

(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
2024年1月4日(04.01.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/004647 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/12 (2006.01) A61K 35/68 (2006.01)
A23K 10/10 (2016.01) A61P 9/12 (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01) A61P 25/20 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/022021

(22) 国際出願日: 2023年6月14日(14.06.2023)

(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 2022-105469 2022年6月30日(30.06.2022) JP

(71) 出願人: 株式会社 A l g a l e x (ALGALEX CO., LTD.) [JP/JP]; 〒9042234 沖縄県うるま市字洲崎 1 2 - 7 5 Okinawa (JP).

(72) 発明者: 多田 清志 (TADA Kiyoshi); 〒9042234 沖縄県うるま市字洲崎 1 2 - 7 5 株式会社 A l g a l e x 内 Okinawa (JP). 高田 大地 (TAKADA Daichi); 〒9042234 沖縄県うるま市字洲崎 1 2 - 7 5 株式会社 A l g a l e x 内 Okinawa (JP). 日高 英祐 (HIDAKA Eisuke); 〒9042234 沖縄県うるま市字洲崎 1 2 - 7 5 株式会社 A l g a l e x 内 Okinawa (JP). 伊藤 順子 (ITO Junko); 〒9042234 沖縄

県うるま市字洲崎 1 2 - 7 5 株式会社 A l g a l e x 内 Okinawa (JP).

(74) 代理人: 渡 邊 薫 (WATANABE Kaoru); 〒1080014 東京都港区芝四丁目 1 0 番 5 号 オーキッドプレイス田町ビル 6 階 薫風国際特許事務所 Tokyo (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

(54) Title: HETEROTROPHIC MICROALGAE, USE THEREOF, AND METHOD FOR INCREASING γ -AMINOBUTYRIC ACID IN HETEROTROPHIC MICROALGAE

(54) 発明の名称: 従属栄養性微細藻類及びその用途、並びに従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸を増加させる方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide heterotrophic microalgae having a high content of γ -aminobutyric acid, and a method for increasing the content of γ -aminobutyric acid in the heterotrophic microalgae. The present invention provides heterotrophic microalgae in which the content of γ -aminobutyric acid is at least 100 mg per 100 g of a dry algal body. The present invention provides a food, a medicine, or a feed containing the heterotrophic microalgae. The present invention provides a method for increasing the content of γ -aminobutyric acid in heterotrophic microalgae, the method comprising a step for culturing the heterotrophic microalgae in a culture medium containing γ -aminobutyric acid.

(57) 要約: 本発明は、 γ -アミノ酪酸の含有量が多い従属栄養性微細藻類、及び、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させる方法を提供することを目的とする。本発明は、 γ -アミノ酪酸の含有量が、乾燥藻体 1 0 0 g 当たり 1 0 0 m g 以上である、従属栄養性微細藻類を提供する。本発明は、当該従属栄養性微細藻類を含有する、食品、医薬品、又は飼料も提供する。本発明は、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程を含む、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させる方法も提供する。

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：

従属栄養性微細藻類及びその用途、並びに従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸を増加させる方法

技術分野

[0001] 本発明は、従属栄養性微細藻類及びその用途、並びに従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸を増加させる方法に関する。

背景技術

[0002] γ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid: GABA) は、タンパク質を構成しない、水溶性のアミノ酸の一種である。 γ -アミノ酪酸は、自然界に広く分布しており、生体内においてはグルタミン酸から生合成される。哺乳動物の脳内において、 γ -アミノ酪酸は、抑制型神経伝達物質として働き、脳機能改善作用、リラックス作用、ストレス軽減作用、及び血圧低下作用を示し、また、睡眠の質を改善する機能を有することが報告されている。

[0003] 現在までに、 γ -アミノ酪酸を含有する微細藻類に関していくつか報告されている。例えば、下記特許文献1には、 γ -アミノ酪酸を含有するパブロボ科の微細藻類 (OPMS30543株及びOPMS30543X株) が開示されている。下記特許文献2には、 γ -アミノ酪酸を含有するイデユコゴメ綱に属する藻類が開示されている。下記特許文献3には、 γ -アミノ酪酸を含有するイデユコゴメ細胞が開示されている。

[0004] 微細藻類の中には従属栄養性を示すもの (従属栄養性微細藻類) がある。ここで、「従属栄養性微細藻類」とは、光照射が必須となる光合成によって増殖させる光合成培養によらず、有機の炭素源を与えることで光照射をすることなしに培養、増殖が可能な性質を持つ藻類である。これまで、従属栄養性を示し且つ γ -アミノ酪酸を多く含有する微細藻類については報告されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開 2 0 2 1 － 1 3 3 1 3 号公報
特許文献2：特開 2 0 2 0 － 7 2 6 9 8 号公報
特許文献3：特表 2 0 1 4 － 5 2 4 2 4 8 号公報
特許文献4：特開平 1 0 － 0 7 2 5 9 0 号公報
特許文献5：特許 7 2 1 8 0 2 3 号公報

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：ATCC (American Type Culture Collection), “*Aurantiochytrium limacinum* (Honda et Yokochi) Yokoyama et Honda MYA-1381TM”, <https://www.atcc.org>.
非特許文献2：NCBI (National Center for Biotechnology Information), “*Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381”, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/68529>.
非特許文献3：Rinka Yokoyama ・ Daisuke Honda, “Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov.”, *Mycoscience* (2007) 48:199-211.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、 γ -アミノ酪酸の含有量が多い従属栄養性微細藻類を提供することを主目的とする。また、本発明は、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させる方法を提供することを主目的とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、従属栄養性微細藻類が培地に含まれる γ -アミノ酪酸を取り込み、藻体内に蓄積すると

いう知見を得た。その結果、本発明者らは、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸を増加させる技術、及び、 γ -アミノ酪酸を多く含有する従属栄養性微細藻類を得る技術を確立した。また、本発明者らは、培地に含まれる γ -アミノ酪酸を従属栄養性微細藻類によって回収する方法も見出した。本発明は、これらの結果、完成されたものである。

[0009] すなわち、本発明は、 γ -アミノ酪酸の含有量が、乾燥藻体100g当たり100mg以上である、従属栄養性微細藻類を提供する。

前記従属栄養性微細藻類は、ヤブレツボカビ類（Thraustochytriales）に属する微細藻類であってよい。

前記従属栄養性微細藻類は、オーランチオキトリウム属（Aurantiochytrium）に属する微細藻類であってよい。

本発明は、前記従属栄養性微細藻類を含有する、食品、医薬品、又は飼料も提供する。

本発明は、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程を含む、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させる方法も提供する。

本発明は、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、前記従属栄養性微細藻類を回収する工程と、を含む、培地から γ -アミノ酪酸を回収する方法も提供する。

本発明は、 γ -アミノ酪酸を含む組成物を用いて培地を調製する工程と、前記培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、前記従属栄養性微細藻類を回収する工程と、を含む、組成物から γ -アミノ酪酸を回収する方法も提供する。

本発明は、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で培養された従属栄養性微細藻類を用いることを含む、食品、医薬品、又は飼料の製造方法も提供する。

発明の効果

[0010] 本発明により、 γ -アミノ酪酸の含有量が多い従属栄養性微細藻類が提供される。また、本発明により、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含

有量を増加させる方法が提供される。なお、本発明の効果は、ここに記載された効果に限定されず、本明細書内に記載されたいずれかの効果であってもよい。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態を示したものであり、本発明の範囲がこれらの実施形態のみに限定されることはない。

[0012] 1. γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類

[0013] 本発明の一実施形態に係る従属栄養性微細藻類において、 γ -アミノ酪酸の含有量は、乾燥藻体100g当たり100mg以上である。当該 γ -アミノ酪酸の含有量は、乾燥藻体100g当たり、例えば120mg以上、140mg以上、160mg以上、180mg以上、200mg以上、220mg以上、240mg以上、260mg以上、280mg以上、300mg以上、350mg以上、400mg以上、450mg以上、500mg以上、又は550mg以上であってよい。

[0014] 本実施形態に係る従属栄養性微細藻類は、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養することにより得られ、 γ -アミノ酪酸を少なくとも含まない培地中で培養することにより得られた従属栄養性微細藻類に比べて、藻体中の γ -アミノ酪酸の含有量が多い。すなわち、本実施形態に係る従属栄養性微細藻類は、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類である。なお、前記含まない培地とは、 γ -アミノ酪酸及び／又はL-グルタミン酸を含まない培地であることが望ましく、 γ -アミノ酪酸及び／又はL-グルタミン酸が1mg/L以下の培地であることが望ましい。

[0015] 本明細書において、「 γ -アミノ酪酸の含有量が多い」及び「 γ -アミノ酪酸高含有」とは、 γ -アミノ酪酸を含まない培地中で培養することにより得られた従属栄養性微細藻類（コントロール）の藻体中の γ -アミノ酪酸の含有量に比べて、藻体中の γ -アミノ酪酸の含有量が多いことをいう。サンプルとコントロールとを対比する場合、培地中の γ -アミノ酪酸及び／又は

Ｌ－グルタミン酸濃度以外は同じ培養条件にて培養を行い、サンプルの「 γ －アミノ酪酸の含有量が多い」及び「 γ －アミノ酪酸高含有」を判断してもよい。本実施形態に係る従属栄養性微細藻類の藻体中の γ －アミノ酪酸の含有量は、例えば、上記コントロールの藻体中の γ －アミノ酪酸の含有量の１．１倍以上、１．３倍以上、１．５倍以上、１．８倍以上、２．０倍以上、２．３倍以上、２．５倍以上、２．８倍以上、３．０倍以上、３．５倍以上、４．０倍以上、４．５倍以上、５．０倍以上、５．５倍以上、又は６．０倍以上であってよい。

[0016] 上記従属栄養性微細藻類としては、例えば、ヤブレッツボカビ類 (*Thraustocythiales*) 又はラビリンチュラ類 (*Labyrinthulales*) に属する微細藻類が挙げられ、これらの群から１種又は２種以上を用いることができる。

[0017] 上記ヤブレッツボカビ類に属する微細藻類としては、例えば、オーランチオキトリウム属 (*Aurantiochytrium*)、シゾキトリウム属 (*Schizochytrium*)、スラウストキトリウム属 (*Thraustochytrium*)、パリエティキトリウム属 (*Parietichytrium*)、又はウルケニア属 (*Ulkenia*) に属する微細藻類が挙げられ、これらの群から１種又は２種以上を用いることができる。

[0018] 上記ラビリンチュラ類に属する微細藻類としては、例えば、ラビリンチュラ属 (*Labyrinthula*) に属する微細藻類が挙げられる。

[0019] 上記オーランチオキトリウム属に属する微細藻類としては、例えば、オーランチオキトリウム リマシナム (*Aurantiochytrium limacinum*) 又はオーランチオキトリウム マングローベイ (*Aurantiochytrium mangrovei*) に属する微細藻類が挙げられる。オーランチオキトリウム リマシナムの株としては、例えば、SR-21株、4W-1b株、NIES3737株、ATCC MYA-1381株、mh0186株、及びF29-b株が挙げられる。オーランチオキトリウム マングローベイの株としては、例えば、18W-13a株、RCC893株、MP2株、BL10株、及びFB3株が挙げられ、これらの群から１種又は２種以上を用いることができる。

[0020] SR-21株は、工業技術院生命工学工業技術研究所（現在は、独立行政

法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 特許生物寄託センター (NITE-IPOD) に、「海生菌SR21菌株」の名称で平成7年(1994年)3月6日付けで寄託され、受託番号FERM BP-5034を取得し、また、財団法人発酵研究所に平成7年3月17日付けで寄託され、受入番号IFO 32693を取得している(特許文献4(特開平10-072590号公報)の段落[0035])。また、SR-21株は、ATCCからも、ATCC MYA-1381株(Strain designation SR21 [IFO 32693])として入手可能であり(非特許文献1:<https://www.atcc.org>) ; 非特許文献2:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、非特許文献2にはこのMYA-1381株に関し、登録日:2011年6月28日と記載されている。また、SR-21株は、当初シゾキトリウム属に分類されていたが、現在はオーランチオキトリウム属に分類されている(非特許文献3:Mycoscience (2007) 48:199-211.等参照)。

・NITE-IPOD:International Patent Organism Depositary (IPOD), Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation(NITE), #120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 2920818, Japan.

・ATCC:American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

[0021] 本実施形態に係る従属栄養性微細藻類はγ-アミノ酪酸の含有量が多いため、例えば、当該従属栄養性微細藻類を摂取、投与又は塗布することにより、脳機能改善作用、リラックス作用、ストレス軽減作用、及び血圧低下作用、コラーゲン生成促進作用、表皮細胞増殖作用、ヒアルロン酸合成促進作用などが得られることが期待される。したがって、本実施形態に係る従属栄養性微細藻類の用途は、各種組成物(例えば、食品、医薬品、皮膚外用剤、飼料等)が好ましく、例えば、動物(人を含む)が経口で摂取する物品がより好ましく、より好ましくは、食品、医薬品又は飼料である。すなわち、本実施形態に係る従属栄養性微細藻類は、好ましくは、食品用、医薬品用、又は

飼料用の従属栄養性微細藻類である。

[0022] 2. γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法

[0023] 上記 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類は、本発明の一実施形態に係る従属栄養性微細藻類の製造方法によって得られうる。当該従属栄養性微細藻類の製造方法は、具体的には、 γ -アミノ酪酸の含有量が乾燥藻体100g当たり100mg以上である従属栄養性微細藻類を製造する方法であり、すなわち、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法である。

[0024] 本実施形態に係る従属栄養性微細藻類の製造方法は、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程（以下「培養工程」ともいう。）を含む。当該培養工程を行うことにより、培地中の γ -アミノ酪酸を従属栄養性微細藻類に取り込ませ、蓄積させることができる。これにより、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させることができる。さらに、当該培養工程を行うことにより、従属栄養性微細藻類によって、培地中のL-グルタミン酸を γ -アミノ酪酸に変換させ、 γ -アミノ酪酸を当該微細藻類内に蓄積させることも可能である。また、当該培養工程を行うときに、 γ -アミノ酪酸を蓄積させること、及び／又は、グルタミン酸から γ -アミノ酪酸への変換及び変換された γ -アミノ酪酸を蓄積させることも可能である。したがって、上記培養工程により、 γ -アミノ酪酸及び／又はグルタミン酸を含まない培地中で培養した従属栄養性微細藻類に比べて γ -アミノ酪酸の含有量が多い従属栄養性微細藻類が培養されうる。なお、グルタミン酸は、L-グルタミン酸が好ましい。

[0025] 2-1. 従属栄養性微細藻類の培養

[0026] 2-1-1. 培地

[0027] 本実施形態に係る γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法は、 γ -アミノ酪酸を含む培地を調製する工程（以下「培地調製工程」ともいう。）を含んでいてよい。上記培養工程において用いられる培地は、当該培地調製工程において調製されうる。当該培地は、 γ -アミノ酪酸及び／又はグルタミン酸を含む培地でもよく、 γ -アミノ酪酸を少なくとも含む培地で

あることが、 γ -アミノ酪酸高含有の従属栄養性微細藻類を得やすいので、より好ましい。

[0028] 上記培養工程において用いられる培地中の γ -アミノ酪酸の含有量は、例えば10mg/L以上、20mg/L以上、30mg/L以上、40mg/L以上、50mg/L以上、60mg/L以上、70mg/L以上、80mg/L以上、90mg/L以上、又は100mg/L以上であってよい。

また、上記培養工程において用いられる培地中のグルタミン酸の含有量は、例えば10mg/L以上、20mg/L以上、30mg/L以上、40mg/L以上、50mg/L以上、60mg/L以上、70mg/L以上、80mg/L以上、90mg/L以上、又は100mg/L以上であってよい。

また、上記培養工程において用いられる培地中の γ -アミノ酪酸及びグルタミン酸の含有量は、上述した γ -アミノ酪酸含有量及びグルタミン酸含有量を適宜組み合わせた合計値であってよい。

[0029] 上記培地調製工程において、 γ -アミノ酪酸及び／又はグルタミン酸を含む培地は、例えば、 γ -アミノ酪酸及び／又はグルタミン酸を含む組成物又は γ -アミノ酪酸単体及び／又はグルタミン酸単体と、従属栄養性微細藻類の培養に必要な成分と、を用いて調製されうる。したがって、上記培地調製工程は、 γ -アミノ酪酸を含む組成物又は γ -アミノ酪酸を用いて γ -アミノ酪酸を含む培地を調製する工程であってよい。 γ -アミノ酪酸を含む組成物又は γ -アミノ酪酸単体の配合量を調整することにより、培地中の γ -アミノ酪酸の含有量を上記で述べた数値範囲に調整できる。また、グルタミン酸を含む培地は、例えば、グルタミン酸を含む組成物又はグルタミン酸単体と、従属栄養性微細藻類の培養に必要な成分と、を用いて調製されうる。したがって、上記培地調製工程は、グルタミン酸を含む組成物又はグルタミン酸を用いてグルタミン酸を含む培地を調製する工程であってよい。また、 γ -アミノ酪酸及びグルタミン酸の両方を含む培地を調製してもよい。

[0030] γ -アミノ酪酸を含む組成物は、例えば、焼酎粕、泡盛蒸留粕及び漬物な

どの発酵残渣及び発酵残液、並びに、 γ -アミノ酪酸を含む食品を用いた食品製造過程での廃液及び廃棄食品など、水溶性のアミノ酸の一種として γ -アミノ酪酸が存在しているものであればよい。グルタミン酸を含む組成物は、例えば、グルタミン酸やポリグルタミン酸を製造する際の食品製造過程、又は、グルタミン酸を含む食品を用いた食品製造過程での廃液及び廃棄食品など、水溶性のアミノ酸の一種としてグルタミン酸が存在しているものであればよい。なお、グルタミン酸は昆布；トマト等の野菜類；チーズ等の発酵食品や上述した焼酎蒸留粕、泡盛蒸留粕等の発酵残渣等に含まれる。 γ -アミノ酪酸を含む組成物及び／又はグルタミン酸を含む組成物といったこれらは従属栄養性微細藻類の培養に用いる培地の材料として利用可能である。培地の材料として、 γ -アミノ酪酸を含む組成物を少なくとも用いることが、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を得やすいので、好ましい。

[0031] 本発明者らは、培地を調製する際に用いる γ -アミノ酪酸及び／又はグルタミン酸を含む組成物として、泡盛蒸留粕等といった酒製造において発酵後に発生する残渣（以下、「酒製造残渣」ともいう）に着目した。泡盛蒸留粕は、泡盛の製造工程で発生し、その一部はもろみ酢、家畜の飼料、又は農作物の肥料として利用されているが、それでも捌ききれない場合は産業廃棄物として処理されている。泡盛蒸留粕等の酒製造残渣の廃棄量を低減させるため、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣の新たな活用法が模索されているという現状がある。本発明者らは、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣を培地の材料として活用することを検討した。その結果、本発明者らは、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣の液体に由来する成分に γ -アミノ酪酸が含まれており、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣の液体に由来する成分が上記培養工程に適していることを見出した。以下、上記培地調製工程について、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地を調製する場合を一例に挙げて説明する。

[0032] 本明細書における「酒」とは、特に限定されないが、原料から、麹菌及び酵母を用いて、発酵させて製造される酒が好ましい。酒製造残渣として、当該酒の製造工程において生じるスラリー状又は固形状の粕などが挙げられる

。当該酒製造残渣として、日本酒粕、泡盛蒸留粕、焼酎蒸留粕などが挙げられ、これらから選択される１種又は２種以上を用いることができる。このうち、蒸留粕である、泡盛蒸留粕及び／又は焼酎蒸留粕が好ましい。酒の原料は、特に限定されず、日本酒、泡盛、焼酎等の製造で一般的に使用されている原料（例えば、穀類及び芋類等）が挙げられ、より具体的な例として、例えば、米、大麦、小麦、蕎麦、大豆、トウモロコシ等の穀類；サツマ芋等の芋類；サトウキビ；栗等が挙げられ、これらから選択される１種又は２種以上を用いることができる。

[0033] 「泡盛蒸留粕」とは、泡盛の製造工程において生じる蒸留残渣であり、焼酎蒸留粕」とは、焼酎の製造工程において生じる蒸留残渣である。また、「日本酒粕」とは、日本酒の製造工程において生じる醸造残渣である。酒粕の状態は特に限定されないが、泡盛蒸留粕又は焼酎蒸留粕は、スラリー状等を挙げることができ、日本酒粕は、固形状等を挙げることができる。泡盛蒸留酒粕等の酒製造残渣は、アミノ酸及びクエン酸などの有機酸並びにミネラル及びビタミンなどを含有する液体と、タンパク質及び食物繊維などを含有する固体と、を含む。

[0034] 泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地は、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を少なくとも含んでいればよく、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の固体に由来する成分を含んでいてもよく、含んでいなくてもよい。

[0035] 泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地は、上記培地調製工程において調製されうる。培地調製工程において、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣は、例えば、固液分離されてもよく、されなくてもよい。

[0036] まず、一例として、培地調製工程は、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣を固液分離することを含む工程であってよい。具体的には、培地調製工程は、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣を固液分離して得られた液体に由来する成分を含む培地を調製する工程であってよい。

[0037] 上記固液分離は、例えば、遠心分離、沈降分離、ろ過分離、圧搾、及び市

販の固液分離機などの既知の手段によって行われてよい。

[0038] 固液分離して得られた液体は、例えば、そのまま用いられてよい。すなわち、培地調製工程において、固液分離して得られた液体そのものを用いて培地を調製してよい。例えば、当該液体と後述する添加物とを混合して、培地を調製してもよい。または、固液分離して得られた液体に少なくとも1つの処理が施されたものを用いて培地を調製してもよい。例えば、固液分離して得られた液体に乾燥処理を施して乾燥物を作製し、その後、当該乾燥物と後述する添加物と水とを混合して培地を調製してもよい。

[0039] 固液分離される泡盛蒸留粕等の酒製造残渣は、例えば、少なくとも1つの処理が施された後に用いられてもよい。当該少なくとも1つの処理は、例えば、冷蔵、冷凍、加熱、濃縮、滅菌、及び乾燥から選択されてよい。

[0040] 次に、他の一例として、培地調製工程は、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣を固液分離することを含まない工程であってもよい。具体的には、培地調製工程は、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣を固液分離せずに用いて当該泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地を調製する工程であってもよい。

[0041] 固液分離せずに用いられる泡盛蒸留粕等の酒製造残渣は、例えば、熟成もろみの蒸留において生じた泡盛蒸留粕（蒸留残渣）等の酒製造残渣に固液分離以外の少なくとも1つの処理が施されたものであってもよい。当該少なくとも1つの処理は、例えば、冷蔵、冷凍、加熱、濃縮、滅菌、及び乾燥から選択されてよい。例えば、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣に乾燥処理を施して乾燥物を作製し、その後、当該乾燥物と後述する添加物と水とを混合して培地を調製してもよい。

[0042] 培地調製工程において調製される培地は、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分以外に、添加物を含んでいてよい。すなわち、培地調製工程は、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分と、添加物と、を含む培地を調製する工程であってよい。

[0043] 上記添加物としては、例えば、糖類、ミネラル成分（天然海水及び人工海

水を含む）、有機酸、無機酸、有機塩基、無機塩基、ビタミン、アミノ酸、ペプチド、及びタンパク質が挙げられる。培地に含まれる添加物の種類は、培養される従属栄養性微細藻類の種類に応じて当業者によって適宜選択されてよい。

[0044] 上記糖類としては、例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース、マルトース、シュクロース、ラクトース、オリゴ糖、及び糖アルコール（グリセロールなど）から選択される少なくとも1つの糖類が挙げられる。培地中の糖類の量は、培養される従属栄養性微細藻類の種類に応じて当業者によって適宜調整されてよい。

[0045] 上記ミネラル成分としては、例えば、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸アンモニウム、硫酸銅、硫酸ニッケル、及び硫酸亜鉛などの硫酸塩；リン酸カリウムなどのリン酸塩；炭酸カルシウムなどの炭酸塩；塩化コバルト、塩化マンガン、塩化ナトリウム、及び塩化カルシウムなどの塩化物；アルカリ金属酸化物；モリブデン酸ナトリウムなどのモリブデン酸塩；亜セレン酸ナトリウムなどの亜セレン酸塩；臭化カリウム及びヨウ化カリウムなどのハロゲン化物；天然海水塩；レッドシーソルト（Red Sea Salt）などの人工海水塩；から選択される少なくとも1つのミネラル成分が挙げられる。培地中のミネラル成分の量は、培養される従属栄養性微細藻類の種類に応じて当業者によって適宜調整されてよい。

[0046] 培地調製工程において、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地のpHは、必要に応じて調整されてよい。例えば、培地調製工程において、上記添加物を添加する前及び／又は後において、酸又は塩基を添加してpHを調整してもよい。当該pHは、培養される従属栄養性微細藻類の種類に応じて当業者によって適宜調整されてよい。

[0047] 培地調製工程において、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地は、好ましくは滅菌される。すなわち、培地調製工程は、好ましくは、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地を調製及び滅菌する工程である。当該滅菌は、オートクレーブ滅菌、濾過滅菌、

煮沸滅菌、及び放射線滅菌などの既知の手段によって行われてよい。

[0048] 例えば、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣の固体部分が培地中に残存している場合、高温下で当該培地を滅菌することにより、培地中の固体部分の一部又は全部が可溶化することがある。このように、滅菌する処理が、培地に含まれる泡盛蒸留粕等の酒製造残渣由来の固体部分を可溶化させる処理を兼ねていてもよい。

[0049] 泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地は、液体培地でもよく固体培地でもよい。従属栄養性微細藻類を大量培養する場合には、固体培地よりも液体培地の方が適している。

[0050] 以上、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地を例示したが、本実施形態に係る γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法において用いられる培地はこれに限定されず、 γ -アミノ酪酸を含む培地であればよい。また、培地調製工程として泡盛蒸留粕を用いて γ -アミノ酪酸を含む培地を調製する工程を主に例示したが、培地調製工程はこれに限定されず、例えば、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣以外の γ -アミノ酪酸を含む組成物、又は γ -アミノ酪酸を用いて、培地を調製してもよい。

[0051] 2-1-2. 培養条件

[0052] 培養工程における培養温度、培養期間、及び培養法などの培養条件は、従属栄養性微細藻類を培養可能な条件であればよい。例えば、温度は5～40℃、好ましくは10～35℃、より好ましくは20～28℃、さらにより好ましくは25℃±1℃にて、通常1～10日間、好ましくは3～7日間、例えば4～5日間培養を行い、通気攪拌培養、振とう培養、又は静置培養で行うことができる。また、培地中の γ -アミノ酪酸及び／又はグルタミン酸の各濃度を調整してから培養を開始してもよいが、培養開始後の培養工程でこれらの各濃度を所定濃度になるように調整してもよく、例えば、培養工程において、培養開始後に、 γ -アミノ酪酸及び／又はグルタミン酸を含む組成物を培地に流加して、培地中のこれらの濃度を調整してもよい。好ましくは、培養工程において、培養開始後に、グルタミン酸を含む組成物を流加し

ながら、培地中のグルタミン酸濃度が所定濃度になるように調整することであり、このときの培地中のグルタミン酸濃度（グルタミン酸Na換算）は、特に限定されないが、例えば、 $0.001 \sim 50 \text{ g/L/hr}$ である。

[0053] 従属栄養性微細藻類を大量培養する場合、培養工程は、好ましくは、種培養と本培養とに分けて、又は、種培養と前培養と本培養とに分けて行われる。具体的には、培養工程は、種培養用の培地中で従属栄養性微細藻類を培養して種藻を得る種培養工程と、 γ -アミノ酪酸を含む（例えば泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む）本培養用の培地中で当該種藻を培養する本培養工程と、を含むことが好ましい。または、培養工程は、上記種培養工程と、 γ -アミノ酪酸（例えば泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分）を含む前培養用の培地中で当該種藻を培養する前培養工程と、 γ -アミノ酪酸（例えば泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分）を含む本培養用の培地中に前培養培地を加えて培養する本培養工程と、を含むことが好ましい。

[0054] 種培養用の培地は、例えば、従属栄養性微細藻類を培養する培地として既知の培地であってもよく、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地であってもよい。効率的に大量培養するためには、種培養用の培地は、従属栄養性微細藻類を培養する培地として既知の培地であることが好ましい。種培養用の培地として γ -アミノ酪酸（例えば泡盛蒸留粕等の酒製造残渣中の液体に由来する成分）を含む培地を用いる場合、種培養用の培地の成分組成は、前培養用又は本培養用の培地と同一でもよく、異なってもよい。前培養用の培地の成分組成は、本培養用の培地と同一でもよく、異なってもよい。

[0055] 従属栄養性微細藻類は、適当な細胞培養手段を有する培養装置で培養されてよい。「細胞培養手段」とは、細胞を培養するための機能を有する手段を意味し、例えば、培養槽である。当該培養槽は、攪拌装置、振動装置、温度制御装置、pH調節装置、濁度測定装置、光制御装置、 O_2 、 CO_2 などの気体濃度測定装置、及び圧力測定装置から選択される1又は複数の装置を有し

てもよい。当該培養槽は濃縮・分離槽と同一の槽であってもよく、濃縮・分離槽とは別の槽であってもよい。培養槽が濃縮・分離槽と別の槽である場合、適切な手段（例えば流路）により、培養槽と濃縮・分離槽とが連結されていてもよい。

[0056] 2-2. 従属栄養性微細藻類の回収

[0057] 本実施形態に係る γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法は、さらに、従属栄養性微細藻類を回収する工程（以下「回収工程」ともいう。）を含んでいてよい。当該回収工程は、具体的には、上記で説明した培養工程によって培養された従属栄養性微細藻類を回収する工程である。

[0058] 回収工程において、従属栄養性微細藻類は、培地から分離して回収されてもよく、培地と共に回収されてもよい。すなわち、回収工程において回収される従属栄養性微細藻類は、培地から分離された従属栄養性微細藻類であってもよく、従属栄養性微細藻類と培地との混合物であってもよい。培地から分離された従属栄養性微細藻類を回収する場合、回収工程は、培養された従属栄養性微細藻類を培地から分離する工程（以下「分離工程」ともいう。）を含んでいてよい。分離工程において、培地と従属栄養性微細藻類との分離は、例えば、遠心分離又は濾過などの既知の手段によって行われてよい。

[0059] 2-3. 従属栄養性微細藻類の乾燥

[0060] 本実施形態に係る γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法は、さらに、従属栄養性微細藻類を乾燥する工程（以下「乾燥工程」ともいう。）を含んでいてよい。乾燥工程において、培養された従属栄養性微細藻類が乾燥され、当該従属栄養性微細藻類は乾燥藻体となる。当該乾燥工程は、例えば、上記回収工程よりも後に行われてよい。

[0061] 乾燥される従属栄養性微細藻類は、例えば、培地から分離された従属栄養性微細藻類であってもよく、従属栄養性微細藻類と培地との混合物であってもよい。乾燥を効率的に行うためには、乾燥される従属栄養性微細藻類は、培地から分離された従属栄養性微細藻類であることが好ましい。すなわち、好ましい実施態様において、上記回収工程は上記分離工程を含む工程であり

、且つ、上記乾燥工程は培地から分離された従属栄養性微細藻類を乾燥する工程である。

[0062] 上記乾燥は、既知の手段によって行われてよい。例えば、当該乾燥は、加熱乾燥、低温乾燥、通風乾燥、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥、自然乾燥、及び市販の乾燥装置などから選択される少なくとも1つによって行われてよい。

[0063] 2-4. 従属栄養性微細藻類の粉砕

[0064] 本実施形態に係る γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法は、上記で説明した工程以外に、従属栄養性微細藻類を粉砕する工程（以下「粉砕工程」ともいう。）を含んでいてよい。粉砕工程は、例えば、上記回収工程の後且つ上記乾燥工程の前、又は、上記乾燥工程の後に行われてよい。粉砕工程は、好ましくは、上記乾燥工程の後に行われる。乾燥工程後の従属栄養性微細藻類（乾燥藻体）は、水分量が低下しているため、粉砕が容易であり、また、小さい粒度となるように粉砕することもできる。当該粉砕は、既知の粉砕手段によって行われてよい。

[0065] 本実施形態に係る製造方法によって、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を得ることができ、このような微細藻類を得るための製造方法であってもよい。

ところで、本発明者らは先に、特願2022-6913（特許文献5：特許7218023号公報）において、従属栄養性微細藻類自体のにおい及び味を改善する技術を提案した。特願2022-6913に開示されているように、本発明者らは、泡盛蒸留粕の液体に由来する成分を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、当該培養された従属栄養性微細藻類を乾燥する工程と、を行うことにより、従属栄養性微細藻類のにおい及び味を改善できることを見出した。

[0066] 本実施形態において製造される従属栄養性微細藻類のにおい及び味を改善したい場合、例えば、特願2022-6913において開示された技術の適用が検討されてもよい。当該技術を適用する場合、本実施形態に係る γ -ア

ミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法は、例えば、泡盛蒸留粕等の酒製造残渣の液体に由来する成分を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、当該培養された従属栄養性微細藻類を乾燥する工程と、を含んでいてよい。また、当該製造方法は、上記粉碎工程をさらに含んでいてもよい。粉碎工程を行なうことで、得られる乾燥藻体の粒度を低減できる。これにより、乾燥藻体を含む物品の口当たりを向上させたり、乾燥藻体を他の原料に配合した場合の分散性を向上させたりすることが可能である。なお、本実施形態に係る γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を製造する際に、特願2022-6913（特許文献5：特許7218023号公報）に記載の製造方法を適用してもよい。

[0067] 3. γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を含有する食品、医薬品、又は飼料等

[0068] 本発明は、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を含有する組成物（例えば食品、医薬品、飼料、又は皮膚外用剤など）も提供することができる。 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類は、具体的には、 γ -アミノ酪酸の含有量が乾燥藻体100g当たり100mg以上である従属栄養性微細藻類である。当該従属栄養性微細藻類の詳細は、上記1. 及び2. で説明したとおりであり、当該説明が本実施形態にも当てはまる。

[0069] 本明細書において「食品」とは、人が食べるために直接使用できる、食用可能な状態のものをいう。飼料（餌料を含む）などの人以外の動物に与えられる食物は、本明細書に記載されている「食品」に該当しない。

[0070] 食品には、例えば、一般食品、特定用途食品、及び保健機能食品（特定保健用食品、栄養機能食品、及び機能性表示食品）が含まれる。一般食品には、いわゆる健康食品と呼ばれるものが含まれ、例えば、機能性食品、栄養補助食品、健康補助食品、及びサプリメントなどが含まれる。

[0071] 食品の種類としては、例えば、肉加工品、水産加工品、乳加工品、野菜加工品、果実加工品、油脂食品、嗜好食品、調味料、菓子類、冷凍食品、レトルト食品、缶詰食品、びん詰め食品、及びインスタント食品などが挙げられ

るが、これらに限定されない。

[0072] 飼料は、人以外の動物に与えられる餌である。飼料には、例えば、ペットフード、家畜飼料、家禽飼料、及び養魚飼料が含まれる。飼料が与えられる動物としては、例えば、家畜類（牛、豚、鶏、馬、ヒツジ、ヤギなど）、魚類、貝類、及びペット（イヌ、ネコ、ハムスター、ウサギ、インコ、熱帯魚、爬虫類、両生類、昆虫など）などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0073] γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類含有の組成物（例えば食品、医薬品、及び飼料等）の形態としては、例えば、液体状、固体状、半固体状、ペースト状、顆粒状、粉末状、及びカプセル状などが挙げられるが、特に限定されない。

[0074] 本実施形態に係る γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類含有の組成物（例えば食品、医薬品、飼料、皮膚外用剤、経口組成物等）は γ -アミノ酪酸の含有量が多いため、当該食品、医薬品、又は飼料等の摂取、投与又は塗布など使用により、脳機能改善作用、リラックス作用、ストレス軽減作用、及び血圧低下作用などが得られることが期待される。

[0075] よって、本実施形態に用いる γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類は、脳機能改善作用、リラックス作用、ストレス軽減作用、及び血圧低下作用の組成物に含有させることができ、 γ -アミノ酪酸によって予防、改善又は治療が可能な症状又は疾患の予防、改善又は治療に用いることができる。

また、本実施形態は、脳機能改善用組成物、リラックス用組成物、ストレス軽減用組成物、及び血圧低下用組成物などの各種組成物又は各種薬剤の製造における又は製造のために用いる、前記 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類又はその使用を提供することもできる。

また、本実施形態は、前記 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類又はこれを含む組成物を用いる、 γ -アミノ酪酸によって予防、改善又は治療が可能な症状又は疾患の予防方法、改善方法又は治療方法を提供することができる。

また、本実施形態は、 γ -アミノ酪酸によって予防、改善又は治療が可能な症状又は疾患の予防用、改善用又は治療用の前記 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類又はこれを含む組成物を提供することもできる。

また、本実施形態に係る組成物には、上述した症状又は疾患、これらに関連する症状又は疾患などに関する予防、改善又は治療等をコンセプトとし、必要に応じてその旨を表示した食品、サプリメントなどを包含してもよく、摂取用の組成物が好適である。

[0076] 本実施形態において、「予防」とは、適用対象における症状若しくは疾患の発症の防止若しくは発症の遅延、又は適用対象における症状若しくは疾患の発症の危険性を低下させること等をいう。本技術において、「改善」とは、適用対象における疾患、症状又は状態の好転又は維持；悪化の防止又は遅延；進行の逆転、防止又は遅延をいう。また、「非治療目的」とは、医療行為、すなわち、治療による人体への処置行為を含まない概念である。例えば、健康増進、美容行為等が挙げられる。

[0077] 4. 上記 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類含有組成物（例えば、食品、医薬品、飼料、又は皮膚外用剤等）の製造方法

[0078] 本発明は、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を含有する組成物（例えば、食品、医薬品、飼料、皮膚外用剤など）の製造方法も提供する。本発明の一実施形態に係る製造方法は、具体的には、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で培養された従属栄養性微細藻類（ γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類）を用いることを含む。

[0079] 上記 γ -アミノ酪酸を含む培地中で培養された従属栄養性微細藻類は、好ましくは、本発明の一実施形態に係る γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法によって製造された従属栄養性微細藻類である。すなわち、本実施形態に係る組成物（例えば、食品、医薬品、又は飼料、皮膚外用剤等）の製造方法は、好ましくは、本発明の一実施形態に係る γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類の製造方法において説明した工程を含んでいてよい。当該工程の詳細は、上記2. で説明したとおりである。

[0080] 本実施形態に係る組成物の製造方法は、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類と、組成物として許容される1以上の成分と、を用いることを含む。本実施形態に係る食品の製造方法は、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類と、食品として許容される1以上の成分と、を用いることを含む。本実施形態に係る医薬品の製造方法は、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類と、医薬品として許容される1以上の成分と、を用いることを含む。本実施形態に係る飼料の製造方法は、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類と、飼料として許容される1以上の成分と、を用いることを含む。

[0081] 本実施形態に係る製造方法によって製造される γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類含有組成物（例えば、食品、医薬品、及び飼料等）の詳細は、上記3. で説明したとおりであり、当該説明が本実施形態にも当てはまる。

[0082] 5. 従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させる方法

[0083] 上記で述べたとおり、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養することにより、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させることができる。上記培養により、培地中の γ -アミノ酪酸を従属栄養性微細藻類に取り込ませ、蓄積させることができるからである。したがって、本発明は、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させる方法（以下「 γ -アミノ酪酸含有量増加方法」ともいう。）も提供する。

[0084] 本発明の一実施形態に係る γ -アミノ酪酸含有量増加方法は、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程を含む。当該工程は、上記2. で説明した培養工程と同じである。また、本実施形態に係る γ -アミノ酪酸含有量増加方法は、培養工程以外に、培地調製工程、回収工程、及び乾燥工程から選択される少なくとも1つの工程を含んでよい。これらの工程の詳細は、上記2. で説明したとおりであり、当該説明が本実施形態にも当てはまる。

[0085] 本明細書において、「 γ -アミノ酪酸の含有量を増加させる」とは、従属

栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を上記培養工程により増加させることをいう。当該増加は、上記培養工程前における従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を、例えば1.1倍以上、1.3倍以上、1.5倍以上、1.8倍以上、2.0倍以上、2.3倍以上、2.5倍以上、2.8倍以上、3.0倍以上、3.5倍以上、4.0倍以上、4.5倍以上、5.0倍以上、5.5倍以上、又は6.0倍以上に増加させることであってよい。

[0086] 6. 培地から γ -アミノ酪酸を回収する方法

[0087] 上記で述べたとおり、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養することにより、培地中の γ -アミノ酪酸を従属栄養性微細藻類に取り込ませ、蓄積させることができる。培地中の γ -アミノ酪酸を取り込んだ従属栄養性微細藻類を回収することにより、結果として、 γ -アミノ酪酸を培地から回収することができる。したがって、本発明は、培地から γ -アミノ酪酸を回収する方法も提供する。

[0088] 本発明の一実施形態に係る培地から γ -アミノ酪酸を回収する方法は、 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、当該従属栄養性微細藻類を回収する工程と、を含む。これらの工程は、それぞれ、上記2.で説明した培養工程及び回収工程と同じである。また、本実施形態に係る培地から γ -アミノ酪酸を回収する方法は、培養工程及び回収工程以外に、培地調製工程及び／又は乾燥工程を含んでいてよい。これらの工程の詳細は、上記2.で説明したとおりであり、当該説明が本実施形態にも当てはまる。

[0089] 7. 組成物から γ -アミノ酪酸を回収する方法

[0090] 上記で述べたとおり、 γ -アミノ酪酸を含む組成物を用いて調製された培地中で従属栄養性微細藻類を培養することにより、培地中の γ -アミノ酪酸を従属栄養性微細藻類に取り込ませ、蓄積させることができる。培地中の γ -アミノ酪酸を取り込んだ従属栄養性微細藻類を回収することにより、結果として、上記組成物に含まれていた γ -アミノ酪酸を培地から回収すること

ができる。したがって、本発明は、組成物から γ -アミノ酪酸を回収する方法も提供する。

[0091] 本発明の一実施形態に係る組成物から γ -アミノ酪酸を回収する方法は、 γ -アミノ酪酸を含む組成物を用いて培地を調製する工程と、当該培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、当該従属栄養性微細藻類を回収する工程と、を含む。これらの工程は、それぞれ、上記2. で説明した培地調製工程、培養工程、及び回収工程と同じである。また、本実施形態に係る組成物から γ -アミノ酪酸を回収する方法は、培地調製工程、培養工程、及び回収工程以外に、乾燥工程を含んでいてよい。乾燥工程の詳細は、上記2. で説明したとおりであり、当該説明が本実施形態にも当てはまる。

[0092] 本実施形態の培地調製工程において用いられる組成物は、例えば泡盛蒸留粕であってよいが、本発明の効果を損なわない限り特に限定されない。

[0093] 8. 本発明は、以下の構成又は技術的特徴を適宜採用することができる。

- ・ [1] γ -アミノ酪酸の含有量が、乾燥藻体100g当たり100mg以上である、従属栄養性微細藻類。
- ・ [2] 前記従属栄養性微細藻類が、ヤブレツボカビ類 (*Thraustochytriales*) に属する微細藻類である、前記 [1] に記載の従属栄養性微細藻類。
- ・ [3] 前記従属栄養性微細藻類が、オーランチオキトリウム属 (*Aurantiochytrium*) に属する微細藻類である、前記 [1] 又は [2] に記載の従属栄養性微細藻類。
- ・ [4] 前記 [1] ~ [3] のいずれか1つに記載の従属栄養性微細藻類を含有する、組成物。好ましくは、食品、医薬品、又は飼料である。

[0094] ・ [5] γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程を含む、従属栄養性微細藻類の製造方法、又は、従属栄養性微細藻類含有組成物の製造方法。当該従属栄養性微細藻類は、前記 [2] 又は [3] に記載の従属栄養性微細藻類であることが好適である。当製造された従属栄養性微細藻類は、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類であることが好適である。当該培地は、酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地を調製及

び滅菌した γ -アミノ酪酸を含む培地である。

・〔6〕 前記培養工程後に、前記従属栄養性微細藻類を回収する工程を含む、前記〔5〕記載の製造方法。

・〔7〕 前記培養工程中又は当該工程前に、 γ -アミノ酪酸を含む組成物を用いて培地を調製する工程を含む、前記〔5〕又は〔6〕に記載の製造方法。

・〔8〕 γ -アミノ酪酸を含む組成物を用いて培地を調製する工程と、前記培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、前記従属栄養性微細藻類を回収する工程と、を含む、従属栄養性微細藻類の製造方法、又は、従属栄養性微細藻類含有組成物の製造方法。

・〔9〕 従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させるための、又は、培地から γ -アミノ酪酸を回収するための、又は、食品、医薬品若しくは飼料を製造するための、前記〔5〕～〔8〕のいずれか1つに記載の製造方法。

・〔10〕 前記培地が、(i) γ -アミノ酪酸含有組成物を調整及び滅菌して得られた培地である、又は、(ii) 酒製造残渣又は酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地を調整及び滅菌して得られた培地である、前記〔1〕～〔9〕に記載のいずれか1つの製造方法。培養工程中又は当該工程前に、酒製造残渣又は酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地を調整及び滅菌する工程を含んでもよい。

[0095] ・〔11〕 前記〔5〕～〔10〕のいずれか1つに記載の製造方法により得られた、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を用いる、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を含む組成物の製造方法。

・〔12〕 前記〔5〕～〔10〕のいずれか1つに記載の製造方法により得られた、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類又はこの使用。

[0096] ・〔13〕 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程を含む、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させる方法。

- ・〔14〕 γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、前記従属栄養性微細藻類を回収する工程と、を含む、培地から γ -アミノ酪酸を回収する方法。

- ・〔15〕 γ -アミノ酪酸を含む組成物を用いて培地を調製する工程と、前記培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、前記従属栄養性微細藻類を回収する工程と、を含む、組成物から γ -アミノ酪酸を回収する方法。

- ・〔16〕 γ -アミノ酪酸を含む培地中で培養された従属栄養性微細藻類を用いること、又は、前記〔5〕～〔10〕のいずれか1つに記載の製造方法により得られる γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を用いることを含む、組成物（例えば、食品、医薬品、又は飼料など）又は当該組成物の製造方法。当該培養された従属栄養性微細藻類は、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類であることが、好ましい。

- ・〔17〕 前記培地が、酒製造残渣又は酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地を調整及び滅菌して得られた培地である、前記〔13〕～〔16〕に記載のいずれか1つの方法。培養工程中又は当該工程前に、酒製造残渣又は酒製造残渣中の液体に由来する成分を含む培地を調整及び滅菌する工程を含んでもよい。

- ・〔18〕 前記従属栄養性微細藻類が、前記〔2〕又は〔3〕に記載の従属栄養性微細藻類である、前記〔13〕～〔17〕に記載のいずれか1つの方法。

[0097] ・〔19〕 前記従属栄養性微細藻類が、抑制型神経伝達、脳機能改善、リラックス、ストレス軽減、血圧低下、睡眠の質改善から選択される1種又は2種以上に用いられるものである、前記〔1〕～〔4〕のいずれか1つに記載の従属栄養性微細藻類、又は、前記〔5〕～〔18〕に記載のいずれか1つの方法。

- ・〔20〕 前記組成物が、抑制型神経伝達、脳機能改善、リラックス、ストレス軽減、血圧低下、不安感の低減、睡眠の質改善から選択される1種又

は2種以上に用いられるものである、前記〔4〕に記載の組成物、又は、前記〔5〕～〔18〕に記載のいずれか1つの方法。

・〔21〕 前記脳機能改善が、過食症、うつ病、認知機能障害などから選択される1種又は2種以上の疾患又は症状の予防・改善である、前記〔19〕に記載の組成物、又は、前記〔20〕に記載の方法。前記認知機能障害として、例えば軽度認知機能障害、アルツハイマー病、老化による認知機能障害（例えば、記憶力、空間認知力等の低下等）等；などから選択される1種又は2種以上が挙げられる。

実施例

[0098] 以下で実施例を参照して本発明をより詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0099] <試験例1>

[0100] (1) 実施例1の乾燥藻体の製造

以下の手順に従って従属栄養性微細藻類を培養し、乾燥藻体を得た。

[0101] a) 泡盛蒸留粕上清培地の調製

泡盛製造工場から入手した泡盛蒸留粕（蒸留残渣）を6000×gで10分間遠心分離した。得られた液体（上清）をpH6に調整し、泡盛蒸留粕上清培地を得た。

[0102] b) GTY培地の調製

蒸留水1Lに対して、グルコース20g、酵母エキス5g、トリプトン10g、及びレッドシーソルト（Red Sea Salt）16.7gを添加した。これにより、GTY培地を得た。

[0103] c) 種培養

NITE（独立行政法人製品評価技術基盤機構）から分譲されたオーランチオキトリウム リマシナムSR-21株（FERM BP-5034）を、GTY培地で3日間振とう培養し、種藻を得た。

[0104] d) 本培養

90Lジャーファメンターに、泡盛蒸留粕上清培地30L、水道水30L

、グルコース 1.2 kg、レッドシーソルト 1 kg を入れ、121℃で20分間蒸気滅菌した。これにより、泡盛蒸留粕中の液体に由来する成分を含む培地（以下「泡盛蒸留粕含有培地」ともいう。）を得た。当該泡盛蒸留粕含有培地に、種藻を含む G T Y 培地を播種し、好気条件下で24時間攪拌培養した。

[0105] e) 回収及び乾燥

本培養後の培地を6000×gで10分間遠心分離し、培養されたオーランチオキトリウム リマシナム（藻体）を培地から分離した。分離された固形分（藻体）を回収し、ドラムドライヤーを用いて150℃で1分間乾燥して、実施例1の乾燥藻体を得た。

[0106] (2) 比較例1の乾燥藻体の製造

上記(1)c)と同一の条件でオーランチオキトリウム リマシナムを培養し、比較例1の藻体を得た。その後、上記(1)e)の手順に従い、比較例1の乾燥藻体を得た。

[0107] (3) γ-アミノ酪酸の含有量の測定

実施例1の培養（本培養）0時間の培地、実施例1の乾燥藻体、比較例1の培養0時間の培地、及び比較例1の乾燥藻体のそれぞれについて、γ-アミノ酪酸の含有量を測定した。当該測定は、ニンヒドリン試液によるポストカラム誘導体化法によるアミノ酸自動分析計を用いて実施された。

[0108] 測定結果を下記表1に示す。なお、実施例1の試験については2回実施したため、表1において、それぞれの試験で得られた培地及び乾燥藻体を「実施例1-1」、「実施例1-2」と表記した。

[0109] [表1]

	培養0時間の培地中の γ-アミノ酪酸の含有量 [mg/L]	乾燥藻体中の γ-アミノ酪酸の含有量 [mg/100g]
実施例1-1	96	557
実施例1-2	66	420
比較例1	1以下	88

[0110] 上記表1の結果から、泡盛蒸留粕含有培地を用いることにより、GTY培地に比べて藻体中の γ -アミノ酸含有量を増加できることが分かる。これにより、本発明によって藻体中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加できることが確認された。また、本発明によって γ -アミノ酪酸高含有藻体が得られることが確認された。

[0111] <試験例2>

[0112] (1) 実施例2の乾燥藻体の製造

以下の手順に従って従属栄養性微細藻類を培養し、乾燥藻体を得た。

[0113] 上記試験例1の(1) a) ~ c) の手順に従い、培地の調製と種培養を行った。その後、下記のd) 前培養及びe) 本培養を行った。

[0114] d) 前培養

90Lジャーファメンターに、泡盛蒸留粕上清培地15L、水道水45L、グルコース1.2kg、レッドシーソルト1kgを入れ、121℃で20分間蒸気滅菌した。これにより、泡盛蒸留粕含有培地を得た。当該泡盛蒸留粕含有培地に、種藻を含むGTY培地を播種し、好気条件下で24時間攪拌培養した。

[0115] e) 本培養

600Lジャーファメンターに、泡盛蒸留粕上清培地150L、水道水150L、グルコース12kg、レッドシーソルト5kgを入れ、121℃で20分間蒸気滅菌した。これにより、泡盛蒸留粕含有培地を得た。当該泡盛蒸留粕含有培地に、前培養培地60Lを移し、好気条件下で34時間攪拌培養した。

[0116] 本培養後、上記試験例1の(1) e) の手順に従い、実施例2の乾燥藻体を得た。

[0117] (2) γ -アミノ酪酸の含有量の測定

上記試験例1の(3)に記載された方法により、本培養開始時の培地、本培養終了時の培地、及び実施例2の乾燥藻体のそれぞれについて、 γ -アミノ酪酸の含有量を測定した。

[0118] 測定結果を下記表 2 に示す。

[0119] [表2]

	γ-アミノ酪酸の含有量
本培養開始時の培地	106 [mg/L]
本培養終了時の培地	27 [mg/L]
実施例2の乾燥藻体	278 [mg/100g]

[0120] 上記表 2 の結果から、培地 1 L 当たりのγ-アミノ酪酸の含有量は、本培養工程を経て 79 mg 減少したことが分かる ($106 - 27 = 79$ [mg/L])。当該減少分のγ-アミノ酪酸が全て藻体内に取り込まれたと仮定すると、得られた乾燥藻体の量が培地 1 L 当たり 24 g であったことから、乾燥藻体 100 g 当たりのγ-アミノ酪酸の含有量は計算上では約 329 mg でありうる ($79 / 24 \times 100 \div 329$ [mg/100g (乾燥藻体)])。しかしながら、実際の測定結果によれば、乾燥藻体 100 g 当たりのγ-アミノ酪酸の含有量は 278 mg であったことから、培地中のγ-アミノ酪酸減少分の約 84.5% が乾燥藻体中に取り込まれ、蓄積されたと考えられる ($278 / 329 \times 100 \div 84.5$ [%])。

[0121] これにより、γ-アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養すると、培地中のγ-アミノ酪酸が従属栄養性微細藻類内に取り込まれることで、藻類中のγ-アミノ酪酸の含有量を増加できることが確認できた。

[0122] <試験例 3>

[0123] (1) 実施例 3 の乾燥藻体の製造

以下の手順に従って従属栄養性微細藻類を培養し、乾燥藻体を得た。

[0124] a) 焼酎蒸留粕上清培地の調製

「泡盛蒸留粕（残渣）」を、焼酎製造工場から入手した「芋（サツマイモ）焼酎蒸留粕（残渣）」に代えた以外は、上記試験例 1 の「(1) a) 泡盛蒸留粕上清培地の調製」に従って、焼酎蒸留粕上清培地（芋焼酎蒸留粕上清培地）を得た。

[0125] b) G T Y 培地の調製及び c) 種培養

試験例3における「b) G T Y培地の調製」「c) 種培養」は、上記試験例1の「(1) b)」 「(1) c)」に従って、行った。藻株は、オーランチオキトリウム リマシナムSR-21株 (FERM BP-5034) を用いた。

200 mLの培養培地を入れて栓をした500 mL容三角フラスコを、オートクレーブにて121℃で20分間で滅菌した。これにより、焼酎蒸留粕中の液体に由来する成分を含む培地（以下、「焼酎蒸留粕含有培地」ともいう。）を得た。栓は、通気性のあるシリコンゴム連続気泡スポンジプラグを用いた。また、フラスコ培養に用いる培養培地が、25%焼酎蒸留粕含有培地である場合には、当該培地は、焼酎蒸留粕上清培地50 mL、水150 mL、グルコース4 g、レッドシーソルト3.34 gを含む培地である。25%焼酎粕含有培地の「%」は、「焼酎蒸留粕上清培地の体積量 (mL) / [焼酎蒸留粕上清培地の体積量 (mL) 及び水の体積量 (mL) の合計量 (mL)] 」 × 100 (%) にて、求めることができる。当該合計量は、培地の体積量 (mL) でもある。

また、焼酎蒸留粕上清培地の体積量 (mL) 及び水の体積量 (mL) の割合を調製して、50%、75%、100%の焼酎蒸留粕含有培地を調製した。焼酎蒸留粕含有培地中のグルコース、レッドシーソルトの濃度は、焼酎蒸留粕上清培地の濃度を変化させた場合でも、「25%」のときと同じ「グルコース4 g、レッドシーソルト3.34 g / 体積量200 mL」になるように調製した。なお、100%の焼酎蒸留粕含有培地は、前記合計量200 mL当たり、水の体積量 (mL) 0 mL 及び焼酎蒸留粕上清培地の体積量 (mL) 200 mLである。

[0126] d) フラスコ培養

焼酎蒸留粕含有培地に、種藻を含むG T Y培地を播種し、好気条件下で36時間培養した。このときの培養条件は、25℃で、110ストローク／分の振とうであった。

[0127] 25%焼酎粕培養培地を用いた試験例を実施例3-1とし、焼酎粕培養培

地中の焼酎粕上清培地含有率を 50%、75%、100%に代えた試験例を、それぞれ、実施例 3-2、実施例 3-3、実施例 3-4 とした。

[0128] e) 回収及び乾燥

実施例 3 における回収及び乾燥は、フラスコ培養後、上記試験例 1 の「(1) e)」の手順に従って、実施例 3-1、実施例 3-2、実施例 3-3、実施例 3-4 の各乾燥藻体を得た。

また、 γ アミノ酪酸の含有量の測定は、上記試験例 1 の「(3) γ -アミノ酪酸の含有量の測定」に従って、行った。

実施例 3 における各測定結果を下記表 3 に示す。DCW は、乾燥藻体重量の略である。藻体内 GABA 実測値/理論値は、〔培養終了時の藻体内 GABA 実測値 [mg/100g] / 培地中の GABA 減少分が全て藻体に回収されたと仮定した時の藻体内 GABA 理論値 [mg/100g]〕から求めた値である。表 3 中の「培地中」の「培地」とは、「芋焼酎蒸留粕含有培地」のことである。

[0129] [表3]

実施例 3	3-1	3-2	3-3	3-4
焼酎粕 [%]	25	50	75	100
培養開始時の培地中の GABA [mg/L]	8	17	23	33
培養開始時の培地中のグルタミン酸 [mg/L]	12	25	34	49
培養終了時(36hr)の培地中の GABA [mg/L]	1	1	2	1
培養終了時(36hr)の DCW [g/L]	5.96	7.64	6.87	7.05
培地中の GABA 減少分が全て藻体に回収されたと仮定した時の藻体内 GABA 理論値 [mg/100g]	117	209	306	454
培養終了時の藻体内 GABA 実測値 [mg/100g]	101	280	623	746
藻体内 GABA 実測値/理論値	0.86	1.34	2.04	1.64

[0130] 上記表 3 の結果から、泡盛蒸留粕だけでなく、焼酎蒸留粕を用いた場合で

も、培地中のGABAを、従属栄養性微細藻類の藻体内に取り込むことができた。このことから、泡盛蒸留粕、焼酎蒸留粕及び日本酒粕等の酒製造残渣（酒製造粕等）だけではなく、 γ -アミノ酪酸を含む組成物又は γ -アミノ酪酸含有培地を用いて、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を得ることができることが確認された。

焼酎蒸留粕濃度50%以上の培養培地を用いた場合には、培地中の γ -アミノ酪酸を全量藻体内に蓄積した以上の γ -アミノ酪酸が、従属栄養性微細藻類の藻体内に蓄積されていることが確認され、培養開始時の培養培地中には焼酎蒸留粕上清培地由来のL-グルタミン酸が含まれていた。このことから、藻体内で γ -アミノ酪酸がL-グルタミン酸から生産され、生産された γ -アミノ酪酸はこの藻体内に蓄積されることが確認できた。

焼酎蒸留粕濃度50%の培養培地を用いた場合には、得られたDCWが高く、培養培地中のL-グルタミン酸が増殖に主に使われたと考えられる。このため、焼酎蒸留粕濃度50%の培養培地を用いた場合には、藻体内でのL-グルタミン酸由来の γ -アミノ酪酸の生産量が低いのであろうと考えられる。一方で、焼酎蒸留粕75%の培養培地を用いた場合には、DCWが低く、藻体内でのL-グルタミン酸由来の γ -アミノ酪酸の生産量が高いと考えられる。

また、従属栄養性微細藻類の藻体内に、 γ -アミノ酪酸を、約1質量%含有させることができることが確認された。このことから、培地中の γ -アミノ酪酸及び／又はグルタミン酸濃度等の培養条件を調整することで、藻体内の蓄積量の上限を適宜調整することができる考える。例えば、従属栄養性微細藻類の藻体内に、 γ -アミノ酪酸を、少なくとも約2，3もしくは5質量%まで含有させることができるであろう。

[0131] <試験例4>

[0132] (1) 実施例4の乾燥藻体の製造

以下の手順に従って従属栄養性微細藻類を培養し、乾燥藻体を得た。

[0133] 上記試験例1の(1)a)～c)の手順に従い、泡盛蒸留粕上清培地の調

製、G T Y 培地の調製、種培養を行った。その後、上記試験例 2 の「(1) d) 本培養」の 90 L ジャー培養を、好気条件下で行った。藻株は、オーランチオキトリウム リマシナム S R - 2 1 株 (F E R M B P - 5 0 3 4) を用いた。

なお、90 L ジャー培養に用いた泡盛蒸留粕含有培地は、泡盛蒸留粕培養培地中の泡盛粕上清培地の濃度（含有率）が 50 % になるように調製し、滅菌後、50 % 泡盛蒸留粕含有培地を得た。培養開始後の培地に、培養中に、グルタミン酸 N a 水溶液（濾過滅菌済み）を、表 4 に示すような条件にて流加させた。グルタミン酸 N a 水溶液（グルタミン酸 N a 濃度 200 g / L）を、培地中のグルタミン酸 N a 濃度が 0.6 g / L / h r となるように流加した。表 4 中の「培地中」の「培地」とは、「泡盛蒸留蒸留粕含有培地」のことである。

[0134] [表4]

	実施例 4
培養開始時の培地中の GABA [mg/L]	24
培養終了時(96hr)の培地中の GABA [mg/L]	3.3
グルタミン酸 Na 流加	24hr 以降、0.6g/L/hr
培養 96hr の DCW [g/L]	34.94
培地中の GABA が全て藻体に回収されたと仮定した時の藻体内 GABA 理論値 [mg/100g]	59.2
培養 96hr の藻体内 GABA 実測値 [mg/100g]	196
藻体内 GABA 実測値/理論値	3.31

[0135] 流加したグルタミン酸量が多いが DCW が低く、L - グルタミン酸がうまく増殖につかえていないことが確認できた。一方で、培養培地中の G A B A を、全量藻体内に蓄積した以上の G A B A が藻体内に蓄積されていることが確認できた。

培養培地中の L - グルタミン酸は、ヤブレッツボカビ類に属する微細藻類、

特にはオーランチオキトリウム属微細藻類の藻体内に取り込まれ、増殖に使われている。増殖に使われる以上のL-グルタミン酸が、藻体内に取り込まれた場合には、藻体内で γ -アミノ酪酸に変換され蓄積されることが考えられた。

このことから、従属栄養性微細藻類は、その体内でL-グルタミン酸から γ -アミノ酪酸を生産し、生産された γ -アミノ酪酸を体内に蓄積できることが確認された。このように、培養培地中に γ -アミノ酪酸の他にL-グルタミン酸を供給することによっても、 γ -アミノ酪酸高含有従属栄養性微細藻類を得ることができることが確認された。

[0136] <試験例 5>

[0137] オーランチオキトリウム属 2 株（オーランチオキトリウム属 M15d1 株、オーランチオキトリウム属 S28P 株）を、<試験例 3>に従って、それぞれ、泡盛蒸留粕上清培地を 50%含む泡盛蒸留粕含有培地（50%泡盛蒸留粕含有培地）に播種し、フラスコ培養を行った。これら 2 株は、本発明者らによって日本国内で採取され、保管されていたものである。泡盛蒸留粕上清培地は、<試験例 1>の泡盛蒸留粕上清培地の調製に従って得られた γ -アミノ酪酸含有組成物（培地用）である。

試験例 5 で用いられる、50%泡盛蒸留粕含有培地は、<試験例 3>に従って、泡盛蒸留粕上清培地の濃度を調整し、得ることができる。

表 5 における「培地」とは、50%泡盛蒸留粕含有培地のことである。 γ -アミノ酪酸の含有量の測定は、<試験例 1>と同様にして行った。

[0138]

[表5]

実施例 5	5-1	5-2
株（オーランチオキトリウム属）	M15d1 株	S28P 株
培養開始時の培地中の GABA [mg/L]	79	79
培養終了時(36hr)の培地中の GABA [mg/L]	0	1
培養終了時(36hr)の DCW [g/L]	14.02	13.93
培地中の GABA 減少分が全て藻体に回収されたと仮定した時の藻体内 GABA 理論値 [mg/100g]	563	560
培養終了時の藻体内 GABA 実測値 [mg/100g]	487	527
藻体内 GABA 実測値/理論値	0.86	0.94

[0139] この試験結果から、S R 2 1 株以外のオーランチオキトリウム属 2 株とも、培養培地中の G A B A を培養時に回収して藻体内に蓄積することが示された。従属栄養性微細藻類であるオーランチオキトリウム属に属する微細藻類は、藻株に関係なく γ -アミノ酪酸を高含有化できること、及び γ -アミノ酪酸を培地から回収できることが示された。従属栄養性微細藻類であるオーランチオキトリウム属に属する微細藻類を培養する際に γ -アミノ酪酸を含む培地を用いることも微細藻類中の γ -アミノ酪酸含有量の増加に有益であることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] γ -アミノ酪酸の含有量が、乾燥藻体100g当たり100mg以上である、従属栄養性微細藻類。
- [請求項2] 前記従属栄養性微細藻類が、ヤブレツボカビ類（*Thraustochytriales*）に属する微細藻類である、請求項1に記載の従属栄養性微細藻類。
- [請求項3] 前記従属栄養性微細藻類が、オーランチオキトリウム属（*Aurantiochytrium*）に属する微細藻類である、請求項1又は2に記載の従属栄養性微細藻類。
- [請求項4] 請求項1又は2に記載の従属栄養性微細藻類を含有する、食品、医薬品、又は飼料。
- [請求項5] γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程を含む、従属栄養性微細藻類中の γ -アミノ酪酸の含有量を増加させる方法。
- [請求項6] γ -アミノ酪酸を含む培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、
前記従属栄養性微細藻類を回収する工程と、を含む、培地から γ -アミノ酪酸を回収する方法。
- [請求項7] γ -アミノ酪酸を含む組成物を用いて培地を調製する工程と、
前記培地中で従属栄養性微細藻類を培養する工程と、
前記従属栄養性微細藻類を回収する工程と、を含む、組成物から γ -アミノ酪酸を回収する方法。
- [請求項8] γ -アミノ酪酸を含む培地中で培養された従属栄養性微細藻類を用いることを含む、食品、医薬品、又は飼料の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/022021

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/12(2006.01)i; **A23K 10/10**(2016.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i; **A61K 31/197**(2006.01)i; **A61K 35/68**(2006.01)i;
A61P 9/12(2006.01)i; **A61P 25/20**(2006.01)i; **A61P 25/28**(2006.01)i
 FI: C12N1/12 C; A23K10/10; A23L33/10; A61K31/197; A61K35/68; A61P9/12; A61P25/20; A61P25/28

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; A23K10/10; A23L33/10; A61K31/197; A61K35/68; A61P9/12; A61P25/20; A61P25/28

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2016-016362 A (KURITA WATER IND LTD) 01 February 2016 (2016-02-01) claims, paragraphs [0033], [0048], example 1	1-8
Y	claims, paragraphs [0033], [0048], example 1	1-8
X	JP 2015-012842 A (UNIV TSUKUBA) 22 January 2015 (2015-01-22) claims, paragraphs [0015], [0016], experiment 1	1-3, 5-7
Y	claims, paragraphs [0015], [0016], experiment 1	1-8
X	JP 2019-004807 A (SAN OKINAWA KK) 17 January 2019 (2019-01-17) claims, examples	1-3, 5-7
Y	claims, examples	1-8
Y	JP 2021-193983 A (SOPROS INC) 27 December 2021 (2021-12-27) claims	1-8
Y	JP 2018-093766 A (SOBIO TECH INC) 21 June 2018 (2018-06-21) claims	1-8

☒ 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

03 August 2023

Date of mailing of the international search report

15 August 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/022021

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-290114 A (HONDA TRADING CORP) 21 October 2004 (2004-10-21) paragraph [0008], table 3	1-8
P, X	JP 7218023 B1 (ALGALEX CO., LTD.) 06 February 2023 (2023-02-06) example 1	1-8
A	WO 2020/261245 A1 (NOBLEGEN INC.) 30 December 2020 (2020-12-30) paragraphs [0046], [0089], [0222]	1-8
A	多田 清志, 新規食料資源としての微細藻類の可能性, 食品と開発, 01 November 2019, vol. 54, no. 11, pp. 4-7 entire text, (TADA, Kiyoshi. Food Processing and Ingredients.), non-official translation (The possibility of microalgae as a new food resource)	1-8
A	JP 2021-013313 A (OP BIO FACTORY KK) 12 February 2021 (2021-02-12) claims	1-8
A	JP 2020-072698 A (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY) 14 May 2020 (2020-05-14) tables 4, 11	1-8
A	JP 2014-524248 A (EVONIK DEGUSSA GMBH) 22 September 2014 (2014-09-22) claims	1-8
A	JP 2005-006608 A (YOKOYAMA, Sadaji) 13 January 2005 (2005-01-13) paragraph [0008]	1-8
A	JP 2004-159612 A (KUMAMOTO PREFECTURE) 10 June 2004 (2004-06-10) claims	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/022021

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2016-016362	A	01 February 2016	(Family: none)	
JP	2015-012842	A	22 January 2015	(Family: none)	
JP	2019-004807	A	17 January 2019	(Family: none)	
JP	2021-193983	A	27 December 2021	(Family: none)	
JP	2018-093766	A	21 June 2018	(Family: none)	
JP	2004-290114	A	21 October 2004	(Family: none)	
JP	7218023	B1	06 February 2023	(Family: none)	
WO	2020/261245	A1	30 December 2020	JP 2022-540788 A paragraphs [0038], [0079], [0203] US 2022/0312793 A1 paragraphs [0046], [0089], [0222] EP 3989730 A1 paragraphs [0046], [0089], [0222] CN 114286625 A paragraphs [0047], [0090], [0227]	
JP	2021-013313	A	12 February 2021	(Family: none)	
JP	2020-072698	A	14 May 2020	US 2021/0147791 A1 tables 4, 11 WO 2019/107385 A1 tables 4, 11 EP 3719114 A1 tables 4, 11 KR 10-2020-0115476 A tables 4, 11 CN 111868228 A tables 4, 11	
JP	2014-524248	A	22 September 2014	US 2014/0308310 A1 claims WO 2013/023873 A1 claims EP 2744907 A1 claims DE 102011110996 A1 claims CN 103930560 A claims	
JP	2005-006608	A	13 January 2005	(Family: none)	
JP	2004-159612	A	10 June 2004	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 1/12(2006.01)i; A23K 10/10(2016.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A61K 31/197(2006.01)i; A61K 35/68(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 25/20(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i FI: C12N1/12 C; A23K10/10; A23L33/10; A61K31/197; A61K35/68; A61P9/12; A61P25/20; A61P25/28		
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（IPC）） C12N1/12; A23K10/10; A23L33/10; A61K31/197; A61K35/68; A61P9/12; A61P25/20; A61P25/28		
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/Biosis (STN)		
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
X	JP 2016-016362 A (栗田工業株式会社) 01.02.2016 (2016-02-01) 特許請求の範囲, [0033], [0048], 実施例1	1-8
Y	特許請求の範囲, [0033], [0048], 実施例1	1-8
X	JP 2015-012842 A (国立大学法人 筑波大学) 22.01.2015 (2015-01-22) 特許請求の範囲, [0015], [0016], 実験1	1-3, 5-7
Y	特許請求の範囲, [0015], [0016], 実験1	1-8
X	JP 2019-004807 A (有限会社サンおきなわ) 17.01.2019 (2019-01-17) 特許請求の範囲, 実施例	1-3, 5-7
Y	特許請求の範囲, 実施例	1-8
Y	JP 2021-193983 A (S o P r o s 株式会社) 27.12.2021 (2021-12-27) 特許請求の範囲	1-8
Y	JP 2018-093766 A (藻バイオテクノロジー株式会社) 21.06.2018 (2018-06-21) 特許請求の範囲	1-8
☒ 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、一般的な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抵触するものではなく、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 03.08.2023		国際調査報告の発送日 15.08.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 西村 亜希子 4N 3435 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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 2004-290114 A (株式会社 ホンダ トレーディング) 21.10.2004 (2004 - 10 - 21) [0008], 表3	1-8
P, X	JP 7218023 B1 (株式会社 A l g a l e X) 06.02.2023 (2023 - 02 - 06) 実施例1	1-8
A	WO 2020/261245 A1 (NOBLEGEN INC.) 30.12.2020 (2020 - 12 - 30) [0046], [0089], [0222]	1-8
A	多田 清志, 新規食料資源としての微細藻類の可能性, 食品と開発, 2019.11.01, Vol.54, No.11, pp.4-7 全文	1-8
A	JP 2021-013313 A (オーピーバイオファクトリー株式会社) 12.02.2021 (2021 - 02 - 12) 特許請求の範囲	1-8
A	JP 2020-072698 A (国立研究開発法人科学技術振興機構) 14.05.2020 (2020 - 05 - 14) 表4, 表11	1-8
A	JP 2014-524248 A (エボニック デグサ ゲーエムベーハー) 22.09.2014 (2014 - 09 - 22) 特許請求の範囲	1-8
A	JP 2005-006608 A (横山 定治) 13.01.2005 (2005 - 01 - 13) [0008]	1-8
A	JP 2004-159612 A (熊本県) 10.06.2004 (2004 - 06 - 10) 特許請求の範囲	1-8

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/022021

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2016-016362	A	01.02.2016	(ファミリーなし)	
JP	2015-012842	A	22.01.2015	(ファミリーなし)	
JP	2019-004807	A	17.01.2019	(ファミリーなし)	
JP	2021-193983	A	27.12.2021	(ファミリーなし)	
JP	2018-093766	A	21.06.2018	(ファミリーなし)	
JP	2004-290114	A	21.10.2004	(ファミリーなし)	
JP	7218023	B1	06.02.2023	(ファミリーなし)	
WO	2020/261245	A1	30.12.2020	JP 2022-540788	A
				[0038], [0079], [0203]	
				US 2022/0312793	A1
				[0046], [0089], [0222]	
				EP 3989730	A1
				[0046], [0089], [0222]	
				CN 114286625	A
				[0047], [0090], [0227]	
JP	2021-013313	A	12.02.2021	(ファミリーなし)	
JP	2020-072698	A	14.05.2020	US 2021/0147791	A1
				Table4, Table11	
				WO 2019/107385	A1
				表4, 表11	
				EP 3719114	A1
				Table4, Table11	
				KR 10-2020-0115476	A
				表4, 表11	
				CN 111868228	A
				表4, 表11	
JP	2014-524248	A	22.09.2014	US 2014/0308310	A1
				Claims	
				WO 2013/023873	A1
				Claims	
				EP 2744907	A1
				Claims	
				DE 102011110996	A1
				Claims	
				CN 103930560	A
				Claims	
JP	2005-006608	A	13.01.2005	(ファミリーなし)	
JP	2004-159612	A	10.06.2004	(ファミリーなし)	