

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-209272**(P2007-209272A)**(43) 公開日 **平成19年8月23日(2007.8.23)**

(51) Int. Cl.

C 1 2 P 9/00 (2006.01)

F I

C 1 2 P 9/00

テーマコード (参考)

4 B O 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 26 O L (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2006-33657 (P2006-33657)
(22) 出願日 平成18年2月10日 (2006.2.10)(71) 出願人 000001904
サントリー株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
(74) 代理人 100089705
弁理士 社本 一夫
(74) 代理人 100140109
弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74) 代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男
(74) 代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(74) 代理人 100128750
弁理士 福所 しのぶ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物発酵による長鎖高度不飽和脂肪酸を構成要素として含むリン脂質の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】長鎖高度不飽和脂肪酸を構成要素として含む、リン脂質の製造方法を提供する。

【解決手段】モルティエラ属に属する微生物であるモルティエラ・アルピナを、当該微生物の菌体中にリン脂質が蓄積する条件で培養し、その培養物からリン脂質を得る。ここで、当該培養物に含まれるすべてのリン脂質の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における、分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比は5%以下である。この方法により得られるリン脂質として、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジイルイノシトール、ホスファチジン酸、カルジオリピンなどのグリセロリン脂質が挙げられる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

長鎖高度不飽和脂肪酸を構成要素として含むリン脂質（LCPUFA-PL）の製造方法であって、以下：

（i）モルティエラ属に属する微生物を、当該微生物の菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養し；そして

（ii）その培養物からLCPUFA-PLを得る、ここで、当該培養物に含まれるすべてのリン脂質（PL）の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソバルミチン酸の組成比は5%以下である；

ことを含む、前記方法。

10

【請求項 2】

モルティエラ属に属する微生物がモルティエラ亜属である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

モルティエラ属に属する微生物がモルティエラ・アルピナである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養することが、pH 4～pH 10 の初発 pH を含む条件で培養することを含む、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5】

菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養することが、pH 4～pH 6 の pH を維持するように制御しながら培養することを含む、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養することが、3.7 mM～147 mM のリン酸塩を含む培地中で培養することを含む、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養することが、8.3 以上の最大所要攪拌動力（ $KLA = (P/V)^{0.95} \cdot Vs^{0.67}$ ）で攪拌しながら培養することを含む、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 8】

菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養することが、菌体を増殖させた後、10～25℃で4～18時間培養することを含む、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養することが、28℃で2日間～20日間培養した後、10～25℃で4～18時間培養することを含む、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 10】

菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養することが、
 （a）pH 4～pH 10 の初発 pH を含む条件で培養すること；
 （b）pH 4～pH 6 の pH を維持するように制御しながら培養すること；
 （c）3.7 mM～147 mM のリン酸塩を含む培地中で培養すること；
 （d）8.3 以上の最大所要攪拌動力（ $KLA = (P/V)^{0.95} \cdot Vs^{0.67}$ ）で攪拌しながら培養すること；および
 （e）菌体を増殖させた後または28℃で2日間～20日間培養した後、10～25℃で4～18時間培養すること；
 からなる群から選択される少なくとも2つの培養条件を含む、請求項 1 ないし 3 のい

50

れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

培養物が、培養液もしくは滅菌処理した培養液、または、それらから集菌した培養菌体もしくはその乾燥菌体を含む、請求項 1 ないし 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

L C P U F A - P L が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジン酸およびカルジオリピンからなる群より選択される少なくとも 1 種のグリセロリン脂質を含む、請求項 1 ないし 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

オメガ 6 系高度不飽和脂肪酸、オメガ 3 系高度不飽和脂肪酸、および、オメガ 9 系高度不飽和脂肪酸からなる群より選択される長鎖高度不飽和脂肪酸 (L C P U F A) を構成要素として含む L C P U F A - P L を製造するための、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

オメガ 6 系高度不飽和脂肪酸が、1 1 , 1 4 - エイコサジエン酸 (2 0 : 2 、 ω 6) 、 8 , 1 1 , 1 4 - エイコサトリエン酸 (ジホモ - γ - リノレン酸 ; 2 0 : 3 、 ω 6) 、 5 , 8 , 1 1 , 1 4 - エイコサテトラエン酸 (アラキドン酸 ; 2 0 : 4 、 ω 6) 、 1 3 , 1 6 - ドコサジエン酸 (2 2 : 2 、 ω 6) 、 7 , 1 0 , 1 3 , 1 6 - ドコサテトラエン酸 (2 2 : 4 、 ω 6) 、 および 4 , 7 , 1 0 , 1 3 , 1 6 - ドコサペンタエン酸 (2 2 : 5 、 ω 6) からなる群より選択される 1 以上の脂肪酸である、請求項 1 3 に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

オメガ 3 系高度不飽和脂肪酸が、1 1 , 1 4 , 1 7 - エイコサトリエン酸 (α - リノレン酸 ; 2 0 : 3 、 ω 3) 、 8 , 1 1 , 1 4 , 1 7 - エイコサテトラエン酸 (2 0 : 4 、 ω 3) 、 5 , 8 , 1 1 , 1 4 , 1 7 - エイコサペンタエン酸 (2 0 : 5 、 ω 3) 、 7 , 1 0 , 1 3 , 1 6 , 1 9 - ドコサペンタエン酸 (2 2 : 5 、 ω 3) 、 および 4 , 7 , 1 0 , 1 3 , 1 6 , 1 9 - ドコサヘキサエン酸 (2 2 : 6 、 ω 3) からなる群より選択される 1 以上の脂肪酸である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

オメガ 9 系高度不飽和脂肪酸が、5 , 8 , 1 1 - エイコサトリエン酸 (ミード酸 ; 2 0 : 3 、 ω 9) 、 7 , 1 0 , 1 3 - ドコサトリエン酸 (2 2 : 3 、 ω 9) 、 および 4 , 7 , 1 0 , 1 3 - ドコサテトラエン酸 (2 2 : 4 、 ω 9) からなる群より選択される 1 以上の脂肪酸である、請求項 1 3 に記載の方法。

30

【請求項 1 7】

アラキドン酸 (5 , 8 , 1 1 , 1 4 - エイコサテトラエン酸) およびドコサヘキサエン酸 (4 , 7 , 1 0 , 1 3 , 1 6 , 1 9 - ドコサヘキサエン酸) からなる群より選択される L C P U F A を構成要素として含む L C P U F A - P L を製造するための、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

分子中に少なくとも 1 つの共役二重結合を有する L C P U F A を構成要素として含む L C P U F A - P L を製造するための、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 9】

培養物に含まれるすべてのリン脂質 (P L) の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比が 5 % 以下であり、かつ、当該脂肪酸の総量におけるアラキドン酸の組成比が 1 3 % 以上である、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

培養物に含まれるすべてのリン脂質 (P L) の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比が 5 % 以下であり、かつ、当該脂肪酸の総量におけるアラキドン酸の組成比に対する該イソパルミチン酸の組成比が 1 / 6 以

50

下である、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

L C P U F A - P L が、アラキドン酸を含むリン脂質を含み、そして培養物に含まれるすべてのリン脂質中のアラキドン酸量が、乾燥菌体 1 g あたり 1 1 . 8 m g 以上であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

L C P U F A - P L が、ジホモ - γ - リノレン酸 (D G L A) を含むリン脂質を含み、そして培養物に含まれるすべてのリン脂質中の D G L A 量が、乾燥菌体 1 g あたり 1 . 5 m g 以上であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

L C P U F A - P L が、アラキドン酸を含むホスファチジルコリンを含み、そして、培養物に含まれるすべてのホスファチジルコリンの構成要素として含まれるアラキドン酸量が、乾燥菌体 1 g あたり 1 . 0 m g 以上であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

L C P U F A - P L が、アラキドン酸を含むホスファチジルエタノールアミンを含み、そして、培養物に含まれるすべてのホスファチジルエタノールアミンの構成要素として含まれるアラキドン酸量が、乾燥菌体 1 g あたり 0 . 5 m g 以上であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

L C P U F A - P L が、アラキドン酸を含むホスファチジルセリンを含み、そして、培養物に含まれるすべてのホスファチジルセリンの構成要素として含まれるアラキドン酸量が、乾燥菌体 1 g あたり 0 . 0 5 m g 以上であることを特徴とする 1 ないし 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

培養物が、アラキドン酸を構成要素として含むリン脂質およびアラキドン酸を構成要素として含むトリグリセリドを含むが、ここで、リン脂質の構成要素として存在するアラキドン酸量のトリグリセリドの構成要素として存在するアラキドン酸量に対する比が 0 . 2 以上であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、長鎖高度不飽和脂肪酸を構成要素として含むリン脂質 (long-chain poly-unsaturated fatty acid - phospholipid : L C P U F A - P L) の製造方法であって、モルティエラ属に属する微生物を、当該微生物の菌体中に L C P U F A - P L が多く蓄積する条件で培養を行い、そして当該微生物の培養物から L C P U F A - P L を抽出して得ることを含むことを特徴とする前記方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

リン脂質 (P L) には、脳機能改善効果や抗ストレス効果、コレステロール低下作用など様々な生理機能が知られている。P L にはいくつか種類が知られており、主なものとしては、ホスファチジルコリン (P C)、ホスファチジルセリン (P S)、ホスファチジルエタノールアミン (P E)、ホスファチジリンイノシトール (P I) 等が挙げられる。これら P L はそれぞれ異なった機能および物性を有している。

【0 0 0 3】

P L の中でも、炭素数 2 0 以上の長鎖高度不飽和脂肪酸 (L C P U F A と略す) を構成要素とするリン脂質 (説明の便宜上、L C P U F A - P L と略称する) は、脳機能改善効果が高く、L C P U F A を構成要素としないリン脂質 (説明の便宜上、non - L C P U F A - P L と略称する) よりも高い効果を有している (非特許文献 1 参照)。なお、L C P U F A の具体的な例としては、例えば、ドコサヘキサエン酸 (D H A) やアラキドン酸

10

20

30

40

50

(ARA)等を挙げることができる。

【0004】

また、リン脂質型でないLCPUFA誘導体にも脳機能改善効果があることが知られている(特許文献1参照)。ただし、リン脂質型でないLCPUFA誘導体の脳機能改善効果は、上記LCPUFA-PLやnon-LCPUFA-PL等のリン脂質とは異なり、大脳の海馬に対する作用に基づくと考えられている。

【0005】

LCPUFA-PLの脳機能改善効果が優れている理由としては、(1)脳内で実際に存在している構造であり、(2)脳血管関門を通過することができ、(3)肝臓を経由せずに吸収されるため肝臓で捕捉または修飾されずに脳等の組織に到達するという各理由が挙げられる。

10

【0006】

各理由について具体的に説明する。まず、(1)の理由については、脳内のLCPUFAはほとんどリン脂質の形で存在することが知られている。より具体的には、LCPUFAは、主として上記PC、PS、PE、PI等の化合物として存在しており、脳内で様々な機能を発揮している。次に、(2)の理由については、標識したリン脂質を経口摂取すると、脳組織で標識したリン脂質が検出されることから、リン脂質が脳組織へ到達することがわかっている(非特許文献2参照)。さらに、(3)の理由については、リン脂質が吸収される際には、消化器官内で、構成する2つの脂肪酸のうち、1つが加水分解されてリゾリン脂質が生じる。このリゾリン脂質が小腸から吸収され、小腸細胞内でリン脂質に再構成された後、リンパ管から吸収される(非特許文献3参照)。それゆえ、LCPUFA-PLは肝臓を経由せずに生体の全身に運ばれることになる。

20

【0007】

LCPUFA-PLは、従来から、これを多く含む動物の臓器や卵等から調製または精製することで生産されている。具体的には、牛脳からの調製や、豚肝臓あるいは魚卵からのリン脂質画分の精製等を挙げることができる(特許文献2および3参照)。また、ある種の海洋細菌がLCPUFA-PLを生産することや(非特許文献4参照)、アラキドン酸生産能を有する糸状菌が、アラキドン酸含有リン脂質を菌体内に含有していることも知られている(非特許文献5参照)。

【0008】

現在のリン脂質の工業的な生産法としては、一般的に、原料からトリグリセリドを主成分とする油脂を抽出する際に、当該油脂とともに抽出される。抽出時の溶媒としてはヘキサン等が用いられる。抽出された油脂にはガム質が含まれているが、このガム質は油脂の着色、泡立ちの原因となる。そこで、ガム質を脱ガム工程で除去することになるが、この工程でほとんどのリン脂質がガム質に移行するので、当該ガム質を精製することによりリン脂質を製造する。

30

【0009】

しかしながら、上記従来の技術で提供される、LCPUFA-PLはその供給量が不安定となる上に、品質は必ずしも安定していない。具体的には、現在入手できるLCPUFA-PLは、一般的には、上述した動物の臓器や卵黄、魚卵等を由来としている。これら動植物油由来の供給源においては、気象条件による供給量やLCPUFA含量の変動、さらに環境汚染による影響などの問題がある。さらには、牛脳をはじめとする動物臓器については、狂牛病の流行以降、利用が非常に困難な状況となっている。それゆえ、LCPUFA-PLを効率的かつ安定的に製造することが困難であるという問題を有している。

40

【0010】

微生物を用いた技術の場合、海洋細菌由来のLCPUFA-PLは、ヒトや動物にはほとんど見られず細菌特有の脂肪酸である分岐型脂肪酸を主要な成分として含んでおり、栄養組成物としては適さない。

【0011】

一方でアラキドン酸を生産する糸状菌の一つであるコニディオボラス属(*Conidiobolus*

50

sp.)を用いたLCPUFA-PLの生産が提案されているが(特許文献4参照)、この菌株はイソミリスチン酸(isomyristic acid)(iso 14:0)やイソパルミチン酸(isopalmitic acid)(iso 16:0)等の分岐型脂肪酸を多く含んでいることが報告されている(非特許文献6、非特許文献7参照)。その上一部の菌では、エントモフトラ目(entomophthorales)特有の真菌症(エントモフトラ症(entomophthorosis))と呼ばれる真菌症の一種で鼻腔内粘膜に初発し、咽頭、鼻腔内の気道上、顔面一帯へ拡大する)の原因菌となることもあり、健康人に感染症を起こす能力(バイオセーフティレベル2)を有するものもある(非特許文献8、非特許文献9参照)。また昆虫その他の小動物への寄生性を有しており(非特許文献10参照)、人体・環境に与える悪影響という観点から工業的に用いる微生物としては不相当である。

10

【0012】

また現在、アラキドン酸含有トリグリセリドの工業生産に用いられているモルティエラ属(*Mortierella* sp.)においては、アラキドン酸生産のための種々の条件検討が積極的に行われており、なかでも各種ミネラル塩の添加や、培地のpH、培養温度などによりアラキドン酸の生産性が向上することが報告されている。具体的には、各種ミネラル塩の添加が、菌体内に蓄積されるLCPUFA含有トリグリセリドとLCPUFA-PLの生産性に影響することが分かっている(非特許文献11)。また初発pHに関しては、(1)培養の初発pHが6.0~6.6が至適であること(非特許文献11)、(2)培養後期ではpHを上げることにより、アラキドン酸含有トリグリセリドの生産量が上がること(特許文献5)が知られているが、リン脂質画分に関して最適化された知見はない。更に培養温度に関しては、低温で5日以上培養することによりリン脂質中LCPUFA含有量が増加することが知られている(非特許文献12)。しかしながらこのような長期の低温培養はコスト面からも工業生産としては不向きである上、上記の条件は何れもトリグリセリドの構成要素として存在するLCPUFA生産に注目した培養条件であり、LCPUFA-PLの生産に特化した培養条件は未だ検討されていないのが実情である。このような培養方法で生産した菌体内では、LCPUFA-PLは著量のトリグリセリドに混入した微量成分として検出されているものの、その含有量は微量である上(11.7mg/g 乾燥菌体 非特許文献5参照)、トリグリセリド生産の副産物であるため品質や供給量が安定ではなく、LCPUFA-PLの十分な利用が期待できない。

20

【0013】

30

以上のことから、より安全に、安定的に食品や動物飼料に利用することが可能なLCPUFA-PL含有油脂の開発が望まれている。

【特許文献1】特開2003-48831号公報(2003年(平成15)2月21日公開)

【特許文献2】特開平11-35587号公報(1999年(平成11)2月9日公開)

【特許文献3】特開平8-59678号公報(1996年(平成8)3月5日公開)

【特許文献4】特公平6-2068号公報(1994年(平成6)1月12日公告)

【特許文献5】特表平10-51244号公報(1998年(平成10)12月2日公表)

【非特許文献1】A. Bruni, et al., Nature, Vol.260, p331-333(1976)

40

【非特許文献2】G. Toffano, et al. Clinical Trials Journal, Vol.24, p18-24(1987)

【非特許文献3】今泉勝巳、臨床栄養、第67巻、p119(1985)

【非特許文献4】矢澤一良ら、油科学、第44巻、p787-793(1995)

【非特許文献5】S. Shimizu, et al., JAOCS, Vol.68, No.4, p254-258(1991)

【非特許文献6】D. Tyrrell, Can. J. Microbiol., Vol.17, p1115-1118(1971)

【非特許文献7】D. Tyrrell, et al., Can. J. Microbiol., Vol.22, p1058-1060(1976)

【非特許文献8】G. S. de Hoog, et al., ATLAS OF CLINICAL FUNGI, 2nd edition, p.118-123

50

【非特許文献 9】日本細菌学会、病原細菌に関するバイオセーフティ指針、改定第 2 版、p7 (2002 年)

【非特許文献 10】長谷川武治ら、微生物の分類と同定、p19-20、東京大学出版会 (1975 年)

【非特許文献 11】K. Higashiyama, et al., JAOCs, Vol.75, p1501-1505 (1998)

【非特許文献 12】S. Jareonkitmongkol, et al., Arch. Microbiol., Vol.161, p316-319 (1994)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

10

本発明では分岐脂肪酸の含有量が低く、かつ長鎖高度不飽和脂肪酸を構成要素として含むリン脂質 (LCPUFA-PL) を高含量蓄積する微生物の培養物を得ることにより、より安心して食品や動物飼料に用いることができ、品質の安定した LCPUFA-PL を、効率的かつ安定的に供給することが可能な技術の提供を目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者は上記課題を解決するため、分岐型脂肪酸含有量が少なく、そして、効率的な LCPUFA-PL の製造方法を求めた結果、長鎖高度不飽和脂肪酸 (LCPUFA) 含有脂質を生産する脂質生産菌としてモルティエラ属が当該事項に好適であることを見出した。

20

【0016】

しかも生体膜構成要素である LCPUFA-PL は、菌体内合成が厳密に制御されていると予想されるにも関わらず、菌体あたりの LCPUFA-PL 量が顕著に増える条件を見出し、本発明を完成させるに至った。

【0017】

すなわち本発明は、分岐型脂肪酸含量が少なく、かつ LCPUFA を構成要素として含むリン脂質 (LCPUFA-PL) の製造方法であって、上記脂質生産菌菌体中に LCPUFA-PL を多く蓄積させる培養を行うことを特徴としている。上記製造法においては、さらに、上記脂質生産菌培養工程の後段で実施され、LCPUFA-PL の供給原料となる乾燥菌体を得ることや、菌体から LCPUFA-PL 含有油脂を抽出する油脂抽出工程も含まれる。

30

【0018】

したがって、本発明の方法は、

(i) モルティエラ属に属する微生物を、当該微生物の菌体中に LCPUFA-PL が蓄積する条件で培養し；そして

(ii) その培養物から LCPUFA-PL を得る、ここで、当該培養物に含まれるすべてのリン脂質 (PL) の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比は 5 % 以下である；

ことを含む、LCPUFA-PL の製造方法である。

【0019】

40

また、本発明の方法は、

(i) モルティエラ属に属する微生物を、当該微生物の菌体中に LCPUFA-PL が蓄積する条件で培養し；

(ii) その培養物から脂質成分を総脂質画分として抽出し、さらにトリグリセリド画分およびリン脂質画分に分画し；そして

(iii) 当該リン脂質画分から LCPUFA-PL を得る、ここで、当該培養物に含まれるすべてのリン脂質 (PL) の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比は 5 % 以下である；

ことを含む、LCPUFA-PL の製造方法である。

【0020】

50

本発明の方法で用いる微生物

本発明の方法で用いる微生物は、モルティエラ属に属し、LCPUFA-PLを生成し得る微生物であれば特に限定されるものではない。本発明の方法で用いるモルティエラ属の微生物は、モルティエラ亜属であることが好ましい。モルティエラ亜属の微生物としては、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*)、モルティエラ・ポリセファラ (*Mortierella polycephala*)、モルティエラ・エキシグア (*Mortierella exigua*)、モルティエラ・フィグロフィラ (*Mortierella hygrophila*)、モルティエラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) 等が含まれる。より好ましくは、本発明の方法で用いるモルティエラ属の微生物は、モルティエラ・アルピナである。

【0021】

モルティエラ属に属する微生物は、LCPUFAとしてアラキドン酸 (ARA) を構成要素として含むLCPUFA-PL (ARA-PLと略す) の生産能を有する種や株が多く知られている。ARA-PLの生産能を有するモルティエラ属を選択する場合には、当該モルティエラ属の微生物がモルティエラ亜属であることが好ましい。モルティエラ亜属の微生物としては、モルティエラ・アルピナ、モルティエラ・ポリセファラ、モルティエラ・エキシグア、モルティエラ・フィグロフィラ、モルティエラ・エロンガタ等を挙げることができる。

【0022】

ARA-PLの生産能を有するモルティエラ亜属の微生物のより具体的な菌株としては、例えば、モルティエラ・ポリセファラ (*M. polycephala*) IFO6335、モルティエラ・エロンガタ (*M. elongata*) CBS125.71、モルティエラ・エキシグア (*M. exigua*) IFO8571、モルティエラ・ベルヤコバ (*M. beljakovae*) CBS601.68、モルティエラ・スクムケリ (*M. schmuckeri*) NRRL2761、モルティエラ・フィグロフィラ (*M. hygrophila*) IFO5941、モルティエラ・アルピナ (*M. alpina*) IFO8568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68等を挙げることができる。これらの菌株は、何れも大阪市の財団法人発酵研究所 (IFO) 米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection, ATCC) および、Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) 等から何ら制限なく入手することができる。さらに、ARA-PLの生産能を有するモルティエラ亜属の他の菌株としては、本発明者らを含む研究グループが土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ (*M. elongata*) SAM0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を挙げることができる。

【0023】

また、LCPUFAとしてジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) を構成要素として含むLCPUFA-PL (DGLA-PLと略す) の生産能を有する微生物のより具体的な菌株としては、本発明者らを含む研究グループが土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ (*M. elongata*) SAM1860 (微工研菌条第3589号) を挙げることができる。

【0024】

そして、LCPUFAとしてミード酸を構成要素として含むLCPUFA-PL (ミード酸-PLと略す) の生産能を有する微生物のより具体的な菌株としては、本発明者らを含む研究グループが土壌から分離した菌株モルティエラ・アルピナ (*M. alpina*) SAM2086 (8生寄文第1235号、FERMP-15766) を挙げることができる。

【0025】

本発明の方法で用いるモルティエラ属に属する微生物は、生産されるLCPUFAの種類に応じた菌株を1種のみを選択してもよいし、2種以上を組み合わせ選択してもよい。

【0026】

10

20

30

40

50

本明細書において、本発明の方法に用いる微生物を、脂質生産菌または菌と記載することがある。本明細書においては、これらは同義である。

【0027】

本発明の方法における微生物培養工程

本発明の方法に使用する微生物の培養条件は特に限定されるものではなく、培養しようとする菌株の種類に応じて適宜設定してよい。

【0028】

本発明に使用される上記菌株を含む微生物を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、または予め培養して得られた前培養液を、液体培地または固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステープリカー、大豆タンパク、脱脂ダイズ、綿実カス等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができるが、特に大豆から得られる窒素源、具体的には大豆、脱脂大豆、大豆フレーク、食用大豆タンパク、おから、豆乳、きな粉等が挙げられる。また、脱脂大豆に熱変性を施したものの、より好ましくは脱脂大豆を約70～90で熱処理し、さらにエタノール可溶成分を除去したものを単独または複数で、あるいは前記窒素源と組み合わせて使用することができる。実用上、一般的には、炭素源の総添加量は0.1～40重量%の範囲内であることが好ましく、1～25重量%の範囲内がより好ましい。また、窒素源の総添加量は0.01～10重量%の範囲内が好ましく、0.1～10重量%の範囲内がより好ましい。さらに、培地流加する場合には、初発の炭素源の添加量を1～5重量%の範囲内とするとともに、初発の窒素源の添加量を0.1～6重量%の範囲内とすることが好ましい。培養途中に流加する培地の成分は、炭素源および窒素源の双方であればよいが、より好ましくは炭素源のみを流加すればよい。

【0029】

上記炭素源・窒素源以外の成分も特に限定されるものではなく、必要に応じて、公知の微量栄養源等を適宜選択して添加することができる。微量栄養源としては、例えば、リン酸イオン、カルシウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン等のアルカリ金属またはアルカリ土類金属のイオン；鉄、ニッケル、コバルト、マンガン等のV I I B～V I I I族の金属イオン；銅、亜鉛等のI B～I I B族の金属イオン；各種ビタミン類；等を挙げることができる。液体培地における上述した各成分の含有率（添加率）は特に限定されるものではなく、本発明の方法に用いる微生物の生育を阻害しない濃度であれば、公知の範囲内とすればよい。

【0030】

特にリン脂質の生産性においてはリン酸塩を添加するのが好適である。添加するリン酸塩は、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等が挙げられる。添加するリン酸塩の濃度は、本発明の方法に用いる微生物の成育を阻害しない濃度であれば特に限定されないが、3.7 mM～147 mMの範囲内であることが好ましく、3.7 mM～44 mMの範囲とすることがより好ましく、22 mM～44 mMの範囲内が特に好ましい。これにより脂質生産菌体内のリン脂質含量を高めることができる。

【0031】

培養液のpHは、本発明の方法に用いる微生物の生育を阻害しない範囲であれば特に限定されるものではない。例えば、初発pHは、pH4～pH10の範囲であればよく、好ましくは弱酸性であるpH4～6であり、さらに好ましくはpH4～5に調製する。培養中のpHは制御しても、制御しなくてもよい。本発明の方法の好ましい態様においては、培養中のpHを制御する。本発明に用いるモルティエレラ属を液体培地で培養を行った場合、培養後期、特に炭素源の枯渇後に培養液中のpHが上昇する。このpH上昇を抑え、

培養開始から培養期間を通してpH 4 ~ 6、好ましくはpH 4 ~ 5.5の低い範囲内のpHを維持するよう制御して培養することにより、菌体内に蓄積するリン脂質の量を高めることができ、それにより菌体あたりのLCPUFA-PL量を増やすことができる。

【0032】

培養温度は、本発明の方法に用いる微生物の生育を阻害しない温度であれば特に限定されるものではないが、一般的には、5 ~ 40の範囲内であればよく、20 ~ 30の範囲内が好ましい。培養期間も特に限定されるものではないが、通常は、2 ~ 20日間の範囲内であればよく、工業的には3 ~ 10日間の範囲内が好ましく、3 ~ 6日間の範囲内がより好ましい。

【0033】

また、好ましい態様において本発明の方法の培養温度および培養期間は以下のように制御する。先に一般的な糸状菌の最適生育温度である28前後の比較的高温範囲内で、2 ~ 20日間、好ましくは3 ~ 10日間、より好ましくは3 ~ 6日間、さらに好ましくは2 ~ 4日間、最も好ましくは4日間培養して菌体を増殖させた後、最初の培養温度よりも低温となる温度範囲で培養すれば、生産される不飽和脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸(PUFA)の割合を高めることができる。このときの低温の温度範囲としては10 ~ 25が好ましく、15 ~ 25がより好ましいが、実用的観点からは20 ~ 25が特に好ましい。またこのような低温培養を行う期間は特に限定されるものではないが、4時間 ~ 18時間の範囲内が好ましく、12時間 ~ 18時間の範囲がより好ましい。このような短時間の温度制御により、コストを抑えて得られるリン脂質中のLCPUFAの割合を高めることができる。

10

20

【0034】

培養中に培地に施す外的な処理も特に限定されるものではなく、通気攪拌培養、振盪培養、静置培養等の公知の培養方法を適宜選択すればよい。特に通気攪拌培養においては、攪拌により培養液の流動性を高めることでLCPUFA-PLの生産性を上げることができ、その場合の最大所要攪拌動力KLA(= (P/V)^{0.95} Vs^{0.67})は8.0以上、好ましくは8.3以上である。

【0035】

上述した培養条件、すなわち、初発pH、培養中のpHの制御、培地中に添加するリン酸塩の濃度、培養温度および期間、ならびに攪拌力、等の条件は単独で、または組み合わせて使用することにより、目的とするLCPUFA-PLを菌体内に多量に蓄積させることができる。

30

【0036】

なお、本発明にかかる製造方法においては、LCPUFAを含む不飽和脂肪酸の収率を増加させる目的で、不飽和脂肪酸の前駆体や基質を培地中に加えてもよい。不飽和脂肪酸の前駆体や基質としては、具体的には、例えば、ヘキサデカン、オクタデカン等の炭化水素；オレイン酸、リノール酸、ドコサヘキサエン酸等の脂肪酸またはその塩；エチルエステル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル等の脂肪酸エステル；オリーブ油、大豆油、なたね油、綿実油、ヤシ油、魚油等の油脂類；等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。これらは、単独で用いてもよいし、2種類以上を適宜組み合わせて用いてもよい。上記不飽和脂肪酸の前駆体や基質の添加量は特に限定されるものではないが、一般的には、培地全重量に対して0.001 ~ 10%の範囲内であればよく、0.5 ~ 10%の範囲内であることが好ましい。また、これらを唯一の炭素源として脂質生産菌を培養してもよい。このように適当な基質を培地に添加することにより、目的脂肪酸をリン脂質内に効率よく取り込ませることができる。

40

【0037】

本発明の方法におけるLCPUFA-PLの抽出および精製工程

本発明にかかる製造方法では、上記のようにして培養した培養物からLCPUFA-PLを得るため、リン脂質(PL)抽出工程を必須の工程として有する。このPL抽出工程において、菌体からPLを抽出する方法は特に限定されるものではないが、抽出媒による

50

抽出を用いることが好ましい。

【0038】

本発明の方法においてLCPUFA-PLを抽出する培養物とは、上記のようにして培養した、培養液そのものであってもよく、滅菌処理した培養液であってもよい。または、培養物は、培養液から集菌した後そのままの培養菌体、すなわち生菌のまま用いることができるし、生菌を滅菌処理したものをを用いることもできる。また、上記の培養液は培養途中の培養液であってもよく、培養終了時の培養液であってもよい。集菌した菌体は、塊状のまま用いてもよいし、板状、ひも状、粒状、粉末状など任意の形状に加工してから用いてもよい。菌体の集菌方法も特に限定されるものではなく、培養した菌体が少量の場合には、一般的な遠心分離機を用いて遠心分離すればよい。大量の場合には、連続遠心分離により分離することが好ましいが、これに膜等による濾過を組み合わせてもよい。また、集菌した菌体は湿菌体のままでもよいし、湿菌体を乾燥させた乾燥菌体として用いてもよい。特に本発明では、乾燥菌体を用いることが好ましい。これにより、効率的に油脂を抽出することができる。湿菌体の乾燥方法は特に限定されるものではなく、送風、熱処理、減圧処理、凍結乾燥等の公知の乾燥処理を挙げることができる。

10

【0039】

上記抽出媒による抽出としては、用いられる抽出媒は特に限定されるものではないが、一般的には、脂肪族系有機溶媒および水の少なくとも何れかの抽出液、または、超臨界炭酸ガスを挙げることができる。上記抽出液のうち、脂肪族有機溶媒としては、具体的には、例えば、ヘキサン、石油エーテル等の飽和炭化水素；アセトン等のケトン類；メタノール、エタノール等のアルコール類；酢酸エチル等のエステル類；クロロホルム等のハロゲン化炭化水素；アセトニトリル等のシアン化炭化水素；ジエチルエーテル等のエーテル類；等を挙げることができる。これら抽出液は1種類のみを用いてもよいし、2種類以上を適宜選択して用いてもよい。上記抽出液の中でも、リン脂質を効率的に抽出するための脂肪族系有機溶媒としては、飽和炭化水素、アルコール、飽和炭化水素とアルコールとの混合溶媒、または、ハロゲン化炭化水素とアルコールとの混合溶媒が用いられることが好ましい。飽和炭化水素としてはヘキサンが用いられることが好ましく、アルコールとしてはエタノールが用いられることが好ましく、飽和炭化水素とアルコールとの混合溶媒としては、ヘキサン/エタノール混合溶媒が用いられることが好ましく、ハロゲン化炭化水素とアルコールとの混合溶媒としては、クロロホルム/メタノール混合溶媒が用いられることが好ましい。上記各有機溶媒の中でも、特に、食品に用いる場合には、ヘキサンおよび/またはエタノールを用いることが好ましい。なお、ヘキサンおよびエタノールの混合溶媒やエタノールを用いる場合には、これに少量の水を加えてもよい。

20

30

【0040】

上記抽出媒による抽出処理は、バッチ式で行ってもよいし連続式で行ってもよい。また、抽出媒による抽出の条件も特に限定されるものではなく、抽出しようとするPLの種類や、菌体の量（体積や重量）に応じて適切な温度、適切な抽出媒の量、適切な時間で抽出すればよい。抽出時には、菌体を抽出媒に分散させた上で緩やかに攪拌することが好ましい。これにより効率的な抽出が可能となる。

【0041】

本発明の方法により得られるLCPUFA-PLは、高濃度のLCPUFAを含有する液状油脂（トリグリセリドなど）に溶解した組成物として抽出されてもよい。高濃度のLCPUFAを含有する液状油脂（トリグリセリドなど）としては、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、脂肪酸、脂肪酸アルコールエステルなどを挙げることができる。高濃度のLCPUFAを含有する液状油脂（トリグリセリドなど）を構成するLCPUFAとしては、炭素数20以上で二重結合を有する不飽和構造の脂肪酸であればよく、特に限定されるものではない。また、本発明の方法により得られるLCPUFA-PLは、ステロール、ステロールエステル、糖脂質、スフィンゴ脂質、ワックス、色素、カロテノイド、トコフェロール類などの脂溶性物質を含む組成物として抽出されてもよい。

40

【0042】

50

PL 精製工程の具体的な方法、すなわち上記 PL 抽出工程で得られた粗 PL を精製する方法は特に限定されるものではなく、公知の精製方法、例えば、薄層クロマトグラフィー (TLC)、カラムクロマトグラフィー法、アセトン分画等の溶媒分画法等を用いることができる。クロマトグラフィーに用いられる担体は特に限定されるものではなく、公知のものを好適に用いることができる。溶媒分画法に用いられる溶媒も特に限定されるものではなく、公知の溶媒を好適に用いることができる。

【0043】

本発明の方法により製造される脂質

本発明の方法により製造されるリン脂質は、長鎖高度不飽和脂肪酸 (LCPUFA) を構成要素として含むものである。本明細書において LCPUFA とは、炭素数 20 以上で二重結合を有する不飽和構造の脂肪酸をいう。

10

【0044】

本発明の方法により得られる乾燥菌体中に含まれるリン脂質は、構成要素として LCPUFA が含まれているもの (LCPUFA-PL) であれば特に限定されるものではなく、公知のすべてのリン脂質、例えばグリセロリン脂質、スフィンゴリン脂質、リゾリン脂質等、を挙げることができる。具体的には、例えば、グリセロリン脂質としては、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルグリセロール (PG)、カルジオリピン (CL)、等；スフィンゴリン脂質としては、スフィンゴミエリン (SP) 等；リゾリン脂質としては、リゾホスファチジルコリン (LPC)、リゾホスファチジルセリン (LPS)、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、リゾホスファチジルイノシトール (LPI)、リゾホスファチジルグリセロール (LPG)、ホスファチジン酸、等；が挙げられる。これらリン脂質の中でも、PC、PS、PE、PI、ホスファチジン酸および CL が好ましい。

20

【0045】

本発明の方法により製造されるリン脂質に構成要素として含まれる LCPUFA としては、炭素数 20 以上で二重結合を有する不飽和構造の脂肪酸であればよく、特に限定されるものではない。好ましくは、オメガ 9 ($\omega 9$) 系高度不飽和脂肪酸、オメガ 6 ($\omega 6$) 系高度不飽和脂肪酸、およびオメガ 3 ($\omega 3$) 系高度不飽和脂肪酸からなる群より選択される LCPUFA である。ここで、 $\omega 9$ 系、 $\omega 6$ 系、 $\omega 3$ 系とは、不飽和脂肪酸の二重結合の位置に応じた系統である。具体的には、 $\omega 9$ 系、 $\omega 6$ 系、 $\omega 3$ 系とは、脂肪酸のカルボキシル基と反対側の炭素から番号付けをしたときに、それぞれ、9 位、6 位、3 位に二重結合を有する不飽和脂肪酸の系統を意味する。具体的な LCPUFA としては、例えば、 $\omega 9$ 系高度不飽和脂肪酸では、5, 8, 11 - エイコサトリエン酸 (ミード酸；20:3、 $\omega 9$)；7, 10, 13 - ドコサトリエン酸 (22:3、 $\omega 9$)；4, 7, 10, 13 - ドコサトリエン酸 (22:4、 $\omega 9$) 等を挙げることができる。また、 $\omega 6$ 系高度不飽和脂肪酸では、11, 14 - エイコサジエン酸 (20:2、 $\omega 6$)；8, 11, 14 - エイコサトリエン酸 (ジホモ- γ -リノレン酸；20:3、 $\omega 6$)；5, 8, 11, 14 - エイコサテトラエン酸 (アラキドン酸；20:4、 $\omega 6$)；13, 16 - ドコサジエン酸 (22:2、 $\omega 6$)；7, 10, 13, 16 - ドコサテトラエン酸 (22:4、 $\omega 6$)；4, 7, 10, 13, 16 - ドコサペンタエン酸 (22:5、 $\omega 6$) 等を挙げることができる。 $\omega 3$ 系高度不飽和脂肪酸では、11, 14, 17 - エイコサトリエン酸 (α -リノレン酸；20:3、 $\omega 3$)；8, 11, 14, 17 - エイコサテトラエン酸 (20:4、 $\omega 3$)；5, 8, 11, 14, 17 - エイコサペンタエン酸 (20:5、 $\omega 3$)；7, 10, 13, 16, 19 - ドコサペンタエン酸 (22:5、 $\omega 3$)；4, 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサヘキサエン酸 (22:6、 $\omega 3$)、等を挙げることができる。なお、上記の各 LCPUFA の名称の後のかっこ内でコロンを間に挟んだ 2 つの数字は、脂肪酸の炭素鎖長および不飽和度を表すものであり、「(炭素鎖長)：(二重結合の数)」を示している。上記 LCPUFA の中でも、アラキドン酸 (ARA) および / または 4, 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサヘキサエン酸 (DHA) がより好ましく用いられる。

30

40

50

これらのLCPUFAは、LCPUFA-PLの構成要素として1種類のみ含まれてもよいし、2種類以上含まれてもよい。

【0046】

上記LCPUFAにおいては、構造中に含まれる炭素-炭素二重結合構造(-C=C-)のうち、少なくとも1つが共役二重結合となっていてよい。この共役二重結合は、カルボニル基(C=O)と共役しているものであってもよいし、互いに隣接する炭素-炭素二重結合同士で共役しているものであってもよい。

【0047】

したがって、本発明の方法は、上記に詳述したLCPUFA-PLを製造するための方法である。また、本発明の製造方法により製造されるリン脂質も本発明の範囲内である。

10

【0048】

本発明の方法により製造されるリン脂質は、上述したリン脂質が少なくとも1種含まれていればよく、2種類以上のリン脂質が含まれていてもよい。また、精製工程を経ない粗リン脂質である場合には、各種微量成分を含んでいてもよい。このような微量成分としては、脂質生産菌由来のリン脂質以外の脂質成分(油脂等)を挙げることができる。

【0049】

本発明の方法により得られるリン脂質の組成の特色

本発明の方法により得られるLCPUFA-PLの組成は、当業者に公知のいずれかの手法によって測定することができる。例えば、リン脂質の脂肪酸部分の定性および定量は、当業者に公知の塩酸メタノール法によりリン脂質の構成要素である脂肪酸をメチルエステルに誘導してガスクロマトグラフィーで評価することにより行うことができる。リン脂質の親水基部分の分析は、公知の分離法、例えば、薄層クロマトグラフィー(TLC)、カラムクロマトグラフィー法、質量分析法、アセトン分画等の溶媒分画法、等を用いて行うことができる。

20

【0050】

本発明の方法による培養物から得られるリン脂質は、その構成要素として含まれる、イソミリスチン酸(isomyristic acid)(iso14:0)やイソパルミチン酸(isopalmitic acid)(iso16:0)等の分岐型脂肪酸が少ないことを特徴としている。分岐型脂肪酸の含有率は、例えば、イソパルミチン酸の含有率で評価することができる。具体的には、分岐型脂肪酸が少ないとは、すべてのPL中の構成要素として含まれる総脂肪酸の総量におけるイソパルミチン酸の組成比が5%以下であることを意味し、好ましくは0.5%以下、より好ましくは0.1%以下であることを意味する。

30

【0051】

また、本発明の方法により得られるLCPUFA-PLを含むリン脂質は、培養物に含まれるすべてのリン脂質の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比が5%以下であり、かつ、当該脂肪酸の総量におけるアラキドン酸の組成比が13%以上であってよい。好ましくは、イソパルミチン酸の組成比は0.5%以下または0.1%以下であってよく、アラキドン酸の組成比は20%以上または25%以上であってよい。

【0052】

さらに、本発明の方法により得られるLCPUFA-PLを含むリン脂質は、培養物に含まれるすべてのリン脂質の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比が5%以下であり、かつ、当該脂肪酸の総量におけるアラキドン酸の組成比に対する該イソパルミチン酸の組成比が1/6以下であってよい。好ましくは、イソパルミチン酸の組成比は0.5%以下または0.1%以下であってよく、アラキドン酸の組成比に対するイソパルミチン酸の組成比は1/10以下または1/20以下であってよい。

40

【0053】

本発明にかかる製造方法で得られるリン脂質について、乾燥菌体1g中に含まれるすべてのリン脂質の構成要素として含まれる脂肪酸量は、特に限定されるものではないが、3

50

4 . 7 m g 以上であることが好ましく、3 6 . 3 m g 以上であることがより好ましく、4 7 . 7 m g 以上であることがさらに好ましく、6 5 . 2 m g 以上であることが特に好ましい。

【 0 0 5 4 】

本発明の方法で得られる L C P U F A - P L の構成要素の L C P U F A としてアラキドン酸 (A R A) が含まれている場合、乾燥菌体 1 g 中に含まれるすべてのリン脂質の構成要素として含まれる A R A 量は、特に限定されるものではないが、1 2 . 1 m g 以上であることが好ましく、1 5 . 1 m g 以上であることがより好ましく、1 9 . 9 m g 以上であることがさらに好ましい。

【 0 0 5 5 】

また、本発明の方法で得られる L C P U F A - P L の構成要素の L C P U F A としてジホモ - γ - リノレン酸 (D G L A) が含まれている場合、乾燥菌体 1 g 中に含まれるすべてのリン脂質の構成要素として含まれる D G L A 量は、特に限定されるものではないが、1 . 5 m g 以上であることが好ましく、1 . 8 m g 以上であることがより好ましく、2 . 0 m g 以上であることがさらに好ましい。

【 0 0 5 6 】

本発明の方法で得られる L C P U F A - P L がフォスファチジルコリン (P C) である場合、乾燥菌体 1 g 中に含まれるすべての P C の構成要素として含まれる脂肪酸量は、特に限定されるものではないが、5 . 9 9 m g 以上、好ましくは 1 0 . 0 m g 以上、より好ましくは 1 5 . 0 m g 以上、さらに好ましくは 2 0 . 0 m g 以上である。また、本発明の方法で得られる L C P U F A - P L がフォスファチジルエタノールアミン (P E) である場合、乾燥菌体 1 g 中に含まれるすべての P E の構成要素として含まれる脂肪酸量は、特に限定されるものではないが、7 . 6 2 m g 以上、好ましくは 1 0 . 0 m g 以上、より好ましくは 1 5 . 0 m g 以上、さらに好ましくは 2 0 . 0 m g 以上である。さらに、本発明の方法で得られる L C P U F A - P L がフォスファチジルセリン (P S) である場合、乾燥菌体 1 g 中に含まれるすべての P S の構成要素として含まれる脂肪酸量は、特に限定されるものではないが、1 . 0 9 m g 以上、好ましくは 2 . 0 m g 以上、より好ましくは 3 . 0 m g 以上である。

【 0 0 5 7 】

本発明の方法により得られる L C P U F A - P L に、アラキドン酸 (A R A) を構成要素として含むフォスファチジルコリン (A R A - P C) が含まれる場合、すべてのホスファチジルコリンの構成要素として含まれるアラキドン酸量は、特に限定されるものではないが、乾燥菌体 1 g あたり 1 . 0 m g 以上、好ましくは 1 . 0 8 m g 以上、より好ましくは 4 . 0 m g 以上、さらに好ましくは 5 . 0 m g 以上である。また、本発明の方法により得られる L C P U F A - P L に、A R A を構成要素として含むフォスファチジルエタノールアミン (A R A - P E) が含まれる場合、すべてのホスファチジルエタノールアミンの構成要素として含まれるアラキドン酸量は、特に限定されるものではないが、乾燥菌体 1 g あたり 0 . 5 m g 以上、好ましくは 1 . 3 5 m g 以上、より好ましくは 2 . 0 m g 以上、さらに好ましくは 3 . 0 m g 以上、特に好ましくは 5 . 0 m g 以上である。さらに、本発明の方法により得られる L C P U F A - P L に、A R A を構成要素として含むフォスファチジルセリン (A R A - P S) が含まれる場合、すべてのホスファチジルセリンの構成要素として含まれるアラキドン酸量は、特に限定されるものではないが、乾燥菌体 1 g あたり 0 . 0 5 m g 以上、好ましくは 0 . 0 6 m g 以上、より好ましくは 0 . 1 5 m g 以上、さらに好ましくは 0 . 3 m g 以上、特に好ましくは 0 . 4 m g 以上である。

【 0 0 5 8 】

本発明の方法により得られる L C P U F A - P L に、ジホモ - γ - リノレン酸 (D G L A) を構成要素として含むフォスファチジルコリン (D G L A - P C) が含まれる場合、すべてのホスファチジルコリンの構成要素として含まれる D G L A 量は、特に限定されるものではないが、乾燥菌体 1 g あたり 0 . 1 1 m g 以上、好ましくは 0 . 3 m g 以上、より好ましくは 0 . 6 m g 以上である。本発明の方法により得られる L C P U F A - P L に

10

20

30

40

50

、DGLAを構成要素として含むフオスファチジルエタノールアミン(DGLA-PE)が含まれる場合、すべてのホスファチジルエタノールアミンの構成要素として含まれるDGLA量は、特に限定されるものではないが、乾燥菌体1gあたり0.1mg以上、好ましくは0.3mg以上、より好ましくは0.5mg以上である。

【0059】

また、本発明の方法により得られる培養物は、LCPUFA-PLの他にLCPUFAを構成要素として含むトリグリセリドを含んでおり、含まれる割合も特に限定されないが、本発明の方法により培養された培養物はそれ以外の方法により培養された培養物と比較してLCPUFA-PLの含有率が高められている。培養物中のLCPUFA-PLの含有率が高められていることは、例えば、リン脂質の構成要素として含まれるアラキドン酸(ARA-PL)とトリグリセリドの構成要素として含まれるアラキドン酸(ARA-TG)の比を評価することで行うことができる。本発明の方法により得られる培養物においては、例えば、ARA-PLとARA-TGの比(ARA-PL/ARA-TG)は、0.2以上であり、好ましくは0.84以上であり、より好ましくは1.05以上であり、さらに好ましくは1.70以上である。

10

【発明の効果】

【0060】

本発明にかかる製造方法を用いてLCPUFAを構成要素として含むリン脂質(LCPUFA-PL)を生成し得るモルティエレラ属を培養することにより、短期間でLCPUFA-PLを上記菌体内に多量に蓄積させることができる。その上、本発明にかかる培養法で製造された菌体中のリン脂質は、分岐脂肪酸の含有量が少ない。それ故、その菌体を供給原料としてLCPUFA-PLを抽出することにより、これまで限られた供給源から少量しか得られないため、供給量も不安定で、品質も必ずしも安定していなかったLCPUFA-PLを、より安心して食品や動物飼料に用いることができる高品質の工業製品として効率的かつ安定的に提供することが可能となる。

20

【実施例】

【0061】

以下、本発明を比較例、実施例に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。また以下比較例、実施例にて示されるリン脂質とは、シリカゲルカラムにおいて、クロロホルム洗浄では溶出されず、その後のメタノール溶出によって回収される画分、または、ヘキサン：ジエチルエーテル＝7：3を展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)において、スポット位置から全く移動しない画分と定義する。

30

実施例1：分岐脂肪酸(イソパルミチン酸(iso16:0))の生産性

酵母エキス1%、グルコース4%を含む培地(pH6.3)20mLを100mLのマイヤフラスコに作製し120で20分間殺菌した。コニディオボラス属に属する2菌株、コニディオボラス・スロモボイデス(*Conidiobolus thromboides*)CBS183.60、およびコニディオボラス・ナノデス(*Conidiobolus nanodes*)CBS154.56、ならびに、表1に示すモルティエレラ属に属する菌株A～Eを培地に1白金耳接種し、往復振盪120rpm、温度28の条件にて7日間培養した。培養終了後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、凍結乾燥で一晩乾燥させ乾燥菌体を得た。

40

【0062】

得られた乾燥菌体に4mLのクロロホルム/メタノール＝2：1混合溶媒を加え、70で1時間緩やかに攪拌し有機溶媒層を回収後、再び4mLの上記混合溶媒を加えて有機溶媒層をすべて集めた。この有機溶媒を遠心エバポレーターで留去することにより総脂質画分を得た。得られた総脂質画分は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)にて、トリグリセリド(TG)およびリン脂質(PL)に分画した。展開溶媒はヘキサン：エチルエーテル＝7：3(v/v)の混合溶媒とした。両画分をそれぞれかき取り、塩酸メタノール法でメチルエステルに誘導してガスクロマトグラフィーにより脂肪酸の定性およ

50

び定量を行った。内部標準にはペンタデカン酸を用いた。

【 0 0 6 3 】

その結果を表 2 に示す。なお、表 2 中の重量はすべて乾燥菌体 1 g あたりの量を示す。

【 0 0 6 4 】

【表 1】

	モルティエラ属培養菌株
乾燥菌体 A	A: モルティエラ・アルピナ (<i>Mortierella alpina</i> 1S-4) AKU3998
乾燥菌体 B	B: モルティエラ・スクムケリ (<i>Mortierella schmuckeri</i>) NRRL2761
乾燥菌体 C	C: モルティエラ・アルピナ (<i>Mortierella alpina</i>) CBS224.37
乾燥菌体 D	D: モルティエラ・ベルヤコバ (<i>Mortierella beljakovae</i>) CBS601.68
乾燥菌体 E	E: モルティエラ・エロンガータ (<i>Mortierella elongata</i>) CBS125.71

10

【 0 0 6 5 】

【表 2】

乾燥菌体	抽出 画分	抽出された脂質 (脂肪酸として) (mg)	各画分 総脂肪酸中の ARA、iso16:0 の割合(%)		各画分中 「iso16:0/AR A」比	ARA 分布 「ARA-PL/ ARA-TG」比
			ARA	iso16:0		
コニディオボラス・ス ロモボイデス	PL	43.3	32.9	5.81	0.18	1.16
	TG	161.8	7.58	6.44	0.85	
コニディオボラス・ナ ノデス	PL	33.5	22.8	6.96	0.30	0.95
	TG	141.5	5.69	14.44	2.54	
A	PL	20.5	26.7	0	0	0.30
	TG	114.6	15.9	0.09	0.01	
B	PL	36.3	29.2	0	0	1.49
	TG	284	2.5	0.02	0.01	
C	PL	36.8	26.1	0	0	4.41
	TG	10.9	20.0	0	0	
D	PL	47.8	12.9	0.33	0.03	1.40
	TG	122	3.6	0.36	0.10	
E	PL	45.3	18.0	0.11	0.01	0.84
	TG	116.6	8.4	0.24	0.03	

20

30

※ 表中の略語はそれぞれ以下のものを意味する。

PL:リン脂質、TG:トリグリセリド、ARA:アラキドン酸、iso16:0:イソパルミチン酸、

ARA-PL:リン脂質の構成要素として含まれるアラキドン酸

ARA-TG:トリグリセリドの構成要素として含まれるアラキドン酸。

40

【 0 0 6 6 】

モルティエラ属では、アラキドン酸を高割合で含み、かつコニディオボラス属に比較して分岐型脂肪酸の含有率の低いリン脂質を蓄積することが確認できた。

実施例 2 : モルティエラ属における L C P U F A 含有リン脂質組成

酵母エキス 1 %、グルコース 4 %を含む培地 (pH 6 . 3) 4 m L を 2 0 m L のマイヤーフラスコに作製し 1 2 0 で 2 0 分間殺菌した。表 1 に示す菌株 A、B、D および E を

50

培地に1白金耳接種し、往復振盪120rpm、温度28℃の条件にて7日間培養を行い、乾燥菌体A'、B'、D'およびE'を得た。またソーヤフラワー1%、グルコース1.5%、KH₂PO₄ 0.3%を含む培地(pH5.0)4mlを20mlのマイヤーフラスコに作製後、表1に示す菌株Cを植菌し、上記と同様に培養を行い乾燥菌体C'を得た。

【0067】

実施例1と同様にして得た総脂質画分を、クロロホルム：メタノール：酢酸：水＝50：37.5：3.5：2(v/v/v/v)の展開溶媒を用いたTLCを行い、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジリノシトール(PI)、カルジオリピン(CL)の各リン脂質画分に分画し、実施例1と同様の方法により脂肪酸の定性および定量を行った。

【0068】

その結果を表3に示す。なお表3中の重量はすべて乾燥菌体1gあたりの量を示す。

【0069】

【表3】

乾燥菌体	リン脂質画分	抽出された脂質 (脂肪酸として) (mg)	各画分総脂肪酸中 LCPUFA量	
			ARA(mg)	DGLA(mg)
A'	PC	5.99	1.08	0.11
	PE	7.62	1.35	0.19
	PS	1.09	0.06	ND
	PI	1.42	0.02	0.02
	CL	1.36	0.05	ND
B'	PC	12.4	5.37	0.16
	PE	12.1	2.81	0.10
	PS	3.56	0.70	0.01
	PI	3.19	0.09	0.06
	CL	2.39	0.12	ND
C'	PC	20.7	6.53	0.65
	PE	26.4	5.67	0.75
	PS	1.95	0.36	0.04
	PI	5.32	0.25	0.26
	CL	2.40	0.21	0.16
D'	PC	16.2	4.42	0.87
	PE	19.2	2.43	0.56
	PS	2.20	0.18	0.03
	PI	4.00	0.05	0.12
	CL	3.90	0.22	0.17
E'	PC	14.1	4.55	0.33
	PE	16.6	3.27	0.36
	PS	3.30	0.43	0.03
	PI	4.00	0.13	0.16
	CL	3.50	0.22	0.16

* ND: TLC で検出できず

※表中の略語はそれぞれ以下のものを意味する。

LCPUFA:長鎖高度不飽和脂肪酸、ARA:アラキドン酸、DGLA:ジホモγ-リノレン酸

【0070】

実施例3：リン酸塩添加培養

ソーヤフラワー1%、グルコース3%、更に表4に示す6種類の濃度の KH_2PO_4 を含む培地(pH6.3)4mLを20mLのマイヤーフラスコに作製し、120度で20分間殺菌した。モルティエレラ・スクムケリ(*Mortierella schmuckeri*)NRRL2761とモルティエレラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)CBS224.37の孢子懸濁液を上記培地に植菌し、往復振盪120rpm、温度28度の条件にて5日間培養した。培養終了後、実施例1と同様の方法にて凍結乾燥菌体より総脂質を抽出し、Sep-Pak Plusカラムクロマトグラフィーによりトリグリセリド(TG)およびリン脂質(PL)に分画した。溶出溶媒としてはトリグリセリド溶出にクロロホルム、リン脂質溶出にメタノールを用い、この有機溶媒を遠心エバポレーターで留去することにより各画分を得た。分画後は、塩酸メタノール法でメチルエステルに誘導してガスクロマトグラフィーにより脂肪酸の定性および定量を行った。内部標準にはペンタデカン酸を用いた。

10

【0071】

その結果を表4に示す。なお表4中の重量はすべて乾燥菌体1gあたりの量を示す。

【0072】

【表4】

菌株	KH_2PO_4 濃度	抽出されたリン脂質 (mg) (脂肪酸として)	リン脂質脂質中の LCPUFA量(mg)		ARA分布 「ARA-PL/ ARA-TG」 比
			ARA	DGLA	
モルティエレラ ・スクムケリ	0%	21.8	4.9	0.4	0.41
	0.05%(3.7mM)	33.4	7.7	1.0	0.54
	0.3%(22mM)	37.3	7.9	1.1	0.64
	0.4%(29mM)	25.2	7.5	0.9	0.60
	0.6%(44mM)	36.8	8.0	1.0	0.68
	2%(147mM)	24.6	5.0	0.5	0.62
モルティエレラ ・アルピナ	0%	42.3	8.8	1.7	0.30
	0.05%(3.7mM)	58.3	13.3	1.9	0.82
	0.3%(22mM)	57.8	13.1	1.9	0.79
	0.4%(29mM)	55.8	12.1	1.8	0.85
	0.6%(44mM)	49.8	10.4	1.5	1.05
	2%(147mM)	37.2	6.5	0.9	1.64

20

30

※ 表中の略語はそれぞれ、以下のものを意味する。

LCPUFA:長鎖高度不飽和脂肪酸、ARA:アラキドン酸、DGLA:ジホモγ-リノレン酸

ARA-PL:リン脂質の構成要素として含まれるアラキドン酸

ARA-TG:トリグリセリドの構成要素として含まれるアラキドン酸。

40

【0073】

培地中にリン酸塩を添加することによって、菌体あたりのリン脂質量、リン脂質中LCPUFA量が増えること、またその効果は、トリグリセリドよりもリン脂質において有効であることを確認した。

実施例4：初発低pH培養

ソーヤフラワー1%、グルコース1.5%、 KH_2PO_4 0.3%を含む培地の初発pHを7種類のpH(pH4.0、pH4.5、pH5.0、pH5.5、pH6.3、pH7.0、pH8.0)に調整し、その培地4mLを20mLのマイヤーフラスコに入れて120度で20分殺菌した。モルティエレラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)CBS

50

224.37の孢子懸濁液を上記培地に植菌し、往復振盪120rpm、温度28℃の条件にて5日間培養した。培養終了後、実施例3と同様の方法にて凍結乾燥菌体より総脂質を抽出し、Sep-Pak Plusカラムクロマトグラフィーによりトリグリセリド(TG)およびリン脂質(PL)に分画後、脂肪酸の定性および定量を行った。

【0074】

その結果を表5および図1に示す。なお表5中の重量はすべて乾燥菌体1gあたりの量を示す。

【0075】

【表5】

初発 pH	抽出された脂 肪酸としての リン脂質(mg)	リン脂質画分中の LCPUFA量(mg)		リン脂質画分中の LCPUFAの割合(%)	
		ARA	DGLA	ARA	DGLA
4.0	64.6	13.5	2.0	21.0	3.1
4.5	71.9	15.5	2.3	21.6	3.2
5.0	65.2	15.1	2.4	23.2	3.6
5.5	59.8	12.8	2.0	21.4	3.3
6.3	47.1	9.6	1.4	20.4	2.9
7.0	51.4	8.9	1.2	17.3	2.4
8.0	47.5	7.2	1.1	15.2	2.3

※表中の略語はそれぞれ、以下のものを意味する。

LCPUFA:長鎖高度不飽和脂肪酸、ARA:アラキドン酸、DGLA:ジホモγ-リノレン酸

【0076】

初発pHを下げることにより、リン脂質中のLCPUFA割合の増加と、特に菌体あたりのリン脂質量、リン脂質中のLCPUFA量の顕著な増加が認められた。

実施例5：培養後期の低pH制御

ソヤフラワー1.5%、グルコース2%、 KH_2PO_4 0.3%を含む培地(pH5.0)5Lを10Lジャーファメンターに入れ、120度で20分殺菌した(培地I)。またソヤフラワー1.5%、グルコース2%を含む培地(pH4.5)5Lを10Lジャーファメンターに入れ、同様に120度で20分殺菌した(培地II)。モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)CBS224.37を接種し、通気量1vvmで6日間通気攪拌培養を行った。攪拌は、培養開始時は300rpmで培養2日目より500rpmに上げて行い、培養温度は、培養開始時は28℃で培養3日目より20℃に下げた。培養1日目に1.0%、2日目に0.75%のグルコースを添加した。また培地IIのみ、培養6日間を通して培地のpHが5.0以下となるよう、0.5Nの H_2SO_4 で制御を行った。培養終了後、実施例3と同様の方法にて総脂質の抽出、トリグリセリド(TG)およびリン脂質(PL)の分画、脂肪酸の定性および定量を行った。

【0077】

培養5日目での結果を表6に示す。なお表6中の重量はすべて乾燥菌体1gあたりの量を示す。また、培養中のpH変動を図2aに、抽出されたリン脂質量の変化についてのpH制御の効果を図2bに示す。

【0078】

【表 6】

サンプリング日	培地pH		抽出されたリン脂質 (脂肪酸として) (mg)		リン脂質画分中の LCPUFA量(mg)				培地当たりの PL 生産性(g/L) 「Ⅱ／Ⅰ」比
					ARA		DGLA		
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅰ	Ⅱ	
5 日目	6.0	5.1	49.7	60.7	19.1	22.7	1.21	1.60	1.40

※表中の略語はそれぞれ以下のものを意味する。

LCPUFA:長鎖高度不飽和脂肪酸、ARA:アラキドン酸、DGLA:ジホモγ-リノレン酸、PL:リン脂質

10

【0079】

培養後半のpH上昇を抑えた培養法(培地ⅠⅠ)の方が、乾燥菌体あたりのLCPUFA量、特に培地あたりの生産性が優れており、10Lジャーファメンターで、培養後期のpH上昇を抑制するpH制御法が有効であることが分かった。

実施例6: 攪拌制御

ソヤフラワー1.0%、グルコース2%、 KH_2PO_4 0.3%を含む培地(pH 5.0)5Lを10Lジャーファメンターに入れ、120度で20分殺菌した。モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)CBS224.37を接種し、培養温度28℃、通気量1vvmにて7日間通気攪拌培養を行った。攪拌は表7に示すように、培養2日目に4種類に変更して培養を継続し、2日目には0.5%のグルコースを添加した。培養終了後、実施例3と同様の方法にて総脂質の抽出、トリグリセリド(TG)およびリン脂質(PL)の分画、脂肪酸の定性および定量を行った。

20

【0080】

培養4日目での結果を表7に示す。なお表7中の重量はすべて乾燥菌体1gあたりの量を示す。また、表7に示す攪拌パラメータKLAとは単位液量あたりの所要攪拌動力 P/V (W/m^3)と通気線速度パラメータ V_s (m/s)から定義される最大所要攪拌動力 $KLA = (P/V)^{0.95} V_s^{0.67} [(\text{W}/\text{m}^3)^{0.95} (\text{m}/\text{s})^{0.67}]$ を表す。

30

【0081】

【表 7】

2日目以降の 攪拌パラメータ KLA	リン脂質画分総脂肪酸中の ARA割合(%)	リン脂質画分中の ARA量(mg)
2.60	20.6	10.7
8.27	34.1	17.1
12.8	36.2	18.5
18.8	39.9	20.2

* 1日目はいずれのジャーもKLA=8.27で培養した。ARAはアラキドン酸を意味する。

40

【0082】

KLAを上げて培養液の流動性を高めることにより、リン脂質画分中のアラキドン酸割合、乾燥菌体あたりのアラキドン酸量ともに増加させることができた。

実施例7: 低温培養

ソヤフラワー1%、グルコース1.5%、 KH_2PO_4 0.3%を含む培地(pH 5.0)20mLを100mLのマイヤーフラスコに入れて120度で20分殺菌した。モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)CBS224.37の孢子懸濁液を上記培地に植菌し、往復振盪120rpm、温度28℃で4日間培養後、培養温度を6種類

50

(10、16、20、24、28、32) に変えて更に往復振盪 120 rpm で 18 時間培養した。培養終了後、実施例 3 と同様の方法にて総脂質の抽出、トリグリセリド (TG) およびリン脂質 (PL) への分画、脂肪酸の定性および定量を行った。その結果を表 8 および図 3 に示す。

【0083】

また上記と同様の培地に、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS 224.37 の孢子懸濁液を上記培地に植菌し、往復振盪 120 rpm、温度 28 で 4 日間培養後、培養温度を 20 に下げ、さらに 2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、14 時間、18 時間、培養した。培養終了後、実施例 3 と同様の方法にて総脂質の抽出、トリグリセリド (TG) およびリン脂質 (PL) への分画、脂肪酸の定性および定量を行った。その結果を表 9 および図 4 に示す。

10

【0084】

なお表 8、表 9 中の重量はすべて乾燥菌体 1 g あたりの量を示す。

【0085】

【表 8】

4日目 変更温度 (°C)	リン脂質画分総脂肪酸中の ARA割合(%)	リン脂質画分中の ARA量(mg)	ARA分布 「ARA-PL/ARA-TG」 比
32	20.8	11.5	0.64
28	24.6	13.4	0.84
24	27.9	16.4	1.02
20	30.7	17.5	1.05
16	30.6	17.0	1.12
10	28.7	15.3	1.70

20

※ 表中の略語はそれぞれ、以下のものを意味する。

ARA: アラキドン酸、ARA-PL: リン脂質の構成要素として含まれるアラキドン酸、

ARA-TG: トリグリセリドの構成要素として含まれるアラキドン酸。

30

【0086】

【表 9】

20°C培養時間 (時間)	リン脂質画分総脂肪酸中の ARA割合(%)	リン脂質画分中の ARA量(mg)
0	22.9	9.6
2	22.1	9.0
4	26.2	11.5
6	26.4	11.5
8	27.2	12.1
10	27.5	12.1
12	28.0	12.6
14	30.9	16.1
18	31.4	15.9

40

※ ARA はアラキドン酸を意味する

【0087】

培養途中で低温へシフトさせることにより、リン脂質画分中のアラキドン酸割合、乾燥菌体あたりのアラキドン酸量ともに大きく増加し(表 8、図 3 a)、その効果は 4 時間の

50

低温培養から見られており、非常に短時間で有効であることが確認された（表 9、図 4）。また、アラキドン酸増加の効果は、トリグリセリド画分よりもリン脂質画分の方が大きく、「ARA - PL / ARA - TG」比の大きい油脂を菌体内に蓄積させることができた（表 8、図 3 b）。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 8 】

【図 1】図 1 a は、初発 pH と抽出されたリン脂質量の相関を示すグラフである。図 1 b は、初発 pH と抽出されたリン脂質中のアラキドン酸量の相関を示すグラフである。

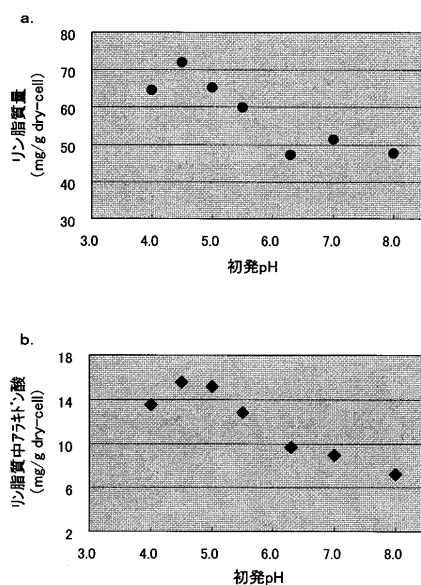
【図 2】図 2 a は、培地 I および培地 II の培養中の pH 変動を示すグラフである。● は培地 I（pH 制御なし）、■ は培地 II（pH 制御あり）を示す。図 2 b は、培養日数と抽出されたリン脂質量の相関を示すグラフである。○ は培地 I（pH 制御なし）、□ は培地 II（pH 制御あり）を示す。

10

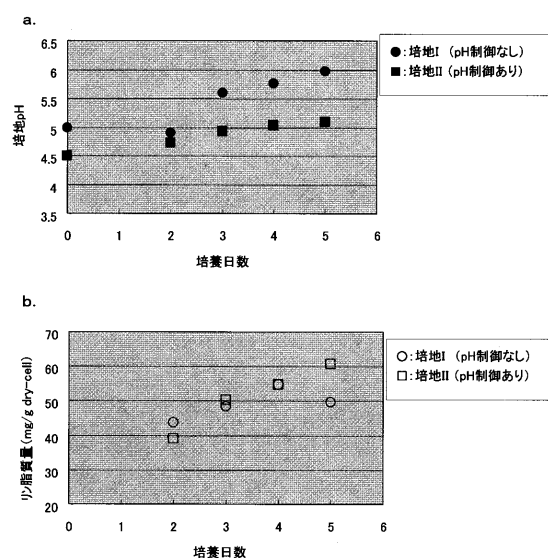
【図 3】図 3 a は、培養 4 日目に温度変更後の、リン脂質画分総脂肪酸中のアラキドン酸（ARA）の割合を示すグラフである。図 3 b は、培養 4 日目に温度変更後の、トリグリセリド画分に存在するアラキドン酸に対するリン脂質画分に存在するアラキドン酸の比を示すグラフである。

【図 4】図 4 は、培養 4 日目に 20 に温度をシフトした後の培養時間に対するリン脂質画分総脂肪酸中のアラキドン酸（ARA）の割合を示すグラフである。

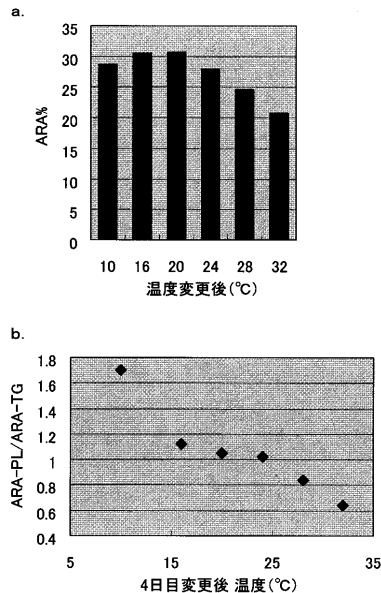
【図 1】



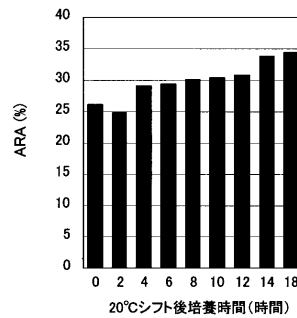
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【手続補正書】

【提出日】平成19年2月8日(2007.2.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

長鎖高度不飽和脂肪酸を構成要素として含むリン脂質(LCPUFA-PL)の製造方法であって、以下：

(i) モルティエラ属に属する微生物を、当該微生物の菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養し；そして

(ii) その培養物からLCPUFA-PLを得る、ここで、当該培養物に含まれるすべてのリン脂質(PL)の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比は5%以下である；

ことを含む、前記方法。

【請求項2】

モルティエラ属に属する微生物がモルティエラ亜属である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

モルティエラ属に属する微生物がモルティエラ・アルピナである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

菌体中にLCPUFA-PLが蓄積する条件で培養することが、pH4～pH10の初

発 pH を含む条件で培養することを含む、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

菌体中に L C P U F A - P L が蓄積する条件で培養することが、p H 4 ~ p H 6 の p H を維持するように制御しながら培養することを含む、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

菌体中に L C P U F A - P L が蓄積する条件で培養することが、3 . 7 m M ~ 1 4 7 m M のリン酸塩を含む培地中で培養することを含む、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

菌体中に L C P U F A - P L が蓄積する条件で培養することが、8 . 3 以上の最大所要攪拌動力 ($K L A = (P / V)^{0.95} \cdot V_s^{0.67}$) で攪拌しながら培養することを含む、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

菌体中に L C P U F A - P L が蓄積する条件で培養することが、菌体を増殖させた後、1 0 ~ 2 5 で 4 ~ 1 8 時間培養することを含む、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

菌体中に L C P U F A - P L が蓄積する条件で培養することが、2 8 で 2 日間 ~ 2 0 日間培養した後、1 0 ~ 2 5 で 4 ~ 1 8 時間培養することを含む、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0】

菌体中に L C P U F A - P L が蓄積する条件で培養することが、
 (a) p H 4 ~ p H 1 0 の初発 p H を含む条件で培養すること；
 (b) p H 4 ~ p H 6 の p H を維持するように制御しながら培養すること；
 (c) 3 . 7 m M ~ 1 4 7 m M のリン酸塩を含む培地中で培養すること；
 (d) 8 . 3 以上の最大所要攪拌動力 ($K L A = (P / V)^{0.95} \cdot V_s^{0.67}$) で攪拌しながら培養すること；および
 (e) 菌体を増殖させた後または 2 8 で 2 日間 ~ 2 0 日間培養した後、1 0 ~ 2 5 で 4 ~ 1 8 時間培養すること；
 からなる群から選択されるすくなくとも 2 つの培養条件を含む、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

培養物が、培養液もしくは滅菌処理した培養液、または、それらから集菌した培養菌体もしくはその乾燥菌体を含む、請求項 1 ないし 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

L C P U F A - P L が、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジイルノシトール、ホスファチジン酸およびカルジオリピンからなる群より選択される少なくとも 1 種のグリセロリン脂質を含む、請求項 1 ないし 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

オメガ 6 系高度不飽和脂肪酸、オメガ 3 系高度不飽和脂肪酸、および、オメガ 9 系高度不飽和脂肪酸からなる群より選択される長鎖高度不飽和脂肪酸 (L C P U F A) を構成要素として含む L C P U F A - P L を製造するための、請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

オメガ 6 系高度不飽和脂肪酸が、1 1 , 1 4 - エイコサジエン酸 (2 0 : 2 , $\omega 6$) 、 8 , 1 1 , 1 4 - エイコサトリエン酸 (ジホモ - γ - リノレン酸 ; 2 0 : 3 , $\omega 6$) 、 5 , 8 , 1 1 , 1 4 - エイコサテトラエン酸 (アラキドン酸 ; 2 0 : 4 , $\omega 6$) 、 1 3 , 1

6 - ドコサジエン酸 (22 : 2、 ω 6)、7, 10, 13, 16 - ドコサテトラエン酸 (22 : 4、 ω 6)、および 4, 7, 10, 13, 16 - ドコサペンタエン酸 (22 : 5、 ω 6) からなる群より選択される 1 以上の脂肪酸である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

オメガ 3 系高度不飽和脂肪酸が、11, 14, 17 - エイコサトリエン酸 (α - リノレン酸 ; 20 : 3、 ω 3)、8, 11, 14, 17 - エイコサテトラエン酸 (20 : 4、 ω 3)、5, 8, 11, 14, 17 - エイコサペンタエン酸 (20 : 5、 ω 3)、7, 10, 13, 16, 19 - ドコサペンタエン酸 (22 : 5、 ω 3)、および 4, 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサヘキサエン酸 (22 : 6、 ω 3) からなる群より選択される 1 以上の脂肪酸である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

オメガ 9 系高度不飽和脂肪酸が、5, 8, 11 - エイコサトリエン酸 (ミード酸 ; 20 : 3、 ω 9)、7, 10, 13 - ドコサトリエン酸 (22 : 3、 ω 9)、および 4, 7, 10, 13 - ドコサテトラエン酸 (22 : 4、 ω 9) からなる群より選択される 1 以上の脂肪酸である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

アラキドン酸 (5, 8, 11, 14 - エイコサテトラエン酸) およびドコサヘキサエン酸 (4, 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサヘキサエン酸) からなる群より選択される LCPUFA を構成要素として含む LCPUFA - PL を製造するための、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

分子中に少なくとも 1 つの共役二重結合を有する LCPUFA を構成要素として含む LCPUFA - PL を製造するための、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

培養物に含まれるすべてのリン脂質 (PL) の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比が 5 % 以下であり、かつ、当該脂肪酸の総量におけるアラキドン酸の組成比が 13 % 以上である、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

培養物に含まれるすべてのリン脂質 (PL) の構成要素として含まれる脂肪酸の総量における分岐型脂肪酸であるイソパルミチン酸の組成比が 5 % 以下であり、かつ、当該脂肪酸の総量におけるアラキドン酸の組成比に対する該イソパルミチン酸の組成比が 1 / 6 以下である、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

LCPUFA - PL が、アラキドン酸を含むリン脂質を含み、そして培養物に含まれるすべてのリン脂質中のアラキドン酸量が、乾燥菌体 1 g あたり 11.8 mg 以上であることを特徴とする、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

LCPUFA - PL が、ジホモ - γ - リノレン酸 (DGLA) を含むリン脂質を含み、そして培養物に含まれるすべてのリン脂質中の DGLA 量が、乾燥菌体 1 g あたり 1.5 mg 以上であることを特徴とする、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

LCPUFA - PL が、アラキドン酸を含むホスファチジルコリンを含み、そして、培養物に含まれるすべてのホスファチジルコリンの構成要素として含まれるアラキドン酸量が、乾燥菌体 1 g あたり 1.0 mg 以上であることを特徴とする、請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

LCPUFA - PL が、アラキドン酸を含むホスファチジリエタノールアミンを含み、そして、培養物に含まれるすべてのホスファチジリエタノールアミンの構成要素として含まれるアラキドン酸量が、乾燥菌体 1 g あたり 0.5 mg 以上であることを特徴とする、

請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

LCPUFA-PL が、アラキドン酸を含むホスファチジルセリンを含み、そして、培養物に含まれるすべてのホスファチジルセリンの構成要素として含まれるアラキドン酸量が、乾燥菌体 1 g あたり 0.05 mg 以上であることを特徴とする請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

培養物が、アラキドン酸を構成要素として含むリン脂質およびアラキドン酸を構成要素として含むトリグリセリドを含むが、ここで、リン脂質の構成要素として存在するアラキドン酸量のトリグリセリドの構成要素として存在するアラキドン酸量に対する比が 0.2 以上であることを特徴とする、請求項 1 ないし 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

また現在、アラキドン酸含有トリグリセリドの工業生産に用いられているモルティエラ属 (*Mortierella* sp.) においては、アラキドン酸生産のための種々の条件検討が積極的に行われており、なかでも各種ミネラル塩の添加や、培地の pH、培養温度などによりアラキドン酸の生産性が向上することが報告されている。具体的には、各種ミネラル塩の添加が、菌体内に蓄積される LCPUFA 含有トリグリセリドと LCPUFA-PL の生産性に影響することが分かっている (非特許文献 11)。また初発 pH に関しては、(1) 培養の初発 pH が 6.0 ~ 6.6 が至適であること (非特許文献 11)、(2) 培養後期では pH を上げるにより、アラキドン酸含有トリグリセリドの生産量が上がること (特許文献 5) が知られているが、リン脂質画分に関して最適化された知見はない。更に培養温度に関しては、低温で 5 日以上培養することによりリン脂質中 LCPUFA 含有量が増加することが知られている (非特許文献 12)。しかしながらこのような長期の低温培養はコスト面からも工業生産としては不向きである上、上記の条件は何れもトリグリセリドの構成要素として存在する LCPUFA 生産に注目した培養条件であり、LCPUFA-PL の生産に特化した培養条件は未だ検討されていないのが実情である。このような培養方法で生産した菌体内では、LCPUFA-PL は著量のトリグリセリドに混入した微量成分として検出されているものの、その含有量は微量である上 (11.7 mg/g 乾燥菌体 非特許文献 5 参照)、トリグリセリド生産の副産物であるため品質や供給量が安定ではなく、LCPUFA-PL の十分な利用が期待できない。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

本発明の方法で用いる微生物

本発明の方法で用いる微生物は、モルティエラ属に属し、LCPUFA-PL を生成し得る微生物であれば特に限定されるものではない。本発明の方法で用いるモルティエラ属の微生物は、モルティエラ亜属であることが好ましい。モルティエラ亜属の微生物としては、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*)、モルティエラ・ポリセファラ (*Mortierella polycephala*)、モルティエラ・エキシグア (*Mortierella exigua*)、モルティエラ・フィグロフィラ (*Mortierella hygrophila*)、モルティエラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) 等が含まれる。より好まし

くは、本発明の方法で用いるモルティエラ属の微生物は、モルティエラ・アルピナである。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

A R A - P L の生産能を有するモルティエラ亜属の微生物のより具体的な菌株としては、例えば、モルティエラ・ポリセファラ (*M. polycephala*) I F O 6 3 3 5、モルティエラ・エロンガタ (*M. elongata*) C B S 1 2 5 . 7 1、モルティエラ・エキグア (*M. exigua*) I F O 8 5 7 1、モルティエラ・ベルヤコバ (*M. beljakovae*) C B S 6 0 1 . 6 8、モルティエラ・スクムケリ (*M. schmuckeri*) N R R L 2 7 6 1、モルティエラ・フィグロフィラ (*M. hygrophila*) I F O 5 9 4 1、モルティエラ・アルピナ (*M. alpina*) I F O 8 5 6 8、A T C C 1 6 2 6 6、A T C C 3 2 2 2 1、A T C C 4 2 4 3 0、C B S 2 1 9 . 3 5、C B S 2 2 4 . 3 7、C B S 2 5 0 . 5 3、C B S 3 4 3 . 6 6、C B S 5 2 7 . 7 2、C B S 5 2 9 . 7 2、C B S 6 0 8 . 7 0、C B S 7 5 4 . 6 8 等を挙げることができる。これらの菌株は、何れも大阪市の財団法人発酵研究所 (I F O) 米国のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection, A T C C) および、Centrralbureau voor Schimmelcultures (C B S) 等から何ら制限なく入手することができる。さらに、A R A - P L の生産能を有するモルティエラ亜属の他の菌株としては、本発明者らを含む研究グループが土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ (*M. elongata*) S A M 0 2 1 9 (微工研菌寄第 8 7 0 3 号) (微工研条寄第 1 2 3 9 号) を挙げることができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

また、L C P U F A としてジホモ - γ - リノレン酸 (D G L A) を構成要素として含む L C P U F A - P L (D G L A - P L と略す) の生産能を有する微生物のより具体的な菌株としては、本発明者らを含む研究グループが土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ (*M. elongata*) S A M 1 8 6 0 (微工研条寄第 3 5 8 9 号) を挙げることができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

そして、L C P U F A としてミード酸を構成要素として含む L C P U F A - P L (ミード酸 - P L と略す) の生産能を有する微生物のより具体的な菌株としては、本発明者らを含む研究グループが土壌から分離した菌株モルティエラ・アルピナ (*M. alpina*) S A M 2 0 8 6 (F E R M P - 1 5 7 6 6) を挙げることができる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

上記炭素源・窒素源以外の成分も特に限定されるものではなく、必要に応じて、公知の微量栄養源等を適宜選択して添加することができる。微量栄養源としては、例えば、リン酸イオン、カルシウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン等のアルカリ金属またはアルカリ土類金属のイオン；鉄、ニッケル、コバルト、マンガン等のV I I B ~ V I I I 族の金属イオン；銅、亜鉛等のI B ~ I I B 族の金属イオン；各種ビタミン類；等を挙げることができる。液体培地における上述した各成分の含有率（添加率）は特に限定されるものではなく、本発明の方法に用いる微生物の生育を阻害しない濃度であれば、公知の範囲内とすればよい。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

培養液のpHは、本発明の方法に用いる微生物の生育を阻害しない範囲であれば特に限定されるものではない。例えば、初発pHは、pH4 ~ pH10の範囲であればよく、好ましくは弱酸性であるpH4 ~ pH6であり、さらに好ましくはpH4 ~ pH5に調製する。培養中のpHは制御しても、制御しなくてもよい。本発明の方法の好ましい態様においては、培養中のpHを制御する。本発明に用いるモルティエラ属を液体培地で培養を行った場合、培養後期、特に炭素源の枯渇後に培養液中のpHが上昇する。このpH上昇を抑え、培養開始から培養期間を通してpH4 ~ pH6、好ましくはpH4 ~ pH5.5の低い範囲内のpHを維持するように制御して培養することにより、菌体内に蓄積するリン脂質の量を高めることができ、それにより菌体あたりのLCPUFA-PL量を増やすことができる。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

培養中に培地に施す外的な処理も特に限定されるものではなく、通気攪拌培養、振盪培養、静置培養等の公知の培養方法を適宜選択すればよい。特に通気攪拌培養においては、攪拌により培養液の流動性を高めることでLCPUFA-PLの生産性を上げることができ、その場合の最大所要攪拌動力KLA(= (P/V)^{0.95} · V^{0.67})は8.0以上、好ましくは8.3以上である。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0045】

本発明の方法により製造されるリン脂質に構成要素として含まれるLCPUFAとしては、炭素数20以上で二重結合を有する不飽和構造の脂肪酸であればよく、特に限定されるものではない。好ましくは、オメガ9(ω9)系高度不飽和脂肪酸、オメガ6(ω6)系高度不飽和脂肪酸、およびオメガ3(ω3)系高度不飽和脂肪酸からなる群より選択されるLCPUFAである。ここで、ω9系、ω6系、ω3系とは、不飽和脂肪酸の二重結合の位置に応じた系統である。具体的には、ω9系、ω6系、ω3系とは、脂肪酸のカルボキシル基と反対側の炭素から番号付けをしたときに、それぞれ、9位、6位、3位に二

重結合を有する不飽和脂肪酸の系統を意味する。具体的なLCPUFAとしては、例えば、 ω 9系高度不飽和脂肪酸では、5, 8, 11-エイコサトリエン酸(ミード酸; 20:3, ω 9); 7, 10, 13-ドコサトリエン酸(22:3, ω 9); 4, 7, 10, 13-ドコサテトラエン酸(22:4, ω 9)等を挙げることができる。また、 ω 6系高度不飽和脂肪酸では、11, 14-エイコサジエン酸(20:2, ω 6); 8, 11, 14-エイコサトリエン酸(ジホモ- γ -リノレン酸; 20:3, ω 6); 5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸(アラキドン酸; 20:4, ω 6); 13, 16-ドコサジエン酸(22:2, ω 6); 7, 10, 13, 16-ドコサテトラエン酸(22:4, ω 6); 4, 7, 10, 13, 16-ドコサペンタエン酸(22:5, ω 6)等を挙げることができる。 ω 3系高度不飽和脂肪酸では、11, 14, 17-エイコサトリエン酸(α -リノレン酸; 20:3, ω 3); 8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸(20:4, ω 3); 5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸(20:5, ω 3); 7, 10, 13, 16, 19-ドコサペンタエン酸(22:5, ω 3); 4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸(22:6, ω 3)、等を挙げることができる。なお、上記の各LCPUFAの名称の後のかっこ内でコロンを間に挟んだ2つの数字は、脂肪酸の炭素鎖長および不飽和度を表すものであり、「(炭素鎖長):(二重結合の数)」を示している。上記LCPUFAの中でも、アラキドン酸(ARA)および/または4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸(DHA)がより好ましく用いられる。これらのLCPUFAは、LCPUFA-PLの構成要素として1種類のみ含まれてもよいし、2種類以上含まれてもよい。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0061

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0061】

以下、本発明を比較例、実施例に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。また以下比較例、実施例にて示されるリン脂質とは、シリカゲルカラムにおいて、クロロホルム洗浄では溶出されず、その後のメタノール溶出によって回収される画分、または、ヘキサン:ジエチルエーテル=7:3を展開溶媒としたシリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)において、スポット位置から全く移動しない画分と定義する。

実施例1:分岐脂肪酸(イソパルミチン酸(iso16:0))の生産性

酵母エキス1%、グルコース4%を含む培地(pH6.3)20mLを100mLのマイヤーフラスコに作製し120で20分間殺菌した。コニディオボラス属に属する2菌株、コニディオボラス・スロモボイデス(*Conidiobolus thromoboides*)CBS183.60、およびコニディオボラス・ナノデス(*Conidiobolus nanodes*)CBS154.56、ならびに、表1に示すモルティエレラ属に属する菌株A~Eを培地に1白金耳接種し、往復振盪120rpm、温度28の条件にて7日間培養した。培養終了後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、凍結乾燥で一晩乾燥させ乾燥菌体を得た。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0070】

実施例3:リン酸塩添加培養

ソヤフラワー1%、グルコース3%、更に表4に示す6種類の濃度のKH₂PO₄を

含む培地 (pH 6.3) 4 mL を 20 mL のマイヤーフラスコに作製し、120 で 20 分間殺菌した。モルティエレラ・スクムケリ (*Mortierella schmuckeri*) NRRL 2761 とモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS 224.37 の孢子懸濁液を上記培地に植菌し、往復振盪 120 rpm、温度 28 の条件にて 5 日間培養した。培養終了後、実施例 1 と同様の方法にて凍結乾燥菌体より総脂質を抽出し、Sep-Pak Plus カラムクロマトグラフィーによりトリグリセリド (TG) およびリン脂質 (PL) に分画した。溶出溶媒としてはトリグリセリド溶出にクロロホルム、リン脂質溶出にメタノールを用い、この有機溶媒を遠心エバポレーターで留去することにより各画分を得た。分画後は、塩酸メタノール法でメチルエステルに誘導してガスクロマトグラフィーにより脂肪酸の定性および定量を行った。内部標準にはペンタデカン酸を用いた。

【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

【表 4】

菌株	KH ₂ PO ₄ 濃度	抽出されたリン脂質 (mg) (脂肪酸として)	リン脂質中の LCPUFA 量 (mg)		ARA 分布 「ARA-PL/ ARA-TG」 比
			ARA	DGLA	
モルティエレラ ・スクムケリ	0%	21.8	4.9	0.4	0.41
	0.05% (3.7mM)	33.4	7.7	1.0	0.54
	0.3% (22mM)	37.3	7.9	1.1	0.64
	0.4% (29mM)	25.2	7.5	0.9	0.60
	0.6% (44mM)	36.8	8.0	1.0	0.68
	2% (147mM)	24.6	5.0	0.5	0.62
モルティエレラ ・アルピナ	0%	42.3	8.8	1.7	0.30
	0.05% (3.7mM)	58.3	13.3	1.9	0.82
	0.3% (22mM)	57.8	13.1	1.9	0.79
	0.4% (29mM)	55.8	12.1	1.8	0.85
	0.6% (44mM)	49.8	10.4	1.5	1.05
	2% (147mM)	37.2	6.5	0.9	1.64

※ 表中の略語はそれぞれ、以下のものを意味する。

LCPUFA: 長鎖高度不飽和脂肪酸、ARA: アラキドン酸、DGLA: ジホモ γ-リノレン酸

ARA-PL: リン脂質の構成要素として含まれるアラキドン酸

ARA-TG: トリグリセリドの構成要素として含まれるアラキドン酸。

【手続補正 14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

KLA を上げて培養液の流動性を高めることにより、リン脂質画分中のアラキドン酸割合、乾燥菌体あたりのアラキドン酸量ともに増加させることができた。

実施例 7: 低温培養

ソヤフラワー 1 %、グルコース 1 . 5 %、 KH_2PO_4 0 . 3 %を含む培地 (p H 5 . 0) 2 0 m L を 1 0 0 m L のマイヤーフラスコに入れて 1 2 0 度で 2 0 分殺菌した。モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) C B S 2 2 4 . 3 7 の孢子懸濁液を上記培地に植菌し、往復振盪 1 2 0 r p m、温度 2 8 で 4 日間培養後、培養温度を 6 種類 (1 0 、 1 6 、 2 0 、 2 4 、 2 8 、 3 2) に変えて更に往復振盪 1 2 0 r p m で 1 8 時間培養した。培養終了後、実施例 3 と同様の方法にて総脂質の抽出、トリグリセリド (T G) およびリン脂質 (P L) への分画、脂肪酸の定性および定量を行った。その結果を表 8 および図 3 に示す。

フロントページの続き

(72)発明者 白石 明子

大阪府茨木市双葉町 1 4 - 1 7 - 5 1 5

(72)発明者 河島 洋

大阪府高槻市真上町 6 - 1 1 - 1 - 1 1 3

F ターム(参考) 4B064 AD88 AE63 CA05 CB27 CC07 CC09 CD02 DA01 DA06 DA10