

(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2014-510166

(P2014-510166A)

(43) 公表日 平成26年4月24日 (2014. 4. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 1 B 3/12 (2006.01)	C 1 1 B 3/12	4 B O 2 4
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P 7/64 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 P 7/64	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 H O 5 9
C 1 2 R 1/645 (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 41 頁) 最終頁に続く		

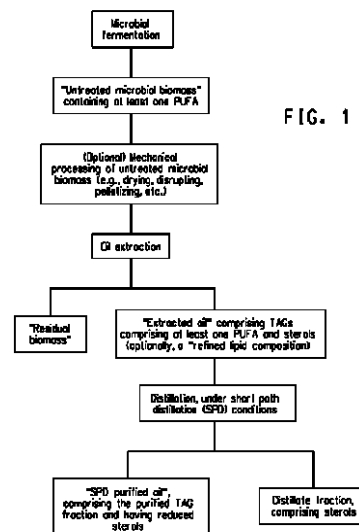
(21) 出願番号 特願2013-553603 (P2013-553603)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月10日 (2012. 2. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年9月17日 (2013. 9. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/024687
 (87) 国際公開番号 W02012/109563
 (87) 国際公開日 平成24年8月16日 (2012. 8. 16)
 (31) 優先権主張番号 61/441, 842
 (32) 優先日 平成23年2月11日 (2011. 2. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 390023674
 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・
 アンド・カンパニー
 E. I. DU PONT DE NEMO
 URS AND COMPANY
 アメリカ合衆国、デラウェア州、ウィルミ
 ントン、マーケット・ストリート 100
 7
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 シュウ・チエン・リヤーン
 アメリカ合衆国デラウェア州19711.
 ニューアーク、ポイントアベニュー4
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 短行程蒸留を使用する微生物源からのトリグリセリド油の精製

(57) 【要約】

ステロール含有微生物油組成物中のステロールの量を低減させる方法であって、短行程蒸留下で、ステロール含有微生物油を蒸留することを含み、前記蒸留は、ステロールを含む蒸留物画分および短行程蒸留に供されていないステロール含有微生物油組成物中のステロールの量と比較して低減した量のステロールを有するトリアシルグリセロール含有画分を生成する方法が開示される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ステロール含有微生物油組成物中のステロールの量を低減させる方法であって、

a) 短行程蒸留条件下で、ステロール含有微生物油を少なくとも 1 回蒸留することであって、前記油は、

(i) 1 つ以上の多価不飽和脂肪酸を含むトリアシルグリセロール；および、

(ii) 少なくとも 300 mg / 油 100 g のステロール画分；

を含み、

前記蒸留は、前記ステロールを含む蒸留物画分および短行程蒸留に供されていない前記ステロール含有微生物油組成物中のステロールの量と比較して低減した量のステロールを有するトリアシルグリセロール含有画分を生成すること；および

10

b) 場合により、前記トリアシルグリセロール含有画分を回収することを含む方法。

【請求項 2】

前記短行程蒸留条件が、30 m Torr 以下の真空レベルおよび 300 以下の温度におけるステロール含有微生物油の少なくとも 1 回の通過を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ステロール画分が、スチグマステロール、エルゴステロール、ブラシカステロール、カンベステロール、 Δ^5 -シトステロールおよびデスモステロールからなる群から選択される 1 つ以上のステロールを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記ステロール画分が、エルゴステロールを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記トリアシルグリセロール含有画分中のステロールの量の低減が、前記ステロール含有微生物油組成物中のステロールの量と比較して少なくとも 40 % である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

低減したステロール画分を有する前記トリアシルグリセロール含有画分が、短行程蒸留に供されていない前記ステロール含有微生物油組成物と比較して改善された澄清性を有する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記温度が、280 以下である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ステロール含有微生物油組成物が、誘導結合プラズマ発光分光法により測定して 20 ppm 未満のリンを有するリファインド脂質組成物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ステロール含有微生物油組成物を、酵母、藻類、ユーグレナ類、ストラメノパイル菌類、またはそれらの混合物から得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ステロール含有微生物油組成物を、モルティエレラ (Mortierella)、ヤブレツボカビ (Thraustochytrium)、シゾキトリウム (Schizochytrium)、ヤロウィア (Yarrowia)、カンジダ (Candida)、ロドトルラ (Rhodotorula)、ロドスポリジウム (Rhodosporidium)、クリプトコッカス (Cryptococcus)、トリコスポロン (Trichosporon)、およびリボマイセス (Lipomyces) からなる群から選択される属からの油性微生物から得る、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記ステロール含有微生物油組成物を、組換えヤロウィア (Yarrowia) 細胞の微生物バイオマスから得る、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

50

前記組換えヤロウィア (Yarrowia) 細胞が、リノール酸、 α -リノレン酸、エイコサジエン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、ドコサテトラエン酸、 α -6ドコサペンタエン酸、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサトリエン酸、エイコサテトラエン酸、 α -3ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸の生成について遺伝子操作されている、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記蒸留が、前記微生物油組成物の2回以上の連続短行程蒸留を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

それぞれの連続短行程蒸留が、直前の短行程蒸留よりも高い温度におけるものである、請求項13に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、参照により全体として本明細書に組み込まれる2011年2月11日に出願された米国仮特許出願第61/441,842号明細書の利益を主張する。

【0002】

本発明は、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を含有する脂質の精製を対象とする。短行程蒸留 (SPD) を使用して、特に、トリアシルグリセロールが濃縮され、少なくとも1つのPUFAを含む微生物油組成物から不所望なステロール (例えば、エルゴステロール) の量を低減させる方法が提供される。

【背景技術】

【0003】

微生物、例えば糸状菌、酵母および藻類は、脂肪酸、グリセロ脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、サッカロ脂質、ポリケチド、ステロール脂質およびプレノール脂質を含む種々の脂質を生成する。これらの脂質の一部を、脂質が生成される微生物細胞から抽出することが有利であり、したがって種々の方法が実施されている。

【0004】

微生物から一般に抽出される脂質の1つのクラスは、グリセロールの脂肪酸エステル (「トリアシルグリセロール」または「TAG」) を含むグリセロ脂質である。TAGは、脂肪酸についての一次貯蔵単位であり、したがって長鎖多価不飽和脂肪酸 (PUFA)、ならびに短鎖飽和および不飽和脂肪酸および長鎖飽和脂肪酸を含有し得る。PUFA、例えばエイコサペンタエン酸 [「EPA」; α -3] およびドコサヘキサエン酸 [「DHA」; α -3] を医薬品および食品に含めることへの関心が高まっている。したがって、PUFAを含む脂質組成物を効率的におよびコスト効率的に抽出、リファインおよび精製する手段が、特に望まれる。

【0005】

多くの典型的な脂質単離手順は、微生物細胞の破碎 (例えば、機械的、酵素的または化学的手段を介する)、後続の有機または低公害溶媒を使用する油抽出を含む。破碎プロセスは微生物細胞から細胞内脂質を放出させ、それらを抽出の間に溶媒に容易に接近可能とする。抽出後、溶媒を典型的には除去する (例えば、蒸発により、例えば、真空の適用、温度または圧力の変化などによる)。

【0006】

得られる抽出油は、脂肪体中に蓄積する親油性構成成分が濃縮される。一般に、脂肪体の主要な構成要素は、TAG、エルゴステロールエステル、他のステロールエステル、遊離エルゴステロールおよびリン脂質からなる。脂肪体中に存在するPUFAは、主にTAG、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロールおよびリン脂質の構成成分としてであるが、遊離脂肪酸の形態でもあり得る。続いて、抽出油をリファインして高度に精製されたPUFA濃縮TAG画分を生成することができる。精製TAG画分に関する最終規格

10

20

30

40

50

は、用途依存的であり得、例えば、油を添加剤または補助品（例えば、食料組成物、特殊調製粉乳、動物飼料などにおけるもの）として、化粧または医薬組成物などにおいて使用すべきか否かに依存する。許容可能な汚染物質基準は、自ら課す（特定の汚染物質は、不所望な特性、例えばかすみ／混濁、臭気をもたらす）かまたは外部栄養物審議会（例えば、A Voluntary Monograph Of The Council for Responsible Nutrition (Washington, D.C.) , March 2006は、- 3 EPA、- 3 DHAおよびそれらの混合物についての最大の酸、ペルオキシド、アニシジン、TOTOX、ポリ塩化ジベンゾ - パラ - ジオキシンおよびポリ塩化ジベンゾフランの値を規定する）により決定される。

【0007】

10

特許文献1 (GIST - Brocades) は、PUFAを含む微生物油（例えば、モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) からのもの）を極性溶媒により処理して溶媒中に可溶性である少なくとも1つのステロール（例えば、デスモステロール）を抽出し、次いでステロールを含有する溶媒の少なくとも一部を油から分離し、油は、1.5%未満のステロール含有率を有する方法を記載している。

【0008】

特許文献2 (Martek) は、微生物バイオマス（例えば、シゾキトリウム (Schizochytrium)）からPUFAを含む中性脂肪を回収する方法であって、バイオマスを非極性溶媒と接触させて抽出プロセスにおいて脂質を回収する工程、脂質組成物をリファインおよび／または漂白および／または脱臭する工程、極性溶媒を脂質組成物に添加する工程、混合物を冷却して少なくとも1つの他の化合物（例えば、三飽和グリセリド、リン含有材料、ワックスエステル、飽和脂肪酸含有ステロールエステル、ステロール、スクアレン、炭化水素）を選択的に沈殿させ、次いで脂質組成物からこの不所望な化合物の量を低減させる工程を含む方法を記載している。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許第6,166,230号明細書

【特許文献2】米国特許第7,695,626号明細書

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従来の方法は、PUFA、具体的には高度不飽和脂肪酸の高温への曝露を回避し、微生物油からエルゴステロール（エルゴスタ - 5, 7, 22 - トリエン - 3 - オール；CAS登録番号57-87-4）汚染物質の量を低減させる有効な手段として短行程蒸留の技術を利用しなかった。

【課題を解決するための手段】

【0011】

第1の実施形態において、本発明は、ステロール含有微生物油組成物中のステロールの量を低減させる方法であって、

40

a) 短行程蒸留条件下で、ステロール含有微生物油を少なくとも1回蒸留すること（前記油は、

(i) 1つ以上の多価不飽和脂肪酸を含むトリアシルグリセロール；および、

(ii) 少なくとも300mg / 油100gのステロール画分；

を含み、

前記蒸留は、ステロールを含む蒸留物画分および短行程蒸留に供されていないステロール含有微生物油組成物中のステロールの量と比較して低減した量のステロールを有するトリアシルグリセロール含有画分を生成する）；および

b) 場合により、トリアシルグリセロール含有画分を回収することを含む方法に関する。

50

【 0 0 1 2 】

第 2 の実施形態において、短行程蒸留条件は、30 mTorr 以下の真空レベルおよび 300 以下の温度におけるステロール含有微生物油の少なくとも 1 回の通過を含む。

【 0 0 1 3 】

第 3 の実施形態において、ステロール画分は、スチグマステロール、エルゴステロール、ブラシカステロール、カンペステロール、 Δ^5 -シトステロールおよびデスモステロールからなる群から選択される 1 つ以上のステロールを含む。

【 0 0 1 4 】

第 4 の実施形態において、トリアシルグリセロール含有画分中のステロールの量の低減は、ステロール含有微生物油組成物中のステロールの量と比較して少なくとも 40 % である。好ましくは、トリアシルグリセロール含有画分中のステロールの量の低減は、ステロール含有微生物油組成物中のステロールの量と比較して少なくとも 70 % であり、より好ましくは、少なくとも 80 % である。

10

【 0 0 1 5 】

第 5 の実施形態において、低減したステロール画分を有するトリアシルグリセロール含有画分は、短行程蒸留に供されていないステロール含有微生物油組成物と比較して改善された澄明性を有する。

【 0 0 1 6 】

第 6 の実施形態において、ステロール含有微生物油組成物は、酵母、藻類、ユーグレナ類、ストラメノパイル、菌類、またはそれらの混合物から得る。好ましくは、ステロール含有微生物油組成物は、モルティエレラ (*Mortierella*)、ヤブレツボカビ (*Thraustochytrium*)、シゾキトリウム (*Schizochytrium*)、ヤロウシア (*Yarrowia*)、カンジダ (*Candida*)、ロドトルラ (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、トリコスポロン (*Trichosporon*)、およびリボマイセス (*Lipomyces*) からなる群から選択される属からの油性微生物から得、より好ましくは、ステロール含有微生物油組成物は、多価不飽和脂肪酸の生成について遺伝子操作された組換えヤロウシア (*Yarrowia*) 細胞の微生物バイオマスから得る。

20

【 0 0 1 7 】

第 7 の実施形態において、蒸留工程は、微生物油組成物の 2 回以上の連続短行程蒸留を含み得る。それぞれの連続短行程蒸留は、直前の短行程蒸留の温度よりも高い温度におけるものであり得る。

30

【 0 0 1 8 】

生物寄託

以下の生物材料は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 に寄託され、以下の名称、受託番号および寄託日を有する。

40

【 0 0 1 9 】

【 表 1 】

生物材料	受託番号	寄託日
ヤロウシア・リポリティカ (<i>Yarrowia lipolytica</i>) Y8412	ATCC PTA-10026	2009 年 5 月 14 日
ヤロウシア・リポリティカ (<i>Yarrowia lipolytica</i>) Y8259	ATCC PTA-10027	2009 年 5 月 14 日

【 0 0 2 0 】

上記列挙した生物学的材料は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペ

50

スト条約の条項に従って寄託された。列挙された寄託株は、指定の国際寄託機関で少なくとも30年間維持され、それを開示する特許の付与に際して公的に入手可能となる。寄託株の利用可能性は、政府の行為により付与された特許権を失墜させて主題発明を実施する認可とはみなされない。

【0021】

ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y9502は、米国特許出願公開第2010-0317072-A1号明細書に記載の方法論に従ってY・リポリティカ (Y. lipolytica) Y8412から誘導した。同様に、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y8672は、米国特許出願公開第2010-0317072-A1号明細書に記載の方法論に従ってY・リ

10

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の方法の概要をフローチャートの形態で提供する。具体的には、微生物発酵手順は未処理微生物バイオマスを生成し、それを場合により機械的に加工することができる。未処理微生物バイオマスの油抽出は、残留バイオマスおよび抽出油をもたらす。次いで、短行程蒸留 (SPD) 条件を使用する抽出油の蒸留が、精製トリアシルグリセリド (TAG) 画分 (すなわち、SPD精製微生物油) 中のステロールの量を低減させる。

【図2】以下の (A) pZKUM; および (B) pZKL3-9DP9N についてのプラスミドマップを提供する。

20

【0023】

以下の配列は、37 C. F. R. § 1.821-1.825 (「ヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列開示を含む特許出願の要件 - 配列規則 (Requirement s for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules)」) に従い、世界知的所有権機関 (World Intellectual Property Organization) (WIPO) 標準 ST.25 (1998) ならびに EPO および PCT の配列表要件 (規則 5.2 および 49.5 (a) の 2)、ならびに実施細則第 208 号 および 付属書 C) と一致する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データについて使用される記号および形式は、37 C. F. R. § 1.822 に記載の規則に従う。

30

【0024】

配列番号 1 ~ 8 は、表 1 に指定するとおり、遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム、タンパク質 (またはその一部)、またはプラスミドである。

【0025】

【表 2】

表 1. 核酸およびタンパク質配列番号のまとめ

説明	核酸配列番号	タンパク質配列番号
プラスミド pZKUM	1 (4313 bp)	--
プラスミド pZKL3-9DP9N	2 (13565 bp)	--
ユーグレナ・グラシリス(<i>Euglena gracilis</i>)に由来する合成突然変異体 δ-9 エロンガーゼ(「EgD9eS-L35G」)	3 (777 bp)	4 (258 AA)
ヤロウィア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>)δ-9 デサチュラーゼ遺伝子(GenBank 受託番号 XM_501496)	5 (1449 bp)	6 (482 AA)
ヤロウィア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>) コリンリン酸シチジリルトランスフェラーゼ遺伝子(GenBank 受託番号 XM_502978)	7 (1101 bp)	8 (366 AA)

10

【発明を実施するための形態】

【0026】

本明細書に引用される全ての特許および非特許文献の開示は、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

20

【0027】

量、濃度、または他の値もしくはパラメーターが範囲、好ましい範囲、または好ましい上方値および好ましい下方値の列挙として挙げられる場合、これは、範囲が個別に開示されているかどうかに関わらず、任意の範囲上限または好ましい上方値と、任意の範囲下限または好ましい下方値との任意のペアから形成される全ての範囲を具体的に開示していると理解されるべきである。本明細書において数値の範囲が引用されている場合、特に記載のない限り、この範囲は、その終点、および範囲内の全ての整数および分数を含むことが意図される。本発明の範囲が、範囲を定義する場合において規定の値に限定されることは意図されない。

【0028】

30

本明細書において使用される用語「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (has)」、「有する (having)」、「含有する (contains)」もしくは「含有する (containing)」、またはその任意の他の変形は、非排他的包含をカバーするものと意図される。例えば、要素の列挙を含む組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置は、それらの要素のみに必ずしも限定されるものではなく、表現的に列挙されていないかまたはそのような組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置に固有の他の要素を含み得る。さらに、表現的に逆の記載がない限り、「または」は、包含的なまたはを指すかまたは排他的なまたはを指さない。例えば、条件 A または B は、以下のいずれか 1 つにより充足される：A は真であり（または存在し）、B は偽である（または存在しない）、A は偽であり（または存在せず）、B は真である（または存在する）、ならびに A および B は真である（または存在する）。

40

【0029】

また、本発明の要素または構成成分に先行する不定冠詞「a」および「an」は、要素または構成成分の例の数（すなわち、出現率）に関して非限定的であると意図される。したがって、「a」または「an」は、1 つまたは少なくとも 1 つを含めるように読まれるべきであり、要素または構成成分の単数形の単語形態は、数字が明らかに単数を意味しない限り複数形も含む。

【0030】

本明細書において使用される用語「発明」または「本発明」は、特許請求の範囲および

50

本明細書に記載の本発明の全ての態様および実施形態を指すことが意図され、いかなる特定の実施形態または態様にも限定されるものと読まれるべきではない。

【0031】

以下の定義を本開示において使用する：

「二酸化炭素」は「CO₂」と略す。

「American Type Culture Collection」は、「ATCC」と略す。

「多価不飽和脂肪酸」は、「PUFA」と略す。

「リン脂質」は、「PL」と略す。

「トリアシルグリセロール」は、「TAG」と略す。本明細書において、用語「トリアシルグリセロール」(TAG)は、用語「トリアシルグリセリド」と同義であり、グリセロール分子にエステル化された3つの脂肪酸アシル残基から構成される中性脂肪を指す。TAGは、長鎖PUFAおよび飽和脂肪酸、ならびに短鎖飽和および不飽和脂肪酸を含有し得る。

10

「遊離脂肪酸」は、「FFA」と略す。

「総脂肪酸」は、「TFA」と略す。

「脂肪酸メチルエステル」は、「FAME」と略す。

「乾燥セル重量」は、「DCW」と略す。

「ミリtorr」は、「mTorr」として略す。

【0032】

20

「低減した」という用語は、より小さい量、例えば、元の量よりもほんのわずかに少ない量を有し、または例えば量が規定材料中で完全に欠落すること、および中間の全ての量を含むことを意味する。

【0033】

本明細書において使用される用語「微生物バイオマス」は、PUFAを含むTAGを含む微生物発酵からの微生物細胞材料を指す。バイオマスは、全細胞、全細胞溶解物、ホモジナイズされた細胞、部分加水分解された細胞材料、および/または破砕細胞の形態であり得る。

【0034】

用語「未処理微生物バイオマス」は、溶媒による抽出前の微生物バイオマスを指す。場合により、未処理微生物バイオマスは、溶媒による抽出前に少なくとも1つの機械的プロセス(例えば、バイオマスの乾燥、バイオマスの破砕、またはそれらの組合せによる)に供することができる。

30

【0035】

本明細書において使用される用語「残留バイオマス」は、溶媒により少なくとも1回抽出された、PUFAを含むTAGを含む微生物発酵からの微生物細胞材料を指す。

【0036】

用語「脂質」は、任意の脂溶性(すなわち親油性)天然分子を指す。脂質は、多くの重要な生物学的機能を有する多様な群の化合物、例えば細胞膜の構造的構成成分、エネルギー保存源、およびシグナル伝達経路中間体である。脂質はケトアシルまたはイソプレンのいずれかに、完全にまたは部分的に由来する、疎水性または両親媒性の小分子として広く定義することができる。Lipid Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS) 分類体系(National Institute of General Medical Sciences, Bethesda, MD)に基づく脂質の一般的概要を以下の表2に示す。

40

【0037】

【表 3】

表2. 脂質クラスの概要

構造的構成単位	脂質カテゴリー	脂質クラスの例
ケトアシル下位 単位の縮合に 由来する	脂肪酸アシル	脂肪酸、エイコサノイド、脂肪酸エステルおよび脂肪酸アミドを含む
	グリセロ脂質	主に一置換、二置換、および三置換グリセロールを含み、最も周知なものはグリセロールの脂肪酸エステル（トリアシルグリセロール）である
	グリセロリン脂質 またはリン脂質	ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールおよびホスファチジン酸を含む
	スフィンゴ脂質	セラミド、ホスホスフィンゴ脂質（例えば、スフィンゴミエリン）、スフィンゴ糖脂質（例えば、ガングリオシド）、スフィンゴシン、セレブロシドを含む
	サッカロ脂質	アシルアミノ糖、アシルアミノ糖グリカン、アシルトレハロース、アシルトレハロースグリカンを含む
	ポリケチド	ハロゲン化アセトゲニン、ポリエン、直鎖テトラサイクリン、ポリエーテル抗生物質、フラボノイド、芳香族ポリケチドを含む
イソプレン下位 単位の縮合に 由来する	ステロール脂質	ステロール（例えば、コレステロール）、C18ステロイド（例えば、エストロゲン）、C19ステロイド（例えば、アンドロゲン）、C21ステロイド（例えば、プロゲステロン、糖質コルチコイドおよび鉱質コルチコイド）、セコステロイド、胆汁酸を含む
	プレノール脂質	イソプレノイド、カロテノイド、キノン、ヒドロキノン、ポリプレノール、ホパノイドを含む

10

20

30

40

50

【0038】

用語「ステロール含有微生物油組成物」は、25において液体であり、(i)少なくとも1つのステロール；および(ii)1つ以上のPUFAを含むトリアシルグリセリド(TAG)を含む脂質物質を指す。より具体的には、微生物バイオマスに由来するステロール含有微生物油組成物は、1つ以上のステロールを含む、少なくとも300mg/油100gのステロール画分を有する。

【0039】

細胞の膜透過性において機能するステロールは、全ての主要な群の生物から単離されているが、単離される優勢なステロールの多様性が存在する。高等動物における優勢なステロールは、コレステロールである一方、シトステロールは一般に高等植物において優勢なステロールである（しかし、カンベステロールおよびスチグマステロールを伴うことも多い）。微生物に見出される優勢なステロールに関する一般化は、より困難である。それというのも、組成が特定の微生物種に依存するためである。例えば、油性酵母ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)は、主に、エルゴステロールを含み、モルティエレラ(*Mortierella*)属の菌類は、主に、コレステロールおよびデスモステロールを含み、シゾキトリウム(*Schizochytrium*)属のストラメノパイルは、主に、ブラシカステロールおよびスチグマステロールを含む。ステロール含有微生物油中に見出されることが多いステロールのまとめを以下の表3に示し；対照的に、それらのステロールは、典型的には、魚油中に見出されない。表3のステロールは、ステロール含有微生物油中に存在する場合、高融点およびより低い貯蔵温度において低減した溶解度に起因して微生物油から沈殿する傾向があり、混濁油をもたらす。これらのステロールの濃度を低減させることにより微生物油の不所望な混濁性を最小化することが極めて望ましい。

【0040】

【表 4】

表 3. ステロール含有微生物油中のステロール

一般名	化学名	CAS 登録番号
スチグマステロール	スチグマス-5,22-ジエン-3-オール	83-48-7
エルゴステロール	エルゴスタ-5,7,22-トリエン-3 β -オール	474-67-9
ブラシカステロール	エルゴスタ-5,22-ジエン-3 β -オール	57-87-4
カンペステロール	(24R)-エルゴスト-5-エン-3 β -オール	474-62-4
β -シトステロール	スチグマスト-5-エン-3-オール、	83-46-5
デモステロール	コレスタ-5,24-ジエン-3 β -オール	313-04-2

10

【0041】

好ましいステロール含有微生物油は、1つ以上のステロールを含む、少なくとも300 mg / 油100 gのステロール画分を有する。

【0042】

ステロール含有微生物油組成物は、好ましくは、総脂質中約25%のPUFA、好ましくは、総脂質中少なくとも約30%のPUFA、より好ましくは、総脂質中少なくとも約35%のPUFA、より好ましくは、総脂質中少なくとも約40%のPUFA、より好ましくは、総脂質中少なくとも約40~45%のPUFA、より好ましくは、総脂質中少なくとも約45~50%のPUFA、より好ましくは、少なくとも約50~60%のPUFA、最も好ましくは、総脂質中少なくとも約60~70%のPUFAまたはそれ以上も含む。

20

【0043】

ステロール含有微生物油組成物は、典型的には微生物発酵により提供される微生物バイオマスに由来する。したがって、本発明において有用なステロール含有微生物油組成物は、水を含み得る。好ましくは、油は、10重量パーセント未満の含水率、より好ましくは、5重量パーセント未満の含水率、最も好ましくは、3重量パーセント以下の含水率を有する。

【0044】

油性生物において、油は総脂質の大部分を構成する。「油」は主としてトリアシルグリセロール(TAG)から構成されるが、他の中性脂肪、リン脂質(PL)および遊離脂肪酸(FFA)も含有し得る。油中の脂肪酸組成および総脂質の脂肪酸組成は、一般に類似しており；したがって総脂質中のPUFA濃度の増加または減少は、油中のPUFA濃度の増加または減少に対応し、逆もまた然りである。

30

【0045】

「中性脂肪」は、脂肪体の細胞中に貯蔵脂肪として一般に見出される脂質を指し、細胞のpHにおいて脂質は荷電基を担持しないため、そのように称される。一般にこれらは完全に非極性であり、水についての親和性を有さない。中性脂肪は、一般に脂肪酸とのグリセロールのモノ-、ジ-、および/またはトリエステルを指し、それぞれモノアシルグリセロール、ジアシルグリセロールもしくはトリアシルグリセロール(TAG)とも称され、または集合的にアシルグリセロールとも称される。アシルグリセロールからFFAを放出するためには、加水分解反応が起きなくてはならない。

40

【0046】

用語「抽出油」は、油が合成される細胞材料、例えば微生物から分離された油を指す。抽出油は、広範な方法を介して得られ、最も単純なものは物理的手段のみを伴う。例えば、種々のプレス構造(例えばスクリュー、エキスペラー、ピストン、ビードピーターなど)を使用する機械的圧潰が、細胞材料から油を分離し得る。あるいは、油抽出は種々の有機溶媒(例えばヘキサン、イソヘキサン)による処理、酵素的抽出、浸透圧衝撃、超音波抽出、超臨界流体抽出(例えばCO₂抽出)、鹸化およびそれらの方法の組合せを介して行うことができる。抽出油のさらなる精製または濃縮は、任意選択である。

50

【0047】

「リファインド脂質組成物」という用語は、米国特許出願公開第2011-0263709-A1号明細書に開示される超臨界二酸化炭素(CO_2)抽出の生成物である微生物油組成物を指す。リファインド脂質組成物は、中性脂肪および/または遊離脂肪酸を含み得る一方、リン脂質を実質的に含まない。リファインド脂質組成物は、American Oil Chemists' Society (AOCS) Official Method Ca 20-99、標題「Analysis for Phosphorus in Oil by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy」(Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 6th ed., Urbana, IL, AOCS Press, 2009、参照により本明細書に組み込まれる)により測定して好ましくは、30ppm未満のリン、より好ましくは、20ppm未満のリンを有する。リファインド脂質組成物は、微生物バイオマスの油組成物に対してTAGが濃縮されていてよい。リファインド脂質組成物は、例えば本明細書に記載の短行程蒸留を介するさらなる精製に付して「精製油」を生成することができる。

10

【0048】

したがって、本明細書に記載の方法に好ましいステロール含有微生物油組成物は、超臨界 CO_2 抽出に由来するリファインド脂質組成物であり、リファインド脂質組成物は、少なくとも1つのPUFAを含むTAGを含み、少なくとも1つのステロールを含む。

20

【0049】

「蒸留」という用語は、混合物を沸騰液体混合物中でのそれらの揮発性の差異に基づき分離する方法を指す。蒸留は、単位操作、または物理的分離プロセスであり、化学反応ではない。

【0050】

「短行程蒸留」(「SPD」と略す)という用語は、極端に高い真空下で操作し、蒸発後に蒸留すべき材料からの揮発性化合物が凝縮表面に短距離のみ移動するようにSPD装置が蒸発器に近接した内部凝縮器を備える分離法を指す。結果として、この分離法からの熱分解は最小である。

【0051】

「SPD精製油」という用語は、1つ以上のPUFAを含むトリアシルグリセロール画分を含有する微生物油であって、短行程蒸留条件下での少なくとも1回の蒸留のプロセスに付した微生物油を指す。蒸留プロセスは、短行程蒸留前の油のステロール含有量と比較してSPD精製油中のステロールの量を低減させる。

30

【0052】

本明細書において用語「総脂肪酸(TFA)」は、例えば微生物バイオマスまたは油であり得る所与の試料中において、(当技術分野において公知の)塩基エステル交換法により脂肪酸メチルエステル(FAME)に誘導体化することができる全ての細胞脂肪酸の総和を指す。したがって、総脂肪酸は、(ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、およびTAGを含む)中性脂肪画分からの、および(ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミン画分を含む)極性脂質画分からの脂肪酸を含むが、FFAは含まない。

40

【0053】

細胞の「総脂質含有率」という用語は、乾燥細胞重量(DCW)のパーセントとしてのTFAの尺度であるが、総脂質含有率は、DCWのパーセントとしてのFAME(FAME%DCW)の尺度として近似させることができる。したがって総脂質含有率(TFA%DCW)は、例えばDCW100ミリグラム当たりの総脂肪酸のミリグラムに等しい。

【0054】

総脂質中の脂肪酸濃度は、本明細書においてTFAの重量パーセント(%TFA)、例えばTFA100ミリグラム当たりの所与の脂肪酸のミリグラムとして表現される。本開

50

示において、特に具体的な記載のない限り、総脂質に対する所与の脂肪酸のパーセントへの言及は、% T F Aとしての脂肪酸濃度に等しい（例えば総脂質の% E P Aは、E P A % T F Aに等しい）。

【 0 0 5 5 】

場合によっては、細胞中の所与の脂肪酸含有率をその乾燥細胞重量の重量パーセント（% D C W）として表現することが有用である。したがって例えばエイコサペンタエン酸 % D C Wは、以下の式に従って求められる：（エイコサペンタエン酸 % T F A）*（T F A % D C W）] / 1 0 0。しかしながら、乾燥細胞重量の重量パーセント（% D C W）としての細胞中の所与の脂肪酸含有率は、以下のとおり近似させることができる：

（エイコサペンタエン酸 % T F A）*（F A M E % D C W）] / 1 0 0。

10

【 0 0 5 6 】

「脂質プロファイル」および「脂質組成」という用語は同義であり、特定の脂質画分、例えば総脂質中または油中などに含有される個々の脂肪酸の量を指し、その量はT F Aの重量パーセントとして表現される。混合物中に存在する個々の脂肪酸の総和は、1 0 0になるべきである。

【 0 0 5 7 】

用語「脂肪酸」は、変動する約C₁₂からC₂₂の鎖長の長鎖脂肪酸（アルカン酸）を指すが、鎖長のより長い酸およびより短い酸の両方も公知である。優勢な鎖長は、C₁₆からC₂₂の間である。脂肪酸の構造は「X：Y」（式中、Xは特定の脂肪酸中の炭素[「C」]原子の総数であり、Yは二重結合の数である）の簡易表記体系により表される。「飽和脂肪酸」と「不飽和脂肪酸」、「一価不飽和脂肪酸」と「多価不飽和脂肪酸」（P U F A）、および「 - 6 脂肪酸」（「 - 6」または「n - 6」）と「 - 3 脂肪酸」（「 - 3」または「n - 3」）の区別に関する追加的詳細は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7, 238, 482号明細書に提供されている。

20

【 0 0 5 8 】

本明細書でP U F Aを記載するために使用される命名法を表4に示す。「略記法」と題された欄では - 基準系を使用して、炭素数、二重結合数、この目的で1番目である炭素から数えた炭素に最も近い二重結合の位置を示す。表の残りは、 - 3および - 6脂肪酸ならびにそれらの前駆体の一般名、明細書全体を通じて使用される略語、ならびにそれぞれの化合物の化学名をまとめる。

30

【 0 0 5 9 】

【表 5】

表4. 多価不飽和脂肪酸および前駆体の命名法

一般名	略語	化学名	略記法
ミリスチン酸	--	テトラデカン酸	14:0
パルミチン酸	パルミテート	ヘキサデカン酸	16:0
パルミトレイン酸	--	9-ヘキサデセン酸	16:1
ステアリン酸	--	オクタデカン酸	18:0
オレイン酸	--	シス-9-オクタデセン酸	18:1
リノール酸	LA	シス-9, 12-オクタデカジエン酸	18:2 ω-6
γ-リノレン酸	GLA	シス-6,9,12-オクタデカトリエン酸	18:3 ω-6
エイコサジエン酸	EDA	シス-11,14-エイコサジエン酸	20:2 ω-6
ジホモ-γ-リノレン酸	DGLA	シス-8,11,14-エイコサトリエン酸	20:3 ω-6
アラキドン酸	ARA	シス-5,8,11,14-エイコサテトラエン酸	20:4 ω-6
α-リノレン酸	ALA	シス-9,12,15-オクタデカトリエン酸	18:3 ω-3
ステアリドン酸	STA	シス-6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸	18:4 ω-3
エイコサトリエン酸	ETra	シス-11,14,17-エイコサトリエン酸	20:3 ω-3
エイコサテトラエン酸	ETA	シス-8,11,14,17-エイコサテトラエン酸	20:4 ω-3
エイコサペンタエン酸	EPA	シス-5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸	20:5 ω-3
ドコサテトラエン酸	DTA	シス-7,10,13,16-ドコサテトラエン酸	22:4 ω-3
ドコサペンタエン酸	DPA _n -6	シス-4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸	22:5 ω-6
ドコサペンタエン酸	DPA _n -3	シス-7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸	22:5 ω-3
ドコサヘキサエン酸	DHA	シス-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸	22:6 ω-3

10

20

【0060】

「高レベルPUFA生成」という用語は、微生物宿主の総脂質の少なくとも約25%のPUFA、好ましくは、総脂質の少なくとも約30%のPUFA、より好ましくは、総脂質の少なくとも約35%のPUFA、より好ましくは、総脂質の少なくとも約40%のPUFA、より好ましくは、総脂質の少なくとも約40~45%のPUFA、より好ましくは、総脂質の少なくとも約45~50%のPUFA、より好ましくは、少なくとも約50~60%のPUFA、最も好ましくは、総脂質の少なくとも約60~70%のPUFAの生成を指す。PUFAの構造形態は限定的でなく；したがって例えばPUFAは、FFAとして、またはエステル化形態、例えばアシルグリセロール、リン脂質、硫脂質または糖脂質で総脂質中に存在し得る。

30

【0061】

「油性」という用語は、それらのエネルギー源を油の形態で貯蔵する傾向がある生物を指す(Weete, In: Fungal Lipid Biochemistry, 2nd Ed., Plenum, 1980)。一般に、油性微生物の細胞油はS字形曲線に従い、脂質の濃度は対数後期または初期静止期においてそれが最大に達するまで増加し、次に後期静止期および死滅期中に徐々に減少する(Yongmanitchai and Ward, Appl. Environ. Microbiol., 57: 419-25 (1991))。油性微生物がそれらの乾燥細胞重量の約25%を超えて、油として蓄積することは珍しくない。

40

【0062】

ステロール含有微生物油組成物は、酵母、藻類、ユーグレナ類、ストラメノパイル、菌類、およびそれらの混合物からなる群から選択される微生物宿主細胞に由来し得る。好ましくは、微生物宿主細胞は油性であり、モルティエレラ(Mortierella)、ヤブレッツボカビ(Thraustochytrium)、シゾキトリウム(Schizochytrium)、ヤロウィア(Yarrowia)、カンジダ(Candida)、ロドトルラ(Rhodotorula)、ロドスポリジウム(Rhodospiridium)、クリプトコッカス(Cryptococcus)、トリコスボロン(Tricho

50

s p o r o n)、およびリボマイセス (L i p o m y c e s) からなる群から選択される属のメンバーであり得る。「油性酵母」という用語は、油を生成し得る酵母に分類される微生物を指す。油性酵母の例には、決して限定されるものではないが、以下の属：ヤロウイア (Y a r r o w i a)、カンジダ (C a n d i d a)、ロドトルラ (R h o d o t o r u l a)、ロドスポリジウム (R h o d o s p o r i d i u m)、クリプトコッカス (C r y p t o c o c c u s)、トリコスポロン (T r i c h o s p o r o n) およびリボマイセス (L i p o m y c e s) が含まれる。

【 0 0 6 3 】

一般に、油性微生物中の脂質蓄積は、成長培地内に存在する全炭素対窒素比に応答して誘発される。油性微生物中で遊離パルミテート (1 6 : 0) のデノボ合成をもたらすこのプロセスについては、米国特許第 7 , 2 3 8 , 4 8 2 号明細書において詳述されている。パルミテートは、エロンガーゼおよびデサチュラーゼの作用を介して形成される、鎖長のより長い飽和および不飽和脂肪酸誘導体の前駆体である。

10

【 0 0 6 4 】

幅広い脂肪酸 (飽和および不飽和脂肪酸、ならびに短鎖および長鎖脂肪酸を含む) を、脂肪酸の主要貯蔵単位である T A G 中に取り込むことができる。本明細書に記載の方法および宿主細胞において、長鎖 P U F A の T A G 中への取り込みが最も望ましいが、P U F A の構造的形態は限定的でない (したがって、例えば、E P A は、総脂質中に F F A として、またはエステル化形態、例えばアシルグリセロール、リン脂質、スルホ脂質または糖脂質で存在し得る) 。より具体的には、本方法の一実施形態において、少なくとも 1 つの P U F A は、L A、G L A、E D A、D G L A、A R A、D T A、D P A n - 6、A L A、S T A、E T r A、E T A、E P A、D P A n - 3、D H A およびそれらの混合物からなる群から選択される。より好ましくは、少なくとも 1 つの P U F A は、E D A、D G L A、A R A、D T A、D P A n - 6、E T r A、E T A、E P A、D P A n - 3、D H A、およびそれらの混合物からなる群から選択される P U F A のように、少なくとも C₂₀ 鎖長を有する。一実施形態において、少なくとも 1 つの P U F A は、A R A、E P A、D P A n - 6、D P A n - 3、D H A、およびそれらの混合物からなる群から選択される。別の好ましい実施形態において、少なくとも 1 つの P U F A は、E P A および D H A からなる群から選択される。

20

【 0 0 6 5 】

ほとんどの P U F A は中性脂肪として T A G 中に取り込まれて脂肪体中に貯蔵される。しかしながら、油性生物中の総 P U F A の計測は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンおよび T A G 画分中に局在する P U F A を最低限含むべきであることに留意することが重要である。

30

【 0 0 6 6 】

少なくとも 1 つの P U F A、例えば E P A (またはその誘導体) を含み、(本明細書に記載の蒸留に供されていない組成物に対して) 低減した量のステロールを有する S P D 精製油は、周知の臨床的および薬学的価値を有する。例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 9 - 0 0 9 3 5 4 3 A 1 号明細書参照。例えば、P U F A を含む脂質組成物を、静脈内栄養補給を受ける患者のために、または栄養失調を防止もしくは治療するために食事代用品または補助品、特に特殊調製粉乳として使用することができる。あるいは、精製 P U F A (またはその誘導体) を、通常使用において受容者が食事補給について所望量を受容するように配合された調理油、脂肪またはマーガリン中に取り込むことができる。P U F A は、特殊調製粉乳、栄養補助品または他の食品中にも取り込むこともでき、抗炎症またはコレステロール低下剤として使用することができる。場合により、組成物は、ヒトまたは動物のいずれかの薬学的使用に使用することができる。

40

【 0 0 6 7 】

ヒトまたは動物の P U F A の補給は、添加 P U F A、およびそれらの代謝結果のレベルの増加をもたらす得る。例えば、E P A による治療は、E P A のレベルの増加だけでなく、E P A の下流生成物、例えばエイコサノイド (すなわち、プロスタグランジン、ロイコ

50

トリエン、トロンボキサン)、D P A n - 3 および D H A のレベルの増加ももたらし得る。複雑な調節機序は、種々の P U F A を組み合わせ、または P U F A の異なるコンジュゲートを添加してそのような機序を防止、制御または克服して個体における所望レベルの規定の P U F A を達成することを望ましくし得る。

【0068】

あるいは、P U F A、またはその誘導体は、動物および水産飼料、例えば乾燥飼料、半湿潤および湿潤飼料の合成において利用することができる。それというのも、これらの配合物は、一般に、栄養組成物の少なくとも1~2%が - 3 および / または - 6 P U F A であることを要求するためである。

【0069】

本発明は、短行程蒸留条件を使用するステロール含有微生物油組成物の蒸留を介して、低減した量のステロールを有する T A G 含有画分を含む S P D 精製油を生成する方法に関するが、ステロール含有微生物油組成物自体を得るために有用であり得る関連方法の概要が認識される。図1にフローチャートの形態で図示されるとおり、ほとんどのプロセスは、微生物発酵から開始し、特定の微生物を、成長および P U F A の生成を可能とする条件下で培養する。適切な時間において、微生物細胞を発酵容器から回収する。この未処理微生物バイオマスは、種々の手段、例えば、乾燥、破砕、ペレット化などを使用して機械的に加工することができる。次いで、未処理微生物バイオマスの油抽出を実施し、残留バイオマス(例えば、細胞デブリス)および抽出油を生成する。次いで、短行程蒸留条件を使用する抽出油(ステロールおよび P U F A を含むトリアシルグリセリド [T A G] を含有する)の蒸留は、精製 T A G 画分(すなわち、S P D 精製微生物油)中のステロールの量を低減させる。図1のそれらの態様のそれぞれを以下にさらに詳述する。

【0070】

本発明において有用なステロール含有微生物油は、典型的には微生物発酵により提供される微生物バイオマスに由来する。微生物バイオマスは、天然か組換えかにかかわらず、所望の P U F A を含有する脂質を生成し得る、任意の微生物からのものであり得る。好ましくは、微生物は高レベル P U F A 生成が可能であり得る。

【0071】

例として A R A 油の商業的供給源は、典型的には、モルティエラ (M o r t i e r e l l a) 属(糸状菌)、ハエカビ (E n t o m o p h t h o r a) 属、ピシウム (P y t h i u m) 属およびチノリモ (P o r p h y r i d i u m) 属(紅藻)の微生物から生成される。最も注目すべきことに、M a r t e k B i o s c i e n c e s C o r p o r a t i o n (C o l u m b i a , M D) は A R A 含有真菌油 (A R A S C O (登録商標); 米国特許第5,658,767号明細書)を生成し、これは実質的に E P A を含まず、モルティエラ・アルピナ (M o r t i e r e l l a a l p i n a) またはピシウム・インシジオスム (P y t h i u m i n s i d i u o s u m) のいずれかに由来する。

【0072】

同様に、E P A は、利用される規定の微生物の天然能力に基づく多数の異なる方法を介して、微生物を利用して生成することができる[例えば、従属栄養珪藻キクロテラ (C y c l o t e l l a) 種およびニツチア (N i t z s c h i a) 種(米国特許第5,244,921号明細書); シュードモナス (P s e u d o m o n a s) 種、アルテロモナス (A l t e r o m o n a s) 種またはシュワネラ (S h e w a n e l l a) 種(米国特許第5,246,841号明細書); ピシウム (P y t h i u m) 属の糸状菌(米国特許第5,246,842号明細書); またはモルティエラ・エロンガータ (M o r t i e r e l l a e l o n g a t a)、M . エクシグア (M . e x i g u a)、または M . ハイグロフィラ (M . h y g r o p h i l a) (米国特許第5,401,646号明細書); およびナンノクロロプシス (N a n n o c h l o r o p s i s) 属の真正眼点藻 (K r i e n i t z , L . a n d M . W i r t h , L i m n o l o g i c a , 36:204-210 (2006))]。

【0073】

DHAも、天然微生物の天然能力に基づく方法を使用して生成することができる。例えばシゾキトリウム (*Schizochytrium*) 種 (米国特許第5,340,742号明細書; 米国特許第6,582,941号明細書); ウルケニア (*Ulkenia*) (米国特許第6,509,178号明細書); シュードモナス (*Pseudomonas*) 種 YS-180 (米国特許第6,207,441号明細書); スラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属 LFF1 株 (米国特許出願公開第2004/0161831A1号明細書); クリプテコジニウム・コーニイ (*Crypthecodinium cohnii*) (米国特許出願公開第2004/0072330A1号明細書; de Swaaf, M. E. et al. *Biotechnol Bioeng.*, 81(6): 666-72 (2003) および *Appl Microbiol Biotechnol.*, 61(1): 40-3 (2003)); エミリアニア (*Emiliania*) 種 (特開平5-308978号公報 (1993)); およびジャボノキトリウム (*Japonochytrium*) 種 (ATCC #28207; 特開199588/1989号公報] について開発された方法参照。さらに以下の微生物がDHA生成能を有することが公知である: ビブリオ・マリヌス (*Vibrio marinus*) (深海から単離された細菌; ATCC #15381); 微小藻類キクロテラ・クリプティカ (*Cyclotella cryptica*) およびイソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*); ならびに鞭毛菌類、例えばスラウストキトリウム・アウレウム (*Thraustochytrium aureum*) (ATCC #34304; Kendrick, L. *lipids*, 27: 15 (1992)) および ATCC #28211、ATCC #20890、および ATCC #20891 と称されるスラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 種。現在、DHAを商業生成する少なくとも3つの異なる発酵法が存在する: DHASCO (商標) を生成するための C. コーニイ (*C. cohnii*) の発酵 (Martek Biosciences Corporation, Columbia, MD); 以前にDHAGoldとして公知の油を生成するためのシゾキトリウム (*Schizochytrium*) 種の発酵 (Martek Biosciences Corporation); および DHA active (商標) を生成するためのウルケニア (*Ulkenia*) 種の発酵 (Nutrinova, Frankfurt, Germany)。

【0074】

組換え手段を使用するPUFAの微生物生成は、天然微生物源からの生成と比べて、いくつかの利点を有することが予期される。例えば、宿主中への新しい生合成経路の導入により、および/または不所望な経路の抑制により宿主の天然の微生物脂肪酸プロファイルを変えることができ、それにより所望のPUFA (またはそのコンジュゲート形態) の生成レベルの増加および不所望なPUFAの生成の減少がもたらされるため、油生成に好ましい特徴を有する組換え微生物を使用し得る。第2に組換え微生物は、規定の用途を有し得る特定形態でPUFAを提供し得る。さらに培養条件を制御することにより、とりわけ微生物により発現される酵素のための特定基質源を提供することにより、または化合物/遺伝子操作を付加して不所望な生化学的経路を抑制することにより、微生物油生成を操作することができる。したがって、例えば、こうして生成される - 3 脂肪酸と - 6 脂肪酸との比を改変し、または他のPUFAの下流もしくは上流生成物の顕著な蓄積なしに、規定のPUFA (例えばEPA) の生成を遺伝子操作することが可能である。

【0075】

したがって、例えば、適切なPUFA生合成経路遺伝子、例えば - 4 デサチュラーゼ、 - 5 デサチュラーゼ、 - 6 デサチュラーゼ、 - 12 デサチュラーゼ、 - 15 デサチュラーゼ、 - 17 デサチュラーゼ、 - 9 デサチュラーゼ、 - 8 デサチュラーゼ、 - 9 エロンガーゼ、C₁₄/C₁₆ エロンガーゼ、C₁₆/C₁₈ エロンガーゼ、C₁₈/C₂₀ エロンガーゼおよびC₂₀/C₂₂ エロンガーゼの規定の組合せを導入することにより、EPAを生成する天然能力を欠く微生物を遺伝子操作してPUFA生合成経路を発現させることができるが、導入される規定の酵素 (およびそれらの酵素をコードする遺伝子

）は、本発明を決して限定するものではないと認識されるべきである。

【0076】

いくつかの酵母が、少なくとも1つのPUFAを生成するように組換え遺伝子操作されている。例えば、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (Dyer, J. M. et al., Appl. Envi. Microbiol., 59:224-230 (2002); Domergue, F. et al., Eur. J. Biochem., 269:4105-4113 (2002); 米国特許第6,136,574号明細書; 米国特許出願公開第2006-0051847-A1号明細書) および油性酵母ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) (米国特許第7,238,482号明細書; 米国特許第7,465,564号明細書; 米国特許第7,588,931号明細書; 米国特許第7,932,077号明細書; 米国特許第7,550,286号明細書; 米国特許出願公開第2009-0093543-A1号明細書; および米国特許出願公開第2010-0317072-A1号明細書) における研究参照。

10

【0077】

一部の実施形態において、微生物宿主細胞が油性である場合に利点が認識される。油性酵母は天然で油合成および蓄積が可能であり、総油含有率は、細胞乾燥重量の約25%を超えて、より好ましくは、細胞乾燥重量の約30%を超えて、最も好ましくは、細胞乾燥重量の約40%を超えて構成し得る。代替実施形態において、例えば酵母、例えばサッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの非油性酵母を、細胞乾燥重量の25%を超える油を生成し得るように、それを遺伝子操作して油性にすることができる (国際公開第2006/102342号パンフレット)。

20

【0078】

典型的に油性酵母として同定される属には、限定されるものではないが、ヤロウィア (*Yarrowia*)、カンジダ (*Candida*)、ロドトルラ (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、トリコスボロン (*Trichosporon*) およびリボマイセス (*Lipomyces*) が含まれる。より具体的には、例証的な油合成酵母には、ロドスポリジウム・トルロイデス (*Rhodospiridium toruloides*)、リボマイセス・スターケイ (*Lipomyces starkeyi*)、L. リポフェラス (*L. lipoferus*)、カンジダ・レブカウフィ (*Candida reukaufi*)、C. プリケリーマ (*C. pulcherrima*)、C. トロピカリス (*C. tropicalis*)、C. ユチリス (*C. utilis*)、トリコスボロン・プランズ (*Trichosporon pullans*)、T. クタネウム (*T. cutaneum*)、ロドトルラ・グルチヌス (*Rhodotorula glutinus*)、R. グラミニス (*R. graminis*)、およびヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) (以前はカンジダ・リポリティカ (*Candida lipolytica*) に分類された) が含まれる。

30

【0079】

最も好ましいのは、油性酵母ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) であり; さらなる実施形態において、最も好ましいのはATCC#20362、ATCC#8862、ATCC#18944、ATCC#76982および/またはLGAMS(7)1と称されるY. リポリティカ (*Y. lipolytica*) 株である (Papanikolaou S., and Aggelis G., Bioresour. Technol. 82(1):43-9 (2002))。

40

【0080】

一部の実施形態において、油性酵母は「高レベル生成」が可能であることが望ましいことがあり、生物は総脂質の少なくとも約5~10%の所望のPUFA (すなわち、LA、ALA、EDA、GLA、STA、ETRA、DGLA、ETA、ARA、DPAn-6、EPA、DPAn-3および/またはDHA) を生成し得る。より好ましくは、油性酵

50

母は、総脂質の少なくとも約10～70%の所望のPUFAを生成する。PUFAの構造形態は限定的でないが、好ましくは、TAGはPUFAを含む。

【0081】

したがって、本明細書に記載のPUFA生合成経路遺伝子、および遺伝子産物は、異種微生物宿主細胞中、特に油性酵母細胞（例えばヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*））中で生成することができる。組換え微生物宿主中における発現は、種々のPUFA経路中間体を生成するのに、または従来は宿主を使用して可能でなかった新しい生成物を合成するために宿主中に既存のPUFA経路をモジュレートするのに、有用であり得る。

【0082】

上記に提供される引用教示に基づき、好ましい $\Delta 3 / \Delta 6$ PUFA生成のために多数の油性酵母を遺伝子操作することができるが、油性酵母の代表的PUFA生成株であるヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）について表5に記載する。これらの株は、以下のPUFA生合成経路遺伝子： $\Delta 4$ デサチュラーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、 $\Delta 15$ デサチュラーゼ、 $\Delta 17$ デサチュラーゼ、 $\Delta 9$ デサチュラーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、 $\Delta 9$ エロンガーゼ、 C_{14} / C_{16} エロンガーゼ、 C_{16} / C_{18} エロンガーゼ、 C_{18} / C_{20} エロンガーゼ、および C_{20} / C_{22} エロンガーゼの種々の組合せを有するが、導入される規定の酵素（およびそれらの酵素をコードする遺伝子）および生成される規定のPUFAは、決して本発明を限定するものではないことが認識されるべきである。

【0083】

10

20

【表 6】

表5. ω -3/ ω -6PUFAを生成するために遺伝子操作された代表的なヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)株の脂質プロファイル

株	参考 文献	ATCC 寄託 番号	脂肪酸含有率(総脂肪酸のパーセント [%] として)												TFAs % DCW		
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 (ALA)	GLA	20:2 (EDA)	DGLA	ARA	ETA	EPA	DPAn-3	DHA	
野性型 pDMW208 pDMW208- D62	米国特許第 7,465,564号 明細書	#76982	14	11	3.5	34.8	31	0	0	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	11.9	8.6	1.5	24.4	17.8	0	25.9	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	16.2	1.5	0.1	17.8	22.2	0	34	--	--	--	--	--	--	--	--
M4	米国特許第 7,932,077号 明細書	--	15	4	2	5	27	0	35	--	8	0	0	0	--	--	--
Y2034	米国特許第 7,588,931号 明細書	--	13.1	8.1	1.7	7.4	14.8	0	25.2	--	8.3	11.2	--	--	--	--	--
Y2047		PTA-7186	15.9	6.6	0.7	8.9	16.6	0	29.7	--	0	10.9	--	--	--	--	--
Y2214		--	7.9	15.3	0	13.7	37.5	0	0	--	7.9	14	--	--	--	--	--
EU	米国特許第 7,932,077号 明細書	--	19	10.3	2.3	15.8	12	0	18.7	--	5.7	0.2	3	10.3	--	--	36
Y2072		--	7.6	4.1	2.2	16.8	13.9	0	27.8	--	3.7	1.7	2.2	15	--	--	--
Y2102		--	9	3	3.5	5.6	18.6	0	29.6	--	3.8	2.8	2.3	18.4	--	--	--
Y2088		--	17	4.5	3	2.5	10	0	20	--	3	2.8	1.7	20	--	--	--
Y2089		--	7.9	3.4	2.5	9.9	14.3	0	37.5	--	2.5	1.8	1.6	17.6	--	--	--
Y2095		--	13	0	2.6	5.1	16	0	29.1	--	3.1	1.9	2.7	19.3	--	--	--
Y2090		--	6	1	6.1	7.7	12.6	0	26.4	--	6.7	2.4	3.6	26.6	--	--	22.9
Y2096		PTA-7184	8.1	1	6.3	8.5	11.5	0	25	--	5.8	2.1	2.5	28.1	--	--	20.8
Y2201	PTA-7185	11	16.1	0.7	18.4	27	0	--	3.3	3.3	1	3.8	9	--	--	--	
Y3000	米国特許第 7,550,286号 明細書	PTA-7187	5.9	1.2	5.5	7.7	11.7	0	30.1	--	2.6	1.2	1.2	4.7	18.3	5.6	--

【表 7】

Y4001	--	4.3	4.4	3.9	35.9	23	0	--	23.8	0	0	0	--	--	--	--
Y4036	--	7.7	3.6	1.1	14.2	32.6	0	--	15.6	18.2	0	0	--	--	--	--
Y4070	--	8	5.3	3.5	14.6	42.1	0	--	6.7	2.4	11.9	--	--	--	--	--
Y4086	--	3.3	2.2	4.6	26.3	27.9	6.9	--	7.6	1	0	2	9.8	--	--	28.6
Y4128	PTA-8614	6.6	4	2	8.8	19	2.1	--	4.1	3.2	0	5.7	42.1	--	--	18.3
Y4158	--	3.2	1.2	2.7	14.5	30.4	5.3	--	6.2	3.1	0.3	3.4	20.5	--	--	27.3
Y4184	--	3.1	1.5	1.8	8.7	31.5	4.9	--	5.6	2.9	0.6	2.4	28.9	--	--	23.9
Y4217	--	3.9	3.4	1.2	6.2	19	2.7	--	2.5	1.2	0.2	2.8	48.3	--	--	20.6
Y4259	--	4.4	1.4	1.5	3.9	19.7	2.1	--	3.5	1.9	0.6	1.8	46.1	--	--	23.7
Y4305	--	2.8	0.7	1.3	4.9	17.6	2.3	--	3.4	2	0.6	1.7	53.2	--	--	27.5
Y4127	PTA-8802	4.1	2.3	2.9	15.4	30.7	8.8	--	4.5	3.0	3.0	2.8	18.1	--	--	--
Y4184	--	2.2	1.1	2.6	11.6	29.8	6.6	--	6.4	2.0	0.4	1.9	28.5	--	--	24.8
Y8404	--	2.8	0.8	1.8	5.1	20.4	2.1	--	2.9	2.5	0.6	2.4	51.1	--	--	27.3
Y8406	PTA-10025	2.6	0.5	2.9	5.7	20.3	2.8	--	2.8	2.1	0.5	2.1	51.2	--	--	30.7
Y8412	PTA-10026	2.5	0.4	2.6	4.3	19.0	2.4	--	2.2	2.0	0.5	1.9	55.8	--	--	27.0
Y8647	--	1.3	0.2	2.1	4.7	20.3	1.7	--	3.3	3.6	0.7	3.0	53.6	--	--	37.6
Y9028	--	1.3	0.2	2.1	4.4	19.8	1.7	--	3.2	2.5	0.8	1.9	54.5	--	--	39.6
Y9477	--	2.6	0.5	3.4	4.8	10.0	0.5	--	2.5	3.7	1.0	2.1	61.4	--	--	32.6
Y9497	--	2.4	0.5	3.2	4.6	11.3	0.8	--	3.1	3.6	0.9	2.3	58.7	--	--	33.7
Y9502	--	2.5	0.5	2.9	5.0	12.7	0.9	--	3.5	3.3	0.8	2.4	57.0	--	--	37.1
Y9508	--	2.3	0.5	2.7	4.4	13.1	0.9	--	2.9	3.3	0.9	2.3	58.7	--	--	34.9
Y8145	--	4.3	1.7	1.4	4.8	18.6	2.8	--	2.2	1.5	0.6	1.5	48.5	--	--	23.1
Y8259	PTA-10027	3.5	1.3	1.3	4.8	16.9	2.3	--	1.9	1.7	0.6	1.6	53.9	--	--	20.5
Y8370	--	3.4	1.1	1.4	4.0	15.7	1.9	--	1.7	1.9	0.6	1.5	56.4	--	--	23.3
Y8672	--	2.3	0.4	2.0	4.0	16.1	1.4	--	1.8	1.6	0.7	1.1	61.8	--	--	26.5

P U F A 生合成経路を油性酵母中に導入する手段は周知であるため、当業者は、本発明の方法論が、上記のヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株にも、本発明が実証される種 (すなわちヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)) または属 (すなわちヤロウィア (*Yarrowia*)) にも限定されないことを認識する。それよりむしろ、P U F A を生成し得る、任意の油性酵母または任意の他の好適な微生物が、本方法論において使用するのに同等に好適である。

【0086】

所望の P U F A を含有する脂質を生成する微生物種は、P U F A が微生物により生成される条件下で発酵培地中で培養し、成長させることができる。典型的には、微生物に炭素および窒素源を、微生物の成長および / または P U F A の生成を可能とする多数の追加の化学物質または物質とともにフィードする。発酵条件は、上記引用において記載されたとおり使用される微生物に依存し、得られるバイオマス中の P U F A の高い含有率について最適化することができる。

10

【0087】

一般に、炭素源のタイプおよび量、窒素源のタイプおよび量、炭素対窒素比、異なる無機イオンの量、酸素レベル、成長温度、pH、バイオマス生成期の長さ、油蓄積相の長さ、ならびに細胞回収時期および方法を改変することにより、培地条件を最適化することができる。例えば、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) は、一般に、複合培地、例えば酵母抽出物 - ペプトン - デキストロースブロス (Y P D) 中で、または限定最小培地 (例えば成長に必要な構成成分を欠き、それにより P U F A の生成を可能にする所望の組換え発現カセットの選択を強制する、酵母窒素原礎培地 (D I F C O L a b o r a t o r i e s , D e t r o i t , I M)) 中で成長させる。

20

【0088】

所望量の P U F A が微生物により生成された場合、発酵培地を処理して P U F A を含む微生物バイオマスを得ることができる。例えば、発酵培地を濾過し、または別の方法により処理して水性構成成分の少なくとも一部を除去することができる。発酵培地および / または微生物バイオマスを低温殺菌し、または他の手段により処理して、微生物油および / または P U F A 生成物を損ない得る、内在微生物酵素の活性を低減させることができる。

30

【0089】

微生物バイオマスは、例えば、バイオマスの乾燥、バイオマスの破碎 (例えば、細胞溶解を介する)、バイオマスのペレット化、またはそれらの組合せにより機械的に加工することができる。未処理微生物バイオマスは、例えば、所望の含水率に乾燥させ、容易な取扱のために造粒もしくはペレット化し、および / または例えば物理的手段、例えばビードピーター、スクリュウ押出などを介して機械的に破碎して細胞内容物へのより大きい接近可能性を提供することができる。微生物バイオマスは、油抽出を依然として行っていないため、いかなる機械的加工の後であっても未処理バイオマスと称する。

40

【0090】

米国仮特許出願第 61 / 441, 836 号明細書 (代理人整理番号 C L 5 0 5 3 U S P R V、2011 年 2 月 11 日に出願) および米国特許出願第 X X / X X X, X X X 号明細書 (代理人整理番号 C L 5 0 5 3 U S N A (本願と同時出願)) (それぞれ、参照により本明細書に組み込まれる) に記載のとおり、機械的加工の好ましい方法は、吸油し得る粉砕剤 (例えば、シリカ、ケイ酸塩) を用いる乾燥酵母の 2 軸スクリュウ押出を行って破碎バイオマス混合物を提供し、次いで結合剤 (例えば、スクロース、ラクトース、グルコース、可溶性デンプン) を前記破碎バイオマス混合物とブレンドして固体ペレットを形成し得る固定可能な混合物を提供し、続いて固定可能な混合物から固体ペレット (例えば、約 1 mm 直径 x 6 ~ 10 mm 長さのもの) を形成することを含む。

【0091】

任意選択の機械的加工後、微生物油を、油を生成した微生物中に存在し得る他の細胞材料から抽出を介して分離する。未処理バイオマスから微生物油を抽出するための手段は、

50

当技術分野において周知である。これらの方法は、残留バイオマス（すなわち、細胞デブリスなど）および抽出油をもたらす；好ましい方法は、溶媒抽出に依拠する。

【0092】

より好ましい実施形態において、超臨界CO₂抽出を、米国特許出願公開第2011-0263709-A1号明細書に開示されるとおり実施する。この特定の方法論は、未処理微生物バイオマスを溶媒抽出に供してリン脂質および残留バイオマスを除去し、次いで得られた抽出物を分別して少なくとも1つのPUFAを有するリファインド脂質組成物を有する抽出油を生成し、リファインド脂質組成物は未処理微生物バイオマスの油組成物に対してTAGが濃縮されている。

【0093】

一部の実施形態において、抽出油は、さらなる加工工程、例えば脱ガム処理（例えば、リン酸を使用）、漂白（例えば、シリカまたはクレーを用いる）、および/または脱臭に付してリファインド脂質組成物をもたらすことができる。

【0094】

本発明によれば、次いで、抽出油またはリファインド脂質組成物を、短行程蒸留条件下で蒸留に供する。具体的には、蒸留工程は、短行程蒸留（SPD）蒸留器を介するステロール含有微生物油の少なくとも1回の通過を含む。市販のSPD蒸留器は、化学エンジニアリングの技術分野において周知である。好適な蒸留器は、例えば、Pope Scientific (Saukville, WI) から入手可能である。SPD蒸留器は、蒸発器および凝縮器を含む。典型的な蒸留は、蒸発器の温度、凝縮器の温度、蒸留器中への油のフィード速度および蒸発器の真空レベルにより制御する。

【0095】

当業者が認識するとおり、SPD蒸留器を介する通過の数は、ステロール含有微生物油の水分のレベルに依存する。含水率が低ければ、SPD蒸留器を介する単一の通過で十分であり得る。

【0096】

しかしながら、好ましくは、蒸留は、SPD蒸発器を介するステロール含有微生物油の2回以上の連続通過を含む複数回通過プロセスである。第1の通過は、典型的には、約1から50 torr 圧、好ましくは、約5から30 torr 圧下で、蒸発器の比較的低い表面温度、例えば、約100から150 で実施する。このことは、残留水および低分子量有機材料が蒸留されるため、脱水油をもたらす。次いで、脱水油を蒸発器のより高温およびより低圧において蒸留器を介して通過させてステロールが濃縮された蒸留物画分および短行程蒸留に供されていない油と比較して低減した量のステロールを有するTAG含有画分を提供する。TAG含有画分の追加の通過は、蒸留器を介して行ってさらなるステロールを除去することができる。それぞれの追加の通過について、蒸留温度は、直前の蒸留の温度に対して増加させることができる。好ましくは、ステロール画分の量の低減が、ステロール含有微生物油のステロール画分と比較して少なくとも約40%～70%、好ましくは、少なくとも約70%～80%、より好ましくは、約80%超になるように十分な通過を実施する。

【0097】

好ましくは、SPD条件は、30 mTorr 以下、好ましくは、5 mTorr 以下の真空レベルにおけるステロール含有微生物油の少なくとも1回の通過を含む。好ましくは、SPD条件は、約220から300 、好ましくは、約240から280 における少なくとも1回の通過を含む。

【0098】

SPDプロセスは、SPDに供されなかったステロール含有微生物油組成物と比較して改善された澄明性を有する低減したステロール画分を有するTAG含有画分（すなわち、SPD精製油）をもたらす。改善された澄明性は、油の混濁性または不透明性の欠落を指す。ステロール含有微生物油は、約10 未満の温度における貯蔵時に、低温における油中のステロールの低減した溶解度に起因して混濁する。蒸発プロセスは、得られるTAG

10

20

30

40

50

含有画分が低減した量の存在するステロールを有し、したがって約 10 における貯蔵時に澄明なままであるか、または実質的に澄明であるようにステロール画分の実質的部分を除去するように作用する。油の澄明性を評価するために使用することができる試験法は、American Oil Chemists' Society (AOCS) Official Method Cc 11-53 ("Cold Test", Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 6th ed., Urbana, IL, AOCS Press, 2009、参照により本明細書に組み込まれる)である。

【0099】

驚くべきことに、蒸留プロセスにおけるステロールの量の低減は、高度不飽和脂肪酸、例えば EPA が濃縮された油の顕著な分解なしで達成することができる。油の分解は、PUFA 含有率およびクロマトグラフィープロファイリング (以下実施例 3 に実証) に基づき評価することができる。

【0100】

TAG 含有画分の回収は、蒸発器を介する通過の完了後に画分を好適な容器に迂回させることにより達成することができる。

【実施例】

【0101】

本発明を以下の実施例でさらに定義する。これらの実施例は本発明の好ましい実施形態を示しながら、例証としてのみ挙げられるものと理解すべきである。上記考察およびこれらの実施例から、当業者は本発明の本質的特徴を確認してその趣旨および範囲を逸脱することなく本発明の種々の変更および改変を行い、それを種々の使用および条件に適応させることができる。

【0102】

以下の略語を使用する: 「C」は摂氏であり、「mm」はミリメートルであり、「μm」はマイクロメートルであり、「μL」はマイクロリットルであり、「mL」はミリリットルであり、「L」はリットルであり、「min」は分であり、「mM」はミリモル濃度であり、「mTorr」はミリTorrであり、「cm」はセンチメートルであり、「g」はグラムであり、「wt」は重量であり、「h」または「hr」は時間であり、「temp」または「T」は温度であり、「i.d.」は内径である。

【0103】

実施例 1A

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Z1978 株からの EPA を含む未処理微生物バイオマスの調製

本実施例は、EPA の生成について遺伝子操作された組換えヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Z1978 株および 2 段階流加プロセスを使用するこの株を培養するために使用された手段を記載する。微生物バイオマスを前処理して 56.1 EPA % TFA を有する乾燥未処理微生物バイオマスをもたらした。

【0104】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y9502 株の遺伝子型

Y9502 株の作製は、参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2010-0317072-A 1 号明細書に記載されている。ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC # 20362 に由来する Y9502 株は、-9 エロンガーゼ / -8 デサチュラーゼ経路の発現を介して、総脂質に対して約 57.0 % の EPA を生成し得た。

【0105】

野生型ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC # 20362 に対する Y9502 株の最終遺伝子型は、Ura⁺、Pex3⁻、unknown1⁻、unknown2⁻、unknown3⁻、unknown4⁻、unk

10

20

30

40

50

nown5 -、unknown6 -、unknown7 -、unknown8 -、unknown9 -、unknown10 -、YAT1::ME3S::Pex16、GPD::ME3S::Pex20、YAT1::ME3S::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、GPAT::EgD9e::Lip2、YAT1::EgD9eS::Lip2、FBAINm::EgD8M::Pex20、EXP1::EgD8M::Pex16、FBAIN::EgD8M::Lip1、GPD::EaD8S::Pex16(2コピー)、YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1、YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco、FBAINm::EaD9eS/EaD8S::Lip2、GPD::FmD12::Pex20、YAT1::FmD12::Oct、EXP1::FmD12S::Aco、GPDIN::FmD12::Pex16、EXP1::EgD5M::Pex16、FBAIN::EgD5SM::Pex20、GPDIN::EgD5SM::Aco、GPM::EgD5SM::Oct、EXP1::EgD5SM::Lip1、YAT1::EaD5SM::Oct、FBAINm::PaD17::Aco、EXP1::PaD17::Pex16、YAT1::PaD17S::Lip1、YAT1::YICPT::Aco、YAT1::MCS::Lip1、FBA::MCS::Lip1、YAT1::MaLPAAT1S::Pex16であった。上記発現カセットの構造は、簡易表記体系「X::Y::Z」により表され、Xはプロモーター断片を記載し、Yは遺伝子断片を記載し、Zはターミネーター断片を記載し、それらは全て互いに作動的に連結する。略語は、以下のとおりである：FmD12は、フザリウム・モニリフォルメ(*Fusarium moniliforme*) - 12デサチュラーゼ遺伝子[米国特許第7, 504, 259号明細書]であり；FmD12Sは、フザリウム・モニリフォルメ(*Fusarium moniliforme*) [米国特許第7, 504, 259号明細書]に由来するコドン最適化 - 12デサチュラーゼ遺伝子であり；ME3Sは、モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*) [米国特許第7, 470, 532号明細書]に由来するコドン最適化C₁₆/18エロンガーゼ遺伝子であり；EgD9eは、ユーグレナ・グラシリス(*Euglena gracilis*) - 9エロンガーゼ遺伝子[米国特許第7, 645, 604号明細書]であり；EgD9eSは、ユーグレナ・グラシリス(*Euglena gracilis*) [米国特許第7, 645, 604号明細書]に由来するコドン最適化 - 9エロンガーゼ遺伝子であり；EgD8Mは、ユーグレナ・グラシリス(*Euglena gracilis*) [米国特許第7, 256, 033号明細書]に由来する合成突然変異体 - 8デサチュラーゼ遺伝子[米国特許第7, 709, 239号明細書]であり；EaD8Sは、ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*) [米国特許第7, 790, 156号明細書]に由来するコドン最適化 - 8デサチュラーゼ遺伝子であり；E389D9eS/EgD8Mは、ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389 - 9エロンガーゼ(米国特許第7, 645, 604号明細書)に由来するコドン最適化 - 9エロンガーゼ遺伝子(「E389D9eS」と、 - 8デサチュラーゼ「EgD8M」(前出)[米国特許出願公開第2008-0254191-A1号明細書]とを連結させて作出されたDGLAシンターゼであり；EgD9eS/EgD8Mは、 - 9エロンガーゼ「EgD9eS」(前出)と - 8デサチュラーゼ「EgD8M」(前出)[米国特許出願公開第2008-0254191-A1号明細書]とを連結させて作出されたDGLAシンターゼであり；EaD9eS/EgD8Mは、ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*) - 9エロンガーゼ[米国特許第7, 794, 701号明細書]に由来するコドン最適化 - 9エロンガーゼ遺伝子(「EaD9eS」と - 8デサチュラーゼ「EgD8M」(前出)[米国特許出願公開第2008-0254191-A1号明細書]とを連結させて作出されたDGLAシンターゼであり；EgD5MおよびEgD5SMは、ユーグレナ・グラシリス(*Euglena gracilis*) [米国特許第7, 678, 560号明細書]に由来する合成突然変異体 - 5デサチュラーゼ遺伝子[米国特許出願公開第2010-0075386-A1号明細書]であり；EaD5SMは、ユーグレナ・アナ

ベナ (*Euglena Anabaena*) [米国特許第7,943,365号明細書] に由来する合成突然変異体 5デサチュラーゼ遺伝子であり [米国特許出願公開第2010-0075386-A1号明細書]; PaD17は、ピシウム・アフアニデルマタム (*Pythium aphanidermatum*) - 17デサチュラーゼ遺伝子 [米国特許第7,556,949号明細書] であり; PaD17Sは、ピシウム・アフアニデルマタム (*Pythium aphanidermatum*) [米国特許第7,556,949号明細書] に由来するコドン最適化 - 17デサチュラーゼ遺伝子であり; Y1CPT1は、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 [米国特許第7,932,077号明細書] であり; MCSは、ヘアリーベッチ根粒菌 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) 3841 [米国特許出願公開第2010-0159558-A1号明細書] に由来するコドン最適化マロニル-CoAシンセターゼ遺伝子であり; MaLPAAAT1Sは、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 米国特許第7,879,591号明細書] に由来するコドン最適化リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ遺伝子である。

【0106】

Y9502株の総脂質含有率および組成の詳細な分析のために、細胞を2段階で合計7日間成長させるフラスコアッセイを実施した。分析に基づいて、Y9502株は3.8g/Lの乾燥細胞重量 [「DCW」] を生成し、細胞の総脂質含有率は37.1 [「TFA%DCW」] であり、乾燥細胞重量のパーセントとしてのEPA含有率 [「EPA%DCW」] は21.3であり、それぞれの脂肪酸濃度をTFAの重量パーセント [「%TFA」] とする脂質プロファイルは以下のとおりであった: 16:0 (パルミテート) は2.5、16:1 (パルミトレイン酸) は0.5、18:0 (ステアリン酸) は2.9、18:1 (オレイン酸) は5.0、18:2 (LA) は12.7、ALAは0.9、EDAは3.5、DGLAは3.3、ARAは0.8、ETRAは0.7、ETAは2.4、EPAは57.0、その他は7.5。

【0107】

Y9502株からのヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Z1978株の作製

株からのZ1978株の開発は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第13/218591号明細書 (代理人整理番号CL4783USNA、2011年8月26日出願) および同第13/218708号明細書 (代理人整理番号CL5411USNA、2011年8月26日出願) に記載されている。

【0108】

具体的には、Y9502株のUra3遺伝子を破壊するため、構築物pZKUM (図2A; 配列番号1; 米国特許出願公開第2009-0093543-A1号明細書の表15に記載) を使用してUra3突然変異体遺伝子をY9502株のUra3遺伝子中に統合した。形質転換は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2009-0093543-A1号明細書の方法論に従って実施した。合計27個の形質転換体 (8つの形質転換体を含む第1の群、8つの形質転換体を含む第2の群、および11個の形質転換体を含む第3の群から選択) を、5-フルオロオロチン酸 [「FOA」] プレート (FOAプレートは、1リットル当たり以下を含む: 20gのグルコース、6.7gの酵母素原礎培地、75mgのウラシル、75mgのウリジンおよび100mg/Lから1000mg/Lの濃度の範囲に対するFOA活性試験に基づく適切な量のFOA (Zymo Research Corp., Orange, CA) (それというのも、供給業者から受容したそれぞれのバッチ内で変動が生じるためである)) 上で成長させた。さらなる実験は、形質転換体の第3の群のみが実際のUra-表現型を有することを決定した。

【0109】

脂肪酸 [「FA」] 分析のため、細胞を遠心分離により回収し、脂質をBligh, E. G. & Dyer, W. J. (Can. J. Biochem. Physiol., 37

10

20

30

40

50

: 911 - 917 (1959)) に記載のとおり抽出した。脂肪酸メチルエステル [「FAME」] を、ナトリウムメトキシドによる脂質抽出物のエステル交換により調製し (Roughan, G., and Nishida I., Arch Biochem Biophys., 276 (1): 38 - 46 (1990))、続いて 30 - mX0.25 mm (i.d.) HP-INNOWAX (Hewlett-Packard) カラムを備えた Hewlett-Packard 6890 GC により分析した。オープン温度は 3.5 /min において 170 (25 min 保持) から 185 であった。

【0110】

直接的な塩基エステル交換のため、ヤロウイア (Yarrowia) 細胞 (0.5 mL 培養物) を回収し、蒸留水中で 1 回洗浄し、Speed-Vac 中で真空下で 5 ~ 10 分間乾燥させた。ナトリウムメトキシド (100 μ l の 1%) および既知量の C15:0 トリアシルグリセロール (C15:0 TAG; カタログ番号 T-145, Nu-Check Prep, Elysian, MN) を試料に添加し、次いで試料をボルテックスに付し、50 において 30 分間ロックした。3 滴の 1 M の NaCl および 400 μ l のヘキサンの添加後、試料をボルテックスに付し、回転させた。上層を取り出し、GC により分析した (前出)。

【0111】

あるいは、Lipid Analysis, William W. Christie, 2003 に記載の塩基触媒エステル交換法の改変を、発酵またはフレーク試料からのプロス試料の定型分析に使用した。具体的には、プロス試料を室温水中で急速解凍し、次いで 0.22 μ m の Corning (登録商標) Costar (登録商標) Spin-X (登録商標) 遠心チューブフィルター (カタログ番号 8161) を有するタール塗布 2 mL 微小遠心チューブ中に (0.1 mg に) 秤量した。予め測定された DCW に応じて、試料 (75 ~ 800 μ l) を使用した。Eppendorf 5430 遠心分離機を使用して、試料を 14000 rpm において 5 ~ 7 分間または必要な限り遠心分離してプロスを取り出した。フィルターを取り出し、液体を抜き、約 500 μ l の脱イオン水をフィルターに添加して試料を洗浄した。遠心分離して水を除去した後、フィルターを再度取り出し、液体を抜き、フィルターを再挿入した。次いで、チューブを遠心分離機中に再挿入し、このときは頂部を開放し、約 3 ~ 5 分間乾燥させた。次いで、フィルターをチューブの約 1 / 2 の箇所 で 切断し、新たな 2 mL 丸底 Eppendorf チューブ (カタログ番号 2236335-2) 中に挿入した。

【0112】

切断フィルター容器の周縁に接触するにすぎないが、試料またはフィルター材料に接触しない適切なツールによりフィルターをチューブの底部に押圧した。トルエン中の既知量の C15:0 TAG (前出) を添加し、500 μ l の新たに作製された 1% のナトリウムメトキシドのメタノール中溶液を添加した。試料ペレットを適切なツールにより完全に崩壊させ、チューブを密閉し、50 加熱ブロック (VWR カタログ番号 12621-088) 中に 30 分間装入した。次いで、チューブを少なくとも 5 分間冷却させた。次いで、400 μ l のヘキサンおよび 500 μ l の 1 M の NaCl の水中溶液を添加し、チューブを 2 回 6 秒間ボルテックスに付し、1 分間遠心分離した。約 150 μ l の頂部 (有機) 層をインサートを有する GC バイアル中に装入し、GC により分析した。

【0113】

GC 分析を介して記録された FAME ピークを、既知の脂肪酸と比較したその滞留時間により特定し、FAME ピーク面積を既知量の内部標準 (C15:0 TAG) と比較することにより定量した。したがって、任意の脂肪酸 FAME の近似量 (μ g) [「 μ g FAME」] は式: (規定の脂肪酸についての FAME ピーク面積 / 標準 FAME ピーク面積) * (標準 C15:0 TAG の μ g) に従って算出する一方、C15:0 TAG の 1 μ g は 0.9503 μ g の脂肪酸に等しいため、任意の脂肪酸の量 (μ g) [「 μ g FA」] は式: (特定の脂肪酸についての FAME ピーク面積 / 標準 FAME ピーク面積) * (標準 C15:0 TAG の μ g) * 0.9503 に従って算出する。0.9503 の変換係数

10

20

30

40

50

は、0.95 から 0.96 の範囲であるほとんどの脂肪酸について決定される値の近似であることに留意されたい。

【0114】

それぞれの個々の脂肪酸の量を TFA の重量パーセントとしてまとめる脂質プロファイルを、個々の FAME ピーク面積を全ての FAME ピーク面積の総和により割って 100 を掛けることにより決定した。

【0115】

このように、GC 分析は、第 3 群の pZKUM - 形質転換体 # 1、# 3、# 6、# 7、# 8、# 10 および # 11 にそれぞれ 28.5%、28.5%、27.4%、28.6%、29.2%、30.3% および 29.6% の EPA の TFA が存在することを示した。これらの 7 つの株を、Y9502U12、Y9502U14、Y9502U17、Y9502U18、Y9502U19、Y9502U21 および Y9502U22 株（集合的に Y9502U）株とそれぞれ命名した。

10

【0116】

次いで、構築物 pZKL3 - 9DP9N（図 2B；配列番号 2）を作製して 1 つの - 9 デサチュラーゼ遺伝子、1 つのコリンリン酸シチジリルトランスフェラーゼ遺伝子、および 1 つの - 9 エロンガーゼ突然変異体遺伝子を Y9502U 株のヤロウヰア（Yarrowia）YALI0F32131p 遺伝子座（GenBank 受託番号 XM_506121）に統合した。pZKL3 - 9DP9N プラスミドは、以下の構成成分を含有した：

20

【0117】

【表 8】

表 6. プラスミド pZKL3-9DP9N(配列番号 2)の説明

配列番号2内の RE部位および ヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成成分の説明
AscI/BsiWI (887-4)	YALI0F32131p 遺伝子座の 884bp 5'部分(GenBank 受託番号 XM_506121、 図中「Lip3-5」と標識)
PacI/SphI (4396-3596)	YALI0F32131p 遺伝子座の 801bp 3'部分(GenBank 受託番号 XM_506121、 図中「Lip3-3」と標識)
Swal/BsiWI (11716-1)	YAT1::EgD9eS-L35G::Pex20、以下を含む: <ul style="list-style-type: none"> • YAT1: ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)YAT1 プロモーター(図中「YAT」と標識;米国特許出願公開第 2010-0068789A1 号明細書); • EgD9eS-L35G: ユーグレナ・グラシリス(Euglena gracilis) (「EgD9eS」;米国特許第 7,645,604 号明細書)に由来する δ-9 エロンガーゼ遺伝子の合成突然変異体(配列番号 3;米国特許出願公開第 13/218591 号明細書); • Pex20:ヤロウィア(Yarrowia)Pex20 遺伝子(GenBank 受託番号 AF054613)からの Pex20 ターミネーター配列
PmeI/SwaI (8759-11716)	GPDIN::YID9::Lip1、以下を含む: <ul style="list-style-type: none"> • GPDIN:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)GPDIN プロモーター(米国特許第 7,459,546 号明細書); • YID9:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)δ-9 デサチュラーゼ遺伝子(GenBank 受託番号 XM_501496;配列番号 5); • Lip1: ヤロウィア(Yarrowia)Lip1 遺伝子(GenBank 受託番号 Z50020)からの Lip1 ターミネーター配列
ClalI/PmeI (6501-8759)	EXP::YIPCT::Pex16、以下を含む: <ul style="list-style-type: none"> • EXP1:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)エクスポートタンパク質(EXP1)プロモーター(図中「Exp」と標識;米国特許第 7,932,077 号明細書); • YIPCT:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)コリンリン酸シチジリルトランスフェラーゼ[「PCT」]遺伝子(GenBank 受託番号 XM_502978;配列番号 7); • Pex16:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)Pex16 遺伝子(GenBank 受託番号 U75433)からの Pex16 ターミネーター配列
Sall/EcoRI (6501-4432)	ヤロウィア(Yarrowia)Ura3 遺伝子(GenBank 受託番号 AJ306421)

10

20

30

【0118】

pZKL3-9DP9N プラスミドを AscI / SphI により消化し、次いで Y9502U17 株の形質転換に使用した。形質転換体細胞を最小培地 [「MM」] プレート上にプレーティングし、30 に 3 ~ 4 日間維持した(最小培地は、1 リットル当たり: 20 g のグルコース、1.7 g のアミノ酸を有さない酵母窒素原礎培地、1.0 g のプロリン、および pH 6.1 (調整不要)を含む)。単一コロニーを MM プレート上に再度画線し、次いで液体 MM 中に 30 において接種し、250 rpm/min において 2 日間振とうさせた。細胞を遠心分離により回収し、高グルコース培地 [「HGM」] 中で再懸濁し、次いで 250 rpm/min において 5 日間振とうさせた(高グルコース培地は、1 リットル当たり: 80 g のグルコース、2.58 g の KH_2PO_4 および 5.36 g の K_2HPO_4 、pH 7.5 (調整不要)を含む)。細胞を上記の脂肪酸分析に供した。

40

【0119】

GC 分析は、選択された 96 個の pZKL3-9DP9N を有する Y9502U17 の株のほとんどが 50 ~ 56 % の EPA の TFA を生成することを示した。59.0 %、56.6 %、58.9 %、56.5 %、および 57.6 % の EPA の TFA を生成した 5 つの株(すなわち、#31、#32、#35、#70 および #80)を、それぞれ Z1977、Z1978、Z1979、Z1980 および Z1981 と命名した。

【0120】

50

野性型ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC # 20362 に対するこれらの pZKL3-9DP9N 形質転換体株の最終遺伝子型は、Ura⁺、Pex3⁻、unknown1⁻、unknown2⁻、unknown3⁻、unknown4⁻、unknown5⁻、unknown6⁻、unknown7⁻、unknown8⁻、unknown9⁻、unknown10⁻、unknown11⁻、YAT1::ME3S::Pex16、GPD::ME3S::Pex20、YAT1::ME3S::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、GPAT::EgD9e::Lip2、YAT1::EgD9eS::Lip2、YAT::EgD9eS-L35G::Pex20、FBAINm::EgD8M::Pex20、EXP1::EgD8M::Pex16、FBAIN::EgD8M::Lip1、GPD::EaD8S::Pex16 (2コピー)、YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1、YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco、FBAINm::EaD9eS/EaD8S::Lip2、GPDIN::YLD9::Lip1、GPD::FmD12::Pex20、YAT1::FmD12::Oct、EXP1::FmD12S::Aco、GPDIN::FmD12::Pex16、EXP1::EgD5M::Pex16、FBAIN::EgD5SM::Pex20、GPDIN::EgD5SM::Aco、GPM::EgD5SM::Oct、EXP1::EgD5SM::Lip1、YAT1::EaD5SM::Oct、FBAINm::PaD17::Aco、EXP1::PaD17::Pex16、YAT1::PaD17S::Lip1、YAT1::YLCPT::Aco、YAT1::MCS::Lip1、FBA::MCS::Lip1、YAT1::MaLPAA1S::Pex16、EXP1::YLPCT::Pex16 であった。

【0121】

Z1977、Z1978、Z1979、Z1980 および Z1981 株の YALI0F32131p 遺伝子座 (GenBank 受託番号 XM_50612) のノックアウトは、pZKL3-9DP9N による形質転換により生成されたこれらの EPA 株のいずれにおいても確認されなかった。

【0122】

Z1977、Z1978、Z1979、Z1980 および Z1981 株の YPD プレートからの細胞を、成長させ、以下の方法論に従って総脂質含有率および組成について分析した。

【0123】

Y・リポリティカ (*Y. lipolytica*) の特定株の総脂質含有率および組成の詳細な分析のため、フラスコアッセイを以下のとおり実施した。具体的には、新たに画線された細胞の1つのループを3mLの発酵培地 [「FM」] 培地中に接種し、250rpm および 30 において一晩成長させた (発酵培地は、1リットル当たり: 6.70g/L の酵母窒素原礎培地、6.00g の KH_2PO_4 、2.00g の K_2HPO_4 、1.50g の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、20g のグルコースおよび 5.00g の酵母抽出物 (BBL) を含む)。OD_{600nm} を計測し、細胞のアリコート を 125mL フラスコ中の 25mL の FM 培地で 0.3 の最終 OD_{600nm} まで添加した。250rpm および 30 におけるシェーカーインキュベーターにおける2日後、6mLの培養物を遠心分離により回収し、125mL フラスコ中の 25mL の HGM 中で再懸濁した。250rpm および 30 におけるシェーカーインキュベーターにおける5日後、1mLのアリコートを脂肪酸分析 (前出) に使用し、乾燥細胞重量 [「DCW」] 測定のために 10mL を乾燥させた。

【0124】

DCW 測定のため、10mL の培養物を、Beckman GS-6R 遠心分離機中の Beckman GH-3.8 ローター中で 4000rpm における5分間の遠心分離により回収した。ペレットを 25mL の水中で再懸濁し、上記のとおり再回収した。洗浄したペレットを 20mL の水中で再懸濁し、事前に秤量したアルミニウムパンに移した。細

胞懸濁液を真空オーブン中で 80 °C において一晚乾燥させた。細胞の重量を測定した。

【0125】

細胞の総脂質含有率 [「TFA % DCW」] を算出し、TFA の重量パーセントとしてのそれぞれの脂肪酸の濃度 [「% TFA」] および乾燥細胞重量のパーセントとしての EPA 含有率 [「EPA % DCW」] をまとめるデータとともに考察した。

【0126】

したがって、以下の表 7 は、フラスコアッセイにより測定された Z 1977、Z 1978、Z 1979、Z 1980 および Z 1981 株の総脂質含有率および組成をまとめる。具体的には、この表は、細胞の総乾燥細胞重量 [「DCW」]、細胞の総脂質含有率 [「TFA % DCW」]、TFA の重量パーセントとしてのそれぞれの脂肪酸の濃度 [「% TFA」] および乾燥細胞重量のパーセントとしての EPA 含有率 [「EPA % DCW」] をまとめる。

10

【0127】

【表 9】

表 7. フラスコアッセイによるヤロウィア(Yarrowia)Z1977、Z1978、Z1979、Z1980 および Z1981 株の総脂質含有率および組成

株	DCW (g/L)	TFA % DCW	%TFA													EPA % DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	EtrA	ETA	EPA	その他	
Z1977	3.8	34.3	2.0	0.5	1.9	4.6	11.2	0.7	3.1	3.3	0.9	0.7	2.2	59.1	9.9	20.3
Z1978	3.9	38.3	2.4	0.4	2.4	4.8	11.1	0.7	3.2	3.3	0.8	0.6	2.1	58.7	9.5	22.5
Z1979	3.7	33.7	2.3	0.4	2.4	4.1	10.5	0.6	3.2	3.6	0.9	0.6	2.2	59.4	9.8	20.0
Z1980	3.6	32.7	2.1	0.4	2.2	4.0	10.8	0.6	3.1	3.5	0.9	0.7	2.2	59.5	10.0	19.5
Z1981	3.5	34.3	2.2	0.4	2.1	4.2	10.6	0.6	3.3	3.4	1.0	0.8	2.2	58.5	10.7	20.1

10

20

30

40

【 0 1 2 8 】

ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) Z1978株
の発酵：振とうフラスコ中で、ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipo

50

lytica) Z1978株の凍結培養物から接種材料を調製した。インキュベーション期間後、培養物を使用して種発酵槽に接種した。種培養物が適切な標的細胞密度に達したとき、次いでそれを使用してより大きな発酵槽に接種した。発酵は、2段階流加法であった。第1の段階において、高細胞密度への急速成長を促進する条件下で酵母を培養し；培養培地は、グルコース、種々の窒素源、微量金属、およびビタミンを含むものであった。第2の段階において、酵母を窒素飢餓状態にし、グルコースを連続的にフィードして脂質およびPUFAの蓄積を促進した。標準操作条件につき温度（30～32に制御）、pH（5～7に制御）、溶解酸素濃度およびグルコース濃度を含むプロセス可変要素をモニタリングおよび制御して一貫したプロセス性能および最終PUFA油の品質を確保した。

【0129】

発酵当業者は、発酵ラン自体、培地条件、プロセスパラメーター、スケールアップなど、ならびに培養物をサンプリングする特定の時点に応じて規定のヤロウィア（Yarrowia）株の油プロファイルに変動が起きることを把握する（例えば米国特許出願公開第2009-0093543-A1号明細書参照）。

【0130】

発酵後、酵母バイオマスを脱水および洗浄して塩および残留培地を除去し、リパーゼ活性を最小化した。次いで、ドラム乾燥させて水分を5%未満に低減させて短期貯蔵および輸送の間の油安定性を確保した。

【0131】

乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）Z1978株のバイオマスの特性決定

乾燥未処理酵母バイオマスの脂肪酸組成を、以下のガスクロマトグラフィー〔「GC」〕法を使用して分析した。具体的には、トリグリセリドを、メタノール中のナトリウムメトキシドを使用するエステル交換により脂肪酸メチルエステル〔「FAME」〕に変換した。得られたFAMEを、トルエン/ヘキサン（2：3）中での希釈後に30-mX0.25mm（i.d.）OMEGAWAX（Supelco）カラムを備えたAgilent 7890 GCを使用して分析した。オープン温度を5/minにおいて160から200、次いで10/minにおいて200から250（10分間保持）増加させた。

【0132】

GC分析を介して記録されたFAMEピークは、既知のメチルエステル〔「ME」〕と比較してそれらの保持時間により同定し、FAMEピーク面積を既知量の内部標準（C15：0トリグリセリド、試料についてエステル交換手順を介して採取）と比較することにより定量した。したがって、任意の脂肪酸FAMEの近似量（mg）〔「mg FAME」〕は、式：（規定の脂肪酸についてのFAMEピーク面積 / 15：0 FAMEピーク面積）*（内部標準C15：0 FAMEのmg）に従って算出する。次いで、FAME結果を、1.042～1.052の適切な分子量変換係数により割ることにより対応する脂肪酸のmgに補正することができる。

【0133】

TFAの重量パーセントとしてのそれぞれの個々の脂肪酸の量をまとめる脂質プロファイルは、個々のFAMEピーク面積を全てのFAMEピーク面積の総和により割り、100を掛けることにより（±0.1重量%以内に）近似させた。

【0134】

ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）Z1978株からの乾燥未処理酵母バイオマスは、表8に示すとおり、56.1EPA% TFAを含有した。

【0135】

10

20

30

40

【表 10】

表 8. 乾燥未処理 Z1978 バイオマスの脂肪酸組成

脂肪酸	総脂肪酸の重量パーセント
C18:2 (ω-6)	14.2
C20:5 EPA	56.1
C22:6 DHA	検出不能 (<0.05)
他の構成成分	29.7

【0136】

10

実施例 1 B

未処理ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Z1978 株バイオマスからの低減したステロール含有率を有する SPD 精製微生物油の調製

本実施例は、実施例 1 A の乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Z1978 株バイオマスを、押出およびペレット化を介して破碎し、超臨界流体抽出 [「SCFE」] を使用して油を抽出し、短行程蒸留条件を使用する蒸留により油のステロール含有率を低減させるために使用された手段を記載する。

【0137】

乾燥未処理酵母バイオマスの押出を介する破碎およびペレット化

実施例 1 A の乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Z1978 株バイオマスを、2 軸スクリー押出機にフィードした。具体的には、84 重量パーセントの酵母 (約 39% の総微生物油を含有) および 16% の珪藻土 (Celatom MN-4; EP Minerals, LLC, Reno, NV) の混合物を、40 mm 2 軸スクリー押出機 (Coperion Werner Pfleiderer ZSK-40 mm MC, Stuttgart, Germany) に 23 kg/hr の速度においてフィードした。26.5% のスクロースから作製された水/スクロース溶液を、押出機の破碎帯域後に 70 mL/min の流速において注入した。押出機は、37 kW モーターおよび高トルクシャフトにより、140 rpm において稼働させた。%トルク範囲は 17~22 であった。得られた破碎酵母粉末を、最終水冷バレル中で 35 に冷却した。湿潤押出粉末を、1 mm 穴径 x 1 mm 厚スクリーンから組み立てられ、80 PRM に設定された LCI Multi-Granulator モデル番号 MG-55 (LCI Corporation, Charlotte, NC) 中にフィードした。押出物を、27 kg/hr、定常 2.2 アンペア電流の流れにおいて形成し、慣用の乾燥装置を使用して乾燥させた。約 1 mm の直径 x 6 から 10 mm の長さの乾燥ペレットは、Sartorius MA35 水分分析装置 (Sartorius AG, Goettingen, Germany) により計測して 1.7% の最終含水率を有した。

20

30

【0138】

押出酵母バイオマスの抽出

押出酵母ペレットを、抽出溶媒としての超臨界流体相二酸化炭素 (CO_2) を使用して抽出して EPA を含有するトリグリセリド濃縮抽出油を生成した。具体的には、酵母ペレットを 320 L ステンレス鋼抽出容器に装填し、ポリエステルフォーム濾過マット (Aero-Flow Industries, Kingsbury, IN) のプラグ間に充填した。容器を密封し、次いで CO_2 を市販の圧縮器 (Pressure Products Industries) により熱交換器 (予熱器) を介して計量供給し、垂直抽出容器中にフィードして破碎酵母のペレットからトリグリセリド濃縮油を抽出した。抽出温度は予熱器により制御し、抽出圧力は抽出容器と分別器容器との間に位置する自動制御弁 (Kammer) により維持した。 CO_2 および油抽出物は、この制御弁を介して低圧に膨張させた。抽出油を膨張溶液から沈殿物として分別器中で回収した。分別器中の膨張 CO_2 相の温度は、分別器の上流に位置する追加の熱交換器の使用により制御した。この低圧 CO_2 流は、分別器容器の頂部を流出し、フィルター、凝縮器、および質量流量計を介して

40

50

圧縮器に再循環させて戻した。抽出油を分別器から周期的に抜き、生成物として回収した。

【0139】

抽出容器に、最初に150kgの抽出酵母ペレットを装填した。次いで、トリグリセリド濃縮油をペレットから超臨界流体CO₂により5000psig(345bar)、55、および出発酵母ペレット1kg当たり32kgのCO₂の溶媒フィード比において抽出した。合計39.6kgの抽出油を分別器容器から回収し、それに約1000ppmの2つの酸化防止剤のそれぞれ：Covi-ox T70(Cognis, Ontario, Canada)およびDadex RM(Nealanders, Ontario, Canada)を添加した。抽出油は、GC分析(下記)により測定して661mgのエルゴステロール/油100gを含有した。

10

【0140】

具体的には、エルゴステロール含有率は、紫外線(UV)検出を有する高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定した。抽出油試料(100mg)を、14mLの9:10の2-プロパノール:1-ヘプタノールにより希釈し、十分に混合した。96%純度エルゴステロール(Alfa Aesar, Inc., Ward Hill, MA)の校正スタンダードを、2-プロパノール中の10から300μg/mLの範囲で調製した。試料およびスタンダードを、12.5分間における水中0.02%の炭酸アンモニウム-65%から100%のアセトニトリルのアセトニトリル勾配を使用するXDB-C8 HPLCカラム(4.6mmのid.、150mmの長さ、5μmの粒子サイズ、Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE)上でのクロマトグラフィーにかけた。注入容積は5μLであり、流速は1.2mL/minであり、カラム温度は50であった。エルゴステロールピークのUV(282nm)応答を、同一条件下で分析した校正スタンダードと比較した。

20

【0141】

S PD条件下での蒸留

抽出油を脱ガスし、次いで6インチのステンレス鋼分子蒸留器(POPE Scientific, Saukville, WI)を介して12kg/hrのフィード速度を使用して通過させた。残留水を除去した。蒸発器および凝縮器の表面温度は、それぞれ140および150に設定した。真空は15torrに維持した。約3重量%の抽出油を蒸留物中の水として取り出した。脱水抽出油は、リン脂質を実質的に含まず、0.5ppmのリンを含有した。視覚調査時、脱水抽出油は室温において混濁していた。

30

【0142】

脱水抽出油を6インチの分子蒸留器を介して12kg/hrのフィード速度において2回目として通過させた。真空を1mtorrに低下させ、蒸発器および凝縮器の表面温度をそれぞれ240および50に維持した。約7重量%の脱水抽出油を蒸留物として取り出し；この画分は主として遊離脂肪酸およびエルゴステロールを含有した。284mgのエルゴステロール/油100g(抽出油のエルゴステロール含有率と比較してエルゴステロール含有率の約57%低減)を含有するトリアシルグリセロール含有画分(すなわち、S PD精製油)も得た。S PD精製油は、数日間の100における貯蔵後に澄明であった。

40

【0143】

実施例2

未処理ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) Y9502株バイオマスからの低減したステロール含有率を有するS PD精製微生物油の調製

本実施例は、乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) Y9502株バイオマスを、押出を介して破碎し、超臨界流体抽出[「SCFE」]を使用して油を抽出し、短行程蒸留条件を使用する蒸留により油のステロール含有率を低減させるために使用された手段を記載する。

【0144】

50

乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y9502株バイオマスの調製

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y9502株 (実施例1A)を、2段階流加プロセスにおいて培養し、得られた微生物バイオマスを実施例1Aに記載の方法論に従って脱水し、洗浄し、乾燥させた。

【0145】

乾燥未処理酵母バイオマスの押出を介する破碎

乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y9502株バイオマスを、2軸スクリュウ押出機にフィードした。具体的には、酵母バイオマス (約37%の総微生物油を含有)を、70mm2軸スクリュウ押出機 (Coperion Werner Pfleiderer ZSK-70mm SCD, Stuttgart, Germany)に、270kg/hrの速度において珪藻土の不存在下でフィードした。

【0146】

押出機は、150kWのモーターおよび高トルクシャフトにより、150rpmおよび総アンペア範囲の33パーセントにおいて稼働させた。得られた破碎酵母バイオマスを最終水冷バレル中で81に冷却した。破碎バイオマスの含水率は、Sartorius MA35水分分析装置 (Sartorius AG, Goettingen, Germany)により計測して2.8重量%であった。

【0147】

押出酵母バイオマスの抽出

押出酵母バイオマスを珪藻土と混合して床の圧密を防止し、抽出溶媒としての超臨界流体相二酸化炭素 (CO_2) を使用して抽出してEPAを含有する粗製トリグリセリド油 (すなわち、「抽出油」) を生成した。具体的には、合計82.7kgの押出酵母バイオマスを、41kgの珪藻土 (Celatom MN-4; EP Minerals, LLC, Reno, NV) と混合し、実施例1Bに記載のものと同一の様式で構成された320Lのステンレス鋼抽出容器に装填したが、以下を除いた: (i) 抽出温度を予熱器により40に制御し; (ii) 抽出圧力を4500psig (310bar) に維持し; (iii) 抽出に出発酵母1kg当たり44kgの CO_2 の溶媒フィード比を使用した。このようにして、23.2kgの油を破碎酵母から抽出した。抽出油は、実施例1Bの方法論によるGC分析により測定して774mgのエルゴステロール/油100gを含有した。

【0148】

SPD条件下での蒸留

抽出油を、2インチのガラス分子蒸留器を介して通過させて脱水抽出油を提供した。流速は、約480g/hrに維持した。真空、蒸発器および凝縮器温度は、それぞれ0.2mmHg、130および60であった。次いで、以下の表に示すとおり脱水抽出油を蒸留器を介して1mtorrの真空において異なる温度において3回通過させ、それぞれの通過後、トリアシルグリセロール含有画分 (すなわち、SPD精製油) のエルゴステロールレベル、EPA含有率 (TFAの重量%として) および総 ω -3含有率 (TFAの重量%として) を上記のとおり測定した。

【0149】

【表11】

表9. SPD 精製油のエルゴステロールおよび PUFA 含有率

	1 回目の通過	2 回目の通過	3 回目の通過
温度(°C)	210	240	270
エルゴステロール(mg/100 g)	110	52.8	1.21
C20:5 EPA (重量% TFA)	54.9	55.2	55.4
総 ω -3 (重量% TFA)	57.51	57.92	57.18

10

20

30

40

50

【0150】

したがって、210において、SPD精製油のエルゴステロールレベルは、110mg/油100gであり、それは240において約53mg/油100gに低減された。エルゴステロールは、温度を270にさらに増加させた場合に1mg/油100gにほぼ完全に除去された。このことは、抽出油のエルゴステロール含有率と比較して1回目の通過、2回目の通過および3回目の通過それぞれにおけるエルゴステロール含有率の約57%、約86%および約99.8%の低減に対応する。

【0151】

SPD精製油のPUFA含有率に関して、表9のデータは、油を270におけるSPD蒸留器を介して通過させた場合であっても、EPAも総-3含有物も顕著な分解が生じなかったことを実証する。

10

【0152】

3回目の通過のSPD精製油を、クロマトグラフィープロファイリングを使用して予想外の構成成分および汚染物質の出現についてさらに分析した。具体的には、試験は、(i)火炎イオン化検出を有するガスクロマトグラフィー(GC/FID)；(ii)薄層クロマトグラフィー(TLC)；および(iii)質量分析、光散乱および紫外線検出を有する液体クロマトグラフィーにより行った(HPLC/MS/ELSD/UV)。GC/FIDプロファイルは、SPD精製油試料のメチルエステルについてランした。TLCおよびHPLC/MS/ELSD/UVプロファイルは、SPD精製油について直接ランした。全ての場合において、SPD精製油プロファイルを、ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) Y4305株バイオマスを用いて調製された参照油と比較した。

20

【0153】

具体的には、参照油は、実施例1Aに記載の方法論に従って乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) Y4305株バイオマスから生成した。55.6EPA%TFAを生成し得るY4305株は、米国特許出願公開第2009-0093543A1号明細書に記載されている。乾燥未処理バイオマスを、油とイソヘキサン溶媒との比を1:7として媒体ミルを使用して機械的に破碎した。残留バイオマス(すなわち、細胞デブリス)を、デカンター遠心分離機を使用して除去し、溶媒を蒸発させてトリグリセリドを含有する抽出油を得た。抽出油を、低温アセトンを使用して、抽出油と溶媒との比を1:1.5として脱ガム処理し、次いで50%の水性クエン酸により酸脱ガム処理した。次いで、脱ガム処理油を酸活性化クレーにより漂白し、210において30分間脱臭して参照油試料を得た。

30

【0154】

3回目の通過のSPD精製油のクロマトグラフィープロファイルは、参照試料のプロファイル中に見られないいかなるピークも含有しなかった。両方の試料を同日に同一条件下でランした。さらに、参照試料のプロファイルの対応するピークよりも顕著に高い応答を有するSPD精製油の未同定ピークは存在しなかった。また、3回目の通過のSPD精製油のピークは、低温(すなわち、それぞれ210および240)において生成された1回目の通過または2回目の通過のSPD精製油の対応するピークよりも高い応答を有しなかった。これらの分析は、SPDを使用する高温におけるエルゴステロールの除去が、油中に分解生成物の出現をもたらさないことを示し；したがって、この加工技術の適用によってはPUFAの顕著な分解が生じないことが仮定される。

40

【0155】

実施例3

未処理ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) Y8672株バイオマスからの低減したステロール含有率を有するSPD精製微生物油の調製

本実施例は、乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) Y8672株バイオマスを、媒体ミルを使用する機械的破碎を介して破碎し、イソヘキサン溶媒を使用して粗製油を抽出し、短行程蒸留条件を使用する蒸留によりアセ

50

トン脱ガム処理油のステロール含有率を低減させるために使用された手段を記載する。

【0156】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y8672株の遺伝子型

米国特許出願公開第2010-0317072-A1号明細書に記載のY8672株の作製 ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC #20362に由来するY8672株は、 -9エロンガーゼ / -8デサチュラーゼ経路の発現を介して、総脂質に対して約61.8%のEPAを生成し得た。

【0157】

野性型ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC #20362に対するY8672株の最終遺伝子型は、Ura⁺、Pex3⁻、unknown1⁻、unknown2⁻、unknown3⁻、unknown4⁻、unknown5⁻、unknown6⁻、unknown7⁻、unknown8⁻、Leu⁺、Lys⁺、YAT1::ME3S::Pex16、GPD::ME3S::Pex20、GPD::FmD12::Pex20、YAT1::FmD12::Oct、EXP1::FmD12S::ACO、GPAT::EgD9e::Lip2、FBAINm::EgD9eS::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、YAT1::EgD9eS::Lip2、FBAINm::EgD8M::Pex20、FBAIN::EgD8M::Lip1、EXP1::EgD8M::Pex16、GPD::EaD8S::Pex16 (2コピー)、YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1、YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco、FBAIN::EgD5SM::Pex20、YAT1::EgD5SM::Aco、GPM::EgD5SM::Oct、EXP1::EgD5M::Pex16、EXP1::EgD5SM::Lip1、YAT1::EaD5SM::Oct、YAT1::PaD17S::Lip1、EXP1::PaD17::Pex16、FBAINm::PaD17::Aco、GPD::YLCPT1::Aco、およびYAT1::MCS::Lip1であった。略語は実施例1Aに定義されるとおりである。

【0158】

Y8672株の総脂質含有率および組成の詳細な分析のため、細胞を2段階で合計7日間成長させるフラスコアッセイを実施した。分析に基づいて、Y8672株は3.3g/Lの乾燥細胞重量 [「DCW」] を生成し、細胞の総脂質含有率は26.5 [「TFA% DCW」] であり、乾燥細胞重量のパーセントとしてのEPA含有率 [「EPA% DCW」] は16.4であり、それぞれの脂肪酸濃度をTFAの重量パーセント [「%TFA」] とする脂質プロファイルは以下のとおりであった：16:0 (パルミテート) は2.3、16:1 (パルミトレイン酸) は0.4、18:0 (ステアリン酸) は2.0、18:1 (オレイン酸) は4.0、18:2 (LA) は16.1、ALAは1.4、EDAは1.8、DGLAは1.6、ARAは0.7、ETRAは0.4、ETAは1.1、EPAは61.8、その他は6.4。

【0159】

乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y8672株バイオマスの調製

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y8672株を、実施例1Aに記載の方法論に従って、2段階流加プロセスにおいて培養し、得られた微生物バイオマスを脱水し、洗浄し、乾燥させた。

【0160】

抽出油を生成するための乾燥未処理酵母バイオマスの媒体ミルおよびイソヘキサン溶媒を介する破碎および抽出

乾燥未処理ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y8672株バイオマスを、イソヘキサン溶媒を用いて媒体ミルを使用して機械的に破碎した。残留バイオマス (すなわち、細胞デブリス) を、デカンター遠心分離機を使用して除

10

20

30

40

50

去し、溶媒を蒸発させてトリグリセリドを含有する抽出油を得た。

【 0 1 6 1 】

抽出油を実施例 1 B の方法論を使用して分析した。表 1 0 に示すとおり、微生物油は 5 8 . 1 E P A % T F A を含有した。

【 0 1 6 2 】

【表 1 2 】

表 10. 抽出 Y8672 微生物油の脂肪酸組成

脂肪酸	総脂肪酸の重量パーセント
C18:2 (ω-6)	15.6
C20:5 EPA	58.1
C22:6 DHA	検出不能
他の構成成分	26.3

10

【 0 1 6 3 】

抽出油の一部を、低温アセトンを使用して抽出油と溶媒との比を 1 : 1 . 5 として脱ガム処理した。アセトン脱ガム処理油は、8 8 0 m g のエルゴステロール / 油 1 0 0 g および 7 4 . 5 p p m のリンを含有した。

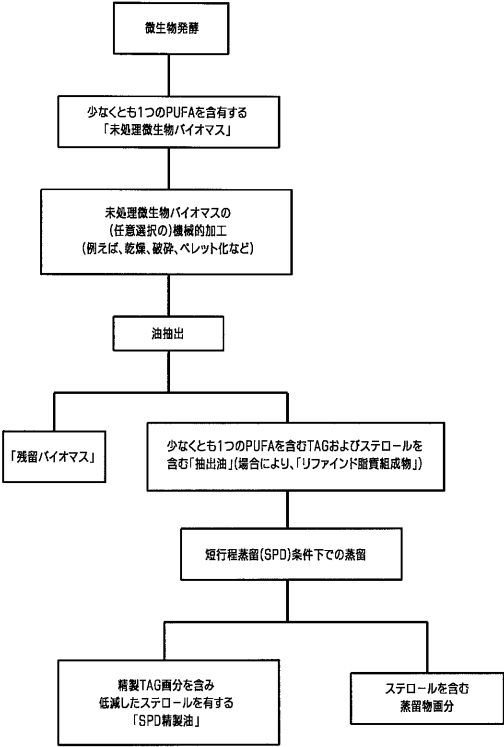
【 0 1 6 4 】

S P D 条件下での蒸留

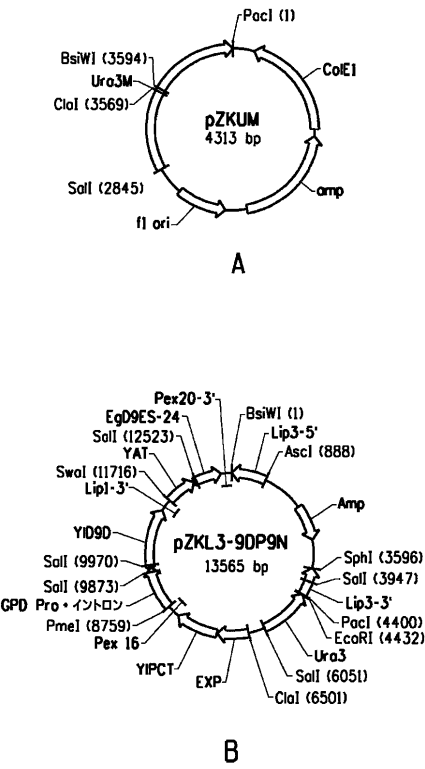
20

アセトン脱ガム処理油を、実施例 1 B の方法論に従って短行程蒸留に供した（但し、蒸発器温度を 2 5 5 に設定した）。第 1 の通過の間に蒸留物はほぼ回収されなかった。それというのも、アセトン脱ガム処理油中にほとんど水が存在しなかったためである。第 2 の通過の間、約 1 2 重量 % の蒸留物が回収された。トリアシルグリセロール含有画分（すなわち、S P D 精製油）の最終エルゴステロールレベルは、1 0 6 m g / 1 0 0 g （アセトン脱ガム処理油のエルゴステロール含有率と比較してエルゴステロール含有率の約 8 8 % の低減）であり；S P D 精製油は、6 6 p p m のリンを含有した。

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配 列 表 】

2014510166000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/024687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - B01D 3/12 (2012.01) USPC - 203/80 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) - B01D 3/10, 3/12; C07C 57/02, 57/12 (2012.01) USPC - 203/71, 73, 74, 77, 80; 435/254.2; 554/1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, ProQuest, Google Patents, Google		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,166,230 A (BIJL et al) 26 December 2000 (26.12.2000) entire document	1-14
Y	US 7,678,930 B2 (SONDBØ et al) 16 March 2010 (16.03.2010) entire document	1-14
Y	US 2,874,171 A (NELSON) 17 February 1959 (17.02.1959) entire document	3, 4
Y	US 2002/0016317 A1 (SCHUL et al) 07 February 2002 (07.02.2002) entire document	6
Y	US 2008/0107791 A1 (FICHTAL et al) 08 May 2008 (08.05.2008) entire document	8
Y	US 4,293,220 A (DENTON et al) 06 October 1981 (06.10.1981) entire document	8
Y	US 2010/0305341 A1 (BAILEY et al) 02 December 2010 (02.12.2010) entire document	10-12
Y	US 2006/0110806 A1 (DAMUDE et al) 25 May 2006 (25.05.2006) entire document	12
<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 01 May 2012		Date of mailing of the international search report 29 MAY 2012
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: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1:645

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
J, 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, R
O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, 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, H
U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI
, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN

(72)発明者 ロバート・ディー・オーランド

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 5 0 - 0 5 1 3 . ランデンバーグ . ニューアークロード 3
1 0 . ピーオーボックス 5 1 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA05 BA80 CA02 DA12 EA04
4B064 AD88 CA06 CA19 CE01 DA01 DA10 DA20
4B065 AA58Y AA72X AA72Y AA83Y AB01 AC14 BA02 CA13
4H059 BB57 BC07 BC48 CA11 CA19 CA72 CA73