

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4020642号
(P4020642)

(45) 発行日 平成19年12月12日(2007.12.12)

(24) 登録日 平成19年10月5日(2007.10.5)

(51) Int. Cl.		F I
C 1 2 P 7/64	(2006.01)	C 1 2 P 7/64
C 0 7 C 57/03	(2006.01)	C 0 7 C 57/03

請求項の数 36 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2001-553374 (P2001-553374)	(73) 特許権者	503166090
(86) (22) 出願日	平成13年1月19日(2001.1.19)		マーテック・バイオサイエンス・コーポ レイション
(65) 公表番号	特表2003-520046 (P2003-520046A)		アメリカ合衆国、21045 メリーラン ド州、コロンビア、ドビン・ロード 64 80
(43) 公表日	平成15年7月2日(2003.7.2)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/001806		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W02001/053512	(74) 代理人	100128048
(87) 国際公開日	平成13年7月26日(2001.7.26)		弁理士 新見 浩一
審査請求日	平成15年10月22日(2003.10.22)	(72) 発明者	リューカー、クレイグ エム、 アメリカ合衆国 92129 カリフォル ニア州 サンディエゴ ビビロ ストリ ート 9238
(31) 優先権主張番号	60/177,125		
(32) 優先日	平成12年1月19日(2000.1.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
微生物の受託番号	ATCC 20888		
微生物の受託番号	ATCC 20889		
微生物の受託番号	ATCC 20890		
微生物の受託番号	ATCC 20891		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無溶媒抽出プロセス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微生物から脂質を得るプロセスであって、

- (a) 発酵培地で生育させた微生物の細胞から、細胞内脂質を放出させる工程と、
- (b) 放出された細胞内脂質を、同脂質を得るために有機溶媒で抽出することなく有機溶媒の含量が5%未満の媒質中で実施される、水相を含む重い層と前記脂質を含む軽い層から成る相分離混合物を生成する手順に供する工程と、
- (c) 前記軽い層から前記重い層を分離する工程と、
- (d) 前記軽い層から前記脂質を得る工程と、から成るプロセス。

【請求項 2】

工程(a)の前に、前記発酵培地中に存在する任意のタンパク質の少なくとも一部を可溶化する工程をさらに含む請求項1に記載のプロセス。

【請求項 3】

タンパク質を可溶化する前記工程は前記発酵培地を塩基と接触させることを含む、請求項2に記載のプロセス。

【請求項 4】

前記処理工程は、前記細胞を溶解して、溶解した細胞混合物を生成することを含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項 5】

相分離混合物の生成は溶解した細胞混合物を遠心することを含む、請求項4に記載のプ

10

20

ロセス。

【請求項 6】

前記処理工程は、細胞の加熱、塩基性化合物への細胞の曝露、キレート化合物への細胞の曝露、またはそれらの組合せから成る群より選択される処理を含む、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 7】

前記処理工程は発酵培養液に塩基を加えることを含む、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 8】

前記塩基は水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩、リン酸塩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 7 に記載のプロセス。

10

【請求項 9】

前記処理工程は前記微生物を少なくとも 50 の温度に加熱することを含む、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 10】

前記処理工程は、前記細胞を、塩基性化合物、キレート化合物、またはそれらの混合物に暴露する前か、最中か、後に、細胞を少なくとも 50 に加熱することから成る、請求項 9 に記載のプロセス。

【請求項 11】

前記処理工程は、前記細胞を乾燥させずに実施して細胞内脂質を放出させる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のプロセス。

20

【請求項 12】

前記分離工程は、

(i) 前記軽い層に水性洗浄溶液を加えるステップと、

(ii) 前記軽い層から前記水性洗浄溶液を分離するステップと、

(iii) 前記脂質が実質的に乳化されていないようになるまで、前記ステップ (i) および (ii) を繰り返すステップとからさらに成る、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 13】

前記処理工程、相分離混合物を生成する手順に供する工程、および分離工程が、前記脂質を得るために少なくとも 3 回繰り返される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のプロセス。

30

【請求項 14】

前記軽い層は乳化された脂質を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 15】

前記乳化された脂質は、水相中の前記脂質の懸濁物を含む、請求項 14 に記載のプロセス。

【請求項 16】

前記水相は固形細胞材料を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 17】

相分離混合物を生成する手順に供する前記工程は、放出された細胞内脂質を含む媒質を比重選別法に供して水相を含む重い層と前記脂質を含む軽い層から成る相分離混合物を生成することから成る、請求項 1 に記載のプロセス。

40

【請求項 18】

前記比重選別法は、放出された細胞内脂質を含む発酵培地を、積層ディスク型、セパレータ型、またはデカンター型遠心分離機に通過させることから成る、請求項 17 に記載のプロセス。

【請求項 19】

前記比重選別法は遠心から成る、請求項 17 に記載のプロセス。

【請求項 20】

50

- (a) 発酵培地中で微生物を生育する工程と、
- (b) 細胞内脂質を放出させるために、前記微生物の細胞を、
- (i) 前記発酵培地中に存在する任意のタンパク質の少なくとも一部分を溶かすために同発酵培地を塩基と接触させることと、
- (ii) 前記発酵培地の温度を少なくとも 50 に上昇させて、前記微生物の細胞を溶解し、溶解した細胞混合物を生産することと、
- により処理する工程と、
- (c) 放出された細胞内脂質を、同脂質を得るために有機溶媒により抽出することなく有機溶媒の含量が 5 % 未満の媒質中で実施され、前記溶解した細胞混合物から異なる密度の物質を分離することから成る、水相を含む重い層と前記脂質を含む軽い層から成る相分離混合物を生成する手順に供する工程と、 10
- (d) 前記軽い層から前記重い層を分離する工程と、
- (e) 前記軽い層に水性洗浄溶液を加える工程と、
- (f) 工程 (e) の前記混合物から異なる密度の物質を分離する工程と、
- (g) 前記相分離混合物から前記重い層を除去する工程と、
- (h) 前記脂質が実質的に乳化されていないようになるまで前記工程 (e) ~ (g) を繰り返す工程と、 から成る請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 2 1】

- (a) 発酵培地中で微生物を生育する工程と、
- (b) 細胞内脂質を放出させるために、前記発酵培地および前記微生物の細胞を処理する工程と、 20
- (c) 放出された細胞内脂質を含む前記発酵培地を比重選別法に供して水相を含む重い層と前記脂質を含む軽い層から成る相分離混合物を生成する工程と、
- (d) 前記重い層から前記軽い層を分離する工程と、
- (e) 前記軽い層を処理して、前記脂質と水との間に形成されたエマルジョンを破壊することと、粗脂質を回収することとにより前記軽い層から脂質を得る工程と、 から成る請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 2 2】

前記処理工程は、前記細胞を乾燥させずに実施して細胞内脂質を放出させる、請求項 2 1 に記載のプロセス。 30

【請求項 2 3】

前記エマルジョンを破壊する処理は、エマルジョンを、水、水溶性のアルコールまたはアセトンと混合し、かつ、該混合物を比重選別法に供することから成る、請求項 2 1 に記載のプロセス。

【請求項 2 4】

精製された脂質を得るために、前記脂質をさらに精製または処理に供する、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 5】

前記脂質は脱色および脱臭される、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 6】 40

前記微生物は発酵プロセスから得られる、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 7】

前記微生物は 1 2 g / L 未満の塩化ナトリウムの塩分レベルで生育できる、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 8】

前記微生物が脂質に富んだ微生物である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 9】

前記微生物は少なくとも 20 重量%の脂質を含む、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載 50

載のプロセス。

【請求項 3 0】

前記微生物は藻類、真菌類、細菌類および原生生物から成る群より選択される、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 3 1】

前記微生物は、黄金色藻、緑藻、渦鞭毛虫、酵母、モルティエラ (Mortierella) 属の真菌類、およびストラメノパイルから成る群より選択される微生物から成る、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 3 2】

前記微生物はヤブレッツボカビ (Thraustochytriales) 目の微生物から成る、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のプロセス。 10

【請求項 3 3】

前記微生物は、ヤブレッツボカビ (Thraustochytrium) 属、シゾチトリウム (Schizochytrium) 属およびそれらの混合物から選択される、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 3 4】

前記微生物は、ATCC 番号 2 0 8 8 8、ATCC 番号 2 0 8 8 9、ATCC 番号 2 0 8 9 0、ATCC 番号 2 0 8 9 1 および ATCC 番号 2 0 8 9 2 の識別特性を有する微生物、モルティエラ シュムツケリ (Mortierella schmuckerii) 株、クリプテコディニウム コニ (Crypthecodinium cohnii) 株、上述の任意のものに由来する突然変異株、なら 20
びにそれらの混合物から成る群から選択される、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 3 5】

前記微生物は、コレステロール、フィトステロール、デスモステロール、トコトリエノール、トコフェロール、ユビキノン、 α -カロチン等のカロテノイドおよびキサントフィル、ルテイン、リコピン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、および共役リノール酸のような脂肪酸、ならびにエイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、ジホモガンマリノレン酸および γ -リノレン酸のような ω -3 および ω -6 高度不飽和脂肪酸、またはそれらの混合物を 30
少なくとも約 0 . 1 g / L / h 生産することができる、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 3 6】

前記脂質の少なくとも 2 0 % は、コレステロール、フィトステロール、デスモステロール、トコトリエノール、トコフェロール、ユビキノン、 α -カロチン等のカロテノイドおよびキサントフィル、ルテイン、リコピン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、および共役リノール酸のような脂肪酸、ならびにエイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、ジホモガンマリノレン酸および γ -リノレン酸のような ω -3 および ω -6 高度不飽和脂肪酸、またはそれらの混合物である、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】 40

【0 0 0 1】

(発明の属する技術分野)

本発明は、任意の多くの量の無極性有機溶媒を使用せずに、微生物から脂質を抽出するプロセスに関する。

【0 0 0 2】

(発明の背景)

ω -3 の高度不飽和脂肪酸 (特にドコサヘキサエン酸 (DHA) が豊富な脂質混合物) の生産のような、一般的な微生物による脂質生産プロセスは、所望の脂質を生産できる微生物を発酵槽、池またはバイオリアクター中で生育し、微生物のバイオマスを単離し、それを乾燥させ、無極性有機溶媒 (例えばヘキサン) で細胞内脂質を抽出することを含む。一 50

般に、微生物の細胞内脂質は、微生物の乾燥細胞を破裂（つまり溶解）した後に抽出される。抽出した脂質は、高純度および/または高品質の脂質を生産するためにさらに精製されることもある。微生物は、最初に、発酵培養液(fermentation broth)を水で希釈してから、微生物を単離するために混合物を遠心することにより通常単離される。その後、細胞を乾燥させ、脂質を直ちにまたはその後近いうちに抽出しない場合、細胞は脂質の分解を防止するために例えば真空密閉バッグに収納される。

【0003】

望ましくないことに、乾燥プロセスは、微生物を熱に曝し、これは不適切に行われれば脂質を破損、すなわち脂質の質を劣化させる可能性がある。真空密閉バッグは漏れを生じる可能性があり、これは微生物を空気に曝すため、脂質の質をさらに劣化させる可能性がある。さらに、乾燥させた微生物を抗酸化剤で処理しない場合、脂質は空気または光へ曝されることによりさらに劣化する可能性がある。例えばカロテノイド、キサントフィルおよびDHAのような長鎖脂肪酸は空気および/または光による酸化によって分解し得る。さらに、場合によっては、乾燥した微生物に曝された作業者は、該作業者に安全性および/または健康に対する危険を生じるアレルギー反応を起こすことがある。

10

【0004】

さらに、工業的規模の生産では、脂質の抽出に使用される大量の揮発性かつ可燃性の無極性有機溶媒が、危険な作業条件を生じる可能性がある。抽出プロセスでの無極性有機溶媒の使用では、耐爆発性の油回収システムの使用が必要であり、そのため脂質回収のコストが増す可能性がある。さらに、微生物からの脂質抽出における無極性有機溶媒の使用では、適切な廃棄方法を必要とする無極性有機溶媒廃棄流が生じるが、これによって脂質抽出の全生産費がさらに増大する。

20

【0005】

従って、無極性有機溶媒の使用を必要としない、微生物からの脂質抽出プロセスが求められている。また抽出に先立って微生物を乾燥させる費用のかかる工程を必要としない、微生物からの脂質抽出プロセスも求められている。

【0006】

(発明の概要)

本発明の1実施形態は、

- (a) 微生物の細胞を溶解して、溶解した細胞混合物を生産する工程と、
 - (b) 溶解した細胞混合物を処理して、重い層および脂質に富んだ軽い層から成る相が分離した混合物を生成する工程と、
 - (c) 脂質に富んだ軽い層から重い層を分離する工程と、
 - (d) 軽い層から脂質および/または脂質の部分を得る工程と、
- から成る、微生物から脂質を得るプロセスを提供する。

30

【0007】

本発明の別の実施形態は、

- (a) 微生物を培地で生育する工程と、
 - (b) 前記培地と微生物細胞を処理して、細胞内脂質を放出させる工程と、
 - (c) 前記放出された細胞内脂質を含む培地を比重選別法にかけて、軽い脂質を含む相と
 - および重い相を形成する工程と、
 - (d) 前記重い相から前記軽い相を分離する工程と、
 - (e) 前記軽い相を処理して、前記脂質と水との間に形成されたエマルジョンを壊す工程と、
 - (f) 粗脂質を回収する工程と、
- から成る、微生物から脂質を得るプロセスを提供する。

40

【0008】

本発明の別の実施形態によれば、

- (a) 微生物を培地で生育する工程と、
- (b) 前記培地から得た微生物細胞を、乾燥させずに処理し、細胞内脂質を放出させる工

50

程と、

(c) 前記放出された細胞内脂質を含む培地を比重選別法にかけて、軽い脂質を含む相と重い相を形成する工程と、

(d) 前記重い相から前記軽い相を分離する工程と、

(e) 前記軽い相を処理して、前記脂質と水との間に形成されたエマルジョンを壊す工程と、

(f) 粗脂質を回収する工程と、

から成る、微生物から脂質を回収するプロセスが提供される。

【0009】

好ましくは、微生物は発酵槽中の発酵培地で培養される。代わりに、微生物は、フォトバイオリクターか池で光合成を利用して培養してもよい。好ましくは、微生物は脂質に富んだ微生物である。より好ましくは、微生物は、藻類、細菌類、真菌類および原生生物から成る群より選択される。より好ましくは、微生物は、黄金色藻、緑藻、渦鞭毛虫、酵母、モルティエラ (*Mortierella*) 属の真菌類、およびストラメノパイルから成る群より選択される。好ましくは、微生物には、モルティエラ属、クリプテコディニウム (*Cryptecodinium*) 属およびヤブレッツボカビ (*Thraustochytriales*) 目の微生物が含まれる。より好ましくは、微生物は、ヤブレッツボカビ (*Thraustochytrium*) 属、シゾチトリウム (*Schizochytrium*) 属またはそれらの混合物から選択される。より好ましくは、微生物は、ATCC 番号 20888、ATCC 番号 20889、ATCC 番号 20890、ATCC 番号 20891 および ATCC 番号 20892 の識別特性を有する微生物、モルティエラ シュムツケリ (*Mortierella schmuckerii*) 株、クリプテコディニウム コニ (*Cryptecodinium cohnii*) 株、上述の任意のものに由来する突然変異株、ならびにそれらの混合物から成る群より選択される。

10

20

【0010】

細胞の処理には、溶解、破裂、または透過化処理のような、脂質を放出するための処理が含まれる。本明細書に使用する場合、用語「溶解する」「溶解している」「溶解された」等は、細胞の破壊や透過化処理を含む、細胞内脂質を放出するための処理を指すために一般に使用される。好ましくは、該処理は、細胞の加熱、塩基性条件への細胞の暴露、キレート化合物への細胞の暴露、またはその組み合わせから成る群より選択される。より好ましくは、細胞の溶解または破裂は、細胞を塩基性条件、キレート化合物またはそれらの組み合わせに細胞を暴露している間に、細胞を少なくとも 50 まで加熱することを含む。

30

【0011】

好ましくは、比重選別法は、放出された細胞内脂質を含む発酵培養液を、積層ディスク型、セパレータ型、またはデカンター型遠心分離機に通過させることを含む。

【0012】

分離された溶解細胞混合物は、溶解細胞から生じる固形物質を含む水溶液から成る重い層と、脂質を含む軽い層とから成る。軽い層と重い層は遠心によって分離することができる。脂質は乳化された状態で存在し得る。脂質が実質的に乳化されていないようになるまで、軽い層を、水溶性洗浄溶液でさらに洗浄することができる。好ましくは、エマルジョンを破壊する処理は、エマルジョンを、水、アルコール、アセトンまたはそれらの混合物と混合し、かつ、該混合物を比重選別法に供することを含む。好ましくは、該プロセスは、ヘキサンのような無極性有機溶媒を使用せずに行われる。

40

【0013】

本発明の脂質抽出プロセスが発酵プロセスからの微生物の使用を包含する場合、該抽出プロセスはさらに、水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩、リン酸塩およびそれらの混合物から成る群より選択された塩基を添加することにより、発酵培養液にタンパク質化合物の少なくとも一部を可溶化することも含み得る。

【0014】

本発明の上記プロセスは、少なくとも約 50 の温度まで微生物を加熱することも含み得る。好ましくは、塩基のような化合物が、細胞の溶解を援助するために培地に加えられる

50

【0015】

加熱の代わりとして、細胞を、EDTAのようなキレート化合物の援助によって溶解してもよい。キレート化剤は、細胞の溶解または破裂の援助に加えて、鉄や銅のような発酵培養液中のフリーラジカルを生成する金属イオンとキレートを形成（と結合）することにより脂質の酸化の防止を援助する。キレート化剤の好ましい形式は、食物等級またはGRAS（一般に安全と認められるもの）のである。有効なキレート化合物には、EDTA、クエン酸またはクエン酸塩、乳酸、リン酸三ナトリウム、ポリリン酸塩、ヘキサメタリン酸塩、EGTA、DTPA、フィチン酸またはCDTA、ならびにこれらの化合物の他の塩の形式が含まれる。1実施形態では、細胞壁を一緒にまとめておくのを支援する二価陽イオンと結合してキレート化することにより細胞壁を分解するために、EDTAナトリウムが細胞へ添加される。このプロセスは、より少ないEDTAで高温で行うか、またはより高濃度のEDTAで低温で行うことができる。例えば、本願発明者らは、シゾトリウム属のDHAに富んだ細胞を、発酵プロセスの終わりに培養液にEDTAを添加することにより、透過化および/または破裂できることを見出した。30で細胞を破裂させるのを支援するためには10,000ppmの濃度が要求され、50では5,000ppmの濃度が、70を超える温度では1000ppm未満の濃度が、有効である。

10

【0016】

キレート化剤は、均質化のような物理的プロセスによって細胞を破壊することをより容易にするために、発酵培養液に加えられ得る。キレート化剤に加えて、細胞を溶解すべく内部浸透圧を増加させるために、水も加えられ得る。

20

【0017】

好ましくは、微生物は、約12g/l未満の塩化ナトリウム、より好ましくは約5g/l未満の塩化ナトリウム、最も好ましくは約3g/l未満の塩化ナトリウムの塩分レベルで生育することができる。好ましくは、微生物は、約7g/l未満のナトリウムかつ約250mg/l未満の塩化物の塩分レベルで生育できる。好ましくは、塩化物は、約70~約150mg/lまでの量で存在する。

【0018】

好ましくは、微生物は、少なくとも約20重量%の脂質、より好ましくは少なくとも約30重量%の脂質、そして最も好ましくは少なくとも約40重量%の脂質を含む。代わりに、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約30%、より好ましくは少なくとも約40%の脂質が、コレステロール、フィトステロール、デスモステロール、トコトリエノール、トコフェロール、ユビキノン、 α -カロチン等のカロテノイドおよびキサントフィル、ルテイン、リコピン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、および共役リノール酸のような脂肪酸ならびにエイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、ジホモガンマリノレン酸および γ -リノレン酸のような ω -3および ω -6高度不飽和脂肪酸、またはそれらの混合物である。

30

【0019】

本発明の1つの特定の態様では、微生物は、コレステロール、フィトステロール、デスモステロール、トコトリエノール、トコフェロール、ユビキノン、 α -カロチンのようなカロテノイドおよびキサントフィル、ルテイン、リコピン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、および共役リノール酸のような脂肪酸、ならびにエイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、ジホモガンマリノレン酸および γ -リノレン酸のような ω -3および ω -6高度不飽和脂肪酸、またはそれらの混合物を好ましくは含む脂質の混合物を1時間当たりで1リットル当たり少なくとも約0.1グラム（約0.1g/L/h）、少なくとも約0.2g/L/h、さらに好ましくは少なくとも約0.3g/L/h、最も好ましくは少なくとも約0.4g/L/hで生産することができる。

40

【0020】

50

本発明の別の態様では、微生物は、藻類、真菌類、細菌類および原生生物から成る群より選択される。好ましくは、微生物はヤブレッツボカビ目である。より好ましくは、微生物は、ヤブレッツボカビ属、シゾチトリウム属またはそれらの混合物から選択される。最も好ましくは、微生物は、ATCC番号20888、ATCC番号20889、ATCC番号20890、ATCC番号20891およびATCC番号20892の識別特性を有する微生物、上述の任意のものに由来する突然変異株、ならびにそれらの混合物から成る群より選択される。好ましくは、微生物は、ATCC番号20888、ATCC番号20889、より好ましくはATCC番号20888の識別特性を有する微生物、モルティエラ シュムツケリ (Mortierella schmuckerii) 株、クリプトコディニウム コニ (Cryptocodium cohnii) 株、上述の任意のものに由来する突然変異株、およびそれらの混合物の識別特性を有する微生物から成る群より選択される。

10

【0021】

(発明の詳細な説明)

本発明は、微生物から脂質を抽出、回収、単離、または取得するプロセスに関する。本発明のプロセスは、様々な微生物から様々な脂質（例えばコレステロール、フィトステロール、デスモステロール、トコトリエノール、トコフェロール、ユビキノン、 α -カロチンのようなカロテノイドおよびキサントフィル、ルテイン、リコピン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、および共役リノール酸のような脂肪酸、ならびにエイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、ジホモガンマリノレン酸および γ -リノレン酸またはその混合物のような ω -3および ω -6高度不飽和脂肪酸、より好ましくはドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、および/またはドコサペンタエン酸(DPA)(即ちDPAの ω -3型)のような ω -3高度不飽和脂肪酸)を抽出すること、特に比較的大量のDHAを含む脂質を該脂質を生産する微生物から抽出すること；ならびにアラキドン酸やドコサペンタエン酸(DPA)(即ちDPAの ω -6型)のような ω -6高度不飽和脂肪酸を該脂肪酸を生産する微生物から抽出することに適用される。比較的大量の ω -3高度不飽和脂肪酸を生産する例示的な微生物が、本願と同一の出願人に譲渡され、いずれもBarckayに付与された米国特許第5,340,594号および第5,340,742号に開示されている。また、比較的大量のアラキドン酸を生産する例示的な微生物が、本願と同一の出願人に譲渡され、Barclayに付与された米国特許第5,583,019号に開示されている。上記の開示された特許はすべて、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

30

【0022】

しかしながら、簡潔さのために、この発明の詳細な説明は、 ω -3高度不飽和脂肪酸を含む脂質を、該脂質を生産する微生物から抽出するケース、特に、比較的多量のDNAを生産する微生物から脂質を抽出するケースを、便宜および例示の目的で示す。しかしながら、本発明は全体としてそのように限定されるものではなく、当業者には、本発明の概念を、本明細書で論じた技術に従って様々な脂質組成物を生産する他の微生物に適用できることを認識できることは当然である。これらの微生物には、リン脂質；遊離脂肪酸；脂肪酸のトリグリセリドを含む脂肪酸のエステル；ステロール、色素（例えばカロテノイドとオキシカロテノイド）および他の脂質；ならびにフィトステロール、得る語ステロール、リポ酸、および α -カロチン、トコトリエノールおよびトコフェロールを含む抗酸化剤のような脂質関連化合物のような様々な脂質を生産する、真菌類、原核生物、藻類および細菌類のような微生物が含まれる。好ましい脂質および脂質関連化合物には、コレステロール、フィトステロール、デスモステロール、トコトリエノール、トコフェロール、ユビキノン、 α -カロチンのようなカロテノイドおよびキサントフィル、ルテイン、リコピン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、および共役リノール酸のような脂肪酸、ならびにエイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、ジホモガンマリノレン酸および γ -リノレン酸のような ω -3および ω -6高度不飽和脂肪酸、またはそれらの混合物が含まれるが、それらに限

40

50

定されるわけではない。簡潔さのために、別段述べられていなければ、用語「脂質」は、脂質および/または脂質関連化合物のことを指す。本発明で使用するのに適する可能性のある他の脂質および微生物は、当業者に容易に明らかとなるであろう。

【0023】

一般的な微生物脂質（特にDHAのような - 3高度不飽和脂肪酸）の製造プロセスは、DHAを生産する微生物を発酵槽中で生育し、該微生物を単離し、微生物のバイオマスを乾燥させて、無極性有機溶媒（例えばヘキサン）により細胞内脂質を抽出することを含む。抽出した脂質は、一般に高純度および/または高品質の脂質を生産するためにさらに精製される。微生物の単離は、発酵培養液を水で希釈してから、微生物を単離するために混合物を遠心することを含む。脂質を、微生物を単離した後に直ちにまたは近いうちに抽出しない場合、単離した微生物は、例えばドラム乾燥機上で、通常乾燥され、脂質の分解を防止するために包装材に（例えば真空密閉バッグに）密閉される。望ましくないことに、乾燥プロセスは、微生物を熱に曝し、これは不適切に行われれば脂質を破損、すなわち脂質の質を劣化させる可能性がある。包装材は漏れを生じる可能性があり、これは脂質の質をさらに劣化させる可能性がある。さらに、乾燥させた微生物を抗酸化剤で処理しない場合、脂質は空気および/または光へ曝されることによりさらに劣化する可能性がある。

10

【0024】

発酵培養液から粗油を直接回収することにより、それらの問題は回避できる。無極性有機溶媒による抽出工程を回避することにより、製造コストが下がると共に、個人によってはアレルギー反応を引き起こす可能性がある、乾燥させた微生物への作業者の暴露もなくなる。

20

【0025】

本発明は、実質的に無極性の有機溶媒がない抽出プロセス（つまり「無溶媒」抽出プロセス）を使用して、微生物から脂質を得る方法を提供する。用語「無溶媒抽出プロセス」とは、水性または極性溶媒が使用された場合に、該水性または極性溶媒が約5%未満、好ましくは約4%未満、より好ましくは約2%未満、最も好ましくは1%未満の無極性有機溶媒を含む抽出プロセスのことを指す。しかしながら、溶媒は、精製プロセスのような下流の工程で使用することができる。本発明のプロセスは、好ましくは発酵プロセスから微生物を取得または単離することを含み得る。大豆を乾燥させなければならぬ大豆からの油の抽出のような現行の方法の先行技術のプロセスとは対照的に、本発明のプロセスは、抽出プロセスに先立って乾燥工程を必要としない。したがって、本発明のプロセスは、重量で少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約30%、最も好ましくは少なくとも約50%の含有水を含む微生物バイオマスから脂質を抽出することに適用可能である。微生物が発酵プロセスから得られる場合、本発明のプロセスは、培養液に存在し得るすべてのタンパク質化合物を溶解させるために塩基を添加することを含み得る。「塩基」は水溶液中でアルカリ（塩基）反応を示す物質である。すなわち、塩基はプロトンと結びつき、水酸化物イオンを分離する。塩基は培養液中に存在し得るタンパク質化合物の少なくとも1部分を加水分解または可溶化するのに十分な強度である。タンパク質を可溶化するのに有用な塩基は、化学の分野の当業者には周知である。本発明のプロセスに有用な例示的塩基には、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムの水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩、および炭酸マグネシウムが含まれるが、それらに限定されるわけではない。リン酸三ナトリウムのような塩基リン酸塩類のような他の非常に塩基性の強い化合物も使用することができる。

30

40

【0026】

本発明のプロセスは、細胞内に存在する脂質を放出するために微生物細胞を破裂または溶解させることも含み得る。細胞は、化学的方法；熱的方法；フレンチプレス、ミル、超音波処理、均質化、および蒸気爆発を含むがそれらに限定されない機械的方法；およびそれらの組み合わせを含む既知の方法のうちの任意のものを使用して溶解することができる。細胞の熱的溶解では、微生物の細胞（つまり細胞壁）が分解または崩壊するまで、微生物を含む発酵培養液が加熱される。一般に、発酵培養液は、少なくとも約50、少なくと

50

も約75、より好ましくは約100、最も好ましくは少なくとも約130の温度まで加熱される。このプロセスの重要な態様は、抽出された脂質が分解される温度よりも低い温度を維持することである。微生物の細胞壁の熱による溶解は、細胞壁がタンパク質から構成されている微生物に対して有効である。このプロセス中、発酵槽のヘッドスペース（上部の空間）は、酸素による脂質の酸化を防止するために窒素や別の不活性ガスで充填することができる。

【0027】

培養液の加熱は、タンパク質を変性させ、タンパク質を含めた有機物質の可溶化も支援する。発酵培養液の加熱工程は、直列熱交換器の使用を含めたどの既知の方法によって達成してもよく、好ましくは、発酵培養液内へ蒸気を散布し、約90分未満、好ましくは約60分未満、より好ましくは約30分未満の間、所望の温度で培養液を維持することによって、達成される。

10

【0028】

本発明の無溶媒抽出プロセスは、使用した発酵培養液を脂質から少なくとも部分的に分離することも含む。通常これは、遠心によって（例えば、培養液を積層ディスク型、セパレータ型またはデカンター型遠心分離機に通過させ、エマルジョン相として脂質を収集することによって）達成される。混合物の遠心により、重い層と軽い層を含む2相の混合物が生じる。一般に、重い層は水相であり、大多数の細胞の破片を含む。その後、乳化脂質を含む軽い層が水で希釈され、2相に混合物に再び分離され、軽い層が再び単離される。水によるこの希釈、分離および単離プロセス（つまり洗浄プロセス）は、水を供給し、該プロセスにわたって重い層を除去することにより連続的に達成できるし、または、別個の複数の工程でも行うことができる。洗浄プロセスは、実質的に乳化されていない脂質層が得られるまで、通常繰り返されるが、少量のエマルジョンが残る可能性はある。エマルジョンの油-水の界面は、洗浄プロセスによって除去された細胞片の残りによって安定化されると考えられる。洗浄プロセス中に、加える連続量の水を減らして、脂質含有量を増加させる。給水の量を減らす速度が速すぎると、脂質水相に失われるが、給水の量を減らす速度が遅すぎると、洗浄プロセスが非効率となる。分離された水性層を観察または分析することにより、適切な給水の減小速度を容易に決定することができる。一般に、脂質層（つまり軽い層）は有色であるため、多くの場合、脂質層と分かれている水性層の色を単に分析または観察することにより、給水の適切な減小速度を決定することができる。

20

30

【0029】

代わりにおよび好ましくは、WO第96/05278号（引用によりこの全体が本明細書に組み込まれる）に概説したような脱油プロセスを使用して、エマルジョンを壊し、油を回収することができる。このプロセスでは、水溶性の化合物（例えばアルコールおよび/またはアセトン）がエマルジョンを壊すために油/水エマルジョンに加えられ、生じた混合物は、遠心によって分離される。単離された脂質は、標準的な植物油を精製するために使用されるプロセスと類似のプロセスを使用して、さらに精製することができる。簡潔に説明すると、脂質精製プロセスは、一般に、脂質にリン酸を加えることによりリン脂質を水和してから、遊離脂肪酸を中和するために水酸化ナトリウムを加えることを含む。これらの化合物は遠心により除去される。この後に、さらに脂質中の任意の残留量の水和したリン脂質（「ガム」）および中和された脂肪酸（「石けん材料」）をさらに除去するために水で洗浄する工程が続く。生じた脂質はTrysilTMと標準的な脱色用粘土を使用して脱色される。キレート化によって二価金属イオンを除去するためにクエン酸も加えられる。その後、TrysilTMおよび脱色用粘土は、精製脂質を生産するために過によって除去される。脂質中に存在し得る高融点化合物を除去するために、脱色された脂質を冷温ろ過してもよいが、この工程は通常めったに必要とされない。

40

【0030】

得られた脂質は、存在し得るすべての低分子量成分を除去することによりさらに精製することができる。典型的には、それらの成分は、高真空下で高温で蒸気で散布することにより除去される。このプロセスは、存在し得る任意の過酸化結合を分解し、臭いを低減ま

50

たは除去し、油の安定性の改善を支援する。その後、製品安定性を改善するために、得られた脱臭脂質に抗酸化剤を加えてもよい。

【0031】

精製プロセス中に、飽和脂肪酸のような高融点化合物を除去するために、単離脂質に脱ろう処理を施すことができる。脱ろうプロセスは、有機溶媒（例えばヘキサン）に単離した脂質を溶解し、生じた有機溶液を冷却し、該溶液をろ過して、脂質またはステアリン相の高融点成分を除去することを一般に含む。特に単離脂質が濁っているか不透明な場合、脱ろうプロセスによって通常明瞭な脂質が生じる。認識されるように、ヘキサンのような溶媒の使用は、上述の「精製」プロセスのようなプロセスにおいて許容し得る。代わりに、溶媒を使用せずに、単離脂質を冷蔵し、凝固した不純物を濾去してもよい。

10

【0032】

上に概説した精製、脱色、脱臭プロセスは、トリグリセリドに富んだ脂質混合物のために使用される。このプロセスの代わりに、またはこのプロセスに加えて、他の脂質（例えば色素またはカロテノイド）を、例えば、様々な溶媒への分配、クロマトグラフィ法などにより、分離および精製することができる。

【0033】

本発明のプロセスが発酵プロセスから微生物を単離することを含む一方で、本発明の利点の1つは、1つの容器中で微生物の発酵と脂質の単離を行えることである。例えば、発酵後、発酵容器に塩基を加え、混合物を加熱して、細胞を溶解することができる。重い層と軽い層に相を分けた後、例えば、軽い層をさらなる処理のために別の容器に移すか、または重い層を発酵容器の底から排出することにより発酵容器から取除き、残った軽い層を、同じ発酵容器内でさらに処理することができる。

20

【0034】

連続発酵システムで生育した細胞、細胞の生育が困難な培養物（例えば脆弱）、または光合成に基づく培養システムで生産された培養物のように、微生物培養物の細胞中の脂質濃度は高い（例えば約20%を超える）が細胞濃度が低い（例えば約40g/L未満）場合、必要ならば本発明の方法を使用する前に遠心、濾過、または沈降によって細胞を濃縮することができる。

本発明のさらなる目的、効果および新規な特徴は、限定を意図しない以下の実施例を吟味すれば当業者には明白になるだろう。

30

【0035】

（実施例）

プロセス再現性を、新たな無溶媒抽出プロセスから粗油を使用して3つの完全に精製された油の試料を生産することにより特徴付けた。また、コントロールとしての役割を果たすよう、ヘキサン抽出した試料も完全に精製した。発酵、抽出および油単離の工程は多量で行ったが、製油の研究は少量で行った。

プロセス再現性を実証するために、完全製油試料を分析した。

【0036】

発酵：

油に富んだ微生物（シゾトリウム属）を、後続の抽出プロセス用の発酵培養液を生産するために、約4543リットル（1200ガロン）の発酵プロセスで生育した。単一バッチを使用して、3つの無溶媒抽出プロセス用の開始培養液を生成した。13g/Lにグルコースレベルを制御しつつ発酵を94時間稼働し、その時間経過後、コーンシロップの供給を終了した。残余グルコースレベルは4時間後に<5g/Lまで下降した。これにより最終時間は98時間となった。培養液の最終量は約3626リットル（958ガロン）だった。最終収率は146g/L細胞乾燥重量であった。プロセス中の汚染チェックと最終培養液試料の徹底的な分析の両方で、汚染のいかなる徴候も示されなかった。

40

【0037】

ヘキサン抽出したコントロール試料：

発酵バッチからの培養液の少量アリコートをドラム乾燥し、コントロール試料としての役

50

割を果たすよう、ヘキサンで抽出された。バイオマス中間物を二倍ドラム乾燥機を使用して回収した。この脂質の分析を表1に示す。

【0038】

【表1】

表1. ドラム乾燥したシゾチトリウム属バイオマスの分析

パラメータ	値
DHA含量(FAMEベース)	35.7%
油含量	62.7%
過酸化物価 (meq/kg)	2.6
全培養数 (cfu/g)	<50
DHA含量	20.3%
FAME含量	56.9%

*細胞乾燥重量ベース

無溶媒抽出プロセス：

粗油を、発酵培養液の3つの約1514リットル(約400ガロン)のアリコート処理により得た。発酵槽からの各約1514リットル(400ガロン)のアリコートを、腐食剤/熱処理工程から開始して、別々に処理した。各アリコートを1リットル当たり20グラムの45% KOHで処理し、発酵培養液に上記を通じることにより、130分で約30分間加熱した。処理した培養液から、商用規模のWestfalia HFA-100積層ディスク型遠心分離機を使用して、粗油を回収された。様々なプロセスパラメータに対する結果の概要を表2に報告し、最終的な粗油の分析結果を表3に示す。

【0039】

【表2】

表2. 無溶媒抽出プロセスから得られたプロセスデータ

	SFE-1	SFE-2	SFE-3
培養液の処理			
処理した培養液の体積	288 gal	288 gal	258 gal
最終処理pH	7.5	8.0	8.7
加熱処理後の最終体積	388 gal	398 gal	308 gal
凝縮状態からの体積増加	34.7%	38.2%	19.4%
最初の通過エマルジョン			
全体積 (gal)	180	133	149
エステル化油の濃度(w/w)	12.0%	24.5%	16.1%
見かけの密度 (g/mL)	0.986	0.991	0.999
油の単離			
回収した全粗油 (lb)	182	165	174
DHA油の割り当てロット番号	SF1A	SF2A	SF3A

gal=ガロン。 288ガロン=約1090リットル、258ガロン=約977リットル、388ガロン=約1469リットル、398ガロン=約1506リットル、308ガロン=約1166リットル、180ガロン=約681リットル、133ガロン=約503.4リットル、149ガロン=約564リットル。

lb=ポンド。 182ポンド=約82kg、165ポンド=約75kg、174ポンド=79kg

【表3】

表3. 無溶媒抽出プロセスから得られたDHA油のロットの分析

パラメータ	SF1A	SF2A	SF3A
DHA含量 (%FAME)	39.0%	38.6%	39.2%
過酸化物価 (meq/kg)	4.6	1.8	2.0
酸価 (mg KOH/g)	N/D	N/D	N/D
水分含量	N/D	N/D	N/D

精製：

ヘキサン抽出コントロールからの粗油試料と同様に、粗の各アリコートからの試料を、小

10

20

30

40

50

規模で脱ろう処理し、精製し、脱色し、脱臭した。これらの小規模実験からの様々なプロセスデータを、様々な処理工程に対する回収効率を含む表4に示す。ベンチスケールプロセスに対する回収効率を深く解釈することは難しいが、損失は不釣り合いに大きくなる傾向があるので、表4に示した値は、無溶媒抽出試料に対する値が、脱ろう工程の1つの例外を除いて、ヘキサン抽出コントロールに対する測定値を範囲に含むことを示す。ヘキサンコントロールに対する脱ろう工程中の回収率は他の3つの試料に対して観察された回収率よりも低かったが、この違いは統計学的観点からはわずかなものがある。脱ろう工程中の高い損失は、ヘキサンコントロール試料についての全回収率も同様に低下させた。そのような収率の低さが、油の全体の質に重大な影響を及ぼすとは予想されなかった。全体として、様々な油試料の処理の差は最小だった。

【0040】

【表4】

表4. 製油工程から得られた種々のプロセスデータ

	HEX-1	SF1A	SF2A	SF3A
処理条件				
種々の濃度	45.0%	52.9%	52.8%	45.0%
蒸気散布速度	3.4%	3.4%	2.5%	2.2%
回収効率				
脱ろう	80.6%	92.3%	87.7%	85.5%
精製	89.4%	84.8%	91.8%	95.0%
水洗	90.6%	94.5%	95.8%	81.2%
脱色	86.1%	89.2%	87.3%	84.1%
脱臭	97.4%	96.1%	97.2%	97.5%
包装	88.2%	89.7%	89.3%	95.8%
全体	48.2%	56.9%	58.5%	51.8%

3つの無溶媒抽出作業からの完全製油試料と、ヘキサン抽出コントロールとを分析した。その結果を表5に示す。各パラメータの対応する放出仕様も示す。

【0041】

【表5】

表5. ヘキサン抽出油と比較した無溶媒抽出プロセスからのRBD DHA油に対するQC結果

ヘキサン 稼働識別番号	無溶媒抽出プロセス			
	HEX-1	SFA1	SFA2	SFA3
過氧化物価 (meq/kg)	0.28	0.69	0.35	0.34
酸価 (mg KOH/g)	0.17	0.11	0.57	0.24
水分と揮発性	0.00%	0.06%**	0.00%	0.00%
微量金属 (ppm)				
鉛	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20
砒素	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20
鉄	0.22	0.21	0.56***	0.02
銅	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
水銀	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20
DHA (%FAME)	36.9	37.3	37.0	37.7
DHA (mg/g oil)	342	345	343	351
ヘキサン (ppm)	<3	<3	<3	<3

* 精製工程と脱色工程を繰り返した後、値は0.22mg KOH/gまで減小した。

** サンディエゴ発酵化学分析グループにより分析された試料

*** 精製工程と脱色工程を繰り返した後、値は<0.02ppmまで減小した。

表6には、ヘキサンコントロールに対する、無溶媒抽出プロセスからの3つの試料の平均分析結果のより直接的な比較を示す。

【0042】

10

20

30

40

50

【表6】

表6. 平均値の比較

ヘキサン パラメータ	コントロール	無溶媒抽出			
		平均	標準偏差	CV	差%
過酸化物価 (meq/kg)	0.28	0.46	0.20	43.3%	64.3%
酸価 (mg KOH/g)	0.17	0.19*	0.06	33.3%	11.2%
水分と揮発性	0.00%	0.02%	0.03%	173%	ND
微量金属 (ppm)					
鉛	<0.20	<0.20	N/A	N/A	0.0%
砒素	<0.20	<0.20	N/A	N/A	0.0%
鉄	0.22	0.26	0.27	104%	18.2%
銅	<0.05	<0.05	N/A	N/A	0.0%
水銀	<0.20	<0.20	N/A	N/A	0.0%
DHA 含量 (%FAME)	36.9%	37.3%	0.4%	0.9%	1.1%
DHA 含量 (mg/g)	342	346	4	1.2%	1.2%
ヘキサン(ppm)	<3	<3	N/A	N/A	0.0%

* 再び作成した試料に対する酸価を用いて計算した。

この実験からの結果は、無溶媒抽出プロセスが再現可能であると共に、無溶媒抽出からの脂質がプロセスの性能および生成物の質の点でヘキサン抽出プロセスから得られた脂質と相対的に区別が不能であることを明らかに実証している。これらの2つのプロセスから得られた生成物の脂肪酸とステロール分布間の類似性によって決定されるように、無溶媒抽出プロセスからの最終産物は、現行のヘキサンに基づく抽出プロセスからの脂質と実質的に等価である。

【0043】

本発明は、様々な実施形態で、本明細書で図示および説明したのと実質的に同様な構成要素、方法、プロセス、システムおよび/または装置（様々な実施形態、サブコンビネーション、ならびにそのサブセットを含む）を実質的に含む。当業者には、本開示を理解した後で本発明を生産および使用する方法が理解されるだろう。本発明は、様々な実施形態で、本明細書またはその様々な実施形態で図示および/または説明しなかったアイテムがない状態（例えば性能改善のため、実施容易性達成のため、および/または実施コスト低減のために、以前の装置またはプロセスで使用された可能性があるようなアイテムがない状態を含む）で装置およびプロセスを提供することを含む。

【0044】

本発明の以上の考察は、例示と説明を目的として示された。以上の考察は、本明細書に開示した形式に本発明を限定することを意図しない。発明の説明は1または複数の実施形態ならびに特定の変形例および改変例の説明を含んでいるが、他の変形例および改変例も、例えば本開示を理解した後で当業者の技能と知識の範囲内にあるのと同様な、本発明の範囲内にある。いかなる特許性のある主題も公に与えることなく、代替の、互換可能の、および/または均等の構造、機能、範囲、または工程を含めた許容される程度の代替実施形態を含む権利を得ることが、そのような、代替の、交換可能の、および/または均等の構造、機能、範囲、または工程が本明細書に開示されているかいないかに拘わらず意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の無溶媒抽出プロセスの1実施形態のフローチャート。

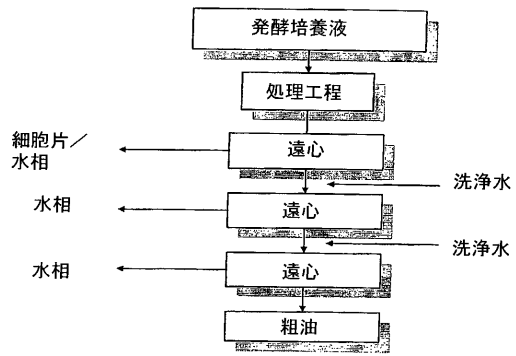
10

20

30

40

【 図 1 】



フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC 20892

前置審査

- (72)発明者 アデュ - ピーザー、スウィジン バトリック
アメリカ合衆国 92131 カリフォルニア州 サンディエゴ ロックスボロ ロード 110
97
- (72)発明者 エンゲルハート、ブライアン エス.
アメリカ合衆国 92117 カリフォルニア州 サンディエゴカンバー ドライブ 5639
- (72)発明者 ヴィーダー、ジョージ ティ.ザ サード
アメリカ合衆国 92065 カリフォルニア州 ラモナ メイン ストリート 2674

審査官 新留 豊

- (56)参考文献 特開平04 - 211366 (JP, A)
特開平11 - 116983 (JP, A)
米国特許第05340594 (US, A)
特開平11 - 285376 (JP, A)
国際公開第98 / 003671 (WO, A1)
米国特許第05928696 (US, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12P 7/64