

(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2015-527062  
(P2015-527062A)

(43) 公表日 平成27年9月17日(2015.9.17)

(51) Int.Cl.

**C 12 P** 7/64 (2006.01)  
**C 12 N** 1/16 (2006.01)  
**C 12 N** 1/12 (2006.01)  
**C 12 N** 1/14 (2006.01)  
**C 12 N** 1/20 (2006.01)

F 1

C 12 P 7/64  
C 12 N 1/16  
C 12 N 1/16  
C 12 N 1/12  
C 12 N 1/14

テーマコード(参考)

4 B 0 6 4  
4 B 0 6 5  
4 H 0 1 3  
C  
A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-520558 (P2015-520558)  
(86) (22) 出願日 平成25年6月28日 (2013.6.28)  
(85) 翻訳文提出日 平成27年2月23日 (2015.2.23)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2013/048532  
(87) 國際公開番号 WO2014/004999  
(87) 國際公開日 平成26年1月3日 (2014.1.3)  
(31) 優先権主張番号 61/666,096  
(32) 優先日 平成24年6月29日 (2012.6.29)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 512234658  
ビーピー・バイオフューエルズ・ユーケイ  
・リミテッド  
イギリス国ミドルセックス ティーダブリ  
ュー16 7ビーピー、サンベリー・オン  
・テムズ、チャートシー・ロード  
(74) 代理人 100140109  
弁理士 小野 新次郎  
(74) 代理人 100075270  
弁理士 小林 泰  
(74) 代理人 100101373  
弁理士 竹内 茂雄  
(74) 代理人 100118902  
弁理士 山本 修

最終頁に続く

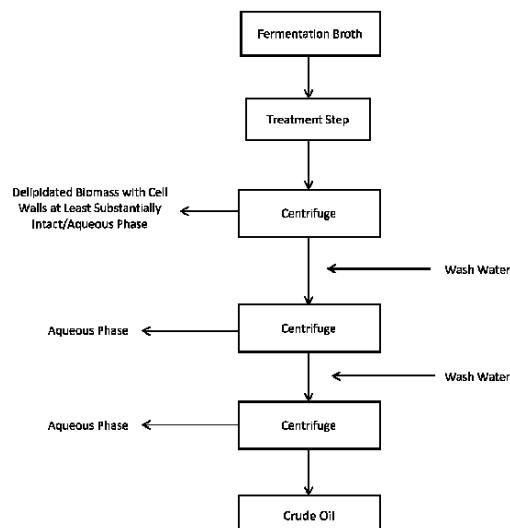
(54) 【発明の名称】微生物からの再生可能な材料の分離のための方法

## (57) 【要約】

再生可能な材料、例えば脂質を、微生物、例えば油性酵母から分離する方法は、微生物の細胞壁を状態調節して、細孔を形成し、開口し、又は拡大すること、そして細孔を通して再生可能な材料の少なくとも一部を除去することを含みうる。これらの方法は、実質的にインタクトである細胞壁をもち、そしてメソ細孔をもつ、脱脂された微生物をもたらしうる。これらの脱脂された微生物は、バイオ燃料を製造するために使用されうる。

【選択図】図1

FIG. 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

微生物からの再生可能材料の分離のための方法であって：  
再生可能な材料を含有する微生物の細胞壁を状態調節して、細孔を形成し、開口し又は拡大し；そして  
細孔を通して再生可能な材料の少なくとも一部を除去すること；  
を含んでなる、前記方法。

**【請求項 2】**

細胞壁が、少なくとも実質的にインタクトのままである、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

微生物が、油性酵母を含んでなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

油性酵母が、Rhodotorula、Pseudozyma、又はSporidiobolus 属に属する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

状態調節が、摂氏約 120 度における約 4 時間の熱的処理を含んでなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

除去することが、溶媒との接触、或いはホモジナイザー、ビーズミル、高剪断力混合器、又はこれらのいずれもの組合せを含んでなる機械的破壊デバイスの使用を含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

微生物が、重量基準で少なくとも約 20 パーセントの再生可能な材料を含んでなり；そして

重量パーセント基準で、再生可能な材料の少なくとも約 50 パーセントが、除去の工程中に細孔を通して通過する；

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

状態調節後、個数基準で、全細孔の少なくとも 50 パーセントが、メソ細孔で構成される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項の方法によって製造される脱脂された微生物。

**【請求項 10】**

個数基準で、細胞壁の少なくとも約 50 パーセントが、少なくとも実質的にインタクトなままである、請求項 9 に記載の脱脂された微生物。

**【請求項 11】**

油性酵母からの脂質の抽出のための方法であって：

油性酵母を熱的処理によって状態調節して、細胞壁の多孔性を増加させ；そして  
実質的にインタクトな細胞壁をもつ油性酵母から脂質を除去すること；

を含んでなる、前記方法。

**【請求項 12】**

油性酵母が、抽出前に、少なくとも約 50 重量パーセントの脂質を含んでなる、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

除去することが、油性酵母から脂質の少なくとも約 50 重量パーセントを除去することを含んでなる、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

**【請求項 14】**

個数基準で、形成された全細孔の少なくとも約 50 パーセントがメソ細孔である、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 15】**

10

20

30

40

50

熱的処理が、摂氏約80度より上の温度、少なくとも約10分の時間、及び約2～約14のpHの範囲を含んでなる、請求項11～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

バイオ燃料の製造のための方法であって：

酵母を糖で培養して、酵母の細胞壁中に脂質を蓄積させ；

酵母を状態調節して、細胞壁中に細孔を形成し、又はそれを拡大し；

細胞壁中の細孔を通して脂質を除去し；

酵母から脂質を分離し；そして

脂質をバイオ燃料に転換すること；

を含んでなる、前記方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

共同研究契約のための団体の名称

米国特許法第103条(c)(2)項の目的のために、再生可能な材料の分野における共同研究契約が、BP Biofuels UK LimitedとMartek Biosciences Corporationとの間で、2008年12月18日に締結された。また米国特許法第103条(c)(2)項の目的のために、再生可能な材料の分野における共同開発契約が、BP Biofuels UK LimitedとMartek Biosciences Corporationとの間で、2009年8月7日に締結された。

20

【0002】

技術分野

本発明は、再生可能な材料とバイオ燃料の製造に向けられた方法及び系に関する。本発明の側面は、油性微生物から再生可能な材料を抽出することに関する。

【背景技術】

【0003】

温室効果ガスレベル及び気候変化の問題は、固定炭素と放出された二酸化炭素との間の天然のサイクルを使用しようとする技術の開発につながっている。これらの技術が進歩するのに伴って、供給原料をバイオ燃料に転換する各種の技術が開発されている。然しながら、上述の技術の進歩にも関わらず、再生可能な炭素源の燃料への転換のための、経済的実行可能性を改善する必要性及び要求が残っている。

30

【0004】

植物油由来のバイオディーゼル燃料は、慣用的な石油系(化石)ディーゼルに対して、再生可能で、生分解性で、非毒性であり、そして硫黄も芳香族化合物も含有していないという利点を有しうる。しかし、植物油由来のバイオディーゼルの潜在的に不利な点の一つは、高価格であり、その殆どが植物油供給原料の費用に起因する。従って、バイオディーゼル燃料製造の経済的側面は、少なくともある程度、植物油原材料の費用によって制限されている。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

栄養学的産物における使用のための脂質は、藻類中で产生することができる。藻類中の脂質の製造は、藻類を増殖させ、それを乾燥し、そしてそれから細胞内脂質を抽出することを含みうる。藻類中の材料を抽出することは困難でありうる。

【0006】

抽出される材料の高い収率と細胞壁構造の最小の破壊をもたらす、油性微生物から再生可能な材料を抽出するための方法及び系に対する必要性と要求が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

50

本発明は、油性微生物から再生可能な材料を抽出するための方法及び系、並びにこのような方法から得られる脱脂された微生物に関する。

ある態様によれば、再生可能な材料を含有する微生物から再生可能な材料を分離するための方法は、細孔を形成し、開口し又は拡大し、そして再生可能な材料の少なくとも一部を細孔を通して除去するための、微生物の細胞壁の状態調節を含みうる。細胞壁の細孔を形成し、開口し又は拡大するために、この方法は、細胞壁の構造及び／又は細胞壁の成分を変性させることを含みうる。細胞壁の構造及び／又は細胞壁の成分は、輸送タンパク質、膜内在性タンパク質、受容体タンパク質、凝集タンパク質、抗原タンパク質、隔壁、出芽痕、装飾炭水化物、非構造炭水化物、構造炭水化物、グルカン、マンナン、マンノプロテイン、アセチルグルコサミン、キチン、樽型孔 (dolipores)、細孔キャップ、タンパク質架橋、炭水化物架橋、タンパク質 - 炭水化物架橋、包埋脂質、リン脂質、グリセリド、ステロール、ステロールエステル、又はこれらのいずれもの組合せを含みうる。  
10

#### 【0008】

ある態様によれば、細胞壁又は細胞壁の構造は、少なくとも実質的にインタクトなままである。

再生可能な材料は、バイオ燃料又はバイオ燃料前駆体を含みうる。例えば、バイオ燃料又はバイオ燃料前駆体は、脂質、有機酸、アミノ酸、アルコール、エステル、アルカン、アルケン、オレフィン、パラフィン、ワックス、又はこれらの組合せを含みうる。ある態様によれば、バイオ燃料又はバイオ燃料前駆体は、実質的に極性な材料を含みうるが、一方、他の態様において、バイオ燃料又はバイオ燃料前駆体は、実質的に非極性な材料を含みうる。ある態様によれば、隔壁、相、又は層は、非極性な再生可能な材料から、極性な再生可能な材料を分離しうる。ある態様によれば、再生可能な材料は、脂質及び／又はトリグリセリドを含む。  
20

#### 【0009】

ある態様によれば、再生可能な材料は、食品産物、医薬組成物、化粧品産物、及び／又は工業用組成物に製造することができる。再生可能な材料から製造することができる食品産物の例は、次を含む：ヒトの食品、動物の食品、医薬用食品、食品添加物、飲料、治療用飲料、栄養飲料、機能性食品、補助食品、栄養補助食品、調製粉乳、妊娠及び授乳期女性用食品、及び老人用食品。  
30

#### 【0010】

本明細書中で使用される微生物は、藻類、真菌、及び／又は細菌を含みうる。特に、真菌は、油性酵母を含みうる。ある態様によれば、油性酵母は、Rhodotorula、Pseudozyma、又はSporidiobolus属に属しうる。特に、酵母は、Sporidiobolus pararoseus又はRhodotorula ingeniosaでありうる。例えば、微生物は、ATCC寄託番号PTA-12508(MK29404(Dry1-13J)株)、ATCC寄託番号PTA-12509(MK29404(Dry1-182J)株)、ATCC寄託番号PTA-12510(MK29404(Dry1-173N)株)、ATCC寄託番号PTA-12511(MK29404(Dry55)株)、ATCC寄託番号PTA-12512(MK29404(Dry41)株)、ATCC寄託番号PTA-12513(MK29404(Dry1)株)、ATCC寄託番号PTA-12515(MK29404(Dry1-147D)株)、又はATCC寄託番号PTA-12516(MK29404(Dry1-72D)株)の一つ又はそれより多くに対応しうる。もう一つの例として、微生物は、ATCC寄託番号PTA-12506(MK29794(KDry16-1)株)、ATCC寄託番号PTA-12507(MK29794(KDry7)株)、ATCC寄託番号PTA-12514(MK29794(K200Dry1)株)、又はATCC寄託番号PTA-12517(MK29794(33Dry1)株)の一つ又はそれより多くに対応しうる。  
40

#### 【0011】

微生物の細胞壁を状態調節する各種の技術は、熱的処理、化学的処理、酵素的処理、及

び／又は機械的処理を含みうる。

処理方法は、いずれもの適した期間又は時間、例えば少なくとも約10分、少なくとも約20分、少なくとも約60分、少なくとも約120分、約10分ないし約240分、約10分ないし約15分、約20分ないし約40分、又は約30分ないし約180分でありうる。

#### 【0012】

処理方法は、いずれもの適した温度、例えば少なくとも摂氏約50度、少なくとも摂氏約80度、少なくとも摂氏約100度、少なくとも摂氏約120度、摂氏約40度ないし摂氏約140度、摂氏約80度ないし摂氏約120度、摂氏約80度、又は摂氏約100度でありうる。

10

#### 【0013】

処理方法は、いずれもの適した圧力、例えば常圧、完全な真空、部分的真空、それぞれ絶対圧に基づいて、約0.1バールないし約1,000バール、約1バールないし約100バール、約10バールないし約50バール、又は約0.1バールないし約0.5バールでありうる。

#### 【0014】

処理方法は、いずれもの適したpH、例えば約1ないし約14、約2ないし約14、約2ないし約5、約7より低い、約3より低い、約2、約9より高い、又は約12でありうる。

20

#### 【0015】

ある態様によれば、状態調節は、少なくとも摂氏約80度の熱的処理温度を含みうる。ある態様によれば、状態調節は、少なくとも約10分の時間を含みうる。ある態様によれば、状態調節は、摂氏約120度における約4時間の熱的処理を含みうる。

#### 【0016】

細孔を通して再生可能な材料の少なくとも一部を除去することは、水性抽出技術、溶媒抽出技術、機械的抽出技術、又はこれらの技術のいずれもの組合せを使用して達成しうる。機械的抽出技術は、押し出し、プレス機、射出(extruding)、及び／又は類似のことを含みうる。ある態様によれば、機械的抽出は、機械的破壊デバイスを使用して行いうる。機械的破壊デバイスは、ホモジナイザー、ビーズミル、高剪断力混合器、又はこれらのいずれもの組合せを含みうる。ある態様によれば、機械的破壊デバイスは、ビーズミルを含む。

30

#### 【0017】

ある態様によれば、溶媒抽出技術は、機械的破壊デバイスの使用を排除しうる。

ある態様によれば、微生物は、処理及び除去の前に、再生可能な材料の少なくとも重量基準で約50パーセントを含みえて、そして重量パーセント基準で再生可能な材料の少なくとも約50パーセントは、微生物から再生可能な材料を除去する間に、細孔を通して通過しえる。微生物からの再生可能な材料の除去又は分離は、少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約80パーセント、少なくとも約90パーセント、少なくとも約95パーセント、約50パーセントないし約99パーセント、約80パーセントないし約95パーセント、又は約90パーセントないし約99パーセントでありうる。

40

#### 【0018】

ある態様によれば、状態調節された微生物の抽出収率は、状態調節されない微生物より、例えば少なくとも約10パーセント、少なくとも約20パーセント、少なくとも約30パーセント、少なくとも約40パーセント、少なくとも約50パーセント、約20パーセントないし約40パーセント、約40パーセントないし約50パーセント、状態調節されない微生物より改善されうる。

#### 【0019】

ある態様によれば、状態調節された微生物の抽出収率は、状態調節及び除去後、少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少

50

なくとも約 8 0 パーセント、少なくとも約 9 0 パーセント、少なくとも約 9 5 パーセント、約 5 0 パーセントないし約 9 9 パーセント、約 8 0 パーセントないし約 9 5 パーセントでありうる。

#### 【 0 0 2 0 】

ある態様によれば、油抽出性指数は、それぞれ重量基準で、状態調節されない微生物より、少なくとも約 1 0 パーセント、少なくとも約 2 0 パーセント、少なくとも約 3 0 パーセント、少なくとも約 4 0 パーセント、少なくとも約 5 0 パーセント、約 2 0 パーセントないし約 4 0 パーセント、約 4 0 パーセントないし約 5 0 パーセント増加しうる。

#### 【 0 0 2 1 】

ある態様によれば、油抽出性指数は、状態調節及び除去後、少なくとも約 5 0 パーセント、少なくとも約 6 0 パーセント、少なくとも約 7 0 パーセント、少なくとも約 8 0 パーセント、少なくとも約 9 0 パーセント、少なくとも約 9 5 パーセント、約 5 0 パーセントないし約 9 9 パーセント、約 8 0 パーセントないし約 9 5 パーセントでありうる。 10

#### 【 0 0 2 2 】

ある態様によれば、油回収指数は、それぞれ重量基準で、状態調節されない微生物より、少なくとも約 1 0 パーセント、少なくとも約 2 0 パーセント、少なくとも約 3 0 パーセント、少なくとも約 4 0 パーセント、少なくとも約 5 0 パーセント、約 2 0 パーセントないし約 4 0 パーセント、約 4 0 パーセントないし約 5 0 パーセント増加しうる。

#### 【 0 0 2 3 】

ある態様によれば、油回収指数は、状態調節及び除去後、少なくとも約 5 0 パーセント、少なくとも約 6 0 パーセント、少なくとも約 7 0 パーセント、少なくとも約 8 0 パーセント、少なくとも約 9 0 パーセント、少なくとも約 9 5 パーセント、約 5 0 パーセントないし約 9 9 パーセント、約 8 0 パーセントないし約 9 5 パーセントでありうる。 20

#### 【 0 0 2 4 】

ある態様によれば、油抽出収率指数は、それぞれ重量基準で、状態調節されない微生物より、少なくとも約 1 0 パーセント、少なくとも約 2 0 パーセント、少なくとも約 3 0 パーセント、少なくとも約 4 0 パーセント、少なくとも約 5 0 パーセント、約 2 0 パーセントないし約 4 0 パーセント、約 4 0 パーセントないし約 5 0 パーセント増加しうる。

#### 【 0 0 2 5 】

ある態様によれば、油抽出収率指数は、状態調節及び除去後、少なくとも約 5 0 パーセント、少なくとも約 6 0 パーセント、少なくとも約 7 0 パーセント、少なくとも約 8 0 パーセント、少なくとも約 9 0 パーセント、少なくとも約 9 5 パーセント、約 5 0 パーセントないし約 9 9 パーセント、約 8 0 パーセントないし約 9 5 パーセントでありうる。 30

#### 【 0 0 2 6 】

ある態様によれば、微生物の細胞壁を状態調節する工程は、メソ細孔及び／又はマイクロ細孔を含んでなる細孔を形成しうる。特に、個数基準で、状態調節後、全細孔の少なくとも約 5 0 パーセント、少なくとも約 6 0 パーセント、少なくとも約 7 0 パーセント、少なくとも約 8 0 パーセント、少なくとも約 9 0 パーセント、少なくとも約 9 5 パーセント、約 5 0 パーセントないし約 9 9 パーセント、約 8 0 パーセントないし約 9 5 パーセントでありうる。 40

#### 【 0 0 2 7 】

状態調節された微生物は、本明細書中に記載される方法のいずれかによって製造しうる。ある態様によれば、状態調節された微生物は、約 8 より大きいゼオライト表面積：基質表面積の比を有して、一方、状態調節されない微生物のゼオライト表面積：基質表面積の比は約 2 でありうる。ある態様によれば、状態調節された微生物は、約 1 0 、約 2 0 、約 1 0 0 、約 6 ないし約 1 0 0 、約 8 ないし約 2 0 、又は約 1 0 ないし約 1 2 のゼオライト表面積：基質表面積を有する。ある態様によれば、状態調節されない微生物は、約 4 、約 3 、約 1 、約 1 ないし約 4 、約 1 . 5 ないし約 3 、又は約 2 ないし約 2 . 5 のゼオライト表面積：基質表面積を有する。ゼオライト表面積及び基質表面積は、不均一触媒作用測定の分析技術を使用して測定されている。 50

## 【0028】

枯渇された、又は脱脂された微生物は、本明細書中に記載される方法のいずれかによつて製造しうる。ある態様によれば、これらの場合中で、脱脂された微生物の細胞壁は、少なくとも実質的にインタクトなままでありうる。さらに具体的には、個数基準で、細胞壁の少なくとも約10パーセント、少なくとも約20パーセント、少なくとも約30パーセント、少なくとも約40パーセント、少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセント、少なくとも約90パーセント、少なくとも約95パーセント、約10パーセントないし約99パーセント、約40パーセントないし約90パーセント、又は約70パーセントないし約90パーセントが、少なくとも実質的にインタクトなままでありうる。

10

## 【0029】

ある態様によれば、細胞壁の細孔は、物質が細孔を経由して細胞壁の構造を越えて輸送されうるような、完全な細胞壁構造を貫く細胞壁構造中の孔、開口、又は開口部を意味する。

## 【0030】

ある態様によれば、実質的にインタクトは、細胞壁の構造の少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセント、約50パーセントないし約80パーセント、約50パーセントないし約60パーセント、約60パーセントが構造的完全性を維持することを指す。

20

## 【0031】

再生可能な材料は、本明細書中に記載される方法のいずれかによって製造しうる。

ある態様によれば、油性酵母から脂質を抽出するための方法は、熱的処理を使用して油性酵母を状態調節して、細胞壁の多孔性を増加させること、および細胞壁が少なくとも実質的にインタクトな、又はさもなくば完全にインタクトなまま、油性酵母から脂質を除去することを含みうる。

## 【0032】

油性酵母から脂質を除去するために、各種の技術、例えば溶媒抽出又は機械的処理を使用しうる。

ある態様によれば、油性酵母は、抽出前に少なくとも約50重量パーセントの脂質を含みうる。さらに、油性酵母から脂質を除去する場合、脂質の少なくとも約50重量パーセントを油性酵母から除去しうる。

30

## 【0033】

ある態様によれば、油性酵母の状態調節は、メソ細孔及びマイクロ細孔を含んでなる細孔を形成することを含みうる。例えば、個数基準で、形成される全細孔の少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセント、又は少なくとも約90パーセントが、メソ細孔（ゼオライト表面積によって測定されるような）でありうる。

## 【0034】

ある態様によれば、油性酵母は、状態調節前、約2のゼオライト表面積：基質表面積の比を、そして状態調節後、約8のゼオライト表面積：基質表面積の比を含みうる。

40

油性酵母を状態調節するために使用される熱的処理は、例えば、摂氏約80度より上の温度、約10分より多い時間、及び約2ないし約14のpH範囲を含みうる。

## 【0035】

油性酵母から脂質を除去するために使用される機械的処理は、例えば、ホモジナイザー、ビーズミル、高剪断力混合器、プレス機、押し出し機、加圧破壊機、湿式ミル、低温ミル、及び／又は環式ミルを使用することを含みうる。

## 【0036】

バイオ燃料は、本明細書中に記載される方法のいずれかを使用して製造しうる。

ある態様によれば、脱脂された酵母は、実質的にインタクトであり、そしてメソ細孔を持つ細胞壁を有しうる。

50

## 【0037】

ある態様によれば、脱脂された酵母は、約20重量パーセントより少ない細胞中に残った脂質を有しうる。ある態様によれば、脱脂された酵母は、除去後、状態調節されない細胞の全脂質含有量に対して、細胞中に残る、脂質の約10ないし約30重量パーセントを有しうる。

## 【0038】

ある態様によれば、細胞壁の少なくとも約10パーセント、少なくとも約20パーセント、少なくとも約30パーセント、少なくとも約40パーセント、少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセント、少なくとも約90パーセント、又は少なくとも約95パーセントが、実質的にインタクトでありうる。ある態様によれば、脱脂された酵母は、約40ないし約80パーセントの実質的インタクトな細胞壁を有しうる。

10

## 【0039】

ある態様によれば、脱脂された酵母は、個数基準で、全細孔の少なくとも約10パーセント、少なくとも約20パーセント、少なくとも約30パーセント、少なくとも約40パーセント、少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセント、又は少なくとも約90パーセントの最終的なメソ細孔含有率を有しうる。ある態様によれば、脱脂された酵母は、全細孔の約50パーセントないし約90パーセントの最終的なメソ細孔含有率を有しうる。

20

## 【0040】

ある態様によれば、バイオ燃料の製造のための混合物は、実質的にインタクトな細胞壁、及び脂質材料をもつ脱脂された油性微生物を含みうる。

ある態様によれば、バイオ燃料の製造のための製造施設は、脂質蓄積装置、及び脂質蓄積装置と流体連通している脂質抽出装置を含みえて、液体抽出装置は、細胞の状態調節デバイス及び脂質分離デバイスを含んでなる。細胞の状態調節デバイスは、一つ又はそれより多い熱伝達機器の要素（例えば熱交換器）を含みえて、そして脂質分離デバイスは、一つ又はそれより多い抽出機器の要素を含みうる。ある態様によれば、抽出機器は、機械的破壊デバイスを含みうる。

30

## 【0041】

ある態様によれば、バイオ燃料を製造するための方法は、次を含みうる：糖溶液で酵母を培養して、酵母の細胞壁中に脂質を蓄積させること；酵母を状態調節して、細胞壁に細孔を形成するか又は細孔を拡大すること；細胞壁中の細孔を通して脂質を除去すること；酵母から脂質を分離すること；そして例えば水素処理又はトランスエステル化によって、脂質をバイオ燃料に転換すること。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0042】

本明細書に組込まれ、そしてその一部を構成する付属する図面は、本開示の態様を例示し、そして説明と共に、本発明の特徴、利点、及び原理を説明するために役立つものである。図中：

40

【図1】図1は、油性微生物から再生可能な材料を抽出するための方法の一つの態様を例示するプロセスフロー図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0043】

本発明は、油性微生物から再生可能な材料を抽出するための方法及び系を提供し、これは、望ましくは、抽出される材料の高い収率並びに細胞及び細胞壁構造の最小の破壊をもたらしうる。再生可能な材料は、バイオ燃料製造において使用することができる。微生物からのバイオ燃料の製造は、植物（油糧種子を含む）からのバイオ燃料の製造に対して多くの利点、例えば短い生活環、少ない労力必要性、季節及び気候への非依存性、並びに容易な規模拡大性を有しうる。微生物の培養はまた、大きな面積の農地を必要とせず、そして食料生産との競合が少ない。

50

## 【0044】

本明細書中で使用される場合、用語“再生可能な材料”は、好ましくは、天然の生態学的サイクル及び／又は資源によって少なくとも一部置換することが可能な供給源及び／又は過程に少なくとも部分的に由来する物質及び／又は品目を指す。再生可能な材料は、例えば、化学薬品、化学薬品中間体、溶媒、接着剤、潤滑剤、モノマー、オリゴマー、ポリマー、バイオ燃料、バイオ燃料中間体、バイオガソリン、バイオガソリンブレンド原料、バイオディーゼル、グリーンディーゼル、再生可能なディーゼル、バイオディーゼルブレンド原料、バイオ蒸留物、バイオ木炭、バイオコークス、生物油、再生可能な建築材料、及び／又は同種のものを幅広く含みえる。さらに具体的な例として、再生可能な材料は、制約されるものではないが、次のいずれもの一つ又はそれより多くを含みうる：メタン、エタノール、n-ブタノール、イソブタノール、2-ブタノール、脂肪アルコール、イソブテン、イソブレノイド、トリグリセリド、脂質、脂肪酸、乳酸、酢酸、プロパンジオール、ブタンジオール。ある態様によれば、再生可能な材料は、一つ又はそれより多いバイオ燃料成分を含みうる。例えば、再生可能な材料は、アルコール、例えばエタノール、ブタノール、又はイソブタノール、或いは脂質を含みうる。ある態様において、再生可能な材料は、生存生物体、例えば藻類、細菌、真菌、及び／又は同種のものに由来することができる。ある態様によれば、再生可能な材料は、脂質、例えばナタネ油に少なくともある程度類似した炭素鎖長の特性を持つ脂肪酸である。

10

## 【0045】

用語“バイオ燃料”は、好ましくは、少なくとも部分的に再生可能な供給源に由来する燃料及び／又は燃焼発生源として使用するために適した成分及び／又は流れを指す。バイオ燃料は、例えば化石燃料と比較した場合、持続可能に製造され、及び／又は大気への正味の炭素放出の減少（全炭素生活環）を有する及び／又は正味の炭素放出を有しないことができる。ある態様によれば、再生可能な供給源は、例えば地下から、採掘又は穿孔された材料を排除することができる。ある態様において、再生可能な供給源は、単細胞生物体、多細胞生物体、植物、真菌、細菌、藻類、栽培された作物、非栽培作物、木材、及び／又は同種のものを含むことができる。

20

## 【0046】

ある態様によれば、再生可能な供給源は微生物を含む。バイオ燃料は、輸送用燃料として使用するために、例えば陸上車両、海上船舶、航空機、及び／又は同種のものにおいて使用するために、適していることができる。さらに具体的には、バイオ燃料は、ガソリン、ディーゼル、ジェット燃料、灯油、及び／又は同種のものを含みうる。バイオ燃料は、発電、例えば、水蒸気発生、適した熱伝導媒体を用いたエネルギー交換、合成ガス発生、水素発生、電力生産、及び／又は同様のことにおいて使用するために適していることができる。ある態様によれば、バイオ燃料は、バイオディーゼルと石油ディーゼルのブレンドである。

30

## 【0047】

用語“バイオディーゼル”は、本明細書中で使用される場合、直接的使用及び／又はディーゼル製品へのブレンド及び／又は再生可能な供給源由来のセタンの供給のために適した成分又は流れを指す。適したバイオディーゼル分子は、脂肪酸エステル、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、脂質、脂肪アルコール、アルカン、ナフサ、蒸留物範囲の材料、パラフィン性材料、芳香族材料、脂肪族化合物（直鎖、分枝鎖、及び／又は環式）、及び／又は同種のものを含むことができる。バイオディーゼルは、圧縮着火エンジン、例えば自動車用ディーゼル内燃エンジン、トラック用高負荷ディーゼルエンジン、及び／又は同種のものにおいて使用することができる。別の方法において、バイオディーゼルは、ガスタービン、加熱炉、ボイラ、及び／又は同種のものにおいて使用することもできる。ある態様によれば、バイオディーゼル及び／又はバイオディーゼルブレンドは、工業的に受容された燃料の規格、例えばB5、B7、B10、B15、B20、B40、B60、B80、B99.9、B100、及び／又は同種のものに合致するか、又はこれらに準拠している。

40

50

## 【0048】

ある態様によれば、再生可能なディーゼル（水素処理された）及び／又は再生可能なディーゼルブレンドは、工業的に受容された燃料の規格、例えばB5、B7、B10、B15、B20、B40、B60、B80、B99.9、B100、及び／又は同種のものに合致するか、又はこれらに準拠している。

## 【0049】

用語“脂質”は、本明細書中で使用される場合、油、脂肪、ワックス、グリース、コレステロール、グリセリド、ステロイド、ホスファチド、セレブロシド、脂肪酸、脂肪酸関連化合物、誘導化合物、他の油状材料、及び／又は同種のものを指す。脂質は、生存細胞中で生産することができ、そして比較的高い炭素含有量及び比較的高い水素含有量を、比較的低い酸素含有量を伴って有することができる。脂質は、典型的には、比較的高いエネルギー含有量を、例えば質量基準で含む。

10

## 【0050】

用語“生物体”は、本明細書中で使用される場合、相互依存的かつ従属的要素の、少なくとも比較的複雑な構造を指し、その関係及び／又は特質は、全体の中のそれらの機能によって殆ど決定することができる。生物体は、機能的に分離されているが互いに依存性である器官により生命活動を続けるように設計された個体を含むことができる。生物体は、増殖、生殖、及び／又は同種のことが可能であるような生物を含むことができる。ある態様によれば、微生物は、単一細胞（単細胞）、細胞のクラスター、又は多細胞の比較的複雑な生物体を含む。

20

## 【0051】

生物体は、いずれもの適した簡単な（単）細胞生物、複雑な（多）細胞生物、及び／又は同種のものを含むことができる。生物体は、藻類、真菌（酵母を含む）、細菌、及び／又は同種のものを含むことができる。生物体は、微生物、例えば藍藻、細菌又は原虫を含むことができる。生物体は、一つ又はそれより多い天然に存在する生物体、一つ又はそれより多い遺伝子的に改変された生物体、天然に存在する生物体及び遺伝子的に改変された生物体の組合せ、及び／又は同種のものを含むことができる。多数の異なった生物体の組合せによる態様は、本開示の範囲内である。いずれもの適した組合せ又は生物体の種又は種類、例えば一つ又はそれより多い生物体（酵母及び細菌、異なった属、異なった種、又は異なった変種）、少なくとも約二つの生物体の種、少なくとも約五つの生物体の種、約二つの生物体の種類ないし約20個の生物体の種、及び／又は同種のものを使用することができる。

30

## 【0052】

一つの態様において、生物体は、例えば酵母のような、真菌界の単細胞のメンバーであることができる。使用することができる油性酵母の例は、制約されるものではないが、次の油性酵母を含む：*Candida apicola*、*Candida* sp.、*Cryptococcus curvatus*、*Cryptococcus terriculus*、*Debaromyces hansenii*、*Endomycopsis vernalis*、*Geotrichum carabidarum*、*Geotrichum cucujoidarum*、*Geotrichum histendarum*、*Geotrichum silvicola*、*Geotrichum vulgare*、*Hypopichia burtonii*、*Lipomyces lipofer*、*Lipomyces orientalis*、*Lipomyces starkeyi*、*Lipomyces tetrasporous*、*Pichia mexicana*、*Rodosporidium sphaerocarpum*、*Rhodosporidium toruloides*、*Rhodotorula aurantiaca*、*Rhodotorula dairenensis*、*Rhodotorula diffluens*、*Rhodotorula glutinosa*、*Rhodotorula gracilis*、*Rhodotorula graminis*、*Rhodotorula minuta*、*Rhodotorula mucilaginosa*

40

50

osa、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Rhodotorula terpenoidalis*、*Rhodotorula toruloides*、*Sporobolomyces alborubescens*、*Starmerella bombicola*、*Torulaspora delbruekii*、*Torulaspora pretoriensis*、*Trichosporon behrend*、*Trichosporon brassicae*、*Trichosporon domesticum*、*Trichosporon laibachii*、*Trichosporon loubieri*、*Trichosporon loubieri*、*Trichosporon montevideense*、*Trichosporon pullulan*、*Trichosporon sp.*、*Wickerhamomyces canadensis*、*Yarrowia lipolytica*、及び*Zygoascus meyerae*。

## 【0053】

生物体は、いずれもの適した条件下で、例えば嫌気的に、好気的に、光合成的に、ヘテロトロピックに、及び／又は同種の条件下で、作動し、機能し、及び／又は生きることができる。ある態様によれば、酵母は、空気の存在下でヘテロトロピックに培養されうる。

## 【0054】

用語“油性物(oleaginous)”は、本明細書中で使用される場合、油を保有すること、油を含有すること、及び／又は、油、脂質、脂肪、及び／又は他の油様材料を产生することを指す。油性物は、生物体の全重量の少なくとも約20重量パーセントの油、少なくとも約30重量パーセントの油、少なくとも約40重量パーセントの油、少なくとも約50重量パーセントの油、少なくとも約60重量パーセントの油、少なくとも約70重量パーセントの油、少なくとも約80重量パーセントの油、及び／又は同種の油を产生する生物体を含みうる。油性物は、培養中の微生物、脂質集積中の微生物、収穫条件における微生物、及び／又は同種の微生物を指しうる。

## 【0055】

再生可能な材料は、微生物の細胞壁構造を変化させることによって、油性微生物から抽出又は分離することができる。微生物の細胞壁は、構造中に小さい細孔を、例えば細胞物質の拡散のために含有しうる。ある態様による状態調節によって、これらの細孔の個数、大きさ及び／又は透過性は、以下に詳細に記載される各種の技術を使用して、増加させることができる。微生物の細胞壁中の細孔の個数、大きさ及び／又は透過性の増加は、微生物の内部構造中からの再生可能な材料の抽出又は除去を可能にする。微生物から再生可能な材料を抽出する他の方法と比較して、本明細書中に記載される方法は、抽出される材料の高い収率及び／又は細胞及び／又は細胞壁構造の最小の破壊をもたらしうる。

## 【0056】

一般的に、再生可能な材料は、細孔を形成し、開口し、及び／又は拡大するための微生物の細胞壁を状態調節することによって、微生物から分離されうる。細孔が、十分な状態（例えば、再生可能な材料又は脂質が通過することを可能にするために十分大きい）に達した後、再生可能な材料の少なくとも一部が、細孔を通して、そして細胞壁構造を破壊することなく、微生物から除去されうる。ある態様によれば、細胞壁の破壊は、細胞の直径の少なくとも約50パーセントの長さ又は直径を持つ孔、断裂又は開口を含む。ある態様によれば、少なくとも実質的にインタクトな細胞壁は、溶解された細胞を除外する。

## 【0057】

細孔を形成し、開口し、又は拡大するための微生物の細胞壁の状態調節は、細胞壁構造及び／又は成分を変性させることを含みうる。細胞壁構造及び／又は成分は、制約されるものではないが、輸送タンパク質、膜内在性タンパク質、受容体タンパク質、凝集タンパク質、抗原タンパク質、隔壁、出芽痕、装飾炭水化物、非構造炭水化物、構造炭水化物、グルカン、マンナン、マンノプロテイン、アセチルグルコサミン、キチン、樽型孔(dolipores)、細孔キャップ、タンパク質架橋、炭水化物架橋、タンパク質-炭水化物架橋、包埋脂質、リン脂質、グリセリド、ステロール、ステロールエステル、及びこれ

10

20

30

40

50

らの組合せを含みうる。

**【0058】**

細胞壁を状態調節するための処理工程は、熱的処理、化学的処理、酵素的処理、及び／又は機械的処理を含みうる。これらの処理工程は、温度、水蒸気吹込み、酸処理、アルカリ処理、溶媒選択、及び各種の他の技術に対する適した調節を含みうる。例えば、熱的処理は、少なくとも摂氏約80度の温度で行い得る。これらの状態調節の処理のいずれかは、少なくとも約10分の時間で行い得る。また、これらの状態調節の処理は、約2ないし約14のpHの範囲で行いうる。

**【0059】**

例として、熱的処理は、摂氏約120度の温度で、約4時間で行いうる。細孔の大きさ、細孔の個数、及び／又は細胞壁の透過性を増加させるための細胞壁を状態調節することによって、微生物中の物質は、改変された細胞壁構造を通して拡散して、再生可能な材料の回収を可能にしうる。さらに、細胞壁が単に改変され、そして破壊されていないため、細胞自体は少なくとも実質的にインタクトなままでありうる。

10

**【0060】**

状態調節後、形成された又は拡大された細孔は、マクロ細孔、メソ細孔及び／又はマイクロ細孔を含みうる。ある態様によれば、メソ細孔は、ゼオライト表面積として測定された、約2ナノメートルないし約50ナノメートルの直径を有し、一方マイクロ細孔は約2ナノメートルより小さい直径を有する。

20

**【0061】**

ある態様によれば、状態調節された微生物は、少なくとも約4ナノメートル、少なくとも約10ナノメートル、少なくとも約20ナノメートル、少なくとも約40ナノメートル、少なくとも約50ナノメートル、少なくとも約80ナノメートル、約4ナノメートル、約10ナノメートル、約20ナノメートル、約40ナノメートル、約4ナノメートルないし約40ナノメートル、約6ナノメートルないし約20ナノメートル、又は約2ナノメートルないし約10ナノメートルの平均細孔直径を持つ細孔を含んでなる。

30

**【0062】**

ある態様によれば、平均細孔直径は、少なくとも約0.01、少なくとも約0.05、少なくとも約0.1、約0.2、約0.01ないし約0.1、約0.05ないし約0.1、又は約0.1の状態調節されない微生物の平均細孔直径に対する比を有する。

30

**【0063】**

ある態様によれば、細孔の全個数に基づいて、細胞壁中の全細孔の少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセント、又は少なくとも約90パーセント、約50ないし約90パーセント、約70ないし約90パーセント、約80ないし約90パーセントが、状態調節後にメソ細孔である。

40

**【0064】**

ある態様によれば、状態調節された微生物は、約8より大きいゼオライト表面積：基質表面積の比を有しえて、一方、状態調節されない微生物のゼオライト表面積：基質表面積の比は、約2である。例えば、油性酵母は、状態調節前に、約2のゼオライト表面積：基質表面積の比を、そして状態調節後、約8のゼオライト表面積：基質表面積の比を有しうる。

40

**【0065】**

本明細書中の方法を行いうる微生物は、制約されるものではないが、藻類、真菌、及び細菌を含む。例えば、適した真菌は、油性酵母、例えばRhodotorula、Pseudozyma、又はSporidiobolus属に属するものを含みうる。

**【0066】**

ある態様によれば、酵母は、Sporidiobolus属に属する。具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12508(MK29404(Dry 1-13J)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、

50

開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12509(MK29404(Dry1-182J)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12510(MK29404(Dry1-173N)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12511(MK29404(Dry55)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12512(MK29404(Dry41)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12513(MK29404(Dry1)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12515(MK29404(Dry1-147D)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12516(MK29404(Dry1-72D)株)に対応する微生物である。

10

#### 【0067】

他の態様において、酵母は、Rhodotorula ingeniosa属に属する。具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12506(MK29794(KDry16-1)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12507(MK29794(KDry7)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12514(MK29794(K200Dry1)株)に対応する微生物である。もう一つの具体的な態様において、開示される微生物は、ATCC寄託番号PTA-12517(MK29794(33Dry1)株)に対応する微生物である。

20

#### 【0068】

再生可能な材料は、制約されるものではないが、水性抽出技術(例えばpH調節)、溶媒抽出技術(例えば極性又は非極性)、及び機械的抽出技術を含む各種の処理のいずれか一つ又はそれより多くを使用して、細孔を経由して微生物から除去しうる。細孔又は透過性の増加をもたらす抽出法の一つの例を図1に例示する。機械的抽出技術又は機械的処理の例は、押し出し、プレス、射出、等を含む。機械的破壊デバイス、例えばホモジナイザー、ビーズミル、高剪断力混合器、プレス機、押し出し機、加圧破壊機、湿式ミル、乾式ミル、等も、微生物から再生可能な材料を除去し、そして少なくとも実質的にインタクトな細胞壁を伴う細胞の残骸をもたらすことを援助するために使用しうる。ある態様によれば、溶媒抽出技術は、機械的破壊デバイスの使用を排除しうる。

30

#### 【0069】

本明細書中に記載されるように微生物を状態調節することによって、状態調節された微生物の抽出収率は、状態調節されない微生物より顕著に改善されうる。ある態様によれば、重量基準で少なくとも約50パーセントの再生可能な材料を含む微生物は、除去処理の結果として、細孔を通過する少なくとも約50重量パーセントの再生可能な材料を有しうる。例えば、抽出前に少なくとも約50重量パーセントの脂質を含む油性酵母は、少なくとも約50重量パーセントの細孔を通して除去される脂質を有しうる。ある態様によれば、脱脂された酵母は、約20重量パーセントより少ない細胞中に残る脂質を有しうる。

40

#### 【0070】

微生物の多孔性及び透過性を測定するために使用することができる幾つかの技術が存在し、それは以下を含む：蛍光染料及びフローサイトメトリー(例えば二酢酸フルオレセイン及び臭化エチジウム)、外部プローブ分子(例えばグリコール及びポリグリコール)による微生物の篩特性の測定、冷凍乾燥微生物のヘリウム置換及び窒素吸着、ポリカチオンアッセイ(例えば260nmにおけるDEAE-デキストランの吸光度の測定)、及びHPGEL濾過。

#### 【0071】

記載される微生物の性能を特徴づけるために使用される一つの測定基準は、脂肪酸抽出

50

性 (fatty acid extractability)、又は FAE である。本開示による微生物のいずれかの FAE は、以下の式によって計算することができる：

【0072】

【数1】

$$\frac{\ell}{b \times C_{\text{バイオマス}}} = 1 - \left( \frac{c_{\text{バイオミル}} \times (100 - C_{\text{バイオマス}})}{C_{\text{バイオマス}} \times (100 - c_{\text{バイオミル}})} \right)$$

【0073】

式中、b は、状態調節及び除去の工程後の全バイオマスであり、典型的にはグラムで測定され；

C<sub>バイオマス</sub> は、状態調節及び除去の工程に先立つ FAME のパーセントであり、C<sub>バイオマス</sub> は、FAME の全グラムをバイオマスの全グラムで割ったものとして計算され；用語 “FAME” は、本明細書中で使用される場合、脂肪酸メチルエステル (fatty acid methyl ester) を指し；

c<sub>バイオミル</sub> は、状態調節及び除去の工程後の FAME のパーセントであり、c<sub>バイオミル</sub> は、FAME の全グラムをバイオミルの全グラムで割ったものとして計算され；そして

1 は、状態調節及び除去の工程後の、しかし油回収工程に先立つ油の全質量であり、典型的にはグラムで測定される。

【0074】

ある態様によれば、本明細書中に記載される方法は、微生物の油又は脂肪酸抽出性指数の増加をもたらしうる。例えば、この方法は、少なくとも約 10 重量パーセントの微生物の FAE 指数の増加をもたらしうる。ある態様によれば、FAE 指数の増加は、少なくとも約 20 重量パーセント、少なくとも約 30 重量パーセント、又は少なくとも約 40 重量パーセントでありうる。

【0075】

ある態様によれば、ヘキサンによる油回収後、油の質量 (L) が測定される。ヘキサンによる油回収後の FAME もさらに測定される。ある態様において、FAME 測定に先立ち、当技術において既知の真空蒸発が試料に対して行われる。

【0076】

本開示による微生物のいずれかの油抽出収率は、以下の式によって計算することができる：

【0077】

【数2】

$$100 \times \frac{L \times C_{\text{油}}}{B \times C_{\text{バイオマス}}}$$

【0078】

式中、B は、状態調節及び除去の工程に先立つ全バイオマスであり、典型的にはグラムで測定され；

C<sub>バイオマス</sub> は、状態調節及び除去の工程に先立つ FAME のパーセントであり、C<sub>バイオマス</sub> は、FAME の全グラムをバイオマスの全グラムで割ったものとして計算され；

C<sub>油</sub> は、状態調節及び除去並びに油回収の工程後の FAME のパーセントであり、C<sub>油</sub> は、FAME の全グラムを油の全グラムで割ることによって計算され；そして

L は、状態調節及び除去並びに油回収の工程後の油の全質量であり、典型的にはグラムで測定される。微生物又は発酵プロセスからこれらの測定値を得ることは、当業者の能力の範囲内である。

【0079】

ある態様によれば、本明細書中に記載される方法は、微生物の油抽出収率の増加をもたらしうる。例えば、この方法は、少なくとも約 10 重量パーセントの微生物の油抽出収率

10

20

30

40

50

の増加をもたらしうる。ある態様によれば、油抽出収率の増加は、少なくとも約20重量パーセント、少なくとも約30重量パーセント、又は少なくとも約40重量パーセントでありうる。

#### 【0080】

油回収指数は、油抽出性に対する油抽出収率の比である。ある態様によれば、本明細書中に記載される方法は、少なくとも約10重量パーセントの油回収指数の増加をもたらしうる。ある態様によれば、油回収指数の増加は、少なくとも約20重量パーセント、少なくとも約30重量パーセント、又は少なくとも約40重量パーセントでありうる。

#### 【0081】

細胞壁の状態調節及び細孔を通した再生可能材料の除去により、細胞壁は、少なくとも実質的にインタクトなままでありうる。ある態様によれば、個数基準で、細胞壁の少なくとも約10パーセント、少なくとも約20パーセント、少なくとも約30パーセント、少なくとも約40パーセント、少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセント、少なくとも約90パーセント、又は少なくとも約95パーセントが、少なくとも実質的にインタクトなままである。ある態様によれば、個数基準で、細胞壁の約50パーセントないし約80パーセントがインタクトなままである。

10

#### 【0082】

ある態様によれば、状態調節及び除去後、微生物は、個数基準で、全細孔の少なくとも約10パーセント、少なくとも約20パーセント、少なくとも約30パーセント、少なくとも約40パーセント、少なくとも約50パーセント、少なくとも約60パーセント、少なくとも約70パーセント、少なくとも約80パーセント、又は少なくとも約90パーセントの最終メソ細孔含有率となりうる。ある態様によれば、微生物は、全細孔の約50パーセントないし約90パーセントの最終メソ細孔含有率を有する。

20

#### 【0083】

本明細書中に開示されるような再生可能な材料は、非ヒト動物又はヒトのための食品、補助食品、化粧品、又は医薬組成物の製造のために使用することができる。再生可能な材料は、次の非制約的例へと製造することができる：食品産物、医薬組成物、化粧品、及び工業的組成物。ある態様によれば、再生可能な材料は、バイオ燃料又はバイオ燃料前駆体である。

30

#### 【0084】

食品産物は、動物又はヒトの消費のためのいずれもの食品であり、そして固体及び液体組成物の両方を含む。食品産物は、動物又はヒトの食品に対する添加物ができる、そして医療食品を含む。食品は、制約されるものではないが、通常の食品；ミルク、飲み物、治療用飲料、及び栄養飲料を含む液体産物；機能性食品；補助食品；栄養補助食品；未熟児用処方を含む調整粉乳；妊娠及び授乳期女性のための食品；成人用食品；老人用食品；及び動物用食品を含む。ある態様において、本明細書中に開示される微生物、再生可能な材料、又は他の生物産物は、以下の一つ又はそれより多くの中の添加物として、直接使用されるか、又は含まれることができる：油、ショートニング、スプレッド、他の脂肪成分、飲み物、ソース、酪農食品又は大豆食品（例えばミルク、ヨーグルト、チーズ及びアイスクリーム）、焼成製品、例えば栄養補助食品（カプセル又は錠剤の形態の）としての栄養分産物、ビタミン補助食品、食餌補助食品、粉末飲料、完成又は半完成粉末食品産物、及びこれらの組合せ。

40

#### 【0085】

先に記述したように、再生可能な材料は、バイオ燃料又はバイオ燃料前駆体でありうる。さらに具体的には、再生可能な材料は、脂質、有機酸、アミノ酸、アルコール、エステル、アルカン、アルケン、オレフィン、パラフィン、ワックス、又はこれらのいずれもの組合せを含みうる。ある態様によれば、再生可能な材料は、実質的に極性な材料、又は実質的に非極性な材料を含みうる。ある態様によれば、隔壁、相、又は層は、非極性の再生可能な材料から、極性な再生可能な材料を分離しうる。

50

## 【0086】

バイオ燃料を製造するための方法も、さらに本明細書中に含まれる。ある態様によれば、バイオ燃料を製造するための方法は、酵母を糖で培養して、酵母の細胞壁中に脂質を集積させ；酵母を状態調節して、細胞壁中の細孔を形成し又は拡大し；細胞壁中の細孔を通して脂質を除去し；酵母から脂質を分離し；そして脂質をバイオ燃料に転換することを含む。脂質は、例えば、水素処理又はエステル転移反応の使用によりバイオ燃料に転換される。バイオ燃料を製造するための混合物は、実質的にインタクトな細胞壁をもつ脱脂された油性微生物、及び脂質物質を含みうる。

## 【0087】

ある態様によれば、本発明は、バイオ燃料を製造するための製造施設に向けられる。ある態様によれば、製造施設は、脂質集積装置、及び脂質集積装置と流体連通している脂質抽出装置を含みうる。脂質抽出装置は、細胞状態調節デバイス及び脂質分離デバイスを含みうる。細胞状態調節デバイスは、熱伝達機器の一つ又はそれより多い要素を含みうる。脂質分離デバイスは、抽出機器の一つ又はそれより多い要素を含みうる。

10

## 【0088】

ある態様によれば、本発明は、脱脂された微生物、再生可能な材料、及び／又は本明細書中に記載される方法のいずれかによって製造されるバイオ燃料に向けられる。

## 【実施例】

## 【0089】

実施例1

20

この実験において、微生物M K 2 9 4 0 4 - D r y 1は、スクロース限定培地の発酵プロス中にあった。状態調節工程中に、発酵プロスを80℃で3時間加熱してから、微生物を含有するプロスをドラム乾燥させた。除去工程中に、ドラム乾燥させた材料を、その後ヘキサン中に1:5と1:12(油:ヘキサン)との間の比で、いずれもの攪拌を伴わずに、室温で30分から1日の間浸漬した。これは、残留バイオマスを分析し、そして溶媒中に溶解された油の量を決定することによって決定された33パーセントと43パーセントの間の油抽出性をもたらした。この材料を、顕微鏡下で観察し、そして細胞の95パーセントより多くが、インタクトである、即ち細胞破壊がないように見受けられた。

## 【0090】

実施例2

30

この実施例において、微生物M K 2 9 4 0 4 - D r y 1は、スクロース限定培地の発酵プロス中にあった。状態調節工程中に、微生物を含有するプロスを、ビーズミルを通して380ml/分で3回加工した(3回通過)。除去工程中に、材料の試料を乾燥(冷凍乾燥器を使用)させ、そして油抽出性について分析した。乾燥試料(3g)を(30ml)ヘキサンで洗浄し、そして試料の脂肪含有量を決定することによって決定された油抽出性は、概略85パーセントの油抽出性をもたらした。

## 【0091】

実施例3

40

この実施例において、微生物M K 2 9 4 0 4 - D r y 1は、スクロース限定培地の発酵プロス中にあった。状態調節工程中に、発酵プロスを80℃で1時間加熱してから、付加的高温前処理をした。発酵プロスの一部(80リットルの発酵プロスの10リットル)の高温前処理は、摂氏121度で4時間行った。除去工程中に、材料の試料を乾燥(冷凍乾燥器を使用)させ、そして油抽出性について分析した。乾燥試料(3g)を(30ml)ヘキサンで洗浄し、そして試料の脂肪含有量を決定することによって決定された前処理された発酵プロスの油抽出性は、>76パーセントであり、これは、実施例1の試料に対して改善されていた。

## 【0092】

次いで、前処理された発酵プロスを、ビーズミルを380ml/分の速度で通過させ(1回通過)、得られた試料は>93パーセントの油抽出性を有していた。実施例1のように、視覚検査では、細胞は、ビーズミルによる加工に先立ち全細胞であるように見受けら

50

れた。

**【0093】**

試料が3回通過ではなく1回通過を受けたことから、高い油抽出性がより少ない機械的破壊により達成されたので、この実施例の方法も実施例2に対して改善されている。

**実施例4**

この実施例において、低温殺菌した全細胞の酵母バイオマスの三つの試料を、状態調節し、そして比較した。それぞれの試料を、分析の何日も前に除去し、そしてそれぞれの試料を四つの精製工程にかけた。微孔分析のためにアルゴンを使用した(87.3度ケルビンで)。表1に、当該三つの試料それぞれについての、抽出可能な油(Ex.Oil)、 $m^2/gm$ の全比表面積(total specific surface area)(TSA)、 $m^2/gm$ の基質(メソ細孔)比表面積(matrix specific surface area)(MSA)、 $m^2/gm$ のゼオライト(マイクロ細孔)比表面積(zeolite specific surface area)(ZSA)、ゼオライト表面積/基質表面積の比(Z/M)、及びゼオライト表面積/全表面積の比(Z/TSA)を含むデータを提供する。

**【0094】**

**【表1】**

表1: 状態調節後のバイオマスの評価

	処理	Ex.Oil	TSA	MSA	ZSA	TPV	Z/M	Z/TSA
1	80°C, 3 時間	40%	10.696	1.052	9.644	0.0067	9.17	0.90
2	121°C, 4 時間	54%	9.11	0.672	8.429	0.0035	12.54	0.93
3	121°C, 4 時間	85%	14.249	0.72	13.53	0.0035	18.79	0.95

**【0095】**

表1に示すように、それぞれの事例において、状態調節された試料のゼオライト表面積/基質表面積の比は、8よりも高かった。

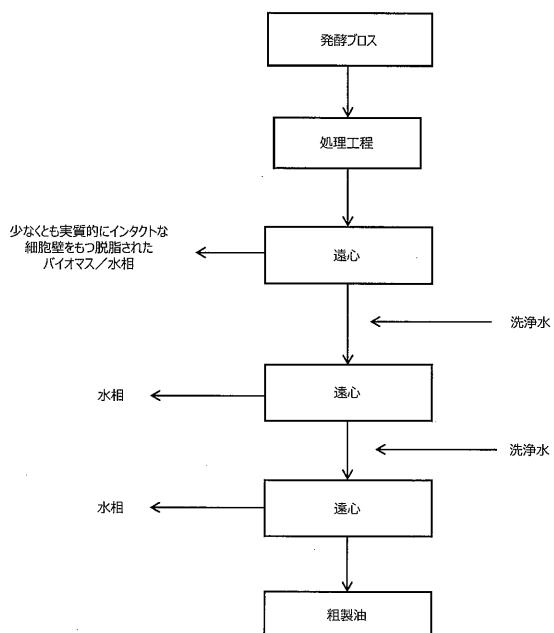
当業者にとって、開示された構造及び方法に、本発明の範囲及び思想から逸脱することなく各種の改変及び変更を行うことができるることは明白である。特に、いずれか一つの態様の記載を、記載又は他の態様と自由に組み合わせて、二つ又はそれより多い要素又は制約の組合せ及び/又は変更をもたらすことができる。本発明の他の態様は、本明細書中に開示される本発明の明細書及び実行を考慮して、当業者にとって明白となる。明細書及び実施例は、例示のみと考えられ、本発明の真の範囲及び思想は、以下の特許請求の範囲によって示されることは意図されている。

10

20

30

## 【図1】



## 【手続補正書】

【提出日】平成27年3月4日(2015.3.4)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

微生物からの再生可能材料の分離のための方法であって：

再生可能な材料を含有する微生物の細胞壁を状態調節して、細孔を形成し、開口し又は拡大し；そして

細孔を通して再生可能な材料の少なくとも一部を除去すること；  
を含んでなる、前記方法。

## 【請求項2】

細胞壁が、少なくとも実質的にインタクトのままである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

微生物が、油性酵母を含んでなる、請求項1又は2に記載の方法。

## 【請求項4】

油性酵母が、Rhodotorula、Pseudozyma、又はSporidiobolus属に属する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項5】

状態調節が、摂氏約120度における約4時間の熱的処理を含んでなる、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項6】

除去することが、ホモジナイザー、ビーズミル、高剪断力混合器、又はこれらのいずれの組合せを含んでなる機械的破壊デバイスの使用を含んでなる、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

微生物が、重量基準で少なくとも約20パーセントの再生可能な材料を含んでなり；そして

重量パーセント基準で、再生可能な材料の少なくとも約50パーセントが、除去の工程中に細孔を通して通過する；

請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

状態調節後、個数基準で、全細孔の少なくとも50パーセントが、メソ細孔で構成される、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項の方法によって製造される脱脂された微生物。

【請求項10】

個数基準で、細胞壁の少なくとも約50パーセントが、少なくとも実質的にインタクトなままである、請求項9に記載の脱脂された微生物。

【請求項11】

油性酵母からの脂質の抽出のための方法であって：

油性酵母を熱的処理によって状態調節して、細胞壁の多孔性を増加させ；そして

実質的にインタクトな細胞壁をもつ油性酵母から脂質を除去すること；  
を含んでなる、前記方法。

【請求項12】

油性酵母が、抽出前に、少なくとも約50重量パーセントの脂質を含んでなる、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

除去することが、油性酵母から脂質の少なくとも約50重量パーセントを除去することを含んでなる、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項14】

個数基準で、形成された全細孔の少なくとも約50パーセントがメソ細孔である、請求項11～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

熱的処理が、摂氏約80度より上の温度、少なくとも約10分の時間、及び約2～約14のpHの範囲を含んでなる、請求項11～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

バイオ燃料の製造のための方法であって：

酵母を糖で培養して、酵母の細胞壁中に脂質を集積させ；

酵母を状態調節して、細胞壁中に細孔を形成し、又はそれを拡大し；

細胞壁中の細孔を通して脂質を除去し；

酵母から脂質を分離し；そして

脂質をバイオ燃料に転換すること；

を含んでなる、前記方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2013/048532

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12N1/06 C12P7/64  
ADD.

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)  
C12N C12P

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/061647 A2 (SOLAZYME INC [US]; FRANKLIN SCOTT [US]; LU WENHUA [US]; RAKITSKY WALTE) 10 May 2012 (2012-05-10) paragraphs [0263], [0265], [0272]; table 1 -----	1-16
A	SERAPHIM PAPANIKOLAOU ET AL: "Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications", EUROPEAN JOURNAL OF LIPID SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 113, no. 8, 15 August 2011 (2011-08-15), pages 1052-1073, XP055078398, ISSN: 1438-7697, DOI: 10.1002/ejlt.201100015 the whole document -----	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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 application or patent 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

10 September 2013

17/09/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Voorst, Frank

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/048532

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2012061647	A2	10-05-2012	AU 2011323288 A1	30-05-2013
			CA 2816125 A1	10-05-2012
			CN 103282473 A	04-09-2013
			EP 2635663 A2	11-09-2013
			SG 190154 A1	28-06-2013
			US 2012119862 A1	17-05-2012
			WO 2012061647 A2	10-05-2012

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 10 L 1/02 (2006.01)	C 12 N 1/20	A
	C 12 N 1/14	E
	C 10 L 1/02	

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

(74) 代理人 100117813

弁理士 深澤 憲広

(74) 代理人 100188374

弁理士 一宮 維幸

(72) 発明者 セラーズ, マーティン・ジョン

アメリカ合衆国イリノイ州 60563, ネイパーウィル, ウエスト・ワレンヴィル・ロード 150, エムシー 200-1ダブリュー

(72) 発明者 ジェファーズ, デーヴィッド

アメリカ合衆国イリノイ州 60563, ネイパーウィル, ウエスト・ワレンヴィル・ロード 150, エムシー 200-1ダブリュー

(72) 発明者 デュメニル, ジャン-シャルル

アメリカ合衆国イリノイ州 60563, ネイパーウィル, ウエスト・ワレンヴィル・ロード 150, エムシー 200-1ダブリュー

(72) 発明者 パイ, ヴィディヤ

アメリカ合衆国イリノイ州 60563, ネイパーウィル, ウエスト・ワレンヴィル・ロード 150, エムシー 200-1ダブリュー

(72) 発明者 ボーデン, ジェイコブ

アメリカ合衆国イリノイ州 60563, ネイパーウィル, ウエスト・ワレンヴィル・ロード 150, エムシー 200-1ダブリュー

F ターム(参考) 4B064 AD85 CA06 CC15 CE08 CE20 DA20

4B065 AA72X AC14 BD08 BD10 BD16 BD50 CA13 CA60

4H013 BA02