

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5482982号
(P5482982)

(45) 発行日 平成26年5月7日(2014.5.7)

(24) 登録日 平成26年2月28日(2014.2.28)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 11/08 (2006.01)
C O 2 F 3/34 (2006.01)
C O 2 F 3/10 (2006.01)
C O 2 F 3/00 (2006.01)
C 1 2 P 19/14 (2006.01)

C 1 2 N 11/08 B
C O 2 F 3/34 1 O 1 D
C O 2 F 3/10 Z
C O 2 F 3/00 G
C 1 2 P 19/14 A

請求項の数 2 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-558627 (P2008-558627)
(86) (22) 出願日 平成19年3月6日(2007.3.6)
(65) 公表番号 特表2009-529335 (P2009-529335A)
(43) 公表日 平成21年8月20日(2009.8.20)
(86) 国際出願番号 PCT/CZ2007/000015
(87) 国際公開番号 W02007/104268
(87) 国際公開日 平成19年9月20日(2007.9.20)
審査請求日 平成22年2月3日(2010.2.3)
(31) 優先権主張番号 PUV2006-17510
(32) 優先日 平成18年3月13日(2006.3.13)
(33) 優先権主張国 チェコ(CZ)
(31) 優先権主張番号 PUV-2006-17511
(32) 優先日 平成18年3月13日(2006.3.13)
(33) 優先権主張国 チェコ(CZ)

(73) 特許権者 508257496
レンティカツ, アー. エス.
チェコ国 1 6 0 0 0 プラハ, エヴ
ロフスカ 4 2 3 / 1 7 8
(74) 代理人 100091683
弁理士 ▲吉▼川 俊雄
(72) 発明者 ストローカル, ラデック
チェコ国 4 7 0 0 1 チェスカ リパ
, ツヴィコブスカ 2 8 7 1
(72) 発明者 ローゼンベルク, ミハル
スロバキア国 8 1 1 0 5 ブラチスラ
ヴァ, ザーレブスカ 8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素又は微生物をポリビニールアルコールゲルに固定した形状の生体触媒の工業生産法、その使用及びその生産装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酵素または微生物をポリビニールアルコールゲルに固定化してなる生体触媒の工業生産装置であって、

連続コンベヤーベルト(1)と；

連続コンベヤーベルト(1)上の生物活性材料を含む混合物を乾燥させるために、第1補助換気装置(19)によって内蔵熱素子(5)付き通風システム(6)に送り込まれた乾燥空気を連続コンベヤーベルト(1)に供給する上部乾燥通路(2)と；

圧力調整槽(15)とコンプレッサー(16)によって前記混合物を連続コンベヤーベルト(1)に滴下することのできる二横列のキャストインジェクターを有する少なくとも1つのキャストインジェクターヘッド(17)を含む滴下キャストインジェクター機械装置であって、連続コンベヤーベルト(1)の上部かつ、連続コンベヤーベルト(1)が通過する上部乾燥通路(2)の前方に設置された、連続コンベヤーベルト(1)に前記混合物を滴下するための滴下キャストインジェクター機械装置と；

前記上部乾燥通路(2)の後に、固定化された生物活性材料を有する連続コンベヤーベルト(1)が通過する再膨潤槽(7)と；

前記再膨潤槽(7)の後に、固定化された生物活性材料を取り除き回収するために連続コンベヤーベルト(1)が通過する拭き取り回収装置(9)であって、冷却機能を備えた回収タンク(8)と連結した機械的ワイパー(27)と、一体化した高圧ポンプ(10)と低圧ポンプ(11)とそれぞれのパイプラインで連結した高圧ノズル(26)と、を有す

10

20

る拭き取り回収装置（９）と；

前記拭き取り回収装置（９）の後に、固定化された生物活性材料を取り除いた後の連続コンベヤーベルト（１）を洗浄するために連続コンベヤーベルト（１）が通る洗浄ボックス（１３）であって、洗浄液槽（１２）とそれぞれのパイプラインで連結した低圧ポンプ（１４）に連結したノズルを有する洗浄ボックス（１３）と；及び

洗浄ボックス（１３）の後、連続コンベヤーベルト（１）を乾燥させるために通る、下方乾燥通路（３）と；

を有する工業生産装置。

【請求項２】

請求項１に記載の工業生産装置であって、

前記拭き取り回収装置（９）が、固定化された生体活性材料を有する前記連続コンベヤーベルト（１）が通る枠（２５）で形成されており；

前記拭き取り回収装置（９）が、パネ圧機械装置（２８）で固定された前記機械的ワイパー（２７）を有しており；

前記拭き取り回収装置（９）が、前記連続コンベヤーベルト（１）の進行方向の逆方向を 0° として、前記連続コンベヤーベルト（１）の表面を $45^{\circ} \sim 80^{\circ}$ の角度で洗浄できる、

前記枠（２５）に固定された高圧ノズル（２６）を有しており；

前記機械的ワイパー（２７）と前記高圧ノズル（２６）の固定位置が、固定化された生体活性材料を有する前記連続コンベヤーベルト（１）が前記高圧ノズル（２６）を通った後に前期機械的ワイパー（２７）を通るような位置であり；

前記機械的ワイパー（２７）と前記高圧ノズル（２６）とが協力して前記連続コンベヤーベルト（１）から固定化された生体活性材料を取り除くことが出来る位置に固定されており；

前記拭き取り回収装置（９）が、ブラシ付きの上ワイパー（２９）と下ワイパー（２９）を有しており；

前記連続コンベヤーベルト（１）が前記枠（２５）を離れるときに、前記連続コンベヤーベルト（１）の外側と内側の両面を同時に洗浄するために前記ブラシ付きの上ワイパー（２９）と下ワイパー（２９）の間を通る；

ことを特徴とする工業生産装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明はポリビニールアルコールゲルに固定した固定化酵素又は微生物形状の生物活性材料を有する生体触媒の工業的生産法、その使用、及び生物活性材料の限度に従い又生物担体体積と面積を最適化でき、連続コンベヤーベルトが通る乾燥通路の前方に配置のキャスティング機械装置を含むその工業生産装置に関する。

【背景技術】

【０００２】

ポリビニールアルコール担体又はポリウレタン担体を用いる微少細菌のカプセル封入は現場で周知である。ポリビニールアルコールゲル（以後の本文では“ＰＶＡ－ゲル”と呼ぶ）に配置の微生物、酵素、孢子及び／又は細胞形状の生物活性材料を有する生体触媒の生産法は、チェコ特許第２４９１７９号に開示されている。ＰＶＡ－ゲルは、生物活性材料用のゲル担体として化学触媒又は生物触媒の生産に非常に適する。本法に従って製造したゲル本体は、以前に知られたゲル体に比べて、特に耐摩耗性と引っ張り強度に関してより高い機械的安定性を与える。上述の機械的物性の改良により、ゲル体が反応性と動的に適切なレンズ型形状に生産できる。それ故生成ゲル体は、以前に周知のものに比べ数ヶ月以上、高回転数の攪拌下でも頑丈で摩耗に耐える。大きな直径と低い高さで特徴付けられるレンズ形状により、物理活性、化学活性又は生物活性な材料は表面真下に常に位置し、その反応性で動的に有用な配置を与える。生物活性材料の担体としてＰＶＡ－ゲルを利用するバイオテクノロジー手段は、現場で周知である。

【 0 0 0 3 】

上述の担体を排水からの脱窒素プロセスに利用することは周知である。この利用は、例えば欧州特許第 0 7 5 8 6 8 0 号（多孔性セルロース誘導体）、W O 0 9 5 0 8 5 1 3 号（ポリビニールアルコール、蛭石、ポリウレタン）、及び中国特許第 1 0 7 6 4 8 8 号（ポリビニールアルコール）に記載された。記載の担体は、しばしば前もって種々な方法で、特に細菌硝化（例えばペガサス（商品名 PEGASUS）又はペガズル（商品名 PEGAZUR）プロセスを参照）により濃縮するか、又は純粋な硝化細菌又は脱窒細菌を直接固定して濃縮した活性化汚泥の固定化に（通常）用いられている。文献を参照すると担体の非常に重要な特性は、反応装置容積、より正確には現在処理中の排水体積に対する比表面積の程度である。即ちこのパラメーターは、反応装置に配置した所定比表面積を有する担体量（又はより正確には重量又は体積による）により特に影響されるので、反応装置の大きさとこの反応装置中の排水保持時間に直接関係する。例えばポリエチレングリコール（PEG）担体に固定化した幾何寸法 $S/V = 3$ と 2 の錠剤形状の細菌を用いる窒素汚染除去プロセスにより、担体中の活性化汚泥の湿潤バイオマス含量が 2 重量 / 体積 % で、一日当たり 0.34 kg/m^3 乃至 1.14 kg/m^3 の脱窒素速度が得られる（ティ角野（T. Sumino）、エッチ中村（H. Nakamura）、エヌ森（N. Mori）、ワイ川口（Y. Kawaguchi）、ポリエチレングリコールプレポリマーによる細菌硝化の固定化（Immobilization of Nitrifying Bacteria by Polyethylene Glycol Prepolymer）、ジャーナルオブファーマンテーションアンドバイオエンジニアリング（Journal of Fermentation and Bioengineering）、7 3 巻（1 号）、3 7 - 4 2 頁、1 9 9 2 年）。

10

20

【 0 0 0 4 】

しかしその体積、より正確にはその形状と寸法に対する担体の比（幾何的）表面積の程度は、特に経済的理由により同質のパラメーターである。形状が球又は円筒状のいずれかに近似され、底直径（ d ）と高さ（ h ）がほぼ同一値である担体が、今なお固定化細胞による下水の脱窒素に用いられる。排水からの脱窒素用担体寸法の最小値は 1 mm である。通常用いる担体の大きさは 3 mm で、担体の体積対表面積比（ S/V ）は約 2 mm^{-1} 乃至 6 mm^{-1} である。レンズ形又は帯形担体を用いる場合、固定化細胞を飲料水、産業用水及び排水から窒素化合物を除去するのに用いて、同程度かより高い強いプロセスでも現行プロセスに比べ使用生体触媒は少なくできる。

【 0 0 0 5 】

バイオテクノロジープロセスでのゲル担体の別の代替え使用は、乳酸産生法においてである。この酸は広く使用され、中でも特に食品工業、製薬工業及び化学工業で用いられる。乳酸は多数の微生物で産生するが、主として糸状真菌と糸状細菌による。糸状真菌の内ではリゾプスアリズス（*Rhizopus arrhizus*）又はリゾプスオリゼ（*oryzae*）は良い乳酸産生菌である。その議論の余地のない利点は、細菌に比べて + L 酸だけを産生するという事実である。しかし発酵形式は好氣的である（高度減菌空気の生成が必要）。糸状真菌の好氣的形式は、乳酸カルシウム塩の直接産生の場合には有利であるが、炭酸カルシウムの場合にはその間に非効率な中和（弱い攪拌）の結果、発酵の延長と収率低下が起こりうる（マッティ、エム（Mattey, M.）、クリティカルレビューインバイオテクノロジー（Critical Reviews in Biotechnology）、1 2 巻、8 7 — 1 3 2 頁、1 9 9 2 年）。

30

40

【 0 0 0 6 】

細菌発酵の利点は、それが嫌気性形式、それ故培養装置の簡単化ができ低無菌性の必要性が低いことである。ショ糖基質（グルコース、ショ糖、ラクトース）を温度 3 0 乃至 4 0 でその産生菌の性質に従い異なる + L 酸、- D 酸及び D L 酸の形の乳酸に転換するラクトバチルス（*Bactobacillus*）属細菌が工業生産に主に用いられる。

【 0 0 0 7 】

ゲル担体ヘカプセル封入する微生物の固定化は、完全発酵培地でバイオマス増殖なしに反応装置中のバイオマスを濃縮できる方法の一つである。本法は細胞を天然ゲル又は合成ゲルカプセルに封入することからなる。その細胞は担体細孔より大きい必要があり、その結果細胞の放出は起こらないが、同時に基質と産物のカプセル封入細胞への自由拡散を保

50

証する。

【 0 0 0 8 】

異なる担体への乳酸菌の固定化は現在周知である。中でも担体としては天然ゲルのカラギーナン、ペクチン酸、アルギン酸（ノートン、エス等（Norton, S. et al.）、エンザイムミクロビアルテクノロジー（Enzyme Microbial Technol.）、16巻、457 - 466頁、1994年；リヒター、ケイ等（Richter, K. et al.）、アクタバイオテクノロジー（Acta Biotechnol.）、11巻、229 - 341頁、1991年；ヤン、ジェイ等（Yan, J. et al.）、ケミカルバイオケミカルエンジニアリング（Chem. Biochem. Eng.）、Q15巻（2号）、59 - 63頁、2001年）及び合成担体のポリアクリルアミド（ツリ、エイ等（Tuli, A. et al.）、エンザイムミクロビアルテクノロジー（Enzyme Microbial Technol.）、7巻、164 - 168頁、1985年）がある。固定化物は、通常関連ゲルを硬化溶液に滴下して直径3mm乃至5mmの球形状に生成する。しかしこの方法の不利な点は、固定化物の球形状により球内部への拡散に限界を生ずることである。ゲルの全体積が使用されず、その結果微生物は球表面の真下でしか増殖しない。

10

【 0 0 0 9 】

固定化の別の適法は乳酸菌のポリビニールアルコールゲルへのカプセル封入である。これは他の担体に比べて多くの利点がある。第一にこれは安価で、微生物に無毒であり、殆ど生分解性でなく、優れた物理的機械的物性を有し、微生物に対する副作用がなく、且つ長期の安定性を示す（ドイツ特許第19827552.8号）。更に上述の発明に従う方法による細胞の固定化は、基質の架橋が乾燥空気流中で起こることにより、現在使用の凍結（ドイツ特許第4327923号）又はホウ酸システムでの硬化（米国特許第5290693号）による架橋の手順を置換できるので、増殖性微生物（固定化後の高い微生物生存度と、固定化手順後の高い微生物生存率を保証する）と考えられる。更に固定化物のレンズ型形状により、微生物増殖と乳酸産生のために最適な担体全体積負荷を保証する。本法で生成した固定化物はバッチ、半連続、及び連続の発酵操作形式で繰り返し使用できる。

20

【 0 0 1 0 】

グルコースや他の糖類を発酵プロセスでエタノールに転換できる酵母の出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）又は他の酵母微生物は、伝統的にエタノール産生に用いられることは通常知られている。この発酵はビールやワイン生産の基礎であるが、又工業目的、食料目的及び燃料目的用エタノール生産の土台である。最近エタノール産生菌として細菌を用いる技術への関心の高まりが指摘されている。ザイモモナスモビリス（*Zymomonas mobilis*）はエタノールの細菌産生菌の一つである。これはグラム陰性通性嫌気性微生物である。これは酵母に比べて幾つかの利点がある。より速いバイオマスの増殖（しかし通常より遅いバイオマスの産生）、基質利用と産物創生のより速い比速度、酸素供給監視の不要性と、より少ない副代謝物の産生。これは通常嫌気性微生物で起こるエントナー - ドウドロッフ（Entner-Doudoroff）経路によりグルコースと果糖に代謝する。この代謝経路で、グルコース1モルがエタノール2モル、炭酸ガス2モルとアデノシン三リン酸（ATP）1モルに転換される。この代謝経路はバイオマスに変わるグルコース量を最小にし、このようにしてエタノール産生を増加する。実勢収率（g アルコール / g グルコース）は細菌で0.49に上昇し、酵母で通常0.44である。

30

40

【 0 0 1 1 】

ザイモモナスモビリス（*Zymomonas mobilis*）遊離細胞の助けによる発酵は、バッチ、半連続、及び連続の操作形式でも起こる（ロジャース、ピーエル（Rogers P.L.）、トライブ、ディイー（Tribe D.E.）、米国特許第4403034号；ロジャース、ピーエル等（Rogers P.L. et al.）、米国特許第4443543号；ザルツブラン、ダブリュ等（Salzbrunn W. et al.）、米国特許第4876196号；ピュウロック、ジェイディ（Bullock J.D.）、英国特許第2075053号）。

【 0 0 1 2 】

今日まで研究の興味は、微生物生産性の向上と、種々の革新、例えば細胞のリサイクル

50

、凝集微生物の使用などによる発酵装置配置の修正に焦点を合わせてきた（アルクリ、イー
ージェイ等（Arcuri E.J., et al.）、米国特許第4413058号；ロジャース、ピー
エル等（Rogers P.L. et al.）、米国特許第4443544号）。

【0013】

発酵産物（エタノール）が液体培地に集まり、蒸留によりほぼ全てが単離される。産物
単離に際して使用配置と技術に関わりなく、沈降、遠心分離、ろ過などによりバイオマス
含量を大幅に減少することが好ましい。不溶性含量の上昇は必要な蒸留エネルギーを増加
し、技術的問題（蒸留装置の汚染、発泡など）を生じ、維持管理の必要性を増し、又産物
の品質にも影響する。一方ではエタノール産生で最大効率を得る必要がある。エタノール
産生速度は発酵槽のバイオマス量に正比例する。これは一定条件では、バイオマス含量の
増加により所定量のエタノール産生に必要な時間の短縮が起こることを意味する。完全発
酵培地でバイオマスの増殖なしに反応装置内のバイオマスを濃縮できる方法の一つは、微
生物をゲル担体へカプセル封入する固定化である。本法は細胞の天然又は合成ゲルカプセル
へのカプセル封入に基づく。細胞の大きさは、担体の細孔の大きさより大きい必要があ
るので細胞の放出は起こらず、同時に基質と産物のカプセル封入細胞への自由拡散が保証
された。

【0014】

細菌属ザイモナス（Zymomonas）の種々担体への固定化は現在周知である。中でもこれ
らは天然ゲルのカラギーナンとアルギン酸（チータム、ピーエスジェイ（Cheetham P.S.J.
）、米国特許第4393136号；チバタ、アイ（Chibata, I.）、米国特許第4350765号；菊田、エム（Kikuta M.）、米国特許第5990191号；山田、ティ等（Yamada, T. et al.）、米国特許第4680263号）と、合成担体のポリアクリルアミド（山田、ティ等（Yamada, T. et al.）、米国特許第4680263号；チータム、ピーエスジェイ（Cheetham P.S.J.）、米国特許第4393136号）である。固定化物は、大抵は関連ゲルを硬化溶液に滴下して直径3mm乃至5mmの球形状に生成する。しかしこの方法の不利な点は、固定化物の球形状により球内部の拡散に限界を生ずることである。ゲル全体積が細胞負荷に使用されず、その結果微生物は担体球表面の直下だけでしか増殖せず、基質全体積を負荷しない。

【0015】

適切な固定化法は、細菌ザイモナスモビリス（Zymomonas mobilis）のポリビニールアル
コールゲルへのカプセル封入である。この方法は他の担体に比べ多くの利点がある。第一に安価で、微生物に無毒であり、殆ど生分解性でなく、優れた物理的機械的物性を有し、微生物に対す副作用がなく、且つ長期安定性を示す（ドイツ特許第19827552.8号）。更に上述の発明に従う方法による細胞の固定化は、基質の架橋が乾燥空気流中で起こることにより、現在使用の凍結（ドイツ特許第4327923号）又はホウ酸システムでの硬化（米国特許第5290693号）による架橋の手順を置換できるので、生産性の高い微生物（固定化後の高い微生物生存度と、固定化手順後の高い微生物生存率を保証する）と考えられる。更に固定化物のレンズ型形状により、微生物増殖とエタノール産生のために担体全体積の最適利用を保証する。本法で生成した固定化物はバッチ、半連続及び連続の発酵形式で繰り返し使用できる。

【0016】

球形状の固定化物を用いて、10重量%のグルコース培地を有するカラギーナンに固定化したザイモナスモビリス（Zymomonas mobilis）の助けで、固定化物直径4mmの固定化物20mlで充満した500mlバッチ反応装置中、温度30℃で、エタノールは1時間当たりゲル1ml当たりエタノール77mg（mg_{エタノール}/ml_{ゲル}/時間）が産生した（チバタ、アイ（Chibata, I.）、米国特許第4350765号）。産生菌をアルギン酸ナトリウムに固定し、固定化物中の湿潤細胞重量が20%ww/v（ww - 湿潤細胞重量で、乾燥細胞重量の1/5に相当）を含む場合、同一条件下の生産性は、バッチシステムで1時間当たり湿潤細胞重量1g当たりエタノール0.49g（g_{エタノール}/g_{ww}/時間）であり、再計算後98mg_{エタノール}/ml_{ゲル}/時間に相当し、連続形

10

20

30

40

50

式では $0.47 \text{ g エタノール} / \text{g}_{\text{ww}} / \text{時間}$ であり、析再計算後 $94 \text{ mg エタノール} / \text{m l ゲル} / \text{時間}$ に相当する（チータム、ピーエスジェイ（Cheetham P.S.J.）、米国特許第 4393136 号）。

【0017】

バイオテクノロジープロセスでのゲル担体の代替え使用は、固定化酵素インベルターゼの助けによるショ糖からのグルコースと果糖の産生法においてである。ショ糖は主に甜菜やサトウキビに存在する貯蔵二糖類である。これは食品工業で又発酵プロセスの基質として用いられる。これは単糖のグルコースと果糖からなる。ショ糖は加水分解を用いて、例えば酵素インベルターゼを用いる酵素加水分解によりこれら単糖類を与える。その使用により、グルコースと果糖（転化糖）混合物の創生をもたらす、非加水分解ショ糖に比べ結晶による濁度生成の減少、甘味の増加、及び発酵プロセスの有用性のような多くの利点をもたらす。

10

【0018】

工業的实施では、リサイクルできないインベルターゼの酵素調合物をショ糖の加水分解に用いる。これがこの酵素がグルコース - 果糖シロップ生産での最大経済的項目となる理由である。本酵素の適切な固定化法により複数回使用ができ、更に全生産プロセスを連続化でき、これによりその有効性を著しく増す。最もよく用いられる技術は架橋である。最もしばしば用いられる架橋剤は、ポリアミド（ソウ、エム等（Sou M. et al.）、特開昭 58-086085 号公報；ロールバック、アールピー等（Rohrbach R.P. et al.）、米国特許第 426842 号）、グルタルアルデヒド（リー、ディエム等（Lee D.M. et al.）、米国特許第 4749653 号）、結合していないカルボキシル基を有するポリマー（マウズ、オー（Mauz O.）、米国特許第 4767620 号）、エポキシ基を有するポリマー（マウズ、オー（Mauz O.）、米国特許第 4931476 号）、光架橋ビチューメンへの固定化（国弘、アイ（Kunihiro, I.）、特開昭 55-023941 号公報）、及びグルタルアルデヒドの助けによるガラス球への固定化のような架橋剤の助けによる種々の基質への埋め込み（トシユキ、ワイ等（Toshiyuki Y. et al.）、特開昭 58-179494 号公報）である。他法はグルタルアルデヒドの助けによるシリカゲル粒子へのインベルターゼの共有結合（チボー、ピーエイ（Thibault P.A.）、EP0231668）、ジスルフィド結合の助けによる有機担体と無機担体への共有結合（コルミール、アールエイ等（Cormier R.A. et al.）、米国特許第 4176006 号）、有機シランの助けによる共有結合（ホー、ジーエッチ等（Ho G.H. et al.）、米国特許第 4384045 号）、ジアルデヒドの助けによるセルロース及びリグニン材料への共有結合（モンサン、ピー（Monsan P.）、米国特許第 4405715 号）、及びジアルキルアミノアルキルセルロースとの共有結合（ラピンス、シーエッチジェイ等（Lapins Ch.D. et al.）、米国特許第 4933284 号）である。インベルターゼは又吸収により固定化された。例えば獣骨からの材料に（フィンドレイ、シーエッチジェイ（Findlay Ch.J.）、米国特許第 5037749 号）。他法は高転化酵素活性を有する細胞可溶化液のアルギン酸ゲル（尾花、エッチ等（Obana H. et al.）、特開昭 57-163484 号公報；チャン、エッチエヌ等（Chang H.N. et al.）、米国特許第 5766907 号）、又はポリウレタンポリマー（ハルトゲン、エフジェイ等（Hartdegen F.J. et al.）、米国特許第 4098645 号）へのカプセル封入である。例えばポリエチレンイミン処理した棉へ酵素吸着後グルタルアルデヒドにより架橋するような組み合わせ技法（山崎、エッチ等（Yamazaki H. et al.）、中国特許第 1203187 号）も又実用性がある。

20

30

40

【0019】

ポリビニールアルコールゲル（PVA）の使用は非常によい代替え物と思われる。インベルターゼは PVA ゲルで覆われた固体中心を有する担体にうまく固定化された（山本、エッチ等（Yamamoto H. et al.）、特開 2005-042037 号公報）。ポリチレングリコールを混合した光架橋 PVA は、又共有結合とインベルターゼ封入に用いられた（市村、ケイ（Ichimura K.）、特開昭 58-152483；末広、ティ等（Suehiro T. et al.）、特許登録第 1252285 号；泉田、エッチ等（Izumida H. et al.）、特許登録

50

第1071491号)。PVA基質は又ホウ酸で架橋してインペルターゼをゲルにカプセル封入するか(グオーチェン、シーエッチ等(Guocheng Ch. Et al.)、中国特許第1076488号)、又は乾燥(石村、エフ等(Ishimura F. et al.)、米国特許第4727030号)により架橋できる。他法は又架橋(堤、エス等(Tsutsumi S. et al.)、特許登録第2046288号)か、又は酢酸ビニルの添加(森谷、ティ等(Moriya T. et al.)、特開昭56-113290号公報)、ビニルアミン(森谷、ティ等(Moriya T. et al.)、特開昭56-113292号公報)、又はアミノアセタール化PVA(山内、エイ等(Yamauchi A. et al.)、米国特許第4307151号)の添加と組み合わせ用いる。

【0020】

10

バイオテクノロジープロセスでのゲル担体の代替え使用は、固定化グルコアミラーゼ酵素の助けによるデンプンからのグルコース産生法においてである。植物の栄養貯蔵物質であるデンプンは、食品工業と又発酵工業でグルコースの主供給源の一つである。デンプンはアミラーゼとアミロペクチンという二つの形の分子を含む。例えばトウモロコシ中のアミラーゼは全デンプンの10%に相当する。これは α -1,4-グルコシド結合で連結した最大1000個までのグルコース単位を含む。残り90%はアミロペクチンに相当し、 α -1,4-グリコシド結合とは別に α -1,6-グリコシド結合が又含まれる。その鎖中のグルコース単位の数最大10000個までである。

【0021】

発酵プロセスに用いるデンプン原料の前処理プロセスは二段階からなる。第一段階では、細胞内酵素の α -アミラーゼの助けでデンプンの液化が起こり、高温で α -1,4-グルコシド結合をランダムに解離する。この反応により異なる鎖長を有するデキストリンと低オリゴ糖の形成が起こる。

20

【0022】

第二段階では、デキストリンとオリゴ糖は細胞外酵素のグルコアミラーゼにより非還元末端からグルコース単位に解離する。グルコアミラーゼは α -1,4-グルコシド結合と α -1,6-グルコシド結合の両者を解離する。しかし α -1,6-グルコシド結合は遙かに遅い速度で加水分解する。この加水分解速度は又鎖長に依存する。

【0023】

工業的な実施では、デンプン1トン当たり、リサイクルできないグルコアミラーゼ酵素調合物1l乃至1.2lが用いられる。この酵素の適切な固定化により、複数回使用が全プロセスの連続化の可能性も含めて可能になるであろう。ポリアミン(シモン等(Symon et al.)、米国特許第4415663号;ランテロ等(Lantero et al.)、米国特許第5472861号;ドゥフィリッピ(DeFilippi)、米国特許第4343901号;ロールバック等(Rohrbach et al.)、米国特許第4268423号)、グルタルアルデヒド(リー等(Lee et al.)、米国特許第4749653号;西村等(Nishimura et al.)、米国特許第4888285号;ロールバー等(Rorvah et al.)、韓国特許第8601229号)、アクリル化剤又はアリ-ル化剤(ボロス等(Boross et al.)、米国特許第4794083号;セレメネブ等(Selemenev et al.)、ロシア特許第2204600号)のような薬剤の架橋により、酵素の無機基質又は有機基質への強固な固定を用いて、この酵素の固定化が顕著に改善された。吸着法(アブドゥラー等(Abdullah et al.)、米国特許第4226937号;熊倉等(Kumakura et al.)、特開昭61-060700号公報;モタイ等(Motai et al.)、特開昭59-232092号公報;セレメネブ等(Selemenev et al.)、ロシア特許第2181770号;木村等(Kimura et al.)、特開昭63-056297号公報)、及び又固定化グルコアミラーゼを有する膜反応装置(トーマス等(Thomas et al.)、米国特許第5130237号)の使用は適切に思われる。生体物質をゲル構造にカプセル封入し、主として微生物固定化に用いられるカプセル封入は、グルコアミラーゼ固定化では全く存在しない。しかしより大きな構造への架橋化無しでは、この酵素は基質の細孔から容易に洗い流される。

30

40

【0024】

50

バイオテクノロジープロセスでのゲル担体の代替え使用は、ラクトース溶液加水分解の方法と、固定化 β -ガラクトシダーゼの助けによるラクトース溶液からのD-ガラクトース、D-グルコース及びガラクトオリゴ糖の産生においてである。

【0025】

二糖ラクトースは大部分の哺乳類の乳腺で合成される。これは乳清の抽出により雌ウシのミルク(ラクトース含量4.5乃至5重量%を有する)から商業的に生産される(バルドリック、バンフォード(Baldrick and Bamford)、1997年)。ミルク及び乳製品に存在するラクトースは重要な栄養項目を表す。これはビフィズス菌の増殖を支え、ガラクトトリピッド及びガラクトオリゴ糖産生に必要なガラクトース供給源であり、カルシウムの吸収をたすけるなどである(マルドナード等(Maldonado et al.)、1998年)。これは低溶解度を有し、18重量%を越える濃度で結晶化する。ラクトース結晶はコンデンスミルクとアイスクリームのような乳製品の生産で不快な砂のようなテクスチャ(ザドウ(Zadow)、1992年)を生ずるので、これは問題のように思われる。ラクトースの加水分解がこれら産物にとって非常に望ましい理由はこれによる。更にラクトースの加水分解は、ドライミルク製品の吸湿性をかなり減少させ、甘味を増加させ、且つメイラード反応のプロセスを低下する(クルダ等(Cruda et al.)、2001年;ザドウ(Zadow)、1992年;ローゼンバーグ等(Rosenberg et al.)、1995年)。

【0026】

β -ガラクトシダーゼはミルク中のラクトースの加水分解だけでなく、又乳清処理でも重要である。乳清はチーズ、コテッジチーズ、及びカゼイン生産時に乳業副産物として非常に大量に生じる。チーズ生産時には、一億五千万トンの乳清が世界で毎年生じ(平均してチーズ1kg当たり乳清10l)、世界全体のチーズ生産は常に増加してきた。乳清は今なお大規模に処理できず、経済環境問題を意味する(ノバリン等(Novalin et al.)、2005年)。更にその取り扱いは多くの制限を伴い、環境に自由には放出できない。生じた廃棄物の半分は乳清蛋白濃縮物(WPC)の生産に用いるが、主として家畜の給餌用である(ルドルホーバ(Rudolfova)、クルダ(Curda)、2005年)。乳清は又エタノール生成の原料として使用できる。この事実を考慮すると、これは将来の発酵プロセスの魅力的な基質であるかも知れない(コテ等(Cote et al.)、2004年)。例えばエタノール生産時にラクトースに用いるクリベロマイセス(*Kluyveromyces*)酵母の使用が可能である。ラクトースの加水分解により基質としてより高濃度の炭素源を有する濃縮乳清が使用でき、その結果発酵収率をかなり増加する(ローゼンバーグ等(Rosenberg et al.)、1995年)。幾つかの場合には、増殖性微生物は存在グルコースだけを利用し、残留ガラクトースはその後単離、精製、又は化学修飾できるよう発酵プロセスが実施できる(ローゼンバーグ(Rosenberg)、2000年)。

【0027】

食品工業での β -ガラクトシダーゼの他の重要な使用は、ガラクトオリゴ糖(GOS)の創成である。これは β -ガラクトシダーゼのグルコシド転移活性により、ラクトース加水分解時に同時に形成する。 β -ガラクトシダーゼのグルコシド転移活性は1950年代に最初に記載された(アロンソン(Aronson)、1952年)。最初に発表された研究はGOSの好ましい効果を監視し、その産生の最適法の探索に焦点が合わされた(マホーニー(Mahoney)、1998年)。

【0028】

GOSは、ヒト消化管での生菌培養物の増殖、より正確には活動を選択的に刺激する非消化性食物成分である所謂プロバイオティクスの一群に属する。その β 配置により、GOSは β グリコシド結合を選択的に加水分解する唾液酵素と消化液酵素による加水分解に耐性である(佐古等(Sako)、1999年)。GOSは大腸に入り多くの重要なプロセスに加わる。ビフィズス菌促進マイクロフローラにより、GOSは短鎖脂肪酸(酢酸、プロピオン酸、乳酸及び酪酸)と気体に代謝する(ジョンソン等(Johnson)、1993年)。最初の酸類は腸蠕動を刺激し、pHを低下してカルシウムと鉄の吸収を助ける。GOSは又その健康への有益な効果が認められているビフィズス菌成長因子として知られている。更に

ビフィズス菌は選択的にガラクトオリゴ糖を利用して、消化管での好ましくない微生物の増殖を抑制する（ペニシン（Pennisin）、1997年）。GOSは又口腔マイクロフローラ（ストレプトコッカスミュータンス（*Streptococcus mutants*））を利用しないときには口腔の健康に有益なので、齲歯形成を防止する（ジラジー（Szilagyi）、1999年）。

【0029】

各々のβ - ガラクトシダーゼにより産生GOSの全量と構造は異なる。例えばビフィドバクテリウム属の異なる株からβ - ガラクトシダーゼを単離後、それに続いて30%ラクトース溶液からGOS合成に使用後、産生量には明白な差があった。ビフィドバクテリウムアングラータム（*Bifidobacterium angulatum*）の場合、溶液中に存在する全糖類の43.8%を形成するが、ビフィドバクテリウムシュードロンガム（*Bifidobacterium pseudolongum*）の場合には26.8%に過ぎない（ラビユー等（Rabiu et al.）、2001年）。構造に関しては、二つの単糖単位の新規形成のグルコシド結合（ガラクトース - ガラクトース、ガラクトース - グルコース）の型は、ビフィドバクテリウムビフィダム（*Bifidobacterium bifidum*）の場合ではバチルススルクランス（*Bacillus circulans*）の場合のβ（1 - 4）（モザファール等（Mozaffar et al.）、1984年）やストレプトコッカスサーモフィルス（*Streptococcus thermophilus*）でのβ（1 - 6）（松本（Matsumoto）、1990年）とは反対にβ（1 - 3）である（ドゥモルティール等（Dumortier et al.）、1994年）。

【0030】

酵素β - ガラクトシダーゼは以下の方法で固定化された。封入（マンマレヤ（Mammarella）、ルビオロ（Rubiolo）、2005年；ロドリゲス - ノガレス（Rodriguez-Nogales）、デルガディヨ（Delgadillo）、2005年）、架橋（サンガー（Sungur）、アクブラット（Akbulut）、1994年）、吸着（カルピオ等（Caripio et al.）、2000年）、共有結合（フー等（Hu et al.）、1993年；フィンドレイ（Findlay）、1991年、ディセリオ等（DiSerio et al.）、2003年）、膜封入（ノバリン等（Novalin et al.）、2005年）、又はこれら方法の組み合わせ（1.2.1部により詳しく説明する）。

【0031】

β - ガラクトシダーゼ固定化プロセスは、固定化後酵素活性の損失のようなある不都合と関連する。固定化後のβ - ガラクトシダーゼ活性の低下は5%乃至90%の範囲であり、用いた固定化法に依存する。この不都合は固定化物再使用の可能性により償われる。繰り返し使用時に酵素活性と固定化物の安定性を保つ能力は、固定化物の工業規模の適応で決定的なパラメーターである（田中（Tanaka）、川本（Kawamoto）、1999年）。

【0032】

ポリアクリルアミドとポリビニールアルコールゲルがしばしば封入法に用いられる。PVA基質は又糸状真菌から単離のβ - ガラクトシダーゼのカプセル封入に用いられ、これによりその温度安定性が増加した。この酵素は50、24時間後にその以前の活性の70%を、60ではその以前の活性の5%を保持した（バツァローバ等（Batsalova et al.）、1987年）。カーレ（Khare）、グプタ（Gupta）（1988年）は、架橋とそれに続くポリアクリルアミドゲルへのカプセル封入の二つの方法の組み合わせを用いて、大腸菌（*E. coli*）からβ - ガラクトシダーゼを固定した。同一手順だが、架橋剤としてジメチルアジポイミデートと、酵素阻止物質のウシ血清アルブミン、システイン及びラクトースを用いて、その活性は以前の固定化剤活性の190%と評価された。好熱細菌サーマスアクアティクス（*Thermus aquaticus*）から異なる方法によるβ - ガラクトシダーゼ固定化を比較すると、架橋とそれに続くアガロース顆粒への封入は、高酵素活性という利益を持つ高濃度酵素の固定化に好ましいプロセスであることが示された（バーガー等（Burger et al.）、1995年）。固定化プロセスにより異なる反応条件で酵素の安定性が増加した。コウジカビ（*A. oryzae*）からβ - ガラクトシダーゼの多孔性PVA凍結ゲルへの封入により、酵素、pH値及びイオン強度の耐温度性が増加した（ロッシ等（Rossi

10

20

30

40

50

et al.)、1999年)。

【0033】

吸着は技術的要求が厳しくない固定化法である。疎水性木綿繊維は、例えば担体として働き、担体上の酵素は以前の活性の50%を保つ(シャーマ(Sharma)、山崎(Yamazaki)、1984年)。バッケン等(Bakken)はコウジカビ(*A. oryzae*)からの β -ガラクトシダーゼを膜形式でポリ塩化ビニルとシリカゲルに吸着し、軸向き流通反応装置でミルク中のラクトース加水分解に用いた(1990年)。骨粉に吸着固定化した β -ガラクトシダーゼはその以前の活性の83%保ったが、4回のバッチ加水分解でその固定化物は活性を徐々に失った。4回目の加水分解後、固定化物の活性は初期活性の24%にしか過ぎなかった(カルピオ等(Carpio et al.)、2000年)。この実験により僅かな脱着が
10
起こるこの固定化法の不都合が示された。この影響は適切な架橋剤の添加により除かれた(ズゾドゥラック(Szczodrak)、2000年)。

【0034】

ピートター等(Piettaa)(1989年)は共有結合を用いてコウジカビ(*A. oryzae*)から単離の β -ガラクトシダーゼを二つの異なる担体に固定した。第一の物はゼオライトであるが、少量の酵素しか結合しないので使いやすくなかった。これに反して、ナイロン6粉末は大量の酵素と共有結合し安定な複合体を生じた。ピーターズ(Peters)、レーム(Rehm)(2006年)は β -ガラクトシダーゼを共有結合によりポリヒドロキシアルカノエート顆粒に固定した。得られた固定化物は異なる条件下で長期間の保存に安定で、担体と固定化酵素間での強い結合の証拠を与える。
20

【0035】

二個の反応性官能基を有するグルタルアルデヒドは、 β -ガラクトシダーゼ固定化で最もよく使われる架橋剤である(グイサン等(Guisan et al.)、1997年;ズゾドゥラック(Szczodrak)、2000年;ゾー(Zhou)、チェン(Chen)、2001年)。しかし架橋固定化法は、特に吸着又は封入のような他の方法(上述と、パネサル(Panesar et al.)等、印刷中)との組み合わせで用いる。例えば封入法を用いて、アルギン酸とゼラチンからなる繊維形状に固定したコウジカビ(*A. oryzae*)からの β -ガラクトシダーゼは、次いでグルタルアルデヒドで架橋し酵素が洗い流されるのを防いだ(タンリセブン(Tanriseven)、ドーガン(Dogan)、2002年)。この形の架橋は又コバルト-アルギン酸ゲルへの β -ガラクトシダーゼの固定化に用いられた。しかしラクトース加水分解時にコバルトが放出するため、食品工業でこの固定化物の使用は不可能になった(アテス(Ates)、メーメトグル(Mehmetoglu)、1997年)。
30

【0036】

固定化酵素の活性と安定性は、pH値、温度及びイオン強度に影響される(ロイ(Roy)、グプタ(Gupta)、2003年)。遊離酵素に比べ固定化酵素は、大部分の公表研究で記載されているように最適pH幅が広く、温度範囲も広い。固定化 β -ガラクトシダーゼがより低いpH値とより高い温度で安定性がより高いことは、ラクトース加水分解で利点になり、更にそのpH値を下げ、その温度を上げて汚染の危険を減ずる。一方pH最適条件のシフトと安定性の増加は、これらの条件下ではpHが5.5乃至6.0の間隔内の甘味乳清のラクトース加水分解で有利になる(ズゾドゥラック(Szczodrak)、2000
40
年)。

【0037】

異なる微生物供給源からの β -ガラクトシダーゼも、又連続と同様にバッチ操作形式でガラクトオリゴ糖産生の目的で固定できる(チョークカイスワスディー等(Chockchaisawasdee et al.)、2005年)。遊離酵素に比べ、固定化酵素はより低いGOS濃度を生じた。この低下は固定化システム内の酵素への基質アクセスが制限されることで起こった(マホーニー(Mahoney)、1998年)。出現GOSの濃度と構造は、初期基質濃度と酵素起源に相当程度依存した。初期ラクトース濃度の14%から23%への増加により、GOSの産生は二倍になった(フォード(Foda)、ロペズ-ライバ(Lopez-Leiva)、2000年;チョークカイスワスディー等(Chockchaisawasdee et al.)、2005年)。
50

【 0 0 3 8 】

シン等 (Shin et al.) (1998 年) は、ブレアシングラリス A T T C 2 4 1 9 3 (Bullera singularis ATTC 24193) から単離の酵素をキチン顆粒に固定した。彼らはこのように固定化した酵素を G O S 産生に用いた。実験は 1 5 日間継続し、その間に全糖類 (初期基質濃度は 1 0 0 g / l であった) 中に G O S 5 5 重量 % と、体積生産能 4 . 4 g / l / h を記録した。オリゴ糖産生で固定化 β - ガラクトシダーゼ使用の他例は、又アルベイラック (Albayrak)、ヤング (Yang) (2002 年) の研究に記載されている。彼らは木綿繊維に固定したコウジカビ (A. oryzae) からの酵素を用いて、全糖類 (基質濃度 4 0 0 g / l を有する) の最大産生が 2 6 重量 %、体積生産能が 1 0 6 g / l / h に達した。フォード (Foda)、ロペズ - ライバ (Lopez-Leiva) (2000 年) は、G O S 生成のため 10
に固定化 β - ガラクトシダーゼによる膜流通反応装置を試験した。彼らは限外濾過処理した初期ラクトース濃度 2 0 重量 % を有する乳清を用いて最高の産生 (3 1 重量 %) に達した。乳清はラクトースの豊富な供給源である。その G O S 産生での使用は非常に魅力的に思われる。

【 0 0 3 9 】

ポリビニールアルコール担体に基づく生体触媒で、製品でもある固定化物調合に用いる周知のキャストリング装置があり、通常レンズ型形状又は小さいベルトに製造される。ポリビニールアルコールゲルとバイオマスの混合物を、正確で前もって規定した用量で滴下キャストリング機械装置を用いて、連続コンベヤーベルトに塗布し、生産プロセス中に乾燥と物理的ゲル化により接着性の塊に変える。現在ポリビニールアルコール担体に基づく 20
固定化物生産用キャストリング装置は、連続コンベヤーベルト (例えばポリエチレン製) が通える乾燥通路前方に配置したキャストリング機械装置からなる。キャストリングヘッドとして周知のキャストリング機械装置は、直径が 0 . 1 mm 乃至 2 . 0 0 mm で変化する一横列のキャストリングニードルインジェクターを取り付け、電磁石の助けで異なる振動数と異なるパルス長で振動し、ポリビニールアルコールゲルとバイオマスの混合物を連続コンベヤーベルトに移動するか又は注ぐ。キャストリング装置は更に乾燥通路上部に配置の再膨潤区域を含み、低圧噴霧ジェットシステムを形成して乾燥製品を濡らす (再膨潤)。更にキャストリング装置は回収部を備え、ステンレススチールワイパー上に配置した 30
ジェット噴霧により洗い流すステンレススチール板製の圧力ワイパーを含み、ベルトの駆動シリンダー上のキャストリング装置の搬送枠に取り付ける。連続大気除湿又は連続凍結を用いて乾燥媒体源として外気又は除湿空気を扱い、乾燥通路に入る前に加熱素子により暖め、ポリビニールアルコール担体に基づいて生成した固定化物を乾燥してゲル化を確実にする。このように配置したキャストリング装置は、特にポリビニールアルコール担体に基づく固定化物をコンベヤーベルトから除去するのが困難なために、長期間の経済的生産は不可能である。機械的ステンレススチールワイパーが拭き取りに、次いで回収に用いられる。ワイパーはコンベヤーベルト表面、即ち弾性に基づいてしっかりと押し付け、それに続いて塊をワイパーで拭き取り回収容器に落ちる。ベルトからのこの製品の機械的除去は、特に大きなクラスター、ポリビニールアルコール担体の凝集物の形成と、低活性又は 40
ゼロ活性製品の当然な生成を考慮すると、完全からはほど遠い。更なる不都合は、又キャストリング装置の連続コンベヤーベルトの少なからぬ機械的摩耗である。更にキャストリング装置の再膨潤部での塩溶液の使用により、塩が連続ベルト表面にくっつき、その結果キャストリング装置のコンベヤーベルトの表面張力が変わるため製品形状が変化する。この変化は、コンベヤーベルトから固定化物を除去し引き離す際、損傷と大きなクラスター又は凝集物の形成が大抵の場合に避けられないことを意味する。

【 0 0 4 0 】

【特許文献 1】チェコ特許第 2 4 9 1 7 9 号

【特許文献 2】欧州特許第 0 7 5 8 6 8 0 号

【特許文献 3】W O 0 9 5 0 8 5 1 3 号

【特許文献 4】中国特許第 1 0 7 6 4 8 8 号

【特許文献 5】ドイツ特許第 1 9 8 2 7 5 5 2 . 8 号

10

20

30

40

50

【特許文献6】ドイツ特許第4327923号	
【特許文献7】米国特許第5290693号	
【特許文献8】米国特許第4403034号	
【特許文献9】米国特許第4443543号	
【特許文献10】米国特許第4876196号	
【特許文献11】英国特許第2075053号	
【特許文献12】米国特許第4413058号	
【特許文献13】米国特許第4443544号	
【特許文献14】米国特許第4393136号	
【特許文献15】米国特許第4350765号	10
【特許文献16】米国特許第5990191号	
【特許文献17】米国特許第4680263号	
【特許文献18】特開昭58-086085号公報	
【特許文献19】米国特許第426842号	
【特許文献20】米国特許第4749653号	
【特許文献21】ドイツ特許第4327923	
【特許文献22】米国特許第5290693	
【特許文献23】米国特許第4767620号	
【特許文献24】米国特許第4931476号	
【特許文献25】特開昭55-023941号公報	20
【特許文献26】特開昭58-179494号公報	
【特許文献27】欧州特許第0231668号	
【特許文献28】米国特許第4176006号	
【特許文献29】米国特許第4384045号	
【特許文献30】米国特許第4405715号	
【特許文献31】米国特許第4933284号	
【特許文献32】米国特許第5037749号	
【特許文献33】特開昭57-163484号公報	
【特許文献34】米国特許第5766907号	
【特許文献35】米国特許第4098645号	30
【特許文献36】中国特許第1203187号	
【特許文献37】特開2005-042037号公報	
【特許文献38】特開58-152483号公報	
【特許文献39】特許登録第1252285号	
【特許文献40】特許登録第1071491号	
【特許文献41】米国特許第4727030号	
【特許文献42】特許登録第2046288号	
【特許文献43】特開昭56-113290号公報	
【特許文献44】米国特許第4307151号	
【特許文献45】米国特許第4415663号	40
【特許文献46】米国特許第5472861号	
【特許文献47】米国特許第4343901号	
【特許文献48】米国特許第4268423号	
【特許文献49】米国特許第4888285号	
【特許文献50】韓国特許第8601229号	
【特許文献51】米国特許第4794083号	
【特許文献52】ロシア特許第2204600号	
【特許文献53】米国特許第4226937号	
【特許文献54】特開昭61-060700号公報	
【特許文献55】特開昭59-232092号公報	50

- 【特許文献 56】ロシア特許第 2 1 8 1 7 7 0 号
- 【特許文献 57】特開昭 6 3 - 0 5 6 2 9 7 号公報
- 【特許文献 58】米国特許第 5 1 3 0 2 3 7 号
- 【非特許文献 1】ティ角野 (T. Sumino)、エッチ中村 (H. Nakamura)、エヌ森 (N. Mori)、ワイ川口 (Y. Kawaguchi)、ポリエチレングリコールプレポリマーによる細菌硝化の固定化 (Immobilization of Nitrifying Bacteria by Polyethylene Glycol Prepolymer)、ジャーナルオブファーマンテーションアンドバイオエンジニアリング (Journal of Fermentation and Bioengineering)、7 3 巻 (1 号)、3 7 - 4 2 頁、1 9 9 2 年
- 【非特許文献 2】マッティ、エム (Mattey, M.)、クリティカルレビューインバイオテクノロジー (Critical Reviews in Biotechnology)、1 2 巻、8 7—1 3 2 頁、1 9 9 2 年 10
- 【非特許文献 3】ノートン、エス等 (Norton, S. et al.)、エンザイムミクロビアルテクノロジー (Enzyme Microbial Technol.)、1 6 巻、4 5 7 - 4 6 6 頁、1 9 9 4 年
- 【非特許文献 4】リヒター、ケイ等 (Richter, K. et al.)、アクタバイオテクノロジー (Acta Biotechnol.)、1 1 巻、2 2 9 - 3 4 1 頁、1 9 9 1 年
- 【非特許文献 5】ヤン、ジェイ等 (Yan, J. et al.)、ケミカルバイオケミカルエンジニアリング (Chem. Biochem. Eng.)、Q 1 5 巻 (2 号)、5 9 - 6 3 頁、2 0 0 1 年
- 【非特許文献 6】ツリ、エイ等 (Tuli, A. et al.)、エンザイムミクロビアルテクノロジー (Enzyme Microbial Technol.)、7 巻、1 6 4 - 1 6 8 頁、1 9 8 5 年
- 【非特許文献 7】バルドリック、バンフォード (Baldrick and Bamford)、1 9 9 7 年 20
- 【非特許文献 8】マルドナード等 (Maldonado et al.)、1 9 9 8 年
- 【非特許文献 9】ザドウ (Zadow)、1 9 9 2 年
- 【非特許文献 10】クルダ等 (Cruda et al.)、2 0 0 1 年
- 【非特許文献 11】ローゼンバーグ等 (Rosenberg et al.)、1 9 9 5 年
- 【非特許文献 12】ノバリン等 (Novalin et al.)、2 0 0 5 年
- 【非特許文献 13】ルドルホーバ (Rudolfova)、クルダ (Curda)、2 0 0 5 年
- 【非特許文献 14】コーテ等 (Cote et al.)、2 0 0 4 年
- 【非特許文献 15】ローゼンバーグ (Rosenberg)、2 0 0 0 年
- 【非特許文献 16】アロンソン (Aronson)、1 9 5 2 年
- 【非特許文献 17】マホーニー (Mahoney)、1 9 9 8 年 30
- 【非特許文献 18】佐古等 (Sako)、1 9 9 9 年
- 【非特許文献 19】ジョンソン等 (Johnson)、1 9 9 3 年
- 【非特許文献 20】ペニシン (Pennisin)、1 9 9 7 年
- 【非特許文献 21】ジラジー (Szilagyi)、1 9 9 9 年
- 【非特許文献 22】ラビュー等 (Rabiu et al.)、2 0 0 1 年
- 【非特許文献 23】モザファール等 (Mozaffar et al.)、1 9 8 4 年
- 【非特許文献 24】松本 (Matsumoto)、1 9 9 0 年
- 【非特許文献 25】ドゥモルティール等 (Dumortier et al.)、1 9 9 4 年
- 【非特許文献 26】マンマレヤ (Mammarella)、ルビオロ (Rubiolo)、2 0 0 5 年
- 【非特許文献 27】ロドリゲス - ノガレス (Rodriguez-Nogales)、デルガディオ (Delgadillo)、2 0 0 5 年 40
- 【非特許文献 28】サンガー (Sungur)、アクブラット (Akbulut)、1 9 9 4 年
- 【非特許文献 29】カルピオ等 (Caripio et al.)、2 0 0 0 年
- 【非特許文献 30】フー等 (Hu et al.)、1 9 9 3 年
- 【非特許文献 31】フィンドレイ (Findlay)、1 9 9 1 年
- 【非特許文献 32】ディセリオ等 (DiSerio et al.)、2 0 0 3 年
- 【非特許文献 33】田中 (Tanaka)、川本 (Kawamoto)、1 9 9 9 年
- 【非特許文献 34】バツァローバ等 (Batsalova et al.)、1 9 8 7 年
- 【非特許文献 35】カーレ (Khare)、グプタ (Gupta)、1 9 8 8 年
- 【非特許文献 36】バーガー等 (Berger et al.)、1 9 9 5 年 50

- 【非特許文献 37】 ロッシ等 (Rossi et al.)、1999 年
- 【非特許文献 38】 シャーマ (Sharma)、山崎 (Yamazaki)、1984 年
- 【非特許文献 39】 バッケン等 (Bakken)、1990 年
- 【非特許文献 40】 カルピオ等 (Carpio et al.)、2000 年
- 【非特許文献 41】 ズゾドゥラック (Sczcidrak)、2000 年
- 【非特許文献 42】 ピートテー等 (Piettaa) (1989 年)
- 【非特許文献 43】 ピーターズ (Peters)、レーム (Rehm) (2006 年)
- 【非特許文献 44】 グイサン等 (Guisan et al.)、1997 年
- 【非特許文献 45】 ゴー (Zhou)、チェン (Chen)、2001 年
- 【非特許文献 46】 パネサール (Panesar et al.) 等、印刷中
- 【非特許文献 47】 タンリセブン (Tanriseven)、ドーガン (Dogan)、2002 年
- 【非特許文献 48】 アテス (Ates)、メーメトグル (Mehmetoglu)、1997 年
- 【非特許文献 49】 ロイ (Roy)、グプタ (Gupta)、2003 年
- 【非特許文献 50】 チョークカイサワスディー等 (Chockchaisawasdee et al.)、2005 年
- 【非特許文献 51】 フォーダ (Foda)、ロペズ - ライバ (Lopez-Leiva)、2000 年
- 【非特許文献 52】 シン等 (Shin et al.) (1998 年)
- 【非特許文献 53】 アルベイラック (Albayrak)、ヤング (Yang)、2002 年
- 【発明の開示】

【0041】

上述の欠陥が、ポリビニールアルコールゲルに固定した固定化酵素又は微生物の形状の生物活性材料を有する生体触媒の工業生産法と、遊離の自然又は前処理（凝集）酵素触媒、又は増殖性微生物、又はその一部とポリビニールアルコールゲルを含む混合物からなる生物活性材料を工業生産に用い、その後混合物を生物活性材料の限度を考慮して温度 80 乃至 15 の乾燥空気流中で、体積対表面積の幾何比を 7 mm^{-1} より大きく保って成形ゲル化し、その結果生成生体触媒を培養し、その後所定バイオテクノロジープロセスにたいして、より高い生産性、より高い生産酵素安定性、長期間の繰り返し使用又は後続の生体触媒の容易な分離プロセスによる規定が可能な制御を維持する条件でバイオテクノロジープロセスで使用する事実に基づくその使用により除かれる。

【0042】

固定化細胞による技術上の主な利点は以下の通りである。生体触媒の繰り返し使用とプロセスの連続化により、高濃度の固定バイオマスをシステムで保持する可能性と関連する所定プロセスの運転費用の少なからぬ削減と、バイオマスの分離と産物単離でのより低い費用。プロセスを連続化した場合、担体基質からのバイオマスの流失は起こらず、非生産的な増殖段階は低減し、収率の増加とより速い反応速度が得られる。本発明に従うバイオテクノロジープロセスの制御法により必要な反応体積と反応時間が減少し、操作費用と投資の低減を意味する利点がもたらされる。

【0043】

レンズ型形状担体、より正確には円筒形の担体で、その高さが底半径より 4 倍乃至、最高 20 倍まで、又は小さなベルト型、より正確にはブロック型で、その次元の一つが他の二つの次元より 4 倍乃至最高 20 倍より小さく、その結果担体の体積対表面積（幾何）比（ S/V ）が 7 mm^{-1} より大きい担体を用いることは、固定化細胞を用いて飲料水、工業用水及び排水から窒素ガスの形で窒素化合物を除去する現行プロセスの強化に望ましい。

【0044】

飲料水、工業用水及び排水から窒素汚染の除去を予定した生体触媒の調合に有用なのは、硝化脱窒細菌をポリビニールアルコールゲルにカプセル封入後、ポリビニールアルコール担体と細菌細胞の混合物を温度 80 乃至 15 で乾燥し、レンズ型形状又は小さなベルト型にゲル化成形することにより、この生体触媒の体積対表面積比が最低 7.0 mm^{-1} にした後に、適切な硫酸ナトリウム溶液で固定化物を硬化することである。次いでこの

固定化物を、含窒素基質にアンモニア性窒素 10 mg / l 乃至 1000 mg / l、硝酸性窒素 10 mg / l 乃至 1500 mg / l 含有の水性栄養媒体中で、温度 20 乃至 35、pH 値 6.0 乃至 9.5 で培養する。

【0045】

生体触媒含有の硝化細菌は、生体触媒含有脱窒細菌とは別に調合する。両方の生体触媒を含有するバイオマスの培養は、硝化脱窒に指定された工業装置で直接実施できる。

【0046】

硝化細菌の純粋な混合培養物（ニトロソモナスヨーロピア（*Nitrosomonas europaea*）とニトロバクターヴィノグラドスキー（*Nitrobacter winogradskyi*））は、カプセル封入の助けて PVA 基質との固定化物調合に用いる。使用の無機栄養細菌（緩徐成長生命体）は、ニトロソモナスヨーロピア（*Nitrosomonas europaea*）細菌の場合にはアンモニア（アンモニア性窒素）酸化による窒素から、ニトロバクターヴィノグラドスキー（*Nitrobacter winogradskyi*）の場合には亜硝酸（亜硝酸性窒素）酸化による窒素から生存エネルギーを得る。脱窒細菌（パラコッカスデニトリフィカンス（*Paracoccus denitrificans*））は、酸素の代わりに硝酸塩の窒素（硝酸性窒素）を電子受容体に用いて、カプセル封入の助けて PVA 基質との固定化物調合に用いる。この脱窒細菌は有機栄養細菌で、その増殖に有機炭素が必要である。使用培養溶液と、実際の工業排水は全く有機物を含まないの、アルコール類、糖類などの有機炭素を、好ましくはメタノールを安価で比較的バイオマスを僅かしか産生しないため添加する必要がある。

【0047】

レンズ型形状の固定化物は、微生物増殖のためにゲル担体全体積（細胞負荷）の最適利用を保つことにより、微生物と酵素の酵素増殖物性の最適利用が保たれ、ポリビニールアルコール（PVA）固定化物を用いるバイオテクノロジープロセスの比生産性増加が見られるのは有用である。このように調合した生体触媒は、バッチ、半連続及び連続の発酵操作形式で繰り返し使用できる。

【0048】

糖類基質からエタノール産生を予定した生体触媒の調合に有用なのは、嫌気性細菌ザイモモナスモビリス（*Zymomonas mobilis*）をポリビニールアルコールゲルにカプセル封入後、ポリビニールアルコール担体と細菌ザイモモナスモ（*Zymomonas*）細胞の混合物を温度 80 乃至 15 で乾燥しゲル化成形後、この固定化物を糖類基質 2 重量% 乃至 25 重量% 含有の水性栄養媒体中で、温度 20 乃至 40、pH 値 3.5 乃至 7.0、エタノール 1 重量% 乃至 15 重量% 存在下に培養することである。このプロセスで固定化細胞を液体部から分離し、産生完了後エタノール産生に繰り返し使用するのは又有用である。このように調合した生体触媒は、バッチ、半連続及び連続の発酵操作形式で繰り返し使用できる。

【0049】

糖類基質から乳酸産生を予定した生体触媒の調合に有用なのは、好熱性有孢子性乳酸菌（*Bacillus coagulans*）をポリビニールアルコールゲルにカプセル封入後、ポリビニールアルコール担体と有孢子性乳酸菌細菌（*Bacillus coagulans*）細胞の混合物を温度 80 乃至 15 で乾燥し、固定化物の体積対表面積比が 7.0 mm^{-1} より大きくゲル化成形後、この固定化細胞を糖類基質 2 重量% 乃至 14 重量% 含有の水性培養媒体中で、温度 30 乃至 60、pH 値 5.0 乃至 7.5、乳酸又はその塩 1 重量% 乃至 12 重量% の範囲で存在下に培養することである。固定化細胞を液体部から分離し、産生完了後乳酸産生のために繰り返し使用するのは又有用である。このように調合した生体触媒は、バッチ、半連続及び連続の発酵操作形式で繰り返し使用できる。

【0050】

有孢子性乳酸菌（*Bacillus coagulans*）CCM 4318 株を乳酸産生の生産性向上に用いるのは有用である。この細胞株自身は乳酸産生で高生産性の特徴を有し、生体触媒の体積対用面積比が最低 7.0 mm^{-1} に保ちながらその生体触媒の限度を考慮すると、この乳酸産生の生産性はより一層高い。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

糖類溶液から転化糖産生を予定した生体触媒の調合に有用なのは、酵素インベルターゼをポリビニールアルコールゲルにカプセル封入後、ポリビニールアルコール担体と酵素の混合物を温度 8 0 乃至 1 5 で乾燥し、固定化物の体積対表面積比が最低 7.0 mm^{-1} にゲル化成形後、このように調合した酵素を温度 2 0 乃至 5 0 、pH 値 3.5 乃至 7.0 で、糖類基質 2 重量% 乃至 5 0 重量% 含有の糖類溶液の加水分解に用いることである。

【 0 0 5 2 】

加水分解完了後固定化インベルターゼを液体部から分離し、転化ショ糖産生に繰り返し使用し、固定化インベルターゼを用いてショ糖加水分解を、バッチ、半連続及び連続形式で実施するのは有用である。

10

【 0 0 5 3 】

ポリビニールアルコールゲル (PVA) へのインベルターゼの固定化に関する本法は、乾燥空気流中温度 8 0 乃至 1 5 でゲルを乾燥することに基づくが、ゲルとインベルターゼ官能基間に相互作用が起こる。固定化物のレンズ型形状により、固定化物の体積対表面積比が最低 7.0 mm^{-1} の場合、ゲル全体積の最適使用とインベルターゼの高い比活性度の達成が保証される。このように固定化した酵素は基質から流失せず、バッチ、半連続及び連続操作形式で利用できる。

【 0 0 5 4 】

多糖類から D - グルコース生成を予定した生体触媒の調合に有用なのは、グルコアミラーゼ酵素をポリビニールアルコールゲルにカプセル封入後、ポリビニールアルコール担体と酵素の混合物を温度 8 0 乃至 1 5 で乾燥し、固定化物の体積対表面積比が最低 7.0 mm^{-1} にゲル化成形後、このように調合した酵素を温度 2 0 乃至 4 5 、pH 値 3.5 乃至 7 で、糖類基質 2 重量% 乃至 4 0 重量% 含有のデンプンの部分的加水分解で生成した多糖類の加水分解に使用することである。

20

【 0 0 5 5 】

ゲル官能基とグルコアミラーゼ間で相互作用が起こる場合、グルコアミラーゼの流失を防ぐために、温度 8 0 乃至 1 5 の空気流中の乾燥プロセスでポリビニールアルコールゲル (PVA) への酵素固定化を実施するのは有用である。本法による固定化酵素は基質から流失せず、バッチ、半連続及び連続形式で利用できる。このように調合したグルコース含有の糖類基質は、発酵食品工業で利用できる。

30

【 0 0 5 6 】

加水分解完了後、固定化グルコアミラーゼは液体部から分離し、グルコース産生に繰り返し使用するのは又有用である。

【 0 0 5 7 】

固定化グルコアミラーゼを用いる加水分解は、バッチ、バッチ供給及び連続操作形式で実施するのは又有用である。

【 0 0 5 8 】

固定化グルコアミラーゼを、エタノールの発酵産生プロセスでデンプン基質の糖化に用いるのは又有用である。

40

【 0 0 5 9 】

固定化グルコアミラーゼを、乳酸の発酵産生プロセスでデンプン基質の糖化に用いるのは又有用である。

【 0 0 6 0 】

ラクトース溶液の加水分解、ラクトース溶液からの D - ガラクトース、D - グルコース及びガラクトオリゴ糖の産生を予定する生体触媒の調合に有用なのは、酵素 β - ガラクトシダーゼをポリビニールアルコールゲルに封入後、ポリビニールアルコール担体と酵素の混合物を温度 8 0 乃至 1 5 で乾燥し、固定化物の体積対表面積比が最低 7.0 mm^{-1} にゲル化成形後、このように調合した酵素を温度 2 0 乃至 6 0 、pH 値 3.0 乃至 7.0 で、糖類基質 2 重量% 乃至 5 0 重量% 含有のラクトース溶液の加水分解に使用する

50

ことである。

【 0 0 6 1 】

加水分解終了後この固定化β - ガラクトシダーゼを液体部から分離し、D - ガラクトース、D - グルコース及びガラクトオリゴ糖産生に繰り返し使用し、固定化β - ガラクトシダーゼを用いてラクトースの加水分解をバッチ、バッチ供給及び連続操作形式で実施するのは又有用である。

【 0 0 6 2 】

固定化生体触媒産生用の装置は工業生産装置であり、生物活性材料の限度により生体担体の体積と表面積を最適化し、連続コンベヤーベルトが通る乾燥通路前方に取り付けた滴下キャスト機械装置を含み、この装置は圧力調整槽とコンプレッサーに連結した二横列のキャストニードルインジェクターを有する少なくとも1つのキャストヘッドと、コンベヤーベルトと、乾燥空気の供給源である乾燥システムを備え、ベンチレーターを用いて上乾燥流路、更には下最終乾燥通路と再膨潤槽を通る内蔵加熱素子を有する送風システムに乾燥空気を吹き込み、下最終乾燥通路と再膨潤槽の間に機械的拭き取りと高圧洗浄に基づいて設計した拭き取り回収装置を取り付け、冷却付き回収容器、更には洗浄槽とパイプラインで連結した低圧ポンプと連結した噴流による連続コンベヤーベルトの最終洗浄用の洗浄ボックスにいたる一体化した高圧ポンプと低圧ポンプとパイプラインで連結する。

【 0 0 6 3 】

本発明に従うこの装置は完全に新規な工業用キャスト装置組み立て品を形成し、電磁石を用いて異なる振動数とパルス長で振動する直径が0.1mm乃至2.00mmの二横列のキャストニードルインジェクターを備えた一つ又は二つのキャストヘッドと、駆動制御部付きのコンベヤーベルト、向流乾燥付き乾燥通路、再膨潤槽、独立の回収用低圧洗浄システム、及びキャスト装置下部の向流乾燥付き下乾燥通路からなる。回収容器の塩水溶液を用いて高圧ノズルに加圧水を送る高圧ポンプを含む独立の高圧洗浄システムがこの装置の一部であることは又有用である。このようにしてコンベヤーベルトから塊の機械的拭き取り効率が増強される。

【 0 0 6 4 】

本修正の装置、即ちこの形式の回収洗浄装置により、ポリビニールアルコール担体に基づく経済的な固定化物の工業生産が中断されることなく確保できることは又重要である。

【 0 0 6 5 】

拭き取り可能な回収装置がエラー無しで機能するのに有用なのは、キャスト装置の一部である拭き取り可能回収装置が側枠で形成され、角度45度乃至80度で洗浄する機械的ポリマーワイパーをバネ圧機構と、枠に固定した支持用ステンレススチールパイプ分配システム上に固定し、高圧噴流システムを用いた洗浄を有するステンレススチール加圧機械装置上に配置し、コンベヤーベルトの内側と外側を洗浄するために、機械的ポリマーワイパー背後にバネ機構で固定したポリマーブラシを有する下ワイパーと上ワイパーがあり、この枠からはみ出た場所で産物からコンベヤーベルトを最終洗浄するために、更には下ワイパーと上ワイパーが備わる場合である。拭き取り可能な回収装置の設計機構により、連続コンベヤーベルト内面が平坦でなく、波形又は凸凹である場合でも、その反対側を又清掃することは又利点である。

【 0 0 6 6 】

本発明に従うこの装置は、他の接着性材料の生産でコンベヤーベルトから他の接着性材料を拭き取るために又利用できる。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 6 7 】

ポリビニールアルコールゲルに固定化した硝化細胞と脱室細胞を用いて、排水から窒素を除去するプロセスにおける上述の担体生産法と使用法を以下の例で説明する。

【 実施例 1 】

【 0 0 6 8 】

固定化物 - 硝化細菌（ニトロソモナスヨーロピア（*Nitrosomonas europaea*）とニトロバクターヴィノグラドスキー（*Nitrobacter winogradskii*））の純粋混合培養液を P V A - ヒドロゲルにカプセル封入して硝化用生体触媒を調合した。

【 0 0 6 9 】

固定化物 - 脱窒細菌（パラコッカスデニトリフィカンス（*Paracoccus denitrificans*））をカプセル封入して脱窒用生体触媒を調合した。

【 0 0 7 0 】

固定化はこのような方法で行った。ポリビニールアルコール（P V A）1 0 0 g、ポリエチレングリコール（P E G）6 0 g 及び蒸留水 7 9 0 g 含有の P V A 溶液を調合した。生成細胞濃度がゲル 1 d m³ 当たり細胞 0 . 6 0 g になるようにバイオマスの均一な懸濁液をこのように調合した溶液に加えた。このように調合した細胞混合物の P V A 溶液を硬いプレート上に滴下後、温度 8 0 乃至 1 5 の乾燥空気流中で架橋成形した。次いで体積対表面積が最低 7 m m⁻¹ の固定化物を、硫酸ナトリウム（0 . 0 1 モル / l）と塩化アンモニウム（0 . 1 モル / l）溶液に 6 0 分間移した。この固定化物を培養、又はその後貯蔵媒体に温度 4 で保存した。

【 0 0 7 1 】

硝化微生物の場合には、バッチ培養を窒素基質のアンモニア性窒素含量が 5 0 m g / l から 5 0 0 m g / l に徐々に増加する水性培養媒体で行い、その間 p H 7 . 0、溶解酸素濃度 1 . 5 m g / l より高くで細胞培養を行った。

【 0 0 7 2 】

脱窒微生物の場合には、窒素基質含量が硝酸性窒素 2 0 0 m g / l と他の栄養物を有する水性培養媒体で、温度 2 0 乃至 3 5 、p H 7 . 8 で、炭素基質としてメタノール存在下にバッチ培養を行った。両生体触媒中のバイオマス含量は、培養後 P V A 1 0 0 0 m l 当たりバイオマス乾物約 6 0 m g 乃至 8 0 m g であった。

【 0 0 7 3 】

次いで調合固定化物を繰り返しバッチ発酵に付した。アンモニア性窒素約 8 0 0 m g / l と、カプセル封入硝化細菌を有する生体触媒 2 0 0 0 g 含有の合成排水（W W）含有量 1 5 l の硝化（アンモニア除去による窒素）を、有効容積 1 7 l の反応装置内で 4 時間後に終了し、1 時間 x 生体触媒 1 k g 当たりアンモニア性窒素約 1 5 0 0 m g の硝化速度で、それぞれ W W m³ x 1 日当たりアンモニア性窒素約 4 . 8 k g と、生体触媒 m³ x 1 日当たりアンモニア性窒素 3 6 k g が得られた。

【 0 0 7 4 】

硝酸性窒素 8 0 0 m g / l の濃度を有する合成排水含有量 1 5 l のカプセル封入脱窒細菌を有する生体触媒 8 0 0 g による脱窒（硝酸塩除去での窒素）を、有効容積 1 5 . 8 l の反応装置中で炭素基質としてメタノール存在下に 3 時間で終了し、1 時間 x 生体触媒 1 k g 当たり硝酸性窒素約 2 0 0 0 m g の脱窒速度で、それぞれ W W m³ x 1 日当たり硝酸性窒素約 6 k g と、生体触媒 m³ x 1 日当たり硝酸性窒素 4 5 k g を与えた。

【 実施例 2 】

【 0 0 7 5 】

アンモニア性窒素 2 0 0 m g / l 乃至 1 0 0 0 m g / l の高窒素汚染濃度でニクロム酸の酸化値がゼロの実排水で、実際に硝化脱窒を連続調整して窒素汚染の除去に実施例 1 で上述したように調合培養した固定化物を用いた。

【 0 0 7 6 】

攪拌硝化反応装置の有効容積は 1 7 l、攪拌脱窒反応装置の有効容積は 3 . 8 l の連続モデル装置を用いて同時の硝化脱窒を試験した。アンモニア性窒素含有量約 1 6 0 0 m g / l を有する実際の工業排水の流速は 1 日当たり 3 5 l であった。

【 0 0 7 7 】

カプセル封入硝化細菌を有する生体触媒 2 0 0 0 g を硝化反応装置に加えた。カプセル封入脱窒細菌を有する生体触媒 8 0 0 g を脱窒反応装置に加えた。

【 0 0 7 8 】

数週間の実験で、平均硝化速度は1時間×生体触媒1kg当たりアンモニア性窒素約1000mg、硝化効率が95%で、炭素基質としてメタノール存在下での平均脱窒速度は1時間×生体触媒1kg当たり硝酸性窒素約1600mgが得られた。窒素汚染除去速度はWW×1日当たり約1.5kg/m³であった。

【実施例3】

【0079】

アンモニア性窒素200mg/l乃至1000mg/lの高窒素汚染含有量でニクロム酸の酸化値の高い(>1000mg/l)実排水で、硝化脱窒を連続調整して窒素汚染の除去に実施例1で上述したように調合培養した固定化物を用いた。

【0080】

このように調合の固定化物をバッチ発酵に付した。カプセル封入硝化細菌を有する生体触媒2000gによるアンモニア性窒素含量約800mg/lの合成排水(WW)15lの硝化(アンモニア除去での窒素)を、有効容積17lの反応装置中で12時間後に終了し、硝化速度1時間×生体触媒1kg当たりアンモニア性窒素約500mgで、それぞれWWm³×1日当たりアンモニア性窒素約1.6kgと、生体触媒m³×1日当たりアンモニア性窒素12kgが得られた。

【0081】

硝酸性窒素800mg/lの濃度を有する合成排水含有量15lと、カプセル封入脱窒細菌を有する生体触媒800gを、有効容積15.8lの反応装置中で炭素基質としてメタノール存在下に脱窒(硝酸塩除去による窒素)して6時間で終了し、脱窒速度1時間×生体触媒1kg当たり硝酸性窒素約1000mgで、それぞれWWm³×1日当たり硝酸性窒素約3kgと、生体触媒m³×1日当たり硝酸性窒素22.5kgが得られた。

【0082】

ポリビニールアルコールゲルに固定化した有孢子性乳酸菌(*Bacillus coagulans*)細胞を用いて、糖類基質から乳酸を産生する上述の担体生産法と使用法を以下の例で説明する。

【実施例4】

【0083】

有孢子性乳酸菌(*Bacillus coagulans*)CCM4318孢子懸濁液は、その保存培養液0.2cm³をペトリ皿(直径9cm)の滅菌済み炭酸カルシウム(3時間、160℃)を有するMRS寒天表面上に播種して調合した。実験室用恒温装置で温度50℃、72時間インキュベートした。次いで孢子形成した培養液を滅菌蒸留水5cm³で覆い、エルレンマイヤーフラスコに移した。次いで得られた懸濁液を温度70℃で25分間インキュベート後、ポリビニールアルコール(PVA)ゲルへの固定化に用いた。

【0084】

ポリビニールアルコール(PVA)100g、ポリエチレングリコール(PEG)60g及び蒸留水790g含有のPVA溶液を調合した。最終細胞濃度はゲル1dm³当たり細胞(乾物)0.67gになるように、バイオマスの均一な懸濁液50mlをこのように調合した溶液に加えた。このように調合した細胞混合物のPVA溶液を硬いプレート上に摘下後、温度勾配80℃乃至15℃の乾燥空気流中で架橋成形した。次いで体積対表面積が最低7mm⁻¹の固定化物を、硫酸ナトリウム溶液(0.1mol/l)に60分間移した。この固定化物をバッチ発酵に用いるか、又はろ過後温度4℃で滅菌水道水中に保存した。

【0085】

産生培地2.6lを有する5lの実験室用発酵槽で、バイオマス増殖を繰り返しのバッチ発酵により実施した。産生培地は蒸留水1l中に、ショ糖60g、酵母抽出物10g、リン酸一水素アンモニウム1g、硫酸マグネシウム7水和物0.2g、硫酸マンガン4水和物0.05g、硫酸第1鉄7水和物0.01gを含有する。この産生培地を短時間煮沸し、温度60℃に冷却後、湿潤固定化物400gを加えた。温度を1時間かけて徐々に45℃に下げ、pHが同時に6.9から5.0に下がった後、26%アンモニア水溶液を加

10

20

30

40

50

えて以下の発酵時に5.8に維持した。バッチ形式で発酵を実施し、連続に攪拌した(200rpm)。糖類基質消費後、固定化物を発酵培地から分離し新規の発酵に用いた。以下の条件下に同様な方法で一連の9回のバッチ発酵を実施した。2回目の転換から5回目の転換までは温度50、pH6.0で、6回目の転換から10回目の転換までは温度52、pH値6.3で行った。発酵の全持続時間は、繰り返し発酵で48時間(第1転換)から12時間(第10転換)に短縮して、乳酸収率91%から93%になった。PVAゲル中のバイオマス濃度は10回目の転換後、固定化物1g当たり細胞0.065gに増加した。

【実施例5】

【0086】

培地組成、固定化物調合、及びバッチ発酵は実施例4で上述したものと類似で、ショ糖の代わりにグルコースを産生培地に用いただけである(60g/l)。発酵14時間後、第10回目の転換で乳酸55.2g/lとグルコース1.2g/lが生じた。

【実施例6】

【0087】

実施例4で上述のように調合した湿潤固定化物350gを6lの発酵槽に移し、蒸留水1l中に、ショ糖60g、酵母抽出物5.0g、リン酸一水素アンモニウム0.8g、硫酸マグネシウム7水和物0.2g、硫酸マンガン4水和物0.05g、硫酸第1鉄7水和物0.01gを含有する産生培地2dm³を加えた。バッチ式で温度52で一定に攪拌し(200回転/分)、アンモニア水溶液(26%)を加えてpH値を6.3に保持して発酵を実施した。ショ糖含有量140g/lと同じ組成の産生培地2lを、ショ糖濃度を20g/dm³に下げた後に発酵槽内の濃度が15g/l乃至30g/lの範囲に維持できる速度で、徐々に一括処理した。培地中の乳酸含有量は15時間後93.5g/dm³で、残留糖は2.6g/lであった。

【実施例7】

【0088】

培地組成と固定化物の調合は実施例5に上述の物と同じであった。固定化物350gを10回目の転換後、6lの発酵槽に移し、蒸留水1l中に、グルコース60g、酵母抽出物5.0g、リン酸一水素アンモニウム0.8g、硫酸マグネシウム7水和物0.2g、硫酸マンガン4水和物0.05g、硫酸第1鉄7水和物0.01gを含有する産生培地2.5dm³を加えた。温度52で一定に攪拌し(200rpm)、pH値を6.3に維持して発酵した。グルコース濃度が20g/dm³に減少後産生培地を徐々に一括処理し、同一組成の発酵培地を反応装置中の残留ショ糖濃度を15g/l乃至30g/lの範囲に維持し、残量グルコース濃度を10g/dm³乃至15g/dm³に、実際の乳酸濃度を40g/dm³乃至48g/dm³の範囲に維持するように取り除いた。発酵を40日間連続で実施し、このプロセスで装置の平均体積生産能は1立方メートル×1時間当たり乳酸13.5乃至17.0gの範囲であった。

【0089】

ポリビニールアルコールゲルに固定化したザイモナスモビリス(*Zymomonas mobilis*)細胞を用いた糖類基質からのエタノール産生プロセスにおける上述の担体生産法と使用法を以下の例で説明する。

【実施例8】

【0090】

250mlの培養フラスコ(温度121で20分間滅菌)中に培養媒体100mlを調合した。この培養媒体は、蒸留水1l中に酵母抽出物5g、硫酸アンモニウム1g、硫酸マグネシウム7水和物0.5g、リン酸二水素カリウム1g、グルコース100gを含有した(pHは5乃至5.5)。次いで調合培地をザイモナスモビリス(*Zymomonas mobilis*)CCM2770培養液で播種し、固体培養媒体上で増殖し温度30で24乃至48時間静的に培養した。このように調合したバイオマスを接種材料(10体積%)として用い、250mlの培養フラスコ中の上述組成の培養液100mlに入れた。温度30

10

20

30

40

50

で静的培養 12 時間後に、この微生物を再度培養媒体 (5 体積%) に移した。バイオマス乾物の値が 1.2 g/dm^3 になるまで温度 30 で培養を実施し、培地を僅かに攪拌するのは有効であった。培養終了後、バイオマスを遠心分離 (5500 回転/分、25 分) により分離し、固定化に使用した。

【0091】

ポリビニールアルコール (PVA) 100 g、ポリエチレングリコール (PEG) 60 g 及び蒸留水 790 g 含有の PVA 溶液を調合した。均一なバイオマス懸濁液 50 ml を、生成細胞濃度がゲル 1 dm^3 当たり 0.56 g になるようにこのように調合した溶液に加えた。このように調合した細胞混合物の PVA 溶液を硬いプレート上に滴下後、温度勾配 80 乃至 15 の乾燥空気流中で架橋成形した。次いで体積対表面積が最低 7 mm^2 の固定化物を、硫酸ナトリウム溶液 (0.1 モル/l) に 30 分乃至 60 分間移した。

【0092】

固定化物中の細胞バイオマスは、 6 dm^3 の実験室用発酵槽で毎回発酵プロセスの殺菌培養媒体 3 dm^3 で増殖した。次いで 23 体積% の固定化物の培養媒体を一定に攪拌しながら (80 回転/分) バッチ式に培養することで培養媒体の pH は 6.5 に調節され、温度 25 で自然に pH = 4.0 に低下した。流体相を除去し、新鮮な培地を固定化物に加え、このプロセスをもう一度繰り返した。次いで流体相を除去し、新鮮な培地を固定化物に加え、pH 値を 6.5 に調節した (1 M 苛性ソーダ溶液により)。次いで一定に攪拌しながら (80 rpm) pH 値を自然発酵により pH = 5 に下げた後、グルコースが枯渇するまで発酵を実施した。流体相を除去し、新鮮な培地を固定化物に加え、このプロセスを 6 回繰り返した。このように調合した固定化物中の細胞乾物は、ゲル 1 dm^3 当たり細胞 65.8 g に増加した。

【0093】

グルコース含有量 150 g/dm^3 を有し、pH = 5.5 の殺菌産生培地 2.2 dm^3 を、このように調合した固定化細胞 (湿潤生体触媒 450 g) に加えた。発酵が一定に攪拌した (80 rpm) 5 l のバイオリアクターで生じ、30 で苛性ソーダ (2 モル/ dm^3) を加えて pH を 5.0 に維持した。発酵 1 時間後、この培地はエタノール 73.8 g/ dm^3 を含有したが、残留グルコース濃度は 1.8 g/dm^3 であった。PVA 担体に固定化したザイモモナスモビリス (*Zymomonas mobilis*) によるエタノールの比生産能は、1 時間当たりゲル 1 ml 当たりエタノール 202 mg に達した。

【実施例 9】

【0094】

実施例 8 に上述したように調合した湿潤固定化物 450 g を、グルコース含有量 200 g/dm^3 を有する産生培地 2.2 dm^3 に加えた (pH = 5.0)。一定に攪拌しながら (80 rpm、) バッチ式で発酵が生じ、温度 30 で苛性ソーダ溶液 (2 モル/ dm^3) を加えて pH を 5.0 に保持した。このように 6 回発酵を実施した。各転換後、13 時間後の培地中のエタノール含有量は、最低 94.0 g/ dm^3 乃至 98.0 g/ dm^3 であり、残留グルコースは 3 g/ dm^3 乃至 8 g/ dm^3 であった (即ち理論収率の 94% 乃至 98%)。

【実施例 10】

【0095】

実施例 9 に上述したように調合増殖した固定化物を用いた。グルコース濃度 150 g/dm^3 を有する産生培地 1050 ml (発酵培地体積の 30% で形成した固定化物) を固定化物 450 g に加えた。一定に攪拌しながら (80 rpm、) バッチ式で発酵が生じ、温度 30 で苛性ソーダ溶液 (2 モル/ dm^3) を加えて pH を 5.0 に保持した。グルコース濃度 320 g/dm^3 を有する培養媒体 1500 ml を、グルコース濃度の値が 20 g/dm^3 に低下後、発酵槽中の残留グルコース濃度が 15 g/dm^3 乃至 30 g/dm^3 に維持する速度で徐々に一括処理した。20 時間後、培地中のエタノール含有量は 113.5 g/dm^3 、即ち理論収率の 91% であり、残留グルコースは 4.6 g/dm^3 であった。

【実施例 11】

【0096】

実施例 8 に上述したように調合増殖したザイモナスモビリス (*Zymomonas mobilis*) CCM2770 固定化物を用いた。湿潤固定化物 450 g をグルコース 150 g / dm³ を有する培養媒体 2.2 dm³ に移し、pH を 5.0 に調整した。発酵が pH = 5.0、温度 30 で生じた。発酵槽中のグルコース含有量の値が 10 g / dm³ 乃至 20 g / dm³ に低下後、グルコース含有量 50 g / dm³ を有する培養媒体を連続処理し、発酵槽中の残留グルコース濃度が 17 g / dm³ 乃至 30 g / dm³ の範囲で、エタノールの実濃度が 58 g / dm³ 乃至 65 g / dm³ の範囲の希釈率で発酵培地を除去した。発酵を 50 日間連続で実施し、装置の容積生産能は 1 時間当たり 1 立方メートル当たりエタノール 30 g であり、エタノールの比生産能が 1 時間当たりゲル 1 ml 当たりエタノール 140 mg に相当する。

10

【実施例 12】

【0097】

実施例 8 と同じ手順でザイモナスモビリス亜種ボマシ (*Zymomonas mobilis subsp. pomacii*) CCM2771 を産生微生物として用いた。発酵 15 時間後に培地はエタノール 68.3 g / dm³ を含み、残留グルコース濃度は 6.8 g / dm³ であった。

【0098】

ポリビニールアルコールゲルにカプセル封入したインペルターゼを用いて、ショ糖溶液から転化糖を生成する上述の担体生産法と使用法を以下の例で説明する。

20

【実施例 13】

【0099】

ポリビニールアルコール (PVA) 100 g、ポリエチレングリコール (PEG) 60 g 及び蒸留水 790 g 含有の PVA 溶液を調合した。酵素調合のインペルターゼ (シグマ社 (Sigma)) (酵素濃度、100 g / l) 50 ml をこの調合溶液に加えた。このように調合した酵素混合物の PVA 溶液を硬いプレート上に滴下後、温度勾配 80 乃至 15 の乾燥空気流中で架橋成形した。次いで体積対表面積が最低 7 mm⁻¹ の固定化物を、硫酸ナトリウム溶液 (0.1 モル / l) に 10 分乃至 120 分間移した。調合固定化物は温度 4 で 10 mm の酢酸緩衝溶液 (pH = 4.5) 中に保存できる。

【0100】

30

このように調合した固定化酵素は、pH 4.5 の 10 mm 酢酸緩衝溶液に溶解したショ糖の加水分解に使用できる。固定化インペルターゼ 120 g をショ糖溶液 (100 g / l) 1000 ml に加えた。温度 30 でバッチ式に一定に攪拌して (80 rpm) 加水分解を実施した。ショ糖は加水分解 50 分後にグルコースと果糖に完全に加水分解した。

【実施例 14】

【0101】

実施例 13 に上述のように調合した湿潤固定化物 120 g を、濃度 450 g / l のショ糖溶液 1000 ml (pH = 4.5、10 mm 酢酸緩衝溶液) に温度 30 で加えた。連続に攪拌してバッチ式で加水分解が生じた。360 分後のこのような残留ショ糖濃度は 10.1 g / l であった。

40

【実施例 15】

【0102】

実施例 13 に上述したように調合した湿潤固定化物 120 g を、濃度 280 g / l のショ糖溶液 1000 ml (pH = 4.5、10 mm 酢酸緩衝溶液) に温度 30 で加えた。一定に攪拌してバッチ式で加水分解が生じた。360 分後のこのような残留ショ糖濃度は 1.8 g / l であった。加水分解後流体相を除去し、固定化インペルターゼを上述の手順で繰り返しのバッチ加水分解に用いた。加水分解 240 分後の残留ショ糖濃度は、6 回の転換後 3 g / l であった。

【実施例 16】

【0103】

50

実施例 13 に上述したように調合した固定化物。湿潤固定化物 25 g を、 $\text{pH} = 4.5$ (硫酸による調整) でシヨ糖濃度 120 g/l を有する糖蜜 0.5 l に移した。 $\text{pH} = 4.5$ 、30 で、200 rpm で攪拌して加水分解を実施した。濃度 120 g/l の糖蜜を発酵槽に連続処理し、発酵槽中のシヨ糖量の値が 30 g/l 乃至 40 g/l に低下後、シヨ糖濃度が 30 g/l 乃至 40 g/l に達する (転換 66% 乃至 75%) 速度で加水分解培地を除去した。この固定化物の比活性度はこの形式では 1 時間当たり 1 グラム当たり 0.35 g (1 時間当たり固定化物 1 グラム当たり評判のシヨ糖のグラム数) であった。

【実施例 17】

【0104】

実施例 13 に上述したように調合した固定化物を用いた。湿潤固定化物 25 g を、 $\text{pH} = 4.5$ でシヨ糖濃度 120 g/l を有する糖蜜 0.5 l に移した。 $\text{pH} = 4.5$ 、温度 45 で、200 rpm で攪拌して加水分解が生じた。濃度 120 g/l の糖蜜を発酵槽で連続処理し、発酵槽中のシヨ糖量の値が 30 g/l 乃至 40 g/l に低下後、シヨ糖濃度が 30 g/l 乃至 40 g/l に達する (転換 66% 乃至 75%) 速度で加水分解培地を除去した。この固定化物の比活性度は、500 時間連続に実施するこの形式の加水分解では、1 時間当たり 1 グラム当たり 0.55 g 乃至 0.60 g (1 時間当たり固定化物 1 グラム当たり評判のシヨ糖のグラム数) であった。

【0105】

ポリビニールアルコールゲルにカプセル封入したグルコアミラーゼを用いた、デンプン加水分解物からのグルコースの産生プロセスにおける上述の担体産生法と使用法を以下の例で説明する。

【実施例 18】

【0106】

ポリビニールアルコール (PVA) 100 g、ポリエチレングリコール (PEG) 60 g 及び蒸留水 790 g 含有の PVA 溶液を調合した。サンウルトラエル (商品名 SUN Ultra L) (ノボザイム社 (Novozymes)) 酵素調合液 50 ml をこの調合溶液に加えた。このように調合した酵素混合物の PVA 溶液を硬いプレート上に滴下後、温度勾配 80 乃至 15 の乾燥空気流中で架橋成形した。次いで体積対表面積が最低 7 mm^2 の固定化物を、硫酸ナトリウム溶液 (0.1 モル/l) に 10 分乃至 120 分間移した。調合固定化物は温度 4 で 10 mm 酢酸緩衝溶液 ($\text{pH} = 4.5$) に溶解して 30 重量% のグルコース中に保存できる。

【0107】

このように調合した固定化酵素を用いてデンプン加水分解物、例えば $\text{pH} = 4.5$ の 10 mm 酢酸緩衝溶液に溶解した麦芽糖モラセス (組成: 多糖類 33 重量%、マルトトリオース 20 重量%、麦芽糖 53 重量%、グルコース 4 重量%) を加水分解した。固定化グルコアミラーゼ 120 g を糖類濃度 100 g/l を有するこのように調合した溶液 1000 ml に加えた。温度 30 で一定に攪拌して (200 rpm)、バッチ式で加水分解を実施した。培地は加水分解 60 分後にグルコース 70 g/l 乃至 80 g/l を含んでいた。

【実施例 19】

【0108】

糖類濃度 250 g/l を有する麦芽糖培地 5000 ml ($\text{pH} = 4.5$) を、実施例 18 に上述したように調合した湿潤固定化物 200 g に温度 40 で加えた。一定に攪拌してバッチ式で加水分解が起こった。このようにして 6 時間でグルコース 180 g/l が生じた。加水分解後流体相を除去し、固定化グルコアミラーゼを用いて上述の手順でバッチ加水分解を繰り返した。産生グルコース濃度は、6 回目の転換後加水分解 6 時間で 178 g/l であった。

【実施例 20】

【0109】

実施例 18 に上述したように調合した固定化物を用いた。湿潤固定化物 25 g を、 $\text{pH} = 4.5$ で糖類濃度 100 g/l を有する麦芽糖モラセス 0.5 l に移した。 $\text{pH} = 4.$

10

20

30

40

50

5、温度30 で、200rpmで攪拌して加水分解が生じた。糖類濃度100g/lの麦芽糖モラセスを発酵槽で連続処理し、発酵槽中のグルコース濃度の値が55g/l乃至65g/lに増加後、グルコース濃度が50g/l乃至60g/lに達する(転換50%乃至60%)速度で加水分解培地を除去した。この固定化物の比活性度は、900時間の連続加水分解実施の形式で、1時間当たり1グラム当たり0.3g乃至0.4g(1時間当たり固定化物1グラム当たり産生グルコースのグラム数)であった。

【実施例21】

【0110】

実施例18に上述したように調合した固定化物を用いた。湿潤固定化物25gを、pH=4.5で糖類濃度100g/lを有する麦芽糖モラセス0.5lに移した。pH=4.5、温度45 で、200rpmで攪拌して加水分解が生じた。糖類濃度100g/lの麦芽糖モラセスを発酵槽で連続処理し、発酵槽中のグルコース濃度の値が55g/l乃至65g/lに増加後、グルコース濃度が60g/l乃至70g/lに達する(転換60%乃至70%)速度で加水分解培地を除去した。この固定化物の比活性度は、1500時間の連続加水分解実施形式で、1時間当たり1グラム当たり0.55g乃至0.6g(1時間当たり固定化物1グラム当たり産生グルコースのグラム数)であった。

【実施例22】

【0111】

実施例18に上述したように調合した固定化物を用いた。糖類濃度195g/lの麦芽糖モラセス、酵母抽出物5g/l、硫酸アンモニウム1g/l、硫酸マグネシウム7水和物0.5g/l、リン酸二水素カリウム1g/lの全てを蒸留水に溶解した組成を有するpH=4.5の培地。固定化グルコアミラーゼを有する固定化剤50gをこのように調合した殺菌培地1lに加えた。次いで懸濁液を微生物の指数増殖期にある10体積%のザイモナスモビリス(*Zymomonas mobilis*)接種材料で播種した。微生物を用いる新生グルコースとエタノール産生の同時利用が加水分解プロセスで起こった。このようにしてエタノールが13.5時間に70g/lで産生した。

【実施例23】

【0112】

実施例18に上述したように調合した固定化物を用いた。糖類含有量80gの麦芽糖モラセス、酵母抽出物10g、リン酸一水素アンモニウム1g、硫酸マグネシウム7水和物0.2g、硫酸マンガン4水和物0.05g、硫酸第一鉄7水和物0.01gの全てを蒸留水1lに溶解した組成を有するpH=6.0の培地を転換に用いた。固定化グルコアミラーゼを有する固定化剤50gをこのよう調合した殺菌培地1lに加えた。次いで懸濁液を5体積%の有孢子性乳酸菌(*Bacillus coagulans*)孢子懸濁液で播種した。微生物を用いる新生グルコースと乳酸産生の同時利用が加水分解プロセスで起こった。発酵24時間後培地に乳酸55.2g/lとグルコース1.2g/lを産生した。

【0113】

ポリビニールアルコールゲルにカプセル封入したβ-ガラクトシダーゼを用いた、ラクトース溶液の加水分解、D-ガラクトース、D-グルコース及びガラクトオリゴ糖生成における上述の担体生産法と使用法を以下の例で説明する。

【実施例24】

【0114】

ポリビニールアルコール(PVA)100g、ポリエチレングリコール(PEG)60g及び蒸留水790g含有のPVA溶液を調合した。ラクトザイム(商品名Lactozyme)(ノボザイム社(Novozymes))酵素調合液50mlをこの調合溶液に加えた。このように調合した酵素混合物のPVA溶液を硬いプレート上に滴下後、温度勾配80乃至150の乾燥空気流中で架橋成形した。次いで体積対表面積が最低 7mm^{-1} の固定化物をリン酸カリウム緩衝溶液(pH=6.5)に10分乃至120分間移した。調合固定化物はエタノールを5%乃至10%加えたリン酸緩衝溶液(pH=6.5)中、温度4で保存できる。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

このように調合した固定化酵素は初期活性 $900 \pm 100 \text{ U} / \text{cm}^3$ を有する。

【実施例 2 5】

【 0 1 1 6 】

実施例 2 4 に上述したように調合した固定化物を用いた。pH = 6.5 で 2 mm 塩化マグネシウムを加えた 0.1 M リン酸緩衝液中のラクトース溶液を加水分解に用いた。固定化 β - ガラクトシダーゼ 130 g をラクトース濃度 100 g / l のこのように調合した溶液 1000 ml に加えた。一定の攪拌 (200 rpm) でバッチ式に温度 30 で加水分解が生じた。加水分解後流体相を除去し、固定化 β - ガラクトシダーゼを上述の手順で繰り返しのバッチ加水分解に用いた。培地は加水分解 210 分後ラクトース 13 g / l 乃至 2 g / l を含有した。

10

【実施例 2 6】

【 0 1 1 7 】

実施例 2 4 に上述したように調合した固定化物を用いた。pH = 6.5 で 2 mm の塩化マグネシウムを加えた 0.1 M リン酸緩衝液中のラクトース溶液を加水分解に用いた。初期活性 $786 \text{ U} / \text{cm}^3$ を有する固定化 β - ガラクトシダーゼ 130 g を、ラクトース濃度 100 g / l のこのように調合した溶液 1000 ml に加えた。連続攪拌 (200 回転 / 分) でバッチ式に温度 30 で加水分解が生じた。転換持続時間は一定であった。固定化剤の活性は 25 回のバッチ加水分解後 5 % 乃至 10 % 減じ、通常 160 時間継続した。

【 0 1 1 8 】

20

上例で記載のポリビニールアルコール担体に基づく固定化物生産用のキャスティング装置の配置について、更なる本文で説明する。以下の説明はこの発明の原理の適用原理を説明するものに過ぎないことは明らかである。

【 0 1 1 9 】

図面 1 に連続的工業生産に適合したポリビニールアルコール担体に基づく固定化物生産用のキャスティング装置の本構成バージョンを示す。この構成バージョンは上乾燥通路 2 前方に配置の摘下キャスティング組み立て部を含み、上乾燥通路 2 は二横列のキャスティングインジェクターを備え、圧力調節槽 15 とコンプレッサー又は加圧空気容器 16 と連結した一つ又は複数の複列摘下キャスティングヘッド 17 で形成される。上乾燥通路 2 は、その内部に制御駆動部を有する連続コンベヤーベルト 1 が通り、乾燥空気供給源 4 である乾燥システムを備え、除湿空気が第 1 補助換気装置 19 を通して一体化した熱素子 5 を有する、数力所で上乾燥通路 2 に通じる送風システム 6 に入る。連続コンベヤーベルト 1 は、上乾燥通路から離れた後、再膨潤槽 7 とキャスティング装置の反対の底側に位置する最終乾燥通路 3 を通りキャスティング装置の一方側に進み、パイプラインにより洗浄ボックス 13 から離れた後にコンベヤーベルトによる最終乾燥に用いる上乾燥通路から乾燥空気を送る第 2 補助換気装置 20 に導かれ、その反対側からは湿潤廃空気の産物 18 が外へ導かれる。機械的拭き取りと高圧洗浄の原理で設計した拭き取り可能な回収装置 9 は、一体化した高圧ポンプ 10 と低圧ポンプ 11 を有するパイプラインにより再膨潤回収用の塩溶液 24 を含み冷却を備えた回収容器 8 と、脱塩水含有の洗浄槽 12 とパイプラインで連結した低圧ポンプ 14 に連結した連続コンベヤーベルト 1 を噴流を用いて洗浄するための洗浄ボックス 13 と連結し、再膨潤用塩溶液 24 を有する再膨潤槽 7 と最終乾燥通路 3 の間で一体化する。

30

40

【 0 1 2 0 】

ポリビニールアルコール担体に基づく固定化物生産用のこの装置の機能は以下の通りである。ポリビニールアルコールゲルと生体物質の混合物を、直径 0.1 乃至 2.00 mm の二横列のキャスティングニードルを備えた二つのキャスティングヘッド 17 で形成した摘下キャスティング組み立て部から、電磁石を用いて異なる振動数又はパルス長で振動して、上乾燥通路 2 を通る駆動制御部付きの連続コンベヤーベルト 1 上に移動するか又は注ぐ。摘下キャスティング用の混合物を、コンプレッサー又は加圧空気槽 16 と連結した圧力調整槽 15 で一括処理する。コンベヤーベルト 1 上の混合物の乾燥は、第 1 補助換気装

50

置 19 と、上乾燥通路の温度勾配を制御し上乾燥通路 2 の各区域に導く空調送風パイプライン 6 に配置した熱素子 5 上を通る連続大気除湿器 4 から得られる水蒸気や水を含まない空気により確保される。次いで連続コンベヤーベルト 1 に付着残留した乾燥混合物は再膨潤用の塩溶液を有する再膨潤槽 7 を通った後、産物、即ちポリビニールアルコール担体に基づく固定化物は、この拭き取り可能な回収装置 9 から引き離される。本装置は高圧ポンプ 10 と噴流で形成した高圧水供給用システムを備え、このシステムは独立の回路に連結する。拭き取り可能なポリマーブレードと、高圧ポンプ 10 が供給する塩水溶液の噴流を用いてコンベヤーベルトから産物を引き離す。最後にコンベヤーベルト 1 は洗浄ボックス 13 と低圧ポンプ 14 に位置する噴流を用いて処理し、洗浄脱塩水は洗浄ボックス 13 から流れ落ちる洗浄槽 12 に回収する。コンベヤーベルト洗浄用の低圧水送出システムは独立の回路と連結する。次いで湿潤コンベヤーベルト 1 を、第 2 補助換気装置 20 を設置したパイプラインを通して上乾燥通路から乾燥空気を送風する下乾燥通路 3 で最後に乾燥し、湿潤廃空気は湿潤廃空気出口 18 を通して下乾燥通路 3 から追い出される。

10

【0121】

図面 2 に再膨潤槽の構成を示す。このバージョンの再膨潤槽 7 は、傾斜した底を有する槽 21 からなり、その最下部には出口弁 22 が産物と再膨潤用の溶液排出のために配置される。コンベヤーベルト 1 は二つの導テンションロール 23 で先導され、同時に槽 21 を通過するコンベヤーベルトの槽 21 を満たした再膨潤用の塩水溶液 24 への浸漬を指定する。

【0122】

20

図 3 に拭き取り可能な回収装置 9 の構成を示す。このバージョンの拭き取り可能な回収装置 9 は、機械的ポリマーワイパーをバネ圧組み立て部 28 を有するステンレススチール圧力組み立て部 27 に配置した側枠 25 からなる。このバネ圧組み立て部 28 は、バネ 35 の上にあるワッシャ付き推力制御ネジ 34 により形成される。拭き取り可能な回収装置 9 は、更に枠 25 に固定した支持用ステンレススチールパイプ分配システムに連結した高圧ノズル 26 により形成され、角度 45 度乃至 80 度で洗浄できる。ステンレススチールパイプ分配システム 30 は高さ調整能を備え、調整ネジ 31 により固定する。コンベヤーベルト 1 は上ワイパーと下ワイパー 29 の間を通りながら、上枠 33 上に固定したポリマーブラシ 32 付き上下ワイパー 29 をコンベヤーベルト内側洗浄のためにワイパー 27 後方のその内外側に堅固に配置する。コンベヤーベルトは枠 25 の出口点でコンベヤーベルト 1 の内外側を最終処理するための下ポリマーワイパーと上ポリマーワイパー 29 を備える。

30

【0123】

拭き取り回収装置 9 の機能は再膨潤槽 7 後方の生産ラインに整え、そこからコンベヤーベルト 1 がこの装置の下部分から、即ち反対方向に外へでる。装置の上部分でコンベヤーベルト 1 上に適応した産物が、今は垂直位に逆さまになることが明らかである。コンベヤーベルトからのその除去法は、機械的ワイパー 27 と又高圧ノズル 26 が協力してコンベヤーベルト 1 の外側に付着した産物に影響するという事実に基づく。コンベヤーベルト 1 上の産物は先ず高圧洗浄に導かれ、バネ圧機械装置 28 付き機械的ワイパー 27 に対し角度 40 度乃至 80 度で働き、コンベヤーベルト 1 に対する傾斜が又 5 度乃至 15 度の範囲で制御できる圧力ノズル 26 により送られた塩水溶液の加圧分配システムにより保証される。ポリマーブラシ付きで、コンベヤーベルト 1 の内側と外側を同時に最終処理する堅固に固定した下ワイパーと上ワイパー 29 は、ステンレススチール圧力組み立て部 28 上のバネ付き機械的ポリマーワイパー 27 の後ろに取り付ける。コンベヤーベルト 1 は、下ポリマーワイパーと上ポリマーワイパー 29 上の枠 25 から離れ、その両側を最後に処理する。

40

【0124】

図面 4 に洗浄ボックス 13 の構成を示す。このバージョンの洗浄ボックス 13 は、互いに連結した蓋 43 付き上部 36 と出口 38 付き下部 37 で形成され、その間をコンベヤーベルト 1 が通り、これら部分はキャスティング機械枠 39 と連結する。更に洗浄水供給管

50

４１と連結した上洗浄ノズル４０は上部３６に取り付け、供給管４１に連結した下洗浄ノズル４２を下部分３７に同様に取り付ける。調節可能なポリマーワイパー４４をコンベヤーベルトの水で拭き取るために上部３６の両側に固定し、ワイパー４５を下部分３７の両側に同様に固定する。洗浄ボックス１３を上組み立て区分４６と下組み立て区分４７により、キャストリング機械枠３９に固定する。

【産業上の利用可能性】

【０１２５】

本発明は固定化物の生産に使用でき、食品工業、製薬及び排水処理、特に窒素化合物を飲料水、上水及び廃水（排水、農業用水、都市上水、工業排水）から生物学的な除去で、そこに存在する種々の窒素化合物を硝化細菌と脱窒素細菌の生理活性により気体窒素に転換し、更には乳酸、エタノール、グルコース及びグルコース・果糖モラセスの生産プロセス、Ｄ・ガラクトースへのラクトースの加水分解、及びガラクトオリゴ糖生産への応用を意図する。これらの全ては、１時間当たり商品名レンチカツ（LentiKats）の固定化物１ｋｇ乃至１０ｋｇの処理能力で、連続的工業生産を提供する装置を用いて生産される。

【０１２６】

食品工業、製薬用途及び排水処理を予定する固定化物生産用のこの装置は、連続生産で使用できる。

【図面の簡単な説明】

【０１２７】

この発明を図面を用いてより詳細に説明する。

【図１】図１はキャストリング機械の図式を示す。

【図２】図２は再膨潤槽の図式を示す。

【図３】図３は回収装置の部分断面を示す。

【図４】図４は洗浄ボックスの図式を示す。

【符号の説明】

【０１２８】

１	駆動制御部付きコンベヤーベルト	
２	上乾燥通路	
３	下乾燥通路	
４	乾燥空気供給源 - 連続吸着型除湿器	30
５	空気パイプライン上の加熱素子	
６	乾燥空気送風システム	
７	生産用キャストリング装置下部の再膨潤槽	
８	冷却付き回収容器	
９	回収用高圧装置	
１０	高圧ポンプ	
１１	送り用低圧ポンプ	
１２	洗浄槽	
１３	洗浄ボックス	
１４	洗浄用低圧ポンプ	40
１５	１０リットル乃至１２リットルの圧力調整槽	
１６	コンプレッサー	
１７	キャストリング用摘下手	
１８	湿潤廃空気用出口	
１９	第１換気装置	
２０	第２換気装置	
２１	槽	
２２	逃がしコック	
２３	テンションロール	
２４	再膨潤用塩溶液	50

2 5	側枠
2 6	ノズル
2 7	機械的ワイパー
2 8	圧力バネ機械装置
2 9	上ワイパー、下ワイパー
3 0	分配管
3 1	調節ネジ
3 2	ブラシ
3 3	上保護枠
3 4	推進制御ネジ
3 5	バネ
3 6	ボックス上部
3 7	ボックス下部
3 8	出口
3 9	キャストイング機械枠
4 0	上洗浄ノズル
4 1	供給管
4 2	低洗浄ノズル
4 3	蓋
4 4	調節可能なワイパー
4 5	ワイパー
4 6	上組み立て部
4 7	下組み立て部

10

20

【図 1】

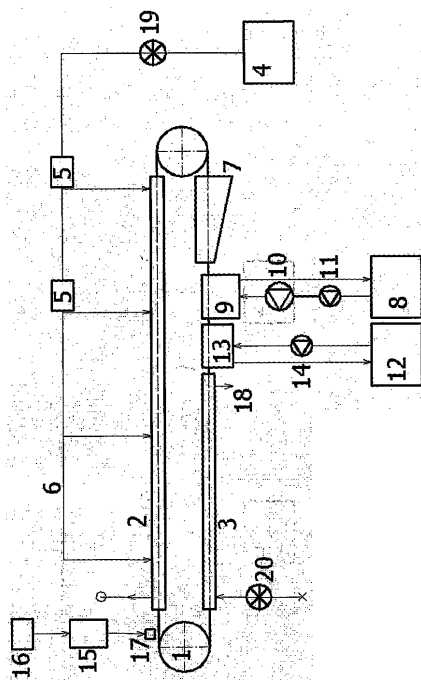


Fig. 1

【図 2】

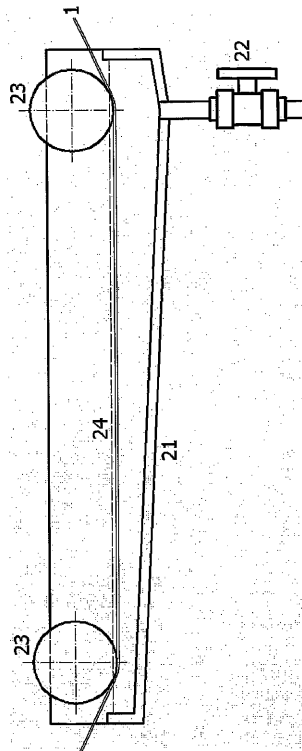


Fig. 2

【図 3】

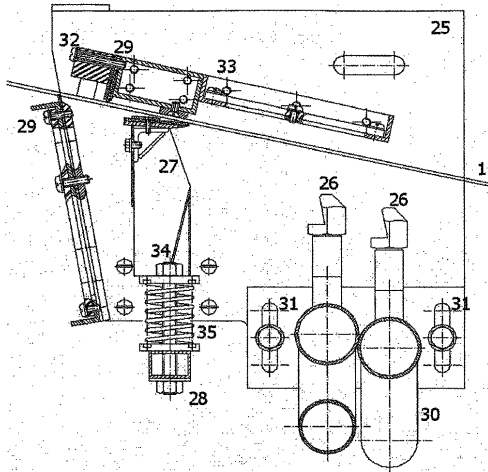


Fig. 3

【図 4】

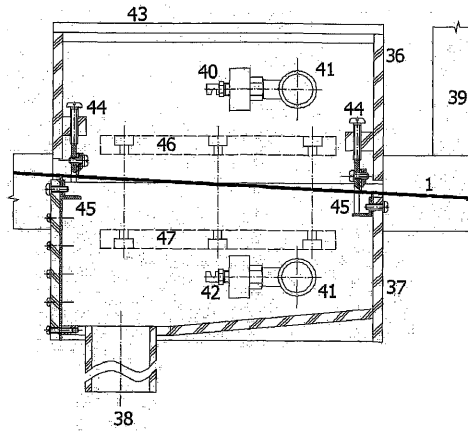


Fig. 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	9/96	(2006.01)	C 1 2 P	19/14	Z
C 1 2 P	7/56	(2006.01)	C 1 2 N	9/96	
C 1 2 P	7/06	(2006.01)	C 1 2 P	7/56	
			C 1 2 P	7/06	

(72)発明者 レブロス, マルティン
スロバキア国 0 2 2 0 1 チャドチャ, エム.アール. ステファニカ 2 5 6 0

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特表2 0 0 2 - 5 1 8 5 7 0 (J P , A)
特開平0 9 - 1 8 7 2 7 2 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C 1 2 N 1 1 / 0 0 - 1 3 / 0 0