

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5300047号  
(P5300047)

(45) 発行日 平成25年9月25日(2013.9.25)

(24) 登録日 平成25年6月28日(2013.6.28)

(51) Int.Cl. F 1  
**C 1 2 P 13/00 (2006.01)** C 1 2 P 13/00  
**C 1 2 P 23/00 (2006.01)** C 1 2 P 23/00  
**C 0 7 C 403/24 (2006.01)** C 0 7 C 403/24  
**C 0 7 C 227/28 (2006.01)** C 0 7 C 227/28

請求項の数 3 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2008-137636 (P2008-137636)  
 (22) 出願日 平成20年5月27日(2008.5.27)  
 (65) 公開番号 特開2009-284767 (P2009-284767A)  
 (43) 公開日 平成21年12月10日(2009.12.10)  
 審査請求日 平成23年4月15日(2011.4.15)

微生物の受託番号 IPOD FERM P-20853

(73) 特許権者 304020177  
 国立大学法人山口大学  
 山口県山口市吉田1677-1  
 (72) 発明者 藤井 克彦  
 山口県山口市吉田1677-1 国立大学  
 法人山口大学内

審査官 高原 慎太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微細藻類によるパントテン酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

光照射下の好気的環境において、有機栄養源を含まない独立栄養培地液で、受託番号が FERM P-20853 で表される、Monoraphidium sp. GK12 を培養することを特徴とするパントテン酸の製造方法。

【請求項2】

前記独立栄養培地液はpHが6.0~7.0の範囲内とし、炭酸ガスを導入し、且つ新鮮培養液の補充と増殖菌液の回収を行いながら培養槽内の細胞密度を $1.0 \times 10^5$  cells/ml ~  $1.0 \times 10^7$  cells/mlの範囲に保持しつつ培養を行うことを特徴とする請求項1記載のパントテン酸の製造方法。

【請求項3】

光照射下の好気的環境において、有機栄養源を含まない独立栄養培地液で、受託番号が FERM P-20853 で表される、Monoraphidium sp. GK12 を培養するにあたり、前記独立栄養培地液は pH が 6.0 ~ 7.0 の範囲内であり、炭酸ガスを導入し、且つ新鮮培養液の補充と増殖菌液の回収を行いながら培養槽内の細胞密度を $1.0 \times 10^5$  cells/ml ~  $1.0 \times 10^7$  cells/mlの範囲に保持しつつ培養を行うことを特徴とするパントテン酸及びアスタキサンチンの併産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、藻類モノラフィディウム属 (Monoraphidium属) を用いたパントテン酸の製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

パントテン酸は1933年Williamsらにより酵母の生育因子群"ビオス"として発見され、ビタミンとして有用な物質である。生体内で酵素的な活性化を受けて -メルカプトエチルアミンとアミド結合をしてパンテテインとなり、これはATPにより酵素的にリン酸化を受けてホスホパンテテインとなり、更にATPと結合して補酵素Aとなる。

【0003】

このパントテン酸の生理作用はホスホパンテテインを補酵素として含む酵素類の作用に基づいており、特に、糖および脂肪酸の代謝との関わりが深く、そのためにパントテン酸の欠乏は細胞内の補酵素A濃度の低下を介して、エネルギー代謝の異常・障害をきたし、広範で複雑な病態をもたらすことが知られている。

【0004】

これまでにパントテン酸の製造においては、例えばパントテン酸エステルのプロテアーゼ、アシラーゼ、リパーゼを用いたエステル加水分解 (特許文献1) が報告されている。しかしながら、この方法は化学合成的手法であり、動物や魚の飼料、人の食品、化粧品、医薬品等に用いられるパントテン酸の製造方法としては適さない。

【0005】

また、天然物が好まれる社会的傾向から、化学方法により合成されるパントテン酸は敬遠されがちであり、近年微生物を用いた製法が提案され、コリネフォルム細菌を用いて酵素的にパントテン酸を製造する方法 (特許文献2) などが提案されているが、有機物を与えての従属栄養培養であり生産コストが高く、その生産性は十分とはいえない。

【0006】

他方、本発明者らは、すでにアスタキサンチン生産微細藻類Monoraphidium sp.GK12 (以下GK12とする) を分離し、この藻類がアスタキサンチンを蓄積し、アスタキサンチンの製造方法として特許出願を行っている (特許文献3、4) (寄託番号FERM P-20853)。今回更にGK12が、パントテン酸の製造にも有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【特許文献1】特開平1 - 228488

【特許文献2】特開2001 - 112489

【特許文献3】特開2007 - 308432

【特許文献4】特開2007 - 306870

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、新たなパントテン酸の製造方法を提供するものであり、更にパントテン酸とアスタキサンチンとを効率よく併産する手法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記目的を達成するため、本発明は、GK12による独立栄養培地液 (溶液培地であるため、「培地液」という) でのパントテン酸の製造方法に関する。

【0009】

すなわち、本発明は、光照射下の好气的環境において、有機栄養源を含まない独立栄養培地液で、受託番号がFERM P-20853で表される、Monoraphidium sp. GK12を培養することを特徴とするパントテン酸の製造方法である。

【0010】

更に本発明の好ましい態様は、前記パントテン酸の製造方法において前記独立栄養培地液はpHが6.0~7.0の範囲内であり、炭酸ガスを導入し、且つ新鮮培養液の補充と増殖菌液の回収を行いながら培養槽内の細胞密度が $1.0 \times 10^5$  cells/ml ~  $1.0 \times 10^7$  cells/mlの範囲に

10

20

30

40

50

保持しつつ培養を行うことを特徴とするものである。

【0011】

更に本発明の好ましい態様は、光照射下の好気的環境において、有機栄養源を含まない独立栄養培地液で、受託番号がFERM P-20853で表される、Monoraphidium sp. GK12を培養するにあたり、前記独立栄養培地液はpHが6.0~7.0の範囲内であり、炭酸ガスを導入し、且つ新鮮培養液の補充と増殖菌液の回収を行いながら培養槽内の細胞密度を $1.0 \times 10^5$  cells/ml ~  $1.0 \times 10^7$  cells/mlの範囲に保持しつつ培養を行うことを特徴とするパントテン酸及びアスタキサンチンの併産方法である。

【発明の効果】

【0012】

本発明に基づく製造方法によれば、藻類を用いることによる天然由来品のパントテン酸の製造として、動物や魚の飼料、人の食品、化粧品、医薬品等に安心して用いられる合成パントテン酸の代替として利用することが可能となる。

【0013】

また、培養液として有機栄養源を用いていない独立栄養培地液を用いることで有機物やビタミンなどの高価な組成物を除き、培地のコストを低減することができる。

【0014】

更に、有機物を除いたことで、雑菌汚染リスクを低減することができるだけでなく、野外培養等生産コストを低減させることができる。つまり、藻類の屋外培養で一般に行われている雑菌繁殖を防ぐための冷暖房機器による温度制御、蛍光灯による照度制御等、厳密な無菌制御、雑菌防止のために要する無菌設備は不要となるのである。

【0015】

更に、天然のパントテン酸とアスタキサンチンを同じ培養システムで同時に効率よく低コストで生産することが可能となる。

【0016】

更に、温暖化ガスとして用途も見出されないまま海底あるいは地中へと埋設処分が検討されている産業由来炭酸ガスの有効利用に貢献することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明に用いられるGK12は、本発明者が既に分離して寄託機関にFERM-P20853として寄託しているものである。

【0018】

本発明におけるGK12の培養条件は、有機栄養源を含まない独立培養培地液であり、光合成を行える培養条件であれば特に制限はない。

【0019】

用いる培地は例えば表1に示すMBM若しくはDMのようにカリウム、カルシウム、マグネシウム、ナトリウム、マンガン、亜鉛、銅、モリブデン等の塩類及びホウ酸、モール塩、EDTAナトリウム等、従来知られている有機栄養源を含まない独立栄養培地液が何ら制限なく使用される。光照射は蛍光灯若しくは太陽光など近紫外線を含む光を用いることができるが、特にこれに制限はない。炭酸ガスは空気と炭酸ガスを混合した気体を導入する他、大気中の二酸化炭素を利用することもできる。炭酸ガスは、勿論石灰石の熱分解によって作ることもできるが、発酵工業の炭酸ガスあるいは煙導ガス等を利用することも可能であり、炭酸ガス排出量を減ずるといった環境対策にも役立つものである。

【0020】

10

20

30

40

【表 1】

Constituents	Medium composition (mg/L)		
	MG	MBM	DM
KNO <sub>3</sub>	100	250	1,000
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	20	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20	75	250
NaCl	-	25	100
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	10	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	410	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	75	250
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-
β-glycerophosphate	30	-	-
HEPES	400	-	-
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	-	2.86	2.86
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	2.5	2.5
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	0.222	0.222
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	-	0.079	0.079
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.702	0.702	0.702
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	1.660	0.660	0.660
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.196	-	-
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.036	-	-
ZnCl <sub>2</sub>	0.0105	-	-
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.004	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0025	0.0247	0.0247

培養液のpHは6.0～7.0の範囲内で、好ましくは特にMBM培地においてはpH6.5付近であり、DM培地においてはpH6.0付近である。

## 【0021】

連続培養を行う場合には例えば、図1に示す装置等を用いる。図1は本発明において連続培養を行う際に基本となる装置であり、培養槽に炭酸ガス吹込み口2、排気管3、新鮮培養液入口4、増殖菌液拔出し口5及びpHメーター6を備えている。本図にあっては、炭酸ガスは上方よりパイプで吹き込んでいるが、下部から目皿等を通して吹き込んでもよい。また、反応時に温度が上昇するのを避けるため冷却装置としての蛇管等の熱交換器を設けてもよいし、また培養液の一部を外部循環してもよい。逆に反応を促進するための熱交換器から熱を供給することもできる。

## 【0022】

培養槽は特に限定されず、一般に用いられるものが使用できるし、必要なパントテン酸若しくは/及びアスタキサンチンの量に応じて適宜必要な容積の容器を使用することができる。培養槽への新鮮培養液の供給はポンプを用いることができるが、新鮮培養液が培養槽へ供給することができればカスケード等、特に限定されない。細胞密度は $1.0 \times 10^5$  cells/ml～ $1.0 \times 10^7$  cells/mlの範囲に保持すればよいが、特に $5.0 \times 10^5$  cells/mLに達するまでは培養液の抜き取り及び補充をせずに行い、 $5.0 \times 10^5$  cells/mLに達したら、連続培養をすることが好ましい。

## 【0023】

連続培養における炭酸ガスの導入濃度は特に限定されないが、1%～2% vol/volになるように炭酸ガスを混合した空気を常圧下で培養液中に吹き込み、その条件下に飽和にした状態とするのが好ましい。しかし、液中の炭酸ガスが濃度を上げるために培養槽内を加圧することも有効な場合もある。この炭酸ガスは実験室では空気にボンベから炭酸ガスを混合した混合気体を、エアーポンプを用いて供給することができる。

## 【 0 0 2 4 】

培養条件の具体的な例としては、有機栄養源を含まない独立培養培地液を用いて、20～30 の温度で1000～30000lux蛍光灯照射下、炭酸ガス濃度が1%vol/volになるように炭酸ガスを混合した空気を培養液中に吹き込む条件を挙げることができる。このガスの吹き込みにより培養槽の攪拌も同時に行われる。なお、有機物を含まず、雑菌繁殖の恐れがないことから、それぞれの装置、器具について滅菌処理をする必要はなく、培養は屋外でも屋内でも可能である。

## 【 0 0 2 5 】

微細藻類からパントテン酸若しくは/及びアスタキサンチンを抽出する方法は、従来から知られている方法を採用すればよいのであり、特に制限はない。例えば、培養液から藻類を分離し、藻類の細胞壁を破壊後抽出溶剤でパントテン酸若しくは/及びアスタキサンチンを分離カラム等を用いて抽出し、分離した抽出溶媒からパントテン酸やアスタキサンチンを得る方法が採られる。ここで、パントテン酸若しくは/及びアスタキサンチンは破壊後抽出溶剤をそのまま使うこともできるし、さらにカラム等を用いて抽出したものを扱うこともできる。また、パントテン酸の相当量は培養上清にも含まれていることから、これをカラム等に通して抽出することも可能である。

## 【 0 0 2 6 】

かくして製造したパントテン酸若しくは/及びアスタキサンチンは、動物や魚の飼料、人の食品、化粧品、医薬品等において有用である。パントテン酸若しくは/及びアスタキサンチンの使用量は上記用途や使用目的によって大きく変動するので、一概に規定することができないのであり、それぞれの用途に応じて最適な量を用いればよい。なお、パントテン酸若しくは/及びアスタキサンチンはそれぞれ分離することなく魚や家畜類用飼料に配合してもよい。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 2 7 】

(GK12のフラスコ培養および培養液組成の改良)

MBM、およびDMと命名した2種類の組成の異なる培養液、及びMonoraphidium sp属において一般的に使用されているMB培養液を調製し、GK12培養への適合性を検討した。以前の研究でGK12を集積、分離した際はMG培養液(pH7.2)はグリセロリン酸およびHEPESをリン源および緩衝成分として含んでいた。一方で、MBMおよびDM培養液はグリセロリン酸とHEPESの代わりに $\text{KH}_2\text{PO}_4$ と $\text{K}_2\text{HPO}_4$ を含んでおり、これら無機リン酸でリン源および緩衝成分を代替している。本研究で試験した培養液の組成を表1にまとめた。MG培養液のpHは1.0N NaOHで調整し、MBMとDMは1.0M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ あるいは1.0M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ で調整した。滅菌生理食塩水に懸濁したGK12 ( $1.0 \times 10^6$  cells/mL) 30  $\mu\text{L}$ を100mLフラスコに入った30mLの培養液に接種し、150rpm 20、30  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の照度(蛍光灯)で振とう培養した。細胞密度は3日ごとに検鏡観察で計測した。細胞からのパントテン酸、アスタキサンチンの抽出は後述の方法で行なった。

## 【 0 0 2 8 】

図2に示すように、pH6.0～7.0においてMBM培養液、DM培養液ともにMG培養液と同程度もしくはそれを超える細胞密度となる場合もあった。

(パントテン酸の抽出方法)

培養が終了した菌液を卓上遠心機で3,000rpm、10minで遠心分離して菌体を回収し、これを生理食塩水で洗浄した後、500  $\mu\text{L}$ の抽出溶媒(脱イオン水)、50mgの0.5-mmガラスビーズ、50mgの0.1-mmジルコニアビーズと混合し、ビーズ破碎処理を30秒間行った。このようにして調製した細胞破碎液を14,500rpm 20、10minで微量遠心機で遠心分離し、水層(以下、抽出エキス1)をガラスバイアルに回収した。この破碎抽出操作を2回行い、抽出エキス1をバイアルに貯めて行った。また、遠心分離で菌体を回収した後に残った上清も別途貯めて行った。

(アスタキサンチンの抽出方法)

培養が終了した菌液を卓上遠心機で3,000rpm、10minで遠心分離して菌体を回収し、こ

10

20

30

40

50

れを生理食塩水で洗浄した後、500  $\mu$ Lの抽出溶媒(acetone/chloroform、30/70vol%)、50 mgの0.5-mmガラスビーズ、50mgの0.1-mmジルコニアビーズと混合し、ビーズ破碎処理を30秒間行った。このようにして調製した細胞破碎液を14,500rpm 20、10minで微量遠心機で遠心分離し、クロロホルム層(以下、抽出エキス2)をガラスバイアルに回収した。この破碎抽出操作を5回行い、抽出エキス2をバイアルに貯めて行った。

(パントテン酸の定量方法)

パントテン酸の定量には、パントテン酸要求微生物を用いたいわゆるバイオアッセイ法を用いた。パントテン酸定量用基礎培地(日本製薬(株)製)にパントテン酸要求微生物 *Lactobacillus plantarum* NBRC3070株コロニーを接種して菌懸濁液を調製し、24孔マイクロプレートに900  $\mu$ Lずつ分注した。ここに濃度既知の標準パントテン酸、GK12抽出エキス、あるいは上清を100  $\mu$ L加えて30で24時間静置培養を行なった。静置培養後、各プレート孔の試料液を吸光光度計で測定し、波長600nmにおける吸光度を基に、要求微生物の増殖程度を定量し、GK12抽出液および上清に含まれるパントテン酸量を算出した。定量したパントテン酸量(培地液はMBM、pH6.5)を図3に示す。GK12は菌体だけでなく、培養上清にパントテン酸を多く含んでいた。

(アスタキサンチンの定量方法)

アスタキサンチン濃度は高速液体クロマトグラフ((株)島津製作所製)で直接定量したクロマト条件は固定相=Inertsil ODS-3Vcolumn(ジールサイエンス(株)製)、移動相はacetone/chloroform溶媒(30/70 vol%)、流速は0.3mL/min.検出は490nmの吸光度測定により行なった。図4は定量したアスタキサンチン量を示す。pH6.0~7.0においてMBM、DM培地のいずれにおいてもMB培地と同程度のアスタキサンチンが生産されていた。

(GK12の回分培養)

連続培養の予備培養として、先述の方法でMBM培養液を用いてGK12の30mL培養を15日間行なった。増殖菌液は、排気管を備えた900mLボトルに入ったMBM培養液500mLに $1.0 \times 10^4$  cells/mLになるように接種し、屋外で本培養を開始した。pH、温度、照度の制御は行なわなかった。菌液50mLを3-4日毎に分取し細胞密度を計測するとともに、抜いた50mLの分だけ、新鮮培養液を補充した。

(GK12の連続培養)

図1のように連続培養装置を試作した。装置は2Lの培養槽があり、ここに1.5LのMBM培養液(pH6.5)が入っている。また、SPP-1ポータブルpH計((株)三商製)と排気管が備わっており、新鮮培養液を供給するためのMP-1100送液ポンプ(東京理化工機(株))が接続されている。フラスコで予備培養した菌液を $1.0 \times 10^4$  cells/mLになるよう接種し、細胞密度が $5.0 \times 10^5$  cells/mLに達するまでは培養液の抜き取りおよび補充をせずに回分式で培養した。そして $5.0 \times 10^5$  cells/mLに達したら、連続培養を開始した。連続培養は菌液抜き取りおよび新鮮培養液の補充を1日あたり120mL/h  $\times$  8時間(960mL/日、希釈率0.64/日)の条件で行なった。

細胞増殖に対する炭酸ガス導入効果も同じ装置で検討した。1%、2%あるいは4%炭酸ガスを導入しつつ培養を行なった。他の培養方法は上記の方法と同じである。

【0029】

図5は上記連続培養装置による連続培養の結果を示す。ここに示すように、細胞密度の増殖においては炭酸ガス1%を吹き込んだ場合が最も有効であった。

(雑菌繁殖)

雑菌繁殖については、顕微鏡観察により行った。MBM培養液及びMD培養液による培養によっては、雑菌の繁殖は見られなかった。

【産業上の利用可能性】

【0030】

本発明は、動物や魚の飼料、人の食品、化粧品、医薬品等として天然由来のパントテン酸及びアスタキサンチンを低コストで提供することができる。また、藻類の炭素源として炭酸ガスを用いることで、炭酸ガス排出量を減ずるという環境対策にも役立つものである。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】連続培養を行う際の装置を示す。

【図2】フラスコ培養による細胞密度を示す。

【図3】フラスコ培養によるパントテン酸生産量を示す。

【図4】フラスコ培養によるアスタキサンチン生産量を示す。

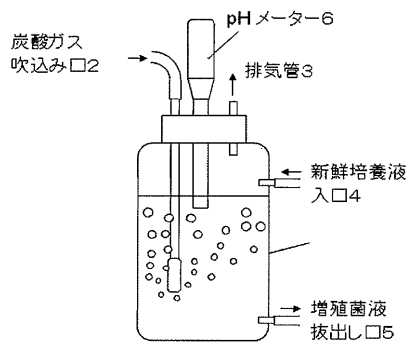
【図5】炭酸ガスを導入した連続培養による細胞密度を示す。

【符号の説明】

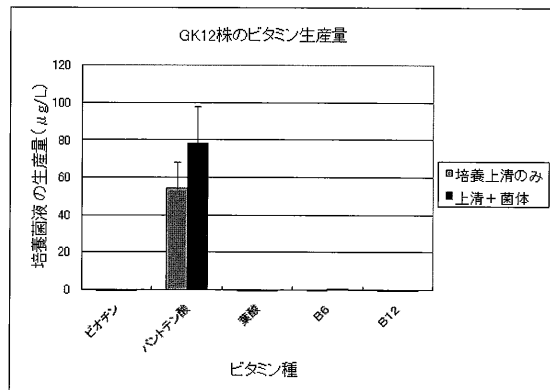
【0032】

- 1 培養槽
- 2 炭酸ガス吹込み口
- 3 排気管
- 4 新鮮培養液入口
- 5 増殖菌液抜出し口
- 6 pHメーター

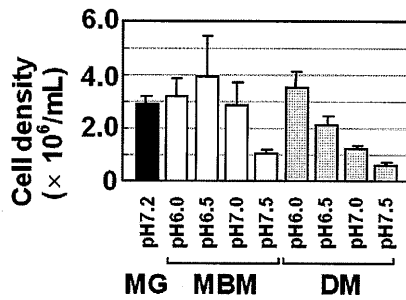
【図1】



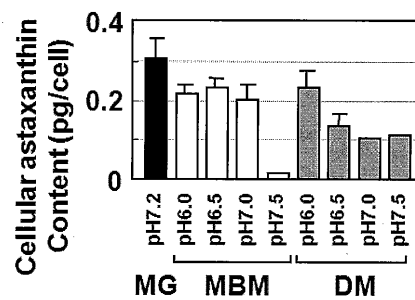
【図3】



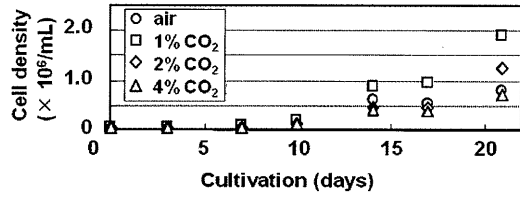
【図2】



【図4】



【 5 】





---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2007-308432(JP,A)

特開2007-306870(JP,A)

FUJII,K. et al., Isolation of the non-fatidious microalga with astaxanthin-accumulating property and its potential fo, Aquaculture, 2006年11月, Vol.261, pp.285-293

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P

CAplus/REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)