

(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2018-24679

(P2018-24679A)

(43) 公開日 平成30年2月15日(2018.2.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07C 227/40 (2006.01)	C07C 227/40	4B064
C07C 229/08 (2006.01)	C07C 229/08	4H006
C12P 13/08 (2006.01)	C12P 13/08	D
C12P 13/06 (2006.01)	C12P 13/06	B

審査請求 有 請求項の数 7 O L 外国語出願 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2017-160995 (P2017-160995)	(71) 出願人	514199250 シージェイ チェイルジェダン グ コーポ レイション 大韓民国 ソウル 04560 ジュン グ -グ ドングホ-ロ 330
(22) 出願日	平成29年8月24日 (2017.8.24)	(71) 出願人	512172187 インダストリー-ユニバーシティー コー ポレーション ファウンダーション ハン ヤン ユニバーシティー 大韓民国 133-791 ソウル ソン ドング ワンシムニ-ロ 222 ハン ヤン ユニバーシティー
(62) 分割の表示	特願2014-555500 (P2014-555500) の分割	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
原出願日	平成25年2月6日 (2013.2.6)		
(31) 優先権主張番号	61/595,527		
(32) 優先日	平成24年2月6日 (2012.2.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10-2012-0125739		
(32) 優先日	平成24年11月7日 (2012.11.7)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

最終頁に続く

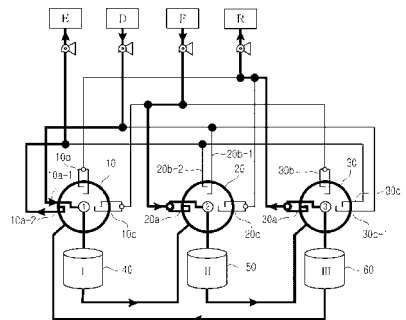
(54) 【発明の名称】 バリンの連続分離のための装置及びそれを用いたバリンの連続分離方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 バリンを連続して分離する装置及びそれを用いたバリンの連続分離方法の提供。

【解決手段】 脱着剤ポートD、フィードポートF、ラフィネートポートR、抽出物ポートE、前記ポート連結される複数のロータリーバルブ(10、20、30)と、複数のクロマトグラフィーゾーン(40、50、60)とを含み、複数の連結ポート(10a-1、10a-2、10b、10c)、(20a、20b-1、20b-2、20c)、(30a、30b、30c-1、30c-2)を備え、複数のロータリーバルブが回転することにより、複数の連結ポートのいずれか1つのみ開放され、それに応じてポート(D、F、R、E)の夫々に選択的に連結されるいずれか1つのロータリーバルブが切り替えられるバリンの連続分離装置。ロイシンやイソロイシン等のアミノ酸を含む混合物から高い純度と収率でバリンを連続して分離することができる、バリンの連続分離方法。

【選択図】 図4a



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

脱着剤ポート D と、
フィードポート F と、
ラフィネートポート R と、
抽出物ポート E と、
前記ポート (D、F、R、E) とそれぞれ選択的に連結される複数のロータリーバルブ (10、20、30) と、
前記複数のロータリーバルブ (10、20、30) 毎にそれぞれ備えられた複数のクロマトグラフィーゾーン (40、50、60) とを含み、
前記複数のロータリーバルブ (10、20、30) は互いに連結され、
前記複数のロータリーバルブ (10、20、30) は、それぞれ複数の連結ポート (10 a、10 b、10 c)、(20 a、20 b、20 c)、(30 a、30 b、30 c) を備え、
前記複数のロータリーバルブ (10、20、30) が回転することにより、前記複数の連結ポート (10 a、10 b、10 c)、(20 a、20 b、20 c)、(30 a、30 b、30 c) のいずれか 1 つのみ開放され、それに応じて前記ポート (D、F、R、E) のそれぞれに選択的に連結されるいずれか 1 つのロータリーバルブ (10、20、30) が切り替えらえることを特徴とするパリンの連続分離装置。

10

【請求項 2】

前記複数のロータリーバルブ (10、20、30) は、所定時間が経過すると回転し、
前記複数のロータリーバルブ (10、20、30) の回転により、前記ポート (D、F、R、E) に連結されるロータリーバルブ (10、20、30) が切り替えられることを特徴とする請求項 1 に記載のパリンの連続分離装置。

20

【請求項 3】

前記複数のロータリーバルブ (10、20、30) は、前記所定時間後の回転により第 1、第 2 及び第 3 位置を循環するように連続して切り替えられ、
前記第 1 位置では、第 1 連結ポート (10 a、20 a、30 a) が開放され、
前記第 2 位置では、第 2 連結ポート (10 b、20 b、30 b) が開放され、
前記第 3 位置では、第 3 連結ポート (10 c、20 c、30 c) が開放されることを特徴とする請求項 2 に記載のパリンの連続分離装置。

30

【請求項 4】

前記第 1 位置では、
前記脱着剤ポート脱着剤ポート D が第 1 ロータリーバルブ 10 の第 1 連結ポート 10 a を通過して第 1 クロマトグラフィーゾーン 40 に連通し、
前記フィードポート F が第 2 ロータリーバルブ 20 の第 2 連結ポート 20 a を通過して第 2 クロマトグラフィーゾーン 50 に連通し、
前記ラフィネートポート R が第 3 ロータリーバルブ 30 の第 3 連結ポート 30 a を通過して第 3 クロマトグラフィーゾーン 60 に連通し、
前記抽出物ポート E が第 1 ロータリーバルブ 10 の第 1 連結ポート 10 a を通過することを特徴とする請求項 3 に記載のパリンの連続分離装置。

40

【請求項 5】

前記第 1 位置で前記フィードポート F から流入した分離対象混合物は、前記第 2 クロマトグラフィーゾーン 50 を通過することによりパリンとその他の物質に分離され、
前記第 1 位置で分離された前記パリンは、前記第 3 ロータリーバルブ 30 に流入して前記ラフィネートポート R から流出し、
前記第 1 位置で分離された前記その他の物質は、前記第 1 ロータリーバルブ 10 に流入して前記抽出物ポート E から流出することを特徴とする請求項 4 に記載のパリンの連続分離装置。

【請求項 6】

前記所定時間は、前記分離対象混合物から分離された前記パリンが前記第 3 ロータリー

50

バルブ 30 に流入し、前記その他の物質が前記第 3 ロータリーバルブ 30 に流入しない時間であることを特徴とする請求項 5 に記載のバリンの連続分離装置。

【請求項 7】

前記ロータリーバルブ(10、20、30)が前記第 1 位置から前記第 2 位置に回転すると、前記フィードポート F から流入した分離対象混合物は、前記第 3 クロマトグラフィゾーン 60 を通過することによりバリンとその他の物質に分離され、

前記第 2 位置で分離された前記バリンは、前記第 1 ロータリーバルブ 10 に流入して前記ラフィネートポート R から流出し、

前記第 2 位置で分離された前記その他の物質は、前記第 1 位置で分離されたその他の物質と共に前記第 2 ロータリーバルブ 10 に流入し、前記抽出物ポート E から流出することを特徴とする請求項 6 に記載のバリンの連続分離装置。

10

【請求項 8】

前記複数のロータリーバルブ(10、20、30)は、連続して回転することにより第 1、第 2 及び第 3 位置に交互に切り替えられ、

前記第 1、第 2 及び第 3 位置で前記ポート(D、F、R、E)が連結される前記ロータリーバルブはそれぞれ異なることを特徴とする請求項 1 に記載のバリンの連続分離装置。

【請求項 9】

前記フィードポート F から流入した分離対象混合物は、バリンとその他の物質に分離され、

前記複数のロータリーバルブ(10、20、30)が位置を切り替える回転間隔が、前記バリンはいずれか 1 つのロータリーバルブから他のロータリーバルブに移動し、前記その他の物質は移動していない時間であることを特徴とする請求項 8 に記載のバリンの連続分離装置。

20

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のバリンの連続分離装置を用いてバリンを連続分離する方法において、

前記脱着剤ポートに脱着剤を注入し、前記フィードポートにバリンを含む混合物を流入して前記ラフィネートポートからバリンを回収する工程を含むことを特徴とするバリンの連続分離方法。

【請求項 11】

30

前記脱着剤が水であることを特徴とする請求項 10 に記載のバリンの連続分離方法。

【請求項 12】

前記回収されたバリンの純度が 90% ~ 99% であることを特徴とするバリンの連続分離方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バリンの連続分離のための装置及びそれを用いたバリンの連続分離方法に関し、より具体的には、ロイシンやイソロイシンなどのアミノ酸を含む混合物からバリンを連続して分離するための装置及びそれを用いたバリンの連続分離方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

バリン(valine)は、 $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ の化学式を有する L-アミノ酸であり、医薬品や化粧品の主要原料の 1 つとして用いられる。また、動物飼料に利用される重要な成分の一つでもある。これらの理由から、バリンの利用に注目した産業的市場における関心は日増しに大きくなっている。

【0003】

バリン生産過程は主にコリネバクテリウム(Corynebacterium)の発酵により行われる。これに関して注目すべきは、発酵過程にバリンだけでなく他の不純物なども共に得られるということである。これらの不純物は、塩、アラニン、ロイシン、イソロイシンなどで

50

あり、これらの不純物は全てバリンから分離しなければならない。

【0004】

従来の技術で用いられるバリンの分離方法としては、イオン排除クロマトグラフィー(特許文献1)、沈殿剤を用いた結晶化方法(特許文献2、3及び4)、化学反応法(特許文献5)などがある。しかし、前記分離方法のうち、イオン排除クロマトグラフィー方法は、ロイシン、イソロイシンなどのアミノ酸の分離が難しく、廃水発生量が多く、結晶化などの後処理工程がさらに必要であるという欠点がある。また、沈殿剤を用いた結晶化方法は、沈殿剤を除去するための工程を必要とするので工程が複雑であり、精製のための後処理工程がさらに必要であるという欠点がある。また、化学反応法は、ロイシンとイソロイシンを全て分離することができるが、濃縮及び加水分解工程を必要とするので工程が複雑であり、溶媒を多量に用いるのでそれを回収する後処理工程に多くの設備を必要とすることから精製工程のコストが上昇する。

10

【0005】

一方、クロマトグラフィー分離工程は、吸着剤に基づく分離工程であり、多数のバイオ製品の分離精製段階に広範囲に用いられており、その運用方式によって大きくバッチ(batch)クロマトグラフィー工程と連続疑似移動床(simulated moving bed, SMB)クロマトグラフィー工程に区分される。前記SMB工程は、1961年に米国のUOP社が石油化学製品の分離のために最初に開発した工程であり、その性能と分離効率はバッチ工程に比べてはるかに優れることが報告されている。このようなSMB工程の優位性により、単に石油化学製品の分離精製だけでなく、糖物質、キラル化合物、バイオ製品、医薬品などの高付加製品の分離精製にまで広く用いられている。

20

【0006】

従来のほとんどのSMB工程(4-ゾーンSMB)は、図1に示すように、4つのゾーン(カラム)と4つのポートが配置された構成となっており、4つのポートのうちフィードポートと脱着剤ポートから分離対象混合物と溶媒(脱着剤)がそれぞれ注入される。また、ラフィネート(Raffinate)ポートと抽出物(Extract)ポートから吸着力の弱い物質と強い物質が分離して得られる。このような一連の分離対象混合物と溶媒の注入、そして両成分の回収が連続して行われるようにするために、4つのポートは所定時間間隔で溶媒が流れる方向に応じて動くようになっている。

30

【0007】

しかし、前記4-ゾーンSMB工程は、少なくとも4つのカラムを必要とする。一般に、各カラム毎のバルブと吸着剤はいずれも高価であるため、カラムの数を最小限にすることが好ましい。

【0008】

よって、図2に示すように、3つのクロマトグラフィーゾーンを有するSMB(3-ゾーンSMB)工程が導入されている。図2に示すように、3つのゾーンを用いるので、最小カラム数を4つから3つに減らすことができる。また、4つのポートは、従来の4つのクロマトグラフィーゾーンを有するSMB構造と同様に配置される。

【0009】

しかし、前記3-ゾーンSMB工程において、バリンのように吸着力が弱いために速く移動する低親和性成分は、図2のラフィネートポートから回収されるが、図2のようなラフィネートの濃縮ゾーン(enrichment zone)がないので、過度な希釈が避けられない。すなわち、回収されたバリンの濃度が分離対象混合物中のバリン濃度に比べて低くなると、SMB分離工程の後続の後処理工程の運用コストが上昇するという副作用が発生する。よって、このような副作用を克服する新たな構造を有する3-ゾーンSMB工程の適用が必要とされる。

40

【0010】

そこで、本発明者は、上記に鑑みて研究を重ねるなかで、疑似移動層クロマトグラフィー工程を行う装置により、ロイシンやイソロイシンなどのアミノ酸を含む混合物から効率的にバリンを連続的且つ効果的に分離できることを確認し、本発明を完成するに至った。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特開昭62-255453号公報

【特許文献2】特開1996-333312号公報

【特許文献3】特開1998-237030号公報

【特許文献4】米国特許第6072083号明細書

【特許文献5】米国特許第4263450号明細書

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Kang, S.H. et al., Process Biochem., 2010, 45, 1468-1476

【非特許文献2】Lee, K.B. et al., AIChE J., 2008, 54, 2852-2871

【非特許文献3】Nam, H.G. et al., Process Biochem., 2011, 46, 2044-2053

【非特許文献4】Chung, S. F. et al., AIChE J., 1968, 14, 857-866

【非特許文献5】Wilson, E. J. et al., Ind. Eng. Chem. Fundam., 1966, 5, 9-14

【非特許文献6】Wilke, C.R. et al., AIChE J., 1955, 1, 264-270

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、ロイシンやイソロイシンなどのアミノ酸を含む混合物からバリンを連続して分離する装置及びそれを用いたバリンの連続分離方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

上記課題を解決するために、図4a~図4cに示すように、本発明において、バリンの分離のために用いる装置は、脱着剤ポートDと、フィードポートFと、ラフィネートポートRと、抽出物ポートEと、3つのロータリーバルブ(10、20、30)と、各ロータリーバルブ(10、20、30)に連結される3つのクロマトグラフィーゾーン(40、50、60)とを含む。

【0015】

3つのロータリーバルブ(10、20、30)は、それぞれ3つの連結ポート(10a、10b、10c)、(20a、20b、20c)、(30a、30b、30c)を備え、ロータリーバルブ(10、20、30)の回転に応じて各ロータリーバルブ(10、20、30)のいずれか1つの連結ポートのみ開放されることにより、脱着剤ポートD、フィードポートF、ラフィネートポートR、抽出物ポートEに連通する。

【0016】

すなわち、脱着剤ポートD、フィードポートF、ラフィネートポートR、抽出物ポートEに連結される各流路は3つに分岐されるように分岐点を有し、3つのロータリーバルブ(10、20、30)に全て連結されており、いずれかの連結ポートが開放された後に特定のロータリーバルブに連結される。

【0017】

以下、具体的な作動方式について説明する。

【0018】

図3は本発明で用いる3つのクロマトグラフィーゾーンを有する擬似移動層(3-ゾーンSMB)工程の構造を示す概略図である。図3に示すように、ポートの移動が脱着剤ポート、フィードポート、ラフィネートポート、抽出物ポートの順になっており、それぞれラフィネート濃度の希釈を防止する濃縮ゾーンを運用することができる。よって、従来の3-ゾーンSMBの問題であるラフィネート濃度の低下を予防できるという利点を有する。また、脱着剤ポートとフィードポートが1つのカラムで連結されている構造であるので、溶媒の使用量を低減することができるという利点もある。

【0019】

10

20

30

40

50

また、本発明においては、図4に示す工程が連続して行われる装置を提供する。図4aは第1位置における装置を示す図であり、図4bは第2位置における装置を示す図であり、図4cは第3位置における装置を示す図である。第1、第2、第3位置は連続して循環する。すなわち、本発明による装置は、第1位置、第2位置、第3位置の順に作動し、その後再び第1位置に回帰する方式である。

【0020】

特定位置への設定は、ロータリーバルブ(10、20、30)の回転により行われる。すなわち、ロータリーバルブ(10、20、30)の第1連結ポート(10a、20a、30a)が開放されることによって第1位置に設定され、さらにロータリーバルブ(10、20、30)が回転することにより第2連結ポート(10b、20b、30b)が開放され、それにより第2位置に設定され、再びロータリーバルブ(10、20、30)が回転することにより第3連結ポート(10c、20c、30c)が開放され、第3位置に設定される。ロータリーバルブ(10、20、30)がさらに回転すると再び第1位置に設定される。

10

【0021】

一方、以下では本発明のより良き理解のため一部の連結ポート(10a、20b、30c)は流入ポート(10a-1、20b-1、30c-1)と流出ポート(10a-2、20b-2、30c-2)に分けて図示し、説明する。

【0022】

図4aに示す第1位置では、ロータリーバルブ(10、20、30)の第1連結ポート(10a、20a、30a)のみ開放され、第2連結ポート(10b、20b、30b)及び第3連結ポート(10c、20c、30c)は閉鎖される。

20

【0023】

第1位置において、脱着剤ポートDは第1ロータリーバルブ10に連結され、フィードポートFは第2ロータリーバルブ20に連結され、ラフィネートポートRは第3ロータリーバルブ30に連結され、抽出物ポートEは第1ロータリーバルブ10に連結される。

【0024】

よって、脱着剤ポートDから流入する脱着剤は、第1ロータリーバルブ10及び第1クロマトグラフィーゾーン40を通過し、その後第2ロータリーバルブ20に流入する。

【0025】

フィードポートFから流入する分離対象混合物は、第1クロマトグラフィーゾーン40を通過した脱着剤と共に第2ロータリーバルブ20に流入し、第2クロマトグラフィーゾーン50を通過する。

30

【0026】

本発明において、分離対象混合物はバリンを含んでおり、さらに不純物として塩、アラニン、ロイシン、イソロイシンなどを含んでいる。第2クロマトグラフィーゾーン50を通過した後、流動速度の差による分離対象混合物の成分の分離が行われる。バリンは他の不純物に比べて吸着力が弱い低親和性(low-affinity)成分であるので、より速く移動する。よって、その後分離対象混合物はバリンとその他の物質に分離され、それぞれ時間差を置いて第3ロータリーバルブ30に流入する。

【0027】

分離しようとするバリンはラフィネートポートRから流出するが、その他の物質は第3クロマトグラフィーゾーン60を通過して再び第1ロータリーバルブ10を通過することにより抽出物ポートEに流出する。

40

【0028】

所定時間(すなわち、ロータリーバルブの回転時間間隔)が経過すると、ロータリーバルブ(10、20、30)が回転して図4bに示されるように第2位置に切り替えられる。所定時間の基準については後述する。

【0029】

図4bに示す第2位置では、ロータリーバルブ(10、20、30)の第2連結ポート(10b、20b、30b)のみ開放され、第1連結ポート(10a、20a、30a)及び

50

第3連結ポート(10c、20c、30c)は閉鎖される。

【0030】

第1位置と比較すると、第2位置では、ポート(D、F、R、E)に連結されるロータリーバルブ(10、20、30)が1つずつ移動する。

【0031】

すなわち、第2位置では、脱着剤ポートDは第2ロータリーバルブ20に連結され、フィードポートFは第3ロータリーバルブ30に連結され、ラフィネートポートRは第1ロータリーバルブ40に連結され、抽出物ポートEは第2ロータリーバルブ20に連結される。

【0032】

よって、脱着剤ポートDから流入する脱着剤は、第2ロータリーバルブ20及び第2クロマトグラフィーゾーン50を通過し、その後第3ロータリーバルブ30に流入する。

【0033】

フィードポートFから流入する分離対象混合物は、第2クロマトグラフィーゾーン50を通過した脱着剤と共に第3ロータリーバルブ30に流入し、第3クロマトグラフィーゾーン60を通過する。

【0034】

しかし、この場合、図4aに示す第1位置から流入した分離対象混合物のうちその他の物質は流動速度の差により第3ロータリーバルブ30にまだ流入していない。これを行うため、前述したロータリーバルブの回転時間間隔が調整される。

【0035】

よって、第2位置で第3ロータリーバルブ30に流入した分離対象混合物は第3クロマトグラフィーゾーン60を通過し、その後流動速度の差により分離対象混合物の分離が行われてバリンとその他の物質に分離されるが、分離しようとするバリンは第1ロータリーバルブ10とラフィネートポートRを通じて流出するのに対して、残りの物質は第1位置で分離されたものの第3ロータリーバルブ30にまだ流入していないその他の物質と合わせてより効果的に第2ロータリーバルブ20を通過し、その後抽出物ポートEに流入する。

【0036】

所定時間が経過すると、ロータリーバルブ(10、20、30)が回転して図4cに示す第3位置に切り替えられる。

【0037】

図4cに示す第3位置では、ロータリーバルブ(10、20、30)の第3連結ポート(10c、20c、30c)のみ開放され、第1連結ポート(10a、20a、30a)及び第2連結ポート(10b、20b、30b)は閉鎖される。

【0038】

第2位置と比較すると、第3位置では、ポート(D、F、R、E)に連結されるロータリーバルブ(10、20、30)が1つずつ移動する。

【0039】

第1、第2位置の説明と同様に、分離対象混合物はフィードポートFから流入し、第3クロマトグラフィーゾーン60を通過した脱着剤と共に第1ロータリーバルブ10に流入し、第1クロマトグラフィーゾーン40を通過するが、この時、図4bに示す第2位置で流入した分離対象混合物のうち残りの物質が流動速度の差により第2ロータリーバルブ20にまだ流入していない時点であるので、同様に共に合わせられて第3ロータリーバルブ30を通過し、その後抽出物ポートEに流入する。

【0040】

分離対象混合物のうち分離しようとするバリンは、第2ロータリーバルブ20を通過し、その後ラフィネートポートRに分離される。

【0041】

所定時間が経過すると、ロータリーバルブ(10、20、30)が回転して再び図4aに

10

20

30

40

50

示す第1位置に切り替えられ、上記過程が連続して行われる。

【0042】

本発明において、前記第1、第2及び第3クロマトグラフィーゾーンに用いられる吸着剤としては、多孔性ポリマーレジンをを用いることができ、不溶性ポリスチレンジビニルベンゼンポリマー (insoluble polystyrene divinylbenzene polymer) 物質からなるレジンをを用いることが好ましい。前記レジンは、表面積が大きく、固有の細孔径分布及び細孔容積分布 (pore size and volume distribution) を有し、様々な物質、特に薬学的化合物の精製に有用である。具体的には、Amberchrom CG161 (Rohm & Haas) 又は Chromalite PCG Series (Purolite) などを用いることができる。商業的に用いられる前記レジンの粒径は10~300 μm であり、表面積は700~900 m^2/g であり、気孔の大きさは100~200 μm であり、細孔容積分布は0.7~1.5 ml/g であり、均等係数 (uniformity coefficient) は2未満である。

10

【0043】

前記分離対象混合物は、バリン、及びバリンと共に分枝鎖アミノ酸に含まれるイソロイシン又はロイシンを含む混合物であり、微生物発酵により得られたバリン発酵液であることが好ましい。本発明の具体的な実施例においては、精製されたバリン、イソロイシン及びロイシンを人為的に混合した混合液、及び微生物発酵により得られたバリン発酵液を用いた。これは、微生物発酵の際にバリンのみ生産されることはほとんどなく、多くはイソロイシン及びロイシンが共に生産されるからである。

【0044】

本発明によるバリンの連続分離装置によれば、分離対象混合物のうち分離しようとするバリンはラフィネートポートRから流出し、その他の物質は流動速度の差だけでなく、ロータリーバルブ (10、20、30) の回転により効果的に分離されて抽出物ポートEから流出し、バリンを連続して分離することができる。

20

【0045】

また、本発明のバリンの連続分離装置の制御において、脱着剤ポートD、フィードポートF及びラフィネートポートRの流量を調節し、それと共にロータリーバルブの回転速度を調節することにより制御することができる。前記各ポートの流量は、カラムの intrinsic parameter (吸着係数、物質伝達係数、空隙率、物質環境など) を考慮して調節することができる。

30

【0046】

また、本発明は前記バリンの連続的分離装置を用いることよってバリンを連続分離する方法において、前記脱着剤ポートを用いて脱着剤を流入し、前記フィードポートにバリンを流入させ、前記ラフィネートポートからバリンを回収する工程を含むことを特徴とするバリンの連続分離法を提供する。前記脱着剤は水であることが好ましい。また、前記方法で回収されたバリンの純度は90%~99%であることを特徴とする。

【0047】

さらに、本発明の一実施例によれば、本発明によるバリンの連続分離装置により、バリン、ロイシン及びイソロイシンを含む分離対象混合物を分離した結果、回収されたバリンの収率は約98%以上、純度は約98%以上であったので、混合物からバリンを効果的に分離できることが確認された。

40

【発明の効果】

【0048】

(発明の有益な効果)

本発明は、擬似移動層クロマトグラフィー工程を行う装置により、ロイシンやイソロイシンなどのアミノ酸を含む混合物から高純度及び高収率でバリンを連続して分離することができる。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】従来の4つのクロマトグラフィーゾーンを有する擬似移動層 (4-ゾーンSMB)

50

クロマトグラフィー工程の構造を示す概略図である。

【図2】従来の3つのクロマトグラフィーゾーンを有するSMB(3-ゾーンSMB)工程の構造を示す概略図である。

【図3】本発明で用いる3つのクロマトグラフィーゾーンを有する擬似移動層(3-ゾーンSMB)工程の構造を示す概略図であり、従来の3-ゾーンSMBと差別化されたポート配置方式に基づいて開発された工程の構造を示すものである。

【図4a】本発明で用いる3-ゾーンSMB工程のための装置の模式図であり、ロータリバルブの回転に応じた各ゾーンの連結を示すものである。

【図4b】本発明で用いる3-ゾーンSMB工程のための装置の模式図であり、ロータリバルブの回転に応じた各ゾーンの連結を示すものである。

【図4c】本発明で用いる3-ゾーンSMB工程のための装置の模式図であり、ロータリバルブの回転に応じた各ゾーンの連結を示すものである。

【図5】吸着剤選定のためのパルステストの結果を示す図である。ここで、(a)はAmberchrom CG161C、(b)はAmberlite CG71C、(c)はDIAION SK1B、DはAmberlite XAD-7HPの結果である。

【図6】Amberchrom CG161C吸着剤に対する階段式フロントルテストの結果を示す図である。ここで、(a)はイソロイシン、(b)はロイシン、(c)はパリンの結果である。

【図7】Amberchrom CG161C吸着剤における吸着平衡データ(q vs. C)を示す図である。ここで、(a)はパリン、(b)はロイシン、(c)はイソロイシンのデータである。

【図8】混合物フロントルテストのデータとシミュレーション結果を比較した図である。ここで、(a)はロイシン、(b)はイソロイシン、(c)はパリンの結果である。

【図9】SMB実験の結果であり、SMB脱着剤ポートから流出する流出溶液に対するHPLC濃度分析の結果を示す図である。ここで、(a)はラフィネート濃度分析の結果であり、(b)は抽出物濃度分析の結果である。

【図10】SMB実験により得られたサンプルに対するHPLCの生データ(raw data)クロマトグラムである。ここで、(a)は分離対象混合物、(b)はラフィネート、(c)は抽出物のクロマトグラムである。

【図11】SMB実験の結果であり、カラムプロフィール(60.5ステップ)を示す図である。ここで、黒色の実線はパリンのシミュレーション結果、灰色の実線はイソロイシンのシミュレーション結果、黒色の点線はロイシンのシミュレーション結果、円形はパリンの実験結果、四角形はイソロイシンの実験結果、菱形はロイシンの実験結果である。

【図12】Chromalite PCG-600吸着剤に基づいて行ったSMB実験の結果であり、ラフィネートポートから流出する流出溶液に対するHPLC濃度分析の結果を示す図である。

【図13】Chromalite PCG-600吸着剤に基づいて行ったSMB実験の結果であり、抽出物ポートから流出する流出溶液に対するHPLC濃度分析の結果を示す図である。

【図14】Chromalite PCG-600吸着剤を用いて行ったSMB実験の結果であり、カラムプロフィール(44.5ステップ)を示す図である。ここで、黒色の実線はパリンのシミュレーション結果、灰色の実線はロイシンのシミュレーション結果、円形はパリンの実験結果、赤色の三角形はロイシンの実験結果である。

【発明を実施するための形態】

【0050】

以下、実施例を挙げて本発明の構成及び効果についてより具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を例示するものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

【0051】

アプローチ方法：パリン精製のクロマトグラフィー適用のための探索

10

20

30

40

50

1)モデルベースデザインアプローチ

新たな分離システムにおける連続工程を開発する上で最優先で考慮すべき事項が2つある。まず、開発期間中に要する費用と期間の最小化である。次に、開発される工程の最適状態が維持され、最大の生産性と最大の分離効率を得られる条件でなければならない。これら2つの条件をどちらも満たすためには、詳細モデル(detailed model)に基づく吸着及び物質伝達現象を正確に把握しなければならず、また、関連する様々なパラメータ値を得なければならない。このような詳細モデル及びパラメータに基づく工程設計のアプローチ方法をモデルベースデザインアプローチ(model-based design approach)という。本発明においても、このようなアプローチ方法によりパリンの連続分離を行うSMB工程を開発した。

10

【0052】

2)コンピュータシミュレーション

モデルベースデザインアプローチの核心となる段階の1つがコンピュータシミュレーションである。これは、カラム内の各成分の吸着及び物質伝達現象に対する詳細モデル式を数値解析的方法で解いてその解を得る過程をいう。このような数値解析的方法は膨大な計算量を要するので、コンピュータを用いて行う。

【0053】

シミュレーションに用いられるカラムモデル式には多くの種類があるが、そのうち正確性と効率性を考慮して集中質量移動モデル(lumped mass-transfer model)(非特許文献1)を本発明のシミュレーションモデルとした。集中質量移動モデルに基づくコンピュータシミュレーションは、各アミノ酸成分の基礎パラメータの測定と検証だけでなく、SMB工程の分離効率の検証にも活用された。さらに、このモデル式はSMB最適化ツールの製作にも用いた。

20

【0054】

3)SMB最適化ツール

モデルベースデザインアプローチにおいてコンピュータシミュレーションと共に核心的な役割を果たすものとしてSMB最適化ツールがある。このツールは、開発されるSMB工程の最適運転条件を得るために用いられる。この最適化ツールの製作のために優先的に必要なのが最適化アルゴリズムである。現在まで、SMBなどの複雑な形態の工程最適化においては、統計学的理論に立脚した遺伝子アルゴリズムが最も効率的であることが知ら

30

【0055】

本発明においても、パリンの連続分離工程の最適化のために、遺伝子アルゴリズムに基づくSMB最適化コンピュータプログラムを構築した。遺伝子アルゴリズム自体もこれまで発展を繰り返してきたが、本発明の最適化ツール製作段階においては、最新の遺伝子アルゴリズムといえるNSGA-II-JGアルゴリズム(非特許文献2)を基本アルゴリズムとして採用した。

【0056】

SMB最適化ツールの製作方法は、マイクロソフト・エクセルのソフトウェアのVBA(visual basic application)言語を用いて最適化アルゴリズムをコード化(coding)することにより、NSGA-II-JGアルゴリズムと詳細モデル式の計算が同時に行われるようにした。

40

【0057】

実験の準備

1)材料

分離対象混合物を構成する3つのアミノ酸成分のうち、パリンとロイシンはFlukaから購入し、イソロイシンはSigmaから購入した。アミノ酸を溶解するために用いた水は3次脱イオン蒸留水(Distilled Deionized Water, DDW)であり、Milli-Q system(Millipore)により得た。実験に用いた吸着剤は、Amberchrom CG161C(Rohm & haas)、Amberlite CG71C(Sigma Aldrich)、DIAIO

50

N S K 1 B (Mitsubishi Chemical)、A m b e r l i t e X A D - 7 H P (Sigma Aldrich)である。H P L C濃度分析に用いたメタノールは、B u r d i c k & J a c k s o n C o . (Muskegon, MI)から購入した。

【0058】

吸着剤の選定実験及び各物質の基礎パラメータの測定実験に用いたガラス材質のオムニフィットガラスカラム(Omnifit Glass Column)は、B i o c h e m i c a l F l u i d i c s C o . (Boonton, NJ)から購入し、前者の実験には長さ11.6cm、直径1.5cmのカラムを用い、後者の実験には長さ21.7cm、直径2.5cmのカラムを用いた。

【0059】

2)装置

シングルカラム実験装置

吸着剤の選定実験には、Y o u n g - L i n S P 9 3 0 DポンプとY o u n g - L i n U V 7 3 0 D検出器を用いた。この2つの装置の制御及びデータ処理は、A u t o c h r o - 3 0 0 0ソフトウェアにより行った。各吸着剤で充填されたカラム内にアミノ酸パルスを注入する際に用いたインジェクターはR h e o d y n e 7 7 2 5 iインジェクターであり、注入量は100 μ lとした。

【0060】

吸着剤の選定の完了後に行う各アミノ酸の基礎パラメータの測定実験においては、F P L C P - 9 2 0ポンプ及びW a t e r s 4 8 6 U V検出器、並びにA m e r s h a m F P L C c o l l e c t o r (Frac-900)を用いた。各詳細装置の制御とデータ収集は、U n i c o r n 5 . 1ソフトウェアにより行った。

【0061】

バリンの連続分離のための3-ゾーンSMB装置

図4に示す装置を自主的に組み立てて用いた。完成したSMB実験装置における脱着剤の流量速度と分離対象混合物の流量速度はY o u n g - L i n S P 9 3 0 Dポンプを用いてそれぞれ制御し、ラフィネート流量速度はI s m a t e c M C P - C P F I S M 9 1 9ポンプを用いて制御した。4つのポートが周期的に移動する効果を得るために、S T V a l c o ロータリーバルブ(VICI, Houston, TX)を用いた。図4a~図4cは前記S T v a l v eの作動模式図である。実験に用いたV a l c o ロータリーバルブはL a b v i e w 8 . 0ソフトウェアにより自動制御した。

【0062】

HPLC濃度分析装置

SMB実験により回収された物質の濃度測定のためにHPLC濃度分析装置を用いた。分析用カラムとしては、W a t e r s S y m m e t r y C - 1 8 カラム(250 \times 4.6mmID, particle size 5 μ m)を用いた。HPLC濃度分析に関する全てのデータの収集は、W a t e r s M i l l e n n i u mソフトウェアを用いて処理した。W a t e r s 5 1 5 H P L Cポンプを用いて移動相の流量速度を制御した。濃度分析のためのサンプルは、R h e o d y n e 9 7 2 5 iインジェクターを用いて分析用カラム内に注入し、注入量は20 μ lとした。試料の検出はW a t e r s 9 9 6 P D A検出器を用いた。

【0063】

バリンのフロントルテストにより得られたサンプルの濃度分析は、Y o u n g - L i n S P 9 3 0 DポンプとY o u n g - L i n U V 7 3 0 D検出器を用いた。Y o u n g - L i nポンプと検出器の制御及びデータ処理は、A u t o c h r o - 3 0 0 0ソフトウェアにより行った。実験により得られたサンプルは、R h e o d y n e 7 7 2 5 iインジェクターを用いて分析用カラム内に注入し、注入量は20 μ lとした。

【実施例1】

【0064】

バリンの分離に適した吸着剤の選定

1)実験方法

10

20

30

40

50

バリンからロイシンとイソロイシンを分離する可能性のある4種類の通常の吸着剤、例えば、Amberchrom CG161C (Rohm & Haas)、Amberlite CG71C (Sigma Aldrich)、DIAION SK1B (Mitsubishi Chemical)、Amberlite XAD-7HP (Sigma Aldrich)を用いて、最も適する吸着剤を選定するための実験を一連のパルステスト方式で行った。

【0065】

前記パルステストの条件は次の通りである。3つのアミノ酸の各濃度は2g/Lとし、注入量は100μlとした。移動相の流量は2ml/分とした。

【0066】

2) 実験結果

上記結果を図5に示す。図5に示すように、Amberchrom CG161C吸着剤を除く他の吸着剤は、バリンの選択的分離が難しいことが確認された。上記結果から、バリンを分離するためのSMB工程の構築には、Amberchrom CG161C吸着剤が最も適することが確認された。

【実施例2】

【0067】

Amberchrom CG161Cカラムの空隙率の測定

1) 実験方法

前記実施例1で選定したAmberchrom - CG161C吸着剤の空隙率を測定した。まず、前記吸着剤をカラムに充填し、その後粒子間空隙率(inter-particle porosity)(e_b)を測定する実験を行った。実施例1と同様の方式で行ったが、実施例1とは異なり、分離しようとする分離対象物質の代わりに粒子間空隙率の測定に適したトレーサー分子をカラム内に注入した。用いたトレーサー分子はブルーデキストランであり、注入濃度は1g/Lとし、流量は4ml/分とし、注入量は500μlとした。

【0068】

2) 実験結果

上記実験の結果、カラムの粒子間空隙率の値は0.391であった。重要な情報の一つである粒子内空隙率は文献に報告されている値を用いたが、この値は0.737である(非特許文献3)。

【実施例3】

【0069】

Amberchrom CG161C相におけるバリン、ロイシン、イソロイシンの基礎パラメータの測定

吸着係数の測定

1) 実験方法

分離対象混合物の各成分に該当するバリン、ロイシン、イソロイシンの基礎パラメータの測定のために階段式フロントルテスト(multiple frontal test)を行った。階段式フロントルテストは、分離しようとする各物質の吸着平衡データを得て、そのデータに基づいて吸着モデル式を作成すると共に関連吸着パラメータを決定するために行われる実験である。

【0070】

具体的には、階段式フロントルテストにおいて、2台のポンプを用い、一方のポンプにはDDW、他方のポンプにはバリン、ロイシン又はイソロイシン溶液を満たした。その後、カラム内の吸着剤相と移動相間の平衡が得られるまで、バリン、ロイシン又はイソロイシン溶液をカラム内部に注入し続けた。平衡状態では吸着剤粒子間の濃度と吸着剤内部の濃度がどちらもカラム内に注入されるバリン、ロイシン又はイソロイシン溶液の濃度と同じ濃度に維持されるので、簡単な物質収支式を立てると吸着剤相における吸着濃度が直ちに得られる。カラム内部の濃度が平衡をなすと、分離対象混合物溶液の比率を前段階より高くし、新たに平衡状態を維持するようにした。再度、この平衡状態に対して物質収支式を立て、吸着剤相における吸着濃度を計算した。このような階段式フロントルテストを行

10

20

30

40

50

うことにより、各アミノ酸成分に対するステップタイムをパルステストの結果から得られた滞留時間の2～3倍に決定した。

【0071】

また、各アミノ酸成分に対する階段式フロントルテストは全5段階とし、ステップタイムとしてバリンは40分、ロイシンは70分、イソロイシンは70分に設定した。また、全ての試料の濃度は5g/L、流量は4ml/分で一定に維持した。ロイシンとイソロイシンはUV検出器において205nm、218nmの波長で実験を行った。それに対して、バリンの場合は、ロイシンやイソロイシンの実験におけるオンライン・モニタリング方式とは異なり、ダイレクトHPLC分析方式(カラム流出液を逐一採取してその濃度をHPLC装置で分析する方式)を採用した。HPLC分析条件は、10%メタノール水溶液を移動相として用い、注入量を20 μ lとし、流量を0.5ml/分とした。分析前に標準溶液を用いて自主的に検量線(calibration curve)を決定した。その結果を図6に示し、それに基づいて吸着平衡データを算出し、その結果を図7に示す。

【0072】

2)実験結果

図7に示すように、バリン、ロイシン、イソロイシンの全てがAmberchrom CG161C相で線形吸着関係を示す。よって、各アミノ酸成分を線形吸着モデル式にフィッティングし、そこから線形吸着係数を決定した。決定した吸着係数の値を下記表1に示す。

【0073】

物質伝達係数の決定

1)実験方法

吸着係数と共にもう一つの重要な基礎パラメータといえる物質伝達係数を下記の方法で決定した。

【0074】

まず、軸方向分散係数(axial dispersion coefficient)と境膜物質移動係数(film mass-transfer coefficient)は、Chung & Wen correlation(非特許文献4)とWilson & Geankopolis correlation(非特許文献5)を用いてそれぞれ予測し、分子拡散係数(molecular diffusivity)は、Wilke & Chang correlation(非特許文献6)を用いて計算した。また、粒子内拡散係数(intra-particle diffusivity)は、フロントル実験のデータと集中質量移動モデルに基づくシミュレーション結果を互いにフィッティングして決定した。

【0075】

2)実験結果

前述したように決定された分子拡散率と粒子内拡散率の値を下記表1に示す。

【0076】

【表1】

	線形吸着係数	粒子内拡散係数 ($\text{cm}^2/\text{分}$)	分子拡散係数 ($\text{cm}^2/\text{分}$)
ロイシン	5.527	5.40×10^{-5}	5.40×10^{-4}
イソロイシン	4.361	3.00×10^{-4}	4.35×10^{-4}
バリン	0.926	3.00×10^{-4}	5.10×10^{-4}

【0077】

前述したように決定された吸着係数及び物質伝達係数の値の適正性を確認するために、この値を代入したモデルシミュレーション結果とフロントル実験結果を比較して図6に示す。

【0078】

図6に示すように、シミュレーション結果と実験データが一致することが確認された。よって、前述したように決定された基礎パラメータの値は、後続して行われるSMB工程の最適化に十分に活用することができる。

【実施例4】

【0079】

混合物フロントル実験による基礎パラメータの検証

1) 実験方法

前記実施例3で決定された基礎パラメータ値の検証のために、混合物フロントル実験を行った。この実験においては、実施例3とは異なり、3つのアミノ酸を全て含む混合物溶液を分離対象混合物として用いてフロントル実験を行った。

10

【0080】

また、実施例3で決定された基礎パラメータ値と混合物フロントル実験条件に基づいてモデルシミュレーションを行った。さらに、そのシミュレーション結果を混合物フロントル実験データと比較した。その結果を図8に示す。

【0081】

2) 実験結果

図8に示すように、実験データとシミュレーション結果が一致することが確認された。これは、実施例3で決定された基礎パラメータ値は、純粋な成分のときだけでなく、混合物状態においても、各アミノ酸のカラム内の挙動を説明することができることを意味する。また、各アミノ酸間の相互作用がほとんどないことを意味する。

20

【実施例5】

【0082】

バリンの連続分離のための工程の最適化

最適化過程で重点を置いたのは、目標分離対象物質であるバリンの高純度と高収率を保持しつつバリンの生産性を最大化することである。ここで、バリンの生産性は下記式のように定義される。

【0083】

(式1)

$$\text{バリンの生産性(Productivity)} = Q_{\text{ra f}} \times C_{\text{ra f, valine}}$$

30

(上記式において、 $Q_{\text{ra f}}$ はラフィネートポートにおける流量速度を意味し、 $C_{\text{ra f, valine}}$ はラフィネートポートにおけるバリンの濃度を意味する。)

【0084】

バリンの生産性を目的関数(objective function)に設定し、バリンの純度と収率を制約条件(constraint)に設定して最適化過程を行った。具体的な最適化過程を要約すると次の通りである。

【0085】

$$\text{Max } J = \text{Productivity} [Q_{\text{feed}}, Q_{\text{ra f}}, t_{\text{sw}}]$$

$$\text{Subject to Valine purity} = 98\%$$

$$\text{Valine yield} = 98\%$$

40

$$\text{Fixed variables } Q_{\text{des}} = 5 \text{ mL / 分}$$

$$C_{\text{feed}} \text{ for each component} = 5 \text{ g / L}$$

$$LC = 21.7 \text{ cm}, d_c = 2.5 \text{ cm}$$

(上記式において、 Q_{feed} と Q_{des} は分離対象混合物の流量速度と脱着剤の流量速度をそれぞれ意味し、 t_{sw} はスイッチングタイムを意味する。)

【0086】

上記式に従って、本発明の3-ゾーンSMB装置を用いたバリン分離工程を最適化するために、NSGA-II-JGアルゴリズムに基づく最適化コンピュータプログラムを自主的にコード化し、前記コンピュータプログラムをAspenシミュレーターに接続して該当工程を最適化した。その結果を下記表2に示す。

50

【 0 0 8 7 】

【 表 2 】

入口及び出口の流量速度 (mL/分)	Q_{feed}	2.42
	Q_{raf}	2.71
	Q_{ext}	4.71
	Q_{des}	5.00
ゾーンの流量速度 (mL/分)	Q_1	5.00
	Q_2	7.42
	Q_3	4.71
スイッチングタイム (分)		21.33
バリンの純度 (%)		98.0
バリンの収率 (%)		98.1

10

【 実施例 6 】

20

【 0 0 8 8 】

S M B 実験

こうして得られたデータを用いて、本発明によるバリンの連続分離装置でバリンを分離し、その収率と純度を次のように測定した。

【 0 0 8 9 】

1) 実験方法

図 4 に示す装置と、前記実施例 5 で得られた最適化条件を用いて S M B 実験を行った。カラムは Amberchrom CG161C を用いた。

【 0 0 9 0 】

まず、実験を始める前に、カラムの連結から行った。ここで、脱着剤(水)の流量速度を 2 mL / 分に維持し、他のポンプの作動を中止した。それぞれのバルブとカラムを連結した。ここで、カラム内部に空気が入らないように注意した。カラムの全ての連結を終え、その後脱着剤の流量速度を目標値まで増加させた。S M B 実験は分離対象混合物溶液が注入される時点から始まるので、分離対象混合物ポンプを作動させると同時に Labview 8.0 ソフトウェアを実行した。Labview 8.0 によりバルブのスイッチングとスイッチングタイムを同時に制御した。

30

【 0 0 9 1 】

S M B 実験は周期的定常状態(cyclic steady state)に達するまで行った。25 番目のステップ以降は定常状態に達することが確認された。よって、S M B 実験は、それよりにはるかに多いステップである 60 番目のステップまで行った。S M B 実験が行われている間、ステップ毎に各排出ポートから溶出する溶液の濃度を H P L C 装置を用いて分析した。また、カラムプロフィールの決定のために、最後のステップで関連サンプルを採取した。このために、S M B 実験が 60.5 ステップに達したときに、駆動している全てのポンプを同時に停止した。そして、バルブに連結されたカラムの下部を開けてカラムから出てくる溶液を回収し、その濃度を分析した。H P L C 分析条件は、10%メタノール水溶液を移動相として用い、注入量を 20 μ l とし、流量を 0.5 mL / 分とした。分析前に標準溶液を用いて自主的に検量線を決定した。その結果を図 9 に示す。図 9 において(a)はラフィネート濃度分析の結果であり、(b)は抽出物濃度分析の結果である。

40

【 0 0 9 2 】

2) 実験結果

50

図9の(a)に示すように、ラフィネート溶液内のほとんどの成分がバリンであり、不純物に該当するロイシンとイソロイシンはほとんど存在しないことが確認された。これは、バリンの純度が非常に高く維持されていることを意味する。また、図9の(b)に示すように、抽出物濃度分析の結果においてほとんどの成分がロイシンとイソロイシンであり、検出されたバリンの量は無視できるほど少ないことが確認された。これは、抽出物ポートにおけるバリンの損失が非常に少ないことを意味する。

【0093】

また、前記SMB実験を行うと共に該当SMB工程に対するコンピュータシミュレーションを同時に行い、その結果をラフィネートと抽出物のHPLC濃度分析データと直接比較した。図9に示すように、シミュレーション結果とSMB実験データが一致することが分かる。

10

【0094】

このようなSMB実験により分離されたバリンの最終純度と収率の定量的測定のために、最後の6つのステップで得られた流出溶液を同じ割合で混合し、その後その溶液についてHPLC濃度分析を行った。分析された濃度データに基づいてバリンの純度と収率を計算し、その結果を下記表3に示す。

【0095】

【表3】

	実験	シミュレーション
収率(%)	98.25	98.01
純度(%)	97.50	98.03

20

【0096】

前記表3と図9の結果から、本発明のAmberchrom CG161Cを用いたSMB工程は、バリンの連続分離と高純度及び高収率の保持において非常に優れることが確認された。これに関する実験による実証データとして、図10にHPLC濃度分析の生クロマトグラム(HPLCの生データ)を示す。

【0097】

まず、分離対象混合物溶液に対するHPLCの生データ(図10のa)においては、3つのアミノ酸成分の全てが大きいサイズのピークを示している。バリンの生産ポートに該当するラフィネートポートの流出液に対するHPLCの生データ(図10の(b))においては、バリン成分のみ大きいサイズのピークを明確に示しているのに対して、イソロイシンのピークは非常に小さいサイズを示しており、ロイシンのピークはほとんど見出されなかった。不純物のみ得られるように設定された抽出物ポートの流出液に対するHPLCの生データ(図10の(c))においては、バリン成分のピークはほぼ無視できるのに対して、他の2つのアミノ酸成分は大きいサイズのピークを示している。このような一連のHPLCの生データにより、本発明におけるバリンの連続分離SMB実験が成功したことが再度確認された。

30

【0098】

前述したラフィネートと抽出物における濃度グラフ以外に、カラムプロフィールデータも重要なSMB実験データの1つである。このような理由から、カラムプロフィールデータの確保に必要なサンプルを最終スイッチング周期の中間時間、すなわち60.5ステップで採取した。そのサンプル濃度を分析し、その結果を図12に示す。図11に示すように、カラムプロフィールデータもシミュレーション結果と一致することが確認された。これはカラムプロフィールデータもSMB実験が成功したことを証明するものである。すなわち、SMBカラム内の各アミノ酸成分のsolute waveがバリンの高純度及び高収率分離に最大限有利に分布していることが実験的に検証されたものであるといえる。

40

【0099】

よって、前述した全てのSMB実験データ(出口ポートにおける濃度グラフ、カラムプ

50

ロフィール)により、本発明のAmberchrom CG161Cを用いたSMB工程が産業的規模のバリン連続分離過程に十分に適用できることが分かった。

【0100】

前述したSMB工程は、Amberchrom CG161C吸着剤に基づいて最適化され、実験的に検証された。この吸着剤以外に、バリン分離に効果が検証されているChromalite PCG-600に基づくSMB工程も最適化を行い、それに対する実験も行った。その結果、Chromalite PCG-600吸着剤も、SMB工程に適用するとバリンの連続分離に十分に活用できることが確認された。

【実施例7】

【0101】

実際の発酵混合物における実験

上記実験と同様の方法で実際の発酵混合物を用いて実験を行った。

【0102】

実際の発酵混合物内のバリン及びロイシン成分の基礎パラメータ(吸着係数及び物質伝達係数)を測定するために、発酵混合物溶液をChromalite PCG600C resinが充填されたシングルカラム内に注入し、カラム流出物の各時間の濃度を測定する混合物フロントル実験を行った。

【0103】

上記実験で得られた濃度プロフィールデータとインバース法(inverse method)を用いてバリンとロイシンの基礎パラメータを決定し、その結果を表4に示す。

【0104】

【表4】

	吸着等温線パラメーター	粒子内拡散係数 ($\text{cm}^2/\text{分}$)	分子拡散係数 ($\text{cm}^2/\text{分}$)
バリン	0.6565	1.20×10^{-5}	5.10×10^{-4}
ロイシン	3.925	1.75×10^{-5}	5.40×10^{-4}

【0105】

表4に示す基礎パラメータに基づいて、実際の発酵混合物からバリンとロイシンを連続して分離するPCG600C-SMB工程を最適設計した。このSMB工程も、本発明の新たなポート配置順序に基づくものであり、カラムの構成は図3に示すように3-ゾーン構造を採用した。

【0106】

このようなPCG600C-SMB工程の最適化過程で重点を置いたのは、バリンの高収率とロイシンの高除去率を保持しつつバリンの生産性を最大化することである。このような最適化目標を達成するために、バリンの生産性を目的関数に設定し、バリンの収率とロイシンの除去率を制約条件に設定して最適化過程を行った。具体的な最適化過程を要約すると次の通りである。 Q_{des} はバリンの純度及び収率を増加させることのできる範囲内で調節された値である。

【0107】

Max $J = \text{Productivity} [Q_{feed}, Q_{raf}, t_{sw}]$

Subject to Valine yield = 97%

Leucine removal efficiency = 90%

Fixed variables $Q_{des} = 6 \text{ mL} / \text{分}$

$LC = 21.7 \text{ cm}$, $d_c = 2.5 \text{ cm}$

Column configuration = 1 - 1 - 2

(上記式において、 Q_{feed} と Q_{des} は分離対象混合物の流量速度と脱着剤の流量

10

20

30

40

50

速度をそれぞれ意味し、 $t_{s,w}$ はスイッチングタイムを意味する。)

【0108】

上記式によるPCG600C-SMB工程を最適化するために、NSGA-II-JGアルゴリズムに基づく最適化コンピュータプログラムを自主的にコード化し、前記コンピュータプログラムをAspenシミュレーターに接続して該当工程を最適化した。最適化結果を表5に示す。

【0109】

【表5】

入口及び出口の流量速度 (mL/分)	Qfeed	3.27
	Qraf	3.93
	Qext	5.34
	Qdes	6.00
ゾーンの流量速度 (mL/分)	Q1	6.00
	Q2	9.27
	Q3	5.34
スイッチングタイム (分)		17.85

10

20

【0110】

表5の最適化結果を実験的に検証するために、PCG600C-SMB工程装置を自主的に組み立てた。組み立てた工程装置の模式図を図4に示す。

【0111】

表2の最適化結果と図4の工程装置を用いて、実際の発酵混合物を対象とするバリン分離SMB実験を行った。この実験に用いた実際の発酵混合物内のバリンとロイシンの濃度は、それぞれ71.8 g/Lと0.742 g/Lであった。

【0112】

実際の発酵混合物を対象とするバリン分離SMB実験の結果を図12～図14に示す。図12のラフィネートの結果に示すように、バリンの高濃度回収がシミュレーションで予測したレベルで行われており、ロイシンの流出濃度レベルは無視できるほど低い。図13の抽出物の結果に示すように、ロイシンがシミュレーションで予測したレベルで好適に除去されていることが確認された。また、抽出物ポートにおけるバリンの損失は非常に少ないことが確認された。これらの実験結果は、PCG600C-SMB工程によるバリンとロイシンの連続分離において、バリンの高収率とロイシンの高除去率が十分に保持されることを意味するものである。

30

【0113】

図12及び図13の結果と共に、図14のカラムプロファイル結果も、バリンとロイシンの連続分離が成功したことを示すものである。図14に示すように、各カラム内のバリンとロイシンの濃度分布は、バリンの高収率回収とロイシンの高除去率保持に非常に有利であることが確認された。これらの結果から、実際の発酵混合物内のバリンの99.7%をラフィネートポートにより回収することができ、それと同時にロイシンの98.0%を抽出物ポートにより除去することができることが分かる。

40

【符号の説明】

【0114】

D：脱着剤ポート

F：フィードポート

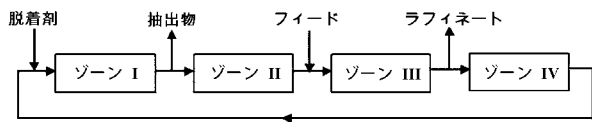
R：ラフィネートポート

F：抽出物ポート

50

10, 20, 30 : ロータリーバルブ
40, 50, 60 : クロマトグラフィーゾーン
10a, 10b, 10c, 20a, 20b, 20c, 30a, 30b, 30c : 連結ポート

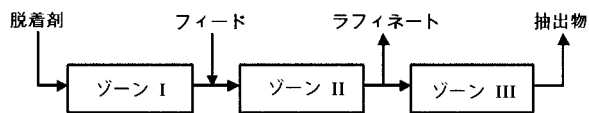
【図 1】



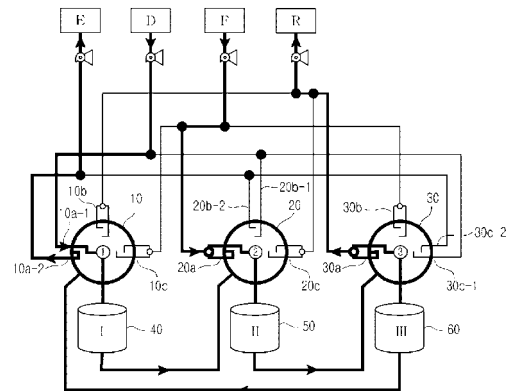
【図 2】



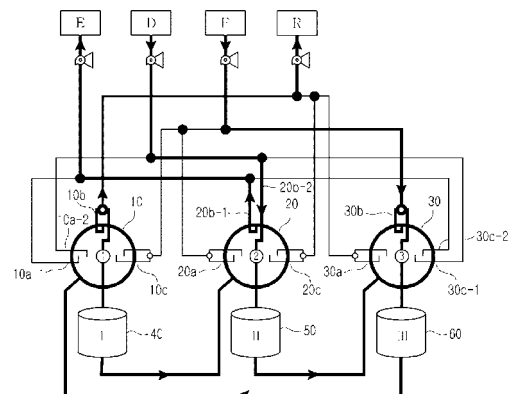
【図 3】



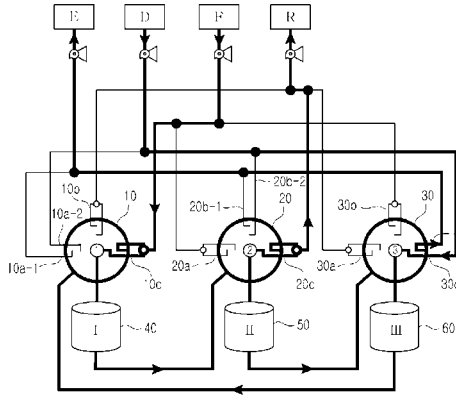
【図 4 a】



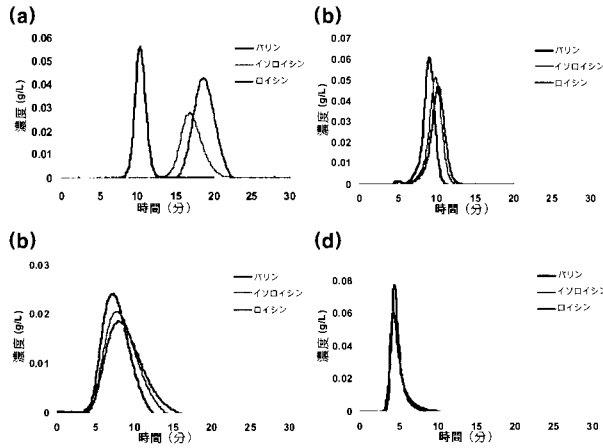
【図 4 b】



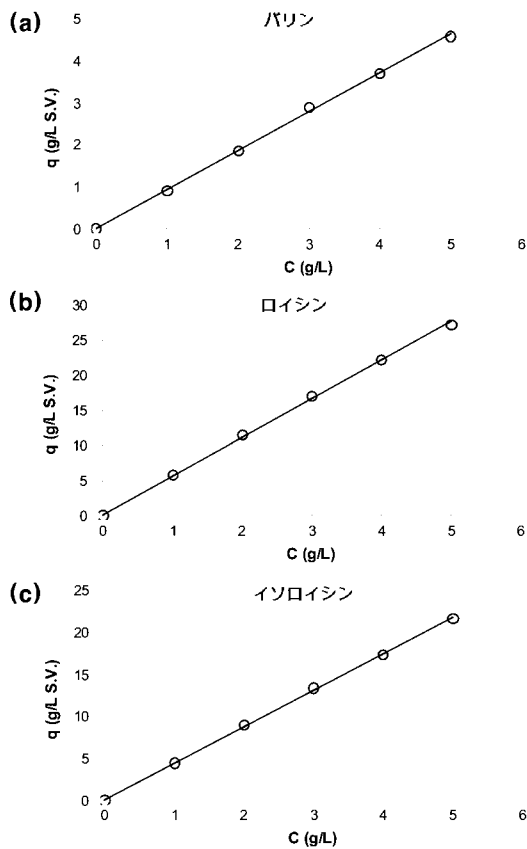
【 図 4 c 】



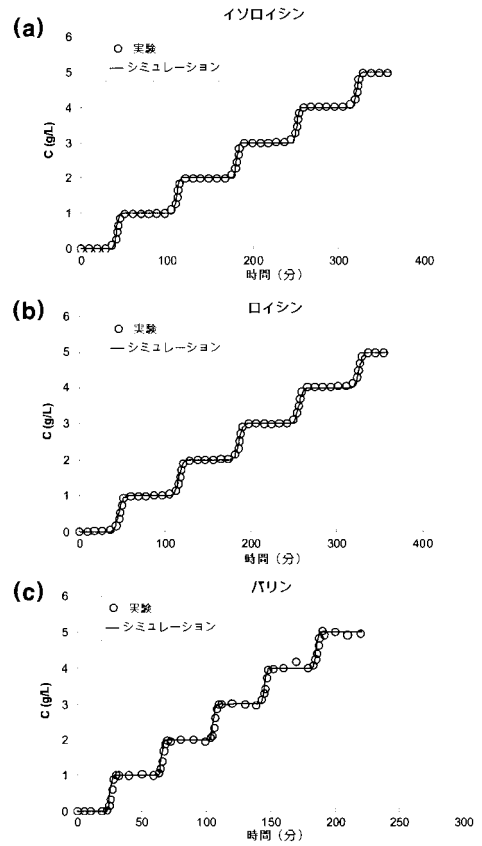
【 図 5 】



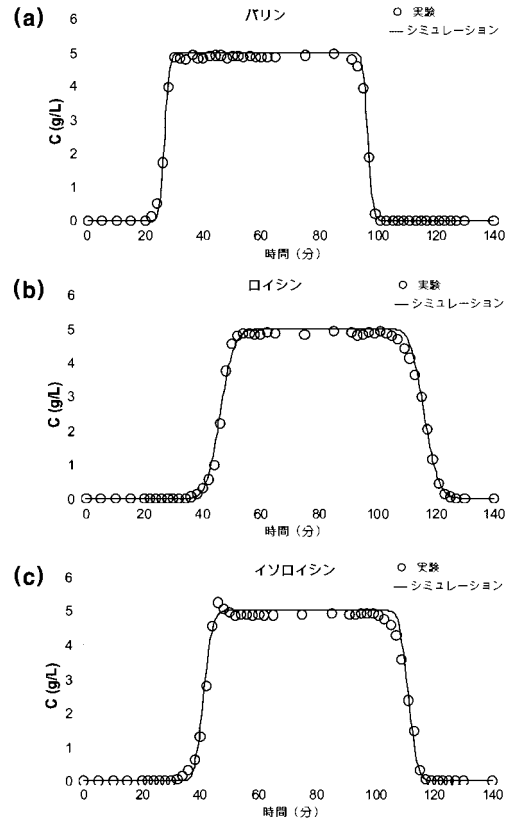
【 図 7 】



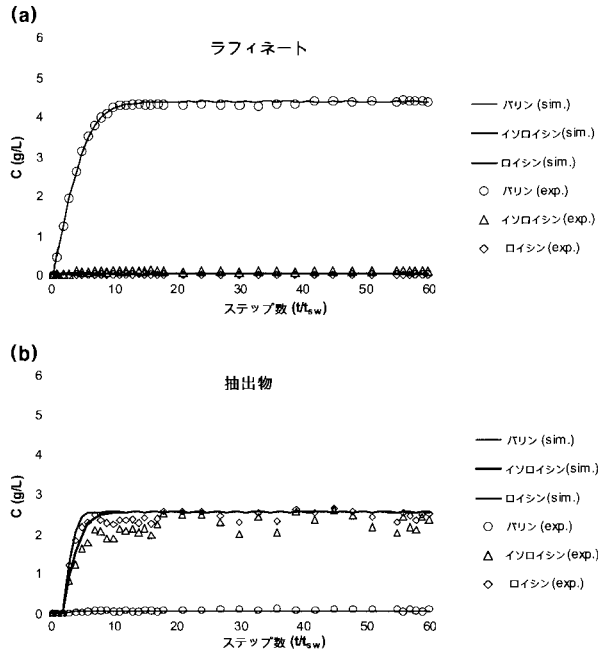
【 図 6 】



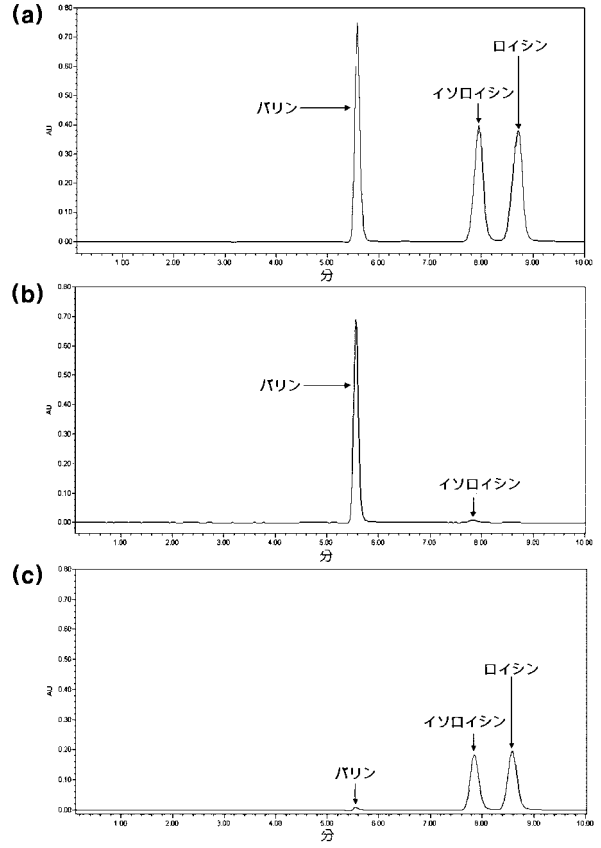
【 図 8 】



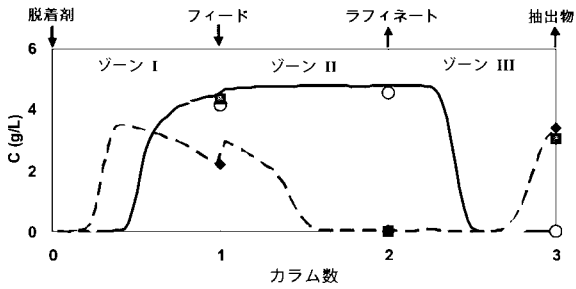
【 図 9 】



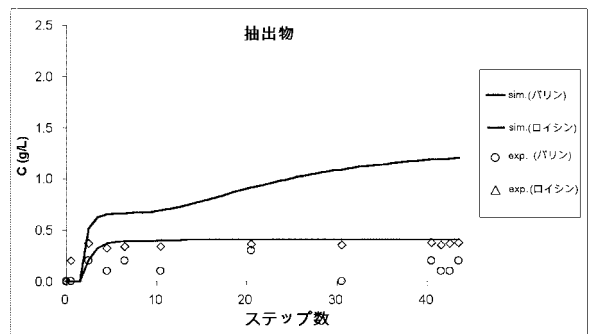
【 図 10 】



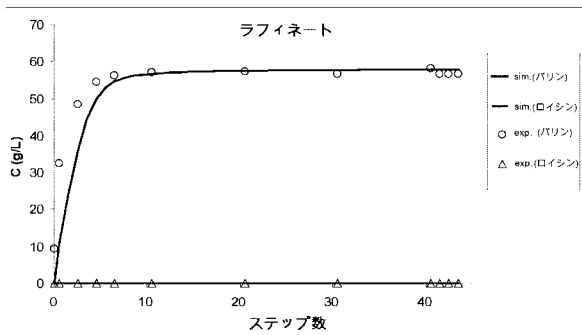
【 図 11 】



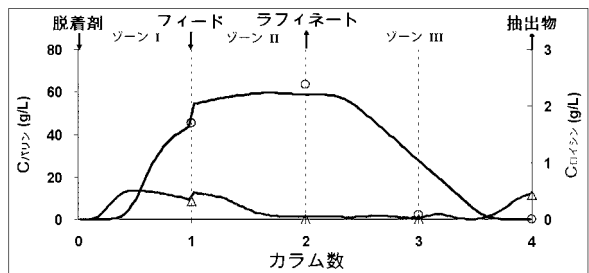
【 図 13 】



【 図 12 】



【 図 14 】



【手続補正書】

【提出日】平成29年8月24日(2017.8.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

パリンの連続的分離装置であって、該装置が、

該装置に脱着剤を供給するように構成された脱着剤ポート(D)；

該装置にパリンを含む混合物を供給するように構成されたフィードポート(F)；

該混合物から分離されたパリンを該装置の外部に流出させるように構成されたラフィネートポート(R)；

該混合物から分離されたその他の物質を該装置の外部に流出させるように構成された抽出物ポート(E)；

第1ロータリーバルブ(10)、第2ロータリーバルブ(20)及び第3ロータリーバルブ(30)として特定される3つのみのロータリーバルブ；並びに

第1クロマトグラフィーゾーン(40)、第2クロマトグラフィーゾーン(50)及び第3クロマトグラフィーゾーン(60)として特定される3つのみのクロマトグラフィーゾーンを含み、

該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側と該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側の間に該第1ロータリーバルブ(10)として特定される1つのみのロータリーバルブが配置され、該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側と該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側とが、該第1ロータリーバルブ(10)により流体連結され、

該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側と該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側の間に該第2ロータリーバルブ(20)として特定される1つのみのロータリーバルブが配置され、該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側と該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側とが、該第2ロータリーバルブ(20)により流体連結され、

該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側と該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側の間に該第3ロータリーバルブ(30)として特定される1つのみのロータリーバルブが配置され、該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側と該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側とが、該第3ロータリーバルブ(30)により流体連結され、

該第1ロータリーバルブ(10)が、該第1ロータリーバルブ(10)の回転方向に沿って順次配置された第1連結ポート(10a)、第2連結ポート(10b)及び第3連結ポート(10c)を含み、

該第2ロータリーバルブ(20)が、該第2ロータリーバルブ(20)の回転方向に沿って順次配置された第1連結ポート(20a)、第2連結ポート(20b)及び第3連結ポート(20c)を含み、

該第3ロータリーバルブ(30)が、該第3ロータリーバルブ(30)の回転方向に沿って順次配置された第1連結ポート(30a)、第2連結ポート(30b)及び第3連結ポート(30c)を含み、

該装置は、該第1、第2及び第3ロータリーバルブが、同時に各ロータリーバルブの回転方向に回転するとき、パリンの連続分離のために、第1作動、第2作動及び第3作動を連続的に行い、ここで、

該第1作動において、該脱着剤ポート(D)は、該第1ロータリーバルブ(10)の第1連結ポート(10a)を介して該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側に流体連結さ

れ、該フィードポート(F)は、該第2ロータリーバルブ(20)の第1連結ポート(20a)を介して該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側に流体連結され、該ラフィネートポート(R)は、該第3ロータリーバルブ(30)の第1連結ポート(30a)を介して該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側に流体連結され、かつ該抽出物ポート(E)は、該第1ロータリーバルブ(10)の第1連結ポート(10a)を介して該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側に流体連結され、

該第2作動において、該脱着剤ポート(D)は、該第2ロータリーバルブ(20)の第2連結ポート(20b)を介して該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側に流体連結され、該フィードポート(F)は、該第3ロータリーバルブ(30)の第2連結ポート(30b)を介して該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側に流体連結され、該ラフィネートポート(R)は、該第1ロータリーバルブ(10)の第2連結ポート(10b)を介して該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側に流体連結され、かつ該抽出物ポート(E)は、該第2ロータリーバルブ(20)の第2連結ポート(20b)を介して該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側に流体連結され、かつ

該第3作動において、該脱着剤ポート(D)は、該第3ロータリーバルブ(30)の第3連結ポート(30c)を介して該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側に流体連結され、該フィードポート(F)は、該第1ロータリーバルブ(10)の第3連結ポート(10c)を介して該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側に流体連結され、該ラフィネートポート(R)は、該第2ロータリーバルブ(20)の第3連結ポート(20c)を介して該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側に流体連結され、かつ該抽出物ポート(E)は、該第3ロータリーバルブ(30)の第3連結ポート(30c)を介して該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側に流体連結され、

ポリスチレンジビニルベンゼンポリマーが、脱着剤として使用される、前記バリンの連続的分離装置。

【請求項2】

前記第1ロータリーバルブ(10)の第1連結ポート(10a)は、流入ポート(10a-1)及び流出ポート(10a-2)を含み、該流入ポート(10a-1)及び流出ポート(10a-2)は、前記第1作動時に開放されて、前記脱着剤ポート(D)は該流入ポート(10a-1)を介して前記第1クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側に流体連結され、かつ前記抽出物ポート(E)は該流出ポート(10a-2)を介して前記第3クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側に流体連結され、かつ該流入ポート(10a-1)及び流出ポート(10a-2)は、前記第2及び第3作動時に閉鎖され、

該第1ロータリーバルブ(10)の第2連結ポート(10b)は、該第2作動時に開放されて、前記ラフィネートポート(R)は該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側に流体連結され、かつ該第2連結ポート(10b)は、該第1及び第3作動時に閉鎖され、

該第1ロータリーバルブ(10)の第3連結ポート(10c)は、該第3作動時に開放されて、前記フィードポート(F)は該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側に流体連結され、かつ該第3連結ポート(10c)は、該第1及び第2作動時に閉鎖され、

前記第2ロータリーバルブ(20)の第1連結ポート(20a)は、該第1作動時に開放されて、該フィードポート(F)は前記第2クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側に流体連結され、かつ該第1連結ポート(20a)は、第2及び第3作動時に閉鎖され、

該第2ロータリーバルブ(20)の第2連結ポート(20b)は、流入ポート(20b-1)及び流出ポート(20b-2)を含み、該流入ポート(20b-1)及び流出ポート(20b-2)は、該第2作動時に開放されて、該脱着剤ポート(D)は該流入ポート(20b-1)を介して該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側に流体連結され、かつ該抽出物ポート(E)は該流出ポート(20b-2)を介して該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側に流体連結され、かつ該流入ポート(20b-1)及び流出ポート(20b-2)は、該第1及び第3作動時に閉鎖され、

該第2ロータリーバルブ(20)の第3連結ポート(20c)は、該第3作動時に開放されて、該ラフィネートポート(R)は該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側に流体

連結され、かつ該第3連結ポート(20c)は、該第1及び第2作動時に閉鎖され、

前記第3ロータリーバルブ(30)の第1連結ポート(30a)は、該第1作動時に開放されて、該ラフィネートポート(R)は該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側に流体連結され、かつ該第1連結ポート(30a)は、該第2及び第3作動時に閉鎖され、

該第3ロータリーバルブ(30)の第2連結ポート(30b)は、第2作動時に開放されて、該フィードポート(F)は該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側に流体連結され、かつ該第2連結ポート(30b)は、該第1及び第3作動時に閉鎖され、かつ

該第3ロータリーバルブ(30)の第3連結ポート(30c)は、流入ポート(30c-1)及び流出ポート(30c-2)を含み、該流入ポート(30c-1)及び流出ポート(30c-2)は、該第3作動時に開放されて、該脱着剤ポート(D)は該流入ポート(30c-1)を介して該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側に流体連結され、かつ該抽出物ポート(E)は該流入ポート(30c-2)を介して該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側に流体連結され、かつ該流入ポート(30c-1)及び流出ポート(30c-2)は、該第1及び第2作動時に閉鎖される、

請求項1記載のバリンの連続的分離装置。

【請求項3】

前記混合物が、その他の物質としてロイシンとイソロイシンの少なくとも一つを含む、請求項1記載のバリンの連続的分離装置。

【請求項4】

バリンの連続的分離装置を使用するバリンの連続分離方法であって、

該装置が、

該装置に脱着剤を供給するように構成された脱着剤ポート(D)；

該装置にバリンを含む混合物を供給するように構成されたフィードポート(F)；

該混合物から分離されたバリンを該装置の外部に流出させるように構成されたラフィネートポート(R)；

該混合物から分離されたその他の物質を該装置の外部に流出させるように構成された抽出物ポート(E)；

第1ロータリーバルブ(10)、第2ロータリーバルブ(20)及び第3ロータリーバルブ(30)として特定される3つのみのロータリーバルブ；並びに

第1クロマトグラフィーゾーン(40)、第2クロマトグラフィーゾーン(50)及び第3クロマトグラフィーゾーン(60)として特定される3つのみのクロマトグラフィーゾーンを含み、

該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側と該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側の間に該第1ロータリーバルブ(10)として特定される1つのみのロータリーバルブが配置され、該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側と該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側とが、該第1ロータリーバルブ(10)により流体連結され、

該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側と該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側の間に該第2ロータリーバルブ(20)として特定される1つのみのロータリーバルブが配置され、該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側と該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側とが、該第2ロータリーバルブ(20)により流体連結され、

該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側と該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側の間に該第3ロータリーバルブ(30)として特定される1つのみのロータリーバルブが配置され、該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側と該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側とが、該第3ロータリーバルブ(30)により流体連結され、

該方法は、バリンの連続分離のために、第1作動、第2作動及び第3作動を連続的にを行い、

ここで、該方法は、

該第 1 作動において、該脱着剤ポート(D)を、該第 1 ロータリーバルブ(10)により該第 1 クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側に流体連結させること、該フィードポート(F)を、該第 2 ロータリーバルブ(20)により該第 2 クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側に流体連結させること、該ラフィネートポート(R)を、該第 3 ロータリーバルブ(30)により該第 2 クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側に流体連結させること、及び該抽出物ポート(E)を、該第 1 ロータリーバルブ(10)により該第 3 クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側に流体連結させること；

該第 2 作動において、該脱着剤ポート(D)を、該第 2 ロータリーバルブ(20)により該第 2 クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側に流体連結させること、該フィードポート(F)を、該第 3 ロータリーバルブ(30)により該第 3 クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側に流体連結させること、該ラフィネートポート(R)を、該第 1 ロータリーバルブ(10)により該第 3 クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側に流体連結させること、及び該抽出物ポート(E)を、該第 2 ロータリーバルブ(20)により該第 1 クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側に流体連結させること、並びに

該第 3 作動において、該脱着剤ポート(D)を、該第 3 ロータリーバルブ(30)により該第 3 クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側に流体連結させること、該フィードポート(F)を、該第 1 ロータリーバルブ(10)により該第 1 クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側に流体連結させること、該ラフィネートポート(R)を、該第 2 ロータリーバルブ(20)により該第 1 クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側に流体連結させること、及び該抽出物ポート(E)を、該第 3 ロータリーバルブ(30)によって該第 2 クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側に流体連結させること

を含み、

ポリスチレンジビニルベンゼンポリマーが、脱着剤として使用される、前記方法。

【請求項 5】

前記第 1 ロータリーバルブが、第 1 連結ポート、第 2 連結ポート及び第 3 連結ポート(10a、10b、10c)を含み、

前記方法が、

前記第 1 作動時には、該第 1 連結ポート(10a)が開放されて、前記脱着剤ポート(D)を前記第 1 クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側に流体連結させ、前記抽出物ポート(E)を前記第 3 クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側に流体連結させること、及び該第 2 連結ポート及び第 3 連結ポート(10b、10c)が閉鎖されること；

前記第 2 作動時には、該第 2 連結ポート(10b)が開放されて、前記ラフィネートポート(R)を該第 3 クロマトグラフィーゾーン(60)の下流側に流体連結させること、及び該第 1 連結ポート及び第 3 連結ポート(10a、10c)が閉鎖されること；並びに

前記第 3 作動時には、該第 3 連結ポート(10c)が開放されて、前記フィードポート(F)を該第 1 クロマトグラフィーゾーン(40)の上流側に流体連結させること、及び該第 1 連結ポート及び第 2 連結ポート(10a、10b)が閉鎖されること

を含む、請求項 4 記載のバリンの連続分離方法。

【請求項 6】

前記第 2 ロータリーバルブが、第 1 連結ポート、第 2 連結ポート及び第 3 連結ポート(20a、20b、20c)を含み、

前記方法が、

前記第 1 作動時には、該第 1 連結ポート(20a)が開放されて、前記フィードポート(F)を前記第 2 クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側に流体連結させること、及び該第 2 連結ポート及び第 3 連結ポート(20b、20c)が閉鎖されること；

前記第 2 作動時には、該第 2 連結ポート(20b)が開放されて、前記脱着剤ポート(D)を該第 2 クロマトグラフィーゾーン(50)の上流側に流体連結させ、前記抽出物ポート(E)を前記第 1 クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側に流体連結させること、及び該第 1 連結ポート及び第 3 連結ポート(20a、20c)が閉鎖されること；並びに

前記第3作動時には、該第3連結ポート(20c)が開放されて、前記ラフィネートポート(R)を該第1クロマトグラフィーゾーン(40)の下流側に流体連結させること、及び該第1連結ポート及び第2連結ポート(20a、20b)が閉鎖されることを含む、請求項4記載のバリンの連続分離方法。

【請求項7】

前記第3ロータリーバルブが、第1連結ポート、第2連結ポート及び第3連結ポート(30a、30b、30c)を含み、

前記方法が、

前記第1作動時には、該第1連結ポート(30a)が開放されて、前記ラフィネートポート(R)を前記第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側に流体連結させること、及び該第2連結ポート及び第3連結ポート(30b、30c)が閉鎖されること；

前記第2作動時には、該第2連結ポート(30b)が開放されて、前記フィードポート(F)を前記第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側に流体連結させること、及び該第1連結ポート及び第3連結ポート(30a、30c)が閉鎖されること；並びに

前記第3作動時には、該第3連結ポート(30c)が開放されて、前記脱着剤ポート(D)を該第3クロマトグラフィーゾーン(60)の上流側に流体連結させ、前記抽出物ポート(E)を該第2クロマトグラフィーゾーン(50)の下流側に流体連結させること、及び該第1連結ポート及び第2連結ポート(30a、30b)が閉鎖されることを含む、請求項4記載のバリンの連続分離方法。

フロントページの続き

- (72)発明者 チョング ホ リー
大韓民国 ソウル 157 794 ガングセオ グ デウングチョン 2 ドング ヒュンダイ
アイ パーク 103 501
- (72)発明者 セウング フーン カング
大韓民国 ギエオングギ ド 421 220 ブチェオン シ オジェオング グ イエオウオ
ル ドング イエオウオル フマンシア 3 ダンジ アプト.301 606
- (72)発明者 ジャエ フン ユ
大韓民国 ソウル 157 210 ガングセオ グ マゴク ドング ハンソル ソルパーク
103 1406
- (72)発明者 ユ シン キム
大韓民国 ソウル 157 200 ガングセオ グ ガヤング ドング ドシガエバル 2 ダ
ンジ アプト.209 1506
- (72)発明者 スング ヨング ムン
大韓民国 ソウル 140 728 ヨングサン グ イチョン 1 ドング ハンガラム アプ
ト.216 606
- (72)発明者 ヘエ ゲウン ナム
大韓民国 ソウル 157 910 ガングセオ グ フワゴク1 ドング 915 26
- (72)発明者 チャン フン パーク
大韓民国 ソウル 135 280 ガングナム グ ダエチ ドング 953 8 301
- Fターム(参考) 4B064 AE05 AE06 CA02 CE09 CE10 DA01 DA10 DA20
4H006 AA02 AB10 AD17 BD60 BD82 BD84 BS10 BU32 NB21

【外国語明細書】

2018024679000001.pdf