

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成20年3月27日(2008.3.27)

【公開番号】特開2005-270115(P2005-270115A)

【公開日】平成17年10月6日(2005.10.6)

【年通号数】公開・登録公報2005-039

【出願番号】特願2005-146665(P2005-146665)

【国際特許分類】

C 12 P 7/64 (2006.01)

C 12 N 1/12 (2006.01)

C 12 R 1/89 (2006.01)

【F I】

C 12 P 7/64

C 12 N 1/12 A

C 12 N 1/12 A

C 12 R 1:89

C 12 P 7/64

C 12 R 1:89

【手続補正書】

【提出日】平成20年2月7日(2008.2.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

微生物の多価不飽和脂肪酸含量を豊富にする方法であって、飽和の1%未満の溶存酸素レベルを有する発酵培地で、前記微生物を発酵させることを含む方法。

【請求項2】

産物と微生物を生産する従属栄養方法であって、飽和の1%未満の溶存酸素レベルを有する発酵培地で、ポリケチドシンターゼ遺伝子を有する前記微生物を培養することを含む方法。

【請求項3】

微生物により生産される脂質の合計の少なくとも15%を多価不飽和脂肪酸として生産することができる、スラウストキトリアレス(Thraustochytriales)目である微生物から、多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する方法であって、非アルコール炭素源と制限栄養素源とを含む培地で前記微生物の発酵を行う段階を含む方法であり、

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の少なくとも4%である場合に、非アルコール炭素源と制限栄養素源とが発酵培地のバイオマス密度を増大させるために培地に添加され、かつ

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の3%未満である場合に、培地の発酵が多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する、

多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する方法。

【請求項4】

そのバイオマスの少なくとも20%を脂質として生産することができる、スラウストキトリアレス(Thraustochytriales)目である微生物から、多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する方法であって、炭素源を含む培地で前記微生物の発酵を行う段階を含む方法であり、

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の少なくとも4%である場合に、炭素源が発酵培地のバイオマス密度を増大させるために供給バッチ方法の発酵培地に添加され、かつ

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の3%未満である場合に、培地の発酵が多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する、

多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する方法。

**【請求項5】**

そのバイオマスの少なくとも20%を脂質として生産することができる、スラウストキトリアレス(Thraustochytriales)目である微生物から、多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する方法であって、非アルコール炭素源と制限栄養素源とを含む培地で前記微生物の発酵を行う段階を含む方法であり、

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の少なくとも4%である場合に、非アルコール炭素源と制限栄養素源とが発酵培地のバイオマス密度を増大させるために培地に添加され、かつ

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の3%未満である場合に、培地の発酵が多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する、

多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する方法。

**【請求項6】**

微生物により生産される脂質の合計の少なくとも15%を多価不飽和脂肪酸として生産することができる、スラウストキトリアレス(Thraustochytriales)目である微生物から、多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する方法であって、炭素源を含む培地で前記微生物の発酵を行う段階を含む方法であり、

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の少なくとも4%である場合に、炭素源が発酵培地のバイオマス密度を増大させるために供給バッチ方法の発酵培地に添加され、かつ

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の3%未満である場合に、培地の発酵が多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する、

多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する方法。

**【請求項7】**

そのバイオマスの少なくとも20%を脂質として生産することができる、スラウストキトリアレス(Thraustochytriales)目である微生物を生育する方法であって、炭素源と制限栄養素源とを含む培地で前記微生物の発酵を行う段階を含む方法であり、

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の少なくとも4%である場合に、炭素源と制限栄養素源とが発酵培地のバイオマス密度を増大させるために培地に添加され、

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の3%未満である場合に、培地の発酵が多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産し、

前記方法が少なくとも0.5g/L/hrの平均速度で脂質を生産し、かつ

前記微生物により生産された脂質の合計の少なくとも15%が多価不飽和脂肪酸である、

微生物を生育する方法。

**【請求項8】**

スラウストキトリアレス(Thraustochytriales)目である微生物を生育する方法であって、炭素源と制限栄養素源とを含む培地で前記微生物の発酵を行う段階を含む方法であり、

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の少なくとも4%である場合に、炭素源と制限栄養素源とが発酵培地のバイオマス密度を増大させるために培地に添加され、

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の3%未満である場合に、培地の発酵が多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産し、かつ

前記微生物がそのバイオマスの少なくとも20%をいくつかの多価不飽和脂肪酸を含む脂質として生産することができる、

微生物を生育する方法。

**【請求項9】**

発酵培地のバイオマス密度を増大させるために、発酵培地でスラウストキトリアレス(Thraustochytriales)目である微生物を生育するステップと、

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の3%未満である場合に、前記微生物に脂質を生産させるステップと、

少なくとも15%が多価不飽和脂肪酸である脂質を回収するステップとを含む、微生物脂質を生産する方法。

**【請求項10】**

炭素源と制限栄養素源とを含む培地で微生物の発酵を行うステップと、

発酵培地の溶存酸素レベルが飽和の少なくとも4%である場合に、炭素源と制限栄養素源とを発酵培地に添加するステップと、

発酵培地の溶存酸素レベルが飽和の3%以下である場合に、脂質を生産するステップと

少なくとも15%が多価不飽和脂肪酸である微生物脂質を回収するステップとを含む、微生物脂質を生産する方法。

**【請求項11】**

供給バッチ方法である、請求項1～3、5、または7～10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項12】**

バッチ方法または連続方法である、請求項1～3、5、または7～10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項13】**

発酵培地の溶存酸素含量が飽和の3%未満である場合に、脂質生産を引き起こす栄養素制限状態を誘導するために、制限栄養素源を全く加えないかあるいはほどんど加えない状態で炭素源を添加する、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項14】**

培地の発酵が多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産する場合、発酵培地の溶存酸素含量は飽和の1%未満である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項15】**

発酵培地中の溶存酸素レベルが最初の24時間は8%、24時間目から40時間目までは4%、40時間目からプロセスの終りまでは0.5%以下に維持され少なくとも90時間行われる、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項16】**

発酵培地中の溶存酸素レベルがプロセスの40時間目以降からプロセスの終りまで0.5%以下に維持される、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項17】**

非アルコール炭素源が炭水化物を含む、請求項3または5に記載の方法。

**【請求項18】**

制限栄養素源が、窒素源、炭素源、リン酸塩源、ビタミン源、微量金属源、主要金属源、珪酸源、およびそれらの混合物から成る群より選択される栄養素源を含む、請求項3、5、または7～10のいずれか一項記載の方法。

**【請求項19】**

制限栄養素源が、それらの金属の硫酸塩および塩化物の塩ならびにそれらの混合物から成る群より選択される微量金属源および主要金属源から成る群より選択される栄養素源を含む、請求項3、5、または7～10のいずれか一項記載の方法。

**【請求項20】**

制限栄養素源が窒素源を含む、請求項3、5、または7～10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項21】**

制限栄養素源が無機アンモニウム塩を含む、請求項3、5、または7～10のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 2】**

制限栄養素源が水酸化アンモニウムを含む、請求項 3、5、または 7～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 3】**

発酵培地の pH が制限栄養素源によって調節される、請求項 3、5、または 7～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 4】**

発酵培地が少なくとも 20 の温度である、請求項 1～3、5、または 7～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 5】**

微生物によって生産された脂質の合計の少なくとも 15 % を多価不飽和脂肪酸として生産する、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 6】**

微生物によって生産された脂質の合計の少なくとも 15 % をドコサヘキサエン酸として生産する、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 7】**

少なくとも 0.5 g / L / hr の平均速度で脂質を生産する、請求項 1～6 または 8～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 8】**

少なくとも 0.5 g / L / hr の平均速度で脂質を生産し、前記脂質の少なくとも 15 % が多価不飽和脂肪酸である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 9】**

少なくとも 0.5 g / L / hr の平均速度で脂質を生産し、-3 および -6 脂肪酸の合計量が前記脂質の少なくとも 20 % である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 0】**

少なくとも 0.5 g / L / hr の平均速度で脂質を生産し、前記脂質の少なくとも 25 % がドコサヘキサエン酸である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 1】**

微生物が、好気的条件下で生産することができる多価不飽和脂肪酸または他の脂質を生産することができる、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 2】**

微生物が、好気的条件下で生産される多価不飽和脂肪酸または他の脂質を生産する、請求項 3 1 に記載の方法。

**【請求項 3 3】**

微生物が好気的条件下で生産することができる多価不飽和脂肪酸または他の脂質を生産することができる方法であって、前記微生物が供給バッチ方法において生育する、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 4】**

微生物が、好気的条件下で生産される多価不飽和脂肪酸または他の脂質を生産する、請求項 3 3 に記載の方法。

**【請求項 3 5】**

微生物が好気的条件下で生産することができる多価不飽和脂肪酸または他の脂質を生産することができる方法であって、前記微生物が供給バッチ方法において生育する、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 6】**

微生物が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成る群より選択される、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 7】**

発酵培地中の溶存酸素が調節される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 38】**

発酵培地中の溶存酸素が、発酵槽のヘッドスペース中の酸素量の調節および発酵培地がかきませられる速度の調節から成る群より選択されるステップにより調節される、請求項 37 に記載の方法。

**【請求項 39】**

平均で少なくとも 0.2 g / L / hr のドコサヘキサエン酸を生産する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 40】**

(a) 発酵培地から水を除去し、乾燥微生物を得るステップと、

(b) 微生物脂質の少なくとも 15% が多価不飽和脂肪酸である、前記乾燥微生物から脂質を単離するステップとをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 41】**

微生物脂質の少なくとも 15% がドコサヘキサエン酸である、請求項 40 に記載の方法。

**【請求項 42】**

(a) 発酵培地を処理して、微生物細胞を透過化、溶解、または破裂させるステップと、

(b) 脂質 / 水エマルションの破壊を援助する作用物質の支援があるかまたは支援がない状態で比重選別法により発酵培地から脂質を回収するステップであって、微生物脂質の少なくとも 15% が多価不飽和脂肪酸であるステップとをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 43】**

微生物脂質の少なくとも 15% がドコサヘキサエン酸である、請求項 42 に記載の方法。

**【請求項 44】**

(a) 乾燥微生物を得るために、前もって遠心せずに発酵培地から水を蒸発させるステップと、

(b) 乾燥微生物から脂質を単離するステップであって、微生物脂質の少なくとも 15% が多価不飽和脂肪酸であるステップとをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 45】**

微生物脂質の少なくとも 15% がドコサヘキサエン酸である、請求項 44 に記載の方法。

**【請求項 46】**

培地の発酵が多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産し、発酵培地が少なくとも 100 g / 1 のバイオマス密度を有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 47】**

培地の発酵が多価不飽和脂肪酸を含む脂質を生産し、発酵培地が少なくとも 150 g / 1 のバイオマス密度を有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 48】**

微生物がポリケチドシンターゼ遺伝子を有する、請求項 2 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 49】**

ポリケチドシンターゼ遺伝子が微生物中で天然で生じる、請求項 48 に記載の方法。

**【請求項 50】**

ポリケチドシンターゼ遺伝子が微生物へ遺伝学的に導入される、請求項 48 に記載の方法。