

# 限外濾過法による菌体破砕物と酵素の分離

菅 田 浩  
小 山 憲 治  
村 山 敬 一  
赤 沢 道 博

## Separation of Enzymes from Cell Debris Using an Ultrafiltration Method

Kou SUGETA  
Kenji KOYAMA  
Keiichi MURAYAMA  
Michihiro AKAZAWA

An ultrafiltration method to separate enzymes from cell debris was investigated using a UF-3000PS membrane. The liquid which permeated the UF-membrane was transparent, and no cell debris penetrated the membrane. The recovery of enzymes was approximately 96% for 4th numbers of batch. The advantage of using the UF-membrane method to separate enzymes from cell debris was further discussed.

### 1. はじめに

限外濾過法で菌体破砕物と酵素の分離を検討した。微生物を利用する生化学物質の生産において、目的生化学物質の多くは菌体内に存在するので、単離・精製にはまず菌体を濃縮し、そして菌体を破砕して目的生化学物質を水溶液中に抽出する。その後、菌体破砕物と目的物質の分離に移行する。菌体破砕物と目的生化学物質の分離は遠心分離法、濾過法や沈澱法が主に用いられてきたが、必ずしも効率的であるとはいえず条件によっては十分清澄な液がえられないこと、収率が低いこと、またクローズド系での運転操作ができない等の欠点がある。

さて、限外濾過は高分子物質（蛋白質、酵素、合成高分子、コロイド等）の濃縮・脱塩の技術で発展してきた。これは高分子物質は膜で阻止し、低分子物質は膜を透過させる大ざっぱなふるい分け技術である。市販の限外濾過膜の分画分子量が1万～5万に集中していることがその目的が多いことを物語っている。

分画分子量が大きい限外濾過膜があれば高分子物質まで膜を透過させることが可能になり、その適応範囲は広がってくる。すなわち菌体の濃縮・洗浄<sup>1)</sup>、ウィルスの除蛋白質<sup>2)</sup>、高分子物質の分子量分画<sup>3)</sup>など従来の限外濾過では不可能であった分野にまで適用が広がってくる。我々は分画分子量が100万のUF-1000PS、300万のUF-3000PSの膜を開発した。これらの膜は他社膜を含めても市販されている限外濾過膜の中では一番孔径の大きい膜であり、又ユーザーから好評を得ている膜である。

この報文は遺伝子組み換えで生化学物質を製造する場合のモデル系を仮定して、孔径の大きいUF-300PS膜を用いた限外濾過法で菌体破砕物と酵素の分離を検討した。

### 2. 実 験

#### 〔1〕 試料

菌体溶液 (E. Coli, 濃度 100 g/l) 3 l を超音波で処理して菌体を破砕し、これに酵素（ペルオキシダーゼ、

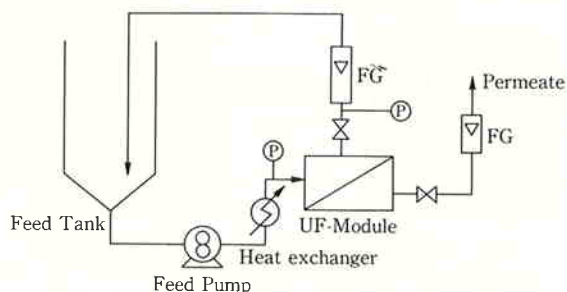


Fig. 1 Schematic diagram of ultrafiltration by TOSOH-UF system UF-20SS.

分子量4万)を100 mg/l となるように加えたものを試料原液とした。

#### (2) 限外濾過膜および装置

限外濾過膜は東ソー(株)製, UF-3000PS (公称分画分子量300万)を用いた。

限外濾過装置は東ソー(株)製, UF-20SS システム, 膜面積が 0.2 m<sup>2</sup> のシステムを用いた。システムのフローシートを Fig. 1 に示した。

#### (3) 操作方法

原液を処理する前に純水で次の条件に設定した。

- 純水の循環量: 7 l/min
- 純水の膜透過速度: 15~45 l/m<sup>2</sup>·hr の間に設定して最適の条件を探索した。

上記条件に設定して最適の条件を探索後, 次のように濾過操作を行った。

- a) システム内をりん酸緩衝液で洗浄・置換する。
- b) 試料原液 3 l をタンクに入れ, 1 l まで3倍濃縮する。
- c) 濃縮液をりん酸緩衝液で元の 3 l に希釈する。
- d) 再び, 3倍濃縮する。
- e) b~d の操作を3回繰り返す。

#### (4) 酵素活性測定法

- 1) ペルオキシダーゼの酵素活性測定は ABTS 発色法で行った。
- 2) 操作温度は 10°C で行った。
- 3) 阻止率は(1)式で計算した。

$$\text{阻止率(\%)} = (1 - \frac{\text{透過液の酵素活性}}{\text{原液の酵素活性}}) \times 100 \quad \dots (1)$$

### 3. 結果と考察

#### (1) 最適条件の探索

限外濾過法は従来主として高分子と低分子との分離を目的として使用されてきた。これに対して本研究では,

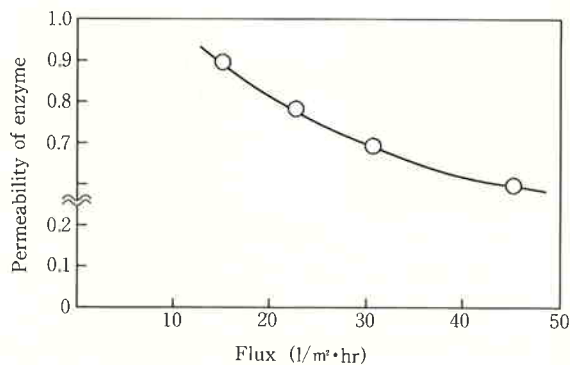


Fig. 2 Effect of the flux on the apparent permeability of enzyme through UF-3000PS membrane.

懸濁物である菌体破砕物と高分子である酵素とを分離することが目的であり, 積極的に酵素を膜透過させねばならず, その条件について検討した。限外濾過はクロスフロー法で膜面を洗浄しながら操作するため膜面線速度は重要であるが高効率で酵素を膜透過させる必要がある場合, 最適の線速度が存在する。その線速度は低い。前報<sup>1)</sup>から循環量は 7 l/min (膜面線速度 0.5 m/sec) に固定した。

膜透過速度の酵素の透過率に与える影響を見るため, 循環量を 7 l/min に固定して純水の透過速度を 15 l/m<sup>2</sup>·hr~45 l/m<sup>2</sup>·hr の範囲で変化させた。Fig. 2 に酵素の透過率への膜透過速度依存性を示す。この膜透過速度範囲では比較的高い透過率が得られているが, 明らかに膜透過速度の増加により酵素の透過率は減少傾向にある。すなわち, 循環速度を一定に保ちつつ膜透過速度を増加させると, 膜に阻止された菌体破砕物の高濃度層が膜表面に形成され, 高分子である酵素はこの高低抗層を水や低分子物質と同じ速度で通過できず, このため膜透過液中の酵素濃度は原液中のそれに比べ低い値を示すものと考えられる。菌体破砕物と酵素との限外濾過分離において, 濾液としてできるだけ高濃度の酵素溶液を得る必要があるとき, 膜透過速度は低く設定することは効果がある。

#### (2) 回分回数と酵素回収率の関係

1) の考察より循環量 7 l/min で純水の膜透過速度を 15 l/m<sup>2</sup>·hr に設定して3倍濃縮回分法を4回繰り返した。

原液の酵素活性を100とした場合の3倍濃縮回分回数と濾液中の酵素活性の収率の関係を Fig. 3 に示す。膜透過液は透明であり菌体破砕物のもれはない。ペルオキシダーゼ酵素の回収率は回分1回目で約62%, 回分4回

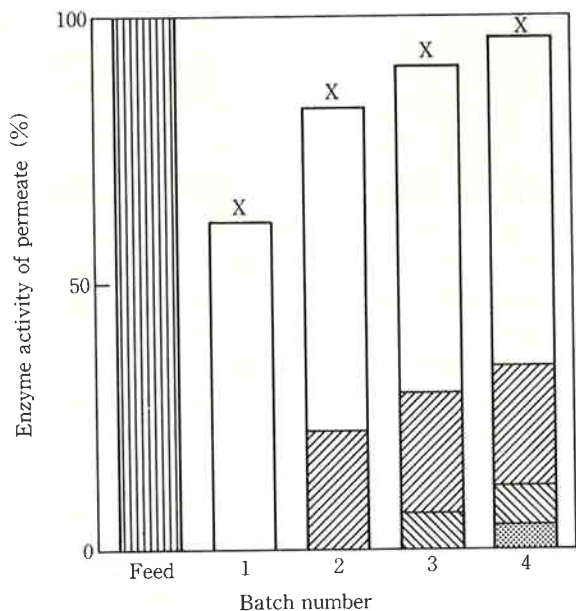


Fig. 3 Relationship between the enzyme activity and batch number.

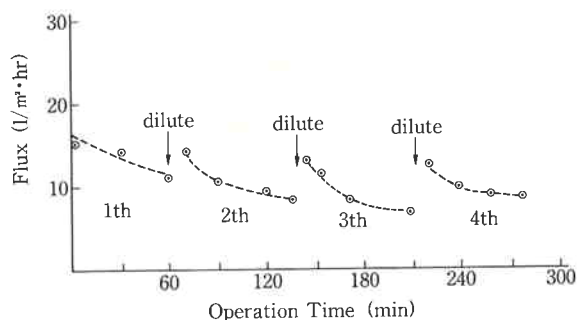


Fig. 4 Relationship between the flux and operation time.

目で約96%の回収率であった。阻止率が変化しないと仮定した理論値は(2)式<sup>4)</sup>で計算した。

$$C_p/C_f = 1 - \{(1/X)^{1-R}\}^n \quad \dots\dots (2)$$

ここで  $C_p$  は滲液中の全酵素活性,  $C_f$  は原液の全酵素活性,  $X$  は濃縮倍率(この実験では3),  $R$  は阻止率(ここでは [1] の結果から0.1),  $n$  は回分回数である。(2)式の理論値は×印で示した。両者はほぼ一致しており, 分画操作中に阻止率の変化がなく, 理想的な条件下で膜分離していることが明らかである。

Fig. 4 に操作時間と透過速度の関係を示した。濃縮と共に透過速度は低下はしているが平均の透過速度は約  $9 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$  である。

(3) 処理液量と膜面積の関係

2) の結果から酵素の回収率が95%以上得られるの

は, 3倍濃縮回分法で4回, すなわち原液量の2.67倍<sup>(注)</sup>の液量を膜透過させればよい。この膜透過液量を膜透過速度と必要とする処理時間で割れば膜面積が計算できる。

処理原液量  $X \text{ l}$

処理時間  $Y \text{ hr}$

膜透過速度はこの実験から  $9 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$  とすると, 膜面積 ( $\text{m}^2$ ) =  $2.67X/9 \cdot Y$  の関係になる。

注) 3倍濃縮であるから1回の回分法で透過する液量は処理原液 ( $X$ ) に対して  $(2/3)(X)$  である。

回分処理4回であるから

$(2/3)(X)(4) = 2.67(X)$  となる。

4. おわりに

UF-3000PS 膜を用いた菌体破砕物と酵素の分離は非常に有効である。特に膜滲過液は透明であり何の処理もすることなく, 次の工程のクロマト分離に移行することは可能である。従来使用されてきた連続遠心分離では, 菌体破砕物と目的酵素の密度差が小さく, 又液の粘性も高いので遠心上清に菌体破砕物が移行して清澄な液は得られにくく, 滲過をして次工程に移行している。次に膜法での酵素回収率は95%以上もあり, 遠心分離法と比較しても十分高い。

以上のことから菌体破砕物と酵素の分離に膜法を用いる利点は,

- a) 清澄な酵素溶液が得られ次工程に容易に移行できる。
- b) 酵素回収率が高い。
- c) 操作が簡単。
- d) クローズド系で操作が可能。
- e) 処理時間が短い。以上のことが考えられる。

今後は菌体破砕物と酵素の分離において Bioprocessing Aid (BPAS) を用いた膜滲過法を検討する予定である。

文 献

- 1) 大野, 小山, 村山; “発酵工学会誌” **62**, 189 (1984)
- 2) TOSOH; “membrane Separation Report”
- 3) 小山他; “東洋曹達研究報告” **26**, (1)25 (1982)  
ibid, 27, (2)75 (1983)  
TOSOH; “membrane Separation Report”
- 4) 萩原, 橋本; “膜による分離法” 講談社, 79



著者

氏名 菅田 浩  
Kou SUGETA

入社 昭和61年4月1日

所属 科学計測事業部  
企画開発部  
精製技術開発室  
システムデザイングループ

著者

氏名 小山 憲治  
Kenji KOYAMA

入社 昭和44年3月4日

所属 企画開発部  
ソフト開発室  
応用技術グループ  
副主任研究員

著者

氏名 村山 敬一  
Keiichi MURAYAMA

入社 昭和53年4月3日

所属 生物学研究所  
第五研究室  
主任研究員

著者

氏名 赤沢 道博  
Mishihiko AKAZAWA

入社 昭和47年4月16日

所属 企画開発部  
精製技術開発室  
システムデザイングループ  
グループリーダー