

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 3 区分

【発行日】平成 27 年 3 月 26 日 (2015.3.26)

【公表番号】特表 2014-510165 (P2014-510165A)

【公表日】平成 26 年 4 月 24 日 (2014.4.24)

【年通号数】公開・登録公報 2014-021

【出願番号】特願 2013-553593 (P2013-553593)

【国際特許分類】

C 1 1 B 1/10 (2006.01)

C 1 1 B 3/12 (2006.01)

A 2 3 D 9/02 (2006.01)

C 1 2 P 7/64 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 R 1/645 (2006.01)

【F I】

C 1 1 B 1/10 Z N A

C 1 1 B 3/12

A 2 3 D 9/02

C 1 2 P 7/64

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1:645

【手続補正書】

【提出日】平成 27 年 2 月 3 日 (2015.2.3)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 8 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 8 5】

当業者は、油の重量パーセントとして計測して 97.4% の EPA エチルエステルを含み、実質的に DHA、NPDA および HPA を含まない EPA 濃縮物を、当業者に周知の手段を使用して容易に変換して代替的形態の EPA 濃縮物を得ることができることを認識する（すなわち、EPA エチルエステルを、遊離脂肪酸、トリアシルグリセロール、メチルエステル、およびそれらの組合せに変換することができる）。したがって、例えば、97.4% の EPA エチルエステルを、グリセロール分解を介してトリグリセリドに再エステル化して油の重量%として計測して少なくとも 70 重量% の EPA を含み、実質的に DHA、NPDA および HPA を含まないトリグリセリド形態の EPA 濃縮物をもたらすことができる。

さらに、EPA の生成について遺伝子操作された組換えヤロウシア (Yarrowia) 細胞の任意の微生物バイオマスから本明細書における本発明の方法により調製された EPA 濃縮物は、実質的に DHA、NPDA および HPA を含まないと予期されることが留意される。最終 EPA 濃縮物が実質的に DHA、NPDA および HPA を含まない、Y・リポリティカ (Y. lipolytica) Y9502 株から得られた微生物油に基づき上記で得られた結果は、実施例 27 および実施例 31 から得られた微生物油から調製される EPA 濃縮物から予期される。DHA、NPDA および HPA 不純物が、油として乾燥細胞重量の 25% を超過して蓄積するヤロウシア (Yarrowia) から得られた、TFA の重量%として計測して 30 から 70 重量% の EPA を含む初期微生物油中に存在し

ないため、脂肪酸不純物は、それから生成されたEPA濃縮物中にも存在しない。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0486

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0486】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. (a) ある水分レベルを有し、含油微生物を含む微生物バイオマスをペレット化する工程；

(b) 工程(a)のペレット化された微生物バイオマスを抽出して抽出油を生成する工程；および

(c) 工程(b)の抽出油を、短行程蒸留条件下で少なくとも1回蒸留する工程を含み、前記蒸留が、蒸留物画分および脂質含有画分を生成する方法。

2. 前記含油微生物が、酵母、藻類、菌類、細菌、ユーグレナ類、ストラメノパイルおよび卵菌綱からなる群から選択される、上記1に記載の方法。

3. 前記含油微生物が、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸を油中に含む、上記1に記載の方法。

4. 前記微生物バイオマスの前記水分レベルが、約1から10質量パーセントの範囲である、上記1に記載の方法。

5. 前記微生物バイオマスをペレット化する工程(a)が、

(1) 前記微生物バイオマスおよび少なくとも1つの吸油し得る粉碎剤を混合して、破碎微生物バイオマスを含む破碎バイオマス混合物を提供する工程；

(2) 前記破碎バイオマス混合物を少なくとも1つの結合剤とブレンドして、固体ペレットを形成し得る固定可能な混合物を提供する工程；ならびに

(3) 前記固定可能な混合物を固体ペレットに形成して、ペレット化微生物バイオマスを提供する工程を含む、上記1に記載の方法。

6. 前記破碎微生物バイオマスを、

(a) 約0.04から0.4KW/(kg/hr)の総比エネルギーインプット(SEI)；

(b) 次第に短くなるピッチ長さを有するブッシュエレメントを使用する圧密帯域；および

(c) 流動制限を使用する圧縮帯域

を含む2軸スクルー押出機中で生成し；前記押出機中で前記圧密帯域は前記圧縮帯域よりも先行する、上記5に記載の方法。

7. (a) 前記少なくとも1つの粉碎剤が、

(i) 前記少なくとも1つの粉碎剤は、2.0から6.0のMoh硬度およびASTM法D1483-60に従って測定される0.8以上の吸油係数を有する粒子である；

(ii) 前記少なくとも1つの粉碎剤は、シリカおよびケイ酸塩からなる群から選択される；ならびに

(iii) 前記少なくとも1つの粉碎剤は、前記固体ペレット中の微生物バイオマス、粉碎剤および結合剤の質量の総和に対して約1から20質量パーセント存在する、からなる群から選択される特性を有し、ならびに/または

(b) 前記少なくとも1つの結合剤が、

(iv) 前記少なくとも1つの結合剤は、水ならびにスクロース、ラクトース、フルクトース、グルコース、および可溶性デンプンからなる群から選択される炭水化物から選択される；ならびに

(v) 前記少なくとも1つの結合剤は、前記固体ペレット中の微生物バイオマス、粉碎剤および結合剤の質量の総和に対して約0.5から10質量パーセント存在する、

からなる群から選択される特性を有する、
上記 5 に記載の方法。

8. (a) 前記微生物バイオマスを混合する工程 (1) および少なくとも 1 つの結合剤をブレンドする工程 (2) は、押出機中で実施し、同時に実施し、または押出機中で同時に実施し；

(b) 前記固定可能な混合物から前記固体ペレットを形成する工程 (3) は、

(i) 前記固定可能な混合物をダイに通して押出してストランドを形成する工程；

(ii) 前記ストランドを乾燥および破壊する工程；ならびに

(iii) 前記固定可能な混合物をダイに通して押出してストランドを形成する工程

(i) ならびに前記ストランドを乾燥および破壊する工程 (ii) の組合せ

からなる群から選択される工程を含む、

上記 5 に記載の方法。

9. 前記固体ペレットが、

(a) 前記固体ペレットは、約 0.5 から約 1.5 mm の平均直径および約 2.0 から約 8.0 mm の平均長さを有する；

(b) 前記固体ペレットは、約 0.1 から 5.0 質量パーセントの水分レベルを有する、ならびに

(c) 前記固体ペレットは、前記固体ペレット中の微生物バイオマス、粉碎剤および結合剤の質量の総和に対して約 70 から約 98.5 質量パーセントの含油微生物を含む微生物バイオマス、約 1 から約 20 質量パーセントの少なくとも 1 つの吸油し得る粉碎剤および約 0.5 から 10 質量パーセントの少なくとも 1 つの結合剤を含む

からなる群から選択される特性を有する、上記 5 に記載の方法。

10. 工程 (b) において、前記抽出は、有機溶媒により実施して抽出油を生成し、前記抽出油を、前記抽出油を蒸留する前記工程 (c) の前に脱ガム処理し、場合により漂白する、上記 1 に記載の方法。

11. 工程 (b) において、前記抽出が：

(1) 前記ペレット化微生物バイオマスを、液体または超臨界流体二酸化炭素を含む溶媒により処理することであって、含油微生物を含む前記ペレット化微生物バイオマスは、

(i) 実質的にリン脂質を含まない脂質画分を含む抽出物；および

(ii) リン脂質を含む残留バイオマス；

を得るために少なくとも 1 つの多価不飽和脂肪酸を油中にさらに含むこと；ならびに

(2) 工程 (1) 区分 (i) において得られた抽出物を少なくとも 1 回分別して少なくとも 1 つの多価不飽和脂肪酸を含むリファインド脂質組成物を有する抽出油を得ることであって、前記リファインド脂質組成物は、溶媒により処理されていないペレット化微生物バイオマスの油組成物に対してトリアシルグリセロールが濃縮されていること

を含む、上記 1 に記載の方法。

12. (i) 工程 (b) の前記抽出油が、ステロール画分を含み、

(ii) 工程 (c) の前記蒸留物画分が、前記ステロールを含み、

(iii) 工程 (c) の前記脂質含有画分が、短行程蒸留に供されなかった前記抽出油中のステロールの量と比較して低減した量の前記ステロールを含む、
上記 1 に記載の方法。

13. 前記ステロール画分が、スチグマステロール、エルゴステロール、ブラシカステロール、カンベステロール、 β -シトステロールおよびデスモステロールからなる群から選択される 1 つ以上のステロールを含む、上記 12 に記載の方法。

14. 少なくとも 1 つの多価不飽和脂肪酸を含み、溶媒により処理されていないペレット化微生物バイオマスの油組成物に対してトリアシルグリセロールが富化されたりファインド脂質組成物を有する前記抽出油が、少なくとも 300 mg / 100 g のステロール画分をさらに含む、上記 11 に記載の方法。

15. リファインド脂質組成物を有する前記抽出油を、短行程蒸留条件下で少なくとも 1 回蒸留し、前記蒸留が、ステロールを含む蒸留物画分ならびにトリアシルグリセロールお

よび短行程蒸留に供されなかったリファインド脂質組成物を有する前記抽出油中のステロールの量と比較して低減した量のステロールを含む脂質含有画分を生成する、上記 1 4 に記載の方法。

16．前記酵母が、ヤロウシア (Yarrowia) である、上記 2 に記載の方法。

17．前記ヤロウシア (Yarrowia) が、リノール酸、 α -リノレン酸、エイコサジエン酸、ジホモ α -リノレン酸、アラキドン酸、ドコサテトラエン酸、 α -6 ドコサペンタエン酸、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサトリエン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸、 α -3 ドコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される多価不飽和脂肪酸の生成について組換え遺伝子操作されている、上記 16 に記載の方法。

18．(d) 工程 (c) の脂質含有画分をエステル交換する工程；および

(e) 工程 (d) のエステル交換された脂質含有画分を富化して油濃縮物を得る工程をさらに含む、上記 1 に記載の方法。

19．(i) 前記含油微生物が、微生物油としてそれらの乾燥細胞質量の 25% を超過して蓄積し；

(ii) 前記微生物油が、総脂肪酸の質量パーセントとして計測して 30 から 70 質量パーセントのエイコサペンタエン酸を含み、実質的にドコサヘキサエン酸を含まず、

(iii) 工程 (e) の富化が、少なくとも 2 つのプロセスの組合せによるものであり、前記第 1 のプロセスは、分留を含み、前記第 2 のプロセスは、尿素アダクト形成、液体クロマトグラフィー、超臨界流体クロマトグラフィー、擬似移動床クロマトグラフィー、実移動床クロマトグラフィーおよびそれらの組合せからなる群から選択され；

(iv) 前記油濃縮物が、油の質量パーセントとして計測して少なくとも 70 質量パーセントのエイコサペンタエン酸を含み、実質的にドコサヘキサエン酸を含まないエイコサペンタエン酸濃縮物である、

上記 18 に記載の方法。

20．リン脂質を含む前記残留バイオマスをさらに抽出して前記リン脂質を単離する、上記 11 に記載の方法。

【手続補正 3】

【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】

(a) ある水分レベルを有し、含油微生物を含む微生物バイオマスをペレット化する工程；

(b) 工程 (a) のペレット化された微生物バイオマスを抽出して抽出油を生成する工程；および

(c) 工程 (b) の抽出油を、短行程蒸留条件下で少なくとも 1 回蒸留する工程を含み、前記蒸留が、蒸留物画分および脂質含有画分を生成する方法。