

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3861341号

(P3861341)

(45) 発行日 平成18年12月20日(2006.12.20)

(24) 登録日 平成18年10月6日(2006.10.6)

(51) Int. Cl.		F I	
BO1D 61/14	(2006.01)	BO1D 61/14	500
BO1D 61/16	(2006.01)	BO1D 61/16	
C12N 1/20	(2006.01)	C12N 1/20	A
C12P 13/04	(2006.01)	C12P 13/04	

請求項の数 5 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平8-267016	(73) 特許権者	000000066
(22) 出願日	平成8年10月8日(1996.10.8)		味の素株式会社
(65) 公開番号	特開平9-164323		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(43) 公開日	平成9年6月24日(1997.6.24)	(72) 発明者	田辺 俊哉
審査請求日	平成14年12月11日(2002.12.11)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 生産技術研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平7-265275	(72) 発明者	中村 徹
(32) 優先日	平成7年10月13日(1995.10.13)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 生産技術研究所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		審査官 星野 紹英
		(56) 参考文献	特開昭59-014795 (JP, A)
			特開平07-236493 (JP, A)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発酵液の膜除菌方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エシェリヒア(Escherichia)属に属する微生物を培養して得られた発酵液を膜濾過し、菌体を分離する方法において、発酵液にポリエチレンイミンを添加した後、膜濾過し、菌体を分離することを特徴とする膜除菌方法。

【請求項2】

エシェリヒア属に属する微生物を培養して得られた発酵液を膜濾過し、菌体を分離する方法において、発酵液にポリエチレンイミンを添加し、さらに発酵液のpHを3~7に調整した後、菌体を膜分離することを特徴とする膜除菌方法。

【請求項3】

使用する膜が限外濾過膜または精密濾過膜であることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の膜除菌方法。

【請求項4】

ポリエチレンイミンの添加量が、発酵液に対し、0.0005~0.5重量%であることを特徴とする請求項1~3のいずれか1請求項に記載の膜除菌方法。

【請求項5】

ポリエチレンイミン添加前及び/または添加後に発酵液を50~130に加熱することを特徴とする請求項1~4のいずれか1請求項に記載の膜除菌方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

20

【発明の属する技術分野】

本発明は、エシェリヒア属に属する微生物を培養して得られた発酵液の処理において菌体、菌体破砕物等の懸濁物質、または溶存高分子不純物を膜で除去するに際し、緩和な条件での前処理で膜透過流束を向上させる方法に関する。すなわち、膜閉塞物質を前処理し、膜除菌時の透過速度を著しく向上させ、処理時間の短縮、設備を極小化する方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

近年、遺伝子組換え菌体による発酵生産技術が進歩しており、遺伝子操作の容易な、エシェリヒア属に属するエシェリヒア・コリ（以下E. coliと略す。）がこの目的のためにしばしば利用されている。発酵終了時、目的生産物が菌体外にある場合は殺菌後、膜分離または遠心分離による除菌を行ない、得られた菌体除去液を次の処理工程に供するのが通常である。また、目的生産物が菌体内に存在する場合、凍結、ホモジナイザー、ミル等を用いて菌体を破砕してから膜分離または遠心分離による菌体、菌体破砕物の除去を実施する。

10

【0003】

一般に膜分離の方が完全に菌体を除去でき、遠心分離に比べて清澄な除菌液を取得できるが、その透過速度が低いことから装置が大きくなるという欠点を持つ。除菌用の膜としては精密濾過膜（以下MFと略す。）、限外濾過膜（以下UFと略す。）等が一般的であるが、E. coliを培養して得られた発酵液（以下、E. coli発酵液と略す。）の場合、菌体の破砕の有無によらずその透過速度が低いことが問題となる。

20

【0004】

従来、発酵液の膜除菌における透過流束の向上法としては、前処理法として発酵液の加熱処理が有効であることが知られている。例えば、日本特許公開公報特開昭57-91196には、イノシンまたはグアノシン発酵液をpH5.5～9.0で90～110℃に加熱処理することにより、限外濾過膜で菌体および高分子物質を分離する際の膜透過速度が向上することが記載されている。また、日本特許公開公報特開昭60-78588には、アミノ酸発酵液を50～100℃で加熱処理することにより、限外濾過膜透過速度が向上することが記載されている。

【0005】

しかしながら、前述したように、E. coli発酵液から膜を用いて除菌する場合、極めて低い透過速度のため過大な膜処理設備を要してしまう。また、pH調整と加熱操作の組み合わせによる前処理で透過速度を向上させることも可能ではあるが、E. coli発酵液に関しては、それほど効果的ではない。また、加熱処理はしばしば発酵液の着色や反応による微量不純物の副生を生じやすく、また目的物が熱的に不安定な場合には使用することができない。

30

【0006】**【発明が解決しようとする課題】**

従って、エシェリヒア属に属する微生物を培養して得られた発酵液から菌体を膜を用いて分離する方法において、より緩和な前処理条件で膜透過速度を向上させる方法の開発が求められている。

40

【0007】**【課題を解決するための手段】**

本発明は、エシェリヒア属に属する微生物を培養して得られた発酵液を膜濾過し、菌体、菌体破砕物等の懸濁物質または溶存高分子不純物を分離する方法において、発酵液にポリエチレンイミン（以下、PEIと略す。）を添加した後、膜濾過し、菌体を分離することを特徴とする膜除菌方法に関するものである。

【0008】**【発明の実施の形態】**

本発明に用いられるエシェリヒア属に属する微生物は、野生株または変異株のいずれでもよいし、細胞融合もしくは遺伝子操作などの遺伝学的手法により誘導される組み替え株等

50

も用いることができる。エシェリヒア属に属する微生物としては、エシェリヒア・コリが挙げられる。これらの微生物の目的生産物は、本発明に用いられるUF膜、MF膜を透過する物質であれば良く、例えば、リジン、グルタミン酸、イソロイシン、バリン、ロイシン等のアミノ酸、イノシン、グアノシン等の核酸、乳酸、リンゴ酸等の有機酸、ビタミン等を挙げることができる。

【0009】

本発明に用いられる発酵液は、上記微生物を適当な培地で培養増殖せしめることにより、得ることができる。そのような培地には格別の制限はなく、通常炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要に応じ有機栄養源を含む通常の培地でよい。培養は、特許国際出願公開W095/16042、欧州特許公開685555号、日本特許公開公報特開平08-047397等に記載の方法

10

【0010】

炭素源としては、上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フルクトース、シュクロース、マルトース等の糖類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸等の有機酸類及びこれらの塩類等を使用することができる。

【0011】

窒素源としては上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等の無機塩のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等の硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカー等の有機窒素化合物、あ

20

【0012】

他に無機塩、微量金属塩、ビタミン類等、通常の培養に用いられる栄養源を適宜、混合して用いることができる。

【0013】

PEIは、一般に水溶液として入手することが可能であるが、E. coli発酵液に添加または混入させる場合には、1~50%水溶液として添加することがPEI水溶液の粘度上昇を押さえ取り扱いし、また添加による発酵液の希釈防止上有効である。添加方法としては例えば発酵終了時点で発酵液を攪拌しながら、10%PEI溶液を所定量添加混合する方法等が挙げられるが、均一に混合できれば特に方法は問わない。

30

PEI添加量は、E. coli発酵液に対し0.0005~0.5重量%であり、好ましくは0.001~0.05重量%である。

添加されるPEIは水溶性であれば良く、その平均分子量は特に問わないが、10,000~100,000程度のものが入手も容易で扱い易い。

【0014】

PEI添加後、膜分離処理を行えば、膜透過速度向上の効果を得ることができるが、更にPEI添加後のE. coli発酵液のpHを3~9、好ましくは4~7の範囲に調整することで、膜透過速度向上のより高い効果を得ることができる。PEI添加後の発酵液のpHが中性付近の場合にはあらかじめpH調整を実施する必要はないが、上記範囲でpH調整を実施することでより高い効果を得ることができる場合もあり必要に応じて実施することができる。

40

pH調整には、通常使用される塩酸、硫酸、燐酸等の酸、苛性ソーダ、苛性カリ、アンモニア等のアルカリを用いることができる。

【0015】

また、PEIの添加前及び/または添加後に発酵液を加熱処理することも可能である。加熱条件としては、50~130の温度、10~20分の時間が適当である。加熱処理することにより、PEIの混合効率の向上、透過速度の向上が得られる。

【0016】

使用する膜はMFでもUFでも構わない。膜装置としては平膜、ホローファイバー、管状膜、スパイラルいずれの形式でも用いることができる。また、膜材質もポリスルホン、ポリオレフィン、ポリビニリデンジフルオライド、テフロン等の有機膜でも良いし、セラ

50

ミック等の無機材質の膜でも良い。UFの場合は、分画分子量1,000~500,000程度の膜が実用的には便利であるし、MFの場合には細孔径0.05~1 μ m程度のものが適当である。

【0017】

【実施例】

以下に、本発明の方法を実施例に基づいて詳細に説明する。

実施例1および実施例2の膜透過実験は米国Millipore社製Minitan moduleに同社製PTTK膜2枚(UF膜、分画分子量30,000)を設置して実施した。また、PEIはSIGMA社より購入した平均分子量50,000の50%PEI溶液を純水で希釈して得られた10%溶液を使用した。

【0018】

10

実施例1

国際特許出願公開W095/16042の実施例に記載の方法に従い、エシェリヒア・コリB-399株にプラスミドRSFD80を導入したB-399/RSFD80株を用い、L-リジンを生産した。培養は以下の生産培地を用い、培養時間48時間、温度37°Cの条件下、撹拌114~116rpmで行った。

【0019】

(L-リジン生産培地)

A : (NH ₄) ₂ SO ₄	16g/L	
KH ₂ PO ₄	1g/L	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1g/L	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g/L	
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01g/L	
Yeast Ext. (Difco)	2g/L	
L-メチオニン	0.5g/L	

KOHでpH7.0に調整し、115°Cで10分オートクレーブ(16/20容)

B : 20% Glucose (115°Cで10分オートクレーブ) (4/20容)

30

C : 局方CaCO₃ (180°Cで2日間乾熱滅菌) (30g/L)

(A : Bを4 : 1で混合し、1Lに対してCを30g加えて溶解し、抗生物質(ストレプトマイシン 100 μ g/ml、カナマイシン5 μ g/ml)を加え、生産培地とした。) 培養終了時のL-リジンの生産量は、リジン塩酸塩として9.2g/Lであった。

【0020】

このようにして得られたリジン発酵液各300mlに前記10%PEI溶液をそれぞれ0.32g、0.91g、1.6g添加後、98%硫酸でpH4.0に調整し、60°Cで20分撹拌しながら加熱した。各PEI溶液添加後の発酵液中のPEI濃度は、それぞれ約100、300、500ppmである。

【0021】

40

上記処理後の各発酵液を膜透過実験に使用した。膜透過実験は、処理後の各発酵液を50mlに保持したまま、1000ml/分の速度で上記のUF除菌設備に給液し、平均圧力0.9kg-f/cm²で実施した。透過時間30分経過までの透過速度の経時変化を測定したところ、図1に示す結果が得られた。

【0022】

図1より明らかのようにE. coli発酵液においては膜除菌初期(開始後5分以内)の段階で急激な膜透過速度の低下が起こり以後次第に安定化する。30分経過時点での膜透過速度を比較すると、PEI添加により無添加の場合に比べ最大4倍程度にまで向上することが分かる。また透過速度の向上は100ppm程度のPEI添加でも顕著であり、2倍程度に向上した。

50

【 0 0 2 3 】

実施例 2

欧州特許公開685555号もしくは日本特許公開公報特開平08-047397の実施例に記載のエシエリヒア・コリAJ12919株をL-イソロイシン生産に用いた。バクトトリプトン1%、酵母エキス0.5%、NaCl0.5%、寒天1.5%、ストレプトマイシン100 μ g/ml、アンピシリン100 μ g/mlからなる培地にAJ12919株を塗布し、37 $^{\circ}$ Cで18ないし24時間培養後、その一部を白金耳で300mlの発酵培地（グルコース4%、硫酸アンモニウム1.6%、リン酸二水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム7水塩0.1%、硫酸第一鉄7水塩0.001%、硫酸マンガン5水塩0.001%、酵母エキス0.2%、炭酸カルシウム3%、pH7.0）に接種し、攪拌数400rpm、通気量300ml/minにて37 $^{\circ}$ Cで16時間培養して種培養液を得た。得られた種培養液をグルコース6%、硫酸アンモニウム1.6%、リン酸二水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム7水塩0.1%、硫酸第一鉄7水塩0.001%、硫酸マンガン5水塩0.001%、酵母エキス0.2%、pH7.0の組成の発酵培地に接種して、37 $^{\circ}$ C、通気量300ml/minにて、培地中の溶存酸素濃度が5%以上となるように攪拌数を制御しながら、グルコースを適宜供給し、アンモニアガスにてpH7.0付近に維持しつつ23時間培養を行った。培養終了時のL-イソロイシン蓄積量は37g/Lであった。

10

【 0 0 2 4 】

このようにして得られたL-イソロイシン発酵液を発酵終了時点で120 $^{\circ}$ Cで10分加熱後、塩酸でpH4.0に調整した。この処理済み発酵液300mlに10%PEI溶液0.3gを添加後、再度60 $^{\circ}$ Cで20分間加熱した。対照として、PEI無添加のまま60 $^{\circ}$ Cで20分間加熱した発酵液を用いた。膜透過実験は実施例1と同じ装置および条件で実施し、表1の結果が得られた。

20

【 0 0 2 5 】

【表1】

透過時間 (分)	膜透過速度 [L/m ² · hour · (kg-f/cm ²)]	
	PEI無添加	PEI添加
1	7.5	9.6
5	6.0	7.6
10	5.5	6.9
20	5.0	6.2
30	4.8	5.8

30

【 0 0 2 6 】

表1から明らかのようにイソロイシン発酵液においても100ppmのPEI添加量で膜透過速度の向上が確認された。

40

【 0 0 2 7 】

実施例 3

エシエリヒア属に属し、 α -2-チエニルアラニン耐性を有し、L-ロイシンを生産する能力を持つ、日本特許公報特公昭62-34397に記載のエシエリヒア・コリ株（FERM-P 5274）に日本特許公開公報特開平8-70879の実施例1の方法に従って、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによる変異処理を施した後、4-アザロイシンに耐性を有する菌株を釣菌分離し、L-ロイシン生産能力の向上した菌株を得た。

【 0 0 2 8 】

このようにして得られた菌株をグルコース5g/dL、(NH₄)₂SO₄ 2.5g/dL、KH₂PO₄ 0.2 g/dL

50

、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/dL、酵母エキス 0.05g/dL、サイアミン塩酸塩 1mg/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg/dL、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg/dL、炭酸カルシウム 2.5g/dLの組成を持つ、pH 7.0の水溶液培地を用い、31 で72時間攪拌培養した。培養終了時のL - ロイシンの生産量は3.1g/Lであった。

【0029】

発酵終了後、発酵液を300mlずつに分け、上述のSIGMA社製10%PEI水溶液を添加しそれぞれPEI濃度が0, 200, 1000ppmになるように調整した。PEI濃度調整後、発酵液のpHを硫酸で4.0に調整し攪拌しながら60 で30分間加熱処理した。

【0030】

膜透過実験には旭化成社製ペンシル型モジュール (PSP-003、細孔径 $0.3\mu\text{m}$ 、膜面積 150cm^2) を使用した。膜透過実験は循環流量約600ml/分、入口圧力 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ で実施し、60分の透過実験を行って図2の結果を得た。L - ロイシン発酵液においても本発明の方法により膜除菌時の大幅な透過速度の向上が達成された。

【0031】

【発明の効果】

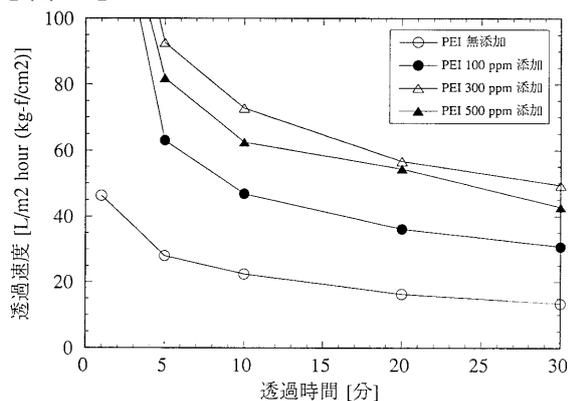
本文で明らかになったように、本発明の方法を用いれば、過大な付帯設備を要することなく容易に発酵液の膜透過速度を向上することが可能となり、膜除菌工程の効率を高めること及び除菌用膜分離設備の小型化が可能となる。

【図面の簡単な説明】

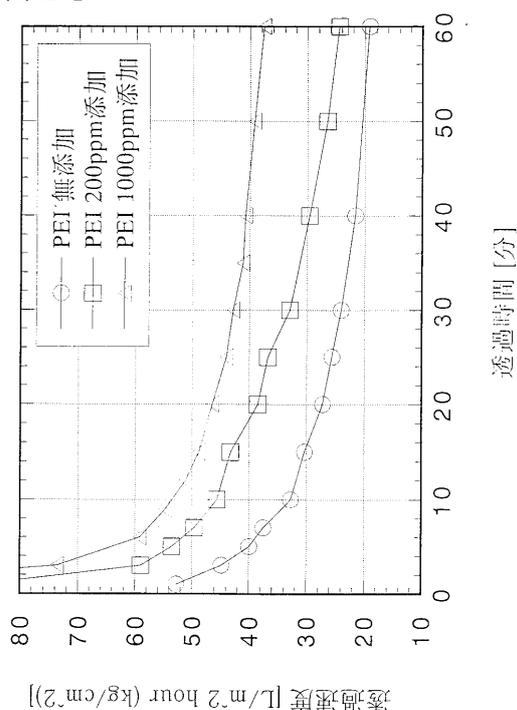
【図1】リジン発酵液のUF濾過における透過速度の経時変化とPEI添加量との関係を示したものである。

【図2】ロイシン発酵液のMF濾過における透過速度の経時変化とPEI添加量との関係を示したものである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

B01D 61/00