



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Study on the Scale-up of L-Lactic Acid
Fermentation by Ammonia Tolerant Mutant Strain
Rhizopus sp. MIK-96-1196

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 劉, 鉄軍 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/3109

氏名(本国籍)	劉 鉄 軍 (中華人民共和国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第412号
学位授与年月日	平成18年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	Study on the Scale-up of L-Lactic Acid Fermentation by Ammonia Tolerant Mutant Strain <i>Rhizopus</i> sp. MK-96-1196 (アンモニア耐性変異株 <i>Rhizopus</i> sp. MK-96-1196 によるL-乳酸発酵のスケールアップに関する研究)
審査委員会	主査 静岡大学 教授 岡部 満 康 副査 岐阜大学 教授 高見澤 一 裕 副査 静岡大学 教授 朴 龍 洙 副査 信州大学 教授 千 菊 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

化石資源の使用は地球温暖化防止の観点から、今後その利用は大幅に制限されるものと思われる。従ってその化石資源を原料とする現在の化学工業はその大幅な構造転換を迫られ、いわゆるポスト石油を見据えた新しい化学工業の構築が不可欠となってきている。世界の石油化学業界は石油に代わるものとしてバイオマスおよびその廃棄物を原料とする新しい化学工業を模索しており、バイオマスから微生物生産したコハク酸などの“C₄ 鍵物質”を出発物質とする新しい化学工業体系を構築しつつある。

本論文はこの鍵物質として乳酸を選び、この乳酸から様々な化学製品を誘導することを最終目標とし、乳酸の大量生産方法の開発を試みた。想定されるプロセスは従来の醗酵工業と異なり、そのリアクターのスケールは数千KLに達するものと考えられる。これまでの研究成果を踏まえ、乳酸の生産菌として *Rhizopus* sp. MK-96-1196 を選び、大型バイオリアクターでの生産を想定したスケールアップの研究をおこなっている。

まずスケールアップに先立ち、乳酸の工業生産に適した培養プロセスの選択を試みている。微生物の一般的な培養方法として1. 回分 2. 流加 3. 連続の3種類の方法があるが、それらのすべてについて表題菌によるL-乳酸生産を行い、それぞれの工業生産を実施する場合の経済性について比較している。連続培養は希釈率0.024(1/h)で最大の乳酸生産性1.25 g/l/hが得られたが、残糖濃度が25 g/lと高く(換言すれば対糖収率が低い)、原料コストを増加させるだけでなく、廃液処理コストも増加させるので、工業的実用性はない

と判断している。特に、常に高い糖濃度を維持しながら培養を行わなければならない連続培養は環境保全の観点からまったく実用性はないと考えられる。回分培養と流加培養とではいずれも高い対糖収率で高濃度の L-乳酸が生産された。特に培養液中の残糖濃度を 30 g/l に制御した流加培養では対糖収率 80%以上で 140 g/l の L-乳酸が生産された。これは今まで報告された中では最も高い濃度であった。また残糖濃度はゼロであり、環境保全の立場からもまったく問題がない。これらの回分ならびに流加培養についても原料コストや回収精製も含めた全変動コストの比較を行い、流加培養が回分培養に対糖収率、L-乳酸濃度に優れ、かつ経済性も最も高く、工業的実用性に優れていると評価している。

ついで大型生産タンクへのスケールアップ基準を選択するため、3 l, 100 l ならびに 5000 l 容量の気泡塔型バイオリアクターを新たに建設し、酸素移動に対して影響を与える因子、即ち、酸素移動容量係数、 k_La と酸素移動速度、OTR について比較検討している。それぞれ容量の異なる気泡塔（幾何学的形状は出来るだけ相似とした）について k_La と OTR が乳酸の生産速度に与える影響を調べ、気泡塔型バイオリアクターの容量に無関係に OTR の方が乳酸の生産速度に顕著に影響することを明らかにしている。換言すれば OTR をスケールアップの基準とすることが妥当であることを示唆している。この結果に基づき想定される 3000 KL 容量（培地量 2000 KL）の気泡塔型バイオリアクターの概略設計をおこなったところ、培養液高さが 20 m に達し、槽底部の酸素分圧が 0.64 atm となり通常の培養条件の 3 倍くらいになることを明らかにしている。このように部分的にでも高い酸素分圧にさらされることは菌の生育ならびに乳酸生産にマイナスの効果を与えることが想定されたので、3 L の気泡塔型バイオリアクターと純酸素を用いて 3000 KL 容量の気泡塔と同一の酸素分圧を設定して培養実験をおこなっている。この結果、通常条件 (0.2 atm) と比較して同じ生育速度および乳酸生産速度が得られている。もちろん溶存炭酸ガス濃度や槽内酸素濃度分布などの問題などの問題も残っているが、基本的には 3000 KL 容量の気泡塔型バイオリアクターへのスケールアップが可能であることを示唆している。

乳酸はコハク酸と共にいわゆる Biomass-based chemical industry の重要な原料となりうる物質であり、これらの化石原料以外の資源からの大量生産が可能となれば、過剰なまでに化石原料に依存している現代の化学工業の構造転換を可能とし、地球温暖化防止にも大いに貢献するであろう。

審 査 結 果 の 要 旨

化石資源の使用は地球温暖化防止の観点から、今後その利用は大幅に制限されるものと思われる。従ってその化石資源を原料とする現在の化学工業はその大幅な構造転換を迫られ、いわゆるポスト石油を見据えた新しい化学工業の構築が不可欠となってきている。世界の石油化学業界は石油に代わるものとしてバイオマスおよびその廃棄物を原料とする新しい化学工業を模索しており、バイオマスから微生物生産したコハク酸などの“C₄ 鍵物質”を出発物質とする新しい化学工業体系を構築しつつある。

本論文はこの鍵物質として乳酸を選び、この乳酸から様々な化学製品を誘導することを最終目標とし、乳酸の大量生産方法の開発を試みた。想定されるプロセスは従来

の醗酵工業と異なり。そのリアクターのスケールは数千KLに達するものと考えられる。

本論文はこの鍵物質として乳酸を選び、この乳酸を大量安定生産するためのプロセスの開発をおこなっている。想定されるプロセスは従来の発酵工業とは異なり、そのリアクターのスケールは数千KLに達するものと考えられる。これまでの研究成果を踏まえ、乳酸の生産菌として *Rhizopus* sp. MK-96-1196 を選び、大型バイオリアクターでの生産を想定したスケールアップの研究をおこなっている。

まずスケールアップに先立ち、乳酸の工業生産に適した培養プロセスの選択を試みた。微生物の一般的な培養方法として1. 回分 2. 流加 3. 連続の4種類の方法があるが、それらのすべてについて表題菌によるL-乳酸生産を行い、それぞれの工業生産を実施する場合の経済性について比較している。連続培養は希釈率 0.024 (1/h)で最大の乳酸生産性 1.25 g/l/h が得られたが、残糖濃度が 25 g/l と高く(換言すれば対糖収率が低い)、原料コストを増加させるだけでなく、廃液処理コストも増加させるので、工業的実用性はないと判断している。回分培養と流加培養とではいずれも高い対糖収率で高濃度のL-乳酸が生産された。特に培養液中の残糖濃度を 30 g/l に制御した流加培養では対糖収率 80%以上で 140 g/l のL-乳酸が生産された。これは今まで報告された中では最も高い濃度であった。また残糖濃度はゼロであった。特に培養液中の残糖濃度を 30 g/l に制御した流加培養では対糖収率 80%以上で 140 g/l のL-乳酸が生産された。これは今まで報告された中では最も高い濃度であった。また残糖濃度はゼロであった。これらの回分ならびに流加培養についても原料コストや回収精製も含めた全変動コストの比較を行い、流加培養が回分培養に対糖収率、L-乳酸濃度に優れ、かつ経済性も最も高く、工業的実用性に優れていると評価している。

ついで大型生産タンクへのスケールアップ基準を選択するため、3 l, 100 l ならびに 5000 l 容量の気泡塔型バイオリアクターを新たに建設し、酸素移動に対して影響を与える因子、即ち、酸素移動容量係数、 k_La と酸素移動速度、OTR について比較検討している。それぞれ容量の異なる気泡塔(幾何学的形状は出来るだけ相似とした)について k_La と OTR が乳酸の生産速度に与える影響を調べ、気泡塔型バイオリアクターの容量に無関係に OTR の方が乳酸の生産速度に顕著に影響することを明らかにしている。換言すれば OTR をスケールアップの基準とすることが妥当であることを示唆している。この結果に基づき想定される 3000 KL 容量(培地量 2000 KL)の気泡塔型バイオリアクターの概略設計をおこなったところ、培養液高さが 2.0 m に達し、槽底部の酸素分圧が 0.64 atm となり通常の培養条件の 3 倍くらいになることを明らかにしている。このように部分的にでも高い酸素分圧にさらされることは菌の生育ならびに乳酸生産にマイナスの効果を与えることが想定されたので、3 L の気泡塔型バイオリアクターと純酸素を用いて 3000 KL 容量の気泡塔と同一の酸素分圧を設定して培養実験をおこなっている。この結果、通常条件 (0.2 atm) と比較して同じ生育速度および乳酸生産速度が得られた。これは 3000 KL 容量の気泡塔型バイオリアクターへのスケールアップが可能であることを示唆している。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

なお本研究について国際学術雑誌に投稿した 2 報の原著論文（英文）はすでに印刷されている。

Tiejun Liu, Shigenobu Miura, Tomohiro Arimura, Min-Yi, Tei, Enoch Y. Park and Mitsuyasu Okabe: Evaluation of L-Lactic Acid Production in Batch, Fed-batch, and Continuous Cultures of *Rhizopus* sp. MK-96-1196 Using an Airlift Bioreactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 10, No. 6, 522-527 (2005).

Tiejun Liu, Shigenobu Miura, Masaaki Yaguchi, Tomohiro Arimura, Enoch Y. Park and Mitsuyasu Okabe: Scale-up of L-Lactic Acid Production by Mutant Strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 from 0.003 m³ to 5 m³ in Airlift Bioreactors. *Journal Bioscience and Bioengineering*, vol. 101, No.1, 9-12 (2006).

また共著論文として

Shigenobu Miura, Lies Dwiarti, Tomohiro Arimura, Minako Hoshino, Lie Tiejun, and Mitsuyasu Okabe: Enhanced Production of L-Lactic Acid by Ammonia-Tolerant Mutant Strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196. *Journal Bioscience and Bioengineering*, vol. 97, No.1, 19-23 (2004).