総 説

微生物による多価不飽和脂肪酸の生産

佐 野 敏 郎

出光石油化学(株)開発部

(〒299-02 千葉県袖ヶ浦町上泉 1,660)

Production of Polyunsaturated Fatty Acids
by Microorganisms

Toshio SANO

Planing and Development Dept. Idemitsu Petrochemical Co., Ltd.

(1,660, Kami-izumi, Sodegaura, Chiba-ken, 〒299-02)

Polyunsaturated fatty acids play the important part in living body as the precursors to synthesize prostaglandins. But the function of polyunsaturated fatty acid has not been made clear. Because natural resources for polyunsaturated fatty acids were limited.

Recently, the commercial process of γ -linolenic acid production was developed by using the fungus which belongs to genus *Mortierella*. Since then, many researchers are making an attempt to develop the new process to produce polyunsaturated fatty acids. Especially, γ -linolenic acid, dihomo- γ -linolenic acid, arachidonic acid and icosapentaenoic acid are widely studied.

1 はじめに

近年、バイオテクノロジーは目覚ましく発達し、遺伝子組み換え、細胞融合、バイオリアクター、あるいはタンパク工学などの新しい技術が世に出されている。これらの技術の一部は既に実用化されているが、大部分は基礎研究の段階で、今後、実用化に向けた研究開発が推進されるであろう。

油脂を取り扱う世界においても、このような先端技術を取り入れた研究が進んでいる。例えば、遺伝子組み換え、細胞融合技術を用いた油脂生産植物の品種改良¹⁾、リパーゼを用いたバイオリアクターによる油脂の改質²⁾がある。このほか、バイオテクノロジーの油脂産業分野への応用として、天然に存在が限られた油脂類の生産を微生物を用いて行わせる研究がある。カカオ脂類似油脂や機能性脂肪酸の生産に関するものが多い³⁾。なかでも、多価不飽和脂肪酸に関する研究が盛んである。このきっかけとなったのは鈴木らによって報告された *Mortierella* 属の糸状菌による γ -リノレン酸生産である⁴⁾。この技術は既に工業化されており、微生物を利用して油脂生産を工業化した世界初の例でもある。以来、 γ -リノレン酸を始め、多価不飽和脂肪酸の微生物生産に関する研究が活発に行われている。また、生体内での多価不飽

和脂肪酸の役割が論議され、生理機能が明らかになるにつれて多価不飽和脂肪酸の重要性が高まっている。

今回は現在研究されている多価不飽和脂肪酸の微生物生産について解説する。

2 微生物と油脂生産

2・1 油脂生産微生物

微生物を用いて油脂を生産させる試みは古くから行われている。これまでに数多くの生産菌が報告されている。油脂生産性の高い微生物として *Lipomyces*, *Candida*, *Rhodotorula* 属の酵母, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* 属の糸状菌がよく知られている(表-1)。菌体中の油脂含有率は60%を越える菌株もあるが、グルコース等の炭素源に対する収率(対糖収率)は高々30%で、1kgの油を作るのに3kgの原料が必要である。それゆえ、現在の糖質価格では、糖質からの油脂生産は大豆油等の植物油にコスト面で太刀打ちできない。微生物を用いて生産される油脂や脂肪酸に生理活性等の特別な機能が要求される一因である。

2・2 油脂生産パターン

微生物はその細胞内にトリグリセリドの形で油脂を蓄積する。蓄積の代表的なパターンを図-1に示す。バッチ培養における油脂生産パターンは2つのフェーズに分

表-1 油脂生産微生物

酵 母			糸 状 菌		
菌 株	油脂含有率 (%)	油脂対糖収量 (%)	菌 株	油脂含有率 (%)	油脂対糖収量 (%)
<i>Candida curvata</i>	51~58	15~27	接合菌類		
<i>Candida</i> sp 107	42	23	<i>Cunninghamella elegans</i>	56	—
<i>Cryptococcus terricolus</i>	55~65	21	<i>Mortierella vinacea</i>	25~66	20
<i>Lipomyces starkeyi</i>	31~43	9~16	<i>Mucor circinelloides</i>	65	14*
<i>Lipomyces lipoferus</i>	64	22	<i>Mucor mucedo</i>	51	5*
<i>Rhodotorula gracilis</i>	32~66	15~17	<i>Rhizopus arrhizus</i>	49	—
<i>Rhodotorula graminis</i>	36~41	10~16	子のう(囊)菌類		
<i>Tricosporon cutaneum</i>	45	24	<i>Aspergillus nidulans</i>	27	9*
			<i>Aspergillus terreus</i>	51~57	10~13*
			<i>Penicillium lilacinum</i>	35~56	12~25*

注) * 印は静置培養のデータ

けられる。最初は微生物が増殖するフェーズで炭素源以外の栄養物の不足が増殖を制限するまでは細胞が増える(単位培養液量当たりの細胞数、重量共に増加)。通常、増殖を制限する栄養源として硫安などの窒素源が用いられる。次に起こるのが油脂蓄積のフェーズである。このフェーズではもはや細胞数の増加は見られないが、油脂蓄積による細胞重量の増加は炭素源が枯渇するまで続く。

増殖が衰えた後に油脂の蓄積が見られるのは、栄養源の欠乏によって増殖速度が低下するとともに油脂合成系を除くタンパク合成などの代謝活性が低下するためであると考えられている。このことは人間でも同様で、大人になって成長が止まってからの糖分の摂り過ぎは脂肪太りの原因となる。油脂生産微生物の場合は細胞内に油滴としてその存在が確認できるほど蓄える。

2.3 油脂蓄積に影響する因子

油脂生産微生物は自らの細胞内に多量の油脂を蓄えるが、生産性、構成脂肪酸組成に影響を及ぼすものがある。これまで検討した *Mortierella* 属による γ -

リノレン酸 (GLA) 生産の例とあわせて示す。

2.3.1 C/N 比

通常の培養では炭素源を増殖制限因子とする場合が多い。この時の C/N 比(培地中の初発炭素源/窒素源重量比)は 5~10/1 である。先に述べたが油脂生産を行う場合は窒素源を増殖制限因子として油脂蓄積をさせるので、C/N 比を 20/1 以上、40/1 前後で培養する⁵⁾。

図-1 油脂蓄積微生物の増殖パターン⁵⁾

図-2 *Mortierella* sp. を用いた γ -リノレン酸生産における初発 C/N 比が油脂蓄積及び γ -リノレン酸含有率に及ぼす影響

GLA 生産の場合も C/N 比を大きくすることによって菌体中の油脂含有率が高くなる (図-2)。しかし、逆に油脂中の GLA 含有率は低下する。

2.3.2 増殖速度と溶存酸素濃度

Choi ら⁷⁾は *Rhodotorula gracili* を用いて連続培養を行い、増殖速度と油脂生産性及び脂肪酸組成との関係を調べている。増殖速度を 0.02 h^{-1} から 0.09 h^{-1} に上げることによってタンパク質の含有率は 8.3% から 37.1% に増えるが、油脂含有率は 50% から 14% に減少した。増殖速度が低いほど油脂の生産性は高くなるが、単位菌体当たり油脂生産速度は増殖速度にかかわらず一定であった。油脂の蓄積が起こるのは細胞の持つ生産活性が上昇したためではなく、むしろ、低増殖速度下において油脂合成系以外の代謝活性が低下したためであると論じている。油脂蓄積を行わない微生物は低増殖速度下において油脂合成活性も低下するため油脂を蓄積しないと考えられている。

また、Choi らは脂肪酸組成も増殖速度によって変化することを報告している。増殖速度が速くなるにしたがって $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ の不飽和脂肪酸は増加するが $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ の飽和脂肪酸、モノエン脂肪酸は減少する。

GLA の生産でも同じ減少が認められる。増殖が活発な培養初期は GLA の含有率が高いが、油脂の蓄積はほとんど見られない。培養後期に増殖速度が低下するとともに油脂の蓄積量が増えるが、GLA の含有率は低下する (図-3)。培養初期に GLA 含有率の高い油脂を回収することも考えられるが、この時期では大部分の GLA が極性脂質区分に存在するためトリグリセリド区分からの GLA 収量はわずかである。

脂肪酸組成は培養液の溶存酸素濃度によっても影響を受ける。前述の Choi らによれば溶存酸素濃度の低い条件で培養すると $C_{18:1}$ は増えるが、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ の減少が起こる。酵素 (desaturase) による脂肪酸の不飽和化反応は酸化的脱水素反応で分子状酸素が必要とされている。低溶存酸素濃度下で基質である酸素の不足により不飽和化が進まず不飽和脂肪酸の割合が減少すると考えられる。

GLA 生産において溶存酸素濃度の影響をみるため培養槽かくはん速度を変えて培養を行った。低いかくはん速度の下、すなわち、溶存酸素が不足する条件下では GLA の含有率が低下した (図-4)。

2.3.3 培養温度

培養温度を変化させると多くの微生物において脂肪酸組成が変わることが知られている。低温下では生体機能を維持するために膜の流動性を保とうとする。そこで、脂質中の不飽和脂肪酸の割合が増える。Ferrante らは *Candida lipolytica* の培養温度を 25°C から 10°C に下

図-3 *Mortierella* sp. の γ -リノレン酸生産パターン

図-4 *Mortierella* sp. を用いた γ -リノレン酸生産における培養槽かくはん速度アップによる γ -リノレン酸含有率の向上

げるとオレイル-CoA 不飽和化酵素の活性が 2 倍になり、リノール酸の比率が増えると報告している⁸⁾。

GLA 生産菌で培養温度を 30°C から 20°C に下げると GLA 含有率の上昇が見られる。極性脂質区分の GLA は増加するが、トリグリセリド区分での増加はない。培養温度を下げることによって増殖速度も低下するため GLA の生産性が下がり工業化に際し問題となる。

3 多価不飽和脂肪酸の微生物生産

多価不飽和脂肪酸には $n-6$ 系脂肪酸である γ -リノレン酸 (GLA)、ジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) アラキドン酸 (AA)、 $n-3$ 系脂肪酸である α -リノレン酸 (ALA)、イコサペンタエン酸 (EPA) などがある。生体内では図-5 に示す経路で合成される。人間はリノール酸、ALA を体内で合成することができないため食事が

図-5 多価不飽和脂肪酸の代謝経路

ら摂取する必要がある。通常はリノール酸、ALA の摂取で他の多価不飽和脂肪酸を充分供給できるが、疾病等により、図-5 に示した合成経路の一部が阻害を受ける。例えば、 $n-6$ 系脂肪酸合成の律速ステップであるリノール酸から GLA を合成する反応は動物脂肪の摂り過ぎやアルコールの飲み過ぎで阻害を受けると言われている^{9), 10)}。このような場合には GLA を直接摂る必要がある。

多価不飽和脂肪酸はプロスタグランジンの直接の前駆体として生体内で重要な役割を演じている。プロスタグランジンの生理作用が明らかにされるにつれて、多価不飽和脂肪酸も注目を浴びようになってきた。多価不飽和脂肪酸の天然資源が限られていることから、安価にかつ大量生産できる手法の開発が望まれ、その一つとして微生物を用いる生産方法の研究が進められている。

3.1 γ -リノレン酸

GLA の原料として植物種子油と微生物由来の油がある。代表的な油脂とその脂肪酸組成を表-2 に示す。植物種子油の月見草、ブラックカレント、ボレージュの各油は既に健康食品として使用されている。ボレージュ油は 20% を越える高い GLA 含有率を有している。微生物起源のものでは *Mortierella* 属、*Mucor* 属からの油

が実用に供されている。

Mortierella 属が生産する GLA に関しては既に多くの総説^{11)~13)}が出されているので参考に願いたい。ここではその他の生産菌について述べる。

特許、文献からこれまでに報告されている GLA 生産菌を表-3 に示す。糸状菌、それも接合菌類に属する菌株と藻類の一部が GLA 生産菌として知られている。糸状菌でも子の菌類に属する *Aspergillus* 属や酵母は ALA を作るかもしくはリノール酸までしか作らないとされている。

Mortierella 属では GLA の含有率は 6~10% であったが、ボレージュ油など GLA 含有率の高い植物種子油に対抗するため GLA 含有率の高い油脂を生産する菌のスクリーニングが行われている。*Mucor* 属には GLA の含有率が 30% を越える菌がいる。また、*Mortierella* 属に変異をかけ 18% の GLA を含む油脂の生産が可能になった報告もある¹³⁾。

表-3 γ -リノレン酸生産菌

菌 株 名	GLA 含有率 (%)	油脂含有率 (%)	引用文献
< 糸状菌 >			
<i>Mortierella isabellina</i>	10.7	49.6	14)
<i>Mortierella ramaniana</i> var. <i>angulisporea</i>	9.2	51.8	14)
<i>Mucor circinelloides</i>	34.4	25.1	15)
<i>Mucor javanicus</i>	32.6	19.6	15)
<i>Mucor ambiguus</i>	15.7	—	16)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	20	45	17)
<i>Cunninghamella elegans</i>	26.3	—	18)
<i>Gilbertella pericaria</i>	21.6	—	19)
<i>Thamnidium elegans</i>	28.1	—	20)
< 藻類 >			
<i>Spirulina</i> M-135	22	—	21)

表-2 γ -リノレン酸含有油脂の脂肪酸組成

油 脂 起 源		脂 肪 酸 組 成 (%)									
		C ₁₄ :0	C ₁₆ :0	C ₁₈ :0	C ₁₈ :1	C ₁₈ :2	C ₁₈ :3 (α)	C ₁₈ :3 (γ)	C ₁₈ :4	C ₂₀ :0	C ₂₂ :1
植 物	月 見 草	0.1	5.6	1.4	12.0	71.9	0.1	6.9	—	0.2	—
	ブラックカレント	0.1	6.3	1.1	10.4	47.8	12.7	16.1	2.9	0.7	—
	ボレージュ	0.1	10.9	3.3	15.1	38.4	0.2	23.9	0.1	0.2	2.2
微 生 物	<i>Mortierella</i> 属	0.9	29.8	3.6	39.4	15.6	—	8.3	—	0.3	—
	<i>Mucor</i> sp. s-16	1.5	20.4	6.3	39.3	12.6	—	16.3	—	0.3	—
	<i>Mucor</i> sp. I-21	1.0	14.0	2.4	36.1	15.2	—	25.4	—	0.3	—

図-6 *Mucor* sp. I-21 による高 γ -リノレン酸含有油の生産

図-6 は高 GLA 含有油脂の生産を目的にスクリーニングした *Mucor* 属の菌株を小型培養槽で培養した例である。この菌は 30% 近くの GLA を含む油脂を生産する。この菌株を使用することによって GLA の生産コストを *Mortierella* 属の場合の 1/4 に下げることが可能になった。

3.2 アラキドン酸

AA も GLA と同様、藻類²²⁾、*Mortierella* 属²³⁾、*Conidioborus* 属²⁴⁾ の糸状菌細胞内に存在することは既に知られている。植物プランクトンであるミドリムシ藻のユーグレナにも含まれている²⁵⁾。

戸谷らは *Mortierella alpina* (IFO8568) を用いポテトペースト培地上で表面培養を行い 20 d で 1 kg の培地

当たり 13 g の AA を得ている²⁶⁾。油脂中の AA 含有率は 50% 近くであった。表面培養はクエン酸などの有機酸発酵に適用されており、酸素要求の高い糸状菌の培養に適していると考えられるが、工業化においては培地の調整、油脂の回収をいかに経済的に行うかが問題となる。

山田らは土壌から数株の AA 生産菌を分離し、菌学的性質を調べたところいずれも *Mortierella* 属の糸状菌であった²⁷⁾。このなかで、*M. alpina* IS-4 株は炭素源をグルコースで培養したところ 4.3 g/L の AA を生産した²⁸⁾。また、培養温度を下げると油脂中の AA 含有率は高くなるものの増殖速の低下をもたらすため生産性が悪くなると論じている。工業化に際しては AA 含有率、生産性を考慮して培養条件を設定する必要がある。

梶らは *Conidioborus heterosporus* の培養で 2.7 g/L の AA 収量を得た²⁹⁾。C/N 比を小さくすると脂質中の AA 含有率が増加する。また、培養中に酸素供給量を増やした場合も AA 含有率の増加が認められた。

表-4 にこれまでに報告された主な AA 生産菌についてまとめた。

3.3 ジホモ- γ -リノレン酸

DGLA は AA 合成における中間体であり、AA 生産菌が生産する油脂には多少の差はあれ、DGLA が含まれている。しかし、著量の DGLA を生産させるためには何らかの方法で DGLA から AA への反応を抑える必要がある。清水らは *M. alpina* IS-4 株を種々の油脂を炭素源にして培養を行った結果、ごま油を用いた場合に DGLA の生産性が向上することを見いだした³⁰⁾。ごま油中に含まれるセサミン等のリグナン化合物が DGLA から AA の変換に関与する酵素 (Δ^5 desaturase) を特異的に阻害することによると報告している^{31), 32)}。セサミンを含む培地で *M. alpina* IS-4 株を培養した結果、23% の DGLA を含む油脂が得られた。DGLA の収量は 2.2 g/L であった。

このほかに、DGLA 生産方法として GLA を含有する油脂を炭素源に培養する方法が開発されている³³⁾。

表-4 アラキドン酸の生産性

生 産 菌	培養方法	炭 素 源	培養日数 (d)	アラキドン酸収量 (g/L)
<i>Mortierella alpina</i> IS-4	液 体	グルコース + オリーブ油	9	4.3
<i>Mortierella alpina</i> (IFO 8856)	固 形	ポテトペースト + グルコース	20	13.1 g/kg
<i>Conidioborus heterosporus</i> (ATCC 12941)	液 体	グルコース	4	2.7
<i>Euglena gracilis</i>	液 体	グルコース + リノール酸	7	0.3

GLA の含有率が高いほど DGLA の収量が向上する。GLA 油が低コストで生産することが可能になれば有効な DGLA 生産方法と考えられる。

3・4 イコサペンタエン酸

EPA は魚油中に多く含まれる。現在は魚油から EPA の高純度品が試薬、薬理研究用として作られており、慢性動脈閉塞症薬として製造承認の申請が出ている。

EPA を生産する微生物のなかに海水産のクロレラがある。このものは淡水産のものに比べると成育が悪い。そこで、この2種のクロレラの間で細胞融合を行い、増殖が速く、しかも EPA の含有率の高い株を開発している³⁴⁾。この培養物は養殖における稚魚の成長促進剤(餌)料として使用されている。海水産のクロレラには約35%の脂質が含まれており、そのうちの37%近くがEPAである。この脂質にはドコサヘキサエン酸が含まれておらず、魚油に比べて高純度化を行いやすいと見なされている。

矢沢らは魚の体内から EPA 生産菌をスクリーニングし、グラム陰性のかん(桿)菌を発見している³⁵⁾。この菌が生産する油脂中にはリノール酸、ALA、イコサテトラエン酸($n-3$ 系 $C_{20}:4$)が含まれておらず、海水産クロレラの油脂と同様、高純度化しやすいと考えられる。矢沢らはこのほかに2,3株のEPA生産細菌を発見している³⁶⁾。

清水らは *Mortierella* 属の糸状菌のなかに12℃で培養するとEPAの生産を行う菌がいることを認めた。しかし、低温培養は大量生産に不向きであることから、ALAを含むあまに油を炭素源にする培養の検討を行い1.4 g/LのEPAを得ている^{37), 38)}。

通常、EPA は $n-3$ 系の脂肪酸合成経路で合成されるものと考えられていたが、*M. alpina* IS-4 株は培養温度を16℃以下にすると $n-6$ 系の AA から EPA を生ずるようになる。この代謝変換が起こる理由として、低温培養条件下おいた時のみ AA を EPA に変換する酵素(Δ^{17} desaturase)が活性化されるためである³⁹⁾。

以上、微生物を用いて多価不飽和脂肪酸を大量に生産させる研究は GLA, DGLA, AA 及び EPA を中心になされている。このなかで実用化されているのは GLA だけである。その他の脂肪酸はまだ研究段階で、実用化に向けて解決すべき問題が多く残っている。GLA にしても、現状よりさらに高い生産性を得るための優れた菌株のスクリーニング及び培養方法の開発はもとより、用途面においても、機能性食品への展開、あるいは、生体における作用機序の解明による医薬品開発などの課題が残っている。

DGLA, AA の生理活性はまだ充分明らかとなっていない。この理由として、これまで、大量に入手する手段がなかったことが挙げられる。微生物法によって安価に

かつ大量に生産する方法が開発されつつあり、今後 DGLA, AA の生産活性の研究が進むと考えられる。

ここに挙げた以外にも注目されている多価不飽和脂肪酸がいくつかある。 $n-3$ 系のオクタデカテトラエン酸($C_{18}:4$)、ドコサヘキサエン酸($C_{22}:6$, DHA)である。現在、これらは魚油から EPA を取る時の副産物として得られているが、まだ微生物を用いて大量に生産させる試みは報告されていない。

4 おわりに

これまで我々が生産手段として用いてきた微生物はごくわずかではない。微生物界には数多くの有用な微生物が埋もれたままである。多価不飽和脂肪酸を生産する微生物も同様、現在知られている菌株よりも能力の高い菌株が未発見のままであると考えられる。また、最近話題のマリンバイオによる深海で生育する微生物の探索や、低温、高温などの特殊環境下で生育する微生物の探索によりこれまでにない生理活性を持つ油脂、脂肪酸が見いだされる可能性は高いと考えられる。これからますます油脂分野において微生物が利用される機会は多くなるものと期待される。

また、多価不飽和脂肪酸生産菌における生合成経路、生産に関与する酵素系解明などの研究はまだ進んでいない。これらの研究がもっと活発に行われ、遺伝子組み換え、バイオリアクターなどを応用した新しい生産技術の開発が望まれる。〔平成元年(1989)8月11日受理〕

文 献

- 1) 武田 茂, 西岡 鑑, 油化学, 37, 581 (1989)
- 2) 澤田紀夫, フードケミカル, 5 (7), 49 (1989)
- 3) 鈴木 修, 油化学, 36, 718 (1987)
- 4) 鈴木 修, 化学と生物, 23, 11 (1985)
- 5) R.H. Kessel, *J. Appl. Bact.*, 31, 220 (1968)
- 6) R.S. Moreton, "Single Cell Oil", Longman Scientific & Technical, Harlow (1988), p. 11
- 7) S.Y. Choi, D.D.W. Ryu, J.S. Rhee, *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1165 (1982)
- 8) G. Ferrante, Y. Ohno, M. Kates, *Can. J. biochem. & Cell Biol.*, 161, 171 (1983)
- 9) R.R. Brenner, *Drug Metabolism Review*, 6, 155 (1977)
- 10) D.F. Horrobin, *Medical Hypotheses*, 6, 929 (1980)
- 11) 天野和俊, "バイオ新素材", シーエムシー, (1987), p. 254
- 12) 天野和俊, フードケミカル, 3 (1), 63 (1987)
- 13) 鈴木 修ら, 油化学, 37, 1081 (1988)
- 14) 鈴木 修, 横地俊弘, 公開特許 昭60-168,391
- 15) 八尋賢一, 中島寿昭, 佐野敏郎, 公開特許 昭63-283,589
- 16) M. Arai, H. Fukuda, 欧州特許 224,799 (1987)
- 17) R.A. Herbert, S.M. Keith, 欧州特許 153,134 (1985)
- 18) 瀬戸 明, 間納由美子, 公開特許 昭60-126,091

- 19) 瀬戸 明, 公開特許 昭61-37,096
- 20) 瀬戸 明, 公開特許 昭61-37,097
- 21) 森 浩文ら, 日本農芸化学大会要旨集, (1986) p. 147
- 22) B.W. Nichols, R.S. Appleby, *Phytochemistry*, **8**, 1909 (1969)
- 23) R.H. Haskins, A.P. Tulloch, R.G. Micetich, *Can. J. Microbiol.*, **10**, 187 (1964)
- 24) D. Tyrell, *Can. J. Microbiol.*, **17**, 115 (1971)
- 25) 奥村昌和ら, 公開特許 昭61-177,990
- 26) N. Totani, A. Watanabe, K. Oba, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **36**, 328 (1987)
- 27) H. Yamada, S. Shimizu, Y. Shinmen, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 785 (1987)
- 28) H. Yamada *et al.*, ISF-JOIS World Congress, Tokyo (1988)
- 29) 梶 美保子ら, 日本農芸化学大会要旨集, (1987) p.156
- 30) S. Shimizu *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 237 (1989)
- 31) 清水 昌ら, 日本農芸化学会誌, **63**, 676 (1989)
- 32) 秋元健吾ら, 日本農芸化学会誌, **63**, 676 (1989)
- 33) 中島寿昭, 佐野敏郎, 公開特許 昭64-47,385
- 34) 養島良一, 山田 理, 藤田 匡, 日本醸酵工学大会要旨集, (1985) p.25
- 35) 渡部和郎ら, 日本農芸化学会誌, **62**, 495 (1988)
- 36) 矢沢一良ら, 公開特許 昭63-216, 488
- 37) S. Shimizu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150** (1), 335 (1988)
- 38) S. Shimizu *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 342 (1989)
- 39) 新免芳文ら, 日本農芸化学会誌, **63**, 676 (1988)