世界知的所有権機関

国 際 事 務 局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6
C12N 1/14, C12P 7/64, C11C 3/00,
A23K 1/16, A23L 1/30

A1

(11) 国際公開番号 WO96/33263

(43) 国際公開日 1996年10月24日(24.10.96)

(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01049
(22) 国際出願日 1996年4月17日(17.04.96)

(30) 優先権データ
特願平7/115183 1995年4月17日(17.04.95) JP
特願平7/236669 1995年9月14日(14.09.95) JP
特願平7/263921 1995年10月12日(12.10.95) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
工業技術院長が代表する日本国(JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR-GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)[JP/JP]
〒100 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo, (JP)
ナガセ生化学工業株式会社
(NAGASE BIOCHEMICALS, LTD.)[JP/JP]
〒550-91 大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号 Osaka, (JP)
サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP]
〒530 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
横地俊弘(YOKOCHI, Toshihiro)[JP/JP]
中原東郎(NAKAHARA, Toro)[JP/JP]
東原孝規(HIGASHIHARA, Takanori)[JP/JP]
〒305 茨城県つくば市東1丁目1番3
工業技術院 生命工学工業技術研究所内 Ibaraki, (JP)
田中悟広(TANAKA, Satohiro)[JP/JP]
〒671-41 兵庫県宍粟郡一宮町公文400 Hyogo, (JP)
矢口敏昭(YAGUCHI, Toshiaki)[JP/JP]
〒567 大阪府茨木市西中条町4番5号
サントリー第2茨木寮307号 Osaka, (JP)
(74) 代理人
弁理士 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.)
〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号
IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)

(81) 指定国
AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
添付公開書類 国際調査報告書
請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。

(54) Title : NOVEL MICROORGANISMS CAPABLE OF PRODUCING HIGHLY UNSATURATED FATTY ACIDS AND PROCESS FOR PRODUCING HIGHLY UNSATURATED FATTY ACIDS BY USING THE MICROORGANISMS

(54) 発明の名称 高度不飽和脂肪酸生産能を有する新規微生物および該微生物を利用する高度不飽和脂肪酸の製造方法

(57) Abstract

A microorganism which is *Schizochytrium* SR21 strain capable of producing (n-3) docosahexaenoic acid (DHA) and (n-6) docosapentaenoic acid (DPA), one which belongs to the same genus as that of this strain, and one which has substantially the same mycological properties as those of these microorganisms; and a process for producing (n-3) DHA and (n-6) DPA by using these microorganisms. They are excellent in reproduction properties and the capability of accumulating fats and have an extremely high (n-3) DHA and (n-6) DPA productivity. Thus, (n-3) DHA and/or (n-6) DPA, which are useful in the fields of foods and drugs, can be efficiently produced by using these microorganisms. Also, fats obtained by incubating these microorganisms are provided. When added to various feeds or foods, these fat compositions containing (n-3) DHA having various physiological activities together with (n-6) DPA it possible to stably and efficiently supply (n-3) DHA and/or (n-6) DPA to the subjects requiring the same.

（５７）要約

本発明は、(n-3)系ドコサヘキサエン酸(ＤＨＡ)および(n-6)系ドコサペンタエン酸(ＤＰＡ)の生産能を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株および該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物、ならびに、該微生物を利用する(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡの製造方法を提供する。本発明の微生物は、増殖性および油脂蓄積性に優れ、(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡの生産能が非常に高い。従って、本発明の微生物を用いて、食品および医薬品の分野で有用な(n-3)系ＤＨＡおよび／または(n-6)系ＤＰＡを効率的に製造することができる。

また本発明は、本発明の微生物を培養して得られる油脂を提供する。この油脂組成物は、種々の生理活性を有する(n-3)系ＤＨＡとともに(n-6)系ＤＰＡを含有するため、これを種々の飼料または食品に添加して、(n-3)系ＤＨＡおよび／または(n-6)系ＤＰＡを必要とする対象にこれら高度不飽和脂肪酸を安定的かつ効率的に供給することができる。

情報としての用途のみ
ＰＣＴに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にＰＣＴ加盟国を同定するために使用されるコード

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CZ チェッコ共和国
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IL イスラエル
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドバ共和国
MG マダガスカル
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア共和国
SL シエラレオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャド
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィエトナム

# 明　細　書

## 高度不飽和脂肪酸生産能を有する新規微生物および該微生物を利用する高度不飽和脂肪酸の製造方法

### 技術分野

本発明は、(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸を含む油脂を生産する能力を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株および該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物、ならびに、該微生物を利用する(n-3)系ドコサヘキサエン酸および／または(n-6)系ドコサペンタエン酸の製造方法に関する。

さらに、本発明は、上記微生物が産生する油脂、該油脂を添加した種々の飼料および食品、ならびに、該油脂を種々の飼料および食品のための添加物として利用する方法に関する。

### 背景技術

動物体内において、ドコサヘキサエン酸(ＤＨＡ)やドコサペンタエン酸(ＤＰＡ)などの高度不飽和脂肪酸は、種々の生理活性を有するものと考えられている。これら高度不飽和脂肪酸は、その不飽和結合の位置の相違により(n-3)系および(n-6)系に分けられることが知られている。動物体内では(n-3)系と(n-6)系の高度不飽和脂肪酸は別の代謝経路に属しており、動物は両者を必須脂肪酸として要求する。

(n-3)系の高度不飽和脂肪酸には、例えばエイコサペンタエン酸[２０：５(n-3)]やドコサヘキサエン酸[２２：６(n-3)]などが含まれ、これらは抗炎症活性、抗血栓活性などの生理活性を有することが知られてお

り、機能性食品や医薬品の素材として注目されている。

一方、(n-6)系の高度不飽和脂肪酸には、例えばγ-リノレン酸[18:3(n-6)]、ジホモ-γ-リノレン酸[20:3(n-6)]、アラキドン酸[20:4(n-6)]などが含まれ、これらは局所ホルモンと呼ばれるプロスタグランジン、ロイコトリエンなどのエイコサノイドの1群あるいは2群への中間代謝物質として注目されている。

動物体内においては、組織により変わるものの、(n-3)系はドコサヘキサエン酸が、そして(n-6)系はアラキドン酸が最終代謝産物となっている。例えば、ヒト赤血球のリン脂質の脂肪酸組成は、(n-3)系はエイコサペンタエン酸0.70%、ドコサペンタエン酸2.09%、ドコサヘキサエン酸4.37%であり、一方、(n-6)系はリノール酸12.67%、ジホモ-γ-リノレン酸0.62%、アラキドン酸16.93%、ドコサペンタエン酸0.86%であり[Hardyら, Biochem.J., vol.274, p133 (1991)]、(n-6)系のドコサペンタエン酸は極めて少ない。

(n-3)系の最終代謝産物である(n-3)系ドコサヘキサエン酸(DHA)は、動物の脳や網膜に特異的に存在し、これら器官において何らかの機能を果たしていると考えられている。この(n-3)系DHAは、青魚に属する魚油に含まれ、特にイワシやマグロ由来の油には20%前後含まれている。近年、マグロの眼窩脂肪などのDHAを高濃度に含有する原料が発見され、また脂肪酸の高度精製技術が発達したことなどから、DHAの生理活性機能の解明や実用化の研究が活発に進められている。DHAの生理活性機能としてコレステロール低下作用、抗血液凝固作用、制癌作用、さらには脳代謝系に関連して記憶学習能力の向上、老人性痴呆症の予防、アルツハイマー疾病の治療薬、稚魚の成長必須脂肪酸などが明らかとなり、また健康食品やベビーミルク等の素材として使用されている。

一方、動物体内で(n-6)系ドコサペンタエン酸(ＤＰＡ)の組成が大きくなる場合は、(n-3)系必須脂肪酸の欠乏に対する代償と考えられる。例えば、(n-6)系が極めて多いサフラワー油を含む食餌を与え続けた3世代目のラットの視神経脈絡膜叢の脂肪酸組成は、(n-3)系ＤＨＡが1／3に減少するが、その一方で、(n-6)系ＤＰＡが4倍になった[Homayounら, J.Neurochem., vol.51, p.45 (1988)]。さらに、ビタミンA欠乏症ラットの肝臓ミクロソームにおいて(n-6)系ＤＰＡ組成が正常値の０．９％から１０．５％へ急増すること[Hammら, Biochem.J., vol.245, p907 (1987)]、および、(n-3)系の少ないパーム油を与えたラットにおいて(n-3)系ＤＨＡが減少し、(n-6)系ＤＰＡが増加すること[Rebhungら, Biosci.Biotech.Biochem., vol.58, p314 (1994)]などが報告されている。

このように、動物の脳や網膜において何らかの機能を果たしていると考えられる(n-3)系ＤＨＡの代償として(n-6)系ＤＰＡが生体内で作られることは、(n-6)系ＤＰＡが何らかの生理的役割を有していることを示唆し、また、アラキドン酸のアンタゴニストとしても期待できる。

さらに、現在知られている(n-6)系ＤＰＡの利用法としては、精神安定剤を脳へ運びやすくする基剤として使用すること(特開昭６１－２０４１３６号)、ならびに、(n-6)系の炭素数２２の不飽和脂肪酸が正常値よりも減少している疾患、例えば、ウイルス、特にワート(wart)ウイルスによる感染；白血病、乳癌および他の種の癌；月経前症候群および良性胸部疾患；高血圧、高脂血症および肥満症、ドライ・アイ(dry eye)症候群；強皮症、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎および他の形の自己免疫および炎症性疾患；不妊症；糖尿病；および精神分裂病およびアルコール中毒(過度および禁酒の両方の影響を含む)を含む精神病的疾患などの治療に(n-6)系ＤＰＡを(n-6)系ドコサテトラエン酸と組み合せて

使用すること(特開昭６０－３８３２４号)が挙げられる。

この(n-6)系ＤＰＡは、一般的に供給される油脂の中には全く存在せず、魚油の中に(n-3)系ＤＰＡとともにわずかに含まれているにすぎない。魚油から(n-6)系ＤＰＡを分離濃縮する方法が特許出願されているが[特開平1-180849]、魚油中の(n-6)系ＤＰＡの含量が１%程度と微量であり、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などの構造の類似した高度不飽和脂肪酸を多く含み、さらに(n-3)系ＤＰＡが(n-6)系ＤＰＡより数倍高い含量で含まれるため、多段のクロマト処理が必要であるなど効率の良い分離・濃縮が困難である。

以上のように、魚油には注目すべき生理機能を有する(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡが存在するが、(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡを多量に含んでいる油脂は未だ知られていない。さらに、魚油の場合、魚類の回遊性等から安定な供給源となりにくいことや、魚油特有の異臭があるなどの欠点がある。また、魚油にはアラキドン酸(ＡＡ)やエイコサペンタエン酸(ＥＰＡ)などの高度不飽和脂肪酸も含まれるため、酸化され易く、安定した品質の油脂を得ることが困難である。さらに、高純度の(n-3)系ＤＨＡまたは(n-6)系ＤＰＡを得ようとする場合、その分離精製が困難である。特に、乳児用ミルクに添加する場合、エイコサペンタエン酸の含有割合が低いものが望ましいが、供給源が魚油の場合にはエイコサペンタエン酸のみを効率的に除去することは極めて困難である。

魚油以外の(n-3)系ドコサヘキサエン酸の供給源として、(n-3)系ドコサヘキサエン酸生産能を有する微生物の培養菌体中に蓄積した油脂が知られている。(n-3)系ドコサヘキサエン酸生産能を有する微生物としては、深海から分離された細菌ビブリオ・マリナス(Vibrio marinus)(ＡＴＣＣ １５３８１)や深海魚の腸内から分離されたビブリオ属細菌、微細藻

類であるシクロテラ・クリプティカ(Cyclotella cryptica)やクリプテコディニウム・コーニー(Crypthecodinium cohnii)(特表平５－５０３４２５)、鞭毛菌類であるスラウストキトリウム・アウレウム(Thraustochytrium aureum)(ＡＴＣＣ ３４３０４)[Kendrick, Lipids, vol.27, p15 (1992)]やジャポノキトリウム・エスピー(Japonochytrium sp.)(ＡＴＣＣ ２８２０７)(特開平１-１９９５８８)などが知られている。しかし、これらの微生物を用いる方法によると、培地１Ｌ(リットル)当たりのドコサヘキサエン酸の生産量は、数１０mg～５００mg程度と極めて低い水準に止どまっている。

一方、微細藻類の一部には、ドコサペンタエン酸を含む脂質を生産するものが存在するが、これはいずれも(n-3)系のドコサペンタエン酸である。また、鞭毛菌類のスラウストキトリウム・アウレウム(ＡＴＣＣ ３４３０４)やジャポノキトリウム・エスピー(ＡＴＣＣ ２８２０７)などにもドコサペンタエン酸が含まれることが知られているが、これらも(n-3)系であると報告されている。即ち、これら微生物によって生産された油脂中に(n-6)系ドコサペンタエン酸が十分量で存在することは知られていない。

発明の開示

本発明者らは、上記のような(n-3)系ドコサヘキサエン酸(ＤＨＡ)および／または(n-6)系ドコサペンタエン酸(ＤＰＡ)の含有量が高く、かつエイコサペンタエン酸(ＥＰＡ)の含有量が低い油脂を高生産する微生物を広く海洋性微生物に求めた。

この結果、ある種の海洋性微生物(シゾキトリウム属に属する新種)が、(n-3)系ＤＨＡを高含有するだけでなく、(n-6)系ＤＰＡをも含有し、さらにＥＰＡの含有量の低い油脂を高生産することを見い出し、本発明を

完成するに至った。

即ち、本発明は、(n-3)系ドコサヘキサエン酸(ＤＨＡ)および(n-6)系ドコサペンタエン酸(ＤＰＡ)を含む油脂を生産する能力を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株および該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物を提供するものである。

また、本発明は、上記微生物を培養し、その培養物から上記油脂を採取することを特徴とする、(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡを含む油脂の製造方法を提供する。

また、本発明は、上記油脂から(n-3)系ＤＨＡまたは(n-6)系ＤＰＡを単離する工程をさらに包含することを特徴とする、(n-3)系ＤＨＡまたは(n-6)系ＤＰＡの製造方法を提供する。

さらに、本発明者らは、上記油脂が種々の飼料および食品のための(n-3)系ＤＨＡおよび／または(n-6)系ＤＰＡの供給源として有用であることを見い出した。

即ち、本発明は、上記油脂を添加した種々の飼料および食品を提供する。

また、本発明は、上記油脂を種々の飼料および食品のための添加物として利用する方法を提供する。

図面の簡単な説明

図１は、シゾキトリウム属ＳＲ２１株の遊走子の形態を示す光学顕微鏡写真である。

図２は、シゾキトリウム属ＳＲ２１株の遊走子の鞭毛の構造を示す透過型電子顕微鏡写真である。

図３は、シゾキトリウム属ＳＲ２１株の栄養細胞塊と原形質とのネットワークを示す光学顕微鏡写真である。

図４は、シゾキトリウム属ＳＲ２１株由来の(n-6)系ドコサペンタエ

ン酸のＧＣ／ＭＳスペクトルを測定した結果を示すチャートである。

図５は、シゾキトリウム属ＳＲ２１株由来の中性油脂中のトリグリセリドを液体クロマトグラフィーにより分離した結果を示すチャートである。

図６は、シゾキトリウム属ＳＲ２１株由来のトリグリセリド(分子種１６：０－１６：０－２２：６)をリパーゼ処理し、次いでトリメチルシリル化した後にＧＣ／ＭＳで測定した結果を示すチャートである。

発明を実施するための最良の形態

以下において、本発明を詳しく説明する。

なお、本明細書中に記載した「油脂」、「脂質」、および「オイル」なる用語は同じ意味で使用した。

本発明の海洋性微生物であるＳＲ２１株は、ミクロネシア連邦のヤップ島沿岸の海水から分離したものである。当初、この菌株は、スラウストキトリウム(Thraustochytrium)属の微生物であると考えられた。しかし、その菌学的性質を詳しく調べた結果、この菌株はシゾキトリウム(Schizochytrium)属の新種と認められる微生物であることがわかった。このシゾキトリウム属ＳＲ２１株の菌学的性質は下記の通りである。

ＳＲ２１株の菌学的性質は、栄養培地および海水中で培養することによって調べた。

まず、人工海水(トロピックマリン)１Ｌにグルコース２g、酵母エキス０．２gおよびグルタミン酸ナトリウム０．５gを加えた栄養培地を小シャーレに入れ、同じ培地によるＳＲ２１株のフラスコ前培養液を１滴接種し、倒立顕微鏡により細胞形態を追跡した。この場合、アメーバ状の不定形細胞の放出が見られた。

次に、同様の追跡をフィルター滅菌した天然海水中で行った。この場合にはアメーバ状の不定形細胞の放出は見られず、２分裂を繰り返した後の

栄養細胞塊のいくつかの細胞から、遊走子の放出が観察された。また、２分裂をせずに１個の栄養細胞から直接遊走子へと分化したものも観察された。

遊走子放出が多く認められたサンプルにグルタルアルデヒドを１０容量%加え、光学顕微鏡により遊走子の観察を行った。

図１は、ＳＲ２１株の遊走子の形態を示す光学顕微鏡写真であり、２本の長さの異なる鞭毛を示している。

さらに酢酸ウランを用いたネガティブ染色法により、鞭毛の電子顕微鏡観察を行った。図２は、ＳＲ２１株の遊走子の鞭毛の構造を示す透過型電子顕微鏡写真であり、鞭毛のマスチゴネマの基部、軸、頂毛からなる三部構造を示している。

また、上記２通りの倒立顕微鏡による細胞形態観察において、栄養細胞が２分裂を繰り返し、細胞塊および原形質のネットワークを形成するものが見られた。図３は、ＳＲ２１株の栄養細胞塊と原形質とのネットワークを示す光学顕微鏡写真である。

ＳＲ２１株が寒天平板培地上で形成するコロニーは、酵母のコロニーと同様の滑らかな黄土色を呈する。また、このＳＲ２１株を液体培地で増殖させると、その初期に２本の長さの異なる鞭毛を持つ遊走子が観察され(図１)、２本の鞭毛のうちの長鞭毛にある毛状構造(マスチゴネマ)が基部、軸、頂毛の三部構造をとる(図２)。これらのことから、ＳＲ２１株は、クロミスタ界(Kingdom Chromista)、不等毛門(Phylum Heterokonta)に属する。さらに原形質のネットワーク形成性、ゴルジ体由来の鱗片から、ＳＲ２１株は、ラビリンチュラ綱(Class Labyrinthulea)ラビリンチュラ目(Order Labyrinthulida)に属する。そして、栄養細胞が球形または楕円形であること、および原形質のネットワーク中の滑走運動がないことから、S

Ｒ２１株がスラウストキトリウム科(Family Thraustochytriidae)に属することは明らかである。

さらに、ＳＲ２１株の栄養細胞は２分裂を繰り返し、８～３２個の栄養細胞塊を形成する。その後、いくつかの細胞からアメーバ状の不定形細胞が放出され、細胞塊から徐々に離れ、１～２時間後に球形細胞になる。この球形細胞はその後遊走子嚢として８ないし１６個の遊走子へ分化する。その際、遊走子嚢の膜は観察されない。さらに、２分裂をせずに１個の栄養細胞から直接遊走子嚢へ分化したり、２分裂をして栄養細胞塊となった後に不定形細胞を経ないで遊走子へ分化する細胞もあり、複雑な生活環を有する。

スラウストキトリウム科は、ポーター[D.Porter, "Handbook of Protoctista", Jones and Bartlett Publishers (1990)]によれば７属３０種よりなる。その後、コラロキトリウム(Corallochytrium)属[Raghukumar,S., Botanica Marina, 30 : 83 (1987)]が加えられ、モス[Moss.S.T., "The Biology of Free-living Heterotrophic Iagellates", Oxford University Press (1991)]によれば８属３３種とされる。

これらスラウストキトリウム科８属の特徴は次の通りである。ラビリンチュロイデス(Labyrinthuloides)属の栄養細胞は球状であるが、原形質ネットワーク上を不規則に滑走する。アプラノキトリウム(Aplanochytrium)属は不動胞子、即ち鞭毛を持たない胞子によって増殖する。アルソーニア(Althornia)属は原形質ネットワークを形成せず、浮遊性である。ジャポノキトリウム(Japonochytrium)属は細胞外に胞嚢(apophysis)を生じる。ウルケニア(Ulkenia)属は遊走子嚢からアメーバ状の不定形細胞が放出された後にそれが遊走子へ分化する。スラウストキトリウム(Thraustochytrium)属は１個の遊走子から１個の栄養細胞となり、それが１個の遊走子嚢を

形成する。シゾキトリウム(Schizochytrium)属は１個の遊走子が着生した後に２分裂を行い、複数個の栄養細胞塊を形成し、それぞれが遊走子嚢となる。コラロキトリウム(Corallochytrium)属はコウラナメクジ状の胞子を形成し、鞭毛を持った遊走子を形成しない。

尚、上記８属のうちウルケニア属については、ゲルトナー[Gaertner, A., Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh., 16 : 139 (1977)]は、遊走子嚢から裸の原形質塊(アメーバ状の不定形細胞)が放出された後に遊走子へ分化する形質を属の分類基準に用い、それまでスラウストキトリウム属に分類されていたスラウストキトリウム・ヴィサージェンス(Thraustochytrium visurgense)[Ulken, A., Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh., 9 : 289 (1965)]およびスラウストキトリウム・アモエボイダム(Thraustochytrium amoeboidum)[Bahnweg, O. およびSparrow, F. K., Jr. Am. J. Bot., 61 : 754 (1974)]の２種をウルケニア属に移し、それらにラグクーマーによる新種ウルケニア・ミヌータ(Ulkenia minuta)[Raghukumar, S., Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh., 16 : 158 (1977)]とさらに３種の新種を併せてウルケニア属６種として新属ウルケニア属を提唱した。

しかし、それ以後にウルケニア属の新しい種について記載した論文はみられない。カーリング[Karring, J. S., "Predominantly Holocarpic and Eucarpic Simple Biflagellate Phycomycetes", J. Cramer (1981)]は、ウルケニア属が独立した属として成立するかどうかについては疑問としており、暫定的なものとして掲げた。ただし、ポーターおよびモスの文献には前述の記載がされている。

ＳＲ２１株はアメーバ状の不定形細胞を形成するので、その形質を重視するとウルケニア属に属するとも考えられる。しかし、ラグクーマーはスラウストキトリウム属のスラウストキトリウム・ストリアタム(Thraustoc

hytrium striatum)が、栄養培地ではバクテリアを捕食するアメーバ状の不定形細胞を形成することを報告している[Raghukumar, S., Marine Biology, 113 : 165 (1992)]。さらに、ラグクーマーは、シゾキトリウム属の新種としたシゾキトリウム・マングローヴァイ(Schizochytrium mangrovei)は栄養培地ではアメーバ状不定形細胞を形成するが、海水に松花粉のみを添加した栄養の希薄な培地で培養した場合はアメーバ状不定形細胞を形成しないことを示した[Raghukumar, S., Trans. Br. Mycol. Soc., 80 : 627 (1988)]。

そこでラグクーマーは、アメーバ状の不定形細胞を形成するという形質が培地組成や培養条件によって影響を受けることから、基準となる培地を使ってこの形質を調査する必要があるとした。その基準培地としては、従来から伝統的によく用いられており、また、これまでの属や種の原記載の中で形態形質を観察する際に用いられることの多かった前述の海水／松花粉培地を挙げている。ウルケニア属に分類されている６種はすべて、この海水／松花粉培地中でアメーバ状不定形細胞を形成することが知られている。一方、スラウストキトリウム・ストリアタムとシゾキトリウム・マングローヴァイは、栄養培地では前述のようにアメーバ状不定形細胞を形成するが、海水／松花粉培地ではアメーバ状不定形細胞を形成しないことから、ウルケニア属に分類されていない。以上に基づくと、ＳＲ２１株は栄養培地ではアメーバ状不定形細胞を形成するが、海水のみの培地ではこれが観察されなかったので、ウルケニア属に分類するのは適当ではないと思われる。

一方、１個の遊走子が着生した後の栄養細胞が２分裂を繰り返し、複数個の栄養細胞塊を形成し、それぞれが遊走子嚢となる形質は、培地組成によらず安定であり、ＳＲ２１株の生活環の中で常に観察される形質である。

この形質およびその他のＳＲ２１株で観察される性質は、ゴールドシュタインら[Goldstein, S. およびBelsky, M., Am. J. Bot., 51 : 72 (1964)]およびブーツら[Booth, T. およびMiller, C. E., Can. J. Bot., 47 : 2051 (1969)]により報告されているシゾキトリウム属の記載に矛盾することがない。よって、ＳＲ２１株はシゾキトリウム属に分類するのが妥当であると判断される。

現在、シゾキトリウム属微生物としては、次の４種が文献に記載されている。

シゾキトリウム・アグレガタム(Schizochytrium aggregatum)は、その栄養細胞が、連続する分裂によって多数の細胞が互いに接着した塊を形成する。その細胞塊のうち、３～４個またはそれ以上の細胞が遊走子嚢へ分化する。また、１個の遊走子嚢は１６～６４個の遊走子を形成する。さらに、２個の細胞からは遊走子放出は見られないと記載されている[Goldstein, S. およびBelsky, M., Am. J. Bot., 51 : 72 (1964)、Booth, T. およびMiller, C. B., Can. J. Bot., 47 : 2051 (1969)]。

シゾキトリウム・ミヌータム(Schizochytrium minutum)は、シゾキトリウム・アグレガタムと同様に栄養細胞の分裂の結果、４～８個または数百の細胞塊を形成し、各遊走子嚢から２個の遊走子を放出する。遊走子は豆型であり、２本の鞭毛の長さは８．５μmと３．０μm程度である[Gaertner, A., Veroff. Inst. Meerestorsch. Bremer., 19 : 61 (1981)]。

また、シゾキトリウム・オクトスポラム(Schizochytrium octosporum)は、１個の遊走子嚢から８個の遊走子が放出される点でシゾキトリウム・ミヌータムと異なっている[Raghukumar, S., Trans. Br. Mycol. Soc., 90 : 273 (1988)]。

さらに、1987年にラグクーマーがゴア(インド)のマングローブの腐朽葉

より分離したスラウストキトリウム科の微生物は、栄養細胞が連続する分裂によって細胞塊を形成することからシゾキトリウム属に分類された。しかし、それまでに記載されていた上記３種の遊走子はいずれも遊走子嚢という袋の中で形成されるのに対して、この微生物では栄養細胞の連続的な２分裂により、４、６、８または１２個の細胞となり、それぞれの細胞が直接遊走子となる過程をとり、遊走子嚢の形態をとらなかった。ラグクーマーはこの特徴に注目し、新種シゾキトリウム・マングローヴァイ(Schizochytrium mangrovei)を設けた[Raghukumar, S., Trans. Br. Mycol. Soc., 90 : 627 (1988)]。

ラグクーマーは同じ文献において、それまで知られていたシゾキトリウム属の検索表を提案した(表１)。

表1．シゾキトリウム属の４種の検索表(ラグクーマーによる)

1．着生した遊走子は繰り返し行われる２分裂
によって細胞塊を形成し、それぞれの細胞
は遊走子嚢に分化する ・・・・・・・ 2

1．着生した遊走子は繰り返し行われる２分裂
によって細胞塊を形成し、それぞれの細胞
は遊走子に分化する ・・・・・・・ S. mangrovei

2．遊走子嚢の直径は１５～２５μmで遊走
子嚢は１６～６４個の遊走子を形成する ・・・ S. aggregatum

2．遊走子嚢の直径は１４μm以下で遊走子
嚢は２または８個の遊走子を形成する ・・・・ 3

3．遊走子嚢は８個の遊走子を形成する ・・・・ S. octosporum

3．遊走子嚢は２個の遊走子を形成する ・・・・ S. minutum

表１に示した検索表および既知の４種を記載した原報と、ＳＲ２１株の菌学的性質を比較してみる。まず、シゾキトリウム属ＳＲ２１株は、分裂した栄養細胞が遊走子嚢の形態をとらずに、ひとつひとつの遊走子になるシゾキトリウム・マングローヴァイとは異なる。また、遊走子嚢の径が１４μm以下であって、各遊走子嚢から２個の遊走子が形成される場合は、シゾキトリウム・ミヌータムに、同じく８個の遊走子が形成される場合は、シゾキトリウム・オクトスポラムにそれぞれ帰属されるが、ＳＲ２１株は８ないし１６個の遊走子へ分化することからこれらのどちらとも異なる。

さらに、遊走子嚢の径が１５～２５μmであって遊走子嚢から１６ないし６４個の遊走子(ただし、記載のある原報には多くのという表現のみ)が形成される場合は、シゾキトリウム・アグレガタムとされるが、この種においてはアメーバ状の不定形細胞は観察されていないため、ＳＲ２１株はこれとも異なる。さらにＳＲ２１株では、２分裂をしない栄養細胞または不定形細胞を経ないで遊走子へ分化する細胞も見られる。以上のことから、ＳＲ２１株はシゾキトリウム属の既存の４種には該当せず、シゾキトリウム属の新種であると認められた。

尚、このシゾキトリウム属ＳＲ２１株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に「海生菌ＳＲ２１菌株」の名称で平成７年３月６日付けで寄託され、受託番号ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４を取得している。さらに、財団法人発酵研究所に平成７年３月１７日付けで寄託され、受入番号ＩＦＯ ３２６９３を取得している。

本発明のＤＨＡおよびＤＰＡ含有油脂の製造方法に用いる微生物は、前記ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４またはＩＦＯ ３２６９３に限らず、上述したシゾキトリウム属ＳＲ２１株の菌学的性質に照らして該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有すると認められる菌株であればいずれの菌株も使用することができる。

また、ここで用いられる微生物には、野性株、変異株あるいは組換え型の微生物が含まれる。本発明の特徴の一つは、微生物の特殊な脂質特性を有する油脂産生能力の認識と、それに伴うこのような高機能および高付加価値を有する油脂の安定かつ信頼できる経済的な供給源の維持の問題の解決である。従って、(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸を高水準で産生する野性株、ならびに、これら高度不飽和脂肪酸を高水準で産生するように設計された変異株および組換え微生物はす

べて本発明の範囲内にある。このような変異株または組換え微生物には、同じ基質を用いて培養したときに、元の野性株が産生する量と比べて、油脂中の(n-3)系ドコサヘキサエン酸および／または(n-6)系ドコサペンタエン酸の量が多くなるように、または総油脂量が多くなるように、あるいはその両方を意図して設計されたものが含まれる。

さらに、費用効果の優れた基質を効率よく用いて、匹敵する野性型と同量の(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸を含有する油脂を産生するように設計された微生物も含まれる。

本発明の(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸を含有する油脂を生産することができる微生物は、例えば、次のようなスクリーニング法に従って選択することができる。即ち、採取した海水を0.4μmの滅菌フィルターを用いて濾過および集菌し、このフィルターを90%天然海水、グルコース、酵母エキス、ペプトンよりなる寒天培地上に張り付け、20～30℃で培養する。この寒天平板培地のフィルター上に形成したコロニーを、上記と同じ組成の寒天培地上で培養し、得られた菌体をスパーテルで採取し、常法に従って菌体から脂肪酸を直接メチルエステル化し、その組成をガスクロマトグラフィーで分析し、(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸を産生している菌株を選択する。さらに、菌体内に油脂を乾燥菌体あたり10重量%以上、好ましくは20重量%以上の量で蓄積し、そして／または全脂肪酸中にエイコサペンタエン酸が1重量%未満、好ましくは0.5重量%未満である菌株を選択することができる。

本発明のシゾキトリウム属SR21株は、乾燥菌体あたり油脂を20重量%以上蓄積することができる。また、油脂中の総脂肪酸あたり(n-3)系ドコサヘキサエン酸を25～45重量%、および(n-6)系ドコサペン

タエン酸を６～１１重量％含有し、エイコサペンタエン酸の含有割合は１重量％未満である。また、本発明の油脂は、(n-3)系脂肪酸中に(n-3)系ドコサヘキサエン酸を９８重量％以上含有している。

従って、本発明の範囲内にあるシゾキトリウム属ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する菌株は、乾燥菌体あたり油脂を１０重量％以上蓄積するのが好ましく、さらに好ましくは２０重量％以上、最も好ましくは３０重量％以上蓄積する。また、油脂中の全脂肪酸あたり、(n-3)系ドコサヘキサエン酸は、１５重量％以上であるのが好ましく、さらに好ましくは２０重量％以上、最も好ましくは３５重量％以上である。また、油脂中の全脂肪酸あたり、(n-6)系ドコサペンタエン酸は、４重量％以上であるのが好ましく、さらに好ましくは５重量％以上、最も好ましくは６～１１重量％である。さらに、油脂中のエイコサペンタエン酸の含有割合は、２重量％未満であるのが好ましく、さらに好ましくは１重量％未満、最も好ましくは０.５重量％未満である。さらに、本発明の油脂は、(n-3)系脂肪酸中に(n-3)系ドコサヘキサエン酸を９０重量％以上、好ましくは９５重量％以上含有しており、また、(n-3)系ドコサヘキサエン酸と(n-6)系ドコサペンタエン酸を、(n-6)系ドコサペンタエン酸１重量部に対して(n-3)系ドコサヘキサエン酸が３～６重量部の比率で含有している。

本発明の油脂は、前述の微生物を、天然海水または人工海水を用いて調製した適当な培地に接種し、常法に従って培養を行うことにより得ることができる。

培地に添加する炭素源としては、グルコース、フルクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプンなどの炭水化物の他、オレイン酸、大豆油などの油脂類や、糖密、グリセロール、マンニトール、

酢酸ナトリウムなどが例示できるが、これらに限られるものではない。これらの炭素源を、例えば、培地１リットル当たり２０～１２０gの濃度で使用することができる。

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、コーンスチープリカーなどの天然窒素源の他に、グルタミン酸ナトリウム、尿素などの有機窒素源、または酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの無機窒素源などが例示できるが、これらに限られるものではない。

この他、必要に応じてリン酸カリウム、リン酸二水素カリウムなどのリン酸塩、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅、塩化マグネシウム、塩化カルシウムなどの無機塩およびビタミン類も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の成育を害しない濃度であれば特に制限はない。

培地を調製した後、適当な酸または塩基を用いてpHを４．０～６．５の範囲に調整し、オートクレーブにより殺菌する。菌の培養は、１０～３５℃、好ましくは１７～３０℃にて通常３～７日間、通気撹拌培養、振盪培養あるいは静置培養などによって行う。

また、(n-3)系ドコサヘキサエン酸および／または(n-6)系ドコサペンタエン酸の産生を促進するため、(n-3)系ドコサヘキサエン酸および／または(n-6)系ドコサペンタエン酸の前駆体を培地に添加することができる。前駆体としては、テトラデカン、ヘキサデカン、オクタデカンなどの炭化水素、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸、オレイン酸などの脂肪酸、またはその塩(例えば、ナトリウム塩またはカリウム塩)、脂肪酸エステル、または脂肪酸を構成成分として含む油脂(例えば、オリーブ油、大豆油、綿実油、ヤシ油)などを挙げることができるが、こ

れらに限られるものではない。

本発明の油脂を商品化が可能な収率で産生するための条件として、次のような条件が挙げられる。シゾキトリウム属ＳＲ２１株の培養条件の検討により、該ＳＲ２１株およびこれと同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する菌株は、天然海水もしくは人工海水または２分の１濃度の天然海水もしくは人工海水を含む培地において、ｐＨ３．５～６．０、望ましくはｐＨ４．０～４．５で良好に生育することがわかった。

培地に添加する炭素源および窒素源は、上記のような通常用いられるものであってよい。窒素源は有機窒素または無機窒素のいずれであってもよく、窒素濃度として一定になるようにすれば、菌体の生育量、脂質含量、ＤＨＡ、ＤＰＡの蓄積量に影響を与えずに有機窒素と無機窒素の比率を変えることができる。これらを通常の微生物培養に用いる濃度で添加して良好な生育が得られる。リン酸塩を、通常の微生物培養に用いられる濃度で用いて良好な生育を達成することができる。

培地中の炭素源濃度とともに窒素源濃度も同じ割合で増加させることで、高濃度培養が可能である。炭素源、窒素源の増加割合に応じて乾燥菌体量、脂質量も増加し、ＤＨＡ、ＤＰＡの生産量も増加する。

高濃度培養の際には、培養開始時に、炭素源、例えばグルコースの濃度のみを増加させておき、窒素源、例えばコーンスチープリカー／硫酸アンモニウムについては通常の量を添加し、グルコース消費量に応じて後から不足する量を添加する方法を用いることもできる。また、高濃度培養の際には、培養開始時に、炭素源、窒素源を低い濃度にしておき、グルコースの消費に応じて、後から、炭素源、窒素源を増加することもできる。

上記条件での培養は通常の撹拌式発酵槽を用いて実施できる。また、気泡塔型培養装置も用いることもできる。通気撹拌培養の条件としては通常

の微生物の培養条件を用いることができる。通気撹拌培養においては、回転数を上昇させ、溶存酸素量を増加させるとフラスコ培養に比べて、顕著な生育速度および菌体収量の増加が観察される。

培養初期においては、特に溶存酸素量を高く維持することが生育速度の増加に重要である。

このようにして、培養物中に(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸含有油脂を蓄積した菌体を、培地１Ｌあたり１０g以上、好ましくは２０g以上、更に好ましくは４０g以上の高い濃度で生産させることができる。また、この油脂は、培養中期以降、良好に菌体内に蓄積され、乾燥菌体あたり３０重量%以上、好ましくは５０重量%以上、より好ましくは６０重量%以上とすることができる。

培養物から菌体を集める方法は、従来から用いられている遠心分離法や濾過などの方法が使用できる。

集められた菌体は、例えば、ダイノミルや超音波などにより破砕した後、クロロホルム、ヘキサン、メタノール、エタノールなどによる溶媒抽出を行うことにより、(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸含有油脂を得ることができる。乾燥菌体1gあたり(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸含有油脂は約０.３g以上が好ましく、０.６g以上が更に好ましい。

本発明は、このようにしてシゾキトリウム属ＳＲ２１菌株またはこれと同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する菌株から得られる油脂に関するものであり、該油脂の脂質特性は、通常は次の通りである。中性脂質の割合が極めて高く、全脂質中の９０重量%以上を占める。中性脂質中の脂肪酸組成は、パルミチン酸４５～５５重量%、(n-3)系ドコサヘキサエン酸３０～４０重量%、(n-6)系ドコサペンタエン酸

５～１０重量%、(n-3)系エイコサペンタエン酸０～１重量%、アラキドン酸０～０．６重量%、その他の脂肪酸１０～２０重量%程度である。なおこの時、ＤＰＡとＤＨＡの比率はＤＰＡ１重量部に対し、ＤＨＡが３～６重量部である。

また得られる中性脂質は、約８５重量%以上、好ましくは９０重量%以上がトリグリセリドであり、ジグリセリド、モノグリセリドはほとんど含まれていない。また、遊離ステロール、ステロールエステルが２～３%含まれている。また、上記脂肪酸組成を有する油脂中のトリグリセリドの分子種は、主に１４:０－１６:０－１６:０、１６:０－１６:０－１６:０、１４:０－１６:０－２２:６、１６:０－１６:０－２２:５、１６:０－１６:０－２２:６、１６:０－２２:５－２２:６、１６:０－２２:６－２２:６である(脂肪酸残基の結合位置は限定されない)。上記の「１４:０」なる記載は、１４が脂肪酸の炭素数を、０が脂肪酸の持つ二重結合の数を表すものであり、例えば、「１６:０」は炭素数１６で二重結合を持たない脂肪酸を表す。

また、該トリグリセリドには、(n-3)系ＤＨＡがグリセリンの２位のみに結合しているもの、または、(n-3)系ＤＨＡがグリセリンの１および２位、または１および３位に結合しているものが含まれている。

極性脂質としては、フォスファチジルコリンが大部分を占め、他にフォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルイノシトールなどを含む。

(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸含有油脂から(n-3)系ドコサヘキサエン酸または(n-6)系ドコサペンタエン酸を分離するには、混合脂肪酸あるいは脂肪酸エステルの状態で、常法により、例えば、尿素付加法、冷却分離法、カラムクロマトグラフィー法な

どにより濃縮採取することにより行う。また、培養菌体などから採取した油脂からの(n-3)系ドコサヘキサエン酸および／または(n-6)系ドコサペンタエン酸含有トリグリセリドの分離は、常法により、例えば冷却分離法、カラムクロマトグラフィー法などにより行う。本発明のシゾキトリウム属ＳＲ２１株を用いた場合、不飽和脂肪酸としてアラキドン酸、ＥＰＡがほとんど含まれていないため、(n-3)系ドコサヘキサエン酸と(n-6)系ドコサペンタエン酸の濃縮採取が容易に行え、高濃度生産には好都合である。

本発明の油脂は、種々の飼料または食品などの製品に(n-3)系ＤＨＡおよび／または(n-6)系ＤＰＡの供給源として利用することができる。本発明の油脂を製品に利用するにあたっては、培養菌体から採取した油脂またはそれを精製して得られる(n-3)系ＤＨＡおよび／または(n-6)系ＤＰＡを使用することもできるが、例えば、該油脂を菌体培養によって製造する途中の培養液もしくはその殺菌した培養液、または培養終了時の培養液もしくはその殺菌した培養液、またはそれぞれから集菌した培養菌体もしくはその乾燥物、または培養液もしくは菌体から該油脂を採取した後の残渣も使用することができる。

さらに本発明は、本発明の油脂を配合した動物用飼料に関する。本発明の動物用飼料としては、ドッグフードやキャットフードなどのペットフード、鶏などの家禽のための飼料、豚や牛などの家畜のための飼料、養魚用飼料などが挙げられる。(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡを含有する油脂を産生、蓄積した本発明の微生物の菌体または培養細胞は、油脂が菌体内に保護されていることによって酸化が防止され、また加熱殺菌にも安定であるため好ましい。また、微生物の培養菌体から(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡを含有する油脂を抽出した後の抽出残渣も本発明

の動物飼料に使用できる。この抽出残渣は、(n-3)系ＤＨＡや(n-6)系ＤＰＡの他に、蛋白質や灰分、炭水化物を含んでいるため好ましい。

さらに本発明は、本発明の油脂を産生、蓄積した培養菌体または培養液を含んでなる微小餌料生物用餌料に関する。従来、魚貝類や甲殻類の養殖において、種苗(稚仔魚)生産には、微小餌料生物(シオミズツボワムシ、ブラインシュリンプなどの動物プランクトン)が用いられており、稚仔魚の養殖には先ずこれらの微小生物を養殖する必要がある。これらの微小生物を培養する場合には、後にそれを餌料として摂取する稚仔魚の栄養要求性を考えて微小餌料生物に与える餌料が決められる。本発明の油脂を含有する培養菌体または培養液を微小餌料生物に与えることにより、(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡを含有し、稚仔魚の栄養要求性を満足できる微小餌料生物が得られる。

さらに本発明には、上記の微小餌料生物を含有する魚貝類用餌料も含まれる。

さらに本発明は、本発明の油脂を、(n-3)系ＤＨＡおよび／または(n-6)系ＤＰＡを強化した家禽卵の生産に利用すること、ならびに(n-3)系ＤＨＡおよび／または(n-6)系ＤＰＡを強化した卵黄油の製造に利用することに関する。本発明の(n-3)系ＤＨＡおよび／または(n-6)系ＤＰＡを強化した家禽卵は、上述の動物用飼料を採卵用家禽、特に鶏に与えて飼育することによって産生される。また、このような家禽卵、特に卵黄から常法に従って油脂を抽出することによって、本発明の(n-3)系ＤＨＡおよび／または(n-6)系ＤＰＡを強化した卵黄油が得られる。また、この卵黄油を乳児用調製乳、未熟児用調製乳、幼児用食品、妊産婦用食品に添加することも本発明に含まれる。

さらに本発明は、本発明の油脂を含有する乳児用調製乳、未熟児用調製

乳、幼児用食品、妊産婦用食品に関する。特に育児用粉乳に関しては、その成分をできるだけ人乳に近似させようとする試みが古くから行われており、人乳中の主要成分である蛋白質、脂肪、糖質などのそれぞれに関して人乳に類似化することが重要課題となっている。特に脂肪に関しては本来母乳に含まれている高度不飽和脂肪酸が、従来の育児用粉乳に欠乏していることが問題となっている。なお、母乳中の不飽和脂肪酸の組成については、種々の報告があり、例えば、「INFORM」[Vol.6, No.8, pp.940-946 (1995年8月)]にはアメリカ人、ヨーロッパ人およびアフリカ人の母乳中の高度不飽和脂肪酸組成が、「JJPEN」[Vol.13, No.9, pp.765-772 (1991)]には日本人の母乳の高度不飽和脂肪酸組成が記載されている。

最近ではアラキドン酸およびＤＨＡは同じく人乳中に含まれており、乳児の発育に役立つとの報告がある[「Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research」, Elsevier Science Publishers, pp.261-264.(1993)]。さらに、胎児の身長や脳の発育における重要性が報告されている[Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90, 1073-1077 (1993)、 Lancet, 344, 1319-1322 (1994)]。

そこで、人乳と調製粉乳の脂肪酸組成の大きな違いであるアラキドン酸およびＤＨＡを調製粉乳に添加しようとする動きがある。このようにＤＨＡを添加する目的で、魚油添加の調製粉乳が上市されてきているが、本来、母乳中には魚油に含まれるＥＰＡはほとんど含まれていない。最近の研究によりＥＰＡは未熟児の成育には不都合であることが明らかとなり[「Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research」, Elsevier Science Publishers, pp.261-264.(1993)]、米国特許第５３７４６５７号には、ＥＰＡが少ないＤＨＡ含有細胞食用油とアラキドン酸含有細胞食用油を組み合わせた幼児用調製乳添加用の油脂が開示されている。しかし、従来知ら

れている調製乳や調製乳添加用油脂において、本来母乳に含まれている(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡを含有する油脂を使用することは全く知られていなかった。

本発明のシゾキトリウム属ＳＲ２１株またはこれと同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する菌株由来の油脂は、(n-6)系ＤＰＡ１重量部に対して(n-3)系ＤＨＡを３～６重量部含有しており、ＥＰＡをほとんど含有していないため、さらに８５%以上がトリグリセリドであるため、母乳に類似した育児用調製乳を製造するのに適している。

さらに本発明は、本発明の油脂を配合した栄養補助食品、老人用食品、健康食品などの食品に関する。本発明の食品は、(n-3)系ＤＨＡおよび/または(n-6)系ＤＰＡを補うことを目的とし、健康維持などに用いられる。その形態は、固形または液状の食品または嗜好品のいずれであってもよい。油脂を含む食品として、例えば、肉、魚、ナッツ等の天然食品、中華料理、ラーメン、スープ等の調理時に油脂を加える食品、天ぷら、フライ、油揚げ、チャーハン、ドーナッツ、かりん糖等の熱媒体として油脂を用いた食品、バター、マーガリン、マヨネーズ、ドレッシング、チョコレート、即席ラーメン、キャラメル、ビスケット、クッキー、ケーキ、アイスクリーム等の油脂食品または加工時に油脂を加えた加工食品、おかき、ハードビスケット、あんパン等の加工仕上げ時に油脂を噴霧または塗布した食品等を挙げることができる。しかし、本発明の食品は油脂を含む食品に限定されるわけではなく、例えば、パン、めん類、ごはん、菓子類(キャンデー、チューインガム、グミ、錠菓、和菓子)、豆腐およびその加工品などの農産食品、清酒、薬用酒、みりん、食酢、醤油、味噌などの発酵食品、ヨーグルト、ハム、ベーコン、ソーセージなどの畜産食品、かまぼこ、揚げ天、はんぺんなどの水産食品、果汁飲料、清涼飲料、スポーツ飲料、

アルコール飲料、茶などの飲料等も挙げることができる。

本発明の食品は、所定量の本発明の油脂を、食品原料とともに配合し、一般の製造法により加工製造することができる。その配合量は剤形、食品の形態性状により異なり、特に限定されるものではないが、一般には食品全量に対して０．００１～５０重量％が好ましい。

さらに本発明は、本発明の油脂を配合した機能性食品(特定保健用食品を含む)に関する。本発明の機能性食品は、(ｎ-３)系ＤＨＡおよび／または(ｎ-６)系ＤＰＡの有する生理活性機能を発揮することを目的とし、機能低下した状態を健康な状態に戻し、維持するための、または機能低下を予防するための食品である。形態としては医薬製剤の形態であってもよいし、また、例えば蛋白質(蛋白質源としてはアミノ酸バランスのとれた栄養価の高い乳蛋白質、大豆蛋白質、卵アルブミン等の蛋白質が最も広く使用されるが、これらの分解物、卵白のオリゴペプチド、大豆加水分解物等の他、アミノ酸単体の混合物も使用される)、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類、乳化剤、香料等に本発明の油脂が配合された自然流動食、半消化態栄養食および成分栄養食や、ドリンク剤、経腸栄養剤等の加工形態を挙げることができるが、前記の飲食品の形態であってもよい。

本発明の機能性食品、栄養補助食品は、本発明の油脂を用いて、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、トローチ、内用液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、ドリンク剤、自然流動食、半消化態栄養食、成分栄養食、経腸栄養剤等の形態を有する飲食品として製造することができる。この際、本発明の油脂とともにいずれの栄養成分あるいは機能性成分を配合してもよい。また、医師の指示に基づく栄養士の管理下に、病院給食の調理の際に任意の食品に本発明の油脂を加え、その場で調整した食事を、(ｎ-３)系ＤＨＡおよび／または(ｎ-６)系ＤＰＡが低下している患者に与えることもで

きる。

さらに本発明は、本発明の油脂を、医薬品単体の製造に利用することに関する。即ち、本発明の油脂を出発原料として、(n-3)系ＤＨＡもしくは(n-6)系ＤＰＡまたはこれらの誘導体を製造することに関する。(n-3)系ＤＨＡもしくは(n-6)系ＤＰＡまたはそれらの混合物は、遊離の形であっても、また薬剤として許容されうる塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、または他のアルカリ金属塩、亜鉛塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のような他の金属の塩の形態や、モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライド、低級アルコールのエステル、リン脂質、糖脂質、アミド等の種々の形態であってもよい。ここで低級アルコールとは炭素数６以下の一価アルコールを指し、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノールなどを例示することができる。

さらに本発明は、本発明の油脂を含有する化粧品に関する。本発明の化粧品は、常法に従い本発明の油脂を、通常の化粧料として知られる種々の形態の基剤に配合して調製することができる。化粧料の形態の例としては、特に限定されないが、例えば、乳液、クリーム、化粧水、パック、分散液、洗浄料等の化粧品とすることができる。化粧料の基剤としては、化粧料の形態に応じた基剤、例えば、精製水、低級アルコール類、多価アルコール類、油脂類、界面活性剤、各種美容成分、紫外線吸収剤、増粘剤、色素、防腐剤、香料等を用いることができる。

さらに本発明は、本発明の油脂を含有する洗浄剤に関する。本発明の洗浄剤としては、薬用、非薬用にかかわらず、身体を清浄に保つために一般に用いられる石鹸、シャンプー、フェイシアルクリーム、リンスなどの他、入浴剤なども含むものであり、また食器などの日常の家庭で用いる器具な

どの洗剤であってもよい。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例１　シゾキトリウム属ＳＲ２１株による油脂の生産(１)

フラスコに５０％濃度の人工海水(トロピックマリン)１Ｌを入れ、次いで、表２に示した量の炭素源(グルコースまたはグリセロール)および窒素源(コーンスチープリカー；以下、ＣＳＬと略記することもある)を添加して培地を調製した。これに、シゾキトリウム属ＳＲ２１株を接種して、２６℃で５日間、振盪培養を行った。

得られた培養物２mlを採取して遠心分離法で菌体を集めた。この菌体を洗浄し、オーブン中、１１０℃で５時間乾燥することにより乾燥菌体を得た。この乾燥菌体の重量を測定して、培地１Ｌ当たりの菌体量を求めた。この結果を表２に示す。

次いで、常法に従って、乾燥菌体から直接的な油脂の抽出および脂肪酸メチルエステルの調製を行った。即ち、乾燥菌体をねじ口試験管に入れ、これに１０％塩酸メタノールおよびジクロロメタンを加え、６０℃の温浴中で３時間加熱して反応させた。次いで、ヘキサンにて脂肪酸メチルエステル成分を抽出し、ガスクロマトグラフ分析により脂肪酸メチルエステル成分の脂肪酸組成を求めて、ドコサヘキサエン酸(ＤＨＡ)の含有割合を求めた。また、前記の反応の際に既知量の内部標準物質を添加することによる内部標準法にて、ガスクロマトグラフ分析により検出された脂肪酸メチルエステル量から菌体中に含まれていた全脂肪酸量を、また、ドコサヘキサエン酸メチルエステル検出量からＤＨＡ生成量を求めた。このようにし

て、培地１Ｌ当たりの全脂肪酸量、乾燥菌体当たりの脂肪酸含有割合、全脂肪酸中のＤＨＡ含有割合、および培地１Ｌ当たりのＤＨＡ量を求めた。これらの結果を表２に示す。

なお、ＤＨＡは、ガスクロマトグラフ質量分析法により標準物質との比較を行って確認した。

表２

| 実験No. | 炭素源 | 炭素源添加量 (g) | ＣＳＬ添加量 (g) | 菌体量 (g) *1) | 全脂肪酸量 (g) *1) | 脂肪酸含有割合 (重量%) *2) | ＤＨＡ含有割合 (重量%) *3) | ＤＨＡ量 (g) *1) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 101 | ｸﾞﾙｺｰｽ | 60 | 10 | 24.2 | 14.1 | 58.0 | 26.8 | 3.77 |
| 102 | ｸﾞﾙｺｰｽ | 90 | 10 | 28.0 | 13.2 | 47.0 | 25.7 | 3.38 |
| 103 | ｸﾞﾙｺｰｽ | 120 | 10 | 27.7 | 10.5 | 37.7 | 29.0 | 3.03 |
| 104 | ｸﾞﾙｺｰｽ | 60 | 20 | 26.9 | 8.2 | 30.3 | 29.7 | 2.43 |
| 105 | ｸﾞﾙｺｰｽ | 90 | 20 | 35.9 | 14.1 | 39.3 | 29.7 | 4.20 |
| 106 | ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ | 60 | 10 | 24.2 | 12.9 | 53.2 | 26.8 | 3.45 |
| 107 | ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ | 90 | 10 | 21.9 | 11.9 | 54.3 | 25.5 | 3.04 |
| 108 | ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ | 60 | 20 | 28.3 | 11.3 | 39.9 | 28.0 | 3.16 |
| 109 | ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ | 90 | 20 | 35.4 | 13.9 | 39.3 | 26.5 | 3.68 |
| 110 | ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ | 120 | 20 | 35.6 | 14.6 | 41.0 | 28.4 | 4.15 |

*1) 培地１Ｌ当たりの量

*2) 乾燥菌体当たりの含有割合

*3) 全脂肪酸中の含有割合

培地１Ｌ当たりの炭素源量が６０～１２０gと高い場合であっても、良好な菌体増殖が行われ、２１．９～３５．９g／Ｌの菌体が得られた。また、培地１Ｌ当たりの脂肪酸量は８．２～１４．６gであり、乾燥菌体当たり３０．３～５８．０重量%の高い含量でＤＨＡ含有脂肪酸が蓄積されていることが示された。さらに、全脂肪酸中のＤＨＡの含量は、２５．５～２９．７重量%と高く、培地１Ｌ当たりのＤＨＡの生産量が２．４３～４．２０gと高いことが示された。

実施例２　シゾキトリウム属ＳＲ２１株による油脂の生産（２）

フラスコに、５０%濃度の人工海水１Ｌ、炭素源としてグルコース６０g、リン酸一カリウム４．０g、酵母エキス１．０g、有機窒素源としてコーンスチープリカー１．０gを入れ、さらに無機窒素源として硝酸アンモニウムを表３に示した量で添加することにより培地を調製した。これにシゾキトリウム属ＳＲ２１株を接種し、２５℃で４日間、振盪培養を行った。

実施例１と同様の方法で培養後の培地１Ｌ当たりの菌体量、培地１Ｌ当たりの全脂肪酸量、乾燥菌体当たりの脂肪酸含有割合、全脂肪酸中のＤＨＡ含有割合、および培地１Ｌ当たりのＤＨＡ量を求めた。これらの結果を表３に示す。

表３

| 実験 No. | 窒素源 | 窒素源添加量 (g) | 菌体量 (g) *1) | 全脂肪酸量 (g) *1) | 脂肪酸含有割合 (重量%) *2) | ＤＨＡ含有割合 (重量%) *3) | ＤＨＡ量 (g) *1) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 201 | 硝酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ | 0.6 | 14.6 | 7.6 | 51.8 | 30.7 | 2.32 |
| 202 | 硝酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ | 1.0 | 19.2 | 7.4 | 38.8 | 30.0 | 2.24 |
| 203 | 酢酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ | 0.7 | 17.8 | 8.1 | 45.3 | 29.1 | 2.35 |
| 204 | 酢酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ | 1.2 | 23.0 | 9.2 | 40.1 | 32.9 | 3.03 |

*1) 培地１Ｌ当たりの量

*2) 乾燥菌体当たりの含有割合

*3) 全脂肪酸中の含有割合

これらの結果から、ＳＲ２１株は窒素源として無機窒素を使用しても良好に増殖できること、およびＳＲ２１株は高いＤＨＡ生産性を有することが示された。

実施例３　シゾキトリウム属ＳＲ２１株による油脂の生産(３)

グルコース６０g、ポリペプトン２０g、酵母エキス１０gおよび５０％濃度の人工海水１Ｌからなる培地(Ａ)、またはグルコース９０g、ポリペプトン１０g、コーンスチープリカー１０gおよび５０％濃度の人工海水１Ｌからなる培地(Ｂ)を用いて、ジャーファーメンター(培養槽容量５Ｌ、培地量３Ｌ)での培養を行った。培養は、培養温度２５℃、通気量０.５vv

m、撹拌速度２００rpmとして行った。

培養後、遠心分離法により菌体を集めて凍結乾燥し、重量法により培地１Ｌ当たりの菌体量を求めた。その結果を表４に示す。

次いで、この乾燥菌体にクロロホルム／メタノール(２：１、v／v)混合液を加え、ガラスビーズの存在下でホモジナイズすることにより、菌体の破砕と油脂の抽出を行った。抽出液をＦolch法により洗浄した後、溶媒を留去して精製油脂を得、その重量を求めた。得られた油脂の一部について常法により脂肪酸メチルエステルを調製し、ガスクロマトグラフ法により油脂量および全油脂中のＤＨＡ含有割合を求めた。ＤＨＡ生成量は、油脂生成量にＤＨＡ含有割合を乗じた値として求めた。これらの結果を表４に示す。

表４

| 実験 No. | 培地 | 培養日数 (日) | 菌体量 (g) *1) | 全油脂量 (g) *1) | 油脂含有割合 (重量%) *2) | DHA含有割合 (重量%) *3) | DHA量 (g) *1) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 301 | (A) | 7 | 35.0 | 8.7 | 24.8 | 43.7 | 3.8 |
| 302 | (B) | 14 | 39.6 | 21.2 | 53.5 | 34.0 | 7.2 |

*1) 培地１Ｌ当たりの量

*2) 乾燥菌体当たりの含有割合

*3) 全脂肪酸中の含有割合

また、このＤＨＡ含有油脂の脂肪酸組成をガスクロマトグラフ法により分析した結果を以下の表５に示す。

表５．脂肪酸組成(重量%)

| 実験 No. | 14:0 | 15:0 | 16:0 | 17:0 | 18:0 | 20:4 (AA) | 20:5 (EPA) | 22:5 (DPA) | 22:6 (DHA) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 301 | 1.6 | 10.1 | 25.0 | 1.8 | 1.0 | − | 0.4 | 11.1 | 43.7 |
| 302 | 2.8 | 6.7 | 44.6 | 1.6 | 1.3 | − | 0.4 | 8.5 | 34.0 |

以上の結果から、シゾキトリウム属ＳＲ２１株は、実用的な培養法である通気撹拌培養でも良好な増殖を示すとともに、ＤＨＡ含量の高い油脂を効率よく蓄積することが示された。ＤＨＡの生産量は、最大で培地１Ｌ当たり７．２gに達し、その生産性はきわめて優れている。

また、表５から、高度不飽和脂肪酸としては、ドコサヘキサエン酸(ＤＨＡ)が極めて高い濃度で含有され、さらにドコサペンタエン酸(ＤＰＡ)も含有されているが、アラキドン酸(ＡＡ)およびエイコサペンタエン酸(ＥＰＡ)をほとんど含まないことが示された。従って、それらの脂肪酸を１０重量%前後含んでいる魚油と比べて、ＤＨＡの濃縮分離操作が容易であるということが示された。

実施例４

実施例１～３により得られた油脂に含まれるドコサヘキサエン酸(ＤＨＡ)、エイコサペンタエン酸(ＥＰＡ)などの(n-３)系脂肪酸それぞれの含有割合と、全(n-３)系脂肪酸に対するＤＨＡの割合を表６に示す。

シゾキトリウム属ＳＲ２１株より得られるＤＨＡ含有油脂は魚油に多く含まれるＥＰＡの含有割合が１．０重量%以下であり、また、全(n-3)系脂肪酸に対するＤＨＡ含有割合が９８重量%以上である。これらのことは、魚油がＥＰＡを１０重量%前後含んでいることに比べると、該菌株がＤＨＡの濃縮、分離および精製の操作を容易にする利点を持っていることを示すものである。

表6．（n-3）系脂肪酸組成（重量%）

| 実験 No. | EPA | DPA | DHA | 全(n-3)系脂肪酸に対するDHAの割合 |
|---|---|---|---|---|
| 101 | 0.3 | 0.1 | 26.8 | 98.5 |
| 102 | 0.2 | Tr | 25.7 | 99.2 |
| 103 | 0.2 | 0.1 | 29.0 | 98.9 |
| 104 | 0.1 | 0.1 | 29.7 | 99.5 |
| 105 | 0.3 | Tr | 29.7 | 98.9 |
| 106 | 0.3 | 0.1 | 26.8 | 98.7 |
| 107 | 0.1 | 0.1 | 25.5 | 99.2 |
| 108 | 0.3 | 0.1 | 28.0 | 98.5 |
| 109 | 0.1 | 0.1 | 26.5 | 99.4 |
| 110 | 0.3 | 0.1 | 28.4 | 98.8 |
| 201 | 0.3 | 0.1 | 30.7 | 98.7 |
| 202 | 0.5 | 0.1 | 30.0 | 98.0 |
| 203 | 0.2 | 0.1 | 29.1 | 99.0 |
| 204 | 0.2 | 0.2 | 32.9 | 98.8 |
| 301 | 0.4 | 0.2 | 43.7 | 98.6 |
| 302 | 0.4 | 0.1 | 34.0 | 98.6 |

Tr：0.05重量%未満

参考例　既知微生物との比較

既知の微生物と、本発明のシゾキトリウム属SR21株とのDHA生産能の比較を行った。

表７に、微生物としてスラウストキトリウム・アウレウム(ＡＴＣＣ３４３０４)を用いて培養を行ってＤＨＡの生産を行った場合[P. Bajapai, P. K. BajapaiおよびO. P. Ward, Appl. Microbiol. Biotechnol. 35：706 (1991)、A. KendricおよびC. Ratledge, Lipids 27：15 (1992)、およびP. K. Bajapai, P. BajapaiおよびO. P. Ward, J. Am. Oil Chem. Soc., 68：509 (1991)を引用]、微生物としてジャポノキトリウム sp.(ＡＴＣＣ２８２０７)を用いて培養を行ってＤＨＡの生産を行った場合(特開平１－１９９５８８号公報を引用)、および微生物としてシゾキトリウム・アグレガタム(ＡＴＣＣ２８２０９)を用いて培養を行ってＤＨＡの生産を行った場合[A. KendricおよびC. Ratledge, Lipids 27：15 (1992)を引用]、ならびに、本発明のシゾキトリウム属ＳＲ２１株を用いて培養を行ってＤＨＡの生産を行った上記の実験No.１０５、２０４および３０２の、培地１Ｌ当たりの菌体量、乾燥菌体当たりの油脂または脂肪酸含有割合、全脂肪酸中のＤＨＡ含有割合および培地１Ｌ当たりのＤＨＡ量を示す。

表７．既知微生物とのＤＨＡ生産能の比較

| 微生物 | 引用文献または実験No. | 菌体量 (g) *1) | 油脂または脂肪酸含有割合 (重量%) *2) | ＤＨＡ含有割合 (重量%) *3) | ＥＰＡ含有割合 (重量%) *3) | ＤＨＡ量 (mg) *1) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ｼﾞｬﾎﾟﾉｷﾄﾘｳﾑ sp. (ATCC28207) | (a) | 1.7 | 8.2 | 30.0 | 6.4 | 42 |
| ｽﾗｳｽﾄｷﾄﾘｳﾑ・ｱｳﾚｳﾑ (ATCC34304) | (b) | 5.0 | 20.2 | 51.0 | 記載なし | 511 |
| ｽﾗｳｽﾄｷﾄﾘｳﾑ・ｱｳﾚｳﾑ (ATCC34304) | (c) | 3.8 | 16.5 | 48.5 | 3.6 | 270 |
| ｽﾗｳｽﾄｷﾄﾘｳﾑ・ｱｳﾚｳﾑ (ATCC34304) | (d) | 4.0 | 10.0 | 24.1 | 9.3 | 96 |
| ｼｿﾞｷﾄﾘｳﾑ・ｱｸﾞﾚｶﾞﾀﾑ (ATCC28209) | (d) | 1.4 | 1.7 | 6.0 | 6.1 | 1 |
| ｼｿﾞｷﾄﾘｳﾑ属SR21株 | No.105 | 35.9 | 39.3 | 29.7 | 0.3 | 4200 |
| ｼｿﾞｷﾄﾘｳﾑ属SR21株 | No.204 | 23.0 | 40.1 | 32.9 | 0.2 | 3030 |
| ｼｿﾞｷﾄﾘｳﾑ属SR21株 | No.302 | 39.6 | 53.5 | 34.0 | 0.4 | 7200 |

*1) 培地１Ｌ当たりの量

*2) 乾燥菌体当たりの含有割合

（ＳＲ２１株：脂肪酸含有割合；他の菌株：油脂含有割合）

*3) 全脂肪酸中の含有割合

(a) 特開平1-199588号公報

(b) P.K.Bajapai, P.BajapaiおよびO.P.Ward, J.Am.Oil Chem.Soc., 68：509 (1991)

(c) P.Bajapai, P.K.BajapaiおよびO.P.Ward, Appl.Microbiol. Biotechnol. 35：706 (1991)

(d) A.KendricおよびC.Ratledge, Lipids 27：15 (1992)

表７に示したように、本発明のシゾキトリウムＳＲ２１株を用いて培養を行うと既知の微生物と比較して培地当たりの菌体量が非常に多く、ＳＲ２１株は増殖性が優れるということがわかる。また、本発明のシゾキトリウムＳＲ２１株は既知の微生物と比較して油脂の含有割合も非常に高い。また、本発明によれば、全脂肪酸中のＤＨＡ含有割合も３０重量％と高いことから、培地１Ｌ当たりのＤＨＡ量は、従来公知の微生物を用いた場合と比較して１０～１００倍程度と高い値となり、ＳＲ２１株はきわめて高いＤＨＡ生産能を有することが明らかである。さらに、既知の微生物によれば、ＥＰＡ含有割合が数重量％の油脂が得られるのに対し、シゾキトリウム属ＳＲ２１株によれば、ＥＰＡ含有割合が０．５重量％以下と極めて低い油脂が得られることがわかる。

実施例５　シゾキトリウム属ＳＲ２１株による油脂の生産(４)

グルコース６０g／Ｌ、コーンスチープリカー０．５g／Ｌ、リン酸カリウム３g／Ｌ、硫酸アンモニウム２g／Ｌおよび５０％人工海水からなる培地を用いて、ジャーファーメンター(５Ｌ容量、培地量３Ｌ)により約６０時間培養を行った。培養条件は、培養温度２８℃、通気量１．０v.v.m.、撹拌速度３００rpm、１０％水酸化ナトリウムによりpH４にコントロールして行った。

培養終了後、遠心分離により集菌し、凍結乾燥後に秤量することにより、培地１Ｌあたり約２０gの乾燥菌体を得た。

油脂の抽出は、常法に従い、乾燥菌体にクロロホルム／メタノール(2：1、v／v)を混合し、ガラスビーズの存在下でホモジナイズすることにより行った。６０gの乾燥菌体より得られた粗抽出油脂は３６gであった。この粗抽出油脂を、常法に従い、メチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を調べたところ表８に示す組成であった。

表８．粗抽出油脂中の脂肪酸組成

| 脂肪酸 | 14:0 | 15:0 | 16:0 | 17:0 | 18:0 | 20:4 AA | 20:5 EPA | 22:5 n-6 DPA | 22:6 n-3 DHA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 含有割合(%) | 2.3 | 5.8 | 44.6 | 2.0 | 1.4 | 0.6 | 0.8 | 8.4 | 34.0 |

実施例６　ドコサペンタエン酸の単離および同定

粗抽出脂肪酸の高度不飽和脂肪酸の濃度を上昇させるため、常法に従い、尿素付加を行って飽和脂肪酸を除去した。即ち、実施例５に示した方法で調製した粗抽出脂肪酸約９gに尿素２０g、メタノール２００mlを加え、６０℃で３時間加熱した後、１０℃まで徐冷した。析出した尿素結晶を濾過後、非結晶溶液分を濃縮し、尿素非付加物約４gを得た。この尿素非付加物の脂肪酸組成は、ドコサペンタエン酸１７．７%、ドコサヘキサエン酸７７．９%であり、その他の脂肪酸の混入率は５%以下であった。

上記処理によって得た尿素非付加物につき、液体クロマトグラフィー(ＯＤＳカラム、移動相 アセトニトリル：水＝９７．５：２．５、検出 ＵＶ)

を行ってドコサペンタエン酸を分取した。これにより、純度９９％以上のドコサペンタエン酸を約３．２g得た。

また、ドコサペンタエン酸の二重結合位置を決定するため、常法に従い、脂肪酸をピコニルエステル誘導体にした後、ＧＣ／ＭＳで解析した。即ち、上記で得られた尿素非付加脂肪酸２０μgにチオニルクロライド１００μlを加え、１分間室温に放置した後、窒素気流下で乾燥させた。これに１０％3-ピリジルカルボニル１０μlを加え、１分間室温に放置した後、ＧＣ／ＭＳで分析を行った。この結果、図４に示したように、ＳＲ２１株が生産するドコサペンタエン酸(２２：５)は、不飽和結合を△４，７，１０，１３，１６の位置に持つ(ｎ-６)系不飽和脂肪酸であると同定された。

実施例７　シゾキトリウム属ＳＲ２１株の脂肪酸分析

粗抽出油脂は、実施例５により得られたものを用いた。この粗抽出油脂を、常法に従い、ヘキサンと９０％メタノールによる液／液分配により、中性脂質と極性脂質を分離した。得られた脂質量はそれぞれ極性脂質１．８g、中性脂質３２．９gであった。この脂質を加水分解後、メチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を分析した。

分析結果は下記の通りである。

表９．粗抽出油脂中の極性／中性脂質組成

| | 極性脂質(%) | 中性脂質(%) |
|---|---|---|
| 14:0 | 1.3 | 3.2 |
| 15:0 | 0.6 | 1.0 |
| 16:0 | 32.4 | 49.2 |
| 20:4(n-6) | 0.2 | 0.6 |
| 20:5(n-3) | 0.6 | 0.8 |
| 22:5(n-6) | 10.6 | 7.9 |
| 22:6(n-3) | 52.1 | 33.7 |

実施例８　シゾキトリウム属ＳＲ２１株の脂質分析

実施例７で得られた中性脂質と極性脂質を、常法に従い、薄層クロマトグラフィーにより分析を行った。発色は硫酸を用いて行い、得られるスポットの同定は各標準脂質とのＲf値により決定した。中性脂質は９０%以上がトリグリセリドであった。また、極性脂質は、大部分がフォスファチジルコリンであり、次いでフォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルイノシトールであった。

また中性脂質中のトリグリセリドを、常法に従い、液体クロマトグラフィー(ＯＤＳカラム、移動相アセトン:アセトニトリル＝３:２、示差屈折検出計)により分子種を分離し(図５)、分取後、加水分解メチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸残基を決定した。

結果は下記の通りである。

表１０．中性脂質中のトリグリセリドの分析

| ピーク No. | 分子種 | 量比(%) |
|---|---|---|
| 1 | 14:0－16:0－16:0 | 3.4 |
| 2 | 16:0－16:0－16:0 | 8.0 |
| 3 | 14:0－16:0－22:6 | 4.0 |
| 4 | 16:0－16:0－22:5 | 7.8 |
| 5 | 16:0－16:0－22:6 | 27.4 |
| 6 | 16:0－22:5－22:6 | 8.4 |
| 7 | 16:0－22:6－22:6 | 16.9 |

この７種類のトリグリセリドが、全トリグリセリド中の７０重量%以上を占めた。このトリグリセリドの最大分子種は、１６:０－１６:０－２２:６であり、全トリグリセリドの約２７重量%を占めていた。

実施例９　トリグリセリドの脂肪酸残基結合位置決定

実施例８で分画したトリグリセリド(分子種１６:０－１６:０－２２:６)を、乾燥後、１，３位に特異的なリパーゼで処理し、得られる２－モノグリセリドをトリメチルシリル化した後にＧＣ／ＭＳにより脂肪酸残基を決定した。リパーゼ処理は、５０mM酢酸緩衝液(pH５.５)２ml、リパーゼ１０００単位、３５℃、３０分間行った。反応終了後、エーテルにより抽出し、市販のトリメチルシリル化剤を用いて、２－モノグリセリドをトリメチルシリル化した。結果は図６に示したように、２２:６が結合したモノグリセリドの分子量に相当するフラグメントピークが得られ、本トリグ

リセリドは２２:６の脂肪酸残基がグリセロール骨格の２位に結合している、１６:０－２２:６－１６:０であった。

実施例１０　窒素濃度の影響

培地１Ｌ当たり、６０gのグルコース、３gのリン酸二水素カリウム、０.５gのコーンスチープリカーを加えた２分の１濃度の人工海水培地に表１１に示す濃度で硫酸アンモニウムを添加し、この培地３Ｌを５Ｌ容積のジャーファーメンターに入れた。この培地に、実施例５と同様に調製した前培養液６０mlを添加し、培養を行った。培養は２８℃、１v.v.m.、３００rpm、pH４.０の条件で行った。

グルコースの消費後に、培養液１００mlを採取して遠心分離法で菌体を集めた。この菌体を洗浄し、凍結乾燥装置によって乾燥菌体を得た。この乾燥菌体の重量を測定して、培地１Ｌ当たりの菌体量を求めた。

次いで、実施例５と同様の方法で培地１Ｌ当たりの菌体量、培地１Ｌ当たり全脂肪酸含有割合、および培地１Ｌ当たりのＤＨＡ量、ＤＰＡ量を求めた。その結果を表１１に示す。

表１１．分析結果

| $(NH_4)_2SO_4$ | 菌体量 | 全脂肪酸量 | 脂肪酸含有割合 | DHA含有割合 | DHA量 | DPA含有割合 | DPA量 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (g) | (g) | (重量%) | (重量%) | (g) | (重量%) | (g) |
| 0.5 | 6.5 | 4.8 | 74.5 | 31.4 | 1.5 | 7.9 | 0.38 |
| 1.0 | 8.6 | 6.0 | 69.8 | 32.0 | 1.9 | 8.0 | 0.48 |
| 2.0 | 15.3 | 9.1 | 59.6 | 35.0 | 3.2 | 8.8 | 0.81 |
| 3.0 | 20.5 | 10.7 | 52.2 | 35.8 | 3.8 | 8.9 | 0.90 |

硫酸アンモニウム濃度を２．０～３．０g／Ｌとした場合に良好な生育を示した。また、硫酸アンモニウム濃度を０．５～１．０g／Ｌとすると脂肪酸含有割合が７０％以上に増加していた。

実施例１１　有機窒素源と無機窒素源の影響

培地１Ｌ当たり、６０gのグルコース、３gのリン酸二水素カリウム、０．５gのコーンスチープリカーを加えた２分の１濃度の人工海水培地に、表１２に示す濃度で窒素源の濃度を一定にして、有機窒素源としてコーンスチープリカー(ＣＳＬ)と無機窒素源として硫酸アンモニウムの２つの割合を変えて添加した。この培地３Ｌを５Ｌ容積のジャーファーメンターに入れ、実施例５と同様に調製した前培養液６０mlを添加し、実施例５と同一の条件で培養を行った。

グルコースの消費後に、培養液１００mlを採取して遠心分離法で菌体を集めた。この菌体を洗浄し、凍結乾燥装置によって乾燥菌体を得た。この乾燥菌体の重量を測定して、培地１Ｌ当たりの菌体量を求めた結果を表１

２に示す。

次いで、実施例５と同様の方法で培地１Ｌ当たりの菌体量、培地１Ｌ当たりの全脂肪酸含有割合、および培地１Ｌ当たりのＤＨＡ量、ＤＰＡ量を求めた。その結果を表１２に示す。

表１２．分析結果

| 実験 No. | CSL (g) | 硫酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ(g) | 菌体量 (g) | 全脂肪酸量 (g) | 脂肪酸含有割合(%) | DHA含有割合 (重量%) | DHA量 (g) | DPA含有割合 (重量%) | DPA量 (g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 501 | 0.7 | 2.0 | 21.0 | 14.8 | 70.5 | 31.8 | 4.7 | 8.1 | 1.2 |
| 502 | 2.0 | 1.7 | 20.0 | 13.7 | 68.5 | 31.7 | 4.3 | 7.3 | 1.0 |
| 503 | 3.3 | 1.3 | 23.2 | 14.5 | 62.4 | 30.7 | 4.5 | 6.9 | 1.0 |
| 504 | 5.3 | 0.7 | 21.0 | 13.7 | 68.5 | 29.9 | 4.3 | 8.0 | 1.1 |
| 505 | 8.0 | 0 | 20.6 | 13.4 | 65.2 | 27.9 | 3.8 | 6.7 | 0.9 |

いずれの組成比においても良好な生育を示し、本菌は有機窒素、無機窒素の区別なく消費して生育する。また、ＤＨＡ、ＤＰＡの生産性にもあまり変化は見られない。

実施例１２　高濃度培養

培地１Ｌ当たり、３gのリン酸二水素カリウムを加えた２分の１濃度の人工海水培地に、表１３に示す濃度でグルコース、コーンスチープリカー、硫酸アンモニウムを添加した。この培地３Ｌを５Ｌ容ジャーファーメンターに入れ、実施例５に示す培養条件で培養を行った。

グルコースの消費後に、培養液１００mlを採取して遠心分離法で菌体を集めた。この菌体を洗浄し、凍結乾燥装置によって乾燥菌体を得た。この乾燥菌体の重量を測定して、培地１Ｌ当たりの菌体量を求め、次いで、実施例５と同様の方法で培地１Ｌ当たりの菌体量、培地１Ｌ当たりの全脂肪酸量、乾燥菌体当たりの脂肪酸含有割合、全脂肪酸中のＤＨＡ、ＤＰＡ含有割合、および培地１Ｌ当たりのＤＨＡ、ＤＰＡ量を求めた。その結果を表１３に示す。

表１３．分析結果

| 実験 No. | ｸﾞﾙｺｰｽ量 (g) | CSL量 | 硫酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ量 (g) | 培養時間 (時間) | 乾燥菌体量 (g) | 全脂肪酸量 (g) | 脂肪酸含有割合 (重量%) | DHA含有割合 (重量%) | DHA量 (g) | DPA含有割合 (重量%) | DPA量 (g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 601 | 60 | 0.7 | 2.0 | 60 | 21.9 | 14.8 | 67.6 | 34.5 | 5.11 | 6.8 | 1.01 |
| 602 | 80 | 0.93 | 2.7 | 84 | 32.0 | 21.9 | 68.6 | 34.7 | 7.62 | 7.1 | 1.55 |
| 603 | 100 | 1.17 | 3.3 | 92 | 37.7 | 31.15 | 82.6 | 33.3 | 10.37 | 6.3 | 2.03 |
| 604 | 120 | 1.4 | 4.0 | 108 | 48.1 | 37.3 | 77.5 | 35.6 | 13.26 | 7.4 | 2.76 |
| 605 | 150 | 1.75 | 5 | 120 | 59.2 | 41.6 | 70.3 | 37.3 | 15.52 | 8.2 | 3.43 |

これらの結果から、本菌は炭素源と窒素源濃度を増加させることにより、グルコース濃度の増加に応じて、ＤＨＡ、ＤＰＡの生産量も増加することが明らかとなった。

実施例１３　撹拌数の影響

実施例５と同一の培地組成および培養条件で、培養槽の撹拌数を１００rpmおよび３００rpmにして培養を行った。グルコース消費時間が、１００rpmでは１００時間程度かかっていたのが、３００rpmでは約半分の５０～６０時間となった。一方、培地１Ｌ当たりの脂肪酸量、ＤＨＡ量、DPA量については３００rpmの方がわずかに多かった(表１４)。

表１４．分析結果

| 回転数 (rpm) | 菌体量 (g) | 全脂肪酸量 (g) | 脂肪酸含有割合(%) | DHA含有割合 (%) | DHA量 (g) | DPA含有割合 (%) | DPA量 (g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 | 15.3 | 9.1 | 59.6 | 35.0 | 3.2 | 8.4 | 0.76 |
| 300 | 20.5 | 10.7 | 52.2 | 35.8 | 3.9 | 8.5 | 0.91 |

実施例１４

実施例１２に従って製造した培養液を集め、フィルタープレスにて液を除去し乾燥させ、水分１０%含有の菌体１０kgを得た。この菌体を常法に従いヘキサン抽出し、ヘキサンを除去した後、５．９kgの油脂を得た。またヘキサン抽出後の菌体を乾燥させヘキサンを除去した後、３．９kgの油抽出残菌体を得た。この油脂には、３５%のＤＨＡと8%のＤＰＡを含有していた。また油抽出残菌体には、１．２%のＤＨＡと０．３%のＤＰＡを含有していた。

実施例１５

イザブラウン種２００食日の採卵鶏１群５羽として２群にわけた。１群は対照群として通常の飼料で２５日間飼育した。残りの群は実験群として、実施例１４により得られた油脂を毎日５gを通常の飼料に加え２５日間飼育した。

２５日目の卵３個分の卵の重量、卵黄重量、ＤＨＡ濃度、ＤＰＡ濃度、卵黄の照り、卵黄の味を測定した。結果を表１５に示す。油脂を加えて飼育することにより、明らかに卵黄中のＤＨＡ、ＤＰＡ含有率は増加した。また、照りがよく、とろける感じの卵黄を得ることができた。

表１５

| | 実験群 | 対照群 |
|---|---|---|
| 卵の重量(３個分)g | ２１３ | ２１１ |
| 卵黄重量 g | ５５ | ５２ |
| ＤＨＡ(%) | ３．５ | １．５ |
| ＤＰＡ(%) | ０．８ | 痕跡量 |
| 卵黄の照 | 照りが良い | ざらざらした感じ |
| 卵黄の味 | とろける感じ | 水っぽい |

実施例１６

イザブラウン種２００食日の採卵鶏を２群にわけた。１群は対照群として５羽を通常の飼料で２５日間飼育した。残りの群は実験群として３羽を、通常の飼料を対照群より５０g減じ、その分を補うために実施例１４により得られた油抽出残菌体５０gを加え２５日間飼育した。

２５日目の卵３個分の卵の重量、卵黄重量、ＤＨＡ濃度、ＤＰＡ濃度、卵黄の照り、卵黄の味を測定した。結果を表１６に示す。油抽出残菌体を加えて飼育することにより、明らかに卵黄中のＤＨＡ、ＤＰＡ含有率は増加した。また、照りがよく、とろける感じの卵黄を得ることができた。

表１６

| | 実験群 | 対照群 |
|---|---|---|
| 卵の重量(３個分)g | ２１２ | ２１１ |
| 卵黄重量 g | ５３ | ５２ |
| ＤＨＡ(%) | 2.1 | 1.5 |
| ＤＰＡ(%) | 0.2 | 痕跡量 |
| 卵黄の照 | 照りが良い | ざらざらした感じ |
| 卵黄の味 | とろける感じ | 水っぽい |

実施例１７　(n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡ含有ミルクの調製

粉末ミルク１００gに、実施例１５で得られた卵黄から常法に従って抽出した(n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡ含有卵黄油[(n-6)系ドコサペンタエン酸0.8、ＤＨＡ3.5%含有]6gを混合することにより(n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡ含有ミルクを調製した。このミルクの全脂肪酸に対する(n-6)系ドコサペンタエン酸の割合は0.19%、ＤＨＡの割合は0.84%となり、従来の調製乳に不足していた(n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡを母乳に近づけることができた。

実施例１８ （n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡ含有ミルクの調製

実施例７で得られた粗抽出油脂を、常法に従い、ヘキサンと９０％メタノールによる液／液分配により、中性脂質と極性脂質とに分離し、（n-6）系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡを含有する中性脂質[(n-6)系ドコサペンタエン酸７．９、ＤＨＡ３３．７％含有]を得た。この油０．６gを、粉末ミルク１００gに混合することにより(n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡ含有ミルクを調製した。このミルクの全脂肪酸に対する(n-6)系ドコサペンタエン酸の割合は０．１９％、ＤＨＡの割合は０．８０％となり、従来の調製乳に不足していた(n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡを母乳に近づけることができた。

実施例１９ （n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡ含有セプセルの調製

表１７．カプセル

| | |
|---|---|
| ゼラチン | ７０．０％ |
| グリセリン | ２２．９％ |
| パラオキシ安息香酸メチル | ０．１５％ |
| パラオキシ安息香酸プロピル | ０．５１％ |
| 水 | 適量 |
| 計 | １００％ |

上記成分からなるソフトカプセル剤皮の中に、実施例１２で得られた(n

-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡ含有微生物オイルを３００㎎を常法により充填し、ソフトカプセル剤を得た。

実施例２０　(n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡ含有飲料の調製

容器中に市販のプレーンヨーグルト５０gと実施例１２で得られた(n-6)系ドコサペンタエン酸およびＤＨＡ含有微生物オイル５０%とβ－シクロデキストリン1gを入れ、これを約3分間撹拌して乳化させ、Ｗ／Ｏ／Ｗ、Ｏ／Ｗ／Ｏ型などが混在するエマルジョンを得た。

実施例２１　ＤＨＡとＤＰＡを含有する微小餌料生物用餌料の製造

実施例5に従って製造した培養液を集め、フィルタープレスにて液を除去し菌体を得た。得られた菌体を１０５℃で3時間、加熱乾燥し、コーヒーミルにより、パウダー化した。得られたパウダーまたはコントロールとしてパン酵母を用いて、ワムシ、およびブラインシュリンプの培養を行った。

培養方法は、海水２００Ｌを３００Ｌの水槽に入れ、通気条件下、２３℃で、ワムシは1㎖あたり１００個体、ブラインシュリンプは1㎖あたり２０個体放養し、飼料として、それぞれ1g／$10^6$個ワムシ1日、1g／$10^5$個ブラインシュリンプ1日になるように上記の菌体パウダーまたはパン酵母を与えた。ワムシまたはブラインシュリンプにこれらを摂取して生育し、3日目にサンプリングして構成脂肪酸組成を調べた結果、表１８および表１９のようになった。

結果が示す通り、ワムシにおいてもブラインシュリンプにおいても、ＤＨＡ、ＤＰＡの蓄積がパン酵母より好成績であった。

表１８．ワムシ

| | 脂肪酸組成（%） | |
|---|---|---|
| | DHA | DPA |
| コントロール（パン酵母） | 0 | 0 |
| 試　験　（SR21株） | 26 | 5 |

表１９．ブラインシュリンプ

| | 脂肪酸組成（%） | |
|---|---|---|
| | DHA | DPA |
| コントロール（パン酵母） | 0 | 0 |
| 試　験　（SR21株） | 23 | 4 |

産業上の利用可能性

本発明の海洋性微生物は、増殖性および油脂蓄積性に優れ、(n-3)系DHAおよび(n-6)系DPAの生産能が高く、かつEPAの生産が極めて少ない。従って、本発明の微生物を用いると、食品および医薬品の分野で有用な(n-3)系DHAおよび(n-6)系DPAの含有量が高く、かつEPAの含有量が低い油脂を高収率で製造することができる。また、この油脂から純度の高い(n-3)系DHAまたは(n-6)系DPAを分離することもできる。

また、本発明の油脂組成物は、種々の生理活性を有する(n-3)系DHAとともに(n-6)系DPAを特定の比率で含有するため、該油脂組成物

を各種製品(乳児用調製乳、未熟児用調製乳、幼児用食品、老人用食品、栄養補助食品、機能性食品、経腸栄養剤、動物用飼料または動物用飼料添加物、微小餌料生物用餌料など)に添加して、(n-3)系ＤＨＡおよび(n-6)系ＤＰＡを必要とする対象にこれら高度不飽和脂肪酸を安定的かつ効率的に供給することができる。特に、動物用飼料または動物用飼料添加物、微小餌料生物用餌料では、ＤＨＡおよびＤＰＡを含有する培養菌体の抽出残渣等を使用できるため、非常に経済的である。また、上記の動物用飼料を家禽に与えることによって、今までになかったＤＨＡおよび／またはＤＰＡを強化した家禽卵または卵黄油を得ることができる。

# 請 求 の 範 囲

1．(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸の生産能を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株(ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４)または該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物。

2．(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸の生産能を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株(ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４)または該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物を培地中で培養し、培養物から油脂を採取することを特徴とする、(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸を含む油脂の製造方法。

3．請求項１または２に記載の(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸を含む油脂から(n-3)系ドコサヘキサエン酸を単離することを特徴とする、(n-3)系ドコサヘキサエン酸の製造方法。

4．請求項１または２に記載の(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸を含む油脂から(n-6)系ドコサペンタエン酸を単離することを特徴とする、(n-6)系ドコサペンタエン酸の製造方法。

5．(n-6)系ドコサペンタエン酸および(n-3)系ドコサヘキサエン酸の生産能を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株(ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４)または該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物を培地中で培養して得られる油脂。

6．前記油脂が、(n-3)系ドコサヘキサエン酸および(n-6)系ドコサペンタエン酸の生産能を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株(ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４)または該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的

に同一の菌学的性質を有する微生物を培地中で培養し、その培養物から採取することによって得られる油脂または該油脂を精製して得られる油脂である請求項５に記載の油脂。

７．前記油脂が、該油脂を菌体培養によって製造する途中の培養液もしくはその殺菌した培養液、または培養終了時の培養液もしくはその殺菌した培養液、またはそれぞれから集菌した培養菌体もしくはその乾燥物、または該油脂を培養液から採取した後の残渣に含まれるものであることを特徴とする請求項５に記載の油脂。

８．前記油脂が、(ｎ-６)系ドコサペンタエン酸を全脂肪酸重量に対し少なくとも１％含有することを特徴とする請求項５～７のいずれかに記載の油脂。

９．前記油脂が、(ｎ-３)系エイコサペンタエン酸を全脂肪酸重量に対し多くても２％しか含有しないことを特徴とする請求項５～８のいずれかに記載の油脂。

１０．前記油脂が、(ｎ-６)系ドコサペンタエン酸１重量部に対し(ｎ-３)系ドコサヘキサエン酸を３～６重量部含有することを特徴とする請求項５～９のいずれかに記載の油脂。

１１．前記油脂が、中性脂質であることを特徴とする請求項５～１０のいずれかに記載の油脂。

１２．前記油脂において、(ｎ-３)系ドコサヘキサエン酸が、グリセリンの２位のみに結合しているグリセリドを含有することを特徴とする請求項５～１１のいずれかに記載の油脂。

１３．前記油脂において、(ｎ-３)系ドコサヘキサエン酸が、グリセリンの１および２位、または１および３位に結合しているグリセリドを含有することを特徴とする請求項５～１１のいずれかに記載の油脂。

１４．前記中性脂質がその８５重量%以上がトリグリセリドであることを特徴とする請求項１１に記載の油脂。

１５．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を含有することを特徴とする栄養補助食品。

１６．前記油脂をゼラチンカプセルに封入して成ることを特徴とする請求項１５に記載の栄養補助食品。

１７．前記栄養補助食品が、前記油脂組成物を含有するドリンク剤または顆粒剤もしくは錠剤の形態を有する飲食品であることを特徴とする請求項１５に記載の栄養補助食品。

１８．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を含有する乳児用調製乳。

１９．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を含有する未熟児用調製乳。

２０．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を含有する幼児用食品。

２１．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を含有する老人用食品。

２２．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を含有する経腸栄養剤。

２３．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を含有する動物用飼料。

２４．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を含有する動物用飼料添加物。

２５．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を含有する微小餌料生物用餌料。

２６．請求項５～１４のいずれかに記載の油脂を与えて飼育することにより得られる家禽卵。

２７．(n-3)系ドコサヘキサエン酸生産能を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株(ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４)または該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物。

２８．（ｎ－３）系ドコサヘキサエン酸生産能を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株（ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４）または該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物を培地中で培養し、培養物から油脂を採取することを特徴とする、（ｎ－３）系ドコサヘキサエン酸を含む油脂の製造方法。

２９．（ｎ－６）系ドコサペンタエン酸生産能を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株（ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４）または該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物。

３０．（ｎ－６）系ドコサペンタエン酸生産能を有するシゾキトリウム属ＳＲ２１株（ＦＥＲＭ ＢＰ－５０３４）または該ＳＲ２１株と同一の種に属するかもしくは実質的に同一の菌学的性質を有する微生物を培地中で培養し、培養物から油脂を採取することを特徴とする、（ｎ－６）系ドコサペンタエン酸を含む油脂の製造方法。

図1





差替え用紙（規則26）

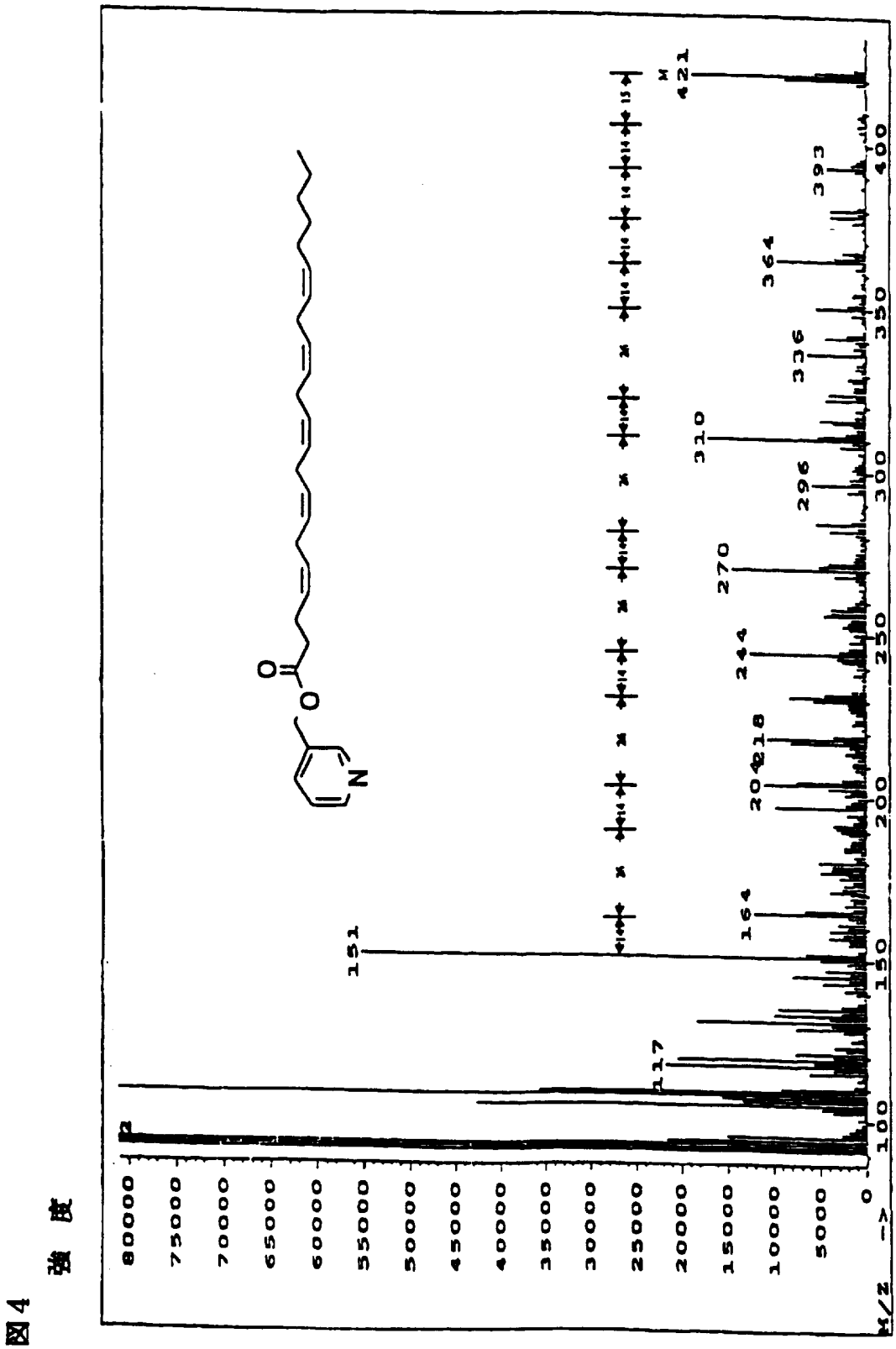
図2



図3



図4


強度
M/Z →
80000
75000
70000
65000
60000
55000
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
100
150
200
250
300
350
400
151
164
204
218
244
270
296
310
336
364
393
421
117
O
O
N

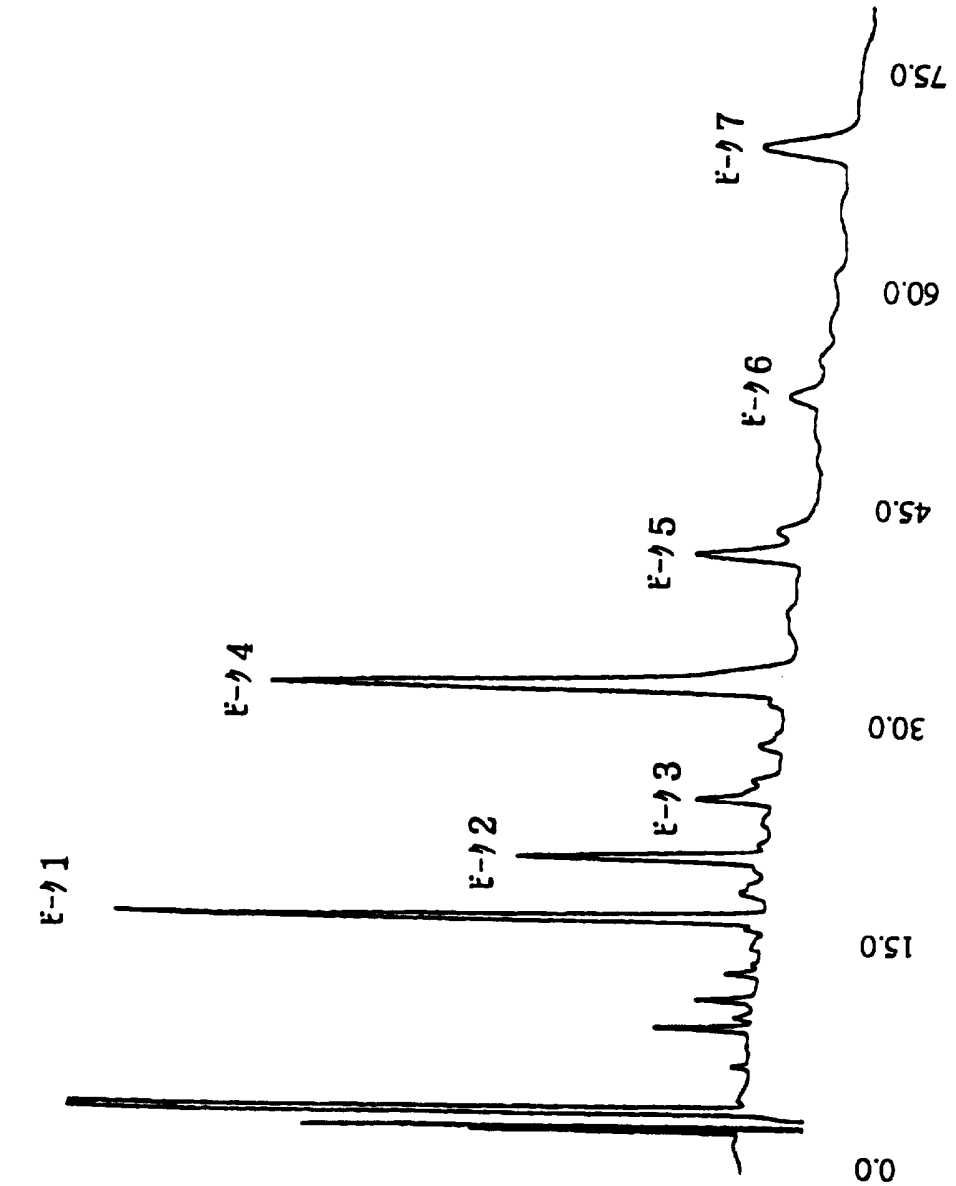
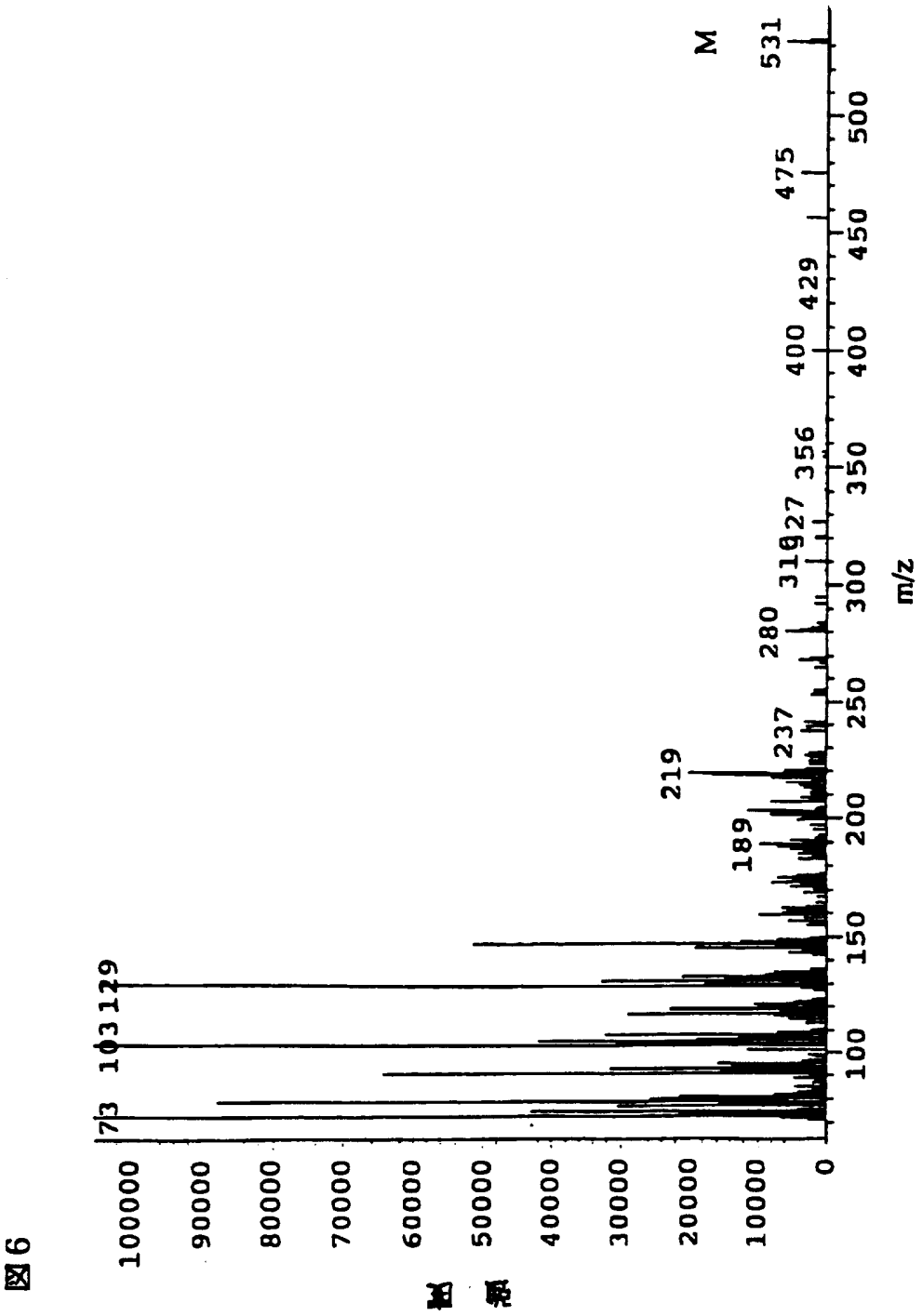



図5

図6


100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
相対強度
73
103
129
189
219
237
280
310
327
356
400
429
475
531
M
100
150
200
250
300
350
400
450
500
m/z

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP96/01049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl$^6$ C12N1/14, C12P7/64, C11C3/00, A23K1/16, A23L1/30

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)

Int. Cl$^6$ C12N1/14, C12P7/64, C11C3/00, A23K1/16, A23L1/30

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

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

WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | JP, 5-276963, A (Kawasaki Steel Corp.), October 26, 1993 (26. 10. 93) & EP, 657543, A1 | 1 - 4, 15 - 30 |
| A | JP, 5-308978, A (Onoda Cement Co., Ltd.), November 22, 1993 (22. 11. 93)(Family: none) | 1 - 4, 15 - 30 |
| X | JP, 59-190948, A (Roussel Huchaf), October 29, 1984 (29. 10. 84) & EP, 120169, A & US, 4701468, A | 5 - 14 |
| X | JP, 1-180849, A (Nippon Oil and Fats Co., Ltd.), July 18, 1989 (18. 07. 89)(Family: none) | 5 - 14 |

☐ 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 document 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| August 12, 1996 (12. 08. 96) | August 27, 1996 (27. 08. 96) |
| **Name and mailing address of the ISA/** Japanese Patent Office<br>Facsimile No. | **Authorized officer**<br>Telephone No. |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP96／01049

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl[6]　C12N1/14,C12P7/64,C11C3/00,A23K1/16,A23L1/30

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（IPC））
Int.Cl[6]　C12N1/14,C12P7/64,C11C3/00,A23K1/16,A23L1/30

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

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）
WPI/L

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 | 関連する請求の範囲の番号 |
|---|---|---|
| A | JP,5－276963,A（川崎製鉄株式会社），26.10月.1993（26.10.93）＆　EP,657543,A1 | 1－4<br>15－30 |
| A | JP,5－308978,A（小野田セメント株式会社），22.11月.1993（22.11.93）（ファミリーなし | 1－4<br>15－30 |
| X | JP,59－190948,A（ルセルーユクラフ），29.10月.1984（29.10.84）＆　EP,120169,A＆　US,4701468,A | 5－14 |
| X | JP,1－180849,A（日本油脂株式会社），18.7月.1989（18.07.89）（ファミリーなし） | 5－14 |

☐ 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」先行文献ではあるが、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<br>12.08.96 | 国際調査報告の発送日　27.08.96 |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（ISA／JP）<br>郵便番号100<br>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）　4B　7432<br>谷口　博　印<br>電話番号　03－3581－1101　内線　3448 |

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（1992年7月）