



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I495725 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：099119944

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 06 月 18 日

(51)Int. Cl. : *C12P1/00 (2006.01)* *C12N1/12 (2006.01)*
C12R1/89 (2006.01)

(30)優先權：2009/08/28 世界智慧財產權組織 PCT/FR2009/001044

(71)申請人：美達寶林公司 (法國) METABOLIUM (FR)
 法國

(72)發明人：庫德拉 柏納 KUDLA, BERNARD (FR)；戴柏尼 佛瑞德瑞克 DE BAENE,
 FREDERIC (FR)；藍吉 馬克 LANGE, MARC (FR)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

GB 2214928A WO 2006/008190A2
 Cases J, Selenium from selenium-rich Spirulina is less
 bioavailable than selenium from sodium selenite and
 selenomethionine in selenium-deficient rats, J Nutr., 2001, Vol.
 131 (9), pp:2343-2350.

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：28 項 圖式數：0 共 32 頁

(54)名稱

利用硒羧酸化合物由而富含硒的光合微生物，以及彼於營養品、化妝品與藥品的應用
 PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS ENRICHED IN SELENIUM USING SELENOHYDROXY
 ACID COMPOUNDS, USES THEREOF IN NUTRITION, COSMETICS AND PHARMACY

(57)摘要

本發明係關於使用 D 或 L 型之硒羧酸化合物，特別是 2-羥基-4-甲基硒丁酸，或這些化合物之對映體、鹽或酯或醯胺衍生物，使光合微生物富含有機硒之方法，及關於因而增進營養價值之該微生物在動物或人類營養品、化妝品或藥物的用途。

The invention relates to the enrichment of photosynthetic microorganisms in organic selenium using selenohydroxy acid compounds, in particular 2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid, in D or L form, or an enantiomer, salt or ester or amide derivative of these compounds, and also to the use of the microorganisms thus enriched in animal or human nutrition, in cosmetics or in pharmacy.

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

公告本

※申請案號：099119944

※申請日：099年06月18日

※IPC分類：

C12P 1/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

利用硒羧酸化合物而富含硒的光合微生物，以及彼於營養品、化妝品與藥品的應用

Photosynthetic microorganisms enriched in selenium using selenohydroxy acid compounds, uses thereof in nutrition, cosmetics and pharmacy

二、中文發明摘要：

本發明係關於使用D或L型之硒羧酸化合物，特別是2-羧基-4-甲基硒丁酸，或這些化合物之對映體、鹽或酯或醯胺衍生物，使光合微生物富含有機硒之方法，及關於因而增進營養價值之該微生物在動物或人類營養品、化妝品或藥物的用途。

三、英文發明摘要：

The invention relates to the enrichment of photosynthetic microorganisms in organic selenium using selenohydroxy acid compounds, in particular 2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid, in D or L form, or an enantiomer, salt or ester or amide derivative of these compounds, and also to the use of the microorganisms thus enriched in animal or human nutrition, in cosmetics or in pharmacy.

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於使用D或L型之硒羥酸化合物，特別是2-羥基-4-甲基硒丁酸或這些化合物之對映體、鹽或酯或醯胺衍生物使光合微生物富含有機硒之方法，及關於因而增進營養價值之該光合微生物在動物或人類營養品、化妝品或藥物的用途。

【先前技術】

硒特別是人類及哺乳類的必要微量營養品（Wendel, A.; Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem., 1992, 67, 1-4, 404-415）。特別地，彼以L(+)-硒半胱氨酸或L(+)-硒甲硫氨酸形式（Muller, S. et al., Arch. Microbiol., 1997, 168, 421）參與硒蛋白質類諸如穀胱甘肽過氧化酶、硫氧化還原蛋白還原酶及硒蛋白質P的生物合成。

已報告在人體內之硒缺乏症，特別是在長時間接受非經腸胃餵食的病患情況中（Von Stockhausen, H.B., Biol. Trace Elem. Res., 1988, 15:147-155）。每日補充200微克硒對於具有平均體重之成年人被認為是安全的且合適的（Schrauzer, G.N., J. Am. Col. Nutr., 2001, 20:1-14）。

硒在自然界以二種形式（有機及無機）被發現。

無機化合物最普遍是鹽類諸如亞硒酸鈉或硒酸鹽。這些化合物對人類及大部分之動物是極具毒性的。

有機化合物（有機硒化合物）在活組織中特別是以胺基酸 L(+)-硒甲硫胺酸、L(+)-甲基硒半胱胺酸及 L(+)-硒半胱胺酸為代表。

L(+)-硒甲硫胺酸是人體內及動物體內有機硒之主要來源。然而，人類及動物對此種胺基酸是非自營的，而僅能經由飲食獲得。

因此硒理想上應以此有機形式被併入用於治療或預防硒缺乏症的食品補充物中。

因此已可顯示：飲食補充 L(+)-硒甲硫胺酸比攝取亞硒酸鈉形式者之毒性低很多的且提供較佳之生物利用性（Mony, M.C. et al., J. of Trace Elem. Exp. Med., 2000, 13 : 367-380）。

現今，除了使用無機硒（主要是亞硒酸鈉形式）及硒甲硫胺酸作為基質者以外，活組織對硒吸收之代謝途徑是未知的。

有機硒之合適的供應可在較高等植物（特別是小麥、玉米、大豆）發現，其中多於 80% 之硒是由 L(+)-硒甲硫胺酸構成（Schrauzer, G.N., J. Am. Coll. Nutrit., 2001, 20(1) : 1-4）。然而，在這些植物中硒濃度是不足的，以致不能容易地且較不昂貴地製造食品添加劑。

用於獲得富含硒甲硫胺酸之組成物所發展的方法之一係由使用無機硒以使某些微生物富含有機硒的方式組成。一旦富含有機硒，這些微生物可被用來作為製備食品或化妝產品之原料。

很多刊物描述例如富含硒之酵母及更特別地啤酒酵母之製備 (Oh Tae-Kwang et al., 06.26.1995之KR950006950專利) , 以供使用彼本身之目的或將彼併入食品組成物之目的 (Moesgaard S. et. al., 09.16.2003之DK 200200408專利) ; 或者供獲得富含硒之衍生產物例如富含硒之麵包 (Wang Boaquan, 08.16.2006之CN 1817143專利) 、 奶類 (Jeng Chang-Yi, 12.11.2003之TW565432專利) 、 蛋 (Cui Li et al., 03.07.2007之CN1302723C專利) 、 巧克力 (In Gyeong Suk et al., 11.08.2004之KR20040101145專利) 或啤酒 (Jakovleva L.G. et al., 07.27.2003之RU2209237專利) 之目的。在健康食品中, 也已建議含有富含硒之酵母的製劑以供懷孕婦女之用 (Wang Weiyi, 05.31.2006之CN1778199) , 或供改良低血糖病患之腸的微環境 (Li Tao Zhao, 08.02.2006之CN1810161專利) 。在皮膚用化妝品領域中, 含有富含硒之酵母的組成物已經發展以供減少頭髮受損之目的 (Kasik Heinz, 06.21.2000之DE19858670) 或預防光老化 (Kawai Norihisa et al., 11.14.1995之JP07300409專利) 。含有富含硒之酵母的醫藥製劑已經用在預防及治療發炎病況諸如與糖尿病相關之視網膜病變 (Crary Ely J., 06.17.1997之US56239482專利) , 或心血管之發炎病況 (Nagy P.L. et al., 09.28.1992之HUT060436專利) 。

細菌及更特別是益生菌本身已是硒富含物之主體 (Calomme M. et al., Biol. Trace Elem. Res., 1995, 47, 379-

383)。已描述嗜酸乳酸桿菌以及洛德 (reuteri) 乳酸桿菌、費仁多 (ferintoshensis) 乳酸桿菌、巴曲 (buchneri) / 帕拉巴曲 (parabuchneri) 乳酸桿菌 (Andreoni V. et al., US0258964 專利) 作為富含硒之食品補充物。已經製備用於強化免疫系統及抗病目的之由酵母及乳酸桿菌組成之益生菌混合物 (Huang Kehe Qin, 11.08.2006 之 CN1283171C 專利)。

然而，在所有這些製劑中，富含硒之微生物係僅由無機硒製備。因此，最普遍被使用之硒來源係由在微生物培養介質中安定化的亞硒酸鈉或硒酸鈉組成。雖然已合成出滿意量之可被人體消化吸收的有機硒，由此富含硒之微生物常具有高殘餘濃度的未轉化無機硒，其經證實對食用彼之個人有危險性。

在以 WO 2006/008190 公開的先前申請案中，新穎之硒羧酸型的有機化合物已經描述能作為在人類及動物體內合成 L(+)-硒甲硫胺酸的先質。

令人驚訝地，申請人已注意到：硒羧酸型有機化合物，諸如在 WO 2006/008190 申請案中描述者，可併入使多種光合微生物富含有機硒的培養介質中。所得結果已揭示：這些化合物能極有效率地使此種微生物特別富含 L(+)-硒甲硫胺酸，而其產率等於或甚至高於使用一般所用之無機化合物所得者。

因此已顯明：使用硒羧酸型有機化合物使光合微生物富含有機硒之方法能製造不含無機硒之有機硒，且也能解

決與先前技藝方法相關之毒性問題。

由此富含硒之光合微生物可以直接用在預防或治療硒缺乏症的食品交易中，特別適用於製造藥用、營養用或化妝用產品及組成物。

【發明內容】

本申請案係關於光合微生物，亦即按照光能量來源生長之微生物的獲得。

“微生物”一詞企圖指明屬於以下範疇之一的任何活的單細胞有機體：單蟲類、單細胞生物、黴菌、或原蟲門，彼具有微觀或超微觀尺寸之真核或原核的細胞結構且彼具有代謝及複製潛能。該等單細胞微生物可以與纖維或生物薄膜之形成有關。

較佳地，依本發明之光合微生物是真核微藻類，更佳是共球藻綱之綠球藻屬；或原核微藻類，諸如藍菌，較佳是螺旋藻屬或節旋藻屬（螺旋藻）。後者對精於此技藝者是習知用來作為食品補充物的，特別是在發展中國家。

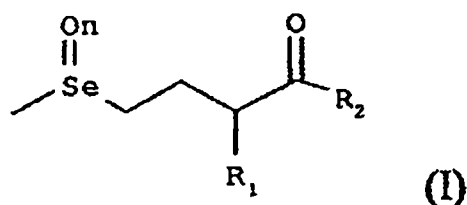
“有機硒”一詞意圖指明一種分子集合，其含有一種具有至少一個硒原子於其化學結構中且能藉由活組織產生之化合物，特別是諸如硒甲硫胺酸、甲基硒半胱胺酸及半胱胺酸等胺基酸，或含彼之肽類或蛋白質。由此富含硒之光合微生物本身可被使用或作為食品添加劑。

彼可以例如被脫水以形成一種安定粉末，該粉末能併入作為製備轉化產物用之基質的組成物中，但也可以活的

方式被用來作為食品轉化方法中之益生菌，以供獲得例如發酵奶或飲品之目的。

本發明之標的因此是一種使光合微生物富含硒甲硫胺酸及／或硒半胱胺酸之新穎方法，其特徵在於該光合微生物在包含硒羧酸型化合物之培養介質中培養。

較佳地，該硒羧酸型化合物是通式（I）之化合物、或其先質、鹽或酯或醯胺衍生物：



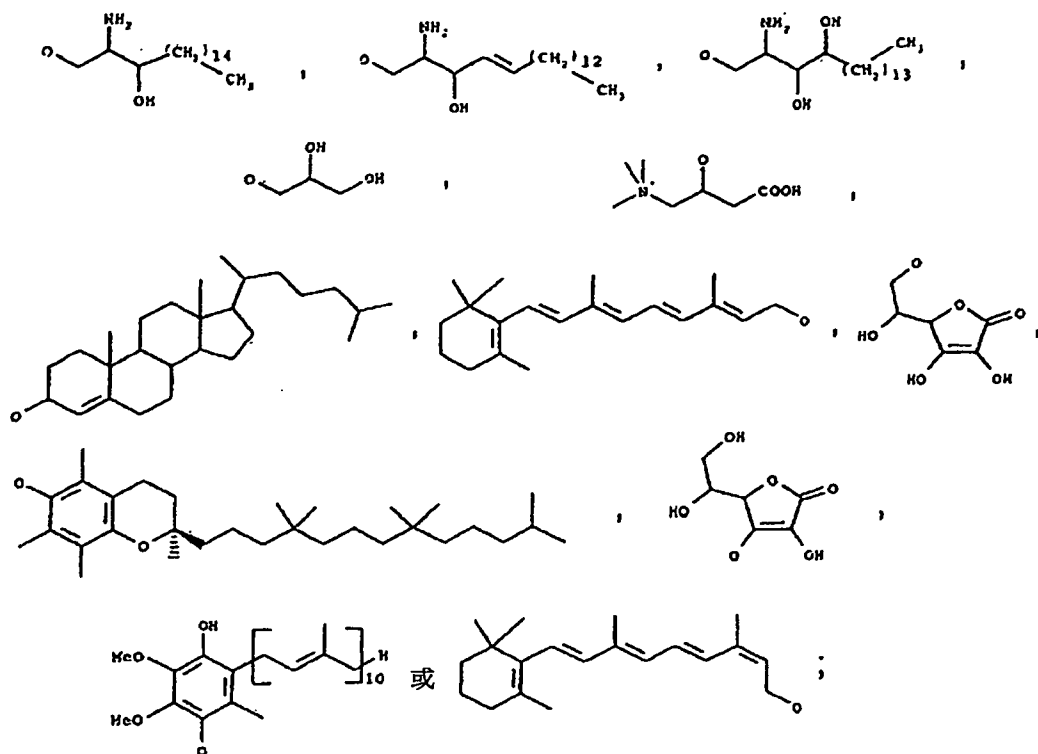
在該式中：

n等於0、1或2；

R₁是OH、OCOR₃、OPO₃H₂、OPO₃R₄R₅或OR₆基團；

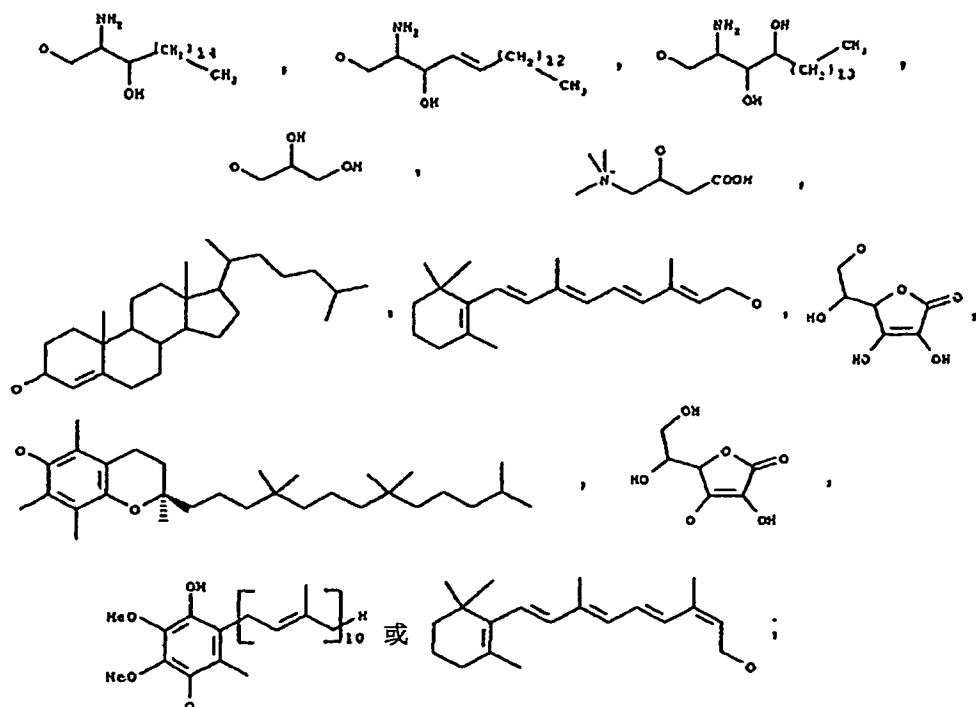
R₂是OH、R₃、NHR₇、S-半胱胺醯基或S-穀胱甘肽基基團；應了解：當n=1且R₂是OH時，R₁不能是OH；

R₃是烷氧基、神經醯胺1、神經醯胺2、神經醯胺3、神經醯胺4、神經醯胺5、神經醯胺6a及6b、S-半胱胺醯基或S-穀胱甘肽基基團，或選自以下之基團：



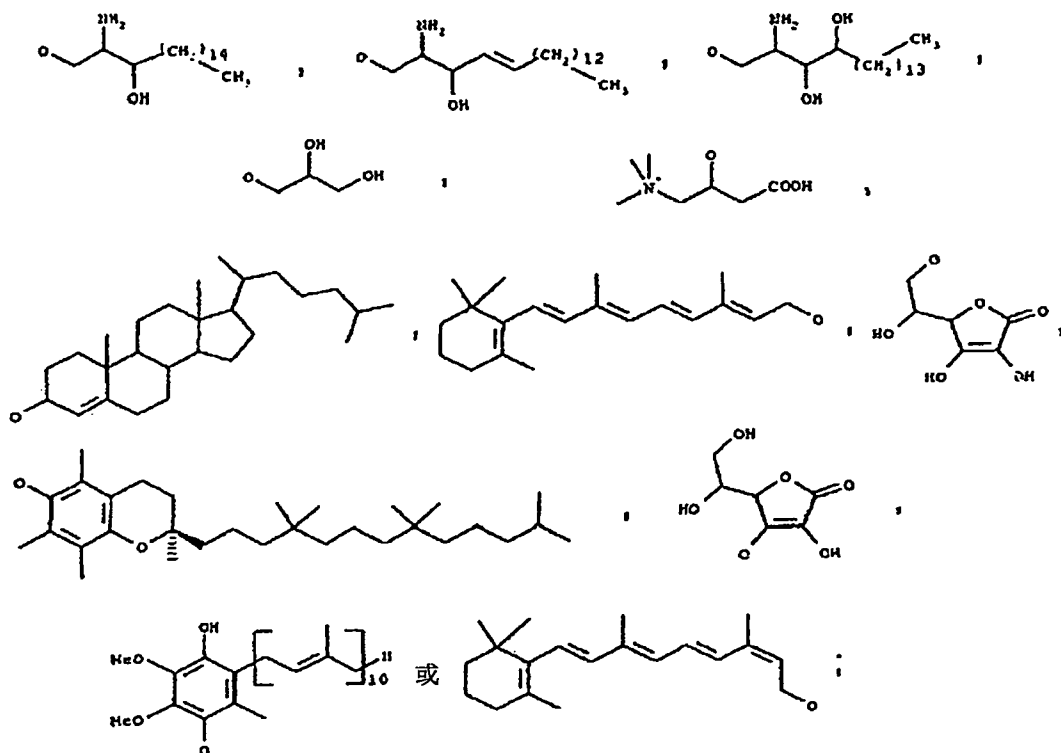
較佳地，R₃是烷氧基、S-半胱胺鹽基或S-穀胱甘肽基基團；

OR₄是(C₁-C₂₆)烷氧基基團、神經醯胺1、神經醯胺2、神經醯胺3、神經醯胺4、神經醯胺5、神經醯胺6a及6b、或選自以下之基團：



較佳地，OR₄是(C₁-C₂₆) 烷氧基基團；

OR₅是 (C₁-C₂₆) 烷氧基基團、神經醯胺 1、神經醯胺 2、神經醯胺 3、神經醯胺 4、神經醯胺 5、神經醯胺 6a及 6b、或選自以下之基團：



較佳地，OR₅是（C₁-C₂₆）烷氧基基團；

OR₆是丙酸根、乳酸根、檸檬酸根、反丁烯二酸根、順丁烯二酸根、肉豆蔻酸根、棕櫚酸根、硬脂酸根、棕櫚油酸根、油酸根或亞油酸根基團、天然脂肪酸基團或13-順式-視黃酸根（retinoate）基團；

R_7 是 H 或 (C₁-C₂₆) 烷基基團、天然胺基酸或天然胺

在以上式 (I) 中:

—“烷基”一詞意圖指明直鏈或環狀、任意分支、任意氟化或多氟化之含有1至26個碳原子且任意地包含一或多

個碳－碳雙鍵之基團，例如甲基、乙基、異丙基、三氟甲基、亞油基、亞麻基、或棕櫚醯基；

－“烷氧基”一詞意圖指明直鏈或環狀、任意分支、任意氟化或多氟化之衍生自含有 1 至 26 個碳原子且任意地包含一或多個碳－碳雙鍵之一級、二級或三級醇的基團，例如甲氧基、乙氧基、異丙氧基、三氟甲氧基、亞油氧基、亞麻氧基、或棕櫚醯氧基；

－神經醯胺型之基團的結構特別經描述於“Cosmetic Lipids and the Skin Barrier”, Thomas Förster Ed. 2002, Marcel Dekker, Inc., 第 2 頁圖 2 中；

－“天然”一詞意圖指明在植物及動物界之組織的代謝中及也在人類代謝中所發現的任何相關化合物（Steglich W., Römpp Encyclopedia Natural Products, G. Thieme ed.）；

－“寡聚物”意圖指明藉由酯型鍵結互相連接之 2 至 15 個單體的聯結所形成之任何化合物；

－“聚合物”意圖指明藉由酯型鍵結互相連接之多於 15 個單體的聯結所形成之任何化合物。

依本發明，該式（I）化合物較佳以鈣鹽、鋅鹽或鎂鹽形式被使用，該等形式通常能在培養介質中獲得更佳之溶解性及由光合微生物之更佳的消化吸收。

在本發明之較佳具體實例中，該光合微生物係選自由藍藻綱及共球藻綱所形成之族群中。因此，該光合微生物係有利地選自藍藻綱或共球藻綱，較佳地選自由共球藻綱之綠球藻屬及藍藻綱之螺旋藻屬或節旋藻屬所形成之族群

中。

本發明更特別是關於選（或取）自以下之式（I）化合物的用途：

- L-2-羥基-4-甲基硒丁酸，
- D-2-羥基-4-甲基硒丁酸，
- DL-2-羥基-4-甲基硒丁酸，

或這些化合物之鹽。

這些化合物描述於 WO 2006/008190 申請案中。

本發明之標的也是一種可依照本發明之方法獲得之富含有機硒之光合微生物。此種微生物在硒當量基礎上通常具有大於 500ppm，較佳地大於 1000ppm，更佳地大於 2000ppm 之有機硒含量，及按該微生物乾重量少於 0.5%，較佳地少於 0.2%，且更佳地少於 0.1% 的無機硒含量。較佳地，本發明係關於光合微生物包含相對於總硒少於 1.5%，較佳地少於 0.5%，更佳地少於 0.1% 之無機硒的情況。

換言之，在依本發明之方法富含硒之該光合微生物中所存在之無機形式之硒殘餘物通常少於在該微生物中所存在之總硒的 1.5%，此通常代表少於 0.5% 之該微生物的總乾生物質量（乾重量）。

本發明最特別地是關於一種富含有機硒之光合微生物，其特徵在於該微生物之硒甲硫胺酸形式的硒含量，相對於在該光合微生物中所存在之總硒，是多於 50 質量%，較佳地多於 70 質量%，更佳地多於 80 質量%，且甚至更佳地多於 90 質量% 的硒。就該微生物中所存在之有機硒的量及

品質而言，與先前技藝中所得者相比，此種硒甲硫胺酸的比例代表一種顯著且特別有利的改良。

特別地，本發明係關於以下情況：該微生物特徵在於彼是富含硒之共球藻綱微藻類，較佳是綠球藻屬者，且特徵在於該微生物含有按該微生物之乾重量計通常大於 50 微克硒當量／克（ $\mu\text{gSe/g}$ ），較佳地大於 $70\mu\text{gSe/g}$ ，且更佳地大於 $100\mu\text{gSe/g}$ 。

經固定於該微生物內之有機分子型（硒甲硫胺酸、硒半胱胺酸及類似者）或無機分子型（硒鹽類）之硒的量以硒質量／克（ $\mu\text{gSe/g}$ ）該微生物乾重量表示。換言之，光合微生物之硒含量藉由計算在這些有機或無機分子中所存在之硒質量而確立且回溯其與該微生物之總乾生物質量的關係。此外，呈有機及無機型之硒的質量比例也被確立且以相對於總硒質量的百分率表示。

依本發明之光合微生物之總硒及硒甲硫胺酸型之硒的含量可以藉由在該微生物之離心及凍乾後分別礦化及酶消化測定，例如藉由遵循 Lobinsky et al., 在 Mester, Z. et al. (2006) *Annal. Bioanal. Chem.* 385: 168-180 中所述之方法。

在本申請案之實例中所說明之依本發明所得之結果顯示：光合微生物（更特別是共球藻綱及藍藻綱微藻類）累積硒甲硫胺酸形式之硒，其含量按這些微藻類之乾重量計通常大於 100 微克硒當量／克（ $\mu\text{gSe/g}$ ），較佳地大於 $200\mu\text{gSe/g}$ ，更佳地大於 $500\mu\text{gSe/g}$ ，甚至更佳地大於 1000

$\mu\text{gSe/g}$ ，且甚至大於 $1400\ \mu\text{gSe/g}$ 。

本發明因此更特別地關於富含有機硒之共球藻綱或藍藻綱，其特徵在於其硒甲硫胺酸形式之有機硒含量按乾重量計通常大於 $100\ \mu\text{gSe/g}$ ，較佳地大於 $200\ \mu\text{gSe/g}$ ，更佳地大於 $500\ \mu\text{gSe/g}$ ，甚至更佳地大於 $1000\ \mu\text{gSe/g}$ 。

此種富含有機硒之共球藻綱及藍藻綱通常特徵在於：其硒甲硫胺酸形式之有機硒含量是多於其所含之總硒的 50% ，較佳地多於 70% ，更佳地多於 80% ，甚至更佳地多於 90% ，且甚至多於 95% ，且也特徵在於其之殘餘無機硒含量是少於其所含之總硒的 1.5% ，較佳地少於 0.5% ，更佳地少於 1% 。通常，其之殘餘無機硒含量按重量計是少於該共球藻綱之總生物質量的 1% ，較佳地少於 0.5% ，更佳地少於 0.2% ，且甚至少於 0.1% 。

本發明也關於依本發明之方法由富含硒之光合微生物製造食品、化妝品或醫藥產品。此種製造使用精於此技藝者已知的技術。

依本發明之光合微生物也可以用在動物營養品中，特別是供獲得富含有機硒之二次衍生物，例如魚、奶或蛋，的目的。

因此所得之衍生產品及分子是用於多種應用，包括在前文中摘述者，特別是作為化妝、醫藥或營養用劑。

本發明之標的也是依本發明之富含硒之光合微生物作為化妝品、醫藥（或治療）或營養產品（劑）的用途。

本發明也關於包含該光合微生物之組成物，通常是化妝、醫藥或營養組成物。

本發明也關於一種用於光合微生物之培養介質，其特徵在於彼包含一或多種如以上定義之式（I）化合物。此種培養介質具有實施依本發明之使光合微生物富含硒之方法的用途。

特別地，本發明係關於一種固態或液態培養介質，其包含至少一種式（I）化合物，較佳是2-羥基-4-甲基硒丁酸或其鹽，濃度在0.5及2000 mg/l之間，較佳在1及1000 mg/l之間，更佳在2及500 mg/l之間，亦即在硒當量基礎上分別約在0.2及800 mg/l之間的該化合物，較佳在硒當量基礎上在0.4及400 mg/l之間的該化合物，更佳在硒當量基礎上在0.8及200 mg/l之間的該化合物。

對於源於海水之微藻類而言，式（I）化合物可以在消毒過濾之海水中或在合成海水（例如由 Aquarium Systems Inc., 公司之“Reef Crystal”介質所製造的）中稀釋以形成最低必需培養介質。

製備依本發明之微藻類的方法特別可以包含一或多個以下步驟：

- 製備含有微藻生長所需之所有化學元素的培養介質，較佳是最低必需介質（minimum medium）；

- 將式（I）化合物，較佳是2-羥基-4-甲基硒丁酸導入該培養介質中作為有機硒來源；

- 將該混合物之pH調節成在6及10之間的值；

— 將在由此形成之混合物中培養之該微藻類的預培養物的接種體放置於 12 及 45℃ 之間的溫度下，於可含有 0 至 20% 氧及 0.3% 至 20% 二氧化碳之氣體中較佳 24 至 120 小時並加以 100 至 500rpm 的軌道搖盪 (orbital shaking)；

— 在 4000 及 10 000 rpm 下將該混合物離心數分鐘，或經由 0.2 微米濾器過濾該混合物且以生理食鹽水清洗過該濾器；

— 細胞丸浸入生理食鹽水中；

— 再次於 4000 及 10 000 rpm 下離心數分鐘；

— 回收含有該富含硒之微藻類的潮濕細胞丸。

該潮濕細胞丸可經凍乾或空氣乾燥。

在以下實例中給予本發明之其他特徵及優點。下文中之實例被提供以僅作為說明且不能以任何方式限制本發明之範圍。

【實施方式】

實例 1：在自營條件下在含有 2-羥基-4-甲基硒丁酸 (THD-177) 的介質中製造富含硒之綠球藻微藻

實驗條件

在光自營條件下所用之菌株是綠球藻 SAG211-11B：一種源自 the University of Göttingen 之 SAG 收集的無寄生物的菌株 (SAG : Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen [Collection of Alga Cultures of the

University of Göttingen]) 。

此菌株在由[Stanley RY et al. 1971 Bacteriol. Rev. 35 : 171-205]所述之 BG-11 介質 (藍綠介質) 中培養，該 BG-11 介質之組成如下 (每升) ：

- (1) NaNO_3 : 1.5 克
- (2) K_2HPO_4 : 0.04 克
- (3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.075 克
- (4) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.036 克
- (5) 檸檬酸 : 0.006 克
- (6) 檸檬酸鐵銨 : 0.006 克
- (7) EDTA- Na_2 : 0.02 克
- (8) Na_2CO_3 : 0.02 克
- (9) 蒸餾水 1.0 升
- (10) 微量元素之溶液 : 1 毫升 / 升

H_3BO_3 : 2.86 克

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 1.81 克

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.222 克

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.39 克

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.08 克

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.05 克

pH 被調節成 7.1 且該介質在 121°C 壓熱 15 分鐘。

此菌株在 25°C 下 2400 ± 200 Lux，在光自營條件下培養 2 至 7 日並加以軌道搖蕩 (80 rpm)， $\text{OD}_{\text{init}660\text{nm}} = 0.05$ 。該菌株之 $\text{OD}_{660\text{nm}}$ 在 48 小時內達到 0.5。

培養條件

有機硒之來源，亦即 2-羥基-4-甲基硒丁酸（THD-177，Tetrahedron SAS, France, CAS：873660-49-2）在硒當量基礎上以 0.5 毫克／升及 100 毫升／升之間的濃度被投予，亦即分別是 1.25 毫克／升及 250 毫克／升之 2-羥基-4-甲基硒丁酸被投予。此含硒之化合物在該培養開始時僅一次地被添加（亦即每 100 毫升培養物 0.125 毫克及 25 毫克之間的量），或在規律之時間間隔下添加數次，間隔時間是在 6 及 24 小時之間，該培養物已維持 2 至 7 日。

實例 2：在含 2-羥基-4-甲基硒丁酸（THD-177）之介質中（依本發明之實例）或在含亞硒酸鈉之介質中（比較用實例），在混營條件下（光及碳水化合物－葡萄糖存在於介質中）製造富含硒之綠球藻微藻

在這些測試中，所用之菌株是綠球藻 SAG211-11B 菌株：一種源自 the University of Göttingen 之 SAG 收集的無寄生物的菌株（SAG：Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen[Collection of Alga Cultures of the University of Göttingen]），其係在混營條件下於以下介質中培養：

酵母萃取物	0.33 克
牛肉萃取物	0.33 克
色糖（tryptose） . . .	0.66 克
FeSO ₄	0.66 毫克

葡萄糖 3.3 克

蒸餾水 加至 1.0 升

pH 調節成 7.2 且該介質在 121°C 下壓熱 15 分鐘。

有機硒之來源，亦即 2-羥基-4-甲基硒丁酸（THD-177，Tetrahedron SAS, France, CAS: 873660-49-2）在硒當量基礎上以 20 毫克／升的濃度被投予，亦即 50 毫克／升之 2-羥基-4-甲基硒丁酸被投予。

無機硒之來源（NaSe，亞硒酸鈉）在硒當量基礎上以 20 毫克／升的濃度被投予，亦即 43.9 毫克／升之亞硒酸鈉被投予。

含硒之有機化合物在綠球藻菌株之指數成長期中（亦即在接種後 3 日）僅一次地被添加。

供分析之樣品的製備

在接種 7 日後，該介質經由 0.2 微米 Nalgene 薄膜（Ref a-PES，直徑 90 毫米）被過濾，且該細胞滯留物以生理食鹽水清洗。濕細胞質量被凍乾以供硒成分之分析（總硒、硒甲硫胺酸及亞硒胺酸）。

綠球藻之硒成分的分析

在該樣品之礦化後，藉由偶合至質量偵測的 ICP 分析總硒。在依照 Lobinsky et al., 於 Mester, Z. et al. (2006) Annal. Bioanal. Chem. 385: 168-180 中所述之方法酶消化該樣品後，硒之物種形成藉由偶合至串聯的質量偵測之高

效率液體層析來進行。

結果

以下表 1 指明在硒當量基礎上對於 7 日接種時間重複三次所得之平均值。

表 1
綠球藻微藻之硒成分分析

	總硒 毫克硒/ 公斤生物質量	硒甲硫胺酸 毫克硒/ 公斤生物質量	硒(IV) 毫克硒/ 公斤生物質量
添加 THD177 20毫克硒/升	1293±23	1274±109 (總硒之98.5%)	6±1 (總硒之0.4%)
添加 NaSe 20毫克硒/升	144±5	29±2 (總硒之20%)	4.1±0.4 (總硒之2.7%)

對於以 THD177 或 NaSe 形式添加之相同劑量的硒（在此情況中為 20 mgSe/l）而言，所得結果顯示：

- 以 THF177 形式進行之添加比以 NaSe 形式進行之添加有多 9 倍之總硒被偵測到；

- 以硒甲硫胺酸形式累積在細胞內之硒的濃度（利用 THD177 之添加所得者）比利用 NaSe 形式之添加所得者高 44 倍；

- 若該添加係以 THD177 形式進行，則以硒甲硫胺酸形式累積在細胞內之硒的濃度大體上達到細胞內硒化合物型之 100%（98.5%）；與之相比，利用 NaSe 者達到 20% 之濃度；

- 若該添加是 THD177 則偵測到在總硒中僅 0.4% 之 Se

(IV) ； 但 在 添 加 NaSe 之 情 況 中 在 總 硒 中 偵 測 到 2.7% 之 Se (IV) 。

實 例 3 ： 在 自 營 條 件 下 於 含 有 2- 羥 基 -4- 甲 基 硒 丁 酸 (THD177) (依 本 發 明 之 實 例) 的 介 質 中 或 在 含 有 亞 硒 酸 鈉 (比 較 用 實 例) 的 介 質 中 製 造 富 含 硒 之 鈍 頂 節 螺 藻 微 藻 ：

在 自 營 條 件 下 於 以 下 介 質 中 培 養 鈍 頂 節 螺 藻 (鈍 頂 節 螺 藻 之 標 準 菌 株 - FLAMANT VERT[®], 18000 Bourges, France - 使 用 其 他 菌 株 3054-E0001 獲 得 類 似 結 果) ：

酵 母 萃 取 物	0.33 克
牛 肉 萃 取 物	0.33 克
色 糖 (tryptose)	0.66 克
FeSO ₄	0.66 毫 克
蒸 餾 水	加 至 1.0 升

pH 調 節 成 7.2 且 該 介 質 在 121℃ 下 壓 熱 15 分 鐘 。

有 機 硒 之 來 源 ， 亦 即 2- 羥 基 -4- 甲 基 硒 丁 酸 (THD-177 , Tetrahedron SAS, France, CAS : 873660-49-2) 在 硒 當 量 基 礎 上 以 25 毫 克 / 升 的 濃 度 被 投 予 ， 亦 即 62.5 毫 克 / 升 之 2- 羥 基 -4- 甲 基 硒 丁 酸 被 投 予 。

無 機 硒 之 來 源 (NaSe , 亞 硒 酸 鈉) 在 硒 當 量 基 礎 上 以 25 毫 克 / 升 的 濃 度 被 投 予 ， 亦 即 54.4 毫 克 / 升 之 亞 硒 酸 鈉 被 投 予 。

含 硒 之 有 機 化 合 物 在 接 種 鈍 頂 節 螺 藻 菌 株 後 立 即 (亦

即 $T=0$) 一次地被添加。

用於分析之樣品的製備

在接種 10 日後，細胞丸粒經由 0.2 微米之 Nalgene 薄膜過濾，且細胞滯留物以生理食鹽水清洗。濕的細胞質量被凍乾以供硒成分（總硒、硒甲硫胺酸及亞硒酸鈉）分析。

鈍頂節螺藻之硒成分分析

在樣品之礦化後，藉由偶合至質量偵測之 ICP 分析總硒。在依照 Lobinsky et al., 於 Mester, Z. et al. (2006) *Annal. Bioanal. Chem.* 385: 168-180 中所述之方法酶消化該樣品後，硒之物種形成藉由偶合至串聯的質量偵測之高效率液體層析來進行。

結果

以下表 2 指明在硒當量基礎上對於 10 日接種時間重複三次所得的平均值。

表 2
鈍頂節螺藻微藻之硒成分分析

	總硒 毫克硒/公斤 生物質量	硒甲硫胺酸 毫克硒/公斤 生物質量	硒(IV) 毫克硒/公斤 生物質量
添加 THD177 25 毫克硒/升	1431±68	1402±47 (總硒之 98%)	17.2±0.7 (總硒之 1.2%)
添加 NaSe 25 毫克硒/升	177±2	13±3 (總硒之 7%)	5.1±0.3 (總硒之 2.9%)

對於以 THD177 或 NaSe 形式添加之相同劑量的硒（在此情況中為 25 mgSe/l）而言，所得結果顯示：

- 以 THF177 形式進行之添加比以 NaSe 形式進行之添加有多 8 倍之總硒被偵測到；

- 以硒甲硫胺酸形式累積在細胞內之硒的濃度（利用 THD177 之添加所得者）比利用 NaSe 形式之添加所得者高 108 倍；

- 若該添加係以 THD177 形式進行，則以硒甲硫胺酸形式累積在細胞內之硒的濃度達到細胞內含硒之化合物型的 98%；與之相比，利用 NaSe 者達到 7% 之濃度；

- 若該添加是 THD177 則偵測到在總硒中僅 1.2% 之 Se (IV)；但在添加 NaSe 之情況中在總硒中偵測到 2.9% 之 Se (IV)。

實例 4：於含有 2-羥基-4-甲基硒丁酸（THD177）（依本發明之實例）的介質中製造富含硒之鈍頂節螺藻微藻

在這些測試中，所用之菌株是鈍頂節螺藻菌株（FLAMANT VERT[®], 18000 Bourges, France）。比較先前實例（實例 3）及新實驗之間的結果：

- 在實例 3 期間，依本發明之含硒 THD-177 之化合物的添加係在接種鈍頂節螺藻菌株後立即一次地進行；

- 在新實驗中，依本發明之含硒 THD-177 之化合物的添加係如實例 2 中在該鈍頂節螺藻之培養的指數期中進行。

結果

以下表 3 指明在硒當量基礎上對於 10 日接種時間重複三次所得的平均值。

表 3
鈍頂節螺藻微藻之硒成分分析

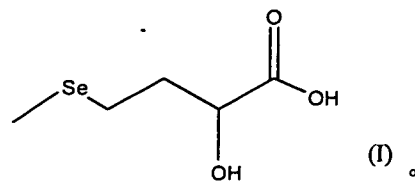
鈍頂節螺藻微藻之硒成分分析	總硒 毫克硒/公斤 生物質量	硒甲硫胺酸/ 公斤生物質量	THD177 毫克硒/公斤 生物質量	硒(IV) 毫克硒/公斤 生物質量
在接種時添加 THD177 25毫克硒/升	1431±68	1402±47 (總硒之98%)	5±1 (總硒之0.35%)	17.2±0.7 (總硒之1.2%)
在指數期添加 THD177 25毫克硒/升	1274±16	1078±89 (總硒之85%)	11±2 (總硒之0.86%)	14±2 (總硒之1.1%)

結果顯示：與“在成長期之期間添加”的測試（更特別地在指數期之期間）相比，在“在接種時添加”之測試中獲得多 12% 之總硒及多 30% 之硒甲硫胺酸型之硒。此差異可能是：與在另一測試（“在指數期中添加”）中者相比，在“在接種時添加”測試中生物質量與該 THD-177 之間較長的接觸時間的結果。

在二情況中，細胞內之硒（IV）濃度仍保持在總硒之 1% 的低濃度下。

七、申請專利範圍：

1. 一種使光合微生物富含有機硒之方法，其特徵在於該光合微生物係在包含硒羧酸型化合物的介質中培養，該硒羧酸型化合物在該微生物之成長期間導入該培養介質中，該硒羧酸型化合物是如下通式（I），或該化合物之鹽或酯或醯胺衍生物：



2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中在自營條件下進行該培養。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中在混營（mixotrophic）條件下進行該培養。

4. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中該光合微生物是選自由共球藻綱（Trebouxiphyceae）所形成之族群。

5. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該光合微生物是選自由綠球藻屬（*Chlorella* genus）所形成之族群。

6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中在雜營（heterotrophic）條件下進行該培養。

7. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該式（I）化合物係選自：

- L-2-羥基-4-甲基硒丁酸，
- D-2-羥基-4-甲基硒丁酸，
- DL-2-羥基-4-甲基硒丁酸，

或這些化合物之鹽。

8.如申請專利範圍第7項之方法，其中該式(I)化合物是鈣鹽、鋅鹽或鎂鹽形式。

9.如申請專利範圍第1至8項中任一項之方法，其中該光合微生物係選自由藍藻綱(Cyanophyceae)及共球藻綱(Trebouxiphyceae)所形成之族群。

10.如申請專利範圍第9項之方法，其中該光合微生物係選自由綠球藻屬及螺旋藻屬或節旋藻屬所形成的族群。

11.一種富含有機硒之光合微生物，其可如申請專利範圍第1至10項之任一項的方法獲得，其特徵在於其硒甲硫胺酸形式之有機硒含量按乾重量計大於 $1000\mu\text{gSe/g}$ 。

12.如申請專利範圍第11項之富含有機硒之光合微生物，該光合微生物特徵在於該微生物之硒甲硫胺酸形式的硒含量，相對於在該光合微生物中所存在之總硒，是多於70質量%之硒。

13.如申請專利範圍第12項之富含有機硒之光合微生物，該光合微生物之硒甲硫胺酸形式的硒含量，相對於在該光合微生物中所存在之總硒，是多於80質量%之硒。

14.如申請專利範圍第12項之富含有機硒之光合微生物，該光合微生物之硒甲硫胺酸形式的硒含量，相對於在該光合微生物中所存在之總硒，是多於90質量%之硒。

15.如申請專利範圍第11至14項中任一項之富含有機硒之光合微生物，其之殘餘無機硒含量，相對於其所含之總硒，是少於1.5質量%。

16.如申請專利範圍第11至14項中任一項之富含有機

硒之光合微生物，該光合微生物為共球藻綱，其之硒甲硫胺酸形式的有機硒含量按乾重量計是大於 $1000 \mu \text{gSe/g}$ 。

17. 如申請專利範圍第 16 項之富含有機硒之光合微生物，其之硒甲硫胺酸形式的有機硒含量是多於其所含之硒總質量的 70%。

18. 如申請專利範圍第 16 項之富含有機硒之光合微生物，其之殘餘無機硒含量，相對於其所含之總硒，是少於 2 質量%。

19. 如申請專利範圍第 16 項之富含有機硒之光合微生物，該光合微生物為共球藻綱之綠球藻屬。

20. 如申請專利範圍第 11 至 14 項之任一項之富含有機硒之光合微生物，該光合微生物為藍藻綱 (Cyanophyceae)，其之硒甲硫胺酸形式的有機硒含量按乾重量計是大於 $1000 \mu \text{gSe/g}$ 。

21. 如申請專利範圍第 20 項之富含有機硒之光合微生物，其之硒甲硫胺酸形式的有機硒含量是多於其所含之硒總質量的 70%。

22. 如申請專利範圍第 20 項之富含有機硒之光合微生物，其之殘餘無機硒含量，相對於其所含之總硒，是少於 2 質量%。

23. 如申請專利範圍第 20 項之富含有機硒光合微生物，該光合微生物為藍藻綱之螺旋藻屬或節旋藻屬。

24. 一種如申請專利範圍第 11 至 23 項中任一項的富含有機硒的光合微生物作為化妝品、藥品及營養劑的用途。

25. 一種組成物，其包含至少一種如申請專利範圍第 11 至 23 項中任一項的富含有機硒的光合微生物。

26. 如申請專利範圍第 25 項之組成物，其中該組成物是化妝品、藥品或營養品。

27. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該光合微生物是綠球藻 (*Chlorella vulgaris*)。

28. 如申請專利範圍第 19 項之富含有機硒之光合微生物，其中該光合微生物是綠球藻 (*Chlorella vulgaris*)。