



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201217519 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：100132832

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 13 日

(51)Int. Cl. : **C12M1/36 (2006.01)**

(30)優先權：2010/09/14 日本

2010-205239

(71)申請人：東麗股份有限公司 (日本) TORAY INDUSTRIES, INC. (JP)

日本

(72)發明人：小林敦 KOBAYASHI, ATSUSHI (JP)；千智勳 CHEON, JIHOON (KR)；武內紀浩  
TAKEUCHI, NORIHIRO (JP)；西田誠 NISHIDA, MAKOTO (JP)；田中祐之  
TANAKA, YUJI (JP)；峯岸進一 MINEGISHI, SHIN-ICHI (JP)

(74)代理人：何金塗；丁國隆

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：5 項 圖式數：6 共 37 頁

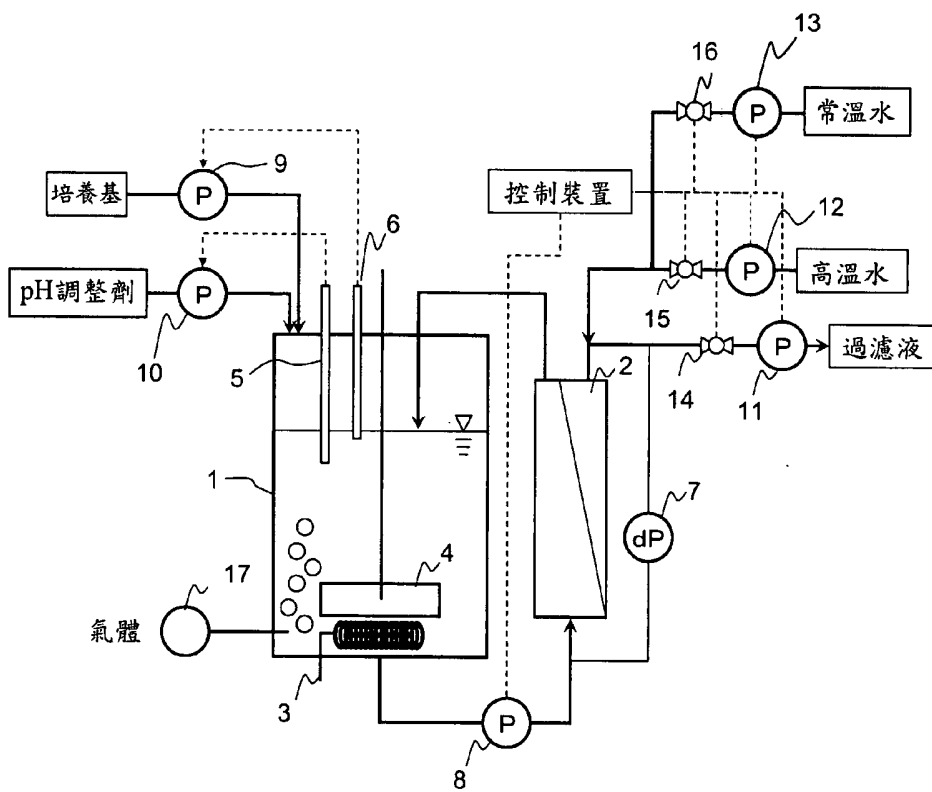
(54)名稱

經由連續發酵之化學品的製造方法

METHOD FOR PRODUCING A CHEMICAL BY A CONTINUOUS FERMENTATION METHOD

(57)摘要

藉由一種經由連續發酵之化學品之製造方法，於使用分離膜回收經由發酵之產品之際，可同時對於微生物混合液之高濃度培養保持過濾性並控制微生物濃度；該經由連續發酵之化學品之製造方法係：以分離膜將含有發酵原料、化學品與微生物或培養細胞之培養液予以過濾、自濾液回收化學品、進一步使未過濾液保持或回流於培養液、並將發酵原料追加於培養液之連續發酵，且自膜單元之透過液側供給洗淨用液體以進行膜洗淨；其特徵為：該洗淨用液體係高於培養液溫度、且 150℃ 以下之高溫水，並藉由供給該洗淨用液體以控制發酵槽內之微生物濃度。



- 1：發酵培養槽
- 2：分離膜模組
- 3：溫度控制裝置
- 4：攪拌裝置
- 5：pH 感測器・控制裝置
- 6：液位感測器・控制裝置
- 7：壓差感測器・控制裝置
- 8：循環泵
- 9：培養基供給泵
- 10：pH 調整劑供給泵
- 11：過濾泵
- 12：高溫水反洗泵
- 13：常溫水反洗泵
- 14：過濾閥
- 15：高溫水反洗閥
- 16：常溫水反洗閥
- 17：氣體供給裝置



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201217519 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：100132832

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 13 日

(51)Int. Cl. : **C12M1/36 (2006.01)**

(30)優先權：2010/09/14 日本

2010-205239

(71)申請人：東麗股份有限公司 (日本) TORAY INDUSTRIES, INC. (JP)  
日本

(72)發明人：小林敦 KOBAYASHI, ATSUSHI (JP)；千智勳 CHEON, JIHOON (KR)；武內紀浩  
TAKEUCHI, NORIHIRO (JP)；西田誠 NISHIDA, MAKOTO (JP)；田中祐之  
TANAKA, YUJI (JP)；峯岸進一 MINEGISHI, SHIN-ICHI (JP)

(74)代理人：何金塗；丁國隆

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：5 項 圖式數：6 共 37 頁

(54)名稱

經由連續發酵之化學品的製造方法

METHOD FOR PRODUCING A CHEMICAL BY A CONTINUOUS FERMENTATION METHOD

(57)摘要

藉由一種經由連續發酵之化學品之製造方法，於使用分離膜回收經由發酵之產品之際，可同時對於微生物混合液之高濃度培養保持過濾性並控制微生物濃度；該經由連續發酵之化學品之製造方法係：以分離膜將含有發酵原料、化學品與微生物或培養細胞之培養液予以過濾、自濾液回收化學品、進一步使未過濾液保持或回流於培養液、並將發酵原料追加於培養液之連續發酵，且自膜單元之透過液側供給洗淨用液體以進行膜洗淨；其特徵為：該洗淨用液體係高於培養液溫度、且 150℃ 以下之高溫水，並藉由供給該洗淨用液體以控制發酵槽內之微生物濃度。

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種使用分離膜之經由連續發酵之化學品的製造方法。

### 【先前技術】

近年來，包含應用於發酵領域，分離膜已利用於飲料水製造、淨水處理、廢水處理等之水處理領域、醫藥品生產領域、食品工業領域等各方面。於飲料水製造、淨水處理、廢水處理等之水處理領域，分離膜作為替代以往之砂濾、凝集沈澱過程，係用於去除水中之雜質。進一步於廢水處理及食品工業領域，由於將高濃度之廢水或原料大量投入於處理槽，並在保持高濃度之微生物之同時進行處理，可得到高去除率或高純度之處理液，故分離膜技術被廣泛使用。

於使用如此分離膜之水處理領域、食品工業領域等，就降低成本之觀點而言，對於透水性能之提升有所要求，因此正嘗試藉由透水性能優異之分離膜以減少膜面積、並將裝置予以微型化等，從而減少設備費、膜交換費、及設置面積。以如此成本之觀點而言，單位設置面積之過濾面積大之中空纖維膜正受到注目。

又，近年來正熱烈進行著伴隨微生物或培養細胞之培養之連續製造方法之提案。此技術係藉由以分離膜將微生物或培養細胞予以過濾，並在自濾液回收產物之同時，使經分離之微生物或培養細胞保持或回流於培養液

，從而得以維持培養液中之高微生物或細胞濃度。例如：於專利文獻1中提案有：使用分離膜進行連續發酵，並藉由提升且維持培養液中之高微生物或細胞濃度而得到較高之物質生產性。

如此針對微生物培養及菌體分離之分離膜技術雖已熱烈施行中，但將如培養液等之生物系被處理液予以膜分離時具有以下問題：即，由於被處理液中所含之菌體、糖、蛋白質、及脂質等，將使得膜之污染顯著、膜之透過通量(flux)於初期即有所降低。

另一方面，於針對微生物培養及菌體分離之分離膜技術，控制微生物增殖已成為問題。於膜分離雖可藉由膜過濾維持高微生物或細胞濃度、並藉由大量微生物以高生產速度得到產物，但若為提升連續發酵之優點而增長發酵時間，則具有以下問題：即，微生物持續增殖，使得前述微生物之濃度過高、膜分離之壓差因而有所上升。為控制微生物濃度，雖亦可考慮於運轉中抽取一部分微生物，但具有以下問題：即，抽取後之微生物之處理、或於抽取中或抽取後、於發酵培養槽內引起其他微生物之污染之可能性將因而變高。

以往，一般膜分離處理，係藉由定期或非定期地將過濾面予以洗淨，以去除附著於過濾面之SS(Suspended Solid; 懸浮固體)或吸附物等而保持過濾能力。例如：於專利文獻2中，係使透過水定期地自透過側逆透過而將膜予以洗淨，藉以維持過濾性能。又，於專利文獻3中已有以下提案：即，藉由自過濾體下方供給氣體(air)，於洗

淨過濾面之同時進行過濾。進一步，於專利文獻4中，則提案一種將過濾體施予化學洗淨之方法，其係於即使以藉由專利文獻2或專利文獻3所揭示之方法，亦無法將膜面洗淨之情形下使用。惟，此等方法均係針對膜面之洗淨的處理方法，並未能控制微生物濃度。其中，又以藥品洗淨具有對於發酵產物產生不良影響、因膜之劣化而導致膜壽命縮短、進一步則有使用後所產生之藥品洗淨廢液之處理等問題。

另一方面，亦可考慮如專利文獻5之技術，其係於使用透過水進行反壓洗淨之際，使用高溫水作為反壓洗淨用水以提高洗淨效果；如專利文獻6之分離膜洗淨運轉技術，其係使用濃縮步驟、膜分離步驟、及溫水洗淨步驟，而於專利文獻7中，則係一種藉由熱水及水解酵素之分離膜之洗淨方法。惟，即使為此等方法，亦具有以下問題：即，難以控制微生物之增殖，且水解酵素價高將直接導致成本提高等。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻1]國際公開WO2007/097260號小冊

[專利文獻2]日本特開平8-141375號公報

[專利文獻3]日本特開2001-38177號公報

[專利文獻4]日本特開2002-126470號公報

[專利文獻5]日本特開2008-289959號公報

[專利文獻6]日本專利第3577992號公報

[專利文獻7]日本特開2006-314883號公報

## 【發明內容】

### [發明所欲解決之課題]

由於對於如上所述，存在於以往之技術中的問題：即，複雜之洗淨步驟、洗淨中所產生之廢液之處理、針對微生物之高濃度培養之過濾性之保持、或對於微生物濃度之過度增加並無控制方法等尚未有所檢討，因此對於用以保持前述過濾性之膜過濾運轉方法或微生物濃度之控制方法之開發有所要求。

本發明之課題係提供一種反壓洗淨方法，其係於使用分離膜並藉由發酵製造、回收產品之際，得以同時對於微生物混合液之高濃度培養保持過濾性並控制微生物濃度。

### [解決課題之手段]

為解決前述課題、本發明係藉由下述(1)～(5)之構成而達成。

(1)一種經由連續發酵之化學品之製造方法，其係以分離膜將發酵原料、化學品與含有微生物或培養細胞之培養液予以過濾、自濾液回收化學品、進一步使未過濾液保持或回流於培養液、並將發酵原料追加於培養液之連續發酵，且自膜單元之透過液側供給洗淨用液體以進行膜洗淨之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該洗淨用液體係高於培養液溫度、且150℃以下之高溫水，並藉由供給該洗淨用液體而控制發酵槽內之微生物濃度。

(2)如(1)所記述之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該洗淨用液體係含有氧化劑。

(3)如(2)所記述之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該氧化劑係含有至少一種選自於由次氯酸鹽、二氧化氯、臭氧、及過氧化氫而成之群組。

(4)如(1)所記述之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該洗淨用液體係含有pH調整劑。

(5)如(1)所記述之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該洗淨用液體係含有該發酵原料。

**[發明之效果]**

藉由本發明，於連續發酵運轉下，除了可有效洗淨因膜過濾而產生之膜的髒污外，並可抑制發酵培養槽內之微生物濃度，從而得以穩定且低成本顯著提升發酵生產效率，又由於並未產生洗淨廢液及抽取培養液而得以降低處理費用，進一步可降低成本並得以廣泛於發酵工業以低成本穩定生產發酵產物，而前述連續發酵運轉係於使用分離膜過濾發酵培養液之同時，連續地將未過濾液保持於發酵培養槽，且同時將含有化學品之透過液取出。

**【實施方式】**

**[發明之實施形態]**

本發明係一種連續發酵裝置之運轉方法，其係使用膜模組進行過濾、且連續地將未過濾液保持於發酵培養槽之同時，將含有化學品之透過液取出之連續發酵運轉；其特徵為：自膜模組之透過液側供給高溫水進行膜洗淨、並因應發酵培養槽內之微生物濃度控制高溫水之供給條件。



用於本發明之膜模組之分離膜，有機膜、無機膜不拘，如聚偏二氟乙烯、聚砵、聚醚砵、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚丙烯、陶瓷製之膜，只要係具有耐藥品性之分離膜均可。

用於本發明之分離膜，較佳為具有平均細孔徑 $0.01\mu\text{m}$ 以上未滿 $1\mu\text{m}$ 之細孔之多孔質膜。又，分離膜之形狀亦可採用平膜、中空纖維膜等之任一形狀。

分離膜表面之平均孔徑，係使用掃描式電子顯微鏡以60000倍將膜表面予以照相攝影、測定任意20個細孔之直徑並將數值予以平均而求得。細孔非圓形時，可藉由影像處理裝置等，求出具有與細孔所具有之面積等面積的圓(等值圓)，並藉由以等值圓直徑作為細孔直徑的方法求得。

根據本發明之較佳形態，可使用前述之分離膜，並使跨膜壓差(transmembrane pressure)於 $0.1\sim 20\text{ kPa}$ 之範圍內進行過濾處理。

本發明中之膜模組，只要係以耐熱性優異之材質製作、且形狀為可將高溫水自模組之透過側注入於供給側者均可。

本發明中所使用之微生物或培養細胞之發酵原料，只要係可促進所發酵培養之微生物或培養細胞之生長、而得以良好生產目的發酵產物之化學品均可。作為發酵原料，使用上較佳者係適當含有例如：碳源、氮源、無機鹽類、及因應必要之胺基酸、以及維生素等之有機微量營養素之一般液體培養基等。只要係部分含有前述可

促進所發酵培養之微生物或培養細胞之生長，而得以良好生產目的發酵產物之化學品之液體，亦可直接使用例如廢水或下水、或添加發酵原料後使用。

作為前述之碳源係使用例如：葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、及乳糖等之糖類、含有此等糖類之澱粉、澱粉水解物、甘薯糖蜜、甜菜糖蜜、蔗汁(cane juice)、甜菜糖蜜或蔗汁之萃取物或濃縮液、甜菜糖蜜或蔗汁之過濾液、糖漿(高級糖蜜；Hi Test molasses)、自甜菜糖蜜或蔗汁經純化或結晶化之原料糖、自甜菜糖蜜或蔗汁經純化或結晶化之精製糖、進一步為醋酸或富馬酸等之有機酸、乙醇等之醇類、及甘油等。其中糖類係指：多元醇之最初氧化生成物、且具有一個醛基或酮基、並將具有醛之糖分類為醛糖、將具有酮之糖分類為酮糖之碳水化合物。

又，作為前述之氮源係使用例如：銨鹽類、尿素、硝酸鹽類、其他所使用之輔助性有機氮源、例如：油粕類、大豆水解液、酪蛋白分解物、其他胺基酸、維生素類、玉米浸液(corn steep liquor)、酵母菌或酵母菌萃取物、肉萃取物、蛋白腴等之胜肽類、各種發酵菌體及其水解物等。

又，作為前述之無機鹽類可適當使用例如：磷酸鹽、鎂鹽、鈣鹽、鐵鹽、及錳鹽等。

於本發明中，雖只要因應微生物之發酵培養、微生物種與產物之生產性，將pH與溫度予以適當設定即可，但一般多將pH設定為4~8、溫度設定為15~65℃之範圍

。發酵培養液之pH，係藉由無機酸或有機酸、鹼性物質、進一步為尿素、氫氧化鈣、碳酸鈣或氨等、調節為於前述範圍內之預定值。

於培養中，若有必要提高氧之供給速度，除了提高通氣量之外、亦可使用以下方法：即，於空氣中添加氧以提高氧濃度之方法、或將發酵培養液予以加壓之方法、提高攪拌速度之方法等。反之，若有必要降低氧之供給速度，除了降低通氣量之外，亦可將碳酸氣體、氮、及氫等不含氧之氣體混合於空氣後供給。

於本發明中，抽取含有微生物或培養細胞之發酵培養液之際，為使微生物或培養細胞之濃度不致於減少、發酵產物之生產性不致於降低，較佳者係根據發酵培養液之OD 600或混合液懸浮固體(Mixed Liquor Suspended Solid; MLSS)將抽取量予以適當調整。

使具有發酵生產能力之新鮮菌體持續增殖所進行之連續培養操作，培養管理上，一般而言，較佳者係於單一發酵反應槽進行。惟，若為連續發酵培養法，其係使菌體持續增殖以生成產物，則發酵反應槽之數量不拘。由於發酵反應槽之容量小等之理由，亦可使用複數個發酵反應槽。此時，以管路將複數個發酵反應槽並列或直列連接後進行連續培養，亦可獲得發酵產物之高生產性。

作為本發明中所使用之微生物或培養細胞，係使用真核細胞或原核細胞，可列舉例如：於發酵工業經常使用之酵母菌或絲狀菌等之真菌類、大腸菌、乳酸菌、棒

狀桿菌(*Corynebacterium*)、放射線菌等之細菌類、動物細胞及昆蟲細胞等。所使用之微生物或細胞、亦可為分離自自然環境者，又亦可為部分性質已經由突變或基因重組改變者。

藉由本發明之製造方法所得到之化學品，為前述之微生物或培養細胞於發酵培養液中所生產之物質。作為化學品，可列舉例如：醇、有機酸、胺基酸、及核酸等於發酵工業大量生產之物質。又本發明亦可適用於如酵素、抗生素、及重組蛋白之物質的生產。可列舉例如：乙醇、1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、及甘油等作為醇。又，可列舉：醋酸、乳酸、丙酮酸、琥珀酸、蘋果酸、依康酸、及檸檬酸等作為有機酸、若為核酸則可列舉肉甘(inosine)，鳥苷、及胞苷(cytidine)等。

又，藉由本發明之製造方法所得到之化學品，較佳者為：含有化成品、乳製品、醫藥品、食品或釀造品中之至少1種之液體物。其中，作為化成品，可列舉例如：有機酸、胺基酸、及核酸，可藉由膜分離過濾後之步驟，適用於製造化學製品之物質；作為乳製品，可列舉例如：低脂牛乳等，可藉由膜分離過濾後之步驟，適用於作為乳製品之物質；作為醫藥品，可列舉例如：酵素、抗生素、重組蛋白，可藉由膜分離過濾後之步驟，適用於製造醫藥品之物質；作為食品，可列舉例如：乳酸飲料等，可藉由膜分離過濾後之步驟，適用於作為食品之物質；作為釀造品，例如：啤酒、蒸餾酒等，可藉由膜分離過濾後之步驟，適用於作為含酒精飲料之物質等。

於本發明中，藉由膜模組中之分離膜過濾處理微生物或培養細胞之發酵培養液之際的跨膜壓差，只要係於微生物或培養細胞及培養基成分不易阻塞網孔之條件下均可，但使跨膜壓差於0.1 kPa以上20 kPa以下之範圍進行過濾處理係屬重要。跨膜壓差，較佳為0.1 kPa以上10 kPa以下之範圍、進一步較佳為0.1 kPa以上5 kPa之範圍。不符前述跨膜壓差之範圍時，可能快速發生微生物及培養基成分阻塞網孔、導致透過水量降低、而使連續發酵運轉產生不適。

作為過濾之驅動力，可利用液位差(水力高差(hydraulic head))或藉由交叉流(cross flow)循環泵而使分離膜產生跨膜壓差。又，作為過濾之驅動力，亦可於分離膜透過水側設置吸入泵。又，使用交叉流循環泵時，可藉由吸力控制跨膜壓差。進一步，亦可藉由導入發酵培養液側壓力之氣體或液體的壓力控制跨膜壓差。進行此等壓力控制時，可以發酵培養液側之壓力與分離膜透過水側之壓力差作為跨膜壓差，並用於控制跨膜壓差。

於本發明中，雖係使用高溫水，其係除了具有膜之洗淨效果之外，亦可降低微生物濃度，但前述高溫水係設定為高於培養液溫度、且150℃以下之溫度。較佳者為：培養液溫度之5℃以上、且未滿100℃之溫度、進一步較佳者為：培養溫度之10℃以上且未滿100℃之溫度。若較培養液溫度低溫時，難於連續發酵控制微生物濃度；若超過150℃時，為維持高溫水之液體狀態必須施加非常

高之壓力，故實施上有其困難。藉由高溫水之反壓洗淨，雖亦可根據前述條件使用高溫的水，但因微生物之特性，微生物亦可能大量快速死亡，故事前測定因溫度所導致之微生物死亡速度較佳。

其中，反壓洗淨係指藉由將液體自分離膜之透過側送至分離膜之供給側，以去除膜面污垢(fouling)物質之方法。

作為反壓洗淨液所使用之高溫水，只要係未受微生物污染、且未含引發膜髒污之物質的高溫水並無特別限制。

高溫水，雖亦可使用恆溫器供給，但亦可於水供給管路設置加熱裝置供給。所供給之高溫水的溫度，設置溫度計檢查較佳，其溫度控制於設定溫度之 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內較佳。

高溫水之供給速度，雖以膜之透過通量1~3倍較佳，但考量微生物濃度、膜洗淨效果等，亦可設定為更佳適當之供給速度。

又，本發明之高溫水中，於不損及發明效果之範圍內，亦可含有洗淨劑，即：次氯酸鈉、二氧化氯、臭氧、及過氧化氫等之氧化劑、或氫氧化鈉、氫氧化鈣或鹽酸、硫酸等之pH調整劑。又為防止培養液中之發酵原料之濃度降低，亦可使用含有發酵原料之高溫水。

本發明係藉由維持反壓洗淨液之溫度的同時，將液體自膜模組之透過側送往膜模組之供給側以進行膜洗淨，且同時進行微生物濃度之控制。前述高溫之反壓洗淨

液為水時，由於高溫水之故，膜附著物容易自分離膜剝離；另一方面，微生物因與高溫水接觸而停止增殖。

前述高溫水被認為可使膜附著物容易自分離膜剝離，即：膜附著物為源自於碳水化合物之物質時，將因高溫水而成為易於溶解之狀態，從而得以自附著於膜之狀態轉而溶解於高溫水。另一方面，前述膜附著物質為源自於蛋白質之物質時，將因高溫水使蛋白質產生變性，改變附著於膜之特性，從而成為容易自膜剝離之狀態。

將前述高溫水改為含有前述洗淨劑之高溫水時，因膜附著物質之來源成分不同，可能促進膜剝離。例如：於前述洗淨劑中，次氯酸鈉係一強氧化劑，藉由經由高溫之氧化劑進行反壓洗淨，可促進源自於碳水化合物之膜附著物質的氧化作用，而得到較高溫水更高之膜洗淨效果。另一方面，前述洗淨劑中，氫氧化鈉及氫氧化鈣為強鹼劑，藉由經由高溫之鹼進行反洗，可促進源自於蛋白質之膜附著物質之變性作用，而得到較高溫水更高之膜洗淨效果。又，於高溫下使用此等強氧化劑或強鹼劑之際，雖可控制微生物增殖，但其濃度若超出一定之範圍，由於具有以下可能性：即，可能發生因添加高溫水而導致微生物去活性及微生物死亡速度之快速增加等，故使用得以進行膜洗淨及控制微生物濃度之濃度範圍之洗淨劑係屬重要。

其中，於本發明中，不損及發明效果之範圍之洗淨劑係指例如：若為次氯酸鈉時，使用有效氯濃度為1～5000 ppm之洗淨液較佳；例如：氫氧化鈉及氫氧化鈣則

使用 pH 10~13 之洗淨液較佳。超出此範圍之濃度下，分離膜可能損傷、對於微生物可能有不良影響；未滿此濃度下，則膜洗淨效果有降低之虞。

作為反壓洗淨液所使用之高溫水之反壓洗淨週期，可根據跨膜壓差及跨膜壓差之變化而決定。反壓洗淨週期為 0.1~12 次/小時之範圍、較佳者為 3~6 次/小時。反壓洗淨週期若超過此範圍，可能發生因添加高溫水而導致微生物去活性及微生物死亡速度之急速增加等，又若低於此範圍，則可能無法得到充分之洗淨效果及微生物控制效果。

作為反壓洗淨液所使用之高溫水之反壓洗淨時間，可根據反壓洗淨週期、跨膜壓差及跨膜壓差之變化而決定。反壓洗淨時間為 5~300 秒/次之範圍、較佳者為 30~180 秒/次。反壓洗淨時間若較此範圍長，可能發生因添加高溫水而導致微生物去活性及微生物死亡速度之急速增加等，又若較此範圍短，則可能無法得到充分之洗淨效果及微生物控制效果。

恆溫槽、高溫水反洗泵、自恆溫槽至模組之管路及閥，只要使用耐熱性優異者均可。高溫水之注入雖亦可為手動，較佳者為：設置過濾、反洗控制裝置、並藉由計時器自動控制過濾泵及過濾側閥、高溫水反洗泵及高溫水反洗閥而注入。

於本發明中，為控制微生物培養槽之微生物濃度，必須監測微生物濃度。微生物濃度之測定雖可採集樣品加以測定，但較佳者為：於微生物培養槽設置 MLSS 測定



器等之微生物濃度感測器，並連續性監測微生物濃度之變化狀況。

其次，使用圖式針對本發明中所用之連續發酵裝置加以說明。

第1圖係為例示說明用於本發明之高溫水供給方法之連續發酵裝置的概略側視圖。第1圖係分離膜模組設置於發酵培養槽外部之代表性連續發酵裝置的例子。於第1圖中，連續發酵裝置基本上係由發酵培養槽1與分離膜模組2與高溫水供給部所構成。其中，為數眾多之中空纖維膜插入於分離膜模組2。又，常溫水供給部係由常溫水反洗泵13與常溫水反洗閥16所構成；高溫水供給部係由高溫水反洗泵12與高溫水反洗閥15所構成；過濾部係由過濾泵11與過濾閥14所構成。關於前述分離膜模組及高溫水供給部將於下文詳述。又，分離膜模組2係經由循環泵8連接於發酵培養槽1。

於第1圖中，可藉由液位感測器・控制裝置6及培養基供給泵9將培養基投入於發酵培養槽1並控制培養槽內之液位，且因應必要，以攪拌裝置4將發酵培養槽1內之培養液予以攪拌；又，因應必要，可藉由氣體供給裝置17供給所需要之氣體。此時，可將所供給之氣體予以回收再利用並再次以氣體供給裝置17供給。又因應必要，可藉由經由pH感測器・控制裝置5及pH調整劑供給泵10調節發酵培養液之pH，以進行高生產性之發酵生產。

進一步，裝置內之發酵培養液係藉由循環泵8循環於發酵培養槽1與分離膜模組2之間。含有發酵產物之發酵

培養液可藉由分離膜模組2將微生物與發酵產物予以過濾、分離、並自裝置系統取出。又，經分離之微生物，可藉由滯留於裝置系統內而維持裝置系統內之高微生物濃度，從而可使發酵生產之生產性高。其中，藉由分離膜模組2之過濾、分離之實施，雖可藉由循環泵8所造成之壓力，而不需使用特別之動力，但因應必要可設置過濾泵11，並藉由壓差感測器・控制裝置7適當調整過濾液量。因應必要，可藉由溫度控制裝置3將發酵培養槽1之溫度維持為固定、維持高微生物濃度。

於本發明之高溫水之供給方法中所使用之高溫水供給部，係由高溫水反洗泵12與高溫水反洗閥15所構成。高溫水係可於監測微生物濃度下投入。

本發明之運轉方法中所使用之控制程序係根據第2圖所示之程序實施。

首先，開始培養液之膜過濾，並監測微生物濃度之變化或跨膜壓差之變化。若因膜過濾而於膜產生髒污、跨膜壓差上升，且確認微生物濃度，該濃度高於設定之微生物濃度時，則使用高溫水進行反壓洗淨。

跨膜壓差上升時，確認微生物濃度，該濃度低於設定之微生物濃度時，則使用培養溫度以下之常溫水進行反壓洗淨。

以高溫水或培養溫度以下之常溫水進行膜洗淨後，確認跨膜壓差以確認洗淨之效果。經確認之壓差高於所設定之基準壓差時，再次確認微生物濃度；經確認之壓差低於所設定之基準壓差時，即可停止反壓洗淨。所設

定之基準壓差，可根據分離膜之特性及分離膜模組之特性而決定。

藉由進行經以上說明之使用高溫水之反壓洗淨，除了可於不產生廢液下將分離膜之髒污予以洗淨之外，亦可控制已過度增殖之微生物之濃度。藉由進行可保持過濾性與控制微生物濃度之高溫水之供給方法，於微生物培養液之過濾中，可提升膜過濾模組之過濾性能，而得以長期間穩定過濾運轉。

#### [實施例]

##### 實施例 1

首先，製作膜過濾模組。使用於製作膜模組之中空纖維膜，係使用將東麗(股)製造之加壓式聚偏二氟乙烯製之中空纖維膜模組“HFS1020”予以解體，僅切出未黏合固定之部分而得到之聚偏二氟乙烯製中空纖維膜。使用聚碳酸酯樹脂之成形品作為分離膜模組構件。所製作之膜過濾模組之容量為0.06L、膜過濾模組之有效過濾面積為200 cm<sup>2</sup>。使用所製作之多孔質中空纖維膜及膜過濾模組進行連續發酵。除非有特別註記，實施例1中之運轉條件如下。

#### [運轉條件]

- 發酵培養槽容量：2.0L
- 發酵培養槽有效容積：1.5L
- 所使用之分離膜：聚偏二氟乙烯製之中空纖維膜60支
- 溫度調整：37℃

- 發酵培養槽通氣量：0.2L/min
- 發酵培養槽攪拌速度：600rpm
- pH調整：藉由3N之NaOH調整為pH6
- 乳酸發酵培養基供給速度：於15～300mL/hr之範圍內可變控制
- 藉由培養液循環裝置之循環液量：3.5L/min
- 膜過濾流量控制：藉由吸引泵之流量控制
- 滅菌：包含膜模組之培養槽及所使用之培養基，均係藉由高壓滅菌鍋於121℃之溫度下20分鐘高壓蒸氣滅菌。

使用 *Sprolactobacillus laevolacticus* JCM2513(SL株)作為微生物、使用表1所示之組成之乳酸發酵培養基作為培養基、產物之乳酸濃度之評價則使用以下所示之HPLC並於以下之條件下進行。

[表 1]

乳酸發酵培養基

| 成分                                                       | 濃度      |
|----------------------------------------------------------|---------|
| 葡萄糖                                                      | 100g/L  |
| 不含胺基酸之酵母菌氮源(Yeast Nitrogen base w/o amino acid)(Difco公司) | 6.7g/L  |
| 白胺酸除外之標準19種胺基酸                                           | 152mg/L |
| 白胺酸                                                      | 760mg/L |
| 肌醇                                                       | 152mg/L |
| 對胺苯甲酸                                                    | 16mg/L  |
| 腺嘌呤                                                      | 40mg/L  |
| 尿嘧啶                                                      | 152mg/L |

- 管柱：Shim-Pack SPR-H(島津公司製)
- 移動相：5mM對甲苯磺酸(0.8mL/min)
- 反應相：5mM對甲苯磺酸、20mM Bis-Tris、0.1mM EDTA·2Na(0.8mL/min)

• 檢測方法：導電度

• 管柱溫度：45℃

又，乳酸之光學純度分析係於以下條件下進行。

• 管柱：TSK-gel Enantio L1(東曹公司製)

• 移動相：1 mM 硫酸銅水溶液

• 流量：1.0 mL/分

• 檢測方法：UV 254 nm

• 溫度：30℃

L-乳酸之光學純度係根據下式(i)計算。

$$\text{光學純度(\%)} = 100 \times (L - D) / (D + L) \quad \cdot \cdot \cdot (i)$$

又，D-乳酸之光學純度係根據下式(ii)計算。

$$\text{光學純度(\%)} = 100 \times (D - L) / (D + L) \quad \cdot \cdot \cdot (ii)$$

其中，L係表示L-乳酸之濃度；D係表示D-乳酸之濃度。

培養：首先將SL株於試管中5mL乳酸發酵培養基中震盪培養一晚（前前前培養）。將所得到之培養液植菌於新鮮之乳酸發酵培養基100mL，於500mL容積之錐形燒瓶(Conical flask)中，37℃下震動培養24小時（前前培養）。於第1圖所示之連續發酵裝置之1.5L之發酵槽中，裝入培養基並將前前培養液予以植菌，藉由附屬之攪拌裝置4予以攪拌，並進行發酵培養槽1之通氣量調整、溫度調整

、pH調整，於循環泵8未運轉下，進行50小時培養（前培養）。前培養結束後立即使循環泵8運轉，除了前培養時之運轉條件外，進行乳酸發酵培養基之連續供給，並在控制膜透過水量下，使膜分離型連續發酵裝置之發酵液量為1.5L的同時進行連續培養，以進行經由連續發酵之D-乳酸之製造。進行連續發酵試驗時之膜透過水量之控制，係藉由測定自過濾泵11流出之過濾量，並根據膜過濾量控制條件使之變化。適當地測定膜過濾培養液中，所生產之D-乳酸濃度及光學純度。

連續發酵過濾運轉進行250小時。膜過濾運轉係使用過濾泵11進行、過濾流量於0～50小時為止並未進行過濾、50～200小時為止係以100mL/h、200～250小時為止係以135mL/h之流量進行過濾。過濾係進行9分鐘過濾、其後1分鐘停止並予以重複。反壓洗淨係於過濾時間50～250小時為止進行，且9分鐘過濾後、1分鐘反壓洗淨，並以反壓洗淨速度600mL/h之流量進行。使用於反壓洗淨之高溫水，係使用將蒸餾水裝入恆溫器，並使溫度固定之高溫水。使用於反壓洗淨之高溫水，係設定使恆溫器溫度為90℃，並於連續發酵200小時至250小時為止使用。於未使用高溫水之期間係使用常溫水進行反壓洗淨。關於發酵培養槽內之微生物濃度，因微生物濃度之增加過濾性將有降低之傾向，故運轉係於設定微生物濃度後，使成為該微生物濃度而進行，而該微生物濃度被認為可適當維持過濾速度、並可維持生產性。過濾壓差係使用壓差計1次/日加以測定，微生物濃度則係使用OD600 1

次/日加以測定。OD600之測定，首先係自發酵培養槽採集樣品、使用生理食鹽水將樣品之OD600稀釋為1以下後、使用分光光度計(島津製作所UV-2450)測定波長600nm之吸光度。將所得到之測定值、乘以生理食鹽水所稀釋之倍率、計算出作為樣品之OD600。將所得到之實驗結果示於第3圖及第4圖。其結果為：微生物濃度降低至OD600為20左右、亦可穩定維持膜過濾壓差，而得以在控制微生物濃度之同時，進行有效之膜洗淨。

#### 實施例2

作為反壓洗淨用高溫水，係將恆溫器設定成溫度為60℃、並於連續發酵200小時起250小時為止使用。前述之方法以外，進行與實施例1相同之D-乳酸連續發酵試驗。將其結果示於第3圖及第4圖。其結果為：微生物濃度降低至OD600為30左右、亦可穩定維持膜過濾壓差，而得以在控制微生物濃度之同時，進行有效之膜洗淨。

#### 實施例3

作為反壓洗淨用高溫水，係將恆溫器設定成溫度為45℃、並於連續發酵200小時起250小時為止使用。前述之方法以外，進行與實施例1相同之D-乳酸連續發酵試驗。將其結果示於第3圖及第4圖。其結果為：微生物濃度維持在OD600為40之同時、亦可穩定維持膜過濾壓差，而得以在控制微生物濃度之同時，進行有效之膜洗淨。

#### 實施例4

使用與實施例1相同之膜過濾模組進行生產丙酮酸之微生物之連續發酵。使用酵母菌之光滑球擬酵母菌

(*Torulopsis glabrata*) 中之光滑球擬酵母菌 P120-5a 株 (FERM P-16745) 作為生產丙酮酸之微生物。

使用表 2 所示之組成之丙酮酸發酵培養基作為發酵培養基，並使用第 1 圖所示之連續發酵裝置進行連續發酵試驗。上述之丙酮酸發酵培養基係於 121℃ 之溫度下 20 分鐘高壓蒸氣滅菌後使用。除非有特別註記，運轉條件如下所述。

[表 2]

丙酮酸發酵培養基

| 成分        | 濃度        |
|-----------|-----------|
| 葡萄糖       | 100g/L    |
| 硫酸銨       | 5g/L      |
| 磷酸二氫鉀     | 1g/L      |
| 硫酸鎂七水合物   | 0.5g/L    |
| 大豆水解物     | 2g/L      |
| 菸鹼酸       | 8mg/L     |
| 維生素B6・鹽酸鹽 | 1mg/L     |
| 生物素       | 0.05mg/L  |
| 維生素B1・鹽酸鹽 | 0.05 mg/L |

※ pH=5.5

[運轉條件]

- ・發酵培養槽容量：2.0L
- ・發酵培養槽有效容積 1.5L
- ・所使用之分離膜：聚偏二氟乙烯製之中空纖維膜 60 支
- ・溫度調整：30℃



- 發酵培養槽通氣量：1.5L/min
- 發酵培養槽攪拌速度：800rpm
- pH調整：藉由4N之NaOH調整為 pH5.5
- 丙酮酸發酵培養基供給速度：於15~300mL/hr之範圍內可變控制

- 藉由培養液循環裝置之循環液量：3.5L/min
- 膜過濾流量控制：藉由吸引泵之流量控制
- 滅菌：包含膜模組之培養槽及所使用之培養基，均係藉由高壓滅菌鍋於121℃之溫度下20分鐘高壓蒸氣滅菌。

又，丙酮酸濃度之評價則藉由HPLC法並根據以下所示之條件予以測定。

- 管柱：Shim-Pack SPR-H(島津公司製)
- 移動相：5mM對甲苯磺酸(0.8mL/min)
- 反應液：5mM對甲苯磺酸、20Mm Bis-Tris、0.1mM EDTA·2Na(流量0.8mL/min)
- 檢測方法：導電度
- 溫度：45℃

又，葡萄糖濃度之測定係使用“葡萄糖測試和光C”(註冊商標)(和光純藥公司製)。

首先，將P120-5a株於試管中5mL丙酮酸發酵培養基中震盪培養一晚(前前前培養)。將所得到之培養液植菌於新鮮之丙酮酸發酵培養基100mL，於500mL容積之錐形燒瓶(Conical flask)中，30℃下震盪培養24小時(前前培養)。將前前培養液植菌於第1圖所示之連續發酵裝置之

1.5L之丙酮酸發酵培養基，藉由附屬於發酵培養槽1之攪拌裝置4予以攪拌，並進行發酵培養槽1之通氣量調整、溫度調整、pH調整，於循環泵8未運轉下，進行24小時培養（前培養）。前培養結束後立即使循環泵8運轉，除了前培養時之運轉條件外，進行丙酮酸發酵培養基之連續供給，並在控制膜透過水量下，使連續發酵裝置之發酵液量為1.5L的同時進行連續培養，以進行經由連續發酵之丙酮酸之製造。進行連續發酵試驗時之膜透過水量之控制，係藉由測定自過濾泵11流出之過濾量，並根據膜過濾量控制條件使之變化。適當地測定膜過濾培養液中，所生產之丙酮酸濃度及殘存葡萄糖濃度。

連續發酵過濾運轉進行250小時。膜過濾運轉係使用過濾泵11進行、過濾流量於0~50小時為止並未進行過濾、50~200小時為止係以100mL/h、200~250小時為止係以135mL/h之流量進行過濾。過濾係進行9分鐘過濾、其後1分鐘停止過濾並予以重複。過濾時間50~250小時為止進行反壓洗淨，9分鐘過濾後、1分鐘反壓洗淨，並以反壓洗淨速度600mL/h之流量進行。使用於反壓洗淨之高溫水，係使用將蒸餾水裝入恆溫器，並使溫度固定之高溫水。使用於反壓洗淨之高溫水，係設定使恆溫器溫度為50℃，並於連續發酵200小時起至250小時為止使用。於未使用高溫水之期間係使用常溫水進行反壓洗淨。關於發酵培養槽內之微生物濃度，因微生物濃度之增加過濾性將有降低之傾向，故運轉係於設定微生物濃度後，使成為該微生物濃度而進行，而該微生物濃度被認為可

適當維持過濾速度、並可維持生產性。過濾壓差係使用壓差計1次/日加以測定；微生物濃度則係使用OD600 1次/日加以測定。OD600之測定，首先係自發酵培養槽採集樣品，使用生理食鹽水將樣品之OD600稀釋為1以下後，使用分光光度計(島津製作所UV-2450)測定波長600nm之吸光度。將所得到之測定值，乘以生理食鹽水所稀釋之倍率，計算出作為樣品之OD600。將所得到之實驗結果示於第5圖及第6圖。其結果為：微生物濃度降低至OD600為55左右、亦可穩定維持膜過濾壓差，而得以在控制微生物濃度之同時，進行有效之膜洗淨。

#### 實施例5

作為反壓洗淨用高溫水，係將恆溫器設定成溫度為40℃，並於連續發酵200小時起250小時為止使用。前述之方法以外，進行與實施例4相同之丙酮酸連續發酵試驗。將其結果示於第5圖及第6圖。其結果為：微生物濃度降低至OD600為65左右、亦可穩定維持膜過濾壓差，而得以在控制微生物濃度之同時，進行有效之膜洗淨。

#### 比較例1

於未進行藉由反壓洗淨用高溫水之反壓洗淨下，進行與實施例1相同之D-乳酸連續發酵試驗。但因考量藉由高溫水之反壓洗淨會稀釋培養液，故取代於實施例1中將高溫水使用於反壓洗淨，而將實施例1中使用於反壓洗淨之水量自培養基投入口投入。將其結果示於第3圖及第4圖。連續發酵250小時之OD600上升至90左右、無法控制微生物濃度、膜過濾壓差亦上升，而未能有穩定之連續發酵過濾運轉。

比較例 2

將藉由反壓洗淨用高溫水之反壓洗淨設定成反壓洗淨水之溫度為 35℃，進行與實施例 1 相同之 D-乳酸連續發酵試驗。將其結果示於第 3 圖及第 4 圖。連續發酵 250 小時之 OD600 上升至 70 左右、無法控制微生物濃度、膜過濾壓差亦上升，而未能有穩定之連續發酵過濾運轉。

比較例 3

將恆溫器設定成作為反壓洗淨用高溫水之溫度為 25℃，並於連續發酵 200 小時起 250 小時為止使用。除了前述之方法以外，進行與實施例 4 相同之丙酮酸連續發酵試驗。將其結果示於第 5 圖及第 6 圖。連續發酵 250 小時之 OD600 上升至 85 左右、無法控制微生物濃度、膜過濾壓差亦上升，而未能有穩定之連續發酵過濾運轉。

[產業上利用之可能性]

本發明係藉由簡單之操作方法，除了有效洗淨因膜過濾所產生之膜的髒污以外、並可控制發酵培養槽內之微生物濃度，而可穩定且低成本顯著提升發酵生產效率，且可降低由於洗淨廢液及抽取培養液所產生之處理費用，進一步可降低成本，並可廣泛於發酵工業低成本且穩定生產發酵產物。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係用以說明於本發明中所使用之膜分離型連續發酵裝置之例子的概略側視圖。

第 2 圖係顯示本發明中之膜過濾模組之反壓洗淨方法、程序之圖。

第3圖係顯示實施例1~3及比較例1~2相關之連續發酵過濾實驗所造成之微生物濃度之歷時變化之圖。

第4圖係顯示實施例1~3及比較例1~2相關之連續發酵過濾實驗所造成之膜過濾壓差之歷時變化之圖。

第5圖係顯示實施例4、5及比較例3相關之連續發酵過濾實驗所造成之微生物濃度之歷時變化之圖。

第6圖係顯示實施例4、5及比較例3相關之連續發酵過濾實驗所造成之膜過濾壓差之歷時變化之圖。

【主要元件符號說明】

- |    |            |
|----|------------|
| 1  | 發酵培養槽      |
| 2  | 分離膜模組      |
| 3  | 溫度控制裝置     |
| 4  | 攪拌裝置       |
| 5  | pH感測器・控制裝置 |
| 6  | 液位感測器・控制裝置 |
| 7  | 壓差感測器・控制裝置 |
| 8  | 循環泵        |
| 9  | 培養基供給泵     |
| 10 | pH調整劑供給泵   |
| 11 | 過濾泵        |
| 12 | 高溫水反洗泵     |
| 13 | 常溫水反洗泵     |
| 14 | 過濾閥        |
| 15 | 高溫水反洗閥     |
| 16 | 常溫水反洗閥     |
| 17 | 氣體供給裝置     |

# 發明專利說明書

PD1118099(5)

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100132832

※申請日：100.01.10

※IPC 分類：

C12M 1/36 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

經由連續發酵之化學品的製造方法

METHOD FOR PRODUCING A CHEMICAL BY A CONTINUOUS  
FERMENTATION METHOD

## 二、中文發明摘要：

藉由一種經由連續發酵之化學品之製造方法，於使用分離膜回收經由發酵之產品之際，可同時對於微生物混合液之高濃度培養保持過濾性並控制微生物濃度；該經由連續發酵之化學品之製造方法係：以分離膜將含有發酵原料、化學品與微生物或培養細胞之培養液予以過濾、自濾液回收化學品、進一步使未過濾液保持或回流於培養液、並將發酵原料追加於培養液之連續發酵，且自膜單元之透過液側供給洗淨用液體以進行膜洗淨；其特徵為：該洗淨用液體係高於培養液溫度、且150℃以下之高溫水，並藉由供給該洗淨用液體以控制發酵槽內之微生物濃度。

### 三、英文發明摘要：

By a method for producing a chemical by a continuous fermentation method, it is possible to keep permeability and control the concentration of microorganisms simultaneously when retrieving fermentation product by using a separation membrane. The method for producing a chemical by a continuous fermentation method is a continuous fermentation method, wherein a culture liquid containing fermentation raw materials, chemicals and microorganisms or culture cells is filtrated by a separation membrane, chemicals are retrieved from a filtrated liquid, furthermore an un-filtrated liquid is retained in or refluxed to the culture liquid, and fermentation raw materials are supplied additionally into the culture liquid, and supplies a cleaning liquid from the filtrated liquid side of membrane unit for cleaning the membrane, and characterized by the cleaning liquid is high-temperature water with temperature higher than the temperature of culture liquid and lower than 150 °C , and the concentration of microorganisms in fermentation tank is controlled by supplying the cleaning liquid.

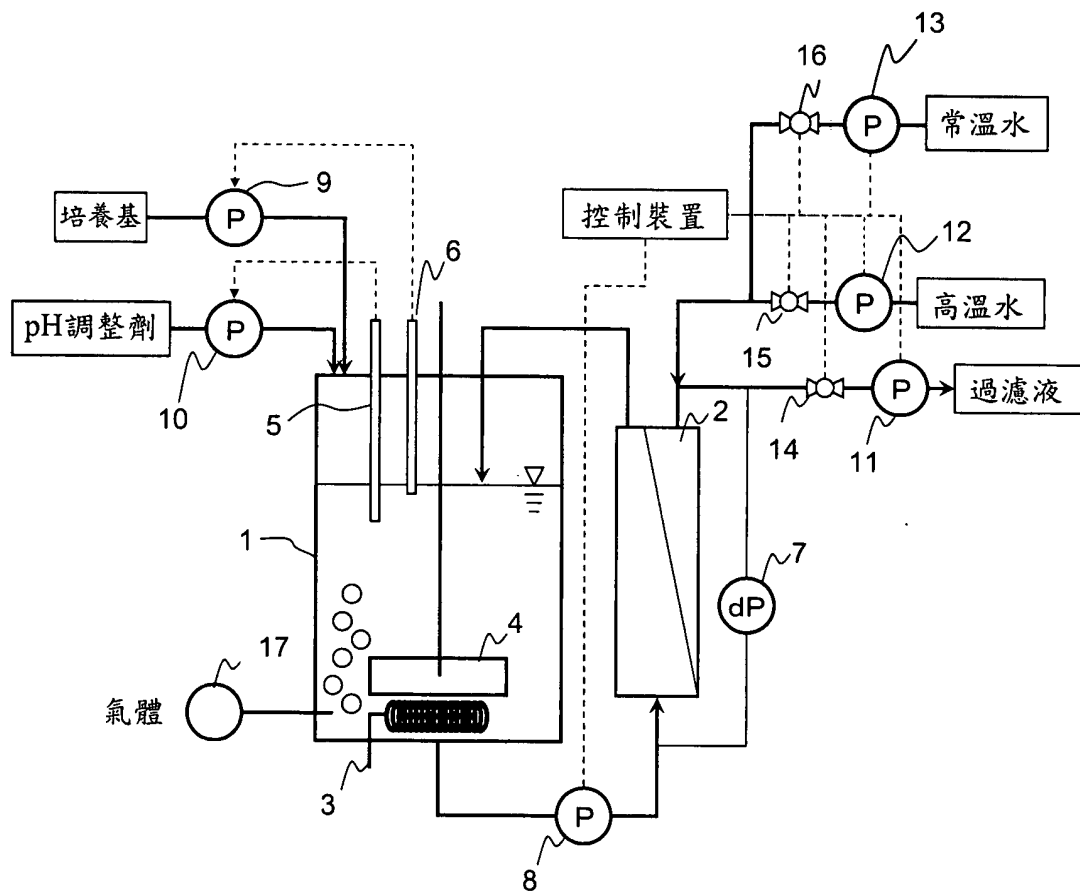
七、申請專利範圍：

- 1.一種經由連續發酵之化學品之製造方法，其係以分離膜將含有發酵原料、化學品與微生物或培養細胞之培養液予以過濾、自濾液回收化學品、進一步使未過濾液保持或回流於培養液、並將發酵原料追加於培養液之連續發酵、且自膜單元之透過液側供給洗淨用液體以進行膜洗淨之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該洗淨用液體係高於培養液溫度、且 150℃ 以下之高溫水，並藉由供給該洗淨用液體以控制發酵槽內之微生物濃度。
- 2.如申請專利範圍第 1 項之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該洗淨用液體係含有氧化劑。
- 3.如申請專利範圍第 2 項之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該氧化劑係含有至少一種選自於由次氯酸鹽、二氧化氯、臭氧、及過氧化氫而成之群組。
- 4.如申請專利範圍第 1 項之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該洗淨用液體係含有 pH 調整劑。
- 5.如申請專利範圍第 1 項之經由連續發酵之化學品之製造方法，其中該洗淨用液體係含有該發酵原料。

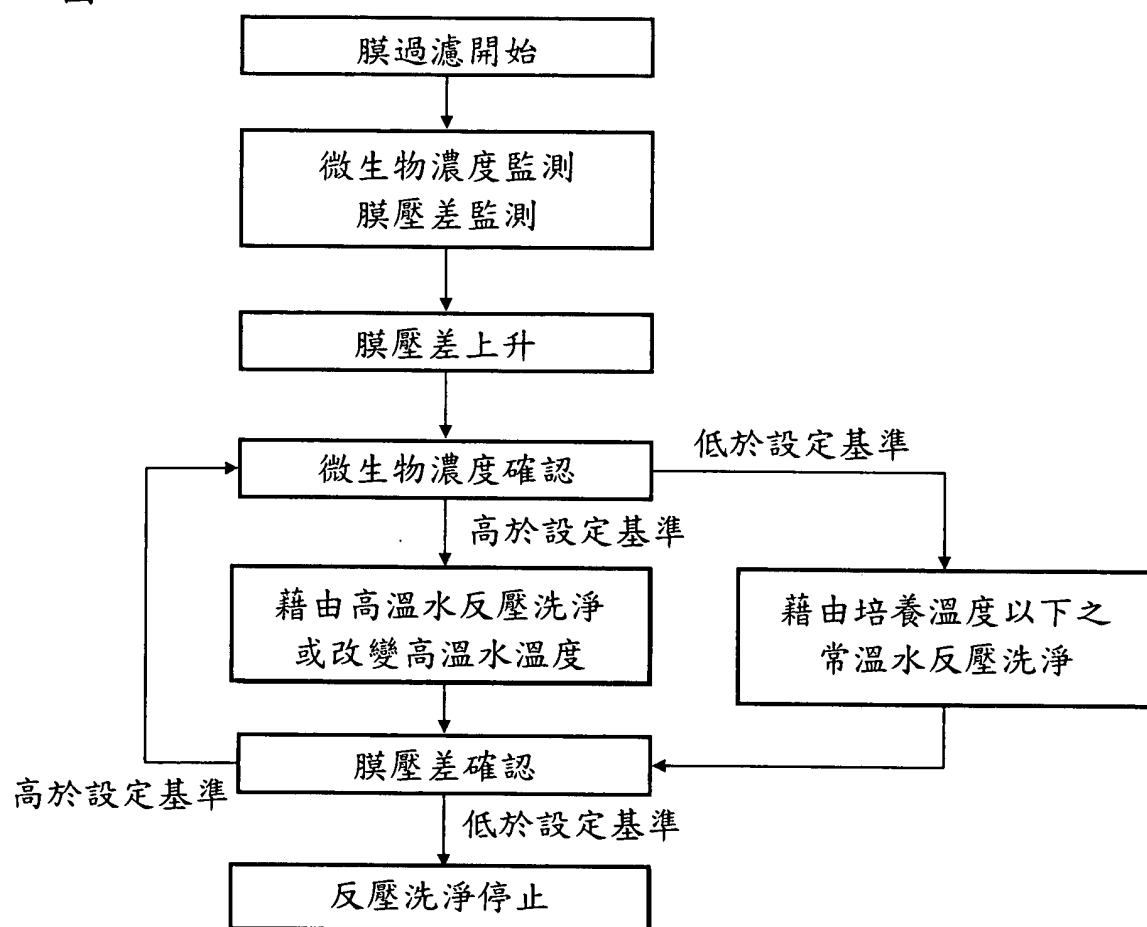


八、圖式：

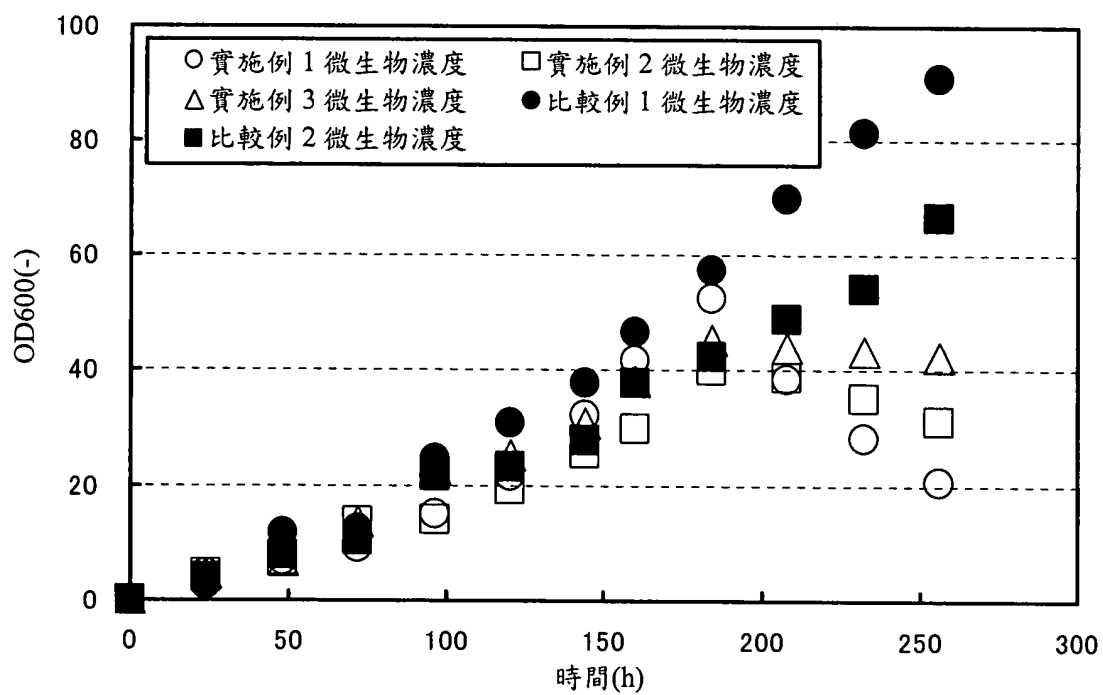
第 1 圖



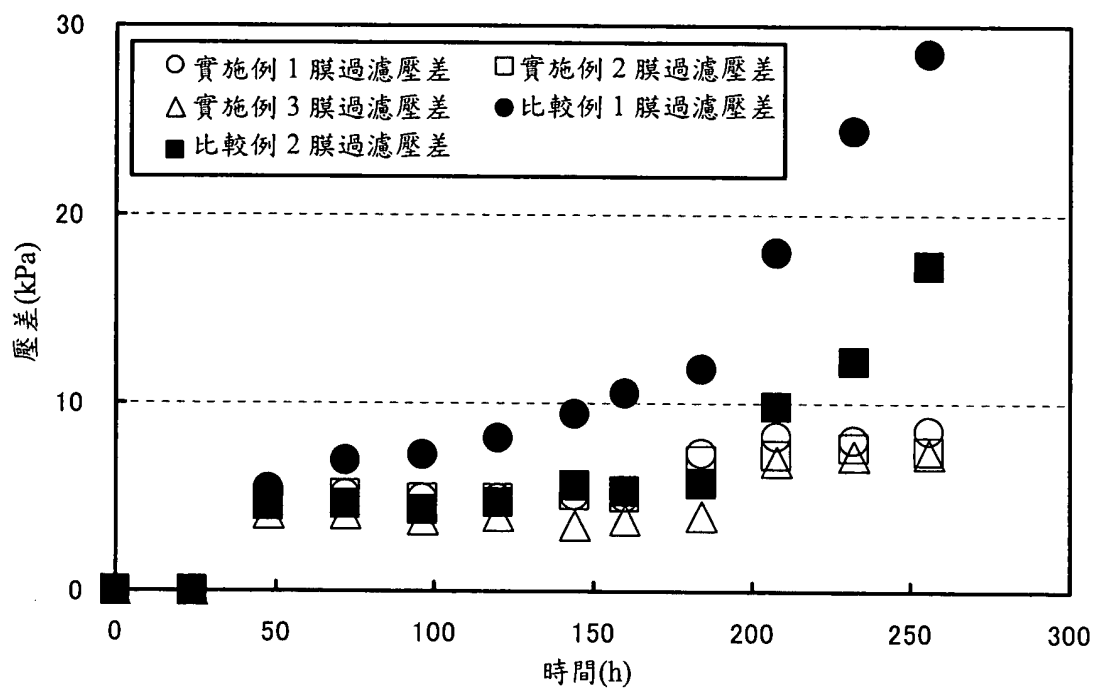
第 2 圖



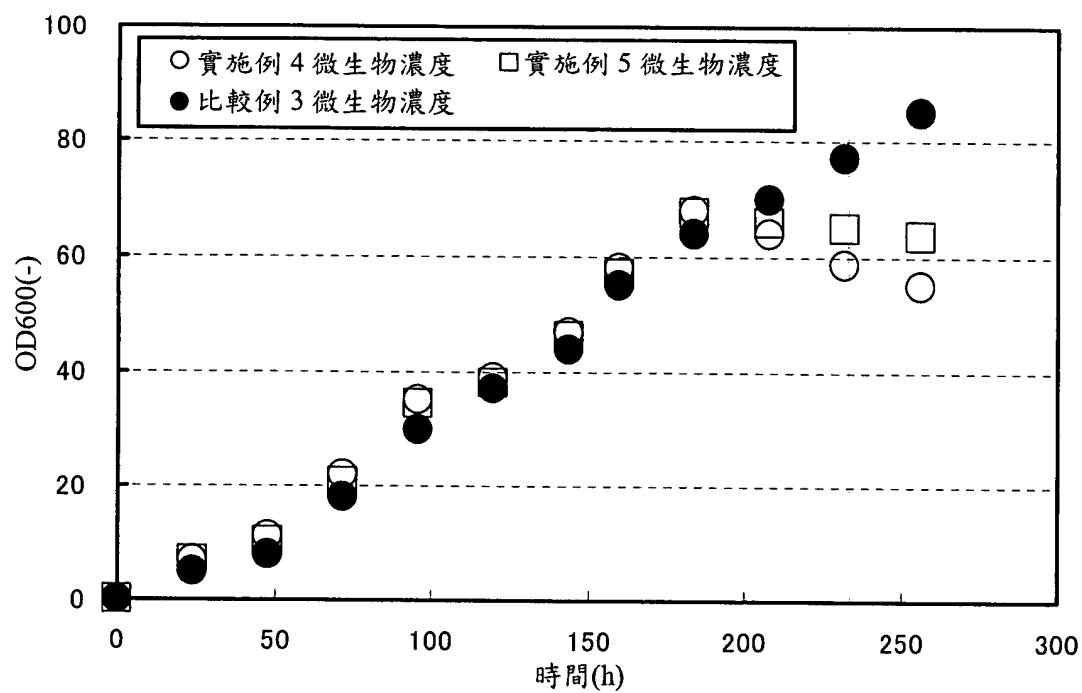
第 3 圖



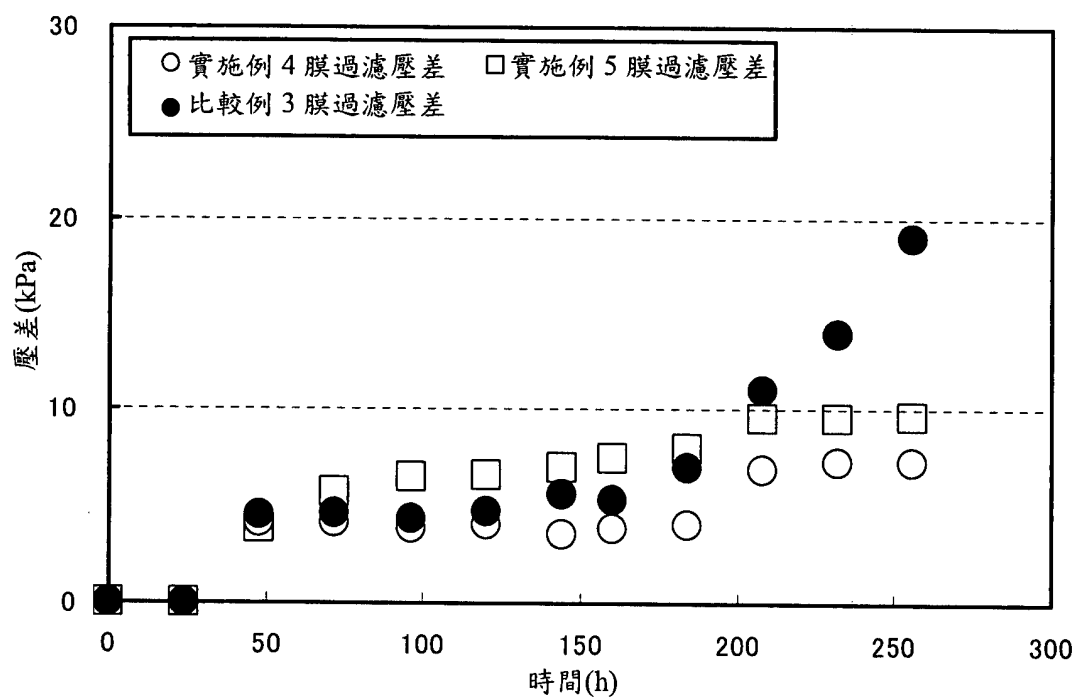
第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖



四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第 1 圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

- |    |                     |
|----|---------------------|
| 1  | 發 酵 培 養 槽           |
| 2  | 分 離 膜 模 組           |
| 3  | 溫 度 控 制 裝 置         |
| 4  | 攪 拌 裝 置             |
| 5  | pH 感 測 器 · 控 制 裝 置  |
| 6  | 液 位 感 測 器 · 控 制 裝 置 |
| 7  | 壓 差 感 測 器 · 控 制 裝 置 |
| 8  | 循 環 泵               |
| 9  | 培 養 基 供 給 泵         |
| 10 | pH 調 整 劑 供 給 泵      |
| 11 | 過 濾 泵               |
| 12 | 高 溫 水 反 洗 泵         |
| 13 | 常 溫 水 反 洗 泵         |
| 14 | 過 濾 閥               |
| 15 | 高 溫 水 反 洗 閥         |
| 16 | 常 溫 水 反 洗 閥         |
| 17 | 氣 體 供 給 裝 置         |

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。