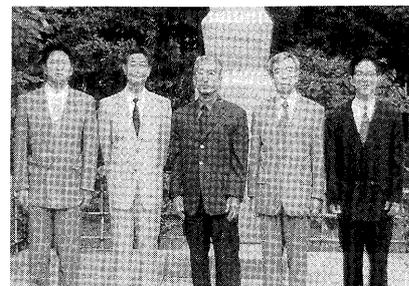


〔生物工学会誌 第79巻 第5号 142-148. 2001〕

総合論文

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

(平成12年度 日本生物工学会技術賞受賞)

小原 仁実^{1*}・土井 梅幸²・大塚 正盛²奥山 久嗣¹・岡田 早苗³Development of Industrial Production of Poly-L-Lactate
from Glucose —Monograph—

HITOMI OHARA,^{1*} UMEYUKI DOI,² MASATAKA OTSUKA,² HISASHI OKUYAMA,¹ AND SANAE OKADA³
(Technology Research Laboratory, Shimadzu Co., 1-8-1 Tsukinowa, Otsu, Shiga 520-2152¹; Research
Laboratory, San-ei Surochemical Co., 24-5 Kitahama-machi, Chita, Aichi 478-8503²; Culture Collection
Center, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo
156-8502³) Seibutsu-kogaku **79**: 142-148, 2001.

A cultivation method called the "Hop-Step-Jump (HSJ)" method has been successfully established. In the cultivation of *Lactobacillus casei* B12-2, a lactic acid bacterium isolated from a tropical sample with a high sugar concentration, the HSJ method reduced the time during which the maximum lactic acid concentration is reached from 30 days to nine. In addition, 5 M sodium hydroxide and ammonia were examined as neutralizers. Tests revealed that the maximum lactic acid concentration was reached more quickly with ammonia than with sodium hydroxide. A seed culture was cultivated by a technique corresponding to HS of the HSJ method and the J cultivation was neutralized. As a result, it took 25 h to achieve a lactic acid concentration of 150 g/l. For industrial-scale fermentation, we used *Lactobacillus lactis* 332, which produces lactic acid of high optical purity with inexpensive corn steep liquor as the nitrogen source and performed the cultivation corresponding to HS of the HSJ method in a 200-l jar fermentor. The J cultivation was carried out industrially in a 20-m³ jar fermentor for L-lactic acid fermentation. In this case, it took 70 h to achieve a lactic acid concentration of 88 g/l. We have developed two approaches to purifying fermented lactic acid: electrodialysis-based enrichment and bipolar membrane-based ion exchange from ammonium lactate to lactic acid. An aqueous solution of 900 g/l L-lactic acid was obtained at an optical purity of 95%. For the industrial production of poly-L-lactate, LL-lactide was produced from pre-polymers of poly-L-lactate through intramolecular transesterification. In the preparation of the pre-polymers, polycondensation takes place in which the linear mono-, di-, and trimer of lactic acid are totally refluxed so that the yield of LL-lactide can be improved. The temperature of the reactor is then raised in three steps to prevent racemization. A melt crystallization method without a solvent was developed for the purification of LL-lactide. Ring-opening polymerization of LL-lactide took place continuously, resulting in the production of high-molecular-weight poly-L-lactate with a weight-average mol. wt. of 200,000.

[Key words: biodegradable plastics, glucose, lactic acid, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, poly-L-lactate]

¹ 株式会社島津製作所基盤技術研究所 (〒520-2152 滋賀県大津市月輪1-8-1), ² サンエイ糖化研究所開発部 (〒478-8503 愛知県知多市北浜町24-5),

³ 東京農業大学応用生物科学部 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

* 著者紹介 (代表) 1984年大阪大学大学院工学研究科博士前期課程修了 (博士 (工学)) 株式会社島津製作所基盤技術研究所 (主任研究員)

TEL. 077-548-9377 FAX. 077-548-9399 E-mail: ohara@shimadzu.co.jp

写真 左より 大塚正盛, 土井梅幸, 小原仁実, 岡田早苗, 奥山久嗣

はじめに

非分解性のプラスチックの廃棄は世界的に問題となっている。また、石油は将来枯渇が予想される。そこでグルコースなどの再生可能資源を利用し、自然環境下で分解するプラスチックの開発が必要である。アメリカではトウモロコシからグルコースを製造し、これを発酵の炭素源としてL-乳酸を製造し、さらにL-乳酸から化学合成によって生分解性プラスチックであるポリ-L-乳酸を製造するという新たな産業が興ろうとしている。本開発は、それ以前より独自に着手し、世界に先駆け工業化したものである。生分解性プラスチックの用途としては、食品包装用・農業用フィルム、漁網・釣り糸などが有望である。これらの用途には、高い光学純度のL-乳酸を構成単位として持つ結晶性のポリ-L-乳酸が適している。¹⁻³⁾しかし、従来L-乳酸はほとんどが食品用途として使用されていたため、味覚とは無関係なD体、L体という光学異性体についての知見がほとんどなかった。また、カルシウム法と呼ばれる従来の乳酸精製法は、副産物として大量の硫酸カルシウムが排出されるという問題があった。さらに、ポリ-L-乳酸を汎用樹脂として工業的に重合する方法は前例がなかった。

本開発の特徴として次の事項が挙げられる。HSJ培養法と呼ばれる高濃度の乳酸を短時間に生産する培養法を確立したこと、コーンステーパーリカーを用いた安価な培地で高い光学純度のL-乳酸を高濃度で生産する乳酸菌 *Lactococcus lactis* 332 を分離したこと、乳酸発酵の中和に使用したアンモニアを再利用できるL-乳酸の精製法を開発したこと、ポリ-L-乳酸の中間体である高い光学純度のLL-ラクチドを高い収率で製造することができる三段還流法を開発したこと、ポリ-L-乳酸の連続重合法を開発したこと、以上の技術を一貫して開発してコストダウンを図ったことである。

1. 培養方法の基礎的検討

1.1. Hop-Step-Jump 培養法の確立 熱帯地域で採取した高い糖濃度の試料から分離した乳酸菌である *Lactobacillus casei* B12-2 が培地中に高濃度の乳酸を蓄積することに着目し、⁴⁾この乳酸菌が最大何 g/l まで乳酸を培地中に蓄積できるかを調べた。最初の実験ではグルコース濃度を20, 50, 100, 150 g/l とし培養を開始した (Fig. 1)。グルコース濃度が20 g/l では2日以内で全グルコースが乳酸となり、当然のことながらそれ以上の乳酸が蓄積することはなかった。グルコース濃度が50 g/l 以上で

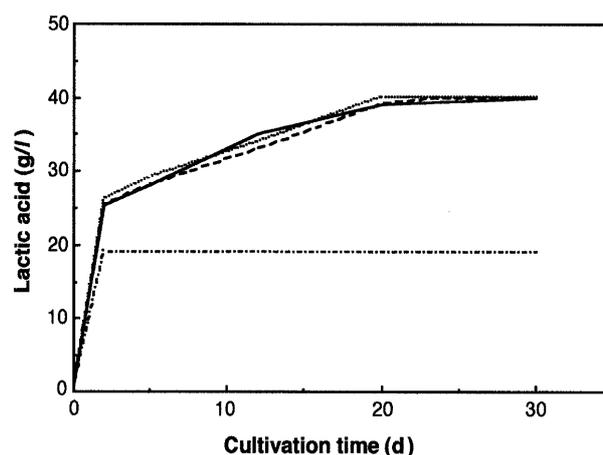


Fig. 1. Detection of the maximum accumulation of lactic acid in a broth by *Lactobacillus casei* B12-2. Fermentation medium: glucose 20 g/l (- · -), 50 g/l (—), 100 g/l (···), 150 g/l (---), yeast extract 10 g/l, peptone 10 g/l, Na acetate·3H₂O 5 g/l, MgSO₄·H₂O 200 mg/l, MnSO₄·4H₂O 10 mg/l, FeSO₄·7H₂O 10 mg/l, NaCl 10 mg/l, pH 7.0.

は乳酸は2日目以降も一様に蓄積し、30日目で約40 g/l となり停止した。また、Fig. 1の結果より、*L. casei* B12-2のグルコース耐性は最低限でも150 g/lであることが明らかになった。ここで注目したことは、グルコース濃度が50 g/lでは30日間の培養中に培地の底に多量の菌体が堆積したことである。そこで、接種菌体量を多くすることで、最大乳酸蓄積量に達する期間を短縮できるのではないかと考えた。使用培地は50 g/lのグルコースを含むGYP培地（以下5GYP培地と略す）5 mlに前培養液1滴を接種し2日間培養した。この培養液を遠心分離して培地上清を除き、沈殿した菌体の上に新鮮な5GYP培地を5 mlを注ぎ入れた。この操作を30日間に亘って2日毎に繰り返す。酸度滴定により各培地上清の乳酸量を定量した。また、この実験とは別に5日間隔で培地上清を交換する実験を行った。その結果、最適な方法として、2日間培養し遠心分離を行い上清と新鮮培地を交換するという操作を2回行い（計4日間）、再度遠心分離後に上清と新鮮培地と交換して5日間培養を行ったところ、培養液上清には約40 g/lの乳酸の蓄積があった。この量は先の実験で30日間かかって達した量と同じである。すなわち、乳酸菌が培養液中に蓄積できる最大乳酸量を知るため実験期間が30日間から9日間に短縮された。岡田は、2日、2日、5日間の3段階で行うこの培養法に、Hop-Step-Jumpの頭文字を採ってHSJ培養法と名付けた。⁵⁾HSJ培養法は、発酵食品などから分離された乳酸菌が、長期間の発酵熟成中にどれだけの乳酸を

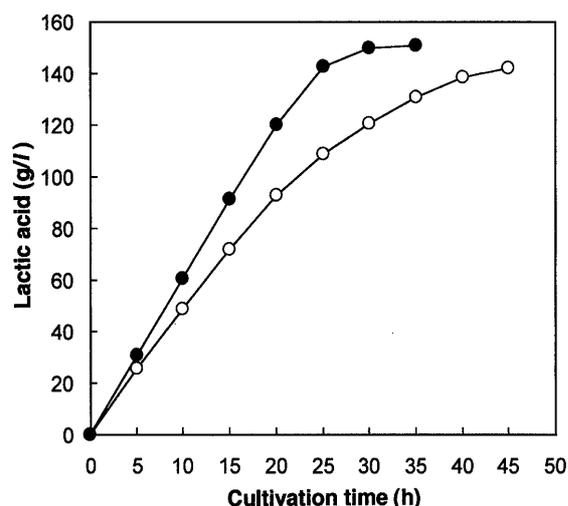


Fig. 2. Selection of a suitable alkaline for the continuous neutralizing cultivation of lactic acid bacteria on the J-cultivation of HSJ cultivation method. GYP broth contained 150 g/l glucose and *Lactobacillus casei* B12-2 were used in the experiment. Symbols: ○, 5 M NaOH; ●, 5 M NH₄OH.

蓄積し得るかや、検出された A 菌・B 菌のどちらが多く乳酸を作っているかなどの判断に有効な方法である。

1.2. 連続中和培養による乳酸多量生産の確立 HSJ 培養法の中で、H 培養および S 培養は菌体量を増やすための前段階の培養期間であり、最後の J 培養の 5 日間は多量の菌体の存在下で一気に乳酸を蓄積させる方法である。したがって、J 培養が乳酸蓄積のための本培養ということになる。そこで、HSJ 培養法における J 培養をアルカリで中和しながら培養することにより、さらに多量の乳酸の蓄積が期待できる。*L. casei* B12-2 は培養液中のグルコース濃度が 150 g/l まで耐糖性であった。そこで、H 培養と S 培養は 5GYP 培地 750 ml を使用し、J 培養だけ 150 g/l のグルコースを含む GYP 培地 750 ml を用いることにした。J 培養では 5 M の水酸化ナトリウム水溶液、またはアンモニア水溶液を中和剤として用いて pH7.0 にコントロールした。なお、乳酸蓄積量はアルカリの消費量から算出した。その結果、水酸化ナトリウム水溶液よりもアンモニア水溶液を用いる方が最大乳酸濃度に達する時間が短く、25 時間で培養液中のグルコースがすべて消費され、理論値に匹敵する約 150 g/l の乳酸の蓄積があった (Fig. 2)。

2. L-乳酸の工業的製造法の検討

2.1. L-乳酸発酵 安価な L-乳酸を生産するためには、安価な培地が不可欠である。一般的に乳酸発酵の窒素源としては酵母エキスやペプトンなどが使われるが、

工業的に使用するには高価である。サンエイ糖化株式会社はトウモロコシを原料にしてグルコースを生産しているが、トウモロコシの浸漬液であるコーンステープリカー (CSL) が副産物として排出される。CSL にはアミノ酸、ミネラル、ビタミンが豊富に含まれているので乳酸菌の培地成分として優れている (Table 1)。そこで、本開発では低コストの培地として CSL を窒素源に使用することにした。一方、現在のデンプン糖工業では、CSL は野生の乳酸菌により発酵させるので D および L-乳酸が含まれている。したがって、培養液中の L-乳酸の光学純度を上げるためには、使用する CSL 濃度を極力下げる必要がある。*L. casei* B12-2 は高い乳酸蓄積濃度を示すが、生成する L-乳酸の光学純度は 90% とポリ-L-乳酸の原料としては満足できるものではなかった。そこで、低濃度の CSL で高い光学純度の L-乳酸を高濃度に蓄積する乳酸菌として *L. lactis* 332 を用いることにした。なお、L-乳酸の光学純度 (%) は $100(L-D)/(L+D)$ で算出される。ここで、L, D は任意の単位で表される L-乳酸および D-乳酸の濃度である。工業用培地として 90 g/l グルコース、10 g/l CSL、20 mg/l 硫酸マンガンを用いた。

Table 1. Components of corn steep liquor.

Component	Concentration (l)
Water	513.4 g
Total nitrogen	32.4 g
Phosphorus	13.9 g
Potassium	22.4 g
Iron	68.2 mg
Calcium	194 mg
Copper	4.28 mg
Magnesium	5.8 g
Zinc	88.0 mg
Manganese	29.2 mg
Ash	79.3 g
Amino nitrogen	10.2 g
Reducing sugar	22.7 g
Lactic acid*	113.4 g
Vitamin B ₁	9.2 mg
Vitamin B ₂	2.7 mg
Vitamin B ₆	17 mg
Choline	1.8 g
Niacin	71.7 mg
Folic acid	308 μg
Pantothenic acid	14.9 mg
Biotin	354 μg
Inositol	3.8 g

pH 3.79.

* Total amount of D and L-lactic acid.

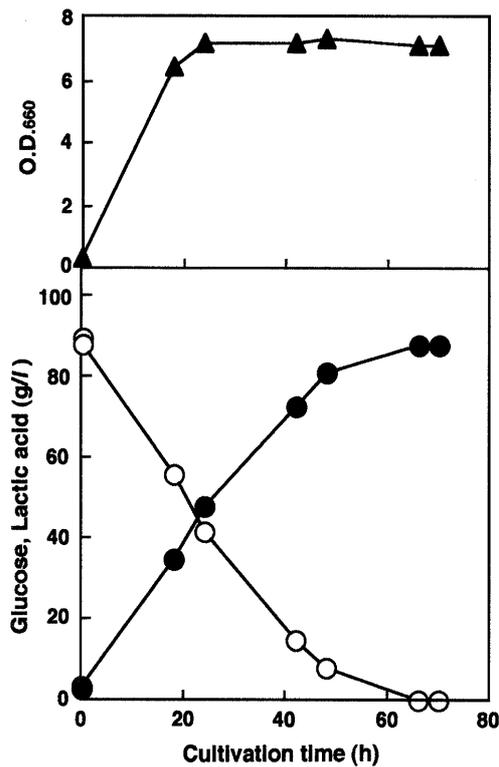


Fig. 3. Time course of lactic acid fermentation by *Lactococcus lactis* 332. Fermentation medium: glucose 90 g/l, corn steep liquor 10 g/l, $MnSO_4$ 20 mg/l. Symbols: ●, lactic acid; ○, glucose; ▲, cell growth (OD_{660}).

本開発では、種菌をHSJ培養法のHおよびS培養に当たる培養を本培養の発酵槽とは別の300 lの発酵槽で行い、J培養に当たる本培養を20 m³の発酵槽で行った。⁵⁾ 発酵中は25 rpmで攪拌し、6 Mアンモニア水でpH5.5にコントロールした(Fig. 3)。培養は70時間で終了し、乳酸濃度は88 g/lであった。

2.2. L-乳酸の精製 生成した乳酸発酵液には微量のグルコース、CSL由来のアミノ酸、リン酸や酢酸などの有機酸、カルシウムやマグネシウムなどの金属類が含まれている。これらの不純物はポリ-L-乳酸の中間体であるLL-ラクチドの合成を阻害するので、除去する必要がある。従来の工業的なL-乳酸製造法は発酵中に生成する乳酸を石灰で中和し、L-乳酸カルシウムとして回収し、硫酸によって遊離させ粗L-乳酸とするのが一般的であった。さらに、エタノールとエステル化し蒸留することにより純度を上げたものが、ポリ-L-乳酸の原料として使われていた。この方法では多量の硫酸カルシウムが発生する。そこで、本開発ではL-乳酸発酵の中和剤としてアンモニアを用い、バイポーラ膜でイオン交換することによって廃棄物を出さず、しかもアンモニアが再利用できるL-乳酸の精製法を開発した(Fig. 4)。さら

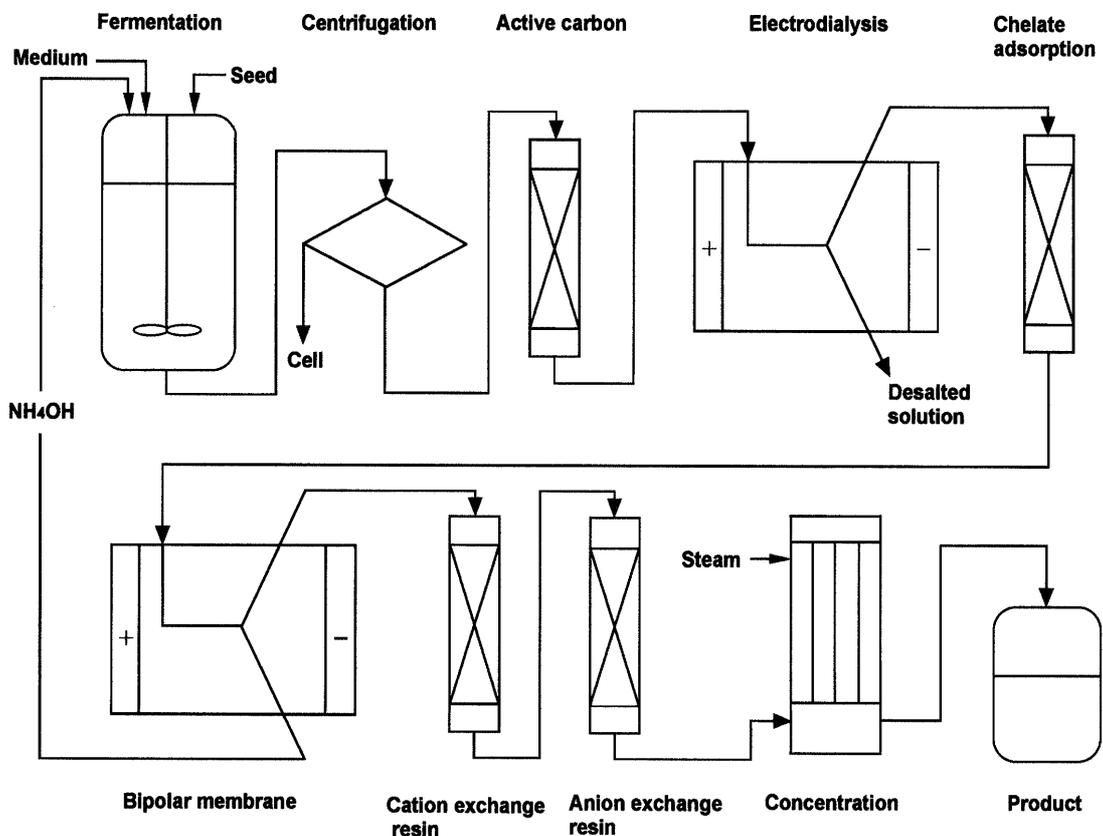


Fig. 4. Process for purification of lactic acid.

に、この方法はエステル化蒸留法よりも設備コストも、エネルギーコストも低く押さえられるという利点がある。⁶⁾

分離濃縮型イオン交換膜による電気透析は、海水の淡水化やアミノ酸調味料の濃縮に実用化されている。L-乳酸の濃縮をすべて熱に頼ろうとすると、多大なエネルギーを必要とする。そこで、本開発ではL-乳酸発酵液の濃縮に電気透析を併用することとした。工場の立地先によっては電気が安価に入手可能と考えたからである。まず、L-乳酸発酵液中の菌体などの不溶性固形分を遠心分離器で除き、活性炭で脱色した後に電気透析を行い、糖やタンパクなどの非電解質とL-乳酸アンモニウムやアミノ酸などの電解質を分離した。使用した装置は一枚あたりの膜面積が2.5 m²のアニオン交換膜とカチオン交換膜を一对として315対積層し、積層された膜の両端に配置した電極に252 Vの電圧を引加した。この工程で発酵液は約2倍に濃縮される。

次に発酵液はアンモニアで中和されているので、L-乳酸アンモニウムを遊離の酸にイオン交換する必要がある。バイポーラ膜と呼ばれる水分解型イオン交換膜（ネオセプタ BP-1、(株)トクヤマ製）はカチオン交換膜とアニオン交換膜が接合した構造を持つ。バイポーラ膜の両側に電極を置き、電圧を引加するとバイポーラ膜のカチオン交換膜とアニオン交換膜の接合面が水が電気分解される（Fig. 5）。この時の両膜外面間の理論電圧は0.83 Vである。すなわち、この値以上の電圧を引加すると、水はH⁺とOH⁻に分解される。このバイポーラ膜とカチオン交換膜とを交互に配置し、電圧を引加すると乳酸ア

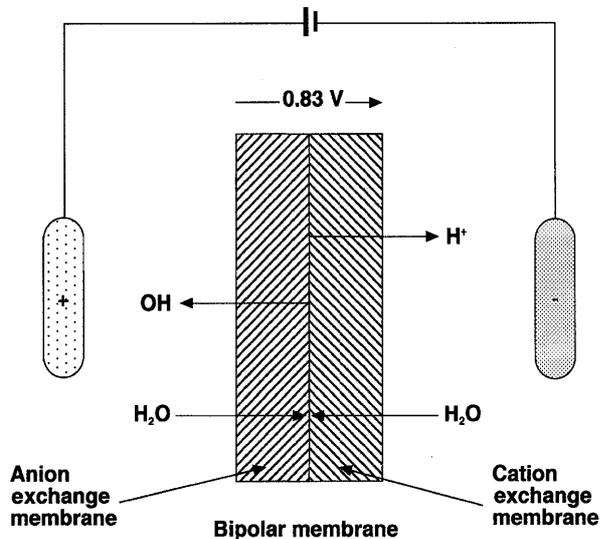


Fig. 5. Principle of bipolar membrane.

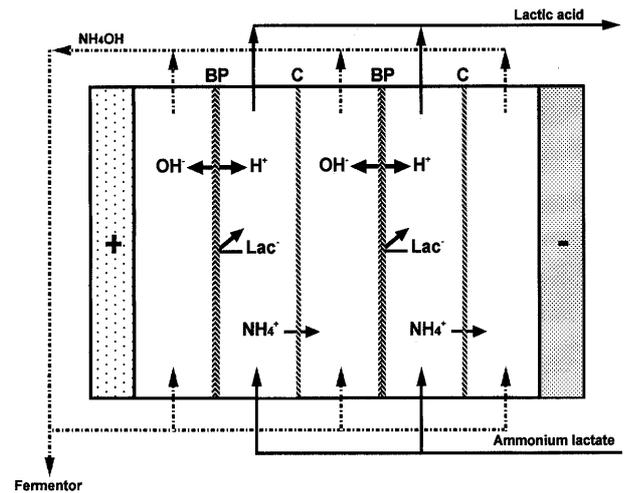


Fig. 6. Ion exchange from ammonium lactate to lactic acid with bipolar membrane. BP, bipolar membrane; C, cation exchange membrane; Lac-, lactate anion.

ンモニウムのアンモニウムイオンをプロトンに交換し、アンモニアも回収することができる（Fig. 6）。⁷⁻⁹⁾ バイポーラ膜を使った電気透析の特徴としては、電解法と比較して、アニオン交換膜とカチオン交換膜が接合しているので電極間の距離が短く引加する電圧を低くすることができる、電極上での酸化還元反応によるガスなどの発生がないという利点がある。また、イオン交換樹脂による方法と比較して、塩から一度に酸とアルカリが製造できる、樹脂の再生の必要がないという利点がある。しかし、発酵液に含まれるCa²⁺やMg²⁺などの2価のカチオンは、極微量でも水酸化物のコロイドを生じさせる。このコロイドがバイポーラ膜の膜面を詰らせ能力の低下を招く。そこで、これらのイオンをあらかじめキレート樹脂で除去した。使用した装置は一枚あたりの膜面積が2.5 m²のバイポーラ膜とカチオン交換膜を一对として、60対積層されている。積層された膜の両端に配置した電極に90 Vの電圧を引加した。なお、1 kgの乳酸アンモニウムを乳酸にイオン交換するのに必要な電力量は0.61 kWhであった。この処理液中には微量のアンモニア、酢酸、アミノ酸などが含まれているのでカチオン交換樹脂とアニオン交換樹脂で除去した。この処理液は乳酸濃度が200 g/lなので、熱による濃縮機で約900 g/lにまで濃縮した。このようにして得られたL-乳酸の分析結果をTable 2に二例示す。L-乳酸の光学純度は平均94.9%であった。さらに光学純度を上げるためにはCSLの処理を野生の乳酸菌ではなく、高い光学純度のL-乳酸を生産する乳酸菌をスターターとして使うことが考えられる。

Table 2. Analysis of purified product.

	Run 1	Run 2
Lactic acid (g/l)*	916	914
Reducing sugar (g/l)	<0.5	<0.5
Total amino acids (mg/l)	7.2	9.2
Optical purity (%)	94.4	95.4

* Total amount of D and L-lactic acid.

3. ポリ-L-乳酸の製造

㈱島津製作所が開発したポリ-L-乳酸製造プロセスは、L-乳酸からL-乳酸プレポリマーを合成し、これを熱解重合による分子内エステル交換反応によって環化し、L-乳酸の環状二量体であるLL-ラクチドを合成し、さらにこのLL-ラクチドを開環重合して高分子量のポリ-L-乳酸を工業的に製造するというものである (Fig. 7).

3.1. LL-ラクチドの合成 L-乳酸の環状二量体であるLL-ラクチドの合成方法としては、L-乳酸を濃縮しスズ系の触媒を添加後、反応蒸発によって製造する方法が文献などで報告されていた。¹⁰⁾しかし、この方法では、L-乳酸からのLL-ラクチド収率は40%以下であった。本開発では、L-乳酸を濃縮し、さらに還流することによって重量平均分子量3000-4000のプレポリマーとし、これを反応蒸発させてLL-ラクチドを合成する方法により、90%以上の収率を達成するに至った。また、LL-ラクチド合成過程の熱によってもL-乳酸はラセミ化することを見だし、これを最小限に抑えるため還流温度を三段階に分割する方法を開発した。¹¹⁾

3.2. LL-ラクチドの精製 このようにして得られたラクチドにもわずかに乳酸および直鎖の乳酸二量体、三量体 (以下、L₁₋₃と略す) が含まれる。これらは重合を阻害するので、高分子量のポリ-L-乳酸を製造するためには除去する必要がある。また、高結晶性のポリ-L-乳酸を製造するにはDD-ラクチドやmeso-ラクチドを除去する必要がある。LL-ラクチド、DD-ラクチドは共に融点が97.8°C、LLとDD-ラクチドのラセミ共晶物は124.0°C、meso-ラクチドは52.0°C、L₁₋₃はそれ以下である。この融点の差を利用し溶融晶析することによりL₁₋₃を除去することができる。工業的にL-乳酸とD-乳酸を分離することは、現在のところ不可能とされている。しかし、ラクチド合成中のラセミ化やCSL由来のD-乳酸のほとんどがmeso-ラクチドとなって除去される (Fig. 8)。さらに、DD-ラクチドがLL-ラクチドと共晶を形成す

ることにより除去されるので、高い純度のLL-ラクチドを得ることができる。この高い純度のLL-ラクチドを中間原料とすることによって、高結晶性のポリ-L-乳酸を製造することができる。そこで、溶剤を用いない溶融晶析法で精製を行った。装置は内径70 mm、長さ400 cmのパイプを4本持ち、60-90°Cで結晶化を、65-95°Cで部分溶解を、70-100°Cで全溶解という工程を4サイクル行った。なお、除去されたラクチドは、射出用や発泡用の低結晶性ポリ乳酸の中間原料となる。¹²⁾

3.3. LL-ラクチドの重合 重合により大量にポリ-L-乳酸を得た例は世界的にもなかった。本開発ではLL-ラクチドの開環重合により、ポリ-L-乳酸を大量に連続生産する方法を開発した。本技術は、使用溶剤を最小限に抑えるグリーンケミストリーの理念に沿って生み出され

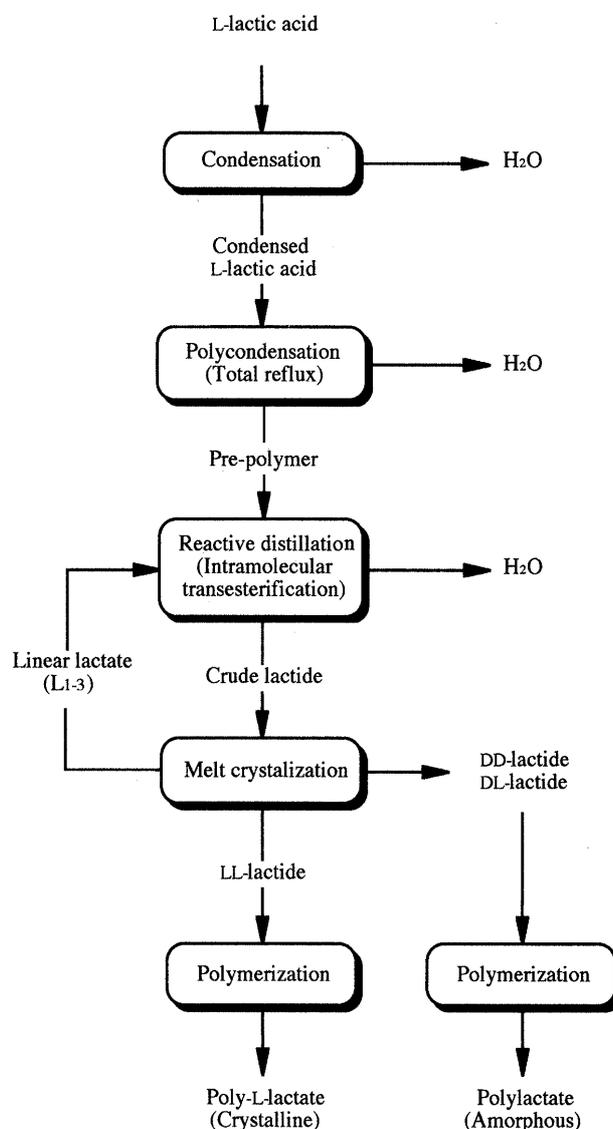


Fig. 7. Flowchart of poly-L-lactate production from L-lactic acid.

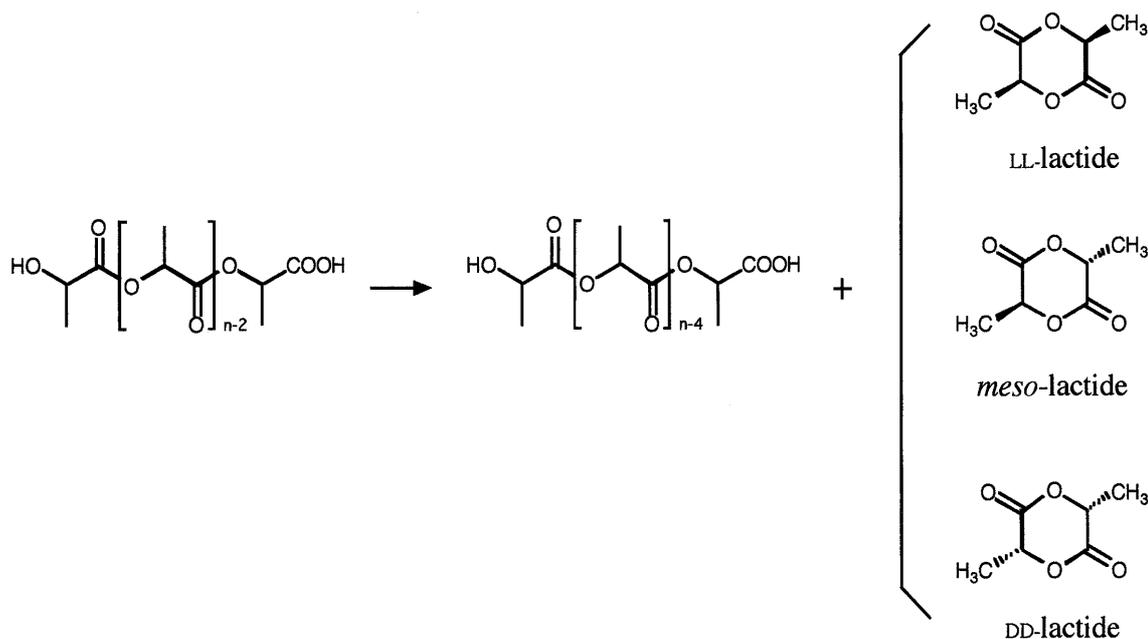


Fig. 8. Production of three isomers of lactide from pre-polymer.

た塊状重合であり、高品質のポリ-L-乳酸を製造するものである。得られたポリ-L-乳酸は重量平均分子量20万、融点175°C、ガラス転移点温度58°C、構成単位であるL-乳酸の光学純度は98.8%であり、高い結晶性を示しフィルムや繊維に適したものであった。

おわりに

ポリ-L-乳酸は従来、縫合糸や骨固定用ボルトなどになぜかに使われていたにすぎず、価格も数十万円/kgと汎用プラスチックの価格にはほど遠かった。本開発によりポリ-L-乳酸の価格は1000円/kg以下となり、さらに量産することにより300円/kg以下の目処も立ち汎用樹脂として本格的に普及することが可能となった。現在では、大手の成形加工メーカーで採用されており180t/年を出荷している。

本開発に関してはアメリカや中国のトウモロコシ由来のグルコースだけでなく、東南アジアのサゴやキャッサバ、欧州のビート、南米のサトウキビ、国内の古米、北海道の馬鈴薯、ファーストフードの食品残査などへの応用の問い合わせが後を絶たない。さらに、今後は直接人間の食料となるグルコースではなく、セルロースを糖化しL-乳酸の原料とする技術の開発も必要である。ポリ-L-乳酸は生分解性プラスチックとして国内で300万t/年の潜在的需要があると言われており、今後ますます需要は伸びるものと予測される。また、ポリ-L-乳酸は圧電・焦電性を持ち、光学活性中心を持つ材料として新たな

機能が見いだされる可能性がある。本開発は生物学、電気化学、化学工学、高分子化学がハイブリッド化した成果であり、21世紀の新しいバイオ産業の端緒ではないかと考えている。

文 献

- 1) 小原仁実：化学と生物，34，174-180(1993).
- 2) 小原仁実：生物学，74，308-311(1996).
- 3) 小原仁実：生物学，76，467-468(1998).
- 4) 岡田早苗：生物学，75，367-369(1997).
- 5) 岡田早苗，大塚正盛，内藤秀雄，土井梅幸：生物学，74，305-308(1996).
- 6) Gordon, C.I., Taylor, G.C., and Breitzke, W.C.: *Industrial and Eng. Chem.*, **44**, 1955-1966(1952).
- 7) 特開平 7-109591
- 8) 特開平 9-135698
- 9) 小林太郎，野間義昭，花田文夫：電解技術討論会要旨集，p. 69-72(1996).
- 10) Kulkarni, R.K., Pani, K.C., Neuman, C., and Leonard, F.: *Arch. Surg.*, **93**, 839-843(1966).
- 11) 特許第2830896号
- 12) 浦山裕司，小原仁実：島津評論，56，163-168(1999).