

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 10 月 2 日(02.10.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/157077 A1

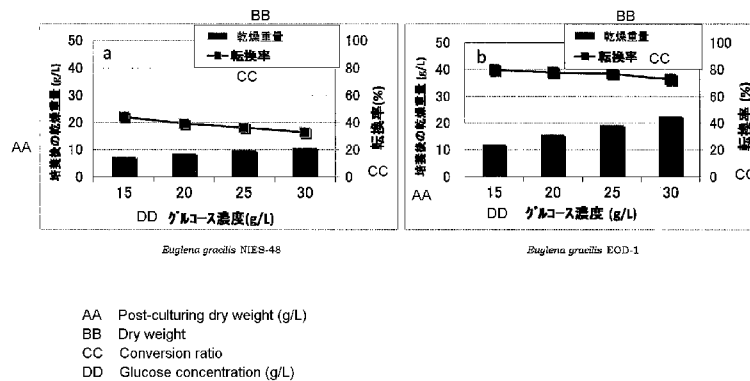
- (51) 国際特許分類:
C12N 1/12 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/058063
- (22) 国際出願日: 2014 年 3 月 24 日(24.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-067558 2013 年 3 月 27 日(27.03.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人筑波大学(UNIVERSITY OF TSUKUBA) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番地 1 Ibaraki (JP). 株式会社神鋼環境ソリューション (KOBELCO ECO-SOLUTIONS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6510072 兵庫県神戸市中央区脇浜町 1 丁目 4 番 7 8 号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 渡邊 信 (WATANABE, Makoto); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番地 1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 出村 幹英 (DEMURA, Mikihide); 〒3058577 茨城県つくば市

天王台一丁目 1 番地 1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 河地 正伸(KAWACHI, Masanobu); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番地 1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 米澤 夏岐(YONEZAWA, Natsuki); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目 1 番地 1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 赤司 昭(AKASHI, Akira); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 4 号 株式会社神鋼環境ソリューション 技術研究所内 Hyogo (JP). 竹▲崎▼潤(TAKEZAKI, Jun); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 4 号 株式会社神鋼環境ソリューション 技術研究所内 Hyogo (JP). 濱田 武志(HAMADA, Takeshi); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 4 号 株式会社神鋼環境ソリューション 技術研究所内 Hyogo (JP). ▲高▼橋 円(TAKAHASHI, Madoka); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 4 号 株式会社神鋼環境ソリューション 技術研究所内 Hyogo (JP). 大開 健司(OHIRAKI, Kenji); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 4 号 株式会社神鋼環境ソリューション 技術研究所内 Hyogo (JP).

[続葉有]

(54) Title: EUGLENA SPP. MICROALGAE, POLYSACCHARIDE MANUFACTURING METHOD, AND ORGANIC COMPOUND MANUFACTURING METHOD

(54) 発明の名称: ユーグレナ属微細藻類、多糖類の製造方法、及び有機化合物の製造方法



(57) Abstract: Provided are Euglena spp. microalgae, which are Euglena gracilis Strain EOD-1 (Deposit Number FERM BP-11530) or a variant thereof and have at least a polysaccharide-producing ability. Provided is a polysaccharide manufacturing method for manufacturing polysaccharides by culturing Euglena spp. microalgae, which are Euglena gracilis Strain EOD-1 (Deposit Number FERM BP-11530) or a variant thereof and have at least a polysaccharide-producing ability, as the polysaccharide-producing organism. Provided is an organic compound manufacturing method for manufacturing at least one kind of organic compound selected from a group consisting of polysaccharides, lipids, Vitamin C, Vitamin E, pigments, and proteins by culturing Euglena spp. microalgae, which are Euglena gracilis Strain EOD-1 (Deposit Number FERM BP-11530) or a variant thereof and have at least a polysaccharide-producing ability.

(57) 要約: ユーグレナグラシリス (*Euglena gracilis*) EOD-1 株 (受託番号 FERM BP-11530) 又はその変異株である、少なくとも多糖類の産生能を有するユーグレナ属微細藻類を提供する。ユーグレナグラシリス (*Euglena gracilis*) EOD-1 株 (受託番号 FERM BP-11530) 又はその変異株である、少なくとも多糖類の産生能を有するユーグレナ属微細藻類を多糖類産生生物として培養することによって多糖類を製造する多糖類の製造方法を提供する。ユーグレナグラシリス (*Euglena gracilis*) EOD-1 株 (受託番号 FERM BP-11530) 又はその変異株である、少なくとも多糖類の産生能を有するユーグレナ属微細藻類を培養することにより、多糖類、脂質、ビタミンC、ビタミンE、色素、及び、蛋白質からなる群より選択される少なくとも1種の有機化合物を製造する有機化合物の製造方法を提供する。

WO 2014/157077 A1



(74) 代理人: 藤本 昇(FUJIMOTO, Noboru); 〒5420081
大阪府大阪市中心区南船場 1 丁目 1 5 番 1 4
号 堺筋稲畑ビル 2 階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, HR, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

ユーグレナ属微細藻類、多糖類の製造方法、及び有機化合物の製造方法
関連出願の相互参照

[0001] 本願は、日本国特願2013-067558号の優先権を主張し、該出願が引用によって本願明細書の記載に組み込まれる。

技術分野

[0002] 本発明は、ユーグレナ属微細藻類、多糖類の製造方法、及び有機化合物の製造方法に関する。

背景技術

[0003] ユーグレナ属微細藻類は、ミドリムシとも称され、培養されることによってパラミロンなどの多糖類等を産生する微生物として知られている。

[0004] 従来、ユーグレナ属微細藻類としては、様々なものが知られており、例えば、ユーグレナグラシリス (*Euglena gracilis*) NIES-48株が知られている（特許文献1）。

[0005] 斯かるユーグレナ属微細藻類は、培養されることによって、パラミロンなどの多糖類を産生し、細胞内に該多糖類を蓄積する。

また、斯かるユーグレナ属微細藻類は、培養条件に応じて、蓄積された多糖類をワックスエステルへと変換したり、多糖類を産生しつつ蛋白質も産生したりし得る。そして、産生され該微細藻類の細胞内に蓄積された多糖類、脂質、蛋白質などの有機化合物は、燃料や食品等の用途において利用され得る。

[0006] しかしながら、斯かるユーグレナ属微細藻類は、多糖類などの有機化合物を産生する性能が必ずしも十分でないという問題を有する。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：日本国特開平07-070207号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、上記の問題点等に鑑み、少なくとも多糖類を十分に産生できるユーグレナ属微細藻類を提供することを課題とする。また、本発明は、多糖類を十分に得ることができる多糖類の製造方法を提供することを課題とする。また、本発明は、多糖類、脂質、ビタミンC、ビタミンE、色素、及び、蛋白質からなる群より選択される少なくとも1種の有機化合物を十分に得ることができる有機化合物の製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 上記課題を解決すべく、本発明に係るユーグレナ属微細藻類は、ユーグレナグラシリス (*Euglena gracilis*) EOD-1株 (受託番号FERM BP-11530) 又はその変異株である、少なくとも多糖類の産生能を有するユーグレナ属微細藻類であることを特徴とする。
- [0010] 本発明に係る多糖類の製造方法は、ユーグレナグラシリス (*Euglena gracilis*) EOD-1株 (受託番号FERM BP-11530) 又はその変異株である、少なくとも多糖類の産生能を有するユーグレナ属微細藻類を多糖類産生生物として培養することによって多糖類を製造することを特徴とする。
- [0011] 本発明の多糖類の製造方法の一態様として、前記培養において用いる培養液が、グルコースを15～30g/L含む態様を採用することができる。
- また、本発明の多糖類の製造方法の他態様として、前記培養において用いる培養液が、酵母分解物を含む態様を採用することができる。
- また、本発明の多糖類の製造方法の他態様として、前記培養において用いる培養液が、AF6培地の組成を有する態様を採用することができる。
- また、本発明の多糖類の製造方法の他態様として、前記多糖類がパラミロンである態様を採用することができる。
- [0012] 本発明に係る有機化合物の製造方法は、ユーグレナグラシリス (*Euglena gracilis*) EOD-1株 (受託番号FERM BP-11530) 又はその変異株である、少なくとも多糖類の産生能を有するユーグレナ属微細藻類を培

養することにより、多糖類、脂質、ビタミンC、ビタミンE、色素、及び、蛋白質からなる群より選択される少なくとも1種の有機化合物を製造することとを特徴とする。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1] *Euglena gracilis* の 18S rRNA 遺伝子塩基配列を比較する表。
- [図2] 18S rRNA 遺伝子を用いて作成した系統樹を表す図。
- [図3A] RAPD 解析のバンドパターンを表す写真。
- [図3B] RAPD 解析のバンドパターンを表す写真。
- [図3C] RAPD 解析のバンドパターンを表す写真。
- [図4] 従属栄養培養における微細藻類のグルコース転換率及び微細藻類の乾燥重量を表すグラフ。
- [図5] 光従属栄養培養における微細藻類の培養期間と微細藻類の乾燥重量とを表すグラフ。
- [図6] pH条件の異なる各培地で光従属栄養培養したときの微細藻類の培養期間と微細藻類の乾燥重量とを表すグラフ。
- [図7] pH条件の異なる各培地で光従属栄養培養したときの微細藻類の培養期間と微細藻類の乾燥重量とを表すグラフ。
- [図8A] 光従属栄養培養において好気条件から嫌気条件へ移行したときの微細藻類の培養期間と、細胞あたりのパラミロン含有率とを表すグラフ。
- [図8B] 光従属栄養培養において好気条件から嫌気条件へ移行したときの微細藻類の培養期間と、培養液あたりのパラミロン量とを表すグラフ。
- [図9A] 光従属栄養培養において好気条件から嫌気条件へ移行したときの微細藻類の培養期間と、細胞あたりの脂質含有率とを表すグラフ。
- [図9B] 光従属栄養培養において好気条件から嫌気条件へ移行したときの微細藻類の培養期間と、培養液あたりの脂質量とを表すグラフ。

発明を実施するための形態

- [0014] 以下、本発明に係るユーグレナ属微細藻類の一実施形態について詳しく説明する。

[0015] 本実施形態のユーグレナ属微細藻類は、ユーグレナグラシリス (Euglena gracilis) EOD-1株(受託番号FERM BP-11530)又はその変異株である、少なくとも多糖類の産生能を有するものである(以下、単にユーグレナ属微細藻類、又は、微細藻類ともいう)。

本実施形態のユーグレナ属微細藻類は、少なくとも多糖類を十分に産生できるという効果を奏する。

[0016] 前記ユーグレナ属微細藻類は、水中を浮遊しつつ生息する生物である。また、前記ユーグレナ属微細藻類は、単細胞性であり、株によって若干異なるが大きさが概ね10 μ mから50 μ mの微小な藻類である。

前記ユーグレナ属微細藻類の性質の詳細について以下に示す。

[0017] (ユーグレナ属微細藻類の形態的性質)

前記ユーグレナ属微細藻類の栄養型細胞は、鞭毛を有し、活発に運動する。また、細胞の形状は、おおよそ紡錘形である。細胞内には、核、葉緑体、ミトコンドリアなどの一般的なオルガネラに加えて眼点という赤色の小器官を有する。

[0018] (ユーグレナ属微細藻類の生理学的又は生化学的性質)

(1) 培地：主として淡水からなる培養液中で増殖できる(廃水由来の有機物を利用しても増殖可能)。

(2) 光合成能：光合成による光独立栄養増殖ができる。

(3) 含有色素：クロロフィルa、クロロフィルb、及び他のカロテノイド類を含む。

(4) 同化蓄積物質：蛋白質、脂質(ワックスエステル)、多糖類(パラミロン)。

(5) 増殖温度域：15℃～35℃(至適温度25℃)。

(6) 好適増殖pH域：pH3.5～5.5(ただし、左記pH範囲外でも増殖可能)

[0019] (ユーグレナ属微細藻類の遺伝子情報)

前記ユーグレナ属微細藻類は、配列番号1で表される18S rDNA (

18S rRNA遺伝子)を有する。

なお、18S rRNA遺伝子の解析は、微細藻類の同定方法として常用されている方法によって行うことができる。具体的には、18S rRNA遺伝子の解析は、例えば、実施例に記載された方法によって行うことができる。

[0020] 前記ユーグレナ属微細藻類の18S rRNA遺伝子における塩基配列は、BLASTホモロジー検索を用いて、GenBankから得た既知のユーグレナ属微細藻類の18S rRNA遺伝子の塩基配列と比較することができる。既知のユーグレナ属微細藻類との配列相同性の一致の程度を比較した結果は、後の実施例において示す。

なお、データベースとしてはEMBL、DDBJなどを使用することもできる。

さらに、分子系統樹作成ソフトMega5プログラム(Tamuraら, 2011, Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739)を用いて、最尤法によって分子系統樹を作成することができる。作成した分子系統樹については、後の実施例において詳細を示す。

[0021] 上記のような手法により、後述する実施例の結果から、前記ユーグレナ属微細藻類は、Euglena gracilisに同定され、ユーグレナグラシリス(Euglena gracilis) EOD-1株と命名された。

[0022] 前記ユーグレナグラシリス(Euglena gracilis) EOD-1株は、2013年6月28日付(原寄託日2013年3月25日)で独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター(NITE-IPOD(郵便番号292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室)にブダペスト条約の規定下で、受託番号FERM BP-11530として国際寄託されている。

[0023] 上述したように、前記ユーグレナ属微細藻類は、細胞内に葉緑体を有することから、光合成によって増殖し得る。即ち、前記ユーグレナ属微細藻類は、光独立栄養生物である。

また、前記ユーグレナ属微細藻類は、ブドウ糖などの有機栄養素を栄養素として利用しても増殖し得る。即ち、前記ユーグレナ属微細藻類は、従属栄養生物でもある。

このように、前記ユーグレナ属微細藻類は、光独立栄養のみによっても増殖し、従属栄養のみによっても増殖し、光独立栄養及び従属栄養を同時に行っても増殖し得る。

[0024] 前記変異株は、例えば、一般的な突然変異処理を施すこと、又は経代培養による適応若しくは自然変異により作製される。

前記突然変異処理は、一般的な変異原を用いて行われ得る。変異原としては、例えば、変異原作用を有する薬剤、紫外線などが挙げられる。変異原作用を有する薬剤としては、例えば、ストレプトマイシン、オフロキサシン、エチルメタンサルホネート、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、ブロモウラシル等のヌクレオチド塩基類似体、又は、アクリジン類などが挙げられる。

[0025] 次に、本発明に係る多糖類の製造方法の一実施形態について説明する。

[0026] 本実施形態の多糖類の製造方法は、前記ユーグレナ属微細藻類を培養することにより、少なくとも多糖類を製造するものである。

本実施形態の多糖類の製造方法は、多糖類を十分に得ることができるという効果を奏する。

[0027] 詳しくは、本実施形態の多糖類の製造方法は、少なくとも水を含む培養液中にて、前記ユーグレナ属微細藻類を培養する培養工程を有する。

[0028] 前記培養液としては、微細藻類の増殖を促進する栄養素と水とを含むものが好ましい。

[0029] 前記栄養素としては、無機栄養素、又は、有機栄養素等が挙げられる。

[0030] 前記無機栄養素としては、例えば、窒素含有無機化合物、リン含有無機化合物などが挙げられる。また、前記無機栄養素としては、例えば、カリウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、コバルトイオン、亜鉛イオン、銅イオン、モリブデンイオン、ニッケルイオンなどが挙げられる。

前記無機栄養素の培養液における濃度は、通常、一般的に知られている程度の濃度である。

[0031] 前記有機栄養素としては、例えば、ブドウ糖（グルコース）、果糖（フルクトース）などの単糖類、ビタミンB6、B12などのビタミン類、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジンなどのアミノ酸、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸、酢酸などの有機酸、エタノールなどのアルコール類などが挙げられる。

[0032] 前記培養液の組成としては、例えば、後述する「AF-6培地」の組成、「Cramer-Myers培地」の組成、「Hutner培地」の組成、又は、これら組成に類似した組成等が採用される。

[0033] 前記培養工程においては、培養液が、炭素源としてのグルコースを15～30g/L含むことが好ましい。また、培養液が、酵母分解物（後述）を含むことが好ましい。また、培養液が、AF6培地の組成を有することが好ましい。

[0034] 前記培養工程は、例えば、上記の培養液と微細藻類とが混合されたものを収容する槽内などにおいて実施することができる。

[0035] 前記培養工程においては、微細藻類に光を照射することにより、微細藻類に光合成をさせることができる。即ち、前記培養工程においては、光独立栄養培養を行うことができる。

前記培養工程において微細藻類に光を照射すると、微細藻類は、光合成によって二酸化炭素を細胞内に取り込み、少なくともパラミロンなどの多糖類を産生しつつ増殖し得る。さらに、微細藻類は、蛋白質、及び、脂質、色素やビタミン類などの二次代謝物などを産生しつつ増殖し得る。

[0036] 前記培養工程において微細藻類に照射される光は、微細藻類に光合成をさせるものであれば、特に限定されない。該光としては、例えば、太陽からの自然光、又は、照明からの光などの人工光等が採用される。

[0037] 前記光独立栄養培養工程において照射する光の強度は、特に限定されるものではないが、通常、 $50 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{s} \sim 200 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ であ

る。

[0038] 前記培養工程においては、微細藻類に光を照射する期間と、微細藻類に光を照射しない期間とを交互に繰り返すことができる。

即ち、前記培養工程においては、光独立栄養培養を行う期間と、光独立栄養培養を行わない期間とを交互に繰り返すことができる。

[0039] 前記培養工程において光を照射する期間は、通常、日光が出ている昼の時間に相当する8時間～15時間である。また、微細藻類の光合成を抑制すべく光を照射しない暗条件の期間は、通常、日光が出ていない夜の時間に相当する9時間～16時間である。これらの期間は、状況や目的に応じて変化させることができる。

なお、光を照射しない暗条件下とは、光合成光量子束密度（PPFD）が $50 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ 以下の条件である。

[0040] 一方で、前記培養工程においては、上述した栄養素のうちの有機栄養素の存在下にて微細藻類を培養する従属栄養培養を行うこともできる。前記培養工程において有機栄養素の存在下にて微細藻類を培養すると、微細藻類は、有機栄養素を細胞内に取り込み、少なくともパラミロンなどの多糖類を産生しつつ増殖し得る。

[0041] 即ち、前記培養工程においては、光独立栄養培養、及び、従属栄養培養のうちの少なくとも一方を行うことができる。

前記培養工程においては、微細藻類の増殖をより促進できるという点で、光独立栄養培養、及び、従属栄養培養の両方を同時に行うことが好ましい。即ち、前記培養工程においては、光従属栄養培養を行うことが好ましい。

[0042] 前記従属栄養培養や光従属栄養培養において用いる有機栄養素としては、前記ユーグレナ属微細藻類が利用できる、エタノールなどのアルコール、ブドウ糖や果糖などの単糖類等、又は、これら成分を含有する廃棄物等が採用されることが好ましい。さらには、前記ユーグレナ属微細藻類の増殖をより確実に促進できるという点で、有機栄養素として酵母又は酵母分解物（以下、酵母エキスともいう）が併用されることが好ましい。

なお、上述の各有機栄養素の少なくとも一部を含むものとして、醸造酒、蒸留酒、清酒粕、焼酎粕、糖蜜、廃糖蜜などが挙げられる。そして、これら酒類などは、有機栄養素の供給源として従属栄養培養や光従属栄養培養において用いられ得る。

[0043] 前記醸造酒は、糖分を含む原料を酵母によってアルコール発酵させて作られたものであり、蒸留処理が施されていないものである。

前記醸造酒は、蒸留処理を行わず、酵母によるアルコール発酵代謝物を含んでいるため、エタノール、水以外に、酵母が産生したブドウ糖（グルコース）などの糖類、蛋白質、アミノ酸、ビタミン、リン、カリウムなどの栄養素を含んでいる。

[0044] 前記醸造酒としては、ビール、清酒、ワイン、穀物を原料とした醸造酒、マメを原料とした醸造酒、イモを原料とした醸造酒、又は、糖を原料とした醸造酒等が挙げられる。

[0045] 前記ビールは、少なくとも麦芽に含まれるデンプンを麦芽内の酵素によって糖化させて糖分を産生させ、さらにこの糖分をビール酵母によってアルコール発酵させて作られたものである。即ち、原料として少なくとも麦芽を用いて上記のごとく作られたものであれば、他の原料をさらに用いたものであっても、本明細書におけるビールに含まれる。

前記麦芽としては、通常、大麦の麦芽が用いられる。

[0046] 前記清酒（日本酒）は、米に含まれるデンプンを麴によって糖化させて糖分を産生させ、さらにこの糖分を酵母によってアルコール発酵させて作られたものである。

[0047] 前記ワインは、少なくともブドウ果汁を酵母によってアルコール発酵させて作られたものである。

[0048] 前記酵母としては、例えば、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属に属するものが挙げられ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae等が挙げられる。

また、前記酵母としては、例えば、いわゆる清酒酵母、いわゆるワイン酵

母、又は、いわゆるビール酵母などが挙げられる。

[0049] 前記酵母分解物（酵母エキス）としては、前記酵母が自己消化することにより生じる酵母自己消化物、酵母を熱水と接触させて細胞壁を破壊したもの、又は、酵素によって酵母の細胞壁を破壊したもの等が挙げられる。

[0050] 前記培養工程においては、微細藻類の酸素呼吸を維持させるべく、酸素を含むガスを培養液に供給することができる。また、前記培養工程においては、微細藻類の光合成を促すべく、二酸化炭素を含むガスを培養液に供給することができる。

斯かるガスの供給は、培養液を曝気すること、培養液を攪拌することなどにより行うことができる。

具体的には、前記培養工程においては、微細藻類に呼吸用の酸素を供給すべく、例えば空気によって培養液を曝気することができる。また、前記培養工程においては、微細藻類の光合成を促進させるべく、例えば、二酸化炭素を比較的多く含む排気ガスなどによって培養液を曝気することができる。

[0051] 前記培養工程においては、曝気等によって培養液中に酸素及び二酸化炭素を供給しつつ、光独立栄養培養及び従属栄養培養を同時に行うことが好ましい。即ち、前記培養工程においては、微細藻類の酸素呼吸及び光合成を促進させるべく、酸素及び二酸化炭素の両方を含むガスを曝気等によって培養液に供給しつつ、有機栄養素の存在下で従属栄養培養を行いながら、光を照射することによって光従属栄養培養を行うことが好ましい。

前記培養工程においては、昼などにて、微細藻類に光を照射しつつ培養液に二酸化炭素を供給することによって微細藻類の光合成を促進させることができる。また、夜などの光が照射されないときに、有機栄養素の存在下で培養液に空気を供給して微細藻類を従属栄養培養することができる。

このようにして培養工程を実施することにより、微細藻類の増殖がより促進され、しかも、微細藻類によるパラミロン等の産生がより促進されるという利点がある。

[0052] 前記培養工程における培養温度は、微細藻類が増殖できる温度であれば、

特に限定されない。該培養温度（培養液の温度）としては、具体的には例えば、 15°C ～ 35°C 、好ましくは 20°C ～ 30°C が採用される。

[0053] 前記培養工程における培養液のpHは、微細藻類が増殖できるpHであれば、特に限定されない。該pHとしては、例えば、 2.5 ～ 5.5 が採用される。

なお、培養液のpHを調整するためには、塩酸のような無機酸を培養液に添加しても良く、酢酸のような有機酸を培養液に添加してもよい。有機酸を培養液に添加することにより、微細藻類が該有機酸を有機栄養素として利用し増殖できるという利点がある。

また、培養液のpHを調整するためには、アルカリ剤を培養液に添加しても良い。アルカリ剤としては、通常、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等が用いられる。

[0054] 前記培養工程においては、前記ユーグレナ (*Euglena*) 属微細藻類にワックスエステルを産生させるべく、培養液への酸素の供給を抑制することができる。

具体的には、前記培養工程においては、例えば、培養液への曝気を停止すること、又は、酸素を含まない不活性ガスなどを培養液に供給すること等により、嫌気条件下にて微細藻類を培養することができる。

前記培養工程においては、細胞内にパラミロンなどの多糖類を蓄積した微細藻類を嫌気条件下にてさらに培養することにより、ユーグレナ属微細藻類がパラミロンをワックスエステルへと変換し、該脂質を細胞内に蓄積し得る。

前記培養工程においては、ワックスエステルの産生をより促進できるという点で、嫌気条件下且つ光が照射されない暗条件下にて微細藻類を培養することが好ましい。

[0055] 一方、前記培養工程においては、前記ユーグレナ (*Euglena*) 属微細藻類に蛋白質を産生させるべく、培養液に酸素を供給しつつ、窒素を含む無機栄養素、又は、窒素を含む有機栄養素の存在下で、微細藻類を培養することがで

きる。

[0056] 前記培養工程においては、上記のようにして微細藻類を培養することにより、微細藻類を増殖させつつ、微細藻類に多糖類、脂質、又は蛋白質などの有機化合物を産生させ、微細藻類の細胞内にこのような有機化合物を蓄積させることができる。

また、前記培養工程においては、培養条件を適宜調整することにより、上記の有機化合物以外の色素、ビタミンCやビタミンEなどのビタミン類、蛋白質、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸などの高度不飽和脂肪酸や飽和脂肪酸などの脂肪酸といった有機化合物をも微細藻類に産生させることができる。

そして、これらの有機化合物が細胞内に蓄積された微細藻類は、食品、医薬品、飼料、化成品、又は燃料など様々な用途にて使用され得るバイオマスとして利用することができる。

[0057] 前記多糖類としては、例えば、パラミロン（ β -1, 3-グルカン）が挙げられる。パラミロンは、グルコースが約700個結合したものである。

前記脂質としては、例えば、ワックスエステルが挙げられる。ワックスエステルは、高級脂肪酸と高級アルコールとがエステル結合したものであり、ワックスエステルとしては、例えば、C-14の脂肪酸とC-14の高級アルコールとがエステル結合したものが挙げられる。

[0058] なお、本実施形態の多糖類の製造方法においては、後述する有機化合物の製造方法と同様な工程を行うことができる。

[0059] 続いて、本発明の有機化合物の製造方法の一実施形態について説明する。

[0060] 本実施形態の有機化合物の製造方法は、上記の培養方法（培養工程）を行うことによって、多糖類、脂質、ビタミンC、ビタミンE、色素、及び、蛋白質からなる群より選択される少なくとも1種を有機化合物として製造するものである。

本実施形態の有機化合物の製造方法は、多糖類、脂質、ビタミンC、ビタミンE、色素、及び、蛋白質からなる群より選択される少なくとも1種の有

機化合物を十分に得ることができるという効果を奏する。

このうち、ビタミンC、ビタミンE、色素、及び蛋白質については、多糖類の製造方法を行うことによって、多糖類と共に製造され得る。

好ましくは、本実施形態の有機化合物の製造方法は、上述した培養工程と、さらに、培養後の微細藻類の分量を高める濃縮工程と、濃縮工程を経た微細藻類の水分をさらに減少させることにより微細藻類を乾燥させる乾燥工程とを有する。なお、前記有機化合物の製造方法においては、濃縮工程や乾燥工程が必ずしも必要でない。

[0061] 前記濃縮工程は、例えば、一般的な濃縮装置を用いることにより行うことができる。

[0062] 前記濃縮装置としては、具体的には例えば、浮上濃縮、重力濃縮、膜濃縮、ベルト濃縮等によって、微細藻類の分量を高めて濃縮する装置が挙げられる。また、前記濃縮装置としては、微細藻類の分量を更に高めるべく脱水装置が用いられ得る。

前記脱水装置としては、具体的には例えば、真空脱水機、加圧脱水機（フィルタプレス）、ベルトプレス、スクリュूपレス、遠心濃縮脱水機（スクリュージェカンタ）、又は、多重円盤脱水機などが挙げられる。

前記濃縮工程は、製造する多糖類、脂質、蛋白質などの利用用途に応じて、濃縮装置のみによって行ってもよく、濃縮装置及び脱水装置の両方によって行ってもよい。

[0063] 前記乾燥工程は、例えば、濃縮工程を経た微細藻類を加熱すること、又は、濃縮工程を経た微細藻類を減圧下におくことなどによって行うことができる。

[0064] 前記濃縮工程を経た微細藻類や、乾燥工程を経た微細藻類は、細胞内に多糖類、脂質、ビタミンC、ビタミンE、色素、及び、蛋白質のうちの少なくとも1種を含み得るものであることから、例えば、そのまま食品等の用途で利用され得る。

また、濃縮工程を経た微細藻類や、前記乾燥工程を経た微細藻類が、必要

に応じて、一般的な抽出処理を施されることによって、多糖類、脂質、ビタミンC、ビタミンE、色素、及び、蛋白質のうちの少なくとも1種が有機化合物として微細藻類から取り出される。取り出された有機化合物は、例えば、食品原料や燃料の用途において利用され得る。

[0065] 前記抽出処理としては、例えば、エタノールやヘキサンなどの有機溶剤によって上記の有機化合物を抽出する抽出処理、又は、亜臨界状態のCO₂溶媒によって上記の脂質等を抽出する抽出処理などが採用される。

[0066] 上記の実施形態のユーグレナ属微細藻類、多糖類の製造方法、及び有機化合物の製造方法は、上記例示の通りであるが、本発明は、上記例示のユーグレナ属微細藻類、多糖類の製造方法、及び有機化合物の製造方法に限定されるものではない。

また、一般のユーグレナ属微細藻類、多糖類の製造方法、及び有機化合物の製造方法において用いられる種々の態様を、本発明の効果を損ねない範囲において、採用することができる。

[0067] 即ち、本発明は、上記実施形態に限定されず、本発明の意図する範囲内において適宜設計変更されることが可能である。また、本発明の作用効果も、上記実施形態に限定されるものではない。

今回開示された実施の形態は、すべての点で例示であって制限的なものではないと考えられるべきである。本発明の範囲は、上記の説明ではなく、特許請求の範囲によって示される。また、本発明の範囲には、特許請求の範囲と均等の意味及び範囲内でのすべての変更が含まれることが意図される。

実施例

[0068] 次に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0069] (ユーグレナ属微細藻類の採取及び単離)

長崎県の湖沼から採取した湖水をAF-6培地(後述)に接種し、室温にて蛍光灯の光を照射しながら2ヶ月間培養した。

培養後の培地中における対象微細藻類をマイクロピペットによって単離し

た。単離した微細藻類を、A F - 6 培地において、蛍光灯の光を照射しながら室温にて培養した。

[0070] (ユーグレナ属微細藻類の同定)

[塩基配列の決定]

単離した微細藻類がユーグレナ属に属する種であることを確認すべく、下記の操作を行った。

即ち、培養したユーグレナ属微細藻類の18S rRNA遺伝子の塩基配列をユーグレナ属微細藻類18S rRNA遺伝子専用プライマーセット (Zakrysら, 2002, Journal of Phycology 38 : 1190-1199) を用い、DNAシーケンサー (Beckman Coulter社製「CEQ8000」) によって決定した。決定した塩基配列を配列表の配列番号1に示す。

[塩基配列の比較]

決定した塩基配列を、BLASTホモロジー検索を用いて、GenBankから得た既知のユーグレナ属微細藻類の18S rRNA遺伝子の塩基配列と比較した。また、既知のユーグレナ属微細藻類との配列相同性の一致の程度を比較した。単離したユーグレナ属微細藻類の18S rRNA遺伝子の塩基配列と、既知のユーグレナ属微細藻類の18S rRNA遺伝子の塩基配列との比較表を図1に示す。

また、分子系統樹作成ソフトMega5プログラム (Tamuraら, 2011, Mol. Biol. Evol. 28 : 2731-2739) を用いて、最尤法によって分子系統樹を作成した。その系統樹を図2に示す。

その結果、上記のごとく単離した微細藻類が、ユーグレナ属に属する種 (*Euglena gracilis* Klebs) であることを同定した。なお、図2におけるEOD-1株のKa、Kb、Na、及びNbは、単離した微細藻類の試験サンプルに付した記号である。いずれの試験サンプルを用いても同様な結果が得られた。

[0071] [RAPD解析]

さらに、単離したユーグレナ属微細藻類と、既知のユーグレナ属微細藻類とを比較するために、RAPD解析(Random Amplified Polymorphic DNA) (参考文献: Williams ら.(1990) Nucleic Acids Res. 18(22), 6531-6535) によって、単離したユーグレナ属微細藻類のバンドパターンと、国立環境研究所保存株6株のバンドパターンとを得た。

RAPD解析におけるPCR条件は、下記の通りである。

サンプル数: 3

プライマー1: AAATCGGGCTG: RAPD-6 配列番号2

酵素: Ex Taq (TAKARA社製)

反応バッファー量: 50 μ L

DNAテンプレート量: 約0.5 ng

PCRの温度条件: 表1に示す通り。詳しくは、94℃で1分間で処理した後、(94℃1分間、40℃45秒間、72℃1分間) × 35回の繰り返し処理、その後72℃で7分間処理。

泳動条件: 2.5質量%アガロースゲル、100V、40分

[0072] [表1]

PCRのサイクル操作	温度(℃)	時間	
変性(denaturation)	94	1分間	
変性(denaturation)	94	1分間	35回繰り返し
結合(annealing)	40	45秒間	
伸長(elongation)	72	1分間	
伸長(elongation)	72	7分間	

[0073] [RAPD解析における比較対象株]

Euglena gracilis NIES-47

Euglena gracilis NIES-48

Euglena gracilis NIES-49

Euglena gracilis NIES-253

Euglena gracilis NIES-286

Euglena gracilis NIES-2149

[0074] さらに、プライマーを換え、同様にしてPCRによりRAPD解析を行っ

た。

プライマー 2 : ATCGGGTCCG : R A P D - 4 配列番号 3

プライマー 3 : GCGATCCCCA : R A P D - 3 配列番号 4

なお、上記プライマー 2 ～ 4 の塩基配列は、Mostafa ら、(2011) Molecules 16, 2598-2608 に記載されているものである。

[0075] 上記のプライマー 1 を用いて R A P D 解析を行った結果（バンドパターン）を図 3 A に示す。また、上記のプライマー 2 及び 3 を用いて R A P D 解析を行った結果をそれぞれ図 3 B、図 3 C に示す。なお、図 3 A ～ 図 3 C における E O D - 1 株の K a、N a は、それぞれ、図 2 における K a、N a と対応している。

[0076] R A P D 解析の結果から、上記のごとく単離したユーグレナ属微細藻類のバンドパターンが、既知のユーグレナ属微細藻類のバンドパターンと異なることがわかった。従って、上記のごとく単離したユーグレナ属微細藻類は、既知のユーグレナ属微細藻類と異なる株であると判断した。

そして、上記のごとく単離したユーグレナ属微細藻類をユーグレナグラシリス (Euglena gracilis) E O D - 1 株と命名した。

[0077] (ユーグレナ属微細藻類の培養)

ユーグレナ属微細藻類を培養するために、下記のものを用意し、下記の培養条件下にて培養工程を行った。

「本発明のユーグレナ属微細藻類株」：

ユーグレナ属微細藻類 (Euglena gracilis) E O D - 1 株

(受託番号：F E R M B P - 1 1 5 3 0)

(独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センターに寄託済み)

「既知のユーグレナ属微細藻類株」：

ユーグレナ属微細藻類 (Euglena gracilis) N I E S - 4 8 株

(独立行政法人国立環境研究所 微生物系統保存施設より入手)

「培養容器」：3 0 0 ～ 5 0 0 m L フラスコなど、後述の通り

「培養液へのガスの供給」：130 rpmの振とう

(培養液を振とうすることによって培養液中に空気を供給する)

「培養温度」：28℃

「培養期間」：後述の通り

「培養液のpH」：後述の通り

「培養のための培養液中の成分」：

表2、表3に示す組成を基本組成として採用した。

なお、表2に示す組成は、独立行政法人国立環境研究所 微生物系統保存施設によって開示されている「AF-6培地」の組成に対して、「P I V m e t a l s」培地の組成（独立行政法人国立環境研究所 微生物系統保存施設によって開示）の成分を加えたものである。また、培養液に含まれる栄養素以外は、水である。

また、表3に示す組成は、C r a m e r - M y e r s 培地の組成を基にしたものである。

[0078] [表2]

	AF-6 培地をベースにした組成
NaNO ₃	140 mg/L
NH ₄ NO ₃	22 mg/L
KH ₂ PO ₄	10 mg/L
K ₂ HPO ₄	5 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	30 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg/L
クエン酸第二鉄	2 mg/L
クエン酸	2 mg/L
ビオチン	2 μg/L
チアミン HCl	10 μg/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.98 mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.02 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.11 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0125 mg/L
MES	400 mg/L
ビタミン B6	1 μg/L
ビタミン B12	1 μg/L

[0079]

[表3]

	Gramer-Myers 培地をベースにした組成
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500 mg/L
KH_2PO_4	500 mg/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20 mg/L
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 mg/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.8 mg/L
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02 mg/L
ビタミン B1	0.1 mg/L
ビタミン B12	1 $\mu\text{g/L}$

[0080] 「微細藻類の培養前の初期重量」：0.78 g/L（乾燥重量）

「有機栄養素」：下記のを培養に応じて適宜変更

・ グルコース

・ 酵母エキス（酵母自己消化物）－

製品名「Dried Yeast Extract D-3」日本製薬社
製

・ 醸造酒としてのビール－市販のビール（麦芽の使用率が66.7%以上）

エタノール5容量%

実施例1～4、比較例1～4においては、暗条件下にて従属栄養培養を行い、それ以外の実施例及び比較例においては、光従属栄養培養を行った。微細藻類を光従属栄養培養するときの培養条件の詳細を以下に示す。

「光照射条件」：12時間光照射の後、12時間暗所

「光の強度」：光合成光量子束密度（PPFD）－約100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 又は約200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$

[0081]（実施例1）

500 mLの坂口フラスコに、表2に示す組成物を200 mL入れた。さらに、グルコースが15 g/Lの濃度となり、酵母エキスが5 g/Lの濃度となるように、グルコース及び酵母エキスを添加した。さらに、塩酸の添加

によって pH を 4.0 に調整し、培養液を調製した。

そして、上記の培養条件下、且つ暗条件下（即ち、従属栄養培養条件下）にてフラスコを振とうさせて、ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) EOD-1 株を 3 日間培養することにより、培養工程を行った。

[0082]（実施例 2～4）

培養液中におけるグルコース濃度がそれぞれ 20 g/L、25 g/L、30 g/L 濃度となるようにグルコース量を変えた点以外は、実施例 1 と同様にして培養工程を行った。

[0083]（比較例 1）

ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) EOD-1 株に代えて、ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) NIES-48 株を 5 日間かけて培養した点以外は、実施例 1 と同様にして培養工程を行った。

[0084]（比較例 2～4）

培養液中におけるグルコース濃度がそれぞれ 20 g/L、25 g/L、30 g/L 濃度となるようにグルコース量を変えた点以外は、比較例 1 と同様にして培養工程を行った。

[0085] 各実施例及び各比較例の培養工程を行った後の微細藻類の乾燥重量をそれぞれ測定した。また、添加した栄養素の転換率を下記の計算式によって求めた。

転換率 (%) =

培養によって増加した藻の乾燥重量 (g/L) / 消費されたグルコース濃度 (g/L)

[0086] 各実施例及び各比較例における培養後の藻の乾燥重量と転換率との結果を図 4 に示す。

図 4 から把握されるように、ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) EOD-1 株は、既知の NIES-48 株よりもバイオマス生産量が高いと言える。

[0087]（実施例 5）

300 ml の三角フラスコを用いた点、表 2 に示す組成物 50 ml に対して、ビール由来のエタノール濃度が 2.5 容量%となるようにビールを添加した培養液を用いた点、酵母エキスを培養液に添加しなかった点、12 時間の光照射環境と 12 時間の暗環境とを繰り返して培養した点、培養期間を 7 日間とした点以外は、実施例 1 と同様にして、ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) EOD-1 株を培養することにより、培養工程を行った。なお、光合成光量子束密度 (PPFD) を約 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ とした。

[0088] (実施例 6)

上記の酵母エキス濃度が 2 g/L となるように酵母エキスを培養液に添加した点以外は、実施例 5 と同様にして培養工程を行った。

[0089] (比較例 5)

ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) EOD-1 株に代えて、ユーグレナ属微細藻類 NIES-48 株を培養した点以外は、実施例 5 と同様にして培養工程を行った。

(比較例 6)

上記の酵母エキス濃度が 2 g/L となるように酵母エキスを培養液に添加した点以外は、比較例 5 と同様にして培養工程を行った。

[0090] 実施例 5、6、比較例 5、6 の培養工程を行いつつ、1、2、3、4、5、7 日間培養後の微細藻類の乾燥重量をそれぞれ測定した。その結果を図 5 に示す。

図 5 から把握されるように、ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) EOD-1 株は、光従属栄養培養の条件下で培養されても、既知の NIES-48 株に比べ高い生産性を有することが分かる。

[0091] (実施例 7 ~ 12)

表 2 に示す組成物に代えて表 3 に示す組成物を用いた点、培養液の初期 pH をそれぞれ pH 5.5、pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0、pH 8.5、又は、pH 9.0 に変更した点、培養期間を 10 日間に変更した点以外は、実施例 5 と同様にして培養工程を行った。

[0092] 実施例 7 ～ 12 の培養工程を行いつつ、経時的に培養後の微細藻類の乾燥重量をそれぞれ測定した。その結果を図 6 に示す。

[0093] (実施例 13 ～ 17)

表 2 に示す組成物に代えて表 3 に示す組成物を用いた点、光合成光量子束密度 (PPFD) を約 $200 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$ とした点、培養液の初期 pH をそれぞれ pH 3.5、pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、又は、pH 5.5 に変更した点、培養期間を 10 日間に変更した点以外は、実施例 5 と同様にして培養工程を行った。

[0094] (実施例 18、19)

表 2 に示す組成物に代えて表 3 に示す組成物を用いた点、培養液の初期 pH をそれぞれ pH 3.5、又は、pH 5.5 にそれぞれ変更した点、培養期間を 10 日間に変更した点以外は、実施例 5 と同様にして培養工程を行った。

[0095] 実施例 13 ～ 19 の培養工程を行いつつ、経時的に培養後の微細藻類の乾燥重量をそれぞれ測定した。その結果を図 7 に示す。

[0096] (実施例 20)

培養期間を 7 日間とした点以外は、実施例 5 と同様にして、ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) EOD-1 株を培養することにより、培養工程を行った。

なお、培養開始から 2 日後までは、フラスコを振とうさせることによって好気条件下での培養とし、それ以後は、振とうを停止し、不活性ガス（窒素ガス）を供給することによって嫌気条件下での培養とした。

[0097] (比較例 7)

ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) EOD-1 株に代えて、ユーグレナ属微細藻類 (*Euglena gracilis*) NIES-48 株を培養した点以外は、実施例 20 と同様にして培養工程を行った。

なお、培養開始から 4 日後までは、フラスコを振とうさせることによって好気条件下での培養とし、それ以後は、振とうを停止し、不活性ガス（窒素

ガス) を供給することによって嫌気条件下での培養とした。

[0098] 実施例 20 及び比較例 7 の培養によって産生されたパラミロン及び脂質 (ワックスエステル) の量を 1 日ごとに測定した。

培養後のパラミロン量の測定は、下記の手順で行った。即ち、培養後の微細藻類と培養液との混合物 (40 mL) を遠心管に入れて、遠心分離した。遠心分離後の沈殿物に純水を加えて懸濁させ再度遠心分離する操作を 2 回繰り返した。そして、遠心分離後の沈殿物に少量の純水を加えて懸濁させ、懸濁物を凍結乾燥させた。このようにして、培養液の成分を除去した。

次に、凍結乾燥後の微細藻類の細胞を、秤量した遠心管 (ブランク値となる) に 400 mg 程度正確に量り取った。アセトンを加えて懸濁させ、遠心分離後の上澄液を取り除いた。上澄液の色がなくなるまで、アセトンによる洗浄操作を 5 回程度繰り返した。このようにして、微細藻類が産生した色素成分を除去した。

続いて、ドデシル硫酸ナトリウム溶液を用いて、パラミロン以外の成分を除去する操作を行った。即ち、色素成分を除去した後の残分に、1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を 20 mL 加え、懸濁させた後、100℃ で 10 分間加熱した。そして、遠心分離した後の上澄液を除去した。このような操作を 2 回繰り返した後、SDS 溶液に代えて純水を用いて同様な操作を 3 回繰り返して、SDS を洗浄除去した。

最後に、105℃ の乾燥器内に遠心管ごとに入れて水分を除去し、パラミロンが入った遠心管の重さを測定した。そして、上記のブランク値との差から、パラミロン量を求めた。

一方、培養後のワックスエステル量の測定は、BLIGHT-DYER 法によって行った。

[0099] 実施例 20 及び比較例 7 の培養において、経時的にパラミロンの量を測定した結果を図 8 A 及び図 8 B に示す。また、経時的に脂質 (ワックスエステル) の量を測定した結果を図 9 A 及び図 9 B に示す。

図 8 A 及び図 8 B から把握されるように、従来のユーグレナ属微細藻類 (E

uglena gracilis) N I E S - 4 8 株と比較して、ユーグレナ属微細藻類 (Euglena gracilis) E O D - 1 株は、パラミロンの産生速度が N I E S - 4 8 株よりも速い。また、E O D - 1 株は、細胞あたりのパラミロン含有量が約 5 5 % 以上であり、N I E S - 4 8 株よりも多い。

また、図 9 A 及び図 9 B から把握されるように、ユーグレナ属微細藻類 (Euglena gracilis) E O D - 1 株は、脂質 (ワックスエステル) の産生速度がより速く、細胞あたりのワックスエステル含有量が、より短期間で高くなる。

[0100] さらに、下記の表 4 及び表 5 に示す組成の培地にて、下記の培養条件下にて培養工程を行った。

[0101] (実施例 2 1)

微細藻類としての上記の E O D - 1 株を光従属栄養培養によって 2 日間培養した。

[0102] (比較例 8)

微細藻類としての上記の N I E S - 4 8 株を光従属栄養培養によって 2 日間培養した。

[0103] 培地としては、H u t n e r の培地を改変したもの (以下「Modified Hutner 培地」ともいう) にグルコースを 3 0 g / L 添加した培地を採用した。具体的な組成は、表 4 の通りであり、また、液体に含まれる栄養素以外は、水である。表 4 における微量金属含有溶液としては、下記表 5 の組成を有する微量金属含有溶液を用いた。微量金属成分以外は水である。

培養方法の詳細は、以下の通りである。

「培養液」：塩酸によって pH を 4. 0 に調整

「培養容器」：5 0 0 m L 坂口フラスコ

「培養前の仕込み」：培養液 2 0 0 m L と培養前微細藻類とを坂口フラスコに収容

(初期バイオマス量を合わせるため、E O D - 1 株では計 2 2 0 m L、

N I E S - 4 8 株では計 2 3 6 m L)

「培養時の温度」：28℃

「培養時の明暗条件」：遮光した暗条件にて培養

「培養時の好気条件」：振とう機に坂口フラスコをセットし、130rpmの往復振とうで運転することにより培養液中に空気を供給

[0104] [表4]

modified Hutner 培地: グルコース添加	
glucose (グルコース)	30 g/L
Asparagine (アスパラギン)	2 g/L
glutamic acid (グルタミン酸)	5 g/L
malic acid (リンゴ酸)	5 g/L
glycine (グリシン)	25 g/L
urea (尿素)	0.4 g/L
succinic acid (コハク酸)	0.1 g/L
KH ₂ PO ₄	0.4 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.14 g/L
MgCO ₃	0.4 g/L
CaCO ₃	0.1 g/L
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.021 g/L
ビタミンB1 (Vitamin B ₁)	0.6 mg/L
ビタミンB12 (Vitamin B ₁₂)	0.05 mg/L
微量金属 (Trace metals) 含有溶液	10 mL/L

[0105] [表5]

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.1 g/L
MgSO ₄ ·H ₂ O	0.58 g/L
(NH ₄) ₂ MoO ₇ ·4H ₂ O	0.18 g/L
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.024 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.077 g/L
H ₃ BO ₃	0.029 g/L
NaNO ₃ ·4H ₂ O	0.074 g/L

[0106] 培養2日後における藻の乾燥重量（バイオマス生産量）と、グルコースの転換率とを、上記と同様にして算出した。結果を表6に示す。

[0107] [表6]

培養2日後	実施例21 (EOD-1株)	比較例8 (NIES-48株)
乾燥重量 (g/L)	24.50	11.50
グルコース転換率 (%)	76	33

[0108] 表6から把握されるように、従来のユーグレナ属微細藻類 (Euglena gracilis) NIES-48株と比較して、ユーグレナ属微細藻類 (Euglena gracilis)

is) EOD-1株は、よりバイオマス生産能力に優れ、また、より優れたグルコース転換率を有する。

産業上の利用可能性

[0109] 本発明の微細藻類、本発明の多糖類の製造方法、及び、本発明の有機化合物の製造方法は、パラミロンなどの多糖類、ワックスエステルなどの脂質、蛋白質などの有機化合物を培養によって得るために好適に使用される。

得られた有機化合物は、微細藻類の細胞内に蓄積されたまま、又は、抽出処理などによって取り出すことにより、健康食品、医薬品、飼料、化成品、又は燃料等の用途で利用することができる。具体的には、培養により微細藻類の細胞内に蓄積された有機化合物としての脂質は、例えば、細胞内から取り出されて燃料の原料として好適に使用される。

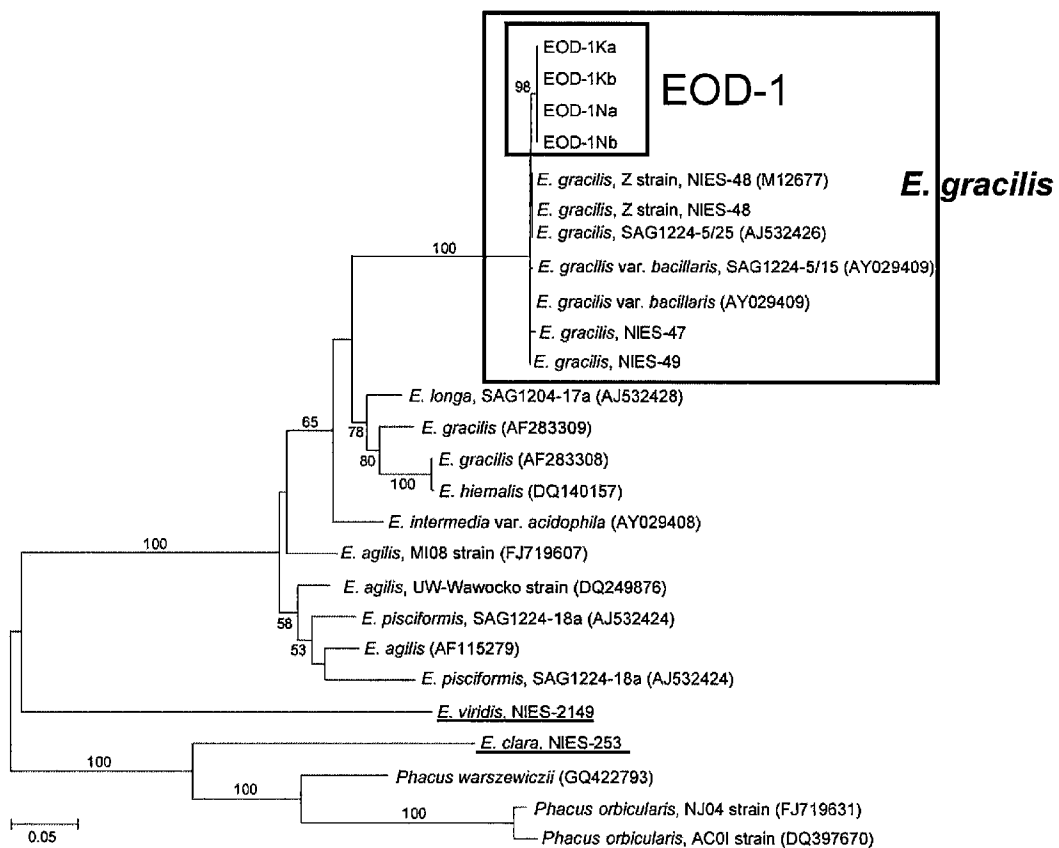
請求の範囲

- [請求項1] ユーグレナグラシリス (*Euglena gracilis*) EOD-1 株 (受託番号 FERM BP-11530) 又はその変異株である、少なくとも多糖類の産生能を有するユーグレナ属微細藻類。
- [請求項2] 請求項1記載のユーグレナ属微細藻類を多糖類産生生物として培養することによって多糖類を製造する多糖類の製造方法。
- [請求項3] 前記培養において用いる培養液が、グルコースを15～30g/L含む請求項2に記載の多糖類の製造方法。
- [請求項4] 前記培養において用いる培養液が、酵母分解物を含む請求項2又は3に記載の多糖類の製造方法。
- [請求項5] 前記培養において用いる培養液が、AF6培地の組成を有する請求項2～4のいずれか1項に記載の多糖類の製造方法。
- [請求項6] 前記多糖類がパラミロンである請求項2～5のいずれか1項に記載の多糖類の製造方法。
- [請求項7] 請求項1記載のユーグレナ属微細藻類を培養することにより、多糖類、脂質、ビタミンC、ビタミンE、色素、及び、蛋白質からなる群より選択される少なくとも1種の有機化合物を製造する有機化合物の製造方法。

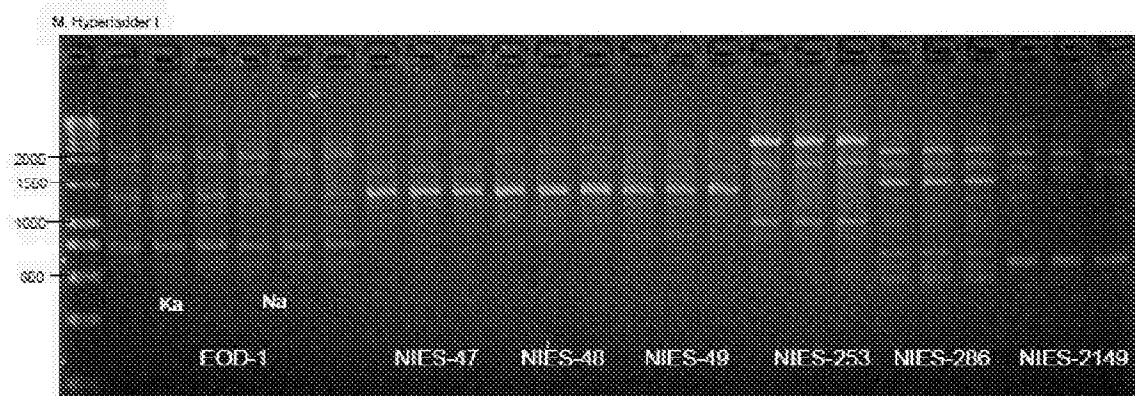
[図1]

配列No.(総数1960)	93	94	108	156	221	251	396	742	785	852	1000	1334	1439	1440	1460	1636	1765	1779
EOD-1	G	C	T	A	T	T	-	T	T	C	G	G	C	A	C	G	C	A
NIES-47	T	G	C	G	A	C	-	C	T	T	G	T	C	A	C	A	T	C
NIES-48(Z)	G	C	C	G	A	C	-	C	C	C	G	T	C	A	C	A	T	A
NIES-48(Z. M12677)	G	C	C	G	A	C	-	C	C	C	-	T	C	A	C	A	T	A
NIES-49	G	C	C	G	A	C	-	C	T	T	G	T	C	A	C	A	T	A
SAG1224-5/15	G	C	C	G	A	C	-	C	T	T	G	T	G	C	G	A	T	A
SAG1224-5/25	G	C	C	G	A	C	-	C	C	C	G	T	C	A	C	A	T	A
AY029409	G	C	C	G	A	C	A	C	T	T	G	T	C	A	C	A	T	A

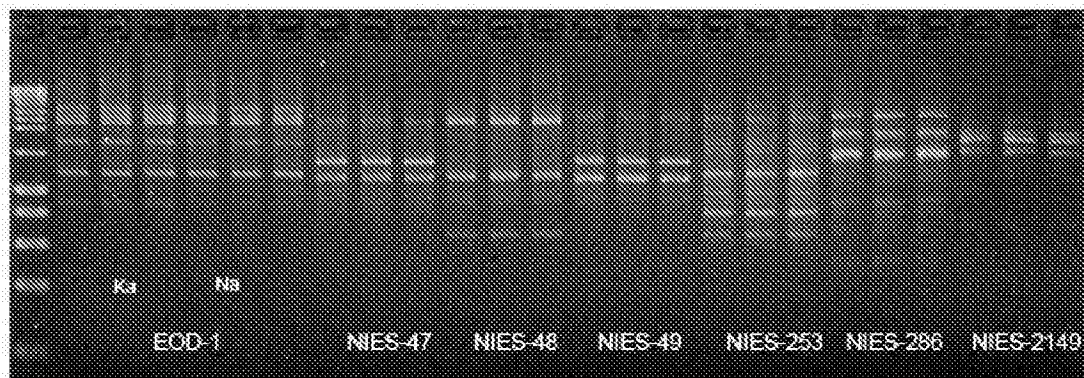
[図2]



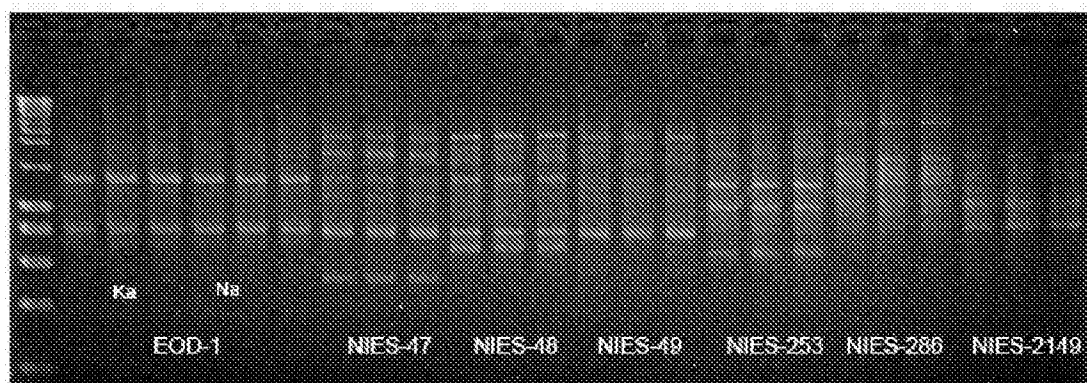
[図3A]



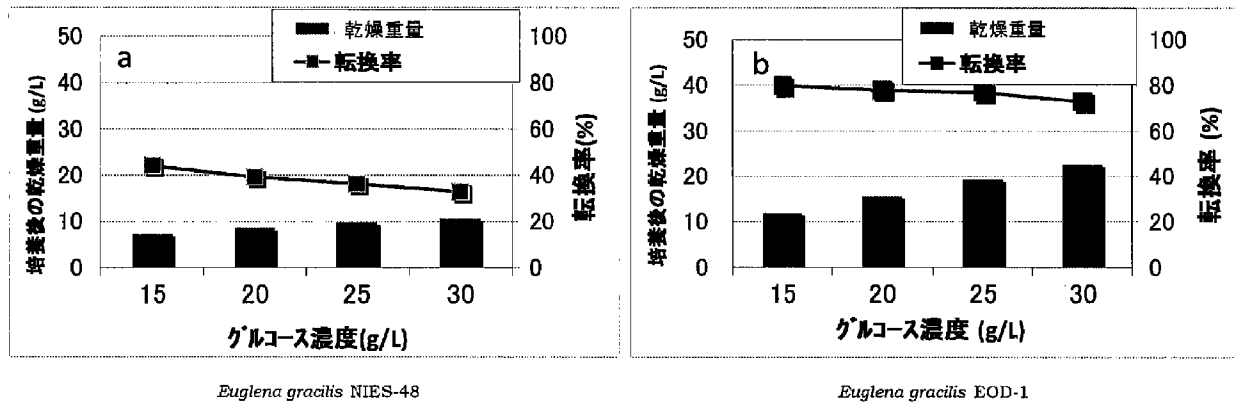
[図3B]



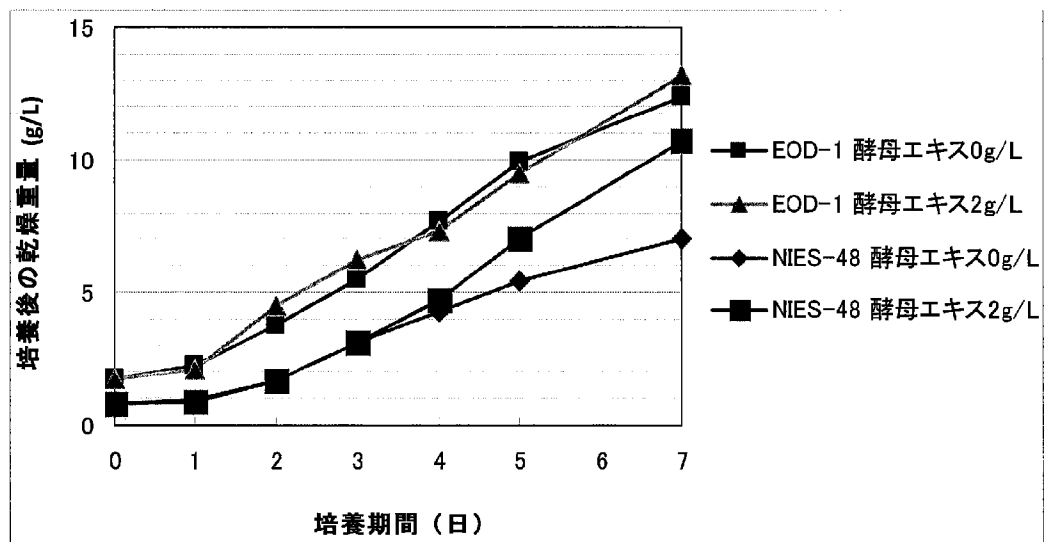
[図3C]



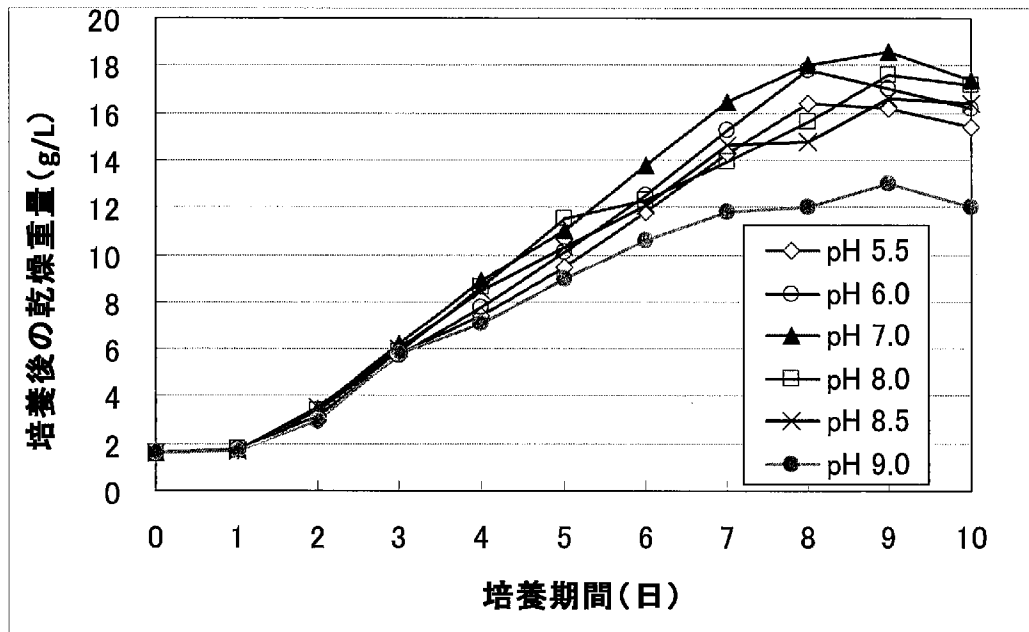
[図4]



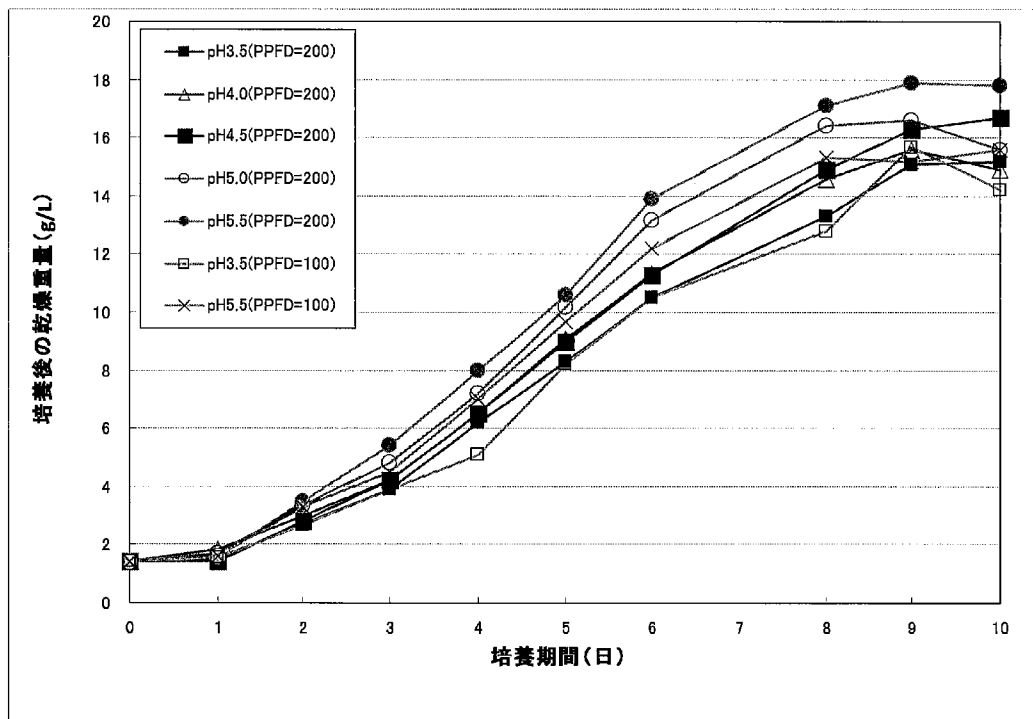
[図5]



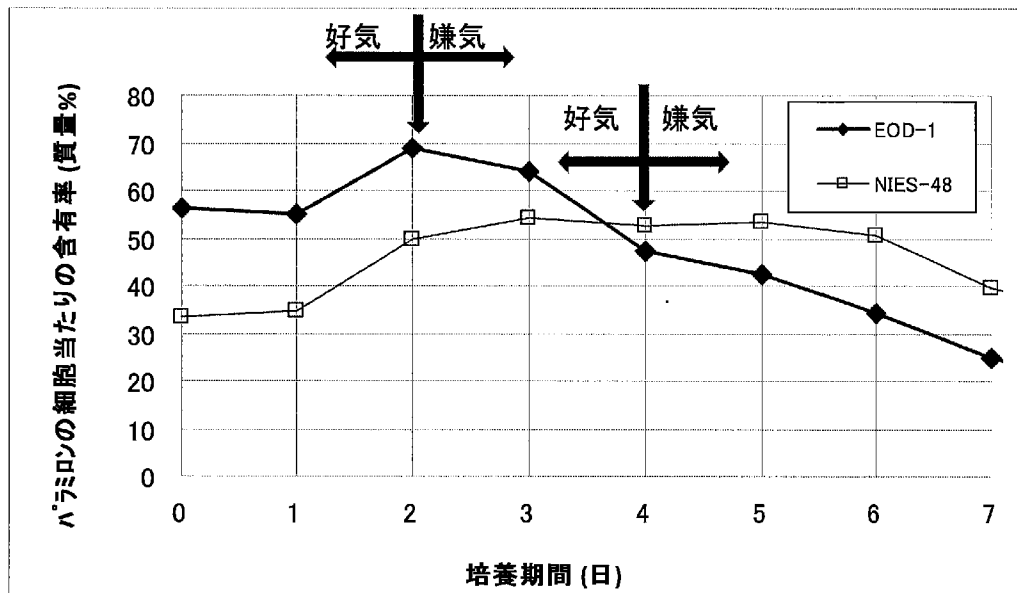
[図6]



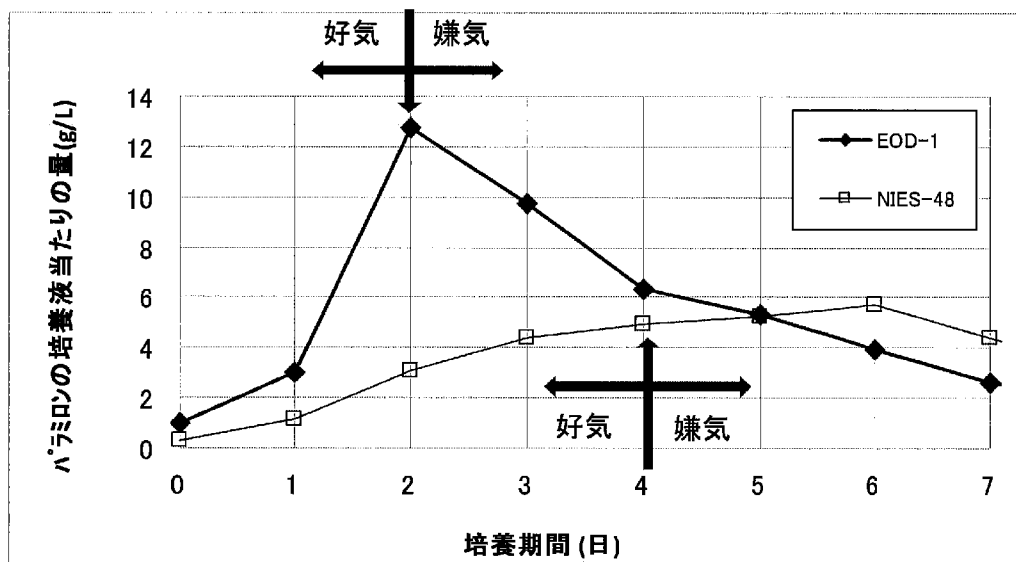
[図7]



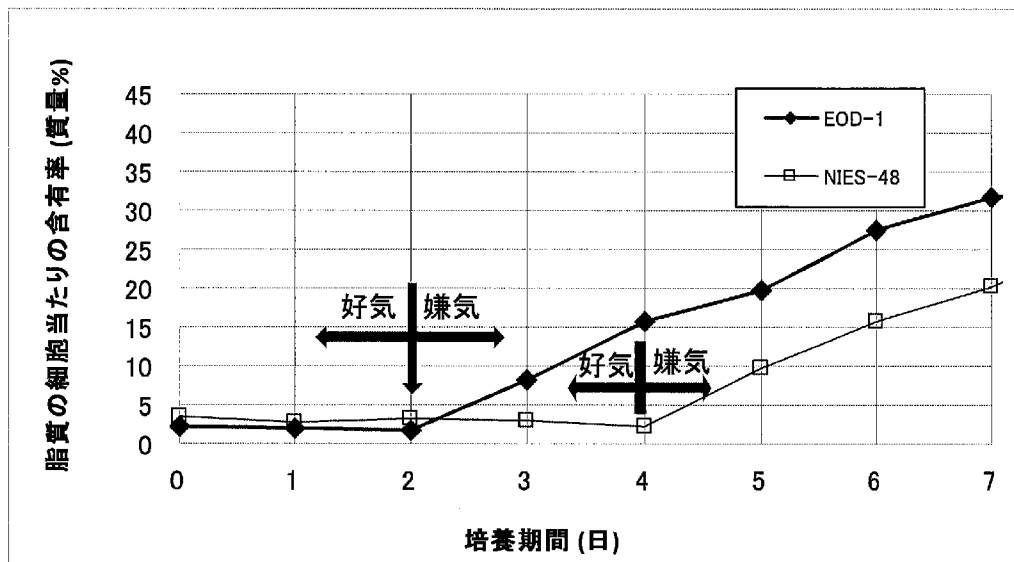
[図8A]



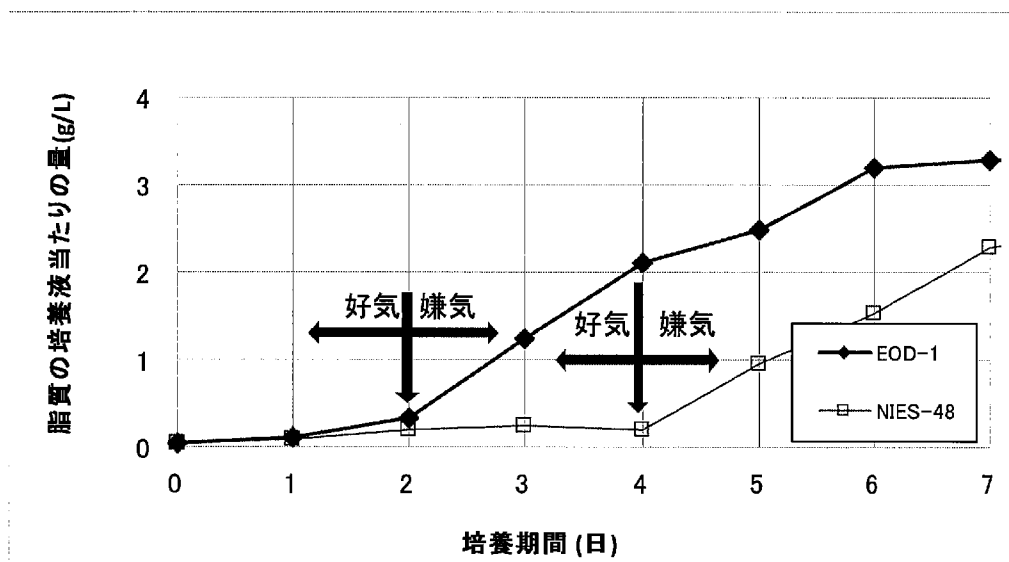
[図8B]



[図9A]



[図9B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/12(2006.01)i, C12P19/04(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i

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)

C12N1/12, C12P19/04, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 06-113819 A (Harima Chemicals, Inc.), 26 April 1994 (26.04.1994), paragraphs [0003] to [0005]; euglena culture medium; examples (Family: none)	1-7
Y	JP 59-118090 A (Shozaburo KITAOKA), 07 July 1984 (07.07.1984), claims 1 to 3; page 2, upper right column, line 14 to lower left column, line 6 (Family: none)	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
12 June, 2014 (12.06.14)

Date of mailing of the international search report
24 June, 2014 (24.06.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058063

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HWANG, C.Y. et al., "Accession: AF081593.1 [gi: 5825256], Definition: Euglena anabaena 18S ribosomal RNA gene, complete sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product", NCBI Entrez Nucleotide [online]; 06-SEP-1999 uploaded, NCBI, [retrieved on 12 June 2014], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/5825256? >	1-7
Y	SHIN W. et al., Ultrastructure of Euglena anabaena var. minor (Euglenophyceae), Phycological Research, 2000, 48(1), p.19-25	1-7
Y	KAWACHI M. et al., MCC-NIES List of Strains, 9th Edition (2013) Microalgae, Endangered Macroalgae and Protists, 2013 Mar 1, Microbial Culture Collection at National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan [retrieved on 12 July 2014], p.90-91, Retrieved from the Internet: <URL: http://mcc.nies.go.jp/download/list9th_j.pdf >	1-7
A	SHEVELEVA E.V. et al., Identification and comparative analysis of the chloroplast alpha-subunit gene of DNA-dependent RNA polymerase from seven Euglena species, Nucleic Acids Res., 2002 Mar 1, 30(5), p.1247-54	1-7

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/12(2006.01)i, C12P19/04(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/12, C12P19/04, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, Thomson Innovation

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 06-113819 A（ハリマ化成株式会社）1994. 04. 26, 【0003】 - 【0005】 , ユーグレナ培養例, 実施例（ファミリーなし）	1-7
Y	JP 59-118090 A（北岡 正三郎）1984. 07. 07, 特許請求の範囲第 1-3 項, 第 2 頁右上欄第 14 行-同左下欄第 6 行 （ファミリーなし）	1-7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 2 . 0 6 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 6 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

渡邊 潤也

4 B

3 1 3 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	HWANG, C. Y. et al., "Accession:AF081593.1[gi:5825256], Definition:Euglena anabaena 18S ribosomal RNA gene, complete sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product", NCBI Entrez Nucleotide[online];06-SEP-1999 uploaded, NCBI, [retrieved on 12 June 2014], Retrieved from the Internet: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/5825256?>	1-7
Y	SHIN W. et al., Ultrastructure of Euglena anabaena var. minor (Euglenophyceae), Phycological Research, 2000, 48(1), p. 19-25	1-7
Y	KAWACHI M. et al., MCC-NIES List of Strains, 9th Edition(2013) Microalgae, Endangered Macroalgae and Protists, 2013 Mar 1, Microbial Culture Collection at National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan[retrieved on 12 July 2014], p. 90-91, Retrieved from the Internet:<URL:http://mcc. nies.go.jp/download/list9th_j.pdf>	1-7
A	SHEVELEVA E. V. et al., Identification and comparative analysis of the chloroplast alpha-subunit gene of DNA-dependent RNA polymerase from seven Euglena species, Nucleic Acids Res., 2002 Mar 1, 30(5), p. 1247-54	1-7