

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011 年 10 月 13 日(13.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/126030 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/16 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/058652

(22) 国際出願日: 2011 年 4 月 5 日(05.04.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2010-088726 2010 年 4 月 7 日(07.04.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱瓦斯化学株式会社(MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) [JP/JP]; 〒1008324 東京都千代田区丸の内二丁目 5 番 2 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高野 健太郎(TAKANO, Kentarou) [JP/JP]; 〒9503112 新潟県新潟市北区太夫浜新割 1 8 2 番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内 Niigata (JP). 莪山 眞與(GAYAMA, Shinyo) [JP/JP]; 〒9503112 新潟県新潟市北区太夫浜新割 1 8 2 番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内 Niigata (JP).

(74) 代理人: 大谷 保, 外(OHTANI, Tamotsu et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門三丁目 2 5 番 2 号

ブリヂストン虎ノ門ビル 6 階 特許業務法人
大谷特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: S-ADENOSYL-L-METHIONINE-CONTAINING DRY YEAST COMPOSITION WITH EXCELLENT STORAGE STABILITY AND PROCESS FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 保存安定性に優れた S-アデノシル- L-メチオニン含有乾燥酵母組成物及びその製造方法

(57) Abstract: Provided is a dry yeast composition which comprises S-adenosyl-L-methionine and a thickening agent and has excellent storage stability. A thickening agent is added to a yeast cell concentrate obtained by incubating a yeast which has an SAMe-producing ability and collecting the cells, and the resultant mixture is dried. Thus, a dry yeast containing, in a high concentration, S-adenosyl-L-methionine which has excellent storage stability and excellent bioabsorbability can be easily and profitably produced. It is hence possible to supply to the market a dry yeast composition that contains, in a high concentration, S-adenosyl-L-methionine, which is useful as a water-soluble physiologically active substance, and that has excellent storage stability and bioabsorbability.

(57) 要約: 本発明の S-アデノシル- L-メチオニンと、増粘剤を含有する保存安定性に優れた乾燥酵母組成物を提供する。SAMe 生産能を有する酵母を培養集菌した酵母菌体濃縮物に増粘剤を添加した後乾燥することによって、保存安定性、さらには生体吸収性に優れた S-アデノシル- L-メチオニンを高濃度を含む乾燥酵母を簡便かつ経済的に製造できるので、水溶性の生理活性物質として有用な S-アデノシル- L-メチオニンを高濃度を含む、保存安定性、さらには生体吸収性に優れた乾燥酵母組成物を市場に提供できる。



WO 2011/126030 A1

明 細 書

発明の名称：

保存安定性に優れたS－アデノシル－L－メチオニン含有乾燥酵母組成物
及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、水溶性の生理活性物質として有用なS－アデノシル－L－メチオニン（以下、SAMeと記す）を高濃度に含む保存安定性に優れた乾燥酵母組成物、及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] SAMeは、生体内に広く存在し、核酸、神経伝達物質、リン脂質、ホルモン、タンパク質などの合成・代謝にて種々のトランスメチラーゼによるメチル化反応のメチル基供与体として重要な役割を演じている水溶性の生理活性物質である。SAMeは、人体の殆ど全ての細胞に見られ、様々な生化学反応における共同因子として働き、メチル基転移、硫黄基転移、およびアミノプロピル基転移の3つの代謝経路により代謝される。例えば、軟骨の維持や脳内物質の生合成に欠かすことの出来ない物質である。近年のSAMeの機能研究より脂肪肝、高脂血症、動脈硬化症、不眠症、アルコール性肝炎、老人性痴呆症などに対する治療効果についても報告されている。このようにSAMeは、重要な生理活性物質であり、欧米諸国において鬱病、肝臓疾患及び関節炎等の治療薬、或いは健康食品として広く利用されている。

[0003] そのため、SAMeを安価で、簡便に製造供給することが強く望まれる。従来、SAMeの製造方法としては、前駆物質であるL－メチオニンを含有させた培地を用いて醗酵生産する方法、酵母などの微生物より単離精製したSAMe合成酵素（メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ）を用い、アデノシン5'－三リン酸（ATP）とL－メチオニンを基質としてSAMeを酵素的に合成する方法及び合成法による方法などが知られている。

[0004] 酵素的合成法については、酵母などの微生物より単離精製したSAMe合成

酵素（メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ）を用い、アデノシン5'-トリリン酸（ATP）とL-メチオニンを基質としてSAMeを酵素的に合成する方法であるが、この方法は、醗酵法と比べ、SAMeの蓄積量が多く、菌体からのSAMe抽出操作が必要ないなどの利点はあるものの、酵素の調製が煩雑であること、得られる酵素の活性が微弱であること、ATP分解酵素等の妨害物質を除去する必要があること、さらには、基質であるATPが極めて高価であるなど様々な問題を有し、必ずしも実用的な方法とは成り得なかった。また、近年の遺伝子工学の発展により、クローン化したSAMe合成酵素遺伝子を用いることによって該酵素の調製がより簡便になり、酵素調製の問題は解決されつつあるものの、依然として高価なATPを基質として使用する必要があるなど、他の実用上の問題は解決されていない。

[0005] また、SAMeは熱的に不安定で常温においても容易に分解する性質を有することから、医薬品、健康食品として使用する際の大きな障害となっている。その対策として、保存安定性の向上を目的とした多くの試みがなされてきた。例えば、前述した製造方法で得られたSAMeの組成物をクロマトグラフィー等により精製した後、硫酸やp-トルエンスルホン酸との塩、又はブタンジスルホン酸との塩等にするによりSAMeの安定化をはかる方法（例えば、特許文献1参照）、または、精製したSAMeに添加物処理を行い、SAMe組成物として安定化をはかる方法（例えば、特許文献1参照）が一般的で、多くの手間と費用を要するため、治療薬や健康食品として重要なSAMeを安価に製造し提供することは極めて困難なことであった。そして近年、SAMeをより安価で、精製工程が少なく、簡便に製造できるSAMe生産能を有し且つ経口摂取が可能な微生物を用いた、SAMe含有乾燥微生物について研究が行われている。（例えば、特許文献2、非特許文献1参照）しかし、現状では、SAMe含有乾燥微生物は、精製したSAMe、SAMe組成物に比べ保存安定性が低いことが問題となっている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開昭59-51213号公報

特許文献2：国際公開第2008/090905号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Biochemica et Biophysica Acta, 1573, 105-108, (2002)

非特許文献2：J of Chromatography B, 863, 94-100 (2008)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、SAMeを高濃度に含む保存安定性に優れた乾燥酵母組成物を、低コストで簡便に製造できるプロセスを確立することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者等は、上記課題を解決するべく、SAMeを高濃度に含有し、かつ安定な状態で長期間保存できる性能的に優れた組成物を経済的に生産する方法について鋭意検討した結果、SAMe生産能を有し且つ経口摂取が可能な酵母を用いて菌体内にSAMeを高濃度に産生蓄積させた後、培養液より遠心分離等の分離手段で酵母菌体を分離し、得られた酵母菌体濃縮物に増粘剤を添加した後、乾燥させることによって、目的とするSAMeを高濃度に含有し、かつ保存安定性に優れた組成物である乾燥酵母を簡便に収率良く製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。また、本発明のSAMe含有乾燥酵母組成物は、保存安定性に加えて、生体吸収性にも優れることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] 本発明は、

(1) S-アデノシル-L-メチオニンと、増粘剤を含有するS-アデノシル-L-メチオニン含有乾燥酵母組成物、及び

(2) S-アデノシル-L-メチオニン生産能を有する酵母を用い、酵母の菌体培養液より得られる酵母菌体濃縮物に増粘剤を添加した後、乾燥するS-アデノシル-L-メチオニン含有乾燥酵母組成物の製造方法、を提供する。

発明の効果

[0011] 本発明のS-アデノシル-L-メチニオン含有乾燥酵母組成物は、保存安定性に優れ、さらには生体吸収性にも優れるので、破碎して粉末状にしたり、必要に応じて他の生理活性成分や賦型剤等の添加剤を加えて、圧縮打錠して錠剤状の組成物としたり、粉体を顆粒状に造粒したり、造粒した顆粒を詰めてカプセル化するなどして、医薬や健康食品用の水溶性の生理活性物質として有用な組成物を提供できる。

また、S-アデノシル-L-メチオニンを高濃度を含み保存安定性に優れる組成物を、さらに生体吸収性にも優れるSAMe含有乾燥酵母組成物を低コストで簡便に製造する方法を提供できる。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明に使用される酵母の種類は、SAMe生産能を有し且つ経口摂取可能なものであればよく、例えばサッカロマイセス属に属する酵母が挙げられる。このうち、サッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) がより好適である。なお、乾燥酵母には、5'-ヌクレオチド、遊離アミノ酸、抗酸化作用を有し肝機能改善に役立つグルタチオン、免疫力の増進作用や整腸作用を有する β -グルカンや食物繊維などの有用成分が多く含まれており、健康食品等として広く利用されている。

[0013] 上記酵母を培養する際に使用する炭素源は、酵母が資化し得るものであれば特に制限はなく、例えば、グルコース、蔗糖、澱粉、廃糖蜜等の炭水化物、エタノール等のアルコール、又は酢酸等の有機酸が挙げられる。窒素源も、使用する酵母が資化し得るものであれば特に制限はなく、例えば、アンモニア、硝酸、尿素等の無機体窒素化合物、又は酵母エキス、麦芽エキス等の有機体窒素化合物を含むものが挙げられる。また、無機塩類としては、リン酸、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、亜鉛、マンガン、コバルト、銅、モリブデン等の塩が用いられる。さらには、SAMeの骨格構成にあずかるメチオニン、アデニン、アデノシルリボヌクレオシドを添加し培養することもできる。

[0014] 培地として、Ｌ－メチオニン含有培地（Shiozaki S., et al., J. Biotechnology, 4, 345-354 (1986)）を用いた。

培地成分としては、スクロース、酵母エキス、Ｌ－メチオニン、尿素、グリシン、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム七水和物、ビオチン、塩化カルシウム二水和物、及び微量金属塩を含む培地に植菌し、スクロース又は／及びエタノール等の炭素源を流加しつつ、好氣的に培養することによりSAM含有菌体を得ることができる。

培養温度及び培養液のpHは使用する酵母の種類によって異なるが、培養温度としては20～35℃の範囲を、培養液のpHとしてはpH4～7の範囲を挙げることができる。

また、菌体内のSAMe含量を高めるには、好氣的に培養することが好ましい。培養槽は、通気可能で必要に応じ攪拌できるものであればよく、例えば、機械的攪拌培養槽、エアーリフト式培養槽及び気泡塔型培養槽等を利用することができる。

培地の供給方法は、炭素源、窒素源、各種無機塩類、各種添加剤等を、一括若しくは個別に連続的又は間欠的に供給する。例えば、蔗糖、エタノール等の基質は他の培地成分との混合物として培養槽に供給してもよく、また他の培地成分とは別に独立して培養槽に供給してもよい。培養液のpH制御は、酸、アルカリ溶液によって行われる。アルカリとしては窒素源として使用されるアンモニア、尿素、又は非窒素系塩基、例えば、苛性ソーダ、苛性カリ等を用いてpH制御するのが望ましい。酸としては無機酸、例えば、リン酸、硫酸、硝酸、又は有機酸が用いられる。なお、無機塩類であるリン酸塩、カリウム塩、ナトリウム塩、硝酸塩等を用いてpH制御することもできる。

[0015] このような条件で培養し、目標量のSAMeが酵母菌体中に蓄積された段階で培養液を抜き出し酵母菌体を分離する。分離方法としては、菌体の分離と洗浄が効率的に行える方法であれば特に制限はないが、向流型のイーストセパレーターや分離膜を用いた限外濾過装置が好適な例として挙げられる。

[0016] ついで、分離した酵母菌体の分離濃縮物に増粘剤を添加する。これによって、乾燥酵母中のSAMeの保存安定性、さらには、生体吸収性が増し、また酵母の乾燥工程での歩留まりも向上し、また乾燥酵母独特の臭気もマスキングされる。添加する増粘剤の量としては、S-アデノシル-L-メチオニン含有乾燥酵母組成物に対する質量比として0.1～70質量パーセントの範囲になるようにすることが好ましく、0.4～70質量パーセント範囲になるようにすることがより好ましく、0.7～70質量パーセント範囲になるようにすることがさらに好ましい。さらにまた、4.5～70質量パーセント範囲になるようにすることが特に好ましい。0.1質量パーセントを下回ると乾燥酵母中のSAMeの保存安定性が不十分となり、70質量パーセントを超えると無駄であるばかりか乾燥酵母中のSAMeの保存安定性が用量依存的に低下する傾向を示す。

[0017] 本発明において増粘剤とは、増粘作用を有し、いわゆるゲル化剤といわれているような食品に添加可能な各種増粘剤等をいう。

具体的に使用できる増粘剤としては、(1) キサンタンガム、ジェランガム、カードラン、アルギンキサンタンガム、プルラン、及び納豆菌ガムから選択される微生物由来増粘剤、

(2) グアーガム、タラガム、ローカストビーンガム、タマリンドガム、及びサイリウムシードガムから選択される種子由来増粘剤、

(3) セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、デンプン、及びカルボキシメチル酸ナトリウムから選択される植物由来増粘剤、

(4) カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸、及びアルギン酸プロピレングリコールエステルから選択される海藻由来増粘剤、

(5) アラビアガム、トラガントガム、シェラック、及びアラビノガラクトンから選択される樹脂由来増粘剤、

(6) キトサン、及びキチンから選択される甲殻由来増粘剤、及び

(7) ペクチン、マンナン、ヒアルロン酸、コンドロイチン、寒天、コラー

ゲン、アルブミン、ツェイン、カゼイン、及びカゼインナトリウム等から選ばれる増粘剤が挙げられ、これらから１種以上を選択して用いることができる。

これらのうち、（１）キサンタンガム、ジェランガム、カードラン、アルギンキサンタンガム、プルラン、及び納豆菌ガムから選択される微生物由来増粘剤、

（２）グアーガム、タラガム、ローカストビーンガム、タマリンドガム、及びサイリウムシードガムから選択される種子由来増粘剤、

（５）アラビアガム、トラガントガム、シェラック、及びアラビノガラクトンから選択される樹脂由来増粘剤、

（６）キトサン、及びキチンから選択される甲殻由来増粘剤、及び

（７）ペクチン、マンナン、ヒアルロン酸、コンドロイチン、寒天、コラーゲン、アルブミン、ツェイン、カゼイン、及びカゼインナトリウムから選ばれる増粘剤がより好ましい。

さらに、（１）キサンタンガム、ジェランガム、カードラン、アルギンキサンタンガム、プルラン、及び納豆菌ガム等の微生物由来増粘剤、及び（２）グアーガム、タラガム、ローカストビーンガム、タマリンドガム、及びサイリウムシードガム等の種子由来増粘剤が特に好ましい。

本発明で使用する増粘剤は食品、化粧品、医薬品用途で汎用されており、安全に使用することができる。

[0018] このようにして増粘剤の添加処理を行った後に、酵母菌体の濃縮物をスプレードライヤによる噴霧乾燥法や凍結乾燥法等の乾燥方法により水分を蒸発させてSAMe含有乾燥酵母組成物とする。

乾燥条件としては、噴霧乾燥法では、入口温度210℃以下、出口温度110℃以下にて乾燥させることが望ましい。凍結乾燥法では、最終棚温度30℃以下にて乾燥させることが望ましい。本発明のSAMe含有組成物は保存安定性の観点から、その水分含量が5.0質量%以下になるようにすることが望ましい。

[0019] さらに、この乾燥酵母組成物を破碎して粉末状にしたり、粉末状の乾燥酵母に必要な応じて他の生理活性成分や賦形剤等の添加剤を加えた後に圧縮打錠し錠剤状の組成物となし、さらに、その表面を被覆したりすることもできる。

また、粉体を顆粒状に造粒することや、粉体や造粒した顆粒を詰めてカプセル化することもできる。

実施例

[0020] 以下、本発明を実施例及び比較例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって限定されるものではない。

[0021] 実施例 1 ～ 4

(a) 酵母菌体の培養

前述した公知の培養法に従って、L-メチオニン含有培地 (Shiozaki S., et al., J. Biotechnology, 4, 345-354 (1986)) にサッカロマイセス属に属する酵母サッカロマイセス・セレビジエ IFO 2346 を接種し、培養温度 27 ～ 29℃ で好氣的に通気攪拌しながら 6 日間培養した。その結果、菌体濃度 3.5 wt %, SAMe 含量 205 mg / g - 乾燥酵母の酵母菌体培養液 18 L を得た。

(b) 酵母菌体の集菌

上記の酵母菌体培養液 18 L を連続ロータリー型遠心分離器 (日立 HIMAC CENTRIFUGE CR10B2) で処理し、菌濃度が乾物換算で 18 質量% に相当する液状の酵母菌体濃縮物 3.4 kg を得た。

(c) 酵母菌体濃縮物への増粘剤の添加

上記の酵母菌体濃縮物 3.4 kg にキサンタンガムを該酵母濃縮物中の SAMe に対する質量比として 0.02、0.2、2.2、11.1 倍量加えて、室温にて 30 分間攪拌混合し、キサンタンガムを添加した酵母菌体濃縮物を得た。

(d) 乾燥酵母の製造

上記のキサンタンガムを添加した酵母菌体濃縮物を凍結乾燥器 (日本真空

技術株式会社製)の凍結乾燥用ステンレステーに流し込み -50°C で凍結した後、最終棚段温度 25°C の条件で36時間凍結乾燥した。得られた凍結乾燥酵母をさらに粉砕することによって粉末乾燥酵母を得た。このようにして得られた粉末乾燥酵母を密閉ガラス容器中に詰め、 40°C 、RH75%の加速度試験条件下で保存安定性試験を行った。表1に 40°C 、RH75%での加速保存安定性試験結果を示した。なお、S A M e 残存率は、S A M e 含有乾燥酵母より過塩素酸を用いた公知の方法でS A M e を抽出し、液体クロマトグラフィーを用いた比較定量法にて実施した。保存後の臭気の有無については5名のパネラーによる官能検査にて求めた。官能検査の評価方法は、5名のパネラー全員が異臭なしとした場合を「○」、5名のうち1~2名が異臭があるとした場合を「△」、5名のうち3名以上が異臭ありとした場合を「×」とした。

本発明におけるS A M e 測定法は、以下の条件の液体クロマトグラフィーを使用した。

用いられた分析条件

カラム：ナカライ (nacalai tesque) COSMOSIL 4.6 $\phi \times 100\text{mm}$

溶離液：0.2M KH_2PO_4 水溶液/メタノール=95/5

流速：0.7mL/min、検出器：UV (260nm)

S A M e 保持時間：約150秒

[0022] 実施例5~8

酵母菌体濃縮物にカードランを用いて、実施例1と同様に処理して、粉末乾燥酵母を得た。得られた粉末乾燥酵母中のS A M e 含量、質量、及び得られたS A M e 含有乾燥酵母の密閉ガラス容器中、 40°C 、RH75%の加速条件下での保存安定性試験の結果、官能検査の結果を表1に示す。

[0023] 実施例9

酵母菌体濃縮物にグアーガムを該酵母濃縮物中のS A M e に対する質量比として0.2倍量加えた以外は、実施例1と同様に処理して、粉末乾燥酵母を得た。得られた粉末乾燥酵母中のS A M e 含量、質量、及び得られたS A

Me 含有乾燥酵母の密閉ガラス容器中、40℃、RH75%の加速条件下での保存安定性試験の結果、官能検査の結果を表1に示す。

[0024] 実施例 10

酵母菌体濃縮物にタマリンドガムを該酵母濃縮物中のSAMeに対する質量比として0.2倍量加えた以外は、実施例1と同様に処理して、粉末乾燥酵母を得た。得られた粉末乾燥酵母中のSAMe含量、質量、及び得られたSAMe含有乾燥酵母の密閉ガラス容器中、40℃、RH75%の加速条件下での保存安定性試験の結果、官能検査の結果を表1に示す。

[0025] 実施例 11

酵母菌体濃縮物にジェランガムを該酵母濃縮物中のSAMeに対する質量比として0.2倍量加えた以外は、実施例1と同様に処理して、粉末乾燥酵母を得た。得られた粉末乾燥酵母中のSAMe含量、質量、及び得られたSAMe含有乾燥酵母の密閉ガラス容器中、40℃、RH75%の加速条件下での保存安定性試験の結果、官能検査の結果を表1に示す。

[0026] 比較例 1

酵母菌体濃縮物へキサンタンガムを添加しなかったこと以外は実施例1と同様に処理して、粉末乾燥酵母を得た。得られた粉末乾燥酵母中のSAMe含量、質量、得られたSAMe含有乾燥酵母の密閉ガラス容器中、40℃、RH75%の加速条件下での保存安定性試験の結果、官能検査の結果を表1に示す。

[0027] 比較例 2

酵母菌体濃縮物にトレハロースを該酵母濃縮物中のSAMeに対する質量比として2.2倍量加えた以外は、実施例1と同様に処理して、粉末乾燥酵母を得た。得られた粉末乾燥酵母中のSAMe含量、質量、得られたSAMe含有乾燥酵母の密閉ガラス容器中、40℃、RH75%の加速条件下での保存安定性試験の結果、官能検査の結果を表1に示す。

[0028]

[表1]

表1

例	添加物	乾燥酵母組成物に対する添加物の質量(%)	乾燥前溶液に対しての添加物の質量(%)	試験開始時の乾燥酵母中のSAmE含量(質量%)	保存安定性試験			60日後の異臭の有無*	
					SAmE残存率(%)				
					30日後	45日後	60日後		
比較例1	無	0.0	0.0	14.5%	5.8%	0.0%	0.0%	×	
実施例1	キサンタンガム	0.48	0.1	16.1%	60.1%	46.4%	28.1%	△	
実施例2	キサンタンガム	4.6	1.0	12.3%	99.6%	99.6%	99.5%	○	
実施例3	キサンタンガム	32.0	10.0	11.9%	99.7%	99.7%	99.7%	○	
実施例4	キサンタンガム	68.6	50.0	5.2%	99.8%	99.8%	99.7%	○	
実施例5	カートラン	0.48	0.1	15.9%	58.8%	44.5%	25.1%	△	
実施例6	カートラン	4.6	1.0	13.3%	94.9%	94.7%	94.4%	○	
実施例7	カートラン	32.0	10.0	11.6%	99.8%	99.8%	99.7%	○	
実施例8	カートラン	68.6	50.0	5.1%	99.8%	99.8%	99.8%	○	
実施例9	グアーガム	4.6	1.0	9.1%	99.7%	99.7%	99.6%	○	
実施例10	タマリンドガム	4.6	1.0	14.6%	92.8%	92.5%	92.3%	○	
実施例11	ジェランガム	4.6	1.0	12.2%	99.7%	99.6%	99.5%	○	
比較例2	トレハロース	32.0	10.0	12.5%	10.4%	0.0%	0.0%	×	

*官能検査: ×:異臭あり、△:異臭が僅かにする、○:異臭なし

*官能検査: ×: 異臭あり、△: 異臭が僅かにする、○: 異臭なし

[0029] 実施例12～19

200L培養槽を用い、固形分濃度が18.2質量%のSAmE含有酵母濃縮液(SAmE含量3.7質量%)に対する添加物の量を1質量%とし、添加物としてκ-カラギーナン(実施例12)、キサンタンガム(実施例13)、グアーガム(実施例14)、タマリンドガム(実施例15)、カードラ

ン（実施例 16）、ジェランガム（実施例 17）、アルギン酸（実施例 18）、セラオス S T - O 2（結晶セルロース）（実施例 19）を添加し、凍結乾燥後の回収率、S A M e 含有量（質量%）40℃で30日、60日後の S A M e 残存率を測定した。

実施例 12～19の詳細な実施例の条件は以下のとおりである。

（a）酵母菌体の培養

実施例 1 と同様の条件で培養し、菌体濃度 3.5 質量%、S A M e 含量 201.5 mg / g - 乾燥酵母の酵母菌体培養液 120 L を得た。

（b）酵母菌体の集菌

上記の酵母菌体培養液 120 L を連続ロータリー型遠心分離器（日立 H I M A C C E N T R I F U G E C R 10 B 2）で処理し、菌濃度が乾物換算で 18 質量%に相当する液状の酵母菌体濃縮物 23.4 kg を得た。

（c）酵母菌体濃縮物への増粘剤の添加

上記の酵母菌体濃縮物 23.4 kg に上記の実施例 12～19の増粘剤を該酵母濃縮物中の S A M e に対する質量比として 1.0 倍量加えて、室温にて 30 分間攪拌混合し、実施例 12～19の増粘剤を添加した酵母菌体濃縮物を得た。

（d）乾燥酵母の製造

上記の実施例 12～19の増粘剤を添加した酵母菌体濃縮物を凍結乾燥器（日本真空技術株式会社製）の凍結乾燥用ステンレストレーに流し込み -50℃で凍結した後、最終棚段温度 25℃の条件で 36 時間凍結乾燥した。得られた凍結乾燥酵母をさらに粉砕することによって粉末乾燥酵母を得た。このようにして得られた粉末乾燥酵母を密閉ガラス容器中に詰め、40℃、R H 75%の加速度試験条件下で保存安定性試験を行った。表 2 に 40℃、R H 75%での加速保存安定性試験の結果を示した。なお、S A M e 残存率は、前記の方法で測定した。また、S A M e 含有酵母濃縮液に対する添加物の混合具合については、目視により分散状況を観察して評価した。添加物の混合具合、凍結乾燥後の回収率、形状、乾燥後 S A M e 含有量（質量%）、40

℃で30日、60日後のS A M e 残存率の結果をまとめて表2に示す。

[0030] [表2]

	比較例1	実施例12	実施例13	実施例14	実施例15	実施例16	実施例17	実施例18	実施例19	乾燥前濃縮液に対しての添加量(質量%)	添加物の混合具合*	乾燥後の回収率	乾燥後の形状	乾燥後のS A M e含有量(質量%)	保存安定性試験 S A M e残存率(%)	
															30日後	60日後
		無	無	無	無	無	無	無	無	0%	—	97%	粉状	14.4%	6.0%	0.0%
		κ-カラギナン	κ-カラギナン	κ-カラギナン	κ-カラギナン	κ-カラギナン	κ-カラギナン	κ-カラギナン	κ-カラギナン	1%	○	97%	粉状	14.0%	70.1%	58.5%
		キサンタンガム	キサンタンガム	キサンタンガム	キサンタンガム	キサンタンガム	キサンタンガム	キサンタンガム	キサンタンガム	1%	△	98%	粉状	12.3%	99.5%	99.3%
		グアーガム	グアーガム	グアーガム	グアーガム	グアーガム	グアーガム	グアーガム	グアーガム	1%	○	98%	粉状	9.1%	99.6%	99.5%
		タマリントガム	タマリントガム	タマリントガム	タマリントガム	タマリントガム	タマリントガム	タマリントガム	タマリントガム	1%	○	97%	粉状	14.6%	93.1%	92.2%
		カトラン	カトラン	カトラン	カトラン	カトラン	カトラン	カトラン	カトラン	1%	△	96%	ゴム状	13.3%	95.0%	94.1%
		ジェランガム	ジェランガム	ジェランガム	ジェランガム	ジェランガム	ジェランガム	ジェランガム	ジェランガム	1%	△	96%	ゴム状	12.2%	99.6%	99.4%
		アルギン酸	アルギン酸	アルギン酸	アルギン酸	アルギン酸	アルギン酸	アルギン酸	アルギン酸	1%	△	98%	粉状	16.1%	69.5%	54.0%
		セオラスST-02(結晶セルロース)	セオラスST-02(結晶セルロース)	セオラスST-02(結晶セルロース)	セオラスST-02(結晶セルロース)	セオラスST-02(結晶セルロース)	セオラスST-02(結晶セルロース)	セオラスST-02(結晶セルロース)	セオラスST-02(結晶セルロース)	1%	○	98%	粉状	16.8%	76.8%	64.0%

*:官能検査:○:均一に分散、△:ほぼ均一に分散

[0031] 比較例3

Ｌ－メチオニンを含まない培地にて培養を行った以外は、実施例1と同様に処理して、粉末乾燥酵母を得た。得られた粉末乾燥酵母中にはS A M eは含有されていなかった。これを用いて以下の実験を行った。

[0032] 性能評価の試験例 1～5、比較性能試験の評価例 1、2

実施例 2、6、9、10、11、比較例 1、及び比較例 3 で得られた乾燥酵母について、文献記載の方法（非特許文献 2）と同様に SD 系ラット（雄 8 週齢、動物数：各群 $n = 3$ ）を用いて、生体吸収性試験を性能評価の試験例 1～5、比較性能試験の評価例 1、2 として行った。

吸収性試験は、非特許文献 2（J of Chromatography B, 863, 94-100 (2008)）の方法を用いて行った。ラットへの乾燥酵母の投与量は、S A M e として $300 \text{ mg} / \text{kg}$ -ラットの投与量になる様に乾燥酵母を蒸留水へ分散した状態でラットに経口投与を行い、経口投与後 0.5、2、3、5 時間後のラットの血液を採取し、血液は速やかに遠心分離により血漿成分の分離を行い、過塩素酸を用いた S A M e 成分の抽出物を、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）で、L C - M S - M S 法（Liquid chromatography coupled with mass spectrometry）により下記の条件で分析した。その結果、各乾燥酵母ともに経口投与 2 時間後血漿中 S A M e 濃度が最も高かった。各乾燥酵母の経口投与 2 時間後生体吸収性試験の結果を表 3 に示す。表 3 より、いずれの試験例も、増粘剤を添加した乾燥酵母の生体吸収性が、評価例 1 として示す添加処理を行っていない比較例 1 の乾燥酵母による場合よりも向上することが確認された。

[0033] なお、生体吸収性試験に用いられた分析機器、条件は以下の通りである。

L C - M S - M S 法

L C - M S - M S 装置：Thermo 社製 Accela、LTQ orbitrap Discovery

H P L C 条件

カラム：ジーエルサイエンス社製 Intersil ODS-3 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$)

流速： $0.5 \text{ mL} / \text{min}$ 、カラムオーブン： 40°C 、検出器：UV (260 nm)、S A M e 保持時間：約 145 秒、注入量： $10 \mu \text{L}$

溶離液： $2 \text{ mmol} / \text{L}$ ヘプタフルオロ酪酸水溶液：アセトニトリル = 30 : 70

MS条件

Ion Source: E S I

Ion Polarity Mode: P o s i t i v e

Scan Mode Type: F Tフルマス

Resolution: 3 0 0 0 0

Mass Range: m/z 3 6 0 - 4 1 0

[0034] [表3]

表3

	乾燥酵母の 由来する 実施例等	添加物	乾燥前酵 母組成物 に対する添 加物 (質量%)	乾燥前溶 液に対し ての添加 物 (質量%)	試験開始時 の乾燥酵母 中のSAmE含 量 (質量%)	経口投与2 時間後の血 漿中SAmE濃 度 ($\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$)
評価例1	(比較例1)	無	0.0	0.0	14.5%	0.96
評価例2	(比較例3)	無	0.0	0.0	0.0%	0.13
試験例1	(実施例2)	キサンタンガム	4.6	1.0	12.3%	1.33
試験例2	(実施例6)	カードラン	4.6	1.0	13.3%	1.21
試験例3	(実施例9)	グアーガム	4.6	1.0	9.1%	1.83
試験例4	(実施例10)	タマリンドガム	4.6	1.0	14.6%	1.18
試験例5	(実施例11)	ジェランガム	4.6	1.0	12.2%	1.19

産業上の利用可能性

[0035] 本発明の組成物を用いることによって、S-アデノシル-L-メチオニンを含む保存安定性に優れた組成物、さらには生体吸収性に優れた組成物として、医薬や健康食品用の生理活性物質として有効に利用できる。

本発明の製造方法は、S-アデノシル-L-メチオニンを高濃度に含み、保存安定性に優れた組成物を、低コストで簡便に製造する方法として利用できる。

請求の範囲

[請求項1] S－アデノシル－Ｌ－メチオニンと、増粘剤を含有するS－アデノシル－Ｌ－メチオニン含有乾燥酵母組成物。

[請求項2] 前記増粘剤が、下記の（１）～（７）のいずれかから選ばれる少なくとも１種である請求項１に記載のS－アデノシル－Ｌ－メチオニン含有乾燥酵母組成物。

（１）キサンタンガム、ジェランガム、カードラン、アルギンキサンタンガム、プルラン、及び納豆菌ガムから選択される微生物由来増粘剤、

（２）グアーガム、タラガム、ローカストビーンガム、タマリンドガム、及びサイリウムシードガムから選択される種子由来増粘剤、

（３）セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、デンプン、及びカルボキシメチル酸ナトリウムから選択される植物由来増粘剤、

（４）カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸、及びアルギン酸プロピレングリコールエステルから選択される海藻由来増粘剤、

（５）アラビアガム、トラガントガム、シェラック、及びアラビノガラクタンから選択される樹脂由来増粘剤、

（６）キトサン、及びキチンから選択される甲殻由来増粘剤、及び

（７）ペクチン、マンナン、ヒアルロン酸、コンドロイチン、寒天、コラーゲン、アルブミン、ツェイン、カゼイン、及びカゼインナトリウムから選ばれる増粘剤

[請求項3] 前記増粘剤が、下記の（１）、（２）及び（５）～（７）のいずれかから選ばれる少なくとも１種である請求項２に記載のS－アデノシル－Ｌ－メチオニン含有乾燥酵母組成物。

（１）キサンタンガム、ジェランガム、カードラン、アルギンキサン

タンガム、プルラン、及び納豆菌ガムから選択される微生物由来増粘剤、

(2) グアーガム、タラガム、ローカストビーンガム、タマリンドガム、及びサイリウムシードガムから選択される種子由来増粘剤、

(5) アラビアガム、トラガントガム、シェラック、及びアラビノガラクタンから選択される樹脂由来増粘剤、

(6) キトサン、及びキチンから選択される甲殻由来増粘剤、及び

(7) ペクチン、マンナン、ヒアルロン酸、コンドロイチン、寒天、コラーゲン、アルブミン、ツェイン、カゼイン、及びカゼインナトリウムから選ばれる増粘剤

[請求項4] 前記増粘剤が、S-アデノシル-ル-メチオニン含有乾燥酵母組成物に対して0.1～70質量%含まれてなる請求項1～3のいずれかに記載のS-アデノシル-ル-メチオニン含有乾燥酵母組成物。

[請求項5] 乾燥酵母が、サッカロマイセス属に属する酵母である、請求項1～4のいずれかに記載のS-アデノシル-ル-メチオニン含有乾燥酵母組成物。

[請求項6] 前記サッカロマイセス属に属する酵母がサッカロマイセス・セレビジエである、請求項5に記載のS-アデノシル-ル-メチオニン含有乾燥酵母組成物。

[請求項7] S-アデノシル-ル-メチオニン生産能を有する酵母を用い、酵母の菌体培養液より得られる酵母菌体濃縮物に増粘剤を添加した後、乾燥する、ことを特徴とするS-アデノシル-ル-メチオニン含有乾燥酵母組成物の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/16(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),
Science Direct, Wiley InterScience, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 2008/090905 A1 (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 31 July 2008 (31.07.2008), entire text & AU 2008208325 A1 & TW 200900505 A & KR 10-2009-0112654 A & EP 2116593 A1 & CA 2675970 A1 & CN 101589136 A	1-2, 4-7/3
X/Y	WO 2009/081833 A1 (Kaneka Corp.), 02 July 2009 (02.07.2009), entire text (Family: none)	1-2, 4-7/1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 June, 2011 (30.06.11)

Date of mailing of the international search report
12 July, 2011 (12.07.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058652

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/132831 A1 (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 22 November 2007 (22.11.2007), entire text & EP 2017331 A1 & TW 200813217 A & CN 101437935 A & US 2009/186400 A1	1-7
Y	WO 2007/129701 A1 (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 15 November 2007 (15.11.2007), entire text & EP 2014764 A1 & TW 200811287 A & CN 101437934 A & KR 10-2009-0015044 A & US 2009/181001 A1	1-7
Y	WO 2009/024605 A1 (BELDEM, 5300 Andenne, BE), 26 February 2009 (26.02.2009), entire text & EP 2028265 A1 & JP 2010-536360 A & CA 2695719 A & MX 2010001957 A & CN 101918533 A	1-7
A	WO 2009/110464 A1 (Kabushiki Kaisha Seikatsu Bunkasha), 11 September 2009 (11.09.2009), entire text (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N1/16(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), Science Direct, Wiley InterScience, CiNii

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	WO 2008/090905 A1 (三菱瓦斯化学株式会社) 2008.07.31, 全文 & AU 2008208325 A1 & TW 200900505 A & KR 10-2009-0112654 A & EP 2116593 A1 & CA 2675970 A1 & CN 101589136 A	1-2, 4-7/3
X/Y	WO 2009/081833 A1 (株式会社カネカ) 2009.07.02, 全文 (ファミリーなし)	1-2, 4-7/1-7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

3 0 . 0 6 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 7 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山本 匡子

4 B

3 0 3 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2007/132831 A1 (三菱瓦斯化学株式会社) 2007. 11. 22, 全文 & EP 2017331 A1 & TW 200813217 A & CN 101437935 A & US 2009/186400 A1	1-7
Y	WO 2007/129701 A1 (三菱瓦斯化学株式会社) 2007. 11. 15, 全文 & EP 2014764 A1 & TW 200811287 A & CN 101437934 A & KR 10-2009-0015044 A & US 2009/181001 A1	1-7
Y	WO 2009/024605 A1 (BELDEM, 5300 Andenne, BE) 2009. 02. 26, 全文 & EP 2028265 A1 & JP 2010-536360 A & CA 2695719 A & MX 2010001957 A & CN 101918533 A	1-7
A	WO 2009/110464 A1 (株式会社生活文化舎) 2009. 09. 11, 全文 (ファミリーなし)	1-7