

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5647610号
(P5647610)

(45) 発行日 平成27年1月7日 (2015.1.7)

(24) 登録日 平成26年11月14日 (2014.11.14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/00 (2006.01)
 B O 1 D 61/54 (2006.01)
 B O 1 D 61/44 (2006.01)
 B O 1 D 61/46 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/00 B
 B O 1 D 61/54 5 1 O
 B O 1 D 61/44 5 O O
 B O 1 D 61/46 5 O O
 C 1 2 M 1/00 C

請求項の数 13 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2011-525466 (P2011-525466)
 (86) (22) 出願日 平成21年9月4日 (2009.9.4)
 (65) 公表番号 特表2012-501632 (P2012-501632A)
 (43) 公表日 平成24年1月26日 (2012.1.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/006438
 (87) 国際公開番号 W02010/025933
 (87) 国際公開日 平成22年3月11日 (2010.3.11)
 審査請求日 平成24年8月29日 (2012.8.29)
 (31) 優先権主張番号 08163856.1
 (32) 優先日 平成20年9月8日 (2008.9.8)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/095,123
 (32) 優先日 平成20年9月8日 (2008.9.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514032544
 カールスバーグ・アクティージェルスラブ
 デンマーク 1 7 9 9 コペンハーゲン・ヴェ
 ー、ニュ・カールスバーグ・ヴァイ 1 0 0
 番
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 睦
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100107180
 弁理士 玄番 佐奈恵
 (72) 発明者 アルヴィド・ガルゼ
 デンマーク、デーコー 3 4 0 0 ヒレレス
 、ブルネビエアウ 1 4 番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 逆電気強化透析 (R E E D) システムにおける液体の改良されたプロセスパラメータ制御のための方法およびシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞成長の生産性および寿命を向上させるために、および/または代謝産物の生成を調節するために、有機酸イオンのような阻害物質を抽出することによる、バイオリアクタまたは生醗酵プロセスにおける液体組成物のプロセスパラメータを制御する方法であって、前記液体を第1逆電気強化透析 (R E E D) 膜スタックおよび第2 R E E D 膜スタックに通過させる少なくとも1つの工程を含み、各スタックが、

i) その間に第1液体のための第1チャンバーを規定する、少なくとも2つのイオン交換膜；

ii) 第2液体のための少なくとも2つの別のチャンバーであって、当該別の各チャンバーは、少なくとも1つの第1チャンバーに近接して配置される、チャンバー；

iii) 1組の端部膜；

iv) 各膜スタックに、少なくとも2つの電極によって電場をかける手段；

v) 前記膜スタック内で電場の方向を逆転させる手段

を有し、

前記第1膜スタック内で電場の方向を反転させることを、前記第2膜スタック内で電場を反転させることに対して、非同時的な時間間隔をもって行い、

前記 R E E D 膜スタックを並列に操作する、方法。

【請求項 2】

10

20

前記プロセスパラメータが、前記液体組成物の pH、標的イオンの濃度、および / または導電率から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記液体組成物を、少なくとも 1 つの別の R E E D 膜スタックに通過させる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 R E E D 膜スタックが、アニオン交換逆電気強化透析 (A X - R E E D) 膜スタックである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 R E E D 膜スタックが、カチオン交換逆電気強化透析 (C X - R E E D) 膜スタックである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

電場の方向を、任意の第 1 膜スタック内で、任意の第 2 以上の膜スタックに関する逆転に対して、実質的に規則的な分散間隔で逆転させる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

電場の方向を、任意の第 1 膜スタック内で、任意の第 2 以上の膜スタックに関する逆転に対して、実質的に等しい長さの分散間隔で逆転させる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

かけられる電場の強さを、前記液体組成物の pH、標的イオンの濃度、および / または導電率に応じて調節する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記第 2 液体の濃度および / または流量を、かけられる電場の強さに対して調節する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記液体組成物が、固定化された若しくは懸濁した微生物培養物を含有する発酵混合物であり、または酵素含有混合物である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記微生物培養物が、バクテリア、酵母、菌類もしくは哺乳類細胞の増殖培養物または休止培養物を含む、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

細胞成長の生産性および寿命を向上させるために、および / または代謝産物の生成を調節するために、有機酸イオンのような阻害物質を抽出することによる、バイオリアクタまたは生醗酵プロセスにおける液体組成物のプロセスパラメータを制御するためのシステムであり、当該システムは少なくとも第 1 逆電気強化透析 (R E E D) 膜スタックおよび第 2 R E E D 膜スタックを含み、各スタックが：

- i) それらの間で第 1 液体のための第 1 チャンバーを規定する、少なくとも 2 つのイオン交換膜；
 - ii) 第 2 液体のための少なくとも 2 つの別のチャンバーであって、当該別の各チャンバーは、少なくとも 1 つの第 1 チャンバーに近接して配置される、チャンバー；
 - iii) 1 組の端部膜；
 - iv) 各膜スタックに、少なくとも 2 つの電極によって電場をかける手段；
 - v) いずれか 1 つの膜スタック内で電場の方向を逆転させる手段
- を有し、

40

前記 R E E D 膜スタックが並列に操作される、システム。

【請求項 13】

細胞成長の生産性および寿命を向上させるために、および / または代謝産物の生成を調節するために、有機酸イオンのような阻害物質を抽出することによる、バイオリアクタまたは生醗酵プロセスにおける液体組成物のプロセスパラメータを制御するための請求項 1

50

2 に記載のシステムの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、少なくとも2つの逆電気強化透析（REED）膜スタックを含む逆電気強化透析（REED）システムにおいて、いずれか1つの膜スタック内の電場の方向を、他の膜スタックに対する電場の逆転に対して非同時性の時間間隔でもって逆転させる、液体組成物の改良されたプロセスパラメータ制御のための方法およびシステムに関する。さらに、本発明は、逆電気強化透析（REED）システムにおいて、パラメータコントロールメカニズムが、DC電流調整および透析物溶液組成の調整の組み合わせによって誘発される、液体組成物の改良されたパラメータ制御のための方法およびシステムに関する。

10

【背景技術】

【0002】

液体組成物のpH、導電率、および/または標的イオンレベルの制御は、金属精錬および発酵液からの有機物の精製のような幅広い技術分野において用いられる重要な工業プロセスである。

【0003】

液体組成物のpHおよび/または標的イオンレベルを制御するために、多数の方法が導入されてきた。前記方法として、精密ろ過および限外ろ過法、イオン交換法、ならびに電気透析法が挙げられる。

20

【0004】

例えば、バイオリアクタは、様々な有機化合物、医薬用タンパク質、アミノ酸、種菌（またはスターター培養物、*starter culture*）、バイオ燃料等を製造するために、または生分解の目的のために、産業において幅広く使用されている。バイオリアクタは多くの場合、最適な機能性を保持するのに特定のpHレベルを必要とする微生物を含んでいる。

【0005】

バイオリアクタにおけるpH調節の標準的手段として、バイオリアクタ中にアルカリ性または酸性中和剤で直接滴定し、それにより、微生物が生成した酸性またはアルカリ性の代謝産物を中和することが挙げられる。しかし、これらの代謝産物の塩は特定の濃度に達するとしばしば成長を阻害する。

30

【0006】

生物学的反応に対する阻害物質等のいくつかの塩および代謝産物の増加によって、正常な回分操作におけるバイオリアクタの生産性に制限が設けられる。阻害を最小限にするための可能な解決策として灌流システムが挙げられ、この灌流システムにおいて、阻害物質を含む発酵培養液がフィルタープロセス（例えば限外ろ過または精密ろ過）によって連続的に抽出され、その一方で微生物が保持され且つ新たな基質溶液が発酵槽に加えられる。灌流システムにおいては、中和剤滴定によるバイオリアクタのpH調節が未だ必要であり、有用な基質成分が透過物と共に失われる。

【0007】

40

電気透析およびいわゆるドナン（Donnan）透析法で利用される、イオン交換膜の使用は、限外ろ過および精密ろ過で通常用いられる膜と比較して、小さい荷電種（または荷電スปีシーズ）をより選択的に抽出し得る。しかし、常套的な電気透析は、バイオリアクタと直接組み合わせると膜の汚染を免れず、また、pH制御のために中和剤滴定が未だ必要である。

【0008】

欧州特許第1237823号は、カチオン交換膜またはアニオン交換膜のいずれかを有する電気強化透析セルにおいて、イオン種を第1溶液から第2溶液へ移動させる装置および方法を開示している。

【0009】

50

米国特許第5,114,554号はカソード電着浴から酸を除去する方法を開示しており、その方法において、導電性基板をカチオン樹脂でコーティングし、コーティング浴の少なくとも一部を限外ろ過に供し、限外ろ過液の少なくとも一部を、直流電流で操作されるアニオン交換膜を有する電気透析セルにおいて、特定の電気透析処理に供する。

【発明の概要】

【0010】

液体組成物の改良されたプロセスパラメータ制御のための方法およびシステムであって、当該液体組成物のpH、標的イオンの濃度、および/または導電率の制御、ならびに電場の逆転（電流逆転）により生じる濃度変化の減少を可能にするプロセスに対する要求がある。特に、pHの変動は、微生物系に負の影響を有することがあり、したがって避ける必要がある。さらに、幾つかの生物系（例えば、タンパク質発現系）は、標的イオン濃度の変動に敏感である。

10

【0011】

従って、第1の要旨において、本発明は、液体組成物のプロセスパラメータ制御の方法であって、前記液体を第1逆電気強化透析（Reverse Electro-Enhanced Dialysis；REED）膜スタックおよび第2REED膜スタックに通過させる少なくとも1つの工程を含み、各スタックが、

i) その間に第1液体のための第1チャンバーを規定する、少なくとも2つのイオン交換膜；

ii) 第2液体のための少なくとも2つの別のチャンバーであって、当該別の各チャンバーは、少なくとも1つの第1チャンバーに近接して配置される、チャンバー；

20

iii) 1組の端部膜；

iv) 各膜スタックに、少なくとも2つの電極によって電場をかける手段；

v) 前記膜スタック内で電場の方向を逆転させる手段

を有し、

前記第1膜スタック内で電場の方向を反転させることを、第2膜スタック内で電場を反転させることに対して、非同時（または非同期）的な時間間隔をもって行う、方法に関する。

【0012】

第2の要旨において、本発明は、液体組成物のプロセスパラメータ制御のためのシステムであって、少なくとも第1逆電気強化透析（REED）膜スタックおよび第2REED膜スタックを含み、各スタックが、

30

i) その間に第1液体のための第1チャンバーを規定する、少なくとも2つのイオン交換膜；

ii) 第2液体のための少なくとも2つの別のチャンバーであって、当該別の各チャンバーは、少なくとも1つの第1チャンバーに近接して配置される、チャンバー；

iii) 1組の端部膜；および

iv) 各膜スタックに、少なくとも2つの電極によって電場をかける手段；

v) いずれか1つの膜スタック内で電場の方向を逆転させる手段

を含む、システムである。

40

【0013】

本発明の第3の要旨は、液体組成物のプロセスパラメータ制御のための本発明のシステムの使用である。

【0014】

本発明の他の要旨は、下記の詳細な説明および実施例から当業者に明らかとなるであろう。

【0015】

[定義]

本発明において、用語「（1または複数の）標的イオン」は、不要なイオン（例えば発酵プロセスにおける阻害物質）、および液体組成物から取り出される所望の生成物を構成

50

するイオンの両方を包含することが意図される。標的イオンの限定的でない例として、乳酸イオンを挙げることができる。乳酸は乳酸菌（L A B）培養物に対する、従って生きている L A B 培養菌を有するバイオリアクタに対する公知の阻害物質であり、乳酸イオンは R E E D 法に対する標的イオンであり得る。用語「標的イオン」は水素イオンを包含しない。

【 0 0 1 6 】

本発明において、用語「逆電気強化透析」または「R E E D」は A X - R E E D および C X - R E E D の両方を含む。

【 0 0 1 7 】

本発明において、用語「A X - R E E D」は、アニオン交換膜がフィード溶液と透析液との間の障壁として用いられ、2つの液体間のアニオン交換が促進される R E E D 配置を意味する。

10

【 0 0 1 8 】

本発明において、用語「C X - R E E D」は、カチオン交換膜がフィード溶液と透析液との間の障壁として用いられ、2つの液体間のカチオン交換が促進される R E E D 配置を意味する。

【 0 0 1 9 】

本発明において、用語「電場の逆転」または「電流逆転」は、R E E D 電極の極性の変化を意味し、それは D C 電流の方向の逆転をもたらし、それによりイオン交換膜を通過するイオンの移動が促進される。

20

【 0 0 2 0 】

本発明において、「電流逆転間隔」は、所定の R E E D スタックについての各電流逆転間の時間を意味する。

【 0 0 2 1 】

本発明において、「分散間隔」は、非同時性の電流逆転間隔を有する複数の R E E D スタックを備えた R E E D システムにおける、第 1 R E E D スタックの電流逆転と第 2 以上の R E E D スタックの連続する電流逆転との間の時間を意味する。

【 0 0 2 2 】

本発明において、用語「スタック」は、少なくとも 2 つのイオン交換膜の組み合わせの 1 つ又はそれより多くの繰り返しの組、一組の端部膜、および前記膜を囲む少なくとも 2 つの電極を含む R E E D システムの単位を意味する。

30

【 0 0 2 3 】

本発明において、用語「複数の R E E D 膜スタック」は、膜およびスペーサーから成る 2 つまたはそれより多くのスタックを意味し、各スタックは電極対の間に配置される。

【 0 0 2 4 】

本発明において、用語「制御」または「制御すること」は、R E E D を用いて、手動で又は自動的に、所望のパラメータ、例えば、p H、標的イオン濃度、導電率を調節する能力を意味する。

【 0 0 2 5 】

図面を参照して本発明を開示する。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 6 】

【図 1】図 1 は、類似のバイオリアクタシステムであって、単一の R E E D スタックにより制御される参照システム、および 4 つの並列の R E E D スタックにより制御される本発明のシステムについての 2 つの p H 曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 7 】

[R E E D 原理]

逆電気強化透析（R E E D）法は、いわゆるドナン（D o n n a n）透析配置に類似したプレートアンドフレーム（または平板形；p l a t e - a n d - f r a m e）膜配置に

50

においてイオン交換膜を利用し、後者は化学ポテンシャルの差によってもたらされる拡散を推進力として利用している。尤も、R E E D法において、イオン交換は、膜配置を通る直流電流によって促進され且つ調節される。R E E D法は、大きすぎて膜を通過し得ない成分（例えばタンパク質）を伴うプロセス溶液における使用が意図され、前記成分はイオン交換膜表面に集まる傾向にある；この作用は膜汚染（または付着）として知られている。R E E D法の対称配置を利用することにより、分離プロセスを著しく妨げることなく電流の方向を一定間隔で逆転させることができる。

【 0 0 2 8 】

通常、プロセス溶液（フィード溶液）はR E E Dシステムを通して流れ、そのR E E Dシステムにおいて、負に帯電したイオン（アニオン）が他のアニオンと交換され（従って 10
アニオン交換R E E D配置（または構成）（A X - R E E D）と呼ばれる）、または正に帯電したイオン（カチオン）がカチオン交換R E E D配置（または構成）（C X - R E E D）において他のカチオンと交換される。透析液溶液はイオンを輸送し、そのイオンはフィード溶液中のイオンと交換される。プレートアンドフレーム配置において、いくつかの膜が積層され、フィード溶液および透析液溶液の各々を交互に容易に促進するフロースペースで隔てられている。

【 0 0 2 9 】

分離の間、各フィードスペース区画を囲む2つの膜は、フィード溶液からのイオン移動を促進し、または透析液からフィード溶液中へのイオン移動を促進する。

【 0 0 3 0 】

本発明の一の態様において、前記少なくとも2つの電極の極性を、間隔をおいて変更する。

【 0 0 3 1 】

各フィード区画を囲む2つの膜が機能を交換するので、電場／電流の方向の各々の逆転は、膜の表面および内部にて、影響を受けたイオンの極性のプロファイルの短時間での再構築をもたらす。膜プロファイルが再構築されるまでに予め除去されたイオンがフィード溶液中に押し戻されるので、このことは分離プロセスの短時間の逆転をもたらす。各々の逆転は短時間の分離の中断を引き起こし且つ僅かなプロセス不安定性を引き起こすので、いずれか1つのR E E Dスタック内での電流逆転の間隔を、汚染（または付着）の増加（または蓄積）が許容する限り、長く保つことが好都合である。

【 0 0 3 2 】

本発明の一の態様において、制御されるプロセスパラメータは、前記液体組成物のpH、標的イオンの濃度および／または導電率から選択される。R E E Dシステムがイオン（例えば、無機イオン、アミノ酸、有機酸、アンモニウムイオン）の脱塩または塩分濃度の調節のために用いられる場合、プロセスストリームに関して、導電率は一般的には主たる制御プロセスパラメータである。さらに、いくつかの種またはシステムに関してオンラインで測定することが困難であり得る又は不可能であり得る、標的イオン濃度の調節に関して、導電率の測定値は、プロセス制御パラメータとして使用され得る。

【 0 0 3 3 】

本発明の一の態様において、前記液体組成物が、少なくとも1つの別のR E E D膜スタックを通過させられる。

【 0 0 3 4 】

電気膜プロセス、例えば、電気透析およびR E E Dは、プレートアンドフレーム膜配置を用いる。十分な膜分離領域（または面積）が得られるまで膜のシートが相互に（一般には膜スペースにより分離されて）積層されるので、プレートアンドフレーム膜配置は、膜領域（または面積）の容易でかつ小型のスタッキングを可能にする。実行できる取扱い、操作およびメンテナンスの目的のために、プレートアンドフレームシステムは一般的に、数個の分離した、実用的な寸法の膜スタックであって、各々がそれ自身の組のフロー接続および電極を有するが、同じ分離機能を有する膜スタックにおいて、操作される。これらのスタックは、並列もしくは直列で、またはそれらの組み合わせで、同じ分離システム 50

の一部として一緒に操作される。小型のシステムのために、各スタックが技術的に実行できる限り大きい膜領域を有する、独立したプレートアンドフレームスタックの数を小さく保つことが好都合である。しかし、独立したスタックの各々が全体のプロセスパラメータの制御における変動を導入する R E E D システムの最適化されたプロセス制御のために、1 よりも多い組の電極が用いられるときには、複数の R E E D スタックを用いて、または複数の R E E D スタックのセクションを用いて、操作することが好都合である。したがって、スタックの数は、件のプロセスに応じて、2 ~ 数百まで変化し得るが、一般的には 2 ~ 50 の範囲内にあり、より一般的には 4 ~ 20 スタックである。

【0035】

R E E D 法は、細胞の成長（連続発酵）の生産性および寿命を向上させるために、ならびに / または代謝産物（例えば組み替えタンパク質）の生成を調節するために、バイオリアクタ / 生発酵プロセスから、有機酸イオンのような阻害物質を抽出するために用いてよい。R E E D 法は、例えば、小さい（または少量の）酸性またはアルカリ性成分（例えば、乳酸塩（またはエステル）、酢酸塩（またはエステル）、アンモニア、硝酸塩（またはエステル））が連続的に生成される、生物学的、生物変換反応または触媒システムにおいて、pH 制御のために用いてよい。生成した有機酸イオンをアルカリ透析液溶液からの水酸化物イオンと交換することにより（それはその後、付随する水素イオンを中和する）、全体的な結果は、一定の pH および有意に減少した有機酸レベルの蓄積である。アルカリ生成システムの場合も同様であり、そのアルカリ生成システムにおいて、アルカリイオンは酸性透析液からの水素イオンと交換され、その水素イオンがフィード溶液における水酸化物イオンを中和する。生成した酸またはアルカリが成長阻害物質としてはたらく生物学的システムにおいて、R E E D システムの pH 制御は、生物学的システム中への直接的な標準的 pH 滴定制御よりも好ましく、その標準的 pH 滴定制御は pH レベルを保持するのみであり、それ自体は中和された酸性またはアルカリ性代謝産物の増加（または蓄積）を抑制することができない。

【0036】

本発明の一の態様において、前記少なくとも第 1 および第 2 R E E D スタックが並列に操作される。そのような配置は、例えば、バイオリアクタにおける微生物への衝撃を最小にする。なぜならば、バイオリアクタ外での保持時間および設定ポイントからの pH ずれが、直列操作と比較して減少するからである。

【0037】

本発明のもう 1 つの態様において、少なくとも第 1 および第 2 R E E D スタックを、直列またはカスケード式で操作する。そのような配置は、通過毎のより高度なイオン除去を可能にし、連続的な下流操作により適している。

【0038】

各電流逆転に続く前記短時間の影響は、膜のイオンプロファイルが再構築されるまでに、短時間の悪影響を導入することにより、R E E D システムの pH 制御に影響を及ぼす。A X - R E E D の場合において、酸性イオンは、各フィード区画において一のアニオン交換膜を通して抽出され、一方、水酸化物イオンは対向するアニオン交換膜を通して入る。電流の方向が逆転すると、最初に言及した膜の内側の抽出された酸性イオンは、水酸化物イオンがフィード溶液に入り始める前に、フィード溶液の中に押し戻される。従って、それまでは酸性イオンを抽出するのに用いられた膜によって水酸化物プロファイルが再構築されるまでの短時間に、pH 制御は観察されない。各々の電流逆転の後、pH 制御が再生されるまでの時相の長さは、種々のプロセス条件および膜特性に依存する；通常、プロセスが再び最適な pH 制御で操作されるまで 10 ~ 90 秒かかる。このことはプロセスパラメータ、例えば、pH の突然の変化として記録され、これはその後、調節して所望の設定値に戻さなければならない。1 つより多くの膜スタックを有するシステムにおいて、不安定性の影響を分散させるため及び電流逆転の全体の影響を減少させるために、各々の独立したスタックにおいて非同期的に電流逆転を実施する。各スタックについての電流逆転の間隔は一般的には同様の長さであるが、逆転のタイミングは、最良のプロセス安定性効果

のために分散させられる。

【0039】

本発明の一の態様において、任意の第1膜スタック内にて、任意の第2以上の膜スタックについての逆転に対して、実質的に規則的な分散間隔にて、電場の方向を逆転させる。

【0040】

スタックに関する電流逆転の間隔の長さは通常、膜汚染の蓄積に関連して選択される。通常、任意の一のREEDスタック内の前記間隔は5～6000秒、好ましくは8～3000秒、より好ましくは10～2000秒、より一層好ましくは100～1500秒の範囲であってよい。単一のREEDスタックを有する先行技術のシステムにおいて、REEDシステムにより制御される接続されたバイオリアクタは、すべての逆転のときに、したがって、各電流逆転の間隔の終わりに、pH変動の完全な影響を蒙る。しかしながら、前記電流逆転の間に実質的に規則的な分散間隔を有する複数のスタックについては、蒙る変動は減少する。

10

【0041】

本発明の別の態様において、任意の第1REED膜スタックと任意の第2以上のREED膜スタックにおける電流逆転の間隔を同じプロセスにおいて最大にするために、任意の第1膜スタック内の電場の方向は、任意の第2以上の膜スタックについての逆転に対して、実質的に等しい長さの分散間隔で逆転させられる。電流逆転の間隔が同じである、即ち、これらの逆転が等しく分散させられる場合、接続されたバイオリアクタは、より減少した影響ではあるが、より多い頻度の影響を受ける。したがって、例えば、4つの並列のREEDスタックを備えた、電流逆転の間隔が12分のシステムにおいて、接続された、プロセスパラメータが制御されるバイオリアクタは、3分ごとにプロセスパラメータの変動に曝されるが、同じ電流逆転間隔長さ(12分)にて作動するが、単一のREEDスタック(または同期された電流逆転間隔を有する4つのスタック)で作動するシステムと比較して、フルREEDシステムの約4分の1だけ、および制御設定ポイントから4分の1以下のずれである。

20

【0042】

本発明の一の態様において、加えられる電場の強さは、前記液体組成物のpH、標的イオン濃度、または導電率に応じて調節される。電場の強さを増加させることにより、REEDシステムにおけるイオン交換は増加し、逆もまた同様である。調節されるプロセスパラメータのオンライン、半オンライン(例えば時間遅延)または二次的(例えば、標的イオン濃度を推定するためにオンライン導電率または混濁度測定値を使用する)測定値は、制御調節機構、例えばPID制御ソフトウェアに入力され、制御調節機構は次に、REEDの電極への電力供給源の出力を調節する。

30

【0043】

REEDシステムは一般には(しかし常にというわけではない)は、REEDシステムが接続されるプロセスの1つの特定のプロセスパラメータを制御し、調節するために作動させられる。制御調節は、REEDシステム内部で起こるイオン交換を制御することにより実施される。このようにして制御されるプロセスパラメータには、pH、導電率、および標的イオン濃度が含まれるが、これらに限定されるものではない。独立したREEDシステムを同じプロセス(例えば、AX-REEDおよびCX-REED)に結合することは、REEDシステムの各々が本発明の方法によって制御され得る、複数のプロセスパラメータの制御を可能にする。

40

【0044】

本発明の方法の一の態様において、前記方法は、加えられる電場の強さに対して、前記第2の液体の濃度および/または流量を調節する工程を更に含む。

【0045】

電流逆転は、プロセス制御において、ずれを導入し得る唯一の影響ではない。プロセスパラメータの最適な制御のために、透析液の濃度および流量、ならびに温度および操作の形態(またはモード)を制御する必要がある。REEDにおけるイオン交換の速度は、プ

50

ロセスパラメータを制御するものであるが、これは、電流および受動的な拡散の組み合わせに応じて決定される。拡散の速度は、透析液からリアクタ内へ移動すべきイオンの濃度に応じて決定される。透析液が高い濃度の pH 調節イオン、例えば、AX-REEDにより操作する場合には水酸化物イオンを有する場合、電流にかかわらず、リアクタ回路内への実質的な水酸化物イオンの拡散が生じる。したがって、REEDシステムにおける拡散速度が単独で、プロセスパラメータ制御に必要なイオン交換を決して越えないように、透析液の濃度を制御できるようにすることが重要である。これは、透析液の濃度および/または流速を、REEDスタックに出力される電流に関連づけることによって行われ、その結果、電流の増加が透析液の濃度を上昇させる。透析液濃度の制御は、例えば、水および高濃度の透析液溶液の、REEDシステムに入る前の透析液ストリームへの添加を調節して、実施することができる。透析液流量の制御は、例えば、透析液流ポンプを調節することにより、または流量調整弁を用いることにより実施することができる。

10

【0046】

REEDシステムに関する透析液流（または流量）を、バイオリアクタにおける生成速度に応じて、シングルパスモード、回分モードまたはそれらの組み合わせにおいて、操作することができる。例えば細胞密度が低い発酵プロセスの初めにおいて、低容量が必要とされる場合、タンクに透析液を循環させることが好都合である。バイオリアクタの生産性が増大するにつれて、REEDスタックを出る透析液が廃棄される割合が増加する。プロセスを全能力（またはフル稼働）で運転する場合、全ての透析液はスタックを通るシングルパスの後に廃棄され、新たな透析液がスタックの中にポンプで送られる。説明したやり方で透析液流を操作することの利点は、水および高濃度の透析液溶液に関する透析液の向上した利用率および向上したプロセスパラメータ制御、特に、一般的なプロセスの間、独立した必要において、特にバイオリアクタシステムに関して、有意の変化に付される向上したプロセスプロセスパラメータ制御を包含する。

20

【0047】

複数のスタックが用いられる場合、プロセス溶液と同じやり方で、スタックの間でブースターポンプを用いて又は用いずに、並列もしくは直列のモードのいずれかで、透析液の流量を設定することができる。

【0048】

本発明の一の態様において、前記液体組成物は、固定化された若しくは懸濁した微生物培養物を含有する発酵混合物であり、または酵素含有混合物である。

30

【0049】

本発明の一の態様において、前記微生物培養物は、バクテリア、酵母、菌類もしくは哺乳類細胞の増殖培養物または休止（もしくは静止；resting）培養物を含む。

【0050】

本発明の別の態様は、液体組成物のプロセスパラメータ制御のためのシステムであり、当該システムは少なくとも第1逆電気強化透析（REED）膜スタックおよび第2REED膜スタックを含み、各スタックが：

- i) それらの間で第1液体のための第1チャンバーを規定する、少なくとも2つのイオン交換膜
 - ii) 第2液体のための少なくとも2つの別のチャンバーであって、当該別の各チャンバーは、少なくとも1つの第1チャンバーに近接して配置される、チャンバー；
 - iii) 1組の端部膜；
 - iv) 各膜スタックに、少なくとも2つの電極によって膜に電場をかける手段；
 - v) いずれか1つの膜スタック内で電場の方向を逆転させる手段
- を有する、システムである。

40

【0051】

前記システムの一態様において、かけられる電場の方向の逆転のための手段は、前記電場の極性を逆転させるようにされた電圧調節器を含む。電場の方向の逆転のための手段は、とりわけ1もしくは複数のリレー機能または1もしくは複数の調節された電源を含む。

50

【 0 0 5 2 】

本発明の別の態様は、液体組成物のプロセスパラメータ制御のための上記システムの使用である。

【 0 0 5 3 】

有機酸で阻害される細胞株によって発酵するバイオリアクタに関して、アニオン交換 R E E D (A X - R E E D) は、生成した有機酸を水酸化物イオンで置換するはたらきをし、従って、酸の生成による p H の低下に対抗する。A X - R E E D の調節により、水酸化物イオンの交換は、中和剤の添加を必要とすることなくバイオリアクタの p H を保持し得る。

【 0 0 5 4 】

同様に、塩基を生成する細胞株によって発酵するバイオリアクタに関して、カチオン交換 R E E D (C X - R E E D) は、生成した塩基を水素イオンで置換するはたらきをし、塩基形成による p H の上昇に対抗する。A X - R E E D を用いる場合のように、C X - R E E D の調節により、水素イオンの交換は、中和剤の添加を必要とすることなくバイオリアクタの p H を保持し得る。

【 0 0 5 5 】

本発明の一の態様において、複数の A X - R E E D スタックおよび C X - R E E D スタックの組み合わせであって、電場の方向を任意の第 1 および第 2 の A X - R E E D または C X - R E E D のいずれかで非同期的に逆転させる、本発明の方法が実施される組み合わせが使用される。A X - R E E D および C X - R E E D の組み合わせの使用は、本出願人の「液体組成物の p H および標的イオンレベルの制御方法」と題する同日に出願された係属中の特許出願においてより詳細に説明されており、この特許出願は引用により本明細書に組み込まれる。前記配置は、p H および標的イオンのレベルの最適な制御を可能にする。

【 0 0 5 6 】

本発明は、以下の限定的でない特定の実施例において、さらに詳細に説明される。

【実施例】

【 0 0 5 7 】

実施例 1

向上した p H 安定性のための、非同時性の電流逆転間隔を有する複数のスタック

乳酸菌 (L A B) 発酵を、A X - R E E D システムにチューブを介して接続されたバイオリアクタにおいて実施した。発酵培養液 (または発酵ブロス) を連続的に、バイオリアクタと A X - R E E D との間で循環させた。A X - R E E D を、乳酸イオン (バイオリアクタで生成される乳酸から得られる乳酸イオン) を水酸化物イオンで置換することによる、バイオリアクタの p H プロセスパラメータの制御のために用い、A X - R E E D は p H を最適な成長条件 ; p H 6 . 0 近くに維持した。イオン交換は次に、P I D 制御ユニットによって調節され、P I D 制御ユニットは R E E D 電極間で D C 電流の出力を調節し、乳酸の増加する生成速度に適合させた。乳酸の生成速度は試験の間増加し、同時に L A B 培養物の数も増えた。

【 0 0 5 8 】

第 1 のトライアルにおいて、7 リットルの生培養液を有する供給回分 L A B 発酵を、A X - R E E D システムにおける単一の膜スタック (R E E D 用に改変された E U R 6 , Eu rodia SA, France) に接続した。スタックは、7 つのセルの組を保持し、各セルの組は、アニオン交換膜 (Neosepta AXE-01、株式会社トクヤマ、日本) によって分離された、発酵培養液のための区画 (シートフロースペース、Eurodia) およびアルカリ性透析液のための区画 (シートフロースペース、Eurodia) を構成した。全体のスタックについて、合計 0.392 m^2 (1 リットルの培養液につき 560 cm^2) の活性な膜の面積 (または動作膜面積) を得るために、各セルの組は、 560 cm^2 の活性な膜の面積を有していた。

0 . 5 M の N a O H 溶液を、透析液溶液として用いた。

電流逆転間隔は16分に設定した。このことは、各電極の極性が16分ごとに变化したことを意味している。

L A B培養物の初期の成長期間の後、R E E Dシステムが作動させられ、バイオリアクタのp Hの制御を引き継いだ。p Hは、攪拌されたバイリアクター内部でp Hプローブによって測定した。電流逆転が起こるときはいつでも、R E E Dスタックがイオン交換プロセスを再構築する短い時間が後に続き、この時間の間に、R E E Dシステムが再びプロセスパラメータの制御を示し、バイオリアクタのp Hをその最適な値に調節するまで、バイオリアクタ内のp Hが低下した。この試験における30分間のインターバルのバイオリアクタのp Hの変化を図1に示す(単一のスタック)。

【0059】

10

第2のトライアルにおいて、200リットルの生培養液を有する供給回分L A B発酵を、A X - R E E Dシステムにおける4つの並列の膜スタックに接続した。スタックは、先のトライアルで用いたものと同じタイプのものであり(R E E D用に改変されたE U R 6、Eurodia SA, France)、各スタックが50個のセルの組を有していたことを除いては、同じ配置を有していた。A X - R E E Dシステムは、合計11.2 m²の活性な膜の面積(培養液1リットルあたり560 cm²)を保持していた。

【0060】

各スタックについて電流逆転を400秒に設定したことを除いては、トライアルを同じ一般的な実験条件で実施した。電流逆転はさらに、制御されるプロセスパラメータ、即ちバイオリアクタのp Hへの影響を減少させるために、等しい長さの規則的な分散間隔100秒にて、非同時的に分散させた。

20

【0061】

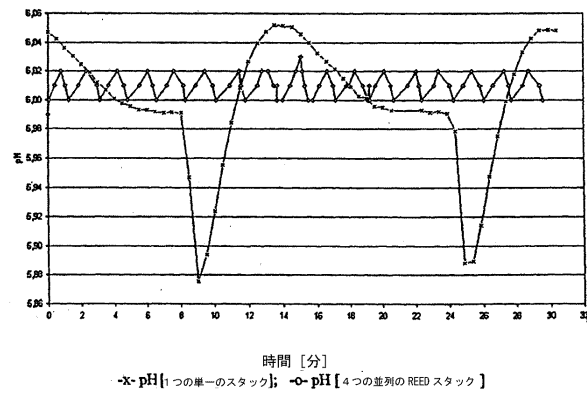
両方のトライアルを、発酵培養液の体積あたりの相対的な膜面積、酪酸生成、分離容量等に関して、同様の条件下にて実施し、プロセスパラメータであるバイオリアクタp Hの変化を図1において比較した。

【0062】

図1は、R E E Dに関するプロセスパラメータ制御における典型的な変動であって、電流逆転に関連して生じる変動を示している。分散した非同時性の電流逆転間隔でもって操作された複数のスタックを備えた類似の配置と比較して、単一のスタックを用いたトライアルに関して、変動は、設定ポイントからより著しくずれた。単一のスタックに関して、他の作用は、電流逆転の遷移が終わって、p Hをその設定ポイントに戻すようにプロセスパラメータの制御が見直されるまで、p Hの変動を安定化するのに役立たない。複数のスタックに関して、作動スタックは直ちに、電流逆転の状態になる一つのスタックの影響に応答して、一つのスタックが回復している間、それらの作用を増加させる。複数のスタックは有意により高い頻度のプロセスパラメータの変動を与えるが、ずれは有意により小さく、それは好ましく、特に微生物プロセス液体または連続プロセス溶液を用いて作動させる場合に好ましい。

30

【図 1】



フロントページの続き

(72)発明者 イェンス - ウルリク・リペ
デンマーク、デーコー - 2820ゲントフテ、コンゲリスヴァイ3ペー番、1チル・ヘイレ

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 特開昭62-146595(JP,A)
特表2007-509747(JP,A)
特表2012-501633(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 7/08

C12P 1/00 - 7/66

B01D 61/00 - 61/58

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)