

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6694820号
(P6694820)

(45) 発行日 令和2年5月20日 (2020.5.20)

(24) 登録日 令和2年4月22日 (2020.4.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 C

請求項の数 12 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2016-547843 (P2016-547843)	(73) 特許権者	516216276
(86) (22) 出願日	平成27年1月27日 (2015.1.27)		ユニヴァーシティ オヴ ニューカッスル アポン タイン
(65) 公表番号	特表2017-503516 (P2017-503516A)		UNIVERSITY OF NEWCA STLE UPON TYNE
(43) 公表日	平成29年2月2日 (2017.2.2)		イギリス国 エヌイー1 7アールユー ニューカッスル アポン タイン、デヴォ ンシャイヤー ビルディング、ファースト フロアー、リサーチ アンド エンター プライズ サービス、エスエージーイー エンタープライズ チーム
(86) 国際出願番号	PCT/GB2015/050183		SAG Enterprise Tea m, Research and Ente rprise Services, Fir st Floor, Devonshire
(87) 国際公開番号	W02015/110844		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成27年7月30日 (2015.7.30)		
審査請求日	平成30年1月26日 (2018.1.26)		
(31) 優先権主張番号	61/931, 723		
(32) 優先日	平成26年1月27日 (2014.1.27)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/013, 479		
(32) 優先日	平成26年6月17日 (2014.6.17)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 フィコシアニン合成の改善

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) シアノバクテリアを成長培地において培養するステップと、

(ii) 光の供給源を用意するステップとを含み、

前記光は最大波長が670～690nmの電磁放射線から成り、前記培養中のシアノバ
クテリアのフィコシアニン合成を促進する

ことを特徴とするフィコシアニン合成方法。

【請求項 2】

前記シアノバクテリア *Spirulina* 又は *Arthrospira* 属である

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記電磁放射線が680nmの最大波長である

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記電磁放射線が682nmの最大波長である

請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記電磁放射線が678nmの最大波長発光である

請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

10

20

前記合成されたフィコシアニンのレベルが、白色光の存在下で培養した同一シアノバクテリアにおいて合成されたフィコシアニンのレベルより少なくとも4.5倍高い

請求項1に記載の方法。

【請求項7】

生化学物質の合成に適し、前記生化学物質が、ヒアルロナン、グルコサミン、サッカライド、多糖、フィコビリタンパク質、アロフィコシアニン、フィコエリトリン、ビリル、フィコビリル、プロテオグリカン及びグリコサミノグリカンから成る群から選択される

請求項1に記載の方法。

【請求項8】

容器とランプとを備え、前記ランプは最大波長が670～690nmの電磁放射線を生じ、前記容器がフィコシアニンを合成可能なシアノバクテリアを培養する成長培地を備え、前記放射線が前記シアノバクテリアの前記フィコシアニン合成を促進し、前記合成されたフィコシアニンのレベルが、白色光の存在下で培養した同一シアノバクテリアにおいて合成されたフィコシアニンのレベルより高い

ことを特徴とするフィコシアニン生産システム。

【請求項9】

前記シアノバクテリアが *Spirulina* 又は *Arthrospira* 属である

請求項8に記載のフィコシアニン生産システム。

【請求項10】

前記電磁放射線が最大波長680～690nmである

請求項8に記載のフィコシアニン生産システム。

【請求項11】

前記合成されたフィコシアニンのレベルが、白色光の存在下で培養した同一シアノバクテリアにおいて合成されたフィコシアニンのレベルより少なくとも4.5倍高い

請求項8に記載のフィコシアニン生産システム。

【請求項12】

前記容器が、タンク、バイオリアクタ、池又は開放水路である

請求項8に記載のフィコシアニン生産システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、あらゆる目的のために参照により全て本願に援用される、以下の2014年1月27日に出願の米国仮特許出願番号第61/931723号“Improvement in the Synthesis of Phycocyanin”を優先権とする2015年1月27日出願のPCT/GB2015/0501837（特許文献1）及び2014年6月17日に出願の米国仮特許出願番号第62/013479号“Improvements in the Synthesis of Phycocyanins”（特許文献2）の優先権及び利益を主張するものである。

本発明は、色素のレベル及び濃度が上昇する微生物細胞培養条件を用いることに関する。

【背景技術】

【0002】

フィコシアニン（PC）は、原核生物であるシアノバクテリア及び特定の真核生物、例えば紅藻、クリプトモナド及び灰色藻（*glaucozystophyte*）で産生される発色団である青色のビリタンパク質である。健康問題と関連づけられている合成着色料のブリリアントブルーFCFに置き換わる天然の食品着色料としてのPCの利用は増加しつつある。水におけるその高い溶解度及び広いpH範囲にわたる安定性から、PCは特に食品着色料としての使用に適している〔非特許文献1〕。加えて、PCは、その酸化防止及び抗炎症特性から、他の関連する健康上の効用も相まって、機能性食品、医薬品及び薬用化粧品業界において高純度で使用されている〔非特許文献2～4〕。より精製度が低い

10

20

30

40

50

PCも、観賞用の魚及び鳥の色を良くするために動物飼料用の添加物として使用されている。最高品質及び純度のPCは、その蛍光特性から、検査キットで使用されている。また、医療で使用するために、PCの治療効果について、始まったばかりながら研究が続けられている〔非特許文献5〕。PC市場はその揺籃期にある。

【0003】

シアノバクテリアにおいて、PCはチラコイド膜内に存在し、フィコエリトリン（PE）及びアロフィコシアニン（AP又はAPC）を含めた他のポリタンパク質と複合体を形成し、これらが一緒になってフィコビリソームとして知られる集光性器官として機能する〔非特許文献6〕。フィコビリソームはクロロフィルが利用できない特定の波長の光を吸収することで光合成の効率を上昇させる〔非特許文献7〕。PCは最大で610～620nmで吸収し、PEは540～570nm、APCは650～655nmで吸収する〔非特許文献6〕。

10

【0004】

シアノバクテリアはPC生産用に水産養殖で広く用いられており、将来的には真核生物も活用される可能性がある。シアノバクテリアの中では、*Arthrospira*属（以前は*Spirulina*属として知られ、商業的には依然として「スピルリナ」として知られる）が最も一般的に培養されている属であるが、PCは他の属、例えば*Aphanizomenon*及び*Anabaena*からも抽出されている。主な培養種は*Arthrospira platensis*及び*A. maxima*である。これらの種は共に、螺旋形の糸状体又はトリコームを有する糸状のシアノバクテリアである。

20

【0005】

その高いPC含有量に加えて、スピルリナは多量の他の栄養補助成分、例えばビタミン及びPUFAも含有し、また単細胞タンパク質が豊富である。そのため、欧米におけるPCへの商業的な関心は高まりつつある〔非特許文献1〕。しかしながら、東洋及びアフリカにおいて、スピルリナは何世紀にもわたって食品として用いられている〔非特許文献9〕。スピルリナ生物有機体はそれだけでも売れる製品であるが、純粋なフィコシアニンは、純度によっては市場価値が極めて高くなる。

【0006】

水分子は遠赤領域の光を吸収するため、自然の藻類環境においては、光合成に関してこの波長で制限が生じる〔非特許文献6〕。浮遊物質により短い波長の光も散乱するため、自然界では青～緑の波長の光ばかりが藻類に供給される。したがって、利用可能な光は環境因子によって決定され、藻類は適応により、利用可能な光の質及び量を活用できるようになる。

30

【0007】

PE及びPCを含有する一部のシアノバクテリアは補色適応と呼ばれる現象を示し、PC：PE比は、異なる光状況に応答して、合成の調節により変化する〔非特許文献10、11〕。最近の研究から、*A. platensis*を特定の波長の光の存在下で操作することでPCの生産量を増やせることが判明している。

【0008】

光フィルタの使用により、Walterら（2012）〔非特許文献12〕は、赤色光（600～700nm）下ではPCの純度が上昇することを実証した。Wangらの以前の研究でも、*A. platensis*生物有機体の生産性が赤色光下での培養で高くなると判明している〔非特許文献13〕。Wangらによる計算は、エネルギーの生物有機体への変換がより効率的であることから、赤色光の使用が光独立栄養的な生産にとって経済的に有益になり得ることを実証した。Farges（2009）〔非特許文献19〕も、多色及び単色光源下での*A. platensis*の成長をモデル化し、電氣的エネルギー消費量の低下及び変わらぬ同等の成長速度の結果としての、赤色620nmLED下での培養効率における数学的上昇を実証している。しかしながら、単色の赤色LED光（620nm）では*A. platensis*のPC濃度が、白色／多色及び赤色＋青色多色LEDと比較して2倍低下することが判明している。これらの研究は、異なる波長の光の下で

40

50

の培養が *A. platensis* 培養物における PC 濃度及び純度に影響し得ることを実証している。しかしながら、通常の赤色 LED のものを超えた波長を使用した試験は行われていない。

したがって、フィコシアニンを合成するための改善された、より低コストの方法が当該分野で必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】PCT/GB2015/0501837

【特許文献2】米国仮特許出願番号第62/013479号

10

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Vonshak, A. 1997. *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology*. CRC Press, London

【非特許文献2】Gonzalez, R. et al. 1999. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacological Research* 39 (1) : 55-59

【非特許文献3】Romy, C. et al. 1998. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflammation Research* 47 : 36-41

20

【非特許文献4】Pinero Estrada, J. E., Bermejo Bescos, P., and Villar del Fresno, A. M. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco* 56 : 497-500

【非特許文献5】Belay, A. 2002. The Potential Application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *The Journal of the American Nutraceutical Association* 5 (2) : 27-48

30

【非特許文献6】Kirk, J. O. T. 2000. *Light & Photosynthesis in Aquatic Systems*. Second ed. Cambridge University Press, Cambridge

【非特許文献7】Wang, R. T., Stevens, C. L. R., and Myers, J. 1977. Action spectra for photoreactions i and ii of photosynthesis in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Photochemistry and Photobiology* 25 (1) : 103-108

40

【非特許文献8】Johnson, J. D. 2006. The Manganese-calcium oxide cluster of Photosystem II and its assimilation by the Cyanobacteria. 2006 (最終アクセス日: 2012年7月20日) <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/oec/motmc.htm> から入手可能

【非特許文献9】Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington, T. C., and Hasan, M. R. 2008. A review on culture, production and use of *spirulina* as

50

food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries and Aquaculture: Rome

【非特許文献10】Bennett, A., Bogorad, L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. The Journal of Cell Biology 58 (2) : 419-435

【非特許文献11】Bogorad, L. 1975. Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. Annual Review of Plant Physiology 26 : 369-401

10

【非特許文献12】Walter, A. et al. 2011. Study of phycocyanin production from *Spirulina platensis* under different light spectra. Brazilian Archives of Biology and Technology 54 : 675-682

【非特許文献13】Wang, C. -Y., Fu, C. -C, and Liu, Y. -C. 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. Biochemical Engineering Journal 37 (1) : 21-25

20

【非特許文献14】Griffiths, M. J., Garcin, C, van Hille, R. P., and Harrison, S. T. L. 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. Journal of Microbiological Methods 85 (2) : 119-123

【非特許文献15】Zhang, Y. -M. and Chen, F. 1999. A simple method for efficient separation and purification of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. Biotechnology Techniques 13 (9) : 601-603

30

【非特許文献16】Boussiba, S. and Richmond, A. E. 1979. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. Archives of Microbiology 120 (2) : 155-159

【非特許文献17】Sudhir et al. 2005. The Effects of Salt Stress on Photosynthetic Electron Transport and Thylakoid Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 38 : 481-485

40

【非特許文献18】Verma, K., Mohanty, P. 2000. Changes of the photosynthetic apparatus in *Spirulina cyanobacterium* by sodium stress. Z Naturforsch C 55 : 16-22

【非特許文献19】Farges, B., Laroche, C, Cornet, J. F., and Dussap, C. G. 2009. Spectral kinetic modeling and long-term behavior assessment

50

of *Arthrospira platensis* growth in photobioreactor under red (620nm) light illumination. *Biotechnol Prog* 25 (1) : 151-62

【発明の概要】

【0011】

本明細書で開示の発明は、フィコシアニンの改善された合成に使用し得る装置及び方法を提供する。本方法ではフィコシアニンレベルの10倍を超える上昇という、従来技術からの明白な改善がみられる。本方法では、フィコシアニンの収穫についても改善がみられる。

【0012】

本明細書で開示の装置は数多くの用途で使用し得て、用途には、以下に限定するものではないが、天然の食品着色料、栄養補助食品業界、機能性食品業界、医薬品業界及び薬用化粧品業界における酸化防止剤並びに非毒性インクとしての使用が含まれる。

【0013】

本発明は、フィコシアニン並びに、以下に限定するものではないが、ヒアルロナン、グルコサミン、他のサッカライド及び／又は多糖、他のフィコビリタンパク質、例えば、以下に限定するものではないが、アロフィコシアニン、フィコエリトリン、ビリル、フィコビリル、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどを含めた他の天然の生化学的組成物を合成及び商業的に生産するための改善された方法を提供する。

【0014】

一実施形態において、本方法は、フィコシアニンを合成可能な微生物を用意し、適切な培養／成長培地を用意し、培養中の微生物に赤色及び／又は近赤外光を照射し、あるいは、培養中の微生物に赤色及び／又は近赤外単色光を照射することを含む。代替の実施形態において、本方法は、培養中の微生物に白色光を照射することも提供する。

【0015】

別の実施形態において、本方法は、天然又は人工のエネルギー源由来のエネルギーを用いて炭素系組成物を光合成可能な生物を用意することを含む。この生物は光合成細菌、光合成古細菌 (archaeon)、光合成原生生物、光合成藻類、光合成蘚類又は光合成植物になり得る。この生物は天然の種になり得る。あるいは、この生物は組み換えDNA技術を用いて作り出された合成生物になり得る。この生物は栽培植物化した植物種になり得て、また別の生物由来のDNAも含み得る。

【0016】

一実施形態において、近赤外光は、約630～約720nmの波長を有する電磁放射線を含む。別の実施形態において、近赤外単色光は、約680nmの波長を有する電磁放射線を含む。代替の実施形態において、近赤外単色光は、約678nmの波長を有する電磁放射線を含む。別の代替の実施形態において、近赤外単色光は、約682nmの波長を有する電磁放射線を含む。一実施形態において、白色光は、約350～約760nmの波長を有する電磁放射線を含む。別の代替の実施形態において、近赤外単色光は、約650nmの波長を有する電磁放射線を含む。さらに別の代替の実施形態において、近赤外単色光は、約720nmの波長を有する電磁放射線を含む。さらに別の代替の実施形態において、単色光は、約450～590nmの波長を有する電磁放射線を含む。

【0017】

別の実施形態において、赤色光は、640～720nmの波長を有する電磁放射線から成る。別の実施形態において、赤色光は、640～1000nmの波長を有する電磁放射線から成る。別の実施形態において、赤色光は、680nmの最大波長発光を有する電磁放射線から成る。代替の実施形態において、赤色光は、678nmの波長を有する電磁放射線から成る。別の代替の実施形態において、赤色光は、682nmの波長を有する電磁放射線から成る。一実施形態において、白色光は、350～760nmの波長を有する電磁放射線から成る。

【0018】

別の好ましい実施形態において、合成されたフィコシアニンは、微生物から浸出する。

【0019】

別の実施形態において、フィコシアニンを合成可能な微生物は、池系又は開放水路系において培養される。好ましい実施形態においては、 $>640\text{ nm}$ LED管を池系又は開放水路系に設置し、これによって微生物におけるフィコシアニンの合成量が増加する。

【0020】

別の実施形態において、本発明はフィコシアニンを生産するためのシステムを考えており、このシステムは容器とランプとを備え、ランプは少なくとも 640 nm 以上の波長を有する電磁エネルギーを発生し、容器はフィコシアニンを合成可能な微生物をさらに含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】光合成におけるエネルギー変換過程の概略説明図。P680及びP700はそれぞれ光化学系II及び光化学系Iの反応中心Chl aを表す。フィコシアニン(PC)($610\sim620\text{ nm}$)は、光合成で使用するために特定の波長の光を吸収するフィコビリソーム集光性器官のためのフィコエリトリン(PE)($540\sim570\text{ nm}$)及びアロフィコシアニン(APC)との複合体中に存在する。

【図2】交換式LEDジャケットを備えたInfor s攪拌槽型フォトバイオリアクタシステムの説明図

【図3】典型的な白色LED、典型的な赤色LED(典型的には $620\sim640\text{ nm}$ 付近)及び 680 nm LED光を比較した典型的な発光スペクトル。右は最適発光波長 680 nm で狭く強い光を放出している 680 nm LEDの発光スペクトルを示す。

20

【図4】別々のA. platensis培養バッチランについての成長曲線(エラーバーは平均値の標準誤差を表す)。表に典型的な白色LEDと比較した、 680 nm LED下でのA. platensisの平均成長速度を記す。2つの光条件下での成長に有意な差はみられなかった。

【図5】 678 nm で正規化し、 680 nm LED下で培養したA. platensisからのフィコシアニン抽出物の吸光度スペクトル。典型的な白色LEDと比較した。薄い破線は誤差(平均値の標準誤差)を表す。フィコシアニンを表す大きい吸収ピークが、 680 nm LED下で培養したA. platensisからの抽出物において 620 nm 付近にみられる。

30

【図6】典型的な白色LEDと比較した、 680 nm LED下で培養したA. platensisからの平均フィコシアニン収率(mg/g)。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。フィコシアニンレベルにおける大きく有意な上昇が、 680 nm LED下で培養したA. platensisにみられる。

【図7】典型的な白色LEDと比較した、 680 nm LED下で培養したA. platensis培養物の質量スペクトル。2つの光条件下での豊富なタンパク質における違いを示す。

【図8】左は典型的な白色LED下で培養したA. platensis培養物(上)及び抽出物(下)。右は、 680 nm LED下で培養したA. platensis培養物(上)及び抽出物(下)である。

40

【図9】前のバッチから接種し 680 nm LED下で培養したA. platensisの別々のバッチについての平均フィコシアニン収率(mg/g)。ランを重ねるごとにフィコシアニン収率が上昇することを示している。これはA. platensisが適応を繰り返して光合成において 680 nm 光をより効率的に利用できることを示すと考えられる。

【図10】 680 nm 光下でのA. platensisバッチ培養物についての成長曲線。破線は、 680 nm 光を利用できるように順化していくA. platensis培養物を示す。順化が起きている誘導期は14日目まで続く。

【図11】左上： 680 nm LED下で培養した高フィコシアニン産生A. platen

50

s i s の凝集。顕微鏡画像は、凝集した培養物における A . p l a t e n s i s トリコーム上の結晶の存在と（下）、非凝集培養物における不在を示しており、おそらくはストレス反応としての細胞外多糖の増加を示している。

【発明を実施するための形態】

【0022】

一般開示事項

本文書で開示の実施形態は説明のための例にすぎず、本発明を限定するためのものではない。本発明の請求項の範囲から逸脱することなく他の実施形態も利用でき、また構造的な変更も加えることができる。

【0023】

明細書本文及び添付の請求項で使用する単数形には、文脈に明らかに反する場合を除き、複数の指示対象が含まれる。したがって、例えば、「ある粒子」と言う場合は複数のそのような粒子が含まれ、「ある表面」と言う場合は1つ以上の表面及びその均等物に言及している等である。

【0024】

電磁放射線の波長との関連で使用する記号「 $\geq$ 」は「 $\sim$ 以上」を意味し、「 $\geq 640\text{ nm}$ 」という記載は、少なくとも 640 nm 又はそれを超える波長、例えば 640 又は 641 nm を有する電磁放射線を意味する。

【0025】

電磁放射線の波長との関連で使用する語「約」は、記載の波長の 2 nm 以内の波長を意味する。したがって、「約 640 nm の波長」という記載は、電磁波波長が $638\sim 642\text{ nm}$ であることを意味する。

【0026】

本明細書で開示の発明は、フィコシアニンの合成に使用し得る装置及び方法を提供する。本方法ではフィコシアニンレベルの4.5倍を超える上昇という、従来技術からの明白な改善がみられる。本明細書で開示の装置は数多くの用途で使用し得て、用途には、以下に限定するものではないが、天然の食品着色料、栄養補助食品業界、機能性食品業界、医薬品業界及び薬用化粧品業界における酸化防止剤並びに非毒性インクとしての使用が含まれる。本発明は、フィコシアニンを合成及び商業的に生産するための改善された方法を提供する。

【0027】

実施形態例において、本方法は、フィコシアニンを合成可能な微生物を用意し、適切な培養／成長培地を用意し、培養中の微生物に赤色及び／又は近赤外光を照射し、あるいは、培養中の微生物に赤色及び／又は近赤外単色光を照射することを含む。代替の実施形態において、本方法は、培養中の微生物に白色光を照射することも提供する。

【0028】

一実施形態において、赤色光は、約 $640\sim 720\text{ nm}$ の波長を有する電磁放射線から成る。別の実施形態において、赤色光は、 $640\sim 1000\text{ nm}$ の波長を有する電磁放射線から成る。別の実施形態において、赤色光は、 680 nm の最大波長発光を有する電磁放射線から成る。代替の実施形態において、赤色光は、 678 nm の波長を有する電磁放射線から成る。別の代替の実施形態において、赤色光は、 682 nm の波長を有する電磁放射線から成る。別の代替の実施形態において、赤色光は、 690 nm の波長を有する電磁放射線から成る。別の代替の実施形態において、赤色光は、 670 nm の波長を有する電磁放射線から成る。代替の実施形態において、赤色光は 680 nm の平均波長を有する電磁放射線から成り、この波長は $640\sim 720\text{ nm}$ の95%信頼区間内にある。一実施形態において、白色光は、 $350\sim 760\text{ nm}$ の波長を有する電磁放射線から成る。

【0029】

赤色 680 nm LED 光下での培養は、白色光と比較して、A . p l a t e n s i s における PC 産生を平均で5倍増加させることが判明しており、その効果は培養物において視覚的に確認できた。質量スペクトル分析は、2種の異なる光源下での培養で生じた幾つ

10

20

30

40

50

かの大きな違い及びタンパク質レベルに関する変化を示している。2種の光源下での成長速度に有意な差はみられなかった。

【0030】

本発明は、以下の実施例を参照することでより速やかに理解できる。実施例は本発明の特定の態様及び実施形態を説明する目的で含めたにすぎず、限定を目的としたものではない。

【実施例】

【0031】

実施例 I：バッチ培養物

2.5 g/l の NaNO_3 (pH 8) を補充した F/2 滅菌培地 (CCAP [Culture Collection of Algae and Protozoa] レシピ) に、無菌条件下、20% (v/v) で、*Arthrospira platensis* (CCMP [Culture Collection of Marine Phytoplankton] 1295/Bigelow Laboratory、米国) (OD_{0.11}~0.12) を対数増殖期に接種した。白色 (Lumitronix Barre LED ハイパワー SMD 600mm、12V) 又は 680nm 赤色 LED を備えた攪拌槽型フォトバイオリアクタ (stirred tank photobioreactor: STPBR) (Infors Labfors 4 ベンチトップモディファイドバイオリアクタ) (図 2、3) に 2.75 l の培養物を装填し、30℃、 $45 \mu\text{mol}^{-1}\text{m}^{-2}$ 光強度、18:6 明暗サイクル、インペラ速度 200 rpm で、0.08 LPM (VVM (volume of air per volume of culture per minute: 1 分あたりの培養物 1 体積あたりの空気の体積) 約 0.03 リットル空気/リットル培地/分、LPM (Litres air per litres medium per minute)) で金網付きリングスパージャ (gauzed ring sparger) を通して天然圧縮空気 (約 0.03% CO_2) を供給して作動させた。pH 及び溶解した酸素をオンラインで 10 分間隔で記録した (Mettler Toledo プロブ)。8 ml の試料を無菌で 1 (接種)、3、6、7、10、13 及び 14 日目に分析のために採取した。

【0032】

実施例 II：成長測定

成長の尺度として、光学濃度 (OD) を、クロロフィルの自家蛍光 (CF) 及び直接細胞計数と共に用いた。OD を 750 nm、Griffiths ら (2011) [非特許文献 14] で、Cary 100 紫外線/可視分光光度計 (Varian) (F/2 培地で補正) を用いて 3 重で測定した。CF を、黒色の 96 ウェルプレートの各ウェルに分割した 3 つの 3 重 300 μl 試料において分析した。試料を 430 nm で励起させ、発光を 690 nm で FLUOstar OPTIMA 蛍光プレートリーダー (BMG LABTECH) を使用して測定した。示度を F/2 培地のブランク試料に対して読み取り、任意の蛍光単位の平均値を統計分析に使用した。細胞計数を、Sedgewick rafter カウンティングセル及び Leitz Dialux 20 光学顕微鏡を使用して行った。3 重の 10 のランダムな試料の計数を 1 μl の培養物について行った。

【0033】

実施例 III：形態学的アセスメント

20 のシアノバクテリアの螺旋の全長及び幅を測定することで、トリコームの形態学的な特徴における変化を評価した。画像を Leitz Dialux 20 光学顕微鏡及び EasyGrab ソフトウェアを用いて撮影し、分析を Image J を使用して行った。画像のサイズは、計数線を用いて 630 ピクセル mm^{-1} でキャリブレーションした。

【0034】

実施例 IV：フィコシアニン分析

PC の抽出は Zhang 及び Chen (1999) [非特許文献 15] の方法に基づいた。5 mL の試料を、事前に計量したガラス管に、3000 g/10 分 (Sigma 3

10

20

30

40

50

K18C遠心分離機)での遠心分離により収穫した。細胞を脱イオン水で一度洗浄し、湿潤した生物有機体の計量を行った。次に、ペレットを3mLの0.05Mリン酸ナトリウムバッファ(pH7)に再懸濁させた。細胞を1時間かけて凍結/融解サイクル(-20℃)により破壊し、3分間にわたって6ミクロンの振幅(Soniprep 150、MSE)で超音波処理した。次に、試料を10000gでの30分間にわたる遠心分離に供し(Sigma 1-15マイクロ遠心分離機)、上清の吸光度を、200~800nmで、分光光度計(Cary 100紫外線-可視分光光度計、Varian)により石英キュベットを使用してスキャンした。リン酸ナトリウムバッファ(0.05M)をブランクとして使用し、PC濃度及び純度を、Bennet及びBogorad(1973) [非特許文献10] (等式1)並びにBoussiba及びRichmond(1979) [非特許文献16] (等式2)の方法を用いてそれぞれ計算した。抽出率を、下の等式3にしたがって計算した。PC濃度は14日目(又は成長がOD0.33に達した時)に3重で分析した。

10

【0035】

1. $PC(mg/mL) = (A_{620} - 0.474(A_{655})) / 5.34$
2. $PC純度 = A_{620} / A_{280}$
3. $抽出率(mg PC / mg 生物有機体) = (PC濃度 * 溶媒体積(mL)) / 生物有機体(mg)$

【0036】

実施例V：質量分析(MS)

20

マトリックス調製：20mgのアルファシアノー4-ヒドロキシケイ皮酸(HCCA)(Brucker Daltonics)を1mlの50%アセトニトリル：2.5% TFA溶液と混合し、25℃での超音波水浴(Grant instruments、ケンブリッジ)における30分間のインキュベーションにより飽和させ、15分間にわたってボルテックスした。マトリックスを遠心分離に供し(14000g、1分間)(Sigma 1-15Kマイクロ遠心分離機)、50μlのアリコートを使用のために新しく準備した。

【0037】

試料の準備

1mlの試料を遠心分離に供し(14000g、5分間)(Sigma 1-15Kマイクロ遠心分離機)、ペレットを2回、新しい脱イオン水(fdw：fresh deionized water)で洗浄し、-80℃で冷凍保存した。ペレットを氷上で解凍し、スポッティングに先立って50μlのfdwに再懸濁させた。試料を1：1でHCCAマトリックスと混合し、4μlの2重試料をスチールのターゲットプレート(MTP384ターゲットプレートグラウンドスチール、Brucker)上に、キャリブラントとしての1μlのHCCAマトリックスを重ねた1μlの細菌スタンダード(Brucker)と共にスポットした。次に、試料をMS分析にかけた(BrukerウルトラフレックスII maldi-toftof)。スペクトルを、flexAnalysisソフトウェアパッケージ(Bruker)を使用して分析した。

30

【0038】

40

実施例VI：個体数分析

試料を15%滅菌グリセロール中で凍結させ、個体数分析のために-80℃で凍結させた(Dr. Andrew Free及びRocky Kindt、エジンバラ大学)。

【0039】

実施例VII：統計分析

データ分析を、Microsoft Excel 2007及びGraphpad Prism 5を使用して行った。

【0040】

実施例VIII：結果：成長

白色LED光と比較して、赤色680nm下での培養物の成長に顕著な違いは観察され

50

なかった（図4）。バッチ赤色2における大きな順化遅延期間に注目されたい（図4）。培養物は、順化して光合成において赤色680nm光を利用できるようになるまでに時間を必要とし（観察結果より）、この順化は可逆的であった。

【0041】

実施例IX：結果：PC分析

フィコシアニン₂は620nmで吸収する。赤色680nmLEDバッチの抽出物におけるPCの存在は、白色LEDよりずっと多かった（図5、6）。670～680nm付近の第2クロロフィルaピークにおいて興味深い青色シフトが観察され、ピーク赤色680nm抽出物吸収は677～678nmであり、ピーク白色抽出物吸収は673～674である（図6）。 10

【0042】

PC濃度は、赤色680nm下での培養を経て白色LED光より平均で5倍（少なくとも9個の試料）上昇し、赤色680nmLED光下では、白色光と比較して、PC純度が若干上昇した（図7表）。培養物においては視覚的な色の違いが観察され、これは赤色680nm光下で培養した細胞のPC含有量の上昇に起因する可能性が最も高い（図7）。

【0043】

実施例X：結果：MS分析

ホールセルMALDIスペクトルは、白色LED光と比較した、赤色680nm下での培養による豊富なタンパク質における違いを示した（図8）。 20

【0044】

実施例XI：結果：浸出差

MS分析用に準備した試料を廃棄する際、赤色680nm試料においては高濃度のPCが溶液となって浸出した（図9）。浸出したPCにおける色の変化は、白色LED光と比較して、赤色680nm培養物において目視ではるかに大きく、5倍上昇をはるかに超えるように見えた。これは赤色680nm培養物ではPC浸出特性が異なる可能性を示しており、下流側の加工（downstream processing：DSP）にとって有益になり得る。680nm光下での培養は、生物有機体からのPCの浸出を増加させ得る。

【0045】

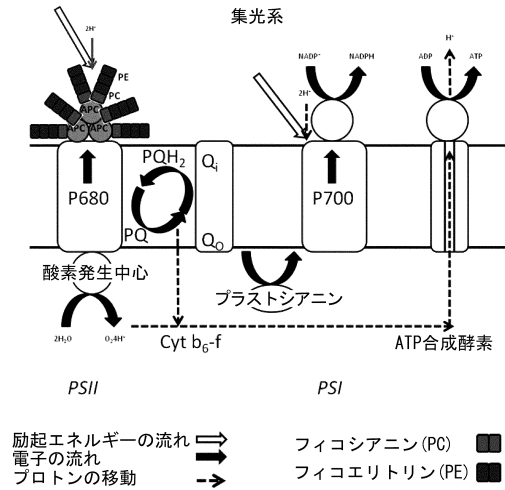
実施例XII：結果：培養物の凝集 30

680nm光下での培養は培養物の凝集も増大させ得て、DSPにとっては利点がある。凝集は、ストレス反応としての細胞外多糖（EPS）の産生の増加の結果になり得る。これは明らかに、当業者が予測し得なかった、予期せぬ優れた結果である。

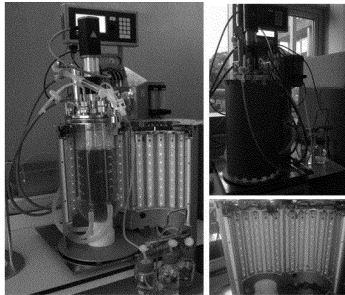
【0046】

当業者ならば、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、これまで説明してきた実施形態を様々に改造したり改変を加えたりできる。当該分野で公知の他の適切な技法及び方法が、当業者により数々の特定の様式でもって、本明細書に記載の本発明の内容を踏まえて適用可能である。したがって、本発明は本明細書で具体的に説明したものとは異なる形で実践し得る。これまでの記載内容は説明のためのものにすぎず、限定的ではない。上記の内容を検討すれば、数多くの他の実施形態が当業者には明白となる。したがって、本発明の範囲は、添付の請求項に、そのような請求項が享受できる均等物の全範囲と併せて準拠することで決定される。 40

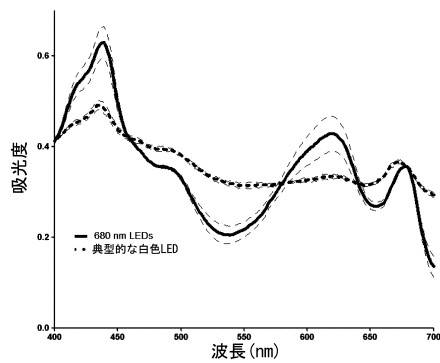
【図 1】



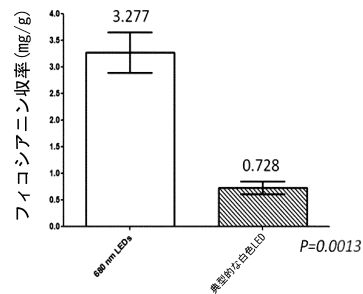
【図 2】



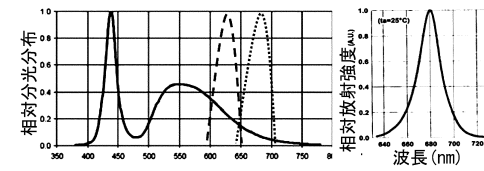
【図 5】



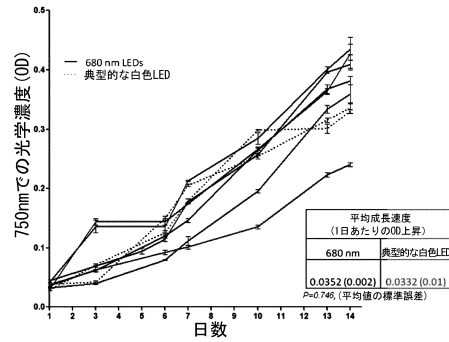
【図 6】



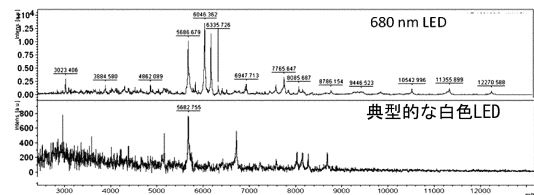
【図 3】



【図 4】



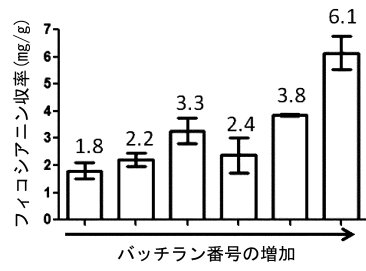
【図 7】



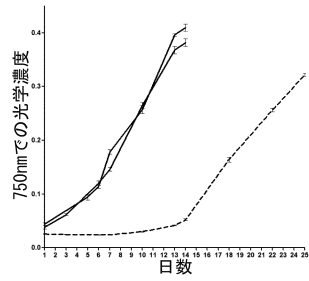
【図 8】



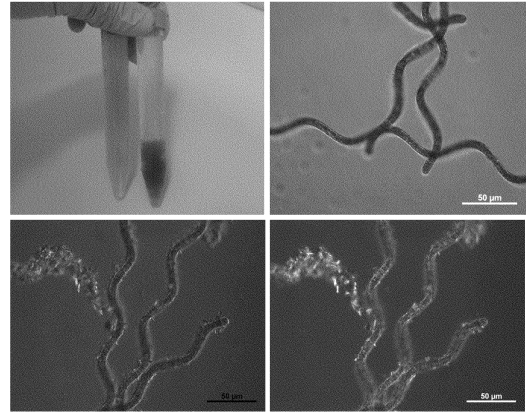
【図 9】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

(73)特許権者 516216276

ユニヴァーシティ オヴ ニューカッスル アポン タイン
UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPON TYNE
イギリス国 エヌイー1 7アールユー ニューカッスル アポン タイン、デヴォンシャイヤー
ビルディング、ファースト フロアー、リサーチ アンド エンタープライズ サービス、エ
スエージーイー エンタープライズ チーム
SAGE Enterprise Team, Research and Enterprise
Services, First Floor, Devonshire Building, Ne
wcastle upon Tyne NE1 7RU Great Britain

(74)代理人 100130111

弁理士 新保 斉

(72)発明者 ブレイン、チェルシー マリー

イギリス国 エヌイー6 1ティーティー ニューカッスル アポン タイン、エスティー パー
ターズ ベイスン ドブソン クレセント 9

(72)発明者 カルドウエル、ゲアリー スティーブン

イギリス国 エヌイー63 0エックスエル ノーサンバーランド、アッシントン、ノース シー
トン、カッスル アイランド ウエイ、リバーバンク ハウス

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特開2002-315569 (JP, A)

国際公開第2013/056142 (WO, A1)

特開2004-027041 (JP, A)

国際公開第2011/065445 (WO, A1)

特開2013-099254 (JP, A)

国際公開第2012/070435 (WO, A1)

特開2013-153744 (JP, A)

国際公開第2013/021675 (WO, A1)

特開平06-212309 (JP, A)

WANG, C.Y. et al., "Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*.", BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, 2007年10月15日, Vol.37, No.1, pp.21-25, doi: 10.1016/j.bej.2007.03.004

TAKANO, H. et al., "Effects of intensity and quality of light on phycocyanin production by a marine cyanobacterium sp. NKBG 042902.", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 1995年11月, Vol.43, No.6, pp.1014-1018

MARKOU, G. et al., "Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode.", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, 2014年 3月, Vol.172, No.5, pp.2758-2768, doi: 10.1007/s12010-014-0727-3

TAKANO, H. et al., "Effects of intensity and quality of light on phycocyanin production by a marine cyanobacterium sp. NKBG 042902.", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 1995年11月, Vol.43, No.6, pp.1014-1018

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 1/00-41/00

C12M 1/00- 3/10

C12N 1/00- 7/08

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/00- 3/00

C07K 1/00-19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed