

明 細 書

発明の名称：

*Leucosporidium*属に属する新規酵母およびこれを用いた油脂の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、酵母を用いた油脂の製造方法およびそれに使用される新規酵母に関する。

背景技術

[0002] 従来、グリーン燃料原料として植物油や動物性油脂が多く用いられてきたが、食料との競合やパームヤシのプランテーションによる熱帯雨林の破壊が問題視されてきている。

そこで、微細藻類による油脂生産、あるいは従属栄養微生物（酵母、カビ）による農業残渣等のリグノセルロース系バイオマスからの油脂生産が注目されている。しかしながら、いずれも高コストであることが課題であり、これをクリアするために従属栄養微生物による油脂生産において原料に対する生産効率（油脂対糖収率）を向上する必要があった。

[0003] 非特許引用文献1に記載されているように、*Leucosporidium*属に属する*Leucosporidium creatinivorum*が多くの酵母のなかでも高い油脂生産能を有することが報告されているが、*Leucosporidium*属酵母に属する酵母は生育温度が比較的低いこと（約20℃）が課題であった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1: Filippucci et al. *Biotechnol Biofuels* (2016) 9:259, DOI 10.1186/s13068-016-0672-1

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記の通り、*Leucosporidium*属酵母の一部の株は油脂生産性が高いことが報告されているが、好低温性であり、工業上用いるには課題があった。

そこで、本発明は、*Leucosporidium*属酵母の中でも、工業生産において有利な好中温性の酵母を用いた油脂の製造方法の提供および当該方法に使用する新規酵母株の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、*Leucosporidium golubevii*に属する酵母が油脂の製造において優れていることを見出した。そして、*Leucosporidium golubevii*に属する株の中に比較的溫度耐性が高い株が存在することを見出した。特に新規油糧酵母株であるIS-300株は他の*Leucosporidium*属酵母種と比較し、溫度耐性が高く28℃の培養条件でも活発に増殖し、油脂を生産することを見出した。これらの知見に基づき、本発明を完成させた。

[0007] 本発明は、糖を含む培地で*Leucosporidium golubevii*に属する酵母を培養して糖から油脂を生成し、得られた油脂を回収することを特徴とする、油脂の製造方法を提供する。

ここで、前記糖を含む培地がリグノセルロース系バイオマスの糖化物を含む培地であってもよい。

また、培養溫度は10℃～30℃であってもよいし、25℃～30℃であってもよい。

また、培地中の糖濃度は50g/L～500g/Lであってもよいし、200g/L～500g/Lであってもよい。

また、前記*Leucosporidium golubevii*に属する酵母は*Leucosporidium golubevii* IS-300 (NITE BP-03675) 株またはその類縁株であってもよく、当該類縁株は、5.8S rDNA領域およびITS1領域、ITS2領域の塩基配列が配列番号1と95%以上同一であり、28℃での油脂生産能が24℃での油脂生産能と同等である株であってもよい。

本発明はまた、油脂生産に優れた新規酵母株として*Leucosporidium golubevii*

i IS-300 (NITE BP-03675) 株を提供する。

本発明の製造方法で得られた油脂は、バイオ燃料、バイオナフサ、食物油、潤滑油、または界面活性剤の原料とすることができる。

本発明はまた、前記製造方法で製造された油脂と当該油脂を原料とするバイオ燃料またはバイオナフサに関する。

発明の効果

[0008] *Leucosporidium golubevii*、特に*Leucosporidium golubevii* IS-300株を用いることにより、バイオマス糖化液等の糖を原料として油脂を効率よく製造することができる。特に、IS-300株は温度耐性が高いため、IS-300株またはその類縁株を培養して油脂の発酵生産を行うことで、培養時の冷却エネルギーを抑制でき、また、培養温度が上がることにより生育速度および油脂生産速度を増大させる効果も期待でき、油脂の効率よく製造することができる。

本発明の方法により生産された油脂は、GHG削減効果のあるバイオ燃料原料およびバイオナフサ原料として使用されるだけでなく、環境負荷の少ない食物油、潤滑油基材、界面活性剤の原料としても使用することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]IS-300株の顕微鏡像（写真）。

[図2]*Leucosporidium*属の分子系統樹（5.8S rDNAおよびITS配列、NJ法）における新規油糧酵母*Leucosporidium golubevii* IS-300株の系統分類学的位置を示す図。系統解析に用いたDNA配列のGenBank Accessionナンバーを図中に示す。各ノードの数字は1,000回試行のbootstrap値。

[図3]*Leucosporidium*属の各菌株の24℃における24時間ごとの乾燥菌体重量と油脂生産量を示す図。

[図4]*Leucosporidium*属の各菌株の28℃における24時間ごとの乾燥菌体重量と油脂生産量を示す図。

[図5]CYM培地をベースとした窒素源種検討、フラスコ培養における乾燥菌体重量の経時変化を示す図。

[図6]CYM培地をベースとした窒素源種検討、フラスコ培養における油脂生産

量の経時変化を示す図。

[図7]YSM培地をベースに窒素源を変更した各条件下のフラスコ培養における乾燥菌体重量の経時変化を示す図。

[図8]YSM培地をベースに窒素源を変更した各条件下のフラスコ培養における油脂生産量の経時変化を示す図。

[図9]CYM培地をベースとした硫安濃度の検討、フラスコ培養における乾燥菌体重量の経時変化を示す図。

[図10]CYM培地をベースとした硫安濃度の検討、フラスコ培養における油脂生産量の経時変化を示す図。

[図11]CYM培地をベースとした各種炭素源検討、250 mLジャーファーマンター培養における乾燥菌体重量の経時変化を示す図。

[図12]CYM培地をベースとした各種炭素源検討、250 mLジャーファーマンター培養における各炭素源の経時変化を示す図。

[図13]CYM培地をベースとした各種炭素源検討、250 mLジャーファーマンター培養における油脂生産量の経時変化を示す図。

[図14]廃糖蜜を用いた2 Lジャーファーマンター培養における乾燥菌体重量、油脂生産量の経時変化を示す図。

[図15]廃糖蜜を用いた2 Lジャーファーマンター培養におけるスクロース濃度、グルコース濃度及びフルクトース濃度の経時変化を示す図。

[図16]培養温度条件検討、250 mLジャーファーマンター培養における乾燥菌体重量の経時変化を示す図。

[図17]培養温度条件検討、250 mLジャーファーマンター培養におけるグルコース濃度の経時変化を示す図。

[図18]培養温度条件検討、250 mLジャーファーマンター培養における油脂生産量の経時変化を示す図。

[図19]培養pH条件検討、2 Lジャーファーマンター培養における乾燥菌体重量の経時変化を示す図。

[図20]培養pH条件検討、2 Lジャーファーマンター培養におけるグルコース

濃度の経時変化を示す図。

[図21]培養pH条件検討、2 Lジャーファーマンター培養における油脂生産量の経時変化を示す図。

[図22]初発グルコース濃度検討、250 mLジャーファーマンター培養における乾燥菌体重量の経時変化を示す図。

[図23]初発グルコース濃度検討、250 mLジャーファーマンター培養におけるグルコース濃度の経時変化を示す図。

[図24]初発グルコース濃度検討、250 mLジャーファーマンター培養における油脂生産量の経時変化を示す図。

[図25]初発グルコース濃度検討、培養初期のグルコース濃度の違いによる対糖油脂収率の比較を示す図。

[図26]初発グルコース濃度検討（高濃度）、250 mLジャーファーマンター培養における乾燥菌体重量の経時変化を示す図。

[図27]初発グルコース濃度検討（高濃度）、250 mLジャーファーマンター培養におけるグルコース濃度の経時変化を示す図。

[図28]初発グルコース濃度検討（高濃度）、250 mLジャーファーマンター培養における油脂生産量の経時変化を示す図。

[図29]初発グルコース濃度検討（高濃度）、培養初期のグルコース濃度の違いによる対糖油脂収率の比較を示す図。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明の油脂の製造方法は、糖を含む培地で*Leucosporidium golubevii*に属する酵母を培養して糖から油脂を生成し、得られた油脂を回収することを特徴とする。

[0011] 油脂は、アシルグリセロールとも呼ばれ、油脂の種類は*Leucosporidium golubevii*に属する酵母によって糖から発酵生産されるものであれば特に制限されず、油脂にはトリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロールが含まれる。

[0012] *Leucosporidium golubevii*は、分類学上、*Leucosporidium golubevii*に分類

される酵母であれば特に限定されないが、IS-300株（NITE BP-03675）を用いることが好ましい。

[0013] *Leucosporidium golubevii* IS-300株は、日本国千葉県袖ヶ浦市のハハコグサ（*Gnaphalium affine*）の花より単離された株であるが、2022年6月24日に独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターNITE Patent Microorganisms Depository（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に、受託番号NITE BP-03675でブダペスト条約に基づく国際寄託されている。コロニーはYPD寒天培地上で白色、光沢があり、平滑で、粘性物質を形成する。細胞は楕円形で、油滴を形成する（図1）。

IS-300株のrRNAをコードするDNAの塩基配列のうち、5.8S rDNA領域およびITS1（internal transcribed spacer1）領域、ITS2（internal transcribed spacer1）領域の塩基配列を配列番号1に示す。

[0014] 本発明の油脂の製造方法においてはIS-300株の類縁株を使用することもでき、IS-300株の類縁株であって、中温（例えば、28℃）での油脂生産能が低温（例えば、24℃）での油脂生産能と同等である株を使用することができる。ここで、28℃での油脂生産能が24℃での油脂生産能と同等であるとは、IS-300株の類縁株を糖含有培地中28℃で培養したときの油脂生産量が、同株を同じ糖含有培地中、同期間24℃で培養したときの油脂生産量の50%以上、好ましくは80%以上であることを意味する。

また、「類縁株」とは5.8S rDNA領域およびITS1領域、ITS2領域の塩基配列が、配列番号1と95%以上、好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上同一である株を意味する。

類縁株は、天然に存在する株でもよいし、IS-300株から変異等により育種される株でもよい。このような類縁株には、*Leucosporidium golubevii* CBS 9652が含まれる。

[0015] 培地は、糖を含み、*Leucosporidium golubevii*が生育可能な培地であれば特に限定されない。

糖は単糖でもよいし、多糖でもよい。また、培地には糖を含有する原料、す

なわち、糖含有原料が含まれてもよい。

具体的な糖としては *Leucosporidium golubevii* が資化可能な糖であれば特に制限されず、種々の糖を利用することができるが、例えば、グルコース、スクロース、フルクトース、キシロース、マンノース、可溶性デンプン、グリセロール、マンニトール等が挙げられる。

糖含有原料としては、モラセスやリグノセルロース系バイオマスの糖化物が挙げられる。ここで、リグノセルロース系バイオマスとしては、バガス、コーンストーバー、麦わら、稲わら、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサス、ササ、ススキ等の草本系バイオマスや、廃木材、オガ粉、樹皮、古紙等の木質系バイオマスなどを好適に用いることができる。なお、リグノセルロース系バイオマスは、セルロースとヘミセルロース（以下、セルロース類と略記することがある）を含んでおり、常法に従ってセルロース類を糖化酵素によってグルコースやキシロース等の糖に分解し、糖含有原料として使用することができる。

[0016] 培地中の糖の濃度は $50 \text{ g/L} \sim 500 \text{ g/L}$ であることが好ましく、 $60 \text{ g/L} \sim 420 \text{ g/L}$ であることがより好ましく、 $100 \text{ g/L} \sim 420 \text{ g/L}$ であることがさらに好ましい。なお、培地が糖含有原料を含むときは、糖含有原料の濃度から換算した糖濃度が上記範囲になるように調整する。

IS-300株は高濃度の糖を資化することができるので、IS-300株またはその類縁株を培養する場合には培地中の糖濃度は $200 \text{ g/L} \sim 500 \text{ g/L}$ または $200 \text{ g/L} \sim 400 \text{ g/L}$ としてもよい。これにより生産される油脂の濃度を上げることができ、油脂の製造効率を向上させることができる。

[0017] 培地はさらに窒素源を含むことが好ましい。窒素源は、特に制限されないが、例えば、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、ペプトン、カザミノ酸、コーンスティプリカー等を使用することができる。窒素源は硫安、尿素、硝酸カリウム等であってもよい。

これら以外の成分としては、マグネシウム塩（硫酸マグネシウム・七水和物等）、カルシウム塩（塩化カルシウム等）、リン酸塩（リン酸カリウム等）

、鉄塩（硫酸鉄等）、銅塩（硫酸銅等）、ナトリウム塩（塩化ナトリウム等）等の無機塩を含むことが好ましい。

- [0018] 一般的に油脂の高生産のためにはC／N比（培地中の窒素と炭素源との比、炭素源量／窒素源量）が高い方が望ましいとされるが、*Leucosporidium*属に属する酵母は油脂生産においてC／N比の影響を受けにくく、酵母の生育しうる窒素濃度であればよく、特に制限されないが、例えば、C／N比（窒素モル濃度に対する炭素モル濃度の比）が10～300が好ましく、10～150がより好ましく、10～100がさらに好ましく、30～100が特に好ましい。
- [0019] 培養温度は、*Leucosporidium golubevii*に属する酵母の生育しうる温度であればよく、特に制限されないが、例えば、10℃～30℃が好ましく、20℃～30℃がより好ましく、20～28℃がさらに好ましい。IS-300株は中温で生育することができるので、IS-300株またはその類縁株を培養する場合には培養温度は25℃～30℃であってもよい。20℃～28℃で培養することにより雑菌の生育を抑制して培養効率を向上させることができるという利点がある。
- [0020] 培地のpHは、*Leucosporidium golubevii*に属する菌株の生育しうるpHであればよく、特に制限されないが、例えば、pH3.5～7.0が好ましく、pH3.5～6.0がより好ましく、pH4.0～6.0がさらに好ましい。
- [0021] *Leucosporidium golubevii*の培養方法は、特に制限されず、菌体を直接培地に接種して培養してもよいが、予め培養して得られた前培養液を、液体培地に接種し培養してよい。あるいは、固形培地に培養しておいた菌株を液体培地に接種し培養してもよい。従来の酵母の培養に用いられる公知の培地を使用してもよく、例えば、PDA培地やYPD培地等を使用することができる。
- [0022] 培養の方法は、*Leucosporidium golubevii*に属する菌株の生育しうる方法であれば、特に制限されないが、例えば、攪拌培養、振とう培養、静置培養等で行うことができる。また、培養方式は、例えば、バッチ培養、流加培養、

連続培養等が挙げられる。

[0023] *Leucosporidium golubevii*に属する菌株の培養時間は、所望の油脂の量に応じて決定すればよく、例えば、1日以上であってよいが、4日以上であることが好ましい。長期間培養する場合、糖を培養中に途中添加することが好ましい。培養期間の上限は特に制限されないが、例えば、30日以内とすることができる。

[0024] 培養後の菌体から、油脂を回収する方法は、従来の公知の方法により行うことができる。例えば、まず、培養液から遠心分離、ろ過等により菌体を分離、回収し、菌体から油脂をノルマルヘキサン等の有機溶媒で抽出することにより、行ってもよい。

[0025] 得られた油脂を精製する工程を行ってもよい。精製工程は、油脂をまとめて精製するものであってもよいし、油脂のうち単一の成分を精製するものであってもよい。例えば、上記回収工程で得られた油脂を含む画分に水または酸を加えることで析出するガム質を除去したり、アルカリ添加による遊離脂肪酸の除去および活性白土を使用した脱色したりするなど、工業的な油脂精製法が適応できる。また、シリカゲルクロマトグラフィーを繰り返すことにより、さらに細かく成分を分離精製してもよい。

[0026] 得られた油脂は、そのまま、あるいは精製したうえで食油脂として使用してもよいが、バイオ燃料、バイオナフサ、潤滑油、または界面活性剤等の原料とすることもできる。

原料に可食糖やモラセスやリグノセルロース系バイオマスの糖化物などのバイオマスを用いて本発明の方法を行い、得られた油脂をメタノールとエステル交換すること（生成物としてFAME）でバイオディーゼルを得ることができ、また得られた油脂を水素化脱酸素しその後、異性化、必要に応じて分解すること（生成物としてHVO、HEFA）でバイオディーゼル、バイオジェット燃料、バイオナフサを得ることができる。得られた油脂を石油精製の水素化処理装置にて石油系原料と共処理することで石油系燃料との混合物であるディーゼル、ジェット燃料、灯油、ガソリン等を得ることができる。

潤滑油としては、例えば、潤滑油基材あるいは添加剤として使用することができ、本発明の方法を行い、得られた油脂をそのまま、あるいは不飽和結合部の部分水素化、あるいは脂肪酸を生成させアルカン化することなどで得ることができる。

界面活性剤としては、例えば、脂肪酸金属塩などの陰イオン界面活性剤が挙げられ、本発明の方法を行い、得られた油脂から脂肪酸を生成させ、それを中和することで得ることができる。

[0027] [実施例]

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の態様には限定されない。

実施例 1

[0028] < 1 > IS-300株の取得

IS-300株は日本国千葉県袖ヶ浦市のハハコグサ (*Gnaphalium affine*) の花より、糖から油脂を生産する能力を指標にして取得された。

[0029] IS-300株のrRNAをコードするDNAの塩基配列のうち、5.8S rDNA領域およびITS1 (internal transcribed spacer1) 領域、ITS2 (internal transcribed spacer2) 領域の塩基配列をDNAシーケンサーで解析し、既存のデータベースに登録されている*Leucosporidium*属他株の配列データとあわせ系統解析を行った結果、IS-300株の5.8S rDNA領域およびITS1領域、ITS2領域は*Leucosporidium golubevii*のタイプ株であるCBS 9651株と100%一致しており、かつ*Leucosporidium golubevii* CBS 9652株と単系統群を形成した(図2)。なお、IS-300株とCBS 9652株は1塩基のみの違いであった。このことからIS-300株は*Leucosporidium golubevii*と同定された。なお、後述の通り、CBS 9651株は28℃での生育および油脂生産能においてIS-300株とは異なるので、5.8S rDNA領域およびITS1領域、ITS2領域の配列が一致するものの、IS-300株はCBS 9651株とは異なる株である。

[0030] 新規*Leucosporidium golubevii* IS-300株および*Leucosporidium golubevii* CBS 9652の5.8S rDNA領域およびITS1領域、ITS2領域の塩基配列を以下に示す

。

[0031] >Leucosporidium golubevii.IS-300

GTGAATATTAGCGCATCTCTTCGGAGAGCGTGACCTCCACTTTCTAACTCTGTGCATTTATTTGGCGGC
TCTGAAGATGTAACAGTCTACTTAGCTGCGGCTCATTTTATAACTAGTTAAAGTATGTAACGAAATA
TCGAAACAAAAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTTGCTCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
TGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCGTGGT
ATTCCGCGGAGCATGTCTGTTTGAGTGTGATGAATCTTCAACCCACCAGTTTCTTGTAATTGGATTG
GTGTTTGGATTTTGAGTGTGCTATTCCTAGTTGAATCAGCTCATTCGTAATATATTAGCATCTCTAAT
TCGAACTCGGATTGACTCAGTGAATAGACTATTCGCTGAGGACACGCTCTTTGTAGTGTGGCCGAATG
AGATCTCAGTAGAAGCTTCCAACACTTTAGTCAACTTTAGA (配列番号 1)

>Leucosporidium golubevii.CBS9652

GTGAATATTAGCGCATCTCTTCGGAGAGCGTGACCTCCACTTTCTAACTCTGTGCATTTATTTGGCGGC
TCTGAAGATGTAACAGTCTACTTAGCTGCGGCTCATTTTATAACTAGTTAAAGTATGTAACGAAATA
TCGAAACAAAAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTTGCTCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
TGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCGTGGT
ATTCCGCGGAGCATGTCTGTTTGAGTGTGATGAATCTTCAACCCACCAGTTTCTTGTAATTGGATTG
GTGTTTGGATTTTGAGTGTGCTATTCCTAGTGAATCAGCTCATTCGTAATATATTAGCATCTCTAAT
CGAACTCGGATTGACTCAGTGAATAGACTATTCGCTGAGGACACGCTCTTTGTAGTGTGGCCGAATGA
GATCTCAGTAGAAGCTTCCAACACTTTAGTCAACTTTAGA (配列番号 2)

実施例 2

[0032] < 2 > 他のLeucosporidium属種との比較

PDA (potato dextrose agar) 培地に生育した各酵母株を、14ml PSチューブに分注したYPD培地に植菌し、48時間、24℃、200rpmにて振盪培養した（前培養）。前培養液を終濃度 $OD_{600}=0.1$ となるように、500mlバッフル付きフラスコに入ったYPD改変培地100mlに植菌し、160rpmで振盪培養した（本培養）。この時、培養温度を24℃と28℃に設定し、必要に応じ消泡剤（Antifoam 204, SIGMA）を添加した。本培養開始から24時間ごとに1mlサンプリングし、乾燥菌体重量と油脂定量に用いた。

[0033] 各培地の組成は以下の通り。

PDA培地

Potato Dextrose broth (Difco) 24 g

Agar (Wako) 20g

蒸留水 1 L

YPD培地

Bacto peptone (Difco) 20 g

Yeast extract (Difco) 10 g

Glucose (Wako) 20 g

蒸留水 1 L

YPD改変培地

Bacto peptone (Difco) 10 g

Yeast extract (Difco) 10 g

Glucose (Wako) 60 g

蒸留水 1 L

[0034] サンプルを遠心（700g、5分）し、得られた沈殿物を凍結乾燥器にて一晚乾燥し乾燥菌体重量を測定した後に油脂生産量の測定に用いた。油脂量測定は以下の方法で行った。

乾燥菌体中のリパーゼを失活させるために、蒸留水を260 μ l、10x D-PBS (Wako) 40 μ lを加えて菌体を再懸濁し、10分間煮沸した。25mg/ml Zymolyase溶液 (Nacalai Tesque, Zymolyase-20T) を100 μ l加えて35℃で1時間振盪しながらインキュベートした後、ガラスビーズ (Merck, G8772-500G) を200 μ l、ヘキサンを500 μ l添加し、1時間攪拌 (TAITEC, E-36, 最大スピード) した。遠心 (10,000g, 10分) し、ヘキサン層を新しいマイクロチューブに移したのち、再度ヘキサンを500 μ l加え、1時間攪拌した。遠心 (10,000g, 10分) したヘキサン層をマイクロチューブに加えた。得られたヘキサン抽出物中の油脂量を酵素反応法 (ラボアッセイ トリグリセライド, Wako, 290-63701) にて測定した。

[0035] 図3および図4に、各菌株の24時間ごとの乾燥菌体重量と油脂生産量を示す。

24℃では*L. drummii* CBS 11562を除くすべての株で旺盛に増殖し、油脂を高生産することが確認できた(図3)。一方、28℃では*Leucosporidium golubevii* CBS9652とIS-300株を除くすべての株で顕著に増殖が抑制されたが、IS-300株とCBS962株はわずかに増殖が抑制されたにすぎず、油脂も高生産していることが確認できた(図4)。

実施例 3

[0036] IS-300株のCYM培地をベースとした添加窒素源種の検討

[試験管培養(前培養)]

アズワン社15 mL ポリスチレン (PS) チューブ (φ17 mm×100 mm) に入った改変YPD113培地 (10 g/L Bacto Yeast Extract, 10 g/L Bacto Tryptone, 30 g/L Glucose) 各3 mL に、YPD寒天プレート上に生えた油糧酵母IS-300株の菌体をディスポループ先端で僅かに掻き取り植菌した。SANYO社INCUBATOR MIR-253内に設置したTAITEC社ROTARY SHAKER NR-2を約200 rpmに設定し、28℃で旋回培養を行った。2日間の前培養を実施した。

[0037] [500 mLバッフル付き三角フラスコ培養でのCYM培地をベースとした窒素源種検討 (本培養)]

CYM培地、およびCYM培地組成中の硫安を尿素あるいは硝酸カリウムへ変更した培地を作製した(表1)。硫安、尿素あるいは硝酸カリウムの添加量は窒素濃度が同じになるように添加した。培地作製時は、それぞれの培地を6N KOHにてpH5.5に調整後、所定量にメスアップし孔径0.22 μmのMFフィルターによるろ過滅菌を行った。その後、滅菌済みの500 mLバッフル付き三角フラスコへ各100 mLずつ無菌的に分注した。試験管での前培養液濁度 (OD600 nm値) を分光光度計で測定し本培養開始時のOD600 nm値が0.05となる量を植菌した後、28℃、180 rpmの速度で旋回培養を実施した。

[0038]

[表1]

表 1. CYM 培地をベースとした添加窒素源種の検討用培地

成分	各検討条件の濃度		
	CYM 培地	CYM 培地 尿素条件	CYM 培地 硝酸カリウム条件
Bacto Yeast Extract	0.75 g/L	0.75 g/L	0.75 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g/L	-	-
CO(NH ₂) ₂	-	0.045 g/L	-
KNO ₃	-	-	0.15 g/L
KH ₂ PO ₄	0.4 g/L	0.4 g/L	0.4 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5 g/L	1.5 g/L	1.5 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.22 g/L	0.22 g/L	0.22 g/L
ZnSO ₄	0.0003 mg/L	0.0003 mg/L	0.0003 mg/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.029 mg/L	0.029 mg/L	0.029 mg/L
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L
MES (pH 緩衝剤)	21.3 g/L	21.3 g/L	21.3 g/L
Glucose	60 g/L	60 g/L	60 g/L

[0039] 図5にIS-300株の乾燥菌体重量、図6に油脂生産量の経時変化を示す。硫安、尿素および硝酸カリウムをそれぞれ添加窒素源とした各条件で、菌体増殖および油脂生産が確認された。

実施例 4

[0040] IS-300株のYSM培地をベースとした添加窒素源種の検討

実施例3と同一条件で前培養を実施した。本培養では、YSM培地、YSM培地組成中の硫安を他窒素源である尿素、硝酸カリウムへ窒素(N)量を揃えて変更した培地を作製した(表2)。実施例3と同様にして各培地を作製し、同一の培養条件にてバッフル付き三角フラスコの旋回培養を実施した。

[0041]

[表2]

表 2. YSM 培地をベースとした添加窒素源種の検討用培地

成分	各検討条件の濃度		
	YSM 培地 硫安条件	YSM 培地 尿素条件	YSM 培地 硝酸カリウム条件
Bacto Yeast Extract	0.5 g/L	0.5 g/L	0.5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g/L	0.5 g/L	0.5 g/L
CO(NH ₂) ₂	-	0.23 g/L	-
KNO ₃	-	-	0.77 g/L
KH ₂ PO ₄	0.092 g/L	0.092 g/L	0.092 g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.7 g/L	0.7 g/L	0.7 g/L
Na ₂ HPO ₄ ・2H ₂ O	1.6 g/L	1.6 g/L	1.6 g/L
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.066 g/L	0.066 g/L	0.066 g/L
ZnSO ₄	0.23 mg/L	0.23 mg/L	0.23 mg/L
MnSO ₄ ・5H ₂ O	0.57 mg/L	0.57 mg/L	0.57 mg/L
H ₃ BO ₃	0.50 mg/L	0.50 mg/L	0.50 mg/L
FeCl ₃ ・6H ₂ O	6.00 mg/L	6.00 mg/L	6.00 mg/L
MES	21.3 g/L	21.3 g/L	21.3 g/L
Glucose	60 g/L	60 g/L	60 g/L

[0042] 図 7 に IS-300 株の乾燥菌体重量、図 8 に油脂生産量の経時変化を示す。硫安、尿素および硝酸カリウムをそれぞれ添加窒素源とした各条件で、菌体増殖および油脂生産が確認された。

実施例 5

[0043] IS-300 株における培地中の硫安濃度の検討

[500 mL バッフル付き三角フラスコ培養での CYM 培地をベースとした硫安濃度の検討（本培養）]

実施例 3 と同一条件で前培養を実施した。本培養では、CYM 培地（硫安濃度 0.1 g/L、窒素濃度 0.103 g/L、C/N 比=273）、CYM 培地組成中の硫安を 10 倍の濃度（硫安濃度 1.0 g/L、窒素濃度 0.294 g/L、C/N 比=96）、100 倍の濃度（硫安濃度 10 g/L、窒素濃度 2.202 g/L、C/N 比=13）とした培地を作製した（表 3）。なお、ここでいう C/N 比は窒素モル濃度に対する炭素モル濃度の比を示す。

。培地組成以外は実施例3と同様に各培地を作製し、同一の培養条件にてバツフル付き三角フラスコの巡回培養を実施した。

[0044] [表3]

表 3. CYM 培地をベースとした硫安濃度の検討用培地

成分	各検討条件の濃度		
	CYM 培地	CYM 培地	CYM 培地
	0.1g/L 硫安条件	1.0 g/L 硫安条件	10 g/L 硫安条件
Bacto Yeast Extract*	0.75 g/L	0.75 g/L	0.75 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g/L	1.0 g/L	10 g/L
KH ₂ PO ₄	0.4 g/L	0.4 g/L	0.4 g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.5 g/L	1.5 g/L	1.5 g/L
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.22 g/L	0.22 g/L	0.22 g/L
ZnSO ₄	0.0003 mg/L	0.0003 mg/L	0.0003 mg/L
MnSO ₄ ・5H ₂ O	0.029 mg/L	0.029 mg/L	0.029 mg/L
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.025 mg/L	0.025 mg/L	0.025 mg/L
MES (pH 緩衝剤)	63.9 g/L	63.9 g/L	63.9 g/L
Glucose	60 g/L	60 g/L	60 g/L

* BD 社 Bionutrients-technical-manual より Total Nitrogen 10.9 %

[0045] 図 9 に各硫安濃度の培地条件下における IS-300 株の乾燥菌体重量、図 10 に油脂生産量の経時変化を示す。硫安濃度を 10 倍濃度（硫安濃度 1.0 g/L、窒素濃度 0.294 g/L、C/N 比=96）とした条件にて、基本条件（硫安濃度 0.1 g/L、窒素濃度 0.103 g/L、C/N 比=273）と比較し油脂生産量について 2 倍以上の増加が認められた。

実施例 6

[0046] IS-300 株のジャーファーマンター培養での各炭素源種からの油脂生産確認
[試験管培養(前培養)]

アズワン社 15 mL ポリスチレン (PS) チューブ (φ17 mm×100 mm) に入った YEL 培地 (5 g/L Bacto Yeast Extract、30 g/L Glucose) 各 3.5 mL に、YPD 寒天プレート上に生えた各油糧酵母菌体をディスポール先端で僅かに掻き取り植菌した。いわしやバイオサイエンス社多連槽振盪培養機 MLU-4-GR-16 を

140 rpmに設定し、28 °Cで2日間の巡回培養を行った。

[0047] [250 mLジャーファーマンター培養での各炭素源からの油脂生産性比較（本培養）]

ジャーファーマンターはABLE-Biott社製250 mL8連培養槽 Bio Jr.8、給気は圧縮空気を使用した。各本培養槽には、それぞれグルコース、キシロース、アラビノース及びグリセロールを炭素源とした95mLの各種CYM改変培地（表4、オートクレーブ滅菌）を準備した。その際、炭素源濃度は約60 g/L（植菌後）とした。試験管培養液を混合し、前培養液5 mLを各本培養槽に植菌した後、22 °Cでの回分培養を開始した。攪拌回転数は下限300 rpmとし、D0下限が2 ppmとなるよう攪拌回転数の自動制御（D0カスケード制御）を行った。通気条件は100 mL/min（1 vvm）とした。培養開始以降、0.5 N KOHによりpH5.0が下限となるよう自動制御し、pHが上昇した場合は0.1 N H₂SO₄にて外付けペリスタティックポンプを用いたマニュアル制御で設定pHまで低下させた。本培養は、168～216時間後まで継続した。

[0048] [表4]

表 4. CYM 改変培地をベースとした炭素源の検討用培地（前培養の植菌後）

成分	濃度
CSL（ソルリス095E）*	2.12 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g/L
KH ₂ PO ₄	0.4 g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.5 g/L
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.22 g/L
ZnSO ₄	0.0003 mg/L
MnSO ₄ ・5H ₂ O	0.029 mg/L
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.025 mg/L
各種炭素源	60 g/L

* CSL : Corn Steep Liquor

[0049] 図11、図12および図13に、それぞれ、各炭素源条件下におけるIS-300株の乾燥菌体重量、各炭素源濃度および油脂生産量の経時変化を示す（アラビノース濃度のみ未測定）。C6糖グルコース、C5糖のキシロースおよびアラ

ビノース、またグリセロールを炭素源とした培養全てにおいて菌体増殖、油脂生産が確認された。C6糖グルコースを炭素源とした条件で最も速い菌体増殖および油脂生産、高い油脂生産量を示した。

実施例 7

[0050] IS-300株のジャーファーマンター培養での廃糖蜜からの油脂生産確認

[試験管培養(種培養)]

アズワン社15 mL ポリスチレン (PS) チューブ ($\phi 17$ mm $\times$ 100 mm) に入った YEL培地 (5 g/L Bacto Yeast Extract, 30 g/L Glucose) 各3.5 mL に、YPD 寒天プレート上に生えた油糧酵母IS-300株の菌体をディスポール先端で僅かに掻き取り植菌した。SANYO社INCUBATOR MIR-253内に設置したTAITEC社ROTARY SHAKER NR-2を約200 rpmに設定し、28 °Cで旋回培養を行った。2日間の前培養を実施した。

[0051] [フラスコ培養(前培養)]

試験管培養液を混合し、種培養液各5 mLをバツフル付き500 mL三角フラスコに入ったYEL培地 (5 g/L Bacto Yeast Extract、 30 g/L Glucose) 100 mLに植菌し、いわしやバイオサイエンス社多連槽振盪培養機MLU-4-GR-16を180 rpmに設定し28 °Cで2日間培養した。

[0052] [2Lジャーファーマンター培養での廃糖蜜からの油脂生産確認 (本培養)]

ジャーファーマンターは丸菱バイオエンジニアリング社製2 L培養槽 Bioneer-Neo 2 Lを使用し、本培養槽には、廃糖蜜を糖源とした950mLのCYM改変培地を準備した。CYM改変培地は実施例6と同一の組成とした。その際、糖源濃度は約60 g/L (グルコース、フルクトース、ショ糖の合算値) とした。前培養液50 mLを本培養槽に植菌した後、22 °Cでの回分培養を開始した。攪拌回転数は下限300 rpmとし、DO下限が24% (約2 ppm) となるよう攪拌回転数の自動制御 (DOカスケード制御) を行った。通気条件は1 L/min (1 vvm) とした。培養開始以降、1.0 N KOH及び0.1 N H₂SO₄によりpHが5.0となるよう自動制御を行った。

[0053] 図14および図15に、それぞれ、廃糖蜜を糖源とした条件下におけるIS-300株の乾燥菌体重量、各糖 (スクロース、グルコース、フルクトース)、油脂

生産量の経時変化を示す。廃糖蜜を炭素源とした条件においても菌体増殖および油脂生産が認められた。培養開始後にスクロース濃度が低下し、次にグルコース濃度、最後にフルクトース濃度が低下する糖濃度の推移を示した。

実施例 8

[0054] ジャーファーマンター培養での培養温度検討

[試験管培養(前培養)]

種培養として実施例 6 と同条件にて、試験管での前培養を行った。

[0055] [250 mL ジャーファーマンター培養での培養温度検討 (本培養)]

ジャーファーマンター、給気は実施例 6 と同一のものをを用いた。各本培養槽には、試薬グルコースを糖源とした 95 mL の CYM 改変培地を準備した。CYM 改変培地は実施例 6 と同一の組成とした。その際、糖濃度は約 60 g/L (植菌後) とした。培養温度条件は、10、12、16、20、24、28、30 及び 32℃ とした。試験管培養液を混合し、前培養液 5 mL を各本培養槽に植菌した後、各温度条件での回分培養を開始した。D0、攪拌回転数の条件は実施例 6 と同一とした。本培養は 144 時間後まで継続した。

[0056] 図 16、図 17 および図 18 に、それぞれ各温度条件における IS-300 株の乾燥菌体重量、グルコースおよび油脂生産量の経時変化を示す。培養温度 10℃ から 30℃ の範囲において菌体増殖および油脂生産が確認され、20℃ から 28℃ の範囲において油脂生産速度、油脂生産量が良好な結果を示した。培養温度 32℃ では油脂生産がみられなかった。

実施例 9

[0057] ジャーファーマンター培養での培養 pH 検討

[試験管培養(種培養)、フラスコ培養(前培養)]

実施例 7 と同条件にて、試験管およびフラスコにて種培養および前培養を行った。

[0058] [2L ジャーファーマンター培養での培養 (本培養)]

ジャーファーマンター、給気は実施例 7 と同一のものをを用いた。本培養槽には、試薬グルコースを糖源とした 950 mL の CYM 改変培地を投入した。CYM 改変培

地は実施例 6 と同一の組成とした。その際、糖濃度は約 60 g/L (植菌後) とした。培養 pH 条件は、pH 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 及び pH 6.0 とした。前培養液 50 mL を本培養槽に植菌した後、22 °C での回分培養を開始した。攪拌回転数は下限 300 rpm とし、D0 下限が 24% (約 2 ppm) となるよう攪拌回転数の自動制御 (D0 カスケード制御) を行った。通気条件は 1 L/min (1 vvm) とした。培養開始以降、1.0 N KOH 及び 0.2 N H₂SO₄ により各検討 pH 条件となるよう自動制御を行った。

- [0059] 図 19、図 20 および図 21 に、それぞれ、各培養 pH 条件における IS-300 株の乾燥菌体重量、グルコース濃度および油脂生産量の経時変化を示す。全ての培養 pH 条件において菌体増殖および油脂生産が認められた。培養 pH 3.5 では、若干グルコース消費が遅い傾向となった。

実施例 10

- [0060] ジャーファーマンター培養における培地の初発糖濃度検討 (試薬グルコース濃度 240 g/L 以下の範囲)

[試験管培養(前培養)]

前培養として実施例 6 と同条件にて、試験管培養を行った。

- [0061] [250mL ジャーファーマンター培養での培養 (本培養)]

ジャーファーマンター、給気は実施例 6 と同一のものを用いた。培地の初発糖 (グルコース) 濃度条件は、60 g/L (基準)、100 g/L、140 g/L、180 g/L、210 g/L および 240 g/L とした。実施例 6 の CYM 改変培地の試薬グルコース濃度を 60 g/L (植菌後) とした培地組成条件を基準とした。他のグルコース濃度の培地については、基準 (グルコース濃度 60 g/L) の培地組成からグルコース濃度の増加分に応じて他の培地成分の濃度を増加させた条件とした。これらの各培地 95mL を 250mL 培養槽に投入した。試験管培養液を混合し、前培養液 5 mL を各本培養槽に植菌した後、各糖濃度条件での回分培養を開始した。pH、D0、攪拌回転数の条件は実施例 6 と同一とした。本培養は 144-240 時間後まで継続した。

- [0062] 図 22、図 23 および図 24 に、それぞれ、各グルコース濃度条件における I

S-300株の乾燥菌体重量、グルコース濃度および油脂生産量の経時変化を示す。グルコース濃度60 g/Lから240 g/Lの範囲において菌体増殖および油脂生産が認められた。また、図25に各初発グルコース濃度条件での対糖油脂収率（グルコース60g/L培養時との相対値）を示す。

実施例 11

[0063] ジャーファーマンター培養における培地の初発糖濃度検討（高濃度）

〔試験管培養（前培養）〕

前培養として実施例6と同条件にて、試験管培養を行った。

[0064] [250mLジャーファーマンター培養での培養（本培養）]

ジャーファーマンター、給気は実施例6と同一のものを用いた。培地の初発糖（グルコース）濃度条件は、60 g/L（基準）、240 g/L、300 g/L、360 g/L、420 g/Lおよび480 g/Lとした。実施例6のCYM改変培地の試薬グルコース濃度を60 g/L（植菌後）とした培地組成条件を基準とした。他のグルコース濃度の培地については、基準（グルコース濃度60 g/L）の培地組成からグルコース濃度の増加分に応じて他の培地成分の濃度を増加させた条件とした。これらの各培地95mLを各250mL培養槽に準備した。試験管培養液を混合し、前培養液5 mLを各本培養槽に植菌した後、各糖濃度条件での回分培養を開始した。pH、D0、攪拌回転数の条件は実施例6と同一とした。本培養は192-360時間後まで継続した。

[0065] 図26、図27および図28に、それぞれ、各初発グルコース濃度条件におけるIS-300株の乾燥菌体重量、グルコース濃度および油脂生産量の経時変化を示す。グルコース濃度60 g/Lから420 g/Lの範囲において菌体増殖および油脂生産が認められた。グルコース濃度480 g/L条件では油脂生産がみられなかった。また、図29に各グルコース濃度条件での対糖油脂収率（グルコース60g/L培養時との相対値）を示す。

請求の範囲

- [請求項1] 糖を含む培地で*Leucosporidium golubevii*に属する酵母を培養して糖から油脂を生成し、得られた油脂を回収することを特徴とする、油脂の製造方法。
- [請求項2] 前記糖を含む培地がリグノセルロース系バイオマスの糖化物を含む培地である、請求項1に記載の油脂の製造方法。
- [請求項3] 培養温度が10℃～30℃である、請求項1に記載の油脂の製造方法。
- [請求項4] 培養温度が25℃～30℃である、請求項1に記載の油脂の製造方法。
- [請求項5] 糖濃度が50g/L～500g/Lである、請求項1に記載の油脂の製造方法。
- [請求項6] 糖濃度が200g/L～500g/Lである、請求項1に記載の油脂の製造方法。
- [請求項7] 前記*Leucosporidium golubevii*に属する酵母が*Leucosporidium golubevii* IS-300 (NITE BP-03675) 株またはその類縁株である、請求項1～6のいずれか一項に記載の油脂の製造方法。
- [請求項8] 前記類縁株は、5.8S rDNA領域およびITS1領域、ITS2領域の塩基配列が配列番号1と95%以上同一であり、28℃での油脂生産能が24℃での油脂生産能と同等である株である、請求項7に記載の油脂の製造方法。
- [請求項9] 油脂が、バイオ燃料、バイオナフサ、食物油、潤滑油、または界面活性剤の原料である、請求項1～8のいずれか一項に記載の油脂の製造方法。
- [請求項10] 請求項1～8のいずれか一項に記載の方法で製造された油脂。
- [請求項11] 請求項10の油脂を原料とするバイオ燃料またはバイオナフサ。
- [請求項12] *Leucosporidium golubevii* IS-300 (NITE BP-03675) 株。