

⑫ 公開特許公報 (A)

平3-254674

⑤ Int. Cl. ⁵

C 12 N 1/12

// (C 12 N 1/12
C 12 R 1:89)

識別記号

庁内整理番号

B 9050-4B
A 9050-4B

⑬ 公開 平成3年(1991)11月13日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全6頁)

⑭ 発明の名称 スピルリナ属藍藻の培養方法

⑰ 特 願 平2-49421

⑱ 出 願 平2(1990)3月2日

⑲ 発 明 者 真 部 永 地 東京都江東区豊洲1丁目1番7号 小野田セメント株式会社中央研究本部内

⑳ 発 明 者 高 野 博 幸 東京都江東区豊洲1丁目1番7号 小野田セメント株式会社中央研究本部内

㉑ 発 明 者 平 野 盛 雄 東京都江東区豊洲1丁目1番7号 小野田セメント株式会社中央研究本部内

㉒ 出 願 人 小野田セメント株式会社 山口県小野田市大字小野田6276番地

㉓ 代 理 人 弁理士 鈴江 武彦 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

スピルリナ属藍藻の培養方法

2. 特許請求の範囲

(1) アルカリ金属の硝酸塩を窒素源とする無機液体培地でスピルリナ属藍藻を培養し、藍藻が生育対数期にあるとき、培地にさらにアンモニウム塩を添加することを特徴とするスピルリナ属藍藻の培養方法。

(2) アルカリ金属の硝酸塩を窒素源とする無機液体培地でスピルリナ属藍藻を培養し、この藍藻をその生育対数期中期から終期の間で一旦収穫し、次に収穫した藍藻をアンモニウム塩を添加した培地で再び培養することを特徴とするスピルリナ属藍藻の培養方法。

(3) 生育対数期中頃から終期の間で一旦収穫した藍藻を、次にアンモニウム塩を添加した培地で再び培養するに当たり、培地中の藻体濃度を濃縮する請求項2記載のスピルリナ属藍藻の培養方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、スピルリナ属藍藻の培養方法に関し、特にγ-リノレン酸を多量に蓄積したスピルリナ属藍藻の培養方法に関する。

(従来技術)

γ-リノレン酸は、プロスタグランジンの前駆体として知られ、最近、生体調節機能を有するいわゆる機能性食品の素材として注目されている。

γ-リノレン酸を食品へ応用するには、食品に供し得る素材からγ-リノレン酸を生産することが望ましく、食品として供し得るスピルリナ属藍藻からγ-リノレン酸を生産することが知られている。

従来から、γ-リノレン酸の増収を目的として培地の改良、培養条件の改善など種々の研究がなされてきたが、それでもスピルリナ属藍藻の増収には限度があって、乾燥藻体重量当りのγ-リノレン酸の含有量は、通常よくても12mg/g程度が普通であった。

(発明が解決しようとした課題)

この発明は、スピルリナ属藍藻の培養に際して、培養の途中で培地にアンモニウム塩を加えることにより、スピルリナ属藍藻内に蓄積されるγ-リノレン酸を増加せしめ、これによってγ-リノレン酸が多量に含まれたスピルリナ属藍藻を得ようとするものである。

(課題を解決するための手段)

本願の発明は、アルカリ金属の硝酸塩を窒素源とする無機液体培地でスピルリナ属藍藻を培養し、藍藻が生育対数期にあるとき、培地にさらにアンモニウム塩を添加することを特徴とするスピルリナ属藍藻の培養方法(請求項1)、アルカリ金属の硝酸塩を窒素源とする無機液体培地でスピルリナ属藍藻を培養し、この藍藻をその生育対数期中頃から終期の間で一旦収穫し、次に収穫した藍藻をアンモニウム塩を添加した培地で再び培養することを特徴とするスピルリナ属藍藻の培養方法(請求項2)、及び生育対数期中頃から終期の間で一旦収穫した藍藻を、次にアンモニウム塩を

けてもよい。

こうした前段の培養を行うことによって、培地中のスピルリナ属藍藻は増殖し、初期の潜伏期から急激に増殖する生育対数期に至る。生育対数期中頃までに達する期間は、培養条件にもよるが、通常、培養開始後3~7日である。本発明では、この生育対数期中頃になったとき、培地にアンモニウム塩を滴下する。アンモニウム塩としては、安価な塩化アンモニウムの外、硝酸アンモニウムなども使用できる。アンモニウム塩滴下後の培地のアンモニウムイオン濃度は、10~15mMとするのが望ましい。これが10mM未満では、スピルリナ属藍藻中のγ-リノレン酸の増加が期待できず、また、これが15mMを超えるとスピルリナ属藍藻自体が死滅する恐れがある。アンモニウム塩を滴下した後は、通気、光照射等を、それまでと同じにして後段の培養を続ける。アンモニウム塩滴下後の培地での後段の培養は、通常2~3日とする。

前段の培養の後、かかるアンモニウム塩を滴下

添加した培地で再び培養するに当たり、培地中の藻体濃度を濃縮する請求項2記載のスピルリナ属藍藻の培養方法(請求項3)である。以下に、これらの発明を説明する。

まず、請求項1の発明について説明すれば、本願発明に使用される藍藻は、スピルリナ・プラテンシス(*spirulina platensis*)、スピルリナ・マキシマ(*spirulina maxima*)などのスピルリナ属藍藻である。また、このスピルリナ属藍藻の培養が行われる培地の組成は、従来のスピルリナ属藍藻の培地と変わりなく、窒素源として硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどのアルカリ金属の硝酸塩を、炭素源として炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなどの炭酸塩や炭酸水素塩をそれぞれ含む無機液体培地であり、代表的なものとしてSOT培地を挙げることができる。ここでの培養は、常法に従って通気しつつ攪拌し、光を照射し25~35℃の温度下で行う。光源は蛍光灯、白熱灯などの人工灯、太陽光のいずれでもよく、光照射は、連続的でも、間欠的で途中で暗期を設

した培地での後段の培養を行うと、意外な事実として、スピルリナ属藍藻中の総脂肪酸の含有量が増加し、その結果としてγ-リノレン酸含有量が増加し、γ-リノレン酸の効率的な生産が可能となる。

請求項2の発明は、培地にアンモニウム塩を添加するのは請求項1の発明と同じであるが、前段の培地で培養、すなわち1次培養を行いその後スピルリナ属藍藻を一旦収穫する点において相違する。収穫した藍藻は、次にアンモニウム塩を添加した新たな培地で後段の培養、すなわち2次培養を行うものである。

培地にアンモニウム塩を添加する前のいわゆる1次培養は、請求項1の発明の場合と同じで、すでに説明した通りである。しかしながら、ここで1次培養したスピルリナ属藍藻は、すでに述べたように、培地から一旦収穫する。そして、収穫した藍藻を、別のアンモニウム塩を添加したSOT培地に移し、ここで再度の培養(2次培養)を行う。よって、この発明では1次培養によって生じ

た老廃物が除去された、新しい培地で2次培養が行われることになる。

なお、収穫したスピルリナ属藍藻の2次培養に際しては、培地中の藻体濃度を約5倍以上に高めて、例えば5g乾燥藻体/ℓ前後の濃度で行ってもよい。こうした場合は、2次培養は容量の小さい培養池や培養槽で効率的に行うことが出来る(請求項3)。

請求項2及び3の発明におけるアンモニウムイオン濃度の範囲は、請求項1の発明の場合よりも広くてよく、10~35mMとする。なお、さらに好ましいアンモニウムイオン濃度の範囲は20~25mMである。これが10mM未満では、2次培養によってもスピルリナ属藍藻中のγ-リノレン酸の増加が期待できず、また、35mMを超えると、スピルリナ属藍藻自体が死滅する恐れがある。アンモニウム塩を添加した培地での2次培養は、通気、光照射等を、1次培養と同じにしてもよいが、必ずしも1次培養と同じ条件で行う必要はない。アンモニウム塩添加後の2次培養は、通常2~3

ナトリウム2.5g/ℓ、リン酸二カリウム0.5g/ℓ、硫酸カリウム1.0g/ℓ、塩化ナトリウム1.0g/ℓ、硫酸マグネシウム7水和物0.2g/ℓ、塩化カルシウム2水和物0.04g/ℓ、硫酸第一鉄7水和物0.01g/ℓ、エチレンジアミンテトラ酢酸ナトリウム2水和物0.08g/ℓ、硼酸2.86mg/ℓ、硫酸マンガン7水和物2.5mg/ℓ、硫酸亜鉛7水和物0.22mg/ℓ、硫酸銅5水和物0.08mg/ℓ、モリブデン酸ナトリウム0.02mg/ℓを含むSOT培地を調整し、これを120℃で15分間加熱殺菌した。培養容器として、巾10cm、高さ25cm、厚さ3cmのガラス製偏平フラスコを用意し、これも上記と同様に加熱殺菌した。

上記の無機液体培地に、スピルリナ・プラテンシスIAM M-135株を、波長750nmの濁度が0.5(培地での乾燥藻体重量が0.3g/ℓ)となるよう接種し、これを前記の偏平フラスコに入れた。フラスコ表面の照度は10Klxとし、

日とする。2次培養は、光照射下で行うことが通常であるが、24時間位は暗黒下で行うことも出来る。この2次培養によって、スピルリナ属藍藻のγ-リノレン酸含有量は大幅に増大し、15mg/g-乾燥藻体以上にもなり、より好条件では20mg/g-乾燥藻体にも達することが出来る。

2次培養の終えた藻体は網で容易に収穫され、網上で十分水洗した後、乾燥する。乾燥された藻体は、そのまま食用に供してもよく、また、食品の加工原料としてもよい。さらにγ-リノレン酸を抽出して利用してもよい。

以上の本願発明によれば、アンモニウム塩を含む培地でスピルリナ属藍藻の培養を行っただけで、藻体内のγ-リノレン酸の含有量を大きく増加することができる。

以下に、実験例をあげて、この発明をさらに説明する。

実験例1.

炭酸水素ナトリウム16.8g/ℓ、硝酸

植物育成用蛍光灯を連続照射し、30℃で4日間培養した。これによって、濁度(OD₇₅₀)が約2.5のスピルリナ培養物を得た(前段の培養)。

次いで、培養容器の中に濾過滅菌した4Mの塩化アンモニウム水溶液を滴下し、培地中の塩化アンモニウム濃度を12.5mMとした後、塩化アンモニウム滴下前と同じ培養条件で72時間培養した(後段の培養)。

培地に塩化アンモニウム添加直後のもの、培地に塩化アンモニウム添加後40時間経過後のもの、同72時間経過後のもの、を各サンプルとして採取し、これを88μm篩に通した。篩上の藻体に蒸留水を注ぎ藻体を洗浄し、これを回収して凍結乾燥した。この乾燥藻体30mgに、内部標準としてn-ペンタデカン酸のメタノール溶液(1mg/ml)の0.3mlと2mlの5%塩酸メタノール溶液を各々加え、湯浴(95~100℃)で2時間反応し、藻体中の脂肪酸をメチルエステル化した。この脂肪酸エステルを1mlのn-ヘキサンで抽出し、ガ

第 1 表

| | 塩化アンモニウムの処理 | 総脂肪酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) | γ-リノレン酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) |
|-----|---------------------------------------|------------------------|---------------------------|
| 実験例 | NH ₄ Cl 添加直後 | 54.2 | 12.5 |
| | " 添加40時間後 | 70.6 | 15.7 |
| | " 添加72時間後 | 60.5 | 15.0 |
| 比較例 | NH ₄ Cl 添加せず※ ₁ | 53.9 | 12.7 |
| | " 添加せず※ ₂ | 50.9 | 12.3 |
| | " 添加せず※ ₃ | 54.8 | 11.8 |

※₁ …後段の培養開始直後※₂ … " 開始40時間後※₃ … " 開始72時間後

実験例 2

スピルリナ・プラテンシス IAM M-135 株をアンモニウム塩を加えない培地で4日間1次培養し、ここで培養されたスピルリナ属藍藻の培養物を、予め加熱殺菌した88 μ m篩で回収した。次いで塩化アンモニウム又は硝酸アンモニウムを25mM添加したSOT培地に、前記の回収した藻

スクロマトグラフィーによって脂肪酸組成を解析した。その結果を第1表に示す。第1表に示すように、乾燥藻体重量当りの総脂肪酸含有量が塩化アンモニウムを加えた培地での後段の培養によって、明らかに増加し、これにともなって乾燥藻体重量当りのγ-リノレン酸の含有量も増加していることが明らかである。

なお、比較例として培地に塩化アンモニウムを添加しない場合を示した。

第 2 表

| | アンモニウム塩の処理 | 総脂肪酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) | γ-リノレン酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) |
|-----|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|
| 実験例 | NH ₄ Cl 添加直後 | 51.4 | 12.1 |
| | " 添加40時間後 | 90.8 | 16.6 |
| | " 添加72時間後 | 77.0 | 19.4 |
| 比較例 | NH ₄ NO ₃ 添加直後 | 52.0 | 12.0 |
| | " 添加40時間後 | 91.4 | 16.7 |
| | " 添加72時間後 | 81.0 | 17.8 |
| 比較例 | アンモニウム塩添加せず※ ₁ | 52.8 | 12.8 |
| | " ※ ₂ | 52.5 | 12.6 |
| | " ※ ₃ | 52.6 | 12.4 |

※₁ …2次培養開始直後※₂ …2次培養開始40時間後※₃ …2次培養開始72時間後

体を懸濁し、濁度(OD₇₅₀)が約2.5となるようにして72時間、2次培養した。なお、1次培養、2次培養の培養条件は実験例1と同様とした。

培地に塩化アンモニウム又は硝酸アンモニウム添加直後のもの、培地に塩化アンモニウム又は硝酸アンモニウム添加後40時間経過後のもの、同72時間経過後のもの、を各サンプルとして採取し、これを88 μ m篩に通した。篩上の藻体に蒸留水を注ぎ藻体を洗浄し、これを回収して凍結乾燥した。この乾燥藻体を実験例1と同様にしてガスクロマトグラフィーによって脂肪酸組成を解析した。その結果を第2表に示す。第2表に示すように、乾燥藻体重量当りの総脂肪酸含有量が塩化アンモニウム又は硝酸アンモニウムを加えた培地での2次培養によって、明らかに増加し、これにともなって乾燥藻体重量当りのγ-リノレン酸の含有量も増加していることが明らかである。

なお、比較例として培地に塩化アンモニウムや硝酸アンモニウムを添加しない場合を示した。

実験例 3

アンモニウム塩として塩化アンモニウムを用い、2次培養開始時の濁度(OD₇₅₀)を実験例2では約2.5であったものを、本実験例では約

8. 5とした。これ以外は実験例2と同様にした。
 ガスクロマトグラフィーによって脂肪酸組成を解析した結果を第3表に示す。なお、比較例として培地に塩化アンモニウムを添加しない場合を示した。

第 3 表

| | 塩化アンモニウムの処理 | 総脂肪酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) | γ-リノレン酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) |
|-----|---------------------------------------|---------------------|------------------------|
| 実験例 | NH ₄ Cl 添加直後 | 49.9 | 12.2 |
| | " 添加40時間後 | 76.1 | 15.9 |
| | " 添加72時間後 | 78.5 | 17.2 |
| 比較例 | NH ₄ Cl 添加せず※ ₁ | 48.5 | 12.0 |
| | " 添加せず※ ₂ | 51.0 | 13.3 |
| | " 添加せず※ ₃ | 51.7 | 13.1 |

※₁ … 2次培養開始直後
 ※₂ … 2次培養開始40時間後
 ※₃ … 2次培養開始72時間後

実験例 4

アンモニウム塩として塩化アンモニウムを用い、

2次培養は24時間暗黒下で行った。それ以外は実験例2と同様にした。ガスクロマトグラフィーによって脂肪酸組成を解析した結果を第4表に示す。なお、比較例として培地に塩化アンモニウムを添加しない場合を示した。

第 4 表

| | 塩化アンモニウムの処理 | 総脂肪酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) | γ-リノレン酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) |
|-----|---------------------------------------|---------------------|------------------------|
| 実験例 | NH ₄ Cl 添加直後 | 53.0 | 12.6 |
| | " 添加24時間暗黒下 | 73.8 | 15.5 |
| 比較例 | NH ₄ Cl 添加せず※ ₁ | 52.8 | 12.8 |
| | " 添加せず※ ₂ | 50.8 | 12.3 |

※₁ … 2次培養開始直後
 ※₂ … 2次培養開始24時間暗黒下

出願人代理人 弁理士 鈴江 武彦

手続補正書

平成 2 年 3 月 9 日

特許庁長官 吉田 文毅 殿

1. 事件の表示

特願平 2 - 4 9 4 2 1 号

2. 発明の名称

スピルリナ属藍藻の培養方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(024) 小野田セメント株式会社

4. 代理人

東京都千代田区霞が関 3 丁目 7 番 2 号

〒 100 電話 03 (502) 3181 (大代表)

(5847) 弁理士 鈴江 武彦

5. 自発補正

6. 補正の対象

明細書

7. 補正の内容

- (1) 4 頁、7 行目の「(spirulinaplantensis)」を「(Spirulina plantensis)」に訂正する。
- (2) 4 頁、8 行目の「(spirulinamaxima)」を「(Spirulina maxima)」に訂正する。
- (3) 5 頁、12 行目の「るのがが望ましい。」を「るのが望ましい。」に訂正する。
- (4) 9 頁、~~最下~~ 20 行目の「10K1x」を「2K1x」に訂正する。
- (5) 14 頁、第 2 表を次頁のように訂正する。



第 2 表

| | アンモニウム塩の 処理 | 総脂肪酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) | γ -リノレン酸含有量 (mg/g-乾燥藻体) |
|-------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| 実 験 例 | NH ₄ Cl 添加直後 | 51.4 | 12.1 |
| | " 添加40時間後 | 90.8 | 16.6 |
| | " 添加72時間後 | 77.0 | 19.4 |
| | NH ₄ NO ₃ 添加直後 | 52.0 | 12.0 |
| | " 添加40時間後 | 91.4 | 16.7 |
| | " 添加72時間後 | 81.0 | 17.8 |
| 比 較 例 | アンモニウム塩添加せず* ₁ | 52.8 | 12.8 |
| | " * ₂ | 52.5 | 12.6 |
| | " * ₃ | 52.6 | 12.4 |

*₁ …2次培養開始直後*₂ …2次培養開始40時間後*₃ …2次培養開始72時間後

(6) 明細書の特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。

2. 特許請求の範囲

(1) アルカリ金属の硝酸塩を窒素源とする無機液体培地でスピルリナ属藍藻を培養し、藍藻が生育対数期にあるとき、培地にさらにアンモニウム塩を添加することを特徴とするスピルリナ属藍藻の培養方法。

(2) アルカリ金属の硝酸塩を窒素源とする無機液体培地でスピルリナ属藍藻を培養し、この藍藻をその生育対数期中期から終期の間で一旦収穫し、次に収穫した藍藻をアンモニウム塩を添加した培地で再び培養することを特徴とするスピルリナ属藍藻の培養方法。

(3) 生育対数期中頃から終期の間で一旦収穫した藍藻を、次にアンモニウム塩を添加した培地で再び培養するに当たり、培地中の藻体濃度を濃縮する請求項2記載のスピルリナ属藍藻の培養方法。

出願人代理人 弁理士 鈴江武彦