

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5371750号  
(P5371750)

(45) 発行日 平成25年12月18日(2013.12.18)

(24) 登録日 平成25年9月27日(2013.9.27)

(51) Int.Cl. F I  
C 1 2 P 9/00 (2006.01) C 1 2 P 9/00

請求項の数 2 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2009-517720 (P2009-517720)	(73) 特許権者	504173471 国立大学法人北海道大学 北海道札幌市北区北8条西5丁目
(86) (22) 出願日	平成20年6月3日(2008.6.3)	(73) 特許権者	503259406 株式会社ロム 北海道札幌市北区新川794-7
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/001394	(74) 代理人	100110766 弁理士 佐川 慎悟
(87) 国際公開番号	W02008/149542	(74) 代理人	100133260 弁理士 小林 基子
(87) 国際公開日	平成20年12月11日(2008.12.11)	(74) 代理人	100145126 弁理士 金丸 清隆
審査請求日	平成23年5月25日(2011.5.25)		
(31) 優先権主張番号	特願2007-148398 (P2007-148398)		
(32) 優先日	平成19年6月4日(2007.6.4)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
微生物の受託番号	NPMD NITE P-68		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物発酵によるDHA含有リン脂質の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

グルコースを含む培地でラビリンチュラ12B株及びラビリンチュラ属微生物よりなる群から選ばれるラビリンチュラ類微生物を増殖させる工程、及び増殖させた前記ラビリンチュラ類微生物を、グルコースを含まない培地でさらに培養する工程を含む、ドコサヘキサエン酸を構成脂質とするリン脂質の製造方法。

【請求項2】

強制通気を行いながら前記グルコースを含まない培地での培養を行う、請求項1に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高付加価値を有するリン脂質を製造する方法に関する。より詳細には、本発明は、3系不飽和脂肪酸の生産能を有する微生物を用いた、3系不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸(DHA)を構成脂質とするリン脂質の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

3系不飽和脂肪酸、特にエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)は、血中脂質低下作用、脳視覚機能の改善などの生理効果を示すことから、機能性脂質と言われている。いずれもヒトに不可欠の栄養分であるが、食品からの摂取が不足し

がちであるために、必要摂取量を補うためのEPAやDHAを含む健康食品素材あるいはサプリメントが広く市販されている。また、EPAについては、高純度のEPAエチルエステルが脂質低下剤などの医薬としても利用されている。さらに、EPAとDHAを成分とする健康食品が厚生労働省により特定健康用食品として2004年に認可されて以来、EPAやDHAを初めとする3系不飽和脂肪酸の利用と市場は、より一層拡大するものと予想されている。

#### 【0003】

一方、脂肪酸そのものではなく、脂肪酸を構成脂質とするリン脂質についても、種々の有用な生理活性を有することが数多く報告されている。例えば、ホスファチジルセリン(PC)の脳機能改善効果(非特許文献1)、ホスファチジルコリン(PC)の動脈硬化症や神経機能障害の改善効果が、それぞれ報告されている。さらに最近は、健康補助食品への利用を目的として、PSやPCにとどまらず、ホスファチジルエタノールアミン(PE)を含むリン脂質全般が注目を集めている。

10

#### 【0004】

このような背景の下、3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質、例えばDHAを構成脂質とするPCやPE(それぞれをDHA-PC、DHA-PEといい、以下、DHAを構成脂質とするリン脂質全体をDHAリン脂質という)の抗腫瘍性や抗酸化性などの生理機能が、培養細胞を使った系にとどまらず、動物生体を使った系でも明らかになってきている。

#### 【0005】

例えば、Kafrawyら(非特許文献2)によれば、DHA-PC、特にPC1分子中に2分子のDHAをもつもの(DHA/DHA-PC)が癌化した動物細胞(マウス白血球細胞)に選択的毒性を示すことを報告している。したがって、3系不飽和脂肪酸、特にDHAを構成脂質とするリン脂質に対する需要は今後さらに高まっていくと期待される。

20

#### 【0006】

3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の代表的な例であるDHAリン脂質の主な供給源は、イカ(特にムラサキイカの皮)や魚油、あるいはこれらの魚油の給餌により得られる鶏卵(特許文献1)などである。ムラサキイカは、リン脂質を多く含む上、そのリン脂質の50%を占めるホスファチジルコリン(PC)の構成脂質の50%がDHAであり、脂質中のDHAリン脂質の含有比率は高いという特徴を有している。

30

#### 【0007】

しかし、DHAリン脂質の工業的な生産を考えた場合、ムラサキイカや魚油等の海産物をDHAリン脂質の供給源とすることは、漁獲高に依存した供給量の不安定性、季節や気候の変化を原因とする品質の不均一性、海洋汚染を原因とする安全性などの他に、魚油独自の臭気(いわゆる魚臭さ)による最終製品の品質や価値の低下、各種の構造類似の長鎖高度不飽和脂肪酸が魚油中に含まれることによる高い精製コスト等の多くの問題を抱えることになる。また鶏卵は、卵黄脂質の30%がリン脂質であり、リン脂質の含有比率は高いが、総脂質量は低く、また卵黄のエタノール抽出物中のDHA含量は12%程度に過ぎない。

40

#### 【0008】

上記の魚油や鶏卵の利用とは異なる3系不飽和脂肪酸の供給源としては、3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物、特にDHA生産能を有する微生物が知られている。微生物を用いたDHAの製造方法は、アメリカ合衆国等では実用化されており、DHA含有脂質の原料や、高DHA含有飼料等が製品化されている。具体的には、例えば、トラウストキトリウム属、シゾキトリウム属の生育技術(特許文献2)、トロウストチトリアレ類から抽出される3系不飽和脂肪酸の利用技術(特許文献3)等が挙げられる。

#### 【0009】

日本国内においても、ラビリンチュラ類をDHAの供給源として用いる技術は種々開発されている。具体的には、例えば、ラビリンチュラ属の微生物であるS3-2株を利用す

50

る技術（特許文献４～特許文献６）、シゾキトリウム属の微生物であるSR21株およびその利用技術（特許文献７～特許文献９）等が挙げられる。

【0010】

しかし、上記の微生物を用いた方法で製造されるDHAは、いずれもリン脂質の構成脂質ではなく、単なる脂肪（トリグリセリド）の構成脂質としてのDHAであり、DHAリン脂質を構成するものではない。

【0011】

本発明者らは、非光合成性の単細胞微生物であるラビリンチュラ類に属する新規微生物12B株を単離し、これがDHAリン脂質を製造することを見だし、特許出願を行った（特許文献10）。しかしながら、この微生物は、微生物の全脂肪に対して40%を超えるDHAを蓄積するが、DHAリン脂質の含有量は、微生物の全脂肪に対して12～13%程度に過ぎない。

10

【0012】

また、生物材料から調製されるDHAリン脂質のほとんどは、リン脂質分子中に1分子のDHAを持つだけであり、構成脂質としてのDHAの含有量が50%を超える、生物材料由来のリン脂質はほとんど報告されていない。従って、リン脂質中のDHA含量を高めることは、機能性食品の他に、医薬としての利用価値も高めることができる、重要な課題である。

【0013】

【非特許文献1】酒井正士ら、「ホスファチジルセリンと脳機能」、2002年、オレオサイエンス、第2巻、第2号、第23-28頁

20

【非特許文献2】Kafrawy Oら、Cancer Lett.、1998年、第132巻（1-2）、第23-29頁

【特許文献1】特開昭59-39258号公報

【特許文献2】特表平8-202405号公報

【特許文献3】特表平8-509355号公報

【特許文献4】特開2001-275656号公報

【特許文献5】特開2004-298798号公報

【特許文献6】特開2003-000292号公報

【特許文献7】特開平9-000284号公報

30

【特許文献8】特開平10-072590号公報

【特許文献9】特開平10-310556号公報

【特許文献10】特開2006-230403号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、魚油や鶏卵を原料とせず、微生物を用いた3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質、特にDHAを構成脂質とするDHAリン脂質をより簡便に製造する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】

40

【0015】

本発明者らは、ラビリンチュラ類12B株に代表される3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を、炭素源を含む通常の培地で培養するだけでなく、この様な培地で増殖させた微生物を、炭素源を含まない培地でさらに培養することによって、脂質全体におけるDHAリン脂質の含有量ひいてはDHAリン脂質の生産量自体も高めることができることを見だし、下記の各発明を完成した。

【0016】

（1）炭素源を含む培地で3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を増殖させる工程、及び増殖させた前記微生物を、炭素源を含まない培地でさらに培養する工程を含む、3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の製造方法。

50

## 【 0 0 1 7 】

( 2 ) 3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物がラビリンチュラ類微生物又はトロウストチトリアレ類微生物である、( 1 ) に記載の製造方法

## 【 0 0 1 8 】

( 3 ) ラビリンチュラ類微生物がラビリンチュラ 1 2 B 株である、( 2 ) に記載の製造方法。

## 【 0 0 1 9 】

( 4 ) ラビリンチュラ類微生物が、ラビリンチュラ属微生物、トラウストキトリウム属微生物、及びシゾキトリウム属微生物よりなる群から選ばれる、( 2 ) に記載の製造方法。

## 【 0 0 2 0 】

( 5 ) ラビリンチュラ類微生物がラビリンチュラ属 S 3 - 2 株又はシゾキトリウム属 S R 2 1 株である、( 4 ) に記載の製造方法。

## 【 0 0 2 1 】

( 6 ) 3系不飽和脂肪酸がドコサヘキサエン酸である、( 1 ) ~ ( 5 ) の何れかに記載の製造方法。

## 【 0 0 2 2 】

( 7 ) 強制通気を行いながら炭素源を含まない培地での培養を行う、( 1 ) ~ ( 6 ) の何れかに記載の製造方法。

## 【 発明の効果 】

## 【 0 0 2 3 】

本発明の方法によれば、3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を用いて、3系不飽和脂肪酸を構成脂質とする高付加価値のリン脂質を大量に生産することができる。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 2 4 】

本発明にいう3系不飽和脂肪酸としては、リノレン酸、オクタデカテトラエン酸、エイコサテトラエン酸、EPA、DHA酸を挙げることができるが、本発明で好ましい3系不飽和脂肪酸は、EPA又はDHAであり、特に好ましくはDHAである。

## 【 0 0 2 5 】

3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物としては、*Mortierella alpina*などのモルティエレラ (*Mortierella*) 属微生物、*Desmarestia acculeata*などのデスマレスティア (*Desmarestia*) 属微生物、*Crypthecodinium cohnii*等の渦鞭毛藻、ラビリンチュラ (*Labyrinthula*) 類微生物等を挙げることができる。ラビリンチュラ類微生物の具体例としては、ラビリンチュラ科のラビリンチュラ (*Labyrinthula*) 属、例えばラビリンチュラ属 S 3 - 2 株 (受託番号 FERM BP - 7090)、ヤブレッツボカビ科のラビリンチュロイド (*Labyrinthuloides*) 属、コラロキトリウム (*Corallochytrium*) 属、アプラノキトリウム (*Aplanochytrium*) 属、アルトルニア (*Althornia*) 属、ジャポノキトリウム (*Japonochytrium*) 属、ウルケニア (*Ulkenia*) 属、トラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 属、およびシゾキトリウム (*Schizochytrium*) 属、例えばシゾキトリウム属 S R 2 1 株 (受託番号 FERM BP - 5034) 等を挙げることができる。

## 【 0 0 2 6 】

また、本発明者らが単離し、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 5 - 8 に所在する、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センター (NPM D) に平成 17 年 1 月 24 日に受託番号 NITE P - 68 として寄託した、ラビリンチュラ類微生物であるラビリンチュラ 1 2 B 株を挙げることができる。本発明の製造方法において特に好ましい微生物は、このラビリンチュラ 1 2 B 株である。ラビリンチュラ 1 2 B 株の詳細な性状は、特許文献 (特開 2006 - 230403) に記載されている。

## 【 0 0 2 7 】

10

20

30

40

50

本発明の製造方法は、炭素源を含む培地で 3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を培養する工程を含む。この工程における培養は、特別な条件下で行う培養ではなく、利用する 3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物にとって、その細胞数を増加させ、菌体内にトリグリセリドや脂肪酸、リン脂質その他の脂肪を蓄積させることのできる、糖その他の炭素源を含む培地を用いた標準的な条件で行われる培養である。従って、使用する微生物毎に報告されている当該微生物が良好に増殖する培養条件、例えば温度、培地組成、培地の pH、酸素濃度、光、振蕩速度、培養時間等に従い、当該微生物の増殖に好適な炭素源を含む培地を適宜選択して使用すればよい。

【0028】

培地の例としては、ラビリンチュラ科微生物に対しては P Y 培地 (約 50% の塩濃度をもつ人工海水 1L 当りポリペプトン 1g、酵母抽出物 0.5g、Kumonra、Appl. Microbiol. Biotechnol.、2002年、第60巻、第275-280頁)等を、ヤブレッツボカビ科微生物に対しては酵母抽出物 ペプトン ブドウ糖 海水培地 (水 1L 当りそれぞれ 10g、10g、80g、500mL)等を、また渦鞭毛藻に対しては酵母抽出物 ブドウ糖 海水塩培地 (水 1L 当りそれぞれ 2g、9g、25g)等を利用することができる。培地は、液体、固形、または形状保持性を有する半固形の何れかの形状を有していればよい。また、上記培養工程では、培地の形状が固形である場合に、当該培地に添加する水分量の下限を 45% (v/w) 以上とすることが好ましく、水分量の上限を 60% (v/w) 以下とすることが好ましい。特に好ましくは 45~50% の範囲内が好ましい。

【0029】

炭素源は、上記の培地に予め添加する、及び/又は培養と共に培地に炭素源を添加することができる。また炭素源の量は、使用する微生物の細胞数が培養時間と共に増加し、菌体内にトリグリセリドや脂肪酸、リン脂質その他の脂肪を蓄積するに十分な量であればよい。また、上記培養工程では、静置培養または振盪培養の何れかを適宜選択することができる。

【0030】

本発明の製造方法は、上記工程によって増殖させた微生物を、炭素源を含まない培地でさらに培養する工程を含む。以下の推察に拘束されるものではないが、炭素源を含む培地で良好に生育し、3系不飽和脂肪酸を含む多くの脂肪を菌体に蓄えた 3系不飽和脂肪酸生産能を有する微生物を、炭素源を含まない培地で更に培養することによって、菌体に蓄積された脂肪を 3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質へと生物変換させ、リン脂質全体における 3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の含有量ひいては 3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質の生産量自体も高めることができるものと推察される。

【0031】

本発明にいう「炭素源を含まない培地」とは、グルコースやデンプンに代表される糖類だけでなく、米糠やふすま、酢酸やエタノールなどを含め、本発明で使用される微生物が菌体内に蓄積された脂肪に先んじて利用を優先するような炭素源を含まない培地を意味する。また、本発明にいう「炭素源を含まない培地」とは、字句通りに炭素源を全く含まない培地のみを意味するものではなく、微生物をして菌体内に蓄積された脂肪を利用して増殖を行わせ、3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質を生成させることができる限りにおいて、少量の炭素源が含まれる培地も意味するものである。例えば、「炭素源を含む培地」で増殖させた微生物を回収してそのまま利用する際の、いわゆる前培養からの持ち込みとしての炭素源、あるいは培地を構成するペプトンその他の成分に混在する微量の炭素源などを含む培地は、本発明にいう「炭素源を含まない培地」に該当する。

【0032】

上記の意味における炭素源を含まないことの他は、本発明にいう「炭素源を含まない培地」は、微生物の増殖にとって必要あるいは良好な栄養素を含む培地であることが好ましく、その様な培地、培養条件及びそれらの例は、前記の「炭素源を含む」培地と、これを

10

20

30

40

50

用いて微生物を培養して菌体に脂肪を蓄積させるときの培養条件と同じであってよい。また、炭素源を除くその他の培地を構成する成分、組成などは、使用する微生物に応じて、当該微生物に好適な成分や組成を採用して用いればよい。

【0033】

本発明で特に好ましい態様は、微生物としてラビリンチュラ12B株を利用したDHAリン脂質の製造方法である。ラビリンチュラ12B株は、炭素源としてグルコースを含む培地を用いて30℃で培養すると、約15g/Lもの脂質(脂肪酸として)を細胞内に蓄積させることから、炭素源を含まない培地で増殖させる際に、炭素源として利用可能な脂肪(トリグリセリド)を豊富に含んでいる点で有利である。また、炭素源を含む培地で増殖させたラビリンチュラ12B株に蓄積される脂肪酸の40%以上がDHAであり、当該DHAを利用してDHAリン脂質へと変換する上でも、好適な微生物である。

10

【0034】

またラビリンチュラ12B株は、比較的単純な組成からなる培地、例えば50%海水、1%ペプトン、1%酵母エキス、8%グルコースを含む培地(以下、F培地と表す)においても良好に増殖し、製造コストを抑制することができる点でも、本発明において有利な微生物である。

【0035】

ラビリンチュラ12B株を利用したDHAリン脂質の製造方法において、上記のF培地は「炭素源を含む培地」の好適な例として使用することができる。また「炭素源を含まない培地」としては、上記のF培地からグルコースを抜き、他に米糠などの炭素源として利用可能な成分を含まない培地(以下、Z1培地と表す)を好適な例として使用することができる。

20

【0036】

ラビリンチュラ12B株を利用したDHAリン脂質の製造方法としては、適量のF培地にラビリンチュラ12B株細胞を接種し、30℃で24時間~72時間、振蕩培養を行ってラビリンチュラ12B株を増殖させた後、この培養液の一部を、あるいは培養液から遠心分離等で回収した細胞を適量のZ1培地に加え、さらに30℃で24時間~72時間培養を行うことを例示することができる。この方法により、F培地で培養を終了した時点に比べて、ラビリンチュラ12B株の細胞内にDHAリン脂質をより多く含ませることができる。特に、「炭素源を含まない培地」における培養工程は、強制通気を行いながら培養することが好ましい。

30

【0037】

本発明の製造方法は、上記の工程で得られた3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質を菌体から抽出ないし回収する工程、さらに必要に応じて当該リン脂質を精製する工程を含んでもよい。微生物菌体内に蓄積したリン脂質の回収並びに精製は、例えばBlighら(Can. J. Biochem. Physiol., 1959年、第37巻、第911-917頁)に記載の方法に従って行うことができる。

【0038】

また、本発明によって製造される3系不飽和脂肪酸を構成脂質とするリン脂質は、そのまま食品、食品添加物、飼料用添加物、医薬品等として用いることができ、また食品、サプリメント、飼料、医薬品又はこれらの原料に添加して利用してもよい。

40

【実施例】

【0039】

本発明について、実施例を示してさらに詳しく説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではなく、当業者は本発明の範囲を逸脱することなく、種々の変更、修正、および改変を行うことができる。なお、以下の実施例では、重量%は単に「%」と記載する。

【0040】

<実施例1>

B<sub>y</sub>+培地(0.1%ペプトン、0.1%酵母エキス、0.5%ブドウ糖、50%海水

50

、1.0%寒天)を含む寒天平板培地で保存しているラビリンチュラ12B株細胞の1白金耳(約1mg)を、10mLのF培地(50%海水、1%ペプトン、1%酵母エキス、8%グルコース)に接種し、30℃で72時間培養した。培養後の培養液の濁度(OD<sub>600</sub>)は約3.6であった。この培養液4mLを、Z1培地(F培地からグルコースを除いた培地)25mLに接種し、30℃で48時間、培養を行った。培養中は経時的に培養液のOD<sub>600</sub>を測定し、また培養終了後の細胞の乾燥重量、乾燥細胞から抽出した全脂質の量、全脂質中のTGの量、リンの量、リンの量から算出されるリン脂質量と全脂質に対する比、及び全脂質脂肪酸中のDHAの含量を求めた(表1)。

#### 【0041】

1白金耳のラビリンチュラ12B株細胞は、乾燥重量に換算して約0.5mgの菌体重量に相当する。この菌体を10mLのF培地に接種し、72時間培養した場合の菌体の乾燥重量は、OD値から換算して24.6mgとなる。一方、1白金耳のラビリンチュラ12B株細胞を10mLのZ1培地へ直接接種して72時間30℃で培養したが、培養終了時のOD値から換算した細胞の乾燥重量は16.3mgであり、F培地で培養した場合の7%であった。このことから、Z1培地を用いて直接培養を行ったときのラビリンチュラ12B株の増殖性は極めて低いと考えられる。

#### 【0042】

一方、F培地で72時間培養した培地4mLに含まれるラビリンチュラ12B株細胞の乾燥重量(換算値)は90.6mgであるが、これを接種したZ1培地で48時間培養して最終的に得られるラビリンチュラ12B株細胞の乾燥重量(換算値)は23.5mgと、2.6倍に増加していた。また、Z1培地を用いた48時間の培養において、細胞から抽出される全脂質量は38.8mgから22.0mgへと約43%減少し、全脂質中のTG(脂肪酸量として)は66.8%から5.4%へと減少していた。

#### 【0043】

これらの結果は、炭素源を含まないZ1培地における培養によって、ラビリンチュラ12B株細胞に蓄積されていた内在性脂質、特にTGが、ラビリンチュラ12B株の増殖のために消費されたことを示唆していると考えられる。

#### 【0044】

その一方、Z1培地で48時間培養後のラビリンチュラ12B株細胞の細胞内全脂質中のリン脂質量(リンの量からの換算値)は、5.0mgから14.8mgへと約3倍増加し、全脂質中のリン脂質量は12.9%から67.3%へと約5倍増加した。また、全脂質中のDHAの含量は、F培地で培養した細胞では44.7%であるのに対して、Z1培地で培養した細胞では培養時間に応じて増加し、48時間培養した場合は約57%であり、ラビリンチュラ12B株細胞において、リン脂質の構成脂質としてのDHA含量の上昇したことを示す。

#### 【0045】

##### <実施例2>

実施例1と同様にラビリンチュラ12B株細胞を培養したF培地の培養液4mLを、Z1培地のペプトンと酵母エキスを2%としたZ2培地、及びZ1培地のペプトンと酵母エキスを4%としたZ4培地各25mLに接種し、30℃で48時間培養した。培養後の濁度、回収された細胞の乾燥重量、乾燥細胞から抽出した全脂質量、全脂質中のリン量、リン量から算出されるリン脂質量とそれらの比及びDHA含量を求めた(表1)。リン脂質の定量はホスファチジルセリン(シグマ)を標準品として無機リン量を定量することにより求めた。

#### 【0046】

その結果、ペプトン、酵母エキスの含量を高めることでラビリンチュラ12B株細胞の細胞収量は増加し(Z1培地で23.5mg、Z2培地で24.3mg、Z4培地で33.9mg)、Z4培地では、接種時(F培地で培養した培養液4mL中の細胞乾燥重量90.6mg)の約4倍となった。また、全培養終了後の細胞から回収される全脂質量は、Z2培地とZ4培地でそれぞれ28.5mgと40.0mgであった。

10

20

30

40

50

## 【0047】

また、Z2培地、Z4培地で培養したラビリンチュラ12B株の細胞全脂質中のリン脂質含量はそれぞれ14.9mg、20.8mgであり、Z1培地で培養した場合の14.8mgよりも増加したが、割合はZ2培地、Z4培地でそれぞれ52.3%及び52.0%であり、Z1培地の場合の67.3%より低下した。また、全脂質に占めるTGの割合もZ培地のペプトンや酵母エキスの濃度が上昇するにつれて増加した。

## 【0048】

すなわち、Z培地のペプトンや酵母エキス濃度を上げることは、全脂質に対するリン脂質の割合は低下させるが、細胞の増殖量の増加によってリン脂質の生産量を高めることが確認された。

10

## 【0049】

<実施例3>

Z1培地に、1mM  $K_2PO_4$ 、1mM  $K_2PO_4$ と1mMセリン、1mM  $K_2PO_4$ と1mMエタノールアミンをそれぞれ添加した培地(以下、それぞれZ1p、Z1ps、Z1paと表す)を用意し、実施例1と同様の培養を行って、培養後の濁度、回収された細胞の乾燥重量、乾燥細胞から抽出した全脂質量、全脂質中のリン量、リン量から算出されるリン脂質量とそれらの比及びDHA含量を求めた。

## 【0050】

その結果、Z1psにおいてリン脂質量の増加(15.2mg)が認められた。この結果は培地に無機リン及びアミノ酸を添加することにより、リン脂質の生産量を増加させることができることが確認された。

20

## 【0051】

上記実施例1~3における分析結果を表1に示す。

## 【0052】



【表 1】

ラビリンチュラ 1 2 B株の増殖、リン脂質含量、及びDHA含量に対する培地組成及び培養時間の影響

	培地								
	F	Z1	Z1	Z1	Z2	Z4	Z1	Z1	Z1
ブドウ糖	+ <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
エタノールアミン							-	+	-
セリン	-	-	-	-	-	-	-	-	+
培養時間 (h)	72	8	24	48	48	48	48	48	48
培養液の濁度 (600 nm) 0 タイム/培養 終了時	0.2 <sup>b</sup> / 36.7	4.87 / 27.2 <sup>c</sup>	5.20 / 21.7 <sup>c</sup>	4.9 / 22.0 <sup>c</sup>	4.8 / 19.3 <sup>c</sup>	5.0 / 22.6 <sup>c</sup>	5.4 / 22.7 <sup>c</sup>	4.81 / 19.5 <sup>c</sup>	4.75 / 23.0 <sup>c</sup>
F 培地での培 養終了時の細 胞乾燥重量 (mg / 4 ml)	90.6								
Z 培地での培 養終了時の細 胞乾燥重量 ( mg / 129 ml)		140	249	235	243	339	205	172	233
細胞密度 (mg/ml)	22.7	4.8	8.6	8.1	8.4	11.7	7.1	5.9	8.0
乾燥菌体に由 来する全脂 質量 (mg)	38.8	32.0	39.7	22.0	28.5	40.0	22.2	18.6	25.5
全脂質に由来 するTG <sup>d</sup> (mg)	25.9	ND <sup>e</sup>	12.5	1.2	6.2	13.9	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
TG / 全脂質 (%)	66.8	ND <sup>e</sup>	48.6	5.4	21.8	34.8	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>
全脂質に由来 するリン脂質 <sup>f</sup> (mg)	5.0	8.7	11.3	14.8	14.9	20.8	10.5	11.1	15.2
リン脂質 / 全 脂質 (%)	12.9	27.2	28.5	67.3	52.3	52.0	47.3	59.7	59.6
リン脂質 / 細 胞の乾燥重量 (%)	5.5	6.2	4.5	6.3	6.1	6.1	6.5	6.5	6.5
DHA / 全脂 質脂肪酸 (%)	44.7	47.2	53.3	56.5	55.3	55.4	ND	ND	ND

a : + ; 含まれている、- ; 含まれていない。

b : 一白金耳相当の細胞を 1 0 m L の F 培地に懸濁した際の OD<sub>600</sub> の値。

c : 一部の細胞が凝集しているため正確な OD<sub>600</sub> は得られない。凡その値を示している。

d : 全脂質を TLC により一次展開して TG のスポットをメタノリシスした。TG の量は脂肪酸として定量した。

e : ND ; 分析していない。

f : 全脂質中のリン量を定量し、リン脂質量に換算した。

## 【 0 0 5 3 】

## &lt; 実施例 4 &gt;

1 ) B Y + 培地の寒天プレートに保存しているラビリンチュラ 1 2 B 株の細胞の 1 白金耳分を 5 0 0 m L フラスコ中の 2 0 0 m L の F 培地に接種し、3 0 、 3 日間前培養を行っ

10

20

30

40

50

た。この前培養液 100 mL を、625 mL の Z1 培地 / 2.5 L 容積のジャーファーマンター（JF：東京理科器械社製）に加え、JF の上部空間（ヘッドスペース）に対して通気（1000 mL / 分）しながら、30℃、攪拌速度 300 rpm で 24 時間培養した。この培養条件によって、消泡剤を使用することなく培養液の発泡による損失を抑制することができる。培養液 30 mL を回収し、細胞の乾燥重量、全脂質量、全リン脂質量を求め、全培養液当りに換算した。DHA 含量の含量は、全脂質をメタノリシス後、GC により求めた。また、容器をフラスコとし、通気を行わずに培養時間を 48 時間とした以外は上記と条件で培養したフラスコ培養を対照として用意した。

【0054】

上記の培養条件において、培養後の培養液の細胞濃度は 5.7 mg / mL となり、時間当りのリン脂質量は 565 μg / mL / 24 時間であった。この値は、対照（フラスコ培養：225 μg / mL / 24 時間）の約 2 倍であった。

10

【0055】

2) JF の攪拌速度を 500 rpm とした他は上記 1) と同じ条件で培養を行ったところ、培養後の培養液の細胞濃度は 6.9 mg / mL に達し、時間当りのリン脂質量は 642 μg / mL / 24 時間となった。

【0056】

3) JF の上部空間（ヘッドスペース）に加えて、培地中にも通気（110 mL / 分）を行った他は、上記 1) と同じ条件で培養を行ったところ、培養後の培養液の細胞濃度は 7.7 mg / mL となり、リン脂質量の生成速度は 755 μg / mL / 24 時間（対照であるフラスコ培養の約 3 倍）に上昇した。

20

【0057】

上記 1)、2)、3) の結果を表 2 に示す。

【0058】

【表 2】

	対照	J F		
		培養 1)	培養 2)	培養 3)
細胞濃度(mg/mL)	8.1	5.7	6.9	7.7
全脂質/細胞重量 (%)	9.3	12.8	16.2	17.6
全リン脂質/全脂質 (%)	67.3	77.8	57.2	66.9
全リン脂質/細胞重量 (%)	6.3	10	9.3	11.5
全リン脂質(μg/ml培養液/24時間)	225	565	642	755
全脂肪酸当りのDHA量	56	52	45	49

30

【0059】

<分析方法>

上記の実施例における各種の分析は、次に示すとおりに行った。

【0060】

1) 全脂質の抽出

40

乾燥菌体よりクロロホルム - メタノールを用いた定法（非特許文献 11）によって抽出される脂質を全脂質とした。全脂質中の脂肪と極性脂質を分離するために、全脂質サンプル 100 μg を、シリカゲルプレート（メルク社製シリカゲル G60）を用いて 1 次元薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。展開溶媒の組成はヘキサン - エーテル - 酢酸（50 : 50 : 1、体積比）である。展開後、プリムリンをプレートに噴霧し、UV 照射下でスポットの位置を確認した。TG の同定は標準物質と Rf 値の比較により行った。

【0061】

2) リン脂質の同定

全脂質（1 mg）を、クロロホルム - メタノール - 水（65 : 25 : 4、体積比）を展開溶媒 A とした 1 次元展開、次いでクロロホルム - アセトン - メタノール - 酢酸 - 水（5

50

0 : 20 : 10 : 10 : 1, 体積比) を展開溶媒 B とした 2 次元展開による二次元 T L C を行い、極性基に特異的な試薬を吹きつけた。対象となるスポットをプレートからかきとり、クロロホルム - メタノール混液を用いてリン脂質を抽出した。リン脂質の同定は、T L C プレート上での検出試薬との反応性、及び抽出物とリン脂質標準物質との異なる 3 種類の展開溶媒 ( 展開溶媒 A、B 及びクロロホルム - メタノール - アンモニア水 ( 50 : 20 : 10、体積比) からなる溶媒 C ) を用いた 1 次元 T L C における R f の比較により行った。

#### 【 0 0 6 2 】

F 培地で 30、72 時間培養後、及び Z 1 培地で 30、48 時間培養後のラビリンチュラ 1 2 B から抽出した全脂質の 1 次元 T L C の結果を、図 1 に示す。スポット 1 が T G、スポット 2 が遊離脂肪酸である。原点 ( スポット 3 ) が極性脂質である。T G、遊離脂肪酸、極性脂質、及びそれ以外の中性脂質の脂肪酸量を基にした割合を表 2 に示す。

#### 【 0 0 6 3 】

##### 【表 3】

F 培地及び各種 Z 培地で培養したラビリンチュラ 1 2 B 株細胞の脂質組成と D H A 含量

培地	全脂質中の割合 <sup>a</sup> 、% (DHA の割合、%)			
	F	Z × 1	Z × 2	Z × 4
T G	88.4 (40.8)	12.7 (52.6)	34.7 (58.8)	38.8 (42.5)
遊離脂肪酸	0 <sup>b</sup>	9.3 (28.8)	12.6 (29.7)	5.5 (40.6)
極性脂質 <sup>c</sup>	8.1 (56.4)	72.6 (56.6)	47.4 (57.1)	50.5 (51.5)
その他の脂質	3.5 (32.7)	5.4 (31.7)	5.4 (29.3)	5.2 (36.9)

a : 全脂質は一次元薄層クロマトグラフィにより分離し、それぞれの脂質クラスの量は脂肪酸の量として相対的に表した。

b : 検出されなかった

c : 薄層クロマトグラフィで原点から移動しなかった脂質を極性脂質とした。

#### 【 0 0 6 4 】

F 培地から Z 培地への移行により T G が減少し、遊離脂肪酸と極性脂質の割合が増加した。Z 2 培地、Z 4 培地で培養した場合も Z 1 培地で培養した場合と同様、T G の減少、極性脂質の増加の傾向を示したが、Z 1 培地の場合ほど顕著ではなかった。Z 2 培地を用いて培養した細胞の場合を除いて極性脂質の D H A 含量は T G の D H A 含量を上回っていた。

#### 【 0 0 6 5 】

全脂質の 2 次元 T L C の結果を図 2 に示す。図 2 a はプレートに蛍光物質 ( プリムリン ) を噴霧した後に紫外線照射下で撮影したものであり、図 2 b は図 2 a を模式的に図示したものである。各スポットには図 2 b に示すように番号を付した。各スポットを与える脂質の検出試薬に対する反応性を調べた。脂質 1、2、3、4、6、7、8、9 は D i t t m e r 試薬に陽性であり、リン脂質であることがわかった。これらの脂質の他の検出試薬に対する反応性から、脂質 2 はホスファチジルイノシトール ( P I )、脂質 3 と 4 はホスファチジルコリン ( P C 1 と P C 2 )、脂質 6 と 7 はホスファチジルエタノールアミン ( P E 1 と P E 2 ) と同定された。この結果は、それぞれの標準物質との R f 値の比較によって確認された。P C、P E とともに 2 つのスポットを与えるのは、構成する脂肪酸 ( 特に D H A の含量) が異なるためであると考えられる。他のリン脂質を含む極性脂質は未同定である。0 は原点をあらわし、スポット 5 と番号のないスポットは D i t t m e r 試薬に対して陰性の脂質である。

#### 【 0 0 6 6 】

##### 3) リン脂質の組成と D H A 含量

Z 1 培地で 30、48 時間培養後のラビリンチュラ 1 2 B 株細胞から抽出した全脂質に対して二次元 T L C を行った後、Z 1 培地由来の脂質の全スポットをかきとり、I s t o k o v i c s らの方法 ( C a n . J . M i c r o b i o l . , 1 9 8 8 年、第 4 4 巻、

10

20

30

40

50

第1051 - 1059頁)に従ってリンを定量した。全リン脂質中、PCは61.3%、PEは11.9%、PIは12.5%、その他が14.6%であった。PCとPEについて脂肪酸量を基にした場合、PC1とPC2はそれぞれ46.0%、54.0%であり、PE1とPE2はそれぞれ46.7%、53.3%であった。

【0067】

さらに、既知量(200 μg)の内部標準物質となるheneicosanoic acidとともに定法によってメタノリシスし、脂肪酸メチルエステルをGCにより分析した。PC1とPC2は全脂肪酸の39.2%及び66.8%がDHA、PE1とPE2は全脂肪酸の23.0%、33.3%がDHAであった。PIのDHA含量は20.9%であった。このことからDHAがPC、特にPC2の構成脂質であることが分かった。計算で求めた全PC、全PEのDHA含量はそれぞれ54.0%と28.4%であった。以上の結果を表3に示す。なお、表3のリン脂質のDHA含量の値は、Z1培地で培養した細胞に由来する全脂質のDHA含量56.5%(表1)や極性脂質のDHA含量56.6%、TGのDHA含量(52.6%)に比べると低いが、これはTLCあるいはGCの過程で多価不飽和脂肪酸の分解が起きているためである。

【0068】

【表4】

Z1培地で48時間培養したラビリンチュラ12B株細胞のリン脂質組成とDHA含量及び収量

	全脂質に対する割合 <sup>a</sup> (%)	全リン脂質に対する割合 <sup>b</sup> (%)	各脂質クラス中での割合 <sup>c</sup> (%)	DHAの含量 (%)	収量 (mg/全培養液(29 ml))
全リン脂質	67.0				14.8
全PC		61.0	(100)	54 <sup>e</sup>	10.8
PC1			46.0	39.2	5.4
PC2			54.0	66.8	5.4
全PE		11.9	(100)	28.4 <sup>f</sup>	2.0
PE1			46.7	23.0	1.0
PE2			53.3	33.3	1.0
全PI <sup>d</sup>		12.5		20.9	
その他のリン脂質		14.6			

a : 全脂質中のリン量を測定してリン脂質量に換算した。

b : 二次元薄層クロマトグラフィによりPCはPC1とPC2、PEはPE1とPE2の2成分(サブクラス)に不完全に分離する。リンの定量の際にサブクラスの区別はしていない。

c : PCとPEのサブクラスをそれぞれ任意に区別して、サブクラスごとの脂肪酸を分析した。PC1とPC2及びPE1とPE2の量比は脂肪酸量を元に計算した。

d : PIは、リンの定量、脂肪酸の分析とも単一の脂質クラスとして行った。

e、f : それぞれPC1及びPC2、PE1及びPE2のDHA含量(%)を元にして計算により求めたDHA含量を示す。

【図面の簡単な説明】

【0069】

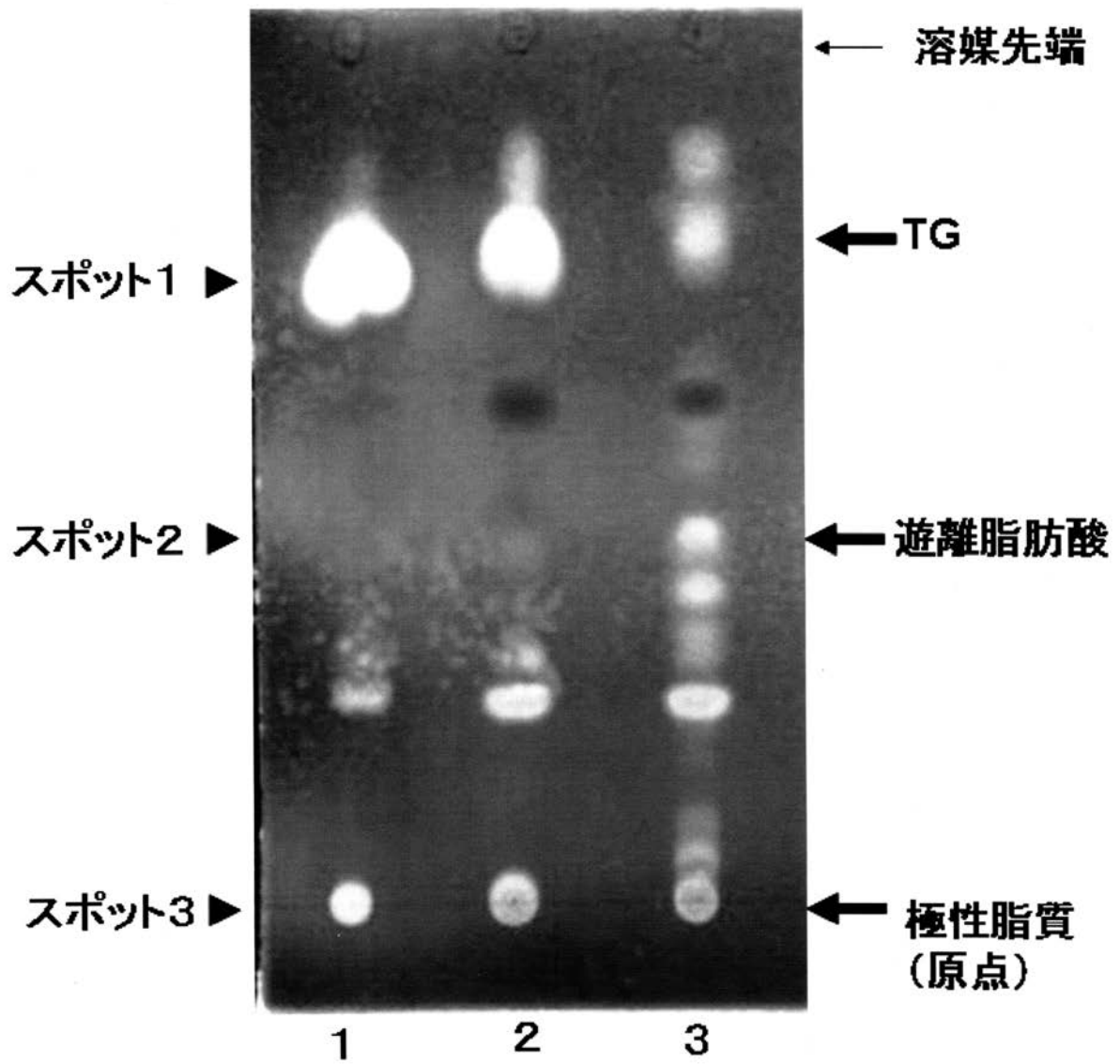
【図1】F培地及びZ1培地で培養したラビリンチュラ12B株細胞の全脂質の1次元TLCのクロマトグラムを示す。レーン1 : F培地で30、72時間後の全脂質(250 μg)、レーン2 : Z1培地で30、24時間培養後の全脂質(250 μg)、レーン3 : Z1培地で30、48時間培養後の全脂質(250 μg)。

【図2a】F培地及びZ1培地で培養したラビリンチュラ12B株細胞の全脂質の2次元

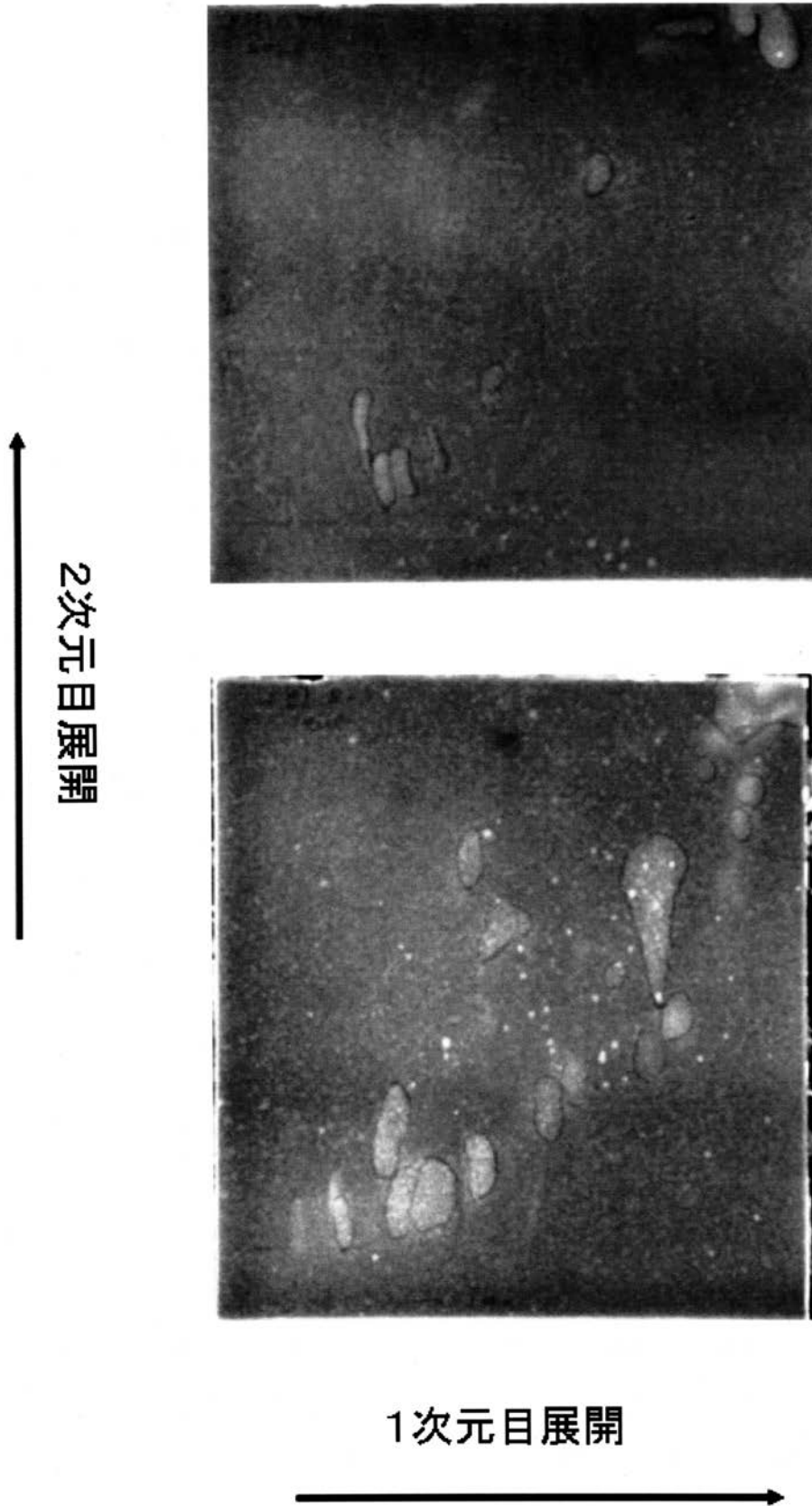
TLCのクロマトグラム（プリムリンを噴霧後、UV照射下で撮影）を示す。パネル上：F培地で30、72時間培養後の全脂質（1mg）、パネル下：Z1培地で30、48時間培養後の全脂質（1mg）。

【図2b】図2aに示すクロマトグラムを模式的に記したものを示す。スポット1から9がリン脂質である。パネル上：F培地で30、72時間培養後の全脂質、パネル下：Z1培地で30、48時間培養後の全脂質。

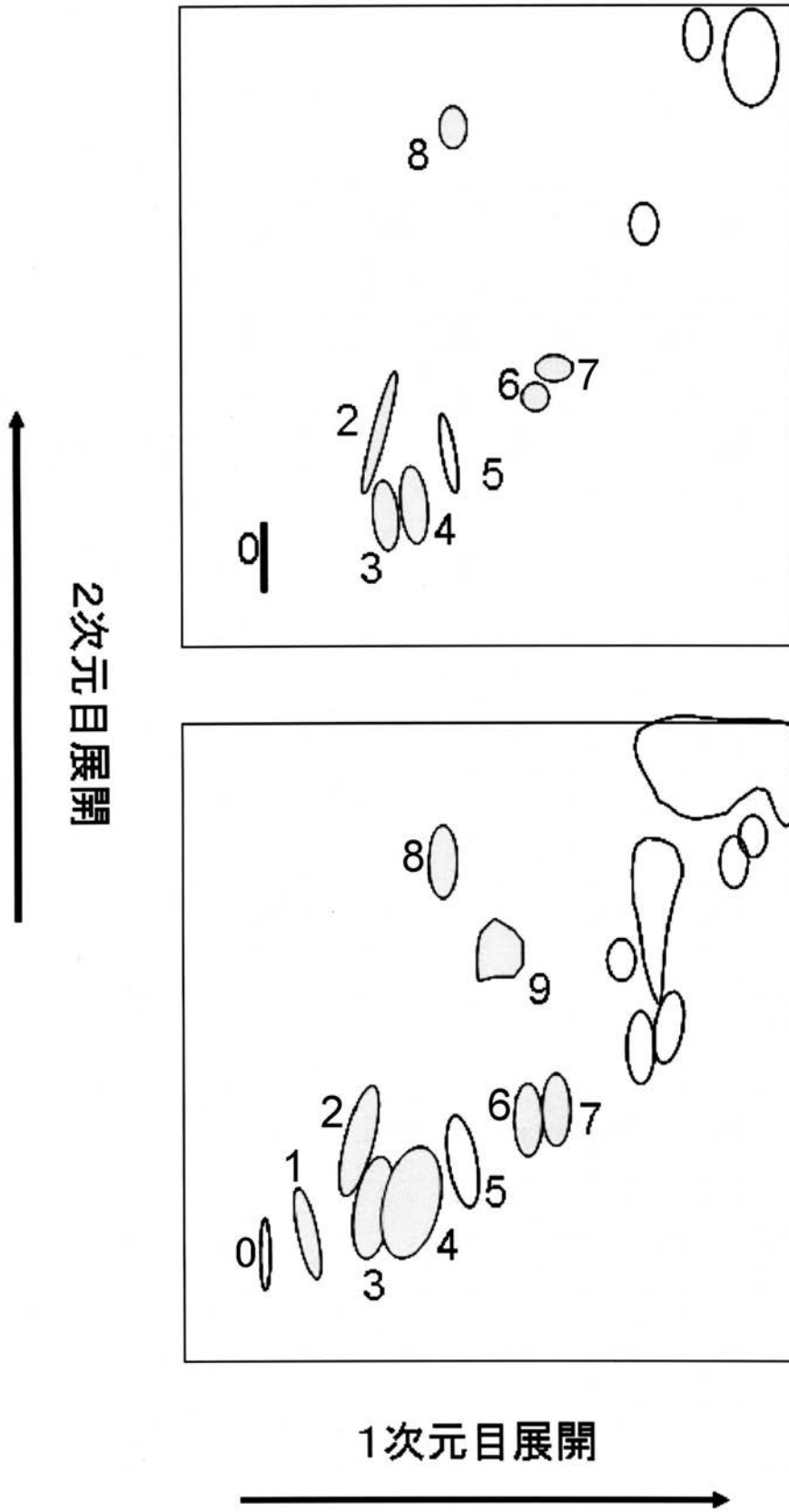
【図1】



【図 2 a】



【図 2 b】





## フロントページの続き

- (72)発明者 奥山 英登志  
北海道札幌市北区北10条西5丁目  
院地球環境科学研究院内 国立大学法人 北海道大学 大学
- (72)発明者 折笠 善丈  
北海道札幌市北区北10条西5丁目  
院地球環境科学研究院内 国立大学法人 北海道大学 大学
- (72)発明者 西田 孝伸  
北海道札幌市北区北10条西5丁目  
院地球環境科学研究院内 国立大学法人 北海道大学 大学

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 特開2006-230403(JP,A)  
特開2004-121019(JP,A)  
特開2005-102680(JP,A)  
特開2001-309779(JP,A)  
特表2005-530519(JP,A)  
国際公開第2005/083101(WO,A1)  
合谷太一 他, 新規高度不飽和脂肪酸生産菌の探索及び培養条件の検討, 第36回油化学討論会  
講演要旨集. 1997, p.160(講演番号:2E13)  
Biotechnology letters. 2006, Vol.28, No.3, p.197-202

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 7/64

C12P 9/00

PubMed

BIOSIS/WPIDS/MEDLINE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)

医学・薬学予稿集全文データベース