

【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30年2月8日(2018.2.8)

【公表番号】特表2017-501705(P2017-501705A)
 【公表日】平成29年1月19日(2017.1.19)
 【年通号数】公開・登録公報2017-003
 【出願番号】特願2016-541029(P2016-541029)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 1/00 (2006.01)
 C 1 2 N 1/16 (2006.01)
 C 1 2 N 9/26 (2006.01)
 C 1 1 B 1/10 (2006.01)
 C 1 1 B 1/02 (2006.01)
 C 1 2 P 7/64 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/00 K
 C 1 2 N 1/16 J
 C 1 2 N 9/26 A
 C 1 1 B 1/10
 C 1 1 B 1/02
 C 1 2 P 7/64

【手続補正書】

【提出日】平成29年12月18日(2017.12.18)

【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】

全発酵ブロスからバイオ燃料の生産に適した脂質を抽出する方法であって：

(a) 油産生微生物を含有する前記ブロスを、約90 ~ 約150、または約100 ~ 約150、または約110 ~ 約150、または約120 ~ 約150、または約130 ~ 約150の温度に加熱することによって、前記全発酵ブロスをプレ処理することと；

場合により、

(i) 前記全発酵ブロスを、約30分間~約18時間、または3時間超~約18時間、または3時間超~約8時間にわたり加熱すること；

(ii) 前記油産生微生物を含有する前記全発酵ブロスによって45 ~ 80で費やされる時間を、前記油産生微生物を含有する前記全発酵ブロスを45から80に60分未満で加熱することによって、最小限にすること；および

(iii) 前記全発酵ブロスを、毎分摂氏約0.1~約80度の平均速度で加熱すること

のうちの少なくとも1つと、

(b) その後産物を前記油産生微生物から抽出することとを含む、方法。

【請求項2】

前記全発酵ブロスのpHを、酸または塩基のいずれかを加えることによって調整するこ

とをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

さらなる等温プロセッシングを可能にするために、前記全発酵ブロスを、約 60 超、または約 70 超、または約 80 超、または約 85 超、または約 90 超に冷却すること、および、場合により、前記全発酵ブロスを、毎分摂氏約 0.2 ~ 約 80 度の平均速度で冷却すること、をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記さらなる等温プロセッシングは、機械的破壊を適用することを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

(a) 前記加熱の後、前記全発酵ブロスを乾燥させること；

(b) 前記全発酵ブロスを、毎秒約 10 cm ~ 毎秒約 240 cm のインペラ先端速度で攪拌すること；および

(c) 前記プレ処理中、前記全発酵ブロスを含有する系において、圧力を、約 10 psi ~ 約 150 psi、または約 20 psi ~ 約 150 psi、または約 30 psi ~ 約 150 psi、または約 50 psi ~ 約 150 psi に維持すること

のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記プレ処理中、前記全発酵ブロスを含有する系に塩が存在して、前記系中で約 0.01 M ~ 約 2 M のイオン強度がもたらされる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記油産生微生物を溶解に曝して、小滴および破片の粒子サイズ分布をもたらしことをさらに含み、放出された産物油小滴および破片の少なくとも 80 容量%、好ましくは 95 容量%は、直径において 0.1 μm よりも大きいサイズを有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

120 cm / 秒を超えるインペラ先端速度での混合によって、前記油および細胞破片小滴を連続相として回収することをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記プレ処理を経た前記発酵ブロスは、前記発酵ブロスを付加的に 30 分間 ~ 約 8 時間にわたり 90 超で加熱することによって、8 時間未満以内に合体され得る、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記抽出プロセスは、前記全発酵ブロス中の金属を、油と比較して少なくとも 2 の比率で濃縮する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

粗糖に前記方法を実行することと、粗油を回収するために全乾燥バイオマスおよび/または溶媒を利用する抽出技術と比較して、金属および無機元素がより少ない粗油を回収することを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記全発酵ブロスは、> 0.05 g / L の濃度で塩およびイオンを伴う粗糖源を含み、好ましくは、前記塩およびイオンは、Na、K、Ca、Mg、Zn、クロリド、サルフェート、ホスフェート、ニトレート、およびそれらの組合せからなる群から選択され、より好ましくは、前記塩およびイオンは、カリウム、カルシウム、またはそれらの組合せを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記塩およびイオンは蓄積して、0.5 ~ 40 g / L の濃度となる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記塩およびイオンは、

- (a) ナトリウムよりも高い濃度のカリウム ;
- (b) 1 g / L を超える濃度のカルシウム ; および
- (c) 2 . 5 g / L を超える濃度のカリウム

のうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記塩およびイオンは、前記産物が前記油産生微生物から放出される場合に、合体による油相の回収に役立つ、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記発酵ブ罗斯は、前記合体の間、0 . 5 ~ 4 0 g / L の濃度の塩およびイオンを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記合体は、合体脂質の粒子サイズ分布をもたらし、合体脂質の少なくとも80容量%、好ましくは95容量%は、直径において40 μ m よりも大きいサイズを有する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記加熱の後に、前記発酵ブ罗斯を減圧することと、さらなるプロセシング前に前記ブ罗斯中で固体を濃縮するために前記全発酵ブ罗斯を冷却することとをさらに含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

混合物を形成するために、前記加熱の後に、溶媒を乾燥細胞または溶解発酵ブ罗斯に加えることをさらに含み、

好ましくは、前記溶媒は、ヘキサン、ドデカン、デカン、ディーゼル、アルコール、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

(a) 接触させて油を前記油産生微生物から抽出するために、前記溶解発酵ブ罗斯および前記溶媒の前記混合物を攪拌すること ;

(b) 前記溶媒および前記油を前記溶解発酵ブ罗斯から分離すること ; および

(c) 前記溶媒および前記油を前記溶解発酵ブ罗斯から分離するために遠心分離機を用いること

のうちの少なくとも1つをさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記油の少なくとも一部を燃料成分に変換するために、前記溶媒および前記油を反応させることをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記溶媒および残りの前記油を、バイオ燃料を含む燃料に変換することをさらに含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記消費されたブ罗斯を、作物の肥料、動物の飼料、酵母抽出物、酵母加水分解物、または炭素 / 栄養源として用いることをさらに含む、請求項 2 0 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記油産生微生物を含有する前記全発酵ブ罗斯は、糖フィードストックを含み、

好ましくは、前記油産生微生物および前記糖フィードストックを含有する前記全発酵ブ罗斯は、発酵槽ブ罗斯のリットルあたり約50 ~ 約250グラムの脂質、発酵槽ブ罗斯のリットルあたり約0 ~ 約50グラムの糖、発酵槽ブ罗斯のリットルあたり約0 ~ 約40グラムの塩、および発酵槽ブ罗斯のリットルあたり約10 ~ 約100グラムの脂質フリー乾燥バイオマスを含む、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記油産生微生物は、少なくとも40重量%の脂肪を含む、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか

一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記油産生微生物を含有する全発酵ブロス低温殺菌することをさらに含み、
好ましくは、前記全発酵ブロスを約 40 ~ 約 80 に約 1 分間 ~ 約 3 時間にわたり加熱することによって、前記全発酵ブロスを低温殺菌することをさらに含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記全発酵ブロスを、約 90 ~ 約 150、または約 100 ~ 約 150、または約 110 ~ 約 150、または約 120 ~ 約 150、または約 130 ~ 約 150 の温度にて、約 30 分間 ~ 約 18 時間、または 3 時間超 ~ 約 18 時間、または 3 時間超 ~ 約 8 時間にわたり保持することをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

(a) 前記全発酵ブロスを、加熱インターバル中に攪拌すること；

(b) 酸を前記全発酵ブロスに加えること；および

(c) 塩基を前記全発酵ブロスに加えること

のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

ビーズミル、ホモジナイザー、オリフィスプレート、高剪断ミキサー、プレス、押出機、圧力破壊、湿式ミリング、乾式ミリング、または他の剪断もしくは機械破壊装置に少なくとも 1 回、好ましくは少なくとも 2 回、前記全発酵ブロスを通させることをさらに含む、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記溶解発酵ブロスを、ベッセル内で約 70 ~ 約 100 にて約 1 ~ 約 60 時間にわたり攪拌することをさらに含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

塩を前記ベッセル内の前記溶解発酵ブロスに加えることをさらに含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

最大約 2 重量 % の前記塩を加えることを含み、

好ましくは、前記塩は、NaCl、KCl、K₂SO₄、Na₂SO₄ であるか、または H₂SO₄ をプラスした少なくとも 1 つの NaOH および KOH の組合せに由来する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記ベッセル内の前記溶解発酵ブロスの pH を約 3 ~ 約 11 に調整するために、塩基を加えることをさらに含む、請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

20 % 未満の遊離脂肪酸である油を、遠心分離により、前記全発酵ブロスから分離することをさらに含む、請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記油産生微生物は、油産生酵母細胞である、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記油産生微生物の油産生細胞壁を破壊するために、アミラーゼ、1 - 4 マンノシダーゼ、および 1 - 3 マンノシダーゼを含む酵素の組合せを用いることをさらに含み、

好ましくは、酵素の前記組合せはさらに、スルファターゼ、プロテアーゼ、およびキチナーゼからなる群から選択される少なくとも 1 つの補助酵素を含む、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記アミラーゼは、1 - 4 結合グルコースに特異的である、請求項 36 に記載の方法。

。

【請求項 3 8】

酵素の前記組合せは、約 5 重量% ~ 約 3 0 重量% のアミラーゼを含む、請求項 3 6 または 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

酵素の前記組合せは、約 5 重量% ~ 約 4 5 重量% の 1 - 4 マンノシダーゼを含む、請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

酵素の前記組合せは、約 5 重量% ~ 約 4 5 重量% の 1 - 3 マンノシダーゼを含む、請求項 3 6 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記油産生細胞壁を破壊した後に前記油産生細胞壁から細胞内代謝物質を収穫することをさらに含む、請求項 3 6 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記細胞内代謝物質は、脂質を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記細胞内代謝物質をバイオ燃料に変換することをさらに含む、請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記細胞内代謝物質を収穫した後に残る水抽出廃水をリサイクルすることをさらに含む、請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記リサイクルされた抽出水を、糖を抽出するためにプロセスフィードストックを洗浄する吸収水として用いることをさらに含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

微生物細胞壁の分解のための酵素の組合せであって：

アミラーゼと；

1 - 4 マンノシダーゼと；

1 - 3 マンノシダーゼと

を含み、

好ましくは、前記アミラーゼは、1 - 4 結合グルコースに特異的である、酵素の組合せ。

【請求項 4 7】

スルファターゼ、プロテアーゼ、およびキチナーゼからなる群から選択される少なくとも 1 つの補助酵素をさらに含む、請求項 4 6 に記載の酵素の組合せ。

【請求項 4 8】

前記組合せは、スポリジオボルス・パラロセウス (*Sporidiobolus pararoseus*) MK 2 9 4 0 4 に用いられる、請求項 4 6 または 4 7 に記載の酵素の組合せ。

【請求項 4 9】

約 5 重量% ~ 約 3 0 重量% のアミラーゼを含む、請求項 4 6 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の酵素の組合せ。

【請求項 5 0】

約 5 重量% ~ 約 4 5 重量% の 1 - 4 マンノシダーゼを含む、請求項 4 6 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の酵素の組合せ。

【請求項 5 1】

約 5 重量% ~ 約 4 5 重量% の 1 - 3 マンノシダーゼを含む、請求項 4 6 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の酵素の組合せ。

【請求項 5 2】

全発酵ブロスからバイオ燃料の生産に適した脂質を抽出する方法であって：

油産生微生物を含有する前記全発酵ブロスに、前記油産生微生物の細胞壁を破壊するた

めに、アミラーゼ、1 - 4 マンノシダーゼ、および 1 - 3 マンノシダーゼを含む酵素の組合せを適用することと；

その後産物を前記油産生微生物から抽出することとを含む、方法。

【請求項 5 3】

酵素の前記組合せはさらに、スルファターゼ、プロテアーゼ、およびキチナーゼからなる群から選択される少なくとも 1 つの補助酵素を含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記アミラーゼは、1 - 4 結合グルコースに特異的である、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

酵素の前記組合せは、約 5 重量% ~ 約 30 重量% のアミラーゼを含む、請求項 5 2 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

酵素の前記組合せは、約 5 重量% ~ 約 45 重量% の 1 - 4 マンノシダーゼを含む、請求項 5 2 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

酵素の前記組合せは、約 5 重量% ~ 約 45 重量% の 1 - 3 マンノシダーゼを含む、請求項 5 2 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記細胞壁を破壊した後に前記油産生細胞壁から細胞内代謝物質を収穫することをさらに含む、請求項 5 2 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記細胞内代謝物質は、脂質を含む、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記細胞内代謝物質をバイオ燃料に変換することをさらに含む、請求項 5 8 または 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記細胞内代謝物質を収穫した後に残る水抽出廃水をリサイクルすることをさらに含む、請求項 5 8 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記リサイクルされた抽出水を、糖を抽出するためにプロセスフィードストックを洗浄する吸収水として用いることをさらに含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記プロセスを、約 90 ~ 約 150、または約 100 ~ 約 150、または約 110 ~ 約 150、または約 120 ~ 約 150、または約 130 ~ 約 150 の温度に加熱することによって、前記全発酵プロセスをプレ処理することをさらに含む、
さらに、

(a) 混合物を形成するために、溶媒、好ましくは、ヘキサン、ドデカン、デカン、ディーゼル、アルコール、およびそれらの組合せからなる群から選択される溶媒を、乾燥細胞または溶解発酵プロセスに加えること；

(b) 接触させて油を前記油産生酵母細胞から抽出するために、前記プロセスおよび前記溶媒の前記混合物を攪拌すること；および

(c) 前記溶媒および前記油を前記プロセスから分離すること

のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 5 2 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記溶媒および前記油を前記プロセスから分離するために遠心分離機を用いることを含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記油の少なくとも一部を燃料成分に変換するために、前記溶媒および前記油を反応さ

せることをさらに含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記溶媒および残りの前記油を、バイオ燃料を含む燃料に変換することをさらに含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記消費されたブросを、作物の肥料、動物の飼料、酵母抽出物、酵母加水分解物、または炭素 / 栄養源として用いることをさらに含む、請求項 5 2 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

水性発酵ブросからバイオ燃料の生産に適した脂質を抽出する方法であって：

脂質を、油産生微生物を含有する前記水性発酵ブросから、バイオマス固体および残りのブрос水を残して抽出することと；

前記残りのブрос水を、糖を抽出するためのプロセスフィードストックを洗浄する吸水水として用いることと

を含む、方法。

【請求項 6 9】

前記水性発酵ブросを低温殺菌することをさらに含む、

好ましくは、前記水性発酵ブросを約 4 0 ~ 約 8 0 に約 1 分間 ~ 最長約 3 時間にわたり加熱することによって、前記水性発酵ブросを低温殺菌することをさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記水性発酵ブросを、約 3 0 分間 ~ 約 1 8 時間、または 3 時間超 ~ 約 1 8 時間、または 3 時間超 ~ 約 8 時間にわたり加熱することを含む、請求項 6 8 または 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

(a) 前記水性発酵ブросを、約 9 0 ~ 約 1 5 0 、または約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 、または約 1 1 0 ~ 約 1 5 0 、または約 1 2 0 ~ 約 1 5 0 、または約 1 3 0 ~ 約 1 5 0 の温度にて、約 3 0 分間 ~ 約 1 8 時間、または 3 時間超 ~ 約 1 8 時間、または 3 時間超 ~ 約 8 時間にわたり保持すること；

(b) 前記水性発酵ブросを、加熱インターバル中に攪拌すること；

(c) 酸を前記水性発酵ブросに加えること；

(d) 塩基を前記水性発酵ブросに加えること；および

(e) ビーズミル、ホモジナイザー、オリフィスプレート、高剪断ミキサー、プレス、押出機、圧力破壊、湿式ミリング、乾式ミリング、または他の剪断もしくは機械破壊装置に少なくとも 1 回、好ましくは少なくとも 2 回、前記水性発酵ブросを通過させること
のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

溶解発酵ブросを、ベッセル内で約 7 0 ~ 約 1 0 0 にて約 1 ~ 約 6 0 時間にわたり攪拌することをさらに含む、請求項 6 8 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 3】

塩を前記ベッセル内の前記溶解発酵ブросに加えることをさらに含む、

好ましくは、前記塩は、NaCl または Na₂SO₄ である、請求項 7 2 に記載の方法

【請求項 7 4】

最大約 2 重量 % の前記塩を、前記ベッセル内の前記溶解発酵ブросに加えることを含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記ベッセル内の前記溶解発酵ブросの pH を約 3 ~ 約 1 1 に調整するために、塩基を加えることをさらに含む、請求項 7 2 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記脂質を、遠心分離により、前記溶解発酵ブロスから分離することをさらに含む、請求項 6 8 ~ 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記水性発酵ブロスは、サトウキビ抽出物を含む、請求項 6 8 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記残りのブロス水と共に前記バイオマス固体をリサイクルすることをさらに含む、請求項 6 8 ~ 7 7 のいずれか一項に記載の方法。