

(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2013-523157  
(P2013-523157A)

(43) 公表日 平成25年6月17日(2013.6.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 B	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/405 (2006.01)	C 0 7 K 14/405	4 H 0 4 5
C 0 7 K 1/30 (2006.01)	C 0 7 K 1/30	
C 0 7 K 1/14 (2006.01)	C 0 7 K 1/14	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2013-503889 (P2013-503889)  
 (86) (22) 出願日 平成23年4月6日 (2011.4.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年10月5日 (2012.10.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/031408  
 (87) 国際公開番号 W02011/127161  
 (87) 国際公開日 平成23年10月13日 (2011.10.13)  
 (31) 優先権主張番号 61/321, 286  
 (32) 優先日 平成22年4月6日 (2010.4.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/321, 290  
 (32) 優先日 平成22年4月6日 (2010.4.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512258986  
 ヘリアエ デベロップメント、 エルエル  
 シー  
 アメリカ合衆国 85297 アリゾナ州  
 ギルバート イースト ジャーマン ロ  
 ード 614  
 (74) 代理人 100079049  
 弁理士 中島 淳  
 (74) 代理人 100084995  
 弁理士 加藤 和詳  
 (74) 代理人 100085279  
 弁理士 西元 勝一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 塩水藻類からのタンパク質の選択的抽出

(57) 【要約】

藻類バイオマスまたは藻類培養物から藻類タンパク質を選択的に抽出および分画するための方法が開示される。藻類バイオマスから生成物を選択的に除去する方法は、藻類タンパク質の効率的な分離を可能にする単一および多工程抽出プロセスを提供する。このタンパク質は、動物原料およびヒト用食物のためのタンパク質の再生可能資源として用いることができる。さらに、タンパク質の抽出後に藻類バイオマス中に残存する脂質は、再生可能燃料を生成するのに用いることができる。

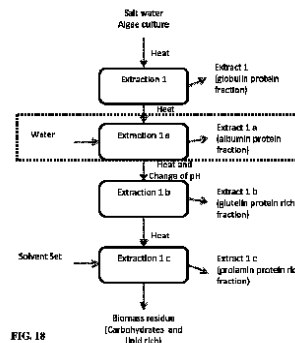


FIG. 18



塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物は、加熱および混合の少なくとも一部の間、約50 で維持される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

実質的に無傷の藻細胞から構成される塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物からアルブミンタンパク質を選択的に抽出する方法であって：

- a. 塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を加熱および混合して、アルブミンタンパク質が富化された加熱された略液相および加熱された略固相を生成することと；
- c. アルブミンタンパク質が富化された加熱された略液相の少なくとも一部を加熱された略固相から分離することと

を含む方法。

10

【請求項11】

塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物および水の混合物は、加熱および混合の少なくとも一部の間、約50 で維持される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

溶媒セットは、エタノールを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

溶媒セットは、アルコールを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

溶媒セットは、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリルからなる群から選択される少なくとも1つの溶媒を含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項15】

溶媒セットは、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリルからなる群から選択される少なくとも1つの溶媒を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項16】

溶媒セットは、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリルからなる群から選択される少なくとも1つの溶媒を含む、請求項7に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対するクロスリファレンス

この出願は、「Extraction with Fractionation of Oil and Proteinaceous Material from Oleaginous Material」のタイトルで2010年4月6日に提出された米国仮出願第61/321,290号および「Extraction with Fractionation of Oil and Co-Products from Oleaginous Material」のタイトルで2010年4月6日に提出された米国仮出願第61/321,286号の利益を主張し、その全内容は、ここでの参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

本発明は、限定されないが、油およびタンパク質を含めた藻類生成物を抽出および分画することに関する。より具体的には、本明細書に記載されているシステムおよび方法は、湿潤藻類バイオマスを処理するための、僅かに非極性の溶媒による段階抽出および分画を利用する。

【背景技術】

【0003】

50

石油は、主に炭化水素から構成される天然資源である。地球からの石油の抽出は、高価であり、危険であり、そして、しばしば環境を犠牲にしている。さらに、世界中の石油貯留層は、急速に減少している。また、石油をガソリンおよびジェット燃料などの有用な燃料に変換するのに必要な輸送ならびに処理に起因してコストも蓄積する。

#### 【0004】

藻類は、その脂質を生産する能力から近年かなり重要性を高めており、持続可能なバイオ燃料を生成するのに用いられ得る。この能力は、再生可能燃料を生成し、世界的な気候変化を低減し、廃水処理することに活用され得る。バイオ燃料の原料としての藻類の優位性は、典型的な陸生の油性作物と比較して高い、1エーカーあたりの生産性、非食品系原料資源、さもなければ非生産性、非耕地性の耕地、広範な水源（未使用の汽水性の食塩水、および廃水）の利用、バイオ燃料ならびにカロテノイドおよびクロロフィルなどの有価副産物の両方を含めた種々の因子から生じる。

10

#### 【0005】

数千種の藻類が、世界中で過去数十年にわたって脂質生産について審査および研究されてきた。中でも、脂質生産に富む約300種が確認されている。脂質の組成および含量は、ライフサイクルの種々の段階で変動し、環境および培養条件によって影響される。抽出のための戦略およびアプローチは、生化学的組成の大幅な変動および藻類細胞壁の物理的特性のために、使用される個々の藻類種/株に応じてずいぶん異なる。従来の物理的抽出プロセス、例えば押出は、藻細胞の細胞壁の厚さおよび小さなサイズ（約2~約20nm）を考えると、藻類とはうまく合わない。さらに、種子から回収される典型的な油と比較したときの藻油中の多量の極性脂質が、精製の問題をもたらす。

20

#### 【0006】

採取の際、培養物中の典型的な藻類濃度は、約0.1~1.0%（w/v）の範囲である。これは、藻類単位重量あたりの水の量の1000倍もが、企図する油抽出の前に除去されなければならないことを意味している。現在、油性材料のための既存の油抽出法は、抽出される油の収率および量を改善するために、ほぼ完全に乾燥したフィードを厳密には必要とする。藻塊を加熱して十分に乾燥させるのに必要なエネルギー量に起因して、バイオ燃料プロセスへの藻類フィードは非経済的になる。典型的には、フィードは、高温で押出またはフレーク状にされて、抽出を高める。これらの工程は、藻類の単細胞のマイクロメータの性質に起因した既存の要件とは連動し得ない。さらに、藻油は、二重結合の長鎖脂肪酸の存在に起因して非常に不安定である。従来の抽出法で用いられた高温は、油の劣化を引き起こし、これにより、かかる方法のコストを増加させる。

30

#### 【0007】

溶媒としてヘキサンを用いることにより、乾燥した藻塊から油を抽出することが当該分野において公知である。このプロセスは、エネルギーを大量消費する。乾燥のための熱および抽出のためのヘキサンの使用は、このタイプの処理が脂質およびタンパク質の劣化を引き起こすに従って、より低量の生成物を生成する。

#### 【0008】

藻油の抽出は、2つのタイプ：破壊的または非破壊的方法に分類され得る。

#### 【0009】

破壊的方法は、機械的、熱的、酵素的または化学的方法により細胞株が関与する。大部分の破壊的方法はエマルジョンを生じ、高価なクリーンアッププロセスを必要とする。藻油は、高い百分率の、極性脂質と中性脂質の乳化を高めるタンパク質とを含有する。乳化は、溶液中に残る栄養および塩成分によってさらに安定化される。エマルジョンは、中性脂質、極性脂質、タンパク質、および他の藻類生成物を含有する複合混合物であり、大規模な精製プロセスは、バイオ燃料に変換されるフィードである中性脂質を単離する。

40

#### 【0010】

非破壊的方法は、低収率を与える。ミルクングとは、成長している藻類培養物から脂質を抽出するための、溶媒または化学物質の使用のことである。藻類生成物を抽出するのに用いられることがある一方で、ミルクングは、溶媒毒性および細胞壁破壊に起因してある

50

種の藻類と連動し得ない。この複雑さは、全体的プロセスの開発を困難にする。さらに、必要とされる溶媒の体積は、培地中の達成可能な最大溶媒濃度に起因して桁外れに大きい。

【0011】

多相抽出は、複合溶媒混合物を用い、溶媒の回収およびリサイクルのためのメカニズムが必要となる大規模な蒸留を必要とする。このことは、かかる抽出を藻油技術での使用に関して非実用的および非経済的なものにする。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、これらの欠点を克服するために、藻類生成物、特に、藻油、藻類タンパク質、および藻類カロテノイドを抽出および分画するための改善された方法およびシステムが当該分野で必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本明細書に記載されている実施形態は、例えば、藻類バイオマスを含めた油性材料から様々な極性の脂質を抽出するためのシステムおよび方法に一般に関する。特に、本明細書に記載されている実施形態は、種々な極性の溶媒および/または直列の膜フィルタを用いて藻類バイオマスから種々な極性の脂質を抽出することに関する。いくつかの実施形態において、フィルタは、マイクロフィルタである。

【0014】

本発明のいくつかの実施形態において、単一の溶媒および水が用いられて、油性材料中に存在する成分を抽出および分画する。他の実施形態において、これらの成分は、限定されないが、タンパク質、極性脂質、および中性脂質を含む。さらに他の実施形態において、1種を超える溶媒が用いられる。さらに他の実施形態において、溶媒の混合物が用いられる。

【0015】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている方法およびシステムは、油性材料から脂質の副産物を抽出するのに有用である。かかる副産物の例として、非限定的には、タンパク質性材料、クロロフィル、およびカロテノイドが挙げられる。本発明の実施形態は、燃料および栄養生成物の両方の生産を可能にするように藻類バイオマスからの藻類生成物の同時の抽出および分画を可能にする。

【0016】

本発明の一実施形態では、塩水藻類からのタンパク質の選択的抽出のための方法が提供される。

【0017】

本発明の別の実施形態において、実質的に無傷の藻細胞から構成される塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物から藻類タンパク質を選択的に抽出する方法は、塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を加熱および混合して、第1グロブリンタンパク質が富化された第1の略液相、および第1略固相から構成される第1の加熱された抽出混合物を生成することと；グロブリンタンパク質が富化された第1略液相の少なくとも一部を第1略固相から分離することと；第1固相を水と混合し加熱して、アルブミンタンパク質で富化された第2略液相および第2略固相から構成される第2の加熱された抽出混合物を生成することと；アルブミンタンパク質が富化された第2略液相の少なくとも一部を第2略固相から分離することと；第2略固体相を水と混合し加熱して、第3略液相および第3略固相から構成される第3の加熱された抽出混合物を生成することと；第3の加熱された抽出混合物のpHを上昇させて、第3略液相をグルテリンタンパク質によって富化することと；グルテリンタンパク質で富化された第3略液相の少なくとも一部を第3略固相から分離することと；第3略固相を加熱し溶媒セットと混合して、プロラミンタンパク質が富化された第4略液相および第4略固相から構成される第4の加熱された抽出混合物を生成すること

10

20

30

40

50

と；プロラミンタンパク質が富化された第4略液相の少なくとも一部を第4略固相から分離することを含む。本発明のいくつかの態様において、分離工程のうちのいずれか1つ以上が、遠心分離、濾過、浮遊、および沈降からなる群から選択される少なくとも1つの方法によって実施される。本発明の他の態様において、第1、第2、第3、および第4の加熱された抽出混合物のうち少なくとも1つが、分離の前に、選択された時間、加熱温度で維持される。本発明のさらに他の態様において、第1、第2、第3、および第4の加熱された抽出混合物のうち少なくとも1つが、約20～約60分の間、加熱温度で維持される。本発明のなお他の態様において、第1、第2、第3、および第4の加熱された抽出混合物のうち少なくとも1つが、約45～約90分の間、加熱温度で維持される。本発明のいくつかの態様において、第1、第2、第3、および第4の加熱された抽出混合物のうち少なくとも1つが、約50 で維持される。さらに他の態様において、第4略固相は、脂質リッチである。本発明の他の態様において、溶媒セットは、エタノールを含む。本発明のさらに他の態様において、溶媒セットは、アルコールを含む。

10

20

30

40

50

#### 【0018】

本発明の別の実施形態において、実質的に無傷の塩水藻細胞から構成される藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物からグロブリンタンパク質を選択的に抽出する方法は、塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を加熱および混合して、グロブリンタンパク質が富化された加熱された液相、および加熱された略固相を生成することと；グロブリンタンパク質が富化された加熱された略液相の少なくとも一部を加熱された略固相から分離することを含む。本発明のいくつかの態様において、塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物は、加熱および混合の少なくとも一部の間、約50 で維持される。

#### 【0019】

本発明の別の実施形態において、実質的に無傷の藻細胞から構成される塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物からアルブミンタンパク質を選択的に抽出する方法は、塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を加熱および混合して、アルブミンタンパク質が富化された加熱された略液相および加熱された略固相を生成することと；アルブミンタンパク質が富化された加熱された略液相の少なくとも一部を加熱された略固相から分離することを含む。本発明のいくつかの態様において、塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物および水の混合物は、加熱および混合の工程の少なくとも一部の間、約50 で維持される。本発明のいくつかの実施形態において、溶媒セットは、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリルからなる群から選択される少なくとも1種の溶媒を含む。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0020】

【図1A】図1Aは、本開示の例示的な実施形態による方法に含まれる工程のフローチャートである。

【図1B】図1Bは、本開示による脱水プロセスの例示的な実施形態の概略図である。

【図2】図2は、本開示による抽出システムの例示的な実施形態の概略図である。

【図3】図3は、最大の非破壊的藻類油抽出効率を示す全極性範囲を包含した一連の溶媒を用いた、凍結乾燥された藻類バイオマスの Soxhlet 抽出、ならびに極性が極性および非極性脂質抽出に及ぼす効果を示す比較グラフである。

【図4A】図4AおよびBは、メタノールおよび石油エーテルを3つの異なる温度で用いる2段階溶媒抽出プロセスにおける中性脂質の(A)純度および(B)回収を示すグラフ表示である。

【図4B】図4AおよびBは、メタノールおよび石油エーテルを3つの異なる温度で用いる2段階溶媒抽出プロセスにおける中性脂質の(A)純度および(B)回収を示すグラフ表示である。

【図5A】図5AおよびBは、水性メタノールおよび石油エーテルを3つの異なる温度で用いる2段階溶媒抽出プロセスにおける中性脂質の(A)純度および(B)回収を示すグラフ表示である。

【図5B】図5AおよびBは、水性メタノールおよび石油エーテルを3つの異なる温度で用いる2段階溶媒抽出プロセスにおける中性脂質の(A)純度および(B)回収を示すグラフ表示である。

【図6】図6は、水性メタノールおよび石油エーテルを3つの異なる温度で用いる2段階溶媒抽出プロセスにおける脂質回収を示すグラフである。

【図7】図7は、溶媒対固体バイオマス比が脂質回収に及ぼす効果を示すグラフである。

【図8】図8は、乾燥バイオマスでの水性メタノールの一段階抽出回収における種々の抽出水溶液の有効性を示すグラフである。

【図9】図9は、全工程のメタノール抽出が累計脂質収率および中性脂質純度に及ぼす効果を示すグラフである。

【図10】図10は、湿潤バイオマスおよびエタノールを用いた脂質の累積回収を示すグラフである。

【図11】図11は、マイクロ波アシスト抽出および従来の抽出システムの抽出時間の比較を示すグラフである。

【図12A】図12Aは、タンパク質抽出工程を組み込んだ本開示の例示的な実施形態による方法に含まれる工程のフローチャートである。図12Aにおける全ての単位はポンドである。

【図12B】図12Bは、本開示による例示的な抽出プロセスに含まれる工程のフローチャートである。

【図13】図13は、中性脂質、極性脂質、およびタンパク質を藻類バイオマスから分離するために1000lbs.の藻類バイオマスが抽出および分画を経て処理される本発明の実施形態の1つを記載するフローチャートおよびマスバランス図である。

【図14】図14は、藻塊が処理されて種々の生成物を形成することができる本発明の実施形態の1つを記載するフローチャートである。

【図15】図15は、藻類の中性脂質が処理されて種々の生成物を形成する本発明の実施形態の1つを記載するフローチャートである。

【図16】図16は、藻類の中性脂質が処理されて燃料生成物を形成する本発明の実施形態の1つを記載するフローチャートである。

【図17】図17は、藻類タンパク質が淡水藻類バイオマスから選択的に抽出される本発明の実施形態の1つを記載するフローチャートである。

【図18】図18は、藻類タンパク質が塩水藻類バイオマスから選択的に抽出される本発明の実施形態の1つを記載するフローチャートである。

【図19】図19は、選択された藻類タンパク質が塩水または淡水藻類バイオマスから抽出される本発明の実施形態の1つを記載するフローチャートである。

【図20】図20は、選択された藻類タンパク質が塩水または淡水藻類バイオマスから抽出される本発明の実施形態の1つを記載するフローチャートである。

【図21】図21は、本明細書において記載されている方法を用いた抽出前後のイカダモ種の細胞を示す写真である。細胞は、抽出の前後両方において実質的に無傷である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

詳細な説明  
定義

用語「導管」またはその任意の変形体は、本明細書において用いられるとき、流体が搬送され得るあらゆる構造を含む。導管の非限定的な例として、管、管類、チャンネル、または他の密閉構造が挙げられる。

【0022】

用語「貯留層」またはその任意の変形体は、本明細書において用いられるとき、流体を保持することが可能であるあらゆる本体構造を含む。貯留層の非限定的な例として、池、タンク、湖、タブ、または他の同様の構造が挙げられる。

【0023】

10

20

30

40

50

用語「約」または「およそ」は、本明細書において用いられるとき、当業者によって理解されているようにほぼ定義され、1つの非限定的な実施形態において、該用語は、10%以内、好ましくは5%以内、より好ましくは1%以内、最も好ましくは0.5%以内であると定義される。

【0024】

用語「阻害する」または「低減する」あるいはこれらの用語の任意の変形例は、本明細書において用いられるとき、所望の結果を得るためのあらゆる測定可能な減少または完全な阻害を含む。

【0025】

用語「効果的」は、本明細書において用いられるとき、所望の、予測される、または意図される結果を達成するのに適切であることを意味している。

10

【0026】

語「1つの(a)」または「1つの(an)」の使用は、本明細書において用語「含む(comprising)」と併せて用いられているとき、「1つ(one)」を意味する場合があるが、「1つ以上の」、「少なくとも1つの」および「1つまたは1を超える」の意味とも一致する。

【0027】

用語「or」は、本明細書において用いられるとき、別途明確に示さない限り「および/または」を意味して代替のみを称し、または代替が互いに排他的であるが、開示は、代替のみを称する定義ならびに「および/または」を支持する。

20

【0028】

用語「湿潤」の使用は、本明細書において用いられるとき、約50%~約99.9%の水分を含有することを意味するのに用いられる。水分は、細胞内にあっても細胞外にあってもよい。

【0029】

用語「溶媒セット」の使用は、本明細書において用いられるとき、1種以上の溶媒を含む組成物を意味するのに用いられる。これらの溶媒は、両親媒性(両親媒性(両親媒性)または僅かに非極性としても知られている)、親水性、または疎水性であってよい。いくつかの実施形態において、これらの溶媒は、水混和性であり、他の場合には水に非混和性である。本発明の方法を実施するのに用いられ得る溶媒の非限定的な例として、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリル、アルカン類(ヘキサン、ペンタン、ヘプタン、オクタン)、エステル類(酢酸エチル、酢酸ブチル)、ケトン類(メチルエチルケトン(MEK)、メチルイソブチルケトン(MIBK))、芳香族類(トルエン、ベンゼン、シクロヘキサン、テトラヒドロフラン)、ハロアルカン類(クロロホルム、トリクロロエチレン)、エーテル類(ジエチルエーテル)、および混合物(ディーゼル、ジェット燃料、ガソリン)が挙げられる。

30

【0030】

用語「油」は、本明細書において用いられるとき、中性脂質および極性脂質を含有する組成物を含む。用語「藻類油」および「藻油」は、本明細書において用いられるとき、互換的に用いられる。

40

【0031】

用語「透析物」または「浸透物」は、本明細書において用いられるとき、限定されないがフィルタまたは膜を含めた分離装置を通過した材料を称し得る。

【0032】

用語「残余分」は、本明細書において用いられるとき、透析物が分離装置を通過した後に残る材料を称し得る。

【0033】

本明細書において用いられるとき、語「含む(comprising)」(および含む(comprising)の任意の形態、例えば「含む(comprise)」および「含む(comprises)」)、 「有する(having)」(および有する(hav

50



ing)の任意の形態、例えば「有する(have)」および「有する(has)」、「含む(including)」(および含む(including)の任意の形態、例えば「含む(includes)」および「含む(include)」)、または「含有する(containing)」(および含有する(containing)の任意の形態、例えば「含有する(contains)」および「含有する(contains)」)は、包含的または無制限であり、付加的な、列挙されていない要素または方法工程を排除しない。

【0034】

用語「極性脂質」またはその任意の変形体は、本明細書において用いられるとき、限定されないが、リン脂質および糖脂質を含む。

10

【0035】

用語「中性脂質」またはその任意の変形体は、本明細書において用いられるとき、限定されないが、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、カロテノイド、ワックス、ステロールを含む。

【0036】

用語「固相」は、本明細書において用いられるとき、概ねどちらかと言えば固体である材料の集合を称し、相中の全ての材料が固体であることを意味することは意図されていない。したがって、いくぶん液体を保持するが相当量の固体を有する相は、該用語の意味の範囲内に包含される。一方で、用語「液相」は、本明細書において用いられるとき、概ねどちらかと言えば液体である材料の集合を称し、かかる集合は、固体材料を含んでいてよい。

20

【0037】

用語「バイオディーゼル」は、本明細書において用いられるとき、藻類に由来する脂肪酸のメチルまたはエチルエステル類を称する。

【0038】

用語「栄養価のあるもの」は、本明細書において用いられるとき、健康上および/または医学的利益を提供する食品を称する。非限定的な例として、カロテノイド、カロテン、キサントフィル、例えば、ゼアキサントリン、アスタキサントリン、およびルテインが挙げられる。

【0039】

用語「バイオ燃料」は、本明細書において用いられるとき、生物源に由来する燃料を称する。非限定的な例として、バイオディーゼル、ジェット燃料、ディーゼル、ジェット燃料ブレンドストックおよびディーゼルブレンドストックが挙げられる。

30

【0040】

極性脂質と併せて用いられているときの用語「不純物」は、本明細書において用いられるとき、対象の生成物と同時抽出されるまたはこれと同じ特性を有する、対象の生成物以外の全ての成分を称する。

【0041】

用語「潤滑剤」は、極性脂質と併せて用いられているとき、本明細書において用いられるとき、水素処理された藻類脂質、例えば、C16~C20アルカン類を称する。

40

【0042】

用語「洗浄剤」は、極性脂質と併せて用いられているとき、本明細書において用いられるとき、糖脂質、リン脂質およびこれらの誘導体を称する。

【0043】

用語「食品添加物」は、極性脂質と併せて用いられているとき、本明細書において用いられるとき、藻類に由来する大豆レクチン代用物またはリン脂質を称する。

【0044】

用語「非グリセリン物質」は、本明細書において用いられるとき、グリセリン画分と分離するあらゆる不純物を称する。さらなるクリーンアップ工程は、医薬品グレードのグリセリンを生成するために存在するものの大部分を除去する。

50

## 【 0 0 4 5 】

用語「不飽和脂肪酸」は、本明細書において用いられるとき、少なくとも1つの二重炭素結合を有する脂肪酸を称する。不飽和脂肪酸の非限定的な例として、パルミトレイン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、オレイン酸、オクタデカン酸、リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、アラキジン酸、エイコセン酸、ホモ リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、ドコサジエン酸、ヘネイコサペンタエン酸、ドコサテトラエン酸が挙げられる。骨格中に20個以上の炭素原子を有する脂肪酸は一般に「長鎖脂肪酸」と称される。骨格中に19個以下の炭素原子を有する脂肪酸は、一般に「短鎖脂肪酸」と称される。

## 【 0 0 4 6 】

不飽和長鎖脂肪酸として、限定されないが、 $n-3$ 脂肪酸、 $n-6$ 脂肪酸、および $n-9$ 脂肪酸が挙げられる。用語「 $n-3$ 脂肪酸」は、本明細書において用いられるとき、限定されないが、表1に列挙されている脂肪酸を称する。

## 【表1】

表1

一般名	脂質名	化学名
エイコサトリエン酸 (ETE)	20:3 (n-3)	オール-シス-11, 14, 17-エイコサトリエン酸
エイコサテトラエン酸 (ETA)	20:4 (n-3)	オール-シス-8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸
エイコサペンタエン酸 (EPA)	20:5 (n-3)	オール-シス-5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸
ヘネイコサペンタエン酸 (HPA)	21:5 (n-3)	オール-シス-6, 9, 12, 15, 18-ヘネイコサペンタエン酸
ドコサペンタエン酸 (DPA)	22:5 (n-3)	オール-シス-7, 10, 13, 16, 19-ドコサペンタエン酸
クルパノドン酸	22:6 (n-3)	オール-シス-4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸
ドコサヘキサエン酸 (DHA)	24:5 (n-3)	オール-シス-9, 12, 15, 18, 21-テトラコサペンタエン酸
テトラコサペンタエン酸	24:6 (n-3)	オール-シス-6, 9, 12, 15, 18, 21-テトラコサヘキサエン酸

## 【 0 0 4 7 】

用語「ジェット燃料ブレンドストック」は、本明細書において用いられるとき、ジェット燃料としての使用に適した炭素鎖長を有するアルカン類を称する。

## 【 0 0 4 8 】

用語「ディーゼルブレンドストック」は、本明細書において用いられるとき、ディーゼルとしての使用に適した炭素鎖長を有するアルカン類を称する。

## 【 0 0 4 9 】

用語「動物飼料」は、本明細書において用いられるとき、動物に栄養補給を提供するのに消費され用いられ得る藻類由来物質を称する。

## 【 0 0 5 0 】

用語「ヒト用食物」は、本明細書において用いられるとき、人々に栄養補給を提供するのに消費され得る藻類由来物質を称する。藻類由来のヒト用食品は、必須の栄養素、例えば、炭水化物、脂肪、タンパク質、ビタミン、またはミネラルを含有し得る。

## 【 0 0 5 1 】

用語「バイオレメディエーション」は、本明細書において用いられるとき、汚染物質、例えば、限定されないが、硝酸塩、リン酸塩、および重金属を、産業廃水または一般廃水

10

20

30

40

50

から除去するための藻類成長の使用を称する。

【0052】

用語「廃水」は、本明細書において用いられるとき、限定されないが、硝酸塩、リン酸塩、および重金属を含めた種々の混入物質または汚染物質を含有する産業廃水または一般廃水を称する。

【0053】

用語「富化された」は、本明細書において用いられるとき、約50%以上の含量を意味する。

【0054】

用語「実質的(略)」は、本明細書において用いられるとき、大部分を意味する。

10

【0055】

用語「グロブリンタンパク質」は、本明細書において用いられるとき、塩可溶性タンパク質を称する。

【0056】

用語「アルブミンタンパク質」は、本明細書において用いられるとき、水溶性タンパク質を称する。

【0057】

用語「グルテリンタンパク質」は、本明細書において用いられるとき、アルカリ可溶性タンパク質を称する。

【0058】

用語「プロラミンタンパク質」は、本明細書において用いられるとき、アルコール可溶性タンパク質を称する。プロラミンタンパク質の非限定的な例は、グリアジン、ゼイン、ホルデン、アベニンである。

20

【0059】

用語「藻類培養物」は、本明細書において用いられるとき、培養培地中の藻細胞を称する。

【0060】

用語「藻類バイオマス」は、本明細書において用いられるとき、少なくとも部分的に脱水された藻類培養物を称する。

【0061】

用語「脱水された」は、本明細書において用いられるとき、すくなくともいくぶんかの水の除去を称する。

30

【0062】

用語「藻類ペースト」は、本明細書において用いられるとき、流れることを可能にする流体特性を有する部分的に脱水された藻類培養物を称する。一般に、藻類ペーストは、約90%の水分を有する。

【0063】

用語「藻類ケーキ」は、本明細書において用いられるとき、藻類ペーストの流体特性に欠き凝集する傾向にある部分的に脱水された藻類培養物を称する。一般に、藻類ケーキは、約60%以下の水分を有する。

40

【0064】

塩水藻細胞として、限定されないが、海洋および汽水性藻類種が挙げられる。塩水藻細胞は、限定されないが、海、大洋、および河口などの水辺において実際に見出される。塩水藻類種の非限定的な例として、ナンノクロロプシス属の種、ドナリエラ属の種が挙げられる。

【0065】

淡水藻細胞は、限定されないが、湖および池などの水辺において実際に見出される。淡水藻類種の非限定的な例として、イカダモ種、ハエマトコッカス属の種が挙げられる。

【0066】

本発明の方法によって用いられ得る微細藻類の非限定的な例は、以下の区分：緑色植物

50

門、藍色植物門（シアノバクテリア）、および不等毛植物門のうちの1つのメンバーである。ある一定の実施形態において、本発明の方法によって用いられる微細藻類は、以下のクラス：珪藻綱、真正眼点藻綱、および黄金色藻綱のうちの1つのメンバーである。ある一定の実施形態において、本発明の方法による微細藻類は、以下の属：ナンノクロロプシス、クロレラ、ドナリエラ、イカダモ、セレナストラム、オシラトリア、フォルミジウム、スピルリナ、アンフォラ、およびオクロモナスのうちの1つのメンバーである。

【0067】

本発明の方法によって用いられ得る微細藻類種の非限定的な例として：アクナンセス・オリエンタリス、アグメヌルム種、アンフィプロラ・ヒアリン、アンフォラ・コフェイフォルミス、アンフォラ・コフェイフォルミス・バー・リネア、アンフォラ・コフェイフォルミス・バー・プンクタタ、アンフォラ・コフェイフォルミス・バー・タヨロリ、アンフォラ・コフェイフォルミス・バー・テヌイス、アンフォラ・デリカティッシマ、アンフォラ・デリカティッシマ・バー・キャピタタ、アンフォラ属の種、アナバエナ、アンキストロデスムス、アンキストロデスムス・ファルカタス、ボエケロヴィア・ホオグランディ、ボロディネラ属の種、ボツリョコックス・ブラウニイ、ボツリョコックス・ステイクス、バクテリオコックス・マイナー、バクテリオコックス・メディオヌクレタス、カルテリア、キートケロス・グラシリス、キートケロス・ムエレリ、キートケロス・ムエレリ・バー・スプサルスム、キートケロス属の種、クラミドモナス・ペリグラヌラタ、クロレラ・アニトラタ、クロレラ・アントルクティカ、クロレラ・アウレオビリディス、クロレラ・カンジダ、クロレラ・カプスレイト、クロレラ・デシカート、クロレラ・エリブソイデア、クロレラ・エメルソニイ、クロレラ・フスカ、クロレラ・フスカ・バー・バクオレタ、クロレラ・グルコトロファ、クロレラ・インフシオナム、クロレラ・インフシオナム・バー・アクトフィラ、クロレラ・インフシオナム・バー・アウゼノフィラ、クロレラ・ケッセレリ、クロレラ・ロボフォラ、クロレラ・ルテオビリディス、クロレラ・ルテオビリディス・バー・アウレオビリディス、クロレラ・ルテオビリディス・バー・ルテスセンス、クロレラ・ミニアタ、クロレラ・ミヌティッシマ、クロレラ・ムタビリス、クロレラ・ノクツルナ、クロレラ・オヴァリス、クロレラ・パルバ、クロレラ・ファトフィリア、クロレラ・プリングシェイミイ、クロレラ・プロトセコイデス、クロレラ・プロトセコイデス・バー・アシジコラ、クロレラ・レグラリス、クロレラ・レグラリス・バー・ミニマ、クロレラ・レグラリス・バー・ウンブリカタ、クロレラ・レイシグリュイ、クロレラ・サッカロフィア、クロレラ・サッカロフィア・バー・エリブソイデア、クロレラ・サリナ、クロレラ・シンプレックス、クロレラ・ソロキニアナ、クロレラ属の種、クロレラ・スファエリカ、クロレラ・スティグマトフォラ、クロレラ・バニエリイ、クロレラ・ブルガリス、クロレラ・ブルガリス・エフ・テルティア、クロレラ・ブルガリス・バー・アウトトロフィカ、クロレラ・ブルガリス・バー・ヴィリディス、クロレラ・ブルガリス・バー・ブルガリス、クロレラ・ブルガリス・バー・ブルガリス・エフ・テルティア、クロレラ・ブルガリス・バー・ブルガリス・エフ・ヴィリディス、クロレラ・キサンテラ、クロレラ・ゾフィンジエンシス、クロレラ・ツレボウシオイデス、クロレラ・ブルガリス、クロロコッカム・インフシオナム、クロロコッカム属の種、クロロゴニウム属、クロオモナス属の種、クリソスファエラ属の種、クリコスファエラ属の種、クリプトコディニウム・コーニイ、クリプトモナス属の種、サイクロテラ・クリプティカ、サイクロテラ・メネグヒニアナ、サイクロテラ属の種、ドナリエラ属の種、ドナリエラ・バルダウシル、ドナリエラ・バイオクラタ、ドナリエラ・グラヌラテ、ドナリエラ・マリタイム、ドナリエラ・ミヌタ、ドナリエラ・パルバ、ドナリエラ・ペイルセイ、ドナリエラ・プリモレクタ、ドナリエラ・サリナ、ドナリエラ・テリコラ、ドナリエラ・テルチオレクタ、ドナリエラ・ヴィリディス、ドナリエラ・テルチオレクタ、エレモスファエラ・ヴィリディス、エレモスファエラ属の種、エリブソイデン属の種、エウグレナ種、フランセシア属の種、フラギラリア・クロトネンシス、フラギラリア属の種、グレオカプサ属の種、グロエオサムニオン属の種、ヘマトコックス・プルビアリス、ヒメノモナス属の種、イソクリシス・エーエフエフ・ガルバナ、イソクリシス・ガルバナ、レボシンクリス、ミクルアクチニウム、ミクルアク

10

20

30

40

50

チニウム、モノラフィディウム・ミヌツム、モノラフィディウム属の種、ナンノクロリス属の種、ナンノクロロプシス・サリナ、ナンノクロロプシス属の種、ナビクラ・アクセプタタ、ナビクラ・ビスカンテラエ、ナビクラ・シュードテネロイデス、ナビクラ・ペリクロサ、ナビクラ・サプロフィラ、ナビクラ属の種、ネフロクロリス属の種、ネフロセルミス属の種、ニツスチア・コムニス、ニツスチア・アレクサンドリア、ニツスチア・クロステリウム、ニツスチア・コムニス、ニツスチア・デイシパタ、ニツスチア・フルスツルム、ニツスチア・ハンツスチアナ、ニツスチア・インコンスピクア、ニツスチア・インテルメディア、ニツスチア・マイクロセファラ、ニツスチア・プシラ、ニツスチア・プシラ・エリプティカ、ニツスチア・プシラ・モノエンシス、ニツスチア・クアツラングラ、ニツスチア属の種、オクロモナス属の種、オオサイスティス・バルバ、オオサイスティス・プシラ、オオサイスティス属の種、オシラトリア・リムネティカ、オシラトリア属の種、オシラトリア・スプレヴィス、パラクロレラ・ケッセレリ、バスケリア・アシドフィラ、パプロバ属の種、フェオダクチラム・トリコヌタム、ファグス、フォルミジウム属、プラティモナス属の種、プレウロクリシス・カルテレ、プレウロクリシス・デンタテ、プレウロクリシス属の種、プロトテカ・ウィクケルハミイ、プロトテカ・スタグノラ、プロトテカ・ポルトリセンシス、プロトテカ・モリフォルミス、プロトテカ・ゾフィ、シュードクロレラ・アクアティカ、ピラミモナス属の種、ピロボツリス、ロドコッカス・オバクス、サルシノイド・クリソフィテ、セネデスムス・アルマツス、シゾシツリウム、スピロギラ、スピルリナ・プラテンシス、スチココッカス属の種、シネココッカス属の種、シネコシスティス、タゲテス・エレクタ、タゲテス・パツラ、テツラエツロン、テツラセルミス属の種、テツラセルミス・スエシカ、タラッシオシラ・ウェイッスフロギイ、およびヴィリディエラ・フリデリシアナが挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0068】

他の実施形態において、バイオマスは、限定されないが、ダイズ、トウモロコシ、ヤシ、カメリナ、ヤトロファ、ナタネ、ココナツ、ピーナツ、ベニバナ、綿実、アマニ、ヒマワリ、ヌカ、およびオリーブを含めた植物材料であってよい。

#### 【0069】

種々の極性の脂質および副産物（例えば、タンパク質）を例えば、藻類バイオマスを含めた湿潤油性材料から抽出するためのシステムおよび方法が開示されている。特に、本明細書に記載されている方法およびシステムは、次第に極性が低くなる（すなわち、一抽出工程から次に進行するに従い、溶媒中の水/水比が次第に低減する）親水性溶媒/水混合物によって順次抽出を行うことによる藻類成分の抽出および分画の両方を行う能力に関する。換言すると、藻類中の介在溶媒（その重量の75%）は、最初は水であり、僅かに非極性の溶媒によって徐々に有機溶媒の共沸混合物に置き換えられる。これは、各工程で生じた極性で可溶性である成分を結果として抽出し、これにより、抽出された成分の同時分画をもたらす。酸浸出および/またはアルカリ抽出によるタンパク質性副生成物の抽出も開示されている。

#### 【0070】

本発明のいくつかの実施形態において、単一の溶媒および水が用いられて、油性材料中に存在する成分を抽出および分画する。他の実施形態において、油性材料中に存在する成分を抽出および分画するのに溶媒セットおよび水が用いられる。いくつかの実施形態において、油性材料は湿潤正である。他の実施形態において、油性材料は、藻類である。

#### 【0071】

極性脂質回収は、そのイオン電荷、水溶解度、および場所（細胞内、細胞外または膜結合性）に主に依存する。極性脂質の例として、限定されないが、リン脂質および糖脂質が挙げられる。極性脂質を分離および精製するのに用いられ得るストラテジーは、バッチまたは連続モードに大まかに分割され得る。バッチモードの例として、沈澱（pH、有機溶媒）、溶媒抽出および結晶化が挙げられる。連続モードの例として、遠心分離、吸着、泡沫分離および沈澱、ならびに膜技術（タンジェント流濾過、透析濾過および沈澱、限外濾過）が挙げられる。

【 0 0 7 2 】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。しかし、詳細な説明および実施例は、本発明の具体的な実施形態を示すが、例示のみによって付与されることが理解されるべきである。したがって、本発明の精神および範囲内での変形および修飾は、この詳細な説明から当業者に明らかになることが意図される。

【 0 0 7 3 】

驚くべきことに、提案されている非破壊的抽出プロセスは、90%の回収をもたらす。残存するバイオマスは、フィードに用いられるとき、その中の少量の極性物質がその価値を高める。これは、少なくとも部分的に、バイオマスの高い長鎖不飽和脂肪酸含量に起因する。加えて、エタノール抽出物は、さらに直接エステル交換され得る。さらに、既存の従来の方法とは違って、本明細書に記載されている方法およびシステムは、あらゆる藻類に関して一般的なものであり、水混和性有機溶媒勾配の使用によって藻類中の極性脂質を含めた相当部の有価成分の回収を可能にする。

10

【 0 0 7 4 】

本発明の使用によって得られる中性脂質は、低い金属含量を有し、これにより、脂質画分の安定性を高め、その後の処理工程を低減する。金属は、酸化を触媒するその能力に起因して、中性脂質を不安定にする。さらに、金属は、水素処理触媒を阻害し、中性脂質混合物が精製され得る前にその除去を必要にする。本明細書に開示されているシステムおよび方法は、タンパク質および/または極性脂質画分における金属の抽出を可能にする。このことは、タンパク質および極性脂質が金属暴露によってあまり影響されず、いくつかの場合においては金属によって実際に安定化されるため、有利である。

20

【 0 0 7 5 】

本明細書に開示されているシステムおよび方法は、湿潤バイオマスによって開始することができ、乾燥および脱水コストを低減する。従来抽出プロセスと比較して、開示されている抽出および分画プロセスは、溶媒リサイクルと併せて、穏やかな温度および圧力条件に起因して操作コストが比較的低いはずである。さらに、従来抽出プロセスは、非常に高いコストがかかり、市場の要求を満たすことができない。

【 0 0 7 6 】

本明細書に記載されているシステムおよび方法の別の態様は、抽出プロセスの間中性脂質からの極性脂質の分離である予備精製を達成する能力である例示的な実施形態において用いた藻油と先の実施形態において用いた植物油との間の差異は、個々のクラスの脂質の百分率を含む。例示的な藻類粗油の組成を、以下の表2に示す植物油と比較する。

30

【表2】

表2

	藻類粗油 (w/w)	植物油 (w/w)
中性脂質	30~90%	90~98%
リン脂質	10~40%	1~2%
糖脂質	10~40%	<1%
遊離脂肪酸	1~10%	<3%
ワックス	2~5%	<2%
顔料	1~4%	ppm

40

【 0 0 7 7 】

植物油の脱ガム（物理的および/または化学的）は、極性脂質（例えば、糖脂質およびリン脂質）を除去するためになされる。化学的に脱ガムされた植物油は、相当量の中性脂質を保持する。この中性脂質画分は、溶媒抽出もしくは超臨界/亜臨界流体抽出または膜技術を用いて、脱ガムされた材料からさらに除去される。対照的に、油性藻類バイオマスからの中性脂質の分離は、藻油中に典型的に見出される多量の極性物質に起因する植物油原料（表2参照）からよりもはるかに困難である。これは、藻油に存在するより高い百分率の極性脂質が、中性脂質の乳化を増進するためである。乳化は、溶液中に残る栄養および塩成分によってさらに安定化される。極性脂質の存在は、金属と併せて、中性脂質の分

50

離および利用に処理困難性をもたらす。しかし、極性脂質は既存の市場を有するため、その回収は、燃料を生成する藻油の使用に相当な価値を加える。

【0078】

極性脂質は、その分子構造に起因して本質的に界面活性剤であり、巨大な既存の市場を有する。極性脂質を生産する既存の技術の多くは、原材料またはコストが非常に高い。糖脂質およびリン脂質の代替の原料は、主に、藻類油、オーツ麦油、小麦胚珠油および植物油である。藻類油は、種、細胞の生理学的状態、培養条件、採取時期、および抽出に利用した溶媒に応じて典型的には約30～85% (w/w)の極性脂質を含有する。さらに、各極性脂質のグリセロール骨格は、中性脂質であるトリアシルグリセロール中の3個の代わりに付着した2個の脂肪酸基を有する。極性脂質のエステル交換では、質量基準あたりで、中性脂質のものと比較して、3分の2の最終生成物、すなわち、エステル化脂肪酸しか得られないことがある。したがって、極性脂質の除去および回収は、多量のバイオ燃料またはトリグリセリドを藻類から生産するのに高度に有利であるだけでなく、付加価値のある副産物である糖脂質およびリン脂質も生成し、このことは、藻類ベースのバイオ燃料の生産に関連するコストをひいては相殺し得る。藻類によって生産される種々の油および副産物を容易に回収および分画する能力は、藻類油プロセスの経済的成功に有利である。

10

【0079】

本明細書に記載されている方法およびシステムのさらなる態様は、藻類バイオマスなどの油性材料からタンパク質を抽出する能力である。本明細書に開示されている、藻類バイオマスからタンパク質性材料を抽出する方法は、柔軟かつカスタマイズ可能な抽出および分画プロセスを含む。例えば、いくつかの実施形態において、抽出および分画は、単1工程で行われ、これにより、高効率なプロセスを提供する。かかるバイオマスから調達されるタンパク質は、動物飼料、食品成分および工業製品に有用である。例えば、かかるタンパク質は、例えば、繊維、接着剤、塗料、セラミック、インク、化粧品、布地、チューイングガム、および生分解性プラスチックの適用において有用である。

20

【0080】

本明細書に記載されている方法およびシステム別の態様は、抽出される成分を基準にした藻類バイオマス対溶媒の比を変動させることを含む。一実施形態において、藻類バイオマスは、等重量の溶媒と混合される。別の実施形態において、藻類バイオマスは、より少ない重量の溶媒と混合される。なお別の実施形態において、藻類バイオマスは、より多い重量の溶媒と混合される。いくつかの実施形態において、藻類バイオマスと混合される溶媒の量は、用いられる溶媒、および藻類バイオマス/溶媒混合物の望ましい極性を基準にして計算される。さらに他の実施形態において、藻塊は、数工程で抽出される。例示的な実施形態において、藻類バイオマスが、第1に、約50～60%の重量で、僅かに非極性の水混和性溶媒によって順次抽出される。第2に、残存する藻類固体が、溶媒中約70%の固体の重量を用いて抽出される。次いで、溶媒中約90%の固体の重量を用いて第3の抽出が実施される。本発明のこれらの態様を報告したが、当業者は、藻類生成物を選択的に抽出するために、藻類バイオマスおよび/または固体の比を所望の極性に調整することによって、異なる極性の異なる溶媒を用いることができる。

30

【0081】

例えば、好ましい実施形態において、用いられる溶媒はエタノールである。成分は、溶媒の比を変動させることによって選択的に単離され得る。タンパク質は、約50%エタノールによって藻類バイオマスから、約80%エタノールによって極性脂質から、および約95%以上のエタノールによって中性脂質から抽出され得る。メタノールが用いられるならば、藻類バイオマスからタンパク質を抽出する溶媒濃度は、約70%である。極性脂質は約90%メタノールを必要とし、中性脂質は約100%メタノールを必要とする。

40

【0082】

本明細書に記載されているシステムおよび方法の実施形態は、驚くべき予測されない結果を示す。まず、回収/抽出プロセスは、湿潤バイオマスにおいて行われ得る。これは、例示的な実施形態が、細胞を乾燥および破壊するのに必要とされる多量のエネルギーの使

50

用を回避するとする、主に経済的な利点である。乾燥藻類バイオマスからの中性脂質の抽出は、本発明のシステムおよび方法を用いるとはるかにより効果的である。開示されているプロセスから得られる収率は、従来の抽出によって得られるものよりも有意に高く純粋である。これは、従来の抽出がエマルジョンを頻繁にもたらして成分の分離を極めて困難にするためである。

#### 【0083】

例示的な実施形態は、いずれの藻類または非藻油性材料に適用されてもよい。例示的な実施形態は、限定されないが、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリルを含めたいずれの水 - 混和性の僅かに非極性の溶媒を用いてもよい。具体的な実施形態は、グリーンな再生可能溶媒、例えば、エタノールを用いてよい。試験されたアルコール溶媒は、単離された中性脂質の収率および純度をさらに高くする。エタノールは、本明細書に開示されている他の溶媒と比較して購入するのが比較的経済的である。いくつかの例示的な実施形態において、抽出および分画は、1工程で、続いて、必要に応じて、膜ベースの精製により実施され得る。得られるバイオマスは、ほとんど水を含まず、水性藻類スラリーよりも少ないエネルギーで完全に乾燥され得る。

10

#### 【0084】

いくつかの例示的な実施形態において、抽出するのにいられる溶媒は、エタノールである。他の実施形態として、限定されないが、シクロヘキサン、石油エーテル、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、ジエチルエーテル、トルエン、酢酸エチル、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、アセトニトリル、イソプロパノール、およびメタノールが挙げられる。いくつかの実施形態において、同じ溶媒が順次抽出工程で用いられる。他の実施形態において、異なる溶媒が各抽出工程で用いられる。さらに他の実施形態において、2種以上の溶媒が混合されて1以上の抽出工程で用いられる。

20

#### 【0085】

本明細書において記載されている方法のいくつかの実施形態において、抽出工程のいずれかにおいて用いられる2種以上の溶媒の混合物は、少なくとも1種の親水性溶媒および少なくとも1種の疎水性溶媒を含む。かかる混合物を用いる場合、親水性溶媒は、拡散を介してバイオマスから材料を抽出する。一方で、比較的少量の疎水性溶媒が組み合わせて用いられ、対象の材料が少量の疎水性溶媒で濃縮されるような液 - 液分離が関与する。次いで、2種の異なる溶媒は、当該分野において公知の技術を用いて分離され得る2層系を形成する。かかる実施においては、疎水性溶媒は、アルカン、エステル、ケトン、芳香族、ハロアルカン、エーテル、または市販の混合物（例えば、ディーゼル、ジェット燃料、ガソリン）のうちのいずれか1種以上であってよい。

30

#### 【0086】

いくつかの実施形態において、本明細書において記載されている抽出プロセスは、pH偏位を1種以上の工程に組み込む。かかるpH偏位は、タンパク質性材料を単離するのに有用である。いくつかの実施形態において、抽出プロセスのpHは、酸（例えば、約5未満）である。いくつかの実施形態において、抽出プロセスのpHは、アルカリ（例えば、約10超）である。

40

#### 【0087】

従来の抽出手順におけるヘキサンの使用は、副産物を食品において用いることができないように藻類バイオマスを汚染する。本発明の実施形態は、はるかに少ないエネルギーを必要とし、生成物を燃料ならびに食料品および栄養補給剤としての使用に好適にするため、当該分野において公知のものよりも優れている。

#### 【0088】

この明細書において議論されているいずれの実施形態も、本発明のいずれの方法またはシステムによっても実施され得、またその逆も然りであることが意図される。さらに、本発明のシステムは、本発明の方法を達成するのに用いられ得る。

例示的な実施形態の説明

#### 【0089】

50



藻類からの油の溶媒抽出に関して、最も良好な場合のシナリオでは、溶媒がトリアシルグリセロール (TAG) を選択的に抽出し、高い回収で藻細胞内の全ての極性脂質および非TAG中性脂質、例えばワックス、ステロールを残す。第2オプションは、極性脂質を選択的に抽出し、次いで、極性脂質を含まないより純粋な中性脂質を抽出して、結果として高い回収を得る。最後のオプションは、抽出物全ての脂質を抽出して、1または2工程で非常に高い回収を達成する。

#### 【0090】

図1Aを参照すると、フローチャート100は、藻類含有バイオマスからの脂質の分画および精製において用いられる方法の例示的な実施形態に含まれる工程の概要を提供する。第1工程110において、藻細胞が採取される。その後の工程120において、藻細胞から水が除去されて、10~25%の固体バイオマスを得る。工程130において、溶媒ベースの抽出がバイオマスにおいて実施されて、画分が収集される。いくつかの実施形態において、工程130はまた、pHベースの抽出および画分収集も組み込む。最後に、より小さな脂質成分を分離するために、限定されないが、例えば、濾過、デカント、および遠心分離の技術を含めた固/液相分離が、工程140において実施され得る。

10

#### 【0091】

藻類バイオマスは、工程110において採取されるとき、典型的には約1~5g/Lの全固体からなる。バイオマスは、限定されないが、気泡浮上分離、膜濾過、軟凝集、沈降、フィルタ押圧、デカンテーションまたは遠心分離を含めた技術を用いて工程120において部分的に脱水され得る。脱水は、固体または半固体物質からの水のいくらか、大部分または全ての除去である。本発明の実施形態は、採取された藻類バイオマスから水を除去する脱水技術を利用する。脱水は、本明細書において記載されている方法のいずれか1つまたは組み合わせを用いて、および当業者に公知のいずれかの他の方法によって行われ得る。

20

#### 【0092】

工程120から得られた脱水された藻類バイオマスは、典型的には約10~30%の固体からなる。このバイオマスは、次いで、水混和性の僅かに非極性の溶媒(例えば、アルコール)によって、各段階で画分を隔離する多段階向流溶媒抽出プロセスで抽出され得る。このタイプのプロセスは、資本および運転経費の両方を低減することができる。いくつかの実施形態において、バイオマスはまた、酸および/またはアルカリ抽出を経て、タンパク質材料を分画する。

30

#### 【0093】

いくつかの実施形態において、藻類バイオマスの脱水は、採取された藻類バイオマスを溶媒、例えば、エタノールで処理することによって行われ得る。藻類バイオマスは、次いで、溶液を沈降させ、次いで、液体は、方法、例えば、限定されないが、吸収によって除去され得る。この新規の脱水方法は、公知の方法よりも資本および運転コストが低く、溶媒リサイクルを可能にし、バイオマスの乾燥コストを低減し、藻類成分の抽出および/または分離の前に藻類バイオマスの極性を減少させるという追加の利益を有する。実際、本明細書において記載されている溶媒ベースの沈降プロセスは、藻類表面上の負電荷を低減または中和させるという事実に起因して、部分的に効果的であるということが理論化されている。本発明のいくつかの実施形態において、脱水方法は、さらに多くの水を除去するように組み合わせられる。いくつかの実施形態において、脱水プロセスの間の溶媒の添加は、抽出プロセスを開始させる。

40

#### 【0094】

図1Bは、脱水プロセス300の例示的な実施を示す。約1g/L~約10g/L(すなわち、0.1~1%w/w)の最終乾燥重量を有する藻類培養物310は、水分離プロセス320に付される。プロセス320は、遠心分離、デカント、沈降または濾過を含み得る。一実施形態において、焼結金属槽フィルタは、培養物の水から藻類バイオマスを分離するのに用いられる。かかるフィルタを用いると、回収された水330は、他の藻類培養物を対象としてリサイクルされる。一方で、回収された藻類バイオマスは、約200g

50

/L (すなわち、10~20% w/w) と高い藻類密度を有する「藻類ペースト」にまで濃縮されている。この濃縮された藻類ペーストは、次いで、溶媒ベースの沈降プロセス350において溶媒340で処理される。

#### 【0095】

沈降プロセス350は、溶媒340を藻類ペーストに添加して、約1:1~約1:10の間の溶媒対バイオマスの重量/重量比を有する混合物を得ることを含む。藻類は沈降ベッセルにおいて沈降して、溶媒/水混合物360は、例えば、吸収および/またはデカントによって除去される。溶媒は、周知の技術、例えば、蒸留および/またはパーペレイションによって回収および再使用され得る。残存する湿潤バイオマス370は、アルコールおよび水溶液中約30%~約60% w/wの固体含量を有すると予測される。

10

#### 【0096】

脱水に理想的な溶媒は、1.1 g/mL超または0.9 g/mL未満の密度を有する工業上一般的な水溶性溶媒である。例として、イソプロパノール、アセトン、アセトニトリル、t-ブチルアルコール、エタノール、メタノール、1-プロパノール、重水(D<sub>2</sub>O)、エチレングリコール、および/またはグリセリンが挙げられる。溶媒密度が1.1 g/mLを超えると、藻類バイオマスは、沈降ベッセルの底部において堆積物を作り出すよりもむしろ浮く。

#### 【0097】

図2は、抽出システム200の例示的な実施形態の概略図である。湿潤または乾燥藻類バイオマスは、限定されないが、移動ベルト、スクリーコンベヤ、または直通抽出チャンパを含めた当該分野において公知の方法を用いて輸送される。抽出用溶媒は、各バイオマスのスロット位置に割り当てられた貯蔵タンクから再循環される。抽出混合物は濾過され、バイオマス固体をスロットに戻し、抽出物を貯蔵タンクに戻す。ベルト上の固体は、抽出のための滞留時間に基づいて周期的に移動する。各貯蔵タンクにおける抽出物は、飽和時に補給されても、未使用の溶媒によって連続的に置き換えられてもよい。これにより、下流の処理時間およびコストも劇的に低減される。この実施形態は、一次貯留層210、輸送機構220、複数の分離装置241~248(例えば、膜濾過装置)、複数の抽出貯留層261~268、および複数のリサイクルポンプ281~287を含む。この実施形態において、一次貯留層210は、複数の入口貯留層211~218に分割される。

20

#### 【0098】

操作の間、藻類バイオマス201は、輸送機構220の第1端221の付近の第1入口貯留層211に置かれる。加えて、溶媒205は、輸送機構220の第2端222の付近の入口貯留層218内に置かれる。輸送機構220は、輸送機構220に沿って、第1端221から第2端222に藻類バイオマスに向かわせる。藻類バイオマスは、輸送されるに従い、複数の分離装置241~248を通過して、種々の極性の画分に分離される。分離装置241~248を通過する透析物部分は、貯留層261~268に向かう。

30

#### 【0099】

例えば、第1分離装置241を通過する、藻類バイオマスの透析物部分(例えば、分離装置241を通過するのに十分に小さな液体および粒子を含有する部分)は、第1貯留層261に向かう。第1貯留層261から、透析物部分がリサイクルされて第1入口貯留層201に戻り得る。第1分離装置241を通過しない藻類バイオマスの残余部分は、次いで、輸送機構220によって、第2入口貯留層212、および第1分離装置241よりも微細な分離または濾過媒体を含み得る第2分離装置242に向かう。

40

#### 【0100】

第2分離装置242を通過する透析物部分のセグメントは、第2貯留層262に向かつて、次いでリサイクルされてリサイクルポンプ282を介して第2入口貯留層212に戻されてよい。第2分離装置242を通過しない藻類バイオマスの残余または抽出部分は、輸送機構220によって第3入口貯留層213に向かつてよい。このプロセスは、各段階での残余部分はその後の入口貯留層に向かうように入貯留層213~218および分離装置243~248について繰り返されてよいが、透析物部分は、リサイクル貯留層に向

50

かって、リサイクルされて現在の入口貯留層に戻る。

【0101】

例示的な実施形態において、第1画分は、最も高い、水対僅かに非極性の溶媒比、すなわち、最も極性の混合物で抽出されるが、最後の画分は、最も純粋な、僅かに非極性の溶媒、すなわち最も極性の低い混合物で抽出される。プロセスは、画分によって、極性を減少させる順序で成分を抽出する。第1画分の機能は、残りの水を除去して溶媒抽出プロセスを促進することである。続いての画分は、極性脂質リッチであるが、最後の画分は中性脂質リッチである。

【0102】

油画分は、エステル化されて、長鎖不飽和脂肪酸を遊離することができる。カロテノイドおよび長鎖不飽和脂肪酸は、プロセス、例えば、非分子蒸留と併せた分子蒸留を用いて油から分離され得る。全ての脂肪酸は、分子蒸留を用いてカロテノイドから分離され得る。蒸留物は、単一の蒸留カラムを用いて分画されて、精製のために、より短鎖の脂肪酸を分離することができる。長鎖不飽和脂肪酸は、カラム中に高沸点残渣として残存する。

10

【0103】

いくつかの非限定的な実施形態において、本明細書において記載されている抽出システムおよび方法は、タンパク質材料を油性材料（例えば、藻類バイオマス）から単離するための1つ以上の工程を組み込む。かかるタンパク質抽出工程は、pH調整を使用して、タンパク質の単離および抽出を達成する。例えば、1つの非限定的な実施形態において、第1分離装置中の溶媒のpHが、タンパク質抽出のために最適化され、タンパク質材料リッチな第1画分を生じる。タンパク質抽出工程のpHは、対象のタンパク質のpKaに応じて調整される。対象のタンパク質のpKaは、限定されないが、Poisson-Boltzmann式、経験的方法、分子動力学をベースとする方法を用いること、または滴定曲線の使用を含めた、当業者に公知の方法を用いて確かめられる。

20

【0104】

いくつかの実施形態において、溶媒pHはアルカリである。例えば、いくつかの実施形態において、溶媒pHは、約10超である。他の実施形態において、溶媒pHは、約10～約12の範囲である。さらなる実施形態において、溶媒pHは、約10、約11、または約12である。他の実施形態において、溶媒pHは、酸である。例えば、いくつかの実施形態において、溶媒pHは、約5未満である。他の実施形態において、溶媒pHは、約2～約5の範囲である。さらなる実施形態において、溶媒pHは、約2、約3、約4、約4.5、または約5である。第1分離装置の抽出部分は、次いで、その後の入口貯留層に向かい、極性ベースの抽出および分画を達成する。別の非限定的な実施形態において、タンパク質材料は、同様の手段（すなわち、溶媒のpH調整）によって最終の分離装置において分離される。

30

【0105】

溶媒pHの調整は、当業者に公知の方法によって達成される。例えば、酸pHは、適切な酸の溶媒ストリーム中への混合によって得られる。タンパク質抽出に有用な例示的な酸として、限定されず、リン酸、硫酸、および塩化水素酸が挙げられる。同様に、アルカリpHは、適切な塩基の溶媒ストリーム中への添加および混合によって得られる。タンパク質抽出に有用な例示的な塩として、限定されず、水酸化カリウム、および水酸化ナトリウムが挙げられる。

40

【0106】

いくつかの実施形態において、タンパク質抽出は、本明細書において記載されている抽出および分画システムとは別個のシステムにおいて実施される。例えば、いくつかの実施形態において、藻類バイオマスは、pH調整された溶媒混合物中に浸漬され、続いて、適切な分離技術（例えば、遠心分離、または濾過）を介して単離される。残存する固体は、次いで、本明細書において記載されているように、極性ベースの抽出および分画システムに導入される。同様に、いくつかの実施形態において、極性ベースの抽出および分画プロセスからの残存抽出物は、pH調整された溶媒混合物に暴露されて、抽出プロセスの最後

50

にタンパク質材料を単離する。

【0107】

図3に示すように、溶媒選択および極性ベースの分画の理論は、溶媒および Soxhlet 抽出プロセスを用いる抽出への影響の詳しい分析によって発展され、固体材料からの脂質の分離を可能とする。Soxhlet 抽出システムは、脂質クラス選択性および回収のための溶媒を迅速にスクリーニングするために利用される。広範な極性、例えば、アルカン類、シクロアルカン、ハロゲン化アルキル、エステル類、ケトン類を包含する種々の化学物質のクラスからの溶媒が試験された。抽出の前に、抽出されるバイオマスの脂質含量および組成が、藻類油の概算のための標準的な方法、例えば、Bligh-Dyer 脂質抽出法を用いて3回試験された。バイオマスに含有される合計脂質は、22.16%であり、その49.52%が中性脂質であった。

10

【0108】

図3は、種々の極性および非極性溶媒を Soxhlet 抽出プロセスと併用した乾燥藻塊の抽出によって集められたデータを提示する。アルカン溶媒の鎖長に応じて、60~70%の純度の中性脂質および15~45%の合計脂質回収が、破壊および溶媒抽出なしに得られ得る。試験した最長鎖のアルカン溶媒、ヘプタンにより、60%の中性脂質および42%の合計脂質が回収された。図3が示すように、溶媒および従来の抽出法、例えば、ヘキサンを用いた乾燥藻塊の抽出結果は非効率的で高価であり、低い収率をもたらす。本明細書に開示されているシステムおよび方法は、成分の損失を最小にしながら種々の極性の成分を分離するために僅かに非極性の溶媒の水に対する割合を制御することによって、これらの非効率性に対処する。

20

【0109】

より低炭素のアルコール溶媒は、極性脂質に対してより選択性であった。中性脂質の純度はメタノールで22%、エタノールで45%であった。イソプロピルアルコールは、極性と非極性脂質との間でいずれの選択性も示さず、52%の純粋な中性脂質生成物を生じた。メタノールにより、67%の合計脂質および90%を超える極性脂質が回収された。したがって、メタノールは、ヘプタンまたはヘキサンを用いて中性脂質を抽出する前に油性材料から極性脂質を選択的に抽出するのにメタノールが用いられ得る本発明の実施形態の優れた候補である。試験した他の溶媒のクラスは、脂質のクラスに対していずれの選択性も示さなかった、なぜなら、元のバイオマスに存在する脂質の組成と同様に、中性脂質純度が49%に近かった。さらに、合計脂質回収は、約15~35%のこれら溶媒によって得られ、これらの溶媒を特定の脂質のクラスの選択的抽出または合計脂質抽出に好適でないものにした。

30

【0110】

Soxhlet 分析から得られる結果は、標準的なベンチスケールのバッチ溶媒抽出装置を用いて、実施例1において以下に示されるように確認された。選択された溶媒は、極性脂質を回収する第1工程ではメタノール、中性脂質回収のための第2工程では石油エーテルであった。全ての抽出は、1:10の固体:溶媒比で実施された。この実験における各抽出工程は、1時間の長さである。なされた他の実験(データ示さず)により、約45分以上は、抽出が成功するには十分に長いことを示している。

40

【0111】

メタノール抽出は、いずれが最適であるかを決定するために、異なる温度、40、50、および65で実施された。石油エーテル抽出は、溶媒の沸点に近い35で実施される。石油エーテルは、中性脂質の高い選択性があるため、低い沸点および抽出後に観測され、抽出後に観察された生成物量を測定した

【0112】

図4Aは、65でのメタノール抽出工程に行われた石油エーテル抽出における中性脂質純度が、80%を超え、この2つの抽出工程では、最終の粗油生成物の中性脂質含量が高められる。図4Bは、合計中性脂質回収が低く、第1工程において相当量の中性脂質が存在した。

50

## 【0113】

メタノール抽出工程における中性脂質の損失を最小にするために、水を溶媒に添加することによって溶媒の極性を増加させてよい。図5Aおよび5Bは上記バイオマスの、70% v/vの水性メタノールによる抽出、続いて石油エーテルによる抽出の結果を示す。図5Aは、中性脂質純度が、純粋なメタノールの使用によって得られたものよりも、石油エーテル抽出においてかなり高かったことを示す。さらに、中性脂質の損失は、第1抽出工程における水性メタノールの使用によって大きく低減された。図5Bに見られるように、より高温でのメタノール抽出により、中性脂質純度が改善されたが、その後の工程において合計脂質回収が僅かに減少した。

## 【0114】

いくつかの例示的な実施形態において、抽出プロセスの温度は、藻類バイオマスに存在する藻類成分の最適な安定性を確保するように制御される。藻類タンパク質、カロテノイド、およびクロロフィルは、温度感受性を示す藻類成分の例である。他の実施形態において、温度は、温度感受性の藻類成分が藻類バイオマスから抽出された後に増加させる。

## 【0115】

さらに他の例示的な実施形態において、抽出プロセスの温度は、所望の生成物の収率を最適化するように調整される。抽出は、周囲温度から抽出混合物の沸点まで、しかしこれ未満で実行され得る。さらに他の実施形態において、抽出プロセスの温度は、所望の生成物の溶解度に応じて変化する。さらに他の実施形態において、抽出は、温度は、抽出されるバイオマスの藻類株に応じて最適化される。抽出温度が上昇することで、所望の化合物の溶解度を増加させ、抽出混合物の粘度を低減して、抽出回収を高める。

## 【0116】

いくつかの実施形態において、抽出は、抽出混合物の沸点を上昇させるために加圧下に行われる。これらの実施において、圧力を、所望の生成物のいずれかが崩壊し、変性し、分解し、または破壊され始める温度未満に抽出混合物の温度を維持しながら、沸騰を防止するのに必要な程度まで増加させる。

## 【0117】

いくつかの例示的な実施形態において、抽出は、用いられる溶媒の沸点付近で、抽出が実施される条件（例えば、周囲圧力または高圧）において実施される。他の実施形態において、抽出は、他の抽出条件を同様に構成する、抽出混合物の沸点付近で実施される。かかる温度において、藻細胞内への溶媒の気相浸透は、より低い物質移動抵抗に起因して、より速い。抽出温度が、溶媒の沸点を有意に超えるようにするとき、溶媒-水システムは共沸混合物を形成し得る。このように、溶媒の沸点またはその付近にシステムを維持することで、費用を低減しながら、抽出を高めるのに十分な蒸気を生成する。加えて、油の溶解度は、より高い温度で増加し、このことは、溶媒沸点に近い温度での抽出の高価をさらに増加させ得る。図6は、水性メタノール-石油エーテル抽出スキームにおける合計脂質回収を示す。メタノール抽出を沸騰温度付近で実施することで中性脂質回収を僅かに減少させるが、図5Bにおいて観察されるように、合計脂質回収を高める。

## 【0118】

他の実施形態において、抽出は、周囲照明条件下に行われる。他の実施形態において、抽出は、光感受性の藻類成分を劣化から保護するために、限定されないが、スチール管またはケースなどの不透明な容器において行われる。カロテノイドは、光感受性の藻類成分である。

## 【0119】

他の例示的な実施形態において、抽出は、標準大気条件下に行われる。さらに他の実施形態において、抽出は、酸化しやすい藻類成分を保護するために、窒素雰囲気下で行われる。さらに他の実施形態において、抽出は、酸化しやすい藻類成分を保護するために、不活性ガス雰囲気下で行われる。酸化しやすい藻類成分として、カロテノイド、クロロフィル、および脂質が挙げられる。

## 【0120】

10

20

30

40

50

例示的な実施形態において、抽出のための溶媒対固体比は、バイオマス中の固体の乾燥重量を基準として3～5の間である。残りの藻類バイオマスは、炭水化物（例えば、デンプン）リッチであり、フィードストックとして用いられて、抽出に用いられる溶媒を生成することができる。

【0121】

図7は、溶媒対固体比の合計脂質回収への影響を示す。溶媒対固体比が増加するに従い、合計脂質回収が対応して劇的に増加した。これは、他の一般的に用いられている油抽出溶媒、例えば、ヘキサンと比較して、メタノール中への脂質の溶解度が低いためであると考えられる。

【0122】

成分の溶解度は、抽出プロセスにおいて用いられる溶媒の極性によって影響される。溶媒度特性は、湿潤バイオマス対溶媒の比を決定するのに用いられ得る。例えば、40% w/wの湿潤バイオマスは、100gの湿潤バイオマスにつき40gのバイオマスおよび60gの水を有する。100gのエタノールがこの混合物に添加されると、エタノール対湿潤バイオマスの比は、1部の湿潤バイオマス対1部のエタノールであり、混合物中のエタノールの濃度は、 $100 / (100 + 60) = \text{約} 62\% \text{ w/w}$ のエタノール（液相中）である。エタノール水混合物中62% w/wのエタノールは、6.6の極性指数に相当し、重量および成分の極性を平均したものによって計算される。62%のエタノールおよび38%の水を含有する混合物中では、エタノールの極性指数は5.2であり、水の極性指数は9であり、結果として、 $(0.62 * 5.2 + 0.38 * 9) \text{ 約} 6.6$ の極性指数をもたらす。極性脂質および中性脂質の、抽出のための混合物の極性指数は、それぞれ約5.8および5.4であると計算される。本開示に照らして、当業者は、これらの成分を選択的に抽出することができる溶媒セットを調合することができる。

【0123】

別の例において、抽出溶媒がイソプロピルアルコールおよびエタノールの1:1混合物であるとき、この溶媒の極性は、 $(3.9 + 5.4) / 2$ 、約4.65である。溶媒対湿潤バイオマスの比は、極性を適合させるように計算される。6.6の極性指数を得るには、本発明者らは、以下の代数方程式を解くことによって計算される55% w/wのIPA-水混合物を作製する必要がある：

【数1】

$$x * 4.65 + (1 - x) * 9 = 6.6$$

↓

$$x = (9 - 6.6) / (9 - 4.65) = 0.55$$

↓

溶媒ミックス-水中55% w/wの溶媒ミックス

↓

40% w/wの湿潤バイオマスでは、湿潤バイオマス対IPA比は $(1 - 0.55) / 0.6 \sim 0.75$ である。

【0124】

40% w/wの湿潤バイオマスについて、これは、100部の湿潤バイオマス対75部の溶媒混合物の比に相当する。40% w/wの湿潤バイオマスは、100gの湿潤バイオマスにつき40gのバイオマスおよび60gの水を有する。75gの溶媒混合物がこの混合物に添加されると、混合物中の溶媒の濃度は $(75 / (75 + 60))$ であり、これは溶媒混合物-水溶液中約55% w/wの溶媒混合物である。この計算は、各抽出段階において各生成物について溶媒バイオマス比を得るのに用いられ得る。溶媒セットのいくつかの非限定例を表3に表す。

【表 3 - 1】

表 3

	部 湿潤バ イオマ ス	部 溶媒	バイオ マス乾 燥	部 乾燥バ イオマ ス	部 水	溶媒水比	抽出溶媒 極性指数
1工程のタン パク質抽出							
エタノール	100	99	40%	40	60	0.62	5.2
I P A	100	52	40%	40	60	0.46	3.9
Me OH	100	93	40%	40	60	0.61	5.1
プロパノール	100	54	40%	40	60	0.47	4
1 : 1 I P A / E t OH混合物	100	68	40%	40	60	0.53	4.55
95%エタノ ール水混合物	100	115	40%	40	60	0.66	5.39
95%エタノ ール5%メタ ノール混合物	100	99	40%	40	60	0.62	5.195
95%エタノ ール5% I P A混合物	100	95	40%	40	60	0.61	5.135
1工程の極性 脂質抽出							
エタノール	100	320	40%	40	60	0.84	5.2
I P A	100	101	40%	40	60	0.63	3.9
Me OH	100	274	40%	40	60	0.82	5.1
プロパノール	100	107	40%	40	60	0.64	4
1 : 1 I P A / E t OH混合物	100	154	40%	40	60	0.72	4.55
95%エタノ ール水混合物	100	468	40%	40	60	0.89	5.39
95%エタノ ール5%メタ ノール混合物	100	317	40%	40	60	0.84	5.195
95%エタノ ール5% I P A混合物	100	289	40%	40	60	0.83	5.135

10

20

30

【表 3 - 2】

1工程の中性 脂質抽出							
エタノール	100	1080	40%	40	60	0.95	5.2
I P A	100	144	40%	40	60	0.71	3.9
Me OH	100	720	40%	40	60	0.92	5.1
プロパノール	100	154	40%	40	60	0.72	4
1 : 1 I P A / E t OH混合物	100	254	40%	40	60	0.81	4.55
95%エタノ ール水混合物	100	21,600	40%	40	60	1.00	5.39
95%エタノ ール5%メタ ノール混合物	100	1,054	40%	40	60	0.95	5.195
95%エタノ ール5% I P A混合物	100	815	40%	40	60	0.93	5.135

40

50

## 【0125】

全ての例において記載されている抽出混合物は、略固相および略液相から作製される。これらの相は、次いで、抽出後に分離される。次いで、これに続いて、液体溶媒を液相から除去することができ、抽出生成物を生じさせる。いくつかの実施形態において、溶媒は蒸発される。かかる実施においては、液体-液体抽出技術は、蒸発される必要がある溶媒の量を低減するのに用いられ得る。用いられるいずれの溶媒も、条件が許すならばリサイクルされ得る。

## 【0126】

抽出前の藻類バイオマスの処理が、脂質抽出の生産性および効率を高めることが理論化された。この方向では、塩基または別の有機溶媒を藻類バイオマスに添加して表面特性を変更し抽出を高める効果を比較しながら実験を行った。水性メタノール、水性水酸化ナトリウム、および水性DMSOを含めた種々の処理を試みた。図8が実証するように、5%のDMSOの添加は、脂質回収を3倍に増加させる。これらの抽出工程は、メタノール抽出工程を劇的に低減するのに活用されてよい。しかし、上記実験で用いた溶液は、高いコスト、粘度、ならびにDMSOを回収およびリサイクルする能力により、より大規模での使用には理想的でないことがある。

## 【0127】

図9は、8工程メタノール抽出が、抽出された中性脂質の累計脂質収率および純度に及ぼす効果を示すチャートである。この実施形態において、112gの湿潤バイオマス(25.6%乾燥重量)を、350mLの純粋なメタノールで抽出し、各工程において160Wの照射電力で10分間加熱した。これにより、抽出混合物の沸点付近である約75の抽出温度をもたらした。このプロセスを用いて、大部分の極性脂質が抽出されたら、高度に純粋な中性脂質が藻油から得られることが可能であることが判明した。図9は、極性脂質が全て抽出されると、高純度の中性脂質を単離することが可能であることを示す。この場合には、メタノール抽出工程5~8において、90%の中性脂質純度で、全バイオマスの5%の収率が得られた。さらに、抽出混合物の沸点に起因して、バイオマス中の大部分の水が、炭水化物、タンパク質および金属と併せて、第1抽出工程において完全に抽出される。

## 【0128】

図10は、脂質回収が、脂質およびタンパク質を湿潤バイオマスから抽出するためのエタノールの使用によってより効果的になり得ることを示す。エタノールを用いることによって、80%の合計脂質回収が、メタノールを用いることによって一般に必要とされる9よりもむしろ約4工程で得られ得る。この回収の増加は、メタノールと比較してエタノール中の脂質の溶解度が高いことに起因し得る。さらに、水性エタノールの沸点は、水性メタノールよりも高く、脂質のさらなる回収を促進する。これは、より高い温度が油の粘性を低くし、これにより分散性を改善するためである。このプロセスの別の明確な利点は、油画分中の残りのエタノールをエステル交換に用いること、およびバイオマス乾燥操作への熱負荷を低くすることである。

## 【0129】

さらに、図10は、初期画分が、タンパク質および他の高度極性分子を含有する非脂質リッチであり、続いて極性脂質リッチな画分、最終的に中性脂質画分であることを実証する。そのため、抽出装置の適正な設計により、単一抽出および分画プロセスにおける3種の全ての生成物を回収することができる。

## 【0130】

本発明の別の実施形態は、抽出を補助するためのマイクロ波を利用する。本出願において開示されている先に集められたデータに基づいて、メタノールが、全ての脂質を藻類から抽出するための最良の単一溶媒であることが示される。そのため、単一溶媒の多工程の抽出は、本出願の実施例1に記載されているように、一溶媒のマイクロ波抽出システムの有効性に関するデータを集めるのに実施した

10

20

30

40

50



## 【0131】

図11は、従来の抽出およびマイクロ波補助抽出の抽出時間および合計脂質回収を比較した対数プロットである。曲線のスロープに基づいて、マイクロ波システムが抽出時間を約5倍以上低減することが計算された。従来の方法は、より高い正味の脂質回収を有するが、これは、極性脂質回収がより高いことに起因するものである。これらの結果に基づいて、マイクロ波の補助を用いてまたは用いずに溶媒を用いて乾燥藻類バイオマスを抽出するための条件が最適化された。本発明のいくつかの実施形態は、水分子を励起する波長を放出する常套的なマイクロ波装置を用いる。本発明のさらに実施形態は、種々の溶媒を励起することが可能である特別注文されたマイクロ波装置を利用する。本発明のさらなる他の実施形態は、藻類バイオマスに存在する脂質を励起することが可能である特別注文のマイクロ波装置を利用する。いくつかの実施形態において、藻類バイオマスに存在する脂質は、マイクロ波を用いて励起され、これにより、脂質成分の藻類バイオマスからの分離および抽出を高める。

10

## 【0132】

水分含量は、油抽出の効率に影響する、バイオマスの別のパラメータである。本発明のいくつかの実施形態において、乾燥藻塊は抽出および分画される。他の実施形態において、藻塊は湿潤である。藻類質量含有率が10%、25%、および33%であるバイオマスサンプルを、抽出性能に及ぼす影響を調査するのに用いた。

## 【0133】

図12Aは、藻類バイオマスからの生成物の段階的抽出の例示的プロセス400を示す。図12Aにおける単位は全てポンドである。図12Aは、プロセス400のマスバランスを示すが、を実施するための設備および/またはシステムの詳細は、本明細書のいずれかの箇所に記載されている。5ポンドの藻類を含有するバイオマスは、約0.63ポンドの極性脂質、1.87ポンドの中性脂質、1ポンドのタンパク質、および1.5ポンドの炭水化物を有する。バイオマスおよび1000ポンドの水が脱水工程405で処理され、これは、950ポンドの水を混合物から分離して、45ポンドの水中の5ポンドの藻類を第1抽出工程410に通す。本明細書に開示されている脱水技術は、脱水工程405において用いられ得る。第1抽出工程410において、238ポンドのエタノールおよび12ポンドの水が、前の工程からの藻類および水と合わされる。第1抽出工程410は、約80.9% w/wのエタノールの液相を有する。231ポンドのエタノール、53ポンドの水、および0.5ポンドの藻類タンパク質の第1液相が回収され、これから、水およびエタノールが、例えば、蒸発によって除去されて、タンパク質リッチな生成物415を残す。蒸発から回収された溶媒は、第1抽出工程410にリサイクルされ得る。

20

30

## 【0134】

第1抽出工程410からの第1固相は、第2抽出工程420に通される；この第1固相は、4.5ポンドの藻類、2.6ポンドの水、および10.9ポンドのエタノールを含む。86ポンドのエタノールおよび4ポンドの水は、前の工程からの第1固相に添加される。第2抽出工程420は、約93.6% w/wのエタノールの液相を有する。85.9ポンドのエタノール、5.9ポンドの水、および0.6ポンドの極性脂質の第2液相は、回収され、これから、水およびエタノールが、例えば、蒸発によって除去されて、極性脂質リッチな生成物425を残す。蒸発から回収された溶媒は、第2抽出工程420にリサイクルされ得る。

40

## 【0135】

第2抽出工程420からの第2固相は、第3抽出工程430に通される；この第1固相は、3.9ポンドの藻類、0.7ポンドの水、および11ポンドのエタノールを含む。74.5ポンドのエタノールおよび3.5ポンドの水は、前の工程からの第2固相に添加される。第3抽出工程430は、約95.4% w/wのエタノールの液相を有する。78.9ポンドのエタノール、3.9ポンドの水、および1.6ポンドの中性脂質の第3液相は、回収され、これから、水およびエタノールが、例えば、蒸発によって除去されて、中性脂質リッチな生成物435を残す。蒸発から回収された溶媒は、第2抽出工程430にリ

50

サイクルされ得る。2.3ポンドの藻類、0.3ポンドの水、および6.6ポンドのエタノールの固相が残存する。

【0136】

図12Aにおいて実証されているように、逐次的な各エタノール抽出工程によって得られる脂質プロファイルは、出発藻類中の水分含量によって大きく影響された。プロセス400のモデルを、異なる初期含水量を各々有する3種の異なるバイオマス収集物において実行した。初期含水量が減少するに従い、最大の脂質回収工程は第3抽出工程から第4(示さず)に変化した。しかし、これらの3種のバイオマスサンプルからの全体の脂質回収は、かなり似ており、全てが藻類バイオマスの合計脂質含量の95%を超えた。

【0137】

より高い水分含量を有する藻塊が用いられたときには、水性エタノール混合物中のエタノール濃度はかなり低くなり、結果として、粗抽出物中の中性脂質百分率も低くなった。90%の水を含む藻類ペーストの脱水は、エネルギーを非常に大量消費するプロセスであることが報告されている。本明細書において記載されている方法は、予想外にも、ほとんど水を含有する藻塊を成功裏に抽出および分画するのに用いられ得る。全体の脂質回収は、90%の水(10%の藻類固体)を含有する藻類ペーストから出発することによっては有意には影響されなかったため、従来の抽出法とは違って、本明細書に開示されている方法は、エネルギーを大量消費する乾燥工程の使用を必要としない。

【0138】

図12Bは、プロセス400の抽出工程の1つの例示的实施500を示す。藻類バイオマスおよび溶媒混合物505は、抽出ベッセル510に提供される。藻類が抽出された後(本明細書のいずれかの箇所に記載されている)、混合物は、粗濾過システム515、例えば、焼結金属管フィルタに提供され、これは、混合物を液相および固相に分離する。固相は、下流の抽出工程に通される。液相は、溶媒除去システム520、例えば、エバポレータに通されて、液相中の溶媒(例えば、エタノール)含量を低減する。溶媒除去後に残存する液相は、遠心分離機525に場合により通される。溶媒除去システムに残存するあらゆる固体は、リサイクルまたは廃棄される。遠心分離機525は、所望の藻類生成物(例えば、タンパク質または脂質)を液相中のあらゆる残存する水および/または固体から分離することを助ける。

【0139】

図14は、藻塊が処理されて1種以上の藻類生成物を形成または回収することができるプロセス600の例を示す。この例において、藻類バイオマスは、本明細書に開示されている方法を用いて前部プロセス605において段階的に抽出される。抽出および分離工程に、エステル化プロセス610、加水分解プロセス615、水素処理プロセス620、および/または蒸留プロセス625が続き、成分および生成物をさらに単離する。成分および生成物は、藻類脂質、藻類タンパク質、グリセリン、カロテノイド、栄養価のあるもの(例えば、長鎖不飽和油および/またはエステル類)、燃料エステル類(一般に、C20以下の鎖長を有するエステル類)、燃料、燃料添加剤、ナフサ、および/または液体石油代用物を含む。好ましい実施形態において、燃料エステル類は、C16の鎖長である。他には、燃料エステル類は、C18の鎖長である。さらに他の実施形態において、燃料エステル類は、鎖長がC20以下の混合物である。

【0140】

エステル化プロセス610、加水分解プロセス615、水素処理プロセス620、および蒸留プロセス625は、場合によるものであり、種々の順序で用いられてよい。破線の矢印および点線の矢印は、加水分解、水素処理、および/または蒸留プロセスが脂質画分の処理において実施されてよいときの選択肢の、全てではなくいくつかを示す。例えば、本発明のいくつかの実施形態において、抽出および/または分離が行われた後、中性脂質画分は、燃料生成物および/または添加剤を作製するために直接水素処理され得る。代替的には、他の実施形態において、中性脂質画分は、エステル化プロセス610に通されてよい。

10

20

30

40

50

## 【0141】

エステル化プロセス610は、当該分野において公知の技術、例えば、酸/塩基触媒作用を含み得、エステル交換を含み得る。塩基触媒作用は、いくつかの生成物を生成するには排除されないが、これらの技術が塩基触媒作用の間に形成される石鹸を回避するときには酸触媒作用が好ましく、下流の処理を複雑にし得る。酵素的エステル化技術が用いられてもよい。エステル化は、実質的に純粋な脂質材料(75%を超える脂質、本明細書において用いられるとき)を処理し得る。エステル化後、副生成物のグリセリンが除去され得る。次いで、エステル化脂質は、種々の鎖長のエステル化脂質および脂質画分中に存在するカロテノイドを分離するために、分子および/または非分子蒸留(プロセス625)を経てよい。次いで、エステル化脂質は、水素処理プロセス620に通されて、ジェット燃料、バイオディーゼル、および他の燃料生成物を生成することができる。当該分野において公知のいずれの水素処理プロセスが用いられてもよく;かかるプロセスは、水素を脂質分子に添加し、酸素分子を除去する。水素処理のための例示的な条件は、トリグリセリド、脂肪酸、脂肪酸エステル類を、600psiの範囲の高圧下および600°Fの範囲の温度下に水素と反応させることを含む。一般的に用いられている触媒はNiMoまたはCoMoである。

10

## 【0142】

原料の脂質よりもむしろ燃料エステル類を水素処理することは、いくつかの利点を有する。まず、エステル化プロセス610は、藻油に存在するある一定のリンおよび金属化合物のレベルを低減する。これらの材料は、水素処理プロセスにおいて典型的に用いられる触媒には毒である。このように、水素処理の前のエステル化は、水素処理触媒の寿命を長くする。また、エステル化は、水素処理される化合物の分子重量を低減し、これにより、水素処理プロセス620の性能を改善する。さらに依然として、水素処理に必要とされるエネルギーを低減することから、蒸気形態で水素処理されるよう、蒸留プロセス625からの燃料エステル類を保持することが有利である。

20

## 【0143】

本発明のいくつかの実施形態において、中性の藻類脂質は、該脂質が燃料生成物および添加剤に変換されるためには、直接水素処理される。他の実施においては、中性脂質はエステル化され、蒸留プロセス625を介してカロテノイド、長鎖不飽和エステル類、エイコサペンタエン酸(EPA)エステル類、および/または燃料エステル類に分離される。蒸留プロセス625は、分子蒸留および当該分野において公知の蒸留技術を含み得る。例えば、蒸留物は、簡単な蒸留カラムを用いて分画されて、精製のために、より短鎖の脂肪酸を分離することができる。長鎖不飽和脂肪酸は、カラム中に高沸点残渣として残存する。いくつかの実施形態において、残存する蒸気は、次いで、水素処理プロセスに送られてよい。本発明の利点の2つは、純粋なフィードおよび蒸気生成物を生じさせることであり、上記のように、エネルギーを大量消費する水素処理反応が好ましい。

30

## 【0144】

本発明のいくつかの実施形態において、極性脂質(および場合により中性脂質)は、エステル化プロセスに通される前に加水分解プロセス615において加水分解される。そうすることで、藻類脂質を開放し、より多量の藻類脂質が有用な生成物とされ得る。

40

## 【0145】

図15は、栄養価のある生成物を中性脂質から生成するプロセス700を示すフローチャートである。プロセス700の一実施において、中性脂質は、EPAリッチな油からカロテノイドを分離する吸着プロセス705に供給される。中性脂質は、本明細書に開示されている選択的抽出技術のいずれかによって生成された藻類源からのものであり得る。しかし、中性脂質は、他の源、例えば、植物源からであってもよい。

## 【0146】

吸着プロセス705は、中性脂質を、カロテノイド、例えば、ベータカロテンおよびキサントフィルを吸着する吸着剤と接触させることを含む。一実施において、吸着剤は、Diaion HP20SS(ITOCHU Chemicals America, In

50

c. から市販されている)である。中性脂質は、バッチタイプのプロセスにおいて吸着剤に接触し得、ここで、中性脂質および吸着剤は、選択された時間量でベッセルに保持される。接触時間の後、吸収剤および液体が、当該分野において公知の技術を用いて分離される。他の実施において、吸着剤は、吸着剤床に保持され、中性脂質は、吸着剤床を通過する。吸着剤床を通過する際、中性脂質のカロテノイド含量は低減され、これにより、EPAリッチな油を生成する。

【0147】

カロテノイドは、限定されないが、アルコール、例えば、エタノール、イソプロピルアルコール、ブタノール、エステル、例えば、酢酸エチルまたは酢酸ブチル、アルカン、例えば、ヘキサン、およびペンタンを含めた適切な溶媒で吸着剤を処理することによって吸着剤材料から回収され得る。

10

【0148】

図16は、燃料生成物830を中性脂質805から生成するためのプロセス800を示すフローチャートである。中性脂質は、本明細書に開示されている選択的抽出技術のいずれかによって生成された藻類源からのものであり得る。しかし、中性脂質は、他の源、例えば、植物源からであってもよい。中性脂質は、脱ガムプロセス810において処理され、ここで、脂質は、酸洗浄されて、中性脂質中の金属およびリン脂質のレベルを低減する。いくつかの実施において、リン酸の相対的希釈溶液が中性脂質に添加され、混合物が加熱および振とうされる。沈殿したリン脂質および金属は、次いで、例えば、遠心分離機によって残存する油から分離される。

20

【0149】

次いで、処理された油は、漂白プロセス815に通されて、クロロフィルおよび他の着色化合物を除去する。いくつかの実施において、漂白プロセス815は、油をクレイおよび/または他の吸着剤材料、例えば、漂白クレイ(すなわちベントナイトまたはフーラー土)と接触させることを含み、油中のクロロフィルおよび他の着色化合物を低減する。処理された油は、次いで、油の成分に水素添加およびこれを脱酸素化して燃料生成物、例えば、ジェット燃料混合物、ディーゼル燃料添加剤、およびプロパンを形成する水素処理プロセス820に通される。加えて、水素処理プロセス820もまた、より短鎖の化合物、例えば、LPGおよびナフサのいくつかのクラッキングおよび作製を引き起こす。本明細書において記載されている水素処理プロセスのいずれかが、水素処理プロセス820に用いられてもよい。

30

【0150】

水素処理プロセス820において作り出された化合物の混合物は、蒸留プロセス825に通されて、種々の燃料生成物830に分離される。蒸留プロセス825は、燃料化合物の分離のための、本明細書において記載されているまたは当該分野において公知である分子および非分子蒸留技術のいずれかを含んでよい。

【0151】

本発明のいくつかの実施形態において、タンパク質は、藻類バイオマスから選択的に抽出され得る。開示されている方法を用いたタンパク質抽出は、多くの利点を付与する。特に、藻細胞は、所望のタンパク質を抽出する前に溶解される必要がない。これは、抽出を簡素化し、その費用を低減する。本発明の方法は、種々のクラスのタンパク質の溶解度プロファイルを、藻類培養物、バイオマス、ペースト、またはケーキから選択的に抽出および分画するために利用する。

40

【0152】

例えば、藻類バイオマスは、水および塩可溶性タンパク質(アルブミンおよびグロブリンと呼ばれる)を抽出するための加熱および混合に付されてよい。この混合物は、次いで、グルテリンと呼ばれるアルカリ可溶性タンパク質を回収するためにpH変化に付される。この工程には、次いで、プロラミンと呼ばれるアルコール可溶性タンパク質の溶媒ベースの分離が続き得る。残存するバイオマスは、炭水化物および脂質リッチである。

【0153】

50

タンパク質は、図 17 および 18 に示されるように、塩水および炭水藻細胞の両方から抽出され得る。塩水藻類培養物またはバイオマス中の塩の存在は、種々のクラスのタンパク質の抽出に影響するが、本明細書に開示されている方法は、淡水または塩水藻類のいずれかからタンパク質を抽出することを可能にする。

【0154】

いくつかの実施形態において、淡水藻細胞からのタンパク質抽出は、図 17 に示される新規プロセスによって達成される。淡水藻細胞または淡水藻類バイオマスは加熱および混合される。混合は、当該分野において公知の種々の方法、例えば、限定されないが、撹拌、振とう、および揺動によって達成され得る。このプロセスは、第 1 略液相および第 1 略固相から構成される、第 1 の加熱された抽出混合物またはスラリーを生成する。固体および液相は、次いで分離される。分離は、限定されないが、遠心分離、デカンテーション、浮遊、沈降、および濾過を含めた、当該分野において公知の種々の方法によって達成され得る。この第 1 略液相は、アルブミンタンパク質が富化されている。

10

【0155】

第 1 略固相は、次いで、塩水と混合され、加熱されて、第 2 略液相および第 2 略固相から構成される、第 2 の加熱された抽出混合物またはスラリーを生成する。塩水は天然の海水であっても水性塩溶液であってもよい。かかる溶液の一例は、主に NaCl を含み、典型的には約 35 g/L を含む。固体および液相は、次いで分離される。この第 2 略液相は、グロブリンタンパク質が富化されている。

【0156】

第 2 略固相は、次いで、水と混合され、加熱されて、第 3 略液相および第 3 略固相から構成される、第 3 の加熱された抽出混合物またはスラリーを生成する。この第 3 抽出混合物またはスラリーの pH は、次いで、約 9 以上まで上げられて、第 3 略液相をグルテリンタンパク質が富化されているようにする。固体および液相は、次いで分離され、第 3 略液相は、グルテリンタンパク質が富化されている。

20

【0157】

第 3 略固相は、次いで、溶媒セットと混合され、加熱されて、第 4 略液相および第 4 略固相から構成される、第 4 の加熱された抽出混合物またはスラリーを生成する。好ましい一実施形態において、溶媒セットはエタノールを含む。他の非限定的な実施形態において、溶媒セットは、以下の溶媒：メタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリル；のうちの 1 種以上を含む。固体および液相は、次いで分離される。この第 4 略液相は、プロラミンタンパク質が富化されている。残存する第 4 略固相は、出芽藻類バイオマスの組成に応じて脂質で富化されている。

30

【0158】

いくつかの実施形態において、塩水藻細胞からのタンパク質抽出は、図 18 に示される新規プロセスによって達成される。塩水藻細胞または塩水藻類バイオマスは加熱および混合される。混合は、当該分野において公知の種々の方法、例えば、限定されないが、撹拌、振とう、および揺動によって達成され得る。このプロセスは、第 1 略液相および第 1 略固相から構成される、第 1 の加熱された抽出混合物またはスラリーを生成する。固体および液相は、次いで分離される。分離は、限定されないが、遠心分離、デカンテーション、浮遊、沈降、および濾過を含めた、当該分野において公知の種々の方法によって達成され得る。この第 1 略液相は、グロブリンタンパク質が富化されている。

40

【0159】

第 1 略固相は、次いで、水と混合され、加熱されて、第 2 略液相および第 2 略固相から構成される、第 2 の加熱された抽出混合物またはスラリーを生成する。固体および液相は、次いで分離される。この第 2 略液相は、アルブミンタンパク質が富化されている。

【0160】

第 2 略固相は、次いで、水と混合され、加熱されて、第 3 略液相および第 3 略固相から構成される、第 3 の加熱された抽出混合物またはスラリーを生成する。この第 3 抽出混合物またはスラリーの pH は、次いで、約 9 以上まで上げられて、第 3 略液相をグルテリン

50

タンパク質が富化されているようにする。固体および液相は、次いで分離され、第3略液相は、グルテリントタンパク質が富化されている。

【0161】

第3略固相は、次いで、溶媒セットと混合され、加熱されて、第4略液相および第4略固相から構成される、第4の加熱された抽出混合物またはスラリーを生成する。好ましい一実施形態において、溶媒セットはエタノールを含む。他の非限定的な実施形態において、溶媒セットは、以下の溶媒：メタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリル；のうちの1種以上を含む。固体および液相は、次いで分離される。この第4略液相は、プロラミンタンパク質が富化されている。残存する第4略固相は、出発藻類バイオマスの組成に応じて脂質で富化されてよい。

10

【0162】

開示されている方法は、図17~20において示されるように種々のタイプのタンパク質の選択的抽出も提供する。上記抽出プロセスの工程のいずれもが、単一のタンパク質生成物を選択的に抽出するために、残りの工程と別個に実施されてもよい。これの2つの例は、抽出工程1aの周囲の破線のボックスによって示されているように、図17および18において見られる。

【0163】

非限定的な例において、グロブリンタンパク質は、バイオマスを塩水と混合して加熱し、略液相および略固相から構成される、加熱された抽出混合物またはスラリーを生成することによって、淡水藻類バイオマスから選択的に抽出され得る。固体および液相は、次いで分離され得る。液相は、グロブリンタンパク質が富化されている。図17の抽出工程1aを参照されたい。

20

【0164】

別の非限定的な例において、アルブミンタンパク質は、バイオマスを水と混合して加熱し、略液相および略固相から構成される、加熱された抽出混合物またはスラリーを生成することによって、塩水藻類バイオマスから選択的に抽出され得る。固体および液相は、次いで分離され得る。液相は、グロブリンタンパク質が富化されている。図18の抽出工程1aを参照されたい。

【0165】

さらなる非限定的な例において、プロラミンタンパク質は、図19に示されるように、淡水または塩水藻類バイオマスのいずれかから選択的に抽出され得る。選択的抽出は、藻類バイオマスを溶媒セットと混合加熱し、略液相および略固相から構成される、加熱された抽出混合物またはスラリーを生成することによって達成される。固体および液相は、次いで分離され得る。液相はプロラミンタンパク質が富化されている。

30

【0166】

なお別の非限定的な例において、タンパク質画分は、図20に示されるように、淡水または塩水藻類バイオマスのいずれかから選択的に抽出され得る。選択的抽出は、藻類バイオマスを溶媒セットと混合加熱し、略液相および略固相から構成される、加熱された抽出混合物またはスラリーを生成することによって達成される。固体および液相は、次いで分離され得る。液相はタンパク質が富化されている。

40

【0167】

本発明のこれらの態様について情報を付与したが、当業者は、一工程の抽出プロセス、または多工程の抽出プロセスのいずれかによって、淡水または塩水藻類バイオマスのいずれかから、所望のタンパク質を選択的に抽出することができる。本開示に照らして、当業者は、藻塊のタンパク質含量および対象のタンパク質の溶媒度特性が考慮されるということ的前提に、上記の開示の多工程の抽出スキームの順序を置き換えることが可能である。開示されている方法の他の実施形態は、各抽出工程間に洗浄工程を組み込んでよい。

【0168】

開示されているタンパク質抽出法のいずれについても、抽出混合物/スラリーは、一定時間の間、加熱温度で維持されてよい。いくつかの実施形態において、抽出混合物は、約

50

20分～約90分の間、加熱温度で維持される。いくつかの態様において、抽出混合物は、約20分と約60分の間、加熱温度で維持される。他の態様において、抽出混合物は、約45分～約90分の間、加熱温度で維持される。

#### 【0169】

いくつかの実施形態において、抽出混合物/スラリーは、約50 未満の温度で加熱されてよい。いくつかの態様において、アルブミン、グロブリン、およびグルテリンタンパク質は、約50 未満の温度で抽出される。他の実施形態において、抽出混合物/スラリーは、抽出混合物/スラリーの沸点近くの温度で加熱される。いくつかの態様において、プロラミンタンパク質は、抽出混合物/スラリーの沸点近くの温度で加熱される。他の実施形態において、圧力は、抽出を高める加熱および混合工程の間、大気圧を超えて最大で50 psi (これを含む)まで増加される。

10

#### 【実施例】

#### 【0170】

##### 実施例1

グリーンな微細藻類スセネデスムス・ジモルファス(SD)を、パネル光バイオリアクタの外側で培養した。種々の脂質含量のSDサンプルを採取した。遠心分離によってバルク水を除去した後、藻類サンプルを3～5cmの藻類ケーキとして-80 で使用まで貯蔵した。予備計算された量の湿潤藻類バイオマス(15g、乾燥藻類の重量等価)および90mLのエタノール溶媒を、冷却器、機械的攪拌および熱電対を備えた3口フラスコに添加した。一実験において、混合物をマイクロ波照射下に10分間還流した。第2に、混合物を電子加熱によって1時間還流した。その後、混合物を室温に冷却し、濾過によって透析物と残余分とに分離した。

20

#### 【0171】

藻類サンプルの合計脂質を、Bligh & Dyerの脂質抽出法に従ってクロロホルム-メタノール-水システムを用いて分析した。この合計脂質の値を脂質回収計算の参照として用いた。合計脂質を、60～200メッシュのシリカゲル(Merck Corp., Germany)を用いて、標準的なカラムクロマトグラフィ方法によって、中性脂質および極性脂質にさらに分離した。各脂質画分を予備秤量したバイアルに移し、回転エバポレータ(Buechi, Switzerland)を用いて初めに30 で蒸発させ、次いで高真空下に乾燥した。乾燥した残余分を窒素下に置き、秤量した。各サンプルの脂肪酸プロファイルを、内部標準としてヘプタデカン酸(C17:0)を用いて脂肪酸メチルエステル類に誘導体化した後にGC-MSによって定量した。

30

#### 【0172】

結果(データ示さず)は、マイクロ波アシスト抽出が、中性脂質の分離にはいくぶん効果的でないが、第1抽出工程における極性脂質の除去については最も良好であることが示された。電子加熱は、抽出効果がより一貫している。最終的な収率は、マイクロ波アシスト抽出と電子加熱補助抽出との間に匹敵するが、マイクロ波アシスト抽出が有意にもより速い。

#### 【0173】

##### 実施例2

##### 藻類バイオマスからのタンパク質抽出

(1)酸浸出:藻類バイオマスをpH4.5で1時間、水に浸漬した。次いで、サンプルを3000rpmで3分間遠心分離し、上澄みを除去した。残存する固体を希酸(pH4.5)で3回洗浄し、凍結乾燥した。

40

#### 【0174】

(2)アルカリ抽出:藻類バイオマスをpH11で1時間、水に浸漬し、続いてpH調整された水を添加した。次いで、サンプルを3000rpmで3分間遠心分離し、上澄みを除去した。上澄みを希酸(pH4.5)で中和し、続いて遠心分離した。残存する固体を希酸(pH4.5)で3回洗浄し、凍結乾燥した。

#### 【0175】

50

酸浸出およびアルカリ抽出の結果を表4において以下に示す。

【表4】

プロセス	タンパク質収率 (重量%)	タンパク質純度 (タンパク質収率 の重量%)
アルカリ抽出	16	45
酸浸出	70	32.5

【0176】

タンパク質収率を重量基準で計算し、凍結乾燥された固体の重量を、pH調整された水に浸漬する前の藻類バイオマスの重量と比較した。タンパク質純度を American Oil Chemists' Society (Ba-2a-38) の公式な方法によって決定し、各プロセスの凍結乾燥された固体中の窒素の量を測定した。タンパク質は、藻類生成物抽出の値を増大させる重要な生成物であるため、この情報は、本明細書に開示されているシステムおよび方法において、種々のタンパク質レベルを有する原料の使用を可能にする。

10

【0177】

実施例3

塩水藻類バイオマスからのタンパク質抽出

初めに塩水中約1~10% w/wの固体とされた塩水藻類培養物を50に加熱し、この温度で1時間維持した。得られたスラリーを遠心分離して液相を固相から分離した。液体抽出物はグロブリンタンパク質リッチであることが判明した(元の藻類バイオマスに約10%の合計タンパク質が存在)。

20

【0178】

固体を次いで淡水に懸濁させ、約50まで加熱し、約1時間維持した。得られたスラリーを再び遠心分離して液相を固相から分離した。液相は、アルブミンタンパク質リッチであることが判明した(元の藻類バイオマスに約10%の合計タンパク質が存在)。

【0179】

固体を次いでエタノールに懸濁させ、70% w/wの混合物を得た。この混合物を約75に加熱し、この温度で約1時間維持した。得られたスラリーを遠心分離して液相を固相から分離した。液相は、アルブミンタンパク質リッチであることが判明した(元の藻類バイオマスに約30%の合計タンパク質が存在)。

30

【0180】

固体を次いでアルカリ溶液(水性NaOH、pH9)に懸濁させ、約50に加熱し、この温度で約1時間維持した。得られたスラリーを遠心分離して液相を固相から分離した。液相は、グルテリンタンパク質リッチであることが判明した(元の藻類バイオマスに約50%の合計タンパク質が存在)。

【0181】

実施例4

エタノールによる藻類バイオマスの工程分画および抽出

1000ポンドのナンノクロコブシ属のバイオマス(Arizona State University、Laboratory for Algae Research and Biotechnologyから得た株202.0から培養、ATCC寄託番号PTA-11048)を採取し、藻類が約35% w/w含まれ、次いで最終的に凍結されるまで脱水した。

40

【0182】

抽出工程を、ヒンジ付蓋を有する400ガロンのジャケット付ケトルにおいて実施した。蓋をストラップで固定し、シリコンでシールした。システムは、2個の翼軸を有する2馬力の防爆モーターを有するミキサーも含有した。凍結した藻類材料をタンク内で空にして、等重量のエタノールを空気圧ドラムポンプを用いてポンピングした。材料を15分間攪拌し、ジャケットによって水蒸気を加熱して、各抽出工程における所望の温度を得た

50



。所望の温度は、沸点近く、混合物の沸点の3以内を意味するが、沸騰しない。この所望の温度は、エタノールの割合が変化するに従って混合物の沸点が変化するため、各抽出工程において異なる。所望の温度に達したら、システムは、ケトルの内容物が均一に加熱されることを各日にするために60分間所望の温度で保持され、これを連続的に撈拌した。

#### 【0183】

次いで、ケトルの内容物を、空気圧のVikingのベーンポンプを1分あたり約1ガロンで用いて、抽出ベッセルの外であってSharplesデカンタ遠心分離機の中にポンピングした。デカンタ遠心分離機のロータ速度を約6000rpmに設定した。固体を密閉したプラスチックドラムに収集し、該固体は、液体に対して約50%w/wの固体からなった。これらの固体をケトルに戻し、ここで、上記抽出工程を繰り返した。デカンタからの液体ストリームをフィードタンク内に収集し、次いで膜濾過システムに供給した。用いた膜は、Graver Technologies製の0.375ft<sup>2</sup>SSの膜であった。操作条件は60 ± 5であり、40psiの平均圧力勾配であった。膜システムを圧縮空気です約15分ごとに逆洗浄し、流束を維持した。膜システムから収集した浸透物は、いずれの粒子状物も含まなかった。残余分を収集し、デカンタにリサイクルした。

10

#### 【0184】

この抽出および分画は、各抽出におけるプロセスを通じた、溶媒の極性の変化に起因するものである。図13に示される抽出において、プロセスを、約65%の純粋な水(35%w/wの藻類固体)を含有する約1000lbs.の湿潤藻類バイオマスによって開始した。これを860lbs.の変性エタノール(95%のエタノールおよび5%のメタノール)と混合し、約55%の水性エタノールを含有する混合物を生じた。固体および液体を上記のようにデカンタを用いて分離した。湿潤固体部分は、525lbsの重量であり、40%の乾燥質量であった。合計525lbs.の95%変性エタノールを固体に添加し、約85%を水性エタノールが占める混合物を生じた。固体および液体を上記のようにデカンタを用いて分離した。固体部分は、354.5lbsの重量であり、40%の乾燥質量であった。この塊に、別の700lbs.の変性エタノールを添加し、約95%の水性エタノールの混合物を生じた。固体および液体を上記のようにデカンタを用いて分離した。得られた固体は、約40%の乾燥質量であった。このバイオマスは、水およびエタノールの潜在熱を基準に計算されるとき、乾燥に60%未満のエネルギーを必要とする。

20

30

#### 【0185】

いくつかの実験において(データ示さず)、他のタイプの変性エタノールを試した。95%のエタノールおよび5%のイソプロピルアルコールを含有する変性エタノールを抽出に用いたが、95%のエタノールおよび5%メタノールのものほど効果的でないことが分かった。100%のエタノールの使用が本発明の好ましい実施形態であるが、コスト制約によって一般に利用可能でない。

#### 【0186】

膜システムからの浸透物ストリームを、社内で製作したバッチ式蒸留室を用いて蒸発させた。操作条件は、真空蒸留の間、約80であった。浸透物中の全てのエタノールを蒸発させた。これらの抽出工程を3回繰り返し、図13に示すように、4つの生成物プールを生じた。これは、各抽出工程について、混合物への水の添加により極性が変化し、各工程について異なる成分の抽出を可能にするためである。生成物1は、藻類タンパク質を含有し、結果として、操作条件下に蒸気化され得ない、システム内の過剰の水を保持することとなった。生成物2は極性脂質を含有した。生成物3は中性脂質を含有した。最終的に、生成物4は残りのバイオマスであり、潜在的な副産物、例えば、カロテノイドを含有した。

40

#### 【0187】

##### 実施例5

エタノールによる藻類バイオマスの脱水および抽出

採取の際、藻類バイオマスは、典型的には約0.1~0.5%(w/w)の間の固体を

50

含有する。これは、限定されないが膜濾過、遠心分離、加熱、沈降または浮遊を含めた藻類産業において公知の方法のいずれかによって脱水され得る。軟凝集は、浮遊または沈降のいずれかを補助してよい。かかる方法の典型的な結果は、約10% w/wの固体を含有する藻類スラリーである。さらに脱水するために、残存する遊離水のいくらかを除去して40% w/wに近い固体濃度を得る別の脱水方法が用いられてよい。しかし、脱水のコストは、第1脱水が行われた後に指数関数的に増加する。本明細書に開示されているシステムおよび方法の利点は、たった1ラウンドの脱水を経た藻塊の抽出および分画を可能にすることである。

#### 【0188】

かかるプロセスの例は、第1抽出ラウンドにおいて、実施例3に記載のプロトコルに従い、90%の純粋な水を含有する1000lbs.の湿潤バイオマス(1000lbs.の変性エタノール(95%のEtOHおよび5%のMeOH)と混合して、約50%の水性エタノールの溶媒混合物を生じることである。得られたバイオマス(350lbs.)は、40%乾燥である。これらの湿潤固体の組成は、50%が水性エタノールである。別の350lbs.の変性エタノールでは、混合物の組成は約81%が水性エタノールである。得られたバイオマス(235lbs.)は、40%乾燥である。これらの湿潤固体の溶媒組成は、81%が水性エタノールである。別の470lbs.の変性エタノールでは、混合物の組成は、約95%が水性エタノールである。得られた固体は、約95%がエタノールで、40%乾燥である。この湿潤バイオマスは、水およびエタノールの潜在熱を基準にして、乾燥に60%未満のエネルギーを必要とする。この場合、1000lbs.の藻類は、1820lbs.のエタノールを用いて抽出された。出発物質が40%の藻類固体である実施例3と比較すると、350lbs.の乾燥藻類等価物が、のエタノールで抽出された。

#### 【0189】

##### 参考文献

以下の参考文献は、全体が参照により本明細書に組み込まれる：

米国特許第7,148,366号

Rhodes, Science Progress, 92(1):39-90, 2009. Generic review on using algae to produce biodiesel  
Christi, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv 25, 294-306. - Generic review on using algae to produce biodiesel

Amin, Energy Convers. Manage., 50:1834-1840, 2009. Generic review on using algae to produce biofuel and gas

Catchpole et al., J. of Supercritical Fluids, 47:591-597, 2009. SCF CO2 based extraction of specialty lipids

Bligh E G & Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959.

Christie, W. W., Lipid Analysis, 3rd ed., Oily Press, Bridgewater, UK, 2003, 416

Approved Methods of the AACC, 9th ed., American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, 1995 AACC Method 58-19.

【図1A】

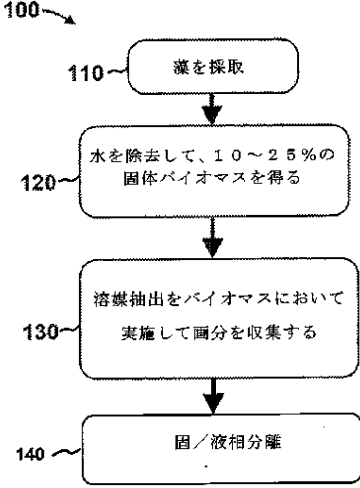


図1A

【図1B】

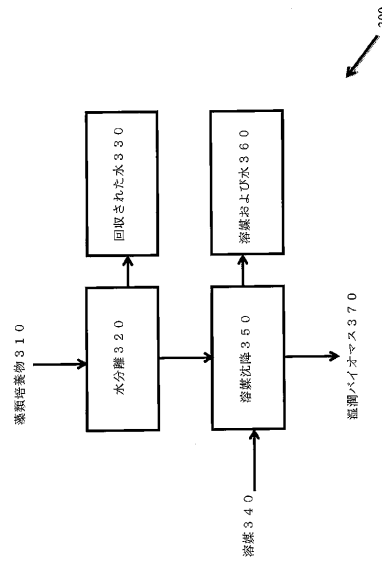


図1B

【図2】

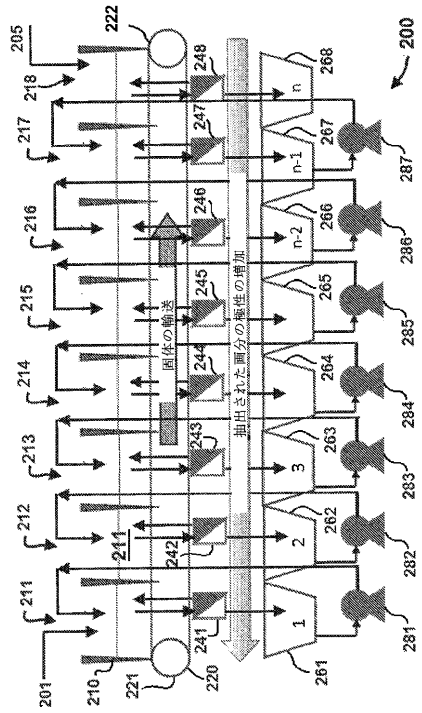


図2

【図3】

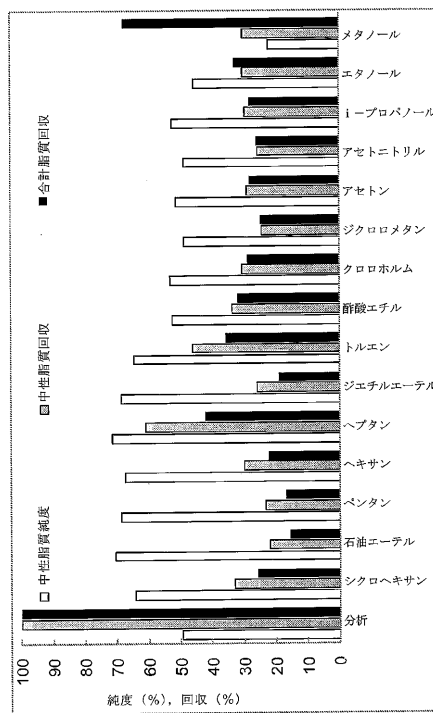


図3

【 図 4 A 】

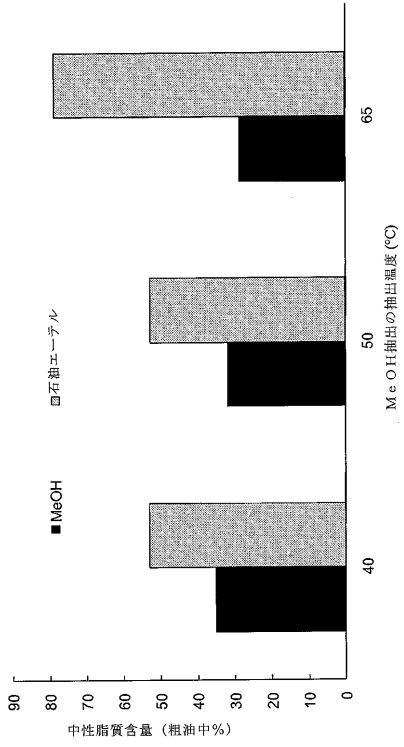


図 4 A

【 図 4 B 】

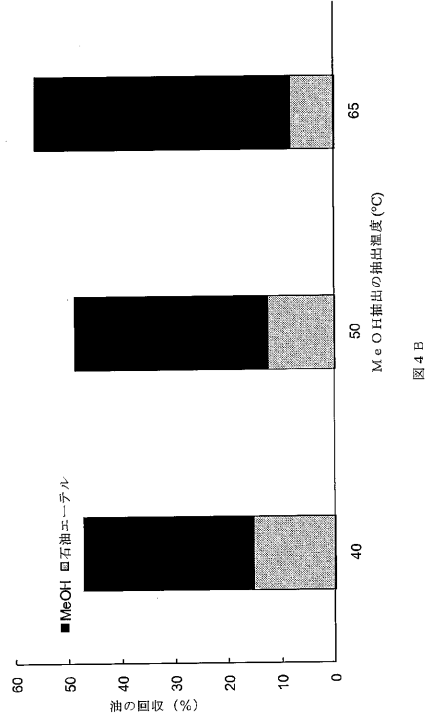


図 4 B

【 図 5 A 】

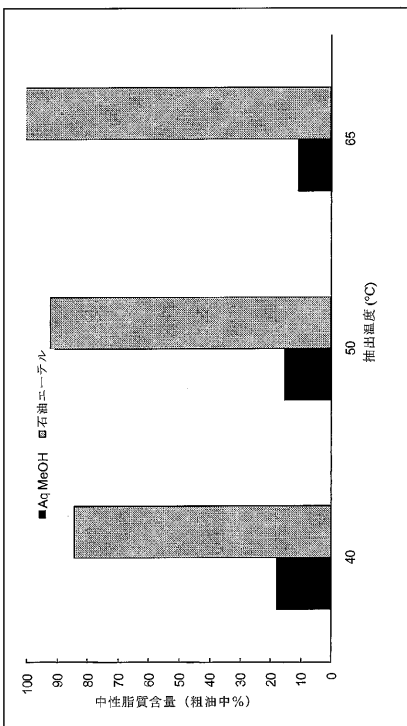


図 5 A

【 図 5 B 】

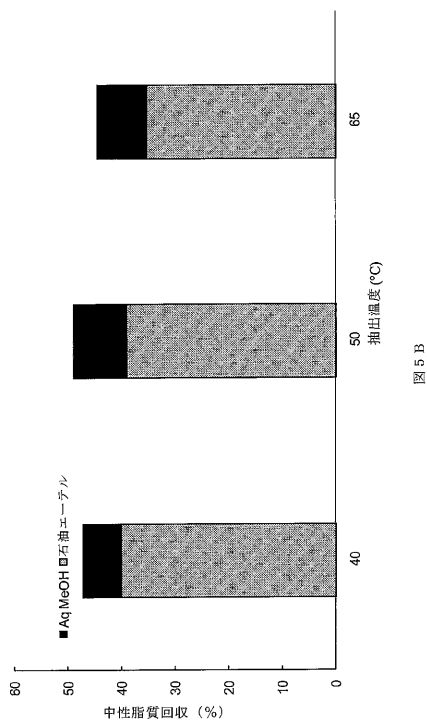


図 5 B

【 図 6 】

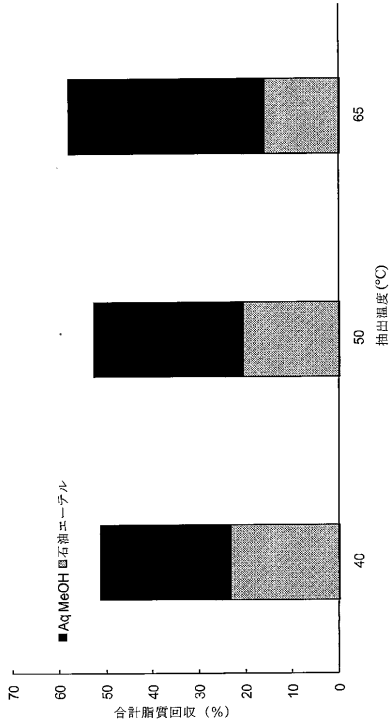


図 6

【 図 7 】

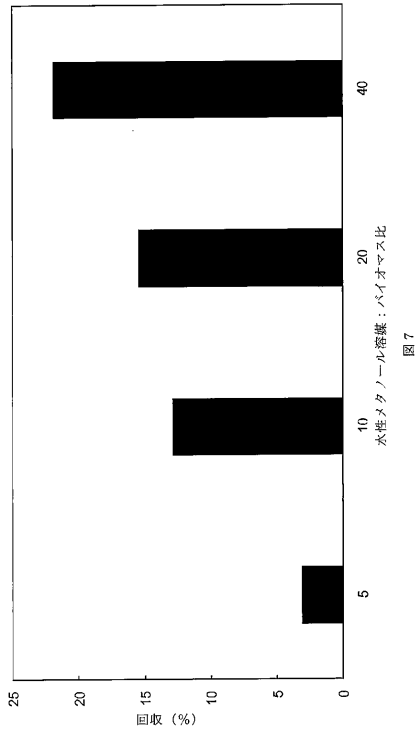


図 7

【 図 8 】

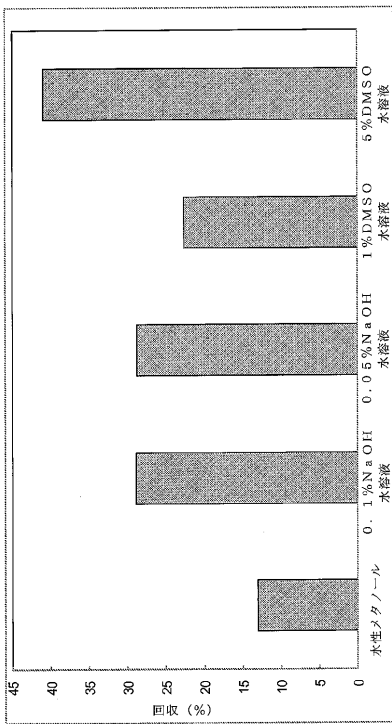


図 8

【 図 9 】

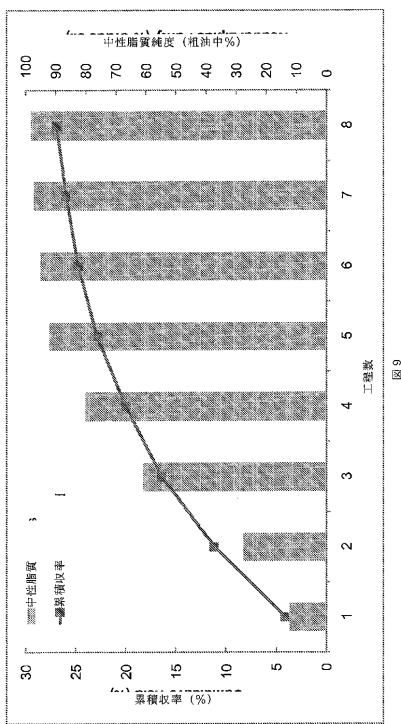


図 9

【図 1 0】

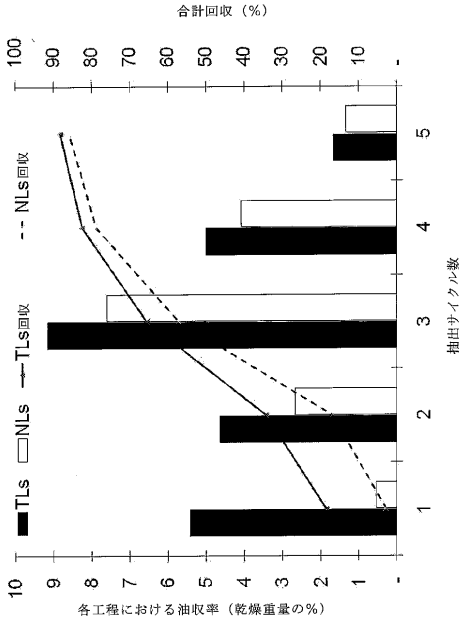


図 10

【図 1 1】

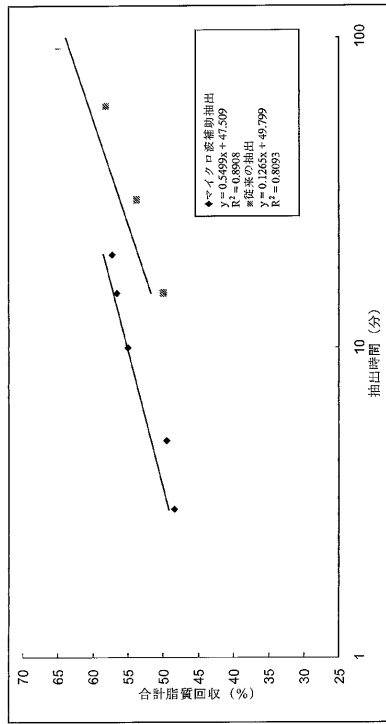


図 11

【図 1 2 A】

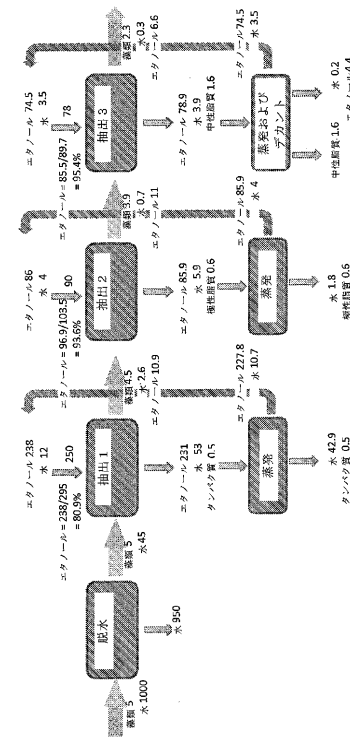


図 1 2 A

【図 1 2 B】

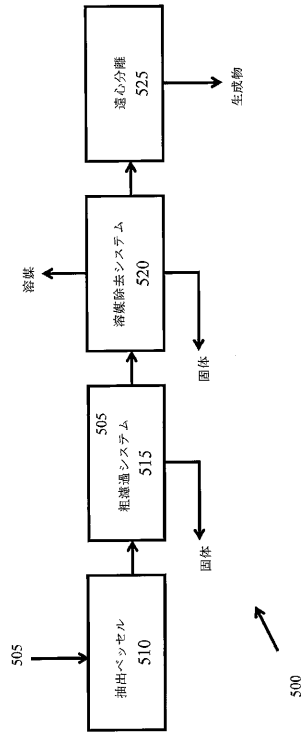


図 1 2 B



【 図 1 7 】

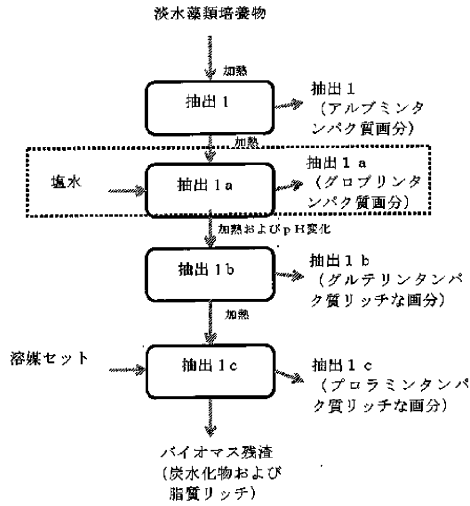


図 1 7

【 図 1 8 】

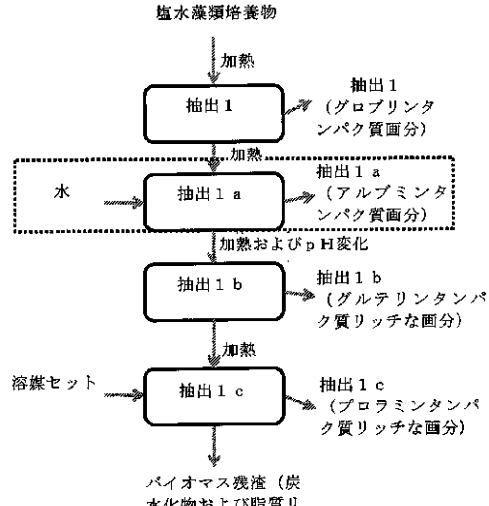


図 1 8

【 図 1 9 】

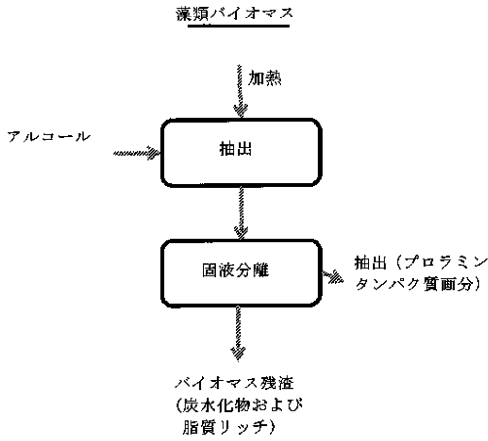


図 1 9

【 図 2 0 】

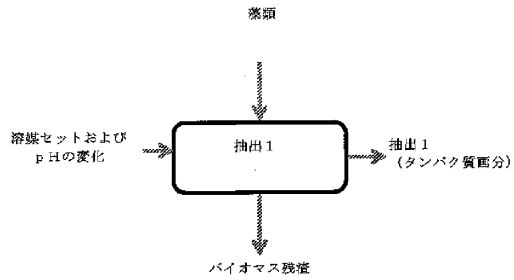


図 2 0



【図 2 1】

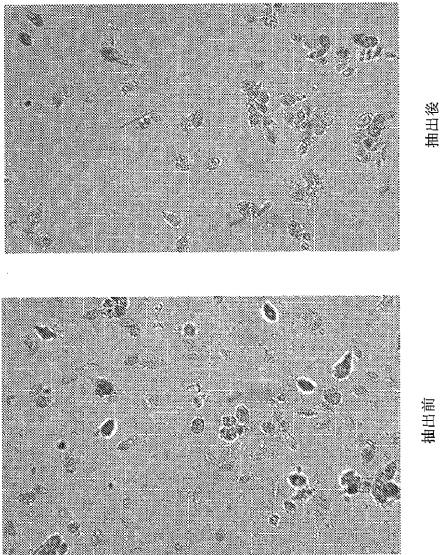


図 2 1

## 【手続補正書】

【提出日】平成24年6月20日(2012.6.20)

## 【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】

無傷の藻細胞から構成される塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物から藻類タンパク質を選択的に抽出する方法であって：

a. グロブリンタンパク質、アルブミンタンパク質、グルテリンタンパク質、およびプロラミンタンパク質を含む無傷の藻細胞から構成される塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を提供することと；

b. 塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を加熱および混合して、グロブリンタンパク質から構成される第 1 略液相、およびアルブミンタンパク質、グルテリンタンパク質、およびプロラミンタンパク質から構成される第 1 略固相から構成される第 1 の加熱された抽出混合物を生成することと；

c. グロブリンタンパク質を含む第 1 略液相の少なくとも一部を第 1 略固相から分離することと；

d. 第 1 固相を水と混合し加熱して、アルブミンタンパク質から構成される第 2 略液相、およびグルテリンタンパク質およびプロラミンタンパク質から構成される第 2 略固相から構成される第 2 の加熱された抽出混合物を生成することと；

e. アルブミンタンパク質から構成される第 2 略液相の少なくとも一部を第 2 略固相から分離することと；

f. 第 2 略固相を水と混合し加熱して、第 3 略液相および第 3 略固相から構成される第 3 の加熱された抽出混合物を生成することと；

g. 第 3 の加熱された抽出混合物の pH を上昇させることと；

h. グルテリントタンパク質から構成される第 3 略液相の少なくとも一部をプロラミンタンパク質から構成される第 3 略固相から分離することと；

i. 第 3 略固相を加熱し溶媒セットと混合して、プロラミンタンパク質から構成される第 4 略液相および第 4 略固相から構成される第 4 の加熱された抽出混合物を生成することと；

j. プロラミンタンパク質から構成される第 4 略液相の少なくとも一部を第 4 略固相から分離することと

を含み、

第 1 略液相は、第 2、第 3、および第 4 略液相よりも高いアルブミンタンパク質濃度を有し、第 2 略液相は、第 1、第 3、および第 4 略液相よりも高いグロブリンタンパク質濃度を有し、第 3 略液相は、第 1、第 2、および第 4 略液相よりも高いグルテリントタンパク質濃度を有し、第 4 略液相は、第 1、第 2、および第 3 略液相よりも高いプロラミンタンパク質濃度を有する、方法。

【請求項 2】

分離工程のうちいずれか 1 つ以上が、遠心分離、濾過、浮遊、および沈降からなる群から選択される少なくとも 1 つの方法によって実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第 1、第 2、第 3、および第 4 の加熱された抽出混合物のうち少なくとも 1 つが、分離の前に、選択された時間、加熱温度で維持される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

第 1、第 2、第 3、および第 4 の加熱された抽出混合物のうち少なくとも 1 つが、約 20 ~ 約 60 分の間、加熱温度で維持される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

第 1、第 2、第 3、および第 4 の加熱された抽出混合物のうち少なくとも 1 つが、約 45 ~ 約 90 分の間、加熱温度で維持される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

第 1、第 2、第 3、および第 4 の加熱された抽出混合物のうち少なくとも 1 つが、約 50 で維持される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

第 4 略固相が、脂質から構成されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

実質的に無傷の塩水藻細胞から構成される藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物からグロブリンタンパク質を選択的に抽出する方法であって：

a. グロブリンタンパク質およびアルブミンタンパク質を含む無傷の藻細胞から構成される塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を提供することと；

b. 塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を加熱および混合して、グロブリンタンパク質から構成される加熱された液相およびアルブミンタンパク質から構成される加熱された略固相から構成される抽出混合物を生成することと；

c. グロブリンタンパク質から構成される加熱された液相の少なくとも一部を加熱された略固相から分離することと

を含み、液相が、略固相よりも高いグロブリンタンパク質濃度を有し、略固相が、液相よりも高いアルブミンタンパク質濃度を有する、方法。

【請求項 9】

塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物は、加熱および混合の少なくとも一部の間、約 50 で維持される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

実質的に無傷の藻細胞から構成される塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物からア

ルブミンタンパク質を選択的に抽出する方法であって：

a . アルブミンタンパク質およびグルテリンタンパク質を含む無傷の藻類から構成される塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を提供することと；

b . 塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物を加熱および混合して、アルブミンタンパク質から構成される加熱された略液相およびグルテリンタンパク質から構成される加熱された略固相から構成される抽出混合物を生成することと；

c . アルブミンタンパク質から構成される加熱された略液相の少なくとも一部を加熱された略固相から分離することと

を含み、加熱された略液相が、加熱された略固相よりも高いアルブミンタンパク質濃度を有し、加熱された略固相が、加熱された略液相よりも高いグルテリンタンパク質濃度を有する、方法。

【請求項 1 1】

塩水藻類バイオマスまたは塩水藻類培養物および水の混合物は、加熱および混合の工程の少なくとも一部の間、約 5 0 で維持される、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

溶媒セットは、エタノールを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

溶媒セットは、アルコールを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

溶媒セットは、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリルからなる群から選択される少なくとも 1 つの溶媒を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

溶媒セットは、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリルからなる群から選択される少なくとも 1 つの溶媒を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 1 6】

溶媒セットは、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、酢酸エチル、およびアセトニトリルからなる群から選択される少なくとも 1 つの溶媒を含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/031408
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A23J1/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A23J A23L A61K C12N		
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, FSTA, BIOSIS, COMPENDEX, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE FSTA [Online] INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANKFURT-MAIN, DE; 1974, WACHOWICZ M ET AL: "The protein of the alga Spirulina platensis. (translated)", XP002651053, Database accession no. FS-1975-01-G-0053 abstract ----- -/--	1-16
<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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 July 2011		09/08/2011
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
		Götz, Michael

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/031408

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>AGBOOLA S ET AL: "Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates",            JOURNAL OF CEREAL SCIENCE, ACADEMIC PRESS LTD, XX,            vol. 41, no. 3, 1 May 2005 (2005-05-01),            pages 283-290, XP004807415,            ISSN: 0733-5210, DOI:            DOI:10.1016/J.JCS.2004.10.007            abstract            Page 284, left column, section 2.2            entitled "Isolation of proteins by the Osborne method"</p> <p>-----</p>	1-16
Y	<p>JU Z Y ET AL: "EXTRACTION, DENATURATION AND HYDROPHOBIC PROPERTIES OF RICE FLOUR PROTEINS",            JOURNAL OF FOOD SCIENCE, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US,            vol. 66, no. 2, 1 March 2001 (2001-03-01),            pages 229-232, XP009080240,            ISSN: 0022-1147, DOI:            DOI:10.1111/J.1365-2621.2001.TB11322.X            abstract            The section bridging pages 229 and 230,            entitled "Protein extraction"</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>WO 2006/095964 A1 (JIN HYUN JIN [KR])            14 September 2006 (2006-09-14)            paragraphs [0016], [0022]</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>WO 2008/031092 A2 (UNIV MISSISSIPPI [US]; PASCO DAVID STANLEY [US]; PUGH NIRMAL DEREK CER) 13 March 2008 (2008-03-13)            page 4, lines 21-35            page 9, lines 6-14            page 12, line 12 - page 13, line 10            claims 1,6-8,15-17</p> <p>-----</p>	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/031408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006095964 A1	14-09-2006	KR 20060097947 A	18-09-2006
WO 2008031092 A2	13-03-2008	CA 2662550 A1	13-03-2008
		EP 2064232 A2	03-06-2009
		US 201003275 A1	07-01-2010

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ケイル、 アニケット

アメリカ合衆国 85226 アリゾナ州 チャンドラー ナンバー1097 ウェスト ジョシ  
ユア ブルーバード 4909

Fターム(参考) 4B064 AG01 AG24 CA08 CC15 CE03 CE08 DA10 DA11  
4H045 AA20 BA10 CA30 DA70 EA01 EA07 EA60 GA01 GA05