

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-503802

(P2007-503802A)

(43) 公表日 平成19年3月1日(2007.3.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 1/14 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/14 B	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/12 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/12 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2006-524224 (P2006-524224)	(71) 出願人	500586299 ノボザイムス アクティーゼルスカブ デンマーク国, デーコー 2 8 8 0 バグ スバエルト, クロシェイバイ 3 6
(86) (22) 出願日	平成16年8月24日 (2004.8.24)		
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月27日 (2006.2.27)		
(86) 国際出願番号	PCT/DK2004/000561		
(87) 国際公開番号	W02005/021735	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成17年3月10日 (2005.3.10)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	PA200301237	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成15年9月1日 (2003.9.1)	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100108903 弁理士 中村 和広
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 海洋微生物のバイオマス及び／又はそのバイオマスの成分の収量を高める方法

## (57) 【要約】

本発明は、Y g/Lの細胞乾燥物質 (CDM) (ここで、Yは、100～300g/Lの範囲で存在する) で、好気性条件下で発酵槽において栄養要求性海洋微生物を連続して培養するための最適化された方法を提供し、ここで培養液 1 L当たり (Y×h) g (hは、1.1～3.0の範囲である) の量で徐々に添加され、そして20～100時間の滞留時間をもって、炭素源を含んで成る培養培地において、前記栄養要求性海洋微生物を培養することを含んで成る。本発明は、細胞脂質、特にポリエーテル酸の高い生産性を維持する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

Y g/Lの細胞乾燥物質 (CDM) (ここで、Yは、100～300g/Lの範囲で存在する) で、好気性条件下で発酵槽において栄養要求性海洋微生物を連続して培養するための方法であって、培養液 1 L当たり (Y×h) g (hは、1.1～3.0の範囲である) の量で徐々に添加され、そして20～100時間の滞留時間をもって、炭素源を含んで成る培養培地において、前記栄養要求性海洋微生物を培養することを含んで成る方法。

## 【請求項 2】

前記培養培地が、培養液 1 L当たり (Y×h×f) (ここで、fは、0.002～0.2の範囲である) の量で徐々に添加される、窒素源を含んで成る請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記培養培地が、達成されるバイオマス濃度のために制限的でない量で、徐々に添加される、バイオマス形成のために必要とされる塩、鉱物及び任意には、ビタミンを含んで成る請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 4】

h が、1.1～2.5の範囲、特に1.2～2.0の範囲である請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

f が、0.004～0.1の範囲、特に0.01～0.04の範囲である請求項 2～4 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 6】

前記栄養要求性海洋微生物が、藻類である請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記栄養要求性海洋微生物が、トラウストキトリド sp. (Thraustochytrids sp.) である請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 8】

前記トラウストキトリド sp. が、シゾキトリウム (Schizochytrium) 又はトラウストキトリウム (Thraustochytrium) から成る群から選択される請求項 1～7 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 9】

前記培養温度が、20～35 の範囲である請求項 1～8 のいずれか 1 項記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記培養培地の pH が、3.0～9.0の範囲である請求項 1～9 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 11】

前記生成されるバイオマスの少なくとも40%が、クロロホルム：メタノールの混合物により抽出できる成分から構成される請求項 1～10のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 12】

前記クロロホルム及びメタノールが、2：1 (v/v) の比で混合される請求項 11 記載の方法。

## 【請求項 13】

少なくとも0.2gのDHA/l/hのポリエン酸生産性が達成される請求項 1～12のいずれか 1 項記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記連続培養工程における培養液の滞留時間が、一定に維持され、そして20～100hの範囲である請求項 1～13のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 15】

前記連続培養工程における培養液の滞留時間が、20～100の範囲内で変化する請求項 1～14のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 16】

前記連続的培養が、次の3培養段階：

a) 初期バッチ工程、続いて

50

b) フェドバッチ工程、続いて

c) 連続工程、

を含んで成る請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

前記溶解される酸素のレベルが、段階 c) の開始から 10% 以下の飽和で維持される請求項 16 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野：

10

本発明は、100 - 300g/L の細胞乾燥物質 (CDM) が連続発酵工程を用いて、20 ~ 100 時間で生成される、好気性条件下で海洋微生物を培養する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景：

微生物のバッチ、フェドバッチ又は連続培養によりバイオマス、又はその有意な部分を構成する成分の産業的製造においては、最高の可能性あるバイオマス生産性を達成することが所望される。さらに、実質的に連続操作を構成する発酵工程は、低い労力必要性及び工程制御のための実質的に低い必要性の利点を有する。連続発酵工程は、十分に安定性である、使用される株に依存し、そのような株が入手できる場合、連続発酵工程の使用は、達成されるべき生成物濃度及び生成物回収能力を包含する全体の培養液特徴に関して、より高い程度の均質性を可能にする製造工程を実質的に提供する。

20

【0003】

アメリカ特許第 5,244,921 号は、60 時間で、70g 以下の CDM/l 収率をもたらす、珪藻、例えばニツスシア・アルバ (*Nitzschia alba*) から商業的に実行可能な収率でエイコサペンタエン酸 (EPA) を生成する方法を記載する。

アメリカ特許第 5,711,983 号は、クリプテコジニウム sp. (*Crypthecodinium* sp.) を包含する海洋渦鞭毛藻類から商業的に実行可能な収率でドコサヘキサエン酸 (DHA) を生成する方法に関する。収率は、75 時間で 23g の CDM/l 及び 160 時間で 33g の CDM/l の範囲で報告されている。

30

【0004】

EP0823475A1 号は、シゾキトリウム属 SR21 からの DHA 及び DPA の生成に関する。得られる収率は、150 時間で多くとも 60g の CDM/l であることが報告されている。

アメリカ特許第 5,518,918 号は、トラウストキトリウム及びシゾキトリウムから成る群から選択された微生物を含んで成るマイクロフローバイオマスに関する。得られる CDM は、8g/L 以下である。

【0005】

W001/04338 号は、多不飽和脂肪酸の合成のために微生物、すなわちクリプテコジニウム・コヒニ (*Crypthecodinium cohnii*) を培養する方法に関する。得られる収率は、140 時間で 46g の以下の CDM/l である。

40

アメリカ特許第 6,582,941 号は、シゾキトリウム株に関する。得られる収率は、120 時間で 60g 以下の CDM/l である。

【0006】

W001/54510 号は、バッチ発酵工程において培養される、真核微生物及び特に、トラウストキトアド (*Thraustochytriads*) 目のマイクロフローに関し、そして全体の発酵工程を次の 2 つの段階、すなわちバイオマスの初期構築のための段階、及び特定される栄養物 - 制限及び低酸素力の条件下でのポリエン脂肪酸の蓄積の発生を可能にする段階に分離することの重要性を強調する。少なくとも 20% (w/w) の脂肪を含む、100g/L 以上の細胞乾燥物質が達成され、そして DHA (オメガ - 3 C22:6, ドコサヘキサエン酸) の生産性は、バッチ発酵工程で 0.3g/L/時間よりも高い。しかしながら、包含される発酵工程の複雑な性質のた

50

めに、DHA - 生産性は、実施される31の同一の発酵バッチ内で-2の因数、変化することが示された（例4を参照のこと）。W001/54510号はまた、20g/Lまでの細胞乾燥物質の収率が、連続発酵工程を用いる場合に達成され得ることを示す（例9を参照のこと）。

従って、高いポリエン酸生産性を維持しながら、油性ポリエン酸生成微小藻類を培養するための発酵工程を単純にするための方法が必要とされる。

【発明の開示】

【0007】

発明の要約：

本発明は、非常に高いバイオマス生産性をもたらす栄養要求性海洋微生物の培養のための改良された方法を提供し、ここで100～300g/Lの収率の細胞乾燥物質が、バイオマス乾燥物質1g当たり約0.5gの脂質の脂質含有率及び少なくとも0.2gのDHA/L/hのポリエン酸生産性を維持しながら、培養液滞留時間が20～100時間の範囲である、連続的に操作された発酵槽から収穫され得る。

従来技術に比較して、そのような高いポリエン酸生産性が細胞増殖及びポリエン酸生成を分断しないで達成され得ることは、最も驚くべきことである。

【0008】

第1の観点においては、本発明は、Y g/Lの細胞乾燥物質（CDM）（ここで、Yは、100～300g/Lの範囲で存在する）で、好気性条件下で発酵槽において栄養要求性海洋微生物を連続して培養するための方法に関し、ここで前記方法は、培養液1L当たり（Y×h）g（hは、1.1～3.0の範囲である）の量で徐々に添加され、そして20～150時間の滞留時間、特に20～100時間の滞留時間をもって、炭素源を含んで成る培養培地において、前記栄養要求性海洋微生物を培養することを含んで成る。

【0009】

hの範囲から出発すると、炭素源の量はいずれの関連する水を含まないものとして与えられることが理解される。次の文章においては、窒素源の量は窒素の量として与えられることが理解される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

発明の特定の記載：

微生物が、増殖するために炭素源を必要とすることは良く知られている。また、培地における炭素源の濃度は、細胞乾燥物質の最終収量のために重要である。

驚くべきことには、連続作動発酵抗体に供給される培地における炭素源の濃度を高めることにより、100～300g/Lの程度、細胞乾燥物質（CDM）として表わされる収率（Y）を得ることが可能であり、ここで前記バイオマスの量は、炭素源又は窒素源のいずれかが、高い脂質及びポリエン酸生産性を維持しながら、バイオマス形成のために制限性である培養培地において海洋微生物を培養する場合、100時間以下で生成される。

【0011】

炭素源は、培養液1L当たりY×h gの量で添加されるべきであり、ここでhは、1.1～3.0の範囲、好ましくは1.1～2.5の範囲、さらにより好ましくは1.2～2.0の範囲である。

カザミノ酸及び/又は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ の形で窒素は、 $0.002 \sim 0.2 \times$ 炭素源の量である量（Y×h×f）、好ましくは $0.04 \sim 0.1 \times$ 炭素源の量である量、さらにより好ましくは、 $0.01 \sim 0.04 \times$ 炭素源の量である量で入手されるべきである。

【0012】

従って、1つの態様においては、本発明は、好気性条件下で栄養要求性海洋微生物を連続して培養する方法に関し[ここで所定の点でのYg/Lの細胞乾燥物質（CDM）（Yは、100～300g/Lの範囲である）が、20～100時間以内に発酵槽から収穫され得]、

i) 培養液1L当たり（Y×h）（ここで、hは1.1～3.0の範囲である）の量で連続的に添加される炭素源；及び

ii) Y×h×f（ここで、fは0.002～0.2の範囲である）の量で連続的に添加される窒素源を含んで成る培養培地において前記海洋微生物を培養することを含んで成る。

10

20

30

40

50

## 【0013】

バイオマス形成のために必要とされる追加の成分、例えば塩、鉱物及びビタミンは、増殖培地へのそれらの成分の添加により微生物に供給される必要がある。前記成分は、それらの成分のさらなる添加が達成されるバイオマス濃度に対して有意な効果を有さないような量で添加されるべきである。

## 【0014】

培養方法の企画：

培養方法の多くの異なった企画が適用され得る。好ましい態様において、本発明の範囲を制限しないいづれかの手段で、培養方法は、次の3培養段階を含んで成る連続発酵工程である：

10

a) 初期バッチ工程、続いて

b) フェドバッチ (fed batch) 工程、続いて

c) 連続工程、ここで培地は、一定の供給速度で連続的に添加され、そして培養液は、合計の液重量が維持されるような手段で連続して除去される。

## 【0015】

$Y$  g/Lの細胞乾燥物質 (CDM) (ここで、 $Y$ は、100~300g/Lの範囲で存在する) で、好気性条件下で発酵槽において栄養要求性海洋微生物を連続して培養するための方法は、培養液1L当たり ( $Y \times h$ ) g ( $h$ は、1.1~3.0の範囲である) の量で徐々に添加され、そして20~100時間の滞留時間を有する、炭素源を含んで成る培養培地において、前記栄養要求性海洋微生物を培養することを含んで成り、ここで前記発酵工程は、次の3培養段階：

20

a) 初期バッチ工程、続いて

b) フェドバッチ (fed batch) 工程、続いて

c) 連続工程を含んで成る。

## 【0016】

段階a) 及びb) は、主に1つの目的、すなわち段階c) におけるの定常状態の達成に基づいて達成されるバイオマス濃度の50%以上のレベルへのバイオマス濃度の達成を可能にするよう作用し、これは、段階c) において、最終的に達成される定常状態バイオマス濃度に近い濃度での段階c) からのバイオマスの収集物の初期発生を可能にする。初期バッチ段階及びフェドバッチ段階のために使用される培地の組成は、この目的を表わすべきである。

30

## 【0017】

段階a) から段階b) への移行は、段階a) 培地における炭素源が消耗されるようになる前に生ぜしめるべきである。

段階b) から段階c) への移行は、

i) 達成されるべき、上記に言及された段階a) 及びb) についての集合的目的のために適切な時点で、及び

ii) 段階b) において使用される供給培地における炭素及び窒素源、及び段階a) のバッチ培地における炭素及び窒素源に依存する時点で生ぜしめられるべきである。

## 【0018】

達成されるバイオマス生産性及び使用される培地の規格に関しての全体的工程の記載を構成する定常状態に入る場合、連続工程の特徴であることが理解されるべきである。

40

当業者に関しては、連続発酵工程が通常、一定の培養液滞留時間を用いることは明白である。しかしながら、当業者に関しては、その滞留時間の変更が連続発酵工程の全体の状態を改良することができ、そしてそのような変動が本発明の範囲内であることもまた、知られており、その結果、次の2つの方法を請求する：

## 【0019】

連続培養工程における培養液の滞留時間が一定に維持され、そして20~100時間の範囲である本発明の方法；及び連続培養工程における培養液の滞留時間が20~100時間の範囲内で変化する本発明の方法。

窒素の量はまた、変化し、そして有機及び無機窒素の合計濃度  $N_{kno.c.}$  が  $Y \times h \times f$  である

50

ような手段で炭素源の量に対応すべきである。

【0020】

本発明の海洋微生物を培養する場合、バイオマス乾燥物質 1 g 当たり約 0.5g の脂質含有量を維持しながら、及び少なくとも 0.20g の DHA/l/h、好ましくは少なくとも 0.25g の DHA/l/h、より好ましくは少なくとも 0.30g の DHA/l/h、最も好ましくは少なくとも 0.35g の DHA/l/h の高いポリエン酸生産性を維持しながら、培養培地 1L・h 当たり 0.67 ~ 15g の範囲で細胞乾燥物質を、発酵槽から収穫され得る CDM の形でバイオマス生産性を得ることが可能である。

【0021】

好ましい態様においては、本発明の方法は、0.20 ~ 0.40g の DHA/l/h の濃度、好ましくは 0.25 ~ 0.4g の DHA/l/h の濃度、より好ましくは 0.30 ~ 0.40g の DHA/l/h の濃度、最も好ましくは 0.35 ~ 0.40g の DHA/l/h の濃度でポリエン酸を生成することができる。

10

【0022】

本発明の発酵は、1つの態様においては、10%以上の溶解された酸素飽和レベルで行われる。しかしながら、低レベルでの発酵の実施は、W001/54510号によれば、ポリエン酸形成での生産性をさらに増強する傾向がある。フェドバッチ発酵工程に対する連続発酵工程の使用の利点は、発酵調節の1つの目的が低レベルで溶解された酸素のレベルを維持することである場合、当業者にとって明白である。なぜならば、連続工程におけるそのような調節が固定されたレベルで通気及び攪拌速度を調節することにより単純に達成され、そしてフェドバッチ工程における調節が発酵工程を通して行われる溶解された酸素の正確な測定に依存すべきであるからである。さらに、溶解された酸素のそのような正確な測定は失敗しやすい。

20

【0023】

従って、本発明者はまた、次の方法を請求する：

Y g/L の細胞乾燥物質 (CDM) (ここで、Y は、100 ~ 300g/L の範囲で存在する) で、好気性条件下で発酵槽において栄養要求性海洋微生物を連続して培養するための方法は、培養液 1L 当たり (Y × h) g (h は、1.1 ~ 3.0 の範囲である) の量で徐々に添加され、そして 20 ~ 100 時間の滞留時間を有する、炭素源を含んで成る培養培地において、前記栄養要求性海洋微生物を培養することを含んで成り、ここで前記発酵工程は、次の 3 培養段階：

a) 初期バッチ工程、続いて

b) フェドバッチ工程、続いて

c) 連続工程を含んで成り、ここで段階 c) における溶解される酸素力のレベルは、10%以下の飽和、好ましくは 5%以下の飽和、より好ましくは 1%以下の飽和で維持される。

30

【0024】

本発明の発酵は、1つの態様においては、20 ~ 35 の範囲、特に 25 ~ 30 の範囲での培養温度で行われる。

培養培地における pH は、3.0 ~ 9.0 の範囲、特に 5.0 ~ 7.5 の範囲であるべきである。

【0025】

栄養要求性海洋微生物：

40

本発明の好ましい栄養要求性海洋微生物は、藻類、特に微小藻類又は藻類のような微生物、好ましくはストラメノピレス (Stramenopiles) グループ、より好ましくはハマトレス ps. (Hamatores sp.), プロテロモナド sp. (Proteromonads sp.), オパリネス sp. (Opalines sp.), デベロパイエラ sp. (Developyella sp.), ジプロフィリス sp. (Diplophrys sp.), ラブリンスリドス sp. (Labrinthulids sp.), トラウストキトリド sp. (Thraustochytrids sp.), ビオセクルス sp. (Biosecids sp.), オーマイセテス (Oomycetes sp.), ヒポキトリジオマイセテス sp. (Hypochoytridiomycetes sp.), コマチオン sp. (Commation sp.), レチキュロスファエラ sp. (Reticulosphaera sp.), ペラゴモナス sp. (Pelagomonas sp.), ペラゴコカス sp. (Pelagococcus sp.), オリコラ sp. (Ollicola sp.), アウレオコーカス sp. (Aureococcus sp.), パヌレス sp.

50

(*Parmales* sp.), ジアトムス sp. (*Diatoms* sp.), キサントフィテス sp. (*Xanthophytes* sp.), ファエオフィテス sp. (*Phaeophytes* sp.) (褐藻)、ユースチグマトフィテス sp. (*Eustigmatophytes* sp.), ラフィドフィテス sp. (*Raphidophytes* sp.), シヌリドス sp. (*Synurids* sp.), アクソジネス sp. (*Axodines* sp.), クリソメリダレス sp. (*Chrysomeridales* sp.), サルシノクリシダレス sp. (*Sarcinochrysidales* sp.), ヒドルラレス sp. (*Hydrurales* sp.), ヒベルジアレス sp. (*Hibberdiales* sp.), 又はクロムリナレス sp. (*Chromulinales* sp.) のメンバーである。

【0026】

本発明の特に好ましい海洋微生物は、トラウストキトリド sp., 特にシゾキトリウム sp., 又はトラウストキトリウム sp. である。最も好ましくは、シゾキトリウム sp., 特に S. リマシナム sp., 好ましくは SP21 株 (FERM BP-5034) である。 10

【0027】

脂質含有率:

本発明の方法は、種々の脂質化合物、特に不飽和脂質、好ましくは多不飽和脂質 (すなわち、少なくとも 2 つの不飽和炭素 - 炭素結合、例えば二重結合を含む脂質)、及びより好ましくは、高い不飽和の脂質 (すなわち、4 又はそれ以上の不飽和炭素 - 炭素結合を含む脂質)、例えばオメガ - 3 及び/又はオメガ - 6 多不飽和脂肪酸、例えばドコサヘキサエン酸 (すなわち、DHA); 及び他の天然に依存する不飽和、多不飽和及び高い不飽和の化合物を生成するために使用され得る。本明細書において使用される場合、用語“脂質”とは、リン脂質; 遊離脂肪酸; 脂肪酸のエステル; トリアシルグリセロール; ステロール 20 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; イソプレノイド - 由来の化合物及び当業界において知られている他の脂質を包含する。特に、本発明の方法は、ポリエン酸の生成において有用である。

【0028】

本発明の方法により生成される細胞乾燥物質における脂質含有物は、クロロホルム: メタノールの混合物により抽出できる成分であり、そして生成されるバイオマスの少なくとも 40%、好ましくは生成されるバイオマスの少なくとも 45%、より好ましくは生成されるバイオマスの少なくとも 50%、さらにより好ましくは生成されるバイオマスの少なくとも 55% を構成する。クロロホルム: メタノールの比は、1 つの態様においては、2:1 (v/v) であり、好ましくはクロロホルム: メタノールの比は、1 つの態様においては、0.1% 30 ブチルヒドロキシトルエンにおいて、2:1 (v/v) である。

【0029】

一定の海洋微生物、例えばトラウストキトリド sp. は、所望する長鎖の多不飽和脂肪酸 (LC PUFA)、例えばエイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) を生成する。

【0030】

また、LC PUFA によりヒト食事を富化することの臨床学的効果が集中的に提供されている。特に興味ある LC PUFA は、エイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) である。しかしながら、ヒト成人のための食事における EPA: DHA の最適化に関するコンセンサスはまだ達成されていず、そしてさらに、バイオマス、脂質及び LC PUFA を高い 40 効率で生成するトラウストキトリド sp. の能力は、1 つの株において最適比の EPA: DHA を生成する能力を組合す必要はない。

【0031】

従って、バイオマス、脂質及び LC PUFA 生産性に関して、及び/又は本発明の出願と組合して生成される EPA: DHA の比に関してトラウストキトリド種の特徴を改良することの観点からは、非常に好都合である。

【実施例】

【0032】

例 1: シゾキトリウム・リマシナム SR21 (FERM BP-5034) の低温保存:

"National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial S 50

science and Technology, Japan"培養物収集所から得られた、寒天上の培養物を、その寒天上の細胞を“1/2TM”(下記に記載される)に懸濁することにより、振盪フラスコに移した。その振盪フラスコ(懸濁液中、100mlの培地“OMEPRK\_A”(下記に記載される)+10mlの細胞を有する500mlの円錐状フラスコ)を、Unitron, Infors AG製の温度調節された回転シェーカーにおいて、28 及び150rpmで25時間インキュベートした。25mlの熱殺菌されたグリセロールを前記振盪フラスコに添加した。室温での40分のインキュベーションの後、1mlのアリコート低温管に移した。

低温管(40pc.)を、フラミンゴ-ボックス(20×20cm w/4cmのフラミンゴ壁、蓋及び底)において、前記低温管を、使用まで-80 で貯蔵所で保持した。

#### 【0033】

培養のために使用される培地：

“OmePRK\_A”：

Tropic Marin(商標)(商品10135)：	16.7g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ：	5g
カザミノ酸、ビタミンフリー；	3g
“MikroPM”(下記に記載される)：	20ml
“VitaPM”(下記に記載される)：	20ml

#### 【0034】

上記をすべて混合した。pHをNaOH/HClにより7.0に調節した。体積を、水道水により900 mlに調節した。

熱殺菌を、121 で20分間、行った。0.25µmのフィルターを通して濾過殺菌された33gのグルコース・1H<sub>2</sub>Oを最終的に添加した。その100mlを、空の熱殺菌された500mlの円錐状振盪フラスコに無菌下に移した。

#### 【0035】

“1/2TM”

Tropic Marin(商標)：16.7g/L

上記を水道水に溶解した。熱殺菌を、121 で20分間、行った。

“MikroPM”

MnSO <sub>4</sub> ・1H <sub>2</sub> O：	0.98g
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O：	3.93g
CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	0.39g
ZnCl <sub>2</sub> ：	0.39g
クエン酸：	19.6g

上記をすべて混合し、体積を脱イオン水により1.0Lに調節した。

#### 【0036】

“VitaPM”

チアミン-ジクロリド：	2.28g
リボフラビン	0.19g
ニコチン酸：	1.53g
カルシウムD-パンテナート：	1.9g
ピリドキサル・HCl	0.38g
D-ビオチン：	0.075g
葉酸：	0.19g

上記をすべて混合し、体積を脱イオン水により1.0Lに調節した。

#### 【0037】

例2：シゾキトリウム・リマシナム株SR21の増殖：

室温で融解された1つの低温管からの細胞を、40mlの円柱状ガラスに含まれる10mlの“OmePRK\_A”培地に移し、そして無菌培養し、そして28 及び150RPM(Unitron, Infors, AG)で24時間インキュベートした。このようにして生成された培養液を、500mlの円錐状振盪フラスコに含まれる100mlの“OmePRK\_A”培地に移し、そして無菌培養し、そして28

10

20

30

40

50



及び150RPM (Unitron, Enfors, AG) で24時間インキュベートした。このようにして生成された培養液90mlを、発酵槽を接種するために使用した。

#### 【 0 0 3 8 】

例 3 : 30 ~ 35時間の液滞留時間でのSR21株の連続培養 :

Porton型の2Lのガラス/ステンレス鋼発酵槽を使用した。1.0Lの培地“ OME8 ”上での菌株の増殖を、下記条件を維持しながら20時間、可能にした :

- NaOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>の調節された添加による6.0 - 7.0の範囲のpH、
- 28 °Cでの温度、
- 300rpmから直線的に上昇する400rpmでの攪拌、
- 1.0L/分での通気、
- 10%以上の飽和での溶解された酸素力。

10

#### 【 0 0 3 9 】

20.1時間で、培養物のフェドバッチ供給を、0.057g/分で培地“ OME8a ” (下記に記載される) により開始した。供給速度を、100時間まで、維持した。

20 ~ 80時間の攪拌を、400rpmから500rpmまで直線的に高め ; 他の工程パラメーターは、前に言及された値で維持された。

100時間で、連続培養モードを、供給培地を“ OME17b ” (下記に記載される) に変え、供給速度を0.5g/分に高め、そして合計の培養液重量を1000gで維持し、ポンプにより発酵槽からの培養液の除去を可能にすることにより、増強した。さらに、攪拌を、100時間で、800rpmまで高めた。発泡を、ブドウ種子油の手動的添加により調節した。

20

#### 【 0 0 4 0 】

ODの測定 (650nm, 1cmのキュベット、測定の前、脱イオン水による液の400倍の希釈) 、及び培養物の呼吸活性 (Innova Air, Tech. Instrumentsからの1313の発酵槽モニターにより測定される場合、排気空気における% O<sub>2</sub>) から判断される場合、定常状態が約160時間で達成された。

#### 【 0 0 4 1 】

190時間で、50mlのサンプルを取り出し、そしてHeraus Labofuge Aeにおいて500rpm及び室温で10分間、遠心分離し ; このようにして生成されたペレットを、約35mlの“ 1/2TM ”により軽く洗浄し、遠心分離を反復し、そしてこのようにして生成されたペレットを - 80 °Cで凍結し、そして次に、Heto Lab EquipmentからのHetosicc CD52-1フリーズドライヤー上で凍結乾燥した。

30

#### 【 0 0 4 2 】

104.1g/Lの懸濁された固体乾量濃度を決定する。すべての培地は独占的に可溶性成分から成るので、この数値は、細胞乾量濃度として取られる。

サンプルの適切な希釈に関して、ACCU - CHEKからの“ Keto-diabur-test 500 ”を用いることにより決定される場合、残留グルコース濃度は、25時間 ~ それ以上で、1g/L以下であった。

#### 【 0 0 4 3 】

この例において、Y = 104.1g/L、h = 1.24及び f = 0.021 .

“ OME8 ”

40

Tropic Marin (商標) :	16.7g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	5g
カザミノ酸、ビタミンフリー	3g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	0.5g
“ MikroPM ” :	20g
“ VitaPM ” :	20g

上記すべてを混合し、pHをNaOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>により6.5に調節し、そして体積を700mlに調節した。

#### 【 0 0 4 4 】

培地の熱殺菌を、発酵槽に含まれる培地と共に121 °Cで40分間、行った。熱殺菌及び -40 °C

50

への冷却後、水道水中、33gのグルコース・1H<sub>2</sub>O ( 121 での40分間の別の熱殺菌の前、体積を300mlに調節した ) を、発酵槽/培地に添加し、従って発行器におけるpHを6.5に調節し、そして次に接種するために容易な“ ONE8 ”を生成した。水道水がこの期間を通して使用された。

#### 【 0 0 4 5 】

“ OME8a ” :

すべての成分は、g/Lで与えられる。

すべての成分 ( グルコースを除く ) を、NaOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> により pHを5.0に調節した後、40% ( v/v ) の最終培地体積において一緒に、121 での40分間、熱殺菌した。グルコースを、60% ( v/v ) の最終体積において別々に熱殺菌し、そして次に、-40 に冷却した後、他の成分に添加した。 10

#### 【 0 0 4 6 】

水道水がこの期間を通して使用された。

Tropic Marin ( 商標 ) : 16.7g/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 5g/L

“ MikroPM ” : 20g/L

“ VitaPM ” : 20g/L

カザミノ酸、ビタミンフリー : 45g/L

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 7.5g/L

グルコース・1H<sub>2</sub>O : 495g/L 20

#### 【 0 0 4 7 】

“ OME17b ” :

すべての成分は、g/Lで与えられる。

すべての成分 ( グルコースを除く ) を、NaOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> により pHを5.0に調節した後、40% ( v/v ) の最終培地体積において一緒に、121 での40分間、熱殺菌した。グルコースを、60% ( v/v ) の最終体積において別々に熱殺菌し、そして次に、-40 に冷却した後、他の成分に添加した。

#### 【 0 0 4 8 】

水道水がこの期間を通して使用された。

Tropic Marin ( 商標 ) : 16.7g/L 30

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 5g/L

“ MikroPM ” : 20g/L

“ VitaPM ” : 20g/L

カザミノ酸、ビタミンフリー : 12.94g/L

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 2.15g/L

グルコース・1H<sub>2</sub>O : 142.3g/L

#### 【 0 0 4 9 】

例 4 : 60 ~ 70時間の液滞留時間でのSR21株の連続培養 :

この培養は、次の変更を伴って、例 3 に記載のようにして行われた : 連続培養モードが100時間で増強される場合、供給流速は、0.25g/分で設定された。さらに、190時間で、供給培地を、“ OME17b ” から “ OME17c ” ( 下記に記載される ) に変えた。 40

285, 350, 450及び500時間で、それぞれ188.6, 152.54, 189.07及び182.75g/Lの細胞乾量濃度を、例 3 に記載のようにして決定した。攪拌及び通気速度を、初期の100時間での800rpm及び1L/分から約400時間での550rpm及び0.75L/分に低める。

#### 【 0 0 5 0 】

残留グルコースは、例 3 に記載のようにして決定される場合、25時間 ~ それ以上の時間で1g/L以下であった。

“ OME17c ” :

すべての成分は、g/Lで与えられる。

すべての成分 ( グルコースを除く ) を、NaOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> により pHを5.0に調節した後、40% 50

(v/v)の最終培地体積において一緒に、121 で40分間、熱殺菌した。グルコースを、60 % (v/v)の最終体積において別々に熱殺菌し、そして次に、-40 に冷却した後、他の成分に添加した。

#### 【0051】

水道水がこの期間を通して使用された。

Tropic Marin (商標) :	16.7g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	10g/L
“ MikroPM ” :	40g/L
“ VitaPM ” :	40g/L
カザミノ酸、ビタミンフリー :	25.88g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	4.3g/L
グルコース・1H <sub>2</sub> O :	284.6g/L

10

#### 【0052】

上記から :

285時間で、Y = 189g/L ; h = 1.37及びf = 0.021 ;

350時間で、Y = 153g/L ; h = 1.70及びf = 0.021 ;

450時間で、Y = 189g/L ; h = 1.37及びf = 0.021 ;

500時間で、Y = 183g/L ; h = 1.42及びf = 0.021。

細胞の生産性内の変動は驚くべきことには、低いことが注目されるべきである (hが一定である場合、Yはまた、それぞれ285時間及び450時間での結果により示されるように、ほとんど一定である)。

20

#### 【0053】

例5 : 高い細胞密度の連続培養からの細胞乾燥物質における脂質含有率 :

凍結乾燥により生成された材料からの、洗浄された50mlの液サンプルを、約40mlの“ 1/2TM ”に十分に再懸濁した。脂質を、前記再懸濁物からクロロホルム : メタノール (2 : 1 (v/v)、0.1% (w/v) のブチルヒドロキシトルエン (BHT)) により抽出し、そして抽出された脂質の量 (g) を、すべてのクロロホルム : メタノールの蒸発の後に決定した。このようにして回収された脂質を、-80 で貯蔵し、そして次に、40 でメチル化にゆだね、そして標準のHPLC方法に従ってDHAについて分析した。

#### 【0054】

30

従って細胞乾燥物質中の脂質含有率及びポリエン酸生産性は、それらの方法により決定され得る。

例3に記載される発酵 (約30~35時間の滞留時間) においては、190時間での細胞乾燥物質中の脂質含有率を、47.5% (w/v) 以上として決定した。

例4に記載される発酵 (約60~70時間の滞留時間) においては、350時間での細胞乾燥物質中の脂質含有率 (攪拌/通気を低める前) は、60.1% (w/w) 以上として決定され、そしてポリエン酸含有率は21であった (合計脂肪酸の% (w/w) でのDHA)。

#### 【0055】

例4に記載される発酵 (約60~70時間の滞留時間) においては、450時間での細胞乾燥物質中の脂質含有率 (攪拌/通気を低める前) は、56.4% (w/w) 以上として決定され、そしてポリエン酸含有率は23であった (合計脂肪酸の% (w/w) でのDHA)。

40

例4に記載される発酵 (約60~70時間の滞留時間) においては、500時間での細胞乾燥物質中の脂質含有率 (攪拌/通気を低める前) は、48.2% (w/w) 以上として決定され、そしてポリエン酸含有率は25であった (合計脂肪酸の% (w/w) でのDHA)。

#### 【0056】

例4に記載される発酵 (約60~70時間の滞留時間) においては、ポリエン酸生産性は、それぞれ350、450及び500時間で、0.30、0.38及び0.34gのDHA/l/hであった。DHAの生産性内の変動は驚くべきことには、低いことが注目されるべきである。結論においては、例4は、本発明の方法を用いることにより、60~70時間の滞留時間で高い細胞濃度及び高いDHA濃度を得ることが可能であることを示す。

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.  
PCT/DK2004/000561

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N1/12 C12P7/64		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/54510 A (BARCLAY WILLIAM R ; MIRRASOUL PETER J (US); WEEDER GEORGE T III (US);) 2 August 2001 (2001-08-02) the whole document	1-17
A	EP 0 622 463 A (KAWASAKI STEEL CO) 2 November 1994 (1994-11-02) the whole document  ----- -/-	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 December 2004		30/12/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Lejeune, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DK2004/000561

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAGUCHI T ET AL: "PRODUCTION OF HIGH YIELDS OF DOCOSAHEXAENOIC ACID BY SCHIZOCHYTRIUMSP. STRAIN SR21" JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. CHAMPAIGN, US, vol. 74, no. 11, November 1997 (1997-11), pages 1431-1434, XP000891774 ISSN: 0003-021X the whole document	1-17
A	WEN ZHI-YOU ET AL: "Perfusion culture of the diatom Nitzschia laevis for ultra-high yield of eicosapentaenoic acid." PROCESS BIOCHEMISTRY, vol. 38, no. 4, 2 December 2002 (2002-12-02), pages 523-529, XP002310143 ISSN: 1359-5113	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No  
PCT/DK2004/000561

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0154510	A	02-08-2001	AU 3120101 A	07-08-2001
			BR 0107832 A	27-04-2004
			CA 2396691 A1	02-08-2001
			CN 1416320 T	07-05-2003
			CZ 20022508 A3	12-02-2003
			DE 01903376 T1	08-07-2004
			EP 1251744 A1	30-10-2002
			ES 2208141 T1	16-06-2004
			HU 0301794 A2	29-09-2003
			JP 2004501603 T	22-01-2004
			MX PA02007321 A	28-01-2003
			NO 20023588 A	26-09-2002
			TR 200302163 T3	23-02-2004
			WO 0154510 A1	02-08-2001
			US 2003180898 A1	25-09-2003
			US 2001046691 A1	29-11-2001
			ZA 200205957 A	19-11-2003
EP 0622463	A	02-11-1994	CA 2121986 A1	27-10-1994
			CN 1101034 A	05-04-1995
			EP 0622463 A2	02-11-1994
			JP 7008268 A	13-01-1995

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ブンベルマン, モーエンス

デンマーク国, デーコー - 2 1 0 0 コペンハーゲン エー, テーホー, リウエエルガーデ 2 1  
, 4

Fターム(参考) 4B065 AA57X AC14 BB02 BC02 BC03 BC13 BC20 CA13 CA41 CA44