

(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  
2015 年 12 月 17 日(17.12.2015)



(10) 国際公開番号  
**WO 2015/190116 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 1/12* (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/002951
- (22) 国際出願日: 2015 年 6 月 12 日(12.06.2015)
- (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 2014-122438 2014 年 6 月 13 日(13.06.2014) JP
- (71) 出願人: 株式会社デンソー(DENSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 倉田 稔(KURATA, Minoru); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地株式会社デンソー内 Aichi (JP). 福田 裕章(FUKUDA, Hiroaki); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地株式会社デンソー内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 金 順姫(KIN, Junhi); 〒4600003 愛知県名古屋市中区錦 2 丁目 1 3 番 1 9 号 瀧定ビル 6 階 Aichi (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, KE, KG, KN, KP, KR, 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).

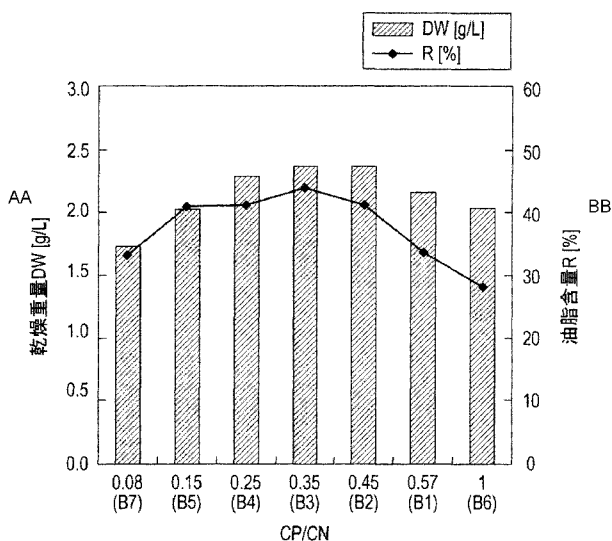
添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))

(54) Title: MICROALGAE CULTURE METHOD, MICROALGAE, AND FAT/OIL PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: 微細藻類の培養方法、微細藻類、及び油脂の製造方法

【図1】



AA Dry weight (DW[g/L])  
BB Oil/fat content (R[%])

(57) Abstract: In this microalgae culture method for culturing microalgae using a culture medium, the ratio of the molar concentration of phosphorus to the molar concentration of nitrogen in the culture medium when culturing starts is within the range of 0.1-0.6. Furthermore, according to the present invention, provided are microalgae cultured using the microalgae culture method. Moreover, according to the present invention, provided is a fat/oil production method in which fat/oil is extracted from the microalgae cultured using the microalgae culture method. According to the microalgae culture method, the microalgae, and the oil/fat production method, productivity in relation to the fat/oil can be improved.

(57) 要約: 培地を用いて微細藻類を培養する微細藻類の培養方法は、培養開始時において、前記培地における窒素のモル濃度に対するリンのモル濃度の比率が、0.1~0.6の範囲内である。さらに本開示によれば、微細藻類の培養用方法により培養された微細藻類が提供される。さらに本開示によれば、微細藻類の培養用方法により培養された微細藻類から、油脂を取り出す油脂の製造方法が提供される。微細藻類の培養方法、微細藻類、油脂の製造方法によれば、油脂の生産性を向上させることができる。

## 明 細 書

発明の名称：

微細藻類の培養方法、微細藻類、及び油脂の製造方法

### 関連出願の相互参照

[0001] 本出願は、2014年6月13日に出願された日本国特許出願2014-122438号、に基づくものであり、ここにその記載内容を参照により援用する。

### 技術分野

[0002] 本開示は、微細藻類の培養方法、微細藻類、及び油脂の製造方法に関する。

### 背景技術

[0003] 近年、微細藻類が生産する油脂を燃料等へ利活用することが注目されている。非特許文献1には、成長や増殖を阻害するようなストレスを与えると、クラミドモナスがトリアシルグリセロールを蓄積することが開示されている。

[0004] 本願発明者らは、下記を見出した。微細藻類を用いて油脂を生産するときの生産性をさらに向上させることが求められている。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0005] 非特許文献1：「緑藻クラミドモナスにおける無機炭素濃縮機構と脂質代謝」  
福澤 秀哉、山野 隆志、梶川 昌孝、光合成研究 174-184、22(3) 2012

### 発明の概要

[0006] 本開示は、油脂の生産性を向上させることができる微細藻類の培養方法、微細藻類、及び油脂の製造方法を提供することを目的とする。

[0007] 本開示の一態様によれば、微細藻類の培養方法は、培地を用いて微細藻類を培養する微細藻類の培養方法であって、培養開始時において、培地における窒素のモル濃度に対するリンのモル濃度の比率が、0.1～0.6の範囲

内である。

[0008] 本開示の別の一態様によれば、微細藻類の培養方法により培養された微細藻類が提供される。

[0009] 本開示の別の一態様によれば、微細藻類の培養方法により培養された微細藻類から、油脂を取り出す油脂の製造方法が提供される。

[0010] 本開示の微細藻類の培養方法、微細藻類、及び油脂の製造方法によれば、油脂の生産性を向上させることができる。

### 図面の簡単な説明

[0011] 本開示についての上記および他の目的、特徴や利点は、添付の図面を参照した下記の詳細な説明から、より明確になる。添付図面において

[図1]図1は、培地ごとに、乾燥重量DW、及び油脂含量Rを示した図であり、

[図2]図2は、培地ごとに、油脂量Tを示した図であり、

[図3]図3は、培養時間と、比率Xとの関係を示した図であり、

[図4]図4は、7種類の培地の組成を示した図であり、

[図5]図5は、培地B4、B5、B6における藻体の長径、短径、体積を示した図である。

### 発明を実施するための形態

[0012] 以下、実施形態について説明する。本実施形態で使用する培地は特に限定されず、適宜選択できる。培地としては、例えば、AF6培地等が挙げられる。培地には、リン源（リンの供給源）、窒素源（窒素の供給源）等を添加することができる。リン源としては、例えば、リン酸一アンモニウム、リン酸二アンモニウム、リン酸一カルシウム、リン酸二カルシウム、リン酸三カルシウム、リン酸マグネシウム等が挙げられる。窒素源としては、例えば、尿素、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸カルシウム、硝酸カリウム等が挙げられる。

[0013] 培養開始時とは、例えば、以下の時点が該当する。培養開始時とは、培養容器内の培地を全て新規なものとし、新規な培地で培養を開始する時点であ

る。培養開始時とは、培養容器内の培地における一部を新規な培地に置換し、置換後の培地で培養を開始する時点である。培養開始時とは、培養容器内の培地にさらに培地を追加し、追加後の培地で培養を開始する時点である。培養開始時とは、培養容器内の培地に一部の成分を追加し、追加後の培地で培養を開始する時点である。

[0014] 培養開始時以降、微細藻類を回収するまで、例えば、窒素源、リン源、それらを含む培地の追加を行わないようにすることができる。この場合、微細藻類から得られる油脂の量を一層多くすることができる。

[0015] 培養する微細藻類は特に限定されず、油脂等を生産するものから、適宜選択できる。微細藻類としては、例えば、クロレラ目、トレボウキシア目等を含むトレボウキシア藻綱の緑藻植物等が挙げられる。

[0016] 培地における窒素のモル濃度とは、培地（微細藻類は除く）における窒素原子のモル濃度を意味する。また、培地におけるリンのモル濃度とは、培地（微細藻類は除く）におけるリン原子のモル濃度を意味する。

[0017] 窒素のモル濃度に対するリンのモル濃度の比率とは、以下のように定義できる。培地における窒素のモル濃度を  $C_N$  とする。培地におけるリンのモル濃度を  $C_P$  とする。窒素のモル濃度に対するリンのモル濃度の比率は、 $C_P / C_N$  で表される。

[0018] 窒素のモル濃度に対するリンのモル濃度の比率は、 $0.1 \sim 0.6$  の範囲内であり、 $0.2 \sim 0.5$  の範囲内であることが好ましく、 $0.3 \sim 0.4$  の範囲内であることが一層好ましい。これらの範囲内であることにより、微細藻類から得られる油脂の量を多くすることができる。

[0019] 微細藻類から、油脂を取り出す方法としては、公知の方法を適宜用いることができる。

(実施例)

(培養方法)

500 ml 扁平フラスコに培地を導入した。その培地に、微細藻類の一例であるシュードココミクサ (*Pseudococcomyxa*) KJ 株を、 $0.02 \text{ g/l}$  と

なるように植株した。シュードココミクサK J株は、2013年6月4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（NITE-IPOD）（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室）に受託番号FERM P-22254として寄託され、その後、ブダペスト条約の規定下で、受託番号FERM ABP-22254として国際寄託に移管されている。

[0020] 直管型LEDを用いて培地に光（光強度： $300\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）を照射し、温度を $25^{\circ}\text{C}$ とし、二酸化炭素濃度1%のガスを通気するという条件で培養を行った。培地のpHは、微細藻類の植株前に硫酸を用いて3.5に調整し、その後は調整しなかった。培養は、培養開始から240時間が経過するまで行った。培養終了後、培地からシュードココミクサK J株の藻体（以下、単に藻体とする）を回収した。さらに、回収した藻体から、周知の方法で油脂を取り出した。よって、以上の工程により、油脂を製造することができた。

[0021] 培地としては、図4に示す組成を有するB1～B7の7種類を用意し、それぞれにおいて、上記の方法で培養を行った。図4に示す培地の組成は、培養開始時における組成である。

[0022] 培地B1～B7は共通して、以下の成分を含む。

[0023] 尿素（窒素源）

リン酸一アンモニウム（リン源）

また、培地B1～B7は、それぞれ、カリウム源、カルシウム源、マグネシウム源、ナトリウム源、及びキレート金属塩を含む。

[0024] 図4において「N」は、窒素源のうち、窒素原子の分の重量を意味する。

「P」は、リン源のうち、リン原子の分の重量を意味する。「K」は、カリウム源のうち、カリウム原子の重量を意味する。「Ca」は、カルシウム源のうち、カルシウム原子の重量を意味する。「Mg」は、マグネシウム源のうち、マグネシウム原子の重量を意味する。「Na」は、ナトリウム源のうち、ナトリウム原子の重量を意味する。

[0025] また、図4において、「CP/CN」は、培養開始時における、培地中で

の窒素のモル濃度に対するリンのモル濃度の比率を意味する。

(評価)

(1) 単位体積の培地から回収した藻体の乾燥重量  $DW$  ( $g/L$ ) を算出した。また、乾燥した状態にある藻体の全重量に対し油脂が占める比率(以下、油脂含量  $R$  (重量%) とする) を算出した。また、乾燥重量  $DW$  と油脂含量  $R$  とを乗算することで、単位体積の培地から得られる油脂量  $T$  を算出した。これらの乾燥重量  $DW$ 、油脂含量  $R$ 、及び油脂量  $T$  は、培地  $B1 \sim B7$  のそれぞれについて算出した。乾燥重量  $DW$ 、及び油脂含量  $R$  の算出結果を図1に示す。また、油脂量  $T$  の算出結果を図2に示す。

[0026] 図1、図2に示されているように、培地  $B1 \sim B5$  を用いた場合、培地  $B6$ 、 $B7$  を用いた場合よりも、乾燥重量  $DW$ 、油脂含量  $R$ 、及び油脂量  $T$  が大きかった。また、培地  $B2 \sim B4$  を用いた場合は、乾燥重量  $DW$ 、油脂含量  $R$ 、及び油脂量  $T$  が一層大きかった。また、培地  $B3$  を用いた場合は、乾燥重量  $DW$ 、油脂含量  $R$ 、及び油脂量  $T$  が特に大きかった。

[0027] 培地  $B1 \sim B5$  を用いた場合に、油脂含量  $R$ 、及び油脂量  $T$  が大きくなる理由は以下のように推測できる。培地  $B1 \sim B5$  では、 $CP/CN$  が小さいので、これらの培地を用いると、微細藻類においてリンが欠乏し、細胞分裂が抑制される。そのことは、後述する(3)で示すように、 $CP/CN$  が小さい培地を用いると細胞1個当りの大きさが大きくなることにより裏付けられる。細胞分裂が抑制されることにより、細胞分裂に要していたエネルギーを光合成による  $CO_2$  固定に利用でき、結果として、油脂含量  $R$ 、及び油脂量  $T$  が大きくなる。

[0028] (2) 培養終了後、回収した藻体の写真を撮影した。藻体は楕円形形状を有していた。撮影した写真において、藻体の長径及び短径を計測し、それらに基づき藻体の細胞1個当りの体積を算出した。その結果を図5に示す。

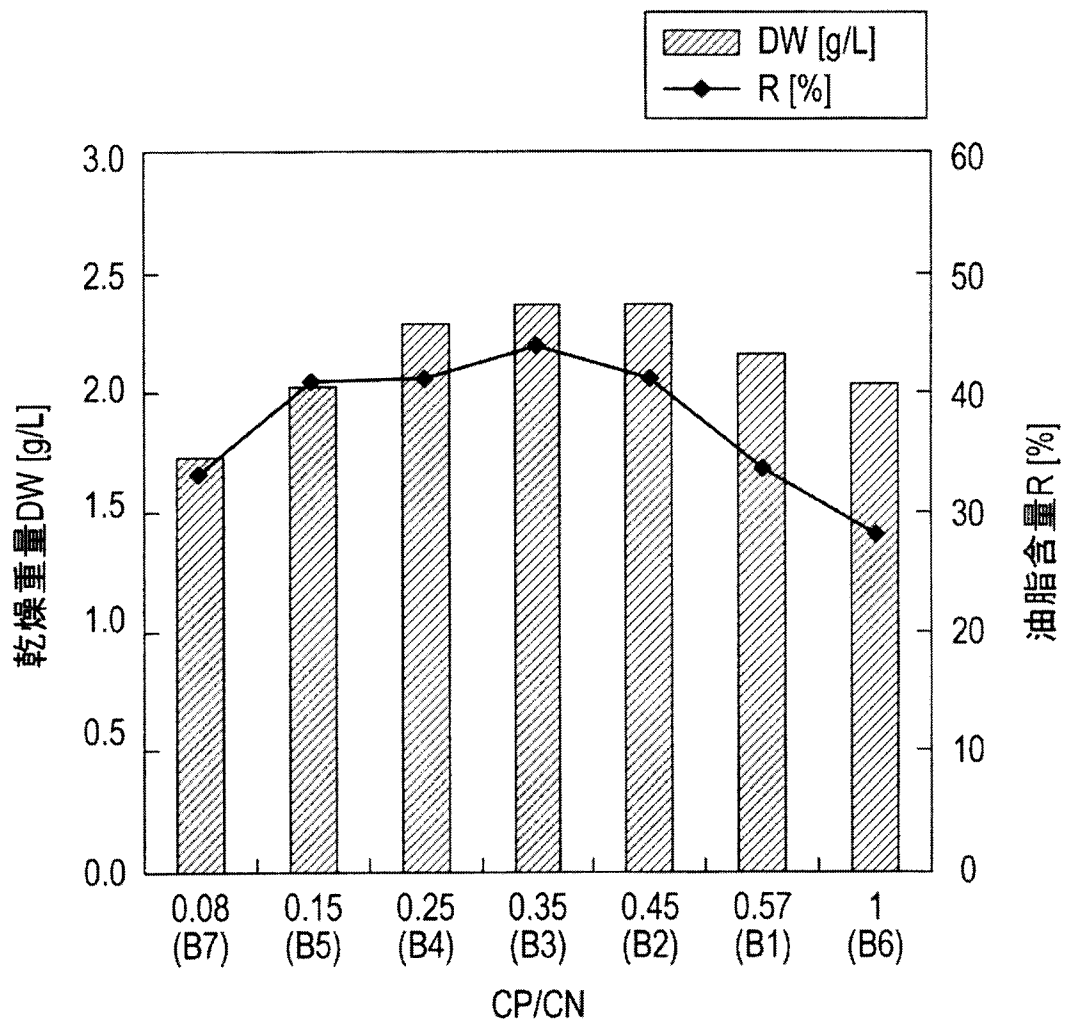
[0029] 図5に示されているように、培地  $B4$ 、 $B5$  を用いた場合は、培地  $B6$  を用いた場合よりも、長径及び短径が長く、細胞1個当りの体積が大きかった。

- [0030] (3) 培養中、培地の一部を定期的に取り出し、藻体の全乾燥重量に対する、藻体に含まれるリンの重量の比率 $X$ を算出した。その結果を図3に示す。図3に示されているように、培地B1～B5、B7を用いた場合、培地B6を用いた場合よりも、同じ培養時間で比べて、比率 $X$ の値が低かった。また、培地B1～B5、B7を用いた場合、培地B6を用いた場合よりも、比率 $X$ が一定の値に達するまでの培養時間が短かった。
- [0031] 以上、実施形態について説明したが、本開示は上記実施形態に限定されることなく、種々の形態を採り得る。
- [0032] 培養する微細藻類はシュードココミクサKJ株以外のものであってもよく、油脂を生産するものの中から、適宜選択できる。
- [0033] 培養に用いる培地の組成は、CP/CNの比率が所定の範囲内である条件下において、適宜設定できる。
- [0034] 培養方法は、培地を全て新規なものとしてから培養を開始する方法であってもよいし、前回の培養の終了後、培地の一部の置換、培地の追加、培地の成分の追加等をしてから、次の培養を開始する方法であってもよい。
- [0035] 以上、微細藻類の培養方法、微細藻類、及び油脂の製造方法の実施形態、構成、態様を例示したが、微細藻類の培養方法、微細藻類、及び油脂の製造方法に係わる実施形態、構成、態様は、上述した各実施形態、各構成、各態様に限定されるものではない。例えば、異なる実施形態、構成、態様にそれぞれ開示された技術的部を適宜組み合わせ得られる実施形態、構成、態様についても微細藻類の培養方法、微細藻類、及び油脂の製造方法に係わる実施形態、構成、態様の範囲に含まれる。

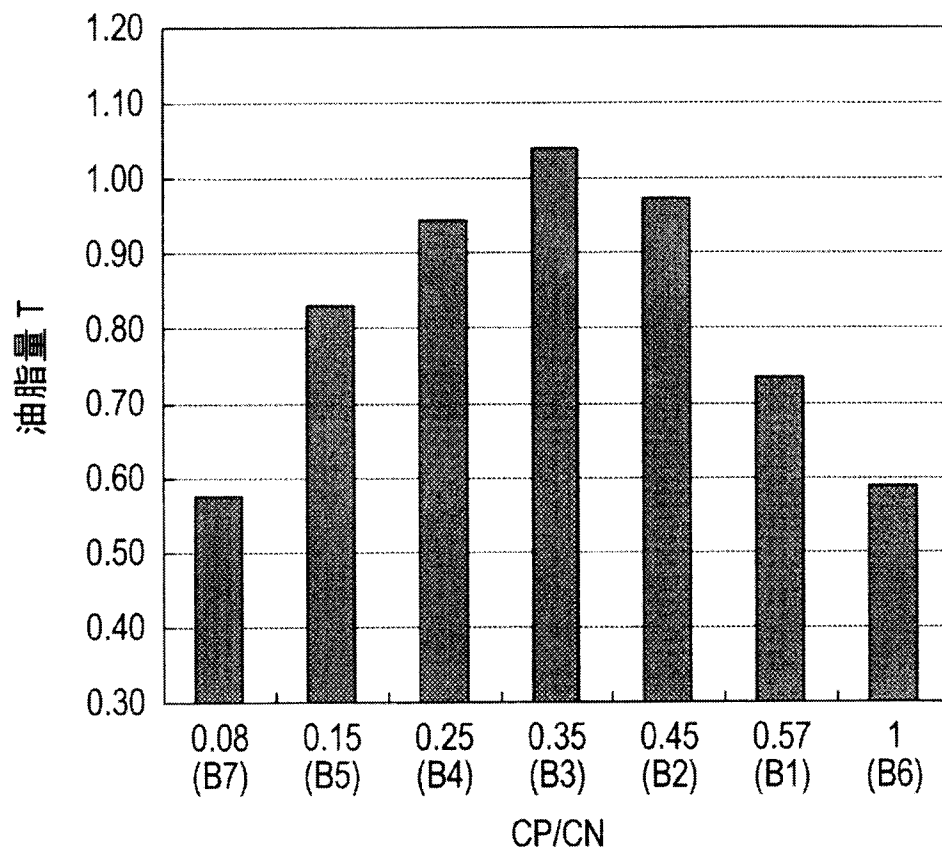
## 請求の範囲

- [請求項1] 培地を用いて微細藻類を培養する微細藻類の培養方法であって、  
培養開始時において、前記培地における窒素のモル濃度に対するリンのモル濃度の比率が、0.1～0.6の範囲内である微細藻類の培養方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の微細藻類の培養方法であって、  
培養開始時において、前記比率が0.2～0.5の範囲内である微細藻類の培養方法。
- [請求項3] 請求項1に記載の微細藻類の培養方法であって、  
培養開始時において、前記比率が0.3～0.4の範囲内である微細藻類の培養方法。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載の微細藻類の培養用方法により培養された微細藻類。
- [請求項5] 請求項1～3のいずれか1項に記載の微細藻類の培養用方法により培養された微細藻類から、油脂を取り出す油脂の製造方法。
- [請求項6] 請求項1に記載の微細藻類の培養方法であって、  
培養開始時において、前記培地における窒素のモル濃度に対するリンのモル濃度の比率が、0.15～0.57の範囲内である微細藻類の培養方法。
- [請求項7] 請求項6に記載の微細藻類の培養方法であって、  
培養開始時において、前記培地における窒素のモル濃度に対するリンのモル濃度の比率が、0.15、0.25、0.35、0.45、0.57のいずれかである微細藻類の培養方法。

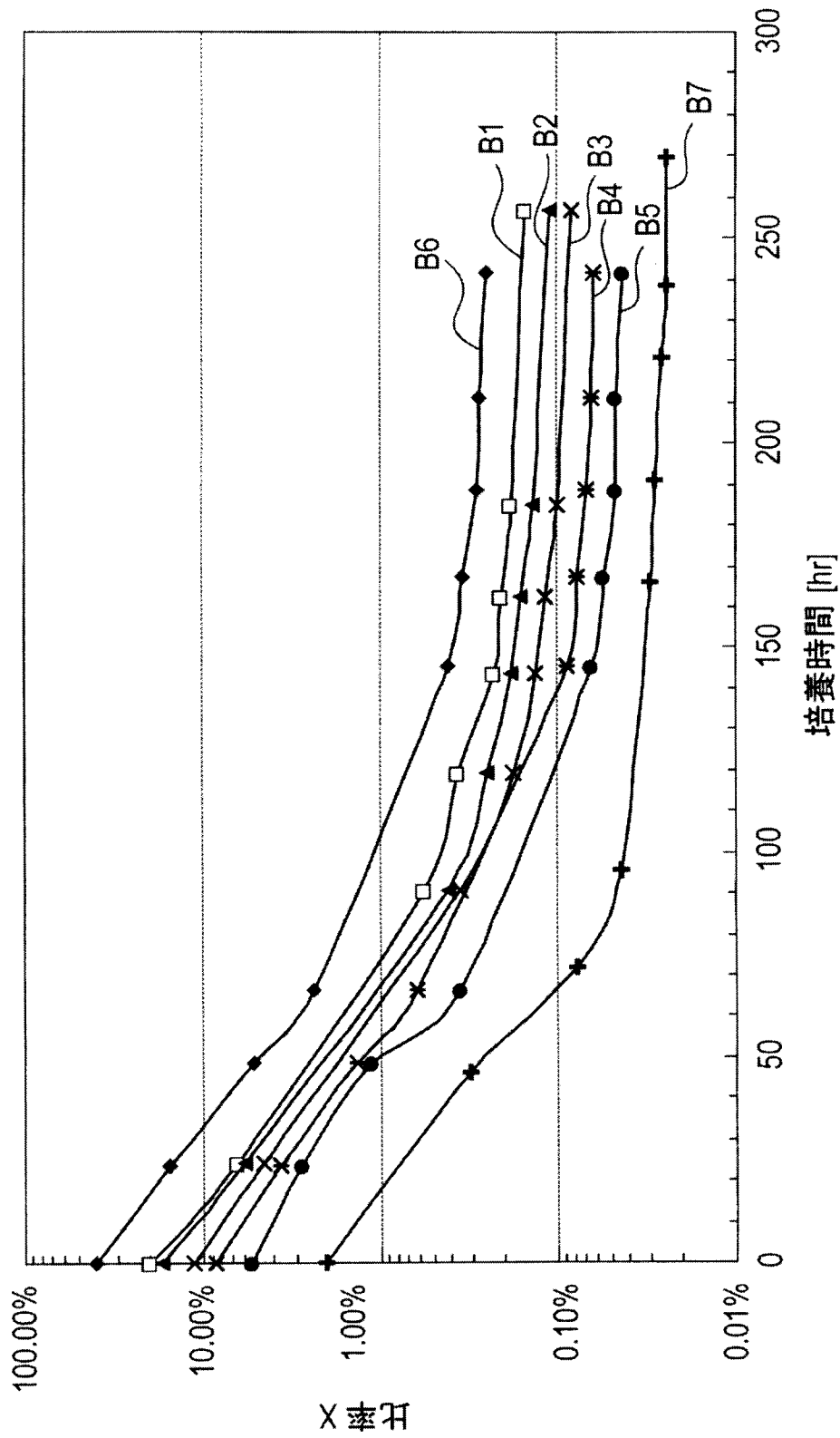
[図1]



[図2]



[図3]



[図4]

|    | イオン交換水<br>(g) | N<br>(mg) | P<br>(mg) | K<br>(mg) | Ca<br>(mg) | Mg<br>(mg) | キレート金属塩<br>(mg) | CP/CN |
|----|---------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-----------------|-------|
| B1 | 500           | 22.4      | 1.61      | 2.77      | 0.202      | 0.812      | 2.1             | 0.57  |
| B2 | 500           | 22.4      | 1.26      | 2.77      | 0.202      | 0.812      | 2.1             | 0.45  |
| B3 | 500           | 22.4      | 0.980     | 2.77      | 0.202      | 0.812      | 2.1             | 0.35  |
| B4 | 500           | 22.4      | 0.704     | 2.77      | 0.202      | 0.812      | 2.1             | 0.25  |
| B5 | 500           | 22.4      | 0.409     | 2.77      | 0.202      | 0.812      | 2.1             | 0.15  |
| B6 | 500           | 22.4      | 2.80      | 2.77      | 0.202      | 0.812      | 2.1             | 0.08  |
| B7 | 500           | 22.4      | 0.210     | 2.77      | 0.202      | 0.812      | 2.1             | 1     |

[図5]

|    | 長径<br>( $\mu\text{m}$ ) | 短径<br>( $\mu\text{m}$ ) | 体積<br>( $\mu\text{L}$ ) |
|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| B4 | 9.023                   | 3.881                   | 0.421293                |
| B5 | 9.547                   | 4.102                   | 0.498504                |
| B6 | 7.597                   | 3.057                   | 0.235244                |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002951

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/12(2006.01)i, C12P7/64(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)

C12N1/00-7/08, C12P1/00-41/00

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 | 1996-2015 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2015 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2015 |

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

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), 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         | JP 2014-014284 A (Hitachi, Ltd.),<br>30 January 2014 (30.01.2014),<br>examples; table 1<br>(Family: none)                                                                                                                                  | 1-7                   |
| X         | WO 2013/115288 A1 (Euglena Co., Ltd.),<br>08 August 2013 (08.08.2013),<br>paragraphs [0024] to [0037]; comparative<br>example 1; examples 1 to 3; table 1<br>& JP 2013-153730 A & US 2015/0010987 A1<br>& AU 2013216014 A & TW 201335373 A | 1-7                   |

☒ 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  
14 August 2015 (14.08.15)

Date of mailing of the international search report  
01 September 2015 (01.09.15)

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/JP2015/002951

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2009/035551 A1 (MARTEK BIOSCIENCES CORP.),<br>19 March 2009 (19.03.2009),<br>example 5<br>& JP 2010-538642 A & US 2009/0064567 A1<br>& US 2012/0272566 A1 & EP 2198038 A1<br>& CN 101874117 A & KR 10-2010-0067111 A                    | 1-7                   |
| X<br>Y    | WO 2011/148981 A1 (Hitachi Plant Technologies,<br>Ltd.),<br>01 December 2011 (01.12.2011),<br>paragraphs [0015], [0019] to [0032]<br>& JP 2011-246605 A & US 2013/0071889 A1<br>& EP 2578689 A1 & CN 103003433 A<br>& KR 10-2013-0025908 A | 1-7<br>5              |
| X         | JP 2012-005398 A (Nagoya University),<br>12 January 2012 (12.01.2012),<br>example 1; table 1<br>(Family: none)                                                                                                                             | 1-7                   |
| X<br>Y    | JP 2010-011838 A (Morio HIRANO),<br>21 January 2010 (21.01.2010),<br>examples 1 to 3; table 2<br>(Family: none)                                                                                                                            | 1-4, 6-7<br>5         |
| X         | JP 2012-023978 A (Hitachi Plant Technologies,<br>Ltd.),<br>09 February 2012 (09.02.2012),<br>paragraphs [0006], [0049] to [0084]<br>(Family: none)                                                                                         | 1-7                   |
| X         | JP 2012-183002 A (Research Institute of<br>Tsukuba Bio-tech Corp.),<br>27 September 2012 (27.09.2012),<br>paragraph [0078]; examples; table 1<br>(Family: none)                                                                            | 1-7                   |
| X         | US 2011/0027827 A1 (CHI, Zhanyou),<br>03 February 2011 (03.02.2011),<br>paragraph [0003]; example 4; table 7<br>(Family: none)                                                                                                             | 1-7                   |
| P, X      | WO 2014/136574 A1 (The University of Tokyo),<br>12 September 2014 (12.09.2014),<br>entire text; particularly, paragraph [0023]<br>& JP 2014-168409 A                                                                                       | 1-7                   |
| P, X      | JP 2015-053873 A (Hitachi, Ltd.),<br>23 March 2015 (23.03.2015),<br>entire text; particularly, paragraph [0048]<br>(Family: none)                                                                                                          | 1-7                   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002951

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P,X       | JP 2015-053863 A (Hitachi, Ltd.),<br>23 March 2015 (23.03.2015),<br>entire text; particularly, paragraph [0031]<br>(Family: none)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1-7                   |
| P,X       | JP 2015-057989 A (Hitachi, Ltd.),<br>30 March 2015 (30.03.2015),<br>entire text; particularly, paragraph [0027]<br>(Family: none)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1-7                   |
| A         | MATSUWAKI, Izumi et al., Analysis of Oil-<br>synthesizing Activity in <i>Pseudochoricystis</i><br><i>ellipsoidea</i> , International Symposium on<br>Microalgal Biofuels and Bioproducts [online],<br>2013, P3., [retrieved on 2015-08-14], Retrieved<br>from the Internet: <URL: <a href="http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf">http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf</a> >., entire text                | 1-7                   |
| A         | KOMATSU, Satoko et al., Effects of Seawater<br>Addition on Culture Stability and Oil<br>Productivity, International Symposium on<br>Microalgal Biofuels and Bioproducts [online],<br>2013, P5., [retrieved on 2015-08-14], Retrieved<br>from the Internet: <URL: <a href="http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf">http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf</a> >., entire text                                 | 1-7                   |
| A         | YAMASAKI, Satoshi et al., Development of<br>Poultry Feed Supplied with Oil-Extracted Algal<br>Cell Residues, International Symposium on<br>Microalgal Biofuels and Bioproducts [online],<br>2013, P18., [retrieved on 2015-08-14],<br>Retrieved from the Internet: <URL: <a href="http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf">http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf</a> >., entire text                         | 1-7                   |
| A         | KASAI, Hiroaki, Development of Aquaculture Feed<br>Produced from the Oil-producing Microalgae,<br><i>Pseudococcomyxa</i> strains, International<br>Symposium on Microalgal Biofuels and<br>Bioproducts [online], 2013, P19., [retrieved on<br>2015-08-14], Retrieved from the Internet: <URL:<br><a href="http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf">http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf</a> >., entire text | 1-7                   |

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/12(2006.01)i, C12P7/64(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（I P C））

Int.Cl. C12N1/00-7/08, C12P1/00-41/00

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   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 5 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）

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X               | JP 2014-014284 A（株式会社日立製作所）2014.01.30,<br>実施例、表1<br>（ファミリーなし）                                                                                            | 1-7            |
| X               | WO 2013/115288 A1（株式会社ユーグレナ）2013.08.08,<br>【0024】－【0037】、比較例1、実施例1－3、表1<br>& JP 2013-153730 A & US 2015/0010987 A1 & AU 2013216014 A & TW<br>201335373 A | 1-7            |

☒ 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

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 4 . 0 8 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 1 . 0 9 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / 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）

戸来 幸男

4 B

5 8 0 3

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<br>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<br>請求項の番号 |
| X                     | WO 2009/035551 A1 (MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION) 2009. 03. 19,<br>EXAMPLE 5<br>& JP 2010-538642 A & US 2009/0064567 A1 & US 2012/0272566 A1 &<br>EP 2198038 A1 & CN 101874117 A & KR 10-2010-0067111 A | 1-7            |
| X<br>Y                | WO 2011/148981 A1 (株式会社日立プラントテクノロジー)<br>2011. 12. 01,<br>【0015】、【0019】－【0032】<br>& JP 2011-246605 A & US 2013/0071889 A1 & EP 2578689 A1 & CN<br>103003433 A & KR 10-2013-0025908 A                      | 1-7<br>5       |
| X                     | JP 2012-005398 A (国立大学法人名古屋大学) 2012. 01. 12,<br>実施例1、表1<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                     | 1-7            |
| X<br>Y                | JP 2010-011838 A (平野盛雄) 2010. 01. 21,<br>実施例1－3、表2<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                          | 1-4, 6-7<br>5  |
| X                     | JP 2012-023978 A (株式会社日立プラントテクノロジー)<br>2012. 02. 09,<br>【0006】、【0049】－【0084】<br>(ファミリーなし)                                                                                                                | 1-7            |
| X                     | JP 2012-183002 A (株式会社筑波バイオテック研究所) 2012. 09. 27,<br>【0078】、実施例、表1<br>(ファミリーなし)                                                                                                                           | 1-7            |
| X                     | US 2011/0027827 A1 (CHI, Zhanyou) 2011. 02. 03,<br>【0003】、Example 4、TABLE 7<br>(ファミリーなし)                                                                                                                 | 1-7            |
| P, X                  | WO 2014/136574 A1 (国立大学法人 東京大学) 2014. 09. 12,<br>全文、特に【0023】<br>& JP 2014-168409 A                                                                                                                       | 1-7            |
| P, X                  | JP 2015-053873 A (株式会社日立製作所) 2015. 03. 23,<br>全文、特に【0048】<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                   | 1-7            |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| P, X                  | JP 2015-053863 A (株式会社日立製作所) 2015. 03. 23,<br>全文、特に【0 0 3 1】<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1-7            |
| P, X                  | JP 2015-057989 A (株式会社日立製作所) 2015. 03. 30,<br>全文、特に【0 0 2 7】<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1-7            |
| A                     | MATSUWAKI, Izumi et al., Analysis of Oil-synthesizing Activity<br>in <i>Pseudochoricystis ellipsoidea</i> , 微細藻類バイオマス利用国際<br>シンポジウム [online], 2013, P3., [retrieved on 2015-08-14],<br>Retrieved from the Internet: <URL:<br><a href="http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf">http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf</a> >.,<br>全文                     | 1-7            |
| A                     | KOMATSU, Satoko et al., Effects of Seawater Addition on Culture<br>Stability and Oil Productivity, 微細藻類バイオマス利用国際シ<br>ンポジウム [online], 2013, P5., [retrieved on 2015-08-14],<br>Retrieved from the Internet: <URL:<br><a href="http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf">http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf</a> >.,<br>全文                              | 1-7            |
| A                     | YAMASAKI, Satoshi et al., Development of Poultry Feed Supplied<br>with Oil-Extracted Algal Cell Residues, 微細藻類バイオマス利<br>用国際シンポジウム [online], 2013, P18., [retrieved on<br>2015-08-14], Retrieved from the Internet: <URL:<br><a href="http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf">http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf</a> >.,<br>全文                      | 1-7            |
| A                     | KASAI, Hiroaki, Development of Aquaculture Feed Produced from<br>the Oil-producing Microalgae, <i>Pseudococcomyxa</i> strains, 微細藻<br>類バイオマス利用国際シンポジウム [online], 2013, P19.,<br>[retrieved on 2015-08-14], Retrieved from the Internet: <URL:<br><a href="http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf">http://www.bio.chuo-u.ac.jp/harayama/uramen2/abstract_brochure_final.pdf</a> >.,<br>全文 | 1-7            |