

(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
2017年11月16日(16.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/195870 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/16 (2006.01) *A61P 17/16* (2006.01)
A23L 31/10 (2016.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A23L 31/15 (2016.01) *A61Q 5/02* (2006.01)
A23L 33/14 (2016.01) *A61Q 5/06* (2006.01)
A23L 33/175 (2016.01) *A61Q 5/12* (2006.01)
A61K 8/44 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61K 8/9728 (2017.01) *A61Q 19/10* (2006.01)
A61K 31/401 (2006.01) *C12P 13/24* (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)

1-1 サントリー ワールド リサーチセン
ター内 Kyoto (JP). 福井 祐子(FUKUI, Yuko);
〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台 8 丁目
1-1 サントリー ワールド リサーチセ
ンター内 Kyoto (JP). 松岡 龍雄(MATSUOKA,
Tatsuo); 〒6190284 京都府相楽郡精華町精華
台 8 丁目 1-1 サントリー ワールド リ
サーチセンター内 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/017932

(22) 国際出願日: 2017年5月11日(11.05.2017)

(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 2016-096566 2016年5月12日(12.05.2016) JP

(71) 出願人: サントリーホールディングス株
式会社(SUNTORY HOLDINGS LIMITED) [JP/
JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜二
丁目 1 番 4 0 号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 成田 幸彦 (NARITA, Yukihiko);
〒6190284 京都府相楽郡精華町精華台 8 丁目

(74) 代理人: 特許業務法人 安富国際特許事
務所(YASUTOMI & ASSOCIATES); 〒5320003
大阪府大阪市淀川区宮原 3 丁目 5
番 3 6 号 Osaka (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, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,
RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,

(54) Title: L-HYDROXYPROLINE-CONTAINING YEAST CELL OR CELL CULTURE PRODUCT OR EXTRACT OF SAME, USE THEREOF, AND METHOD FOR PRODUCING L-HYDROXYPROLINE

(54) 発明の名称: L-ヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれら
の抽出物及びその用途並びにL-ヒドロキシプロリンの製造方法

(57) Abstract: The yeast cell, cell culture product and extract of the same according to the present invention are a cell of
at least one kind of yeast selected from the group consisting of *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma*
caribbica, *Meyerozyma guilliermondii* and *Clavispora lusitaniae*, a cell culture product thereof and an extract of the same,
characterized in that: the yeast cell, cell culture product or extract of the same as described above contains L-hydroxypro-
line; and the ratio $[100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})]$ of the content ($\mu\text{g/mL}$) of L-hydroxyproline (Hyp) to the total content ($\mu\text{g/mL}$)
of L-proline (Pro) and L-hydroxyproline is 35-100.

(57) 要約: 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、コダマエア・オウメリ
(*Kodamaeaohmeri*)、メチニコピア・ロイカウフィ (*Metschnikowiareukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ
(*Meyerozymacaribbica*)、メイエロザイマ・グリエルモンディ (*Meyerozymaguilliermondii*) 及びクラビス
ポラ・ルシタニエ (*Clavisporalusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もし
しくは菌体培養物又はこれらの抽出物であって、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出
物は、L-ヒドロキシプロリンを含有し、L-プロリン (Pro) 及びL-ヒドロキシプロリン (Hyp) の合計含量 ($\mu\text{g/mL}$) に対するL-ヒドロキシプロリンの含量 ($\mu\text{g/mL}$) の割合 ($100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$) が、35~100であることを特徴とする。

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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：

Ｌ－ヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物及びその用途並びにＬ－ヒドロキシプロリンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、Ｌ－ヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物及びその用途、並びに、Ｌ－ヒドロキシプロリンの製造方法に関する。本発明はまた、Ｌ－ヒドロキシプロリンを製造するための酵母の使用に関する。本発明はまた、酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含有する飲食品、化粧品、化粧品原料及びＬ－ヒドロキシプロリン補強用組成物等に関する。

背景技術

[0002] Ｌ－ヒドロキシプロリン（ヒドロキシーＬ－プロリン）は、Ｌ－プロリンの４位の炭素原子に水酸基が結合した構造を有するアミノ酸である。Ｌ－ヒドロキシプロリンの効能として、線維芽細胞におけるコラーゲン産生促進、表皮細胞の増殖促進、コラーゲンと同等以上の保湿効果、皮膚の老化防止、トリペプチドよりも高い経皮吸収性、しわの改善効果、アトピー性皮膚炎の改善効果等が挙げられる。Ｌ－ヒドロキシプロリンは人体に対して安全であることから、飲食品、化粧品、医薬品等に含有させて使用することができ、その有益性は非常に高い。

[0003] Ｌ－ヒドロキシプロリンは、有機合成法によって製造することができるが、微生物を利用する製造方法も検討されている。例えば特許文献１には、ミヤコグサ根粒菌由来のＬ－プロリン シス－４－ヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチドを宿主細胞に導入して得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中にシス－４－ヒドロキシーＬ－プロリンを生成、蓄積させ、該培養物中からシス－４－ヒドロキシーＬ－プロリンを採取するシス－４－ヒドロキシーＬ－プロリンの製造方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第5506668号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] ところで、酵母は、飲食品分野等で古くから様々な工業的利用が試みられている微生物であり、レーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、レーヒドロキシプロリンの効能が期待される化粧料、飲食品等の原料として有用である。しかしながら、菌体又は菌体培養物中にレーヒドロキシプロリンを蓄積する酵母は、未だ報告されていない。

[0006] 本発明は、レーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物及びその用途、並びに、レーヒドロキシプロリンの製造方法を提供することを主な目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、コダマエア・オウメリ(Kodamaea ohmeri)等のある種の酵母を好気培養すると、その菌体又は菌体培養物中にレーヒドロキシプロリンを蓄積することを見出した。また、得られるレーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、レープロリン(P r o)及びレーヒドロキシプロリン(H y p)の合計重量含量に対するレーヒドロキシプロリンの重量含量の割合($100 \times \text{H y p} / (\text{P r o} + \text{H y p})$)が特定範囲になり得ることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づきさらに研究を行い、本発明を完成するに至った。

[0008] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、コダマエア・オウメリ(Kodamaea ohmeri)、メチニコビア・ロイカウフィ(Metschnikowia reukaufii)、メイエロザイマ・カリビカ(Meyerozyma caribbica)、メイ

エロザイマ・ギリエルモンディ (Meyerozyma guilliermondii) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (Clavispora lusitaniae) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物であって、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、 L-ヒドロキシプロリン を含有し、 L-プロリン (P r o) 及び L-ヒドロキシプロリン (H y p) の合計含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対する L-ヒドロキシプロリン の含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の割合 ($100 \times \text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp})$) が、35～100であることを特徴とする。

[0009] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、 L-ヒドロキシプロリン の含量が $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であることが好ましい。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、 L-ヒドロキシプロリン の含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を、OD660で除した値 ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{OD660}$) が、20以上であることが好ましい。

[0010] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の別の態様は、コダマエア・オウメリ (Kodamaea ohmeri)、メチニコビア・ロイカウフィ (Metschnikowia reukaufii)、メイエロザイマ・カリビカ (Meyerozyma caribbica)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (Meyerozyma guilliermondii) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (Clavispora lusitaniae) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物であって、 L-ヒドロキシプロリン の含量が $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であることを特徴とする。

[0011] 本発明の L-ヒドロキシプロリン の製造方法は、コダマエア・オウメリ (Kodamaea ohmeri)、メチニコビア・ロイカウフィ (Metschnikowia reukaufii)、メイエロザイマ・カリビカ (Meyerozyma caribbica)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (Meyerozyma guilliermondii) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (Clavispora lusitaniae) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、上記

酵母の菌体又は菌体培養物中にＬ－ヒドロキシプロリンを蓄積させる工程を含み、上記窒素源がＬ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源であることを特徴とする。

[0012] 本発明の製造方法においては、上記Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドがコラーゲンペプチドであることが好ましい。上記コラーゲンペプチドの平均分子量は１０００～１００００であることが好ましい。

本発明の製造方法においては、上記好気培養を１０～１００時間行うことが好ましい。

[0013] 本発明は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも１種の酵母の、Ｌ－ヒドロキシプロリンを製造するための使用も包含する。

[0014] 本発明の使用は、上記酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、上記酵母の菌体又は菌体培養物中にＬ－ヒドロキシプロリンを蓄積させることを含み、上記窒素源がＬ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源であることが好ましい。

本発明の使用においては、上記Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドがコラーゲンペプチドであることが好ましい。また、上記コラーゲンペプチドの平均分子量は１０００～１００００であることが好ましい。本発明の使用においては、上記好気培養を１０～１００時間行うことが好ましい。

[0015] 本発明の組成物は、本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含むことを特徴とする。

本発明の飲食品は、本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含むことを特徴とする。

[0016] 本発明の化粧品又は化粧品原料は、本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含むことを特徴とする。

本発明の化粧料又は化粧料原料は、コラーゲン産生促進、表皮細胞の増殖促進、皮膚の保湿、皮膚の老化防止、皮膚のたるみの予防又は改善、皮膚のハリ改善、しわの予防又は改善及びアトピー性皮膚炎の改善から選ばれる用途に用いられることが好ましい。

一態様において、本発明の化粧料又は化粧料原料は、化粧料原料であり、レーヒドロキシプロリン含量が5～300ppmであることが好ましい。

本発明の化粧料又は化粧料原料は、化粧料であり、レーヒドロキシプロリン含量が0.01～20ppmであることも好ましい。本明細書中、ppmは、重量ppmを意味する。

[0017] 本発明のレーヒドロキシプロリン補強用組成物は、レーヒドロキシプロリンを含有する、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含むことを特徴とする。

[0018] 本発明のレーヒドロキシプロリン補強用組成物においては、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、レープロリン (Pro) 及びレーヒドロキシプロリン (Hyp) の合計含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対するレーヒドロキシプロリンの含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の割合 ($100 \times \text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp})$) が、35～100であることが好ましい。また、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、レーヒドロキシプロリンの含量が10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であることが好ましい。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、レーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物及びその用途、並びに、レーヒドロキシプロリンの製造方法等を提供することができる。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、飲食品、化粧料等の原料等として好適に使用

される。

図面の簡単な説明

[0020] [図1] 図1は、HPLCによる培養物サンプルのL-ヒドロキシプロリン含量の測定結果を示す図である。

[図2] 図2は、アミノ酸混合標準液H型及びL-ヒドロキシプロリンを含む0.1N塩酸溶液（各アミノ酸濃度 $20\mu\text{mol/L}$ ）を分析したHPLCチャートである（（a）：Ch1の励起波長350nm、蛍光波長450nmで検出、（b）：Ch2の励起波長266nm、蛍光波長305nmで検出）。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明の実施形態について具体的に説明する。しかしながら、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を変更しない範囲において適宜変更して適用することができる。

本明細書中、酵母の属種は、The Yeasts, a Taxonomic Study Fifth Edition (Elsevier発行、2011年)に記載の属種名で記載した。

[0022] 本発明の第一の態様の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物であって、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、L-ヒドロキシプロリンを含有し、L-プロリン (Pro) 及びL-ヒドロキシプロリン (Hyp) の合計含量 ($\mu\text{g/mL}$) に対するL-ヒドロキシプロリンの含量 ($\mu\text{g/mL}$) の割合 ($100 \times \text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp})$) が、35～100である。

[0023] 本発明の第二の態様の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (

Metschnikowia reukaufii)、メイエロザイマ・カリビカ (Meyerozyma caribbica)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (Meyerozyma guilliermondii) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (Clavispora lusitaniae) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物であって、 4 -ヒドロキシプロリンの含量が $10 \mu\text{g/mL}$ 以上である。以下、本発明の第一の態様及び第二の態様の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を、まとめて本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物ともいう。

- [0024] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、コダマエア・オウメリ (Kodamaea ohmeri)、メチニコビア・ロイカウフィ (Metschnikowia reukaufii)、メイエロザイマ・カリビカ (Meyerozyma caribbica)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (Meyerozyma guilliermondii) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (Clavispora lusitaniae) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物である。本発明における酵母は、上記のいずれかの属種の酵母であればよい。酵母は、1種のみ使用してもよく、2種以上を使用してもよい。上記酵母は、さまざまな寄託機関より入手可能である。寄託機関としては、例えば、独立行政法人製品評価技術基盤機構（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）等が挙げられる。また、自然界から分離することもできる。
- 中でも、本発明における酵母としては、 4 -ヒドロキシプロリン含量が多い点から、コダマエア・オウメリ (Kodamaea ohmeri) が好ましい。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、好ましくは、コダマエア・オウメリ (Kodamaea ohmeri) の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物である。

- [0025] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、 4 -ヒドロキシプロリン (Hyp) を含有する。本発明における 4 -ヒドロキシプロリンは、 4 -ヒドロキシ-L-プロリンである。本明細書中、酵母の菌体もし

くは菌体培養物又はこれらの抽出物に含まれるＬーヒドロキシプロリンは、遊離のＬーヒドロキシプロリンを指す。酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物におけるＬーヒドロキシプロリン含量又は蓄積量は、遊離のＬーヒドロキシプロリン量を指す。その菌体又は菌体培養物中に、遊離のＬーヒドロキシプロリンを蓄積する酵母は報告されていなかった。

[0026] 本発明の第一の態様の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、Ｌープロリン（P r o）及びＬーヒドロキシプロリン（H y p）の合計含量（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）に対するＬーヒドロキシプロリンの含量（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の割合（ $100 \times \text{H y p} / (\text{P r o} + \text{H y p})$ ）が、35～100である。このような酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、Ｌーヒドロキシプロリンの効能が期待される飲食品や化粧料の原料等に好適に使用される。「Ｌープロリン（P r o）及びＬーヒドロキシプロリン（H y p）の合計含量（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）に対するＬーヒドロキシプロリンの含量（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の割合」（ $100 \times \text{H y p} / (\text{P r o} + \text{H y p})$ ）を、以下では「（H y p / （P r o + H y p））割合」ともいう。本明細書中、上記（H y p / （P r o + H y p））割合におけるＬープロリン含量は、酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物に含まれる遊離のＬープロリン含量を指す。好ましい態様において、本発明の第二の態様の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、（H y p / （P r o + H y p））割合が、35～100である。

上記（H y p / （P r o + H y p））割合は、好ましくは40～100であり、より好ましくは50～100であり、より好ましくは60～100であり、さらに好ましくは70～100であり、さらにより好ましくは80～100であり、特に好ましくは90～100である。上記（H y p / （P r o + H y p））割合がこのような酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、H y pの含量割合が高く、Ｌーヒドロキシプロリンの効能が期待される飲食品や化粧料の原料等として特に好適である。

[0027] 本発明の第二の態様の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は

、 L -ヒドロキシプロリンの含量が $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上である。本発明の第一の態様の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、 L -ヒドロキシプロリンの含量が $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であることが好ましい。 L -ヒドロキシプロリンの含量が上記範囲である酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、 L -ヒドロキシプロリンの効能が期待される飲食品や化粧料の原料等として好適である。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の L -ヒドロキシプロリンの含量は、 $15\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であることがより好ましく、 $17\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上がより好ましく、 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上がより好ましく、 $30\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上がさらに好ましく、 $40\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上がさらに好ましく、 $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上がさらに好ましく、 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上がさらに好ましく、 $150\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上がさらに好ましく、 $200\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上が特に好ましく、 $250\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上が特に好ましく、 $300\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上が特に好ましい。

酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の L -ヒドロキシプロリンの含量の上限は特に限定されず、多い方が好ましいが、通常、 $6000\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であり、 $3000\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下又は $2000\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であってもよい。

本発明によれば、酵母の菌体又は菌体培養物に由来する L -ヒドロキシプロリンの含量が、上記範囲である酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を提供することができる。

[0028] 酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物中の L -プロリンの含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 及び L -ヒドロキシプロリンの含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定することができる。酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物が菌体を含む場合には、加熱等による自己消化や酵素分解処理等により菌体を破碎し、菌体内容物を溶出したものを用いて、 L -プロリン及び L -ヒドロキシプロリンの含量を測定する。例えば、メルカプトプロピオン酸、 α -フタルアルデヒド (OPA) で1級アミノ基を誘導体化後クロロ蟻酸-9-フルオレニルメチル (FMOCl

）により２級アミノ酸を誘導体化して、ＨＰＬＣにより分析する方法（励起波長２６６ｎｍ、蛍光波長３０５ｎｍで検出）により、Ｌープロリン及びＬーヒドロキシプロリンを定量することができる。Ｌープロリン及びＬーヒドロキシプロリン含量の測定方法及びＨＰＬＣの測定条件等は、実施例に記載の方法及び条件等を採用すればよい。

[0029] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、上記の酵母を液体培地中で好気培養し、必要に応じて菌体破碎等を行って得られるものである。

酵母の菌体培養物は、酵母の菌体及び／又は培養上清を含むことが好ましく、酵母の菌体内容物を含んでいてもよい。酵母の菌体は、生菌であってもよく、死菌であってもよい。酵母の菌体及び／又は培養上清を含む菌体培養物として、上記酵母を好気培養して得られる酵母の菌体（培養菌体）及び培養上清を含む菌体培養液、該菌体培養液から酵母の菌体を集菌したもの（菌体）、又は該菌体培養液から菌体を除去した培養上清が挙げられる。菌体培養液の培養上清を、単に培養上清という。菌体培養物は、好ましくは、酵母の菌体及び培養上清を含む菌体培養液又は培養上清である。

また、菌体又は菌体培養物の抽出物は、通常、菌体内容物を含み、菌体内容物及び培養上清を含むことが好ましい。菌体又は菌体培養物の抽出物として、菌体又は菌体を含む菌体培養物（好ましくは菌体培養液）に、自己消化処理や酵素分解処理等の菌体破碎処理を行って、酵母菌体内容物を培養液中等に溶出したもの（菌体破碎物）、菌体破碎処理を行った菌体又は菌体培養物（菌体破碎物）から菌体残渣を除去したものが挙げられ、好ましくは、菌体破碎処理を行った菌体培養液（菌体破碎物）又は該菌体破碎物から菌体残渣を除去して得られる、菌体内容物及び培養上清を含む抽出物である。

[0030] 上記のように、本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、通常、上記酵母を液体培地中で好気培養して得られる酵母の菌体及び培養上清を含む菌体培養液に、必要に応じて集菌、菌体破碎等の処理を行って調製される。

本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物に含まれるＬーヒドロキシプロリンは、上記の好気培養により得られる酵母の菌体又は菌体培養物に由来することが好ましい。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物に含まれるＬーヒドロキシプロリンは、上記の好気培養前には実質的に存在しないことが好ましい。

本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、例えば、化粧料、酒類を含む飲食品等の原料として好適に使用することができるものである。

[0031] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、Ｌーヒドロキシプロリンの含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を、OD 660 で除した値 ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{OD 660}$) が、20 以上であることが好ましい。Ｌーヒドロキシプロリンの含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を、OD 660 で除した値 ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{OD 660}$) を、以下、 $\text{Hyp}/\text{OD 660}$ 値ともいう。 $\text{Hyp}/\text{OD 660}$ 値が高いほど、細胞あたりのＬーヒドロキシプロリンの含量が多いため好ましい。酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の $\text{Hyp}/\text{OD 660}$ 値の上限は特に限定されず、多いほど好ましいが、通常、300 以下である。 $\text{Hyp}/\text{OD 660}$ 値は、25 以上であることがより好ましく、30 以上がさらに好ましく、40 以上がさらに好ましく、50 以上が特に好ましく、60 以上が特に好ましく、80 以上が最も好ましい。

[0032] OD とは optical density の略で、光学密度を指す。OD は、細胞の濃度などを表す。一般的には 600 nm 又は 660 nm の波長の可視光に対する吸光度 OD 600 又は OD 660 を測定する（バイオ実験イラストレイテッド▲7▼使おう酵母 できる Two Hybrid、秀潤社、2003 年発行）。

$\text{Hyp}/\text{OD 660}$ 値の計算に使用される OD 660 は、菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の調製に用いた、菌体及び培養上清を含む菌体培養液（菌体及び培養上清を含む菌体培養物）の 660 nm の吸光度である。より具体的には、上記の酵母を液体培地中で好気培養して得られる酵母の菌

体培養液をそのまま菌体培養物とする場合には、OD 660は、該菌体培養液（菌体培養物）の吸光度OD 660である。酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物が、酵母の菌体を破砕して菌体内容物を溶出させた菌体又は菌体培養物の抽出物の場合には、OD 660は、その調製に使用した菌体培養液（菌体破砕前の酵母の菌体及び培養上清を含む菌体培養液）の吸光度OD 660である。OD 660は、例えば、分光光度計により測定することができる。

[0033] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、エタノール含量が1 v / v %以下であることが好ましい。エタノール含量が1 v / v %以下であると、各種飲食品や化粧料等の原料として特に好適に使用することができる。エタノールが1 v / v %を超えると、酵母の増殖などに悪い影響がある場合がある。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物のエタノール含量は、より好ましくは0.8 v / v %以下であり、さらに好ましくは0.5 v / v %以下である。エタノール含量は、公知の方法により測定することができる。

[0034] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の形態は特に限定されないが、例えば、ペースト状、懸濁状、エキス状、液状等が挙げられる。

本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、後述するように化粧料、飲食品等の原料として好適に使用することができるものである。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を乾燥等により粉末化して使用することもできる。

[0035] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養し、必

要に応じて菌体破碎等することにより、得ることができる。より具体的には、窒素源は、Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む。

上記酵母を、炭素源及びＬ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、該酵母の菌体又は菌体培養物中にＬ－ヒドロキシプロリンが蓄積し、Ｌ－ヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体又は菌体培養物が得られる。上記酵母を、炭素源及びＬ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源を含有する液体培地中で好気培養することにより、該酵母の菌体又は菌体培養物中にＬ－ヒドロキシプロリンを蓄積させる工程を含む方法は、上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の製造方法、又は、Ｌ－ヒドロキシプロリンの製造方法として好ましい。

[0036] 本発明のＬ－ヒドロキシプロリンの製造方法は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukauffii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも１種の酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、上記酵母の菌体又は菌体培養物中にＬ－ヒドロキシプロリンを蓄積させる工程（以下、Ｈｙｐ蓄積工程ともいう）を含む。上記窒素源は、Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源である。

本発明の製造方法は、所望によりＨｙｐ蓄積工程以外の工程を有してもよい。例えば、後述する前培養工程、集菌工程、菌体破碎工程等の１又は２以上の工程を有していてもよい。

[0037] 本発明のＬ－ヒドロキシプロリンの製造方法においては、上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を得ることができる。

上記Ｈｙｐ蓄積工程を行うことにより、Ｌ－ヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体又は菌体培養物が得られる。得られる酵母の菌体又は菌体培養物は、通常、上記（Ｈｙｐ／（Ｐｒｏ＋Ｈｙｐ））割合が３５～１００である

。また、H y p 蓄積工程により得られる酵母の菌体又は菌体培養物は、通常、L-ヒドロキシプロリンの含量が $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上である。このような酵母の菌体又は菌体培養物は、上述した本発明の酵母の菌体又は菌体培養物として使用できる。また、得られた菌体又は菌体培養物に、所望によりさらに菌体破碎処理等の処理を行って、L-ヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体又は菌体培養物の抽出物を調製することもできる。

H y p 蓄積工程を含むL-ヒドロキシプロリンの製造方法は、上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の製造方法としても好ましい。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を得る場合、H y p 蓄積工程及びその好ましい態様は、L-ヒドロキシプロリンの製造方法におけるH y p 蓄積工程及びその好ましい態様と同じである。

[0038] H y p 蓄積工程において、酵母の液体培地への添加方法は、炭素源及び窒素源を含有する液体培地中に直接少量の菌体を接種することで増殖させることができるが、短期間で菌体濃度を上昇させるためには、前培養した菌液を接種することが好ましい。前培養に用いる培地は特に限定されず、H y p 蓄積工程（通常、本培養）で使用される液体培地と同じ培地でもよく、酵母に使用することができる公知の培地を使用してもよい。前培養の時間は、通常10～72時間であり、好ましくは12～48時間である。前培養温度は、15～40℃とすることが好ましい。前培養した菌液を接種する量としては、通常、H y p 蓄積工程で使用する培地量の $1/100000 \sim 1/2$ であり、 $1/1000 \sim 1/10$ が好ましく、 $1/200 \sim 1/10$ がより好ましく、 $1/200 \sim 1/20$ がさらに好ましい。接種量が上記範囲であれば、H y p 蓄積工程において酵母の増殖が速く、L-ヒドロキシプロリンを効率よく蓄積させることができる。

[0039] H y p 蓄積工程で使用する液体培地の窒素源は、L-ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源である。このような窒素源を用いて上記酵母を好気培養すると、菌体又は菌体培養物中にL-ヒドロキシプロリンが蓄積する。このような窒素源は1種のみ使用してもよく、2種以上を使用してもよい。

。Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドは１種であってもよく、２種以上であってもよい。

Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドとは、Ｌ－ヒドロキシプロリンを構成アミノ酸に含むペプチドであればよいが、好ましくは、構成アミノ酸の１０重量％以上がＬ－ヒドロキシプロリンであるペプチドである。一態様において、Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源は、Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドであることも好ましい。

[0040] Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源は、例えば、Ｌ－ヒドロキシプロリン含有タンパク質を加水分解することにより得ることができる。Ｌ－ヒドロキシプロリン含有タンパク質とは、構成アミノ酸にＬ－ヒドロキシプロリンを含むタンパク質であればよいが、好ましくは、構成アミノ酸の１０重量％以上がＬ－ヒドロキシプロリンであるタンパク質である。上記Ｌ－ヒドロキシプロリン含有タンパク質として、コラーゲン性タンパク質等が好ましい。コラーゲン性タンパク質として、例えば、内臓、皮、魚鱗、骨等のコラーゲンを含む組織から調製されるタンパク質；コラーゲン、ゼラチンが挙げられる。コラーゲン性タンパク質の原料由来は特に限定されない。例えば牛由来、豚由来、魚由来等の動物由来のコラーゲン性タンパク質を好適に使用することができる。コラーゲン性タンパク質は、市販品を使用することができる。Ｌ－ヒドロキシプロリン含有タンパク質の加水分解は、酵素等により公知の方法で行うことができる。

[0041] Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源として、例えば、動物由来のペプトンを好適に使用することができる。好ましくは、牛、豚又は魚由来のペプトンであり、より好ましくは牛又は魚由来のペプトンである。本発明の一態様において、ペプトンとして、獣肉ペプトン、心筋ペプトン、ゼラチンペプトンも好ましい。

本発明において使用できるＬ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源の市販品の一例として、例えば、製品名Pepton（＃211677）（Bacto社）等が挙げられる。

[0042] 一態様において、上記Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドは、好ましくはコラーゲンペプチドである。コラーゲンペプチドとは、加水分解コラーゲンを意味し、天然コラーゲンを熱処理して変性させたゼラチン又は天然コラーゲンを加水分解したコラーゲンペプチド、又は、これらを化学的、酵素的に修飾したものの何れであってもよい。加水分解は、酵素、酸、アルカリ等により行うことができ、好ましくは酵素により行われる。好ましくは、天然コラーゲンを熱処理して変性させたゼラチン又は天然コラーゲンを加水分解したコラーゲンペプチドを用いる。コラーゲンペプチドの原料由来は特に限定されない。例えば牛由来、豚由来、魚由来等の動物由来のコラーゲンペプチドを好適に使用することができる。好ましくは、魚由来のコラーゲンペプチドである。コラーゲンペプチドは、市販品を使用することができる。

[0043] 本発明において使用できるコラーゲンペプチドの市販品の一例として、例えば、新田ゼラチン（株）製の「コラーゲンペプチド イクオスHDL－50SP」（製品名）（平均分子量5000）、「コラーゲンペプチドType S」（製品名）（平均分子量1200）、「スーパーコラーゲンペプチドSCP－2000」（製品名）（平均分子量2000）、野洲化学工業（株）製の「コラーゲンペプチドP－5000」（製品名）（平均分子量5000）、「コラーゲンペプチドF－5000」（製品名）（平均分子量5000）、日祥（株）製の「マリンコラーゲンオリゴCF」（製品名）（平均分子量900～1100）、「マリンコラーゲンオリゴMF」（製品名）（平均分子量900～1500）等が挙げられる。中でも、「コラーゲンペプチドType S」（平均分子量1200）、「コラーゲンペプチド イクオスHDL－50SP」（平均分子量5000）等が好ましい。これらの中で、例えば「コラーゲンペプチド イクオスHDL－50SP」、「コラーゲンペプチドType S」、「コラーゲンペプチドF－5000」、「マリンコラーゲンCF」、「マリンコラーゲンオリゴMF」は魚に由来するものであり、「コラーゲンペプチドP－5000」、「スーパーコラーゲンペプチドSCP－2000」は豚に由来するものである。

[0044] 本発明の好ましい実施態様においては、Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源は、好ましくはコラーゲンペプチド（より好ましくは魚由来のコラーゲンペプチド）及び／又はペプトン（好ましくは動物由来、より好ましくは牛、豚又は魚由来、さらに好ましくは牛又は魚由来のペプトン）であり、特に好ましくはコラーゲンペプチドである。このようなＬ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源を使用すると、酵母の菌体又は菌体培養物中のＬ－ヒドロキシプロリンの蓄積量が多くなる。ペプトンは、獣肉ペプトン、心筋ペプトン、ゼラチンペプトンであってよい。

本発明のＬ－ヒドロキシプロリンの製造方法の好ましい実施態様の一例は、上記の酵母を、炭素源、並びに、コラーゲンペプチド及び／又はペプトンを含む液体培地中で好気培養することにより、上記酵母の菌体又は菌体培養物中にＬ－ヒドロキシプロリンを蓄積させる工程を含む。

[0045] 一態様において、Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源は、平均分子量が１００００以下であることが好ましく、例えば、平均分子量が１００～１００００が好ましい。Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドは、平均分子量が１００００以下であることが好ましく、例えば、平均分子量が１００～１００００が好ましい。また、Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドは、分子量が１００００以下であることも好ましい。

コラーゲンペプチドは、平均分子量が１０００～１００００であることが好ましい。平均分子量が上記範囲のコラーゲンペプチドを窒素源に使用すると、菌体又は菌体培養物中のＬ－ヒドロキシプロリンの蓄積量が多くなる。

Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドの平均分子量は、ゲル濾過などにより算出される。コラーゲンペプチドの平均分子量は、通常、写真用ゼラチン試験法（ＰＡＧＩ法）第１０版「２０－２ 平均分子量」に記載されている方法により算出される値である。ペプチドの平均分子量は、重量平均分子量を指す。

[0046] コラーゲンペプチドの平均分子量は、より好ましくは１０００～６０００であり、さらに好ましくは１０００～５５００であり、特に好ましくは１００

0～5000である。このようなコラーゲンペプチドを窒素源に使用すると、菌体又は菌体培養物中のL-ヒドロキシプロリンの蓄積量がより多くなる。また、一態様において、コラーゲンペプチドの平均分子量として、1000～3000がより好ましく、1000～1500がさらに好ましい。本発明の別の好ましい態様においては、コラーゲンペプチドの平均分子量は、2000～5500がより好ましく、3000～5000がさらに好ましい。

[0047] 上記液体培地中のL-ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源の濃度は、通常0.1～10重量%が好ましく、0.25～5重量%がより好ましく、1～5重量%であることがさらに好ましい。上記窒素源の濃度が上記範囲であると、菌体又は菌体培養物中にL-ヒドロキシプロリンが蓄積する。このため、例えば、L-ヒドロキシプロリン含量が10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上である酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を得ることができる。また、(Hyp / (Pro + Hyp)) 割合が35～100である菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を得ることができる。液体培地中の上記窒素源の濃度は、1.5～4.5重量%がさらにより好ましく、2～4重量%が特に好ましい。上記窒素源の濃度は、培養開始時に上記濃度であればよい。一態様において、上記液体培地中のコラーゲンペプチド又はペプトンの濃度が、上記範囲であることが好ましい。

[0048] 上記炭素源は特に限定されないが、例えば、グルコース、フルクトース、スクロース、ラフィノース、マンノース、マルトース、ガラクトース、マンニトール、トレハロース、メレビトース、セロビオース、澱粉、糖蜜、ソルビトール、L-ソルボース、グリセロール、エタノール、グルシトール等の糖質又は糖アルコール；酢酸、クエン酸、又はグルコン酸等の有機酸等が挙げられる。炭素源は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。中でも、炭素源はグルコース、フルクトース、スクロース等の糖が好ましく、グルコースが特に好ましい。

[0049] 液体培地中の炭素源の濃度は、好ましくは0.1～20重量%であり、好ましくは0.5～15重量%であり、より好ましくは1～10重量%であり、

より好ましくは1～5重量%であり、さらに好ましくは2～5重量%である。液体培地中の炭素源の濃度が1重量%以上であると、菌体の増殖速度が速いため好ましい。なお、炭素源の濃度は、培養開始時に上記濃度であればよい。

[0050] 本発明の製造方法においては、炭素源（C）とL-ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源（N）との重量比（C/N）が0.25～2.0であることが好ましい。C/Nの重量比が上記範囲であると、菌体又は菌体培養物中のL-ヒドロキシプロリンの蓄積量が多くなるため好ましい。上記C/Nの重量比は、0.25～5がより好ましく、0.3～3がより好ましく、0.4～1.5がさらに好ましい。C/Nの重量比が上記範囲であると、菌体又は菌体培養物中のL-ヒドロキシプロリンの蓄積量がより多くなる。一態様において、例えばL-ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源（N）にコラーゲンペプチド（好ましくは平均分子量が1000～5000）又はペプトンを使用する場合には、上記C/Nの重量比は0.25～5がより好ましく、0.3～3がさらに好ましく、0.4～1.5がさらに好ましく、0.5～1.3が特に好ましい。別の好ましい態様において、C/Nの重量比は、0.5～2.0も好ましい。上記C/Nの重量比は、培養開始時に上記範囲であればよい。

[0051] 液体培地は、上述した炭素源及びL-ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源以外の成分を含んでもよく、例えば、酵母抽出物（Yeast extract）を含むことが好ましい。酵母抽出物は、通常L-ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含まず、L-ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源には含まれない。酵母抽出物は、酵母の培養に使用できるものであればよく、特に限定されず、市販品を使用することができる。例えば、製品名Bacto yeast Extract(#212750)（Bacto社）等を好適に使用することができる。

酵母抽出物を使用する場合、酵母抽出物の濃度は、液体培地に対して0.1～3重量%が好ましく、0.5～3重量%がより好ましい。酵母抽出物の濃

度は、培養開始時に上記濃度であればよい。

[0052] 一態様において、液体培地の pH は、3～9 が好ましく、4～9 が好ましく、4 を超えて 9 以下がより好ましく、4.5～8.8 がさらに好ましく、5～8.7 が特に好ましい。液体培地の pH は、適宜調整することができる。pH 調整には、公知の酸又はアルカリ剤を使用でき、例えば塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、グルタミン酸、酢酸、酪酸、乳酸、蟻酸、コハク酸、マレイン酸、リンゴ酸、シュウ酸、クエン酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、アンモニア水、グルタミン酸ナトリウム等が挙げられる。

[0053] 培養温度は、15～45℃が好ましく、20～40℃がより好ましく、25～35℃がさらに好ましい。培養温度がこの温度範囲であると、酵母の増殖が速く、菌体又は菌体培養物中のレーヒドロキシプロリンの蓄積量が多くなる。

[0054] 好気培養を行う方法は特に限定されず、菌を接種した液体培地を、例えば、振盪培養又は攪拌培養すればよい。振盪又は攪拌の速度は特に限定されないが、好ましくは 30～600 rpm であり、一態様において、より好ましくは 30～500 rpm であり、さらに好ましくは 50～500 rpm であり、特に好ましくは 50～300 rpm であり、特に好ましくは 50～100 rpm である。また別の好ましい態様において、振盪又は攪拌の速度は、50～600 rpm も好ましく、100～600 rpm がより好ましい。このような速度で振盪培養又は攪拌培養すると、レーヒドロキシプロリンの蓄積量が多くなるため好ましい。より好ましくは、上記速度で振盪培養する。また、所望により滅菌された空気又は酸素でバブリングを行ってもよい。また、培養形式は、回分培養、流加培養、連続培養のいずれでもよいが、回分培養が好ましい。本発明の製造方法においては、静置培養を行ってもよい。

[0055] 培養時間は特に限定されず、適宜設定すればよいが、例えば、好気培養を 10～100 時間行うことが好ましい。培養時間が上記範囲であると、上記酵母の菌体又は菌体培養物中にレーヒドロキシプロリンが蓄積する。また、通

常、 $(\text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp}))$ 割合が 35 ~ 100 である、酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物、 L-ヒドロキシプロリン 含量が $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以上である酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を得ることができる。また、エタノール含量が少ない（例えば、 $1 \text{ v} / \text{v} \%$ 以下）酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物が得られる。培養時間が 10 時間未満であると、 L-ヒドロキシプロリン の蓄積量が少ない場合や、得られる酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の $(\text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp}))$ 割合が 35 未満となる場合がある。培養時間が 100 時間を超えると、得られる酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物のエタノール濃度が $1 \text{ v} / \text{v} \%$ を超える場合がある。また、コンタミネーションが起こりやすくなったり、酵母の死滅後に自己消化による着色等が生じたりする場合がある。培養時間は、より好ましくは 10 ~ 80 時間であり、より好ましくは 12 ~ 72 時間であり、さらに好ましくは 20 ~ 60 時間であり、さらにより好ましくは 24 ~ 55 時間であり、特に好ましくは 24 ~ 50 時間である。

また、本発明の製造方法においては、菌体又は菌体培養物中の L-ヒドロキシプロリン 含量が $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以上となるまで、好気培養を行うことが好ましい。

本発明の製造方法において、好気培養は、通常、本培養として行われるが、前培養であってもよく、前培養及び本培養において好気培養を行ってもよい。

[0056] 上記の好気培養を行うことにより、上記の酵母の菌体又は菌体培養物中に L-ヒドロキシプロリン が蓄積する。菌体培養物は、酵母の菌体及び培養上清を含む菌体培養液であってもよく、酵母の菌体であってもよく、又は、菌体培養液の培養上清であってもよい。 Hyp 蓄積工程を行うことにより、 L-ヒドロキシプロリン を含有し、 $(\text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp}))$ 割合が、35 ~ 100 である酵母の菌体又は菌体培養物を得ることができる。また、 L-ヒドロキシプロリン の含量が $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以上である酵母の菌体又は菌

体培養物を得ることができる。酵母の菌体又は菌体培養物に、例えば菌体破碎処理を行うことにより、酵母の菌体又は菌体培養物の抽出物を得ることができる。

[0057] 本発明においてレーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はその抽出物を調製する場合は、例えば、Hyp蓄積工程で得られる酵母の菌体及び培養上清を含む菌体培養液をそのままレーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体培養物とすることができる。また、菌体培養液から酵母の菌体を集菌し、得られた菌体を酵母の菌体又は菌体培養物としてもよく、菌体培養液から菌体を除去した培養上清を菌体培養物とすることもできる。さらに、上記菌体又は菌体培養液に、必要に応じて菌体を破碎する処理を行って、菌体内容物を培養液中等に溶出させて菌体又は菌体培養物の抽出物を調製することもできる。菌体又は菌体培養物の抽出物の調製においては、菌体を破碎した後、菌体残渣を除去する工程を行ってもよい。また、菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物には、必要に応じて殺菌、加熱等の処理を行ってもよい。本発明の製造方法は、このような集菌工程、菌体破碎工程、菌体残渣除去工程、殺菌工程等の1又は2以上の工程を含んでもよい。

[0058] 菌体培養液から菌体を集菌する方法は特に限定されず、通常行われている方法を採用することができ、例えば、遠心分離等が挙げられる。

上記菌体を破碎する方法は特に限定されず、通常行われている方法を採用することができ、例えば、自己消化法、酵素分解法、アルカリ抽出法等が挙げられる。中でも、自己消化法が好ましい。自己消化法においては、例えば菌体又は菌体培養物を60～180分間、40～60℃で加熱すればよい。自己消化法においては、例えば、95～100℃で5～15分間加熱してもよい。

菌体残渣を除去する方法は特に限定されない。例えば、濾過、遠心分離等の公知の方法により菌体残渣を除去すればよい。

殺菌を行う場合には、酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を

75～90℃（より好ましくは80℃）、45～90分（より好ましくは60分）加熱することが好ましい。菌体残渣除去及び殺菌を行う場合、いずれを先に行ってもよい。

[0059] 本発明において得られる酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物、及び、その好ましい態様は、上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物、及び、その好ましい態様と同じである。本発明の製造方法によれば、例えば、（Hyp／（Pro+Hyp））割合が、35～100であり、かつ、L-ヒドロキシプロリン含量が10μg/mLである酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を製造することができる。

上記方法により得られる酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物に、さらに天然物由来又は合成されたL-ヒドロキシプロリンを添加してもよいが、好ましい態様においては、酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物に含まれるL-ヒドロキシプロリンは、上記のHyp蓄積工程により得られる酵母の菌体又は菌体培養物に由来するL-ヒドロキシプロリンからなる。

[0060] 本発明で得られるL-ヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、後述する飲食品、化粧品等の原料等として使用することができる。また、本発明のL-ヒドロキシプロリンの製造方法においては、得られる酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物から、L-ヒドロキシプロリンを精製する工程を行ってもよい。L-ヒドロキシプロリンの精製は、例えば、カラムクロマトグラフィー等の公知の方法により行えばよい。

[0061] 本発明は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の、L-ヒドロキシプロリンを製造

するための使用も包含する。

[0062] 上記酵母は、 L-ヒドロキシプロリン を含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を製造するためにも好適に使用される。 L-ヒドロキシプロリン を含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、 $(\text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp}))$ 割合が、 $35 \sim 100$ であることが好ましい。 L-ヒドロキシプロリン を含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、 L-ヒドロキシプロリン の含量が $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以上であることも好ましい。また、 L-ヒドロキシプロリン を含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、上述した $\text{Hyp} / \text{OD}_{660}$ 値が 20 以上であることが好ましい。 L-ヒドロキシプロリン を含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の好ましい態様は、上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の好ましい態様と同じである。

[0063] 本発明の使用は、上記酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、上記酵母の菌体又は菌体培養物中に L-ヒドロキシプロリン を蓄積させることを含むことが好ましい。上記窒素源は、 L-ヒドロキシプロリン 含有ペプチドを含む窒素源であることが好ましい。

[0064] 本発明の使用においては、上記 L-ヒドロキシプロリン 含有ペプチドがコラーゲンペプチドであることが好ましい。また、上記コラーゲンペプチドの平均分子量は $1000 \sim 10000$ であることが好ましい。

[0065] 本発明の使用においては、上記液体培地中の L-ヒドロキシプロリン 含有ペプチドを含む窒素源の濃度が $1 \sim 5$ 重量%であることが好ましい。また、炭素源(C)と L-ヒドロキシプロリン 含有ペプチドを含む窒素源(N)との重量比(C/N)が $0.25 \sim 20$ であることが好ましい。一態様において、上記C/N比は $0.5 \sim 20$ であることも好ましい。本発明の使用においては、上記好気培養を $10 \sim 100$ 時間行うことが好ましく、 $10 \sim 80$ 時間行うことがより好ましい。

[0066] 本発明の使用における液体培地、炭素源及び L-ヒドロキシプロリン 含有ペ

プチドを含む窒素源並びにこれらの好ましい態様は、上述したレーヒドロキシプロリンの製造方法におけるものと同じである。また、好気培養の条件及びその好ましい態様も、上述したレーヒドロキシプロリンの製造方法におけるものと同じである。本発明の使用は、上述した集菌工程、菌体破碎工程、菌体除去工程、殺菌工程等の1又は2以上の工程を含んでもよい。

[0067] 上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、化粧品、飲食品、医薬品等の各種組成物に配合することができる。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含む組成物も、本発明に包含される。

本発明の組成物は、上述した本発明の第一の態様及び第二の態様の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物のいずれかを含めばよく、両方を含んでもよい。本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含む組成物は、該酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物に由来するレーヒドロキシプロリンを含む。本発明の組成物として、例えば、化粧品（化粧品組成物）、飲食品（飲食品組成物）、医薬品（医薬品組成物）、医薬部外品（医薬部外品組成物）等が挙げられる。組成物は、これらの原料であってもよい。一態様において、組成物は、化粧品又は飲食品、これらの原料であることが好ましい。

[0068] 本発明の組成物中の上記の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の含量は特に限定されず、該組成物の種類、用途に応じて適宜設定することができる。例えば、組成物に対して、上記の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の固形分換算の含量を0.00001～50重量%とすることが好ましく、0.00005～20重量%がより好ましく、0.0001～10重量%がさらに好ましい。

[0069] 本発明の組成物が化粧品又は医薬品である場合、その剤型は特に限定されず、溶液状、ペースト状、ゲル状、固体状、粉末状等任意の剤型をとることができる。

化粧品は特に限定されず、例えば、クレンジング剤、洗顔料、化粧水、乳液

、クリーム、美容液、育毛剤、オイル、ゲル、シャンプー、ヘアリンス、ヘアコンディショナー、エナメル、ファンデーション、リップスティック、おしろい、パック、香水、パウダー、オーデコロン、ボディソープ、石鹸、入浴剤、日焼け止めクリーム等とすることができる。

[0070] 上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含む化粧料又は化粧料原料は、本発明における好ましい態様の1つである。化粧料及び化粧料原料は、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物以外の成分を含んでいてもよい。化粧料及び化粧料原料には、化粧料に通常配合される種々の成分を配合することができる。例えば、油分、香料、界面活性剤、保湿剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、防腐剤、顔料、色素等を適宜配合することができる。これらの配合比率は適宜選択すればよい。本発明の化粧料原料は、本発明の化粧料を製造するために好適に使用される。

化粧料の用法及び用量は、化粧料の種類等に応じて、適宜決定することができる。

本発明の化粧料又は化粧料原料は、L-ヒドロキシプロリンを含有することから、例えば、コラーゲン産生促進、表皮細胞の増殖促進、皮膚の保湿、皮膚の老化防止、皮膚のたるみの予防又は改善、皮膚のハリの改善、しわの予防又は改善及びアトピー性皮膚炎の改善から選ばれる用途に好適に用いられ、皮膚のハリの改善、及び、しわの予防又は改善から選ばれる用途により好適に用いられる。

[0071] 化粧料中の上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の含量は、化粧料に対して、固形分換算で0.00001～10重量%が好ましく、0.0001～10重量%とすることが好ましく、0.0001～5重量%がより好ましく、0.001～5重量%がより好ましく、0.01～3重量%がさらに好ましく、0.05～2重量%が特に好ましい。また、別の好ましい態様において、化粧料中の上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の含量は、化粧料に対して、固形分換算で0.00005～1重量%がより好ましく、0.0001～0.5重量%がさらに好ましい。

化粧料原料中の上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の含量は、化粧料原料に対して、例えば、固形分換算で0.001～20重量%が好ましく、0.01～10重量%がより好ましく、0.05～5重量%がさらに好ましく、0.1～2重量%が特に好ましい。化粧料原料中のＬ－ヒドロキシプロリン含量は、例えば、5～300ppmが好ましく、10～200ppmがより好ましく、50～100ppmがさらに好ましい。一態様において、化粧料中のＬ－ヒドロキシプロリン含量は、例えば、0.01～20ppmとすることができ、0.03～15ppmが好ましく、0.05～10ppmがより好ましい。Ｌ－ヒドロキシプロリン含量が上記の範囲となるように、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を配合することが好ましい。

[0072] 本発明の組成物が飲食品（飲食品組成物）である場合、飲食品は特に限定されない。飲食品の形態は、液状、半液体状又は固体状、ペースト状のいずれであってもよく、例えば、一般的な飲食品、健康食品、機能性食品等のいずれでもよい。

一般的な飲食品は特に限定されず、酒類も含まれる。健康食品とは、健康的な又は健康によいとされる食品をいい、栄養補助食品、自然食品等を含む。栄養補助食品とは、特定の栄養成分が強化されている食品をいう。機能性食品とは、体の調節機能を果たす栄養成分を補給するための食品をいい、特定保健用食品、栄養機能食品を含む。

[0073] 栄養補助食品として、美容ドリンク、サプリメント等が挙げられる。本発明の飲食品は、カプセル等の医薬製剤の形態、ドリンク剤等であってもよい。飲食品には、飲食品に配合することが認められている種々の成分を配合することができる。このような成分としては例えば、結合剤、増粘剤、着色剤、安定剤、乳化剤、分散剤、崩壊剤、懸濁化剤、界面活性剤、防腐剤、甘味料、酸味料等が挙げられる。

上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含む飲食品は、本発明における好ましい態様の1つである。

[0074] 飲食品中の上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の含量は、例えば、飲食品に対して、固形分換算で0.0001～10重量%とすることが好ましく、0.001～5重量%がより好ましく、0.01～1重量%がさらに好ましい。また、飲食品中のレーヒドロキシプロリン含量は、0.0001～0.01重量%が好ましく、レーヒドロキシプロリン含量が上記の範囲となるように、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を配合することが好ましい。

上記化粧料、化粧料原料、飲食品等の組成物中のレーヒドロキシプロリン含量は、遊離のレーヒドロキシプロリン含量である。レーヒドロキシプロリンは、好ましくは、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物に由来する。

[0075] 本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含有する化粧料、飲食品、これらの原料等の組成物は、これらに通常使用されている原料、添加剤等をその種類に応じて選択して配合し、これに本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を配合し、公知の手法によって製造することができる。

[0076] 本発明は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含む化粧料又は化粧料原料も包含する。

上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、好ましくは、上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物である。

[0077] 本発明は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる

群より選択される少なくとも１種の酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、上記酵母の菌体又は菌体培養物中にＬーヒドロキシプロリンを蓄積させる工程（Hy p蓄積工程）を含む、Ｌーヒドロキシプロリン含有化粧品原料の製造方法も包含する。上記窒素源は、Ｌーヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源である。本発明のＬーヒドロキシプロリン含有化粧品原料の製造方法の好ましい態様は、上述したＬーヒドロキシプロリンの製造方法の好ましい態様と同じである。上記Ｌーヒドロキシプロリン含有化粧品原料の製造方法は、本発明の化粧品原料の製造方法として好ましい。

Hy p蓄積工程を行うことにより、Ｌーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体又は菌体培養物が得られる。また、酵母の菌体又は菌体培養物に上述した菌体破碎処理を行うことにより、Ｌーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体又は菌体培養物の抽出物が得られる。このようにして得られる酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物、及び、その好ましい態様は、上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物、及び、その好ましい態様と同じである。得られるＬーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、所望により化粧品に通常使用される添加剤等を配合して、Ｌーヒドロキシプロリン含有化粧品原料として使用することができる。また、Ｌーヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物から精製したＬーヒドロキシプロリンに、所望により化粧品に通常使用される添加剤等を配合して、Ｌーヒドロキシプロリン含有化粧品原料を製造することもできる。本発明により得られるＬーヒドロキシプロリン含有化粧品原料は、コラーゲン産生促進、表皮細胞の増殖促進、皮膚の保湿、皮膚の老化防止、皮膚のたるみの予防又は改善、皮膚のハリの改善、しわの予防又は改善及びアトピー性皮膚炎の改善から選ばれる用途の化粧品に好適に使用される。

[0078] 本発明は、Ｌーヒドロキシプロリンを含有する、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、

メイエロザイマ・カリビカ (Meyerozyma caribbica)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (Meyerozyma guilliermondii) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (Clavispora lusitaniae) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含む、Ｌーヒドロキシプロリン補強用組成物も包含する。

上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、Ｌーヒドロキシプロリンを含有するが、Ｌープロリン (P r o) 及びＬーヒドロキシプロリン (H y p) の合計含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対するＬーヒドロキシプロリンの含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の割合 ($100 \times \text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp})$) が、35～100であることが好ましい。上記の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、Ｌーヒドロキシプロリンの含量が $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上が好ましい。このような酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含むＬーヒドロキシプロリン補強用組成物は、化粧品、飲食品等のＬーヒドロキシプロリンを補強、補充又は強化するための添加剤として特に好適に使用することができる。酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の好ましい態様は、上述した本発明の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物及びその好ましい態様と同じである。Ｌーヒドロキシプロリン補強用組成物は、Ｌーヒドロキシプロリン補強用の添加剤組成物として、飲食品、化粧料等に好適に使用することができる。Ｌーヒドロキシプロリン補強用組成物は、Ｌーヒドロキシプロリン補充用組成物又はＬーヒドロキシプロリン強化用組成物と言い換えることもできる。

[0079] 本発明のＬーヒドロキシプロリン補強用組成物は、Ｌーヒドロキシプロリンを含有する上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含んでいればよく、該菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の含量が100重量%であってもよいが、所望により、他の成分を含んでいてもよい。例えばＬーヒドロキシプロリン補強用組成物を食品添加剤として使用する場合には、食品に使用される公知の添加剤1種又は2種以上を含んでいてもよい。

[0080] 本発明のＬーヒドロキシプロリン補強用組成物は、例えば、化粧料添加剤と

しても好適に使用される。Ｌ－ヒドロキシプロリン補強用組成物を化粧品添加剤として使用する場合は、該組成物中、上記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含んでいればよく、該菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の含量が１００重量%であってもよいが、所望により、化粧品に使用される公知の添加剤１種又は２種以上を含んでいてもよい。

[0081] 本発明のＬ－ヒドロキシプロリン補強用組成物の製造方法は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも１種の酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、上記酵母の菌体又は菌体培養物中にＬ－ヒドロキシプロリンを蓄積させる工程を含むことが好ましい。このような工程を含むＬ－ヒドロキシプロリン補強用組成物の製造方法も本発明に包含される。上記窒素源は、Ｌ－ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源である。本発明のＬ－ヒドロキシプロリン補強用組成物の製造方法及びその好ましい態様は、上述したＬ－ヒドロキシプロリンの製造方法及びその好ましい態様と同じである。本発明のＬ－ヒドロキシプロリン補強用組成物の製造方法は、所望により、酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物に公知の食品添加剤、化粧品添加剤等を添加する工程を含んでいてもよい。

[0082] 本発明の別の態様のＬ－ヒドロキシプロリンの製造方法は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも１種の酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、上記酵母の菌体又は菌体培養物中にＬ－ヒドロキシプロリンを蓄積させる工程を含む。

本発明の別の態様の製造方法においては、上記窒素源は、Ｌーヒドロキシプロリン含有タンパク質又はＬーヒドロキシプロリン含有ペプチドを含むことが好ましい。本発明の別の態様の製造方法においては、上記Ｌーヒドロキシプロリン含有タンパク質がコラーゲン性タンパク質であり、上記Ｌーヒドロキシプロリン含有ペプチドがコラーゲンペプチドであることが好ましい。本発明の別の態様の製造方法においては、上記コラーゲン性タンパク質及びコラーゲンペプチドの平均分子量は１０００～１０００００であることが好ましい。本発明の別の態様の製造方法においては、上記液体培地中の窒素源の濃度が１～５重量％であり、炭素源（Ｃ）と窒素源（Ｎ）との重量比（Ｃ／Ｎ）が０．５～２０であることが好ましい。また、上記好気培養を好ましくは１０～１００時間、より好ましくは１０～８０時間行うことが好ましい。

[0083] 本発明の別の態様の使用は、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitanae*) からなる群より選択される少なくとも１種の酵母の、Ｌーヒドロキシプロリンを製造するための使用であって、上記酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、上記酵母の菌体又は菌体培養物中にＬーヒドロキシプロリンを蓄積させることを含み、上記窒素源がＬーヒドロキシプロリン含有タンパク質又はＬーヒドロキシプロリン含有ペプチドを含むことが好ましい。

本発明の別の態様の使用においては、上記Ｌーヒドロキシプロリン含有タンパク質がコラーゲン性タンパク質であり、上記Ｌーヒドロキシプロリン含有ペプチドがコラーゲンペプチドであることが好ましい。本発明の別の態様の使用においては、上記コラーゲン性タンパク質及びコラーゲンペプチドの平均分子量が１０００～１０００００であることが好ましい。本発明の別の態様の使用においては、上記液体培地中の窒素源の濃度が１～５重量％であり、炭素源（Ｃ）と窒素源（Ｎ）との重量比（Ｃ／Ｎ）が０．５～２０である

ことが好ましい。また、上記好気培養を好ましくは10～100時間、より好ましくは10～80時間行うことが好ましい。

[0084] 上記L-ヒドロキシプロリン含有タンパク質としては、上述したコラーゲン性タンパク質が挙げられる。コラーゲン性タンパク質等のL-ヒドロキシプロリン含有タンパク質の平均分子量は、好ましくは10000を超えて100000以下である。タンパク質の平均分子量は、重量平均分子量を指す。コラーゲン性タンパク質等のL-ヒドロキシプロリン含有タンパク質の平均分子量は、ゲル濾過などにより算出される。

実施例

[0085] 以下、本発明をより具体的に説明する試験例等を示す。なお、本発明はこれらの試験例等のみに限定されるものではない。

[0086] 試験例中、検量線の作成に使用するL-ヒドロキシプロリン（Hyp）標準溶液の調製には、ナカライテスク株式会社製のL-4-ヒドロキシプロリンを使用した。L-プロリン（Pro）標準溶液の調製には、ナカライテスク株式会社製のL-プロリンを使用した。試験例で測定したL-ヒドロキシプロリン及びL-プロリンは、いずれも遊離のL-ヒドロキシプロリン及びL-プロリンである。

[0087] <試験例1>

L-ヒドロキシプロリン（以下、Hyp）を蓄積する菌のスクリーニング
Hypを菌体培養液中に蓄積する属種をスクリーニングするため、以下の選抜条件で1～3次選抜試験を行った。

1次選抜試験：選抜条件：エタノール生産量、増殖速度

2次選抜試験：選抜条件：Hyp蓄積量（比色法）

3次選抜試験：選抜条件：Hyp蓄積量（HPLC）

再現性：Hyp蓄積量（HPLC）

[0088] 表1～3に示す属種の異なる株を試験に供した。

[0089]

[表1]

属	種	EtOH(%)
<i>Pichia</i>	<i>kudriavzevii</i>	0.03
<i>Candida</i>	<i>zemlinina</i>	0.22
<i>Issatchenkia</i>	<i>siamensis</i>	0.02
<i>Millerozyma</i>	<i>farinosa</i>	0.10
<i>Kodamaea</i>	<i>ohmeri</i>	0.03
<i>Candida</i>	<i>apicola</i>	0.20
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>rouxii</i>	0.24
<i>Candida</i>	<i>lactis-condensi</i>	0.62
<i>Candida</i>	<i>rugosa</i>	0.03
<i>Hyphopichia</i>	<i>burtonii</i>	0.04
<i>Candida</i>	<i>intermedia</i>	0.02
<i>Pichia</i>	sp	0.02
<i>Trigonopsis</i>	<i>variabilis</i>	0.01
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>pseudorouxii</i>	0.11
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>siamensis</i>	0.08
<i>Citeromyces</i>	<i>siamensis</i>	0.15
<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>	0.01
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>piperi</i>	0.01
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>sydowiorum</i>	0.00
<i>Candida</i>	<i>morakotiae</i>	0.02
<i>Candida</i>	<i>etchellsii</i>	0.04
<i>Candida</i>	<i>pararugosa</i>	0.02
<i>Dipodascus</i>	<i>magnusii</i>	0.00
<i>Hanseniaspora</i>	<i>vineae</i>	0.00
<i>Candida</i>	<i>colliculosa</i>	0.06
<i>Zygosaccharomyces</i>	sp	0.24
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	0.05
<i>Hanseniaspora</i>	<i>osmophila</i>	0.00
<i>Kloeckera</i>	<i>apiculata</i>	0.00
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	0.18
<i>Pichia</i>	<i>barkeri</i>	0.00
<i>Metschnikowia</i>	<i>koreensis</i>	0.78
<i>Candida</i>	<i>homilientoma</i>	0.82
<i>Candida</i>	<i>corydali</i>	0.77
<i>Zygotrulaspora</i>	<i>florentina</i>	0.93
<i>Meyerozyma</i>	<i>guilliermondii</i>	0.56
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	0.17
<i>Starmerella</i>	<i>bombicola</i>	0.02
<i>Lachancea</i>	<i>meyersii</i>	0.11
<i>Saccharomyces</i>	<i>mikatae</i>	0.21
<i>Candida</i>	<i>pelliculosa</i>	0.00
<i>Candida</i>	<i>pulcherrima</i>	0.13
<i>Metschnikowia</i>	<i>reukaufii</i>	0.17

[0090]

[表2]

属	種	EtOH(%)
<i>Kazachstania</i>	<i>africana</i>	0.56
<i>Kazachstania</i>	<i>unisporea</i>	0.41
<i>Kazachstania</i>	<i>aerobia</i>	0.51
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>japonicus</i>	0.74
<i>Pichia</i>	<i>kluyveri</i>	0.00
<i>Candida</i>	<i>zemplinina</i>	0.36
<i>Hanseniaspora</i>	<i>opuntiae</i>	0.02
<i>Starmerella</i>	sp	0.50
<i>Kazachstania</i>	<i>exigua</i>	0.68
<i>Saccharomyces</i>	<i>exiguus</i>	0.55
<i>Candida</i>	<i>holmii</i>	0.43
<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	0.04
<i>Candida</i>	<i>railenensis</i>	0.33
<i>Candida</i>	<i>ernobii</i>	0.35
<i>Debaryomyces</i>	<i>nepalensis</i>	0.07
<i>Candida</i>	<i>sake</i>	0.04
<i>Saccharomyces</i>	<i>kudriavzevii</i>	0.52
<i>Candida</i>	<i>sorbosivorans</i>	0.06
<i>Peterozyma</i>	<i>toletana</i>	0.04
<i>Nakazawaea</i>	<i>holstii</i>	0.23
<i>Candida</i>	<i>succiphila</i>	0.39
<i>Candida</i>	<i>lessepsii</i>	0.32
<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	0.18
<i>Pichia</i>	<i>scolyti</i>	0.18
<i>Lachancea</i>	<i>kluyveri</i>	0.05
<i>Candida</i>	<i>pomicola</i>	0.04
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>bailii</i>	0.23
<i>Pichia</i>	<i>manshurica</i>	0.16
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>bisporus</i>	0.30
<i>Meyerozyma</i>	<i>guilliermondii</i>	0.17
<i>Meyerozyma</i>	<i>caribbica</i>	0.10
<i>Candida</i>	<i>bombi</i>	0.25
<i>Metschnikowia</i>	<i>reukaufii</i>	0.33
<i>Pichia</i>	<i>silvicola</i>	0.38
<i>Kazachstania</i>	<i>ichnusae</i>	0.74
<i>Candida</i>	<i>salmanticensis</i>	0.33
<i>Candida</i>	<i>xestbii</i>	0.13
<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	0.00
<i>Hanseniaspora</i>	<i>thailandica</i>	0.00

[0091]

[表3]

属	種	EtOH(%)
<i>Saccharomyces</i>	<i>ludwigii</i>	0.24
<i>Candida</i>	<i>nivariensis</i>	0.02
<i>Candida</i>	<i>tolerans</i>	0.18
<i>Hanseniaspora</i>	<i>hailandica</i>	0.00
<i>Candida</i>	<i>peltata</i>	0.11
<i>Candida</i>	<i>floricola</i>	0.24
<i>Issatchenkia</i>	<i>terricola</i>	0.04
<i>Clavispora</i>	<i>lusitaniae</i>	0.05
<i>Candida</i>	<i>carphophila</i>	0.19
<i>Trigonopsis</i>	<i>cantarellii</i>	0.16
<i>Candida</i>	<i>valida</i>	0.01
<i>Candida</i>	<i>californica</i>	0.03
<i>Candida</i>	<i>inconspicua</i>	0.02
<i>Brettanomyces</i>	<i>bruxellensis</i>	0.28
<i>Kluyveromyces</i>	<i>thermotolerans</i>	0.85
<i>Pichia</i>	<i>nakasei</i>	0.30
<i>Starmerella</i>	<i>bacillaris</i>	0.50
<i>Zygorhizula</i>	sp	0.39
<i>Pichia</i>	<i>occidentalis</i>	0.05
<i>Candida</i>	<i>natalesensis</i>	0.11
<i>Candida</i>	<i>blatta</i>	0.17
<i>Candida</i>	<i>saopaulonensis</i>	0.17
<i>Kloeckera</i>	<i>hatyaiensis</i>	0.24
<i>Candida</i>	<i>dendronema</i>	0.36
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>	0.34
<i>Tetrapisispora</i>	<i>iriomotensis</i>	0.33
<i>Torulaspora</i>	<i>pretoriensis</i>	0.16
<i>Candida</i>	<i>lambica</i>	0.02
<i>Tetrapisispora</i>	<i>nanseiensis</i>	0.55
<i>Candida</i>	<i>quercitrusa</i>	0.10
<i>Candida</i>	<i>chrysomelidarum</i>	0.06
<i>Meyerozyma</i>	<i>caribbica</i>	0.06
<i>Metschnikowia</i>	<i>fructicola</i>	0.71
<i>Candida</i>	<i>oleophila</i>	0.11

[0092] 1～3次選抜試験では、以下の条件で前培養及び本培養を行った。前培養及び本培養で使用したYPD液体培地は、Y:P:Dが1:2:2（重量比）（Y：酵母抽出物（Bacto社製の製品名Yeast Extract(#212750)）1.0重量%、P：ペプトン（Bacto社製の製品名Pepton(#211677)、ウシの細胞をブタの脾臓由来の酵素で分解したもの）2.0重量%、D：グルコース2.0重量%）である。

[0093] （前培養）

YPD液体培地3 mLに、各菌株を1白金耳接種し、30℃で1日静置培養して前培養液を得た。

[0094] (本培養)

YPD液体培地5 mLに、前培養液100 μ Lを接種して、30℃で1日振盪培養(60 rpm)して酵母の菌体培養液(菌体培養物)を得た。

[0095] 2次選抜試験及び3次選抜試験でHy p含量の測定に使用した培養物サンプルは、本培養で得られた酵母の菌体培養液に以下の自己消化工程及び殺菌工程等を行って調製した。

(自己消化工程)

酵母の菌体培養液を50℃で2時間インキュベートして、自己消化により菌体内容物を培養液中に溶出した。

(殺菌工程)

上記で自己消化した培養液を80℃で1時間インキュベートした。

得られた抽出物から遠心分離(3000 rpm、5 min、1℃)により菌体残渣を除いた。これにより、Hy p蓄積量を測定するための培養物サンプルを調製した。

[0096] 1. 1次選抜試験

(1) エタノール生産量

表1～3に示す酵母116株について、本培養(30℃、1日、振盪培養)して得た菌体培養液の上清の、エタノール濃度を測定した。エタノールの測定には、バイオセンサーBF5(王子計測機器社)を用いた。

[0097] 試験に使用した酵母の培養液上清のエタノール濃度を表1～3に示す。

試験に使用した全ての酵母(116株)において、菌体培養液上清のエタノール濃度は1 v / v %以下であった。

[0098] (2) 増殖速度

次に、上記の酵母の増殖曲線を測定した。測定には、TVS 062CA(ADVANTEC社)を用いて、菌体培養液の吸光度(660 nm)を測定した。

これらの中で、増殖速度が速い100株（以下に記載する16株以外の株）を2次選抜試験及び3次選抜試験に用いることとした。

（2次選抜試験及び3次選抜試験に使用しなかった株）

Zygosaccharomyces rouxii、Zygosaccharomyces pseudorouxii、Zygosaccharomyces siamensis、Candida etchellsii、Starmerella bombicola、Starmerella sp、Candida holmii、Rahnella aquatilis、Candida railenensis、Candida ernobii、Debaryomyces nepalensis、Candida sake、Peterozyma toletana、Trigonopsis cantarellii、Brettanomyces bruxellensis、Candida oleophila

[0099] 2. 2次選抜試験

1次選抜試験で選ばれた100株を用い、以下に記載する比色法によりHyp蓄積量を比較した。

[0100] 2 mL エッペンチューブに0.5 M ホウ酸緩衝液0.2 mL 及び培養物サンプル（又はHyp標準液）0.4 mL を加えよく攪拌し、室温で5分静置の後、氷浴中（0℃）に5分静置した。次に、0.2 M クロラミンT 溶液0.2 mL を加え、時々攪拌しながら、氷浴中（0℃）に120分置いた（酸化反応）。酸化反応後の溶液に、3.6 M チオ硫酸ナトリウム水溶液0.4 mL を加え、密栓し、沸騰水浴中で30分加熱した（脱炭酸反応）。脱炭酸反応後の溶液を、水道水で室温まで冷却後、酢酸エチル0.6 mL を加え、シェイカーで20分激しく振盪した。脱炭酸及び酢酸エチル抽出時は開封防止のためのキャップを被せた。

得られた溶液を遠心分離（1500 rpm、5分）後、1.5 mL エッペンチューブに酢酸エチル層（上層：無色）0.4 mL を分取し、これにエーリッヒ試薬（黄）0.16 mL を加え、室温に30分静置し、サンプルとした（呈色反応：Hypが含まれると赤くなる）。ブランクは、酢酸エチル0.4 mL にエーリッヒ試薬0.16 mL を加えて室温に30分静置して調製した。

ガラス製プレート（96穴、透明、平底）にサンプルを200 µL 分注し、

プレートリーダー (Tecan社製 ; infinite M200 Pro) で 650 nm のベースラインを 0 に調整後、560 nm の吸光度を測定した (揮発及び酸による機器の腐食防止のため、プレートにフィルムを貼った)。

Hyp 標準液 (Hyp 濃度 2.5 ~ 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で検量線を作成し、培養物サンプルの Hyp 濃度を求めた。試験に供した株の中で、比色法による培養物サンプルの Hyp 含量が高い 22 株を選抜した。

[0101] 3. 3 次選抜試験

2 次選抜試験と同じ菌株の培養物サンプルを用い、比色法よりも更に精度の高い HPLC 法により Hyp 蓄積量を測定した。

[0102] HPLC では、オートサンプラーで 1 級アミノ酸 (1 級アミノ基)、2 級アミノ酸 (2 級アミノ基) の蛍光標識化を行い、逆相の HPLC で分析を行うシステムを用いた。1 級アミノ基の蛍光標識には、O-フタルアルデヒド (OPA) を、2 級アミノ基の蛍光標識には、クロロ蟻酸-9-フルオレニルメチル (FMOC) を、それぞれ使用した。

[0103] 培養物サンプルを 0.1 N HCl で希釈してサンプルとした。このサンプルを、サンプルバイアルに 0.45 μm のフィルターでろ過してオートサンプラーにセットした。空バイアルに MPA (メルカプトプロピオン酸) 試薬 30 μL 、OPA 試薬 15 μL 、上記サンプル 5 μL を入れて 1 分静置後、FMOC 試薬を 5 μL 加え 2 分間反応した溶液 1 μL を HPLC に注入した。OPA と 1 級アミノ酸が反応し、残った 2 級アミノ基を持つ Hyp 及び Pro が FMOC と反応する。それぞれの蛍光波長を 2 チャンネルで検出することにより、すべてのアミノ酸を同時に検出することが可能である。

[0104] HPLC 分析に使用した装置及び条件を以下に示す。

(装置)

(株) 島津製作所製の高速液体クロマトグラフ Nexera X2 システム (製品名)

システムコントローラ : CBM-20A、送液ユニット : LC-30AD (2 台)、脱気ユニット : DGU-20A5R、ミキサ : MR180 μL I

1、オートサンプラー：SIL-30AC、カラムオーブン：CTO-20AC、蛍光検出器：RF-20AXS、ワークステーション：LabSolutions LC/GC

[0105] (測定条件)

カラム：Inertsil ODS-4 100mm×3.0mmφ S-2μm (ジーエルサイエンス(株))

ガードカラム：UHPLC Fitting (製品名、ジーエルサイエンス(株)) (Max. Pressure: 130MPa)

移動相

A液：15mmol/L KH_2PO_4 及び 5mmol/L K_2HPO_4 (pH 6.5)

B液：15/45/40 (v/v/v) = 水/アセトニトリル/メタノール

R0 (リンス液)：水/メタノール=20/80 (v/v)

R3 (リンス液)：水/アセトニトリル=80/20 (v/v)

初期B液濃度：10% (v/v)

流量：0.8mL/min

カラムオーブン温度：35℃

注入量：1μL

検出：Ch1：励起波長350nm、蛍光波長450nm

Ch2：励起波長266nm、蛍光波長305nm

セル温度：25℃、Gain: ×4、Sensitivity: Midium

[0106] グラジエントプログラム (B液濃度 (%) は、v/v%)

0~1.5分：B. Conc 10%

1.5~6分：B. Conc 10%→30%のグラジエント

6~11分：B. Conc 30%→40%のグラジエント

11~15分：B. Conc 100%

20~21.5分：B. Conc 100%→10%

25分：コントローラ停止

検量線：各アミノ酸の6.25 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ の0.1N HCl溶液を調製した。これらの各溶液を、上記の方法でMPA、OPA及びFMOCの各試薬と反応させ、HPLCで分析して検量線を引いた。

[0107] アミノ酸混合標準液H型溶液及びL-ヒドロキシプロリンを含む0.1N塩酸溶液についても、上記と同様に各試薬と反応させて、上記の装置及び測定条件でHPLCで分析した。

図2は、アミノ酸混合標準液H型及びL-ヒドロキシプロリンを含む0.1N塩酸溶液（各アミノ酸濃度20 $\mu\text{mol/L}$ ）を分析したHPLCチャートである（（a）：Ch1の励起波長350nm、蛍光波長450nmで検出、（b）：Ch2の励起波長266nm、蛍光波長305nmで検出）。使用したアミノ酸混合標準液H型は、和光純薬工業（株）である。

[0108] HPLCによる測定によっても、2次選抜試験でHyp蓄積量が多いことが確認された22株の菌体培養物について、Hyp含量が多いことが確認された。これらの22株の菌体培養物から調製した培養物サンプルのHPLCによるHyp含量の測定結果を、図1に示す。なお、培養開始前の各液体培地には、遊離のHypは検出されなかった。

[0109] 図1は、HPLCによる培養物サンプルのHyp含量の測定結果を示す図である。

これらの中で、HPLCによる測定でHyp含量が90 $\mu\text{g/mL}$ 以上であった以下の11種の株について、再現性を確認した。

Meyerozyma caribbica（2種）、Candida chrysomelidarum、Candida saopaulonensis、Candida blattae、Clavispora lusitaniae、Metschnikowia reukaufii（2種）、Meyerozyma guilliermondii、Candida morakotiae、Kodamaea ohmeri

[0110] 4. 再現性の確認

上記11株について、再現性を確認した。

3次選抜試験と同様の方法で各菌株の前培養及び本培養を行い、本培養で得

られた菌体培養液を用いて、酵母の自己消化を行って培養物サンプルを調製した。培養物サンプルについて、3次選抜試験のHPLC法と同じ方法で、Hyp含量を測定した。その結果、11株全てについて、3次選抜試験と同様の結果が得られ、再現性を確認することができた。

[0111] <試験例2>

試験例1の結果から、Hyp蓄積量や、食品、化粧品等に使用する際の安全性等の観点から、Hypを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物の調製に有望な属種Meyerozyma caribbica (2種)、Clavispora lusitaniae、Metschnikowia reukaufii、Meyerozyma guilliermondii及びKodamaea ohmeriの6種について、更に実験を行った。

[0112] 上記の6種の菌について、YPD培地の組成(Y:P:Dの比率及びPの種類)及び培養時間を変化させて本培養を行い、菌体培養物中のHyp含量及びPro含量を測定した。

[0113] (前培養)

Y:P:Dが1:2:2(重量比)(Y:酵母抽出物1.0重量%、P:ペプトン2.0重量%、D:グルコース2.0重量%)のYPD液体培地を使用した。酵母抽出物及びペプトンは、試験例1で使用したものと同一である。

前培養は、試験例1の1次選抜試験と同じ条件で行った。

[0114] (本培養)

上記で得られた前培養液100 μ Lを、下記のYPD液体培地5mLに接種して30℃で振盪培養(60rpm)した。培養時間は、1日又は2日として菌体培養液(菌体培養物)を得た。

本培養では、YPD液体培地のPとして、ペプトン又はコラーゲンペプチド(CP)を使用した。コラーゲンペプチドには、コラーゲンペプチドイクオスHDL-50SP(製品名、新田ゼラチン(株)製、平均分子量5000)(以下、コラーゲンペプチド(CP1)と記載する)又はコラーゲンペプチドType S(製品名、新田ゼラチン(株)製、平均分子量120

0) (以下、コラーゲンペプチド (CP2) と記載する) を使用した。YPD 培地において、ペプトンに代えてコラーゲンペプチドを使用した培地は、YPD 改変培地ともいえる。

また、本培養における YPD 液体培地の Y : P : D の比率は、(1) Y : P : D = 1 : 2 : 2 (重量比) (Y : 酵母抽出物 1.0 重量%、P : ペプトン又はコラーゲンペプチド 2.0 重量%、D : グルコース 2.0 重量%)、又は、(2) Y : P : D = 1 : 4 : 5 (重量比) (Y : 酵母抽出物 1.0 重量%、P : ペプトン又はコラーゲンペプチド 4.0 重量%、D : グルコース 5.0 重量%) とした。表 4 に、本培養で使用了培養条件 1 ~ 12 を示す。

[0115] [表4]

培養条件	培地組成	P	時間
1	Y:P:D=1:2:2	ペプトン	1日
2			2日
3		コラーゲンペプチド (CP1)	1日
4			2日
5		コラーゲンペプチド (CP2)	1日
6			2日
7	Y:P:D=1:4:5	ペプトン	1日
8			2日
9		コラーゲンペプチド (CP1)	1日
10			2日
11		コラーゲンペプチド (CP2)	1日
12			2日

[0116] Hyp 含量を測定するための培養物サンプルは、本培養で得られた酵母の菌体培養液を、試験例 1 と同じ方法で自己消化し、殺菌し、菌体残渣を除いて調製した。得られた培養物サンプルを 0.1 N 塩酸溶液で希釈して、HPLC のサンプルを調製した。培養時間 1 日の菌体培養液から調製したサンプルは、培養物サンプルを 10 倍希釈、培養時間 2 日の菌体培養液から調製したサンプルは、40 倍希釈した。これらのサンプルを、試験例 1 と同じ方法で MPA、OPA 及び FMOC の各試薬と反応させ、HPLC で分析した。

[0117] HPLC で使用した装置及び測定条件は、3 次選抜試験と同じである。

検量線は、Hyp 及び Pro それぞれについて、 $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 、 $50 \mu\text{mol/L}$ 、 $100 \mu\text{mol/L}$ 、2

50 $\mu\text{mol/L}$ の 0.1 N HCl 溶液を調製し、これらの溶液を試験例 1 と同じ方法でMPA、OPA及びFMOCの各試薬と反応させ、HPLCで分析して作成した。

[0118] 培養物サンプルのHypの定量結果を表5に示す。表中、CP1は、上記のコラーゲンペプチド（CP1）（製品名コラーゲンペプチド イクオス HDL-50SP）であり、CP2は、コラーゲンペプチド（CP2）（製品名コラーゲンペプチド Type S）である。培養物サンプルのProの定量結果を表6に示す。表中の培養条件は、本培養の条件である。なお、培養開始前の各液体培地には、遊離のHypはほとんど含まれなかった。

[0119]

[表5]

		Hyp (μg/mL)											
培養条件	培地組成 P 時間	Y:P:D=1:2:2						Y:P:D=1:4:5					
		ペプトン		CP1		CP2		ペプトン		CP1		CP2	
		1日	2日	1日	2日	1日	2日	1日	2日	1日	2日	1日	2日
<i>Meyerozyma caribbica</i>		88.27	97.45	27.59	24.67	144.89	170.13	109.59	141.52	48.69	68.53	220.03	295.40
<i>Clavispora lusitanae</i>		93.47	103.45	35.86	33.90	113.94	128.61	72.28	98.97	65.92	89.24	129.33	182.37
<i>Meyerozyma caribbica</i>		63.54	53.62	20.81	17.61	124.28	118.13	80.43	72.44	28.73	40.81	196.34	203.93
<i>Metschnikowia reukauffii</i>		95.80	143.44	68.52	94.48	148.11	203.79	186.71	436.23	103.04	160.17	267.40	615.83
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>		58.30	54.12	21.37	21.10	133.90	134.39	77.66	68.69	44.47	55.81	223.92	195.01
<i>Kodamaea ohmeri</i>		287.51	389.84	158.28	220.34	304.68	436.88	280.75	595.08	232.09	460.01	390.67	711.91

[0121] 表5及び表6に示す結果から、各培養物サンプル中のP r o及びH y pの合計含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対するH y pの含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の割合 ($100 \times \text{H y p} / (\text{P r o} + \text{H y p})$) を計算した。その結果を表7に示す。

[0122]

[表7]

		100 x Hyp / (Pro+Hyp)											
培養条件		Y:P:D=1:2:2						Y:P:D=1:4:5					
培地組成													
P	時間	ペプトン		CP1		CP2		ペプトン		CP1		CP2	
		1日	2日	1日	2日	1日	2日	1日	2日	1日	2日	1日	2日
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	82.7	100.0	73.3	100.0	93.9	100.0	56.7	97.0	71.1	100.0	82.5	100.0
	<i>Clavispora lusitanae</i>	91.7	100.0	86.7	100.0	88.3	100.0	65.6	100.0	74.1	100.0	50.9	97.7
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	82.1	100.0	68.2	100.0	91.1	100.0	35.3	78.7	73.3	74.8	63.0	92.1
	<i>Metschnikowia reukauffii</i>	63.3	88.9	65.0	64.0	64.5	63.6	84.1	97.7	78.3	76.6	83.0	98.1
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	75.7	100.0	65.9	100.0	90.7	100.0	37.9	79.4	66.8	100.0	77.7	97.8
	<i>Kodamaea ohmeri</i>	56.9	62.8	58.5	74.1	63.0	68.2	51.8	65.7	60.1	92.6	59.5	73.1

[0123] 試験に供した6種の酵母は、いずれも好気培養によって培養物中にL-ヒドロキシプロリンを蓄積した。得られた菌体培養物は、いずれも（Hyp / （Pro + Hyp））割合が35以上であった。

[0124] <試験例3>

表8に示すMeyerozyma caribbica、Clavispora lusitaniae、Metschnikowia reukaufii、Meyerozyma guilliermondii及びKodamaea ohmeriを使用した。表8に示すNBRC番号で特定される酵母は、独立行政法人製品評価技術基盤機構（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）より入手した。

[0125] [表8]

菌株	登録番号
<i>Kodamaea ohmeri</i>	NBRC 1271 T
	NBRC 1484
	NBRC 1483
	NBRC 1482
	NBRC 0158
<i>Clavispora lusitaniae</i>	NBRC 10059 T
	NBRC 1019
	NBRC 10058
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	NBRC 1679 T
	NBRC 1405
	NBRC 10798
	NBRC 10799
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NBRC 10279 T
	NBRC 0454
	NBRC 0837
	NBRC 0838
	NBRC 1913
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NBRC 0679 T

[0126] （前培養）

表8に示す酵母を使用した以外は、試験例2と同じ条件で行った。

（本培養）

上記で得られた前培養液100 μ Lを、下記のYPD液体培地5 mLに接種して30℃で振盪培養（60 rpm）した。培養時間は、1日又は2日として菌体培養液を得た。

本培養の条件は、試験例2の培養条件11又は12とした。具体的には、YPD液体培地のPとして、コラーゲンペプチドType S（製品名、新田

ゼラチン（株）製、平均分子量1200）（試験例2のコラーゲンペプチド（CP2））を使用した。YPD液体培地のY:P:Dの比率は、Y:P:D=1:4:5（重量比）（Y:酵母抽出物1.0重量%、P:コラーゲンペプチドType S 4.0重量%、D:グルコース5.0重量%）とした。

[0127] 菌体培養液から、試験例2と同じ方法で培養物サンプルを調製した。得られた培養物サンプルを0.1N塩酸溶液で希釈して、HPLCのサンプルを調製した。培養時間1日の菌体培養液から調製したサンプルは、培養物サンプルを20倍希釈、培養時間2日の菌体培養液から調製したサンプルは、培養物サンプルを50倍希釈した。これらのサンプルを、試験例2と同じ方法でMPA、OPA及びFMOCの各試薬と反応させた。

試験例2と同じ条件で、HPLCで分析して培養物サンプル中のアミノ酸含量を測定した。結果を表9に示す。表9には、Hyp含量及びPro含量に加えて、全アミノ酸量（Total AA）も示す。試験に供した酵母は、いずれも好気培養によって培養物中にL-ヒドロキシプロリンを蓄積した。また、菌体培養液（培養時間1日）の660nmの吸光度（OD660）を表9に示す。吸光度はTVS 062CA（ADVANTEC社）により測定した。

[0128] 表9に示す結果から、各培養物サンプル中のPro及びHypの合計含量（ $\mu\text{g/mL}$ ）に対するHypの含量（ $\mu\text{g/mL}$ ）の割合（ $100 \times \text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp})$ ）を計算した。その結果を表10に示す。また、1日培養物のHyp含量（ $\mu\text{g/mL}$ ）を、菌体培養液の吸光度OD660で除した値（ $\mu\text{g/mL} / \text{OD660}$ ）（Hyp/OD660値）を、表10に示す。

[0129]

[表9]

菌株	登録番号	Hyp (μg/mL)		Pro (μg/mL)		TotalAA (μg/mL)		O.D. 660 nm	
		1日	2日	1日	2日	1日	2日	1日	2日
<i>Kodamaea ohmeri</i>	NBRC 1271 T	250.94	337.65	132.71	170.66	5063.16	3766.39	3.603	
	NBRC 1484	256.36	425.24	179.28	217.76	4543.08	4110.72	4.032	
	NBRC 1483	149.16	277.14	183.26	233.07	4965.25	5644.90	4.024	
	NBRC 1482	237.03	371.25	187.52	213.45	5487.91	5337.12	4.028	
<i>Clavispora lusitaniae</i>	NBRC 0158	341.31	575.90	155.77	196.94	4696.37	3641.03	3.692	
	NBRC 10059 T	155.56	325.05	149.36	2.75	2666.37	2417.88	3.802	
	NBRC 1019	146.64	248.49	132.15	0.67	3183.28	2140.81	3.956	
	NBRC 10058	142.08	332.73	134.95	40.60	2232.51	2524.33	3.676	
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	NBRC 1679 T	112.43	167.20	126.98	12.73	4217.98	1199.33	3.948	
	NBRC 1405	163.56	328.15	130.25	39.15	5232.67	2049.49	3.799	
	NBRC 10798	199.89	380.43	77.26	21.79	5083.03	2003.28	4.013	
	NBRC 10799	115.23	208.32	142.42	178.64	5151.73	5359.63	3.619	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NBRC 10279 T	118.29	147.63	116.76	147.59	5304.08	4601.69	3.699	
	NBRC 0454	183.18	144.18	55.61	11.24	5230.71	3002.32	4.025	
	NBRC 0837	194.00	111.02	31.88	1.52	4003.94	2169.68	4.021	
	NBRC 0838	191.46	94.61	34.83	1.64	3779.62	1892.21	3.494	
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NBRC 1913	129.93	130.36	94.96	9.48	3734.19	1132.65	4.033	
	NBRC 0679 T	167.37	228.04	32.86	3.49	3999.69	1753.72	3.680	

[表10]

菌株	登録番号	100 × Hyp/(Hyp+Pro)		Hyp/OD660
		1日	2日	1日
<i>Kodamaea ohmeri</i>	NBRC 1271 T	65.4	66.4	69.6
	NBRC 1484	58.8	66.1	63.6
	NBRC 1483	44.9	54.3	37.1
	NBRC 1482	55.8	63.5	58.8
	NBRC 0158	68.7	74.5	92.4
<i>Clavispora lusitaniae</i>	NBRC 10059 T	51.0	99.2	40.9
	NBRC 1019	52.6	99.7	37.1
	NBRC 10058	51.3	89.1	38.7
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	NBRC 1679 T	47.0	92.9	28.5
	NBRC 1405	55.7	89.3	43.1
	NBRC 10798	72.1	94.6	49.8
	NBRC 10799	44.7	53.8	31.8
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NBRC 10279 T	50.3	50.0	32.0
	NBRC 0454	76.7	92.8	45.5
	NBRC 0837	85.9	98.6	48.2
	NBRC 0838	84.6	98.3	54.8
	NBRC 1913	57.8	93.2	32.2
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NBRC 0679 T	83.6	98.5	45.5

[0131] <試験例 4>

試験例 2 及び 3 で使用した酵母を用いて、試験例 2 及び 3 と同じ方法で培養し、菌体培養液を得た。これを 50℃で 2 時間インキュベートすることにより、自己消化により菌体内容物を培養液中に溶出した後、80℃で 1 時間インキュベートした。その後、1℃で遠心分離（3000 rpm, 5 min）し、菌体残渣を除いた L-ヒドロキシプロリン含有菌体培養物の抽出物（Hyp 含有菌体培養物の抽出物）を得た。Hyp 含有菌体培養物の抽出物は、適宜希釈して使用することもできる。

[0132] 以下、試験例 4 で得た各 Hyp 含有菌体培養物の抽出物を配合した皮膚外用剤組成物の製造例の一例を示す。

<製造例 1> 石鹼

原料の配合量を表 11 に示す。

石鹼素地を混合攪拌し、その後各 Hyp 含有菌体培養物の抽出物を投入し均一に混合後、成型した。

[0133]

[表11]

原料	使用量(重量部)
石鹼素地	99.9
Hyp含有菌体培養物の抽出物	0.1
全量	100

[0134] <製造例2>シャンプー

原料の配合量を表12に示す。

精製水に1, 3-ブチレングリコールに溶解した防腐剤を投入した。均一に攪拌後、ラウレス硫酸ナトリウム、ヤシ油脂肪酸モノエタノールアミドを投入し、その後色素、香料及び残りの1, 3-ブチレングリコールを投入し、各Hyp含有菌体培養物の抽出物を投入後、均一に混合攪拌した。

[0135] [表12]

原料	使用量(重量部)
ラウレス硫酸ナトリウム	16
ヤシ油脂肪酸モノエタノールアミド	4
1, 3-ブチレングリコール	1.9
Hyp含有菌体培養物の抽出物	0.1
防腐剤、色素、香料	適量
精製水	78
全量	100

[0136] <製造例3>コンディショナー

原料の配合量を表13に示す。

(1) 塩化ステアリルジメチルベンジルアンモニウム及び食塩を精製水に投入し、80℃まで加温し溶解した。

(2) セトステアリルアルコール、水素添加ポリイソブテン及びグリセリンモノステアレートに80℃まで加温し溶解した。

(3) (1) をホモミキサーで攪拌しながら(2)を添加し、添加後5分間予備攪拌を行った。

(4) 予備攪拌終了後、50℃まで攪拌しながら冷却し、各Hyp含有菌体培養物の抽出物を添加しさらに35℃まで攪拌冷却し調製した。

[0137]

[表13]

原料	使用量(重量部)
塩化ステアリルジメチルベンジルアンモニウム	1.4
セトステアリルアルコール	4
水素添加ポリイソブテン	2
グリセリンモノステアレート	1.5
食塩	0.1
Hyp含有菌体培養物の抽出物	0.1
精製水	90.9
全量	100

[0138] <製造例4>ヘアトニック

原料の配合量を表14に示す。

精製水にサリチル酸、グリセリン、エタノールに溶解したビタミンE、レーメントールを投入し、さらに精製水の一部に溶解したグリチルリチン酸ジカリウムを投入し、その後各Hyp含有菌体培養物の抽出物を投入し、均一に混合し調製した。

[0139] [表14]

原料	使用量(重量部)
エタノール	70
ビタミンE	0.4
レーメントール	0.4
グリチルリチン酸ジカリウム	0.1
Hyp含有菌体培養物の抽出物	0.1
サリチル酸	0.5
グリセリン	0.5
精製水	28
全量	100

[0140] <製造例5>ミスト

原料の配合量を表15に示す。

精製水にクエン酸及びクエン酸ナトリウムを投入し溶解した。その後エタノールに溶解した防腐剤及びポリソルベート80を投入した。その後各Hyp含有菌体培養物の抽出物を投入し均一に攪拌し調製した。

[0141]

[表15]

原料	使用量(重量部)
クエン酸	0.01
クエン酸ナトリウム	0.09
防腐剤	適量
ポリソルベート80	0.05
エタノール	10
Hyp含有菌体培養物の抽出物	1
精製水	88.85
全量	100

[0142] <製造例6>化粧水

原料の配合量を表16に示す。

精製水にクエン酸及びクエン酸ナトリウムを投入し溶解した。次にグリセリン、1,3-ブチレングリコール及びエチレンジアミン四酢酸三ナトリウムを順次投入し、さらにエタノールに溶解したポリオキシエチレン(18)オレイルアルコールエーテル、ビタミンE及びメチルパラベンを投入し均一になるまで攪拌した。その後各Hyp含有菌体培養物の抽出物を投入し均一に攪拌し調製した。

[0143] [表16]

原料	使用量(重量部)
グリセリン	4
1,3-ブチレングリコール	4
エタノール	7
ポリオキシエチレン(18)オレイルアルコールエーテル	0.5
クエン酸	0.05
クエン酸ナトリウム	0.1
エチレンジアミン四酢酸三ナトリウム	0.02
ビタミンE	0.5
Hyp含有菌体培養物の抽出物	1
メチルパラベン	0.1
精製水	82.7
全量	100

[0144] <製造例7>乳液

原料の配合量を表 17 に示す。

(1) ステアリン酸、セチルアルコール、ミリスチン酸オクチルドデシル及び流動パラフィンを 80℃まで加温し溶解した。

(2) トリエタノールアミン、ヒアルロン酸ナトリウム、グリセリン、1,3-ブチレングリコール、ポリオキシエチレン(10)モノオレイン酸エステル及びエチレンジアミンヒドロキシ三酢酸ナトリウムを精製水に投入し 80℃まで加温した。

(3) (1) をホモミキサーで攪拌しながら (2) を投入し、投入後 5 分間予備攪拌した。

(4) 予備攪拌終了後、50℃まで冷却し、各 Hyp 含有菌体培養物の抽出物を加え、さらに 35℃まで冷却し調製した。

[0145] [表17]

原料	使用量(重量部)
ステアリン酸	1.5
セチルアルコール	0.5
ミリスチン酸オクチルドデシル	5
ポリオキシエチレン(10)モノオレイン酸エステル	1
流動パラフィン	5
トリエタノールアミン	0.5
Hyp含有菌体培養物の抽出物	1
ヒアルロン酸ナトリウム	0.01
グリセリン	7
1,3-ブチレングリコール	3
エチレンジアミンヒドロキシ三酢酸ナトリウム	0.01
精製水	75.48
全量	100

[0146] <製造例8>クリーム

原料の配合量を表 18 に示す。

(1) ステアリン酸、モノステアリン酸グリセリル、セスキステアリン酸ソルビタン、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、セトステアリルアルコール、スクワラン、ヘキサ(ヒドロキシステアリン酸/ステアリン酸/ロジン酸)ジペンタエリスリット、オリーブ油、ミリスチン酸オクチル

ドデシル及びメチルポリシロキサンを 80℃まで加温し溶解した。

(2) 精製水にグリセリン、1, 3-ブチレングリコール、水酸化ナトリウム及びメチルパラベンを投入し、80℃まで加温し溶解した。

(3) (1) をホモミキサーで攪拌しながら(2)を投入し、投入後5分間予備攪拌した。

(4) 予備攪拌終了後、50℃まで冷却し、各Hyp含有菌体培養物の抽出物を加え、さらに35℃まで冷却し調製した。

[0147] [表18]

原料	使用量(重量部)
ステアリン酸	2.5
モノステアリン酸グリセリル	0.8
セスキステアリン酸ソルビタン	0.6
モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン	0.4
セトステアリルアルコール	2
スクワラン	12
ヘキサ(ヒドロキシステアリン酸／ステアリン酸／ロジン酸)ジペンタエリスリット	2
オリーブ油	5
ミリスチン酸オクチルドデシル	15
メチルポリシロキサン	0.5
グリセリン	10
1, 3-ブチレングリコール	8
水酸化ナトリウム	0.1
メチルパラベン	0.1
Hyp含有菌体培養物の抽出物	0.3
精製水	40.7
全量	100

産業上の利用可能性

[0148] 本発明のL-ヒドロキシプロリンを含有する酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、化粧品、飲食品等の原料として有用である。

請求の範囲

- [請求項1] コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物であって、
前記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、 L-ヒドロキシプロリン を含有し、 L-プロリン (Pro) 及び L-ヒドロキシプロリン (Hyp) の合計含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対する L-ヒドロキシプロリン の含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の割合 ($100 \times \text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp})$) が、 $35 \sim 100$ であることを特徴とする酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物。
- [請求項2] L-ヒドロキシプロリン の含量が $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上である請求項1に記載の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物。
- [請求項3] L-ヒドロキシプロリン の含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を、 OD_{660} で除した値 ($\mu\text{g}/\text{mL} / \text{OD}_{660}$) が、 20 以上である請求項1又は2に記載の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物。
- [請求項4] コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物であって、
 L-ヒドロキシプロリン の含量が $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であることを特徴とする酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物。
- [請求項5] コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Mey*

erozyma caribbica)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (Meyerozyma guilliermondii) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (Clavispora lusitaniae) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、前記酵母の菌体又は菌体培養物中にL-ヒドロキシプロリンを蓄積させる工程を含み、前記窒素源がL-ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源であることを特徴とするL-ヒドロキシプロリンの製造方法。

- [請求項6] 前記L-ヒドロキシプロリン含有ペプチドがコラーゲンペプチドである請求項5に記載の製造方法。
- [請求項7] 前記コラーゲンペプチドの平均分子量が1000～10000である請求項6に記載の製造方法。
- [請求項8] 前記好気培養を10～100時間行う請求項5～7のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項9] コダマエア・オウメリ (Kodamaea ohmeri)、メチニコビア・ロイカウフィ (Metschnikowia reukaufii)、メイエロザイマ・カリビカ (Meyerozyma caribbica)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (Meyerozyma guilliermondii) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (Clavispora lusitaniae) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の、L-ヒドロキシプロリンを製造するための使用。
- [請求項10] 前記酵母を、炭素源及び窒素源を含む液体培地中で好気培養することにより、前記酵母の菌体又は菌体培養物中にL-ヒドロキシプロリンを蓄積させることを含み、前記窒素源がL-ヒドロキシプロリン含有ペプチドを含む窒素源である請求項9に記載の使用。
- [請求項11] 前記L-ヒドロキシプロリン含有ペプチドがコラーゲンペプチドである請求項10に記載の使用。
- [請求項12] 前記コラーゲンペプチドの平均分子量が1000～10000である請求項11に記載の使用。
- [請求項13] 前記好気培養を10～100時間行う請求項10～12のいずれかに

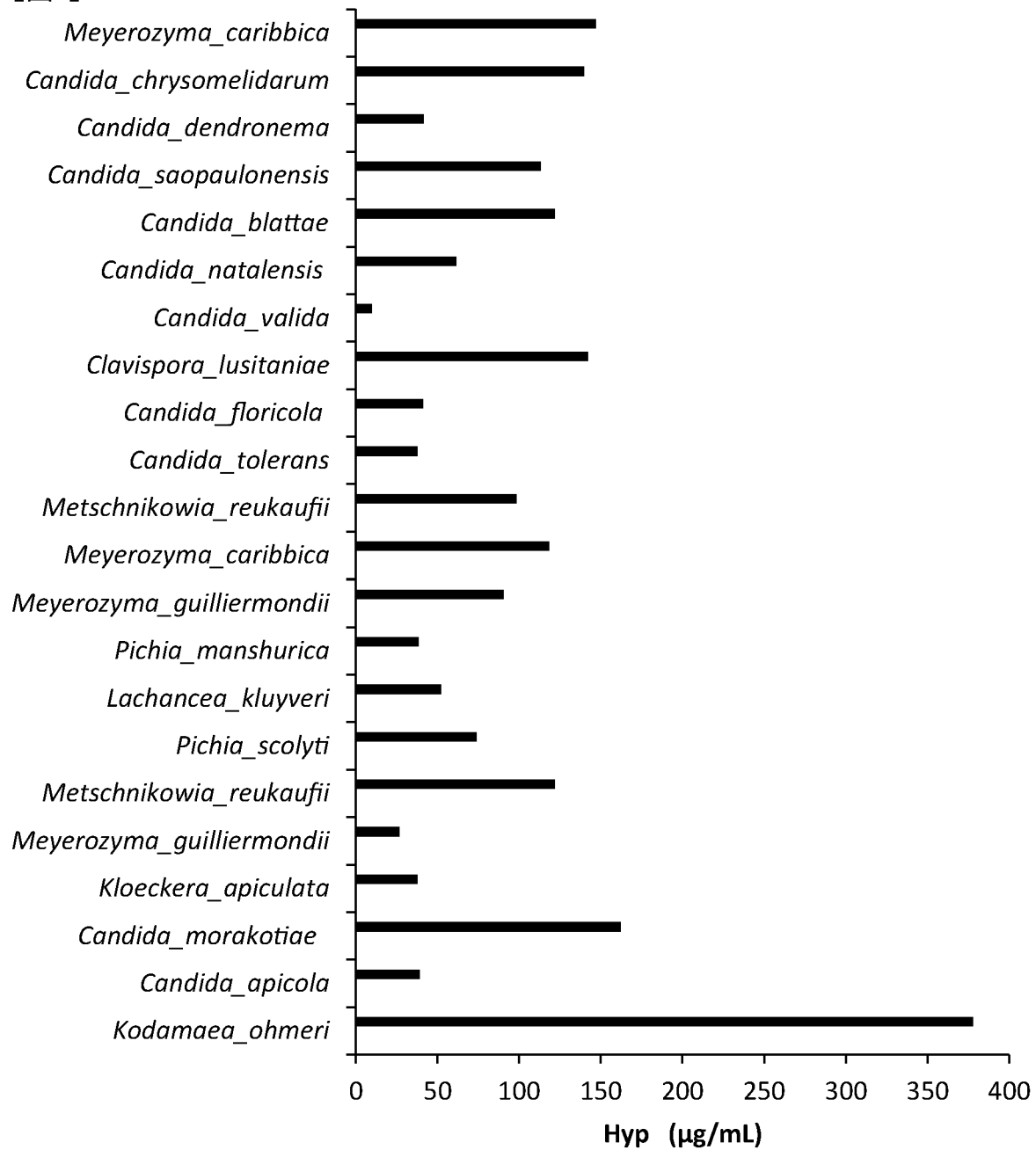
記載の使用。

- [請求項14] 請求項1～4のいずれかに記載の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含むことを特徴とする組成物。
- [請求項15] 請求項1～4のいずれかに記載の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含むことを特徴とする飲食品。
- [請求項16] 請求項1～4のいずれかに記載の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含むことを特徴とする化粧料又は化粧料原料。
- [請求項17] コラーゲン産生促進、表皮細胞の増殖促進、皮膚の保湿、皮膚の老化防止、皮膚のたるみの予防又は改善、皮膚のハリ改善、しわの予防又は改善及びアトピー性皮膚炎の改善から選ばれる用途に用いられる請求項16に記載の化粧料又は化粧料原料。
- [請求項18] 前記化粧料又は化粧料原料は、化粧料原料であり、*Ｌーヒドロキシプロリン*含量が5～300ppmである請求項16又は17に記載の化粧料又は化粧料原料。
- [請求項19] 前記化粧料又は化粧料原料は、化粧料であり、*Ｌーヒドロキシプロリン*含量が0.01～20ppmである請求項16又は17に記載の化粧料又は化粧料原料。
- [請求項20] *Ｌーヒドロキシプロリン*を含有する、コダマエア・オウメリ (*Kodamaea ohmeri*)、メチニコビア・ロイカウフィ (*Metschnikowia reukaufii*)、メイエロザイマ・カリビカ (*Meyerozyma caribbica*)、メイエロザイマ・ギリエルモンディ (*Meyerozyma guilliermondii*) 及びクラビスポラ・ルシタニエ (*Clavispora lusitaniae*) からなる群より選択される少なくとも1種の酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含むことを特徴とする*Ｌーヒドロキシプロリン*補強用組成物。
- [請求項21] 前記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、*Ｌープロリン* (Pro) 及び*Ｌーヒドロキシプロリン* (Hyp) の合計含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に対する*Ｌーヒドロキシプロリン*の含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

の割合 ($100 \times \text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp})$) が、35～100である請求項20に記載のＬ－ヒドロキシプロリン補強用組成物。

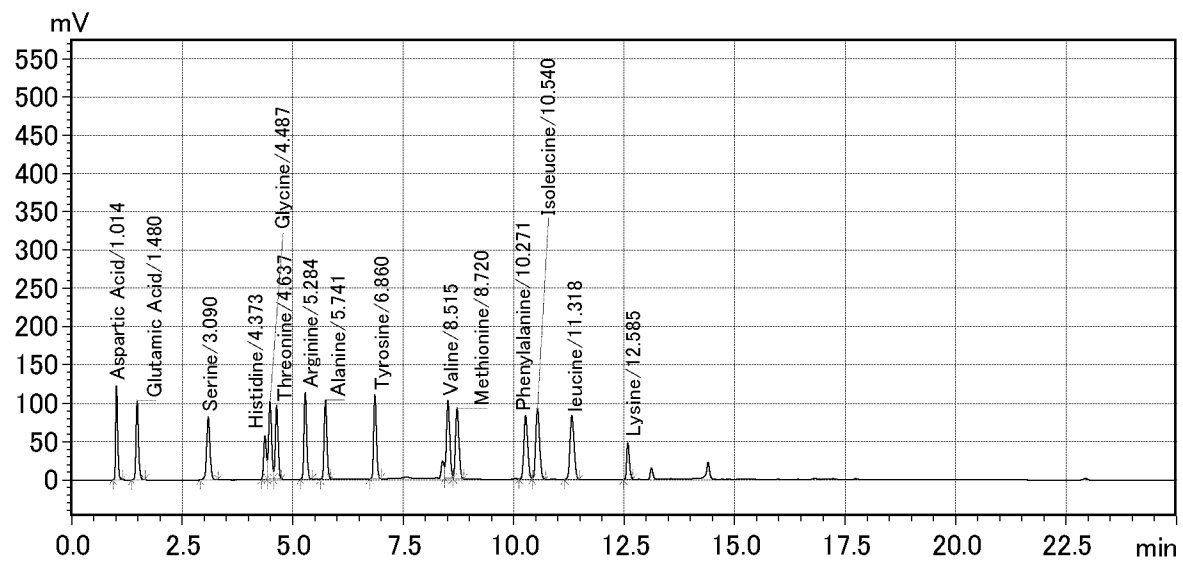
[請求項22] 前記酵母の菌体もしくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、Ｌ－ヒドロキシプロリンの含量が $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以上である請求項20又は21に記載のＬ－ヒドロキシプロリン補強用組成物。

[図1]

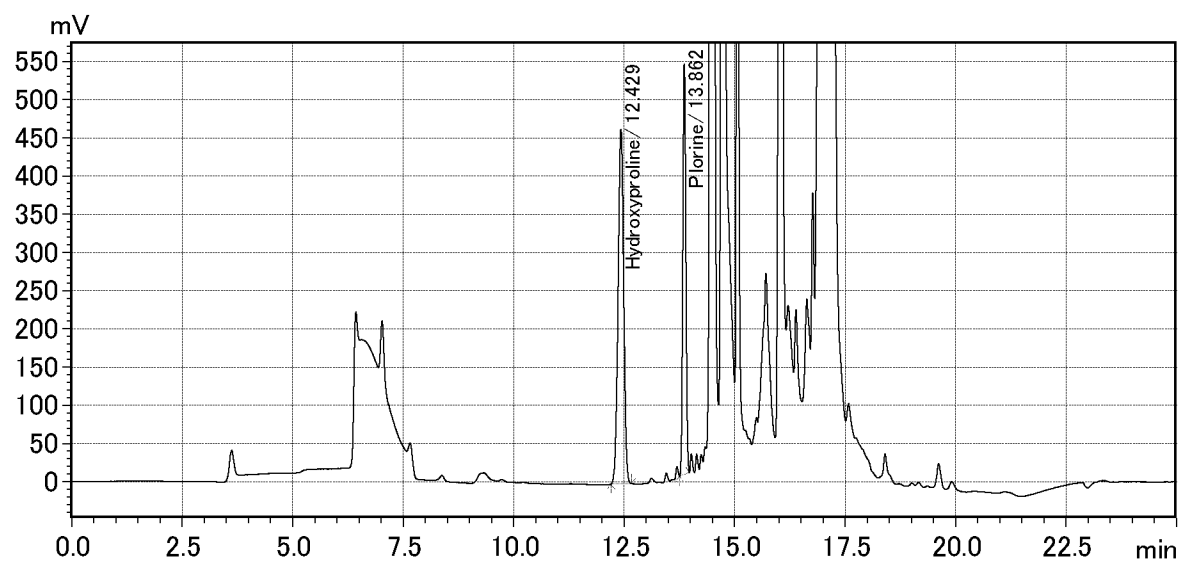


[図2]

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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)

C12N1/16, A23L31/10, A23L31/15, A23L33/14, A23L33/175, A61K8/44, A61K8/9728, A61K31/401, A61K36/06, A61P17/16, A61P43/00, A61Q5/02, A61Q5/06, A61Q5/12, A61Q19/00, A61Q19/10, C12P13/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), REGISTRY (STN),
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN), PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	CN 1821418 A (Zhejiang University of Technology), 23 August 2006 (23.08.2006), page 4, line 6 to page 5, line 14; examples (Family: none)	1-4, 14-19 5-13, 20-22
X A	CN 103667369 A (Beijing Guanhong Technology Group Co., Ltd.), 26 March 2014 (26.03.2014), paragraphs [0002] to [0006], [0018] to [0038] (Family: none)	1-4, 14-19 5-13, 20-22

☒ 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
25 July 2017 (25.07.17)

Date of mailing of the international search report
08 August 2017 (08.08.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017932

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VALDEZ, A. V. et al., Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana, Antonie van Leeuwenhoek, 2011, Vol.100, pages 497-506, ISSN 0003-6072 (Print) 1572-9699 (Online), page 497, summary, page 499, left column, lines 3 to 13	1-22
A	LIU, G.-L. and QIU, Y.-X., Optimizing culture condition of a flocculants-producing strain, Guangzhou Huagong, 2011, Vol.39, No.12, pages 84-87, ISSN 1001-9677, particularly, page 84, summary	1-22
A	JP 2004-516010 A (ATO B.V.), 03 June 2004 (03.06.2004), claims; abstract; examples & US 2003/0166149 A1 claims; abstract; examples & WO 2002/004615 A1	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/017932

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

*C12N1/16(2006.01)i, A23L31/10(2016.01)i, A23L31/15(2016.01)i,
A23L33/14(2016.01)i, A23L33/175(2016.01)i, A61K8/44(2006.01)i,
A61K8/9728(2017.01)i, A61K31/401(2006.01)i, A61K36/06(2006.01)i,
A61P17/16(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q5/02(2006.01)i,
A61Q5/06(2006.01)i, A61Q5/12(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i,
A61Q19/10(2006.01)i, C12P13/24(2006.01)i*

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. 特別ページ参照

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. C12N1/16, A23L31/10, A23L31/15, A23L33/14, A23L33/175, A61K8/44, A61K8/9728, A61K31/401, A61K36/06, A61P17/16, A61P43/00, A61Q5/02, A61Q5/06, A61Q5/12, A61Q19/00, A61Q19/10, C12P13/24

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 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 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)、REGISTRY (STN)、CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)、PubMed、CiNii

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 A	CN 1821418 A (浙江工业大学) 2006.08.23, 第4頁第6行～第5頁第14行, 実施例 (ファミリーなし)	1-4, 14-19 5-13, 20-22
X A	CN 103667369 A (北京贯虹科技集团有限公司) 2014.03.26, 段落0002～0006, 0018～0038 (ファミリーなし)	1-4, 14-19 5-13, 20-22

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 5 . 0 7 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

0 8 . 0 8 . 2 0 1 7

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 1 0 0 - 8 9 1 5
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）

白井 美香保

4 N

4 5 0 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 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	VALDEZ, A. V. et al., Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana, Antonie van Leeuwenhoek, 2011, Vol.100, pages 497-506, ISSN 0003-6072 (Print) 1572-9699 (Online), 第 4 9 7 頁要旨, 第 4 9 9 頁左欄第 3 行～第 1 3 行	1-22
A	LIU, G.-L. and QIU, Y.-X., Optimizing culture condition of a flocculants-producing strain, Guangzhou Huagong, 2011, Vol.39, No.12, pages 84-87, ISSN 1001-9677, 特に第 8 4 頁要旨	1-22
A	JP 2004-516010 A (エイティオー・ベー・ブイ) 2004.06.03, 特許請求の範囲, 要約, 実施例 & US 2003/0166149 A1, 特許請求の範囲, 要約, 実施例 & WO 2002/004615 A1	1-22

発明の属する分野の分類

C12N1/16(2006.01)i, A23L31/10(2016.01)i, A23L31/15(2016.01)i, A23L33/14(2016.01)i, A23L33/175(2016.01)i, A61K8/44(2006.01)i, A61K8/9728(2017.01)i, A61K31/401(2006.01)i, A61K36/06(2006.01)i, A61P17/16(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q5/02(2006.01)i, A61Q5/06(2006.01)i, A61Q5/12(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i, A61Q19/10(2006.01)i, C12P13/24(2006.01)i