●特集 : バイオリアクター

有機酸から中性アミノ酸を生産する バイオリアクターにおけるイオン交換膜による生成物分離

宮脇長人・藤井智幸・矢野俊正

東京大学農学部農芸化学科 〒113 東京都文京区弥生 1-1-1

Product Separation in Bioreactors to Produce Neutral Amino Acids from the Corresponding Organic Acids

Osato Miyawaki, Tomoyuki Fujii and Toshimasa Yano

Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo,
Bunkyo-ku, Tokyo 113, JAPAN

As a typical example for the product separation in bioreactors to produce neutral amino acids from the corresponding organic acids, separation of the mixture of lactate and L-alanine was attempted by the method with negatively charged sulfonated polysulfone reverse osmosis membrane and by the electrodialysis with ion exchange membranes. By one step electrodialysis, lactate and L-alanine could be completely separated from each other. The same method will be commonly applicable to the most of bioreactor processes for neutral amino acids being investigated extensively.

Key words : bioreactor, separation, electrodialysis, amino acid

バイオリアクターによる有機酸から中性アミノ酸を生産するプロセスにおける生成物分離の代表例として、乳酸とL-アラニン混合物の分離を、陰荷電スルホン化ポリスルホン逆浸透膜による分離法およびイオン交換膜による電気透析法により行った。一段の電気透析法により、混合液から乳酸とL-アラニンが完全に分離できることがわかった。多くの中性アミノ酸の酵素法による製造プロセスが研究されており、電気透析法はこれらに共通の生成物分離手段になりうるものと思われる。

1. 緒 言

種々のアミノ酸脱水素酵素によるアミノ化反応やアン

モニア・リアーゼ反応を利用して有機酸から光学特異的に中性アミノ酸を製造するプロセスが研究されており、L-アラニン¹⁾、L-ロイシン²⁾、L-フェニルアラニン^{3, 4)}の製造が試みられている。これらのプロセスはすべて有機酸とアンモニアから中性アミノ酸を生産する点において共通しており、その特徴は、基質と生成物の水溶液での荷電状態が全く異なることである。そこでこの点に着目し、このようなプロセスに、一般的に適用できる可能性のある方法として、荷電逆浸透膜による分離法およびイオン交換膜による電気透析法を適用し、典型的な例として、乳酸とL-アラニン混合液からの各成分の分離を試みた。乳酸とL-アラニンは乳酸脱水素酵素と、L-アラニン脱水素酵素共役バイオリアクターによるL-アラ

Fig. 1 Electro dialysis unit with gauze electrodes of Ag (+) and AgCl (-), and anion (A) and cation (C) exchange membranes. Compartments (1), (2), (6) and (7) contain 0.5 M NaCl and compartments (3) to (5) contain 0.05 M Tris-buffer (pH=8) with or without 0.1 M L-lactate and L-alanine at the beginning.

ニン製造プロセス¹⁾における基質および生成物としての意味を有している。

2. 実験方法

2・1 荷電逆浸透膜による分離法

スルホン化ポリスルホン膜 NTR-7410 または 7450 (日東電工) をペリコンカセットシステム (日本ミリポアリミテッド) に装着し, 0.05 M トリス緩衝液 (pH=8) に溶解した 0.1 M L-乳酸と 0.1 M L-アラニン混合液を室温, 出口圧 1.0 kgf/cm² の条件で分離実験を行い, 透過液の組成分析を行った. L-乳酸および L-アラニンの分析は酵素法^{5, 6)} によった. 酵素はそれぞれについて, 牛心臓 L-乳酸脱水素酵素および *Bacillus subtilis* 由来の L-アラニン脱水素酵素 (ともに Sigma 社製) を用いた.

2・2 イオン交換膜による電気透析

Fig. 1 に示すような電気透析装置を用い, 陽イオン

Table 1 Rejection of L-lactate and L-alanine by sulfonated polysulfone reverse osmosis membrane

Type of membrane	Solute	Rejection
NTR-7410	L-Lactate	17.6%
NTR-7410	L-Alanine	14.0%
NTR-7450	L-Lactate	17.8%
NTR-7450	L-Alanine	10.1%

[L-Lactate]=[L-Alanine]=0.1 M in 0.05 M Tris-buffer, pH=8.

交換膜, 陰イオン交換膜としてそれぞれ徳山曹達製 CH-45 T (スルホン基含有ポリスチレン膜, イオン交換容量=1.8~2.3 meq/g) および AFS-4 T (第四級アミン含有ポリスチレン膜, イオン交換容量=1.8~2.5 meq/g) を用いた. 電極は陽極に銀, 陰極に塩化銀のガーゼ電極を用い, 液室 (1), (2), (6) および (7) には 0.5 M NaCl をいれ, 中央の三室 (3), (4), (5) に 0.05 M トリス緩衝液 (pH=8) に溶解した, それぞれ 0.1 M の L-乳酸と L-アラニン混合液 5 ml を入れ, 分離実験を行った.

3. 結果および考察

はじめに陰荷電型スルホン化ポリスルホン逆浸透膜を用いた分離実験の結果を Table 1 に示す. NTR-7410 (公称 NaCl 阻止率=10%), NTR-7450 (同=50%) 共に L-乳酸および L-アラニンに対する阻止率は 10~20% 程度であり, また両者に対する選択性は陰荷電膜の性質を反映して, 乳酸に対してやや大きい阻止率を示すものの,それほど大きな差ではなく, この方法による両者の分離は困難であると考えられた.

そこで次に, イオン交換膜を用いた電気透析法によって, 両者を分離することを試みた. はじめに Fig. 1 中

Table 2 Electro dialysis of the mixed solution of L-lactate and L-alanine contained in the compartments (3), (4) and (5)

Compartment	[L-Lactate]	[L-Alanine]	pH
(3) (4) (5); before dialysis	0.1 M	0.1 M	8.0
(3); after dialysis	0.182	0.0862	9.26
(4); after dialysis	0.0012	0.0761	6.83
(5); after dialysis	0.0742	0.0922	3.91

Table 3 Electrodialysis of the mixed solution of L-lactate and L-alanine contained only in the compartment (4)

Compartment	[L-Lactate]	[L-Alanine]
(3),(5); before dialysis	0 M	0 M
(4); before dialysis	0.1	0.1
(3); after dialysis	0.0937	0
(4); after dialysis	0	0.0676
(5); after dialysis	0	0.0227

中央の三つの液室 (3) (4) (5) に L-乳酸と L-アラニン混合液を入れ、定電流条件 (100 mA) で約 25 分間 (電圧; 32~40V) 電気透析を行った。これは、この時間内の電気透析によって、液室の一部においてはイオンがほとんど失われ、全体の電気抵抗が急上昇 (10 倍以上) して、定電流回路が過負荷になるためである。実験結果を Table 2 に示す。電気透析によって、負に帯電している L-乳酸 ($pK=3.79$ at $25^{\circ}C$) は中央の液室 (4) から陽極に近い隣室 (3) に移動しており、また液室 (5) からの L-乳酸の陽極側への移動は少なく、陽イオン交換膜によって強く阻止されていることがわかる。これに対して L-アラニンは、等電点が 6.01 で中性に近いため、各液室からあまり移動していない。L-乳酸および L-アラニンともに、全体として電気透析後の収支が約 15% 減少しているが、これは膜材質に対する吸着または、液室 (3)~(5) 以外の液室へのリークによるものと思われる。

次に中央の液室 (4) のみに同様に乳酸と L-アラニンの混合液を入れて、電気透析を行った場合の結果を Table 3 に示す。乳酸は液室 (4) から (3) へほぼ完全に

移動しており、また L-アラニンは一部だけ液室 (4) から (5) に移動するものの、全体としては乳酸と L-アラニンはほぼ完全に分離されていることがわかる。この方法をバイオリクターにおける生成物分離手段とする場合には、液室 (4), (5) より生成物 L-アラニンを回収し、未反応の基質である乳酸は液室 (3) より回収してリクターにフィードバックすれば良いことがわかる。なお、この場合も電気透析後での各成分の回収率が透析前の 90% 程度となっており、Table 2 の場合と同様な理由によるものと思われる。

バイオリクターによる有機酸から中性アミノ酸の製造プロセスにおいては、ほとんどの中性アミノ酸の等電点が 6 付近であることを考慮すると、以上示したようなイオン交換膜を用いた電気透析法が、生成物分離手段として一般的に有効であると思われる。

引用文献

- 1) P. Davies, K. Mosbach : Biochim. Biophys. Acta, **370**, 329 (1974).
- 2) T. Oshima, C. Wandrey, M.-R. Kula, K. Soda : Biotech. Bioeng., **27**, 1616 (1985).
- 3) Y. Asano, A. Nakazawa : Agric. Biol. Chem., **51**, 2035 (1987).
- 4) S. Yamada, K. Nabe, N. Izuo, K. Nakamichi, I. Chibata : Appl. Environ. Microbiol., **42**, 773 (1981).
- 5) O. Miyawaki, K. Nakamura and T. Yano : J. Chem. Eng. Japan, **15**, 224 (1982).
- 6) A. Yoshida : Anal. Biochem., **11**, 383 (1965).

(受付 1989 年 3 月 7 日)