(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
2018年11月15日(15.11.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/207804 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/12 (2006.01) *C12P 19/04* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/017865

(22) 国際出願日： 2018年5月9日(09.05.2018)

(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 2017-093581 2017年5月10日(10.05.2017) JP

(71) 出願人: 学 校 法 人 慶 應 義 塾 **(KEIO UNIVERSITY)** [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目１５番４５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 伊 藤 卓 朗 **(ITO, Takuro)**; 〒9970035 山 形 県 鶴 岡 市 馬 場 町 １ ４ 番 １ 号 慶 應 義 塾 大 学 先 端 生 命 科 学 研 究 所 内 Yamagata (JP). 小 川 健 一 **(OGAWA, Ken'ichi)**. 西 川 正 信 **(NISHIKAWA, Masanobu)**.

(74) 代理人: 伊 藤 温 **(ITOH, Atsushi)**; 〒1040045 東 京 都 中 央 区 築 地 ４ － １ － １ 東 劇 ビル４階 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, 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, 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：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

WO 2018/207804 A1

(54) Title: METHOD FOR PROMOTING STORAGE MATERIAL PRODUCTION BY ALGA

(54) 発明の名称： 藻類による貯蔵物質の生産を促進する方法

(57) Abstract: [Problem] To provide a method, whereby an alga can be continuously cultured using a low-cost and simple means for inducing lipid synthesis, in order to efficiently utilize the alga as a biomass. [Solution] A method for promoting the production of a storage material by an alga, said method comprising a step for continuously culturing and proliferating the alga under light irradiation conditions in a culture solution containing an oxystress inducing agent.

(57) 要約： 【課題】 低コストで簡便な脂質合成誘導方法により、効率的に藻類をバイオマスとして利用するための、藻類の連続培養を可能とする方法を提供する。 【解決手段】 酸化ストレス誘導剤を含む培養液中で、前記藻類を、光照射条件下にて継続して培養し増殖させる工程を含む藻類による貯蔵物質の産生を促進する方法。

明　細　書

発明の名称 ： 藻類による貯蔵物質の生産を促進する方法

技術分野

[0001] 本発明は、藻類による貯蔵物質の産生を促進する方法に関し、さらに詳細には、酸化ストレス誘導剤を用いて藻類に恒常的に貯蔵物質を生産させる方法に関する。

背景技術

[0002] 二酸化炭素の発生を抑制するクリーンなエネルギー源として、バイオマス由来の燃料（バイオ燃料）が期待されている。バイオ燃料は、藻類、動物油脂、大豆、トウモロコシ、その他の油脂穀物など様々な資源を用いて生産しうるが、藻類は、穀物等からのバイオ燃料とは異なり食料高騰の問題を引き起こす心配がなく、培養が容易であり、貯蔵物質の種類や生産効率を調節することができることから、次世代エネルギー源として特に注目されている。これまでに、糖類や油脂など、藻類の貯蔵物質の生産能力を高める種々の方法が検討されている。

[0003] 藻類は、窒素を始めとする栄養欠乏により脂肪を蓄積することが知られているが、栄養欠乏により藻類の増殖能が低下する。すなわち、バイオマスの産生を抑制するようなストレス状態が、藻類における脂肪の蓄積を誘導すると考えられる。バイオマスの生産量と脂肪の蓄積量の両方を高める1つの手段として、藻類のバイオマスを増大させる至適条件で藻類を培養した後に、脂肪の蓄積を最大化するストレス条件に変更する二段階培養が行われている（例えば、非特許文献1参照）。さらに窒素飢餓などのストレス状態は、藻類において活性酸素種（ＲＯＳ）の増加を引き起こし、このような酸化ストレスが藻類における脂肪の蓄積のメディエーターであることが示唆されている（例えば、非特許文献２参照）。

[0004] 本発明者らは、藻類の葉緑体内のグルタチオン濃度を増加させることにより、栄養制限工程を行うことなく、バイオマスの生産性を向上させうること

を見出した（例えば、特許文献1参照）。その代謝メカニズムを解明する中で、酸化ストレスと貯蔵物質の生産性との関係に着目した。藻類に酸化ストレスを付与すると脂質含量が増加することは他にも報告されている（例えば、特許文献２及び３参照）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開ＷＯ２０１２／０２９７２７号パンフレット

特許文献1：国際公開ＷＯ２０１５／０８８１２７号パンフレット

特許文献2：特表２０１４－５０００３１号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Csavina JL, Stuart BJ, Riefler RG, Vis ML (2011) Growth optimization of algae for biodiesel production. J Appl Microbiol 111: 312-318.

非特許文献2：Kaan Yilancioglu et al., “Oxidative Stress Is a Mediator for Increased Lipid Accumulation in a Newly isolated Dunaliella salina Strain.” PLOS ONE (2014) Volume 9, Issue 3, e91957

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 従来のような、栄養欠乏等のストレス付与により藻類の貯蔵物質の生産能を上げようとすると、培地中の窒素やリンが不足することにより、細胞の増殖や光合成が停止するという普遍的な応答が見られる。つまり、藻類の細胞を窒素欠乏条件に曝して脂質合成を誘導する場合、同時に細胞増殖の停止や光合成反応の停止が起こり、脂質を蓄積した細胞はやがて死んでしまうため、効率的なバイオ燃料の製造を行うことは難しい。そのため、従来の窒素飢餓状態等において培養する方法では、継続的なバイオマス生産を行うために、培地の交換や細胞の追加供給を人為的に繰り返し行わなくてはならない。このような煩雑な工程は、実験室レベルの小規模な培養条件であれば実現可

能であるが、商業化を目指した大規模な培養になると、培地の交換や細胞の回収に莫大なコストがかかることになるため、産業上、実用化するのは現実的に困難である。

このような状況において、コスト面や作業効率を考慮して、低コストで簡便な、藻類による脂質合成誘導方法の開発が求められている。

課題を解決するための手段

[0008] 上記のような課題に対して、本発明は、より効率的に藻類をバイオマスとして利用するための、藻類の連続培養を可能とする方法を提供するものである。

すなわち、本発明者らは、藻類の培養中に、栄養欠乏状態にすることや抗生物質の添加等により生育阻害することなしに、酸化ストレス誘導剤を所定濃度で添加することにより、藻類の貯蔵物質の生産を促すことを見出した。

したがって、本発明の一実施形態において、藻類による貯蔵物質の産生を促進する方法は、酸化ストレス誘導剤を含む培養液中で、藻類を、光照射条件下にて継続的に培養し増殖させる工程を含むことを特徴とする。

[0009] また、本発明の異なる観点において、上記の方法を用いて藻類を培養する工程と、当該培養液の少なくとも一部を回収する工程と、を含む、藻類による貯蔵物質の製造方法が提供される。

さらに本発明の異なる実施形態としては、上記の方法を用いて藻類を培養する工程と、当該培養液の少なくとも一部を回収する工程と、を含む、藻類を含むバイオマスの製造方法である。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、酸化ストレス誘導剤を培養液中に所定濃度で添加することで、バッチ培養に限らず、藻類を恒常的に物質生産させることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の一実施形態において用いられる連続培養装置（タービドシステム）の概略図である。

[図2]パラコート添加又は無添加の条件下、クラミドモナス・ラインハルディ

をバッチ培養した時の増殖性を調べた結果である。

[図3]パラコート添加又は無添加の条件下、クラミドモナス・ラインハルディをタービドスタットシステムによる連続培養した時のバイオマス量を調べた結果である。

[図4]パラコート添加又は無添加の条件下、クラミドモナス・ラインハルディをタービドスタットシステムにより一週間連続培養した時の細胞当たりのＴＡＧ蓄積量を調べた結果である。

[図5]パラコート添加又は無添加の条件下、クラミドモナス・ラインハルディをタービドスタットシステムにより一週間連続培養した時の細胞当たりのデンプン蓄積量を調べた結果である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施の形態について説明する。本発明の一実施形態は、藻類による貯蔵物質の産生を促進する方法であって、酸化ストレス誘導剤を含む培養液中で、前記藻類を連続培養により増殖させる工程を含む。

[0013] 1 本発明に係る藻類

本明細書において、用語「藻類」とは、光合成能力を有し、光合成産物を生成可能な藻類をいう。このような藻類としては、例えば、緑藻植物門の緑藻綱等に分類される微細藻類が挙げられ、さらに具体的には、緑藻綱のクラミドモナス属に属するクラミドモナス・ラインハルディ（Chlamydomonas reinhardtii）、クラミドモナス・モエブシイ（Chlamydomonas moewusii）、クラミドモナス・ユーガメタス（Chlamydomonas eugametos）、クラミドモナス・セグニス（Chlamydomonas segnis）等；緑藻綱のドナリエラ属に属するドナリエラ・サリナ（Dunaliella salina）、ドナリエラ・テルチオレクタ（Dunaliella tertiolecta）、ドナリエラ・プリモレクタ（Dunaliella primolecta）等；緑藻綱のクロレラ属に属するクロレラ・ブルガリス（Chlorella vulgaris）、クロレラ・ピレノイドーサ（Chlorella pyrenoidosa）等；緑藻綱のヘマトコッカス属に属するヘマトコッカス・プルビアリス（Haematococcus pluvialis）等；緑藻綱のクロロコックム属に属するクロロコックム・リト

ラエ（Chlorococcum littorale）等；緑藻綱または黄緑色藻綱のボトリオコッカス属に属するボトリオコッカス・ブラウニー（Botryococcus braunii）等；緑藻綱のコリシスチス属に属するコリシスチス・マイナー（Choricystis minor）等；緑藻綱のシュードコリシスチス属に属するシュードコリシスチス・ エリプソイディア（Pseudochoricystis ellipsoidea）等；珪藻綱のアンフォーラ属に属するアンフォーラ（Amphora sp.）等；珪藻綱のニッチア属に属するニッチア・アルバ（Nitzschia alba）、ニッチア・クロステリウム（Nitzschia closterium）、ニッチア・ラエビス（Nitzschia laevis）等；渦鞭毛藻綱のクリプセコディニウム属に属するクリプセコディニウム・コーニー（Crypthecodinium cohnii）等；ミドリムシ綱のミドリムシ属に属するユーグレナ・グラチリス（Euglena gracilis）、ユーグレナ・プロキシマ（Euglena proxima）等；繊毛虫門のゾウリムシ属に属するミドリゾウリムシ（Paramecium bursaria）等；藍藻門のシネココッカス属に属するシネココッカス・アクアティリス（Synechococcus aquatilis）、シネココッカス・エロンガタス（Synechococcus elongatus）等；藍藻門スピルリナ属に属するスピルリナ・プラテンシス（Spirulina platensis）、スピルリナ・スブサルサ（Spirulina subsalsa）等；藍藻門のプロクロロコッカス属に属するプロクロロコッカス・マリウス（Prochlorococcus marinus）等；藍藻門のオーシスチス属に属するオーシスチス・ポリモルファ（Oocystis polymorpha）等；等が例示される。

[0014] なお、本発明で用いることのできる藻類は、光合成により脂質及び糖質を生成し、細胞内に蓄積することができるものであればどのようなものでも用いることができ、前記したものに限定されるものではない。

[0015] ２　貯蔵物質

藻類は光合成によって固定した二酸化炭素を原料としてタンパク質のみならず、糖質（でんぷん）、脂肪酸やトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）などの脂質、その他、多種多様な有機物質を生合成する。本明細書において、用語「貯蔵物質」とは、上記藻類において生産され、酸化ストレスを受けて細

胞内に蓄積される糖質及び脂質等の炭素含有率の高い有機物質を意味する。一般に、ＴＡＧ生合成経路は小胞体特異的なアシル転移酵素により行われ、細胞質内の油体に大部分が貯蔵される。他の実施形態においては、主に葉緑体から供給されるジアシルグリセロール（ＤＡＧ）を用いる経路でＴＡＧが合成される場合もある。多くの藻類が、ストレス環境下で細胞乾燥重量の５０％近くまでＴＡＧを蓄積することは知られているが、ＴＡＧと同様にデンプンも細胞に蓄積される。クラミドモナスにおいて窒素欠乏時に蓄積する脂質量とデンプン合成の関係性について調べた結果、脂質よりもデンプンが広範囲な培養条件において還元された炭素の主要な貯蔵物質であるとの報告がある（Fan J et al., FEBS Lett. 2011 Jun 23;585(12):1985-91.）。クラミドモナスではストレス環境下で利用可能な炭素が、でんぷんと脂質合成の間で振り分けられていると考えられる。

[0016] ３　酸化ストレス誘導剤

本明細書において、「酸化ストレス誘導剤」とは、上記藻類の培養液に添加して藻類を培養することによって、藻類の細胞内で活性酸素種（ＲＯＳ）を発生させるものであれば特に限定されるものではなく、この活性酸素種が引き金となって藻類の細胞内で貯蔵物質の産生及び蓄積が促進される。そのメカニズムは必ずしも明らかではないが、培養液中の窒素欠乏などの環境ストレスに対し、藻類が脂質や糖類などのエネルギーを蓄積する自己防衛反応の1つであり、そのメディエーターとして細胞内の活性酸素種が機能しているのではないかと考えられる。このような酸化ストレス誘導剤の一つとして、藻類の細胞内のグルタチオン濃度を変化させる剤が挙げられる。

[0017] 他の実施形態における酸化ストレス誘導剤は、パラコート、過酸化水素及び次亜塩素酸塩からなる群より選択される剤であり、藻類の増殖を維持しうる濃度で藻類の培養液に含まれることが好ましい。好ましい濃度は、酸化ストレス誘導剤の種類によっても異なるが、例えば、パラコートの場合には、０．０５μＭ以上であり、０．１μＭ以上がより好ましく、さらに好ましくは０．２μＭ程度である。一方、培養細胞の増殖性を維持するという観点か

らは、０．５μＭ未満が好ましく、０．４μＭ以下又は０．３μＭ以下がより好ましく、さらに好ましくは約０．２μＭである。

[0018] 本発明者らは、藻類の葉緑体内のグルタチオン濃度を増加させることによって、藻類を窒素欠乏状態にすることなく糖類や油脂等のバイオマスの生産量を向上させることを見出している（特許文献１）。グルタチオンは、細胞内の酸化還元状態を調節する物質であり、細胞又は器官の分化調節剤として機能しうること、及び植物生長調整補助剤として機能しうることが知られている。そして、葉緑体内のグルタチオン濃度が増加すると藻類の細胞内の光合成産物の生産性が向上するが、このとき同時に光照射による光酸化ストレスも増加する。すなわち、葉緑体内の酸化還元状態のバランスが崩れることによって局所的な酸化ストレスが誘導される可能性がある。したがって、本発明における酸化誘導剤として、例えば、光合成阻害型除草剤であるパラコートやジクワットなどのジピリジル系化合物を用いることができる。この化合物は、光化学系Ｉからフェレドキシンを経由する電子伝達系から電子を奪うことにより、安定なラジカル（不対電子をもつ分子）になる。このラジカル化したジピリジル系化合物が元の状態に戻る際に酸素を1電子還元して活性酸素のスーパーオキシドラジカルを生成し、さらに、過酸化水素を生じて葉緑体やミトコンドリアなどの膜に存在する脂質の過酸化を引き起こす。よって、本発明の一実施形態では、主に葉緑体やミトコンドリアなどの細胞内器官において活性酸素種を産生する酸化ストレス誘導剤が好ましい。

[0019] ４　本発明に係る藻類の培養方法

藻類の培養については多くの知見があり、Chlorella属、Arthrospira属（Spirulina）、あるいは、Dunaliella salinaなどは、食用として大規模な工業的な培養が行われている（Spolaore, P. et al. 2006. J. Biosci. Bioeng. 101: 87-96）。クラミドモナス・ラインハルディは、一般的に酢酸を含む培地で培養され、酢酸を炭素源の一つとして脂質を合成する。この藻類は、栄養欠乏、強光条件においてＴＡＧを蓄積するが、光合成独立栄養条件よりも培地中に酢酸を添加した混合栄養条件下において増殖が速いことから、一般

的にはトリス－酢酸－リン酸（ＴＡＰ）培地（Gorman and Levine, Proc Natl Acad Sci U S A. 1965 Dec; 54(6): 1665-1669.）で培養されることが多い。あるいは、培地のｐＨ調整を容易にするため又は光合成により固定される有機物を唯一の炭素源にするため、ＴＡＰ培地から酢酸を除去してもよい。本実施形態では、独立栄養条件、従属栄養条件あるいはこれらの混合栄養条件のいずれであってもよいが、典型的には、増殖に必要な窒素、微量金属の無機塩（例えば、リン、カリウム、マグネシウム、鉄など）、ビタミン類（例えば、チアミンなど）などを含む培地を好適に用いることができる。例えば、ＡＦ－６培地、ＢＧ－１１培地、Ｃ培地、ＭＢＭ培地、ＭＤＭ培地、ＶＴ培地などの培地およびこれらの改変培地などを用いることができる。培地には、上記組成のほか、炭素源、窒素源等の成分を適宜添加してもよい。

[0020] 図１は、本実施形態における藻類の培養に用いられる好適な連続培養装置（タービドシステム）１の概略を示す。図１に示す連続培養槽１０は、例えばガラス製の透明な壁面を有し、その外部に近接してＬＥＤパネル２０が設置されている。エアーコンプレッサー４１から供給される空気と、炭酸ガスシリンダー４５からの炭酸ガスが混合され、コントローラー４２及びエアーポンプ４４を通じて連続培養槽１０に供給される。藻類の生育により増加する連続培養槽１０内の濁度は、センサー３１にて検出され、ＤＯコントローラー３０にて一定値に制御されている。すなわち、連続培養槽１０内の濁度が設定値を超えるとＤＯコントローラーがポンプ３２を作動させて新鮮な培地を供給するとともに、同量の培養液を連続培養槽１０から抜き出して槽内の濁度を一定に保っている。連続培養槽１０は、図示しない外部熱交換器と接続され、培養温度がコントロールされるとともに、滅菌操作も可能である。

[0021] ＬＥＤパネル２０は、連続培養槽１０の側面、底面、天井面や内部などの空間に設置することができ、連続培養槽１０の前後２つの側面に設置することが好ましい。ＬＥＤパネル２０は、電源２１とタイマー２２によって昼夜のサイクルが制御される。例えば、昼１４時間、夜１０時間のサイクルとす

ることができるがこれに限定されない。光の波長及び照射強度も微細藻類の種類によって、至適が異なるが、それぞれ４００ｎｍ～７００ｎｍ、及び１，０００～６０，０００ｌｕｘ程度が通常には用いられる。光源は、屋内では発光ダイオード（ＬＥＤ）又は白色の蛍光灯を用いることが一般的であるが、これに制限されない。屋外にて太陽光で培養することも可能である。

[0022] 培養液には、空気を吹き込むことが通常であり、通気量としては、１分間の培養液体積当たりの通気量０．１～２ｖｖｍ(volume per volume per minute)がエアーポンプ４４から供給される。さらにCO_2を吹き込むことも、生育を早めるために行うことができ、通気量に対して、０．５～５％程度吹き込むのが好ましい。必要に応じて、培養液を適切な強度で撹拌、あるいは循環してもよい。

[0023] 培養は、本培養の体積に対し、１～５０％の前培養液を添加して行うことが通常である。初発のｐＨは６～９の中性付近が好ましく、培養中はｐＨ調整を行わないことが通常であるが、必要に応じて調整してもよい。培養温度は、２０～３５℃が好ましく、特に２５℃付近が一般的によく用いられる温度であるが、培養温度は、用いる藻類に適した温度であれば制限されない。

本実施形態において藻類の培養物とは、藻体を含む培養液、培養液から回収した藻体を包含する。藻体を培養液から回収する方法は、一般的な遠心分離や濾過、あるいは、凝集剤（flocculant）を用いた重力による沈降などの方法で可能である（Grima, E. M. et al. 2003. Biotechnol. Advances 20: 491-515）。

[0024] ５　本発明に係るバイオマスの製造方法

本発明において、「藻類由来のバイオマス」（以下、「藻類バイオマス」または単に「バイオマス」ともいう）としては、上述した貯蔵物質を含む培養後の藻類の藻体そのもの、及び藻類の藻体の処理物が挙げられる。藻類の藻体の処理物としては、特に制限されないが、藻類の藻体の破砕物、および所望の成分を藻類の藻体から抽出した後の残渣（「藻体残渣」または「残藻体」ともいう）が挙げられる。所望の成分としては、バイオ燃料等の有用成

分が挙げられる。バイオ燃料等の有用成分としては、脂肪酸、油脂の加水分解物、テルペノイドやステロイド等の脂質、炭化水素が挙げられる。

実施例

[0025] これより以下、本発明の具体的な一実施例として、クラミドモナス・ラインハルディ（Chlamydomonas reinhardtii）を回分（バッチ）又は連続方式により培養し、細胞密度及び産生されたトリアシルグリセロール（ＴＡＧ）量を調べた実施例を示す。バッチ培養は、パラコート無添加又は添加（０．０５μＭ、０．１μＭ、０．２μＭ、０．５μＭ）のＴＰ培地を含むフラスコにＣＣ－５０３株を植え継ぎ、インキュベータ（２５℃、光量１５０μｍｏｌ／ｍ^{2}ｓ、明期１４時間－暗期１０時間サイクル）にて静置培養した。連続培養は、図１に示すようなタービドスタット（turbidostat）システムを用いて、パラコート無添加又は添加（０．２μＭ）のＡＦ－６培地を含む角形扁平フラスコで、２５℃、光量１００μｍｏｌ／ｍ^{2}ｓ、明期１４時間－暗期１０時間サイクルにて、１％二酸化炭素添加大気２０ｍｌ／分の通気条件下、濁度（OD_{630}）を０．２５に維持しながら培養した。

[0026] なお、上記ＴＰ培地及びＡＦ－６培地組成は以下のとおりである。

[表1]

[表1]TP培地組成

成分名	終濃度(mol／L)
Tris－HCl	2.00×10^{-2}
NH_4Cl	7.00×10^{-3}
$MgSO_4\ 7H_2O$	8.30×10^{-4}
$CaCl\ 2H_2O$	4.50×10^{-4}
KH_2PO_4	1.65×10^{-3}
K_2HPO_4	1.05×10^{-3}
$Na_2EDTA\ 2H_2O$	1.34×10^{-4}
$FeSO_4\ 7H_2O$	3.29×10^{-5}
$MnCl_2\ 4H_2O$	4.00×10^{-5}
$ZnSO_4\ 7H_2O$	1.36×10^{-4}
$CoCl_2\ 6H_2O$	1.23×10^{-5}
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\ 4H_2O$	9.28×10^{-7}
H_3BO_3	1.84×10^{-4}
$CuSO_4\ 5H_2O$	1.00×10^{-5}

NaOHでpH7．0に調整した。

[0027]

[表2]

[表2]AF－6組成

成分名	終濃度(mol／L)
MES緩衝液	2.05×10^{-3}
クエン酸鉄(III)	8.17×10^{-6}
クエン酸	1.04×10^{-5}
$NaNO_3$	1.65×10^{-3}
NH4NO_3	2.75×10^{-4}
$MgSO_4$ $7H_2O$	1.22×10^{-4}
CaCl $2H_2O$	6.80×10^{-5}
KH_2PO_4	7.35×10^{-5}
K_2HPO_4	2.87×10^{-5}
Na_2EDTA $2H_2O$	1.34×10^{-5}
$FeCl_3$ $6H_2O$	3.63×10^{-6}
$MnCl_2$ $4H_2O$	9.10×10^{-7}
$ZnSO_4$ $7H_2O$	3.83×10^{-7}
$CoCl_2$ $6H_2O$	8.41×10^{-8}
Na_2MoO_4 $2H_2O$	5.17×10^{-8}
チアミン塩酸塩(B1)	2.96×10^{-8}
ビオチン(H)	8.19×10^{-9}
塩酸ピリドキシン(B6)	5.91×10^{-9}
シアノコバラミン(B12)	7.35×10^{-10}

NaOHでpH6．6に調整した。

[0028] 図２は、パラコート添加濃度を変化させたバッチ培養における細胞密度を示す。パラコートの添加濃度を０．０５μM、０．１μM、０．２μMに増加させると、細胞の増殖速度は低下するものの増殖が認められる。一方、パラコート０．５μMを添加条件では細胞が死滅していることが分かる。培養後の細胞に終濃度６６μｇ／ｍｌとなるようにＮｅｉｌ Ｒｅｄ（シグマ社製）を加えて染色し、蛍光顕微鏡で観察するとパラコート０．２μM添加条件でのみ油滴が観察された。

[0029] 次に、パラコートの添加有無の条件下、ケモスタットシステムを用いて一週間連続培養した時の２４時間当たりの培養液希釈量の違いを図３に示す。この実験条件では、濁度、すなわち近似的に細胞密度を一定にして培養していることから、培養液の希釈量（培養液量＋廃液量）はバイオマス量を

示しており、パラコート添加条件下で培養したクラミドモナス・ラインハルディのバイオマス量は、無添加の場合の約０．５５倍となった。

[0030] 一方、一週間連続培養後の、細胞当たりのＴＡＧ蓄積量を既報の方法で測定した（Ito, T. et al. 2013. Metabolomics. 9 (Suppl. 1) : 175-187）。すなわち、遠心分離された５×１０^{7}細胞からBligh & Dyer法で脂質を抽出し、得られた抽出物を高速液体クロマトグラフィー-質量分析計を用いて分析することで、単位細胞当たりのＴＡＧ量を算出した。その結果を図４に示す。パラコート無添加の場合に比べ、０．２μＭのパラコート添加条件下では、細胞当たり、約３９倍のＴＡＧ蓄積量が認められた。これらの結果から、クラミドモナス・ラインハルディの連続培養におけるＴＡＧの生産性は、パラコート添加によって約２１倍に増加し、かつ増殖性を維持していることが示された。

[0031] さらに、一週間連続培養後の、細胞当たりのデンプン蓄積量を、デンプンをアミログルコシダーゼによりグルコースに分解後、既報の方法で測定した（Ito, T. et al. 2013. Metabolomics. 9 (Suppl.1) : 175-187）。すなわち、遠心分離された５×１０^{7}細胞を８０％エタノールと８０℃の温水で洗浄し、デンプンを抽出した。得られたデンプンは、アミログルコシダーゼを用いてグルコースに分解し、高速液体クロマトグラフィー／質量分析計を用いて分析することで、グルコース換算による単位細胞当たりのデンプン量を算出した。その結果を図５に示す。パラコート無添加の場合に比べ、０．２μＭのパラコート添加条件下では、細胞当たり、約１９倍のデンプン蓄積量が認められた。これらの結果から、クラミドモナス・ラインハルディの連続培養におけるデンプンの生産性は、パラコート添加によって約１０倍に増加し、かつ増殖性を維持していることが示された。

符号の説明

[0032] １ 連続培養装置（タービドシステム）

１０ 連続培養槽

２０ ＬＥＤパネル

２１　電源

２２　タイマー

３０　ＤＯコントローラー

３１　センサー

３２　ポンプ

３３　ポンプ

３４　撹拌子

４１　エアーコンプレッサー

４２　コントローラー

４４　エアーポンプ

４５　炭酸ガスシリンダー

５１　新鮮培地貯蔵タンク

請求の範囲

[請求項1] 藻類による貯蔵物質の産生を促進する方法であって、

酸化ストレス誘導剤を含む培養液中で、前記藻類を、光照射条件下にて継続的に培養し増殖させる工程を含む、方法。

[請求項2] 前記酸化ストレス誘導剤が、前記藻類の細胞内のグルタチオン濃度を変化させる剤である請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記酸化ストレス誘導剤が、パラコート、過酸化水素及び次亜塩素酸塩からなる群より選択される剤であり、前記藻類の増殖を維持しうる濃度で前記培養液に含まれる請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 前記貯蔵物質が、炭素密度の高い有機物質である、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項5] 前記貯蔵物質が、脂質及び／又は糖質である、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

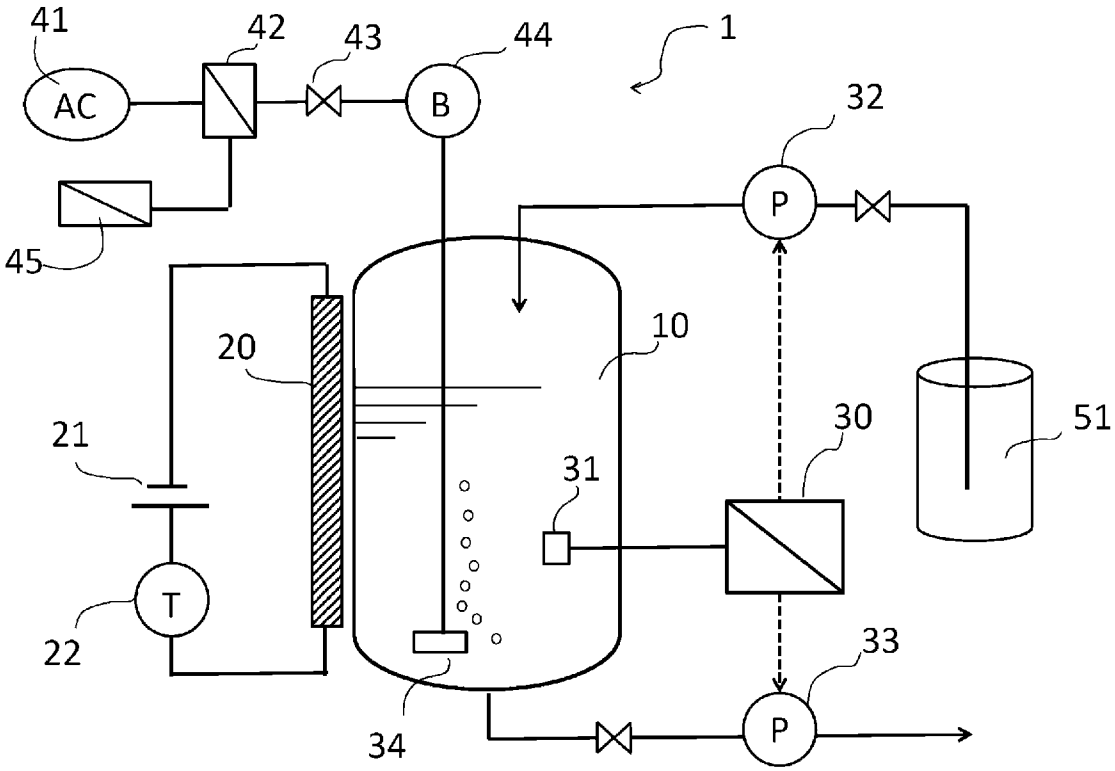
[請求項6] 請求項１～５のいずれか一項に記載の方法を用いて藻類を培養する工程と、

前記培養液の少なくとも一部を回収する工程と、を含む、藻類による貯蔵物質の製造方法。

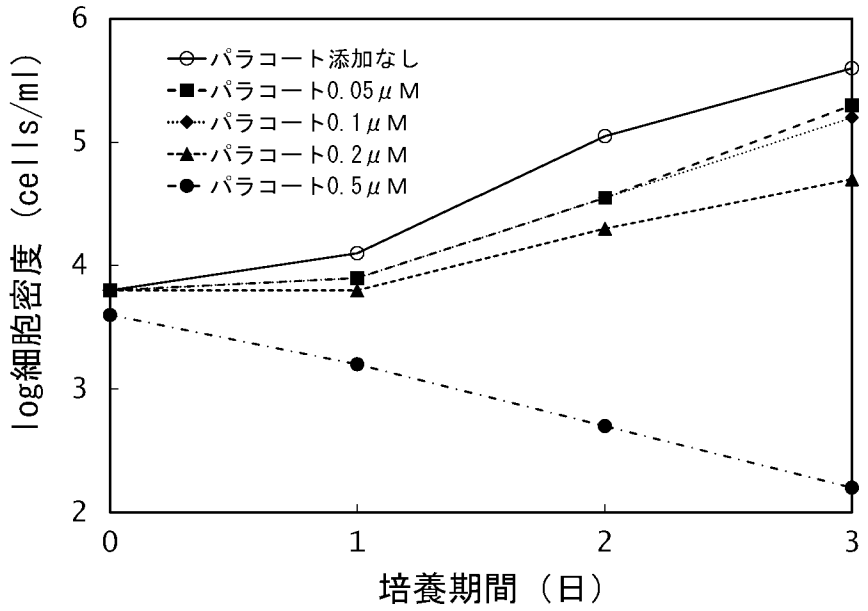
[請求項7] 請求項１～５のいずれか一項に記載の方法を用いて藻類を培養する工程と、

前記培養液の少なくとも一部を回収する工程と、を含む、藻類を含むバイオマスの製造方法。

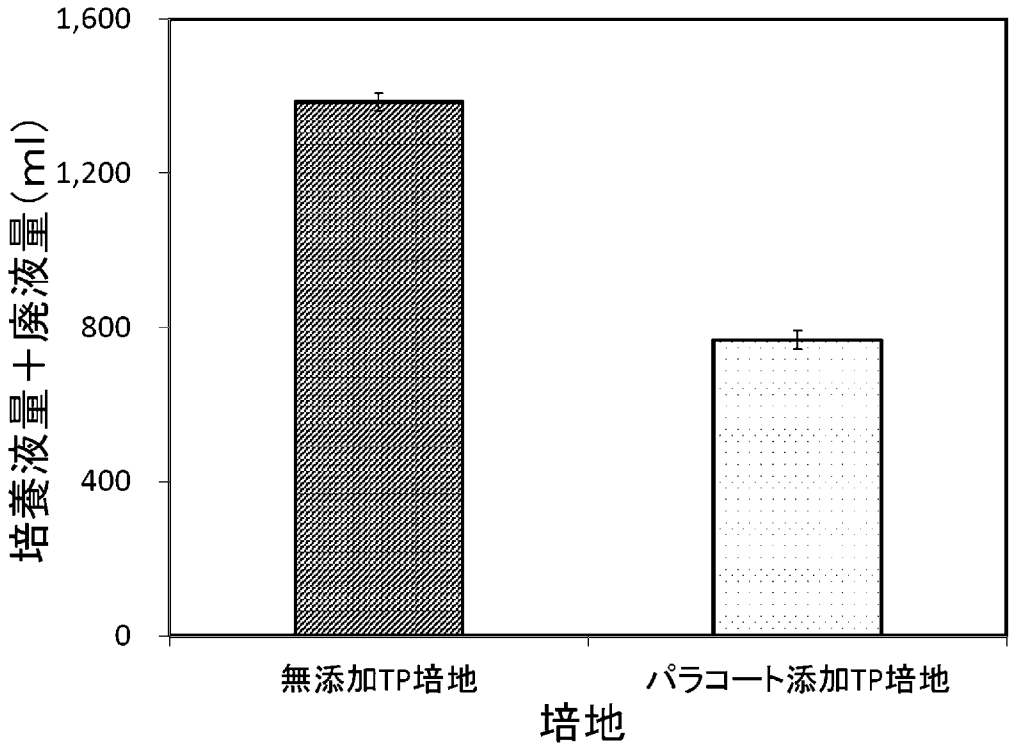
[図1]


41
42
43
44
1
AC
B
32
P
45
20
10
21
30
51
31
T
22
33
34
P

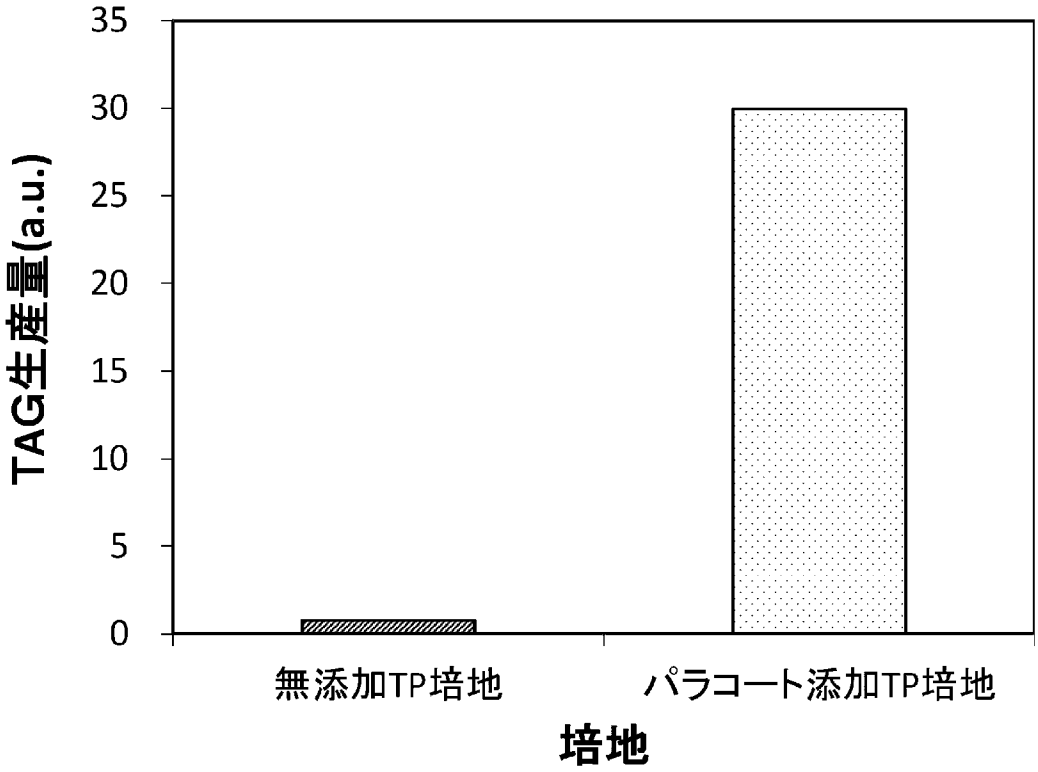
[図2]


パラコート添加なし
パラコート0.05μM
パラコート0.1μM
パラコート0.2μM
パラコート0.5μM
log細胞密度（cells/ml）
培養期間（日）
6
5
4
3
2
0
1
2
3

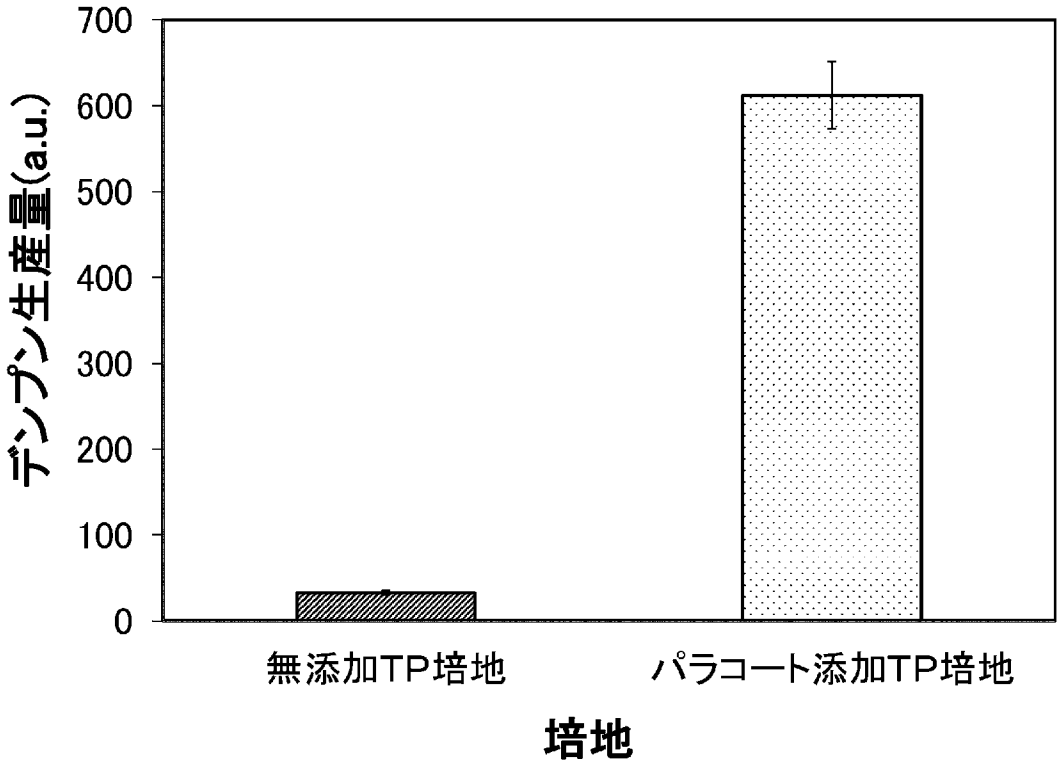
[図3]


1,600
1,200
800
400
0
培養液量＋廃液量（ml）
無添加TP培地
パラコート添加TP培地
培地

[図4]


35
30
25
20
15
10
5
0
TAG生産量(a.u.)
無添加TP培地
パラコート添加TP培地
培地

[図5]


700
600
500
400
300
200
100
0
デンプン生産量(a.u.)
無添加TP培地
パラコート添加TP培地
培地

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/017865

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12N1/12(2006.01)i, C12P7/64(2006.01)i, C12P19/04(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)
Int.Cl. C12N1/12, C12P7/64, C12P19/04

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	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/FSTA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	BATTAH, M. et al., "Effect of Mn^{2}+, Co^{2}+ and H_2O_2 on biomass and lipids of the green microalga Chlorella vulgaris as a potential candidate for biodiesel production", Ann Microbiol (2015), vol. 65, pp. 155-162, abstract, materials and methods, table 3, fig. 3	1-7 3-7
X Y	ABO EL-BAKY, H. H. et al., "Enhancement of antioxidant production in Spirulina platensis under oxidative stress", Acta Physiol Plant (2009), vol. 31, pp. 623-631, abstract, materials and methods, table 1, fig. 1	1-3, 6, 7 3, 4, 6, 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	Date of mailing of the international search report
25 June 2018 (25.06.2018)	10 July 2018 (10.07.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/017865

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2014-500031 A (SANBO INTERNATIONAL ESTABLISHMENT) 09 January 2014, claims & US 2014/0295530 A1, claims & WO 2012/085086 A1 & EP 2468878 A1	1, 2, 6, 7 3, 4, 6, 7
X Y	YILANCIOGLU, K. et al., "Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated Dunaliella salina strain", Plos One (2014), vol. 9, issue 3, e91957, pp. 1-13, abstract, fig. 4C	1-7 3-7
X Y	KIM, B. et al., "Magnesium aminoclay enhances lipid production of mixotrophic Chlorella sp. KR-1 while reducing bacterial populations", Bioresource Technology (2016), vol. 219, pp. 608-613, abstract, fig. 2, materials and methods	1, 2, 4-7 3-7
X Y	YIN-NIN MA R. et al., "Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga Chlorococcum sp", Process Biochemistry (2001), vol. 36, pp. 1175-1179, abstract, table 1, materials and methods	1-3, 6, 7 3, 4, 6, 7
Y	TSUJI, N. et al., "Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in Dunaliella tertiolecta by Zn-induced phytochelatin sysntehsis", Biochem Biophys Res Commun (2002), vol. 293, pp. 653-659, abstract	3-7
Y	VOGS, C. et al., "Time-dependent effects in algae for chemicals with different adverse outcome pathways: a novel approach", Environ Sci Technol (2016), vol. 50, pp. 7770-7780, table S1	3-7
Y	SMALL, D. A. et al., "Toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in Pseudomonas aeruginosa", Appl Microbiol Biotechnol (2007), Vol. 74, pp. 176-185, abstract	3-7
Y	ZAVODNIK, I. B. et al., "Hypochlorous acid-induced oxidative stress in Chinese hamster B14 cells: viability, DNA and protein damage and the protective action of melatonin", Mutation Research (2004), vol. 559, pp. 39-48, abstract	

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１７８６５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/12(2006.01)i, C12P7/64(2006.01)i, C12P19/04(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/12, C12P7/64, C12P19/04

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	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８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)
CAplus/FSTA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(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 Y	BATTAH M. et al., Effect of Mn^{2+}, Co^{2+} and H_2O_2 on biomass and lipids of the green microalga Chlorella vulgaris as a potential candidate for biodiesel production, Ann Microbiol (2015), Vol.65, p.155-162, Abstract, Materials and methods, Table 3, Fig.3	1-7 3-7
X Y	ABD EL-BAKY H.H. et al., Enhancement of antioxidant production in Spirulina platensis under oxidative stress, Acta Physiol Plant (2009), Vol.31, p.623-631, Abstract, Materials and methods, Table 1, Fig.1	1-3,6,7 3,4,6,7

☑　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	国際調査報告の発送日
２５．０６．２０１８	１０．０７．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
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）　４Ｂ　１１９５
松田　芳子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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
X Y	JP 2014-500031 A (サンボ　インターナショナル　エスタブリッシュメント) 2014.01.09, 特許請求の範囲 & US 2014/0295530 A1, Claims & WO 2012/085086 A1 & EP 2468878 A1	1,2,6,7 3,4,6,7
X Y	YILANCIOGLU K. et al., Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated Dunaliella salina strain, Plos One (2014), Vol.9, Issue 3, e91957, p1-13, Abstract, Fig.4C	1-7 3-7
X Y	KIM B. et al., Magnesium aminoclay enhances lipid production of mixotrophic Chlorella sp. KR-1 while reducing bacterial populations, Bioresource Technology (2016), Vol.219, p.608-613, Abstract, Fig.2, Materials and methods	1,2,4-7 3-7
X Y	YIN-NIN MA R. et al., Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga Chlorococcum sp, Process Biochemistry (2001), Vol. 36, p.1175-1179, Abstract, Table 1, Materials and methods	1-3,6,7 3,4,6,7
Y	TSUJI N. et al., Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in Dunaliella tertiolecta by Zn-induced phytochelatin sysntehsis, Biochem Biophys Res Commun (2002), Vol.293, p.653-659, Abstract	3-7
Y	VOGS C. et al., Time-dependent effects in algae for chemicals with different adverse outcome pathways: a novel approach, Environ Sci Technol (2016), Vol.50, p.7770-7780, TableS1	3-7
Y	SMALL D.A. et al., Toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in Pseudomonas aeruginosa, Appl Microbiol Biotechnol (2007), Vol.74, p.176-185, Abstract	3-7
Y	ZAVODNIK I.B. et al., Hypochlorous acid-induced oxidative stress in Chinese hamster B14 cells: viability, DNA and protein damage and the protective action of melatonin, Mutation Research (2004), Vol.559, p.39-48, Abstract	3-7