(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4286558号
(P4286558)

(45)発行日　平成21年7月1日(2009.7.1)　(24)登録日　平成21年4月3日(2009.4.3)

(51)Int.Cl.		F I	
C12P 19/44	(2006.01)	C12P	19/44
C12R 1/01	(2006.01)	C12P	19/44
		C12R	1:01

請求項の数 8　(全 16 頁)

(21)出願番号　特願2003-48822(P2003-48822)
(22)出願日　平成15年2月26日(2003.2.26)
(65)公開番号　特開2004-254595(P2004-254595A)
(43)公開日　平成16年9月16日(2004.9.16)
審査請求日　平成17年11月11日(2005.11.11)

微生物の受託番号　FERM　P-18126

(73)特許権者　591079487
広島県
広島県広島市中区基町１０番５２号
(73)特許権者　591082421
丸善製薬株式会社
広島県尾道市向東町１４７０３番地の１０
(74)代理人　100107515
弁理士　廣田　浩一
(74)代理人　100107733
弁理士　流　良広
(74)代理人　100115347
弁理士　松田　奈緒子
(72)発明者　玉井　正弘
広島県広島市南区比治山本町１２－７０
広島県立食品工業技術センター内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】マンノシルエリスリトールリピッドの製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
植物油脂と栄養素を含む培養液中でマンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ株を除く）を培養してマンノシルエリスリトールリピッドを製造する方法において、前記培養液のｐＨをアンモニアを用いて５．２～５．８の範囲に制御して培養を行い、
初発植物油脂濃度が１８～２０質量％で培養を開始し、該培養開始後７～８日目より前記植物油脂を１．０～１．１ｇ／Ｌ／ｈの速度で培養液中に供給し、
前記植物油脂を流加後における培養液中の前記初発植物油脂量と流加植物油脂量とを合わせた全植物油脂濃度が２５～４０質量％となる条件で培養を行い、前記マンノシルエリスリトールリピッドの生産量が、２０質量％以上（２００ｇ／Ｌ以上）であることを特徴とするマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法。
【請求項２】
培養液中に無機窒素源を含有し、該無機窒素源が、硝酸アンモニウム及び尿素のいずれかである請求項１に記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法。
【請求項３】
マンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ株を除く）におけるマンノシルエリスリトールリピッドを生産する上での培地組成及び培養条件が、下記の通りである請求項１から２のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法。

酵母エキス：０．１～２ｇ／Ｌ
硝酸アンモニウム：０．１～１ｇ／Ｌ
リン酸２水素カリウム：０．１～２ｇ／Ｌ
硫酸マグネシウム：０．１～１ｇ／Ｌ
培養液ｐＨ：５．２～５．８
溶存酸素濃度：３～９ｐｐｍ
培養温度：２６～３２℃

【請求項４】
植物油脂が、大豆油、菜種油、コーン油、ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油及びパーム油から選択される少なくとも１種である請求項１から３のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法。

【請求項５】
植物油脂として、食品廃油（しょうゆ油を除く）を用いる請求項１から４のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法。

【請求項６】
マンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物（Ｃａｎｄｉｄａ ａｎｔａｒｃｔｉｃａ株を除く）が、クルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ） ｓｐ．Ｉ－１１株（ＦＥＲＭ Ｐ－１８１２６）である請求項１から５のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法。

【請求項７】
培養液中のマンノシルエリスリトールリピッド濃度を７質量％以上とした状態で該培養液を室温で１～２日間静置し、マンノシルエリスリトールリピッドを沈殿させて、該培養液からマンノシルエリスリトールリピッドを回収する請求項１から６のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法。

【請求項８】
培養液中のマンノシルエリスリトールリピッド濃度を７質量％以上とした状態で該培養液を遠心分離してマンノシルエリスリトールリピッドを沈殿させて、該培養液からマンノシルエリスリトールリピッドを回収する請求項１から７のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法。

【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、バイオサーファクタントの一種であるマンノシルエリスリトールリピッド（以下、単に「ＭＥＬ」と略記する場合がある。）の生産効率（生産量、生産速度、及び収率）を大幅に向上させることができるマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法に関する。

【０００２】
【従来の技術】
糖脂質は、脂質に１～数十個の単糖が結合した物質であり、生体内において細胞間の情報伝達に関与し、神経系及び免疫系の機能維持にも重要な役割を果たしていることなどが明らかにされつつある。また、糖脂質は，糖の性質に由来する親水性と脂質の性質に由来する親油性の二つの性質を合わせ持つ両親媒性物質であり、このような性質を有する両親媒性物質は界面活性物質と呼ばれている。石油化学工業が隆盛となるまでは、レシチン、サポニン等の生体成分由来の界面活性剤（バイオサーファクタント）が利用されていた。近年、石油化学工業の発展により合成界面活性剤が開発され、その生産量が飛躍的に増加し、日常生活には無くてはならない物質となったが、この合成界面活性剤の使用量の拡大に伴って環境汚染が広がり、社会問題が生じている。このため、安全性が高く、環境に対する負荷を低減できる生分解性の高い界面活性物質の開発が望まれている。

【０００３】
従来より、微生物が生産する界面活性物質としては、糖脂質系、アシルペプタイド系、リ

ン脂質系、脂肪酸系及び高分子系の界面活性物質の５つに分類されている。これらの中でも、糖脂質系の界面活性剤が最もよく研究されており、細菌及び酵母による多くの種類の界面活性物質が報告されている。

【０００４】

前記細菌としては、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属によるラムノリピッド（非特許文献１及び２参照）とユスチラジン酸（非特許文献３参照）、Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ属によるトレハロースリピッド（非特許文献４参照）などが知られている。しかし、いずれも生産量は１５ｇ／Ｌ以下である。

【０００５】

前記酵母としては、Ｃａｎｄｉｄａ属によるソホロースリピッドとマンノシルエリスリトールリピッド（特許文献１参照）などが知られている。

前記ソホロースリピッドについては、Ｃａｎｄｉｄａ ｂｏｍｂｉｃｏｌａを用いてグルコースとオレイン酸の流加培養法により２００時間で１８０ｇ／Ｌの効率的なソホロースリピッドの生産が可能であることが報告されている（非特許文献５参照）。

前記マンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）については、Ｃａｎｄｉｄａ ｓｐ．Ｂ－７株を用いて５質量％の大豆油から５日間で３５ｇ／Ｌ（生産速度:０．３ｇ／Ｌ／ｈ、原料収率:７０質量％）のＭＥＬの生産が可能であることが報告されている（非特許文献６及び７参照）。また、Ｃａｎｄｉｄａ ａｎｔａｒｃｔｉｃａ Ｔ－３４株を用いて８質量％の大豆油から８日間で３８ｇ／Ｌ（生産速度:０．２ｇ／Ｌ／ｈ、原料収率:４８質量％）のＭＥＬの生産が可能であることが報告されている（非特許文献８及び９参照）。同じく、Ｃａｎｄｉｄａ ａｎｔａｒｃｔｉｃａ Ｔ－３４株を用いて６日間隔で計３回の逐次流加により２４日後に２５質量％のピーナッツ油から１１０ｇ／Ｌ（生産速度:０．２ｇ／Ｌ／ｈ、原料収率:４４質量％）のＭＥＬの生産が可能であることが報告されている（非特許文献１０参照）。

Ｃａｎｄｉｄａ ｓｐ．ＳＹ－１６株を用いて１０質量％の植物油脂から回分培養法により２００時間で５０ｇ／Ｌ（生産速度：０．２５ｇ／Ｌ／ｈ、原料収率：５０質量％）のＭＥＬの生産が可能であると共に、流加培養法により２０質量％の植物油から２００時間で１２０ｇ／Ｌ（生産速度：０．６ｇ／Ｌ／ｈ、原料収率：５０質量％）のＭＥＬの生産が可能であることが報告されている（非特許文献１１参照）。

また、醤油醸造工程において副産物として生産されるしょうゆ油（あぶら）を原料としてＣａｎｄｉｄａ ａｎｔａｒｃｔｉｃａ Ｔ－３４株を用いて７日間で８質量％のしょうゆ油から１７ｇ／Ｌ（生産速度:０．１ｇ／Ｌ／ｈ、原料収率:２１質量％）のＭＥＬの生産が可能であることが提案されている（特許文献２参照）。

【０００６】

【特許文献１】

特公昭６０－２４７９７号公報

【特許文献２】

特開２００２－１０１８４７号公報

【非特許文献１】

S.Itoh, H.Honda, Ftonami and T.Suzuki: J. Antibiotics,23,885(1971).

【非特許文献２】

M.Yamaguti, A.Sato and R. Yukuyama: Chem. Ind.,17,741(1976).

【非特許文献３】

S.S.Bhattacharijee, R. H. Haskins and P.A.Golin: Carbohyd.Res.,13,235(1970).

【非特許文献４】

P.Rapp, H.Boch, V.Wary and F.Wagner: J. Gen. Microbiol.,115,491(1979).

【非特許文献５】

U. Rau, C. Manzke and F. Wagner: Biotechnol. Lett., 18, 149(1996).

【非特許文献６】

T. Nakahara, H. Kawasaki, T. Sugisawa, Y. Takamori and T. Tabuchi: J. Ferment.Te

chnol., 61, 19(1983).
【非特許文献７】
H. Kawasaki, T. Nakahara, M. Oogaki and T. Tabuchi: J. Ferment. Technol., 61, 143(1983).
【非特許文献８】
D. Kitamoto, S. Akiba, C. Hioki and T. Tabuchi: Agric. Biol. Chem., 54, 31(1990).
【非特許文献９】
D. KItamoto, K. Haneishi, T. Nakahara and T. Tabuchi: Agric. Biol. Chem., 54, 37(1990).
【非特許文献１０】
D. Kitamoto, K. Fijishiro, H. Yanagishita, T. Nakane and T. Nakahara: Biotechnol. Lett., 14, 305(1992).
【非特許文献１１】
金，伊炳大，桂樹徹，谷吉樹：平成１０年日本生物工学会大会要旨，ｐ１９５．
【０００７】
【発明が解決しようとする課題】
ところで、生分解性が高く、低毒性で環境に優しく、新規な生理機能を持つといわれるマンノシルエリスリトールリピッドなどのバイオサーファクタントを食品工業、医薬品工業、化学工業などで広く普及させていくためには、マンノシルエリスリトールリピッドの生産効率を高め、生産コストの低減を図ることが必要である。しかしながら、現在までのところ、マンノシルエリスリトールリピッドの生産効率（生産速度、対原料収率、及び収率）は低く、更なる生産効率の高いマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法の開発が強く望まれているのが現状である。
【０００８】
本発明は、このような要望に応え、従来における前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、マンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物としてクルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ） ｓｐ．Ｉ－１１株（ＦＥＲＭ Ｐ－１８１２６）を用い、その培地組成及び培養条件を最適化することによって、高い生産速度、高い収率と高い生産物濃度を達成でき、より安価にマンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）を効率よく製造することができる方法を提供することを目的とする。
【０００９】
【課題を解決するための手段】
前記課題を解決するため本発明者らが鋭意検討を重ねた結果、以下の知見を得た。即ち、Ｃａｎｄｉｄａ ａｎｔａｒｃｔｉｃａ Ｔ－３４株を用いてマンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）生産用培地（植物油脂８０ｇ／Ｌ、酵母エキス １ｇ／Ｌ、硝酸ナトリウム ０．５ｇ／Ｌ、リン酸２水素カリウム０．４ｇ／Ｌ、及び硫酸マグネシウム０．２ｇ／Ｌ）で回分培養を行った結果、マンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）をほとんど生産することができなかった。
そこで、Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ ｓｐ．Ｉ－１１（ＦＥＲＭ Ｐ－１８１２６）を用いてマンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）生産用培地における無機窒素源の種類を変えて培養を行ったところ、無機窒素源の種類によりＭＥＬの生産量、菌体の増殖量に違いが認められた。この違いの原因として培養期間中の培養液のｐＨ変化が考えられた。最もＭＥＬの生産が良好であった無機窒素源を用いて培養液中のｐＨを変化させて培養を行うと、制御するｐＨによりＭＥＬの生産量に違いが認められ、最も効率良くＭＥＬを生産できるｐＨの範囲があることを知見した。
【００１０】
一般に、微生物を用いた発酵生産においては、培地組成及び培養条件によって菌体増殖や目的生産物の収率が大きく影響を受けることが知られている。そこで、前記Ｋｕｒｔｚｍ

ａｎｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．Ｉ－１１（ＦＥＲＭ　Ｐ－１８１２６）を用いたＭＥＬ生産用培地における酵母エキス、リン酸２水素カリウム、硫酸マグネシウム、及び無機窒素源の濃度を変えると共に、溶存酸素濃度及び温度の培養条件を変えてＭＥＬの生産に与える影響を調べて、ＭＥＬの生産における最適な培地組成及び培養条件を求めた。

【００１１】

また、ＭＥＬの生産量を増加させるためには原料である植物油脂の供給量を増加させることが必要である。そこで、培養開始時の植物油脂濃度（初発植物油脂濃度）を変化させて培養を行った結果、培養液中の初発植物油脂濃度が高くなりすぎるとＭＥＬの生産速度、生産量、及び収率が減少することが判明し、高いＭＥＬの生産速度を維持できる最適な初発植物油脂濃度の範囲が存在することを知見した。これは、原料である植物油脂を酵母が利用するためには、まず、酵母は細胞外にリパーゼを分泌する。培養液中に分泌されたリパーゼは、植物油脂をグリセロールと脂肪酸に分解する。分解されたグリセロールと脂肪酸は、酵母細胞に吸収されて細胞内でＭＥＬ等の生産に使用される。この時、細胞内に吸収される脂肪酸の吸収速度よりも植物油脂から分解される脂肪酸の生成速度の方が高いため、培養液中の初発植物油脂濃度が高いと、次第に培養液中に脂肪酸が蓄積され、培養液中の脂肪酸の量が過剰となって、酵母によるＭＥＬの生産を抑制してしまうためであると考えられる。

【００１２】

従って、前記Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．Ｉ－１１（ＦＥＲＭ　Ｐ－１８１２６）を用いてマンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）生産用培地のｐＨを制御し、最適な培地組成及び培養条件を設定すると共に、培養途中から植物油脂を流加し、全植物油脂濃度（初発植物油脂量＋流加植物油脂量）を２５質量％以上に制御することによって、培養液中の脂肪酸濃度を過度に上昇させることなく、培養液中の植物油脂濃度を増加させることができ、回分培養では不可能であった２０質量％以上（２００ｇ／Ｌ以上）の高濃度でマンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）を効率よく生産できることを見出し、本発明をなすにいたった。

【００１３】

本発明は、本発明者らによる前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては、下記の通りである。

＜１＞　植物油脂と栄養素を含む培養液中でマンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ株を除く）を培養してマンノシルエリスリトールリピッドを製造する方法において、前記培養液のｐＨをアンモニアを用いて５．２～５．８の範囲に制御して培養を行い、初発植物油脂濃度が１８～２０質量％で培養を開始し、該培養開始後７～８日目より前記植物油脂を１．０～１．１ｇ／Ｌ／ｈの速度で培養液中に供給し、前記植物油脂を流加後における培養液中の前記初発植物油脂量と流加植物油脂量とを合わせた全植物油脂濃度が２５～４０質量％となる条件で培養を行い、前記マンノシルエリスリトールリピッドの生産量が、２０質量％以上（２００ｇ／Ｌ以上）であることを特徴とするマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法である。

＜２＞　培養液中に無機窒素源を含有し、該無機窒素源が、硝酸アンモニウム及び尿素のいずれかである前記＜１＞に記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法である。

＜３＞　マンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ株を除く）におけるマンノシルエリスリトールリピッドを生産する上での培地組成及び培養条件が、下記の通りである前記＜１＞から＜２＞のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法である。

酵母エキス：０．１～２ｇ／Ｌ
硝酸アンモニウム：０．１～１ｇ／Ｌ
リン酸２水素カリウム：０．１～２ｇ／Ｌ
硫酸マグネシウム：０．１～１ｇ／Ｌ

培養液ｐＨ：５．２～５．８
溶存酸素濃度：３～９ｐｐｍ
培養温度：２６～３２℃

＜４＞　植物油脂が、大豆油、菜種油、コーン油、ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油及びパーム油から選択される少なくとも１種である前記＜１＞から＜３＞のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法である。

＜５＞　植物油脂として、食品廃油（しょうゆ油を除く）を用いる前記＜１＞から＜４＞のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法である。

＜６＞　マンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ株を除く）が、クルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株（ＦＥＲＭ　Ｐ－１８１２６）である前記＜１＞から＜５＞のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法である。

＜７＞　培養液中のマンノシルエリスリトールリピッド濃度を７質量％以上とした状態で該培養液を室温で１～２日間静置し、マンノシルエリスリトールリピッドを沈殿させて、該培養液からマンノシルエリスリトールリピッドを回収する前記＜１＞から＜６＞のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法である。

＜８＞　培養液中のマンノシルエリスリトールリピッド濃度を７質量％以上とした状態で該培養液を遠心分離してマンノシルエリスリトールリピッドを沈殿させて、該培養液からマンノシルエリスリトールリピッドを回収する前記＜１＞から＜７＞のいずれかに記載のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法である。

【００１４】
【発明の実施の形態】
（マンノシルエリスリトールリピッドの製造方法）
本発明のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法は、植物油脂と栄養素を含む培養液中でマンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物を、該培養液のｐＨを５．２～５．８の範囲に制御しながら培養を行うものである。

【００１５】
前記マンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選定することができるが、例えば、Ｃａｎｄｉｄａ　ｓｐ．Ｂ－７株、Ｃａｎｄｉｄａ　ａｎｔａｒｃｔｉｃａ　Ｔ－３４株、Ｃａｎｄｉｄａ　ｓｐ．ＳＹ－１６株、Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．Ｉ－１１株、などが挙げられるが、これらの中でも、クルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株がＭＥＬの生産効率が高い点で特に好ましい。

【００１６】
前記クルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株は、リパーゼ生産菌として独立行政法人　産業技術総合研究所　特許生物寄託センターに２０００年１１月２０日に寄託（ＦＥＲＭ　Ｐ－１８１２６）されている。前記クルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株の菌学的な特徴は、本発明者が先に提案した特開２００２－１５９２９０号公報に詳細に記載されている。
なお、クルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株は、上述の通り、リパーゼ生産菌としては知られているが、マンノシルエリスリトールリピッドの生産菌として優れた特徴を有していることは、全く知られておらず、このことは、本発明者の新知見にかかるものである。

【００１７】
前記クルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株の培養には、特に制限はなく、目的に応じて適宜選定することができ、酵母に対して一般に用いられる培地、例えば、ＹＰＤ培地（イーストイクストラクト１０ｇ、ポリペプトン２０ｇ、及びグルコース２０ｇ）を使用することができる。また、最適生育ｐＨは５．６であり、生育可能なｐＨ範囲は２．１～６．６である。最適生育温度は２８℃であり、生育可能な温度範囲は２４～３６℃である。なお、ＭＥＬの生産性を高めるためには、単にクルツマノ

ミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株が生育できるだけでは十分ではなく、培地組成及び培養条件を最適化する必要があり、これら最適条件については後述する。

【００１８】

前記植物油脂としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選定することができ、例えば、大豆油、菜種油、コーン油、ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、パーム油などが挙げられ、これらの中でも、大豆油がＭＥＬの生産効率（生産量、生産速度、及び収率）を向上させることができる点で特に好ましい。

これらは、１種を単独で、又は２種以上を併用しても構わない。

なお、植物油脂としては、てんぷらを製造した後の食品廃油なども利用可能である。

【００１９】

前記無機窒素源として、特に制限はなく、目的に応じて適宜選定することができるが、例えば、硝酸アンモニウム、尿素、硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、硫安、などが挙げられ、これらの中でも、硝酸アンモニウム、尿素が好ましい。

【００２０】

前記クルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株を用いてマンノシルエリスリトールリピッドの生産する場合の好適な培地組成及び培養条件としては、以下の通りである。

酵母エキスは、０．１～２ｇ／Ｌが好ましく、１ｇ／Ｌが特に好ましい

硝酸アンモニウムは、０．１～１ｇ／Ｌが好ましく、０．５ｇ／Ｌが特に好ましい。

リン酸２水素カリウムは、０．１～２ｇ／Ｌが好ましく、０．４ｇ／Ｌが特に好ましい。

硫酸マグネシウムは、０．１～１ｇ／Ｌが好ましく、０．２ｇ／Ｌが特に好ましい。

植物油脂は、８０～２２０ｇ／Ｌが好ましく、１８０ｇ／Ｌが特に好ましい。

溶存酸素濃度は、３～９ｐｐｍが好ましく、７ｐｐｍが特に好ましい

培養温度は、２６～３２℃が好ましく、３０℃が特に好ましい

ｐＨは、５．２～５．８が好ましく、５．４が特に好ましい。

なお、培養液のｐＨ調整は、菌体の栄養素となり得るアンモニアを用いて行うことが好ましい。

【００２１】

本発明のマンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）の製造方法は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選定することができるが、例えば、グルコース２０ｇ／Ｌ、酵母エキス１ｇ／Ｌ、硝酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸２水素カリウム０．５ｇ／Ｌ、及び硫酸マグネシウム０．５ｇ／Ｌの組成の液体培地４ｍＬが入った試験管に１白金耳接種し、３０℃で１日間振とう培養を行う。

これを同じ組成の培地１００ｍＬの入った坂口フラスコに接種して、３０℃で２日間培養を行う。更に、これを所定量の植物油脂と酵母エキス１ｇ／Ｌ、硝酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸２水素カリウム０．５ｇ／Ｌ、及び硫酸マグネシウム０．５ｇ／Ｌの組成の液体培地１．４Ｌが入ったジャーファメンターに接種して、３０℃で１．５Ｌ／分の通気速度と８００ｒｐｍの撹拌速度で本培養を開始する。

なお、ｐＨは、ｐＨメーターで測定できる。溶存酸素濃度は、溶存酸素濃度メーターで測定できる。

【００２２】

－回分培養－

前記回分培養では、培養途中で植物油脂の供給は行わないで、１日に１乃至２回培養液を無菌的に採取して、培養液中の各成分を経時的に測定する。ＭＥＬ、トリグリセリド、ジグリセリド、及び脂肪酸は、採取した培養液に酢酸エチルを加えて激しく振とうした後に静置し、上清の酢酸エチル層を回収する。この酢酸エチル溶液をイアトロスキャン（ヤトロン社製）のロッドにチャージして所定の方法により各成分を定量分析する。

一般的に、微生物による発酵生産においては、原料が無くなって最高濃度に達するまで生産物の増加の程度が緩やかとなることが多い。ＭＥＬ生産でも同様の現象が観察されたの

で、ＭＥＬ生産速度は、培養の経時変化よりＭＥＬがほぼ直線的に増加する部分の傾きより最小自乗法で計算する。

【００２３】

ここで、前記回分培養においては、培養液のｐＨを５．２～５．８の範囲に制御し、培養液中に無機窒素源を含有させ、該無機窒素源が、硝酸アンモニウム及び尿素のいずれかであることが好ましい。この場合、初発植物油脂濃度が１０～２０質量％の範囲で培養を行うことが好ましく、１４～２０質量％の範囲で培養を行うことがより好ましい。

【００２４】

－流加培養－

前記流加培養では、前記回分培養と同様の方法で培養を開始し、培養途中から培養液に植物油脂を定量送液システムを用いて供給する。該定量送液システムは、流量コントローラーと、電子天秤と、ポンプとから構成されている。

具体的には、電子天秤に乗せられた植物油脂の質量を常時測定し、設定した流量に応じた流量コントローラーの信号により送液ポンプを駆動させて、植物油脂を培養液に供給する。流量は０．１ｇ／ｈ刻みで設定でき、１時間当たり１０回程度ポンプを駆動する。供給した植物油脂の質量は、流量コントローラーに表示され、予め設定した時間（＝設定した供給量）までポンプが植物油脂を供給する。

【００２５】

ここで、前記流加培養においては、初発植物油脂濃度を１４～２０質量％で培養を開始し、該培養開始して６～７日後より植物油脂を０．９～１．１ｇ／Ｌ／ｈの速度で供給することが好ましい。

また、植物油脂を流加後における培養液中の初発植物油脂量と流加植物油脂量とを合わせた全植物油脂濃度が２５質量％以上となる条件で培養を行うことが好ましく、３０～３５質量％で培養を行うことがより好ましい。

【００２６】

－マンノシルエリスリトールリピッドの回収方法－

本発明のマンノシルエリスリトールリピッドの回収方法は、培養液中のマンノシルエリスリトールリピッド濃度を７質量％以上とした状態で該培養液を室温で１～２日間静置し、マンノシルエリスリトールリピッドを沈殿させて、該培養液からマンノシルエリスリトールリピッドを回収する。

また、本発明のマンノシルエリスリトールリピッドの回収方法は、培養液中のマンノシルエリスリトールリピッド濃度を７質量％以上とした状態で該培養液を遠心分離してマンノシルエリスリトールリピッドを沈殿させて、該培養液からマンノシルエリスリトールリピッドを回収する。

【００２７】

従来、培養液からのマンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）の回収は、培養液に１～２倍量の酢酸エチルなどの有機溶媒を加えて激しく振とうした後、遠心分離を行って水層と有機溶媒層と菌体層とに分けて、該有機溶媒層を回収することによって行っている。この回収方法では、培養液の大部分を占める水を同時に処理するため、より多くの手数と資材を要していた。

【００２８】

本発明においては、実用生産に近い形態であるジャーファメンターを用いて、初発植物油脂濃度が１０～２０質量％の範囲で培養を開始し、培養期間中のｐＨを５．２～５．８に保持して培養を行うことにより生産速度を高くし、培養途中において原料である植物油脂を最適の条件（初発植物油脂濃度１４～２０質量％、植物油脂供給開始時間６～７日後、植物油脂供給速度１．０ｇ／Ｌ／ｈ）で供給することによって効率的なＭＥＬの生産を可能としている。この場合、ＭＥＬ濃度が７質量％以上、好ましくは１０質量％以上とすることにより、得られた培養液を静置又は遠心分離するだけでＭＥＬと水が分離し、生産したＭＥＬを簡便に効率よく回収できるものである。

【００２９】

以上説明したように、本発明のマンノシルエリスリトールリピッドの製造方法によれば、前記マンノシルエリスリトールリピッドを好ましくは２０質量％以上（２００ｇ／Ｌ以上）、より好ましくは２０～４０質量％（２００～４００ｇ／Ｌ）の高濃度に生産することができる。

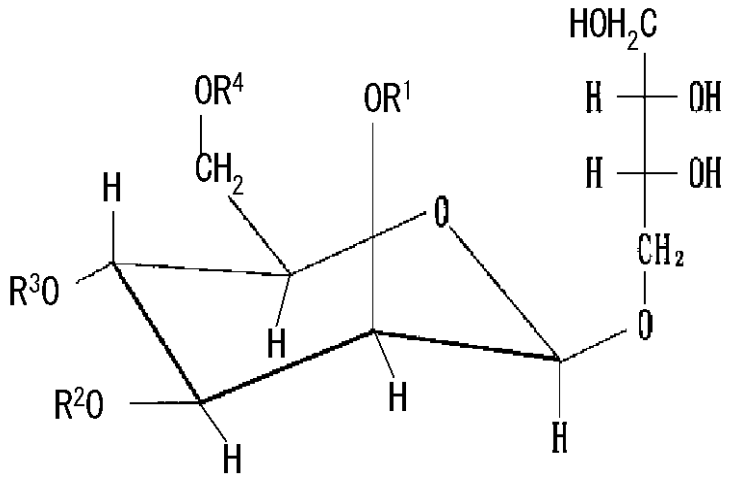
【００３０】

－マンノシルエリスリトールリピッド－

前記マンノシルエリスリトールリピッドは、下記構造式（１）で表される化合物である。

【００３１】

【化１】



構造式（１）

【００３２】

前記構造式（１）において、Ｒ^{1}～Ｒ^{4}は、互いに同一であっても異なっていてもよく、水素原子、アセチル基、又は炭素原子数１～１４、好ましくは３～１２の飽和若しくは不飽和の脂肪酸残基を表す。

【００３３】

前記マンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）は、高い界面活性作用を有し、界面活性剤又はファインケミカルの種々の触媒として用いられる。ヒト急性前骨髄性白血病細胞性ＨＬ６０株にマンノシルエリスリトールリピッドを作用させると顆粒系を分化させる白血病細胞細胞分化誘導作用があり、また、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来のＰＣ１２細胞にマンノシルエリスリトールリピッドを作用させると神経突起の伸長が生ずる神経系細胞株分化誘導作用等の生理活性作用を有する。更に、微生物産生の糖脂質として初めて、メラノーマ細胞のアポトーシスを誘導することが可能となり（X.Zhao et. al., Cancer Research,59, 482-486(1999)）、癌細胞増殖抑制作用がある。これらの生理作用から見て、マンノシルエリスリトールリピッドには抗ガン剤等の医薬としての用途が期待される。また、マンノシルエリスリトールリピッド（ＭＥＬ）には生分解性があり、高い安全性を有すると考えられる。

【００３４】

【実施例】

以下、実施例により本発明について更に詳細に説明するが、本発明は下記実施例に何ら限定されるものではない。

【００３５】

－マンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物－

ポテトデキストロース培地に保存しておいたクルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株（ＦＥＲＭ　Ｐ－１８１２６）を用いた。

【００３６】

－培地成分の最適濃度の決定－

培地成分の酵母エキス、硝酸アンモニウム、リン酸２水素カリウム、及び硫酸マグネシウ

ムの各培地成分の最適濃度を決定するため、各成分について６～８段階に濃度を変えて回分培養を行った。その結果、酵母エキス１ｇ／Ｌ、硝酸アンモニウム０．５ｇ／Ｌ、リン酸２水素カリウム０．４ｇ／Ｌ、及び硫酸マグネシウム０．２ｇ／Ｌを最適培地組成とした。

【００３７】

－溶存酸素濃度と培養温度の最適培養条件の決定－

溶存酸素濃度と培養温度の最適培養条件を決定するため、２つの条件について５～７段階に変えて回分培養を行った。なお、培養液のｐＨはアンモニアを用いて５．４に制御した。ｐＨは、ｐＨメーター、溶存酸素濃度は、溶存酸素濃度メーターにより測定した。

その結果から、最適培養条件として、溶存酸素濃度７ｐｐｍ、培養温度３０℃に決定した。

【００３８】

－培養条件－

グルコース２０ｇ／Ｌ、酵母エキス１ｇ／Ｌ、硝酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸２水素カリウム０．５ｇ／Ｌ、及び硫酸マグネシウム０．５ｇ／Ｌの組成の液体培地４ｍＬが入った試験管に１白金耳接種し、３０℃で１日間振とう培養を行った。

これを同じ組成の培地１００ｍＬの入った坂口フラスコに接種して、３０℃で２日間培養を行った。更に、これを所定量の植物油脂と酵母エキス１ｇ／Ｌ、硝酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸２水素カリウム０．５ｇ／Ｌ、及び硫酸マグネシウム０．５ｇ／Ｌの組成の液体培地１．４Ｌが入ったジャーファメンターに接種して、３０℃で１．５Ｌ／分の通気速度と８００ｒｐｍの撹拌速度で本培養を開始した。

【００３９】

－回分培養－

回分培養では、培養途中において植物油脂の供給を行わないで、１日に１乃至２回培養液を無菌的に採取して、培養液中の各成分を経時的に測定した。ＭＥＬ、トリグリセリド、ジグリセリド、及び脂肪酸は、採取した培養液に酢酸エチルを加えて激しく振とうした後、静置し、上清の酢酸エチル層を回収した。この酢酸エチル溶液をイアトロスキャン（ヤトロン社製）のロッドにチャージして所定の方法により各成分を定量分析した。

なお、ＭＥＬ生産速度は、培養の経時変化よりＭＥＬがほぼ直線的に増加する部分の傾きから最小自乗法により計算した。

【００４０】

－無機窒素源の選定－

無機窒素源として、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、及び硫安を用いて、ｐＨの制御を行わないで前記回分培養を行った。結果を表１に示す。

【００４１】

【表１】

		最高MEL(g/L)	培養期間(h)	1日後のpH	2日以降のpH
無機窒素源	硝酸ナトリウム	3	192	8.3	8.3～8.7
	硝酸アンモニウム	52	168	3.2	4.7～5.7
	塩化アンモニウム	8	144	2.1	2.1
	尿素	29	192	8.2	4.6～4.9
	硫安	8	216	2.4	2.1

表１の結果から、硝酸アンモニウムでは１６８時間で５２ｇ／ＬのＭＥＬを生産した。尿素では１９２時間で２９ｇ／ＬのＭＥＬを生産した。これに対し、硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム及び硫安ではほとんどＭＥＬを生産することができなかった。

また、各無機窒素源でのｐＨの変化を見ると、ＭＥＬをほとんど生産できなかった硝酸ナ

トリウム、塩化アンモニウム及び硫安では、培養開始後１日目以降のｐＨはアルカリ性又は酸性に傾いていた。これに対し、ＭＥＬを良く生産した硝酸アンモニウムでは最初にｐＨが３前後まで低下した後、２日目ごろからｐＨ４．７～５．７の弱酸性域に推移した。また、尿素においても２日目以降からｐＨは４．６～４．９であった。
これらの結果から、ＭＥＬ生産には培養液のｐＨが大きく影響していることが認められる。

【００４２】
－培養液のｐＨ選定－
次に、ＭＥＬ生産に及ぼす培養液のｐＨの影響を調べるため、ｐＨコントローラーを用いて培養期間中のｐＨ５．０～６．６の間で一定の値に保持して培養を行った。この時、無機窒素源としては最も良くＭＥＬを生産した硝酸アンモニウムを用いた。なお、ｐＨを調整するために用いるアルカリ溶液としては、菌体の栄養素となり得るアンモニアを使用した。

【００４３】
【表２】

制御pH	最高MEL(g/L)	培養期間(時間)
5.0	39	96
5.2	46	120
5.4	51	120
5.6	46	90
5.8	45	134
6.0	19	110
6.6	15	96

表２の結果から、ｐＨが５．２～５．８、特にｐＨ５．４に制御して培養することがＭＥＬの生産効率を高める上で効果的であることが認められた。

【００４４】
（実施例１）－回分培養－
上記のようにして設定した、培養条件において、初発大豆油濃度を表３に示すように変化させて、ＭＥＬ生産に与える初発大豆油濃度の影響を検討した。結果を表３に示す。

【００４５】
【表３】

初発大豆油濃度	MEL(g/L)	培養期間(h)	生産速度(g/L/h)	収率(g/g)
4質量%	19	86	0.25	0.48
6質量%	34	86	0.6	0.57
8質量%	51	120	0.62	0.64
10質量%	63	144	0.72	0.63
12質量%	76	134	0.75	0.63
14質量%	106	168	0.73	0.76
16質量%	122	192	0.77	0.76
18質量%	153	240	0.76	0.85
20質量%	154	288	0.77	0.77
22質量%	142	264	0.56	0.65
24質量%	127	168	0.61	0.53

表３の結果から、初発大豆油濃度が１０～２０質量％の間では、ＭＥＬ生産速度は０．７２～０．７７ｇ／Ｌ／ｈとほぼ一定であった。ＭＥＬ生産量は大豆油濃度の上昇に連れてほぼ直線的に増加し、初発大豆油濃度が２０質量％では１５４ｇ／Ｌに達し、収率は大豆油濃度の上昇に伴って次第に上昇し、初発大豆油濃度が１８質量％では０．８５ｇ／ｇに達した。

これに対し、大豆油濃度が４、６及び８質量％での各ＭＥＬ生産速度はそれぞれ０．２５、０．６、及び０．６２ｇ／Ｌ／ｈであった。大豆油濃度が８質量％から濃度を低下することによりＭＥＬの生産速度は急激に減少した。大豆油濃度が４、６及び８質量％でのＭＥＬ生産量はそれぞれ１９、３４及び５１ｇ／Ｌであった。大豆油濃度４、６、及び８質量％でのＭＥＬ収率はそれぞれ０．４８、０．５７、及び０．６４ｇ／ｇであった。

一方、大豆油濃度が２０質量％を超えると、大豆油濃度の増加に連れてＭＥＬ生産速度、ＭＥＬ生産量、及び収率はいずれも低下し、大豆油濃度が２２質量％及び２４質量％での生産速度は０．５６ｇ／Ｌ／ｈ及び０．６１ｇ／Ｌ／ｈであり、生産量は１４２ｇ／Ｌ及び１２７ｇ／Ｌ、収率は０．６５ｇ／ｇ及び０．５３ｇ／ｇであった。

従って、回分培養によるＭＥＬ生産量の上限は、初発大豆油濃度を２０質量％とした場合には１５４ｇ／Ｌであり、これ以上のＭＥＬ生産量の増加は困難であった。これは、培養途中で培養液中の脂肪酸濃度が過度に上昇し、該脂肪酸がＭＥＬの生産を阻害していると考えられる。この中間生産物である脂肪酸の培養液中の濃度を一定濃度以下に保持することによって、ＭＥＬ生産の阻害を解除し、ＭＥＬ生産を効率的に行う方法について、以下検討した。

【００４６】

－流加培養－

前記流加培養では、前記回分培養と同様の方法で培養を開始し、培養途中から培養液に植物油脂を定量送液システムにより供給した。該定量送液システムは、流量コントローラーと、電子天秤と、ポンプとから構成されている。電子天秤に乗せられた植物油脂の質量を常時測定し、設定した流量に応じた流量コントローラーの信号により送液ポンプを駆動させて、植物油脂を培養液に供給した。流量は０．１ｇ／ｈ刻みで設定可能であり、１時間当たり１０回程度ポンプを駆動した。供給した植物油脂の量は、流量コントローラーに表示され、予め設定した時間（＝設定した供給量）までポンプが植物油脂を供給可能であった。

【００４７】
（実施例２）－流加培養（１）－
初発大豆油濃度を１０、１４及び１８質量％として培養を開始し、培養開始後４及び６日目より大豆油を０．９ｇ／Ｌ／ｈの速度で供給する流加培養を行った。結果を表４に示す。
【００４８】
【表４】

初発大豆油濃度	最高MEL(g/L)	培養期間(日)	生産速度(g/L/h)	収率(g/g)
10質量%	186	16	0.5	0.74
14質量%	200	17	0.54	0.8
18質量%	207	16	0.58	0.83

表４の結果から、初発大豆油濃度が１８質量％では１５日目にＭＥＬ濃度が２０質量％に達した。初発大豆油濃度が１４質量％では１７日目にＭＥＬ濃度が２０質量％に達した。これに対し、初発大豆油濃度が１０質量％では、培養を終了した１６日目のＭＥＬ濃度は１８６ｇ／Ｌであり、ＭＥＬ濃度は２０質量％に達しなかった。
【００４９】
（実施例３）－流加培養（２）－
実施例２の結果から、初発大豆油濃度を１８質量％として培養を開始し、培養開始後５、６、７及び８日目より０．９ｇ／Ｌ／ｈの速度で大豆油を供給する流加培養を行った。結果を表５に示す。
【００５０】
【表５】

流加開始時間(日)	最高MEL(g/L)	培養期間(日)	生産速度(g/L/h)	収率(g/g)
5	185	18	0.47	0.74
6	207	16	0.65	0.83
7	204	16	0.63	0.82
8	203	17	0.49	0.81

表５の結果から、流加開始時間が６日目及び７日目のものは、１５日目にＭＥＬ濃度が２０質量％に達した。流加開始時間が８日目のものは、１７日目にＭＥＬ濃度が２０質量％に達した。これに対し、流加開始時間が５日目のものは、培養を終了した１８日目のＭＥＬ濃度が１８５ｇ／Ｌであり、ＭＥＬ濃度が２０質量％に達しなかった。
【００５１】
（実施例４）－流加培養（３）－
実施例２及び３の結果から、初発大豆油濃度を１８質量％として培養を開始し、培養開始後７日目より大豆油を供給し、大豆油の供給速度が０．６、０．８、０．９、１．０及び１．１ｇ／Ｌ／ｈとなるように流加培養を行った。結果を表６に示す。
【００５２】
【表６】

流加速度(g/L/h)	最高MEL(g/L)	培養期間(日)	生産速度(g/L/h)	収率(g/g)
0.6	169	21	0.37	0.68
0.8	206	16	0.63	0.82
0.9	203	16	0.65	0.81
1.0	203	12	0.79	0.81
1.1	205	14	0.71	0.82

表６の結果から、大豆油の供給速度を１．０ｇ／Ｌ／ｈとした時、ＭＥＬ濃度は１２日目に２０質量％に達した。また、０．６、０．８、０．９、１．０及び１．１ｇ／Ｌ／ｈのいずれの供給速度においてもＭＥＬ濃度は２０質量％に達したが、到達までの時間は０．８及び０．９ｇ／Ｌ／ｈでは１５日目、１．１ｇ／Ｌ／ｈでは１４日目であった。

【００５３】

（実施例５）－流加培養（４）－

ＭＥＬ生産量のさらなる向上を目指して、供給する大豆油量を増加させた。初発大豆油濃度を１８質量％とし、培養開始後７日目より１．０ｇ／Ｌ／ｈの速度で大豆油を供給した。培養液中の全大豆油濃度（初発大豆油濃度＋供給大豆油濃度）が２５、３０、３５及び４０質量％となるように大豆油を供給し、流加培養を行った。結果を表７に示す。

【００５４】

【表７】

		最高MEL(g/L)	培養期間(日)	生産速度(g/L/h)	収率(g/g)
全大豆油量	25質量%	203	12	0.79	0.81
	30質量%	239	15	0.72	0.8
	35質量%	279	20	0.67	0.8
	40質量%	307	24	0.63	0.77

表７の結果から、全大豆油濃度（初発大豆油量＋供給大豆油量）が２５質量％では１２日後にＭＥＬ濃度が２０３ｇ／Ｌであった。全大豆油濃度（初発大豆油量＋供給大豆油量）が３０質量％では１５日後にＭＥＬ濃度が２３９ｇ／Ｌであった。全大豆油濃度（初発大豆油量＋供給大豆油量）が３５質量％では２０日後にＭＥＬ濃度が２７９ｇ／Ｌであった。全大豆油濃度（初発大豆油量＋供給大豆油量）が４０質量％では２４日後にＭＥＬ濃度が３０７ｇ／Ｌであった。

従って、全大豆油濃度（初発大豆油量＋供給大豆油量）を２５～４０質量％の範囲に調節することにより、ＭＥＬ濃度が２０質量％以上の高濃度のＭＥＬ生産が可能となることが認められる。

【００５５】

（実施例６）　－ＭＥＬの回収－

初発大豆油濃度が１０～２０質量％の条件で培養してＭＥＬを生産した後、培養液を１０，０００ｒｐｍで５分間遠心分離を行った。その結果、培養液は、菌体層と、緑色の油状液体層と、透明な液体層との３層に分離した。また、培養液を試験管に取って静置しておくと１～２日間で同様に菌体層と、緑色の油状液体層と、透明な液体層との３層に分離した。

初発大豆油濃度が１８質量％の条件で培養した場合において、菌体層と、緑色の油状液体層と、及び透明な液体層中のＭＥＬ量を測定した。その結果、上層の透明な液体層中にはＭＥＬはほとんど存在せず、中層の緑色の油状液体中にはＭＥＬが４６０ｇ／Ｌ含まれて

おり、下層の菌体層にはＭＥＬが１８３ｇ／Ｌ含まれていた。
従って、初発大豆油濃度が１０質量％以上において生産されるＭＥＬ濃度は７質量％以上であり、この濃度以上のＭＥＬを含有する培養液を静置又は遠心分離することにより、培養液とＭＥＬ含有層とを簡単に分離することができ、効率よくＭＥＬを回収できることが判明した。

【００５６】

（比較例１）

初発大豆油濃度を４、６、及び８質量％で回分培養してＭＥＬを生産した（初発大豆油濃度が４、６及び８質量％でのＭＥＬ生産量はそれぞれ１．９、３．４及び５．１質量％であった。）。

得られた培養液を１０，０００ｒｐｍで５分間遠心分離を行うと、菌体と淡い緑色に懸濁した液体の２層に分離した。また、培養液を試験管に取って２日間静置しておくと同様に２層に分離したが、静置しておいても実施例６のような菌体層と、緑色の油状液体層と、透明な液体層との３層に分離されず、ＭＥＬを効率よく回収することができなかった。

【００５７】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によると、マンノシルエリスリトールリピッドを生産する能力を有する微生物としてクルツマノミセス（Ｋｕｒｔｚｍａｎｏｍｙｃｅｓ）　ｓｐ．Ｉ－１１株（ＦＥＲＭ　Ｐ－１８１２６）を用い、その培地組成及び培養条件を最適化することによって、バイオサーファクタントの一種であるマンノシルエリスリトールリピッドの生産効率（生産量、生産速度、及び収率）を大幅に向上させることができた。

フロントページの続き

(72)発明者　田村　幸吉
広島県福山市新市町相方１０８９－８　丸善製薬株式会社　総合研究所内

審査官　小金井　悟

(56)参考文献　特開昭５７－１４５８９６（ＪＰ，Ａ）
特開２００２－１５９２９０（ＪＰ，Ａ）
特開２００２－１０１８４７（ＪＰ，Ａ）
Biosci. Biotechnol. Biochem., ２００２年　1月, Vol.66, No.1, p.188-191
Agricultural and Biological Chemistry, １９９０年, Vol.54, No.1, p.31-36
合葉修一ら, 生物化学工学（上）, 財団法人東京大学出版会, １９６８年　3月３０日, 第２６－２９頁
Biotechnology Letters, １９９２年　4月, Vol.14, No.4, p.305-310
Biotechnology Letters, １９９６年　2月, Vol.18, No.2, p.149-154
金熙植ら, A glycolipid biosurfactant produced from Candida sp. SY16, 日本生物工学会大会講演要旨集, １９９８年　8月３１日, 平成10年度, p.195

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12P　19/00 -19/64
C12R　1/01
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
CAplus(STN)
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)