

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5126774号
(P5126774)

(45) 発行日 平成25年1月23日(2013.1.23)

(24) 登録日 平成24年11月9日(2012.11.9)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 11/04 (2006.01) C 1 2 N 11/04
C 0 9 K 17/32 (2006.01) C 0 9 K 17/32 H
 C 0 9 K 101/00 (2006.01) C 0 9 K 101:00

請求項の数 9 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2007-185043 (P2007-185043)	(73) 特許権者	504258527 国立大学法人 鹿児島大学
(22) 出願日	平成19年7月13日(2007.7.13)		鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
(65) 公開番号	特開2009-17861 (P2009-17861A)	(74) 代理人	100069578 弁理士 藤川 忠司
(43) 公開日	平成21年1月29日(2009.1.29)	(72) 発明者	幡手 泰雄 鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号 国立大学法人 鹿児島大学内
審査請求日	平成22年4月27日(2010.4.27)	(72) 発明者	吉田 昌弘 鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号 国立大学法人 鹿児島大学内
		(72) 発明者	河野 恵宣 鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号 国立大学法人 鹿児島大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法及び土壌改質材。

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

油相中に有用微生物及びゲル形成用水溶性ポリマーを含む水溶液を分散させた第一のW/Oエマルジョンと、油相中に前記のゲル形成用水溶性ポリマーをゲル化させる多価陽イオンを含む水溶液を分散させた第二のW/Oエマルジョンとを調製し、両W/Oエマルジョンの一方を攪拌し、この攪拌下にある一方のW/Oエマルジョンに対して他方のW/Oエマルジョンを添加して攪拌混合することにより、両W/Oエマルジョン中の分散相の液滴同士を衝突させて内部に有用微生物を固定化したゲルビーズを生成させることを特徴とする微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法。

【請求項2】

第一及び第二のW/Oエマルジョンの油相が、前記有用微生物を害しない天然油脂である請求項1に記載の微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法。

【請求項3】

前記天然油脂が菜種油である請求項2に記載の微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法。

【請求項4】

第一のW/Oエマルジョンの有用微生物が乳酸菌又はノ及び酵母菌である請求項1～3のいずれかに記載の微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法。

【請求項5】

第一のW/Oエマルジョンのゲル形成用水溶性ポリマーが水溶性高分子多糖類である請

求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法。

【請求項 6】

前記水溶性高分子多糖類がアルギン酸塩である請求項 5 に記載の微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法。

【請求項 7】

第一の W / O エマルジョン中に分散安定剤を含む請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法。

【請求項 8】

前記請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の製造方法によって得られる微生物内包高分子ゲルビーズを含む土壌改質材。

10

【請求項 9】

微生物内包高分子ゲルビーズが乳酸菌及び酵母菌の一方又は両方を内包する請求項 8 に記載の土壌改質材。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、有用な微生物を失活させずに担持した微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法と、この製造方法にて得られたゲルビーズを含む土壌改質材に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物を利用して土壌や水系の改質、各種廃水や汚染土壌の浄化、有用物質の合成や精製あるいは分離等を行う場合、その処理効率及び操作性を高める上で、該微生物を適当な担体に固定化させて用いる必要がある。従来より、このような担体には、微生物に良好な生育環境を提供できる点から、ポリビニルアルコール（以下、PVA と略称する）の如き水溶性合成樹脂やアルギン酸塩の如き水溶性高分子多糖類の多孔質ゲル粒子が多用されている。

20

【0003】

このような多孔質ゲル粒子としては、微生物の活性を持続的に発揮させるために、粒子自体が構造的に安定で崩壊しにくく、そのゲル構造中に微生物を逸散しにくく且つ代謝を妨げない状態で捕捉し得ることが肝要であるが、加えて工業的に利用する上で、微生物担持物としての量産性、原材料及び工程面からの経済性、製造及び使用中の安全性等が要求され、更に処理効率面から微生物の担持密度が高く、また多様な用途及び使用条件に対応して粒度のコントロールが容易であることも望まれる。

30

【0004】

従来、多糖類系の多孔質ゲル粒子を得る手段としては、該多糖類の水溶液を塩化カルシウム水溶液中に滴下してゲル粒子を生成させる方法が一般的である。また、PVA系の多孔質ゲル粒子を得る手段としては、PVA及びアルギン酸ナトリウムを溶解した水溶液を塩化カルシウム水溶液中に滴下して球状のゲル粒子を形成する方法（特許文献1）、微生物を含むアルギン酸ナトリウムの水溶液を塩化カルシウム水溶液中に滴下してゲル粒子を形成したのち、該ゲル粒子を可溶性固形分の高濃度溶液に浸漬して収縮させる方法（特許文献2）、多孔質核体に塩化カルシウム水溶液を浸透させたのち、PVA系重合体及びアルギン酸ナトリウムを溶解した水溶液に浸漬して該核体の外側にゲル層を形成し、次いで該核体を架橋剤含有液に浸漬してPVA系重合体の架橋を行い、更に水酸化ナトリウム水溶液に浸漬してアルギン酸カルシウムゲルを溶解除去する方法（特許文献3）等が提案されている。

40

【0005】

しかるに、これらの方法では、ゲル形成用ポリマーの水溶液を塩化カルシウム水溶液中に滴下することから、平均粒度が数mm以上といった大きいゲル粒子は生成するが、例えば土壌改質材等として好適な平均粒度が数十 μm といった微小なゲル粒子は得られない上、製法的に量産性に乏しいため、土壌や水系の改質、廃水処理といった大量消費される用

50

途には供給能力及びコストの両面で不適である。

【0006】

一方、本発明者らは先に、微生物を内包する微小なマイクロカプセルの製造方法をいくつか提案している。その一つ目は、マイクロカプセルの外壁材となるポリマーを溶かした有機溶媒中に、微生物を内包したアルギン酸ナトリウム等の高分子ビーズを乳化分散させ、このS/Oエマルジョンを水溶液中に移して有機溶媒を徐々に除去することにより、微生物内包の芯物質が外壁材被膜で覆われたマイクロカプセルを得る方法（特許文献4）である。また二つ目は、良溶剤として壁材ポリマーを溶解した有機溶剤Aと、これよりも高沸点で該壁材ポリマーに対する貧溶剤となる有機溶剤Bとからなる油相中に、微生物及び水中でのゲル形成性を有する保護材ポリマーを含有する水溶液を添加して乳化させることにより、微生物を内包する保護材ポリマーを含有する水滴微粒子が有機相中に分散したW/Oエマルジョンを調製し、これを水相に添加して乳化させて得られるW/O/Wエマルジョンの加温又は加温・減圧により、前記良溶剤及び貧溶剤を順次に蒸発・除去して壁材ポリマーを結晶化させる方法である（特許文献5）。更に三つ目は、壁材ポリマーとなる生分解性ポリマーを含有する有機溶媒からなる油相中に、微生物及び水中でのゲル形成性を有する保護材ポリマーを含有する水溶液を添加し乳化させることにより、微生物を内包する保護材ポリマーを含有する水滴微粒子が有機相中に分散したW/Oエマルジョンを調製し、これを水相に添加して乳化させて得られるW/O/Wエマルジョンの加温又は加温・減圧により、有機溶剤を蒸発・除去して壁材ポリマーを結晶化させる方法である（特許文献6）。

10

20

【特許文献1】特開平8-116974号公報

【特許文献2】特開2005-224160号公報

【特許文献3】特開2005-42037号公報

【特許文献4】特開2003-88747号公報

【特許文献5】特開2004-329159号公報

【特許文献6】特開2006-67956号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らの提案に係る前記3つの方法によれば、有用な微生物を内包し、平均粒度が数十 μm といった微小な粒子サイズであって、且つ物理的及び化学的に安定なマイクロカプセル（ゲルビーズ）を製出できることが実証されている。しかしながら、前記一つ目の方法では、微生物を内包した高分子ビーズを調製する固形化工程が別途必要であり、全体として製造工程が長くなることから、生産能率面での難点があった。また、他の2つの方法でも、壁材ポリマーの他に保護材ポリマーを用いるため、それだけ材料コストが高く付くという難点があった。更に、これらの何れの方法においても、有機溶剤を用い、最後に加温下で該有機溶剤を蒸発させるため、作業環境面での問題もあった。

30

【0008】

本発明は、上述の情況に鑑み、非常に簡便な方法により、有用な微生物を高密度で且つ高活性に固定化した高性能な微粒のゲルビーズを、能率よく低コストで且つ安全に量産できると共に、粒子サイズを広い範囲で任意に調整できる手段と、該ゲルビーズを用いた土壤改質材とを提供することを目的としている。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記目的を達成するために、本発明の請求項1に係る微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法は、油相中に有用微生物及びゲル形成用水溶性ポリマーを含む水溶液を分散させた第一のW/Oエマルジョンと、油相中に前記のゲル形成用水溶性ポリマーをゲル化させる多価陽イオンを含む水溶液を分散させた第二のW/Oエマルジョンとを調製し、両W/Oエマルジョンの一方を攪拌し、この攪拌下にある一方のW/Oエマルジョンに対して他方のW/Oエマルジョンを添加して攪拌混合することにより、両W/Oエマルジョン中の分

50

散相の液滴同士を衝突させて内部に有用微生物を固定化したゲルビーズを生成させることを特徴としている。

【0010】

そして、このような微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法の好適態様として、請求項2の発明では第一及び第二のW/Oエマルジョンの油相が有用微生物を害しない天然油脂である構成、請求項3の発明では該請求項2における天然油脂が菜種油である構成、請求項4の発明では第一のW/Oエマルジョンの有用微生物が乳酸菌又は/及び酵母菌である構成、請求項5の発明では第一のW/Oエマルジョンのゲル形成用水溶性ポリマーが水溶性高分子多糖類である構成、請求項6の発明では該請求項5における水溶性高分子多糖類がアルギン酸塩である構成、請求項7の発明では第一のW/Oエマルジョン中に分散安定剤を含む構成、をそれぞれ採用している。

10

【0011】

一方、請求項8の発明に係る土壌改質材は、上記請求項1～7のいずれかに記載の製造方法によって得られる微生物内包高分子ゲルビーズを含むものとしている。また、このような土壌改質材の好適態様として、請求項9の発明は微生物内包高分子ゲルビーズが乳酸菌及び酵母菌の一方又は両方を内包する構成を採用している。

【発明の効果】

【0012】

請求項1の発明に係る微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法によれば、第一のW/Oエマルジョンの分散相である有用微生物及びゲル形成用水溶性ポリマーを含む水滴粒子と、第二のW/Oエマルジョンの分散相である多価陽イオンを含む水滴粒子とが両W/Oエマルジョンの攪拌混合によって衝突合体するが、その合体した液滴同士は連続相である油相で隔てられているから、各液滴単位で前記ポリマーのゲル化反応が進行し、当該液滴粒子がそのまま含水ゲルビーズに転化すると共に、第一のW/Oエマルジョンの水滴粒子に含まれていた有用微生物の全てが漏れなくゲルビーズ中に取り込まれることになる。

20

【0013】

従って、得られるゲルビーズは、攪拌混合中におけるエマルジョンの分散相としての粒子サイズを反映した微粒子になると共に、両W/Oエマルジョンの調製時の攪拌速度、W/O比、分散安定剤を使用する場合の当該分散安定剤の濃度等の設定により、その粒径を3 μ m～900 μ mといった広範囲で任意にコントロールすることが可能であり、しかも有用微生物を100～200億個/gといった高密度で固定化できる。また、上述のように各液滴単位でゲル化反応が進行することから、生成したゲルビーズは、外殻部が内包する微生物の代謝に要する物質の出入りを妨げない適度な粗さの多孔質構造となり、もって微生物を長期にわたって失活させずに安定的に保持できる高性能な微生物担持体として機能する。

30

【0014】

更に、この製造方法では、2種のW/Oエマルジョンを単に攪拌混合するだけで所望の微生物内包高分子ゲルビーズを一挙に量産できるから、操作的に極めて簡便であると共に高い生産能率で製造コストを低減でき、また芯材や保護材のような格別な材料を必要とせず、それだけ材料コストも少なく済むという利点もある。

40

【0015】

しかして、このような微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法において、請求項2の発明の如く第一及び第二のW/Oエマルジョンの油相に有用微生物を害しない天然油脂を用いれば、有機溶剤のような危険性や有害性がないから、安全に操業できると共に環境保全面でも問題を生じない。特に該天然油脂として請求項3の発明の如く菜種油を用いれば、固定化した微生物の生育に非常に好都合であると共に、菜種油が安価に入手できるので材料コストを低減できる利点もある。

【0016】

なお、有用微生物として請求項4の発明の如く乳酸菌や酵母菌を用いれば、得られる微生物内包高分子ゲルビーズを発酵性材料として好適に利用できる。また、第一のW/Oエ

50

マルジョンのゲル形成用水溶性ポリマーに請求項5の発明の如く水溶性高分子多糖類、特に請求項6の発明のようにアルギン酸塩を用いれば、固定化した微生物の生育により好都合である。

【0017】

更に、請求項7の発明のように、第一のW/Oエマルジョン中に分散安定剤を含むことにより、当該エマルジョンの乳化・分散状態が安定化し、最終的に得られる微生物内包高分子ゲルビーズが均一性に優れたものとなる。

【0018】

一方、請求項8の発明に係る土壌改質剤は、上記製造方法によって得られる微生物内包高分子ゲルビーズを含むから、土壌中に混和したり地表面に散布することにより、土壌に対して内包する微生物による発酵等の微生物活性作用を長期にわたって安定的に発揮できる。そして、請求項9の発明のように微生物内包ゲルビーズとして乳酸菌及び酵母菌の一方又は両方を内包するものを用いた土壌改質材は、作物の生育に好適な発酵型土壌形成に非常に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

以下、本発明に係る微生物内包高分子ゲルビーズの製造方法について、その各工程における具体的操作及び使用材料を含めた実施形態を具体的に説明する。

【0020】

本発明の製造方法では、既述のように、油相中に有用微生物及びゲル形成用水溶性ポリマーを含む水溶液を分散させた第一のW/Oエマルジョンと、油相中に前記のゲル形成用水溶性ポリマーをゲル化させる多価陽イオンを含む水溶液を分散させた第二のW/Oエマルジョンとを攪拌混合することにより、両W/Oエマルジョン中の分散相の液滴同士を衝突させて内部に有用微生物を固定化したゲルビーズを生成させる。

【0021】

第一のW/Oエマルジョンに用いるゲル形成用水溶性ポリマーは、最終的に得られるゲルビーズのゲル構造を形成する成分であり、目的とする微生物に対する適合性を有し、水中でのゲル形成能を持つものであれば特に制限されないが、アルギン酸ナトリウムの如きアルギン酸塩、
-カラギーナンの如き水溶性高分子多糖類や、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールの如き水溶性合成樹脂が挙げられるが、特に水溶性高分子多糖類が乳酸菌や酵母菌等の微生物との適合性に優れる点で好適であり、その中でもアルギン酸塩が最も推奨される。

【0022】

第一のW/Oエマルジョンに用いる有用微生物は、目的とするゲルビーズの用途に応じて選択すればよく、全く制約はないが、特に発酵作用が目的であれば乳酸菌と酵母菌が推奨される。また、これら乳酸菌と酵母菌は各々を単独で使用する以外に、ゲルビーズの用途によっては両者を併用してもよい。

【0023】

また、該エマルジョンの連続相をなす油相成分としては、目的とする微生物を害しないものであればよいが、微生物に対する適合性の面より菜種油等の天然油脂が好適であり、これらの中でも該適合性に特に優れて且つ安価に入手できる菜種油が推奨される。

【0024】

そして、第一のW/Oエマルジョンを調製するには、上記ポリマーの水溶液に有用微生物を添加混合し、この微生物を含むポリマー水溶液を油相中に添加混合して乳化させればよい。このとき、ポリマー水溶液のポリマー濃度としては1～5重量%程度が好適であり、またW/O比つまり水溶液/油相の重量比は0.1～1.0程度の範囲がよい。

【0025】

なお、この第一のW/Oエマルジョンの調製においては、エマルジョンを安定状態として最終的に製出させるゲルビーズを均一なものにするために、系内に分散安定剤を含有させることが望ましい。このような分散安定剤のエマルジョン中の含有量は、目的とするゲ

10

20

30

40

50

ルビーズの粒度、ゲル形成用水溶性ポリマーの種類及び濃度、W/O比等によって好適値が異なるが、0.1～5重量%の範囲がよい。

【0026】

上記の分散安定剤としては、例えば、ポリオキシエチレンが付加したトリあるいはジステチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンが付加したアルコールエーテル、ポリオキシエチレンが付加したソルビタンオレエートの如きツイーン系界面活性剤、ソルビタンオレエートの如きスパン系界面活性剤、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、リグニンするナトリウム、アルキルナフタレンスルホン酸ナトリウムのホルムアルデヒド縮合物、フェノールスルホン酸ナトリウムのホルムアルデヒド縮合物、イソブチレン-無水マレイン酸共重合体、ポリカルボン酸ナトリウム、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ポリグリセノール縮合リシノレイン酸エステル、モノラウリン酸デカグリセリン、ゼラチン、アラビアゴム、カゼイン、デキストリン、ペクチン、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、第三リン酸カルシウム、L-グルタミン酸ジオレイルリビトール等が挙げられる。しかして、これらの分散安定剤は、その一種を単独使用してもよいし、二種以上を併用してもよい。

10

【0027】

第二のW/Oエマルジョンの分散相とする水溶液の多価陽イオンは、前記第一のW/Oエマルジョンに用いるゲル形成用水溶性ポリマーをゲル化させる成分であり、例えばカルシウムやアルミニウムのような多価金属イオンが好適なものとして挙げられる。

20

【0028】

また、該エマルジョンの連続相をなす油相成分は、前記第一のW/Oエマルジョンに用いるものと同様に、微生物に対する適合性の面より天然油脂が好適であり、特に菜種油が推奨されるが、第一のW/Oエマルジョンの油相成分と同じものを用いるのよい。

【0029】

しかして、従って、第二のW/Oエマルジョンを調製するには、塩化カルシウムや硫酸アルミニウムなど多価金属塩の水溶液を油相中に添加混合して乳化させればよい。このとき、上記多価金属塩の水溶液の濃度としては1～20重量%程度、またエマルジョンのW/O重量比は0.01～1程度の範囲がよい。

【0030】

本発明の製造方法では、上述した第一のW/Oエマルジョンと第二のW/Oエマルジョンとを攪拌混合することにより、内部に有用微生物を固定化したゲルビーズを生成させる。このとき、第一のW/Oエマルジョンに対する第二のW/Oエマルジョンの配合比(重量)は、0.1～1程度の範囲とするのがよい。生成したゲルビーズは、適当な濾過手段で油相から分離し、水洗を施して回収する。

30

【0031】

なお、上記の攪拌混合は、攪拌下にある一方のW/Oエマルジョン(通常は第一のW/Oエマルジョン)に、他方のW/Oエマルジョンを添加する形で行う。また、攪拌混合手段は特に制約されないが、攪拌翼のような回転式の攪拌装置を用いる場合は攪拌速度(回転速度)を50～15000rpm程度の範囲で設定するのがよい。

40

【0032】

かくして第一のW/Oエマルジョンと第二のW/Oエマルジョンとを攪拌混合すれば、両W/Oエマルジョン中の分散相の液滴同士が衝突して合体し、その合体した液滴中のゲル形成用ポリマーに多価陽イオンが作用してゲル化反応を生じるが、液滴同士は連続相である油相で隔てられているために該ゲル化反応が液滴単位で進行し、もって当該液滴粒子がそのまま含水ゲルビーズに転化すると共に、第一のW/Oエマルジョンの水滴粒子に含まれていた有用微生物の全てが漏れなくゲルビーズ中に取り込まれることになる。

【0033】

従って、本発明の製造方法においては、得られるゲルビーズの大きさが攪拌混合中におけるエマルジョンの分散相としての粒子サイズを反映することになるから、両W/Oエマ

50

ルジョンとりわけ第一のW/Oエマルジョンの調製時の攪拌速度、W/O比、分散安定剤使用時の当該分散安定剤の濃度等の設定により、生成させるゲルビーズの粒径をコントロールできる。すなわち、攪拌速度が速いほど、またW/O比が低いほど、更に分散安定剤の濃度が高いほど、ゲルビーズが小さくなる。しかして、本発明によれば、これら制御因子の調整により、ゲルビーズの粒径を3 μm ~ 900 μmといった広範囲で任意に設定できることが実証されている。

【0034】

また、本発明の製造方法によれば、上述のように、第一及び第二のエマルジョンの攪拌混合中における液滴がそのまま含水ゲルビーズに転化し、第一のW/Oエマルジョンの水
10
滴粒子に含まれていた有用微生物が漏れなく含水ゲルビーズ中に取り込まれるから、有用微生物を100 ~ 200億個/gといった高密度で固定化することができる。そして、得られたゲルビーズは、上述のような各液滴単位でのゲル化反応によって外殻部が適度な粗さの多孔質構造となるため、内包する微生物の代謝に要する物質の出入りが妨げられず、もって該微生物を長期にわたって失活させずに保持できるから、安定した良好な微生物活性を持続的に発揮する高性能な微生物担持体として機能する。

【0035】

更に、本発明の製造方法によれば、2種のW/Oエマルジョンを単に攪拌混合するだけで微粒状をなす所望の微生物内包高分子ゲルビーズを一挙に量産できるから、操作的に極めて簡便である上、高い生産能率で製造コストを低減でき、またゲル形成のために芯材や保護材のような格別な材料を必要とせず、それだけ材料コストも少なく済む。
20

【0036】

このような微生物内包高分子ゲルビーズは、固定化した有用微生物の種類に応じて様々な用途に供し得るが、その好適な用途の一つに土壤改質材がある。すなわち、該微生物内包高分子ゲルビーズを含む土壤改質材は、土壤中に混和したり地表面に散布することにより、土壤に対して内包する微生物による発酵等の微生物活性作用を長期にわたって安定的に発揮できる。特に微生物内包ゲルビーズとして乳酸菌及び酵母菌の一方又は両方を内包するものを用いた土壤改質材によれば、これら乳酸菌や酵母菌がゲルビーズから土壤中へ長期にわたって徐放されるから、腐敗菌の多い土壤であっても作物の生育に適した発酵型土壤へ徐々に転換し、病虫害の抑制、作物品質及び収穫の向上、連作障害の軽減等を期待
30

【0037】

なお、このような土壤改質材は、上記のような微生物内包高分子ゲルビーズのみからなるものでもよいが、該ゲルビーズと共に堆肥、緑肥、草、稲わら、麦わら、残滓、米ぬか、籾殻、硫安等を配合してもよい。

【実施例】

【0038】

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、以下において%とあるは、いずれも重量%(w/w)を意味する。

【0039】

実施例1

第一の内水相として乳酸菌(ラクトバチリス・ブルガリックス)を 7.7×10^8 cells / mlの割合で懸濁させた2%アルギン酸ナトリウム水溶液、第二の内水相として10%塩化カルシウム水溶液、油相として0.5%の分散安定剤(ソルビタンモノオレート: 和光純薬社製のSpan 80)を溶解させた菜種油、をそれぞれ用意した。そして、油相5000 mlに第一の内水相1000 mlを加え、攪拌翼を用いて180 rpmの速度で40にて1時間攪拌することにより、第一のW/Oエマルジョンを調製した。また、同じく油相1500 mlに第二の内水相150 mlを加え、振動乳化器を用いて室温にて乳化させることによって第二のW/Oエマルジョンを調製した。次に、液温30において攪拌翼にて150 rpmの速度で攪拌している第一のW/Oエマルジョン中に第二のW/Oエマルジョンを添加し、30を維持しつつ同じ攪拌速度で15時間の攪拌混合を行った
50

のち、生成した乳酸菌内包アルギン酸カルシウムゲルビーズを桐山ロートにて濾過し、蒸留水で洗浄した上で回収した。得られたゲルビーズの平均粒度は約100 μ m、回収量は498.5gであった。

【0040】

実施例2~4

第一のW/Oエマルジョンの調製時の攪拌速度を実施例2では50rpm、実施例3では100rpm、実施例4では250rpmにそれぞれ変更した以外は、実施例1と同様にして乳酸菌内包アルギン酸カルシウムゲルビーズを製造した。得られたゲルビーズの平均粒度は、実施例2では約800 μ m、実施例3では約300 μ m、実施例4では約5 μ mであった。

10

【0041】

実施例1~4の結果から、第一のW/Oエマルジョンの調製時の攪拌速度を除く他の諸条件が全て同じであっても、該攪拌速度が変わることで生成するゲルビーズの粒度が大きく変化し、且つその粒度が攪拌速度に依存して反比例的に変化することが判る。従って、本発明の方法によれば、第一のW/Oエマルジョンの調製時の攪拌速度を変えるだけで、他の諸条件を変えることなく、生成するゲルビーズの粒度を数 μ mから1mm程度まで極めて簡便にコントロールできることが明らかである。

【0042】

比較例1

既述の特許文献6(特開2006-67956号公報)に開示される微生物内包生分解マイクロカプセルの製造方法に準じ、まず内水相として実施例1と同じ乳酸菌を同じ割合で懸濁させた2%アルギン酸ナトリウム水溶液12.5ml、有機相として5%のポリカプロラクタム及び3%のソルビタンモノオレートを溶解させたジクロロメタン25ml、外水相として1%のポリビニルアルコール及び30%の第三リン酸カルシウムを含むスラリーを蒸留水に10%の割合で混合したものを600ml、をそれぞれ用意した。そして、マグネチックスターラーで攪拌している外水相に内水相を加え、5にて10分間攪拌してW/Oエマルジョンを調製し、このW/Oエマルジョンを攪拌下にある5の外水相に添加し、30分攪拌することによってW/O/Wエマルジョンを調製した。次いで、このW/O/Wエマルジョンを攪拌しながら25まで昇温し、この温度で1時間攪拌後、更に30まで昇温し、700hPaに減圧して3時間攪拌することにより、ジクロロメタンを除去して乳酸菌内包マイクロカプセルを生成させた。そして、該マイクロカプセルを含む系に0.1M塩酸水溶液600gを添加し、10分間攪拌したのち桐山ロートで濾過し、蒸留水で洗浄した上で該マイクロカプセルを回収した。

20

30

【0043】

〔乳酸菌の回収〕

実施例1で得られたゲルビーズ5gを55mMクエン酸三ナトリウム水溶液に投入し、5分間攪拌することによってゲルビーズを溶解させたのち、この溶液を遠心分離器(国産遠心器株式会社製)にかけて8000rpmで遠心分離して乳酸菌を回収した。一方、比較例1で得られたマイクロカプセル5gを乳鉢で擦り潰し、これを生理食塩水に懸濁させたのち、上記同様に遠心分離して乳酸菌を回収した。

40

【0044】

〔乳酸菌の活性試験〕

上述した実施例1のゲルビーズ及び比較例1のマイクロカプセルより回収した乳酸菌 2×10^8 cellsを、それぞれ803培地〔10%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、5%グルコース、0.2%ラクトース、0.05%Teen80(和光純薬社製のポリオキシエチレンソルビタンモノオレート)、0.1%硫酸マグネシウム七水和物〕100mlに添加し、これをインキュベーター(37)内で静置させ、1日後のグルコースの乳酸への転化率を高速液体クロマトグラフィーにて分析することにより、乳酸菌の乳酸生成に基づく活性を調べた。その結果、比較例1のマイクロカプセルより回収した乳酸菌の乳酸生成量が0.5mMであったのに対し、実施例1のゲルビーズより回収した乳酸菌の乳酸

50

生成量は 3 m M であった。この結果から、内包する乳酸菌への障害性は、実施例 1 で得られるゲルビーズの方が比較例 1 で得られるマイクロカプセルよりも格段に低いことが明らかである。

フロントページの続き

(72)発明者 武井 孝行

鹿児島県鹿児島市郡元1丁目2番24号 国立大学法人 鹿児島大学内

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特開2005-279458(JP,A)

特開2006-067956(JP,A)

Process Biochemistry,2000,35(9),p.885-8

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 11/00-13/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

Science Direct

WPI

CPlus(STN)