

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-533041
(P2009-533041A)

(43) 公表日 平成21年9月17日(2009.9.17)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/12 (2006.01)	C 1 2 M 1/12	4 B O 2 9
B O 1 D 69/08 (2006.01)	B O 1 D 69/08	4 D O O 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2009-504841 (P2009-504841)
 (86) (22) 出願日 平成19年3月27日 (2007. 3. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月3日 (2008. 12. 3)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2007/000764
 (87) 国際公開番号 W02007/116266
 (87) 国際公開日 平成19年10月18日 (2007. 10. 18)
 (31) 優先権主張番号 2006/02975
 (32) 優先日 平成18年4月12日 (2006. 4. 12)
 (33) 優先権主張国 南アフリカ (ZA)

(71) 出願人 508306716
 シネクサ ライフ サイエンス (ピーティワイ) リミテッド
 SYNEXA LIFE SCIENCES (PTY) LTD
 南アフリカ共和国、ケープタウン、7505、タイグベルグ、ステレンボッシュ大学、タイグベルグ キャンパス、クリニカルビルディング、5階、5007C号室
 (74) 代理人 100098431
 弁理士 山中 郁生
 (74) 代理人 100117385
 弁理士 田中 裕人

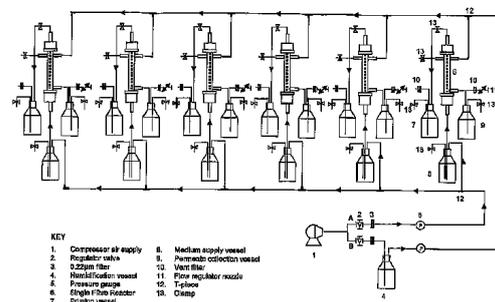
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高性能バイオプロセス装置

(57) 【要約】

本発明は、複数のバイオリアクターからなるシステムに関するものであり、本発明のシステムは、複数のバイオリアクター、加圧流体源、前記流体を前記バイオリアクターに分配する分配手段からなり、前記システムはさらに複数の背圧発生手段を有し、前記背圧発生手段は各バイオリアクターと前記加圧流体源の前後に配置され、各背圧発生手段は、各背圧発生手段の間を流れるときの加圧流体の流れる力より弱い抵抗力を呈する。さらに本発明は、複数のバイオリアクターからなるシステムの操作方法であって、複数のバイオリアクター、加圧流体源、前記流体を前記バイオリアクターに分配する分配手段を設置するステップ、前記ステップにおいては、前記システムは複数の背圧発生手段を有し、前記背圧発生手段は各バイオリアクターに設置されるか、あるいは、各バイオリアクターと前記加圧流体源の間に配置され、各背圧発生手段は、各背圧発生手段の間を流れるときの加圧流体の流れる力より弱い抵抗力を呈するものである、と前記システムを操作するステップからなる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

複数のバイオリクターからなるシステムであって、
複数のバイオリクター、
加圧流体源、
前記流体を前記複数のバイオリクターに分配する分配手段、
からなり、

前記システムは、複数の背圧発生手段を有し、前記背圧発生手段は各バイオリクターと前記加圧流体源の前または後に配置され、各背圧発生手段は、各背圧発生手段の間を流れるときの加圧流体の流れる力より強い抵抗力を呈する。

10

【請求項 2】

請求項 1 に係る前記システムにおいて、前記複数のバイオリクターは前記システム内に並列に配置される。

【請求項 3】

請求項 1 あるいは 2 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記複数のバイオリクターは膜バイオリクターである。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記膜バイオリクターは単繊維型膜バイオリクターあるいは多繊維型膜バイオリクターである。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記複数のバイオリクターは少なくとも一個の中空繊維膜を有する。

20

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記少なくとも一個の中空繊維膜はシェルに包まれた状態の毛細管膜を有する。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記背圧発生手段は、ノズル、あるいはフリットを有する。

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記背圧発生手段は、バイオリクターである。

30

【請求項 9】

請求項 3 乃至 8 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記背圧発生手段は、前記膜である。

【請求項 10】

請求項 1 乃至 9 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記加圧流体源は気体である。

【請求項 11】

請求項 1 乃至 10 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記加圧流体源は空気である。

40

【請求項 12】

請求項 1 乃至 11 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記加圧流体源は液体である。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 12 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記液体は培養液である。

【請求項 14】

請求項 1 乃至 13 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記培養液は前記中空繊維膜の前記管腔へ供給される。

【請求項 15】

請求項 1 乃至 14 のいずれかに係る前記システムにおいて、前記培養液は前記中空繊維

50

膜の前記管腔を通過する。

【請求項 16】

請求項 1 乃至 14 のいずれかに係る前記システムにおいて、気体によって栄養液の供給が行われる。

【請求項 17】

請求項 1 乃至 16 のいずれかに係る前記システムにおいて、バイオフィームは前記中空繊維膜の壁を通過する培養液から栄養を補給しながら前記中空繊維膜の外面上で成長する。

【請求項 18】

請求項 1 乃至 17 のいずれかに係る前記システムにおいて、バイオフィームは過剰栄養の培養液を含めた培養液を透過し、バイオフィームの生産物はリアクターから取り出される。

10

【請求項 19】

複数のバイオリアクターからなるシステムの操作方法であって、前記操作方は、複数のバイオリアクター、加圧流体源、前記流体を前記バイオリアクターに分配する分配手段を設置するステップであって、前記ステップにおいては、前記システムは複数の背圧発生手段を有し、前記背圧発生手段は各バイオリアクターに設置されるか、あるいは、各バイオリアクターと前記加圧流体源の間に配置され、各背圧発生手段は、各背圧発生手段の間を流れるときの加圧流体の流れる力より強い抵抗力を呈するものである、と

20

前記システムを操作するステップからなる。

【請求項 20】

明細書に記載されているか、あるいは例示されている複数のバイオリアクターからなるシステムと実質的に同等な複数のバイオリアクターからなるシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は複数のバイオリアクターからなるシステムに関する。具体的には、本発明は加圧流体を用いた複数のバイオリアクターからなるシステムに関する。

【背景技術】

30

【0002】

バイオテクノロジー産業において、製品の多くは、バイオリアクターを用い、いくつかのバイオプロセスを経て生産される。非常に多くの処理パラメータが結果に影響を及ぼし、そのため、バイオプロセスの作業にも影響が及ぶ。処理パラメータには、生成される微生物の性質、微生物の有する成分、その成分の濃度、成長比、生産媒体、pH、その成長媒体の束一性、酸素量輸送などがある。さらには、幾種類かの異なる方式のバイオリアクターがあり、例として、連続かくはん槽型リアクター (Continually Stirred Tank Reactors, 以下、CSTRと略す)、エアリフト・リアクター (air-lift reactors)、膜バイオリアクター (membrane bioreactors) がある。膜バイオリアクターは非常に重宝するバイオリアクターである。なぜならば継続的な使用が可能であり、最適条件を提供すべく実験が長時間に渡っても培養条件を変更することが可能であり、所定の環境下でより優れた本来的な性能を発揮するからである。実験当初から最適とされる諸条件を正確に予測することは、現状、不可能であるため、プロセス最適化の大半は、経験的に確立される。このように、多くの実験においては、生成物の成長と生成に適する最適な条件を探ることが必要とされる。

40

【0003】

最適な条件を探る実験が、最小限の材料を使用する小規模レベルで、しかも多くのターンアラウンド・タイム費やすことなく、平行的かつあるいは連続的に実施することができればよいかもしれない。一般的には、フラスコやマイクロ・タイター・プレート (micro-titre plates) が組み込まれた小規模な実験システムを用いて多面的かつ平行的な研

50

究が行われる。しかしこのような小規模な実験システムでは、一般的に、フェッド・バッチ(fed batch)および継続的な操作が不可能であり、生産用のバイオリクターレベルまで規模を拡大することができない。膜バイオリクターは、固体/液(空気)界面を提供することによって微生物の自然環境をシミュレートするものであり、さらに著しいバイオプロセスの向上に寄与してきている。このように、大規模な設備をもつ研究室での実験の転用の前段階として、小規模で複数の小型リアクターを使用することは、迅速なスクリーニングや条件の最適化に非常に役立つ。小規模設備から大規模設備に変えることは容易である。そのような小型バイオリクターの有益性が文献などで報告されている。しかし複数の小型リアクターは多チャンネル型ポンプに接続されて駆動されるものであった。この多チャンネル型ポンプが駆動すると、液側で拍動的かつ不均一な流れが生じる。また、多チャンネル型ポンプを駆動させること自体が高価である。空気の流速分布は、普通、各バイオリクターあるいは各実験モジュールの背圧を調整するなどの試行錯誤を重ねることによって、一定に保たれる。

10

【0004】

あるいは、各バイオリクターあるいは各実験モジュールへ、個別に空気を供給する必要がある。ただし、この方法は費用的に高価である。

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

加圧流体源によって駆動される各バイオリクターの状況がほぼ同一な、複数のバイオリクターからなるシステムが待ち望まれている。

20

【課題を解決するための手段】**【0006】**

本発明に係る第一の態様によれば、複数のバイオリクターからなるシステムであって、

- ・ 複数のバイオリクター、
- ・ 加圧流体源、
- ・ 前記流体を前記バイオリクターに分配する分配手段、

からなり、前記システムは、複数の背圧発生手段を有し、前記背圧発生手段は各バイオリクターと前記加圧流体源の前または後に配置され、各背圧発生手段は、各背圧発生手段の間を流れるときの加圧流体の流れる力より強い抵抗力を呈する、ことを特徴とする複数のバイオリクターからなるシステムが提供される。

30

【0007】

前記複数のバイオリクターは、前記システムの中に並列に配置されるのが望ましい。また、前記バイオリクターは単繊維型膜バイオリクター(single fibre membrane bio reactors)あるいは多繊維型膜バイオリクター(multi-fibre membrane bioreactors)のうちいずれかの膜バイオリクターであることが望ましい。特に、前記膜バイオリクターは、シェルに包まれた状態の少なくとも一個の中空繊維膜、例えば毛細管膜を有するのが望ましい。

【0008】

本発明に係る好ましい形態の実施例の例1においては、前記背圧発生手段は、流量調整弁、ノズル、あるいはフリットに相当する。しかしながら、バイオリクター自体が背圧発生手段に相当するものと解釈できる。また、前記バイオリクターが膜バイオリクターである場合、その膜自体が前記背圧発生手段に相当する。理由として、例2に示すように、膜バイオリクターの膜に対して、常に、膜と膜の間に働く抵抗力よりもはるかに大きい流体圧力の抵抗力が及んでいるからである。

40

【0009】

本発明に係る好ましい形態の実施例においては、前記流体は、気体、好ましくは空気に相当する。しかしながら、前記流体は液体、例えば中空繊維膜の管腔へ供給される培養液であってもよい。培養液は中空繊維膜の管腔を通過し、バイオフィルムは中空繊維膜の壁

50

を通過する培養液から栄養を補給しながらその中空繊維膜の外面上で成長するものであってもよい。バイオフィームは過剰栄養の培養液を含めた培養液を透過し、バイオフィームの生成物はリアクターから取り出すことができる。生産物は透過の際に隔離して取り出すことも可能である。栄養分はバイオフィームの成長機構を確認するために観察されるものであってよい。本発明に係る大半の好ましい形態の実施例においては、気体によって栄養液がバイオリアクターに供給される。

【0010】

本発明に係る第二の態様によれば、複数のバイオリアクターからなるシステムの操作方法であって、複数のバイオリアクター、加圧流体源、前記流体を前記バイオリアクターに分配する分配手段を設置するステップ、前記ステップにおいては、前記システムは複数の背圧発生手段を有し、前記背圧発生手段は各バイオリアクターに設置されるか、あるいは、各バイオリアクターと前記加圧流体源の間に配置され、各背圧発生手段は、各背圧発生手段の間を流れるときの加圧流体の流れる力より強い抵抗力を呈するものである、と前記システムを操作するステップからなる。

10

【0011】

本システムは、非常に均一に近い通風、大気圧、液体圧条件のもとで多数のリアクターを並行的に操作することを可能にするものである。以下に本発明に係るシステムの利点を列挙する。

- ・ 培養物のもたらす生物学上の効果、または、同等の条件下で数個のバイオリアクターにて長時間に渡り観察することのできる実験環境を決定できる。すなわち、多数の膜において平行して起こる変化を予定の実験実施期間を超えて観察することができる、または経時変化的な事象を見極める分析を行うために個々のバイオリアクターを犠牲にすることができる。

20

- ・ 複数の培養基の最適化を平行的に行うことができる。このため、プロセスの進展時間が大いに削減される。

- ・ ろ過効率およびバイオと化学の融合性を調べるために異なる膜についてテストすることができる。

【0012】

本発明に係るバイオリアクターにおいては、培養物の働きに関するプロセス条件を最適化するために、圧力と流動の条件を、変更することができる。特筆すべき点を以下に列挙する。

30

- ・ ある合成物の生産に用いられる一連の種または菌株を、同等な条件下で平行して比較することができる。

- ・ 例えばスクリーニング・アプリケーションなど、小規模レベルで多数の異なる生産物を生産することが可能である。

【0013】

本発明に係るシステムは、一般的に、以下に列記するものを有する。

- ・ 米国特許5,945,002号に記載されているタイプの単繊維型あるいは多繊維型膜バイオリアクター。該米国特許に記載のバイオリアクターは、限られた空間あるいは材料で使用するのに適する小型のものであるのが望ましい。

40

- ・ 流体（気体）圧力源。一般的にはエア・コンプレッサあるいはガス・シリンダーがこれに該当する。

- ・ 圧力及び液体の流れを修正できるキャップが付いていて、例えば栄養液といった成長培地入りの圧力容器を含む多数の圧力容器に、加圧流体を送るマニホールド。キャップには3つの接続部があり、1つは加圧流体を取り込むためのものであり、1つは成長培地を送り出すためのものであり、もう1つは新しい媒体もしくは他の添加物を取り込むためのものである。

- ・ 操作上の必要条件に応じ、毛細管膜の場合、バイオリアクターの管腔あるいは毛細管の外側空間（Extra Capillary Space、ECSと略す）のいずれかに対して、各圧力容器は取り付けられる。

50

・ 各バイオリアクターは、好ましくは、流動率に関しての許容範囲内の差に応じて本質的に等価な数値範囲の抵抗力を有する一枚以上の膜を有するのが望ましい。そのような膜を備えることにより、別のバイオリアクターからの流体の流入、または抵抗力に反比例する流体の流入を、確実にする。

・ 通気培養法による培養物の成長のために、圧縮空気などの空気圧力源を、膜バイオリアクターを介して分配する必要がある。通常、ここで分配される空気は、成長培地を生かしておくために供給される空気と同じである。

・ 加湿が必要である場合には、好ましくは、空気供給入り口に細菌ろ過フィルターを取り付けた状態で、加湿器を空気供給口に接続することとしてもよい。細菌ろ過フィルターを取り付けた上で加湿器を使用することにより、加湿空気を送り出す特殊な空気フィルターを用いることなく、無菌状態での操作が可能となる。

・ 加湿器は、乾燥空気を加圧のために送り込み、加湿空気を追い出すためのキャップ付の圧力容器であってもよい。

・ 流体分配手段、例えば送気管は、空気が全てのバイオリアクターに分配されるように、マニホールドで構成されることが望ましい。

・ 上記の送気管は各膜モジュールの毛細管の外側空間に接続されることとしてもよい。

・ 各膜リアクターの空気の排出と生成物取り出しのための出口は、透過物回収容器に接続されていることとしてもよい。

・ 上述の透過物回収容器は、圧力容器であることが望ましく、該圧力容器は3つ接続部を有するキャップを備え、1つは廃棄空気と生成物を容器内に導くためのものであり、1つは必要に応じて生成物を除去するためのものであり、もう1つは空気を排出するためのものである。

・ 上述の透過物回収容器の空気排出口は、例えば流量調整容器、ノズル、あるいは所定の仕様のフリットなどに相当する背圧発生装置に接続されていることが望ましい。

・ 上述のノズルは複数で使用される場合、全て同じノズルであり、同じものを使用することにより、バイオリアクター間の通気を均一にしたり、ノズルの抵抗に比例した通気を行うことができる。

・ 上述のノズルの仕様は、圧力に対する空気の流量を決定付ける。

・ バイオリアクター内の膜の管腔側は液体供給容器に接続された液体供給管を備えることが望ましい。この液体供給管を通じて管腔に液体が注入され、それにより媒体を変更することが可能になる。

・ 液体供給容器は2つの接続部を有するキャップを備え、1つは媒体を容器内に取り込むものであり、もう1つは媒体を容器外に排出するためのものであることが望ましい。

・ 送気管と液体供給管はそれぞれ直列に配置された無菌圧力計を備えることが望ましい。

【0014】

本発明は、適切な改良を加えた上でパーベーパーレーション(pervaporation)技術の応用に用いられる可能性があるものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明について、以下の図面を参照しつつ説明する。

【0016】

図1において、コンプレッサーによる空気供給1は、二股の送気管A、Bへ空気を送り出す。送気管A、B各々は、0.22 μ mフィルター3に接続された制御弁2によって送気を制御されている。送気管Bは加湿容器4に接続され、加湿空気は加湿容器4を出て圧力計5を通過する。送気管Aにも圧力計5が取り付けられている。

【0017】

本システムは6機の単繊維型バイオリアクターから構成される。各バイオリアクターは

10

20

30

40

50

、例えば Al_2O_3 （酸化アルミニウム）など、毛細管物質からなる単一膜中空系（不図示）を有する。送気管Aは6つのT型部材で繋げられ、各バイオリアクター6の媒体供給容器8に接続されている。媒体供給容器8各々は、1つのキャップを備え、該キャップは、送気管Aの入口と、媒体の出口と、成長媒体の栄養分を変更したり新たに加えたりする場合の入口とを有する。なお、栄養分の変更・追加に用いられる入口は、利用時以外はクランプ13で締められている。流入空気により媒体供給容器8内で作り出され、媒体の表面上にかけられる圧力は、中空繊維膜、締め付け解除したクランプ13を通過して、液体供給容器7へと媒体を送り出す。液体供給容器7は1つのキャップを備え、該キャップは媒体を受け入れる入口と、クランプ13で締められていて該液体供給容器内が満杯の場合にはクランプ13の締め付けを解除して容器内を空にするための出口と、換気フィルター10に接続されている空気の出口とを有する。

10

【0018】

T型部材で直列に繋げられた送気管Bは、各バイオリアクター6の管腔、すなわち各中空繊維の外側に、空気を供給する。空気は、使用時以外はクランプ13で締められている穴を通るか、もしくは生成物回収容器9に排出されるべく接続された第2出口を通過して、バイオリアクターのシェルを出る。中空繊維を通過して流れた（透過した）各中空繊維の外側の表面で成長しているバイオフィルム上の生成物を含む媒体と空気は、生成物回収容器9内に入る。生成物回収容器9は1つのキャップを備え、該キャップは、生成物を受け入れる入口と、使用時以外はクランプ13で締められており生成物を生成物回収瓶へ送り出す出口と、換気フィルター10と流量制御ノズルに接続された穴とを有する。

20

【0019】

使用時、各バイオリアクターへの空気および媒体の供給は、ほぼ均一である。というのは、背圧発生手段が、2機のバイオリアクター間の圧力よりも大きい圧力を各バイオリアクターから作り出すからである。このような仕組みで、平行に設置された複数のバイオリアクターを作動させる際には、2機のバイオリアクター間ごとに変化する流量の度合いが制限される。これにより、ほぼ同質な条件（生成物の生成に有益な）下での高い処理能力および・あるいはプロセスの最適化（研究・開発活動に有効）が実現される。

【0020】

上述した単繊維型リアクターは、多繊維型リアクターあるいは、実際に利用されている流体の供給を必要とする他のタイプのバイオリアクターに置き換えることが可能である。圧力は手動、自動のいずれの形態で制御されるものであってもよい。

30

【0021】

また、各リアクターへの圧力および・あるいは流体の供給は、手動、自動いずれかの形態で制御されるものであってもよい。

【0022】

本発明について以下に述べる例を挙げて説明する。ただし本発明は以下の例のみに限定されるものではない。

【0023】

<例1（有酸素状態）>

<ストレプトミセス・セリカラーA3（2）によるアクチノロージンの産生のための最適化>

40

例1においては、背圧発生手段は、各単繊維型リアクターの空気の出口に配置された複数のノズルがこれに相当する。

本実験は、栄養の供給量、栄養濃度、およびストレプトミセス・セリカラー(streptomyces coelicolor)によるアクチノロージン(Actinorhodin)産生における酸素化に関する効果を評価するためのものである。加えて、バイオフィルム形成における移植片のサイズと生産力への影響を評価するものでもある。処理パラメータの変更は、連続的あるいは同時進行的に、ストレプトミセス・セリカラーが移植された12機の単繊維型リアクター各々について実施される。

【0024】

50

アクチノロージンのレベルは、完全な青色色素と記録され、「Ates (他)、1997年 (E1 %、1 cm = 355)」に記載された方法に基づく標準操作手順に従って分光光度法で数値化される。

【0025】

<滅菌処理>

単繊維型リアクターは、標準操作手順に基づく有酸素状態での操作を実施するために、加圧滅菌処理され、セットされる。実験を開始する前に、加圧滅菌処理された成長培地は、各媒体供給容器の中に移植される。

【0026】

<移植片の植え付け>

単繊維型リアクター1～5各々には、10mlの滅菌蒸留水に浸された寒天プレートを用いて作られた1mlの孢子懸濁液が注入される。単繊維型リアクター6～10各々には、28℃で4日間フラスコ培養されたものが1mlずつ注入される。移植片は、各単繊維型リアクターの毛細管の外側空間に、標準的な滅菌技術を用いて、直接注入される。毛細管膜の外表面への移植片の固定化は標準操作手順に基づき行われる。

10

【0027】

<操作>

単繊維型リアクターは、標準操作手順に基づき、有酸素状態で操作される。実験開始時の気圧は、およそ30kPaに設定されている。送気管Aと管腔側の膜導管を通して供給された媒体は、手動でセットされる。手動でセットされるのは、管腔からシェルにかけての膜表面の圧力の差を利用して、バイオフィルムに対する栄養素供給率(供給量)の調節を行うためである。透過物は毎日、透過物回収容器から回収されサンプルに供される。

20

【0028】

栄養のタイプとその濃縮について最適化を行う間、古い成長培地をプライム・ボトルに排出し媒体供給容器に適切な新しいタイプの媒体を充填することにより、現状の成長培地は、新鮮な栄養源と交換される。さらに、単純に残留成長培地を加えて所望の栄養物の周知の終末濃度を作り出す方法で、単純に栄養物や添加物を実験開始時の成長培地に加えることも行われる。

【0029】

酸素化の増加に関する効果を評価する際、圧縮空気は、市販の酸素ポンペを用いて酸素に置き換えられる。

30

【0030】

【表 1】

12 機の単繊維型リアクター(SFR)それぞれの培養条件の一覧

SFR	移植片の形態	開始時	13 日目	15 日目	16-20 日目	26 日目
1	菌糸	ISP2	30 kPa	酸素	グルコースを添加	-
2	菌糸	ISP2	30 kPa	酸素	グルコースを添加	-
3	菌糸	ISP2	30 kPa	酸素	グルコースを添加	ISP2
4	菌糸	ISP2	30 kPa	酸素	1997 年 Ates (他) 発表の媒体	
5	菌糸	ISP2	30 kPa	酸素	1996 年 Bystrykh (他) 発表の低 PO ₄ 媒体	ISP2
6	孢子	ISP2	60 kPa に高める	空気	-	-
7	孢子	ISP2	60 kPa に高める	空気	-	ISP2
8	孢子	ISP2	60 kPa に高める	空気	-	-
9	孢子	ISP2	60 kPa に高める	空気	1997 年 Ates (他) 発表の媒体	ISP2
10	孢子	ISP2	60 kPa に高める	空気	1996 年 Bystrykh (他) 発表の低 PO ₄ 媒体	-

10

20

30

【0031】

< バイオフィルムの成長 >

菌糸あるいは孢子タイプの移植片を用いると、移植後 24 ~ 28 時間以内に、移植片が膜の長手方向に沿って小さな黄色のコロニー状に成長したストレプトミセス・セリカラーとなり、バイオフィルムの成長が確認できる。コロニーは増殖し、色は黄色からオレンジ色に近い赤色に変化し、コロニー同士が繋がり (72 ~ 120 時間)、わずかに先細り形状のバイオフィルムに成長するインターナル・ストレプトミセス・プロジェクト (Internal Streptomyces Project、以下ISPと略す) 2 と称する媒体を摂取することにより成長が急速に進む。バイオフィルムにおいて成長の度合いに差異が生じ始めるにつれ、光沢を帯びたオレンジ色に近い赤色は、不透明な状態に、さらに白色から灰色へと変化し、孢子が形成される (240 ~ 300 時間)。全ての事例において、垂直単繊維型リアクターの上部付近の膜の数箇所部位において差異が生じ始める。このような差異は媒体流量により発生するものと考えられる。媒体中のアクチノロージンを示す赤い色素の出現と孢子形成は一致する。差異が生じたバイオフィルムは濃い藍色に変化し、消費された培養液の pH は増加し、孢子形成の増加とともに、さらに色素が放出される。消費された培養液の pH の増加と同様に、アクチノロージンの有する指標機能により、媒体の色素は赤から青紫へと変わる。

40

【0032】

菌糸が移植された単繊維型リアクター (1 - 5) では、孢子が移植された単繊維型リアクター (6 - 10) ほどの、急速あるいはフィルムの厚みが増すバイオフィルムの成長は

50

見られない。胞子が移植された同じDPリアクターによる操作では、より高密度のバイオフィルムの成長が進むために流速が低下する。このため、容易に膜・バイオフィルムを通過して単繊維バイオリアクターに向かおうとする栄養液の流れに対するより大きな抵抗を、容易に作り出すことができる。1個のバイオフィルム中における成長の差異と色素の発現の度合いの差は、バイオフィルム(束)成長のために供給する栄養を色々変えることができる結果、生じるものであり、供給する栄養を変更できるのは、膜・バイオフィルムの抵抗力、及び・あるいは、リアクターの実験履歴に差異があるからである。同じ移植及び・あるいは培養条件下で、膜ごとの固有の抵抗力が、生成プロセスのロバスト性を決定するのに利用されることがある。

【0033】

しかしながら、同様のPが2機の単繊維型リアクターのバイオフィルム上に生成物を生成する際に用いられることがあったとしても、より遅い流速の影響を受けることがある。差異や色素の発現を再現しても、流速やリアクターの実験履歴によって差異が生じるものと考えられる。

【0034】

<生産性>

360時間(移植片の移植から14日)以上に及ぶ、アクチノロージン濃縮物と単繊維型リアクターの容積生産性の記録は下の表2の通りである。平均すると、菌糸を移植した単繊維型リアクターでは、比較的急速にバイオフィルム形成が進み、比較的容易にアクチノロージン産生が発現するのが観察された一方で、胞子を移植し、空気圧60kPaの条件下で操作が行われた単繊維型リアクターにおいては、全体に及ぶ、より広範囲なアクチノロージン産生が観察された。バイオフィルムを純酸素にさらすことにより、アクチノロージン産生が誘発される。しかしながら、増殖したアクチノロージンのレベルは維持されない。選択した3つの成長培地のうち、4g/lグルコースを含有するISP2成長培地を用いたものの生産性が最も高かった。

【0035】

10

20

【表 2】

異なる単繊維型リアクター(SFR)によるアクチノロージン産生

SFR	アクチノロージン(mg/l)			容積生産性 (mg/l/h/リアクター容積)		
	最大	平均	標準偏差	最大	平均	標準偏差
1	129.27	30.18	28.57	16.50	2.09	3.11
2	119.65	13.16	20.86	13.73	1.17	2.47
3	219.76	68.88	57.56	30.15	6.10	6.86
4	181.64	29.05	33.60	5.78	1.97	1.54
5	67.42	24.01	14.85	6.62	1.82	1.32
6	110.09	17.70	23.34	5.75	1.30	1.55
7	223.62	48.97	56.38	11.33	2.72	3.06
8	206.05	58.44	54.32	15.73	3.61	3.59
9	269.62	69.60	92.24	15.99	3.16	3.79
10	25.23	7.34	7.98	1.17	0.41	0.37

10

20

30

【0036】

単繊維型リアクターの動態解析は、増殖したアクチノロージン産生ではpHレベルがより高く、かつ、グルコースあるいはリン酸のレベルがより低くなる傾向が見られることを示している（例：図2を参照）。この傾向は、統計分析によって確認できる。しかしながら、このような相関関係は重要でない（表3）。

【0037】

【表 3】

基質の利用とアクチノロージン産生の相関関係をピアソンズ相関係数 ($+1 > r > -1$) を用いて示したもの

SFR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
アクチノロージン vs. pH	0.543	0.364	0.829	0.411	0.538	0.491	0.517	0.657	0.429	0.402
アクチノロージン vs. グルコース	-0.251	-0.065	0.095	-0.304	-0.347	-0.442	-0.392	-0.447	-0.281	-0.270
アクチノロージン vs. リン酸塩	不検出	不検出	-0.165	不検出	不検出	不検出	不検出	不検出	-0.243	不検出

10

【 0 0 3 8 】

< 例 2 (有酸素状態) >

< 乳酸連鎖球菌におけるベータ・ラクタマーゼ産生のための最適化 >

例 1 においては、背圧発生手段は、複数の膜そのものに相当する。

20

【 0 0 3 9 】

本実験は、単繊維型リアクターにおける pH および組み換えタンパク質産生の安定化確立手段として、成長培地において増強されたバッファ濃度の効果を評価するためのものである。加えて、バイオフィーム形成における移植片のサイズが及ぼす効果と、栄養をリアクターに供給する際に、リアクターの上部もしくは下部から媒体を供給する構成とする場合の構成上の影響と、利便性について、評価するものでもある。

【 0 0 4 0 】

ベータ・ラクタマーゼの活性は「ニトロセフィン法 (Oxoid社)」に記載された方法に基づく標準操作手順に従って分光光度法で数値化されている。

【 0 0 4 1 】

< 滅菌処理 >

単繊維型リアクターは、標準操作手順に基づく有酸素状態での操作を実施するために、加圧滅菌処理されセットされる。実験を開始する前に、フィルター滅菌媒体は、各媒体供給容器の中に移植される。

30

【 0 0 4 2 】

< 移植片の植え付け >

単繊維型リアクター各々には、30 で16時間、M17-G15 成長培地内で培養された 1 ml の 1X あるいは 50 分の 1 の乳酸連鎖球菌 (L. lactis) PRA 290 (ベータ・ラクタマーゼ) であって、移植片として未完成のものが注入される。移植片は、各単繊維型リアクターの毛細管の外側空間に、標準的な滅菌技術を用いて、直接注入される。追加の移植媒体は、一晚、気圧 8 kPa 環境で各単繊維型リアクターに供給される。

40

【 0 0 4 3 】

< 操作 >

6機の単繊維型リアクターは、それぞれのバンクがマニホールで接続された状態で接続されている。各単繊維型リアクターには各々の供給容器から媒体が供給される。各バンク内では、200 mM もしくは 400 mM の K-PO4 バッファ (pH 7.2) を含有する LM5-V10 0-G75 が、ガラス製のマニホール上部もしくは下部に備えられた媒体入り口から、単繊維型リアクターに供給される。流量、pH、およびベータ・ラクタマーゼの活性度は、新鮮なサンプルを用いて評価される。グルコースとタンパク質のレベルは、サンプルを抽出するのではなく、全体的なものとして観察される。

50

【 0 0 4 4 】

各バンクへの媒体供給は、圧力制御弁を用いて制御される。単繊維型リアクターは、移植片の移植後、2時間ごとに観察される。透過物質のpH変化の数値は移植片の成長を観察するのに用いられると同時に、流量の調整の基礎的判断材料としても用いられる。気圧は、以下の表の通りに調節される。

【 0 0 4 5 】

【表 4】

移植後の経過 (時間)	気圧 (kPa)
0	8
16	13
22	18
28	30
30	50
34	70
36	80

10

20

【 0 0 4 6 】

< バイオフィルムの成長 >

移植片の移植から50時間経過すると、均一な厚みのヨーグルトからなる高濃度のバイオフィルムが、全ての単繊維型リアクターで観察される。指数関数的に成長する乳酸連鎖球菌細胞が保持されることにより、このようなバイオフィルムが形成されると考えられる。バイオフィルムが成長するにつれ、流れに対する抵抗が高くなる。実験の終盤においては、気圧は100kPa近くに設定され、流量は流体を移動できなくする臨界点よりも低い流量に減らされ、その結果、プランクトン様の成長が観察されるようになる。

30

【 0 0 4 7 】

< 生産性 >

より小さなサイズの移植片を用いて単繊維型リアクターで培養された培養物は、単繊維型リアクターでの移植の制御をする場合(図3参照)と比較すると、4~6時間後(図2参照)までに、pHの下降速度とベータ・ラクタマーゼ産生の速度が鈍化する。酵素の最大活性、産生の安定性のいずれについても、際立った差異は、異なる移植片を用いて培養した単繊維型リアクターの間で観察できない。

40

【 0 0 4 8 】

初期の成長は、400mMのK-PO4で調製された媒体によって抑制されているものと考えられる。これらの単繊維型リアクターにおける酵素の産生は、移植片の移植後12~22時間から変化し、複製が始まる。複製の開始は媒体が底部から供給される単繊維型リアクターにおいて観察できるということが、ほぼ断定されている(図3および図4を参照)。しかしながら、高バッファ濃縮の条件では、最大レベルのベータ・ラクタマーゼが記録されている(20000-24000U.L⁻¹)。

【 0 0 4 9 】

以下に示す文献は、本出願の内容を含むものとして考慮されるべきものである。

1. プロセス・バイオケミ32の273-278頁に掲載「バッチおよびフェッド・バッチ培

50

養によるストレプトミセス・セリカラーの産生」(1997年)S.エーテス、M.エリボル、F.マビトゥーナ共著。

2. J.バクテリオル178の2238-2248頁に掲載「アクチノロージンに関連する“青色色素”の産生」(1996年)L.V.ピストリク、M.A.フェルナンデス・モレノ、J.K.エッレーナ、F.マルパリダ、D.A.ホップウッド、L.ディジュイゼン共著。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】本発明に係る複数のバイオリアクターからなるシステムの概略図である。

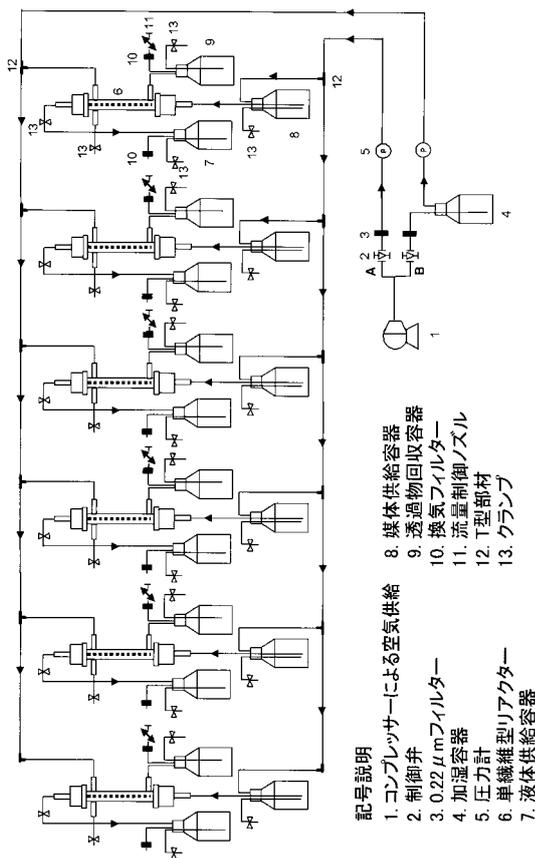
【図2】pH、グルコースと、アクチノロージンの産生量に対する透過物質のリン酸レベルとの関係を示すグラフである。

【図3】200mMのKPO4バッファ、pH7.2、50分の1の濃度の条件で、LM5-V100-G75を用いて培養された場合の単繊維型リアクター(Single Fibre Reactors、SFRsと略す)内における経時変化を表すグラフである。

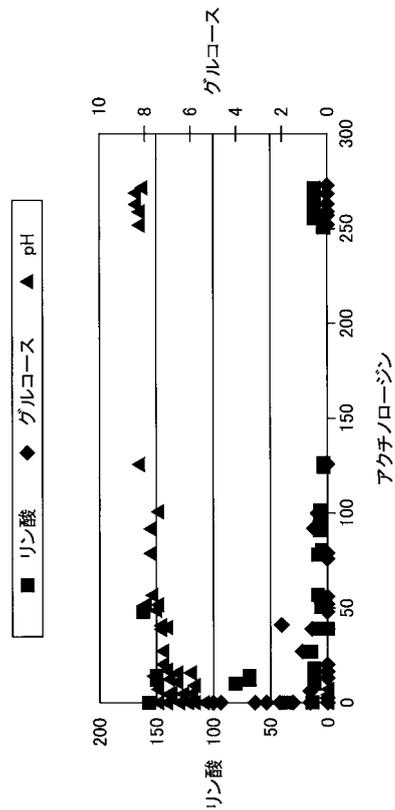
【図4】媒体をマニフォールドの上部あるいは下部の入り口から供給し、200mMのKPO4バッファ、pH7.2の条件で、LM5-V100-G75を用いた上で、1Xの移植片が培養された場合の単繊維型リアクター内における経時変化を表すグラフである。

【図5】媒体をマニフォールドの上部あるいは下部の入り口から供給し、400mMのKPO4バッファ、pH7.2の条件で、LM5-V100-G75を用いた上で、1Xの移植片が培養された場合の単繊維型リアクター内における経時変化を表すグラフである。

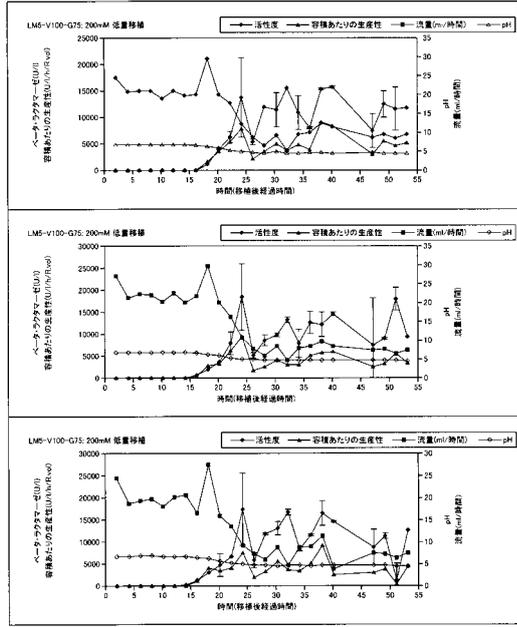
【図1】



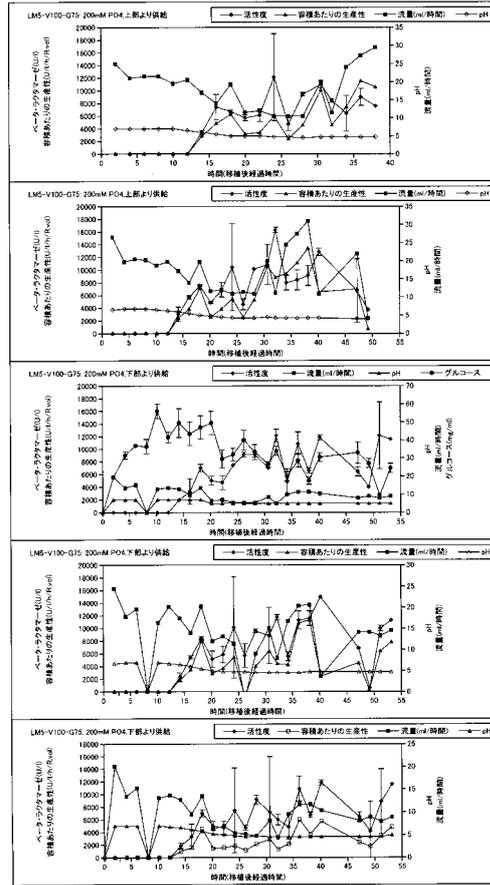
【図2】



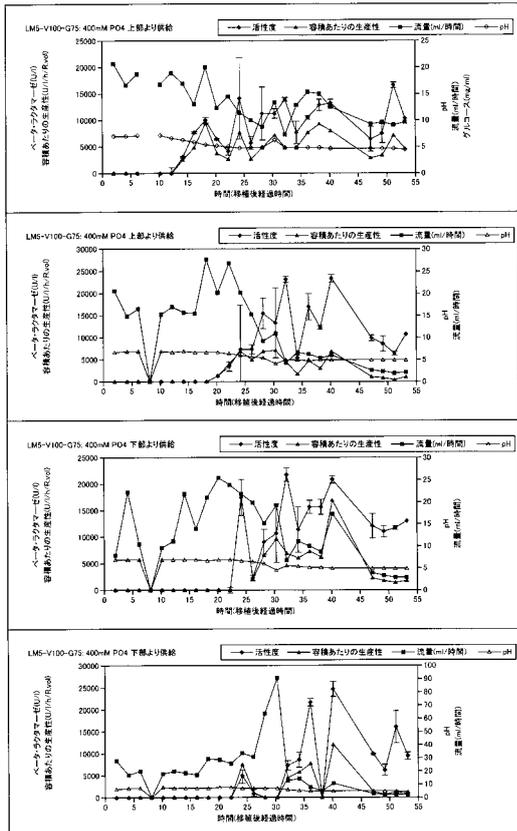
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/000764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12M1/12 C12M3/06		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M B01D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 804 628 A (CRACAUER RAY F [US] ET AL) 14 February 1989 (1989-02-14) column 3, lines 9-26, 49-56 column 4, lines 4-9, 34-43, 51-54 column 5, lines 1-4 claims; figures	1-20
X	EP 0 480 400 A (ENDOTRONICS INC [US]) 15 April 1992 (1992-04-15) page 3, lines 5-8, 45-48 claims; figures	1-20
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 20 August 2007		Date of mailing of the international search report 27/08/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Böhm, Ingo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2007/000764

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 86/02379 A (ENDOTRONICS INC [US]) 24 April 1986 (1986-04-24) page 3, line 29 - page 4, line 8 page 7, lines 14-17 page 8, lines 6-17 page 10, lines 1-10 page 13, lines 24-28 claims; figures	1-20
A	EP 0 343 394 A (ENDOTRONICS INC [US]) 29 November 1989 (1989-11-29) column 1, lines 1-4 column 2, lines 1-32 claims; figures	1-20
A	US 5 945 002 A (LEUKES WINSTON DANIEL [ZA] ET AL) 31 August 1999 (1999-08-31) column 1 - column 2	1,19,20
A	US 4 988 443 A (MICHAELS ALAN S [US] ET AL) 29 January 1991 (1991-01-29) column 2 - column 3	1,19,20
A	US 4 442 206 A (MICHAELS ALAN S [US] ET AL) 10 April 1984 (1984-04-10) column 1 - column 2	1,19,20
A	DE 38 19 704 C1 (KRAFT EUROPE R & D, INC. ZWEIGNIEDERLASSUNG MUENCHEN, 8000 MUENCHEN, D) 28 September 1989 (1989-09-28) column 2 - column 4	1,19,20
A	EP 0 398 083 A (FISCHER KARL HEINZ [DE]; BAUER HERMANN DR [DE]) 22 November 1990 (1990-11-22) claims; figures	1,19,20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2007/000764

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4804628	A	14-02-1989	NONE	
EP 0480400	A	15-04-1992	JP 7008274 A US 5202254 A	13-01-1995 13-04-1993
WO 8602379	A	24-04-1986	EP 0198033 A1 JP 62500356 T	22-10-1986 19-02-1987
EP 0343394	A	29-11-1989	JP 2072862 A US 4973558 A	13-03-1990 27-11-1990
US 5945002	A	31-08-1999	AT 199701 T DE 69612048 D1 DE 69612048 T2 DK 761608 T3 EP 0761608 A2 GR 3036003 T3	15-03-2001 19-04-2001 11-10-2001 16-07-2001 12-03-1997 28-09-2001
US 4988443	A	29-01-1991	NONE	
US 4442206	A	10-04-1984	NONE	
DE 3819704	C1	28-09-1989	DE 8816457 U1 EP 0353422 A1 ES 2036751 T3	10-08-1989 07-02-1990 01-06-1993
EP 0398083	A	22-11-1990	DE 3914956 A1	22-11-1990

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 エドワーズ・ウェード

南アフリカ共和国、ケープタウン、7975、フィッシュホーク、パインストリート 9

(72)発明者 ルーカス・ウィンストン ダニエル

南アフリカ共和国、7941、グラッシーパーク、ファーストアベニュー 187、ウィニフレッド ルーカス様方

(72)発明者 フレーザー・シーナ ジャネット

南アフリカ共和国 ケープタウン、8005、シーポイント、クルーフロード 76、フレネクローズ 16

Fターム(参考) 4B029 AA02 BB02 BB03 CC01 CC02 DA08 DA10 DF03 DF06 DG06
4D006 GA50 HA01 JA52Z KA14 KA16 KA64 KA67 KB25 PC67