

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6276862号
(P6276862)

(45) 発行日 平成30年2月7日 (2018.2.7)

(24) 登録日 平成30年1月19日 (2018.1.19)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 P 23/00 (2006.01)	C 1 2 P 23/00	
C 1 2 N 1/12 (2006.01)	C 1 2 N 1/12	A
C 1 2 R 1/89 (2006.01)	C 1 2 P 23/00	
	C 1 2 R 1:89	

請求項の数 6 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2016-541591 (P2016-541591)	(73) 特許権者	510273880
(86) (22) 出願日	平成27年4月13日 (2015.4.13)		コリア ユニバーシティ リサーチ アン
(65) 公表番号	特表2017-513455 (P2017-513455A)		ド ビジネス ファウンデーション
(43) 公表日	平成29年6月1日 (2017.6.1)		KOREA UNIVERSITY RE
(86) 国際出願番号	PCT/KR2015/003668		SEARCH AND BUSINESS
(87) 国際公開番号	W02015/160154		FOUNDATION
(87) 国際公開日	平成27年10月22日 (2015.10.22)		大韓民国、136-701 ソウル、ソン
審査請求日	平成28年10月17日 (2016.10.17)		ブク-グ、アナム-ロ 145
(31) 優先権主張番号	10-2014-0045962	(74) 代理人	100090251
(32) 優先日	平成26年4月17日 (2014.4.17)		弁理士 森田 憲一
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100139594
			弁理士 山口 健次郎
		(74) 代理人	100185915
			弁理士 長山 弘典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高温で成熟胞子接種及び鉄イオン媒介ハーバー・ワイス反応によるヘマトコッカスプルビアリス内アスタキサンチン生産量増進方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記のステップを含む、ヘマトコッカスプルビアリス (Haematococcus pluvialis) の培養によるアスタキサンチンの生産量を増進させる方法:

(a) ヘマトコッカスプルビアリスの成熟胞子 (cyst) を接種して、 $35 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 以下の光度を照射して増殖 (vegetative growth) させるステップ; 及び

(b) 窒素が欠乏して鉄イオンが添加された独立栄養条件で、 $100 \sim 300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光度を照射して、 $28 \sim 33^\circ\text{C}$ で培養して、ヘマトコッカスプルビアリス内の H_2O_2 生成を誘導し、生成された H_2O_2 により、ヘマトコッカスプルビアリス内アスタキサンチンの生成を誘導するステップ。

【請求項 2】

前記独立栄養条件は、光合成のための無機炭素源として 3~4% の二酸化炭素を供給することを含む請求項 1 に記載のアスタキサンチンの生産量を増進させる方法。

【請求項 3】

前記鉄イオンは、 Fe_2SO_4 、 FeCl_2 、 FeCl_3 及び $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ からなる群から選択される 1 種以上であることを特徴とする請求項 1 に記載のアスタキサンチンの生産量を増進させる方法。

【請求項 4】

前記鉄イオンの濃度は、 $40 \sim 80 \mu\text{M}$ であることを特徴とする請求項 1 に記載のアス

タキサンチンの生産量を増進させる方法。

【請求項5】

前記鉄イオンは、活性酸素 O_2^- 及び H_2O_2 含量に対して100～600モル比で添加されることを特徴とする請求項1に記載のアスタキサンチンの生産量を増進させる方法。

【請求項6】

前記アスタキサンチンの含量は、ヘマトコッカスプルベアリス細胞内活性酸素 O_2^- 及び H_2O_2 が活性酸素 O_2 及び $OH\cdot$ に転換することによって増進されることを特徴とする請求項1に記載のアスタキサンチンの生産量を増進させる方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、二段(two-stage)光培養工程でヘマトコッカスプルベアリス内アスタキサンチンの生産量を増進させる方法に関し、具体的には高温の独立栄養条件で成熟胞子(cyst)の接種及び鉄イオン添加でヘマトコッカスプルベアリス細胞内アスタキサンチンの生産量を増進させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般に、赤みを帯びるケトカロテノイド(Ketocarotenoid)であるアスタキサンチン(Astaxanthin、3,3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4,4'-dione)は、 β -カロテン(β -carotene)のような化学的構造を持つカロテノイド系色素の一種で、有害活性酸素をなくす抗酸化機能性物質で、 β -カロテンに比べて両側末端基にヒドロキシル基($-OH$)とケトン基($=O$)を一つずつ多く持つ独特の分子構造的な特性のために、既存の抗酸化物質よりも飛び切り高い抗酸化活性を持つ。アスタキサンチンは、代表的な抗酸化剤であるビタミンEよりも500倍、 β -カロテンよりも20倍程度高い抗酸化活性を持つ。このような高い抗酸化活性機能により、アスタキサンチンは、医薬品、食品添加剤及び動物と稚魚の飼料添加剤として広く使用されていて、その需要量及び活用範囲が急激に拡大すると予想されている。

20

【0003】

30

このようなアスタキサンチンは、酵母菌株であるファフィア・ロドザイマ(Phaffia rhodozyma)とブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)から生成されて、また、海洋動物と淡水動物に多く分布されているが、海老やザリガニなどの甲殻類から抽出されたアスタキサンチンは、含量が少なく、抽出過程が難しいため適用されずにいて、ファフィア・ロドザイマ菌株は、成長率が高いがアスタキサンチンの収率が低いという問題点を有している。

【0004】

そこで、地球上でアスタキサンチンの蓄積含量と収率の側面で最も優れた微細藻類であるヘマトコッカスプルベアリス(Haematococcus pluvialis)を使用して光による二酸化炭素の固定化と同時にアスタキサンチンの生産性を高めるための様々な研究が行われている。

40

【0005】

従来KR2005-0005341Aでは、アスタキサンチンを生産することができる菌株を培養させ、このような菌株を利用して高含量のアスタキサンチンを生産するための方法で光照射量を増加させて微細藻類によるアスタキサンチンの生産量を増加させるための研究が行われたが、この場合、特別な形態の反応器が必要で、高い光照射量のためのエネルギー費用が大きい短所がある。また、KR2010-0105193Aでは、放射線照射を利用してアスタキサンチンの生産方法を開示しているが、放射線照射費用を節減できない問題点がある。

【0006】

50

一方、細胞成長及びアスタキサンチン合成に必要な炭素源としてただ二酸化炭素のみを利用する独立栄養条件で、アスタキサンチン生産誘導のためのヘマトコッカスプルベアリスの最も核心的なアスタキサンチン合成促進因子はまさに強力な光であるが、光源として太陽を活用した場合、温室ガスの主犯である二酸化炭素のアスタキサンチン転換工程へより経済性を与えることができ、強力な光によってアスタキサンチン合成が促進される反面、太陽光を吸収する微細藻類光培養器内培地の温度上昇により外部バクテリアによる汚染が加速化されるなどの様々な問題点が引き起こされる。

【0007】

したがって、アスタキサンチン蓄積能力が優れたヘマトコッカスプルベアリスを屋外で太陽を活用して産業的に二酸化炭素転換工程に利用するためには、高温の独立栄養条件での遅いアスタキサンチン生産性問題を解決することが何より至急に必要であるのが現状である。

10

【0008】

そこで、本発明者等は、ヘマトコッカスプルベアリスを屋外太陽光で培養して、アスタキサンチン生産収率向上方法を探そうと鋭意努力した結果、高温の独立栄養条件で成熟胞子(cyst)を接種した後、鉄イオンを添加する二段(two-stage)光培養工程でヘマトコッカスプルベアリス細胞内のアスタキサンチンの生産量が顕著に増加するのを確認して本発明の完成に至った。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0009】

本発明の目的は、(a)ヘマトコッカスプルベアリスの成熟胞子(cyst)を接種して増殖(vegetative growth)させるステップ；及び(b)窒素が欠乏して鉄イオンが添加された独立栄養条件で $100\sim300\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光度を照射してヘマトコッカスプルベアリス内アスタキサンチンの生成を誘導するステップを含む、ヘマトコッカスプルベアリス(Haematococcus pluvialis)の培養によるアスタキサンチンの生産量を増進させる方法を提供するところにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記目的を達成するために、本発明は、(a)ヘマトコッカスプルベアリスの成熟胞子(cyst)を接種して増殖(vegetative growth)させるステップ；及び(b)窒素が欠乏して鉄イオンが添加された独立栄養条件で $100\sim300\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光度を照射してヘマトコッカスプルベアリス内アスタキサンチンの生成を誘導するステップを含む、ヘマトコッカスプルベアリス(Haematococcus pluvialis)の培養によるアスタキサンチンの生産量を増進させる方法を提供する。

30

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】高温(30℃、36℃)の独立栄養条件で鉄イオン媒介ハーバー・ワイス反応を介したヘマトコッカスプルベアリスのアスタキサンチン生産能力増大のための誘導過程を図式化した概略図である。

40

【図2】独立栄養条件でアスタキサンチン合成の間各々の温度条件(23℃、30℃、36℃)と鉄イオンの添加によるヘマトコッカスプルベアリスのバイオマス及びアスタキサンチン合成能力に及ぼす影響を示す結果である。

【図3】独立栄養条件でアスタキサンチン合成18日目各々の温度条件(23℃、30℃、36℃)と鉄イオンの添加によるヘマトコッカスプルベアリスのアスタキサンチン蓄積程度を示した光学顕微鏡イメージ結果である。(Scale bars = 40 μm)

【図4】独立栄養条件でアスタキサンチン合成18日の間各々の温度条件(23℃、30℃、36℃)と鉄イオンの添加によるヘマトコッカスプルベアリスのDCF含量、SOD活性及びMDA含量に及ぼす影響を示す結果である。

【図5】23℃温度の独立栄養条件で、アスタキサンチン合成促進時、 O_2^- を人為的に

50

放出する *Methyl viologen* の濃度と鉄イオン (Fe^{2+}) 増加によるヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン蓄積能力の減少及びこれと対照的に金属イオン媒介 Fenton 反応によるアスタキサンチン蓄積能力の維持及び増加程度を示す結果である。

【図 6】23℃でグリーンステージで培養された細胞を高温 (23.4～33.5℃) の独立栄養条件で鉄イオンを添加してヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン生産を確認した結果である。

【図 7】高温 (23℃、30℃、33℃) 条件で成熟胞子 (red cyst) 接種を介したグリーンステージでヘマトコッカスプルビアリスの vegetative growth を確認した結果である。

【図 8】夏場高温の独立栄養条件でグリーンステージで15日間培養後、鉄イオンを添加してレッドステージで63日間培養でヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン生産量増加を確認した結果である。

【図 9】屋外の中温及び高温 (23～28℃及び28～33℃) 条件で、二段 (two-stage: グリーン及びレッドステージ) 光培養を介したヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン生産能力増大を誘導した過程及び結果を示したものである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

他の方式で定義されない限り、本明細書において使用されたあらゆる技術的・科学的用語は、本発明が属する技術分野に熟練した専門家によって通常理解されるものと同じ意味を有する。通常、本明細書において使用された命名法は、本技術分野において周知であり、しかも汎用されるものである。

【0013】

本発明では、高温の独立栄養条件で *H. pluvialis* の生産量を増加させて、アスタキサンチンを大量生産するために、成熟胞子 (cyst) を接種して、鉄イオンが添加された独立栄養条件のヘマトコッカスプルビアリス細胞に $10 \sim 300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光度で照射することによって、ヘマトコッカスプルビアリス内アスタキサンチンの生成を誘導した。

【0014】

本発明で使用した微細藻類である *H. pluvialis* は、自然界に存在する生物体のうちアスタキサンチンの蓄積量が最も高いが、二酸化炭素を唯一の炭素源として使用する独立栄養条件ではアスタキサンチン生産性が低い短所がある。

【0015】

特に、韓国のような夏場の太陽は、強い光と共に高い温度 (30～40℃) を伴うが、このような高温の独立栄養条件でヘマトコッカスプルビアリス細胞でアスタキサンチン合成時アスタキサンチン合成能力が顕著に減少する現象が起きる。アスタキサンチン濃度及び生産性の持続的な減少で細胞が深刻な環境的ストレスに耐えられず結局細胞の死滅がもたらされて、高温 (30～40℃) で生育が活発なバクテリアによる汚染は、このような問題をさらに深刻にする。

【0016】

したがって、本発明は一観点で、(a) ヘマトコッカスプルビアリスの成熟胞子 (cyst) を接種して増殖 (vegetative growth) させるステップ; 及び (b) 窒素が欠乏して鉄イオンが添加された独立栄養条件で $100 \sim 300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光度を照射してヘマトコッカスプルビアリス内アスタキサンチンの生成を誘導するステップを含む、ヘマトコッカスプルビアリス (*Haematococcus pluvialis*) の培養によるアスタキサンチンの生産量を増進させる方法に関する。

【0017】

本発明において、前記培養温度は25～40℃であることが好ましいか、これに限定されない。

【0018】

通常の春の中温条件は、 $17.5 \sim 27.7^{\circ}\text{C}$ であり、夏の高温条件は、 $23.4 \sim 33.5^{\circ}\text{C}$ である。したがって、本発明の moderate temp は、 $23 \sim 28^{\circ}\text{C}$ であり、high temp は、 $28 \sim 33^{\circ}\text{C}$ であることが好ましいか、これに限定されない。

【0019】

本発明において、前記独立栄養条件は、光合成のための無機炭素源として3～4%の二酸化炭素を供給することが好ましいか、これに限定されない。

【0020】

本発明において、前記ステップ(a)は、 $35 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 以下の光度を照射することが好ましいか、これに限定されない。

10

【0021】

本発明のステップ(a)は、「グリーンステージ」を意味し、前記「グリーンステージ」は、窒素が含まれた独立栄養条件に3～4%の二酸化炭素を供給しながら、 $35 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 以下の光度を照射する低ストレスの培養条件を意味する。

【0022】

本発明のステップ(b)は、「レッドステージ」を意味し、前記「レッドステージ」は、窒素が欠乏した独立栄養条件に3～4%の二酸化炭素を供給しながら $100 \sim 350 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光度を照射する高ストレスの培養条件を意味する。

【0023】

本発明において、前記鉄イオンは、 Fe_2SO_4 、 FeCl_2 、 FeCl_3 及び $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ からなる群から選択される1種以上であることが好ましいか、これに限定されない。また、前記鉄イオンの濃度は、 $40 \sim 80 \mu\text{M}$ であることが好ましいか、これに限定されない。

20

【0024】

本発明において、前記鉄イオンは、活性酸素 O_2^- 及び H_2O_2 含量に対して100～600モル比で添加されることが好ましいか、これに限定されない。

【0025】

本発明において、前記アスタキサンチンの含量は、ヘマトコッカスプルビアリス細胞内活性酸素 O_2^- 及び H_2O_2 が活性酸素 O_2 及び $\text{OH}\cdot$ に転換によって増進されることを特徴とする。

30

【0026】

通常、微細藻類は、高温の環境に露出時、光合成をつかさどる葉緑体内にチラコイド(thylakoids)の漏出(leak)、酷い場合には分解(disintegration)が発生する。続いて、チラコイドの酸素吸収率(oxygen uptake rate)が増幅されて、カルビン回路(calvin cycle)を介して還元されることが出来なかった電子がMehler Reaction($\text{O}_2 \text{ uptake} + \text{electron} \rightarrow \text{O}_2^-$)によって酸素と結合して O_2^- がチラコイド中に多量に生成される。続いて、細胞は、過量生産された O_2^- から細胞成分を保護するために、SOD(superoxide dismutase)を発現させるようになり、生成された O_2^- は、葉緑体内SOD(superoxide dismutase)によって H_2O_2 で転換される。結果的に、高温の環境は、微細藻類細胞内多量の H_2O_2 を発生させる。

40

【0027】

H_2O_2 は O_2^- とは違って拡散を介した細胞膜透過が容易であるため、葉緑体器官から出てきた H_2O_2 は、核酸、ミトコンドリア、液胞など他の細胞器官に細胞酸化関連シグナルを伝達するようになって、この時カロテン生成(carotenogenesis)に関連した遺伝因子中 H_2O_2 に敏感な酵素を直接的に非活性化させて、結果的にヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン合成が阻害された可能性がある。

【0028】

一方、植物体でカロテノイドは、色素体(plastid)内で排他的に合成されると

50

報告されているが、ヘマトコッカスプルビアリスは、ストレス反応によって色素体の外の脂質小包 (lipid vesicles, globules) にアスタキサンチンを含むカロテノイドを蓄積する。先述したように H_2O_2 は、 O_2^- とは違って拡散を介した細胞膜透過が容易であるため、鉄イオン媒介ペントン反応 ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot$) は、色素体の外でも十分に発生する。したがって、ヘマトコックス細胞は、鉄イオン媒介Haber-Weiss反応を介して過量生成された $OH\cdot$ による深刻な脂質酸化から自己防御のために、アスタキサンチン合成を促進させた可能性が高い。

【0029】

また、 O_2 、 $OH\cdot$ は、 O_2^- 、 H_2O_2 よりも反応性が高いと報告された。 $OH\cdot$ は、0.3 msec (diffusion lengths of 1.7–20 μm) の非常に短い寿命 (lifetime) を持つ反面、 H_2O_2 は、 $E=1.77 V$ 、 $pK_a 11.6$ の強力な二つの電子酸化剤 (electron-oxidant) であるが、生物学的分子 (biological molecules) に対する反応性が低いため、多くの H_2O_2 による細胞損傷は、 Fe^{2+} のような遷移金属 (transition metal) や酵素 (enzyme) の媒介として H_2O_2 の O_2 及び $OH\cdot$ 転換を誘導して発生する。 O_2^- も適宜に高いreduction potential ($E=0.94 V$) を持っているにも関わらず依然として生物学的分子 (biological molecules) に対する反応性が低い。

【0030】

したがって、高温の培養条件 (30–40 $^{\circ}C$) で細胞内多量生成されたLROS (O_2^- 、 H_2O_2) から鉄イオン媒介Haber-Weiss反応を誘導して、相当部分転換されたMROS (O_2 、 $OH\cdot$) は、PUFA (不飽和脂肪酸) をはじめとする各種細胞成分を酸化させて、結果的にMDA含量が増加した可能性が大きい。さらに室温 (23 $^{\circ}C$) の条件で $FeSO_4$ を追加的に添加しなかった細胞が、 $FeSO_4$ を追加的に添加した細胞に比べてMDA、カロテノイド含量がさらに高い点から推察して脂質酸化は、Haber-Weiss反応時鉄イオン濃度とLROS (O_2^- 、 H_2O_2) の調節を介して加速化されて、鉄イオンとLROS含量比調節 (ratio control) が独立栄養条件でヘマトコッカスプルビアリス細胞のアスタキサンチン生産のために大変重要な要素であることに間違いなく、これにより、細胞内 O_2^- の H_2O_2 含量を綿密に制御することができる。

【0031】

本発明の一実施例では、前記鉄イオンは、活性酸素 O_2^- 及び H_2O_2 含量に対して100–600モル比で添加されることが好ましく、前記範囲からずれて活性酸素 O_2^- 及び H_2O_2 含量に対して100モル比未満に添加される場合には、アスタキサンチン蓄積効率が落ちる問題点があって、活性酸素 O_2^- 及び H_2O_2 含量に対して600モル比を超えて添加される場合には副反応が起きてアスタキサンチン合成が阻害される問題点があり得る。

【0032】

本発明において、前記アスタキサンチンの含量は、ヘマトコッカスプルビアリス細胞内活性酸素 O_2^- 及び H_2O_2 が活性酸素 O_2 及び $OH\cdot$ に転換によって増進されることを特徴とする。

【0033】

本発明の他の実施例では、より効率的なアスタキサンチンの生産量増進のために、高温の培養条件でグリーンステージで成熟胞子 (red cyst) 接種を介したヘマトコックス細胞の生産量を調べて、そこで28–30 $^{\circ}C$ の高温独立培養条件のグリーンステージで成熟胞子 (red cyst) 接種及びレッドステージで鉄イオンの添加は、ヘマトコックス細胞の生産量と生産収率を顕著に増進させることができる。

【0034】

本発明の用語「独立栄養条件」とは、植物が体外で無機物を養分として摂取してそれを有機物に合成できるようにする培地の状態を意味して、「独立栄養培養条件」とも表現し

10

20

30

40

50

、一般に独立栄養条件で光合成のための無機炭素源としては、二酸化炭素を供給して、培地組成は、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ または $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 KNO_3 または KCl 、 $\text{Na}_2\text{Glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Tris-aminomethane 、 Thiamine 、 Biotin 、 Vitamin B12 、 $\text{PIV metal solution}$ 、 Na_2EDTA 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及び $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含むことができるが、これに限定されない。

【実施例】

【0035】

以下、本発明を実施例を挙げて詳述する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に制限されないことは当業者において通常の知識を有する者にとって自明である。

10

【0036】

材料

本発明に使用された菌株は、*Haematococcus pluvialis* NIES-144 であり、National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan から購入して使用した。

【0037】

本実施例に使用された培地の種類は、全部で NIES-C 培地及び NIES-N 培地の二つで、これらの構成成分を下記の表 1 に示した。

20

下記の表 1 で、

－NIES-C 培地：autotrophic medium (独立栄養培地、目的：生長)

－NIES-N 培地：autotrophic medium (独立栄養培地、目的：生育抑制、光誘起、アスタキサンチン生産)

－ CO_2 supply：3% (v/v)

－光条件： $20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (for vegetative growth)； $150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (for inductive growth)

－ FeSO_4 ：450 μM

－MV (methyl viologen)： 10^{-11}M 、 10^{-9}M 、 10^{-7}M (artificial O_2 -generator)

30

－H2DCFDA (carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) 5 μM

－DCF：H2DCFDA が活性酸素 (O_2^- 、 H_2O_2) により酸化されて生成される物質

－SOD (superoxide dismutase)：SOD は、細胞内で O_2^- を H_2O_2 に転換する酵素

－MDA (malondialdehyde)：MDA は、細胞内 PUFA (polyunsaturated fatty acids) が酸素 (O_2) 及び活性酸素 (O_2^- 、 H_2O_2 及び $\text{OH}\cdot$) により酸化されて転換される 2 次代謝物質であり、細胞内 MDA 量を通して細胞の酸化程度を間接的に確認できる一種の酸化指標である。

40

【0038】

【表 1】

NIES-C		NIES-N	
成分	含量 (/L)	成分	含量 (/L)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.15 g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.13 g
KNO_3	0.10 g	KCl	0.07 g
$\text{Na}_2\text{Glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05 g	$\text{Na}_2\text{Glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04 g
Tris-aminomethane	0.05 g	Tris-aminomethane	0.05 g
Thiamine	0.01 mg	Thiamine	0.01 mg
Biotin	0.10 μg	Biotin	0.10 μg
Vitamin B12	0.01 μg	Vitamin B12	0.01 μg
PIV metal solution (per liter) Na_2EDTA 1 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.196 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.022 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mg	3 ml	PIV metal solution (per liter) Na_2EDTA 1 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.196 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.036 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.022 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mg	3 ml

【0039】

実施例 1：独立栄養条件で多様な高温の培養条件及び鉄イオン媒介H a b e r－W e i s s 反応がヘマトコッカスプルビアリスのバイオマス及びアスタキサンチン蓄積に及ぼす影響

独立栄養条件で多様な高温の培養条件及び鉄イオン媒介H a b e r－W e i s s 反応がヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン蓄積に及ぼす影響を調べてるために、下記の実験を行った。

【0040】

有機炭素源が欠乏したN I E S－C培地で低光度の光（ $20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ）と、ただ二酸化炭素のみを唯一炭素源として生育して対数期に達した細胞培養液（ OD_{680} ＝約0.8）内細胞をN I E S－N培地に移して増殖を抑制して、強い光（ $150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ）と共に通常の室温の培養温度（ 23°C ）と高温の培養温度（ 30°C 、 36°C ）、そしてこれと共に各々の温度条件に鉄イオン媒介H a b e r－W e i s s 反応を誘導する物質 FeSO_4 （ $450 \mu\text{M}$ ）を添加した場合としなかった場合を分けて培養18日間バイオマス増加量及びアスタキサンチン蓄積程度を分析した。

【0041】

1－1：バイオマス

図2（A）に示したように、独立栄養条件で温度の増加によるヘマトコッカスプルビアリスのバイオマス生産能力は、 23°C に比べて 30°C で30%、 36°C で57%減少することが確認された反面、培養温度が 30°C で、 Fe^{2+} を添加してH a b e r－W e i s s 反応を誘導した場合、ヘマトコッカスプルビアリスのバイオマス生産能力は Fe^{2+} を添加せず、培養温度が 23°C である場合に比べて9%増加したことが確認され、 Fe^{2+} を添加せず、培養温度が 30°C である場合に比べて41%増加したことが確認された。

【0042】

また、培養温度が 36°C である場合、 Fe^{2+} を添加してH a b e r－W e i s s 反応を誘導した時、ヘマトコッカスプルビアリスのバイオマス生産能力は Fe^{2+} を添加せず

、培養温度が23℃である場合に比べて3%増加したことが確認され、 Fe^{2+} を添加せず、培養温度が30℃である場合に比べて77%増加したことが確認された。

【0043】

1-2: アスタキサンチン蓄積

図2(B)に示したように、独立栄養の条件で温度の増加によるヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン生産能力は、培養温度が23℃である場合に比べて30℃で23%、36℃で42%減少することが確認された反面、培養温度が30℃で、 Fe^{2+} を添加してHaber-Weiss反応を誘導した場合、ヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン生産能力は、 Fe^{2+} を添加せず、培養温度が23℃である場合に比べて17%増加したことが確認され、 Fe^{2+} を添加せず、培養温度が30℃である場合に比べて66%増加したことが確認された。

10

【0044】

また、培養温度が36℃である場合、 Fe^{2+} を添加してHaber-Weiss反応を誘導した時、ヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン生産能力は、 Fe^{2+} を添加せず、培養温度が23℃である場合に比べて7%減少したが、 Fe^{2+} を添加せず、培養温度が30℃である場合に比べて152%増加したことが確認された。

【0045】

さらに、2日間アスタキサンチン合成を行ってヘマトコクス細胞のアスタキサンチン蓄積程度を示す光学顕微鏡写真で確認した結果、図3に示したように、高温の条件が、独立栄養条件でヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン生産に適しないことを意味すると同時に高温でHaber-Weiss反応の導入がヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン生産能力の維持に効果的であることを確認した。

20

【0046】

実施例2: 独立栄養条件で多様な高温の培養条件及び鉄イオン媒介Haber-Weiss反応がヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン合成初期細胞内活性酸素含量、SOD活性度、脂質酸化度及びカロテノイド含量に及ぼす影響

高温の独立栄養条件でアスタキサンチン合成時、ヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン生合成阻害現象を解明するために、下記の実験を行った。

【0047】

まず有機炭素源が欠乏したNIES-C培地で低光度の光($20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)とただ二酸化炭素のみを唯一炭素源として生育して対数期に達した細胞培養液($\text{OD}_{680} = \text{約} 0.8$)をNIES-N培地に移して増殖を抑制して、強い光($150 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)と共に通常の室温の培養温度(23℃)と高温の培養条件(30℃、36℃)、そしてこれと共に各々の温度条件に鉄イオン媒介Haber-Weiss反応を誘導する物質 FeSO_4 ($450 \mu\text{M}$)を添加した場合としなかった場合を分けてアスタキサンチン合成条件を作った後、培養二日間細胞内活性酸素含量(DCF含量)、SOD活性度、脂質酸化度(MDA含量)及びカロテノイド蓄積程度を分析した。

30

【0048】

その結果、図4(A)に示したように、DCF含量(活性酸素含量- O_2^- 、 H_2O_2)は、高温の条件(30℃、36℃)で急激に上昇したが、高温の培養条件に FeSO_4 ($450 \mu\text{M}$)を添加してHaber-Weiss反応を誘導した場合、活性酸素含量は急激に減少した。

40

【0049】

また、図4(B)に示したように、アスタキサンチン合成過程中SOD(superoxide dismutase)活性は全体的に増加する様子を見せたが、高温の培養条件(30℃、36℃)でSOD活性は急激に上昇した反面、高温の培養条件に FeSO_4 ($450 \mu\text{M}$)を添加してHaber-Weiss反応を誘導した場合SOD活性は顕著に減少した。これは、細胞内過量発生した O_2^- が鉄イオン媒介Haber-Weiss反応を通して O_2 に効果的に転換されたためと見られる。

【0050】

50

さらに、図4(C)に示したように、MDA (malondialdehyde) 含量は、高温の条件 (30℃、36℃) でDCF含量 (O_2^- 、 H_2O_2) と正比例して上昇したが、高温の培養条件 (30℃、36℃) に $FeSO_4$ (450 μM) を添加してHaber-Weiss反応を誘導した場合MDA含量はさらに増加することが確認された。これは高温で生産された活性酸素 O_2^- 、 H_2O_2 が、鉄イオン媒介Haber-Weiss反応によって迅速に O_2 、 $OH\cdot$ に転換されて細胞内PUFA (不飽和脂肪酸) と速く反応してMDA形成を加速化したためと見られる。

【0051】

実施例3：室温 (23℃) の独立栄養条件で O_2^- の人為的な発生と鉄イオン媒介Haber-Weiss反応がヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン合成初期細胞内アスタキサンチン蓄積に及ぼす影響

10

室温 (23℃) の独立栄養条件でアスタキサンチン合成時ヘマトコッカスプルビアリス細胞内LROS (O_2^- 、 H_2O_2) の増加によるアスタキサンチン生合成阻害現象を解明するために、有機炭素源が欠乏したNIES-C培地で低光度の光 (20 $\mu E/m^2/s$) とただ二酸化炭素のみを唯一炭素源として生育して対数期に達した細胞培養液 (OD_{680} = 約0.8) をNIES-N培地に移して増殖を抑制して、強い光 (150 $\mu E/m^2/s$) と共に様々な濃度 ($10^{-11} \sim 10^{-7} M$) のMethyl viologenを添加して O_2^- を人為的に強度毎で発生させて、これと共に通常の室温の培養温度 (23℃) で鉄イオン媒介Haber-Weiss反応を誘導する物質 $FeSO_4$ (450 μM) を添加した場合としなかった場合を分けてアスタキサンチン合成条件を作った後、培養4日目細胞内アスタキサンチン蓄積程度を分析した。

20

【0052】

その結果、図5に示したように、ヘマトコッカスプルビアリスは大変少ない量のMethyl viologenにも敏感に反応して過量の O_2^- が発生する条件でアスタキサンチン蓄積能力が減少することが確認されたが、その反面鉄イオンの添加によるLROS (O_2^- 、 H_2O_2) のMROS (O_2 、 $OH\cdot$) に迅速な転換は、ヘマトコッカスプルビアリスのアスタキサンチン蓄積能力を増進させた。これは、室温 (23℃) の独立栄養条件でヘマトコッカスプルビアリスセボの効果的なアスタキサンチン生産のためには、アスタキサンチン合成時、細胞内 O_2^- の H_2O_2 含量の綿密な制御が必要であることを意味する。

30

【0053】

実施例4：高温の独立栄養条件で成熟胞子 (cyst) の接種及び鉄イオン添加によるアスタキサンチン生産増加

4-1：グリーンステージで成熟胞子 (cyst) の接種

本実施例では、二段 (two-stage) 光培養工程で、ヘマトコッカスプルビアリス内アスタキサンチンの生産量が増進されることを確認した。

【0054】

春 (中温条件：17.5~27.3℃) 及び夏 (高温条件：23.4~33.5℃) の平均光度と温度の変化を調べて、春と夏の光度は同じに維持して、温度は特に調節しないまま、屋外でヘマトコックスを活用したより経済的な生物学的二酸化炭素除去のための工程の条件を調べた。

40

【0055】

グリーンステージ (窒素が含まれた独立栄養条件に3~4%二酸化炭素を供給しながら35 $\mu E/m^2/s$ 以下の光度を照射する低ストレスの培養条件) の間23℃で培養されたgreen vegetative細胞を屋外夏場高温条件であるレッドステージ (窒素が欠乏した独立栄養条件に3~4%二酸化炭素を供給しながら100~350 $\mu E/m^2/s$ の光度を照射する高ストレスの培養条件) で鉄イオンを添加して36日間アスタキサンチンの生産量を調べた。

【0056】

その結果、50 μM の鉄イオン濃度で効果的にヘマトコックス細胞のアスタキサンチン生

50

合成が効果的に進行されることを確認し（図6）、その反面鉄イオンが添加されなかった光反応期内ヘマトコクス細胞はアスタキサンチン生合成が阻害された。

【0057】

さらに効果的なアスタキサンチンの生産量増進のために、高温の培養条件でグリーンステージで成熟胞子（red cyst）接種を通してヘマトコクス細胞のvegetative growth可能性の有無を21日間インドアラボスケールで確認した。その結果、たとえ高温の培養条件で成熟胞子（red cyst）接種時23℃培養温度条件よりlag phaseは二日程度長くなったが、グリーンステージが成功的に進行された（図7）。

【0058】

4-2：グリーンステージで成熟胞子（cyst）細胞の接種及びレッドステージで鉄イオン添加

実施例4-1の結果により、夏場高温の独立栄養条件のグリーンステージで成熟胞子（red cyst）接種及びレッドステージで鉄イオン添加を通して、ヘマトコクス細胞のアスタキサンチン生産量を調べた。グリーンステージ培養は、15日間行って、鉄イオン添加後レッドステージ培養は63日間行った。

【0059】

その結果、成熟胞子（red cyst）接種及び50 μMの鉄イオン添加によってヘマトコクス細胞のアスタキサンチン生産量（mg/L/day）は、春季中温の条件で屋外培養は、2.24 mg/L/dayで、高温培養条件では、3.29 mg/L/dayと147%増加したことが分かった（図8）。

【0060】

図9は、屋外の中温及び高温（23～28℃及び28～33℃）条件で、二段（two-stage：グリーン及びレッドステージ）光培養を通したヘマトコックスプルベアリスのアスタキサンチン生産能増大を誘導した過程及び結果を示したもので、中温のグリーンステージ及び鉄イオンが添加されなかったレッドステージ培養条件（57日間2.24 mg/L/day）に比べて高温の独立栄養グリーンステージで成熟胞子（red cyst）接種及びレッドステージの鉄イオン添加培養条件は、アスタキサンチン生産量及び生産収率の顕著な増加（27日間5.53 mg/L/day）を示した。

【産業上の利用可能性】

【0061】

本発明によると、屋外培養時独立栄養条件で太陽を利用したアスタキサンチン生産で成熟胞子（cyst）を接種した後、鉄イオンを添加する二段（two-stage）光培養工程は、高温の条件で多量発生するLROS（ O_2^- 、 H_2O_2 ）を効果的にMROS（ O_2 、 $OH\cdot$ ）に転換して細胞内脂質酸化信号を増幅して、LROS（ O_2^- 、 H_2O_2 ）の過量発生によるアスタキサンチン合成を阻害する問題点を解決することができるので、より経済的にアスタキサンチン生産を増進させることができ、このようなアスタキサンチンは、強力な抗酸化物質として様々な産業分野で有用である。

【0062】

以上、本発明の内容の特定の部分を詳述したが、当業界における通常の知識を持った者にとって、このような具体的な記述は単なる好適な実施態様に過ぎず、これにより本発明の範囲が制限されることはないという点は明らかである。よって、本発明の実質的な範囲は特許請求の範囲とこれらの等価物により定義されると言える。

10

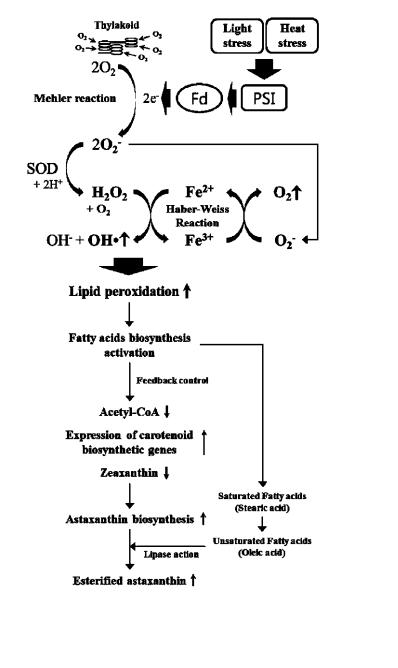
20

30

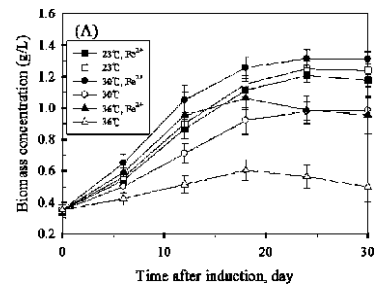
40

【図 1】

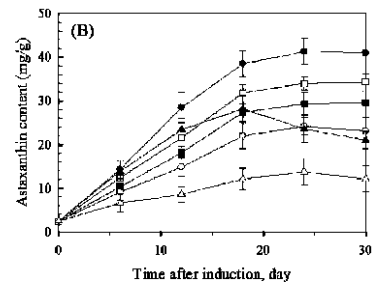
[Fig. 1]



【図 2 (A)】

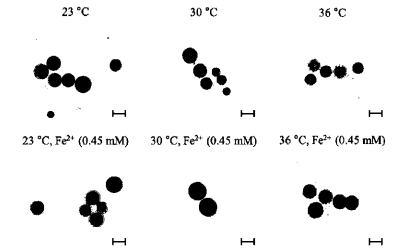


【図 2 (B)】



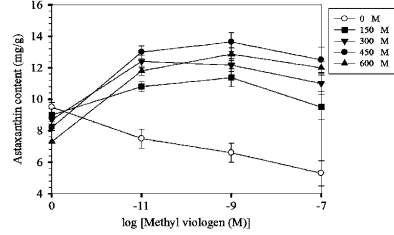
【図 3】

[Fig. 3]



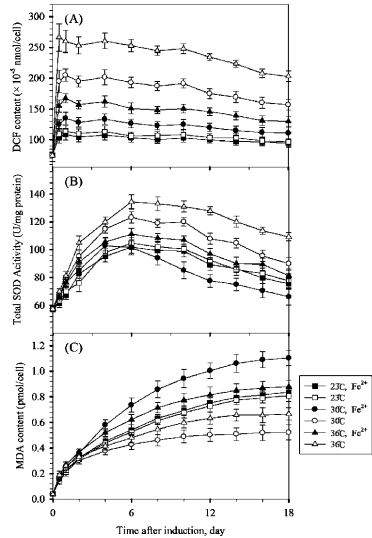
【図 5】

[Fig. 5]

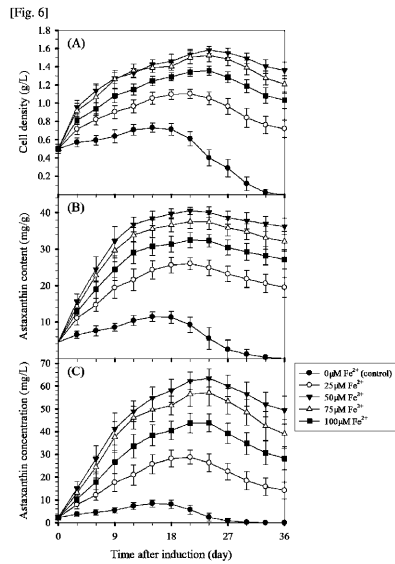


【図 4】

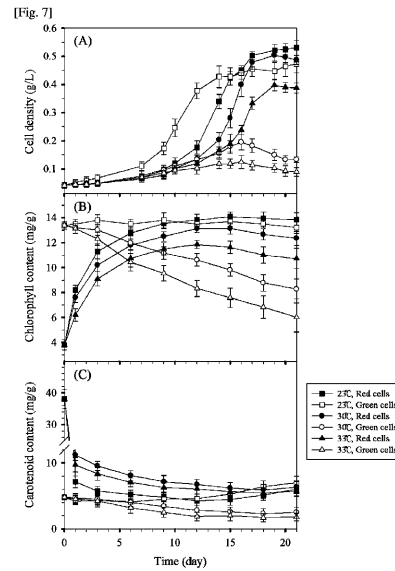
[Fig. 4]



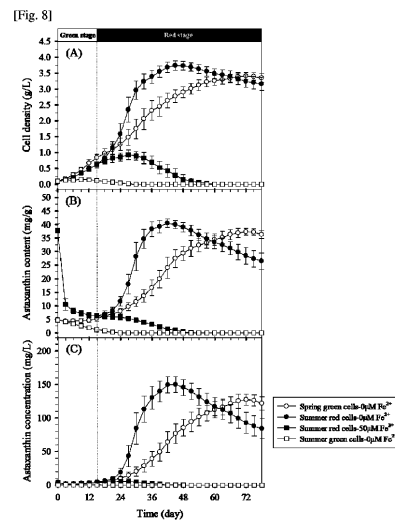
【図 6】



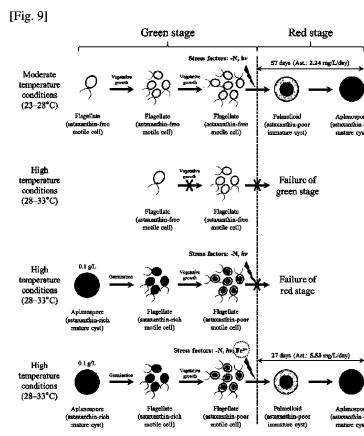
【図 7】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

(74)代理人 100194973

弁理士 尾崎 祐朗

(72)発明者 シム サンジュン

大韓民国, 135-506, ソウル, カンナムーグ, ソルルンーロ, 221, 301-803

(72)発明者 ホン ミヌイ

大韓民国, 136-701, ソウル, ソンブクーク, アナムーロ, 145, コリア ユニバーシテ
ィ, チャンウィグワン, 615

審査官 福岡 信子

(56)参考文献 国際公開第2007/029627 (WO, A1)

特開2001-061466 (JP, A)

特開2004-033070 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)