

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6480187号
(P6480187)

(45) 発行日 平成31年3月6日 (2019.3.6)

(24) 登録日 平成31年2月15日 (2019.2.15)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 1/12 (2006.01)

C 1 2 N 1/12 A

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/12 C

C 1 2 N 1/00 B

請求項の数 8 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2014-561497 (P2014-561497)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (65) 公表番号 特表2015-509732 (P2015-509732A)
 (43) 公表日 平成27年4月2日 (2015.4.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2013/050542
 (87) 国際公開番号 W02013/136025
 (87) 国際公開日 平成25年9月19日 (2013.9.19)
 審査請求日 平成28年2月19日 (2016.2.19)
 (31) 優先権主張番号 1252378
 (32) 優先日 平成24年3月16日 (2012.3.16)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 1257843
 (32) 優先日 平成24年8月16日 (2012.8.16)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 513127711
 フェルメンタル
 フランス国, エフ-33500 リブルヌ
 , リュ リビエール 4
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

微生物の受託番号 CCAP CCAP 1052/21

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ニツシア (N i t z s c h i a) による混合栄養モードでのドコサヘキサエン酸および／または
 エイコサペンタエン酸および／またはカロテノイドの産生

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ニツシア・プレピロストリスの微細藻類を取得する方法であって、以下のステップ：

a) 振幅が $50 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、変化が1時間につき $2 \sim 200$ 回起こる、5秒間～10分間の持続時間で明相と暗相が切り替わるフラッシュの形態で供給される不連続な照明の条件下にて混合栄養モードでニツシア属の1つ以上の株を培養するステップ、
 b) 培地内の有機炭素含有基質の存在下で数世代にわたって前記培養物を維持するステップ、及び
 c) このように培養した微細藻類を回収するステップ、
 を含む方法。

【請求項 2】

前記培養を $5 \text{ mM} \sim 1 \text{ M}$ 、好ましくは $50 \text{ mM} \sim 800 \text{ mM}$ 、より好ましくは $70 \text{ mM} \sim 600 \text{ mM}$ 、より一層好ましくは $100 \text{ mM} \sim 500 \text{ mM}$ の濃度の炭素含有基質の存在下で実施し、その有機炭素含有基質の選択を、乳酸塩、ラクトース、蔗糖、酢酸塩、グリセロール、グルコース、セルロース誘導体、これら分子の混合物の中から行なうことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

培地の中に存在する前記有機炭素含有基質が少なくとも 5 mM のグルコースを含むことを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

フラッシュの数が、1時間につき 10～150回であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

1時間あたりの全光照射量が、フォトンのマイクロモル数を単位として $2,000 \sim 600,000$ マイクロモル/m²、好ましくは $2,000 \sim 200,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ であることを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

更に、以下のステップ：

d) その微細藻類から疎水性物質を回収するステップ、必要に応じて

10

e) 回収したその疎水性脂質からDHA及び/又はEPA及び/又はフコキサンチンを抽出するステップ、

を含むことを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ニツシア・ブレビロストリス種の微細藻類が、受入番号CCAP 1052/21でCCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に供託されたFCC 810株に対応することを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

請求項1～7のいずれか1項に記載の方法により取得できる、微細藻類の全乾燥重量の0.2%超のフコキサンチンを含有することを特徴とする、ニツシア属の微細藻類。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ニツシア (*Nitzschia*) 属、特にニツシア・ブレビロストリス (*Nitzschia brevirostris*) 種の微細藻類を混合栄養モードで特に不連続な照明および/または変化する照明の存在下にて培養する方法に関する。この方法により、バイオマスを高収率にすることと、このようにして培養された微細藻類の脂質、より具体的にはドコサヘキサエン酸 (DHA) および/またはエイコサペンタエン酸 (EPA) を豊富にすることが可能になる。また、この方法は、培養された微細藻類中のカロテノイド、特にフコキサンチンを豊富に取得することを可能とする。例えばこの方法により、混合栄養性であって、脂質、より具体的には多不飽和脂肪酸、及びカロテノイド、より具体的にはフコキサンチンの収率が高い、ニツシア、特にニツシア・ブレビロストリスの株を選択することができる。また、本発明は、ニツシア・ブレビロストリス種に属する微細藻類の株のうちで特にカロテノイドの産生に適した新規な株にも関する。ニツシア・ブレビロストリスのこの新規な株は、混合栄養モードでのドコサヘキサエン酸 (DHA) 及び/またはエイコサペンタエン酸 (EPA) 及び/又はフコキサンチンの産生に有用である。

30

【背景技術】

【0002】

40

微細藻類は、独立栄養性の光合成微生物、すなわち光合成によって自律的に増殖する傾向を有する光合成微生物である。

【0003】

微細藻類は、海水環境や、淡水または塩水のほか、さまざまな地上環境でも増殖する。

【0004】

淡水または海洋で見つかる微細藻類の大半の種は、一般に、独立栄養性である、すなわち光合成によってしか増殖することができない。それらの種にとって、環境中に有機性の炭素含有基質または有機材料が存在することは有利ではなく、増殖を向上させることはない。

【0005】

50

しかし科と起源が非常に多彩な微細藻類のいくつかの種は、厳密には独立栄養性ではないことがわかっている。例えばそのうちの従属栄養性と呼ばれるいくつかは、光がまったくなくない状態で、発酵によって、すなわち有機材料を利用して増殖することができる。

【0006】

増殖する上で光合成が不可欠な微細藻類の他の種は、光合成と、環境中に存在する有機材料の両方を利用することができる。混合栄養性と呼ばれるこれらの中間種は、光と有機材料の両方が存在する状態で培養することができる。

【0007】

“混合栄養性”と呼ばれる藻類のこの特徴は代謝と結び付いていて、その代謝によってこの藻類が光合成と発酵を同時に実行することが可能になっているように思われる。これら2種類の代謝は、藻類の増殖に対するプラスの全体的効果と共存している [Yang, C. 他 (2000年); Biochemical Engineering Journal、第6巻: 87~102ページ]。

10

【0008】

現在、微細藻類は多くの工業的プロジェクトの対象となっている。なぜならいくつかの種は、大量の脂質、特に多不飽和脂肪酸を蓄積または分泌することができるからである。

【0009】

これら多不飽和脂肪酸のうちで、オメガ-3シリーズ (PUFA- $\omega 3$) のいくつかの非常に不飽和な脂肪酸 (HUF A)、特にエイコサペンタエン酸 (EPAまたはC20:5 $\omega 3$) およびドコサヘキサエン酸 (DHAまたはC22:6 $\omega 3$) と、オメガ-6シリーズ (PUFA- $\omega 6$) からのいくつかの非常に不飽和な脂肪酸、特にアラキドン酸 (ARAまたはAA、またはエイコサテトラエン酸C20:4 $\omega 6$) が、栄養学的に重要であると認識されていて、治療の用途で大きな可能性がある。

20

【0010】

必須栄養素の一つとして、DHAは、細胞の通常の機能的発達に必須であり、様々な生化学的プロセス及び機能において、重大な役割を果たす。斯かる高度不飽和の特性は、植物及び動物の両方の細胞膜の特性に関して重要な役割を果たし、低温下での、特に魚の、例えば効率的な適応、あるいは生存を可能とする、流動性、柔軟性、及び選択的透過性をもたらす。

【0011】

30

DHAは、ヒトの脳の主要な構成要素である。DHAは、大脳皮質の15~20%を占め (成人の脳は20g以上のDHAを含有する)、網膜の30~60%を占める。DHAは、細胞膜に組み込まれることにより、神経系の発達及び網膜の機能にとって必須であり、映像及び記憶の機構を十分に維持し、適応において主要な役割を果たす。

【0012】

現在のところ、水産業からの魚油が、市場においてこのようなタイプの脂肪酸の主な供給源になっている。しかしこれらの油には新たな用途 (養殖における食品サプリメント、マーガリンへの組み込み) があるにもかかわらず、活発な漁獲活動が理由で海の漁獲資源が少なくなりつつある。

【0013】

40

したがって、これらのタイプの多不飽和脂肪酸に対する将来における要求の増大に対処するため、EPA、DHAやARAといった脂肪酸の新たな供給源を探す必要がある。

【0014】

微細藻類は、脂肪酸を新たに合成できることに加え、魚油と比べていくつかの利点を有する。微細藻類は、インビトロで制御された条件下において培養できるため、バイオマスを比較的一定の生化学的組成で産生することが可能であることに加え、魚油とは違って不快な臭いがなく、脂質にコレステロールがほとんど含まれないか、まったく含まれていない。

【0015】

最後に、微細藻類によって産生される脂質は、魚油よりも脂肪酸のプロファイルが簡単

50

であるため、興味の対象である脂肪酸を分離する工程の数が限られる。

【0016】

現在のところ、藻類の分類は、主に、形態的基準と、細胞に含まれる光合成色素の性質とに相変わらず基づいている。そのため、藻類は種と形態が非常に多彩であるにもかかわらず、この分類では、藻類の種が、独立栄養性、従属栄養性、混合栄養性のどれであるかがほとんどわからない[Dubinsky他(2010年); Hidrobiologia、第639巻:153~171ページ]。真核性藻類の分類には14の門が含まれる。脂肪酸を産生するこれらの門を構成するさまざまな綱の種の間で、微細藻類に含まれる多不飽和脂肪酸の含量が大きく異なっている。さらに、脂質プロファイル中の脂質、特にEPA、DHA及びARAの相対的な比率は、種と培養条件によって異なる。

10

【0017】

一方、カロテノイドも興味の対象となる分子である。これらは一般に色素として使用されるが、抗酸化剤としてヒトの健康に重要な役割も有している。最後に、それらは免疫系を刺激する能力を有する。フコキサンチンはカロテノイドの例であり、これは、日本料理の食材の海藻であるワカメ中に特に含まれる。

【0018】

微細藻類による脂肪酸及び/又はカロテノイドの産生を工業的スケールで実現するには、複数の因子を考慮する必要がある。例えば培養は、株、温度、光の条件、発酵装置のサイズに応じ、独立栄養条件、混合栄養条件、従属栄養条件のいずれかで実施することができる。培養は、例えば1リットルの容器の中で、実験室で、光バイオリアクターの中で、100,000リットルの容器の中で実施することや、開放された(数ヘクタールの)池の中で実施することもできる。しかし理想的な培養条件を開発するには、エネルギーのコストやそれ以外の資源(例えば労力、培養状態の監視の容易さ)を考慮する必要がある。

20

【0019】

いずれにせよ、微細藻類は、産生する脂肪酸及び/又はカロテノイドの収率増大にとって最適な条件で培養することが望ましい。したがってできるだけ大きな収率が得られることが好ましい(例えば乾燥材料が30g/lを超えるバイオマスと、乾燥材料に対して20重量%超の脂肪酸)。

【0020】

カロテノイドにおいて、微小藻類の乾燥体の0.2%を超える収量が望ましい。

30

【0021】

ニツシア属の微小藻類は、北極や南極等の冷たい海に見られる海洋性の珪藻である。これらの微小藻類は、従属栄養モードで、エイコサペンタエン酸(EPA)を生産するものとして主に知られている。

【0022】

しかしながら、ニツシア・ラエビス(Nitzschia laevis)種において、混合栄養モードが研究されており、EPAの合成に対するその影響が評価されていることに留意されたい。

【発明の概要】

【0023】

そこで出願人は、通常ではない光条件下での多数の実験と、さまざまな基質の添加により、混合栄養モードで培養できるニツシア・プレビロストリス種の微細藻類の株を単離することで、本発明の条件下における多不飽和脂肪酸、特にDHA及び/又はEPA及び/又はフコキサンチンの高収率での産生を可能にした。

40

【0024】

このようにして単離されて選択されたニツシア・プレビロストリスの新規な株である1つの株(FCC810)が、ブダペスト条約の規定に従ってCCAP(藻類と原生生物の培養コレクション、スコットランド海洋科学協会、ダンスタッフネージ海洋研究所、オーバン、アルギル PA371QA、スコットランド、イギリス国)に登録番号CCAP 1052/21として寄託された。

50

【 0 0 2 5 】

培養と選択の方法は、より具体的には、光の強度と周波数がある範囲で特定の変化をする、変化する照明および／または不連続な照明（特にフラッシュの形態の照明）の存在下で微細藻類を有機炭素含有基質とともに混合栄養条件下で培養するというものであった。

【 0 0 2 6 】

微細藻類にとってストレスとなると一般に考えられる明相と暗相（または光の強度がより小さい相）の頻繁な交代により、驚くべきことに、ニツシア・ブレビロストリスの株で、バイオマスと脂質と多不飽和脂肪酸、その中でも特に多不飽和脂肪酸、及び／又はカロテノイド、特にフコキサンチンの産生を増大させることができた。本発明による株を用いることで、光の照射を少なくして多不飽和脂肪酸（特にDHA、EPA、フコキサンチン）を発酵装置の中で工業的に産生させる展望が開け、したがって独立栄養モードでの培養と比べてエネルギーを節約することができるはずである。

10

【 0 0 2 7 】

本発明のさまざまな側面と利点を以下に詳細に記載する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 8 】

したがって本発明は、ニツシア属、特にニツシア・ブレビロストリス種の微細藻類を、不連続な照明および／または時間変化する照明の条件にて、混合栄養モードで培養する方法に関する。照明は強度が変化し、その振幅は一般に5マイクロモル/ m^2 秒 $\sim$ 1,000マイクロモル/ m^2 秒だが、30 $\sim$ 400マイクロモル/ m^2 秒であることが好ましい。この変化は、一般に1時間につき2 $\sim$ 3,600回にできるが、1時間につき2 $\sim$ 200回であることが好ましい。

20

【 0 0 2 9 】

本発明の方法は、ニツシア属における多不飽和脂肪酸、特にDHA及び／又はEPA、及び／又はカロテノイド、特にフコキサンチンの豊富化を可能とする。

【 0 0 3 0 】

これらの培養条件により、規定量の光を照射することができる。光のこの照射は、不連続な照明の段階および／または変化する照明の段階を含むことができ、強度の変化は、振幅が同じでも異なってもよい。照射は、特にフラッシュの形態で行なうことができる。

30

【 0 0 3 1 】

この方法の利点は、培養で得られるバイオマスの収率が増大することである。別の利点は、このようにして培養した微細藻類の多不飽和脂肪酸、より具体的にはドコサヘキサエン酸（DHA）及び／又はエイコサペンタエン酸（EPA）および／またはカロテノイド、特にフコキサンチンが豊富になることである。この方法は、混合栄養性で多不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸（DHA）及び／又はエイコサペンタエン酸（EPA）および／またはカロテノイドの収率が高いニツシア属の株、特にニツシア・ブレビロストリス種の株を選択するのに利用できる。

【 0 0 3 2 】

この微細藻類の混合栄養モードでの培養は、照明条件がどのようなものであれ、5mM $\sim$ 1M、好ましくは50mM $\sim$ 800mM、より好ましくは70mM $\sim$ 600mM、より一層好ましくは100mM $\sim$ 500mMの有機炭素含有基質の存在下でなされることが好ましい。細胞が高濃度の脂質を蓄積できるよう、基質は培養中を通じて連続的に添加される。培養中に追加の基質を培地に添加して一定の濃度を維持する。この有機炭素含有基質は、グルコース、および／またはセルロースの誘導体、および／または乳酸塩、および／またはラクトース、および／または蔗糖、および／または酢酸塩、および／またはグリセロールを純粋な形態または混合物の形態で含んでいることが好ましい。

40

【 0 0 3 3 】

培地に含まれる有機炭素含有基質は、複合分子または基質混合物で構成することができる。例えばトウモロコシ、コムギ、ジャガイモに由来するデンプンの生体内変化による産

50

物、特にデンプンのサイズが小さな分子からなる加水分解産物は、例えば、本発明に従って微細藻類を混合栄養モードで培養するのに適した炭素含有基質である。

【0034】

この方法は、より具体的には、ニツシア属の微細藻類（門：Bacillariophyta、目：Bacillariaceae、科：Bacillariaceae）[生命のITISカタログ、2010年]の株のうちで、混合栄養性であって、有機炭素含有基質を添加した無機培地、例えばf培地プラス窒素強化シリカ[Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in Culture of Marine Invertebrate Animals, pp 26-60. Smith W. L. and Chanley M. H (Eds.) Plenum Press, New York]の中で特に10μEを超える光を照射して培養できる株を選択するためのものである。有機炭素含有基質は、グルコースまたは乳酸塩を5mM以上の濃度で含んでいることが好ましい。

10

【0035】

ニツシア、より具体的にはニツシア・ブレピロストリスのこの新規な株は、以下に記載する本発明の方法による選択と培養の方法によって単離し、選択することができる。

【0036】

本発明によるニツシア・ブレピロストリス株の代表的な1つの株は、出願人が単離したFCC810株であり、CCAPに登録番号CCAP 1052/21として寄託された。このような株は、本発明によれば、変化する光または不連続な光を照射して混合栄養モードで培養するとき、大量のバイオマスと脂質（より具体的にはEPAとARA）を産生することができる。また、それらは顕著な量のカロテノイド、特にフコキサンチンを産生することも出来る。

20

【0037】

完了した分類分析によれば、CCAP 1052/21株は、ニツシア・ブレピロストリス種に属する。本発明は、本願に記載したような混合栄養培養条件で増殖できて脂肪酸（例えばEPAとARA）の産生が可能なニツシア・ブレピロストリス種のあらゆる株に関する。本発明は、本願に記載したような混合栄養培養条件で増殖できて脂肪酸（例えばDHA）の産生が可能なニツシア属の微細藻類のあらゆる種にも関する。

30

【0038】

本発明は、本願に記載されるような混合栄養培養条件下で増殖し、脂肪酸、例えばDHA及び/又はEPA及び/又はカロテノイド、特にフコキサンチンを産生できるニツシア属の微細藻類にも関する。

【0039】

本発明によって単離されたニツシア・ブレピロストリス株により、混合栄養条件下で、大量のバイオマスと、DHAおよび/またはEPAが豊富な脂質を産生させることができる。なおそのDHAおよび/またはEPAは、微細藻類に含まれる全脂質の20%超、または25%超、または30%超を占めることができる。

【0040】

また、本発明のニツシア・ブレピロストリスの単離された株は、混合栄養条件下で、顕著な量のカロテノイド、特にフコキサンチンを産生でき、その量は、微細藻類の全乾燥重量（微小藻類中のカロテノイド成分を含む）に対して0.2%超、より好ましくは0.25%超である。

40

【0041】

本発明では、出願人が単離したFCC810株を用い、変化する照明および/または不連続な照明（特にフラッシュの形態の照明）の存在下にて混合栄養条件下で培養することによって得られたバイオマスは、従属栄養モードで同じ株を培養した場合よりも10~60%、より一般には20~50%多い。従属栄養モードとは、照明がないものの、同一の培養培地を用いた培養条件を意味する。

50

【 0 0 4 2 】

したがって本発明は、ニツシア属、特にニツシア・ブレビロストリス種の微細藻類を、時間変化する照明および／または不連続な照明（例えばフラッシュの形態の照明）の存在下にて混合栄養モードで培養し、多不飽和脂肪酸（例えばDHAおよび／またはEPA、及び／又は1つ以上のカロテノイド、例えばフコキサンチン）を産生させる方法に関する。

【 0 0 4 3 】

したがって本発明は、混合栄養性であって多不飽和脂肪酸（例えばDHAおよび／またはEPA、及び／又は1つ以上のカロテノイド、例えばフコキサンチン）の収率が大きいニツシア属、特にニツシア・ブレビロストリス種の微細藻類を、時間とともに変化する照明および／または不連続な照明の存在下で選択する方法に関する。

10

【 0 0 4 4 】

特に混合栄養モードで培養するときに培養物に変化する照明および／または不連続な照明を照射すると、藻類の増殖に好ましい影響があり、特に脂質及び／又はカロテノイドの産生に関して藻類の生産性を増大させることがわかった。

【 0 0 4 5 】

発明者は、理論に囚われることなく、不連続な光および／または変化する光を微細藻類に照射すると、増殖と脂質及び／又はカロテノイド合成にとって有利な“ストレス”を生じさせることができると考えている。この現象は、自然界において微細藻類は環境の制約に対抗するため予備の脂質及び／又はカロテノイドを蓄積する傾向を有するという事実によって一部が説明できよう。

20

【 0 0 4 6 】

不連続な照明とは、複数の暗い期間によって区切られた照明を意味する。暗い期間は、1 / 4 の時間、好ましくは半分以上の時間存在することができ、その間に藻類が培養される。

【 0 0 4 7 】

本発明の好ましい一実施態様によれば、照明は不連続であり、フラッシュの形態であることがより好ましい。フラッシュは、本発明の意味では、短時間の照明、すなわち30分未満の照明である。フラッシュの持続時間は15分未満が可能であり、5分未満が好ましく、1分未満がさらに好ましい。本発明のいくつかの実施態様によれば、フラッシュの持続時間は、1秒未満にすることができる。フラッシュの持続時間は、例えば1 / 10 秒、2 / 10 秒、3 / 10 秒、4 / 10 秒、5 / 10 秒、6 / 10 秒、7 / 10 秒、8 / 10 秒、9 / 10 秒のいずれかが可能である。光の照射またはフラッシュは、一般に15秒よりも長い期間にわたる。フラッシュの持続時間は一般に5秒間～10分間だが、10秒間～2分間が好ましく、20秒間～1分間がより好ましい。

30

【 0 0 4 8 】

一般に、フラッシュの数は1時間につき約2～3600回である。この数は、例えば1時間につき100～3600回にすることができる。この数は、1時間につき120～3000回、または400～2500回、さらには600～2000回、または800～1500回にすることもできる。この数は、1時間につき2～200回にすることもできるが、10～150回が好ましく、15～100回がより好ましく、20～50回がさらに好ましい。フラッシュは、定期的な時間間隔で発生させること、または不規則な時間間隔で発生させることができる。定期的な時間間隔での発生の場合、1時間あたりのフラッシュの数は、時間間隔（T）を持つ頻度（F）に対応し、 $F = 1 / T$ になると考えられる。この時間間隔は1秒～30分、または1秒～36秒、または1.2秒～30秒、または1.44秒～9秒、または1.8秒～6秒、または2.4秒～4.5秒にすることができる。この時間間隔は18秒～30分にすることもできるが、24秒～6分が好ましく、36秒～4分がより好ましく、72秒～3分がさらに好ましい。1時間あたりのフラッシュの数は、フラッシュの強度と持続時間の関数として選択される（下記参照）。一般に、フラッシュの形態で照射する光の強度は5～1000マイクロモル / m² 秒だが、5～500

40

50

マイクロモル/ m^2 秒または50～400マイクロモル/ m^2 秒が好ましく、150～300マイクロモル/ m^2 秒がより好ましい。定義により、1マイクロモル/ m^2 秒は、文献でしばしば用いられる単位である $1\mu\text{E}/\text{m}^2$ 秒に対応する(アインシュタイン)。

【0049】

本発明の特別な一実施態様によれば、光の強度は50～200マイクロモル/ m^2 秒であり、フラッシュの時間間隔は、フラッシュの持続時間が1秒間～1分間だと10秒～60分である。

【0050】

本発明の別の一実施態様によれば、照明は変化させることができる。これは、照射が暗相によって中断されることはないが、光の強度が時間とともに変化することを意味する。光の強度のこの変化は規則的であり、周期的または循環式にすることができる。本発明によれば、連続した照明の段階と不連続な照明の段階を組み合わせた光照射にすることもできる。

【0051】

本発明によれば、どのような照明条件であれ、培養している藻類に対する光の強度(1秒あたり、1平方メートルあたりのフォトンのマイクロモル数(マイクロモル/ m^2 秒))を単位として表示)が、1時間のうちに少なくとも1回は変化する。光の強度のこの変化の振幅は、一般に、5～1,000、または50～800、または100～600マイクロモル/ m^2 秒である。光の強度は、5～400マイクロモル/ m^2 秒で変化させることもできる。光の強度変化の振幅は70～300マイクロモル/ m^2 秒が好ましく、100～200マイクロモル/ m^2 秒がより好ましい。

【0052】

光のこの強度は、変化する照明という条件では、1時間に数回、順番に、例えば50と100マイクロモル/ m^2 秒に、または5と400マイクロモル/ m^2 秒に、または50と800マイクロモル/ m^2 秒にすることができる。光のこの強度は、順番に50と200マイクロモル/ m^2 秒にできることが好ましい。あるいは不連続な照明という条件では、光のこの強度は、1時間に数回、順番に、例えば0と50マイクロモル/ m^2 秒に、または0と100マイクロモル/ m^2 秒にすることができるが、順番に0と200マイクロモル/ m^2 秒にできることがさらに好ましい。光のこの強度は、1時間に数回、順番に、例えば0と300マイクロモル/ m^2 秒に、または0と600マイクロモル/ m^2 秒に、または0と800マイクロモル/ m^2 秒に、または0と1,000マイクロモル/ m^2 秒にすることもできる。

【0053】

本発明の一実施態様によれば、どのような照明条件であれ、培養している藻類に対する光の強度は、細胞密度の関数として変化する。細胞がより密になるほど、光を強くすることができる。細胞密度は1mlあたりの細胞の数であり、当業者に知られている技術に従って測定される。

【0054】

培養の初期段階において細胞密度が約 $10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/mlであるとき、光の強度を5～15マイクロモル/ m^2 秒、好ましくは5～10マイクロモル/ m^2 秒にすることができる。培養物が $10^6 \sim 10^7$ 細胞/mlに到達すると、光の強度を例えば15～200マイクロモル/ m^2 秒まで大きくできるが、20～50マイクロモル/ m^2 秒まで大きくすることが好ましい。培養物が最終段階で $10^7 \sim 10^8$ 細胞/mlの密度に到達すると、光の強度を例えば50～400マイクロモル/ m^2 秒まで大きくできるが、50～150マイクロモル/ m^2 秒まで大きくすることが好ましい。

【0055】

本発明のいくつかの実施態様によれば、フラッシュの持続時間が例えば1分未満または1秒未満であるとき、光の強度は上記の値よりも大きくすることができる。培養の初期段階において細胞の密度が $10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/mlであるとき、光の強度を5～200マイクロモル/ m^2 秒、好ましくは5～100マイクロモル/ m^2 秒にすることができ

る。培養物が $10^6 \sim 10^7$ 細胞 / ml に到達すると、光の強度を例えば $30 \sim 500$ マイクロモル / m^2 秒まで大きくできるが、 $50 \sim 400$ マイクロモル / m^2 秒まで大きくすることが好ましい。培養物が最終段階で $10^7 \sim 10^8$ 細胞 / ml の密度に到達すると、光の強度を例えば $100 \sim 1,000$ マイクロモル / m^2 秒まで大きくできるが、 $200 \sim 500$ マイクロモル / m^2 秒まで大きくすることが好ましい。

【0056】

本発明の一実施態様によれば、1時間に培養物に照射する光の量は所定の値に留まる。この量は、約 $2,000 \sim 600,000$ 、好ましくは $2,000 \sim 300,000$ マイクロモル / m^2 である。この量は、1時間あたり約 $4,000 \sim 200,000$ マイクロモル / m^2 にすることができる。

10

【0057】

本発明の一実施態様によれば、培養物にフラッシュを1時間に30回照射する。各フラッシュは持続時間が30秒間であり、強度は10マイクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が $9,000$ マイクロモル / m^2 であることを意味する。本発明の別の実施態様によれば、培養物にフラッシュを1時間に20回照射する。各フラッシュは持続時間が30秒間であり、強度は20マイクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が $12,000$ マイクロモル / m^2 であることを意味する。本発明の別の実施態様によれば、培養物にフラッシュを1時間に45回照射する。各フラッシュは持続時間が15秒間であり、強度は5マイクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が $3,375$ マイクロモル / m^2 であることを意味する。本発明の別の実施態様によれば、培養物にフラッシュを1時間に120回照射する。各フラッシュは持続時間が10秒間であり、強度は200マイクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が $240,000$ マイクロモル / m^2 であることを意味する。

20

【0058】

光の強度に関して上に説明したように、本発明の一実施態様によれば、培養物に照射する光の量は、細胞密度の関数として変化させることができる。培養の初期段階において細胞密度が約 $10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞 / ml であるとき、1時間あたりの光の全照射量は、一般に約 $1500 \sim 8000$ マイクロモル / m^2 だが、 $1500 \sim 6000$ マイクロモル / m^2 であることが好ましく、 $2000 \sim 5000$ マイクロモル / m^2 であることがさらに好ましい。培養物が $10^6 \sim 10^7$ 細胞 / ml に到達すると、1時間あたりの光の全照射量を $6000 \sim 67,000$ マイクロモル / m^2 まで増大させることができるが、例えば $6000 \sim 50,000$ マイクロモル / m^2 まで増大させることが好ましく、 $12,000 \sim 45,000$ マイクロモル / m^2 まで増大させることがさらに好ましい。培養物が最終段階で $10^7 \sim 10^8$ 細胞 / ml の密度に到達すると、1時間あたりの光の全照射量を例えば $45,000 \sim 300,000$ マイクロモル / m^2 まで増大させることができるが、例えば $45,000 \sim 200,000$ マイクロモル / m^2 まで増大させることが好ましく $50,000 \sim 150,000$ マイクロモル / m^2 まで増大させることがさらに好ましい。

30

【0059】

本発明の一実施態様によれば、培養の初期段階において（細胞密度が約 $10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞 / ml）、培養物にフラッシュを1時間に30回照射する。各フラッシュは持続時間が30秒間であり、強度は $5 \sim 10$ マイクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が 2250 マイクロモル / $m^2 \sim 4500$ マイクロモル / m^2 であることを意味する。次に、中間段階（細胞密度が $10^6 \sim 10^7$ 細胞 / ml）において、培養物にフラッシュを1時間に30回照射する。各フラッシュは持続時間が30秒間であり、強度は $15 \sim 50$ マイクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が $13,500 \sim 45,000$ マイクロモル / m^2 であることを意味する。次に培養物の最終段階（細胞密度が $10^7 \sim 10^8$ 細胞 / ml）において、培養物にフラッシュを1時間に30回照射する。各フラッシュは持続時間が30秒間であり、強度は $50 \sim 150$ マ

40

50

イクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が45,000~135,000マイクロモル / m^2 であることを意味する。

【0060】

本発明の一実施態様によれば、例えばフラッシュの持続時間が1分間未満または1秒間未満のとき、培養の初期段階において（細胞密度が約 $10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞 / ml ）、培養物にフラッシュを1時間に30回照射する。各フラッシュは持続時間が10秒間であり、強度は50~100マイクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が15,000マイクロモル / $m^2 \sim 30,000$ マイクロモル / m^2 であることを意味する。次に、中間段階（細胞密度が $10^6 \sim 10^7$ 細胞 / ml ）において、培養物にフラッシュを1時間に50回照射する。各フラッシュは持続時間が10秒間であり、強度は200~300マイクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が100,000~150,000マイクロモル / m^2 であることを意味する。次に培養物の最終段階（細胞密度が $10^7 \sim 10^8$ 細胞 / ml ）において、培養物にフラッシュを1時間に120回照射する。各フラッシュは持続時間が10秒間であり、強度は350~450マイクロモル / m^2 秒である。これは、1時間あたりの光の全照射量が420,000~540,000マイクロモル / m^2 であることを意味する。

10

【0061】

培養物への光の照射は、発酵装置の外壁の周囲に配置した複数のランプによって実現できる。クロックが、これらのランプを決められた照射時間だけ稼働させる。発酵装置は、日光があたらない容器の中に位置している。その容器の周囲温度は制御できることが好ましい。

20

【0062】

出願人が確認できたように、このようにして選択した株が混合栄養モードで不連続な光および／または変化する光の存在下においてうまく増殖できるという事実があるため、上記の株は多不飽和脂肪酸、特にDHAとEPA、及び1つ以上のカロテノイド、特にフコキサンチンをより多く産生することができる。

【0063】

したがって本発明の培養方法により、出願人が単離してCCAPにCCAP 1052 / 21という番号で寄託した株と同様、混合栄養性であって多不飽和脂肪酸及び／又はカロテノイドの収率が高いニツシア属の特にニツシア・プレビロストリス種の株を選択することができる。この培養方法は、

30

a) 強度が変化し、その変化の振幅は5~1,000マイクロモル / m^2 秒、好ましくは5~400マイクロモル / m^2 秒であり、その変化は1時間に2~3,600回、好ましくは5~400回である、不連続な照明および／または時間変化する照明という条件下でニツシア属の1種類以上の株を混合栄養モードで培養するステップと、

b) 培地の中で有機炭素含有基質の存在下にこの培養物を数世代にわたって維持するステップと、必要に応じて

c) このようにして培養した微細藻類を回収するステップを含むことを特徴とする。

【0064】

40

“回収ステップ”とは、より具体的には、上記の継代の間に細胞の数が最も増加した株の単離を意味する。

【0065】

有利な場合、混合栄養モードでの培養は、時間中不連続及び／又は可変的な照明条件下で実施され、当該照明は強度を変動でき、その振幅は、 $5 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1} \sim 400 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ に含まれ、これらの変化は、1時間に2~200回行われる。

【0066】

株を選択するため、ニツシア属の特にニツシア・プレビロストリス種のさまざまな株を同一の容器内の複数のマイクロプレート上で並列に培養し、そのさまざまな培養物の条件

50

と変化をしっかりとモニタすることができる。したがってさまざまな株が、不連続な照明および/または変化する照明に対してと、場合によっては培地に添加した1種類または複数種類の炭素含有基質に対してどのように応答するかが容易にわかる。

【0067】

不連続な照明および/または変化する照明と炭素含有基質の添加に対して好ましい応答をする株が、品質(脂質プロファイル中に多不飽和脂肪酸がより豊富に存在し、カロテノイドの中でフコキサンチンがより豊富になる)と量(脂質が、DHA及び/又はEPAをより多い割合で含む)の面で脂質及びカロテノイドの産生に関して一般に最高の収率を提供する。

【0068】

10

微細藻類は、発酵装置の中で不均一な集団から選択することができる。その集団から、本発明の選択法により、特定の範囲の光強度と特定の周波数を持つ不連続な光および/または変化する光を混合栄養という培養条件と組み合わせて有利な変異体を選択する。この場合、培養は、培養物の中で微細藻類を多くの世代にわたって維持しながら実施し、次いで培養が終わったとき、培地の中で過半を占めるようになった成分を単離する。

【0069】

本発明の培養方法により、脂質も産生させることができる。

【0070】

その場合、本発明の方法は、

d) 微細藻類から脂質を回収するステップと、必要に応じて

20

e) 回収した脂質からDHA及び/又はEPAを抽出するステップをさらに含んでいる。

【0071】

本発明の培養方法は、カロテノイドを生産することも可能とする。この場合、本発明の方法は、更に次の工程：

d) 微細藻類から疎水性物質を回収する工程；及び任意で

e) 回収された疎水性物質からDHA及び/又はEPA及び/又はフコキサンチンを抽出する工程

を含む。

【0072】

30

本発明の培養方法は、本発明の混合栄養条件において増殖できてDHA及び/又はEPA及び/又はフコキサンチンの産生が可能なニツシア属のあらゆる種にも適用できる。

【0073】

本発明の培養方法により、培養で得られるバイオマスの産生を最適化することができる。この方法により、このようにして培養された微細藻類の脂肪酸(特にDHA及び/又はEPA)、及びカロテノイド、特にフコキサンチンを豊富にすることもできる。

【0074】

したがって本発明は、上記の方法に従って培養または選択することが好ましい混合栄養性のニツシア属の微細藻類の培養を通じてバイオマスの産生と脂質(特に脂肪酸)の産生を最適化し、次いでこのようにして培養した微細藻類を回収してそこから脂質(特にEPAおよび/またはARA)を抽出することも目的とする。また、本発明は、カロテノイド、特にフコキサンチンの生産を最適にすることにも関する。ニツシア・プレピロストリス種の株が特に関係する。

40

【0075】

脂質(その中にEPAとARAが含まれる)を選択的に抽出する方法は当業者に知られており、例えば[Bligh, E. G. and Dyer, O. K. (1959); A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol., 37:911-917]及び[McCreary DK, Koss a WC, Ramachandran S, Kurtz RR. (1978),

50

“ A novel and rapid method for the preparation of methyl esters for gas chromatography: application to the determination of the fatty acids of edible fats and oils ”, J Chromatogr Sci. 16 (8) : 329 - 31 .] に記載されている。

【 0 0 7 6 】

フコキサンチンを含むカロテノイドの抽出及び解析方法は、当業者に知られており、例えば Wright et al. (1991) (S. W. Wright, S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura, C. A. Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, N. Welschmeyer : Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Marine ecology progress series : Vol. 77 : 183 - 196 , 1991) に記載されている。

10

【 0 0 7 7 】

本発明は、上記の本発明の方法に従って得ることのできるニツシア・ブレビロストリス種の微細藻類にも関する。これら微細藻類は多不飽和脂肪酸が豊富である。このような微細藻類の全脂質には、一般に、その微細藻類に含まれる全脂質の 20 % 超または 25 % 超、しばしば 30 % 超の DHA 及び / または EPA が含まれている。また、当該微細藻類は、当該微細藻類の乾燥重量の 0 . 2 % 超、好ましくは 0 . 25 % 超のフコキサンチンをも含有し得る。

20

【 実施例 1 】

【 0 0 7 8 】

コンピュータで監視する専用の自動制御装置を備えた有効体積が 2 リットルの発酵装置 (バイオリアクター) の中でニツシア・ブレビロストリス F C C 8 1 0 を培養する。このシステムの pH は、塩基 (1 N の水酸化ナトリウム溶液) および / または酸 (1 N の硫酸溶液) を添加して調節する。培養温度は 25 に設定する。ラッシュトンの配置 (下方にポンピングする 3 枚刃のインペラ) に従ってシャフトに取り付けた 2 つの攪拌用ロータを利用して攪拌する。攪拌速度と換気量は、最小 = 100 rpm、最大 = 250 rpm、Q 最小 = 0 . 5 vvm、Q 最大 = 2 vvm にそれぞれ調節する。バイオリアクターには、透明な容器を取り囲む外部照射システムが取り付けられている。

30

【 0 0 7 9 】

温度制御した容器 (25) 内の攪拌台 (140 rpm) の上で事前培養物を反応装置に接種し、80 ~ 100 μ E の光を照射した。事前培養とバイオリアクター内での培養は、f 培地プラス窒素強化シリカの中で実施する。バイオリアクター内で混合栄養培養に用いる有機炭素含有基質は、濃度が 100 mM ~ 150 mM のグルコースである。

【 0 0 8 0 】

培養物のモニタリング

40

【 0 0 8 1 】

乾燥重量を測定して全バイオマスの濃度をモニタリングする (G F B フィルタ (Whatman 社) で濾過し、次いで 100 にて少なくとも 24 時間にわたって乾燥させた後、計量する) 。

【 0 0 8 2 】

全脂質を定量するため、 $7 \cdot 10^8$ 細胞 / ml を抽出した。脂質の抽出法は当業者に知られている。

【 0 0 8 3 】

照明

【 0 0 8 4 】

50

培養物に1時間につき180回のフラッシュを照射する。各フラッシュは持続時間が5秒間であり、強度は300マイクロモル/m²秒である。

【0085】

バイオリアクターの中での培養物に対する光の照射は、発光ダイオードの外壁の周囲に配置した複数のLED（発光ダイオード）ランプによってなされた。LEDに対する電力供給は、照明時間又はフラッシュにおける自動化されたコントロールにより管理される。

【0086】

【表1】

結果

10

	乾燥重量 (g/L)	全脂質 (乾燥重量%)	%DHA	%EPA	フコキサンチン (mg/g)
フラッシュ混合栄養	35.1+/-0.7	23.6+/-0.4	0.6+/-0.5	26+/-1	2.2+/-0.1
従属栄養	25.4+/-0.2	24+/-0.3	0.8+/-0.4	22+/-1	0.8+/-0.1

フロントページの続き

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100182730

弁理士 大島 浩明

(72)発明者 カーディジャ ロマリ

フランス国, エフ - 6 3 0 0 0 クレルモン - フェラン, リュ ドゥ ロラドゥ 6 0 ビス

(72)発明者 フランソワ ゴダール

フランス国, エフ - 3 3 4 2 0 ジェニサック, リュ ドゥ レグリーズ 1 9, レジデンス レ
ビーニュ ルス - ウ - 0 7

(72)発明者 ピエール カレジャ

フランス国, エフ - 3 3 0 0 0 ボルドー, リュ メゾン ドゥ ラ ドラード 4

審査官 上村 直子

(56)参考文献 特表 2 0 0 9 - 5 4 2 2 0 5 (J P , A)

特表 2 0 0 8 - 5 1 7 0 9 0 (J P , A)

特開平 0 8 - 0 8 9 2 3 4 (J P , A)

特表平 1 0 - 5 0 9 8 6 1 (J P , A)

特開昭 6 2 - 2 8 2 5 9 1 (J P , A)

Journal of Applied Phycology, 1 9 9 6 年, 8(4-5), 389-396

Biotechnology Letters, 2 0 0 0 年, 22(9), 727-733

Phytochemistry, 1 9 9 1 年, 30(7), 2301-2303

Biochemical Systematics and Ecology, 1 9 8 8 年, Vol.16, No.7/8, p.589-592

Journal of Phycology, 1 9 8 8 年, Vol.24, p.158-172

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

W P I D S / W P I X (S T N)