



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0108064  
(43) 공개일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인
C07C 7/11 (2006.01) C07C 7/10 (2006.01)	아미리스 인코퍼레이티드
C12P 5/00 (2006.01)	미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트
(21) 출원번호 10-2012-7028294	100, 5885 홀리스 스트리트
(22) 출원일자(국제) 2011년08월12일	(72) 발명자
심사청구일자 없음	타부르 피나르
(85) 번역문제출일자 2012년10월29일	미국 캘리포니아주 94608 에머리빌 수트 100 5885
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/047616	홀리스 스트리트
(87) 국제공개번호 WO 2012/024186	도린 글렌
국제공개일자 2012년02월23일	미국 캘리포니아주 94608 에머리빌 수트 100 5885
(30) 우선권주장	홀리스 스트리트
61/373,876 2010년08월16일 미국(US)	(74) 대리인
	유미특허법인

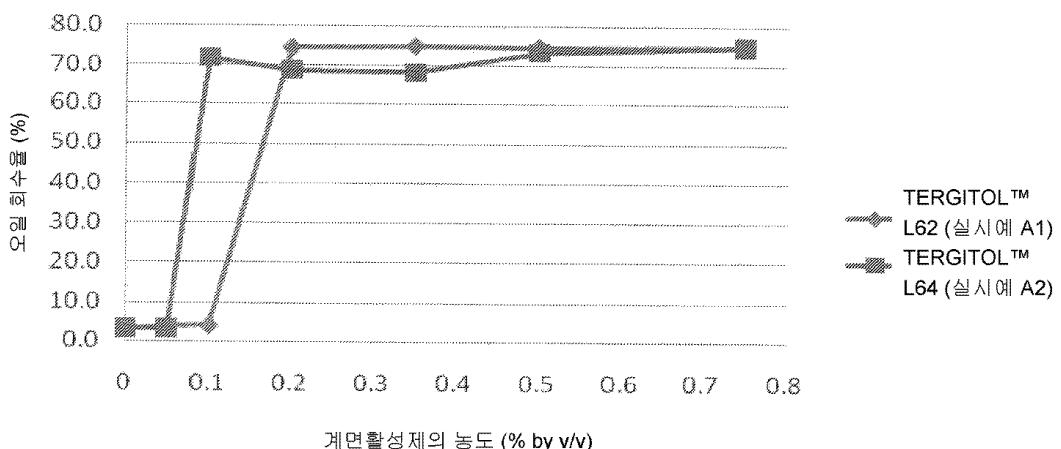
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 바이오오가닉 화합물의 정제 방법

### (57) 요 약

바이오오가닉 화합물의 정제 방법 및 시스템이 기재된다. 일부 구현예에서, 사의 방법은 (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 조성물을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소하고, 상기 조성물의 온도는 상기 조성물의 상 전환 온도의 적어도 약 1°C 아래임; (b) 상기 조성물의 온도를 상기 상 전환 온도의 적어도 약 1°C 위로 증가시키는 단계; 및 (c) 상기 조성물의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 화합물을 제공하는 단계를 포함한다.

### 대 표 도



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 조성물을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소하고, 상기 조성물의 온도는 상기 조성물의 상 전환 온도보다 적어도 약 1°C 낮음;
- (b) 상기 조성물의 온도를 상기 상 전환 온도보다 적어도 약 1°C 높은 온도로 증가시키는 단계; 및
- (c) 상기 조성물의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

단계 (b) 전에 상기 조성물의 부피를 감소시키는 단계를 추가로 포함하고, 상기 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부가 상기 조성물 내에 유지되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 조성물의 부피가 약 75중량% 이상 감소되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제1항, 제2항 또는 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 계면활성제는 비이온성 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 비이온성 계면활성제는 폴리에테르 폴리올, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 아민, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 아민, 폴리에틸렌 글리콜 알킬 에테르 또는 그 조합; 또는 폴리에테르 폴리올, 폴리옥시에틸렌 노닐 폐닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 데데실 폐닐 에테르 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단계 (a)에서 온도는 상기 상 전환 온도보다 적어도 약 5°C 또는 적어도 약 10°C 낮은 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단계 (b)에서 온도는 상기 상 전환 온도보다 적어도 약 5°C 또는 적어도 약 10°C 또는 적어도 약 15°C 높은 온도로 상승되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이오오가닉 화합물은 탄화수소 또는 이소프레노이드 또는 파네신인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 파네신은  $\alpha$ -파네신,  $\beta$ -파네신 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 세균, 균류, 조류 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 에쉐리히아속, 바실러스속, 락토바실러스속, 클루이베로마이세스, 피치아, 사카로마이세스, 야로이야, S. 세레비시애, 클로렐라 미누티시마, 클로렐라 에메르소니, 클로렐라 소르키니아나, 클로렐라 엘립소이디아, 클로렐라 sp., 클로렐라 프로토테코이데스 및 그 조합으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 상기 조 바이오오가닉 조성물을 정제하여 정제된 바이오오가닉 조성물을 수득하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

상기 조 바이오오가닉 조성물의 정제는 플래쉬 증류에 의한 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제12항에 있어서,

상기 정제된 바이오오가닉 조성물을 항산화제 또는 페놀성 항산화제로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 15**

계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 조성물로서,

상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소하고, 상기 조성물의 온도는 상기 조성물의 상 전환 온도보다 적어도 약 1°C 높은 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 16**

제15항에 있어서,

상기 계면활성제는 비이온성 계면활성제인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 17**

제16항에 있어서,

상기 비이온성 계면활성제는 폴리에테르 폴리올, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 아민, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 아민, 폴리에틸렌 글리콜 알킬 에테르 또는 그 조합; 또는 폴리에테르 폴리올, 폴리옥시에틸렌 노닐 폐닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 데테실 폐닐 에테르 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 18**

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물의 온도는 상기 상 전환 온도보다 약 5°C 또는 적어도 약 10°C 또는 적어도 약 15°C 높은 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이오오가닉 화합물은 탄화수소, 이소프레노이드 또는 파네신인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 20

제19항에 있어서,

상기 파네신은 파네신은  $\alpha$ -파네신,  $\beta$ -파네신 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 21

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 세균, 균류, 조류 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 22

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 에쉐리히아속, 바실러스속, 락토바실러스속, 클루이베로마이세스, 피치아, 사카로마이세스, 야로이야, S. 세레비시애, 클로렐라 미누티시마, 클로렐라 에메르소니, 클로렐라 소르키니아나, 클로렐라 엘립소이디아, 클로렐라 sp., 클로렐라 프로토테코이데스 및 그 조합으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 23

제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 에멀젼인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 24

(a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 수중유 에멀젼을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소함;

(b) 상기 수중유 에멀젼을 유중수 에멀젼으로 전환시키는 단계; 및

(c) 상기 유중수 에멀젼의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 조성물을 제공하는 단계

를 포함하는 방법.

### 청구항 25

제24항에 있어서,

단계 (b) 전에 상기 수중유 에멀젼의 부피를 감소시키는 단계를 추가로 포함하고, 상기 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부가 상기 조성물 내에 유지되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 26

제25항에 있어서,

상기 수중유 에멀젼의 부피는 약 75중량% 이상 감소하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 비이온성 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서,

상기 비이온성 계면활성제는 폴리에테르 폴리올, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 아민, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 아민, 폴리에틸렌 글리콜 알킬 에테르 또는 그 조합; 또는 폴리에테르 폴리올, 폴리옥시에틸렌 노닐 페닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 데데실 페닐 에테르 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 29**

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이오오가닉 화합물은 탄화수소, 이소프레노이드 또는 파네신인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서,

상기 파네신은 α-파네신, β-파네신 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 31**

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 세균, 균류, 조류 또는 그 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 32**

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 에쉐리히아속, 바실러스속, 락토바실러스속, 클루이베로마이세스, 피치아, 사카로마이세스, 야로이야, S. 세레비시애, 클로렐라 미누티시마, 클로렐라 에메르소니, 클로렐라 소르키니아나, 클로렐라 엘립소이디아, 클로렐라 sp., 클로렐라 프로토테코이데스 및 그 조합으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 33**

제24항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 상기 조 바이오오가닉 조성물을 정제하여 정제된 바이오오가닉 조성물을 수득하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 34**

제33항에 있어서,

상기 조 바이오오가닉 조성물의 정제는 플래쉬 증류에 의한 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서,

상기 정제된 바이오오가닉 조성물을 항산화제 또는 폐놀성 항산화제로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 36**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단계 (a)에서 조성물은 수중유 에멀젼이고, 상기 단계 (b) 및 (c)에서 조성물은 유중수 에멀젼인 것을 특징으로 하는 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2010. 8. 16 자로 출원된 미국 임시 특허 출원 제 61/373,876 호의 우선권을 주장하며, 이는 본원에 참조로 그 전체로서 포함된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 미생물-유도 바이오오가닉 화합물의 정제 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 하나 이상의 이소프레노이드를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물을 하나 이상의 파네신을 포함한다.

### 배경기술

[0005] 석유-유도 화합물 및 조성물은 플라스틱에서부터 가정용 세제 및 연료에 이르기까지 다양한 제품에서 발견된다. 이들 조성물들의 환경적 영향을 고려할 때, 더 재생가능하고 지속가능한 대체물에 대한 요구가 증가하고 있다.

[0006] 생물 공학은 이러한 화합물 및 조성물에 대한 재생가능한 급원을 제공할 수 있다. 예를 들어, 이소프레노이드는 50,000 개가 넘는 다양한 류의 화합물을 포함하고, 특수 화합물, 약품 및 연료로서를 포함하는 다양한 용도를 가진다. 전형적으로, 이소프레노이드는 석유 급원으로부터 합성되거나 또는 식물 급원으로부터 추출될 수 있다. 더 최근에, 이러한 화합물을 미생물 세포로부터 제조하는 방법이 개발되었다. 예를 들어, 이소프레노이드 및 기타 미생물-유도 화합물 및 조성물, 및 이를 제조하는 방법은 예를 들어 미국 특허 제 7,399,323호, 제 7,540,888호, 제 7,671,245호, 제 7,592,295호, 제 7,589,243호 및 제 7,655,739호에 기재되어 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0007] 그러나, 이러한 화합물의 비용 효율적인 제조 및 정제 방법이 요구되고 있다. 예를 들어, 원하는 바이오오가닉 화합물을 최적의 수율로 수득하는 방법이 요구되고 있다. 유용한 방법들이 본원에 제공된다.

#### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 미생물-유도 바이오오가닉 화합물의 정제 및/또는 분리 방법이 제공한다. 일 측면에서, 본 발명은

[0009] (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 조성물을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소하고, 상기 조성물의 온도는 상기 조성물의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 낮음;

[0010] (b) 상기 조성물의 온도를 상기 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 높은 온도로 증가시키는 단계; 및

[0011] (c) 상기 조성물의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0012] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 단계 (b) 전에 상기 조성물의 부피를 감소시키는 단계를 추가로 포함하고, 상기 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부가 상기 조성을 내에 유지된다. 특정 구현예에서, 상기 조성물의 부피가 약 75중량% 이상 감소된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 에멀젼이다. 특정 구현예에서, 상기 단계 (a)에서 조성물은 수중유 에멀젼이고, 상기 단계 (b) 및 (c)에서 조성물은 유중수 에멀젼이다.

[0013] 다른 측면에서, 본 발명은

[0014] (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 제1 조성물을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소함;

[0015] (b) 상기 제1 조성물을 농축시켜 농축된 조성물을 형성하는 단계 - 상기 농축된 조성물은 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부를 포함하고, 상기 농축된 조성물의 부피는 상기 제1 조성물의 부피보다 작으며, 상기 농축된 조성물의 온도는 상기 농축된 조성물의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 낮음;

- [0016] (c) 상기 농축된 조성물의 온도를 상기 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 높은 온도로 상승시키는 단계; 및
- [0017] (d) 상기 농축된 조성물의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0018] 다른 측면에서, 본 발명은 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 조성물로서, 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소하고, 상기 조성물의 온도는 상기 조성물의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 높은 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 에멀젼이다. 특정 구현예에서, 상기 조성물은 수중유 에멀젼이다. 다른 구현예에서, 상기 조성물은 유중수 에멀젼이다.
- [0019] 다른 측면에서, 본 발명은 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 에멀젼으로서, 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소하고, 상기 에멀젼의 온도는 상기 조성물의 상 전환 온도 혼탁점보다 적어도 약 1°C 높은 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0020] 다른 측면에서, 본 발명은
- [0021] (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 수중유 에멀젼을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소함;
- [0022] (b) 상기 수중유 에멀젼을 유중수 에멀젼으로 전환시키는 단계; 및
- [0023] (c) 상기 유중수 에멀젼의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 조성물을 제공하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0024] 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 수중유 에멀젼의 온도를 상승시키는 단계 (b) 전에, 상기 수중유 에멀젼의 부피를 감소시키는 단계를 추가로 포함하고, 상기 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부가 상기 조성물 내에 유지된다. 특정 구현예에서, 상기 수중유 에멀젼의 부피는 약 75중량% 이상 감소된다.
- [0025] 일부 구현예에서, 본 발명은
- [0026] (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 제1 수중유 에멀젼을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소함;
- [0027] (b) 상기 제1 수중유 에멀젼을 농축시켜 농축된 수중유 에멀젼을 형성하는 단계 - 상기 농축된 수중유 에멀젼은 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부를 포함하고, 상기 농축된 수중유 에멀젼의 부피는 상기 제1 수중유 에멀젼의 부피보다 작음;
- [0028] (c) 상기 농축된 수중유 에멀젼을 유중수 에멀젼으로 전환시키는 단계; 및
- [0029] (d) 상기 유중수 에멀젼의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0030] 본 발명에 의하면, 원하는 바이오오가닉 화합물을 최적의 수율로 수득하는 방법이 제공된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 TERGITOL<sup>TM</sup> L62 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L64를 포함하는 계면활성제의 농도의 함수로서 오일 회수율의 곡선이다. 도 2는 TERGITOL<sup>TM</sup> L62 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L64를 포함하는 계면활성제의 농도의 함수로서 오일 방출 속도의 곡선이다. 도 3은 TERGITOL<sup>TM</sup> L62, TERGITOL<sup>TM</sup> L64, ECOSURF<sup>TM</sup> SA-7 및 ECOSURF<sup>TM</sup> SA-9를 포함하는 계면활성제의 농도의 함수로서 오일 회수율의 곡선이다.

도 4는 TERGITOL™ L62, TERGITOL™ L64, ECOSURF™ SA-7 및 ECOSURF™ SA-9를 포함하는 계면활성제의 농도의 함수로서 오일 방출 속도의 곡선이다.

도 5는 볼텍스 믹서, 회전 믹서, 교반 막대 및 ULTRA-TURRAX® 분산기를 포함하는 상이한 방법으로 혼합된 샘플의 보유/혼합 시간의 함수로서 오일 방출 속도의 곡선이다.

도 6은 ULTRA-TURRAX® 분산기를 이용하여 혼합 시간의 함수로서 오일 방출 속도의 곡선이다.

도 7은 TERGITOL™ L62의 농도의 함수로서 오일 회수율의 곡선이다. ULTRA-TURRAX® 분산기 및 교반 막대를 포함하는 두 가지 혼합 방법을 조사하였다.

도 8은 TERGITOL™ L62의 농도의 함수로서 오일 방출 속도의 곡선이다. ULTRA-TURRAX® 분산기 및 교반 막대를 포함하는 두 가지 혼합 방법을 조사하였다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### [0032] 기술

"조 바이오오가닉 조성물"은 바이오오가닉 화합물이 상기 조 바이오오가닉 조성물의 적어도 약 75 중량%의 양으로 존재하는, 바이오오가닉 화합물을 포함하는 조성물을 의미한다. 일부 구현예에서, 상기 바이오가닉 화합물은 상기 조 바이오오가닉 조성물의 최대 약 80 중량%, 약 85 중량%, 약 87 중량% 또는 약 89 중량%의 양으로 존재한다.

"바이오오가닉 화합물"은 미생물 세포 (천연 발생 및 재조합 모두)에 의하여 생산되는 수불흔화성 화합물을 의미한다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 탄화수소이다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은  $C_4-C_{30}$  함유 화합물 또는 탄화수소이다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 이소프레노이드이다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은  $C_5-C_{20}$  이소프레노이드이다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은  $C_{10}-C_{15}$  이소프레노이드이다.

"상전환 온도" 또는 "PIT"는 에멀젼 시스템의 연속 및 분산 상이 반전되는 (예를 들어, 수중유 에멀젼이 유중수 에멀젼이 되고, 및 그 반대) 온도를 의미한다.

"흔탁점"은 유체 내에 용해되어 있는 하나 이상의 액체 및/또는 고체가 더 이상 완전히 가용성이 아니고, 제2상으로서 침전하여 유체에 흔탁 외관을 제공하는 온도를 의미한다.

"페놀 항산화제"는 페놀 또는 페놀 유도체인 항산화제로서, 상기 페놀 유도체는 하나 이상의 히드록실 치환체를 가지는 미용합 페닐을 함유하는 항산화제를 의미한다. 상기 용어는 또한 폴리페놀을 포함한다. 페놀 항산화제의 예시적 예는 레스베라트롤; 3-tert-부틸-4-히드록시아니솔; 2-tert-부틸-4-히드록시아니솔; 4-tert-부틸카테콜 (TBC로도 알려짐); 2,4-디메틸-6-tert-부틸페놀; 및 2,5-디-tert-부틸-4-메틸페놀 (부틸히드록시톨루엔 또는 BHT로도 알려짐)을 포함한다. 페놀 항산화제의 추가적인 예는 미국 특허 제 7,179,311 호에 개시되어 있다.

"정제된 바이오오가닉 화합물"은 바이오오가닉 화합물이 상기 조성물 내에 약 90 중량% 이상의 양으로 존재하는, 바이오오가닉 화합물을 포함하는 조성물을 의미한다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 약 95 중량%, 약 96 중량%, 약 97 중량%, 약 98 중량%, 약 99 중량% 또는 약 99.5 중량% 이상의 양으로 존재한다.

"정련된 조성물"은 예를 들어 조성물 내에 과산화물 형성을 감소시키기 위하여 또는 항산화제로 조성물을 안정화시키기 위하여 추가로 처리된, 또는 조성물 내 금속의 양을 감소시키기 위하여 퀼레이트제로 추가로 처리되는 정제된 바이오오가닉 조성물을 의미한다.

"공정(들)"은 미생물-유도 유기 화합물의 분리에 유용한 본원에 개시되는 정제 방법(들)을 의미한다. 본원에 개시되는 방법에 대한 변경 (예를 들어, 출발 물질, 시약) 또한 고려된다.

이하 상세한 설명에서, 모든 숫자들은 단어 "약" 또는 "대략적인"이 그와 함께 사용되는지와 무관하게 대략적인 값이다. 숫자들은 1중량%, 2중량%, 5중량% 또는 때때로 10 내지 20중량%로 변화할 수 있다. 하한  $R_L$  및 상한  $R_U$ 을 가지는 수치 범위가 개시될 때마다, 그 범위에 속하지 않는 숫자가 특히 개시된다. 특히, 그 범위 내의 숫자들이 특히 개시된다:  $R=R_L+k*(R_U-R_L)$ , 여기서 k는 1중량% 증가분으로 1중량% 내지 100중량% 범위로 변화할 수 있

다, 즉, k는 1중량%, 2중량%, 3중량%, 4중량%, 5중량%, ..., 50중량%, 51중량%, 52중량%, ..., 95중량%, 96중량%, 97중량%, 98중량%, 99중량% 또는 100중량%이다. 또한, 상기 정의된 바와 같이 두 개의 R 숫자들에 의하여 정의되는 수치 범위 또한 특히 개시된다.

[0042] 청구되는 요지가 이하 상세한 설명 및 예시적인 실시예를 참고로 하여 보다 완전히 이해될 것이며, 이는 비-제한적인 구현예를 예시하는 것으로 의도된다.

#### 정제 방법

[0044] 본원에 개시되는 바이오오가닉 화합물의 정제 방법이 제공된다. 상기 바이오오가닉 화합물은 당업자에 의하여 적합한 것으로 간주되는 임의의 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 상기 바이오오가닉 화합물의 일부 비-제한적 예는 미국 특허 제 7,399,323호 및 제 7,659,097호; 및 PCT 공보 WO 2007/140339, WO 2008/140492, WO 2008/133658 및 WO 2009/014636에 기재된 것과 같은 방법을 사용하여 제조되는 이소프레노이드를 포함하며, 상기 문헌들은 본원에 참조로 그 전체로서 포함된다. 다른 예는 미국 특허 공보 제 2009/0047721 호; 및 PCT 공보 WO 2008/113041 및 WO 2008/151149에 기재된 것과 같은 지방산 유도 올레핀을 포함하며, 상기 문헌들은 본원에 참조로 그 전체로서 포함된다.

[0045] 바이오오가닉 화합물을 생산하는 미생물적 방법에 대하여 기재하는 많은 문헌들이 있으나, 이러한 화합물을 발효 또는 기타 생물학적 생산 시스템으로부터 정제하는 방법에 대하여 기재하는 문헌은 상대적으로 매우 적다. 예를 들어, PCT 공보 WO 2007/139924는 바이오오가닉 화합물의 생산 시스템에 관한 것으로, 일반적으로 바이오오가닉 화합물이 수성 매질로부터 분리되는 고유의 경향에 의존하는 정제 방법에 대하여 기재한다. 그러나, 이러한 분리는 일어나지 않고 정제된 바이오오가닉 화합물이 얻어질 수 있으나, 예멀젼 형성으로 인하여 상당한 생성물 손실이 있을 수 있다.

[0046] 일반적으로, 예멀젼은 물과 오일 (예를 들어, 바이오오가닉 화합물)과 같은 두 가지 비혼화성 액체의 혼합물이다. 발효 (예를 들어, 교반기 또는 숙주 세포에 의하여 생산되는 발효 기체로부터) 또는 다운스트림 공정으로부터의 기계적 에너지는 예멀젼 형성을 촉진시킬 수 있으며, 여기서 바이오오가닉 화합물이 생산되고 연이어 예를 들어 수성 발효 매질 내로 추출된다. 또한, 다양한 참조 문헌에 기재된 바와 같이, 숙주 세포 및 그 안의 다양한 생체 분자 또한 예멀젼 형성을 촉진 및/또는 안정화할 수 있다. 위와 같은 이유로, 예멀젼 형성은 미생물 생산 시스템에서 피할 수 없다. 따라서, 미생물-유도 바이오오가닉 화합물을 비용 효율적으로 정제하기 위하여, 예멀젼을 불안정화하는 단순하고 규모 조정 가능한 정제 방법이 유용할 것이다.

[0047] 예멀젼을 신뢰가능하고 지속적으로 불안정화하고, 미생물-유도 바이오오가닉 화합물의 비용 효율적인 정제 방법을 제공하는 정제 방법이 제공된다. 일반적으로, 상기 방법은 먼저 발효액과 같은 수성 매질 내에서 화학적으로 정의된 예멀젼을 형성하는 것에 의존한다. 이러한 예멀젼의 형성은 그 수성 매질 내 용해도가 온도 증가에 따라 감소하며 상기 수성 매질의 온도가 상 전환 온도 또는 혼탁점 아래인 계면활성제의 첨가에 의하여 중재된다. 그 다음, 상기 조성물의 온도를 그 상 전환 온도 또는 혼탁점 위로 증가시킴으로써, 결과 형성되는 예멀젼을 불안정화시킨다. 특정 구현예에서, 최초로 형성되는 예멀젼은 수중유 예멀젼이다. 일부 구현예에서, 상기 수중유 예멀젼이 불안정화되어 상응하는 유중수 예멀젼을 형성한다.

[0048] 일 측면에서,

[0049] (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 조성물을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소하고, 상기 조성물의 온도는 상기 조성물의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 낮음;

[0050] (b) 상기 조성물의 온도를 상기 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 높은 온도로 상승시키는 단계; 및

[0051] (c) 상기 조성물의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 화합물을 제공하는 단계

[0052] 를 포함하는 방법이 제공된다.

[0053] 본원에서 온도 증가에 따라 감소하는 수성 매질 (예를 들어, 물 또는 액체를 포함하는 물) 내 용해도를 가지는 계면활성제가 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 사의 계면활성제는 비이온 계면활성제이거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴리에테르 폴리올, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬아릴 에테르(e.g., 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬페닐 에테르), 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 아민, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 아민, 폴리에틸렌 글리콜 알킬 에테르 또

는 그 조합이거나 이를 포함할 수 있다. 적합한 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 에테르의 일부 비제한적인 예는 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 에테르, 폴리옥시에틸렌 분지형 테실 에테르, 폴리옥시에틸렌 트리테실 에테르 또는 그 조합을 포함한다. 적합한 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 아릴 에테르의 일부 비제한적인 예는 폴리옥시에틸렌 도데실페닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 옥틸페닐 에테르 또는 그 조합을 포함한다. 적합한 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 에테르의 한가지 비제한적인 예는 폴리옥시에틸렌 올레익 에테르이다. 적합한 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알킬 아민의 일부 비제한적 예는 폴리옥시에틸렌 라우릴 아민, 폴리옥시에틸렌 스테아릴 아민, 폴리옥시에틸렌 탈로 아민 또는 그 조합을 포함한다. 적합한 폴리옥시에틸렌 C<sub>8-20</sub>-알케닐 아민의 한가지 비제한적인 예는 폴리옥시에틸렌 올레일 아민이다. 다른 구현예에서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴리에테르 폴리올, 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르, 폴리옥시에틸렌 도데실페닐 에테르 또는 그 조합이다. 특정 구현예에서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 친수성 테일을 함유한다.

- [0054] 조성물 또는 에멀젼의 상 전환은 상기 에멀젼의 연속 및 분산 상이 반전될 때 (예를 들어, 수중유 에멀젼이 유중수 에멀젼이 되고, 그 반대) 일어난다. 이러한 상 전환이 일어나는 온도가 상기 조성물 또는 에멀젼의 상 전환 온도 (PIT)이다. 일부 구현예에서, 계면활성제, 수성 매질 및 오일 (본원에 개시되는 바이오오가닉 화합물과 같은)을 함유하는 조성물 또는 에멀젼에서 이러한 현상이 일어나며, 여기서 상기 계면활성제는 온도 증가에 따라 감소하는 수성 매질 내 용해도를 가진다. 상기 온도가 물과 계면활성제 분자 간의 상호 작용이 감소하고 물 내 계면활성제 분할이 감소하는 지점까지 상승할 때, 상 전환이 일어날 수 있다. 그 결과, 상기 계면활성제 분자는 상기 상 전환 온도 (PIT) 이상에서 상기 유상 내에서 분할하기 시작한다.
- [0055] 조성물 또는 에멀젼의 PIT는 많은 물리적, 화학적 및 기하학적 요인에 의존할 수 있다. 일반적으로 PIT는 조성물 또는 에멀젼 내 액체 성분의 물리적 특성에 영향을 받을 수 있다. 이러한 물리적 특성의 일부 비제한적 예는 점도, 밀도 및 계면장력을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시되는 조성물 또는 에멀젼의 PIT는 본원에 개시되는 하나 이상의 물리적 특성들을 변화시킴으로써 조정, 감소 또는 증가된다.
- [0056] 조성물 또는 에멀젼의 PIT는 일반적으로 상기 조성물 또는 에멀젼을 함유 및/또는 가공하는 용기의 기하학적 요인에 영향을 받을 수 있다. 이러한 기하학적 요인의 일부 비제한적 예는 임펠러 또는 믹서의 수 및 유형, 교반 속도, 구성 재료 및 그 습윤 특성을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시되는 조성물 또는 에멀젼의 PIT는 본원에 개시되는 하나 이상의 기하학적 요인들을 변화시킴으로써 조정, 감소 또는 증가된다.
- [0057] 조성물 또는 에멀젼의 PIT는 일반적으로 상기 조성물 또는 에멀젼 내 성분의 화학적 특성에 영향을 받을 수도 있다. 이러한 요인의 일부 비제한적인 예는 (1) 계면활성제의 친수성 및 친유성 부분의 성질; (2) 계면활성제의 혼합; (3) 오일의 성질; (4) 유상 및 수상의 침가제의 성질; (5) 계면활성제의 농도; (6) 유상 대 수상의 비, 및 (7) 계면활성제 내 친수성 부분 (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 내 옥시에틸렌 부분)의 사슬 길이 분포이다. 이를 요인들 중 일부는 Mitsui *et al.*, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 43, No. 10, 3044-3048 (1970)에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시되는 조성물 또는 에멀젼의 PIT는 본원에 개시되는 하나 이상의 화학적 특성들을 변화시킴으로써 조정, 감소 또는 증가된다.
- [0058] 상기 계면활성제의 친수성 및 친유성 부분의 성질은 상기 PIT에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로, PIT는 상기 조성물 또는 에멀젼 내 계면활성제의 친수성-친유성 밸런스 (HLB)의 증가에 따라 증가한다. 계면활성제의 HLB 값은 일반적으로 분자의 친수성 및/또는 친유성 영역에 대한 값을 계산함으로써 결정된다. 이는 계면활성제가 친수성인지 또는 친유성인지에 대한 정도의 측정이다. 본원에 개시되는 계면활성제의 HLB 값은 W.C. Griffin, "Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants," *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 5:259 (1954); 및 J.T. Davies, "A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent," *Proceedings of the International Congress of Surface Activity*, pp. 426-438 (1957)와 같은 문헌에 공지된 방법에 의하여 측정될 수 있으며, 상기 문헌들은 본원에 참조로 포함된다.
- [0059] 일부 구현예에서, 본원에 개시되는 계면활성제는 약 2 내지 약 16, 약 2.5 내지 약 15, 약 3 내지 약 14, 약 3 내지 약 10, 약 3 내지 약 8, 또는 약 3 내지 약 6의 HLB 값을 가진다. 특정 구현예에서, 상기 계면활성제는 약 4 내지 약 18, 약 4 내지 약 16, 약 4 내지 약 14, 약 4 내지 약 12, 약 4 내지 약 10, 또는 약 4 내지 약 8의 HLB 값을 가진다. 다른 구현예에서, 상기 계면활성제는 약 6 내지 약 18, 약 8 내지 약 18, 약 8 내지 약 16, 약 8 내지 약 14, 또는 약 8 내지 약 12의 HLB 값을 가진다. 특정 구현예에서, 상기 계면활성제는 약 10 내지

약 18, 약 12 내지 약 18, 또는 약 13 내지 약 15의 HLB 값을 가진다.

[0060] 오일의 성질은 그 오일을 포함하는 조성물 또는 에멀젼의 PIT에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로, PIT는 오일의 친유성이 증가함에 따라 증가한다. 친유성은 일반적으로 로그 P 또는 로그 D로 표현된다. 로그 P는 옥탄을 내 중성 종의 농도 대 물 내 중성 종의 농도의 비율로서 정의되는, 분배 계수 P의 로그를 의미한다. 로그 D는 옥탄을 내 중성 및 전하를 띤 모든 종의 농도 대 물 내 모든 종의 농도의 비로서 정의되는, 분포 계수 D의 로그를 의미한다. 본원에 개시되는 바이오오가닉 화합물과 같은 오일의 친유성은 문헌에 공지되는 임의의 방법에 의하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 상기 오일의 분배 계수는 ASTM E1147-92에 따라 측정될 수 있으며, 상기 문헌은 본원에 참조로 포함된다. 대안적으로, 상기 친유성은 Abraham *et al.*, "Hydrogen bonding. Part 9. The partition of solutes between water and various alcohols," *Phys. Org. Chem.*, 7:712-716 (1994)에 기재되는 전형적인 쉐이크-플라스크 방법에 의하여 결정되며, 상기 문헌은 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시되는 바이오오가닉 화합물의 로그 P 또는 로그 D 값은 약 1 내지 약 6, 약 1 내지 약 5, 약 1 내지 약 4, 또는 약 1 내지 약 3이다.

[0061] 유사 및 수상의 첨가제의 존재 및 성질은 상기 조성물 또는 에멀젼의 PIT에 영향을 미칠 수 있다. 임의로, 본원에 개시되는 조성물 또는 에멀젼은 하나 이상의 첨가제를 포함할 수 있다. PIT를 조정, 감소 또는 증가시키기 위하여 사용될 수 있는 첨가제가 본원에서 사용될 수 있다. 첨가제의 일부 비제한적 예는 수용성 염 및 파라핀, 왁스, 유기 알콜 및 유기 산과 같은 유용성 성분을 포함한다. 일반적으로, 비극성 파라핀 및 왁스는 PIT를 증가시키는 반면, 극성 유기 알콜 및 유기 산은 PIT를 감소시킨다.

[0062] 계면활성제의 농도는 조성물 또는 에멀젼의 PIT에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로, PIT는 계면활성제의 농도가 증가함에 따라 감소한다. 일부 구현예에서, 상기 계면활성제의 농도는 조성물 또는 에멀젼의 총 중량 (또는 부피)을 기준으로 하여, 적어도 약 0.01 중량 (또는 부피)%, 약 0.1 중량 (또는 부피)%, 약 0.25 중량 (또는 부피)%, 약 0.5중량 (또는 부피)%, 약 0.75중량 (또는 부피)%, 약 1중량 (또는 부피)%, 약 2중량 (또는 부피)%, 약 3중량 (또는 부피)%, 약 4중량 (또는 부피)%, 약 5중량 (또는 부피)%, 약 6중량 (또는 부피)%, 약 7중량 (또는 부피)%, 약 8중량 (또는 부피)%, 약 9중량 (또는 부피)%, 약 10중량 (또는 부피)%, 약 15중량 (또는 부피) 또는 약 20중량 (또는 부피)% 이다. 특정 구현예에서, 상기 계면활성제의 농도는 상기 조성물 또는 에멀젼의 총 중량 (또는 부피)를 기준으로 하여, 최대 약 0.01 중량 (또는 부피)%, 약 0.1 중량 (또는 부피)%, 약 0.25 중량 (또는 부피)%, 약 0.5 중량 (또는 부피)%, 약 0.75 중량 (또는 부피)%, 약 1 중량 (또는 부피)%, 약 2 중량 (또는 부피)%, 약 3 중량 (또는 부피)%, 약 4 중량 (또는 부피)%, 약 5 중량 (또는 부피)%, 약 6 중량 (또는 부피)%, 약 7 중량 (또는 부피)%, 약 8 중량 (또는 부피)%, 약 9 중량 (또는 부피)%, 약 10 중량 (또는 부피)%, 약 15 중량 (또는 부피) 또는 약 20 중량 (또는 부피)%이다.

[0063] 유상 대 수상의 비는 조성물 또는 에멀젼의 PIT에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로, PIT는 유상 대 수상의 비가 증가함에 따라 증가한다. 나아가, 계면활성제의 농도가 낮을수록, PIT 증가 속도가 더 높다. 일부 구현예에서, 유상 대 수상의 비는 약 1:100 내지 약 100:1, 약 1:100 내지 약 100:1, 약 1:50 내지 약 50:1, 약 1:20 내지 약 20:1, 약 1:10 내지 약 10:1, 약 1:8 내지 약 8:1, 약 1:6 내지 약 6:1, 약 1:5 내지 약 5:1, 약 1:4 내지 약 4:1, 약 1:3 내지 약 3:1 또는 약 1:2 내지 약 2:1이다.

[0064] 계면활성제 내 친수성 부분의 사슬 길이 분포는 조성물 또는 에멀젼의 PIT에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로, PIT는 친수성 부분 (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 또는 폴리(에틸렌 옥사이드) 알킬아릴 에테르) 내 옥시에틸렌 부분)의 사슬 길이가 감소함에 따라 감소한다. 일부 구현예에서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 또는 폴리옥시에틸렌 알킬아릴 에테르이다. 특정 구현예에서, 상기 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 또는 폴리옥시에틸렌 알킬아릴 에테르 내 옥시에틸렌 단위의 수는 약 2 내지 약 20, 약 3 내지 약 18, 약 4 내지 약 16, 약 4 내지 약 14, 약 4 내지 약 12, 약 4 내지 약 10, 또는 약 4 내지 약 8이다.

[0065] 본원에 개시되는 조성물 또는 에멀젼의 PIT는 당업자에게 공지되는 방법에 의하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 PIT는 육안으로 상 전환이 일어나는 온도를 관찰함으로써 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, PIT는 조성물 또는 에멀젼의 pH를 측정함으로써 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, PIT는 조성물 또는 에멀젼의 전도성을 측정함으로써 결정될 수 있다. 일반적으로, PIT에서 조성물 또는 에멀젼의 외관, pH 또는 전도성 또는 기타 특성들에 관측가능한 변화 또는 전이점이 있다. 조성물 또는 에멀젼의 PIT를 결정하는 방법의 일부 비제한적인 예는 Shinoda *et al.*, "The Correlation between Phase Inversion Temperature in Emulsion and Cloud Point in Solution of Nonionic Emulsifier," *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 68, No. 12, 3485-3490 (1964); and Mitsui *et al.*, "An Application of the Phase-inversion-temperature Method to the

*Emulsification of Cosmetics. I. Factors Affecting the Phase-inversion Temperature," Bulletin of the Chemical Society of Japan, Vol. 43, No. 10, 3044-3048 (1970)*에 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본원에 참조로 포함된다.

- [0066] 조성물 또는 에멀젼의 상전환 온도 또는 혼탁점은 본원에 개시되는 하나 이상의 물리적, 화학적 및 기하학적 요인들에 의하여 조절 또는 조정될 수 있다. 본원에 개시되는 방법에 적합한 임의의 상 전환 온도가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 또는 에멀젼의 상전환 온도 또는 혼탁점은 약 20°C 내지 약 90°C 약 25°C 내지 약 85°C 약 30°C 내지 약 80°C, 약 35°C 내지 약 75°C, 약 40°C 내지 약 70°C, 또는 약 40°C 내지 약 60°C이다.
- [0067] 일부 구현예에서, 특히 PIT가 공지되어 있지 않거나 측정이 어려울 경우, 상기 언급한 Shinoda *et al.*에 기재되어 있는 바와 같이, 사용되는 계면활성제의 혼탁점이 조성물의 PIT의 좋은 근사치가 될 수 있으므로 PIT 대신 사용될 수 있다. 계면활성제의 혼탁점은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 계면활성제의 혼탁점은 "Standard Test Method for Cloud Point of Nonionic Surfactants" 제목의 ASTM D2024-09에 의하여 측정되며, 상기 문헌은 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 상기 혼탁점은 약 20°C 내지 약 95°C의 탈이온수 내 약 0.1 중량% 내지 약 1.0 중량% 농도로 ASTM D2024-09에 의하여 측정된다. 추가적인 구현예에서, 상기 혼탁점은 탈이온수 내 약 0.5 중량% 내지 약 1.0 중량%의 농도로 ASTM D2024-09에 의하여 측정된다.
- [0068] 상기 조성물 또는 에멀젼은 조성물 또는 에멀젼의 온도에 따라 수중유 에멀젼 또는 유중수 에멀젼일 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 화학적으로 정의되는 에멀젼의 온도는 상기 조성물 또는 에멀젼의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 낮다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 또는 에멀젼은 수중유 에멀젼이며, 그 온도는 그 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 낮다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 또는 에멀젼의 온도는 상기 조성물 또는 에멀젼의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 낮다. 다른 구현예에서, 조성물 또는 에멀젼의 온도는 상기 조성물 또는 에멀젼의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 5°C, 적어도 약 10°C, 적어도 약 15°C, 적어도 약 20°C, 적어도 약 25°C, 적어도 약 30°C, 적어도 약 35°C, 적어도 약 40°C 낮다.
- [0069] 일부 구현예에서, 조성물 또는 화학적으로 정의되는 에멀젼의 온도는 상기 조성물 또는 에멀젼의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 높다. 특정 구현예에서, 조성물 또는 에멀젼은 유중수 에멀젼이며, 그 온도는 그 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 높다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 에멀젼의 온도는 상기 조성물 또는 에멀젼의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 5°C, 적어도 약 10°C, 적어도 약 15°C, 적어도 약 20°C, 적어도 약 25°C, 적어도 약 30°C, 적어도 약 35°C, 또는 적어도 약 40°C 높다.
- [0070] 다른 측면에서,
- [0071] (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 수중유 에멀젼을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소함;
- [0072] (b) 상기 수중유 에멀젼을 유중수 에멀젼으로 전환시키는 단계; 및
- [0073] (c) 상기 유중수 에멀젼의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 조성물을 제공하는 단계
- [0074] 를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0075] 수중유 에멀젼의 상응하는 유중수 에멀젼으로의 전환은 문헌에 공지되는 임의의 방법에 의하여 실행될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 전환은 수중유 에멀젼의 온도를 그 PIT보다 높은 온도로 상승시킴으로써 실행된다. 특정 구현예에서, 상기 전환은 (1) 상기 수중유 에멀젼의 온도를 특정 온도에서 또는 일정 온도 범위로 유지시키고; (2) 본원에 개시되는 하나 이상의 물리적, 화학적 및 기하학적 요인들을 이용하여, 상기 수중유 에멀젼의 PIT를 상기 특정 온도 또는 온도 범위 아래의 값으로 감소시킴으로써 실행된다. 다른 구현예에서, 상기 전환은 (1) 상기 수중유 에멀젼의 온도를 특정 온도 또는 온도 범위로 상승 또는 감소시키고; (2) 본원에 개시되는 하나 이상의 물리적, 화학적 및 기하학적 요인들을 이용하여, 상기 수중유 에멀젼의 PIT를 상기 특정 온도 또는 온도 범위 아래의 값으로 조정함으로써 실행된다.
- [0076] 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 탄화수소이다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 C<sub>5</sub>-C<sub>30</sub> 탄화수소이다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 이소프레노이드이다. 추가적인 구현예에서, 상

기 바이오오가닉 화합물은 C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> 이소프레노이드이다. 부가적인 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub> 이소프레노이드이다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 지방산 또는 지방산 유도체이다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 C<sub>5</sub>-C<sub>35</sub> 지방산 또는 지방산 유도체이다. 부가적인 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 카렌, 게라니올, 리날로올, 리모넨, 미르센, 오시멘, 피넨, 사비넨, 테르피넨, 테르피놀렌, 아모르파디엔, 파네신, 파네솔, 네롤리돌, 발렌센 및 게라닐게라니올 또는 이의 조합으로부터 선택된다. 추가적인 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은 미르센,  $\alpha$ -오시멘,  $\beta$ -오시멘,  $\alpha$ -피넨,  $\beta$ -피넨, 아모르파디엔,  $\alpha$ -파네신,  $\beta$ -파네신 또는 이의 조합이다. 특정 구현예에서, 상기 바이오오가닉 화합물은  $\alpha$ -파네신,  $\beta$ -파네신 또는 이의 조합이다.

[0077] 특정 구현예에서, 상기 미생물 세포는 세균이다. 특정 구현예에서, 상기 미생물 세포는 에쉐리히아 (*Escherichia*), 바실러스 (*Bacillus*), 락토바실러스 (*Lactobacillus*) 속에 속한다. 특정 구현예에서, 상기 미생물 세포는 이콜라이 (*E. coli*)이다. 추가적인 구현예에서, 상기 미생물 세포는 진균이다. 더 추가적인 구현예에서, 상기 미생물 세포는 효모이다. 더 추가적인 구현예에서, 상기 미생물 세포는 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*), 퍼치아 (*Pichia*), 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 및 야로이아 (*Yarrowia*)이다. 부가적인 구현예에서, 상기 미생물 세포는 *S. 세레비시애* (*S. cerevisiae*)이다. 특정 구현예에서, 상기 미생물 세포는 조류이다. 특정 구현예에서, 상기 미생물 세포는 클로렐라 미누티시마 (*Chlorella minutissima*), 클로렐라 에메르소니 (*Chlorella emersonii*), 클로렐라 소르킨니아나 (*Chlorella sorkiniana*), 클로렐라 엘립소이디아 (*Chlorella ellipsoidea*), 클로렐라 sp. (*Chlorella sp.*) 또는 클로렐라 프로토테코이데스 (*Chlorella protothecoides*)이다.

[0078] 특정 구현예에서, 정화 (clarifying) 단계는 액체/고체 분리에 의하여 일어난다. 다른 구현예에서, 정화 단계는 침강 후 디캔테이션에 의하여 일어난다. 또 다른 구현예에서, 정화 단계는 여과에 의하여 일어난다. 특정 구현예에서, 정화 단계는 원심분리에 의하여 일어난다. 다른 특정 구현예에서, 정화 단계는 연속 디스크 스택 노즐 원심분리기 내에서 일어난다

[0079] 임의로, 조성물 또는 에멀젼의 pH를 약 7.5 보다 큰 pH로 조정할 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물 또는 에멀젼의 pH는 약 7.5 내지 약 10 사이의 pH로 조정된다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 에멀젼의 pH는 약 7.5 내지 약 9 사이의 pH로 조정된다. 다른 구현예에서, 조성물 또는 에멀젼의 pH는 약 8 내지 약 8.5 사이의 pH로 조정된다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 에멀젼의 pH는 9 보다 큰 pH로 조정된다.

[0080] 상기 조성물 또는 에멀젼의 pH는 당업자에게 적합한 것으로 간주되는 임의의 염기를 사용하여 조정될 수 있다. 적합한 염기의 예시적인 예는: 암모니아, 수산화칼륨, 수산화바륨, 수산화세슘, 수산화나트륨, 수산화스트론튬, 수산화칼슘, 수산화리튬, 수산화루비듐 및 수산화마그네슘을 포함한다. 매우 가용성이고 경제적인 염기가 일반적으로 상업적 규모의 작업에 바람직하다. 그러한 염기의 예시적인 예는 수산화칼륨 및 수산화나트륨을 포함한다.

[0081] 특정 구현예에서, 상기 조성물 또는 에멀젼은 액체/액체 분리에 의하여 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 또는 에멀젼은 바이오오가닉 화합물과 수성 매질 사이의 밀도차에 근거하는 원심분리에 의하여 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 또는 에멀젼은 연속 디스크-스택 원심분리에 의하여 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 또는 에멀젼은 액체/액체 추출 (용매 추출로도 알려짐)에 의하여 분리된다.

[0082] 특정 구현예에서, 상기 방법은 상기 조성물 또는 에멀젼 내 바이오오가닉 화합물을 농축된 조성물 또는 에멀젼으로 종축시킴으로써, 연이은 다운스트림 공정에 대한 부피를 감소시키는 단계를 추가로 포함한다. 따라서, 상기 농축 단계가 행하여지면, pH 조정 단계 및 액체-액체 분리 단계가 상기 조성물 또는 에멀젼 대신 농축된 조성물 또는 에멀젼에 대하여 수행된다.

[0083] 따라서, 다른 측면에서, 상기 방법은

[0084] (a) 계면활성제, 속주 세포, 수성 매질 및 상기 속주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 제1 조성물을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소함;

[0085] (b) 상기 제1 조성물을 농축시켜 농축된 조성물을 형성하는 단계 - 상기 농축된 조성물은 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부를 포함하고, 상기 농축된 조성물의 부피는 상기 제1 조성물의 부피보다 작으며, 상기 농축된 조성물의 온도는 상기 농축된 조성물의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 낮음;

[0086] (c) 상기 농축된 조성물의 온도를 상기 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 높은 온도로 상승시키는

단계; 및

[0087] (d) 상기 농축된 조성물의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0088] 다른 측면에서,

[0089] (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 제1 수중유 에멀젼을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라 감소함;

[0090] (b) 상기 제1 수중유 에멀젼을 농축시켜 농축된 수중유 에멀젼을 형성하는 단계 - 상기 농축된 수중유 에멀젼은 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부를 포함하고, 상기 농축된 수중유 에멀젼의 부피는 상기 제1 수중유 에멀젼의 부피보다 작음;

[0091] (c) 상기 농축된 수중유 에멀젼을 유중수 에멀젼으로 전환시키는 단계; 및

[0092] (d) 상기 유중수 에멀젼의 액체/액체 분리를 수행하여 조 바이오오가닉 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0093] 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 상기 제1 조성물 또는 에멀젼의 부피의 약 50%를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 상기 제1 조성물 또는 에멀젼의 부피의 최대 약 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 또는 1%이다. 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 상기 제1 조성물 또는 에멀젼의 부피의 최대 약 25%이다. 추가적인 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 상기 제1 조성물 또는 에멀젼의 부피의 최대 약 10%이다. 또 추가적인 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 상기 제1 조성물 또는 에멀젼의 최대 약 5%이다.

[0094] 특정 구현예에서, 상기 농축 단계는 접선유동여과 (TFF)에 의하여 일어난다. 예를 들어, 상기 정제된 조성물 또는 에멀젼 (실질적으로 숙주 세포가 없는)이 TFF를 이용하여 탈수된다. 다른 특정 구현예에서, 상기 정화 및 농축 단계는 동시에 일어난다. 예를 들어, 상기 정화 단계가 숙주 세포의 침강에 의하여 일어날 때, 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부를 함유하는 상기 혼합물의 상부가 디캔테이션된다. 이러한 상부가 농축된 조성물 또는 에멀젼이 된다. 다른 예에서, 정화 단계가 연속 디스크 스택 노즐 원심 분리를 이용하여 일어나는 경우, 바이오오가닉 화합물을 포함하는 혼합물 부분은 상기 바이오오가닉 화합물과 수성 매질 간의 밀도 차이에 근거하여 분리될 수 있다. 바이오오가닉 화합물을 함유하는 부분이 농축된 조성물 또는 에멀젼이 된다.

[0095] 임의로, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼의 pH를 약 7.5 보다 큰 pH로 조정할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼의 pH는 약 7.5 내지 약 10 사이의 pH로 조정된다. 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼의 pH는 약 7.5 내지 약 9 사이의 pH로 조정된다. 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼의 pH는 약 8 내지 약 8.5 사이의 pH로 조정된다. 부가적인 구현예에서, 상기 조성물 또는 에멀젼의 pH는 9 보다 큰 pH로 조정된다.

[0096] 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 액체/액체 분리에 의하여 분리되어 조 바이오오가닉 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 상기 바이오오가닉 화합물과 수성 매질 간의 밀도 차에 근거하는 원심분리에 의하여 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 연속, 3상, 디스크-스택 원심분리에 의하여 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 액체/액체 추출 (용매 추출로도 불리움)에 의하여 분리된다.

[0097] 특정 구현예에서, 상기 방법은 상기 조 바이오오가닉 조성물을 정제하여 정제된 바이오오가닉 조성물을 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 임의의 적합한 방법을 사용할 수 있으며, 이는 바이오오가닉 화합물의 원하는 순도 수준 또는 최종 조성물 내 불순물의 허용가능한 수준에 의존할 것이다. 적합한 방법은 이에 제한되지 않으나: 분별 증류, 흡착 및 액체 크로마토그래피를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 정제는 플래쉬 증류에 의한다. 특정 구현예에서, 상기 정제는 실리카 젤 여과에 의한다. 부가적인 구현예에서, 상기 정제는 상기 정제는 알루미나 여과에 의한다.

[0098] 다른 측면에서, 상기 방법은:

[0099] (a) 계면활성제, 숙주 세포, 수성 매질 및 상기 숙주 세포에 의하여 생산되는 바이오오가닉 화합물을 포함하는 제1 조성물 또는 에멀젼을 제공하는 단계 - 상기 수성 매질 내 상기 계면활성제의 용해도는 온도 증가에 따라

감소함;

- [0100] (b) 상기 제1 조성물 또는 에멀젼을 농축시켜 농축된 조성물 또는 에멀젼을 형성하는 단계 - 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼은 바이오오가닉 화합물의 실질적으로 전부를 포함하고, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼의 부피는 상기 제1 조성물 또는 에멀젼의 부피보다 작고, 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼의 온도는 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼의 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 낮음;
- [0101] (c) 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼의 온도를 상기 상 전환 온도 또는 혼탁점보다 적어도 약 1°C 높은 온도로 상승시키는 단계;
- [0102] (d) 상기 농축된 조성물 또는 에멀젼을 원심분리하여 상기 수성 매질로부터 상기 바이오오가닉 화합물을 분리함으로써, 조 바이오오가닉 조성물을 형성하는 단계; 및
- [0103] (e) 상기 중화된 조 조성물을 플래쉬 증류하여 중화되고 정제된 조성물을 제공하는 단계
- [0104] 를 포함한다.
- [0105] 특정 구현예에서, 상기 숙주 세포는 효모 세포이다.
- [0106] 특정 구현예에서, 상기 정제된 조성물 (중화되든 아니든)은 추가로 정련된다. 예를 들어, 상기 바이오오가닉 화합물이 올레핀인 경우, 상기 방법은 상기 정제된 바이오오가닉 화합물에 항산화제를 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 항산화제의 첨가는 과산화물의 형성을 지연시킬 수 있고, 상기 정제된 바이오오가닉 화합물을 안정화시킨다. 당업자에게 적합한 것으로 간주되는 임의의 항산화제를 사용할 수 있다. 그러나, 상기 올레핀이 연이어 수소화되는 경우,  $\alpha$ -토코페놀과 같은 특정 통상적으로 사용되는 항산화제와 같은 온화한 조건 하에 수소화 반응을 간섭하지 않는 폐놀성 항산화제가 바람직하다. 적합한 항산화제의 예시적인 예는 레스베라트롤; 3-tert-부틸-4-히드록시아니솔; 2-tert-부틸-4-히드록시아니솔; 2,4-디메틸-6-tert-부틸페놀; 2,6-디-tert-부틸-4-메틸페놀; 및 4-tert-부틸카테콜을 포함한다.
- [0107] 다른 실시예에서, 상기 정제된 조성물은 킬레이트제를 첨가하여 조성물 내 금속의 양을 감소시킴으로써 추가로 정련될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 정제 단계는 킬레이트제의 첨가에 의하여 상기 조 바이오오가닉 조성물 내 존재하는 금속을 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 임의의 적합한 킬레이트제를 사용할 수 있다. 적합한 킬레이트제의 예시적인 예는 아스코르브산, 시트르산, 말산, 옥살산, 숙신산, 디카르복시메틸루탐산, 에틸렌디아민디숙신산 (EDDS), 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) 등을 포함한다.
- [0108] 본원에 제공되는 공정 및 시스템은 제한된 수의 구현예에 대하여 기재되었으나, 일 구현예의 특징들이 본 발명의 공정 또는 시스템의 다른 구현예의 것으로 보지 않아야 한다. 어떠한 단일 구현예도 본 발명의 방법 또는 시스템의 모든 측면을 대표하는 것이 아니다. 특정 구현예에서, 상기 공정은 본원에 언급되지 않은 많은 단계들을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 공정은 본원에 열거되지 않은 임의의 단계를 포함하지 않는다. 기재되는 구현예로부터 변형 및 변화가 존재한다.
- [0109] 정제 방법은 많은 단계들을 참고로 기재되었음을 주목한다. 특정 구현예에서, 이러한 단계들은 임의의 순서로 실행될 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 단계들이 생략되거나 조합될 수 있으나, 실질적으로 동일한 결과에 도달한다. 첨부하는 청구항들은 청구되는 내용의 범위 내에 속하는 이러한 모든 변형 및 변화를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0110] 본원 명세서에 언급되는 모든 문헌 및 특히 출원들은 각각의 개별적인 공보 또는 특히 공보가 참조로 포함되는 것으로 특별히 및 개별적으로 나타내어지는 것과 같이 동일한 정도로 참조로 본원에 포함된다. 청구되는 내용이 이해의 명확성을 목적으로 예시 및 실시예에 의하여 일부 상세히 기재되나, 첨부되는 청구항들의 사상 또는 범위로부터 이탈함이 없이 이에 대한 특정 변화 및 변형이 행하여질 수 있음이 본원의 교시의 견지에서 당업자에게 분명할 것이다.
- [0111] **실시예**
- [0112] 실시예 1 - CCB의 제조
- [0113] 이 실시예는 농축 정화액 (이하 "CCB")의 제조 방법을 기재한다.
- [0114] 파일럿 플랜트 발효로부터의 발효 수확액을 파일럿 규모의 연속 노즐 원심분리기 내에서 연속 원심분리를 이용하여 분별하였다. 두 아웃풋 스트림 (농축액 및 여액)이 생산되었다. 상기 침강된 세포 및 수성 폐기물을 함유

하는 농축액 스트림이 노즐로부터 배출되었다. 상기 여액 스트림으로부터, 약 50% 물 및 약 50% 파네신을 함유하는 CCB가 수집되었다. 각각의 발효 로트에 접종일에 근거한 고유의 로트 번호가 주어졌다.

- [0115] 실시예 2 - 60°C에서 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 배출되는 파네신에 대한 상이한 계면활성제 농도의 영향
- [0116] 이 실시예는 60°C의 인큐베이션 온도에서 사탕수수 시럽으로부터 유도되는 CCB로부터의 파네신 배출 또는 배출되는 파네신의 양 (오일 회수 및 방출 속도 측면에서)에 대한, TERGITOL™ L62 및 TERGITOL™ L64를 포함하는 상이한 계면활성제의 영향을 보인다.
- [0117] CCB (Lot No.: PP031910F2\_draw2) (튜브 당 1 ml)를 1.5 ml 미량 원심분리기 투브들 내로 분취하였다. 상이한 농도의 TERGITOL™ L62 또는 TERGITOL™ L64를 상기 투브들 내로 첨가하였다. 그 다음, 각각의 투브의 내용물을 볼텍스 믹서에 의하여 주변 온도에서 10 분 동안 혼합하였다. 그 다음, 상기 투브들을 60°C에서 30 분 동안 고온 욕 내에서 인큐베이션하였다. 상기 투브들로부터의 샘플들 (400 $\mu$ l)을 lumisizer 미량 원심분리기 셀 내에 첨가하고, L.U.M. GmbH, Berlin, Germany로부터 구입한 분석학적 원심분리기인 HIGH-END DISPERSION ANALYSER LUMISIZER® (이하 "Lumisizer"라 함)에 의하여 분석하였다. 상기 Lumisizer 내 샘플들을 4000 rpm (2300 x g)에서 약 60°C에서 22 분 동안 원심분리하였다. 샘플들의 세포 내로의 이송 중 열 손실을 방지하기 위하여, 각각의 세포를 상기 이송 단계가 완료될 때까지 약 60°C에서 고온 욕 내로 배치하였다. TERGITOL™ L62를 가지는 샘플을 실시예 A1로 표지하고, TERGITOL™ L64를 가지는 샘플을 실시예 A2로 표지하였다. 실시예 A1-A2의 오일 회수율 및 오일 방출 속도를 측정하고, 오일 회수율 및 오일 방출 속도 대 계면활성제의 농도의 곡선을 도 1 및 도 2에 각각 도시하였다.
- [0118] 도 1을 참조하면, TERGITOL™ L62 및 TERGITOL™ L64 농도 각각의 증가에 따른 오일 회수율의 급격한 증가가 있었다. 이는 예멀젼 파괴에 대한 임계적인 한계 농도가 있었음을 나타내는 것이다. 도 2를 참조로 하면, 실시예 A1은 실시예 A2보다 더 높은 오일 방출 속도를 가진다. 이는 TERGITOL™ L62가 TERGITOL™ L64보다 60°C에서 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 더 많은 오일 (즉, 파네신)을 방출하였음을 나타낸다.
- [0119] 실시예 3: TERGITOL™ L62, TERGITOL™ L64, ECOSURF™ SA-7 및 ECOSURF™ SA-9을 포함하는 상이한 계면활성제를 이용하는 오일 회수율 및 오일 방출 속도의 비교
- [0120] 이 실시예는 60°C의 인큐베이션 온도에서 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 배출되는 파네신의 양에 대한 (오일 회수율 및 오일 방출 속도의 측면에서) TERGITOL™ L62, TERGITOL™ L64, ECOSURF™ SA-7 및 ECOSURF™ SA-9를 포함하는 상이한 계면활성제의 영향을 보인다.
- [0121] 유사한 혼탁점을 가지나 상이한 화학적 구조를 가지는 계면활성제를 CCB 유화파괴에 대하여 시험하였다. 사용되는 계면활성제는 TERGITOL™ L62, TERGITOL™ L64, ECOSURF™ SA-7 및 ECOSURF™ SA-9를 포함한다.
- [0122] CCB (Lot No.: PP040210F2\_draw1) (튜브 당 1 ml)를 1.5 ml 미량 원심분리기 투브들 내로 분취하였다. 상이한 농도의 상이한 계면활성제들을 상기 투브들 내로 첨가하였다. 각각의 투브의 내용물들을 볼텍스 믹서에 의하여 주변 온도에서 10 분 동안 혼합하였다. 그 다음, 상기 투브들을 약 70°C에서 대략 1 시간 동안 고온 욕 내에서 인큐베이션하였다. 상기 투브들로부터의 샘플(400 $\mu$ l)을 lumisizer 미량 원심분리기 세포 내로 첨가하여 Lumisizer에 의하여 분석하였다. 상기 Lumisizer 내 샘플들을 약 60°C에서 22 분 동안 4000 rpm (2300 x g)에서 원심분리하였다. 샘플들의 세포 내로의 이송 중에 열 손실을 방지하기 위하여, 각각의 세포를 이송 단계가 완료될 때까지 약 60°C에서 고온 욕 내로 배치하였다.
- [0123] 각각의 샘플의 오일 회수율 및 오일 방출 속도를 측정하고, 오일 회수율 및 오일 방출 속도 대 계면활성제의 농도를 도 3 및 4에 각각 도시하였으며, 여기서 TERGITOL™ L62를 가지는 샘플을 실시예 B1로 표지하고; TERGITOL™ L64를 가지는 샘플을 실시예 B2로 표지하고; ECOSURF™ SA-7를 가지는 샘플을 실시예 B3으로 표지하고; ECOSURF™ SA-9를 가지는 샘플을 실시예 B4로 표지하였다.

- [0124] 실시예 B1 및 B2로부터 얻은 적정 곡선들은 실시예 B3 및 B4로부터 얻은 곡선들과 달랐다. 실시예 B1 및 실시예 B2의 곡선들은 오일 회수율의 급격한 증가를 가진 반면, 실시예 B3 및 실시예 B4의 곡선들 각각은 계면활성제 농도가 증가될 때 오일 회수율의 보다 점진적인 반응을 가졌다.
- [0125] 실시예 B1 및 B2의 오일 회수율은 낮은 계면활성제 농도에서 실시예 B3 및 B4의 것들보다 더 높았다. 데이터는 0.2 v/v% 이하의 TERGITOL<sup>TM</sup> L62 또는 TERGITOL<sup>TM</sup> L64가 CCB로부터 파네신을 방출하기에 충분하였음을 보인다.
- [0126] TERGITOL<sup>TM</sup> L62 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L64 (The Dow Chemical Company로부터 얻음, Midland, Michigan)는 화학적으로 합성된 화합물인 폴리에테리 폴리올, 비이온성 계면활성제인 반면, ECOSURF<sup>TM</sup> SA-7 및 ECOSURF<sup>TM</sup> SA-9 (The Dow Chemical Company로부터 얻음, Midland, Michigan)는 천연 급원의 씨드오일로부터 변형된 알콜 에톡실레이트계 비이온성 계면활성제이다.
- [0127] 실시예 4 - 30°C 및 40°C에서 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 배출되는 파네신에 대한 계면활성제 농도의 영향
- [0128] 이 실시예는 30°C 및 40°C의 인큐베이션 온도에서 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 파네신 배출 또는 배출되는 파네신의 양에 대한, TERGITOL<sup>TM</sup> L64, TERGITOL<sup>TM</sup> NP-7, 및 TERGITOL<sup>TM</sup> TMN-6를 포함하는 상이한 계면활성제의 농도의 영향을 보인다.
- [0129] CCB (Lot No.: PP040910F1) (튜브 당 1 ml)를 1.5 ml 미량 원심분리기 튜브들 내로 분취하였다. 상이한 농도의 계면활성제를 상기 튜브들 내로 첨가하였다. 그 다음, 각각의 튜브의 내용물을 주변 온도에서 약 10 분 동안 불 텍스 믹서에 의하여 혼합하였다. 그 다음, 상기 튜브들을 30°C 및 40°C에서 각각 약 15 분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상기 튜브들을 상기 인큐베이션 온도에서 5 분 동안 10,000 x g에서 원심분리하였다.
- [0130] 0.1 내지 0.4 v/v% 범위의 양의 TERGITOL<sup>TM</sup> L64과 40°C에서 인큐베이션된 튜브들을 실시예 C1-C4로 각각 표지하였다. 0.2 vol% 및 0.5 vol%의 TERGITOL<sup>TM</sup> NP-7와 40°C에서 인큐베이션된 튜브들을 각각 실시예 C5-C6으로 표지하였다. 0.2 vol% 및 0.5 vol%의 TERGITOL<sup>TM</sup> TMN-6과 40°C에서 인큐베이션된 튜브들을 각각 실시예 C7-C8로 표지하였다. 0.1 내지 0.4 v/v% 범위의 TERGITOL<sup>TM</sup> L64와 30°C에서 인큐베이션된 튜브들을 각각 실시예 C9-C12로 표지하였다. 0.2 vol% 및 0.5 vol%의 TERGITOL<sup>TM</sup> NP-7과 30°C에서 인큐베이션된 튜브들을 각각 실시예 C13-C14로 표지하였다. 0.2 vol% 및 0.5 vol%의 TERGITOL<sup>TM</sup> TMN-6과 30°C에서 인큐베이션된 튜브들을 각각 C15-C16으로 표지하였다.
- [0131] 두 가지 대조 실험 (즉, 대조군 C1-C2)을 계면활성제의 첨가가 없는 것을 제외하고 상기와 동일한 절차에 따라 30°C 및 40°C에서 각각 수행하였다. 이하 표 2는 실시예 C1-C16 및 대조군 C1-C2의 조건을 제공한다.
- [0132] 원심분리 후 샘플들을 관찰함에 의하여, 대조군 C1-C2에 2 층들 (수상 바닥층 및 유화된 파네신 상부층)이 있는 반면, 실시예 C1-C16에 3 층들 (수상 바닥층, 유화된 파네신 중간층 및 투명한 파네신 상부층)이 있는 것으로 밝혀졌다. 상기 실시예 C6 및 C14에서 투명한 파네신 상부층이 모든 샘플들 중 가장 높은 것으로 관찰되었다. 따라서, 실시예 C6 및 C14에서 TERGITOL<sup>TM</sup> NP-7은 30°C 만큼 낮은 온도에서 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 파네신을 방출함에 있어 매우 효과적인 것으로 밝혀졌으며, 이는 사용되는 TERGITOL<sup>TM</sup> NP-7의 혼탁점 (20°C)과 일치하였다. 실시예 C8에서 파네신 상부층의 양은 실시예 C6 및 C14에서의 것들과 대략 동일하였다. 그러나, 실시예 C16에서의 투명한 파네신 상부층의 양은 실시예 C8 및 C6 및 C14에서의 것들보다 훨씬 적었다. 따라서, TERGITOL<sup>TM</sup> TMN-6은, 30°C는 아니더라도 40°C 만큼 낮은 온도에서 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 파네신을 방출함에 있어 매우 효과적인 것으로 밝혀졌으며, 이는 TERGITOL<sup>TM</sup> TMN-6의 혼탁점 (36°C)과 일치하였다. 그러나, 실시예 C1-C4 및 C9-C12에서의 투명한 파네신 상부층의 양은 실시예 C8 및 C6 및 C14에서의 것들보다 훨씬 적었다. 따라서, TERGITOL<sup>TM</sup> L-64는 30°C 및 40°C 모두에서 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 파네신을 방출함에 있어 효과적이지 않은 것으로 밝혀졌으며, 이는 TERGITOL<sup>TM</sup> L-64의 혼탁점 (62°C)과 일치하였다.

## 표 2

[0133]

실시예 C1-C16 및 대조군 C1-C2의 조건들의 열거

샘플	인큐베이션 온도 (°C)	계면활성제의 유형	계면활성제의 농도 (v/v%)
실시예 C1	40	TERGITOL™ L64	0.1
실시예 C2	40	TERGITOL™ L64	0.2
실시예 C3	40	TERGITOL™ L64	0.3
실시예 C4	40	TERGITOL™ L64	0.4
실시예 C5	40	TERGITOL™ NP-7	0.2
실시예 C6	40	TERGITOL™ NP-7	0.5
실시예 C7	40	TERGITOL™ TMN-6	0.2
실시예 C8	40	TERGITOL™ TMN-6	0.5
실시예 C9	30	TERGITOL™ L64	0.1
실시예 C10	30	TERGITOL™ L64	0.2
실시예 C11	30	TERGITOL™ L64	0.3
실시예 C12	30	TERGITOL™ L64	0.4
실시예 C13	30	TERGITOL™ NP-7	0.2
실시예 C14	30	TERGITOL™ NP-7	0.5
실시예 C15	30	TERGITOL™ TMN-6	0.2
실시예 C16	30	TERGITOL™ TMN-6	0.5
대조군 C1	40	-	0
대조군 C2	30	-	0

[0134] 실시예 5 - 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 배출되는 파네신에 대한 인큐베이션 온도 및 상이한 계면활성제의 영향

[0135] 이 실시예는 사탕수수 시럽 유도 CCB로부터 배출되는 파네신의 양에 대한, TERGITOL™ L62, TERGITOL™ L64, 및 TRITON™ X114를 포함하는 상이한 계면활성제, 및 30°C, 40°C, 50°C 및 60°C의 인큐베이션 온도의 영향을 보인다.

[0136] CCB (Lot No.: PP041610F2) (튜브 당 1 ml)를 1.5 ml 미량 원심분리기 튜브들 내로 분취하였다. TERGITOL™ L62, TERGITOL™ L64 및 TRITON™ X114를 포함하는 상이한 계면활성제를 0.5 v/v%의 양으로 상기 튜브들 내로 첨가하였다. 각각의 튜브의 내용물을 주변 온도에서 약 10 분 동안 볼텍스 믹서에 의하여 혼합하였다. 그 다음, 상기 튜브들을 30°C, 40°C, 50°C 및 60°C에서 각각 약 15 분 동안 인큐베이션하였다. 상기 튜브들로부터의 샘플들 (400 µl)을 lumisizer 미량 원심분리기 세포 내에 첨가하고, Lumisizer에 의하여 분석하였다. Lumisizer 내에 샘플들을 상기 인큐베이션 온도에서 22 분 동안 4000 rpm (2300 x g)에서 원심분리하였다.

[0137] 30°C, 40°C, 50°C 및 60°C에서 인큐베이션된 0.5 v/v%의 TERGITOL™ L62를 가지는 샘플들을 실시예 D1, D4, D7 및 D10으로 각각 표지하였다. 30°C, 40°C, 50°C 및 60°C에서 인큐베이션된 0.5 v/v%의 TERGITOL™ L64를 가지는 샘플들을 각각 실시예 D2, D5, D8 및 D11로 표지하였다. 30°C, 40°C, 50°C 및 60°C에서 인큐베이션된 0.5 v/v%의 Tritron X114를 가지는 샘플들을 각각 D3, D6, D9 및 D12로 표지하였다. 네 개의 대조 실험 (대조군 D1-D4)을 계면활성제를 첨가하지 않는 것을 제외하고 상기 절차에 따라 수행하였다.

[0138] 실시예 D1-D12 및 대조군 D1-D4의 오일 방출 속도 및 오일 회수율을 측정하였다. 표 3 및 표 4는 실시예 D1-D12 및 대조군 D1-D4의 오일 방출 속도 및 오일 회수율 결과를 제공한다.

### 표 3

[0139]

실시예 (D1-D12) 및 대조군 D1-D4의 오일 방출 속도

샘플	계면활성제 유형	계면활성제 농도 (v/v%)	인큐베이션 온도 (°C)	오일 방출속도 (mm/sec)
대조군 D1	-	-	30	-0.0401
실시예 D1	TERGITOL™ L62	0.5	30	0.0063
실시예 D2	TERGITOL™ L64	0.5	30	-0.0853
실시예 D3	TRITON™ X114	0.5	30	3.1361
대조군 D2	-	-	40	-0.1674
실시예 D4	TERGITOL™ L62	0.5	40	0.1117
실시예 D5	TERGITOL™ L64	0.5	40	-0.1327
실시예 D6	TRITON™ X114	0.5	40	12.2822
대조군 D3	-	-	50	-0.2128
실시예 D7	TERGITOL™ L62	0.5	50	0.2063
실시예 D8	TERGITOL™ L64	0.5	50	0.0904
실시예 D9	TRITON™ X114	0.5	50	15.5995
대조군 D4	-	-	60	-0.0725
실시예 D10	TERGITOL™ L62	0.5	60	13.7826
실시예 D11	TERGITOL™ L64	0.5	60	9.9733
실시예 D12	TRITON™ X114	0.5	60	36.1787

표 4

[0140]

실시예 (D1-D12) 및 대조군 D1-D4의 오일 회수율

샘플	계면활성제 유형	계면활성제 농도 (v/v%)	인큐베이션 온도 (°C)	예멀젼 길이 (mm)	투명한 오일 길이 (mm)	예멀젼 내 투명한 오일 % (오일 회수율과 동일함)
대조군 D1	-	-	30	9.27	0.42	5%
실시예 D1	TERGITOL™ L62	0.5	30	10.01	0.7	7%
실시예 D2	TERGITOL™ L64	0.5	30	9.29	0.52	6%
실시예 D3	TRITON™ X114	0.5	30	9.01	0.85	9%
대조군 D2	-	-	40	9.38	0.4	4%
실시예 D4	TERGITOL™ L62	0.5	40	9.99	0.7	7%
실시예 D5	TERGITOL™ L64	0.5	40	9.47	0.52	5%
실시예 D6	TRITON™ X114	0.5	40	8.95	7.44	83%
대조군 D3	-	-	50	9.33	0.6	6%
실시예 D7	TERGITOL™ L62	0.5	50	9.25	2.2	24%
실시예 D8	TERGITOL™ L64	0.5	50	9.41	1.85	20%
실시예 D9	TRITON™ X114	0.5	50	8.54	8	94%
대조군 D4	-	-	60	9.11	0.79	9%
실시예 D10	TERGITOL™ L62	0.5	60	11.28	5.93	53%
실시예 D11	TERGITOL™ L64	0.5	60	9.02	6.3	70%
실시예 D12	TRITON™ X114	0.5	60	9.08	7.85	86%

[0141] TRITON™ X114를 가지는 (30°C에서 인큐베이션된) 샘플 (실시예 D3)의 오일 방출 속도가 동일 인큐베이션 온도를

가지는 샘플들 (실시예 D1-D3) 중 가장 높았으며, 이는 TRITON™ X114의 혼탁점 (25°C)와 일치하였다. TERGITOL™ L62 및 TERGITOL™ L64를 가지는 샘플들의 오일 방출 속도는 인큐베이션 온도에 따라 증가하였으며, 이는 각각 32°C 및 62°C의 TERGITOL™ L62 및 TERGITOL™ L64의 혼탁점과 일치하였다.

[0142] 실시예 6 - 오일 회수율 및 오일 방출 속도에 대한 상이한 계면활성제의 영향

[0143] 이 실시예는 50°C의 인큐베이션 온도에서 소정의 배지 발효액 유도 CCB로부터 배출되는 파네신의 양에 대한, TERGITOL™ L62 및 TRITON™ X114를 포함하는 상이한 계면활성제의 효과를 보인다.

[0144] 소정의 매질 발효로부터 분리되는 CCB를 투브 당 1 ml의 양으로 1.5 ml 미량 원심분리기 투브 내로 분취하였다. 0.2 또는 0.5 v/v%의 TRITON™ X114; 및 0.2 v/v%의 TERGITOL™ L62를 포함하는, 상이한 계면활성제를 투브들 내로 첨가하였다. 각각의 투브의 내용물을 볼텍스 믹서에 의하여 주변 온도에서 약 10 분 동안 혼합하였다. 그 다음, 상기 투브들을 약 50°C에서 약 15 분 동안 인큐베이션하였다. 상기 투브들로부터의 샘플들 (400  $\mu$ l)을 lumisizer 미량 원심분리기 세포 내로 첨가하고 Lumizier에 의하여 분석하였다. 상기 Lumisizer 내 샘플들을 50 °C에서 22 분 동안 4000 rpm에서 원심분리하였다.

[0145] 0.2 또는 0.5 v/v% TRITON™ X114를 가지는 샘플들을 각각 실시예 E1 및 E2로 표지하였다. 0.2 v/v% TERGITOL™ L62를 가지는 샘플을 실시예 E3으로 표지하였다.

[0146] 각각의 샘플의 오일 방출 속도 및 오일 회수율을 측정하였다. 표 5 및 6은 실시예 E1-E3에 대한 오일 방출 속도 및 오일 회수율 결과를 제공한다.

**표 5**

실시예 E1-E3의 오일 방출 속도

샘플	계면활성제 유형	계면활성제 농도 (v/v%)	오일 방출 속도 (mm/sec)
실시예 E1	TRITON™ X114	0.2%	21.7
실시예 E2	TRITON™ X114	0.5%	23.1
실시예 E3	TERGITOL™ L62	0.2%	35.9

**표 6**

실시예 E1-E3의 오일 회수율

샘플	계면활성제 유형	계면활성제 농도 (v/v%)	Temp. (°C)	에멀젼 길이 (mm)	투명한 오일 길이 (mm)	에멀젼 내 투명한 오일% (오일 회수율과 동일함)
실시예 E1	TRITON™ X114	0.2%	50	6.48	5.96	92%
실시예 E2	TRITON™ X114	0.5%	50	6.65	6.13	92%
실시예 E3	TERGITOL™ L62	0.2%	50	6.6	5.9	89%

[0149] 실시예 7 - 파일럿 규모 공정

[0150] 이 실시예는 파일럿 규모로 CCB로부터 파네신 방출 가능성을 입증한다.

[0151] 전세포액 (WCB: whole cell broth)을 발효기로부터 직접 얻었다. CCB를 실시예 1에 기재된 바와 같이 여액으로부터 수집하였다.

[0152] TRITON™ X114 (0.2 v/v %)를 WCB에 첨가하고, 혼합하고 53°C로 가열하였다. 상기 혼합물을 4000 rpm (2300 x

g)에서 53°C에서 22 분 동안 원심분리하였다.

[0153] 소정의 매질 발효 (20 L)로부터 분리된 CCB (2.5 L)를 TRITON™ X114 (0.2v/v%)으로 처리하고, 혼합한 다음, 약 53°C로 15 분 동안 가열하였다. 상기 혼합물을 4000 rpm (2300 x g)에서 53°C에서 22 분 동안 원심분리하였다.

[0154] 파네신의 농축을 가스 크로마토그래피 불꽃 이온화 (GC-FID)에 의하여 측정하였다.

[0155] 표 7은 파네신의 평균 농축, 단계 부피 및 WCB로부터 추출된 파네신의 중량, 액체/액체 수상 및 실시예 F1, F2, F3 및 F4로 각각 표지된 조 파네신을 제공한다.

[0156] 전문 생산 기관 (CMO) 공정을 따랐다:

[0157] 각각의 실행의 pH를 5N NaOH로 9.5로 적정하였다. NaCl (0.56 M)를 첨가하였다. TERGITOL™ L81를 첨가하고, 혼합물을 1 시간 동안 주변 온도에서 혼합하였다.

[0158] 표 8은 조건들, 즉, pH 9.5/0.65M NaCl/0.5% L81, 및 상이한 추출 공정, 즉, CMO 공정 (실시예 F5-F9) 및 실시예 F3으로 샘플로부터 얻어진 액체/액체 수상 내 파네신의 농축을 제공한다. 실시예 F5-F9의 액체/액체 수상 내 파네신의 농도는 25 g/L 내지 67 g/L 범위였다. 53°C에서 0.2% TRITON™ X114를 가진 실시예 F3의 액체/액체 수상 내 파네신의 농도는 단지 5 g/L였으며, 이는 실시예 F5-F9의 것들과 비교하여 적어도 5 배 감소된 것이었다. 상기 데이터는 TRITON™ X114 공정이 액체/액체 원심분리 장치 작업을 통하여 파네신 손실 감소를 가져올 것임을 나타낸다.

표 7

[0159] WCB, CCB, 액체/액체 수상 및 조 파네신으로부터 추출된 파네신의 평균 농도, 단계 부피 및 중량

샘플	기원	파네신의 평균 농도 (g/L)	단계 부피 (L)	파네신 (g)
실시예 F1	전세포액 (WCB)	45.5	17.5	797.0
실시예 F2	CCB	239.5	2.5	598.8
실시예 F3	액체/액체 수상	5.4	1.900	10.2
실시예 F4	조 파네신	798.7	0.600	479

표 8

[0160] 상이한 추출 공정으로 샘플로부터 얻어지는 액체/액체 수상 내 파네신의 농도

샘플	실행	매질	화학 & 농도	액체/액체 수상 역가 (g/L)
실시예 F5	4500 L CMO 실행	화학적으로 정의된 매질	pH/NaCl/0.5% L81	25
실시예 F6	60000 L CMO 실행	화학적으로 정의된 매질	pH/NaCl/0.5% L81	30
실시예 F7	60000 L CMO 실행	화학적으로 정의된 매질	pH/NaCl/0.5% L81	67
실시예 F8	60000 L CMO 실행	화학적으로 정의된 매질	pH/NaCl/0.5% L81	52
실시예 F9	60000 L CMO 실행	화학적으로 정의된 매질	pH/NaCl/0.5% L81	51
실시예 F3	20 L 규모 감소	화학적으로 정의된 매질	0.2% TRITON™ X114/53 °C	5

[0161] 실시예 8 - 40°C 및 50°C에서 사탕수수 시럽 유도 WCB로부터 방출된 파네신에 대한 계면활성제 농도의 영향

[0162] 이 실시예는 40°C 및 50°C 인큐베이션 온도에서 사탕수수 시럽 유도 WCB로부터 방출되는 파네신의 양에 대한 계면활성제 농도의 영향을 보이며, 사탕수수 시럽 유도 WCB 및 CCB로부터 방출되는 파네신의 양에 대한 계면활성제 농도의 유사한 영향을 입증한다.

- [0163] 사탕수수 시럽 매질을 사용하는 300 L 발효로부터 수화액을 이용하여, 액체/고체 원심분리 없는 WCB를 평가하였다.
- [0164] 약 0.01 내지 약 0.2 v/v% 범위의 다양한 농도의 TRITON<sup>TM</sup> X114를 WCB에 첨가한 다음, 40°C 및 50°C에서 각각 30 분 동안 인큐베이션하였다.
- [0165] 40°C에서 TRITON<sup>TM</sup> X114 (0.01, 0.03, 0.07, 0.1 및 0.2 v/v%)과 인큐베이션된 WCB를 각각 실시예 G1-G5로 표지하고; 50°C에서 TRITON<sup>TM</sup> X114 (0.01, 0.03, 0.07, 0.1 및 0.2 v/v%)과 인큐베이션된 WCB를 각각 실시예 G6-G10으로 표지하였다.
- [0166] 계면활성제를 첨가하지 않은 것을 제외하고, 상기 절차에 따라 대조 실험 (대조군 G1)을 수행하였다. 오일 방출 속도 및 오일 회수율을 상기 인큐베이션 온도에서 22 분 동안 4000 rpm (2300 x g)에서 Luminizer에 의하여 측정하였다. 표 9 및 표 10은 40°C 및 50°C에서 상이한 농도의 TRITON<sup>TM</sup> X114를 가지는 샘플들의 오일 회수율 및 오일 방출 속도 결과를 제공한다.
- [0167] 이 데이터는 동일한 양의 TRITON<sup>TM</sup> X114가 WCB 또는 CCB에 첨가되어 유사한 수율 개선 특성을 제공할 수 있음을 나타낸다.

표 9

[0168] 실시예 G1-G10 및 대조군 G1-G2의 오일 방출 속도

샘플	계면활성제 유형	계면활성제 농도 (v/v%)	인큐베이션 온도 (°C)	오일 방출 속도 (mm/sec)
대조군 G1	-	-	40	0.0429
실시예 G1	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.01	40	0.0892
실시예 G2	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.03	40	0.7925
실시예 G3	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.07	40	4.6976
실시예 G4	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.1	40	4.1887
실시예 G5	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.2	40	7.2393
대조군 G2	-	-	50	0.0106
실시예 G6	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.01	50	0.0295
실시예 G7	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.03	50	0.8715
실시예 G8	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.07	50	4.4496
실시예 G9	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.1	50	2.8966
실시예 G10	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.2	50	2.0327

표 10

[0169] 실시예 G1-G10 및 대조군 G1-G2의 오일 회수율 결과

샘플	계면활성제 유형	계면활성제 농도 (v/v%)	인큐베이션 온도 (°C)	에멀젼 길이 (mm)	투명한 오일 길이 (mm)	에멀젼 내 투명한 오일% (오일 회수율과 동일함)
대조군 G1	-	-	40	2.12	0.45	21%
실시예 G1	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.01	40	2.16	0.57	26%
실시예 G2	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.03	40	2.23	0.96	43%

실시예 G3	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.07	40	1.9	1.22	64%
실시예 G4	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.1	40	1.88	1.38	73%
실시예 G5	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.2	40	1.79	1.43	80%
대조군 G2	-	-	50	2.22	0.58	26%
실시예 G6	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.01	50	2.18	0.67	31%
실시예 G7	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.03	50	2.18	0.81	37%
실시예 G8	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.07	50	2.18	1.56	72%
실시예 G9	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.1	50	2.04	1.56	76%
실시예 G10	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.2	50	1.93	1.48	77%

- [0170] 두 인큐베이션 온도 모두에서 TRITON<sup>TM</sup> X114 (0.07 v/v%)를 가지는 샘플들 (실예 G3 및 실시예 G8 각각)의 오일 회수율에 있어서, 상응하는 대조 실험 (대조군 G1 및 대조군 G2 각각)의 것과 비교하여, 2 배가 넘는 증가가 있었다.
- [0171] 상기 데이터는 동일한 절대량의 TRITON<sup>TM</sup> X114를 WCB 또는 CCB에 첨가하여 유사한 수율 개선 특성을 제공할 수 있음을 나타낸다.

- [0172] 실시예 9 – 50°C 및 60°C에서 사탕수수 시럽 유도 WCB로부터 방출되는 파네신에 대한, 상이한 계면활성제, 즉 TRITON<sup>TM</sup> X114 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L62의 영향
- [0173] 이 실시예는 50°C 및 60°C의 인큐베이션 온도에서 사탕수수 시럽 유도 WCB로부터 방출되는 파네신의 양에 대한, TRITON<sup>TM</sup> X114 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L62를 포함하는 상이한 계면활성제의 영향을 보이고, 사탕수수 시럽 유도 WCB 및 CCB로부터 방출되는 파네신의 양에 대한 상이한 계면활성제의 영향에 있어서의 차이를 입증한다.
- [0174] WCB (튜브 당 1 ml)를 1.5 ml 미량원심분리기 투브들 내로 분취하였다. 상이한 농도의 TRITON<sup>TM</sup> X114 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L62를 약 0.01% 내지 약 0.1% 범위의 양으로 상기 투브들 내로 첨가하였다. 각각의 투브의 내용물을 주변 온도에서 10 분 동안 볼텍스 믹서에 의하여 혼합하였다. 그 다음, 상기 투브들을 50°C 및 60°C에서 약 15 분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상기 투브들을 상기 인큐베이션 온도에서 22 분 동안 4000 rpm (2300 x g)에서 원심분리하였다.

- [0175] 50°C에서 인큐베이션된 TRITON<sup>TM</sup> X114 (0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 v/v%)를 가지는 투브들을 실시예 H1-G5로 표지하였다. 50°C에서 인큐베이션된 TERGITOL<sup>TM</sup> L62 (0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 v/v %)를 가지는 투브들을 실시예 H6-H10으로 표지하였다. 60°C에서 인큐베이션된 TRITON<sup>TM</sup> X114 (0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 v/v%)를 가지는 투브들을 실시예 H11-H15로 표지하였다. 60°C에서 인큐베이션된 TERGITOL<sup>TM</sup> L62 (0.01, 0.03, 0.05, 0.07 및 0.1 v/v%)를 가지는 투브들을 실시예 H16-H20으로 표지하였다.
- [0176] 계면활성제를 첨가하지 않은 것을 제외하고 상기 절차에 따라 대조 실험 (대조군 H1-H2)을 수행하였다. 각각의 샘플의 오일 방출 속도 및 오일 회수율을 측정하였다. 표 11 및 12는 샘플들의 조건 및 오일 방출 속도 및 오일 회수율을 각각 제공한다.

- [0177] 대조군 H1-H2 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L62를 가지는 샘플들 (실시예 H6-H9, H16-H20)의 오일 방출 속도는 표 11에 낮은 오일 발생 속도로 나타내어지는 바와 같이 나쁜 것으로 밝혀졌다. TRITON<sup>TM</sup> X114를 가지는 샘플들 (실시예 H1-

H4, H12-H15)의 오일 방출 속도는 좋은 것으로 밝혀졌으며, 오일 방출 속도는 일반적으로 TRITON<sup>TM</sup> X114의 농도 및 인큐베이션 온도에 따라 증가하였다.

[0178] 동일한 절대량의 TRITON<sup>TM</sup> X114 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L62를 가지는 샘플들 사이에 오일 회수율의 차이가 거의 없었다. 이 데이터는 TRITON<sup>TM</sup> X114-함유 샘플의 오일 방출 속도가 TERGITOL<sup>TM</sup> L62-함유 샘플의 것보다 높으나, 이는 조파네신의 훨씬 더 높은 회수율을 반드시 의미하지는 않았다. 이는 오일 방출 속도가 주어진 조건에 대한 원심분리기 성능을 나타낸다는 사실로 인한 것일 수 있다. 이 데이터는 TRITON<sup>TM</sup> X114를 가지는 샘플들이 규모 조정된 공정에서 더 빠른 분리 및 더 높은 스루풋을 허용할 수 있음을 나타낸다.

[0179] 실시예 9는 WCB에 적용시 TRITON<sup>TM</sup> X-114 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L62 사이의 큰 성능 차이를 입증한다. 그러나, CCB에 적용시 TRITON<sup>TM</sup> X114 및 TERGITOL<sup>TM</sup> L62 사이에 성능 차이는 최소였다.

### 표 11

[0180] 실시예 H1-H20 및 대조군 H1-H2의 오일 방출 속도

샘플	계면활성제 유형	계면활성제 농도 (v/v%)	온도 (°C)	오일 방출 속도 (mm/sec)
대조군 H1	-	-	50	0.0791
실시예 H1	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.01	50	0.057
실시예 H2	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.03	50	0.2335
실시예 H3	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.05	50	0.4165
실시예 H4	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.07	50	1.5299
실시예 H5	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.1	50	0.7911
실시예 H6	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.01	50	-0.143
실시예 H7	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.03	50	-0.0673
실시예 H8	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.05	50	-0.1377
실시예 H9	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.07	50	-0.0222
실시예 H10	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.1	50	0.0463
대조군 H2	-	-	60	-0.0672
실시예 H11	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.01	60	0.0231
실시예 H12	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.03	60	0.4487
실시예 H13	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.05	60	1.5305
실시예 H14	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.07	60	2.5505
실시예 H15	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.1	60	2.3575
실시예 H16	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.01	60	-0.1838
실시예 H17	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.03	60	-0.209
실시예 H18	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.05	60	-0.2028
실시예 H19	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.07	60	-0.1534
실시예 H20	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.1	60	-0.0672

### 표 12

[0181] 실시예 H1-H20 및 대조군 H1-H2의 오일 회수율 결과

샘플	계면활성제 농도	계면활성제 농도 (v/v%)	온도 (°C)	에멀젼 길이 (mm)	투명한 오일 길이 (mm)	에멀젼 내 투명한 오일% (오일 회수율과 동일함)

대조군 H1	-	-	50	1.59	0.57	36%
실시예H1	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.01	50	N/A	N/A	N/A
실시예H2	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.03	50	1.4	0.6	43%
실시예H3	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.05	50	1.44	0.64	44%
실시예H4	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.07	50	1.22	0.61	50%
실시예H5	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.1	50	1.07	0.57	53%
실시예H6	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.01	50	N/A	N/A	N/A
실시예H7	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.03	50	1.34	0.44	33%
실시예H8	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.05	50	1.43	0.56	39%
실시예H9	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.07	50	1.31	0.52	40%
실시예H10	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.1	50	1.33	0.6	45%
대조군 H2	-	-	60	1.75	0.71	41%
실시예H11	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.01	60	N/A	N/A	N/A
실시예H12	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.03	60	1.86	1	54%
실시예H13	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.05	60	1.93	1.23	64%
실시예H14	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.07	60	1.5	1.02	68%
실시예H15	TRITON <sup>TM</sup> X114	0.1	60	1.44	1.01	70%
실시예H16	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.01	60	1.57	0.56	36%
실시예H17	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.03	60	1.57	0.72	46%
실시예H18	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.05	60	1.55	0.73	47%
실시예H19	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.07	60	1.58	0.76	48%
실시예H20	TERGITOL <sup>TM</sup> L62	0.1	60	1.59	0.83	52%

[0182] 상기에 근거하여, 매우 높은 극성 정제당 발효로부터 유도된 CCB에 대한 0.25 v/v%의 TRITON<sup>TM</sup> X-114 및 0.25%, 0.5%, 0.75%, 및 1.0% v/v의 TERGITOL<sup>TM</sup> L-62의 영향을 시험하고, 연이어 이를 60°C로 가열하고 원심분리하여 예열전 파괴를 평가하였다. 이러한 조건 하에, (계면활성제가 없는 것을 제외하고 동일 조건 하에 실행된) 대조군 샘플을 제외하고 모든 예열전이 동등하게 잘 파괴되었다. 다른 변형에서, 염(5 g/L 내지 25 g/L의 NaCl)을 상기 계면활성제 샘플에 첨가하여 상기 염이 CCB로부터 방출되는 파네신의 양을 더욱 개선시킬 수 있는지 여부를 알아보았다. 그러나, 상기 염은 일반적으로 CCB로부터 방출되는 파네신의 양에 추가적인 영향이 없었다.

[0183] 두 가지 다른 대조 시험을 수행하였다. 한 가지 대조 실험에서, 샘플들을 그 각각의 PIT (또는 혼탁점) 위로 가열하지 않은 것을 제외하고 계면활성제를 첨가한 이전의 문단에 기재된 바와 같이 샘플들을 처리하였다. 두 번째 대조 실험에서, 계면활성제를 첨가하지 않았으나, 샘플들을 PITs 위의 온도로 가열하였다. 두 대조 실험 모두에서, 각각의 샘플들은 파네신 방출이 거의 없거나 없었으며, 계면활성제가 처리되지 않거나 가열되지 않은 샘플과 실질적으로 유사하였다.

[0184] 실시예 10 - 오일 방출 속도에 대한 상이한 혼합 방법의 영향

[0185] 이 실시예의 목적은 오일 방출 속도에 대한 상이한 혼합 방법의 영향을 연구함으로써 인큐베이션에 요구되는 시간을 단축시킬 가능성을 조사하는 것이다.

[0186] CCB로부터 방출되는 파네신의 양에 대한 혼합 또는 파워 인풋의 영향을 ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> 분산기 (IKA<sup>®</sup>, Staufen, Germany로부터 구입), 1100 rpm 및 600 rpm에서의 교반 막대, 볼텍스 믹서 및 회전 믹서를 포함하는 상이한 혼합 장치를 이용하여 연구하였다.

[0187] 첫째로, 두 가지 상이한 로트의 CCB를 TERGITOL<sup>TM</sup> L62로 적정하여 CCB의 품질을 측정하였다. CCB를 TERGITOL<sup>TM</sup> L62에 의하여 완전히 예열전 파괴하지 않았으나, CCB의 약 50%의 상당 수준으로 예열전 파괴하였다. 상기 적

정을 실시예 1의 적정 절차에 따라 수행하였다. 적정 결과에 근거하여, CCB (Lot. No.: PP051410F1\_draw1)를 사용하였으며, TERGITOL™ L62 (0.1%)를 각각의 샘플 내로 첨가하였다. TERGITOL™ L62 첨가 후, 모든 샘플들을 주변 온도에서 10 초 동안 최대 속도로 블텍스 믹서로 혼합하였다. 그 다음, 샘플들을 이하의 방법 및 조건으로 주변 온도에서 특정 시간 동안 혼합하였다.

- [0188] 블텍스 믹서 (실시예 I3로 표지됨): 각 샘플 채취시마다 처음에 15 ml 원추형 바닥 원심분리기 튜브 내에 CCB (5 ml)를 혼합하였다.
- [0189] 회전 믹서 (실시예 I4로 표지됨): 15 ml 원추형 바닥 원심분리기 튜브 내에 CCB (5 ml)를 혼합을 위하여 튜브로 테이터에 장착하였다.
- [0190] 교반 막대 (실시예 I1 및 I2로 표지됨): CCB (10 ml)를 25 ml 신틸레이션 바이알 내에 넣고 교반 막대로 1100 및 600 rpm에서 각각 교반하였다.
- [0191] ULTRA-TURRAX®분산기 (실시예 I5로 표지됨): CCB (20 ml)를 50 ml 원심분리기 튜브 내에 넣고 15000 rpm에서 연속적으로 혼합하였다. 혼합 과정에서 발생되는 열을 제거하기 위하여, 상기 튜브를 수육 내에 넣었다. 혼합 과정 중에 샘플의 온도를 모니터링하여 CCB의 온도가 주변 온도임을 보증하였다.
- [0192] 튜브 또는 바이알로부터 샘플을 꺼내고 수육 내에서 약 50°C에서 15 분 동안 인큐베이션하였다.
- [0193] 약 50°C에서 인큐베이션후, 튜브로부터의 샘플 (400  $\mu$ l)을 lumisizer 미량 원심분리기 셀 내로 첨가하고 Lumisizer에 의하여 분석하였다. 상기 Lumisizer 내에 샘플들을 약 50°C에서 22 분 동안 4000 rpm (2300 x g)에서 원심분리하였다.
- [0194] 샘플들의 오일 방출 속도를 측정하고, 상이한 혼합 방법으로의 오일 방출 속도 대 보유/혼합 시간의 곡선을 도 5에 도시한다.
- [0195] 도 5를 참조하면, 실시예 I5가 10분에서 일찍 시작하는 높고 꾸준한 오일 방출 속도를 가지는 것으로 밝혀졌다. 도 5의 데이터는 혼합 방법이 오일 방출 속도 및 따라서 원심분리기 성능에 상당한 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

[0196] 실시예 11 - ULTRA-TURRAX®분산기로 혼합된 샘플의 오일 방출 속도에 대한 혼합 시간의 영향

- [0197] 실시예 11은 오일 방출 속도에 의하여 나타내어지는 좋은 혼합 달성을 위하여 ULTRA-TURRAX®분산기로 샘플을 혼합하기 위한 최소 시간에 대한 조사를 입증한다.
- [0198] 실시예 J1를 제조하기 위한 절차는 다음과 같았다:
- [0199] CCB (Lot No.: PP042310F1\_draw3) (20 ml)를 50 ml 원심분리기 튜브 내에 첨가하고, TERGITOL™ L62 (0.1 % v/v)를 주변 온도에서 상기 튜브 내로 첨가하였다. 상기 혼합물을 ULTRA-TURRAX®분산기로 15000 rpm에서 15 분 동안 혼합하였다. 혼합 과정에서 발생되는 열을 제거하기 위하여, 상기 튜브를 수육 내에 놓았다. 상기 과정 중 샘플의 온도를 모니터링하여, CCB의 온도가 주변 온도임을 보증하였다. CCB를 튜브로부터 꺼내고 50°C에서 15 분 동안 수육 내에서 인큐베이션하였다.
- [0200] 두 가지 대조 실험 (대조군 J1-J2)을 수행하였다. TERGITOL™ L62 첨가 후 ULTRA-TURRAX®분산기로 혼합하지 않고 튜브의 내용물을 최대 속도에서 5 초 동안 블텍스 믹서에 의해서만 혼합한 것을 제외하고 상기 기재한 절차에 따라 첫번째 대조 실험 (대조군 J1)을 수행하였다. TERGITOL™ L62 첨가 후 ULTRA-TURRAX®분산기로 혼합하지 않은 것을 제외하고 상기 기재한 절차에 따라 두번째 대조 실험 (대조군 J2)을 수행하였다.
- [0201] 상이한 시간 간격으로, 튜브로부터 샘플 (400  $\mu$ l)을 lumisizer 미량 원심분리기 셀 내에 첨가하고 Lumisizer에 의하여 분석하였다. Lumisizer 내 샘플을 50°C에서 22 분 동안 4000 rpm (2300 x g)에서 원심분리하였다.
- [0202] 샘플들의 오일 방출 속도를 측정하고, 오일 방출속도 대 ULTRA-TURRAX®분산기의 혼합 시간의 곡선을 도 6에 도시하였다.
- [0203] 데이터는 대조군 J1으로부터 얻은 오일 방출 속도와 비교하여, 처음 10 분 내에 실시예 J1의 오일 방출 속도의 상당한 증가가 있음을 나타낸다.

- [0204] 실시예 12 - 오일 회수율 및 오일 방출 속도에 대한 TERGITOL™ L62의 농도 및 상이한 혼합 방법의 영향
- [0205] 이 실시예는 오일 회수율 및 오일 방출 속도에 대한 상이한 혼합 방법 및 TERGITOL™ L62 농도의 영향을 보인다.
- [0206] 실시예 12는 "저 혼합" 및 "고 혼합" 하에 최적의 파네신 방출을 제공하기 위하여 요구되는 TERGITOL™ L62의 양을 평가하였다. 상이한 농도의 TERGITOL™ L62를 가지는 샘플의 유화 파괴 효율성을 두 가지 혼합 장치, 교반 막대 및 ULTRA-TURRAX®분산기를 이용하여 연구하였다. 실시예 12의 절차는 다음과 같았다:
- [0207] 교반 막대 (실시예 K1으로 표지됨): CCB (Lot No.: PP052110F2\_draw1) (바이알 당 2 ml)를 4 ml 신틸레이션 바이알 내로 분취하였다. 그 다음, TERGITOL™ L62를 0 내지 0.5 v/v% 범위의 상이한 양으로 상기 바이알 내에 첨가하였다. TERGITOL™ L62 첨가 후에, 각각의 샘플을 주변 온도에서 최대 속도에서 5초 동안 볼텍스 믹서에 의하여 혼합하였다. 각각의 바이알 내 내용물을 주변 온도에서 15 분 동안 볼텍스 믹서로 최대 속도로 주기적으로 혼합하였다.
- [0208] ULTRA-TURRAX®분산기 (실시예 K2로 표지됨): CCB (Lot No.: PP052110F2\_draw1) (튜브 당 2 ml)를 각각 15 ml 원추형 바닥 원심분리기튜브 내로 분취하였다. 그 다음, TERGITOL™ L62를 0 내지 0.5 v/v% 범위의 상이한 양으로 상기 튜브 내에 첨가하였다. TERGITOL™ L62 첨가 후, 각각의 샘플을 주변 온도에서 최대 속으로 5 초 동안 볼텍스 믹서에 의하여 혼합하였다. 그 다음, 각각의 튜브 내 내용물을 ULTRA-TURRAX®분산기로 15000 rpm으로 주변 온도에서 15 분 동안 혼합하였다. 혼합 과정 중 발생되는 열을 제거하기 위하여, 상기 튜브를 수육 내에 넣었다.
- [0209] CCB를 바이알 및 튜브로부터 꺼내고, 약 60°C에서 15 분 동안 오일을 내에서 인큐베이션하였다.
- [0210] 튜브로부터의 샘플(400  $\mu$ l)을 lumisizer 미량 원심분리기 셀 내에 첨가하고 Lumisizer에 의하여 분석하였다. Lumisizer 내 샘플들을 약 60°C에서 22 분 동안 4000 rpm (2300 x g)에서 원심분리하였다.
- [0211] 각각의 샘플의 오일 회수율 및 오일 방출 속도를 측정하고, 오일 회수율 및 오일 방출 속도 대 TERGITOL™ L62 농도의 곡선을 도 7 및 8에 각각 도시한다.
- [0212] 도 7을 참조로 하면, 실시예 K1의 오일 회수율은 TERGITOL™ L62 농도와 함께 급격히 증가하였다. 한편, 실시예 K2는 오일 방출 속도의 더 점진적인 반응을 가졌다. 보다 중요한 것은, TERGITOL™ L62 농도가 0.02 v/v% 및 0.05 v/v%와 같이 0.1 v/v% 보다 낮을 때, 실시예 K1의 오일 회수율은 실시예 K2의 것보다 상당히 높았다는 것 이었다.
- [0213] 한편, ULTRA-TURRAX®분산기를 혼합에 사용할 때, 최대 오일 방출 속도에 도달하기 위한 TERGITOL™ L62의 임계 농도 범위가 있을 것이다. 도 8에 도시하는 곡선은 TERGITOL™ L62의 임계 농도 범위가 0.1 내지 0.2 v.v%였음을 보인다. 이는 원하는 오일 회수율 및 오일 방출 속도에 도달하기 위하여 TERGITOL™ L62의 농도를 최적화할 필요가 있음을 나타낸다.
- [0214] 실시예 13 - 계면활성제 첨가 후 단백질 변화
- [0215] 이 실시예의 데이터는 단백질이 파네신 에멀젼 내에 존재하는 주요 바이오-유화제임을 보인다. TERGITOL™ L62 첨가 후 단백질이 변위될 수 있으며, 이는 바이오-에멀젼으로부터 화학적 에멀젼으로의 전환과 일치한다.
- [0216] bicinchoninic acid 단백질 분석 (BCA) (소혈청 알부민 (BSA) 표준 곡선)에 의한 샘플의 수상 단백질 함량은 TERGITOL™ 62 첨가후 0.95 g/L, TERGITOL™ 62 첨가 후 1.84 g/L인 것으로 밝혀졌다.
- [0217] 다른 데이터 (도시하지 않음)는 프로테아제 처리가 에멀젼 크기를 감소시켰음을 입증하였으며, 이는 단백질이 파네신 에멀젼을 안정화한다는 가설을 더욱 뒷받침한다.

- [0218] 실시예 14 - 사탕수수 시럽 CCB로부터 이전의 액체 분리 공정과 새로운 액체 분리 공정 간의 공정 수율 비교
- [0219] 사탕수수 시럽 CCB로부터 세 가지 이전의 액체 분리 공정들과 본 발명의 액체 분리 공정의 구현예의 공정 수율을 표 13 및 14에 각각 나타낸다.

표 13

- [0220] 사탕수수 시럽 CCB로부터 이전의 액체 분리 공정의 공정 수율

실행	액체 수율 (%)	화학
073009C2 (Y1551, 미정화 시럽)	76	pH 9.5/0.5% L-81/0.65 M NaCl
Campinas (Y1551, 미정화 시럽)	78-92	
082809C1 (Y2450, 저-고체 시럽)	77	

표 14

- [0221] 사탕수수 시럽 CCB로부터 본 발명의 액체 분리 공정의 구현예의 공정 수율

2010, 6, 2에 Tropicalized DSP 수율 (N=4)
액체 수율 (%)
98.5 ±0.2

- [0222] 실시예 15 - 대규모 파네신 분리 공정

- [0223] 연속 디스크 스택 노즐 원심분리기 (Alfa Laval DX203 B-34)를 사용하여 발효액으로부터 세포를 분리하였다. 액체/고체 원심분리기가 발효액으로부터 직접 공급되거나 또는 발효액 또는 발효 수화액을 수화 탱크 또는 보유 탱크로 이송하였다. 원심분리기 공급에 사용되는 탱크를 혼합하고 온도를 약 30-35°C로 조절하였다. 배치 공정에서, 세포 및 하나 이상의 액체를 함유하는, 유량의 약 85%가 원심분리기 노즐로부터 빠져나간 반면, 유량의 약 15%가 CCB로서 포획되었다. 열 교환기/원심분리기 공급 유속은 약 14,000 L/h였다. 이 공정은 3-상 분리 단계로 분리될 필요가 있는 부피를 실질적으로 감소시켰다. 이 단계에서 파네신은 투명한 생성물로서 또는 물과 세포를 함유하는 유화된 상태로 제공되었다.

- [0224] 수화 세포액을 액체/고체 원심분리기를 통한 가공 전에 약 4°C 내지 약 8°C에서 약 24-48 시간 동안 수화 탱크 내에 보유하였다. 수화물을 액체/고체 원심분리기를 통하여 가공하기 전에 약 30°C로 가온하였다.

- [0225] 액체/고체 원심분리기 생성물, 즉 CCB를 다음 단계 전에 약 72 시간까지 약 4°C 내지 약 8°C에서 저장하였다. CCB를 다음 단계 전에 주변 온도로 가온하였다.

- [0226] 이송/공급 배관 및 탱크 실을 파네신 생성물과 화학적 또는 물리적으로 상용가능하도록 선택하였다. 예를 들어, Viton® 배관 및 실을 선택한 반면, EPDM 배관 및 실을 선택하지 않았다.

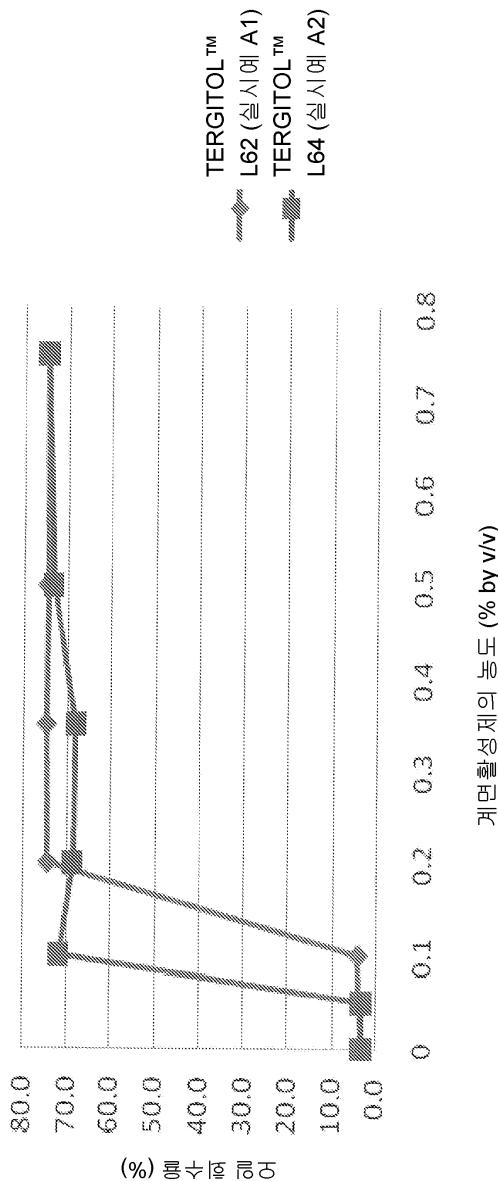
- [0227] 액체/액체 분리 전에 유화 수준을 감소시키기 위하여 CCB를 처리하였다. 상기 처리는 두 단계: (a) TRITON™ X114 (0.25 v/v%)를 CCB에 첨가, 및 (b) CCB 및 TRITON™ X114의 혼합물을 인-라인 가열에 의하여 달성되었다. TRITON™ X114를 CCB에 첨가한 후, 상기 혼합물을 다음 단계 전에 주변 온도에서 (약 30°C 이하) 약 1.5-2 시간 동안 혼합하였다. 상기 혼합물을 생성물 회수에 어떠한 약영향없이 액체/액체 분리 전에 약 3일 이하 동안 약 4°C 내지 약 8°C에서 저장하였다.

- [0228] 연속, 3-상, 디스크-스택 원심분리기를 사용하여 무거운 수상 및 고체로부터 투명한 파네신 상을 분리하였다. 상기 3-상 원심분리기에 공급하기 전에, CCB와 TRITON™ X114의 혼합물을 인-라인 가열함으로써 유화 과정하였다. 상기 혼합물을 열 교환기를 통하여 공급하였으며, 여기서 상기 혼합물은 약 60°C로 약 30 초 동안 가열되었다. 열 교환기 통과 후, 생성물을 2,000-4,000 L/시간의 공급 유속으로 원심분리기 내로 공급하였다. 가벼운 및 무거운 상들이 각각의 출구를 통하여 보울 내로 빠져나갔다. 보울 내에 고체가 서서히 축적되었고, 주기적으로 배출되어 분리 효율을 유지시켰다.

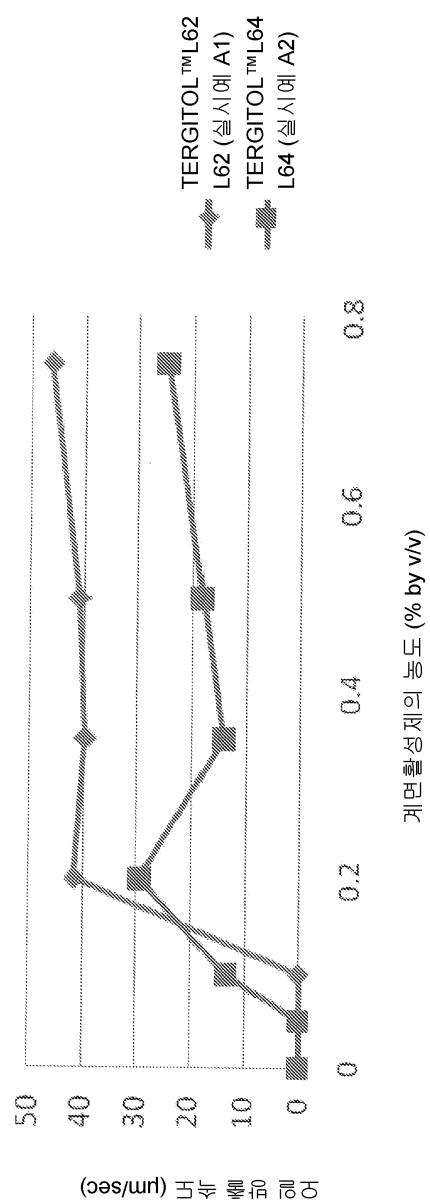
- [0229] 액체/고체 원심분리 또는 여과를 이용하여 마지막 단계로서 조 파네신 상 내 잔류 고체를 제거하였다. 정련 단계 후, 항산화제 (100 ppm w/w) (예를 들어, tert-부틸 카테콜)를 조 파네신에 첨가하여 저장 및 이송을 위하여 생성물을 안정화시켰다. 이러한 공정에 의한 조 파네신의 수율은 GC-FID 분석으로 파네신 함량을 측정하여 약 70-90%였다. 조 파네신의 순도는 약 95%였다.
- [0230] 상기 기재한 실시예들은 당업자에게 청구되는 구현예들을 어떻게 제조하고 이용하는지에 대한 완전한 개시 및 기재를 제시하기 위하여 제공되는 것이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것을 의도하지 않는다. 당업자에게 자명한 변형은 청구범위 내인 것으로 의도된다. 본원 명세서에 인용되는 모든 공보, 특히 및 특히 출원들은 그러한 공보, 특히 또는 특히 출원 각각이 특별히 개별적으로 본원에 참조로 포함되는 것으로 기재된 것과 같이 본원에 참조로 포함된다.

## 도면

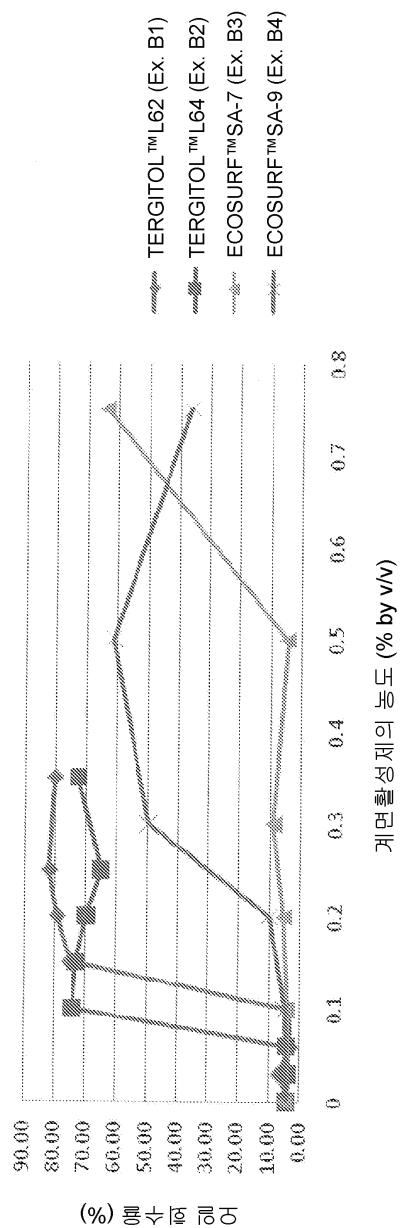
### 도면1



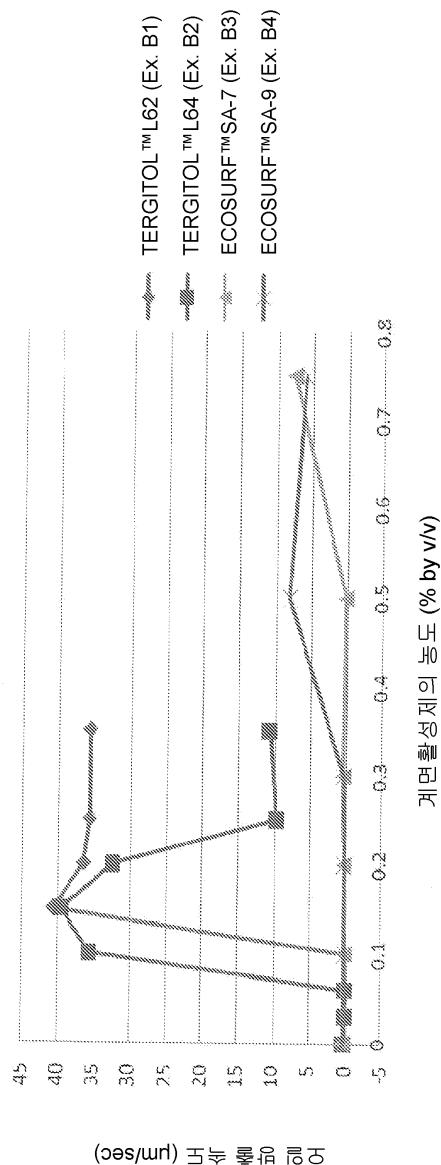
## 도면2



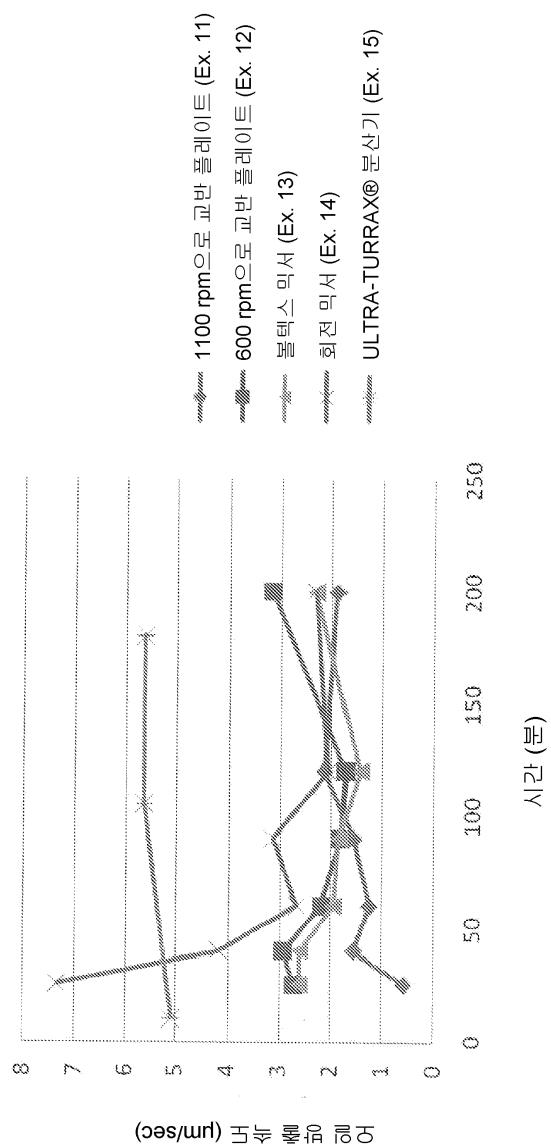
## 도면3



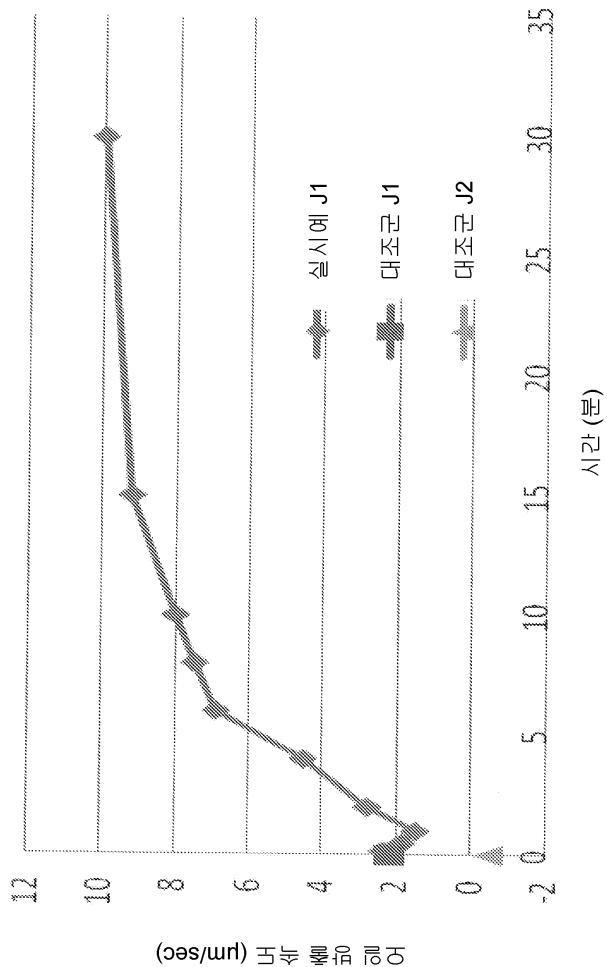
## 도면4



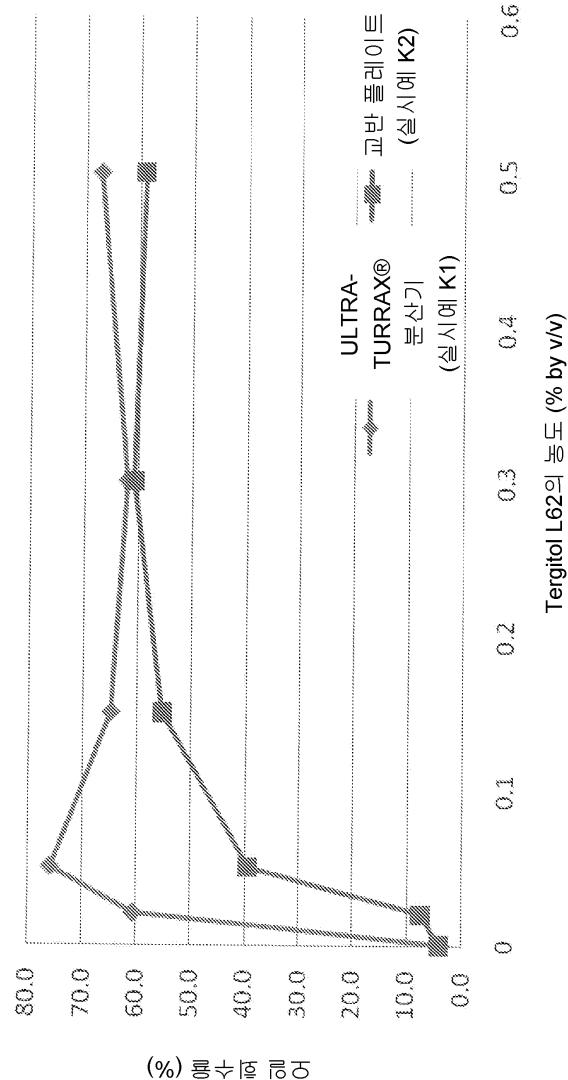
## 도면5



## 도면6



## 도면7



## 도면8

