

(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
2020年8月13日(13.08.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/162407 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/12 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/003963
- (22) 国際出願日: 2020年2月3日(03.02.2020)
- (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 2019-017684 2019年2月4日(04.02.2019) JP
- (71) 出願人: 浜松ホトニクス株式会社 (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) [JP/JP];
〒4358558 静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者: 松永 茂 (MATSUNAGA Shigeru);
〒4358558 静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka

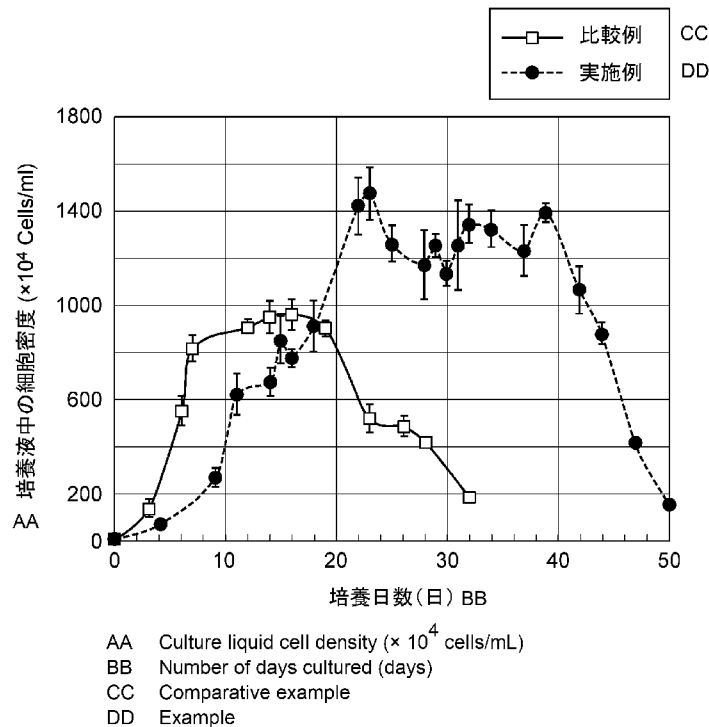
(JP). 伊藤 博康(ITOHI Hiroyasu); 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目 1 番 1 号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9 階 創英国際特許法律事務所 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, 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,

(54) Title: HAPTOPHYTE CULTURING METHOD AND HAPTOPHYTE CULTURING DEVICE

(54) 発明の名称: ハプト藻の培養方法、及びハプト藻の培養装置



(57) Abstract: This haptophyte culturing method has a step for irradiating a haptophyte-containing culture liquid with both yellow light and visible light other than yellow light.

(57) 要約: ハプト藻の培養方法は、ハプト藻を含む培養液に対し、黄色光と黄色以外の可視光とを共に照射するステップを有する。

[続葉有]

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, 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))

明 細 書

発明の名称：ハプト藻の培養方法、及びハプト藻の培養装置

技術分野

[0001] 本開示は、ハプト藻の培養方法、及びハプト藻の培養装置に関する。

背景技術

[0002] 特許文献1には、藻類に人工光を照射して増殖を促進させる藻類培養方法が記載されている。この藻類培養方法では、赤色光を藻類に照射する赤色光照射手順と、青色光を藻類に照射する青色光照射手順と、からなる照射サイクルを一定期間内に少なくとも2サイクル以上行われる。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2015-128448号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 特許文献1に記載の藻類培養方法に挙げられている赤色光又は青色光をハプト藻に照射して培養した場合、ハプト藻は増殖するものの、短期間で減少することが確認された。本開示は、ハプト藻の長寿命化を図ることができる培養方法及び培養装置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

[0005] 本発明者は、黄色光と黄色以外の可視光とを共にハプト藻に照射した場合、光照射による培養開始から個体数が減少するまでの期間が、黄色以外の可視光のみを照射した場合と比較して長くなることを見出した。

[0006] 上記知見に基づき、本開示に係るハプト藻の培養方法は、ハプト藻を含む培養液に対し、黄色光と黄色以外の可視光とを共に照射するステップを有する。このハプト藻の培養方法によれば、ハプト藻は、黄色光と黄色以外の可視光とを受光して増殖する。これにより、黄色以外の可視光のみを照射した場合と比較して、この培養方法は、ハプト藻の長寿命化を図ることができる。

。

[0007] 一実施形態においては、ハプト藻はPavlova lutheriであってもよい。この場合、Pavlova lutheriの長寿命化を図ることができる。

[0008] 本開示の他の側面に係るハプト藻の培養装置は、ハプト藻を含む培養液を貯留する培養槽と、培養槽内の培養液に対して黄色光を照射する第1光源と、培養槽内の培養液に対して黄色以外の可視光を照射する第2光源と、を備える。このハプト藻の培養装置によれば、ハプト藻は、培養槽の培養液内で培養される。ハプト藻は、第1光源から照射される黄色光と、第2光源から照射される黄色以外の可視光とを共に受光して増殖する。これにより、黄色以外の可視光のみを照射した場合と比較して、この培養装置は、ハプト藻の長寿命化を図ることができる。

[0009] 一実施形態に係るハプト藻の培養装置は、黄色光及び可視光が共に培養液に照射されるように第1光源及び第2光源を制御する制御部をさらに備えてもよい。この場合、培養液内のハプト藻は、制御部の制御に基づき照射される第1光源からの黄色光と第2光源からの黄色以外の可視光とを共に受光することができる。

[0010] 一実施形態においては、ハプト藻はPavlova lutheriであってもよい。この場合、Pavlova lutheriの長寿命化を図ることができる。

発明の効果

[0011] 本開示によれば、ハプト藻の長寿命化を図ることができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、実施形態に係る培養装置を示す全体斜視図である。

[図2]図2は、Pavlova lutheriの吸収スペクトルを示すグラフである。

[図3]図3は、波長域の異なる光で培養したときのPavlova lutheriの細胞密度の時間変化を示すグラフである。

[図4]図4は、実施例及び比較例に係るPavlova lutheriの細胞密度の時間変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、図面を参照して、本開示の実施形態について説明する。なお、以下の説明及び各図面において、同一又は相当要素には同一符号を付し、重複する説明は繰り返さない。図面の寸法比率は、説明のものと必ずしも一致していない。「上」「下」「左」「右」の語は、図示する状態に基づくものであり、便宜的なものである。

[0014] (ハプト藻)

本実施形態に係る培養方法は、ハプト藻を効率的に増殖させ、増殖したハプト藻の長寿命化を図る方法である。培養対象であるハプト藻は、エビやカニなどの甲殻類、アサリやアカガイなどの貝類の種苗に対して栄養価の高い餌料となる藻類である。ハプト藻としては、例えば、*Pavlova lutheri*、*Isochrysis galbana*、*Isochrysis* sp.などが挙げられる。

[0015] (ハプト藻の培養装置)

図1は、実施形態に係る培養装置を示す全体斜視図である。本実施形態の培養方法は、例えば、図1に示す培養装置1によって実施される。図1に示す培養装置1は、ハプト藻2を培養する装置である。培養装置1は、培養槽10と、第1照明20と、第2照明21と、水中照明22と、制御部30と、通気部40とを備える。培養槽10は、ハプト藻2及び培養液3を貯留する容器である。培養液3は、培養対象であるハプト藻2の生育環境に適した水である。培養液3は、例えば、海水より窒素やリンなどの栄養塩を多く含む水である。ハプト藻2は、培養液3中で光合成を行い増殖する。

[0016] 培養槽10は、例えば、上方が開放された箱型の空間を内部に画成する。培養槽10は、内部においてハプト藻2及び培養液3を貯留し、水面4を形成する。培養槽10は、内部の下端に底面11を有する。

[0017] 第1照明20及び第2照明21は、培養槽10内のハプト藻2及び培養液3に向けて光を照射する。第1照明20及び第2照明21は、例えば、水面4の上方に配置される。第1照明20及び第2照明21は、発光面を培養槽10の底面11に向けて光を照射する。

[0018] 第1照明20は、培養槽10内の培養液3に対して黄色光を照射する。黄

色光とは、実質的に波長域が500nm以上620nm以下の光である。波長域とは、光のピーク波長が存在する波長の範囲である。黄色光の波長域の上限値は、600nmであってもよい。黄色光の波長域の下限値は、540nmであってもよい。黄色光の波長域の下限値は、550nmであってもよい。ここで、黄色光は、例えば、ピーク波長の半値幅が上記のいずれかの波長域内に入る光としてもよい。第1照明20は、例えば、基板上に固定された複数個の黄色のLED（発光ダイオード：Light Emitting Diode）で構成され、片面に発光面を有する面光源である。

[0019] 第2照明21は、培養槽10内の培養液3に対して黄色以外の可視光を照射する。黄色以外の可視光とは、実質的に波長域が500nm未満又は620nmより長い可視光である。黄色以外の可視光は、600nmより長い波長域の可視光であってもよい。黄色以外の可視光は、540nm未満の波長域の可視光であってもよい。黄色以外の可視光は、550nm未満の波長域の可視光であってもよい。ここで、黄色以外の可視光は、例えば、ピーク波長の半値幅が上記のいずれかの波長域内に入る光としてもよい。第2照明21は、例えば、基板上に固定された複数個のLEDで構成され、片面に発光面を有する面光源である。

[0020] 水中照明22は、培養槽10内に配置され、培養槽10内のハプト藻2及び培養液3に向けて光を照射する。水中照明22は、例えば、底面11から上方に延在した足場23の上端に配置される。水中照明22は、水面4及び底面11から離間して培養液3中に配置される。水中照明22は、底面11に平行な平面に沿って配置される。水中照明22は、両面の発光面を水面4及び底面11に向けて配置される。

[0021] 水中照明22は、黄色光又は黄色以外の可視光を照射する。水中照明22における黄色光の波長域は、第1照明20における黄色光の波長域と同一である。水中照明22における黄色以外の可視光の波長域は、第2照明21における黄色以外の可視光の波長域と同一である。水中照明22は、例えば、基板上に固定された複数個のLEDで構成された2つのLED板の基板同士

を貼り合わせて構成され、両面に発光面を有する面光源である。

[0022] 水中照明 22 は、例えば、透光性を有する樹脂部材によって被覆される。水中照明 22 は、培養液 3 内に配置されることから、防水処理が施される。第 1 照明 20、第 2 照明 21 又は水中照明 22 は内部に電源を有している。第 1 照明 20、第 2 照明 21 又は水中照明 22 の電力は、配線などによって外部電源から供給されてもよい。

[0023] 制御部 30 は、黄色光及び黄色以外の可視光が共に培養液 3 に照射されるように、第 1 照明 20、第 2 照明 21 及び水中照明 22 を制御する。制御部 30 は、例えば、CPU (Central Processing Unit) である。制御部 30 は、第 1 照明 20、第 2 照明 21 及び水中照明 22 と接続される。制御部 30 は、第 1 照明 20、第 2 照明 21 及び水中照明 22 がそれぞれ光を照射するタイミングを制御する。

[0024] 制御部 30 は、例えば、第 1 照明 20 (第 1 光源の一例) による黄色光と、第 2 照明 21 (第 2 光源の一例) による黄色以外の可視光とがそれぞれ同時に培養槽 10 内に照射されるよう制御する。制御部 30 は、水中照明 22 (第 1 光源の一例) による黄色光と、第 2 照明 21 (第 2 光源の一例) による黄色以外の可視光とがそれぞれ同時に培養槽 10 内に照射されるよう制御してもよい。制御部 30 は、第 1 照明 20 (第 1 光源の一例) による黄色光と、水中照明 22 (第 2 光源の一例) による黄色以外の可視光とがそれぞれ同時に培養槽 10 内に照射されるよう制御してもよい。

[0025] 制御部 30 は、第 1 照明 20 及び水中照明 22 の組み合わせ (第 1 光源の一例) による黄色光と、第 2 照明 21 (第 2 光源の一例) による黄色以外の可視光とがそれぞれ同時に培養槽 10 内に照射されるよう制御してもよい。制御部 30 は、第 1 照明 20 (第 1 光源の一例) による黄色光と、第 2 照明 21 及び水中照明 22 の組み合わせ (第 2 光源の一例) による黄色以外の可視光とがそれぞれ同時に培養槽 10 内に照射されるよう制御してもよい。

[0026] 制御部 30 は、第 1 照明 20、第 2 照明 21 又は水中照明 22 の波長及び強度を制御してもよい。制御部 30 において制御される波長及び強度は、培

養槽 10 内のハプト藻 2 の密度、増殖速度又は培養日数などに基づき設定される。制御部 30 は、設定された波長及び強度に基づき、第 1 照明 20、第 2 照明 21 又は水中照明 22 を制御する。

[0027] 通気部 40 は、二酸化炭素及び酸素を含む気体 41 を底面 11 から水面 4 に向かって通気させる。気体 41 は、二酸化炭素及び酸素を含む。ハプト藻 2 は、培養液 3 内を通気する二酸化炭素を用いて光合成を行い、酸素を用いて呼吸を行う。通気部 40 は、空気ポンプ 42、供給管 43、及び放出管 44 を有する。空気ポンプ 42 は、二酸化炭素及び酸素を含む気体 41 を格納する。空気ポンプ 42 は、空気ポンプであってもよい。供給管 43 は、一端を空気ポンプ 42 と接続し、他端を放出管 44 と接続する。供給管 43 は、例えばシリコンチューブからなる。供給管 43 は、空気ポンプ 42 から所定の量の気体 41 を取得する。供給管 43 は、取得した気体 41 を放出管 44 に供給する。

[0028] 放出管 44 は、底面 11 上に配置される。放出管 44 は、長尺状の管部材である。放出管 44 は、例えば、塩化ビニル管からなる。放出管 44 は、内部に管路 45 を画成し、上部に所定の間隔で複数の小穴 46 を有する。複数の小穴 46 は、培養槽 10 内と管路 45 とを連通する。放出管 44 において、供給管 43 から放出管 44 に供給された気体 41 は、管路 45 を通り、複数の小穴 46 から培養槽 10 内へと放出される。

[0029] 供給管 43 が空気ポンプ 42 から取得する気体 41 の量、放出管 44 の大きさ、管路 45 及び小穴 46 の断面の形状及び大きさ、並びに放出管 44 における小穴 46 の配置間隔は、ハプト藻 2 の密度、増殖速度又は培養日数などに応じて適宜設定される。制御部 30 は、通気部 40 を制御してもよい。制御部 30 は、例えば、培養液 3 内を通気する気体 41 の量及び供給速度を制御する。通気部 40 により培養液 3 内に気体 41 が通気されることで、培養槽 10 内を循環する水流が生起される。これにより、ハプト藻 2 が水流に沿って移動することで個体間の受光量の偏りが抑制される。

[0030] (ハプト藻の培養方法)

次に、ハプト藻 2 の培養方法について説明する。培養槽 10 内にハプト藻 2 と培養液 3 が貯留される。制御部 30 の制御に基づき、通気部 40 は、培養液 3 内に気体 41 を通気させる。通気部 40 により培養槽 10 内を循環する水流が生起され、ハプト藻 2 は水流に沿って培養槽 10 内を移動する。制御部 30 の制御に基づき、第 1 照明 20 又は水中照明 22 による黄色光と、第 2 照明 21 又は水中照明 22 による黄色以外の可視光とが、培養槽 10 に貯留された培養液 3 内のハプト藻 2 に共に照射される。これにより、ハプト藻 2 は、黄色光及び黄色以外の可視光を共に受光することで、光合成を行い増殖する。

[0031] (実施形態のまとめ)

黄色光のみをハプト藻 2 に照射して培養してもハプト藻 2 を増殖させることはできない。黄色以外の可視光をハプト藻 2 に照射することにより、ハプト藻 2 を増殖させることができるもののハプト藻 2 は短期間で減少してしまう。黄色以外の可視光とハプト藻 2 の増殖に寄与しない黄色光とを組み合わせることで培養することにより、ハプト藻 2 を増殖させることができ、ハプト藻 2 が短期間で減少する現象が改善される。本実施形態に係るハプト藻 2 の培養方法及び培養装置 1 によれば、黄色光と黄色以外の可視光とを共に照射することにより、ハプト藻 2 の長寿命化を図ることができる。

[0032] (変形例)

以上、種々の例示的实施形態について説明してきたが、上述した例示的实施形態に限定されることなく、様々な省略、置換、及び変更がなされてもよい。例えば、培養槽 10 の側面及び底面 11 は、例えば、第 1 照明 20、第 2 照明 21 又は水中照明 22 以外の光が培養液 3 に入射しないように、外部からの光を遮光する構造を有してもよい。

[0033] また、培養装置 1 は、第 1 照明 20 を備えなくてもよい。この場合、黄色光を照射する光源として、水中照明 22 を用いる。培養装置 1 は、第 2 照明 21 を備えなくてもよい。この場合、黄色以外の可視光を照射する光源として、水中照明 22 を用いる。培養装置 1 は、第 1 照明 20 及び第 2 照明 21

を備えなくてもよい。この場合、水中照明 22 は、黄色光及び黄色以外の可視光を共に照射する。培養装置 1 は、水中照明 22 を備えなくてもよい。この場合、黄色光を照射する光源として、第 1 照明 20 が用いられ、黄色以外の可視光を照射する光源として、第 2 照明 21 が用いられる。第 1 照明 20 又は第 2 照明 21 は、培養槽 10 の側面又は底面 11 の方から光を照射するように配置されてもよい。

[0034] 培養装置 1 は、制御部 30 を備えなくてもよい。この場合、第 1 照明 20、第 2 照明 21 若しくは水中照明 22 による光照射の制御、又は、通気部 40 における気体 41 の通気量若しくは供給速度の制御は、作業員により行われてもよい。本開示の培養方法は、ハプト藻 2 と類似する吸光度の特徴を有する他の植物プランクトンに適用してもよい。他の植物プランクトンは、例えば、黄色光の波長域において吸光度が低いプランクトンである。培養方法は、黄色以外の可視光の照射によりハプト藻が増殖した後において、黄色光を照射するようにしてもよい。

実施例

[0035] 以下、本開示に係る方法及び装置の効果を検証するために実施した種々の実験について説明する。なお、本開示は、以下の実験に限定されるものではない。以下の実験では、ハプト藻 2 の一例として *Pavlova lutheri* を用いた。

[0036] (*Pavlova lutheri* の吸収スペクトル)

Pavlova lutheri の吸収スペクトルを吸光光度分析によって測定した。光源、オパールグラス、試料セル、及び分光検出器を順に一直線に並べた装置を用いた。*Pavlova lutheri* と水とを試料セルに格納し、散乱光を試料セルに照射し、試料セルを透過した光を波長ごとに検出することで、*Pavlova lutheri* の吸収スペクトルを得た。測定条件は以下の通りである。

試料：*Pavlova lutheri* 及び水 1.500×10^4 Cells/ml

光源：タングステンランプ光源（波長域：350nm 以上 3000nm 以下（連続発光））

試料セルの光路長：1cm

分光検出器：浜松ホトニクス社製マルチチャネル分光測定器（PMA）、
リニアCCDアレイ方式

比較対象として水のみを試料セルに格納し、上記の測定条件にて水の吸収スペクトルを得た。結果を図2に示す。

[0037] 図2は、Pavlova lutheriの吸収スペクトルを示すグラフである。図2の横軸は波長（nm）、縦軸は吸光度である。図2は、後述の実施例で用いた光源から照射される赤色光、黄色光、緑色光、青色光、及び白色光のピーク波長の半値幅を示している。赤色光のピーク波長は655nmであり、半値幅は645nm以上670nm以下の範囲である。黄色光のピーク波長は568nmであり、半値幅は510nm以上620nm以下の範囲である。緑色光のピーク波長は530nmであり、半値幅は515nm以上545nm以下の範囲である。青色光のピーク波長は447.5nmであり、半値幅は440nm以上460nm以下の範囲である。白色光のピーク波長は440nm及び570nmであり、短波長側ピークの半値幅は430nm以上460nm以下の範囲であり、長波長側ピークの半値幅は520nm以上650nm以下の範囲である。

[0038] 図2に示すように、水の吸光度は、350nm以上800nm以下の波長の範囲において0付近で推移した。これにより、水が吸収スペクトルへ与える影響は小さいことが確認された。Pavlova lutheriの吸光度は、青色光又は赤色光の波長域周辺においてピークを有する結果となった。つまり、Pavlova lutheriは、青色光又は赤色光の波長域周辺の光を吸収しやすいことが確認された。この結果は、青色光又は赤色光の波長域周辺の光を用いた方が、黄色光又は緑色光を用いるよりもPavlova lutheriの光合成を効率良く行えることを示唆している。

[0039] （黄色光によるPavlova lutheriの増殖抑制効果の確認）

Pavlova lutheriの細胞密度の時間変化を照射光の色ごとに測定した。照射光は、赤色光、黄色光、緑色光及び青色光を用いた。赤色光、黄色光、緑色光及び青色光のピーク波長及び半値幅は、前述の通りである。照射光の色ご

とに培養装置 1 を用意した。第 1 照明 2 0 及び第 2 照明 2 1 を用いず、水中照明 2 2 のみを用いて光を照射した。培養条件は以下のとおりである。

培養槽 1 0 の大きさ（内寸）：幅 3 0 9 mm、奥行 4 3 9 mm、高さ 3 0 0 mm

培養液 3 の水深：1 8 0 mm

通気部 4 0 の気体 4 1 の通気量：毎分 8 L

照射光の強度：1 0 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ （培養日数 0～7 日）、3 3 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ （培養日数 8 日目以降）

[0040] 上記の培養条件で培養された *Pavlova lutheri* の細胞密度を培養日数ごとに測定した。*Pavlova lutheri* の細胞密度は、培養槽 1 0 内から 1 0 μL の培養液 3 を採取し、ワンセルカウンター（ディスポ形血球計算版）によって測定した。この測定を 4 回繰り返し、その平均を算出し、その日の培養液 3 中の *Pavlova lutheri* の細胞密度とした。結果を図 3 に示す。

[0041] 図 3 は、波長域の異なる光で培養したときの *Pavlova lutheri* の細胞密度の時間変化を示すグラフである。図 3 の横軸は培養日数（日）、縦軸は、*Pavlova lutheri* の細胞密度（ $\times 10^4 \text{ Cells/mL}$ ）である。培養を開始した日を 0 日目とした。図 3 に示す各グラフは、*Pavlova lutheri* が赤色光、黄色光、緑色光又は青色光のいずれか 1 つの光を受光して培養された場合において、光ごとの *Pavlova lutheri* の細胞密度をプロットし、各データ点間の推定の細胞密度を近似線で表したものである。

[0042] 図 3 に示すように、赤色光、黄色光、緑色光又は青色光のうち、*Pavlova lutheri* の個体数を最も増加させることができた光は、赤色光であることが確認された。図 2 に示したように、赤色光は *Pavlova lutheri* が吸収しやすい光である。つまり、赤色光を用いることで、*Pavlova lutheri* は、多くの光を吸収して活発に光合成した結果、個体数が増加したと予想される。

[0043] しかしながら、*Pavlova lutheri* が吸収しやすい光である青色光で培養した場合には、個体数は、赤色光ほど増殖せず、むしろ、吸光度がより低い緑色光よりも増殖しなかった。この結果は、吸光度以外にも *Pavlova lutheri* の増

殖の要因が存在することを示唆している。考えられる1つの要因は、光透過率である。Pavlova lutheriが存在する培養槽10の光透過率は、黄色光、赤色光、緑色光、青色光の順に高い。青色光は、他の色の光と比べて透過率が極端に小さい。つまり、青色光は、Pavlova lutheriが吸収しやすい光であるものの、本実験環境のように大規模な培養槽においてはPavlova lutheriに届きにくい光であるため、緑色光よりも個体数の増殖に寄与しなかったと推測される。

[0044] そして、図3に示すように、黄色光は、照射したにもかかわらず殆どPavlova lutheriの増殖に寄与しないことが確認された。上述の通り、黄色光は、Pavlova lutheriが吸収しやすい光ではないものの、最も透過率が高い光である。このため、黄色光は、Pavlova lutheriに届いていないためにPavlova lutheriの増殖に寄与しなかったとは考えにくい。顕微鏡で確認したところ、Pavlova lutheriは、活発に活動しており、光合成をしていることが示唆された。そうすると、Pavlova lutheriは光合成を行いつつ増殖していない状況であると言える。つまり、黄色光は、Pavlova lutheriの活動に必要なエネルギーを与えつつ増殖には寄与しない（増殖を抑えている）という、他の光には無い異質な効果を奏することが確認された。

[0045] 黄色光のみに増殖抑制効果があることから、Pavlova lutheriを増殖させるためには、黄色以外の可視光（例えば、赤色光、緑色光、青色光又は白色光など）を照射する必要があると言える。ただし、赤色光、緑色光又は青色光によって増殖したPavlova lutheriは、いずれも培養日数の経過とともに減少することが確認された。Pavlova lutheriの個体数は、青色光で増殖させた場合には17日目に0となり、緑色光で増殖させた場合には20日目に0となった。Pavlova lutheriの個体数は、赤色光で増殖させた場合にも23日目に大きく個体数が減少しており、数日以内に0となることが予想された。このように、赤色光、緑色光及び青色光は、Pavlova lutheriを増殖させることができるものの、増殖したPavlova lutheriの個体数を一週間程度しか維持させることができず、その後、個体数は急激に減少することが確認された。

[0046] (黄色光及び黄色以外の可視光によるPavlova lutheriの長寿命化効果の確認)

実施例として、培養装置 1 を用いて黄色光及び黄色以外の可視光でPavlova lutheriを培養し、細胞密度の時間変化を測定した。黄色以外の可視光の一例として白色光を用いた。黄色光及び白色光のピーク波長及び半値幅は、前述の通りである。水中照明 2 2 を用いて黄色光を照射し、第 2 照明 2 1 を用いて白色光を照射した。培養条件は以下のとおりである。

培養槽 1 0 の大きさ：幅 3 0 9 mm、奥行 4 3 9 mm、高さ 3 0 0 mm

培養液 3 の水深：1 8 0 mm

通気部 4 0 の気体 4 1 の通気量：毎分 8 L

黄色光の強度： $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (水中照明 2 2 からの黄色光を水中照明 2 2 の上方 6 0 mm において測定)

白色光の強度： $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (第 2 照明 2 1 からの白色光を水面上で測定)

上記の培養条件で培養されたPavlova lutheriの細胞密度を培養日数ごとに前述の方法で測定した。

[0047] 比較例として、別の培養装置 1 を用いて白色光のみでPavlova lutheriを培養し、細胞密度の時間変化を測定した。第 2 照明 2 1 を用いて白色光を照射した。比較例において照射しない黄色光を除く培養条件及び細胞密度の測定方法は、実施例と同一とした。結果を図 4 に示す。

[0048] 図 4 は、実施例及び比較例に係るPavlova lutheriの細胞密度の時間変化を示すグラフである。図 3 の横軸は培養日数 (日)、縦軸は、Pavlova lutheri の細胞密度 ($\times 10^4 \text{ Cells/ml}$) である。培養を開始した日を 0 日目とした。図 4 に示す各グラフは、実施例及び比較例に係るPavlova lutheri の細胞密度をプロットし、各データ点間の推定の細胞密度を近似線で表したものである。

[0049] 図 4 に示すように、比較例に係るPavlova lutheriの細胞密度は、図 3 に示される黄色以外の他の可視光と同様に、培養開始から短期間で増加するが、

7日目から培養日数の経過とともに減少した。具体的には、7日目から細胞密度の増加が鈍化し、細胞密度は7日目から19日目まで800~1000 ($\times 10^4$ Cells/ml) を維持した。19日目を経過すると、細胞密度は減少した。Pavlova lutheriの個体数が800 ($\times 10^4$ Cells/ml) 以上となった期間は、12日間であった。

[0050] これに対して、実施例に係るPavlova lutheriは、比較例と比較して培養開始からの増殖速度はやや小さいが、安定して増殖することが確認された。具体的には、細胞密度は22日目まで増加した。22日目から細胞密度の増加が鈍化し、細胞密度は22日目から39日目まで1100~1500 ($\times 10^4$ Cells/ml) を維持した。39日目を経過すると、細胞密度は減少した。Pavlova lutheriの個体数が800 ($\times 10^4$ Cells/ml) 以上となった期間は、28日間であった。

[0051] このように、実施例では、光照射による培養開始から個体数が急激に減少するまでの期間が39日間であり、比較例の19日間と比較して長くなることが確認された。実施例では、細胞密度の最大値を維持した期間が17日間であり、比較例の12日間と比較して長くなることが確認された。実施例では、800 ($\times 10^4$ Cells/ml) 以上となった期間が28日間であり、比較例の12日間と比較して長くなることが確認された。このように、実施例に係る培養方法によれば、比較例に係る方法と比較して、評価したすべての期間が長くなることが確認された。よって、実施例に係る培養方法によれば、比較例に係る方法と比較して、Pavlova lutheriなどのハプト藻の長寿命化を図ることができることが確認された。

[0052] さらに実施例では、細胞密度の最大値が1100~1500 ($\times 10^4$ Cells/ml) であり、比較例の800~1000 ($\times 10^4$ Cells/ml) と比較して増加した。このように、実施例に係る培養方法によれば、比較例に係る方法と比較して、Pavlova lutheriの細胞密度の最大値を増加させることができることが確認された。

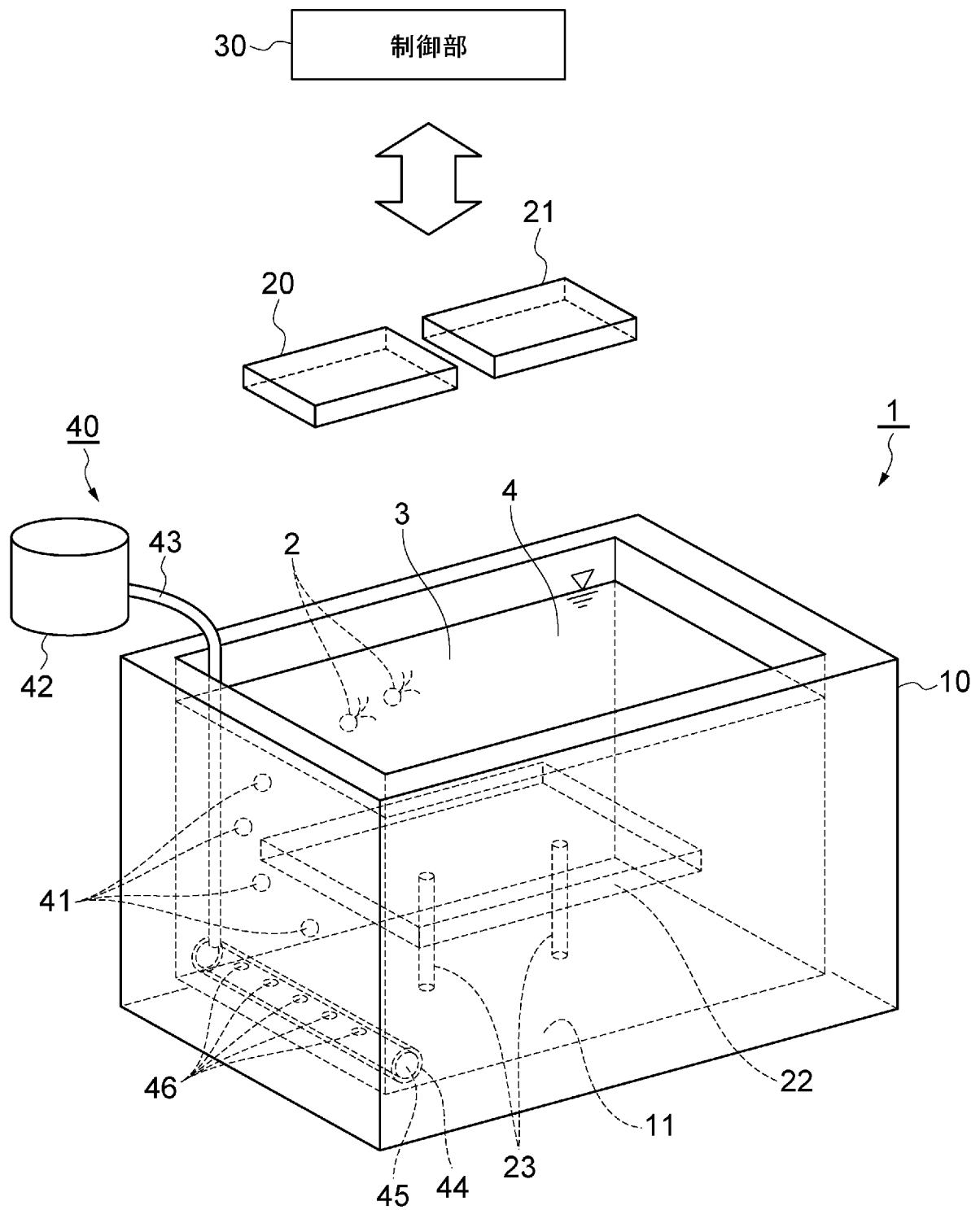
符号の説明

[0053] 1…培養装置、2…ハプト藻、3…培養液、4…水面、10…培養槽、11…底面、20…第1照明、21…第2照明、22…水中照明、23…足場、30…制御部、40…通気部、41…気体、42…空気ポンプ、43…供給管、44…放出管、45…管路、46…小穴。

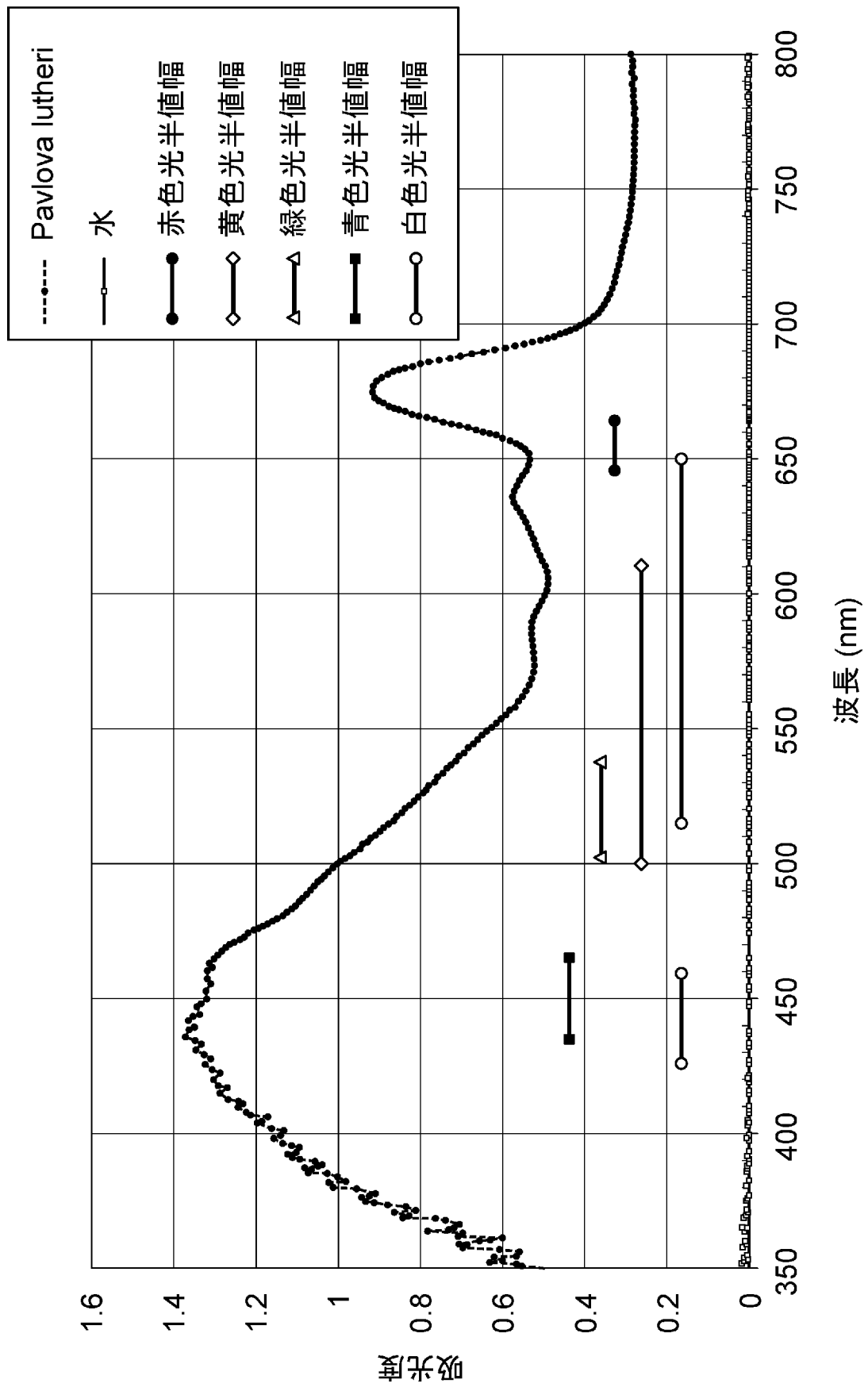
請求の範囲

- [請求項1] ハプト藻を含む培養液に対し、黄色光と黄色以外の可視光とを共に照射するステップを有する、ハプト藻の培養方法。
- [請求項2] 前記ハプト藻は*Pavlova lutheri*である、請求項1に記載のハプト藻の培養方法。
- [請求項3] ハプト藻を含む培養液を貯留する培養槽と、
 前記培養槽内の前記培養液に対して黄色光を照射する第1光源と、
 前記培養槽内の前記培養液に対して黄色以外の可視光を照射する第2光源と、
 を備える、ハプト藻の培養装置。
- [請求項4] 前記黄色光及び前記可視光が共に前記培養液に照射されるように前記第1光源及び前記第2光源を制御する制御部をさらに備える、請求項3に記載のハプト藻の培養装置。
- [請求項5] 前記ハプト藻は*Pavlova lutheri*である、請求項3又は4に記載のハプト藻の培養装置。

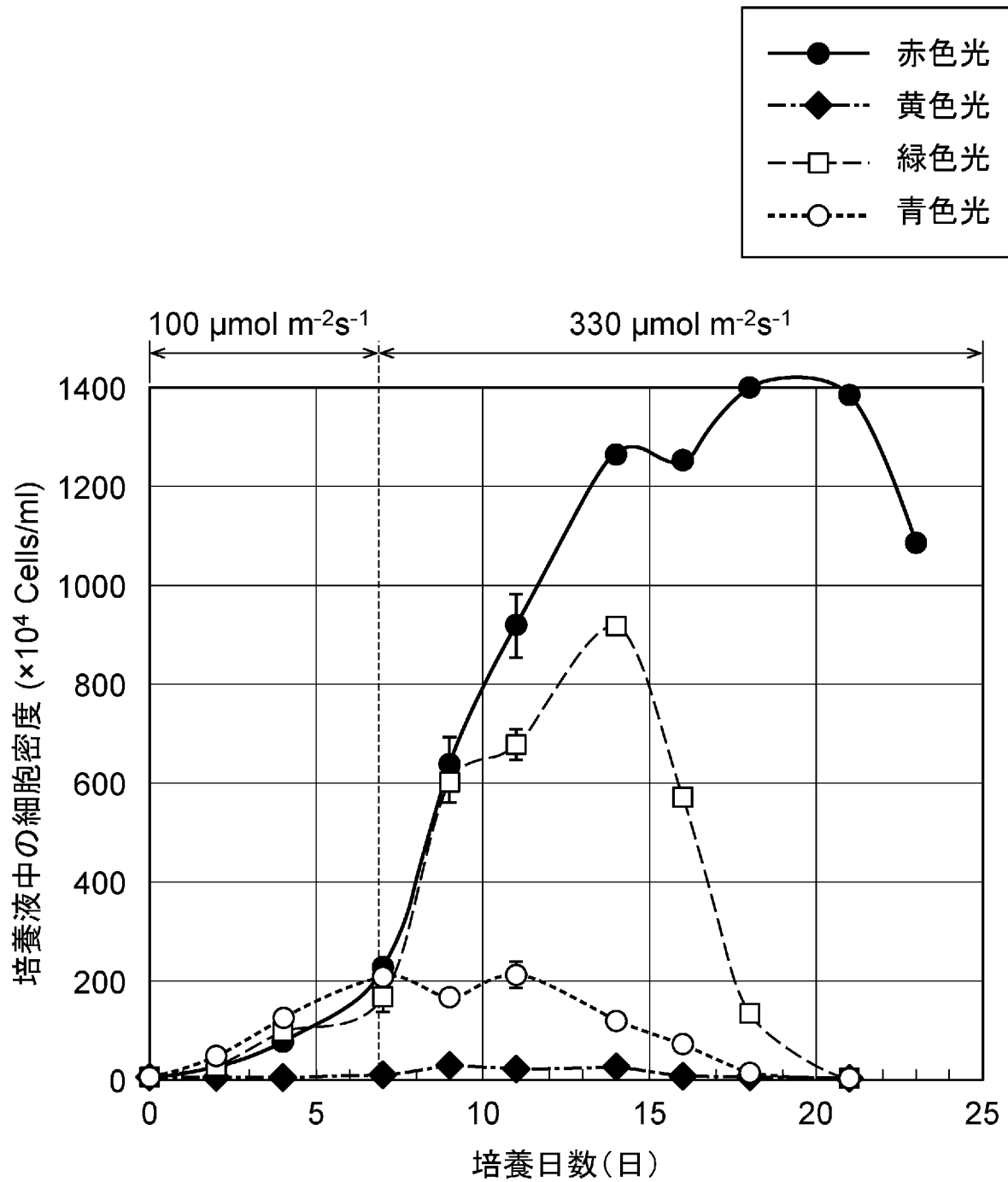
[図1]



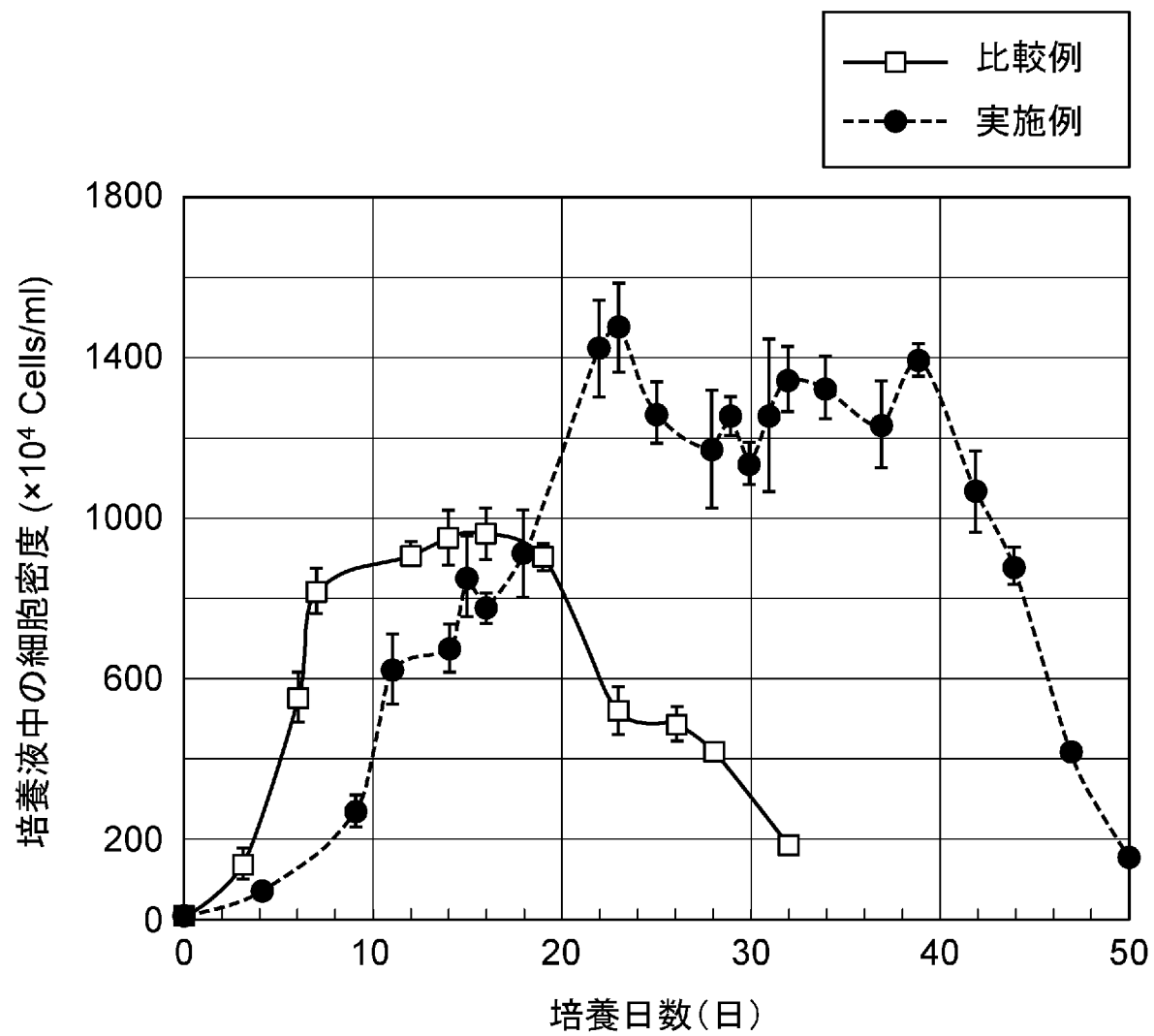
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/003963

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/12 (2006.01) i; C12M 1/00 (2006.01) i
 FI: C12N1/12 A; C12M1/00 E

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; C12M1/00

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/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	石川 卓 他, 白色発光ダイオード(LED)を用いた餌料用微細藻類の培養, Journal of Fisheries Technology, 2012, vol. 4, no. 2, pp. 51-55, summary, section "materials and methods", fig. 2	1-5
Y	summary, section "materials and methods", fig. 2, (ISHIKAWA, Takashi et al., "Cultivation of Microalgae for Live Food under White Light-emitting Diodes (LEDs))	1-5



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

"I" 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

20 April 2020 (20.04.2020)

Date of mailing of the international search report

28 April 2020 (28.04.2020)

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/JP2020/003963

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	矢後 貴英 他, 断続照射光の波長の違いがハプト藻 <i>Isochrysis galbana</i> の増殖と脂肪酸組成へ与える効果, 日仏海洋学会学術研究発表会講演要旨集, 2008, vol. 2008, p. 4, entire text	1, 3, 4
Y	entire text, non-official translation (YAGO, Takahide et al., "Effects of difference in wavelength of intermittent irradiation light on growth and fatty acid composition of the haptophyte <i>Isochrysis galbana</i> ", Lecture abstracts of Academic Research Conference of Japanese-French Oceanographic Society)	1-5
Y	JP 2002-315569 A (TOKAI SANGYO CO., LTD.) 29.10.2002 (2002-10-29) claims 1, 2, 4, paragraph [0022], examples, etc.	1-5
Y	JP 2015-510768 A (FORELIGHT, LLC) 13.04.2015 (2015-04-13) paragraphs [0051], [0118]	1-5
A	WO 2005/102031 A1 (TECHNICAL OFFICE LTD.) 03.11.2005 (2005-11-03) claims 1, 2, 11, paragraph [0015], etc.	1-5
A	RA, C. H. et al., "Effects of light-emitting diode (LED) with a mixture of wavelengths on the growth and lipid content of microalgae", Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, vol. 41, pp. 457-465 Abstract, etc.	1-5
	JP 2011-030463 A (TOYOTA GOSEI CO., LTD.) 17.02.2011 (2011-02-17) claim 5, paragraph [0026]	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/003963

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2002-315569 A	29 Oct. 2002	(Family: none)	
JP 2015-510768 A	13 Apr. 2015	US 2014/0011245 A1	
		WO 2013/138690 A1	
		paragraphs [0051],	
		[0118]	
		EP 2825627 A1	
		KR 10-2015-0035503 A	
WO 2005/102031 A1	03 Nov. 2005	US 2009/0151240 A1	
		claims 1, 2, 11,	
		paragraph [0018]	
		KR 10-2007-0009690 A	
		CN 101018480 A	
JP 2011-030463 A	17 Feb. 2011	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 1/12(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i FI: C12N1/12 A; C12M1/00 E		
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）） C12N1/12; C12M1/00		
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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020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); Cplus/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	石川 卓 他, 白色発光ダイオード (LED) を用いた餌料用微細藻類の培養, Journal of Fisheries Technology, 2012, Vol.4, No.2, p.51-55	1-5
Y	要旨, “材料と方法” の項、図2	1-5
X	矢後 貴英 他, 断続照射光の波長の違いがハプト藻 Isochrysis galbana の増殖と脂 肪酸組成へ与える効果, 日仏海洋学会学術研究発表会講演要旨集, 2008, Vol.2008, p.4	1, 3, 4
Y	全文	1-5
Y	全文	1-5
Y	JP 2002-315569 A (東海産業株式会社) 29.10.2002 (2002 - 10 - 29) 請求項 1、2、4、段落0022, 実施例等	1-5
Y	JP 2015-510768 A (フォアライト, エルエルシー) 13.04.2015 (2015 - 04 - 13) 段落0051, 0118	1-5
Y	WO 2005/102031 A1 (有限会社テクニカルオフィス) 03.11.2005 (2005 - 11 - 03) 請求項 1、2、11、段落0015等	1-5
☒ 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抵 触するものではなく、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 20.04.2020		国際調査報告の発送日 28.04.2020
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 北村 悠美子 4B 4501 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
A	RA C. H. et al., Effects of light-emitting diode (LED) with a mixture of wavelengths on the growth and lipid content of microalgae, Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, Vol. 41, p.457-465 Abstract等	1-5
A	JP 2011-030463 A (豊田合成株式会社) 17.02.2011 (2011 - 02 - 17) 請求項 5、段落0026	1-5

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/003963

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2002-315569	A	29.10.2002	(ファミリーなし)	
JP	2015-510768	A	13.04.2015	US 2014/0011245	A1
				WO 2013/138690	A1
				[0051], [0118]	
				EP 2825627	A1
				KR 10-2015-0035503	A
WO	2005/102031	A1	03.11.2005	US 2009/0151240	A1
				claim 1, 2, 11, [0018]	
				KR 10-2007-0009690	A
				CN 101018480	A
JP	2011-030463	A	17.02.2011	(ファミリーなし)	