

【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1部門第1区分

【発行日】平成19年9月27日(2007.9.27)

【公表番号】特表2007-512007(P2007-512007A)

【公表日】平成19年5月17日(2007.5.17)

【年通号数】公開・登録公報2007-018

【出願番号】特願2006-540109(P2006-540109)

【国際特許分類】

C 12 P 7/62 (2006.01)

【F I】

C 12 P 7/62

【手続補正書】

【提出日】平成19年8月7日(2007.8.7)

【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】

細菌の細胞バイオマスからポリヒドロキシアルカノエート(PHA)を回収する方法であって、前記バイオマスは、発酵により得られ、水性懸濁液中の、約18重量%以上の乾燥細胞含量を有する細胞バイオマス・スラリーの形態であり、

i) 前記細胞バイオマスの壁の破壊および前記バイオマス中に含まれるPHAの溶解を生じさせるために、ならびに溶解PHAに富むPHA溶媒、前記細胞バイオマス・スラリーからの残存する水および濃縮細胞バイオマスの不溶性残渣を含む懸濁液を形成するために、PHA溶媒の注入、激しい攪拌、および反応器内部における迅速な加熱の同時操作に濃縮細胞バイオマス・スラリーをかける段階；

ii) 溶解PHAに富む前記溶媒を残留細胞バイオマスの不溶性残渣から回収するために、前記反応器中に形成された懸濁液を分離段階にかける段階；

iii) PHAに富むPHA溶媒溶液を、溶解PHAの全てを実質的に沈降させるために十分な温度まで急冷する段階；

iv) 沈降PHAの濃縮ペーストを分離するために、水およびPHA溶媒中に溶解する不純物を含むPHA溶媒中に沈降したPHA懸濁液を冷却マイクロ濾過する段階

v) 濃縮PHAペーストを、脆弱で容易に剪断できる高孔隙率のPHA顆粒、残留溶媒および水を含む懸濁液を得るために適切な一定量の溶媒の蒸発を促進するために、水による洗浄、加熱および攪拌の同時操作にかける段階；

vi) 洗浄されおよび加熱されたPHA顆粒を、精製されたPHA粒子を含む懸濁液を得るために、PHA顆粒を急速に破壊する一方、残留溶媒および水を含む懸濁液に水蒸気を注入することにより残留溶媒の抽出処理するように、攪拌および剪断にかける段階；および

vii) 前記懸濁液から精製されたPHA粒子を分離する段階を含むことを特徴とする前記方法。

【請求項2】

使用されるPHA溶媒が、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸アミル、酢酸イソアミル、イソブチルアルコール、1-ブタノール、1-ペンタノール(アミルアルコール)、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノール(イソアミルアルコール)、3-ペンタノール、1-ヘキサノール、シクロヘキサノール、プロピオン酸プロピル、プロ

ピオン酸ブチル、プロピオン酸( p r o p i o n a t e )イソブチル、酪酸( b u t i r a t e )エチル、イソ酪酸イソブチル、及びこれら溶媒の混合物から成る溶媒の群より選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

使用される溶媒が、イソアミルアルコール、またはイソアミルアルコールの異性体の混合物であることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

イソアミルアルコールがエタノール発酵の副産物としてのフーゼル油を分画することにより得られ、前記フーゼル油が、エタノール、n - プロパノール、イソブタノール、n - ブタノールおよび水などの不純物に加えて、主としてイソアミルアルコール及びその異性体から構成されることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

P H A が、ポリ - 3 - ヒドロキシブチレート( P H B )、ポリ( ヒドロキシブチレート - コ( c o ) - ヒドロキシバリレート ) P H B V 、並びにこれらの重合体および共重合体の混合物から成る群より選択されることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

P H A が主要原料としてサトウキビから抽出された糖を使用して P H A を生合成できる微生物を用いた細菌発酵により生産され、前記工程に必要な熱エネルギーおよび電気エネルギーを生産するために用いられる主要なエネルギー源がサトウキビのバガスであることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

P H A が、ポリ - 3 - ヒドロキシブチレート( P H B )、ポリ( ヒドロキシブチレート - コ - ヒドロキシバリレート ) P H B V 、並びにこれらの重合体および共重合体の混合物から成る群より選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

発酵により得られ処理される細菌細胞バイオマスが予め熱不活性化されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

濃縮細胞バイオマス・スラリーに溶媒を注入する段階が、実質的に大気圧において約 90 ° から溶媒の沸点の温度まで細胞バイオマスを加熱するために、および、P H A に富む P H A 溶媒および細胞バイオマス・スラリーからの残存する水を含む液相、残留細胞バイオマスの不溶性残渣により定義される固相ならびに水および P H A 溶媒の蒸気を含む蒸気相を形成するために、液体の P H A 溶媒および蒸気の形態の P H A 溶媒を注入する操作を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

反応器の内部から蒸気相を抜き出す追加段階を含むことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

P H A ペーストが細胞破壊のおよび P H A 溶解の段階中に反応器から抜き出された蒸気相の凝縮に由来する水流で洗浄されることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

濃縮細胞バイオマス・スラリーが、細胞バイオマス懸濁液を含む発酵培養培地を細胞バイオマスの凝集および濃縮の操作にかけることにより得られることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

発酵培養培地の懸濁液中における、工程に供給される細胞バイオマスが、約 3 . 0 : 1 . 0 までの発酵物質 : 水の質量比を提供するように、さらに水で希釈されることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

凝集操作が、約 1 . 5 から約 5 . 5 までの pH に希釈細胞バイオマスを酸性化すること

により、並びに約 7 から約 12 までの pH に達するまでアルカリ化剤を添加することにより達成される、細胞バイオマスを凝固させる段階を含み、蓄積 PHA を含む細胞バイオマスの凝集操作が凝集剤の添加により実施されることを特徴とする、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

希釈細胞バイオマスの酸性化が硫酸および磷酸の少なくとも一つにより定義される酸を添加することにより行われることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

アルカリ化剤が水酸化カルシウムを含むことを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

約 2.0 から約 3.0 までの pH を得るように酸性化が実施され、希釈細胞バイオマスの懸濁液の pH を約 7 から約 12 の範囲に調整するようにアルカリ化剤の添加が為されることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

凝集操作が約 7 から約 12 までの pH に達するまでアルカリ化剤を添加することにより細胞バイオマスを凝固させる段階を含み、蓄積 PHA を含む細胞バイオマスの凝集が凝集剤の添加により達成されることを特徴とする、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 19】

アルカリ化剤が水酸化カルシウムを含むことを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

凝集操作が、約 1.5 から約 5.5 までの pH に細胞バイオマスを酸性化することにより、および約 7 から約 12 までの pH に達するまでアルカリ化剤を添加することにより、細胞バイオマスを凝固させる段階を含み、蓄積 PHA を含む細胞バイオマスの凝集が凝集剤の添加により達成されることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 21】

希釈細胞バイオマスの酸性化が硫酸および磷酸の少なくとも一つにより定義される酸を添加することにより行われることを特徴とする、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

アルカリ化剤が水酸化カルシウムを含むことを特徴とする、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

約 2.0 から約 3.0 までの pH を得るように酸性化が実施され、希釈細胞バイオマスの懸濁液の pH を約 7 から約 12 の範囲に調整するようにアルカリ化剤の添加が為されることを特徴とする、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

凝集操作が約 7 から約 12 までの pH に達するまでアルカリ化剤を添加することにより細胞バイオマスを凝固させる段階を含み、蓄積 PHA を含む細胞バイオマスの凝集が凝集剤の添加により達成されることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 25】

アルカリ化剤が水酸化カルシウムを含むことを特徴とする、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

凝集バイオマス細胞の濃縮がデカンテーションおよび遠心分離の操作の少なくとも一つにより達成されることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 27】

凝集発酵培養培地の懸濁液中における細胞バイオマス・スラリーが、水による洗浄に、および乾燥細胞バイオマスの 18 重量 % から 45 重量 %、好ましくは 25 重量 % から 45 重量 % の範囲の濃縮にかけられることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 28】

細胞バイオマス・スラリーを洗浄および濃縮する段階が前記スラリーを水流および遠心力の作用に同時にかけることにより達成されることを特徴とする、請求項 27 に記載の方法。

**【請求項 29】**

細胞バイオマス・スラリーに注入される液体 P H A 溶媒が加熱されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 30】**

反応器内部に形成された懸濁液に含まれる残留バイオマスの不溶性残渣から、P H A 溶媒に溶解した P H A に富む溶媒を分離する段階が、膜マイクロ濾過およびプレコート・フィルタの濾過の操作の少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 31】**

反応器内部に形成された懸濁液に含まれる残留バイオマスの不溶性残渣から、P H A 溶媒に溶解した P H A に富む溶媒を分離する段階が、低強度の遠心力の作用により前記懸濁液を分離にかける段階を含むことを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

**【請求項 32】**

P H A 溶液に溶解した P H A に富む前記溶液から反応器内部に形成された懸濁液に含まれる残留バイオマスの不溶性残渣を分離する段階で用いられる低強度の遠心力が、ヒドロサイクロンを用いて低濃度の前記残渣を含む懸濁液および前記残渣を濃縮した他の懸濁液を生産することにより、得られることを特徴とする、請求項 3 1 に記載の方法。

**【請求項 33】**

ヒドロサイクロンを離れる、バイオマス不溶性残渣の低濃度の懸濁液が、冷却段階にかけられる前に前記残渣を完全に除去するため、迅速に追加の分離段階にかけられることを特徴とする、請求項 3 2 に記載の工程。

**【請求項 34】**

追加の分離段階が、不溶性残渣を含まず P H A 溶媒に溶解した P H A 溶液を生産するために、ならびにバイオマス不溶性残渣が濃縮されていて、P H A 溶媒に溶解した P H A 画分、水、灰、および P H A 溶媒に溶解した色化合物を含む懸濁液を生産するために、膜マイクロ濾過により達成されることを特徴とする、請求項 3 3 に記載の工程。

**【請求項 35】**

細胞バイオマスの不溶性残渣が濃縮されている懸濁液が、バイオマス不溶性残渣を含むミール、および、不溶性残渣を含まず迅速に冷却段階にかけられる溶媒に溶解した P H A の濾過溶液を生産するために、濾過段階にかけられることを特徴とする、請求項 3 4 に記載の方法。

**【請求項 36】**

不溶性残渣を含まず P H A 溶媒に溶解した P H A の溶液が、マイクロ濾過において約 60 から 90 重量 % の懸濁液を示し、細胞バイオマスの残渣を濃縮した懸濁液がマイクロ濾過において約 10 から 50 重量 % の前記懸濁液を示すことを特徴とする、請求項 3 4 に記載の方法。

**【請求項 37】**

ヒドロサイクロンを離れるバイオマス不溶性残渣が濃縮されている懸濁液が、冷却段階にかけられる前に、バイオマス不溶性残渣を分離するために、濾過段階にかけられることを特徴とする、請求項 3 2 に記載の方法。

**【請求項 38】**

P H A 溶媒に沈降した P H A 懸濁液を冷却マイクロ濾過する段階が、約 3 . 5 % から 8 . 0 % w / w までの P H A の濃度の P H A ペーストを生産するために実施されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 39】**

溶媒が枯渇した水性媒体から分離された P H A 粒子を乾燥する最終段階をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 40】**

工程のいくつかの段階において生成された水および P H A 溶媒蒸気が凝縮されて二つの液相、一方は P H A の抽出および回収の段階における工程に戻る溶媒に富む液相、他方は溶媒に乏しい液相中に含まれる P H A 溶媒を回収できるように工程に再循環される溶媒に

乏しい液相、に分離されることを特徴とする、請求項 1 に記載の工程。

【請求項 4 1】

発酵細胞バイオマスを加熱する段階、前記細胞バイオマスの細胞壁を破壊する段階および前記バイオマスに含まれる P H A を溶解する段階が、最小で約 1 , 0 0 0 , 0 0 0 D a の分子量を有する P H A を含むバイオマスから、最小で約 8 5 0 . 0 0 0 D a の分子量を有する P H A が得られるのに十分に短い合計時間で実施されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 2】

分離および冷却の段階が最小で約 7 5 0 . 0 0 0 D a の分子量を有する P H A が得られるのに十分に短い時間で達成されることを特徴とする、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

乾燥後、段階 ( v i ) で得られた P H A 顆粒が、4 0 から 4 0 0  $\mu\text{m}$ までの範囲および好ましくは 1 0 0 から 2 0 0  $\mu\text{m}$ までの範囲の平均粒径を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

請求項 1 から 4 3 のいずれか一項に従って生産されることを特徴とする、P H B 。