

(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2016-523554

(P2016-523554A)

(43) 公表日 平成28年8月12日(2016.8.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 1/00 (2006.01)	C 1 2 P 1/00 Z	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/12 (2006.01)	C 1 2 N 1/12 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/16 (2006.01)	C 1 2 N 1/16 A	
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P 7/64	
C 1 2 P 7/24 (2006.01)	C 1 2 P 7/24	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-524883 (P2016-524883)	(71) 出願人	513127711 フェルメンタル
(86) (22) 出願日	平成26年7月15日 (2014.7.15)		フランス国, エフー 3 3 5 0 0 リブルヌ
(85) 翻訳文提出日	平成28年3月11日 (2016.3.11)		, リュ リビエール 4
(86) 国際出願番号	PCT/FR2014/051809	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02015/004403		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成27年1月15日 (2015.1.15)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	1356918		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成25年7月12日 (2013.7.12)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不連続細胞培養方法

(57) 【要約】

本発明は、混合栄養条件下、特に不連続及び/又は変化する照明条件下、及び/又は従属栄養条件下で、細胞密度及び所望の分子の生産性の両方を増大させることができる、培養細胞によるバイオマス生産方法に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオマスの生産方法であって、以下の工程：

- a) 発酵槽中、連続モードで、混合栄養又は従属栄養条件下、細胞を培養する工程；及び
b) 混合栄養条件下、半連続モードで操作される n 個の発酵槽に、工程 a) で得られた細胞及びそれらの培養物を連続及び逐次的に供給する工程、ここで n は 2 以上の整数である；

を含む、方法。

【請求項 2】

前記混合栄養条件下での細胞の培養が、時間中に不連続及び / 又は変化する照明条件下で実施される、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記照明の強度が変化し、その振幅が $5 \sim 1,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、好ましくは $5 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、これらの変化が、1 時間あたり $2 \sim 3600$ 回、好ましくは $2 \sim 200$ 回起こる、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記照明がフラッシュの形態である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

工程 a) における培養が、強度 $50 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、並びに持続時間が約 1 秒の 10 分の $1 \sim 5$ 分、好ましくは 1 秒 ~ 1 分、及び 1 時間あたり $2 \sim 3600$ 回、好ましくは $2 \sim 360$ 回の、フラッシュの存在下で実施される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 6】

工程 b) における培養が、強度 $50 \sim 2,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、並びに持続時間が約 1 秒の 10 分の $1 \sim 5$ 分、好ましくは 1 秒 ~ 1 分、及び 1 時間あたり $2 \sim 3600$ 回、好ましくは $2 \sim 360$ 回の、フラッシュの存在下で実施される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記工程 a) 及び / 又は b) における培養が、濃度 $5 \text{ mM} \sim 1.1 \text{ M}$ 、好ましくは $50 \text{ mM} \sim 800 \text{ mM}$ の濃度の有機炭素含有基質の存在下で実施される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 8】

工程 b) の培養が、 $48 \sim 200$ 時間、好ましくは $72 \sim 96$ 時間実施される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞が、混合栄養条件下で、天然又は人工照明に応答して代謝活性を誘導することが可能な、原核若しくは真核単細胞生物、多細胞動物、植物又は真菌生物から単離された真核細胞である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記真核又は原核単細胞生物が、海洋性又は淡水性、光合成性又は非光合成性の、原生生物、酵母又はシアノバクテリアから選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 11】

前記真核単細胞生物が、以下の属：シゾキトリウム (*Schizochytrium*)、ツラウストキトリウム (*Thraustochytrium*)、オドンテラ (*Odontella*)、ファエオダクチルム (*Phaeodactylum*)、ナノクロリス (*Nanochloris*)、クリプトコジニウム (*Cryptothecodinium*)、モノドゥス (*Monodus*)、ナンノクロロプシス (*Nannochloropsis*)、イソクライシス (*Isochrysis*)、ユーグレナ (*Euglena*)、シクロテ 50

ラ (*Cyclotella*)、ニツシア (*Nitzschia*)、オーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*)、セネデスムス (*Scenedesmus*) 及び/又はテトラセルミス (*Tetraselmis*) の種から選択される混合栄養性原生生物である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記真核単細胞生物が、クロレラ (*Chlorella*) 及びヘマトコッカス (*Haematococcus*) 種から選択される混合栄養性原生生物である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

シゾキトリウム、オーランチオキトリウム及びクリプテコジニウム属の種が、シゾキトリウム・sp. (*Schizochytrium* sp.) FCC 36、シゾキトリウム・sp. (*Schizochytrium* sp.) FCC 1320、シゾキトリウム・sp. (*Schizochytrium* sp.) FCC 1491、オーランチオキトリウム・マングロベイ (*Aurantiochytrium mangrovei*) FCC 1311、オーランチオキトリウム・マングロベイ (*Aurantiochytrium mangrovei*) FCC 31、オーランチオキトリウム・マングロベイ (*Aurantiochytrium mangrovei*) FCC 1319、オーランチオキトリウム・マングロベイ (*Aurantiochytrium mangrovei*) FCC 1479、オーランチオキトリウム・マングロベイ (*Aurantiochytrium mangrovei*) FCC 1325、クリプテコジニウム・コーニイ (*Crypthecodinium cohnii*) FCC 30、クリプテコジニウム・コーニイ (*Crypthecodinium cohnii*) FCC 1384、及びクリプテコジニウム・コーニイ (*Crypthecodinium cohnii*) FCC 1348 株から選択される、請求項 11 に記載の方法。

10

20

【請求項 14】

テトラセルミス、セネデスムス、クロレラ、ニツシア及びヘマトコッカス属の種が、テトラセルミス・sp. (*Tetraselmis* sp.) FCC 1563、セネデスムス・アブダンス (*Scenedesmus abundans*) FCC 23、セネデスムス・sp. (*Scenedesmus* sp.) FCC 1483、及びセネデスムス・オブリクウス (*Scenedesmus obliquus*) FCC 4、クロレラ・ソロキニアナ (*Chlorella sorokiniana*) FCC 2、クロレラ・sp. (*Chlorella* sp.) FCC 1553、クロレラ・sp. (*Chlorella* sp.) FCC 1520、ニツシア・sp. (*Nitzschia* sp.) FCC 1687、ヘマトコッカス・sp. (*Haematococcus* sp.) FCC 1643 株から選択される、請求項 11 又は 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 15】

工程 b) で得たバイオマスを回収する 1 つ以上の更なる工程を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記バイオマスが、乾燥重量 1 L あたり 30 g 以上、好ましくは 50 ~ 150 g である、請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 17】

前記バイオマスが、アルコール、有機酸、脂肪酸、多糖類、テルペン、例えばボトリオコッケン (*botryococcene*)、色素、例えばカロテノイド、アミノ酸、酵素、ビタミン、抗生物質、薬理活性を有する化合物、例えば外来又は組換えタンパク質、及び色素から選択される 1 つ以上の所望の分子を含有する、請求項 15 又は 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記バイオマスが、乾燥重量の 10% 以上、好ましくは $30 \pm 5\%$ を占める、請求項 1

50

～ 17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記バイオマスが、油相中に5%、好ましくは20～30%の所望の脂肪酸、及び/又は乾燥物質中に0.1%～1%の色素を含有する、請求項15～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記所望の分子が、エイコサペンタエン酸(EPA)及びドコサヘキサエン酸(DHA)、アラキドン酸(ARA)、 α -リノレン酸(ALA)、オレイン酸、フコキサンチン、カンタキサンチン、アスタキサンチン、ルテイン及びベータカロテンから選択される、請求項19に記載の方法。

10

【請求項21】

前記脂質及び/又は色素を回収する1つ以上の工程、任意で当該脂質からEPA及び/又はDHA及び/又はARA及び/又は色素を抽出する1つ以上の工程を更に含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

工程b)が15～24で実施される、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

以下：

- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号CCAP 4087/3で寄託された、シゾキトリウム・sp. (Schizochytrium sp.) FCC 36; 20
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号CCAP 4087/4で寄託された、シゾキトリウム・sp. (Schizochytrium sp.) FCC 1320;
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号CCAP 4087/5で寄託された、シゾキトリウム・sp. (Schizochytrium sp.) FCC 1491;
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号CCAP 4062/3で寄託された、オーランチオキトリウム・マンフロベイ (Aurantiochytrium mangrovei) FCC 1311; 30
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号CCAP 4062/2で寄託された、オーランチオキトリウム・マンフロベイ (Aurantiochytrium mangrovei) FCC 31;
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号CCAP 4062/4で寄託された、オーランチオキトリウム・マンフロベイ (Aurantiochytrium mangrovei) FCC 1319; 40
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号CCAP 4062/6で寄託された、オーランチオキトリウム・マンフロベイ (Aurantiochytrium mangrovei) FCC 1479;
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号CCAP 4062/5で寄託された、オーランチオキトリウム・マンフロベイ (Aurantiochytrium mangrovei) FCC 1325;
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号CCAP 4062/7で寄託された、オーランチオキトリウム・マンフロベイ (Aurantiochytrium mangrovei) FCC 1326; 50

- d Protozoa) に、番号 CCAP 1104/3 で寄託された、クリプトコジニウム・コーニイ (*Cryptothecodinium cohnii*) FCC 30 ;
- CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 1104/5 で寄託された、FCC 1384 ;
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 1104/4 で寄託された、クリプトコジニウム・コーニイ (*Cryptothecodinium cohnii*) FCC 1348 ; 10
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 66/85 で寄託された、テトラセルミス・sp. (*Tetraselmis* sp.) FCC 1563 ;
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 276/78 で寄託された、セネデスムス・アブンダンス (*Scenedesmus abundans*) FCC 23 ;
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 276/79 で寄託された、セネデスムス・sp. (*Scenedesmus* sp.) FCC 1483 ; 20
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 276/77 で寄託された、セネデスムス・オブリクウス (*Scenedesmus obliquus*) FCC 4 ;
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 211/129 で寄託された、クロレラ・ソロキニアナ (*Chlorella sorokiniana*) FCC 2 ;
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 211/130 で寄託された、クロレラ・sp. (*Chlorella* sp.) FCC 1553 ; 30
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 211/131 で寄託された、クロレラ・sp. (*Chlorella* sp.) FCC 1520 ;
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 1052/22 で寄託された、ニツシア・sp. (*Nitzschia* sp.) FCC 1687 ;
 - CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) に、番号 CCAP 34/18 で寄託された、ヘマトコッカス・sp. (*Haematococcus* sp.) FCC 1643 ; 40

から選択される株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、混合栄養条件下、特に不連続及び/又は変化する照明条件下、及び/又は従属栄養条件下で、細胞密度及び所望の分子の生産性の両方を増大させることができる、培養細胞によるバイオマス生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明のバイオマスの生産方法は、発酵槽中、連続モードで、混合栄養又は従属栄養条

件下、細胞を培養する工程、及び混合栄養条件下、又は従属栄養条件下、半連続モードで操作される発酵槽に、当該生産された細胞及びそれらの培養物を供給する工程を含む。

【0003】

斯かる方法は、細胞及び、特に、原核又は真核単細胞生物に適用可能である。この方法は、特に、光合成細胞、即ち、特に原生生物の、混合栄養条件下、天然又は人工照明に反応しての、代謝活性を誘導できる細胞に適用可能である。この方法は、バイオマスの密度及びそのように培養された細胞中の所望の分子、特に脂質及び/又はカロテノイド、より具体的にはエイコサペンタエン酸(EPA)及び/又はドコサヘキサエン酸(DHA)及び/又はアラキドン酸(AAA)及び/又は-リノレン酸(ALA)及び/又はリノレン酸及び/又はオレイン酸の生産性の、両方を増大させることができる。

10

【0004】

生物供給源による粗材料の生産は、現在の環境保護の側面を考慮すると益々重要になっている。動物及び植物細胞、或いは微生物は、現在、農業食物(例えばアルコール、有機酸、脂肪酸、多糖類、色素、アミノ酸、酵素又はビタミン)、医薬(抗体、薬理活性を有する化合物、外来又は組換えタンパク質)、化粧品(色素、有機化合物、例えば酸、多糖類及び脂肪酸)、及び石油化学産業(バイオ燃料、又は燃料、潤滑剤及び生物プラスチックに転換できる中間体製品)に有用な分子の生産手段として使用されている。

【0005】

例えば、原生生物は、幾つかの種が、顕著な量の回収可能な化合物、例えば脂質、特に多不飽和脂肪酸を蓄積又は分泌できるため、現在多くの産業的計画に供されている。

20

【0006】

細胞による所望の分子の生産は、産業スケールで、一般に発酵方法によって実施される。産業スケールで発酵を実施するために、幾つかの要素、例えば原生生物の場合、株に依存した培養条件(独立栄養、混合栄養又は従属栄養)、温度、照明条件、発酵槽のサイズ等を考慮しなければならない。例えば、培養は、1リットル容器中で、実験室内で、光バイオリアクター中で、及び100,000リットル容器中で、又はオープンポンド(数ヘクタール)中で実施されてもよい。しかしながら、人力や培養モニタリングの容易さ等の他の要素やエネルギーのコストが、理想的な培養条件を開発するためには考慮されなければならない。

【0007】

いずれにしても、細胞は、生産すべき分子の収率を増大させる最適な条件下で培養されるのが望ましい。

30

【0008】

バイオマス生産の分野で通常使用される、3種類の発酵方法が存在する。

【0009】

- 不連続(又は「バッチ」)モード:

タンクに滅菌した培養培地を充填し、ここに種菌を播種する。培地への顕著な添加物の添加を要せずに(主にpH調整剤や脱泡剤)、発酵が起こる。体積は一定で、バイオマスの生産性は比較的低い。発酵の最後に、発酵槽が空にされ、その内容物は置き換えられる。

40

【0010】

- 半連続(又は「フェド-バッチ」)モード:

この生産方法は、培養中に漸進的に栄養物質を導入することに基づく。このモードは、一般に、発酵槽中に高い細胞密度を達成するために使用される。

【0011】

- 連続モード:

この方法において、通常「ケモスタット」と呼ばれる発酵槽が使用され、その中に新鮮な培地が連続的に添加され、一方培養液は連続的に抜き取られて、培養体積が一定に維持される。

【0012】

50

細胞の増殖速度は、栄養物質の供給の速度を変化させ、一方細胞又は株の各種類の生理学的限界（特定のプロセス条件下でのその特定の最大増殖速度（ $\mu m a x$ ）に依存する）を順守することによりモニタリングできる。

【0013】

連続モードは、バイオマスの増殖と所望の代謝物の生産との間の平衡に対応する所定の生理的平衡状態における微生物の培養を可能とする。

【0014】

平衡状態において、定常速度での細胞増殖及び培養のパラメーターは、一定を維持する（pH、体積、溶存酸素濃度、栄養素及び産物の濃度、細胞密度等）。

【0015】

連続モードは、特に、以下の利点を有する：

- バイオマスの全体の生産コストが低下する（洗浄、滅菌及び培養操作、発酵レベルでの装備の不動化の減少）；
- 生産性（1時間あたりに生産されるバイオマスの量）が増大する；
- バイオマスの連続的な回収が、装備の寸法を最大化することにより下流の操作を促進することを可能とする。

【0016】

しかしながら、前記連続プロセスは欠点も有り、特に、所望の分子の生産が細胞の増殖相から離れている、又は部分的に離れているときに不利となる。従って、所望の物質がこの最適の増殖相の外側に有る場合（例えば培養終期、培養の定常期の期間内）、経済的関心に適合した性能を得ることが困難である。

【0017】

連続モードに関連した他の制約は：

- 大量の廃液の管理（バイオマスの濃度の低下）、
- 消費されなかった材料（残留物質）の損失も、下流のプロセス（抽出、乾燥等）に一定の影響を有することである。

【0018】

US615670は、従属栄養条件下、懸濁した細胞を培養する方法を記載しており、当該培養は半連続モードで開始され、連続モードで続行される。この方法は、細胞のエネルギー代謝を変化させ、乳酸塩の生産を変化させることが可能で、高い細胞密度を維持することを可能とする。使用される細胞は好ましくは哺乳類細胞、又は他の動物供給源（昆虫、魚等）である。

【0019】

出願WO2003/020919は、生物生産物を取得するための、高い細胞密度で動物又は植物細胞を培養するための幾つかのユニットを有するシステムに関する。この方法は、特に、半連続モードでの前培養発酵槽及び連続モードでの培養発酵槽を使用する。当該方法は、相乗的な方式で実施を可能にする異なるユニットの特別な配置に基づいている。

【0020】

出願US2009/0263889は、細胞性脂質、例えばDHAの生産のための、原生生物、特にシゾキトリウム（*Schizochytrium*）又はトラウストキトリウム（*Thraustochytrium*）属の、従属栄養条件下での培養方法に関する。当該培養は不連続モードで開始され、連続モードで継続され、又は半連続モードでの培養の中間工程を含む。

【0021】

出願WO2012/074502は、異なる光独立栄養微生物、特に藻類、珪藻、シアノバクテリア、光細菌又は植物の培養方法及びシステムを記載し、当該方法において、「生物性」（他の生物に由来する）又は「非生物性」（無機物又は他の手段によって生産された）刺激剤が、代謝物の生産を生じさせ、又は増大するために使用される。この刺激剤は、照明と組み合わせて使用され得る。この方法は、光独立栄養及び混合栄養、又は光独

10

20

30

40

50

立栄養及び従属栄養の培養条件を組み合わせる。

【0022】

現在、発酵槽中、連続モードで、混合栄養又は従属栄養条件下、細胞を培養する工程（増殖工程）、及び混合栄養条件下、又は従属栄養条件下、半連続モードで操作される発酵槽に、当該生産された細胞及びそれらの培養物を供給する工程（「熟成」工程）が、所望のバイオマス及び分子の生産性を増大できることが見出されている。

【0023】

有利な場合、そのように生産された方法は、特に、以下の長所を有する。

【0024】

- 連続モードで生産されたバイオマスは、良好な増殖速度を有する；

10

【0025】

- 細胞の質量は、半連続モードでの培養の間に、所望の分子が蓄積することによって、顕著に増大する；

【0026】

- 細胞の増殖と所望の分子の生産とは物理的に分離されており、各工程における培養パラメーター（照明、温度、pH、 pO_2 、攪拌等）を最適に出来る；

【0027】

- 連続モードにおける増殖相は、培養物を熟成発酵槽に供給し、それは、不連続（バッチ）培養又は半連続（フェド-バッチ）培養を引き起こす、洗浄及び滅菌に伴う生産停止相を顕著に減少できる；

20

【0028】

- 連続的生産モードと比較して、本発明の方法は、最適な組成でバイオマスを取得することが可能で、即ち、所望の分子の蓄積に適した熟成相の間の物理化学的パラメーターの使用が、連続モードでの生産と比較して、生産性を顕著に改善できる；

【0029】

- 本発明の方法は、熟成相が連続モードである場合と比較して廃液が少なく、これは、1リットルあたりの収量を増大させ、等量のバイオマスのために再処理すべき廃液の量を減少できる。

【0030】

想定される所望の分子は、特に、色素、例えばフコキサンチン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、エキネノン、ベータカロテン及びフェニコキサンチン、（エキソ）多糖類、アミノ酸、ビタミン、脂質、特に脂肪酸、より具体的には多不飽和脂肪酸である。これらの中で、オメガ-3系の幾つかの高度不飽和脂肪酸（HUF A）（「多不飽和脂肪酸」PUFA-3）、特にエイコサペンタエン酸（EPA又はC20:5）及びその前駆体のリノレン酸（ALA又はC18:3）、及びドコサヘキサエン酸（DHA又はC22:6）及びオメガ-6系（PUFA-6）、特にアラキドン酸（ARA又はAA又はエイコサテトラエン酸C20:4）及びその前駆体のリノール酸は、確認された栄養学的重要性を有し、治療的用途に関する優れた性能を有する。一不飽和脂肪酸、特にオレイン酸も、所望の分子として想定される。

30

【0031】

漁業産業で生産される魚油は、現在、この種類の脂肪酸の主要な商業的供給源である。しかしながら、これらの油には新しい用途（水産業における食品添加物、マーガリンへの添加）が見付かっている一方で、集約的な漁業活動によって、海産魚類の供給源は乏しくなりつつある。

40

【0032】

従って、これらのEPA、DHA、ALA及びARA等の脂肪酸の新しい供給源を探索して、この種類の多不飽和脂肪酸の市場での将来の需要増大に備えなければならない。

【0033】

酢酸、プロパン酸、及び酪酸等の短鎖脂肪酸（C1~C7）、ラウリン酸等の中鎖脂肪酸（C8~C12）も、微生物から、特に原生生物から取得される分子である。

50

【0034】

更に、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、エキネノン、ベータカロテン及びフェニコキサンチン、ルテイン又はフコキサンチン等のカロテノイドも、微生物によって生産される所望の分子である。それらは一般に色素として使用されるが、抗酸化剤として人間の健康において重要な役割を有する。最後にそれらは免疫系を刺激する能力を有する。

【0035】

ルテイン及びゼアキサンチンは、摂取後に血中に吸収され、人間の網膜中に蓄積されるカロテノイドである。ルテインは、青色光によって引き起こされる眼球及び皮膚の病変に関するリスクを減少させる。それは特に、老人性黄斑変性 (ARMD) の予防に寄与する。

10

【0036】

更に、「マイコスポリン様アミノ酸」又は「MAA」として知られる分子は、海洋性細菌、シアノバクテリア、真菌及び他の様々な海洋生物等の微生物によって生産される所望の分子である。

【0037】

更に、幾つかの微生物によって生産されるエキソ多糖類も所望の分子であり、それらは、テクスチャー剤 (texturizer) として農業食物調製物の組成に入り、又は艶消し (matify) 剤若しくはテクスチャー剤等として美容製剤の成分として用いられる。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0038】

本発明の方法は、産業スケールでの、脂肪酸及び/又は色素の生産のための任意の種類の細胞、特に原生生物の培養に関する。

【0039】

淡水又は海洋に生息する原生生物種の多くは、一般に独立栄養性、即ちそれらは光合成のみによって増殖できる。それらにとって、環境中の有機炭素含有基質の存在は好ましくなく、それらの増殖を改善しない。しかしながら、様々な種類及び起源の特定の種類の原生生物は、厳密に独立栄養性でないことが見出されている。従って、それらの一部の従属栄養生物は、光が全く存在しない条件下で、酸化的代謝 (発酵又は呼吸) によって、即ち糖等の有機炭素含有基質を使用して、それを炭素及びエネルギーの単一の供給源として、増殖することができる。

30

【0040】

増殖に尚も光合成が不可欠な他の原生生物種は、環境中に存在する有機物と光合成の両方を使用できる。これらの中間的な種類は、混合栄養生物と呼ばれ、光と有機炭素含有基質の存在を利用することが出来る。

【0041】

「混合栄養」藻類の具体的な特徴は、それらの代謝に関連しており、光合成と酸化的代謝を同時に実行できる。両方の種類の代謝が、当該藻類の増殖に対して全体的に有利な効果を有する [Yang C. et al. (2000) Biochemical Engineering Journal 6: 87-102]。

40

【0042】

混合栄養生物と見做される他の生物も存在する。例えば、パラコッカス・パントトロフス (Paracoccus pantotrophus)、ユーグレナ (Euglena) 等の原生生物、及び植物のジオアエア・ムシブラ (Dionaea muscipula) は、光からエネルギーを引き出すことが出来る。

【0043】

混合栄養種の中で、「光従属栄養」種の場合、酸化的代謝 (発酵又は呼吸) によるのみ増殖するが、光が、例えば屈光性 (phototropism) (光に関連して方向設

50

定する能力)、有性生殖サイクルの惹起、又はより一般的には光が当たったときの代謝の変化等の、光受容体を介した細胞に対する影響を有する。これらのメカニズムは、海洋性の糸状新菌類や原生生物等の多くの生物において知られている。

【0044】

本発明において、「混合栄養」細胞、生物又は微生物は、光及び有機炭素含有基質を使用して増殖できる、細胞、生物又は微生物を意味し、また、増殖以外の他の機能、例えばカロテノイドのような分子を生産するために光を使用するものは、「光従属栄養」という。従って、「混合栄養」細胞は、混合栄養条件下で、天然又は人工の照明に応答して、代謝活性を誘導できる。

【0045】

いずれにしても、微生物、細胞において、生産すべき所望の分子、特に脂肪酸及び/又は色素の収量を増大させる最適の条件下で培養するのが望ましい。

【0046】

特に、より効率的でより良好なコスト効果の高い産業的实施のために、従来技術に記載されるものよりも良好な収率で、バイオマス、脂質及びカロテノイドを取得できるのが望ましい。従って、可能な限り高い収率であるのが好ましい(例えば乾燥物質1Lあたり80g超、乾燥物質の合計重量に対して脂肪酸30重量%超、及び乾燥物質の合計重量に対してカロテノイド30重量%超)。

【課題を解決するための手段】

【0047】

詳細な説明

第一の側面において、本発明は、バイオマスの生産方法に関し、当該方法は、以下の工程:

a) 「トップ発酵槽」という発酵槽中、連続モードで、混合栄養又は従属栄養条件下、細胞を培養する工程;及び

b) 混合栄養条件又は従属栄養条件下、好ましくは混合栄養条件下、半連続モードで操作されるn個の、「熟成発酵槽」という発酵槽に、工程a)で得られた細胞及びそれらの培養物を連続的に供給する工程、ここでnは2以上、好ましくは2~10の整数である;を含む。

【0048】

一つの態様において、本発明は、混合栄養又は従属栄養で増殖する工程、及び混合栄養条件下で所望の分子を蓄積する工程を含む、培養方法に関する。

【0049】

「混合栄養条件」は、光及び有機炭素含有基質の供給が有る培養を意味する。

【0050】

「従属栄養条件」は、暗黒下、有機炭素含有基質の供給が有る培養を意味する。

【0051】

「原生生物」は、全ての単細胞真核微生物を意味する。微細藻類(クロレラ、テトラセルミス、ニツキア等)、単細胞真菌類(シゾキトリウム、オーランチオキトリウム等)、又は従属栄養性鞭毛虫(クリプテコジニウム等)は、原生生物の群の一部を形成する。

【0052】

「株」は、天然の株だけでなく、当該天然の株の突然変異をも意味する。

【0053】

「突然変異」は、元の株に由来する生物で、当該株の遺伝子プールが、天然の方法により、又は当業者に知られるランダムな突然変異を生産できる物理化学的方法(UV等)により、又は遺伝子操作方法により改変されたものを意味する。

【0054】

工程a)は、顕著な細胞増殖を達成出来る細胞の増殖相である。一般に、この目標を達成するために、培養する細胞の種類、及び生産すべき所望の分子の種類に依存して、特定の培養培地(細胞への供給溶液)が選択される。例えば、原生生物の場合、培養培地は、

10

20

30

40

50

主要栄養素、微量元素及びビタミンを含有する供給溶液に富む。当該培養培地は、従属栄養又は混合栄養モードでの培養を可能とする、有機炭素含有基質を含有する。

【0055】

工程b)は、所望の分子の蓄積の相である。好ましくは、この相は、代謝をこれらの所望の分子の蓄積に好ましく向かわせることを可能とする第二の供給手段を用いる。例えば、原生生物による脂質の製造の場合、この方向付けは、炭素の濃度と容易に吸収される炭素の濃度との比率(C/N比)を増大させることによりなされる。

【0056】

実際に、連続モードを実行する第一の発酵槽は、細胞の増殖(工程a))を可能とし、この増殖発酵槽からの送流の流れ(又は排出)は、熟成タンクを供給し、そこでのバイオマスは、所望の分子が蓄積している(工程b))。 10

【0057】

本発明のこの態様において、前記方法は、「不連結(uncoupled)」と呼ばれる方法として記載され得て、工程a)の増殖相と工程b)の熟成相は、物理的及び時間的に分離される。

【0058】

本発明のバイオマスの生産方法の連続モードでの細胞の培養の工程a)、又は「増殖工程」は、当業者に知られる発酵槽、例えば「ケモスタット」中で実施されてもよい。

【0059】

工程a)の培養の開始は、通常の方法で実施される(図1)。上流で前培養工程が実施され、連続的なバイオマスの生産を開始するのに望ましい細胞濃度、即ち2~50 g/L、好ましくは5~40 g/Lを得てもよい。 20

【0060】

一般に、クライオチューブからのスケールの増大は、幾つかの前培養工程を経て実施される。例えば、それは、エルレンマイヤー中での2つの工程(前培養1及び前培養2)、並びに発酵槽中での1つの工程(前発酵槽)の3つの工程で行われてもよい。エルレンマイヤー中での増殖は、不連続(バッチ)モードで起こる。一般に、前発酵槽も、不連続モードで起こる。

【0061】

例えば、前記培養は、20ml エルレンマイヤーでの培養から2l エルレンマイヤーでの培養に、そして不連続(バッチ)モードでの発酵槽での培養に(前発酵槽)、そして連続(トップ発酵槽)モードでの発酵槽での培養に漸進的に進み得る。例えば、不連続モードでの発酵槽の容積は40Lで、トップ発酵槽の容積は4000Lである。 30

【0062】

トップ発酵槽での培養の開始は、その間に連続的な体制が達成されない、即ち細胞の増殖が安定しない、又は相内で新鮮な培地を供給する速度に同調しない、構築相を有する。それは、「平衡を達成する」相であり、「定常状態を達成する相」ともいえる。この「定常状態を達成する相」は、培養される微生物の増殖速度に、より正確には特定の増殖速度又は μ_{max} に依存する期間を有する。例えば、この期間は5~200時間、好ましくは10~100時間であってもよい。 40

【0063】

一般に、一旦定常状態に達すると、トップ発酵槽から熟成発酵槽への排出速度は、新鮮な培養培地を供給する速度に相当する流速で構築される。この排出は、所望の体積が移動するまで第一の熟成発酵槽に供給し、そして当該排出は、他の熟成タンクに方向転換される。当業者は、培養される細胞の種類、生産される所望の分子、及びその態様に係る熟成タンクの容量に従い、必要な播種物の体積をどうやって決定するかを知っている。この播種物の体積は、培養される細胞に依存して、熟成発酵槽の容積の10~90%であってもよく、例えば熟成発酵槽の体積の約20%、30%、40%、50%、60%、70%、又は80%である。

【0064】

熟成発酵槽への排出は、公知の装備を使用して標準的な様式で実施される。

【0065】

一般に、工程 a) で使用されるのと異なる培養培地が、熟成相で採用される。異なる態様において、培養培地は、トップ発酵槽からの排出を起源とする播種と同時に、又はその前に、又はその後、熟成発酵槽に供給される。

【0066】

工程 a) の発酵槽における培養の体積は、熟成発酵槽中の培養に必要な培養の最終体積の関数として決定される。一般に、トップ発酵槽の体積は、それを供給する熟成発酵槽の体積の約 5 ~ 100%、好ましくは 10% ~ 50%、より好ましくは約 20% である。例えば、体積 4000 L のトップ発酵槽は、20000 L の熟成発酵槽に供給できる。n 個の熟成発酵槽の体積が異なる場合、最大の発酵槽の体積がトップ発酵槽の体積を決定し得る。

10

【0067】

工程 a) で使用する培養培地は、培養する細胞の特性に従い選択される。

【0068】

細菌、真菌又は酵母の培養において、所定の方法のために特定の培地が開発され得る。しかしながら、最少培地又は富化栄養培地 (enriched nutritive medium) が使用されてもよく、酵母又は原生生物の増殖用に Verduyn 培養培地や、最近の増殖用に LB (Lysogeny Broth) 培地等が使用され得る。植物細胞の培養において、例えば、Murashige 及び Skoog 型の培地が使用され得る。動物細胞の培養において、例えば、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) が使用され得る。

20

【0069】

一般に、特に細菌、原生生物又は真菌等の微生物の培養において、特に、工程 a) における培養培地は、一般に、窒素源及びリン酸源、及び有機炭素含有基質を含有する。後者は、混合栄養モードでの培養を可能とする。

【0070】

この種類の培地の例は、改変 Verduyn 培地 (海水塩 15 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, Na_2EDTA 24 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, パントテン酸塩 3.2 mg/L, 塩酸チアミン 9.5 mg/L, ビタミン B12 0.15 mg/L, 消泡剤 0.1 mL/L) であり、これに有機炭素含有基質が添加される。

30

【0071】

培養培地の他の例は、以下の構成の培地 (海水塩 25 g/L, KNO_3 3 g/L, NaH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g/L, Na_2EDTA 24 mg/L, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, 酵母抽出物 2 g/L, ビオチン 0.15 mg/L, 塩酸チアミン 9.5 mg/L, ビタミン B12 0.15 mg/L, 消泡剤 0.1 mL/L) に、有機炭素含有基質を添加したものである。

40

【0072】

本発明の一つの態様において、前記有機炭素含有基質の濃度は、5 mM ~ 1.1 M (0.9 ~ 200 g/L)、好ましくは 50 mM ~ 800 mM (9 ~ 144 g/L) である。

【0073】

好ましくは、当該有機炭素含有基質は、グルコース、セルロース誘導体、乳酸塩、澱粉、ラクトース、サッカロース、酢酸塩及び / 又はグリセロールの純粋なもの又は混合物で

50

ある。

【0074】

前記培養培地中に含有される有機炭素含有基質は、複合分子又は複数の基質の混合物からなるものであってもよい。トウモロコシ、小麦又はジャガイモ等に由来する澱粉の生物変換で得た産物、特に小サイズの分子からなる澱粉加水分解物は、本発明の混合栄養培養に適した有機炭素含有基質を形成する。

【0075】

培養に十分な濃度を維持するために、本培養方法の過程で、培養培地に追加の基質が添加される。当業者は、どのように有機炭素含有基質のレベルの維持を保證するかを承知している。

【0076】

好ましくは、好ましくは、前記有機炭素含有基質は、300 mM以上の濃度のグルコース、グリセロールを含有する。

【0077】

例えば、DHAの生産のためのオーランチオキトリウム属の原生生物の株の工程a)の培養は、グルコース濃度5~200 g/L、好ましくは30~100 g/L、より好ましくは30~60 g/Lの、生理食塩水培養培地(海水塩10~20 L、好ましくは15 g/L)中で実施され得る。一つの態様において、前記培養培地は、濃度1~50 g/L、好ましくは2~25 g/Lのマグネシウム塩やカリウム塩等の主要栄養素も含有する。一つの態様において、前記培地は、好ましくは1.5~7.5 g/Lのアンモニウム塩を含有する。また、マンガン、亜鉛、コバルト、モリブデン、及び銅、ニッケル及び鉄の塩等、原生生物の培養における通常の様式で使用される微量元素も含有する。これらの微量元素の濃度の典型的な値は、各微量元素において0.02~15 mg/Lである。例えば、マグネシウム及び亜鉛塩は2~4 mg/Lで存在し、コバルト及びモリブデン塩は少量存在し、例えば0.01~0.04 mg/L、好ましくは0.02~0.03 mg/Lである。銅及びニッケル塩は1~4 mg/L、好ましくは1~2 mg/Lで存在する。一般に、鉄塩は他の塩より顕著なレベルで存在し、例えば8~15 mg/Lのレベルである。

【0078】

他の態様において、前記マグネシウム塩は存在する。一つの態様において、前記培地は、ビタミン、例えばチアミン、ビタミンB12、パントテン酸塩及び任意で安定化剤をも含有する。

【0079】

非常に高いオーランチオキトリウム(Aurantiochytrium)密度(1~3 x 10⁹ cells/ml)を達成するのに適した本発明の態様において、下記表1の「初期培地」という培養培地が使用される。

【0080】

10

20

30

【表 1】

	初期培地	供給溶液
炭素源	1~1.6 CMol	3.7 CMol
NH ₄ ⁺	1.5~7.5 g/L	5~10 g/L
海水塩	5~30 g/L	10~30 g/L
Ca	25~70 mg/L	100~200 mg/L
Mn	1~10 mg/L	4~20 mg/L
Zn	0.1~1 mg/L	0.5~2 mg/L
S	0.5~1.5 g/L	2~4 g/L
Co	0.1~1 mg/L	0.5~2 mg/L
Mo	0.01~0.5 mg/L	0.05~1.5 mg/L
Cu	0.05~0.3 mg/L	0.25~0.8 mg/L
Ni	0.02~0.2 mg/L	0.1~0.5 mg/L
K	0.5~2 g/L	3~5 g/L
Mg	70~300 mg/L	250~750 mg/L
P	0.3~1 g/L	1.3~2.5 g/L
Fe	5~10 mg/L	15~25 mg/L
チアミン	15~50 mg/L	50~150 mg/L
ビタミンB12	0.2~0.7 mg/L	0.7~2 mg/L
パントテン酸塩	0.05~0.15 mg/L	15~45 mg/L
安定化剤(EDTA型)	実験助手により決定	実験助手により決定

表 1：本発明の培養方法の工程 a) におけるオーランテオキトリウム株の培養に有用な培養培地の例を示す。

【0081】

「初期培地」は、連続培養を開始するのに使用され得る培地に対応する。そして「供給溶液」は、発酵槽に連続的に供給するのに使用され得る。

【0082】

一般に、例えば原生生物、細菌及び酵母において、トップ発酵槽中のバイオマス濃度が平衡に達したとき、約 5 ~ 100 g/L、好ましくは 10 ~ 70 g/L のバイオマス濃度で、トップ発酵槽からの排出は連続的かつ持続的に、半連続モードを実行する異なる熟成発酵槽に供給すると見做される。細胞の培養は、前記発酵槽中で混合栄養又は従属栄養条件下で維持され（「熟成」工程）、所望の分子が生産される。従って、一般に、工程 b) における熟成発酵槽への供給は、トップ発酵槽が定常状態で細胞密度が一定となったときに開始される。例えば、原生生物の培養において、この細胞密度は、1 mL あたり $10^7 \sim 10^9$ 細胞であり得る。酵母においては、この細胞密度は、1 mL あたり $10^8 \sim 10^9$ 細胞であり得る。細菌においては、この細胞密度は、1 mL あたり $10^9 \sim 10^{10}$ 細胞であり得る。

【0083】

工程 b) における熟成発酵槽への供給は、（一般に）連続で実施され、即ち、n 番目の熟成発酵槽に、トップ発酵槽からの排出物が供給され、その後、n + 1 番目の熟成発酵槽に順番が回る。

【0084】

熟成発酵槽に播種するのに使用される種菌の体積は、一般に、培養される細胞、生産される所望の分子、及び移動前の熟成発酵槽に必要な体積、及び所望の分子の生産の工程に依存する。例えば、原生生物、酵母及び細菌の場合、当該体積は、熟成発酵槽中の細胞懸

濁物の最終体積の10～70%、好ましくは20～60%、より好ましくは30～50%である。

【0085】

一般に、所望の播種物の体積が熟成発酵槽nにおいて達成されたら、次の(n+1)熟成発酵槽(又は「熟成容器」)に供給され、そして次の(n+2)熟成発酵槽に供給される。

【0086】

一つの態様において、熟成発酵槽中の培養は停止され、そして当該発酵槽は、所望の分子の生産が所望のレベルに達したとき、例えば、オーランチオキトリウム属の原生生物の場合、DHAのタイターが5～30g/L、及び/又はカロテノイド色素のタイターが乾燥バイオマス1gあたり0.1～10mgとなったときに排出される。

10

【0087】

排出は、所望の分子の抽出に関するバイオマスの処理を可能とする装置における標準的な方法で実施される。排出後、熟成発酵槽は、一般に、発酵槽のタンク内に備わっている装備の特定の部品で洗浄され、そしてそれは滅菌される。

【0088】

例えば(表2及び図1の表を参照)、72hの熟成発酵槽中での培養時間において、最初の日(D)に、熟成発酵槽1は充填され、他の熟成発酵槽は待機し; D+1日に、熟成発酵槽2は充填され(培養物N+2)、熟成発酵槽1は培養途中であり; D+2日に、熟成発酵槽3が充填され、熟成発酵槽1及び2は培養途中であり; D+3日に、熟成発酵槽1は洗浄され、熟成発酵槽4は充填され、熟成発酵槽2及び3は培養途中である。

20

【0089】

【表2】

	熟成発酵槽1	熟成発酵槽2	熟成発酵槽3	熟成発酵槽4
<u>D日</u>	培養物N	待機	待機	待機
<u>D+1日</u>	培養物N	培養物N+1	待機	待機
<u>D+2日</u>	培養物N	培養物N+1	培養物N+2	待機
<u>D+3日</u>	洗浄及び滅菌	培養物N+1	培養物N+2	培養物N+3
<u>D+4日</u>	培養物N+4	洗浄及び滅菌	培養物N+2	培養物N+3
<u>D+5日</u>	培養物N+4	培養物N+5	洗浄及び滅菌	培養物N+3

30

【0090】

トップ発酵槽により供給される熟成発酵槽の数は2つより多く、一般に、この数は、当該発酵槽及びそれらに関連する装備を保存するのに利用できるスペースによってのみ限定される。一般に、この熟成発酵槽の数は2～10、好ましくは2～6個である。

【0091】

本発明の一つの態様において、熟成培養の時間は、10～200時間、好ましくは20～100時間である。表に例示したサイクルは、時間に応じて変化する。例えば、細菌細胞において、熟成培養の時間は15～72時間の間で変化する。例えば植物細胞において、熟成培養の時間は、48～200時間の間で変化する。

40

【0092】

原生生物、細菌及び酵母の培養において、半連続モードでの培養工程は、一般に、各発酵槽において24～200h、好ましくは48～96h、より好ましくは72～96hで実施される。

【0093】

工程b)における培養培地の組成は、維持されるべき残留の増殖を可能としつつ、所望の分子の蓄積を促進することを可能とする。「残留の増殖」とは、工程1の増殖速度の1

50

～ 90%であるが、所望のバイオマス及び分子の生産性の改善を可能とする増殖を意味する。

【0094】

例えば原生生物による脂質の生産において、連続培養における増殖速度は $0.05 \sim 0.20 \text{ h}^{-1}$ 、好ましくは 0.10 h^{-1} である。

【0095】

前記増殖速度は、時間中の集団数の増大を特徴付ける。斯かる増殖速度 (μ) は、以下の式によって求められる。

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

N_1 は、時間 t_1 でのバイオマスの量、 N_2 は、時間 t_2 におけるバイオマスの量である。バイオマスの量は、光学密度、細胞密度又は乾燥重量で表現され得る。時間 t_1 及び t_2 は、時間 (hours) で表され得る。 μ の値は h^{-1} ($1/\text{hour}$) で表される。

10

【0096】

半連続培養の工程 b) における発酵に使用される培養培地は、培養する細胞の性質によって選択される。好ましくは、この培養培地は、好ましくは1つ以上の所望の分子を蓄積させるように培養された細胞の代謝を誘導することを可能とする。幾つかの細胞において、培養培地中の要素の制限は、分子の蓄積の促進を可能とする方法である。例えば窒素の制限の期間中に脂質の蓄積を増大し得る原生生物が想定され得る。窒素の制限とは、細胞の正常な増殖を確保するのに不十分な培地中の窒素の濃度を意味し、これは、炭素を脂質の形態で蓄積することを促進する代謝の変化をもたらす。斯かる代謝の変化は、C/N比 (炭素濃度と容易に吸収される窒素の濃度との比率) を増大させることによっても達成される。

20

【0097】

しかしながら、前記培養培地は、有機炭素含有基質を含有しており、混合栄養又は従属栄養増殖が可能である。典型的には、原生生物培養において、有機炭素は、 $10 \sim 90 \text{ g/l}$ ($55 \text{ mM} \sim 500 \text{ mM}$) の濃度で存在する。

【0098】

一般に、脂質又は色素の生産のための原生生物の熟成の工程 b) における培養は、約 $20 \sim 200 \text{ g/L}$ ($0.1 \sim 1.1 \text{ M}$) の有機炭素含有基質、約 $1 \sim 15 \text{ g/L}$ のアンモニウム及び $0.9 \sim 3.5 \text{ g/L}$ のリン酸塩を含有する生理食塩水培養培地 (海水塩 $10 \sim 30 \text{ g/L}$) 中で実施され得る。例えば、オーランチオキトリウム株による DHA の生産において、培養培地 (トップ発酵槽由来の細胞懸濁物の体積から、及び濃縮供給溶液の体積から再構築される) は、 $100 \sim 200 \text{ g/L}$ のグルコース、約 $5 \sim 10 \text{ g/L}$ のアンモニウム、及び $1 \sim 2 \text{ g/L}$ のリン酸塩を含有する。一つの態様において、前記培養培地は、主要栄養素、微量元素及びビタミンも含有する。

30

【0099】

一つの態様において、前記熟成工程で使用される栄養溶液は、炭素源 (例えばグルコース又はグリセロール)、窒素源 (例えば $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)、リン酸源 (例えば KH_2PO_4) を含有する。好ましくは、C (炭素)、N (窒素) 及び P (リン酸塩) の間の比率 (C/N/P) は $530:11:1$ であり、但し常に窒素が数倍多い又は少ない、及び/又はリン酸塩が2倍多い又は少ないことが想定され、例えば、下記の比率 $530:22:1$ 、 $530:5.5:1$ 、 $530:22:0.5$ 、 $530:11:2$ 、 $530:22:2$ 、 $530:5.5:0.5$ 、 $530:11:0.5$ 、 $530:5.5:2$ が使用され得る。

40

【0100】

一般に、カロテノイド色素の生産のための酵母の株の熟成の工程 b) における培養は、約 $10 \sim 100 \text{ g/L}$ の有機炭素含有基質、約 $0.15 \sim 15 \text{ g/L}$ のアンモニウム及び約 $0.9 \sim 9 \text{ g/L}$ のリン酸塩を含有する培地中で実施され得る。例えば、ロドトルラ・グルチニス (*Rhodotorula glutinis*) によるアスタキサンチ

50

ンの生産において、20 g/Lのグルコース、約3 g/Lのアンモニウム及び1 g/Lのリン酸を含有する培養培地が使用される。

【0101】

一般に、アミノ酸の生産のための細菌の株の熟成の工程b)における培養は、約20~80 g/Lの有機炭素含有基質、約10~20 g/Lの尿素及び約1~10 g/Lのリン酸塩を含有する培地中で実施され得る。例えば、ブレヴィバクテリウム・フラブム(Brevibacterium flavum)によるL-メチオニンの生産において、50 g/Lのグルコース、約10 g/Lのアンモニウム及び5 g/Lのリン酸を含有する培養培地が使用される。

【0102】

一つの態様において、工程b)は、工程a)よりも低温で実施される。発明者らは、この態様において、工程b)が工程a)と同一の温度で実施された場合と比較して、脂質、特にDHAの生産される量が增大することを見出した。実際に、本発明の方法において、増殖に最適の温度は、DHAの生産の最適温度よりも高い。一般に、工程b)は、工程a)が実施される温度よりも1~8 低い温度で実施される。例えば、培養の工程a)は25 で実施され、工程b)は、18、19、20、21、22、又は23 で実施され得る。例えば培養の工程a)は22 で実施され、工程b)は、18、19、20、21 で実施され得る。例えば培養の工程a)は27 で実施され、工程b)は、20、21、22、23、24、25 又は26 で実施され得る。

【0103】

低い温度も、色素の蓄積を促進する。

【0104】

本発明における培養方法は、混合栄養条件及び/又は従属栄養条件下で実施され、即ち工程a)及び工程b)は、独立して、従属栄養条件下又は独立栄養条件下で実施され得る。一つの態様において、工程a)は従属栄養条件下で、工程b)は混合栄養条件下で実施される。他の態様において、工程a)は混合栄養条件下で、工程b)は従属栄養条件下で実施される。他の態様において、工程a)及びb)は、従属栄養条件下で実施される。例えば、この態様は、従属栄養条件下で良く増殖する原生生物、細菌又は酵母に適している。他の態様において、工程a)及びb)は、混合栄養条件下で実施される。例えば、この最後の態様は、光からエネルギーを引き出せる、原生生物又は細菌、酵母及び他の光合成細胞に適している。例えば、シゾキトリウム又はオーランチオキトリウム属の原生生物、のストック属のシアノバクテリア、又はロドトルラ属の酵母が想定され得る。

【0105】

より具体的には、前記混合栄養条件は、時間中不連続及び/又は変化する照明条件であってもよい。特に、照明はフラッシュの形態である。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。これらのフラッシュの持続時間は、「低頻度」での光の供給に適している。この最後の態様において、照明条件(光の供給)は、「低頻度」である。

【0106】

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

10

20

30

40

50

好ましい。

【0107】

一つの態様において、フラッシュの持続時間は $1 / 150000 \sim 1 / 1000$ 秒である。これらのフラッシュの持続時間は「高頻度」の照明条件がふさわしい；即ちフラッシュの頻度がそれぞれ $150 \text{ kHz} \sim 1 \text{ kHz}$ である。

【0108】

照明条件（光の供給）が「高頻度」である場合のこの態様において、フラッシュは、1時間あたり $3.6 \times 10^5 \sim 5.4 \times 10^9$ 回発生する。この態様において、光の変化は、 $1 \text{ kHz} \sim 150 \text{ kHz}$ 、即ち1秒あたり $1,000 \sim 150,000$ フラッシュの頻度を有すると言われる。ほんはつめいのこの最後の態様における光の供給は、「高頻度と呼ばれる。」

10

【0109】

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 $5 \sim 1000$ マイクロモル/ m^2 秒だが、 $5 \sim 500$ マイクロモル/ m^2 秒または $50 \sim 400$ マイクロモル/ m^2 秒が好ましく、 $150 \sim 300$ 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）。

【0110】

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。

20

【0111】

「変化する照明」は、光の強度が通常1時間あたり2回以上変化することを意味する。本発明の方法に適した照明条件の例は、フランス特許出願 No. 1057380 に記載されている。

【0112】

好ましくは前記照明は様々な強度を有し、その振幅は一般に $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \sim 2,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、好ましくは $50 \sim 1,500$ 、より好ましくは $50 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ である。

30

【0113】

好ましい態様において、前記照明は強度が変化し、その振幅は、 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \sim 1,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、好ましくは $5 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、これらの変化は、1時間あたり $2 \sim 3600$ 回、好ましくは $2 \sim 200$ 回起こる。

【0114】

これらの変化は、一般に、1時間あたり $2 \sim 3600$ 回、好ましくは $50 \sim 500$ 回、より好ましくは $100 \sim 200$ 回起こり得る。これらの培養条件は、所定の光量の供給を可能とする。この照明は、不連続及び/又は変化する照明の相を含み得て、その強度の変化は、同一又は異なる振幅を有し得る。

40

【0115】

培養の変化する及び/又は不連続な照明は、特に混合栄養モードでの培養に使用される時、細胞、特に原生生物、原核微生物、酵母及び植物又は動物細胞の発達に、又は所望の分子の生産に対して望ましい影響をもたらす、その生産性を増大させることを可能とする。理論に拘束されず、発明者らは、細胞への不連続及び/又は変化する光の供給は、増殖に望ましい「ストレス」を引き起こし、脂質の合成を促進する効果を有すると考える。この現象は、天然の細胞が、生息環境の制約に耐えるために脂質の蓄えを蓄積する傾向にあるという事実によって部分的に説明され得る。

50

【0116】

本発明の1つの態様において、混合栄養条件の場合に、工程a)の培養は、フラッシュの存在下で実施される。当該フラッシュの強度は $50 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で、持続時間はおよそ1秒の10分の1～5分間、好ましくはおよそ1秒～1分間、そしてフラッシュの回数は、1時間あたり2～3600回、好ましくは2～360回である。

【0117】

本発明の一つの態様において、工程b)の培養は、フラッシュの存在下で実施される。当該フラッシュの強度は $200 \sim 2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で、持続時間はおよそ1秒の10分の1～10分間、好ましくはおよそ1秒の10分の1～5分間、そしてフラッシュの回数は、1時間あたり2～3600回、好ましくは20～1000回である。

10

【0118】

本発明の一つの態様において、照明条件に拘らず、培養物に供給される光の強度は、細胞密度に応じて変化する。培養物が高密度になる程、光の強度は高くなり得る。細胞密度は1mlあたりの細胞数であり、当業者に公知の技術によって測定される。

【0119】

例えば、原生生物、細菌及び酵母において、培養の初期段階で、細胞密度が1mlあたり約 $10^7 \sim 5 \times 10^7$ 個で、フラッシュの持続時間が1秒～60分、回数が1時間あたり2～360回で変化するとき、光の強度は、 $50 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、好ましくは $50 \sim 150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であってもよい。前記培養の細胞密度が1mlあたり $10^8 \sim 10^9$ 個に達したとき、光の強度は $100 \sim 500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、例えば好ましくは $200 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ に増大させられ得る。最後の段階で培養物の細胞密度が1mlあたり $10^9 \sim 10^{10}$ 個に達したとき、光の強度は $200 \sim 800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、例えば好ましくは $200 \sim 500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ に増大させられ得る。

20

【0120】

本発明の工程b)における原生生物、細菌及び酵母の培養において、フラッシュの持続時間が1秒の10分の1～30分、回数が1時間あたり2～3600回で変化する場合、光の強度は $200 \sim 2000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、例えば好ましくは $300 \sim 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ に増大させられる。

30

【0121】

幾つかの態様において、例えば、フラッシュの持続時間が1分未満、又は1秒未満である場合、光の強度は上記の値よりも大きくなり得る。

【0122】

下記のように(表3A及び3B)、本発明の方法に関する原生生物は、グループ1(非光合成)及びグループ2(光合成)の2つのカテゴリーに分類される。一般に、グループ1の株は、光の要求が低く、又はグループ2と比較して、増殖するための、及び所望の分子を生産するための、光の利用が異なる。一方、個々の株は、異なる光の要求を有し得る。当業者は、その株の要求に応じて、培養時の株に従って、正しい光のパラメーターを如何にして調節するかを承知している。

40

【0123】

本発明の一つの態様において、Schizochytrium、Aurantiochytrium及びCryptothecodinium属(グループ1)に属する株の培養は、光の強度 $25 \sim 1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、好ましくは $75 \sim 800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、より好ましくは $150 \sim 600 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で実施され得る。この態様において、光の強度は1時間に2～200回変化する。強度変化の振幅は $5 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $70 \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、より好ましくは $100 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ である。

【0124】

本発明の一つの態様において、Schizochytrium、Aurantioch

50

ytrium及びCrypthecodinium属(グループ1)に属する株の培養は、フラッシュ照明下で実施される。

【0125】

例えば、グループ1の属の培養は強度 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、1時間あたり30回のフラッシュ照明下で実施される。

【0126】

本発明の他の態様において、Tetraselmis、Scenedesmus、Chlorella、Nitzschia及びHaematococcus属(グループ2)に属する株の培養は、光の強度 $10 \sim 800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、好ましくは $25 \sim 600 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、より好ましくは $75 \sim 250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で実施され得る。この態様において、光の強度は1時間に $2 \sim 3600$ 回変化する。強度変化の振幅は $5 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $70 \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、より好ましくは $100 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ である。本発明の一つの態様において、Tetraselmis、Scenedesmus、Chlorella、Nitzschia及びHaematococcus属(グループ2)に属する株の培養は、フラッシュ照明下で実施される。

10

【0127】

例えば、Tetraselmis及びScenedesmus属の培養は、強度 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、1時間あたり120回のフラッシュ照明下で実施される。

【0128】

例えば、一つの態様において、Chlorella属の株の培養は変化する照明下で実施され、当該光の強度は $50 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で、1時間あたり120回変化する。

20

【0129】

例えば、一つの態様において、Haematococcus属の株の培養は変化する照明下で実施され、当該光の強度は $100 \sim 150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で、1時間あたり60回変化する。

【0130】

例えば、一つの態様において、Nitzschia属の株の培養は変化する照明下で実施され、当該光の強度は $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で、1時間あたり30回変化する。

30

【0131】

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。

40

【0132】

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

50

たりの光の全照射量が 2250 マイクロモル / m^2 ~ 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 ~ 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 ~ 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 $13,500$ ~ $45,000$ 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 ~ 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 ~ 150 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 $45,000$ ~ $135,000$ マイクロモル / m^2 であることを意味する。

【0133】

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 ~ 5×10^5 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 ~ $30,000$ 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 ~ 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 ~ 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。

【0134】

培養物への光の供給は、発酵槽の外壁の周囲に配置された光源によってなされ得る。時計が、光源所定の照明時間においてこれらの光源の発光を引き起こす。好ましい態様において、工程 a) 及び / 又は工程 b) の照明は、発酵槽の内部の発光装置によって確保される。従って、照明の有効性は、外側に配置された光源からの窓を介して光が透過する設計と比較して、良好である。前記照明装置は、ブレードに、又は処理される体積中に浸漬したチューブ部分上に、またはタンクの下部又は上部に、組み込まれて装着された回転部分に配置され得る。本発明の好ましい態様において、前記照明装置は、発酵槽の内部のバッフルに位置する。そのような装置は、フランス特許出願 No. 1353641 に記載されている。前記発酵槽は、従って、バッフルにより担持される複数の光源を備え、当該バッフルは、回転混合部品の動作の下でバイオマス内の攪拌を妨げる機能を有する。これらの光源は、好ましくは、これらのバッフルの少なくとも一部の中に、バイオマスに適合し、タンク内の光を散乱させられる厚さを有する材料中に、部分的に又は完全に被包される。

【0135】

好ましい適切な材料は、食品基準 (American standards of the Food and Drug Administration (FDA) を含む) に対する良好な適合性、良好な熱伝導係数を併せ持つ、ポリスルホンである。ポリスルホンは、微生物の体積に対する熱の除去を可能とし、半透明の特性は、当該材料の厚さが 1 mm ~ 5 cm である場合、光の良好な透過を可能とする。更に、この材料は、洗剤又は酸による洗浄又は滅菌のための熱処理後にも、その特性を維持する。この望ましい特性の組み合わせは変化してもよく、他の材料、例えばポリウレタン、ポリプロピレン、アクリル材料又はポリカーボネート等が選択されてもよい。

【0136】

好ましくは、前記光源は、発光ダイオード (LED) であり、それらは、実走及び応用の両方において、調整が容易である。そのような光源の発光スペクトルは非常に多様で、白色 LED (日光を再現する) が有り、またスペクトル範囲が限定された (例えば赤色、青色又は緑色中心の) LED も有る。そのような光源は、電球やランプよりも熱の発生が

10

20

30

40

50

少なく、更にそれらの寸法は、パツフルのプレートの主要な機能に影響を与える厚みの増大をもたらさずにパツフルの表面に配置できる程十分に小さい。

【0137】

光源のスペクトルは、有利な場合、可視範囲であるが、必要に応じ、可視光範囲外、例えばUV（滅菌も含んで実施する場合等）、又は赤外線（処理する体積内に熱を発生させることを目的として実施する場合等）を含み得る。

【0138】

光源は、非常に多様な調整条件（モニタリング又は管理条件ともいう）を有し得る。

【0139】

本発明の方法は、培養によって得られるバイオマスの収量が増大するという利点を有する。この方法は、所望の分子の蓄積を増大させるという利点も有する。これらの所望の分子の例として、以下のものが挙げられる：アルコール、例えば一級アルコール、二級アルコール、アルコールのエステル及び脂肪アルコール、脂肪酸（FA）、例えば短鎖脂肪酸（SCFA）、長鎖脂肪酸（LCFA）、超長鎖脂肪酸（VLCFA）、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、又は多不飽和脂肪酸、極性若しくは無極性官能基を有する分岐脂肪酸、水酸化脂肪酸、脂肪酸のエステル及びイソ脂肪鎖脂肪酸、脂質、例えば糖脂質、グリセロ糖脂質、リン脂質又はグリセロリン脂質、長鎖脂質、スフィンゴ脂質、ステリド及びセリド、不飽和脂質、例えばテルペン、ステロイド（ステロール：フィトステロール、コレステロール、ビタミンD及び他のビタミン）及びプロスタグランジン、エステル、アルカン、アルケン、アルデヒド、ケトン、有機酸、抗酸化剤、多糖類、色素、アミノ酸、MAA、アミノ酸の偽ペプチドポリマー、例えばシアノフィシン酵素又はビタミン、抗生物質、薬理活性を有する化合物、毒素、外来又は組換えタンパク質、有機化合物、例えば酸、生物燃料として使用出来る分子、テルペン、例えばボトリオコッケン、又は燃料に転換できる中間産物。ヒドロキシブチレート（PHB）等の生物プラスチックの生産に使用される分子も想定される。

10

20

【0140】

特に、この方法は、多不飽和脂肪酸、特にエイコサペンタエン酸（EPA）及び/又はドコサヘキサエン酸（DHA）及び/又はアラキドン酸（ARA）及び/又はリノレン酸（ALA）及び/又はリノレン酸及び/又はオレイン酸及び/又はカロテノイド、特にルテイン、カンタキサンチン、アスタキサンチン、フコキサンチン、ゼアキサンチン、エキネノン、ベータカロテン及びフェニコキサンチンを含有する、培養細胞を富化するという利点を有する。

30

【0141】

本発明の方法、好ましくは混合栄養モードにおける工程a)及び/又はb)を有する態様に従って培養できる細胞の種類は、混合栄養培養で増殖できる、全ての原核又は真核、光感受性の単細胞生物に対応する。更に、混合栄養モードで増殖する能力は、産業的实施に適合する所望のバイオマス又は分子の生産性を達成することを可能とすることが望ましい。「光感受性」とは、混合栄養条件下で、天然又は人工照明に应答して、代謝活性を誘導することが出来る細胞を意味する。この代謝活性は、例えば、色素の合成又は光合成活性であってもよい。

40

【0142】

本発明の方法で培養できる細胞は、好ましくは、混合栄養モードでの工程a)及び/又はb)を含む態様に従い、動物、植物又は真菌から単離された光感受性の真核細胞、多細胞生物又は光感受性真核又は原核単細胞生物から選択され得る。

【0143】

本発明の方法に従って培養できる原核微生物は、例えば、限定されないが、シアノバクテリア、特に体外多糖類（*exo-polysaccharide*）を合成する *Nostoc* sp. 種、又は脂質、多糖類又は色素等の産業的に重要な分子を合成する海洋性細菌 [Stafsnes MH et al.; *J Microbiol.* 2010 Feb; 48(1): 16-23] が挙げられる。

50

【0144】

真核微生物としては、海洋性及び淡水生原生生物、酵母又はシアノバクテリアが挙げられる。これらの微生物は、光合成性又は非光合成性であり得る。非光合成性原生生物は、例えば、混合栄養条件下で培養して、ドコサヘキサエン酸(DHA)及びカロテノイド、例えばアスタキサンチン又はカンタキサンチンを同時に生産する、*Labyrinthomyces* 綱、特に *Schizochytrium* 又は *Aurantiochytrium* 属のものが挙げられる。原生生物 *Nitzschia brevirostris* は、混合栄養条件下で培養してエイコサペンタエン酸(EPA)及びカロテノイド色素を同時に生産する、真核光合成微生物である。酵母等の他の光合成真核微生物も、本発明の方法を使用して、好ましくは混合栄養モードでの工程 a) 及び / 又は b) を含む態様に従って培養され得る。

10

【0145】

光感受性真核細胞として、例えば、多細胞生物から単離され、混合栄養条件下で増殖できる、真核細胞も使用され得る。この種類の生物は、真菌、動物又は植物であってもよい。増殖及び生産相の間の光の供給は、光合成活性や、例えば光誘導性の色素の生合成経路の活性化等の光活性化代謝を維持することを可能とする。多細胞生物由来の真核細胞としては、カルスから得られた未分化植物細胞があり、これは、培養培地に植物ホルモンを添加することによって、未分化状態で維持できる。あるいは、インビトロで培養できるように不死化プロセスによって処理された動物細胞であってもよい。

20

【0146】

本発明の方法に利用できる所望の混合栄養性原生生物は、例えば *Schizochytrium*、*Thraustochytrium*、*Odontella*、*Phaeodactylum*、*Nanochloris*、*Crypthecodinium*、*Monodus*、*Nannochloropsis*、*Isochrysis*、*Euglena*、*Cyclotella*、*Nitzschia*、*Aurantiochytrium*、*Scenedesmus* 及び / 又は *Tetraselmis*、*Chlorella* 及び *Haematococcus* 属の種から選択される。

【0147】

好ましい側面において、所望の原生生物は、*Schizochytrium*、*Thraustochytrium*、*Odontella*、*Phaeodactylum*、*Nanochloris*、*Crypthecodinium*、*Monodus*、*Nannochloropsis*、*Isochrysis*、*Euglena*、*Cyclotella*、*Nitzschia*、*Aurantiochytrium*、*Scenedesmus* 属の種、特に *Schizochytrium*、*Thraustochytrium*、*Odontella*、*Phaeodactylum*、*Nanochloris*、*Crypthecodinium*、*Monodus*、*Nannochloropsis*、*Chlorella* 及び *Haematococcus* 属の種から選択される。

30

【0148】

カロテノイドに関しては、*Schizochytrium* (アスタキサンチン)、*Nitzschia* (フコキサンチン)、*Aurantiochytrium* (カンタキサンチン又はアスタキサンチン) 及び *Scenedesmus* (ルテイン) の原生生物が特に有利である。

40

【0149】

表3A及び3Bは、本発明によって同定された新規株を示しており、これらは、ブダペスト条約の規定に従い、2014年7月8日に、下記表に示したCCAPアクセッション番号で、CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Scottish Association for Marine Science, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll PA371QA, Scotland, United Kingdom) に寄託された。これらの株によって生産される分子も示してい

50

る。従って、本発明は、これらの株に関する。

【0150】

これらの属は2つのグループを構成し、グループ1は、Schizochytrium、Aurantiochytrium及びCrypthecodinium属に属する株によって構成される。Schizochytrium、Aurantiochytriumは単細胞の真菌で、Crypthecodiniumは、従属栄養性鞭毛虫である。これらの属の例は下記表3Aに示されており、グループ1と示されている。一つの態様において、本発明の方法は、Schizochytrium、Aurantiochytrium及びCrypthecodinium属の培養物に関する。

【0151】

第二のグループ2は、光合成性、即ち葉緑体を有する株で構成される。これらの原生生物Tetraselmis、Scenedesmus、Chlorella、Nitzschia及びHaematococcus属は、微細藻類として分類される。一つの態様において、本発明の方法は、Tetraselmis、Scenedesmus、Chlorella、Nitzschia及びHaematococcus属の培養物に関する。

【0152】

【表3A】

グループ1

株	CCAP寄託番号	所望の分子
Schizochytrium sp. FCC 36	CCAP 4087/3	DHA, アスタキサンチン
Schizochytrium sp. FCC1320	CCAP 4087/4	DHA, アスタキサンチン
Schizochytrium sp. FCC1491	CCAP 4087/5	DHA, アスタキサンチン
Aurantiochytrium mangrovei FCC 1311	CCAP 4062/3	DHA, カンタキサンチン, アスタキサンチン
Aurantiochytrium mangrovei FCC 31	CCAP 4062/2	DHA, カンタキサンチン, アスタキサンチン
Aurantiochytrium mangrovei FCC 1319	CCAP 4062/4	DHA, カンタキサンチン, アスタキサンチン
Aurantiochytrium mangrovei FCC 1479	CCAP 4062/6	DHA, カンタキサンチン, アスタキサンチン
Aurantiochytrium mangrovei FCC 1325	CCAP 4062/5	DHA, カンタキサンチン, アスタキサンチン
Crypthecodinium cohnii FCC 30	CCAP 1104/3	DHA, カロテノイド(β -カロテン)
Crypthecodinium cohnii FCC 1384	CCAP 1104/5	DHA, カロテノイド(β -カロテン)
Crypthecodinium cohnii FCC 1348	CCAP 1104/4	DHA, カロテノイド(β -カロテン)

表3A：本発明の方法で利用できる株の例を示す。これらの株は、非光合成性、即ち葉緑体を有しない原生生物である。一つの態様において、本発明の方法は、Schizochytrium、Aurantiochytrium及びCrypthecodinium属の培養物に関する。

【0153】

【表 3 B】

グループ2

株	CCAP寄託番号	所望の分子
Tetraselmis sp. FCC 1563	CCAP 66/85	EPA, ALA
Scenedesmus abundans FCC 23	CCAP 276/78	ALA, オレイン酸, ルテイン
Scenedesmus sp. FCC 1483	CCAP 276/79	ALA, オレイン酸, ルテイン
Scenedesmus obliquus FCC 4	CCAP 276/77	ALA, オレイン酸, ルテイン
Chlorella sorokiniana FCC 2	CCAP 211/129	ルテイン
Chlorella sp. FCC 1553	CCAP 211/130	ルテイン
Chlorella sp. FCC 1520	CCAP 211/131	ルテイン
Nitzschia sp. FCC 1687	CCAP 1052/22	EPA, フコキサンチン
Haematococcus sp. FCC 1643	CCAP 34/18	アスタキサンチン

表 3 B : 本発明の方法で利用できる株の例を示す。これらの株は、光合成性、即ち葉緑体を有する微細藻類である。これらの属は微細藻類である。一つの態様において、本発明の方法は、Tetraselmis、Scenedesmus、Chlorella、Nitzschia及びHaematococcus属の培養物に関する。

【0154】

本発明は、表 3 A 及び 3 B の新規株にも関する。これらの株は、混合栄養特性及び高収率の脂肪酸及び / 又はカロテノイド、特にルテイン、フコキサンチン、アスタキサンチン、カンタキサンチン及び - カロテン、及び有機成分に富む培地中で 10 μ E 超の照明下で培養可能なことをもって選択された。これらの培地は、当業者に周知である。

【0155】

本発明の培養方法は、本発明の混合栄養条件下で増殖し、脂肪酸及び / 又はカロテノイドを生産することが出来る、Schizochytrium、Aurantiochytrium、Cryptothecodinium、Tetraselmis、Scenedesmus、Chlorella、Nitzschia及び Haematococcus属の任意の種にも利用できる。

【0156】

前記微細藻類がChlorella属である場合、それらは、C. acuminata、C. angustoellipsoidea、C. anitrata、C. antarctica、C. aureoviridis、C. autotrophica、C. botryoidea、C. caldaria、C. candida、C. capsulata、C. chlorelloidea、C. cladoniae、C. coelastroides、C. colonialis、C. communis、C. conductrix、C. conglomerata、C. desiccata、C. ellipsoidea、C. elongata、C. emersonii、C. faginea、C. fusca、C. glucotropha、C. homosphaera、C. infusionum、C. kessleri、C. koettlitzii、C. lacustris、C. lewinii、C. lichina、C. lobophora、C. luteo-viridis、C. marina、C. miniata、C. minor、C. minutissima、C. mirabilis、C. mucosa、C. mutabilis、C. nocturna、C. nordstedtii、C. oblonga、C. oocystoides、C. ovalis、C. paramecii、C. parasitica、C. parva、C. peruviana、C. photophila、C. pituita、C. pringsheimii、C. protothecoides、C. pulchelloidea、C. pyrenoidosa、C. regularis、C. reisiglii、C. reniformis、C. rotunda、C. rubescens、C. rugosa、C. saccharophila、C. salina、C. simplex、C. singularis、C. sorokiniana、C. spaerckii、C. sphaerica、C. stigmatophora、C. subsphaerica、C. terricola、C. trebouxioidea、C. vanniellii、C. variabilis、C. viscosa、C. volutis、C. vulgaris、C. zopfingiensis種から選択される。有利な場合、本発明のChlorella属は、C. sorokiniana又はC. vulgaris種から選択される藻類であり得る。

【0157】

10

20

30

40

50

前記微細藻類がScenedesmus属である場合、それらは、*S. abundans*、*S. aciculatus*、*S. aculeolatus*、*S. aculeotatus*、*S. acuminatus*、*S. acutiformis*、*S. acutus*、*S. alda vei*、*S. alternans*、*S. ambuehlii*、*S. anhuiensis*、*S. anomalus*、*S. antennatus*、*S. antillarum*、*S. apicaudatus*、*S. apiculatus*、*S. arcuatus*、*S. aristatus*、*S. armatus*、*S. arthrodesmiformis*、*S. arvernensis*、*S. asymmetricus*、*S. bacillaris*、*S. baculiformis*、*S. bajacalifornicus*、*S. balatonicus*、*S. basiliensis*、*S. bernardii*、*S. bicaudatus*、*S. bicellularis*、*S. bidentatus*、*S. bijuga*、*S. bijugatus*、*S. bijugus*、*S. brasiliensis*、*S. breviaculeatus*、*S. brevispina*、*S. caribeanus*、*S. carinatus*、*S. caudato-aculeolatus*、*S. caudatus*、*S. chlorelloides*、*S. circumfusus*、*S. coalitus*、*S. costatogranulatus*、*S. crassidentatus*、*S. curvatus*、*S. decorus*、*S. denticulatus*、*S. deserticola*、*S. diagonalis*、*S. dileticus*、*S. dimorphus*、*S. disciformis*、*S. dispar*、*S. distentus*、*S. ecornis*、*S. ellipsoideus*、*S. ellipticus*、*S. falkatus*、*S. fenestratus*、*S. flavescens*、*S. flexuosus*、*S. furcosus*、*S. fuscus*、*S. fusiformis*、*S. gracilis*、*S. graevenitzii*、*S. grahneisii*、*S. granulatus*、*S. gujaratensis*、*S. gutwinskii*、*S. hanleyi*、*S. helveticus*、*S. heteracanthus*、*S. hindakii*、*S. hirsutus*、*S. hortobagyi*、*S. houlensis*、*S. huangshanensis*、*S. hystrix*、*S. incrasatulus*、*S. indianensis*、*S. indicus*、*S. inermis*、*S. insignis*、*S. intermedius*、*S. javanensis*、*S. jovais*、*S. jugalis*、*S. kerguelensis*、*S. kissii*、*S. komarekii*、*S. lefevrei*、*S. linearis*、*S. littoralis*、*S. longispina*、*S. longus*、*S. luna*、*S. lunatus*、*S. magnus*、*S. maximus*、*S. microspina*、*S. minutus*、*S. mirus*、*S. morzinensis*、*S. multicauda*、*S. multiformis*、*S. multispina*、*S. multistriatus*、*S. naegelii*、*S. nanus*、*S. notatus*、*S. nygaardii*、*S. oahuensis*、*S. obliquus*、*S. obtusiusculus*、*S. obtusus*、*S. olvalternus*、*S. oocystiformis*、*S. opoliensis*、*S. ornatus*、*S. ovalternus*、*S. pannonicus*、*S. papillosum*、*S. parisiensis*、*S. parvus*、*S. peccensis*、*S. pectinatus*、*S. perforatus*、*S. planctonicus*、*S. plarydiscus*、*S. platydiscus*、*S. pleiomorphus*、*S. polessicus*、*S. polydenticulatus*、*S. polyglobulus*、*S. polyspinosus*、*S. praetervisus*、*S. prismaticus*、*S. producto-capitatus*、*S. protuberans*、*S. pseudoarmatus*、*S. pseudobernardii*、*S. pseudodenticulatus*、*S. pseudogranulatus*、*S. pseudohystrix*、*S. pyrus*、*S. quadrialatus*、*S. quadricauda*、*S. quadricaudata*、*S. quadricaudus*、*S. quadrispina*、*S. raciborskii*、*S. ralfsii*、*S. reginae*、*S. regularis*、*S. reniformis*、*S. rostrato-spinosus*、*S. rotundus*、*S. rubescens*、*S. scenedesmoides*、*S. schnepfii*、*S. schroeteri*、*S. securiformis*、*S. semicristatus*、*S. semipulcher*、*S. sempervirens*、*S. senilis*、*S. serrato-perforatus*、*S. serratus*、*S. serrulatus*、*S. setiferus*、*S. sihensis*、*S. smithii*、*S. soli*、*S. sooi*、*S. spicatus*、*S. spinoso-aculeolatus*、*S. spinosus*、*S. spinulatus*、*S. striatus*、*S. subspicatus*、*S. tenuispina*、*S. terrestris*、*S. tetradesmiformis*、*S. transilvanicus*、*S. tricostatus*、*S. tropicus*、*S. tschudyi*、*S. vacuolatus*、*S. variabilis*、*S. velitaris*、*S. verrucosus*、*S. vesiculosus*、*S. westii*、*S. weberi*、*S. wisconsinensis*、*S. wuhanensis*、*S. wuhuensis*種から選択される。有利な場合、本発明のScenedesmus属は、*S. obliquus*又は*S. abundans*種から選択される藻類であり得る。

【 0 1 5 8 】

前記微細藻類がNitzschia属である場合、それらは、*Nitzschia*、*N. abbreviata*、*N. abonuensis*、*N. abridia*、*N. accedens*、*N. accommodata*、*N. aciculariformis*、*N. acicularioides*、*N. acicularis*(全ての変種を含む)、*N. acidoclinata*、*N. actinastroides*、*N. actydropbila*、*N. acula*、*N. acuminata*(全ての変種を含む)、*N. acuta*、*N. adamata*、*N. adamatoides*、*N. adapta*、*N. adducta*、*N. adductoides*、*N. admissa*、*N. admissoides*、*N. aequalis*、*N. aequatorialis*、*N. aequora*、*N. aequorea*、*N. aerophila*、*N. aerophiloides*、*N. aestuari*、*N. affinis*、*N. africana*、*N. agnewii*、*N. agnita*、*N. alba*、*N. albicostalis*、*N. alexandrina*、*N. alicae*、*N. allanssonii*、*N. alpina*、*N. alpinobacillum*、*N. amabilis*、*N. ambigua*、*N. americana*、*N. amisaensis*、*N. amphibia*、

N. amphibia(全ての変種を含む)、*N. amphibioides*、*N. amphicephala*、*N. amphilepta*、*N. amphioxoides*、*N. amphioxys*(全ての変種を含む)、*N. amphiplectans*、*N. amphiprora*、*N. amplexans*、*N. amundonii*、*N. anassae*、*N. andicola*、*N. angularis*(全ての変種を含む)、*N. angulata*、*N. angustata*(全ての変種を含む)、*N. angustatula*、*N. angustiforaminata*、*N. aniae*、*N. antarctica*、*N. antillarum*、*N. apiceconica*、*N. apiculata*、*N. archibaldii*、*N. arcuata*、*N. arcula*、*N. arcus*、*N. ardua*、*N. aremonica*、*N. arenosa*、*N. areolata*、*N. armoricana*、*N. asperula*、*N. astridiae*、*N. atomus*、*N. attenuata*、*N. aurantiaca*、*N. aurariae*、*N. aurica*、*N. auricula*、*N. australis*、*N. austriaca*、*N. bacata*(全ての変種を含む)、*N. bacillariaeformis*、*N. bacilliformis*、*N. bacillum*、*N. balatonis*、*N. balkanica*、*N. baltica*、*N. barbieri*(全ての変種を含む)、*N. barkleyi*、*N. barronii*、*N. barrowiana*、*N. bartholomei*、*N. bathurstensis*、*N. bavarica*、*N. behrei*、*N. bergii*、*N. beyeri*、*N. biacrula*、*N. bicapitata*(全ての変種を含む)、*N. bicuneata*、*N. bifurcata*、*N. bilobata*(全ての変種を含む)、*N. birostrata*、*N. bisculpta*、*N. bita*、*N. bizertensis*、*N. blankaartensis*、*N. bombiformis*、*N. borealis*、*N. bosumtwiensis*、*N. braarudii*、*N. brebissonii*(全ての変種を含む)、*N. bremensis*(全ての変種を含む)、*N. brevior*、*N. brevirostris*、*N. brevissima*(全ての変種を含む)、*N. brevistriata*、*N. brightwellii*、*N. brittonii*、*N. brunoi*、*N. bryophila*、*N. buceros*、*N. bukensis*、*N. bulnheimiana*、*N. buschbeckii*、*N. calcicola*、*N. caledonensis*、*N. calida*(全ての変種を含む)、*N. californica*、*N. campechiana*、*N. capensis*、*N. capitata*、*N. capitellata*(全ての変種を含む)、*N. capuluspalae*、*N. carnicobarica*、*N. carnico-barica*、*N. challengerii*、*N. chalonii*、*N. chandolensis*、*N. chardezii*、*N. chasei*、*N. chauhanii*、*N. chungara*、*N. chutteri*、*N. circumscutata*、*N. clarissima*、*N. clausii*、*N. clementei*、*N. clementia*、*N. clevei*、*N. closterium*(全ての変種を含む)、*N. coarctata*、*N. cocconeiformis*、*N. communis*(全ての変種を含む)、*N. commutata*、*N. commutatoides*、*N. compacta*、*N. compressa*(全ての変種を含む)、*N. concordia*、*N. confinis*、*N. conformata*、*N. confusa*、*N. congolensis*、*N. constricta*(全ての変種を含む)、*N. consummata*、*N. corpulenta*、*N. costei*、*N. coutei*、*N. cretica*、*N. cucumis*、*N. cursoria*、*N. curta*、*N. curvata*、*N. curvilineata*、*N. curvipunctata*、*N. curvirostris*(全ての変種を含む)、*N. curvula*(全ての変種を含む)、*N. cuspidata*、*N. cylindriiformis*、*N. cylindrus*、*N. dakariensis*、*N. davidsonii*、*N. dealpina*、*N. debilis*、*N. decipiens*、*N. delauneyi*、*N. delicatissima*、*N. delicatula*、*N. delognei*、*N. denticula*(全ての変種を含む)、*N. denticuloides*、*N. desertorum*、*N. dianae*、*N. diaphana*、*N. diducta*、*N. didyma*、*N. dietrichii*、*N. dilatata*、*N. diluviana*、*N. dippelii*、*N. directa*、*N. diserta*、*N. disputata*、*N. dissipata*(全ての変種を含む)、*N. dissipatoides*、*N. distans*(全ての変種を含む)、*N. distantoides*、*N. divaricata*、*N. divergens*、*N. diversa*、*N. diversecostata*、*N. doljensis*、*N. draveillensis*、*N. droebakensis*、*N. dubia*(全ての変種を含む)、*N. dubiformis*、*N. dubioides*、*N. ebroicensis*、*N. eglei*、*N. elegans*、*N. elegantula*、*N. elegans*、*N. elliptica*、*N. elongata*、*N. entomon*、*N. epiphytica*、*N. epiphyticoides*、*N. epithemiformis*、*N. epithemioides*、*N. epithemoides*(全ての変種を含む)、*N. epsilon*、*N. erlandssonii*、*N. erosa*、*N. etoshensis*、*N. examinanda*、*N. eximia*、*N. famelica*、*N. fasciculata*、*N. febigeri*、*N. ferox*、*N. ferrazae*、*N. fibula-fissa*、*N. filiformis*(全ての変種を含む)、*N. flexa*、*N. flexoides*、*N. fluminensis*、*N. fluorescens*、*N. fluvialis*、*N. fogedii*、*N. fonticola*(全ての変種を含む)、*N. fonticoloides*、*N. fonticula*、*N. fontifuga*、*N. forfica*、*N. formosa*、*N. fossalis*、*N. fossilis*、*N. fragilariiformis*、*N. franconica*、*N. fraudulenta*、*N. frauenfeldii*、*N. frequens*、*N. frickei*、*N. frigida*(全ての変種を含む)、*N. frustuloides*、*N. frustulum*(全ての変種を含む)、*N. fruticosa*、*N. fundi*、*N. fusiformis*、*N. gaarderi*、*N. gaertnerae*、*N. gandersheimiensis*、*N. garrensis*、*N. gazellae*、*N. geitleri*、*N. geitlerii*、*N. gelida*(全ての変種を含む)、*N. geniculata*、*N. gessneri*、*N. gieskesii*、*N. gigantea*、

N. gisela, *N. glabra*, *N. glacialis*(全ての変種を含む)、*N. glandiformis*, *N. goetzeana*(全ての変種を含む)、*N. gotlandica*, *N. graciliformis*, *N. gracilis*(全ての変種を含む)、*N. gracillima*, *N. graciloides*, *N. gradifera*, *N. graeffii*, *N. grana*, *N. grandis*, *N. granii*(全ての変種を含む)、*N. granulata*(全ての変種を含む)、*N. granulosa*, *N. groenlandica*, *N. grossestriata*, *N. grovei*, *N. gruendleri*, *N. grunowii*, *N. guadalupensis*, *N. guineensis*, *N. guttula*, *N. gyrosigma*, *N. habirshawii*, *N. habishawii*, *N. hadriatica*, *N. halteriformis*, *N. hamburgiensis*, *N. hantzschiana*(全ての変種を含む)、*N. harderi*, *N. harrissonii*, *N. hassiaca*, *N. heidenii*, *N. heimii*, *N. hemistriata*, *N. heteropolica*, *N. heuflerania*, *N. heufleriana*(全ての変種を含む)、*N. hiemalis*, *N. hiengheneana*, *N. hierosolymitana*, *N. hoehnkii*, *N. hola* 10
stica, *N. hollerupensis*, *N. holsatica*, *N. homburgiensis*, *N. hudsonii*, *N. hummii*, *N. hungarica*(全ての変種を含む)、*N. hustedti*, *N. hustedtiana*, *N. hyalina*, *N. hybrida*(全ての変種を含む)、*N. hybridaeformis*, *N. ignorata*(全ての変種を含む)、*N. iltisii*, *N. impressa*, *N. improvisa*, *N. incerta*, *N. incognita*, *N. inconspicua*, *N. incrustans*, *N. incurva*(全ての変種を含む)、*N. indica*, *N. indistincta*, *N. inducta*, *N. inflatula*, *N. ingenua*, *N. inimasta*, *N. innominata*, *N. insecta*, *N. insignis*(全ての変種を含む)、*N. intermedia*(全ての変種を含む)、*N. intermissa*, *N. interrupta*, *N. interruptestriata*, *N. invicta*(全ての変種を含む)、*N. invisita*, *N. invisitata*, *N. iranica*, *N. irregularis*, *N. irremissa*, *N. irrepta*, *N. irresoluta*, *N. irritans*, *N. italica*, *N. janischii*, *N. jelineckii*, *N. johnmartinii*, *N. juba*, *N. juc* 20
unda, *N. jugata*(全ての変種を含む)、*N. jugiformis*, *N. kahlii*, *N. kanakarum*, *N. kanayae*, *N. kavirondoensis*, *N. kerguelensis*, *N. kimberliensis*, *N. kittlii*, *N. kittonii*, *N. knysnensis*, *N. kolaczekii*, *N. kotschyi*, *N. kowiensis*, *N. krachiensis*, *N. krenicola*, *N. kuetzingiana*(全ての変種を含む)、*N. kuetzingii*, *N. kuetzingioides*, *N. kurzeana*, *N. kurzii*, *N. kuetzingiana*(全ての変種を含む)、*N. labella*, *N. labuensis*, *N. lacrima*, *N. lacunarum*, *N. lacunicola*, *N. lacus-karluki*, *N. lacustris*, *N. lacuum*, *N. laevis*, *N. laevissima*, *N. lagunae*, *N. lagunensis*, *N. lamprocarpa*(全ての変種を含む)、*N. lanceola*(全ての変種を含む)、*N. lanceolata*(全ての変種を含む)、*N. lancettula*, *N. lancettuloides*, *N. lange-bertalotii*, *N. latens*, *N. latestriata*, *N. latiuscula*, *N. lauenbergiana*, *N. lauenburgiana*, *N. lecointei*, *N. leehyi*, *N. legleri*, *N. lehyi*, *N. leistikowii*, *N. lesbia*, *N. lesinensis*, *N. lesotensis*, *N. leucosigma*, *N. levidensis*(全ての変種を含む)、*N. liebetruthii*(全ての 30
 変種を含む)、*N. ligowskii*, *N. limicola*, *N. limulus*, *N. linearis*(全ての変種を含む)、*N. lineata*, *N. lineola*, *N. linkei*, *N. lionella*, *N. littoralis*(全ての変種を含む)、*N. littorea*, *N. longa*, *N. longicollum*, *N. longirostris*, *N. longissima*(全ての変種を含む)、*N. lorenziana*(全ての変種を含む)、*N. lucisensibilis*, *N. lunaris*, *N. lunata*, *N. lurida*, *N. luzonensis*, *N. macaronesica*, *N. macedonica*, *N. macerata*, *N. machardyae*, *N. macilenta*(全ての変種を含む)、*N. magnacarina*, *N. mahihaensis*, *N. mahoodii*, *N. maillardii*, *N. major*, *N. majuscula*(全ての変種を含む)、*N. makarova*, *N. manca*, *N. mancoides*, *N. manguini*, *N. marginata*, *N. marginulata*(全ての 40
 変種を含む)、*N. marina*, *N. martiana*, *N. maxima*, *N. media*, *N. medioconstricta*, *N. mediocris*, *N. mediterranea*, *N. metzeltinii*, *N. microcephala*(全ての変種を含む)、*N. migrans*, *N. minuta*, *N. minutissima*, *N. minutula*, *N. miramarensis*, *N. miserabilis*, *N. mitchelliana*, *N. modesta*, *N. moissacensis*(全ての変種を含む)、*N. mollis*, *N. monachorum*, *N. monoensis*, *N. montanestris*, *N. morosa*, *N. multistriata*, *N. nana*, *N. natalensis*, *N. natans*, *N. nathorsti*, *N. navicularis*, *N. navis-varingica*, *N. navrongensis*, *N. neglecta*, *N. nelsonii*, *N. neocaledonica*, *N. neoconstricta*, *N. neofrigida*, *N. neogena*, *N. neotropica*, *N. nereidis*, *N. nicobarica*, *N. nienhuisii*, *N. normannii*, *N. notabilis*, *N. nova*, *N. novae-guineaensis*, *N. novae-guineensis*, *N. novaehollandiae*, *N. nova-zealandia*, *N. nyassensis*, *N. oberheimiana*, *N.* 50

obesa, *N. obliquecostata*, *N. obscura*, *N. obscurepunctata*, *N. obsidialis*, *N. obsoleta*, *N. obsoletiformis*, *N. obtusa*(全ての変種を含む)、*N. obtusangula*, *N. oceanica*, *N. ocellata*, *N. oliffi*, *N. omega*, *N. osmophila*, *N. ossiformis*, *N. ostenfeldii*, *N. ovalis*, *N. paaschei*, *N. pacifica*, *N. palacea*, *N. palea*(全ての変種を含む)、*N. paleacea*, *N. paleaeformis*, *N. paleoides*, *N. palustris*, *N. pamirensis*, *N. panduriformis*(全ての変種を含む)、*N. pantocsekii*, *N. paradoxa*(全ての変種を含む)、*N. parallela*, *N. pararostrata*, *N. partita*, *N. parvula*(全ての変種を含む)、*N. parvuloides*, *N. paxillifer*, *N. peisonis*, *N. pelagica*, *N. pellucida*, *N. pennata*, *N. peragallii*, *N. perindistincta*, *N. perminuta*, *N. perpusilla*(全ての変種を含む)、*N. perspicua*, *N. persuadens*, *N. pertica*, *N. perversa*, *N. petitiana*, *N. philippinarum*, *N. pilum*, *N. pinguescens*, *N. piscinarum*, *N. plana*(全ての変種を含む)、*N. planctonica*, *N. plicatula*, *N. plioveterana*, *N. polaris*, *N. polymorpha*, *N. ponciensis*, *N. praecurta*, *N. praefossilis*, *N. praereinholdii*, *N. princeps*, *N. procera*, *N. prolongata*(全ての変種を含む)、*N. prolongatoides*, *N. promare*, *N. propinqua*, *N. pseudepiphytica*, *N. pseudoamphioxoides*, *N. pseudoamphioxys*, *N. pseudoamphoxyis*, *N. pseudoatomus*, *N. pseudobacata*, *N. pseudocapitata*, *N. pseudocarinata*, *N. pseudocommunis*, *N. pseudocylindrica*, *N. pseudodelicatissima*, *N. pseudofonticola*, *N. pseudohungarica*, *N. pseudohybrida*, *N. pseudonana*, *N. pseudoseriata*, *N. pseudosigma*, *N. pseudosinuata*, *N. pseudostagnorum*, *N. pubens*, *N. pulcherrima*, *N. pumila*, *N. punctata*(全ての
 10
 20
 30
 40
 50
 変種を含む)、*N. pungens*(全ての変種を含む)、*N. pungiformis*, *N. pura*, *N. puriformis*, *N. pusilla*(全ての変種を含む)、*N. putrida*, *N. quadrangula*, *N. quickiana*, *N. rabenhorstii*, *N. radicula*(全ての変種を含む)、*N. rautenbachiae*, *N. recta*(全ての
 変種を含む)、*N. rectiformis*, *N. rectilonga*, *N. rectirobusta*, *N. rectissima*, *N. regula*, *N. reimeri*, *N. reimerii*, *N. reimersenii*, *N. retusa*, *N. reversa*, *N. rhombica*, *N. rhombiformis*, *N. rhopalodioides*, *N. richterae*, *N. rigida*(全ての変種を含む)、*N. ritscheri*, *N. robusta*, *N. rochensis*, *N. rolandii*, *N. romana*, *N. romanoides*, *N. romanowiana*, *N. rorida*, *N. rosenstockii*, *N. rostellata*, *N. rostrata*, *N. ruda*, *N. rugosa*, *N. rupestris*, *N. rusingae*, *N. ruttneri*, *N. salinarum*, *N. salinicola*, *N. salpaespinosae*, *N. salvadoriana*, *N. sansimoni*, *N. sarcophagum*, *N. scabra*, *N. scalaris*, *N. scaligera*, *N. scalpelliformis*, *N. schoenfeldii*, *N. schwabei*, *N. schweikertii*, *N. scutellum*, *N. sellingii*, *N. semicostata*, *N. semirobusta*, *N. separanda*, *N. seriata*(全ての変種を含む)、*N. serpenticola*, *N. serpentiraphe*, *N. serrata*, *N. sibula*(全ての変種を含む)、*N. sigma*(全ての変種を含む)、*N. sigmaformis*, *N. sigmatella*, *N. sigmoidea*(全ての変種を含む)、*N. silica*, *N. silicula*(全ての
 変種を含む)、*N. siliqua*, *N. similis*, *N. simplex*, *N. simpliciformis*, *N. sinensis*, *N. sinuata*(全ての変種を含む)、*N. smithii*, *N. sociabilis*, *N. socialis*(全ての
 変種を含む)、*N. solgensis*, *N. solida*, *N. solita*, *N. soratensis*, *N. sp.*, *N. spatulata*(全ての変種を含む)、*N. speciosa*, *N. spectabilis*(全ての変種を含む)、*N. sphaerophora*, *N. spiculoides*, *N. spiculum*, *N. spinarum*, *N. spinifera*, *N. stagnorum*, *N. steenbergensis*, *N. stellata*, *N. steynii*, *N. stimulus*, *N. stoliczkiana*, *N. stompssii*(全ての変種を含む)、*N. strelnikovae*, *N. stricta*, *N. strigillata*, *N. striolata*, *N. subaccommodata*, *N. subacicularis*, *N. subacuta*, *N. subamphioxiooides*, *N. subapiculata*, *N. subbacata*, *N. subcapitata*, *N. subcapitellata*, *N. subcohaerens*(
 全ての変種を含む)、*N. subcommunis*, *N. subconstricta*, *N. subcurvata*, *N. subdentacula*, *N. subfalkata*, *N. subfraudulenta*, *N. subfrequens*, *N. subfrustulum*, *N. subraciloides*, *N. subinflata*, *N. subinvicta*, *N. sublaevis*, *N. sublanceolata*, *N. sublica*, *N. sublinearis*, *N. sublongirostris*, *N. submarina*, *N. submediocris*, *N. subodiosa*, *N. subpacifica*, *N. subpunctata*, *N. subromana*, *N. subrostrata*, *N. subrostratoides*, *N. subrostroides*, *N. subsalsa*, *N. subtilioides*, *N. subtilis*(全ての変種

を含む)、*N. subtubicola*、*N. subvitrea*、*N. suchlandtii*、*N. sulcata*、*N. sundaensis*、*N. supralitorea*、*N. tabellaria*、*N. taenia*、*N. taeniiformis*、*N. tantata*、*N. tarda*、*N. taylorii*、*N. temperei*、*N. tenella*、*N. tenerifa*、*N. tenuiarcuata*、*N. tenuirostris*、*N. tenuis*(全ての変種を含む)、*N. tenuissima*、*N. tergestina*、*N. terrestris*、*N. terricola*、*N. thermalis*(全ての変種を含む)、*N. thermaloides*、*N. tibetana*、*N. tirstrupensis*、*N. tonoensis*、*N. towutensis*、*N. translucida*、*N. tropica*、*N. tryblionella*(全ての変種を含む)、*N. tsarenkoi*、*N. tubicola*、*N. tumida*、*N. turgidula*、*N. turgiduloides*、*N. umaoiensis*、*N. umbilicata*、*N. umbonata*、*N. vacillata*、*N. vacua*、*N. valdecostata*、*N. valdestriata*、*N. valens*、*N. valga*、*N. valida*(全ての変種を含む)、*N. vanheurckii*、*N. vanoyei*、*N. vasta*、*N. ventricosa*、*N. vermicularioides*、*N. vermicularis*(全ての変種を含む)、*N. vermicularoides*、*N. vexans*、*N. victoriae*、*N. vidovichii*、*N. vildaryana*、*N. villarealii*、*N. virgata*、*N. visurgis*、*N. vitrea*(全ての変種を含む)、*N. vivax*(全ての変種を含む)、*N. vixnegligenda*、*N. vonhauseniae*、*N. vulga*、*N. weaveri*、*N. weissflogii*、*N. westii*、*N. williamsii*、*N. wipplingeri*、*N. witkowskii*、*N. wodensis*、*N. woltereckii*、*N. woltereckoides*、*N. wuellerstorffii*、*N. wunsamiae*、*N. yunchengensis*、*N. zebuana*、*N. zululandica*である。

10

【0159】

有利な場合、本発明の*Nitzschia*属は、*N. sp.*種から選択される藻類であり得る。

【0160】

20

前記微細藻類が*Haematococcus*属である場合、それらは*H. allmanii*、*H. buetschlii*、*H. capensis*、*H. carocellus*、*H. droebakensis*、*H. grevillei*、*H. insignis*、*H. lacustris*、*H. murorum*、*H. pluvialis*、*H. salinus*、*H. sanguineis*、*H. thermalis*、*H. zimbabwiensis*から選択される種であってもよい。

【0161】

前記微細藻類が*Cryptocodium*属である場合、それらは*C. cohnii*、*C. setense*から選択される種であってもよい。

【0162】

前記微細藻類が*Aurantiochytrium*属である場合、それらは*A. limacinum*、*A. mangrovei*から選択される種であってもよい。

30

【0163】

前記微細藻類が*Schizochytrium*属である場合、それらは*S. aggregatum*、*S. limacinum*、*S. mangrovei*、*S. minutum*、*S. octosporum*から選択される種であってもよい。

【0164】

前記微細藻類が*Tetraselmis*属である場合、それらは*T. alacris*、*T. apiculata*、*T. arnoldii*、*T. ascus*、*T. astigmatica*、*T. bichlora*、*T. bilobata*、*T. bolosiana*、*T. chui*、*T. contracta*、*T. convolutae*、*T. cordiformis*、*T. desikacharyi*、*T. elliptica*、*T. fontiana*、*T. gracilis*、*T. hazenii*、*T. helgolandica*、*T. impellucida*、*T. incisa*、*T. inconspicua*、*T. indica*、*T. levis*、*T. maculata*、*T. marina*、*T. mediterranea*、*T. micropapillata*、*T. rubens*、*T. striata*、*T. subcordiformis*、*T. suecica*、*T. tetrabrachia*、*T. tetrathele*、*T. verrucosa*、*T. viridis*、*T. wettsteinii*から選択される種であってもよい。

40

【0165】

本発明の一つの態様において、糸状真菌の培養は、本発明で記載しているような、通気した発酵槽中で、機械的に攪拌しながら実施され得る。しかしながら、前記培養は、当業者に公知の適切な攪拌条件下、せん断の効果を限定して、糸状の細胞又は単離された細胞の混合栄養条件下での培養を可能とするように実施される。これらの生物の代謝に対する光の効果は公知であり、色素等の産業上重要な代謝物は、混合栄養条件下での培養の間に生産され得る [Folia Microbiol (Praha), 2013 Apr 2. Light regulation on growth, developm

50

ent, and secondary metabolism of marine-derived filamentous fungi. Cai M, Fang Z, Niu C, Zhou X, Zhang Y.]。

【0166】

本発明に従って培養され得る真菌の属は、例えば、ARAの生産においては *Mortierella alpina*、クエン酸の生産においては *Aspergillus niger* である。

【0167】

原生生物 *Aurantiochytrium* は、DHAの生産のために、本発明の方法に従って培養され得る。好ましくは、当該培養は、本発明の好ましい態様に従って実施され、ここで、工程 a) 及び b) は、混合栄養条件下で実施される。例えば、発明者らによって単離され、2013年6月21日に、CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Scottish Association for Marine Science, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll PA371QA, Scotland, United Kingdom) に、アクセッション番号 CCAP 4062/1 で寄託された、*Aurantiochytrium Mangrovei* FCC 1324 株の培養において、DHA 及びアスタキサンチン及び/又はカンタキサンチンに富むバイオマスの生産が可能となる。DHA は、当該原生生物が含有する全脂質の 40% 超、又は 50% 超、又は 60% 超を占め、カロテノイドはアスタキサンチン及び/又はカンタキサンチンに富み、これらは、乾燥物質の全重量に対して、0.1% 超、又は 0.15% 超、又は 0.25% 超を占める。当該株の生産性 (培養物 1 リットルあたり、1 時間あたりの所望の産物の量) のレベルは、0.015 mg/L/h、又は 0.020 mg/L/h 超、又は 0.025 mg/L/h 超を達成し得る (実施例 1 の表 4)。

【0168】

本発明の一つの態様における植物細胞の培養は、*Ranunculaceae* 科に属する植物 *Adonis annua* の細胞懸濁物等が想定され得る。混合栄養条件下で培養すると、*Adonis annua* は、アスタキサンチン及びアドニルピン (β-カロテンからのアスタキサンチンの生合成の中間体代謝物) を生産し、これは、人体において、抗酸化活性及び抗腫瘍活性を有する。

【0169】

本発明の方法において、酵母 *Rhodotorula glutinis* は、その増殖速度、その油脂の豊富さ及びカロテノイド色素、ベータカロテンの合成のため、産業上注目されている。*Rhodotorula glutinis* の培養は、増殖 [Yen H W, Zhang Z.; *Bioresource Technology*. 2011 Oct; 102(19): 9279-81] 及び色素の合成 [Bhosale P, Gadre RV.; *Lett Appl Microbiol*. 2002; 34(5): 349-53] にとって照明が有益であることが示されているため、本発明の方法において有利に想定され得る。不連結培養は、第一の相で細胞の増殖を指向し、第二の相で所望の油脂及び/又は色素の蓄積を指向する、物理化学及び/又は照明パラメータを適用することを可能とする。

【0170】

本発明の幾つかの長所を表 5 に示す。表 5 は、本発明の方法と、不連続、半連続及び連続的方法における、*Aurantiochytrium* によるバイオマスの生産、そして多不飽和脂肪酸に富む油脂の抽出の比較の結果を示す。本発明の (不連結) 方法は、設備の洗浄及び滅菌のための生産停止の相を限定することにより、連続及び半連続 (フェド-バッチ) の利点を組み合わせることが可能で、一方、熟成相によって得られるバイオマスの組成を最適にすることが出来る。

【0171】

10

20

30

40

50

有利な場合、本発明の態様における原生生物、酵母又は細菌の培養において、バイオマスの生産は、乾燥物質 1 L あたり 40 ~ 50 g、好ましくは 80 g 超である。例えば、*Aurantiochytrium* の生産性は、150 g/L である。

【0172】

また、前記原生生物のバイオマスは、10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上の割合で脂肪分を含有する。例えば、*Aurantiochytrium* の場合、バイオマスの脂肪分は30%以上である。

【0173】

例えば、*Schizochytrium* の株は、本発明の一つの態様に従い、混合栄養条件下、DHA 及びアスタキサンチンを生産する。バイオマスの収率は 80 ~ 200 g/L で、乾燥物質の 30 ~ 60% の脂質を含有し、その中で、ドコサヘキサエン酸 (DHA) は、40 ~ 60% を占める。アスタキサンチンの収率は一般に乾燥物質の 0.01 ~ 0.2% である。FCC 36 株は、これらの株の一例である。

【0174】

Aurantiochytrium 属の株は、本発明の一つの態様における混合栄養条件下、DHA 及びアスタキサンチン及び / 又はカンタキサンチンを生産する。バイオマスの収率は 80 ~ 200 g/L で、乾燥物質の約 50% が脂質である。一般にドコサヘキサエン酸 (DHA) は、脂肪酸の 15 ~ 50% を占め ; アスタキサンチン及び / 又はカンタキサンチンは、一般に乾燥物質の 0.01 ~ 0.2% である。FCC 1311、FCC 1319、FCC 1325 及び FCC 31 は、これらの株の例として示され得る。

【0175】

Crypthecodinium 属、特に *Crypthecodinium cohnii* 種の株は、本発明の一つの態様における混合栄養条件下、DHA 及びカロテノイド、特に β -カロテンを生産する。バイオマスの収率は 50 ~ 200 g/L で、乾燥物質の 10 ~ 30% が脂質である。一般にドコサヘキサエン酸 (DHA) は、脂肪酸の 15 ~ 50% を占め ; カロテノイド、特に β -カロテンは、一般に乾燥物質の 0.01 ~ 0.2% である。FCC 1384、FCC 1348 及び FCC 30 は、これらの株の例として示され得る。

【0176】

Chlorella 属、特に *Chlorella* sp. 及び *Chlorella sorokiniana* の株は、本発明の一つの態様における混合栄養条件下、ルテインを生産する。バイオマスの収率は 60 ~ 150 g/L で、乾燥物質の 0.1 ~ 5% がルテインである。そうして生産されたバイオマスは、魚の養殖、特にスズキ及びタイの養殖を意図したワムシの給餌に特に適している。また、それは、免疫刺激及び解毒特性により、栄養補助食品としても使用される。*Chlorella* FCC 2、*Chlorella* sp. FCC 1553 及び FCC 1520 は、これらの株の例として示され得る。

【0177】

Scenedesmus 属、特に *Scenedesmus obliquus*、*Scenedesmus* sp. 及び *Scenedesmus abundans* 種の株は、本発明の一つの態様における混合栄養条件下、ALA、オレイン酸及びルテインを生産する。バイオマスの収率は 30 ~ 100 g/L で、乾燥物質の 10 ~ 60% が脂質である。一般にアルファオレイン酸又は ALA は、脂肪酸の 10 ~ 50% を占め、オレイン酸は全脂肪酸の 25 ~ 50% を占め、ルテインは、一般に乾燥物質の 0.1 ~ 5% である。*Scenedesmus obliquus* FCC 4、*Scenedesmus* sp. FCC 1483 及び *Scenedesmus abundans* FCC 23 は、これらの株の例として示され得る。

【0178】

Tetraselmis 属、特に *Tetraselmis* sp. の株は、本発明の一

10

20

30

40

50

つの態様における混合栄養条件下、EPA及びALAを生産する。一般に、バイオマスの収率は30～80 g/Lで、乾燥物質の10～30%が脂質である。一般にエイコサペンタエン酸(EPA)は、脂肪酸の10～25%を占め、 α -オレイン酸(ALA)は、一般に脂肪酸の5～20%を占める。こうして生産されたバイオマスは、水産業における使用に特に適している。Tetraselmis sp. FCC 1563は、これらの株の例として示され得る。

【0179】

Haematococcus属の株は、本発明の一つの態様における混合栄養条件下、アスタキサンチンを生産する。一般に、バイオマスの収率は5～30 g/Lで、乾燥物質の0.1～15%が脂質である。Haematococcus sp. FCC 1643株は、これらの株の例として示され得る。

10

【0180】

Nitzschia属の株は、本発明の一つの態様における混合栄養条件下、EPA及びフコキサンチンを生産する。一般に、バイオマスの収率は40～120 g/Lで、乾燥物質の10～50%が脂質である。脂肪酸の15～50%がエイコサペンタエン酸(EPA)で、乾燥物質の0.1～5%がフコキサンチンである。Nitzschia sp. FCC 1687株は、これらの株の例として示され得る。

【0181】

本発明において、混合栄養条件下、特に変化する及び/又は不連続の、特にフラッシュの形態の照明の存在下で培養される株は、所望の分子、特に脂質及び/又は色素を生産できる。一般に、従属栄養条件下で脂質及び色素を生産する、Schizochytrium、Aurantiochytrium、Crypthecodinium、Scenedesmus及びNitzschia属に属する株の前記培養は、色素を殆ど又は全く生産しない。加えて、これらの種における、本発明の幾つかの態様に係る混合栄養モードで取得されたバイオマスの量は、従属栄養条件下で取得された量と等しいか、これを上回る(例えば約10～18%上回る)。「従属栄養条件」は、培養培地は同一であるが暗黒下での培養条件をいう。

20

【0182】

従って、本発明は、原生生物の培養方法であって、混合栄養モードでの、特に変化する又は不連続、例えばフラッシュの形態での照明の存在下、特に多不飽和又は一不飽和脂肪酸及び/又はカロテノイド、特にルテイン、フコキサンチン、アスタキサンチン、カンタキサンチン及び α -カロテンを生産するための方法に関する。

30

【0183】

好ましい態様において、前記バイオマスは、油相中に、10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上の所望の脂肪酸成分を含有する。

【0184】

また、前記バイオマスは、油相中に、0.01%以上、好ましくは0.1%以上、より好ましくは0.5%以上の所望の色素成分を含有する。

【0185】

有利な場合、本発明の方法は、更に、生産されたバイオマスから所望の分子を回収する1つ以上の工程を含む。例えば、本発明の方法は、疎水性材料(脂質及び/又は色素を含有する)を回収する1つ以上の工程、及び任意で、脂肪酸、特にEPA及び/又はDHA及び/又はARA及び/又はALA及び/又はオレイン酸を抽出する1つ以上の工程、及び/又は色素、特にルテイン、フコキサンチン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カンタキサンチンエキネノン、ベータカロテン及びフェニコキサンチンをこの疎水性材料から抽出する1つ以上の工程を含む。

40

【0186】

所望の分子の回収は、公知の方法によって実施され得る。

【0187】

特に、所望の分子が脂肪酸である場合、本発明の方法は、任意で、更に、前記脂質から

50

この脂肪酸を抽出する1つ以上の工程を含む。EPA、ARA及びDHAを含有する脂質の選択的抽出方法は、当業者に周知であり、例えば[Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959); A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol., 37:911-917]に記載されている。

【図面の簡単な説明】

【0188】

【図1】本発明の一つの態様に係る方法である「不連結方法」の模式図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0189】

本発明は、下記実施例において非限定的に例示される。

【実施例】

【0190】

実施例1

オーランチオキトリウム属FCC 1324株によるDHA及びカンタキサンチンに富む油の生産を下記に示す。

【0191】

工程a) :

オーランチオキトリウムの培養は、専用の自動コントローラーを用いてコンピューター管理の下、1~2L容量の発酵槽(バイリアクター)中で実施された。当該系のpHは、塩基(2N水酸化ナトリウム溶液)及び/又は酸(1N硫酸溶液)を添加して調整された。培養温度は、26℃に設定された。攪拌は、Rush-tonの設定(3刃インペラ下方排水)に従うシャフト上にマウントした3つの攪拌ローターを使用して実施された。溶存酸素圧は、攪拌速度(250~600rpm)、通気速度(0.25~1vvm)、又は酸素流速(0.1~0.5vvm)によって、培養の間中培地内で制御された。自動化管理システムに組み込まれたコントロールパラメーターは、定常pO₂を15%で維持することを可能にした。前記バイリアクターは、透明なタンクを取り囲む外部照明システムを備える。光の強度及びサイクルは、コンピューター管理の下、専用の自動装置にコントロールされた。培養物に1時間あたり60回のフラッシュを照射し、各フラッシュの持続時間は20秒、強度は100 μmol · m⁻² · s⁻¹とした。

【0192】

前記リアクターに、温度管理された(26℃)チャンバー中、100~200 μEで照明を照射し、混合テーブル(140rpm)上で調製した前培養物を播種した。前培養及びバイリアクター中の培養は、改変Verduyn培地(海水塩15g/L, (NH₄)₂SO₄ 3g/L, KH₂PO₄ 1g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g/L, Na₂EDTA 24mg/L, ZnSO₄ · 7H₂O 3mg/L, MnCl₂ · 2H₂O 3mg/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.04mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 10mg/L, パントテン酸3.2mg/L、塩酸チアミン9.5mg/L、ビタミンB12 0.15mg/L)中で実施された。使用する炭素含有基質は、300mM~1Mの濃度のグルコースである。

【0193】

新鮮な培地の連続的供給は、0.08~0.15 h⁻¹の希釈レベルで、各成分の初期濃度の10~15倍の濃縮培地を用いて実施される。当業者は、どのようにして連続的培養を実施し、供給流速を計算するかを決定し、また定常状態に達した時間を決定することが出来る。

【0194】

一旦定常状態に達すると、この培養槽からの連続的排出が、工程b)の熟成発酵槽に供給される。

【0195】

10

20

30

40

50

工程 b) :

前記培養は、専用の自動コントローラーを用いてコンピューター管理の下、10～20 L 容量の発酵槽（バイオリクター）中で実施された。後者の制御システム及びパラメーター化は、あらゆる点で、工程 a) のものと類似している。

【0196】

前記リアクターに、工程 a) から排出された培養体積の約50%が播種され；同時に、タンクに、2倍に濃縮された培地が同一の流速で供給されることにより、以下の最終的な組成が得られる：海水塩 15 g/L；グルコース 60～120 g/L； $(NH_4)_2SO_4$ 0.8 g/L； KH_2PO_4 1 g/L； $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/L, Na_2EDTA 24 mg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 mg/L, $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 3 mg/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.04 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/L、パントテン酸塩 3.2 mg/L、塩酸チアミン 9.5 mg/L、ビタミンB12 0.15 mg/L。

10

【0197】

前記培養において、1時間あたり60回のフラッシュが照射され、各フラッシュの持続時間は20秒、強度は $500 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ である。

【0198】

培養のモニタリング

全バイオマスの濃度は、乾燥重量の測定によりモニタリングされた（Whatman GF/Fフィルターでの濾過、24時間以上、105 °Cでのオープン乾燥後の計量）。

20

【0199】

全脂質の定量に関し、 10^8 cells/mLが抽出された。脂質抽出方法は、当業者に周知である。

【0200】

カロテノイド、特にカンタキサンチンの定量のため、 10^8 cells/mLが抽出された。カンタキサンチンを含むカロテノイドの解析及び抽出方法は、当業者に周知である。

【0201】

表4：結果（n = 3）

【表4】

30

乾燥重量(g/L)	全脂質(DMの%)	DHA%	カンタキサンチン(DM1gあたりのmg)
155 +/- 3.3	55 +/- 2.8	18.0 +/- 3.0	2.1 +/- 0.3

【0202】

表4は、本発明の（不連続）方法と、半連続及び連続的方法とを用いた場合における、オランチオキトリウムによるDHAに富む油脂の生産の比較データを表す。不連続、半連続及び連続的方法で引用される数値は、1年間以上の予測による、不連続、半連続及び連続培養における、発明者らのこの株及び他の類似の株を用いた従来の実験に基づく。

40

【0203】

【表 5】

ユニタリー演算	パッチ	フェドープッチ	連続	不連結
生産されたバイオマス (不連結モードで生産された バイオマスとの相対的 パーセンテージ)	5.8%	29%	84.3%	100%
濃縮過程での排水	1,280 m ³ /年	-	9,690 m ³ /年	-
	3.9 m ³ /日		29.4 m ³ /日	
脱水過程での排水(水)	280トン/年	1,400トン/年	3,990トン/年	4,810トン/年
	0.85トン/日	4.2トン/日	13.3トン/日	14.6トン/日
排水Kg/生産された バイオマスKgの比率	39 L	7 L	24 L	7 L
脱水を除く				

10

【0204】

実施例 2

高細胞密度、低脂質（5～10%）でバイオマスを連続的に生産し、その後、このバイオマスの熟成によって、脂肪酸を蓄積させる。

20

【0205】

工程 a) : バイオマスの生産のための連続的培養

オーランチオキトリウムの培養は、専用の自動コントローラーを用いてコンピューター管理の下、1～2 L 容量の発酵槽（バイオリアクター）中で実施された。当該系の pH は、塩基（2 N 水酸化ナトリウム溶液）及び/又は酸（1 N 硫酸溶液）を添加して調整された。培養温度は、26 に設定された。攪拌は、3つの攪拌ローター：スパージャーの上方の攪拌シャフトの下端に配置された6枚の真っ直ぐな刃を有する1つの Rushton タービン、及び攪拌シャフト上に配置された3枚の刃の2つのプロペラを用いて実施された（攪拌ローター間の距離 = プロペラの直径 × 1.5）。

30

【0206】

溶存酸素圧は、攪拌速度（250～600 rpm）、通気速度（0.25～1 vvm）、又は酸素流速（0.1～0.5 vvm）によって、培養の間中培地内で制御された。自動化管理システムに組み込まれたコントロールパラメーターは、定常 pO₂ を 15% で維持することを可能にした。

光の強度及びサイクルは、コンピューター管理の下、専用の自動装置にコントロールされた。培養物に1時間あたり60回のフラッシュを照射し、各フラッシュの持続時間は20秒、強度は 100 μmol · m⁻² · s⁻¹ とした。

【0207】

発酵層は、パッフルに固定された内部照明システムを備える。

40

【0208】

光の強度及びサイクルは、コンピューター管理の下、専用の自動装置にコントロールされた。培養物に1時間あたり60回のフラッシュを照射し、各フラッシュの持続時間は20秒、強度は 100 μmol · m⁻² · s⁻¹ とした。

【0209】

前培養は、温度管理された（26）チャンバー中、100～200 μE で照明を照射し、混合テーブル（140 rpm）上で実施された。前記リアクターに、当該前培養物を 1% 播種し、不連続モードで培養した。

【0210】

最初の培地中に含有されていた基質が消費され、所望の細胞密度が達成されたら、一方

50

からの培養培地の排出、及び他方からの供給溶液の供給が開始される。定常状態は、少なくとも5滞留時間後に達成される。当該定常状態が安定化すると、操作パラメーター（ベンチレーション流速、パワー消費、供給流速、pH、マッシュの体積）、当該マッシュ中の基質の残留濃度、並びに高分子濃度及び生産されたバイオマスの組成が、一定になる。

【0211】

FCC1324株において、選択される供給溶液の組成及び選択される希釈レベルは、各日の培養槽の体積の2.4倍に相当する体積のマッシュを生産することを可能とする。

【0212】

前記体制は、50時間の培養の終盤で安定と見なされる。当該体制が安定化したら、マッシュ中の残留グルコース濃度は約0g/Lに安定化し、細胞密度は約 3×10^9 cells/mLに安定化し、これは、バイオマス約65g/Lに相当し、バイオマス中の脂質の量は、約5%（脂質g/乾燥物質g）に安定化する。連続モードにおける発酵は、合計で890時間継続され、その中で815時間は、安定化条件下でされた。

10

【0213】

この例において、供給溶液による希釈のレベルは、使用された培地及び使用された培養条件下での、その株の最大増殖速度の半分で設定された。

【0214】

前記培地の排出流速は、供給溶液の流速、及びpHを調整する液体の体積を考慮して調整される。

【0215】

バッチモードでの培養を開始するための培養培地の組成は、図1に詳述されている。

20

【0216】

連続培養の供給溶液は、15g/Lの市販の海水塩（例えばINSTANT OCEAN salts）、110g/Lのグルコースを含有し、そして、前培養及び不連続培養で使用される培地が含有する量の約3倍に相当する濃度の、微量元素、主要栄養素及びビタミンを含有する。供給溶液に含有される他の成分については、表1に詳述されている。

【0217】

全バイオマスの濃度は、乾燥重量の測定によりモニタリングされた（Whatman GF/Fフィルターでの濾過、24時間以上、105°Cでのオープン乾燥後の計量）。

30

【0218】

全脂質の定量に関し、 10^8 cells/mLが抽出された。脂質抽出方法は、当業者に周知である。

【0219】

カロテノイド、特にカンタキサンチンの定量のため、 10^8 cells/mLが抽出された。カンタキサンチンを含むカロテノイドの解析及び抽出方法は、当業者に周知である。

【0220】

表6．連続培養で取得された定常状態の特性

40

【表6】

残留グルコース	0.1 ± 0.02	g/L
細胞密度	3.109±/− 0.5.109	cells/mL
乾燥重量	65 ±/− 5	g/L
脂肪酸含量	7% ±/− 3%	%

【0221】

工程b) 熟成

50

連続培養で生産されたマッシュは、高い細胞密度のバイオマスで、脂質含量は非常に低い（5～10%）。このバイオマスを培養条件下の熟成タンク中に写し、そこでバイオマスは、非常に迅速に脂肪酸を蓄積する（24時間以内に65g/L）。これは、生産すべき脂肪酸に富んだバイオマスの高度な蓄積を可能とする。

【0222】

この例において、幾つかの熟成試験が、ケモスタットモードで操作された発酵槽に由来するマッシュから出発して実施された。培養は、専用の自動コントローラーを用いてコンピューター管理の下、3～5L容量の発酵槽（バイオリアクター）中で実施された。後者の制御システム及び設定は、あらゆる点で工程a)におけるものと類似する。

【0223】

この例において記載された熟成試験において、連続培養から取り出した体積は、1回で取り出された。産業的な発酵において、この移動は、培養培地の排出によって漸進的に実施される。

【0224】

熟成タンク中で、C/N/P比が530:11:1の栄養溶液が、取り出された体積に漸進的に添加される。

【0225】

当該栄養溶液は、炭素源（ここではグルコース）が枯渇した各時間で熟成タンクに添加される。

【0226】

熟成タンク中で実施された、供給される不連続培養物のモニタリングは、あらゆる点で、工程a)のものと同じのプロトコールに従い実施された。その結果を表7に示す。

【0227】

表7: 25 及び pH 6.5 で 24 時間及び 48 時間生産した乾燥物質、脂肪酸及び DHA (5 回反復)

【表7】

	24時間培養	48時間培養
乾燥重量	160 g/L (+/- 2g/l)	185 g/l (+/-5g/l)
脂肪酸	67 g/L (+/-2g/l)	85 g/l (+/-5g/l)
DHA	16.5 g/L (+/-0.5g/l)	21 g/L (+/-2g/l)
アスタキサンチン	0.05 mg/g DM (+/-0.01)	0.07 mg/g DM (+/-0.01)

【0228】

実施例3

Chlorella属 FCC 1520 株によるルテインの生産に特に使用され得るバイオマスの生産を、以下に示す。

【0229】

工程a)

Chlorellaの培養は、専用の自動コントローラーを用いてコンピューター管理の下、1～2L容量の発酵槽（バイオリアクター）中で実施された。当該系のpHは、塩基（2N水酸化ナトリウム溶液）及び/又は酸（1N硫酸溶液）を添加して調整された。培養温度は、26 に設定された。攪拌は、Rush-tonの設定（3刃インペラ下方排水）に従うシャフト上にマウントした3つの攪拌ローターを使用して実施された。溶存酸素圧は、攪拌速度（250～600rpm）、通気速度（0.25～1vvm）、又は酸素流速（0.1～0.5vvm）によって、培養の間中培地内で制御された。自動化管理システムに組み込まれたコントロールパラメーターは、定常pO₂を15%で維持することを可能にした。前記バイオリアクターは、パッフルに固定された内部照明システムを備

10

20

30

40

50

える。光の強度及びサイクルは、コンピューター管理の下、専用の自動装置にコントロールされた。培養物に1時間あたり30回のフラッシュを照射し、各フラッシュの持続時間は60秒、強度は50~100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とした。

【0230】

前記リアクターに、温度管理された(26)チャンバー中、100~200 μE で照明を照射し、混合テーブル(140rpm)上で調製した前培養物を播種した。前培養及びバイオリアクター中の培養は、以下の培地中で実施された。グルコース20 g/L; KNO_3 2 g/L; NaH_2PO_4 0.54 g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.179 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2465 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0147 g/L; 酵母抽出物0.25 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01035 g/L; H_3BO_3 0.000061 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.000169 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.000287 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0000025 g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_24 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0000125 g/L; 塩酸チアミン(ビタミンB1) 0.2 mg/L; ビオチン(ビタミンH) 0.001 mg/L; シアノコバラミン(ビタミンB12) 0.001 mg/L。

10

【0231】

新鮮な培地の連続的供給は、0.08~0.15 h^{-1} の希釈レベルで、以下の培地を用いて実施される。グルコース224.55 g/L; KNO_3 22.45 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.165 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.77 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.17 g/L; H_3BO_3 0.0015 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0042 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0072 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0000625 g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_24 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0003125 g/L; 塩酸チアミン(ビタミンB1) 2.24 mg/L; ビオチン(ビタミンH) 0.0112 mg/L; シアノコバラミン(ビタミンB12) 0.0112 mg/L。当業者は、どのようにして連続的培養を実施し、供給流速を計算するかを決定し、また定常状態に達した時間を決定することが出来る。

20

【0232】

一旦定常状態に達すると、この培養槽からの連続的排出が、工程b)の熟成発酵槽に供給される。

30

【0233】

工程b):

前記培養は、専用の自動コントローラーを用いてコンピューター管理の下、10~20L容量の発酵槽(バイオリアクター)中で実施された。後者の制御システム及び設定は、あらゆる点で、工程a)のものと類似している。

【0234】

前記リアクターに、工程a)から排出された培養体積の約50%が播種され;同時に、タンクに、2倍に濃縮された培地が同一の流速で供給されることにより、以下の最終的な組成が得られる:グルコース500 g/L; KNO_3 50 g/L; NaH_2PO_4 13.5 g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.47 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.1625 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3675 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.086 g/L; H_3BO_3 0.061 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.169 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.287 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 g/L; $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_24 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0125 g/L; 塩酸チアミン(ビタミンB1) 5 mg/L; ビオチン(ビタミンH) 0.025 mg/L; シアノコバラミン(ビタミンB12) 0.025 mg/L。

40

【0235】

前記培養において、1時間あたり3回のフラッシュが照射され、各フラッシュの持続時間

50

は 20 秒、強度は $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ である。

【0236】

培養のモニタリング

全バイオマスの濃度は、乾燥重量の測定によりモニタリングされた (Whatman GF/F フィルターでの濾過、24 時間以上、 10^5 でのオープン乾燥後の計量)。

【0237】

カロテノイド、特にルテインの定量のために、 10^8 cells/mL が抽出された。ルテインを含むカロテノイドの抽出及び解析の方法は、当業者に周知である。

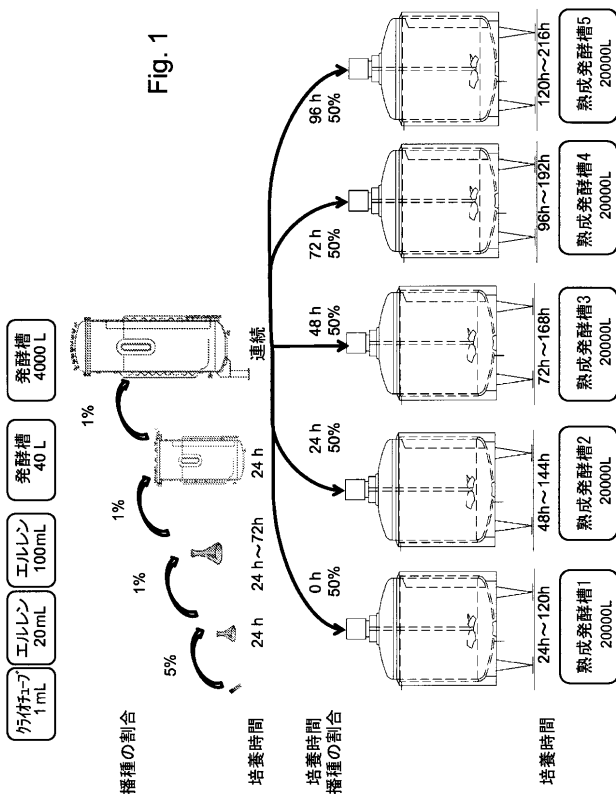
【0238】

表 8 : 結果 (n = 3)

【表 8】

乾燥重量 (g/L)	カンタキサンチン (DM1gあたりのmg)
130 +/- 5	5.1 +/- 0.1

【図 1】



【手続補正書】

【提出日】平成28年3月15日(2016.3.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

バイオマスの生産方法であって、以下の工程：

- a) 発酵槽中、連続モードで、混合栄養又は従属栄養条件下、細胞を培養する工程；及び
b) 混合栄養条件下、半連続モードで操作されるn個の発酵槽に、工程a)で得られた細胞及びそれらの培養物を連続及び逐次的に供給する工程、ここでnは2以上の整数である；

を含み、当該栄養条件下での細胞の培養が、時間中に不連続及び/又は変化する照明条件下で実施される、方法。

【請求項2】

前記照明の強度が変化し、その振幅が $5 \sim 1,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、好ましくは $5 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、これらの変化が、1時間あたり2～3600回、好ましくは2～200回起こる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記照明がフラッシュの形態である、請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

工程a)における培養が、強度 $50 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、並びに持続時間が約1秒の10分の1～5分、好ましくは1秒～1分、及び1時間あたり2～3600回、好ましくは2～360回の、フラッシュの存在下で実施される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

工程b)における培養が、強度 $50 \sim 2,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、並びに持続時間が約1秒の10分の1～5分、好ましくは1秒～1分、及び1時間あたり2～3600回、好ましくは2～360回の、フラッシュの存在下で実施される、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記工程a)及び/又はb)における培養が、濃度 $5 \text{ mM} \sim 1.1 \text{ M}$ 、好ましくは $50 \text{ mM} \sim 800 \text{ mM}$ の濃度の有機炭素含有基質の存在下で実施される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記細胞が、混合栄養条件下で、天然又は人工照明に応答して代謝活性を誘導することが可能な、原核若しくは真核単細胞生物、多細胞動物、植物又は真菌生物から単離された真核細胞である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記真核又は原核単細胞生物が、海洋性又は淡水性、光合成性又は非光合成性の、原生生物、酵母又はシアノバクテリアから選択される、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記真核単細胞生物が、以下の属：シゾキトリウム (*Schizochytrium*)、ツラウストキトリウム (*Thraustochytrium*)、オドンテラ (*Odontella*)、ファエオダクチルム (*Phaeodactylum*)、ナノクロリス (*Nanochloris*)、クリプテコジニウム (*Crypthecodinium*)、モノドゥス (*Monodus*)、ナンノクロロプシス (*Nannochloropsis*)

、イソクライシス (*Isochrysis*)、ユーグレナ (*Euglena*)、シクロテラ (*Cyclotella*)、ニツシア (*Nitzschia*)、オーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*)、セネデスムス (*Scenedesmus*) 及び / 又はテトラセルミス (*Tetraselmis*) の種から選択される混合栄養性原生生物である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記真核単細胞生物が、クロレラ (*Chlorella*) 及びヘマトコッカス (*Haematococcus*) 種から選択される混合栄養性原生生物である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

工程 b) で得たバイオマスを回収する 1 つ以上の更なる工程を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記バイオマスが、アルコール、有機酸、脂肪酸、多糖類、テルペン、例えばボトリオコッケン (*botryococcene*)、色素、例えばカロテノイド、アミノ酸、酵素、ビタミン、抗生物質、薬理活性を有する化合物、例えば外来又は組換えタンパク質、及び色素から選択される 1 つ以上の所望の分子を含有する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記所望の分子が、エイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA)、アラキドン酸 (ARA)、 ω -リノレン酸 (ALA)、オレイン酸、フコキサンチン、カンタキサンチン、アスタキサンチン、ルテイン及びベータカロテンから選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記脂質及び / 又は色素を回収する 1 つ以上の工程、任意で当該脂質から EPA 及び / 又は DHA 及び / 又は ARA 及び / 又は色素を抽出する 1 つ以上の工程を更に含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

工程 b) が 15 ~ 24 で実施される、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2014/051809

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12N1/12 C12N1/14 C12N1/20 C12N13/00 C12P7/64	
	C12P23/00	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12P 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 practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/209014 A1 (CHI ZHANYOU [US] ET AL) 20 August 2009 (2009-08-20) paragraph [0029] - paragraph [0031] page 2	1-22
Y	----- EP 2 559 342 A1 (FERMENTALG [FR]) 20 February 2013 (2013-02-20) example 2 ----- -/--	1-22
<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 *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*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 *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 *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 *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
13 October 2014		15/01/2015
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

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2014/051809

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

SEE SUPPLEMENTAL SHEET

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-12 (in full); 13-22 (in part)

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/051809

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MPHO SETLHAKU ET AL: "Improvement in the bioreactor specific productivity by coupling continuous reactor with repeated fed-batch reactor for acetone-butanol-ethanol production", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 161, no. 2, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 147-152, XP055110168, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.004 page 148, right-hand column -----</p>	1

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2014/051809

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009209014	A1	20-08-2009	NONE

EP 2559342	A1	20-02-2013	EP 2559342 A1 20-02-2013
			FR 2979049 A1 22-02-2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2014/051809
application contains

The International Searching Authority has found that the international

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-12 (in full); 13-22 (in part)

A method for the production of biomass, comprising the steps of:

(a) growing cells in a continuous mode under mixotrophic or heterotrophic conditions in a fermenter, followed by

(b) feeding continuously and sequentially n fermenters operating in a fed-batch mode, n being an integer equal to at least 2, with the cells produced in step (a) and the growth thereof under mixotrophic conditions.

2. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Schizochytrium sp. FCC 36 strain

3. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Schizochytrium sp. FCC 1320 strain

4. Claims 13-15 (all in part)

The Schizochytrium sp. FCC 1491 strain

5. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Aurantiochytrium mangrovei FCC 1311 strain

6. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Aurantiochytrium mangrovei FCC 31 strain

7. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Aurantiochytrium mangrovei FCC 1319 strain

8. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Aurantiochytrium mangrovei FCC 1479 strain

9. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Aurantiochytrium mangrovei FCC 1325 strain

10. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Crypthecodinium cohnii FCC 30 strain

11. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Crypthecodinium cohnii FCC 1384 strain

12. Claims 13, 15-23 (all in part)

The Crypthecodinium cohnii FCC 1348 strain

13. Claims 14-23 (in part)

The Tetraselmis sp. FCC 1563 strain

14. Claims 14-23 (in part)

The Scenedesmus abundans FCC 23 strain

15. Claims 14-23 (in part)

The Scenedesmus sp. FCC 1483 strain

16. Claims 14-23 (in part)

The Scenedesmus obliquus FCC 4 strain

17. Claims 14-23 (in part)

The Chlorella sorokiniana FCC 2 strain

18. Claims 14-23 (in part)

The Chlorella sp. FCC 1553 strain

19. Claims 14-23 (in part)

The Chlorella sp. FCC 1520 strain

20. Claims 14-23 (in part)

The Nitzschia sp. FCC 1687 strain

21. Claims 14-23 (in part)

The Haematococcus sp. FCC 1643 strain

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2014/051809

Cadre n°. II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. Les revendications n° se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :

2. Les revendications n° parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :

3. Les revendications n° parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n°. III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:

4. Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:
1-12 (complètement); 13-22 (en partie)

- Remarque quant à la réserve**
- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.
- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/051809

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MPHO SETLHAKU ET AL: "Improvement in the bioreactor specific productivity by coupling continuous reactor with repeated fed-batch reactor for acetone-butanol-ethanol production", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 161, no. 2, 1 octobre 2012 (2012-10-01), pages 147-152, XP055110168, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.004 page 148, colonne de droite -----</p>	1

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/051809

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2009209014	A1	20-08-2009	AUCUN

EP 2559342	A1	20-02-2013	EP 2559342 A1 20-02-2013
			FR 2979049 A1 22-02-2013

Demande internationale No. PCT/ FR2014/ 051809

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUE SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-12(complètement); 13-22(en partie)

Procédé de production de biomasse, comprenant:
a) la culture des cellules en mode continu en conditions de mixotrophie ou d'hétérotrophie dans un fermenteur, puis
b) l'alimentation en continu et successivement de n fermenteurs fonctionnant en mode semi-continu, n étant un nombre entier égal ou supérieur à 2, par les cellules produites dans l'étape a) et leur culture en conditions de mixotrophie.

2. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)

La souche Schizochytrium sp. FCC 36

3. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)

La souche Schizochytrium sp. FCC 1320

4. revendications: 13-15(en partie)

La souche Schizochytrium sp. FCC 1491

5. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)

La souche Aurantiochytrium mangrovei FCC 1311

6. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)

La souche Aurantiochytrium mangrovei FCC 31

7. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)

La souche Aurantiochytrium mangrovei FCC 1319

8. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)

La souche Aurantiochytrium mangrovei FCC 1479

9. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)

La souche Aurantiochytrium mangrovei FCC 1325

Demande internationale No. PCT/ FR2014/ 051809

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

10. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)
La souche *Crypthecodinium cohnii* FCC 30

11. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)
La souche *Crypthecodinium cohnii* FCC 1384

12. revendications: 13, 15-23(toutes en partie)
La souche *Crypthecodinium cohnii* FCC 1348

13. revendications: 14-23(en partie)
La souche *Tetraselmis* sp. FCC 1563

14. revendications: 14-23(en partie)
La souche *Scenedesmus abundans* FCC 23

15. revendications: 14-23(en partie)
La souche *Scenedesmus* sp. FCC 1483

16. revendications: 14-23(en partie)
La souche *Scenedesmus obliquus* FCC 4

17. revendications: 14-23(en partie)
La souche *Chlorella sorokiniana* FCC 2

18. revendications: 14-23(en partie)
La souche *Chlorella* sp. FCC 1553

19. revendications: 14-23(en partie)
La souche *Chlorella* sp. FCC 1520

20. revendications: 14-23(en partie)
La souche *Nitzschia* sp. FCC 1687

Demande internationale No. PCT/ FR2014/ 051809

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

21. revendications: 14-23(en partie)

La souche Haematococcus sp. FCC 1643

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 R	1/89	(2006.01)	C 1 2 N	1/12	A
			C 1 2 R	1:89	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(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 バトリス ガルニエ
フランス国, エフ - 3 3 2 3 0 ラゴルス, シュマン ドゥ クイロン 6

(72) 発明者 ジュリアン パグリアルディーニ
フランス国, エフ - 3 3 3 0 0 ボルドー, プラス ポール エ ジャン - ポール アビソー 1
2, アパルトマン デ 8

(72) 発明者 ピエール カレイヤ
フランス国, 3 3 5 0 0 リブルヌ, リュ リビエール 4, セノオ フェルメンタル

F ターム (参考) 4B064 AC31 AD87 AD90 CA01 CA08 CC30 CD30 DA01 DA10 DA16
4B065 AA72X AA83X AA84X AC09 BC48 BC50 CA02 CA13 CA41 CA44
CA50