

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年7月31日 (31.07.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/090989 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 7/64 (2006.01) C12N 1/14 (2006.01)
C11C 3/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/051121
- (22) 国際出願日: 2008年1月25日 (25.01.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-016498 2007年1月26日 (26.01.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人宮崎大学 (UNIVERSITY OF MIYAZAKI) [JP/JP]; 〒8892192 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 Miyazaki (JP). 日本水産株式会社 (NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒1008686 東京都千代田区大手町二丁目6番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 林 雅弘 (HAYASHI, Masahiro) [JP/JP]; 〒8892192 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 国立大学法人宮崎大学内 Miyazaki (JP). 中島 早苗 (NAKAJIMA, Sanae) [JP/JP]; 〒8892192 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 国立大学法人宮崎大学内 Miyazaki (JP). 長野 直樹 (NAGANO, Naoki) [JP/JP]; 〒8892192 宮崎県
- (74) 代理人: 須藤 阿佐子, 外(SUDO, Asako et al.); 〒1840002 東京都小金井市梶野町5-6-26 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: METHOD FOR INCREASING THE CONTENT OF DOCOSAHEXAENOIC ACID IN MATERIAL CONTAINING OIL-AND-FAT OR OIL-AND-FAT

(54) 発明の名称: 油脂含有物あるいは油脂中のドコサヘキサエン酸含有率を増加する方法

(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide an oil-and-fat having an increased docosahexaenoic acid content. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] Disclosed are: a method for producing a highly unsaturated fatty acid, which is characterized by culturing a stramenopile capable of producing the highly unsaturated fatty acid in a culture medium containing a substance which inhibits a fatty acid desaturase; a highly unsaturated fatty acid, particularly an oil-and-fat having an increased docosahexaenoic acid content, which is produced by the method; a method for enhancing the ability of producing a highly unsaturated fatty acid of a stramenopile, which is characterized by culturing the stramenopile in a culture medium containing a substance which inhibits a fatty acid desaturase; and a stramenopile having an enhanced ability of producing a highly unsaturated fatty acid, which is produced by the method. Particularly, in the method for producing the highly unsaturated fatty acid, the method for enhancing the ability of producing the highly unsaturated fatty acid, and the stramenopile having an enhanced ability of producing the highly unsaturated fatty acid, the stramenopile may be a microorganism belonging to the class *Labyrinthulomycetes*.

(57) 要約: 課題: ドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂を提供すること。解決手段: 高度不飽和脂肪酸産生能を有するストラメノパイルを、脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を含有する培地で培養することを特徴とする、高度不飽和脂肪酸の製造方法、該方法により得られた高度不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸含有率が増加された油脂。ストラメノパイルを、脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を含有する培地で培養することを特徴とする、ストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能の増強方法、該方法により得られた高度不飽和脂肪酸産生能が増強されたストラメノパイル。特に該ストラメノパイルがラビリンチュラ綱に分類される微生物である、該高度不飽和脂肪酸の製造方法、該高度不飽和脂肪酸産生能の増強方法、および該高度不飽和脂肪酸産生能が増強されたストラメノパイル。

WO 2008/090989 A1

明 細 書

油脂含有物あるいは油脂中のドコサヘキサエン酸含有率を増加する方法 技術分野

[0001] 本発明は、高度不飽和脂肪酸産生能を有するストラメノパイルを、脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を含有する培地で培養することを特徴とする、高度不飽和脂肪酸の製造方法、および該方法により得られた高度不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂に関する。また、ストラメノパイルを、脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を含有する培地で培養することを特徴とする、ストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能の増強方法、および該方法により得られた高度不飽和脂肪酸産生能が増強されたストラメノパイルに関する。

背景技術

[0002] 従来、医薬品あるいは健康食品の素材として魚油に含まれる高度不飽和脂肪酸が注目されており、魚油由来のイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)等が多数上市されている。前述の通り、これらの高度不飽和脂肪酸は主に魚油を主原料としているが、原料の魚類は天然資源であり入手や価格が不安定という側面を有しており、魚油に変わるものとして近年微生物による高度不飽和脂肪酸の生産が行われている。例えば、渦鞭毛藻 Crypthecodinium cohnii によってDHAを生産する方法(非特許文献1)、あるいはモルティエセラ属糸状菌がアラキドン酸高含有油脂を生産する方法(特許文献1、2)等が知られており、これらは既に実用化されている。

[0003] 近年、ストラメノパイル(鞭毛に中空の小毛を持つ単細胞真核生物の一群)であるラビリンチュラに、高度不飽和脂肪酸が蓄積されることが知られている(非特許文献2)。このような中でラビリンチュラによるDHA生産が種々検討され、シゾキトリウム属(非特許文献3)あるいはウルケニア属(非特許文献4)に属する微生物等で実用化されている。しかしながら、脂質蓄積能や総脂肪酸中のDHA含有率に限界があり、微生物で生産したDHAのコストは、魚油由来のDHAと比較して高価になってしまう問題がある。

[0004] 特許文献1:特開昭63-44891号公報

特許文献2:特開昭63-12290号公報

非特許文献1:ツヴィ・コーエン(Zvi Cohen)ら編,「シングル セル オイルズ(Single Cell Oils)」, (米国), エイオーシーエス・プレス(AOCSPress), 2005年, p. 86-98

非特許文献2:中原(Nakahara)ら, ジャーナル・オブ・アメリカン・オイル・ケミスト・ソサエティー (Journal of the American Oil Chemists' Society), 1996年, 第73巻, p. 1421-1426

非特許文献3:ツヴィ・コーエン(Zvi Cohen)ら編,「シングル セル オイルズ(Single Cell Oils)」, (米国), エイオーシーエス・プレス(AOCSPress), 2005年, p. 36-52

非特許文献4:ツヴィ・コーエン(Zvi Cohen)ら編,「シングル セル オイルズ(Single Cell Oils)」, (米国), エイオーシーエス・プレス(AOCSPress), 2005年, p. 99-106

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 上述の通り細胞中の脂質蓄積能についてはその向上に限界があり、高度不飽和脂肪酸の微生物生産において画期的なコストダウンを図る方法の一つとして、総脂質中の高度不飽和脂肪酸の含有率を向上させることが必須と考えられる。本発明は、このような事情のもとで、ストラメノパイルを培養して高度不飽和脂肪酸を生産するに当り、高度不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂を得るための改良技術を提供することを目的としてなされたものである。

本発明は、高度不飽和脂肪酸産生能を有するストラメノパイルを用いる生産効率を高め、高収率で高度不飽和脂肪を製造する方法、および该方法により得られた高度不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂を提供することを課題とする。また、ストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能の増強方法、および该方法により得られた高度不飽和脂肪酸産生能が増強されたストラメノパイルを提供することを課題とする。特に該ストラメノパイルがラビリンチュラ綱に分類される微生物である、該高度不飽和脂肪酸の製造方法、該方法により得られたドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂、該高度不飽和脂肪酸産生能の増強方法、および該高度不飽和脂肪酸産生能が増強されたストラメノパイルを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、ストラメノパイルを培養して、高度不飽和脂肪酸を生産させる際に、培地に脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を添加することにより、従来の該物質を添加しない培地の場合に比べ、ドコサヘキサエン酸の生産性が向上することを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

[0007] 本発明は、以下の(1)～(8)の高度不飽和脂肪酸の製造方法を要旨とする。

(1) 高度不飽和脂肪酸産生能を有するストラメノパイルを脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を添加した培地を用いて培養することを特徴とする高度不飽和脂肪酸の製造方法。

(2) ストラメノパイルがラビリンチュラ綱 (Labyrinthulea) に分類される微生物である、(1)記載の製造方法。

(3) ラビリンチュラ綱に分類される微生物がラビリンチュラ属 (Labyrinthula)、アルトルニア属 (Althornia)、アプラノキトリウム属 (Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属 (Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属 (Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属 (Schizochytrium)、ヤブレッツボカビ属 (Thraustochytrium)、またはウルケニア属 (Ulkenia) に属する微生物である、(2)記載の製造方法。

(4) 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質が $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素および／または $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質である、(1)ないし(3)のいずれかに記載の製造方法。

(5) $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質がセサミンである、(4)記載の製造方法。

(6) $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質がクルクミンである、(4)記載の製造方法。

(7) $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素および／または $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を培地中に100ng/ml～100 μ g/ml含有する培地を用いる、(1)ないし(6)のいずれかに記載の製造方法。

(8) 高度不飽和脂肪酸がドコサヘキサエン酸である、(1)ないし(7)のいずれかに記載の製造方法。

[0008] また、本発明は、以下の(9)～(16)の油脂含有物あるいは油脂中のドコサヘキサ

エン酸含有率を増加する方法を要旨とする。

(9)微生物を用いて長鎖高度不飽和脂肪酸を含む油脂含有物あるいは長鎖高度不飽和脂肪酸を含む油脂を製造するに際し、微生物として高度不飽和脂肪酸産生能を有するストラメノパイルを用い、該ストラメノパイルを、培地に脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を添加して培養し、ストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能を増強することを特徴とする、油脂含有物あるいは油脂中のドコサヘキサエン酸含有率を増加する方法。

(10)ストラメノパイルがラビリンチュラ綱(Labyrinthulea)に分類される微生物である、(9)記載の方法。

(11)ラビリンチュラ綱に分類される微生物がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、またはウルケニア属(Ulkenia)に属する微生物である、(10)記載の方法。

(12)脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質が $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素および／または $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質である、(9)ないし(11)のいずれかに記載の方法。

(13) $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質がセサミンである、(12)記載の方法。

(14) $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質がクルクミンである、(12)記載の方法。

(15) $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素および／または $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を培地中に100ng/ml～100 μ g/ml含有する培地を用いる、(9)ないし(14)のいずれかに記載の製造方法。

(16)高度不飽和脂肪酸がドコサヘキサエン酸である、(9)ないし(15)のいずれかに記載の製造方法。

[0009] また、本発明は、以下の(17)のドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂を要旨とする。

(17) (9)ないし(16)のいずれかに記載の製造方法により得られた、ドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂。

[0010] また、本発明は、以下の(18)～(21)の高度不飽和脂肪酸産生能が増強されたストラメノパイルを要旨とする。

(18)ストラメノパイルを脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を含有する培地で培養するストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能の増強方法により得られた高度不飽和脂肪酸産生能が増強されたストラメノパイル。

(19)ストラメノパイルがラビリンチュラ綱(Labrynthulea)に分類される微生物である、(18)記載のストラメノパイル。

(20)ラビリンチュラ綱に分類される微生物がラビリンチュラ属(Labrynthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Jap onochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labrynthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochy trium)、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、またはウルケニア属(Ulkenia)に属する微生物である、(19)記載のストラメノパイル。

(21)高度不飽和脂肪酸産生能がドコサヘキサエン酸産生能である、(18)ないし(20)のいずれかに記載のストラメノパイル。

発明の効果

[0011] 本発明により、医薬品あるいは食品素材として用いられる高度不飽和脂肪酸を、効率的に生産する方法、ならびに、高度不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂を提供することができる。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 微生物を用いて長鎖高度不飽和脂肪酸を含む油脂含有物あるいは長鎖高度不飽和脂肪酸を含む油脂を製造するに際し、微生物として高度不飽和脂肪酸産生能を有するストラメノパイルを用いる。すなわち、本発明の高度不飽和脂肪酸の製造方法は、長鎖高度不飽和脂肪酸を含む油脂含有物あるいは長鎖高度不飽和脂肪酸を含む油脂を製造する方法である。

本発明の高度不飽和脂肪酸の製造方法は、高度不飽和脂肪酸産生能を有するストラメノパイルを、脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を含有する培地で培養

することを特徴とする。ストラメノパイルとは、鞭毛に中空の小毛を持つ単細胞真核生物の一群である。本発明におけるストラメノパイルとは、高度不飽和脂肪酸を産生する能力を有するものであり、特に好ましくはラビリンチュラ綱に分類される微生物であり、特に好ましくはラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、ヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)、またはウルケニア属(Ulkenia)に属する微生物またはそれらの混合物から選択される。微生物は、上述の任意のものに由来する突然変異株、ならびにそれらの混合物から成る群より選択される。

なお、本発明における前記微生物の分類は、「海洋と生物」、生物研究社、2001年、第23巻、第1号、p. 9に記載された分類体系にしたがっている。

[0013] このストラメノパイルを通常用いられる固体培地あるいは液体培地等で、脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質の存在下にて、常法により培養する。この時、用いられる培地としては、例えば炭素源としてグルコース、フルクトース、サッカロース、デンプン、グリセリン等、また窒素源として酵母エキス、コーンステーパーリカー、ポリペプトン、グルタミン酸ナトリウム、尿素、酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム等、また無機塩としてリン酸カリウム等、その他必要な成分を適宜組み合わせた培地であり、ラビリンチュラ類を培養するために通常用いられるものであれば特に限定されないが、特に好ましくは酵母エキス・グルコース寒天培地(GY培地)が用いられる。

培地は調製後、pHを3.0～8.0の範囲内に調整した後、オートクレーブ等により殺菌して用いる。培養は、10～40℃、好ましくは15～35℃にて、1～14日間、通気攪拌培養、振とう培養、あるいは静置培養で行えば良い。

[0014] また、脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質としては、好ましくは $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素および／または $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質として用いられるものであれば特に限定されないが、特に好ましくはセサミンまたはクルクミンが用いられ、またこれらを組み合わせても用いても良い。ここで、本発明において $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素(delta-5-desaturase)および／または $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素(delta-6

-desaturase)を阻害する物質とは、各種脂肪酸のカルボキシル末端から数えて5または6位の位置に二重結合を導入する能力を有する酵素、すなわち Δ 5脂肪酸不飽和化酵素および/または Δ 6脂肪酸不飽和化酵素の活性を阻害する物質を指す。

[0015] また、 Δ 5脂肪酸不飽和化酵素および/または Δ 6脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質は、培地に10ng/ml~1g/ml、好ましくは100ng~100 μ g/ml添加する。

[0016] ストラメノパイルを培地で生育し、その培地から得た微生物細胞を処理し、細胞内脂質(長鎖高度不飽和脂肪酸を含む油脂含有物あるいは長鎖高度不飽和脂肪酸)を放出させ、その放出された細胞内脂質を含む培地から脂質を回収する。すなわち、このようにして培養したストラメノパイルを遠心分離等回収し、細胞を破碎し定法に従い適当な有機溶媒を用いて細胞内の脂肪酸を抽出することにより、高度不飽和脂肪酸、特に好ましくはドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂を得ることができる。ストラメノパイルを、培地に脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を添加して培養することで、ストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能を増強することができ、油脂含有物あるいは油脂中のドコサヘキサエン酸含有率を増加する。よって、得られた油脂は高度不飽和脂肪酸、特に好ましくはドコサヘキサエン酸含有率の高い油脂である。

[0017] ストラメノパイルを培養して、高度不飽和脂肪酸を生産させる際に、培地に脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を添加することにより、従来の該物質を添加しない培地の場合に比べ、ドコサヘキサエン酸の生産性が向上する。ストラメノパイルを栄養源および海水を含む基本培地に脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を添加して培養して、ストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能を増強することができる。すなわち、ストラメノパイルを脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を含有する培地で培養するストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能の増強方法により得られた高度不飽和脂肪酸産生能が増強されたストラメノパイルである。

[0018] 以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。実施例で用いたラビリンチュラ綱に分類される微生物の入手方法、分離方法は周知の一般的な方法による。

入手方法:ラビリンチュラ類は、一般に海域に普遍的に生息する微生物であり、特に海洋沿岸域に生息する水草、海藻やマングローブ汽水域の落ち葉、沈殿物等か

ら分離される。

分離方法:ラビリンチュラ類は馬血清海水寒天培地、松花粉寒天培地、コレステロール寒天培地等を用いて分離される。

実施例 1

[0019] 本発明方法による高度不飽和脂肪酸の製造・1

Δ6脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質の存在下での、ラビリンチュラ綱に分類される微生物による高度不飽和脂肪酸を製造した。

すなわち、沖縄県石垣市周辺のマングローブ林、海水などから分離したラビリンチュラ綱に分類された微生物33株について、Δ6脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質としてクルクミン(ナカライテスク社製)を1 μg/ml加えたGY培地(日本水産学会誌、68巻、5号、674-678(2002)に記載の方法「3%グルコース、1%酵母エキスを含むGY培地を50%人工海水で調製しpHを6.0に調整後、液体培地あるいは1.5%寒天で平板培地として使用した。」にしたがって製造)にて28°C、4日間培養した。培養後、微生物を遠心分離(1500Xg,10min)によって回収し、細胞を超音波破碎後、クロロホルム/メタノール(2:1,V/V)で抽出し、総脂質を得た。得られた総脂質を10%塩化水素-メタノール溶液でメタノリシス後、脂肪酸組成をガスクロマトグラフィー(島津製作所社製;モデルGC-2014)によって測定した。なお、クルクミンを添加せずに前述同様に行ったものを対照とした。4株(株名 mh295, 313, 314, 375)について、脂肪酸組成のガスクロマトグラフィーのチャートから測定したドコサヘキサエン酸のピーク面積の百分率を表1に示す。

[0020] [表1]

株名	対照(%)	実施例1(%)
mh295	19.19	22.32
mh313	26.03	31.05
mh314	13.27	27.23
mh375	26.02	33.77

[0021] この結果、本実施例により得られた油脂は、対照と比較してドコサヘキサエン酸の含有率が有意に上昇した。したがって本発明は高度不飽和脂肪酸、特にドコサヘキ

サエン酸を効率的に製造する優れた方法であることが確認された。

実施例 2

[0022] 本発明方法による高度不飽和脂肪酸の製造・2

実施例1の Δ 6脂肪酸不飽和化酵素を Δ 5脂肪酸不飽和化酵素に替え、実施例1と同様にして Δ 5脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質の存在下でのラビリンチュラ綱に分類される微生物による高度不飽和脂肪酸を製造した。なお、セサミンを添加せずに前述同様に行ったものを対照とした。4株(株名mh295, 313, 314, 375)について、脂肪酸組成のガスクロマトグラフィーのチャートから測定したドコサヘキサエン酸のピーク面積の百分率を表2に示す。

[0023] [表2]

株名	対照(%)	実施例2(%)
mh295	19.19	21.47
mh313	26.03	42.32
mh314	13.27	22.31
mh375	26.02	29.96

[0024] この結果、本実施例により得られた油脂は、対照と比較してドコサヘキサエン酸の含有率が有意に上昇した。したがって本発明は高度不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸を効率的に製造する優れた方法であることが確認された。

実施例 3

[0025] 本発明方法により生産された高度不飽和脂肪酸の定量

実施例1及び2で培養された菌体から抽出した総脂質約40mgに、内部標準物質としてノナデカン酸(C19:0) 0.5mgを加え、10%塩化水素-メタノール溶液でメタノリシス後、脂肪酸組成をガスクロマトグラフィー(島津製作所社製、モデルGC-2014)によって測定した。DHAはじめ、各脂肪酸のピーク面積とC19:0のピーク面積の比から、各脂肪酸を定量した。DHAの結果を表3に示す。

[0026] [表3]

	対照(%)	対照(g/L)	実施例1(g/L)	実施例2(g/L)
mh295	19.19	0.45	0.67	0.98
mh313	26.03	0.56	0.71	1.45
mh314	13.27	0.21	0.66	0.82
mh375	26.02	0.39	1	0.64

[0027] この結果、実施例1あるいは2により得られた油脂は、対照と比較してドコサヘキサエン酸の含有量が有意に上昇した。したがって本発明は高度不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸を効率的に製造する優れた方法であることが確認された。

産業上の利用可能性

[0028] 本発明により、医薬品あるいは食品素材として用いられる高度不飽和脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸を効率的に生産する方法、およびドコサヘキサエン酸含有率が高い油脂が提供される。さらに、ストラモノパイル、特にラビリンチュラ綱に分類される微生物の高度不飽和脂肪酸産生能、特にドコサヘキサエン酸産生能を増強する方法、また高度不飽和脂肪酸産生能、特にドコサヘキサエン酸産生能が増強されたストラモノパイルが提供される。

請求の範囲

- [1] 高度不飽和脂肪酸産生能を有するストラメノパイルを脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を添加した培地を用いて培養することを特徴とする高度不飽和脂肪酸の製造方法。
- [2] ストラメノパイルがラビリンチュラ綱 (Labrynthulea) に分類される微生物である、請求項1記載の製造方法。
- [3] ラビリンチュラ綱に分類される微生物がラビリンチュラ属 (Labrynthula)、アルトルニア属 (Althornia)、アプラノキトリウム属 (Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属 (Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属 (Labrynthuloides)、シゾキトリウム属 (Schizochytrium)、ヤブレッツボカビ属 (Thraustochytrium)、またはウルケニア属 (Ulkenia) に属する微生物である、請求項2記載の製造方法。
- [4] 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質が Δ 5脂肪酸不飽和化酵素および/または Δ 6脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質である、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の製造方法。
- [5] Δ 5脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質がセサミンである、請求項4記載の製造方法。
- [6] Δ 6脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質がクルクミンである、請求項4記載の製造方法。
- [7] Δ 5脂肪酸不飽和化酵素および/または Δ 6脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を培地中に100ng/ml~100 μ g/ml含有する培地を用いる、請求項1ないし6のいずれか一項に記載の製造方法。
- [8] 高度不飽和脂肪酸がドコサヘキサエン酸である、請求項1ないし7のいずれか一項に記載の製造方法。
- [9] 微生物を用いて長鎖高度不飽和脂肪酸を含む油脂含有物あるいは長鎖高度不飽和脂肪酸を含む油脂を製造するに際し、微生物として高度不飽和脂肪酸産生能を有するストラメノパイルを用い、該ストラメノパイルを、培地に脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を添加して培養し、ストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能を増強することを特徴とする、油脂含有物あるいは油脂中のドコサヘキサエン酸含有率を増

加する方法。

- [10] ストラメノパイルがラビリンチュラ綱 (Labyrinthulea) に分類される微生物である、請求項9記載の方法。
- [11] ラビリンチュラ綱に分類される微生物がラビリンチュラ属 (Labyrinthula)、アルトルニア属 (Althornia)、アプラノキトリウム属 (Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属 (Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属 (Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属 (Schizochytrium)、ヤブレッツボカビ属 (Thraustochytrium)、またはウルケニア属 (Ulkenia) に属する微生物である、請求項10記載の方法。
- [12] 脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質が Δ 5脂肪酸不飽和化酵素および／または Δ 6脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質である、請求項9ないし11のいずれか一項に記載の方法。
- [13] Δ 5脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質がセサミンである、請求項12記載の方法。
- [14] Δ 6脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質がクルクミンである、請求項12記載の方法。
- [15] Δ 5脂肪酸不飽和化酵素および／または Δ 6脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を培地中に100ng/ml \sim 100 μ g/ml含有する培地を用いる、請求項9ないし14のいずれか一項に記載の製造方法。
- [16] 高度不飽和脂肪酸がドコサヘキサエン酸である、請求項9ないし15のいずれか一項に記載の製造方法。
- [17] 請求項9ないし16のいずれか一項に記載の製造方法により得られた、ドコサヘキサエン酸含有率の増加した油脂。
- [18] ストラメノパイルを脂肪酸不飽和化酵素を阻害する物質を含有する培地で培養するストラメノパイルの高度不飽和脂肪酸産生能の増強方法により得られた高度不飽和脂肪酸産生能が増強されたストラメノパイル。
- [19] ストラメノパイルがラビリンチュラ綱 (Labyrinthulea) に分類される微生物である、請求項18記載のストラメノパイル。
- [20] ラビリンチュラ綱に分類される微生物がラビリンチュラ属 (Labyrinthula)、アルトルニア

ア属(Althornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、ヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)、またはウルケニア属(Ulkenia)に属する微生物である、請求項19記載のストラメノパイル。

- [21] 高度不飽和脂肪酸産生能がドコサヘキサエン酸産生能である、請求項18ないし20のいずれか一項に記載のストラメノパイル。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/051121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P7/64(2006.01) i, C11C3/00(2006.01) i, C12N1/14(2006.01) i

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)
C12P7/00-7/66, C11C3/00, C12N1/14

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)
BIOSIS/WPI (DIALOG), JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2), G-Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 2006-230403 A (National University Corporation Hokkaido University), 07 September, 2006 (07.09.06), (Family: none)	<u>17</u> 1-16, 18-21
A	Sakayu SHIMIZU, "Yuryo Biseibutsu no Tansaku·Kaihatsu·Ikushu to Kinosei Shishitsu Seisan eno Riyo", Bioscience & Industry, 2004, Vol.62, No.1, pages 11 to 16	1-21
A	Shigeaki FUJIKAWA, "Tokushu Shishitsu Kogaku Saizensen Biseibutsu Yushi no Seisan to Sono Riyo", Kagaku to Kogyo, 2000, Vol.74, No1, pages 26 to 32	1-21

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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 07 February, 2008 (07.02.08)	Date of mailing of the international search report 19 February, 2008 (19.02.08)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P7/64(2006.01)i, C11C3/00(2006.01)i, C12N1/14(2006.01)i			
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. C12P7/00-7/66, C11C3/00, C12N1/14			
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) BIOSIS/WPI (DIALOG), JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2), G-Search			
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	
X A	JP 2006-230403 A (国立大学法人 北海道大学) 2006.09.07 (ファミリーなし)	17 1-16, 18-21	
A	清水 昌, 油糧微生物の探索・開発・育種と機能性脂質生産への利用, バイオサイエンスとインダストリー, 2004, Vol. 62, No. 1, p. 11-16	1-21	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 07.02.2008		国際調査報告の発送日 19.02.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 三原 健治	4 N 2 9 3 7
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	藤川 茂昭, 特集 脂質工学最前線 微生物油脂の生産とその利用, 科学と工業, 2000, Vol. 74, No. 1, p. 26-32	1-21