(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5378368号
(P5378368)
(45)発行日　平成25年12月25日(2013.12.25)　(24)登録日　平成25年10月4日(2013.10.4)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 1/12 (2006.01)　C12N 1/12 A
C12P 23/00 (2006.01)　C12P 23/00

請求項の数 5　(全 12 頁)

(21)出願番号　特願2010-512842(P2010-512842)
(86)(22)出願日　平成20年6月17日(2008.6.17)
(65)公表番号　特表2010-530241(P2010-530241A)
(43)公表日　平成22年9月9日(2010.9.9)
(86)国際出願番号　PCT/IN2008/000394
(87)国際公開番号　WO2008/155781
(87)国際公開日　平成20年12月24日(2008.12.24)
審査請求日　平成23年6月9日(2011.6.9)
(31)優先権主張番号　1657/KOL/2007
(32)優先日　平成19年6月18日(2007.6.18)
(33)優先権主張国　インド(IN)

(73)特許権者　509347631
ヴィデヒ、チョウドハリー
インド国　ウェスト　ベンガル、ムルシダバード　ピン　７４２　１４８、ポスト－ラルゴラ　ディスト、ラデハ　キサン　バーワン、シャンチラル　アガルウォル
(74)代理人　100090918
弁理士　泉名　謙治
(74)代理人　100082887
弁理士　小川　利春
(74)代理人　100072774
弁理士　山本　量三

最終頁に続く

(54)【発明の名称】金黄色の藻類及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記の工程を含むことを特徴とするカロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ属藻の培養方法。
（ａ）０．１～０．１５ｇ／Ｌの炭素源及び０．０６～０．３５ｇ／Ｌの窒素源を含む培地中で５～７日間、スピルリナ属藻を培養する；
（ｂ）上記（ａ）工程を終了後、培地中の炭素源の濃度を０．２～１．５ｇ／Ｌに増大させ、かつ窒素源の濃度を０．００５～０．０３ｇ／Ｌに低下させてスピルリナ属藻を５～７日間培養する；
（ｃ）上記（ｂ）工程の間、培地を高炭素栄養剤により周期的に助成する；
（ｄ）上記（ｃ）工程の後に生成したスピルリナ属藻を収集する。
【請求項２】
前記炭素源が、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、及びその組み合わせから選ばれる請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記窒素源が、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、及びその組み合わせから選ばれる請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記高炭素有機栄養剤が、クエン酸塩化合物、酢酸塩化合物クエン酸塩化合物クエン酸塩化合物、及びその組み合わせから選ばれる請求項１に記載の方法。

【請求項５】
下記の工程を含むことを特徴とするカロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ属藻バイオマスの生産方法。
（ａ）０．１～０．１５ｇ／Ｌの炭素源及び０．０６～０．３５ｇ／Ｌの窒素源を含む培地中で５～７日間、スピルリナ属藻を培養する；
（ｂ）上記（ａ）工程を終了後、培地中の炭素源の濃度を０．２～１．５ｇ／Ｌに増大させ、かつ窒素源の濃度を０．００５～０．０３ｇ／Ｌに低下させてスピルリナ属藻を５～７日間培養する；
（ｃ）上記（ｂ）工程の間、培地を高炭素栄養剤により周期的に助成する；
（ｄ）上記（ｃ）工程の後に生成したスピルリナ属藻を収集する。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、カロチノイドに富んだ藻類及び藻類バイオマス（biomass）の製造に関する。
【背景技術】
【０００２】
藻類（algae）は単純な植物に似た生物体である。それは、単細胞又は多細胞の生物体である。藻類は天然に見出され、種々のクラスに分類され、また、種々の色や形態で見出される。栄養価が高いことや、食料源が減少し、人口が常に増加し、かつ農業地が減少する理由から、藻類は、将来の潜在的な食料と考えられている。栄養的成分のほかに、藻類、特に、微細藻類（microalgae）は、貴重な添加剤、治療用、化学－予防性や工業的用途を有する他の化合物や色素材の主要な原料でもある。
【０００３】
カロチノイドは、種々の用途を有する色素（pigments）類である。その用途としては、健康食品、化粧品、家禽、家畜、魚、甲殻類の餌添加物、医薬品における治療用、化学－予防用の補助材、さらに、種々の産業における着色剤がある。栄養補助食品ブームは、主に、それらについて明らかにされた抗酸化性や治療性のために混合カロチノイドの需要を増大させている。近年になって発見されたその健康上の利点はさらにカロチノイドの市場におけるポテンシャルを増大させている。カロチノイドの成長する世界的な市場価値は、近い将来１０億米ドル（約１０００億円）以上に達するものと予想されている。天然品に対する消費者の要求は、有害性の問題から、合成物よりはむしろ、生物原料からのカロチノイドの生産を有利にしている。
【０００４】
多くの研究により、天然の混合カロチノイドは、良好な相乗的な効果を有し、個々のカロチノイドの成分よりも大きな抗酸化性を有することを明らかになった。これは、個々のカロチノイドの成分よりも天然の混合カロチノイドを取得することにより大きな利益をもたらす。天然の混合カロチノイドは、植物材料又は微細藻類を含む生物源から取得することができる。しかし、植物におけるカロチノイドの合成の生産性や割合は、比較的小さく、結果として植物から生産されるカロチノイドは、高価である。藍（blue‐green）類を含む幾つかの微細藻類がカロチノイドを含むことが発見され、天然の混合カロチノイドを生産するために微細藻類を利用する利点が増大している。
【０００５】
スピルリナ（spirulina）は、シアノバクテリア門（phylum）に属する原核性の藍微細藻類の原始的な形態である。スピルリナ種は、光合成性、フィラメント状の、棒～螺旋状の形態を有する。最も重要な種は、スピルリナ マキシマ(maxima)、スピルリナ フシフォルミス(fusiformis)、スピルリナ パシフィカ(pacifica)、スピルリナ プラテンシス(platensis)　及び他の多くのものである。スピルリナは、種々の生物的活性及び栄養的重要性を有する天然の生物活性や栄養成分の貴重な原料である。最近の研究によると、スピルリナの抗酸化性や免疫刺激性は、その混合カロチノイドやポリサッカライド成分によるこ

とも明らかにされている。

【０００６】

スピルリナの化学組成は、蛋白質を５５０００－７２０００ｍｇ／１００ｇ、炭水化物を１５０００－２５０００ｍｇ／１００ｇ、脂肪（リピッド）を６０００－８０００ｍｇ／１００ｇ、加えて、ビタミンを３５０－６５０ｍｇ／１００ｇ、ミネラルを５０００－７０００ｍｇ／１００ｇ、色素に似た天然混合カロチノイドを３７０ｍｇ／１００ｇ、クロロフィル－ａを１０００ｍｇ／１００ｇ、及びサイコシアニンを１４０００ｍｇ／１００ｇである。スピルリナの天然の混合カロチノイド成分は、ベーターカロチン、ゼアキサンテン（zeaxanthene）、エキネノン(echinenone)、ベータークリプトザンテン（beta-cryptoxanthene）、ヒドロキシエキネノン（hydroxyechinenone）及び他のカロチノイドからなることが報告されている。食料や餌の補助剤、栄養補助食品、及び化粧品における最終用途に対し、スピルリナの需要が世界的に増加している。しかし、その濃い藍色や、味および香りなどの他の感覚的特性はそれほど良いものではないために、その大きな商業的使用を制限している。

【０００７】

これまで、利用できるスピルリナを生産するために提案されている多くの培養手順（protocol）がある。

特許文献１は、藍色の藻類の成長及び増殖に関する。該特許は、スピルリナを培養する場合の炭素源やｐＨ値を制御し、コントロールする方法を開示している。$NaHCO_3$又は二酸化炭素を培養媒地に添加してｐＨを精密に制御し、藍色の藻類の成長及び繁殖を促進させている。

【０００８】

特許文献２は、$NaHCO_3$を含有するｐＨが８～１１、水温２５～４０℃の無機化合物中での食用の新鮮なスピルリナの培養に関する。

特許文献３は、$NaHCO_3$、$NaNO_3$及び他の無機栄養分を含む媒地を使用した連続フロー培養にて成長したスピルリナ　プレテンシスの変異体を開示する。

特許文献４は、培養溶液に特定量の縮合リン酸塩、充分な鉄イオンを解離させ、解離状態を維持してその成長を促進する海の藍色の藻類の培養方法を開示する。上記したように、Na_2CO_3、$NaHCO_3$、NaH_2PO_4及び他の無機塩が栄養分として添加されている。ｐＨ調整剤若しくは緩衝剤が藻類の成長にとって適切なｐＨレベルを得るために添加されている。

【０００９】

特許文献５は、海水をベースとする媒体中で、重炭酸ナトリウム塩を１．２～３．０％ｗ／ｖの範囲、窒素含有量を０．１～０．３％ｗ／ｖの範囲、リンを０．１～０．３％ｗ／ｖの範囲、及びカリを０．１～０．３％ｗ／ｖの範囲で、ｐＨを６．５及び８．０にしてスピルリナをバイオマス生成させるプロセスを開示している。

上記した特許文献は、より高いスピルリナを得るための栄養分の添加及び方法を主に開示している。

【００１０】

さらに、幾つかの栄養成分である鉄、セレニウム、ゲラニウムなどを選択的に増大するプロトコールが提案されている。

特許文献６は、メチオニン第一鉄（ferrous）を使用し、鉄分に富んだスピルリナを生産に関する。

特許文献７は、ゲラニウム及びセレニウムを含有するスピルリナを生産するために二酸化ゲラニウム及びセレン酸ナトリウム中におけるスピルリナの培養を開示する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１１】

【特許文献１】ＣＮ１２１８８３

【特許文献２】ＣＮ１２５４０１２

【特許文献３】ＲＯ１１７３８８
【特許文献４】ＪＰ１０３７２８１（特開昭６４－３７２８１号）
【特許文献５】ＡＵ２００４３２２４１２
【特許文献６】ＣＮ１１４４８４４
【特許文献７】ＣＮ１０９２１０４
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１２】
しかしながら、これまで、かなり多量の天然の混合カロチノイドを含有する藍色の藻類などのスピルリナ又は他の微細藻類を成長させることには成功していない。加えて、良好な外観や改善した感覚特性を有するスピルリナの製造に着目した大きな努力はされてこなかった。
したがって、天然の混合カロチノイドを増大した量で含有し、かつ良好な外観や改善した感覚特性を有する、スピルリナ及び他の藍細藻類などの微細藻類を培養する要求は満たされていなかった。
【００１３】
本発明は、カロチノイド及びバイオマスに富んだ金黄色のスピルリナ属藻を培養する方法を提供することを目的とする。
本発明は、カロチノイド及び炭水化物に富んだ金黄色のスピルリナ属藻バイオマスを提供することも目的とする。
【課題を解決するための手段】
【００１４】
本発明は、以下の要旨を有する。
１．下記の工程を含むことを特徴とするカロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ（Spirulina）属藻の培養方法。
（ａ）０．１～０．１５ｇ／Ｌの炭素源及び０．０６～０．３５ｇ／Ｌの窒素源を含む培地中で５～７日間、スピルリナ属藻を培養する；
（ｂ）上記（ａ）工程を終了後、培地中の炭素源の濃度を０．２～１．５ｇ／Ｌに増大させ、かつ窒素源の濃度を０．００５～０．０３ｇ／Ｌに低下させてスピルリナ属藻を５～７日間培養する；
（ｃ）上記（ｂ）工程の間、培地を高炭素栄養剤により周期的に助成する；
（ｄ）上記（ｃ）工程の後に生成したスピルリナ属藻を収集する。
２．前記炭素源が、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、及びその組み合わせから選ばれる上記１に記載の方法。
３．前記窒素源が、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、及びその組み合わせから選ばれる上記１に記載の方法。
４．前記高炭素有機栄養剤が、クエン酸塩化合物、酢酸塩化合物クエン酸塩化合物クエン酸塩化合物、及びその組み合わせから選ばれる上記１に記載の方法。
５．下記の工程を含むことを特徴とするカロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ属藻バイオマスの生産方法。
（ａ）０．１～０．１５ｇ／Ｌの炭素源及び０．０６～０．３５ｇ／Ｌの窒素源を含む培地中で５～７日間、スピルリナ属藻を培養する；
（ｂ）上記（ａ）工程を終了後、培地中の炭素源の濃度を０．２～１．５ｇ／Ｌに増大させ、かつ窒素源の濃度を０．００５～０．０３ｇ／Ｌに低下させてスピルリナ属藻を５～７日間培養する；
（ｃ）上記（ｂ）工程の間、培地を高炭素栄養剤により周期的に助成する；
（ｄ）上記（ｃ）工程の後に生成したスピルリナ属藻を収集する。
【００１５】
本発明の一つの態様によれば、以下の過程を含む。カロチノイドに富んだ金黄色の（goluden　yellow）スピルリナ属藻を培養する方法が提供される。低炭素濃度及び中程度の

窒素濃度を有する培地中で、スピルリナ属藻を始めの５～７日間培養する過程；次いで、炭素の濃度を増大させ、かつ窒素の濃度を減少させて、そのスピルリナ属藻を５～７日間培養する過程；炭素源の濃度を増加させた後、培地を周期的に高炭素の有機栄養剤を補充する過程；その後に、金黄色のカロチノイドに富んだスピルリナ属藻を収集する過程。

培養に使用されるスピルリナ属藻は、藍色のスピルリナ属藻から選択される。培養する間の培地中の窒素に対する炭素の割合を変え、また、培地を周期的にクエン酸塩や酢酸塩を補充することにより、カロチノイドの生産を高め、かつ、藍のスピルリナ属藻の色を金黄色に変えることになる。

本発明の別の態様は、以下の過程で培養されたカロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ属藻を提供する。低炭素及び高窒素を含む培地中で始めの５～７日間スピルリナ属藻を培養する；次いで、炭素の濃度を増大させ、かつ窒素の濃度を減少させて、スピルリナ属藻を５～７日間培養する；炭素源の濃度を増加させた後、培地を高炭素有機栄養剤を周期的に補充する；その後に、スピルリナ属藻のカロチノイド含有量が乾燥セルの１００ｇｍあたり少なくとも６００ｍｇである金黄色のカロチノイドに富んだスピルリナ属藻を収集して得る。本発明の別の態様によれば、得られたスピルリナ属藻は、乾燥セルの１００ｇｍあたり６００ｍｇ～１２００ｍｇを含有する。

【００１６】

本発明の別の態様は、以下の過程を含むカロチノイドに富んだスピルリナ属藻バイオマスを製造する方法を提供する。低炭素濃度及び適度の窒素濃度を有する培地中で始めの５～７日間、スピルリナ属藻を培養し、次いで、炭素の濃度及び還元性窒素の濃度を増加させて、スピルリナ属藻を５～７日間培養し、炭素源の濃度を増加させた後、周期的に培地に高炭素有機栄養剤を補充し、その後に、金黄色のカロチノイドに富んだスピルリナ属藻を収集する過程を含む。

【００１７】

本発明の別の態様は、以下の過程で製造された金黄色のカロチノイドに富んだスピルリナ属藻を提供する。低炭素及び高窒素を含む培地中で始めの５～７日間スピルリナ属藻を培養する；次いで、炭素の濃度を増大させ、かつ窒素の濃度を減少させて、スピルリナ属藻を５～７日間培養する；炭素源の濃度を増加させた後、周期的に培地に高炭素有機栄養剤を補充する；その後に、スピルリナ属藻のカロチノイド含有量が乾燥セルの１００ｇｍあたり少なくとも６００ｍｇである金黄色のカロチノイドに富んだスピルリナ属藻のバイオマスを収集して得る。本発明の別の態様によれば、得られたスピルリナ属藻は、乾燥セルの１００ｇｍあたり６００ｍｇ～１２００ｍｇのカロチノイドを含有する。

【００１８】

本発明において、「低炭素および中程度の窒素媒地」という用語は、０．１～０．１５ｇ/Ｌ（リットル）の濃度の炭素源、０．０６～０．３５ｇ/Ｌの窒素源、及び他の栄養成分を含む液状、又は半固体状のいずれかの栄養性培養地を意味する。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】図１は、本発明の一態様の方法により製造された金黄色のスピルリナ属藻を示す。

【発明を実施するための形態】

【００２０】

本発明は、その種々の例示の態様について説明されるが、本発明は、その技術思想から離れることなく、その範囲内で、多くの変形、改良、種々の態様の下位態様、最適化、及びバリエーションが可能である。

【００２１】

本発明の一つの態様によれば、以下のカロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ属藻を培養する方法が提供される。０．１～０．１５ｇ/Ｌの炭素源及び０．０６～０．３５ｇ/Ｌの窒素源を含む媒地で５～７日間、又はスピルリナ属藻が黄色に着色するまでスピルリナ属藻を培養する。これは、スピルリナ属藻を所望の段階まで成長させることになる。ク

ロロフィル及びサイコシアニンの濃度は低下する。低炭素及び適度の培地中で最初にスピルリナ属藻を成長させた後、培地中の炭素源の濃度は、０．２～１．５ｇ/Ｌまで増大させ、一方、窒素源の濃度は、０．００５～０．０３ｇ/Ｌまで低下させる。そこで、スピルリナ属藻は続く５～７日間成長させる。この間、培地は、周期的にクエン酸塩又は酢酸塩又はその組み合わせの形態の高炭素有機栄養剤を助成し、カロチノイドの生成を高め、かつバイオマスを増大させる。１２～１５日後にスピルリナ属藻培養物が収集され、スピルリナ属藻バイオマスの形態でカロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ属藻が得られる。

【００２２】

本発明のカロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ属藻は、カロチノイドを生成しうる藻類であればいかなる藻類でも培養することにより得られる。本発明のカロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ属藻は、一つの態様では、使用される藻類は、スピルリナ属から選ばれる。別の態様では、使用されるスピルリナは、S.プラテンシスである。

【００２３】

本発明者によると、培養する間、培地における窒素含有量に対する炭素の割合を変え、また、高炭素有機物を周期的に補充することにより、カロチノイドの生産を２～３倍高められることが見出された。また、そうすることにより、クロロフィル及びサイコシアニンのレベルの低下をもたらし、藍藻類の色を金黄色に変えることになる。

【００２５】

本発明における一つの実施態様では、製造されるカロチノイドに富んだスピルリナ属藻は、スピルリナである、本発明で培養されたスピルリナは、Ｓ．プラテンシス(platensis)、Ｓ．マキシマ(maxima)、S. フシフォルミス（fusiformis）、S. パシフィカ(pacifica)、Ｓ．インジカ(indica)、Ｓ．マサルテイ(Massartii)、Ｓ．ジェネリ(jenneri)、及びＳ．サブサラ(Subsala)などのスピルリナ種から選ばれる。本発明で培養されたカロチノイドに富んだスピルリナは、スピルリナ プラテンシスである。

【００２６】

天然の生育地、又は保管若しくは種子バンク施設のいずれかから所望の種のスピルリナ属藻を入手し、それを適宜の基礎となる栄養媒地中で、本発明の培養方法を使用する所望のバイオマスを得るための適切な培養条件にて培養することにより種菌（inoculum）が生成する。

【００２７】

一つの実施態様では、種菌は、スピルリナ種のS. プラテンシスから調製される。上記藻類の培養物は、約８．６０～１０．６０のｐＨの範囲、０．２～１０Ｋｌｕｘの光強度の光相及び暗相の各１２時間で、また、光合成を高めかつ藻類の培養成長を促進するために２時間毎の撹拌を行う、２５０ｍＬの培養容器中で、１．５％の寒天（agar）の存在又は存在なしに、５０％希釈した既存のザロウク（Ｚａｒｒｏｕｋ's ）培地中で成長させられる。

【００２８】

次いで、種菌は、大規模でスピルリナ属藻を生産するために通常使用される媒地に移される。媒地中の炭素及び窒素の濃度は、それぞれ、０．１～０．１５ｇ/Ｌの炭素源及び０．０６～０．３５ｇ/Ｌに調整され、スピルリナ属藻は、５～７日間成長し、スピルリナ属藻が黄色に着色し始める。大規模でスピルリナ属藻を培養する分野の当業者には自明であるが、培地は、新鮮な水又は塩水中で調製される。

【００２９】

５～７日間後、培地中の炭素及び窒素の濃度は、それぞれ、０．２～１．５ｇ/Ｌの炭素源及び０．００５～０．０３ｇ/Ｌに調整され、スピルリナ属藻は、さらに５～７日間成長する。この間、培地は、周期的に、クエン酸塩、酢酸塩、又はその組み合わせの形態の高炭素有機栄養剤を補充することにより、スピルリナ属藻セル中のバイオマス及びカロチノイドの生成を促進させる。

【００３０】

一つの態様では、培地は、クエン酸第二鉄（ferric）又はクエン酸ナトリウムから選ばれるクエン酸塩化合物が補充される。別の態様では、培地は、酢酸カリウム若しくはナトリウムから選ばれる酢酸塩化合物が補充される。本発明で使用されるクエン酸塩化合物及び酢酸塩化合物の濃度は、表１に示される。

【００３１】

【表１】

Ｓ．Ｎｏ	塩	ｍｇ／リットル
１	クエン酸第二鉄若しくはナトリウム	０．５～１０
２	酢酸カリウム若しくはナトリウム	７５～２５０

【００３２】

本発明において、カロチノイドに富んだスピルリナ属藻を生成させるために使用される培養装置(system)は、スピルリナ属藻の成長や光合成効率を役立つ限り特に限定されるものではない。培養装置は、小さい規模では、管、瓶、フラスコ、カーボイ、バケット、タブ、タンク、種々のタイプの生物反応器、開放若しくは温室、又はガラスハウス（raceway ponds）からなることができ、５０ｍＬ（リットル）～１０００Ｌの大きさである。大規模では、培養装置は、開放若しくは閉鎖の円筒型容器、タンク、種々のタイプの生物反応器、開放若しくは温室、又はガラスハウスから選ばれる。上記した培養装置には、エアーレーション、撹拌機、光及び温度制御機器を備えることができる。

【００３３】

さらに、培地には、これらに限定されないが、リン酸水素ニカリウム、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、硫酸第一鉄、Mn、Zn、Co、Cu、Moなどの周期表のＡ５族元素、及び塩化ナトリウムなどから選ばれる栄養剤が供給される。これらの物質は、当業者に知られているように、スピルリナ属藻の成長にとって必要とされるものである。

【００３４】

本発明の好ましい態様によると、低炭素で中程度の窒素を含有する培地が表２にしめされる。

【００３５】

【表２】

Ｓ．Ｎｏ	塩	ｍｇ／リットル
１．	リン酸水素ニカリウム	５０～２００
２．	硝酸ナトリウム又は 硫酸アンモニウム	１７５～３５０ ６０～１２０
３．	硫酸カリウム	７５～５００
４．	硫酸マグネシウム	２００～３５０
５．	塩化カルシウム	２０～５０
６．	硫酸第一鉄	１０～２５
７．	重炭酸ナトリウム又は炭酸ナトリウム	１００～１５０
８．	Ａ５族元素（Mn、Zn、Co、Cu、Mo）	トレース
９．	塩化ナトリウム（粗）	６０～６０００

【００３６】

本発明における媒地は、新鮮な水又は塩水又はその組み合わせを使用することにより調製される。

本発明の一態様では、使用される炭素源は、重炭酸ナトリウム、又は炭酸ナトリウム、又はその組み合わせから選ばれる。

本発明の一態様では、使用される窒素源は、硝酸ナトリウム又は硫酸アンモニウムから選ばれる。しかし、藍藻類の成長を助ける他の窒素源も本発明の目的に使用できる。

【００３７】
本発明の一つの好ましい態様によると、高炭素で中程度の窒素含有の媒地が表３に示される。
【００３８】
【表３】

Ｓ．Ｎｏ	塩	ｍｇ／リットル
１．	リン酸水素ニカリウム	５０～２００
２．	硝酸ナトリウム又は 硫酸アンモニウム	１５～３０ ５～１５
３．	硫酸カリウム	７５～５００
４．	硫酸マグネシウム	２００～３５０
５．	塩化カルシウム	２０～５０
６．	硫酸第一鉄	１０～２５
７．	重炭酸ナトリウム又は炭酸ナトリウム	２００～１５００
８．	Ａ５族元素（Mn、Zn、Co、Cu、Mo）	トレース
９．	塩化ナトリウム（粗）	６００～６０００

【００３９】
全体にわたる培養プロセスの間、藻類の培養温度は、６～３６℃の範囲に保持される。好ましい態様では、該温度は、２６～３０℃の範囲に保持するのが好ましい。培養は、約１～１００Ｋｌｕｘ、好ましくは４０～６０Ｋｌｕｘの範囲の光照射される。培養のｐＨは、７．８～１０．８の範囲に維持されるが、CO_2でエアレーションをしながら、９．２～９．６の範囲に維持するのが好ましい。発生する酸素を開放し、適切な栄養の摂取を促進し、かつ培養に適切な光を与えるために、培養は、手動又は機械により５ｒｐｍ若しくはそれ以上、好ましくは１２～１６ｒｐｍで撹拌される。培養装置の深さは、５ｃｍ若しくはそれ以上、好ましくは１２～１６ｃｍに保つことにより、藻類バイオマスの成長に良い影響をもたらし、より高いカロチノイドの収率を得られる。
【００４０】
低炭素－中窒素の媒地、次いで、高炭素－低窒素の培地で培養し、更に、クエン酸塩及び酢酸塩で周期的に助成するという、上記したパターンを繰り返しは、バッチで、又は連続方式で実施される。
【００４１】
カロチノイドに富んだ藻類は、既存の方法により、好ましくは、１００～１５０メッシュのナイロン製スクリーン又は布を通過させることにより収集される。収集されたカロチノイドに富んだスピルリナ　バイオマスのｐＨは、９．６～１０．８である。カロチノイドに富んだ藻類のpHを低下させるために、バイオマスは、十分な水、好ましくは酸性水で洗浄し、付着した塩を洗い出し、ｐＨを中性か又は約７．０にさせられる。
【００４２】
最終的な用途により、藻類は、湿ったバイオマスを天日乾燥、スプレー乾燥、オーブン乾燥、ドラム乾燥、熱気乾燥又は凍結乾燥など適宜の手段により乾燥形態にせしめることができる。
【００４３】
本発明により得られるカロチノイドに富んだ藻類又はバイオマスは、湿った形態でも乾燥形態でも、好ましくは、光や空気や湿気を通さない適宜の包装材料中に真空又は窒素で吹き込んで包装し、約４～２８℃の温度で保存することができる。
【００４４】
本発明により得られる藻類は、１００ｇｍの乾燥セルのバイオマスあたり、少なくとも６００ｍｇの混合カロチノイドを含んでいる。さらに、混合カロチノイド量を増大させた本発明のカロチノイドに富んだ藻類は、炭水化物の含有量も１００ｇｍの乾燥セルのバイ

オマスあたり、４００００～６００００ｍｇの範囲という顕著に増大している。

【００４５】

本発明の方法を使用して培養された藻類は、天然に産出する藻類や従来の培養された藻類よりも２～３倍高い混合カロチノイドを有し、天然の混合カロチノイドの効率的な資源として利用される。クロロフィルやサイコシアニン量の低下は、良くない外観や感覚的特性を有する天然に産出する藻類や従来の培養された藍藻類に比べて、藻類の見た目の良好さや感覚的特性を改善する。さらに、この点は、食品や餌の補助剤、栄養補助食品、化粧品、及び他の商業的利用分野において藻類の利用範囲を広げることになる。

【００４６】

上記において、本発明は、種々の例示の態様について説明したが、本発明は、その技術思想から離れることなく、その範囲内で、多くの変形、改良、種々の態様の下位の態様、最適化、及びバリエーションが可能であることは、本発明の分野の当業者にとって明らかである。

【実施例】

【００４７】

実施例１：カロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ プラテンシス;

カロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナ　プラテンシスを得るために種菌（inoculum）調製液を使用した。ｐＨ９．５を有する０．７５～１．５％の寒天（agar）を含有する濃度５０％のザロウク（Zarrouk）培地中で１２：１２時間の光：闇の処方により、２～１０Kluxの光強度で温度２８～３２℃において、スピルリナ プラテンシス
トリコマス（trichomes） を培養することにより、無菌状態で種菌を調製した。

得られた種菌は、次いで、ｐＨ９～９．５を有する濃度５０％のザロウク培地中で１２時間の光と闇の相で、２～１０Kluxの光強度でさらに成長させた。その間、培養栄養分を均一に混合するため、培地をしばしば攪拌して、良好な光合成効率、及び種菌の十分なビルトアップを達成せしめた。

【００４８】

上記したスピルリナを本発明の種菌として使用した。２０リットルのスピルリナ　プラテンシス種菌を、１２～１６ｃｍの深さで２×２の池中において、以下に記載する成分を含む低炭素－中窒素の培地中で約５～７間培養した。

【００４９】

【表４】

Ｓ．Ｎｏ	無機塩	ｍｇ／リットル
１．	リン酸水素ニカリウム	５０
２．	クエン酸ナトリウム	３００
３．	硫酸カリウム	７５
４．	硫酸マグネシウム	２００
５．	塩化カルシウム	２０
６．	硫酸第一鉄	１０
７．	重炭酸ナトリウム	１５０
８．	Ａ５族元素（Mn、Zn、Co、Cu、Mo）	トレース
９．	塩化ナトリウム（粗）	６００

【００５０】

低炭素－中窒素の培地は、約２～３日の間隔を補充した。培養は、２６～３６℃の範囲の温度、１０～８０Kluxの光強度、及び攪拌下に、光相の間が約１～２時間の規則正しい間隔で行った。５～７日間の培養の終わりに、スピルリナ　トリコメスは、目に見える粘性分泌をもつ細長い半浮揚性に見え、また、黄色味をおびたくすんだ茶色がかった緑であった。

【００５１】

次いで、炭素－窒素の濃度を増加させた以下の成分を含む高炭素－低窒素培地中で、上

記で成長させたスピルリナ　プラテンシスを培養した。

【００５２】

【表５】

Ｓ．Ｎｏ	塩	ｍｇ／リットル
１．	リン酸水素ニカリウム	５０
２．	硝酸ナトリウム	１５
３．	硫酸カリウム	７５
４．	硫酸マグネシウム	２００
５．	塩化カルシウム	２０
６．	硫酸第一鉄	１０
７．	重炭酸ナトリウム	１５００
８．	Ａ５族元素（Mn、Zn、Co、Cu、Mo）	トレース
９．	塩化ナトリウム（粗）	６００

【００５３】

培地の温度を１６～３６℃の範囲に保持した。培養は、１～１００Kluxの光強度で成長させた。高炭素－低窒素培地中で成長させた後、スピルリナ　プラテンシス　トリコメスは、目に見える粘性の分泌性で長くふわふわ性のないように見え、かつ金黄色であった。

【００５４】

上記のスピルリナ培養物は、さらに、下記するクエン酸塩及び酢酸塩により周期的に助成した。

【００５５】

【表６】

Ｓ．Ｎｏ	塩	ｍｇ／リットル
１．	クエン酸第二鉄	０．５
２．	酢酸ナトリウム	１５０

【００５６】

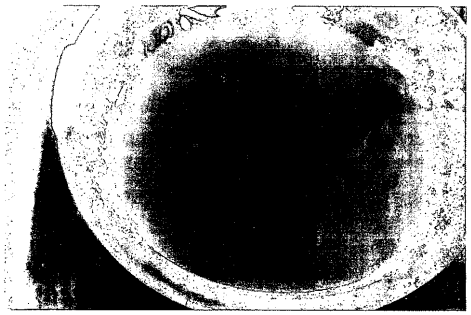
培養物のｐＨを、バブルの空気中に５％のレベルでCO_2を通過させることにより調整した。温度を１６～３６℃の範囲に保持した。光強度は１０～８０Klux であった。藻の培養物はしばしば攪拌した。スピルリナ　トリコメスは、粘液分泌性で長くふわふわ性のないように見えた。類の培養物は濃い金黄色に達した。

【００５７】

得られた金黄色のスピルリナの培養物は、約０．７５ｇ／Ｌであった。このスピルリナは、１００ｇｍの乾燥セルのバイオマスあたり８８０ｍｇの天然の混合カロチノイドを含有していた。

混合カロチノイドの増大に加えて、上記カロチノイドに富んだ金黄色のスピルリナは、１００ｇｍの乾燥セルのバイオマスあたり４３６００ｍｇの炭水化物の顕著な増大も示した。

【図１】



フロントページの続き

(72)発明者　ナガナス、バブラオ　クムブル
インド国　マハラシトラ、ピン　４１３　５２０、ディストリクト　ラテル、タルカ　アウサ、ピー．オー　アンド　ヴィルラゲーベルクンド

審査官　三原　健治

(56)参考文献　Tibtech,Vol.18(2000)p.160-167
J.Ferment.Bioeng.,Vol.74,No.6(1992)p.403-405
J.Biosci.Bioeng.,Vol.101,No.2(2006)p.87-96
Acta Physiol.Plant.,Vol.24,No.3(2002)p.323-329

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　　１／００－１／３８
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）