

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6563393号
(P6563393)

(45) 発行日 令和1年8月21日(2019.8.21)

(24) 登録日 令和1年8月2日(2019.8.2)

(51) Int.Cl.	F 1
C 1 2 N 1/12 (2006.01)	C 1 2 N 1/12 A
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P 7/64
C 1 1 B 1/10 (2006.01)	C 1 1 B 1/10
C 1 1 B 3/12 (2006.01)	C 1 1 B 3/12
C 1 1 C 3/10 (2006.01)	C 1 1 C 3/10

請求項の数 36 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2016-531575 (P2016-531575)	(73) 特許権者	517443842
(86) (22) 出願日	平成25年11月21日(2013.11.21)		フェルマンタル
(65) 公表番号	特表2016-532444 (P2016-532444A)		フランス国 3 3 5 0 0 リブルヌ リュ
(43) 公表日	平成28年10月20日(2016.10.20)		リヴィエル 4
(86) 国際出願番号	PCT/NZ2013/000213	(74) 代理人	100106091
(87) 国際公開番号	W02015/016720		弁理士 松村 直都
(87) 国際公開日	平成27年2月5日(2015.2.5)	(74) 代理人	100060874
審査請求日	平成28年11月1日(2016.11.1)		弁理士 岸本 瑛之助
(31) 優先権主張番号	613593	(74) 代理人	100079038
(32) 優先日	平成25年8月1日(2013.8.1)		弁理士 渡邊 彰
(33) 優先権主張国・地域又は機関	ニュージーランド(NZ)	(72) 発明者	ダインズ マーク ハンフリー
			ニュージーランド国 オークランド テ
			アタル ペニンスラ レワレワ ロード
			2 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】珪藻バイオマスの生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高度不飽和脂肪酸(HUFA)生産性の珪藻バイオマスの生産方法であって、前記珪藻はHUFA生産性のニッチア・ラエビス(*Nitzschia laevis*)種のいずれか1つから選択され、前記方法は、珪藻を培地にて従属栄養的に連続培養して、24時間毎に総培養量の少なくとも50%を除去して新鮮培地と置換して、バイオマスを少なくとも20gの乾燥重量/L/日の体積生産速度で生産する複数工程からなり、前記培地が、珪藻を対数期増殖に維持するための必須栄養素を供給するよう設計され、かつ、ケイ酸塩源が培養過程の間、連続的に加えられる、方法。

【請求項 2】

前記HUFAがEPA、DHAおよびARAのいずれか1つ以上から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記HUFAがオメガ-3脂肪酸である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記珪藻バイオマスがバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%の総HUFAレベルを有する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記珪藻バイオマスがバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも3%の総HUFAレベルを有する、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

前記珪藻バイオマスがEPAとDHAの混合物をバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%のレベルで含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記珪藻バイオマスがEPAをバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%のレベルで含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記バイオマスの体積生産速度が少なくとも25gの乾燥重量/L/日である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記バイオマスの平均体積生産速度が、少なくとも72時間の期間にわたって少なくとも20gの乾燥重量/L/日である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

前記バイオマスの平均体積生産速度が、少なくとも1カ月の期間にわたって少なくとも20gの乾燥重量/L/日である、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

前記バイオマスの平均体積生産速度が、少なくとも2カ月の期間にわたって少なくとも20gの乾燥重量/L/日である、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

前記方法が培養される珪藻類の灌流培養を含まない、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

培養pHを7.0から9.0の範囲内に維持する、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

培養温度を15から30℃に維持する、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 15】

攪拌および/または背圧を提供して、溶存酸素レベルを空気飽和度10%以上に維持する、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 16】

前記方法が培養量の少なくとも50%を新鮮培地と24時間毎に置換することを含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 17】

前記方法が培養量の少なくとも10%を新鮮培地と4時間毎に置換することを含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

前記方法が培養量の少なくとも5%を新鮮培地と2時間毎に置換することを含む、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 19】

前記方法が培養量の少なくとも0.2%を新鮮培地と5分毎に置換することを含む、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 20】

前記方法が少なくとも500リットルの培地を含む、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】

前記方法がさらにバイオマスの培養物からの分離、およびバイオマス濃縮物生産のためのバイオマスの濃縮を含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

高度不飽和脂肪酸(HUFA)生産性の珪藻バイオマスの生産方法であって、前記珪藻はHUFA生産性のニッチア・ラエビス(Nitzschia laevis)種のいずれか1つから選択さ

10

20

30

40

50

れ、前記方法は、

a) 珪藻を培地にて培養して活性培養物を従属栄養的に生産し、前記活性培養物における前記バイオマスの密度が少なくとも20 g/Lである、工程と、

b) 該活性培養物の一部を除去してバイオマスを回収する工程と、

c) 工程(b)において除去した活性培養物の一部の量と実質的に相当量の新鮮培地を、残りの活性培養物に加え、珪藻をさらに培養する工程と、および

d)、24時間毎に総培養量の少なくとも50%を除去して新鮮培地と置換することによって、工程(b)および工程(c)を必要なだけ繰り返して、活性培養物1リットルにつき少なくとも20 gの乾燥菌体重量のバイオマスを24時間の期間内に回収する工程とからなり、

前記培地が、珪藻を対数期増殖に維持するための必須栄養素を供給するよう設計され、かつ、ケイ酸塩源が培養過程の間、連続的に加えられる、方法。

【請求項23】

前記HUF AがEPA、DHAおよびARAのいずれか1以上から選択される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記HUF Aがオメガ-3脂肪酸である、請求項22に記載の方法。

【請求項25】

前記珪藻バイオマスがバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%の総HUF Aレベルを有する、請求項22~24に記載の方法。

【請求項26】

前記珪藻微生物バイオマスがEPAをバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%のレベルで含む、請求項22~25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

工程(b)および工程(c)を繰り返して、活性培養物1リットルにつき少なくとも25 gの乾燥菌体重量のバイオマスを24時間の期間内に回収する、請求項22~26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

工程(b)および工程(c)を繰り返して、活性培養物1リットルにつき少なくとも30 gの乾燥菌体重量のバイオマスを24時間の期間内に回収する、請求項22~27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

1リットルの活性培養物につき、少なくとも20 gの乾燥菌体重量のバイオマスを各日、少なくとも7日間連続して回収する、請求項22~28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

工程(b)および(c)を少なくとも5回繰り返す、請求項22~29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

工程(b)および(c)を順次行う、請求項22~30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

工程(b)および(c)を同時に行う、請求項22~31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

高度不飽和脂肪酸(HUF A)またはそのエステルを生成する方法であって、請求項1~32のいずれか1項に記載の方法によって生産されるバイオマスから前記HUF Aまたはそのエステルを抽出する工程を含む、方法。

【請求項34】

前記HUF Aがその天然型である、トリグリセリド、リン脂質、または糖脂質である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

10

20

30

40

50

抽出したその天然型であるH U F Aは次いで、エタノールの存在下にエステル化されてH U F Aの脂肪酸エチルエステル（F A E E）を形成する、請求項3 3または3 4に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記H U F AのF A E Eをクロマトグラフィー、溶媒分配、短行程蒸留、分子蒸留、および高速液体クロマトグラフィー（H P L C）のいずれか1つかまたはその組合せによって精製する、請求項3 5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

本発明は、珪藻バイオマスの生産方法に関する。より詳細には、本発明は連続培養を用いて珪藻バイオマスを生産するための方法に関する。好ましい1実施態様において、このバイオマスは高度不飽和脂肪酸からなる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

珪藻類は、微細藻類の広範囲に及ぶ1群であり、海洋、淡水および土壌に見出すことができる。珪藻培養（自然にかまたは商業的に生産）によるバイオマスは、脂質、脂肪酸（特に、高度不飽和脂肪酸—H U F A）、アミノ酸、色素、および薬理学的な目的の複合天然物を含む、商業目的の多くの産物を含む。バイオマス自体はさらに食物に関する用途（特に、水産養殖）ならびに水産養殖排水中のリンや窒素、または重金属で汚染された水の処理（バイオレメディエーション（微生物を利用した環境浄化））用途を有する。開発中のさらなる用途としては、ケイ（珪）殻（細胞壁または珪藻の外層）由来のシリコンのナノテクノロジーにおける使用があげられる。しかしながら、珪藻類からの産物の商業的な妥当性は、その生産コスト次第である。

20

【0 0 0 3】

工業的発酵は、資本的設備、栄養素およびエネルギーの面から費用がかかるプロセスであり、通常は比較的高価な産物が大量に生産される場合にのみ妥当とされる。

【0 0 0 4】

異なるモードの培養または発酵が可能である。最もシンプルなモードの発酵でかつもっぱら独占的に工業的プロセスで使用されているのは、バッチ発酵である。バッチ発酵においては、細胞を栄養培地に接種、一定期間増殖させ、次いで回収する。フェドバッチ発酵は、バッチ発酵と同様であるが、濃縮栄養素を成長期の間、培養物に供給する点が異なる。連続発酵では、バイオマスおよび栄養液からなる培養物を発酵容器から連続回収し、新鮮栄養液と置換する。連続発酵における回収率は、培養物中の細胞密度が一定であるよう選択する。半連続発酵と連続発酵は、回収が連続ではなく定期的に行われることを除いて、同様である。灌流発酵では、産物を生産する細胞を培養物中に保持する一方、目的産物を含む培地を連続回収する。

30

【0 0 0 5】

細胞内で目的産物を生産する場合、細胞は通常、可能な限り最も高いバイオマス密度まで培養し、最も有効な体積生産性（すなわち、単位時間当たりの発酵培地体積につき生産される産物量）を得て、それによって目的産物の生産コストを最小にする。しかし、高バイオマス密度では、酸素、栄養素、また該当する場合は光の十分な供給に困難が生じ得る。例えば、バッチまたはフェドバッチ発酵においては、微生物培養物は通常、回収の時点で、定常期にある。通常こうしたタイプの発酵における培地または供給方式では、多くの場合二次代謝産物（しばしば商業目的産物）の形成を引き起こす手段として、1以上の栄養素を厳格に制限する培養を行う。

40

【0 0 0 6】

光合成生物（微細藻類等）は、連続または半連続培養条件下で光栄養的に生育できることが知られていた。こうした条件下で、光は、低減した炭素よりむしろエネルギー源とし

50

て用いられる。多くの著者によって (Richardsonら (1969) *Applied Microbiology* 18: 245-250; Droop (1974) *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 54: 825-855; Laing (1991) *Lab. Leaflet*, MAFF Direct, Fish. Res.

Lowestoft (67) 31 pp等) 連続または半連続光栄養培養 (タービドスタット) において藻類を生育する手段が開示されてきた。このような培養において、細胞は通常、使用可能な光量を制限されるので培養密度が低くなり、したがって体積生産性が非常に低くなる。光バイオリアクター技術における進歩は、光学的平面を狭くして培養物がより高いバイオマス濃度に到達できるようにすることで、光が制限される問題のある程度克服してきた (Zouら (2000) *Eur. J. Phycol.* 35: 127-133)

。しかし、これには、培養の表面積対体積比を増すことが必要で、リアクター構造の資本費用を著しく増大させる。さらに、こうした濃度での生育は遅い (光が制限される) ため、体積生産性が再び低くなる。光バイオリアクターシステムにはさらに、工業的需要に応えるのに十分に大きい体積に構築するには不経済であるというデメリットがあり、最も商業的にスケーラブルな光バイオリアクターデザインをもってしても発酵槽で可能なバイオマス密度のたった10分の1を達成するにすぎない。したがって光バイオリアクターは、通常、光合成生物の生育研究用ラボラトリツールに過ぎないと考えられている。

【0007】

高度不飽和脂肪酸 (HUF A) を含む医薬品、医用食品および栄養補助食品は、現在、数十万の患者の治療に使われており、さらに間もなく何百万もの患者の治療に使われるようになるだろう。エイコサペンタエン酸 (EPA) は、原体における活性代謝物として用いられるHUF Aである。ドコサヘキサエン酸 (DHA) もまた医薬品、医用食品および栄養補助食品産業における使用に高い可能性を有する。こうした使用の一例として、循環器疾患の処置または予防的処置があげられる。

【0008】

HUF Aは、新規経済的に化学合成できないので、生物源から抽出しなくてはならない。現在、製薬業者は、原体の生産用HUF A源として魚に依存する。この目的で魚油にもっぱら依存することは、製薬業者および製薬会社に多くの深刻なリスクをもたらし、こうした投薬を受ける患者にもリスクをもたらす可能性がある。このリスクには、これらに限るものではないが、製薬会社にとって財政的に壊滅的であり得る、供給不足の可能性と関連するリスク、ならびにその健康のために投薬に頼る患者に悪影響を与えるリスクなどが含まれる。魚油自体は、その組成がいろいろな魚種間で劇的に異なるため、特定の標準物質ではない。1魚種内でさえ、その組成は場所によって多様であり、1つの場所でも1年の中でも時期によって異なる。出発物質におけるこのような多様性は、最終医薬製品の製造を非常に困難にする。さらに、魚油に現れるポリ塩化ビフェニル (PCB)、ダイオキシン、およびメチル水銀などの毒性汚染物質に対する懸念はますます高まっている。天然魚資源および水産養殖の長期間持続可能性についての広範囲の懸念もある。

【0009】

したがって、魚油に代わる、安定して、信頼性があり、そのため商業用および持続可能な生産方法に適用できるHUF Aの代替源が切実に必要とされている。工業的発酵は、HUF Aの商業的生産のための代替手段として考えられる。しかし、工業的発酵を商業的規模で用いるのには多くの問題がある。

【0010】

数々の著者が脂質生産のための微生物の連続培養を開示してきた (例えば、HallおよびRatlidge (1977) *App. Env. Microbiol.* 33: 577-584; Gillら (1977) *App. Env. Microbiol.* 33: 231-239; Ykema et al. (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 211-218; Brown et al. (1989) *J. Ferment. Bioeng.* 68: 344-352; KendrickおよびRatlidge (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 18-22;

10

20

30

40

50

PapanikolaouおよびAggelis (2002) Bioresource Technology 82:43-49)。うちいくつかは確かに高容量バイオマス生産性を開示しているが、開示生物で高度不飽和脂肪酸の生産するものはない(HUFA; 20以上の炭素および4以上の二重結合を有する脂肪酸)。

【0011】

他のタイプの生物、とりわけCryptothecodinium属の微細藻類およびヤブレッツボカビ科の海生菌(Schizochytrium種、Thraustochytrium種およびUlkenia種を含む)はおそらくより独特にHUFA、特にオメガ-3 DHAの生産に適合している。これらの生物が、窒素を制限する条件下でDHAを最も多量に生産することから、工業的方法において用いられるフェドバッチ培養によく適合する一方で、著者数名はDHA生産のためこれらの生物種の連続従属栄養培養を開示してきた。しかし、これら連続培養のほとんどは、実験室で行われただけで、かつその生産率は低く、商業的に実行可能なものではない。

10

【0012】

GanuzatとIzquierdo ((2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:985-990)は、DHA生産のためのSchizochytrium G13/2Sの連続培養を開示している。1時間につき0.04の希釈でそのバイオマス生産性は最高となり、7.7 g/Lの乾燥重量でわずか7.4 g/日の体積生産性となる。

20

【0013】

Ethierら((2011) Bioresource Technology 102:88-93)はDHA生産のためのSchizochytrium limacinumの連続培養を開示している。その最高バイオマス生産性はたった3.88 g/U/日である。

【0014】

PleisnerとErrikson (<http://www.marbio.sdu.dk/uploads/MarBioShell/Pleissner%20-%20VejlennutheetalPoster.pdf> accessed 8 Feb 2013)はDHA生産のためのCryptothecodinium cohniiの連続培養を開示するが、わずか12 g/L/日のバイオマス生産性を達成するにすぎない。さらにこの体積生産性でのバイオマスのHUFA含有量はたった1.67%であり、最終抽出および処理に問題がある。

30

【0015】

対照的に、WumpelmannはWO2005/021735にてDHA生産のためのSchizochytrium limnaceumの高培養密度での連続培養、これによる100 g/L/日を超えるバイオマス生産性の達成を開示している。著者は、この生物からDHAを生産するのに特に適した方法を開示し、例えば、溶存酸素分圧は低レベルに維持すべきであると示しているが、この条件が他のタイプの微生物に用いることさえできるかどうか、またはもしそうならば、全く異なる環境および栄養要求を有するその他生物についてそうした種類の生産性を可能にするにはどのようにその条件を多様化すべきなのかについての十分なガイダンスは提供していない。この著者が開示する方法はまた、工業的に適切な規模での生産にはあまり適合していない。実際、開示の実施例は、実験室内で2 Lの発酵槽中で行うのみで、窒素源としての培地構成成分(カザアミノ酸等)のうち1成分を用いるコストだけでも、100 L以上の規模では法外な額になってしまう。

40

【0016】

その他のタイプの生物、特に珪藻類は、オメガ-3 EPAの生産、とりわけ比較的低いDHAの存在量でEPAを生産するのに有利である場合に、より適合する。

【0017】

WenとChenは、オメガ-3脂肪酸EPAの生産のための珪藻Nitzschia laevisの従属栄養培養を開示している。しかし、真の連続培養におけるその最大バ

50

イオマス生産性はわずか 2.8 g/L/日 ((2002) *Biotechnol. Prog.* 18:21-28)であり、一方、これに灌流を加えると(細胞と培地を分離し、細胞を発酵槽に戻して追加の新鮮培地を加える) 6.75 g/L/日 に上がった((2001) *Appl Microbiol Biotechnol* 57:316-322)。
【0018】

Griffithsら(WO2011/155852)は灌流支援連続培養と真の連続培養の両方での珪藻 *Nitzschia laevis* の従属栄養培養を開示した。著者は培養物の体積生産性を開示しておらず、培養乾燥重量は約 10 g/L 以下、また灌流支援連続培養において培養物から取り除いた総量は1日につき1発酵槽容量であった。もし容量全てが回収物で灌流ではないとすると、最大バイオマス生産性はWenとChenが記載するより著しく高くなるが、それでもわずか約 10 g/L/日 であろう。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明の第1の局面によれば、珪藻バイオマスの生産方法が提供され、該方法は、珪藻を培地にて連続培養して、バイオマスを少なくとも 20 g の乾燥重量/L/日の体積生産速度で生産する工程からなり、培地が、珪藻を対数期増殖に維持するための必須栄養素を供給するよう設計されている。

【0020】

好ましくは、該珪藻が少なくとも1つの高度不飽和脂肪酸(HUFA)を生産する。

20

【0021】

好ましくは、該HUFAがEPA、DHAおよびARAのいずれか1以上から選択される。

【0022】

好ましくは、該HUFAがオメガ-3脂肪酸である。

【0023】

好ましくは、該珪藻バイオマスがバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%の総HUFAレベルを有する。好ましくは、該珪藻バイオマスがバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも3%の総HUFAレベルを有する。

【0024】

好ましくは、該珪藻バイオマスがEPAとDHAの混合物をバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%のレベルで含む。

30

【0025】

好ましくは、該珪藻バイオマスが少なくとも1つのHUFAをバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%のレベルで含む。

【0026】

好ましくは、該珪藻バイオマスがEPAをバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%のレベルで含む。

【0027】

好ましくは、該バイオマスの体積生産速度が少なくとも 25 g の乾燥重量/L/日である。好ましくは、該バイオマスの体積生産速度が少なくとも 30 g の乾燥重量/L/日である。

40

【0028】

好ましくは、該バイオマスの平均体積生産速度が、少なくとも72時間の期間にわたって少なくとも 20 g の乾燥重量/L/日である。好ましくは、該バイオマスの平均体積生産速度が、少なくとも1週間の期間にわたって少なくとも 20 g の乾燥重量/L/日である。好ましくは、該バイオマスの平均体積生産速度が、少なくとも1カ月の期間にわたって少なくとも 20 g の乾燥重量/L/日である。好ましくは、該バイオマスの平均体積生産速度が、少なくとも2カ月の期間にわたって少なくとも 20 g の乾燥重量/L/日である。

50

【0029】

好ましくは、該方法が、培養される珪藻類の灌流培養を含まない。

【0030】

好ましくは、該珪藻がニッチア (*Nitzschia*) 種である。好ましくは、該珪藻が *Nitzschia laevis* である。好ましくは、該珪藻が *Nitzschia laevis* 株 In1CS20 である。

【0031】

好ましくは、該珪藻がキクロテラ (*Cyclotella*) 種である。

【0032】

好ましくは、該珪藻がフェオダクチラム (*Phaeodactylum*) 種である。

10

【0033】

好ましくは、該珪藻は従属栄養的に培養される。

【0034】

好ましくは、該培地が低減した炭素源からなる。

【0035】

好ましくは、該低減した炭素源が、グルコース、フルクトース、高フルクトースコーンシロップ、単糖類、二糖類、アルコール類、酢酸またはその塩の、いずれか1以上から選択される。

【0036】

好ましくは、該ケイ酸塩源を培養過程の間、連続的に加える。

20

【0037】

好ましくは、該ケイ酸塩源がアルカリ金属ケイ酸塩である。

【0038】

好ましくは、該アルカリ金属ケイ酸塩がケイ酸ナトリウムまたはケイ酸カリウムである。

【0039】

好ましくは、培養において生産されたバイオマスの乾燥菌体重量グラム毎に20から120mgのメタケイ酸ナトリウム五水和物のレベルでケイ酸ナトリウムを連続的に加える。

【0040】

30

好ましくは、生産されたバイオマスの乾燥菌体重量1グラムにつき40から100mgのメタケイ酸ナトリウム五水和物で、該ケイ酸塩を加える。好ましくは、生産されたバイオマスの乾燥菌体重量1グラムにつき75mgのメタケイ酸ナトリウム五水和物で、該ケイ酸塩を加える。

【0041】

好ましくは、該培養pHを7.0から9.0の範囲内に維持する。好ましくは、該培養pHを7.5から8.5の範囲内に維持する。好ましくは、該培養pHを8.0から8.5の範囲内に維持する。

【0042】

好ましくは、該培養温度を15から30℃に維持する。好ましくは、該培養温度を20から25℃に維持する。

40

【0043】

好ましくは、攪拌および／または背圧を提供して空気飽和度10%以上の溶存酸素レベルを維持する。

【0044】

好ましくは、該溶存酸素レベルを空気飽和度20%以上に維持する。好ましくは、該溶存酸素レベルを空気飽和度30%以上に維持する。好ましくは、該溶存酸素レベルを空気飽和度40%以上に維持する。

【0045】

好ましくは、該方法は、培養量の少なくとも50%を新鮮培地と24時間毎に置換する

50

ことを含む。

【0046】

好ましくは、該方法は、培養量の少なくとも10%を新鮮培地と4時間毎に置換することを含む。

【0047】

好ましくは、該方法は、培養量の少なくとも5%を新鮮培地と2時間毎に置換することを含む。

【0048】

好ましくは、該方法は、培養量の少なくとも0.2%を新鮮培地と5分毎に置換することを含む。

10

【0049】

好ましくは、該方法は少なくとも500リットルの培地を含む。

【0050】

好ましくは、該方法はさらにバイオマスの培養物からの分離、およびバイオマス濃縮物生産のためのバイオマスの濃縮を含む。

【0051】

好ましくは、該バイオマスを遠心分離、凝集、ろ過、または浮上分離のいずれか1以上によって濃縮する。

【0052】

好ましくは、該バイオマスを連続遠心分離によって濃縮する。

20

【0053】

好ましくは、該方法はバイオマス濃縮物の乾燥工程をさらに含む。

【0054】

好ましくは、該バイオマス濃縮物を噴霧乾燥、凍結乾燥、トンネル乾燥、真空乾燥、ドラム乾燥のいずれか1以上によって乾燥する。

【0055】

本発明の第2の局面によれば、珪藻バイオマスの生産方法が提供され、該方法は、

- a. 珪藻を培地にて培養して活性培養物を生産、
 - b. 該活性培養物の一部を除去してバイオマスを回収、
 - c. 工程(b)において除去した活性培養物の一部の量と実質的に相当量の新鮮培地を、残りの活性培養物に加え、珪藻をさらに培養、および
 - d. 工程(b)および工程(c)を必要なだけ繰り返して、活性培養物1リットルにつき少なくとも20gの乾燥菌体重量のバイオマスを24時間の期間内に回収、することからなり、
- 培地が、珪藻を対数期増殖に維持するための必須栄養素を供給するように設計されている方法、である。

30

【0056】

好ましくは、工程(c)における新鮮培地の添加を、一度に行う。

【0057】

あるいは、工程(c)における新鮮培地の添加を複数回に分けて行い、その全量が工程(b)において除去された一部の量と実質的に相当量である。

40

【0058】

好ましくは、該珪藻が少なくとも1つの高度不飽和脂肪酸(HUFA)を生産する。

【0059】

好ましくは、該HUFAがEPA、DHAおよびARAのいずれか1以上から選択される。

【0060】

好ましくは、該HUFAがオメガ-3脂肪酸である。

【0061】

好ましくは、該珪藻バイオマスがバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%の総HU

50

F A レベルを有する。好ましくは、該珪藻バイオマスがバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも 3 % の総 H U F A レベルを有する。

【0062】

好ましくは、該珪藻バイオマスが E P A と D H A の混合物をバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも 2 % のレベルで含む。

【0063】

好ましくは、該珪藻バイオマスが少なくとも 1 つの H U F A をバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも 2 % のレベルで含む。

【0064】

好ましくは、該珪藻バイオマスが E P A をバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも 2 % のレベルで含む。 10

【0065】

好ましくは、工程 (b) および工程 (c) を繰り返して、1 リットルの活性培養物につき、少なくとも 25 g の乾燥菌体重量のバイオマスを 24 時間の期間内に回収する。好ましくは、工程 (b) および工程 (c) を繰り返して、1 リットルの活性培養物につき、少なくとも 30 g の乾燥菌体重量のバイオマスを 24 時間の期間内に回収する。

【0066】

好ましくは、1 リットルの活性培養物につき、少なくとも 20 g の乾燥菌体重量のバイオマスを各日、少なくとも 3 日間連続して回収する。好ましくは、1 リットルの活性培養物につき、少なくとも 20 g の乾燥菌体重量のバイオマスを各日、少なくとも 7 日間連続して回収する。好ましくは、1 リットルの活性培養物につき、少なくとも 20 g の乾燥菌体重量のバイオマスを各日、少なくとも 30 日間連続して回収する。好ましくは、1 リットルの活性培養物につき、少なくとも 20 g の乾燥菌体重量のバイオマスを各日、少なくとも 60 日間連続して回収する。 20

【0067】

好ましくは、工程 (b) および (c) を少なくとも 5 回繰り返す。好ましくは、工程 (b) および (c) を少なくとも 20 回繰り返す。好ましくは、工程 (b) および (c) を少なくとも 100 回繰り返す。

【0068】

好ましくは、該活性培養物におけるバイオマスの密度が少なくとも 20 g / L である。好ましくは、該活性培養物におけるバイオマスの密度が少なくとも 30 g / L である。 30

【0069】

好ましくは、該方法が、活性培養物の灌流を含まない。

【0070】

好ましくは、該珪藻がニッチア (*Nitzschia*) 種である。好ましくは、該珪藻が *Nitzschia laevis* である。好ましくは、該珪藻が *Nitzschia laevis* 株 In1CS20 である。

【0071】

好ましくは、該珪藻が *Cyclotella* 種である。

【0072】

好ましくは、該珪藻がフェオダクチラム (*Phaeodactylum*) 種である。 40

【0073】

好ましくは、該珪藻が従属栄養的に培養される。

【0074】

好ましくは、該培地が低減した炭素源からなる。

【0075】

好ましくは、該低減した炭素源が、グルコース、フルクトース、高フルクトースコーンシロップ、単糖類、二糖類、アルコール類、酢酸またはその塩の、いずれか 1 以上から選択される。

【0076】

好ましくは、ケイ酸塩源を培養過程の間、連続的に加える。

【0077】

好ましくは、該ケイ酸塩源がアルカリ金属ケイ酸塩である。好ましくは、該アルカリ金属ケイ酸塩がケイ酸ナトリウムまたはケイ酸カリウムである。

【0078】

好ましくは、培養において生産されたバイオマスの乾燥菌体重量グラム毎に20から120mgのメタケイ酸ナトリウム五水和物のレベルで該ケイ酸ナトリウムを連続的に加える。

【0079】

好ましくは、生産されたバイオマスの乾燥菌体重量1グラムにつき40から100mgのメタケイ酸ナトリウム五水和物で、該ケイ酸塩を加える。好ましくは、生産されたバイオマスの乾燥菌体重量1グラムにつき75mgのメタケイ酸ナトリウム五水和物で、該ケイ酸塩を加える。

10

【0080】

好ましくは、該培養pHを7.0から9.0の範囲内に維持する。さらに好ましくは、該培養pHを7.5から8.5の範囲内に維持する。最も好ましくは、培養pHを8.0から8.5の範囲内に維持する。

【0081】

好ましくは、該培養温度を15から30℃に維持する。さらに好ましくは、該培養温度を20から25℃に維持する。

20

【0082】

好ましくは、攪拌および／または背圧を提供して、溶存酸素レベルを空気飽和度10%以上に維持する。

【0083】

好ましくは、該溶存酸素レベルを空気飽和度20%以上に維持する。好ましくは、該溶存酸素レベルを空気飽和度30%以上に維持する。好ましくは、該溶存酸素レベルを空気飽和度40%以上に維持する。

【0084】

好ましくは、工程(b)および(c)は、順次行う。

【0085】

あるいは、工程(b)および(c)は、同時に行う。

30

【0086】

好ましくは、該方法は活性培養物の一部を除去する工程(b)および新鮮培地を加える工程(c)を含み、該活性培養物量の少なくとも50%を24時間毎に置換する。

【0087】

好ましくは、該方法は活性培養物の一部を除去する工程(b)および新鮮培地を加える工程(c)を含み、該活性培養物量の少なくとも10%を4時間毎に置換する。

【0088】

好ましくは、該方法は活性培養物の一部を除去する工程(b)および新鮮培地を加える工程(c)を含み、該活性培養物量の少なくとも5%を2時間毎に置換する。

40

【0089】

好ましくは、該方法は活性培養物の一部を除去する工程(b)および新鮮培地を5分毎に該活性培養物量の少なくとも0.2%の速度で連続的に加える工程(c)を含む。

【0090】

好ましくは、工程(a)は少なくとも500リットルの活性培養物を含む。

【0091】

好ましくは、該方法はさらに工程(b)において除去した活性培養物の一部を濃縮して、バイオマス濃縮物を生産することを含む。

【0092】

好ましくは、該バイオマスを遠心分離、凝集、ろ過、または浮上分離のいずれか1以上

50

によって濃縮する。

【0093】

好ましくは、該バイオマスを連続遠心分離によって濃縮する。

【0094】

好ましくは、該方法はバイオマス濃縮物の乾燥工程をさらに含む。

【0095】

好ましくは、該バイオマス濃縮物を、噴霧乾燥、凍結乾燥、トンネル乾燥、真空乾燥、ドラム乾燥のいずれか1以上によって乾燥させる。

【0096】

あるいは、工程(b)において除去した活性培養物の一部は、噴霧乾燥、凍結乾燥、トンネル乾燥、真空乾燥、ドラム乾燥のいずれか1以上によって直接乾燥させてもよい。

10

【0097】

本発明の第3の局面によれば、連続培養において活性培養物が供給され、該活性培養物は培地および珪藻を少なくとも20 g/Lの珪藻バイオマス密度で含む。

【0098】

好ましくは、該バイオマス密度は少なくとも30 g/Lである。

【0099】

好ましくは、該珪藻が少なくとも1つの高度不飽和脂肪酸(HUFA)を生産する。

【0100】

好ましくは、該HUFAがEPA、DHAおよびARAのいずれか1以上から選択される。

20

【0101】

好ましくは、該HUFAがオメガ-3脂肪酸である。

【0102】

好ましくは、該珪藻バイオマスがバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%の総HUFAレベルを有する。好ましくは、該珪藻バイオマスがバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも3%の総HUFAレベルを有する。

【0103】

好ましくは、該珪藻バイオマスがEPAとDHAの混合物をバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%のレベルで含む。

30

【0104】

好ましくは、該珪藻バイオマスが少なくとも1つのHUFAをバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%のレベルで含む。

【0105】

好ましくは、該珪藻バイオマスがEPAをバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%のレベルで含む。

【0106】

好ましくは、該珪藻がニッチア(*Nitzschia*)種、キクロテラ(*Cyclotella*)種、およびフェオダクチラム(*Phaeodactylum*)種から選択される。

40

【0107】

好ましくは、該珪藻が*Nitzschia laevis*である。好ましくは、該珪藻が*Nitzschia laevis*株In1CS20である。

【0108】

本発明の第4の局面によれば、本発明の第1または第2局面の方法によって生産された珪藻バイオマスが提供される。

【0109】

本発明の第5の局面によれば、本発明の第1または第2局面の方法によって生産されたバイオマスから得られる高度不飽和脂肪酸またはそのエステルの組成物が提供される。

【0110】

50

本発明の第6の局面によれば、高度不飽和脂肪酸（H U F A）またはそのエステル組成物を生産する方法が提供され、該方法はH U F Aまたはそのエステルを本発明の第1または第2局面の方法によって生産されたバイオマスから抽出する工程を含む。

【0111】

好ましくは、該H U F Aがその天然型である、トリグリセリド、リン脂質、または糖脂質である。

【0112】

好ましくは、該H U F Aをその天然型にてバイオマスから極性溶媒を用いて抽出する。

【0113】

あるいは、該H U F Aをその天然型にてバイオマスから非極性溶媒を用いて抽出する。

10

【0114】

あるいは、該H U F Aをその天然型にてバイオマスから極性および非極性溶媒の組合せからなる溶媒組成物を用いて抽出する。

【0115】

好ましくは、該極性溶媒はアルコール、アセトン、および極性超臨界流体のいずれか1以上から選択する。

【0116】

好ましくは、該非極性溶媒はヘキサン、イソヘキサン、トリグリセリド、および非極性超臨界流体のいずれか1以上から選択する。

【0117】

20

好ましくは、抽出したその天然型であるH U F Aは次いで、エタノールの存在下にエステル化されてH U F Aの脂肪酸エチルエステル（F A E E）を形成する。

【0118】

好ましくは、該H U F AのF A E Eをクロマトグラフィー、溶媒分配、短行程蒸留、分子蒸留、および高速液体クロマトグラフィー（H P L C）のいずれか1つまたはその組合せによって精製する。

【0119】

好ましくは、その天然型であるH U F Aは、けん化されH U F Aの遊離脂肪酸を生産する。

【0120】

30

好ましくは、その遊離脂肪酸型であるH U F Aは、クロマトグラフィー、分子蒸留および／またはH P L Cによって精製する。

【0121】

あるいは、その天然型であるH U F Aはクロマトグラフィーによって精製する。

【0122】

本発明の第7の局面によれば、本発明の第3または第4の局面のバイオマスからなる、人間および／または動物用の栄養補助食品が提供される。

【0123】

本発明の第8の局面によれば、本発明の第1または第2局面によって生産されたバイオマスからなる、人間および／または動物用の栄養補助食品が提供される。

40

【0124】

本発明の第9の局面によれば、本発明の第6の局面の方法によって生産された組成物からなる、栄養補助食品、医用食品、食品または飼料添加物、または医薬製品が提供される。

【0125】

本発明のさらなる局面は、全てその新規局面であると考えらるべきであることは、本発明の実用的な用途の少なくとも1例を提供する以下の記載を読めば、当業者に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0126】

50

本発明の実施形態を例示目的にのみ添付の図面を参照して記載する。

【図1】図1は、本発明の連続培養によるバイオマス回収量（グラム／日／リットル）を示す。

【図2】図2は、異なる硫黄供給を行った培養物についての経時の培養乾燥重量を示す。

【図3】図3は、硫黄の供給に対して達成された培養乾燥重量のグラフを示す。

【図4】図4は、硫黄の供給に対して、培養物が対数期増殖からそれた時の乾燥菌体重量のグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0127】

全般的に、本発明は珪藻を培養して、商業的に有用な生産速度で珪藻バイオマスを生産する方法に関する。

【0128】

珪藻バイオマスは、脂質、脂肪酸、アミノ酸、色素および薬理学的目的の複合天然物を含む、数々の商業目的の生産物を含む。バイオマス自体もまた商業的有用性を有する。

【0129】

特に目的とするのは高度不飽和脂肪酸（H U F A）の生産であり、とりわけH U F A エイコサペンタエン酸（E P A）の生産である。D H A などの高レベルの共濃縮化合物不在でE P Aを生産するよう珪藻類を誘導でき、これにより、さらに濃縮／精製できるE P Aの生産が可能になることが見出されてきた。

【0130】

微生物によるバイオマスの生産は、以前は、微生物バイオマスの最大密度に到達するバッチまたはフェドバッチ発酵条件下で微生物を生育させた場合にのみ採算がとれると考えられていた。特に、珪藻類などの微生物のいくつかのクラスは、培養物の生育が遅すぎる、および／または培養物のバイオマスの割合が望ましい商業的産物としては比較的低い、またはその独特の栄養要求のために生育が非常に困難である、といったことのために、バッチまたはフェドバッチ発酵条件下でのバイオマスの経済的な生産に使用することさえできない、と信じられていた。珪藻類は、大量のシリカ（細胞壁の構造要素）要求、および、大部分は、塩類増殖培地要求などの、特殊で異例の環境的かつ栄養的な必要性を有する。これら発酵性微生物は、ラボラトリの古典的な発酵槽中フェドバッチモードにて生育させることができる一方、これら生物の特徴のために、低体積生産性となり工業規模の発酵コストが法外になる。

【0131】

微生物の増殖期はおおまかに、誘導期（微生物がその増殖条件に適応する）、対数期（対数増殖期または指数増殖期ともいい、微生物が指数関数的な速度で増大する）、定常期（増殖率と死滅率が等しくなり、最大菌体密度に到達、これは多くの場合、栄養素の欠失などの増殖制限要因による）および死滅期（死滅率が増殖率を上回る）に分類される。

【0132】

驚いたことに、本発明者らは、十分に高く採算がとれる体積生産性を珪藻類の連続培養を利用することによって達成できることを見出した。培養物を対数期増殖またはそれに近い状態に維持することによって、回収時にこれら珪藻類が有するバイオマス密度および／または望ましい分子の含有量はバッチおよびフェドバッチ発酵により生産される従来の定常期培養と比べて低くなることがあるが、この培養による全体の生産性は、バッチまたはフェドバッチ培養にて達成し得るものよりはるかに高いことが見出された。さらに、望ましいH U F Aの生産性がより高いことが見出された。典型的には、培養の定常期への移行は、商業的に有用な産物の大量生産を誘導し、また微生物培養の定常期への移行は概して何らかの形の栄養制限、一般的には窒素制限によって開始される。しかしながら、本発明者らは驚いたことに、珪藻類、特に従属栄養的に増殖できる珪藻類を使うとこれにあたらな場合も多いこと、および、栄養制限が培養物を増殖させるその目的産物の生産よりもむしろ望ましくない分子の生産をもたらす得ることを見出した。本発明者らは驚いたことに栄養素を制限せずに培養を対数期増殖に維持して、はるかに高いバイオマスの体積生産

性およびH U F Aなどの特定の望ましい産物を獲得した。

【0133】

連続培養では、対数期増殖に維持された活性培養物を連続的に除去して培養物量を一定に保ちながら新鮮培地を連続的に添加する。半連続培養では、ある量の活性培養物（すなわち、培地中对数期にて増殖する細胞活性）を定期的または少なくとも定期的な時間間隔にて除去し、等しいかまたは実質的に同様量（すなわち、ほぼ等量）の新鮮培地を培養物に添加し返して除去したものと置き換え、該活性培養物の平均量が培養時間にわたって実質的に一定に保たれる。半連続培養では、通常、培養物容量を新鮮培養培地と置換する前に、まず活性培養物の一部分を除去するが、これはこの一連のイベントに発酵槽容器のための追加スペースは必要ないためである。ただし、そうすることで特定の商業上の利益があるなら、一連のイベントを逆に行うことも可能である。誤解を避けるため、文脈上明白に他の意味に解釈すべき場合を除き、明細書および請求項を通じて、「連続培養」または「連続的に培養（する）など」は連続培養と半連続培養の両方を含むよう解釈すべきである。

10

【0134】

当業者であれば、培地には微生物の増殖を可能にしかつ維持するための栄養素が必要であることに気づくだろう。培地は窒素源（例えばこれに限るものではないが、アンモニウムイオン、硝酸塩、酵母エキス、ダイズ粉、ペプトン、トリプトン）、リン酸塩源および硫黄源からなる。しかし、珪藻類を増殖するには、培地はさらにシリカ源を含む必要があり、これはシリカが全ての珪藻類の細胞壁の基礎であるためである。培地はさらに追加で1以上のマグネシウム、カルシウム、コバルト、マンガン、ホウ（硼）素、亜鉛、モリブデン、鉄、クロム、ニッケル、セレン、銅およびビタミン類を含む。珪藻類の培地における栄養素が他の微生物のそれと著しく異なることは、当業者にとって明らかであろう。しかし、本願の知見があれば、当業者は、珪藻類の増殖を制限しない培地に要する構成成分を決定するための実験方法を認識または利用できるだろう。

20

【0135】

しかし、驚いたことに、本発明者らは、培地は連続培養をサポートするよう設計する必要がある点について重要な差異があることを見出した。伝統的に、単一栄養素の制限は、バイオマスの一定の乾燥重量を成すのに要するこの特定の栄養素量を決定するのに用いることができる。連続培養については、しかしながら、本発明者らは、好ましくは培地を、活性培養物が対数期にあり続けるよう設計することを見出した。本発明者らは、このことによって、乾燥菌体重量（グラム当たり）換算でより高い栄養要求になることを見出した。本発明の方法においては、好ましくは培地が全ての必須栄養素が珪藻類を対数期増殖またはそれに近い状態に維持する量を提供するよう設計する。

30

【0136】

驚いたことに、本発明者らは、低培養密度で操作した培地における栄養素濃度を基準化してより多くのバイオマスを作製するといった手順を単純にとるだけでは不十分であること、および、特に培地設計に慎重に注力を傾けなくてはならないこと、を見出した。本発明者らは、化合物濃度が通常低いために、低培養密度では、栄養素における不均衡は比較的、大切ではないことを見出した。しかし、高バイオマス密度（本発明で示すように）での高速で連続的な増殖のためには、栄養素の供給は、対数期増殖にて増殖中の生物の必要性に厳密にマッチしなくてはならない。高培養密度を達成するには、比較的高濃度の栄養素が要求されるが、本発明者らはさらに、珪藻類に過剰に供給された栄養素は時間と共に、バイオマス組成を変性および／または増殖速度を阻害するレベルに蓄積することもあることを見出した。亜鉛または銅等の一定の細胞要求は、高すぎる濃度で供給されると、珪藻類に実際に毒性であり得る。銅塩類の添加は、例えば、珪藻類を死滅させ、また池、ラグーンやプールでのその再増殖を防ぐための十分に確立した方法である。珪藻類は、高濃度で毒性効果を持つ数々の栄養素の過剰供給に、予想外に影響を受けやすいようである。

40

【0137】

50

供給不足の栄養素は、いくつかの連続回収の過程で枯渇し、再度、バイオマス組成における望ましくない変化または増殖における望ましくない変性がもたらされる。本発明者らは、一定の状況で1以上の栄養素をわずかに制限することは例えばこれによってバイオマスにおけるH U F Aの割合が高くなるならおそらく望ましく、一方で、通常、増殖速度の低減（すなわち、定常期への移行）は望ましくないことを見出した。その結果、本発明者らは、珪藻類がかなりの内部蓄積を有し得る微量金属類およびリン酸塩等の培地の要素は、より長期の時間枠で欠乏し得るため、これら要素に特に注意を払わなくてはならないことを見出した。

【0138】

たとえ、ある特定のレベルのバイオマス生産性にて正しい栄養素バランスを達成したとしても、培地中の全ての成分レベルを単純に倍増したりバイオマス生産性レベルの倍増を単純に期待することはできない。低減した炭素源などのいくつかの成分の添加は、生産されるバイオマス量に直接関連し得るが、より高濃度での増殖に阻害効果をももたらし得る。したがって、供給戦略はこの基本的な問題を改善するよう発展させる必要がある。例えば、回収物の全量を一度に置換するよりもむしろ時間と共に珪藻類のための置換培地を何回かに分けて供給するほうが望ましいだろう。塩化ナトリウム等のいくつかの成分は、例えば、培地の浸透圧バランスのために存在し、したがって生産するバイオマスに直接比例して供給されることはない。亜鉛などのいくつかの栄養素は、一定の濃度範囲内に維持しなくてはならない。低すぎる増殖速度およびその低下、高すぎる毒性効果は、増殖の低減、および最後には培養物死滅を引き起こす。カリウム等のいくつかの栄養素は、二重の役割を果たすため、例えばその浸透圧効果と栄養素としての利用との間のバランスをとらなくてはならない。培養における栄養素の量は、利用する微生物や培養量次第である一方で、本願における洞察と教示、すなわち連続培養において珪藻細胞を対数期増殖に維持することが望ましく、また、通常発酵で必要とされるのとは異なる培地組成が要求されること、を得れば、当業者は、ルーチンの実験方法を利用して、珪藻を対数期増殖かまたはそれに近い状態に維持するために培地に必要な構成成分の量を決定できるようになる。例えば、本発明者らは、実施例8において、珪藻の活発な対数期増殖の維持に要する硫黄量を決定するための手順の1例を示した。

【0139】

珪藻類の培養を扱う場合の特殊な問題点は、ケイ酸塩の供給である。本発明者らは、比較的lowな濃度でさえ、ケイ酸塩は他の培地成分と相互作用して沈殿物およびゲルを形成し、それ自体と溶液からの他の栄養素との両方を除去して珪藻類がそれらを利用できなくなってしまうことを見出した。これが生じるのを防ぐため、生産されるバイオマス量が増すにつれ、ケイ酸塩（生産されるバイオマスに比例して供給される）の添加に特別な注意を払う必要がある。ケイ酸塩は好ましくは、培養の過程を通じて連続添加し、ケイ酸塩沈殿物形成の低減を助け、また、ケイ酸塩量の供給を助けて培養を対数期増殖かまたはそれに近い状態に維持する（例えば、ケイ酸塩の添加方法は、WO 2012/053912に記載）。ケイ酸塩源は好ましくはアルカリ金属珪酸塩、例えば（これに限るものではないが）ケイ酸ナトリウムまたはケイ酸カリウムである。好ましい実施形態においては、ある量のケイ酸ナトリウムを連続的に添加、すなわち、20 mg ~ 120 mg のメタケイ酸ナトリウム五水和物を、培養物中に生産されるバイオマスの乾燥菌体重量グラム毎に、より好ましくは40 mg ~ 100 mg のメタケイ酸ナトリウム五水和物を、生産されるバイオマスの乾燥菌体重量グラム毎に、および最も好ましくは75 mg のメタケイ酸ナトリウム五水和物を、培養物中に生産されるバイオマスの乾燥菌体重量グラム毎に連続的に添加する。

【0140】

本発明者らは、珪藻類を連続的に高密度で、20 g の乾燥菌体重量（DCW）/L以上の範囲、例えば20から150 g のDCW/L、またはより好ましくは30から100 g のDCW/L、さらにより好ましくは30から70 g のDCW/Lで培養できることを見出した。好ましくは、培養物における珪藻類の高密度を維持するため、回収時培養物の乾燥

10

20

30

40

50

菌体重量は、培養を行う期間にわたって回収平均の $\pm 5\%$ 以内に収める。本発明の連続培養における珪藻類のこうした密度は、1日に1リットルの活性培養物につき少なくとも20グラムのDCW(DCW/L/日)のバイオマス(すなわち1日に発酵容器内の1リットルの活性培養物につき20グラムのバイオマスが生産される)の高体積生産速度、より好ましくは1日に1リットルの活性培養物につき少なくとも30グラムのDCWのバイオマスを可能にするが、本願の教示を用いて50gのDCW/L/日のバイオマス、より好ましくは60gのDCW/L/日のバイオマス、さらにより好ましくは70gのDCW/L/日のバイオマスかそれ以上と高く最適化できる。したがって、生産速度の範囲は好ましいいずれかの最小値から好ましいいずれかの最大値であって、例えば(これに限るものではないが)20から50gのDCW/L/日のバイオマス、より好ましくは20から60gのDCW/L/日のバイオマス、より好ましくは20から70gのDCW/L/日のバイオマスである。

10

【0141】

本発明の方法の連続培養では好ましくは、24時間毎に活性培養物の少なくとも35vol%、より好ましくは少なくとも40vol%、より好ましくは少なくとも50vol%、さらにより好ましくは少なくとも60vol%を置換する。あるいは、本方法では、4時間毎に活性培養物の少なくとも6vol%、より好ましくは少なくとも8vol%、より好ましくは少なくとも10vol%、より好ましくは少なくとも12vol%、最も好ましくは少なくとも15vol%を置換する。さらに本発明の別の方法では、好ましくは、2時間毎に活性培養物の少なくとも3vol%、より好ましくは少なくとも4vol%、より好ましくは少なくとも6vol%、最も好ましくは少なくとも7vol%を置換する。またさらに本発明の別の方法では、好ましくは5分毎に活性培養物の少なくとも0.15vol%、より好ましくは0.2vol%、より好ましくは少なくとも0.3vol%、最も好ましくは少なくとも0.35vol%を置換する。回収物量と置換は、対数期にある生物の増殖速度と一致するよう選択すべきであり、そうすれば、連続回収における培養密度は低下せずまた培養物は定常期に入らない。24、4、および2時間毎の半連続回収および連続回収を例としてあげるが、細胞の対数増殖維持を可能にするものであれば、24時間未満のいずれの時間間隔を用いてもよく、その結果、回収と回収との間の時間間隔を下流の処理の必要性に応えるように選択できるが、所定の回収時乾燥重量および増殖速度については、より頻繁に回収してより高いバイオマス生産性を得ることに留意されたい。

20

30

【0142】

場合によっては、以前の培養方法では、微生物培養物の密度および生産性の増加に灌流を用いた。灌流では、活性培養物から細胞と培地を分離し、細胞を発酵槽に戻し、追加新鮮培地を加える。灌流は、工業規模のバイオマス生産に関して実用的ではないコストおよび手順を加えてしまうため、本発明の方法には好ましくは活性培養物の灌流を含めない。灌流培養はさらに雑菌混入に極端に影響を受けやすく、また純粋培養を長期間維持するのに異例の手段を必要とする。無菌性の維持が重要であり、これは生産生物よりも早く増殖する侵入汚染(混入)生物が何回かの回収過程で素早く培養物中で優位を占めてしまい、この時点で培養物を破棄しなくてはならないためである。本発明の方法によって、驚いたことに灌流を要しない高生産性培養が提供される。本発明者らは、本発明の方法を行う間、特に培養物の回収と新鮮培地の再充填の両方で、発酵槽に汚染(混入)生物が侵入しないよう注意を払うべきことを見出したが、この問題は灌流の必要性が無いことで軽減される。

40

【0143】

本発明者らは、本発明の方法を少なくとも12リットルの活性培養物、より好ましくは少なくとも14リットルの活性培養物、より好ましくは少なくとも400リットルの活性培養物、さらにより好ましくは少なくとも500リットルの活性培養物の規模で実行できることを示した。ただし、本願における教示があれば、少なくとも10000リットル、少なくとも100000リットル、およびさらに少なくとも200000リットルなどの

50

より大規模な培養を工業生産に利用できる。

【0144】

実用的であるべく、本発明の連続培養は好ましくはある一定期間にわたり持続可能である。本発明者らは、本発明の方法が少なくとも72時間（3日）、より好ましくは少なくとも5日、さらにより好ましくは1週間（7日）、さらにより好ましくは少なくとも1カ月（30日）、最も好ましくは少なくとも2カ月（60日）維持できることを実証した。半連続培養については、活性培養物の一部の除去および新鮮培地の置換のサイクルを、好ましくは少なくとも5回繰り返す。しかし、本願記載の本発明の実施例（実施例1～5を参照）において、培養をこれ以上維持できないという兆候がなければ、培養は60日後（活性培養物の除去および新鮮培地の置換がゆうに100回を超えた後）に中断した。したがって、培養を数か月または数年の期間、問題なく継続できないような示唆はない。好ましい実施形態では、バイオマスの平均体積生産速度は、少なくとも72時間（3日）、より好ましくは少なくとも1週間（7日）、より好ましくは少なくとも1カ月（30日）、さらにより好ましくは少なくとも2カ月（60日）の期間にわたって、少なくとも20gの乾燥重量/L/日である。

10

【0145】

好ましくは、本発明の方法は、同定済の珪藻の培養からなる。好ましくは、培養条件下、珪藻の株を、少なくとも1つのHUF A、好ましくはEPAおよび／またはDHAの生産能について、選択する。当業者は、HUF Aを生産できる珪藻種を知っているであろうし、またはこうしたことを決定するためのルーチンの実験方法を実行できるだろう（例えば、Dunstanら（1993）Phytochemistry 35:155-161を参照）。好ましい実施形態において、珪藻は、これらに限るものではないが、ニツシア（Nitzschia）種、キクロテラ（Cyclotella）種またはフェオダクテラム（Paeodactylum）種から選ぶ。最も好ましくは該珪藻は、Nitzschia laevis株ln1CS20である。

20

【0146】

当業者は、発酵に、必要な微生物を「接種」するための方法を知っているだろう。発酵は通常、発酵容器で行うかまたは、当業者には明らかなその他適当な容器にて行う。

【0147】

本発明の方法によって生産される珪藻バイオマスは、ある代謝状態（対数増殖期）にあり、定常期培養物とは組成が極めて異なる。高度不飽和脂肪酸（HUF A）を生産可能な珪藻類を用いる場合、このような状態によって、比較的高レベルの1以上のHUF Aをもたらされる。最も好ましくはこのHUF AがEPAであるが、また有益には2以上のHUF Aの混合物、好ましくはEPA、DHAおよびARA、より好ましくはEPAおよびDHAである。EPAとDHAは両方ともオメガ-3脂肪酸であり、特に有益な健康上の特性を有することが知られる。これら脂肪酸またはそのエステル型のものは、医薬品、医用食品、食品または飼料添加物、化粧品、または栄養補助食品として使用できる。ARAはオメガ-6脂肪酸であり、さらに健康上有益な特性を有することが知られる。好ましくは、珪藻バイオマスは、バイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%、より好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも3%の総HUF Aレベル（異なるHUF Aの混合物から成ることができる）を有する。より好ましくは珪藻バイオマスが、バイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%、さらにより好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも3%のレベルで、EPAおよびDHAの混合物を含む。少なくとも1つのHUF Aは好ましくは、バイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2%（すなわち、2%のレベルの単一HUF A）、より好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2.5%、より好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも2.7%、さらにより好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも3.2%のレベルで本発明の方法により生産される。生産するHUF Aは最も好ましくはEPAである。当業者がいったん本明細書における教示を得れば、バイオマス中の総HUF Aまたは単一HUF Aの最高レベルは、条件の精密な調整

30

40

50

および珪藻の選択次第である。しかし、本発明者らは、最高の限界は乾燥菌体重量の５％、より好ましくは１０％、より好ましくは１５％、さらにより好ましくは２０％の領域にある可能性が高いと信じる。バイオマス中、１以上のＨＵＦＡの含有範囲は、したがって、好ましい最小値のいずれかから好ましい最高値のいずれかの間であり、例えば（これに限るものではないが）、ＨＵＦＡのレベルは、好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の１～２０％、より好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の２～１５％、より好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の２～１０％、より好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の２．７～１０％、さらにより好ましくはバイオマスの乾燥菌体重量の３．２～１０％である。

【０１４８】

現在の技術によれば、ＨＵＦＡを生産させるためには、ほとんどの微細藻類は光合成的に培養しなくてはならない。本発明の特に好ましい局面では、本発明者らは驚いたことに、連続発酵を用いて従属栄養的に珪藻類を培養してＨＵＦＡを高生産性にて生産させられることを見出した。これによって、高密度発酵のために光を供給する必要なく商業的な生産が可能になり、その結果、先述の高密度培養に十分な光を提供することに関する技術的な問題を克服できる。珪藻類を従属栄養的に培養する場合、好ましくは低減した炭素源を培地に供給する。好ましくは低減した炭素源は、（これらに限るものではないが）グルコース、フルクトース、高フルクトースコーンシロップ、単糖類、二糖類、アルコール類、酢酸またはその塩のいずれか１以上から選択する。

【０１４９】

現在の技術によれば、ＨＵＦＡ類の高体積生産性を得るには、バッチまたはフェドバッチ条件を使用すべきであり、これは菌体をオレオ生成状態を誘引する定常期にする場合に通常、窒素および／またはリン酸塩制限を用いて行うもので、藻類のバイオマス組成が対数期に増殖するバイオマスの組成と著しく異なる。本発明の特に好ましい局面では、本発明者らは驚いたことに対数期に維持した珪藻の連続発酵を用いて珪藻類を従属栄養的に培養してＨＵＦＡを高体積生産性にて生産させることができることをつきとめた。これによって、バッチまたはフェドバッチ発酵に適さない珪藻類などの生物の商業的な生産が可能になり、こうした生物をさらに大きな規模で増殖させるという課題が克服される。

【０１５０】

本発明者らは、さらに培養ｐＨは好ましくは７．０から９．０の範囲内、より好ましくは７．５から８．５の範囲内、最も好ましくは８．０から８．５の範囲内に維持することを見出した。培養温度は好ましくは１５℃～３０℃、より好ましくは２０～２５℃の温度に維持する。好ましくは攪拌および／または背圧を提供して溶存酸素レベルを１０％、より好ましくは２０％、さらにより好ましくは３０％の空気飽和度かそれ以上に維持する。この溶存酸素レベルはさらにより好ましくは４０％の空気飽和度かそれ以上に維持する。こうした条件によって、珪藻の増殖およびＨＵＦＡ形成（ＨＵＦＡを生産可能な珪藻を用いる場合）を促進する。溶存酸素レベルは好ましくは培養時間の少なくとも８０％、より好ましくは９０％の間維持する。好ましい溶存酸素レベルをわずかに下回る程度のレベルも、それが培養に著しく影響を与えない限り、本発明の範囲内であると考えられる。

【０１５１】

本発明はさらに、バイオマスの分離、抽出または精製工程前の連続培養における、培地および珪藻類（少なくとも２０ｇ／Ｌのバイオマス密度で）を含む活性培養物（すなわち、培地中对数期にて増殖する珪藻細胞活性）を含む。好ましくは、ＨＵＦＡを生産可能な珪藻を用いる場合、該珪藻バイオマスは高度不飽和脂肪酸（ＨＵＦＡ）を含む。

【０１５２】

活性培養物部分の連続培養からの分離後、例えば遠心分離または連続遠心分離または当該技術分野で周知のバイオマス回収手段である、例えばこれに限るものではないが遠心分離、凝集、ろ過および／または浮上分離法によって、珪藻バイオマス構成成分は好ましくは濃縮して液体成分を実質的に除去または分離しバイオマス濃縮物を生産する。バイオマスの細胞は任意に洗浄して過剰な培地を除去および／または加熱処理（低温殺菌等）その他（例えば、生産物収量を減少させ得る内在性酵素類を変性させる）で死滅させることが

10

20

30

40

50

できる。バイオマスは任意で、例えば噴霧乾燥、凍結乾燥、トンネル乾燥、真空乾燥および／またはドラム乾燥によって乾燥させ水分を低減または除去する。乾燥させたバイオマスは任意で、粉碎して微粉を形成するかまたは任意でペレット状に形成する。あるいは、連続培養から除去した活性培養物の一部を、事前の濃縮なしに直接乾燥してよい。

【0153】

本発明の珪藻バイオマスは、1以上の抽出工程にかけてよく、H U F Aまたはそのエステルなどの所望の生産物をバイオマスから抽出し、組成物（例えばH U F A組成物）を生じさせる。適当な抽出方法は当該分野で周知であり所望の生産物に依存する。例えばH U F Aの抽出については、バイオマスを非選択的脂質溶媒（臨界点近傍のジメチルエーテルまたはエタノール等）で抽出、および溶媒から残渣として回収してよい。あるいは、バイオマスは他の極性または非極性溶媒、例えば、これに限るものではないがヘキサン、アルコール、アセトン、超臨界または液体二酸化炭素、またはその混合物（例えば、ヘキサンおよびイソプロパノール）を用いて抽出してよい。バイオマスは、バッチまたは向流の方法のどちらかで溶媒を用いて抽出してよい。溶媒（H U F Aを含む）は、抽出したバイオマスから、例えば（これに限るものではないが）沈降、ろ過、遠心分離によって分離する。H U F A（またはそのエステル）は、溶媒から回収する。

10

【0154】

H U F Aは、遊離脂肪酸類および／またはエステル化した脂肪酸の形でバイオマス中に存在する。エステル化した形の脂肪酸の例としては、トリグリセリド類、リン脂質類、および糖脂質類（総称して「脂質類」とされる）があげられる。脂質類はH U F Aの天然型である（すなわち、あらゆる外的化学修飾前のバイオマス中に自然に見られる型）。遊離脂肪酸類は、引き続きバイオマス中にある状態で脂質類から切断されるか（例えば酵素の作用によって）、または任意に抽出、濃縮および／または精製工程において脂質類から切断できる（例えば、別のエステルまたは遊離脂肪酸形成のため）。

20

【0155】

抽出後、さらにH U F A濃縮または1以上のH U F Aを混合物から精製する工程を当該技術分野で周知の手法を用いて行ってよい。例えば、抽出した物質は酸、アルカリ、および／または酵素で、アルコールまたは水の存在下に処理して、遊離脂肪酸または脂肪酸アルキルエステルを形成してよい。例えば、H U F Aはエステル交換して脂肪酸エチルエステル（F A E E）を形成してよい。エステルは、要求される精製標準を達成するために任意に精製してよい。精製プロセスの例としては、クロマトグラフィー、分子蒸留および／または高速液体クロマトグラフィー（H P L C）があげられる。誤解を避けるため、H P L Cは高圧液体クロマトグラフィーと称することがある。あるいは、バイオマス中の脂質類はけん化して遊離脂肪酸類を形成してよい。遊離脂肪酸類は、例えば（これに限るものではないが）クロマトグラフィーによって任意に精製または分離してよい。遊離脂肪酸の型に精製したH U F Aは、次いでそれ自体として用いるか、または当該技術分野で周知のプロセスを用いてエチルエステル（F A E E）に変換してよい。

30

【0156】

H U F Aまたはそのエステルの精製後、H U F Aは次いで、人間および／または動物の消費に適した各種食品または飼料用途、例えば、これに限るものではないが、医薬製品、医用食品、食品添加物、化粧品、栄養補助食品、または飼料添加物などに使用できる。一部の例では、バイオマスそれ自体は各種食品または飼料用途、例えば、これに限るものではないが、医薬製品、医用食品、食品添加物、化粧品、栄養補助食品、または飼料添加物等に使用できる。

40

【0157】

珪藻の制御された培養を提供する本発明の方法を用いることによって、H U F A製品を一貫して、持続可能に、また追跡可能な形（すなわち、優れた製造プロセスによって）で、環境汚染物質（うち全てが同様のH U F A製品源としての魚油に問題を起こす）に関する懸念なく、提供できる。

定義および略語

50

【0158】

高度不飽和脂肪酸（H U F A）は、20個以上の炭素と4以上の二重結合を含む脂肪酸である。これらはオメガ-3またはオメガ-6であってよい。

【0159】

脂肪酸類はC X : Yの形で記載し、ここでXの数は脂肪酸中の炭素原子の数を示し、またYの数は脂肪酸中の二重結合の数を示す。Yが0と等しければ、当該脂肪酸は飽和脂肪酸であることを示し、Yが0より大きければ当該脂肪酸は不飽和脂肪酸であることが示される。二重結合の位置およびタイプは、例えば、「シス5、11、14」と特定してよく、ここでこれらの数は、当該分子のカルボン酸端から数えた炭素-炭素二重結合の場所を反映する。

10

【0160】

文脈上明白に他の意味に解釈すべき場合を除いて、明細書および請求項を通じて、「脂肪酸」の意味するところは、人間の利用（消費または局所投与のため等）に適する遊離脂肪酸類およびエステル化した形の脂肪酸の両方を含むものと理解すべきである。人間が消費するのに適したエステル化した形の脂肪酸の例としては、トリグリセリド類、リン脂質類、糖脂質類、およびエチルエステル類があげられる。ヒトの消化管内での処理中にメタノールを体内に放出するために、メチルエステル類は人間の消費組成物としては好ましくなく、したがって、組成物および生産方法において好ましくない。「C20:5」などの用語は、例えば、遊離脂肪酸およびエステル化した形の脂肪酸（メチルエステル類は含めない）の両方を含むものと理解するものであり、ここで炭素原子および二重結合の数はエステルの脂肪酸部分のみについての数である。

20

【0161】

オメガ-3脂肪酸は、分子のメチル端（オメガ端）から3つめの炭素原子に第一の二重結合を有する脂肪酸である。オメガ-3は、しばしばn-3と短縮され、両方の用語はここで区別なく用いられる。

【0162】

オメガ-6脂肪酸は、分子のメチル端から6つめの炭素原子に第一の二重結合を有する脂肪酸である。オメガ-6は、しばしばn-6と短縮される。

【0163】

EPA、C20:5 n-3、エイコサペンタエン酸は、20の炭素原子と5つの二重結合を有するオメガ-3脂肪酸である。

30

【0164】

ARA、C20:4 n-6、アラキドン酸は、20の炭素原子と4つの二重結合を有するオメガ-6脂肪酸である。

【0165】

DHA、C22:6 n-3、ドコサヘキサエン酸は、22の炭素原子と6つの二重結合を有するオメガ-3脂肪酸である。

【0166】

DCW、乾燥菌体重量は、一度全ての水分を除去したバイオマスの重量を意味する。

【0167】

対数期または対数増殖は、本明細書を通じて指数増殖と同義で使用し、全て当該技術分野で周知の定義と矛盾なく使用する。

40

【0168】

「従属栄養培養」とは、培養のために供給されるエネルギーの少なくとも90%が、通常有機炭素の1以上の型で供給される栄養素（グルコース、酢酸塩等）に由来する、生物の培養を意味する。したがって、供給エネルギーの最大10%が光エネルギーに由来してよい。供給エネルギーの好ましくは5%未満またはより好ましくは1%未満は、光エネルギーに由来する。より好ましくは、供給エネルギーの全てが供給栄養素に由来する。

【0169】

「活性培養物」は、発酵槽等の適当な容器に含まれる培地中对数期にて増殖する細胞活

50

性のバイオマスを意味する。

【0170】

「光独立栄養培養」（または光合成独立栄養生物微生物または珪藻類）は、唯一のエネルギー源が光である生物の培養を意味する。

【0171】

「栄養素制限」は、問題の栄養素が不在または低レベルであることで該生物が、該栄養素が高レベルで存在する場合には起きないような代謝の変化を起こし、またそのことが本質的に培養の定常期への入口となることを意味する。もし増殖が対数的に進行するなら、培養は非制限栄養素条件にあると考えられる。

【0172】

文脈上明白に他の意味に解釈すべき場合を除いて、本明細書および請求項を通じて、「連続培養」または「連続的に培養」は、厳密な連続培養（ここで活性培養物を連続的に除去する一方で新鮮培地を連続的に加えて培養量を一定に保つ）と半連続培養（ここで活性培養物の1容量は規則的にかまたは少なくとも定期的な時間間隔で取り除き、かつそれに等しいかまたは実質的に同様の量の新鮮培地を培養物に加えて取り除いた分と置換し、活性培養物の平均量が、培養期間にわたって実質的に一定に保たれるようにする）の両方を含むものとして理解すべきである。半連続培養については、通常、新鮮培地と培養量を置換する前にまず活性培養物の一部を取り除くが、これはこの一連のイベントに発酵槽容器内で追加スペースを要しないためである。ただし、この一連のイベントは逆に行うこともできる。

【0173】

文脈上明白に他の意味に解釈すべき場合を除いて、本明細書および請求項を通じて、「珪藻類」または「珪藻」は、例えば、これに限るものではないが、羽状（ニッチア（*Nitzschia*）等）および中心（キクロテラ（*Cyclotella*）等）珪藻類などの珪藻綱の全ての生物を含むよう理解すべきである。

【0174】

文脈上明白に他の意味に解釈すべき場合を除いて、本明細書および請求項を通じて、「からなる（comprise）」、「からなる（comprising）」等の語は、排他的または網羅的な意味ではなく、包括的な意味、すなわち「含むが、これ（ら）に限るものではない」と、解するべきである。

【0175】

ここに開示する数字の範囲（例えば、1～10）はまた、この範囲内の全ての有理数（例えば、1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9および10）およびさらにその範囲（例えば、2～8、1.5～5.5および3.1～4.7）内の有理数のいずれの範囲をも組み込むことを意図する。

【実施例】

【0176】

実施例1 *Nitzschia laevis*の半連続培養

*Nitzschia laevis*株In1CS20の培養物を20L攪拌容器中14L培養にて増殖させた。pHは、NaOHを添加して8.0以上に維持、温度は20℃に維持、および圧力は周囲より約500mbar上に維持した。攪拌し飽和度40%を上回る溶存酸素レベルを維持した。

【0177】

培養物1リットルにつき約40gの乾燥菌体重量の密度まで細胞を増殖させ、回収を開始した。4時間毎に、回収時1.4リットルの培養物を容器から引き抜き、約400mlの新鮮培地を1時間毎に供給して培養量を14Lに戻した。これを7日間持続した。

【0178】

新鮮培地は以下から構成した。

【表 1】

	g/L
グルコース一水和物	95
硝酸ナトリウム NaNO_3	10.1
酵母エキス	3.1
Na_2HPO_4	1.16
塩化ナトリウム NaCl	8.4
塩化カリウム KCl	1.17
硫酸マグネシウム七水和物 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.9
塩化カルシウム二水和物 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.204
硫酸ナトリウム	0.586

10

	mg/L
塩化コバルト六水和物 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.081
塩化マンガン四水和物 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.843
ホウ酸 H_3BO_3	103.1
塩化亜鉛 ZnCl_2	1.05
モリブデン酸ナトリウム二水和物 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.363
塩化第二鉄六水和物	7.22
クエン酸塩	675
硫酸銅	0.024
ビタミン B12	202.7
チアミン	0.34
ビオチン	0.34

20

30

【0179】

毎時の供給に加えて、さらにメタケイ酸ナトリウムを別にほぼ連続的に培養物に供給、すなわち約 7.5 % w/w のメタケイ酸ナトリウム（五水和物）／乾燥菌体重量で供給した。

【0180】

培養物の光学濃度を 10 分毎に記録したところ、7 日間の期間を通じて平均 $\pm 2\%$ の範囲内であった。培養乾燥菌体重量（DCW）は、7 日間のうち 4 日目の回収 1 で採取した追加 100 ml のサンプルから測定した。このサンプルはさらに組成分析に用いた。

【0181】

乾燥菌体重量測定値は、次いで他の各回収時に DCW を計算するのに使用した。

【0182】

回収量に DCW を掛けて、バイオマス採集物、したがって、バイオマス生産性を計算した。

【0183】

下表 1 において、DCW およびバイオマスの EPA 含有量で斜体の数値はその周辺データから計算している。

40

【表 2 - 1】

表 1

	1 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	42.0	1.5	63.0
回収 2	41.6	1.4	58.2
回収 3	41.4	1.4	58.0
回収 4	41.3	1.4	57.9
回収 5	41.2	1.4	57.7
回収 6	41.1	1.4	57.6

バイオマス生産性(g/L/日)	25.2
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.5
EPA生産性 (mg/L/h)	26.2

	2 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	41.0	1.4	57.4
回収 2	40.8	1.4	57.2
回収 3	40.7	1.4	56.9
回収 4	40.5	1.4	56.7
回収 5	40.3	1.4	56.5
回収 6	40.2	1.4	56.2

バイオマス生産性(g/L/日)	24.3
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.5
EPA生産性 (mg/L/h)	25.4

10

20

30

40

【表 2 - 2】

	3 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	40.0	1.5	60.0
回収 2	39.7	1.4	55.5
回収 3	39.6	1.4	55.5
回収 4	39.6	1.4	55.4
回収 5	39.6	1.4	55.4
回収 6	39.5	1.4	55.3

バイオマス生産性 (g/L/日)	24.1
バイオマスの E P A 含有量 (%)	2.5
E P A 生産性 (mg/L/h)	25.1

	4 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	39.5	1.5	59.3
回収 2	39.3	1.4	55.1
回収 3	39.5	1.4	55.3
回収 4	39.6	1.4	55.5
回収 5	39.8	1.4	55.7
回収 6	39.9	1.4	55.9

バイオマス生産性 (g/L/日)	24.1
バイオマスの E P A 含有量 (%)	2.5
E P A 生産性 (mg/L/h)	25.1

	5 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	40.1	1.4	56.1
回収 2	40.3	1.4	56.4
回収 3	40.5	1.4	56.7
回収 4	40.7	1.4	57.0
回収 5	40.9	1.4	57.3
回収 6	41.1	1.4	57.5

バイオマス生産性(g/L/日)	24.4
バイオマスの E P A 含有量 (%)	2.5
E P A 生産性 (mg/L/h)	25.4

10

20

30

40

【表 2 - 3】

	6 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	41.3	1.4	57.8
回収 2	41.5	1.4	58.1
回収 3	41.7	1.4	58.3
回収 4	41.8	1.4	58.6
回収 5	42.0	1.4	58.8
回収 6	42.2	1.4	59.1

バイオマス生産性(g/L/日)	25.1
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.5
EPA生産性 (mg/L/h)	26.1

	7 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	42.4	1.5	63.6
回収 2	41.9	1.4	58.7
回収 3	41.8	1.4	58.5
回収 4	41.7	1.4	58.4
回収 5	41.6	1.4	58.2
回収 6	41.4	1.4	58.0

バイオマス生産性(g/L/日)	25.4
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.5
EPA生産性 (mg/L/h)	26.4

実施例 2

【0184】

実施例 1 の培養では、回収を再開する前に培養量の 50 % を回収してリセットし、培養物 1 リットルにつき約 40 g の乾燥菌体重量の密度に戻るまで増殖させた。

【0185】

本実施例では、回収 (0.7 から 0.8 L の間) は 2 時間毎に行った (回収量は、回収時乾燥重量がほぼ一定に保たれるように調整)。培養量は再充填を 2 回行って培養量を 14 L に戻した (1 回は約 400 mL の新鮮培地を回収直後に供給、もう 1 回は 1 時間後に行い、残量を供給)。培地組成は実施例 1 と同様であった。実施例 1 で用いたのと同じ方法でケイ酸塩を培養物に供給した。

【0186】

培養物の光学濃度を 10 分毎に記録したところ、7 日間の期間を通じて平均 $\pm 2\%$ の範囲内であった。培養乾燥菌体重量 (DCW) およびバイオマス組成決定のため、8 日間のうち 6 日目の回収時に追加 100 mL のサンプルを採取した。

【0187】

バイオマス生産性を実施例 1 に記載のように計算した。下表 2 において、DCW およびバイオマスの EPA 含有量で斜体の数値はその周辺データから計算した。

【表 3 - 1】

表 2

	1 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	40.0	0.8	32.0
回収 2	39.7	0.7	27.8
回収 3	39.7	0.7	27.8
回収 4	39.7	0.7	27.8
回収 5	39.7	0.7	27.8
回収 6	39.7	0.7	27.8
回収 7	39.7	0.7	27.8
回収 8	39.8	0.7	27.8
回収 9	39.8	0.7	27.8
回収 10	39.8	0.7	27.8
回収 11	39.8	0.7	27.8
回収 12	39.8	0.7	27.9

バイオマス生産性 (g/L/日)	24.1
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.6
EPA生産性 (mg/L/h)	26.2

	2 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	39.8	0.9	35.8
回収 2	39.4	0.8	31.6
回収 3	39.4	0.8	31.5
回収 4	39.3	0.8	31.5
回収 5	39.3	0.8	31.4
回収 6	39.2	0.8	31.4
回収 7	39.1	0.8	31.3
回収 8	39.1	0.8	31.3
回収 9	39.0	0.8	31.2
回収 10	39.0	0.8	31.2
回収 11	38.9	0.8	31.1
回収 12	38.9	0.8	31.1

バイオマス生産性 (g/L/日)	27.2
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.5
EPA生産性 (mg/L/h)	28.3

【表 3 - 2】

	3 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	38.8	0.9	34.9
回収 2	38.5	0.8	30.8
回収 3	38.5	0.8	30.8
回収 4	38.6	0.8	30.8
回収 5	38.6	0.8	30.9
回収 6	38.6	0.8	30.9
回収 7	38.6	0.8	30.9
回収 8	38.6	0.8	30.9
回収 9	38.6	0.8	30.9
回収 10	38.7	0.8	30.9
回収 11	38.7	0.8	30.9
回収 12	38.7	0.8	30.9

バイオマス生産性 (g/L/日)	26.8
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.6
EPA生産性 (mg/L/h)	29.0

	4 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	38.7	0.8	31.0
回収 2	38.7	0.8	31.0
回収 3	38.7	0.8	31.0
回収 4	38.8	0.8	31.0
回収 5	38.8	0.8	31.0
回収 6	38.8	0.8	31.1
回収 7	38.8	0.8	31.1
回収 8	38.9	0.8	31.1
回収 9	38.9	0.8	31.1
回収 10	38.9	0.8	31.1
回収 11	38.9	0.8	31.2
回収 12	39.0	0.8	31.2

バイオマス生産性 (g/L/日)	26.6
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.5
EPA生産性 (mg/L/h)	27.7

【表 3 - 3】

	5 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	39.0	0.8	31.2
回収 2	39.0	0.8	31.2
回収 3	39.0	0.8	31.2
回収 4	39.0	0.8	31.2
回収 5	39.1	0.8	31.3
回収 6	39.1	0.8	31.3
回収 7	39.1	0.8	31.3
回収 8	39.1	0.8	31.3
回収 9	39.1	0.8	31.3
回収 10	39.1	0.8	31.3
回収 11	39.2	0.8	31.3
回収 12	39.2	0.8	31.3

バイオマス生産性 (g/L/日)	26.8
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.4
EPA生産性 (mg/L/h)	26.8

	6 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	39.2	0.9	35.3
回収 2	39.0	0.8	31.2
回収 3	39.2	0.8	31.3
回収 4	39.3	0.8	31.5
回収 5	39.5	0.8	31.6
回収 6	39.6	0.8	31.7
回収 7	39.7	0.8	31.8
回収 8	39.9	0.8	31.9
回収 9	40.0	0.8	32.0
回収 10	40.2	0.8	32.1
回収 11	40.3	0.8	32.2
回収 12	40.5	0.8	32.4

バイオマス生産性 (g/L/日)	27.5
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.3
EPA生産性 (mg/L/h)	26.4

【表 3 - 4】

	7 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	40.6	0.85	34.5
回収 2	40.2	0.75	30.2
回収 3	40.1	0.75	30.1
回収 4	40.0	0.75	30.0
回収 5	39.9	0.75	29.9
回収 6	39.8	0.75	29.9
回収 7	39.7	0.75	29.8
回収 8	39.7	0.75	29.7
回収 9	39.6	0.75	29.7
回収 10	39.5	0.75	29.6
回収 11	39.4	0.75	29.5
回収 12	39.3	0.75	29.5

バイオマス生産性 (g/L/日)	25.9
バイオマスの E P A 含有量 (%)	2.4
E P A 生産性 (mg/L/h)	25.9

	8 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	39.2	0.85	33.3
回収 2	39.1	0.75	29.3
回収 3	39.3	0.75	29.5
回収 4	39.5	0.75	29.6
回収 5	39.7	0.75	29.8
回収 6	39.9	0.75	29.9
回収 7	40.1	0.75	30.1
回収 8	40.3	0.75	30.3
回収 9	40.6	0.75	30.4
回収 10	40.8	0.75	30.6
回収 11	41.0	0.75	30.7
回収 12	41.2	0.75	30.9

バイオマス生産性 (g/L/日)	26.0
バイオマスの E P A 含有量 (%)	2.5
E P A 生産性 (mg/L/h)	27.1

実施例 3

【0188】

実施例 2 の培養では、2 時間毎の回収から 2 4 時間毎の回収に切替えた。回収時、7 0 分間の過程にわたって発酵槽中 7 L (5 0 %) の培養物量を発酵槽から取り除いた。回収完了時、発酵槽の再充填を開始、すなわち、全量 1 4 L に到達するまで毎時約 4 0 0 m L の新鮮培地を発酵槽に再添加した。

【0189】

新鮮培地およびケイ酸塩の供給は前述の実施例と同様に行った。

【0190】

培養乾燥菌体重量および組成を決定するため、100 mLのサンプルを回収時に取得した。乾燥菌体重量は、40.4 g/L（1日目）から44.6 g/L（5日目）および43.9 g/L（6日目）の範囲であり、バイオマス生産性が20.5～22.6 g/L/日であった。

【0191】

バイオマスのEPA含有量は乾燥菌体重量2.5～2.7%であった。

実施例4

10

【0192】

実施例3の培養では、24時間毎の回収からほぼ連続培養に切替えた。培養がいったん40 g/Lを超える乾燥重量に到達したら、30 mLの培地を5分毎に加えた。さらにケイ酸塩を実施例1に記載のように加えた。培養量を14.0～14.2 Lに維持するのに必要なだけ回収を行った。ケイ酸塩として添加する追加量およびサンプルとして採取する量を含め、1日約8.9 Lの培地を添加、回収した。

【0193】

培養乾燥菌体重量および組成を決定するため、サンプルを平日午前9時に採取した。2つの午前9時の乾燥重量測定値の平均値を24時間の期間の代表値とし、バイオマス生産性は、これに基づいて計算した。バイオマス生産性を下表3に示す。

20

【表4】

表3

日	午前9時のDCW (g/L)	計算のための平均乾燥重量 (g/L)	回収量 (L)	バイオマス生産(g/L)	EPA含有量 (%)	EPA生産性 (mg/L/時)
1	44.5	42.7	8.9	27.1	2.7	30.5
2	40.9	41.2	8.9	26.2	2.8	30.5
3		41.7	8.9	26.5	測定せず	
4		42.2	8.9	26.8	測定せず	
5	42.5	42.8	8.9	27.2	2.7	30.6
6	43.1	42.9	8.9	27.3	2.9	33.0
7	42.8	42.8	8.9	27.2	2.8	31.8

30

実施例5

【0194】

実施例4の培養では、本実施例の7日の期間を過ぎても連続培養を維持した。7.2 Lの回収物でリセット後、4時間毎の回収方式に切替、すなわち、除去した活性培養物量を回収が完結した後に1回の添加で新鮮培地と置換した。これをさらに1カ月継続した。実施例1と2との間のリセットによる、培養8日目および、実施例2と3との間のリセットによる培養18日目を除き、図1に示すように、午前9時から午前9時に測定した培養物のバイオマス生産性は、60日間20 g/L/日を下回ることにはなかった（ただし実施例4の後の平日の生産性は週末の平均値としてプロットしてある）。後の培養段階では、35 g/L/日を超えるバイオマス生産性が見られた。この時、EPAはバイオマスの約2.5%であり、35 mg EPA/L/時を超えるEPA生産性となった。同じ培地を一貫して用い、また生産性の増加は酸素利用可能率を改善するための攪拌および圧力における変化のおかげである。

40

【0195】

EPAの生産と共に、該生物はARAとDHAの両方を生産した。典型的なバイオマス

50

組成では、DHAがバイオマスの約0.15%およびARAがバイオマスの約0.1%であった。

実施例6

【0196】

Nit z s c h i a l a e v i s株In1CS20の培養物を600Lのエアリフト容器中500L培養にて増殖させた。pHは、NaOHを添加して8.0以上に維持、温度は20℃に維持、および圧力は周囲より約500mbar上に維持した。エアフローは、飽和度30%を上回る溶存酸素レベルを容器の底で維持するように調整した。

【0197】

培養物1リットルにつき約40gの乾燥菌体重量の密度まで細胞を増殖させ、回収を開始した。4時間毎に、回収時40リットルの培養物を容器から引き抜き、新鮮培地で培養量を500Lに戻した。これを6日間持続した。4日目に、発酵槽中の泡の高さが上板に近づくまでエアフローを上げ、発酵槽中の運転容量を480に低減した。回収物は4時間毎に38Lに比例的に低下した。

【0198】

新鮮培地は以下から構成した。

【表5】

	g/L
グルコース一水和物	120
硝酸ナトリウム NaNO_3	12.7
酵母エキス	3.9
Na_2HPO_4	1.47
塩化ナトリウム NaCl	7.5
塩化カリウム KCl	1.04
硫酸マグネシウム七水和物 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4
塩化カルシウム二水和物 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.181
硫酸ナトリウム	0.521

	mg/L
塩化コバルト六水和物 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.072
塩化マンガン四水和物 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.750
ホウ酸 H_3BO_3	91.643
塩化亜鉛 ZnCl_2	0.936
モリブデン酸ナトリウム二水和物 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.212
塩化第二鉄六水和物	6.42
クエン酸塩	600.0
硫酸銅	0.022
ビタミン B12	180.2
チアミン	0.302
ビオチン	0.302

【0199】

培地の再充填に加えて、さらにメタケイ酸ナトリウムを別にほぼ連続的に培養物に供給、すなわち約7.5% w/wのメタケイ酸ナトリウム（五水和物）／乾燥菌体重量で供給した。

【0200】

培養乾燥菌体重量は、最初の回収および2日目から6日目の組成分析時に採取したサンプルから測定した。バイオマス生産性は実施例1に記載のように計算した。

【0201】

培養乾燥重量（DCW）、バイオマス生産性、EPA含有量およびEPA生産性を表4に示す。

【表 6 - 1】

	1 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	46.6	40.0	1864.0
回収 2	46.6	40.0	1864.7
回収 3	46.6	40.0	1865.3
回収 4	46.6	40.0	1866.0
回収 5	46.7	40.0	1866.7
回収 6	46.7	40.0	1867.3

バイオマス生産性 (g/L/日)	22.4
バイオマスの EPA 含有量 (%)	測定せず
EPA 生産性 (mg/L/h)	不明

	2 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	46.7	40.0	1868.0
回収 2	46.8	40.0	1871.3
回収 3	46.9	40.0	1874.6
回収 4	46.9	40.0	1878.0
回収 5	47.0	40.0	1881.3
回収 6	47.1	40.0	1884.7

バイオマス生産性 (g/L/日)	22.5
バイオマスの EPA 含有量 (%)	2.3
EPA 生産性 (mg/L/h)	21.6

	3 日目		
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	47.2	40.0	1888.0
回収 2	47.6	40.0	1903.0
回収 3	48.0	40.0	1918.2
回収 4	48.3	40.0	1933.5
回収 5	48.7	40.0	1948.8
回収 6	49.1	40.0	1964.4

バイオマス生産性 (g/L/日)	23.1
バイオマスの EPA 含有量 (%)	2.6
EPA 生産性 (mg/L/h)	25.0

10

20

30

40

【表 6-2】

4 日目			
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	49.5	38.0	1881.0
回収 2	50.3	38.0	1909.7
回収 3	51.0	38.0	1938.7
回収 4	51.8	38.0	1968.3
回収 5	52.6	38.0	1998.3
回収 6	53.4	38.0	2028.7

バイオマス生産性 (g/L/H)	24.4
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.5
EPA生産性 (mg/L/h)	25.4

5 日目			
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	54.2	38.0	2059.6
回収 2	53.6	38.0	2037.5
回収 3	53.0	38.0	2015.6
回収 4	52.5	38.0	1994.0
回収 5	51.9	38.0	1972.5
回収 6	51.4	38.0	1951.4

バイオマス生産性 (g/L/日)	25.1
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.2
EPA生産性 (mg/L/h)	23.0

6 日目			
	DCW (g/L)	回収 (L)	回収バイオマス (g)
回収 1	50.8	38.0	1930.4
回収 2	49.9	38.0	1896.0
回収 3	49.0	38.0	1862.1
回収 4	48.1	38.0	1828.9
回収 5	47.3	38.0	1796.3
回収 6	46.4	38.0	1764.3

バイオマス生産性 (g/L/日)	23.1
バイオマスのEPA含有量 (%)	2.2
EPA生産性 (mg/L/h)	21.2

【0202】

実施例 7 より大規模な培養のための説明

【0203】

Nitzschia laevis 株 In1CS20 の培養物を 80,000 L 攪拌タンク発酵槽中 70,000 L の培地にて増殖させる。pH は、KOH を添加して 8.0 以上に維持、温度は 20℃ に維持、および圧力は周囲より約 300 mbar 上に維持する

。容器中60,000L地点で飽和度30%を上回る溶存酸素レベルを維持するよう、攪拌を調整する。

【0204】

培養物1リットルにつき約40gの乾燥菌体重量の密度まで細胞を増殖させ、回収を開始した。回収時約7000リットルの培養物を、圧力を輸送力として使って4時間毎に容器から引き抜き、新鮮培地で容量を70,000Lに戻す。これを21日間持続し、藻類バイオマスの乾燥重量約35トンまたは24g/L/日に匹敵する量をこの期間の過程にわたって生産する。

【0205】

培地充填に加えて、メタケイ酸ナトリウム溶液を別に連続的に培養物に供給、すなわち、約7.5%w/wメタケイ酸ナトリウム五水和物)／乾燥菌体重量で供給する。

10

実施例8 珪藻の対数期増殖をサポートするための栄養素(硫黄)レベルの確認

【0206】

硫黄を欠いた完全に確定した増殖培地を作製し、ここでは硫黄は別として全ての栄養素はpH8.0にて無制限に供給した。

【0207】

一連の重複無菌培地を250mLの三角フラスコに、各種の量の硫酸マグネシウムを添加してある100mLの無硫黄培地を加えて調製した。細胞要求に必要な量よりも少し多めとなるよう期待して、硫酸塩の濃度のより高いものを、このレベルの40%、30%、20%、10%および0%である他の濃度と共に選択した。

20

【0208】

次いでフラスコに低レベルの、指数的に増殖する*Nitzschia laevis*細胞(5mg乾燥重量/フラスコ)を接種して、先の培養からの硫黄のキャリーオーバーを制限した。フラスコは20℃のオービタルシェーカー上に置いて増殖させた。

【0209】

培養乾燥重量を培養3日目～8日目に決定した。添加硫黄の無い培養とは別に、培養4日目までに同様のレベルの増殖が見られ、この時点で、硫黄の供給量が多いものほどより高密度に増殖して、細胞密度が分岐した。(図2を参照)。

【0210】

硫黄供給に対するピーク乾燥菌体重量をプロットして(図3)、十分な硫黄を供給した接種材料によって、バイオマスが約1.5g/Lまで蓄積されたが、その後最大で約98.5mgの乾燥菌体重量を硫黄1mgにつき生産できたことが確認された。これによって従来のバッチ発酵(1gの乾燥菌体重量につき10.1mgのS)におけるバイオマスの増殖をサポートするために必要な硫黄の最小量を決定できた。

30

【0211】

しかし、培養物がその最高乾燥重量に到達するより早く対数期増殖をでることは、図2より明らかである。細胞を対数期増殖に維持するのに必要な硫黄量を計算するため、まず培養物における真の硫黄量を、硫黄がゼロ(無硫黄)培養にて蓄積されたバイオマス量および乾燥菌体重量当たりの硫黄要求を用いて計算した。次いで、培養物が対数期増殖からそれた時の乾燥菌体重量を、培地の修正硫黄含有量に対してプロットし(図4)、1mgの硫黄につき対数期増殖に維持できた乾燥菌体重量がわずか91.9mgであったことが確認された。このことは、培養物を対数期に維持するためには1gの乾燥菌体重量につき10.9mgの硫黄が必要であると言い換えられる。

40

【0212】

45gのDCW/Lの密度の培養物において、この約8%の違いは、約36mg/Lの硫黄または600mg/Lを超える硫酸マグネシウム七水和物の追加要求量に達し、結果としてアプローチにおける違いがどれだけ培地設計にとって重要であるかが実証された。

【0213】

対数期増殖をサポートする培地設計を決定するため、培地における各栄養素について本実験を行った。したがって、いったん本願における教示を得れば、本実施例にしたがって

50

いろいろな規模の発酵で多様な珪藻類の対数期増殖をサポートする培地を設計できる。

実施例9 *Cyclotella cryptica*の使用についての説明

【0214】

珪藻 *Cyclotella cryptica* を14 Lの発酵槽中連続培養で従属栄養的に培養する。培地組成は、Pahlら (J Bioscience and Bioengineering 109: 235-239 (2010)) 実施例8の方法の通りに調整した。)) に従う。pHは7.2~8.1に維持し温度は23℃~25℃に維持する。培養乾燥菌体重量は少なくとも40 gの乾燥重量/Lに増加させ、この時点で培養物の10%回収および再充填の、4時間サイクルを開始する。ケイ酸塩と新鮮培地を、実施例1のように培養物に供給した。バイオマスのEPA含有量は、乾燥菌体重量の少なくとも2%であることが期待される。回収した培養物は遠心分離によって少なくとも150 gの乾燥wt/Lに濃縮し、凍結乾燥する。凍結乾燥したバイオマスはエタノールで抽出し、エタノール抽出物中の脂質はエステル交換してFAEEを形成する。FAEEは短行程蒸留によって部分的に濃縮し(着色化合物の除去)、次いでEPA-EEを、分子蒸留によって少なくとも60%純度に精製する。

10

実施例10 *Phaeodactylum tricornutum*の使用についての説明

【0215】

珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* (絶対光独立栄養生物) をまずAptら (米国特許番号7,939,710) の方法にしたがって変換し、エネルギー源としてグルコースと炭素を使って従属栄養的に増殖する能力を付与する。変換した生物をAptら (米国特許番号7,939,710) (実施例8の方法の通りに調整) 記載する培地を使って14 Lの発酵槽中連続培養で従属栄養的に培養する。pHは最初に8.0より上に設定、維持する。温度は28℃に維持し、攪拌と通気を調整して少なくとも空気飽和度40%の溶存酸素レベルを維持する。培養乾燥菌体重量を少なくとも20 gの乾燥重量/Lに増加させ、この時点で培養物の10%回収および再充填の、4時間サイクルを開始する。ケイ酸塩と新鮮培地を、実施例1のように培養物に供給した。バイオマスのEPA含有量は、少なくとも2%の乾燥菌体重量であることが期待される。回収した培養物は遠心分離によって少なくとも150 gの乾燥wt/Lに濃縮し、凍結乾燥する。凍結乾燥したバイオマスはエタノールで抽出し、エタノール抽出物中の脂質はエステル交換してFAEEを形成する。FAEEは短行程蒸留によって部分的に濃縮し、次いでEPA-EEを、分子蒸留によって少なくとも50%純度に精製する。

20

30

【0216】

培養乾燥菌体重量および回収方式は、少なくとも20 gの乾燥重量/L/日の速度でバイオマスを生産するように、選択する。培地条件は、生産されるバイオマスが、乾燥菌体重量の2%より高いレベルでEPAを含むように選択する。

【図 1】

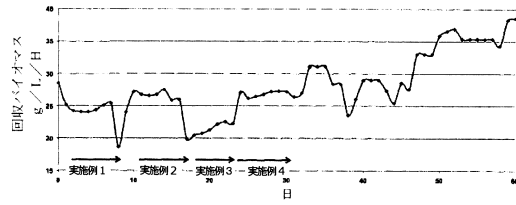


図 1

【図 2】

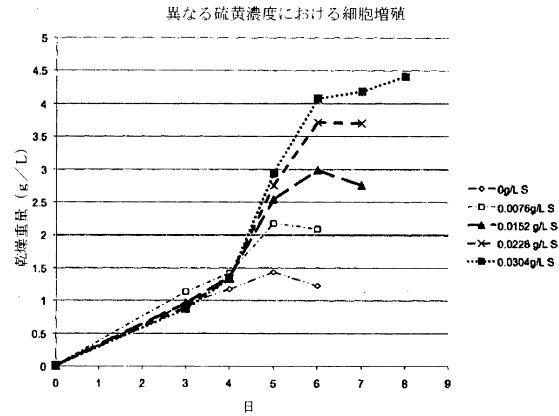


図 2

【図 3】

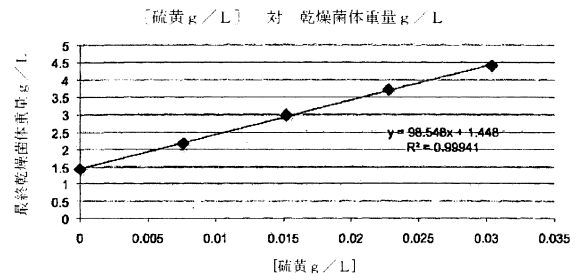


図 3

【図 4】

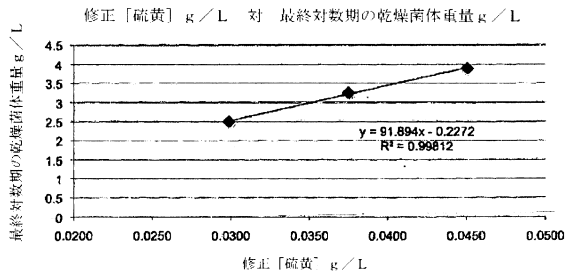


図 4

フロントページの続き

- (72)発明者 グリフィス ハイウェル デイヴィッド
ニュージーランド国 オークランド キャンベルズ ベイ ビーチ ロード 266
- (72)発明者 ギブズ モールランド デイヴィッド
ニュージーランド国 オークランド オラケイ アオテア ストリート 109シー

審査官 小倉 梢

- (56)参考文献 国際公開第2011/155852 (WO, A1)
国際公開第2012/071983 (WO, A1)
Process Biochemistry, 2002年, Vol. 38, p. 523-529

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 1/38
C11B 1/00 - 1/16
C11B 3/00 - 3/16
C11C 3/00 - 3/14
C12P 7/00 - 7/66
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
WPIDS/WPIX (STN)