

(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2017-500037

(P2017-500037A)

(43) 公表日 平成29年1月5日(2017.1.5)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 P	7/64	(2006.01)	C 1 2 P	7/64	4 B O 6 4
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2016-540595 (P2016-540595)	(71) 出願人	503220392
(86) (22) 出願日	平成26年12月19日 (2014.12.19)		ディーエスエム アイビー アセツ ビー・ブイ・
(85) 翻訳文提出日	平成28年7月27日 (2016.7.27)		オランダ国, 6 4 1 1 ティーイー ヘーレン, ヘット オーバールーン 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/071459	(74) 代理人	100107456
(87) 国際公開番号	W02015/095688		弁理士 池田 成人
(87) 国際公開日	平成27年6月25日 (2015.6.25)	(74) 代理人	100128381
(31) 優先権主張番号	61/918, 922		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	米国 (US)		弁理士 酒巻 順一郎
		(72) 発明者	バーカー, マーク
			アメリカ合衆国, ケンタッキー州, マウント スターリング, ウェイズ ミルロード 8 9 8 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物細胞から微生物油を入手するための方法

(57) 【要約】

本発明は、細胞から脂質を入手するための方法であって、溶解細胞組成物を形成するために細胞を溶解し、かつ解乳化溶解細胞組成物から脂質を入手することによる方法に関する。本発明はさらに、本発明の方法によって調製された脂質に向けられる。本発明はさらに、特定のアニシジン値、ペルオキシド値および/またはリン含量を有する微生物脂質に向けられる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1 つ以上の微生物細胞から 1 種以上の多価不飽和脂肪酸を含む微生物油を入手するための方法であって：

- (a) 溶解細胞組成物を形成するために前記微生物油を含む前記細胞を溶解する工程；
- (b) 解乳化溶解細胞組成物を形成するために前記溶解細胞組成物を解乳化する工程；
- (c) 前記解乳化溶解細胞組成物から前記油を分離する工程；および
- (d) 前記油を回収する工程

を含み、(b) は前記溶解細胞組成物の pH を低下させる工程を含む、方法。

【請求項 2】

10

- (a) または (b) の少なくとも 1 つは、前記細胞または前記組成物を少なくとも 70 へ加熱する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

- (a) または (b) の少なくとも 1 つは、前記細胞または前記組成物を約 70 ~ 約 100 へ加熱する工程をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

- (b) は、前記溶解細胞組成物に乳化剤を添加する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

- (b) は、前記 pH を約 6 以下へ低下させる工程をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

- (b) は、前記溶解細胞組成物の前記 pH を約 0.5 ~ 約 6 へ低下させる工程をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

- (b) は、溶解細胞組成物の重量で約 0.5 % ~ 約 20 % の量で酸を添加する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

- (b) は、前記溶解細胞組成物の重量で約 0.05 % ~ 約 20 % の量で塩を添加する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

- (b) は、前記溶解細胞組成物を攪拌する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

- (a) は、前記細胞を攪拌する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記酸は、硫酸、リン酸、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、次亜塩素酸、亜塩素酸、塩素酸、過塩素酸、フルオロ硫酸硝酸、フルオロアンチモン酸、フルオロホウ酸、ヘキサフルオロリン酸、クロム酸、ホウ酸、酢酸、クエン酸、ギ酸およびそれらの組み合わせから選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記酸は、硫酸である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

- (a) の前記細胞は、未洗浄である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

- (a) の前記細胞は、発酵プロセス内に含有されている、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

- (c) は、前記溶解細胞組成物を遠心分離する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 14 のい

50

ずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記多価不飽和脂肪酸は、 γ -3 脂肪酸、 γ -6 脂肪酸およびそれらの混合物から選択される、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記多価不飽和脂肪酸は、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサペンタエン酸 (DPA)、アラキドン酸 (ARA)、 γ -リノール酸 (GLA)、ジホモ- γ -リノール酸 (DGLA)、ステアリドン酸 (SDA) およびそれらの混合物から選択される、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記多価不飽和脂肪酸は、ドコサヘキサエン酸 (DHA) である、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記多価不飽和脂肪酸は、アラキドン酸 (ARA) である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記微生物細胞は、藻類、酵母、真菌、原生生物または細菌細胞である、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記微生物細胞は、モルティエレラ (Mortierella) 属、クリプトコディニウム (Cryptothecodinium) 属またはスラウストキトリアレス (Thraustochytriales) 目に由来する、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記微生物細胞は、スラウストキトリアレス (Thraustochytriales) 目に由来する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記微生物細胞は、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 属、シゾキトリウム (Schizochytrium) 属またはそれらの混合物に由来する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記微生物細胞は、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella Alpina) に由来する、請求項 20 に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記溶解細胞組成物は、液体、細胞断片および微生物油を含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

有機溶媒は、前記細胞から前記油を入手するためには使用されない、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記解乳化溶解細胞組成物の平均粒径は、25 ミクロン以下である、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 28】

前記乳化剤は、イオン性乳化剤である、請求項 4～27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記イオン性乳化剤は、アニオン性硫酸塩乳化剤、アニオン性スルホン酸塩乳化剤、アニオン性リン酸塩乳化剤、アニオン性カルボン酸塩乳化剤およびそれらの組み合わせから選択されるアニオン性乳化剤である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記イオン性乳化剤は、ラウリル硫酸アンモニウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウレス硫酸ナトリウム、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム、ミレス硫酸ナトリウムおよびそれ

50

らの組み合わせから選択されるアニオン性硫酸塩乳化剤である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記乳化剤は、前記溶解細胞組成物の重量で 0.2% ~ 10% の量で添加される、請求項 4 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記塩は、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、硫酸塩およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 8 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

(d) の前記油は、原油である、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 34】

(d) は、精製油を入手するために前記原油を精製する工程をさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記油は、少なくとも 30 重量% のアラキドン酸を含む、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記油は、少なくとも 30 重量% のドコサヘキサエン酸を含む、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

20

前記油は、約 50 未満のアニシジン値を有する、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記油は、約 8 ppm 以下のリン含量を有する、請求項 1 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記油は、約 5 meq / kg 未満のペルオキシド値を有する、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

請求項 1 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法によって入手される油。

30

【請求項 41】

(a) および (b) は、1 工程の溶解および解乳化する工程を形成するために一緒に結合される、請求項 1 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

(c) は、前記解乳化溶解細胞組成物の前記 pH を上昇させる工程をさらに含む、請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

1 つ以上の微生物細胞から 1 種以上の多価不飽和脂肪酸を含む微生物油を入手するための方法であって：

(a) 溶解細胞組成物を形成するために前記微生物油を含む前記細胞を溶解する工程；

40

(b) 解乳化溶解細胞組成物を形成するために前記溶解細胞組成物を解乳化する工程；

(c) 前記解乳化溶解細胞組成物から前記油を分離する工程；および

(d) 前記油を回収する工程

を含み、(a) および (b) は、前記 pH を上昇させる工程を含む 1 工程の溶解および解乳化する工程を形成するために一緒に結合される、方法。

【請求項 44】

前記 1 工程の溶解および解乳化する工程は、前記 pH を約 8 以上へ上昇させる工程を含む、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記 1 工程の溶解および解乳化する工程は、前記 pH を約 8 以上へ上昇させるために塩

50

基を添加する工程を含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

1 つ以上の微生物細胞から 1 種以上の多価不飽和脂肪酸を含む微生物油を入手するための方法であって：

(a) 解乳化溶解細胞組成物を形成するために好適な p H で前記微生物油を含む前記細胞を溶解する工程；

(b) 前記解乳化溶解細胞組成物から前記油を分離する工程；および

(c) 前記油を回収する工程

を含み、前記解乳化溶解細胞組成物は前記溶解する工程中に入手される、方法。

【発明の詳細な説明】

10

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

[関連出願の相互参照]

[0001] 本出願は、2 0 1 3 年 1 2 月 2 0 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 9 1 8 , 9 2 2 号明細書の出願日の利益を主張するものであり、上記特許出願の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

[発明の背景]

[0002] 本明細書では、1 つ以上の微生物細胞から 1 種以上の多価不飽和脂肪酸 (P U F A) を含む微生物油を入手するための方法であって、溶解細胞組成物を形成するために細胞を溶解し、およびその後溶解細胞組成物から油を回収することによる方法が開示される。さらに本明細書では、本明細書に記載した少なくとも 1 つの方法によって微生物細胞から回収される 1 種以上の P U F A を含む微生物油が開示される。

20

【0 0 0 3】

[0003] 1 種以上の P U F A を含有する微生物油は、例えば、藻類および真菌などの微生物によって生成される。

【0 0 0 4】

[0004] 微生物細胞から P U F A 含有油を入手するための典型的な方法は、微生物細胞バイオマスを生成するために発酵槽、pondまたはバイオリアクター内で所望の油を生成できる微生物を増殖させる工程；その中でバイオマスが増殖させられた発酵培地からバイオマスを分離する工程；乾燥細胞から油を抽出するために水非混和性有機溶媒（例えば、ヘキサン）を使用して微生物細胞バイオマスを乾燥する工程；および油から有機溶媒（例えば、ヘキサン）を除去する工程を包含している。この方法は、さらに細胞バイオマスを含有する発酵培地を水で希釈し、その後希釈発酵培地からバイオマスを分離するために遠心分離する工程を包含することができる。

30

【0 0 0 5】

[0005] 微生物細胞から P U F A 含有油を入手するためのまた別の方法は、微生物細胞バイオマスを生成するために発酵槽、pondまたはバイオリアクター内で所望の油を生成できる微生物を増殖させる工程；細胞壁を破壊するために機械的力（例えば、ホモジナイゼーション）、酵素的処理または化学的処理を使用することによってその中で細胞が増殖させられた P U F A 含有油を発酵培地内に放出させる工程；ならびに水混和性有機溶媒、例えば、イソプロピルアルコールを使用して結果として生じる P U F A 含有油、細胞断片および液体を含む組成物から油を回収する工程を含んでいる。油は、組成物から機械的に分離することができ、油および水性バイオマス廃棄物流の両方からアルコールが除去されなければならない。

40

【0 0 0 6】

[0006] 微生物細胞から P U F A 含有油を入手するための上述の方法のいずれかの工業的規模の使用は、危険な稼働状態をもたらす、かつ費用のかかる防爆装置の使用を必要とする大量の揮発性および可燃性有機溶媒の使用を必要とする。さらに、有機溶媒の使用は、揮発性有機化合物 (V O C) 放出に関する厳密な環境的規制に対応するための費用のかか

50

る溶媒回収方法の実行を必要とする有機溶媒廃棄物流を生成し、これはしたがって結果的により多くの労働力およびコストのかかる装置の必要を生じさせる。

【 0 0 0 7 】

[0007]さらに、細胞を乾燥させるため、および/または回収した油から溶媒を除去するための上述の方法における熱の使用は、P U F A 含有油を分解させ、エネルギー使用量を増加させることがあり、これはさらに加工処理コストを増大させる可能性がある。分解は、例えば微生物細胞壁の完全性が破壊される、および/または微生物細胞が熱に曝露される場合のように、P U F A 含有油が酸素に曝露させられた場合に発生する。

【 0 0 0 8 】

[0008]微生物細胞からP U F A 含有油を入手するための無溶媒法は、微生物細胞バイオマスを生成するために発酵槽、ポンドまたはバイオリアクター内で所望の油を生成できる微生物を増殖させる工程；細胞壁を破壊するために機械的力（例えば、ホモジナイゼーション）、酵素的処理または化学的処理を使用することによってその中で細胞が増殖させられた発酵培地内にP U F A 含有油を放出させる工程；ならびにp Hを上昇させる、塩を添加する、加熱する、および/または結果として生じる組成物を攪拌する工程によってP U F A 含有油、細胞断片および液体を含む結果として生じる組成物から原油を回収する工程を含んでいる。しかし細胞からP U F A 含有油を入手するためのこの無溶媒法は、長い油回収時間、大量の塩および/または多数の工程を必要とすることがあり、これらは全てが加工処理コストを増加させる可能性がある。

【 0 0 0 9 】

[0009]結果として、微生物細胞から高品質P U F A 含有油を入手するための方法であって、揮発性有機溶媒を使用しない、容易に入手できる装置を使用して実施できる、必要とする工程数が最小である、油回収時間がより短い、および高収率の高品質P U F A 含有油を提供できる方法に対する必要が依然として存在する。

【 0 0 1 0 】

[0010]本明細書では、1つ以上の微生物細胞から1種以上の多価不飽和脂肪酸（P U F A）を含む微生物油を入手するための方法であって：（a）溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む細胞を溶解する工程；（b）解乳化溶解細胞組成物を形成するために溶解細胞組成物のp Hを低下させる工程を含む、溶解細胞組成物を解乳化する工程；（c）解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程；および（d）油を回収する工程を含む方法が開示される。

【 0 0 1 1 】

[0011]本明細書では、1つ以上の微生物細胞から1種以上の多価不飽和脂肪酸（P U F A）を含む微生物油を入手するための方法であって：（a）溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む細胞を溶解する工程；（b）解乳化溶解細胞組成物を形成するために溶解細胞組成物のp Hを約6以下へ低下させる工程を含む、溶解細胞組成物を解乳化する工程；（c）解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程；および（d）油を回収する工程を含む方法が開示される。

【 0 0 1 2 】

[0012]本明細書では、1つ以上の微生物細胞から1種以上の多価不飽和脂肪酸（P U F A）を含む微生物油を入手するための方法であって：（a）溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む細胞を溶解する工程；（b）解乳化溶解細胞組成物を形成するために、溶解細胞組成物の重量で約0.5%～約20%の量の酸を添加することにより溶解細胞組成物のp Hを低下させる工程を含む、溶解細胞組成物を解乳化する工程；（c）解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程；および（d）油を回収する工程を含む方法が開示される。

【 0 0 1 3 】

[0013]本明細書では、1つ以上の微生物細胞から1種以上の多価不飽和脂肪酸（P U F A）を含む微生物油を入手するための方法であって：（a）溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む細胞を溶解する工程；（b）解乳化溶解細胞組成物を形成するために

溶解細胞組成物の pH を約 6 以下へ低下させる工程を含む、溶解細胞組成物を解乳化する工程；（c）解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程；および（d）油を回収する工程を含み、（a）または（b）の少なくとも 1 つは、組成物を少なくとも 70 の温度へ加熱する工程をさらに含む、方法が開示される。

【0014】

[0014] 本明細書では、1 つ以上の微生物細胞から 1 種以上の多価不飽和脂肪酸（PUFA）を含む微生物油を入手するための方法であって：（a）溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む細胞を溶解する工程；（b）解乳化溶解細胞組成物を形成するために、溶解細胞組成物の重量で約 0.5%～約 20% の量の酸を添加することにより溶解細胞組成物の pH を低下させる工程を含む、溶解細胞組成物を解乳化する工程；（c）解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程；および（d）油を回収する工程を含み、（a）または（b）の少なくとも 1 つは、組成物を少なくとも 70 の温度へ加熱する工程をさらに含む、方法が開示される。

10

【0015】

[0015] 本明細書では、1 つ以上の微生物細胞から 1 種以上の多価不飽和脂肪酸（PUFA）を含む微生物油を入手するための方法であって：（a）溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む細胞を溶解する工程；（b）解乳化溶解細胞組成物を形成するために溶解細胞組成物の pH を約 6 以下へ低下させるために酸を添加する工程、および溶解細胞組成物を攪拌する工程を含む、溶解細胞組成物を解乳化する工程；（c）解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程；および（d）油を回収する工程を含む方法が開示される。

20

【0016】

[0016] 本明細書では、1 つ以上の微生物細胞から 1 種以上の多価不飽和脂肪酸（PUFA）を含む微生物油を入手するための方法であって：（a）溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む細胞を溶解する工程；（b）解乳化溶解細胞組成物を形成するために溶解細胞組成物の pH を低下させる工程を含む、溶解細胞組成物を解乳化する工程；（c）解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程；および（d）油を回収する工程を含み、（a）および（b）は、1 工程の溶解および解乳化する工程を形成するために一緒に結合される、方法が開示される。

【0017】

[0017] 本明細書では、1 つ以上の微生物細胞から 1 種以上の多価不飽和脂肪酸（PUFA）を含む微生物油を入手するための方法であって：（a）溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む細胞を溶解する工程；（b）解乳化溶解細胞組成物を形成するために溶解細胞組成物を解乳化する工程；（c）解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程；および（d）油を回収する工程を含み、（a）および（b）は、pH を上昇させる工程を含む 1 工程の溶解および解乳化する工程を形成するために一緒に結合される、方法が開示される。

30

【0018】

[0018] 本明細書では、1 つ以上の微生物細胞から 1 種以上の多価不飽和脂肪酸（PUFA）を含む微生物油を入手するための方法であって：（a）溶解細胞組成物を形成するために好適な pH で微生物油を含む細胞を溶解する工程；（b）解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程；および（c）油を回収する工程を含み、解乳化溶解細胞組成物は溶解する工程に入手される、方法が開示される。

40

【0019】

[0019] 本明細書では、本明細書に記載した方法のいずれかによって入手される微生物油が開示される。

【0020】

[0020] 多価不飽和脂肪酸（PUFA）は、脂肪酸のメチル末端から第 1 二重結合の位置に基づいて分類される； -3 （ $n-3$ ）脂肪酸は、第 3 炭素で第 1 二重結合を含有するが、他方 -6 （ $n-6$ ）脂肪酸は、第 6 炭素で第 1 二重結合を含有する。例えば、ドコサヘキサエン酸（DHA）は、炭素 22 個の鎖長および 6 つの二重結合を備える -3 長

50

鎖多価不飽和脂肪酸 (LC-PUFA) であり、「22:6n-3」と称されることが多い。1つの実施形態では、PUFAは、-3脂肪酸、-6脂肪酸およびそれらの混合物から選択される。また別の実施形態では、PUFAは、LC-PUFAから選択される。さらにまた別の実施形態では、PUFAは、ドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサペンタエン酸(DPA)、アラキドン酸(ARA)、-リノール酸(GLA)、ジホモ- -リノール酸(DGLA)、ステアリドン酸(SDA)およびそれらの混合物から選択される。また別の実施形態では、PUFAは、DHA、ARAおよびそれらの混合物から選択される。また別の実施形態では、PUFAは、DHAである。さらにまた別の実施形態では、PUFAはARAである。

【0021】

[0021] LC-PUFAは、少なくとも3つの二重結合を含有し、18個以上の炭素または20個以上の炭素の鎖長を有する脂肪酸である。-6シリーズのLC-PUFAには、ジ-ホモ-リノール酸(C20:3n-6)、アラキドン酸(C20:4n-6) (「ARA」)、ドコサテトラエン酸またはアドレン酸(C22:4n-6)およびドコサペンタエン酸(C22:5n-6) (「DPA n-6」)が含まれるがそれらに限定されない。-3シリーズのLC-PUFAには、エイコサトリエン酸(C20:3n-3)、エイコサテトラエン酸(C20:4n-3)、エイコサペンタエン酸(C20:5n-3) (「EPA」)、ドコサペンタエン酸(C22:5n-3)およびドコサヘキサエン酸(C22:6n-3)が含まれるがそれらに限定されない。LC-PUFAにはさらにまた、C24:6(n-3)およびC28:8(n-3)を含むがそれらに限定されない22個を超える炭素および4つ以上の二重結合を備える脂肪酸が含まれる。

【0022】

[0022] PUFAは、遊離脂肪酸、塩、脂肪酸エステル(例えば、メチルもしくはエチルエステル)、モノアシルグリセロール(MAG)、ジアシルグリセロール(DAG)、トリアシルグリセロール(TAG)および/またはリン脂質(PL)の形態であってよい。

【0023】

[0023] 高不飽和脂肪酸(HUFA)は、4つ以上の不飽和炭素-炭素結合を含有する-3および/または-6多価不飽和脂肪酸である。

【0024】

[0024] 本明細書で使用する「細胞」は、油含有生体物質、例えば油性微生物由来の生体物質を意味する。微生物によって生成される、または微生物細胞から入手される油は、「微生物油」と呼ばれる。藻類および/または真菌によって生成される油は、さらにまた各々藻類油および/または真菌油と呼ばれる。

【0025】

[0025] 本明細書で使用する「微生物細胞」または「微生物」は、例えば、藻類、細菌、真菌、原生生物、酵母およびそれらの組み合わせなどの生物、例えば単細胞生物を意味する。一部の実施形態では、微生物細胞は、真核細胞である。微生物細胞には、金色藻類(例えば、ストラメノパイル(*Stramenopiles*)界の微生物); 緑色藻類; 珪藻類; 渦鞭毛藻類(例えばクリプトコディニウム・コーニイ(*Cryptothecodinium cohnii*)もしくはC.コーニイ(*C. cohnii*))を含む、例えば、クリプトコディニウム(*Cryptothecodinium*)属のメンバーを含む渦鞭毛植物(*Dinophyceae*)目の微生物); スラウストキトリアレス(*Thraustochytriales*)目の微細藻類; 酵母(子囊菌綱(*Ascomycetes*)もしくは担子菌綱(*Basidiomycetes*)); ならびにムコール(*Mucor*)属、モルティエレラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)およびモルティエレラ属シュムツケリ亜属(*Mortierella sect. schmuckeri*)を含むがそれらに限定されないモルティエレラ(*Mortierella*)属およびフィチウム・インシジオスム(*Pythium insidiosum*)を含むがそれらに限定されないフィチウム(*Pythium*)属の真菌が含まれるがそれらに限定されない。

。

10

20

30

40

50

【0026】

[0026] 1つの実施形態では、微生物細胞は、モルティエレラ (*Mortierella*) 属、クリプトコディニウム (*Cryptothecodinium*) 属またはスラウストキトリアレス (*Thraustochytriales*) 目に由来する。さらにまた別の実施形態では、微生物細胞は、クリプトコディニウム・コーニイ (*Cryptothecodinium Cohnii*) に由来する。さらにまた別の実施形態では、微生物細胞は、クリプトコディニウム・コーニイ (*Cryptothecodinium Cohnii*)、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*)、スラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属、シゾキトリウム (*Schizochytrium*) 属およびそれらの混合物から選択される。

10

【0027】

[0027] さらにまた別の実施形態では、微生物細胞には、モルティエレラ (*Mortierella*) 属、コニディオボラス (*Conidiobolus*) 属、フィチウム (*Pythium*) 属、フィトフトラ (*Phytophthora*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、クラドスポリウム (*Cladosporium*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、エントモフトラ (*Entomophthora*) 属、エキノスポランジウム (*Echinosporangium*) 属およびサブプロレグニア (*Saprolegnia*) 属に属する微生物が含まれるがそれらに限定されない。また別の実施形態では、ARAは、モルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*)、モルティエレラ・エキシグア (*Mortierella exigua*)、モルティエレラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*)、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*)、モルティエレラ属シュムツケリ亜属 (*Mortierella schmuckeri*) およびモルティエレラ・ミヌティッシマ (*Mortierella minutissima*) を含むがそれらに限定されないモルティエレラ (*Mortierella*) 属に由来する微生物細胞から入手される。別の実施形態では、ARAは、モルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (*Mortierella exigua*) IF08571、モルティエレラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IF05941、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70およびCBS754.68ならびにそれらの突然変異体由来の微生物細胞から入手される。さらにまた別の実施形態では、微生物細胞は、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) に由来する。

20

30

【0028】

[0028] さらにまた、微生物細胞は、スラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属 (種にはアルジメンタレ種 (*arudimentale*)、アウレウム種 (*aureum*)、ベンチコラ種 (*benthicola*)、グロボサム種 (*globosum*)、キネイ種 (*kinnei*)、モチバム種 (*motivum*)、マルチルジメンタレ種 (*multirudimentale*)、パチデルマム種 (*pachydermum*)、プロリフェラム種 (*proliferum*)、ロゼウム種 (*roseum*)、ストリアツム種 (*striatum*) が含まれる)；シゾキトリウム (*Schizochytrium*) 属 (種にはアグレガタム種 (*aggregatum*)、リムナセウム種 (*limnaceum*)、マングロベイ種 (*mangrovei*)、ミヌツム種 (*minutum*)、オクトスポラム種 (*octosporum*) が含まれる)；ウルケニア (*Ulkenia*) 属 (種には、アモエボイデア種 (*amoeboides*)、ケルグエレンシス種 (*kerguelensis*)、ミヌタ種 (*minuta*)、プロフンダ種 (*profunda*)、

40

50

nda)、ラジエート種(radiate)、サイレンス種(sailens)、サルカリアナ種(sarkariana)、シゾキトロプス種(schizochytrrops)、ビスルゲンシス種(visurgensis)、ヨルケンシス種(yorkensis)が含まれる);オーランチオキトリウム(Aurantiaochytrium)属;オブロンギキトリウム(Oblongichytrium)属;シシオイドチティウム(Sicyoidochyttium)属;パリエンティキトリウム(Parientichytrium)属;ボトリオキトリウム(Botryochytrium)属;およびそれらの組み合わせを含むがそれらに限定されないスラウストキトリアレス(Thraustochytriales)目の微細藻類に由来する。ウルケニア(Ulkenia)属内で記載された種は、シゾキトリウム(Schizochytrium)属のメンバーであると考えられるであろう。また別の実施形態では、微生物細胞は、スラウストキトリアレス(Thraustochytriales)目に由来する。さらにまた別の実施形態では、微生物細胞は、スラウストキトリウム(Thraustochytrium)属に由来する。さらにまた別の実施形態では、微生物細胞は、シゾキトリウム(Schizochytrium)属に由来する。さらにまた別の実施形態では、微生物細胞は、スラウストキトリウム(Thraustochytrium)属、シゾキトリウム(Schizochytrium)属またはそれらの混合物から選択される。

10

【0029】

[0029] 1つの実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む微生物細胞を溶解する工程を含む。用語「溶解する」および「溶解する工程」は、それにより微生物細胞の壁および/または膜が破壊される方法を意味する。1つの実施形態では、微生物細胞は、機械的、化学的、酵素的、物理的およびそれらの組み合わせから選択される少なくとも1つの処理を受けさせることによって溶解される。また別の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む微生物細胞を溶解する工程を含むが、このとき溶解する工程は機械的、化学的、酵素的、物理的およびそれらの組み合わせから選択される。

20

【0030】

[0030] 一部の実施形態では、細胞の溶解前に、細胞は洗浄および/または低温殺菌することができる。一部の実施形態では、細胞を洗浄する工程は、何らかの細胞外水溶性または水分散性化合物を除去するために水などの水溶液を使用する工程を含んでいる。一部の実施形態では、細胞は、1回、2回、3回またはそれ以上洗浄することができる。一部の実施形態では、細胞を低温殺菌する工程は、何らかの望ましくない酵素、例えば、油を分解させる可能性がある、またはPUFAの収率を低下させる可能性がある酵素を不活性化するために細胞を加熱する工程を含む。一部の実施形態では、細胞は洗浄され、その後溶解される前に低温殺菌される。一部の実施形態では、溶解される細胞は、発酵プロセス内に含有されている。

30

【0031】

[0031] 一部の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む未洗浄微生物細胞を溶解する工程を含む。一部の実施形態では、微生物油を含む微生物細胞を含む発酵プロセスは、最初に例えば水を用いて洗浄され、その後溶解細胞組成物を形成するために細胞が溶解される。他の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を形成するために発酵培地内で未洗浄細胞を溶解する工程を含む。

40

【0032】

[0032] 機械的処理には、ホモジナイゼーション、超音波、冷間圧縮、粉碎およびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。一部の実施形態では、本方法は、ホモジナイゼーションによって細胞を溶解する工程を含む。一部の実施形態では、本方法は、ホモジナイザーを用いて細胞を溶解する工程を含む。

【0033】

[0033] ホモジナイゼーションには、フレンチ(French)細胞プレス、ソニケーター、ホモジナイザー、マイクロフルイダイザー、ボールミル、ロッドミル、ペブルミル、

50

ビーズミル、高圧研磨ロール、垂直軸インパクト、工業用ブレンダー、高剪断ミキサー、パドルミキサー、ポリトロンホモジナイザー、工業用ホモジナイザー（例えば、Nir Soavi製VHPホモジナイザーならびにAPV Rannie製およびAPV Gaulin製ホモジナイザー）、工業用剪断流体プロセッサ（例えば、マイクロフルイディクス高剪断流体プロセッサ）、細胞溶解/ビーズミル型ホモジナイザー（例えば、Dyno-Mill製およびBuhler製）ならびにそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。一部の実施形態では、細胞は、任意選択的に加熱されるホモジナイザー内を貫流する。一部の実施形態では、好適なホモジナイゼーションは、高圧および/または低圧のいずれかでのホモジナイザーの1～3回の通過を含むことができる。

【0034】

[0034]一部の実施形態では、ホモジナイゼーション中の圧力は、150 bar～1,400 bar; 150 bar～1,200 bar; 150 bar～900 bar; 150 bar～300 bar; 300 bar～1,400 bar; 300 bar～1,200 bar; 300 bar～900 bar; 400 bar～800 bar; 500 bar～700 barまたは600 barである。一部の実施形態では、ホモジナイゼーション中の圧力は、2,000 psi～20,000 psi; 2,000 psi～18,000 psi; 2,000 psi～16,000 psi; 2,000 psi～14,000 psi; 2,000 psi～12,000 psi; 2,000 psi～10,000 psi; 2,000 psi～8,000 psi; 2,000 psi～6,000 psi; 2,000 psi～4,000 psi; 4,000 psi～20,000 psi; 4,000 psi～18,000 psi; 4,000 psi～16,000 psi; 4,000 psi～14,000 psi; 4,000 psi～12,000 psi; 4,000 psi～10,000 psi; 4,000 psi～8,000 psi; 4,000 psi～6,000 psi; 6,000 psi～20,000 psi; 6,000 psi～18,000 psi; 6,000 psi～16,000 psi; 6,000 psi～14,000 psi; 6,000 psi～12,000 psi; 6,000 psi～10,000 psi; 6,000 psi～8,000 psi; 8,000 psi～20,000 psi; 8,000 psi～18,000 psi; 8,000 psi～16,000 psi; 8,000 psi～14,000 psi; 8,000 psi～12,000 psi; 8,000 psi～10,000 psi; 10,000 psi～20,000 psi; 10,000 psi～18,000 psi; 10,000 psi～16,000 psi; 10,000 psi～14,000 psi; 10,000 psi～12,000 psi; 12,000 psi～20,000 psi; 12,000 psi～18,000 psi; 12,000 psi～16,000 psi; 12,000 psi～14,000 psi; 14,000 psi～20,000 psi; 14,000 psi～18,000 psi; 14,000 psi～16,000 psi; 16,000 psi～20,000 psi; 16,000 psi～18,000 psiまたは18,000 psi～20,000 psiである。

【0035】

[0035]一部の実施形態では、微生物細胞は、均質化される前に高剪断ミキサー内で混合される。一部の実施形態では、高剪断ミキサーは、少なくとも5,000 rpm; 少なくとも7,500 rpm; 少なくとも10,000 rpm; 少なくとも12,500 rpm; 少なくとも15,000 rpm; 5,000 rpm～15,000 rpm; 5,000 rpm～12,500 rpm; 5,000 rpm～10,000 rpm; 5,000 rpm～7,500 rpm; 7,500 rpm～15,000 rpm; 7,500 rpm～12,500 rpm; 7,500 rpm～10,000 rpm; 10,000 rpm～15,000 rpm; 10,000 rpm～12,500 rpmまたは12,500 rpm～15,000 rpmの範囲内で操作される。

【0036】

[0036]物理的処理には、抵抗、対流、蒸気、流体浴、ソーラーおよびそれらの組み合わせを含むがそれらに限定されない加熱が含まれるがそれらに限定されない。一部の実施形

10

20

30

40

50

態では、細胞は、その壁の中／壁の上に抵抗コイルを備えるタンク内で加熱される。一部の実施形態では、細胞は、その中を貫通するチューブを備える液体浴内で加熱される。

【 0 0 3 7 】

[0037] 化学的処理には、細胞の pH を上昇させる工程；細胞の pH を低下させる工程；細胞を化学薬品と接触させる工程およびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。

【 0 0 3 8 】

[0038] 一部の実施形態では、細胞は、細胞の pH を上昇させる工程によって溶解される。一部の実施形態では、pH は塩基を添加する工程によって上昇させられる。塩基には、水酸化物（例えば、LiOH、NaOH、KOH および $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ）ならびにそれらの組み合わせ；炭酸塩（例えば、 Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、 MgCO_3 およびそれらの組み合わせ）；重炭酸塩（例えば、 LiHCO_3 、 NaHCO_3 、 KHCO_3 およびそれらの組み合わせ）ならびにそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。塩基は、固体（例えば、結晶、顆粒およびペレット）；液体（例えば、水溶液）およびそれらの組み合わせの形態であってよい。

10

【 0 0 3 9 】

[0039] 一部の実施形態では、塩基は、1 ~ 12、1 ~ 10、1 ~ 8、1 ~ 6、1 ~ 5、2 ~ 12、2 ~ 10、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 5、3 ~ 10、3 ~ 6、3 ~ 5、4 ~ 10、4 ~ 8、4 ~ 6、5 ~ 10 または 5 ~ 8 の pK_b を有する。本明細書で使用する用語「 pK_b 」は、塩基の結合定数 K_b の負の対数を意味する。 K_b は、水中の塩基のイオン化の平衡定数を意味する：

20

【 数 1 】



；および塩基 B の K_b は：

【 数 2 】

$$K_b = \frac{[\text{HB}^+][\text{OH}^-]}{[\text{B}]}$$

30

であると規定されている。

【 0 0 4 0 】

[0040] 一部の実施形態では、pH は、約 8 以上；約 9 以上；約 10 以上；約 11 以上および約 12 以上から選択される。他の実施形態では、pH は、7 ~ 13；7 ~ 12；7 ~ 11；7 ~ 10；7 ~ 9；8 ~ 13；8 ~ 12；8 ~ 11；8 ~ 10；8 ~ 9；9 ~ 12；9 ~ 11；9 ~ 10；10 ~ 12；および 10 ~ 11 の pH から選択される。

【 0 0 4 1 】

[0041] 一部の実施形態では、細胞の pH は、塩素アルカリ法によって上昇させることができる。一部の実施形態では、塩化ナトリウムおよび細胞を含有する発酵ブ罗斯は、細胞の pH を上昇させる水酸化ナトリウムの形成を生じさせる電気分解にかけられる。一部の実施形態では、発酵ブ罗斯は、塩化ナトリウムに代えて、または追加して、塩化カルシウムもしくは塩化カリウムを含み、電気分解は各々水酸化カルシウムもしくは水酸化カリウムの形成を生じさせ、それにより細胞の pH を上昇させる。

40

【 0 0 4 2 】

[0042] 一部の実施形態では、細胞は、細胞の pH を低下させる工程によって溶解される。一部の実施形態では、pH は酸を添加する工程によって低下させられる。酸には、硫酸；リン酸；塩酸；臭化水素酸；ヨウ化水素酸；次亜塩素酸；亜塩素酸；塩素酸；過塩素酸；フルオロ硫酸；硝酸；フルオロアンチモン酸；フルオロホウ酸；ヘキサフルオロリン酸；クロム酸；ホウ酸；酢酸；クエン酸；ギ酸およびそれらの組み合わせが含まれるがそれ

50

らに限定されない。一部の実施形態では、pHは、約7以下、約6.5以下、約6以下、約5.5以下、約5以下、約4.5以下、約4以下、約3.5以下、約3以下、約2.5以下、約2以下、約1.5以下、約1以下および約0.5以下から選択される。他の実施形態では、pHは、約0.5～約7；約0.5～約6.5；約0.5～約6；約0.5～約5.5；約0.5～約5；約0.5～約4.5；約0.5～約4；約0.5～約3.5；約0.5～約3；約0.5～約2.5；約0.5～約2；約0.5～約1.5；約0.5～約1；約1～約7；約1～約6.5；約1～約6；約1～約5.5；約1～約5；約1～約4.5；約1～約4；約1～約3.5；約1～約3；約1～約2.5；約1～約2；約1～約1.5；約1.5～約7；約1.5～約6.5；約1.5～約6；約1.5～約5.5；約1.5～約5；約1.5～約4.5；約1.5～約4；約1.5～約3.5；約1.5～約3；約1.5～約2.5；約1.5～約2；約2～約7；約2～約6.5；約2～約6；約2～約5.5；約2～約5；約2～約4.5；約2～約4；約2～約3.5；約2～約3；約2～約2.5；約2.5～約7；約2.5～約6.5；約2.5～約6；約2.5～約5.5；約2.5～約5；約2.5～約4.5；約2.5～約4；約2.5～約3.5；約2.5～約3；約3～約7；約3～約6.5；約3～約6；約3～約5.5；約3～約5；約3～約4.5；約3～約4；約3～約3.5；約3.5～約7；約3.5～約6.5；約3.5～約6；約3.5～約5.5；約3.5～約5；約3.5～約4.5；約3.5～約4；約4～約7；約4～約6.5；約4～約6；約4～約5.5；約4～約5；約4～約4.5；約4.5～約7；約4.5～約6.5；約4.5～約6；約4.5～約5.5；約4.5～約5；約5～約7；約5～約6.5；約5～約6；約5～約5.5；約5.5～約7；約5.5～約6.5；約5.5～約6；約6～約7；約6～約6.5および約6.5～約7から選択される。

10

20

【0043】

[0043]一部の実施形態では、酸は、pHを低下させるために、細胞プロスの重量（または容積）で約2%～約10%、約2%～約9%、約2%～約8%、約2%～約7%、約2%～約6%、約3%～約6%、約4%～約6%、約5%～約6%、約2%～約5%、約2%～約4%、約2%～約3%、約3%～約5%、約3%～約4%または約4%～約5%の量で添加される。

【0044】

[0044]酵素的处理は、細胞を1種以上の酵素と接触させる工程を意味する。酵素には、プロテアーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、キチナーゼ、ペクチナーゼおよびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。プロテアーゼの非限定的な例には、セリンプロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパルテートプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、アラカーゼ (alacase) およびそれらの組み合わせが含まれる。セルラーゼの非限定的な例には、スクラーゼ、マルターゼ、ラクターゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アミラーゼ、リゾチーム、ノイラミニダーゼ、ガラクトシダーゼ、 α -マンノシダーゼ、グルクロニダーゼ、ヒアルロニダーゼ、プルラーゼ、グルコセレブロシダーゼ、ガラクトシルセラミダーゼ、アセチルガラクトサミニダーゼ、フコシダーゼ、ヘキシサミニダーゼ、イツロニダーゼ、マルターゼ-グルコアミラーゼおよびそれらの組み合わせが含まれる。キチナーゼの非限定的な例にはキトトリオシダーゼが含まれる。ペクチナーゼの非限定的な例には、ペクトリアーゼ、ペクトザイム (pectozyme)、ポリガラクトツロナーゼおよびそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、一部の酵素は加熱する工程によって活性化される。一部の実施形態では、溶解は、酵素の使用を含んでいない。

30

40

【0045】

[0045]本明細書で使用する「溶解細胞組成物」は、細胞断片および細胞の他の内容物を含む1つ以上の溶解細胞を微生物油（溶解細胞由来）と組み合わせ、および任意選択的に液体（例えば、水）、栄養素および微生物細胞を含有するプロスを含む組成物を意味する。一部の実施形態では、微生物細胞は、水を含む発酵プロスまたは発酵培地中に含有されている。一部の実施形態では、溶解細胞組成物は、1つ以上の溶解細胞、細胞断片、微

50

10

20

30

40

50

5 ～ 約 6 ; 約 3 . 5 ～ 約 5 . 5 ; 約 3 . 5 ～ 約 5 ; 約 3 . 5 ～ 約 4 . 5 ; 約 3 . 5 ～ 約 4 ; 約 4 ～ 約 7 ; 約 4 ～ 約 6 . 5 ; 約 4 ～ 約 6 ; 約 4 ～ 約 5 . 5 ; 約 4 ～ 約 5 ; 約 4 ～ 約 4 . 5 ; 約 4 . 5 ～ 約 7 ; 約 4 . 5 ～ 約 6 . 5 ; 約 4 . 5 ～ 約 6 ; 約 4 . 5 ～ 約 5 . 5 ; 約 4 . 5 ～ 約 5 ; 約 5 ～ 約 7 ; 約 5 ～ 約 6 . 5 ; 約 5 ～ 約 6 ; 約 5 ～ 約 5 . 5 ; 約 5 . 5 ～ 約 7 ; 約 5 . 5 ～ 約 6 . 5 ; 約 5 . 5 ～ 約 6 ; 約 6 ～ 約 7 ; 約 6 ～ 約 6 . 5 および 約 6 . 5 ～ 約 7 から選択される。一部の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物の pH を約 0 . 5 ～ 約 6 へ低下させる工程を含んでいる。

【 0 0 4 8 】

[0048] 一部の実施形態では、本方法は、細胞ブロスまたは溶解細胞組成物の重量（または容積）で約 0 . 5 % ～ 約 2 0 %、約 0 . 5 % ～ 約 1 5 %、約 0 . 5 % ～ 約 1 0 %、約 0 . 5 % ～ 約 9 %、約 0 . 5 % ～ 約 8 %、約 0 . 5 % ～ 約 7 %、約 0 . 5 % ～ 約 6 %、約 0 . 5 % ～ 約 5 %、約 0 . 5 % ～ 約 4 %、約 0 . 5 % ～ 約 3 %、約 0 . 5 % ～ 約 2 % および 約 0 . 5 % ～ 約 1 % の量で酸を添加する工程によって溶解細胞組成物を解乳化する工程を含む。1つの実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物の重量で約 0 . 5 % ～ 約 2 0 % の量で酸を添加する工程によって溶解細胞組成物を解乳化する工程を含む。

【 0 0 4 9 】

[0049] 一部の実施形態では、本方法は、細胞を溶解前、溶解中または溶解後に加熱する工程をさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物および / または細胞を少なくとも 1 0 、少なくとも 2 0 、少なくとも 2 5 、少なくとも 3 0 、少なくとも 3 5 、少なくとも 4 0 、少なくとも 4 5 、少なくとも 5 0 、少なくとも 5 5 、少なくとも 6 0 、少なくとも 6 5 、少なくとも 7 0 、少なくとも 7 5 、少なくとも 8 0 、少なくとも 8 5 、少なくとも 9 0 、少なくとも 9 5 または少なくとも 1 0 0 へ加熱する工程を含む。他の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物および / または細胞を約 1 0 ～ 約 1 0 0 、約 1 0 ～ 約 9 0 、約 1 0 ～ 約 8 0 、約 1 0 ～ 約 7 0 、約 2 0 ～ 約 1 0 0 、約 2 0 ～ 約 9 0 、約 2 0 ～ 約 8 0 、約 2 0 ～ 約 7 0 、約 3 0 ～ 約 1 0 0 、約 3 0 ～ 約 9 0 、約 3 0 ～ 約 8 0 、約 3 0 ～ 約 7 0 、約 4 0 ～ 約 1 0 0 、約 4 0 ～ 約 9 0 、約 4 0 ～ 約 8 0 、約 5 0 ～ 約 1 0 0 、約 5 0 ～ 約 9 0 、約 5 0 ～ 約 8 0 、約 5 0 ～ 約 7 0 、約 6 0 ～ 約 1 0 0 、約 6 0 ～ 約 9 0 、約 6 0 ～ 約 8 0 、約 7 0 ～ 約 1 0 0 、約 7 0 ～ 約 9 0 、約 8 0 ～ 約 1 0 0 、約 8 0 ～ 約 9 0 または約 9 0 ～ 約 1 0 0 へ加熱する工程を含んでいる。また別の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を約 7 0 ～ 約 1 0 0 、約 7 0 ～ 約 9 0 、約 8 0 ～ 約 1 0 0 、約 8 0 ～ 約 9 0 または約 9 0 ～ 約 1 0 0 へ加熱する工程を含む。さらにまた別の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を少なくとも 7 0 、少なくとも 7 5 、少なくとも 8 0 、少なくとも 8 5 、少なくとも 9 0 、少なくとも 9 5 または少なくとも 1 0 0 へ加熱する工程を含む。さらにまた別の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を少なくとも 7 0 へ加熱する工程をさらに含む。さらにまた別の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を約 7 0 ～ 約 1 0 0 へ加熱する工程をさらに含む。

【 0 0 5 0 】

[0050] 一部の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物が 5 ミクロン ～ 2 5 ミクロン ; 5 ミクロン ～ 2 0 ミクロン ; 5 ミクロン ～ 1 5 ミクロン ; 1 0 ミクロン ～ 2 5 ミクロン ; 1 0 ミクロン ～ 2 0 ミクロン ; 1 0 ミクロン ～ 1 5 ミクロン ; 1 5 ミクロン ～ 2 5 ミクロン ; 1 5 ミクロン ～ 2 0 ミクロン および 2 0 ミクロン ～ 2 5 ミクロン から選択される平均粒径を含むようになるまで溶解細胞組成物を加熱する工程をさらに含む。また別の実施形態では、溶解細胞組成物の平均粒径は、2 5 ミクロン以下、2 0 ミクロン以下、1 5 ミクロン以下、1 0 ミクロン以下および 5 ミクロン以下から選択される。また別の実施形態では、溶解細胞組成物の平均粒径は、2 5 ミクロン以下である。一部の実施形態では、平均粒径は、例えば、Beckman Coulter LS 13 320 粒径分析装置（Beckman Coulter、カリフォルニア州ブレア（Brea, CA））を使用して測定できる。一部の実施形態では、平均粒径は、Malvern MS 2000 粒径

10

20

30

40

50

分析装置 (Malvern Instruments、英国ウスターシャー (Worcestershire, United Kingdom)) を使用して測定できる。一部の実施形態では、溶解細胞組成物は、溶解細胞組成物を解乳化するために十分な期間にわたり加熱される。

【0051】

[0051] 一部の実施形態では、細胞および / または溶解細胞組成物は、閉鎖型システムまたはエバポレーターを備えるシステム内で加熱することができる。一部の実施形態では、エバポレーターを備えるシステム内で、細胞および / または溶解細胞組成物中に存在する水の一部分が蒸発によって除去されるように細胞および / または溶解細胞組成物を加熱することができる。一部の実施形態では、1つの方法は、細胞および / または溶解細胞組成物中に存在する水を重量 (または容積) で 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45% または 50% まで除去するために、エバポレーターを備えるシステム内で細胞および / または溶解細胞組成物を加熱する工程を含む。一部の実施形態では、1つの方法は、重量 (または容積) で 1% ~ 50%、1% ~ 45%、1% ~ 40%、1% ~ 35%、1% ~ 30%、1% ~ 25%、1% ~ 20%、1% ~ 15%、1% ~ 10%、1% ~ 5%、5% ~ 50%、5% ~ 45%、5% ~ 40%、5% ~ 35%、5% ~ 30%、5% ~ 25%、5% ~ 20%、5% ~ 15%、5% ~ 10%、10% ~ 50%、10% ~ 45%、10% ~ 40%、10% ~ 35%、10% ~ 30%、10% ~ 25%、10% ~ 20%、10% ~ 15%、15% ~ 50%、15% ~ 45%、15% ~ 40%、15% ~ 35%、15% ~ 30%、15% ~ 25%、15% ~ 20%、20% ~ 50%、20% ~ 45%、20% ~ 40%、20% ~ 35%、20% ~ 30%、20% ~ 25%、25% ~ 50%、25% ~ 45%、25% ~ 40%、25% ~ 35%、25% ~ 30%、30% ~ 50%、30% ~ 45%、30% ~ 40%、30% ~ 35%、35% ~ 50%、35% ~ 45%、35% ~ 40%、40% ~ 50%、40% ~ 45% または 45% ~ 50% の水を除去するために、エバポレーターを備えるシステム内で細胞および / または溶解細胞組成物を加熱する工程を含む。

10

20

【0052】

[0052] 一部の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物に乳化剤を添加する工程をさらに含む。一部の実施形態では、乳化剤は洗剤である。一部の実施形態では、乳化剤は界面活性剤である。一部の実施形態では、乳化剤は、溶解前、溶解中または溶解後に添加される。1つの実施形態では、乳化剤は、溶解後に添加される。一部の実施形態では、乳化剤は、溶解細胞組成物に添加される。本明細書で使用する用語「乳化剤」は、エマルジョンを安定化する物質を意味する。乳化剤は、イオン性乳化剤、非イオン性乳化剤およびそれらの組み合わせから選択される。一部の実施形態では、乳化剤は、イオン性乳化剤である。

30

【0053】

[0053] 一部の実施形態では、イオン性乳化剤は、アニオン性乳化剤、カチオン性乳化剤およびそれらの組み合わせから選択される。一部の実施形態では、アニオン性乳化剤は、アニオン性硫酸塩乳化剤、例えば、硫酸アルキル (例えば、ラウリル硫酸アンモニウム、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) / ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) およびそれらの組み合わせ)、アルキル硫酸エーテル (例えば、ラウレス硫酸ナトリウム / ラウリルエーテル硫酸ナトリウム、ミレス硫酸ナトリウムおよびそれらの組み合わせ) およびそれらの組み合わせ; アニオン性スルホン酸塩乳化剤、例えば、ドキュセート (例えば、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、スルホン酸塩フルオロ界面活性剤 (例えば、パーフルオロオクタンスルホン酸塩およびパーフルオロブタンスルホン酸塩)、アルキルベンゼンスルホン酸塩およびそれらの組み合わせ); アニオン性リン酸塩乳化剤 (例えば、リン酸アルキルアリアルエーテル、リン酸アルキルエーテルおよびそれらの組み合わせ); アニオン性カルボン酸塩乳化剤 (例えば、カルボン酸アルキル (例えば、ステアリン酸ナトリウム、ラウロイルサルコシンナトリウム、カルボン酸フルオロ界面活性剤 (例えば、パーフルオロノナン酸塩、パーフルオロオクタン酸塩およびそれらの組み合わせ) およびそれらの

40

50

組み合わせ) ; ならびにそれらの組み合わせであってよい。一部の実施形態では、乳化剤は、アニオン性乳化剤である。1つの実施形態では、アニオン性乳化剤は、アニオン性硫酸塩乳化剤、アニオン性スルホン酸塩乳化剤、アニオン性リン酸塩乳化剤、アニオン性カルボン酸塩乳化剤およびそれらの組み合わせから選択される。また別の実施形態では、アニオン性乳化剤は、アニオン性硫酸塩乳化剤である。さらにまた別の実施形態では、アニオン性硫酸塩乳化剤は、ラウリル硫酸アンモニウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウレス硫酸ナトリウム、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム、ミレス硫酸ナトリウムおよびそれらの組み合わせから選択される。さらにまた別の実施形態では、アニオン性硫酸塩乳化剤は、ドデシル硫酸ナトリウムである。

【0054】

[0054]一部の実施形態では、カチオン性乳化剤は、pH依存性第一級アミン；pH依存性第二級アミン；pH依存性第三級アミン；オクテニジン二塩酸塩；永久的帯電第四級アンモニウムカチオン（例えば、アルキルトリメチルアンモニウム塩（例えば、臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）/臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化セチルトリメチルアンモニウム（CTAC）およびそれらの組み合わせ）、塩化セチルピリジニウム（CPC）、塩化ベンザルコニウム（BAC）、塩化ベンゼトニウム（BZT）、5-ブロモ-5-ニトロ-1,3-ジオキサン、塩化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、臭化ジオクタデシルジメチルアンモニウム（DODAB）およびそれらの組み合わせ) ; ならびにそれらの組み合わせであってよい。

【0055】

[0055]一部の実施形態では、乳化剤の分子量は、500g/mol以下、450g/mol以下、400g/mol以下、350g/mol以下および300g/mol以下から選択される。さらにまた別の実施形態では、乳化剤の分子量は、250g/mol~500g/mol、250g/mol~450g/mol、250g/mol~400g/mol、250g/mol~350g/mol、250g/mol~300g/mol、300g/mol~500g/mol、300g/mol~450g/mol、300g/mol~400g/mol、300g/mol~350g/mol、350g/mol~500g/mol、350g/mol~450g/mol、350g/mol~400g/mol、400g/mol~500g/mol、400g/mol~450g/molおよび450g/mol~500g/molから選択される。例えば、SDSの分子量は288g/molであり、CTABの分子量は364g/molである。さらにまた別の実施形態では、乳化剤の分子量は、250g/mol~450g/mol、250g/mol~400g/mol、250g/mol~350g/molおよび250g/mol~300g/molから選択される。

【0056】

[0056]一部の実施形態では、乳化剤は粉末として添加される。一部の実施形態では、乳化剤は、5%~50%、5%~45%、5%~40%、5%~35%、5%~30%、10%~50%、10%~45%、10%~40%、10%~35%、10%~30%、15%~50%、15%~45%、15%~40%、15%~35%、15%~30%、20%~50%、20%~45%、20%~40%、20%~35%、20%~30%、25%~50%、25%~45%、25%~40%、25%~35%、25%~30%、30%~50%、30%~45%、30%~40%および30%~35%の量の乳化剤濃度を有する溶液で添加される。

【0057】

[0057]一部の実施形態では、（例えば、粉末形または溶液形にある）乳化剤は、発酵ブロスまたは溶解細胞組成物の重量（または容積）で0.2%~10%、0.2%~9.5%、0.2%~9%、0.2%~8.5%、0.2%~8%、0.2%~7.5%、0.2%~7%、0.2%~6.5%、0.2%~6%、0.2%~5.5%、0.2%~5%、0.2%~4.5%、0.2%~4%、0.2%~3.5%、0.2%~3%、0.2%~2.5%、0.2%~2%、0.2%~1.5%、0.2%~1%、0.2%~0.5%、0.5%~10%、0.5%~9.5%、0.5%~9%、0.5%~8.5%

10

20

30

40

50

、0.5%～8%、0.5%～7.5%、0.5%～7%、0.5%～6.5%、0.5%～6%、0.5%～5.5%、0.5%～5%、0.5%～4.5%、0.5%～4%、0.5%～3.5%、0.5%～3%、0.5%～2.5%、0.5%～2%、0.5%～1.5%、0.5%～1%、1%～10%、1%～9.5%、1%～9%、1%～8.5%、1%～8%、1%～7.5%、1%～7%、1%～6.5%、1%～6%、1%～5.5%、1%～5%、1%～4.5%、1%～4%、1%～3.5%、1%～3%、1%～2.5%、1%～2%、1%～1.5%、1.5%～10%、1.5%～9.5%、1.5%～9%、1.5%～8.5%、1.5%～8%、1.5%～7.5%、1.5%～7%、1.5%～6.5%、1.5%～6%、1.5%～5.5%、1.5%～5%、1.5%～4.5%、1.5%～4%、1.5%～3.5%、1.5%～3%、1.5%～2.5%、1.5%～2%、2%～10%、2%～9.5%、2%～9%、2%～8.5%、2%～8%、2%～7.5%、2%～7%、2%～6.5%、2%～6%、2%～5.5%、2%～5%、2%～4.5%、2%～4%、2%～3.5%、2%～3%、2%～2.5%、2.5%～10%、2.5%～9.5%、2.5%～9%、2.5%～8.5%、2.5%～8%、2.5%～7.5%、2.5%～7%、2.5%～6.5%、2.5%～6%、2.5%～5.5%、2.5%～5%、2.5%～4.5%、2.5%～4%、2.5%～3.5%、2.5%～3%、3%～10%、3%～9.5%、3%～9%、3%～8.5%、3%～8%、3%～7.5%、3%～7%、3%～6.5%、3%～6%、3%～5.5%、3%～5%、3%～4.5%、3%～4%および3%～3.5%から選択される量で添加される。また別の実施形態では、（例えば、粉末形または溶液形にある）乳化剤は、発酵プロスまたは溶解細胞組成物の重量（または容積）で0.2%～5%、0.5%～5%、1%～5%、1.5%～5%、2%～5%、2.5%～5%および3%～5%から選択される量で添加される。さらにまた別の実施形態では、乳化剤は、溶解細胞組成物の重量で0.2%～10%の量で添加される。

10

20

30

40

【0058】

[0058] 一部の実施形態では、乳化剤は、発酵プロスまたは溶解細胞組成物の界面張力（例えば、表面張力）を低下させる。本明細書で使用する用語「界面張力」または「表面張力」は、2つの相間の界面で長さが1メートル当たりの想像線に作用する力を意味する。一部の実施形態では、乳化剤によって形成されるエマルジョンの界面張力は、内因性物質によって形成されるエマルジョンより小さい。一部の実施形態では、界面張力は、ダイン（dyne）/cmで測定できる。

【0059】

[0059] 一部の実施形態では、乳化剤は、発酵プロスまたは溶解細胞組成物の電位の絶対値を上昇させる（すなわち、正の電位を上昇させる、または負の電位を低下させる）。一部の実施形態では、アニオン性乳化剤の添加は、発酵プロスまたは溶解細胞組成物の電位における下方移動を生じさせることができる（すなわち、正の電位を低下させる、または負の電位を上昇させる）。一部の実施形態では、カチオン性乳化剤の添加は、発酵プロスまたは溶解細胞組成物の電位における上方移動を生じさせることができる（すなわち、正の電位を上昇させる、または負の電位を低下させる）。本明細書で使用する用語「電位」は、エマルジョン中の粒子間の界面動電位を意味する。一部の実施形態では、電位は、mVで測定できる。一部の実施形態では、乳化剤によって形成されるエマルジョンの電位の絶対値は、内因性物質によって形成されるエマルジョンより高い。

【0060】

[0060] 一部の実施形態では、イオン性乳化剤の添加は、水中油型エマルジョンをもたらす。一部の実施形態では、水中油型エマルジョンには、油、水およびイオン性乳化剤が含まれるがそれらに限定されない。

【0061】

[0061] 一部の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物に塩を添加する工程をさらに含む。用語「塩」は、酸由来の水素イオンを金属（例えば、アルカリ金属、アルカリ土類金

50

属および遷移金属)または正荷電化合物(例えば、 NH_4^+)で置換することによって形成されたイオン性化合物を意味する。一部の実施形態では、塩は、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、硫酸塩またはそれらの組み合わせであってよい。塩中に存在する負荷電イオン種には、ハロゲン化物、硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、リン酸水素、リン酸二水素、炭酸塩、重炭酸塩およびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。一部の実施形態では、塩は、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、グルタミン酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、塩化カリウム、塩化鉄、硫酸鉄、硫酸アルミニウム、酢酸アンモニウムおよびそれらの組み合わせから選択される。一部の実施形態では、塩は NaOH を含まない。塩は、固体(例えば、結晶形、非晶質形、ペレット形および/または顆粒形)および/または例えば水を含む溶液(例えば、希釈溶液、飽和溶液または超飽和溶液)として添加することができる。

10

【0062】

[0062]一部の実施形態では、塩は、 $5\text{ g/L} \sim 25\text{ g/L}$ 、 $5\text{ g/L} \sim 10\text{ g/L}$ 、 $10\text{ g/L} \sim 15\text{ g/L}$ 、 $15\text{ g/L} \sim 20\text{ g/L}$ 、 $20\text{ g/L} \sim 25\text{ g/L}$ または $10\text{ g/L} \sim 20\text{ g/L}$ の量で添加される。

【0063】

[0063]他の実施形態では、塩は、溶解細胞組成物に溶解細胞組成物の重量(または容積)で20%以下、15%以下、10%以下、7.5%以下、5%以下または2%以下の量で添加される。一部の実施形態では、塩は、溶解細胞組成物に溶解細胞組成物の重量(または容積)(例えば、ブロス総重量(または容積))で約0.05%~約20%、約0.1%~約20%、約0.1%~約15%、約0.1%~約10%、約0.5%~約20%、約0.5%~約15%、約0.5%~約10%、約0.5%~約5%、約0.5%~約4%、約0.5%~約3%、約0.5%~約2.5%、約0.5%~約2%、約0.5%~約1.5%、約0.5%~約1%、約1%~約20%、約1%~約15%、約1%~約10%、約1%~約5%、約1%~約4%、1%~約3%、約1%~約2.5%、約1%~約2%、約1%~約1.5%、約1.5%~約5%、約1.5%~約4%、約1.5%~約3%、約1.5%~約2.5%、約1.5%~約2%、約2%~20%、約2%~約15%、約2%~約10%、約2%~約5%、約2%~約4%、約2%~約3%、約2%~約2.5%、約2.5%~約5%、約2.5%~約4%、約2.5%~約3%、約3%~約5%、約3%~約4%、約4%~約5%、約5%~約20%、約5%~約15%、約5%~約10%、約10%~約20%、約10%~約15%または約15%~約20%の量で添加される。例えば、溶解細胞組成物の重量が1,000kgである場合、重量(または容積)で0.5%~20%の量で添加される塩は、溶解細胞組成物に5kg~200kgの塩の添加を必要とする。一部の実施形態では、塩は、溶解細胞組成物に溶解細胞組成物の重量(または容積)で約0.05%~約20%、(重量(または容積)で)約0.1%~約20%、約0.5%~約15%または(重量(または容積)で)約2%~約10%の量で添加される。

20

30

【0064】

[0064]一部の実施形態では、本方法は、(i)細胞の溶解前、溶解中または溶解後に；(i)溶解細胞組成物の解乳化前、解乳化中または解乳化後に、またはそれらの組み合わせで攪拌する工程をさらに含む。用語「攪拌する工程」および「攪拌」は、細胞および/または溶解細胞組成物における運動に力を適用して影響を及ぼす方法を意味する。一部の実施形態では、本方法は、かき混ぜる工程、混合する工程、ブレンダーする工程、震動させる工程、振動させる工程またはそれらの組み合わせによって細胞および/または溶解細胞組成物を攪拌する工程を含む。

40

【0065】

[0065]一部の実施形態では、攪拌機は、細胞組成物または溶解細胞組成物中に塩基および/または塩を分散させる分散様式攪拌機である。一部の実施形態では、攪拌機は加熱板を有する。一部の実施形態では、攪拌機はかき混ぜ用マントルを有する。一部の実施形態

50

では、攪拌機は1つ以上のインペラを有する。本明細書で使用する「インペラ」は、回転すると細胞組成物または溶解細胞組成物に運動を付与するように配列された器具を意味する。本発明とともに使用するために好適なインペラには、等厚翼インペラ、ラッシュトン(Rush-ton)ブレードインペラ、軸流インペラ、半径流インペラ、凹面ブレードディスクインペラ、高効率インペラ、プロペラ、パドル、タービンおよびそれらの組み合わせが含まれる。

【0066】

[0066] 一部の実施形態では、本発明の方法は、細胞および/または溶解細胞組成物を各々0.1hp/1,000gal~10hp/1,000gal、0.5hp/1,000gal~8hp/1,000gal、1hp/1,000gal~6hp/1,000galまたは2hp/1,000gal~5hp/1,000gal(細胞または組成物)で攪拌する工程を含む。一部の実施形態では、本方法は、細胞および/または溶解細胞組成物を各々0.1hp/1000gal~10hp/1000gal(細胞または組成物)で攪拌する工程を含む。

10

【0067】

[0067] 一部の実施形態では、本発明は、10rpm以下、20rpm以下、50rpm以下、100rpm以下、150rpm以下、200rpm以下、250rpm以下、300rpm以下、350rpm以下、400rpm以下、10rpm~400rpm、10rpm~350rpm、10rpm~300rpm、10rpm~250rpm、10rpm~200rpm、10rpm~150rpm、10rpm~100rpm、10rpm~50rpm、10rpm~20rpm、20rpm~400rpm、20rpm~350rpm、20rpm~300rpm、20rpm~250rpm、20rpm~200rpm、20rpm~150rpm、20rpm~100rpm、20rpm~50rpm、50rpm~400rpm、50rpm~350rpm、50rpm~300rpm、50rpm~250rpm、50rpm~200rpm、50rpm~150rpm、50rpm~100rpm、100rpm~400rpm、100rpm~350rpm、100rpm~300rpm、100rpm~250rpm、100rpm~200rpm、100rpm~150rpm、150rpm~400rpm、150rpm~350rpm、150rpm~300rpm、150rpm~250rpm、150rpm~200rpm、200rpm~400rpm、200rpm~350rpm、200rpm~300rpm、200rpm~250rpm、250rpm~400rpm、250rpm~350rpm、250rpm~300rpm、300rpm~400rpm、300rpm~350rpmまたは350rpm~400rpmで攪拌する工程を含む。一部の実施形態では、攪拌する工程は、350rpm以下の速度で行われる。

20

30

【0068】

[0068] 一部の実施形態では、本方法は、細胞および/または溶解細胞組成物を90ft/分~1,200ft/分、200ft/分~1,000ft/分、300ft/分~800ft/分、400ft/分~700ft/分または500ft/分~600ft/分のインペラ先端速度を有する攪拌機を使用して攪拌する工程を含んでいる。一部の実施形態では、本方法は、200ft/分~1000ft/分のインペラ先端速度を有する攪拌機を用いて攪拌する工程を含む。

40

【0069】

[0069] 一部の実施形態では、本方法は、細胞および/または溶解細胞組成物を5cm/秒~900cm/秒、5cm/秒~750cm/秒、5cm/秒~500cm/秒、5cm/秒~350cm/秒、5cm/秒~300cm/秒、5cm/秒~250cm/秒、5cm/秒~200cm/秒、5cm/秒~150cm/秒、5cm/秒~100cm/秒、5cm/秒~50cm/秒、5cm/秒~25cm/秒、25cm/秒~900cm/秒、25cm/秒~750cm/秒、25cm/秒~500cm/秒、25cm/秒~350cm/秒、25cm/秒~300cm/秒、25cm/秒~250cm/秒、25cm/秒~200cm/秒、25cm/秒~150cm/秒、25cm/秒~100cm

50

/ 秒、25 cm / 秒 ~ 50 cm / 秒、50 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、50 cm / 秒 ~ 7
 50 cm / 秒、50 cm / 秒 ~ 500 cm / 秒、50 cm / 秒 ~ 350 cm / 秒、50 cm / 秒 ~ 300 cm / 秒、50 cm / 秒 ~ 250 cm / 秒、50 cm / 秒 ~ 200 cm / 秒、
 秒、50 cm / 秒 ~ 150 cm / 秒、50 cm / 秒 ~ 100 cm / 秒、100 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、100 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、100 cm / 秒 ~ 500 cm / 秒、
 100 cm / 秒 ~ 350 cm / 秒、100 cm / 秒 ~ 300 cm / 秒、100 cm / 秒 ~ 250 cm / 秒、100 cm / 秒 ~ 200 cm / 秒、100 cm / 秒 ~ 150 cm / 秒、
 150 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、150 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、150 cm / 秒 ~ 500 cm / 秒、150 cm / 秒 ~ 350 cm / 秒、150 cm / 秒 ~ 300 cm / 秒、
 150 cm / 秒 ~ 250 cm / 秒、150 cm / 秒 ~ 200 cm / 秒、200 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、200 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、200 cm / 秒 ~ 500 cm / 秒、
 200 cm / 秒 ~ 350 cm / 秒、200 cm / 秒 ~ 300 cm / 秒、200 cm / 秒 ~ 250 cm / 秒、250 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、250 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、
 250 cm / 秒 ~ 500 cm / 秒、250 cm / 秒 ~ 350 cm / 秒、250 cm / 秒 ~ 300 cm / 秒、300 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、300 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、
 300 cm / 秒 ~ 500 cm / 秒、300 cm / 秒 ~ 350 cm / 秒、350 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、350 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒、350 cm / 秒 ~ 800 cm / 秒、
 350 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、350 cm / 秒 ~ 700 cm / 秒、350 cm / 秒 ~ 650 cm / 秒、350 cm / 秒 ~ 600 cm / 秒、350 cm / 秒 ~ 550 cm / 秒、
 350 cm / 秒 ~ 500 cm / 秒、350 cm / 秒 ~ 450 cm / 秒、350 cm / 秒 ~ 400 cm / 秒、400 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、400 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒、
 400 cm / 秒 ~ 800 cm / 秒、400 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、400 cm / 秒 ~ 700 cm / 秒、400 cm / 秒 ~ 650 cm / 秒、400 cm / 秒 ~ 600 cm / 秒、
 400 cm / 秒 ~ 550 cm / 秒、400 cm / 秒 ~ 500 cm / 秒、400 cm / 秒 ~ 450 cm / 秒、450 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、450 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒、
 450 cm / 秒 ~ 800 cm / 秒、450 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、450 cm / 秒 ~ 700 cm / 秒、450 cm / 秒 ~ 650 cm / 秒、450 cm / 秒 ~ 600 cm / 秒、
 450 cm / 秒 ~ 550 cm / 秒、450 cm / 秒 ~ 500 cm / 秒、500 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、500 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒、500 cm / 秒 ~ 800 cm / 秒、
 500 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、500 cm / 秒 ~ 700 cm / 秒、500 cm / 秒 ~ 650 cm / 秒、500 cm / 秒 ~ 600 cm / 秒、500 cm / 秒 ~ 550 cm / 秒、
 550 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、550 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒、550 cm / 秒 ~ 800 cm / 秒、550 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、550 cm / 秒 ~ 700 cm / 秒、
 550 cm / 秒 ~ 650 cm / 秒、550 cm / 秒 ~ 600 cm / 秒、600 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、600 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒、600 cm / 秒 ~ 800 cm / 秒、
 600 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、600 cm / 秒 ~ 700 cm / 秒、600 cm / 秒 ~ 650 cm / 秒、650 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、650 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒、
 650 cm / 秒 ~ 800 cm / 秒、650 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、650 cm / 秒 ~ 700 cm / 秒、700 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、700 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒、
 700 cm / 秒 ~ 800 cm / 秒、700 cm / 秒 ~ 750 cm / 秒、750 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、750 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒、750 cm / 秒 ~ 800 cm / 秒、
 800 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒、800 cm / 秒 ~ 850 cm / 秒または850 cm / 秒 ~ 900 cm / 秒のインペラ先端速度を有する攪拌機を使用して攪拌する工程を含んで
 いる。用語「インペラ先端速度」は、インペラがその中心軸の周囲を回転するときのインペラの最も外側の部分の速度を意味する。

【0070】

[0070] 一部の実施形態では、攪拌する工程（および本明細書に記載した任意選択的な追加の工程）は、インペラを含む容器内で実施されるが、このときインペラ径対容器容積の比は、0.1 ~ 0.5、0.1 ~ 0.4、0.2 ~ 0.5、0.2 ~ 0.4、0.3 ~ 0.5または0.3 ~ 0.4である。

10

20

30

40

50

【0071】

[0071]一部の実施形態では、攪拌する工程（および本明細書に記載した任意選択的な追加の工程）は、インペラを含む容器内で実施されるが、インペラ径対容器内径の比は、少なくとも0.25、少なくとも0.34、少なくとも0.65、0.25～0.65、0.25～0.33、0.3～0.6、0.3～0.5、0.3～0.4、0.34～0.65、0.34～0.6、0.34～0.55、0.37～0.55、0.4～0.65、0.4～0.6、0.4～0.5または0.42～0.55である。

【0072】

[0072]一部の実施形態では、攪拌する工程は、細胞および/または溶解細胞組成物が10～10,000、1,000～10,000、1,500～10,000または2,000～10,000のレイノルズ(Reynolds)数によって記載される流動条件下に置かれるように細胞および/または溶解細胞組成物を混合する工程を含む。一部の実施形態では、攪拌する工程中の溶解細胞エマルジョンは、2,000以上、3,000以上もしくは5,000以上、または2,000～10,000、3,000～10,000もしくは5,000～10,000のレイノルズ数を有する。

【0073】

[0073]一部の実施形態では、攪拌容器は2つのインペラを有することができる。一部の実施形態では、インペラはラッシュトンプレードインペラである。一部の実施形態では、インペラは少なくとも最小インペラの直径に等しい間隔をあけて相互に離れている。一部の実施形態では、インペラは、先端間の距離が30インチ～40インチ、33インチ～37インチ、33インチ、34インチ、35インチ、36インチまたは37インチである。一部の実施形態では、攪拌容器は、少なくとも10,000L、少なくとも20,000L、少なくとも30,000L、少なくとも40,000Lまたは少なくとも50,000Lの容積を有する。一部の実施形態では、攪拌容器は、90インチ～110インチ、95インチ～105インチ、98インチ、99インチ、100インチ、101インチまたは102インチの内径を有する。一部の実施形態では、第1インペラは、攪拌容器の底部から15インチ～20インチ、16インチ～19インチまたは17インチ～18インチに位置し、第2インペラは第1インペラの上方60インチ～80インチ、65インチ～75インチ、68インチ、69インチ、70インチ、71インチ、72インチ、73インチ、74インチまたは75インチに位置する。一部の実施形態では、溶解細胞組成物は、少なくとも50rpm、少なくとも60rpmまたは少なくとも70rpmで攪拌される。一部の実施形態では、溶解細胞組成物は、50rpm～70rpm、50rpm～60rpmまたは60rpm～70rpmで攪拌される。

【0074】

[0074]一部の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を攪拌する工程をさらに含む。一部の実施形態では、溶解細胞組成物を攪拌する方法は、溶解細胞組成物を解乳化する。

【0075】

[0075]一部の実施形態では、解乳化中に形成される油滴の平均粒径は、5ミクロン～50ミクロン；5ミクロン～45ミクロン；5ミクロン～40ミクロン；5ミクロン～35ミクロン；5ミクロン～30ミクロン；5ミクロン～25ミクロン；5ミクロン～20ミクロン；5ミクロン～15ミクロン；10ミクロン～50ミクロン；10ミクロン～45ミクロン；10ミクロン～40ミクロン；10ミクロン～35ミクロン；10ミクロン～30ミクロン；10ミクロン～25ミクロン；10ミクロン～20ミクロン；10ミクロン～15ミクロン；15ミクロン～50ミクロン；15ミクロン～45ミクロン；15ミクロン～40ミクロン；15ミクロン～35ミクロン；15ミクロン～30ミクロン；15ミクロン～25ミクロン；15ミクロン～20ミクロン；20ミクロン～50ミクロン；20ミクロン～45ミクロン；20ミクロン～40ミクロン；20ミクロン～35ミクロン；20ミクロン～30ミクロン；20ミクロン～25ミクロン；25ミクロン～50ミクロン；25ミクロン～45ミクロン；25ミクロン～40ミクロン；25ミクロン～35ミクロン；25ミクロン～30ミクロン；30ミクロン～50ミクロン；30ミクロン

ン～45ミクロン；30ミクロン～40ミクロン；30ミクロン～35ミクロン；35ミクロン～50ミクロン；35ミクロン～45ミクロン；35ミクロン～40ミクロン；40ミクロン～50ミクロン；40ミクロン～45ミクロンおよび45ミクロン～50ミクロンから選択される。また別の実施形態では、解乳化中に形成される油滴の平均粒径は、少なくとも10ミクロン、少なくとも15ミクロン、少なくとも20ミクロン、少なくとも25ミクロン、少なくとも30ミクロン、少なくとも35ミクロンおよび40ミクロン以上から選択される。また別の実施形態では、解乳化中に形成される油滴の平均粒径は、少なくとも10ミクロン、少なくとも15ミクロン、少なくとも20ミクロンおよび少なくとも25ミクロンから選択される。一部の実施形態では、平均粒径は、例えば、Beckman Coulter LS 13 320 粒径分析装置 (Beckman Coulter、カリフォルニア州ブレア) を使用して測定できる。一部の実施形態では、平均粒径は、例えば、Malvern MS 2000 粒径分析装置 (Malvern Instruments、英国ウスターシャー) を使用して測定できる。

10

【0076】

[0076] 一部の実施形態では、溶解細胞組成物は、解乳化溶解細胞組成物を形成するために乳化剤、酸、塩、加熱および攪拌のうちの1つ以上にかけられる。

【0077】

[0077] 一部の実施形態では、本方法は、1工程の溶解および解乳化する工程を形成するために溶解する工程および解乳化する工程と一緒に組み合わせることをさらに含む。

【0078】

20

[0078] 一部の実施形態では、本方法は、1工程の溶解および解乳化する工程を形成するために、細胞および溶解細胞組成物のpHを上昇させる工程を含む溶解する工程および解乳化する工程と一緒に組み合わせることをさらに含む。一部の実施形態では、1工程の溶解および解乳化する工程は、細胞および溶解細胞組成物のpHを約8以上へ上昇させる工程を含んでいる。一部の実施形態では、1工程の溶解および解乳化する工程は、細胞および溶解細胞組成物のpHを上昇させるために塩基を添加する工程を含む。一部の実施形態では、1工程の溶解および解乳化する工程は、細胞および溶解細胞組成物のpHを約8以上へ上昇させるために塩基を添加する工程を含む。

【0079】

[0079] 一部の実施形態では、1工程の溶解および解乳化する工程に添加できる塩基は、既に本明細書で上記の塩基から選択される。一部の実施形態では、1工程の溶解および解乳化する工程の細胞および溶解細胞組成物のpHは、約8以上；約9以上；約10以上；約11以上および約12以上から選択されるpHへ上昇させることができる。他の実施形態では、1工程の溶解および解乳化する工程の細胞および溶解細胞組成物のpHは、7～13；7～12；7～11；7～10；7～9；8～13；8～12；8～11；8～10；8～9；9～12；9～11；9～10；10～12および10～11から選択されるpHへ上昇させることができる。

30

【0080】

[0080] 一部の実施形態では、細胞は、解乳化溶解細胞組成物を形成するために好適なpHで溶解される。一部の実施形態では、好適なpHは、既に本明細書で上記の塩基を添加する工程によって達成される。一部の実施形態では、好適なpHは、7～13；7～12；7～11；7～10；7～9；8～13；8～12；8～11；8～10；8～9；9～13；9～12；9～11；9～10；10～13；10～12および10～11から選択される。他の実施形態では、好適なpHは、10～13から選択される。さらにまた別の実施形態では、好適なpHは、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12および少なくとも13から選択される。

40

【0081】

[0081] 一部の実施形態では、好適なpHは、細胞プロスまたは組成物の重量（または容積）で約0.5%～約20%、約0.5%～約15%、約0.5%～約10%、約0.5%～約9%、約0.5%～約8%、約0.5%～約7%、約0.5%～約6%、約0.5

50

% ~ 約 5 %、約 0.5 % ~ 約 4 %、約 0.5 % ~ 約 3 %、約 0.5 % ~ 約 2 % および 約 0.5 % ~ 約 1 % から選択される量で塩基を添加する工程によって達成される。1つの実施形態では、好適な pH は、ブロスの重量で約 0.5 % ~ 約 20 % の量で塩基を添加する工程によって達成される。

【0082】

[0082]他の実施形態では、好適な pH は、既に本明細書で上記の酸を添加する工程によって達成される。一部の実施形態では、好適な pH は、7 以下；約 6.5 以下；約 6 以下；約 5.5 以下；約 5 以下；約 4.5 以下；約 4 以下；約 3.5 以下；約 3 以下；約 2.5 以下；約 2 以下；約 1.5 以下；約 1 以下および約 0.5 以下から選択される。一部の実施形態では、好適な pH は、約 6 以下から選択される。他の実施形態では、pH は、約 0.5 ~ 約 7；約 0.5 ~ 約 6.5；約 0.5 ~ 約 6；約 0.5 ~ 約 5.5；約 0.5 ~ 約 5；約 0.5 ~ 約 4.5；約 0.5 ~ 約 4；約 0.5 ~ 約 3.5；約 0.5 ~ 約 3；約 0.5 ~ 約 2.5；約 0.5 ~ 約 2；約 0.5 ~ 約 1.5；約 0.5 ~ 約 1；約 1 ~ 約 7；約 1 ~ 約 6.5；約 1 ~ 約 6；約 1 ~ 約 5.5；約 1 ~ 約 5；約 1 ~ 約 4.5；約 1 ~ 約 4；約 1 ~ 約 3.5；約 1 ~ 約 3；約 1 ~ 約 2.5；約 1 ~ 約 2；約 1 ~ 約 1.5；約 1.5 ~ 約 7；約 1.5 ~ 約 6.5；約 1.5 ~ 約 6；約 1.5 ~ 約 5.5；約 1.5 ~ 約 5；約 1.5 ~ 約 4.5；約 1.5 ~ 約 4；約 1.5 ~ 約 3.5；約 1.5 ~ 約 3；約 1.5 ~ 約 2.5；約 1.5 ~ 約 2；約 2 ~ 約 7；約 2 ~ 約 6.5；約 2 ~ 約 6；約 2 ~ 約 5.5；約 2 ~ 約 5；約 2 ~ 約 4.5；約 2 ~ 約 4；約 2 ~ 約 3.5；約 2 ~ 約 3；約 2 ~ 約 2.5；約 2.5 ~ 約 7；約 2.5 ~ 約 6.5；約 2.5 ~ 約 6；約 2.5 ~ 約 5.5；約 2.5 ~ 約 5；約 2.5 ~ 約 4.5；約 2.5 ~ 約 4；約 2.5 ~ 約 3.5；約 2.5 ~ 約 3；約 3 ~ 約 7；約 3 ~ 約 6.5；約 3 ~ 約 6；約 3 ~ 約 5.5；約 3 ~ 約 5；約 3 ~ 約 4.5；約 3 ~ 約 4；約 3 ~ 約 3.5；約 3.5 ~ 約 7；約 3.5 ~ 約 6.5；約 3.5 ~ 約 6；約 3.5 ~ 約 5.5；約 3.5 ~ 約 5；約 3.5 ~ 約 4.5；約 3.5 ~ 約 4；約 4 ~ 約 7；約 4 ~ 約 6.5；約 4 ~ 約 6；約 4 ~ 約 5.5；約 4 ~ 約 5；約 4 ~ 約 4.5；約 4.5 ~ 約 7；約 4.5 ~ 約 6.5；約 4.5 ~ 約 6；約 4.5 ~ 約 5.5；約 4.5 ~ 約 5；約 5 ~ 約 7；約 5 ~ 約 6.5；約 5 ~ 約 6；約 5 ~ 約 5.5；約 5.5 ~ 約 7；約 5.5 ~ 約 6.5；約 5.5 ~ 約 6；約 6 ~ 約 7；約 6 ~ 約 6.5 および 約 6.5 ~ 約 7 から選択される。一部の実施形態では、好適な pH は、約 0.5 ~ 約 6 から選択される。

10

20

30

【0083】

[0083]一部の実施形態では、本方法は、未洗浄解乳化溶解細胞組成物を形成するために微生物油を含む未洗浄溶解細胞を解乳化する工程およびその後未洗浄解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程を含んでいる。未洗浄解乳化溶解細胞組成物は、それにより溶解細胞組成物が、例えば後に遠心分離によって除去される水またはバッファーを用いて洗浄されない方法を意味する。溶解細胞組成物を洗浄する工程は、細胞から得られる油の総収率を減少させる可能性がある。

【0084】

[0084]また別の実施形態では、溶解細胞組成物が洗浄される回数は、1回、2回、3回以上減少させることができる。一部の実施形態では、洗浄する工程は、1回、2回または3回以下である。

40

【0085】

[0085]一部の実施形態では、溶解細胞組成物を形成する工程、溶解細胞組成物に乳化剤を添加する工程、溶解細胞組成物を酸と接触させる、もしくは溶解細胞組成物の pH を低下させる工程、溶解細胞組成物を塩と接触させる工程、溶解細胞組成物を加熱する工程および溶解細胞組成物を攪拌する工程の様々な組み合わせを単一容器内で発生させることができる。一部の実施形態では、細胞を形成する工程、細胞を酸と接触させる、もしくは溶解細胞組成物の pH を低下させる工程、溶解細胞組成物に乳化剤を添加する工程、細胞を塩と接触させる工程、細胞を加熱する工程および細胞を攪拌する工程の様々な組み合わせを単一容器内で発生させることができる。一部の実施形態では、単一容器は、発酵容器を

50

含んでいる。一部の実施形態では、発酵容器は、少なくとも20,000L、少なくとも50,000L、少なくとも100,000L、少なくとも120,000L、少なくとも150,000L、少なくとも200,000Lまたは少なくとも220,000Lの容積を有することができる。一部の実施形態では、発酵容器は、20,000L~220,000L、20,000L~100,000L、20,000L~50,000L、50,000L~220,000L、50,000L~150,000L、50,000L~100,000L、100,000L~220,000L、100,000L~150,000L、100,000L~120,000L、150,000L~220,000L、150,000L~200,000Lまたは200,000L~220,000Lの容積を有することができる。

10

【0086】

[0086]一部の実施形態では、容器内で形成された多量の細胞および/または溶解細胞組成物は、1つ以上の攪拌容器内に移すことができる。一部の実施形態では、攪拌容器は、少なくとも20,000L、少なくとも30,000L、少なくとも40,000Lまたは少なくとも50,000Lの容積を有する。一部の実施形態では、攪拌容器は、20,000L~50,000L、20,000L~40,000L、20,000L~30,000L、30,000L~50,000L、30,000L~40,000Lまたは40,000L~50,000Lの容積を有することができる。

【0087】

[0087]一般に、本明細書に記載した方法は、微生物細胞から微生物油を入手する、分離する、またはさもなければ回収するために有機溶媒を利用しない。一部の実施形態では、微生物細胞から微生物油を入手する際に有機溶媒は使用されない。また別の実施形態では、有機溶媒は、微生物油を入手するために十分な量または濃度で細胞に添加されない、溶解細胞組成物に添加されない、および/または本明細書に開示した方法中に油に添加されない。有機溶媒には、極性溶媒、非極性溶媒、水混和性溶媒、水非混和性溶媒およびそれらの組み合わせが含まれる。

20

【0088】

[0088]一部の実施形態では、本方法は、解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程をさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、解乳化溶解細胞組成物を遠心分離する工程によって解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程を含む。一部の実施形態では、解乳化溶解細胞組成物を放置することによって解乳化溶解細胞組成物から油が分離されるが、このとき油は重力を使用して解乳化溶解細胞組成物から（例えば、分離層として）分離される。一部の実施形態では、分離は、親油性膜によって達成される。一部の実施形態では、分離する工程は、10~100の温度で遠心分離する工程を含む。一部の実施形態では、油は、最初にpHを（例えば、本明細書で上記の塩基を添加する工程によって）上昇させ、その後油を入手するために解乳化溶解細胞組成物を遠心分離する工程によって解乳化溶解細胞組成物から分離される。

30

【0089】

[0089]一部の実施形態では、解乳化溶解細胞組成物のpHは、解乳化溶解細胞組成物に塩基を添加する工程によって上昇させられる。解乳化溶解細胞組成物に添加できる塩基は、上記の塩基と同一である。一部の実施形態では、pHは、約7.5以上；約8以上；約9以上；約10以上；約11以上および約12以上から選択される。他の実施形態では、pHは、7~13；7~12；7~11；7~10；7~9；8~13；8~12；8~11；8~10；8~9；9~12；9~11；9~10；10~12および10~11のpHから選択される。

40

【0090】

[0090]一部の実施形態では、本方法は、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも9

50

0、少なくとも95 または少なくとも100 の温度で解乳化溶解細胞組成物を遠心分離する工程によって解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程を含む。一部の実施形態では、本方法は、10 ~ 100、10 ~ 90、10 ~ 80、20 ~ 100、20 ~ 90、20 ~ 80、25 ~ 100、25 ~ 90、25 ~ 80、25 ~ 75、30 ~ 100、30 ~ 90、30 ~ 80、40 ~ 100、40 ~ 90、40 ~ 80、50 ~ 100、50 ~ 90、50 ~ 80、50 ~ 70、60 ~ 100、60 ~ 90、60 ~ 80、60 ~ 70、70 ~ 100、70 ~ 90、70 ~ 80、80 ~ 100、80 ~ 90 または90 ~ 100 の温度で解乳化溶解細胞組成物を遠心分離する工程によって解乳化溶解細胞組成物から油を分離する工程を含む。

10

【0091】

[0091]一部の実施形態では、遠心分離する工程は、(解乳化溶解細胞組成物の遠心分離機への)1キログラム/分(kg/分)~500kg/分、1kg/分~400kg/分、1kg/分~300kg/分、1kg/分~200kg/分、1kg/分~100kg/分、1kg/分~75kg/分、1kg/分~50kg/分、1kg/分~40kg/分、1kg/分~30kg/分、1kg/分~25kg/分、1kg/分~10kg/分、10kg/分~500kg/分、10kg/分~400kg/分、10kg/分~300kg/分、10kg/分~200kg/分、10kg/分~100kg/分、10kg/分~75kg/分、10kg/分~50kg/分、10kg/分~40kg/分、10kg/分~30kg/分、20kg/分~500kg/分、20kg/分~400kg/分、20kg/分~300kg/分、20kg/分~200kg/分、20kg/分~100kg/分、20kg/分~75kg/分、20kg/分~50kg/分、20kg/分~40kg/分、25kg/分~500kg/分、25kg/分~400kg/分、25kg/分~300kg/分、25kg/分~200kg/分、25kg/分~100kg/分、25kg/分~75kg/分、25kg/分~50kg/分、30kg/分~600kg/分、30kg/分~500kg/分、30kg/分~400kg/分、50kg/分~500kg/分、100kg/分~500kg/分または200kg/分~500kg/分の供給速度で実施される。

20

【0092】

[0092]一部の実施形態では、本方法は、1,000g~25,000g、1,000g~20,000g、1,000g~10,000g、2,000g~25,000g、2,000g~20,000g、2,000g~15,000g、3,000g~25,000g、3,000g~20,000g、5,000g~25,000g、5,000g~20,000g、5,000g~15,000g、5,000g~10,000g、5,000g~8,000g、10,000g~25,000g、15,000g~25,000gまたは少なくとも1,000g、少なくとも2,000g、少なくとも4,000g、少なくとも5,000g、少なくとも7,000g、少なくとも8,000g、少なくとも10,000g、少なくとも15,000g、少なくとも20,000gまたは少なくとも25,000gの遠心力で解乳化溶解細胞組成物を遠心分離する工程を含む。本明細書で使用する「g」は、標準重力またはおよそ 9.8 m/s^2 を意味する。一部の実施形態では、本方法は、解乳化溶解細胞組成物を4,000rpm~14,000rpm、4,000rpm~10,000rpm、6,000rpm~14,000rpm、6,000rpm~12,000rpm、8,000rpm~14,000rpm、8,000rpm~12,000rpmまたは8,000rpm~10,000rpmで遠心分離する工程を含んでいる。

30

40

【0093】

[0093]一部の実施形態では、油は、例えば、デカントする工程、脱脂する工程、真空吸引する工程、ポンピングする工程、吸出し吸引する工程、引抜き吸引する工程、サイフォン吸引する工程、またはさもないければ分離した組成物の表面から微生物油を回収する工程によって回収することができる。

50

【 0 0 9 4 】

[0094] 一部の実施形態では、本方法は、油から水を除去するために回収されている油を乾燥する工程を含む。一部の実施形態では、油を加熱する工程は、水を蒸発させるために油を加熱する工程を含むことができるがそれには限定されない。一部の実施形態では、乾燥する工程後、油は油の重量（または容積）%（パーセンテージ）で3%未満、2.5%未満、2%未満、1.5%未満、1%未満、0.5%未満、0.1%未満または0%である含水率を有する。一部の実施形態では、乾燥する工程後、油は、油の重量（または容積）%で0%~3%、0%~2.5%、0%~2%、0%~1.5%、0%~1%、0%~0.5%、0.1%~3%、0.1%~2.5%、0.1%~2%、0.1%~1.5%、0.1%~1%、0.1%~0.5%、0.5%~3%、0.5%~2.5%、0.5%~2%、0.5%~1.5%、0.5%~1%、1%~3%、1%~2.5%、1%~2%、1%~1.5%、1.5%~3%、1.5%~2.5%、1.5%~2%、2%~3%、2%~2.5%または2.5%~3%の含水率を有する。

10

【 0 0 9 5 】

[0095] 本明細書では、本明細書に開示した方法のいずれかによって微生物細胞から入手できる微生物油が開示される。一部の実施形態では、油は、少なくとも30重量（または容積）%のアラキドン酸を含む。一部の実施形態では、油は、少なくとも30重量（または容積）%のドコサヘキサエン酸を含む。

【 0 0 9 6 】

[0096] アニシジン値（AV）は、AOC S 公式法 Cd 18 - 90 にしたがって決定される。1つの実施形態では、本明細書に記載した油は、約50未満；約40未満；約30未満；約20未満；約15未満または約10未満のAVを有する。一部の実施形態では、油は、約50未満のAVを有する。用語の「アニシジン値」は、例えば油の酸化中に発生するアルデヒドおよびケトンなどの二次反応産物の尺度を意味する。

20

【 0 0 9 7 】

[0097] ペルオキシド値（PV）は、AOC S 公式法 Cd 8 - 53 にしたがって決定される。1つの実施形態では、本明細書に記載した油は、約20 meq / kg 未満；約10 meq / kg 未満または約5 meq / kg 未満のPVを有する。一部の実施形態では、油は、約5 meq / kg 未満のPVを有する。用語の「ペルオキシド値」は、油の酸化中に発生する、例えばペルオキシドおよびヒドロペルオキシドなどの一次反応産物の尺度を意味する。本明細書で使用するペルオキシド値は、meq / kg で測定される。

30

【 0 0 9 8 】

[0098] 一部の実施形態では、油は、100 ppm 以下、95 ppm 以下、90 ppm 以下、85 ppm 以下、80 ppm 以下、75 ppm 以下、70 ppm 以下、65 ppm 以下、60 ppm 以下、55 ppm 以下、50 ppm 以下、45 ppm 以下、40 ppm 以下、35 ppm 以下、30 ppm 以下、25 ppm 以下、20 ppm 以下、15 ppm 以下、10 ppm 以下、9 ppm 以下、8 ppm 以下、7 ppm 以下、6 ppm 以下、5 ppm 以下、4 ppm 以下、3 ppm 以下、2 ppm 以下または1 ppm 以下のリン含量を有する。一部の実施形態では、油は、8 ppm 以下のリン含量を有する。

【 0 0 9 9 】

[0099] 一部の実施形態では、油は、1種以上のPUFAを含む。一部の実施形態では、油は、（PUFAの重量で）少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%または少なくとも80%のPUFAを含む。一部の実施形態では、油は、（DHAの重量で）少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%または少なくとも80%のDHAを含む、および/または（DPA n - 6の重量で）少なくとも10%、少なくとも15%または少なくとも20%のDPA n - 6、および/または（EPAの重量で）少なくとも10%、少なくとも15%

40

50

または少なくとも20%のEPA、および/または(ARAの重量で)少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%のARAを含む。一部の実施形態では、油は、(EPAの重量で)50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、15%未満、10%未満または5%未満のEPAを含む。一部の実施形態では、油は、(DHAの重量で)50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、15%未満、10%未満または5%未満のDHAを含む。一部の実施形態では、油は、重量(または容積)で10%未満、5%未満、2%未満、1%未満または0.5%未満のステロールを含む。

10

【0100】

[0100]一部の実施形態では、油は、重量(または容積)で少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または50%~95%、50%~90%、50%~85%、50%~80%、50%~75%、60%~95%、60%~90%、60%~85%、70%~95%、70%~90%、70%~85%、75%~95%、75%~90%または75%~85%のトリグリセリドを含む。

【0101】

[0101]一部の実施形態では、トリグリセリドは、重量(または容積)で少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%または少なくとも80%のDHAを含む。一部の実施形態では、トリグリセリドは、重量(または容積)で少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%のARAを含む。一部の実施形態では、トリグリセリドは、重量(または容積)で少なくとも50%、少なくとも40%、少なくとも30%、少なくとも20%、少なくとも15%、少なくとも10%または少なくとも5%のEPAを含む。

20

【0102】

[0102]1つの実施形態では、本明細書に記載した方法のいずれかによって入手および/または回収された微生物油は原油である。また別の実施形態では、本明細書に記載した油は精製油である。「原油」は、それ以上加工処理せずに微生物細胞から入手される油である。「精製油」は、精製する、漂白するおよび/または脱臭する標準的な加工処理を用いて原油を処理することによって入手される油である。例えば、米国特許第5,130,242号明細書を参照されたい。一部の実施形態では、精製する工程には、焼灼精製、ゴム除去、酸処理、アルカリ処理、冷却、加熱、漂白、脱臭、脱酸およびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。

30

【0103】

[0103]一部の実施形態では、本方法は、微生物細胞を含む発酵ブロス濃縮する工程を含む。一部の実施形態では、本方法は、溶解細胞組成物を濃縮する工程を含む。本明細書で使用する「濃縮する工程」は、組成物から水を除去する工程を意味する。濃縮する工程には、蒸発させる工程、化学的に乾燥する工程、遠心分離する工程などおよびそれらの組み合わせを含むことができるがそれらに限定されない。一部の実施形態では、細胞組成物または溶解細胞組成物は、溶解細胞組成物の重量(または容積)で少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%または少なくとも30%の油濃度を提供するために濃縮される。一部の実施形態では、細胞組成物または溶解細胞組成物は、溶解細胞組成物の重量(または容積)で4%~40%、4%~30%、4%~20%、4%~15%、5%~40%、5%~30%、5%~20%、10%~40%、10%~30%、10%~20%、15%~40%、15%~30%、20%~40%、20%~30%、25%~40%または30%~40%の油濃

40

50

縮物を提供するために濃縮される。

【0104】

[0104]本発明とともに使用するための微生物細胞にとって効果的な培養条件には、油生産を許容する効果的な培地、バイオリアクター、温度、pHおよび酸素条件が含まれるがそれらに限定されない。効果的な培地は、その中で微生物細胞、例えばスラウストキトリアレス(*Thraustochytriales*)目微生物細胞が培養される任意の培地を意味する。そのような培地は、典型的には、同化できる炭素、窒素およびリン酸塩基源ならびに適切な塩、鉱物、金属および他の栄養素、例えばビタミン類を有する水性培地を含んでいる。本発明とともに使用するための微生物細胞は、従来型発酵バイオリアクター、振とうフラスコ、試験管、マイクロタイター皿およびペトリ皿内で培養できる。

10

【0105】

[0105]一部の実施形態では、微生物細胞は、少なくとも30重量(または容積)%の油、少なくとも35重量(または容積)%の油、少なくとも40重量(または容積)%の油、少なくとも50重量(または容積)%の油、少なくとも60重量(または容積)%の油、少なくとも70重量(または容積)%の油または少なくとも80重量(または容積)%の油を含む。一部の実施形態では、本発明とともに使用するための微生物細胞は、少なくとも0.1グラム/L/時(g/L/時)のDHA、少なくとも0.2g/L/時のDHA、少なくとも0.3g/L/時のDHAまたは少なくとも0.4g/L/時のDHAを生成できる。一部の実施形態では、本発明とともに使用するための微生物細胞は、少なくとも0.01グラム/L/時(g/L/時)のARA、少なくとも0.05g/L/時のARA、少なくとも0.1g/L/時のARA、少なくとも0.2g/L/時のARA、少なくとも0.3g/L/時のARAまたは少なくとも0.4g/L/時のARAを生成できる。

20

【0106】

[0106]一部の実施形態では、本明細書に記載した方法のいずれかによって入手される油、消費されたバイオマスまたはそれらの組み合わせは、例えばベビーフード、人工栄養乳、飲料、ソース、乳製品を主原料とする食品(例えば、牛乳、ヨーグルト、チーズおよびアイスクリーム)、油(例えば、調理油またはサラダドレッシング)およびオープンで焼いた商品;栄養補助食品(例えば、カプセル形もしくは錠剤形);任意の非ヒト動物(例えば、それらの製品(例えば、肉、乳汁もしくは卵)がヒトによって消費される動物)用の飼料または飼料添加物;食品添加物;および医薬品(直接的または補助療法の用途において)などの食品または食品成分として直接的に使用できる。用語「動物」は、動物界に属するあらゆる生物を意味しており、それらから製品(例えば、乳汁、卵、家禽肉、牛肉、豚肉または羊肉)が由来する任意のヒト動物および非ヒト動物が含まれる。一部の実施形態では、油および/またはバイオマスは海産食品において使用できる。海産食品は、限定なく、魚、エビおよび貝類に由来する。用語「製品」には、限定なく、肉、卵、乳汁または他の製品を含むそのような動物に由来する任意の製品が含まれる。油および/またはバイオマスがそのような動物に与えられる場合、多価不飽和油は、これらの油中のそれらの含量を増加させるためにそのような動物の肉、乳汁、卵または他の製品に組み込むことができる。

30

40

【0107】

[実施例]

[実施例1]

[0107]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(300g)を60℃で1時間低温殺菌した。未洗浄細胞ブロスを180RPMの速度で攪拌し、60℃へ加熱した。細胞はブロスのpHを7~7.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液およびAlcalase(登録商標)2.4FG(*Novozymes*(ノースカロライナ州フランクリントン(*Franklinton*, NC)))から入手可能)をブロス重量に基づいて0.5%の量で添加する工程により溶解した。攪拌を維持しながら、溶解細胞組成物のpHは、98重量%のH₂SO₄溶液を添

50

加する工程によって4へ調整した。溶解細胞組成物の重量で2%の量の固体のNaClを添加し、この組成物を90へ加熱し、20時間保持した。50重量%のNaOH溶液を添加する工程によって組成物のpHを7.5~8.5へ調整し、その後原油を生じさせるために8000rpmで5分間遠心分離(Thermo Scientific Sorvell ST40R遠心機)すると、これは(DHAの重量で)91.7%のDHAを産生した。

【0108】

[実施例2]

[0108]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(300g)を60で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、細胞ブロスのpHを2に調整するために重量で20%のH₂SO₄溶液を添加し、その後このブロスを90へ加熱し、45時間保持することによって形成した。組成物のpHを7.5~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加し、その後に原油を生じさせるためにこの組成物を8000rpmで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)51.62%のDHAを産生した。

10

【0109】

[実施例3]

[0109]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(300g)を60で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、細胞ブロスのpHを2に調整するために、20重量%のH₂SO₄溶液、ブロスの重量で2%の量の固体NaClを添加する工程;およびブロスを90へ加熱して18時間保持する工程によって形成した。原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機で)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)38.82%のDHAを産生した。

20

【0110】

[実施例4]

[0110]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(300g)を60で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で2%の、98重量%のH₂SO₄溶液を添加し、ブロスを90で4時間加熱する工程によって形成した。組成物のpHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加し、90で21時間保持し、その後原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)72%のDHAを産生した。原油は、145のアニシジン値(AV)を有していた。

30

【0111】

[実施例5]

[0111]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(300g)を60で1時間低温殺菌した。未洗浄細胞ブロスを180RPMの速度で攪拌し、60へ加熱した。細胞はブロスのpHを7~7.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液およびAlcalase 2.4FG(Novozymes(ノースカロライナ州フランクリントン))をブロス重量に基づいて0.5%の量で添加する工程により溶解した。攪拌を維持しながら、溶解細胞組成物のpHは、98重量%のH₂SO₄溶液を添加する工程、およびその後組成物を90へ加熱する工程によって4へ調整した。90で45時間放置した後、原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離すると(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)、これは(DHAの重量で)81%のDHAを産生した

40

50

。原油は、14.5のAVを有している。

【0112】

[実施例6]

[0112]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(300g)を60℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で2.5%の、98重量%の H_2SO_4 溶液を添加する工程、およびその後ブロスを90℃へ5時間加熱する工程によって形成した。組成物のpHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加し、90℃で数時間保持した後、その後原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)92.5%のDHAを産生した。

10

【0113】

[実施例7]

[0113]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(350g)を60℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で2%の、98重量%の H_2SO_4 溶液を添加する工程、およびその後ブロスを90℃へ5~6時間加熱する工程によって形成した。組成物のpHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加し、90℃で数時間保持した後、その後原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)82.63%のDHAを産生した。

20

【0114】

[実施例8]

[0114]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(350g)を60℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で1%の、98重量%の H_2SO_4 溶液を添加する工程、およびその後ブロスを90℃へ5~10時間加熱する工程によって形成した。pHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加する工程、および原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)42%のDHAを産生した。

30

【0115】

[実施例9]

[0115]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(350g)を60℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で3%の、98重量%の H_2SO_4 溶液を添加する工程、およびその後ブロスを90℃へ1~5時間加熱する工程によって形成した。pHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加する工程、および原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)88%のDHAを産生した。

40

【0116】

[実施例10]

[0116]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(350g)を60℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で4%の、70重量%の硝酸溶液を添加する工程、およびその後ブロスを90℃へ1時間加熱する工程によって形成した。pHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加する工程、および原油を生じさせるためにこの組成物を

50

8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)82%のDHAを産生した。

【0117】

[実施例11]

[0117]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(350g)を60℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で2%の、70重量%の硝酸溶液を添加する工程、およびブロスを90℃へ5~6時間加熱する工程によって形成した。pHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加する工程、および原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)58.5%のDHAを産生した。

10

【0118】

[実施例12]

[0118]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(350g)を60℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で2.5%の、70重量%の硝酸溶液を添加する工程、およびブロスを90℃へ5時間加熱する工程によって形成した。pHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加し、90℃で数時間保持した後、その後に原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)74%のDHAを産生した。

20

【0119】

[実施例13]

[0119]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(350g)を60℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で4%のリン酸を添加する工程、およびブロスを90℃へ5時間加熱する工程によって形成した。組成物のpHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加し、90℃で数時間保持した後、その後に原油を回収するためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離した。この組成物の45gのサンプルは、1.0mLの原油を産生した。

30

【0120】

[実施例14]

[0120]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(350g)を60℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で8%のリン酸を添加する工程、およびブロスを90℃へ3時間加熱する工程によって形成した。組成物のpHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加し、90℃で数時間保持した後、その後に原油を回収するためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離した。この組成物の45gのサンプルは、0.5mLの原油を産生した。

40

【0121】

[実施例15]

[0121]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(2000L)を190rpmで攪拌する処理タンク内に配置した。解乳化溶解細胞組成物は、ブロスの重量で4%の、98重量%の H_2SO_4 溶液を添加する工程、およびブロスを90~95℃へ1時間加熱することによって形成した。組成物を75℃へ冷却し、pHを7~8.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液を添加し

50

、組成物を一晚混合し、原油を生じさせるために1754RPM、8L/分で組成物をインラインで遠心分離する工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、(DHAの重量で)93%のDHAおよび0.69meqのペルオキシド値(PV)、23.9のAVおよび1.04の遊離脂肪酸(FFA)含量を備える原油が産生した。

【0122】

[実施例16]

[0122]微生物細胞(シゾキトリウム種(*Schizochytrium* sp.))を含有する細胞ブロス(550L)を193rpmで攪拌する処理タンク内に配置した。細胞ブロスを60℃へ加熱し、50重量%のNaOH溶液を添加する工程によってpHを7.3~7.5に調整し、アルカラーゼをブロスの重量で0.5%の量で添加した。2時間後、98重量%のH₂SO₄溶液を添加する工程によって溶解細胞組成物のpHを4に調整し、攪拌を維持しながら90℃へ加熱した。90℃で20時間後、組成物を75℃へ冷却し、50重量%のNaOH溶液を添加する工程によってpHを8.5へ調整し、組成物を一晚保持し、原油を生じさせるために1754RPM、8L/分で組成物をインラインで遠心分離する工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、(DHAの重量で)84%のDHAおよび0meqのPV、7.3のAVならびに0.17のFFA含量を備える原油が産生した。

10

【0123】

[実施例17]

[0123]微生物細胞(モルティエレラ(*Mortierella*)属)を含有する細胞ブロス(2500~3000L)は、沈着させるために数時間にわたりデカンテーションタンク内に配置した。沈着したら、バイオマス無含有液体の50~60%を廃棄するためにポンプ作用で排出した。濃縮未洗浄低温殺菌細胞ブロスは、その後に処理タンクとインライン関係にある高剪断ミキサー(60HzでSiemens ULTRA-Turrax UTL 1000/10)に通して通過させた。解乳化溶解細胞組成物は、pHを0.9~1.5に調整するために、ブロスの重量で3%の、98重量%のH₂SO₄溶液を添加する工程によって形成し、脱イオン水中のブロスの10mL希釈液中の1mLが25μm以下の粒径を生じさせるまで94℃へ20~24時間加熱した。解乳化溶解細胞組成物は、固形含量10%(OmniMark Uwave湿度計を用いて生成した数字)へ脱酸素水を用いて希釈し、水の添加が85%未満への温度低下を引き起こした場合は85℃へ再加熱した。微生物油は、組成物を30分間混合しながら、またはサンプルの遠心分離がエマルジョン相の完全な非存在を証明するまでpHを7.8~8.2へ調整するために50%のNaOH溶液を添加することにより、および原油を回収するために1750RPMおよび7L/分の流量で7~10時間にわたりインラインで遠心分離(Seital SR1010)することにより解乳化溶解細胞組成物から分離した。

20

30

【0124】

[0124]細胞ブロスの3つの個別バッチには、各々独立して上記の方法を受けさせた。

バッチ1の原油は、86.6%のARA(ARAの重量で)ならびに26.1のAVおよび0.39meqのPVを備える乾燥濾過原油を産生した。

バッチ2の原油は、87.6%のARA(ARAの重量で)ならびに14のAVおよび0.31meqのPVを備える乾燥濾過原油を産生した。

40

バッチ3の原油は、85%のARA(ARAの重量で)ならびに24.7のAVおよび0.51meqのPVを備える乾燥濾過原油を産生した。

【0125】

[実施例18]

[0125]微生物細胞(モルティエレラ(*Mortierella*)属)を含有する細胞ブロス(1000mL)を70℃で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、pHを0.7~1.0のpHに調整するためにブロスの重量で4%の硝酸(70%溶液)を添加する工程、および200rpmの速度で30時間攪拌しながらブロスを90℃へ加熱する工程によって形成した。pHを8.0~8.2へ調整するためにNaOHの50重量/重

50

量%溶液を添加し、その後に原油を生じさせるためにこの組成物を8,000gで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell 40R)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(ARAの重量で)74.13%のARAおよび27.9のAVを備える原油を産生した。

【0126】

[実施例19]

[0126]微生物細胞(モルティエレラ(Mortierella)属)を含有する細胞ブロス(1000mL)を70で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、pHを0.7~1.5のpHに調整するためにブロスの重量で15%のリン酸(85%溶液)を添加する工程、および200rpmの速度で50時間攪拌しながら組成物を90へ加熱する工程によって形成した。pHを8.0~8.2へ調整するために50重量/重量%のNaOH溶液を添加する工程、およびその後に原油を生じさせるためにこの組成物を8,000gで(5分間遠心分離するThermo Scientific製Sorvell 40R)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(ARAの重量で)42.61%のARAを産生した。原油は、16.1のAVを有していた。

10

【0127】

[実施例20]

[0127]微生物細胞(モルティエレラ(Mortierella)属)を含有する細胞ブロス(1000mL)を70で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、pHを0.7~1.5のpHに調整するためにブロスの重量で6%の塩酸(32%溶液)を添加する工程、および200rpmの速度で50時間攪拌しながらブロスを90へ加熱することによって形成した。pHを8.0~8.2へ調整するために50重量/重量%のNaOH溶液を添加し、その後に原油を生じさせるためにこの組成物を8,000gで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell 40R)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(ARAの重量で)72.61%のARAを産生した。原油は、11.1のAVを有していた。

20

【0128】

[実施例21]

[0128]微生物細胞(シゾキトリウム種(Schizochytrium sp.))を含有する細胞ブロス(300g)を60で1時間低温殺菌した。解乳化溶解細胞組成物は、pHを11へ調整するために12.5重量%のNaOH溶液を細胞ブロスに添加する工程、ブロスの重量で2%のNaClを添加する工程、および組成物を90へ加熱する工程によって形成した。90で25時間置いた後、原油を生じさせるためにこの組成物を8000RPMで5分間遠心分離する(Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは(DHAの重量で)71%のDHAを産生した。

30

【0129】

[実施例22]

[0129]微生物細胞(モルティエレラ(Mortierella)属)を含有する未洗浄細胞ブロスは、70で1時間低温殺菌し、その後に処理タンクとインライン関係にある高剪断ミキサー(Siemens ULTRA-Turrax UTL 1000/10(60Hzで))に通して通過させた。解乳化溶解細胞組成物は、pHを.07~1.5に調整するために、ブロスの重量で3.5%の、98%硫酸溶液を添加する工程;90へ加熱する工程;および200rpmの速度で攪拌しながら28時間保持する工程によって形成した。50%のNaOHおよび組成物の重量で2%のNaClを添加する工程によって組成物を中和してpHを8.0へ調整し、原油を生じさせるために組成物を遠心分離する(Seital SR1010)工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは77.4%のARA(ARAの重量で)ならびに12.4のAV、2.27%のFFA含量および0.13meqのPVを備える原油を産生した。

40

【0130】

50

[実施例 2 3]

[0130]微生物細胞（クリプトコディニウム・コーニイ（*Cryptothecodinium cohnii*））を含有する洗浄細胞ブロス（750g）を60℃で1時間低温殺菌した。細胞は、細胞ブロスをホモジナイザー（Microfluidizer M110）に12,000PSIで2回通過させることによって機械的に溶解した。溶解細胞組成物は、丸底フラスコ内に配置し、重組成物の量で4%の硫酸（98%純粋）溶液を添加する工程によって解乳化し、200RPMで撹拌しながら90℃へ加熱し、28時間保持した。50%のNaOH溶液を添加する工程によって組成物を中和してpHを8.0へ調整し、その後原油を生じさせるためにこの組成物を8000gで5分間遠心分離する（Thermo Scientific製Sorvell 40R）工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは（DHAの重量で）（FAME分析に基づく）45%のDHAならびに12.35のAVおよび1.09meqのPVを備える原油を産生した。

10

【0131】

[実施例 2 4]

[0131]微生物細胞（シゾキトリウム種（*Schizochytrium* sp.））を含有する未洗浄細胞ブロス（750g）は60℃で1時間低温殺菌し、250RPMで撹拌する1Lのフラスコ内に配置した。温度は、粘度が原因で長くなる混合時間を短縮させるために60℃へ上昇させた。解乳化溶解細胞組成物は、pHを12.62に調整するために、ブロスの重量で4%の、50%のNaOHを添加する工程；90℃へ加熱する工程；およびpHが7.75へ低下するまで26時間にわたり反応させる工程によって形成した。微生物油は、原油を生じさせるためにこの組成物を（Thermo Scientific製Sorvell 40R遠心機で）8000gで5分間遠心分離する工程によって解乳化溶解細胞組成物から分離すると、これは（DHAの重量で）88%のDHAを産生した。

20

【0132】

[実施例 2 5]

[0132]微生物細胞（シゾキトリウム種（*Schizochytrium* sp.））を含有する未洗浄細胞ブロス（750g）は60℃で1時間低温殺菌し、250RPMで撹拌する1Lのフラスコ内に配置した。温度は、粘度が原因で長くなる混合時間を短縮させるために60℃へ上昇させた。解乳化溶解細胞組成物は、pHを12.93に調整するために、ブロスの重量で4%の、50%のNaOHを添加する工程；90℃へ加熱する工程；およびpHが7.95へ低下するまで26時間にわたり反応させる工程によって形成した。原油を生じさせるためにこの組成物を8000gで5分間遠心分離する（Thermo Scientific製Sorvell ST）工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは（DHAの重量で）（FAME分析に基づく）82.5%のDHAを産生した。

30

【0133】

[実施例 2 6]

[0133]微生物細胞（シゾキトリウム種（*Schizochytrium* sp.））を含有する未洗浄細胞ブロス（750g）は60℃で1時間低温殺菌し、250RPMで撹拌する1Lのフラスコ内に配置した。温度は、粘度が原因で長くなる混合時間を短縮させるために60℃へ上昇させ、pHは7.5へ上昇した。解乳化溶解細胞組成物は、pHを12.28に調整するために、ブロスの重量で3.5%の、50%のNaOH溶液を添加する工程；90℃へ加熱する工程；およびpHが7.88へ低下するまで32時間にわたり反応させる工程によって形成した。原油を生じさせるためにこの組成物を8000gで5分間遠心分離する（Thermo Scientific製Sorvell 40R遠心機）工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは（DHAの重量で）（FAME分析に基づく）88%のDHAを産生した。

40

【0134】

50

[実施例 27]

[0134]微生物細胞（シゾキトリウム種（*Schizochytrium* sp.））を含有する未洗浄細胞ブロス（750 g）は60 で1時間低温殺菌し、250 RPMで攪拌する1 Lのフラスコ内に配置した。温度は、粘度が原因で長くなる混合時間を短縮させるために60 へ上昇させた。解乳化溶解細胞組成物は、pHを12.87に調整するために、ブロスの重量で4.0%の、50%のNaOH溶液を添加する工程；90 へ加熱する工程；およびpHが8.15へ低下するまで36時間にわたり反応させる工程によって形成した。原油を生じさせるためにこの組成物を8000 gで（Thermo Scientific製Sorvell 40R遠心機）5分間遠心分離する工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは（DHAの重量で）（FAME分析に基づく）84%のDHAを産生した。

10

【0135】

[比較例 1]

[0135]微生物細胞（シゾキトリウム種（*Schizochytrium* sp.））を含有する細胞ブロス（300 g）を60 で1時間低温殺菌した。未洗浄細胞ブロスを180 RPMの速度で攪拌し、60 へ加熱した。細胞は、pHを7~7.5へ調整するために50重量%のNaOH溶液およびブロス重量に基づいて0.5%の量でAlcalase（登録商標）2.4 FG（Novozymes（ノースカロライナ州フランクリントンから入手可能）を添加する工程により溶解した。攪拌を維持しながら、溶解細胞組成物はpHを10~11に調整するために12.5重量%のNaOH溶液および組成物の重量で2%の量のCaCl₂を同時に添加する工程、およびその後に組成物を90 へ加熱して68時間にわたり保持する工程によって解乳化した。原油を生じさせるためにこの組成物を8000 RPMで5分間遠心分離する（Thermo Scientific製Sorvell ST40R遠心機）工程によって解乳化溶解細胞組成物から微生物油を分離すると、これは（DHAの重量で）62.5%のDHAおよび43.8のAVを備える原油を産生した。

20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. **1470/1459-13-03**
PCT/US 14/71459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/20, A23D 7/00, C11B 3/00, A23D 9/00 (2015.01) CPC - A61K 31/20, A23D 9/007, C11B 3/16, C12P 7/6472 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) IPC(8): A61K 31/20, A23D 7/00, C11B 3/00, A23D 9/00 (2015.01) CPC: A61K 31/20, A23D 9/007, C11B 3/16, C12P 7/6472 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8): C11B 1/10, B01D 17/04 (2015.01) CPC: C11B 3/003, C11B 3/006, B01D 17/04 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Google patents, Google scholar, Google web, PatBase, Proquest Dialog obtain/extract/recover; microbe/algae/fungus/bacteria/yeast; oil/lipid/triglyceride/polyunsaturated fatty acid/PUFA/essential fatty acid; lysing/rupture/break/digest/degrade; membrane/wall; demulsify; pH; combine/together; low/decrease/reduce; increase/enhance		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/153246 A2 (CHERINKO et al.) 8 December 2011 (08.12.2011) para [0008]; para [0031]; para [0032]; para [0011]; para [0332]; para [0161]; para [0012]; para [0007]; para [0210]; para [0119]; para [0017]	43-46 1-3
Y	US 2010/0227042 A1 (PENET et al.) 9 September 2010 (09.09.2010) Abstract; para [0008]; para [0001]; para [0079]	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 03 March 2015 (03.03.2015)		Date of mailing of the international search report 19 MAR 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. **14/071459**
 PCT/US 14/71459

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-42
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(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 タバイエーンジャド, ナスリーン
アメリカ合衆国, ケンタッキー州, レキシントン, オーチャード グラス ロード 3 2 4
0

(72)発明者 シャンク, ジンジャー
アメリカ合衆国, ケンタッキー州, ウィンチェスター, ウェスト ヒックマン ストリート
2 7

(72)発明者 レイニンガー, ニール フランシス
アメリカ合衆国, ケンタッキー州, ウィンチェスター, サンドルウッド ポワント 2 0 8

(72)発明者 マシューズ, シニア, カート リヴェル
アメリカ合衆国, サウス カロライナ州, フォート ミル, イースト シェヴァル ドライ
ヴ 6 3 1

F ターム(参考) 4B064 AD88 AD90 CA06 CA08 CA09 CC21 CC30 DA10 DA16
4B065 AA86X AC14 CA13 CA41 CA54