

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5366070号  
(P5366070)

(45) 発行日 平成25年12月11日(2013.12.11)

(24) 登録日 平成25年9月20日(2013.9.20)

(51) Int. Cl. F 1  
**C 1 2 N** 1/16 (2006.01) C 1 2 N 1/16 B  
**C 1 2 R** 1/72 (2006.01) C 1 2 N 1/16 Z  
 C 1 2 N 1/16 B  
 C 1 2 R 1:72

請求項の数 2 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2008-82266 (P2008-82266)	(73) 特許権者	312015749 興人ライフサイエンス株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目1番3号
(22) 出願日	平成20年3月27日(2008.3.27)	(74) 代理人	100160978 弁理士 榎本 政彦
(65) 公開番号	特開2009-95335 (P2009-95335A)	(72) 発明者	濱澤 和弘 佐伯市城南町2番20号
(43) 公開日	平成21年5月7日(2009.5.7)	(72) 発明者	丸山 修 佐伯市弥生大字伊崎390番地の3
審査請求日	平成22年2月15日(2010.2.15)	(72) 発明者	松下 洋和 佐伯市野岡町1丁目1番22-301号
(31) 優先権主張番号	特願2007-250864 (P2007-250864)	(72) 発明者	青柳 吉紀 東京都三鷹市下連雀6-14-6-12
(32) 優先日	平成19年9月27日(2007.9.27)	審査官	水落 登希子
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		最終頁に続く
前置審査			

(54) 【発明の名称】 酵母菌体の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

グリセリンを資化しうる食品用酵母を、パーム油中の油脂をアルキルアルコールとエステル交換しアルキルエステルを除いて得られるグリセリンを60~90重量%含む粗グリセリン画分を主炭素源として用いた培地中で連続培養することを特徴とする、酵母菌体の製造方法。

【請求項2】

前記食品用酵母が、キャンディダ・ユティリス(Candida utilis)である、請求項1記載の酵母菌体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物油由来のグリセリンを炭素源として酵母を培養する、酵母菌体の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、地球環境問題の解決のために、再生産可能である植物原料からの物質生産、例えば、植物油からカーボンニュートラルな軽油代替燃料としてのバイオディーゼル燃料(BDF)等、が注目を集めている。しかしながら、例えば、BDF製造時に、油脂中のグリセリンとアルコールとをエステル交換するため、グリセリンが大量に副生成物として生成

することから、これを焼却したり寒冷地の道路凍結防止剤として撒かれたりしているが、更に有利なグリセリンの活用が、大きな課題となっている。

また、通常、副成したグリセリンには、植物油由来の不純物、油脂・脂肪酸あるいは触媒等が混入しており、加熱あるいはアルカリにより容易に着色するという欠点を有しており、有効活用には、十分に精製する必要があるという問題点もあった。

#### 【0003】

従来より、グリセリンを資化する酵母が知られており、グリセリンを炭素源としてかかる酵母を培養し、酵母菌体あるいは酵母生産物を取得する方法が報告されている（例えば、特許文献1、等）。しかしながらこれら方法に用いられるグリセリンは精製されたものであり、また、かかるグリセリンを用いて連続培養すると、条件によっては培養液に沈殿が生じ、十分な生産性が得られないという欠点があった。

10

#### 【0004】

植物油由来のグリセリンは副生成物として生じるために安価な原材料であることから、更に有利な利用技術が求められている。

【特許文献1】特開昭49-116284号公報、同53-3580号公報、同57-43682号公報、

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

本発明は、これら従来技術に鑑み、植物油由来のグリセリンを十分に精製することなく活用する、連続培養による酵母菌体の製造方法を提供することを課題とする。

20

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

本発明者は、植物油由来の粗精製したグリセリンを使用することで課題を解決できることを見だし、本発明に到達した。

すなわち本発明は、

(1) グリセリンを資化する食品用酵母を、植物油中の油脂をアルキルアルコールとエステル交換しアルキルエステルを除いて得られるグリセリンを含む画分を主炭素源として用いた培地中で培養することを特徴とする、酵母菌体の製造方法、

(2) 前記植物油がパーム油である、上記(1)記載の酵母菌体の製造方法、

30

(3) 前記食品用酵母が、カンディダ・ユティリス(Candida utilis)である、上記(1)又は(2)記載の酵母菌体の製造方法、

(4) 前記培養が連続培養であることを特徴とする、上記(1)~(3)のいずれか一つに記載の酵母菌体の製造方法

を提供するものである。

#### 【発明の効果】

#### 【0007】

本発明は、安価な粗グリセリンを用いるにもかかわらず、着色することもなく、グルコース、精製グリセリン等を炭素源として用いた場合と比較して、菌体収量あるいはRNA等の菌体内有用物質の蓄積量も多く、極めて経済的である。

40

また、連続培養においても、なんら特殊な方法を用いなくても、精製グリセリンを用いた場合のように培養液に不溶物が析出し収量の低下を招く、ということもない。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0008】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明で用いられる食品用酵母は、食用のものであればいずれでもよく、例えば、サッカロミセス(Saccharomyces)属、ハンセンラ(Hansenula)属、カンディダ(Candida)属の酵母が例示され、なかでもカンディダ・ユティリス(Candida utilis)が好ましい。

50

本発明において、これら酵母のうち、グリセリンを資化できる能力がある株が用いられる。

#### 【0009】

本発明で用いられる植物油由来の粗グリセリンとは、植物油中の油脂（モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライド）をアルキルアルコールとエステル交換しアルキルエステルを除いたグリセリンを含む画分で、グリセリンが60～90重量%、好ましくは70～85重量%の粗グリセリンをいう。

粗グリセリン中のグリセリンの割合が60重量%未満であれば、加熱によりあるいはアルカリにより着色することがあり好ましくなく、一方、90重量%を超えると、精製に労力を要し、高価となるため好ましくない。

用いられる植物油は特に制限はないが、例えば、菜種油、大豆油、パーム油、ココナッツ油等が例示され、中でもパーム油が好ましい。

#### 【0010】

本発明の製造方法は、上述した粗グリセリンを主炭素源とする培地にグリセリン資化性酵母を接種、連続的に培養して、培養物から酵母菌体を採取することによって行われる。

粗グリセリンは、バッチ培養では10%以上を添加すると増殖が遅くなるが、連続培養においては供給したグリセリンがすぐに資化されるため、20%程度まで添加することができる。

粗グリセリン以外の培地成分としては、窒素源、無機物が含まれる。窒素源としては使用酵母の利用可能なものであればよく、硫酸アンモニウム、アンモニア水、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、尿素などを例示することができる。これら窒素源は、一般に、0.1～3%程度添加される。

無機物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、鉄、マンガ、亜鉛、銅等が用いられる。無機物は0.1～5%程度、金属は0.0001～0.1%程度、添加される。

更に、必要に応じて、ビタミンその他の生育促進物質、例えば酵母エキス、ペプトン等を添加することもできる。特に、酵母としてサッカロミセス属を用いた場合においては、酵母エキス、ペプトン等の添加効果が大きく、培養速度に大きく影響する。

#### 【0011】

培養は、オートクレーブ（例えば121 20分間）殺菌したグリセリンを含む培地に酵母を接種し、培地中の溶存酸素を低下させない範囲で振とう培養あるいは通気攪拌培養することにより実施される。培養温度は20～38、好ましくは22～30である。pHは3.0～8.0、特に4.0から6.0が好ましい。

#### 【0012】

連続培養は、培地を供給して、供給した分を排出して培養する方法をいい、通常に通気攪拌可能な発酵槽が用いられ、2日間から2週間程度連続培養される。

培地成分の添加は、バッチ培養が終了すると同時に、ポンプで一定量の培地を連続的に供給し、培養液の排出は保持液量を一定に保つように、発酵槽の天板から挿入した配管を通して排出用のポンプで培養液を連続的に引き出すことにより行う。

培地は通常培地殺菌と同様にオートクレーブしたものが用いられる。pHは、4.0～6.0になるようにアルカリまたはアンモニア水でコントロールする。また、培養液中の溶存酸素を保つために、必要な通気攪拌あるいは加圧を行う。

#### 【0013】

培養した菌体は、ろ過、遠心分離などの手段により集菌し、洗浄することにより取得することができる。

#### 【実施例】

#### 【0014】

以下、実施例を挙げて、本発明を詳細に説明する。

なお、実施例中のグリセリン濃度、菌体量、菌体中のRNA含有量は、以下の方法によって測定した。

10

20

30

40

50

(1) グリセリンの定量：HPLCで分析した。分析条件としては、使用カラム：shodex Sugar SP0810、溶離液：純水、流速：1ml/min、温度：80、検出器：RI、注入量：5μlで行った。

(2) 菌体量：定法により絶対乾燥重量として求め、単位培養液当たりの重量として表記した。

(3) RNA含有量：シュミット・タンホイザー・シュナイダーの方法(J. Biol. Chem. 1946年164巻747頁)によりRNAを抽出後、RNA量を求め、これを菌体乾燥重量あたりの百分率で表記した。

#### 【0015】

##### 試験例1

キャンディダ・ユティリス ATCC9226を、予めYPD培地(酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース2%)を含む試験管で種母培養した。

500ml容の三角フラスコに培地を30ml仕込み、オートクレーブ殺菌した後、種母培養液を0.3~1%植菌し、30で約24時間、300rpmで振とう培養した(バッチ培養)。培地組成は、パーム油由来粗グリセリン(SUMI ASIH社製、輸入販売元中央化成(株)、グリセリン含量83%)0.6%(グリセリン純分として0.5%相当)、尿素0.05%、硫酸アンモニウム0.017%、リン酸一カリウム0.5%、リン酸二カリウム0.05%、硫酸マグネシウム0.005%、硫酸鉄4.3ppm、硫酸マンガン4.3ppm、硫酸亜鉛4.3ppm、硫酸銅0.43ppmを用い、pHは5.5に調整した。なお、尿素は別殺菌後別添加した。

結果を表1に示す。

表1に示すように、炭素源として粗グリセリンを使用すると、グリセリンに対する菌体収率が59%と、高い菌体生産性を示した。

#### 【0016】

##### 【表1】

菌株	対液菌体生成量 (mg/ml)	対グリセリン菌体収率 (%)	対液RNA生成量 (mg/ml)	RNA含有量 (%)
ATCC9226	3.08	59.1	0.316	10.26

#### 【0017】

##### 比較試験例1

試験例1において、粗グリセリンに換えて精製グリセリン(MUSIM MAS社製、輸入販売元中央化成(株)、グリセリン含量99.9%)0.5%を用いた以外は試験例1と同様に実施した。

結果を表2に示す。

表2から、対液のRNA生産性と対グリセリン菌体収率は粗グリセリンの方が精製グリセリンよりも高いことがわかる。

#### 【0018】

##### 【表2】

菌株	対液菌体生成量 (mg/ml)	対グリセリン菌体収率 (%)	対液RNA生成量 (mg/ml)	RNA含有量 (%)
ATCC9226	2.92	56.0	0.266	9.11

#### 【0019】

##### 比較試験例2

試験例1において、粗グリセリンに換えてグルコース0.5%を用いた以外は試験例1と同様に実施した。

結果を表3に示す。

表 3 から、対液の RNA 生産性は粗グリセリンと同程度であるが、対糖菌体収率は粗グリセリンの方がグルコースに比べて極めて高いことがわかる。

【 0 0 2 0 】

【表 3】

菌株	対液菌体生成量 (mg/ml)	対糖菌体収率 (%)	対液 RNA 生成量 (mg/ml)	RNA 含有量 (%)
ATCC9226	2.48	49.6	0.336	13.55

【 0 0 2 1 】

10

試験例 2

試験例 1 において、キャンディダ・ユティリス ATCC 9226 に換えて、キャンディダ・ユティリス ATCC 9950 を用いた以外は試験例 1 と同様に実施した。

結果を表 4 に示す。

表 4 からわかるように、菌体収率、対液の RNA 生成量ともに高い値を示した。

【 0 0 2 2 】

【表 4】

菌株	対液菌体生成量 (mg/ml)	対グリセリン菌体収率 (%)	対液 RNA 生成量 (mg/ml)	RNA 含有量 (%)
ATCC9950	2.92	56.0	0.342	11.71

20

【 0 0 2 3 】

比較試験例 3

試験例 2 において、粗グリセリンに換えて精製グリセリン (MUSIM MAS 社製、輸入販売元中央化成 (株)、グリセリン含量 99.9%) 0.5% を用いた以外は試験例 2 と同様に実施した。

結果を表 5 に示す。

表 5 から、菌体収率はやや高いが、RNA の生産性は粗グリセリンに比べて劣ることがわかる。

30

【 0 0 2 4 】

【表 5】

菌株	対液菌体生成量 (mg/ml)	対グリセリン菌体収率 (%)	対液 RNA 生成量 (mg/ml)	RNA 含有量 (%)
ATCC9950	3.08	59.1	0.260	8.44

【 0 0 2 5 】

比較試験例 4

試験例 2 において、粗グリセリンに換えてグルコース 0.5% を用いた以外は試験例 2 と同様に実施した。

40

結果を表 6 に示す。

表 6 から、粗グリセリンの方がグルコースよりも対液の菌体生産性や RNA 生産性が高い傾向であることがわかる。

【 0 0 2 6 】

【表 6】

菌株	対液菌体生成量 (mg/ml)	対糖菌体収率 (%)	対液RNA生成量 (mg/ml)	RNA含有量 (%)
ATCC9950	2.70	54.0	0.312	11.56

## 【 0 0 2 7 】

## 試験例 3

サッカロミセス・セレピシエ（「ダイヤースト Y S T」協和発酵フーズ（株）製）を、予め Y P D 培地（酵母エキス 1 %、ポリペプトン 2 %、グルコース 2 %）を含む試験管で種母培養した。

10

5 0 0 m l 容の三角フラスコに培地を 3 0 m l 仕込み、オートクレーブ殺菌した後、種母培養液を 0 . 3 ~ 1 % 植菌し、3 0 で約 4 8 時間、3 0 0 r p m で振とう培養した（バッチ培養）。培地組成は、パーム油由来粗グリセリン（S U M I A S I H 社製、輸入販売元中央化成（株）、グリセリン含量 8 3 %）2 . 4 %（グリセリン純分として 2 . 0 % 相当）、ポリペプトン 2 %、酵母エキス 1 % を用いた。

結果を表 7 に示す。

## 【 0 0 2 8 】

## 比較試験例 5

試験例 3 において、粗グリセリンに換えて精製グリセリン（M U S I M M A S 社製、輸入販売元中央化成（株）、グリセリン含量 9 9 . 9 %）2 . 0 % を用いた以外は試験例 3 と同様に実施した。

20

結果を表 7 に示す。

## 【 0 0 2 9 】

## 試験例 4

試験例 3 において、サッカロミセス・セレピシエ（「ダイヤースト Y S T」協和発酵フーズ（株）製）に代えて、サッカロミセス・セレピシエ（「オリエンタルイースト」オリエンタル酵母工業（株）製）を用いた以外は試験例 3 と同様に実施した。

結果を表 7 に示す。

## 【 0 0 3 0 】

## 比較試験例 6

試験例 4 において、粗グリセリンに換えて精製グリセリン（M U S I M M A S 社製、輸入販売元中央化成（株）、グリセリン含量 9 9 . 9 %）2 . 0 % を用いた以外は試験例 4 と同様に実施した。

30

結果を表 7 に示す。

## 【 0 0 3 1 】

## 試験例 5

試験例 3 において、サッカロミセス・セレピシエ（「ダイヤースト Y S T」協和発酵フーズ（株）製）に代えて、サッカロミセス・セレピシエ（「カネカイースト」（株）カネカ製）を用いた以外は試験例 3 と同様に実施した。

40

結果を表 7 に示す。

## 【 0 0 3 2 】

## 比較試験例 7

試験例 5 において、粗グリセリンに換えて精製グリセリン（M U S I M M A S 社製、輸入販売元中央化成（株）、グリセリン含量 9 9 . 9 %）2 . 0 % を用いた以外は試験例 5 と同様に実施した。

結果を表 7 に示す。

## 【 0 0 3 3 】

【表 7】

	使用菌株 サッカロミセス・セレビスエ	グリセリン	対液菌体生成量 (mg/ml)	対グリセリン菌体収率 (%)	対液RNA生成量 (mg/ml)	RNA含有量 (%)
試験例3	ダイヤイーストYST	粗グリセリン	2.46	12.3	0.257	10.45
比較試験例5	ダイヤイーストYST	精製グリセリン	2.34	11.7	0.231	9.87
試験例4	オリエンタルイースト	粗グリセリン	2.46	12.3	0.231	9.39
比較試験例6	オリエンタルイースト	精製グリセリン	2.34	11.7	0.195	8.33
試験例5	カネカイースト	粗グリセリン	2.82	14.1	0.288	10.21
比較試験例7	カネカイースト	精製グリセリン	2.48	12.4	0.216	8.71

## 【0034】

表 7 から、パン酵母であるサッカロミセス・セレビスエ 3 種類の培養ではいずれも、粗グリセリンの方が精製グリセリンよりも、対グリセリン菌体収率、対液 RNA 生産量、RNA 含有量が高いことがわかる。

## 【0035】

## 実施例 1

キャンディダ・ユティリス ATCC 9226 を 30 ml 容試験管に YPD 培地 6 ml を入れて滅菌した培地に植菌し、24、24 時間、300 rpm で振とう培養（試験管振とう機、いわしや製）し、さらに 80 ml 容試験管に YPD 培地を 15 ml 入れて滅菌した培地 3 本に前述培養液を 0.3 ml ずつ植菌し、24、24 時間振とう培養した。

合計 45 ml の種母を 5 L 容発酵槽に予め仕込んでおいた培地に植菌し、約 29 時間バッチ培養を行った。培地組成の炭素源は試験例 1 で使用した粗グリセリンを純分として 6% になるように添加した。他の培地成分として、リン酸一アンモニウム 0.451%、硫酸アンモニウム 0.242%、硫酸マグネシウム 0.12%、塩化カリウム 0.205%、硫酸鉄 26 ppm、硫酸マンガン 26 ppm、硫酸亜鉛 26 ppm、硫酸銅 2.6 ppm を用いた。培養条件は、張り込み液量 2 L、pH 4.0（9N-アンモニア水で pH をコントロール）、培養温度 23、通気量 1 vvm、攪拌 650 rpm、内圧 0.05 MPa で行った。培地供給はマイクロチューブポンプ（MPE 型、EYELA 製）で連続的に培地を供給し、排出管から同様にマイクロチューブポンプで連続的に培養液を抜き出し、保持液が一定になるようにコントロールした。発酵槽内に残存するグリセリン量は定期的にサンプリングを行い、HPLC で分析した。グリセリン濃度がほぼ 0.5 ± 0.2 g/l 前後になるように供給液量をコントロールした。連続培養は 3 日間行った。

結果を表 8 に示した。

## 【0036】

## 【表 8】

	対液菌体生成量 (mg/ml)	対グリセリン菌体収率 (%)	対液 RNA 生成量 (mg/ml)	RNA 含有量 (%)
バッチ培養終了	33.60	56.0	3.55	10.57
連続 1 日目	35.76	59.6	3.67	10.26
連続 2 日目	35.80	59.7	3.71	10.36
連続 3 日目	36.00	60.0	3.72	10.33

## 【0037】

## 比較例 1

実施例 1 において、粗グリセリンの代わりに比較試験例 1 で使用した精製グリセリンを用いた以外は実施例 1 と同様に連続培養を行った。

バッチ培養終了時には、対グリセリン菌体収率は 53.3% であったが、連続培養 1 日目の途中から菌体増殖の障害が起こり、残存グリセリン濃度が上昇して、連続培養の維持が出来ず、培養を中止した。この時、通液培地には不溶物が発生しており、この影響で何らかの障害が起きたものと思われる。

10

20

30

40

50

**【産業上の利用可能性】****【0038】**

以上述べてきた通り、本発明によると、B D F 製造時に副成する植物油由来のグリセリンを、粗グリセリンの状態を用いることで、着色もなく、グルコースあるいは精製グリセリンを用いたよりも菌体収率あるいはRNA等の菌体内有用物質の蓄積量も多い、工業的に有利な、連続培養による酵母菌体の製造方法が提供される。



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開昭62-186998(JP,A)  
特開2007-215501(JP,A)  
特開平10-327801(JP,A)  
Biotechnol.Lett. , 1996年, Vol.18, No.8, p.943-946  
OCL , 2005年, Vol.12, No.2, p.161-169

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 1/00-7/08  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX(STN)