(19)日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11)国際公開番号
WO2018/043146

発行日　令和1年6月24日(2019.6.24)

(43)国際公開日　平成30年3月8日(2018.3.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 1/12	(2006.01)	C12N	1/12	A	4B064
C12P 7/26	(2006.01)	C12P	7/26		4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 24 頁）

出願番号	特願2018-537121 (P2018-537121)
(21)国際出願番号	PCT/JP2017/029513
(22)国際出願日	平成29年8月17日(2017.8.17)
(31)優先権主張番号	特願2016-170925 (P2016-170925)
(32)優先日	平成28年9月1日(2016.9.1)
(33)優先権主張国	日本国(JP)

(71)出願人　000002004
昭和電工株式会社
東京都港区芝大門１丁目１３番９号
(74)代理人　110001070
特許業務法人ＳＳＩＮＰＡＴ
(72)発明者　松本　陽子
東京都港区芝大門一丁目１３番９号　昭和電工株式会社内
(72)発明者　石倉　正治
東京都港区芝大門一丁目１３番９号　昭和電工株式会社内
(72)発明者　鈴木　廣志
東京都港区芝大門一丁目１３番９号　昭和電工株式会社内

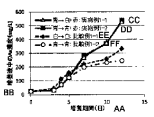
Ｆターム(参考)　4B064 AC31　CA08　CC30　DA10

最終頁に続く

(54)【発明の名称】光合成微細藻類の培養方法

(57)【要約】

本発明は、従来よりも効率的にキサントフィルを得ることが可能な、光合成微細藻類の培養方法を提供する。本発明の培養方法は、キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類に、光照射（ａ）を行う細胞数増加工程（Ａ）および、前記細胞数増加工程（Ａ）が行われた光合成微細藻類に、光照射（ｂ）を行う光合成微細藻類中のキサントフィル含有量を増加させる工程（Ｂ）を含む光合成微細藻類の培養方法であり、前記光照射（ａ）が光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤを用いた光照射であり、前記光照射（ｂ）が光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤおよび波長６２０～６９０ｎｍの赤色光を含むＬＥＤを用いた光照射であり、前記光照射（ａ）と光照射（ｂ）とが、異なる光源を用いた光照射である。



AA　Culturing period (days)
BB　Ax concentration in liquid culture medium (mg/L)
CC　Blue → white + red: Example 1-1
DD　Blue → blue + red: Example 1-2
EE　White → white: Comparative example 1-1
FF　Blue → blue: Comparative example 1-2

【特許請求の範囲】
【請求項１】
キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類に、光照射（ａ）を行う細胞数増加工程（Ａ）および、前記細胞数増加工程（Ａ）が行われた光合成微細藻類に、光照射（ｂ）を行う光合成微細藻類中のキサントフィル含有量を増加させる工程（Ｂ）を含む光合成微細藻類の培養方法であり、
前記光照射（ａ）が光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤを用いた光照射であり、
前記光照射（ｂ）が光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤおよび波長６２０～６９０ｎｍの赤色光を含むＬＥＤを用いた光照射であり、
前記光照射（ａ）と光照射（ｂ）とが、異なる光源を用いた光照射である、光合成微細藻類の培養方法。
【請求項２】
前記光照射（ｂ）における青色光の光量と、前記光照射（ａ）における青色光の光量との差をΔＢとし、前記光照射（ｂ）における赤色光の光量と、前記光照射（ａ）における赤色光の光量との差をΔＲとしたとき、ΔＲ－ΔＢ＞０である、請求項１に記載の光合成微細藻類の培養方法。
【請求項３】
前記光照射（ａ）が光源として、白色ＬＥＤを用いた光照射（Ｉ）、白色ＬＥＤおよび青色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩ）、白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩＩ）、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＶ）、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを交互に用いた光照射（Ｖ）並びに青色ＬＥＤを用いた光照射（ＶＩ）から選択される少なくとも１種の光照射であり、
前記光照射（ｂ）が光源として、白色ＬＥＤを用いた光照射（Ｉ）、白色ＬＥＤおよび青色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩ）、白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩＩ）、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＶ）、並びに青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを交互に用いた光照射（Ｖ）から選択される少なくとも１種の光照射である、請求項１または２に記載の光合成微細藻類の培養方法。
【請求項４】
前記工程（Ａ）で用いられる、キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類が、キサントフィルを乾燥質量換算で３～９質量％含むシスト化した光合成微細藻類である、請求項１～３のいずれか一項に記載の光合成微細藻類の培養方法。
【請求項５】
前記工程（Ａ）および工程（Ｂ）において、光合成微細藻類のキサントフィル含有量を、乾燥質量換算で２質量％以上保つ、請求項１～４のいずれか一項に記載の光合成微細藻類の培養方法。
【請求項６】
前記光照射（ａ）および光照射（ｂ）において、光合成有効光量子束密度が、７５０μｍｏｌ／（m^2・ｓ）以上である、請求項１～５のいずれか一項に記載の光合成微細藻類の培養方法。
【請求項７】
前記工程（Ａ）が３～７日間行われ、前記工程（Ｂ）が４～１０日間行われ、工程（Ａ）と工程（Ｂ）とを合わせて７～１７日間行われる、請求項１～６のいずれか一項に記載の光合成微細藻類の培養方法。
【請求項８】
工程（Ｂ）により得られた光合成微細藻類の培養液１Ｌ当たりの、キサントフィルの量（ｍｇ）を工程（Ａ）および（Ｂ）が行われる合計の期間（ｄａｙ）で除した、キサントフィルの生産性（ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ））が、２０ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ）以上である、請求項１～７のいずれか一項に記載の光合成微細藻類の培養方法。
【請求項９】

前記キサントフィルがアスタキサンチンであり、光合成微細藻類が、ヘマトコッカス属の緑藻類である、請求項１～８のいずれか一項に記載の光合成微細藻類の培養方法。
【請求項１０】
請求項１～９のいずれか一項に記載の培養方法により得られたキサントフィル含有量が３００ｍｇ／Ｌ以上である光合成微細藻類の培養液。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、キサントフィルを含む光合成微細藻類の培養方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
現在キサントフィルは、様々な用途に使用されている。
キサントフィルの一種であるアスタキサンチンは、赤色のカロテノイドの一種であり、強力な抗酸化作用を有することが知られている。このため、アスタキサンチンは、食材用色素、化粧品、健康食品などに使用されている。
【０００３】
アスタキサンチンは、化学合成することも可能であるが、天然由来のアスタキサンチンが広く使用されている。天然由来のアスタキサンチンは、オキアミ、アマエビなどのエビ類、ファフィア酵母、藻類などから抽出されている。
【０００４】
エビ類あるいはファフィア酵母のアスタキサンチン含有量は低いことが知られている。このため、藻類を培養することにより、アスタキサンチンを得る方法が検討されている。藻類、例えば、ヘマトコッカスは、窒素源枯渇や強光といった外部環境の変化（ストレス）に応じてシスト化し、藻体内にアスタキサンチンを蓄積することが知られている。現在商用化されているヘマトコッカスによるアスタキサンチン生産はアスタキサンチンを蓄積する前の緑色の鞭毛をもつ遊走子状の細胞（グリーンステージ）で細胞数を増やし、その後ストレスによりシスト細胞（レッドステージ）細胞内にアスタキサンチンを蓄積させる方法がとられている。しかしながらこの遊走細胞の培養は弱光条件を好むなど培養環境の維持が難しいことが知られている（例えば、非特許文献１参照）。
また、ヘマトコッカス等の藻類を培養することにより、アスタキサンチンを得る方法としては、様々な検討がされている（例えば、特許文献１～４参照）。
【０００５】
例えば、特許文献１では、キサントフィルを含有する光合成微細藻類を栄養培地に接種して増殖させる工程、増殖した微細藻類をシスト化させる工程を含む、光合成微細藻類からキサントフィルを製造する方法が開示されている。
【０００６】
特許文献２では、シスト化した緑藻に、２５，０００μｍｏｌ／（m^3・ｓ）以上の光合成有効光量子束投入量で光照射を行う、緑藻の製造方法が開示されている。
特許文献３では、藻類に赤色光照明光と、青色光照明光とを別個独立に、繰り返し照射する藻類の培養方法が開示されている。
【０００７】
特許文献４では、藻類を培養して藻体内にアスタキサンチンを生産させる際に、アスタキサンチン生産培養期間の光照射を、青色ＬＥＤと、赤色ＬＥＤとを併用して行うことが開示されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００８】
【特許文献１】国際公開２００５／１１６２３８号
【特許文献２】特開２００７‐９７５８４号公報
【特許文献３】国際公開２０１３／０２１６７５号

【特許文献４】国際公開２０１５／１５１５７７号
【非特許文献】
【０００９】
【非特許文献１】北村晃利、他2名、「Haematococcus属緑藻によるアスタキサンチンの商業生産」、生物工学、公益社団法人　日本生物工学会、２０１５年、　第９３巻　第７号　ｐ．３８３－３８７
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
特許文献１～４では、アスタキサンチン等のキサントフィルを効率的に得るために、種々の検討がされているが、より効率的にキサントフィルを得ることが可能な光合成微細藻類の培養方法が求められていた。
【００１１】
そこで、本発明は、従来よりも効率的にキサントフィルを得ることが可能な、光合成微細藻類の培養方法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】
【００１２】
本発明者らは、鋭意検討を行ったところ、シスト化した光合成微細藻類に特定のパターンでの光照射を行うことにより、上記課題を解決することができることを見出した。
すなわち、本発明の、例えば以下の［１］～［１０］に関する。
【００１３】
［１］　キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類に、光照射（ａ）を行う細胞数増加工程（Ａ）および、前記細胞数増加工程（Ａ）が行われた光合成微細藻類に、光照射（ｂ）を行う光合成微細藻類中のキサントフィル含有量を増加させる工程（Ｂ）を含む光合成微細藻類の培養方法であり、
前記光照射（ａ）が光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤを用いた光照射であり、
前記光照射（ｂ）が光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤおよび波長６２０～６９０ｎｍの赤色光を含むＬＥＤを用いた光照射であり、
前記光照射（ａ）と光照射（ｂ）とが、異なる光源を用いた光照射である、光合成微細藻類の培養方法。
【００１４】
［２］　前記光照射（ｂ）における青色光の光量と、前記光照射（ａ）における青色光の光量との差をΔＢとし、前記光照射（ｂ）における赤色光の光量と、前記光照射（ａ）における赤色光の光量との差をΔＲとしたとき、ΔＲ－ΔＢ＞０である、［１］に記載の光合成微細藻類の培養方法。
［３］　前記光照射（ａ）が光源として、白色ＬＥＤを用いた光照射（Ｉ）、白色ＬＥＤおよび青色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩ）、白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩＩ）、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＶ）、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを交互に用いた光照射（Ｖ）並びに青色ＬＥＤを用いた光照射（ＶＩ）から選択される少なくとも１種の光照射であり、
前記光照射（ｂ）が光源として、白色ＬＥＤを用いた光照射（Ｉ）、白色ＬＥＤおよび青色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩ）、白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩＩ）、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＶ）、並びに青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを交互に用いた光照射（Ｖ）から選択される少なくとも１種の光照射である、［１］または［２］に記載の光合成微細藻類の培養方法。
【００１５】
［４］　前記工程（Ａ）で用いられる、キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類が、キサントフィルを乾燥質量換算で３～９質量％含むシスト化した光合成微細藻類である、［１］～［３］のいずれかに記載の光合成微細藻類の培養方法。

【００１６】
［５］ 前記工程（Ａ）および工程（Ｂ）において、光合成微細藻類のキサントフィル含有量を、乾燥質量換算で２質量％以上に保つ、［１］～［４］のいずれかに記載の光合成微細藻類の培養方法。
【００１７】
［６］ 前記光照射（ａ）および光照射（ｂ）において、光合成有効光量子束密度が、７５０μｍｏｌ／（m^2・ｓ）以上である、［１］～［５］のいずれかに記載の光合成微細藻類の培養方法。
【００１８】
［７］ 前記工程（Ａ）が３～７日間行われ、前記工程（Ｂ）が４～１０日間行われ、工程（Ａ）と工程（Ｂ）とを合わせて７～１７日間行われる、［１］～［６］のいずれかに記載の光合成微細藻類の培養方法。
【００１９】
［８］ 工程（Ｂ）により得られた光合成微細藻類の培養液１Ｌ当たりの、キサントフィルの量（ｍｇ）を工程（Ａ）および（Ｂ）が行われる合計の期間（ｄａｙ）で除した、キサントフィルの生産性（ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ））が、２０ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ）以上である、［１］～［７］のいずれかに記載の光合成微細藻類の培養方法。
【００２０】
［９］ 前記キサントフィルがアスタキサンチンであり、光合成微細藻類が、ヘマトコッカス属の緑藻類である、［１］～［８］のいずれかに記載の光合成微細藻類の培養方法。
【００２１】
［１０］ ［１］～［９］のいずれかに記載の培養方法により得られたキサントフィル含有量が３００ｍｇ／Ｌ以上である光合成微細藻類の培養液。
【発明の効果】
【００２２】
従来よりも効率的にキサントフィルを得ることが可能な、光合成微細藻類の培養方法が提供される。
【図面の簡単な説明】
【００２３】
【図１】実施例１、比較例１の培養液中の全窒素濃度の経時変化を示す。
【図２】実施例１、比較例１の培養液中の細胞数の経時変化を示す。
【図３】実施例１、比較例１の培養液中のアスタキサンチン濃度の経時変化を示す。
【図４】実施例１、比較例１の細胞内のアスタキサンチン濃度の経時変化を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２４】
次に本発明について具体的に説明する。
本発明の光合成微細藻類の培養方法は、キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類に、光照射（ａ）を行う細胞数増加工程（Ａ）および、前記細胞数増加工程（Ａ）が行われた光合成微細藻類に、光照射（ｂ）を行う光合成微細藻類中のキサントフィル含有量を増加させる工程（Ｂ）を含む。本発明において、前記光照射（ａ）が光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤを用いた光照射であり、前記光照射（ｂ）が光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤおよび波長６２０～６９０ｎｍの赤色光を含むＬＥＤを用いた光照射であり、前記光照射（ａ）と光照射（ｂ）とが、異なる光源を用いた光照射である。以下、本発明について詳細に説明する。
【００２５】
（キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類）
本発明には、キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類が用いられる。本発明に用いられる光合成微細藻類としては、キサントフィルを含んでおり、シスト化していればよい。

【００２６】
（光合成微細藻類）
本発明に用いられる光合成微細藻類としては、キサントフィルを生産する能力があり、シスト化可能であり、かつ光合成をすることができる藻類であれば、特に制限はない。光合成微細藻類としては、緑藻類が、キサントフィルの生産性の観点から好ましい。
【００２７】
緑藻類としては、例えば、ヘマトコッカス（Ｈａｅｍａｔｏｃｏｃｃｕｓ）属に属する緑藻類が好ましく用いられる。ヘマトコッカス属の緑藻類としては、ヘマトコッカス・プルビアリス（Ｈ．ｐｌｕｖｉａｌｉｓ）、ヘマトコッカス・ラクストリス（Ｈ．ｌａｃｕｓｔｒｉｓ）、ヘマトコッカス・カペンシス（Ｈ．ｃａｐｅｎｓｉｓ）、ヘマトコッカス・ドロエバケンシ（Ｈ．ｄｒｏｅｂａｋｅｎｓｉ）、ヘマトコッカス・ジンバブエンシス（Ｈ．ｚｉｍｂａｂｗｉｅｎｓｉｓ）などが挙げられる。
【００２８】
ヘマトコッカス・プルビアリス（Ｈ．ｐｌｕｖｉａｌｉｓ）としては、米国テキサス大学藻類保存施設に寄託されているＵＴＥＸ２５０５株、デンマークのコペンハーゲン大学のＳｃａｎｄｉｎａｖｉａｎ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ａｌｇａｅ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｚｏａ, Ｂｏｔａｎｉｃａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅに保存されているＫ００８４株などが挙げられる。
【００２９】
ヘマトコッカス・ラクストリス（Ｈ．ｌａｃｕｓｔｒｉｓ）としては、独立行政法人国立環境研究所に寄託されているＮＩＥＳ１４４株、ＮＩＥＳ２２６３株、ＮＩＥＳ２２６４株、ＮＩＥＳ２２６５株、ＡＴＣＣに寄託されているＡＴＣＣ３０４０２株および同３０４５３株あるいはＵＴＥＸ　１６株および同２９４株などが挙げられる。
【００３０】
ヘマトコッカス・カペンシス（Ｈ．ｃａｐｅｎｓｉｓ）としては、ＵＴＥＸ　ＬＢ１０２３株などが挙げられる。
ヘマトコッカス・ドロエバケンシ（Ｈ．ｄｒｏｅｂａｋｅｎｓｉ）としては、ＵＴＥＸ　ＬＢ５５株が挙げられる。
【００３１】
ヘマトコッカス・ジンバブエンシス（Ｈ．ｚｉｍｂａｂｗｉｅｎｓｉｓ）としては、ＵＴＥＸ　ＬＢ１７５８株などが挙げられる。
これらの中でも、光合成微細藻類としては、ヘマトコッカス・ラクストリス、ヘマトコッカス・プルビアリスがより好ましく用いられる。
【００３２】
（キサントフィル）
キサントフィルとは、カロテノイドの一種である。キサントフィルとしては、アスタキサンチン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、アドニルビン、アドニキサンチン、クリプトキサンチンなどが挙げられる。
【００３３】
本発明の培養方法は、工程（Ａ）によって、培養が難しい浮遊細胞（シスト化していない光合成微細藻類）を用いて細胞増殖を行う必要が無いため、強い光の照射下でも、光合成微細藻類の細胞数が増加する。工程（Ａ）で増加した細胞にはすでにキサントフィルが含まれているため、細胞がダメージを受けることなく、工程（Ｂ）により、各光合成微細藻類の各々の細胞中に有するキサントフィル含有量が増加するため、本発明の培養方法は、大量のキサントフィルを得ることができる。
【００３４】
得られるキサントフィルは、主に光合成微細藻類の種類によって決まり、特に限定は無いが、高い抗酸化作用を持つアスタキサンチンであることが、キサントフィルの有効活用の点から好ましい。アスタキサンチンを得ることが可能な光合成微細藻類としては、例えば、前述のヘマトコッカス属の緑藻類が挙げられ、ヘマトコッカス・ラクストリス、ヘマ

トコッカス・プルビアリスが好ましい。

【００３５】

（シスト化）

光合成微細藻類の中には、例えば、光照射、栄養飢餓状態、酸化物の存在などのストレスにより、細胞内にキサントフィルなどを蓄積し、休眠胞子化する藻類が存在する。

【００３６】

この休眠状態に入ることをシスト化という。本発明において、シスト化とは、休眠状態に入りキサントフィルを蓄積し始めた状態から完全にシスト化し休眠胞子となった状態のいずれの状態も含む。

【００３７】

（キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類のキサントフィル含有量）

本発明に用いるキサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類としては、キサントフィルを含有したまま娘細胞を形成し、娘細胞放出による細胞増殖後すぐに光照射のストレスによるキサントフィル生成が可能となる様に、キサントフィルをある程度蓄積する光合成微細藻類を用いることが好ましい。

【００３８】

具体的には、前記工程（Ａ）で用いられる、キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類が、キサントフィルを乾燥質量換算で３～９質量％含むシスト化した光合成微細藻類であることが好ましい。すなわち、本発明において光照射される光合成微細藻類は、光照射を行う直前の時点、言い換えると光照射（ａ）開始時点においてキサントフィルを乾燥質量換算で３～９質量％含んでいることが好ましく、光照射中には、キサントフィル量は変動する。キサントフィルを多く含むシスト化した光合成微細藻類を得ることは一般には難しいため、キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類としては、キサントフィルを乾燥質量換算で３～７質量％含むことがより好ましい。

【００３９】

なお、キサントフィルを多く含む、例えば乾燥質量換算で、７質量％を超えて９質量％以下含むシスト化した光合成微細藻類を用いて本発明の製造方法を実施する方法としては、キサントフィルを、乾燥質量換算で３～７質量％含むシスト化した光合成微細藻類を用いて、本発明の製造方法を実施することにより、キサントフィルを乾燥質量換算で７質量％を超えて９質量％以下含むシスト化した光合成微細藻類を得て、得られたキサントフィルを乾燥質量換算で７質量％を超えて９質量％以下含むシスト化した光合成微細藻類を用いて、再度本発明の製造方法を実施する方法が例示できる。

【００４０】

なお、光合成微細藻類のキサントフィル含有量は、所定量の光合成微細藻類を乾燥させた際の質量および、所定量の光合成微細藻類に含まれるキサントフィル含有量から求めることができる。

【００４１】

〔工程（Ａ）〕

本発明の光合成微細藻類の培養方法は、前述のキサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類に、光照射（ａ）を行う細胞数増加工程（Ａ）を有する。

【００４２】

工程（Ａ）は、後述の光照射（ａ）が行われる以外は、例えば、従来公知の光合成微細藻類の細胞数を増やす際に行われる培養方法と同様に行うことができ、特に制限は無い。

例えば、工程（Ａ）としては、キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類を、培地に接種し、光照射（ａ）を行う方法が挙げられる。

【００４３】

工程（Ａ）は好ましくは３～７日間行われ、より好ましくは４～６日間行われる。なお、工程（Ａ）では、通常は常に光照射（ａ）が行われるが、工程の進捗状況を確認する際等に、一時的に光照射（ａ）が行われなくてもよい。但し、一時的に光照射が行われない場合には、工程（Ａ）において光照射が行われない時間の合計は、工程（Ａ）の５％以下

であることが好ましい。

【００４４】

工程（Ａ）で用いられるキサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類の量としては、特に制限は無いが、後述の培地１Ｌあたり、通常は０．０５～５ｇであり、好ましくは０．３～２ｇである。前記範囲では、より効率的にキサントフィルを得ることができるため好ましい。

【００４５】

工程（Ａ）では光合成微細藻類の細胞数が増加する。光合成微細藻類の細胞数が増加する理由は、以下の通りであると本発明者らは推測した。キサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類は、工程（Ａ）では、培地中の栄養素を利用しながら光合成することにより２～３２個の娘細胞を含んだシスト細胞となる。この細胞からキサントフィルを含有する娘細胞が放出される。このようにして、工程（Ａ）では、光合成微細藻類の細胞数が増加すると考えられる。

【００４６】

〔工程（Ｂ）〕

本発明の光合成微細藻類の培養方法は、前記細胞数増加工程（Ａ）が行われた光合成微細藻類に、光照射（ｂ）を行う光合成微細藻類中のキサントフィル含有量を増加させる工程（Ｂ）を有する。工程（Ｂ）では、光照射（ｂ）を行うことにより、個々の光合成微細藻類中のキサントフィル含有量が増加する。

【００４７】

工程（Ｂ）は、後述の光照射（ｂ）が行われる以外は、例えば、従来公知の光合成微細藻類のキサントフィル含有量を増加させる際、シスト化を促進する際に行われる培養方法と同様に行うことができ、特に制限は無い。

【００４８】

例えば、工程（Ｂ）としては、工程（Ａ）を行った後、光合成微細藻類を取り出すことなく、そのまま光照射（ｂ）を行う方法、工程（Ａ）を行った後、光合成微細藻類を取り出した後、新たな培地に接種し、光照射（ｂ）を行う方法が挙げられる。

【００４９】

工程（Ｂ）は好ましくは４～１０日間行われ、より好ましくは６～８日間行われる。なお、工程（Ｂ）では、通常は常に光照射（ｂ）が行われるが、工程の進捗状況を確認する際等に、一時的に光照射（ｂ）が行われなくてもよい。但し、一時的に光照射が行われない場合には、工程（Ｂ）において光照射が行われない時間の合計は、工程（Ｂ）の５％以下であることが好ましい。

また、本発明の培養方法では、工程（Ａ）と工程（Ｂ）とを合わせて、好ましくは７～１７日間行われ、より好ましくは１０～１４日間行われる。

【００５０】

工程（Ｂ）では、光合成微細藻類中のキサントフィル含有量が増加する。キサントフィル含有量が増加する理由は、以下の通りであると本発明者らは推測した。工程（Ａ）により、細胞数が増えた光合成微細藻類は、工程（Ｂ）で栄養飢餓かつ光照射のストレスでシスト化が進み、光合成微細藻類の各細胞内で、さらなるキサントフィルが生成され蓄積されるため、キサントフィル含有量が増加すると考えられる。

【００５１】

本発明の培養方法では、このようにして、光合成微細藻類の細胞数増加と、細胞数増加に続いて各細胞内のキサントフィル量の増加とが起こるため、効率的にキサントフィルを得ることができる。

【００５２】

なお、本発明の培養方法では、工程（Ａ）および工程（Ｂ）において、光合成微細藻類のキサントフィル含有量を、乾燥質量換算で２質量％以上に保つことが好ましく、２．５質量％以上に保つことがより好ましく、２．８質量％以上に保つことがさらに好ましい。すなわち、工程（Ａ）および工程（Ｂ）においては、キサントフィルを含有したまま娘細

胞が放出され、光照射のダメージにより死滅することなく、光照射のストレスによるキサントフィル生成が可能となる様に、常に光合成微細藻類のキサントフィル含有量が、好ましくは乾燥質量換算で２質量％以上、より好ましくは２．５質量％以上となるように、さらに好ましくは２．８質量％以上となるように維持することが好ましい。なお、工程（Ａ）および工程（Ｂ）において、光合成微細藻類のキサントフィル含有量の上限は、特に限定は無いが、通常は乾燥質量換算で１５質量％以下である。

【００５３】

本発明の培養方法では、前述のように工程（Ａ）において細胞数が増加し、細胞数が増加する際に、乾燥質量換算の光合成微細藻類のキサントフィル含有量が低下する。細胞数が増加する工程（Ａ）においても、乾燥質量換算の光合成微細藻類のキサントフィル含有量が前記範囲となるようにすることにより、より効率的にキサントフィルを得ることができるため好ましい。

【００５４】

（光照射（ａ）および光照射（ｂ））

工程（Ａ）では、光照射（ａ）が行われる。光照射（ａ）は、光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤを用いた光照射である。光照射（ａ）は、光源として、白色ＬＥＤを用いた光照射（Ｉ）、白色ＬＥＤおよび青色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩ）、白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩＩ）、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＶ）、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを交互に用いた光照射（Ｖ）、並びに青色ＬＥＤを用いた光照射（ＶＩ）から選択される少なくとも１種の光照射であることが好ましい。

【００５５】

工程（Ｂ）では、光照射（ｂ）が行われる。光照射（ｂ）は、光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤおよび波長６２０～６９０ｎｍの赤色光を含むＬＥＤを用いた光照射である。なお、前記青色光を含むＬＥＤと、赤色光を含むＬＥＤとは、別のＬＥＤであっても、同一のＬＥＤであってもよい。すなわち、例えば、青色光を含むＬＥＤおよび赤色光を含むＬＥＤとして、青色光と、赤色光とを含む、白色ＬＥＤを用いることができる。光照射（ｂ）は、光源として、白色ＬＥＤを用いた光照射（Ｉ）、白色ＬＥＤおよび青色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩ）、白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＩＩ）、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射（ＩＶ）、並びに青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを交互に用いた光照射（Ｖ）から選択される少なくとも１種の光照射であることが好ましい。

【００５６】

なお、光照射（ａ）において、光照射（Ｉ）を行う場合には、少なくとも青色光を含む白色ＬＥＤが用いられ、光照射（ｂ）において、光照射（Ｉ）を行う場合には、少なくとも青色光と、赤色光とを含む白色ＬＥＤが用いられ、光照射（ｂ）において光照射（ＩＩ）を行う場合には、少なくとも赤色光を含む白色ＬＥＤが用いられる。

【００５７】

本発明では、光照射（ａ）と光照射（ｂ）とが、異なる光源を用いた光照射である。なお、「異なる光源を用いた光照射」とは、「光照射（ａ）と光照射（ｂ）とでは、少なくとも一部の光源として、発光波長が異なる光源（ＬＥＤ）を用いた光照射が行われること」および「光照射（ａ）において発光波長が異なる複数の光源を同時に用いた光照射が行われ、光照射（ｂ）において発光波長が異なる複数の光源を同時に用いた光照射が行われ、光照射（ａ）と光照射（ｂ）とに用いられる光源（発光波長）の組み合わせが同じである場合において、光照射（ａ）における、各光源の強度比と、光照射（ｂ）における、各光源の強度比とが異なる光照射が行われること」の少なくとも一方を満たすことを意味する。なお、「異なる光源を用いた光照射」とは、光源の光量や、光源（ＬＥＤ）の本数等が異なることを意味するものではない。

【００５８】

より詳細には、異なる光源を用いるとは、少なくとも一方の光照射が光源として複数の

光源を用いる場合には、光源の少なくとも一部が異なればよい。例えば光照射（ａ）において白色ＬＥＤを用いた場合には、光照射（ｂ）において、白色ＬＥＤおよび青色ＬＥＤを用いた場合、白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた場合も、異なる光源を用いた光照射となる。別の例としては、光照射（ａ）において、白色ＬＥＤおよび青色ＬＥＤを用いた場合には、光照射（ｂ）において、白色ＬＥＤを用いた場合、白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた場合、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた場合も、異なる光源を用いた光照射となる。光照射（ａ）が、青色ＬＥＤと赤色ＬＥＤによる青色光と赤色光を交互に照射する場合は、光照射（ａ）は青色光のみ照射と赤色光のみの照射の組合せであるから、光照射（ｂ）が青色光と赤色光の同時照射であるときは異なる光源による光照射とみなす。

【００５９】

また、異なる光源を用いる別の例としては、光照射（ａ）および光照射（ｂ）において、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた光照射が行われる場合において、光照射（ａ）では青色ＬＥＤの発光強度が赤色ＬＥＤの発光強度よりも強く、光照射（ｂ）では青色ＬＥＤの発光強度が赤色ＬＥＤの発光強度よりも弱い場合が挙げられる。

【００６０】

光照射（ａ）で行われる光照射としては、光照射（Ｉ）、光照射（ＩＩ）、光照射（ＩＶ）、光照射（Ｖ）または光照射（ＶＩ）であることが好ましい。光照射（ａ）では、青色光の照射が効果的であり、青色ＬＥＤや白色ＬＥＤを用いることが好ましい。光照射（ａ）としては、制御の容易さの観点から、光照射（Ｉ）、光照射（ＩＩ）、光照射（ＩＶ）または光照射（ＶＩ）であることが好ましい。

【００６１】

光照射（ｂ）で行われる光照射としては、光照射（ＩＩＩ）、光照射（ＩＶ）または光照射（Ｖ）であることが好ましい。光照射（ｂ）では、青色光および赤色光の照射が効果的であり、赤色ＬＥＤを、青色ＬＥＤや白色ＬＥＤと共に用いることが好ましい。光照射（ｂ）としては、制御の容易さの観点から、光照射（ＩＩＩ）、または光照射（ＩＶ）であることが好ましい。

【００６２】

青色ＬＥＤとは、ピーク波長が４００～４９０ｎｍのＬＥＤ（発光ダイオード）であり、好ましくはピーク波長が４３０～４７０ｎｍのＬＥＤである。青色ＬＥＤとしては例えば、昭和電工製（ＧＡ２ＲＴ４５０Ｇ）等を用いることができる。

【００６３】

赤色ＬＥＤとは、ピーク波長が６２０～６９０ｎｍのＬＥＤ（発光ダイオード）であり、好ましくはピーク波長が６４５～６７５ｎｍのＬＥＤである。赤色ＬＥＤとしては例えば、昭和電工製（ＨＲＰ－３５０Ｆ）等を用いることができる。

【００６４】

白色ＬＥＤとしては、青色ＬＥＤチップと、励起光が青色光であり、発光波長が黄色光である蛍光体とを組み合わせた白色ＬＥＤ、青色ＬＥＤチップと、励起光が青色光であり、発光波長が黄色光である蛍光体、および発光波長が黄色以外（例えば、赤色、緑色、青緑色）の蛍光体を組み合わせた白色ＬＥＤ、青、赤、緑の各ＬＥＤチップを有する白色ＬＥＤ等を挙げることができる。白色ＬＥＤとしては例えば、日亜化学製（ＮＥＳＷ１４６Ａ）、株式会社ビームテック製（ＬＴＮ４０ＹＤ）等を用いることができる。

【００６５】

光照射（ａ）および光照射（ｂ）の光量（強度）はそれぞれ、特に限定されないが、例えば光合成有効光量子束密度（Photosynthetic Photon Flux Density：ＰＰＦＤ）が７５０μｍｏｌ／（m^2・ｓ）以上であることが好ましく、１，０００μｍｏｌ／（m^2・ｓ）以上であることがより好ましく、１，２００μｍｏｌ／（m^2・ｓ）以上であることが特に好ましい。光合成有効光量子束密度の上限としては、特に限定されないが、機器入手の容易さの観点、エネルギー効率の観点から通常は３０，０００μｍｏｌ／（m^2・ｓ）以下、好ましくは２０，０００μｍｏｌ／（m^2・ｓ）以下である。なお、光照射の際に、発光波長の異なる二種類のＬＥＤを同時に用いる場合には、上記光量は、用いたＬＥＤの

合計の光量である。

【００６６】

光照射（ａ）では、光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤを用いた光照射が行われる。光照射（ａ）における、波長４００～４９０ｎｍの青色光の光量（ＰＰＦＤ）は、全光量（ＰＰＦＤ）を１００％とすると、好ましくは５％以上、より好ましくは１０％以上、さらに好ましくは１５％以上である。上限としては、特に限定は無いが、１００％であってもよい。光源として青色ＬＥＤを用いた場合には、波長４００～４９０ｎｍの青色光の光量（ＰＰＦＤ）は、通常８０～１００％となる。前記範囲では、光合成微細藻類の細胞数の増加が好適に進むため好ましい。

【００６７】

光照射（ｂ）では、光源として、波長４００～４９０ｎｍの青色光を含むＬＥＤおよび波長６２０～６９０ｎｍの赤色光を含むＬＥＤを用いた光照射が行われる。光照射（ｂ）における、波長４００～４９０ｎｍの青色光の光量（ＰＰＦＤ）は、全光量（ＰＰＦＤ）を１００％とすると、好ましくは５％以上、より好ましくは１０％以上、さらに好ましくは１５％以上である。また、光照射（ｂ）における、波長６２０～６９０ｎｍの赤色光の光量（ＰＰＦＤ）は、全光量（ＰＰＦＤ）を１００％とすると、好ましくは５％以上、より好ましくは１０％以上、さらに好ましくは１５％以上である。上限としては、特に限定は無いが、光源として、青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを用いた場合には、波長４００～４９０ｎｍの青色光の光量と、波長６２０～６９０ｎｍの赤色光の光量との合計が１００％であってもよい。前記範囲では、光合成微細藻類のキサントフィル含有量が好適に増えるため好ましい。

工程（Ａ）から、工程（Ｂ）への変化、すなわち、光照射（ａ）から光照射（ｂ）への変化においては、青色光の光量が減少するか、赤色光の光量が増加するかの、少なくとも一方の変化が存在することが好ましく、両方の変化が存在することがより好ましい。前記変化が存在すると、光照射（ａ）で光合成微細藻類の細胞数の増加が進み、光照射（ｂ）でキサントフィル含有量が好適に増えるため好ましい。

光照射（ａ）から光照射（ｂ）への変化において、青色光の光量が減少する場合には、光照射（ｂ）において照射される全光線の光量中の青色光の割合が、光照射（ａ）において照射される全光線の光量中の青色光の割合から、３％以上減少することが好ましく、３０％以上減少することがより好ましくし、４０％以上減少することが特に好ましい。

光照射（ａ）から光照射（ｂ）への変化において、赤色光の光量が増加する場合には、光照射（ｂ）において照射される全光線の光量中の赤色光の割合が、光照射（ａ）において照射される全光線の光量中の赤色光の割合から、１０％以上増加することが好ましく、１５％以上増加することがより好ましくし、２５％以上増加することが特に好ましい。

また、前記光照射（ｂ）における青色光の光量と、前記光照射（ａ）における青色光の光量との差をΔＢ（光照射（ｂ）における青色光の光量－光照射（ａ）における青色光の光量）とし、前記光照射（ｂ）における赤色光の光量と、前記光照射（ａ）における赤色光の光量との差をΔＲ（光照射（ｂ）における赤色光の光量－光照射（ａ）における赤色光の光量）としたとき、ΔＲ－ΔＢ＞０であることが、キサントフィル含有量の観点から好ましい。

【００６８】

なお、光照射（Ｖ）を行った場合には、赤色ＬＥＤを用いて光照射を行っている際には、青色光の光量は、０％となり、青色ＬＥＤを用いて光照射を行っている際には、赤色光の光量は、０％となる。光照射（Ｖ）を行う場合には、光照射（Ｖ）を行っている際の、青色ＬＥＤを用いた光照射の時間と、赤色ＬＥＤを用いた光照射の時間とが、後述の範囲になればよい。

【００６９】

光合成有効光量子束密度が前記範囲内では、光量が充分であるため、効率的に光合成微細藻類の増殖およびキサントフィルの生成が可能であり好ましい。なお、キサントフィルを充分含有していない光合成微細藻類に高い光合成有効光量子束密度で光照射を行うと、

細胞数が増える前に細胞にダメージが起こり、死滅することがあるが、本発明の培養方法は、上述のようにキサントフィルを含むシスト化した光合成微細藻類を用いるため、高い光合成有効光量子束密度で光照射を行っても、細胞数が増え好ましい。

【００７０】

なお、光照射（ａ）および光照射（ｂ）の光量は、同じであっても、異なっていてもよい。工程（Ａ）の中で光照射（ａ）の光量は、制御の容易さの観点から一定であってもよく、細胞密度に応じて最適な光量に制御されるように変動させてもよい。また、工程（Ｂ）の中で光照射（ｂ）の光量は、制御の容易さの観点から一定であってもよく、細胞密度に応じて最適な光量に制御されるように変動させてもよい。

【００７１】

各光照射（光照射（ＩＩ）、（ＩＩＩ）および（ＩＶ））において、発光波長の異なる二種類のＬＥＤを同時に用いる場合における光量（強度）の比としては特に制限は無い。光照射に用いる任意の色のＬＥＤをＸ色ＬＥＤとし、光照射に用いるＸ色ＬＥＤとは異なる発光波長のＬＥＤをＹ色ＬＥＤとすると、Ｘ色ＬＥＤとＹ色ＬＥＤとの強度比（光合成有効光量子束密度の比）は、通常１：２０～２０：１であり、好ましくは１：１５～１５～１であり、より好ましくは１：１０～１０：１である。

【００７２】

光照射（Ｖ）は、前述のように青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤを交互に用いた光照射である。すなわち、光照射（Ｖ）では、青色ＬＥＤを用いた光照射と赤色ＬＥＤを用いた光照射とを交互に行う。光照射（Ｖ）では、各ＬＥＤを用いた光照射が、それぞれ一定期間別個独立に行われる。

【００７３】

光照射（Ｖ）では、青色ＬＥＤを用いた光照射および赤色ＬＥＤを用いた光照射をそれぞれ少なくとも１回行われる。青色ＬＥＤを用いた光照射をI_Bとし、赤色ＬＥＤを用いた光照射をI_Rとすると、光照射（Ｖ）としては、例えば、I_B、I_Rの順で、それぞれ１回行われる光照射、またはI_B、I_Rの順で行われる光照射を１ステップとし、少なくとも一回該ステップが行われる光照射が挙げられる。

【００７４】

光照射（Ｖ）では、I_Bを行う時間と、I_Rを行う時間との比としては特に限定は無い。光照射（ａ）として、光照射（Ｖ）を行う場合には、I_Bを行う時間と、I_Rを行う時間との比（I_B：I_R）は、通常は１：１～２５０：１である。また、光照射（ｂ）として、光照射（Ｖ）を行う場合には、I_Bを行う時間と、I_Rを行う時間との比（I_B：I_R）は、通常は１：１～１：２５０である。

【００７５】

なお、前記I_Bを行う時間は、青色ＬＥＤを用いた光照射を複数回行う場合には、工程（Ａ）または工程（Ｂ）で行われる青色ＬＥＤを用いた光照射の合計時間を意味し、前記I_Rを行う時間は、赤色ＬＥＤを用いた光照射を複数回行う場合には、工程（Ａ）または工程（Ｂ）で行われる赤色ＬＥＤを用いた光照射の合計時間を意味する。

【００７６】

なお、光照射（ａ）は、光照射（Ｉ）～（ＶＩ）から選択される少なくとも１種の光照射であるが、光照射（ａ）は、光照射（Ｉ）～（ＶＩ）から選択される１種の光照射であってもよく、光照射（ａ）は、光照射（Ｉ）～（ＶＩ）から選択される２種以上の光照射であってもよい。光照射（ａ）としては、光照射（Ｉ）～（ＶＩ）から選択される１種の光照射であることが、制御の容易さの観点から好ましい。

【００７７】

光照射（ａ）が、光照射（Ｉ）～（ＶＩ）から選択される２種以上の光照射であるとは、光照射（Ｉ）～（ＶＩ）から選択される２種以上の光照射を同時に行う態様、順番に行う態様等が挙げられる。

【００７８】

なお、光照射（ｂ）は、光照射（Ｉ）～（Ｖ）から選択される少なくとも１種の光照射

であるが、光照射（ｂ）は、光照射（Ｉ）～（Ｖ）から選択される１種の光照射であってもよく、光照射（ｂ）は、光照射（Ｉ）～（Ｖ）から選択される２種以上の光照射であってもよい。光照射（ｂ）としては、光照射（Ｉ）～（Ｖ）から選択される１種の光照射であることが、制御の容易さの観点から好ましい。

【００７９】

光照射（ｂ）が、光照射（Ｉ）～（Ｖ）から選択される２種以上の光照射であるとは、光照射（Ｉ）～（Ｖ）から選択される２種以上の光照射を同時に行う態様、順番に行う態様等が挙げられる。

【００８０】

なお、前述のように本発明では、光照射（ａ）と光照射（ｂ）とが、異なる光源を用いた光照射であるが、光照射（ａ）および光照射（ｂ）の少なくとも一方において、前記２種以上の光照射が行われた場合には、光照射（ａ）および光照射（ｂ）において、一部でも異なる光源を用いればよい。例えば、光照射（ａ）において、光照射（Ｉ）および光照射（ＩＩ）が行われる場合には、光照射（ｂ）が、光照射（Ｉ）のみである場合、光照射（ＩＩ）のみである場合、光照射（Ｉ）と光照射（ＩＩＩ）または（ＩＶ）とを行った場合、光照射（ＩＩ）と、光照射（ＩＩＩ）または（ＩＶ）とを行った場合等は、異なる光源を用いた光照射となる。

【００８１】

また、前記のように光照射（ａ）と光照射（ｂ）において、ともに光照射（ＩＶ）を行う場合であって、光照射（ａ）と光照射（ｂ）とでは青色ＬＥＤと赤色ＬＥＤの発光強度が異なる場合も、異なる光源を用いたとみなす。

以下、工程（Ａ）、工程（Ｂ）を行う際の、光照射（ａ）、光照射（ｂ）以外の条件について説明する。

【００８２】

（培地）

本発明の光合成微細藻類の培養方法に用いる培地としては、特に制限がない。

培地としては、通常は、光合成微細藻類の増殖に必要な窒素、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）などを含む、液体状の培地が用いられる。

培地としては、具体的には、ＶＴ培地、Ｃ培地、ＭＣ培地、ＭＢＭ培地、ＭＤＭ培地などの培地（藻類研究法　千原光雄・西澤一俊編、共立出版（１９７９）を参照）、ＯＨＭ培地、ＢＧ－１１培地およびこれらの改変培地などが用いられる。

【００８３】

細胞数増加工程（Ａ）では、光合成微細藻類の細胞数が増加、すなわち増殖する。細胞数増加工程（Ａ）で用いる培地としては、増殖に適した窒素源となる成分を添加した培地、例えば窒素濃度が、０．０３ｇ／Ｌ以上、好ましくは０．０３～０．５ｇ／Ｌ、より好ましくは０．０５～０．５ｇ／Ｌの培地を用いることが好ましい。

【００８４】

前記範囲では、細胞数の増加を効率的に行うことができ、且つ、工程（Ｂ）において工程（Ａ）で用いた培地をそのまま使用した場合でも、光合成微細藻類が有するキサントフィル含有量を充分に増加させることができるため好ましい。

【００８５】

なお、工程（Ｂ）においても、通常は培地を用いるが、工程（Ｂ）に用いる培地としては、工程（Ａ）で用いた培地をそのまま使用してもよく、培地を変更してよい。工程（Ｂ）に用いる培地としては、光合成微細藻類が有するキサントフィル含有量を、増加させる観点から、窒素源となる成分をほとんど含まない培地、例えば窒素濃度が、０．０２ｇ／Ｌ未満、好ましくは０．０１ｇ／Ｌ未満の培地を用いることが好ましい。

【００８６】

なお、工程（Ａ）で用いた培地をそのまま使用する場合には、工程（Ａ）において細胞数の増加が停止、あるいはほぼ停止した時点で、培地に含まれる窒素濃度は通常０．０２ｇ／Ｌ未満となる。また、工程（Ａ）と工程（Ｂ）とで培地を変更する場合には、工程（

Ｂ）において、上記窒素濃度の培地を採用すればよい。
前記範囲では、工程（Ｂ）において、光合成微細藻類が有するキサントフィル含有量を充分に増加させることができるため好ましい。

【００８７】
（培養条件）
工程（Ａ）および工程（Ｂ）における培養条件には、特に制限はなく、一般に、光合成微細藻類の培養に用いられる温度、ｐＨが用いられる。
光合成微細藻類の培養は、例えば１５～３５℃で行われ、好ましくは２０～３０℃で行われ、より好ましくは２２～２８℃で行われる。培養中のｐＨは、６．０～１０．０に保たれることが好ましく、７．０～９．０に保たれることがより好ましい。

【００８８】
工程（Ａ）および工程（Ｂ）では、二酸化炭素が供給されることが好ましい。二酸化炭素は、１～５Ｖ／Ｖ％濃度の二酸化炭素を含有するガスを、例えば、０．２～２ｖｖｍとなるように吹き込むことで供給される。なお、二酸化炭素を含有するガスとしては、二酸化炭素と空気とを混合したガスや、二酸化炭素と窒素ガスとを混合したガスを用いることができる。

【００８９】
扁平培養瓶等の扁平培養槽を用いる場合、前記二酸化炭素の供給により、培養液が撹拌され、微細藻類に対して光照射が均一に行われる。なお、培養液の撹拌は、別途撹拌機を用いて行ってもよい。

【００９０】
（培養装置）
工程（Ａ）および工程（Ｂ）に用いられる培養装置は、光合成微細藻類、通常は光合成微細藻類を含む培養液に光照射できる装置であればよく、特に制限は無いが、通常は二酸化炭素を含有するガスを供給可能なラインを有する。

【００９１】
培養装置としては、例えば、小スケールの場合は、扁平培養瓶、大スケールの場合は、ガラス製、プラスチック製などの透明板で構成された扁平培養槽、照明器を備えた撹拌機つきのタンク型培養槽、チューブ型培養槽、エアドーム型培養槽、中空円筒型培養槽などが用いられる。また、密閉容器が好ましく用いられる。

【００９２】
（培養方法）
本発明の光合成微細藻類の培養方法では、上記培地、培養条件、培養装置などを適宜選択して組合せ、工程（Ａ）および工程（Ｂ）を行う。工程（Ａ）および工程（Ｂ）を行う方法としては、大きく分けて二つの方法がある。一つ目の方法は、工程（Ａ）および工程（Ｂ）を同一の培地で行う方法、すなわち、一段階培養法である。二つ目の方法は、工程（Ａ）を行った後、光合成微細藻類と、培地とを分離し、分離された光合成微細藻類と、新たな培地とを用いて工程（Ｂ）を行う方法、すなわち、二段階培養法である。前記一段階培養法は、工程（Ａ）と工程（Ｂ）とで培地が同じであるため、操作が容易であり、また、工程（Ａ）と工程（Ｂ）とが連続的に行われるため、雑菌の混入が起きづらいため好ましい。前記二段階培養法は、工程（Ａ）、工程（Ｂ）のそれぞれにおいて、最適な培地を選択できる点で好ましい。前記一段階培養法は、連続培養には不向きであり、通常は回分式の培養として行われる。

【００９３】
（生産性および培養液）
本発明の光合成微細藻類の培養方法は、工程（Ａ）、工程（Ｂ）を有するため、従来よりも効率的にキサントフィルを得ることが可能である。

【００９４】
具体的には、工程（Ｂ）により得られた光合成微細藻類の培養液１Ｌ当たりの、キサントフィルの量（ｍｇ）を工程（Ａ）および（Ｂ）が行われる合計の期間（ｄａｙ）で除し

た、キサントフィルの生産性（ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ））が、好ましくは２０ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ）以上であり、より好ましくは３０ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ）以上であり、特に好ましくは４０ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ）以上である。生産性としては、高いほど好ましく、その上限としては特に制限は無いが、本発明の培養方法では、キサントフィルの生産性は、通常は１００ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ）以下である。

【００９５】

本発明の光合成微細藻類の培養方法では、通常液体状の培地を用いるため、光合成微細藻類の培養液が得られる。本発明の培養方法で得られる光合成微細藻類の培養液は、培養液１Ｌあたり、好ましくはキサントフィル含有量が３００ｍｇ／Ｌ以上であり、より好ましくは４００ｍｇ／Ｌ以上であり、特に好ましくは５００ｍｇ／Ｌ以上である。キサントフィル含有量としては、高いほど好ましく、その上限としては特に制限は無いが、得られる光合成微細藻類の培養液のキサントフィル含有量は、通常は１０００ｍｇ／Ｌ以下である。

【００９６】

本発明の光合成微細藻類の培養方法で得られる光合成微細藻類は、キサントフィルを乾燥質量換算で４～１５質量％含むことが好ましく、５～１２質量％以上含むことがより好ましい。

【００９７】

（キサントフィルの回収）

本発明の光合成微細藻類の培養方法では、キサントフィルが光合成微細藻類内に蓄積されている。このため、キサントフィルの回収は、光合成微細藻類を回収した後、従来公知の方法を始め、特に制限なく、光合成微細藻類から回収される。光合成微細藻類からキサントフィルを回収する方法としては、例えば、機械的に光合成微細藻類を破壊した後、有機溶媒、超臨界二酸化炭素により抽出する方法が挙げられる。

【実施例】

【００９８】

次に本発明について実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

（光合成微細藻類）

光合成微細藻類として、ヘマトコッカス・ラクストリスＮＩＥＳ－１４４株を用いた。

【００９９】

（培養液中のアスタキサンチン濃度の測定）

所定量の培養液をバイオマッシャーＩＶ（株式会社ニッピ製）にとり、アセトンを加えてＦａｓｔＰｒｅｐ－２４（フナコシ株式会社製）で細胞を破砕しアスタキサンチンを抽出した。

【０１００】

遠心分離後、上澄を適宜アセトンで希釈したのち、４７４ｎｍにおける吸光度を測定し、アスタキサンチンのアセトン中での吸光係数（$A_{1\%}$＝２，１００）から、培養液中のアスタキサンチン濃度（ｍｇ／Ｌ）を算出した。

【０１０１】

（乾燥藻体質量の測定）

所定量の培養液を、あらかじめ恒温乾燥器で恒量としておいたＧＳ２５ガラス繊維ろ紙（アドバンテック東洋株式会社製）を用いて吸引濾過し、イオン交換水で洗浄したのち、１０５℃の恒温乾燥器で２時間乾燥した。その後、デシケーター中で室温まで冷却したのち、その質量を測定することにより、培養液中の乾燥藻体質量（ｍｇ／Ｌ）を求めた。

【０１０２】

（細胞内のアスタキサンチン濃度の算出）

前記培養液中のアスタキサンチン濃度（ｍｇ／Ｌ）を、培養液中の乾燥藻体質量（ｍｇ／Ｌ）で除することにより、細胞内のアスタキサンチン濃度（質量％）（乾燥質量換算）を算出した。

【０１０３】
（培養液中の全窒素濃度（ｍｇ／Ｌ）の測定）
所定量の培養液から遠心分離により細胞を沈殿として除いた上澄を作製し、この上澄中の全窒素濃度を全窒素測定試薬キット１４３Ｃ１９１（東亜ディーケーケー株式会社製）、ポータブル簡易全窒素・全りん計ＴＮＰ－１０（東亜ディーケーケー株式会社製）を用いて測定した。
【０１０４】
（細胞数の測定）
所定量の培養液の細胞数を、改良ノイバウエル血球計算盤を用いて、顕微鏡下で細胞数をカウントすることにより、培養液中の細胞数（ｃｅｌｌｓ／ｍＬ）を算出した。
【０１０５】
〔実施例１〕
１．０Ｌ容量扁平培養瓶（フラスコ厚　約３８ｍｍ　ただしガラス厚を含む）に表１に示す培地を４００ｍｌ入れ、オートクレーブ滅菌後、シスト化したヘマトコッカス・ラクストリスＮＩＳＥ－１４４を０．５０ｇ／Ｌとなるように接種した。接種したヘマトコッカス・ラクストリスＮＩＳＥ－１４４の、乾燥質量あたりのアスタキサンチン含有量は４．８質量％であった。
【０１０６】
【表１】

表1

成分	g／L
KNO_3	0. 7
K_2HPO_4	0. 07
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0. 131
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0. 063
クエン酸(無水)	0. 0105
クエン酸鉄(Ⅲ)アンモニウム	0. 0105
EDTA・2Na	0. 00175
Na_2CO_3	0. 035
H_3BO_3	0. 005
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0. 0032
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0. 0004
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0. 000004
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0. 000014
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0. 000026

【０１０７】
＜工程Ａ＞
扁平培養瓶の両面から青色ＬＥＤ（昭和電工製、ＧＡ２ＲＴ４５０Ｇ）（発光波長として、波長４００～４９０ｎｍの青色光をＰＰＦＤ換算で９８％含む）を用いて光照射（光照射（ａ））しながら、培養瓶の底面から３Ｖ／Ｖ％二酸化炭素を含む空気を０．５ｖｖ

ｍで通気することにより撹拌し、２５℃で培養を行った。

【０１０８】

照射する光の強さは光量子計（ＬＩ－ＣＯＲ社製、ＬＩ－２５０Ａ）を用いて扁平培養瓶の表面で測定を行い、光合成有効光量子束密度（ＰＰＦＤ）が両面合計で１，３００μｍｏｌ／（m^2・ｓ）になるように調整した。

光照射を開始してから５日目で、培養液中の全窒素濃度が、２０ｍｇ／Ｌ未満となった。この時点で、細胞数の増加に必要な窒素源が充分に消費されたと判断した。

【０１０９】

＜工程Ｂ＞

次いで、ＰＰＦＤは変えずに、光源を青色ＬＥＤから、白色ＬＥＤ（株式会社ビームテック製、ＬＴＮ４０ＹＤ）（発光波長として、波長４００～４９０ｎｍの青色光をＰＰＦＤ換算で１９％含み、波長６２０～６９０ｎｍの赤色光をＰＰＦＤ換算で１４％含む）および赤色ＬＥＤ（昭和電工製、ＨＲＰ－３５０Ｆ）（発光波長として、波長６２０～６９０ｎｍの赤色光をＰＰＦＤ換算で９６％含む）（光量子束密度の比が５：１）へ変更（実施例１－１）、あるいは青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤ（光量子束密度の比が１：１）へと変更（実施例１－２）し（光照射（ｂ））、培養開始後１２日間（光源を変更後７日間）培養を行った。

【０１１０】

培養液は適宜サンプリングを行い、ｐＨ、培養液中の細胞数、培養液中のアスタキサンチン濃度、培養液中の乾燥藻体質量、および培養液中の全窒素濃度の測定を行った。測定した培養液中のアスタキサンチン濃度、培養液中の乾燥藻体質量から、細胞内のアスタキサンチン濃度の算出を行った。ｐＨは全培養期間中を通じて７．５～８．５であった。

【０１１１】

培養液中の細胞数、培養液中のアスタキサンチン濃度、培養液中の乾燥藻体質量については培養終了後、実験開始当初の培養液量、実験終了時の扁平培養瓶に残った培養液量、途中でサンプリングした培養液量から計算により通気撹拌により蒸発した水分を求め、期間中一定速度で水分が蒸発したと考えて値を補正した。

【０１１２】

培養液中の全窒素濃度の経時変化、培養液中の細胞数の経時変化、培養液中のアスタキサンチン濃度の経時変化、細胞内のアスタキサンチン濃度の経時変化を、それぞれ図１、図２、図３および図４に示す。

【０１１３】

培養液中の窒素は５日目までには消費された。細胞数は４日目まで増殖を示し、その後はほぼ一定、あるいは微増を示し１２日目の細胞数は、実施例１－１、１－２とも約８×10^5ｃｅｌｌｓ／ｍｌであった。培養液中のアスタキサンチン濃度は５日目で約１２０ｍｇ／Ｌであり、その後、実施例１－１、１－２とも増加し、１２日目で実施例１－１で５３０ｍｇ／Ｌ（アスタキサンチンの生産性：４４ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ））、実施例１－２で５４０ｍｇ／Ｌ（アスタキサンチンの生産性：４５ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ））となった。細胞内のアスタキサンチン濃度は培養開始当初４．８質量％であり、３日目で最も低い２．９質量％へと減少したが、その後上昇に転じ、１２日目で実施例１－１で７．１質量％、実施例１－２で８．４質量％となった。

光源の種類、培養１２日後の培養液中のアスタキサンチン濃度、アスタキサンチンの生産性を表２に示す。

【０１１４】

〔比較例１〕

扁平培養瓶の両面からＰＰＦＤが両面合計で１，３００μｍｏｌ／（m^2・ｓ）となるように白色ＬＥＤ（比較例１－１）あるいは青色ＬＥＤ（比較例１－２）を用いて光照射し、途中で光源を変更しなかった以外は実施例１と同様にして培養を行った。

【０１１５】

培養液中の全窒素濃度の経時変化、培養液中の細胞数の経時変化、培養液中のアスタキ

サンチン濃度の経時変化、細胞内のアスタキサンチン濃度の経時変化を、それぞれ図１、図２、図３および図４に示す。

【０１１６】

培養液中の窒素は５日目までには消費された。細胞数は４日目まで増殖を示し、その後はほぼ一定となり１２日目の細胞数は、比較例１－２で約７×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍｌ、比較例１－１で約３．８×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍｌとなった。比較例１－１では比較例１－２の半分程度の細胞数であった。

【０１１７】

培養液中のアスタキサンチン濃度は５日目で、比較例１－２で約１２０ｍｇ／Ｌ、比較例１－１白色で約１６０ｍｇ／Ｌであった。その後、比較例１－１、１－２とも徐々に増加し、１２日目で比較例１－２で２４５ｍｇ／Ｌ（アスタキサンチンの生産性：２０ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ））、比較例１－１で３３０ｍｇ／Ｌ（アスタキサンチンの生産性：２８ｍｇ／（Ｌ・ｄａｙ））となった。細胞内のアスタキサンチン濃度は培養開始当初４．８質量％であり、３日目で最も低い比較例１－２で２．９質量％、比較例１－１で２．７質量％へと減少したが、その後上昇に転じ、１２日目で比較例１－２で７．１質量％、比較例１－１で７．０質量％となった。

光源の種類、培養１２日後の培養液中のアスタキサンチン濃度、アスタキサンチンの生産性を表２に示す。

【０１１８】

〔実施例２〕

培養開始時に用いる光照射（ａ）の光源を青色ＬＥＤから白色ＬＥＤに変更した以外は実施例１と同様にして培養を行った。

なお、光照射開始から５日経過後、光照射（ｂ）の光源を白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤ（光量子束密度の比が５：１）へ変更した実施例を実施例２－１とし、光源を青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤ（光量子束密度の比が１：１）へ変更した実施例を実施例２－２とした。

光源の種類、培養１２日後の培養液中のアスタキサンチン濃度、アスタキサンチンの生産性を表２に示す。

【０１１９】

〔実施例３〕

培養開始時に用いる光照射（ａ）の光源を、青色ＬＥＤから白色ＬＥＤおよび青色ＬＥＤ（光量子束密度の比が５：１）に変更した以外は実施例１と同様にした培養を行った。

なお、光照射開始から５日経過後、光照射（ｂ）の光源を白色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤ（光量子束密度の比が５：１）へ変更した実施例を実施例３－１とし、光源を青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤ（光量子束密度の比が１：１）とした実施例を実施例３－２とした。

光源の種類、培養１２日後の培養液中のアスタキサンチン濃度、アスタキサンチンの生産性を表２に示す。

【０１２０】

〔実施例４〕

培養開始時に用いる光照射（ａ）の光源を、青色ＬＥＤから青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤ（光量子束密度の比が１：１）に変更した以外は実施例１－１と同様にして培養を行った。

光源の種類、培養１２日後の培養液中のアスタキサンチン濃度、アスタキサンチンの生産性を表２に示す。

【０１２１】

〔実施例５〕

光照射開始から５日経過後に用いる光照射（ｂ）の光源を、白色ＬＥＤに変更した以外は、実施例１と同様にして培養を行った。

光源の種類、培養１２日後の培養液中のアスタキサンチン濃度、アスタキサンチンの生産性を表２に示す。

【０１２２】
〔実施例６〕
実施例１において、培養開始から５日間行った青色ＬＥＤを用いた光照射（ａ）を、培養開始から４日間行われる、青色ＬＥＤを用いた２１時間の光照射と、赤色ＬＥＤを用いた０．１時間の光照射とを、交互に連続して行う光照射に変更し、光源を青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤへ変更するのを、光照射開始から５日経過後から、４日経過後に変更し、光源変更後の光照射を７日間から８日間に変更した以外は、実施例１－２と同様にして培養を行った（実施例６－１）。
【０１２３】
実施例１において、培養開始から５日間行った青色ＬＥＤを用いた光照射（ａ）を、培養開始から４日間行われる、青色ＬＥＤを用いた９２時間の光照射と、赤色ＬＥＤを用いた４時間の光照射とを、交互に行う光照射に変更し、光源を青色ＬＥＤおよび赤色ＬＥＤへ変更するのを、光照射開始から５日経過後から、４日経過後に変更し、光源変更後の光照射を７日間から８日間に変更した以外は、実施例１－２と同様にして培養を行った（実施例６－２）。
光源の種類、培養１２日後の培養液中のアスタキサンチン濃度、アスタキサンチンの生産性を表２に示す。
【０１２４】
【表２】
表２

	光照射(a)	光照射(b)	培養後の培養液中のアスタキサンチン濃度 (mg/L)	アスタキサンチン生産性 (mg/(L･day))
実施例 1-1	青	白+赤	530	44
実施例 1-2	青	青+赤	540	45
実施例 2-1	白	白+赤	470	39
実施例 2-2	白	青+赤	490	41
実施例 3-1	白+青	白+赤	500	42
実施例 3-2	白+青	青+赤	510	43
実施例 4	青+赤	白+赤	490	41
実施例 5	青	白	450	38
実施例 6-1	青 21hr/赤 0.1hr 交互照射	青＋赤	485	40
実施例 6-2	青 92hr/赤 4hr 交互照射	青＋赤	490	41
比較例 1-1	白	白	330	28
比較例 1-2	青	青	245	20

上述の各実施例、比較例で使用した各光源の青色光、赤色光の割合、各実施例、比較例の工程Ａ、Ｂにおける、各光源間の光量子束密度の比に基づき、各実施例、比較例における光照射（ａ）、光照射（ｂ）における、青色光の割合（％）および赤色光の割合（％）を算出し、ΔＢ、ΔＲ、ΔＲ－ΔＢを算出し、各実施例の培養後の培養液中のアスタキサ

ンチン濃度（ｍｇ／Ｌ）（表３中でＡｘ濃度と表記）と共に、表３に示した。

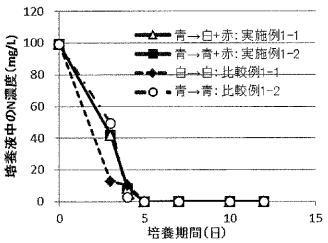
なお、各実施例、比較例では、工程Ａと工程Ｂとで、ＰＰＦＤは変えていないため、前記青色光の割合（％）および赤色光の割合（％）の増減が、光量の増減と一致し、ΔＲ－ΔＢの大小関係は、具体的な光量で求めても、割合で求めても一致する。

【表３】

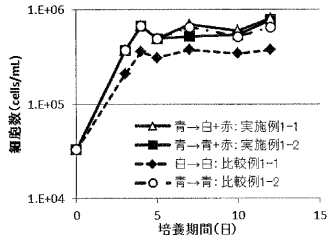
表3

	光照射(a)		光照射(b)	光照射(a)		光照射(b)		ΔB	ΔR	ΔR－ΔB	Ax濃度
				青色光%	赤色光%	青色光%	赤色光%				
実施例1－1	青	白	赤	98	0	15.8	27.7	−82.2	27.7	109.8	530
実施例1－2	青	青	赤	98	0	49	48	−49.0	48.0	97.0	540
実施例2－1	白	白	赤	19	14	15.8	27.7	−3.2	13.7	16.8	470
実施例2－2	白	青	赤	19	14	49	48	30.0	34.0	4.0	490
実施例3－1	青 白	白	赤	32.2	11.7	15.8	27.7	−16.3	16.0	32.3	500
実施例3－2	青 白	青	赤	32.2	11.7	49	48	16.8	36.3	19.5	510
実施例4	青	白	赤	49	48	15.8	27.7	−33.2	−20.3	12.8	490
実施例5	青	白		96	0	19	14	−77.0	14.0	91.0	450
実施例6－1	青赤(0.4%)	青	赤	97.6	0.4	49	48	−48.6	47.6	96.2	485
実施例6－2	青赤(4.2%)	青	赤	93.9	4	49	48	−44.9	44.0	88.9	490
比較例1－1	白	白		19	14	19	14	0.0	0.0	0.0	330
比較例1－2	青	青		98	0	98	0	0.0	0.0	0.0	245

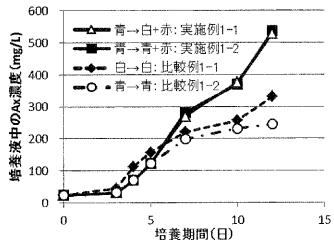
【図１】


培養液中のNa濃度(mg/L)
培養期間(日)
青→白+赤：実施例1-1
青→青+赤：実施例1-2
白→白：比較例1-1
青→青：比較例1-2

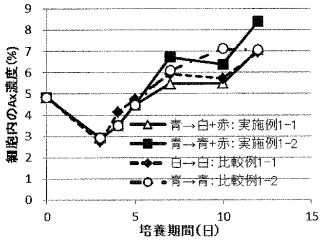
【図２】


細胞数(cells/mL)
培養期間(日)
青→白+赤：実施例1-1
青→青+赤：実施例1-2
白→白：比較例1-1
青→青：比較例1-2

【図３】


培養液中のAs濃度(mg/L)
培養期間(日)
青→白+赤：実施例1-1
青→青+赤：実施例1-2
白→白：比較例1-1
青→青：比較例1-2

【図４】


細胞内のAs濃度(%)
培養期間(日)
青→白+赤：実施例1-1
青→青+赤：実施例1-2
白→白：比較例1-1
青→青：比較例1-2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/029513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1/12(2006.01)i, *C12P7/26*(2006.01)n

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, C12P7/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2015/151577 A1 (Nippon Suisan Kaisha, Ltd.), 08 October 2015 (08.10.2015), paragraphs [0014], [0027]; table 2 & US 2017/0107554 A paragraphs [0052], [0085]; table 2	10 1-9
Y	Tomohisa KATSUDA, "A Biochemical Engineering Study of Bioproductions Using Photobioreactor", Journal of the Society for Bioscience and Bioengineering, Japan, 2008, vol.86, no.3, pages 117 to 122, page 121, column of 'Baiyoekichu no Hikari Kyodo to Spectrum no Henka o Riyo shita Yuyo Busshitsu Seisan'	1-9

☐ 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
06 November 2017 (06.11.17)	14 November 2017 (14.11.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／０２９５１３

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, C12P7/26(2006.01)n

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, C12P7/26

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	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７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)

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	WO 2015/151577 A1 (日本水産株式会社) 2015.10.08, [0014],[0027],表２ & US 2017/0107554 A [0052],[0085],TABLE 2	10 1-9
Y	勝田知尚，フォトバイオリアクターによる有用物質生産のための生物化学工学的検討， 生物工学会誌，2008，vol.86，no.3，p.117-122， p.121「培養液中の光強度とスペクトルの変化を利用した有用物質生産」の欄	1-9

☐　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
０６．１１．２０１７	１４．１１．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
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	福間　信子	４Ｎ	３５３９
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８		

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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

Ｆターム(参考) 4B065 AA83X BC48 CA09 CA41 CA50

（注）この公表は、国際事務局（ＷＩＰＯ）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第１８４条の１０第１項(実用新案法第４８条の１３第２項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。