(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117545836 A
(43)申请公布日 2024.02.09

(21)申请号 202280044679.7
(22)申请日 2022.06.23
(30)优先权数据
2021-104448 2021.06.23 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/025179 2022.06.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/270598 JA 2022.12.29
(71)申请人 学校法人东京女子医科大学
地址 日本东京都
(72)发明人 清水达也 原口裕次 山中久美子 原亨和 喜多祐介
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 曾祯 段承恩
(51)Int.Cl.
C12N 5/07(2006.01)

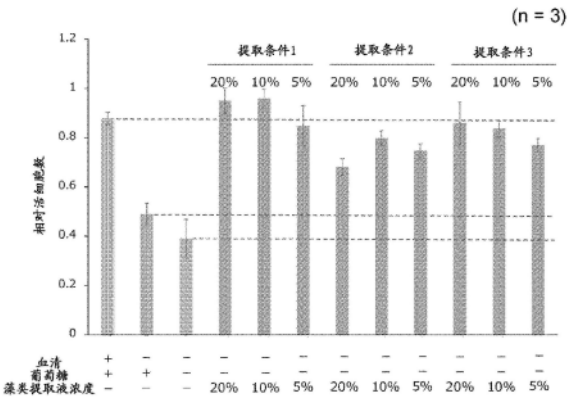
权利要求书1页 说明书16页 附图8页

(54)发明名称

动物细胞培养用组合物的制造方法、由此获得的动物细胞培养用组合物以及使用了该组合物的动物细胞的培养方法

(57)摘要

本发明提供制造动物细胞培养用组合物的方法,包括:(1)通过将藻类与固体酸催化剂混合,进行加热,从而获得藻类提取物的工序;和(2)将上述藻类提取物添加于动物细胞培养用培养基,调整上述藻类提取物的浓度的工序。此外,本发明提供藻类和动物细胞的再循环培养方法,包括:(i)使用培养了动物细胞之后的废液(第1废液)培养藻类的工序;(ii)通过回收上述藻类,与固体酸催化剂混合进行加热,从而获得藻类提取物的工序;(iii)将上述藻类提取物添加于上述(i)的藻类培养后的废液(第2废液),调整上述藻类提取物的浓度而制造动物细胞培养用组合物的工序;和(iv)使用上述动物细胞培养用组合物培养动物细胞的工序。



CN 117545836 A

1.一种制造动物细胞培养用组合物的方法,包括以下工序:

工序(1),通过将藻类与固体酸催化剂混合,进行加热,从而获得藻类提取物;以及

工序(2),将所述藻类提取物添加于动物细胞培养用培养基,调整所述藻类提取物的浓度。

2.根据权利要求1所述的方法,所述动物细胞培养用培养基实质上不包含血清和/或无血清培养的添加因子。

3.根据权利要求1或2所述的方法,所述动物细胞培养用培养基实质上不包含葡萄糖。

4.根据权利要求1~3中任一项所述的方法,所述动物细胞培养用培养基实质上不包含选自L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-胱氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和L-缬氨酸中的1种或多种氨基酸。

5.根据权利要求1~4中任一项所述的方法,所述动物细胞培养用培养基实质上不包含维生素类。

6.根据权利要求1~5中任一项所述的方法,所述动物细胞培养用培养基为无机盐培养基。

7.根据权利要求1~6中任一项所述的方法,所述藻类为微藻类。

8.根据权利要求1~7中任一项所述的方法,所述藻类为小球藻属的微藻类。

9.根据权利要求1~8中任一项所述的方法,所述固体酸催化剂为通过向来源于木质系原料的碳化物导入磺基进行磺化从而获得的木质固体酸催化剂或通过向酚醛树脂导入磺基进行磺化从而获得的树脂固体酸催化剂。

10.根据权利要求1~9中任一项所述的方法,所述工序(1)在70℃~150℃下实施。

11.根据权利要求1~10中任一项所述的方法,所述工序(1)实施2小时~24小时。

12.一种动物细胞培养用组合物,是通过权利要求1~11中任一项所述的方法而获得的。

13.一种动物细胞的培养方法,其中,使用通过权利要求1~11中任一项所述的方法而获得的动物细胞培养用组合物。

14.一种藻类和动物细胞的再循环培养方法,包括下述工序:

工序(i),使用培养了动物细胞之后的废液即第1废液对藻类进行培养;

工序(ii),通过回收所述藻类,与固体酸催化剂混合进行加热,从而获得藻类提取物;

工序(iii),将所述藻类提取物添加于所述(i)的藻类培养后的废液即第2废液,调整所述藻类提取物的浓度而制造动物细胞培养用组合物;以及

工序(iv),使用所述动物细胞培养用组合物对动物细胞进行培养。

15.一种用于调制动物细胞培养用组合物的藻类提取物的制造方法,包括下述工序:

工序(1),通过将藻类与固体酸催化剂混合,进行加热,从而获得藻类提取物。

动物细胞培养用组合物的制造方法、由此获得的动物细胞培养用组合物以及使用了该组合物的动物细胞的培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物细胞培养用组合物的制造方法、由此获得的动物细胞培养用组合物和使用了该组合物的动物细胞的培养方法。

背景技术

[0002] 哺乳类细胞在医学、药学、理工学、农学、兽医学等这样的各种研究/产业领域中被利用了。通过使用了这些细胞培养技术的研究来阐明各种病因,导致了各种治疗法的开发。为了各种疾病的治疗/预防,利用了由哺乳动物细胞生产出的生物药物/抗体药物、疫苗。进一步,培养细胞对于细胞生物学、生物化学、遗传学、生理学、分子生物学等这样的基础学术领域的进展也有大贡献。最近,培养出的肌细胞作为“培养肉”的细胞源而被利用了。报导了“培养肉”的蛋白质生产效率与以往的采用家畜饲养的生产相比远远有效率,通过将食用肉生产从以往的采用家畜饲养的情况改变为培养肉生产系统,从而可以减少最大99%的土地利用、96%的水消耗、96%的温室效应气体排出、45%的能量消耗。因此可以认为今后作为使用了培养细胞的食用肉生产能够持续的食品生产系统而在世界上逐步扩大。将来,预测由于培养哺乳类细胞的作为食品的应用,从而需要巨大的量的细胞。

[0003] 哺乳类细胞的培养中培养基是不可或缺的,现在大量的培养基也被用于细胞研究。培养基虽然包含各种营养素,但主要是葡萄糖和氨基酸。这些营养素来源于谷物、异养微生物,这些异养微生物也需要来源于谷物的各种营养素。谷物的栽培需要大量化学肥料和农药,要求巨大的量的能量,成为温室效应气体(GHG)的产生和环境污染的原因。此外谷物生产由于地球变暖、环境污染等环境变化而大受影响。

[0004] 现在,在AlgaeBase(http://www.algaebase.org/)中注册了150,000种以上藻类,该数每天被更新。由于种类的多样性,因此藻类的性质各式各样,涉及从在纯水或海水的任一者或这两者的环境下生长繁殖的种类,到嗜碱性(好塩基性)和嗜碱性(好アルカリ性)种类。根据这些特征,现在正在开发多样的用途。其中,包含利用微藻类的氮同化能力的排液处理、由化石燃料的燃烧产生的二氧化碳气体的固定等(非专利文献1~3)。

[0005] 微藻类通过光合作用由二氧化碳合成以碳水化合物(糖类)、脂质为代表的营养素,使用氮气/氨/硝酸盐等而产生氨基酸。微藻类通过利用太阳能和无机物,从而有效地生产各种营养素。由微藻类生产的这些营养素在能量和食品产业领域等各种领域中被利用。例如,从微藻类提取出的脂质作为代替石油的替代能量而被期待(非专利文献4)。而且,从微藻类提取出的葡萄糖作为生产生物乙醇的酵母的营养素而被利用(非专利文献5~6)。进一步,由微藻类生产的包含氨基酸的营养素作为营养辅助食品、宠物食品、土壤用的肥料而被利用(非专利文献7~10)。微藻类一般被认为是几乎没有残留物地最有效地合成营养素的光合作用生物(非专利文献11)。

[0006] 为了在体外对细胞进行培养,除了包含氨基酸、维生素、矿物等的合成培养基以外,在多数情况下,需要人、牛的胎儿、牛的新生儿、马、鸡、兔等的血清。血清中包含生长因

子等细胞的增殖所需要的因子,多数情况下它们在细胞的增殖中不可或缺。然而,血清具有每批次品质都不同,不稳定、昂贵等课题,要求替代它们的物质。针对这样的课题,在专利文献1～3中记载了微藻类的提取物在细胞培养中,能够部分替代血清的功能。然而,关于是否能够通过微藻类的提取物与不包含细胞培养所需要的氨基酸(特别是,谷氨酰胺等)、维生素等成分的合成培养基(例如,无机盐培养基)的混合来对细胞进行培养并未记载,况且,关于能够完全替代血清、无血清培养的添加因子,完全没有记载。

[0007] 报导了在添加了使用液体酸将微藻类通过水解进行提取而得的藻类提取物的培养基(例如,不含有氨基酸和/或维生素类的培养基)中能够培养动物细胞(专利文献4)。然而,关于该提取液能够完全替代血清、无血清培养的添加因子没有记载。

[0008] 此外,记载了来源于藻类的氨基酸(例如,类菌孢素氨基酸(专利文献5))、硫酸化多糖(特别是,岩藻多糖(专利文献6))显示细胞增殖效果,但关于能够完全替代血清、无血清培养的添加因子,没有记载。

[0009] 报导了使用固体酸作为用于由海藻类生物质、植物系材料获得包含单糖的糖化液的水解催化剂的技术,但关于通过所得的糖化液而进行细胞培养没有公开(专利文献7～8)。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:日本特开昭57-65179号公报

[0013] 专利文献2:日本特开昭57-206384号公报

[0014] 专利文献3:日本特开昭60-186280号公报

[0015] 专利文献4:国际公开第2021/066113号

[0016] 专利文献5:日本特开2016-216750号公报

[0017] 专利文献6:国际公开第00/62785号

[0018] 专利文献7:日本特开2014-36589号公报

[0019] 专利文献8:日本特开2019-199462号公报

[0020] 非专利文献

[0021] 非专利文献1:L.Wang,M.Min,Y.Li,P.Chen,Y.Chen,et al.,Cultivation of green algae Chlorella sp.in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant.Appl.Biochem.Biotechnol.162(2010)1174-1186.

[0022] 非专利文献2:F.Rossi,E.J.Olguin,L.Diels,R.De Philippis,Microbial fixation of CO2 in water bodies and in drylands to combat climate change,soil loss and desertification.N.Biotechnol.32(2015)109-120.

[0023] 非专利文献3:J.Cheng,Y.Zhu,Z.Zhang,W.Yang,Modification and improvement of microalgae strains for strengthening CO2 fixation from coal-fired flue gas in power plants.Bioresour.Technol.(2019)doi:10.1016/j.biortech.2019.121850.

[0024] 非专利文献4:I.Ajjawi,J.Verruto,M.Aqui,L.B.Soriaga,J.Coppersmith,et al.,Lipid production in Nannochloropsis gaditana is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator.Nat.Biotechnol.35(2017)647-652.

[0025] 非专利文献5:S.H.Ho,S.W.Huang,C.Y.Chen,T.Hasunuma,A.Kondo,et al.,Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock.Bioresour.Technol.135(2013)191-198.

[0026] 非专利文献6:G.E.Lakatos,K.Ranglova,J.C.Manoel,T.Grivalsky,J.Kopecky,et al.,Bioethanol production from microalgae polysaccharides.Folia Microbiol.(Praha).(2019)doi:10.1007/s12223-019-00732-0.

[0027] 非专利文献7:S.McCusker,P.R.Buff,Z.Yu,A.J Fascetti,Amino acid content of selected plant,algae and insect species:a search for alternative protein sources for use in pet foods.J.Nutr.Sci.3(2014)e39.

[0028] 非专利文献8:G.Gutierrez-Salmean,L.Fabila-Castillo,G.Chamorro-Cevallos,Nutritional and toxicological aspects of Spirulina(Arthrospira).Nutr.Hosp.32(2015)34-40.

[0029] 非专利文献9:E.T.Alori,O.O.Babalola,Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa.Front.Microbiol.9(2018)2213.

[0030] 非专利文献10:M.I.Khan,J.H.Shin,J.D.Kim,The promising future of microalgae:current status,challenges,and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels,feed,and other products.Microb.Cell Fact.17(2018)36.

[0031] 非专利文献11:A.K.Singh,M.P.Singh,Importance of algae as a potential source of biofuel.Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand).60(2014)106-109.

发明内容

[0032] 发明所要解决的课题

[0033] 本发明的目的是确立减少环境负荷和对环境变化的影响风险的新的细胞培养体系。

[0034] 用于解决课题的手段

[0035] 本发明者们为了解决上述课题,从各种角度探讨而进行了研究开发。其结果令人惊讶地发现了,添加了使用固体酸催化剂从微藻类提取出的营养素的培养基(特别是,实质上不含有血清和/或无血清培养的添加因子的培养基)能够对动物细胞进行培养。即,本发明包括以下方案。

[0036] [1]一种制造动物细胞培养用组合物的方法,包括以下工序:

[0037] (1)通过将藻类与固体酸催化剂混合,进行加热,从而获得藻类提取物的工序;以及

[0038] (2)将上述藻类提取物添加于动物细胞培养用培养基,调整上述藻类提取物的浓度的工序。

[0039] [2]根据项目1所述的方法,上述动物细胞培养用培养基实质上不包含血清和/或无血清培养的添加因子。

[0040] [3]根据上项目1或2所述的方法,上述动物细胞培养用培养基实质上不包含葡萄糖。

[0041] [4]根据项目1～3中任一项所述的方法,上述动物细胞培养用培养基实质上不包含选自L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-胱氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和L-缬氨酸中的1种或多种氨基酸。

[0042] [5]根据项目1～4中任一项所述的方法,上述动物细胞培养用培养基实质上不包含维生素类。

[0043] [6]根据项目1～5中任一项所述的方法,上述动物细胞培养用培养基为无机盐培养基。

[0044] [7]根据项目1～6中任一项所述的方法,上述藻类为微藻类。

[0045] [8]根据项目1～7中任一项所述的方法,上述藻类为小球藻属的微藻类。

[0046] [9]根据项目1～8中任一项所述的方法,上述固体酸催化剂为通过向来源于木质系原料的碳化物导入磺基进行磺化从而获得的木质固体酸催化剂或通过向酚醛树脂导入磺基进行磺化从而获得的树脂固体酸催化剂。

[0047] [10]根据项目1～9中任一项所述的方法,上述工序(1)在70℃～150℃下实施。

[0048] [11]根据项目1～10中任一项所述的方法,上述工序(1)实施2小时～24小时。

[0049] [12]一种动物细胞培养用组合物,是通过项目1～11中任一项所述的方法而获得的。

[0050] [13]一种动物细胞的培养方法,其中,使用通过项目1～11中任一项所述的方法而获得的动物细胞培养用组合物。

[0051] [14]一种藻类和动物细胞的再循环培养方法,包括下述工序:

[0052] (i)使用培养了动物细胞之后的废液(第1废液)对藻类进行培养的工序;

[0053] (ii)通过回收上述藻类,与固体酸催化剂混合进行加热,从而获得藻类提取物的工序;

[0054] (iii)将上述藻类提取物添加于上述(i)的藻类培养后的废液(第2废液),调整上述藻类提取物的浓度而制造动物细胞培养用组合物的工序;以及

[0055] (iv)使用上述动物细胞培养用组合物对动物细胞进行培养的工序。

[0056] [15]一种用于调制动物细胞培养用组合物的藻类提取物的制造方法,包括下述工序:

[0057] (1)通过将藻类与固体酸催化剂混合,进行加热,从而获得藻类提取物的工序。

[0058] [16]根据项目15所述的方法,上述动物细胞培养用培养基实质上不包含血清和/或无血清培养的添加因子。

[0059] [17]根据项目15或16所述的方法,上述动物细胞培养用组合物实质上不包含葡萄糖。

[0060] [18]根据项目15～17中任一项所述的方法,上述动物细胞培养用组合物实质上不包含选自L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-胱氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和L-缬氨酸中的1种或多种氨基酸。

[0061] [19]根据项目15～18中任一项所述的方法,上述动物细胞培养用组合物实质上不包含维生素类。

[0062] [20]根据项目15～19中任一项所述的方法,上述动物细胞培养用组合物为无机盐培养基。

[0063] [21]根据项目15～20中任一项所述的方法,上述藻类为微藻类。

[0064] [22]根据项目15～21中任一项所述的方法,上述藻类为小球藻属的微藻类。

[0065] [23]根据项目15～22中任一项所述的方法,上述固体酸催化剂为通过向来源于木质系原料的碳化物导入磺基进行磺化从而获得的木质固体酸催化剂或通过向酚醛树脂导入磺基进行磺化从而获得的树脂固体酸催化剂。

[0066] [24]根据项目15～23中任一项所述的方法,上述工序(1)在70℃～150℃下实施。

[0067] [25]根据项目15～24中任一项所述的方法,上述工序(1)实施2小时～24小时。

[0068] [26]根据项目15～25中任一项所述的方法,上述工序(1)在加压下实施。

[0069] 发明的效果

[0070] 根据本发明的方法,能够提供能够将细胞的培养所需要的营养素从微藻类容易地提取、廉价、并且使环境负荷减少的新的细胞培养体系。

附图说明

[0071] 图1为使用含有或不含葡萄糖/血清的DMEM进行了培养的原代牛成肌细胞的相对活细胞数。

[0072] 图2为使用添加了在各提取条件下获得的藻类提取液的不含葡萄糖/血清的DMEM进行了培养的原代牛成肌细胞的相对活细胞数。

[0073] 图3为使用添加了在各提取条件下获得的藻类提取液的不含葡萄糖/血清的DMEM进行了培养的原代牛成肌细胞的相对活细胞数。

[0074] 图4为用各培养基进行了培养的原代牛成肌细胞的显微镜图像。

[0075] 图5为用各培养基进行了培养的原代牛成肌细胞的显微镜图像。

[0076] 图6为使用添加了在各提取条件下获得的藻类提取液的不含葡萄糖/血清的DMEM进行了培养的原代牛成肌细胞的相对活细胞数。

[0077] 图7A为使用了固体酸处理藻类(绿球藻目)提取液的动物肌细胞培养(显微镜照片)。

[0078] 图7B为使用了固体酸处理藻类(绿球藻目)提取液的动物肌细胞培养(定量评价)。

具体实施方式

[0079] 以下,关于本发明的实施方式,根据需要以附图为参照进行说明。实施方式的构成为例示,本发明的构成不限定于实施方式的具体构成。另外,在本说明书中被引用的全部文献的全部内容通过参照而被援用到本说明书中。

[0080] 在一实施方案中,本发明提供动物细胞培养用组合物的制造方法,包括以下工序:

[0081] (1)通过将藻类与固体酸催化剂混合,进行加热,从而获得藻类提取物的工序;以及

[0082] (2)将上述藻类提取物、与实质上不包含血清和/或无血清培养的添加因子的动物细胞培养用培养基进行混合的工序。

[0083] 此外,在一实施方案中,本发明提供制造动物细胞培养用组合物的方法,包括以下

工序：

[0084] (1)通过将藻类与固体酸催化剂混合，进行加热，从而获得藻类提取物的工序；以及

[0085] (2)将上述藻类提取物添加于动物细胞培养用培养基，调整上述藻类提取物的浓度的工序。

[0086] 通过发现了下述令人惊讶的认识而完成：通过本发明的方法而获得的包含来源于藻类的成分(藻类提取物)的动物细胞培养用组合物即使实质上不包含血清和/或无血清培养的添加因子，也发挥与添加了动物细胞的维持和增殖所需要的血清或无血清培养的添加因子的动物细胞用培养基同等或更好的效果。因此，通过本发明而提供的动物细胞培养用组合物不需要添加在以往的动物细胞的培养中被使用的血清或无血清培养的添加因子。特别是，血清每批次品质都不同，此外，具有昂贵等课题，但本发明有助于这些课题的解决。动物细胞培养用组合物中的藻类提取物的浓度由于根据藻类提取物的提取条件、作为原料使用的藻类的种类或量、进行培养的动物细胞的种类等而条件不同，因此没有限定，例如，相对于动物细胞培养用组合物的全部体积，可以包含藻类提取物0.1～99％(v/v)、1～80％(v/v)、2～50％(v/v)、3～30％(v/v)、5～25％(v/v)。

[0087] 在本说明书中所谓“血清”，是指在血液凝固时，形成上清液的淡黄色的液体成分，包含生长因子等细胞的增殖所需要的因子。其来源可以为人、牛的胎儿、牛的新生儿、马、鸡、兔等，没有特别限定。由本发明提供的动物细胞培养用组合物即使不包含这些血清，也能够与包含血清的情况同等或更好地使动物细胞增殖。

[0088] 在本说明书中所谓“无血清培养的添加因子”，是指在无血清培养基中，一般代替血清添加的使细胞增殖(生长)的因子，是指例如，胰岛素、运铁蛋白、乙醇胺、亚硒酸钠、白蛋白、巯基乙醇、前列腺素等根据目标的细胞而被添加于无血清培养基的物质。由本发明提供的动物细胞培养用组合物即使不包含这些无血清培养的添加因子，也能够与包含无血清培养的添加因子的情况同等或更好地使动物细胞增殖。

[0089] 在本说明书中，所谓“固体酸催化剂”(也称为“固体酸”)，是指由在反应溶液中以固体分散的酸构成的催化剂，可举出例如，沸石、氧化铝、二氧化硅、H-丝光沸石、铌酸等无机固体酸、向强酸性离子交换体(例如，アンバーリスト(商标)-15、ナフィオン(商标)NR-50等)等这样的树脂等有机原材料导入了磺基、羧基、酚性羟基等酸性基的物质等，可以使用为了使接触表面积多而制备成粉末状或粒状的固体酸催化剂。通过在将藻类水解时使用固体酸，从而不需要在使用了液体酸时需要的中和处理。由此，由通过中和处理而可能产生的盐引起的盐浓度的上升被抑制。此外，固体酸催化剂能够回收而再利用，也能够使环境负荷减少。

[0090] 在一实施方案中，作为在本发明中可以应用的固体酸催化剂，可以使用通过向来源于木质系原料的碳化物导入磺基进行磺化从而获得的木质固体酸催化剂或通过向酚醛树脂导入磺基进行磺化从而获得的树脂固体酸催化剂等。

[0091] 在本发明的一实施方案中可以使用的木质固体酸催化剂可以为在不烧掉木质系原料的程度的温度条件下被碳化而制成碳化物，进行导入磺基(或也被称为磺酸基)的磺化而获得的物质。作为木质系固体酸催化剂，可以使用例如，日本专利第5528036号等、J.Am.Chem.Soc 2008,vol.130,No.38,12787-12793所公开的固体酸等。

[0092] 在本发明的一实施方案中可以使用的树脂固体酸催化剂可以为向原料酚醛树脂导入磺基进行磺化而获得的物质。

[0093] 本发明中可以使用的动物细胞培养用培养基可以为实质上不包含选自L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-胱氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和L-缬氨酸中的1种或多种氨基酸的动物细胞培养用培养基。即使以往的动物细胞培养用培养基所包含的这些氨基酸缺损,通过本发明而获得的藻类提取物也可以代替这些氨基酸,能够使动物细胞增殖。

[0094] 在一实施方案中,本发明中可以使用的动物细胞培养用培养基可以为实质上不包含维生素类的动物细胞培养用培养基。本发明中可以使用的、所谓实质上不包含维生素类的动物细胞培养用培养基,例如,可以为实质上不包含选自泛酸、氯化胆碱、叶酸、i-肌醇、烟酰胺、吡哆醇、核黄素、硫胺、和它们的药学上容许的盐中的1种或多种维生素类的物质。即使以往的动物细胞培养用培养基所包含的这些维生素类缺损,通过本发明而获得的藻类提取物也可以代替这些维生素类,能够使动物细胞增殖。

[0095] 在一实施方案中,本发明中可以使用的动物细胞培养用培养基可以为实质上不包含葡萄糖的动物细胞培养用培养基,进一步可以为实质上不包含丙酮酸的动物细胞培养用培养基。即使以往的动物细胞培养用培养基所包含的葡萄糖缺损,通过本发明而获得的藻类提取物也可以代替葡萄糖,能够使动物细胞增殖。

[0096] 在本说明书中,所谓“实质上不包含”,是指该物质几乎不包含,但并不意味着该物质完全不包含,例如,如果为葡萄糖则可以包含小于定量下限的10mg/L(例如,小于10mg/L、小于5mg/L、或小于1mg/L),例如如果为氨基酸(例如,L-谷氨酰胺等),则可以包含小于定量下限的0.1mg/L,或如果为维生素类则可以包含小于定量下限的1μg/L。此外,如果为血清,则可以包含小于1%(v/v)(例如,小于1%(v/v)、小于0.5%(v/v)、或小于0.1%(v/v)),如果为无血清培养的添加因子,则可以包含小于1μg/L(例如,小于1μg/L、小于0.5μg/L、小于0.1μg/)。

[0097] 在本说明书中,所谓“藻类”,是指通过光合作用而产生氧的生物之中,除主要在地上栖息的蕨类植物、蕨类植物、种子植物以外的物种的总称。藻类只要具备光合作用所需要的环境,就能够自己制作出氧、营养成分(例如,葡萄糖、氨基酸),能够进行增殖。本发明通过发现了在添加了包含从藻类提取出的成分的组合物的培养基中,能够对细胞进行培养,从而完成。

[0098] 在一实施方案中,能够应用本发明的藻类可以为微藻类(也称为“单细胞藻类”)。在本说明书中,所谓“微藻类”,是指在藻类中,个体由单一细胞构成的藻类,也包含多个微藻类个体集中而形成群体的微藻类,存在淡水产或海产、或狭盐性或广盐性的微藻类。例如,作为微藻类的例子,可举出以叶绿素a和b作为叶绿体的主要色素的绿藻类、以叶绿素d作为主要色素的单细胞性的蓝藻类(蓝细菌)、以叶绿素a和藻胆蛋白作为主要色素的单细胞性的红藻类。如果进一步详细地举例,则对于绿藻类,可举出绿藻纲衣藻目的莱茵衣藻(Chlamydomonas reinhardtii)(日本名:クラミドモナス)(淡水产)、杜氏藻目的杜氏盐藻(Dunaliella salina)(日本名:ドナリエラ)(海产)、团藻虫目的团藻(Volvox carteri)(日本名:ボルボックス)(淡水产)、绿球藻目的海洋绿藻(Chlorococcum littorale)(海产)、环藻目的水网藻(Hydrodictyon reticulatum)(日本名:アミミドロ)(淡水产)、二角盘星藻

(Pediastrum duplex)(日本名:クンショウモ)(淡水产)、二形栅藻(Scenedesmus dimorphus)(日本名:イカダモ)(淡水产)、共球藻纲小球藻目的小球藻属(Chlorella sp.)(日本名:クロレラ)(例如,小球藻(Chlorella vulgaris)(淡水产)、蛋白核小球藻(Chlorella pyrenoidosa)(淡水产)、椭圆小球藻(Chlorella ellipsoidea)(淡水产)、小球藻(Chlorella regularis)等)(淡水产))、裸藻门裸藻纲裸藻目的细小裸藻(Euglena gracilis)和近轴裸藻(Euglena proxima)(日本名:ミドリムシ)(淡水产)等。对于单细胞性的蓝藻类,可举出蓝菌门的アカリオクロリス・マリナ(Acaryochloris marina)(海产)、盐泽螺旋藻(Spirulina subsalsa)(淡水产)、钝顶节螺藻(Arthrospira platensis)(淡水产)、聚球藻菌属(Synechococcus sp.)(海产或淡水产)等。对于单细胞性的红藻类,可举出红藻门红藻纲青绿藻目的温泉红藻(Cyanidium caldarium)(日本名:イデユココゴメ)(淡水产)或红藻门红藻纲青绿藻目的喜温红藻(Galdieria partita)(淡水产)等。对于单细胞性的轮藻类,可举出绿藻门的轮藻纲链丝藻目的裂丝藻属(Stichococcus sp.)(海产)。此外,可举出作为单细胞性的石莼纲的藻类的フィラメントス—ウルボフィテ(Filamentous-ulvophyte)。能够应用本发明的藻类除了在上述中举出的藻类以外,还可以为它们的进行了基因操作的基因重组体,也可以为除上述以外的藻类。例如,本发明可以应用的藻类可以为淡水产或海产、和/或狭盐性或广盐性的微藻类,但优选为海产和/或广盐性的微藻类,例如能够应用于海滩绿球藻(Chlorococcum littorale)、聚球藻菌属的藻类等,但不限定于此。

[0099] 本发明所使用的藻类可以使用天然的藻类,也可以使用通过公知的培养法进行了增殖的藻类。

[0100] 一般而言,蛋白质、多糖等生物体高分子在加热下(例如,约60℃～约200℃,优选为约80℃～约180℃,更优选为约70℃～约150℃,进一步优选为约95℃～约135℃)被水解,产生低聚物、单体(对于蛋白质为肽、氨基酸,对于多糖为寡糖、单糖)。因此,在本发明中,加热工序可以在约60℃～约200℃,优选为约80℃～约180℃,更优选为约70℃～约150℃,进一步优选为约95℃～约135℃下实施。此外,本发明的加热工序的时间可以根据所使用的藻类的种类、量、或浓度、或反应溶液的pH、温度等条件来调整,例如,可以实施约30分钟～约48小时、约1小时～约36小时、约2小时～约24小时、约2.5小时～约12小时、约2.5小时～约7小时。另外,在本说明书中,“约”的术语是指包含带有“约”的数值的±10%、优选为±5%、更优选为±3%、进一步优选为±1%的范围的数值。

[0101] 在一实施方案中,在工序(1)中使用的藻类在被供于加热处理前,可以进行干燥处理、例如冷冻干燥。

[0102] 在一实施方案中,工序(1)可以在加压下实施。在本说明书中,所谓“加压下”,是指与大气压、即1大气压相比高的气压条件,例如,可以在1.1大气压以上、1.5大气压以上、1.8大气压以上、或2大气压以上实施。例如,可以为1.1～300大气压、1.5～200大气压、1.8～100大气压、2～50大气压例如2～20大气压。加压条件可以通过任意的装置、方法而被实施,例如,可以通过使用高压釜从而实现加压条件。

[0103] 在一实施方案中本发明提供通过上述方法而获得的动物细胞培养用组合物。

[0104] 此外,在一实施方案中本发明提供使用通过上述方法而获得的动物细胞培养用组合物的、动物细胞的培养方法。

[0105] 在本说明书中,所谓动物细胞,以包含脊椎动物(哺乳类(也称为“哺乳动物”。)、鸟类、两栖类、爬虫类或鱼类)的细胞、或无脊椎动物(例如,海鞘、节肢动物(甲壳类(例如,虾、蟹等)、昆虫类等)、棘皮动物(海胆、海参、海星等)、软体动物(例如,贝、乌贼、章鱼等)等)的细胞的含义而被使用。在一实施方案中,能够应用本发明的动物细胞可以为脊椎动物(例如,人、猴、牛、鲸、熊、鹿、马、猪、野猪、绵羊、兔、大鼠、小鼠、仓鼠、山羊、犬或猫等哺乳动物、鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸭、绿雉等鸟类、蛙、沙罗曼达、蝾螈等两栖类、鳄鱼、蜥蜴、蛇、乌龟、中华鳖等爬虫类、金枪鱼、大麻哈鱼、マス、鲤鱼、鲨鱼、鳗鱼、河豚等鱼类)的细胞、无脊椎动物(例如,海鞘、节肢动物(甲壳类(例如,虾、蟹等)、昆虫类等)、棘皮动物(海胆、海参、海星等)、软体动物(例如,贝、乌贼、章鱼等)等)的细胞、或来源于它们的原代细胞、确立细胞株、多能干细胞(例如,ES细胞、ntES细胞、Muse细胞、iPS细胞)、或组织干细胞(例如,间充质干细胞)或从它们被分化诱导了的细胞。此外,动物细胞的生物体组织中的来源可以为例如,肌肉系(例如,成肌细胞)、皮肤系(例如,成纤维细胞、角质形成细胞)、肝脏系(例如,肝实质细胞)、肾脏系(例如,肾细胞(例如,HEK293))、心脏系(例如,心肌细胞)、消化器系(例如,口腔粘膜细胞、肠道上皮细胞、壁细胞)、造血系(例如,造血干细胞)、生殖组织系(例如,卵巢细胞(例如,CHO细胞)、精细胞、子宫上皮细胞)、粘膜系(例如,上皮细胞)、骨组织系(例如,成骨细胞、软骨细胞)等,也可以来源于除这些以外的组织。

[0106] 通过本发明而能够提供的动物细胞培养用组合物可以包含1种以上来源于藻类的成分,例如,可以包含2种以上来源于藻类的成分。例如,可以组合包含大量包含葡萄糖的来源于藻类的成分、与大量包含构成蛋白质的氨基酸的来源于藻类的成分。此外,通过本发明而能够提供的动物细胞培养用组合物可以包含通过除固体酸催化剂以外的提取方法、例如超声波处理、使用了液体酸的方法(例如,国际公开第2021/066113号)而获得的藻类提取物。

[0107] 在对本发明的细胞进行培养的方法中,添加包含来源于藻类的成分的组合物的培养基只要根据进行培养的细胞的种类来适当选择即可,但优选为具有缓冲作用的介质,例如,可以为磷酸缓冲液、伊格尔培养基、达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM)、DMEM:F12培养基、格拉斯哥极限必需培养基、Grace昆虫培养基、Ham培养基、Iscove改良伊格尔培养基、RPMI-1640培养基、L-15培养基、Mccoy5A培养基等,在这些培养基中,可以使用实质上不包含血清和/或无血清培养的添加因子的培养基。此外,可以为实质上不包含葡萄糖、维生素类和/或蛋白质构成氨基酸(例如,选自L-谷氨酰胺、L-精氨酸、L-胱氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和L-缬氨酸中的1以上氨基酸)的培养基。培养基可以为液体培养基,也可以为固体培养基。通过将通过本发明的方法而获得的藻类提取物添加于动物细胞培养用培养基,从而供给细胞的生存所需要的营养素(例如,生长因子、葡萄糖、和蛋白质构成氨基酸、维生素类等),能够进行细胞培养。将藻类提取物添加于动物细胞培养用培养基的比例只要根据进行培养的细胞的种类等来适当调整即可,例如,相对于添加了藻类提取物的动物细胞培养用培养基的全部体积,可以包含藻类提取物0.1～99%(v/v)、1～80%(v/v)、2～50%(v/v)、3～30%(v/v)、5～25%(v/v)。

[0108] 在一实施方案中,本发明提供用于调制实质上不包含血清和/或无血清培养的添加因子的动物细胞培养用组合物的藻类提取物的制造方法,包括下述工序:

[0109] 通过将藻类与固体酸催化剂混合,进行加热,从而获得藻类提取物的工序。

[0110] 此外,在一实施方案中,本发明提供用于调制动物细胞培养用组合物的藻类提取物的制造方法,包括下述工序:

[0111] 通过将藻类与固体酸催化剂混合,进行加热,从而获得藻类提取物的工序。

[0112] 制造预定用于调制实质上不包含血清和/或无血清培养的添加因子的动物细胞培养用组合物的、藻类提取物的方法也包含于本发明的范围。因此,将由本发明提供的藻类提取物、与动物细胞培养用培养基进行混合的工序可以通过与实施本发明的人相同的人来实施,也可以通过与实施本发明的人不同的人来实施。

[0113] 在一实施方案中,由本发明提供的藻类提取物可以与实质上不包含血清和/或无血清培养的添加因子的动物细胞培养用培养基作为被分开地包装了的套件而提供。

[0114] 在一实施方案中,本发明提供藻类和动物细胞的再循环培养方法。该方法可以包括:

[0115] (i)使用对动物细胞进行了培养后的废液(第1废液)对藻类进行培养的工序;

[0116] (ii)通过回收上述藻类,与固体酸催化剂混合进行加热,从而获得藻类提取物的工序;

[0117] (iii)将上述藻类提取物添加于上述(i)的藻类培养后的废液(第2废液),调整上述藻类提取物的浓度而制造动物细胞培养用组合物的工序;以及

[0118] (iv)使用上述动物细胞培养用组合物对动物细胞进行培养的工序。

[0119] 通过本发明,对在再生医疗或生物医药等领域、培养食品的领域中的动物细胞的培养工序中被大量地产生,并只能被废弃的动物细胞进行了培养后的培养基(废液)能够有效地利用于藻类(例如,微藻类)的培养。此外,对藻类进行了培养后的培养基(废液)可以进一步用于动物细胞的培养。由此,藻类和动物细胞的再循环培养方法被确立,有助于环境负荷的减少。

[0120] 作为在上述工序(i)“使用对动物细胞进行了培养后的废液(称为“第1废液”)对藻类进行培养的工序”中,第1废液(在本说明书中,为了方便而记载为“废液”,但不是指实际上被废弃),可以使用在动物细胞的培养中通常可以使用的、并且对动物细胞进行了培养后的培养基。能够应用于本发明的、对动物细胞进行培养前的动物细胞用培养基只要是公知的就没有限定,例如,可以为伊格尔培养基、达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM)、DMEM:F12培养基、格拉斯哥极限必需培养基、Grace昆虫培养基、Ham培养基、Iscove改良伊格尔培养基、RPMI-1640培养基、L-15培养基、Mccoy5A培养基、M199培养基等,只要是能够对动物细胞进行培养的培养基就可以使用。

[0121] 供给能够应用于本发明的第1废液的动物细胞的培养方法只要按照公知的培养方法(例如,37℃,饱和水蒸气下,5%CO_2的加湿气氛下)即可,没有特别限定。

[0122] 上述工序(ii)“通过回收上述藻类,与固体酸催化剂混合进行加热,从而获得藻类提取物的工序”适用关于制造上述动物细胞培养用组合物的方法的工序(1)的说明。

[0123] 上述工序(iii)“将上述藻类提取物添加于上述(i)的藻类培养后的废液(称为“第2废液”),调整上述藻类提取物的浓度而制造动物细胞培养用组合物的工序”可以适用关于制造上述动物细胞培养用组合物的方法的工序(2)的说明。然而,在上述工序(iii)中,代替动物细胞培养用培养基,可以应用上述(i)的藻类培养后的废液(第2废液)。可以使用在本

工序中制备的动物细胞培养用组合物,对动物细胞进行培养。通过实施这些方法,从而确立藻类和动物细胞的再循环培养方法。

[0124] 进一步,在其它方案中,可以进一步实施将在工序(iv)中对动物细胞进行了培养后的废液作为上述工序(i)的第1废液而对藻类进行培养,即,工序(i)。此外,进一步,可以将工序(i)~(iv)以任意次数重复。

[0125] 实施例

[0126] 以下,基于实施例进一步详细地说明本发明,但它们完全不限定本发明。

[0127] <实施例1>

[0128] 1.材料与方法

[0129] 1-1.微藻类培养

[0130] 在本研究中,使用了真核微藻类小球藻(Chlorella vulgaris Beijerinck)(以下,称为"小球藻")(NIES-2170)(国立环境研究所,茨城县)。C.vulgaris利用将甘博格B5培养基(富士フィルム和光純薬,大阪府)与0.1%的Hyponex(ハイポネックスジャパン,东京都)混合而成的培养基进行了培养。培养分别使用1L的螺口试剂瓶(アズワン,大阪府)4支,在4连低速搅拌器(アズワン)上在60rpm、由气体交换器(東海ヒット,静冈县)得到的CO_2气体浓度20%气体流量50mL/分钟、24小时光条件下(LC-LED450W,タイテック,琦玉县),在室温(25℃)的环境下进行了。在培养7天后,将微藻类使用离心机(Sorvall Xpro Series Centrifuge,Thermo-Fischer Scientific,马萨诸塞州,美国)进行(1700×g,10分钟)回收,用纯水进行2次离心洗涤后(1700×g,5分),回收到50mL螺纹瓶(アズワン)。然后,通过冷冻干燥机(FDU-1200,东京理化,东京都)使其干燥了。

[0131] 1-2.从微藻类的营养素提取

[0132] 为了从微藻类提取营养素,使用了水解法(以下,称为"固体酸处理"和"液体酸处理")。称量上述干燥藻类的重量,在使用了固体酸的情况下在表1所示的各条件下进行了处理。具体而言,将冷冻干燥了的小球藻(100或200mg)、固体酸(ZP150DH,フタムラ化学株式会社,爱知,日本)200mg加入蒸馏水(4mL),在规定的温度下进行了加热搅拌。在反应后,将固体物质通过过滤而除去,将滤液以1700×g离心处理5分钟后,将该上清液用于细胞培养实验。

[0133] 在液体酸处理的情况下,将冷冻干燥了的小球藻调制为50g/L,在1NHCl、100℃、24小时的条件下使用加热块(Labnet International Inc.,新泽西州,美国)进行了加热。在加热处理后,通过氢氧化钠进行了中和。将固体物质通过过滤而除去,将滤液以1700×g离心处理5分钟后,将该上清用于细胞培养实验。

[0134] 在使用了超声波的处理的情况下,将冷冻干燥了的小球藻调制为50g/L,使用超声波细胞破碎装置(Bioruptor UCD-200TM,コスモバイオ,东京都)进行了提取。以20kHz的输出以10分钟的处理时间进行了提取。将固体物质通过过滤而除去,将滤液以1700×g离心处理5分钟后,将其上清液用于细胞培养实验。

[0135] 表1

[0136]

	藻种类	藻类重量 (mg)	固体酸量 (mg)	温度 (℃)	时间 (小时)
提取条件 1	小球藻	200	200	130	3
提取条件 2	小球藻	100	200	130	3

[0137]

提取条件 3	小球藻	100	200	160	3

[0138] 1-3.细胞培养与细胞生死判别试验

[0139] 原代牛成肌细胞由从东京芝浦脏器株式会社购买的牛颊肉进行了分离。原代牛成肌细胞通过补充了10％牛胎儿血清(FBS,Thermo-Fischer Scientific,马萨诸塞州,美国)和1％青霉素-链霉素(P/S,Invitrogen,Carlsbad,加利福尼亚州,美国)的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM)(Sigma-Aldrich,密苏里州,美国)在37℃下在包含5％CO_2的湿润气氛下进行了培养。相对活细胞数通过XTT测定法(Biological Industies,康涅狄格州,美国)和细胞的显微镜观察而进行了评价。将牛成肌细胞在96孔板(AGCテクノグラス株式会社,静冈县,日本)中以30,000细胞/孔的密度进行接种,在补充了10％FBS和1％P/S的DMEM中培养了一晚。在培养一晚后,舍弃培养基,用磷酸盐缓冲生理盐水(PBS,Sigma-Aldrich社)洗涤了2次。然后,使用含有10％FBS的DMEM、不含牛血清的DMEM、营养缺损培养基和在营养缺损培养基中进行了藻类提取物添加的样品对细胞进行了3天培养。为了使各溶液中的由色素的吸光度的差消失,在即将实施XTT测定法前,取各溶液,加入100μL的10％FBS和1％P/S,接着添加了50μL的XTT试剂。接着细胞生死判别试验如规程那样实施了。自制不含葡萄糖的DMEM(Invitrogen)或仅包含DMEM的无机盐成分的无机盐培养基,作为营养素缺损培养基而使用。此外动物细胞的相位差图像通过显微镜(ELIPSE TS2,株式会社ニコン,东京都,日本)使用软件(NIS-Elements BR,ニコン)而取得。

[0140] 另外,在本实施例中使用的培养基只要没有特别指明,就使用了以下组成的培养基。此外关于FBS,使用了含有10％FBS或不包含FBS的培养基。

[0141] (A)通常的动物细胞培养所使用的培养基DMEM的营养素/矿物组成

[0142] (i)糖质

[0143] • 葡萄糖:1000mg/L或4500mg/L

[0144] • 丙酮酸:110mg/L

[0145] (ii)氨基酸

[0146] • L-精氨酸:84mg/L

[0147] • L-胱氨酸:48mg/L

[0148] • L-谷氨酰胺:584mg/L

[0149] • 甘氨酸:30mg/L

[0150] • L-组氨酸:42mg/L

[0151] • L-异亮氨酸:105mg/L

[0152] • L-亮氨酸:105mg/L

[0153] • L-赖氨酸:146mg/L

[0154] • L-蛋氨酸:30mg/L

[0155] • L-苯丙氨酸:66mg/L

[0156] • L-丝氨酸:42mg/L

[0157] • L-苏氨酸:95mg/L

[0158] • L-色氨酸:16mg/L

[0159] • L-酪氨酸:71mg/L

[0160] • L-缬氨酸:94mg/L

[0161] (iii)维生素

[0162] • 泛酸:4mg/L

[0163] • 氯化胆碱:4mg/L

[0164] • 叶酸:4mg/L

[0165] • i-肌醇:7.2mg/L

[0166] • 烟酰胺:4mg/L

[0167] • 吡哆醇:4mg/L

[0168] • 核黄素:0.4mg/L

[0169] • 硫胺:4mg/L

[0170] (iv)矿物

[0171] • $CaCl_2$:200mg/L

[0172] • KCl:400mg/L

[0173] • $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_20$:0.10mg/L

[0174] • $MgSO_4$:98mg/L

[0175] • NaCl:6400mg/L

[0176] • $NaHCO_3$:3700mg/L

[0177] • NaH_2PO_4:109mg/L

[0178] • 酚红:15mg/L

[0179] (B)使用了藻类提取液的动物细胞培养实验中使用的培养基组成(1)DMEM(不含葡萄糖)

[0180] 用于显示通过使用藻类提取液从而能够替代糖质(葡萄糖/丙酮酸)。

[0181] (i)糖质

[0182] • 葡萄糖:0mg/L

[0183] • 丙酮酸:0mg/L

[0184] (ii)氨基酸

[0185] • L-精氨酸:84mg/L

[0186] • L-胱氨酸:48mg/L

[0187] • L-谷氨酰胺:584mg/L

[0188] • 甘氨酸:30mg/L

[0189] • L-组氨酸:42mg/L

[0190] • L-异亮氨酸:105mg/L

[0191] • L-亮氨酸:105mg/L

[0192] • L-赖氨酸:146mg/L

[0193] • L-蛋氨酸:30mg/L

[0194] • L-苯丙氨酸:66mg/L

[0195] • L-丝氨酸:42mg/L

[0196] • L-苏氨酸:95mg/L

[0197] • L-色氨酸:16mg/L

[0198] • L-酪氨酸:71mg/L

[0199] • L-缬氨酸:94mg/L

[0200] (iii)维生素

[0201] • 泛酸:4mg/L

[0202] • 氯化胆碱:4mg/L

[0203] • 叶酸:4mg/L

[0204] • i-肌醇:7.2mg/L

[0205] • 烟酰胺:4mg/L

[0206] • 吡哆醇:4mg/L

[0207] • 核黄素:0.4mg/L

[0208] • 硫胺:4mg/L

[0209] (iv)矿物

[0210] • $CaCl_2$:200mg/L

[0211] • KCl:400mg/L

[0212] • $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$:0.10mg/L

[0213] • $MgSO_4$:98mg/L

[0214] • NaCl:6400mg/L

[0215] • $NaHCO_3$:3700mg/L

[0216] • NaH_2PO_4:109mg/L

[0217] • 酚红:15mg/L

[0218] (2)无机盐培养基

[0219] 用于显示通过使用藻类提取液从而能够替代糖质(葡萄糖/丙酮酸)、氨基酸(L-精氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸)和维生素(泛酸、氯化胆碱、叶酸、i-肌醇、烟酰胺、吡哆醇、核黄素、硫胺)。

[0220] (i)糖质

[0221] • 葡萄糖:0mg/L

[0222] (ii)氨基酸

[0223] • L-精氨酸:0mg/L

[0224] • L-胱氨酸:0mg/L

[0225] • L-谷氨酰胺:0mg/L

[0226] • 甘氨酸:0mg/L

[0227] • L-组氨酸:0mg/L

[0228] • L-异亮氨酸:0mg/L

[0229] • L-亮氨酸:0mg/L

[0230] • L-赖氨酸:0mg/L

[0231] • L-蛋氨酸:0mg/L

[0232] • L-苯丙氨酸:0mg/L

[0233] • L-丝氨酸:0mg/L

[0234] • L-苏氨酸:0mg/L

[0235] • L-色氨酸:0mg/L

[0236] • L-酪氨酸:0mg/L

[0237] • L-缬氨酸:0mg/L(iii)维生素

[0238] • 泛酸:0mg/L

[0239] • 氯化胆碱:0mg/L

[0240] • 叶酸:0mg/L

[0241] • i-肌醇:0mg/L

[0242] • 烟酰胺:0mg/L

[0243] • 吡哆醇:0mg/L

[0244] • 核黄素:0mg/L

[0245] • 硫胺:0mg/L

[0246] (iv)矿物

[0247] • $CaCl_2$:200mg/L

[0248] • KCl:400mg/L

[0249] • $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$:0.10mg/L

[0250] • $MgSO_4$:98mg/L

[0251] • NaCl:6400mg/L

[0252] • $NaHCO_3$:3700mg/L

[0253] • NaH_2PO_4:109mg/L

[0254] • 酚红:15mg/L

[0255] 2.结果

[0256] 2-1.使用了微藻类提取物的细胞培养

[0257] 作为牛成肌细胞培养的营养素,调查了藻类提取物是否能够利用。在将牛成肌细胞使用不含葡萄糖和/或血清的培养基进行了培养的情况下,在3天后与用含有营养的培养基进行了培养的情况相比,都确认了细胞生存数的降低(图1)。然而,通过使用固体酸,添加从C.vulgaris提取出的提取物5%、10%和20%从而细胞生存率恢复(图2),进一步与使用含有营养的培养基进行了培养的情况相比显示高相对活细胞数。该效果在提取条件1(130℃、3小时)下最高。其结果,证明了藻类提取物在对哺乳类细胞的培养中作为重要的营养素的葡萄糖和牛血清的代用物而被利用(图2)。

[0258] 接下来,关于使用了固体酸的藻类提取物的制造方法,为了探索更最佳的条件,在以下各条件下将微藻类水解,使用所得的藻类提取物对牛成肌细胞进行了3天培养。

[0259] 表2

[0260]

	藻种类	藻类重量 (mg)	固体酸量 (mg)	温度 (℃)	时间 (小时)
提取条件 1	小球藻	200	200	130	3
提取条件 4	小球藻	100	200	70	6
提取条件 5	小球藻	100	200	70	20
提取条件 6	小球藻	100	200	100	3
提取条件 7	小球藻	100	200	100	6

[0261] 其结果,在提取条件7(100℃、6小时)下水解而获得的藻类提取物显示出与在提取条件1(130℃、3小时)下获得的藻类提取物同等程度的细胞增殖性(图3)。

[0262] 进一步,调查了藻类提取物是否也能够作为全部营养素和动物血清的代用物而利用。这里,使用了不包含营养素和血清的无机盐培养基。使用其培养基而培养了3天,结果,大部分的细胞死亡了(图4、图6)。然而,通过添加20%和10%固体酸处理藻类提取液,从而获得了高于用不含牛血清的DMEM和含有10%牛血清的DMEM进行了培养的情况的活细胞数(图4、图6)。其结果显示出通过在无机盐成分基础上使用固体酸处理藻类提取液从而可以代替动物细胞的培养所需要的营养素和动物血清。另一方面通过在无机盐中添加液体酸处理藻类提取液从而显示出与不含牛血清的DMEM同等的活细胞数(图5、图6)。然而超声波处理藻类提取液的添加效果不及使用了不含牛血清的DMEM时的活细胞数(图5、图6)。

[0263] <实施例2>

[0264] 关于藻类提取物的浓度,如图2、图3和图6所示那样浓度高时大体上相对活细胞数大。然而,有时不一定是那样,其根据提取条件、藻类的种类而不同。因此,在构建以下记载的再循环系统的情况下,需要以活细胞数变为最大的方式基于提取条件、培养基的成分分析等来确定提取物的浓度。

[0265] 如上述那样,藻类提取物向动物细胞培养用培养基的添加即使在实质上不包含血清、葡萄糖等的情况下,也对动物细胞的培养带来大的效果。本发明者们已经明确了,使用动物细胞培养后的废液能够进行藻类的培养(Haraguchi Y,Shimizu T.Microalgal culture in animal cell waste medium for sustainable'cultured food' production.Arch.Microbiol.2021 Nov;203(9):5525-5532.)。

[0266] 在使用将动物细胞(C2C12小鼠成肌细胞)培养了2天后的培养废液(第1废液)而将海洋绿藻培养了2天的培养废液(第2废液)中,添加从由本申请发明的方法得到的藻类(海洋绿藻)的提取物,结果明确了能够进行动物细胞(C2C12小鼠成肌细胞)的培养(图7,A:培养后的显微镜照片;B:相对活细胞数的定量评价)。因此,显示出能够构建使用动物细胞培养后的废液对藻类进行培养,将通过该藻类的固体酸处理而提取了的提取物,添加于使用动物细胞废液(第1废液)对藻类进行了培养后的废液(第2废液)而用于动物细胞的培养这样的再循环系统。

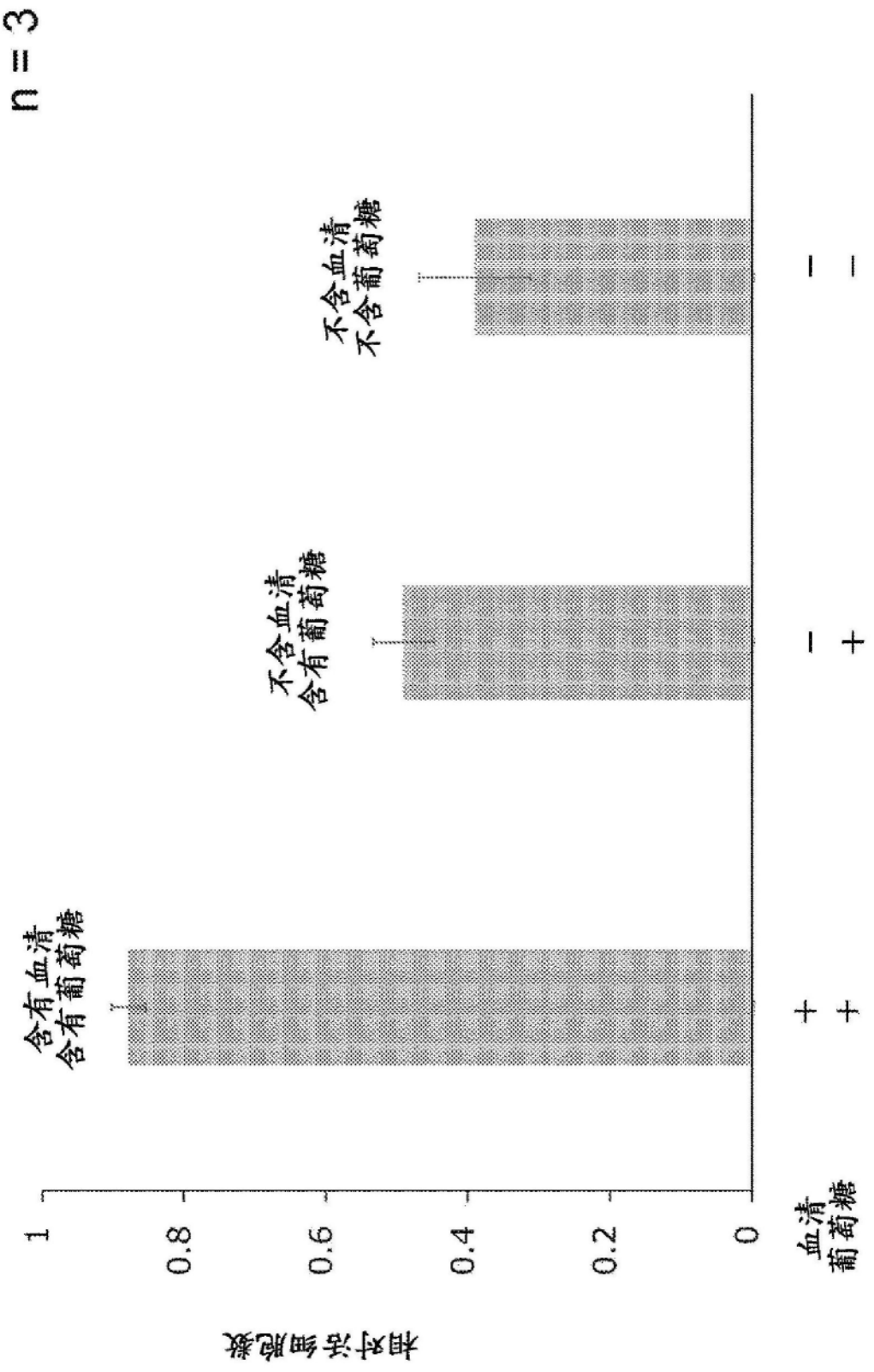

n = 3
含有血清
含有葡萄糖
不含血清
含有葡萄糖
不含血清
不含葡萄糖
相对活细胞数
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
血清
葡萄糖
+ +
- +
- -

图1

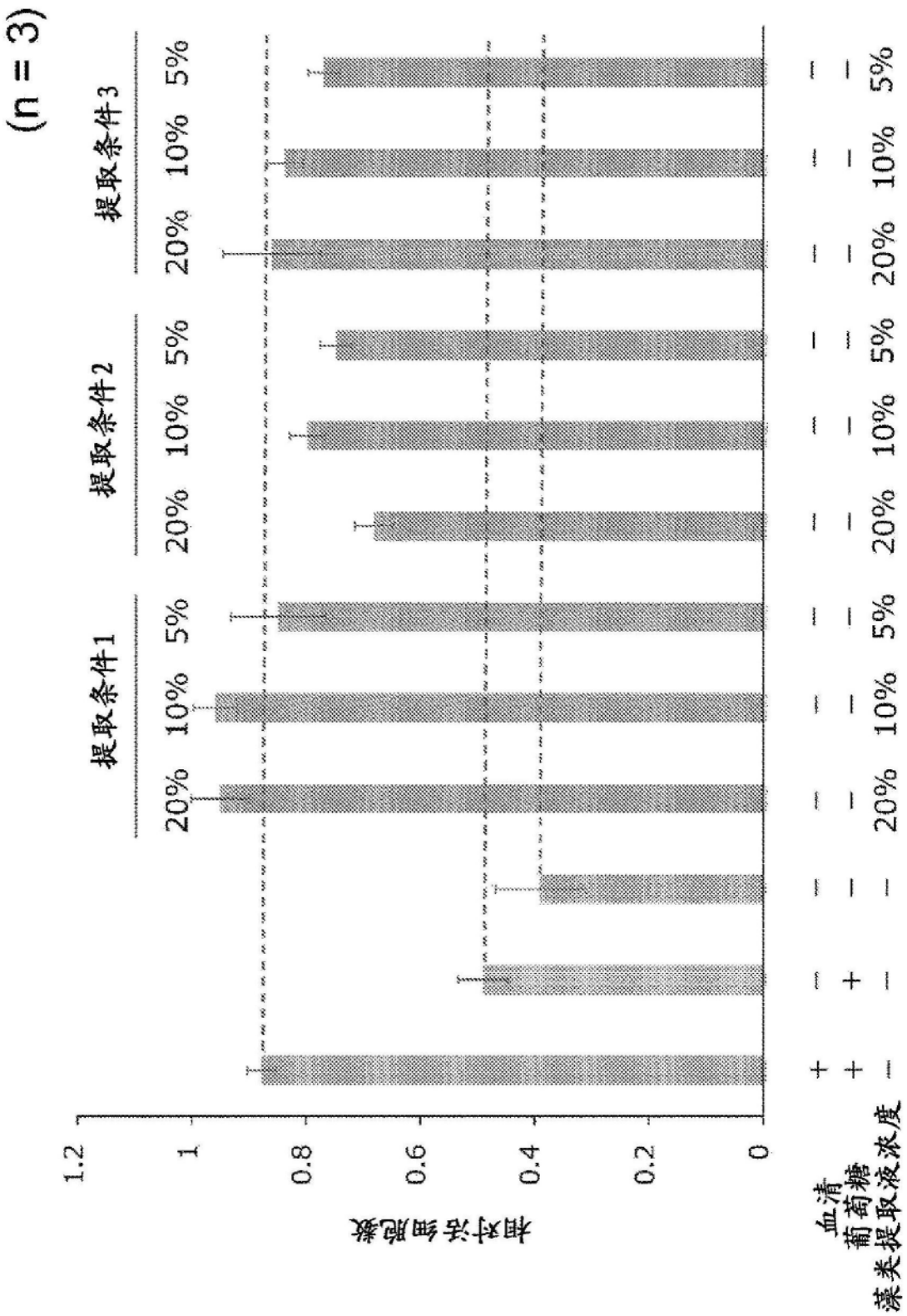

(n = 3)
提取条件1
提取条件2
提取条件3
20% 10% 5%
20% 10% 5%
20% 10% 5%
相对活细胞数
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
血清
葡萄糖
藻类提取液浓度
+ + — 20% 10% 5% 20% 10% 5% 20% 10% 5%
+ + — — — — — — — — —
— — — — — — — — — — —

图2

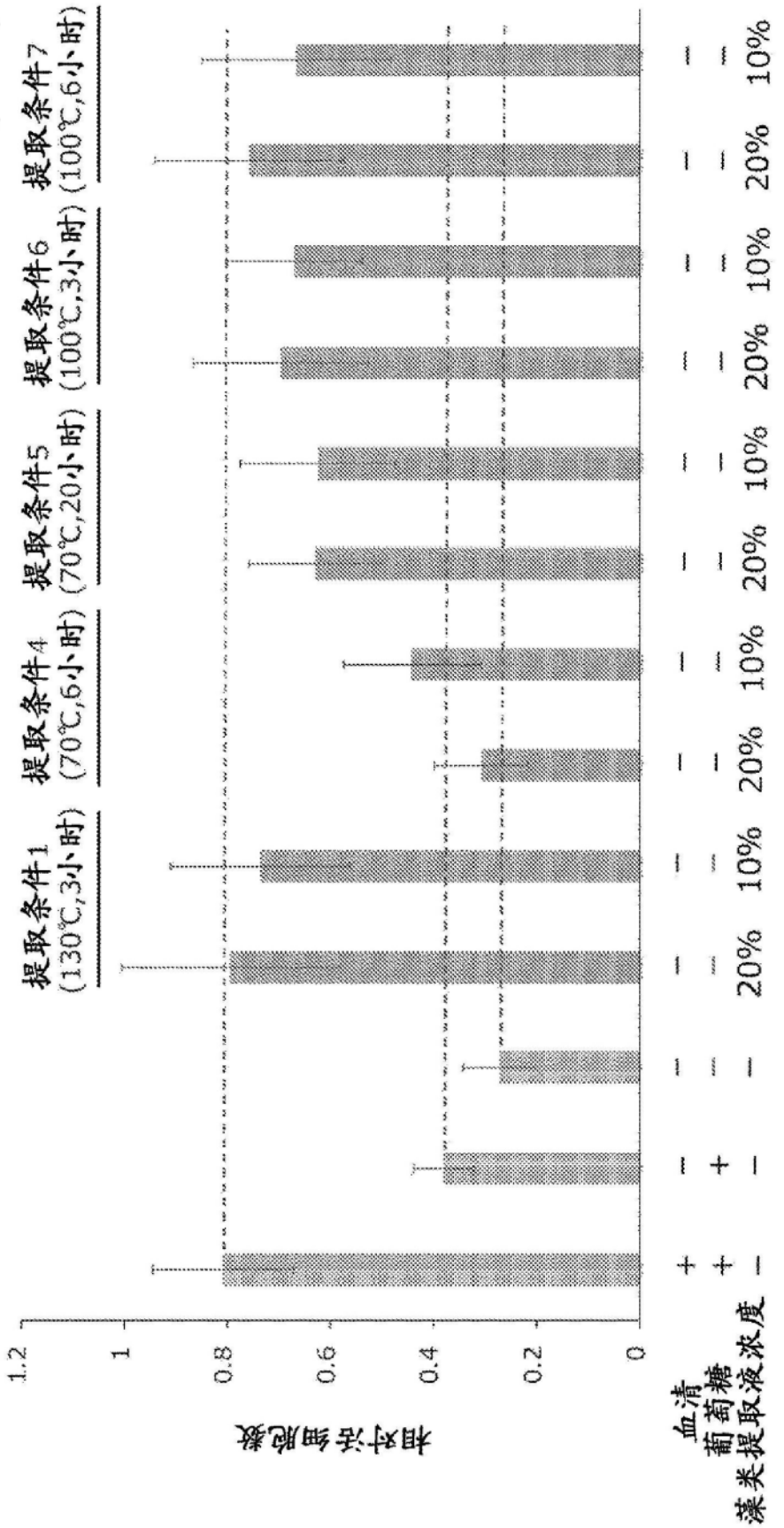

(n = 3)
提取条件1 (130℃,3小时)
提取条件4 (70℃,6小时)
提取条件5 (70℃,20小时)
提取条件6 (100℃,3小时)
提取条件7 (100℃,6小时)
相对活细胞数
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
血清
葡萄糖
藻类提取液浓度
+ + − − − − − − − − − −
+ + + − − − − − − − − −
− − − 20% 10% 20% 10% 20% 10% 20% 10%

图3

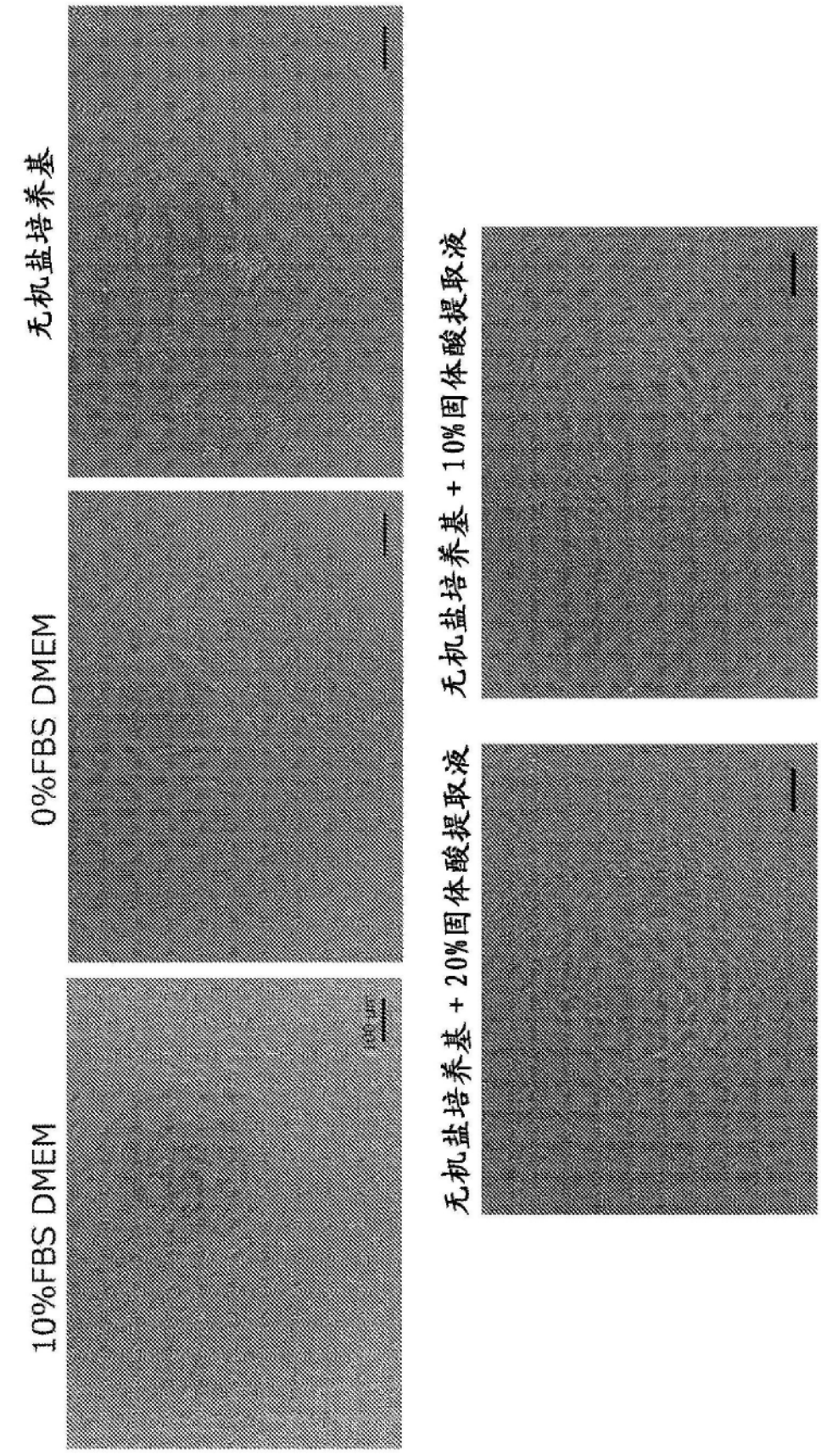

10%FBS DMEM
0%FBS DMEM
无机盐培养基
无机盐培养基 + 20%固体酸提取液
无机盐培养基 + 10%固体酸提取液

图4

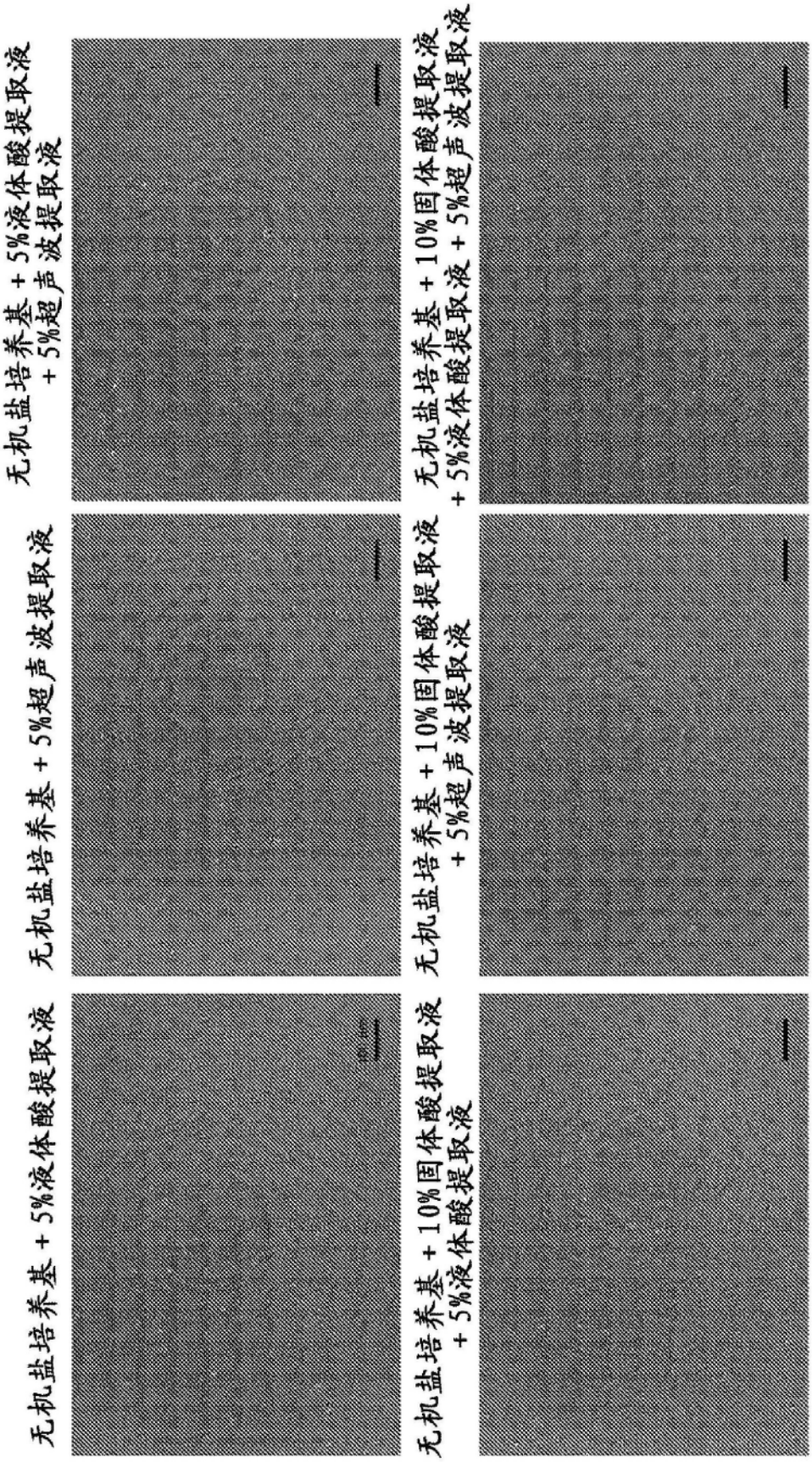

无机盐培养基 + 5%液体酸提取液
无机盐培养基 + 5%超声波提取液
无机盐培养基 + 5%液体酸提取液 + 5%超声波提取液
无机盐培养基 + 10%固体酸提取液 + 5%液体酸提取液
无机盐培养基 + 10%固体酸提取液 + 5%超声波提取液
无机盐培养基 + 10%固体酸提取液 + 5%液体酸提取液 + 5%超声波提取液

图5

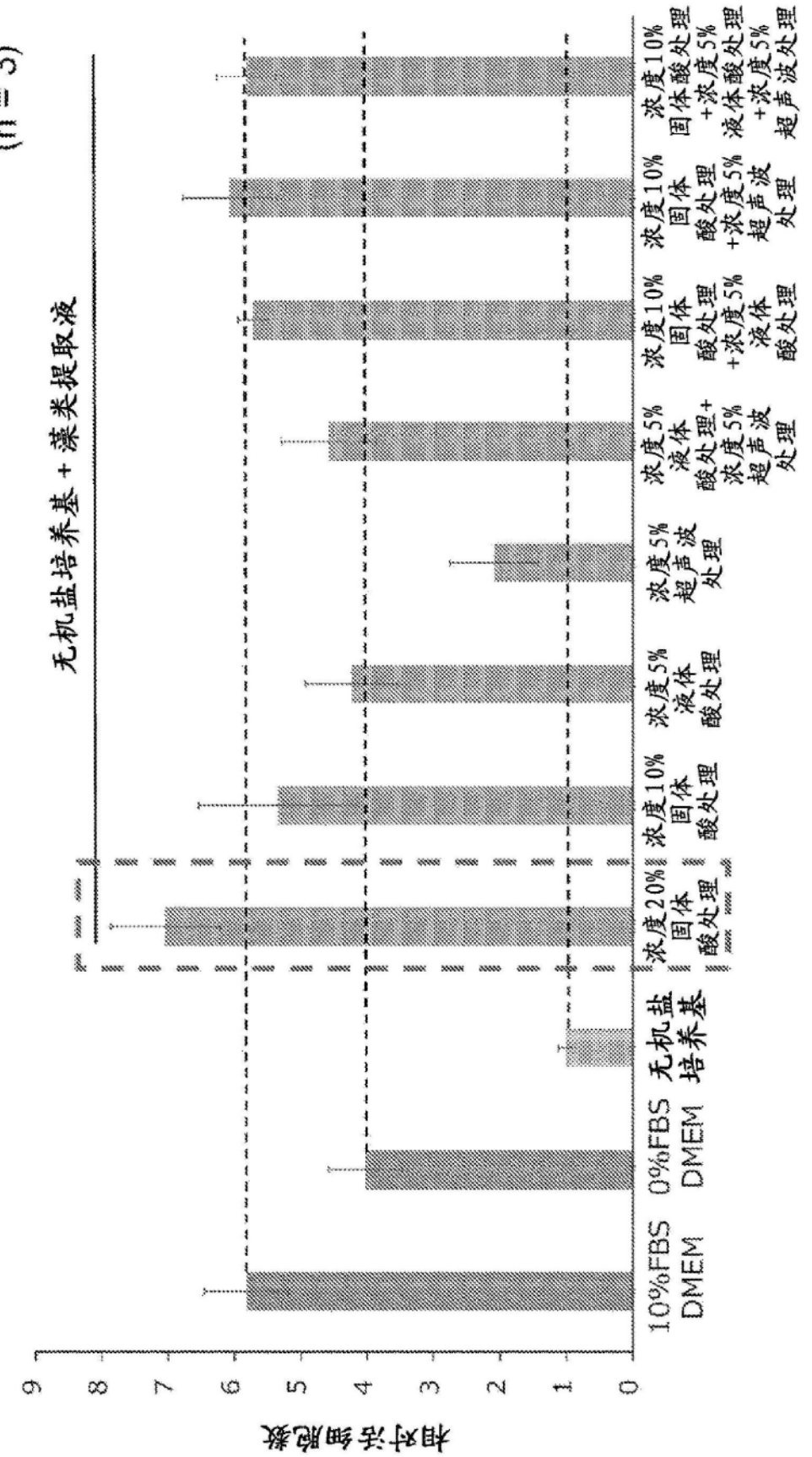

无机盐培养基 + 藻类提取液
(n = 3)
相对活细胞数
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10%FBS DMEM
0%FBS DMEM
无机盐培养基
浓度20%固体酸处理
浓度10%固体酸处理
浓度5%液体酸处理
浓度5%超声波处理
浓度5%液体酸处理+浓度5%超声波处理
浓度10%固体酸处理+浓度5%液体酸处理
浓度10%固体酸处理+浓度5%超声波处理
浓度10%固体酸处理+浓度5%超声波处理

图6

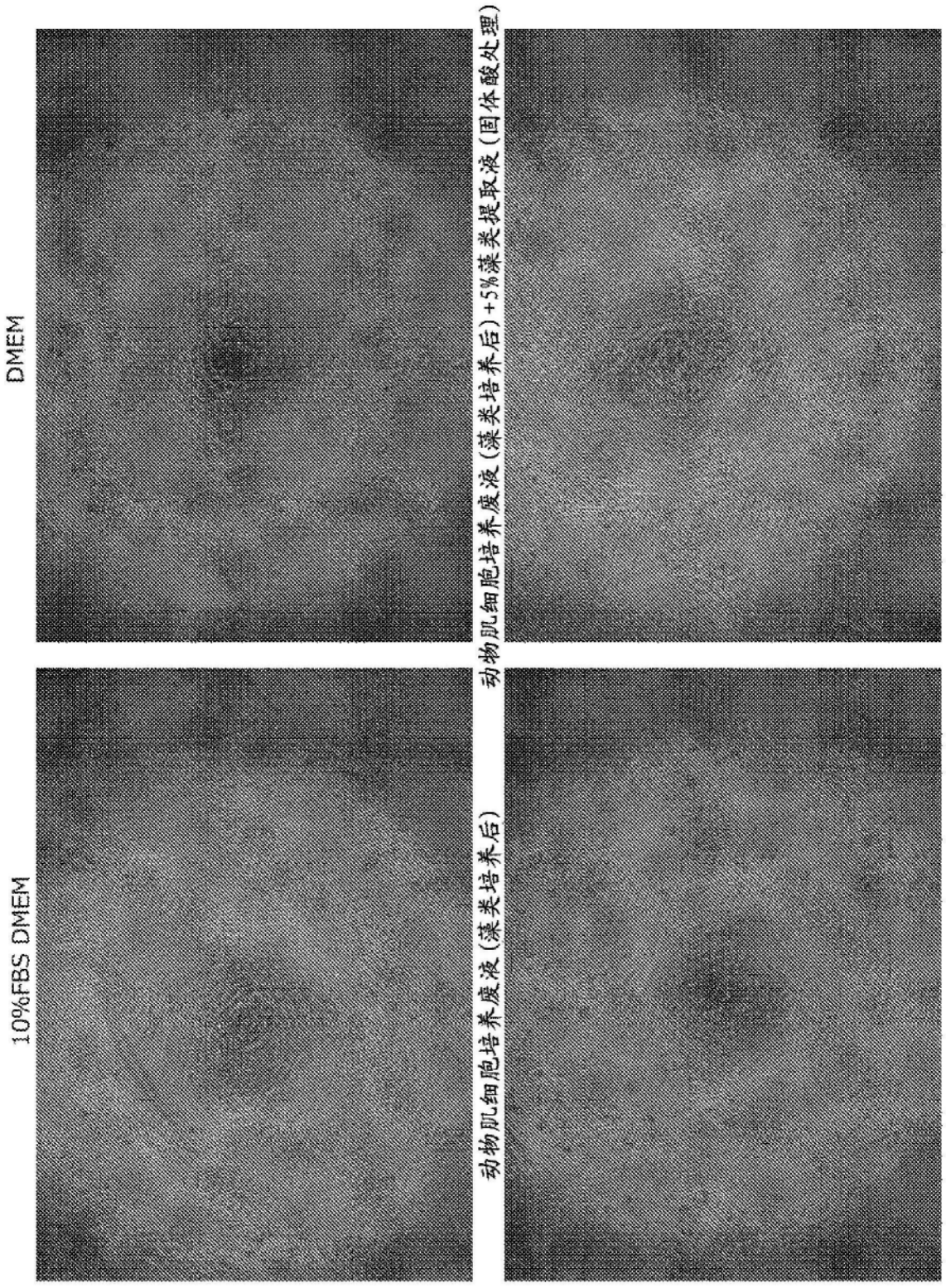

DMEM
10%FBS DMEM
动物肌细胞培养废液(藻类培养后)
动物肌细胞培养废液(藻类培养后)+5%藻类提取液(固体酸处理)

图7A

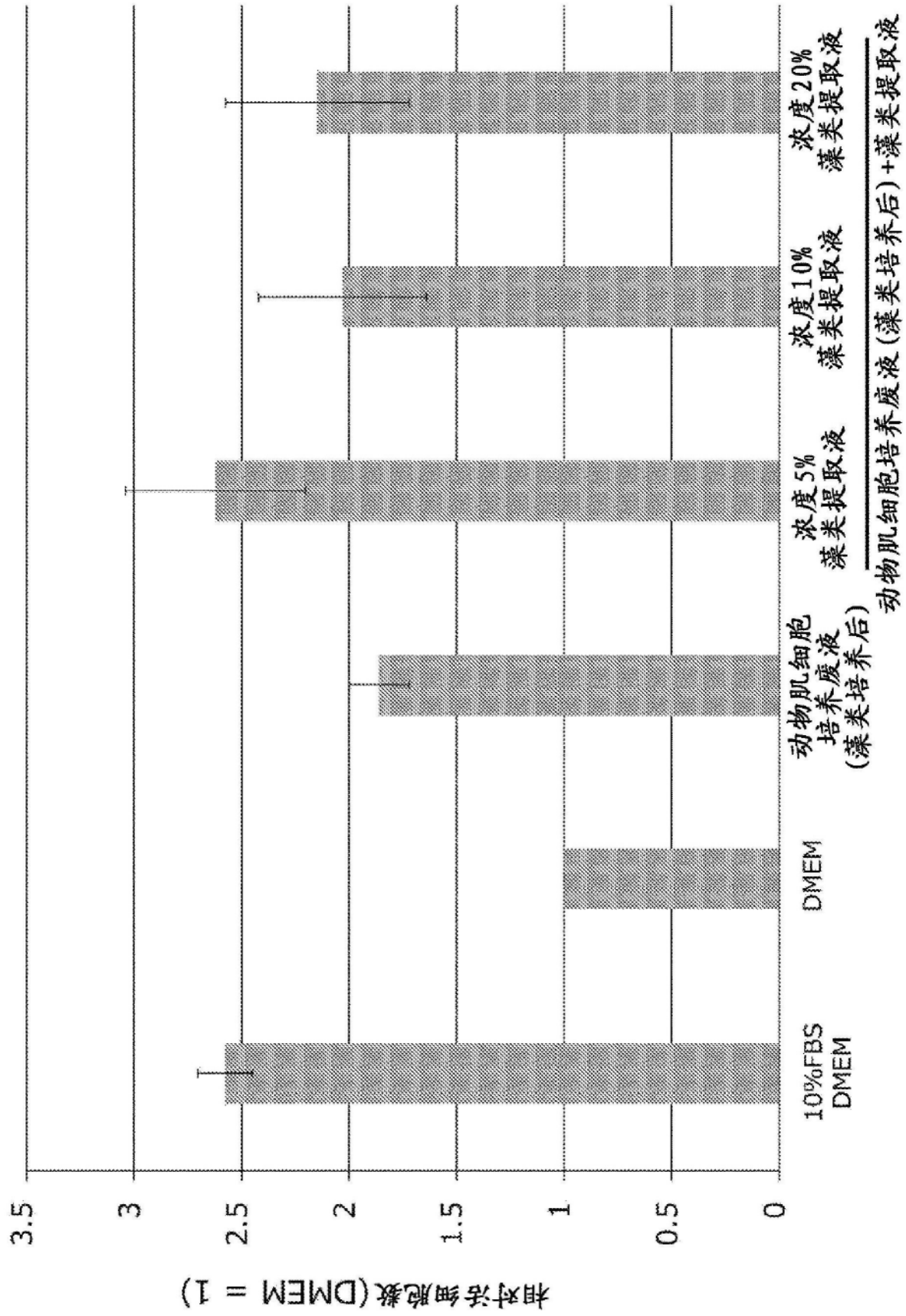

相对活细胞数(DMEM = 1)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10%FBS DMEM
DMEM
动物肌细胞培养废液(藻类培养后)
浓度5%藻类提取液
浓度10%藻类提取液
浓度20%藻类提取液
动物肌细胞培养废液(藻类培养后)+藻类提取液

图7B