコを用いて、40 mL の培養液に対し培養開始時に抽出剤 TDA (○), TOA (●) または Alamine336 (◐) の 30% (v/v) オレイルアルコール溶液 20 mL を重層した場合および重層しない場合 (非中和発酵) (◆) の菌体生存率の経時変化を比較した。

であると推測された。

4. 中和発酵後の抽出プロセスの検討

中和発酵における問題点は発酵後培養液における抽出度の低下である。非中和発酵条件においては抽出度の低下が起こらなかったことから、抽出度低下の原因として NaOH 添加による pH の上昇および Na⁺イオン濃度の増加が考えられた。そこで HCl 添加による pH の低下、陽イオン交換樹脂 (AMBERLITE IR-120 PLUS (H)) の使用による pH の低下および Na⁺イオンの除去により、抽出度を改善することを試みた。HCl 添加による pH の低下により TDA 使用時には抽出度が上昇した (図 3)。また、陽イオン交換を行なった場合には更なる抽出度の上昇が見られ、他の抽出溶媒使用時に関しても抽出度が非中和時と同程度となった (図 3)。以上の結果から、抽出度低下の原因が Na⁺イオンであることが明らかとなり、中和発酵と陽イオン交換を組み合わせることで、中和発酵により大量に生産された乳酸を抽出溶媒中へ効率良く抽出することが可能となった。

以上を含めて、現時点で考えられる実プロセスを表 1

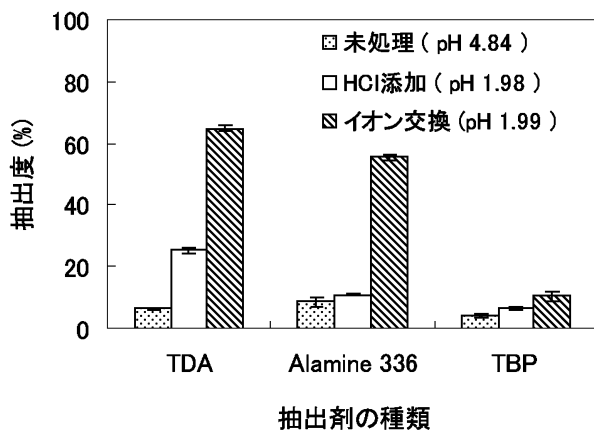


図 3. イオン交換処理による水相からの乳酸の抽出度の変化。抽出剤として TDA, Alamine336 または TBP の 80% (v/v) オレイルアルコール溶液を用いた。中和発酵終了後の培養上清から抽出を行った場合、培養上清に対し HCl の添加によって pH を 2 付近まで低下させた後に抽出した場合、および培養上清を陽イオン交換処理を行った後に抽出した場合の抽出度を比較した。

表 1. L-乳酸生産プロセスの比較。

	非中和発酵 + 溶媒抽出法	NaOH 中和発酵 + 溶媒抽出法	抽出発酵
最終乳酸濃度 (換算値)	45 g/L 程度	70 g/L 程度	60 g/L 程度
対糖収率 (g/g)	約 33%	約 42%	約 35%
抽出溶媒の選択	毒性の制約なし	毒性の制約なし	毒性の制約あり
中和剤	不要	必要	不要
イオン交換処理	なし	あり	なし
菌体再利用	不可	可	不可

にまとめて示す。NaOH 中和を行った後に溶媒抽出を行うプロセスが最終的に生産される乳酸量や対糖収率が高く、発酵と抽出を別々に行えるため毒性の制約なしに使用する溶媒を選択できる利点がある。一方、中和やイオン交換処理をする必要があることが欠点として挙げられ、これらに必要なコスト次第では抽出発酵が優れたプロセスになると考えられる。

5. ま と め

中和発酵時の発酵後の抽出度低下は陽イオン交換を用いることにより改善が可能であった。一方、抽出発酵においては中和発酵には劣るものの 60 g/L の高い乳酸生産量を達成できた。さらに、抽出溶媒による菌体生存率への影響を解析し、抽出溶媒毒性の軽減が抽出発酵の生産性の向上に重要であると推察された。

謝 辞

本稿で紹介した著者らのグループによる研究成果は NEDO 「バイオマスからの組換え酵母による高効率乳酸生産プロセスの開発」の一環として行われたものである。

文 献

- Gordon, G.I., G.C. Taylor, and W.C. Breitzke. 1952. Lactic acid from corn sugar. *Ind. Eng. Chem.* 44: 1955–1966.
- Hofvendahl, K., and B. Hahn-Hagerdal. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 87–107.
- Ishida, N., S. Saitoh, K. Tokuhiko, E. Nagamori, T. Matsuyama, K. Kitamoto, and H. Takahashi. 2005. Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1964–1970.
- Michelle, T.Z. 2005. *The Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* (10th ed.). Molecular Probes Inc. USA.
- Saitoh, S., N. Ishida, T. Onishi, K. Tokuhiko, E. Nagamori, K. Kitamoto, and H. Takahashi. 2005. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2789–2792.
- Tsuji, H. 2002. Autocatalytic hydrolysis of amorphous-made polylactides: effects of L-lactide content, tacticity, and enantiomeric polymer blending. *Polymer* 43: 1789–1796.
- Valli, M., M. Sauer, P. Branduardi, N. Borth, D. Porro, and D. Mattanovich. 2005. Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations analyzed by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1515–1521.
- Valli, M., M. Sauer, P. Branduardi, N. Borth, D. Porro, and D. Mattanovich. 2006. Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5492–5499.
- Van Breugel, J., J. van Krieken, A.C. Baro, J.M.V. Lancis, and M. vila Camprubi. 2002. Method of industrial-scale purification of lactic acid, US Patent 6630603.
- Wieder, D.E., H. Hang, and H.M. Fox. 1993. Measurement of intracellular pH using flow cytometry with carboxy-SNARF-1. *Cytometry* 14: 916–921.
- 石田豆広, 大西 徹, 高橋治雄. 2006. 遺伝子組換え酵母による新しい乳酸生産技術. *未来材料*. 6: 44–50.
- 小原仁実, 土井梅幸, 大塚正盛, 奥山久嗣, 岡田早苗. 2001. グルコースからポリ-L-乳酸を工業的に製造する方法の開発. *生物工学会誌*. 79: 142–148.
- 田中元治, 赤岩英夫. 2002. 溶媒抽出化学. *裳華房*.