

明 細 書

発明の名称：藻類有用成分抽出法

技術分野

[0001] 本発明は、藻類から有用成分を抽出する方法に関する。この方法により、トリアシルグリセロール、カロテノイドなどの有用成分と ω 3脂肪酸、オキシリピン類などの有用成分とを分けて抽出することが可能になる。

背景技術

[0002] 超微細藻類であり、オイル高生産能がある真正眼点藻Nannochloropsis（以下、「ナンノクロロプシス」という場合がある。）は様々な有用成分を含む海産性藻類である。バイオ燃料や食料油脂として注目されているトリアシルグリセロール（TAG）に関する知見として、栄養欠乏条件下で脂質が蓄積すること、脂質の中では貯蔵脂質であるTAGが蓄積すること、飽和脂肪酸の割合が増えることが報告されている（Biotechnol. Bioeng. 102, (2009) 100-112., Frontiers in Microbiology (2015) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00912>）。ナンノクロロプシスのTAGにはパルミチン酸（C16:0）が多く含まれており、バイオディーゼルの原料として有利である。一方で、ナンノクロロプシスには ω 3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（C20:5、EPA）も多く含まれている（The Plant Journal (2008) 54, 621-639）。 ω 3脂肪酸はナンノクロロプシスでは主に膜脂質に多く含まれ、動物体内ではさまざまな機能にとって重要であり、多価不飽和脂肪酸に属している（Frontiers in Microbiology (2015) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00912>）。 ω 3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（C20:5、EPA）やDHAは、脂肪が多い魚（たとえば、サケ、マグロ、マス）や甲殻類（たとえば、カニ、ムール貝、カキ）のような海産物に含まれている。このような海産物に含まれる ω 3脂肪酸は魚や甲殻類の体内で合成されておらず、餌としてとりこんだ藻類の体内で合成されたものが海産物内に蓄積したものである。漁獲高が減っていく中で新たな ω 3脂肪酸供給源として海産性藻類が注目されている。さらにEPAを体内に持つナンノク

クロロプシスからはEPAの代謝産物であるオキシリピン類が生成できる(Phytochemistry 102 (2014) 152-161)。このオキシリピン類は広く抗炎症活性を示すことが報告されており(Phytochemistry 102 (2014) 152-161)、オキアミやエビにおいては、ヒドロキシエイコサペンタエン酸(HEPE)類を抽出する方法が報告されている(特開2015-163607号公報)。また、ナンノクロロプシスは自然界に存在する天然色素であり、抗酸化作用を持つことが知られているカロテノイドも含んでいる。カロテノイドはトマトやカボチャなどの緑黄色野菜に多く含まれているが、微細藻類も様々なカロテノイドを蓄積していることが報告されている。例えば、ユーグレナにはジアトキサンチンが、褐藻類にはフコキサンチンというカロテノイド色素が含まれている。ナンノクロロプシス属においてもカロテノイド類の蓄積が報告されている(Algal Research volume3 (2014) 36-43)。

[0003] このような様々な有用成分を含むナンノクロロプシスだが、各有用成分を分けて取り出すための方法は開発されていない。藻類からの脂質抽出はクロロホルム・メタノール・水混合液による抽出法が広く使用されているが(非特許文献1-4)、クロロホルム・メタノール・水抽出では膜脂質や貯蔵脂質がまとめて抽出されてくるため、さらに有用成分をより分ける作業が必要となる。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: J Biol Chem 226 (1957) 497-509

非特許文献2: Can J Biochem Physiol 37 (1959) 911-917

非特許文献3: Eur J Biochem 230 (1995) 987-993

非特許文献4: BMC Biotechnology 11:7 (2011) doi: 10.1186/1472-6750-11-7.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 藻類中に含まれる有用成分を分けて取り出すことができれば、回収作業を効率化できる。本発明は、このような背景の下になされたものであり、藻類中の有用成分を分けて抽出する手段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

[0006] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、非極性、極性の2種類の有機溶媒を2段階で用いることにより、TAG、カロテノイドなどの有用成分と ω 3脂肪酸、オキシリピン類などの有用成分とを分けて抽出できることを見出し、この知見に基づき、本発明を完成するに至った。

[0007] 即ち、本発明は、以下の〔1〕～〔7〕を提供するものである。

〔1〕藻類から有用成分を抽出する方法であって、以下の工程（1 a）と工程（2 a）、又は工程（2 b）と工程（1 b）を含むことを特徴とする方法、

（1 a）非極性溶媒を用いて、乾燥させた藻類から第一の有用成分を抽出する工程、

（2 a）極性溶媒を含む溶媒を用いて、工程（1 a）の抽出後の残渣から第二の有用成分を抽出する工程、

（2 b）極性溶媒を含む溶媒を用いて、乾燥させた藻類から第二の有用成分を抽出する工程、

（1 b）非極性溶媒を用いて、工程（2 b）の抽出後の残渣から第一の有用成分を抽出する工程。

[0008] 〔2〕工程（1 a）と工程（2 a）を含むことを特徴とする〔1〕に記載の方法。

[0009] 〔3〕第一の有用成分が、トリアシルグリセロール及び／又はカロテノイドであり、第二の有用成分が、 ω 3脂肪酸及び／又はオキシリピン類であることを特徴とする〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

[0010] 〔4〕非極性溶媒が、ヘキサンであり、極性溶媒を含む溶媒が、エタノール又はエタノールとヘキサンの混合溶媒であることを特徴とする〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

- [0011] [5] 藻類が、トリアシルグリセロールを含み、膜脂質に ω 3脂肪酸及びオキシリピン類を含む藻類であることを特徴とする〔1〕又は〔2〕に記載の方法。
- [0012] [6] 藻類が、Nannochloropsis属、Microchloropsis属、Monodus属、Fistulifera属、又はPhaeodactylum属に属する藻類であることを特徴とする〔1〕又は〔2〕に記載の方法。
- [0013] [7] 第一の有用成分が、トリアシルグリセロール及び／又はカロテノイドであり、第二の有用成分が、 ω 3脂肪酸及び／又はオキシリピン類であり、非極性溶媒が、ヘキサンであり、極性溶媒を含む溶媒が、エタノール又はヘキサンとエタノールの混合溶媒であり、藻類がNannochloropsis属に属する藻類であることを特徴とする〔1〕又は〔2〕に記載の方法。
- [0014] 本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2024-011901の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

- [0015] 本発明は藻類から有用成分を抽出する新規な方法を提供する。この方法により、TAG、カロテノイドなどの有用成分と ω 3脂肪酸、オキシリピン類などの有用成分とを分けて抽出することが可能になる。

図面の簡単な説明

- [0016] [図1]2段階抽出方法の概略を示す図。
- [図2]各条件における抽出液の様子を示す図。
- [図3]各抽出物に含まれる脂肪酸の組成を示す図。
- [図4]各抽出物に含まれるTAGを示す図。矢印部分の白いスポットがTAG。
- [図5]各TAGに含まれる脂肪酸の組成を示す図。
- [図6]乾燥藻体に含まれる成分を示す図。
- [図7]各抽出物に含まれる色素を示す図。
- [図8]2段階目の抽出溶媒に含まれるオキシリピン類の量を示す図。
- [図9]実施例2の操作の概略を示す図。
- [図10]各条件における抽出液の様子を示す図。

[図11]各抽出物に含まれるTAGを示す図。矢印部分の白いスポットがTAG。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の藻類から有用成分を抽出する方法は、（１）非極性溶媒を用いて第一の有用成分を抽出する工程及び（２）極性溶媒を含む溶媒を用いて第二の有用成分を抽出する工程を含むことを特徴とするものである。工程（１）及び工程（２）の順序は特に限定されず、工程（１）が先であっても、工程（２）が先であってもよい。即ち、本発明の方法は、下記の工程（１ a）と工程（２ a）を含んでいてもよく、工程（２ b）と工程（１ b）を含んでいてもよい。

[0018] 工程（１ a）では、非極性溶媒を用いて、乾燥させた藻類から第一の有用成分を抽出する。

[0019] 非極性溶媒としては、ヘキサン、シクロヘキサン、ジクロロメタンなどを挙げることができる。これらの中では、ヘキサンが好ましい。ヘキサンを使用することにより、藻類中に含まれるTAG及び β -カロテンをほぼ全量回収することでき（図４及び図７）、これらの成分の抽出を効率的に行うことができるからである。なお、本発明における「ヘキサン」とは、ノルマルヘキサンのみからなるものであってもよく、ノルマルヘキサンを主成分として少量の他の物質（例えば、メチルシクロペンタン、メチルペンタンなど）を含むものであってもよい。

[0020] 第一の有用成分は、非極性溶媒により抽出できるものであれば特に限定されないが、TAG、カロテノイドが好ましい。これらの成分の一方のみを抽出対象としてもよいが、両方の成分を抽出対象としてもよい。カロテノイドとしては、 β -カロテン、 α -カロテン、 γ -カロテン、 ϵ -カロテン、ルテイン、ゼアキサンチン、フコキサンチン、ジアトキサンチン、ジアジノキサンチンなどを挙げることができる。

[0021] 使用する藻類は、有用成分を抽出できるものであれば特に限定されないが、Nannochloropsis属、Microchloropsis属、Monodus属、Fistulifera属、又

はPhaeodactylum属に属する藻類が好ましく、Nannochloropsis属に属する藻類が特に好ましい。Nannochloropsis属に属する藻類としては、Nannochloropsis oceanica、Nannochloropsis oculata、Nannochloropsis granulata、Nannochloropsis australis、Nannochloropsis limnetica、Nannochloropsis maritimaを挙げることができ、Microchloropsis属に属する藻類としては、Microchloropsis gaditana、Microchloropsis salinaを挙げることができ、Monodus属に属する藻類としては、Monodus subterraneusを挙げることができ、Fistulifera属に属する藻類としては、Fistulifera solaris、Fistulifera pelliculosa、Fistulifera saprophilaを挙げることができ、Phaeodactylum属に属する藻類としては、Phaeodactylum tricornutumを挙げることができる。また、使用する藻類は、トリアシルグリセロールを含み、膜脂質に ω 3脂肪酸及びオキシリピン類を含む藻類であることが好ましい。このような藻類としては、Monodus属に属する藻類（例えば、Monodus subterraneus）、Fistulifera属に属する藻類（例えば、Fistulifera solaris、Fistulifera pelliculosa、Fistulifera saprophila）、Microchloropsis属に属する藻類（例えばMicrochloropsis gaditana、Microchloropsis salina）、Nannochloropsis属に属する藻類（例えばNannochloropsis oceanica、Nannochloropsis oculata、Nannochloropsis granulata、Nannochloropsis australis、Nannochloropsis limnetica、Nannochloropsis maritima）などを挙げることができる。

[0022] 藻類として、Nannochloropsis属に属する藻類を使用する場合、通常の培地で培養されたものを使用してもよいが、リン欠乏培地、窒素欠乏培地で培養し、TAGを蓄積させたものを使用してもよい。リン欠乏培地によるTAGの蓄積は、例えば、後述する実施例の記載や国際公開第2015/137449号の記載に従って行うことができる。窒素欠乏培地によるTAGの蓄積は、例えば、国際公開第2015/137449号の記載に従って行うことができる。

[0023] 藻類の乾燥は、常法に従って行うことができる。乾燥させた藻類から有用成分の抽出は、例えば、1) 乾燥させた藻類に溶媒を添加する工程、2) 一定時間経過させる工程、3) 上清を回収する工程を含む方法によって行うこ

とができる。添加する溶媒の量は特に限定されないが、乾燥させた藻類100 mgに対して、3～100 mLの溶媒を添加することが好ましく、15～45 mLの溶媒を添加することがより好ましい。溶媒添加後、経過させる時間は特に限定されないが、0.3～24時間とするのが好ましく、0.5～18時間とするのがより好ましい。上清の回収は、遠心分離など常法に従って行うことができる。上記1)～3)の工程は、通常、2回以上繰り返し、得られた上清を合わせたものを有用成分の抽出液とする。繰り返しの回数は2回以上であればよいが、3～7回とするのが好ましく、4～6回とするのがより好ましい。上記抽出液中には、有用成分以外の成分も含まれているので、クロマトグラフィなどによって、有用成分のみを分離してもよい。

[0024] 工程(2a)では、極性溶媒を含む溶媒を用いて、工程(1a)の抽出後の残渣から第二の有用成分を抽出する。

[0025] 極性溶媒を含む溶媒は、極性溶媒を含んでいるものであればよく、極性溶媒のみからなる溶媒であっても、極性溶媒と非極性溶媒の混合溶媒であってもよい。極性溶媒としては、エタノール、1-ブタノール、2-ブタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、アセトンなどを挙げることができる。極性溶媒と混合する非極性溶媒は、ヘキサン、シクロヘキサン、ジクロロメタンなどを挙げることができる。極性溶媒と非極性溶媒の混合溶媒としては、エタノールとヘキサンの混合溶媒、1-ブタノールとヘキサンの混合溶媒、2-ブタノールとヘキサンの混合溶媒、1-プロパノールとヘキサンの混合溶媒、2-プロパノールとヘキサンの混合溶媒、アセトンとヘキサンの混合溶媒などを挙げることができる。極性溶媒と非極性溶媒の混合比は特に限定されないが、質量比で、極性溶媒／非極性溶媒＝30／70～70／30であることが好ましく、40／60～60／40であることがより好ましい。極性溶媒を含む好適な溶媒としては、エタノール、エタノールとヘキサンの混合溶媒、1-ブタノールとヘキサンの混合溶媒、2-ブタノールとヘキサンの混合溶媒、1-プロパノールとヘキサンの混合溶媒、2-プロパノールとヘキサンの混合溶媒、アセトンとヘキサンの混合溶媒を挙げることができる。

[0026] 第二の有用成分は、極性溶媒を含む溶媒により抽出できるものであれば特に限定されないが、 ω 3脂肪酸、オキシリピン類が好ましい。これらの成分の一方のみを抽出対象としてもよいが、両方の成分を抽出対象としてもよい。 ω 3脂肪酸としては、EPA、DHAなどを挙げることができ、オキシリピン類としては、15-ヒドロキシエイコサペンタエン酸、15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸、13-ヒドロキシ-9,11-オクタデカジエン酸、13-ヒドロキシ-9,11,15-オクタデカトリエン酸、13-ヒドロキシ-6,9,11-オクタデカトリエン酸、15-ヒドロキシ-8,11,13エイコサトリエン酸、8-ヒドロキシエイコサペンタエン酸、8-ヒドロキシエイコサテトラエン酸、18-ヒドロキシエイコサペンタエン酸などを挙げることができる。

[0027] 工程（2 a）の抽出の前に、工程（1 a）の抽出後の残渣から残存する非極性溶媒を除去することが望ましい。工程（1 a）の抽出後の残渣から有用成分の抽出は、例えば、1）残渣に溶媒を添加する工程、2）一定時間経過させる工程、3）上清を回収する工程を含む方法によって行うことができる。添加する溶媒の量は特に限定されないが、残渣100 mgに対して、15～100 mLの溶媒を添加することが好ましく、30～60 mLの溶媒を添加することがより好ましい。溶媒添加後、経過させる時間は特に限定されないが、0.3～24時間とするのが好ましく、0.5～18時間とするのがより好ましい。上清の回収は、遠心分離など常法に従って行うことができる。上記1）～3）の工程は、通常、2回以上繰り返し、得られた上清を合わせたものを有用成分の抽出液とする。繰り返しの回数は2回以上であればよいが、2～6回とするのが好ましく、3～4回とするのがより好ましい。上記抽出液中には、有用成分以外の成分も含まれているので、クロマトグラフィなどによって、有用成分のみを分離してもよい。

[0028] 工程（2 b）では、極性溶媒を含む溶媒を用いて、乾燥させた藻類から第二の有用成分を抽出する。極性溶媒を含む溶媒は、工程（2 a）の溶媒と同様のものを使用でき、藻類は、工程（1 a）の藻類と同様のものを使用できる。また、第二の有用成分は、工程（2 a）の成分と同様のものでよい。

[0029] 工程（１ｂ）では、非極性溶媒を用いて、工程（２ｂ）の抽出後の残渣から第一の有用成分を抽出する。非極性溶媒は、工程（１ａ）の溶媒と同様のものを使用できる。第一の有用成分は、工程（１ａ）の成分と同様のものによい。

実施例

[0030] 以下に、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

[0031] 〔実施例１〕

実験材料

真正眼点藻 *Nannochloropsis* NIES-2145（以下、「N. 2145」という。）を使用した。この藻類株は、独立行政法人国立環境研究所（<http://www.nies.go.jp/>）から入手可能である。

[0032] 実験操作

1. 培養条件

N. 2145の培養にはF2N培地を通常液体培養の培地として使用した。

Na₂EDTA・2H₂O 440 mg、FeCl₃・6H₂O 316 mg、CoSO₄・7H₂O 1.2 mg、ZnSO₄・7H₂O 2.1 mg、MnCl₂・4H₂O 18 mg、CuSO₄・5H₂O 0.7 mg、Na₂MoO₄・2H₂O 0.7 mgをイオン交換水100 mLへ溶解し、f/2 metalとして4℃に保存しておいた。

tris(hydroxymethyl)aminomethane 121.14gをイオン交換水900 mLへ溶解し、HClでpH7.6に調整した後に、1 Lに調整したものを1 M Tris-HCl（pH7.6）として4℃に保存しておいた。

NaNO₃ 7.5 mg、NH₄Cl 26.745 mg、NaH₂PO₄・2H₂O 3 mg、Vitamin B₁₂ 0.25 μg、Biotin 0.25 μg、Thiamine HCl 50 μg、f/2 metal 0.5 mL、1 M Tris-HCl（pH7.6）1 mLを人工海水 98.5 mLへ溶解し、フィルター滅菌してからF2N培地として使用した。人工海水はダイゴ人工海水SP（FUJIFILM）を使用した。F2N培地からNaH₂PO₄をのぞいたリン欠乏培地として使用した。各液体培地を使用し、20～30 μmol photons/m²/sec, 23℃, 1 20 min⁻¹巡回培養した。

[0033] 2. 脂質抽出

通常培地の細胞

通常培地で20日間培養した培養液850 mLを3500×g, 5分間遠心し、培養細胞を沈殿させた。海水塩を除くためイオン交換水50 mLに懸濁した後、再度3500×g, 5分間遠心し、沈殿させた。沈殿をイオン交換水7 mLに懸濁した後、平たく伸ばし60℃で22時間乾燥させ340 mgの乾燥藻体を得た。乾燥藻体を65 mgずつ3つ用意し、以下の条件1から条件3の実験を行った。

[0034] 条件1ではコントロールとして従来用いられるクロロホルム・メタノール混合液で抽出を行った。乾燥藻体65 mgにクロロホルム1.5 mL, メタノール 3 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.4 mLを1回目の抽出液として回収した。さらにクロロホルム1.5 mL、メタノール 3 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清5 mLを2回目の抽出液として回収した。さらにクロロホルム1.5 mL、メタノール 3 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを3回目の抽出液として回収した。さらにクロロホルム3 mL、メタノール1.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを4回目の抽出液として回収した。最後にクロロホルム3 mL、メタノール1.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを5回目の抽出液として回収した。1回目から5回目までの抽出液は1つにまとめて乾燥し、25 mg/mLになるようにクロロホルム：メタノール=2:1に溶解した後、-20℃に保存した。

[0035] 条件2では1段階目としてヘキサンで抽出を行い、沈殿の溶媒を乾燥で除いた後、エタノールで2段階目の抽出を行った。乾燥藻体65 mgにヘキサン4.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを1回目の抽出液として回収した。さらにヘキサン4.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを2回目の抽出液とし

て回収した。さらにヘキサン4.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを3回目の抽出液として回収した。さらにヘキサン4.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを4回目の抽出液として回収した。最後にヘキサン4.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを5回目の抽出液として回収した。1回目から5回目までの抽出液は1つにまとめて乾燥し、25 mg/mLになるようにヘキサンに溶解した後、1段階目抽出物として-20℃に保存した。沈殿に残存するヘキサンを乾燥で除いた後、エタノールを用いて2段階目の抽出を行った。沈殿にエタノール9 mLを添加し、18時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを1回目の抽出液として回収した。さらにエタノール9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを2回目の抽出液として回収した。さらにエタノール9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを3回目の抽出液として回収した。最後にエタノール9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを4回目の抽出液として回収した。1回目から4回目までの抽出液は1つにまとめて乾燥し、25 mg/mLになるようにエタノールに溶解した後、2段階目抽出物として-20℃に保存した。

[0036] 条件3では条件2と同様に1段階目としてヘキサンで抽出を行い、沈殿の溶媒を乾燥で除いた後、ヘキサン・エタノール混合液で2段階目の抽出を行った。エタノール9 mLの代わりにヘキサン6 mL、エタノール3 mLを使用した以外は条件2と同じ操作を行った。

[0037] リン欠乏培地の細胞

リン欠乏培地で7日間培養した培養液3 Lを3500×g, 5分間遠心し、培養細胞を沈殿させた。海水塩を除くためイオン交換水50 mLに懸濁した後、再度35

00×g, 5分間遠心し、沈殿させた。沈殿をイオン交換水7 mLに懸濁した後、平たく伸ばし60℃で22時間乾燥させ302 mgの乾燥藻体を得た。乾燥藻体を58 mgずつ3つ用意し、以下の条件1から条件3の実験を行った。

[0038] 条件1ではコントロールとして従来用いられるクロロホルム・メタノール混合液で抽出を行った。乾燥藻体58 mgにクロロホルム3 mL、メタノール 6 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを1回目の抽出液として回収した。さらにクロロホルム3 mL、メタノール 6 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを2回目の抽出液として回収した。さらにクロロホルム3 mL、メタノール 6 mLを添加し、17時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを3回目の抽出液として回収した。さらにクロロホルム6 mL、メタノール3 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを4回目の抽出液として回収した。さらにクロロホルム6 mL、メタノール3 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを5回目の抽出液として回収した。さらにクロロホルム6 mL、メタノール3 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを6回目の抽出液として回収した。最後にクロロホルム6 mL、メタノール3 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを7回目の抽出液として回収した。乾燥にかかる時間を短縮するため2層分離を行った。下層であるクロロホルム層を脂質抽出液として回収した。2層分離のために1回目から3回目までの抽出液には1%(W/V)KCl 5.4 mL、クロロホルム3 mLを添加した。4回目から7回目までの抽出液には1%(W/V)KCl 5.4 mL、メタノール3 mLを添加した。懸濁した後、1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、下層であるクロロホルム層を脂質抽出液として回収した。1回目から7回目までの脂質抽出液は1つにまとめて乾燥し、25 mg/mLになるようにクロロホルム：メタ

ノール=2:1に溶解した後、-20℃に保存した。

- [0039] 条件2では1段階目としてヘキサンで抽出を行い、沈殿の溶媒を乾燥で除いた後、エタノールで2段階目の抽出を行った。乾燥藻体58 mgにヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを1回目の抽出液として回収した。さらにヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを2回目の抽出液として回収した。さらにヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを3回目の抽出液として回収した。さらにヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを4回目の抽出液として回収した。さらにヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを5回目の抽出液として回収した。さらにヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを6回目の抽出液として回収した。最後にヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを7回目の抽出液として回収した。1回目から7回目までの抽出液は1つにまとめて乾燥し、25 mg/mLになるようにヘキサンに溶解した後、1段階目抽出物として-20℃に保存した。沈殿に残存するヘキサンを乾燥で除いた後、エタノールを用いて2段階目の抽出を行った。沈殿にエタノール9 mLを添加し、17時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを1回目の抽出液として回収した。さらにエタノール9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを2回目の抽出液として回収した。さらにエタノール9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを3回目の抽出液として回収した。最後にエタノール9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に

置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを4回目の抽出液として回収した。1回目から4回目までの抽出液は1つにまとめて乾燥し、25 mg/mLになるようにエタノールに溶解した後、2段階目抽出物として-20℃に保存した。

[0040] 条件3では条件2と同様に1段階目としてヘキサンで抽出を行い、沈殿の溶媒を乾燥で除いた後、ヘキサン・エタノール混合液で2段階目の抽出を行った。エタノール9 mLの代わりにヘキサン6 mL、エタノール3 mLを使用した以外は条件2と同じ操作を行った。

[0041] 3. 脂質分析

脂質抽出液5 μ l (0.125 mg相当) に1 mMヘンエイコサン酸 50 μ l、1.5M塩酸/メタノールを500 μ lを添加し、懸濁した後、85℃, 1時間静置し、脂肪酸をメチルエステル化した。ヘキサン500 μ lを添加し、懸濁した後、1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上層のメチルエステル化した脂肪酸を含むヘキサンを回収した。下層に再びヘキサン500 μ lを添加し、懸濁した後、1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上層を回収した。下層に再びヘキサン500 μ lを添加し、懸濁した後、1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上層を回収した。回収したメチルエステル化した脂肪酸を乾燥させた後、ヘキサン100 μ lに溶解し、ガスクロマトグラフィサンプルとした。トリアシルグリセロール (TAG) については薄層シリカプレート (TLC) を用いて単離後にガスクロマトグラフィを用いて分析を主とした。脂質抽出液5 μ l (0.125 mg相当) をTLCプレートにスポットし、ヘキサン160 mL、ジエチルエーテル40 mL、酢酸4 mLの混合液で45分間展開した。TAGの移動度のコントロールとしてトリオレイン0.1 mgをスポットした。0.001%プリムリンを用いて、UV照射下でTAGを確認した。TAGがのっている部分のシリカを削り取り、1 mMヘンエイコサン酸 50 μ l、1.5 M 塩酸/メタノールを500 μ lを添加し、懸濁した後、85℃, 1時間静置し、脂肪酸をメチルエステル化した。ヘキサン500 μ lを添加し、懸濁した後、1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上層のメチルエステル化した脂肪酸を含むヘキサンを回収した。下層に再びヘ

キサン500 μl を添加し、懸濁した後、1000 $\times$ g、5分間スイングローターで遠心し、上層を回収した。下層に再びヘキサン500 μl を添加し、懸濁した後、1000 $\times$ g、5分間スイングローターで遠心し、上層を回収した。回収したメチルエステル化した脂肪酸を乾燥させた後、ヘキサン100 μl に溶解し、ガスクロマトグラフィサンプルとした。ガスクロマトグラフィは島津製作所GC-2030にHR-SS-10（内径0.25 mm、長さ25 m）（SHINWA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.）を取り付けて行った。

[0042] 4. 色素分析

抽出物に含まれる色素の種類を比較するためにTLCによる分析を行った。脂質抽出液10 μl （0.25 mg相当）をTLCプレートにスポットし、石油エーテル70 mL、アセトン30 mLの混合液で40分間展開した。コントロールとしてハウレンソウからクロロホルム・メタノール抽出した色素を用いた。

[0043] 5. オキシリピン類分析

脂質抽出液に含まれるオキシリピン類を調べるためにLC-MSを用いて分析を行った。通常培地で培養した細胞を用いた条件2の2段階目エタノールによる脂質抽出液、及び条件3の2段階目ヘキサン・エタノール混合液による脂質抽出液を1000倍希釈し、溶液中の遊離型15-HEPE及び15-HETE含量を島津製作所LC-MS8050を用いて測定した。カラムにはPhenomenex, Kinetex C8（内径2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 2.6 μm ）を使用した。

[0044] 実験結果

1. 脂質抽出

これまでのクロロホルム・メタノール混合液による抽出と2段階抽出を比較するために条件1から条件3の方法で脂質抽出を行った（図1）。条件1ではコントロールとして従来用いられるクロロホルム・メタノール混合液で抽出を行った。条件2では1段階目としてヘキサンで抽出を行い、沈殿の溶媒を乾燥で除いた後、エタノールで2段階目の抽出を行った。条件3では1段階目としてヘキサンで抽出を行い、沈殿の溶媒を乾燥で除いた後、ヘキサン・エタノール混合液で2段階目の抽出を行った。脂質抽出には通常培地で培養した細胞と

よりTAGが蓄積しやすいリン欠乏培地で培養した細胞の2種類の細胞を用いた。

[0045] 通常培地で20日間培養した培養液850 mLから340 mgの乾燥藻を得た。乾燥藻体を65 mgずつ3つ用意し、条件1から条件3の実験を行った。条件1では1回目の抽出で濃い緑色の抽出液が得られ、2、3回目と段階的に薄くなっていき、4、5回目の抽出液はほぼ着色していなかった（図2左上）。条件2、3の1段階目のヘキサン抽出では1回目の抽出液で濃い緑色の抽出液が得られ、2回目から5回目の抽出液は段階的に薄くなってはいかなかった（図2左中）。1段階目のヘキサン抽出後に2段階目にヘキサン・エタノール混合液で抽出すると2回目抽出でほとんど着色がなくなったが、エタノールで抽出すると4回目抽出でも抽出液が緑に着色していた（図2左下）。回収した各脂質重量から2段階抽出でもこれまでのクロロホルム・メタノール抽出と同程度の脂質が回収できることが分かった（表1）。

[0046] リン欠乏培地で7日間培養した培養液3 Lから302 mgの乾燥藻体を得た。乾燥藻体を58 mgずつ3つ用意し、条件1から条件3の実験を行った。リン欠乏培地ではTAG蓄積量が増加することが予想されたため、抽出に用いる有機溶媒量と抽出回数を通常培地よりも多くした。条件1では1回目の抽出で濃い緑色の抽出液が得られ、2、3回目と段階的に薄くなっていき、4回目以降の抽出液は着色していなかった（図2右上）。条件2、3の1段階目のヘキサン抽出では1回目の抽出液と17時間抽出した3回目で濃い緑色の抽出液が得られ、4回目の抽出液からは段階的に薄くなってはいかなかった（図2右中）。1段階目のヘキサン抽出後に2段階目にヘキサン・エタノール混合液で抽出すると2回目抽出でほとんど着色がなくなったが、エタノールで抽出すると4回目抽出でも抽出液がうっすらと緑に着色していた（図2右下）。回収した各脂質重量からTAG蓄積量が増えるリン欠乏培養細胞でも2段階抽出でクロロホルム・メタノール抽出と同程度の脂質が回収できることが分かった（表1）。また乾燥藻体重量当たりの脂質重量が通常培養細胞と比べて多くなることが分かった。さらに通常培養細胞と比較して1段階目で回収されてくる脂質量が多くなることが

が分かった。

[表1]

培養	条件	藻体乾燥重量(mg)	抽出溶媒	抽出脂質乾燥重量(mg)	残渣乾燥重量(mg)	藻体重量における脂質重量の比率(%)
通常	1	65.07	クロロホルム・メタノール	23.61	48.95	36.3
通常	2	65.11	1段階目ヘキサン 2段階目エタノール	1段階目6.16 2段階目11.61	47.19	1段階目9.5 2段階目17.8
通常	3	65.08	1段階目ヘキサン 2段階目ヘキサン・エタノール	1段階目5.97 2段階目12.49	46.75	1段階目9.2 2段階目19.2
リン欠乏	1	58.15	クロロホルム・メタノール	27.61	26.47	47.5
リン欠乏	2	58.19	1段階目ヘキサン 2段階目エタノール	1段階目18.88 2段階目9.23	29.78	1段階目32.4 2段階目15.9
リン欠乏	3	58.23	1段階目ヘキサン 2段階目ヘキサン・エタノール	1段階目19.19 2段階目7.09	31.30	1段階目33.0 2段階目12.2

[0047] 2. 脂質分析

脂質に含まれる脂肪酸を分析するためにガスクロマトグラフィ分析を行った。図3の結果から通常培養ではクロロホルム・メタノール抽出と比べて2段階目のエタノール抽出もしくはヘキサン・エタノール抽出ではパルミチン酸 (C16:0) の割合が少なくなっていた。エタノール抽出と比べてヘキサン・エタノール抽出の方がよりC16:0の割合が少なく、エイコサペンタエン酸 (C20:5, EPA) の割合が多くなっていた。リン欠乏培養ではクロロホルム・メタノール抽出と比べて1段階目のヘキサン抽出ではEPAの割合が少なくなっており、2段階目のエタノール抽出もしくはヘキサン・エタノール抽出ではEPAの割合が多く、C16:0、パルミトオレイン酸 (C16:1) の割合が少なくなっていた。ナンノクロロプシスでは膜脂質に比べてTAGではアラキドン酸 (C20:4)、EPAの割合が少ないことが知られている (Frontiers in Microbiology (2015) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00912>、Plant Physiol. 171, (2016), 2469-2482、)。1段階目でEPAの割合が少なくなった原因はヘキサン抽出物にTAGが多く含まれているためだと考えられた。そこで各抽出液に含まれるTAGを分析するため、TLC分析及びガスクロマトグラフィ分析を行った。図4の結果

果から通常培養でもリン欠乏培養でも1段階目のヘキサン抽出でTAGを全量回収でき、2段階目の抽出液にはTAGが含まれないことが分かった。また、脂質当たりに含まれるTAG量はクロロホルム・メタノール抽出よりもヘキサン抽出の方が多いことが明らかとなった。各TAGに含まれる脂肪酸成分は図5に示した。通常培養のクロロホルム・メタノール抽出ではTAGの量が少ないため、EPAは検出できなかった。そのためC16:0の割合がこれまで報告されている割合よりも大きくなってしまったが、ヘキサン抽出ではこれまでの通常培養後のTAGに含まれる脂肪酸成分と同様にEPAが6%であった。リン欠乏培養ではEPAの割合は特に少なく1%になっていた。以上の脂質分析の結果から、1段階目のヘキサン抽出ではクロロホルム・メタノール抽出と同程度かそれ以上のTAGを抽出できること、2段階目の抽出物にはTAGは含まれないこと、ヘキサン抽出後にエタノール抽出又はヘキサン・エタノール抽出することでクロロホルム・メタノール抽出と同程度の脂質を抽出できることが明らかになった（図6）。

[0048] 3. 色素分析

各抽出物をTLC上にスポットし、石油エーテル・アセトンを用いて展開した。その結果、通常培養の1段階目ヘキサン抽出物にのみ β -カロテンが含まれており、2段階目のエタノール又はヘキサン・エタノール抽出物には β -カロテンが含まれていないことが判明した（図7左）。また、ハウレンソウには見られない移動度を持つ新規カロテノイド様のスポットが4つ（丸数字1、2、4、5の矢印で示す）見られた。リン欠乏培養ではヘキサン抽出物に β -カロテンが含まれてはいたが、通常培養と比較して、少ない量であることがわかった（図7右）。また、通常培養では見られなかった新たなカロテノイド様スポット（丸数字3の矢印で示す）が見られた。以上の結果から本発明の非極性溶媒、極性性溶媒の2段階抽出法により、1段階目の抽出物に β -カロテンが全量回収できること、性質の異なる新規カロテノイドが分けて回収できること、培養によって蓄積するカロテノイドをコントロールできることが示された。

[0049] 4. オキシリピン類分析

EPAの代謝産物であるオキシリピン類が2段階抽出法ではどこの抽出物に含まれるのかをLC-MSを用いて調べた。ヘキサン抽出後にエタノール抽出又はヘキサン・エタノール抽出を行うと極性溶媒に親和性のある遊離型ヒドロキシエイコサペンタエン酸（15-HEPE）及びヒドロキシエイコサテトラエン酸（15-HETE）が2段階目の抽出物に大量に含まれていることが分かった（図8）。エタノール抽出の方がヘキサン・エタノール抽出よりもオキシリピン類が回収されることが分かった。

[0050] 5. まとめ

以上の結果から、藻体乾燥後に非極性溶媒、極性溶媒の2段階の抽出を行う本発明では1段階目の非極性溶媒によってTAG、 β -カロテンが全量回収できることが示された。2段階目の抽出溶媒としては2つの選択肢がある。極性溶媒を用いると遊離型オキシリピン類が効率よく回収でき、非極性溶媒と極性溶媒の混合溶媒を用いると遊離型オキシリピン類の回収率は下がるが膜脂質に含まれるEPAの回収率が上がる。このように本発明は藻類から目的に応じて有用成分を分けて回収するために有効な方法である。

[0051] 「実施例2」

実験材料

実験材料は実施例1と同じものを使用した。

[0052] 実験操作

脂質抽出

通常培地で培養した細胞を用いて条件2の抽出工程順番を入れ替えたものを条件4として実験を行った。即ち、条件4では1段階目としてエタノールで抽出を行い、沈殿の溶媒を乾燥で除いた後、ヘキサンで2段階目の抽出を行った。乾燥藻体65 mgにエタノール4.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを1回目の抽出液として回収した。さらにエタノール4.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを2回目の抽出液として回収した。さらにエタノール4.5 mL

を添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを3回目の抽出液として回収した。さらにエタノール4.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを4回目の抽出液として回収した。最後にエタノール4.5 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら30分間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清4.5 mLを5回目の抽出液として回収した。1回目から5回目までの抽出液は1つにまとめて乾燥し、25 mg/mLになるようにヘキサンに溶解した後、1段階目抽出物として-20℃に保存した。沈殿に残存するエタノールを乾燥で除いた後、ヘキサンを用いて2段階目の抽出を行った。沈殿にヘキサン9 mLを添加し、18時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを1回目の抽出液として回収した。さらにヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを2回目の抽出液として回収した。さらにヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを3回目の抽出液として回収した。最後にヘキサン9 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。1000×g, 5分間スイングローターで遠心し、上清9 mLを4回目の抽出液として回収した。1回目から4回目までの抽出液は1つにまとめて乾燥し、25 mg/mLになるようにヘキサンに溶解した後、2段階目抽出物として-20℃に保存した。条件4との比較のために条件1、条件2についても実施例1と同じ操作で行った。

[0053] 脂質分析

抽出した脂質に含まれるTAGを調べるために実施例1と同じ手順でTLC展開を行った。

[0054] 実験結果

脂質抽出

実施例1で示した条件2の抽出工程順番を入れ替えても抽出可能かどうかを調べるために条件1、条件2、条件4の方法で脂質抽出を行った（図9）。実施

例1と同じく条件1ではコントロールとして従来用いられるクロロホルム・メタノール混合液で抽出を行った。条件2では1段階目としてヘキサンで抽出を行い、沈殿の溶媒を乾燥で除いた後、エタノールで2段階目の抽出を行った。条件4では1段階目としてエタノールで抽出を行い、沈殿の溶媒を乾燥で除いた後、ヘキサンで2段階目の抽出を行った。脂質抽出には通常培地で培養した細胞を用いた。

[0055] 条件1では実施例1と同じく1回目の抽出で濃い緑色の抽出液が得られ、2、3回目と段階的に薄くなっていき、4、5回目の抽出液はほぼ着色していなかった（図10上）。

[0056] 条件2の1段階目のヘキサン抽出では実施例1と同じく1回目の抽出液で濃い緑色の抽出液が得られ、2回目から4回目の抽出液は段階的に薄くなってはいかなかった（図10右中）。1段階目のヘキサン抽出後に2段階目にエタノールで抽出すると実施例1と同じく4回目抽出でも抽出液が緑に着色していた（図10右下）。条件4の1段階目のエタノール抽出では1回目の抽出液で濃い緑色の抽出液が得られ、2回目から5回目の抽出液は段階的に薄くなってはいかなかった（図10左中）。1段階目のエタノール抽出後に2段階目にヘキサンで抽出すると1回目の抽出液で薄い緑色の抽出液が得られ、2回目抽出でほとんど着色がなくなった（図10左下）。条件4の2段階目のヘキサン抽出液は条件2の1段階目のヘキサン抽出液と比べて緑色が薄かった。このことから条件4の2段階目のヘキサン抽出液は条件2の1段階目のヘキサン抽出液よりも色素成分が少なく、効率よくTAGを回収できていることが予想された。また、回収した各脂質重量から2段階抽出の順番を入れ替えても一定量の脂質が回収できることが分かった（表2）。

[表2]

培養	条件	藻体乾燥重量 (mg)	抽出溶媒	抽出脂質乾燥重量 (mg)	残渣乾燥重量 (mg)	藻体重量における脂質重量の比率 (%)
通常	1	65.0	クロロホルム・メタノール	26.06	30.94	40.1
通常	4	65.0	1段階目エタノール 2段階目ヘキサン	1段階目 7.43 2段階目 1.95	48.37	1段階目 11.4 2段階目 3.0
通常	2	65.0	1段階目ヘキサン 2段階目エタノール	1段階目 4.57 2段階目 6.44	46.53	1段階目 7.0 2段階目 9.9

[0057] 脂質分析

各抽出液に含まれるTAGを分析するため、実施例1と同じくTLC分析を行った。図11の結果から条件2では実施例1と同じく1段階目のヘキサン抽出でTAGを全量回収でき、2段階目のエタノール抽出液にはTAGが含まれないことが分かった。2段階抽出の順番を入れ替えた条件4では1段階目のエタノール抽出液にTAGが一部含まれるが、大部分のTAGは2段階目のヘキサンで回収できること、脂質あたりに含まれるTAG量は従来のクロロホルム・メタノール抽出よりも多いことが明らかとなった。

[0058] 以上の脂質分析の結果から、1段階目の溶媒と2段階目の溶媒は順番を入れ替えて使用することも可能であるといえる。順番を入れ替えた場合、2段階目の抽出においては色素の混入が少なく、従来のクロロホルム・メタノール抽出よりもTAGを効率よく回収できることが明らかとなった。

[0059] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0060] 本発明により抽出可能なTAGは燃料や食品として利用され、 ω 3脂肪酸やカロテノイドやオキシリピン類は食品や医薬として利用される。従って、本発明は、燃料、食品、医薬などに関連する産業分野において利用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 藻類から有用成分を抽出する方法であって、以下の工程（1 a）と工程（2 a）、又は工程（2 b）と工程（1 b）を含むことを特徴とする方法、
- （1 a）非極性溶媒を用いて、乾燥させた藻類から第一の有用成分を抽出する工程、
- （2 a）極性溶媒を含む溶媒を用いて、工程（1 a）の抽出後の残渣から第二の有用成分を抽出する工程、
- （2 b）極性溶媒を含む溶媒を用いて、乾燥させた藻類から第二の有用成分を抽出する工程、
- （1 b）非極性溶媒を用いて、工程（2 b）の抽出後の残渣から第一の有用成分を抽出する工程。
- [請求項2] 工程（1 a）と工程（2 a）を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 第一の有用成分が、トリアシルグリセロール及び／又はカロテノイドであり、第二の有用成分が、 ω 3脂肪酸及び／又はオキシリピン類であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 非極性溶媒が、ヘキサンであり、極性溶媒を含む溶媒が、エタノール又はエタノールとヘキサンの混合溶媒であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項5] 藻類が、トリアシルグリセロールを含み、膜脂質に ω 3脂肪酸及びオキシリピン類を含む藻類であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項6] 藻類が、Nannochloropsis属、Microchloropsis属、Monodus属、Fistulifera属、又はPhaeodactylum属に属する藻類であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項7] 第一の有用成分が、トリアシルグリセロール及び／又はカロテノイドであり、第二の有用成分が、 ω 3脂肪酸及び／又はオキシリピン類

であり、非極性溶媒が、ヘキサンであり、極性溶媒を含む溶媒が、エタノール又はヘキサンとエタノールの混合溶媒であり、藻類がNannochloropsis属に属する藻類であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。