

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4318751号
(P4318751)

(45) 発行日 平成21年8月26日(2009.8.26)

(24) 登録日 平成21年6月5日(2009.6.5)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 M 1/36 (2006.01)

C 1 2 M 1/36

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/00

B

C 1 2 N 1/14 (2006.01)

C 1 2 N 1/14

B

C 1 2 N 1/16 (2006.01)

C 1 2 N 1/16

B

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

A

請求項の数 13 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-532365
 (86) (22) 出願日 平成9年3月12日(1997.3.12)
 (65) 公表番号 特表2000-506387(P2000-506387A)
 (43) 公表日 平成12年5月30日(2000.5.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB1997/000669
 (87) 国際公開番号 W01997/033973
 (87) 国際公開日 平成9年9月18日(1997.9.18)
 審査請求日 平成16年3月12日(2004.3.12)
 (31) 優先権主張番号 9605255.0
 (32) 優先日 平成8年3月13日(1996.3.13)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 9700027.7
 (32) 優先日 平成9年1月2日(1997.1.2)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(73) 特許権者

ノボザイムス、 バイオファーマ、 ユー
 ケー、 リミテッド
 イギリス国ノッティンガム、 キャッスル、
 ブールバード、 キャッスル、 コート (番地
 なし)

(74) 代理人

弁理士 佐藤 一雄

(74) 代理人

弁理士 小野寺 捷洋

(74) 代理人

弁理士 中村 行孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発酵制御

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

供給培地の添加が培養条件の一つの尺度として副生成物産生を用いることによって制御される培地で微生物を培養する方法であって、副生成物が微生物によって産生される帯電した代謝物であり、かつ代謝物の産生を培地のコンダクタンスを測定することによって監視することを特徴とする、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の微生物の培養法であって、

(i) 発酵培地と微生物を入れるのに適合した発酵容器を準備し、この容器は供給培地を容器に供給するための第一の口と、供給培地の導入の速度を制御するための制御手段と、発酵培地の電氣的コンダクタンスを測定するためのプローブと、発酵培地を容器から取り出すための第二の口とを有し、

(ii) 上記微生物と発酵培地を容器に導入し、

(iii) 発酵培地の電気コンダクタンスを、上記プローブで上記培養法の経過中に間隔をおいて測定して、上記プローブが上記間隔で上記電気コンダクタンスを示す一連の電気シグナルを生じるようにして、

(iv) 上記電気シグナルを上記制御手段に供給して、上記の供給培地の供給を制御し、培地のコンダクタンスの望ましくないほど高い値に応答して、供給培地の供給を補正する、
 段階を含む、方法。

【請求項 3】

上記の制御手段が、アルゴリズムを操作するコンピューターを含んでなり、上記アルゴリズムが、測定した電気コンダクタンスシグナルと所定の値との比較を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記の制御手段が、アルゴリズムを操作するコンピューターを含んでなり、上記アルゴリズムが、所定期間にわたるコンダクタンスの変化を計算し、上記の変化を所定の値と比較することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

微生物が真菌である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

真菌が酵母である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

酵母が *Saccharomyces* である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

微生物が *E. coli* である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

代謝物が有機酸である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

有機酸が酢酸である、請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 11】

微生物が、この微生物にとって異種性であるポリペプチドを産生する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

ポリペプチドがヒトアルブミンである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

上記物質を産生する微生物を培養した後、この物質を回収することによる物質の製造法であって、培養を請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法によって行なうことを特徴とする、方法。

【発明の詳細な説明】

30

発明の分野

本発明は、流加 (fed-batch) または連続発酵法の制御に関する。最大バイオマス収率を必要とするまたは酢酸等の酸の蓄積が毒性を示したり、生成物にとって有害になることがある発酵工程では、このような酸の存在は望ましくない。

背景および先行技術

発酵工程に対する培地添加速度を精確に制御して、代謝物の蓄積を防止することが、主要な目的である。幾つかの微生物は、培地を高過ぎる添加速度で供給すると、好ましくない代謝物を生じる。例としては、パン酵母および *Escherichia coli* が挙げられる (De Deken, 1966 年; Doelle, 1981 年)。パン酵母は、糖の添加が多すぎると、エタノールやアセテートのような発酵生成物を生成する (Fiechter et al., 1981 年)。パン酵母の製造中に、これによって細胞や生成物収率の損失を引き起こす (Fiechter et al., 1981 年)。細菌である *E. coli* は、糖が過剰であると、酢酸のような酸を生成する (Doelle, 1981 年)。また、微生物を異種生成物の生産に用いるときには、これらの代謝物の形成は、特にこれらが毒性または阻害効果を有するときには、好ましくない。アセテート、エタノールおよび有機酸は、通常は細胞代謝にとって毒性を有することがある (Moon, 1983 年; Pampulha & Loureiro-Dias, 1989 年)。これは、野生型株より弱いことが多い突然変異株を成育するときには特に明らかである。従って、流加または連続発酵工程に原料供給添加速度 (feed addition rate) を良好に制御することが望ましい。多くのオン・ラインコンピューター制御の方法が可能である。例えば、 CO_2 発生速度および O_2 消費速度をオン・ラインで分析して、いわゆる呼吸商 (RQ) を計算することが

40

50

多い (Wang et al., 1977 年)。RQ は、 CO_2 発生速度を O_2 消費速度で割ったものである。糖の制限条件下では、RQ は約 1.0 ~ 1.1 となり、正確な数値はその株に依存する。しかしながら、パン酵母の培養物を高過ぎる糖添加速度で供給すると、エタノールが生成し、この場合の RQ 値は 1.1 より有意に高くなる (Wang et al., 1977 年; Fiechter et al., 1981 年)。次に、これを用いて、RQ が減少するように供給速度を変化させることができる (Wang et al., 1977 年)。

E P 第 2 8 3 7 2 6 号 (Hitachi) および Turner et al. の文献 (1994 年) には、アセテート濃度を監視することによる発酵の制御が開示されているが、この制御は培地を採取して、HPLC または同様な不連続法を用いることによって行なわれた。HPLC は、グルコース濃度を測定して、アセテートの蓄積を制御するのに用いられた (Sakamoto et al., 1994 年)。

10

本発明によって解決される問題点は、このような発酵を制御する代替および改良法を提供することである。

本発明の一つの局面では、副生成物の産生を培養条件の尺度として用いることによって供給培地の添加を制御する培地中で微生物を培養する方法であって、副生成物が微生物によって産生された帯電した (electrically charged) 代謝物であり、代謝物の産生を培地のコンダクタンスを測定することによって監視することを特徴とする方法を提供する。

帯電した代謝物の発生は、以前は供給培地の添加を制御するのに用いられたことはなかった。例えば、アセテートが糖発酵で生成するときには、RQ は 1 であるので、この RQ 値は糖を制限した成育の際に得られる値に近いので、RQ の測定は有用ではない。電気伝導率 (electrical conductivity) は、ヨーグルト培養や他の乳酸桿菌発酵におけるラクテートのような所望な有機酸の比較的多量な形成 (Latrille et al., 1992 年; Belfares et al., 1993 年)、酢酸生成 (SU-A-1495367 号) を測定し、発酵培養物の塩含量を制御するのに (Soyez et al., 1983 年) 用いられてきた。後者の場合には、無機塩を培地に添加し、その手法は単に人為的に加えられた塩を測定して所望な塩濃度を維持するためのものであった。伝導率は、細胞密度を測定するのに用いられてきた (JP-A-2109973 号)。伝導率は、アセテートのような好ましくない酸であって少量でもあると発酵がうまく行かなくなるものの蓄積を防止し解決するのには用いられていなかった。本発明者らは、アセテートのような有機酸の形成が望ましくない場合に、電気伝導率の増加をオン・ラインで測定してフィードバック系に使用して、RQ を用いることができるのと同様な方法で供給速度を制御することができることを見出した。本発明では、発酵工程中にオン・ラインの電気伝導率シグナルが増加すると、望ましくない酸の形成を十分に示し、これらの酸の蓄積を防止し解決する目的で供給添加速度を補正するのに用いられることが示されている。従って、多年に亘り、アセテートの産生を (オフ・ラインの生化学分析で) 測定して、他のパラメーター (例えば、 CO_2 発生) に基づいた発酵の制御が十分に働いているかどうかを見るために測定することは知られていたが (E P 315944, 1989 年)、発酵を制御する目的でアセテートの発生を電氣的に測定した者はいなかった。

20

30

微生物と発酵培地は、帯電した代謝物が生成する可能性があり、かつ発酵は供給培地の添加を制御することが望ましいものとすべきであるのは、明らかである。同様に、発酵は、帯電した生成物が所望であるもの、例えば乳酸発酵であるものとすべきではない。本発明が有用である微生物としては、E. coli や Bacilli のような細菌、および酵母、例えば *Saccharomyces* spp.、具体的には *S. cerevisiae* や糸状菌 (filamentous fungi) のような真菌等が挙げられる。しかしながら、本発明は、原則的には原生動物、植物細胞および動物細胞、例えば昆虫細胞や CHO (チャイニーズ・ハムスター卵巣) 細胞のような哺乳動物細胞の培養にも適用可能である。

40

代謝物は、典型的にはアセテート、ピルベート、ラクテートのような有機酸、またはシトレート (citrate)、イソシトレート、 α -ケトグルタレート、スクシネート、フマレート、マレート、またはオキザロアセテートのようなクエン酸回路中間体である。

微生物を培養して、バイオマス、所望な代謝物、または微生物にとって本来的なものまた

50

は異種性のものであるポリペプチドを産生することができる。従って、例えば微生物はヒトアルブミンをコードするポリヌクレオチドを含んでおりかつ発現する酵母であることができる。好都合なことには、ポリペプチドは、酵母から周囲の培地に分泌され、そこから回収される。

伝導率の測定は極めて感度が高く、1 mM程度の低い酸濃度を検出することができる。これは、一般に受け入れられて用いられているオン・ライン R Q 測定の有用な代替法または付加的方法であることを意味している。

制御は、伝導率を測定することができ、発酵装置に挿入され、シグナルをオン・ラインコンピュータに連結するプローブを用いて行なうことができる。伝導率プローブは、標準的な pH プローブ用の口に極めて簡単に挿入することができる。次に、コンピュータアルゴリズムにより、伝導率またはコンダクタンスの変化を選択された時間に互って計算することができる。伝導率の変化が選定された限界より大きければ、供給培地添加速度がコンピュータアルゴリズムによって自動的に減少する。これは、次に供給基質および存在している蓄積代謝物の共消費を促進し、それ以上産生されるのを防止する。時間の期間および伝導率変化限界の選定は、発酵工程の精確な性質に依存する。

発明の詳細な説明

本発明の好ましい態様を、実施例によりおよび添付図面について説明する。

第 1 図は、組換えヒトアルブミンを産生する酵母菌株の流加発酵の際の幾つかの重要なパラメーターを表したものである。供給添加を開始および終了する時点を示す。

第 2 図は、所定時間に、計画的に供給速度を突然 20 % 増加した際の流加発酵の部分についてのパラメーターを示す。

第 3 図は、第 2 図と同じ実験であるが、この場合には 40 % の段階増加を供給添加速度に適用した。

第 4 図は、第 5 図に示される実験で用いた電気的コンダクタンスシグナルを用いる、典型的な供給速度制御アルゴリズムの簡略化した作業工程図である。

第 5 図は、指数因子 K を、この酵母菌株についての通常値 0.07 h^{-1} より高い 0.12 h^{-1} に設定した実験における幾つかのパラメーターを表したものである。実験中に、作業工程図が第 4 図に示されているコンダクタンスシグナルを用いるアルゴリズムは、アクティブ (active) であった。

第 6 図は、第 4 図に示されているコンダクタンス制御アルゴリズムがアクティブであった細菌菌株 *E. coli* DH5 α を用いる実験の幾つかのパラメーターを示す。因子 K は、この実験では 0.4 h^{-1} に設定した。通常は、因子 0.11 h^{-1} が用いられるであろう (Riesenberget al., 1991 年)。

第 7 図は、供給速度を手動で 3 段階 ($2.1 \sim 2.3 \text{ h}$) で増加した後、実施例 5 に記載した通りに修飾したことを除き第 4 図に記載したのと同じアルゴリズムによって制御した細菌菌株 *E. coli* DH5 α を用いる実験の幾つかのパラメーターを示す。

第 8 図は、本発明の方法に用いるのに適当な発酵装置を図解的に表したものである。

実施例 1 : 通常の流加発酵の際の電気コンダクタンス

流加発酵中 (図 1) の電気コンダクタンスの正常の傾向を決定するため、本発明者らは Aber Instruments (Aberystwyth、英国) Capacitance プローブを備えた Aber Instruments Biomass Monitor 214A に連結した発酵制御コンピュータでのコンダクタンスを監視した。コンダクタンスシグナルは、発酵槽の曝気のためにノイズが多かった。従って、コンダクタンスは、Biomass Monitor 214A 上で供給フィルター (supplied filter) 2 号を用いて電気的に濾過しなければならなかった。代替法として、シグナルが適正に濾過されてノイズシグナルを平らにする限り、他の伝導率プローブおよびモニターを用いることができる。このような設定の一つとしては、3 分フィルターを用いる MCD43 モニター (LTH Electronics) に連結した Broadley James 伝導性プローブ (FT Applikon 製) を挙げることができる。第 1 図の総てのデータは、(発酵制御コンピュータのデータ保存に限界があるため) 10 分間に互って平均したものである。

発酵は、Clark et al. (1990 年) によって記載された方法で行ない、上記文献の内容

10

20

30

40

50

は、引用により本明細書に包含される。本質的には、発酵は、下記の通りであった。発酵は、組換えヒトアルブミン（rHA）を発現する目的で形質転換した酵母を基本とした。酵母の構築のクローニング法は、EP第431880号に開示された通りであった。所定の液体培地（緩衝最小培地（BMM）塩培地：Yeast Nitrogen Base [アミノ酸および $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ なし、Difco]，1.7 g / リットル；クエン酸一水和物，6.09 g / リットル；無水 Na_2HPO_4 ，20.16 g / リットル；pH 6.5 ± 0.2； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，5 g / リットル；スクロースを加えて20 g / リットルとする）での保存（stock）マスター細胞培養物を用いて、20%（w / v）トレハロースの存在下で培養物のアリクウォットを凍結することにより振盪フラスコ培養物の製造に適する工程酵母（process yeast）のランニング・ストック（running stocks）（製造業者の運用細胞バンク）を調製した。

10

振盪フラスコ培養 酵母 [c i r ° , p A Y E 3 1 6] を、種容器（seed vessel）の接種に生理学的に適切な純粋培養物として成育した。種容器のタイミングを再現可能にする場合には、成育の相（主要炭水化物過剰量）および接種バイオマス（ 12 ± 2 mg / リットルであり、培地10リットル当たり100 mlの接種物を必要とする）を定義する必要がある。1個の保存バイアルを、BMM 100 ml および2%（w / v）スクロースを含む振盪フラスコに接種し、0.6 ~ 1.2 g / リットル（600 nmでの光学濃度によって評価）の細胞乾燥重量（cdw）が得られるまで、フラスコをオービタル振盪機（200 rpm回転数 / 分）上で30 でインキュベーションした。次いで、この培養物を用いて、種発酵容器（seed fermentation vessel）を 12 ± 2 mg / リットルの濃度まで接種した。

20

種発酵 主生産発酵槽の接種物は、生産微生物、好ましくは*S. cerevisiae* [c i r ° , p A Y E 3 1 6] をシードファーマンター（seed fermenter）中で成育させ、約100 g / リットルの高細胞乾燥重量とすることによって提供された。流加法をおこない、エタノールおよびアセテートの蓄積を最小限にすることにより、細胞収率を最大にした。それぞれの発酵の全体を、B. Braun（ドイツ）から入手できる多発酵槽コンピューターシステム（Multi-Fermenter Computer System）（MFCS）ソフトウェアのようなコンピューター制御システムによって監視して、制御した。B. Braunから供給されるソフトウェアは、Supervisory Control and Data Acquisition Packageであり、同様なパッケージは他社からも発売されている。このアルゴリズムは、スクロースの添加を制御して、クラブトリー（Crabtree）効果を回避することによって最大バイオマスを得て、これによりエタノールおよび / またはアセテートの産生を最小限にしようとするものである。発酵容器を、高温（hot）NaOHで洗浄し、発熱性物質不含水（PFW）で濯いだ。加熱滅菌した容器には、1容の滅菌したMW 10培地（第1表）のバッチ塩と微量元素が入っていた。代替の培地を、第2表に示す。明らかに、初期伝導率は、培地の組成によって変化する。rHA産生用培地を限外濾過して（分子量10,000をカット・オフ）、内毒素を除去することができる。

30

第1表

MW10培地

<u>組成</u>	<u>バッチ培地</u>	<u>供給培地</u>	
塩			
KH_2PO_4	2.74 g/l	10.9 g/l	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.58 g/l	2.3 g/l	10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.06 g/l	0.24 g/l	
H_3PO_4 (85%w/w)	0.88 ml/l	1.76 ml/l	
ビタミン			
パントテン酸Ca	20 mg/l	180 mg/l	
ニコチン酸	33.3 mg/l	300 mg/l	20
m-イノシトール	20 mg/l	180 mg/l	
d-ビオチン	0.133 mg/l	0.8 mg/l	
チアミン・HCl	16 mg/l	32 mg/l	
微量元素ストック	10 ml/l	20 ml/l	30
スクロース	0*	500 g/l	
微量元素ストック成分			
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 g/l		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g/l		40
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.2 g/l		

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079 g/l
H_3BO_3	1.5 g/l
KI	0.2 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.56 g/l

10

微量元素を脱イオン水に加えて、98% H_2SO_4 の35ml/Lで酸性にした。

* 20gスクロース/リットルを、20リットルのシード (seed) 発酵槽段階でバッチ培地に加えた。任意の発熱性物質除去法例えば、限外濾過と同様に、任意の適切な滅菌法を用いることができる。ビタミンは、常にフィルター滅菌した。

20

第2表: MW11D培地

組成	バッチ培地	供給培地
塩		
KH_2PO_4	4.66 g/l	9.54 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.98 g/l	2.02 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.10 g/l	0.21 g/l
H_3PO_4 (85%w/w)	1.63 g/l	3.33 g/l
ビタミン		
パントテン酸Ca	68 mg/l	140 mg/l
ニコチン酸	114 mg/l	233 mg/l
m-イノシトール	68 mg/l	140 mg/l
d-ビオチン	0.34 mg/l	0.70 mg/l
チアミン・HCl	17.1 mg/l	35 mg/l

30

40

微量元素ストック	10.2 ml/l	21 ml/l
スクロース	0*	500 g/l

微量元素ストック成分

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 g/l	10
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g/l	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.2 g/l	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079 g/l	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.56 g/l	20

微量元素を脱イオン水に加えて、98% H_2SO_4 の35ml/Lで酸性にした。

* 20gスクロース/リットルを、20リットル種発酵槽段階でバッチ培地に加えた。任意の発熱性物質除去法例えば、限外濾過と同様に、任意の適当な滅菌法

を用いることができる。ビタミンは、常にフィルター滅菌した。

培地を容器に加えた後、30の操作温度を設定し、同様に最小攪拌速度を典型的には400~500rpmに設定した。初期pHを、pHコントローラセットを用いて、アンモニア溶液(比重0.901)で 5.7 ± 0.2 に調整した。2M H_2SO_4 も、pH補正剤として使用した。スクロースを20g/リットルまで、MW10バッチビタミン、およびBreox FMT30消泡剤を0.04g/lまで、容器に加えた。

滅菌濾過した空気を、0.5vvm(すなわち、0.5リットル非圧縮空気/1リットル培地/分)で容器に導入し、培地に、純粋振盪フラスコ培養物を 12 ± 2 mg細胞乾燥重量/リットルまで接種し、MFC Sコンピューターシステムを始動した。成育のバッチ相が完了した後(30分での溶存酸素圧(dissolved oxygen tension)増加が>15%によって示される)、MFC Sシステムのコントロール下で供給培地の添加を開始した。制御法は、製造発酵槽について以下に記載したのと同様にであった。発酵中に、気流を2段階で増加して、約1vvmの流れを保持した。追加のBreox FMT30を、最終濃度が0.3g/リットルとなるまで添加した。溶存酸素圧(DOT)を、攪拌速度を変化させることによって20%空気飽和で制御した。攪拌速度を更に増加させ、気流速度がその最大値に到達したならば、供給制御アルゴリズム(下記参照)によって供給速度を制御して、DOTが15%を下回るまで減少しないようにして、酸素を限定した条件であってさもなくば発酵生成物を形成する条件を防止した。

また、RQを、供給添加制御のフィード・バックとして用いた。供給速度を、 $RQ \geq 1.2$

としながら、10分毎に減少した。更に、120分RQ平均($RQAVG_{120}$)を計算して、ノイズRQシグナルを除去した(Goodey et al., 1996年)。 $RQAVG_{120}$ の値が

$$\geq 1.13$$

であるときには、供給速度を2時間毎に20%だけ減少した。発酵の開始時にはRQ値が高いことが予想されるため、この $RQAVG_{120}$ は供給添加相の最初の4時間は制御しなかった。供給が終了したならば、培養物を生産容器に移した。

生産発酵 生産発酵槽(第8図)に、種発酵槽(上記参照)で成育した培養物を接種した。種発酵槽の細胞乾燥重量(CDW)濃度は、通常は80g/リットルより大であった。種発酵槽培養物を移した直後の生産発酵槽中のCDW濃度は、0.25~1.00g/リットルであった。1時間以内に供給を開始するのが好ましいが、必要ならば、遅らせることができる。供給法は、エタノールおよびアセートの蓄積を最小限にして、細胞および生成物収率を最大にしようとするものであった。

発酵は、最適ガス溶解および嵩混合を行なうように設計された第8図に示されるような発酵槽で行なった。発酵槽は、とりわけ、供給培地を供給し、発酵の終了時に培地を取り出し、電気的コンダクタンスを測定するためのプローブを導入する口を備えていた。高温NaOH洗浄とPFW濯ぎを行なう容器には、1容の滅菌MW10(第1表)、バッチ塩、および微量元素が入っていた。この培地は、容器とは独立して、熱または濾過滅菌によって滅菌することができる。本発明によれば、MW10のような発酵培地は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)またはその塩が含まれていると産生したアルブミンに有意に高程度の着色汚染物を生じるので、それを含まないのが有利であることを見出だした。

操作温度は30℃に設定し、攪拌機速度を均質溶液を保持するのに十分であるように、典型的には約50rpmに調節した。初期pHをアンモニア溶液(SG0.901)で調節した(コントローラーは 5.7 ± 0.2 に設定した)。2M H_2SO_4 を、第二のpH補正剤として用いることができる。MW10バッチビタミンを、必要に応じて適当な消泡剤と同様に添加した(例えば、Breox FMT30を0.4g/リットルまで)。供給が開始したならば、OURおよびCER値が制御を有効にするのに十分に高くなるまでは、RQオーバー・ライドコントロール(over-ride control)は、不能であり、RQが一貫して > 1.2 であるときには、この期間中には供給速度を手動で減少した。

培養物のpHは、1.7%(w/v)アンモニアの自動添加によって5.5で一定に保持した。温度は、30℃に保持した。滅菌気流を、0.5vvmで導入した。発酵の際に、気流を3段階で増加して、約1vvmの流れを保持した。これは、連続質量スペクトル分析によって測定した(Fisons VG Gas分析装置)。次いで、発酵を上記のようにして行なった。また、Brooks圧力コントローラーを用いて、発酵槽の圧力を発酵の際に約0.5バールgまで増加した。

供給速度を、成育率を約 $0.07 \text{ 時}^{-1} (\text{h}^{-1})$ とするのに必要な供給速度 FR_{start} で開始した。次いで、供給速度を、下記のアルゴリズムによるコンピューター制御によって増加した。

$$FR = FR_{\text{start}} \text{EXP}(K * \text{カウンター})$$

ここで、FR: 供給速度($\text{ml} \cdot \text{分}^{-1} (\text{min}^{-1})$)

K: 0.07に保持した指数定数

カウンター(counter): 0から開始して毎分0.0167ずつ増加したカウンター変数。しかしながら、カウンター変数は、

- a. 溶存酸素圧(DOT)が15%未満であるときには、毎分0.0167ずつ、
- b.

$$RQ \geq 1.2$$

の間は、10分毎に0.333ずつ、

- c. 供給添加を4時間より以前に開始したとき、

$$RQAVG_{120} \geq 1.13$$

10

20

30

40

50

としながら 2 時間毎に $0.223/K$ ずつ (20% の供給速度の減少を生じる) 減少した。

このような発酵の結果を、第 1 図に示す。コンダクタンスの傾向は、通常は流加発酵の経過中に下降傾斜傾向を示したと結論することができる。

実施例 2 : 供給速度が突然 20% だけ増加した相中の電気コンダクタンス

アセテート蓄積の防止および補正におけるコンダクタンスシグナルの使用を確立するため、実施例 1 に記載したのと同様な炭素を制限した流加発酵でのある段階で、供給速度を意図的に 20% 突然の段階 - 増加させた。結果を第 2 図に示す。過剰供給を行なった期間中、コンダクタンスは有意に増加したことが示されている。実際に、パン酵母産生の制御に用いられることが多いパラメーターである RQ は、有意な増加は示さなかった。これは、コンダクタンスシグナルが有用であることを示しており、アセテート産生がパン酵母産生の際には望ましくないからである。コンダクタンスの増加は、培養試料で分析したように、培養物におけるアセテート濃度の増加と相関した。アセテートを、Boehringer Mannheim 製の酵素分析キット番号 148261 を用いて分析した。

10

実施例 3 : 供給速度が突然 40% だけ増加した相中の電気コンダクタンス

実施例 2 に示したのと同様な実験において、供給速度を突然 40% 増加させた (第 3 図を参照されたい)。予想されたように、効果は、実施例 2 におけるよりも極端であった。 RQ も増加した。しかしながら、供給速度の低下を起こす濃度 (実施例 2 を参照されたい) として典型的に用いられる 1.2 の値には到達しなかった。これは、コンダクタンスが RQ よりも敏感な物理的制御パラメーターであることを再度示している。

20

実施例 4 : 電気コンダクタンスを包含する供給速度制御アルゴリズムの使用

第 4 図には、この実施例に用いた供給添加制御アルゴリズムを表す作業工程図が示されている。この基礎は、実施例 1 に示された正常の制御アルゴリズムであった。気流および圧力増加は、ガス・ホールド・アップ容積の変化によりコンダクタンスが僅かに増加するという事実により、気流または圧力設定値増加がコンダクタンス供給制御を 1 時間適用するのを防止する条件が必要であった。

更に、実施例 1 と比較して、下記のことを供給速度制御アルゴリズムに加えた。コンダクタンスの変化 (ΔC , mS) を、30 分の時間間隔で測定した。供給を終わりの 1.5 時間以内に開始した場合には、フィード・バック制御は生じない。しかしながら、その後、増加 ΔC が選定された時間間隔に互って

30

$\geq 0.1 mS$

である場合には、自動的な供給速度減少が起きるのである。供給速度減少の実際的な大きさは、下記のように ΔC の実際の値に依存して作られる： $F R_{reduced} = F R_{original} * (1 - \Delta C)$ 。

$RQ \leq 0.95$ 、

または RQ_{30} (30 分に互って平均した RQ) の 20 分の時間間隔での差： $RQ_{30} - RQ_{30-20分前}$ が < -0.025 であるときには、供給速度の減少は適用されない。これらの条件はいずれも、酵母が既に供給基質と発酵生成物を共代謝しており、供給速度の減少は必要ないことを示している。

指数定数 K (実施例 1 を参照されたい) を、産生発酵生成物 (production fermentation products) が実施例 1 と同一であるこの酵母菌株について予想される非常に高い 0.12 時^{-1} に設定した実験を行なった。これを行なって、第 4 図に示しかつ上記した制御アルゴリズムの作用を試験した。結果を第 5 図に示す。この図は、コンダクタンスが安定的に増加し、アセテート濃度の増加と相関していることを示している。2.3 時間 (h) (バッチ齢 (batch age)) では、自動供給速度の減少を適用した。しかしながら、これは十分ではなく、自動供給速度の減少を、もう一度 4.5 時間 (バッチ齢) に適用した。その後、アセテート濃度は、 $0 mM$ に減少した。次いで、アセテート濃度は、バッチ齢 5 時間で一時的に増加したが、コンダクタンスは減少していた。同時に、4.5 時間 (バッチ齢) までの期間に添加して pH を制御する過剰量のアンモニウムイオンが、恐らく培養物の pH 変化によって判定されるように消費されていた。アンモニウムイオンは、アセテートイ

40

50

オンよりも良好に電流を通し (Owens, 1985年)、これはコンダクタンスシグナルの全般的減少を説明することが知られている。また、バッチ齢 6 時間に、アセレート濃度の小さなピークが生じた。この場合には、コンダクタンス増加は、供給速度の減少を誘発するのに十分なものではなかった。しかしながら、その後アセレート濃度の減少によって判定されたように、それ以上の供給速度の減少は必要なかった。

実施例 5 : 電気コンダクタンスを含む供給速度制御アルゴリズムの細菌株 E. coli での使用

細菌菌株 Escherichia. coli DH5 α を、Riesenberg et al. (1991 年) によって記載された培地を用いて発酵槽で育成した。実施例 4 と同一の制御アルゴリズムを用いた。しかしながら、因子 K は、0.4 時間⁻¹ に設定した。第 6 図に、制御アルゴリズムの作用の結果を示す。アセレートの蓄積の後、2 回の自動的供給速度減少により、アセレートは 4.5 から 5 mM に減少した。

発酵に対するこの人工的に高い実験 (artificially high challenge) は、系が極端な条件下でも働くことを示していた。

実施例 6 : 別の E. coli 発酵

これは、発酵の平衡に対する更に現実的な (しかし、まだ人工的な) 実験を示している。細菌菌株 E. coli DH5 α を、Riesenberg et al. (1991 年) によって記載された培地を用いて、発酵槽で育成した。実施例 4 と同様な制御を用いた。しかしながら、因子 K は 0.1 時間⁻¹ に設定した。これは、通常の好気条件下では、有機アニオンを産生しないものであろう。次いで、バッチ齢 21.3 ~ 22.3 時間の間に (第 7 図を参照されたい)、供給速度を手動で 3 段階で増加した。この介入の後、下記の修飾以外は第 4 図に記載したアルゴリズムに従って、伝導率を増加し、供給速度を制御した。制御段階は (伝導率の増加が極めて急激であったので) 10 分毎に 1 回行なったが、供給速度の減少の大きさは、第 4 図に記載したものの 4 分の 1 であった。従って、供給速度の式は、 $F R_{reduced} = F R_{original} (1 - \Delta C / 4)$ であった。第 7 図に示されるように、これは、生成したアセレートが菌体によって消費されるように発酵を制御した。この実施例は、制御アルゴリズムを、様々な生物体、育成速度および培地の種類のような様々な状況に対して最適にすることができることを示している。

「Breox」は、商標である。

文献

10

20

30

Belfares *et al* (1993) *Bioprocess Eng.* 9, 197-204.

Clarke P.M., Collins S.H. and Mead D.J. (1990) "Fermentation of genetically engineered yeast in the presence of polyalkylene compound" WO 90/02808.

De Deken R.H. (1966) "The Crabtree effect: a regulatory system in yeast" *J. Gen. Microbiol.* 44, 149-156.

10

Doelle W. (1981) "New developments in the elucidation of the mechanisms of the Pasteur and Crabtree effects in bacteria" In: Moo-Young M., Robinson C.W. and Vezina C. (Eds.), *Advances in Biotechnology*, Pergamon Press, Vol. 1, pp 249-254.

20

Fiechter A., Fuhrmann G.F. and Kappeli O. (1981) "Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells" *Adv. Microbiol. Physiol.* 22, 123-183.

Goodey A.R., Sleep D., van Urk, H., Berezenko S., Woodrow J.R. and Johnson, R.A. (1996). Process of high purity albumin production. International Patent Application. Publication No. WO 96/37515.

30

Latrille E., Picque D., Perret B. and Corrieu G. (1992) "Characterizing acidification kinetics by measuring pH and electrical conductivity in batch thermophilic lactic fermentations" *J. Ferment. Bioeng.* 74, 32-38.

40

Moon N.J. (1983) "Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures" *J. Appl.*

Bacteriol. **55**, 453-460.

Owens J.D. (1985). Formulation of culture media for conductimetric assays: Theoretical considerations. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 3055-3076.

Pampulha M.E. and Loureiro-Dias M.C. (1989) "Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 547-550.

10

Riesenbergl D., Schulz V., Knorre W.A., Pohl H.-D., Korz D., Sanders E.A., Ross A. and Deckwer W.-D. (1991). High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.* **20**: 17-28.

20

Sakamoto *et al* (1994) *J. Ferment. Bioeng.* **78**, 304-309.

Soyez K., Schultz E. and Prause M. (1983) "Verfahren zur Steuerung der Kultivierung von Mikroorganismen" German Patent (DDR) 200894/2.

Turner C., Gregory M.E. and Thornhill N.F. (1994) "Closed-loop control of fed-batch cultures of recombinant *E. coli* using on-line HPLC" *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 819-829.

30

Wang H.Y., Cooney C.L. and Wang D.I.C. (1977) "Computer-aided Bakers' yeast fermentations" *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 69-86.

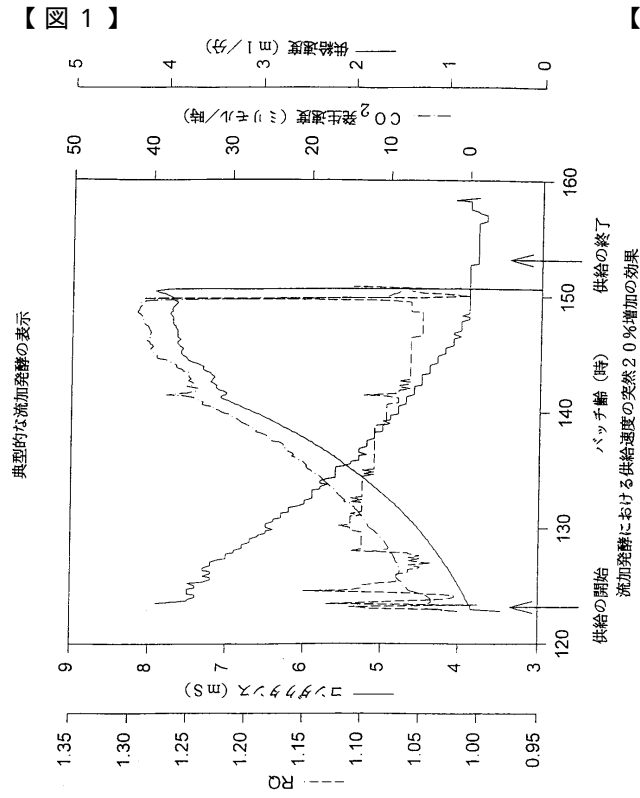


Figure 1

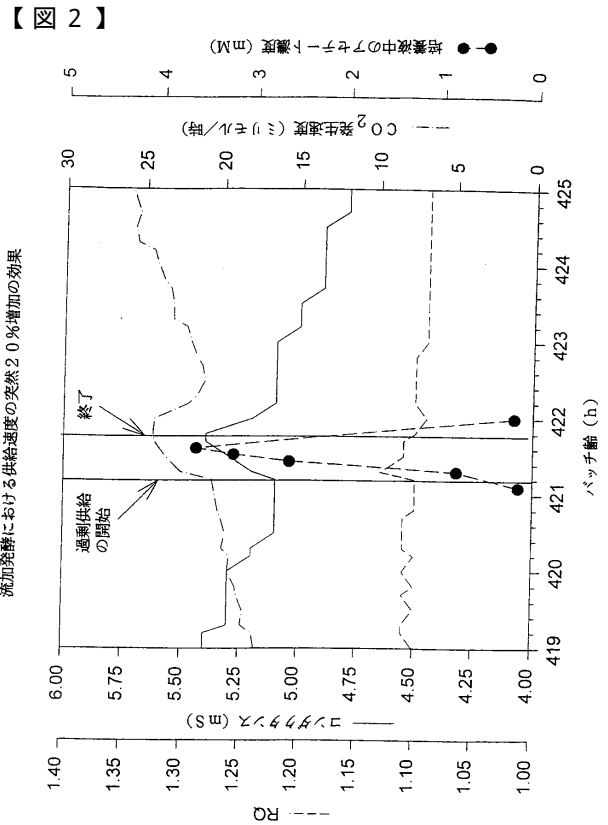


Figure 2

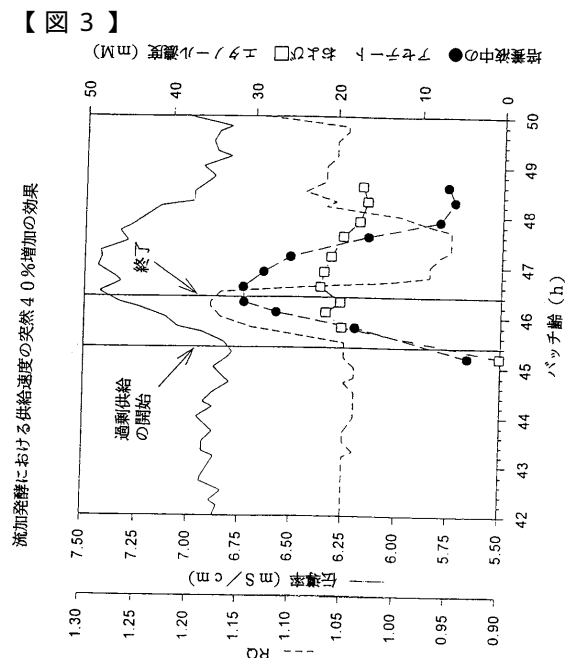


Figure 3

【図 4】
供給制御アルゴリズムの簡略化した作業工程図 (1.5秒サイクル)

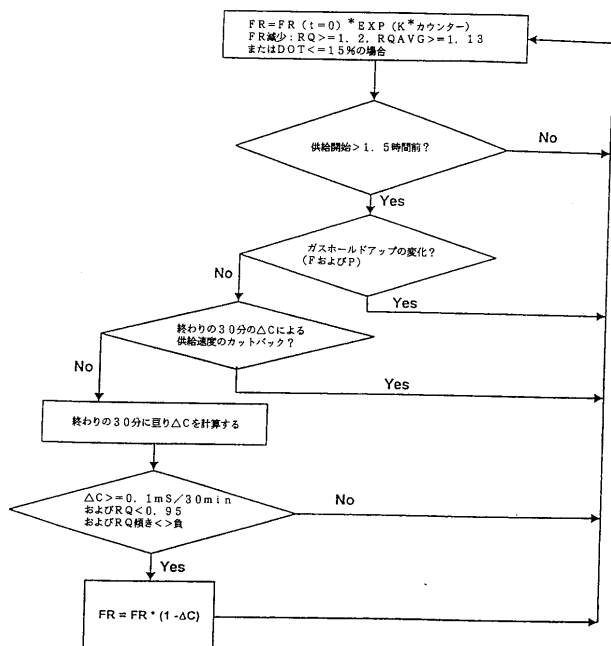


Figure 4

【図 5】

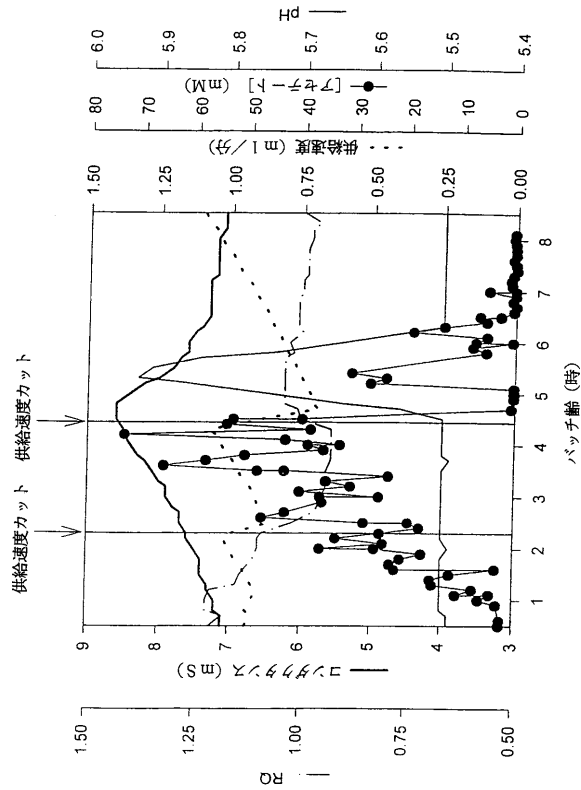


Figure 5

【図 6】

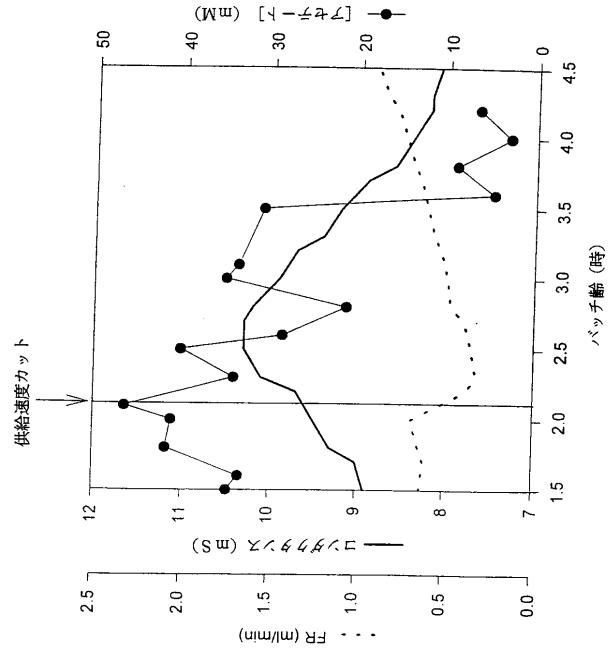


Figure 6

【図 7】

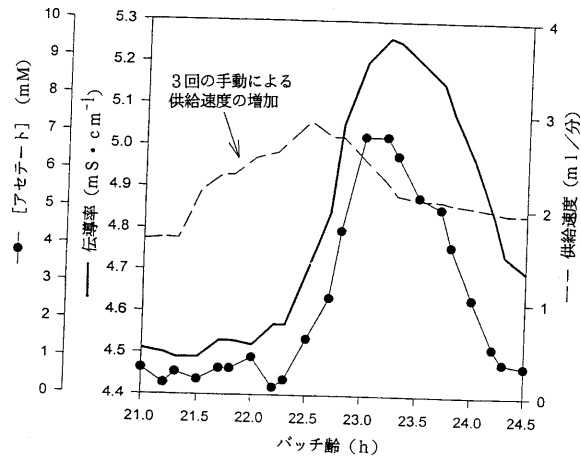


Figure 7

【図 8】

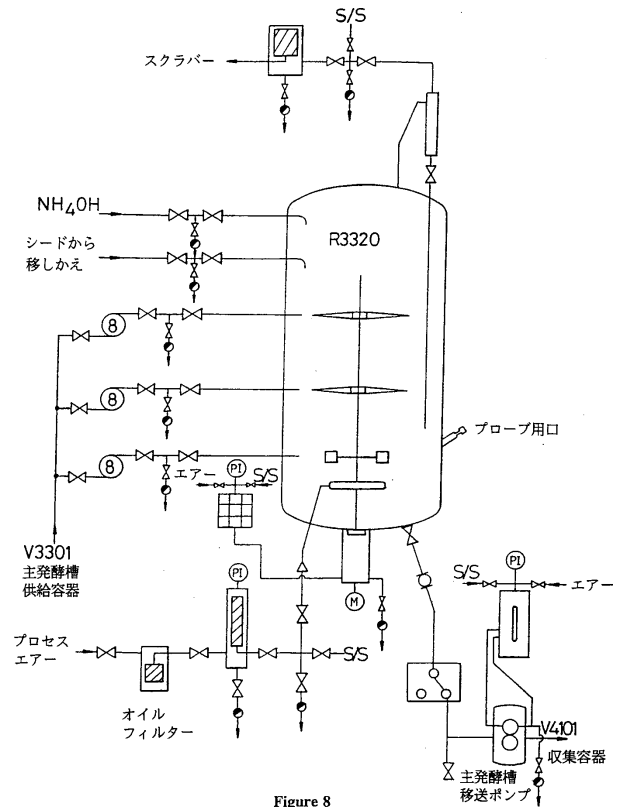


Figure 8

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/00 (2006.01) C 1 2 P 21/00 C

- (72)発明者 デイビッド、ジョン、ミード
イギリス国ノッティンガム、キャッスル、ブルバード、キャッスル、コート デルタ、バイオテ
クノロジー、リミテッド内
(72)発明者 ヘンドリック、パン、アーク
イギリス国ノッティンガム、キャッスル、ブルバード、キャッスル、コート デルタ、バイオテ
クノロジー、リミテッド内

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 特開平 0 2 - 1 0 9 9 7 3 (J P , A)
特開昭 6 3 - 2 3 3 7 8 0 (J P , A)
英国特許出願公開第 0 2 1 7 7 8 0 1 (G B , A)

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