

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-55071

(P2006-55071A)

(43) 公開日 平成18年3月2日(2006.3.2)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 19/44 (2006.01)</b>	C 1 2 P 19/44	4 B O 6 4
C 1 2 R 1/645 (2006.01)	C 1 2 P 19/44	
	C 1 2 R 1:645	

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2004-240266 (P2004-240266)	(71) 出願人	591181894 よつ葉乳業株式会社 北海道河東郡音更町新通2〇丁目3番地
(22) 出願日	平成16年8月20日 (2004.8.20)	(71) 出願人	504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地
		(74) 代理人	100074077 弁理士 久保田 藤郎
		(74) 代理人	100086221 弁理士 矢野 裕也
		(72) 発明者	山根 正樹 北海道北広島市輪厚465番地1号 よつ 葉乳業株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クリヴェロマイセス・マルキシアナスによる4-trans, 8-trans-sphingadienineを主要なスフィンゴイド塩基として持つセレブロシドの製造法

(57) 【要約】

【課題】 乳製品の製造工程で大量に生じるホエーを利用して、酵母による4 trans, 8 trans sphingadienineを主要な構成スフィンゴイド塩基としてもつセレブロシドの効果的な製造法を提供すること。

【解決手段】 ホエーあるいはホエー派出物を含む培地にクリヴェロマイセス・マルキシアナスを培養し、培養物から4 trans, 8 trans sphingadienine を主要なスフィンゴイド塩基として持つセレブロシドを採取することを特徴とするセレブロシドの製造法を提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ホエーあるいはホエー派出物を含む培地にクリヴェロマイセス・マルキシアナスを培養し、培養物から 4 trans, 8 trans sphingadienine を主要なスフィンゴイド塩基として持つセレブロシドを採取することを特徴とするセレブロシドの製造法。

## 【請求項 2】

クリヴェロマイセス・マルキシアナスが、クリヴェロマイセス・マルキシアナス NBRC10005 株である請求項 1 記載の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

## 【0001】

本発明は、ホエーあるいはホエー派生物を含む培地を使用し、クリヴェロマイセス・マルキシアナスによる 4 trans, 8 trans sphingadienine を主要なスフィンゴイド塩基として持つセレブロシドの製造法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド塩基を構成成分として持つ脂質クラスの総称であり、脂肪酸がスフィンゴイド塩基の 2 位のアミノ基に酸アミド結合したものがセラミドである。1 位の水酸基にグルコースが結合したものがセレブロシドと言われている。

スフィンゴ脂質は、真核生物一般に存在する生体膜脂質成分であり、動物、植物および微生物によって構成スフィンゴイド塩基や構成脂肪酸およびその他の構成成分に違いが認められ、生物種固有のスフィンゴ脂質の分子種が存在している。酵母を含む真菌類に存在するセレブロシドを含むスフィンゴ糖脂質の構成スフィンゴイド塩基は、そのほとんどが 9 methyl 4 trans, 8 trans sphingadienine から構成されており、高等植物や動物の場合、9 位のメチル基が存在しない構造を持ったスフィンゴイド塩基から構成されている。

20

## 【0003】

ヒトを含めてスフィンゴ脂質の存在意義は依然不明な点が多いが、セラミドは、皮膚の上側層である角質層の主要脂質成分であり、セラミドのようなスフィンゴ脂質を含有する組成物の局所塗布は、例えば皮膚の障壁機能および水分保持特性を改善する（例えば非特許文献 1）ことが知られている。セレブロシドを含む組成物に関する特許としては、抗嘔吐剤（特許文献 1）、NKT 細胞活性化剤（非特許文献 2）、エイズ発症予防薬および進行抑制薬（特許文献 3）、大腸ガン予防剤および予防食品（特許文献 4）などがある。

30

これまで、化粧品や栄養補助食品等に使用されるセラミドやスフィンゴ糖脂質およびスフィンゴミエリンを含むスフィンゴ脂質調製物は、主に動物供給源、特にウシから抽出されていた。しかし、ウシ海綿状脳症 (BSE) の発生以来、潜在的な病原性の危険から植物起源へ移行したものの、植物由来のスフィンゴ脂質調製物は非常に高価である。

## 【0004】

酵母ピヒア・シッフエリ (*Pichia ciferrii*) のような微生物は、スフィンゴ脂質、スフィンゴシン、フィトスフィンゴシンやそれらの誘導体を生成することが発見されており（例えば非特許文献 2、特許文献 5）、セラミドやスフィンゴ糖脂質の化学合成の出発物質としてのスフィンゴイド塩基の生産法は公知である。

40

しかし、従来の酵母によるスフィンゴ脂質調製物に含まれる構成スフィンゴイド塩基は、高等生物の構成スフィンゴイド塩基として存在していないアセチル化されたものであった。また、サッカロマイセス属、チゴサッカロマイセス属およびクリヴェロマイセス属酵母にもセレブロシドが存在する（例えば特許文献 6、非特許文献 3）が、構成スフィンゴイド塩基は高等生物には存在しない 9 methyl 4 trans, 8 trans sphingadienine が多く存在している（例えば非特許文献 3）。

このような実情から、動物もしくは植物組織以外で高等生物に共通のスフィンゴイド塩基を持った安全で安価なスフィンゴ脂質の新規供給源が望まれていた。

## 【0005】

50

一方、ホエーはホエイまたは乳清とも呼ばれ、牛の乳などの獣乳からチーズ等の乳製品を製造する際に副生する液状のものである。一般に、それを噴霧乾燥したホエーパウダーとして流通している。主な成分として獣乳からチーズとして移行した成分の残りの成分を含有、すなわち、乳糖、ホエータンパク質、灰分等から構成されている。

ホエーに関しては詳しい成書が多くあり、その産業的利用に関しても詳しく言及されている（例えば非特許文献4）。また、ホエーに類似したものとして、乳またはホエーを限外濾過（UF）等の技術によってタンパク質を回収することで得られる透過液（パーミエート）がある。このようなホエー派生物は、主成分が乳糖と灰分からなる。

ホエーを培地として用いて酵母を培養し、各種のバイオマス生産を行うことは古くから知られているが、ホエー派生物も乳糖を主要な炭素原とするという意味でホエー同様に利用できる。ホエーおよびホエー派生物は、食品素材として用いることが可能な素材であるが、大量に生じるため、付加価値が低く、産業上の高度な利用が望まれている。

【0006】

【特許文献1】特開平06-271598

【特許文献2】WO98/44928

【特許文献3】特開平09-315980

【特許文献4】特開2001-213782

【特許文献5】特表2002-519070

【特許文献6】特表2004-89047

【非特許文献1】Eur. J. Dermatol, 1巻, p. 39-43, 1991年

【非特許文献2】J. Bacteriol., 80巻, p. 484-491, 1960年

【非特許文献3】FEMS Yeast Res., 4巻, p. 553-558, 2002年

【非特許文献4】Whey and lactose processing, Elsevier Applied Science, 1992年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、高等生物には広く存在するものの、これまで真菌類ではほとんど蓄積しないとされている4 trans, 8 trans sphingadienineをセレブロシドの主要な構成スフィンゴイド塩基として含む酵母を検索し、炭素源としてホエーあるいはホエー派生物を含む培地に当該酵母を培養し、ヒトに安全なセレブロシドを安価に製造する方法を提供することを課題とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、生物学的に安全で、増殖能が活発な酵母に、高等生物と同様の構造を持ったスフィンゴ糖脂質が存在すれば、高付加価値なスフィンゴ脂質調製物の安全で、安価な供給源となりうると仮定を立て、係る微生物を用いてホエーあるいはホエー派生物などの安価な炭素源を含む培地で培養すれば、従来以上に安価なスフィンゴ脂質調製物が供給できることが可能になると考えた。

【0009】

このような着想のもとに、微生物の検索を行い、4 trans, 8 trans sphingadienineを主要なスフィンゴイド塩基として持つセレブロシドを含むスフィンゴ脂質を蓄積する酵母を見出した。本発明は、このような知見に基づいて完成された。

請求項1に記載の発明は、ホエーあるいはホエー派出物を含む培地にクリヴェロマイセス・マルキシアナスを培養し、培養物から4 trans, 8 trans sphingadienineを主要なスフィンゴイド塩基として持つセレブロシドを採取することを特徴とするセレブロシドの製造法である。

請求項2に記載の発明は、クリヴェロマイセス・マルキシアナスが、クリヴェロマイセス・マルキシアナスNBRC10005株である請求項1記載の製造法である。

【発明の効果】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 0 】

本発明によれば、安価、かつ安定的に入手できるホエーあるいはホエー派出物を用いて、ヒトに安全なセレブロシドを安価に製造することができる。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

## 【 0 0 1 1 】

本発明者らは、生物学的に安全で、増殖能が活発な酵母の中から、本発明に使用できる酵母を以下の方法で検索した。

まず、ラクトース資化性を有する乳酵母の中から、ブレッタノマイセス・アノマルス (*Brettanomyces anomalus*) NBRC 0796、キャンディダ・インターメディア (*Candida intermedia*) NBRC 0761、キャンディダ・ケフィール (*Candida kefyr*) NBRC 10287、キャンディダ・テヌイス (*Candida tenuis*) NBRC 10315、デバリオマイセス・ハンセニイ (*Debaryomyces hansenii*) NBRC 0083、クリヴェロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) ATCC 12426、*Kluyveromyces lactis* NBRC 0433、*Kluyveromyces lactis* NBRC 0648、*Kluyveromyces lactis* NBRC 1090、*Kluyveromyces lactis* NBRC 1267、*Kluyveromyces lactis* NBRC 1673、*Kluyveromyces lactis* NBRC 1903、*Kluyveromyces marxianus* NBRC 10005、*Kluyveromyces wickerhamii* NBRC 1675、ロドトルラ・マイニユータ (*Rhodotorula minuta*) NBRC 0387、ヤマダツィマ・ファリノサ (*Yamadazyma farinosa*) NBRC 1163を選抜し、これらを培養し、培養物からセレブロシドを分離してスフィンゴイド塩基の組成を調べることによって、目的とするスフィンゴ脂質調製物の供給源となり得る微生物を検索した。すなわち、上記の微生物をそれぞれ500ml容の三角フラスコに入れた100mlのYPD培地で培養を行い、菌体を回収後、全脂質を抽出した。

## 【 0 0 1 2 】

得られた全脂質を100ml容のナス型フラスコに移して濃縮乾固の後、0.4規定のメタノール性水酸化カリウム50mlを加えて37℃で2時間保持した。反応後、クロロホルム/メタノール/水が8:4:3になるように300ml容の分液漏斗へ移して1昼夜保持した。液が2層に分離したことを確認した後、上精をアスピレーターで除去して、等量のクロロホルム/メタノール/水(3:48:47)の加えて良く攪拌した後、2層になるまで放置した。この作業は2回繰り返して行った。下層をナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固してアルカリ安定脂質(粗セレブロシド)画分を得た。

次に、このアルカリ安定脂質(粗セレブロシド)画分を、調製用ケイ酸薄層クロマトグラフィー(TLC)に供してクロロホルム/メタノール/酢酸(90:10:1 v/v)で展開後、標準品(sigma社製牛脳由来セレブロシド)と移動率(Rf)が一致するセレブロシドを分離精製した。得られたセレブロシドはジオキサニル性5%水酸化バリウムを用いて分解し、生成したスフィンゴイド塩基の組成を常法によって分析した。

その結果、クリヴェロマイセス・マルキシアナス NBRC 10005由来のセレブロシドは、真菌に特徴的な9 methyl 4 trans, 8 trans sphingadienineをほとんど含有せず、80%以上が4 trans, 8 trans sphingadienineから構成されていることを見出した。

## 【 0 0 1 3 】

このようにして、本発明に使用する酵母を選抜した。すなわち、本発明には、4 trans, 8 trans sphingadienineを主要な構成スフィンゴイド塩基とするセレブロシドを含むスフィンゴ脂質を蓄積できるクリヴェロマイセス属の酵母であれば使用することができる。好ましい酵母は、クリヴェロマイセス・マルキシアナスであり、特に好ましい酵母は、クリヴェロマイセス・マルキシアナス NBRC 10005である。

クリヴェロマイセス・マルキシアナスの培養には、液体培地が用いられ、該培地には炭素源としてホエーあるいはホエー派生物を含むことが必要である。なお、当該酵母が生育でき、目的とするセレブロシドを生産することができるのであれば、他の炭素源を含む培地(例えばYPD培地など)を使用することができる。

## 【0014】

ホエーやその派生物としては、甘性ホエー、酸性ホエー、ホエーパーミエート（ホエーを限外ろ過などの技術でタンパク質を回収することで得られる透過液）などがある。これらは液状でも粉状でもよいが、除タンパク処理したものが好適である。培地中のホエー濃度は、ラクトース換算で0.5～20%、好ましくは2～10%が適当である。

培地成分としては、炭素源の他に、上記酵母の生育に有用な窒素源、無機塩類などを含むことが望ましい。窒素源としては、硫酸アンモニウム、コーンステープリカーなどがあり、単独で用いても、組合わせて用いてもよい。なお、培地中の濃度は、硫酸アンモニウムは0.5～5%、コーンステープリカーは0.5～10%程度が適当である。また、無機塩類としては限定されず、例えばリン酸一カリウム、硫酸マグネシウムなどが用いられる。

培地の初期pHは7.5～9.0に調整することが望ましく、8.0～9.0がより好ましい。pHの調節には、水酸化ナトリウム、アンモニア、炭酸ナトリウムなどが用いられる。

液体培地にクリヴェロマイセス・マルキシアナスを接種し、15～35℃、好ましくは15～25℃の温度で振盪培養を行う。培養時間は、セレブロシドが十分に生産されるまで、通常は24～72時間、好ましくは24～48時間である。

## 【0015】

培養終了後、微生物菌体を回収して全脂質を分離し、脂質中に存在するスフィンゴ糖脂質の定量・定性分析を行う。この方法は既知の方法に従って実施すればよく、例えば蒸発光散乱検出器付高速液体クロマトグラフィー（HPLC ESLD）やガスクロマトグラフィー（GC）を用いて行うことができるが、これらの分析法等に限定されるものではなく、当該技術分野において公知の様々な方法で行うことができる。

## 【実施例】

## 【0016】

本発明の詳細を以下の実施例によって説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

## 【0017】

## 実施例1

独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門(NBRC)より入手したクリヴェロマイセス・マルキシアナス NBRC10005<sup>1</sup>を一白金耳かきとり、試験管中の液体培地(3ml)に接種して種培養を行った。菌体が増殖して白濁した培養液(1ml)を、500ml容の三角フラスコ中の液体培地100mlへ接種して培養を行った。

使用した液体培地はホエーパウダー(2%ラクトース相当量、よつ葉乳業社製)、0.5%硫酸アンモニウム、1%コーンステープリカー、0.075%リン酸カルシウムおよび0.075%硫酸マグネシウムを含むもの(pH5.5)を用い、25℃、135rpmでの振盪培養を行った。約24時間後定常期に達した菌体は、遠心分離および蒸留水による洗浄を3度繰り返したのち、湿菌体を凍結乾燥し、供試材料とした。

## 【0018】

凍結乾燥菌体0.5gを、5mlのメタノールと共に超音波破碎機(UD 200、Tomy Seiko、Tokyo、Japan)で10分間破碎し、全脂質は引き続き5mlのクロロホルム/メタノール(2:1および1:2、v/v)でそれぞれ2回ずつ10分攪拌抽出した。得られた抽出液にクロロホルム/メタノール/蒸留水の比が8:4:3になるようにクロロホルムと蒸留水を加えて静置後、下層を濃縮して全脂質画分とした。

## 【0019】

全脂質を100ml容のナス型フラスコへ移して濃縮乾固し、20mlの0.4規定メタノール性水酸化カリウムを加え超音波処理を行って完全に懸濁させた後、37℃で1時間保持した。

次いで、100ml容の分液ロートへクロロホルム-メタノール-水(8:4:3 v/v)になるように移した後、得られた下層を弱アルカリ安定画分とした。得られた弱アルカリ安定画分を、調製用ケイ酸薄層クロマトグラフィー(TLC)に供してクロロホルム/メタノール/酢酸(90:10:1 v/v)で展開した。その後、標準品(sigma社製牛脳由来セレブロシド)と移動率(R<sub>f</sub>値)が一致するセレブロシドを分離精製した。

10

20

30

40

50

セレブロシドの構成成分分析では、スフィンゴイド塩基分析の際はジオキサン性5%水酸化バリウムを、脂肪酸および構成糖分析の際は5%無水メタノール性塩化水素を用いて分解し、得られた構成成分（スフィンゴイド塩基、脂肪酸、糖）の組成を常法によって分析した。また、ヒドロキシ脂肪酸の分析は、メチルエステル誘導体を更にアセチル誘導体として、CP Sil 88キャピラリーカラム（0.25mm×50m、Chrompack社製）を用い、160～220（昇温5 /min）の温度条件でGC分析に供した。

【0020】

その結果、クリヴェロマイセス・マルキシアナス NBRC10005<sup>T</sup>由来セレブロシドは表1に示したような構成成分からなることが判明した。

【0021】

【表1】

表1 クリヴェロマイセス・マルキシアナス NBRC10005<sup>T</sup>由来セレブロシドの構成成分

構成スフィンゴイド塩基	%
4-hydroxysphinganine	5.2
4-hydroxynonadecasphinganine	4.2
4-hydroxyeicosasphinganine	0.2
4-trans-sphingenine	4.7
4-trans, 8-trans-sphingadienine	83.4
9-methyl-4-trans, 8-trans-sphingadienine	2.3
構成脂肪酸	
16:0(2-OH)	84.2
18:0(2-OH)	6.7
20:0(2-OH)	2.0
24:0(2-OH)	0.6
26:0(2-OH)	6.5
構成糖	
Glucose	100

【0022】

構成成分分析の結果、クリヴェロマイセス・マルキシアナス NBRC10005<sup>T</sup>は、従来知られている真菌由来セレブロシドの特徴である9メチル型スフィンゴイド塩基をほとんど蓄積せず、高等生物で特徴的なスフィンゴイド塩基である4 trans, 8 trans sphingadienineと16:0(2 OH)およびグルコースからなるセレブロシドがほとんどを占めることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0023】

本発明によれば、乳製品の製造工程で大量に生じるホエーを利用して発酵生産を行うことにより、安全性の高いセレブロシドを効率よく製造することができる。このセレブロシドは、化粧品、食品などの分野において幅広く利用される。

---

フロントページの続き

(72)発明者 角田 有希子

北海道北広島市輪厚4 6 5 番地1号 よつ葉乳業株式会社中央研究所内

(72)発明者 元島 英雅

北海道北広島市輪厚4 6 5 番地1号 よつ葉乳業株式会社中央研究所内

(72)発明者 大西 正男

北海道帯広市西2 2 条南3 丁目2 6 - 3

Fターム(参考) 4B064 AF41 CA06 CD21 DA10