



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C12P 7/64 (2006.01)
C11C 3/00 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0046143
(43) 공개일자 2007년05월02일

(21) 출원번호 10-2007-7004428

(22) 출원일자 2007년02월23일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년02월23일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2005/015380

(87) 국제공개번호 WO 2006/022310

국제출원일자 2005년08월18일

국제공개일자 2006년03월02일

(30) 우선권주장 JP-P-2004-00244218 2004년08월24일 일본(JP)

(71) 출원인 산토리 가부시킴이샤
일본 오사카후 오사카시 기타쿠 도지마하마 2초메 1-40

(72) 발명자 가와시마 히로시
일본 5691121 오사카 다카쓰키시 마카미초 6-11-1-113
사쿠라다니 에이치
일본 6110011 교토 우지시 고카쇼 간유치 교다이쇼쿠인슈쿠샤 323
오가와 준
일본 6038051 교토 교토시 기타쿠 가미가모사카키다초 28-301
시미즈 사카유
일본 6168212 교토 교토시 우쿄쿠 도키와야마시타초 6-9

(74) 대리인 박장원

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 1 종류의 고도 불포화 지방산 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 제조 방법 및 그 이용

(57) 요약

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 20 중량% 이상인 유지의 제조 방법에 있어서, 상기 유지를 생산할 수 있는 미생물을 배양하고, 소망에 따라 해당 유지를 채취하는 것을 특징으로 하는 방법, 이 방법에 의하여 얻는 유지, 및 상기 유지의 제조방법을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 20 중량% 이상인 유지의 제조 방법에 있어서, 상기 유지를 생산할 수 있는 미생물을 배양하고, 소망에 따라 상기 유지를 채취하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율은 전체 트리글리세라이드에 대하여 30 중량% 이상인 것인 방법.

청구항 3.

제2항에 있어서, 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율은 전체 트리글리세라이드에 대하여 40 중량% 이상인 것인 방법.

청구항 4.

제3항에 있어서, 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율은 전체 트리글리세라이드에 대하여 50 중량% 이상인 것인 방법.

청구항 5.

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 동일한 고도 불포화 지방산은 아라키돈산인 것인 방법.

청구항 6.

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 미생물은 모르티에렐라 (*Mortierella*) 속의 미생물인 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 미생물은 모르티에렐라 (*Mortierella*) 속 모르티에렐라 (*Mortierella*) 아속의 미생물인 것인 방법.

청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 미생물은 모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*) 종의 미생물인 것인 방법.

청구항 9.

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 미생물이 고도 불포화 지방산을 함유하는 유지를 생산할 수 있는 미생물의 변이주인 것인 방법.

청구항 10.

제1항 내지 제9항에 기재되어 있는 방법에 의하여 생산되는 유지.

청구항 11.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 20 중량% 이상인 유지를 생산할 수 있는 모르티에렐라(*Mortierella*)속 미생물.

청구항 12.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 30 중량% 이상인 유지를 생산할 수 있는 모르티에렐라 (*Mortierella*)속 미생물.

청구항 13.

제11항 또는 제12항에 있어서, 모르티에렐라 알피나(*Mortierella alpina*)인 것인 미생물.

청구항 14.

제11항 또는 제13항에 있어서, 변이주인 것인 미생물.

청구항 15.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 20 중량% 이상인 유지.

청구항 16.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 30 중량% 이상인 유지.

청구항 17.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 40 중량% 이상인 유지.

청구항 18.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 50 중량% 이상인 유지.

청구항 19.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 20 중량% 이상인 유지를 함유하여 이루어지는 미생물 배양균체.

청구항 20.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 30 중량% 이상인 유지를 함유하여 이루어지는 미생물 배양균체.

청구항 21.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 40 중량% 이상인 유지를 함유하여 이루어지는 미생물 배양균체.

청구항 22.

글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 50 중량% 이상인 유지를 함유하여 이루어지는 미생물 배양균체.

명세서

기술분야

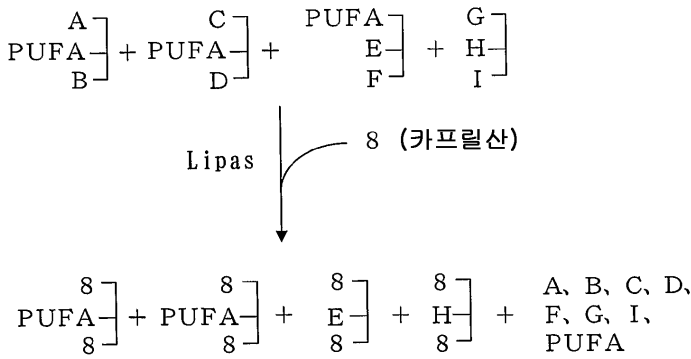
본 발명은 1 종류의 고도 불포화 지방산 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 제조 방법 및 그 이용에 관한 것으로, 특히, 상기 트리글리세라이드를 효율적으로, 그리고 안정적으로 제조하는 방법과, 이 제조 방법에 의하여 얻게 되는 트리글리세라이드 및 그 대표적인 이용에 관한 것이다.

배경기술

여기서 말하는 고도 불포화 지방산 (PUFA)이라 함은, 탄소수가 18개 이상이고, 이중 결합이 2개 이상인 지방산이다. PUFA는 여러 가지 독특한 생리 활성이 있기 때문에, 각종 식품 및 동물 사료에 첨가되어 그 기능성을 높이는 데 사용된다. 주된 것으로는 리놀산 (LA), α -리놀렌산 (ALA), γ -리놀렌산 (GLA), 디호모- γ -리놀렌산 (DGLA), 미드산 (MA), 아라키돈산 (AA), 다가 불포화지방산 (EPA), 도코사헥사엔산 (DHA) 등을 들 수 있다. 이용에 있어서는 유리지방산형이나 인지질형으로서 사용되기도 하지만, 주로, 트리글리세라이드형으로서 사용되고, 그 아실 잔기에 PUFA가 구성 성분으로서 함유되어 있는 경우가 많다.

일반적으로, PUFA 자체의 화학 합성은 어렵고, 그 비용도 매우 비싸기 때문에, 그것의 실제적인 공급원은 생물자원에서부터 추출하는 것에 한정되어 있다. 일반적으로는 유지 식물, 어패류, 미생물, 미세 해초류 등에서 추출하는 경우가 많다. 이들 생물은 여러 종류의 PUFA를 함유하고 있는 것이 많고, 단일 PUFA로 이루어진 생물자원은 거의 알려져 있지 않다.

PUFA를 트리글리세라이드형으로 이용함에 있어서, 최근, PUFA의 결합 위치나 결합 개수를 특정한, 이른바 「구조 지질」로서 이용함으로써, 더 기능성이 높아지는 것이 알려져 있다. 구조 지질을 제조하는 경우, 위치 특이적인 화학적 수법을 사용하기도 하지만, 대개의 경우, 식품으로서의 용도가 중심이기도 하기 때문에, 리파아제 등의 효소를 이용한 아실기의 변환 반응으로 제조하는 경우가 많다 (일본 공개 특허 공보 2003-4831, P01-0044). 이 경우, 반응계의 설계에도 영향을 받지만, 일반적으로는 원료 트리글리세라이드 중의 특정 위치에 결합한 지방산의 결합은 절단하지 않고, 그 밖의 위치에 결합한 지방산만을 가수분해 반응 또는 아실기 교환 반응에 의하여 제거하는 것이 많다. 반응식 1에, PUFA 함유 트리글리세라이드 혼합물과 카프틸산의 리파아제 반응에 의하여, 1, 3위에 카프틸산을 함유하는 트리글리세라이드와 유리지방산이 생성되는 경우의 예를 나타낸다 (A 내지 I: 지방산, 8: 카프틸산).



이 경우, 생성물인 구조 지질 중의 목적으로 하는 PUFA 함량은 원료 트리글리세라이드 중의 절단하지 않는 지방산 잔기 (이 경우는 2위) 중에 함유되는 목적으로 하는 PUFA 함량에 의존한다. 또한, 부수적으로 생산되는 유리지방산의 이용 가치가 높은 경우도 많지만, 이 유리지방산에 함유되는 지방산의 종류와 비율은 원료 트리글리세라이드 중의, 절단하는 지방산 잔기 (이 경우 1위와 3위) 중에 함유되는 지방산의 종류와 비율에 의존한다.

특정의 PUFA를 특정의 위치에 함유하는 구조 지질을, 그 PUFA를 함유하는 트리글리세라이드 등을 출발 원료로 하여, 리파아제 등을 이용한 아실기의 변환 반응으로 제조하는 동시에, 부수적으로 생산되는 지방산도 이용하고자 하는 경우, 출발 원료가 여러 종류의 PUFA를 함유하는 혼합물인 경우에는 다음과 같은 점이 문제가 된다. (1) 글리세롤 골격에 결합된 상태로 남기고 싶은 아실기에, 목적으로 하는 PUFA 이외의 지방산이 혼입되어 버린다. (2) 글리세롤 골격으로부터 벗어나서 부수적으로 생산되는 지방산이 여러 종류의 지방산의 혼합물이 되어 버린다.

상기 (1)와 (2)를 동시에 해결하려면 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드를 출발 원료로 하면 좋다. 이렇게 함으로써, 글리세롤 골격에 결합된 상태로 남기고 싶은 아실기에 대하여도, 글리세롤 골격으로부터 벗어나서 부수적으로 생산되는 지방산에 대하여도, 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류만으로 이루어지는 순도가 높은 것이 되어 부가가치가 높아진다.

또한, 사람이나 동물이 특정의 PUFA의 생리 작용을 기대하여 그 PUFA를 함유하는 지질을 섭취하는 경우에는, 안정성 등의 물성이나 생체에의 저자극성의 관점에서 트리글리세라이드로서 섭취하는 경우가 많지만, 지질이기에 때문에 칼로리가 높은 것이 염려가 되기도 한다. 이 경우, 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드를 섭취하면, 그 이외의 지방산을 섭취하지 않아도 되기 때문에, 동량의 목적으로 하는 PUFA를 섭취하기 위하여 섭취하여야 하는 칼로리가 가장 낮아지는 효과도 기대할 수 있다.

이와 같이, 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드는 매우 부가가치가 높은 물질이다.

목적으로 하는 PUFA를 함유하는 트리글리세라이드 혼합물 중에, 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드 분자종이 약간이라도 함유되어 있는 경우에는, 고속 액체 크로마토그래피 등을 이용하여 분리 정제할 수 있는 경우가 있다. 또한, 목적으로 하는 PUFA를 함유하는 지질을 유리지방산이나 지방산 알코올 에스테르의 형태로 변환한 후, 고속 액체 크로마토그래피 등을 이용하여 목적으로 하는 PUFA 1 종류를 분리 정제하여 취득하고, 또한 화학 합성 또는 효소 변환에 의하여 글리세롤과 결합시킴으로써, 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드를 얻는 것도 원리적으로는 가능하다.

발명의 상세한 설명

그러나, 전술한 종래의 기술에서는 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 효율적이고 안정적으로 제조하는 것이 곤란하다는 문제가 있었다.

또한, 전술한 바와 같이, 일반적으로 PUFA 자체의 화학 합성은 어렵고, 그 비용도 매우 비싸기 때문에, 그 실제적인 공급원은 생물 자원으로부터의 추출에 한정되어 있다. 주된 공급원으로서, 리놀산이나 α -리놀렌산은 유지식물을, 아라키돈산이나 디호모- γ -리놀렌산은 미생물을, EPA나 DHA는 어패류나 미세 해초류 등을 주된 공급원으로서 들 수 있다. 이들 공급원에 함유되는 PUFA는 트리글리세라이드형으로 존재하는 것이 많다.

그러나, 그 트리글리세라이드에는 많은 경우, 여러 종류의 PUFA이 함유되어 있고, 또한 그 결합 위치도 글리세롤 골격의 1위, 2위, 3위의 모두에 분포하고 있는 것이 많다. 이와 같이, 트리글리세라이드의 3 개의 지방산 잔기의 종류를 구별한 트리글리드 분자종이라는 관점에서는 상당히 많은 종류의 분자종이 혼재되어 있기 때문에, 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드인 분자종은 거의 함유되어 있지 않거나, 또는 함유되어 있어도 소량 존재하고 있는 것에 지나지 않고, 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어진 트리글리세라이드인 분자종을 상기 공급원으로부터 분리 정제하는 것은 어렵다. 또한, 트리글리세라이드 혼합물로부터 특정의 트리글리세라이드 분자종을 분리 정제하기 위하여는 고속 액체 크로마토그래피 등의 분석용 기기를 사용할 필요가 있어서, 공업적으로 대량 제조하는 것은 매우 곤란하다.

또한, 목적으로 하는 PUFA 1 종류를, 유리지방산이나 지방산 알코올 에스테르의 형태로 분리 정제하여 취득하고, 그 후에 화학 합성 또는 효소 변환에 의하여 글리세롤과 결합시킴으로써, 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드를 얻는 것도 가능하기는 하다. 그러나, 목적으로 하는 PUFA 자체는 역시 상기 공급원으로부터 얻을 수 밖에 없고, 유지의 추출, 유리지방산 또는 지방산 알코올 에스테르로의 변환, 목적으로 하는 PUFA의 분리 정제, 화학 합성 또는 효소 변환에 의한 글리세롤과의 결합, 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드의 분리 정제와 같은 매우 많은 공정을 거쳐야하므로 비용이나 수량적으로 큰 문제가 있기 때문에, 완전히 실용적이라고는 말할 수 없었다.

본 발명은 상기 과제를 감안하여 이루어진 것으로, 그 목적은 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 효율적이고, 안정적으로 공급하는 것이 가능한 기술과, 그 대표적인 이용 기술을 제공하는 것에 있다.

본 발명자는 상기 과제를 감안하여 예의 검토한 결과, 목적으로 하는 PUFA를 함유하는 트리글리세라이드를 생산하는 지질 생산균에 돌연변이 처리를 실시함으로써, 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드를 고농도로 함유하는 돌연변이주를 취득할 수 있고, 또한, 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드를 그 돌연변이주의 균체로부터 용이하게 추출할 수 있는 것을 밝혀내어, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

즉, 본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 제조 방법은 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 생성할 수 있는 지질 생산균을 배양함으로써 균체를 얻고, 그 균체로부터 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 추출하는 제조 방법으로서, 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 생성할 수 있는 지질 생산균을 배양하는 것을 특징으로 한다.

따라서, 본 발명은 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 20 중량% 이상인 유지의 제조 방법에 있어서, 상기 유지를 생산할 수 있는 미생물을 배양하고, 소망하는 바에 따라서 상기 유지를 채취하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

상기 방법에 있어서, 좋기로는, 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 30 중량% 이상이다.

더 좋기로는, 상기 방법에 있어서, 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율은 전체 트리글리세라이드에 대하여 40 중량% 이상이며, 더 좋기로는, 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 50 중량% 이상이다.

상기 방법에 있어서, 상기 동일한 고도 불포화 지방산은, 예를 들면 아라키돈산이다.

상기 방법에 있어서 사용하는 미생물은, 좋기로는 모르티에렐라(*Mortierella*)속의 미생물이며, 더 좋기로는, 모르티에렐라(*Mortierella*)속 모르티에렐라(*Mortierella*) 아속의 미생물이다. 좋기로는, 상기 미생물은 모르티에렐라 알피나(*Mortierella alpina*)종의 미생물이다. 통상, 상기 미생물은 고도 불포화 지방산을 함유하는 유지를 생산할 수 있는 미생물의 변이주이다.

본 발명은, 또한 상기 방법에 의하여 생산되는 유지에 관한 것이다.

본 발명은, 또한 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 20 중량% 이상인 유지를 생산할 수 있는 모르티에렐라 (*Mortierella*)속 미생물, 종기로는 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 30 중량% 이상인 유지를 생산할 수 있는 모르티에렐라 (*Mortierella*)속 미생물을 제공한다. 더 종기로는, 미생물은 예를 들면 모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*)이다. 상기 미생물은 종기로는 변이주이며, 예를 들면 인공 변이주이다.

본 발명은, 또한 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 20 중량% 이상인 유지, 종기로는 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 30 중량% 이상인 유지, 더 종기로는 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 40 중량% 이상인 유지, 더 종기로는 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 50 중량% 이상인 유지를 제공한다.

본 발명은, 또한 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 20 중량% 이상인 유지를 함유하여 이루어지는 미생물 배양균체를 제공한다. 종기로는, 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 30 중량% 이상이며, 더 종기로는 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 40 중량% 이상이며, 예를 들면 글리세롤의 3 개의 히드록실기에 동일한 고도 불포화 지방산이 결합하여 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 전체 트리글리세라이드에 대하여 50 중량% 이상이다.

발명의 효과

본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 효율적으로, 그리고 안정적으로 제조하고, 상기 트리글리세라이드를 용이하게 입수할 수 있으면 이하와 같은 효과를 얻을 수 있다.

특정의 PUFA를 특정의 위치에 함유하는 구조 지질을 리파제 등을 이용한 아실기의 변환 반응으로 제조하는 동시에, 부수적으로 생산되는 지방산도 이용하고자 하는 경우, 본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 출발 원료로서 사용함으로써, 글리세롤 골격에 결합된 상태로 남기고 싶은 아실기에 대하여도, 글리세롤 골격으로부터 벗어나서 부수적으로 생산되는 지방산에 대하여도, 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류만으로 이루어지는 순도가 높은 것이 되어, 주생성물, 부생성물 모두 부가가치가 매우 높아진다.

또한 사람이나 동물이 특정의 PUFA의 생리 작용을 기대하여 그 PUFA를 함유하는 지질을 섭취하는 경우에는, 트리글리세라이드를 구성하는 3 개의 지방산 잔기가 모두 목적으로 하는 PUFA 1 종류로 이루어지는 트리글리세라이드를 섭취하면, 그 이외의 지방산을 섭취하지 않아도 되기 때문에, 동량의 목적으로 하는 PUFA를 섭취하기 위하여 섭취하여야 하는 칼로리가 가장 낮아진다고 하는 효과도 기대된다.

발명을 실시하기 위한 최선의 실시 상태

이하, 본 발명의 하나의 실시 형태에 대하여 설명하지만, 본 발명은 이것에 한정되는 것은 아니다.

본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 제조 방법은 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 생성할 수 있는 지질 생산균을 배양함으로써 균체를 얻고, 그 균체로부터 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 추출하는 제조 방법으로서, 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 생성할 수 있는 지질 생산균을 배양하는 것을 특징으로 하고 있다.

본 발명에서 사용하는 상기 지질 생산균으로서, 특히 한정되는 것은 아니지만, 모르티에렐라 (*Mortierella*)속, 코니디오볼루스 (*Conidiobolus*)속, 피툼 (*Pythium*)속, 피토프토라 (*Phytophthora*)속, 페니실륨 (*Penicillium*)속, 클라도스포륨 (*Cladosporium*)속, 무코르 (*Mucor*)속, 후자륨 (*Fusarium*)속, 아스페르길러스 (*Aspergillus*)속, 로도토룰라 (*Rhodotorula*)속, 엔토모프토라 (*Entomophthora*)속, 에키노스포랑기움 (*Echinosporangium*)속 및 사프로레그니아 (*Saprolegnia*)속으로부터 선택되는 적어도 1 종이 사용되는 것이 좋다.

이 중, 상기 지질 생산균으로서 모르티에렐라속이 사용되는 경우, 상기 모르티에렐라속의 균이 모르티에렐라 아속인 것이 좋고, 이 모르티에렐라아속의 균이 모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*)인 것이 더 좋다. 모르티에렐라 (*Mortierella*)속 모르티에렐라 (*Mortierella*) 아속에 속하는 미생물에서는, 예를 들면 모르티에렐라 엘롱가타 (*Mortierella elongata*), 모르티에렐라 엑시구아 (*Mortierella exigua*), 모르티에렐라 히그로필라 (*Mortierella hygrophila*), 모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*) 등을 들 수 있다.

구체적으로는, 모르티에렐라 엘롱가타 (*Mortierella elongata*) IF08570, 모르티에렐라 엑시구아 (*Mortierella exigua*) IFO8571, 모르티에렐라 히그로필라 (*Mortierella hygrophila*) IF05941, 모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*) IFO8568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430, CBS219.35, CBS224.37, CBS250.53, CBS343.66, CBS527.72, CBS529.72, CBS608.70, CBS754.68 등의 균주를 들 수 있다.

또한, 모르티에렐라 아속 이외에 AA-PL의 생산능을 가진 균주로서는, 에키노스포란기움·트랜스버살리스 (*Echinosporangium transversalis*) ATCC16960, 코니디오볼루스·헤테로스포루스 (*Conidiobolus heterosporus*) CBS138.57, 사프로레그니아·라포니카 (*Saprolegnia lapponica*) CBS284.38 등을 들 수 있다.

이들 균주는 모두 오사카시의 재단법인 발효 연구소 (IFO) 및 미국의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection, ATCC) 및 센트랄뷰로 부어 스킴멜컬처스 (Centrralbureau voor Schimmelcultures (CBS)로부터 아무런 제한 없이 입수할 수 있다. 또한, 본 발명의 연구 그룹이 토양으로부터 분리한 균주 모르티에렐라 알피나 SAM 2268 (FERM P-17762)를 사용할 수도 있으나, 이들 균주에 한정하는 것은 아니다. 이들 타입 컬처에 속하는 균주, 또는 자연계로부터 분리한 균주를 그대로 사용할 수 있으나, 증식 및/또는 단리를 1회 이상 실시함으로써 얻는 원래의 균주와는 성질이 다른 자연 돌연변이를 사용할 수 있다.

또한, 이들 지질 생산균에 돌연 변이 처리를 실시하고, 선택함으로써, 1 종의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 생성 능력이 높아진 지질 생산균을 선택할 수도 있다. 돌연 변이 처리는 상기 지질 생산균에 적용 가능하면, 특히 한정되는 것은 아니지만, 방사선 (X선, 감마선, 중성자선) 조사나 자외선 조사, 고열 처리 등을 실시하거나, 또한 미생물을 적당한 버퍼 중 등에 현탁하고, 변이원을 가하고 일정시간 인큐베이트한 후, 적당하게 희석하여 한천 배지에 식균하고, 변이주의 콜로니를 얻는 일반적인 돌연 변이 조작을 들 수 있다.

변이원으로서, 나이트로젠 머스터드, 메틸 메탄술포네이트나 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘 (NTG) 등에 알킬화제, 5-브로모우라실 등의 염기 유사체, 마이토마이신 C 등의 항생 물질, 6-멜캅토피린 등의 염기 합성 저해제, 프로플라빈 등의 색소류, 4-니트로퀴놀린-N-옥시드 등이 일종의 발암제, 염화 망간, 포름알데히드 등의 화합물을 들 수 있다. 또한, 사용하는 미생물은 생육균체 (균사)이어도 좋고, 포자이어도 좋다.

돌연 변이 처리한 지질 생산균으로부터 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 생성 능력이 높아진 지질 생산균을 선택하는 방법은, 특히 한정되는 것은 아니지만, 돌연 변이 처리한 지질 생산균이 생성하는 트리글리세라이드를 액체 고속 크리마토그래피 등으로 분석하는 것이 좋다.

실시에 1에 개시하는 바와 같이, 돌연 변이 처리를 가한 약 3,000 개의 균주를 상기와 같이 하여 선택하였더니, 동일한 PUFA 잔기만으로 이루어지는 트리글리세라이드를, 다른 트리글리세라이드에 대하여 높은 비율로 함유하는 유지를 생산하는 변이체를 3주 얻었다. 즉, 변이 처리한 균주 약 1,000 주당, 평균 1 주의 목적으로 하는 변이주를 얻을 수 있었다. 따라서, 본 발명의 변이주를 얻게 되는 빈도는 일반적인 변이 처리-선택에 의한 랜덤 선택법의 경우에 비하여 매우 높고, 본 발명에 있어서 실제로 얻은 3 개의 변이주와 동등한 상기 특성을 가지는 변이주는 본 발명의 실시예 1에 기재되어 있는 방법을 반복함으로써 용이하게 얻을 수 있다.

1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 생성 능력이 높아진 지질 생산균을 배양하는 구체적인 방법은 그 균이 증식하여 트리글리세라이드를 생성할 수 있는 배양 방법이면 특히 한정되는 것이 아니며, 지질 생산균의 종류에 따라 공지의 배양 방법으로 배양하면 좋다. 일반적으로는 배양하고자 하는 지질 생산균의 균주의 포자, 균사, 또는 미리 배양하여 얻은 전(前) 배양액을, 액체 배지 또는 고체 배지에 접종하여 배양한다. 대량으로 균체를 취득하고 싶은 경우에는 액체 배양이 바람직한 경우가 많다. 배양 설비에 대하여는 특히 한정하지 않지만, 소량의 배양이면, 각종 시험관이나 플라스크에 액체 배지를 넣고 진탕 배양하거나 한천 플레이트에 접종하여 정지 배양하면 좋다. 대량의 배양의 경우는 각종 발효기를 사용하면 좋다.

배양에 사용되는 배지의 종류도 특히 한정되는 않지만, 지질 생산균의 종류에 따라 공지의 성분을 적당히 선택하여 조제하면 좋다. 또한, 공지의 조성의 배지나 시판되는 배지를 그대로 사용하여도 좋다.

배지가 액체 배지인 경우에는, 탄소원은 특히 한정되는 것이 아니고, 일반적인 당류를 매우 적합하게 사용할 수 있다. 구체적으로는 예를 들면, 글루코스, 프락토스, 크실로스, 사카로스, 말토스, 가용성 전분, 당밀, 글리세롤, 만니톨 등을 들 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용하여도 좋고, 2 종류 이상을 적당히 조합하여 사용하여도 좋다.

질소원도 특히 한정되는 것이 아니며, 공지의 것을 매우 적합하게 사용할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들면, 펩톤, 효모 엑기스, 맥아 엑기스, 고기 엑기스, 카사미노산, 콘 스틱 리커, 대두 단백질, 탈지 다이즈, 면실 침전물 등의 천연 질소원; 요소 등의 유기 질소원; 질산나트륨, 질산암모늄, 황산암모늄 등의 무기 질소원 등을 들 수 있다. 본 발명에서는 배양하고자 하는 균주의 종류에 따라 다르지만, 상기한 것들 중에서도, 특히, 대두로부터 얻게 되는 천연 질소원, 구체적으로는, 대두, 탈지 대두, 대두 플레이크, 식용 대두 단백질, 비지, 두유, 콩가루 등을 사용하는 것이 좋다. 이들 중에서도, 탈지 대두에 열 변성을 실시한 것, 더 좋기로는 탈지 대두를 약 70 내지 90℃에서 열처리하고, 또한 에탄올 가용 성분을 제거한 것을 사용할 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용하여도 좋고, 2 종류 이상을 적당히 조합하여 사용하여도 좋다.

상기 탄소원·질소원 이외의 성분도 특히 한정되는 것이 아니며, 필요에 따라서, 공지의 미량 영양원 등을 적당히 선택하여 첨가하는 것이 좋다. 미량 영양원으로서, 예를 들면 인산 이온 등의 무기산 이온; 칼슘 이온, 나트륨 이온, 마그네슘 이온, 칼륨 이온 등의 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속의 이온; 철, 니켈, 코발트, 망간 등의 VIB 내지 VIII족 금속 이온; 구리, 아연 등의 IB 내지 IIB족 금속의 이온; 각종 비타민류; 등을 들 수 있다.

액체 배지에 있어서의 전술한 각 성분의 함유율(첨가율)은 특히 한정되는 것이 아니며, 지질 생산균의 생육을 저해하지 않는 농도이면, 공지의 범위 내로 하면 좋다. 실용상, 일반적으로는 탄소원의 총 첨가량은 0.1 내지 40 중량%의 범위 내인 것이 좋고, 1 내지 25 중량%의 범위 내가 더 좋다. 또한, 질소원의 총 첨가량은 0.01 내지 10 중량%의 범위 내가 좋고, 0.1 내지 10 중량%의 범위 내가 더 좋다. 또한, 배지 유가하는 경우에는 최초의 탄소원의 첨가량을 1 내지 5 중량%의 범위 내로 하는 동시에, 최초의 질소원의 첨가량을 0.1 내지 6 중량%의 범위 내로 하는 것이 좋다. 배양 도중에 유가하는 배지의 성분은 탄소원 및 질소원 둘 다 이이면 좋지만, 더 좋기로는, 탄소원만을 유가하면 좋다.

또한, 본 발명에 관한 제조 방법에 있어서는 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 수율을 증가시킬 목적으로, 불포화 지방산의 전구체를 배양기 중에 추가하여도 된다. 불포화 지방산의 전구체로서는, 구체적으로는, 예를 들면 헥사데칸, 옥타데칸 등의 탄화수소; 올레산, 리놀산 등의 지방산 또는 그 염; 에틸 에스테르, 글리세린 지방산 에스테르, 솔비탄 지방산 에스테르 등의 지방산 에스테르; 올리브유, 대두유, 유채씨유, 면실유, 야자유 등의 유지류; 등을 들 수 있으나, 특히 한정되는 것은 아니다. 이들 전구체는 단독으로 사용하여도 좋고, 2 종류 이상을 적당히 조합하여 사용하여도 좋다.

상기 불포화 지방산의 전구체의 첨가량은 특히 한정되는 것은 아니지만, 일반적으로는 배지 전체 중량에 대하여 0.001 내지 10%의 범위 내에서 있으면 좋고, 0.5 내지 10%의 범위 내인 것이 좋다. 또한, 이들 전구체를 유일한 탄소원으로 하여 지질 생산균을 배양하여도 된다.

배양 조건도 특히 한정되는 것이 아니며, 배양하고자 하는 균주의 종류에 따라 적당히 설정하면 된다. 예를 들면, 배양 온도는 일반적으로는 5 내지 40℃의 범위 내이면 좋고, 20 내지 30℃의 범위 내가 좋다. 또한, 먼저 20 내지 30℃의 범위 내에서 배양하여 균체를 증식시킨 후, 5 내지 20℃의 범위 내에서 배양을 계속하여도 좋다. 이와 같이 온도 관리를 실시하고, 즉, 최초로 비교적 고온으로 배양하고, 그 후, 최초의 배양 온도보다 저온이 되는 온도 범위에서 배양하면, 생산되는 불포화 지방산 중의 고도 불포화 지방산(PUFA)의 비율을 높일 수 있다.

배지의 pH도 특히 한정되는 것은 아니지만, 일반적으로는 pH 4 내지 10의 범위 내이면 좋고, pH 5 내지 9의 범위 내인 것이 더 좋다. 배양 기간도 특히 한정되는 것은 아니지만, 통상은 2 내지 30일간의 범위 내이면 좋고, 5 내지 20일간의 범위 내가 좋고, 5 내지 15일간의 범위 내가 더 좋다. 배양 중에 배지에 실시하는 외적인 처리도 특히 한정되는 것은 아니지만, 통기 교반 배양, 진탕 배양, 정지 배양 등의 공지의 배양 방법을 적당히 선택하면 좋다.

고체 배양으로 배양하는 경우는 고형물 중량에 대하여 50 내지 100 중량%의 물을 가한 맹장지, 왕겨, 쌀겨 등을 이용하여 5 내지 40℃, 좋기로는, 상기 온도에서 3 내지 14일간 배양을 실시한다. 이 경우에 필요에 따라서 배지 중에 질소원, 무기염류, 미량 영양원을 가할 수 있다.

본 발명에 있어서는 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 생성량을 높이기 위하여, 테트라데칸, 헥사데칸 등의 탄화수소, 테트라데칸산, 헥사 데칸산 등의 지방산 또는 그 염(예를 들면, 나트륨염, 칼륨 염 등) 및 에스테르, 또는 상기 지방산이 구성 성분으로서 함유되는 유지(예를 들면, 야자유, 팜 핵유) 등을 기질로서 첨가할 수 있다.

배양 조건도 특히 한정되는 것은 아니며, 배양하고자 하는 균주의 종류에 따라 적절하게 설정하면 된다. 배양 중에 배지에 실시하는 외적인 처리도 특히 한정되는 것은 아니며, 통기 교반 배양, 진탕 배양, 정치 배양 등의 공지의 배양 방법을 적당히 선택하면 된다. 고체 배양으로 배양할 수도 있다.

본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 구성하는 PUFA는 탄소수가 18개 이상이고, 이중 결합이 2개 이상인 지방산이면 좋다. 구체적으로는, 예를 들면, 에이코사디엔산; 디호모- γ -리놀렌산, 미드산 등의 에이코사트리엔산; 아라키돈산(AA) 등의 에이코사테트라엔산; 다가 불포화 지방산; 도코사디엔산; 도코사트리엔산; 도코사테트라엔산; 도코사펜타엔산; 도코사헥사엔산(DHA); 테트라코사디엔산; 테트라코사트리엔산; 테트라코사테트라엔산; 테트라코사펜타엔산; 테트라코사헥사엔산 등을 들 수 있다. 상기 PUFA 중에서는 아라키돈산(AA)이 더 바람직하게 사용된다.

상기 PUFA에 있어서는 구조 중에 함유되는 탄소-탄소 이중 결합 구조($-C=C-$) 중에서, 적어도 1개가 공역 이중 결합으로 되어 있어도 좋다. 이 공역 이중 결합은 카르보닐기($C=O$)와 공역인 것이어도 좋고, 서로 인접하는 탄소-탄소 이중 결합끼리 공역인 것이어도 좋다.

상기 지질 생산균이 생산하는 총 트리글리세라이드에서 차지하는 목적으로 하는 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 비율은 특히 한정되는 것은 아니지만, 30 중량% 이상인 것이 좋고, 33 중량% 이상이면 더 좋고, 45 중량% 이상이면 더 좋다. 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드가 트리아라키도노일 글리세롤인 경우, 총 트리글리세라이드에서 차지하는 트리아라키도노일 글리세롤의 비율은 특히 한정되는 것은 아니지만, 30 중량% 이상인 것이 좋고, 33 중량% 이상이면 더 좋고, 45 중량% 이상이면 더 좋다.

본 발명에서는 상기 지질 생산균 배양 공정에 의하여 집균된 균체에 대하여, 유지 추출 공정을 실시한다. 유지 추출 공정에서는 집균한 상태 그대로의 균체, 즉, 생균으로 사용할 수 있고, 멸균 처리하여 사용할 수도 있다. 또한, 집균 하지 않고 배양액 그대로 처리하여도 좋다. 집균한 균체는 임의의 형상으로 가공하여 사용하여도 된다. 균체의 집균 방법도 특히 한정되는 것은 아니지만, 배양한 균체가 소량의 경우에는 일반적인 원심 분리기를 사용하여 원심 분리하면 좋다. 대량인 경우에는 연속 원심 분리에 의하여 분리하는 것이 바람직하지만, 이것에 막 등에 의한 여과를 조합하여도 된다.

또한, 집균한 균체는 습균체 그대로이어도 좋고, 습균체를 건조시킨 건조균체로서 사용하여도 좋다. 특히 본 발명에서는 건조 균체를 사용하는 것이 좋다. 이에 의하여, 효율적으로 유지를 추출할 수 있다. 습균체의 건조 방법은 특히 한정되는 것이 아니며, 송풍, 열처리, 감압 처리, 동결 건조 등의 공지의 건조 처리를 들 수 있다.

상기 유지 추출 공정에서는 균체로부터 유지를 추출하는 방법은 특히 한정되는 것이 아니며, 공지의 추출 방법을 사용할 수 있다. 구체적으로는, 가압에 의한 압착 추출, 열수나 스팀을 이용한 렌더링에 의한 추출, 각종 추출매에 의한 추출, 초임계 탄산 가스의 적어도 어느 하나를 들 수 있다.

상기 가압에 의한 압착 추출로서는, 원료에 압력을 가하여 균체 내의 유분을 짜는 방법이면 특히 한정되는 것은 아니지만, 구체적으로는, 예를 들면, 배치식의 유압 프레스, 연속식 압착기 등의 장치를 사용하는 방법을 들 수 있다.

상기 렌더링에 의한 추출로서는, 건식 또는 습식의 어느 것이어도 좋고, 특히 한정되는 것은 아니지만, 구체적으로는, 직화에 의한 건식법, 오토클레이브에 의한 스팀 렌더링(습식법) 등을 들 수 있다.

건식법에 대하여, 구체적으로 설명하면, 예를 들면, 균체를 직화나 자켓 증기 가열 등에 의하여 유지를 용출시킨다. 또한, 스팀 렌더링에 대하여 구체적으로 설명하면, 균체에 가열 증기를 불어넣어 가열 및 교반하면, 유분을 수분, 단백질 등과 함께 에멀전의 형태로 얻게 된다. 이것을 원심분리기에 의하여 폐수를 분리하고, 필요하면 여과하여 원유를 얻는다. 스팀 렌더링의 조건으로서는, 특히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 3 내지 4 kg/cm²의 가열 증기로 4 내지 6시간 용출시키는 조건을 들 수 있다.

상기 추출매에 의한 추출로서는, 사용되는 추출매는 특히 한정되는 것은 아니지만, 일반적으로는 지방족계 유기용매 및 물의 적어도 어느 하나의 추출액, 또는 초임계 탄산 가스를 들 수 있다. 상기 추출액 중에서, 지방족 유기용매로서는, 구체적

으로는, 예를 들면, 헥산, 석유 에테르 (펜탄 및 헥산을 주성분으로 하는 유기용매) 등의 포화 탄화 수소; 아세톤 등의 케톤류; 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 알코올류; 초산에틸 등의 에스테르류; 클로로포름, 디클로로메탄 등의 할로겐화 탄화수소; 아세트니트릴 등의 시안화탄화수소; 디에틸 에테르 등의 에테르류 등을 들 수 있다.

상기 추출액 중에서, 물은 공지의 용질을 용해시킨 수용액으로서 사용하여도 된다. 이들 추출액은 1 종류만을 사용하여도 좋고, 2 종류 이상을 적당히 선택하여 사용하여도 된다. 상기 추출액 중에서도, 트리글리세라이드 등의 유지를 효율적으로 추출하기 위하여는 헥산이나 석유 에테르 등의 포화 탄화수소를 사용하는 것이 좋고, 헥산이 더 좋다.

상기 추출매에 의한 추출 처리는 배치식으로 실시하여도 좋고 연속식으로 실시하여도 좋다. 또한, 추출매에 의한 추출의 조건도 특히 한정되는 것은 아니며, 추출하고자 하는 트리글리세라이드 등의 유지의 종류나, 균체의 양 (체적이나 중량)에 따라 적절한 온도, 적절한 추출매의 양, 적절한 시간에 추출하면 좋다. 추출시에는 균체를 추출매에 분산시킨 후에, 부드럽게 교반하는 것이 좋다. 이것에 의하여 효율적인 추출이 가능하게 된다.

상기 유지 추출 공정에 의하여 추출된 유지를 그대로 사용할 수도 있고, 더 정제하여 트리글리세라이드 함량을 높일 수도 있다. 정제 방법은 일반적인 유지 정제에 사용하는 방법이면 특히 한정되는 것이 아니고, 탈검, 탈산, 탈색, 탈취, 여과, 윈터링, 분자 증류, 수증기 증류 등을 들 수 있다. 이들 처리는 단독으로 하여도 좋고, 복수를 조합하여 실시하여도 좋다.

이와 같이 하여, 목적으로 하는 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 비율이 높은 트리글리세라이드를 얻을 수 있으나, 목적으로 하는 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 비율을 더 높이는 것도 가능하다. 방법은 특히 한정되는 것은 아니지만, 컬럼 크리마토그래피나, 요소 포집, 분자 증류 등을 들 수 있다.

본 발명의 이용 방법은 특히 한정되는 것은 아니지만, 대표적인 것으로서는 본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 효소 반응의 기질 (원료)로서 사용하는 용도를 들 수 있다.

또 하나의 기질은 특히 한정되는 것은 아니지만, 트리글리세라이드, 디글리세라이드, 모노글리세라이드, 유리지방산, 지방산 알코올 에스테르 등을 사용할 수 있다. 좋기로는 동식물 유지, 미생물 유지, 미세 해초류 유지, 중쇄지방산 트리글리세라이드, 탄소수가 2 내지 24인 지방산, 탄소수가 2 내지 24인 지방산의 알코올 에스테르가 사용된다. 더 좋기로는, 트리카프로일 글리세롤, 카프릴산, 카프릴산에틸이 사용되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

효소 반응은 특히 한정되는 것이 아니며, 어떠한 반응이어도 무방하지만, 대표적으로는 리파제 반응, 포스포리파제 반응, 에스테라제 반응 등을 들 수 있다. 반응에 의하여 얻게 되는 생성물은 기능성 유지나 유리지방산 등이고, 기능성 유지는 특히 한정되는 것은 아니지만, 대표적으로는 2위에만 고도 불포화 지방산이 결합된 구조 지질, 1, 3위에만 고도 불포화 지방산이 결합된 구조 지질, 고도 불포화 지방산과 중쇄지방산으로 이루어지는 구조 지질 등을 들 수 있다. 좋기로는, 1, 3위에 카프릴산, 2위에 PUFA이 결합된 구조 지질을 들 수 있고, 더 좋기로는, 1, 3위에 카프릴산, 2위에 아라키돈산 또는 에이코사트리엔산 또는 다가 불포화 지방산 또는 도코사헥사엔산이 결합된 구조 지질을 들 수 있다. 반응에 의하여 얻게 되는 유리지방산으로서는, 본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드에서 유도되는 순도가 높은 고도 불포화 지방산을 들 수 있다.

또한, 본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 보급하기 위한 영양 조성물로서 사용하는 용도도 들 수 있다. 영양 조성물의 사용 대상이 되는 생물은 특히 한정되는 것이 아니며, 어떠한 생물이어도 무방하나, 대표적인 것은 사람이고, 그 이외에는 가축 동물이나 실험 동물 등을 들 수 있다. 영양 조성물은 어떠한 형태로도 섭취할 수 있으나, 경구 섭취하는 방법이 가장 좋다. 따라서, 본 발명에는 상기 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 함유하는 식품도 포함된다.

본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드에는 기능성을 향상시키기 위하여 각종 첨가제를 가할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들면, 스테롤, 스테롤 에스테르, 당지질, 스펅고 지질, 왁스, 색소, 카르테노이드, 토코페롤류, 비타민 E, 도코트리엔올, 세사민, 세사미놀, 세사몰, 아스타크산틴, 아스타크산틴 에스테르, 스테롤류, 카로틴류 등을 들 수 있지만, 특히 것은 아니다. 본 발명에 관한 지질 조성물은 영양 조성물로서 식품 등에 이용할 수 있기 때문에, 식품에 첨가 가능한 첨가제는 모두 첨가할 수 있다.

본 발명에 관한 식품은 본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 함유하고 있으면 좋기 때문에, 그 종류는 특히 한정되는 것은 아니다. 구체적으로는, 빵, 화과자·양과자 (빙과 등도 포함한다), 반찬류, 유제품, 시리얼 식품, 두부·유부류, 면류, 도시락류, 조미료, 소맥분이나 식육 등의 농산 가공품, 장기 보존식품 (통조림, 냉동식품,

레토르트 식품 등), 청량 음료수, 우유 음료, 두유, 포타주 스프 등의 스프류 등의 일반 식품을 들 수 있지만, 특히 한정되는 것은 아니다. 상기 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드의 이들 일반 식품에 대한 첨가 방법은 특히 한정되는 것은 아니며, 일반 식품의 종류에 따라 공지의 적절한 방법을 채용할 수 있다.

또한, 본 발명에 관한 식품에는 건강식품이나 영양 식품 등과 같이, 일반 식품이 아닌 특정 용도에 사용되는 기능성 식품을 들 수 있다. 구체적으로는, 각종 서플리먼트 등의 영양 보조 식품, 특정 보건용 식품 등을 들 수 있다. 본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드는 서플리먼트 등의 경우에는 적당한 형상으로 가공하는 것만으로 그대로 사용할 수 있다. 이 때의 가공 형상은 특히 한정되는 것은 아니다. 구체적으로는, 본 발명에 관한 지질 조성물 (또는 식품)은 액상 또는 분말 형태이어도 좋고, 캡슐 형태이어도 좋으며, 정제나 타블렛 형태이어도 좋다. 또한, 일반적인 유지 계 식품에의 용해, 분말화 등 일반적인 유지에 대하여 사용할 수 있는 기술은 모두 적용하는 것이 가능하다.

또한, 본 발명은 상기와 같은 식품 분야뿐만 아니라, 의약품 분야에도 이용할 수 있다. 즉, 본 발명에 관한 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드는 의약품으로서 이용되어도 좋다. 의약품으로서 이용하는 경우의 구체적인 예도 특히 한정되지 않으며, 그 목적에 따라 공지의 기술을 이용하면 된다.

실시예

이하, 본 발명을 실시예에 기초하여 더 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이것에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*) SAM 2268의 변이 처리에 의한 트리아라키도노일 글리세롤 고생산 주의 취득

모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*) SAM 2268 (FERMP-17762)를 차펙(Czapek) 한천 배지 (0.2% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 0.01% FeSO₄·7H₂O, 3% 수크로스, 2% 한천, pH 6.0) 300 ml를 포함하는 대형 슬랜트병에 식균하고, 28℃에서 2 주간 배양하였다.

배양 후, 멸균수 50 ml를 첨가하고 흔들어서 섞은 후, 4중 거즈로 여과하고, 8,000×g로 10 분간 원심한 후, 50 mM 트리스 완충 용액 (pH 7.5)에 현탁하여 포자 현탁액을 조제하였다. 1×10⁶/ml의 포자 현탁액 1.5 ml에, 0.5% NTG (N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아디닌) 용액 0.5 ml를 가하고, 28℃에서 15분간 변이 처리를 실시하였다. 10% Na₂S₂O₃를 3 ml 가하고 5,500×g로 10분간 원심한 후, 멸균수로 세정하고, NTG 처리 포자 현탁액을 얻었다.

NTG 처리 포자 현탁액을 GY 한천 배지 (1% 글루코스, 0.5% 효모 엑기스, 0.005% 트리톤 X-100, 1.5% 한천, pH 6.0)에 도포하고, 28℃에서 생육한 콜로니를 다른 GY 한천 배지로 옮겼다. 생육한 균체의 일부를 건조시켜, 통상의 방법에 따라, 트리글리세라이드를 헥산으로 추출하고, 헥산을 유거하여 얻은 트리글리세라이드를 고속 액체 크로마토그래피로 분석하였다. 약 3,000개의 콜로니를 조사한 결과, 총 트리글리세라이드 중에서 차지하는 트리아라키도노일 글리세롤의 비율이 높아진 변이주 3주 (#1주, #2주 및 #3주)를 얻었다.

#1주, #2주, #3주의 총 트리글리세라이드 중의 트리아라키도노일 글리세롤의 비율 (중량%)은 각각, 17.0%, 15.1%, 12.2%이었지만, 그 밖의 콜로니에서는 모두, 8% 이하이었다. 또한, 이 #1주, #2주, #3주의 총 트리글리세라이드 중의 트리아라키도노일 글리세롤의 비율 (중량%)은 통상의 방법에 따라, 분석용 칼럼으로서 COSMOSIL 5C18-MA 칼럼 (4.6×250 mm)을 사용하여 아세트니트릴/아세톤 (1:1)을 이동상(移動相) (1.0 ml/min)으로 하여 시차 굴절 검출계로 검출하였다.

실시예 2. 트리아라키도노일 글리세롤 생산능의 비교

50 ml 엘렌마이어 플라스크에 넣은 액체 배지 10 ml (글루코스 2%, 효모 엑기스 1%, 팔미트레인산 1% 또는 없음)에, 아래에 개시하는 모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*) 3주의 백금 루프를 각각 식균하고, 28℃, 120 rpm로 7일간 진탕 배양하였다.

(1) *Mortierella alpina* #1 (실시예 1에서 얻은 변이주)

(2) *Mortierella alpina* SAM 2268

(3) *Mortierella alpina* IF0 8568

배양 후, 균체를 여과에 의하여 모아서, 건조시켰다. 생육한 균체의 일부를 건조시켜, 통상의 방법에 따라, 트리글리세라이드를 헥산으로 추출하고, 헥산을 유거하여 트리글리세라이드를 얻었다. 얻은 트리글리세라이드를 액체 고속 크로마토그래피에 제공하고, 트리글리세라이드 분자종을 분석함으로써 트리아라키도노일 글리세롤 (tri-AA)의 비율을 구하였다. 또한, 생육한 균체의 일부를 건조시켜, 통상의 방법에 따라, 염산메탄올로 균체 내의 지방산을 메틸에스테르화한 후 헥산으로 추출하고, 헥산을 유거하여 지방산 메틸 에스테르를 얻었다. 얻은 지방산 메틸 에스테르를 가스 크로마토그래피에 제공하고, 총 지방산 중의 아라키돈산의 비율을 구하였다. 결과를 표 1에 나타낸다.

[표 1]
트리아라키도노일 글리세롤 (tri-AA)의 생산성

균주	#1	SAM 2268	IF0 8568
총 트리글리세라이드 중 tri-AA의 비율 (중량%)	33.3	10.2	18.5
총 지방산 중의 아라키돈산의 비율 (중량%)	48.2	38.8	45.6

신주(新株)인 SAM 2268의 tri-AA의 비율은 10.2%이었지만, 변이주 #1의 tri-AA의 비율은 33.3%에 달했다. 또한, 총 지방산 중의 아라키돈산의 비율이 동일한 정도인 IF0의 tri-AA의 비율은 18.5% 밖에 되지 않았다.

실시에 3. 트리아라키도노일 글리세롤 생산의 경시 변화

50 ml 엘렌마이어 플라스크에 넣은 액체 배지 10 ml (글루코스 2%, 효모 엑기스 1%, 팔미트레인산 1% 또는 없음)에, 이하에 개시하는 모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*) #1의 백금 루프를 식균하고, 28℃, 120 rpm로 6, 8, 10일간 진탕 배양하였다. 배양 후, 균체를 여과에 의하여 모아 실시예 2와 마찬가지로 트리아라키도노일 글리세롤 (tri-AA)의 비율 및 총 지방산 중의 아라키돈산의 비율을 구하였다. 결과를 표 2에 나타낸다.

[표 2]
#1 주의 트리아라키도노일 글리세롤 (tri-AA) 생산의 경시 변화

배양 일수 (일)	6	8	10
총 트리글리세라이드 중의 tri-AA의 비율 (중량%)	30.1	45.9	60.4
총 지방산 중의 아라키돈산의 비율 (중량%)	45.6	53.2	62.2

tri-AA의 비율은 6일째에는 30.1%이었지만, 8일째에는 45.9%, 10일째에는 62.5%에 달했다.

실시에 4. 트리아라키도노일 글리세롤의 대량생산

모르티에렐라 알피나 (*Mortierella alpina*) #1의 백금 루프 중 배지 A 100 ml에 접종하고, 왕복 진탕 100 rpm, 28℃의 조건에서 3일간 전(前) 배양하였다. 다음으로, 용적 10 l의 통기 교반 배양조에 5 l의 본배지 D를 넣고 멸균하고, 거기에 상기 전(前) 배양액을 전량 접종하고, 26℃, 환기량 1 vvm, 교반 회전수 300 rpm로, 10일간 배양하였다. 글루코스 소비에 따라서 적절하게 1% 상당의 글루코스를 유하(流下)하였다. 얻은 배양균체를 멸균하고, 배지를 제거한 후에 건조시켜, 건조 균체 75 g를 얻었다.

이 건조균체 75 g에 헥산 225 ml를 가하고 상온에서 3시간 부드럽게 교반한 후, 여과하여 헥산층을 얻었다. 그 후, 건조균체에 대하여 다시 헥산 150 ml를 가하고 상온에서 3시간 부드럽게 교반한 후, 여과하여 헥산층을 얻었다. 헥산층을 합한 후 헥산을 유거하여, 조(粗)추출유 35 g를 얻었다. 또한, 활성 백토 처리를 하고, 트리글리세라이드 33 g를 얻었다. 얻은 트

리글리세라이드의 일부에 대하여, 실시예 2와 같이 트리아라키도노일 글리세롤 (tri-AA)의 비율 및 총지방산 중의 아라키돈산의 비율을 구하였더니, 각각, 55.0%, 59.7%이었다. 얻은 트리글리세라이드의 일부에 대하여는 실시예 1에 나타난 고속 액체 크로마토그래피로 tri-AA를 분리함으로써, 10 g의 tri-AA를 얻었다.

실시예 5. 트리아라키도노일 글리세롤을 이용한 리파제 반응

이온 교환 수지 담체 (Dowex MARATHON WBA: 다우 케미컬사 제품, 상표) 10 g을, *Rhizopus delemar* 리파제 12.5% 수용액 (다리파제 분말: 타나베 제약 (주) 제품) 8 ml에 현탁하고, 감압하에서 건조시켜 고정화 리파제를 얻었다.

다음으로, 카프릴산트리글리세라이드 (MCT) 8 g, 상기 고정화 리파아제 600 mg, 물 240 μ l을 30°C에서 48시간, 교반 (130 rpm)하면서 반응시켰다. 반응 종료후, 반응액을 없애고, 활성화된 고정화 효소를 얻었다.

실시예 4에서 얻은 트리아라키도노일 글리세롤 (tri-AA) 1 g, 카프릴산 2 g, 상기 고정화 효소 (*Rhizopus delemar* 리파제, 담체: Dowex MARATHON WBA) 150 mg를 30°C에서 48시간, 교반 (130rpm)하여 반응시켰다. 고정화 효소를 없앤 반응 유지 중에는 tri-AA의 1, 3-위로부터 잘라낸 아라키돈산과 과잉 반응 기질인 카프릴산이 존재하고 있는데, 알칼리 추출에 의하여 이들 지방산을 제거함으로써 1회 처리 유지를 얻었다. 얻은 1회 처리 유지 1 g, 카프릴산 2 g, 회수한 고정화 효소 150 mg을 30 °C에서 48시간, 교반 (130 rpm)하여 반응시켰다. 먼저와 동일한 처리에 의하여 카프릴산 등을 제거함으로써 2회 처리 유지 0.8 g을 얻었다. 이 2회 처리 유지는 96 몰%의 1, 3-카프릴로일-2-아라키도노일 글리세롤이었다.

실시예 6. 트리아라키도노일 글리세롤을 배합한 캡셀의 조제

젤라틴 (닛타 젤라틴사 제품)과 식품 첨가용 글리세린 (가오사 제품)을 중량비 100:35가 되도록 혼합하여 물을 가하고, 50 내지 60°C의 온도 범위에서 용해시키고, 점도 2000 cp의 젤라틴 피막을 조제하였다. 다음으로, 실시예 4에서 얻은 트리아라키도노일 글리세롤 (tri-AA)를 55.0% 함유하는 트리글리세라이드와 비타민 E 오일 (에이자이사 제품)를 중량비 100:0.05가 되도록 혼합하고, 내용물을 조제하였다.

이들을 사용하여, 통상의 방법에 의하여 캡셀 성형 및 건조를 실시하고, 캡셀 한 개당 180 mg의 내용물을 함유하는 소프트 캡셀을 제조하였다. 이 소프트 카프셀은 모두 경구 섭취에 매우 적합한 것이었다.

실시예 7. 트리아라키도노일 글리세롤을 배합한 음료의 조제

실시예 4에서 얻은 트리아라키도노일 글리세롤 (tri-AA)를 55.0%를 함유하는 트리글리세라이드와 대두 레시틴 (쓰지 제이유사 제품)를 중량비 9:1로 혼합하고, 수중에 균일하게 분산하여 리포솜 분산액을 얻었다. 이 리포솜 분산액을, 오렌지 주스, 탄산수, 커피 음료, 밀크, 두유, 또는 포타주 스프 음료에 대하여, 1/100 용량씩 첨가함으로써, 본 발명에 관한 식품으로서의 상기 각 음료를 조제 (제조)하였다. 이들 음료는 모두 경구 섭취에 매우 적합한 것이었다.

또한, 본 발명은 이상 실시한 각 구성에 한정되는 것이 아니며, 특허 청구의 범위에 개시한 범위에서 여러 가지 변경이 가능하고, 다른 실시 형태나 실시예에 각각 개시된 기술적 수단을 적당히 조합하여 얻게 되는 실시 형태도 본 발명의 기술적 범위에 포함된다.

산업상 이용 가능성

이상과 같이, 본 발명에서는 발효 기술에 의하여 1 종류의 PUFA 잔기 3 개로 이루어지는 트리글리세라이드를 효율적이고, 그리고 안정적으로 제조할 수 있다.

따라서, 본 발명은, 특히 기능성 식품에 관련된 산업에 넓게 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 일반 식품, 또한 의약품 등에 관련 되는 산업에도 사용할 수 있다.