

(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  
2017年8月24日(24.08.2017)



(10) 国際公開番号  
WO 2017/141318 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12P 7/64 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/054301
- (22) 国際出願日: 2016年2月15日(15.02.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1番1号 Hyogo (JP). 大学共同利用機関法人自然科学研究機構(INTER-UNIVERSITY RESEARCH INSTITUTE CORPORATION NATIONAL INSTITUTES OF NATURAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒1818588 東京都三鷹市大沢二丁目2番1号 Tokyo (JP). D I C株式会社(DIC CORPORATION) [JP/JP]; 〒1748520 東京都板橋区坂下3丁目3番5号 Tokyo (JP).

(HASUNUMA Tomohisa); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1番1号 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 加藤 悠一(KATO Yuichi); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1番1号 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 皆川 純(MINAGAWA Jun); 〒4448585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中3番8号 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 基礎生物学研究所内 Aichi (JP). 西江 晴男(NISHIE Haruo); 〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C株式会社 総合研究所内 Chiba (JP). 太郎田 博之(TARODA Hiroyuki); 〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C株式会社 総合研究所内 Chiba (JP).

- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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, 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,

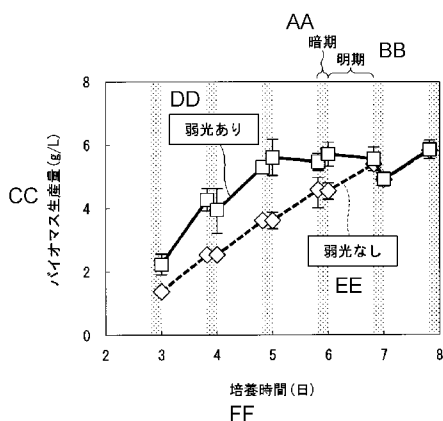
- (72) 発明者: 近藤 昭彦(KONDO Akihiko); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1番1号 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 蓮沼 誠久

[続葉有]

(54) Title: PRODUCTION METHOD OF FAT AND OIL

(54) 発明の名称: 油脂の製造方法

[図1A]



- AA Dark period
- BB Bright period
- CC Biomass production amount (g/L)
- DD Low light preset
- EE Low light absent
- FF Incubation time (days)

(57) Abstract: A production method of fat and oil according to the present invention comprises a step of incubating a halotolerant algae in a culture medium that includes salt, wherein the incubation is performed outside and wherein the halotolerant algae is irradiated with a total of 50 to 2500 mmol photons/m<sup>2</sup> of light at night.

(57) 要約: 耐塩性藻類を、塩を含む培地中で培養する工程を備える油脂の製造方法であって、前記培養を屋外で行い、夜間に合計50~2500mmol photons/m<sup>2</sup>の光を照射する、製造方法。

WO 2017/141318 A1



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.

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).

(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

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称： 油脂の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、油脂の製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] 光合成生物とは、光エネルギーを利用してCO<sub>2</sub>を固定する生物の総称である。特に藻類は、培養条件が良好であれば光合成効率が高い光合成生物の一種である。藻類の工業的培養は半世紀以上にわたって行われており、工業原料、燃料、飼料、健康食品等としての需要があり、今後も藻類の工業的培養は産業上重要な位置を占めると考えられる。

[0003] 今後、化石燃料の枯渇化が懸念されることから、代替燃料の探索の必要性が高まっている。また、近年、需要者の健康志向の向上から、健康食品への需要が増加し、藻類が産生する有用成分への関心が高まっている。

[0004] このような背景のもと、例えば、特許文献1には、藻類生成物を生成するために藻類を生育するための方法が記載されている。より具体的には、(1)藻細胞分裂の速度及び藻細胞数を増加させるように、第1の従属栄養もしくは光従属栄養生育条件下で該藻類を生育することと、(2)藻類生成物を生成するために第2の生育条件下で該藻類を生育することと、を含み、藻細胞数は、該第2の生育条件下では著しく増加しない方法が記載されている。また、前記藻類生成物は、油又は脂質であることが記載されている。

[0005] また、特許文献1には、前記第1の生育条件下では、細胞分裂および藻類増殖(生育段階)を促進し、前記第2の生育条件下では、生育した藻細胞を生成物の生成(生成段階)に集中させることが記載されている。さらに、前記第2の生育条件においては、藻細胞の生育は、大部分のエネルギー及び資源を、更なる細胞分裂/増殖ではなく所望の藻類生成物の生成に費やすことが記載されている。また、特許文献1には、前記第1の生育条件は第1のバイオリクター内で、前記第2の生育条件は第2のバイオリクター内で行

うことが記載されている。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0006] 特許文献1：特表2012-512655号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1の技術によれば、好適に所望の油脂を生産することができる。しかしながら、かかる技術を屋外培養に適用しようとする、所望の油脂が好適に製造できない場合があることが判明した。

[0008] そこで、本発明は、屋外培養に適用する場合であっても、所望の油脂を好適に製造する技術を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは鋭意検討を行った結果、屋外培養の際に必然的に生じる明暗周期において、夜間に光を照射させることで本発明の課題が解決されうることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の態様を含む。

(1) 耐塩性藻類を、塩を含む培地中で培養する工程を備える油脂の製造方法であって、前記培養を屋外で行い、夜間に合計 $50\sim 2500\text{mmol photons/m}^2$ の光を照射する、製造方法。

(2) 前記光の照射が、夜間に $2\sim 50\mu\text{mol photons/m}^2/\text{秒}$ の光を連続的に照射するものである、(1)に記載の製造方法。

(3) 前記培地中の塩濃度を段階的に増加させる、(1)又は(2)に記載の製造方法。

(4) 耐塩性藻類が、クラミドモナス属の藻類である、(1)～(3)のいずれかに記載の製造方法。

(5) 前記クラミドモナス属の藻類が、クラミドモナス・スピーシーズJSC4株である、(4)に記載の製造方法。

## 発明の効果

[0010] 本発明によれば、屋外培養においても好適に油脂を製造することができる。

## 図面の簡単な説明

- [0011] [図1A]実験例1におけるバイオマス生産量の経時変化を示す。  
[図1B]実験例1における油脂含有率の経時変化を示す。  
[図1C]実験例1における油脂生産量の経時変化を示す。  
[図1D]実験例1におけるデンプン含有率の経時変化を示す。  
[図2A]実験例1におけるバイオマス生産量の経時変化を示す。  
[図2B]実験例2における油脂含有率の経時変化を示す。  
[図2C]実験例2における油脂生産量の経時変化を示す。  
[図3A]実験例3におけるバイオマス生産量の経時変化を示すグラフである。  
[図3B]実験例3における油脂含有率の経時変化を示すグラフである。  
[図4A]実験例4におけるバイオマス生産量の経時変化を示すグラフである。  
[図4B]実験例4における油脂含有率の経時変化を示すグラフである。

## 発明を実施するための形態

- [0012] 一実施形態において、本発明は、耐塩性藻類を、塩を含む培地中で培養する工程を備える油脂の製造方法であって、前記培養を屋外で行い、夜間に合計50～2500mmol photons/m<sup>2</sup>の光を照射する、製造方法を提供する。
- [0013] 耐塩性藻類を用いた油脂の製造は、将来的には耐塩性藻類を屋外で大規模に培養することにより行われることが想定される。しかしながら、実施例において後述するように、発明者らは、耐塩性藻類を培養して油脂を製造する場合に、培養を屋外で行うと、所望の油脂が好適に製造できない場合があることを見出した。
- [0014] 発明者らは、更に、この原因の1つとして、培養中に暗期（夜）が存在することが挙げられ、夜間に所定の強度の光を照射することにより、デンプンの生産を低下させ、油脂の製造効率を向上させることができることを明らか

にし、本発明を完成させた。

- [0015] ここで、耐塩性藻類の培養を屋外で行うとは、耐塩性藻類の培養を屋外で、又は屋外と同等の環境下で培養することを意味する。より具体的には、太陽光により耐塩性藻類を培養する場合において、明暗周期が生じる状況で培養することを意味する。
- [0016] 上述したように、本実施形態の油脂の製造方法では、耐塩性藻類の培養を屋外で行い、夜間に所定の強度の光を照射することにより、デンプンの生産を低下させ、油脂の製造効率を向上させる。本明細書において、夜間とは、1日あたりの暗期の合計時間を意味する。この際、本明細書において暗期とは、照射される光量が  $2 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{秒}$  未満であることを意味する。屋外における夜間は、通常、1日1回の連続した時間である。
- [0017] しかしながら、エネルギーコストの観点等から、夜間に照射する光の量は最小限であることが好ましい。夜間における合計の光照射量が  $50 \text{mmol photons}/\text{m}^2$  以上、例えば  $100 \text{mmol photons}/\text{m}^2$  以上、例えば  $500 \text{mmol photons}/\text{m}^2$  以上、例えば  $1000 \text{mmol photons}/\text{m}^2$  以上であれば、耐塩性藻類の培養を屋外で行う場合においても油脂の製造効率を向上させることができる。
- [0018] 油脂の製造量の観点からは、夜間における合計の光照射量が多いほど好ましいが、エネルギーコストの観点等から、夜間における合計の光照射量の上限は  $2500 \text{mmol photons}/\text{m}^2$  程度である。
- [0019] 夜間における光の照射は、照射量の合計が  $50 \sim 2500 \text{mmol photons}/\text{m}^2$  の光を照射であれば特に制限されず、例えば、一定の強度の光を連続的に照射してもよい。具体的には、夜間に  $2 \sim 50 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{秒}$  の光を連続的に照射してもよい。ここで、連続的とは、夜間に暗期が生じないように光を照射することを意味する。
- [0020] あるいは、夜間に強度の異なる光を連続的に照射してもよい。例えば、 $10 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{秒}$  の光を所定時間照射した後、 $30 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{秒}$  の光を所定時間照射する等の照射パターンが

挙げられる。

[0021] あるいは、夜間に一定の強度の光を断続的に照射してもよい。ここで、断続的にとは、暗期が所定時間生じることを意味する。例えば、 $30 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{秒}$ の光を所定時間照射した後、所定時間暗期にし、再び $30 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{秒}$ の光を所定時間照射する等の照射パターンが挙げられる。本実施形態において、暗期は短いほど好ましい。暗期の長さは、例えば10分以下であってもよく、例えば1分以下であってもよく、例えば30秒以下であってもよく、例えば10秒以下であってもよい。

[0022] あるいは、夜間に強度の異なる光を断続的に照射してもよい。例えば、 $10 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{秒}$ の光を所定時間照射した後、所定時間暗期にし、続いて $30 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{秒}$ の光を所定時間照射する等の照射パターンが挙げられる。本実施形態においても、上記実施形態と同様に、暗期は短いほど好ましい。

[0023] 夜間に照射する光の光源は、例えば蛍光灯であってもよく、LEDであってもよい。また、照射する光は、白色光であってもよく、波長400~700nmの光であってもよい。

[0024] [耐塩性藻類]

本実施形態の油脂の製造方法で用いる耐塩性藻類は、耐塩性のものであれば特に限定されず、例えばクラミドモナス (*Chlamydomonas*) 属の藻類、クロレラ (*Chlorella*) 属の藻類、ドナリエラ (*Dunaliella*) 属の藻類、ナンノクロロプシス (*Nannochloropsis*) 属の藻類、ボツリオコッカス (*Botryococcus*) 属の藻類、キートケロス・ムエレリ (*Chaetoceros*) 属の藻類、クロコッカム (*Chlorecocum*)、ユーグレナ (*Euglena*) 属の藻類、ヘマトコッカス (*Haematococcus*) 属の藻類、イソクリシス (*Isochrysis*) 属の藻類、ナビキュラ (*Navicula*) 属の藻類、ネオクロリス (*Neochloris*) 属の藻類、ポルフ

イリディウム (*Porphyridium*) 属の藻類、プリムネシウム (*Prymnesium*) 属の藻類、セネデス (*Scenedes*) 属の藻類、スピルリナ (*Spirulina*) 属の藻類、スピロギラ (*Spirogyra*) 属の藻類、シネココッカス (*Synechococcus*) 属の藻類、テトラセルミス (*Tetraselmis*) 属の藻類等が挙げられる。中でも、クラミドモナス属の藻類、クロレラ属の藻類、ドナリエラ属の藻類、ナンノクロロプシス属の藻類が好ましい。

[0025] クラミドモナスは、緑藻綱クラミドモナス目（もしくはオオヒゲマワリ目）に属する単細胞の鞭毛虫からなる属である。クラミドモナスの多くは淡水産であるが、海水中に生育するものもある。海生のクラミドモナス属の藻類とは、海産や汽水産及び海水塩を含む培地で生育可能なクラミドモナス属の藻類をいう。クラミドモナス属の藻類としては、コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*)、クラミドモナス・スピーシーズ JSC4 株 (*Chlamydomonas* sp. JSC4、FERM BP-22266) 等が挙げられる。

[0026] クロレラ属の藻類としては、クロレラ・ブルガリス (*Chlorella vulgaris*)、クロレラ・ピレノイドサ (*Chlorella pyrenoidosa*)、クロレラ・ソロキニアナ (*Chlorella sorokiniana*) 等が挙げられる。中でも、クロレラ・ソロキニアナが好ましい。クロレラ・ソロキニアナとしては、クロレラ・ソロキニアナ NIES-2168 株が挙げられる。

[0027] ドナリエラ属の藻類としては、ドナリエラ・ビオクラータ (*Dunaliella bioculata*)、ドナリエラ・サリナ (*Dunaliella salina*)、ドナリエラ・テルチオレクタ (*Dunaliella tertiolecta*) 等が挙げられる。ドナリエラ・サリナとしては、ドナリエラ・サリナ NIES-2168 株が挙げられる。ドナリエラ・ビオクラータとしては、ドナリエラ・ビオクラータ NIES-2253 株が挙げられる。ドナリエラ・テルチオレクタとしては、ドナリエラ・テルチオ

レクタNIES-2258株が挙げられる。

[0028] ナンノクロロプシス属の藻類としては、ナンノクロロプシス オキュラータ (*Nannochloropsis oculata*) が挙げられる。ナンノクロロプシス オキュラータとしては、ナンノクロロプシス オキュラータNIES-2146株が挙げられる。

[0029] 本実施形態の油脂の製造方法で用いる耐塩性藻類としては、中でも、クラミドモナス属の藻類が好ましく、クラミドモナス・スピーシーズJSC4株が特に好ましい。クラミドモナス・スピーシーズJSC4株は、2014年3月5日付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（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）にプタベスト条約の規定下で受託番号FERM BP-22266として国際寄託されている。

[0030] [培地]

本実施形態の油脂の製造方法において、培地としては、耐塩性藻類が生育するものであればとくに制限されず用いることができる。より具体的には、改変Bold 3N培地、改変Basal培地、改変Bristol培地、BG-11培地、改変HSM培地、MB6N培地等が挙げられる。

[0031] (塩)

塩は、耐塩性藻類の増殖を抑制又は防止するとともに、油脂の産生を促進する機能を有する。このため、塩は、耐塩性藻類の培養当初から培地に添加されていてもよいし、耐塩性藻類の増殖をさせた後に培地に添加してもよい。また、耐塩性藻類を、塩を含まない培地を用いて増殖させた後、塩を含む培地に移動させて培養してもよい。

[0032] 塩としては、例えば、海水塩、海水、海水の濃縮液、人工海水等が挙げられる。ここで、海水塩は、海水を蒸発乾固させたものであってもよい。また、人工海水は、海水の組成を模して人工的に調整された粉末や濃縮液のことであり、海水を必要とする生物の飼育や培養において、入手性、再現性、廉価性に優れ、天然海水の代用として利用できるものである。市販の人工海水は、塩化ナトリウムを主成分として、様々な無機塩類やpH調整剤等が含ま

れており、水道水や蒸留水で希釈することにより海水に近い成分となる。

[0033] 塩としては、上記の海水塩、人工海水に限られず、適宜の塩を調整して用いてもよい。例えば、藻類の大量培養を想定した場合には、海水を用いることに利便性があるが、塩化ナトリウムを用いても、油脂の産生量に対して同様の効果を奏することができる。

[0034] 本実施形態の油脂の製造方法において、塩は、上記のいずれの塩であってもよいが、培地中の塩濃度を調整しやすい点で、海水塩、人工海水等が使いやすい。

[0035] (塩濃度の段階的制御)

実施例において後述するように、夜間に光を照射するとともに、培地中の塩濃度を段階的に増加させることにより、油脂の生産量を更に向上させることができる。より詳細には、初期の段階においては、塩濃度が低いため、耐塩性藻類の増殖が好適に生じる。そして、段階的に塩濃度を増加させることにより、耐塩性藻類の増殖は抑制又は防止され、一方で初期段階において増殖した耐塩性藻類が油脂を産生する。これにより、油脂を効率的かつ大量に生産することができる。

[0036] 本明細書において、耐塩性藻類を培養し始めた時に用いた培地中の塩濃度を「1段階目の塩濃度」という場合がある。培地中の塩濃度を1回のみ増加させた場合、藻体回収時の培地中の塩濃度は「2段階目の塩濃度」となる。また、塩濃度を多段階増加させた場合、例えば、培地中の塩濃度をN回(Nは、2以上の整数を示す。)増加させた場合、藻体回収時の培地中の塩濃度は「N+1段階目の塩濃度」となる。

[0037] 藻類の増殖効率を高める観点から、培地における1段階目の塩濃度は、0.01~5%(w/v)であることが好ましく、0.01~3%(w/v)であることがより好ましく、0.01~2%(w/v)が更に好ましい。1段階目の培養期間としては、用いる耐塩性藻類の増殖速度によって異なるが、1日~3日が好ましい。

[0038] 培地中の塩濃度は、0.5~5%(v/w)ずつ段階的に増加させてもよ

い。塩濃度の段階的制御方法としては、培地中の塩濃度を1回のみ増加させる「2段階培養法」と、培地中の塩濃度をN回（Nは、2以上の整数を示す。）増加させる「多段階培養法（グラジエント法ともいう。）」が挙げられる。なお、塩濃度一定の培養方法を「バッチ法」という場合がある。

[0039] 最終的な培地中の塩濃度（藻体回収時の培地中の塩濃度）は、2%（v/w）以上であることが好ましく、3%（v/w）以上であることがより好ましく、5%（v/w）以上であることが更に好ましい。

[0040] （2段階培養法）

2段階培養法において、増加させる塩濃度は、0.5～5%（v/w）が好ましく、1～5%（v/w）がより好ましい。2段階目の培養期間としては、用いる耐塩性藻類の増殖速度によって異なるが、3日～8日が挙げられる。

[0041] （多段階培養法）

多段階培養法において、段階ごとに増加させる塩濃度は、0.5～2%（v/w）であることが好ましく、0.5%～1.5%であることがより好ましい。段階ごとに増加させる塩濃度は、それぞれ異なってもよいが、培養が容易である観点から同じであることが好ましい。同様に、各段階における培養期間は、それぞれ異なってもよいが、同じであることが好ましい。各段階における培養期間は、1日～3日が好ましく、1日がより好ましい。

[0042] 段階数（上述したN）としては、2～7であることが好ましく、3～5であることがより好ましい。2～N段階目の総培養期間としては、用いる耐塩性藻類の増殖速度によって異なるが、3日～8日が好ましく、4日～6日がより好ましい。

[0043] なお、藻類の大量培養を想定した場合には、海水を用いることに利便性があるが、塩化ナトリウムを用いても、油脂産生に対して同様の効果を有し、好ましく用いることができる。

[0044] （培養方法）

本実施形態の油脂の製造方法において、耐塩性藻類の培養方法は、公知慣

用の方法で行うことができる。培養においては、上述した培地を用いることができる。培養方法としては、静置培養法を用いることも可能であるが、油脂の生産性を考えると、振とう培養法又は深部通気攪拌培養法が好ましい。振とう培養は、往復振とうであっても、回転振とうであってもよい。培養温度は、15～40℃が挙げられる。

[0045] 培養終了後、培養液からの藻体の回収は、一般的な方法である遠心分離法や、濾紙又はガラスフィルターによるろ過等により行なうことができる。このようにして回収した藻体は、そのまま用いてもよく、凍結乾燥法、熱風乾燥法等により乾燥藻体にしてもよい。得られた藻体又は乾燥藻体から、油脂成分を抽出することができる。

[0046] 培養中に炭酸ガスを供給することが好ましい。炭酸ガスの供給方法としては、公知慣用の方法が挙げられる。例えば、培養液中に通気することが挙げられる。

[0047] (油脂)

本実施形態の油脂の製造方法により製造される油脂はトリグリセリドである。トリグリセリドは、グリセリンのアシル体であり、アルキルエステル化することによりバイオディーゼル燃料として利用することができる。本実施形態の油脂の製造方法により製造されるトリグリセリドは、グリセリンと脂肪酸とのエステル体であり、脂肪酸としては炭素数10～30の飽和脂肪酸又は不飽和脂肪酸である。

[0048] 上記のトリグリセリドを加水分解することにより、燃焼効率の高い高級不飽和脂肪酸を製造することができる。燃焼効率の高い高級不飽和脂肪酸としては、オレイン酸、リノレン酸等が挙げられる。中でも、燃焼効率が特に高いことからオレイン酸が好ましい。

[0049] (油脂の抽出方法)

藻体から油脂成分を抽出する方法としては、特に制限されず、通常の油脂の抽出方法を用いることができる。具体的には、Folch法やBligh-Dyer法に代表されるクロロホルム／メタノール系等の有機溶媒による

一般的な抽出方法が挙げられる。

### 実施例

[0050] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0051] (バイオマス生産量の測定)

バイオリクターから採取した液体試料を、予め精密に秤量した0.45  $\mu$ m孔径のフィルターでろ過し、これを恒量になるまで凍結乾燥して精密に秤量した。ろ過前後のフィルター質量の差を、ろ過した液体試料量で割り、藻濃度を決定した。以下、藻濃度を「バイオマス生産量」という場合がある。

[0052] (油脂含有率及び油脂生産量の測定)

凍結乾燥した藻体15mgを、直径0.5mmのガラスビーズ0.5gが入ったマイクロバイアルに取り、これに1mLの0.5M KOH溶液を加えて、ビーズビーター式ホモジナイザーで40分破碎処理した。処理液を7mLの0.5M KOH溶液で共洗いしながら50mL容耐熱ガラスビンに移して密栓し、ウォーターバス中で100℃、15分間処理した。室温まで冷却後、8mLの0.7M HClメタノール溶液と10mLの14% (v/v) 3フッ化ホウ素メタノール溶液(シグマ・アルドリッチ社)を加え、再度ウォーターバス中で100℃15分間処理した。室温まで冷却後、4mLの飽和食塩水と3mLのn-ヘキサンを加えて、ボルテックスミキサーで5分間攪拌した。攪拌した液を50mLプラスチック遠沈管に移して7000rpmで2分間遠心分離した。

[0053] 上清100 $\mu$ Lをエッペンドルフチューブに取り、890 $\mu$ Lのn-ヘキサンと10 $\mu$ Lの内部標準物質(ペンタデカン酸メチル、シグマ社)を加えた後、10000rpmで3分間遠心分離し、上清をGCMS分析装置で分析した。

[0054] GCMS分析装置(GCMS-QP2010Plus、島津製作所)には、DB-23キャピラリーカラム(0.25mm $\phi$ ×60m、0.15 $\mu$ m

膜厚、アジレント・テクノロジー社)を装着し、ヘリウムガスを毎分2.3 mL流した。インジェクター、イオン源及びインターフェース温度は、それぞれ230、230及び250°Cに設定し、カラム温度は、試料注入後1分間50°Cで保持後に毎分25°Cで175°Cまで昇温し、更に毎分4°Cで230°Cまで昇温後5分間保持した。上記上清1 µLを注入して、スプリット比5:1でカラム分離して、脂肪酸メチルエステルの各成分を50~500 m/zのフルスキャンモードで検出し、内部標準の添加量を基に油脂の質量を定量した。続いて、藻体の質量に対する油脂の質量を算出し、油脂含有率(質量%)とした。また、上述したバイオマス生産量と油脂含有率との積により、油脂生産量を算出した。

[0055] (デンプン含有率の測定)

凍結乾燥した藻体5 mgを蒸留水1 mLに懸濁し、これを蒸留水で10倍希釈した。この希釈液100 µLに対し、2 mgのアントロン、750 µLの97%硫酸、250 µLの蒸留水の混合液1 mLを加えてボルテックスミキサーで攪拌し、100°Cで15分間処理した。続いて、氷上で15分間静置した後、15000 rpmで5分間遠心分離した。上清の波長620 nmの吸光度を測定し、グルコース標準液の検量線を元に濃度を算出し、デンプン含有率を求めた。

[0056] [実験例1]

明暗周期下で耐塩性藻類を培養するとともに、培地中の塩濃度を変化させて、油脂の製造効率を検討した。具体的には、表1に組成を示すMB6N培地1 Lに海水塩を0.1% (w/v) 添加して複数のバイオリアクターに入れ、オートクレーブ滅菌した。続いて、各バイオリアクター内の培地に、クラミドモナス・スピーシーズJSC4株を、藻濃度が約100 mg/Lとなるように接種した。続いて、バイオリアクターを2群に分け、それぞれ以下に示す「弱光なし」及び「弱光あり」の条件下で約2日間培養した(以下、「弱光なし群」及び「弱光あり群」という場合がある。)。なお、弱光あり条件の暗期における合計の光照射量は、 $30 \mu\text{mol photons}/\text{m}^2$

／秒×(60×60×4)秒=432mmol photons/m<sup>2</sup>であった。

[0057] 次に、各バイオリクター内に海水塩を終濃度2% (w/v) となるように添加し、以下に示す「弱光なし」及び「弱光あり」の条件下で更に培養を続けた。経時的にバイオリクター内の試料をサンプリングし、バイオマス生産量、油脂含有率、油脂生産量、デンプン含有率を測定した。

[0058] [表1]

MB6N培地組成

成分	濃度
NaNO <sub>3</sub>	8.8 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.22 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.17 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.43 mM
NaCl	0.43 mM
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	9.2 μM
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	26 μM
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25 μM
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	57 nM
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2.4 μM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6.1 nM
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	6.6 nM
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5.4 nM

[0059] (弱光なし条件)

培養温度：30℃

CO<sub>2</sub>濃度：2%

明期(昼)：250μmol photons/m<sup>2</sup>/秒、20時間

暗期(夜)：0μmol photons/m<sup>2</sup>/秒、4時間

[0060] (弱光あり条件)

培養温度：30℃

CO<sub>2</sub>濃度：2%

明期(昼)：250μmol photons/m<sup>2</sup>/秒、20時間

暗期(夜)：30μmol photons/m<sup>2</sup>/秒、4時間

[0061] 図1A～図1Dは測定結果を示すグラフである。図1Aはバイオマス生産量の経時変化を示す。図1Bは油脂含有率の経時変化を示す。図1Cは油脂生産量の経時変化を示す。図1Dはデンプン含有率の経時変化を示す。

[0062] その結果、図1Dに示すように、耐塩性藻類を弱光なし条件下で培養した場合、すなわち、屋外と同等の条件下で培養した場合においては、デンプン含有率が高くなることが明らかになった。この結果は、耐塩性藻類の培養を屋外で行うと、油脂よりもデンプンが優勢に生産されることを示す。

[0063] 一方、図1Dに示すように、耐塩性藻類を弱光あり条件下で培養した場合、すなわち、耐塩性藻類を屋外で培養し、夜間に所定の強度の光を照射する条件下においては、デンプン含有率が低くなることが明らかになった。

[0064] また、図1A～図1Cに示すように、弱光あり条件下では、弱光なし条件下と比較して、バイオマス生産量、油脂含有率、油脂生産量のいずれも高くなる傾向が認められた。

[0065] 以上の結果から、耐塩性藻類を屋外で培養した場合に、油脂よりもデンプンが優勢に生産されてしまう原因の1つとして、培養中に暗期（夜）が存在することが考えられた。また、夜間に所定の強度の光を照射することにより、デンプン含有率を低下させ、油脂の製造効率を向上させることができることが明らかになった。

[0066] [実験例2]

培地中の塩濃度の初期値を2% (w/v) とし、1日毎に0.5% (w/v) ずつ上昇させた点、及び「弱光なし」及び「弱光あり」の条件を以下の条件に変更した点以外は実験例1と同様にして、クラミドモナス・スピーシーズJSC4株を培養した。経時的にバイオリクター内の試料をサンプリングし、バイオマス生産量及び油脂含有率を測定した。また、バイオマス生産量及び油脂含有率に基づいて、実験例1と同様にして油脂生産量を算出した。なお、弱光あり条件の暗期における合計の光照射量は、 $30 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{秒} \times (60 \times 60 \times 12) \text{秒} = 1296 \text{mmol photons/m}^2$ であった。

## [0067] (弱光なし条件)

培養温度：30℃

CO<sub>2</sub>濃度：2%

明期（昼）：250 μmol photons/m<sup>2</sup>/秒、12時間

暗期（夜）：0 μmol photons/m<sup>2</sup>/秒、12時間

## [0068] (弱光あり条件)

培養温度：30℃

CO<sub>2</sub>濃度：2%

明期（昼）：250 μmol photons/m<sup>2</sup>/秒、12時間

暗期（夜）：30 μmol photons/m<sup>2</sup>/秒、12時間

[0069] 図2A～図2Cは測定結果を示すグラフである。図2Aはバイオマス生産量の経時変化を示す。図2Bは油脂含有率の経時変化を示す。図2Cは油脂生産量の経時変化を示す。

[0070] その結果、図2A～図2Cに示すように、弱光あり条件下では、弱光なし条件下と比較して油脂含有率の増加量が大きく、バイオマス生産量及び油脂生産量が高くなる傾向が認められた。なお、本実験例では、測定開始時の油脂含有率をサンプル間で揃えることができず、弱光あり条件下の培養4日目における油脂含有率は弱光なし条件下と比較して低かった。油脂含有率の上昇率を比較すると、弱光あり条件下の方が弱光なし条件下よりも高かったため、測定開始時の油脂含有率を揃えた場合には弱光あり条件下の油脂含有率は更に高くなると考えられた。

## [0071] [実験例3]

培地中の塩濃度の初期値を2% (w/v) とし、1日毎に1% (w/v) ずつ上昇させた点以外は実験例2と同様にして、クラミドモナス・スピーシーズJSC4株を培養した。経時的にバイオリクター内の試料をサンプリングし、バイオマス生産量及び油脂含有率を測定した。また、バイオマス生産量及び油脂含有率に基づいて、実験例1と同様にして油脂生産量を算出した。

[0072] 図3 Aはバイオマス生産量の経時変化を示すグラフであり、図3 Bは油脂含有率の経時変化を示すグラフである。

[0073] その結果、図3 A及び図3 Bに示すように、弱光あり条件下では、弱光なし条件下と比較して、バイオマス生産量及び油脂含有率が高くなる傾向が認められた。なお、本実験例では、測定開始時の油脂含有率をサンプル間で揃えることができず、弱光あり条件下の培養4日目における油脂含有率は弱光なし条件下と比較して低かった。油脂含有率の上昇率を比較すると、弱光あり条件下の方が弱光なし条件下よりも高かったため、測定開始時の油脂含有率を揃えた場合には弱光あり条件下の油脂含有率は更に高くなると考えられた。

[0074] [実験例4]

培地中の塩濃度の初期値を2% (w/v) とし、1日毎に1.5% (w/v) ずつ上昇させた点以外は実験例2と同様にして、クラミドモナス・スピーシーズJSC4株を培養した。経時的にバイオリクター内の試料をサンプリングし、バイオマス生産量及び油脂含有率を測定した。また、バイオマス生産量及び油脂含有率に基づいて、実験例1と同様にして油脂生産量を算出した。

[0075] 図4 Aはバイオマス生産量の経時変化を示すグラフであり、図4 Bは油脂含有率の経時変化を示すグラフである。

[0076] その結果、図4 A及び図4 Bに示すように、弱光あり条件下では、弱光なし条件下と比較して、バイオマス生産量及び油脂含有率が高くなる傾向が認められた。なお、本実験例では、測定開始時の油脂含有率をサンプル間で揃えることができず、弱光あり条件下の培養4日目における油脂含有率は弱光なし条件下と比較して低かった。油脂含有率の上昇率を比較すると、弱光あり条件下の方が弱光なし条件下よりも高かったため、測定開始時の油脂含有率を揃えた場合には弱光あり条件下の油脂含有率は更に高くなると考えられた。

**産業上の利用可能性**

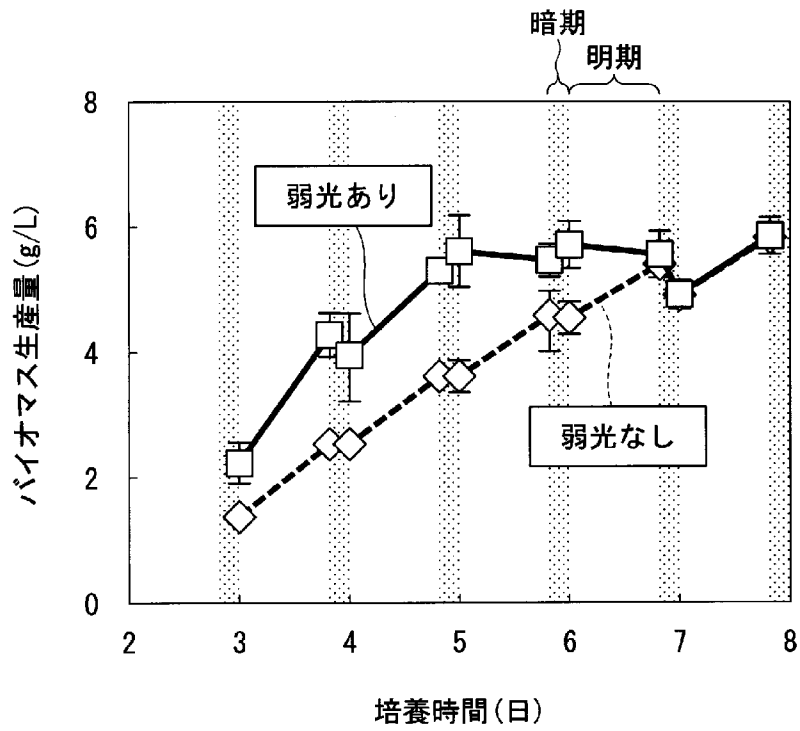
[0077] 本発明によれば、屋外培養においても好適に油脂を製造することができる

。

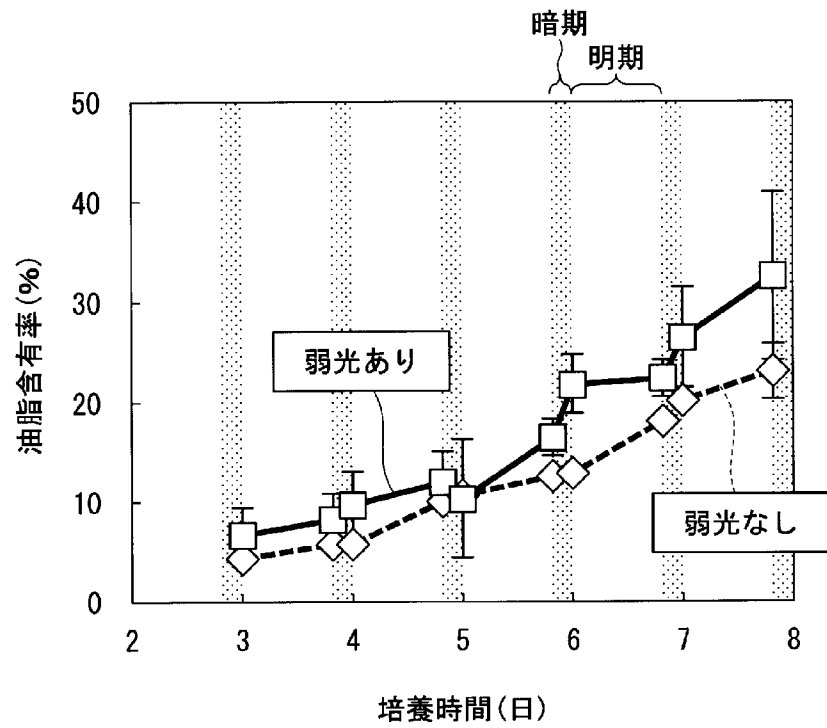
### 請求の範囲

- [請求項1] 耐塩性藻類を、塩を含む培地中で培養する工程を備える油脂の製造方法であって、前記培養を屋外で行い、夜間に合計50～2500 mmol photons/m<sup>2</sup>の光を照射する、製造方法。
- [請求項2] 前記光の照射が、夜間に2～50 μmol photons/m<sup>2</sup>/秒の光を連続的に照射するものである、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記培地中の塩濃度を段階的に増加させる、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項4] 耐塩性藻類が、クラミドモナス属の藻類である、請求項1～3のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記クラミドモナス属の藻類が、クラミドモナス・スピーシーズJSC4株である、請求項4に記載の製造方法。

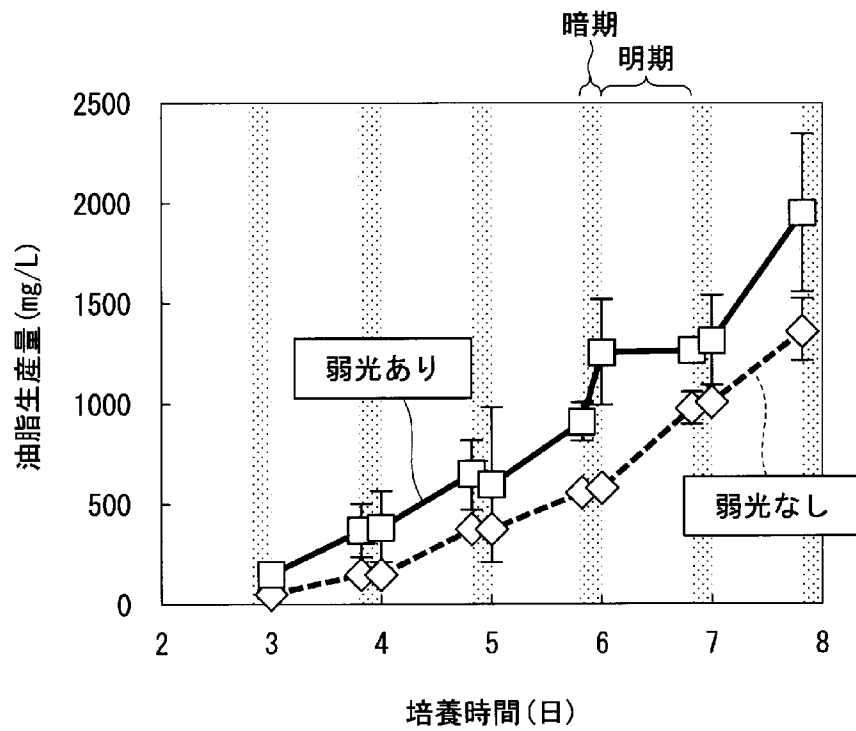
[図1A]



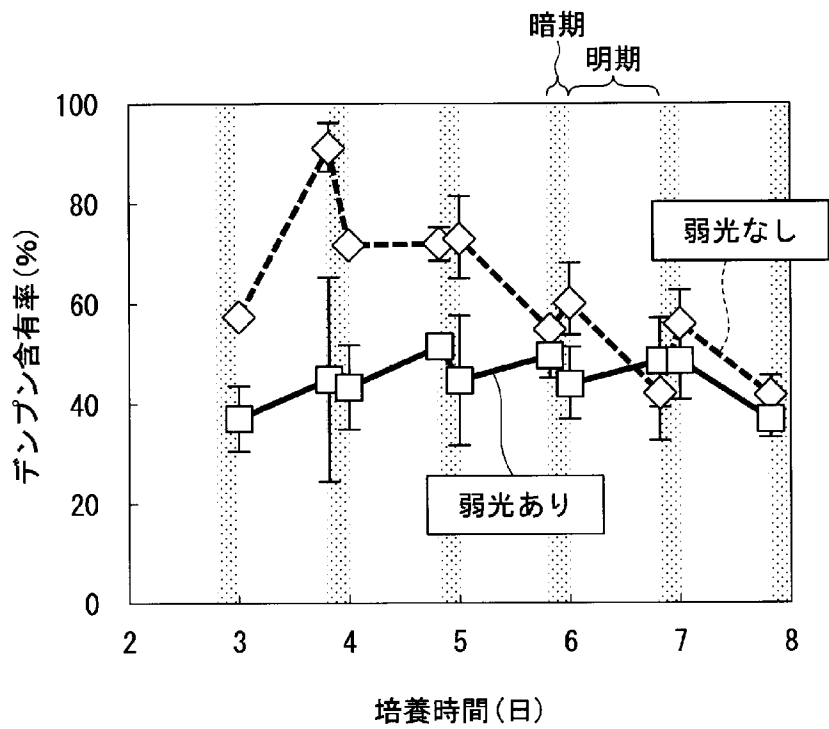
[図1B]



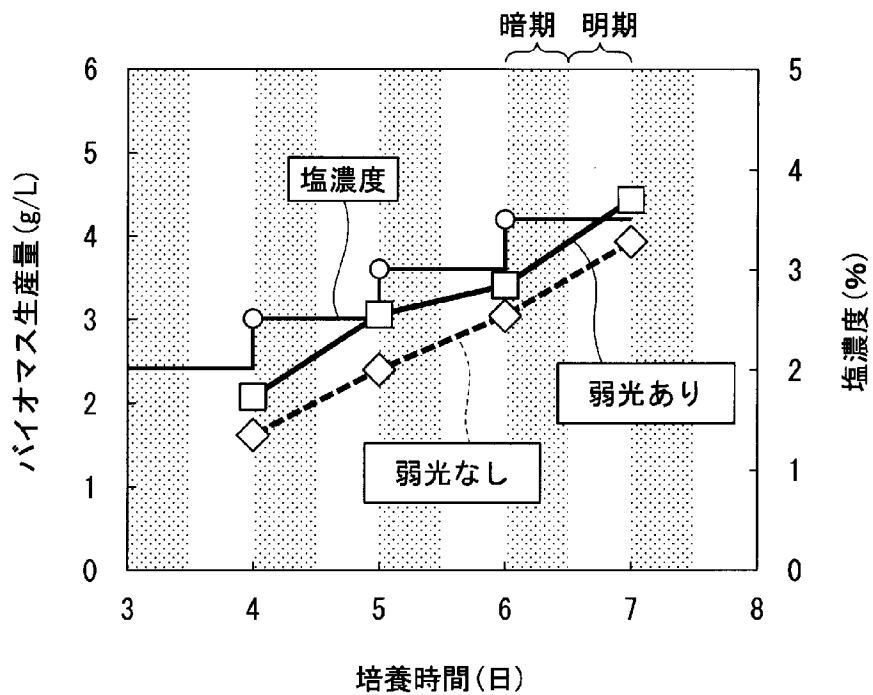
[図1C]



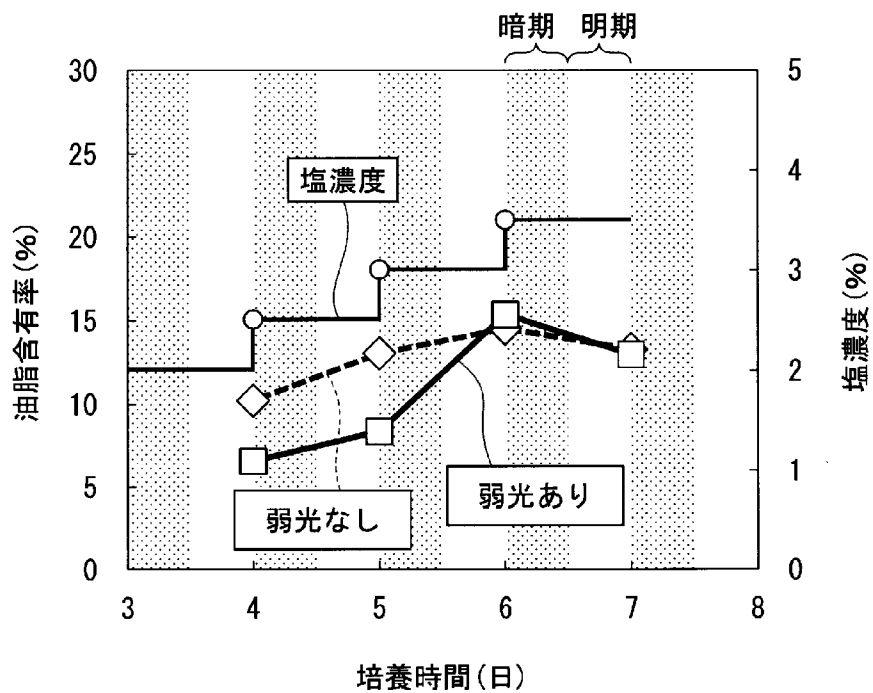
[図1D]



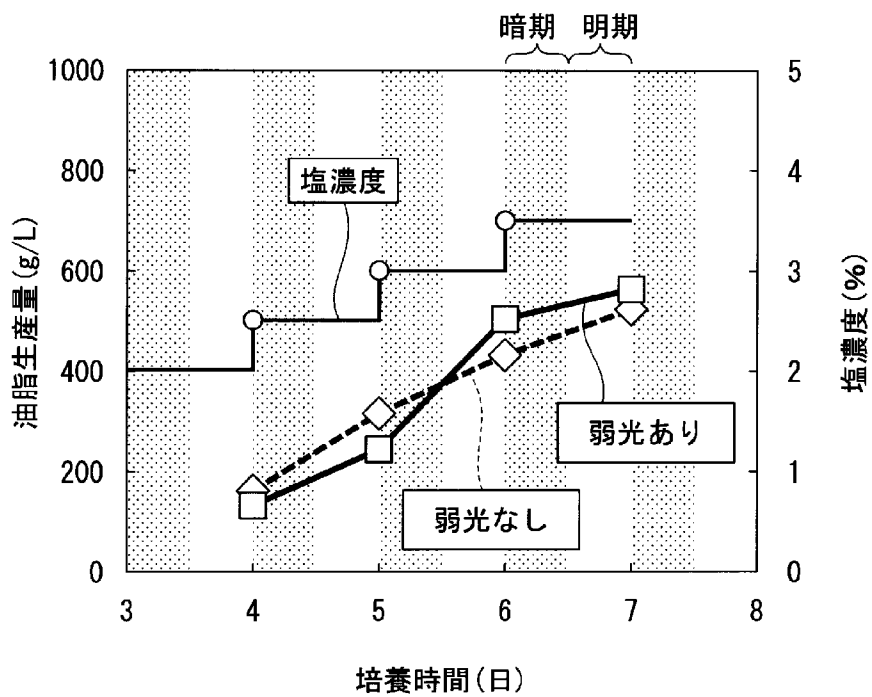
[図2A]



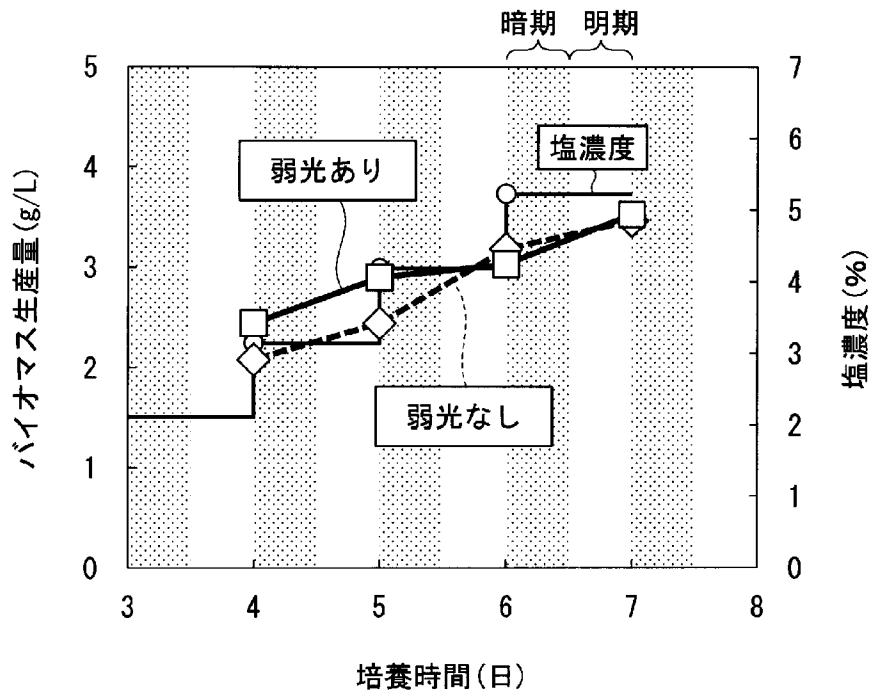
[図2B]



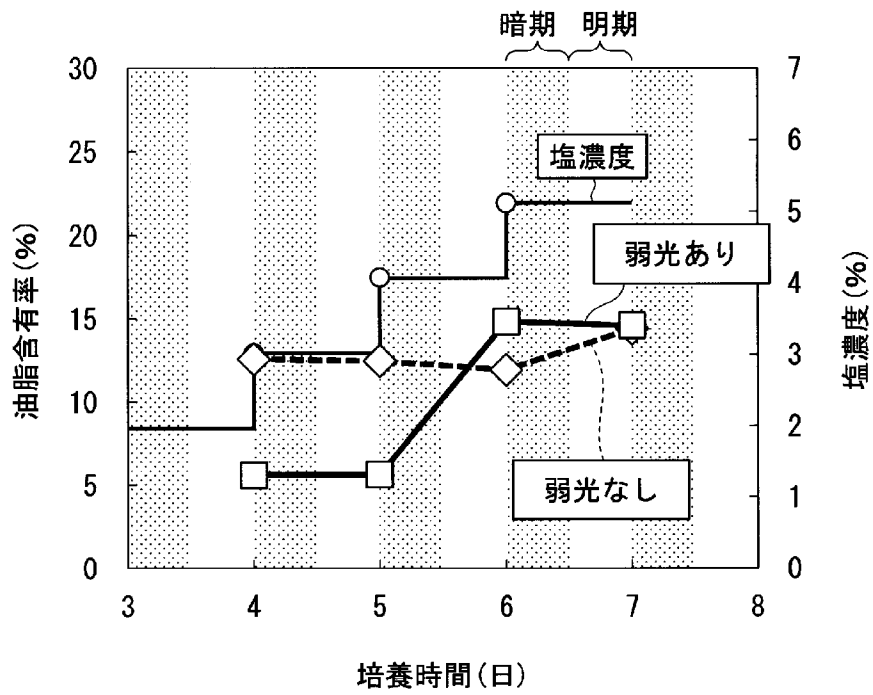
[図2C]



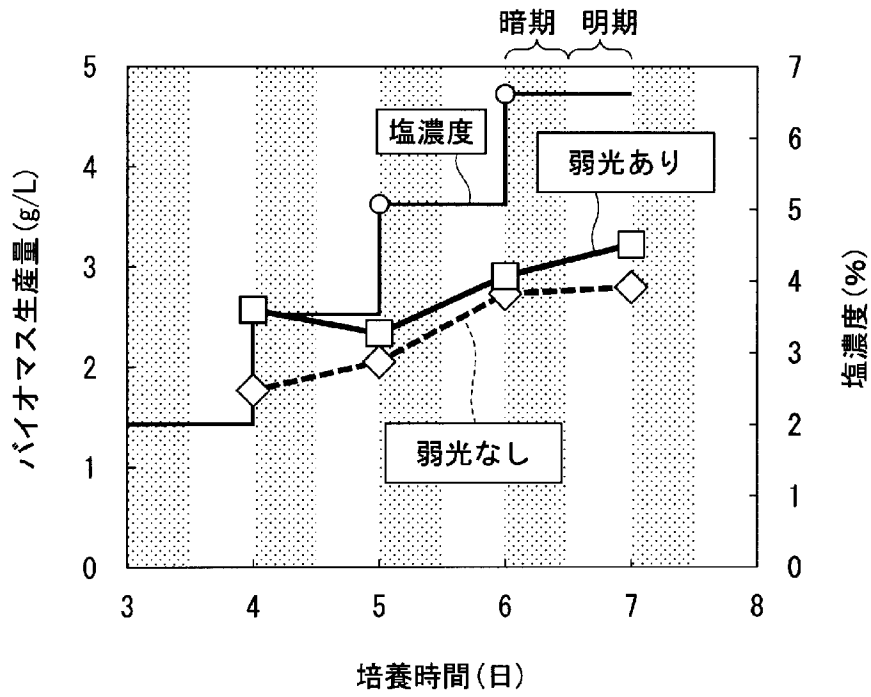
[図3A]



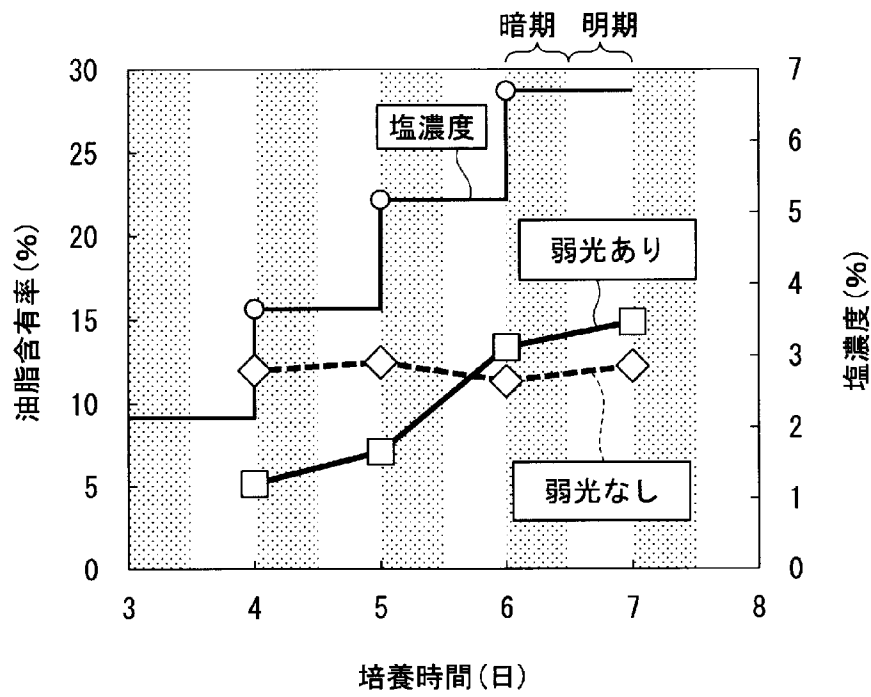
[図3B]



[図4A]



[図4B]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/054301

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                  C12P7/64(2006.01) i, C12N1/12(2006.01) i</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>											
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                  C12P7/64, C12N1/12</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:33%;">Jitsuyo Shinan Koho</td> <td style="width:33%;">1922-1996</td> <td style="width:33%;">Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td style="width:33%;">1996-2016</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2016</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2016</td> </tr> </table> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)                  CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN),                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)</p>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016	
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016								
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016								
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">Y</td> <td>BIRKOU Maria et al., Improving Fatty Acid Composition of Lipids Synthesized by Brachionus plicatilis in Large Scale Experiments, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012, Vo.89, p.2047-2055, particularly, abstract, fig. 1, 3, page 2049, left column, 1st paragraph</td> <td align="center">1-5</td> </tr> <tr> <td align="center">Y</td> <td>HO Shih-Hsin et al., Dynamic metabolic profiling of the marine microalga Chlamydomonas sp. JSC4 and enhancing its oil production by optimizing light intensity, Biotechnology for Biofuels, 2015, Vol.8, No.48, p.1-17, particularly, abstract, fig. 4</td> <td align="center">1-5</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	BIRKOU Maria et al., Improving Fatty Acid Composition of Lipids Synthesized by Brachionus plicatilis in Large Scale Experiments, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012, Vo.89, p.2047-2055, particularly, abstract, fig. 1, 3, page 2049, left column, 1st paragraph	1-5	Y	HO Shih-Hsin et al., Dynamic metabolic profiling of the marine microalga Chlamydomonas sp. JSC4 and enhancing its oil production by optimizing light intensity, Biotechnology for Biofuels, 2015, Vol.8, No.48, p.1-17, particularly, abstract, fig. 4	1-5
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	BIRKOU Maria et al., Improving Fatty Acid Composition of Lipids Synthesized by Brachionus plicatilis in Large Scale Experiments, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012, Vo.89, p.2047-2055, particularly, abstract, fig. 1, 3, page 2049, left column, 1st paragraph	1-5									
Y	HO Shih-Hsin et al., Dynamic metabolic profiling of the marine microalga Chlamydomonas sp. JSC4 and enhancing its oil production by optimizing light intensity, Biotechnology for Biofuels, 2015, Vol.8, No.48, p.1-17, particularly, abstract, fig. 4	1-5									
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.      <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>											
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%;">                     "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                 </td> <td style="width:50%;">                     "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                      "&amp;" document member of the same patent family                 </td> </tr> </table>			"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							
"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										
<p>Date of the actual completion of the international search                  30 March 2016 (30.03.16)</p>		<p>Date of mailing of the international search report                  12 April 2016 (12.04.16)</p>									
<p>Name and mailing address of the ISA/                  Japan Patent Office                  3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,                  Tokyo 100-8915, Japan</p>		<p>Authorized officer</p> <p>Telephone No.</p>									

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054301

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RODOLFI Liliana et al., <i>Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor</i> , <i>Biotechnology and Bioengineering</i> , 2009, Vol.102, No.1, p.100-112, particularly, abstract, page 104, left column, 2nd paragraph	1-5
Y	TYAGI Rashmi et al., <i>Application of NaCl for Cultivation of Isolated Botryococcus Braunii Strains</i> , <i>International Journal of Agriculture and Food Science Technology</i> , 2013, Vol.4, No.3, p.227-232, particularly, abstract	1-5
Y	WO 01/023519 A1 (Micro Gaia Co., Ltd.), 05 April 2001 (05.04.2001), particularly, claims; page 18 & US 6579714 B1 & EP 1138757 A1 & CN 1336956 A each claim	1-5
Y	WO 2015/025552 A1 (Kobe University), 26 February 2015 (26.02.2015), claims; paragraph [0014]; examples & JP 5746796 B	1-5
Y	HO Shih-Hsin et al., <i>Optimizing biodiesel production in marine Chlamydomonas sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy</i> , <i>Biotechnology for Biofuels</i> , 2014, Vol.7, No.97, p.1-16, particularly, abstract	1-5
A	JP 2010-528627 A (Solazyme, Inc.), 26 August 2010 (26.08.2010), particularly, claims & US 2009/0004715 A1 & WO 2008/151149 A2 & EP 2351845 A1 & CN 104212844 A & KR 10-2014-0131602 A each claim	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P7/64(2006.01)i, C12N1/12(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. C12P7/64, C12N1/12		
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 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII)		
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	BIRKOU Maria et al., Improving Fatty Acid Composition of Lipids Synthesized by Brachionus plicatilis in Large Scale Experiments, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012, Vo. 89, p. 2047-2055, 特に、要約・図1・図3・2049頁の左欄第1段落	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 30.03.2016	国際調査報告の発送日 12.04.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 原 大樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 5278

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	H0 Shih-Hsin et al., Dynamic metabolic profiling of the marine microalga Chlamydomonas sp. JSC4 and enhancing its oil production by optimizing light intensity, Biotechnology for Biofuels, 2015, Vol.8, No.48, p.1-17, 特に、要約・図4	1-5
Y	RODOLFI Liliana et al., Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor, Biotechnology and Bioengineering, 2009, Vol.102, No.1, p.100-112, 特に、要約・104頁の左欄第2段落	1-5
Y	TYAGI Rashmi et al., Application of NaCl for Cultivation of Isolated Botryococcus Braunii Strains, International Journal of Agriculture and Food Science Technology, 2013, Vol.4, No.3, p.227-232, 特に、要約	1-5
Y	WO 01/023519 A1 (株式会社マイクロガリア) 2001.04.05, 特に [特許請求の範囲]・p.18 & US 6579714 B1 & EP 1138757 A1 & CN 1336956 A , 各々の [特許請求の範囲] 等	1-5
Y	WO 2015/025552 A1 (国立大学法人神戸大学) 2015.02.26, [特許請求の範囲] [0014] [実施例] & JP 5746796 B	1-5
Y	H0 Shih-Hsin et al., Optimizing biodiesel production in marine Chlamydomonas sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy, Biotechnology for Biofuels, 2014, Vol.7, No.97, p.1-16, 特に、要約	1-5
A	JP 2010-528627 A (ソラザイム、インク) 2010.08.26, 特に [特許請求の範囲] & US 2009/0004715 A1 & WO 2008/151149 A2 & EP 2351845 A1 & CN 104212844 A & KR 10-2014-0131602 A, 各々の [特許請求の範囲]	1-5