

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4689043号
(P4689043)

(45) 発行日 平成23年5月25日 (2011.5.25)

(24) 登録日 平成23年2月25日 (2011.2.25)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 D
C 1 2 M 1/02 (2006.01)	C 1 2 M 1/02 A
C 1 2 M 1/12 (2006.01)	C 1 2 M 1/02 B
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/12 A
	C 1 2 N 1/00 A

請求項の数 93 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-582528 (P2000-582528)
 (86) (22) 出願日 平成11年10月15日 (1999.10.15)
 (65) 公表番号 特表2003-529316 (P2003-529316A)
 (43) 公表日 平成15年10月7日 (2003.10.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB1999/001688
 (87) 国際公開番号 W02000/029544
 (87) 国際公開日 平成12年5月25日 (2000.5.25)
 審査請求日 平成18年10月11日 (2006.10.11)
 (31) 優先権主張番号 09/193,384
 (32) 優先日 平成10年11月17日 (1998.11.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501196747
 バイオコン インディア リミテッド
 インド国 561 229 バンガロー、
 ヘバゴディ、トウェンティース ケイ. エ
 ム. ホスル ロード
 (74) 代理人 100106448
 弁理士 中嶋 伸介
 (74) 代理人 100067817
 弁理士 倉内 基弘
 (72) 発明者 シュリクマル スリアナラヤン
 インド国 560 034 バンガロー、
 フォース ブロック コラマンガラ、エイ
 ス メイン ロード、553ビー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固体状態発酵法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオリアクターが微生物を培養するすべてのステップを封じ込めた環境中で行う、微生物を固体培地上で培養するためのバイオリアクターであって、下記を含む当該バイオリアクター：

他のモジュールの上に適合してモジュールのスタックを形成する複数のモジュール、それらのモジュールは、更に、下記を含む：

一平面内に配置した連絡用チャンネル及び非連絡用チャンネルにより形成された底板（ここで、モジュール内側において、非連絡用チャンネルは孔を有さない一方で、連絡用チャンネルは孔を有し、流体が連絡用チャンネルからモジュール内側へ出ることを可能にする）；

モジュールの底板に載せたフレーム；及び
 混合装置。

【請求項 2】

バイオリアクターが、微生物が外側環境から分離され続けて運転される、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 3】

バイオリアクターのモジュールの環境を特異的に制御することのできる、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 4】

バイオリアクターをステンレス鋼又はポリカーボネートから作ってある、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 5】

バイオリアクターが、各モジュール中に配分した固体状態培地を更に含む、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6】

固体状態培地を、メイズブラン、トウモロコシ、小麦、大豆殻、大豆、セリアル、パーミキュライト、セライトCRポリウレタンフォーム、よりなる群から選択する、請求項 5 に記載のバイオリアクター。

【請求項 7】

固体培地が、水溶液を吸収することのできる任意の支持材料である、請求項 5 に記載のバイオリアクター。

【請求項 8】

水溶液が、栄養培地である、請求項 7 に記載のバイオリアクター。

【請求項 9】

バイオリアクターが、各モジュールに配分された微生物を更に含む、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 10】

微生物が、遺伝子改変されている、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 11】

微生物を、細菌、酵母及びカビよりなる群から選択する、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 12】

カビが、無隔壁である、請求項 11 に記載のバイオリアクター。

【請求項 13】

カビが、有隔壁である、請求項 11 に記載のバイオリアクター。

【請求項 14】

カビが、細胞内有隔壁である、請求項 11 に記載のバイオリアクター。

【請求項 15】

カビが、細胞外有隔壁である、請求項 11 に記載のバイオリアクター。

【請求項 16】

モジュールが、モジュール内から外側環境への漏出を防止するように適合されている、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 17】

モジュールが、外側の汚染物がモジュールの内側に入るのを防止するように適合されている、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 18】

モジュールが、ゴムガスケットでシールすることにより一緒に適合されている、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 19】

モジュールの寸法とスタックの大きさを調節することができる、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 20】

複数のモジュールのスタックを並行して運転する、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 21】

モジュールが、複数の形状である、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 22】

モジュールが、方形の形状である、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

連絡用と非連絡用チャンネルが、互い違いになっている、請求項 19 に記載のバイオリアクター。

【請求項 24】

モジュールが、円形の形状である、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 25】

連絡用及び非連絡用チャンネルを放射状に配置した、請求項 18 に記載のバイオリアクター。

【請求項 26】

連絡用チャンネルが、モジュールへの流体の等しい分配のために分枝している、請求項 18 に記載のバイオリアクター。

10

【請求項 27】

連絡用チャンネルが、流体がモジュールの内部へ入れるように孔を有する、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 28】

非連絡用チャンネルが、流体を運ぶための管である、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 29】

非連絡用チャンネルが、流体を運ぶための連絡用チャンネルを形成する管の間のスペースにより形成される、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 30】

20

非連絡用チャンネルが、伝導によりモジュールの温度を制御する手段として加熱及び冷却用流体を運ぶ、請求項 28 又は 29 に記載のバイオリアクター。

【請求項 31】

連絡用チャンネルが、流体を運ぶ、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 32】

流体を、スチーム、空気、水、接種物又は有機溶媒よりなる群から選択する、請求項 31 に記載のバイオリアクター。

【請求項 33】

非連絡用チャンネルが、熱を伝導することのできる流体を運ぶ、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

30

【請求項 34】

非連絡用チャンネルにより運ばれる流体が、スチーム、空気又は水である、請求項 33 に記載のバイオリアクター。

【請求項 35】

底板が、連絡用及び非連絡用チャンネルを挟む 2 枚の金属シートを含む、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 36】

底板が、連絡用及び非連絡用チャンネルを挟む 2 枚の金属シートを有しない、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 37】

40

2 枚の金属シートが、複数の孔を有する、請求項 35 に記載のバイオリアクター。

【請求項 38】

孔が、流体が連絡用チャンネルからモジュールの内部に入ることができるように連絡用チャンネルに開けた孔に対応する、請求項 37 に記載のバイオリアクター。

【請求項 39】

底板上に載せたフレームが、固体培地が底板と接触するように固体培地のための容器を形成する、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 40】

熱を、培養中に、伝導によりバイオリアクターから除去する、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

50

【請求項 4 1】

フレームの高さを調節することのできる、請求項 1 に記載のバイオリクター。

【請求項 4 2】

フレームの高さが、4 ~ 8 cm である、請求項 1 に記載のバイオリクター。

【請求項 4 3】

混合装置を、固体培地の混合のためにモジュールの中心に配置した、請求項 1 に記載のバイオリクター。

【請求項 4 4】

混合装置が、少なくとも 2 つの混合用アームを含む、請求項 1 に記載のバイオリクター。

10

【請求項 4 5】

混合装置が、1 つの混合用アームを含む、請求項 1 に記載のバイオリクター。

【請求項 4 6】

混合用アームにブレードを取り付けてある、請求項 4 5 に記載のバイオリクター。

【請求項 4 7】

混合用アームが、回転し得る、請求項 4 5 に記載のバイオリクター。

【請求項 4 8】

混合用アームが、モジュールの中心軸の周りで旋回することができる、請求項 4 5 に記載のバイオリクター。

【請求項 4 9】

回転と旋回が 2 つの独立したシャフトにより達成される、請求項 4 7 又は 4 8 に記載のバイオリクター。

20

【請求項 5 0】

回転速度の旋回速度に対する比を、バイオリクターの内容物の等しい再分配を可能にするように固定してある、請求項 4 7 又は 4 8 に記載のバイオリクター。

【請求項 5 1】

2 つの独立のシャフトを少なくとも 1 つの独立のモーターにより駆動する、請求項 4 9 に記載のバイオリクター。

【請求項 5 2】

2 つの独立のシャフトを 2 つの独立のモーターにより駆動する、請求項 4 9 に記載のバイオリクター。

30

【請求項 5 3】

バイオリクターが、更に、中心分配ポートを含む、請求項 1 に記載のバイオリクター。

【請求項 5 4】

流体を連絡用チャンネルに送達するための手段として、中心分配ポートを連絡用チャンネルに接続した、請求項 5 3 に記載のバイオリクター。

【請求項 5 5】

中心分配ポートが、リングである、請求項 5 3 に記載のバイオリクター。

【請求項 5 6】

バイオリクターが、ヘッダー装置を更に含む、請求項 1 に記載のバイオリクター。

40

【請求項 5 7】

流体を非連絡用チャンネルに導くために、ヘッダー装置を非連絡用チャンネルに接続した、請求項 5 6 に記載のバイオリクター。

【請求項 5 8】

バイオリクターが、更に、収集ポートを含む、請求項 1 に記載のバイオリクター。

【請求項 5 9】

底板内の非連絡用チャンネルを離れる流体を集めるために収集ポートを非連絡用チャンネルに接続した、請求項 5 8 に記載のバイオリクター。

【請求項 6 0】

50

収集ポートが、分配リングと同心で且つ中心分配ポートの直ぐ内側にあるリングである、請求項 5 8 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6 1】

内部収集リングの直径が、分配リングの直径より大きく、それにより、周辺の円形ヘッダーから非連絡用チャンネルに入る流体が、分配リングを超えて、収集ポートに流れ込み、収集リングを通してモジュールから流れ出る、請求項 6 0 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6 2】

バイオリアクターが、その各モジュールに接続した交互の放出板及び捕集板を更に含む、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6 3】

流体が、放出板を通してモジュールに入る、請求項 6 2 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6 4】

流体が、捕集板を通してモジュールを去る、請求項 6 2 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6 5】

頂部放出板又は捕集板が、連絡用チャンネルの底部にのみ孔を有し且つ底部放出板又は捕集板が、連絡用チャンネルの上部にのみ孔を有する、請求項 6 2 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6 6】

放出板及び捕集板が、流体をバイオリアクター内に保持できるように閉じることのできるバルブを有する、請求項 6 2 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6 7】

放出板及び捕集板が、バイオリアクター内の圧力が増大するように閉じることのできるバルブを有する、請求項 6 2 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6 8】

頂部放出板の上及び底部放出板の下に、くぼんだ両端を更に含む、請求項 6 2 に記載のバイオリアクター。

【請求項 6 9】

バイオリアクターが、そのバイオリアクターの操作のための補助装置を更に含む、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 7 0】

バイオリアクターが、抽出された生成物の精製のための装置を更に含む、請求項 1 に記載のバイオリアクター。

【請求項 7 1】

封じ込めた様式で運転するバイオリアクター内で微生物を培養して細胞性生成物を抽出する方法であって、下記を含む当該方法：

封じ込めた様式で運転する単一の発酵装置内での次のステップの実施

固体培地の殺菌ステップ；

固体培地への微生物の接種ステップ；

微生物の培養ステップ；

細胞性生成物の微生物からの抽出ステップ；及び

抽出された細胞と使用した固体培地の殺菌ステップ。

【請求項 7 2】

殺菌前に、バイオリアクターを、その内部が外側環境から分離されるように組み立てるステップを更に含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

モジュールの殺菌前に、バイオリアクターに固体培地を充填するステップを更に含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

殺菌を、加熱用流体をバイオリアクター内に送ることにより行う、請求項 7 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 5】

加熱用流体が、スチーム、水、空気又は他の任意の流体を包含する、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

殺菌を、バイオリアクター内の圧力を増大させることにより行う、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

殺菌を、殺菌用ガスをバイオリアクター内に送ることにより行う、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

殺菌ガスを、エチレンオキシド及びオゾンよりなる群から選択する、請求項 7 7 に記載の方法。

10

【請求項 7 9】

殺菌を、殺菌用化学薬品をバイオリアクター内に送ることにより行う、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 0】

殺菌用化学薬品を、 - プロピオラクトン、過酸化水素及びピロカルボン酸ジエチルエステルよりなる群から選択する、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

培養が、バイオリアクターの温度を制御することを更に含む、請求項 7 1 に記載の方法

20

【請求項 8 2】

バイオリアクターの温度の制御が、冷却用及び加熱用流体を、バイオリアクター内の固体培地と接触しない様式でバイオリアクターを通過させることを含む、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

培養が、バイオリアクターの酸素含有量を制御することを更に含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

培養が、バイオリアクターの湿度の制御を更に含む、請求項 7 1 に記載の方法。

30

【請求項 8 5】

方法が、固体培地に微生物を接種した後に固体培地を混合することを更に含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 6】

微生物の培養が、バイオリアクター内の水分含量を流体をバイオリアクター内に送り込むことにより調節することを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 7】

微生物の培養が、バイオリアクター内の酸素含有量を酸素をバイオリアクター内に送ることにより調節することを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 8】

微生物の培養が、バイオリアクターの温度を調節することを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

40

【請求項 8 9】

微生物の培養が、化学薬品及び栄養物よりなる群から選択した物質をバイオリアクターの運転中にバイオリアクターに加えることを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 9 0】

抽出を、抽出用流体をバイオリアクター内に送ることにより行う、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 9 1】

抽出用流体が、有機溶媒を含む、請求項 9 0 に記載の方法。

50

【請求項 9 2】

殺菌が、抽出語にバイオリクター内に残っている培地を殺菌した後にバイオリクターを分解することを更に含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

抽出された細胞と使用した固体培地の殺菌のステップが、殺菌された抽出された細胞と使用した固体培地を処理することを更に含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

背景

固体状態発酵法は、数世紀にわたって、最もしばしば食品生産に関して、実施されてきており、微生物例えばカビ、酵母及び細菌を湿った固体基材上で増殖させる技術と定義することができる。最近数年間に、固体状態発酵法及びその酵素、代謝産物及び有機化合物製造への応用に関心が再燃してきた。固体状態発酵用装置は、一般に用いられている液中発酵法を、収率、コスト及び使い易さにおいて超える幾つかの利点を提供する。それらの経済的利点にもかかわらず、産業用の固体状態発酵用装置の商品化は、効率的及び実際のデザインの欠如のために限られていた。

10

【0002】

様々な固体状態発酵用装置が以前に記載されている(総説としては、例えば、Larroche等「Special Transformation Process Using Fungal Spores and Immobilized Cells」、Adv. Biochem. Eng. Biotech., (1997), 55巻、179頁; Roussos等「Zymotis: A large Scale Solid State Fermenter」、Applied Biochemistry and Biotechnology, (1993), 42巻、37-52頁; Smits等「Solid-State Fermentation-A Mini Review, 1998, Agro-Food-Industry Hi-Tech, 3/4月、29-36頁を参照されたい)。これらの装置は、2つのカテゴリーに入り、それらのカテゴリーは、静的システムと攪拌式システムである。静的システムにおいては、固体培地は、発酵プロセス中定常的である。固体状態発酵法に用いる定常的システムの例には、フラスコ、ペトリ皿、トレー、固定床カラム及びオープンが含まれる。攪拌式システムの一例は、回転ドラム(Larroche等、前書)である。

20

【0003】

静的及び攪拌式の両固体状態発酵システムにおける主要な問題は、発酵プロセスで生じる熱の効率的除去を得ることである。多くの固体状態発酵システムで採用されている熱除去の一つの方法は、エアレーションである。熱除去の手段としてエアレーションを用いることの不利益は、熱が除去されるだけでなく、固体マトリクスから水も蒸発し、基材の乾燥を生じることである。定常的エアレーションは又、バイオリクター内の酸素と二酸化炭素の濃度に関して安定な環境を維持することを一層困難にもする。熱蓄積を回避する他の手段は、基床を混合することである。残念ながら、発酵中の混合は、細胞の損傷及び基材粒子のひどい凝集を生じる。基材の凝集は、局所的な基材温度の不均一を生じ、それは、バイオマスの増殖と活性に局所的差異を生じる。これらの問題は、ある生成物の工業的製造にしばしば必要とされる大規模なシステムにおいて一層大きいものとなる。当分野で利用可能な装置を用いる固体状態発酵法の大規模実施は、大きな労働力を要するという更なる不利益を有する。

30

40

【0004】

固体状態発酵法に含まれるステップには、1) 培養装置及び培養培地の殺菌、2) 微生物の培養培地への接種、3) 微生物の培養、4) 培養微生物からの生物学的生成物の抽出、及び5) 廃棄物及び培養装置の抽出後処理が含まれる。培養システムが機構を与え、それにより、培養プロセス中の増殖環境が、特定の条件が培養プロセス中維持されるように正確に制御されることも望ましい。今日まで固体状態発酵法に利用可能な何れの装置も、単一の発酵装置内で固体状態発酵法に必要なすべてのステップを実施することを可能にしない。今までのところ、固体状態発酵法の実施は、時間のかかる実際的でない複数の操作を行うことを含んでいる。かかる操作は、しばしば、培養環境を培養環境外からの汚染物質にさらし、効率的且つ正確に培養を制御する能力を妨げ、そして低下した品質及び/又は

50

収率を生じる危険にさらす。

【 0 0 0 5 】

固体状態発酵法に含まれるすべての操作を、封じ込められた様式で操作することができ且つバイオリクター内の環境を微生物の増殖を阻害せずに制御することのできる単一の装置内に合わせた小型のリアクターが入用である。その上、化学物質及び栄養物をバイオリクターに、汚染を生じずに、均一に加えることを可能にする装置が入用である。

【 0 0 0 6 】

発明の要約

本発明は、微生物培養のための改善された固体状態発酵用装置を提供する。一般に、この発明は、バイオリクター及び固体培地上での微生物の培養のためのバイオリクターの利用方法を提供する。出願人は、ここでは、本発明のバイオリクターにプラフラクター(商標)として言及する。好適具体例において、この発明は、本質的にモジュール方式であって、固体状態発酵工程のすべてを単一の封じ込められた環境で実施するバイオリクターを提供する。このバイオリクターのモジュール性は、バイオリクターの大きさをユーザーの要求に合わせることを可能にする。バイオリクターの構造は、固体状態発酵法を、発酵中の微生物が発酵工程のコース中外側環境から分離されているような仕方を実施することを可能にする。ある好適具体例において、これらのモジュール内の環境は、特定の条件に合うように正確に制御される。

10

【 0 0 0 7 】

このバイオリクターの一つの面は、発酵中にバイオリクター内に蓄積する熱を伝導により除去する機構である。特に、このバイオリクターは、個々のモジュールを積み上げることにより構築される。このバイオリクターのモジュール構造は、他のものの上に積み重なった多数のモジュールを与え、各々は、固体培地を外部環境から分離して保持するためのフレームに接続された底部を有する。このバイオリクターの底板は、非連絡用チャンネルと呼ばれる多数のチャンネルを有し、それは、2枚のシートの間挟まれて加熱及び冷却流体を運ぶ。熱は、伝導により、これらのモジュールへ移動し、そこから移動する。この方法により、このモジュールの温度は、正確に、種々の微生物の特定の要求に合うように維持される。

20

【 0 0 0 8 】

このバイオリクターの他の面は、流体をモジュールの内部に加える機構である。この具体例において、上記のモジュールの底部は、流体をモジュールの内部に送達し、それにより、バイオリクター内の水分及び酸素含有量を調節する方法を提供するための連絡用チャンネルと呼ばれる第2のチャンネルのセットを含む。例えば、最適の増殖のためには、幾つかの微生物は、高い二酸化炭素濃度を必要とする。この具体例の他の面は、関心ある化合物を微生物から抽出することのできる機構を与える。例えば、関心ある化合物を採集するために抽出するための抽出用流体を、連絡用チャンネルを通して送ることができる。この具体例の更に別の面において、これらの連絡用チャンネルは、蒸気、ガス(例えば、エチレンオキシド又はオゾン)又は化学薬品(例えば、プロピオラクトン、過酸化水素又はピロカルボン酸ジエチルエステル)をバイオリクター及びその内容物の殺菌のために発酵の前及び後にバイオリクター内に送ることができる。本発明の最後の面は、バイオリクターの運転中にバイオリクターに加えることのできる物質(例えば、化学薬品及び/又は栄養物)である。

30

40

【 0 0 0 9 】

更なる具体例において、本発明は、バイオリクターの内容物を混合する機構を提供する。本発明により、各モジュールの内部は、回転中、そのモジュールの中心軸の回りを旋回する混合用アームを有する。混合は、発酵工程中の混合するのが適当であると認められる任意の時点で行うことができる。好ましくは、混合は、バイオリクター内の培地への接種後に、接種物をバイオリクター内の培地に均等に分配するように起こす。

【 0 0 1 0 】

本発明の教示は、特に、微生物による生成物の生産及び抽出のために利用することができ

50

る。ある好適具体例において、これらの微生物は、生物学的に有用な生成物を生成し、それは、バイオリアクター内の微生物から抽出することができ、医薬及び工業的利用のために収穫することができる。本発明により生成され得る医薬品の幾つかの例は、ロバスタチン及びシクロスポリンである。工業的利用において用い得る生成物には、微生物酵素レンネット及びペプチダーゼが含まれる。様々な微生物の何れでも、本発明により利用することができる。

【0011】

好適な具体例の詳細な説明

定義

「固体状態発酵」又は「固体状態培養」：用語「固体状態発酵」及び「固体状態培養」は、しばしば、「半固体状態の発酵」として言及され、ここでは、任意の自由に流れる物質の非存在下で微生物に係留点を与える微生物の固体培地上での発酵工程を意味する。固体培地中の水の量は、任意の量であってよい。例えば、固体培地は、殆ど乾燥していてもよいし、どろどろでもよい。当業者は、用語「固体状態発酵」と「半固体状態発酵」が交換可能であることを知っている。

10

【0012】

「バイオリアクター」：用語「バイオリアクター」は、ここで用いる場合、微生物を接種された発酵培地を保持して、固体状態発酵工程を封じ込められた様式で実施することのできる装置を意味する。バイオリアクターを用いて、封じ込められた環境内の特定の条件下で増殖することのできる任意の微生物を増殖させることができる。バイオリアクター内で増殖することのできる微生物の幾つかの例は、カビ、酵母及び細菌である。特に好適な微生物は、カビである。本発明で用いることのできるカビには、有隔性及び無隔性のカビが含まれる。有隔性のカビは、細胞外の又は細胞内の有隔性のカビであってよい。

20

【0013】

「培養プラント」：用語培養プラントは、ここで用いる場合、微生物を封じ込められた環境中で増殖させることのできるバイオリアクターに、そのバイオリアクター装置を運転するのに必要な補助装置を加えたものをいう。本発明による培養プラントは、幾つかの繋がったモジュールのスタックと培養プラントの運転に係する補助装置よりなる。補助装置の幾つかの例は、温度プローブ、湿度センサー、排気ガス分析器、圧力センサー、空気流センサー、シードファーマンター、水又は栄養物追加用タンク、制御管ラック及び重量センサーである。コンピューターにより自動化され得る様々な他の有用物には、冷却水、流れ、及び濾過圧縮空気の移動が含まれる。その他は、真空の操作、シードトランスファー、水又は栄養物のモジュールへの添加及びパイラックの制御を包含する。かかる補助装置及びコンピューターによる自動化の例は、当分野では周知である。

30

【0014】

「モジュール」：モジュールは、ここで用いる場合、底板とフレームにより形成される構造をいう。底板は底部を形成し、フレームは構造の側面を形成し、それは、培地を保持するための容器として役立ち得る。個々のモジュールは又、そのモジュールの環境を制御することを可能にする他の構成要素例えば混合用アーム、連絡用及び非連絡用チャンネル(以下に詳述)をも有する。個々のモジュールは、他のものの上に積み重ねて、シールされた内部環境を形成することができ、それは、これらのモジュールの内容物の外側環境への漏出を防ぎ、モジュール外からの粒子によるモジュール内部の汚染をも防ぐ。

40

【0015】

「スタック」：ここで用いる場合、用語「スタック」は、他のモジュールの上に置いて高さを調節できるバイオリアクターを造り出す培養プラント内の複数のモジュールをいう。

【0016】

「封じ込められた」：用語「封じ込められた」は、ここで用いる場合、「封じ込められた」と「無菌の」の両方の定義をカバーしている。語「封じ込められた」は、バイオリアクターが、バイオリアクター内で増殖している微生物を囲むことができることを意味する(例えば、バイオリアクター内の生菌は環境と接触することはできず、環境を汚染すること

50

はできない)。この特徴は、バイオリアクターを病原性微生物の培養に用いる場合又は、一般に、局所的調節が封じ込められた装置内で増殖させることをしばしば必要とする改変された微生物の培養に用いる場合に、特に有用である。「封じ込め」の定義は、リアクター内容物から環境を保護することに集中しており、リアクター内容物を環境から保護することではない。例えば、外側環境からバイオリアクター内へものを動かすが、バイオリアクターの内容物が外側環境を汚染することは許さない低圧システムを有することにより封じ込めを達成することができる。

【 0 0 1 7 】

本発明のバイオリアクターを操作する「無菌の」様式は、バイオリアクターの内容物を環境による汚染から防護するようなものである。無菌操作は、所望の微生物のみをバイオリ
10
アクター内で増殖させて均一な所望の産物を再現可能に生成することを可能にするので有用である。この無菌の環境は、最終産物が、生産工程にばらつきをもたらす外部の未知の微生物により汚染されないことを確実にする。

【 0 0 1 8 】

従って、このバイオリアクターは、封じ込めた様式で操作し、即ち、このバイオリアクターは、バイオリアクターの内容物を環境による汚染から防護し且つその内容物から環境を防護する。封じ込めた環境で操作するこのバイオリアクターの他の有利な点は、水分含量、酸素含有量、及び温度を、所望の条件に合うように正確に制御することができることである。

【 0 0 1 9 】

「天然の」：用語「天然の」は、ここで用いる場合、自然環境において、人の介入や遺伝子操作なしで、微生物により生成されるタンパク質又は化学生成物を意味する。
20

【 0 0 2 0 】

「遺伝子の変化された」：用語「遺伝子の変化された」又は「遺伝子改変された」は、ここでは、遺伝子操作による人の介入の結果、微生物により生成される任意の生物学的生成物又は、遺伝子工学若しくは組換えDNA技術により変化させた微生物自体に言及する際に用いる。例えば、関心ある特定のタンパク質をコードする遺伝子を組換えDNA技術により微生物に導入して、その微生物にそのタンパク質を生成させることができる(Ausubel等、「Current Protocols in Molecular Biology」, Greene Publishing Associates, New York, V.1&2 1996(参考として本明細書中に援用する)を参照されたい)。
30

【 0 0 2 1 】

「流体」：用語「流体」は、ここで用いる場合、連絡用チャンネル又は非連絡用チャンネルを通過させることのできる任意の物質を意味する。流体の幾つかの非制限的な例は、水、蒸気、及び無菌の空気である。この流体は、微生物を含む任意の栄養培地であってよい。

【 0 0 2 2 】

「チャンネル」：「チャンネル」は、ここで用いる場合、物質例えば空気又は水を導くことのできる任意の通路を意味する。ここで用いるチャンネルには、連絡用チャンネルと非連絡用チャンネルの両方が含まれる。チャンネルは、管が流体の通過のための通路を形成する特別の構造であるという点において、管(又はパイプ)から区別することができる。例
40
えば、一つの底板構造は、溶接管を一緒に含む。これらの管は、連絡用チャンネル及び非連絡用チャンネルとして役立つ。

【 0 0 2 3 】

固体状態発酵

上記のように、本発明は、微生物を特定条件下で固体培地上で培養するためのバイオリアクターを提供する。このバイオリアクターは、固体状態発酵の実施に関係するすべての操作を一つの装置内に合わせるように構築し、それらの操作は下記を含む

- (a) 培養装置及び装置内に置いた培養培地を殺菌し；
- (b) 培養培地に微生物を接種し；
- (c) 微生物を特定の条件下で培養し；

10

20

30

40

50

- (d) 生物学的産物を培養した微生物から抽出し；そして
 (e) 廃棄物及び培養装置の抽出後処理を行う。

【0024】

本発明の装置は、微生物を封じ込めた領域内で固体培地上で培養するための、物質を扱うための、培養工程を制御するための、その工程中に化学栄養物を添加するための、関心ある産物の抽出のための及び廃棄物処理の前に残留物を処理するための公知の既存の方法を超える有意の利点を提供する。封じ込めは、ここで用いる場合、バイオリアクターの封じ込めと無菌の性質の両方をいう。例えば、このバイオリアクターは、バイオリアクターの内容物を外側環境による汚染から防護すること(無菌の様式での操作)により及びバイオリアクター内で増殖している潜在的に有害な又は病原性の微生物から環境を防護すること(封じ込めた様式での操作)により、封じ込めた様式で操作する。この装置の封じ込める性質は、全発酵工程中無菌環境を維持するという利点を提供する以外に、固体状態発酵の全工程を外側環境から分離して実施することを可能にする。本発明によるバイオリアクターの封じ込める性質は、更に、発酵培地、温度及び水分含量をその場で殺菌し、接種し、制御する能力を提供する。その上、生物学的産物の発酵培地からの抽出は、リアクターを分解したり開けたりせずに達成することができる。産物の抽出後に、リアクター内容物をその場で殺菌することができる。そのリアクターを、その後、分解して、殺菌した、使用済み物質を捨て、清浄化し、次の発酵サイクルのために再利用することができる。

10

【0025】

このリアクターは、下記の仕方で封じ込めを達成する：

20

- 1) バイオリアクターの内容物を接種前に殺菌し、発酵工程の開始前に、バイオリアクター内のすべての微生物を排除する。
- 2) 接種物のシードベッセルからバイオリアクターへのトランスファーは、微生物を環境にさらすことなく、例えば、シードベッセルとリアクターを繋ぐシールされた、殺菌された管により達成することができる(トランスファーは、シードベッセルとバイオリアクターの間の圧力差により起きる)。この方法は又、トランスファーされる微生物が環境により汚染されるのを防ぐ。
- 3) リアクターから排出される空気(培養されている微生物の胞子を運び得る)は、微生物をトラップすることのできる排気ガスフィルターを通して排出される。かかる排気ガスフィルターは、当分野で周知であり、液中発酵のための標準的の装備として用いられている。
- 4) 産物をバイオリアクターから抽出した後に、そのリアクターをその場で殺菌することができる。リアクター内の如何なる生菌も、装置を開いてその内容物を環境と接触させる前に破壊することができる。

30

【0026】

バイオリアクター

本発明のバイオリアクター(図1～5参照)は、他のものの上に適合させて適当な高さの「スタック」4を形成することのできる多数の別々のモジュール3から構築される。これらの積み上げたモジュールを、並行して運転して、単一の機能的ユニット(ここでは、「培養プラント」又は「バイオリアクター」という)を造る。このバイオリアクターは、操作を可能にする任意の適当な材料(その二例はステンレス鋼とポリカーボネートであるが、これらに限らない)で構築することができる。個々のモジュールは、モジュールの底部を形成する板2とモジュールの側面を形成するフレーム1を有する。ある好適具体例において、このモジュールの形状は、方形である。例えば、方形の底部の上に適合された方形のフレーム。他の好適具体例において、このモジュールの形状は、長方形である。他の好適具体例において、このモジュールの形状は、円形である。好ましくは、このモジュールの形状は、円形である。

40

【0027】

板2は、モジュールの底部を形成し、ここでは、「底板」という。フレーム1を、底板の

50

上に載せ、モジュール内から外側環境への漏出を防止するようにシールする。シールの非制限的な一つの例は、ゴムガasket 5 であり、それは、一のモジュールの底板 2 の底部と他のモジュールのフレーム 1 の縁との間に適合して、圧縮又は下方向圧力により締められてシールが固定されるのを確実にする。フレーム 1 は、モジュールの側面を形成し、培地を保持する容器を形成するように機能する。好ましくは、フレームの高さは、4 ~ 8 センチメートルである。一つの好適具体例において、バイオリアクター 6 の内部に置かれる培地は、固体培地である。固体培地上で増殖することのできる微生物を、本発明により培養することができる。モジュールの寸法及びモジュールのスタックの寸法は、使用する環境に都合のよい大きさに変えることができる。

【 0 0 2 8 】

底板は、2つの基本的構造物の1つであり得る。一具体例において、この底板は、熱を伝導することのできる任意の材料で造られた2つの平らなシート 8 の間に挟まれた管 7 から構築される。これらの管は、隣接する管の間にチャンネルが形成されるように相互に間隔を開けて位置される。チャンネルの側面は、管により形成され、チャンネルの上部と下部は、平らなシートにより形成される。これらのチャンネルは、非連絡用チャンネルである(以下で、一層詳細に論じる)。更に別の具体例において、底板は、平面上に多数の管を並べて置き、それらを一緒に溶接することにより構築される。この特定の具体例においては、管は、シートの間には挟む必要はない。

【 0 0 2 9 】

上記のように、これらのモジュールは、任意の都合のよい大きさ及び形状であってよい。方形又は長方形の構造において、チャンネル 7 は、互いに平行に走る。例えば、多数の管を平面上に平行に置き、それらを一緒に溶接する 10。円形の構造においては(図 3 参照)、管 7 のセットは、円形パターンで、モジュールの中心軸から放射状に配置する。

【 0 0 3 0 】

チャンネルの2つの別々のセット(連絡用チャンネル 1 1 と非連絡用チャンネル 1 2)を形成することは、本発明の重要な面である。これらの連絡用及び非連絡用チャンネルは、底板 2 におけるそれらの配置において互い違いにする。連絡用チャンネルは、流体を、モジュールの内部に接触するようにモジュール内に運ぶ。連絡用チャンネルは又、円形の構造の場合は、それらが放射状に広がる際に「Y」の字状に分枝して、管内を通る流体がモジュール内に等しく分配されることを確実にする。連絡用チャンネル 1 1 に開けた孔 1 3 は、流体が連絡用チャンネル 1 1 から出て、例えば、モジュール 6 内に封じ込められている固体マトリクスと接触することを可能にする。これらの孔 1 3 は、各孔 1 3 が板 2 の等しい表面積を与えるように配置されている。孔 1 3 は又、連絡用チャンネル 1 1 により運ばれた流体がモジュール 3 に分配され得るように孔 1 3 を並べた連絡用チャンネル 1 1 に挟まれた金属シート 8 にも開けられている。方形構造のモジュールにおいて、これらの孔は、好ましくは、等距離の間隔を開けて位置させる。円形構造のモジュール 3 において、孔間の間隔は、好ましくは、中心から周辺へ向かって徐々に減らして、半径の増加に伴う板の面積の非線形的な増加を補償する。

【 0 0 3 1 】

当業者は、任意の多様な流体を連絡用チャンネル 1 1 により分配することができることを認めるであろう。一つの好適な具体例において、内部バイオリアクター 6 は、連絡用チャンネル 1 1 及び非連絡用チャンネル 1 2 を通してスチームを送って殺菌することができる。他の好適具体例において、連絡用チャンネル 1 1 を、殺菌前に、真空源に取り付けてバイオリアクター内の空気を除去することができる。この殺菌工程は、スチームを用いて又は殺菌用ガス例えばエチレンオキシドを用いて行うことができる。スチーム又はガスを用いる殺菌のための適当な条件は、当業者により、容易に決定することができる。他の好適具体例においては、微生物を含む流体を連絡用チャンネル 1 1 を通して送ることにより、培養培地に微生物を接種することができる。微生物を含む流体は、栄養培地であってよい。

【 0 0 3 2 】

一度微生物がバイオリアクター内で増殖すれば、本発明の他の面は、バイオリアクター内の環境を連絡用チャンネル 11 を用いて調節することができることを規定する。例えば、このモジュールの湿度は、水を連絡用チャンネル 11 を通して送ることにより調節することができる。加えて、化学物質及び/又は栄養物を連絡用チャンネルを通して、バイオリアクターの運転の進行中に加えることができる(当分野で「流下式」と呼ばれる工程)。化学物質及び/又は栄養物の添加は、化学物質及び/又は栄養物の分配が均等となるように行うことができる(例えば、バイオリアクター中への均一な分配)。例えば、糖を、一度発酵が進行した場合に発酵培地に加えることは、有利である。発酵工程中着実に低下する限られた初期量の栄養物を微生物に与える(例えば、固体表面発酵の場合等)のではなくて連続的に給餌する能力は、一層高品質の産物と一層大きい収率を生じる。発酵工程の開始において栄養物の塊を加えることは、微生物の増殖に対して阻害的であることもあり得る。栄養物を、微生物の最適な増殖のために、非阻害的レベルに制限することは、好ましいことである。

10

【0033】

連絡用チャンネル 11 を交互に用いて、モジュール内の酸素含有量を、無菌の空気を連絡用チャンネル 11 を通して送ることにより調節することができる。同様に、モジュールの二酸化炭素又は窒素含有量を、特定の条件に合わせることができ、その範囲は、液中発酵を超えて有意に改善されている。実際、任意のガスを、正確に制御されたレベルでバイオリアクターに加えることができる。従って、本発明の装置は、当分野で以前には利用できなかった有意の利点を提供する。

20

【0034】

一度微生物が増殖相を終えたならば、関心ある生物学的化合物を分離するために抽出用の液体例えば有機溶媒を連絡用チャンネル 11 を通して送るのが望ましいであろう。更なる実証として、抽出工程の完了時に、廃棄物を、未だバイオリアクター内にあるうちに、殺菌により又は生成した廃棄物に適した他の手段によって、適当に処理することができる。これらの例は、バイオリアクターの内部に連絡用チャンネル 11 によって加えることのできる流体の多様性を示すものであって、連絡用チャンネル 11 の用途範囲の制限を意味するものではないと理解される。

【0035】

連絡用チャンネル 11 を、流体を連絡用チャンネル 11 に送達する分配ポート 14 に接続することは、本発明の構成の他の面である。分配用リング 15 の位置は、モジュール 3 の形状に依って変わり得る。本発明の方形の構造においては(図 1、2 及び 4)、分配ポート 14 を、モジュールの一端に位置させる。本発明の円形構造においては、分配用「リング」15 を中心に位置させ、連絡用チャンネル 11 を中心の分配用リング 15 から外へ放射状に配置する。

30

【0036】

このバイオリアクターは、更に、スタックの 1 つ置き板が放出板 23 及び捕集板 24 と呼ばれるように組み立てられる(図 5 参照)。放出板 23 は、流体をバイオリアクターに与え、捕集板 24 は、流体をバイオリアクターから搬出させる。これらの流体をこれらの板に運ぶパイプにはバルブがある。これらのパイプ及びバルブは、リアクター内の培地と接触する流体を運ぶ連絡用チャンネルにある。好適具体例において、殺菌、接種及び発酵、スチーム接種物は、放出板 23 又は捕集板 24 により、それぞれ、送られ、そして排出される。流れの向きは、この工程で必要とされるものと逆であってよい。流れの向きが逆であることを必要とし得る一つの例は、湿度勾配がバイオリアクター内にできているかどうかである。空気流の向きを逆にして、他の向きにおいて蓄積した湿気を移転させることができる。

40

【0037】

殺菌及び発酵の操作中に、他の好適具体例は、排出バルブを部分的に閉じることにより背圧を確立する手段を提供する。最後の具体例において、抽出中、抽出用流体を頂部放出板 23 から送り、抽出された物質を底部捕集板 24 から取り出す。この工程中、中間の板に

50

接続されたバルブは、閉じておく。頂部と底部の板へのバルブだけを開けておく。抽出用流体を底部放出板 2 3 から送り且つ頂部捕集板 2 4 から捕集することにより抽出を行うことも可能である。

【 0 0 3 8 】

この抽出工程を可能にするこのバイオリアクターの構造の特別の特徴は、頂部板と底部板の間に位置する中間の板の連絡用チャンネルが、板の上下のモジュールへの流体の分配のために管の全体に孔を有することである。頂部板は、連絡用チャンネルを形成する管の底部にのみ孔を有し、底部板は、連絡用チャンネルを形成する管の上部にのみ孔を有する。この特徴は、抽出用その他の流体を例えば頂部板に加え、そこから、それらの流体が介在する板を通して底部板までちよろちよろ流れ下ることを可能にする。抽出された物質を、
10
次いで、底部板から集めることができる。勿論、これらの通し孔は、中間の板に限られなければならないことはない。加えて、管上のこれらの通し孔の配置は、上記のものと異なってよく、例えば、これらの孔は、互いの向かいになくて互い違いであってよい。

【 0 0 3 9 】

当分野で周知のように、くぼんだ両端 2 1 を底部板の下と頂部板の上に配置して、頂部及び底部板の連絡用チャンネルの孔から出たエキストラクトを集めることができる(図 4 参照)。これらのくぼんだ両端は、バイオリアクターの運転に絶対に必要な訳ではないが、リアクターを高圧で運転する際に特別の安全性を与える。くぼんだ両端は、平坦なものより圧力に耐えることができるので圧力下で運転する容器について標準的なものである。

【 0 0 4 0 】

上記のように、これらの管は、連絡用チャンネル 1 1 及び非連絡用チャンネル 1 2 を形成する。非連絡用チャンネル 1 2 は、配置において、連絡用チャンネル 1 1 と互い違いになっており、連絡用チャンネル 1 1 と違って、孔 1 3 を有しない。非連絡用チャンネル 1 2 は、底板 2 を通して加熱及び冷却用流体を運び、伝導によりモジュール 3 内の環境の温度を制御するように機能する。モジュール 3 を加熱又は冷却するために用いることのできる流体の一例は、水である。或は、モジュール 3 を伝導により加熱又は冷却することのできる任意の流体を本発明で用いることができる。好ましくは、モジュール 3 内の温度をモニターして予め形成してある操作に従って調節して特定の条件に合わせる。本発明の一具体例においては、バイオリアクターに、モジュールの温度をモニターすることのできるプローブを挿入する。本発明によれば、モジュール 3 の内側の温度をある温度範囲に調節する
30
ことができる。例えば、バイオリアクターを殺菌する際には、モジュール 3 を非常に高温にすることが望まれよう。他の例においては、微生物の増殖中は、その特定の微生物の増殖に適した温度を維持することが望まれよう。

【 0 0 4 1 】

本発明の非連絡用チャンネル 1 2 は、モジュール 3 の周辺の周りに位置するヘッダー 1 6 のシステムに接続され、2 枚の金属シート 8 の間に挟まれていてよい。このヘッダー装置 1 6 は、流体を非連絡用チャンネル 1 2 に送達する。上記のように、モジュール 3 は、様々な形状であってよく、従って、ヘッダー 1 6 の配置は、それを適用するモジュール 3 に適合する形状の内に変化させてもよい。モジュール 3 が方形であれば、ヘッダー装置 1 6 は、モジュール 3 の側面に配置することができる。モジュール 3 が円形であれば、ヘッダー装置 1 6 は、適当な直径で、流体を非連絡用チャンネル 1 2 に送達するためのモジュール 3 の外側から中心に向かう放射状の構造でなければならない。この大きさ及び構造の変動は、収集ポート 1 7 にも適用する。方形モジュール 3 (図 1 参照)において、収集ポート 1 7 は、モジュール 3 の側面に配置することができる。モジュール 3 が円形であるならば
40
(図 3 参照)、流体は、上記の分配リング 1 5 と同心で且つ分配リング 1 5 の直ぐ内側にある「収集リング」1 7 により、底板から去る。内部収集リング 1 7 の直径は、分配リング 1 5 の直径より大きくなるように選択し、それにより、周辺の円形ヘッダーから非連絡用チャンネル 1 2 に入る流体は、分配リング 1 5 を超えて、収集リング 1 7 に流れ込み該リングから流れ出る。当業者は、上記の構造は単に例として示されているということ及びヘッダー装置 1 6 と収集ポート 1 7 は、それらの機能が維持されることを確実にする如何な
50

る方法で構築してもよいということを理解するであろう。

【0042】

底板2及びフレーム1に加えて、各モジュールは、混合装置をも有することができる(図4の18)。混合装置18の機能は、モジュール6内部の固体培地を攪拌することである。攪拌は、例えば、培地に微生物を接種した後に行うことができる。攪拌は又、生物学的に有用な産物の微生物からの抽出工程中に行うこともできる。当業者は、攪拌を、発酵工程中の攪拌が必要と認められる任意の時点で実施することができる(もっとも、微生物特にカビの潜在的損傷の故に、発酵工程中に過剰の混合は起こさないのが好ましい)ということを理解するであろう。

【0043】

本発明において、混合装置18は、好ましくは、モジュール3の中心に配置する。この発明の一つの面において、混合装置は、少なくとも1つの好ましくは2つの混合用アーム22を有する。これらの混合用アームには、例えば、フラットブレード25を取り付けることができる(図6参照)が、バイオリクターを用いる特定の応用に必要な混合工程で助成するであろう歯形その他の任意の変形物を取り付けることもできる。特に好適なブレード構造は、混合アームの直径の周りに短いブレードが互い違いになっているが、これらの短いブレードの間に並んだギャップ又は水平のオーバーラップが存在しないものである。

【0044】

本発明の他の面において、これらの混合アームは、モジュールの中心軸の周りを回る際に回転する。この旋回中の回転は、混合装置の中心にあり2つの独立のモーター20により駆動される2つの同心シャフト19により達成することができる。内側のシャフトは、2つの混合用アームを回転させることができ、一方、外側のシャフトは、これらのアームをモジュールの中心軸の周りを旋回させる。ここに記載したシャフトとモーターの特定の配置は、この発明をこの一つの配置に限定するものではない。この旋回しながら同時に回転することを達成する混合装置の任意の配置は、クレームしている発明の範囲内にあると考えられる。例えば、本発明は、遊星歯車システムを用いるモーターを使用することができる。

【0045】

本発明の混合の面の特に好適な面は、中心軸の周りを旋回するアームの旋回速度が、そのアームの回転速度に対する正確な比に調節されることである。この面は、バイオリクターの内容物の塊での移動を防止するためのバイオリクターの内容物の適当な混合に対して臨界的である。バイオリクターの内容物が塊で円運動中に押されるのを防ぐために、この混合用アームは、回転するアームの前にある培地を持ち上げてそれを回転するアームの後ろに置く回転するブレードが通過し得る距離と同じ距離だけ旋回する。2つの別々のモーターを用いてこの混合装置を制御するならば、各モーターの速度を別々に制御することができる。もし1つのモーターを使用するならば、歯車を、それらの運動がバイオリクターの内容物の効率的な混合と等しい再分配を達成するように編成されるように選択することにより、旋回対回転の比を正確に調節することができる。

【0046】

上記のように、このバイオリクターは、バイオリクター6の内側の環境の正確な制御を可能にするように組み立てる。これを達成するためには、バイオリクターに、その内側の環境をモニターすることのできるプローブを取り付けることは望ましいことであろう。プローブは、バイオリクター6の内側の温度、湿度、酸素濃度又は二酸化炭素濃度をモニターするのに必要とされ得る。他のプローブには、排気ガス分析機、圧力センサー、空気流センサー及び重量センサーが含まれる。その上、バイオリクターのある運転は、自動化に従順である(例えば、冷却水、スチーム、濾過濃縮空気の動き、真空、シードトランスファーの操作、水又は栄養物の添加、パイブラックの制御、並びにモーター及びポンプの特定の時点でのオン・オフ)。上記のような補助装置は、液中発酵の自動化のために普通に用いられており、当業者に公知である。

【0047】

バイオリアクターの作動

上述した通りの本発明のバイオリアクターは、固体状態発酵の工程のすべてを単一の装置でかつ封じ込めた様式で実施することを可能にする。本発明のバイオリアクターは、1) 培養装置及び培地を滅菌する、2) 培地に微生物を接種する、3) 微生物を培養する、4) 培養された微生物から生物学的生成物を抽出する、並びに5) バイオリアクターのモジュールの内部の物質を外部環境に暴露しないで、抽出後処理加工する工程を実施する。本発明のバイオリアクターは、また、バイオリアクターの内部の増殖環境を精確に調節する。本発明のこれらの態様は、発酵プロセスにおける各々の工程において複数の操作、例えば培地を固体状態発酵装置の外部でオートクレープで処理し、次いで培地を発酵装置に移すことを必要とする従来の固体状態発酵装置に勝る莫大な便宜をもたらす。

10

【0048】

本発明に従えば、微生物を培養するためにバイオリアクターを使用するプロセスは、初めに清浄にしたモジュール3に発酵培地6を充填することを含む。任意の固体状態発酵培地を本発明において用いてよい。固体状態培地のいくつかの例は、メイズふすま、コーン、小麦大豆外皮、大豆、その他の穀類、ミネラル(例えば、パーミキュライト、セリット、ポリウレタンフォーム)、又は水溶液を吸収することができる任意の支持物質である。

【0049】

バイオリアクターに培地を投入した後に、次いでモジュール3と一緒にアSEMBルしてスタック4を形成する。いくつものスタック4を縦並びに作動させてよい。本発明に従えば、一旦アSEMBルしたら、バイオリアクターの内部を外部環境から隔離する。いくつものスタック4を縦並びに作動させて必要とする通りの大きさのパッチサイズにしてよい。一旦スタック4を確定したら、滅菌用流体、例えばスチーム又はガスを連絡用チャンネル11を通して送ってマトリックスを滅菌する。スチームを同時に非連絡用チャンネルを通して送ってバイオリアクターを滅菌するために適した温度(スチームについて121、エチレンオキシドについて50)に加熱する。いくつかの好適な実施態様では、連絡用チャンネル11を真空源に接続することによってバイオリアクターから空気を排気した後にスチーミングしてもよい。モジュール内部の滅菌されたマトリックスを、冷却用水を非連絡用チャンネル12に通しかつ加えて滅菌冷却空気を反応装置のモジュール3に通すことによって冷却してもよい。冷却プロセスの間、バイオリアクターを、所望する培養温度に達するまで、正圧の滅菌空気下に保つ。反応装置内部に捕捉された空気を、必要ならば連絡用チャンネルを通してベントさせてよい。ベンチングは、交互板のベントを通して行うのが好ましい。

20

30

【0050】

滅菌した後に、培養すべき微生物の液状接種材料を連絡用チャンネル11を通してバイオリアクタースタック4のモジュール3の中に移送してよい。本発明のバイオリアクター内で培養する微生物は、任意のバクテリア、酵母又は菌類でよい。これらの生物を培養する目的は、食品生産又は生物学的に活性な分子のような好適な化合物の工業的生産のためにすることができる。一旦適当な量の微生物をモジュールに加えかつ水分含量を調節したら、ミキサー18を接種材料と固体マトリックスとを混合する期間作動させてよい。次いでミキサー18を停止して微生物にマトリックスにコロニーを造らせる。発酵プロセスの間よりもむしろ発酵の前に接種材料とマトリックスとを混合すると、微生物が増殖する機会を有する前に接種材料の均質な分布を可能にする。

40

【0051】

増殖期間中、バイオリアクター内部の環境を、例えばプローブによってモニターして注意深く保つ。前に記載した通りに、滅菌空気を連絡用チャンネル11を通してバイオリアクターの中に送って微生物を増殖させるために必要な酸素を供給する。液体を、また連絡用チャンネル11を通してバイオリアクターに送ることによってバイオリアクターの水分含量を調節することができる。水分含量は、混合工程の前に、水分をマトリックス全体を通して等しく分布させるように調節するのが好ましい。モジュール3の温度は、水を非連絡用チャンネル12を通して送ることによって制御する。滅菌、接種、温度制御、抽出及び

50

抽出後の作業の内の任意のものを、当分野において知られつつ用いられている技術を使用することによって自動化してよい。

【0052】

微生物を発酵させるプロセスは、熱を発生する。バイオリクター内部に熱が蓄積すると、発酵プロセスにとって問題となり得る。本発明によって熱を除く一方法は、蒸発冷却である。蒸発冷却は、バイオリクターから水を除くことが望ましいならば（例えば、培地があまり多くの水分を含有するならば）、好適な熱除去方法になり得る。蒸発冷却は、空気を板23を通して連絡用チャンネルに送りかつ空気を捕集板24から外にベントさせることによって達成することができる。バイオリクターから水を除くことが望ましくないならば、本発明は伝導を熱除去方法として利用するのが好適である。本明細書中に記載する通りの伝導による熱除去方法は、冷却用流体を非連絡用チャンネル12を通過させることを要する。

10

【0053】

伝導によって発酵させる間に発生される熱を除去することの利点は2つ存在する。一つの利点は、酸素を供給するために必要な空気のみをモジュール3中に送る必要があるということである。冷却要求と関係のないことは、また、ある特定の微生物を培養するために必要となり得る任意の特定の雰囲気バイオリクター内部に保つことを助成する。例えば、特定の微生物は、高い二酸化炭素濃度を要するかもしれない。

【0054】

伝導によってかつ水分を床から蒸発させることによらないで熱を除去することの第二の利点は、伝導が発酵培地から熱を除去しないことである。蒸発冷却は、発酵培地から水の損失を生じる。発酵培地があまりに乾燥することになるならば、この乾燥は、微生物の発酵増殖に悪影響を与え得る。水分損失を補うために、蒸発される水分を計算して発酵培地に加えて戻さなければならない。

20

【0055】

床は、水分置換した後に、適当な温度に達した後に、床水分含量の不均質性を防ぐために十分に混合する必要があるかもしれない。菌類のような糸状微生物を混合すると、菌系破損を生じ、多くの場合に、特に菌類の無隔性属、例えば *Rhizomucor* を伴う発酵を実施する場合に、産生される生成物の量の低下を生じ、従って、混合を発酵プロセスの初めに行いかつ一旦発酵が始まったらそれを最少に保つのが好適である。

30

【0056】

混合は、幾種かの微生物にとって有害になる可能性があるが、一面に密生した菌系体により、特に菌類発酵の場合に、床を通る過度の水分圧力降下を防ぐことができる。少ない空気流れを保つ時でさえ、水分損失は決して除かれず、水分勾配が何日もの期間にわたって発達し得る（例えば、バイオリクターは底部で乾燥しかつ頂部で湿り得る）。これらの勾配は、特に空気流れの方向を数時間毎に規則的に逆転することによって除かれる。この空気流れ逆転のタイミングは、空気流れの方向を数時間毎に（例えば、数日毎に）逆転するように自動化することができる。この方法を使用して、水分含量の均質性を、バイオリクター全体を通して保つことができる。

40

【0057】

熱除去は、また、一部発酵プロセスの間発酵培地を混合することによって助成されてきた。菌系体マスへの過度の破損及び損傷の他に、有意の凝集もまた起き得、これは、また、菌系体のむしろ、生成物品質及び収率低下を生じる。伝導による熱除去は、発酵の間混合することによって熱を除去する必要性を省く。

【0058】

微生物は、それらが生物活性な生成物を細胞外で産生する能力を有する、例えば多くの微生物は抗生物質を分泌することから、培養されるのがしばしばである。幾種かの微生物は、バイオ工学用途において有用な生物活性な生成物を天然に産生する。微生物は、特に関心のある生物活性な生成物を産生するように遺伝学的に変更することができることは当分野において良く知られている。（上記の *Ausubel* 等を参照、これを本明細書中に援

50

用する)。従って、培養期間を完了する際に、生物活性な分子を微生物から抽出するのが望ましいかもしれない。抽出用流体、例えば有機溶媒を放出板23を通して連絡用チャンネル11に送って関心のある代謝物質を抽出して出してよい。抽出用流体は、関心のある生成物を溶解し、捕集板24を通して反応装置の外にもたらし、それで生成物を回収することができるようにする任意の適した流体である。代わりに、抽出プロセスは、細胞を破壊するために超音波又は音波処理によって助成してもよい。抽出プロセスの持続期間全体を通して、加熱用又は冷却用流体を非連絡用チャンネル12を通過させることによってバイオリアクターの温度を任意の所望のレベルに制御してよい。同じ装置を発酵及び抽出の両方のために使用することができることは、本発明によって提供される特別の利点である。

10

【0059】

好適な実施態様では、所望の生成物を精製するために捕集板24を更なる装置又は装置の(例えば、限外ろ過装置、精密ろ過装置又はクロマトグラフィーカラム)に直接結合する。結合は、滅菌及び収容される環境を保つ様式で実施する。接種から最終生成物の捕集に至るまで、汚染が生じ得る点は終局的に一点も存在しない。従って、この装置を使用すると、従来利用可能な方法に比べるならば、外部環境による生成物汚染の可能性を排除する。加えて、バイオリアクターの内容物のサンプルは、バイオリアクターの内部環境が閉じこめられかつ均質であることから、バイオリアクターの内容物を正確に表示するものである。その上に、バイオリアクターの汚染が行われたかどうかを評価するためにサンプルを採取するプロセスは、無菌状態を破ることなく行うことができる。汚染についてネガティブとテストするサンプルは、バイオリアクターの内容物全体が無菌であることを保証する。関心のある生成物が毒性である(例えば、免疫抑制剤シクロスポリン)ならば、この特徴もまた有利である。当業者ならば、抽出プロセスが選択的なものでありかつあらゆる発酵プロセスにおいて行われる必要がないことを認めるものと思う。

20

【0060】

精製プロセスを自動化することは、生産手順全体においてすべてのパラメーターの精確な制御を可能にすることになる。総括的には、本発明のバイオリアクターは、微生物を増殖しかつそれらから生成物を抽出する、特に安全及び微生物の取り扱いの面で改良された方法を提供する。これらの特徴は、本発明のバイオリアクターを、遺伝的に改質された微生物成育を固体基材上で増殖させるための魅力的なオプションにする。そのようなバイオリ

30

【0061】

抽出プロセスを完了した後に、バイオリアクターの内部の残留物質を任意の適した方法で、依然バイオリアクターの内部にありながら処理してよい。例えば、物質を加熱(例えば、滅菌)、冷却により又は物質に適した溶液と反応させることによって処理してよい。物質を廃棄用に適したものにする任意の処理様式を本発明の実施において利用した後に装置を解体することができる。一旦スタックを解体したら、残留物質を廃棄してよく、バイオリアクターを洗浄して別の発酵において再使用してよい。

40

【0062】

例

本発明は、下記の限定しない例を検討することによって更に理解されることができる。

【0063】

例1:

細胞外代謝物質(例えば、食品生成物)を製造及び抽出するためのバイオリアクターの使用

小麦ふすま3キログラムを全板面積およそ2500平方cmを有するバイオリアクターのモジュール中に投入した。バイオリアクターをアSEMBルし、真空を連絡用チャンネルに接続することによってバイオリアクターから空気を排気した。この後に、スチームを連絡用チャンネル並びに非連絡用チャンネルに同時に送ってバイオリアクター及びその内容物

50

を温度 12.1 に加熱した。バイオリアクターをこの温度に 4.5 分間保ち、この後に、スチーム圧力を開放した。同時に、滅菌空気を連絡用チャンネルに送り、その間およそ 2.5 の冷却用水を非連絡用チャンネルに送った。バイオリアクターが冷却して 3.7 に下がった時に、それに *Rhizhormucor pusillus* の菌株の十分に増殖された接種材料を接種した。この菌株はミルク凝固酵素（また、微生物レンネットとしても知られている）と呼ばれる種々のプロテアーゼを産生する。この酵素はチーズ製造産業において使用される。接種されたふすまを温度 3.7 で 4 日の期間の間培養して糸状菌に基材に完全にコロニーを造らせた。この期間の間、ふすまの温度を、温水又は冷水を非連絡用チャンネルを通して循環させることによって保った。同時に、流量 7 リットル/分の滅菌空気を交互板の連絡用チャンネルを通してバイオリアクターに送り、捕集板の連絡用チャンネルを通して外に排気させた。空気流れの方向を数時間毎に逆転し床内の水分勾配を防いだ。

10

【 0 0 6 4 】

4 日後に、水 1.5 リットルを最上の板の連絡用チャンネル中に送り、連絡用チャンネル内の孔を通して板のスタックを少しずつ流下させた。酵素を含有する水性エキストラクトがスタックの底部から収集された。この後に、空気を最上板中に送って床内の捕捉される最大量の残留エキストラクトを吹き飛ばした。次いで、スチームを連絡用チャンネル及び非連絡用チャンネルに送って抽出されたかび臭いふすまを滅菌した。次いで、この滅菌された使用済みのふすまを廃棄した。次いで、酵素を含有する水性エキストラクトを限外ろ過によって濃縮した。

20

【 0 0 6 5 】

例 2 :

細胞内代謝物質、例えば製剤生成物を製造するためのバイオリアクターの使用
小麦ふすま 20 キロを板面積およそ 22,600 平方 cm のバイオリアクター中に投入した。バイオリアクターを例 1 に記載する通りにして滅菌した。

【 0 0 6 6 】

滅菌した後に、バイオリアクターを冷却して 3.0 にし、それに *Fusarium solani* の菌株の十分に増殖された接種材料を接種した。この菌株は、シクロスポリンと呼ばれる免疫抑制薬を細胞内で産生する。シクロスポリンは、移植された器官の拒絶を防ぐのに用いられる。接種材料を滅菌されたふすまと、混合用アームを使用して 1 時間の期間十分に混合した。次いで、接種されたふすまを 120 時間の期間培養した。流量 7.5 リットル/分の滅菌空気を連続してバイオリアクターに送った。バイオリアクターの温度を初めの 2.4 時間の間 2.9 に制御し、次の 4.8 時間の間 3.2 に制御し、最終的に最後の 4.8 時間の間 2.9 に制御した。

30

【 0 0 6 7 】

この後に、バイオリアクターを下記のようにしてメタノール 120 リットルで抽出した。初めに、メタノール 60 リットルを上部板を通して導入し、バイオリアクターの中に少しずつ流下させ、培養されたふすまと接触させた。このメタノールをバイオリアクター内に 2.4 時間の期間残留させ、細胞内シクロスポリンを菌類細胞から外に出してメタノールの中に拡散させた。次いで、この「初めの浸漬液」を下部板から排液させ、次の 60 リットルのロットに替え、これを再びふすまと 6 時間の期間接触したままにさせた。第二ロットを排液し、残留するエキストラクトを空気で床からフラッシュして出した。この手順に従うことによって、シクロスポリンの効率的な抽出を実施することができた。

40

【 0 0 6 8 】

次いで、バイオリアクター内の使用済みのふすまを水で洗浄して微量の残留メタノールを除いた。次いで、バイオリアクターを開放し、使用済みのふすまを排出して廃棄した。メタノールがその性質によりバイオリアクター内の生物質をすでに殺していたので、バイオリアクターを開放する前に滅菌する必要は無かった。シクロスポリンを含有するメタノールエキストラクトを回転真空蒸発器で蒸発させ、次いでカラムクロマトグラフィーを使用して精製した。

50

【 0 0 6 9 】

例 3 :

一部細胞内及び一部細胞外代謝物質（例えば製剤生成物）を製造するためのバイオリアクターの使用

小麦ふすま 15 キロを板面積およそ 14,500 平方 cm のバイオリアクター中に投入した。バイオリアクターを下記に記載する通りにして滅菌した：バイオリアクターをアセンブルし、スチームを交互放出板の連絡用チャンネル並びに非連絡用チャンネルの中に同時に送ってバイオリアクター及びその内容物を加熱した。空気とスチームとを同時に中間の捕集板の連絡用チャンネル及び非連絡用チャンネルからベントさせた（図 5 を参照）。また、混合系を作動させ、ベンチングを進行させながら、反応装置の内容物を連続して分解して空気ポケットを取り除いた。バイオリアクターの温度が 100 に達した時に、スチームのベンチングを停止した。混合もまた停止した。反応装置を温度 121 に加熱させた。バイオリアクターをこの温度に 60 分間保ち、この後に、スチーム圧力を開放した。同時に、滅菌空気を連絡用チャンネルの中に送り、その間およそ 25 の冷却用水を非連絡用チャンネルに送った。

10

【 0 0 7 0 】

滅菌した後に、バイオリアクターを冷却して 30 にし、それに *Aspergillus flavipes* の菌株の十分に増殖された接種材料を接種した。この菌株は、メビノリン酸 (mevinolinic acid) を産生する。産生されるメビノリン酸の内のいくらかは培地中に分泌され、他方メビノリン酸の内のいくらかは菌類菌糸体中に捕捉されたままである。メビノリン酸は、過コレステリン血症の治療において使用される化合物ロバスタチン (Lovastatin) を製造するのに使用される。接種材料を滅菌されたふすまと、混合用アームを使用して 1 時間の期間十分に混合した。次いで、接種されたふすまを 120 時間の期間培養した。流量 50 リットル / 分の滅菌空気を連続してバイオリアクターに送った。バイオリアクターの温度を培養期間中ずっと 30 に制御した。空気流れの方向を自動制御バルブを使用して 1 時間毎に変えた。

20

【 0 0 7 1 】

増殖させた後に、混合用アームを再び 20 分間作動させてかび臭いふすまを分解して抽出のための準備をした。バイオリアクターを下記のようにしてアセトン 90 リットルで抽出した。初めに、メタノール 45 リットルを上部板を通して導入し、バイオリアクターの中に少しずつ流下させ、培養されたふすまと接触させた。このアセトンをバイオリアクター内に 16 時間の期間残留させた。次いで、この「初めの浸漬液」を下部板から排液させ、次の 45 リットルのロットに替え、これを再びふすまと 6 時間の期間接触したままにさせた。第二ロットを排液し、残留するエキストラクトを空気で床からフラッシュして出した。

30

【 0 0 7 2 】

この手順に従うことによって、メビノリン酸の効率的な抽出を実施することができた。バイオリアクター内の使用済みのふすまを水で洗浄して微量の残留アセトンを除いた。次いで、バイオリアクターを開放し、使用済みのふすまを排出して廃棄した。アセトンがその性質によりバイオリアクター内の生物質をすでに殺していたので、バイオリアクターを開放する前に滅菌する必要は無かった。メビノリン酸を含有するアセトンエキストラクトを蒸発させ、エチルアセテートで再抽出した。エチルアセテートを真空下で蒸発させてメビノリン酸をラクトン化してロバスタチンにさせた。ロバスタチンをエチルアセテート濃縮物から晶出させ、メタノール及びアセトン中で再晶出させることによって精製した。

40

【 0 0 7 3 】

例 4 :

醸造産業において有用なバクテリア酵素を製造するためのバイオリアクターの使用

マルトデキストリン 1.5 kg 及び小麦ふすま 15 kg を板面積およそ 14,500 平方 cm のバイオリアクター中に投入した。バイオリアクターの内容物を例 3 に記載する通りにして滅菌した。反応装置を冷却した後に、選定した菌株 *Bacillus subtilis*

50

l i s の接種材料 10 リットルをバイオリアクターに移し、混合用アームを使用して十分に混合した。B a c i l l u s のこの菌株は、バクテリア天然プロテアーゼであるベータグルカナーゼ (b e t a g u l u c a n a s e) と醸造産業においてモルトにされた大麦からエキストラクトを一層高い収率で製造するために有用なアミラーゼとの混合物を産生する。

【 0 0 7 4 】

培養の温度を 32 に保った。培養時間は、72 時間であった。発酵させた後に、バイオリアクターを、10 の冷水を非連絡用チャンネルを通して循環させることによって 15 に冷却した。次いで、冷水 60 リットルを流量 15 リットル / 時でバイオリアクターの中に送って酵素を 4 時間で完全に抽出した。冷条件下での抽出は、この温度感受性のプロテアーゼの変性を最少にするのを助成した。抽出した後に、反応装置をスチームで滅菌し、エキストラクトを、限外ろ過及び精密ろ過を使用して処理して最終生成物を生じた。

10

【 0 0 7 5 】

例 5 :

大豆を使用した風味のあるフレーバリング剤を製造するためのバイオリアクターの使用例 3 及び 4 に記載するバイオリアクターに大豆 10 k g を投入しかつ滅菌した。次いで、それに、冷却した後に、A s p e r g i l l u s o r y z a e の菌株を接種し、30 において 2 日間増殖させた。増殖させた後に、バイオリアクターに塩化ナトリウム (塩) 5 % を含有する水を充填し、熱水を非連絡用チャンネルを通して送ることによって温度を 50 に上げた。混合用アームを 6 時間毎に 20 分間周期的に作動させた。この条件を 1 週間保ち、その間大豆中のタンパク質のほとんどが加水分解された。反応装置の内容物を滅菌し、排液した。この液をろ過しかつスプレー乾燥させて風味のあるフレーバー付けされた水解物を生じた。

20

【 0 0 7 6 】

例 6 :

バイオリアクターを滅菌するためのエチレンオキシドの使用

初期水分およそ 60 % の生小麦ふすま 15 k g を板面積およそ 14 , 500 平方 c m のバイオリアクター中に投入した。反応装置を完全にアSEMBルし、それを真空源に接続し、真空およそ 28 インチ (711 m m) H g を発達させた。同時に、熱水をジャケット内で循環させてバイオリアクターの温度を 50 にもたらしした。次いで、エチレンオキシドと二酸化炭素との 90 : 10 の比の混合物をバイオリアクターの中に送った。ガスの量を計算してエチレンオキシドの濃度およそ 760 p p m にした。エチレンオキシドをバイオリアクター内におおよそ 6 時間の期間残留させ、その後に再び真空を引いておよそ 28 インチのレベルにした。次いで、二酸化炭素を 0 . 45 ミクロン滅菌フィルターを経て送ることによって真空を破った。次いで、二酸化炭素を滅菌空気によってフラッシュして出した。

30

【 0 0 7 7 】

反応装置を冷却して 30 にし、それに R h i z h o p u s d e l e m a r 種の十分に増殖された接種材料を接種した。この種は、生デンプン加水分解用酵素を産生する。先の観測から、生デンプン加水分解用酵素は、121 のスチームによって滅菌したふすま (ここで、デンプンはゲル化されるようになる) に対してエチレンオキシド処理によって滅菌した滅菌生ふすま (ここで、デンプンはゲル化されていない) 上で一層効率的に産生されることが分かった。生デンプン加水分解用活性は、アルコールの製造を含む食品産業における種々の用途に有用である。

40

【 0 0 7 8 】

培養を 30 において 96 時間の間増殖させた。このインキュベーションの後に、培養を水で抽出し、エキストラクトを、精密ろ過に続けて限外ろ過を使用して濃縮した。次いで、反応装置をスチームで滅菌した後に、内容物を廃棄した。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 円形バイオリアクターの略図である。

50

【図2】 方形バイオリアクターの略図である。

【図3】 底板中の連続チャンネル及び非連続チャンネル並びに垂直スタックを形成する底板とフレームの配置の略図表示である。

【図4】 ゴムガスケットでシールされたモジュールのスタック及び単一モジュール内の連続及び非連続チャンネルのオーバーヘッドビューの略図である。

【図5A】 放出板及び捕集板を描いた略図である。

【図5B】 殺菌中にバイオリアクターを通る流体の流れを描いた略図である。

【図5C】 殺菌中にバイオリアクターを通る流体の流れを描いた略図である。

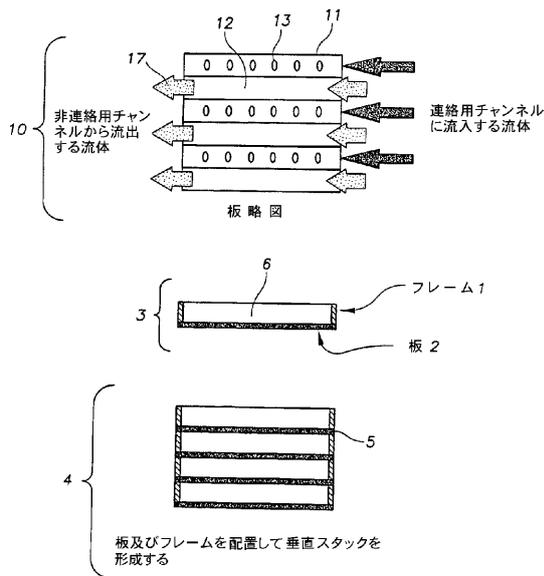
【図5D】 抽出中にバイオリアクターを通る流体の流れを描いた略図である。

【図6】 ブレードを取り付けた混合用アームの図解である。

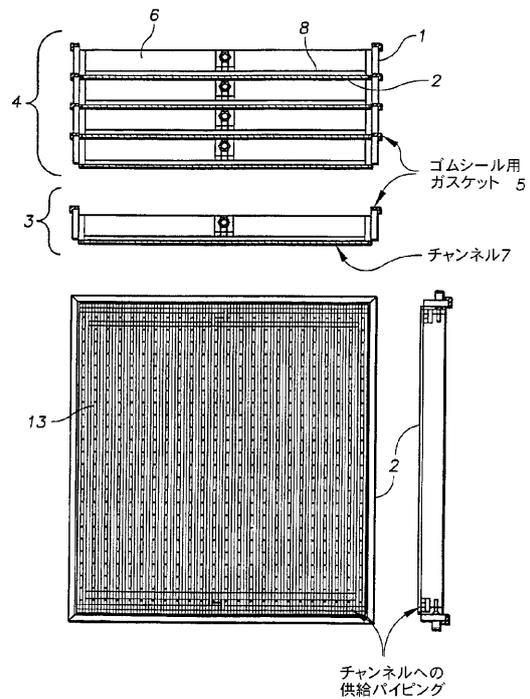
【符号の説明】

- 3 モジュール
- 4 スタック
- 11 連絡用チャンネル
- 12 非連絡用チャンネル
- 18 ミキサー
- 23 放出板
- 24 捕集板

【図1】



【図2】



【 6 】

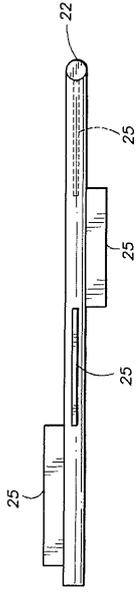


FIG. 6

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 1/00 F

(72)発明者 キラン マズムダル
インド国 5 6 0 0 3 4 バンガロー、コラマンガラ、サード ブロック、セブンス クロス、
8 7 4 / 1、カリカ

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 5 7 2 3 9 (W O , A 1)
特開平 0 6 - 2 2 5 7 5 8 (J P , A)
特開平 0 2 - 0 5 3 4 7 8 (J P , A)
英国特許出願公開第 0 1 1 5 6 7 3 9 (G B , A)
米国特許第 0 4 2 1 2 9 4 9 (U S , A)
欧州特許出願公開第 0 0 2 2 5 4 7 9 (E P , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12M 1/00-3/10
WPI