

油脂発酵クロニクル

小川 順

発酵産業における遅咲きの新分野

発酵技術開発の歴史を時系列でたどると、おおざっぱにアルコール発酵→有機酸発酵→アミノ酸発酵→核酸発酵の順に開発されてきたといえよう。油脂発酵はこれらに遅れ、もっとも最近に開発された技術といえる。

油脂発酵の技術開発が遅れた要因は、水になじまない物質の取り扱いが技術的に遅れていたこともあるが、油脂が植物・動物、魚類から充分に供給されており、わざわざ微生物で作るまでもないと認識されてきたことも理由の一つに挙げられる。

微生物による油脂の発酵生産が着目されるようになった理由としては、微生物でしか大量供給できない油脂に対する需要が出てきたことが挙げられる。その初期の例の一つが、本稿にて詳しく述べるアラキドン酸高含有油脂である。本油脂の商業化の成功に加え、最近では、植物油脂、魚油の安定供給に不安材料が増えてきたこと、さらには、環境問題、エネルギー問題、再生可能資源利用の観点から、微生物による油脂発酵・油脂変換が新たな技術領域としてますます注目されるようになってきている。

本よもやま話では、油脂発酵技術開発の歴史を、筆者らの研究室で進められたアラキドン酸生産性糸状菌の開発経緯を中心に振り返ってみたい。

微生物に求められた油脂

サラダ油など、我々が日常的に食している油脂の多くは植物由来であり、その主成分は炭素数18で二重結合数が2以下の脂肪酸から成るトリアシルグリセロールである。一方、我々の体を構成し、さまざまな生理機能を担っている脂質を構成する脂肪酸分子種には、炭素数が18あるいは20以上でかつ二重結合数が3から6のいわゆる高度不飽和脂肪酸（PUFA）が含まれている。

PUFAの主要な生合成経路を図1Aに示した（主にn-6、n-3経路）。 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸などのn-6経路のPUFAは、リノール酸から不飽和化と鎖長延長反応を繰り返して生成する。通常、アラキドン酸がn-6経路の最終産物である。エイコサペンタエン酸（EPA）は α -リノレン酸を出発脂肪酸として同様な過程を経て生成する（n-3経路）。n-3経路ではEPAはさらに鎖長延長と不飽和化を受けてドコサヘキサエン酸（DHA）へと変換される。高等動物ではジホ

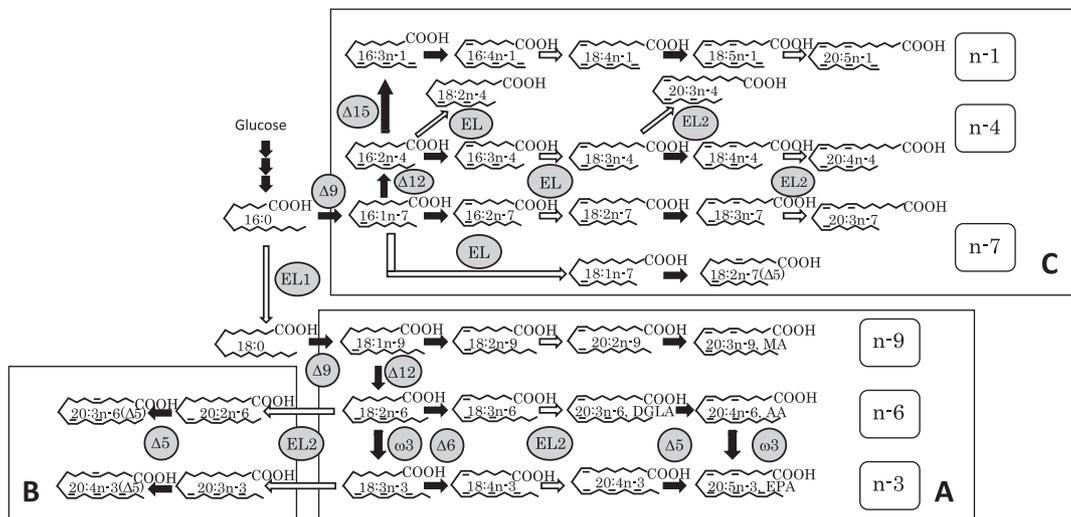


図1. *M. alpina* 1S-4 およびその変異株における PUFA の生合成経路。図中の Δ9, ω3 などは脂肪酸のそれぞれの番号の位置に二重結合を挿入する不飽和化酵素 (DS) を, EL は鎖長延長酵素を表す。A: Δ12 不飽和化酵素欠損株, B: Δ6 不飽和化酵素欠損株, C: 鎖長延長酵素欠損変異株。AA: アラキドン酸, DGLA: ジホモ- γ -リノレン酸, MA: ミード酸。黒矢印: 不飽和化反応, 白矢印: 鎖長延長反応。

モ- γ -リノレン酸, アラキドン酸, EPAはそれぞれプロスタグランジン1, 2および3系の一連のエイコサノイド類の母核として多彩な代謝を受ける。リノール酸と α -リノレン酸は共に高等動物では生合成できず, 欠乏すると成長阻害, 生殖不能などの欠乏症を呈するので, 食餌として摂取する必要がある。

したがって, リノール酸, α -リノレン酸あるいはそれから誘導されるPUFAは必須脂肪酸とも呼ばれる。リノール酸および α -リノレン酸は植物においてオレイン酸の飽和化反応によって生成され, 大豆などの種子油中に大量に存在するため, 微生物生産のターゲットとしての意義は小さい。

一方, リノール酸, α -リノレン酸から導かれる動物性のPUFAに関して, EPAやDHAといった ω 3脂肪酸(n-3経路の脂肪酸)と総称されるものについては魚油からの供給が可能であったが, ω 3脂肪酸とのバランスが重要とされさまざまな生理活性を示す γ -リノレン酸, ジホモ- γ -リノレン酸, アラキドン酸などの ω 6脂肪酸(n-6経路の脂肪酸)の実用的な供給源がない状況であった。この脂肪酸供給における空白地帯を埋めるべく, 1980年代に微生物に油脂供給源を探索する研究が始められた。

油脂発酵生産研究の黎明期 (1980年~)

油脂生産微生物の探索研究が最初に工業化に結実したのは1980年代後半のことである。当時の工業技術院化学技術研究所の鈴木修氏らの研究成果にもとづき¹⁾, *Mortierella*属 *Micromucor* 亜属の *Mortierella isabellina* を用いる γ -リノレン酸の発酵生産が実現し, 化粧品素材や健康食品素材としての開発が行われた。当時学部生だった筆者も, 出光興産株式会社製の γ -リノレン酸が入ったグミがおやつとして研究室の机の上に置かれていたことを思い出す。

同じ頃, 筆者が属していた京都大学農学部発酵生理学研究室においても, 当時の山田秀明教授のもと, 清水昌先生が中心となられサントリー株式会社との共同研究によりPUFA生産微生物の探索研究が行われ^{2,3)}, こちらでは *Mortierella* 属 *Mortierella* 亜属の糸状菌によりアラキドン酸が著量生産されることが見いだされた⁴⁾。同じ *Mortierella* 属でも *Micromucor* 亜属の糸状菌は炭素数18の脂肪酸しか作れないのに対し, *Mortierella* 亜属の糸状菌においては例外なく炭素数20のPUFAの生産能が観察され, 分類学的にも非常に興味深い知見であった⁵⁾。さて, 探索担当者の後日談だが, 生産物の価格もそう高くはなく, 実験も菌を培養しては一つ一つ脂質を抽出,

メチルエステル化し, ガスクロで脂肪酸組成分析をする地味なもので, 土壌分離のカビ (*Mortierella alpina*) の抽出物にアラキドン酸のピークを見いだした時も, 同時に取り組んでいた新規微生物酵素の発見時ほどの感動は, 実はなかったそうである。それが今や一大産業を形成する技術となっているゆえ, 先見の明と地道な研究の継続の大切さを実感したとのこと。

その後, 後述するように *M. alpina* を用いるPUFAの発酵生産研究, 育種研究を通して ω 6脂肪酸(n-6系脂肪酸)のみならず ω 3脂肪酸(n-3系脂肪酸), さらに, n-9, n-7, n-4, n-1系脂肪酸といったさまざまな脂肪酸含有油脂の発酵生産の可能性が示された。これにより, 微生物による油脂生産の潜在能力が認知され, さらに, 植物油脂, 魚油の安定供給に不安材料が増えてきたことも重なり, 多様な微生物を対象としたPUFA生産能の探索が国内外を問わず行われてきた。その結果, 表1に例示するさまざまな微生物がPUFA生産菌として見いだされ, これらの微生物が作る油脂にSingle Cell Oil(発酵油脂)という呼称が与えられるようになった⁶⁾。代表的なものとしては, 上記 *Mortierella* 属の他に, *Mucor* 属, *Rhizopus* 属, *Cunninghamella* 属による γ -リ

表1. 代表的な油脂生産微生物

脂肪酸	菌株
n-6 (ω 6) 系脂肪酸	
18:2n-6	<i>Mortierella alpina</i> 1S-4 Mut49
GLA	<i>Mucor circinelloides</i> , <i>Mo. isabellina</i> , <i>Mo. ramanniana</i> var. <i>angulisporea</i> , <i>Cunninghamella echinucalta</i> , <i>Mu. mucedo</i> , <i>C. elegans</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Rhizopus spp.</i> , <i>Thamnidium elegans</i>
DGLA	<i>Mo. alpina</i> 1S-4, <i>Mo. alpina</i> 1S-4 Mut44, <i>Mo. alpina</i> 1S-4 S14, <i>Saprolegnia ferax</i>
AA	<i>Mo. alpina</i> 1S-4 and other <i>Mortierella</i> subgenus, <i>Entomophthora exitalis</i> , <i>Blastocladiella emersonii</i> , <i>Conidiobolus nanodes</i>
DPA (n-6)	<i>Schyzochytrium</i> sp.
n-3 (ω 3) 系脂肪酸	
ALA	Most microorganisms
20:4n-3	<i>Mo. alpina</i> 1S-4 S14
EPA	<i>Mortierella</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Mo. alpina</i> 1S-4 Mut48, <i>Saprolegnia diclina</i> , <i>Pythium irregulare</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Euglena gracilis</i>
DHA	<i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Ulkenia</i> sp., <i>Thraustochytrium aureum</i> , <i>Schyzochytrium</i> sp.
DPA (n-3)	<i>Thraustochytrium aureum</i>

18:2n-6; リノール酸, GLA; γ -リノレン酸, DGLA; ジホモ- γ -リノレン酸, AA; アラキドン酸, DPA (n-6); ドコサペンタエン酸 (n-6), ALA; α -リノレン酸, EPA; エイコサペンタエン酸, DHA; ドコサヘキサエン酸, DPA (n-3); ドコサペンタエン酸 (n-3)。

ノレン酸生産, *Shewanella*属細菌, *Saprolegnia*属糸状菌, *Euglena*属藻類によるEPA生産, *Cryptocodinium*属藻類, *Thraustochytrium*属, *Schyzochytrium*属, *Ulkenia*属海洋性卵菌によるDHA生産などが挙げられる。

M. alpina 1S-4株を用いる PUFA 高含有油脂の発酵生産と商業化

アラキドン酸生産 京都大学のキャンパスの土壌から分離された*M. alpina* 1S-4株(和名は「クセレケカビ」と少しかわいそうな名前だが、図2Aに示すようにとても美しいカビである)は、グルコースを含む単純な培地によく生育し、アラキドン酸を含むトリアシルグリセロールを菌体内に著量蓄積する⁷⁾。後述する工業スケールでの最適培養条件下でのアラキドン酸生産量は15–20 g/lに達し、得られた菌体のトリアシルグリセロール含量は500–600 mg/g乾燥菌体、油脂の全脂肪酸中のアラキドン酸量は30–70%に達する。これにより、アラキドン酸を高い含量で含むユニークな脂肪酸組成の発酵油脂の実用生産が可能になった。

セサミンの発見とジホモ- γ -リノレン酸生産 さらなる生産性の向上を目指した取り組みの中から、面白い展開につながる発見があった。その一つが、ごまの機能性成分セサミンの発見である。一見油脂の発酵生産と関係がなさそうなこの発見の経緯にも、*M. alpina* 1S-4株の油脂生産能のすばらしさを垣間見ることができる。培養条件の最適化を行っていた研究者が、生合成経路をショートカットして生産性を向上させる、つまり、油を原料にPUFAを作る検討を行った。実験としては、*M. alpina* 1S-4株の培養培地にさまざまな油を加えてアラキドン酸生産性の変動を観察していた。オレイン酸やリノール酸を多く含有するオリーブ油や大豆油を添加した際、アラキドン酸生産の向上が見られたことから、さらに対象を広げて検討を加えたところ、ごま油を加えた際にアラキドン酸生産が激減しその前駆体であるジホモ- γ -リノレン酸が著量蓄積する現象が観察された⁸⁾。アラキ

ドン酸生産性の向上検討としては失敗であるが、この現象の解析からごま成分セサミンの $\Delta 5$ 不飽和化酵素に対する特異的阻害剤としての生理機能が見いだされることとなった⁹⁾。本発見をきっかけにセサミンの生理機能研究が展開され、抗酸化活性をはじめ、アルコール代謝改善などの肝機能改善機能も見いだされ、健康食品として多様な商品開発が成されるに至っている¹⁰⁾。もちろん、本発見を起点に、後にジホモ- γ -リノレン酸の発酵生産も確立されている。

EPA生産 もう一つの面白い発見が、*M. alpina* 1S-4株によるEPAの発酵生産につながっている。たまにあることだが、週末を挟んで*M. alpina* 1S-4株の培養を行った際、図らずも恒温槽の電源が落ち長時間の低温培養となってしまった。一応脂肪酸組成を分析してみたところ、アラキドン酸の蓄積ではなくEPAの蓄積が観察されたのであった。この現象の解析から、本菌に $\omega 3$ 不飽和化酵素が存在すること、本酵素は高温(28°C)下でも生産されるが、低温下でのみ活性が発現することが見いだされた¹¹⁾。しかし、*M. alpina* 1S-4株の低温培養はコスト的難点と生産性の低さから実用的ではなかったため、EPA生産に向けては別のアプローチが展開された。すなわち、*M. alpina* 1S-4株の強力な $\Delta 6$ 、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素活性を活用し、n-3系脂肪酸の前駆体である α -リノレン酸からEPAを誘導することが検討された。果たして、 α -リノレン酸を高含有する亜麻仁油を原料とするEPA生産法が確立されるに至っている¹²⁾。

以上、セサミンの発見、EPA発酵生産の確立、いずれをとっても、*M. alpina* 1S-4株が明瞭な油脂生産特性を示し、脂肪酸生合成系の優秀なモデル生物として機能したことが大きくその成功に影響したのは明らかである。

アラキドン酸生産の商業化 さて、アラキドン酸生産の最適化であるが、これは、地道な培養工学的検討の末に達成された。特に重要だったのは菌形態の制御であった。アラキドン酸生産における最良菌形態である小型のペレット状態(図2B)を維持すべく、培地組成、特に窒素源(大豆蛋白質が良好)、塩類の添加条件(KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 の補強)が詳細に検討され、菌体の破損や粘性の上昇が抑えられたことで充分な通気攪拌条件(10–15 ppm)が確保できる菌形態制御条件が見いだされた¹³⁾。この成果により、工業スケールの培養にて高いアラキドン酸生産量(15–20 g/l)が達成され、商業生産を推し進めることとなった¹⁴⁾。

現在、発酵生産されたアラキドン酸高含有油脂は、乳児用ミルクの添加物として、あるいは種々の乳製品の品質を高めるための素材として世界的に使用されている。

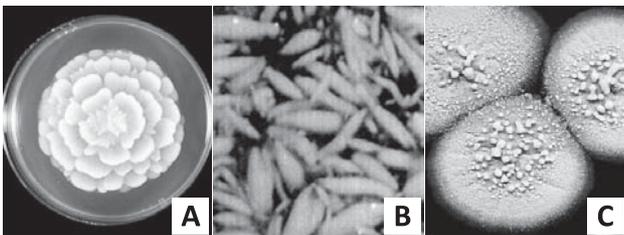


図2. *M. alpina* 1S-4のさまざまな形態。(A) 親株の寒天培地上でのコロニー、(B) 親株の液体培養における小型ペレット形態、(C) 油脂漏出変異株の寒天培地上でのコロニー。

また、成人用の栄養補助食品素材、医薬品素材としての商品開発も進められている。本技術により初めてアラキドン酸の安定供給が可能となったことがさまざまな用途開発を促し、新たな産業分野を生み出すきっかけを提供している。

M. alpina 1S-4株の育種開発（1990年～）

1990年代以降、筆者らの研究室では、アラキドン酸商業生産の実績に裏打ちされた*M. alpina* 1S-4株の高いPUFA生産能を活かし、多様なPUFA分子種の生産を可能とするための育種開発が積極的に展開された。発想は単純で、本菌のアラキドン酸生合成経路（n-6経路）を適当に分断すれば、生合成の前駆体脂肪酸の蓄積や生合成経路自体の変更が可能となり、アラキドン酸以外のPUFA生産も可能となるだろうというものである。実際の実験としては、本菌の胞子を*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンにて変異処理し、寒天培地上に生育した突然変異株を一つずつ丹念に単離し、改めて寒天培地上に生育させた菌体のコロニーを切り出して乾燥後、脂質を抽出、メチルエステル化し、一つずつガスクロにて脂肪酸組成を分析すると言うものである¹⁵⁾。文章にすると簡単そうではあるが、胞子の回収からしてとても難儀で、一連の作業は面倒かつ時間のかかるものである。これを毎年配属される4回生を中心に足かけ10余年繰り返し、不飽和化酵素や鎖長延長酵素がさまざまに欠損した変異株が取得されるに至った。現在では、6種のユニークなPUFA生合成経路と5種のバイパス、経路上の35種の脂肪酸を任意に作り出すことが可能になっている（学生さんたちの尽力に感謝）（図1A, B, C）¹⁶⁻¹⁸⁾。以下に特徴的な変異株を一部紹介する。

Δ12不飽和化酵素欠損株 Δ12不飽和化酵素欠損変異株では、オレイン酸（18:1n-9）をn-6経路の親脂肪酸であるリノール酸（18:2n-6）に変換できない。このような変異株では、n-6経路は機能せず、本来ほとんど機能しないはずのn-9経路が優勢となる。よって、蓄積したオレイン酸（18:1n-9）は徐々に18:1n-9→18:2n-9→20:2n-9→20:3n-9（ミード酸）と変換を受け、最終的にミード酸を蓄積する（図1A）。変異に起因する代謝バランス変動が、本菌の潜在能力（n-9経路の駆動）を引き出した顕著な例である。

Δ6不飽和化酵素欠損株 Δ6不飽和化酵素欠損変異株では、n-6経路はΔ6不飽和化反応を省略して進行する（図1B）。すなわち、親脂肪酸であるリノール酸（18:2n-6）は鎖長延長酵素（EL2）により直接鎖長延長され炭素数20のPUFAとなり、さらにΔ5不飽和化酵素により不飽

和化される。結局、Δ8位の2重結合が欠落した炭素数20のPUFAが生成する（18:2n-6→20:2n-6→20:3n-6(Δ5)）。

鎖長延長酵素欠損変異株 炭素数16から18への鎖長延長反応に関与する酵素（EL1）が部分的に欠失した変異株はパルミチン酸（16:0）を著量蓄積する。本変異株の脂肪酸組成は複雑で、親株が生成する脂肪酸以外に少なくとも12種の脂肪酸が検出される（図1C）。本変異株で最初に起こる反応は、Δ9不飽和化酵素によるパルミチン酸（16:0）から16:1n-7への変換である。生成した16:1n-7はそのままn-7経路の親脂肪酸として使用され、最終的に20:3n-7が生成する。また、16:1n-7はΔ12不飽和化酵素によって16:2n-4へと変換されn-4経路の親脂肪酸として使用され、最終的に20:4n-4が生成する。これまでにないn-7、n-4経路が駆動する、まったく新規なPUFA生産株の誕生である。

これらの多彩な変異株の取得は、スクリーニングを担当した学生さんたちの緻密で思慮深い観察力によるところが大きい。最後に紹介した鎖長延長酵素欠損変異株は、その脂肪酸組成分析のガスクロチャートのパターンなど、およそ親株のものとはほど遠く、一見コンタミ菌と判断しそうなものである。そのようなサンプルに対し、執拗に解析を試みた粘り強さの賜物であろう。また、ガスクロチャートのみならず、変異株のコロニー形態に魅力を感じた学生が、コロニー表面に汗をかいたような変異株を選抜してきた（図2C）。この変異株はガスクロチャート上では親株とまったく何の差異もないが（へたをすると見つかっていなかった）、驚くことに脂質を菌体外生産していたのである。汗のようなものは、漏れ出した油脂だったのだ。このような油脂漏出変異株は、連続発酵プロセスへの応用などが期待でき、生産性向上につながる新たな研究の展開をもたらしてくれる実にユニークな変異株である。

M. alpina 1S-4株の分子育種（2000年～）

2000年代以降は、*M. alpina* 1S-4株のさらなる改良を実現するための分子育種法開発が展開された¹⁹⁻²¹⁾。薬剤耐性とウラシル要求性を指標とし、*M. alpina* 1S-4株の胞子に対してパーティクルガン法やアグロバクテリウム法により遺伝子を導入する形質転換系が確立された。本技術を用いるPUFA生合成経路上の不飽和化酵素や鎖長延長酵素の過剰発現、あるいはRNAiによる発現抑制により、さまざまなPUFAの生産性向上に成功している。さらに、これまでに取得した有用変異株の形質転換系も構築し、変異株がもつ特性を利用した分子育種によるPUFA生産も可能となっている。

最近ならびにこれからの展開 (2010年～)

これから重要となるだろう二つの観点から、微生物による油脂発酵生産、油脂変換技術の今後の展開の一例を紹介してみたい。

健やかさの観点から 近年、食生活の変化によって、 ω 3脂肪酸を含む食材（魚類など）の利用が減少し、 ω 6脂肪酸を多く含む食材（肉類など）を好むようになってきた。この脂肪酸バランスの変化が、生活習慣病の増加を引き起こす原因のひとつとなっている。 ω 3脂肪酸には生活習慣病予防に加えて、脳機能の発達やアレルギー抑制など多彩な効果が報告されており、その摂取が国からも奨励されるようになった。しかし、今のところ魚油以外の適切な供給源はなく、その安定供給に不安材料が増えてきたことから新たな ω 3脂肪酸素材が求められている。筆者らも、*M. alpina* 1S-4株のさらなる改良による ω 3脂肪酸の効率的生産を目指すとともに²²⁾、新たな ω 3脂肪酸資源を求め、自然界を対象としたスクリーニングに取り組んでいる。

一方、このようにさまざまなPUFAを食するようになると、それらがどのように体内で代謝されるかに関する知見も重要となってくる。また、メタボリックシンドロームの増加による脂質代謝改善の観点からも、腸内細菌におけるPUFA代謝に関する情報の収集が急務となってきている。筆者らも、腸内細菌の一つである乳酸菌におけるPUFA代謝を詳細に解析し、PUFAを飽和化（PUFA発酵生産に見られる不飽和化とは逆の反応）する新規な代謝を見いだしている²³⁻²⁶⁾。本代謝系にて機能するユニークな水和脱水、酸化還元、異性化、飽和化反応による代謝産物の生理活性を評価するとともに、各種反応を活用する機能性脂質生産、腸管内脂質代謝の制御を通じた健康維持について検討を重ねている。

環境の観点から 石油資源の枯渇が危惧され、また、CO₂排出削減に向けた低炭素社会への移行が求められるなか、再生可能資源であるバイオマスへの原料転換、燃料資源転換が検討されている。しかし、酸素原子含有率が高いバイオマス資源を、現在化成品原料・燃料として利用されている石油由来の低酸素含有化合物の代替物とすることは、化合物としてもあるいはその変換（還元反応）にかかるエネルギーの観点からも、難しい課題であるといえる。一方、油脂は、バイオマスの中でも比較的low酸素な化合物である。従って、糖類などのバイオマス資源を油脂発酵技術により一端low酸素な化合物群に変換することにより、バイオマス資源と石油資源の現状のギャップを補うことができる可能性がある²⁷⁾。この観点

から、筆者らも優れた油脂発酵微生物である*M. alpina*を起点とした油糧系バイオマス供給・変換技術（バイオリピッドプラットフォーム）の開発に取り組んでいる。

まとめ

以上、油脂発酵技術の開発史を主に研究初期の頃を中心に、今後の展開に至るまで俯瞰した。学術的な内容とはならず恐縮だが、その裏にあった研究者、学生さんたちの苦労話、工夫なども紹介させて頂いた。振り返るにつれ、示唆に富むことばかりで、恩師の先生、諸先輩方、同僚、学生さんへの感謝の気持ちでいっぱいになる。自分自身も含め、あらためて「故きを温ねて新しきを知る」ことで、今後の研究を一味違った豊かなものとして展開させたい。

文 献

- 1) 鈴木 修：発酵と工業, **43**, 1024 (1985).
- 2) 清水 昌, 山田秀明：油脂, **42**, 224 (1989).
- 3) 清水 昌ら：BIO INDUSTRY, **7**, 438 (1990).
- 4) Yamada, H. et al.: Agric. Biol. Chem., **51**, 785 (1987).
- 5) Amano, H. et al.: Mycotaxon, **94**, 257 (1992).
- 6) Cohen, Z. and Ratledge, C.: Single Cell Oils, AOCS Press, Champaign (2005).
- 7) Shinmen, Y. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **31**, 11 (1989).
- 8) Shimizu, S. et al.: J. Am. Oil. Chem. Soc., **66**, 237 (1989).
- 9) Shimizu, S. et al.: Lipids, **26**, 512 (1991).
- 10) 秋元健吾, 清水 昌：New Food Industry, **39**, 25 (1997).
- 11) Shimizu, S. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **150**, 335 (1988).
- 12) Shimizu, S. et al.: J. Am. Oil. Chem. Soc., **66**, 342 (1988).
- 13) Higashiyama, K. et al.: J. Am. Oil. Chem. Soc., **75**, 1815 (1998).
- 14) 藤川茂昭ら：バイオサイエンスとインダストリー, **57**, 30 (1999).
- 15) Jareonkitmongkol, S. et al.: J. Gen. Microbiol., **138**, 997 (1992).
- 16) Certik, M. et al.: Trends Biotechnol., **16**, 500 (1998).
- 17) 清水 昌ら：オレオサイエンス, **3**, 129 (2003).
- 18) 櫻谷英治ら：蛋白質 核酸 酵素, **54**, 725 (2009).
- 19) Sakuradani, E. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **84**, 1 (2009).
- 20) Sakuradani, E. et al.: J. Biotechnol., **144**, 31 (2009).
- 21) 櫻谷英治ら：オレオサイエンス, **12**, 263 (2012).
- 22) Ando, A. et al.: Appl. Environ. Microbiol., **75**, 5529 (2009).
- 23) Ogawa, J. et al.: J. Biosci. Bioeng., **100**, 355 (2005).
- 24) Kishino, S. et al.: Lipid Technology, **21**, 177 (2009).
- 25) 岸野重信ら：バイオサイエンスとインダストリー, **66**, 54 (2008).
- 26) Kishino, S. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **416**, 188 (2011).
- 27) 小川 順ら：バイオプラジャーナル, **44**, 13 (2012).