

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-500647

(P2012-500647A)

(43) 公表日 平成24年1月12日(2012.1.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 9/00 (2006.01)</b>	C 1 2 P 9/00	4 B 0 1 8
<b>C 1 2 N 1/12 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/12 C	4 B 0 6 4
<b>A 6 1 K 35/74 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/12 B	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 P 3/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/74 A	4 C 0 8 3
<b>A 6 1 K 8/99 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/02	4 C 0 8 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-524428 (P2011-524428)	(71) 出願人	506107612 エコ ソリューション
(86) (22) 出願日	平成21年8月28日 (2009. 8. 28)		フランス国, エフー93230 ロマンビル, アブニュ ガストン ルーセル, 102, パルク ビオシテック
(85) 翻訳文提出日	平成23年4月7日 (2011. 4. 7)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(86) 国際出願番号	PCT/FR2009/001044	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(87) 国際公開番号	W02010/023384	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開日	平成22年3月4日 (2010. 3. 4)	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(31) 優先権主張番号	08/55827	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(32) 優先日	平成20年8月29日 (2008. 8. 29)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

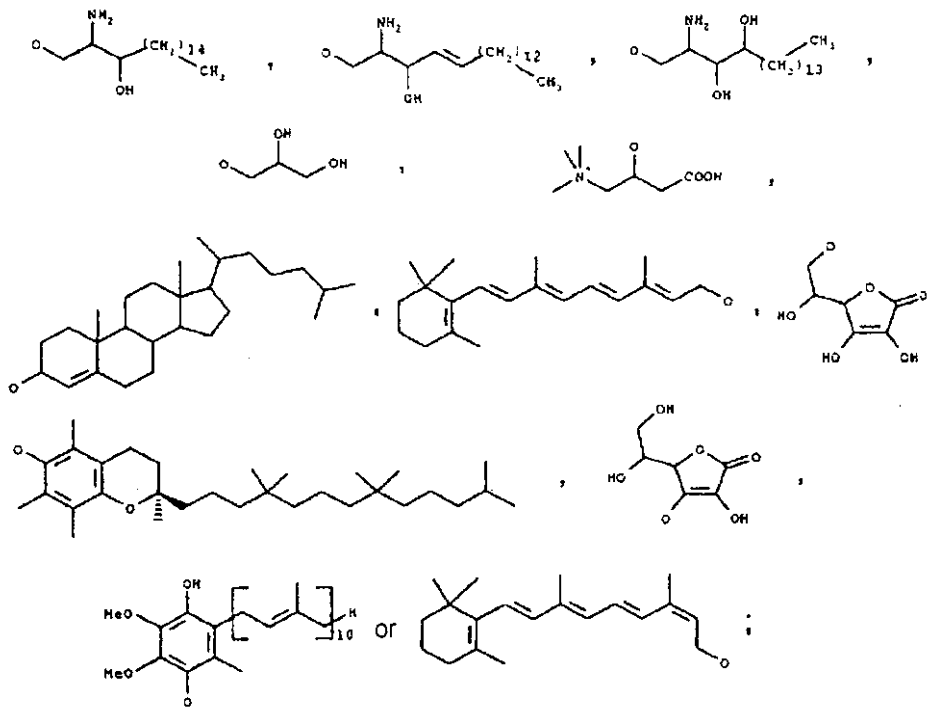
(54) 【発明の名称】 セレノヒドロキシ酸化合物を使用してセレンが濃縮された光合成微生物、並びに栄養食品、化粧品及び医薬におけるこれらの使用

## (57) 【要約】

本発明は、セレノヒドロキシ酸化合物、特にD若しくはL形態での2 - ヒドロキシ - 4 - メチルセレノブタン酸、或いはこれらの化合物のエナンチオマー、塩又はエステル若しくはアミド誘導体を使用した光合成微生物の有機セレンの濃縮、並びにそれによって濃縮された微生物の、動物又はヒトの栄養上、化粧品又は医薬での使用に関する。



## 【化3】



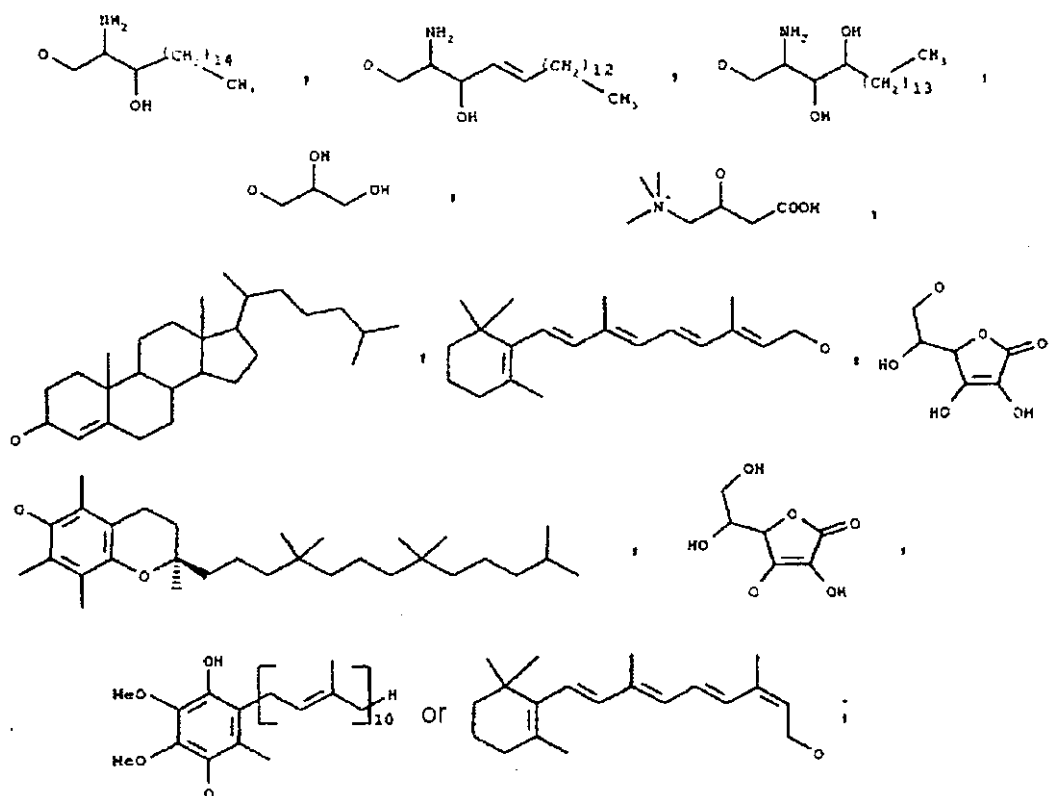
10

20

から選択される基であり、

OR<sub>5</sub> は、(C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub>)アルコキシル基又は以下の：

## 【化 4】



10

20

から選択される基であり、

OR<sub>6</sub>は、ピルビン酸、乳酸、クエン酸、フマル酸、マレイン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸又はリノール酸基、天然脂肪酸基或いは1,3-シス-レチノア-ト基であり；

R<sub>7</sub>は、H又は(C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub>)アルキル基、天然アミノ酸又は天然アミンである、ことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

30

## 【請求項3】

前記式(I)の化合物が：

- L - 2 - ヒドロキシ - 4 - メチルセレノブタン酸，
- D - 2 - ヒドロキシ - 4 - メチルセレノブタン酸，
- DL - 2 - ヒドロキシ - 4 - メチルセレノブタン酸，

又はこれらの化合物の塩から選択されることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

## 【請求項4】

前記式(I)の化合物が、カルシウム塩、亜鉛塩又はマグネシウム塩の形態であることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

40

## 【請求項5】

前記光合成微生物が、藍藻綱及び緑藻綱によって形成されるグループから選択される、好適にはクロレラ属の緑藻綱及びスピルリナ(Spirulina)又はアースロスピラ(Arthrospira)属の藍藻綱で形成されるグループから選択され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】

請求項1~5のいずれか1項に記載の方法に従って得ることができる、有機セレンが濃縮された光合成微生物。

## 【請求項7】

50

前記光合成微生物が、該微生物のセレノメチオニンの形態でのセレンの含有量が、光合成微生物に存在する全セレンに対して、セレンの50質量%以上、好適には70質量%以上、より好適には80質量%以上、さらに好適には90質量%以上を示すことを特徴とする、請求項6に記載の有機セレンが濃縮された光合成微生物。

【請求項8】

前記光合成微生物が、全セレンに対して無機セレンを1.5質量%未満、好適には0.5質量%未満、より好適には0.1質量%未満含んでなることを特徴とする、請求項6又は7に記載の有機セレンが濃縮された光合成微生物。

【請求項9】

請求項6～8のいずれか1項に記載の有機セレンが濃縮された光合成微生物、又は請求項1～5のいずれか1項に記載の方法に従って得ることができる有機セレンが濃縮された光合成微生物であって、当該微生物が緑藻綱であり、さらに微生物が微生物の乾燥重量で100µg Se/g以上のセレノメチオニン含有量を有することを特徴とする光合成微生物。

10

【請求項10】

前記微生物が、該微生物の全乾燥重量に対して、0.5質量%未満、好適には0.2質量%未満、より好適には0.1質量%未満の無機セレンを含んでなることを特徴とする、請求項6～9のいずれか1項に記載の有機セレンが濃縮された光合成微生物。

【請求項11】

セレノメチオニンの形態での有機セレンの含有量が、含有するセレンの全質量の50%以上、好適には70%以上、より好適には80%以上、さらに好適には90%以上を示すことを特徴とする、有機セレンが濃縮された緑藻綱。

20

【請求項12】

セレノメチオニンの形態での有機セレンの含有量が、乾燥重量で100µg Se/g以上、好適には200µg Se/g以上、より好適には500µg Se/g以上、さらに好適には1000µg Se/g以上であることを特徴とする、有機セレンが濃縮された緑藻綱。

【請求項13】

無機セレンの残存量が含有する全セレンに対して、2質量%未満、好適には1.5質量%未満、より好適には1質量%未満であることを特徴とする、請求項11又は12に記載の有機セレンが濃縮された緑藻綱。

30

【請求項14】

無機セレンの残存量が、緑藻綱の全バイオマスに対して乾燥重量で、無機セレンの0.5質量%未満、好適には0.2質量%未満、より好適には0.1質量%未満に規定されることを特徴とする、請求項11～13のいずれか1項に記載の有機セレンが濃縮された緑藻綱。

【請求項15】

セレノメチオニンの形態での有機セレンの含有量が、含有するセレンの全質量の50%以上、好適には70%以上、より好適には80%以上、さらに好適には90%以上を示すことを特徴とする、有機セレンが濃縮された藍藻綱。

40

【請求項16】

セレノメチオニンの形態での有機セレンの含有量が乾燥重量で、100µg Se/g以上、好適には200µg Se/g以上、より好適には500µg Se/g以上、さらに好適には1000µg Se/g以上であることを特徴とする、有機セレンが濃縮された藍藻綱。

【請求項17】

無機セレンの残存量が含有する全セレンに対して、2質量%未満、好適には1.5質量%未満、より好適には1質量%未満であることを特徴とする、請求項15又は16に記載の有機セレンが濃縮された藍藻綱。

【請求項18】

50

無機セレンの残存量が、藍藻綱の全バイオマスに対して乾燥重量で、無機セレン 0.5 質量%未満、好適には 0.2 質量%未満、より好適には 0.1 質量%未満に規定されることを特徴とする、請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の有機セレンが濃縮された藍藻綱。

【請求項 19】

スピルリナ (*Spirulina*) 又はアースロスピラ (*Arthrospira*) 属に属することを特徴とする、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の藍藻綱。

【請求項 20】

化粧品、医薬、又は栄養剤としての、請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の有機セレンが濃縮された光合成微生物の使用。

10

【請求項 21】

請求項 6 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の、有機セレンが濃縮された少なくとも 1 つの光合成微生物を含んでなる組成物。

【請求項 22】

前記組成物が、化粧品、医薬又は栄養組成物であることを特徴とする、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の式 (I) のセレノヒドロキシ酸タイプの 1 又は複数の化合物を含んでなることを特徴とする、光合成微生物のための培地。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、特にセレノヒドロキシ酸化合物を使用した、より詳細には (D, L) 形態での 2 - ヒドロキシ - 4 - メチルセレノブタン酸、或いはこの化合物のエナンチオマー、塩又はエステル若しくはアミド誘導体を使用した光合成微生物の有機セレンの濃縮 (enrichment)、並びにこれによって濃縮された (enriched) 光合成微生物の、動物又はヒトの栄養上、化粧品又は医薬での使用に関する。

【背景技術】

【0002】

セレンは、特にヒトや哺乳類に必須の微量栄養素である (Wendel, A.; Phosphorus, Sulphur Silicon Relat Elem., 1992, 67, 1-4, 404-415)。特に、これは L (+) - セレノシステイン又は L (+) - セレノメチオニンの形態での、セレン含有タンパク質、例えばグルタチオンペルオキシダーゼ、チオレドキシ還元酵素及びセレノプロテイン P 等の合成に参与する (Muller, S. 等, Arch. Microbiol., 1997, 168, 421)。

30

セレン欠乏症は、ヒトにおいて、特に非経口摂取を長期にわたり受けた患者において報告されている (Von Stockhausen, H.B., Biol. Trace Elem. Res., 1988, 15:147-155)。200 µg のセレンの毎日の補給は、平均体重の成人に安全且つ十分であると考えられる (Schrauzer, G.N., J. Am. Col. Nutr., 2001, 20:1-14)。

【0003】

セレンは天然に、有機及び無機の 2 つの形態、で確認される。

40

【0004】

この無機化合物は、最も一般的には塩、例えば亜セレン酸ナトリウム又はセレン酸ナトリウム等である。これらの化合物は、ヒトや大抵の動物に非常に有毒である。

【0005】

有機化合物 (有機セレン化合物) は、生体中で、特に、アミノ酸 L (+) - セレノメチオニン、L (+) - メチルセレノシステイン及び L (+) - セレノシステインの形態により表される。

【0006】

L (+) - セレノメチオニンは、ヒト及び動物の有機セレンの主たる供給源である。しかしながら、食事を通してのみ得ることができるこのアミノ酸に対して、ヒト及び動物は

50

栄養要求性を有する。

【0007】

従って、セレンは、理想的にはセレン欠乏症の治療または予防を目的とする食物サプリメント中にこの有機形態により取り込まれるべきである。

【0008】

よって、L (+) - セレノメチオニンを食事に補充することはそれほど有毒でなく、亜セレン酸ナトリウムの形態での摂取より良好なバイオアベイラビリティを供することを示すことは可能である、とされてきた (Mony, M.C. 等, J. of Trace Elem. Exp. Med., 2000, 13:367-380)。

【0009】

現在のところ、基質として主として亜セレン酸ナトリウム、及びセレノメチオニンの形態での無機セレンを使用したもの以外、生体によるセレンの取り込みに関する代謝経路は知られていない。

【0010】

有機セレンの適当な供給は、高等植物 (特に小麦、トウモロコシ、大豆) で確認することができ、80%を上回るセレンが、L (+) - セレノメチオニンから構成される (Schrauzer, G.N., J. Am. Coll. Nutrit., 2001, 20(1):1-4)。しかしながら、これらの植物のセレン濃度は、食品添加物を容易に且つ安価に生産することができるほど十分ではない。

【0011】

セレノメチオニンが豊富な組成物を得ることについて検討される1つのアプローチは、一定の微生物を無機セレンを使用して有機セレンを濃縮することである。一度濃縮されると、これらの微生物は出発原料として食品又は化粧品の調製のために使用することができる。

【0012】

多数の出版物は、例えば、セレン濃縮された酵母、より詳細には酵母サッカロマイセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の調製を記載しており (Oh Tae-Kwang 等, patent KR950006950 of 06.26.1995)、これらをそれ自体として使用する又はこれらを食品組成物中に取り込む (Moesgaard S. 等, patent DK200200408 of 09.16.2003); 或いはセレン濃縮由来の製品、例えばセレン濃縮されたパン (Wang Boaquan, patent CN 1817143 of 08.16.2006)、牛乳 (Jeng Chang-Yi, patent TW565432 of 12.11.2003)、卵 (Cui Li 等, patent CN1302723C of 03.07.2007)、チョコレート (In Gyeong Suk 等, patent KR 20040101145 of 11.08.2004) 又はビール (Jakovleva L.G. 等, patent RU2209237 of 07.27.2003) を得ることを目的とするものである。健康食品領域では、セレン濃縮された酵母を含有する調製はまた、妊娠した女性 (Wang Weiyi, patent CN1778199 of 05.31.2006)、又は低血糖患者の腸微小環境を改善するために提案される (Li Tao Zhao, patent CN 1810161 of 08.02.2006)。デルモコスメティクス (dermocosmetics) 分野において、セレン濃縮された酵母を含有する組成物が脱毛を減少する目的で (Kasik Heinz, patent DE 19858670 of 06.21.2000) 又は光老化の予防 (Kawai Norihisa 等, patent JP07300409 of 11.14.1995) で、開発される。セレン濃縮された酵母を含有する医薬製剤は、炎症性病態、例えば糖尿病に関連した網膜症等 (Crary Ely J., patent US5639482 of 06.17.1997)、又は心臓血管系の炎症性病態 (Nagy P.L. 等, patent HUT060436 of 09.28.1992) の予防及び治療で使用されている。

【0013】

細菌、より詳細にはプロバイオティック細菌は、それ自体もまたセレン濃縮の対象となる (Calomme M. 等, Biol. Trace Elem. Res., 1995, 47, 379-383)。ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) だけでなく、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバチラス・フェリントシェンシス (*Lactobacillus fermentoshensis*)、及びラクトバチラス・ブッフネリ/パラブッフネリ (*Lactobacillus buchneri/parabuchneri*) (Andreoni V. 等, patent US0258964) もまた、セレン濃縮された

10

20

30

40

50

食物サプリメントとして記載される。酵母及び乳酸桿菌から産生されるプロバイオティックスの混合物は、免疫システム及び疾患に対する抵抗力を強化する目的で調製されている (Huang Kehe Qin, patent CN1283171C of 11.08.2006)。

【0014】

しかしながら、これらの調製物全てにおいて、セレン濃縮された微生物は無機セレンだけから調製される。従って、最も一般的に使用されるセレンの供給源は、微生物培地の可溶化された亜セレン酸ナトリウム又はセレン酸ナトリウムから成る。従って、濃縮された微生物は、人体で同化することができる有機セレンの十分な量を合成しているにも関わらず、未転換の無機セレンの高残留レベルをしばしば示し、これは同様の物を消費している人にとって危険であることがわかる。

10

【0015】

公開された先願のWO2006/008190で、セレノヒドロキシ酸タイプの新規の有機化合物が、ヒト及び動物でのL(+)-セレノメチオニンの合成のための前駆物質として供給することができるとして記載される。

【0016】

驚くことに出願人は、セレノヒドロキシ酸タイプの有機化合物、例えばWO2006/008190に記載されるものを、様々な光合成微生物の有機セレンを濃縮するために、培地に取り込むことができると記載している。得られた結果から、これらの化合物、特にL(+)-セレノメチオニンで、通常使用される無機化合物を使用して得られるものと同等の、又はそれを上回る収率で、このような微生物の濃縮を非常に効果的に可能にすることは明らかである。

20

【0017】

従って、セレノヒドロキシ酸タイプの有機化合物を使用した、光合成微生物の有機セレンの濃縮により、無機セレンを含まない有機セレンを産生し、そして先行技術の方法に関連した毒性の問題を解決することが可能となるのは明らかである。

【0018】

よって、濃縮された光合成微生物は、セレン欠乏症の予防又は治療に関して食品取引で、特に医薬、栄養又は化粧品製品及び組成物を産生する目的で、直接使用することができる。

【発明の概要】

30

【0019】

本発明の詳細な説明

本願は、光合成微生物、つまり成長が光エネルギー源に依存的である微生物を得ることに関する。

【0020】

用語「微生物」は、以下の界：顕微鏡又は超顕微鏡レベルのサイズの真核又は原核細胞構造、並びに代謝及び生殖能を有するモネラ、原生生物、真菌又は原生動物、の1つに属する任意の生存している単細胞生物を意味することを目的とする。当該単細胞微生物は、フィラメント又はバイオフィルムの形成に関与してよい。

【0021】

40

好適には、本発明の光合成微生物は、真核性の微細藻類、より好適にはクロレラ (Chlorella) 属の緑藻綱、或いは原核の微細藻類、例えばシアノ細菌、好適にはスピルリナ (Spirulina) 又はアースロスピラ (Arthrospira) 属 (スピルリナ属 (spirulin)) のものである。後者は、食物サプリメントとして使用されるものとして、特に開発途上国で周知である。

【0022】

用語「有機セレン」は、少なくとも1つのセレン原子を化学構造に有する化合物を、少なくとも1つ含有する分子の集合体を意味することを目的とし、これらは生体によって生成されることができる、例えば特に、アミノ酸セレノメチオニン、メチルセレノシステイン及びセレノシステイン、或いはこれらを含むペプチド又はタンパク質である。

50

## 【0023】

従って、セレンが濃縮された光合成微生物は、それ自体として、又は食品添加物として使用することができる。これらは、例えば、トランスフォーム (transformed) 製品の調製のための塩基として機能する組成物中に取り込むことができる安定な粉末を形成するように脱水してよく、また食品トランスフォーメーション方法でプロバイオティクスとして、例えば、発酵乳又は飲料を得る目的のために、生で使用することができる。

## 【0024】

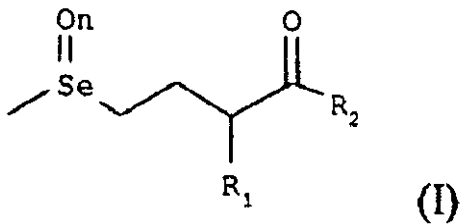
従って、本発明の対象は、光合成微生物をセレノメチオニン及び/又はセレノシステインで濃縮するための新規の方法であり、光合成微生物がセレノヒドロキシ酸タイプの化合物を含んでなる培地で培養されることを特徴とする。

10

## 【0025】

好適には、セレノヒドロキシ酸タイプの化合物が一般式 (I) の化合物、或いはこれらの前駆物質、塩又はエステル若しくはアミド誘導体であって：

## 【化1】



20

式中：

n が、0, 1 又は 2 であり；

R<sub>1</sub> が、OH, OCOR<sub>3</sub>, OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, OPO<sub>3</sub>R<sub>4</sub>R<sub>5</sub> 又は OR<sub>6</sub> 基であり；

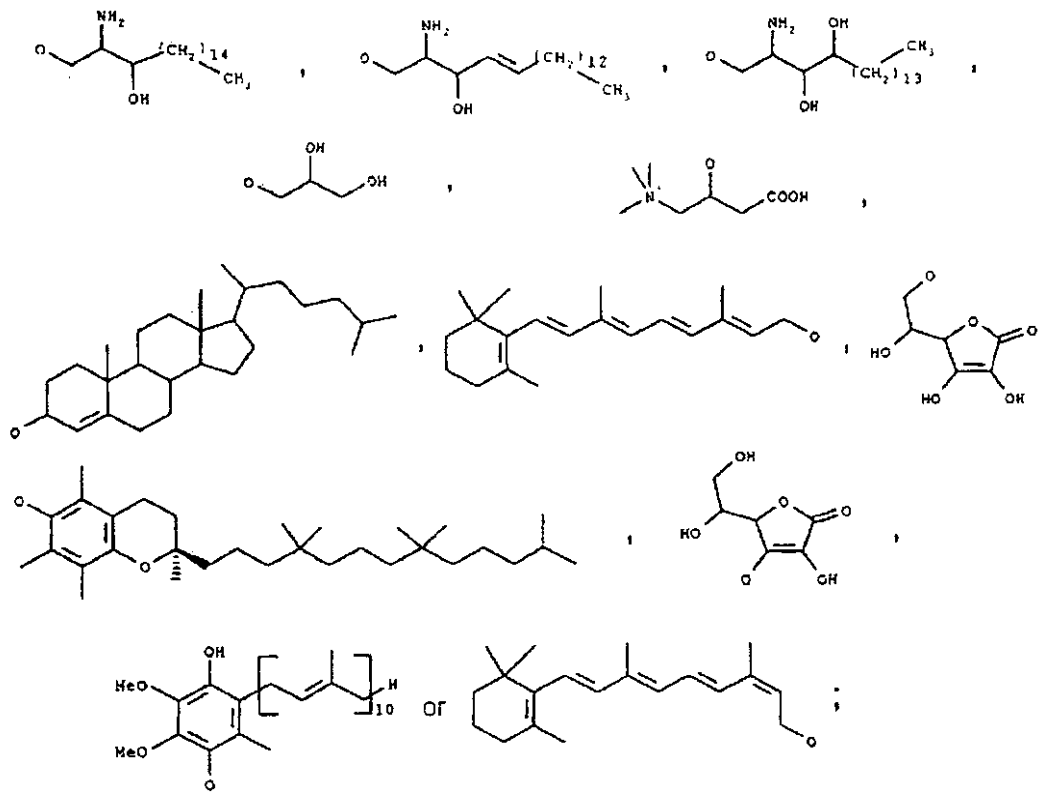
R<sub>2</sub> が、OH, R<sub>3</sub>, NHR<sub>7</sub>, S-システニル又は S-グルタチオニル基であり；

n = 1 であり且つ R<sub>2</sub> が OH の場合は、R<sub>1</sub> は OH とすることはできないと理解され；

R<sub>3</sub> が、アルコキシル, セラミド 1, セラミド 2, セラミド 3, セラミド 4, セラミド 5, セラミド 6 a 及び 6 b, S-システニル又は S-グルタチオニル基, 或いは以下：

30

【化2】



10

20

から選択される基、  
である化合物。

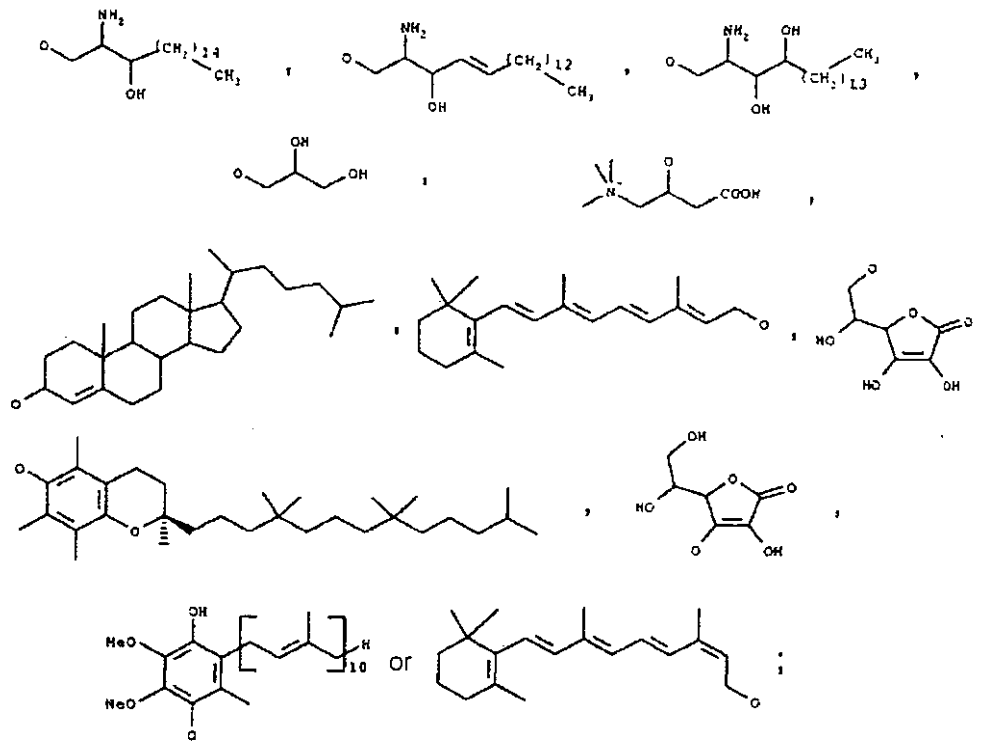
【0026】

好適には、 $R_3$  は、アルコキシル、S - システニル又はS - グルタチオニル基であり

30

；  
 $OR_4$  は、 $(C_1-C_{26})$  アルコキシル、セラミド1、セラミド2、セラミド3、セラミド4、セラミド5又はセラミド6 a及び6 b基、或いは以下：

## 【化 3】



10

20

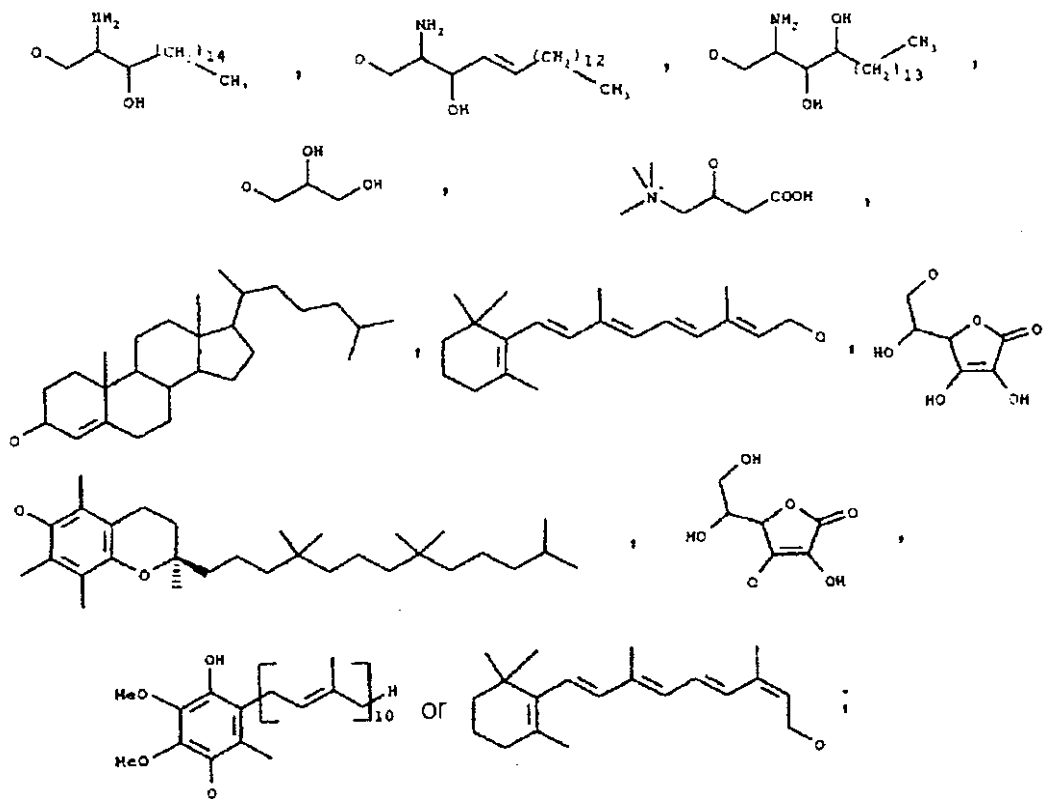
から選択される基である。

## 【0027】

好適には、OR<sub>4</sub>は(C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub>)アルコキシル基であり；

OR<sub>5</sub>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub>)アルコキシル、セラミド1、セラミド2、セラミド3、セラミド4、セラミド5又はセラミド6a及び6b基、或いは以下：

## 【化 4】



10

20

の基から選択される基である。

好適には、OR<sub>5</sub>は、(C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub>)アルコキシル基であり；

OR<sub>6</sub>は、ピルビン酸，乳酸，クエン酸，フマル酸，マレイン酸，ミリスチン酸，パルミチン酸，ステアリン酸，パルミトレイン酸，オレイン酸又はリノール酸基，天然脂肪酸基或いは1,3-シス-レチノア-ト基であり；

30

R<sub>7</sub>は、H又は(C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub>)アルキル基，天然アミノ酸或いは天然アミンである。

## 【0028】

上記の式(I)において；

用語「アルキル」は、直鎖又は環状、任意に分岐した、任意にフッ素化又はポリフッ素化の、1～26個の炭素原子を含有し、且つ任意に1又は複数の炭素-炭素二重結合を含んでなる基、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、トリフルオロメチル、リノレイル、リノレニル又はパルミトイルを意味することを目的とし；

## 【0029】

用語「アルコキシル」は、直鎖又は環状、任意に分岐した、任意にフッ素化した或いはポリフッ素化した、1～26個の炭素原子を含む、並びに任意に1又は複数の炭素-炭素二重結合を含んでなる一級、二級又は三級アルコールに由来する基、例えばメトキシル、エトキシル、イソプロポキシル、トリフルオロメトキシル、リノレオキシル(linoleoxyl)、リノレノキシル(linolenoxyl)又はパルミトキシル(palmitoxyl)を意味することを目的とし；

40

セラミドタイプのラジカルの構造は、特に「Cosmetic Lipids and the Skin Barrier」, Thomas Forster Ed. 2002, Marcel Dekker, Inc., p. 2, 図2に記載され；

## 【0030】

用語「天然」は、植物及び動物界の生物の代謝、並びにヒトの代謝で確認される任意の

50

対応する化合物を意味することを目的とし (Steglich W., Rompp Encyclopedia Natural Products, G. Thieme ed.) ;

用語「オリゴマー」は、互いにエステルタイプの結合によって結合する 2 ~ 15 個のモノマーの結合によって形成される任意の化合物を意味することを目的とし;

用語「ポリマー」は、エステルタイプの結合によって互いに結合した、15 個より多いモノマーの結合によって形成される任意の化合物を意味することを目的とする。

【0031】

本発明によれば、式 (I) の化合物は好適には、カルシウム塩、亜鉛塩又はマグネシウム塩の形態で使用され、通常これによって培地における良好な溶解性、及び光合成微生物による良好な同化もまた得ることが可能である。

10

【0032】

本発明の好適な一実施形態では、光合成微生物は藍藻綱及び緑藻綱によって形成されるグループから選択される。従って、光合成微生物は、好適には藍藻綱又は緑藻綱、好適にはクロレラ属の緑藻綱及びスピルリナ (Spirulina) 又はアースロスピラ (Arthrospira) 属の藍藻綱で構成されるグループから選択される。

【0033】

本発明は、より詳細には、式 (I) の化合物の使用であって、当該化合物は:

- L - 2 - ヒドロキシ - 4 - メチルセレノブタン酸,
- D - 2 - ヒドロキシ - 4 - メチルセレノブタン酸,
- DL - 2 - ヒドロキシ - 4 - メチルセレノブタン酸,

20

又はこれらの化合物の塩から選択される (又は得られる) 使用に関する。

【0034】

これらの化合物は、WO 2006 / 008190 に記載される。

【0035】

本発明の対象はまた、有機セレンが濃縮された光合成微生物であって、本発明の方法に従って得ることができる。このような微生物は、セレン当量に基づき通常 500 ppm 以上、好適には 1000 ppm 以上、より好適には 2000 ppm 以上の有機セレン含有量、並びに微生物の乾燥重量で 0.5% 未満、好適には 0.2% 未満、より好適には 0.1% 未満の無機セレン含有量を有する。好適には、本発明は、光合成微生物が全セレンに対して無機セレンを 1.5 質量% 未満、好適には 0.5 質量% 未満、より好適には 0.1 質量% 未満含んでなる場合に関する。

30

【0036】

言い換えれば、本発明の方法に従って濃縮された光合成微生物に存在する無機形態でのセレンの残渣は、通常微生物に存在する全セレンの 1.5% 未満の割合を占め、これは通常当該微生物の全乾燥バイオマス (乾燥重量) の 0.5% 未満を示す。

【0037】

本発明は、最も詳細には、有機セレンが濃縮された光合成微生物に関し、微生物のセレノメチオニンの形態でのセレンの含有量が、光合成微生物に存在する全セレンに対して、50 質量% 以上、好適には 70 質量% 以上、より好適には 80 質量% 以上、さらに好適には 90 質量% 以上を示すことを特徴とする。このようなセレノメチオニンの割合は、微生物に存在する有機セレンの量及び質に関して、先行技術で得られたものと比較して、相当且つ著しく好適な改善を示す。

40

【0038】

特に、本発明は、微生物がセレン濃縮された緑藻綱微細藻類、好適にはクロレラ属のものであり、微生物が微生物の乾燥重量で 1 グラムあたり通常 50 マイクログラムセレン当量 ( $\mu\text{g Se/g}$ ) 以上、好適には 70  $\mu\text{g Se/g}$  以上、より好適には 100  $\mu\text{g Se/g}$  以上のセレノメチオニン含有量を有することを特徴とする場合に関する。

【0039】

微生物の内部に有機分子の形態 (セレノメチオニン、セレノシステイン等) 又は無機分子の形態 (セレン塩) で固定されたセレンの量は、微生物の乾燥重量の 1 グラムあたりの

50

セレンの質量 ( $\mu\text{g Se/g}$ ) として表す。言い換えれば、光合成微生物のセレン含有量は、微生物の全乾燥バイオマスに対して、これらの有機又は無機分子で存在するセレン質量を算出することによって規定される。さらに、有機及び無機形態で存在するセレンの質量による割合はまた全セレンの質量に対するパーセンテージとして規定され表される。

【0040】

本発明の光合成微生物の全セレン及びセレノメチオニンの形態でのセレンの含有量は、それぞれ微生物の遠心分離及び凍結乾燥後のミネラル化 (mineralization) 及び酵素消化によって、例えば以下の M e s t e r , Z . 等の (2006) A n n a l . B i o a n a l . C h e m . 3 8 5 : 1 6 8 - 1 8 0 に記載される L o b i n s k y 等の方法によって、測定することができる。

10

【0041】

本願の実施例で説明する、本発明に従って得られた結果は、光合成微生物、より詳細には緑藻綱及び藍藻綱微細藻類が、これらの微細藻類の乾燥重量で通常1グラムあたり100マイクログラムセレン当量 ( $\mu\text{g Se/g}$ ) 以上、好適には200  $\mu\text{g Se/g}$  以上、より好適には500  $\mu\text{g Se/g}$  以上、さらに好適には1000  $\mu\text{g Se/g}$  以上、さらに1400  $\mu\text{g Se/g}$  以上の含有量で、セレノメチオニンの形態でセレンを蓄積することを示す。

【0042】

従って、本発明はより詳細には、有機セレンのセレノメチオニンの形態での含有量が、乾燥重量で通常100  $\mu\text{g Se/g}$  以上、好適には200  $\mu\text{g Se/g}$  以上、より好適には500  $\mu\text{g Se/g}$  以上、さらに好適には1000  $\mu\text{g Se/g}$  以上であることを特徴とする有機セレンが濃縮された緑藻綱又は藍藻綱に関する。

20

【0043】

有機セレンが濃縮されたこのような緑藻綱又は藍藻綱は、セレノメチオニンの形態での有機セレンの含有量が含有する全セレンの50%以上、好適には70%以上、より好適には80%以上、さらに好適には90%以上、さらに95%を示し、そして無機セレンの残存量が含有する全セレンの通常1.5%未満、好適には0.5%未満、より好適には0.1%未満であることを通常特徴とする。通常は、無機セレンの残存量は、乾燥重量で緑藻綱の全バイオマスの1%未満、好適には0.5%未満、より好適には0.2%未満、さらに好適には0.1%未満である。

30

【0044】

本発明はまた、本発明の方法に従ってセレンが濃縮された当該光合成微生物由来の、食品、化粧品又は医薬製品の製造に関する。この製造では、当業者に周知の技術を使用する。

【0045】

本発明の光合成微生物はまた、動物の栄養において、特に有機セレンが濃縮された二次誘導体、例えば魚、牛乳、又は卵を得る目的に対しても有用である。

【0046】

従って、生成され得られた製品及び分子は、前置きで概要を述べたものを含むさまざまな応用で、特に化粧剤、医薬又は栄養剤として有用である。

40

【0047】

本発明の対象はまた、本発明のセレン濃縮された光合成微生物の、化粧品、医薬品（若しくは治療薬）又は栄養製品（若しくは剤）としての使用である。

【0048】

本発明はまた、光合成微生物を含んでなる組成物、通常化粧組成物、医薬組成物又は栄養組成物に関する。

【0049】

本発明はまた、光合成微生物のための培地に関し、1又は複数の上に定義した式 (I) の化合物を含んでなることを特徴とする。このような培地は、光合成微生物のセレンを濃縮する本発明の方法を実行するために有用である。

50

## 【0050】

特に、本発明は、少なくとも1つの式(I)の化合物、好適には2-ヒドロキシ-4-メチルセレンオブタン酸又はこの塩を、0.5~2000mg/l、好適には1~1000mg/l、より好適には2~500mg/l、すなわちそれぞれセレン当量に基づき当該化合物の約0.2~800mg/l、好適にはセレン当量に基づき当該化合物の0.4~400mg/l、より好適にはセレン当量に基づき当該化合物の0.8~200mg/lの濃度で含んでなる固体又は液体培地に関する。

## 【0051】

海洋起源の微細藻類に関して、最少培地を形成するために、式(I)の化合物は細菌濾過海水、又は、例えば、Aquarium Systems Inc.社由来の「リーフクリスタル(Reef Crystal)」培地から生成した人工海水で希釈することができる。

10

## 【0052】

本発明の微細藻類の調製方法は、特に1又は複数の以下の：

- 培地、好適には微細藻類の成長に必須の化学元素を含む最少培地を調製する段階；
- 培地中に、式(I)の化合物、好適には2-ヒドロキシ-4-メチル-セレンオブタン酸をセレンの有機供給源として導入する段階；
- 混合物のpHを6~10の値に調整する段階；
- このように形成された混合物で培養下の当該微細藻類の前培養の播種菌液を、温度12~45で、軌道振盪100~500rpmで、さらに0~20%の酸素及び0.3%~20%の二酸化炭素を含有する雰囲気中、好適には24~120時間置く段階；
- 混合物を4000~10000rpmで数分間遠心分離する、又は0.2マイクロメートルフィルターを通して混合物を濾過しフィルターを生理食塩水でリンスする段階；
- 細胞ペレットを生理食塩水に取り込む段階；
- 4000~10000rpmで数分間、再度遠心分離する段階；
- セレン濃縮された微細藻類を含有するモイストの細胞ペレットを回収する段階、を含むことができる。

20

## 【0053】

モイストの細胞ペレットは、凍結乾燥又は風乾してよい。

## 【0054】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の実施例において示す。以下の実施例は、説明の目的でのみ供され、本発明の範囲を何ら限定することはできない。

30

## 【実施例】

## 【0055】

実施例1：独立栄養条件下での、2-ヒドロキシ-4-メチルセレンオブタン酸(THD-177)含有培地での、セレン濃縮されたクロレラブルガリス(*Chlorella vulgaris*)微細藻類の産生

## 【0056】

実験条件

光独立栄養条件下で使用した株は、クロレラブルガリス(*Chlorella vulgaris*) SAG 211-11B：ゲッティンゲン(Goettingen)大学のSAGコレクション(collection)に由来する純粋培養株(SAG: Sammlung von Algenkulturen der Universität Goettingen [ゲッティンゲン大学の藻類培養のコレクション])である。

40

## 【0057】

この株を、Stanley RY等(1971 Bacteriol. Rev. 35:171-205)によって記載されたBG-11培地(青緑色の培地)で培養し、この組成は以下の通りである(1リットルあたり)：

- (1)  $\text{NaNO}_3$  : 1.5 g
- (2)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 0.04 g
- (3)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 0.075 g
- (4)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 0.036 g

50

- (5) クエン酸 : 0.006 g  
 (6) クエン酸鉄アンモニウム : 0.006 g  
 (7) EDTA - Na<sub>2</sub> : 0.001 g  
 (8) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : 0.02 g  
 (9) 蒸留水 : 1.0 L  
 (10) 微量元素溶液 : 1 ml / L  
     H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 2.86 g  
     MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O : 1.81 g  
     ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O : 0.222 g  
     Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O : 0.39 g  
     CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O : 0.08 g  
     Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O : 0.05 g

10

## 【0058】

pHを7.1に調整し、そして培地を121で15分間オートクレーブした。

## 【0059】

この株を、25、2400 + / - 200 Luxで、光独立栄養条件下で、軌道振盪 (80 rpm)、OD<sub>660nm</sub> = 0.05で2~7日間培養した。株のOD<sub>660nm</sub>は、48時間で0.5に到達する。

## 【0060】

培養条件

20

セレンの有機供給源、主として2-ヒドロキシ-4-メチルセレンオブタン酸 (THD-177, Tetrahedron SAS, France, CAS: 873660-49-2) を、セレン当量に基づき0.5 mg / l ~ 100 mg / lの濃度で、すなわち、1.25 mg / l ~ 250 mg / lの2-ヒドロキシ-4-メチルセレンオブタン酸を投与した。培養の初めに、セレン含有の化合物を一度だけ (すなわち、培養液100mlあたり、0.125mg ~ 25mgの量)、又は一定時間ごとに数回添加した。なおこの間隔は6~24時間であり、培養は2~7日間維持した。

## 【0061】

実施例2 : 2-ヒドロキシ-4-メチルセレンオブタン酸 (THD-177) (本発明の実施例) 含有培地、又は亜セレン酸ナトリウム (比較例) 含有培地での、混合栄養条件 (光の存在及び培地中に炭水化物-グルコースの存在) 下でのセレン濃縮されたクロレラブルガリス (chlorella vulgaris) 微細藻類の産生 :

30

## 【0062】

これらの試験において、使用した株は、クロレラブルガリス (chlorella vulgaris) SAG 211-11B株 : ゲッティンゲン大学のSAGコレクションに由来する純粋培養の株 (SAG: Sammlung von Algenkulturen der Universitat Goettingen [ゲッティンゲン大学の藻類培養コレクション]) であって、混合栄養条件下で以下の培地で培養した :

- 酵母抽出物 0.33 g  
 牛肉抽出物 0.33 g  
 トリプトース 0.66 g  
 FeSO<sub>4</sub> 0.66 mg  
 グルコース 3.3 g  
 蒸留水 qsp 1.0 L

40

## 【0063】

pHを7.2に調整し、そして培地を121で15分間オートクレーブした。

## 【0064】

セレンの有機供給源、主として2-ヒドロキシ-4-メチルセレンオブタン酸 (THD-177, Tetrahedron SAS, France, CAS: 873660-49-2) をセレン当量に基づき濃度20 mg / lで、すなわち50 mg / lの2-ヒドロキシ-4-メチルセレンオブタン酸を投与した。

## 【0065】

無機セレン供給源 (NaSe, 亜セレン酸ナトリウム) をセレン当量に基づき濃度20 mg

50

/ l、すなわち 43.9 mg / l の亜セレン酸ナトリウムを投与した。

【0066】

セレン含有の化合物を、クロレラブルガリス (chlorella vulgaris) 株の指数増殖期 (すなわち播種の3日後) に一度だけ添加した。

【0067】

分析用サンプルの調製：

7日間のインキュベーション後、0.2ミクロンの NaI gene の膜 (a-PES, 直径90mmを参照されたい) を通して培地を濾過し、細胞残余分を生理食塩水でリンスした。セレン (セレン, セレノメチオニン及び亜セレン酸ナトリウム全て) 含有の成分分析のために、ウェットの細胞集団を凍結乾燥した。

10

【0068】

クロレラブルガリス (chlorella vulgaris) のセレン含有成分の分析

サンプルのミネラル化後に、結合 ICP 質量分析 (ICP coupled to detection by mass) によって全セレンをアッセイした。サンプルの酵素消化後に、Mester, Z. 等の (2006) *Annal. Bioanal. Chem.* 385: 168 - 180 において L o b i n s k y 等によって記載される方法に従って、高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析によってセレンのスペシエーションを行った。

【0069】

結果

以下の表 1 は、インキュベーション時間 7 日間で、3 通りに得られた、セレン当量に基づく平均値を示す。

20

【0070】

【表 1】

表 1

クロレラブルガリス (Chlorella vulgaris) 微細藻類の  
セレン含有成分の分析

	全 Se mgSe/kg バイオマス	セレノメチオニン mgSe/kg バイオマス	Se (IV) mgSe/kg バイオマス
THD177 20 mgSe/lの添加	1293±23	1274±109 (全Seの98.5%)	6±1 (全Seの0.4%)
NaSe 20 mgSe/lの添加	144±5	29±2 (全Seの20%)	4.1±0.4 (全Seの2.7%)

30

【0071】

40

THD 177 又は NaSe の形態で、この場合に 20 mg Se / l で添加したセレンの同用量に関して得られた結果から：

- 添加を NaSe の形態で行う場合よりも、添加を THD 177 の形態で行う場合の方が 9 倍の全 Se が検出され；
- THD 177 の添加によって得られた、セレノメチオニンの形態で細胞内に蓄積されたセレンのレベルが、NaSe の形態での添加によって得られたものの 4.4 倍であり；
- 細胞内にセレノメチオニンの形態で蓄積されたセレンのレベルは、NaSe では 20% のレベルであるのに比べ、THD 177 の形態で添加を行った場合は、実質的にセレン含有の細胞内化合物形態の 100% (98.5%) に達し；そして
- 添加が THD 177 の場合は、全セレン中に Se (IV) が 0.4% だけ検出され、一方

50

NaSeの添加の場合は、全セレン中にSe(IV)が2.7%検出された、ことが示された。

【0072】

実施例3：2-ヒドロキシ-4-メチルセレノブタン酸(THD-177)含有培地(本発明の実施例)又は亜セレン酸ナトリウム含有培地(比較例)で、独立栄養条件下での、セレン濃縮されたアースロスピラ・プラテンシス(*Arthrospira platensis*)微細藻類の産生：

これらの試験において、使用した株は、2009年8月4日に、パスツール研究所、25 rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15の、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM)[国立微生物培養コレクション]に、番号CNCM I-4218で寄託されたアースロスピラ・プラテンシス(*Arthrospira platensis*)3054-E0001の株である。

10

【0073】

3054-E0001株を独立栄養条件下で、以下の培地で培養した：

酵母抽出物 0.33g  
牛肉抽出物 0.33g  
トリプトース 0.66g  
FeSO<sub>4</sub> 0.66mg  
蒸留水 qsp 1.0L

20

【0074】

pHを7.2に調整し、培地を121で15分間オートクレーブした。

【0075】

セレンの有機供給源、主として2-ヒドロキシ-4-メチルセレノブタン酸(THD-177, Tetrahedron SAS, France, CAS: 873660-49-2)を、セレン当量に基づき濃度25mg/l、すなわち濃度62.5mg/lの2-ヒドロキシ-4-メチルセレノブタン酸を投与した。

【0076】

無機セレン供給源(NaSe, 亜セレン酸ナトリウム)を、セレン当量に基づき濃度25mg/lで、すなわち54.4mg/lの亜セレン酸ナトリウムを投与した。

30

【0077】

アースロスピラ・プラテンシス(*Arthrospira platensis*)株の播種直後に、一度だけセレン含有の化合物を添加した(すなわち、T=0)。

【0078】

分析用のサンプルの調製：

10日間のインキュベーション後、0.2ミクロンのNalgeneの膜を通して細胞ペレットを濾過し、細胞残余分を生理食塩水でリンスした。セレン(全セレン、セレノメチオニン及び亜セレン酸ナトリウム)含有の成分分析のために、ウェットの細胞集団を凍結乾燥した。

【0079】

アースロスピラ・プラテンシス(*Arthrospira platensis*)のセレン含有成分の分析

40

サンプルのミネラル化後に、全セレンを結合ICP質量分析によってアッセイした。サンプルの酵素消化の後に、Mester, Z.等の(2006) *Annal. Bioanal. Chem.* 385: 168-180においてLobinsky等によって記載された方法に従って、高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析によってセレンのスペシエーションを行った。

【0080】

結果

以下の表2は、10日間のインキュベーション期間で3通りに得られた、セレン当量に基づく平均値を示す。

【0081】

50

## 【表 2】

表 2

アースロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*) 微細藻類の  
セレン含有成分の分析

	全 Se mgSe/kg バイオマス	セレノメチオニン mgSe/kg バイオマス	Se (IV) mgSe/kg バイオマス
THD177 25 mgSe/lの添加	1431±68	1402±47 (全Seの98%)	17.2±0.7 (全Seの1.2%)
NaSe 25 mgSe/lの添加	177±2	13±3 (全Seの7%)	5.1±0.3 (全Seの2.9%)

10

## 【0082】

得られた結果から、THD177又はNaSeの形態で添加したセレンの同一用量、この場合は25 mg Se / lに関して：

20

- THD177の形態で行った添加に関しては、NaSeの形態で行った添加よりも8倍の全Seが検出され；

- THD177の添加によって得られた、セレノメチオニンの形態で細胞内に蓄積されたセレンのレベルは、NaSeの形態での添加によって得られたものより108倍高く；

- セレノメチオニンの形態で細胞内に蓄積されたセレンのレベルは、NaSeでは7%のレベルであるのに比べ、THD177の形態で添加を行った場合は、セレン含有の細胞内化合物形態の98%に達し；そして

- NaSeの添加の場合には全セレン中で2.9%のSe (IV)が検出されたのに対して、添加がTHD177の場合には、全セレン中の1.2%のSe (IV)だけが検出された

30

ことが示された。

## 【0083】

実施例4：2-ヒドロキシ-4-メチルセレノブタン酸 (THD-177) 含有培地での、セレン濃縮されたアースロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*) 微細藻類の産生 (本発明の実施例)

この試験において、使用した株はアースロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*) 3054-E0001株である。比較は、

- 本発明に従って、セレンTHD-177含有の化合物の添加を、アースロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*) 株の播種直後に一度だけ行った、前回の実施例である実施例3の結果、と

40

- 実施例2のように、アースロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*) 株の培養の指数増殖期において、本発明に従って、セレンTHD-177の含有の化合物の添加を行った、新たな実験結果、との間で行った。

## 【0084】

結果

以下の表3は、10日間のインキュベーション期間で3通りに得られた、セレン当量に基づく平均値を示す。

## 【0085】

【表 3】

表 3

アースロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*) 微細藻類の  
セレン含有成分の分析

アースロスピラ・ プラテンシス ( <i>Arthrospira platensis</i> ) 微細藻類の セレン含有 成分の分析	全 Se mgSe/kg バイオマス	セレノメチオニン mgSe/kg バイオマス	THD177 mgSe/kg バイオマス	Se (IV) mgSe/kg バイオマス
播種における THD177 25 mgSe/lの添加	1431±68	1402±47 (全Seの98%)	5±1 (全Seの0.35%)	17.2±0.7 (全Seの1.2%)
指数増殖期における THD177 25 mgSe/lの添加	1274±16	1078±89 (全Seの85%)	11±2 (全Seの0.86%)	14±2 (全Seの1.1%)

10

20

【0086】

結果から、「指数増殖期中の添加」試験と比較して、「T0での添加」試験で全セレンが12%より多く、且つセレノメチオニンの形態でのセレンが30%より多く得られたことが示された。この違いは、「指数増殖期中の添加」試験よりも、「T0での添加」試験における、バイオマスとTHD177との長い接触時間の結果によるものとしてすることができる。

いずれの場合においても、細胞内Se(IV)レベルは全セレンの1%と低い状態である。

30

【手続補正書】

【提出日】平成23年7月20日(2011.7.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

実施例3：2-ヒドロキシ-4-メチルセレノブタン酸(THD-177)含有培地(本発明の実施例)又は亜セレン酸ナトリウム含有培地(比較例)で、独立栄養条件下での、セレン濃縮されたアースロスピラ・プラテンシス(*Arthrospira platensis*)微細藻類の産生：

これらの試験において、使用した株は、アースロスピラ・プラテンシス(*Arthrospira platensis*)3054-E0001の株である。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/001044

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>	
INV. C12N1/12 ADD. A61K8/99          A61K36/02          A23L1/30	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
	Relevant to claim No.
X	CASES JULIEN ET AL: "Selenium from selenium-rich spirulina is less bioavailable than selenium from sodium selenite and selenomethionine in selenium-deficient rats" JOURNAL OF NUTRITION, vol. 131, no. 9, September 2001 (2001-09), pages 2343-2350, XP002526985 ISSN: 0022-3166
Y	the whole document
X	GB 2 214 928 A (CAOLA KOZMETIKAI [HU]) 13 September 1989 (1989-09-13)
Y	the whole document
	----- -/-
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.
<input checked="" type="checkbox"/>	See patent family annex.
* Special categories of cited documents :	
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
'E' earlier document but published on or after the international filing date	'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	'&' document member of the same patent family
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 January 2010	27/01/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Lejeune, Robert

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2009/001044

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/008190 A (TETRAHEDRON SAS [FR]; ERDELMEIER IRENE [FR]; MICHEL JEAN-CLAUDE [FR];) 26 January 2006 (2006-01-26) cited in the application the whole document	1-5,8, 13,17,23
A	LARSEN E H ET AL: "Speciation of selenoamino acids, selenium ions and inorganic selenium by ion exchange HPLC with mass spectrometric detection and its application to yeast and algae" JOURNAL OF ANALYTICAL ATOMIC SPECTROMETRY DECEMBER 2001 ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY GB, vol. 16, no. 12, December 2001 (2001-12), pages 1403-1408, XP002526986 the whole document	1-23
A	DE SOUZA MARK P ET AL: "Selenium assimilation and volatilization from dimethylselenoniopropionate by Indian mustard" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 122, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 1281-1288, XP002526987 ISSN: 0032-0889 the whole document	1-23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2009/001044

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2214928	A	13-09-1989	AT 389888 B 12-02-1990
			AU 1326288 A 10-08-1989
			BE 1001675 A3 06-02-1990
			CA 1310927 C 01-12-1992
			CH 676605 A5 15-02-1991
			CN 1034842 A 23-08-1989
			DK 148888 A 10-08-1989
			ES 2006114 A6 01-04-1989
			FI 881310 A 10-08-1989
			FR 2626890 A1 11-08-1989
			GR 1000446 B 30-07-1992
			HU 51669 A2 28-05-1990
			IL 85777 A 29-03-1992
			IT 1216140 B 22-02-1990
			JP 1215278 A 29-08-1989
			LU 87172 A1 26-10-1989
			NL 8800692 A 01-09-1989
			NO 881215 A 10-08-1989
			PL 271284 A1 21-08-1989
			PT 87016 A 04-10-1989
			SE 468815 B 22-03-1993
			SE 8800991 A 10-08-1989
			YU 55488 A1 31-10-1989
			ZA 8801956 A 02-11-1988
WO 2006008190	A	26-01-2006	AT 435850 T 15-07-2009
			AU 2005263649 A1 26-01-2006
			BR PI0513733 A 13-05-2008
			CA 2574629 A1 26-01-2006
			CN 101098879 A 02-01-2008
			DK 1778706 T3 31-08-2009
			EP 1778706 A2 02-05-2007
			ES 2328051 T3 06-11-2009
			FR 2873376 A1 27-01-2006
			JP 2008507490 T 13-03-2008
			KR 20070050446 A 15-05-2007
			US 2006105960 A1 18-05-2006

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/001044

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b>		
INV. C12N1/12		
ADD. A61K8/99      A61K36/02      A23L1/30		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CASES JULIEN ET AL: "Selenium from selenium-rich spirulina is less bioavailable than selenium from sodium selenite and selenomethionine in selenium-deficient rats" JOURNAL OF NUTRITION, vol. 131, no. 9, septembre 2001 (2001-09), pages 2343-2350, XP002526985 ISSN: 0022-3166	6-7, 9-12,14, 20-22
Y	le document en entier	1-5,8, 13,17,23
X	GB 2 214 928 A (CAOLA KOZMETIKAI [HU]) 13 septembre 1989 (1989-09-13)	6-7, 9-12, 14-16, 18-22
Y	le document en entier	1-5,8, 13,17,23
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
15 janvier 2010		27/01/2010
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Lejeune, Robert

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/001044

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 2006/008190 A (TETRAHEDRON SAS [FR]; ERDELMEIER IRENE [FR]; MICHEL JEAN-CLAUDE [FR];) 26 janvier 2006 (2006-01-26) cité dans la demande le document en entier	1-5,8, 13,17,23
A	LARSEN E H ET AL: "Speciation of selenoamino acids, selenonium ions and inorganic selenium by ion exchange HPLC with mass spectrometric detection and its application to yeast and algae" JOURNAL OF ANALYTICAL ATOMIC SPECTROMETRY DECEMBER 2001 ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY GB, vol. 16, no. 12, décembre 2001 (2001-12), pages 1403-1408, XP002526986 le document en entier	1-23
A	DE SOUZA MARK P ET AL: "Selenium assimilation and volatilization from dimethylselenoniopropionate by Indian mustard" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 122, no. 4, avril 2000 (2000-04), pages 1281-1288, XP002526987 ISSN: 0032-0889 le document en entier	1-23

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/001044

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 2214928	A	13-09-1989	AT 389888 B	12-02-1990
			AU 1326288 A	10-08-1989
			BE 1001675 A3	06-02-1990
			CA 1310927 C	01-12-1992
			CH 676605 A5	15-02-1991
			CN 1034842 A	23-08-1989
			DK 148888 A	10-08-1989
			ES 2006114 A6	01-04-1989
			FI 881310 A	10-08-1989
			FR 2626890 A1	11-08-1989
			GR 1000446 B	30-07-1992
			HU 51669 A2	28-05-1990
			IL 85777 A	29-03-1992
			IT 1216140 B	22-02-1990
			JP 1215278 A	29-08-1989
			LU 87172 A1	26-10-1989
			NL 8800692 A	01-09-1989
			NO 881215 A	10-08-1989
			PL 271284 A1	21-08-1989
			PT 87016 A	04-10-1989
			SE 468815 B	22-03-1993
			SE 8800991 A	10-08-1989
			YU 55488 A1	31-10-1989
			ZA 8801956 A	02-11-1988
WO 2006008190	A	26-01-2006	AT 435850 T	15-07-2009
			AU 2005263649 A1	26-01-2006
			BR PI0513733 A	13-05-2008
			CA 2574629 A1	26-01-2006
			CN 101098879 A	02-01-2008
			DK 1778706 T3	31-08-2009
			EP 1778706 A2	02-05-2007
			ES 2328051 T3	06-11-2009
			FR 2873376 A1	27-01-2006
			JP 2008507490 T	13-03-2008
			KR 20070050446 A	15-05-2007
			US 2006105960 A1	18-05-2006

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 K 8/99	
A 2 3 L 1/304 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	
	A 2 3 L 1/304	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74) 代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72) 発明者 クドラ, ヘルナール

フランス国, エフ - 9 1 4 7 0 レ モリエール, リュ ドゥ ゴメツ 5 2

(72) 発明者 ドゥ ベネ, フレデリク

フランス国, エフ - 7 7 5 0 0 シェール, アブニュ エミール ゲリー 3 9

(72) 発明者 ランジュ, マルク

フランス国, エフ - 7 5 0 1 4 パリ, リュ プレジン 1 3

F ターム(参考) 4B018 MD89 ME02

4B064 AA04 AC32 AC36 AC37 AC38 BJ03 CA08 CC03 CD02 CD04

DA01 DA10 DA20

4B065 AA83X AA84X AA85X AC16 BB03 BB04 BC48 CA01 CA02 CA41

CA44 CA50

4C083 AA031 CC01 FF01

4C087 AA01 AA03 BC80 CA09 MA52 MA63 NA14 ZC21