

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6919827号  
(P6919827)

(45) 発行日 令和3年8月18日(2021.8.18)

(24) 登録日 令和3年7月28日(2021.7.28)

(51) Int. Cl. F 1  
**C 1 2 P 7/64 (2006.01)** C 1 2 P 7/64  
**C 1 2 N 1/12 (2006.01)** C 1 2 N 1/12

請求項の数 16 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2016-539098 (P2016-539098)	(73) 特許権者	501304397
(86) (22) 出願日	平成26年12月19日 (2014.12.19)		ディーエスエム ニュートリショナル プ
(65) 公表番号	特表2016-540514 (P2016-540514A)		ロダクツ アーゲー
(43) 公表日	平成28年12月28日 (2016.12.28)		DSM Nutritional Pro
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/003113		ducts AG
(87) 国際公開番号	W02015/092544		スイス国、4303 カイザーアウグスト
(87) 国際公開日	平成27年6月25日 (2015.6.25)		、ヴルミスヴェーク 576
審査請求日	平成29年12月6日 (2017.12.6)	(74) 代理人	100107456
審査番号	不服2019-9737 (P2019-9737/J1)		弁理士 池田 成人
審査請求日	令和1年7月23日 (2019.7.23)	(74) 代理人	100128381
(31) 優先権主張番号	61/918,880		弁理士 清水 義憲
(32) 優先日	平成25年12月20日 (2013.12.20)	(74) 代理人	100162352
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 酒巻 順一郎
		(74) 代理人	100165526
			弁理士 阿部 寛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物から油を回収する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

脂質産生微生物のバイオマスから脂質を抽出する方法であって、  
 (a) 0.2% ~ 0.4% の体積 / 体積の濃度の1つまたは複数のプロテアーゼと脂質産生微生物のバイオマスを接触させて脂質産生微生物を加水分解することであって、界面活性剤の非存在下において遂行されることと；

(b) (i) 加水分解した脂質産生微生物を NaCl と接触させ、(ii) 次いで、遠心分離して湿潤バイオマス層と油層に分けて油層を除去し、(iii) さらに、湿潤バイオマス層をヘキサンと接触させることにより、湿潤バイオマス層から脂質を抽出することであって、湿潤バイオマス層対ヘキサンの比が 1 : 0.2 の体積 : 体積であることとを含み

10

、前記脂質を抽出する方法が、乾燥工程を欠く、方法。

【請求項2】

脂質の少なくとも60%が前記脂質産生微生物のバイオマスから抽出される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

脂質の少なくとも90%が前記脂質産生微生物のバイオマスから抽出される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

1つまたは複数のプロテアーゼと脂質産生微生物のバイオマスを接触させることの前に

20

前記脂質産生微生物のバイオマスが遠心分離によって濃縮されることを更に含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記脂質産生微生物のバイオマスが 20% の固体まで濃縮される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記脂質産生微生物のバイオマスが 15% ~ 20% の固体へ濃縮される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

1 つまたは複数のプロテアーゼと脂質産生微生物のバイオマスを接触させることが 6 ~ 9 の pH で遂行される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 8】

1 つまたは複数のプロテアーゼと脂質産生微生物のバイオマスを接触させることが 55 ~ 70 の温度で遂行される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

1 つまたは複数のプロテアーゼと脂質産生微生物のバイオマスを接触させることが 70 以下の温度で遂行される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

1 つまたは複数のプロテアーゼと脂質産生微生物のバイオマスを接触させることが 1 ~ 20 時間遂行される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 11】

1 つまたは複数のプロテアーゼと脂質産生微生物のバイオマスを接触させることが 4 時間遂行される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記プロテアーゼがアルカラーゼ（登録商標）2.4L FG である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

1 つまたは複数のプロテアーゼと脂質産生微生物のバイオマスを接触させることが、0.2% または 0.4% のアルカラーゼの存在下において 55 で 18 ~ 20 時間遂行される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 14】

前記脂質産生微生物のバイオマスが、藻類、菌類、細菌及び原生生物からなる群から選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記脂質産生微生物のバイオマスが *Thraustochytrium* 属、*Schizochytrium* 属及びその混合物から選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記脂質産生微生物のバイオマスが、ATCC アクセション番号 PTA-6245 として寄託された *Thraustochytrium* 属の種である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。 40

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[ 関連出願の相互参照 ]

本出願は、2013 年 12 月 20 日に出願された米国仮特許出願第 61/918,880 号の優先権を主張し、その全体は参照により本明細書に援用される。

【0002】

[ 背景 ]

湿式抽出法または乾式抽出法を使用して、微生物（微細藻類等）から油を回収すること 50

ができる。乾式抽出法において、典型的には微生物は採取され、油の抽出の前に乾燥される。しかしながら、乾燥は高価かつエネルギー多消費型のプロセスである。また、油が多価不飽和脂肪酸（P U F A）に富むならば（例えば食品及び栄養サプリメントの適用のために）、プロセスは、乾燥に關与する高温に起因してP U F Aの著しい酸化を引き起こし得る。

【 0 0 0 3 】

更に、典型的には微生物から油を回収する乾式抽出法は有機溶媒（ヘキサン等）により行われ、適切な油収率のために機械的細胞破碎方法とのカップリングが要求される。しかしながら、機械的破碎方法は高価かつエネルギー多消費型である一方で、有機溶媒は引火性かつ毒性があり、最終油製品から除去しなくてはならない。

10

【 0 0 0 4 】

[ 概要 ]

微生物から油（すなわち脂質）を回収する方法が本明細書において提供される。方法は、例えば栄養油及び/または脂質バイオ燃料を得ることに有用である。本明細書において記述される油を回収する方法は、随意に、一体化されたバイオプロセスとして（すなわち「ワンポット」方法として）遂行され得る。

【 0 0 0 5 】

本明細書において記述される微生物の集団から脂質を回収する方法は、微生物の破碎を引き起こす条件下で1つまたは複数の酵素と微生物の集団を接触させることと、低減させた量の有機溶媒の存在下または有機溶媒の非存在下において、破碎した微生物から脂質を抽出することとを含む。随意に、接触工程は発酵培地中で起こる。

20

【 0 0 0 6 】

抽出工程は随意に有機溶媒の非存在下において遂行される。これらの例において、脂質の少なくとも60%を、微生物の集団から抽出することができる。抽出工程は、随意に、従来の抽出方法と比較して、低減させた量の有機溶媒を使用して遂行され得る。これらの例において、脂質の少なくとも90%を、微生物の集団から抽出することができる。随意に、微生物対有機溶媒の比は、1 : 6 ~ 1 : 0.2の体積 : 体積である（例えば1 : 0.2の体積 : 体積）。有機溶媒は随意にヘキサンであり得る。

【 0 0 0 7 】

微生物の集団は、随意に接触工程の前に濃縮することができる。随意に、微生物の集団は遠心分離及び固相の回収によって濃縮される。微生物の集団は20%の固体（例えば15 ~ 20%の固体）へ濃縮することができる。

30

【 0 0 0 8 】

接触工程は界面活性剤の非存在下において遂行され得る。随意に、接触工程は、6 ~ 8.5以内（例えば約7.5）のpHで遂行され得る。接触工程は、随意に55 ~ 70以下の温度で遂行され得る。随意に、接触工程は70以下の温度で遂行され得る。接触工程は1 ~ 20時間（例えば4時間）遂行され得る。

【 0 0 0 9 】

随意に、接触工程において使用される酵素はプロテアーゼである。酵素は随意にアルカラーゼ2.4Lである。随意に、酵素は0.2% ~ 0.4%の体積/体積の濃度である。接触工程は、随意に0.4%または0.2%の酵素の存在下において55で18 ~ 20時間遂行され得る。例えば、接触工程は、0.4%の酵素の存在下において55で18時間遂行され得る。随意に、接触工程は0.4%の酵素の存在下において70で4 ~ 6時間遂行される。

40

【 0 0 1 0 】

随意に、抽出工程は油（例えばココナッツ油）の存在下において遂行される。随意に、抽出工程はバイオ燃料の存在下において遂行される。

【 0 0 1 1 】

随意に、方法は乾燥工程を欠く。

【 0 0 1 2 】

50

微生物の集団は、藻類、菌類、細菌及び原生生物からなる群から選択される。随意に、微生物の集団は、*Thraustochytrium*属、*Schizochytrium*属またはその混合物から選択される。随意に、例えば、ATCCアクセッション番号PTA-6245として寄託されるような微生物の集団は*Thraustochytrium*属の種である。

#### 【0013】

1つまたは複数の実施形態の詳細は以下の図面及び記述中で説明される。他の特色、目的及び利点は、記述及び図面ならびに請求項から明らかである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0014】

【図1】40 mM（左側のバー）、100 mM（中央のバー）及び160 mM（右側のバー）の塩酸、リン酸、硫酸、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムにより加水分解した細胞から回収された油のパーセンテージを示すグラフである。

【図2】0.2%（左側のバー）及び0.4%（右側のバー）のビスコザイム、アルカラゼ、フレーバーザイム及びマンナウェイ酵素により酵素的に加水分解した細胞から回収された油のパーセンテージを示すグラフである。

【図3】40 mMの $H_2SO_4$ 、160 mMの $H_2SO_4$ 及び0.2%のアルカラゼによる加水分解後に、洗浄されない細胞（左側バー）及び洗浄された細胞（右側バー）から回収された油のパーセンテージを示すグラフである。

【図4】55 で18時間及び70 で4時間酵素的に加水分解した細胞から回収された油のパーセンテージを示すグラフである。

【図5】有機溶媒あり、低減させた量の有機溶媒あり、及び有機溶媒なしで、酵素的に加水分解し抽出した細胞から回収された油のパーセンテージを示すグラフである。

【図6】純粋な油の脂質クラスプロファイル（トリグリセリド（TG）藻類油（左側のバー）、バイオ燃料（中央のバー）、及びエチル化された（EE）藻類油（右側バー）が含まれる）に基づいた、酵素的に加水分解した細胞から回収されバイオ燃料により抽出された油のパーセンテージを示すグラフである。

#### 【0015】

#### [ 詳細な説明 ]

微生物の集団から脂質を回収する方法が本明細書において記載される。脂質を回収する方法は、微生物の破碎を引き起こす条件下で1つまたは複数の酵素と微生物の集団を接触させることと、低減させた量の有機溶媒の存在下または有機溶媒の非存在下において、破碎した微生物から脂質を抽出することを含む。同じ容器内で微生物による油の産生及び細胞破碎を遂行して、油を随意に放出することができるので、本明細書において記述される方法は、「ワンポット」または「一体化」プロセスと称することができる。したがって、下流のプロセッシング工程（例えば油の抽出及び回収）は、上流プロセッシング工程（例えば発酵）の末端で一体化することができる。

#### 【0016】

#### I. 微生物

本明細書において記述される方法は微生物の集団から脂質を回収することを含む。本明細書において記述される微生物の集団は、藻類（例えば微細藻類）、菌類（酵母が含まれる）、細菌または原生生物であり得る。随意に、微生物には、*Thraustochytriales*目の*Thraustochytrid*類、より具体的には*Thraustochytriales*目の*Thraustochytrium*属及び*Schizochytrium*属が含まれる。随意に、微生物の集団には、米国特許第5,340,594号及び第5,340,742（それらの全体は参照により本明細書に援用される）中で記述されているような*Thraustochytriales*目が含まれる。微生物は、*Thraustochytrium*属の種（ATCCアクセッション番号PTA-6245として寄託された*Thraustochytrium*属の種（すなわちONC-T18）等）であり得る。

10

20

30

40

50

## 【0017】

本明細書において記述される方法における使用のための微生物は、多様な脂質化合物を産生することができる。本明細書において使用される時、脂質という用語には、リン脂質、遊離脂肪酸、脂肪酸のエステル、トリアシルグリセロール、ステロール及びステロールエステル、カロテノイド、キサントフィル（例えばオキシカロチノイド）、炭化水素、ならびに当業者に公知の他の脂質が含まれる。随意に、脂質化合物には不飽和脂質が含まれる。不飽和脂質には、多価不飽和脂質（すなわち少なくとも2つの不飽和炭素 - 炭素結合（例えば二重結合）を含有する脂質）または高度不飽和脂質（すなわち4つ以上の不飽和炭素 - 炭素結合を含有する脂質）が含まれ得る。不飽和脂質の例には、オメガ - 3多価不飽和脂肪酸及び/またはオメガ - 6多価不飽和脂肪酸（ドコサヘキサエン酸（すなわちDHA）、エイコサペンタエン酸（すなわちEPA）ならびに他の天然に存在する不飽和化合物、多価不飽和化合物及び高度不飽和化合物等）が含まれる。

10

## 【0018】

## II. プロセス

## 発酵

本明細書において記述される微生物は当技術分野において公知の方法に従って培養することができる。例えば、*Thraustochytrid*（例えば*Thraustochytrium*属の種）は、米国特許公開US2009/0117194またはUS2012/0244584（それらの全体は参照により本明細書に援用される）中で記述される方法に従って培養することができる。微生物は増殖培地（「培養培地」としても公知）中で増殖される。多様な培地のうちの任意ものは本明細書において記述される微生物の培養における使用のために適切であり得る。随意に、培地は微生物のための様々な栄養成分（炭素源及び窒素源が含まれる）を供給する。

20

## 【0019】

随意に、本明細書において提供される微生物は、対象となる化合物のバイオマス及び/または産生（例えば油または総脂肪酸（TFA）の含有量）を増加させる条件下で培養される。*Thraustochytrid*類は、典型的には例えば生理食塩水培地中で培養される。随意に、*Thraustochytrid*類は、約2.0g/L~約50.0g/Lの塩濃度を有する培地中で培養され得る。随意に、*Thraustochytrid*類は、約2g/L~約35g/L（例えば約18g/L~約35g/L）の塩濃度を有する培地中で培養される。随意に、本明細書において記述される*Thraustochytrid*類は、低い塩条件において増殖させることができる。例えば、*Thraustochytrid*類は、約5g/L~約20g/L（例えば約5g/L~約15g/L）の塩濃度を有する培地中で培養され得る。培養培地は随意にNaClを含む。随意に、培地は、天然または人工的な海塩及び/または人工海水を含む。

30

## 【0020】

従来の方法と比較して、培養培地中の塩素濃度は低減させることができる（すなわちより低い量で）。培養培地は、ナトリウム源として塩化物非含有ナトリウム塩（例えば硫酸ナトリウム）を含むことができる。例えば、培養培地中の総ナトリウムの約100%、75%、50%または25%未満が、塩化ナトリウムによって供給されるように、総ナトリウムの大部分は非塩化物塩によって供給することができる。

40

## 【0021】

随意に、培養培地は、約3g/L、500mg/L、250mg/Lまたは120mg/L未満の塩素濃度を有する。例えば、培養培地は、約60mg/L~120mg/L以内の塩素濃度を有する。本方法に従う使用のための適切な非塩化物ナトリウム塩の例には、ソーダ灰（炭酸ナトリウム及び酸化ナトリウムの混合物）、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、硫酸ナトリウム及びその混合物が含まれるが、これらに限定されない。例えば米国特許第5,340,742号及び第6,607,900号（その各々の全体の内容は参照により本明細書に援用される）を参照されたい。

## 【0022】

50

*Thraustochytrid*の培養のための培地には、多様な炭素源のうちの任意のものが含まれ得る。炭素源の例には、脂肪酸；脂質；グリセロール；トリグリセロール；炭水化物（グルコース、デンプン、セルロース、ヘミセルロース、フルクトース、デキストロース、キシロース、ラクツロース、ガラクトース、マルトトリオース、マルトース、ラクトース、グリコーゲン、ゼラチン、デンプン（トウモロコシまたは小麦）、アセテート、*m*-イノシトール（コーンステープ液に由来する）、ガラクトロン酸（ペクチンに由来する）、*L*-フコース（ガラクトースに由来する）、ゲンチオピオース、グルコサミン、*D*-グルコース-1-リン酸（グルコースに由来する）、セロピオース、デキストリン、及びシクロデキストリン（デンプンに由来する）等）；シヨ糖（糖蜜から）；ポリオール（マルチトール、エリトリトール、アドニトール及びオレイン酸（グリセロール及びツイーン80等）等）；アミノ糖（*N*-アセチル-*D*-ガラクトサミン、*N*-アセチル-*D*-グルコサミン及び*N*-アセチル-*D*-マンノサミン等）；ならびに任意の種類バイオマスまたは廃液ストリームが含まれる。

10

## 【0023】

随意に、培地は約5 g/L ~ 約200 g/Lの濃度で炭素源を含む。培地は約1 : 1 ~ 約40 : 1の間のC : N（炭素対窒素）の比を有することができる。二相培養を使用する場合、培地は、第1の相のために約1 : 1 ~ 約5 : 1、次いで第2の相において約1 : 1 ~ 約1 : ほぼ0（すなわち窒素なしまたは最小）以内のC : N比を有することができる。本明細書において使用される時、最小という用語は、約10%未満（例えば、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2% 20 未満、約1%未満、約0.9%未満、約0.8%未満、約0.7%未満、約0.6%未満、約0.5%未満、約0.4%未満、約0.3%未満、約0.2%未満、または約0.1%未満）を指す。例えば、培地中の最小の窒素は、約10%未満（例えば、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.9%未満、約0.8%未満、約0.7%未満、約0.6%未満、約0.5%未満、約0.4%未満、約0.3%未満、約0.2%未満、または約0.1%未満）の培地中の窒素を指すことができる。

20

## 【0024】

*Thraustochytrid*類の培養のための培地には、多様な窒素源のうちの任意のものが含まれ得る。例示的な窒素源には、アンモニウム溶液（例えばH<sub>2</sub>O中のNH<sub>4</sub>） 30、アンモニウム塩またはアミン塩（例えば(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>OOCCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (NH<sub>4</sub>Ac))、ペプトン、トリプトン、酵母抽出物、麦芽抽出物、魚粉、グルタミン酸ナトリウム、ダイズ抽出物、カザミノ酸及び穀物粕が含まれる。適切な培地中の窒素源の濃度は、典型的には約1 g/L ~ 約25 g/L以内の範囲である。

30

## 【0025】

培地は随意にリン酸塩（リン酸カリウムまたはリン酸ナトリウム等）を含む。培地中の無機塩及び微量栄養素には、硫酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、オルトバナジウム酸ナトリウム、クロム酸カリウム、モリブデン酸ナトリウム、亜セレン酸、硫酸ニッケル、硫酸銅、硫酸亜鉛、塩化コバルト、塩化鉄、塩化マンガン、塩化カルシウム及びEDTA 40 が含まれ得る。ビタミン（塩酸ピリドキシン、塩酸チアミン、パントテン酸カルシウム、パラアミノ安息香酸、リポフラビン、ニコチン酸、ピオチン、葉酸及びビタミンB12等）を含むことができる。

40

## 【0026】

培地のpHは、酸または塩基を使用して、及び/または必要に応じて窒素源を使用して、3.0 ~ 10.0以内へ調整され得る。随意に、培地は4.0 ~ 6.5のpHへ包括的に調整される。培地は滅菌することができる。

## 【0027】

一般的には、微生物の培養のために使用される培地は液体培地である。しかしながら、微生物の培養のために使用される培地は固形培地であり得る。本明細書において論じられ 50

50

るような炭素源及び窒素源に加えて、固形培地は、構造的支持を提供する及び/または培地が固体形状であることを可能にする、1つまたは複数の構成要素（例えばアガーまたはアガロース）を含有することができる。

【0028】

細胞は1日～60日間のいつでも培養することができる。随意に、培養は、14日以下、13日以下、12日以下、11日以下、10日以下、9日以下、8日以下、7日以下、6日以下、5日以下、4日以下、3日以下、2日以下、または1日以下の間実行される。培養は約4～約30（例えば約18～約28）の温度で随意に実行される。培養には、通気-振盪培養、振盪培養、静置培養、パッチ培養、準連続培養、連続培養、ローリングパッチ培養、ウェーブ培養、または同種のものが含まれ得る。培養は、従来型の攪拌発酵槽、気泡塔発酵槽（パッチ溶媒または連続培養）、ウェーブ発酵槽などを使用して遂行され得る。

10

【0029】

培養は、振盪が含まれる多様な方法のうちの1つまたは複数によってエアレーションされ得る。随意に、振盪は、約100rpm～約1000rpm（例えば約350rpm～約600rpmまたは約100～約450rpm）の範囲である。随意に、培養は、バイオマス産生相の間に及び脂質産生相の間に異なる振盪スピードを使用してエアレーションされる。あるいはまたは追加で、振盪スピードは、培養容器のタイプ（例えばフラスコの形またはサイズ）に依存して変動し得る。

【0030】

随意に、溶存酸素（DO）のレベルは、脂質産生相の間にあるよりもバイオマス産生相の間により高い。したがって、DOレベルは脂質産生相の間に低減する（すなわちDOレベルはバイオマス産生相中の溶存酸素の量よりも少ない）。随意に、溶存酸素のレベルは飽和未満に低減される。例えば、溶存酸素のレベルは非常に低いかまたは場合によっては検出不能なレベルへ低減され得る。

20

【0031】

より高い量の所望される化合物を得るために、所望される脂質の産生は、1つまたは複数の培養条件のシフトを含む方法に従って細胞を培養することによって促進され得る。随意に、細胞は最初にバイオマスを最大化する条件下で培養され、続いて1つまたは複数の培養条件は脂質産生性を支援する条件へシフトされる。シフトされる条件には、酸素濃度、C:N比、温度及びその組み合わせが含まれ得る。随意に、2ステージ培養が遂行され、第1のステージはバイオマス産生を支援し（例えば、高酸素（例えば一般的にはまたは第2のステージと比較して）、低C:N比、及び周囲温度の条件を使用して）、続いて第2のステージは脂質産生を支援する（例えば酸素は減少され、C:N比は増加され、温度は減少される）。

30

【0032】

低温殺菌

随意に、もたらされたバイオマスを低温殺菌して、細胞を死滅させてバイオマス中に存在する所望されない物質を不活性化する。例えば、バイオマスを低温殺菌して、物質を分解する化合物を不活性化することができる。バイオマスは発酵培地中に存在することができるか、または低温殺菌工程のために発酵培地から単離することができる。低温殺菌工程は、バイオマス及び/または発酵培地を高温へ加熱することによって遂行することができる。例えば、バイオマス及び/または発酵培地は、約50～約95（例えば約60～約90、または約65～約80）の温度で加熱することができる。随意に、バイオマス及び/または発酵培地は、約30分間～約120分間（例えば約45分間～約90分間、または約55分間～約75分間）で加熱することができる。低温殺菌は、当業者に公知であるような適切な加熱手段を使用して（直接的な蒸気噴射によって等）遂行することができる。

40

【0033】

採取及び洗浄

50

随意に、バイオマスは当業者に公知の方法に従って採取することができる。例えば、バイオマスは、随意に様々な従来の方法（遠心分離（例えば固体排出遠心分離機）または濾過（例えばクロスフロー濾過）等）を使用して、発酵培地から収集することができ、細胞バイオマスの収集の加速のために沈殿剤（例えばリン酸ナトリウムまたは塩化カルシウム）の使用も含むことができる。

【0034】

随意に、バイオマスは水により洗浄される。随意に、バイオマスは約20%の固体まで濃縮することができる。例えば、バイオマスは約5%～約20%の固体、約7.5%～約15%の固体、もしくは約15%の固体～約20%の固体、または列挙された範囲内の任意のパーセンテージへ濃縮することができる。随意に、バイオマスは、約20%以下の固体、約19%以下の固体、約18%以下の固体、約17%以下の固体、約16%以下の固体、約15%以下の固体、約14%以下の固体、約13%以下の固体、約12%以下の固体、約11%以下の固体、約10%以下の固体、約9%以下の固体、約8%以下の固体、約7%以下の固体、約6%以下の固体、約5%以下の固体、約4%以下の固体、約3%以下の固体、約2%以下の固体、または約1%以下の固体へ濃縮することができる。

10

【0035】

加水分解

細胞の加水分解（すなわち細胞破碎）は、化学的、酵素的、及び/または機械的な方法を使用して遂行され得る。細胞の加水分解のための化学的方法は細胞への酸の添加を含むことができ、本明細書において酸加水分解と称される。酸加水分解法において、バイオマスは例えば遠心分離を使用して水により洗浄され、細胞の加水分解の前に上述のように濃縮され得る。随意に、バイオマスは水により約15%の固体へ濃縮される。

20

【0036】

次いで酸は洗浄された湿潤バイオマスへ添加される。随意に、バイオマスは酸の添加の前に乾燥されない。酸加水分解工程における使用のために適切な酸には、硫酸、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硝酸、過塩素酸、及び当業者に公知であるような他の強酸が含まれる。適切な量の酸を洗浄された湿潤バイオマスへ添加して、約100mM～約200mM（例えば約120mM～約180mM、または約140mM～約160mM）の最終濃度を達成することができる。硫酸は洗浄された湿潤バイオマスへ160mMの最終濃度で添加され得る。

30

【0037】

次いで水、バイオマス及び酸を含む、もたらされた混合物を、一定の期間でインキュベーションして、細胞を加水分解することができる。随意に、混合物は、約30～約200の温度でインキュベーションされ得る。例えば、混合物は、約45～約180、約60～約150、または約80～約130の温度でインキュベーションされ得る。随意に、混合物は121の温度でオートクレーブ中でインキュベーションされる。混合物は、細胞の少なくとも50%（例えば細胞の少なくとも60%、細胞の少なくとも70%、細胞の少なくとも80%、細胞の少なくとも90%、細胞の少なくとも95%、または細胞の100%）を加水分解するのに適切な一定の期間でインキュベーションされ得る。細胞のインキュベーションのための期間は培養温度に依存する。混合物をより高い温度でインキュベーションすることは、より速い速度で進む加水分解をもたらすことができる（すなわち加水分解のためにより短い期間が要求される）。いくつかの例において、細胞は60で1時間インキュベーションされ得る。随意に、インキュベーション工程は、直接的または間接的な低温殺菌装置（例えばMicrothermicsから商業的に入手可能な連続フローサーマルシステム（例えばMicrothermics UHT/HTST Lab 25 EHV Hybrid）（Raleigh, North Carolina）等）を使用して遂行される。

40

【0038】

上述のように、細胞加水分解（すなわち細胞破碎）は、酵素的方法を使用して遂行され得る。具体的には、微生物の集団は、微生物の破碎を引き起こす条件下で1つまたは複数

50



の酵素と接触させることができる。随意に、酵素はプロテアーゼである。適切なプロテアーゼの例はアルカラゼ 2.4 L FG (Novozymes; Franklinton, North Carolina) である。随意に、細胞は酵素的加水分解の前に水により洗浄されない。

【0039】

微生物の集団を発酵させて水性培地中で浮遊させることができる。発酵培地は発酵槽中で重力により沈降させることができ、培地をデカントするかそうでなければ除去して、微生物の集団の所望される濃度を提供することができる。あるいは、発酵培地を遠心分離によって濃縮して、微生物の集団の所望される濃度を提供することができる。微生物の集団は 20% 以下の固体へ濃縮され得る。例えば、微生物の集団は約 5% ~ 約 20% の固体、約 7.5% ~ 約 15% の固体、もしくは約 15% の固体 ~ 約 20% の固体、または列挙された範囲内の任意のパーセンテージへ濃縮することができる。微生物の集団は、1 つまたは複数の酵素と微生物を接触させる前に濃縮することができる。

10

【0040】

1 つまたは複数の酵素と微生物を接触させる前に、発酵培地の pH は、随意に約 6 ~ 8.5、例えば約 6.5 ~ 8.5 もしくは約 7 ~ 8、または列挙された範囲内の任意の値に調製され得る。例えば、発酵培地の pH は、随意に 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4 または 8.5 へ調整され得る。pH は、例えば塩基（水酸化ナトリウム（例えば 1 N の NaOH）、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウムまたは水酸化カリウム等）を使用して調整され得る。

20

【0041】

微生物の集団が発酵培地中にあるときに、微生物は 1 つまたは複数の酵素と接触させることができる（すなわち接触工程は発酵培地中で起こる）。随意に、発酵培地へ添加される酵素は約 0.2% ~ 約 0.4% の体積 / 体積 (v/v) の濃度である。例えば、発酵培地へ添加される酵素は、0.2% (v/v)、0.25% (v/v)、0.30% (v/v)、0.35% (v/v) または 0.4% (v/v) からの濃度であり得る。

【0042】

接触工程は 70 °C 以下の温度で遂行され得る。例えば、微生物は、約 70 °C 以下、約 65 °C 以下、約 60 °C 以下、約 55 °C 以下、約 50 °C 以下または約 45 °C 以下の温度で 1 つまたは複数の酵素と接触させることができる。随意に、接触工程は、約 45 °C ~ 約 70 °C、約 50 °C ~ 約 70 °C、または約 55 °C ~ 約 65 °C の温度で遂行される。接触工程を適切な期間で遂行して、微生物の破碎をもたらす。例えば、接触工程は、約 1 時間 ~ 約 20 時間、例えば 2 時間 ~ 18 時間、4 時間 ~ 16 時間、6 時間 ~ 14 時間、もしくは 8 時間 ~ 12 時間、または列挙された範囲内の任意の時間枠で遂行され得る。随意に、接触工程は約 4 時間遂行され得、加水分解温度は随意に約 70 °C であり得る。

30

【0043】

最適温度、時間、pH 及び酵素濃度は具体的な酵素に依存し、与えられた酵素に適切であるように、当業者は温度、時間、pH 及び酵素濃度を修飾することができるだろう。

40

【0044】

随意に、接触工程は、約 0.2% または約 0.4% の酵素のいずれかの存在下において約 55 °C で約 18 ~ 20 時間遂行される。例えば、接触工程は、0.4% の酵素の存在下において 55 °C で 18 時間遂行され得る。あるいは、接触工程は 0.4% の酵素の存在下において 70 °C で 4 ~ 6 時間遂行される。随意に、接触工程は、界面活性剤の非存在下において（すなわち界面活性剤は存在しないで）遂行される。

【0045】

随意に、細胞破碎は、当業者に公知であるような他の化学的方法及び機械的方法を使用して遂行され得る。例えば、細胞破碎は、アルカリ加水分解、ビーズ粉碎、超音波処理、界面活性剤加水分解、溶媒抽出、急速減圧（すなわち細胞爆弾法）、もしくは高剪断機械

50

的方法、化学物質との接触、ホモジナイゼーション、超音波、粉碎、剪断力、フレンチプレス、コールドプレス、加熱、乾燥、浸透圧衝撃、圧力振動、自己分解遺伝子の発現、またはこれらの組み合わせを使用して遂行され得る。随意に、細胞破碎は、本明細書において記述される化学的、酵素的及び/または機械的な方法のうち2つ以上の組み合わせ（例えばビーズ粉碎と組み合わせた酵素的加水分解）を使用して遂行され得る。細胞破碎方法は、連続して（例えばビーズ粉碎に続いて酵素的加水分解）遂行され得る。

【0046】

抽出

上述のように、脂質は、低減させた量の有機溶媒の存在下において（すなわち有機溶媒抽出）または有機溶媒の非存在下において、微生物の集団から抽出される。

10

【0047】

随意に、抽出工程は、乾燥微生物細胞全体からの脂質の抽出に必要とされる有機溶媒の量と比較して低減させた量の有機溶媒を使用して遂行される。本明細書において使用される時、乾燥微生物細胞全体からの脂質の抽出に必要とされる有機溶媒の量と比較して低減された量の有機溶媒、という用語は、乾燥微生物細胞全体からの脂質の抽出に必要とされるものより少ない有機溶媒の量を意味する。例えば、微生物またはバイオマス対乾燥微生物細胞全体のために必要とされる有機溶媒の比は、典型的には1:4以上である。したがって、低減させた量の有機溶媒は、約1:4未満の微生物またはバイオマス対有機溶媒の比を提供することができる。例えば、微生物またはバイオマス对本明細書において記述される加水分解された湿潤バイオマスから油を抽出するための有機溶媒の比は、約1:0.2~約1:1（例えば1:0.2、1:0.3、1:0.4、1:0.5、1:0.6、1:0.7、1:0.8または1:0.9）であり得る。随意に、有機溶媒の追加量は、約1:6まで等の比の微生物またはバイオマス対有機溶媒で、使用することができる。

20

【0048】

抽出工程における使用のために適切な有機溶媒には、ヘキサン、イソプロピルアルコール、塩化メチレン、ドデカン、メタノール、エチル化油、及び超臨界二酸化炭素が含まれる。

【0049】

有機溶媒及び微生物またはバイオマスは、微生物またはバイオマスからの脂質の抽出に適切な一定の期間で混合することができる。例えば、有機溶媒及び微生物またはバイオマスは、約10分間以上、20分間以上、30分間以上、40分間以上、50分間以上、1時間以上、または2時間以上混合することができる。続いて、脂質は、溶液を遠心分離することによって混合物の残りの構成要素から分離することができる。

30

【0050】

随意に、微生物によって理論的に産生された脂質のうち少なくとも約50%は、この方法を使用して微生物の集団から抽出される（すなわち、方法は少なくとも50%の収率を提供する）。例えば、微生物の集団から抽出された脂質の収率は、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%である。

【0051】

脂質は、有機溶媒の非存在下においても微生物の集団から抽出することができる。本明細書において使用される時、有機溶媒の非存在下においては、微生物の集団の重量に基づいて約0.5%未満（例えば、約0.4%未満、約0.3%未満、約0.2%未満、約0.1%未満、約0.05%未満、約0.01%未満、約0.005%未満、または0%）の有機溶媒を意味する。

40

【0052】

随意に、脂質は、油（例えばココナッツ油）またはバイオ燃料の使用によって破碎した微生物から抽出することができる。

【0053】

随意に、抽出工程の間に添加される油は、栄養油（例えば栄養源に由来するかまたはそれから得られた油）であり得る。本明細書において記述される方法における使用のために

50

適切な栄養油の例には、ココナッツ油、ヤシ油、キャノーラ油、ヒマワリ油、大豆油、トウモロコシ油、オリーブ油、サフラワー油、パーム核油、綿実油、及びその組み合わせが含まれる。アルキル化誘導体(例えばメチル化油またはエチル化油)等のそれらの油の任意の誘導体も使用することができる。

【0054】

本明細書において使用される時、バイオ燃料は、任意の燃料、燃料添加剤、バイオマス出発材料に由来する芳香族化合物及び/または脂肪族化合物を指す。例えば、本明細書において記述される方法における使用のために適切なバイオ燃料は、植物源または藻類源に由来し得る。バイオ燃料のために適切な源の例には、藻類、トウモロコシ、スイッチグラス、サトウキビ、テンサイ、ナタネ、大豆、及び同種のものが含まれる。

10

【0055】

随意に、バイオ燃料は、生物源から油を採取し、油をバイオ燃料に転換することによって得ることができる。生物源から得られる油(例えば植物源及び/または藻類源から得られる油)を転換する方法は、当業者に公知である。随意に、バイオ燃料を得る方法は、油産生バイオマス(例えば藻類)を培養し、油(例えば藻類油)を抽出し、油(例えば藻類油)を転換してバイオ燃料を形成することを含み得る。随意に、油はエステル交換反応を使用してバイオ燃料に転換することができる。本明細書において使用される時、エステル交換反応は、別のアルコールによってエステルのアルコキシ基を交換するプロセスを指す。例えば、本明細書において記述される方法における使用のためのエステル交換反応プロセスは、藻類油(例えばトリグリセリド)をバイオディーゼル(例えば脂肪酸アルキルエステル及びグリセロール)へ転換することを含み得る。エステル交換反応は、従来の化学プロセス(酸触媒反応または塩基触媒反応等)の使用によって、または酵素触媒反応の使用によって遂行され得る。

20

【0056】

本明細書において使用される時、有機溶媒という用語が、本明細書において、栄養油(ココナッツ油、ヤシ油、キャノーラ油、ヒマワリ油、大豆油、トウモロコシ油、オリーブ油、サフラワー油、パーム核油、綿実油、またはそのアルキル化(例えばメチル化またはエチル化)誘導体等)は含まれないと定義されるので、その用語にはバイオ燃料は含まれない。

【0057】

随意に、破碎した微生物からの脂質の抽出に使用される油またはバイオ燃料は、抽出された脂質から後続して除去されない。抽出された油の後続の分画(添加される油またはバイオ燃料は油画分のうちのただ1つと共にとどまる)は、抽出された脂質から油またはバイオ燃料を除去するとは判断されない。例えば、回収後に本明細書において記述される油は、本明細書において記述される製品のうちの1つもしくは複数としての使用のために他の油と組み合わせることができるか、または本明細書において記述される製品のうちの1つもしくは複数の中に取り込むことができる。それらの他の油または製品(バイオ燃料等)のうちの任意の1つは、回収プロセスの結論後に回収された油との組み合わせに対する代替として、またはそれに加えて、抽出工程の間に脂質及びバイオマスの混合物へ添加され得る。抽出工程の間に他の油を添加することは、使用済みバイオマスから脂質の解乳化及び分離を支援することができる。

30

40

【0058】

バイオマスから脂質を分離する有機溶媒抽出に依存する従来の方法において、回収後に脂質から有機溶媒を除去しなければならないが、典型的には少なくとも微量の溶媒が後に残される。本明細書において記述される方法において、しかしながら、随意に、抽出工程の間に添加される油またはバイオ燃料が最終製品として使用されるかまたは最終製品の中に取り込まれる場合、そのうちの約80%を超えるものが回収された油中にとどまる。すなわち、随意に、抽出工程の間に添加される油またはバイオ燃料のうちの約20%未満が、最終製品としての使用または最終製品の中への取り込みの前に、回収された油から除去される。例えば、随意に、抽出工程の間に添加される油またはバイオ燃料のうちの約15

50

%未満、約10%未満、約5%未満、約2%未満、または0%は、最終製品としての使用または最終製品の中への取り込みの前に、回収された油から除去される。

【0059】

随意に、微生物によって理論的に産生された脂質のうちの少なくとも40%は、この方法を使用して微生物の集団から抽出される（すなわち、方法は少なくとも約40%の収率を提供する）。例えば、微生物の集団から抽出された脂質の収率は、少なくとも約50%、少なくとも60%、少なくとも70%または少なくとも80%であり得る。

【0060】

あるいは、脂質は機械的方法を使用して抽出することができる。加水分解されたバイオマス及び微生物は遠心分離することができ、脂質は構成要素の残りから分離することができる。随意に、脂質は遠心分離された材料の上部層中に含有され、例えば吸引またはデカントによって他の材料から取り出すことができる。

【0061】

III. 製品

本明細書において記述される方法に従って産生された多価不飽和脂肪酸（PUFA）及び他の脂質は、例えばそれらの生物学的特性または栄養特性を利用して、任意の多様な適用において利用することができる。随意に、化合物は、医薬品、食品サプリメント、動物用飼料添加剤、化粧品、及び同種のものにおいて使用することができる。本明細書において記述される方法に従って産生された脂質は、他の化合物の産生における中間体としても使用することができる。

【0062】

随意に、本明細書において記述される方法に従って産生された脂質は、最終製品（例えば食品または飼料のサプリメント、乳児用調合乳、医薬品、燃料など）の中へ取り込むことができる。本明細書において記述される脂質の取り込みのために適切な食品または飼料のサプリメントには、飲料（牛乳、水、スポーツドリンク、エナジードリンク、茶及びジュース等）；糖菓（ゼリー及びビスケット等）；脂肪を含有する食品及び飲料（乳製品等）；加工食品製品（軟質の米（または粥）等）；乳児用調合乳；朝食用シリアル；または同種のものが含まれる。随意に、1つまたは複数の産生された脂質は、食物サプリメント（例えばマルチビタミン剤等）の中へ取り込むことができる。随意に、本明細書において記述される方法に従って産生された脂質を、食物サプリメント中に含めることができ、随意に食品または飼料の構成要素（例えば食品サプリメント）の中へ直接取り込むことができる。

【0063】

本明細書において記述される方法によって産生された脂質が取り込まれ得る飼料原料の例には、ペットフード（キャットフード；ドッグフード及び同種のもの；観賞魚、養殖魚または甲殻類のための飼料など等）；農場で飼育される動物（家畜及び水産養殖において飼育される魚類または甲殻類が含まれる）のための飼料が含まれる。本明細書において記述される方法に従って産生された脂質が取り込まれ得る食品または飼料材料は、好ましくは意図されるレシピエントである生物体へ快いものである。この食品または飼料材料は、食品材料について現在公知の任意の物理的特性（例えば固体、液体、軟質）を有し得る。

【0064】

随意に、産生された化合物（例えばPUFA）のうちの1つまたは複数を経済品の中へ取り込むことができる。かかる経済品の例には、様々なタイプの錠剤、カプセル、飲用薬剤などが含まれる。随意に、経済品は局所適用のために適切である。投薬量形状には、例えばカプセル、油、粒子、細粒、散剤、錠剤、丸薬、トローチ剤、または同種のものが含まれ得る。

【0065】

本明細書において記述される方法に従って産生された脂質を、多様な薬剤の任意のものとの組み合わせによって本明細書において記述されるような製品の中へ取り込むことができる。例えば、かかる化合物は1つまたは複数の結合剤または充填剤と組み合わせること

10

20

30

40

50

ができる。いくつかの実施形態において、製品は、1つまたは複数のキレート剤、色素、塩、界面活性剤、保湿剤、粘度調整剤、増粘剤、皮膚軟化剤、香料、防腐剤など、及びその組み合わせを含むことができる。

【0066】

以下の実施例は、本明細書において記載される方法及び組成物の特定の態様を更に例示することを意図し、特許請求の範囲を限定するようには意図されない。

【実施例】

【0067】

実施例1。低温殺菌、採取及び洗浄、ならびに化学的加水分解

低温殺菌

T18バイオマスを60 で1時間攪拌しながら加熱して細胞を低温殺菌した。

【0068】

採取及び洗浄

低温殺菌されたT18バイオマスを周囲温度で20分間4150rpmで遠心分離して、細胞ペーストから最終培地を分離した。培地を除去し、同等の質量の水を細胞ペーストへ添加して細胞を洗浄した。細胞ペースト-水混合物を1分間振盪し、再遠心分離し、水相を除去した。

【0069】

化学的加水分解

水洗浄T18細胞ペーストを水により150g/Lへ調整した。サブサンプル(10mL)を取り出し、50mL遠心分離チューブへ添加した。各々のサブサンプルを表1に従って最終濃度へ酸または塩基により処理した。混合物を121 で15分間オートクレーブして細胞を加水分解した。加水分解後に、サンプルをヘキササン抽出して、回収された油のパーセンテージを物質収支によって決定した(図1)。160mMのHCl及びH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>による加水分解は85%を超える油回収をもたらした。

【0070】

【表1】

表1：

サンプル番号	酸/塩基のタイプ	濃度(mM)	油回収(%)
1	HCl	40	1
2	HCl	100	47
3	HCl	160	100
4	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	40	12
5	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100	3
6	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	160	5
7	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40	7
8	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	68
9	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160	94
10	NaOH	40	8
11	NaOH	100	40
12	NaOH	160	52
13	KOH	40	8
14	KOH	100	20
15	KOH	160	54

【0071】

実施例2。酵素的加水分解

水洗浄 T 1 8 細胞ペーストを水により 2 2 0 g / L へ調整した。pH を 1 N の NaOH により 7 . 5 へ調整した。サブサンプル ( 1 0 m L ) を取り出し、5 0 m L 遠心分離チューブへ添加した。各々のサブサンプルを表 2 に従って酵素により処理した。混合物を 5 0 で 2 2 時間振盪しながらインキュベーションして細胞を加水分解した。加水分解後に、サンプルをヘキサン抽出して、回収された油のパーセンテージを物質収支によって決定した ( 図 2 ) 。アルカラーゼ単独または別の酵素と組み合わせた加水分解は 8 5 % を超える油回収をもたらした。

【 0 0 7 2 】

【表 2】

表 2 :

サンプル番号	酵素	濃度(% v/v)	油回収(%)
1	ビスコザイム	0.2	0.1
2		0.4	0.3
3	アルカラーゼ	0.2	96
4		0.4	96
5	フレーバーザイム	0.2	1
6		0.4	0.3
7	マンナウエイ	0.2	0
8		0.4	0.8
9	アルカラーゼ/ビスコザイム	0.2/0.2	93
10	アルカラーゼ/マンナウエイ	0.2/0.2	91
11	フレーバーザイム/マンナウエイ	0.2/0.2	0.3

【 0 0 7 3 】

実施例 3。酸加水分解及び酵素的加水分解、洗浄の効果

低温殺菌非洗浄 T 1 8 バイオマス ( 1 0 m L ) のサブサンプルを 5 0 m L 遠心分離チューブへ添加した。対照を水洗浄し、水で 1 7 0 g / L へ調整し、5 0 m L 遠心分離チューブの中へサブサンプルをとった。各々のサブサンプルを表 3 に従って酸または酵素により処理した。酸加水分解サンプルを 1 2 1 で 1 5 分間オートクレーブして細胞を加水分解した。酵素的に加水分解したサンプルを 1 N の NaOH により pH 7 . 5 へ調整し、5 0 で 2 6 時間振盪しながらインキュベーションして細胞を加水分解した。酸加水分解または酵素的加水分解後に、サンプルをヘキサン抽出して、回収された油のパーセンテージを物質収支によって決定した ( 図 3 ) 。洗浄した油の回収に同等な洗浄していない油の回収は、0 . 2 % のアルカラーゼ加水分解で達成された。

【 0 0 7 4 】

10

20

30

【表 3】

表 3 :

サンプル番号	洗浄した/洗浄していない	酸処理/酵素処理	濃度	油回収(%)
1	洗浄していない	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 mM	5
2	洗浄した	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 mM	61
3	洗浄していない	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160 mM	27
4	洗浄した	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160 mM	91
5	洗浄していない	アルカラゼ	0.2% v/v	93
6	洗浄した	アルカラゼ	0.2% v/v	94

10

## 【 0 0 7 5 】

実施例 4。酵素的加水分解、温度 / 時間の効果

水洗浄 T 1 8 細胞ペーストを水により 2 1 0 g / L へ調整した。pH を 1 N の NaOH により 7 . 5 へ調整した。サブサンプル ( 1 0 m L ) を 5 0 m L 遠心分離チューブの中へ添加した。各々のサブサンプルを 0 . 2 % の v / v アルカラゼにより処理した。混合物を 7 0 °C で 4 時間振盪しながらインキュベーションして細胞を加水分解した。対照を 5 5 °C で 1 8 時間振盪しながらインキュベーションした。加水分解後に、サンプルをヘキサン抽出して、回収された油のパーセンテージを物質収支によって決定した ( 図 4 )。7 0 °C へ温度を増加させることによって、5 5 °C で 1 8 時間の加水分解に同等な油の回収は、4 時間で達成された。

20

## 【 0 0 7 6 】

実施例 5。酵素的加水分解、低減させた有機溶媒による抽出

水洗浄 T 1 8 細胞ペーストを水により 2 2 0 g / L へ調整した。pH を 1 N の NaOH により 7 . 5 へ調整した。サブサンプル ( 1 0 m L ) を 5 0 m L 遠心分離チューブへ添加した。各々のサブサンプルを 0 . 2 % の v / v アルカラゼにより処理した。混合物を 5 5 °C で 2 2 時間振盪しながらインキュベーションして細胞を加水分解した。加水分解後に、各々のサブサンプルを表 4 に従って抽出し、回収された油のパーセンテージを物質収支によって決定した ( 図 5 )。対照は、1 : 2 ( 湿潤バイオマス : ヘキサン ) でヘキサン抽出した。サンプル 2 は、4 0 °C で 2 0 分間 4 1 5 0 r p m で遠心分離した。サンプル 3 は、2 0 g / L の NaCl により処理し、続いて遠心分離した。サンプル 4 は、2 0 g / L の NaCl により処理し、続いて遠心分離した。油層を除去し、1 : 0 . 2 ( 湿潤バイオマス : ヘキサン ) を添加して残りの油を抽出した。ヘキサン抽出の前に遊離油を除去することによって、1 : 2 ( 湿潤バイオマス : ヘキサン ) 比に同等な油回収は、1 : 0 . 2 ( 湿潤バイオマス : ヘキサン ) 比により達成された。

30

## 【 0 0 7 7 】

## 【表 4】

表 4 :

サンプル番号	抽出方法	油回収(%)
1	1:2 湿潤バイオマス:ヘキサン	95
2	溶媒なし (遠心分離単独)	12
3	20g/L NaCl+遠心分離	51
4	NaCl +遠心分離 > 1:0.2 湿潤バイオマス:ヘキサン	99

40

## 【 0 0 7 8 】

50

## 実施例 6。酵素的加水分解、バイオ燃料による抽出

水洗浄 T 1 8 細胞ペーストを水により 2 0 0 g / L へ調整し、pH を 1 N の NaOH に  
より 7 . 5 へ調整した。サブサンプル ( 1 0 m L ) を取り出し、5 0 m L 遠心分離チュー  
ブへ添加した。各々のサブサンプルを 0 . 2 % の v / v アルカラゼにより処理した。混  
合物を 5 5 で 1 8 時間振盪しながらインキュベーションして細胞を加水分解した。加水  
分解後に、各々のサブサンプルを表 5 に従ってバイオ燃料により抽出し、油のパーセン  
テージを物質収支によって決定し、純粋な油の脂質クラスプロファイルに基づかせた ( 図 6  
及び表 5 )。1 : 0 . 4 ( 湿潤バイオマス : バイオ燃料 ) による抽出は、脂質クラスプロ  
ファイルに基づいて、8 5 % を超える油回収をもたらした。トリグリセリド ( TG ) 藻類  
油をエチル化し ( EE )、親 TG 油に加えて、油抽出のために使用した ( 表 6 )。湿潤バ  
イオマス : EE 藻類油のすべての比は、脂質クラスプロファイルに基づいて、8 5 % を超  
える油回収をもたらした。

【 0 0 7 9 】

【表 5】

表 5 :

湿潤バイオマ ス:バイオ燃 料の比	TG:EE-FFA の比	藻類油の%	実際の藻類油 の%	油回収 (%)
純粋な藻類油	52.8	100		
1:2	0.0455	4.45	7.96	56
1:1	0.0764	7.44	14.7	51
1:0.4	0.268	20.48	23.5	96
1:0.2	0.42	31.42	46.4	68
バイオ燃料	0.00291	0		

【 0 0 8 0 】

【表 6】

表 6 :

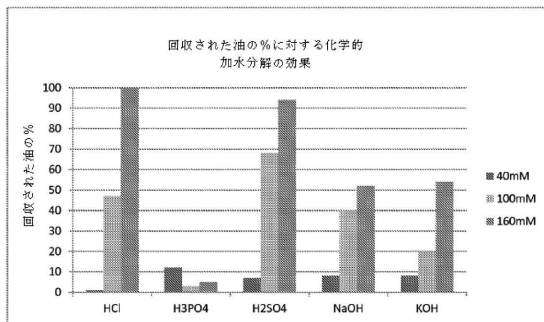
湿潤バイオマス:抽出 油の比	油抽出効率(物質収支に基づ く) (%)	油抽出効率(DHA:オレイ ン酸の比に基づく) (%)
バイオ燃料		
1:2	76	56
1:1	54	51
1:0.4	59	96
1:0.2	54	68
TG 藻類油		
1:2	52	
1:1	40	
1:0.4	34	
1:0.2	43	
EE 藻類油		
1:2	76	100
1:1	70	100
1:0.4	75	100
1:0.2	83	100

【 0 0 8 1 】

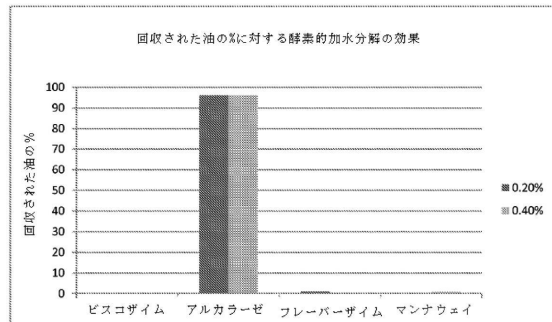


添付の請求項の組成物及び方法は、本明細書において記述される具体的な組成物及び方法によって範囲を限定されず、それらは請求項の少数の態様の例証として意図され、機能的に等価な任意の組成物及び方法はこの開示の範囲内である。本明細書において示され記述されるものに加えて組成物及び方法の様々な修飾は、添付の請求項の範囲内に入ることが意図される。更に、特定の代表的な組成物、方法、ならびにこれらの組成物及び方法の態様のみが具体的に記述されているが、他の組成物及び方法、ならびに組成物及び方法の様々な特色の組み合わせは、具体的に列挙されなかったとしても、添付の請求項の範囲内に入ることが意図される。したがって、工程、要素、構成要素または成分の組み合わせは、本明細書において明示的に述べることができるが、明瞭に明示されなかったとしても、工程、要素、構成要素及び成分の他のすべての組み合わせが含まれる。

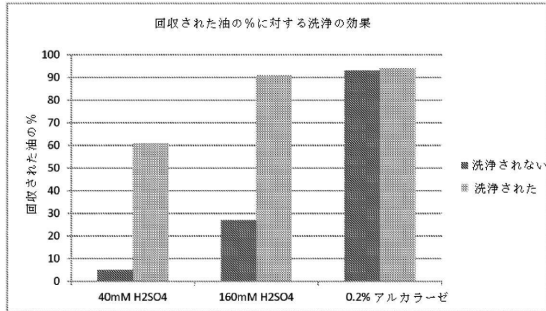
【図1】



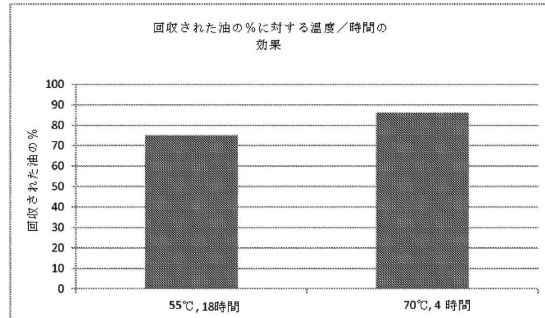
【図2】



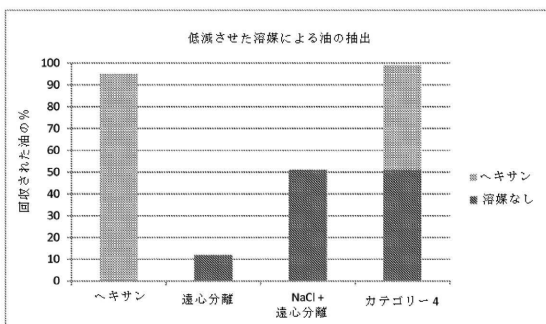
【 図 3 】



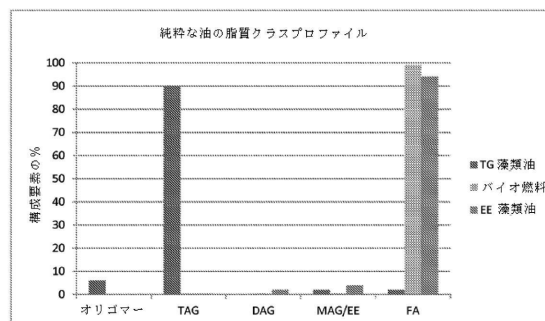
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 デニス, ドロシー, エー.  
カナダ, ノヴァ スコシア州 ビー3ケー 2ジェイ7, ハリファックス, キャボット プ  
レイス 5518
- (72)発明者 アルメンタ, ロベルト, イー.  
カナダ, ノヴァ スコシア州 ビー2ワイ 3ジー1, ダートマス, クランストン アヴェ  
ニュー 23

合議体

審判長 長井 啓子  
審判官 中島 庸子  
審判官 平林 由利子

- (56)参考文献 国際公開第2012/164211号  
米国特許出願公開第2005/0170479号明細書

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
IPC C12P