

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2022-2522  
(P2022-2522A)

(43) 公開日 令和4年1月11日(2022.1.11)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/00	Z N A B	4 B O 6 4	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/12</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/12	A	4 B O 6 5	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/10			
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/6427</b>	<b>(2022.01)</b>	C 1 2 P	7/6427			
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/6409</b>	<b>(2022.01)</b>	C 1 2 P	7/6409			

審査請求 有 請求項の数 20 O L 外国語出願 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2021-149514 (P2021-149514)  
 (22) 出願日 令和3年9月14日 (2021.9.14)  
 (62) 分割の表示 特願2017-550112 (P2017-550112) の分割  
 原出願日 平成28年3月25日 (2016.3.25)  
 (31) 優先権主張番号 62/138,631  
 (32) 優先日 平成27年3月26日 (2015.3.26)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 516175607  
 マラ リニューアブルズ コーポレーショ  
 ン  
 カナダ, ビー2ワイ 4 ティー6 ノバ  
 スコシア州, ダートマス, リサーチ  
 ドライブ 101  
 (74) 代理人 100107456  
 弁理士 池田 成人  
 (74) 代理人 100162352  
 弁理士 酒巻 順一郎  
 (74) 代理人 100123995  
 弁理士 野田 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】粗製グリセリンを用いたバイオマス及び油分の高密度生産

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】粗製グリセリンをより高付加価値の製品へと転化する効率的なプロセスに用いることが出来る、1種または複数種の微生物の培養方法を提供する。

【解決手段】(a) 窒素源、及び第1の濃度レベルの粗製グリセリンを含む培地中で1種または複数種の微生物を培養することと、

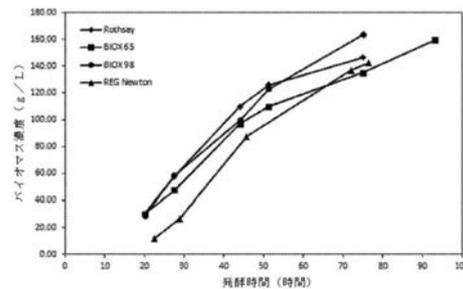
(b) グリセリンの第1の濃度が第1の閾値レベルまで低下した時点で、第1の濃度レベルに達するのに十分な濃度で、追加量の粗製グリセリンを前記培地に供給し、前記供給中に窒素源を前記培地に添加しないことと、

(c) 前記粗製グリセリンの第1の濃度レベルが第1の閾値レベルまで低下するまで、前記粗製グリセリン濃度を監視することと、

(d) 所望の微生物細胞密度に達するまで、ステップ(b)及び(c)を繰り返すことと

を含む、1種または複数種の微生物の培養方法である。

【選択図】図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 粗製グリセリンを第 1 の濃度レベルで含む培地中で 1 種または複数種の微生物を培養することと、

(b) グリセリンの第 1 の濃度が第 1 の閾値レベルまで低下した時点で、第 1 の濃度レベルに達するのに十分な濃度で、追加量の粗製グリセリンを前記培地に供給することと、

(c) 前記粗製グリセリンの第 1 の濃度レベルが第 1 の閾値レベルまで低下するまで、前記粗製グリセリン濃度を監視することと、

(d) 所望の微生物細胞密度に達するまで、ステップ (b) (c) 及び (d) を繰り返すことと

を含む、1 種または複数種の微生物の培養方法。

## 【請求項 2】

前記 1 種または複数種の微生物が *Thraustochytrium* 属または *Schizochytrium* 属の微生物である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記 1 種または複数種の微生物が ONC-T18 である、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記微生物が、1 種または複数種の脂肪酸を産生する能力を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記脂肪酸が多価不飽和脂肪酸である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記多価不飽和脂肪酸が、アルファリノレン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、ガンマ-リノレン酸、リノール酸、リノレン酸、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記脂肪酸を単離することを更に含む、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 8】

第 1 の濃度レベルが 1 g / L と 60 g / L との間である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記第 1 の閾値レベルが 0 g / L と 5 g / L との間である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記監視することが溶存酸素レベルを測定することを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記監視することが、前記培地の試料を取得することと、該試料中の前記グリセリン濃度を測定することとを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記監視することが、熱量分析、化学反応に基づく熱量分析、蛍光分析、HPLC 分析、酵素学的分析、またはそれらの組み合わせを用いて前記試料を分析することを含む、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記細胞密度が 50 g / L と 250 g / L との間である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記微生物細胞密度が全脂肪酸の 50 重量% ~ 80 重量% を含有する、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 15】  
前記全脂肪酸が10～45%のDHAを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 16】  
前記微生物細胞密度が全細胞重量の5～36%のDHAを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 17】  
前記培地が1種または複数種の異なる炭素源を含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 18】 10  
前記粗製グリセリンが滅菌されていない、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 19】  
前記粗製グリセリンが、メタノール、水、灰分、非グリセリン有機物、硫酸ナトリウム、牛脂脂肪酸メチル、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 20】  
前記灰分が、カルシウム、鉄、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、亜鉛またはそれらの組み合わせを含む、請求項19に記載の方法。
- 【請求項 21】 20  
前記粗製グリセリンがバイオディーゼルの副生成物である、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 22】  
1種または複数種の脂肪酸の製造方法であって、  
(a) 脂肪酸を産生する能力を有する微生物を準備することと、  
(b) 粗製グリセリンを含む培地を準備することと、  
(c) 前記培地中、前記1種または複数種の脂肪酸を産生するのに十分な条件下で前記微生物を培養して、前記微生物の少なくとも50重量%である前記1種または複数種の不飽和脂肪酸の最終濃度を与えることと  
を含む、前記方法。 30
- 【請求項 23】  
前記微生物が *Thraustochytrium* 属または *Schizochytrium* 属の微生物である、請求項22に記載の方法。
- 【請求項 24】  
前記微生物が ONC-T18 である、請求項22に記載の方法。
- 【請求項 25】  
前記脂肪酸が多価不飽和脂肪酸を含む、請求項22～24のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 26】 40  
前記多価不飽和脂肪酸が、アルファリノレン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、ガンマ-リノレン酸、リノール酸、リノレン酸、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項25に記載の方法。
- 【請求項 27】  
前記脂肪酸を単離することを更に含む、請求項22～26のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 28】  
前記培地が1種または複数種の異なる炭素源を含む、請求項22～27のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 29】 50  
前記粗製グリセリンが滅菌されていない、請求項22～28のいずれか1項に記載の方

法。

【請求項 30】

前記粗製グリセリンが、メタノール、水、灰分、非グリセリン有機物、硫酸ナトリウム、牛脂脂肪酸メチル、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 22 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

前記灰分が、カルシウム、鉄、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、亜鉛またはそれらの組み合わせを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記粗製グリセリンがバイオディーゼルの副生成物である、請求項 22 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は 2015 年 3 月 26 日出願の米国仮出願第 62 / 138 , 631 号の優先権を主張し、該出願はその全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

20

【0002】

微生物の従属栄養発酵は、高価値の油分及びバイオマス製品を生み出す効率的な方法である。微生物は、特定の培養条件下で細胞内油を合成し、この細胞内油を抽出し、これを用いてバイオ燃料（例えば、バイオディーゼル、バイオジェット燃料など）及び栄養脂質（例えば、DHA、EPA、及びDPAなどの多価不飽和脂肪酸）を製造することができる。一部の微生物のバイオマスはまた、高い多価不飽和脂肪酸（PUFA）及びタンパク質含有量に起因して高い栄養価のバイオマスでもあり、動物飼料用の栄養補助剤として使用することができる。しかしながら、従属栄養発酵は、高コスト、且つ高エネルギー消費及び高原料消費の集約型プロセスである。炭素原料コストは一般に、微生物バイオマス及び油分の総生産コストの非常に大きな部分である。既存の微生物発酵は、炭素源としてグルコースなどの高価な炭水化物を主に使用する。生産プロセスを経済的に有利にするために、より安価な炭素代替物が検討されている。グルコースに加えて、フルクトース及びグリセリンなどのいくつかの他の形態の炭素が微生物用の天然炭素基質である。しかしながら、高度に精製されたグリセリンはグルコースよりも大きなコストがかかる。

30

【発明の概要】

【0003】

1 種または複数種の微生物の培養方法が提供される。上記方法は、粗製グリセリンを第 1 の濃度レベルで含む培地中で 1 種または複数種の微生物を培養することと、グリセリンの第 1 の濃度が第 1 の閾値レベルまで低下した時点で、第 1 の濃度レベルに達するのに十分な濃度で、追加量の粗製グリセリンを上記培地に供給することと、上記粗製グリセリンの第 1 の濃度レベルが第 1 の閾値レベルまで低下するまで、上記粗製グリセリン濃度を監視することとを含む。上記ステップは、所望の微生物細胞密度に達するまで、繰り返されてもよい。

40

【0004】

1 種または複数種の脂肪酸の製造方法も提供される。上記方法は、脂肪酸を産生する能力を有する微生物を準備することと、粗製グリセリンを含む培地を準備することと、上記培地中、上記 1 種または複数種の脂肪酸を産生するのに十分な条件下で上記微生物を培養して、上記微生物の少なくとも 50 重量%である上記 1 種または複数種の不飽和脂肪酸の最終濃度を与えることとを含む。

【図面の簡単な説明】

50

## 【0005】

【図1】唯一の炭素源として異なるバイオディーゼル製造者由来の様々な粗製グリセリン原料を使用した発酵の間の、バイオマス濃度 (g/L) の経時的プロファイルを示すグラフである。

【図2】異なる容積比の粗製グリセリンとグルコースとの混合物を使用した発酵の間の、バイオマス濃度 (g/L) の経時的プロファイルを示すグラフである。グリセリンとは Rothsay 社の粗製グリセリンを意味し、グルコースは 750 g/L のグルコース溶液を意味する。上記比とは 2 種の溶液の容積比であった。

【図3】唯一の供給炭素源として粗製グリセリンを使用した *Thraustochytrium ONC-T18* の大規模 (200, 000 L) 発酵の間の、バイオマス及び脂質濃度の経時的プロファイルを示すグラフである。

【図4】メタノールを用いたバイオディーゼルのエステル交換反応の概略図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0006】

バイオ燃料に対する世界的な需要及び生産能力の増加の結果として、副生成物としての粗製グリセリンの巨大な余剰が生じている。粗製グリセリンの精製には過大な投資を必要とする一方、未精製粗製グリセリンは経済的価値がほとんどない。その結果、多くのバイオ燃料製造業者は粗製グリセリンを産業排水の一種と見なしている。したがって、かかる粗製グリセリンをより高付加価値の製品へと転化する効率的なプロセスは大いに注目されることとなる。バイオディーゼルの副生成物であるグリセリン (粗製グリセリンの一種) が炭素源として使用されてはいるが、粗製グリセリンの不純物に起因する毒性及びかかる毒性を回避するための適当な発酵の炭素供給方法がないことにより、高密度のバイオマス及び油分は得られていない。これに対して、本明細書では、粗製グリセリンを用いた微生物の培養方法及び油分の製造方法が提供される。該提供される方法により、発酵中に高いバイオマス及び油分の生産がもたらされ、68%の油分を含有する 172 g/L の乾燥細胞重量を達成した。かかる生産性は、グルコースを用いる流加発酵によって達成することができる生産性に匹敵する。

## 【0007】

このように、上記提供される方法は、工業的副生成物であるグリセリン (粗製) を一部のまたは唯一の炭素基質として他の栄養成分と共に用いて、微生物を高い細胞密度 (> 100 g/L) 及び高い油分含有量 (> 50%) へと増殖させることを可能にする。工業起源由来の粗製グリセリンは前処理を殆どまたは全く必要としない。粗製グリセリン基質は、非常に高いバイオマス及び油分の収量を達成することができつつ、いずれの生物学的阻害効果も最小限に維持できるような、規定され且つ制御されたやり方によって発酵槽に供給される。本明細書では、無菌発酵プロセスに必要とされる一般的な滅菌操作をなくすることができることも実証される。また、上記粗製グリセリンの前処理を軽減または排除することもでき、上記グリセリンを製造者から受け入れた際にそのまま微生物培養に供給することができる。かかるプロセスが工業的規模で実施される場合、これにより相当なエネルギーコストが節約される。本明細書では、用語「前処理」とは、物理的または生物学的に上記培養増殖に影響を及ぼす場合がある非グリセリン不純物の除去をいう。前処理の例としては、不純物を沈殿させる及び除去するための化学的処理、培養環境の pH を適合させるための pH 調整、懸濁した固体を除去するためのろ過または遠心分離が挙げられる。

## 【0008】

本明細書では、1種または複数種の微生物の培養方法が提供される。上記方法は、粗製グリセリンを第1の濃度レベルで含む培地中で1種または複数種の微生物を培養することと、グリセリンの第1の濃度が第1の閾値レベルまで低下した時点で、第1の濃度レベルに達するのに十分な濃度で、追加量の粗製グリセリンを上記培地に供給することと、上記粗製グリセリンの第1の濃度レベルが第1の閾値レベルまで低下するまで、上記粗製グリセリン濃度を監視することとを含む。場合により、第1の濃度レベルは、1 g/L と 60 g/L との間、または 1 g/L と 60 g/L との間の任意のレベル、但し両端値を含む、

10

20

30

40

50

である。場合により、第1の濃度レベルは、5 g/Lと60 g/Lとの間、15 g/Lと60 g/Lとの間、5 g/Lと20 g/Lとの間、または15 g/Lと20 g/Lとの間である。場合により、第1の閾値レベルは、0 g/Lと5 g/Lとの間または0 g/Lと5 g/Lとの間の任意のレベル、但し両端値を含む、である。したがって、第1の閾値レベルは、例えば、0、1、2、3、4または5 g/Lであってよい。任意選択で、所望の微生物細胞密度に達するまで、上記ステップが繰り返される。場合により、上記所望の微生物細胞密度は100 g/Lより大きい。場合により、上記所望の細胞密度は、50~200 g/L、50~150 g/L、50~100 g/L、100~250 g/L、100~150 g/L、または80~100 g/Lである。場合により、上記細胞密度は50 g/Lと250 g/Lとの間の任意の密度、但し両端値を含む、である。場合により、上記細胞密度は80~100 g/Lである。場合により、上記細胞密度は120~230 g/Lである。場合により、上記微生物細胞密度は、全脂肪酸の50重量%~80重量%を含有する。任意選択で、上記全脂肪酸は10~45%のDHAを含む。任意選択で、上記微生物細胞密度は全細胞重量の5~36%のDHAを含む。

10

20

30

40

50

#### 【0009】

上記微生物は、1種または複数種の脂肪酸を産生する能力を有する。したがって、1種または複数種の脂肪酸の製造方法が提供される。上記方法は、脂肪酸を産生する能力を有する微生物を準備することと、粗製グリセリンを含む培地を準備することと、上記培地中、上記1種または複数種の脂肪酸を産生するのに十分な条件下で上記微生物を培養して、上記微生物の少なくとも50重量%である上記1種または複数種の不飽和脂肪酸の最終濃度を与えることとを含む。任意選択で、上記脂肪酸は多価不飽和脂肪酸である。上記多価不飽和脂肪酸は、例えば、アルファリノレン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、ガンマ-リノレン酸、リノール酸、リノレン酸、及びそれらの組み合わせであってよい。

#### 【0010】

上記提供される方法において、上記粗製グリセリン濃度を監視することは、当業者に公知の種々の方法を用いて実施することができる。任意選択で、上記監視することは溶存酸素レベルを測定することを含む。任意選択で、上記監視することは、上記培地の試料を取得することと、該試料中の上記グリセリン濃度を測定することとを含む。任意選択で、上記監視することは、熱量分析、化学反応に基づく熱量分析、蛍光分析、HPLC分析、酵素学的分析、またはそれらの組み合わせを用いて上記試料を分析することを含む。

#### 【0011】

上記提供される方法における使用に好適な種々の微生物が存在する。本明細書に記載される微生物は、藻類（例えば、微細藻類）、真菌（酵母を含む）、細菌、または原生動物であってよい。任意選択で、上記微生物は、Thraustochytriales目のThraustochytrid、より詳細には、Thraustochytrium属のThraustochytrialesを含む。任意選択で、上記微生物の集団は、米国特許第5,340,594号及び同第5,340,742号に記載されるThraustochytrialesを含み、上記特許は参照によりそれらの全体が本明細書に援用される。上記微生物は、米国特許第8,163,515号に記載される、ATCC寄託番号第PTA-6245（すなわち、ONC-T18）として寄託されたThraustochytrium種などのThraustochytrium種であってもよく、上記特許は参照によりその全体が本明細書に援用される。したがって、上記微生物は、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%またはそれ以上（例えば、100%を含む）配列番号1と同一である、18s rRNA配列を有していてもよい。

#### 【0012】

本明細書に記載の方法において用いるための微生物は種々の脂質化合物を産生してもよい。本明細書では、用語脂質とは、リン脂質、遊離脂肪酸、脂肪酸のエステル、トリアシ

ルグリセリン、ステロール及びステロールエステル、カロテノイド、キサントフィル（例えば、オキシカロテノイド）、炭化水素、ならびに当業者に公知の他の脂質を包含する。任意選択で、上記脂質化合物は不飽和脂質を含む。上記不飽和脂質としては、多価不飽和脂質（すなわち、少なくとも2の不飽和炭素-炭素結合、例えば二重結合を含有する脂質）または高度に不飽和の脂質（すなわち、4以上の不飽和炭素-炭素結合を含有する脂質）を挙げることができる。不飽和脂質の例としては、ドコサヘキサエン酸（すなわち、DHA）、エイコサペンタエン酸（すなわち、EPA）などのオメガ-3及び/またはオメガ-6多価不飽和脂肪酸、及び他の天然起源の不飽和、多価不飽和及び高度に不飽和の化合物が挙げられる。10%のシード容積を接種すると、この長い誘導期が劇的に短縮される。

10

#### 【0013】

上記提供される方法は、当技術分野で公知の方法に従って微生物を培養するための追加のステップを含むか、またはそれらと共に用いてもよい。例えば、*Thraustochytrid*、例えば*Thraustochytrium sp.*は、米国特許公開2009/0117194または2012/0244584に記載の方法に従って培養することができ、これらの特許文献は、該特許文献中で用いられる方法または組成物の各ステップに関して、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

#### 【0014】

微生物は増殖培地（「培養培地」としても知られる）中で増殖させる。種々の培地のいずれかが、本明細書に記載の微生物の培養における使用に適し得る。任意選択で、上記培地は、炭素源及び窒素源を含む上記微生物のための種々の栄養成分を供給する。*Thraustochytrid*培養のための培地は、種々の炭素源のいずれを含んでいてもよい。炭素源の例としては、脂肪酸、脂質、グリセリン、トリグリセリン、炭水化物、ポリオール、アミノ糖、及び任意の種類のパイオマスまたは廃棄物流が挙げられる。脂肪酸としては、例えばオレイン酸が挙げられる。炭水化物としては、グルコース、セルロース、ヘミセルロース、フルクトース、デキストロース、キシロース、ラクツロース、ガラクトース、マルトトリオース、マルトース、ラクトース、グリコーゲン、ゼラチン、デンプン（トウモロコシまたは小麦）、アセテート、*m*-イノシトール（例えば、コーンステイプリカー由来）、ガラクトロン酸（例えば、ペクチン由来）、*L*-フコース（例えば、ガラクトース由来）、ゲンチオピオース、グルコサミン、アルファ-D-グルコース-1-リン酸（例えば、グルコース由来）、セロピオース、デキストリン、アルファ-シクロデキストリン（例えば、デンプンに由来）、及びスクロース（例えば、糖蜜由来）が挙げられるが、これらに限定はされない。ポリオールとしては、マルチトール、エリトリトール、及びアドニトールが挙げられるが、これらに限定はされない。アミノ糖としては、*N*-アセチル-D-ガラクトサミン、*N*-アセチル-D-グルコサミン、及び*N*-アセチル-ベータ-D-マンノサミンが挙げられるが、これらに限定はされない。

20

30

#### 【0015】

上記提供される方法において用いられる培地または複数の培地は粗製グリセリンを含む。本明細書では、用語「粗製グリセリン」とは、製造プロセス、例えばバイオディーゼル製造の副生成物をいう。用語「粗製グリセリン」は、用語「グリセリン(*glycerol*)」または「グリセリン(*glycerin*)」と区別される。というのも、これらの製品は、単独でまたは本質的に純粋な形態での「グリセリン(*glycerol*)」または「グリセリン(*glycerin*)」を含むからである。用語「グリセリン(*glycerol*)」及び「グリセリン(*glycerin*)」は、本明細書を通して同義で用いられる。したがって、粗製グリセリンは、純粋なグリセリン(*glycerol*)またはグリセリン(*glycerin*)に加えて更なる薬剤及び/または成分を含有する。任意選択で、上記粗製グリセリンはバイオディーゼル製造の副生成物である。粗製グリセリンは、トリグリセリドのエステル交換によるバイオディーゼル製造の主要な副生成物、またはトリグリセリドの加水分解（ケン化）による石ケン製造の副生成物である。例えば、一般的なバイオディーゼルプロセスは、脂肪または油分（トリグリセリド）のメタノールな

40

50

どのアルコールとの、脂肪酸のエステル（バイオディーゼル）及びグリセリンを形成する反応である。メタノールを用いた反応の例を図4に示す。脂肪/油分中の不純物ならびに、多くの場合ナトリウムメチラートなどの化学的触媒によって促進される当該反応自体に起因して、最終的なグリセリン画分は比較的に高い含有量の不純物を含む。一般的な粗製グリセリンの組成及び物性を表1に示す（出典：REG Ralston社の粗製グリセリンの分析証明書）。同一の粗製グリセリンの灰分組成を表2に示す。粗製グリセリンのキャラクタリゼーションの更なる例が引用文献、Thompson and He, Applied Engineering in Agriculture, Vol. 22(2): 261-265 (2006), 及びHu et al., J. Agric. Food Chem., 2012, 60(23): 5915-5921 (2012)に記載されており、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に援用される。

10

20

30

40

50

## 【表1】

表1 REG Ralston社粗製グリセリン副生成物。

成分	値	単位	試験法
グリセリン含有量	80.5	質量%	AOCS Ca 14-56/USP
メタノール含有量	0.01	質量%	AOCS Ba 13-87 改変
水含有量	12.8	質量%	AOCS Ca 2e-84
灰分	6.6	質量%	AOCS Ca 11-55
全脂肪酸含有量	0.08	質量%	AOCS Ca 5b-71
MONG(グリセリン以外の有機物)	0.1	質量%	計算値、100%からグリセリン、水、及び灰分を減じることによる
pH	4.3	n/a	pH計
ガードナー色相	5	n/a	ASTM D1544

## 【表2】

表2 REG Ralston社粗製グリセリン副生成物の灰分組成。

分析対象物	単位	値
カルシウム	mg/kg	10
鉄	mg/kg	2
マグネシウム	mg/kg	2
カリウム	mg/kg	14
ナトリウム	mg/kg	25100
亜鉛	mg/kg	0.5

## 【0016】

任意選択で、上記粗製グリセリンは培地または複数の培地中の唯一の炭素源である。任意選択で、上記培地は1種または複数種の更なる炭素源を含む。任意選択で、上記粗製グリセリンは滅菌または前処理がなされない。任意選択で、上記粗製グリセリンは、メタノール、水、灰分、非グリセリン有機物、硫酸ナトリウム、牛脂脂肪酸メチル、またはそれらの組み合わせを含む。任意選択で、上記灰分は、カルシウム、鉄、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、亜鉛またはそれらの組み合わせを含む。

## 【0017】

任意選択で、本明細書において提供される微生物は、バイオマス及び/または目的の化合物の産生（例えば、油分または全脂肪酸（TFA）の含有量）を増加させる条件下で培養される。Thraustochytridは、例えば、一般的には生理食塩水培地中で培養される。場合により、Thraustochytridは約0.5g/L～約50.0g/Lの塩濃度の培地中で培養してもよい。場合により、Thraustochytridは約0.5g/L～約35g/L（例えば、約18g/L～約35g/L）の塩濃度の培地中で培養される。任意選択で、本明細書に記載のThraustochytridは低塩条件で培養してもよい。例えば、上記Thraustochytridは約0.5g/L～約20g/L（例えば、約0.5g/L～約15g/L）の塩濃度の培地中で培養してもよい。上記培養培地は、任意選択で、NaClを含む。任意選択で、上記培地は天然または人工の海塩及び/または人工海水を含む。

10

## 【0018】

上記培養培地は、ナトリウム源として非塩化物含有ナトリウム塩を含んでいてもよい。本方法に従った使用に好適な非塩化物ナトリウム塩の例としては、ソーダ灰（炭酸ナトリウムと酸化ナトリウムの混合物）、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、及びそれらの混合物が含まれるが、これらに限定はされない。例えば、米国特許第5,340,742号及び第6,607,900号を参照されたく、これらの特許のそれぞれの全体の内容は参照により本明細書に援用される。例えば、培養培地中の全ナトリウムの約100%未満、75%未満、50%未満、または25%未満しか塩化ナトリウムによって供給されないような、全ナトリウムの相当の部分が非塩化物塩によって供給されてもよい。

20

## 【0019】

場合により、上記培養培地の塩化物濃度は、約3g/L未満、500mg/L未満、250mg/L未満、または120mg/L未満である。例えば、上記提供される方法において使用するための培養培地の塩化物濃度は、約60mg/Lと120mg/Lとの間、但し両端値を含む、であってよい。

## 【0020】

Thraustochytrid培養用の培地は、種々の窒素源のいずれかを含んでいてもよい。例示的な窒素源としては、アンモニウム溶液（例えば、H<sub>2</sub>O中のNH<sub>4</sub>）、アンモニウム塩またはアミン塩（例えば、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>OOCCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(NH<sub>4</sub>Ac))、ペプトン、トリプトン、酵母エキス、麦芽エキス、魚粉、グルタミン酸ナトリウム、大豆エキス、カザミノ酸及び醸造かすが挙げられる。好適な培地中の窒素源の濃度は、一般には約1g/Lと約25g/Lとの間、但し両端値を含む、の範囲である。

30

## 【0021】

上記培地は、任意選択で、リン酸カリウムまたはリン酸ナトリウムなどのリン酸塩を含む。培地中の無機塩及び微量栄養素としては、硫酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、オルトバナジウム酸ナトリウム、クロム酸カリウム、モリブデン酸ナトリウム、亜セレン酸、硫酸ニッケル、硫酸銅、硫酸亜鉛、塩化コバルト、塩化鉄、塩化マンガン塩化カルシウム、及びEDTAが挙げられる。ピリドキシン塩酸塩、チアミン塩酸塩、パントテン酸カルシウム、p-アミノ安息香酸、リボフラビン、ニコチン酸、ビオチン、葉酸及びビタミンB12などのビタミンが含まれていてもよい。

40

## 【0022】

上記培地のpHを、適当である場合には、酸もしくは塩基を用いて、及び/または窒素源を用いて、3.0と10.0との間、但し両端値を含む、に調節してもよい。任意選択で、上記培地を滅菌してもよい。

## 【0023】

一般に、微生物の培養に用いられる培地は液体培地である。但し、微生物の培養に用いられる上記培地は固体培地であってもよい。固体培地は、本明細書で論じられる炭素源及び窒素源に加えて、構造的支持を与える及び/または当該の培地を固体形態とする1種ま

50

たは複数種の成分（例えば、寒天またはアガロース）を含有していてもよい。

【0024】

任意選択で、得られたバイオマスを低温殺菌し、該バイオマス中に存在する望ましからざる物体を不活性化する。例えば、上記バイオマスを低温殺菌し、化合物を分解する物体を不活性化してもよい。上記バイオマスは、低温殺菌ステップに対して、発酵培地中に存在していてもよいし、または発酵培地から単離されていてもよい。上記低温殺菌ステップは、上記バイオマス及び/または発酵培地を昇温状態に加熱することによって行うことができる。例えば、上記バイオマス及び/または発酵培地を、約50～約95（例えば、約55～約90または約65～約80）の温度に加熱してもよい。場合により、上記バイオマス及び/または発酵培地を約30分～約120分間（例えば、約45分～約90分間、または約55分～約75分間）加熱してもよい。上記低温殺菌は、例えば蒸気の直接注入などの適宜の加熱手段を用いて行うことができる。

10

【0025】

任意選択で、低温殺菌ステップは実施されない。換言すれば、本明細書で教示される方法は、任意選択で低温殺菌ステップを含まない。

【0026】

場合により、上記バイオマスを、当業者に現在公知のものを含む種々の方法に従って採取することができる。例えば、上記バイオマスは、例えば遠心分離（例えば、固体排出遠心分離機を用いて）またはろ過（例えば、十字流ろ過）を用いて、発酵培地から収集することができる。任意選択で、上記採取ステップは、細胞バイオマスの収集を加速するための沈殿剤（例えば、リン酸ナトリウムまたは塩化カルシウム）の使用を含む。

20

【0027】

任意選択で、上記バイオマスは水洗される。場合により、上記バイオマスを最大約20%の固形分に濃縮してもよい。例えば、上記バイオマスを、約5%～約20%の固形分、約7.5%～約15%の固形分、または約固形分～約20%の固形分、または上記列挙した範囲内の任意の割合まで濃縮してもよい。場合により、上記バイオマスを、約20%以下の固形分、約19%以下の固形分、約18%以下の固形分、約17%以下の固形分、約16%以下の固形分、約15%以下の固形分、約14%以下の固形分、約13%以下の固形分、約12%以下の固形分、約11%以下の固形分、約10%以下の固形分、約9%以下の固形分、約8%以下の固形分、約7%以下の固形分、約6%以下の固形分、約5%以下の固形分、約4%以下の固形分、約3%以下の固形分、約2%以下の固形分または約1%の固形分まで濃縮してもよい。

30

【0028】

上記提供される方法は、任意選択で、上記バイオマスまたは微生物から上記多価不飽和脂肪酸を単離することを含む。上記多価不飽和脂肪酸の単離は、当業者に現在公知の方法を含む、種々の方法の1種または複数種を用いて行うことができる。例えば、多価不飽和脂肪酸の単離方法は米国特許第8,163,515号に記載され、該特許はその全体が参照により本明細書に援用される。任意選択で、上記培地は、上記多価不飽和脂肪酸の単離に先立って滅菌されない。任意選択で、滅菌は温度の上昇を含む。任意選択で、上記微生物によって産生され、上記提供される方法から単離される多価不飽和脂肪酸は中鎖脂肪酸である。場合により、上記1種または複数種の多価不飽和脂肪酸は、アルファリノレン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、ガンマ-リノレン酸、リノール酸、リノレン酸及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。

40

【0029】

本明細書に記載の方法に従って製造される多価不飽和脂肪酸（PUFA）及び他の脂質を含む油分は、その生物学的、栄養学的または化学的特性を活用する様々な用途のいずれかにおいて利用することができる。したがって、上記提供される方法は、任意選択で、採取された閾値容積の部分から油分を単離することを含む。任意選択で、上記油分は燃料、例えばバイオ燃料を製造するために用いられる。任意選択で、上記油分は医薬品、食品補

50

助剤、動物飼料添加剤、化粧品などに用いてもよい。本明細書に記載の方法に従って製造される脂質はまた、他の化合物の製造における中間体として用いてもよい。

【0030】

例として、上記提供される方法を用いて培養された微生物によって産生される油分は脂肪酸を含んでもよい。場合により、上記脂肪酸は、アルファリノレン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、ガンマ-リノレン酸、リノール酸、リノレン酸及びそれらの組み合わせからなる群より選択される。場合により、上記油分はトリグリセリドを含む。場合により、上記油分は、パルミチン酸(C16:0)、ミリスチン酸(C14:0)、パルミトレイン酸(C16:1(n-7))、シス-ワクセン酸(C18:1(n-7))、ドコサペンタエン酸(C22:5(n-6))、ドコサヘキサエン酸(C22:6(n-3))、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

10

【0031】

任意選択で、本明細書に記載の方法に従って製造される脂質は、最終製品(例えば、食品または飼料補助剤、乳児用調合乳、医薬品、燃料など)に組み入れられてもよい。上記脂質が組み入れられてもよい好適な食品または栄養補助剤としては、牛乳、水、スポーツ飲料、エネルギー飲料、茶及びジュースなどの飲料;キャンデー、ゼリー、及びビスケットなどの菓子;乳製品などの脂肪含有食品及び飲料;炊いた米(または粥)などの加工食品製品;乳児用調合乳;朝食用シリアル等が挙げられる。任意選択で、1種または複数種の製造される脂質は、例えばビタミンまたはマルチビタミンなどの栄養補助食品に組み入れられてもよい。任意選択で、本明細書に記載の方法に従って製造される脂質は、栄養補助食品中に含まれていてもよく、任意選択で、食品または飼料の成分(例えば、食品補助剤)中に直接組み入れられてもよい。

20

【0032】

本明細書に記載の方法によって製造される脂質を組み入れてもよい飼料の例としては、猫用飼料などのペットフード;犬用飼料など;水槽魚、養殖魚または養殖甲殻類などの飼料;農場、養殖で飼育される動物(家畜及び養殖で飼育される魚または甲殻類を含む)の飼料が挙げられる。本明細書に記載の方法に従って製造される脂質を組み入れてもよい食品または飼料の材料は、意図される受容者である生物の嗜好に合うことが好ましい。この食品または飼料の材料は、食品材料に関する現在知られている任意の物理的特性(例えば、固体、液体、軟質)を有していてもよい。

30

【0033】

任意選択で、1種または複数種の上記製造される化合物(例えば、PUFA)は、栄養補助食品または医薬品中に組み入れられてもよい。かかる栄養補助食品または医薬品の例としては、様々な種類の錠剤、カプセル剤、飲用可能な薬剤などが挙げられる。任意選択で、上記栄養補助食品または医薬品は局所適用に好適である。剤形としては、例えば、カプセル剤、油剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、丸剤、トローチ剤などを挙げることができる。

【0034】

本明細書に記載の方法に従って製造される油分または脂質は、種々の他の薬剤のいずれかと組み合わせて、本明細書に記載の製品中に組み入れられてもよい。例えば、かかる化合物は、1種もしくは複数種の、結合剤または充填剤、キレート剤、顔料、塩、界面活性剤、湿潤剤、粘度調整剤、増粘剤、皮膚軟化剤、香料、防腐剤など、あるいはそれらの任意の組み合わせと組み合わせてもよい。

40

【0035】

上記開示される方法及び組成物の製品に用いてもよい、上記製品と共に用いてもよい、上記製品の調製に用いてもよい、または上記製品である、物質、組成物、及び成分が開示される。これらの及び他の物質は本明細書に開示され、これらの物質の組み合わせ、部分集合、相互作用、群などが開示される場合、種々の個々の及び集団としての組み合わせ、並びにこれらの化合物の置換のそれぞれの明確な言及が明示的に開示されないとしても、

50

それぞれが本明細書に明確に企図され、記載されると解釈されるべきものである。例えば、方法が開示及び議論され、その方法を含む多くの分子に対してなされ得る多くの改変が議論される場合、そうでない旨が明確に示されない限り、上記方法のそれぞれの及び全ての組み合わせ及び置換、ならびに可能な改変が明確に企図される。同様に、これらの任意の部分集合または組み合わせも明確に企図され開示される。この概念は、開示される組成物を用いる方法におけるステップを始めとする、但しこれに限定されない、本開示の全ての態様に適用される。したがって、種々の実施可能な更なるステップがある場合、これらの更なるステップのそれぞれは、開示される方法の任意の特定のステップまたは方法ステップの組み合わせを用いて実行することができること、及び、かかる組み合わせまたは組み合わせの部分集合のそれぞれが明確に企図されており、開示されているとみなされる必要があることが理解されるべきものである。

10

## 【0036】

全体を通して、範囲（例えば、1～10）及び約所与の値（例えば、約1または約10）に対する言及は、記載された値または複数の値（例えば、1及び/または10）を包含する。

## 【0037】

本明細書に引用される刊行物及び該刊行物の引用の対象となる内容は、参照によりその全体が本明細書に明確に援用される。

## 【0038】

以下の実施例は、本明細書に記載の方法及び組成物の特定の態様を更に例証することを意図しており、特許請求の範囲の範囲を限定することを意図するものではない。

20

## 【実施例】

## 【0039】

## 実施例1 粗製グリセリン発酵

4種の粗製グリセリン流を、3社の異なるバイオディーゼル製造者（Rothsay社（カナダ、ウィニペグ）、BIOX社（カナダ、ハミルトン）及びREG Newton LLC（アイオワ州、ニュートン））から得た。これらの組成を対応する製造者によって提供された情報に基づいて表3に列挙する。異なる粗製グリセリンの間で大きなばらつきが示されることは明らかであった。

30

## 【表3】

表3 バイオディーゼル由来の粗製グリセリン副生成物の粗製グリセリン成分。

成分	単位	値			
		Rothsay	BIOX 65	BIOX 98	REG Newton
グリセリン	質量%	80	60~70	> 98	79.2
灰分	質量%	2.6	n/a	n/a	6.3
メタノール	質量%	n/a	n/a	n/a	0.1
水分	質量%	12.3	微量	< 2	12.4
遊離脂肪酸	質量%	1.7	n/a	n/a	0.04
MONG	質量%	3.4	n/a	n/a	1.96
硫酸ナトリウム	質量%	n/a	16~20	n/a	n/a
牛脂脂肪酸メチル	質量%	n/a	2~10	n/a	n/a
pH	n/a	2.2	2.5	3.7	5.2

40

\*MONG:非グリセリン有機物

## 【0040】

実験室規模の発酵実験を行うために、水酸化ナトリウム溶液を用いて、Rothsay及びBIOX 65粗製グリセリンのpHを5.5に調整した。BIOX 98及びREG

50

G Newton粗製グリセリンはpH調整を行わなかった。次いで、全ての粗製グリセリン流をオートクレーブ滅菌し、これらを供給炭素の唯一の供給源として用いて、2 L発酵槽中で、別個の粗製グリセリンを用いたThraustochytrium ONC-T18の流加発酵を実施した。全ての初期発酵培地は、(リットル当たり)グリセリン60 g、大豆ペプトン2 g、塩化ナトリウム1.65 g、硫酸マグネシウム七水和物4 g、リン酸二水素カリウム2.2 g、リン酸水素二カリウム2.4 g、硫酸アンモニウム20 g、塩化カルシウム二水和物0.1 g、塩化鉄0.003 g、硫酸銅五水和物0.003 g、モリブデン酸ナトリウム無水物0.0015 g、硫酸亜鉛七水和物0.003 g、塩化コバルト六水和物0.0015 g、塩化マンガン四水和物0.0015 g、硫酸ニッケル六水和物0.0015 g、ビタミンB12 0.00003 g、ビオチン0.00003 g、チアミン塩酸塩0.006 gを含有していた。上記2 L発酵槽をRothsay、BIOX 65及びBIOX 98の発酵に用い、5 L発酵槽をREG Newtonの発酵に用いた。全ての発酵のpHを水酸化ナトリウム及びリン酸溶液によって4.5±0.2に制御した。全ての発酵の温度を28℃に制御した。全ての発酵を、対応する粗製グリセリンを唯一の炭素原料として用いて、流加法で運転した。適当な時間に、ある量の粗製グリセリンを自動的に発酵槽にポンプ注入して、培地中グリセリン濃度を60 g/L(2 L運転)、または20 g/L(5 L運転)とした。

10

#### 【0041】

かかる炭素供給を、特定のバイオマス濃度及び細胞内油含有量に達するまで、発酵全体を通じて実施した。140 g/L~165 g/Lの範囲の最終バイオマス濃度(図1)が達成され、65%~78%の範囲の細胞内脂質を含有した(表4)。被験粗製グリセリン原料間の品質のばらつき及び該原料に適用した最小限の前処理を考慮すると、これらの結果によって、粗製グリセリン副生成物を使用した、工業的に実施可能なバイオマス及び脂質の製造を実施するために開発された上記高細胞/脂質密度流加発酵プロセスが、不安定な状況に左右されないものであることが良好に実証された。

20

#### 【表4】

表4 唯一の炭素源として種々の粗製グリセリン原料を用いた発酵結果の概要。

指標	単位	値			
		Rothsay	BIOX 65	BIOX 98	REG Newton
発酵時間	時間	75	93	75	76.4
最終的な乾燥バイオマス	g/L	146.63	159.29	163.43	142.49
最終的な脂質含有量	%	70.02	67.88	77.56	65.56
最終的な脂質	g/L	102.67	108.13	126.76	93.42
バイオマス生産性	g/L-d	46.92	41.11	52.30	44.76
脂質生産性	g/L-d	32.85	27.90	40.56	29.35

30

#### 【0042】

##### 実施例2 混合炭素源発酵

発酵による製造プラントの運転にとって、十分な且つ途切れることのない量で炭素原料が供給されることが決定的に重要である。主たる炭素原料の供給が不足する状況下においては、補助的な炭素原料の利用が可能であることが、当該プラントの持続的な運転にとって重要となり得る。そこで、グルコースと粗製グリセリンとの混合物を用いたThraustochytrium ONC-T18の発酵を実施した。グルコースは、脂質製造のためのThraustochytridの高密度発酵用の周知の炭素源ではあるが、同一の発酵でグルコースを第2の炭素源と共に用いると、炭素の異化代謝産物抑制を生じるかどうか不明確であった。実施例1に示したものと同様の初期培地処方を用いて、2台の2 L発酵槽を準備した。実施例1に示した規格のRothwayの粗製グリセリンを入手し、750 g/Lのグルコース溶液も調製した。次いで、第1の発酵槽用の炭素原料とし

40

50

て、粗製グリセリンとグルコース溶液とを 80 : 20 の容積比で物理的に混合し、また第 2 の発酵槽用の炭素原料として 20 : 80 の容積比で混合した。実施例 1 に記載したものと同様の炭素供給方法によって発酵を実施した。図 2 及び表 5 に示すデータによって実証されるとおり、粗製グリセリン及びグルコースを混合炭素原料として使用することにより、粗製グリセリンを唯一の炭素原料として用いた場合に匹敵するバイオマス及び脂質の結果を生じた。より好ましい炭素源と第 2 の炭素源の両方の炭素が増殖培地中に存在する場合に、前者の存在によって後者の代謝が阻害される現象である炭素の異化代謝産物抑制が、この実施例には該当しないことが見出された。発酵に際して、グリセリンとグルコースの両方が、該培養プロセスを通して同時に消費された。この実施例は、Thraustochytrid の工業的培養に際して、粗製グリセリンを主たる炭素源、または従たる炭素源として用いてもよく、且つ第 2 の炭素原料を同じ発酵で用いてもよいことを実証している。かかる炭素使用の柔軟性により、大規模な発酵プロセスの運転の安定性が確保される。

10

## 【表 5】

表5 異なる容量比の粗製グリセリンとグルコースとの混合物を用いた発酵結果の概要。

指標	単位	値	
		粗製グリセリン: グルコース(80:20)	粗製グリセリン: グルコース(80:20)
発酵時間	時間	72	72
最終的な乾燥バイオマス	g/L	134.84	148.59
最終的な脂質含有量	%	68.97	69.41
最終的な脂質	g/L	93.00	103.14
バイオマス生産性	g/L-d	44.95	49.53
脂質生産性	g/L-d	31.00	34.38

20

## 【0043】

## 実施例 3 混合粗製グリセリン発酵

実施例 2 と同様に、持続的な大規模プラントの運転にとって、異なるバイオディーゼル製造プロセスに由来する粗製グリセリンの混合物を使用することが可能であることも有利となるであろう。この目的のために、4 種の粗製グリセリン流を等容量比で混合して、粗製グリセリン混合物を形成した。各粗製グリセリン流の規格を表 6 に列挙する。混合後に、この粗製グリセリン混合物を、如何なる更なる処理（例えば、pH 調整、ろ過）または滅菌も行うことなく、炭素原料として使用した。この実験のために、滅菌操作の前に、初期培地のバッチにグリセリンを加えなかった以外は、実施例 1 に示したものと同様の処方の初期培養培地を用いて、30 L の発酵槽を準備した。接種直後に、上記粗製グリセリン混合物を実施例 1 に記載した供給方法に従って供給し、各供給により培地中のグリセリン濃度を 20 g/L とした。70 時間までに、バイオマスは 171.54 g/L に達し、脂質は 68.00 % であった。上記粗製グリセリン混合物を滅菌せずに使用したにもかかわらず、発酵には汚染がなかった。

30

40

## 【表 6】

表6 粗製グリセリン混合物を作製するための異なるバイオディーゼル製造プロセス由来の粗製グリセリン副生成物の組成。

成分	単位	値			
		Rothsay	BIOX 65	REG Ralston	REG Newton
グリセリン	質量%	80	60~70	80.5	79.2
灰分	質量%	2.6	n/a	6.6	6.3
メタノール	質量%	n/a	n/a	0.01	0.1
水分	質量%	12.3	微量	12.8	12.4
遊離脂肪酸	質量%	1.7	n/a	0.08	0.04
MONG*	質量%	3.4	n/a	0.1	1.96
硫酸ナトリウム	質量%	n/a	16~20	n/a	n/a
牛脂脂肪酸メチル	質量%	n/a	2~10	n/a	n/a
pH	-	2.2	2.5	4.3	5.2

\*MONG:非グリセリン有機物

## 【0044】

実施例 4 工業的なバイオマス及び脂質の製造のための粗製グリセリン

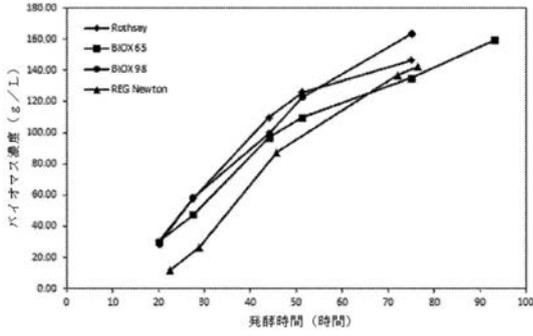
上記開発された工業的なバイオマス及び脂質の製造のための粗製グリセリンを用いた発酵プロセスの実施可能性を証明するために、2種の大規模な(200,000L)発酵を実施した。REG Ralston社の粗製グリセリンを唯一の供給炭素源として、いずれの前処理または滅菌も行わずに使用した。培地処方は、初期培地のバッチに30g/Lのグルコースのみを加え、第1バッチにおいては1g/Lの大豆ペプトンを用い、第2バッチにおいては1g/Lの(大豆ペプトンに代えて)コーンステープソリッドを用いた以外は、実施例1に記載したものと同様であった。発酵は、pH4.5±0.3で、温度を29±1に制御して実施した。2回の発酵のうち1回のバイオマス及び脂質の経時プロファイルを図3に示す一方、両方の大規模運転の全てのプロセス指標を表7に列挙する。いずれの前処理操作または滅菌操作も行わずに、バイオディーゼル粗製グリセリン副生成物を唯一の供給炭素源として用いて、200,000Lの発酵槽によって、平均で180.76g/Lのバイオマス、126.53g/Lの脂質を製造することができる。これらの結果は、バイオマス及び脂質の大規模な工業的製造のための炭素原料として、粗製グリセリンを使用することができることを実証している。

## 【表 7】

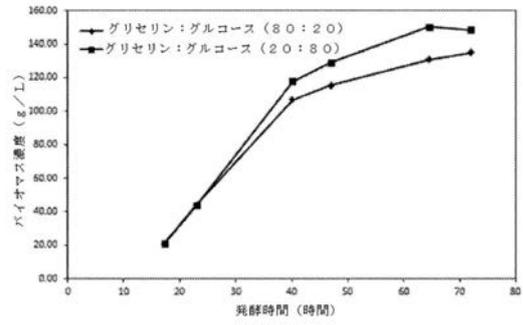
表7 前処理または滅菌なしで唯一の供給炭素源として粗製グリセリンを用いた大規模(200,000L)発酵。

指標	単位	値	
		第1バッチ	第2バッチ
発酵時間	時間	94	96
最終的な乾燥バイオマス	g/L	172.95	188.56
最終的な脂質含有量	%	70.00	70.80
最終的な脂質	g/L	121.07	133.50
バイオマス生産性	g/L-d	44.16	47.14
脂質生産性	g/L-d	30.91	33.38

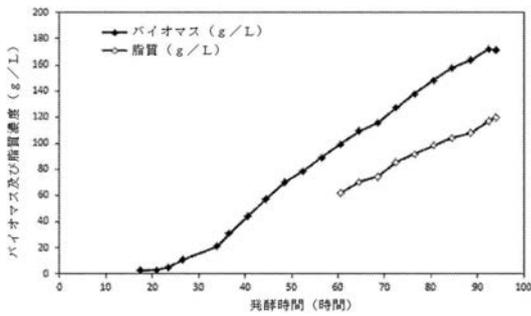
【 図 1 】



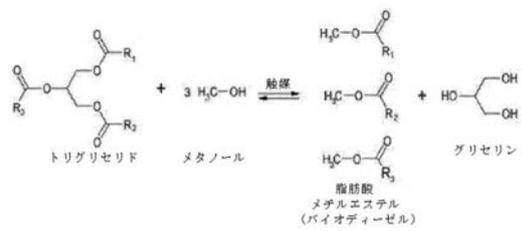
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



## 【配列表】

2022002522000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】令和3年10月11日(2021.10.11)

## 【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】

(a) 窒素源、及び第1の濃度レベルの粗製グリセリンを含む培地中で1種または複数種の微生物を培養することと、

(b) グリセリンの第1の濃度が第1の閾値レベルまで低下した時点で、第1の濃度レベルに達するのに十分な濃度で、追加量の粗製グリセリンを前記培地に供給し、前記供給中に窒素源を前記培地に添加しないことと、

(c) 前記粗製グリセリンの第1の濃度レベルが第1の閾値レベルまで低下するまで、前記粗製グリセリン濃度を監視することと、

(d) 所望の微生物細胞密度に達するまで、ステップ(b)及び(c)を繰り返すことと

を含む、1種または複数種の微生物の培養方法。

【請求項2】

前記1種または複数種の微生物が *Thraustochytrium* 属または *Schizochytrium* 属の微生物である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記1種または複数種の微生物が ATCC寄託番号PTA-6245を有する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記微生物が、1種または複数種の脂肪酸を産生する能力を有する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記脂肪酸が多価不飽和脂肪酸である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記多価不飽和脂肪酸が、アルファリノレン酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、ガンマ-リノレン酸、リノール酸、リノレン酸、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記脂肪酸を単離することを更に含む、請求項4に記載の方法。

【請求項8】

第1の濃度レベルが1g/Lと60g/Lとの間である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記第1の閾値レベルが0g/Lと5g/Lとの間である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記監視することが溶存酸素レベルを測定することを含まない、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記監視することが、前記培地の試料を取得することと、該試料中の前記グリセリン濃度を測定することとを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

前記監視することが、熱量分析、化学反応に基づく熱量分析、蛍光分析、HPLC分析、酵素学的分析、またはそれらの組み合わせを用いて前記試料を分析することを含む、請求項 1 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

前記細胞密度が  $159.29 \text{ g/L}$  と  $250 \text{ g/L}$  との間である、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

前記微生物細胞密度が全脂肪酸の  $70 \text{ 重量}\%$  ~  $80 \text{ 重量}\%$  を含有する、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

前記全脂肪酸が  $10 \sim 45 \%$  の DHA を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記微生物細胞密度が全細胞重量の  $36 \%$  ~  $45 \%$  の DHA を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

前記培地が 1 種または複数種の異なる炭素源を含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 8】

前記粗製グリセリンが滅菌されていない又は前処理されていない、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 9】

前記粗製グリセリンが、メタノール、水、灰分、非グリセリン有機物、硫酸ナトリウム、牛脂脂肪酸メチル、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 2 0】

前記粗製グリセリンがバイオディーゼルの副生成物である、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 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	7/6434 (2022.01)	C 1 2 P	7/6434	
C 1 2 P	7/6432 (2022.01)	C 1 2 P	7/6432	
(72)発明者	パデュー, ローラ			
	カナダ, ノバスコシア州	ビー3エイチ	1ケー4,	ハリファックス, イングリス
				ストリート 5720
(72)発明者	ミルウェイ, マイケル			
	カナダ, ノバスコシア州	ビー3エル	2ティー5,	ダートマス, オールド フェリー
				ロード 41
(72)発明者	ベリーマン, ケヴィン			
	カナダ, ノバスコシア州	ビー3エー	2エム8,	ダートマス, クリアビュー
				クレセント 18
(72)発明者	ヴァレンティン, マーシア			
	カナダ, ノバスコシア州	ビー3ジー	1ピー1,	イースタン パッセージ, メルローズ
				クレセント 167
(72)発明者	サン, ジーヨン			
	カナダ, ノバスコシア州	ビー2ダブリュー	6イー5,	ダートマス, パークビュー
				レーン 19
(72)発明者	アルメンタ, ロベルト イー.			
	カナダ, ノバスコシア州	ビー2ワイ	3ジー1,	ダートマス, クランストン
				アベニュー 23
F ターム(参考)	4B064 AD87 AD88 AD89 AD90 CA08 CA09 CC01 CC03 CC09 CD01			
	CD06 CD23 DA10 DA16			
	4B065 AA83X AA86X AC14 BB02 BB06 BC12 BC13 CA13 CA41 CA54			
	CA55			

【外国語明細書】

2022002522000001.pdf