(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-525667
(P2024-525667A)
(43)公表日　令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/00 (2006.01)*	C12N	1/00	K	4B065
C12N	*1/18 (2006.01)*	C12N	1/18		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全24頁）

(21)出願番号　特願2024-501186(P2024-501186)
(86)(22)出願日　令和4年7月12日(2022.7.12)
(85)翻訳文提出日　令和6年2月26日(2024.2.26)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/069504
(87)国際公開番号　WO2023/285480
(87)国際公開日　令和5年1月19日(2023.1.19)
(31)優先権主張番号　21185098.7
(32)優先日　令和3年7月12日(2021.7.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,
最終頁に続く

(71)出願人　524011029
イースタップ・アクチエンゲゼルシヤフト
スイス国、５２００　ブルック、バーデナーストラーセ、１３
(74)代理人　100069556
弁理士　江崎 光史
(74)代理人　100111486
弁理士　鍛冶澤 實
(74)代理人　100139527
弁理士　上西 克礼
(74)代理人　100164781
弁理士　虎山 一郎
(74)代理人　100221981
弁理士　石田 大成
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　酵母からタンパク質および糖類を単離するための方法

(57)【要約】
以下のステップを含む、タンパク質および糖類を単離するために、酵母、特にビール酵母を溶解するための方法：
ａ）酵母懸濁液、特にビール酵母懸濁液を提供するステップ；
ｂ）前記酵母懸濁液中の酵母を物理的に溶解するステップ；
ｃ）ステップｂ）からの溶解酵母懸濁液を精密濾過するステップ；
ｄ）ステップｃ）からの精密濾過の透過物を限外濾過するステップであって、限外濾過の保持物として、タンパク質を主固体成分として有する相が分離されるステップ；
ｅ）ステップｃ）からの精密濾過の保持物を、塩基性条件下でプロテアーゼで処理し、および引き続き、マンナンを主固体成分として有する相を、特に濾過および／または遠心分離によって、分離するステップ；
ｆ）ステップｅ）で保持された相を連続的に、最初に塩基性条件下、次いで酸性条件下で処理し、引き続き、グ

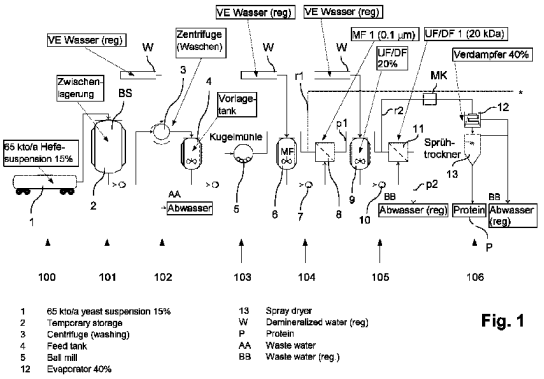


Fig. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下のステップ：
ａ）酵母懸濁液、特にビール酵母懸濁液を提供するステップ；
ｂ）前記酵母懸濁液中の酵母を物理的に溶解するステップ；
ｃ）ステップｂ）からの溶解酵母懸濁液を精密濾過するステップ；
ｄ）ステップｃ）からの精密濾過の透過物を限外濾過するステップであって、限外濾過の保持物として、タンパク質を主固体成分として有する相が分離されるステップ；
ｅ）ステップｃ）からの精密濾過の保持物を、塩基性条件下でプロテアーゼで処理し、および引き続き、マンナンを主固体成分として有する相を、特に濾過および／または遠心分離によって、分離するステップ；
ｆ）ステップｅ）で保持された相を、最初に塩基性条件下、次いで酸性条件下で連続的に処理し、引き続き、グルカンを主固体成分として有する相を、特に濾過および／または遠心分離によって、分離するステップ、
を含む、タンパク質および糖類を単離するために、酵母、特にビール酵母を溶解するための方法。
【請求項２】
ステップａ）において提供される酵母懸濁液が、酵母懸濁液の全重量を基準として、５～３０重量％、特に７～２０重量％の固形物の割合を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ステップａ）において提供される酵母懸濁液が、０～１５℃の温度、好ましくは２～１２℃の温度、特に３～７℃または５℃の温度を有する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記の酵母懸濁液が、ステップｂ）の前に洗浄プロセスに付され、当該プロセスにおいて、酵母懸濁液の液相の少なくとも一部、特に酵母懸濁液の液相の少なくとも５０重量％、殊に少なくとも６０重量％が、さらに別の液体、特に水によって置き換えられる、請求項１～３のいずれか１つに記載の方法。
【請求項５】
ステップｂ）における物理的溶解が、ホモジナイザーまたは粉砕媒体ミル、特にボールミルにおいて行われる、請求項１～４のいずれか１つに記載の方法。
【請求項６】
ステップｂ）における物理的溶解が、パルス電界によって行われる、請求項１～５のいずれか１つに記載の方法。
【請求項７】
電界強度が、１～３０ｋＶ／ｃｍ、特に５～２４ｋＶ／ｃｍであり、および／または比エネルギー入力が、１～１８０ｋＪ／Ｌ、特に３～１２０ｋＪ／Ｌである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
ステップｃ）における精密濾過が、０．１～０．５μｍ、好ましくは０．１～０．２μｍ、特に０．１μｍの孔径を有する濾材を使用して実施され、ならびにステップｄ）における限外濾過が、９０ｎｍ未満の孔径および／または１～１００ｋＤａ、殊に５～１００ｋＤａ、好ましくは１０～５０ｋＤａ、特に１５～２５ｋＤａ、殊に２０ｋＤａの排除限界を有する濾材を使用して実施される、請求項１～７のいずれか１つに記載の方法。
【請求項９】
ステップｃ）における精密濾過および／またはステップｄ）における限外濾過がダイアフィルトレーションとして実施され、その際に、フィード側で好ましくは連続的に水が供給される、請求項１～８のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１０】
ステップｄ）において分離された、主固体成分としてタンパク質を主固体成分として有する相が、ステップｄ）の後に乾燥され、特に噴霧乾燥される、請求項１～９のいずれか

１つに記載の方法。
【請求項１１】
ステップｅ）において、プロテアーゼが、ステップｃ）からの精密濾過の保持物の固形分を基準として、０．０００１～１０重量％、特に０．００１～５重量％、殊に０．０１～１重量％または０．０５～０．５重量％の割合で使用され、前記プロテアーゼが好ましくはスブチリシンであり、ステップｅ）における前記処理が、７．５～１３、好ましくは８～１１、特に８．５～１０．５のｐＨ値で、および／または４０～８０℃、好ましくは５０～７０℃、特に５５～６５℃の温度で行われる、請求項１～１０のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１２】
ステップｅ）におけるプロテアーゼでの処理が、１０分間～１８時間、特に３～１２時間続く、請求項１～１１のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１３】
ステップｆ）において、前記の保持された相が、第１の期間、好ましくは１～５時間の第１の期間において、７．５～１３、好ましくは８～１１、特に８．５～１０．５のｐＨ値で、および４０～９５℃、好ましくは６５～８５℃、特に７５～８５℃の温度で処理され、次いで、第２の期間、好ましくは０．５～２時間の第２の期間において、２～６．５、好ましくは３～５、特に３．５～４．５のｐＨ値で、および５０～９５℃、好ましくは８０～９５℃、特に８０～９０℃の温度で処理される、請求項１～１２のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１４】
ステップｆ）において、第１の期間におけるｐＨ値が、ステップｅ）における処理の間のｐＨ値と一致し、ならびに、ステップｆ）において、第１の期間における温度が、第２の期間における温度よりも低く、および／または第１の期間が第２の期間よりも長い、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
ステップｅ）におけるマンナンを主固体成分として有する相の分離および／またはステップｆ）におけるグルカンを主固体成分として有する相の分離が、濾過、特に組み合わされた精密濾過および限外濾過によって行われる、請求項１～１４のいずれか１つに記載の方法。
【請求項１６】
前記精密濾過が、０．１～０．５μｍ、特に０．１～０．２μｍ、好ましくは０．１μｍの孔径を有する濾材を使用して実施され、ならびに前記限外濾過が、９０ｎｍ未満の孔径および／または１～１００ｋＤａ、殊に５～１００ｋＤａ、好ましくは１０～５０ｋＤａ、特に１５～２５ｋＤａ、殊に２０ｋＤａの排除限界を有する濾材を使用して実施される、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
ステップｅ）における精密濾過および／またはステップｆ）における限外濾過が、ダイアフィルトレーションとして実施される、請求項１５または１６に記載の方法。
【請求項１８】
ステップｅ）において分離された、マンナンを主固体成分として有する相が、ステップｅ）の後に乾燥され、特に噴霧乾燥され、および／または、ステップｆ）によって分離された、グルカンを主固体成分として有する相が、ステップｆ）の後に乾燥され、特に噴霧乾燥される、請求項１～１７のいずれか１つに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、タンパク質および糖類を単離するための、酵母、特にビール酵母を溶解するための方法に関する。
【背景技術】

【０００２】
酵母は、出芽または分裂によって増殖し、従来からずっと技術的に重要な単細胞真菌である。例えば、酵母は、ビール、ワイン、スピリッツ、食品および治療物質の製造に使用される。基本的に、種々のタイプの酵母が存在し、いわゆるパン酵母またはビール酵母（サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ））が最も一般的に使用される酵母の１つである。従って、相当の量の、酵母含有、特にビール酵母含有副生成物が付随的に発生する。
【０００３】
特に、酵母の細胞壁は、一連の技術的に有用な生体分子、例えばタンパク質、グルカン、マンナン、キチンおよび脂質を含有するので、酵母含有廃棄物は、これらの物質を得るために処理される。そこで酵母の細胞壁を、興味対象の物質を放出するために、部分的または完全に溶解させる。
【０００４】
例えば、ＥＰ１９９０４１９Ａ１（Ｔｅｘ－ａ－ｔｅｃ　ＡＧ）（特許文献１）は、グルカン、タンパク質、マンナンおよび脂質を酵母から単離するための方法であって、酵母が連続するステップにおいて、上昇させた温度で超音波で処理される方法を記載している。
【０００５】
ＥＰ２２７２８７６Ａ１（Ａｎｇｅｌ　Ｙｅａｓｔ　Ｃｏ．，　Ｌｔｄ．）（特許文献２）は、微生物、例えば酵母８４４０の細胞壁からグルカンおよびマンナンを抽出する方法を開示している。当該方法は、以下のステップを含む：ａ）アルカリ性プロテアーゼおよびマンナナーゼにより微生物の細胞を処理するステップ；ｂ）ステップａ）からの混合物を重質相および軽質相に分離するステップ；ｃ）ステップｂ）から得られた重相を乾燥させてグルカン調製物を得るステップ；およびｄ）ステップｂ）から得られた軽相を乾燥させてマンナン調製物を得るステップ。前記グルカンおよびマンナン調製物は、治療用途が意図されている。
【０００６】
ＷＯ２０１０／０７０２０７Ａ１（Ｇｌｙｋｏｓ　Ｆｉｎｌａｎｄ　Ｏｙ）（特許文献３）は、糖類画分を含む免疫刺激剤組成物を製造するための方法であって、酵母細胞を加水分解し、可溶性画分を得るステップを含む方法を記載している。このようにして得られた糖類画分は、食品成分または飲料成分として加えることができ、または医薬品として使用することができる。
【０００７】
しかしながら、酵母から技術的に利用可能な生体分子を単離するための従来から知られている方法は、特に大規模なアプローチにおいて、完全に納得のいくものではない。例えば、収率と労力との間の比（特にエネルギー－および時間の要件に関して）が、多くの方法において不十分であり、これは、経済的な生産を大きく妨げる。
【０００８】
他の方法は、個々の成分（例えば、グルカンまたはマンナン）を選択的に得ることに向けられているが、その他の成分（例えば、タンパク質）は考慮されないままである。これは、酵母含有副生成物の最も完全な利用という観点において不利である。
【０００９】
従って、上述の欠点を少なくとも部分的にまたは完全に克服する改善された解決策が依然として必要とされている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１０】
【特許文献１】ＥＰ１９９０４１９Ａ１
【特許文献２】ＥＰ２２７２８７６Ａ１
【特許文献３】ＷＯ２０１０／０７０２０７Ａ１

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１１】
本発明の課題は、酵母細胞、特にビール酵母細胞から生体分子を得るための改良された方法を提供することである。特に、可能な限り高い収率および純度と同時に、様々な異なる生体分子、特に好ましくはタンパク質、グルカンおよびマンナンを、単離できるべきである。前記方法はさらに、生体分子を大規模な工業的アプローチにおいて可能な限り効率的に得ることを可能にすべきである。ここで、前記方法は、できるだけ少ないエネルギー消費および時間消費で実施できることが望ましい。
【課題を解決するための手段】
【００１２】
前記課題の解決は、請求項１の特徴によって定義される。従って、本発明の本質は、以下のステップを含む、タンパク質および糖類を単離するために、酵母、特にビール酵母（Ｂｉｅｒｈｅｆｅ）を溶解（Ａｕｆｓｃｈｌｉｅｓｓｅｎ）するための方法である：
ａ）酵母懸濁液、特にビール酵母懸濁液を提供するステップ；
ｂ）前記酵母懸濁液中の酵母を物理的に溶解するステップ；
ｃ）ステップｂ）からの溶解酵母懸濁液を精密濾過するステップ；
ｄ）ステップｃ）からの精密濾過の透過物を限外濾過するステップであって、限外濾過の保持物として、タンパク質を主固体成分として有する相が分離されるステップ；
ｅ）ステップｃ）からの精密濾過の保持物を、塩基性条件下でプロテアーゼで処理し、および引き続き、マンナンを主固体成分として有する相を、特に濾過および／または遠心分離によって、分離するステップ；
ｆ）ステップｅ）で保持された相を連続的に、最初に塩基性条件下、次いで酸性条件下で処理し、引き続き、主固体成分としてグルカンを有する相を、特に濾過および／または遠心分離によって、分離するステップ。
【００１３】
驚くべきことに、本発明による物理的、化学的および生化学的処理ステップの組み合わせが、比較的低いエネルギー必要量および比較的短い必要時間で良好な収率を可能とすることが示された。これは、全ての生成物、すなわちタンパク質、グルカンおよびマンナンに当てはまり、これらの物質に関してそれぞれ約４０％までの収率を、高い純度で達成することができる。
【００１４】
さらに、前記方法は、大規模なアプローチに適している。１年あたり数万トンの酵母懸濁液、または１時間に数千キログラムの酵母懸濁液を、問題なく処理することができる。
【００１５】
「グルカン」は、Ｄ－グルコース分子から構成され、グリコシド結合によって互いに連結されたオリゴ糖類または多糖類である。酵母細胞に存在するようなグルカンは、典型的には、β－グリコシド結合を有するβ－グルカンであり、特にβ－１，３－グルカンである。
【００１６】
「マンナン」は、糖マンノースのポリマーである多糖類である。酵母に存在するマンナンは、典型的には、α（１－６）－結合骨格ならびに平均して約２個の糖単位長であるα（１－２）－およびα（１－３）－結合側鎖を有する。「精密濾過」は、孔径≧０．１μｍを有する濾材、特に膜による濾過のためのプロセスを意味する。対照的に、限外濾過における孔径は０．１μｍ未満である。
【００１７】
特に別段の記載がない限り、「固体成分」はそれぞれ、それぞれの成分の乾燥物質を指す。用語「主固体成分」は、重量で最も大きな割合を有する固体の成分を表す。
【００１８】
ステップａ）で提供される酵母懸濁液は、特に０～１５℃、好ましくは２～１２℃、特

に３～７℃または３～５℃の温度で貯蔵されたおよび／または低温殺菌された酵母懸濁液である。これは、懸濁液に含まれる望ましくない副生成物が可能な限り少ないことを確実にする。

【００１９】

しかしながら、原則的に、ステップａ）で提供される酵母懸濁液は、別の温度、特に室温で貯蔵され、低温殺菌されていない酵母懸濁液であってもよい。

【００２０】

酵母懸濁液は、特に、水系酵母懸濁液である。その際、水は、酵母懸濁液の連続液相として存在する。

【００２１】

酵母懸濁液は、特に、ビール酵母懸濁液であり、これは好ましくは使用済みのビール酵母を含有する。そのようなビール酵母懸濁液は、例えば、ビール製造における副生成物として生じ、本発明による方法では直接使用することができる。

【００２２】

酵母懸濁液は、酵母懸濁液の全重量を基準として、好ましくは、５～３０重量％、特に７～２０重量％の固形物の割合を有する。これが、本発明による方法に特に適していることが見出された。任意に、液体、特に水を用いて、酵母懸濁液の固形物の割合を所望の範囲に調整することができる。

【００２３】

酵母懸濁液は、ステップａ）において、特に０～１５℃、好ましくは２～１２℃、特に３～７℃または５℃の温度を有する。これにより、懸濁液の組成が、例えば活性な酵母細胞により、さらに変化しないこと、または望ましくない副生成物の形成が低減されることが確実となる。

【００２４】

さらに好ましくは、ステップｂ）も、および任意にまたステップｃ）およびｄ）も、０～１５℃、好ましくは２～１２℃、特に３～７℃または５℃の温度で実施される。これにより、望ましくない副生成物の形成がさらに低減される。

【００２５】

しかしながら、原則的に、ステップａ）、ｂ）、ｃ）および／またはｄ）における酵母懸濁液は、別の温度、例えば室温を有していてもよい。

【００２６】

有利な実施形態によれば、提供される酵母懸濁液は、ステップｂ）の前に洗浄プロセスに付され、当該プロセスにおいて、酵母懸濁液の液相の少なくとも一部、特に酵母懸濁液の液相の少なくとも５０重量％、殊に少なくとも６０重量％が、さらに別の液体または置換液体、特に水によって置き換えられる。洗浄プロセスは、好ましくは、遠心分離機またはドラムフィルター中で実施される。

【００２７】

必要な場合には、洗浄プロセスにより、液体中に溶解した望ましくない成分の割合を減少させることができ、それによって、単離すべき物質の純度および質を改善することができる。しかしながら、洗浄プロセスは任意であり、省略することもできる。

【００２８】

ステップｂ）における物理的溶解は、特に電界を用いて、ホモジナイザー、または粉砕媒体ミルにおいて、特にボールミルにおいて、行われる。

【００２９】

ホモジナイザーは、特に高圧ホモジナイザーであり、特に１０００バールを超える、殊に１２００バールを超える圧力で運転される。

【００３０】

粉砕媒体ミルでは、粉砕材料および自由に移動可能な粉砕媒体、特にボールを、処理チャンバー内で循環させる。その際に、粉砕媒体と処理チャンバーの壁と粉砕材料との間の衝突が起こる。そこで、粉砕材料の細化が、とりわけ破壊により起こる。

【００３１】
単離すべきタンパク質が穏やかに、しかしそれにもかかわらず効果的に放出され得るので、粉砕媒体ミル、特にボールミルによる溶解が、今回特に有利であることが判明した。これは、特に、ビール酵母懸濁液に当てはまる。しかしながら、特別な用途のために、物理的溶解のための別の方法を使用することもできる。
【００３２】
ステップｂ）における電界を用いた物理的溶解は、特に、パルス電界（英語ではＰＥＦまたは「Ｐｕｌｓｅｄ　Ｅｌｅｃｔｒｉｃ　Ｆｉｅｌｄｓ」とも呼ばれる）を用いて行うことができる。この溶解技術自体は、別との関連では当業者に公知である。
【００３３】
パルス電界により処理する場合、酵母懸濁液は、特に、２つの電極の間に配置され、パルス電界で処理される。パルス電界は、特に、高い電界強度および短い継続時間によって特徴付けられる。そこで、細胞膜における可逆的または不可逆的な細孔形成が起こり、それによって、細胞内成分が放出され得、および／または細胞外物質が細胞内に入り込むことができる。
【００３４】
今回特に、以下のパラメーターが、酵母懸濁液中の酵母の溶解を制御するのに適していることが見出された：電界強度［ｋＶ／ｃｍ］、酵母懸濁液の投入温度［℃］および比エネルギー入力［ｋＪ／Ｌ］。プロセスに必要なエネルギー（酵母懸濁液１リットル当たりのキロジュール）が、エネルギー入力として理解される。さらに、エネルギー入力は、パルスの周波数［Ｈｚ］を介して調整することができ、他方で当該周波数は、流量に応じて、および既知の装置で自動的に制御される。
【００３５】
好ましくは、電界強度は、１～３０ｋＶ／ｃｍ、特に５～２４ｋＶ／ｃｍである。
【００３６】
比エネルギー入力は、好ましくは１～１８０ｋＪ／Ｌ、特に３～１２０ｋＪ／Ｌである。
【００３７】
酵母懸濁液の投入温度は、とりわけ０～１５℃、好ましくは２～１２℃、特に３～７℃または５℃である。
【００３８】
このようなパラメーターにより、酵母懸濁液中の酵母を効果的に溶解することができる。
【００３９】
パルス電界を用いて物理的な細胞溶解を実施するための装置は、ＰＥＦ　Ｐｉｌｏｔ　Ｄｕａｌ装置（Ｅｌｅａ－Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；ドイツ）のように、様々な供給業者から市販されている。
【００４０】
好ましくは、パルス電界による処理に続いて、機械的後処理が行われる。従ってこれは、好ましくは、ステップｂ）とｃ）との間に行われる。
【００４１】
機械的後処理は、特にミキサーによって、好ましくは高い剪断力を有するミキサーによって、実施することができる。ローター・ステーターミキサー、特にインラインローター・ステーターミキサーが特に適している。インラインローター・ステーターミキサでは、典型的には、一方の端部に入口を有し、他方の端部に出口を有するハウジング内に、ローター及びステーターが収容される。そこで、処理すべき酵母懸濁液を、連続流でミキサーに通すことができる。
【００４２】
ミキサーを用いた機械的後処理の際の剪断速度は、特に、酵母細胞がさらに溶解されるように選択される。それによって、パルス電界の印加後に場合によってはまだ完全に放出

されていない細胞内成分（タンパク質）を、放出することができる。高い剪断力により、既に開裂した酵母細胞がさらに「絞られ」、細胞内成分、特にタンパク質を、細胞から漏出させることができる。

【００４３】

ステップｃ）における精密濾過は、好ましくは、０．１～０．５μｍ、好ましくは０．１～０．２μｍ、特に０．１μｍの孔径を有する濾材を使用して実施される。これが、物理的溶解後に、固形分を基準として、透過物中における単離すべきタンパク質の相対的な富化、および同時に保持物中におけるバイオマス残渣、例えば細胞断片および脂肪の富化を達成するために、特に好ましいことが見出された。

【００４４】

特に、ステップｃ）における精密濾過はダイアフィルトレーションとして実施され、フィード側（ｖｏｒｌａｇｅｎｓｅｉｔｉｇ）で、好ましくは連続的に、置換液体、特に水が供給される。換言すると、ダイアフィルトレーションでは、好ましくは、透過物として排出される溶解した酵母懸濁液の液相が、フィード側で少なくとも部分的に、特に完全に、連続的に置換液体（特に水）によって置き換えられる。

【００４５】

溶解した酵母懸濁液は、特に、フィード容器から循環される。濾材の後の流れを制御することによって、ダイアフィルトレーションにおける駆動力として作用する膜間圧力を調節することができる。

【００４６】

ダイアフィルトレーションは、好ましくは、透過物の排出が置換溶媒の連続的な流れ（Ｎａｃｈｆｌｉｅｓｓｅｎ）をもたらし、特にその結果、ダイアフィルトレーションの間の循環体積が一定のままであるように、閉鎖循環で行われる。

【００４７】

具体的には、ステップｃ）における精密濾過は、好ましくは、ステップｃ）からの精密濾過の透過物中のタンパク質の割合が、透過物中の固体の全重量を基準として、好ましくは少なくとも５０重量％、より好ましくは５０～８０重量％、特に６０～７０重量％となるように実施される。

【００４８】

ステップｃ）における精密濾過の透過物中の固形物全体の割合は、透過物の全重量を基準として、好ましくは１～１０重量％、特に３～７重量％である。

【００４９】

さらに好ましくは、ステップｃ）における精密濾過は、ステップｃ）からの精密濾過の保持物中のタンパク質の割合が、保持物中の固体の全重量を基準として、５０重量％未満、好ましくは４０重量％未満、特に３５重量％未満となるように実施される。

【００５０】

ステップｃ）における精密濾過の保持物中の固形物全体の割合は、保持物の全重量を基準として、好ましくは２０～５０重量％、特に２５～３０重量％である。

【００５１】

さらなる可能な実施形態によれば、溶解させた酵母懸濁液は、精密濾過ステップｃ）の前に、酸化剤、特にオゾン（O_3）および／または過酸化水素（H_2O_2）で処理される。これにより特に、望ましくない副生成物および／または味の変化をもたらす化学反応を防ぐことができる。しかしながら、酸化剤での処理は任意である。

【００５２】

さらに、溶解した酵母懸濁液は、精密濾過ステップｃ）の前に酵素的に処理することができる。これにより、必要に応じて、プロセスの効率および収率を高めることができる。しかしながら、精密濾過ステップｃ）の前の酵素的処理は任意である。

【００５３】

ステップｄ）における限外濾過は、好ましくは、９０ｎｍ未満の孔径および／または１～１００ｋＤａ、特に５～１００ｋＤａ、好ましくは１０～５０ｋＤａ、特に１５～２５

ｋＤａ、殊に２０ｋＤａの排除限界（公称分子量カットオフ）を有する濾材を用いて行われる。排除限界は、濾材、特に膜によって、９０％が保持される分子の最小分子量として定義される。

【００５４】

特に、ステップｄ）における限外濾過はダイアフィルトレーションとして実施され、フィード側で、好ましくは連続的に、置換液体、特に水が供給される。換言すると、ステップｄ）におけるダイアフィルトレーションでは、好ましくは、ダイアフィルトレーションにおいて透過物として排出されるステップｃ）からの精密濾過の透過物の液相が、フィード側で少なくとも部分的に、特に完全に、連続的に置換液体（特に水）によって置き換えられる。

【００５５】

ステップｄ）においてフィード（Ｖｏｒｌａｇｅ）を形成する、ステップｃ）からの精密濾過の透過物は、特に、フィード容器から循環される。濾材の後の流れを制御することによって、ステップｄ）におけるダイアフィルトレーションの駆動力として作用する膜間圧力を、再度調節することができる。

【００５６】

ステップｄ）におけるダイアフィルトレーションは、好ましくは、透過物の排出が置換液体の連続的な流れをもたらし、特にその結果、ダイアフィルトレーションの間の循環体積が一定のままであるように、閉鎖循環で行われる。

【００５７】

ステップｄ）における限外濾過およびダイアフィルトレーションによって、保持物中のタンパク質の相対的な固形物の割合を狙いを定めて増加させることができる。

【００５８】

好ましくは、ステップｄ）における限外濾過は、ステップｄ）において分離された、タンパク質を主固体成分として有する相におけるタンパク質の割合が、固体の重量を基準として、少なくとも７５重量％、特に少なくとも８５重量％、好ましくは少なくとも９０重量％となるように実施される。

【００５９】

ステップｄ）において分離された相中の固形物全体の割合は、ステップｄ）において分離された相の全重量を基準として、好ましくは０．５～７重量％、特に１～３重量％である。

【００６０】

特に、ステップｃ）における精密濾過もステップｄ）における限外濾過も、ダイアフィルトレーションとして実施される。

【００６１】

特に好ましくは、ステップｄ）において分離された、主固体成分としてタンパク質を有する相が、ステップｄ）の後に乾燥され、特に噴霧乾燥される。これによって、タンパク質を、高い純度を有する粉末状生成物として得ることができる。噴霧乾燥のために適した装置および方法自体は、当業者に公知である。

【００６２】

特に好ましくは、噴霧乾燥前に、固形分、特にタンパク質含有率は、特に少なくとも５０重量％、殊に少なくとも６０重量％、好ましくは少なくとも７０重量％の固形分に濃縮される。濃縮は、特に、液相を部分的に蒸発させる蒸発器中で行われる。濃縮のために適した装置および方法自体は、当業者に公知である。

【００６３】

ステップｄ）において分離された、タンパク質を主固体成分として有する相は、任意に、ステップｄ）の後に、酸化剤、特にオゾンおよび／または過酸化水素で処理することができ、ならびに／あるいは吸着剤材料、例えば活性炭と接触させることができる。これにより特に、タンパク質の生成物の質を改善することができる。例えば、望ましくない変色および／または香味が、化学的に分解および／または除去され得る。

【００６４】
噴霧乾燥が行われる場合、酸化剤での処理および／または吸着剤材料との接触は、好ましくは噴霧乾燥の前に行われ、そしてそれらが行われる場合、濃縮の前に行われる。
【００６５】
酸化剤での処理は、特に好ましくは、膜接触器（Ｍｅｍｂｒａｎｋｏｎｔａｋｔｏｒ）を用いて実施される。膜接触器では、物質交換中の流体は、多孔質膜によって互いに隔てて通される。今回の場合、流体は、ステップｄ）において分離された、タンパク質を主固体成分として有する相と、酸化剤である。酸化剤は、膜接触器において、膜を通り抜けて、ステップｄ）で分離された、タンパク質を主固体成分として有する相に、到達する。膜接触器の使用が、他の接触器と比較して特に有利かつ効率的であることが今回見出された。これは特に、膜接触器における圧力喪失およびエネルギー必要量は比較的低いが、酸化剤は依然としてその効果を非常に効果的に発揮することができるためである。
【００６６】
ステップｅ）では、プロテアーゼが使用される。プロテアーゼは、タンパク質を加水分解的に分解することができる酵素である。プロテアーゼは、タンパク質分解酵素とも呼ばれる。
【００６７】
好ましくは、ステップｅ）において、プロテアーゼは、ステップｃ）からの精密濾過の保持物の固形分を基準として、０．０００１～１０重量％、特に０．００１～５重量％、特に０．０１～１重量％または０．０５～０．５重量％の割合で使用される。
【００６８】
プロテアーゼは、好ましくはアルカリ性プロテアーゼ、特にセリンプロテアーゼ、特に好ましくはスブチリシンである。
【００６９】
セリンプロテアーゼは、活性中心にアミノ酸セリンを有するプロテアーゼのサブファミリーである。
【００７０】
スブチリシン型のプロテアーゼ（スブチラーゼ、スブチロペプチダーゼ、ＥＣ　３．４．２１．６２）は、触媒活性アミノ酸に基づいてセリンプロテアーゼとして分類される。それらは、天然には、微生物、特にバチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）種から生成され、分泌される。それらは非特異的エンドペプチダーゼとして作用し、すなわち、それらは、ペプチドまたはタンパク質の内部にある任意の酸アミド結合を加水分解する。それらのｐＨ最適条件は、多くの場合、明らかにアルカリ性の範囲にある。
【００７１】
プロテアーゼ、特に言及した特定のプロテアーゼは、本発明の方法において極めて有利であることが見出された。特に、プロテアーゼによって選択的にマンナンを放出させることができ、マンナンは、マンナンを主固体成分として有する液相の形態で分離することができる。
【００７２】
特に、当該方法は、マンナナーゼの添加なしで、またはマンナナーゼの非存在下で実施される。マンナナーゼは、マンナンを分解する酵素である。
【００７３】
ステップｅ）における処理は、好ましくは、７．５～１３、好ましくは８～１１、特に８．５～１０．５のｐＨ値で、および／または４０～８０℃、好ましくは５０～７０℃、特に５５～６５℃の温度で行われる。ｐＨ値は、好ましくは、使用されるプロテアーゼに合わせて調整される。
【００７４】
特に、ステップｅ）において、ｐＨ値は、塩基、好ましくは４．７５未満、特に１未満のpK_B値を有する塩基を添加することによって調節される。pK_B値は、負の、塩基定数K_Bの１０を底とする対数を表す。特に好ましくは、それは無機塩基、特にＮａＯＨで

ある。このような塩基が特に適していることが見出された。

【００７５】

塩基は、好ましくは、希釈形態で（例えば水中で３０～６０重量％の割合で）使用される。

【００７６】

ステップｅ）における処理は、特に１０分～１８時間、特に３～１２時間続く。これにより、収率を最適化することができる。

【００７７】

さらなる実施形態では、ステップｅ）では、少量の液体を有するペースト状画分を処理することができる。これにより、それぞれ酵母懸濁液の組成および反応手順に応じて、酵素ステップを収率に関して最適化することができる。

【００７８】

ステップｆ）において、保持された相は、好ましくは、第１の期間で、好ましくは１～５時間、７．５～１３、好ましくは８～１１、特に８．５～１０．５のｐＨ値で、および／または４０～９５℃、好ましくは６５～８５℃、特に７５～８５℃の温度で処理される。引き続き、保持された相は、好ましくは、第２の期間で、好ましくは０．５～２時間、２～６．５、好ましくは３～５、特に３．５～４．５のｐＨ値で、および／または５０～９５℃、好ましくは８０～９５℃、特に８０～９０℃の温度で処理される。

【００７９】

ステップｆ）において言及される「ステップｅ）で保持された相」は、特に、ステップｅ）でマンナンを主固体成分として有する相の分離後に保持される相として理解される。従って特に、「ステップｅ）で保持された相」は、ステップｃ）からの保持物に対応し、そこから、マンナンを主固体成分として有する相が分離された。

【００８０】

マンナンを主固体成分として有する相の分離がステップｅ）において、例えば濾過によって行われる場合、ステップｆ）において参照される「ステップｅ）で保持された相」は、特に、ステップｅ）からの保持物である。この場合、ステップｅ）ではマンナンを主固体成分として有する相が透過物を形成し、これが分離される。

【００８１】

特に好ましくは、ステップｆ）において、第１の期間におけるｐＨ値は、ステップｅ）における処理中のｐＨ値に対応するように選択される。

【００８２】

さらに好ましくは、ステップｆ）において、第１の期間における温度は、ステップｅ）における処理中の温度よりも高い。

【００８３】

好ましくは、ステップｆ）において、第１の期間における温度は、第２の期間における温度よりも低く、および／または、第１の期間は第２の期間よりも長い。

【００８４】

ステップｆ）において、必要に応じて、ｐＨ値は、塩基、好ましくはＮａＯＨを添加することによって、および／または酸、好ましくはH_2SO_4を添加することによって調節される。

【００８５】

ここで、塩基は、好ましくは、ステップｅ）で上述したような塩基である。特に好ましくは、ステップｆ）における塩基は、ステップｅ）における塩基と同一の塩基である。

【００８６】

酸は、特に、４．７５未満、特に１未満のｐK_S値を有する酸である。ｐK_S値は、負の、酸定数K_Sの１０を底とする対数を表す。特に好ましくは、それは鉱酸、特にH_2SO_4である。

【００８７】

酸は、好ましくは、希釈形態で（例えば水中で３０～６０重量％の割合で）使用される

。
【００８８】
これらの前述の手段（特に組み合わせにおいて）が、プロセスの効率の点で特に有利であることが見出された。
【００８９】
ステップｅ）における主固体成分としてマンナンを有する相の分離は、好ましくは、濾過、特に組み合わされた精密濾過と限外濾過によって行われる。同様に、ステップｆ）における主固体成分としてグルカンを有する相の分離は、好ましくは、濾過、特に組み合わされた精密濾過と限外濾過によって行われる。
【００９０】
ステップｅ）でのマンナンを有する相の分離後に保持された相は、ステップｆ）において特に「保持された相」としてさらに処理される。
【００９１】
ここで精密濾過は、それぞれ、好ましくは、０．１～０．５μｍ、特に０．１～０．２μｍ、好ましくは０．１μｍの孔径を有する濾材を使用して実施される。限外濾過は、好ましくは、それぞれ、９０ｎｍ未満の孔径および／または１～１００ｋＤａ、特に５～１００ｋＤａ、好ましくは１０～５０ｋＤａ、特に１５～２５ｋＤａ、殊に２０ｋＤａの排除限界（公称分子量カットオフ）を有する濾材を用いて実施される。
【００９２】
ステップｅ）における精密濾過および／またはステップｆ）における限外濾過は、好ましくはダイアフィルトレーションとして、特にステップｃ）およびｄ）において記載されたのと同じ方法で、実施される。
【００９３】
ここで、ステップｅ）において、特に、マンナンを主固体成分として有する相を精密濾過の透過物の形態で排出し、限外濾過に供給し、限外濾過の保持物におけるマンナンの相対的な割合を増加させる。
【００９４】
ステップｆ）において、特に、グルカンを主固体成分として有する相を精密濾過の透過物の形態で排出し、限外濾過に供給し、限外濾過の保持物におけるグルカンの相対的な割合を増加させる。
【００９５】
ステップｅ）および／またはｆ）におけるダイアフィルトレーションでは、液体が、特にステップｅ）および／またはｆ）が行われる反応容器から循環され、フィード側で好ましくは連続的に置換液体が供給される。
【００９６】
さらなる有利な実施形態によれば、ステップｅ）および／またはｆ）における分離は、ドラムフィルターおよび／または遠心分離機によって行われる。これは特に、ステップｆ）における。
【００９７】
従って、特定の実施形態において、ステップｅ）における分離は、上述のように、組み合わされた精密濾過および限外濾過によって実施され、ステップｆ）における分離は、ドラムフィルターおよび／または遠心分離機によって、特に遠心分離機によって実施される。
【００９８】
好ましくは、ステップｅ）において分離された、主固体成分としてマンナンを有する相は、ステップｅ）の後に乾燥され、特に噴霧乾燥され、および／または、ステップｆ）において分離された、主固体成分としてグルカンを有する相は、ステップｆ）の後に乾燥され、特に噴霧乾燥される。これによって、マンナンもグルカンも、高い純度を有する粉末状生成物として得ることができる。
【００９９】

好ましくは、噴霧乾燥の前に、固形分、特にマンナンおよび／またはグルカンの含有率が、特に蒸発器を使用して、濃縮される。

【０１００】

ステップｅ）において分離された、マンナンを主固体成分として有する相は、任意に、ステップｅ）の後に、酸化剤、特にオゾンおよび／または過酸化水素で処理することができ、ならびに／あるいは吸着剤材料、例えば活性炭と接触させることができる。

【０１０１】

同様に、ステップｆ）において分離された、グルカンを主固体成分として有する相は、任意に、ステップｆ）の後に、酸化剤、特にオゾンおよび／または過酸化水素で処理することができ、ならびに／あるいは吸着剤材料、例えば活性炭と接触させることができる。

【０１０２】

それにより、タンパク質分離の場合と同様に、マンナンおよび／またはグルカンの生成物の質を改善することができる。

【０１０３】

ステップｅ）および／またはｆ）の後に噴霧乾燥が行われる場合、酸化剤での処理および／または吸着剤材料との接触は、好ましくは噴霧乾燥の前に行われ、そしてそれが行われる限り、濃縮の前に行われる。

【０１０４】

酸化剤での処理は、特に好ましくは、膜接触器を用いて実施される。これに関する利点は、タンパク質流との関連で上述されている。

【０１０５】

以下の詳細な説明および特許請求の範囲の全体から、本発明のさらなる有利な実施形態および特徴の組み合わせが明らかにされる。

【図面の簡単な説明】

【０１０６】

実施例の説明のために使用される図１および図２は、タンパク質（Ｐ）、マンナン（Ｍ）およびグルカン（Ｇ）を単離する目的に関する、ビール酵母の溶解のための本発明による方法のプロセスフロー図を示す。

【０１０７】

基本的に、各図中、同一の部分には同一の符号が付されている。

【０１０８】

発明を実施するための方法

図１および図２は、タンパク質（Ｐ）、マンナン（Ｍ）およびグルカン（Ｇ）を単離する目的に関する、ビール酵母の溶解のための本発明による方法のプロセスフロー図を示す。

【０１０９】

第１のステップ１００において、冷却された水系ビール酵母懸濁液ＢＳ（温度＝５℃；固体濃度＝１５重量％）が、次のステップ１０１で貯蔵タンク２に５℃で一時的に貯蔵されるために、タンクトラック１で供給される。

【０１１０】

さらに、ビール酵母懸濁液ＢＳは、遠心分離機３内で洗浄プロセス１０２に付される。そこで、ビール酵母懸濁液ＢＳの液相が水Ｗによって置き換えられ、フィードタンク４に供給される。

【０１１１】

次いで、フィードタンク４から、洗浄されたビール酵母懸濁液がボールミル５に導かれ、ここで、懸濁液中のビール酵母細胞が、後続のプロセスステップ１０３において物理的に溶解される。溶解したビール酵母懸濁液が、引き続き、精密濾過ステップ１０４に付される。精密濾過は、０．１μｍの孔径を有する濾材を用いたダイアフィルトレーションとして実施される。そこで、溶解したビール酵母懸濁液は、フィード容器６から、ポンプ７を用いて、精密濾過器８を介して循環され、フィード側で連続的に水Ｗが置換液体として

供給される。膜間圧力（これは透過物の流出によって制御できる）は、約１．５ｂａｒである。精密濾過の透過物ｐ１中のタンパク質の割合は、透過物ｐ１中の固体の全重量を基準として、例えば、６０～７０重量％である。

【０１１２】

精密濾過ステップ１０４の透過物ｐ１は、次いで、限外濾過ステップ１０５に付される。限外濾過は、２０ｋＤａの排除限界（公称分子量カットオフ）を有する濾材を用いたダイアフィルトレーションとして実施される。そこで、透過物ｐ１は、さらに別のフィード容器９から、ポンプ１０を用いて、限外濾過器１１を介して循環され、フィード側で連続的に水Ｗが置換液体として供給される。膜間圧力（これは透過物の流出によって制御できる）は、約２ｂａｒである。限外濾過ステップ１０５により、保持物ｒ２中のタンパク質の相対的な固形物の割合が増加され、その結果、タンパク質の固形物の割合は、留まった保持物ｒ２中の全固形分を基準として、約９０重量％である。

【０１１３】

限外濾過ステップ１０５の透過物ｐ２は、廃水として排出される（これは必要に応じて再処理することができる）。

【０１１４】

タンパク質を主固体成分として有する、限外濾過ステップ１０５の保持物ｒ２は、乾燥プロセス１０６に付され、当該保持物ｒ２は、蒸発器１２を通過した後、噴霧乾燥装置１３に供給される。そこから、粉末形態の生成物Ｐとしてタンパク質がもたらされる。

【０１１５】

全プロセスにわたるタンパク質の収率は、ビール酵母懸濁液ＢＳ中の利用可能なタンパク質の含有率を基準として、約３８重量％である。

【０１１６】

図２に示されるように、精密濾過プロセス１０４の保持物ｒ１は、順次、酵素的および化学的にさらに処理される。図２は、アスタリスク（＊）で印を付けられた箇所で、図１のアスタリスクで印を付けられた箇所に続く。

【０１１７】

タンパク質分解消化ステップ１０７において、保持物ｒ１は、反応器１４において、例えば８時間、０．２重量％（保持物ｒ１の固形分を基準とする）のスブチリシンの形態のプロテアーゼＥで処理される。処理は、約９．５のｐＨ値で行われ、ここでｐＨ値は、ＮａＯＨの４５％水溶液の形態の塩基Ｂを添加することによって調節され、プロテアーゼでの処理の間、一定に保たれる。

【０１１８】

タンパク質分解消化により、選択的にマンナンが放出され、これは引き続き、精密濾過および下流の限外濾過によって、マンナンを主固体成分として有する水相の形態で分離される。精密濾過も限外濾過も、ダイアフィルトレーションとして実施される。精密濾過の間、濾過される液体は、ポンプ１５を用いて、反応器１４から精密濾過フィルター１６（孔径：０．１μｍ）を介して循環され、フィード側で連続的に置換液体が供給される。引き続き、精密濾過の透過物が、限外濾過段階のフィード容器１７に供給され、そこから、液体が、ポンプ１８を用いて限外濾過器１９（排除限界：２０ｋＤａ）を介して循環される。限外濾過により、限外濾過段階の保持物におけるマンナンの相対的な固形物の割合が増加され、その結果、マンナンの固形物の割合は、留まった保持物中の全固形分を基準として、約６５重量％である。限外濾過段階の透過物は、廃水として排出される（これは必要に応じて再処理することができる）。

【０１１９】

マンナンを主固体成分として有する、限外濾過段階の保持物は、乾燥プロセス１１０に付され、当該保持物は、蒸発器２０を通過した後、噴霧乾燥装置２１に供給される。そこから、粉末形態の生成物Ｍとしてマンナンがもたらされる。

【０１２０】

全プロセスにわたるマンナンの収率は、ビール酵母懸濁液ＢＳ中の利用可能なマンナン

の含有率を基準として、約３９重量％である。

【０１２１】

次いで、反応器１４中に保持された相が、約８０℃の温度に加熱され、約３時間の第１の期間において、９．５のｐＨ値での塩基性抽出１０８に付される。ｐＨ値は、希ＮａＯＨの制御された添加によって一定に保たれる。

【０１２２】

引き続き、温度を再び約８５℃に上昇させ、ｐＨ値を、水中の５０％H_2SO_4を添加することによって４の値に低下させる。次いで、反応器中に保持された相を、１時間の期間において、酸抽出１０９に付す。

【０１２３】

塩基性および酸性抽出が行われた後、マンナンと同様に、グルカンを主成分として有する液相が、２つのフィルター段階（精密濾過器１６および限外濾過器１８）を介してダイアフィルトレーションによって分離される。これにより、ダイアフィルトレーション段階の保持物中の全固形分を基準として、約７２重量％のグルカンの固形物の割合が達成される。

【０１２４】

グルカンを主固体成分として有する、限外濾過段階の保持物が、同様に、乾燥プロセス１１０に付され、当該保持物は、蒸発器２０を通過した後、噴霧乾燥装置２１に供給される。そこから、粉末形態の生成物Ｇとしてグルカンがもたらされる。

【０１２５】

全プロセスにわたるグルカンの収率は、ビール酵母懸濁液ＢＳ中の利用可能なグルカンの含有率を基準として、約４２重量％である。

【０１２６】

しかしながら、本発明は、示された実施例に限定されない。従って、これは、本発明の枠内において任意に変更することができる。

【０１２７】

例えば、ビール酵母懸濁液の代わりに例えば別の酵母懸濁液を使用することもできる。同様に、不可避でないプロセスステップ、例えば洗浄プロセス１０２は、省略することができる。さらに、細胞溶解は、ボールミル５を使用する代わりにパルス電界によって実施することができる。とりわけ、記載されたフィルター段階（精密濾過器１６および限外濾過器１８）を使用する代わりに、ドラムフィルターまたは遠心分離機を使用して、マンナンおよび／またはグルカンを分離することも可能である。

【０１２８】

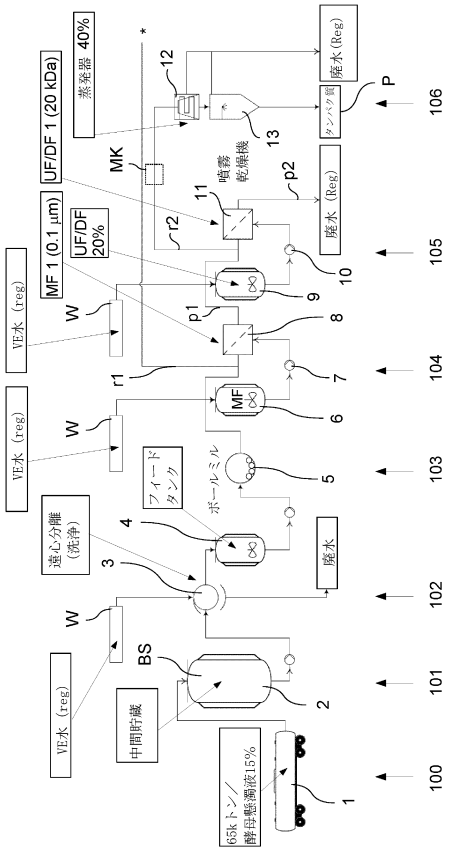
さらに、蒸発器１２の前および／または蒸発器２０の前に、任意に、膜接触器ＭＫまたはＭＫ’を設けることができる。これによって、対応する相を、噴霧乾燥前に、酸化剤、例えばオゾンおよび／または過酸化水素で処理することができる。

【０１２９】

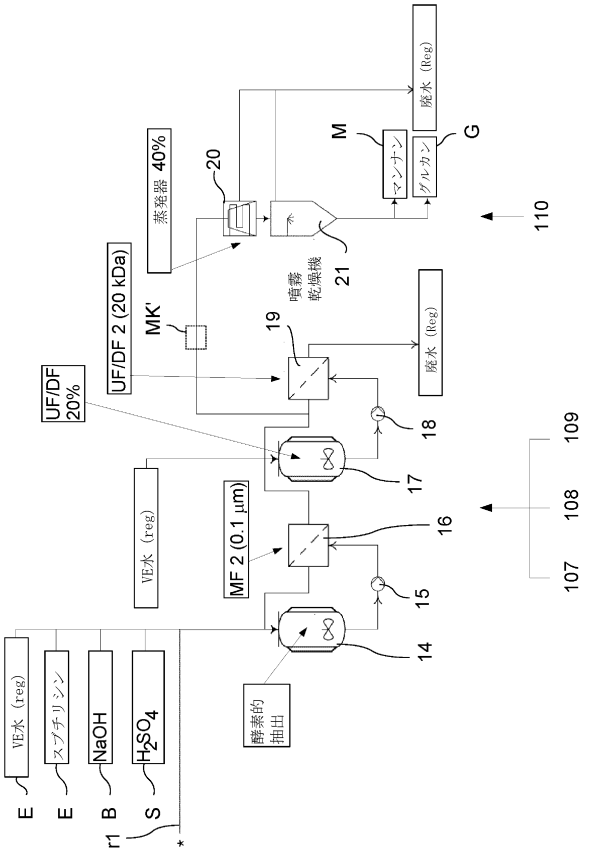
要約すると、タンパク質および糖類を単離するために、酵母、特にビール酵母を溶解するための新規で特に有利な方法であって、大規模なアプローチに特に適した方法が提供されたことが示される。

【図面】

【図１】


VE水（reg）
VE水（reg）
VE水（reg）
MF 1 (0.1 μm)
UF/DF 1 (20 kDa)
蒸発器 40%
UF/DF 20%
遠心分離（洗浄）
中間貯蔵
65kトン／酵母懸濁液15%
フィードタンク
ボールミル
MF
噴霧乾燥機
廃水
廃水（Reg）
タンパク質
MK
W
BS
r1
r2
p1
p2
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
100
101
102
103
104
105
106
P

【図２】


UF/DF 2 (20 kDa)
蒸発器 40%
UF/DF 20%
MK'
VE水（reg）
MF 2 (0.1 μm)
噴霧乾燥機
廃水（Reg）
マンナン
グルカン
酵素的抽出
VE水（reg）
スプチリシン
NaOH
H_2SO_4
E
E
B
S
r1
14
15
16
17
18
19
20
21
M
G
107
108
109
110

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/069504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/06(2006.01)i; *C12R 1/865*(2006.01)n

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; C12R

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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAOEWANEE THAMMAKITI ET AL. "Preparation of spent brewer' s yeast beta-glucans for potential applications in the food industry" *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY,* Vol. 39, 01 January 2004 (2004-01-01), pages 21-29 XP055704411 abstract page 22, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 4 figure 1	1-18
A	SILVA ARAÚJO VILMA BARBOSA DA ET AL. "Followed extraction of [beta]-glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (Saccharomyces uvarum) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise" *INNOVATIVE FOOD SCIENCE AND EMERGING TECHNOLOGIES,* NL, Vol. 23, 01 June 2014 (2014-06-01), pages 164-170 DOI: 10.1016/j.ifset.2013.12.013 ISSN: 1466-8564, XP055873254 abstract paragraphs [02.2], [02.3]	1-18

☑ 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
06 October 2022	**14 October 2022**
Name and mailing address of the ISA/EP **European Patent Office** **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands** Telephone No. **(+31-70)340-2040** Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	Authorized officer **Sonnerat, Isabelle** Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/069504

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0950716 A1 (FARMINT GROUP HOLDING S A [LU]) 20 October 1999 (1999-10-20) example 1 Claims 2-4	1-18
A	WO 2020127951 A2 (OHLY GMBH [DE]) 25 June 2020 (2020-06-25) examples 1,2 claims 1,6,9 abstract figure 1	1-18
A	WO 2010070207 A1 (GLYKOS FINLAND OY [FI]; SAARINEN JUHANI [FI] ET AL.) 24 June 2010 (2010-06-24) cited in the application abstract page 26, paragraph 4 - page 27, paragraph 1 page 28, paragraph 4 - page 29, paragraph 2 claims 1, 17-21 figures 1,2	1-18
A	WO 2006121803 A1 (SENSIENT FLAVORS INC [US]; SEDMAK JOSEPH JAMES [US]) 16 November 2006 (2006-11-16) abstract paragraphs [0028], [0029] examples 1-4 figure 2	1-18
A	HUANG KAI ET AL. "Optimising separation process of protein and polysaccharide from spent brewer's yeast by ultrafiltration : Optimising separation process of protein and polysaccharide" *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*, GB, Vol. 47, No. 6, 10 April 2012 (2012-04-10), pages 1259-1264 DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.02967.x ISSN: 0950-5423, XP055873264 abstract page 1260, left-hand column, paragraph 1-4	1-18
A	BZDUCHA-WRÓBEL ANNA ET AL. "Evaluation of the Efficiency of Different Disruption Methods on Yeast Cell Wall Preparation for [beta]-Glucan Isolation" *MOLECULES*, Vol. 19, No. 12, 15 December 2014 (2014-12-15), pages 20941-20961 DOI: 10.3390/molecules191220941 XP055873260 abstract	1-18

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/EP2022/069504

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
EP 0950716 A1	20 October 1999	AT 312194 T	15 December 2005
		DE 69832690 T2	13 July 2006
		EP 0950716 A1	20 October 1999
		ES 2252810 T3	16 May 2006
		US 6060089 A	09 May 2000
WO 2020127951 A2	25 June 2020	AU 2019408401 A1	15 July 2021
		BR 112021011754 A2	31 August 2021
		CA 3123507 A1	25 June 2020
		CN 113518819 A	19 October 2021
		EP 3670646 A1	24 June 2020
		EP 3898933 A2	27 October 2021
		IL 284221 A	31 August 2021
		JP 2022514769 A	15 February 2022
		US 2022071231 A1	10 March 2022
		WO 2020127951 A2	25 June 2020
WO 2010070207 A1	24 June 2010	CN 102257011 A	23 November 2011
		EP 2370475 A1	05 October 2011
		ES 2624703 T3	17 July 2017
		US 2011250235 A1	13 October 2011
		WO 2010070207 A1	24 June 2010
WO 2006121803 A1	16 November 2006	BR PI0611535 A2	21 September 2010
		CA 2607004 A1	16 November 2006
		CA 2912012 A1	16 November 2006
		CN 101184780 A	21 May 2008
		EP 1877447 A1	16 January 2008
		JP 5296531 B2	25 September 2013
		JP 2008541700 A	27 November 2008
		US 2006263415 A1	23 November 2006
		US 2010190872 A1	29 July 2010
		WO 2006121803 A1	16 November 2006

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2022/069504

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12N1/06
ADD. C12R1/865

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N C12R

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SAOEWANEE THAMMAKITI ET AL: "Preparation of spent brewer' s yeast beta-glucans for potential applications in the food industry", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, Bd. 39, 1. Januar 2004 (2004-01-01), Seiten 21-29, XP055704411, Zusammenfassung Seite 22, linke Spalte, Absatz 4 - rechte Spalte, Absatz 4 Abbildung 1 ----- -/--	1-18

[x] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [x] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung;; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung;; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
6. Oktober 2022	14/10/2022

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Sonnerat, Isabelle

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2022/069504

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SILVA ARAÚJO VILMA BARBOSA DA ET AL: "Followed extraction of [beta]-glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (Saccharomyces uvarum) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise", INNOVATIVE FOOD SCIENCE AND EMERGING TECHNOLOGIES, Bd. 23, 1. Juni 2014 (2014-06-01), Seiten 164-170, XP055873254, NL ISSN: 1466-8564, DOI: 10.1016/j.ifset.2013.12.013 Zusammenfassung Absätze [02.2], [02.3]	1-18
A	EP 0 950 716 A1 (FARMINT GROUP HOLDING S A [LU]) 20. Oktober 1999 (1999-10-20) Beispiel 1 Ansprüche 2-4	1-18
A	WO 2020/127951 A2 (OHLY GMBH [DE]) 25. Juni 2020 (2020-06-25) Beispiele 1,2 Ansprüche 1,6,9 Zusammenfassung Abbildung 1	1-18
A	WO 2010/070207 A1 (GLYKOS FINLAND OY [FI]; SAARINEN JUHANI [FI] ET AL.) 24. Juni 2010 (2010-06-24) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 26, Absatz 4 - Seite 27, Absatz 1 Seite 28, Absatz 4 - Seite 29, Absatz 2 Ansprüche 1, 17-21 Abbildungen 1,2	1-18
A	WO 2006/121803 A1 (SENSIENT FLAVORS INC [US]; SEDMAK JOSEPH JAMES [US]) 16. November 2006 (2006-11-16) Zusammenfassung Absätze [0028], [0029] Beispiele 1-4 Abbildung 2	1-18

-/--

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (April 2005)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2022/069504

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HUANG KAI ET AL: "Optimising separation process of protein and polysaccharide from spent brewer's yeast by ultrafiltration : Optimising separation process of protein and polysaccharide", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, Bd. 47, Nr. 6, 10. April 2012 (2012-04-10) , Seiten 1259-1264, XP055873264, GB ISSN: 0950-5423, DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.02967.x Zusammenfassung Seite 1260, linke Spalte, Absatz 1-4 -----	1-18
A	BZDUCHA-WRÓBEL ANNA ET AL: "Evaluation of the Efficiency of Different Disruption Methods on Yeast Cell Wall Preparation for [beta]-Glucan Isolation", MOLECULES, Bd. 19, Nr. 12, 15. Dezember 2014 (2014-12-15), Seiten 20941-20961, XP055873260, DOI: 10.3390/molecules191220941 Zusammenfassung -----	1-18

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (April 2005)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2022/069504

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0950716 A1	20-10-1999	AT 312194 T	15-12-2005
		DE 69832690 T2	13-07-2006
		EP 0950716 A1	20-10-1999
		ES 2252810 T3	16-05-2006
		US 6060089 A	09-05-2000
WO 2020127951 A2	25-06-2020	AU 2019408401 A1	15-07-2021
		BR 112021011754 A2	31-08-2021
		CA 3123507 A1	25-06-2020
		CN 113518819 A	19-10-2021
		EP 3670646 A1	24-06-2020
		EP 3898933 A2	27-10-2021
		IL 284221 A	31-08-2021
		JP 2022514769 A	15-02-2022
		US 2022071231 A1	10-03-2022
		WO 2020127951 A2	25-06-2020
WO 2010070207 A1	24-06-2010	CN 102257011 A	23-11-2011
		EP 2370475 A1	05-10-2011
		ES 2624703 T3	17-07-2017
		US 2011250235 A1	13-10-2011
		WO 2010070207 A1	24-06-2010
WO 2006121803 A1	16-11-2006	BR PI0611535 A2	21-09-2010
		CA 2607004 A1	16-11-2006
		CA 2912012 A1	16-11-2006
		CN 101184780 A	21-05-2008
		EP 1877447 A1	16-01-2008
		JP 5296531 B2	25-09-2013
		JP 2008541700 A	27-11-2008
		US 2006263415 A1	23-11-2006
		US 2010190872 A1	29-07-2010
		WO 2006121803 A1	16-11-2006

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　リーデル・ヴォルフガング
ドイツ連邦共和国、７９５９１　アイメルディンゲン、マルクグラーフェンストラーセ、８
(72)発明者　ヴェアポーテン・ルディ
スイス連邦、６３３２　ハーゲンドルン－シャム、フルールストラーセ、２２

Ｆターム（参考）　4B065　AA72X AA80X BC01 BD01 BD10 BD15 BD18 BD45 CA22 CA24 CA60

【要約の続き】
ルカンを主固体成分として有する相を、特に濾過および／または遠心分離によって、分離するステップ。