(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2015-77119
(P2015-77119A)
(43)公開日　平成27年4月23日(2015.4.23)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	1/20	(2006.01)	C12N	1/20	A	4B029
C12P	7/46	(2006.01)	C12P	7/46		4B064
C12M	1/00	(2006.01)	C12M	1/00	D	4B065

審査請求 未請求　請求項の数 18　ＯＬ　（全 44 頁）

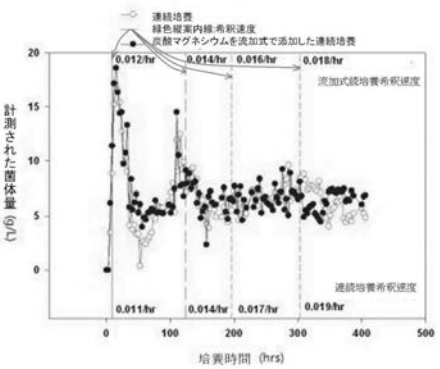
(21)出願番号　特願2014-4247(P2014-4247)
(22)出願日　平成26年1月14日(2014.1.14)
(31)優先権主張番号　10-2013-0122726
(32)優先日　平成25年10月15日(2013.10.15)
(33)優先権主張国　韓国(KR)
(31)優先権主張番号　10-2013-0122727
(32)優先日　平成25年10月15日(2013.10.15)
(33)優先権主張国　韓国(KR)
(31)優先権主張番号　10-2013-0122728
(32)優先日　平成25年10月15日(2013.10.15)
(33)優先権主張国　韓国(KR)

(71)出願人　514011181
カンウォン　ナショナル　ユニバーシティ, ユニバーシティ－インダストリー　コーペレーション　ファンデーション
大韓民国江原道春川市江原大学路１
(74)代理人　100156845
弁理士　山田　威一郎
(74)代理人　100124039
弁理士　立花　顕治
(74)代理人　100124431
弁理士　田中　順也
(74)代理人　100112896
弁理士　松井　宏記

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アクチノバシラススクシノゲネスを用いたコハク酸連続生産工程

(57)【要約】
【課題】本発明はアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いた菌体再循環連続式発酵工程に関し、菌体再循環の際、コハク酸の生産量は約60g/Lと表し、生産性は時間当たり3.873g/Lのコハク酸生産量を持つことを確認した。
【解決手段】菌体の再循環発酵工程は一般的な連続培養に比べて菌体は2倍以上、コハク酸生産量は5倍程度高く、コハク酸の生産性においては8倍以上増加することを確認した。このような高生産性、高収率のコハク酸生産工程は、既存の回分式培養に比べて生産単価を節減できるだけでなく、培養単位を大規模化しなくてもパイロット規模でも産業化段階水準で生産を可能にする。従って、本発明の工程を導入した場合、産業化への適用がさらに有利になるものと見込まれる。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ブドウ糖(glucose)、酵母エキス(yeast extract)及びコーンスティープリカー(corn steep liquor)を含む培地、及び炭酸水素ナトリウム($NaHCO_3$)を発酵槽に連続供給する段階と、
前記発酵槽で培養液を連続除去する段階と、を含むアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項２】
前記連続除去される培養液でアクチノバシラススクシノゲネスを分離する段階と、
分離されたアクチノバシラススクシノゲネスを発酵槽に供給する段階と、をさらに含むことを特徴とする、請求項第１項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項３】
前記連続培養方法は、10～30g/Lの濃度の炭酸マグネシウム($MgCO_3$)を2～4ml/hrの速度で供給する段階をさらに含むことを特徴とする、請求項第１項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項４】
前記培地は、1～100ml/hrの速度で供給し、前記炭酸水素ナトリウム($NaHCO_3$)は8～10 g/Lの濃度を2～4 ml/hrの速度で供給することを特徴とする、請求項第１項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項５】
前記連続培養方法は二酸化炭素を0.4～0.8vvmの速度で曝気(aeration)供給することを特徴とする、請求項第１項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項６】
前記のブドウ糖は45～65 g/Lの濃度、酵母エキスは5～8 g/Lの濃度及びコーンスティープリカーは1～14 g/Lの濃度で含有されていることを特徴とする、請求項第１項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項７】
前記アクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)はUK13菌株(KCTC 12233BP)であることを特徴とする、請求項第１項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項８】
前記の培地、炭酸水素ナトリウム及び炭酸マグネシウムは1～100 ml/hrの速度で供給することを特徴とする、請求項第２項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項９】
前記連続除去された培養液を15～22.5 ml/hrの速度で発酵槽に供給して菌体濃度を高める段階をさらに含むことを特徴とする、請求項第２項に記載のアクチノバシラススクシノゲネスを用いたコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項１０】
前記アクチノバシラススクシノゲネスを分離する段階は細胞分離器を使用したことを特徴とする、請求項第２項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。

【請求項１１】
前記培地、炭酸水素ナトリウムまたは炭酸マグネシウムはドリップチューブを使用して供給することを特徴とする、請求項第１項ないし第３項のいずれか１項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法。
【請求項１２】
内部に培養液が保存される発酵槽と、
前記発酵槽に供給される培養液を分離手段を通じて菌体と培養液に分離して排出する細胞分離器と、
培地供給部で供給される培地の汚染を防止し、培地の速度を制御して発酵槽に供給するドリップチューブと、
前記細胞分離器から排出される菌体を回収して前記発酵槽に供給する回収ラインと、を含んでなることを特徴とするアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養システム。
【請求項１３】
前記細胞分離器は、所定の大きさを持ち、上部垂直部が上部に形成され、前記上部垂直部の下部には間隔を置いて前記上部垂直部より直径が小さい培養液排出口が形成され、前記上部垂直部と培養液排出口には傾斜部が形成されることを特徴とする、請求項第１２項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養システム。
【請求項１４】
前記細胞分離器は、所定の大きさを持ち、上部傾斜部が上部に形成され、前記上部傾斜部の下部には間隔を置いて前記上部傾斜部より直径が小さい培養液排出口が形成され、前記上部傾斜部と培養液排出口との間には上部垂直連結部と下部傾斜連結部が連続形成されることを特徴とする、請求項第１２項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養システム。
【請求項１５】
前記細胞分離器の内面は培養液を迅速に培養液排出口に排出できるように曲面案内部が形成されることを特徴とする、請求項第１３項または第１４項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養システム。
【請求項１６】
前記分離手段は円筒状の管または多数個のメッシュ層から構成されるフィルターのうち一つであることを特徴とする、請求項第１２項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養システム。
【請求項１７】
前記ドリップチューブは培地供給部と連結されるチューブ連結部と培地の速度を制御する速度制御部から構成されることを特徴とする、請求項第１２項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養システム。
【請求項１８】
前記ドリップチューブの一側には内部に収容される二酸化炭素を内部または設定位置に流入できるように二酸化炭素流入口が形成されることを特徴とする、請求項第１２項に記載のアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養システム。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本発明は、アクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いた連続培養工程に関し、より具体的には最適の生産培地及びドリップチューブ(drip tube)と細胞分離器とを用いた菌体再循環システムの導入によりシステムを安定化させてコハク酸を高効率で生産する。

【背景技術】

【０００２】

コハク酸(succinic acid)は直鎖ジカルボン酸。HOOC-CH2CH2-COOH。ナトリウム塩は貝類の味成分で調味料として使用される。1550年R.アグリコラが化石となった樹脂である琥珀を乾留して得たという記録があることから琥珀酸とも言う。無色の柱状または板状の結晶で分子量118.09、融点185℃、沸点235℃、比重1.564である。なお、TCA回路の一員である主な有機酸としてカルボン酸の一種である。TCA回路でコハク酸が生成される段階はα-ケトグルタル酸が脱水素化、 脱カルボキシ化されてスクシニル補酵素 A(succinyl Co-A)を形成した後、再びコハク酸に転換されて生成され、コハク酸はコハク酸脱水素酵素によってフマル酸に酸化される。

【０００３】

化学的合成法と微生物発酵により生産が可能なコハク酸の中で医薬品、食品の添加剤、及び保存剤など特殊な用途として使用される少量のコハク酸のみ微生物発酵法によって生産されている。その反面、産業的に使用される大部分のコハク酸は、米国、欧州、日本および中国の巨大化学会社により原油や液化天然ガスから由来したn-ブタン(butane)とアセチレン(acetylene)から合成されている。一般的に化学的コハク酸合成工程は、製造過程で有害性固形廃棄物、廃溶液及び廃ガス(一酸化炭素を含む)等を多量に排出するという問題点を持っているだけでなく、資源の枯渇の可能性の高い化石原料を基礎物質として使用するので、これを代替する微生物を用いたコハク酸生産方法に対する研究開発が急を要する実情である。また、油価の上昇により生産原価が持続的に増加しているので、生産工程の代替が急を要して穀物から生産され得る生物学的なコハク酸生産が関心の対象となっている。

【０００４】

コハク酸は医薬、食料品、石油化学工程における様々な分野にわたって適用され得るC4系列の有機酸であって、米エネルギー省で未来10大重要な物質として選定したことがある。最近、発酵技術の発展により水素置換を通じて生産してきた既存のプロセスを代替できる水準に達したので、世界的に多くの研究が進められている。また、年間20兆ウォン規模以上の国際的市場が形成されており、その価値が非常に高いと言える。

【０００５】

培養の形式としては微生物の性質によって一般的な好気性発酵とアルコール発酵として代表される嫌気性発酵とに分けることができるが、培地の状態によっては液体培養と固体培養とに操作上で回分培養と連続培養とにそれぞれ分類することができる。

【０００６】

回分培養(Batch culture)とは発酵槽を使用して培養の経過によって培地成分が減少されて主な基質が完全に消費されるまで培養を継続し、微生物の増殖と目的生産物を蓄積する閉鎖反応の一種であり、発酵工業で最も一般的に用いられている方法である。接種後の誘導期、対数増殖期、正常期、生長減速期、及び停止期の5段階に分けられる。細胞培養の際、正常期の細胞を新たな培地に種菌後、再び生長周期を繰り返す。培養の過程で培地成分や細胞密度が変化して細胞環境が一定せず生産性の低い欠点があるが、連続培養に比べて装置や方法が簡便であるため、よく使用される。

【０００７】

流加培養(Fed-batch culture)とは増殖に対して制限因子となっている基質を少量ずつ続けて供給しながら一定に低濃度で保持する培養法で、培養に適した環境を続けて調節できる長所がある。一般的に流加培養は増殖を阻害する基質を原料とする場合、Feeding速度を調節したり、基質の濃度が高くなると、cataboliteの抑制など調節機構によって生産性が低下する場合、または栄養要求性変異株を用いる場合、要求性栄養物質の供給を調節

してFeedback調節を防止する場合に使用される。但し、流加培養は最適条件を調節するか、適切なFeed rateを保持することが困難であるので、Dilution rateが急激に減少することができ、培養を調節し難いという短所がある。

【０００８】

連続培養(continuous culture)とは連続的に培養液を発酵槽の内に供給するとともに同じ量の培養液を流出させることにより正常状態を保持しながら微生物を培養する方法であって、ケモスタット(chemostat)は栄養液の炭素源や窒素源などを増殖制限基質として微生物の増殖を制御する方法で、タービドスタット(turbidostat)は微生物の濃度を一定に保持するようにバッチを続けて供給・流出させる方法である。

【０００９】

連続培養は一応培養の正常状態が確立すれば、正常状態で反応が行われ、定常状態に到達した後には細胞、産物、基質の濃度が一定して保持され、自動制御、運転操作の標準化と自動化が可能であり、労働力が低減される効果があり、最も大きな長所は正常期の時間を延長して誘導期、停止期などの時間を最小化することができるので、生産性が非常に大きいという魅力がある。

【００１０】

しかし、現在の連続培養工程は供給される液量の速度をポンプで調節することにより、細胞比成長速度を人為的に固定させることができることに大きな長所がある。本発明はこれに加えて、生産菌株の生理学的特性を用いて少量の炭酸イオン濃縮液を流加式で添加する工程を追加することにより、限界希釈速度の克服、コハク酸の生産量の増加を図った。また、連続式培養を通じた発酵工程は回分式培養に比べて小さな規模の工程で回分培養ほど生産することができるので、発酵槽の規模を効率的に引き下げ、従って生産単価の節減をもたらすことにより産業化における市場内での競争力を持たせる。

【００１１】

しかし、連続培養は一つの生成物だけのための工程体系であり、雑菌比増殖速度が生産菌株比増殖速度より大きいのが一般的なので、雑菌に汚染されれば、生産菌株が雑菌に代替されるおそれがあり、改良菌株の場合、遺伝形質が変形して復帰変異株が発生することができ、復帰変異株の非増殖速度が大きければ、生産量は非常に減少する結果が発生する。また、工程コスト面でProductの濃度が低く、分離回収コストが増加する問題がある。

【００１２】

また、回分式又は流加培養式は規定された大きさの反応槽で生産性が低い。即ち回分式又は流加式培養は前述の様々な段階の工程を経るため非効率的なので、問題点を克服しようと連続培養を選択して高生産性を達成することができるが、微生物を固定化させる方式を使用する場合には、微生物の過剰発現により詰まり現象が発生することができる。

【００１３】

従って、殆どの発酵工程は固定化よりは浮遊培養(suspension)で生産物を製造する方法を用いる。しかし、このような浮遊培養法で連続発酵を行う場合は菌体のwashoutのため、生産性を高めるのに限界がある。

【００１４】

一方、反応器の単位体積で菌体の増殖率(dX/dt)は、次の数式で表すことができる。

【００１５】

$$dX/dt=D(X1-X0)+(\mu-kd)X$$

【００１６】

この際、Dは希釈率(dilution rate)、Xは菌体濃度、X0は反応器に流入される菌体濃度、X1は反応器から流出される菌体濃度、μは菌体の生成速度、kdは死滅速度である。ここで、菌体のwashoutを防止するためには$(\mu-kd)X$が$D(X1-X0)$より大きくなければならない。しかし、生産性はDXに比例するため、菌体のwashoutを防止するため、Dを小さく運転する場合に生産性が低下するようになる。従って、生産性の向上のため、反応器から流出される流れで菌体を回収する様々な方法が考案された。

【００１７】

菌体を回収する方法としては、沈殿法又は多孔性微細繊維(hollow fiber)を用いるろ過法などがある。現在、２つの方法はすべて都市下水の処理には使用されているが、生物工程では、それぞれ遅い沈殿速度と膜の表面に微生物が付いている現象のため使用されていない。この際、生産性を高めるためには上の数式で『DX』を増加させながら連続運転を行わなければならないが、前記のような理由により未だ高濃度の連続培養が実現していない。

【００１８】

細胞分離器は連続培養の際、細胞再循環に使用される装置であって、外部に排出される培養液で菌体を再び回収して発酵に使うすることができるようにする装置である。菌体の回収が行われることにより、低い細胞比成長速度でも高水準の希釈速度を保持できるようになって全体的に生産性の極大化をもたらす。このような装置の効果は連続培養でその効果が著しく、膜やフィルターを用いた装置がバクテリア培養で広く使用されている。

【００１９】

しかし、膜やフィルターを用いた細胞分離器を使用するとき、粘性のある培養液の場合には培養液と菌体が膜やフィルターを詰めたり、損傷を与えるため効果的ではなく、分離効率が急激に減少する問題点が発生する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００２０】

【特許文献１】韓国登録特許１０-０３０１９６０号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００２１】

従って、前記のような問題点を解決するため、本発明はブドウ糖(glucose)、酵母エキス(yeast extract)及びコーンスティープリカー(corn steep liquor)を含む培地、及び炭酸水素ナトリウム(NaHCO3)を発酵槽に連続供給する段階、および前記発酵槽で培養液を連続除去する段階を含むアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)大量生産のための連続培養方法を提供することを目的とする。

【００２２】

本発明の他の目的は、内部に培養液が保存される発酵槽と、前記発酵槽に供給される培養液を分離手段を通じて菌体と培養液とに分離して排出する細胞分離器と、培地供給部で供給される培地と、前記細胞分離器から排出される菌体を回収して前記発酵槽に供給するドリップチューブとを含んでなることことを特徴とするアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養システムを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【００２３】

前記のような目的を達成するため、本発明はブドウ糖(glucose)、酵母エキス(yeast extract)及びコーンスティープリカー(corn steep liquor)を含む培地、及び炭酸水素ナトリウム($NaHCO_3$)を発酵槽に連続供給する段階、および前記発酵槽で培養液を連続除去する段階を含むアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養方法を提供する。

【００２４】

本発明の一実施例において、連続除去される培養液でアクチノバシラススクシノゲネスを分離する段階、および分離されたアクチノバシラススクシノゲネスを発酵槽に供給する段階をさらに含むことができる。

【００２５】

本発明の一実施例において、前記連続培養方法は10～30 g/Lの濃度の炭酸マグネシウム($MgCO_3$)を2～4 ml/hrの速度で供給する段階をさらに含むことができる。

【００２６】
本発明の一実施例において、前記の培地は、1～100ml/hrの速度で供給し、前記炭酸水素ナトリウム($NaHCO_3$)は8～10 g/Lの濃度を2～4ml/hrの速度で供給することができる。
【００２７】
本発明の一実施例において、前記連続培養方法は二酸化炭素を0.4～0.8vvmの速度で曝気(aeration)供給することができる。
【００２８】
本発明の一実施例において、前記ブドウ糖は45～65 g/Lの濃度、酵母エキスは5～8 g/Lの濃度及びコーンスティープリカーは1～14 g/Lの濃度で含有されることができる。
【００２９】
本発明の一実施例において、前記アクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)はUK13菌株(KCTC 12233BP)であることができる。
【００３０】
本発明の一実施例において前記培地、炭酸水素ナトリウム及び炭酸マグネシウムは1～100 ml/hrの速度で供給することができる。
【００３１】
本発明の一実施例において、連続除去された培養液を15～22.5ml/hrの速度で発酵槽に供給して菌体濃度を高める段階をさらに含むことができる。
【００３２】
本発明の一実施例において、アクチノバシラススクシノゲネスを分離する段階は細胞分離器を使用することができる。
【００３３】
本発明の一実施例において、前記培地、炭酸水素ナトリウムまたは炭酸マグネシウムはドリップチューブを使用して供給することができる。
【００３４】
また、本発明は、内部に培養液が保存される発酵槽と、前記発酵槽に供給される培養液を分離手段を通じて菌体と培養液とに分離して排出する細胞分離器と、培地供給部で供給される培地の汚染を防止し、培地の速度を制御して発酵槽に供給するドリップチューブと、前記細胞分離器から排出される菌体を回収して前記発酵槽に供給する回収ラインと、を含んでなることを特徴とするアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を用いてコハク酸(Succinic acid)の大量生産のための連続培養システムを提供する。
【００３５】
本発明の一実施例において、前記細胞分離器は、所定の大きさを持ち、上部垂直部が上部に形成され、前記上部垂直部の下部には間隔を置いて前記上部垂直部より直径の小さい培養液排出口が形成され、前記上部垂直部と培養液排出口には傾斜部が形成されることができる。
【００３６】
本発明の一実施例において、前記細胞分離器は、所定の大きさを持ち、上部傾斜部が上部に形成され、前記上部傾斜部の下部には間隔を置いて前記上部傾斜部より直径の小さい培養液排出口が形成され、前記上部傾斜部と培養液排出口の間には上部垂直連結部と下部傾斜連結部が連続形成されることができる。
【００３７】
本発明の一実施例において、前記細胞分離器の内面は培養液を迅速に培養液排出口に排出できるように曲面案内部が形成されることができる。
【００３８】
本発明の一実施例において、前記分離手段は円筒状の管または多数個のメッシュ層から構成されるフィルターのうち一つであることができる。
【００３９】
本発明の一実施例において、前記ドリップチューブは培地供給部と連結されるチューブ連結部と培地の速度を制御する速度制御部から構成されることができる。

【００４０】
本発明の一実施例において、前記ドリップチューブの一側には菌体に沿って供給される二酸化炭素を外部または設定位置に排出できるように二酸化炭素排出口が形成されることができる。
【発明の効果】
【００４１】
本発明に係る連続培養でコハク酸を生産すれば、回分式培養より高いコハク酸生産性を持つようになるので既存の生産単価に比べて安価に生産工程が進むことができ、また本発明に係るコハク酸生産菌株液状培養用培地及び連続培養工程を用いた産業的規模の液状培養を通じて石油化学誘導体及び医薬、食品産業などに多様に用いられるコハク酸を低廉な原価で競争力のある大量供給が可能である。
【００４２】
また、本発明のドリップチューブと細胞分離器を使用する場合、発酵中の汚染を防止して菌体の濃度を高めることができ、コハク酸の生産量を増加させると共に生産収率を増加させて培地の使用を最小化した工程で高い経済性を達成することができる。
【図面の簡単な説明】
【００４３】
【図１】炭酸マグネシウムを流加式で添加する連続培養発酵工程と連続培養を行ったとき、菌体量を比較したグラフである。
【図２】炭酸マグネシウムを流加式で添加する連続培養発酵工程と連続培養を行ったとき、ブドウ糖の残量を示した比較グラフである。
【図３】炭酸マグネシウムを流加式で添加する連続培養発酵工程と連続培養を行ったとき、コハク酸生産量を示した比較グラフである。
【図４】炭酸マグネシウムと炭酸水素ナトリウムを流加式で添加する連続培養発酵工程と連続培養を行ったとき、ブドウ糖に対する計測された菌体量を示した比較グラフである。
【図５】炭酸マグネシウムと炭酸水素ナトリウムを流加式で添加する連続培養発酵工程と連続培養を行ったとき、ブドウ糖に対する発酵槽内のブドウ糖残量を示した比較グラフである。
【図６】炭酸マグネシウムと炭酸水素ナトリウムを流加式で添加する連続培養発酵工程と連続培養を行ったとき、菌体量に対する発酵槽内のコハク酸生産量を比較したグラフである。
【図７】連続式発酵工程を模式したものである。
【図８】菌体再循環発酵工程と連続培養を行ったとき、菌体量を比較したグラフである。
【図９】菌体再循環発酵工程と連続培養を行ったとき、ブドウ糖の残量を比較したグラフである。
【図１０】菌体再循環発酵工程と連続培養を行ったとき、コハク酸の生産量を比較したグラフである。
【図１１】菌体再循環発酵工程と連続培養を行ったとき、ブドウ糖に対する菌体量の収率を比較したグラフである。
【図１２】菌体再循環発酵工程と連続培養を行ったとき、ブドウ糖に対するコハク酸の収率を比較したグラフである。
【図１３】実際の菌体再循環発酵工程を行うときの培養を示したものである。
【図１４】本発明に係る菌体再使用システムを示す構成図である。
【図１５】本発明に係る菌体再使用システムを構成する細胞分離器の実施例を示す図面である。
【図１６】本発明に係る菌体再使用システムを構成する細胞分離器の実施例を示す写真である。
【図１７】本発明に係る菌体再使用システムを構成するドリップチューブを示す図面である。
【図１８】数回繰り返された連続培養の菌体の成長を示すグラフである。

【図１９】菌体量、ブドウ糖の残量、コハク酸生産量の情報を用いてブドウ糖に対する菌体の収率、ブドウ糖に対するコハク酸の収率を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００４４】
本発明で使用される用語に対する定義は、以下の通りである。
【００４５】
本明細書を通じて文脈で特に必要でなければ、『含む。』及び『含む、』という言葉は提示された段階または物質を含むが、任意の他の段階または物質が排除されないことを内包するものと理解しなければならない。
【００４６】
ここで使用された用語『連続培養』はバイオリアクター(発酵槽)で連続的な栄養分供給、基質供給、細胞の製造を含む発酵方法を言う。この連続供給、除去又は細胞の製造は同一又は異なるストリームで発生することができる。連続工程はバイオリアクター内で正常状態の達成をもたらす。『定常状態』とはこれら測定可能な変数全部(即ち、供給速度、バイオリアクターで保持される基質及び栄養分濃度、バイオリアクターで細胞濃度およびバイオリアクターから細胞の除去、バイオリアクターから生産物の除去はもちろん、温度と圧力のような条件変数)が時間にわたって一定であるということを意味する。
【００４７】
本発明で使用される全ての技術用語は、特別に定義されていない以上、本発明の関連分野で通常の当業者が一般的に理解するような意味として使用される。また、本明細書には望ましい方法や試料が記載されるが、これと類似又は同等のものも本発明の範疇に含まれる。本明細書に参考文献として記載されるすべての刊行物の内容は本発明に導入される。
【００４８】
コハク酸を生産するにおいて強力な発酵工程は連続培養工程と知られているが、連続培養工程は回分式発酵とは異なり、連続的に殺菌された発酵培地を発酵槽に供給し、微生物と目的物などが混合された発酵培養液を供給される液量ほど発酵槽の外部に流出させて発酵槽内の液量を一定に保持させながら微生物を発酵する発酵方法である。他の名前ではキモスタット(chemostat)とも呼ぶが、正常状態下で培養液内の化学量論的特性が一定の工程であるためである。
【００４９】
アクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)は、通性嫌気性菌株としてこぶ胃バクテリア(rumen bacteria)の一種で高い濃度のコハク酸(succinic acid)を生産することで最も注目されているバクテリアの一つである。
【００５０】
本発明はアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を生産菌株として連続培養を通じてコハク酸を大量生産するためのシステムである菌体再循環を用いた連続培養システム(cell recycling continuous system)に最適化された培地組成物及び菌体再循環方法に関するものであって、特に炭酸マグネシウム($MgCO_3$)及び/又は炭酸水素ナトリウム($NaHCO_3$)を流加式で供給してコハク酸大量生産に関する条件を確立してコハク酸の連続生産を可能にすることである。
【００５１】
また、コハク酸を連続培養工程で生産するとき、ドリップチューブ(drip tube)と細胞分離器を用いて遥かに安定的、かつ高収率のコハク酸を生産できる発明に関するものであって、より具体的には菌体成長速度の速いアクチノバシラススクシノゲネスが培地タンクへ汚染されることを防ぐドリップチューブと連続培養の際、効果的に細胞を分離して捨てられる細胞を再使用できるようにしてアクチノバシラススクシノゲネスの菌体量を大きく向上させる発明に関するものであり、より具体的にはドリップチューブと細胞分離器がすべて重力による密度差で上澄液と固形物、細胞を分離する装置でドリップチューブは滅菌された培地タンクから発酵槽へ入ってくる流入口上に設ける装置として発酵槽で滅菌された培地タンクへ逆に入ることを防ぐ装置である。

【００５２】
一般的に使用されていない培地が続けて入ってきて培養液が出る連続培養工程でアクチノバシラススクシノゲネスのような菌体の成長速度が非常に早い微生物は発酵時に発生する泡や曝気される空気によって培地流入口に付いて育てられ、培地の流入速度の遅い場合、培地の流入管を通じて滅菌された、使用されていない培地タンクへ入って汚染させてしまう。ここに発酵槽の培地流入管にドリップチューブを設けることにより、効果的にこのような現象を防ぐことができる。
【００５３】
本発明の細胞分離器は重力による密度差によって上澄液と固形物を分離させるものであり、特に内部に分離管が設けられ、速い流速及び高粘度の流体でも固形物の分離効率が改善され得るため、連続培養の効率が極大化されることができる。
【実施例】
【００５４】
以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。しかし、これら実施例は本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれら実施例に限るものではない。
【００５５】
<材料及び機構>
本発明に使用したブドウ糖はDAEJUNG(株)、炭酸水素ナトリウムはduksan(株)で購入し、酵母エキス、コーンスティープリカー固形分及び炭酸マグネシウム($MgCO_3$)はsigma aldrichで購入して使用した。
【００５６】
<実施例１>
1.生産菌株(producing strain)
本発明に係るコハク酸生産菌株はATCC(American Type Culture Collection)で購入したアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)(ATCC 55618)を遺伝子変形させた突然変異株、UK13菌株(KCTC 12233BP)を使用した。
【００５７】
２．菌株の保存
本発明者らは、前記生産菌株を保存した後、一定量を分注して使用し、本発明に係る生産菌株を保存する培地は、固体培地としてTSA(tryptic soy agar)の培地(pancreatic digest of casein 15 g、papaic digest of soybean 5 g、NaCl 5 g、寒天(agar)15 g、蒸留水1L)を用いた。
【００５８】
菌株保管は液状培養を通じて得た菌体を4℃に保管するか、または20% グリセロールstockを製造して-80℃に保管し、必要時ごとに保管されたstockを取り出して固体継代培養培地に接種後に培養して使用した。
【００５９】
３.成長培養(または種菌培養)及び接種
本発明者らはコハク酸の生産培養に先立って菌体の量を増やすために成長培養を行い、成長培養(前培養、pre-cultivation、種菌培養)はTSB(tryptic soy broth)培地(pancreatic digest of casein 17g、papaic digest of soybean 3 g、デキストロース2.5g、NaCl 5 g、K2HPO4(potassium phosphate dibasic)2.5 g、蒸留水1L)を使用して活性の高い菌体を得た。
【００６０】
固体培地で成長した単一コロニーを無菌的に回収した後、これを液体培地に1%(v/v)となるように接種した。培養は2.5L大きさの攪拌反応器(stirred tank reactor)で1.2 Lの培養体積で行われた。最初の菌体の成長培養は振盪培養器で38℃、200rpmで1ないし2日間培養し、液状成長培養は50ml体積のガラスチューブに5mlの操業体積で行われ、円滑な培養のために斜めに培養した。1次成長培養は12ないし15時間培養し、その後2次成長培養は

250 mlフラスコで操業体積30ml濃度で6ないし12時間培養した後、目的物の生産のため発酵槽に接種した。

【００６１】

４．連続培養方法

本発明に係るアクチノバシラススクシノゲネス菌株を用いたコハク酸大量生産のための連続培養は図7の模式図に示した。

【００６２】

本発明に係る微生物培養の実施は培養方法によって連続培養、流加式培養または連続培養と流加式培養の結合で行うことができ、培養システムによって多段階培養システム(Multi stage system)または細胞再循環システム(cell recycle system)に進めることができ、これに限るものではない。

【００６３】

本発明に係る一実施例として具体的には先ず発酵槽(Bioreactor)に液体培地を培養槽に生産菌株を1%の接種量で種菌した後、連続培養を行い、炭酸マグネシウム及び/又は炭酸水素ナトリウムは生産培地に流加式で追加的に供給した。また、細胞の密度を保持するため、細胞再循環システム(cell recycle system)に進行してアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を濾過、洗浄した後に回収し、再び培養槽に供給した。

【００６４】

５．培地(culture medium)および培養条件

本発明に係る成長培養と生産培養はすべて1%の接種量で接種し、生産培地はブドウ糖(Glucose)45g/L、酵母エキス(Yeast extract)10g/L、コーンスティープリカー(corn steep liquor)10g/L、炭酸水素ナトリウム5g/L及び炭酸マグネシウム(magnesium carbonate:MgCO3)20g/Lが含まれた生産培地を使用し、流加式添加連続培養の場合、前記培地で炭酸マグネシウムを3～10g/Lの濃度で炭酸水素ナトリウムを5～35 g/Lの濃度で製造して3ml/hrの速度で追加した。

【００６５】

また、培養液のpHは6～7の範囲で培養し、温度は35～40℃の間で安定させた後、Foam Breaker及びシリコン消泡剤で泡を除去しながら培養を行った。

【００６６】

６．連続培養の操業

本発明に係る連続培養は、前述のような培地を使用し、ポンプを通じて送る培地の流速は0～100 ml/hrの間で多様に変化させながら培養を行った。この際、流速が0 ml/hrの場合は培地の出入りのない回分式培養である。

【００６７】

また、一実施例として菌体を再循環するcell recycle systemの場合には再循環されるポンプの流速は培地で発酵槽へ流入される殺菌培地流速の1/2で調整して培養を行った。

【００６８】

二酸化炭素の曝気は0.6vvm(aeration volume/medium volume/minute)の速度で曝気させ、水酸化ナトリウムを用いて一定の水素イオンを保持させて培養した。炭酸マグネシウム及び/又は炭酸水素ナトリウムのような炭酸イオンを提供するため、炭酸マグネシウムを3ないし10 g/L、炭酸水素ナトリウムを5ないし40 g/Lの濃度で濃縮した溶液を使用し、連動ポンプを用いて3 ml/hrの速度で発酵槽内に投入させた。また、本発明の一実施例として発酵槽から排出される二酸化炭素を循環して再び発酵槽の内部に供給する再循環システムを備えることができる。

【００６９】

炭酸マグネシウムや炭酸水素ナトリウムのような水に溶けて炭酸イオンを形成する物質を濃縮液として添加することは、生産菌株であるアクチノバシラススクシノゲネスがコハク酸を生合成するにおいて、二酸化炭素の豊富な供給が必須的であるためである。また、バクテリアは二酸化炭素を用いるため水に溶けた炭酸イオンを細胞膜に存在するポンプタ

ンパク質を用いて容易に能動輸送させるので、このような論理によってコハク酸の生産性を増やすため、炭酸イオンを直接発酵槽に添加させる工程を追加した。

【００７０】

炭酸マグネシウム及び/又は炭酸水素ナトリウムのような炭酸イオンを提供するため、炭酸マグネシウムを10ないし40g/L、炭酸水素ナトリウムを5ないし40g/Lの濃度で濃縮した溶液を使用し、連動ポンプを用いて3ml/hrの速度で発酵槽内に投入させた。

【００７１】

本発明の一実施例として流加式連続培養には最初発酵槽にブドウ糖(Glucose)50 g/L、酵母エキス(Yeast extract)5g/L、コーンスティープリカー(corn steep liquor)10g/L及び炭酸水素ナトリウム10g/Lを含む培養液に菌株を接種し、連続供給用培地にはブドウ糖50g/L、酵母エキス5g/L及びコーンスティープリカー10g/Lを供給し、炭酸マグネシウムと、炭酸水素ナトリウムを培地とは別に流加式で供給した。この際、連続供給用培地は1～100ml/hrの速度で供給し、前記炭酸水素ナトリウム($NaHCO_3$)は8～10 g/Lの濃度を2～4ml/hrの速度で供給し、10～30g/Lの濃度の炭酸マグネシウム($MgCO_3$)を2～4 ml/hrの速度で供給した。

【００７２】

７．菌体の再循環(cell recycling system)

本発明の発酵槽に含まれた最初の培地はブドウ糖(Glucose)50g/L、酵母エキス(Yeast extract)5g/L、コーンスティープリカー(corn steep liquor)10g/L、炭酸マグネシウム20g/L及び炭酸水素ナトリウム10g/Lを含む最初の培地にアクチノバシラススクシノゲネスを接種し、菌体再循環連続培養の連続培養用液体培地を次のように製造した。ブドウ糖(Glucose)50g/L、酵母エキス(Yeast extract)5g/L、コーンスティープリカー(corn steep liquor)10g/L、炭酸マグネシウム20g/L及び炭酸水素ナトリウム10g/Lが含まれた。この際、連続培養用液体培地を30～55ml/hrの速度で供給すると同時にアクチノバシラススクシノゲネスを培養する培養液を30～55ml/hrの速度で除去した。

【００７３】

また、本発明者らは一実施例として高い菌体濃度を保持するため、細胞再循環工程を付加して除去される培養で生産菌株であるアクチノバシラススクシノゲネスを濾過を通じて回収した後に洗浄して回収し、回収したアクチノバシラススクシノゲネスが含まれた培養液を15～22.5ml/hrの速度で供給してコハク酸生産のための菌体の濃度を高めた状態で連続培養を行った。

【００７４】

<実施例２>

ドリップチューブを装着した連続式培養工程

従来のアクチノバシラススクシノゲネスを用いた菌体再循環工程の場合、菌体の細胞比成長速度の速い微生物は発酵槽または培養槽に供給する純粋培地(連続培養用培地)の流入管を通じて純粋培地タンクを汚染させる場合が多くの問題点があった。これは図18に示されたように連続培養中にアクチノバシラススクシノゲネスが純粋培地に汚染されてあたかも細胞再循環培養のように菌体量が急増することを知ることができる。このような現象は発酵槽内の培養液が若干の粘性があり、曝気される二酸化炭素が発酵槽内の培地流入口に付いて起こる現象であり、培養の途中に泡の発生時にはこのような現象が殆ど起きていることを確認した。

【００７５】

また、図19はドリップチューブを装着した後の連続式培養の菌体の変化の程度を表したグラフであって約300時間程度円滑に操業されることを確認することができた。

【００７６】

１．ドリップチューブの製作

本発明者らは図15に示すように2つの類型のドリップチューブを製作するようになった。

【００７７】

イ．二酸化炭素加圧形ドリップチューブ

先ず図17の左側(図17(a))に示した二酸化炭素加圧形ドリップチューブの特徴は曝気される二酸化炭素を再び再循環させて培地流入口に空気で圧力を加える方式で流速の遅い希釈速度に極めて効果的である。実験結果、約0～50ml/hrの流速までは非常に効果的で、その以後の速度は培地が流れる油圧が強まって空気で押すラインに培地が流れる場合もよく観察された。

【００７８】

ロ．重力形ドリップチューブ

次に図17の右側(17b))に示した重力形ドリップチューブは完全に重力による密度差で流入口に付いて培地に沿って育って上がってくる菌体が培地より密度が大きくて再び下がるように作る形態であり、従って、高さが高いほどその効果は大きくなる。本発明で実験した結果、図17の右側に示したように約16cm程度の高さにも非常に立派に作動していることを確認した。

【００７９】

製作されたドリップチューブを用いて多様な希釈速度(1/hr)でポンプを稼動し、コハク酸培養を行った結果、同じ条件で従来の60ないし80時間程度しかできなかった連続培養を図19に示したように300時間程度培養を行っても無理なく円滑に行われ、それ以上の時間をテストしてもアクチノバシラススクシノゲネスが純粋培地タンクへ逆行して育っている現象は発見されなかった。

【００８０】

<実施例３>

細胞分離器を装着した連続式培養工程

細胞再循環連続培養は高い菌体量によって既存の連続培養の時に可能であった生産菌株の細胞比成長速度より高い速度の希釈速度で培養が可能で、既存の連続培養より高い濃度の菌体、生産性を示すことが特徴である。バクテリアの連続式発酵工程で細胞再循環工程に使用される既存の細胞分離器は膜やフィルターを使用した場合がかなり多かった。しかし、膜やフィルターを使用した細胞の分離には菌体の大きさ、培養液の粘度など様々な要因が問題点として発生することができ、そのような問題は膜やフィルターの詰まり現象として表れる。このような問題は細胞の再循環の効率を落とすため、円滑な連続培養の操業を苦しめることになる。

【００８１】

本発明者らはこのような問題点を解決するため、効果的に細胞を分離することができる細胞分離器を考案して図15のような細胞分離器を製作した。本発明の細胞分離器は前述のドリップチューブのような原理により重力による密度差で菌体を分離して分離器内に分離管を置いてその効率を高めようとした。

【００８２】

製作された細胞分離器を用いて細胞再循環培養を行った。希釈速度は約40ml/hrで、再循環速度は希釈速度の1/2である約20ml/hrの速度で進行し、ブドウ糖54.5 g/L、酵母エキス6.5g/L、コーンスティープリカー固形分9.5g/L、炭酸水素ナトリウム10 g/L、炭酸マグネシウム2 g/Lの培地を含む細胞再循環連続式培養を行った 。

【００８３】

実験結果、図16に示したように密度差により菌体と培養液が分離されて分離器の底の部分に沈んでいる現象を確認することができ、図8に示したように連続培養に比べて細胞の再循環連続培養が約3倍菌体量が増加されたことを確認することができ、純粋培地を入れる速度と再循環される速度の比が1:0.5のとき、最終排出ラインの菌体量を分析したとき表われる菌体量を見て細胞分離器で抜けて出る培養液で約65%以上の菌体を回収することを確認することができた。

【００８４】

<実施例４>

ドリップチューブ(drip tube)及び細胞分離器(cell separator)の連結構造

本願発明の菌体再使用システム１０は培養液が保存される発酵槽２０と、前記発酵槽２０に供給される培養液を分離手段５０を通じて菌体と培養液とに分離して排出する細胞分離器３０と、前記発酵槽２０に培地を供給するドリップチューブ４０と、前記細胞分離器３０から排出される菌体を回収して発酵槽２０に供給する回収 ライン６０などから構成される。

【００８５】

前記発酵槽２０は、所定の大きさを持ち、内部には培養液を収容できるように収容空間２１が形成され、上部には培地と菌体が供給される発酵槽流入口２２が形成され、下部には内部に収容される培養液を排出する発酵槽排出口２３が形成される。

【００８６】

即ち、前記発酵槽２０はドリップチューブ４０を通じて供給される培地を発酵槽流入口２２を通じて収容空間２１に供給した後、前記収容空間２１に収容される培地や菌体などから形成される培養液を前記発酵槽排出口２３を通じて細胞分離器３０に伝達されるようにしたものである。

【００８７】

前記発酵槽２０で供給される培養液を分離及び排出する細胞分離器３０は発酵槽２０で供給される培養液を分離手段５０を通じて菌体と培養液とに分離するようになる。この際、発酵槽２０と細胞分離器３０との間には培養液または菌体の円滑な移動のためポンプを備えることができ、別途の説明は省略する。

【００８８】

ここで前記分離手段５０は培養液と菌体を分離できる公知された手段などが選択的に適用されることができ、本願発明では比重により菌体と培養液を分離できる円筒状の管や多数個のメッシュ網層から構成されるフィルターのうち一つが選択的に構成される。

【００８９】

また、本願発明で前記細胞分離器３０は示された図15(a)ないし図15(c)を択一して構成され、これを具体的に察してみると以下の通りである。

【００９０】

先ず示された図15(a)の細胞分離器３０は、所定の大きさを持ち、上部垂直部３１ａが上部に形成され、前記上部垂直部３１ａの下部には間隔を置いて前記上部垂直部３１ａより直径の小さい培養液排出口３２ａが形成され、前記上部垂直部３１ａと培養液排出口３２ａには傾斜部３３ａが形成される例を示したものである。

【００９１】

即ち、示された図15(a)の細胞分離器３０は、上部垂直部３１ａと培養液排出口３２ａとの間に形成される傾斜部３３ａを用いて前記分離手段５０を通じて分離された培養液を前記培養液排出口３２ａに迅速に移動できるようにしたのである。

【００９２】

この際、前記上部垂直部３１ａの上部には発酵槽２０で供給される培養液が供給される培養液供給部３４ａと、前記分離手段５０を通じて分離された菌体を回収ライン６０に供給するチューブ連結部３５ａがそれぞれ形成される。

【００９３】

また、示された図15(b)の細胞分離器３０は、所定の大きさを持ち、上部傾斜部３１ｂが上部に形成され、前記上部傾斜部３１ｂの下部には間隔を置いて前記上部傾斜部３１ｂより直径の小さい培養液排出口３２ｂが形成され、前記上部傾斜部３１ｂと培養液排出口３２ｂとの間には上部垂直連結部３３ｂと下部傾斜連結部３４ｂが連続形成される例を示したものである。

【００９４】

即ち、示された図15(b)の細胞分離器３０は、前記上部傾斜部３１ｂと培養液排出口３２ｂとの間に形成される上部垂直連結部３３ｂと下部傾斜連結部３４ｂを用いて多くの量の培養液を収容しながら分離手段５０を通じて培養液と菌体を分離することができるようにしたのである。この際、前記上部傾斜部３１ｂの上部には発酵槽２０へ供給される培養

液が供給される培養液供給部３５ｂと、前記分離手段５０を通じて分離された菌体を回収ライン６０に供給するチューブ連結部３６ｂがそれぞれ形成される。

【００９５】

次に、示された図15(c)の細胞分離器３０は内面に培養液排出口３２ａ、３２ｂで培養液を速やかに排出できるように曲面案内部３２が形成される例を示したものである。この際、前記曲面案内部３２は曲面だけでなく、曲面と傾斜面の組み合せから構構成できることを明らかにする。

【００９６】

前記発酵槽２０に培地を供給するドリップチューブ４０は培地供給部７０で供給される培地を速度調節して前記発酵槽２０に供給するようになる。そして本願発明で前記ドリップチューブ４０は示された図4(a)または図4(b)のうち択一して形成される。

【００９７】

先に示された図17(a)のドリップチューブ４０は、所定の大きさを持ち、一側には培地を供給する培地供給部７０と連結されるチューブ連結部４１が形成され、前記発酵槽２０と連結される部分には供給される培地の速度を制御する速度制御部４２が装着される例を示したものである。

【００９８】

即ち、前記ドリップチューブ４０はチューブ連結部４１を通じて供給される培地の速度を速度制御部４２を通じて発酵槽２０に供給するようにしたのである。この際、前記培地の速度を制御する速度制御部４２は、断面の径の変化または公知された流体調節機構を用いて培地の供給速度を制御し、別途の説明は省略する。

【００９９】

また、示された図4(b)のドリップチューブ４０は、所定の大きさを持ち、一側には培地を供給する培地供給部７０と連結されるチューブ連結部４３が形成され、前記発酵槽２０と連結される部分には供給される培地の速度を制御する速度制御部４２が装着され、一側には内部に収容される二酸化炭素を再循環、または設定位置に流入できるように二酸化炭素の流入口４１が形成されることを示したものである。

【０１００】

即ち、前記ドリップチューブ４０はチューブ連結部４１を通じて供給される培地の速度を速度制御部４２を通じて発酵槽２０に供給ながら内部に収容される二酸化炭素による培地の汚染を防止できるように一側に二酸化炭素流入口４３を形成したものである。

【０１０１】

前記細胞分離器３０から排出される菌体を回収して発酵槽２０に供給する回収ライン６０は細胞分離器３０の分離手段５０を通じて外部に排出される培地を前記発酵槽２０に供給するようになる。このため前記回収ライン６０は、所定の長さを持つホース６１と、前記ホース６１の途中に装着されて培地を発酵槽２０に伝達するポンプ６２から構成される。

【０１０２】

<実験例１>

１．コハク酸の定量分析

本発明者らはアクチノバシラススクシノゲネス(Actinobacillus succinogenes)を培養した培養液で本発明の目的の生産物であるコハク酸の定量分析のため1.5mlマイクロチューブに試料を採取して連続希釈(serial dilution)を通じて希釈した上で0.45μm濾過紙を用いて２回濾過過程を行った後、HPLCを用いて次の条件で分析した。

分析温度:25℃

流速: 0.8ml/min

移動相: 0.01N H2SO4

分析時間: 20分

試料注入量: 10μl

コラム: Organic acid column(Bio-Rad、Aminex HPX 87H、125-0140)

検出器: UV detector
検出波長: 210 nm
【０１０３】
２．糖分析
培養液中の糖分析は培養液を12,000 rpmで10分間遠心分離した後、上澄液を取って12,000rpmで10分間3回遠心分離を繰り返し行って上澄液のみ取った後、0.45μmHPLC用濾過紙を用いて濾過した。HPLCを用いた糖分析の条件は次の通りである:
分析温度: 40℃
流速: 1.2ml/min
移動相(mobile phase): アセトニトリル:水=75:25(v/v)
分析時間: 15分
試料注入量:20μl
コラム:Amine column(250mm×46mm、RS tech)
検出器:RI detector
【０１０４】
３．アクチノバシラススクシノゲネスの菌体量確認
発酵槽で培養される培養液を回収して12000 rpmの速度で10分間遠心分離を行って蒸留水やsaline waterで3回以上洗浄した。その後100℃で10～12時間乾燥した後、重量を測定する。または回収された培養液を均一に混ぜた後、660nmで分光吸度計を用いて吸光度を測定した。菌体量は濁度で測定できるが、生産培地のうち、炭酸マグネシウムが含まれた培養の場合、1N塩酸を用いて原液を50倍希釈する過程を通じて炭酸マグネシウムを完全に溶けた後、 吸光度を測定した。
【０１０５】
４．菌体量、コハク酸の生産量、使用されたブドウ糖に対する培養変数の計算式
連続培養と菌体再循環発酵工程に適用される数式は、下記に示されており、 以下の数式に使用される単語は以下の通りである。
V: 発酵槽体積、F: 流速、D: 希釈速度、X: 発酵槽内の菌体量、P: 発酵槽内のコハク酸生産量、S0: 最初のブドウ糖濃度、S: 発酵槽内のブドウ糖濃度、γX:時間当たり体積当たり菌体が育つ速度、γS:時間当たり体積当たりブドウ糖を用いる速度、γP:時間当たり体積当たりコハク酸を生産する速度を示す。
【０１０６】
連続培養の場合、菌体樹脂は次のように計算した。
【数１】

$$FX_0 - FX_1 + V\gamma_{X_1} = \frac{dX_1}{dt}$$

$$steady\ state, \frac{dX_1}{dt} = 0$$

$$\gamma_X = DX$$

基質樹脂は次のように計算した。
【数２】

$$FS_0 - FS_1 - V\frac{\mu}{Y_{X/S}}X_1 = V\frac{dS_1}{dt}$$

$$steady\ state, \frac{dS_1}{dt} = 0$$

$$\gamma_S = D(S_0 - S)$$

目的物(product)の樹脂は次のように計算した。

【数３】

$$FP_0 - FP_1 + V\gamma_{P_1} = V\frac{dP_1}{dt}$$

$$steady\,state, \frac{dP_1}{dt} = 0$$

$$\gamma_P = DP$$

【０１０７】

上式を満足し、それぞれブドウ糖に対する菌体、ブドウ糖に対するコハク酸生産量、菌体に対するコハク酸生産量は上に図示したものを用いて以下のように定義して分析した。

【数４】

$$Y_{X/S} = \frac{\gamma_X}{\gamma_S}、\quad Y_{P/S} = \frac{\gamma_P}{\gamma_S}、\quad Y_{P/X} = \frac{\gamma_P}{\gamma X}$$

【０１０８】

ロ．菌体再循環連続培養工程の場合

菌体樹脂、

【数５】

$$\frac{F}{V}X_0 + \frac{\alpha F}{V}CX_1 - \frac{(1+\alpha)}{V}FX_1 + \gamma_{X_1} = \frac{dX_1}{dt}$$

$$steady\,state, \frac{dX_1}{dt} = 0$$

$$\gamma_X = D(1+\alpha)X - D\alpha CX$$

基質樹脂、

【数６】

$$\frac{F}{V}S_0 + \frac{\alpha F}{V}S_1 - \frac{(1+\alpha)}{V}FS_1 - \frac{\mu}{Y_{X/S}}X_1(\gamma_{S_1}) = \frac{dS_1}{dt}$$

$$steady\,state, \frac{dS_1}{dt} = 0$$

$$\gamma_S = DS_0 + D\alpha S - (1+\alpha)DS$$

$$\gamma_P = (1+\alpha)P$$

【０１０９】

上式を満足し、それぞれブドウ糖に対する菌体、ブドウ糖に対するコハク酸生産量、菌体に対するコハク酸生産量は 上に図示したものを用いて次のように定義することができる。

【数７】

$$Y_{X/S} = \frac{\gamma_X}{\gamma_S} \quad Y_{P/S} = \frac{\gamma_P}{\gamma_S} \quad Y_{P/X} = \frac{\gamma_P}{\gamma X}$$

【０１１０】

<実験例２>

炭酸マグネシウムの添加連続培養と連続培養との比較

本発明者らは、前記実施例に係る炭酸マグネシウムの添加の有無による連続式培養の生産性を比較するため、次のような実験を行った。

【０１１１】

1.2 Lの発酵槽の体積に炭酸マグネシウムを含まない生産培地を希釈速度は12から24 ml/hrの速度で次第に増加させた。また、炭酸マグネシウムは流加式で添加し、3 ml/hrの速度で供給した。

【０１１２】

1.菌体量およびブドウ糖の消耗率

分析結果図1に示したように菌体量面では大きな差異がなくほぼ同じ量を示すことを確認することができた。しかし、図2に示したようにブドウ糖の残量は確かな差異を示した。

【０１１３】

また、希釈速度が増加することによってブドウ糖の残量が急激に増える連続培養とは異なって、炭酸イオンの添加連続培養工程は依然としてブドウ糖を全量消耗していることが確認された。

【０１１４】

従って、このような結果を通じて炭酸イオンを添加する場合、連続培養で克服しない希釈速度を克服できるという結論が得られ、コハク酸の生産量も増加することを知ることができる(図4参照)。

【０１１５】

また、添加された炭酸マグネシウムが発酵槽に入ると、全体体積で希釈されるため、その濃度は極微量であるといえる。しかし、極微量の添加にも優れたブドウ糖利用効果を示すことを確認することができた。

【０１１６】

２．コハク酸生産性(Productivity of succinic acid)

分析結果表1に示された結果を見ると、回分式培養によるコハク酸の生産性は時間当たり、リットル当たり0.339gの水準であるが、連続式培養の結果を見ると0.015の希釈速度以降は回分式培養の生産性より増加した数値を確認することができ、炭酸マグネシウム添加連続培養の場合、0.012の低い希釈速度(1/hr)にも時間当たり、リットル当たり0.469 gの回分式培養より高い生産性を確認することができた。また、最終0.018の希釈速度でも0.481の回分式培養より高い生産性を確認することができた(回分式培養は最終生産されたコハク酸量を全体培養時間で割った値である。連続培養の場合DP、希釈速度と該当時間のコハク酸生産量の積である)。

【０１１７】

また、炭酸マグネシウムの効果を確認したので、流加式の添加なく炭酸マグネシウムを20g/Lの濃度水準で最初から使用して培養したときは0.0449までブドウ糖を全量使用することを確認でき、以後、希釈速度をさらに増加させることができることを確認した(表1参照)。また、コハク酸生産性は希釈速度0.0449/hrの速度のとき、時間当たり、リットル当たり0.671 gの生産性が表れることを確認することができた。菌体の場合にも炭酸マグネシウムが含まれた培地ではそうでないものに比べて2倍ないし4倍近く増加することを確認できた(表1参照)。

【０１１８】

【表１】

$MgCO_3$の供給有無による連続培養の生産性比較

Bioreactor	回分培養	連続培養									
		$MgCO_3$ 無添加							$MgCO_3$ 添加		
Dilution rate	.	0.011	0.0116	0.013	0.014	0.015	0.017	0.019	0.281	0.0337	0.0449
Steady X	7.85	4.396	7.810	3.813	5.641	4.486	6.721	5.303	19.078	19.885	21.632
Steady S	0	6.464	5.280	4.990	1.079	7.245	27.634	33.987	0.284	0.000	0.000
Steady P	29.47	25.447	27.681	20.677	23.727	23.595	22.948	17.378	14.650	14.632	14.924
qs	0.119	0.096	0.059	0.136	0.109	0.126	0.044	0.039	0.659	0.076	0.093
qp	0.078	0.064	0.041	0.070	0.059	0.079	0.058	0.062	0.022	0.026	0.031
γX	0.164	0.048	0.091	0.050	0.079	0.067	0.114	0.101	0.536	0.719	0.972
γS	0.938	0.424	0.461	0.520	0.615	0.566	0.295	0.209	1.257	1.614	2.022
DP	0.61	0.280	0.321	0.269	0.332	0.354	0.390	0.330	0.412	0.523	0.671
Yx/s	0.174	0.114	0.197	0.095	0.128	0.119	0.387	0.482	0.427	0.442	0.481
$Y_{P/X}$	3.754	5.789	3.544	5.422	4.206	5.259	3.414	3.277	0.328	0.325	0.332

Dilution rate: 希釈率(D=F/V;hU)
Recycled continuous: 菌体再循環連続式培養
Steady X: 正常状態での発酵槽内の菌体量(g/L)
Steady S: 正常状態での発酵槽内のブドウ糖残量(g/L)
Steady P: 正常状態での発酵槽内のコハク酸生産量(g/L)
q_S:細胞比ブドウ糖の消耗速度(gブドウ糖/g細胞/時間)
q_P:細胞比コハク酸の生産速度(gコハク酸/g細胞/時間)
γ_X:菌体成長速度(g菌体量/リットル/時間)
γ_S:ブドウ糖の消耗速度(gブドウ糖/リットル/時間)
DP:コハク酸生産速度(gコハク酸/リットル/時間)
$Y_{X/S}$:ブドウ糖に対する菌体の収率(g菌体/gブドウ糖)
$Y_{P/S}$:ブドウ糖に対するコハク酸の収率(gコハク酸/gブドウ糖)
$Y_{P/X}$:菌体量に対するコハク酸の収率(gコハク酸/g菌体)

【０１１９】

<実験例３>

炭酸水素ナトリウム($NaHCO_3$)の添加有無による連続培養

本発明者らは、前記実施例で炭酸マグネシウムの添加による連続培養の効果がさらに増加することを確認した後、炭酸水素ナトリウムの添加による効果を確認するため、次のような実験を行った。

【０１２０】

炭酸水素ナトリウムは炭酸マグネシウムのように代表的な炭酸イオン供給物質であり、炭酸水素ナトリウムの溶解度が高い特性を用いて炭酸水素ナトリウムを30 g/Lの濃度水準で炭酸マグネシウムは以前のような5 g/Lの濃度水準で濃縮液を作って実験を行った。濃縮液はやはり3ml/hrの速度で添加し、以外の微生物培養条件や発酵槽操業条件は前記実施例１と同じである。

【０１２１】

分析結果、二種の成分をともに添加したとき、炭酸マグネシウムを添加したときより優れた効果を示すことを観察できた。図4に示した結果をみると、菌体の増加量は微々たるように観察されるが、図5に示したようにブドウ糖をすべて用いることができない連続培養に比べて炭酸イオン添加連続培養をブドウ糖を全量使用することを知ることができ、図6に示されたようにコハク酸も僅かに増加したように見えるが両実験の希釈速度は6～8倍差異がある。

【０１２２】

従って、炭酸イオン添加連続培養の希釈速度が6～8倍高い速度にも連続培養の結果より似ているか、やや高い傾向を見せることを知ることができる。

【０１２３】

また、表2をみると、炭酸マグネシウムと炭酸水素ナトリウムの添加連続培養はマグネシウム添加連続式培養よりも6倍以上高い希釈速度で、ブドウ糖をほぼ全量使用し、発酵槽内の菌体の減少は起きるが、コハク酸の生産性は3倍程度増加された最高1.390 g/L/hrの数値を示すことを知ることができる。このような数値は回分式培養について4倍以上増加された数値であり、生産性の4倍増加は、流加式添加連続培養でコハク酸を生産する場合、発酵槽の生産規模が4倍縮小されても同じ生産量を持つことを意味する。従って、コハク酸の産業化においてさらに競争力があるものと見込まれる。

【０１２４】

【表２】

$NaHCO_3$の供給有無による連続培養でコハク酸生産性比較

Bioreactor	回分培養	**連続培養**						
		$MgCO_3$ 添加				**MgCO3 及び $NaHCO_3$ 添加**		
Dilution rate	.	0.012	0.014	0.016	0.018	0.066	0.073	0.083
Steady X	7.85	6.034	5.952	6.680	6.924	4.388	3.023	0.935
Steady S	0	2.879	0.226	1.045	0.000	0.000	0.000	0.000
Steady P	29.47	40.365	36.078	28.204	26.056	25.519	19.038	14.886
q_s	0.119	0.062	0.086	0.090	0.104	0.651	1.050	3.876
q_p	0.078	0.078	0.084	0.068	0.069	0.384	0.460	1.322
Y_X	0.164	0.070	0.083	0.108	0.128	0.290	0.221	0.078
Y_S	0.938	0.377	0.510	0.598	0.718	2.858	3.173	3.623
DP	0.61	0.469	0.501	0.456	0.481	1.684	1.390	1.236
$Y_{x/s}$	0.174	0.186	0.162	0.181	0.178	0.101	0.070	0.021
$Y_{P/X}$	3.754	6.689	6.062	4.222	3.763	5.815	6.298	15.927
Yp/s	0.655	1.244	0.984	0.762	0.670	0.589	0.438	0.341

【０１２５】

<実験例４>

菌体再循環工程の有無による連続培養工程の生産性(productivity)比較

本発明者らは、前記実施例に係る菌体再循環連続培養工程がコハク酸生産性に及ぼす影響を確認するため、菌体再循環システムのない連続培養と菌体再循環システムを付加した

連続培養をそれぞれ行った後、菌体量、ブドウ糖使用量、コハク酸の生産性を比較した。

【０１２６】

1.2 Lの発酵槽の体積に培地の流入速度はそれぞれ33.7ml/hr、40.44 ml/hr、53.88 ml/hrの速度で次第に増加させ、再循環速度はそれぞれ殺菌培地流入速度の1/2の速度で行われた。

【０１２７】

１．菌体量の比較

菌体再循環システムの有無による連続培養工程で菌体量を分析した結果、図8と表1に示されたようにポンプを流した後、30時間目までは連続培養と菌体再循環工程ともに似た菌体量を示すが、以後明確に差異が出て再循環工程の菌体量がさらに増加することを知ることができる。

【０１２８】

連続培養の場合、菌体量が希釈速度0.0281/hrの速度で19.078 g/L、希釈速度0.0337/hrで19.885 g/L、希釈速度0.0449/hrから21.632に大きな増加はなかった。

【０１２９】

菌体再循環の工程は、希釈速度0.0281/hrから39.325g/L、0.0337/hrから43.328 g/L、0.0449/hrから53.806に増加する様相を呈した。

【０１３０】

従って、実験結果、全体的に菌体再循環工程が連続培養工程より菌体量が約2倍程度増加したことを知ることができ、グラフ最終排出ラインに出た菌体量を確認してみると、約65%以上の菌体が再び発酵槽に回収されたことを知ることができる。

【０１３１】

２．ブドウ糖使用量の比較

菌体再循環システムの有無による連続培養工程でブドウ糖の使用程度を分析した結果、連続培養と再循環工程ともにブドウ糖を全部使用していることを確認することができた。これを通じて両工程ともに希釈速度をさらに増加させることができることを確認でき、菌体再循環工程はさらに大幅に増加させることができることを確認することができた(図9参照)。

【０１３２】

３．コハク酸生産量の比較

菌体再循環システムの有無による連続培養工程でコハク酸生産量を分析した結果、コハク酸の生産量は連続培養工程では定常状態で0.281/hrの希釈速度を持つとき、12ないし18 g/Lの間で生産量が多く分布していることを観察することができ、平均的には約14.65 g/Lを生産したものを観察できた。希釈速度を0.0337/hr及び0.0449/hrに増加させたときにもコハク酸の生産量の大きな変化はなく、平均的に約14.7 g/Lの生産量を示した(図10、表1)。

【０１３３】

菌体再循環工程を付加した連続培養の場合、希釈速度0.0281/hrのとき60.173 g/L、希釈速度0.0337/hrのとき60.580 g/L、0.0449/hrでは57.459であるものと表れ、菌体量が希釈速度が増加することによって増加したが、コハク酸の生産量は小幅に増加してはやや減少したもので、格別な大きな差異がないことをみたとき、希釈速度をさらに高めるか、培地の濃度水準をさらに高める必要があることを知ることができる。

【０１３４】

４．収率 (yield rate)の比較

菌体再循環工程の有無による連続培養工程の効率性を確認するため収率を計算し、それぞれの収率を分析した結果を表1とともに図4及び図5に示した。

【０１３５】

図11及び図12はそれぞれ前述の菌体量、ブドウ糖の残量、コハク酸生産量の情報を用いてブドウ糖に対する菌体の収率、ブドウ糖に対するコハク酸の収率を表したグラフである。

【０１３６】
この分析は先立って図示したグラフのサンプルごとにそれぞれ計算して示し、菌体再循環発酵工程が連続培養よりブドウ糖に対する菌体の収率も全体的に約2倍程度高いことを確認した(図11参照)。
【０１３７】
ブドウ糖に対するコハク酸の収量のグラフでもやはり菌体再循環発酵工程が4ないし5倍程度高いことを確認することができ、ブドウ糖に対するコハク酸の収率では希釈速度が増加するとき、収率はほぼ同じことを確認した(図12)。
【０１３８】
全体的な培養変数に関する結果は表3に示し、分析の結果、ブドウ糖に対する菌体の収率($Y_{x/s}$;g菌体/gのブドウ糖)は菌体再循環工程で希釈率が最も高い0.0449/hrの際、1.196と最も高く、菌体再循環工程のある場合、約3倍程度高い収率を示すことを知ることができた。
【０１３９】
また、ブドウ糖に対するコハク酸の収率($Y_{p/s}$;gコハク酸/gのブドウ糖)は菌体再循環工程間には有意味な差がないが、菌体再循環工程のない連続培養に比べると3倍以上高かった。
【０１４０】
また、菌体量に対するコハク酸の収率($Y_{p/x}$;gコハク酸/g菌体)は菌体再循環工程で希釈率が最も低い0.0281/hrで1.950と最も高く、菌体再循環工程のある場合、約2倍以上高い収率を示すことを知ることができた。
【０１４１】

【表３】

回分培養、連続培養及び菌体再循環工程の培養変数

Bioreactor	Batch culture	Continuous			Recycled continuous		
Dilution rate	.	0.281	0.0337	0.0449	0.0281 (0.0141)	0.0337 (0.0169)	0.0449 (0.0225)
Steady X	15.411	19.078	19.885	21.632	39.325	44.328	53.806
Steady S	0.000	0.284	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Steady P	32.343	14.650	14.632	14.924	60.173	60.025	57.459
qs	0.034	0.659	0.076	0.093	0.048	0.051	0.056
qp	0.024	0.022	0.026	0.031	0.064	0.073	0.072
γX	0.321	0.536	0.719	0.972	1.301	1.861	3.185
γS	0.517	1.257	1.614	2.022	1.531	1.531	1.531
DP	0.372	0.412	0.523	0.671	2.536	3.221	3.873
$Y_{X/S}$	0.342	0.427	0.442	0.481	0.874	0.985	1.196
$Y_{P/S}$	0.719	0.328	0.325	0.332	1.104	1.101	1.054
$Y_{P/X}$	2.099	0.772	0.740	0.695	1.950	1.739	1.230

この際、表の略字は以下の通りである。
Batch culture: 回分式培養
Continuous culture: 連続式培養
Recycled continuous: 菌体再循環連続式培養
Steady X: 正常状態での発酵槽内の菌体量(g/L)
Steady S: 正常状態での発酵槽内のブドウ糖残量(g/L)
Steady P: 正常状態での発酵槽内のコハク酸生産量(g/L)
q_S: 細胞比ブドウ糖の消耗速度(gブドウ糖/g細胞/時間)
q_P: 細胞比コハク酸の生産速度(gコハク酸/g細胞/時間)
γ_X: 菌体成長速度(g菌体量/リットル/時間)
γ_S: ブドウ糖消耗速度(gブドウ糖/リットル/時間)
D_P: コハク酸生産速度(gコハク酸/リットル/時間)
$Y_{X/S}$: ブドウ糖に対する菌体の収率(g菌体/gブドウ糖)
$Y_{P/S}$: ブドウ糖に対するコハク酸の収率(gコハク酸/gブドウ糖)
$Y_{P/X}$: 菌体量に対するコハク酸の収率(gコハク酸/g菌体)

【０１４２】

従って、収率を計算した結果、全体的に菌体再循環工程のある連続培養が菌体再循環工程のある連続培養より非常に高い収率を示すことにより供給した培地を効率的に使用しながらも定量的にもコハク酸を大量生産することを知ることができた。

【０１４３】

これまで本発明に対して望ましい実施例を中心として察してみた。本発明が属する技術分野で通常の知識を持つ者は、本発明が、本発明の本質的な特性から外れない範囲で変形された形態として具現されることを理解することができるだろう。従って、開示された実施例は限定的な観点ではなく、説明的な観点で考慮されなければならない。本発明の範囲

は、前述の説明ではなく、特許請求の範囲に示されており、それと同等の範囲内にあるすべての差異点は本発明に含まれたものと解釈されるべきである。

【符号の説明】

【０１４４】

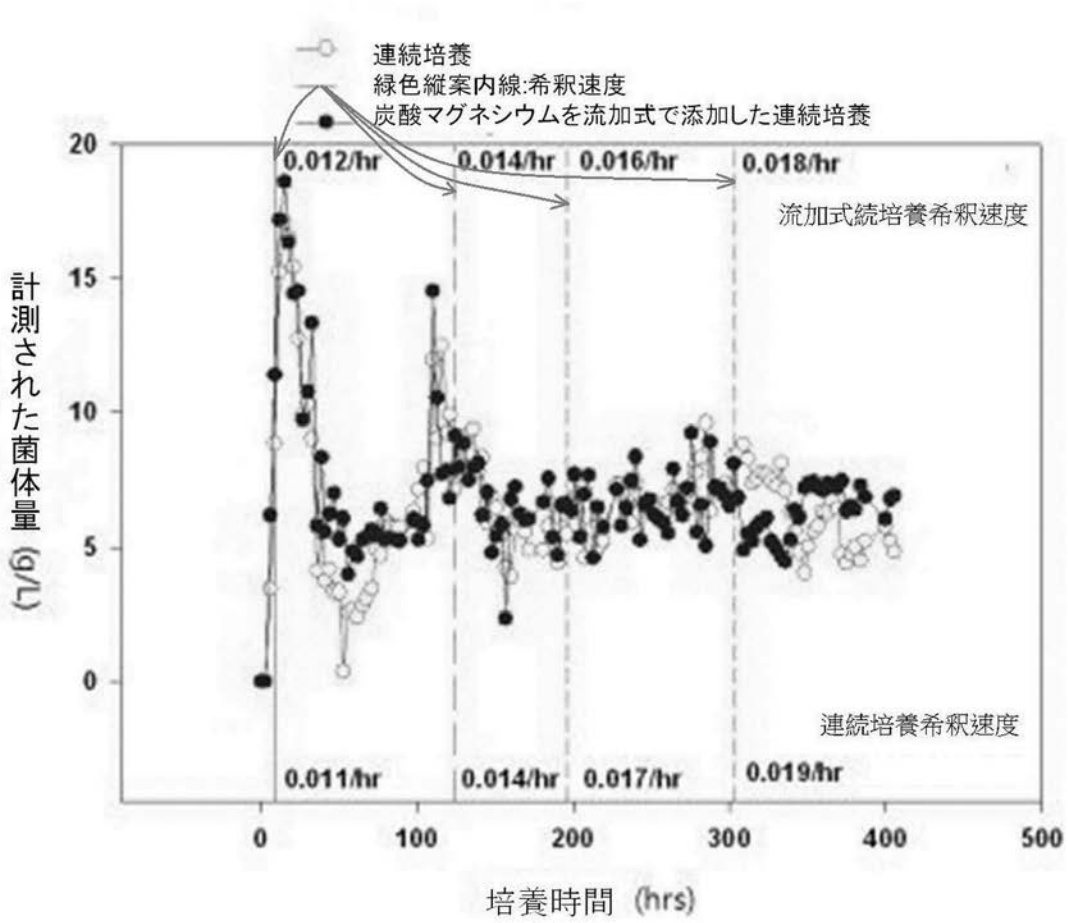
１０　菌体再使用システム
２０　発酵槽
３０　細胞分離器
４０　ドリップチューブ
５０　分離手段
６０　回収ライン

【受託番号】

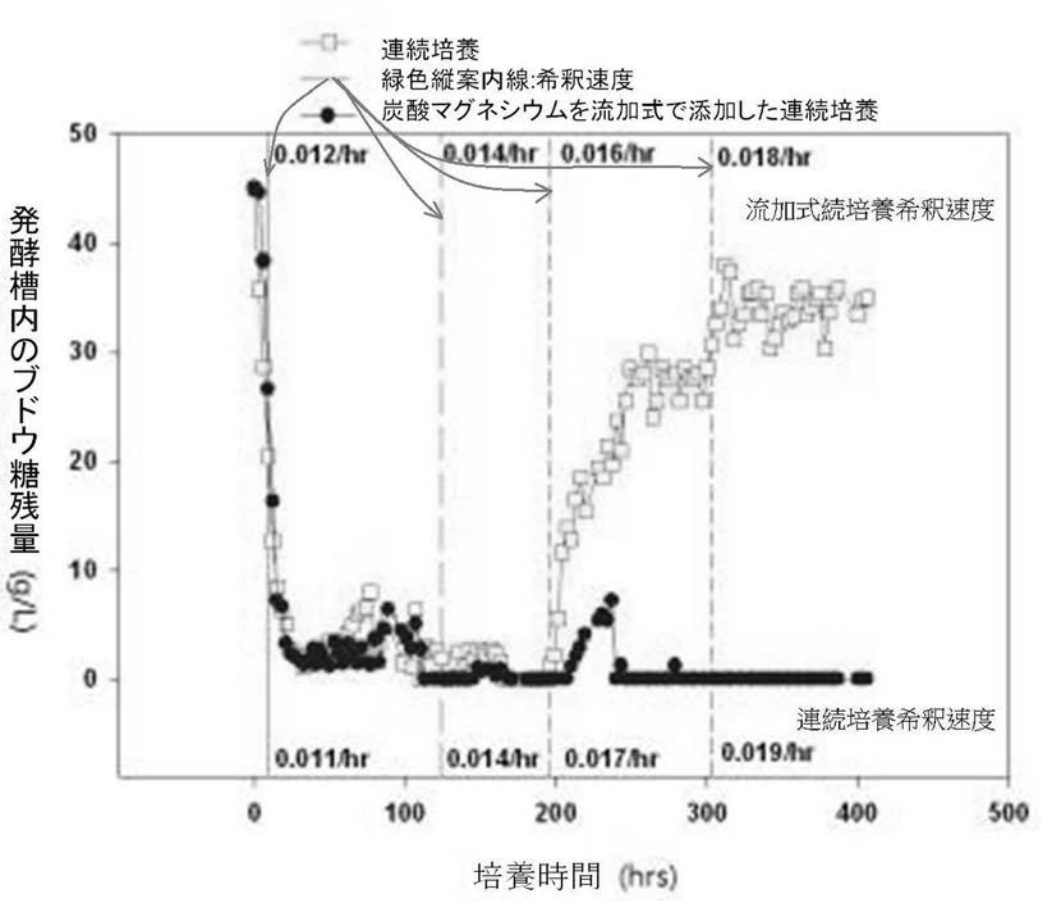
【０１４５】

ＫＣＴＣ　１２２３３ＢＰ

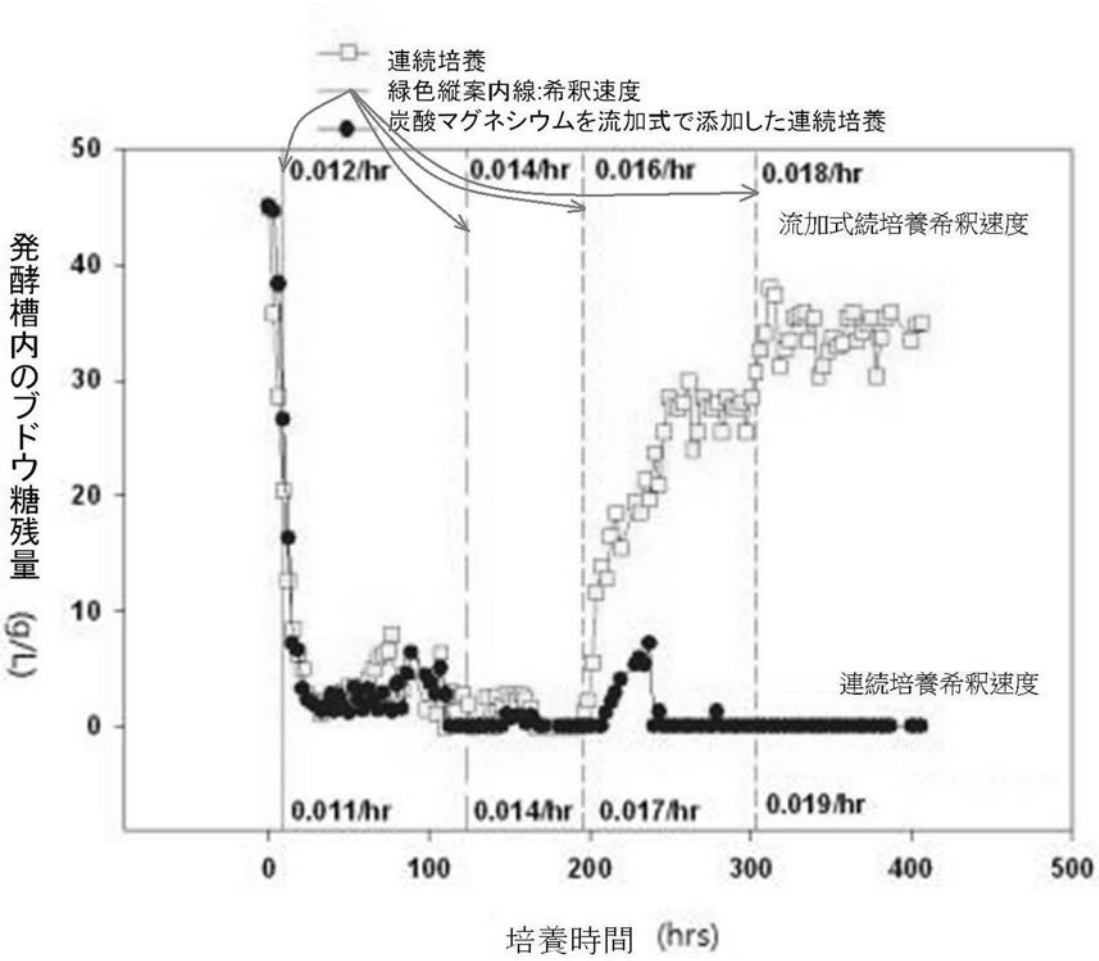
【図１】


連続培養
緑色縦案内線:希釈速度
炭酸マグネシウムを流加式で添加した連続培養
0.012/hr
0.014/hr
0.016/hr
0.018/hr
流加式続培養希釈速度
連続培養希釈速度
0.011/hr
0.014/hr
0.017/hr
0.019/hr
計測された菌体量 (g/L)
培養時間 (hrs)
0
5
10
15
20
0
100
200
300
400
500

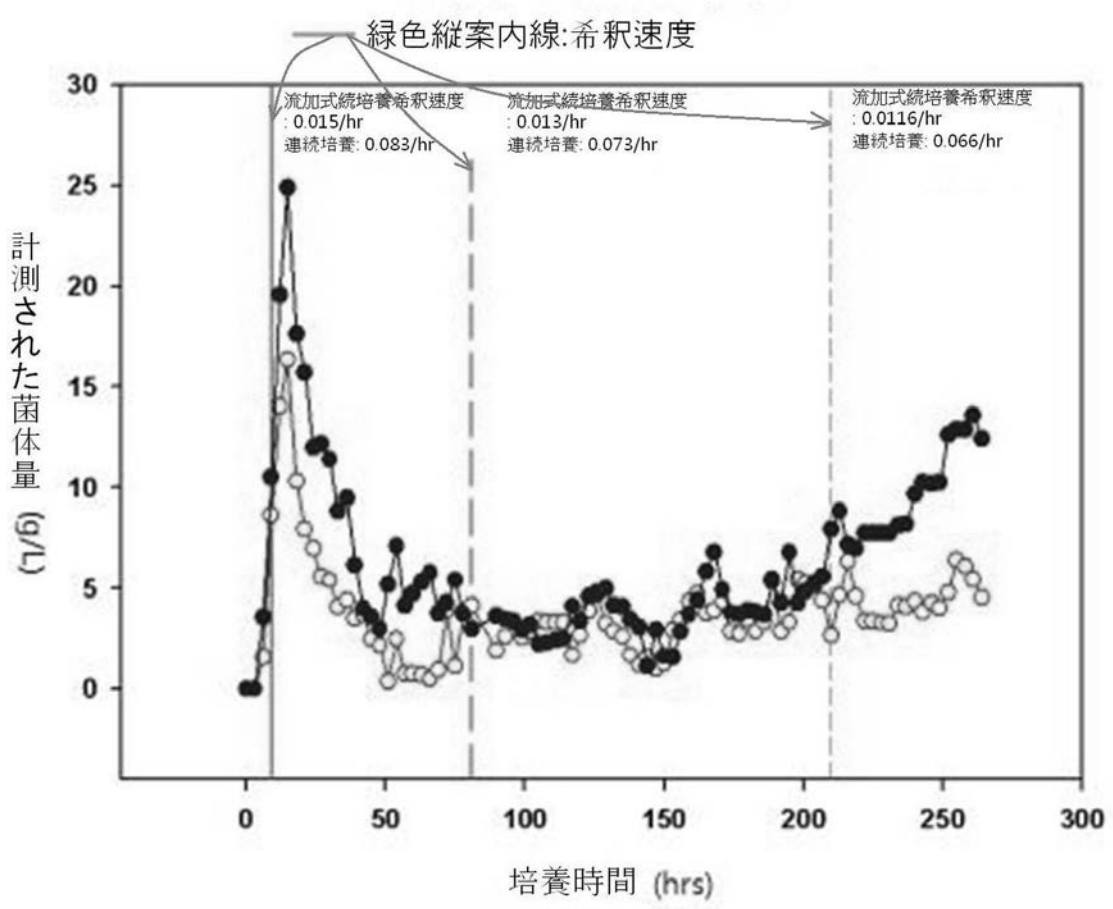
【図２】


連続培養
緑色縦案内線:希釈速度
炭酸マグネシウムを流加式で添加した連続培養
0.012/hr
0.014/hr
0.016/hr
0.018/hr
流加式続培養希釈速度
連続培養希釈速度
0.011/hr
0.014/hr
0.017/hr
0.019/hr
発酵槽内のブドウ糖残量 (g/L)
培養時間 (hrs)
0
10
20
30
40
50
0
100
200
300
400
500

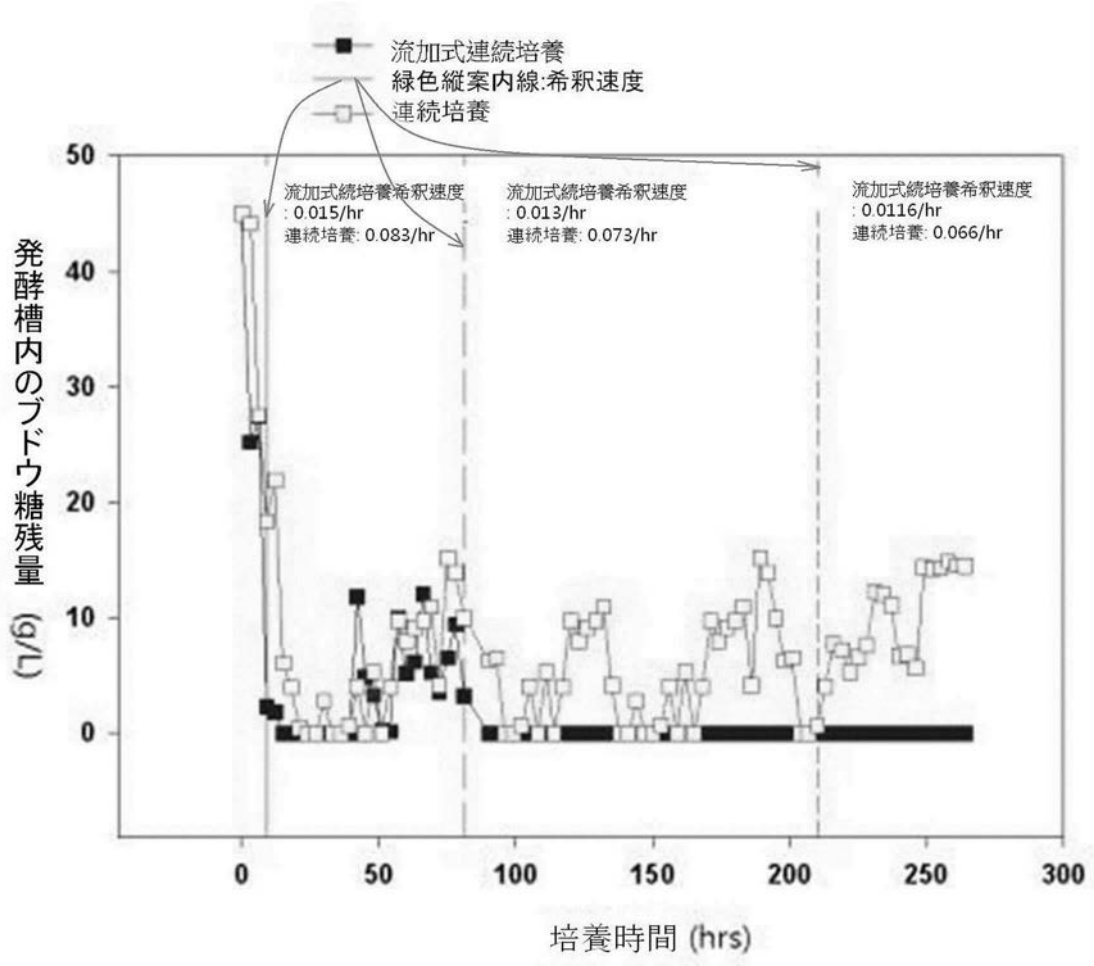
【図３】


連続培養
緑色縦案内線:希釈速度
炭酸マグネシウムを流加式で添加した連続培養
0.012/hr
0.014/hr
0.016/hr
0.018/hr
流加式続培養希釈速度
連続培養希釈速度
0.011/hr
0.014/hr
0.017/hr
0.019/hr
発酵槽内のブドウ糖残量 (g/L)
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
培養時間 (hrs)

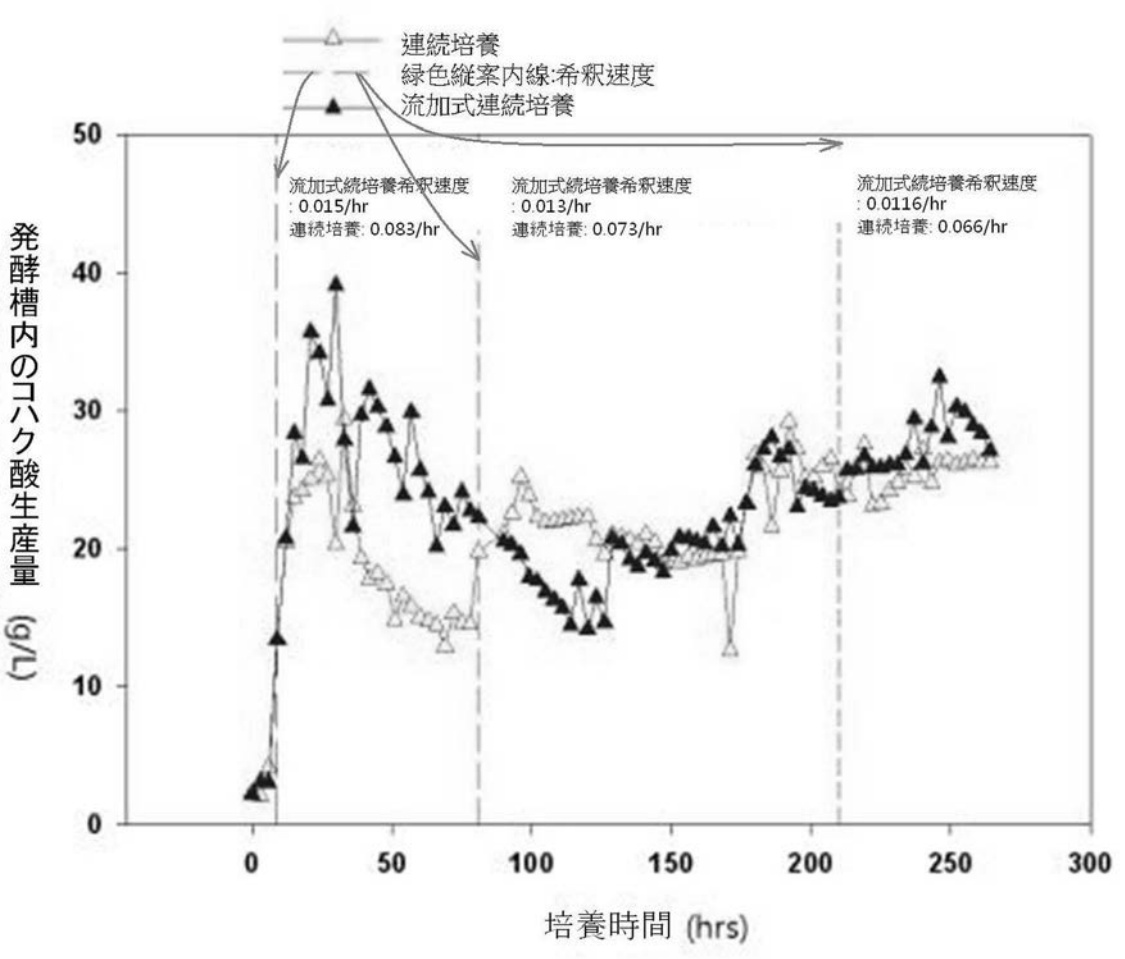
【図４】


緑色縦案内線:希釈速度
流加式続培養希釈速度
: 0.015/hr
連続培養: 0.083/hr
流加式続培養希釈速度
: 0.013/hr
連続培養: 0.073/hr
流加式続培養希釈速度
: 0.0116/hr
連続培養: 0.066/hr
計測された菌体量 (g/L)
培養時間 (hrs)
0
5
10
15
20
25
30
0
50
100
150
200
250
300

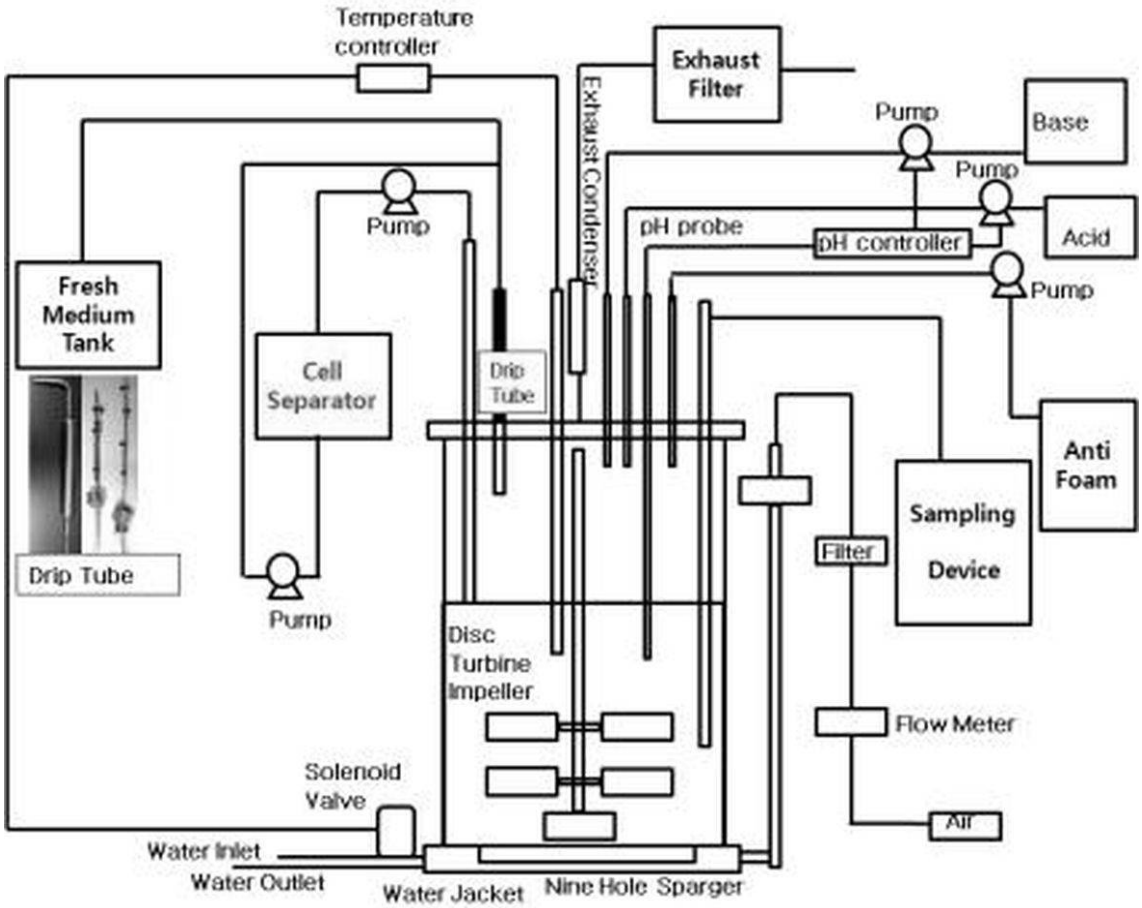
【図５】


流加式連続培養
緑色縦案内線:希釈速度
連続培養
流加式続培養希釈速度
: 0.015/hr
連続培養: 0.083/hr
流加式続培養希釈速度
: 0.013/hr
連続培養: 0.073/hr
流加式続培養希釈速度
: 0.0116/hr
連続培養: 0.066/hr
発酵槽内のブドウ糖残量 (g/L)
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
250
300
培養時間 (hrs)

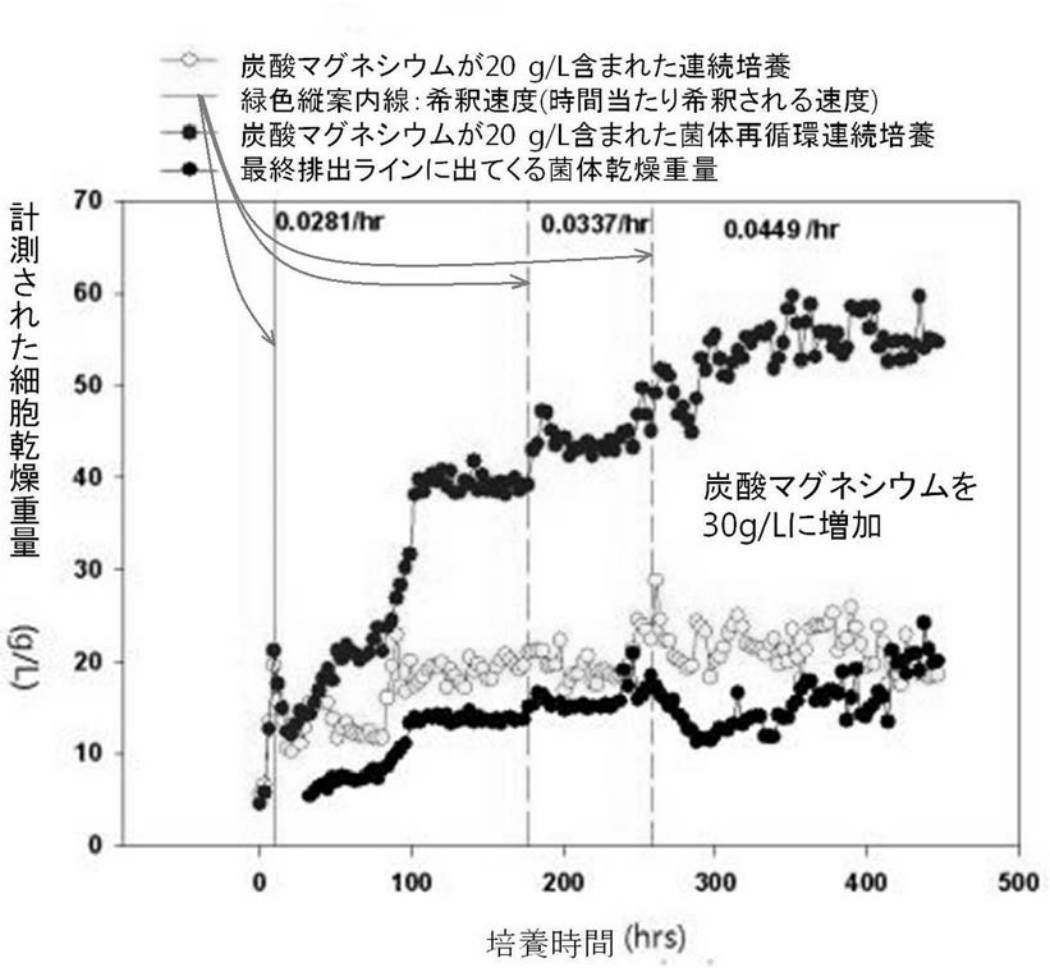
【図６】


連続培養
緑色縦案内線:希釈速度
流加式連続培養
流加式続培養希釈速度
: 0.015/hr
連続培養: 0.083/hr
流加式続培養希釈速度
: 0.013/hr
連続培養: 0.073/hr
流加式続培養希釈速度
: 0.0116/hr
連続培養: 0.066/hr
発酵槽内のコハク酸生産量 (g/L)
0
10
20
30
40
50
0
50
100
150
200
250
300
培養時間 (hrs)

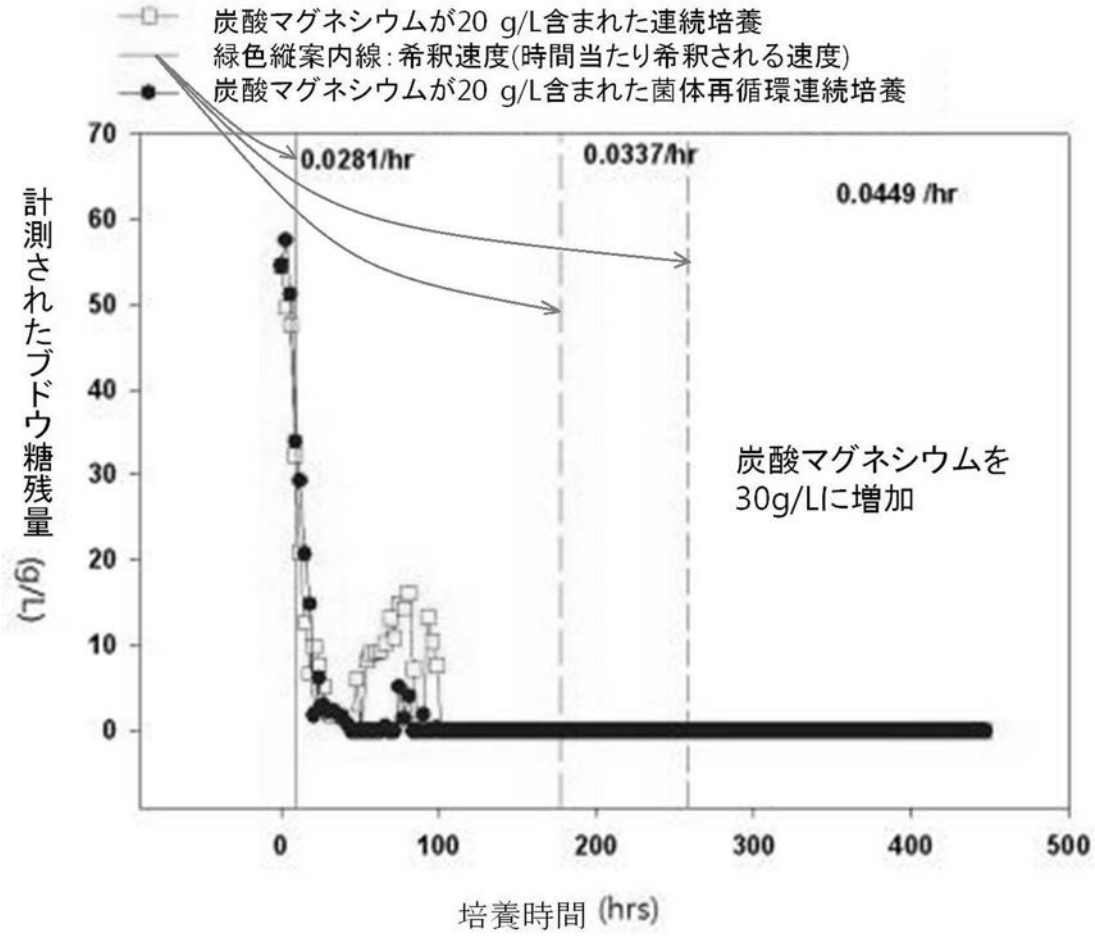
【図７】


Temperature controller
Exhaust Filter
Exhaust Condenser
Pump
Base
Pump
Pump
pH probe
pH controller
Acid
Pump
Fresh Medium Tank
Cell Separator
Drip Tube
Anti Foam
Drip Tube
Sampling Device
Filter
Pump
Disc Turbine Impeller
Flow Meter
Solenoid Valve
Air
Water Inlet
Water Outlet
Water Jacket
Nine Hole Sparger

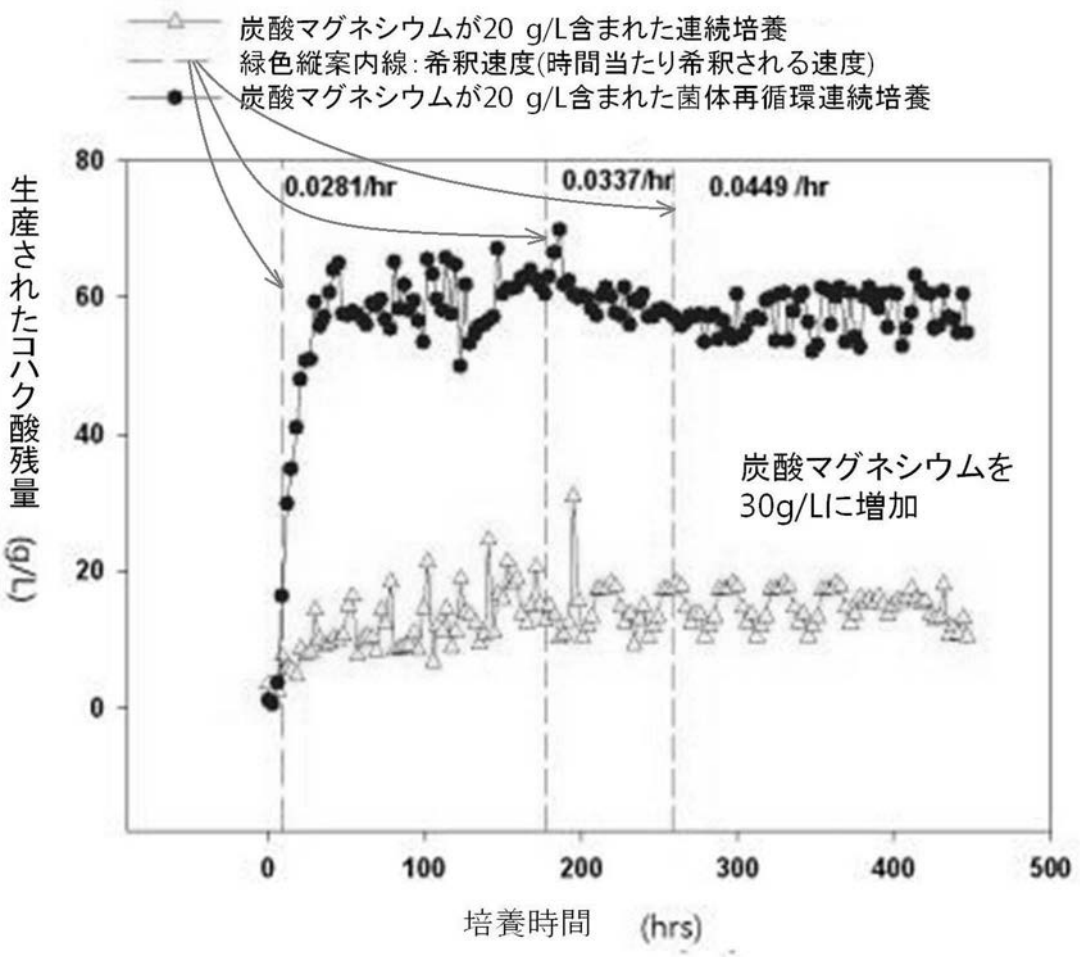
【図８】


炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた連続培養
緑色縦案内線：希釈速度(時間当たり希釈される速度)
炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた菌体再循環連続培養
最終排出ラインに出てくる菌体乾燥重量
0.0281/hr
0.0337/hr
0.0449 /hr
炭酸マグネシウムを
30g/Lに増加
計測された細胞乾燥重量 (g/L)
培養時間 (hrs)
0
10
20
30
40
50
60
70
0
100
200
300
400
500

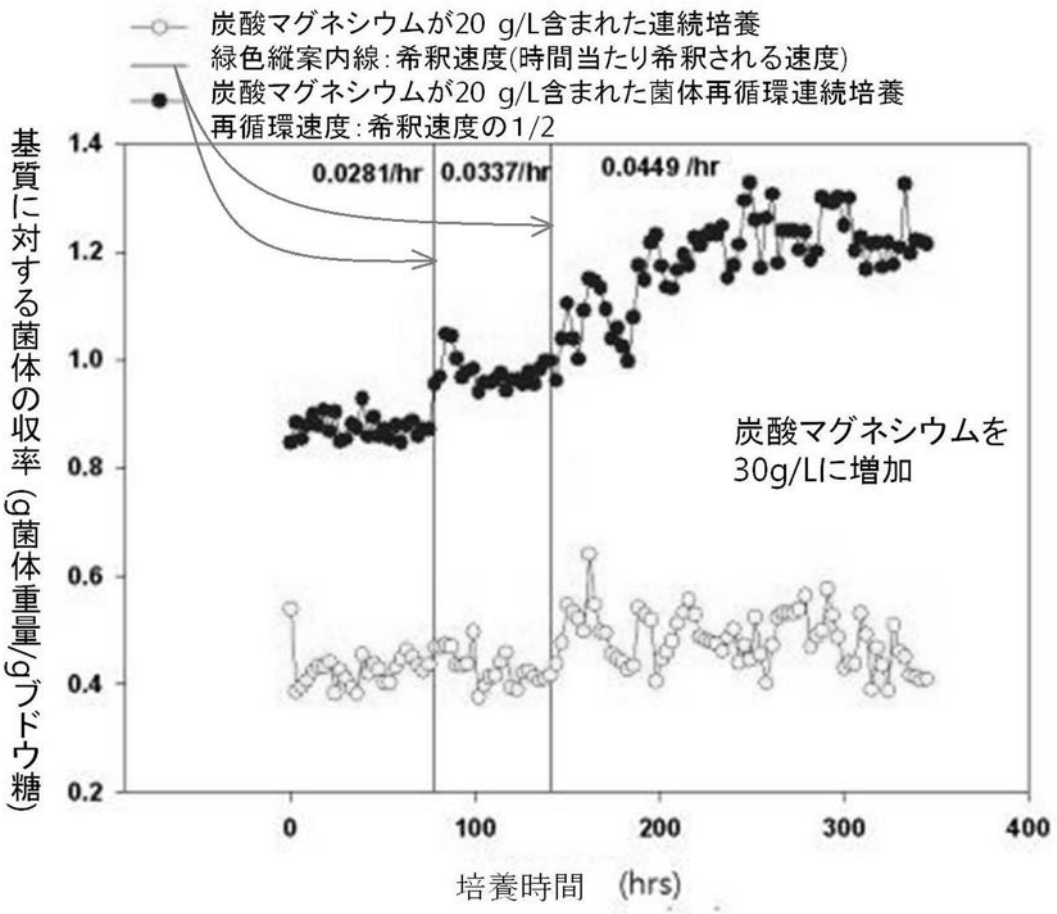
【図９】


炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた連続培養
緑色縦案内線：希釈速度(時間当たり希釈される速度)
炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた菌体再循環連続培養
0.0281/hr
0.0337/hr
0.0449 /hr
炭酸マグネシウムを
30g/Lに増加
計測されたブドウ糖残量 (g/L)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
培養時間 (hrs)

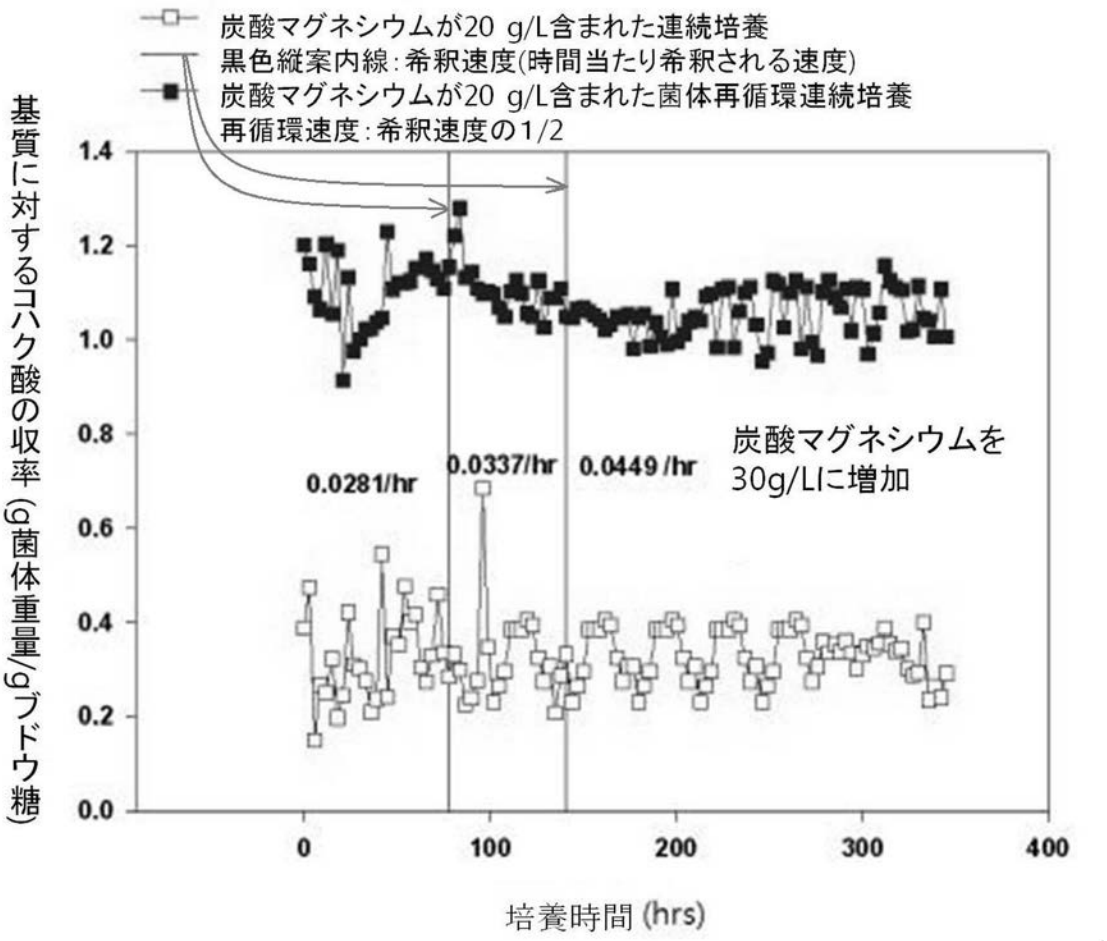
【図１０】


炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた連続培養
緑色縦案内線：希釈速度(時間当たり希釈される速度)
炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた菌体再循環連続培養
0.0281/hr
0.0337/hr
0.0449 /hr
炭酸マグネシウムを
30g/Lに増加
生産されたコハク酸残量 (g/L)
培養時間 (hrs)
0
20
40
60
80
0
100
200
300
400
500

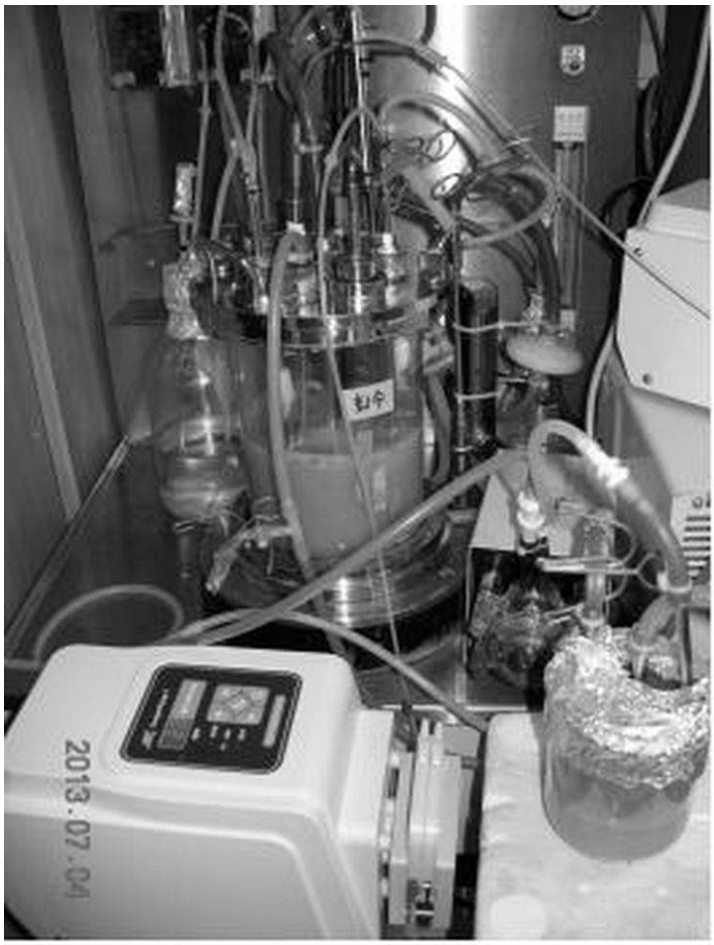
【図１１】


炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた連続培養
緑色縦案内線：希釈速度(時間当たり希釈される速度)
炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた菌体再循環連続培養
再循環速度：希釈速度の1/2
0.0281/hr
0.0337/hr
0.0449 /hr
炭酸マグネシウムを
30g/Lに増加
基質に対する菌体の収率（g菌体重量/gブドウ糖）
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
100
200
300
400
培養時間 (hrs)

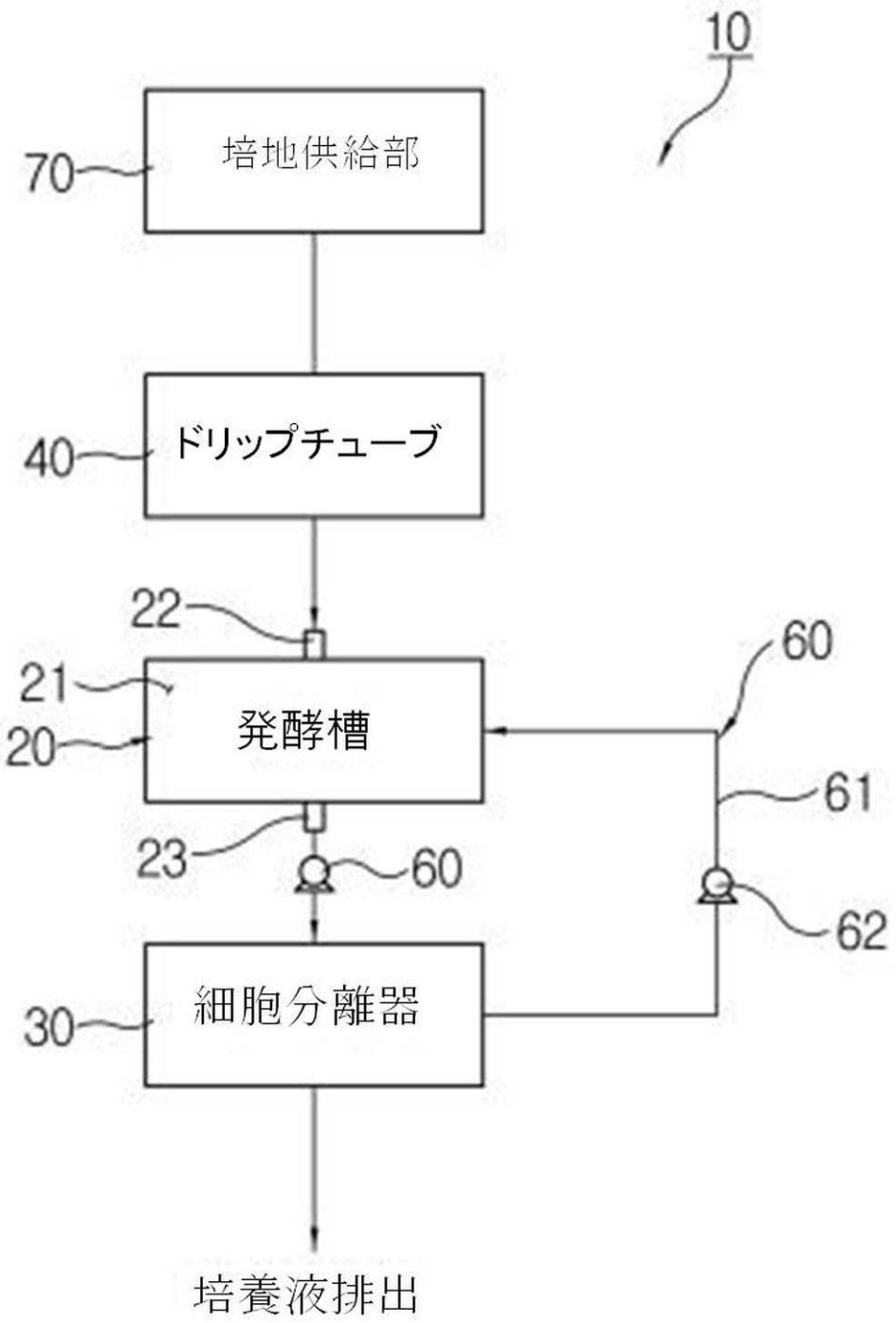
【図１２】


炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた連続培養
黒色縦案内線：希釈速度(時間当たり希釈される速度)
炭酸マグネシウムが20 g/L含まれた菌体再循環連続培養
再循環速度：希釈速度の1/2
基質に対するコハク酸の収率 (g菌体重量/gブドウ糖)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0281/hr
0.0337/hr
0.0449 /hr
炭酸マグネシウムを
30g/Lに増加
0
100
200
300
400
培養時間 (hrs)

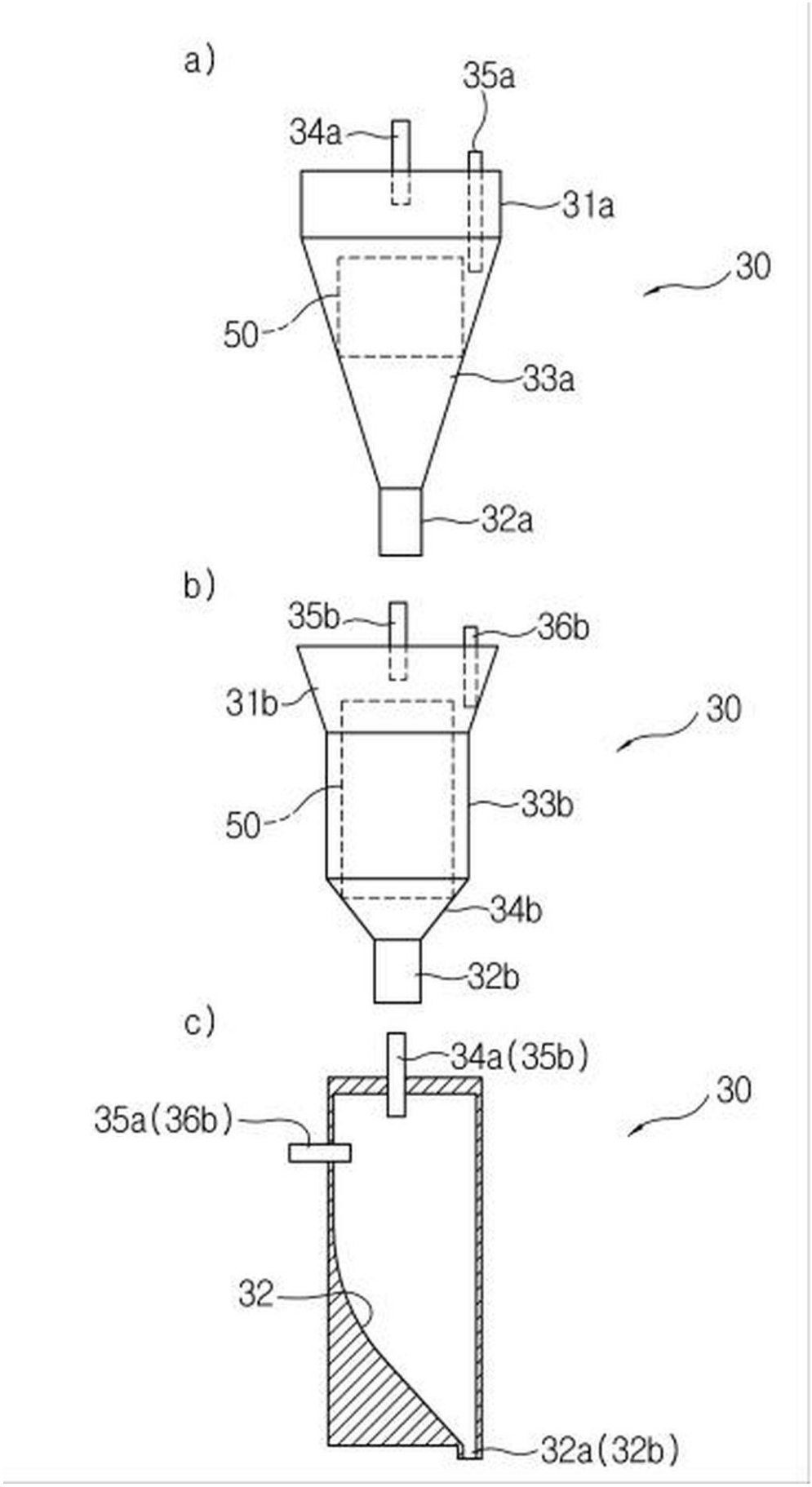
【図１３】



【図１４】


10
70
培地供給部
40
ドリップチューブ
22
21
20
発酵槽
60
61
23
60
62
30
細胞分離器
培養液排出

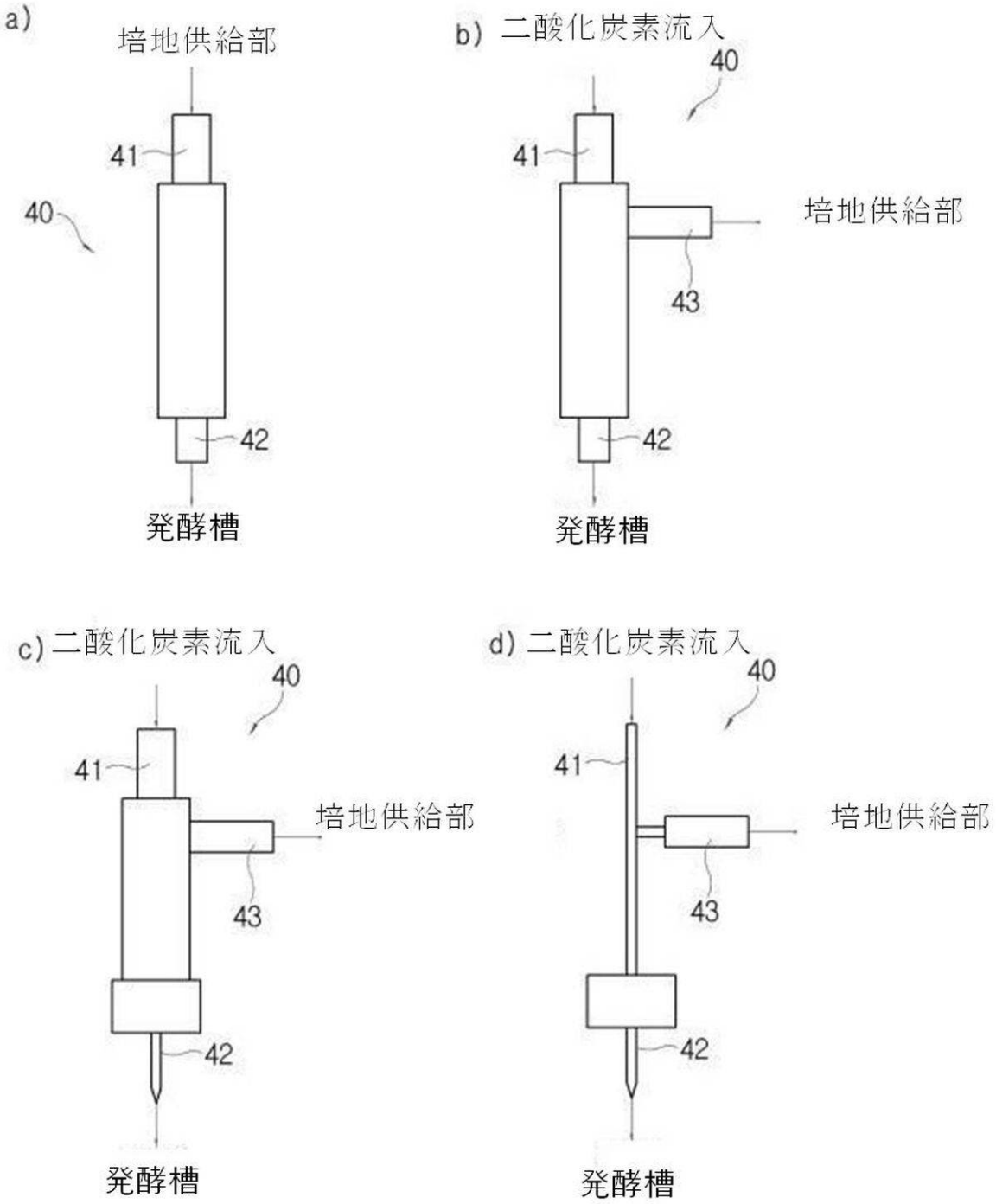
【図１５】


a)
35a
34a
31a
30
50
33a
32a
b)
35b
36b
31b
30
50
33b
34b
32b
c)
34a(35b)
30
35a(36b)
32
32a(32b)

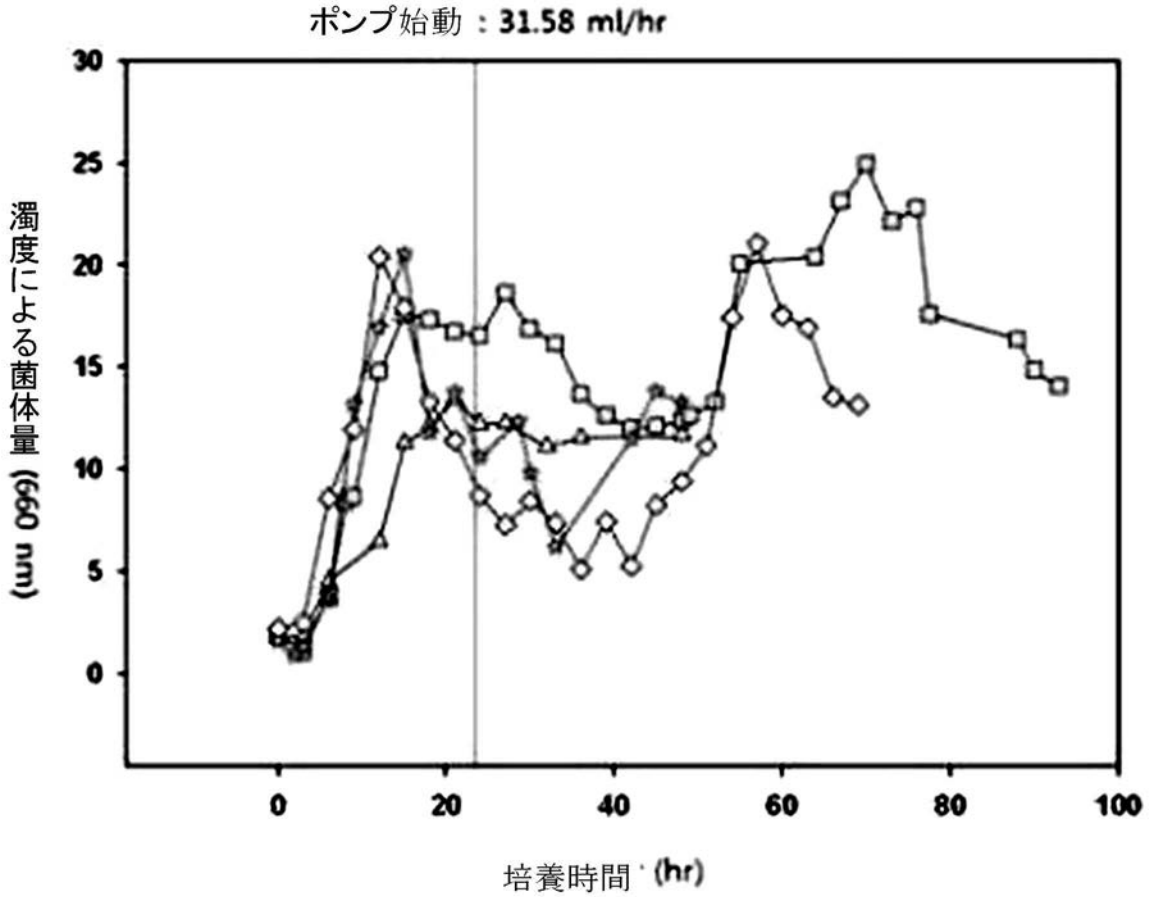
【図１６】



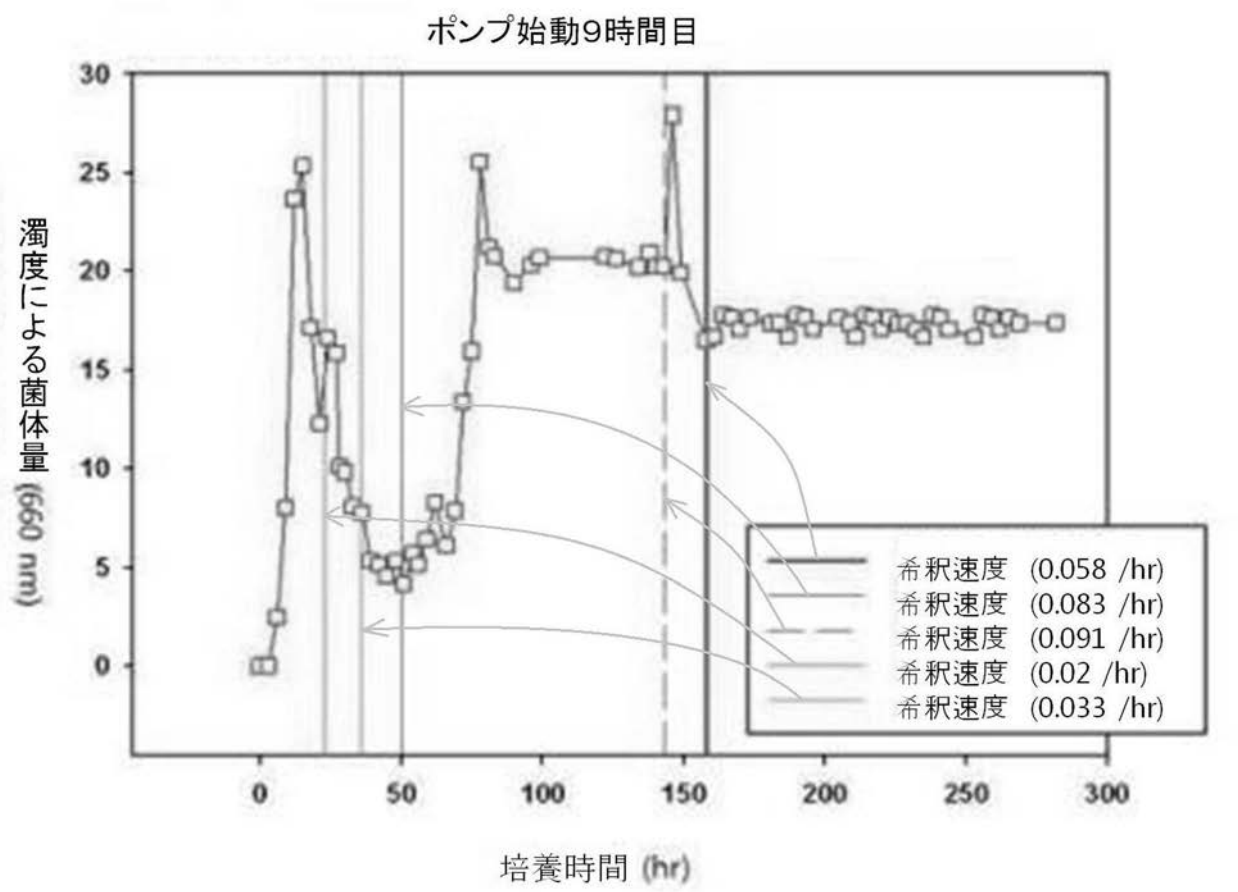
【図１７】


a)
培地供給部
41
40
42
発酵槽
b) 二酸化炭素流入
40
41
培地供給部
43
42
発酵槽
c) 二酸化炭素流入
40
41
培地供給部
43
42
発酵槽
d) 二酸化炭素流入
40
41
培地供給部
43
42
発酵槽

【図１８】


ポンプ始動：31.58 ml/hr
濁度による菌体量 (660 nm)
30
25
20
15
10
5
0
0
20
40
60
80
100
培養時間 (hr)

【図１９】


ポンプ始動9時間目
濁度による菌体量 (660 nm)
30
25
20
15
10
5
0
0
50
100
150
200
250
300
培養時間 (hr)
希釈速度 (0.058 /hr)
希釈速度 (0.083 /hr)
希釈速度 (0.091 /hr)
希釈速度 (0.02 /hr)
希釈速度 (0.033 /hr)

フロントページの続き

特許法第３０条第２項適用申請有り　▲１▼刊行物名：２０１３年年次集会及び展示会の予稿集　８４頁　発行者名：ソサエティー　フォー　インダストリアル　マイクロバイオロジー　アンド　バイオテクノロジー　発行日：２０１３年８月１１日　▲２▼集会名：ソサエティー　フォー　インダストリアル　マイクロバイオロジー　アンド　バイオテクノロジー　２０１３年年次集会及び展示会　開催場所：シェラトン　サンディエゴ（アメリカ合衆国　９２１０１　カリフォルニア州　サンディエゴ　ハーバーアイランドドライブ　１３８０）　開催日：２０１３年８月１１日－１５日

(72)発明者　チュン　ギテク
大韓民国江原道春川市ゴンジ路３６１　エー－６０６
(72)発明者　パク　サンミン
大韓民国江原道江陵市玉渓面玉渓路９１９　チャ－１０６
(72)発明者　リ　ドホン
大韓民国ソウル特別市端草区端草中央路２００　１６－１５０３
(72)発明者　キム　サンギョン
大韓民国忠清南道天安市西北区シチョン路７３　２０８－８０４
(72)発明者　ウム　キュリ
大韓民国京畿道加平郡北面華岳ジアム路　２２３－１４１

Ｆターム(参考) 4B029 AA02 BB02 CC01 DA01
4B064 AD36 CA02 CD01 CD09 CD21 DA01 DA10 DA16
4B065 AA01X AC14 BB03 BB15 BB26 BB29 BC01 CA11 CA41 CA44