

4. 膜による分離

4-1. 精密ろ過膜による菌体の分離

発酵生産物あるいは菌体破砕物から有用物質を得るためには、培地中に含まれる菌体を分離する必要がある。菌体分離は遠心分離法により行われてきたが、最近では膜分離法も用いられてきている。¹⁻⁴⁾

菌体分離に使用される膜として、限外ろ過 (UF) 膜と精密ろ過 (MF) 膜があるが、高い透過流束を得るために、主に MF 膜が使用されている。MF 膜には従来から使用されている有機質膜と最近急速に進展してきたセラミック (無機質) 膜がある。⁵⁻⁷⁾ この両者は用途に応じて使い分けられている。

ろ過型式には dead-end 型ろ過 (DEF) と cross flow 型ろ過 (CFF) があるが、分析用あるいは低菌体濃度液の場合には DEF を用いた全ろ過方式が用いられ、バイオリアクターのような高菌体濃度液の場合には CFF を用いた循環方式が一般に用いられる。

MF 膜を用いた菌体分離への CFF の有効性と問題点に関しては既に述べられているのでそれを参照していただきたい。^{4,8)} CFF 利用の最大の問題点は膜面上に形成される菌体ケーキ層や膜細孔の目詰りによるろ過抵抗の増大による液透過流束の急激な低下である。透過流束を高い状態に維持する方法のなかで、もっとも一般的に行われる方法はガスやろ液による逆洗法である。しかしながら、逆洗を伴うろ過機構に関する定量的検討はほとんど行われていない。そこで本稿では、加圧ポンプ停止法という新しい洗浄法を含めて、菌体の逆洗を伴う CFF におけるろ過特性とそれに及ぼす膜孔径の影響について概説する。

1. CFF における逆洗の効果

パン酵母を 0.9 wt% NaCl 水溶液に分散させた酵母分散液およびグルコースを基質としたエタノール発酵液の平膜による酵母の CFF におけるろ過時間と透過流束の関係を Fig. 1~3 に示す。Fig. 1 は 2分15秒間加圧ろ過を行い、45秒間加圧ポンプを停止する操作のくり返しによる方法の結果である。⁹⁾ Fig. 2 は異なる条件の酵母スラリーの逆洗なしの CFF の結果であり、Fig. 3 はろ液による加圧逆洗を伴う CFF の結果である。¹⁰⁾

いずれの方法においても酵母の場合には、逆洗なし

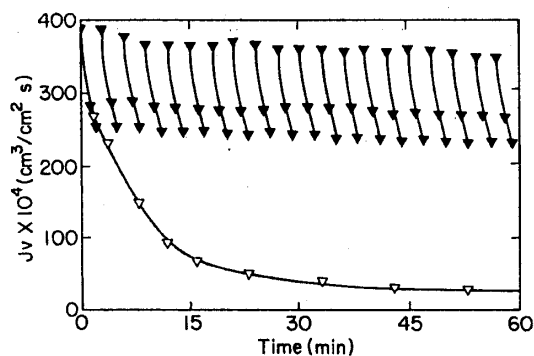


Fig. 1. Relation between filtration flux and filtration time. (membrane: FM-120).

▽, continuous operation of pump, ▼, periodical stop of pump. $\Delta p = 1.0 \text{ kg/cm}^2$; $T = 25^\circ\text{C}$; $Q = 71/\text{min}$; $Cx = 7.0 \text{ g/L}$.

の場合に比較して 5~10 倍の透過流束がえられている。しかしながら、菌体の種類によっては逆洗の効果はそれほどない場合も報告されており、¹¹⁾ 逆洗法が必ずしも万能でないことを示している。

2. 透過流束に及ぼす膜孔径の影響

CFF における透過流束は MF 膜の孔径依存性を示し、菌体の大きさにより最大値を示す最適な孔径が存

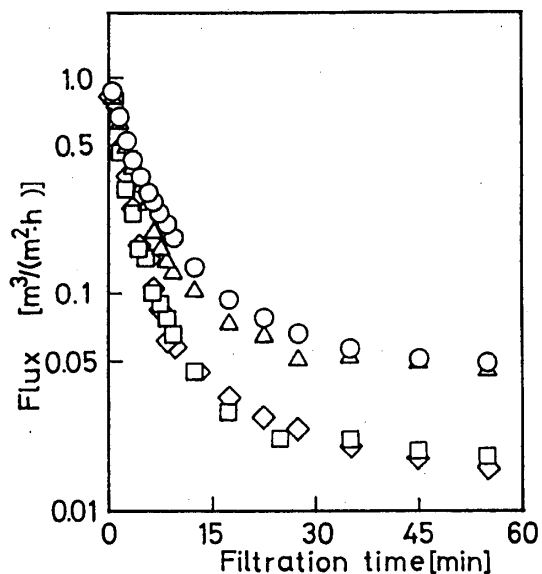


Fig. 2. Relation between filtration flux and filtration time without backwashing. For symbols, see Fig. 3. (membrane: FM-45).

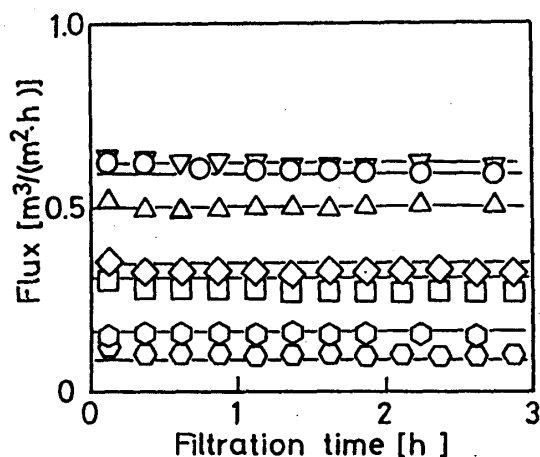


Fig. 3. Relation between filtration flux and filtration time with backwashing by filtrate (membrane: FM-45).

		Yeast concentration (dry-g/l)	pH (-)	Operating pressure (kPa)
Yeast suspension	○	8.5	3.6	50
	△	8.5	6.0	100
	▽	8.5	6.0	50
	○	30.0	3.0	50
Fermentation broth	□	8.5	5.5	50
	◇	10.0	3.0	50
	○	32.2	3.0	50

在することが知られている。酵母のろ過において加圧ポンプ停止法では公称孔径 $0.8\mu\text{m}$ に、ろ液による逆洗法では $0.45\sim0.6\mu\text{m}$ に最適孔径がある。

加圧ポンプ停止法において酵母（乾燥重量 7 g/l ）を 1 kg/cm^2 の圧力でろ過した後、膜面上を水洗した膜の純水透過流束（PWF）の未使用膜の PWF に対する比率は孔径 $0.45\sim1.2\mu\text{m}$ の膜では $50\sim80\%$ となるが、孔径 $3\mu\text{m}$ 以上の膜では約 10% となっており、大孔径膜では透過流束の回復率が低いことを示している。Fig. 4 と 5 は水洗後の膜の断面写真である。孔径 $0.45\mu\text{m}$ の膜 (Fig. 4) では酵母（平均径 $5\sim6\mu\text{m}$ ）は細孔内に侵入していないが、 $5\mu\text{m}$ の膜では細孔内全域にわたって入り込んでいることがわかる。すなわち孔径の大きい膜の透過流束の回復が低い理由は細孔内に残存する酵母によるものと推定される。

3. ろ過式

逆洗を伴う CFF のろ過プロセスを示す式は十分に

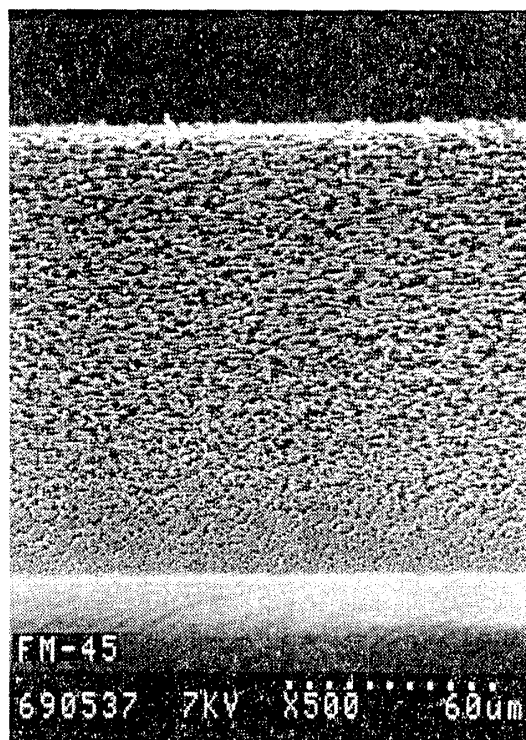


Fig. 4. Cross-sectional view of MF membrane after filtration of yeast. (membrane: FM-45).

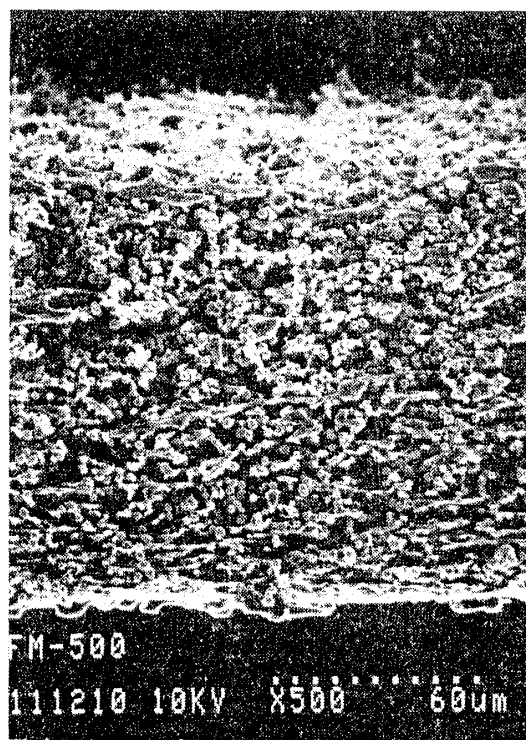


Fig. 5. Cross-sectional view of MF membrane after filtration of yeast. (membrane: FM-500).

検討されていない。ろ過式は一般に式(1)で表される。

$$\frac{1}{q} = \frac{\mu}{A\Delta p} (R_m + R_c) \quad (1)$$

ここで、 q : 透過流束, μ : ろ液の粘度, A : 膜面積, Δp : ろ過圧力, R_m : 膜抵抗, および R_c : ケーク抵抗. 実際のろ過プロセスでは R_m と R_c が同時に増加していくが, モデル的には R_m の変化はろ材閉塞モデルで表され, R_c の変化は Ruth のケークろ過モデルで表される. ろ材(膜)閉塞ろ過には, 完全閉塞, 中間閉塞および標準閉塞ろ過があり, それぞれのモデルにおいてその物理的意味が与えられている.¹²⁾

未使用の MF 膜におけるろ過式はろ過開始後約10分間はみかけ上, 式(2)で表される標準閉塞式に従い, その後ケークろ過に移り, 最終的には一定の透過流束に達する.¹⁰⁾

$$1 - \sqrt{\frac{q}{q_0}} = K_s V \quad (2)$$

ここで、 V : ろ液量, q_0 : ろ過時間 $t=0$ における透過流束および K_s : 膜物性と菌体濃度により決まるろ過定数. 式(2)はろ液による逆洗を行った場合にも適用できた. この結果は, 逆洗により膜面上および膜断面に存在する酵母がほぼ完全に洗い流されることを式の上からは意味しているが, 実際の現象がそうになっていることを必ずしも示すものではない.

菌体を含む発酵液の場合は, 菌体だけでなく, 菌体の代謝生産物や自己分解物質の膜への吸着や堆積によるろ過抵抗の増加があり, ろ過抵抗の構成はモデル的には表現できても, 実際の現象はかなり複雑なものとなっていると推定される.

次に逆洗後のろ過プロセスが式(3)で表せるケークろ過式に従うとすれば, 逆洗の効果は β で評価できる.¹³⁾

$$\frac{1}{q} - \frac{1}{q_0} = \beta K_c V \quad (3)$$

ここで K_c : 菌体濃度により決まるろ過定数, β : 剪断流あるいは逆洗により除去されなかった膜面上のケークの残存率であり, 逆洗工程や CFF を行わない場合は $\beta=1$ となる. すなわち逆洗効果が大きいほど β の値は小さくなる. なお標準閉塞ろ過式を適用する場合は, 未使用膜における q_0 と K_s の値と逆洗を伴う場合のそれらの値を比較することにより逆洗効果を評価できる.

4. 最適逆洗操作

菌体濃度, ろ過圧力および循環流量を一定にすると, 透過流束(ろ過速度)は逆洗時間(あるいは加圧ポンプ停止時間)と逆洗間隔(=ろ過時間+逆洗時間)により決まる. 従って, 式(4)で定義される逆洗間隔当たりの平均透過流束 \bar{q} が最大となる最適な逆洗時間や逆洗間隔が存在することが予想される.

$$\bar{q} = \frac{V_n}{A \cdot t_c} = \frac{V_f - V_b}{A(t_f + t_b)} \quad (4)$$

ここで、 t_c : 逆洗間隔, t_f : ろ過時間, t_b : 逆洗時間, V_n : t_c の間に得られる正味のろ液量, V_f : t_f の間に膜を透過するろ液量および V_b : 逆洗に要したろ液量であり, ガスやポンプ停止による逆洗では $V_b \approx 0$.

式(4)において, V_b および V_f は膜の逆洗条件と劣化度によりほぼ決まる. 最大の \bar{q} を与えると予想される逆洗条件(すなわち t_f , t_b および V_b の決定)は現状では trial and error 方式によって実験的に決めているが, それが最適条件であるという保証は何もない.

5. 今後の課題

逆洗を伴うろ過操作は既に実用的に使われており, その逆洗条件の設定やエンジニアリングの技術は経験的手法により行われている. しかしながら, 逆洗を伴う CFF における膜の劣化状態やろ過機構については, まだ十分に研究されていないと言える. 従って, 最適逆洗条件を菌体分散液や膜の特性値, 膜モジュールの型式および逆洗方法から定量的に予測することは現状では非常に困難である.

ろ過プロセスの予測のためには, Fig. 4 と 5 に示したような観察を含めて, ろ過の基本的現象を詳細に調べるような基本的研究と実験データの蓄積が必要であり, その研究が CFF の実用化をより発展させるものと思われる.

文 献

- 1) McGregor, W. C. (Ed.): *Membrane Separation in Biotechnology*, Marcel Dekker, Inc. (1986).
- 2) Asenjo, J. A., Hong, J. (Ed.): *Separation, Recovery and Purification in Biotechnology*, ACS symposium series 314 (1986).
- 3) 中村厚三: バイオエンジニアリング (日本醸酵工学会編), p. 99, 日刊工業新聞社 (1985).
- 4) 永井史郎: 膜, 12, 22 (1987).
- 5) Taniguchi, M., Kotani, N., Kobayashi, T.: *J.*

- Ferment. Technol.*, 65, 179 (1987).
- 6) 中島忠夫, 清水正高, 富山典孝: SPG 応用技術研究会創立3周年記念研究成果論文集 (SPG 応用技術研究会) (1986).
 - 7) 樋口浩之, 中尾真一, 木村尚史: 化学工学協会第19回秋季大会要旨集, p. 256 (1985).
 - 8) 中西一弘, 田所敬章, 松野隆一: 醸酵工学, 63, 458 (1985).
 - 9) 大谷 肇, 中尾真一, 木村尚史: 日本醸酵工学会大会要旨集, p. 146 (1986).
 - 10) Matsumoto, K., Katsuyama, S., Ohya, H.: *J. Ferment. Technol.*, 65, 77 (1987).
 - 11) Kroner, K. H., Schütte, H., Hustedt, H., Kula, M. R.: *Process Biochemistry*, 19, 67 (1984).
 - 12) Hermia, J.: *Trans. Institut. Chem. Engers.*, 60, 183 (1982).
 - 13) 泰平信夫, 末岡明伯: 膜分離プロセスの設計法 (日本膜学会), p. 17, 喜多見書房 (1985).

4-2. 限外ろ過膜による発酵液の分離・濃縮

1. はじめに

近年精密ろ過, 限外ろ過あるいは逆浸透などの膜を利用した分離精製技術が急速に進展し, 発酵分野においてもその適用が注目を集めている。

その中で限外ろ過膜は, 分離する粒子あるいは分子の大きさから言うと精密ろ過膜と逆浸透膜の中間に位置するものであるが, 菌体の濃縮・分離などの精密ろ過膜の適用範囲からタンパク質等の生体高分子物質の濃縮脱塩などに至る幅広い範囲の利用が可能であり, 発酵プロセスにおける重要な分離技術であると考えられる。

本稿では, 限外ろ過膜による発酵液の分離・濃縮の実例について, おもに筆者らの経験を中心に紹介する。

2. 膜法の利点と発酵プロセスへの適用工程

発酵液の分離・濃縮を膜法によって行う場合の特長

としては, 以下のような点が挙げられる。

1) 低温で操作できる

従来の蒸発濃縮などに比べ, 製品への熱負荷が少ないので, 熱に弱い酵素などの生体成分の濃縮が容易である。

2) 相変化や化学試薬添加の必要がない

硫酸塩析や有機溶媒による沈殿操作に比べ, 相変化がないので, 分離成分の活性変化の危険性が少なく, 試薬の添加を必要としないのでランニングコストが安い。

3) 密閉系で処理が可能である

特に最近の遺伝子組み換え菌による物質生産などのバイオハザード対策を要するものには有利であろう。

4) 分離液の清澄度が高い

発酵液では菌体などの懸濁成分を多く含み, 粒径が小さく溶媒である水との密度差も小さいため, 遠心分離法やプレコートフィルターろ過法では, 清澄度の高い液を得ることが困難である場合が多いが, 膜法により従来得られなかった清澄度の高い分離液を得ることが可能となった。

以上は, 膜法一般にあてはまるが, 限外ろ過法の特長として次の点を追加することができる。

5) 分子量の違いによる分画分離が可能

6) 低い静水圧で操作できる

同時に運転も容易でランニングコストも安い。

7) ウイルスやパイロジェンの除去が可能

発酵プロセスにおける限外ろ過の適用工程について一覧表としてまとめたものを Table 1 に示した。

3. 使用される膜材質および膜形状について

UF (限外ろ過) 膜の素材としては, ポリスルホン系が中心であるが, その他にもポリオレフィン系, ポリエーテルスルホン系, ポリイミド系, セルロース系などがあり, 最近ではセラミック系も開発されて

Table 1. Application of ultrafiltration on fermentation process.

Process	Conventional procedures	Character of UF
Harvesting & washing of microbial cell	centrifugation	high yield, closed system
Clarification of broth	centrifugation, filter press etc.	aseptic, closed system, removal of virus
Separation of cell debris	centrifugation etc.	closed system
Separation of biopolymer	salting out etc.	mild condition, low cost
Concentration & desalting of biopolymer	salting out, gel filtration, evaporation etc.	without phase change (mild condition), low cost