

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6499203号  
(P6499203)

(45) 発行日 平成31年4月10日(2019.4.10)

(24) 登録日 平成31年3月22日(2019.3.22)

(51) Int. Cl.		F I			
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 M</b>	<b>1/00</b>	<b>C</b>
<b>C 1 2 M</b>	<b>3/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 M</b>	<b>3/00</b>	<b>Z</b>

請求項の数 10 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2016-570371 (P2016-570371)	(73) 特許権者	000176763 三菱ケミカルエンジニアリング株式会社 東京都中央区日本橋本石町一丁目2番2号
(86) (22) 出願日	平成27年1月20日(2015.1.20)	(74) 代理人	100181766 弁理士 小林 均
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/051344	(74) 代理人	100187193 弁理士 林 司
(87) 国際公開番号	W02016/117023	(72) 発明者	国友 信秀 東京都中央区日本橋本石町1-2-2 三 菱ケミカルエンジニアリング株式会社内
(87) 国際公開日	平成28年7月28日(2016.7.28)	(72) 発明者	藤井 宏記 東京都中央区日本橋本石町1-2-2 三 菱ケミカルエンジニアリング株式会社内
審査請求日	平成30年1月10日(2018.1.10)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酸素含有気体のマイクロナノバブルを供給する装置及び溶存二酸化炭素を除去する装置を備えた生物反応装置及びこの生物反応装置を用いた生物反応方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

微生物または細胞を含有する培養液を収容する培養槽と、  
上記培養槽から上記培養液を抜き出す管路と、  
この培養槽から抜き出した培養液から、二酸化炭素透過性膜を介して減圧により、溶存二酸化炭素を除去する溶存二酸化炭素除去装置と、  
この溶存二酸化炭素を除去した培養液に、酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させるマイクロナノバブル発生装置と、  
この溶存二酸化炭素を除去し、酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させた培養液を上記培養槽に戻す管路と、  
を備えることを特徴とする、生物反応装置。

【請求項2】

上記溶存二酸化炭素除去装置は、平行する多数の二酸化炭素透過性中空系膜中に上記培養槽から抜き出された培養液が流され、これらの中空系膜と略直角する方向に減圧気体流されるか、または、この中空系膜中に減圧気体流され、これらの中空系膜と略直角する方向に、上記培養槽から抜き出された培養液が流されることにより、上記培養槽から抜き出した培養液から溶存二酸化炭素を除去するものであることを特徴とする、請求項1に記載の生物反応装置。

【請求項3】

上記培養槽から上記培養液を抜き出す管路にろ過器が配され、このろ過器で分離された

ろ過液が上記溶存二酸化炭素除去装置に供給され、このろ過器で分離された、ろ過液が除かれた上記培養液が、管路を通して上記培養槽に戻されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の生物反応装置。

【請求項 4】

上記ろ過器は中空糸膜とこれを収容する容器とからなり、上記培養槽から抜き出された培養液がこの中空糸膜中に流され、この中空糸膜の外部からろ過液が取り出されることを特徴とする、請求項 3 に記載の生物反応装置。

【請求項 5】

上記微生物または細胞が多孔質構造体の細孔中に担持されており、上記培養槽から上記培養液を抜き出す管路に、ポリフッ化ビニリデン等の有機高分子化合物からなる多孔性膜、金属製の金網等のろ過膜が配され、このろ過膜で分離されたる過液を上記溶存二酸化炭素除去装置に供給することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の生物反応装置。

10

【請求項 6】

上記多孔質構造体が、連続孔のある三次元立体網目構造を有することを特徴とする、請求項 5 に記載の生物反応装置。

【請求項 7】

上記多孔質構造体が、ポリビニルアルコール系多孔質ゲルであることを特徴とする、請求項 6 に記載の生物反応装置。

【請求項 8】

上記微生物または細胞を担持した多孔質構造体が、上記培養槽中の培養液中に分散した状態で存在することを特徴とする、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の生物反応装置。

20

【請求項 9】

上記微生物または細胞を担持した多孔質構造体が、上記培養槽中にカラム、網体等の固定部材で固定されていることを特徴とする、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の生物反応装置。

【請求項 10】

上記請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の生物反応装置により、微生物または細胞好気性微生物の代謝産物等の反応物を得ることを特徴とする、生物反応方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、微生物または細胞（以下、「微生物等」という）を培養する生物反応装置及びこの生物反応装置を用いた生物反応方法に関し、生物反応時には、微生物等を含有する培養液に酸素を含有する気体のマイクロナノバブルを供給して含有させるとともに、微生物等を含有する培養液に溶存二酸化炭素を除去することによって、生物反応を効率的に行うことを特徴とするものである。

【背景技術】

【0002】

微生物等を培養槽中で培養して、有機酸、アルコール等の化学品、医薬品等の有用化学物質を製造する生物反応が行われている。

40

【0003】

生物反応は、化学反応と異なり、反応自体は遅いが、多大なエネルギーや多くの化学物質を使用しないので、環境にとって温和で有意義な反応である。しかし、生物反応は、一般的に反応が温和で遅いという問題があった。すなわち、化学反応には、1 時間以内の反応で十分な場合が多いのに対して、生物反応の場合は、数時間から長い場合は数日または特に長い場合数週間以上の反応時間を要する場合もある。このため、生物反応を効率的、経済的に行うことが求められている。

【0004】

生物反応を効率化する技術として、特許文献 1 には、マイクロバブルを含有させた培養液中で細胞培養を行うことにより、細胞の増殖を促進することが開示されている。また、

50

特許文献 2 ~ 5 には、微生物の培養において、培養液中にマイクロナノバブルあるいはナノバブルを存在させることにより、微生物の活性化を促進し、生物反応の反応効率の向上、反応時間の短縮等を図ることが開示されている。

【 0 0 0 5 】

具体的には、特許文献 1 には、培養槽の培養液取り出した濾過液にマイクロバブルを含有させて、培養槽に供給することが記載されている。特許文献 2 には、バッチ方式において、培養槽から培養液を抜き出し、菌体ろ過器でろ過してろ過液を得、このろ過液にマイクロナノバブルを混合して培養槽に返送することが記載されている。特許文献 3 には、培養液を培養槽に供給する前段階で、培養液にマイクロナノバブル及びナノバブルを混合することが記載されており、また、特許文献 4 には、培養液を培養槽に供給する前段階で、

10

【 0 0 0 6 】

また、細胞培養において培養槽の培養液に溶存した二酸化炭素を除去するために、特許文献 5 には、比較的小径の気泡を生じる第 1 の散気手段によって培養液中に酸素を供給し、比較的大径の気泡を生じる第 2 の散気手段に二酸化炭素非含有ガスを通気することにより、培養液中の溶存二酸化炭素を気泡中に拡散させて培養液から除去することが記載されており、また、特許文献 6 には、培養液中に酸素含有気体を供給しながら、図 5 ~ 7 に示されるような、二酸化炭素透過膜性のガス交換手段 4 に、空気混合ガスを通気させることにより、培養液中の溶存二酸化炭素を培養液から除去することが記載されている。

【 0 0 0 7 】

20

しかしながら、特許文献 5 に記載された溶存二酸化炭素除去手段では、大径の気泡で溶存二酸化炭素を効率的に除去するためには通気量を増大させる必要があり、細胞の損傷を生じる可能性が増大する。

【 0 0 0 8 】

また、特許文献 6 に記載された溶存二酸化炭素除去手段は、図 5 ~ 7 に示されるように、培養液 M 中に溶存する二酸化炭素を、濃度差により、二酸化炭素透過膜 4 の気相部 4 1 内に引き込み、気相部 4 1 内を通気する空気混合ガスにのせて除去するものであるが、二酸化炭素の濃度差により生じる弱い力によって、二酸化炭素透過膜を通して、溶存二酸化炭素を気相部 4 1 内に引き込むので、培養液に溶存した二酸化炭素を十分に除去することは困難である。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 9 】

【特許文献 1】特開 2 0 1 1 - 1 2 0 5 3 5 号公報

【特許文献 2】特許第 4 1 4 6 4 7 6 号公報

【特許文献 3】特許第 4 8 0 5 1 2 0 号公報

【特許文献 4】特許第 4 9 5 6 0 5 2 号公報

【特許文献 5】特開 2 0 0 8 - 1 8 2 8 9 9 号公報

【特許文献 6】特開 2 0 1 4 - 0 1 8 1 7 4 号公報

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 0 】

本発明の生物反応装置及びこの生物反応装置を用いた生物反応方法の課題は、微生物等の培養液に、微生物等の呼吸作用に必要な酸素を十分に供給するとともに、微生物等の培養液から、微生物等の呼吸作用により生じた溶存二酸化炭素を十分に除去することにより、微生物等の呼吸作用を促進し、微生物等を用いた生物反応を効率的かつ経済的に行うことのできる生物反応装置及びこの生物反応装置を用いた生物反応方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 1 】

50

上記課題を解決するため、本発明の生物反応装置及びこの生物反応装置を用いた生物反応方法は、培養槽から抜き出した培養液から、真空減圧により二酸化炭素分離膜を通して溶存二酸化炭素を除去し、マイクロナノバブル発生装置により酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させた後、培養液を培養槽に還流することを特徴とするものである。

【0012】

本発明の「マイクロナノバブル」とは、「マイクロバブル」および/または「ナノバブル」を意味する。「通常の気泡」は水中を急速に上昇して表面で破裂して消えるのに対し、「マイクロバブル」といわれる直径50 μm以下の微小気泡は、水中で縮小していつか消滅し、この際に、フリーラジカルと共に、直径100 nm以下の極微小気泡である「ナノバブル」を発生し、この「ナノバブル」はある程度の長時間水中に残存する。極微小気泡である「ナノバブル」は、「ウルトラファインバブル」とも呼ばれる。なお、現在、ISO（国際標準化機構）において、ファインバブル技術に関する国際標準の作成が検討されており、国際標準が作成されれば、現在一般的に用いられている「ナノバブル」との呼称が、「ウルトラファインバブル」に統一される可能性もある。

10

【発明の効果】

【0013】

本発明は、マイクロナノバブル発生装置により、微生物等を含有する培養液に酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させて、微生物等の呼吸作用に必要な酸素を供給するとともに、溶存二酸化炭素除去装置により、微生物などを含有する培養液から溶存二酸化炭素を除去して、微生物等の呼吸作用により増加する培養液中の溶存二酸化炭素濃度を低下させることにより、微生物等を用いた生物反応を効率的かつ経済的に行うことができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】本発明の生物反応装置の第1実施形態を示す模式図である。

【図2】本発明の生物反応装置の第2実施形態を示す模式図である。

【図3】本発明の生物反応装置の第3実施形態を示す模式図である。

【図4】本発明の生物反応装置の第4実施形態を示す模式図である。

【図5】特許文献6（特開2014-018174号公報）に示された図1である。

【図6】特許文献6に示された図2Aである。

【図7】特許文献6に示された図2Bである。

30

【発明を実施するための形態】

【0015】

まず、本発明の生物反応装置及び生物反応方法の一般的な事項について説明する。

【0016】

本発明の生物反応は、培養槽に収容した微生物等を含有する培養液中において、培養液を栄養源として、微生物等に反応生成物を生成させるものである。

【0017】

本発明における培養液としては、糖類、窒素源が含有されたものを用いる。糖類としては、通常、マルトース、スクロース、グルコース、フルクトース、これらの混合物等の糖類が用いられ、培養液における糖類の濃度は、特に限定されないものの、0.1~10 w/v%に設定するのが好ましい。また、窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウムまたはコーンステープリカー、酵母エキス、肉エキス、ペプトン等が用いられ、0.1~10 w/v%に設定するのが好ましい。さらに、培養液には糖類、窒素源以外にも、必要に応じて、ビタミン、無機塩類等を添加することが好ましい。

40

【0018】

本発明における細胞としては、例えば、抗体医薬として使用される生理活性ペプチドまたは蛋白質を製造するための動物細胞、とりわけ遺伝子組換え動物細胞等が挙げられる。

【0019】

また、微生物としては、醸造、発酵等の技術分野で従来用いられている、アスペルギルス菌等の麹菌、納豆菌、酢酸菌、酵母菌、乳酸菌等の好気性微生物のほか、遺伝子組み換

50

え技術で創り出される各種好気性微生物を用いることができる。培養槽で生成された反応生成物は、微生物等を含有する培養液と共に培養槽から抜き出され、ろ過器で微生物とろ過液に分離され、ろ過液から反応生成物が回収される。

【0020】

本発明のろ過器は、ろ過膜と該ろ過膜を収容する容器とからなる。ろ過膜は、有機膜、無機膜を問わない。ろ過膜の形状は、平膜、中空糸膜、スパイラル式などいずれの形状のものも採用することができるが、中でも、中空糸膜モジュールが好ましく、中空糸膜モジュールであれば、外圧式、内圧式のいずれの形状のものも採用することができる。

【0021】

本発明のろ過方式としては、中空糸膜モジュールを用いたクロスフローろ過が好ましい。このろ過方式は、反応生成物、微生物等を含有する培養液を中空糸膜の内部に供給しつつろ過して、その外部からろ過液を取り出すものであり、中空糸膜の内部に堆積する微生物等の膜汚れが上記培養液の平行流による剪断力によって掻き取られるので、安定したろ過状態を長期にわたって維持することができる。

10

【0022】

中空糸膜モジュールを用いたクロスフローろ過を行う場合には、膜汚れを掻き取るためには、ろ過の対象となる液体をある程度以上の流速で中空糸膜内に流す必要がある。しかしながら、本発明では、ろ過の対象となる、微生物等を含有する培養液が酸素含有気体のマイクロナノバブルを含んでいるため、通常より低い流速で流しても、膜汚れを掻き取ることができ、微生物等に与えるストレスやダメージを大幅に軽減することができる。

20

【0023】

具体的には、一般的なクロスフローろ過においては、循環流速が、有機膜を用いた場合には1~2 m/s程度、セラミック膜を用いた場合には1~3 m/s程度で定常運転されるが、培養液に酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させることにより、膜汚れを少なく、ろ過抵抗を小さく維持できるため、同じフラックス(単位時間・単位膜面積あたりの膜ろ過水量)を得るために必要な循環流速を0.2~1.5 m/s程度まで低減することができる。また、同じ循環流速で運転する場合、フラックスを1.2~2.0倍程度増加することができる。

【0024】

ろ過膜としては、分離性能及び透水性能、さらには耐汚れ性の観点から、有機高分子化合物を好適に使用することができる。例えば、ポリエチレン系樹脂、ポリプロピレン系樹脂、ポリ塩化ビニル系樹脂、ポリフッ化ビニリデン系樹脂、ポリスルホン系樹脂、ポリエーテルスルホン系樹脂、ポリアクリロニトリル系樹脂、セルロース系樹脂およびセルローストリアセテート系樹脂などが挙げられ、これらの樹脂を主成分とする樹脂の混合物であってもよい。

30

【0025】

溶液による製膜が容易で物理的耐久性や耐薬品性にも優れているポリ塩化ビニル系樹脂、ポリフッ化ビニリデン系樹脂、ポリスルホン系樹脂、ポリエーテルスルホン系樹脂およびポリアクリロニトリル系樹脂が好ましく、ポリフッ化ビニリデン系樹脂またはそれを主成分とする樹脂が、化学的強度(特に耐薬品性)と物理的強度を併せ有する特徴をもつためより好ましく用いられる。

40

【0026】

ここで、ポリフッ化ビニリデン系樹脂としては、フッ化ビニリデンの単独重合体が好ましく用いられる。さらに、ポリフッ化ビニリデン系樹脂は、フッ化ビニリデンと共重合可能なビニル系単量体との共重合体を用いても構わない。フッ化ビニリデンと共重合可能なビニル系単量体としては、テトラフルオロエチレン、ヘキサフルオロプロピレンおよび三塩化フッ化エチレンなどが例示される。

【0027】

ろ過膜の平均細孔径は、使用する目的や状況に応じて適宜決定することができるが、ある程度小さい方が好ましく、通常は0.01 μm以上1 μm以下であることが好ましい。

50

中空糸膜の平均細孔径が $0.01\ \mu\text{m}$ 未満であると、微生物等、糖や蛋白質などの成分やその凝集体などの膜汚れ成分が細孔を閉塞して、安定運転ができなくなる。透水性能とのバランスを考慮した場合、好ましくは $0.02\ \mu\text{m}$ 以上であり、さらに好ましくは $0.03\ \mu\text{m}$ 以上である。また、 $1\ \mu\text{m}$ を超える場合、膜表面の平滑性と膜面の流れによる剪断力や、逆洗やエアースクラビングなどの物理洗浄による細孔からの汚れの成分の剥離が不十分となり、安定運転ができなくなる。

【0028】

また、平均細孔径が微生物等の大きさに近づくと、これらが直接細孔を塞いでしまう場合がある。さらに発酵液中の微生物または培養細胞の一部が死滅することにより細胞の破砕物が生成する場合があり、これらの破砕物によって細孔の閉塞を回避するために、平均細孔径は $0.4\ \mu\text{m}$ 以下が好ましく、 $0.2\ \mu\text{m}$ 以下が好適である。

10

【0029】

ここで、ろ過膜の平均細孔径は、倍率 $10,000$ 倍以上の走査型電子顕微鏡観察で観察される複数の細孔の直径を測定し、平均することにより求めることができる。 $10$ 個以上、好ましくは $20$ 個以上の細孔を無作為に選び、それら細孔の直径を測定し、数平均して求めることが好ましい。細孔が円状でない場合などは画像処理装置等によって、細孔が有する面積と等しい面積を有する円、すなわち等価円を求め、等価円直径を細孔の直径とする方法により求めることも好ましく採用できる。

【0030】

本発明の生物反応装置及びこの生物反応装置を用いた生物反応方法においては、目的物の回収は、バッチ式で行ってもよいし、連続式で行ってもよい。

20

【0031】

バッチ式で行う場合には、培養槽内における生物反応が完了した後、培養槽ポンプを駆動して、ろ過したろ過液をろ過液貯槽に移送する。

【0032】

連続式で行う場合には、培養槽の微生物等を含有する培養液の水位が一定に保たれるように、培養槽に供給される培養液の量とバランスをとって、ろ過したろ過液を抜き出し、ろ過液貯槽に移送する。

【0033】

バッチ式、連続式のどちらを選定するかは、生物反応の効率、必要とされる目的物の純度、経済性等を考慮して、適宜選択することができる。

30

【0034】

つぎに、本発明の生物反応装置及びこの生物反応装置を用いた生物反応方法の主要な特徴点は、前述のように、生物反応時に、  
○マイクロナノバブル発生装置により、微生物等を含有する培養液に酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させること、及び  
○溶存二酸化炭素除去装置により、微生物等を含有する培養液から溶存二酸化炭素を除去して、微生物等の呼吸作用により増加する培養液中の溶存二酸化炭素濃度を低下させること、  
を特徴とするものであり、以下にこれらの事項について説明する。

40

【0035】

<マイクロナノバブル発生装置により、微生物等を含有する培養液に酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させることについて>

本発明の第1の特徴は、マイクロナノバブル発生装置により、微生物等を含有する培養液に酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させることにより、微生物等の呼吸作用に必要な酸素を十分に培養液中に供給して呼吸作用を促進し、生物反応を効率的に行うことにある。

【0036】

生物反応時に微生物等を含有する培養液に、酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させることにより、特許文献1~4にも記載されているように、微生物等の活性化を促進

50

し、生物反応の反応効率の向上、反応時間の短縮等を図ることができる。

【0037】

本発明では、生物反応時に微生物等を含有する培養液に、酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させるが、微生物等に呼吸に必要な酸素を効率的に供給する観点からは、酸素含有気体の酸素含有率を高く設定するのが好ましい。

【0038】

微生物等を含有する培養液または洗浄液にマイクロナノバブルを含有させる手段としては、

a) 培養槽の外部に設けたマイクロナノバブル発生装置により、培養槽の微生物等を含有する培養液にマイクロナノバブルを放出する手段、

b) 培養槽に培養液を供給する管路に設けたマイクロナノバブル発生装置により、培養槽に供給される培養液にマイクロナノバブルを含有させる手段、

c) 微生物等を含有する培養液から回収したろ過液に、マイクロナノバブル発生装置によりマイクロナノバブルを含有させ、このマイクロナノバブルを含有するろ過液を培養槽に還流する手段

d) マイクロナノバブルを予め含有させた培養液を、管路を通じて培養槽に供給する手段などを採用することができる。

【0039】

これらの手段は、単独で、あるいは、組み合わせて採用できるが、どの手段を採用するかは、使用する微生物等の剪断力等に対する耐性、生物反応の効率、経済性等を考慮して、適宜選択することができる。

【0040】

微生物等に与えるストレスやダメージが最も少ない手段は、上記b)及びd)の手段であり、ストレスやダメージに著しく弱い微生物等を用いる場合には、上記b)またはd)の手段を用いるのが好ましい。

【0041】

一般的には、上記a)の手段ではナノバブルの放出によって生じる剪断力により、微生物等にストレスやダメージが与えられることが多い。また、上記c)手段ではろ過の際に生じる剪断力により、微生物等にストレスやダメージが与えられるが、ろ過手段を選択することにより、微生物等に与えられるストレスやダメージをかなり軽減することができる。

【0042】

また、後述するように、微生物等を多孔質構造体で担持する手法を採用すれば、このようなストレスやダメージを大幅に軽減することができる。

【0043】

マイクロナノバブル発生装置としては、公知あるいは市販されている装置を用いることができる。

【0044】

マイクロバブル発生装置としては、例えば、ある程度の高圧で十分な量の気体を水中に溶解させた後、その圧力を解放してやることで溶解した気体の過飽和条件を作り出す「加圧溶解型マイクロバブル発生装置」、水流を起こして渦を発生させ、渦内に大きな気泡を巻き込み、この渦を崩壊させたときに気泡がバラバラに細分化する現象を利用した「気液二相流旋回型マイクロバブル発生装置」等を用いることができる。

【0045】

また、ナノバブル発生装置としては、例えば、特開2007-312690号公報、特開2006-289183号公報、特開2005-245817号公報、特開2007-136255号公報、特開2009-39600号公報に記載されたもの等を用いることができる。

【0046】

< 溶存二酸化炭素除去装置により、微生物等を含有する培養液から溶存二酸化炭素を除

10

20

30

40

50

去して、微生物等の呼吸作用により増加する培養液中の溶存二酸化炭素濃度を低下させることについて>

本発明の第2の特徴は、培養槽から抜き出した、微生物等を含有する培養液から、二酸化炭素透過性膜を介して減圧により、溶存二酸化炭素を除去することにより、微生物等の呼吸作用により高くなる培養液の溶存二酸化炭素濃度を十分に低下させて呼吸作用を促進し、生物反応を効率的に行うことにある。

【0047】

上記のように、細胞培養液から溶存二酸化炭素を除去する手段として、特許文献5に記載されているような、培養液中に二酸化炭素非含有ガスの比較的大径の気泡を供給する手段があるが、この手段では、溶存二酸化炭素を十分に除去するため通気量を増大させると、細胞の損傷を生じる可能性が増大する。また、特許文献6に記載されているような、二酸化炭素の濃度差を利用して、培養液中に配した二酸化炭素透過膜性膜を通して気相部に引き込む手段があるが、この手段は、二酸化炭素の濃度差により生じる小さな力によって、溶存二酸化炭素を二酸化炭素透過性膜を通して引き込むものであるため、培養液に溶存した二酸化炭素を十分に除去することは難しい。

【0048】

これに対して、本発明では、培養槽から抜き出した、微生物等を含有する培養液を溶存二酸化炭素除去装置に導き、この培養液から、減圧により生じる圧力差を駆動力として、二酸化炭素透過性膜を介して溶存二酸化炭素を十分に除去するものである。

【0049】

培養液には、二酸化炭素以外にも酸素、窒素等が溶存しており、酸素分子、窒素分子の大きさ(それぞれ、 $3.64$ 、 $3.78$ )は二酸化炭素分子の大きさ( $4.6$ )よりも小さいことから、溶存二酸化炭素除去装置により、培養液に溶存している二酸化炭素だけでなく、酸素、窒素等も除去されることとなるが、本発明では、まず、溶存二酸化炭素の除去を十分にいき、これと共に除去される溶存酸素については、マイクロナノバブル発生装置で発生させる酸素含有気体のマイクロナノバブルにより補充する。

【0050】

本発明の溶存二酸化炭素除去装置の二酸化炭素透過性膜としては、公知または市販されているもの、例えば、ポリイミド膜高分子膜等の高分子膜、ナノメートルオーダーの細孔を持つゼオライト膜、シリカ膜、炭素膜等の無機膜を用いることができる。また、特公平7-102310号公報に開示されているような、未架橋のビニルアルコール-アクリル酸塩共重合体水溶液を、二酸化炭素透過性支持体上へ膜状に塗布した後、加熱し、架橋させて水不溶化し、この水不溶化物に、二酸化炭素キャリア(二酸化炭素と親和性を有する物質)を含む水溶液を吸収させてゲル化することにより製造される二酸化炭素透過性膜、特開2009-195900号公報に開示されているような、ポリビニルアルコール-ポリアクリル酸共重合体ゲル膜に炭酸セシウム若しくは重炭酸セシウム若しくは水酸化セシウムからなる添加剤を添加したゲル層を親水性の多孔膜に担持させて $CO_2$ 促進輸送膜を形成し、所定の主成分ガスに少なくとも二酸化炭素と水蒸気が含まれる原料ガスを $CO_2$ 促進輸送膜の原料側面に $100$ 以上の供給温度で供給して、 $CO_2$ 促進輸送膜を透過した二酸化炭素を透過側面から取り出す二酸化炭素透過性膜等も用いることができる。

【0051】

本発明の溶存二酸化炭素除去装置の構造としては、好ましくは、  
1) 平行する多数の二酸化炭素透過性中空糸膜中に、培養槽から抜き出した、微生物等を含有する培養液を流し、これらの中空糸膜と略直交する方向に減圧気体を流す構造、  
2) 平行する多数の二酸化炭素透過性中空糸膜中に減圧気体を流し、これらの中空糸膜と略直交する方向に、培養槽から抜き出した、微生物等を含有する培養液を流す構造、  
3) 平行する多数の二酸化炭素透過性中空糸膜中に、培養槽から抜き出した、微生物等を含有する培養液を流し、これらの中空糸膜と略平行する方向に減圧気体を流す構造、及び  
4) 平行する多数の二酸化炭素透過性中空糸膜中に減圧気体を流し、これらの中空糸膜と略平行する方向に、培養槽から抜き出した、微生物等を含有する培養液を流す構造、



を採用することができる。上記 1) の構造の溶存二酸化炭素除去装置を用いた場合には、溶存二酸化炭素の除去が効率的に行えるので、さらに好ましい。これらの構造を備えた装置は、例えば、株式会社ポリポアから、「Liqui-Cell」という商品名で各種のタイプのもので市販されている。

【0052】

溶存二酸化炭素除去装置、マイクロナノバブル発生装置により与えられるシェアストレスに強い微生物等を用いる場合には、培養槽から抜き出した、微生物等を含有する培養液を直接これらの装置に供給して良いが、シェアストレスに弱い微生物等を用いる場合には、この培養液を一旦ろ過器に供給し、このろ過器で分離されたろ過液をこれらの装置に供給し、このろ過器で分離された、ろ過液が除かれた培養液（すなわち、微生物等が濃縮された培養液）を管路を通して培養槽の戻すようにすることが好ましい。

10

【0053】

また、微生物等に与えるシェアストレスを更に軽減するためには、微生物等を細孔中に担持した多孔質構造体（以下、「担持構造体」という。）を用いることができる。この担持構造体を用いた生物反応装置及び生物反応方法について、以下に説明する。

【0054】

1) 担持構造体

担持構造体は、微生物等を細孔の奥まで担持させた、担持密度の高いものであり、この担持構造体は、多孔質構造体と、微生物等及びマイクロナノバブルを含有する培養液とを接触させることにより製造することができる。

20

【0055】

多孔質構造体としては、細孔を有するもの、特に、連続孔を有する三次元立体網目構造を有するものを用いることが好ましい。単にこのような構造を有する多孔質構造体を用いただけでは、通常、細孔の内部には酸素が十分に供給されないため、微生物等は多孔質構造体の表面にしか担持することができない。

【0056】

一方、多孔質構造体に接触させる培養液として、微生物等及びマイクロナノバブルを含有する培養液を用いることで、多孔質構造体の細孔の奥まで酸素を供給でき、細孔の奥まで微生物等を担持させることができ、微生物等の担持密度を高くすることができる。

【0057】

さらに、生物反応により得られた微生物等の代謝産物などの反応物（以下、「目的物」という。）を培養槽から回収する場合等では、培養液から微生物等を分離しろ過液を回収する必要があるが、担持構造体を用いれば、微生物等の分離を簡単かつ経済的に行うことができる。

30

【0058】

次に、担持構造体の製造方法の好適例について説明する。

【0059】

多孔質構造体に微生物等を担持させる方法としては、培養液に微生物等を添加して、微生物等を培養・増殖させた後に多孔質構造体と接触させ担持させる方法、または、培養液に微生物等及び多孔質構造体を添加して、微生物等を培養・増殖させながら担持させる方法が挙げられる。

40

【0060】

前者の方法は、次のような手順で行う。

a) まず、必要とする微生物等以外の微生物、細菌等が存在しないようにするため、多孔質構造体、培養液等を滅菌する。

b) 次に、培養液に微生物等を添加し、培養液にマイクロナノバブルを含有させながら、微生物等を培養・増殖させる。

c) 微生物等が一定濃度以上に増殖した段階で、培養液にマイクロナノバブルを含有させながら、多孔質構造体と接触させる。

【0061】

50

また、後者の方法は、次のような手順で行う。

a) まず、必要とする微生物等以外の微生物、細菌等が存在しないようにするため、多孔質構造体、培養液等を滅菌する。

d) 次に、培養液に多孔質構造体を添加し、培養液にマイクロナノバブルを含有させる。

e) 培養液に微生物等を添加し、培養液にマイクロナノバブルを含有させながら、微生物等を培養・増殖させる。

#### 【0062】

上記の方法において用いる培養液には、主として糖類、窒素源が含まれる。糖類としては、通常、マルトース、スクロース、グルコース、フルクトース、これらの混合物等の糖類が用いられ、培養液における糖類の濃度は、特に限定されないものの、0.1～10w/v%に設定するのが好ましい。また、窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウムまたはコーンステーパーリカー、酵母エキス、肉エキス、ペプトン等が用いられ、0.1～10w/v%に設定するのが好ましい。さらに、培養液には糖類、窒素源以外にも、必要に応じて、ビタミン、無機塩類等を添加することが好ましい。

10

#### 【0063】

上記工程b)及び工程e)における微生物等の培養液への添加濃度は、特に限定されないものの、0.5～10g/Lとするのが好ましく、3.0～6.0g/Lにするのがより好ましい。

#### 【0064】

なお、上記工程b)においては、微生物等の増殖を促進するために処理水にマイクロナノバブルを含有させているが、マイクロナノバブルを含有させなくても微生物等の培養・増殖が十分迅速に行える場合には、マイクロナノバブルの含有を省略することができる。

20

#### 【0065】

上記工程c)における、マイクロナノバブルの含有させた培養液と多孔質構造体との接触は、例えば、処理水中に多孔質構造体を入れて振とう攪拌することにより行うことができる。

#### 【0066】

連続孔を有する三次元立体網目構造を有する多孔質構造体の連続孔の孔径は、担持する微生物等の大きさにもよるが、通常は1～30μmであるのが好ましく、5～10μm前後であるのがより好ましい。

30

#### 【0067】

本発明において好適に用いられる多孔質構造体の素材としては、ポリビニルアルコールといったビニルアルコール系樹脂、ポリエチレングリコールといったエーテル系樹脂、ポリメタクリル酸といったアクリル系樹脂、ポリアクリルアミドといったアクリルアミド系樹脂、ポリエチレン、ポリプロピレンといったオレフィン系樹脂、ポリスチレンといったスチレン系樹脂、ポリエチレンテレフタレートやポリブチレンテレフタレートといったエステル系樹脂、ポリアクリロニトリルといったアクリロニトリル系樹脂、ポリウレタンスポンジといったウレタン系樹脂、アルギン酸カルシウム、(カッパ)カラギーナン、寒天、セルロース誘導体といった多糖類、ポリエステルエアクリレート、エポキシアクリレート、ウレタンアクリレートといった光硬化性樹脂、活性炭といった多孔質無機化合物などを例示することができる。

40

#### 【0068】

より好適には、内部に至るまで多孔質で網目状となった構造を有する点、及びゲル内に多量の水を取り込むことができる点で、ポリビニルアルコール系多孔質ゲルが好ましい。

#### 【0069】

さらに、多孔質ゲルの機械的強度を十分に向上させることができ、生物反応の際に強い攪拌を行っても十分に耐え得る強度を有する点で、ホルマー化ポリビニルアルコール系多孔質ゲルやアセタール化ポリビニルアルコール系多孔質ゲルがより好ましい。ポリビニルアルコール系多孔質ゲルの具体例としては、例えば、株式会社クラレの商品名クラゲールを挙げることができる。

50

## 【 0 0 7 0 】

担持構造体は、上記のように、培養液にマイクロナノバブルを含有させることで、微生物等の担持密度を高くしたものである。

## 【 0 0 7 1 】

生物反応を効率的に行うための要素としては、培養液中の微生物等の密度を高くすることが挙げられるが、密度を高くしすぎると、微生物等に栄養分及び酸素が十分に提供されなくなるため生物反応の効率が低下することとなる。

## 【 0 0 7 2 】

培養液だけを用いて微生物等を培養する場合、好気性微生物を適正に培養できる菌体密度は、3 ~ 6 g / L程度とされている。

10

## 【 0 0 7 3 】

一方、微生物等を多孔質構造体に担持させる場合には、微生物等への栄養分及び酸素の提供の点には問題はないものの、従来の担持方法では多孔質構造体の細孔の奥まで微生物等を担持させることが難しいため、上記培養液を多孔質構造体に高密度で微生物等を担持し続けることが困難であった。(純粋培養における多孔質構造体の細孔の奥まで微生物等を担持させた事例は見当たらない。)

## 【 0 0 7 4 】

これに対して、本発明の担持構造体では、培養液にマイクロナノバブルを含有させることにより、多孔質構造体の細孔の奥まで微生物等を担持させることができ、微生物等、多孔質構造体の素材等にもよるが、密度を上記培養液の菌体密度の5 ~ 6倍程度にすることができる。

20

## 【 0 0 7 5 】

担持構造体の形状は、特に限定されないが、例えば球状、直方体形状、立方体形状等の粉粒体形状が好ましい。粉粒体を用いれば、好気性微生物固定化のための表面積を大きく増大させることができ、より高効率で目的物を製造することができる。多孔質ゲル粉粒体の乾燥時の粒径(直径)は0.5 ~ 10 mmであるのが好ましい。

## 【 0 0 7 6 】

担持構造体の使用形態は、微生物培養液中にカラム、網体等で固定されていても、また、微生物培養液中に分散した状態で存在してもよい。

## 【 0 0 7 7 】

2) 微生物培養液にマイクロナノバブルを含有させること

本発明においては、上記1)で得られた担持構造体は、培養液と共に微生物培養槽に収容され、この微生物培養液にマイクロナノバブルを含有させて生物反応が行われる。

30

## 【 0 0 7 8 】

このように、微生物等を細孔の奥まで担持させた、微生物等の担持密度の高い多孔質構造体を用い、さらに、培養液にマイクロナノバブルを含有させることにより、多孔質構造体の細孔の奥に担持した微生物等にも呼吸に必要な酸素を十分に供給できるので、生物反応の効率を向上することができる。

## 【 0 0 7 9 】

以上に説明したように、本発明の生物反応装置及びこの生物反応装置を用いた生物反応方法は、微生物等の培養液に、微生物等の呼吸作用に必要な酸素を十分に供給するとともに、微生物等の培養液から、微生物等の呼吸作用により生じた溶存二酸化炭素を十分に除去することにより、微生物等の呼吸作用を促進し、微生物等を用いた生物反応を効率的かつ経済的に行うことのできる極めて優れたものである。

40

## 【 0 0 8 0 】

以下、本発明の実施形態を、添付の図面を参照しながら詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 【 0 0 8 1 】

図1に、この発明の生物反応装置の第1実施形態を模式的に示す。この第1実施形態は、シヤアストレスに強い微生物等を用いる場合に好適に用いることができ、培養槽1から

50

抜き出した、微生物等を含有する培養液 5 を、直接、溶存二酸化炭素除去装置 2 及びマイクロナノバブル発生装置 3 に供給するものである。なお、第 1 実施形態では、培養槽 1 には、微生物等を含有する培養液 5 を攪拌するための培養槽攪拌機 10 が設置されている。

【0082】

第 1 実施形態では、次のようにして、微生物等の培養液からの溶存二酸化炭素の除去及び微生物等の培養液への酸素含有気体のマイクロナノバブルの含有が行われる。

- a) 培養槽 1 に培養液 4 を供給する。
- b) バルブ 14 を閉、バルブ 13 を開として培養槽ポンプ 8 を駆動し、微生物等を含有する培養液 5 を培養槽 1 から抜き出し、二酸化炭素透過性膜を介して減圧により溶存二酸化炭素を除去する溶存二酸化炭素除去装置 2 に供給する。
- c) 溶存二酸化炭素除去装置 2 で溶存二酸化炭素を除去した培養液を、マイクロナノバブル発生装置 3 に供給し、酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させる。
- d) マイクロナノバブル発生装置 3 で酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させた培養液を、培養槽 1 に戻す。
- e) 培養槽 1 で生成された反応生成物は、適当な時期に、バルブ 13 を閉、バルブ 14 を開として培養槽ポンプ 8 を駆動し、ろ過器 6 を通してろ過液と共に回収し、ろ過液貯槽 9 に貯えられる。

10

【0083】

第 1 実施形態では、微生物等を含有する培養液から溶存二酸化炭素を除去して、微生物等の呼吸作用により増加する培養液中の溶存二酸化炭素濃度を低下させるとともに、この培養液に酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させて、微生物等の呼吸作用に必要な酸素を供給することにより、微生物等を用いた生物反応を効率的かつ経済的に行うことができる。

20

【0084】

さらに、第 1 の実施形態では、培養槽 1 から抜き出した培養液 4 を、溶存二酸化炭素を除去し、酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させた後に、再び培養槽 1 に戻すので、培養槽 1 内の微生物等の濃度を高く維持することができる。

【0085】

図 2 に、この発明の生物反応装置の第 2 実施形態を模式的に示す。この第 2 実施形態は、シェアストレスに弱い微生物等を用いる場合に好適に用いることができ、培養槽 1 から抜き出した、微生物等を含有する培養液 5 をろ過器 6 に供給し、このろ過器 6 で分離されたろ過液を、溶存二酸化炭素除去装置 2 及びマイクロナノバブル発生装置 3 に供給するものである。なお、第 2 実施形態では、培養槽 1 には、微生物等を含有する培養液 5 を攪拌するための培養槽攪拌機 10 が設置されている。

30

【0086】

第 2 実施形態では、次のようにして、微生物等の培養液からの溶存二酸化炭素の除去及び微生物等の培養液への酸素含有気体のマイクロナノバブルの含有が行われる。

【0087】

- a) 培養槽 1 に培養液 4 を供給する。
- b) バルブ 14 を閉、バルブ 13 及びバルブ 15 を開として培養槽ポンプ 8 を駆動し、微生物等を含有する培養液 5 を培養槽 1 から抜き出し、ろ過器 6 に供給する。
- c) ろ過器 6 で分離された、ろ過液が除かれた培養液（すなわち、微生物等が濃縮された培養液）を、培養槽 1 に戻す。
- d) ろ過器 6 で分離されたろ過液を、二酸化炭素透過性膜を介して減圧により溶存二酸化炭素を除去する溶存二酸化炭素除去装置 2 に供給する。
- e) 溶存二酸化炭素除去装置 2 で溶存二酸化炭素を除去したろ過液を、マイクロナノバブル発生装置 3 に供給し、酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させる。
- f) マイクロナノバブル発生装置 3 で酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させたろ過液を、培養槽 1 に戻す。
- g) 培養槽 1 で生成された反応生成物は、適当な時期に、バルブ 13 を閉、バルブ 14

40

50

を開として培養槽ポンプ 8 を駆動し、ろ過液と共に回収し、ろ過液貯槽 9 に貯えられる。

【 0 0 8 8 】

第 2 実施形態では、微生物等を含有する培養液のろ過液から溶存二酸化炭素を除去し、また、このろ過液に酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させることにより、微生物等に加わるシェアストレスを低減しつつ、微生物等を用いた生物反応を効率的かつ経済的に行うことができる。

【 0 0 8 9 】

図 3 に、この発明の生物反応装置の第 3 実施形態を模式的に示す。

第 3 実施形態は、微生物等をポリビニルアルコール系多孔質ゲル等の多孔質構造体に担持させた担持構造体 1 1 を用いることを特徴としている。また、担持構造体 1 1 を用いることにより、微生物等を含有する培養液をろ過する際に、ポリフッ化ビニリデン等の有機高分子化合物からなる多孔性膜、金属製の金網等のろ過精度の低い平膜 7 を用いることができる。

10

【 0 0 9 0 】

第 3 実施形態では、次のようにして、微生物等の培養液からの溶存二酸化炭素の除去及び微生物等の培養液への酸素含有気体のマイクロナノバブルの含有が行われる。

【 0 0 9 1 】

a) 培養槽 1 に培養液 4 を供給し、培養槽 1 内において、微生物等を担持した担持構造体 1 1 を培養液 4 に分散させる。

b) バルブ 1 4 を閉、バルブ 1 3 を開として培養槽ポンプ 8 を駆動し、微生物等を含有する培養液 5 を培養槽 1 から平膜 7 を通して抜き出し、ろ過液を、二酸化炭素透過性膜を介して減圧により溶存二酸化炭素を除去する溶存二酸化炭素除去装置 2 に供給する。

20

c) 溶存二酸化炭素除去装置 2 で溶存二酸化炭素を除去したろ過液を、マイクロナノバブル発生装置 3 に供給し、酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させる。

d) マイクロナノバブル発生装置 3 で酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させたろ過液を、培養槽 1 に戻す。

g) 培養槽 1 で生成された反応生成物は、適当な時期に、バルブ 1 3 を閉、バルブ 1 4 を開として培養槽ポンプ 8 を駆動し、ろ過液と共に回収し、ろ過液貯槽 9 に貯えられる。

【 0 0 9 2 】

第 3 実施形態は、培養液中の溶存二酸化炭素濃度を低下させるとともに、酸素含有気体のマイクロナノバブルを含有させることにより、微生物等を用いた生物反応を効率的かつ経済的に行うことができるの特長の他に、微生物等を担持させた担持構造体 1 1 を用いることにより、次のような特長を有する。

30

○培養槽 1 中の微生物等の密度を高くできるため、生物反応の効率を高めることができる。

○微生物等を含有する培養液 5 から微生物等を分離するために、醸造や発酵の技術分野で通常行われている精密ろ過器を採用する必要はなく、ポリフッ化ビニリデン等の有機高分子化合物からなる多孔性膜、金属製の金網等のろ過精度の低い平膜 7 を採用できるため、ろ過工程を経済的かつ効率的に行うことができる。

○微生物等に大きなストレスやダメージを与えることなく、生物反応を効率的、経済的に行うことができる。

40

【 0 0 9 3 】

図 4 に、この発明の生物反応装置の第 4 実施形態を模式的に示す。

第 4 実施形態は、第 3 実施形態における微生物等を担持させた担持構造体 1 1 を、培養槽 1 中にカラム、網体等の固定部材 1 2 で固定したものである。

【 0 0 9 4 】

第 4 実施形態における、微生物等を含有する培養液 5 のろ過液からの溶存二酸化炭素の除去、及び、このろ過液への酸素含有気体のマイクロナノバブルの含有は、第 3 実施形態と同様に行われる。

【 0 0 9 5 】

50

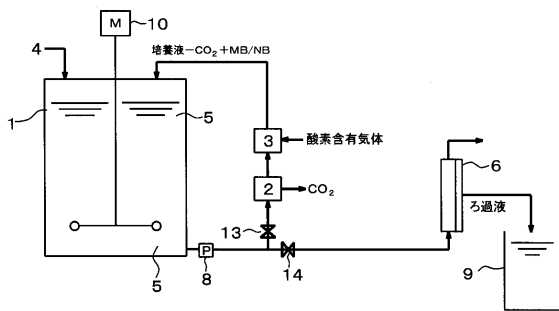
第4実施形態では、微生物等を担持させた担持構造体11が培養槽1中に固定されているため、担持構造体11が損傷・破壊されることが少ない、担持構造体11から微生物等が脱離することが少ない等の特長を有する。

【符号の説明】

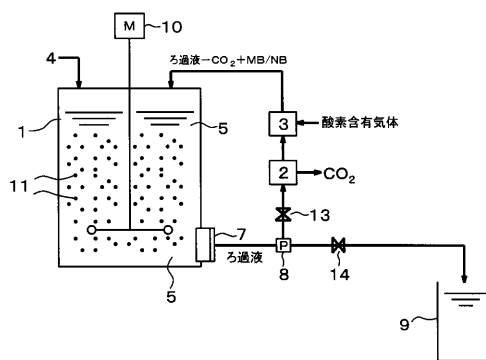
【0096】

- 1 培養槽
- 2 溶存二酸化炭素除去装置
- 3 マイクロナノバブル発生装置
- 4 培養液
- 5 微生物等を含有する培養液
- 6 ろ過器
- 7 平膜
- 8 培養槽ポンプ
- 9 ろ過液貯槽
- 10 培養槽攪拌機
- 11 担持構造体（好気性微生物を担持させた多孔質構造体）
- 12 固定部材
- 13 ~ 15 バルブ

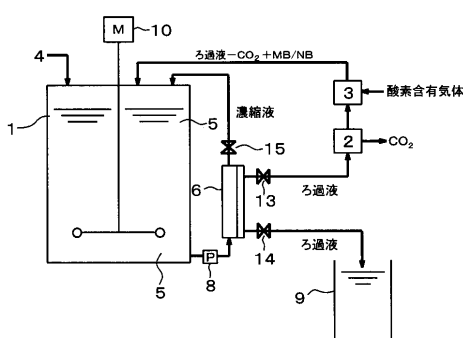
【図1】



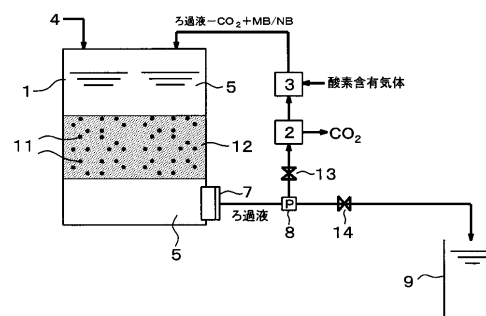
【図3】



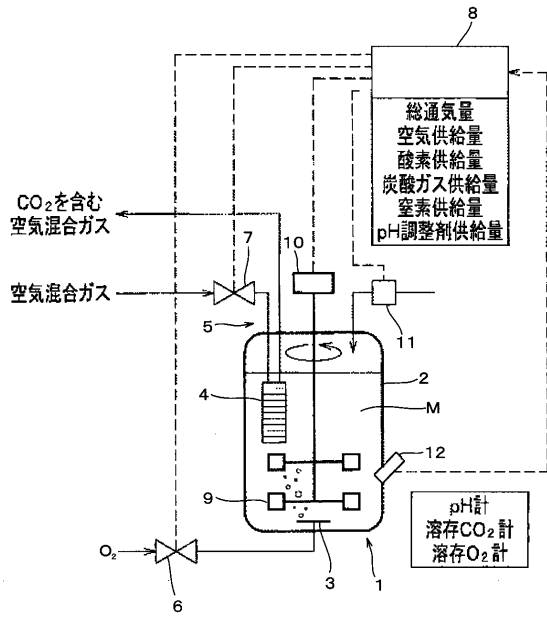
【図2】



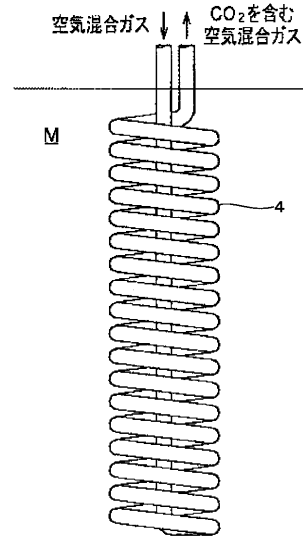
【図4】



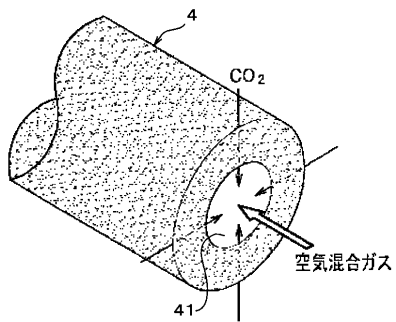
【図5】



【図6】



【図7】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 田中 伸宏  
東京都中央区日本橋本石町1-2-2 三菱ケミカルエンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 熊田 和矩  
東京都中央区日本橋本石町1-2-2 三菱ケミカルエンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 樋口 正守  
東京都中央区日本橋本石町1-2-2 三菱ケミカルエンジニアリング株式会社内

審査官 吉森 晃

- (56)参考文献 特開平02-002342(JP,A)  
特開2011-120535(JP,A)  
特開2008-149265(JP,A)  
特開2007-312690(JP,A)  
国際公開第2007/097260(WO,A1)  
特表昭63-500216(JP,A)  
特開2001-340075(JP,A)  
特開2005-042037(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12M 3/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)  
DWPI(Derwent Innovation)