

(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2017-534722

(P2017-534722A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 8 B 37/00 (2006.01)	C 0 8 B 37/00 P	4 B 0 6 5
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	C 0 8 B 37/00 Q	4 C 0 7 6
A 6 1 K 8/73 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	4 C 0 8 3
C 0 9 J 11/06 (2006.01)	A 6 1 K 8/73	4 C 0 9 0
C 0 9 J 101/00 (2006.01)	C 0 9 J 11/06	4 J 0 4 0
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-519630 (P2017-519630)	(71) 出願人	516308962
(86) (22) 出願日	平成27年10月13日 (2015.10.13)		アルゴスルス
(85) 翻訳文提出日	平成29年5月19日 (2017.5.19)		フランス・44600・サン・ナゼール・
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/073689		ブルヴァール・ドゥ・ルニヴェルシテ・
(87) 国際公開番号	W02016/059058		37
(87) 国際公開日	平成28年4月21日 (2016.4.21)	(71) 出願人	510187118
(31) 優先権主張番号	1459796		ユニヴェルシテ・ドゥ・ナント
(32) 優先日	平成26年10月13日 (2014.10.13)		フランス・F-44000・ナント・ケ・
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ドゥ・トゥルヴィル・1
		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
		(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 脱ガム方法

(57) 【要約】

本発明は、微生物、単細胞生物及び糸状菌類から選択される生物から膜多糖類を生成するための方法に関し、前記方法は、前記膜多糖類を抽出する少なくとも1回の工程、及び可溶性タンパク質のより小さな規模の抽出を含み、これらは、前記生物のボールミル中での機械的処理、又は前記生物の超音波による物理学的処理によって行われる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

微生物、単細胞生物及び糸状菌類から選択される生物から膜多糖類を得るための方法において、前記生物のボールミル中での機械的処理、又は前記生物の超音波による物理学的処理によって、前記膜多糖類を抽出する少なくとも1回の工程であって、可溶性タンパク質の抽出の低下が伴う工程を含む方法。

【請求項2】

機械的処理が、ガラス製ボールを備えたボールミルを、
-ボールの平均直径(d_{GM})が、 $1.5 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-3} \text{m}$ の範囲に及び、
-刃の末端における攪拌スピード(v)が、 $5 \sim 20 \text{m/秒}$ の範囲に及ぶ
条件下で使用する、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

ボールミル中における機械的処理が、 $2 \sim 50$ 分、好ましくは、 $10 \sim 40$ 分の範囲に及ぶ時間をかけて実施される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

ミルのボールの充填率が、 $60 \text{体積/体積}\% \sim 80 \text{体積/体積}\%$ 、好ましくは、 $65 \text{体積/体積}\% \sim 80 \text{体積/体積}\%$ の範囲に及ぶ、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

物理学的処理が、超音波反応器を、
-エネルギーが、 $500 \sim 5000 \text{J}$ の範囲に及び、
-出力が、 $200 \text{W} \sim 400 \text{W}$ の範囲に及び、
-反応器のフィード流速が、 $0.15 \text{l/分} \sim 3 \text{l/分}$ の範囲に及ぶ
条件下で使用する、請求項1に記載の方法。

20

【請求項6】

超音波処理が、 $5 \sim 30$ 秒の範囲に及ぶ時間をかけて実施される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

機械的又は物理学的処理の工程に、抽出した膜多糖類の量を測定する工程が続く、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

複数回の処理の工程、好都合には、 $2 \sim 10$ 回の処理の工程を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項9】

少なくとも1回の処理の工程に、抽出するに至った膜多糖類の量を測定する工程が続く、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

複数回の処理の工程を含み、少なくとも2回の処理の工程のそれぞれに、抽出するに至った膜多糖類の量を測定する工程が続く、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

生物が、ラン藻類、微細藻類、細菌類及び糸状菌類から選択される、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項12】

生物が、紅藻植物門から、より具体的には、チノリモ属及びロデラ属、ラセンモ属及びドゥナリエラ属から、好ましくはチノリモ、アルスロスピラ・プラテンシス、ボツリオコッカス・ブラウニー、クリプテコディニウム・コーニイ、クロレラ・アウトトロフィカ、ナビクラ・インケルタ、及びロドソルス・マリヌスの株から選択される、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記培養液から可溶性多糖の画分を抽出することである工程を含む、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

50

膜多糖の抽出の工程に、前記多糖類を精製する工程が続く、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

化学組成物、食品組成物、化粧品組成物又は医薬組成物中での、請求項13又は14の規定に従って得られた可溶性多糖の画分の使用。

【請求項16】

組成物の、更にとりわけ、エマルジョンの増粘剤、ゲル化剤、界面活性剤、又はそうでなければ、安定化剤としての、請求項13又は14の規定に従って得られた可溶性多糖の画分の使用。

【請求項17】

衛生的な植物生成物中で若しくは衛生的な植物生成物として、又は材料、特に、接着剤としての、請求項13又は14の規定に従って得られた可溶性多糖の画分の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオマス、特に、藻類のバイオマスの活用の分野に関し、より具体的には、本発明は、微生物、特に、ラン藻類、微細藻類、細菌類、光合成微生物に、また糸状菌類に由来する多糖類を抽出するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

微細藻類は、真核生物であり、これらは通常単細胞であり、細胞膜及び壁により区切られている。この壁の組成及び構造は、問題になっている微細藻によって異なることがある。

【0003】

したがって、特定の緑藻類、例として、クロレラにおいては、壁が、セルロースからなっており、極めて柔軟性を欠き、このため、この緑藻は、機械的ストレスに対して高い抵抗性を示す。

【0004】

珪藻類のクラスに属する微細藻類の場合、壁は、被殻とも呼ばれ、結晶シリカからなる。後者は、クロレラよりも脆い。

【0005】

最後に、その他の種も、環境攻撃から自体を保護するために、それらの細胞の周囲に多糖類のコーティングを作る。このコーティングの厚さは、時間と共に変化し、微細藻が指数関数的に成長する間は極めて薄く、次いで、静止期にはより厚くなる。静止期においては、膜多糖類の生成速度が、培養液中への可溶化速度よりも大きい。

【0006】

バイオ精製の目的で微細藻類のバイオマスの全てを活用することを目指す場合、前記微細藻類の多様な代謝産物を分画し、単離することが必要になり、これらの代謝産物は一般に、培養液中に可溶性である。

【0007】

したがって、主要な代謝産物は、多糖類、タンパク質及び色素である。

【0008】

本発明が更にとりわけ標的とする微生物は、いくつかのタイプの多糖類、すなわち、細胞内多糖類、及び膜多糖類と呼ばれる細胞外多糖類を含む。

【0009】

本発明が更にとりわけ標的とする微生物は、好ましくは、単細胞である。

【0010】

しかし、これらの多糖類の場合、抽出の収率の問題がある。これは、微細藻類を培養する間に、膜多糖類の一部が、培養液中で、遊離し、溶解するからである。この遊離画分は、容易に回収し得る。しかしまた、結合型膜多糖類、すなわち、細胞の外側に、それらの

10

20

30

40

50

外面上において付着している膜多糖類もある。これらの結合型膜多糖類は時に、菌体外多糖類又はEPSと呼ばれる。

【0011】

いくつかの種、例として、チノリモ(*Porphyridium cruentum*)においては、結合型膜多糖類は、全ての膜多糖類のおよそ50%を構成することが予想される。

【0012】

本出願の発端である、提示する問題は、膜多糖類を選択的に抽出すること、つまり、遊離の膜多糖類を抽出するだけでなく、細胞溶解を引き起こさずに結合型膜多糖類も培養液中に放出させることが困難であることにある。

【0013】

更にとりわけ、本出願の発端である、提示する問題は、細胞溶解を引き起こさずに、結合型膜多糖類を培養液中に抽出することが困難であることにある。

【0014】

実際に、これは、細胞溶解の結果、培養液中に、細胞構成要素の全部又は一部が放出され、その結果、多様な代謝産物、特に、膜多糖類の精製がより複雑になるからである。

【0015】

バイオマス、特に、藻類から多糖類を抽出するのは既知の作業であり、例えば、US4960697は、溶解している多糖類、特に、非イオン性のグルカンを抽出するための方法を開示しており、この方法は、多糖類を沈殿させるために、二価のカチオン、次いで、水混和性の有機溶剤を使用する。

【0016】

EP0311496は、細胞周囲及び菌体外の多糖類を化学的に生成させ、抽出するための方法を記載しており、この方法は、多糖類を、特に、セチルピリジニウムを用いて沈殿させる工程を使用する。

【0017】

W083/03738は、チノリモ株の微細藻を培養するための方法、及び溶液を、濃水酸化ナトリウム溶液によって塩基性化する工程と、加熱する工程と、低温条件下で塩酸溶液を添加する工程とを使用して、膜多糖類を抽出するための方法を記載している。この加水分解に、多糖類の沈殿が続く、これは、有機溶媒によって、特に、2~3体積のエタノールを添加することによって行われる。

【0018】

この方法により、細胞内及び細胞外の多糖類の抽出が可能になる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

【特許文献1】US4960697

【特許文献2】EP0311496

【特許文献3】W083/03738

【非特許文献】

【0020】

【非特許文献1】Dubois M、Gilles KA、Hamilton JK、Rebers PA、Smith F.、「Colorimetric method for determination of sugars and related substances」、Anal. Chem. 1956年;28:350~356頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

しかし、これらの方法により、バイオマスの破壊が引き起こされ、これは、多様な代謝産物を活用するという目的に適合しない。

【0022】

本発明に従う方法により、結合型膜多糖類の抽出が可能になる。

10

20

30

40

50

【0023】

したがって、本発明に従う方法により、膜多糖類を、高い収率で、細胞溶解の程度を低下させて抽出することが可能になる。

【0024】

特に、本発明の発明対象は、微細藻類、ラン藻類、細菌類、糸状菌類及び光合成微生物に由来する多糖類の抽出である。

【課題を解決するための手段】

【0025】

本発明の第1の発明対象は、生物から膜多糖類を得るための方法であり、前記方法は、前記生物のボールミル中での機械的処理、又は前記単細胞生物の超音波による物理学的処理によって、前記膜多糖類を抽出する少なくとも1回の工程であって、可溶性タンパク質の抽出の低下が伴う工程を含む。

10

【0026】

更にとりわけ、この方法は、結合型膜多糖類を得ることを狙う。

【0027】

標的とする生物は、更にとりわけ、微生物、単細胞生物及び糸状菌類から選択される。

【0028】

前記機械的又は物理学的処理は、細胞に対して、十分に制御された機械的ストレスを生成することを可能にする任意のその他の技法により実施することができる。特に、パイプ中のキャビテーションについて言及することができ、キャビテーションは、循環する培養液中に十分な減圧を生成して、期待する機械的作用を示す振動波を生成する気泡の発生を生み出すことである。

20

【0029】

本発明の第2の発明対象は、得られた可溶性多糖の画分の使用である。

【0030】

より詳細には、本発明の発明対象は、膜多糖類を得るための方法であり、この方法は、以下の工程を、この順番で含む：

- 微生物、単細胞生物及び糸状菌類から選択される、少なくとも1つの生物を含む培養液を提供し、
- 前記培養液に対して、前記生物のボールミル中での機械的処理、又は前記単細胞生物の超音波による物理学的処理によって、前記膜多糖類を抽出する工程であって、可溶性タンパク質の抽出の低下が伴う工程を実施し、
- 前記培養液から可溶性多糖の画分を抽出し、
- 任意選択により、多糖類を含む前記画分を精製する。

30

【0031】

この方法により、結合型膜多糖類の抽出が可能になる。

【0032】

好都合なことに、前記膜多糖類を抽出する工程に、可溶性タンパク質の抽出は伴わない。

【0033】

好ましくは、この方法は、サーキットモードで実施される。

40

【0034】

本発明の目的では、表現「可溶性タンパク質の抽出の低下」は、タンパク質の抽出収率の、EPSの抽出収率に対する比と定義する、抽出の選択性が、0.7未満であることを意味するものとする。

【0035】

本発明に従って使用する「サーキットモード」の原理を、図1に提示する。

【0036】

サーキットモードにより、簡便な様式の連続的なデバイス上で、ある体積を「回分式」に処理することが可能になる。

50

【0037】

このモードに従うと、処理しようとする培養液を、フィード槽(A)中に供給し、ここで、攪拌に付し、次いで、反応器(R)に送り、ここで、この培養液中の可溶性多糖類の濃度を増加させるが、それほど高い程度まで、この培養液の可溶性タンパク質の濃度を増加させないことが可能な処理に付す。処理の終わりに、培養液を、フィード槽に送り返し、ここで、攪拌に付す。培養液が反応器中で処理されるように、処理しようとする培養液は、反応器内にN回導入され、このことが、パス回数に相当する。

【0038】

処理の間に生成した多様な代謝産物のアッセイを、フィード槽中で、N回の処理の終わり又は各パスの後のいずれかに行う。

10

【0039】

多様な代謝産物のアッセイを、各パスの後に実施する場合、反応培養液の多糖類の濃度が増加する限り、前記培養液を反応器に送り返す。反応器に通すパス回数は一般に、1回及び10回を含めて、1~10回である。

【0040】

組成物の滞留時間は、反応器に通す組成物の全てのパスに相当する。

【0041】

本発明に従う方法により、細胞を摩滅させ、したがって、細胞の完全性を顕著に改変することなく、結合型膜多糖類(又はEPS)の画分を引き離すことが可能になる。

【0042】

この処理はまた、脱ガムとも呼ばれる。

20

【0043】

本発明に従う方法により、一方では、多糖の抽出収率を、先行技術の方法と比較して増加させることが、他方では、続く、多糖の精製の操作を促進することが可能になる。

【0044】

実際に、多糖の抽出収率を増加させ、その結果、膜多糖類の総質量に対して最高90質量%の膜多糖類を抽出することが可能になっている。

【0045】

更に、すでに言及したように、本発明に従う方法は、細胞の完全性をわずかに改変するに過ぎない限り、その他の水溶性の、細胞の構成要素、例えば、水溶性タンパク質及びクロロフィルが、培養液内に、過剰に多量に放出されるのを阻止することも可能にする。したがって、本発明に従う方法は、細胞溶解が生じる先行技術の方法により得られる生成物よりも粘性が低い反応生成物が得られる利点を有する。

30

【0046】

実際に、バイオマスのバイオ精製の視点からすれば、細胞の構成要素のそれぞれの選択的な抽出が望まれる。しかし、特定の化合物、例として、特に、培養液のその他の分子、例として、タンパク質と複合体を形成する傾向を有する膜多糖類の存在が、選択的な抽出を混乱させる恐れがある。

【0047】

したがって、本発明に従う方法により、反応の終わりに、培養液中の水溶性多糖類の回収収率及び純度を増加させることが可能になる。

40

【0048】

特に、多糖類を含有する回収培養液中のタンパク質の比率の低下に起因して、またそうでなければ、細胞からの多糖類の取出しに起因して、構成成分の精製の操作が促進され、こうして、多糖類と複合体を形成することが可能なその他の細胞化合物を回収する下流の工程が促進される。

【0049】

本発明に従う方法は、遊離及び結合型の膜多糖類を標的とし、それらを事実上全て回収することを可能にするとみなすべきである。

【0050】

50

本発明に従う方法の別の利点は、生物、特に、単細胞生物の培養液に対して、特に、生産のアウトプットにおける、微細藻類の懸濁液に対して、この方法を直接実施することができることであり、それにより、前記方法を実施するために使用する水の体積を低下させることに寄与する。

【0051】

更にまた、この方法により、乾燥の工程を実施するのを回避することも可能になり、乾燥の工程は、当然のことながら、長時間を要する工程であり、エネルギーの観点からも金銭的な観点からも高コストの工程である。

【0052】

本発明に従う方法の1つの変形形態に従うと、機械的又は物理学的処理の工程に、抽出した膜多糖類の量を測定する工程が続く。

10

【0053】

本発明に従う方法は、処理の工程を複数回、好都合には、2~10回含むことができる。

【0054】

また、本発明に従う方法は、少なくとも1回の機械的又は物理学的処理の工程と、それに続く、抽出した膜多糖類の量を測定する工程とを含むこともできる。

【0055】

抽出した膜多糖類の量を決定することを可能にする、任意の方法を実行することができる。

【0056】

20

これらの方法、例として、比色分析法は、当業者の一般的な能力の一部である。

【0057】

特に、多糖類のアッセイは、比色分析法により、フェノール及び硫酸を使用して実施する(Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F., 「Colorimetric method for determination of sugars and related substances」、Anal. Chem. 1956年;28:350~356頁)。

【0058】

別の変形形態に従うと、本発明に従う方法はまた、複数回の処理の工程を含むことができ、少なくとも2回の処理の工程のそれぞれに、抽出するに至った膜多糖類の量を測定する工程が続く。

30

【0059】

特に、N回目の処理の工程の終わりに測定した膜多糖類の量が、(N-X)回目の処理の工程の終わりに測定した膜多糖類の量と実質的に同一である場合に、前記方法を中断することができる;Xは、処理の総回数Nよりも小さい処理の回数であり、特に、Xは、1に等しい。

【0060】

好都合には、本発明に従う方法は、前記培養液から可溶性多糖の画分を抽出することである工程を含む。

【0061】

好都合には、膜多糖類を抽出する工程に、前記多糖類を精製する工程が続く。

【0062】

40

本発明に従う方法では、膜多糖類を抽出する工程に、前記多糖類を精製する工程が続き得る。

【0063】

適切な精製のプロセスを選択するのは、当業者の能力の一部であり、このプロセスは従来、pHを変化させる方法、エタノール沈殿法、及びメンブランを使用する物理的な分離から選択される。

【0064】

本発明に従う、多糖類を抽出するための方法は、任意の生物、好ましくは、微生物から実施することができ、好ましくは、ラン藻類、微細藻類、細菌類又は糸状菌類から実施する。

50

【0065】

好都合には、微細藻類の静止期の間に、すなわち、「指数関数的成長」の期間の終わり又は後で、中間の又は成熟した生理学的状况で、本発明に従う方法を実施する。

【0066】

好ましくは、生物は、紅藻植物門から、より具体的には、チノリモ属及びロデラ属、ラセンモ属及びドゥナリエラ属から、好ましくはチノリモ、アルスロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*)、ボツリオコッカス・ブラウニー (*Botryococcus braunii*)、クリプテコディニウム・コーニイ (*Cryptocodinium cohnii*)、クロレラ・アウトトロフィカ (*Chlorella autotrophica*)、ナビクラ・インケルタ (*Navicula incerta*)、及びロドソルス・マリヌス (*Rhodospirillum rubrum*) の株から選択される。

10

【0067】

ボールミルを使用する方法

第1の好ましい変形形態によれば、本発明に従う方法は、その間にボールミルを使用する工程を含む。

【0068】

ボールミルは従来、粘性の製品、例として、ペンキをホモジナイズするために、また、鉱物を粉砕するためにも使用されている。ボールミルは、処理しようとする組成物を受容することを目的とするチャンバー、例えば、蓋が閉じるボウルを含み、前記チャンバーに、ポンプを介して、処理しようとする組成物をフィードする。

【0069】

20

従来、ボールミルのうちのボールが占有するボウルの体積のパーセントに相当する充填率は、50%~80%、好ましくは、65%~80%の範囲に及ぶ。

【0070】

ボールを除く、チャンバーの内容物は、処理しようとする単細胞生物又は懸濁液を本質的に含む。

【0071】

充填率を、特に、使用するボールの性質に従って調整することができる。実際に、特定の事例では、ボールが攪拌機の刃と刃の間に凝集するのを観察することができている。

【0072】

特に、ガラスで作製されたボールの場合、ミルのボールの充填率は、好都合には、60体積/体積%~80体積/体積%、好ましくは、65体積/体積%~80体積/体積%の範囲に及ぶ。

30

【0073】

処理しようとする培養液に適切な充填率を選択することは、当業者の能力の一部である。

【0074】

ミル中における組成物のフィード流速は一般に、150ml/分~200ml/分の範囲に及ぶ。処理しようとする培養液に適切なフィード流速を選択することもまた、当業者の能力の一部である。

【0075】

ボールミルを用いる処理は一般に、18~40℃、好ましくは、18~25℃を含む温度で実施する。

40

【0076】

方法の第1の変形形態によれば、本発明に従う方法で使用する機械的処理は、ガラス製ボールミルを、

- ボールの平均直径(d_{GM})が、 $1.5 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-3} m$ の範囲に及び、
- 刃の末端における攪拌スピード(v)が、5~20m/秒の範囲に及ぶ

条件下で使用する。

【0077】

ボールミルの工程の終わりに、処理した組成物を回収し、次いで、前記組成物中に存在する多糖類を、抽出し、任意選択により、精製する。

50

【0078】

方法の1つの実行形態によれば、単回のボールミルの工程を実施する。

【0079】

方法の1つの好ましい実行形態によれば、ボールミル中における処理を、少なくとも2回、好ましくは、2～10回、好都合には、3～4回繰り返す。

【0080】

好ましくは、ボールミル中における処理を、2～50分、好ましくは、10～40分の範囲に及ぶ滞留時間をかけて実施する。

【0081】

超音波を使用する方法

10

この方法によれば、処理しようとする培養液を、超音波反応器にポンプで供給し、その内部で、培養液は超音波処理を受ける。

【0082】

方法の第2の変形形態によれば、物理学的処理は、超音波反応器を、

- エネルギーが、500～5000Jの範囲に及び、
- 出力が、200～400Wの範囲に及び、
- 反応器のフィード流速が、0.150l/分～3l/分の範囲に及ぶ

条件下で使用する。

【0083】

超音波処理の工程の終わりに、処理した組成物を回収し、次いで、前記組成物中に存在する多糖類を、抽出し、任意選択により、精製する。

20

【0084】

好ましくは、超音波を用いる機械的処理を、5～30秒の範囲に及ぶ時間をかけて実施する。

【0085】

膜多糖類の特性

また、本発明の発明対象は、本発明に従う方法に従って得られた可溶性多糖の画分の使用でもあり、前記方法は、記培養液から可溶性多糖の画分を抽出することである工程と、任意選択により、それに続く、前記多糖類を精製する工程とを含む。

【0086】

30

前記膜多糖の画分は、化学組成物、食品組成物、化粧用組成物又は医薬組成物中で使用される。

【0087】

前記膜多糖の画分は、好都合な特性、特に、質感をもたらす特性を有する。

【0088】

前記膜多糖画分は、組成物、更にとりわけ、エマルジョンに、増粘剤、ゲル化剤、界面活性剤、又はそうでなければ、安定化剤として使用することができる。

【0089】

したがって、前記膜多糖画分は、衛生的な植物生成物中で、又は衛生的な植物生成物として使用することができる。

40

【0090】

また、前記膜多糖の画分は、材料、特に、接着剤としても使用することができる。

【0091】

また、本発明に従って得られた膜多糖類は、オリゴ糖に分画することもできる。

【0092】

こうして得られたオリゴ糖は、ファインケミストリーにおいて、反応体として好都合に使用される。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】上記に詳述したサーキットモードの原理を示す図である。

50

【図2】抽出係数を、平均ボールサイズの関数として示すグラフである。

【図3】一方で、タンパク質及び多糖類の溶解係数の曲線を示し、他方で、平均ボール直径の関数としての糖類の純度指数(IP)を示すグラフである。

【図4】若いバイオマスに対する、超音波による抽出係数を、2000J(200W)におけるパス回数の関数として示すグラフである。

【図5】中間の～培養が進行したバイオマスに対する、超音波による抽出係数を、2000J(200W)におけるパス回数の関数として示すグラフである。

【図6】成熟したバイオマスに対する、超音波による抽出係数を、2000J(400W)におけるパス回数の関数として示したグラフである。

【図7】成熟したバイオマスに対する、超音波による抽出係数を、2000J(200W)におけるパス回数の関数として示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0094】

続く実施例により、本発明を例示するが、それらにより、本発明の範囲が制限されることはない。

【実施例】

【0095】

これらの実施例については全て、チノリモの培養液を使用する。このバイオマスを、10lの管状の光バイオリアクター中で培養した。

【0096】

タンパク質(図中、「prot」と表す)を、280nmにおける吸光度により測定し、分光光度法による測定の正確性を検証するために、前記測定を、任意選択により、BCAプロトコールに従って実施するタンパク質アッセイによって補う。

【0097】

色素、すなわち、総クロロフィル及び総カロテノイド(図中それぞれ、Chl及びPPCと表す)の定量化を、分光法によりそれぞれ678nm及び416nmにおいて実施する。

【0098】

B-フィコエリトリン(図中、B-PEと表す)を、Bermejoプロトコールによりアッセイする。

【0099】

1. ボールミルを使用する方法

1.1 平均ビーズ直径の関数としての抽出係数の決定

チノリモの培養液を、ガラス製ボールミル(DynoMill MutlilAb、WAB社、スイス)により、

Q:ml/分で示すフィード流速:170、

φ:ミル充填率:75%、

n:攪拌スピード:2389/分→v:攪拌機の刃の末端におけるスピード:8m/秒

の条件下で処理した。

【0100】

参考までに、高圧ミル(2700b)では、細胞の破壊が可能であり、したがって、溶液/安定な懸濁液中への、全て(100%)の代謝産物、したがって、全ての多糖類の放出が生じる。それぞれの代謝産物についての測定単位は、抽出係数であり、その最大(100%)が、HPミルに供した材料に関して得られた応答に相当する。

【0101】

ミルの工程(複数回可)の後に、遠心分離を実施し(13400×g、10分)、分析を、微細藻類の水性抽出液を構成する上清に対して実施する。

【0102】

結果を、図2に提示する。

【0103】

異なる平均直径を有するボールを用いて、ミルによる3つの処理を実施した:

10

20

30

40

50

a) $0.625 \times 10^{-3} \text{m}$ の平均直径を有するボールを用いると、細胞の脱構造が観察され、タンパク質の選択性は最大である。多糖類を回収するには、これらのボールは適切でない。細胞の脱構造の間は、細胞のコンパートメント化が維持され、代謝産物の放出は一般に選択的である。

【0104】

b) $1.3 \times 10^{-3} \text{m}$ の平均直径を有するボールを用いると、細胞の崩壊に類似する破壊が観察され(細胞は完全に破壊され、デブリは微細である)、タンパク質の放出、多糖類の放出が伴い、また、色素の均一な放出も伴う。全ての色素が均一に放出されることは、細胞の極度の破壊を反映し、この方法は、タンパク質と多糖類との間の選択性がより低く、この方法によっては、多糖類の選択的な抽出が可能にならない。

10

【0105】

c) $2.15 \times 10^{-3} \text{m}$ の平均直径を有するボールが、細胞の代謝産物と比較した糖の選択的抽出に最も適切であり、この方法が、最も少ない細胞破壊をもたらす方法である。

【0106】

1.2 溶解係数及び純度指数の決定

ミルによる上記の3つの操作の終わりに、得られた結果に基づいて、タンパク質及び多糖類の溶解係数の曲線を、平均ボール直径の関数としてプロットし、図3に示し、同じグラフ上で、糖類の純度指数をプロットした。

【0107】

このグラフから、 $1.3 \times 10^{-3} \text{m}$ の平均ボール直径以降、多糖類の溶解係数は、タンパク質の溶解係数よりも大きくなり、多糖類の純度指数は、ボールのサイズと共に増加することが浮かび上がる。

20

【0108】

$1.5 \times 10^{-3} \text{m}$ 超の平均直径を有するボールを選択すると、膜多糖類の溶解の程度が、その他の細胞化合物、特に、タンパク質の溶解の程度よりも大きい条件が得られる。

【0109】

$2.15 \times 10^{-3} \text{m}$ に等しい平均直径を有するボールを選択すると、膜多糖類の溶解の程度は低い、純度指数がより高い条件が得られる。

【0110】

$1.5 \times 10^{-3} \text{m}$ 超の平均直径を有するボールを用いて、処理しようとする培養液をボールミルに通すパスを数回実施することによって、80%程度の溶解が首尾よく得られる。

30

【0111】

2. 超音波を使用する方法

使用する技術は、Synetude社が供給するSonitube(登録商標)タイプSM35/3である。これは、超音波トンネルであり、400Wの最大出力を有し、その操作周波数は35kHzである。

【0112】

懸濁液を、Sonitubeにポンプで供給し、そこで、超音波処理に付す(処理体積として、70mlの体積)。したがって、操作パラメータは、フィード流速、及び更に、超音波出力(200W~400W)である。操作の間に、液体に供給されるエネルギーのかなりの部分が、熱の形で消散する。このため、懸濁液の温度を、 30°C を超えないようにモニターする。

40

【0113】

各実験において、先行する段落で定義した、2700bにおいて実施するHPミルによる処理を、参照として用いる。

【0114】

超音波処理の工程の後に、遠心分離を実施する($13000 \times g$ 、10分)。

【0115】

全ての分析を、微細藻類の水性抽出液を構成する上清に対して実施する。

【0116】

超音波については、回分式テストを実施した。

【0117】

50

A_{280} から計算した抽出係数に存在する恐れがあり得る偏りを排除するために、生化学的タンパク質アッセイを実施した。

【0118】

静止期では、膜多糖類が生成するレベルが、培養液中に溶解するレベルよりも高いという知見に基づいて、超音波処理を生理学的状況が異なるチノリモの懸濁液に対して実施することを決めた。

【0119】

これは、若い生理学的状況では、膜多糖類が生成するレベルは、まだ低く、とにかく、培養液中に溶解するレベルよりも低いからである。

【0120】

10

a. 若い生理学的状況

培養液は、3.7gの固体/lを有し、これには、1.5g/lの結合型膜多糖類及び0.3g/lの溶解型膜多糖類が含まれた。連続的パスの間のモニタリングを、図4に提示する。

【0121】

特定の選択性が観察される。超音波処理により、40%程度のタンパク質の放出を伴う、結合型膜多糖類の50%超の放出を達成することが可能になる。にもかかわらず、細胞の生理学的状況は、脱ガムが、比較的少量の結合型膜多糖類(1.5g/l)に対して生じることを指す。

【0122】

また、この生理学的状況から、高いレベルの細胞破壊も説明される。

20

【0123】

b. 中間の生理学的状況、静止期の始まり

培養液は、4.5g固体/lを有し、これには、1.7g/lの結合型膜多糖類及び0.4g/lの溶解型膜多糖類が含まれた。連続的パスの間のモニタリングを、図5に提示する。

【0124】

培養が進行すると、結合型のEPSの量が増加する。選択的な脱ガムの現象が、結合型膜多糖類の増加に伴って促進されるように見える。実際に、膜多糖の(80%に近い)非常に満足な抽出係数を達成するのが可能になり、一方、可溶性タンパク質の放出は(<50%)限定的である。したがって、チノリモの成熟する間の細胞壁の厚さであれば、細胞壁のより大きな部分を引き離すことが可能になるが、細胞を体系的に溶解することはないように見える。

30

【0125】

c. 成熟した生理学的状況

培養液は、6.4gの固体/lを有し、これには、3.2g/lの結合型膜多糖類及び0.44g/lの溶解型膜多糖類が含まれた。この実験については、最小及び最大の操作出力、すなわち、200W及び400Wをテストした。連続的パスの間のモニタリングを、図6及び図7に提示する。

【0126】

このバイオマスに対しては、(<5%)非常に弱い細胞溶解が観察される。 A_{280} の信頼性は、疑わしい場合がある(いくつかの値は、およそ0%である)が、B-PEアッセイは、信頼性があることが認められている方法であり、したがって、(極度の)溶解の指標として役立ち得る。

40

【0127】

この状況では、400Wにおける処理が、200Wにおけるよりも選択的であるように見えるであろう。実際に、抽出係数の比、すなわち、[多糖類(%)]/[B-PE(%)]は、200Wにおいては3.5であり、400Wにおいては8である。更に、400Wにおいては、(20%に近い)より広範な脱ガムが観察される。

【0128】

これらの実験から、適切な条件下における超音波により、微細藻類の脱ガムが可能になることがわかる。

【符号の説明】

50

【 0 1 2 9 】

A フィード槽

B 反応器

【 図 1 】

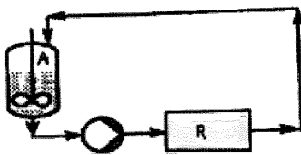


Figure 1

【 図 2 】

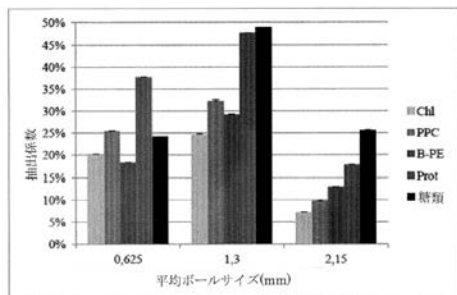


Figure 2

【 図 3 】

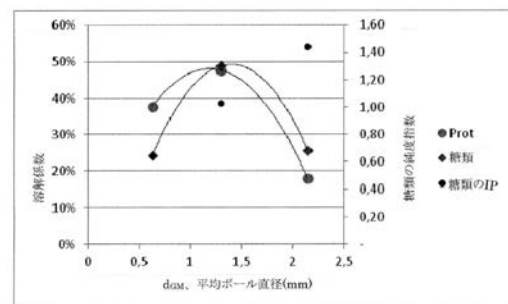


Figure 3

【 図 4 】

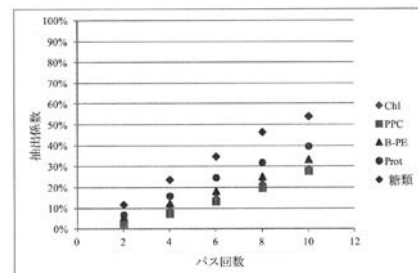


Figure 4

【図 5】

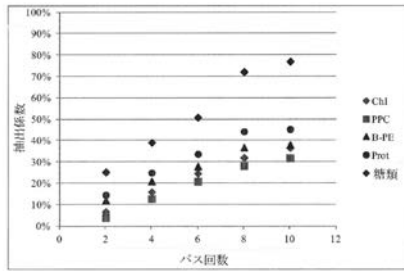


Figure 5

【図 7】

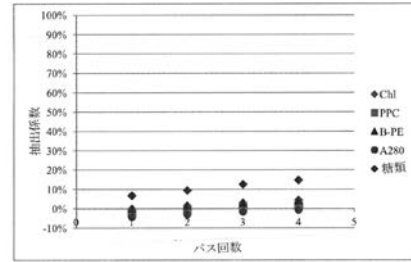


Figure 7

【図 6】

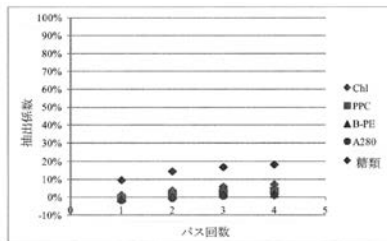


Figure 6

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月13日(2017.6.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微生物、単細胞生物及び糸状菌類から選択される生物から膜多糖類を得るための方法において、前記生物のボールミル中での機械的処理、又は前記生物の超音波による物理学的処理によって、前記膜多糖類を抽出する少なくとも1回の工程であって、可溶性タンパク質の抽出の低下が伴う工程を含む方法。

【請求項 2】

機械的処理が、ガラス製ボールを備えたボールミルを、

- ボールの平均直径(d_{GM})が、 $1.5 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-3} \text{m}$ の範囲に及び、

- 刃の末端における攪拌速度(v)が、 $5 \sim 20 \text{m/秒}$ の範囲に及ぶ

条件下で使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

ボールミル中における機械的処理が、2～50分の範囲に及ぶ時間をかけて実施される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

ミルのボールの充填率が、60体積/体積%～80体積/体積%の範囲に及び、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

物理学的処理が、超音波反応器を、
-エネルギーが、500～5000Jの範囲に及び、
-出力が、200W～400Wの範囲に及び、
-反応器のフィード流速が、0.150l/分～3l/分の範囲に及ぶ
条件下で使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

超音波処理が、5～30秒の範囲に及ぶ時間をかけて実施される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

機械的又は物理学的処理の工程に、抽出した膜多糖類の量を測定する工程が続く、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

少なくとも1回の処理の工程に、抽出するに至った膜多糖類の量を測定する工程が続く、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

生物が、ラン藻類、微細藻類、細菌類及び糸状菌類から選択される、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

生物が、紅藻植物門から、より具体的には、チノリモ属及びロデラ属、ラセンモ属及びドゥナリエラ属から選択される、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記培養液から可溶性多糖の画分を抽出することである工程を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

膜多糖の抽出の工程に、前記多糖類を精製する工程が続く、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

化学組成物、食品組成物、化粧品組成物又は医薬組成物中での、請求項11の規定に従って得られた可溶性多糖の画分の使用。

【請求項14】

組成物の増粘剤、ゲル化剤、界面活性剤、又はそうでなければ、安定化剤としての、請求項11の規定に従って得られた可溶性多糖の画分の使用。

【請求項15】

衛生的な植物生成物中で若しくは衛生的な植物生成物として、又は接着剤中で若しくは接着剤としての、請求項11の規定に従って得られた可溶性多糖の画分の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/073689

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A01G33/00 C12N1/12 A61K8/73 A61K47/36 A61K31/715
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01G C12N A61K

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, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 311 496 A2 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 12 April 1989 (1989-04-12) abstract page 2, line 52 - line 61 page 2, line 19 - line 23 -----	15-17
X	PATEL ANIL KUMAR ET AL: "Separation and fractionation of exopolysaccharides from <i>Porphyridium cruentum</i> ", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 145, 20 December 2012 (2012-12-20), pages 345-350, XP028706121, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2012.12.038 abstract page 345, left-hand column, line 18 - line 23 ----- -/--	15,17

☒ 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

17 November 2015

Date of mailing of the international search report

26/11/2015

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

Mundel, Christophe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/073689

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARCATI ALAIN ET AL: "Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga <i>Porphyridium cruentum</i> by membrane technology", ALGAL RESEARCH-BIOMASS BIOFUELS AND BIOPRODUCTS, vol. 5, July 2014 (2014-07), pages 258-263, XP002739397, ISSN: 2211-9264	15-17
Y	abstract page 258, left-hand column, line 23 - right-hand column, line 2 -----	1-14
Y	KADAM S U ET AL: "Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY 20130522 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY USA, vol. 61, no. 20, 22 May 2013 (2013-05-22), pages 4667-4675, XP002739398, DOI: 10.1021/JF400819P abstract Ultrasound-Assisted Extraction; page 4670 - page 4671 -----	1-14
Y	DOUCHA J ET AL: "Influence of processing parameters on disintegration of <i>Chlorella</i> cells in various types of homogenizers", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 81, no. 3, 29 August 2008 (2008-08-29), pages 431-440, XP019654147, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-008-1660-6 abstract page 431, left-hand column, line 1 - line 3 page 431, right-hand column, line 15 - line 17 ----- -/--	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/073689

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HONGLI ZHENG ET AL: "Disruption of Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY ; PART A: ENZYME ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS INC, NEW YORK, vol. 164, no. 7, 24 February 2011 (2011-02-24), pages 1215-1224, XP019918055, ISSN: 1559-0291, DOI: 10.1007/S12010-011-9207-1 abstract -----	1-14
X	LI ZHANG ET AL: 31 October 2013 (2013-10-31), ULTRASONICS SONOCHEMISTRY ELSEVIER B.V. NETHERLANDS, VOL. 21, NR. 2, PAGE(S) 576 - 581, XP002739399, ISSN: 1350-4177 abstract 2.2. High-intensity ultrasound treatment; page 577 page 576, left-hand column, line 13 - line 18 -----	1,7,14, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/073689

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0311496	A2	12-04-1989	AU 2294688 A 06-04-1989
			DE 3887431 D1 10-03-1994
			DE 3887431 T2 28-07-1994
			EP 0311496 A2 12-04-1989
			FR 2621327 A1 07-04-1989
			IL 87899 A 13-05-1993
			JP H01128794 A 22-05-1989
			US 4906746 A 06-03-1990

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2015/073689

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV. A01G33/00	C12N1/12	A61K8/73 A61K47/36 A61K31/715
ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A01G C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 311 496 A2 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 12 avril 1989 (1989-04-12) abrégé page 2, ligne 52 - ligne 61 page 2, ligne 19 - ligne 23 -----	15-17
X	PATEL ANIL KUMAR ET AL: "Separation and fractionation of exopolysaccharides from <i>Porphyridium cruentum</i> ", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 145, 20 décembre 2012 (2012-12-20), pages 345-350, XP028706121, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2012.12.038 abrégé page 345, colonne de gauche, ligne 18 - ligne 23 ----- -/--	15,17
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
17 novembre 2015		26/11/2015
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Mundel, Christophe

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2015/073689

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MARCATI ALAIN ET AL: "Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga <i>Porphyridium cruentum</i> by membrane technology", ALGAL RESEARCH-BIOMASS BIOFUELS AND BIOPRODUCTS, vol. 5, juillet 2014 (2014-07), pages 258-263, XP002739397, ISSN: 2211-9264	15-17
Y	abrégé page 258, colonne de gauche, ligne 23 - colonne de droite, ligne 2 -----	1-14
Y	KADAM S U ET AL: "Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY 20130522 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY USA, vol. 61, no. 20, 22 mai 2013 (2013-05-22), pages 4667-4675, XP002739398, DOI: 10.1021/JF400819P abrégé Ultrasound-Assisted Extraction; page 4670 - page 4671 -----	1-14
Y	DOUCHA J ET AL: "Influence of processing parameters on disintegration of <i>Chlorella</i> cells in various types of homogenizers", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 81, no. 3, 29 août 2008 (2008-08-29), pages 431-440, XP019654147, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-008-1660-6 abrégé page 431, colonne de gauche, ligne 1 - ligne 3 page 431, colonne de droite, ligne 15 - ligne 17 -----	1-14
Y	HONGLI ZHENG ET AL: "Disruption of Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY ; PART A: ENZYME ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS INC, NEW YORK, vol. 164, no. 7, 24 février 2011 (2011-02-24), pages 1215-1224, XP019918055, ISSN: 1559-0291, DOI: 10.1007/S12010-011-9207-1 abrégé -----	1-14
	----- -/--	

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2015/073689

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LI ZHANG ET AL: 31 octobre 2013 (2013-10-31), ULTRASONICS SONOCHEMISTRY ELSEVIER B.V. NETHERLANDS, VOL. 21, NR. 2, PAGE(S) 576 - 581, XP002739399, ISSN: 1350-4177 abrégé 2.2. High-intensity ultrasound treatment; page 577 page 576, colonne de gauche, ligne 13 - ligne 18 -----	1,7,14, 15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2015/073689

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0311496	A2	12-04-1989	
		AU 2294688 A	06-04-1989
		DE 3887431 D1	10-03-1994
		DE 3887431 T2	28-07-1994
		EP 0311496 A2	12-04-1989
		FR 2621327 A1	07-04-1989
		IL 87899 A	13-05-1993
		JP H01128794 A	22-05-1989
		US 4906746 A	06-03-1990

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 0 9 J 103/00	(2006.01)	C 0 9 J 101/00	
C 1 2 N 1/14	(2006.01)	C 0 9 J 103/00	
C 1 2 N 1/20	(2006.01)	C 1 2 N 1/14	A
C 1 2 N 1/12	(2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
		C 1 2 N 1/12	C

(81)指定国 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, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ジェレミ・プリュヴォ
フランス・F-44250・サン・ブルヴァン・レ・パン・アヴニュ・ドゥ・ラ・クロワ・デュ・スッド・4

(72)発明者 パスカル・ジャウエン
フランス・F-445120・ル・プリギュン・リュ・フォッシュ・27・レジドンス・レ・カナリー

(72)発明者 リュク・マーシャル
フランス・F-44600・サン・ナゼール・リュ・パルマンティエ・41

(72)発明者 セバスチャン・ジュボー
フランス・F-44350・ゲランド・ルート・ドゥ・ロスコナン・21

(72)発明者 ジョエル・フルランス
フランス・F-44130・フェイ・ドゥ・ブルターニュ・ラ・モリッセ・(番地なし)

Fターム(参考) 4B065 AA83X AC14 BD01 CA22 CA41 CA44 CA50

4C076 EE30 EE58 FF35 FF36 FF43

4C083 AD211 EE01 EE07

4C090 AA03 AA04 AA08 BA94 BC04 BC06 BC15 BC17 BC19 CA09

CA23 DA03 DA04 DA22 DA26 DA27 DA31

4J040 BA001 KA27 KA28 KA29 KA38