

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6201753号
(P6201753)

(45) 発行日 平成29年9月27日(2017.9.27)

(24) 登録日 平成29年9月8日(2017.9.8)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 P 13/08 (2006.01)	C 1 2 P 13/08	A
C 1 2 P 13/04 (2006.01)	C 1 2 P 13/04	
C 1 2 P 7/56 (2006.01)	C 1 2 P 7/56	
C 1 2 P 7/24 (2006.01)	C 1 2 P 7/24	
C 1 2 M 1/04 (2006.01)	C 1 2 M 1/04	

請求項の数 12 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-522748 (P2013-522748)	(73) 特許権者	000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(86) (22) 出願日	平成25年3月27日(2013.3.27)	(74) 代理人	100089118 弁理士 酒井 宏明
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/059086	(72) 発明者	金森 智子 滋賀県大津市園山1丁目1番1号 東レ株式会社 滋賀事業場内
(87) 国際公開番号	W02013/146920	(72) 発明者	澤井 秀樹 愛知県東海市新宝町31番地 東レ株式会社 東海工場内
(87) 国際公開日	平成25年10月3日(2013.10.3)	(72) 発明者	武内 紀浩 滋賀県大津市園山1丁目1番1号 東レ株式会社 滋賀事業場内
審査請求日	平成28年3月2日(2016.3.2)		
(31) 優先権主張番号	特願2012-82599 (P2012-82599)		
(32) 優先日	平成24年3月30日(2012.3.30)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 連続発酵による化学品の製造方法および連続発酵装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

発酵槽内の培養液中で細胞を培養することにより、原料を発酵させて化学品を生成する化学品生成ステップと、

前記化学品生成ステップで生成した化学品を含む培養液を、並列に配置された複数の分離膜ユニットに供給する培養液供給ステップと、

前記培養液供給ステップで供給された培養液をろ過して、前記化学品を含んだ透過液を分離するろ過ステップと、

前記ろ過ステップでろ過されない濃縮液を前記発酵槽内に還流する還流ステップと、

前記複数の分離膜ユニットに供給する酸素を含む気体の流量を2段階以上に変えるとともに、最も高流量の気体の供給を行う分離膜ユニットを順次変更しながら気体を供給することによりスクラビングする洗浄ステップと、

を含み、前記化学品生成ステップで培養する細胞の最適 $k_L a$ 値から所定の範囲内となるように、前記化学品生成ステップおよび前記洗浄ステップで供給する、酸素を含む気体の供給量および供給時間を設定することを特徴とする化学品の製造方法。

【請求項2】

前記ろ過ステップは、ろ過操作を間欠的に行うことを特徴とする、請求項1に記載の化学品の製造方法。

【請求項3】

前記細胞が細菌であることを特徴とする請求項1または2に記載の化学品の製造方法。

【請求項 4】

前記細菌が、エシェリシア属 (Genus Escherichia)、プロビデンシア属 (Genus Providencia)、コリネバクテリウム属 (Genus Corynebacterium)、ブレビバクテリウム属 (Genus Brevibacterium) またはセラチア属 (Genus Serratia) のいずれかに属する細菌であることを特徴とする請求項 3 に記載の化学品の製造方法。

【請求項 5】

前記細菌が、エシェリシア・コリ (Escherichia coli)、プロビデンシア・レットグーリ (Providencia rettgeri)、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum)、ブレビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum) またはセラチア・マルセセンス (Serratia marcescens) のいずれかであることを特徴とする請求項 3 に記載の化学品の製造方法。

10

【請求項 6】

前記細胞が酵母であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の化学品の製造方法。

【請求項 7】

前記化学品が、アミノ酸であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか一つに記載の化学品の製造方法。

【請求項 8】

前記アミノ酸が、L - スレオニン、L - リジン、L - グルタミン酸、L - トリプトファン、L - イソロイシン、L - グルタミン、L - アルギニン、L - アラニン、L - ヒスチジン、L - プロリン、L - フェニルアラニン、L - アスパラギン酸、L - チロシン、L - メチオニン、L - セリン、L - バリンまたは L - ロイシンであることを特徴とする請求項 7 に記載の化学品の製造方法。

20

【請求項 9】

前記化学品が有機酸であることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか一つに記載の化学品の製造方法。

【請求項 10】

前記化学品が乳酸であることを特徴とする、請求項 9 に記載の化学品の製造方法。

30

【請求項 11】

前記化学品がカダベリンであることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか一つに記載の化学品の製造方法。

【請求項 12】

発酵原料を細胞によって発酵培養することにより、該発酵原料を、化学品を含有する培養液に変換する発酵槽と、

前記培養液から化学品を分離する並列に配置された複数の分離膜ユニットと、

前記発酵槽から前記複数の分離膜ユニットに培養液を送液する発酵液循環手段と、

前記複数の分離膜ユニットに、酸素を含んだ気体の流量を 2 段階以上に変えて供給することによりスクラビング洗浄する気体供給手段と、

40

前記発酵槽で培養する細胞の最適 $k_L a$ 値から所定の範囲内となるように、前記発酵槽および前記複数の分離膜ユニットへの、酸素を含む気体の供給量および供給時間を制御する制御手段と、

を備え、前記制御手段は、最も高流量の気体の供給を行う分離膜ユニットを順次変更するよう制御することを特徴とする連続発酵装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は連続発酵による化学品の製造方法および連続発酵装置に関するものである。よ

50

り詳細には、発酵槽と前記発酵槽に接続された複数の分離膜ユニットを有する循環機構を備えた化学品の製造装置を用いて、分離膜ユニットに気体を供給しながら連続発酵により化学品を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物や培養細胞の培養を伴う物質生産方法である発酵法は、大きく(1)回分発酵法(Batch発酵法)および流加発酵法(Fed-Batch or Semi-Batch発酵法)と(2)連続発酵法(Continuous発酵法)とに分類することができる。上記(1)の回分発酵法および流加発酵法は、設備的には簡素であり、短時間で培養が終了し、また、純菌培養による生産物発酵においては培養菌以外の雑菌による汚染が起きる可能性が低いというメリットがある。しかし、時間の経過とともに培養液中の生産物濃度が高くなり、生産物阻害や浸透圧の上昇などの影響により生産性および収率が低下する。このため、長時間にわたり安定して高収率かつ高生産性を維持するのは困難である。

10

【0003】

一方、連続発酵法は、発酵槽内における目的物質の蓄積を回避する事により、上述の回分および流加発酵法に比べ長時間にわたって高収率かつ高生産性を維持できる。従来の連続培養は、発酵槽へ新鮮培地を一定速度で供給し、これと同量の培養液を槽外へ排出することによって、発酵槽内の液量を常に一定に保つ培養法である。回分培養では初発基質濃度が消費されると培養が終了するが、連続培養では理論的には無限に培養を持続できる。

20

【0004】

連続培養に関して、最近では、有機高分子分離膜を用いた連続培養装置が提案されている(例えば、特許文献1、2参照)。

【0005】

しかし、分離膜は、ろ過面にSS(Suspended Solid)や吸着物が付着することでろ過能力が低下し、必要なる過液量が得られなくなることがあった。

【0006】

一方、連続発酵ではなく、水処理の分野では、分離膜の洗浄に気体供給によるスクラビングを行うことが提案されている(例えば、特許文献3参照)。

しかし、連続発酵では、発酵液中の酸素量が発酵の成績に影響を与えるため、単純に水処理におけるスクラビング方法を適用すると、所望の速度で化学品が得られないという問題が起きることがある。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第07/097260号

【特許文献2】日本国特開2008-212138号公報

【特許文献3】日本国特許第3645814号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0008】

このように従来の技術では、膜分離技術を用いた連続発酵運転に対する適切なスクラビング洗浄方法について検討されておらず、膜面洗浄を行って分離膜のろ過性を維持しながら、かつ、発酵による化学品の生産性を高めるための方法が求められていた。

【0009】

本発明は、上記に鑑みてなされたものであって、簡便な操作方法で、気体による分離膜の洗浄効果を高めながら、長時間にわたり安定して高生産性を維持する連続発酵法による化学品の製造方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

50

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った結果、連続発酵装置で培養する細胞の最適 $k_L a$ 値に基づき、装置内に供給する酸素を含む気体の供給量を設定し、循環機構に備える複数の分離膜ユニットに気体の供給量を異なる量に順次変化させて供給することにより、分離膜の洗浄効果を保持しつつ、発酵性能を維持することが可能であることを見出した。

本発明の化学品の製造方法は、発酵槽内の培養液中で細胞を培養することにより、原料を発酵させて化学品を生成する化学品生成ステップと、前記化学品生成ステップで生成した化学品を含む培養液を、並列に配置された複数の分離膜ユニットに供給する培養液供給ステップと、前記培養液供給ステップで供給された培養液をろ過して、前記化学品を含んだ透過液を分離するろ過ステップと、前記ろ過ステップでろ過されない濃縮液を前記発酵槽内に還流する還流ステップと、前記複数の分離膜ユニットに酸素を含む気体を、少なくとも2つの異なる量に変化させて供給することによりスクラビングする洗浄ステップと、を含み、前記化学品生成ステップで培養する細胞の最適 $k_L a$ 値から所定の範囲内となるように、化学品生成ステップおよび洗浄ステップでの酸素を含む気体の供給量および供給時間を設定することを特徴とする。

【発明の効果】

【0011】

本発明によって、分離膜のろ過性を長時間にわたり安定させることが可能になるとともに、発酵成績を高めることが可能となり、広く発酵工業において、発酵生産物である化学品を低コストで長期間安定に生産することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、本発明の実施の形態にかかる連続発酵装置の一例を示す概略図である。

【図2】図2は、本発明の実施の形態の変形例にかかる連続発酵装置の一例を示す概略図である。

【図3】図3は、比較例1～3および実施例1、2の菌体濃度の変化図である。

【図4】図4は、比較例1～3および実施例1、2の生産速度の変化図である。

【図5】図5は、比較例1～3および実施例1、2の対糖収率の変化図である。

【図6】図6は、比較例1～3および実施例1、2の膜間差圧の変化図である。

【図7】図7は、比較例4および実施例3の菌体濃度の変化図である。

【図8】図8は、比較例4および実施例3の生産速度の変化図である。

【図9】図9は、比較例4および実施例3の対糖収率の変化図である。

【図10】図10は、比較例4および実施例3の膜間差圧の変化図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下に、本発明の実施の形態にかかる化学品の製造方法および連続発酵装置を図面に基づいて詳細に説明する。なお、本実施の形態により本発明が限定されるものではない。

1. 連続発酵装置

連続発酵装置の一例について、図1を参照して説明する。図1は、本発明の実施の形態にかかる連続発酵装置の概略図である。本実施の形態において、3つの分離膜ユニットを並列に接続した場合を例にとって説明するが、並列に接続する分離膜ユニットの本数に制限は無く、2以上の分離膜ユニットを使用するものであればよい。

【0014】

図1に示すように、連続発酵装置100は、発酵槽1、分離膜ユニット2A、2Bおよび2C、ならびに発酵槽1と分離膜ユニット2A、2Bおよび2Cとを接続する配管23および25とを備えている。発酵槽1と分離膜ユニット2A、2Bおよび2Cとは、配管23および25により接続されることで循環系を形成している。

【0015】

発酵槽1は、その内部に培養液が入れられるように構成されている。具体的には、発酵槽1は、耐圧性、耐熱性および耐汚れ性に優れる材質で作られる。発酵槽1には、円筒型

、多角筒型など様々な形状が適用可能である。発酵槽 1 は、発酵原料、細胞、その他発酵に必要な固体、液体または気体を注入して攪拌することができ、必要に応じて滅菌でき、さらに密閉することが可能な形状を備えればよい。培養液の攪拌効率の観点からは、発酵槽 1 は円筒型であることが好ましい。発酵槽 1 内は、発酵槽 1 の外部から発酵槽 1 内部に雑菌が入り増殖することを防ぐため、加圧状態に維持されることが好ましい。発酵槽 1 内の気圧を管理するために、発酵槽圧力計等の機構が設けられる。

【 0 0 1 6 】

分離膜ユニット 2 A、2 B および 2 C は、多数の中空糸膜または平膜等の分離膜を備える。また、分離膜ユニット 2 A、2 B および 2 C の詳細については後述するが、一つ分離膜ユニット 2 A、2 B および 2 C 内に、直列に接続した複数の分離膜モジュールを備えても良い。

10

【 0 0 1 7 】

連続発酵装置 1 0 0 は、制御装置 2 2 を備える。制御装置 2 2 は、各種の演算を行うことができる。また制御装置 2 2 は、各種センサの検知結果、使用者の入力、および各種設定に基づいて、連続発酵装置 1 0 0 内の各部の動作を制御する。

【 0 0 1 8 】

連続発酵装置 1 0 0 はさらに、発酵槽気体供給装置 2 1、温度制御部 5、攪拌装置 6、pH 制御部 7、レベル制御部 8 を発酵工程に主に関与する機構として備える。

【 0 0 1 9 】

発酵槽気体供給装置 2 1 は、発酵槽 1 内に気体を供給する。供給された気体は、回収され、再び発酵槽気体供給装置 2 1 により発酵槽 1 内に供給されてもよい。

20

なお、雑菌混入を抑制するために、発酵槽 1 内の圧力は、外気圧よりも高く保たれることが好ましい。

【 0 0 2 0 】

温度制御部 5 は、温度センサおよび温度調整部を備える。温度センサは発酵槽 1 内の培養液の温度を検知する。温度センサによる検知結果が一定の範囲を示すように、制御装置 2 2 による制御を受けて、温度調整部が動作する。こうして、発酵槽 1 内の温度が一定に維持されることで、発酵または細胞の増殖に適した温度環境が維持される。温度調整部は、加熱および冷却の一方又は両方の機能を有することができる。

【 0 0 2 1 】

攪拌装置 6 は、発酵槽 1 内の培養液を攪拌することで、適切な発酵環境を維持する。

30

【 0 0 2 2 】

pH 制御部 7 は、pH センサ 7 1 および中和剤供給ポンプ 1 3 を備える。pH センサ 7 1 は発酵槽 1 内の培養液の pH を検知する。中和剤供給ポンプ 1 3 は中和剤槽と発酵槽 1 とを接続する配管上に設置されており、中和剤を発酵槽 1 内に添加する。中和剤供給ポンプ 1 3 は、制御装置 2 2 の制御に基づいて、pH センサ 7 1 の検知結果が所定の範囲を示すように動作する。なお、中和剤としては酸および/またはアルカリが用いられる。

【 0 0 2 3 】

レベル制御部 8 は、レベルセンサ 8 1 および培地供給ポンプ 1 2 を備える。培地供給ポンプ 1 2 は、培地槽と発酵槽 1 とを接続する配管上に配置される。制御装置 2 2 の制御に基づいて、発酵槽 1 内の培養液量が所定の下限を下回ったことをレベルセンサ 8 1 の検知結果が示すと、発酵槽 1 へ培地を供給するように培地供給ポンプ 1 2 が稼働し、培養液量が上限に達したことを示すと、培地供給ポンプ 1 2 の動作を停止させる。こうして、発酵槽 1 内の培養液量が適切に保たれる。

40

【 0 0 2 4 】

連続発酵装置 1 0 0 は、発酵槽 1 と分離膜モジュール 2 A、2 B および 2 C との間で培養液を循環させる循環系を備える。具体的には、連続発酵装置 1 0 0 は、発酵槽 1 と分離膜ユニット 2 A、2 B および 2 C の一次側とを連通する配管 2 3、および分離膜ユニット 2 A、2 B および 2 C の分離膜を透過しなかった濃縮液を発酵槽 1 に戻す配管 2 5 を備える。なお、本実施の形態では、配管 2 3 は分離膜ユニット 2 A、2 B および 2 C の下部に

50

接続されているので、分離膜ユニット2 A、2 Bおよび2 Cには下部から培養液が供給される。発酵槽1から分離膜ユニット2 A、2 Bおよび2 Cに培養液を供給する配管2 3上には、循環ポンプ2 4が配置される。循環ポンプ2 4は、発酵槽1から分離膜ユニット2 A、2 Bおよび2 Cに向かって培養液を送るように稼働する。

【0025】

また、連続発酵装置100は、分離膜ユニット2 Aに接続され、ろ液（つまり透過液）を装置外に排出する配管2 6 Aを備える。この配管2 6 A上には、ろ過ポンプ1 4 Aが設けられると共に、ろ過バルブ1 5 Aが設けられる。分離膜ユニット2 Bおよび2 Cについても同様に、ろ液を排出する配管2 6 Bおよび2 6 C、ろ過バルブ1 5 Bおよび1 5 C、およびろ過ポンプ1 4 Bおよび1 4 Cが設けられる。なお、本実施形態では、ろ過バルブ1 5 Aは、ろ過ポンプ1 4 Aと分離膜ユニット2 Aとの間に設けられているが、本発明はこの配置に限定されるものではない。

10

【0026】

連続発酵装置100は、分離膜ユニット2 Aを逆圧洗浄する構成を備える。逆圧洗浄とは、分離膜の二次側から一次側に洗浄用液体（以下、「洗浄液」と称することがある。）を通すことによって、分離膜を洗浄することである。連続発酵装置100は、洗浄液を収容する洗浄液槽、洗浄液槽と分離膜ユニット2 Aとの二次側とを接続する配管2 7 A、配管2 7 A上に設けられた洗浄ポンプ1 6 A、および洗浄バルブ1 7 Aを備える。洗浄ポンプ1 6 Aにより、洗浄液が分離膜ユニット2 Aに向けて送られる。配管2 7 Aには、圧力計、流量計、滅菌用装置、滅菌用フィルタなどが設置されていてもよい。分離膜ユニット2 Bおよび2 Cも同様に、洗浄液槽と分離膜ユニットの二次側を接続する配管2 7 Bおよび2 7 C、洗浄ポンプ1 6 Bおよび1 6 C、洗浄バルブ1 7 Bおよび1 7 Cを備える。なお、本実施形態では、洗浄バルブ1 7 Aは、洗浄ポンプ1 6 Aと分離膜ユニット2 Aとの間に設けられているが、本発明はこの配置に限定されるものではない。

20

【0027】

差圧制御部9 Aは、分離膜ユニット2 Aの膜間差圧（TPD：Transmembrane Pressure Difference）を検知することができる。つまり、分離膜ユニット2 Aの一次側（培養液が供給される側）と二次側（透過液すなわちろ液が排出される側）との間での差圧を検知する。分離膜ユニット2 Bおよび2 Cも同様に、それぞれ差圧制御部9 Bおよび9 Cを備える。

30

【0028】

さらに、連続発酵装置100は、スクラビング（scrubbing）に關与する構成を備える。スクラビングとは、分離膜ユニット2 A、2 Bおよび2 Cの1次側に気体を供給することで、その気体が分離膜ユニット内を通過する際に発生する液体及び気体の揺れによって、分離膜の表面に付着している物質を分離膜の表面から除去する洗浄方法である。なお、以下、分離膜モジュール2 A、2 B、2 C内の、処理対象である原液と接する側を1次側と呼び、処理後の濾過液と接する側を2次側と呼ぶ。

【0029】

連続発酵装置100では、特に、分離膜ユニット2 Aに対して、膜ユニット内のモジュールの下部、または、図2に示すように、各膜ユニットへの分岐点2 9と膜ユニットを連通する配管の途中、のいずれかから気体が供給される。特に、スクラビングに關与する構成として、気体供給源、気体供給口、および気体供給源からの気体の供給速度を調整することのできる機構が設けられる。

40

【0030】

具体的には、分離膜ユニット2 Aは、気体供給制御バルブ1 8 A、流量計2 0 Aを備える。分離膜ユニット2 Bおよび2 Cも同様に、気体供給制御バルブ1 8 Bまたは1 8 Cと、流量計2 0 Bまたは2 0 Cとをそれぞれ備える。本実施の形態では、分離膜ユニット2 A、2 B、2 Cには、配管2 8 A、2 8 B、2 8 Cを介してスクラビング気体供給装置1 9から気体が供給されるが、スクラビング気体供給装置1 9は分離膜ユニット2 A、2 B、2 C毎に備えても良い。また、分離膜ユニット2 A、2 B、2 Cが複数の分離膜モジュ

50

ールを直列に配列したものである場合、スクラビング気体供給装置 19 は、分離膜モジュール毎に備えられていても良いし、複数のユニットやモジュールに対して共通のスクラビング気体供給装置 19 を用いても良い。

【0031】

スクラビング気体供給装置 19 は、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に対して、分離膜の一次側に、つまり培養液が供給される側に、配管 28 A、28 B、28 C を介して接続される。配管 28 A、28 B、28 C は、分離膜ユニット 2 に培養液を供給する配管 23 とは異なる管である。また、配管 28 A、28 B、28 C は分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C 内に備えられた分離膜モジュールの下部に直接接続される。または、図 2 の変形例に示すように、各分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C への分岐点 29 と分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C とを連通する配管 23 A、23 B、23 C の途中で接続されていてもよい。本書において「下部」とは、分離膜モジュールの底部であってもよいし、底面から分離膜モジュールの高さの 1/3 までの範囲を指してもよい。配管 28 A、28 B、28 C を介して、スクラビング気体供給装置 19 は、気体を分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C へ送り込むことができる。気体供給制御バルブ 18 A、18 B、18 B は、配管 28 A、28 B、28 C 上に配置され、開閉することで分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C へ気体の供給量を調整することができる。配管 28 A、28 B、28 C には、発酵槽 1 内に雑菌が入らないように、滅菌用装置や滅菌用フィルタなどが設置されてもよい。

10

【0032】

気体供給口とは、気体を培養液または液体内に放出する部分である。気体供給口は、膜表面を洗浄できるような気泡を発生させるように形成されていることが好ましい。発生される気泡は微細気泡でもよいし粗大気泡でもよい。気泡の大きさは、分離膜の種類および散気量等の条件によって、気体供給口の形状を変えることで変更される。気体供給口は、塩化ビニル製またはステンレス製の配管に、空気吐出孔を設けることで形成されていてもよいし、多孔性のゴム、セラミック、メンブレンを用いた散気管なども使用することができる。気体供給口の大きさは、規定した量の気体が供給可能で、かつ、発酵液による詰まりが発生しない大きさであればよい。発酵系の中に雑菌が入らないように、気体供給口に滅菌用フィルタなどを設置することもできる。

20

【0033】

本実施の形態では、気体供給口は、配管 28 A、28 B、28 C の両端部のうち、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に近い側の端部、すなわち、分離膜モジュールの下部に設けられている。言い換えると、配管 28 A、28 B、28 C は、気体供給源から気体供給口までを繋ぐ管である。

30

【0034】

気体供給口は分離膜モジュールの下部にもうけられていてもよいが、図 2 に示す変形例のように、配管 28 A、28 B、28 C が、分岐点 29 と分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C とを連通する配管 23 A、23 B、23 C の途中で接続されている場合、配管 28 A、28 B、28 C と配管 23 A、23 B、23 C との接続部に設けられていてもよい。

【0035】

また、スクラビング気体供給装置 19 により供給される気体の線速度を測定する機構の例として、流量計 20 A、20 B、20 C が示される。流量計 20 A、20 B、20 C は、配管 28 A、28 B、28 C に設けられ、配管 28 A、28 B、28 C 内を通過する気体の流量を測定することができる。流量計 20 A、20 B、20 C は、スクラビング気体供給装置 19 により分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に供給される気体の線速度の測定に利用される。

40

【0036】

2. 分離膜ユニットおよびモジュール

本実施の形態における分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C とは、気体の供給が同一のバルブを介して同時に行われる分離膜の単位を指し、一つの分離膜モジュール、または直列に接続した二以上の分離膜モジュールを備える。

50

【 0 0 3 7 】

本実施の形態における分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に含まれる分離膜モジュールは、分離膜と、分離膜を収容するケースとを備える。

【 0 0 3 8 】

分離膜モジュールに用いられる分離膜は、有機膜、無機膜のいずれであってもよい。分離膜は、培養液のろ過に使用でき、気体による洗浄に対して耐久性を持つ膜であればよい。例えば、分離膜として、ポリフッ化ビニリデン製、ポリスルホン製、ポリエーテルスルホン製、ポリテトラフルオロエチレン製、ポリエチレン製、ポリプロピレン製、セラミックス製の膜が挙げられる。特に、発酵液による汚れが発生しにくく、かつ洗浄がしやすく、さらに気体による洗浄に対する耐久性に優れているポリフッ化ビニリデン製の分離膜が好ましい。

10

【 0 0 3 9 】

分離膜は、発酵液の中の細胞を効果的に分離するため、平均細孔径が $0.001 \mu\text{m}$ 以上 $10 \mu\text{m}$ 未満の細孔を有する多孔性膜であることが好ましい。また、分離膜の形状は、平膜、中空系膜などいずれの形状のものも採用することができるが、モジュール体積に比べ膜面積が広い中空系膜が好ましい。膜の平均孔径は、ASTM : F 3 1 6 - 8 6 記載の方法（別称：ーフドライ法）にしたがって決定される。なお、このーフドライ法によって決定されるのは、膜の最小孔径層の平均孔径である。

【 0 0 4 0 】

なお、ーフドライ法による平均孔径の測定の標準測定条件は、以下のとおりである。

20

使用液体：エタノール

測定温度：25

昇圧速度：1 kPa / 秒

平均孔径 [μm] は、下記式より求まる。

平均孔径 [μm] = ($2860 \times$ 表面張力 [mN / m]) / ーフドライ空気圧力 [Pa]

【 0 0 4 1 】

エタノールの 25 における表面張力は $21.97 \text{mN} / \text{m}$ である（日本化学会編、化学便覧基礎編改訂 3 版、II - 8 2 頁、丸善（株）、1984 年）ので、標準測定条件の場合は、

30

平均孔径 [μm] = $62834.2 /$ (ーフドライ空気圧力 [Pa])

にて求めることができる。

【 0 0 4 2 】

外圧式中空系膜の外径は、 0.5mm 以上 3mm 以下であることが望ましい。外径が 0.5mm 以上であることで、中空系膜中に流れるろ過液の抵抗を比較的小さく抑えられる。また、外径が 3mm 以下であることで、発酵液または気体による外圧により中空系膜がつぶれることを抑制できる。

【 0 0 4 3 】

内圧式中空系膜の内径は、 0.5mm 以上 3mm 以下が望ましい。内径が 0.5mm 以上であることで、中空系膜中に流れる発酵液の抵抗を比較的小さく抑えることができる。また、内径が 3mm 以下であることで、膜表面積を確保することができるので、使用モジュール本数の増大を抑制することができる。

40

【 0 0 4 4 】

分離膜モジュールのケースは、耐圧性に優れる材質で作られており、円筒型、多角筒型など、発酵液をモジュールの 1 次側へ供給することができる形状であれば良い。発酵液の流れやハンドリング製を考慮すると、ケースは円筒型であることが好ましい。

【 0 0 4 5 】

3 . 化学品の製造方法

本実施形態の製造方法は、連続発酵により化学品を製造する方法であって、以下のステップ (a) ~ (e) を備え、化学品生成ステップで培養する細胞の最適 $k_L a$ 値から所定

50

の範囲内となるように、化学品生成ステップおよび洗浄ステップで供給する、酸素を含む気体の供給量および時間を設定することを特徴とする：

(a) 発酵槽内の培養液中で細胞を培養することにより、原料を発酵させて化学品を生成する化学品生成ステップ

(b) 前記化学品生成ステップで生成した化学品を含む培養液を、並列に配置された複数の分離膜ユニットに供給する培養液供給ステップ

(c) 前記培養液供給ステップで供給された培養液をろ過して、前記化学品を含んだ透過液を分離するろ過ステップ

(d) 前記ろ過ステップでろ過されない濃縮液を前記発酵槽内に還流する還流ステップ

(e) 前記複数の分離膜ユニットに酸素を含む気体を、少なくとも2つの異なる量に変化させて供給することによりスクラビングする洗浄ステップ。

各工程について、以下に説明する。なお、工程 (a) ~ (d) は細胞の連続培養工程または連続発酵工程と言い換えられてもよい。

【 0 0 4 6 】

3 - 1 . 化学品の生成工程

[細胞]

本明細書において、「細胞」とは、微生物および培養細胞、ならびに真核細胞および原核細胞を包含する概念である。微生物としては、発酵工業においてよく使用されるパン酵母などの酵母；大腸菌、乳酸菌、コリネ型細菌などの細菌；糸状菌；放線菌等が用いられる。培養細胞は、多細胞生物由来の細胞であり、例えば動物細胞および昆虫細胞などが挙げられる。化学品の製造に用いられる細胞は、自然環境から単離されたものでもよく、また、突然変異や遺伝子組換えによって一部性質が改変されたものであってもよい。細胞は、目的とする化学品、原料、培養条件等に応じて選択される。

【 0 0 4 7 】

真核細胞は、細胞内に細胞核 (核) と呼ばれる構造を持ち、細胞核 (以下、単に「核」と称する) を有さない原核生物とは明確に区別される。化学品の製造には、真核細胞のうちで酵母を好ましく用いることができる。化学品の製造に好適な酵母としては、例えば、サッカロミセス属 (Genus *Saccharomyces*) に属する酵母等が挙げられる。この中でも特に好ましい種は、サッカロミセス・セレビセ (*Saccharomyces cerevisiae*) である。

【 0 0 4 8 】

原核細胞は、細胞内に細胞核 (核) と呼ばれる構造を持たず、細胞核 (核) を有する真核生物とは明確に区別される。化学品の製造には、例えば、原核細胞のうちで乳酸菌を好ましく用いることができる。

【 0 0 4 9 】

また、L - アミノ酸を生産する細胞として、例えば、発酵工業においてよく使用される大腸菌やコリネ型細菌などの細菌が挙げられる。具体的には、L - スレオニン生産菌としては、エシェリシア属 (Genus *Escherichia*)、プロビデンシア属 (Genus *Providencia*)、コリネバクテリウム属 (Genus *Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム属 (Genus *Brevibacterium*) またはセラチア属 (Genus *Serratia*) に属する細菌等が挙げられる。この中でも特に好ましい種は、エシェリシア・コリ (*Escherichia coli*)、プロビデンシア・レットゲリ (*Providencia rettgeri*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) およびセラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*) である。

【 0 0 5 0 】

また、L - リジン生産菌としては、エシェリシア属、コリネバクテリウム属またはブレ

10

20

30

40

50

ビバクテリウム属に属する細菌等が挙げられる。この中でも特に好ましい細菌は、エシェリシア・コリ、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・フラバムおよびブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムである。

【0051】

L - グルタミン酸生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・フラバムおよびブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムが好ましい。

【0052】

L - トリプトファン生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・フラバム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) およびエシェリシア・コリ等が挙げられる。

10

【0053】

L - イソロイシン生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・フラバム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムおよびセラチア・マルセセンス等が挙げられる。

【0054】

L - グルタミン生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・フラバム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムおよびフラボバクテリウム・リゲンス (*Flavobacterium rigense*) 等が挙げられる。

20

【0055】

L - アルギニン生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・フラバム、セラチア・マルセセンス、エシェリシア・コリおよびバチルス・サブチリス等が挙げられる。

【0056】

L - アラニン生産菌としては、ブレビバクテリウム・フラバムおよびアルスロバクター・オキシダンス (*Arthrobacter oxydans*) 等が挙げられる。

【0057】

L - ヒスチジン生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・フラバム、ブレビバクテリウム・アモニアジェネス (*Brevibacterium ammoniagenes*)、セラチア・マルセセンス、エシェリシア・コリ、バチルス・サブチリスおよびストレプトマイセス・コエリコラー (*Streptomyces coelicolor*) 等が挙げられる。

30

【0058】

L - プロリン生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、カルチア・カテナフォルマ (*Kurthia cateniforma*)、セラチア・マルセセンスおよびエシェリシア・コリ等が挙げられる。

【0059】

L - フェニルアラニン生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・フラバム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムまたはエシェリシア・コリ等が挙げられる。

40

【0060】

L - アスパラギン酸生産菌としては、ブレビバクテリウム・フラバム、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megatherium*)、エシェリシア・コリおよびシュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) 等が挙げられる。

【0061】

L - チロシン生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・フラバム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムおよびエシェリシア・コリ等が挙げられる。

50

【0062】

L - メチオニン生産菌としては、エシェリシア・コリ、コリネバクテリウム・グルタミカム等が挙げられる。

【0063】

L - セリン生産菌としては、エシェリシア・コリ、コリネバクテリウム・グルタミカム、プレバクテリウム・フラバム、アルスロバスター・オキシダンス、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (*Corynebacterium acetoacidophilum*) およびプレバクテリウム・ラクトファーメンタム等が挙げられる。

【0064】

L - バリン生産菌としては、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム、セラチア・マルセセンスおよびクレブシエラ・ニューモニア (*Klebsiella pneumoniae*) 等が挙げられる。

10

【0065】

L - ロイシン生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムおよびセラチア・マルセセンス等が挙げられる。

【0066】

L - アミノ酸の生産能力を持つ微生物は、自然環境から単離されたものでもよく、また、突然変異や遺伝子組換えによって一部性質が改変されたものであってもよい。一例として、日本国特開平2 - 219582号公報に記載されているL - スレオニン生産性の向上したプロビデンシア・レトゲリ、および特表平3 - 500486号公報に記載されているL - アラニン生産性の向上したコリネバクテリウム・グルタミカム等が挙げられる。

20

【0067】

培養液中に含まれるL - アミノ酸の分離および精製は、従来知られているろ過、濃縮、蒸留および晶析などの方法を組み合わせて行うことができる。

【0068】

D - 乳酸を製造する場合、D - 乳酸脱水素酵素の酵素活性が増強された野生型株の細胞を用いることが好ましい。酵素活性を増強させる方法としては、従来知られている薬剤変異による方法も用いることができる。また、細胞に、D - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子 (以下、D - LDHともいうことがある) を組み込むことによりD - 乳酸脱水素酵素の酵素活性を付与、あるいは増強することもできる。つまり、化学品の生成には、組換え細胞も好適に用いられる。

30

【0069】

組換え細胞を用いてD - 乳酸を製造する場合、宿主細胞としては、原核細胞である大腸菌、および真核細胞である酵母などが好ましく、酵母が特に好ましい。また、酵母のうちサッカロマイセス属 (*Genus Saccharomyces*) に属する酵母が好ましく、サッカロマイセス・セレビセ (*Saccharomyces cerevisiae*) がさらに好ましい。特に、50%以上の対糖収率を示す酵母が好ましい。対糖収率とは、消費した全糖量に対する乳酸の生産量の比率である。

【0070】

D - LDHは、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) およびピルビン酸を、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD+) およびD - 乳酸に変換する活性を持つタンパク質をコードしていればよく、特定の配列には限定されない。例えば、D - LDHとしては、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、およびペディオコッカス・アシディラクティシ (*Pediococcus acidilactici*)、バシラス・ラエボラクティカス (*Bacillus laevolacticus*)、アメリカカプトガニ (*Limulus polyphemus*)、カプトガニ (*Tachypleus tridentatus*)、ミナミカプトガニ (*Tachypleus gigas*)、およびマルオカプトガニ (*Tachypleus rotundicauda*) 由来の遺伝子が好ましく、バシラス・ラエボラクティカス、およびアメリカカプトガニ由来の遺伝子がさらに好ましい。

40

50

【0071】

L-乳酸を製造する場合、L-乳酸脱水素酵素の酵素活性が増強された野生型株の細胞を用いることが好ましい。酵素活性を増強させる方法としては、従来知られている薬剤変異による方法も用いることができる。また、乳酸生産能力を人為的に付与された、あるいは乳酸生産能力を人為的に増強された細胞を用いることができる。例えば、細胞に、L-乳酸脱水素酵素遺伝子（以下、「L-LDH」と称することがある）を導入することで、L-乳酸生産能力を付与、あるいは増強することができる。つまり、組換え細胞も好適に用いられる。

【0072】

組換え細胞を用いてL-乳酸を製造する場合、宿主細胞としては、原核細胞である大腸菌、および真核細胞である酵母などが好ましい。酵母は特に好ましく用いられる。また、酵母のうちサッカロマイセス属（Genus *Saccharomyces*）に属する酵母が好ましく、サッカロマイセス・セレビセ（*Saccharomyces cerevisiae*）がさらに好ましい。

10

【0073】

L-LDHは、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）およびピルビン酸を、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）およびL-乳酸に変換する活性を持つタンパク質をコードしていればよく、特定の配列には限定されない。例えば、L-LDHとして、対糖収率の高い乳酸菌由来、ほ乳類由来、またはカエル由来の遺伝子を用いることができる。ほ乳類由来の遺伝子としては、ホモ・サピエンス（*Homo sapiens*）由来のL-LDHを好適に用いることができる。また、カエル由来の遺伝子としては、特にコモリガエル科（*Pipidae*）に属するカエル由来のL-LDHを用いることが好ましく、コモリガエル科に属するカエルの中でも、アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）由来のL-LDHを好ましく用いることができる。

20

【0074】

D-LDH、L-LDHには、遺伝的多型性の遺伝子、および変異誘発などによる変異型の遺伝子も含まれる。遺伝的多型性とは、遺伝子上の自然突然変異により遺伝子の塩基配列が一部変化しているものである。また、変異誘発とは、人工的に遺伝子に変異を導入することをいう。変異誘発は、例えば、部位特異的変異導入用キット（Mutank（タカラバイオ社製））を用いる方法、およびランダム変異導入用キット（BD Diversify PCR Random Mutagenesis（CLONTECH社製））を用いる方法などにより実行される。また、D-LDH、L-LDHは、NADHとピルビン酸をNAD⁺と乳酸に変換する活性を持つタンパク質をコードしているならば、塩基配列の一部に欠失または挿入が存在していても構わない。

30

【0075】

ピルビン酸を製造する場合について述べる。ピルビン酸を生産する細胞としては、例えば、シュードモナス属（Genus *Pseudomonas*）、コリネバクテリウム属（Genus *Corynebacterium*）、エシェリシア属（Genus *Escherichia*）、アシネトバクター属（Genus *Acinetobacter*）に属する細菌が挙げられる。また、シュードモナス・フルオレエセンス（*Pseudomonas fluorescens*）、シュードモナス・アエロギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）、エシェリシア・コリ（*Escherichia coli*）などの細菌がより好ましい。さらに、突然変異または遺伝子組換えによって、性質の一部が改変された細菌が用いられてもよい。例えば、酸化的リン酸化によるATP生産に直接関与するATPase遺伝子を変異、または欠失させた細菌も好ましく用いられる。

40

【0076】

またカビおよび酵母なども好ましく用いられる。例えば、サッカロマイセス属（Genus *Saccharomyces*）、トルロプシス属（Genus *Toluropus*

50

is)、カンジダ属 (Genus Candida)、またはシゾフィリウム属 (Genus Schizophyllum) に属するカビおよび酵母を用いることができる。さらに好ましくは、サッカロミセス・セレビセ (Saccharomyces cerevisiae)、サッカロミセス・コプシス (Saccharomyces copsis)、カンジダ・グラブラータ (Candida glabrata)、カンジダ・リポリチカ (Candida lipolytica)、トルロプシス・グラブラータ (Toluropusis glabrata)、またはシゾフィリウム・コムネ (Schizophyllum commune) などに属するカビおよび酵母を用いてピルビン酸を製造することが出来る。

【0077】

10

培養液に含まれるピルビン酸の分離および精製は、ろ過および陰イオン交換カラムを用いた方法により行うことができる。例えば、日本国特開平6-345683に示される弱塩性イオン交換体を用いた精製法を好適に用いることができる。

【0078】

イタコン酸を製造する場合について述べる。イタコン酸を生産する細胞としては、例えばカビあるいは酵母を好ましく用いることができる。更に好ましくは、アスペルギルス属 (Genus Aspergillus)、あるいはウスティラゴ属 (Genus Ustilago) に属するカビ、およびカンジダ属 (Genus Candida)、ロドトルラ属 (Genus Rhodotorula) に属する酵母が挙げられる。中でも、アスペルギルス・テレウス (Aspergillus terreus)、アスペルギルス・イタコニクス (Aspergillus itaconicus)、ウスティラゴ・メイディス (Ustilago maydis)、ウスティラゴ・シノドンティス (Ustilago cynodontis)、およびウスティラゴ・ラベンホルスティナ (Ustilago rabenhorstina) のカビ、あるいはカンジダ・アンタルクティカ (Candida antarctica) を、イタコン酸の生産に好ましく用いることができる。

20

【0079】

カダベリンを製造する場合について述べる。カダベリンを生産することが可能な細胞としては、リジン脱炭酸酵素および/またはリジン・カダベリンアンチポーターの酵素活性が増強された微生物が好ましい。更に好ましくは、リジン脱炭酸酵素および/またはリジン・カダベリンアンチポーターをコードする遺伝子を組み込んだ組換え微生物が挙げられる。更に好ましくは、リジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子が1または2種類以上組み込まれている組換え微生物が挙げられる。

30

【0080】

カダベリンを製造する場合、組換え微生物としては大腸菌およびコリネ型細菌が好ましく、リジン脱炭酸酵素活性を有し、かつホモセリン栄養要求性またはS-(2-アミノエチル)-L-システイン耐性の少なくともいずれか1つの特徴を有しているコリネ型細菌がさらに好ましい。更には、微生物は、ホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を欠損していることが好ましく、遺伝子挿入変異生成によりホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を欠損していることが更に好ましい。また、コリネ型細菌の属が、コリネバクテリウム属およびプレバクテリウム属からなる群より選ばれる少なくとも1つの属であることが好ましい。更に好ましくは、コリネバクテリア・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) である。

40

【0081】

[培地]

発酵原料(以下、単に「原料」と称する。)とは、発酵によって目的の化学品を生じる物質である。原料は、細胞、培養条件、および目的とする化学品等に応じて、変更可能である。

【0082】

培養に用いられる培地は、原料を含むと共に、細胞の生育を促し、目的とする発酵生産

50

物である化学品を良好に生産させ得る成分を含む。本明細書では、特に限定しない限り、「培地」とは液体培地を指す。培地は、例えば、炭素源、窒素源、無機塩類、および必要に応じてアミノ酸、およびビタミンなどの有機微量栄養素を含有する。

【0083】

上記の炭素源としては、例えば、グルコース、シュークロース、フラクトース、ガラクトースおよびラクトース等の糖類；これら糖類を含有する澱粉、澱粉加水分解物、甘藷糖蜜、甜菜糖蜜、ケーンジュース；甜菜糖蜜またはケーンジュースからの抽出物もしくは濃縮液；甜菜糖蜜またはケーンジュースのろ過液；シラップ（ハイテストモラセス）；甜菜糖蜜またはケーンジュースからの精製もしくは結晶化された原料糖；甜菜糖蜜またはケーンジュースからの精製もしくは結晶化された精製糖；酢酸やフマル酸等の有機酸；エタノールなどのアルコール類；並びにグリセリンなどが使用される。ここで糖類とは、多価アルコールの最初の酸化生成物であり、アルデヒド基またはケトン基をひとつ持ち、アルデヒド基を持つ糖をアルドース、ケトン基を持つ糖をケトースと分類される炭水化物のことを指す。

10

【0084】

また、上記の窒素源としては、例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源が使用され、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンステープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用される。

20

【0085】

また、上記の無機塩類としては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩およびマンガン塩等を適宜使用することができる。

【0086】

[培養液]

培養液とは、培地およびその中で培養されている細胞を含み、培養の結果として生成された化学品を含み得る。

分離膜モジュールにより得られるろ液には、実質的に細胞は含まれないが、説明の便宜上、ろ液も培養液と称することがある。

【0087】

30

[培養]

連続発酵装置100では、発酵槽1内へ原料を導入しつつ、発酵槽1内から培養液を引き抜くことで、連続培養が行われる。

【0088】

培養初期にBatch培養またはFed-Batch培養を行って、細胞濃度を高くした後に、連続培養を開始しても良い。この際、必要に応じて、細胞の引き抜きを行うこともできる。また、高濃度の細胞を接種し、培養開始とともに連続培養を行っても良い。

【0089】

原料の導入について説明する。図1では、培養実行中に培地供給ポンプ12が稼働することで、発酵槽1内に培地が導入され、その結果として原料が導入される。

40

【0090】

培養実行中、原料の導入は停止されずに常に行われていてもよいし、状況に応じて原料の導入と停止とが切り替えられてもよい。例えば、上述したように、培地の導入の開始および停止が、レベルセンサ81の検出結果に基づいて行われてもよいし、図示しないタイマーの計測結果に基づいて一定の時間毎に行われてもよい。なお、原料の導入が自動で行われる形態だけでなく、手動で行われる形態も、本発明の技術的範囲に含まれる。

【0091】

次に、培養液の引き抜きについて説明する。培養液中の細胞の濃度は、培養液の環境が微生物または培養細胞の増殖にとって不適切となって死滅する比率が高くない範囲で、高い状態で維持することが、効率よい生産性を得るのに好ましい。

50

【 0 0 9 2 】

連続発酵装置 1 0 0 は、循環系によって培養液を引き抜くことで、化学品の回収を行いつつ、細胞濃度を高く維持しながら、連続培養を行うことができる。循環系を用いた培養液の引き抜きの詳細については、後述する。

【 0 0 9 3 】

発酵槽 1 には、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C につながる配管 2 3 の他に、引き抜き用の流路が接続されていてもよく、培養液の引き抜きが、この引き抜き用の流路を通じて行われてもよい。このとき、培養液の液体部分だけでなく、細胞も引き抜かれてもよい。

【 0 0 9 4 】

培養中に、発酵槽 1 に新たな細胞が導入されてもよい。細胞の導入は、手動で行われてもよいし、自動的にも行われてもよい。

10

【 0 0 9 5 】

発酵槽 1 においては、原料の供給と培養液の引き抜きの開始時期は必ずしも同じである必要はない。また、原料の供給および培養液の引き抜きは連続的であってもよいし、間欠的であってもよい。

【 0 0 9 6 】

連続培養操作は、管理上、通常、単一の発酵槽 1 で行うことが好ましい。しかしながら、細胞を増殖させつつ生産物を生成する連続発酵培養法であれば、発酵槽 1 の数は問わない。発酵槽 1 の容量が小さい等の理由から、複数の発酵槽 1 を用いることもあり得る。その場合、複数の発酵槽 1 を配管で並列または直列に接続して連続培養を行っても、高い生産性が得られる。

20

【 0 0 9 7 】

図 1 の連続発酵装置 1 0 0 においては、発酵槽 1 内の培養液は、攪拌装置 6 によって攪拌され、さらに、温度制御部 5、pH 制御部 7、レベル制御部 8 によって、発酵に適した条件が維持される。

【 0 0 9 8 】

細胞の培養は、通常、pH が 3 以上 10 以下で、温度が 15 以上 65 以下の範囲で行うことができる。培養液の pH は、無機の酸あるいは有機の酸、アルカリ性物質、さらには尿素、水酸化カルシウム、炭酸カルシウムおよびアンモニアガスなどによって、上記範囲内のあらかじめ定められた範囲内に調整される。連続発酵装置 1 0 0 においては、制御装置 2 2 の制御の下、pH 制御部 7 によって pH が自動制御され、温度制御部 5 によって温度が自動制御される。

30

【 0 0 9 9 】

3 - 2 . 培養液のろ過工程

ろ過工程により、培養液から連続的に化学品を回収することができ、かつ培養を継続することができる。具体的には、図 1 においては、循環ポンプ 2 4 によって、培養液が発酵槽 1 から引き抜かれ、配管 2 3 を通って分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に供給される。培養液は、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C によって、濃縮液と透過液とに分離される。

【 0 1 0 0 】

図 1 の循環ポンプ 2 4 はクロスフロー循環ポンプに該当し、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C ではクロスフローろ過が行われる。ただし、本発明はこれに限定されるものではなく、膜ろ過方法として全量ろ過が採用されてもよい。ただし、連続発酵運転では膜に付着する微生物等の汚れの量が多いので、この汚れを効果的に除去するためには、クロスフローろ過を行うことが好ましい。クロスフローろ過によって、培養液の剪断力で汚れを除去することができるからである。クロスフローにさらにスクラビングを組み合わせることによって、より高い洗浄効率を実現することができる。

40

【 0 1 0 1 】

ろ過の駆動力は、発酵槽 1 と分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C との液位差（水頭差）を利用するサイホンによって得られてもよいし、クロスフロー循環ポンプにより発生する膜間差圧によって得られてもよい。また、ろ過の駆動力として、分離膜ユニット 2 A、2 B

50

、2 C のろ液側に吸引ポンプが設置されてもよい。図 1 の形態では、ろ過ポンプ 1 4 A、1 4 B、1 4 C が吸引ポンプに該当する。

【 0 1 0 2 】

クロスフロー循環ポンプを使用する場合には、吸引ポンプの圧力により膜間差圧を制御することができる。さらに、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C の一次側に導入する気体または液体の圧力によっても膜間差圧を制御することができる。分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C の一次側の圧力とろ液側の圧力との差を膜間差圧として検出し、この膜間差圧に基づいて、ポンプの制御等を行うことができる。

【 0 1 0 3 】

図 1 の構成では、循環ポンプ 2 4 によって、発酵槽 1 から分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C へ培養液が供給される。また、差圧制御部 9 A、9 B、9 C によって検知された膜間差圧に応じて、循環ポンプ 2 4 およびろ過ポンプ 1 4 A、1 4 B、1 4 C の動作が制御されることで、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に供給される培養液の量が適切に調整される。

10

【 0 1 0 4 】

ろ過は連続的に行うこともできるし、間欠的に行うこともできる。間欠的にろ過を行う場合、例えばろ過を 5 ~ 1 2 0 分間継続して実行する毎に、所定の時間（例えば 0 . 1 ~ 1 0 分間）ろ過を停止することができる。より好ましくは、ろ過を 5 ~ 1 0 分間継続するごとに、0 . 2 5 ~ 3 分間ろ過を停止する。後述するように、スクラビングは、ろ過停止中に行っても良いし、ろ過中に行っても良い。

20

【 0 1 0 5 】

3 - 3 . 分離および循環工程

培養液中の細胞は分離膜を透過しないので、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C を通過した濃縮液（透過しなかった液体）では、細胞濃度が高められている。濃縮液が配管 2 5 を通って発酵槽 1 に戻されることで、発酵槽 1 内に細胞が保持される。分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C の分離膜を透過したろ液は、配管 2 6 A、2 6 B、2 6 C を通って装置外に排出される。

こうして、発酵槽 1 内の細胞濃度は高く保たれ、かつ化学品が連続的に培養系から分離される。

【 0 1 0 6 】

3 - 4 . 気体供給工程

気体の供給は、その全量を分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C を通して行ってもよいし、一部を発酵槽 1 に直接行ってもよい。特に、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C の洗浄効果と、後述する最適 $k_L a$ を考慮して、適切な量の気体をスクラビング気体供給装置 1 9 によって分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C を通して供給し、残りの量を発酵槽 1 へ直接供給することが好ましい。

30

【 0 1 0 7 】

図 1 に示す構成では、発酵槽 1 へ気体を供給する工程は、発酵槽気体供給装置 2 1 および攪拌装置 6 によって実行可能である。

【 0 1 0 8 】

一方、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C へのスクラビング用の気体の供給は、スクラビング気体供給装置 1 9 によって行われる。気体の供給によって、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C 内の分離膜から、汚れが除去される。

40

【 0 1 0 9 】

複数の分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に対して、スクラビング気体供給装置 1 9 は 1 つでも複数でも良い。1 つのスクラビング気体供給装置 1 9 から各分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C への気体供給切り替えは、気体供給制御バルブ 1 8 A、1 8 B、1 8 C 等で行う。

【 0 1 1 0 】

図 1 に示す構成では、スクラビング開始時には、気体供給制御バルブ 1 8 A、1 8 B、

50

18Cが、制御装置22またはタイマー等の制御により開かれる。スクラビング停止時には、同様に、制御装置22またはタイマー等の制御により、これらの気体供給制御バルブ18A、18B、18Cが閉じられる。

【0111】

スクラビング時には、分離膜ユニット2A、2B、2Cへの培養液等の液体の供給も行われる。スクラビングによる洗浄効果と、分離膜ユニット2A、2B、2Cにおける液体の流れによる洗浄効果とが合わさることで、高い洗浄効果が得られる。

【0112】

特に図1の構成では、スクラビング時に、分離膜ユニット2A、2B、2Cに発酵槽1から培養液が供給される。具体的には、スクラビング用の気体が供給されているときに、循環ポンプ24が稼働する。このとき、ろ過ポンプ14A、14B、14Cが停止され、かつろ過バルブ15A、15B、15Cが閉、すなわち、ろ過を停止してもよい。また、ろ過ポンプ14A、14B、14Cが稼働し、かつろ過バルブ15A、15B、15Cが開かれていてもよい。

【0113】

こうして、培養液の流れによる剪断力とスクラビングによる洗浄効果とにより、高い洗浄効果が得られる。なお、気体供給時に分離膜ユニット2A、2B、2Cに供給される液体は、培養液に限定されるものではない。培養液以外には、例えば細胞のっていない培地等、発酵を阻害しないような液体を用いることができる。

【0114】

スクラビングに用いられる気体としては、ガスボンベ、ブローア、コンプレッサー、あるいは配管によって供給される圧縮ガスなどを使用することができる。つまりスクラビング気体供給装置19としては、気体を圧縮し、その一方で、一定の圧力でその気体を供給することが可能な装置、または、圧縮された気体を収容しており、一定の圧力でその気体を供給することが可能なタンクが用いられる。

【0115】

スクラビングによって供給される気体は、酸素を含有する気体であることが好ましく、純酸素であってもよい。また、酸素の濃度は、発酵に悪影響のない気体、例えば、空気、窒素、二酸化炭素、メタン、または前記気体らの混合気体などを混合することで、調整可能である。酸素の供給速度を上げるときは、単純に供給量を増加させる以外に、空気に酸素を加えて酸素濃度を21%以上に保つ、培養液を加圧する、攪拌速度を上げる、あるいは通気速度を上げるなどの手段を用いることができる。

【0116】

スクラビング洗浄の効果とは、分離膜の表面に付着した細胞等の汚れを除去することである。さらに、スクラビング洗浄により、発酵効率を向上させることも可能である。スクラビングにより供給された気体は、培養液と接触し、分離膜ユニット2A、2B、2Cおよび配管25の中で発酵液と接触しながら流れる。分離膜ユニット2A、2B、2Cの中では、分離膜に接触して膜を揺らし、分離膜ユニット2A、2B、2Cから発酵槽1まで、配管25の中で発酵液と接触しながら流れて発酵槽1に入り、発酵槽1中で攪拌された後、発酵液面の上部にある空間に上昇し、発酵液との接触が終わる。一方、発酵槽1に直接気体が供給された場合は、発酵槽1中で攪拌された後、すぐに発酵液面の上部にある空間に上昇し、発酵液との接触が終わる。したがって、本実施の形態では、分離膜ユニット2A、2B、2Cに気体を供給しているため、酸素を含む気体を発酵槽1に供給した場合よりも、発酵液と気体との接触が増え、これにより、より多くの酸素が発酵液に溶解して、発酵効率を向上することができる。

【0117】

スクラビングの実行条件、すなわちスクラビング実行のタイミング、分離膜ユニット2A、2B、2Cへのスクラビングを行う頻度、スクラビング流量を増加させる頻度、1回のスクラビング当たりの時間等は、具体的に限定されるものではない。スクラビングの実行条件は、後述するkLa、膜間差圧、膜間差圧の変化、発酵槽内の圧力、供給する気体

10

20

30

40

50

の種類、培養される細胞の種類、製造される化学品の種類、および原料の種類等の様々な条件に応じて変更可能である。また、本実施の形態のように、複数の分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C を有する場合、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に順番に気体を供給してスクラビングを行うほか、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C 全体に所定量の気体を供給しながら、順番に気体の供給量を増加させてスクラビングを行ってもよい。

【 0 1 1 8 】

各分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C へ、スクラビングを行う頻度（スクラビング用気体の供給量を増加させる頻度を含む）は、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C 全体としての性能安定維持の観点から、なるべく平等にする方が好ましい。気体供給時間（気体の供給量を増加させる時間を含む）や、スクラビングの間隔（次に気体供給量を増加させるまでの間隔を含む）は、運転条件により異なるため、最適な条件は、小スケールの実験あるいは経験的に決定すればよい。例えば、10個の分離膜ユニットを備える連続発酵装置において、10個の分離膜ユニットのうち1つの分離膜ユニットのスクラビング時間（供給量を増加させる時間を含む）を1分間とし、スクラビングを行う分離膜ユニットを順次代えた場合、1ユニットあたり10分に1回の頻度で気体が供給され、適度なスクラビング洗浄が施せる。

10

【 0 1 1 9 】

各分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C へスクラビングを行う頻度（気体の供給量を増加させる頻度を含む）は、0.1回/時間以上、360回/時間以下が好ましく、より好ましくは12回/時間以上、120回/時間以下である。スクラビング洗浄頻度が360回/時間以下であることで、分離膜への損傷、および運転コストの上昇などの問題が発生しにくい。また、スクラビングの洗浄頻度が0.1回/時間以上であることで、洗浄効果を十分に得ることができる。

20

【 0 1 2 0 】

スクラビング洗浄時間（気体の供給量を増加させる時間を含む）は、5秒以上1時間以下/回の範囲であり、より好ましくは10秒以上600秒以下/回である。スクラビング洗浄時間が1時間以内であることで、分離膜の損傷および乾燥、並びに運転コストの上昇などの問題の発生が抑制される。また、スクラビング洗浄時間が5秒以上であることで、洗浄効果を十分に得ることができる。

【 0 1 2 1 】

分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に供給される気体量は、流量計 2 0 A、2 0 B、2 0 C で計測することができる。図 1 の構成では、制御装置 2 2 は、流量計 2 0 A、2 0 B、2 0 C で計測された気体供給量を検知し、気体供給制御バルブ 1 8 A、1 8 B、1 8 C の開閉（または開閉の度合い）を変化させることによりスクラビングを行う分離膜ユニット（または気体供給量）を調整することができる。

30

分離膜ユニットへの気体の流量は、バルブの開度の変化によって、2段階に変更されてもよいし、3段階以上に変更されてもよい。また、上述したとおり、流量を0とする段階を含むときは、供給の ON / OFF の切り替えであってもよい。

【 0 1 2 2 】

スクラビングを行う、または気体の供給量を増加させる分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C を順次変える操作は、制御装置 2 2 で各分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C とスクラビング気体供給装置 1 9 をつなぐ配管 2 8 上の気体供給制御バルブ 1 8 A、1 8 B、1 8 C の開閉または開度を制御することで行うことができる。ある単位時間中に気体の供給量を増加させる分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C は、一つであってもよいし、二以上であってもよい。また、その間の他の分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C への供給量は $k_L a$ が一定の範囲内であれば、0にしても良いし、少量供給しても良い。また、全ての分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C への気体供給量を減らし、発酵槽 1 への直接供給する気体量を増加させる時間があってもよい。

40

【 0 1 2 3 】

制御装置 2 2 は、より具体的には、分離膜ユニット 2 A に供給される気体の流量が、3

50

つの分離膜ユニットの中で最も多くなるように制御した後（つまり、分離膜ユニット 2 A への供給量を増大させて、他の分離膜ユニットへの供給量をそれよりも小さくした状態で気体を供給した後）、分離膜ユニット 2 B に供給される気体の流量が最も多くなるように制御し、その後、分離膜ユニット 2 C に供給される気体の流量が最も多くなるように制御することができる。このように、制御装置 2 2 は、最も高流量の気体の供給を受ける分離膜ユニットを順次変更することができる。

制御装置 2 2 は、複数の分離膜ユニットにおいて、一定の順序で（例えば、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C の順を繰り返すように）、気体の供給量を増大させる対象となる分離膜ユニットを切り替えてもよい。また、制御装置 2 2 は、特定の分離膜ユニットでは、他の分離膜ユニットよりも頻繁に気体の流量が増大するように、制御してもよい。

10

【 0 1 2 4 】

なお、同時に 2 つ以上の分離膜ユニットが、最も高流量の気体の供給を受けてもよい。例えば、5 本の分離膜ユニット A、B、C、D および E が並列に配置された構成において、そのうちの 2 本の分離膜ユニットへの気体の供給量が同等であって、かつ他の 3 本よりも多く供給してもよい。

【 0 1 2 5 】

3 - 5 . 逆圧洗浄

化学品の製造方法は、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C 内部の分離膜を逆圧洗浄する工程をさらに備えてもよい。図 1 の構成では、分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C の 2 次側に洗浄用配管 2 7 A、2 7 B、2 7 C が接続されているので、洗浄ポンプ 1 6 A、1 6 B、1 6 C を用いて分離膜ユニット 2 A、2 B、2 C に洗浄液を投入することができる。

20

【 0 1 2 6 】

逆圧洗浄実行時には、ろ液を溜めるろ液槽に洗浄液が流入しないように、ろ過が停止される。すなわち、ろ過バルブ 1 5 A、1 5 B、1 5 C が閉じ、かつろ過ポンプ 1 4 A、1 4 B、1 4 C が停止する。この状態で、洗浄バルブ 1 7 A、1 7 B、1 7 C が開き、洗浄ポンプ 1 6 A、1 6 B、1 6 C が稼働することで、逆圧洗浄が行われる。

【 0 1 2 7 】

逆圧洗浄を停止するときには、洗浄バルブ 1 7 A、1 7 B、1 7 C が閉じ、洗浄ポンプ 1 6 A、1 6 B、1 6 C が停止する。この状態でろ過バルブ 1 5 A、1 5 B、1 5 C が開き、ろ過ポンプ 1 4 A、1 4 B、1 4 C が稼働することで、ろ過が実行される。

30

【 0 1 2 8 】

これらの制御は、制御装置 2 2 により実行可能である。逆圧洗浄の開始時および終了時を決定するために、連続発酵装置 1 0 0 は、図示しないタイマー等の計測器を備えてもよい。

【 0 1 2 9 】

逆圧洗浄に使用される洗浄液としては、発酵に悪影響がなく、かつ、分離膜の洗浄ができる液体、例えば、水、ろ過液、発酵培地または発酵培地に添加する成分の一部、または、塩酸、硫酸、硝酸、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、次亜塩素酸ナトリウムの水溶液またはそれらの混合液体などが挙げられる。

【 0 1 3 0 】

4 . k L a

酸素移動容量係数 $k L a$ について説明する。酸素移動容量係数 $k L a$ （以下、単に $k L a$ と略す）は、通気攪拌培養時において、単位時間に気相から液相へ酸素を移動させ溶解酸素を生成させる能力を示すものであり、以下の式（1）で表すことができる。また、 $k L a$ は、通気攪拌培養時において、気相から供給される酸素と微生物によって消費される酸素とによって表される培養液中の酸素の収支式、式（2）において用いられる（生物学実験書、日本生物工学会編、培風館、p . 3 1 0（1 9 9 2））。

40

【 0 1 3 1 】

$$d C / d t = k L a \times (C ^ * - C) \quad \cdot \cdot \cdot (1)$$

ここで、

50

C : 培養液中の溶存酸素濃度 DO (ppm)

C* : 微生物による酸素の消費がない場合の気相と平衡の溶存酸素濃度 DO (ppm)

kLa : 酸素移動容量係数 (hr^{-1})

【0132】

$$dC/dt = kLa \times (C^* - C) - QO_2 \times X \quad \dots (2)$$

ここで、

C : 培養液中の溶存酸素濃度 DO (ppm)

C* : 微生物による酸素の消費が無い場合の気相と平衡の溶存酸素濃度 DO (ppm)

X : 菌体濃度 (g/L)

QO₂ : 比呼吸速度 ($\text{mg O}_2 / (\text{g cell} \cdot \text{h})$)

kLa : 酸素移動容量係数 (hr^{-1})

【0133】

培養反応槽における kLa は、亜硫酸酸化法 (バッチ法・連続法)、気体置換法 (Gas s i n g O u t 法 (スタティック法、ダイナミック法))、排気ガス分析法などで測定できる (前掲生物学実験書、p311 等)。以下に、気体置換法 (ダイナミック法) による kLa の測定の一例を示す。

【0134】

まず、培養反応槽に水あるいは使用する培地をいれ、これらの液体中の酸素を窒素ガスにより置換するか、あるいは亜硫酸ナトリウムをほぼ飽和濃度に達する程度に加えることなどにより脱酸素して、該液体の酸素濃度を低下させる。次いで、かかる液体中に溶存酸素濃度電極を差し込み、通気速度、攪拌速度および温度を任意の条件に設定し、その条件での溶存酸素の上昇過程を測定する。ここで、上記式 (1) より、下記式 (3) が導かれるため、通気した時間に対して、(C* - C) ppm の対数をプロットすることで、kLa を求めることができる。

$$\ln(C^* - C) = -kLa \times t \quad \dots (3)$$

【0135】

kLa は様々な要素で変動する。当該要素は、発酵槽 1 および分離膜ユニット 2A、2B、2C への通気量以外に、例えば、培養液の液量、発酵槽 1 内での培養液の攪拌、発酵槽 1 への通気量、温度などが挙げられ、これらは連続培養中にも比較的制御が容易である。

【0136】

発酵槽 1 内の酸素移動容量係数 kLa を最適化して一定にして培養することにより、高発酵力価を維持した培養が可能となる。たとえば、kLa が設定値より 30% 以上減少すると、最適培養条件よりも嫌気培養になりすぎて、糖消費速度が低下し、炭素源が過剰にあまり、目的の化学品の生産速度が低下する。kLa を一定にすることで、高い生産速度で化学品が得られ、極めて効率のよい化学品の製造が可能となる。例えば kLa を一定にして、組換え酵母を用いて乳酸を製造する方法として、日本国特許第 4806904 号がある。

【0137】

本実施の形態においては、予めこの測定を行って培養対象細胞の化学品生産力が高く維持される kLa を見出しおき、分離膜ユニット 2A、2B、2C のうち一つだけに気体を供給した時に当該 kLa が維持可能な気体供給量 (V) を計測する。該気体供給量を等分に分割 (V/3) して分離膜ユニット 2A、2B、2C に供給し、十分な洗浄効果が得られる場合には、気体の供給を他の分離膜ユニット 2A、2B、2C または発酵槽 1 に分散させるか、またはスクラビング時間を短縮することができる。該気体供給量 (V/3) では分離膜ユニット 2A、2B、2C の洗浄効果が不足している場合には、当該 kLa が維持可能な供給量 (V) の気体を、分離膜モジュール 2A、2B、2C に順次供給するか、当該 kLa が維持可能な供給量 (V) の気体を、連続供給用 (V₁) と間欠供給用 (V

10

20

30

40

50

2) とに振り分け、分離膜モジュール 2 A、2 B、2 C に所定量 ($V_1 / 3$) の気体を連続的に供給しながら、順次分離膜モジュール 2 A、2 B、2 C に所定量 (V_2) の気体を間欠的に供給することによりスクラビング洗浄の効果を向上させればよい。少なくとも 2 つの異なる量での気体供給によっても洗浄効果が十分でない場合は、通気する気体の酸素含有量を減らす、または発酵槽 1 の攪拌速度を落とすなどして、 $k_L a$ が所定範囲内となるように設定すればよい。

【0138】

5. 化学品

本書に述べる製造方法によって得られる化学品は、細胞が培養液中に生産する物質である。化学品としては、例えば、アルコール、有機酸、ジアミン、アミノ酸および核酸など発酵工業において大量生産されている物質を挙げることができる。また、上記製造方法は、酵素、抗生物質および組換えタンパク質のような物質の生産に適用することも可能である。

10

【0139】

例えば、アルコールとしては、エタノール、1, 3 - ブタンジオール、1, 4 - ブタンジオールおよびグリセロール等が挙げられる。

【0140】

また、有機酸としては、酢酸、乳酸、ピルビン酸、コハク酸、リンゴ酸、イタコン酸、アミノ酸およびクエン酸等を挙げることができる。また、ジアミンとしてはカダベリン、核酸であればイノシン、グアノシンおよびシチジン等を挙げることができる。

20

【0141】

アミノ酸としては、L - スレオニン、L - リジン、L - グルタミン酸、L - トリプトファン、L - イソロイシン、L - グルタミン、L - アルギニン、L - アラニン、L - ヒスチジン、L - プロリン、L - フェニルアラニン、L - アスパラギン酸、L - チロシン、L - メチオニン、L - セリン、L - バリンおよび L - ロイシン等が挙げられ、特に、L - スレオニン、L - リジンおよび L - グルタミン酸が好適である。

【実施例】

【0142】

以下、実施例を示して本発明についてより具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されない。以下の実施例で用いた連続発酵装置の概略構成は、分離膜ユニットの数以外は、図 1 に示すとおりである。また、以下の例では、化学品として、D - 乳酸および L - リジンを連続発酵により製造した。

30

【0143】

[A . D - 乳酸濃度の測定方法]

培養液中に含まれる D - 乳酸濃度の測定は、次の方法で行った。D - 乳酸を含む培養液を 100 μ L 取り、下記に示す条件で HPLC 法により乳酸量を測定することで確認した。

カラム：Shim-Pack SPR-H (島津社製)

移動相：5 mM p - トルエンスルホン酸 (流速 0.8 mL/min)

反応液：5 mM p - トルエンスルホン酸、20 mM ピストリス、0.1 mM EDTA · 2Na (流速 0.8 mL/min)

40

検出方法：電気伝導度

温度：45

検量線は、濃度既知の D - 乳酸を標品として分析を行い、横軸に D - 乳酸濃度、縦軸に検出ピーク面積をプロットして作成した。

【0144】

[B . L - リジン濃度の測定方法]

培養液中に含まれる L - リジン濃度の測定は、次の方法で行った。測定する L - リジンを含む培養液を 25 μ L 取り、そこに 400 μ L の NaHCO₃ (75 mM) および内標として 25 μ L の 1, 4 - ブタンジオール (2 g/L) を加えた。上記の溶液に、150

50

μl の0.2 M ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を添加後、37 で1時間反応させた。

その溶液50 μl をアセトニトリル1 mLに溶解し、10,000 rpmで5分間遠心した上清10 μl を以下の条件でHPLCにより分析した。

・カラム：CAPCELLPAK C18 TYPE SG120 (資生堂)

・移動相：0.1% (w/w) リン酸水溶液：アセトニトリル = 45 : 55 (流速1 mL/min)

・検出方法：UV (360 nm)

・温度：23

検量線は、濃度既知のL-リジンを標品として分析を行い、横軸にL-リジン濃度、縦軸にL-リジン面積 / 1,4-ブタンジオール (内標) 面積の面積比をプロットして作成した。

【0145】

[C. グルコース濃度、菌体濃度の測定方法]

グルコース濃度の測定には、“グルコーステストワコーC” (登録商標) (和光純薬社製) を用いた。

菌体濃度については、適当な希釈を行った発酵液のOD600 nmの吸収を測定することで行った。

【0146】

[D. 膜ろ過モジュールの製作]

東レ (株) 製加圧式ポリフッ化ビニリデン中空系膜モジュール“HFS1020”を解体して、接着固定されていない部分のみを切り出した。こうして切り出されたポリフッ化ビニリデン中空系膜をケース内に収容することで、分離膜モジュールを作製した。ケースとしては、ポリカーボネート樹脂の成型品を用いた。

【0147】

[E. 連続発酵によるD-乳酸の製造に用いられる遺伝子組換え株の作製]

D-乳酸生産能力をもつ微生物として、PDC1 遺伝子、SED1 遺伝子、およびTDH3 遺伝子座にアメリカカプトガニ由来のldh 遺伝子が導入された酵母を作製した。具体的には、WO2010/140602に記載の方法により、遺伝子改変を行った。得られた菌株を、SU042株と称する。SU042株を用いて、後述するようにD-乳酸の連続発酵を行った。

【0148】

本菌株について、予めD-乳酸生産能が最も高くなる最適kLaを検討したところ、kLa = 10の時、最もD-乳酸生産能力が高いことが判明した。

【0149】

[F. 連続発酵によるL-リジンの製造に用いられる遺伝子組換え株の作製]

L-リジン生産能力をもつ微生物として、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 (以下、ATCC13032株と略す。) のホモセリンデヒドロゲナーゼ (HOM) 遺伝子破壊株の作製を行った。具体的には、日本国特開2008-212138に記載の方法により、遺伝子改変を行った。得られた菌株を、コリネバクテリウム・グルタミカム delta-HOM株 (以下、delta-HOM株と略す。) と称する。delta-HOM株を用いて、後述するようにL-リジンの連続発酵を行った。

【0150】

本菌株について、予めL-リジン生産能が最も高くなる最適kLaを検討したところ、kLa = 250の時、最もL-リジン生産能力が高いことが判明した。

【0151】

[G. 連続発酵によるD-乳酸の製造]

(比較例1)

図1に示す連続発酵装置100を用いて、D-乳酸の連続発酵を実施した。各分離膜ユニットには、[D]で作製した中空系膜モジュールを1本使用した。D-乳酸連続発酵に

10

20

30

40

50

おける運転条件として共通の条件は下記のとおりである。

【0152】

共通条件

- ・微生物：サッカロマイセス・セレピセ SU042株
- ・培地：発酵培地（表1）
- ・発酵液容量：1.0（L）
- ・温度：32（℃）
- ・発酵槽攪拌速度：400（rpm）
- ・滅菌：中空糸膜モジュールを含む発酵槽、および使用培地は総て121℃、20minのオートクレーブにより高圧（2気圧）蒸気滅菌した。
- ・pH調整：5N水酸化カルシウム懸濁液によりpH4.5に調整
- ・循環ポンプ流量：1.7L/min
- ・各分離膜ユニットのろ過速度：0.2m³/m²/day（一定）
- ・分離膜ユニットあたりの分離膜モジュール数：1本

10

【0153】

変更条件

- ・分離膜ユニット数：4
- ・1ユニットあたりの有効膜面積：70cm²
- ・全ユニットあたりの有効膜面積：280cm²
- ・スクラビング気体供給装置19による各分離膜ユニットへの気体供給条件
- ：1ユニットあたりの気体供給量100mL/min、全ユニットに常時供給
- ・発酵槽気体供給装置21による発酵槽1への気体供給量：0 mL/min
- ・上記気体供給条件におけるkLa：10

20

【0154】

【表1】

酵母乳酸発酵培地

原料糖	75 g
硫酸アンモニウム	1.5g
Up to 1L	

30

【0155】

まず、5mLのSC培地（グルコース100g/L、Yeast Nitrogen base 6.7g/L、ロイシンを除く標準19種アミノ酸152mg/L、ロイシン760mg/L、イノシトール152mg/L、p-アミノ安息香酸16mg/L、アデニン40mg/L、ウラシル152mg/L）を投入した試験管に、寒天培地から掻き取ったSW-1株を植菌した。これを温度30℃で24時間振とう培養した（前々培養）。得られた前々培養液を、表1に示した培地を50mL投入した500mLの三角フラスコに全量植菌し、30℃で前培養を行った。得られた前培養液を、1.0LのD-乳酸発酵培地投入された連続発酵装置に植菌し、24時間培養を行った。その後、発酵槽内の培養液量が一定となるように供給量を制御しながら、D-乳酸発酵培地を連続供給することで、連続培養を行った。こうして、連続発酵によるD-乳酸の製造を行った。

40

適宜、ろ過液中の生産されたD-乳酸濃度および残存グルコース濃度は[A]および[C]に示す方法により測定した。

本比較例での発酵液中の菌体濃度（-）の推移を図3に示し、D-乳酸生産速度（g/L/h）、の推移を図4に示し、対糖収率（%）の推移を図5に示す。また膜間差圧（kPa）の推移を図6に示す。

【0156】

（比較例2）

以下の条件以外は比較例1と同様の条件下で、連続発酵を行った。

50

変更条件

- ・分離膜ユニット数：4
 - ・1ユニットあたりの有効膜面積：70 cm²
 - ・全ユニットあたりの有効膜面積：280 cm²
 - ・スクラビング気体供給装置19による各分離膜ユニットへの気体供給条件
- ：1ユニットあたりの気体供給量400 mL/min、全ユニットに常時供給
- ・発酵槽気体供給装置21による発酵槽1への気体供給量：0 mL/min
 - ・上記気体供給条件におけるkLa：50

本比較例での発酵液中の菌体濃度(-)の推移を図3に示し、D-乳酸生産速度(g/L/h)の推移を図4に示し、対糖収率(%)の推移を図5に示す。また膜間差圧(kPa)の推移を図6に示す。

10

【0157】

(比較例3)

以下の条件以外は比較例1と同様の条件下で、連続発酵を行った。

変更条件

- ・分離膜ユニット数：1
 - ・1ユニットあたりの有効膜面積：280 cm²
 - ・全ユニットあたりの有効膜面積：280 cm²
 - ・スクラビング気体供給装置19による分離膜ユニットへの気体供給条件
- ：1ユニットあたりの気体供給量400 mL/min、常時供給
- ・発酵槽気体供給装置21による発酵槽1への気体供給量：0 mL/min
 - ・上記気体供給条件におけるkLa：7

20

本比較例での発酵液中の菌体濃度(-)の推移を図3に示し、D-乳酸生産速度(g/L/h)の推移を図4に示し、対糖収率(%)の推移を図5に示す。また膜間差圧(kPa)の推移を図6に示す。

【0158】

(実施例1)

以下の条件以外は比較例1と同様の条件下で、連続発酵を行った。

変更条件

- ・分離膜ユニット数：4
 - ・1ユニットあたりの有効膜面積：70 cm²
 - ・全ユニットあたりの有効膜面積：280 cm²
 - ・スクラビング気体供給装置19による各分離膜ユニットへの気体供給条件
- ：各ユニットとも2.5分間400 mL/minで供給した後、7.5分間気体の供給なし(0 mL/min)を繰り返し、気体の供給量を増加させる2.5分間はユニット間で同時にならないように制御
- ・発酵槽気体供給装置21による発酵槽1への気体供給量：0 mL/min
 - ・上記気体供給条件におけるkLa：10

30

本比較例での発酵液中の菌体濃度(-)の推移を図3に示し、D-乳酸生産速度(g/L/h)の推移を図4に示し、対糖収率(%)の推移を図5に示す。また膜間差圧(kPa)の推移を図6に示す。

40

比較例1と比較して、対糖収率、D-乳酸生産速度が同等である一方で、膜間差圧の上昇速度が低い値のまま推移し、同等の発酵効率を確保しながらも、高い膜洗浄効果が得られていることが確認できた。また、比較例2と比較して、同等の膜間差圧の上昇速度であるにも関わらず、高い対糖収率、D-乳酸生産速度を示し、発酵効率が向上していることが確認できた。また、比較例3と比較して、対糖収率、D-乳酸生産速度が同等である一方で、膜間差圧の上昇速度がやや低い値で推移し、同じ膜面積、同じ通気量であっても、MDを複数にすることで、同等の発酵効率を確保しながらも、高い膜洗浄効果が得られることが確認できた。

【0159】

50

(実施例2)

以下の条件以外は比較例1と同様の条件下で、連続発酵を行った。

変更条件

- ・分離膜ユニット数：4
 - ・1ユニットあたりの有効膜面積：70 cm²
 - ・全ユニットあたりの有効膜面積：280 cm²
 - ・スクラビング気体供給装置19による各分離膜ユニットへの気体供給条件
- ：各ユニットとも2.5分間300 mL/minで供給した後、7.5分間10 mL/minでの気体の供給を繰り返し、気体の供給量を増加させる2.5分間はユニット間で同時にならないように制御

10

- ・発酵槽気体供給装置21による発酵槽1への気体供給量：100 mL/min
- ・上記気体供給条件におけるkLa：10

本比較例での発酵液中の菌体濃度()の推移を図3に示し、D-乳酸生産速度(g/L/h)、の推移を図4に示し、対糖収率(%)の推移を図5に示す。また膜間差圧(kPa)の推移を図6に示す。

比較例1と比較して、対糖収率、D-乳酸生産速度が同等である一方で、膜間差圧の上昇速度が低い値のまま推移し、同等の発酵効率を確保しながらも、高い膜洗浄効果が得られていることが確認できた。また、比較例2と比較して、同等の膜間差圧の上昇速度であるにも関わらず、高い対糖収率、D-乳酸生産速度を示し、発酵効率が向上していることが確認できた。

20

【0160】

[I. 連続発酵によるL-リジンの製造]

(比較例4)

図1に示す連続発酵装置100を用いて、L-リジンの連続発酵を実施した。各分離膜ユニットには、[D]で作製した中空糸膜モジュールを1本使用した。L-リジン連続発酵における運転条件として以下の実施例および比較例に共通の条件は下記のとおりである。

共通条件

- ・微生物：コリネバクテリウム・グルタミカム delta-HOM株
- ・培地：リジン発酵培地(表2)
- ・発酵液容量：3.0(L)
- ・温度：30()
- ・発酵槽撹拌速度：350(rpm)
- ・滅菌：中空糸膜モジュールを含む発酵槽1、および使用培地は総て121、20 minのオートクレーブにより高圧(2気圧)蒸気滅菌した。
- ・pH調整：28%アンモニア水溶液によりpH7.3に調整
- ・循環ポンプ流量：3.0 L/min
- ・各分離膜ユニットのろ過速度：0.2 m³/m²/day(一定)
- ・分離膜ユニットあたりの分離膜モジュール数：1本

30

変更条件

- ・分離膜ユニット数：4
 - ・1ユニットあたりの有効膜面積：70 cm²
 - ・全ユニットあたりの有効膜面積：280 cm²
 - ・スクラビング気体供給装置19による各分離膜ユニットへの気体供給条件
- ：1ユニットあたりの気体供給量280 mL/min、全ユニットに常時供給
- ・発酵槽気体供給装置21による発酵槽1への気体供給量：0 mL/min
 - ・上記気体供給条件におけるkLa：200

40

【0161】

【表 2】

コリネバクテリウム用L-リジン発酵培地

成分	量	単位
グルコース	100	g/L
尿素	1	g/L
イーストエキストラクト	5	g/L
リン酸水素二カリウム	2.5	g/L
硫酸マグネシウム・7水和物	175	g/L
塩化カルシウム・2水和物	205	g/L
硫酸鉄・7水和物	0.05	g/L
硫酸マンガン・5水和物	13	ppm
硫酸銅・5水和物	6.3	ppm
硫酸亜鉛・7水和物	13	ppm
塩化ニッケル・6水和物	5	ppm
塩化コバルト・6水和物	1.3	ppm
モリブデン	1.3	ppm
β -アラニン	23	ppm
ニコチン酸	14	ppm
ビオチン	0.5	ppm
チアミン	7	ppm

【0162】

まず、5 mL の B Y 培地 (0 . 5 % イーストエキストラクト (yeast extract) 、 0 . 7 % ミートエキストラクト (meat extract) 、 1 % ペプトン、 0 . 3 % 塩化ナトリウム) を投入した試験管に、寒天培地から掻き取った δ - H O M 株を植菌した。これを温度 3 0 ° C で 2 4 時間振とう培養した (前々培養) 。得られた前々培養液を、表 2 に示した培地を 5 0 m L 投入した 5 0 0 m L の三角フラスコに全量植菌し、 3 0 ° C で前培養を行った。得られた前培養液を、 3 L の L - リジン発酵培地が入入された連続発酵装置に植菌し、 2 4 時間培養を行った。その後、発酵槽内の培養液量が一定となるように供給量を制御しながら、 L - リジン発酵培地を連続供給することで、連続培養を行った。こうして、連続発酵による L - リジンの製造を行った。

適宜、ろ過液中の生産された L - リジン濃度および残存グルコース濃度は [B] および [C] に示す方法により測定した。

本比較例での発酵液中の菌体濃度 (-) の推移を図 7 に示し、 L - リジン生産速度 (g / L / h) 、の推移を図 8 に示し、対糖収率 (%) の推移を図 9 に示す。また膜間差圧 (k P a) の推移を図 1 0 に示す。

【0163】

(実施例 3)

以下の条件以外は比較例 5 と同様の条件下で、連続発酵を行った。

変更条件

- ・分離膜ユニット数：4
- ・1ユニットあたりの有効膜面積：70 cm²
- ・全ユニットあたりの有効膜面積：280 cm²
- ・スクラビング気体供給装置19による各分離膜ユニットへの気体供給条件

：各ユニットとも2.5分間900 mL/minで供給した後、7.5分間10 mL/minでの気体の供給を繰り返し、気体の供給量を増加させる2.5分間はユニット間で同時にならないように制御

- ・発酵槽気体供給装置21による発酵槽1への気体供給量：0 mL/min
- ・上記気体供給条件におけるkLa：200

10

本実施例での発酵液中の菌体濃度(-)の推移を図7に示し、L-リジン生産速度(g/L/h)、の推移を図8に示し、対糖収率(%)の推移を図8に示す。また膜間差圧(kPa)の推移を図10に示す。

比較例4と比較して、同等の対糖収率、L-リジン生産速度であるが、膜間差圧の上昇速度が抑制され、低い値のまま推移した。つまり、同等のL-リジン生産効率と高い膜洗浄効果が得られることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0164】

本発明は、発酵槽と複数の分離膜ユニットと循環機構とを備える連続発酵装置において、連続発酵装置で培養する細胞の最適kLa値に基づき、装置内に供給する酸素を含む気体の供給量を設定し、複数の分離膜ユニットに異なる量の気体を順次供給して、最適kLaから一定範囲にするという簡便な方法により、分離膜ユニット運転の長期安定性と発酵成績を向上させることができるため、広く発酵工業において利用され、発酵生産物である化学品を低コストで安定に生産することが可能となる。

20

【符号の説明】

【0165】

- 1 発酵槽
- 2 A、2 B、2 C 分離膜ユニット
- 5 温度制御部
- 6 攪拌装置
- 7 pH制御部
- 8 レベル制御部
- 9 差圧制御部
- 12 培地供給ポンプ
- 13 中和剤供給ポンプ
- 14 A、14 B、14 C ろ過ポンプ
- 15 A、15 B、15 C ろ過バルブ
- 16 A、16 B、16 C 洗浄ポンプ
- 17 A、17 B、17 C 洗浄バルブ
- 18 A、18 B、18 C 気体供給制御バルブ
- 19 スクラビング気体供給装置
- 20 A、20 B、20 C 流量計
- 21 発酵槽気体供給装置
- 22 制御装置
- 23、23 A、23 B、23 C 配管
- 24 循環ポンプ
- 25 配管
- 26 A、26 B、26 C 配管
- 27 A、27 B、27 C 配管
- 28 A、28 B、28 C 配管

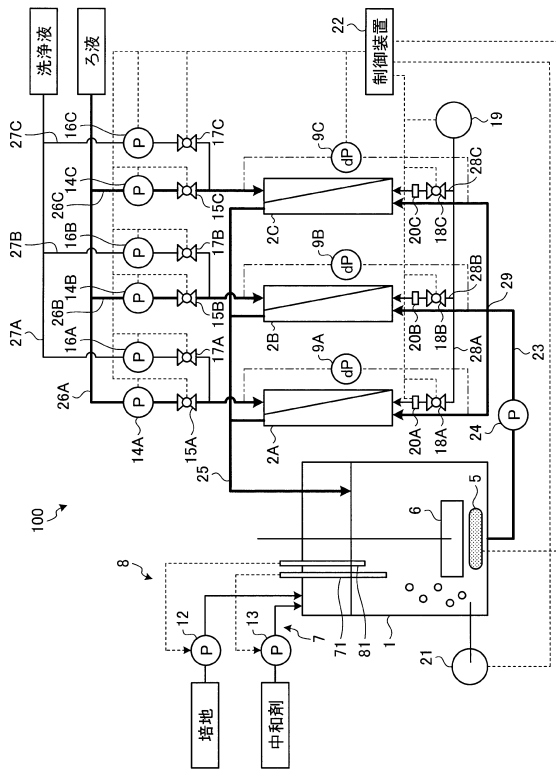
30

40

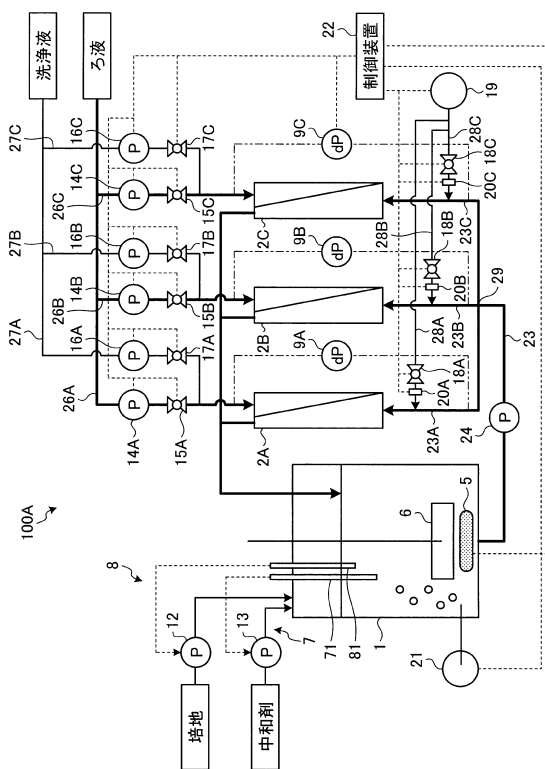
50

- 2 9 各分離膜ユニットへの分岐点
- 7 1 pHセンサ
- 8 1 レベルセンサ
- 1 0 0、1 0 0 A 連続発酵装置

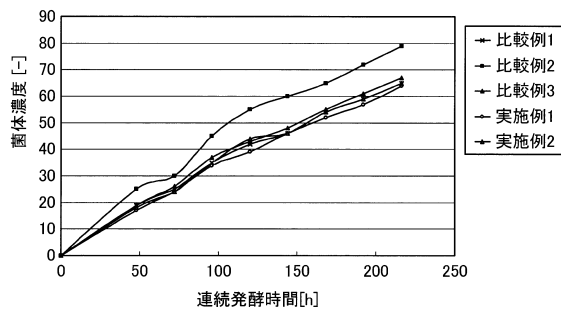
【図 1】



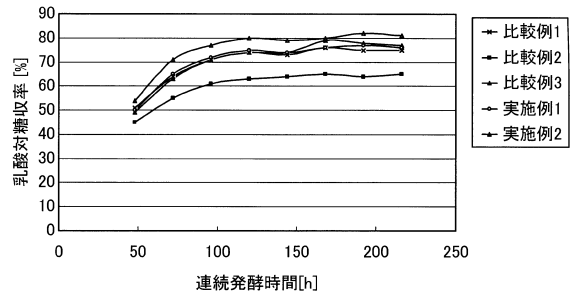
【図 2】



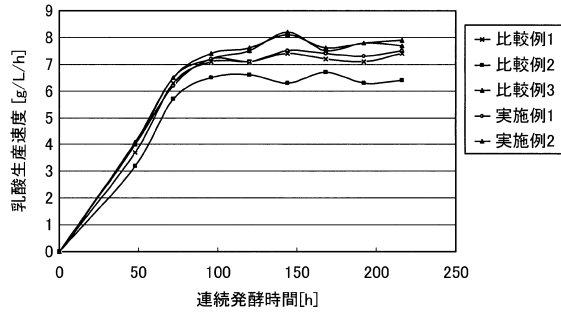
【 図 3 】



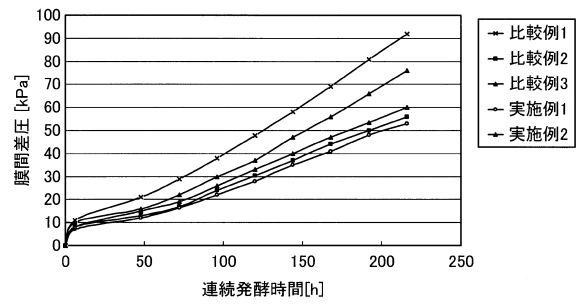
【 図 5 】



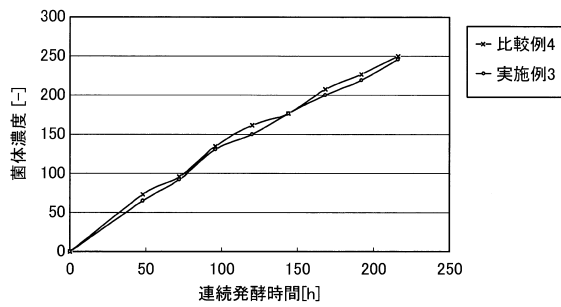
【 図 4 】



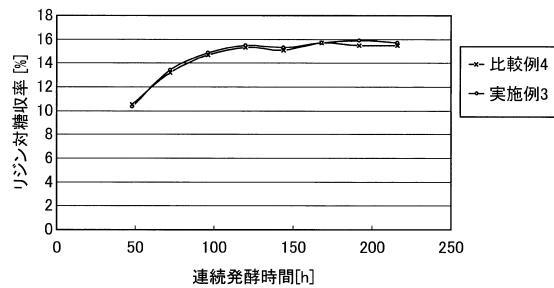
【 図 6 】



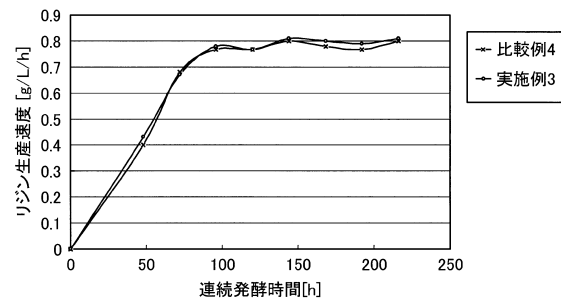
【 図 7 】



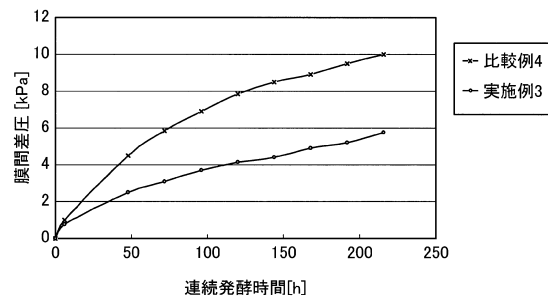
【 図 9 】



【 図 8 】



【 図 10 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 M 1/12 (2006.01) C 1 2 M 1/12

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特開2010-029108(JP,A)
特開2008-161071(JP,A)
特開昭61-254185(JP,A)
特開昭63-188384(JP,A)
特開2006-281022(JP,A)
特開平09-075686(JP,A)
特開2010-036180(JP,A)
国際公開第2010/038613(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 P 1/00 - 41/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)