

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-10383

(P2016-10383A)

(43) 公開日 平成28年1月21日(2016.1.21)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)		C 1 2 N 1/20	C	2 B 0 0 5
C 1 2 P 23/00 (2006.01)		C 1 2 P 23/00		2 B 1 5 0
A 2 3 K 50/75 (2016.01)		C 1 2 N 1/20	E	4 B 0 6 4
A 2 3 K 20/00 (2016.01)		A 2 3 K 1/18	D	4 B 0 6 5
		A 2 3 K 1/16	3 0 4 B	
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 17 頁)				

(21) 出願番号 特願2014-134830 (P2014-134830)
 (22) 出願日 平成26年6月30日 (2014. 6. 30)

(71) 出願人 000004444
 J X 日鉱日石エネルギー株式会社
 東京都千代田区大手町二丁目6番3号
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100169579
 弁理士 村林 望
 (74) 代理人 100182992
 弁理士 江島 孝毅
 (72) 発明者 永井 秀忠
 東京都千代田区大手町二丁目6番3号 J
 X 日鉱日石エネルギー株式会社内

最終頁に続く

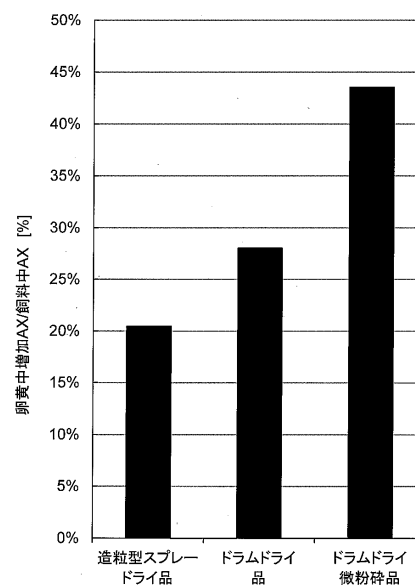
(54) 【発明の名称】 カロテノイドを含有する乾燥菌体粉末およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】色味強化作用の向上した飼料用カロテノイド含有粉末およびその製造方法を提供する。

【解決手段】伝導受熱式乾燥工程および粉碎工程を有するカロテノイド含有乾燥菌体粉末の製造方法を提供する。またこの方法により製造された乾燥菌体粉末を提供する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カロテノイドを産生する微生物の菌体を、100 を超える温度の伝熱部と接触させて伝熱受熱乾燥する工程を含む、カロテノイド含有乾燥菌体粉末の製造方法。

【請求項 2】

カロテノイド産生微生物がパラコッカス (Paracoccus) 属細菌である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

乾燥させた菌体粉末をさらに粉碎して微粉化する工程を含む、請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】

粉碎工程により乾燥菌体粉末の体積粒子径D50を20 μ m 以下に微粉化する、請求項 3 に記載の製造方法。

【請求項 5】

伝熱部の温度が120 以上である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 6】

乾燥がドラム乾燥機による乾燥、真空箱形乾燥機による乾燥、多円筒乾燥機による乾燥、溝型乾燥機による乾燥、棚段式乾燥機による乾燥、またはホットプレート乾燥機による乾燥である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 7】

カロテノイドがアスタキサンチンである、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 8】

製造される粉末が、家禽の飼料に添加するためのものである、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法により製造された乾燥菌体粉末を、家禽飼料に添加する工程を含む、家禽飼料の製造方法。

【請求項 10】

体積粒子径D50が7 ～ 12 μ m であり、かつ以下の手順
i) 濃度1mg (乾燥菌体重量) /mL (EtOH) のサンプル液を用意する、
ii) サンプルを振とうさせる (25 、300rpm) 、
iii) 振とう開始後3分または8分に上澄みを分取し、0.45nmフィルターにより、ろ過する、および
iv) サンプルに等容積のエタノールを添加し、480nmでの吸光度を測定する、
を用いてエタノール抽出を行ったときのアスタキサンチン抽出速度が、3分あたり1 . 1 または8分あたり1 . 9の吸光度 (A480nm) となる抽出速度である、体積粒子径D50が20 μ m 以下に微粉化されたアスタキサンチン含有乾燥パラコッカス菌体粉末。

【請求項 11】

体積粒子径D50が7 ～ 12 μ m のときにエタノール抽出により抽出されるアスタキサンチンの拡散係数Dの25 と35 との温度変化比が 0.807 ± 0.05 である、アスタキサンチン含有乾燥パラコッカス菌体粉末。

【請求項 12】

粉碎工程により微粉化された乾燥菌体粉末の体積粒子径D50が20 μ m 以下である、カロテノイド含有乾燥菌体粉末。

【請求項 13】

カロテノイドがアスタキサンチンである、請求項 12 に記載のカロテノイド含有乾燥菌体粉末。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、カロテノイドを含有する乾燥菌体粉末およびその製造方法に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

カロテノイド化合物は飼料に添加することで魚肉の赤味強化や鶏卵の卵黄の色味強化に利用されてきた。カロテノイドの一種であるアスタキサンチンは家禽類の卵黄や養殖魚介類等の色味強化に利用されている。アスタキサンチンを含む飼料を用いると、これが生体に吸収され、鶏卵や魚肉の色味が強化される。アスタキサンチンの製造方法としては甲殻類からの抽出法、ファフィア酵母を培養する方法、緑藻を培養する方法、有機合成する方法等がある。パラコッカスはアスタキサンチン産生能が高く、その乾燥菌体はサーモンの飼料に利用されている（非特許文献 1）。

10

【 0 0 0 3 】

特許文献 1 は保存安定性に優れたカロテノイド色素含有組成物とその製造方法を記載している。

特許文献 2 はブレバンディモナス属微生物を用いたアスタキサンチンの製造方法を記載している。

特許文献 3 はファフィア酵母を用いた飼料用酵母の製造方法を記載している。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 4 】

20

【 特許文献 1 】 特開 2 0 0 6 - 1 0 1 7 2 1

【 特許文献 2 】 特開 2 0 0 6 - 3 4 0 6 7 6

【 特許文献 3 】 特開平 8 - 1 8 2

【 非特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 非特許文献 1 】 生物学、2 0 1 0 年、第 8 8 巻、第 9 号、pp. 492-493

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

本発明は、色味強化作用の向上した飼料用カロテノイド類含有粉末およびその製造方法を提供することを目的とする。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、本発明者は、カロテノイド産生微生物をスプレードライした場合よりもドラムドライした場合に得られる乾燥菌体粉末の方が飼料に添加した場合に色味強化作用が向上することを見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は以下を包含する。

[1] カロテノイドを産生する微生物の菌体を、1 0 0 を超える温度の伝熱部と接触させて伝熱受熱乾燥する工程を含む、カロテノイド含有乾燥菌体粉末の製造方法。

40

[2] カロテノイド産生微生物がパラコッカス（Paracoccus）属細菌である、1 に記載の製造方法。

[3] 乾燥させた菌体粉末をさらに粉砕して微粉化する工程を含む、1 または 2 に記載の製造方法。

[4] 粉砕工程により乾燥菌体粉末の体積粒子径D50を20 μ m 以下に微粉化する、3 に記載の製造方法。

[5] 伝熱部の温度が1 2 0 以上である、1 ~ 4 のいずれかに記載の製造方法。

[6] 乾燥がドラム乾燥機による乾燥、真空箱形乾燥機による乾燥、多円筒乾燥機による乾燥、溝型乾燥機による乾燥、棚段式乾燥機による乾燥、またはホットプレート乾燥機による乾燥である、1 ~ 5 のいずれかに記載の製造方法。

50

[7] カロテノイドがアスタキサンチンである、 1 ~ 6 のいずれかに記載の製造方法。

[8] 製造される粉末が、家禽の飼料に添加するためのものである、 1 ~ 7 のいずれかに記載の製造方法。

[9] 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法により製造された乾燥菌体粉末を、家禽飼料に添加する工程を含む、家禽飼料の製造方法。

【 0 0 0 9 】

[1 0] 体積粒子径D50が 7 ~ 1 2 μm であり、かつ以下の手順

i) 濃度1mg (乾燥菌体重量) /mL (EtOH) のサンプル液を用意する、

ii) サンプルを振とうさせる (25 、 300rpm)、

iii) 振とう開始後3分または 8 分に上澄みを分取し、0.45nmフィルターにより、ろ過する、および

iv) サンプルに等容積のエタノールを添加し、480nmでの吸光度を測定する、を用いてエタノール抽出を行ったときのアスタキサンチン抽出速度が、3分あたり 1 . 1 または 8 分あたり 1 . 9 の吸光度 (A480nm) となる抽出速度である、体積粒子径D50が 20 μm 以下に微粉化されたアスタキサンチン含有乾燥パラコッカス菌体粉末。

[1 1] 体積粒子径D50が 7 ~ 1 2 μm のときにエタノール抽出により抽出されるアスタキサンチンの拡散係数Dの 25 と 35 との温度変化比が 0.807 ± 0.05 である、アスタキサンチン含有乾燥パラコッカス菌体粉末。

[1 2] 粉碎工程により微粉化された乾燥菌体粉末の体積粒子径D50が 20 μm 以下である、カロテノイド含有乾燥菌体粉末。

[1 3] カロテノイドがアスタキサンチンである、 1 2 に記載のカロテノイド含有乾燥菌体粉末。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明によれば、色味強化作用の向上した乾燥菌体粉末を製造することができる。この粉末を飼料に添加すると、従来のスプレードライにより製造されたカロテノイド含有乾燥菌体粉末添加飼料と比較して、鶏卵の卵黄の色味がより顕著に強化される。また、本発明によれば、従来のスプレードライにより製造されたカロテノイド含有乾燥菌体粉末を添加した飼料と比較して、少ない飼料でも同程度に色味の強化された卵黄が得られるため、製造コストを低減できる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】鶏卵色上げ効果性を比較した図である。

【図 2】エタノール抽出実験結果の図である。

【図 3】(1-E)vs. t 方対数プロット (ドラムドライ品) の図である。

【図 4】(1-E)vs. t 方対数プロット (スプレードライ品) の図である。

【図 5】(1-E)vs. t 方対数プロット (造粒型スプレードライ品) の図である。

【図 6】鶏卵色上げ効果性の乾燥菌体粒度依存性を比較した図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

以下、本発明をさらに詳述する。本発明の範囲はこれらの説明に限定されず、以下の例示以外の態様についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変法を実施することができる。

【 0 0 1 3 】

本発明は色味強化作用の向上した、カロテノイド産生微生物の乾燥菌体粉末に関する。この乾燥菌体粉末はカロテノイドを産生する微生物の菌体を、 1 0 0 を超える温度の伝熱部と接触させて加熱乾燥することにより製造できる。したがって本発明はカロテノイドを産生する微生物の菌体を、 1 0 0 を超える温度の伝熱部と接触させて加熱乾燥する工程を含む、カロテノイド含有乾燥菌体粉末の製造方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

本発明に用いることができる微生物としては、カロテノイドを生産する微生物であればなんら限定されないが、パラコッカス(*Paracoccus*)属細菌、スフィンゴモナス(*Sphingomonas*)属細菌、ブレブンディモナス(*Brevundimonas*)属細菌、エリスロバクター(*Erythrobacter*)属細菌、ヘマトコッカス属藻類、ファフィア属酵母等を用いることができる。パラコッカス属細菌としては、例えば*Paracoccus carotinifaciens*、*Paracoccus marcusii*、*Paracoccus haeundaensis*、*Paracoccus zeaxanthinifaciens*、*Paracoccus denitrificans*、*Paracoccus aminovorans*、*Paracoccus aminophilus*、*Paracoccus kourii*、*Paracoccus halodenitrificans*および*Paracoccus alcaliphilus*が挙げられる。ヘマトコッカス属藻類としては、例えば*Haematococcus pluvialis*、*Haematococcus lacustris*、*Haematococcus capensis*、*Haematococcus droebakensis*および*Haematococcus zimbabwiensis*などが挙げられる。ファフィア属酵母としては、*Phaffia rhodozyma*が挙げられる。ただし、本発明に用いられるカロテノイド産生微生物は、これに限定されない。

10

【0015】

ある実施形態においてカロテノイドを生産する微生物として*Paracoccus carotinifaciens*を用いることができる。*Paracoccus carotinifaciens*の株としては*Paracoccus carotinifaciens* E-396株 (FERM BP-4283) が挙げられる。

【0016】

これらのカロテノイド産生微生物の変異株も本発明に用いることができる。すなわち本発明において、カロテノイド産生能の改変された変異株も使用可能である。変異株としては、アスタキサンチン産生能の高い菌株 (特開2001-95500)、カンタキサンチンを選択的に多く産生する菌株 (特開2003-304875)、ゼアキサンチンおよび -クリプトキサンチンを選択的に多く産生する菌株 (特開2005-87097)、リコペンを選択的に産生する菌株 (特開2005-87100) などが挙げられるがこれに限らない。

20

【0017】

カロテノイドの産生能が改変された変異株は、例えば変異処理とスクリーニングにより取得できる。変異処理方法としてはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンやエチルメタンスルホネートなどの変異原性物質による化学的方法、紫外線およびX線照射などの物理的方法、遺伝子組換えやトランスポゾンによる生物学的方法等が挙げられるがこれに限らない。

【0018】

変異株のスクリーニング方法は、例えば寒天培地上のコロニーの色調で目的の変異株を選択する方法の他、試験管、フラスコ、発酵槽などで変異株を培養し、吸光度、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC) などを利用したカロテノイド色素分析により目的の変異株を選択する方法などが挙げられる。変異と選択は1回または複数回行ってよい。

30

【0019】

本発明のカロテノイド産生微生物が産生するカロテノイドとしては、例えばアスタキサンチン、 -カロテン、リコペン、ゼアキサンチン、 -クリプトキサンチン、カンタキサンチン、フェニコキサンチン、アドニキサンチン、エキネノン、アステロイデノン、3-ヒドロキシエキネノン等が挙げられる。

40

【0020】

カロテノイド産生微生物を培養する方法としては、カロテノイドを生産する条件であればいかなる方法でもよいが、例えば、下記のような方法が挙げられる。即ち、培地としては、例えば産生菌が生育に必要な炭素源、窒素源、無機塩および場合により特殊な要求栄養物質 (例えば、ビタミン、アミノ酸、核酸等) を含むものを使用する。

【0021】

炭素源としては、グルコース、シュークロース、フルクトース、トレハロース、マンノース、マンニトール、マルトース等の糖類；酢酸、フマル酸、クエン酸、プロピオン酸、リンゴ酸、マロン酸等の有機酸；エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、イソブタノール等のアルコール類、およびこれらの組合せが挙げられる

50

。添加割合は、炭素源の種類によるが、一般に培地1L当たり1～100g、例えば2～50gとすることができる。

【0022】

窒素源としては、硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、アンモニア、尿素、およびこれらの組合せが挙げられる。添加割合は、窒素源の種類によるが、一般に、培地1Lに対し0.1～20g、例えば1～10gとすることができる。

【0023】

無機塩としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸鉄、塩化鉄、硫酸マンガン、塩化マンガン、硫酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸銅、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、およびこれらの組合せ等が挙げられる。添加割合は、無機塩の種類によるが、一般に、培地1Lに対し0.1mg～10gとすることができる。

10

【0024】

特殊な要求物質としては、ビタミン類、核酸類、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、乾燥酵母、大豆粕、大豆油、オリーブ油、トウモロコシ油、アマニ油、およびこれらの組合せが挙げられる。添加割合は、特殊な要求物質の種類によるが、一般に、培地1Lに対し0.01mg～100gとすることができる。

【0025】

培地のpHは、例えばpH2～12、例えばpH6～9に調整する。

20

培養は、例えば10～70℃、例えば20～35℃の温度にて、通常、1日～20日間、例えば2～9日間、振とう培養または通気攪拌培養により行うことができる。このような条件下でカロテノイド産生微生物を培養する。培養すると微生物は、菌体内外にカロテノイドを著量産生する。

【0026】

以上の培養方法により得られた培養液は適宜濃縮することができる。濃縮方法としては、膜濃縮、遠心分離法等が挙げられる。

【0027】

次に、培地成分を除去する。遠心分離の際には、濃縮を行ったのであれば濃縮液に加水し、培地成分を除去する。膜分離を用いる場合、ダイアフィルトレーションを行い、培地成分を除去する。加水量は、濃縮液の色素含有量等の状態によるが、例えば1～5倍程度とすることができる。

30

【0028】

さらに、培養物または濃縮物から乾燥菌体粉末を得るために乾燥を行う。すなわち本発明では、培養物または菌体スラリーとして得られるカロテノイド含有菌体を乾燥させて粉末とする。乾燥の方式としては大きく分けて熱風受熱と伝導受熱とがある。熱風受熱乾燥機は目的物に熱風を当てて乾燥を行う。伝熱受熱乾燥機は加熱された伝熱部（プレート）からの伝熱により目的物に熱を加え乾燥を行う。

【0029】

熱風受熱方式の乾燥機としては、トンネル乾燥機、衝突噴流乾燥機、バンド乾燥機、回転型乾燥機、流動層乾燥機、噴霧乾燥機、気流乾燥機等が挙げられる。噴霧乾燥機はスプレードライヤーともいい、液体やスラリーを熱風中に噴霧し、微粒子状製品を得る。液体またはスラリーに熱風を当てると水等の媒体が蒸発し、乾燥した粒子や粉体を得られる。アトマイザー（噴霧機）により生じる滴は、加熱された空気からの熱量供給により乾燥されることとなる。一般に乾燥用の気体は高温であるが、乾燥させる液体またはスラリーの媒体が水であると、噴霧され球状となった液体の表面温度は水の脱離期間中では水の蒸発温度である100℃を超えることがなく、加熱された空気からの熱量の供給速度はそれほど高くできないと考えられる。スプレードライでは滴の表面から乾燥するため、目的物表面の孔は縮小し、表面硬化がもたらされることがある。

40

【0030】

50

伝導受熱乾燥機としては、真空箱形乾燥機、ドラムドライヤー（ドラム式乾燥機、ドラム乾燥機ともいう）、多円筒乾燥機、溝型乾燥機、棚段式乾燥機、ホットプレート乾燥機などが挙げられる。伝導受熱乾燥機は目的物を加熱された伝熱部と接触させるため、伝熱部の温度が100を超える場合は、伝熱効率が高いため非常に高い熱量が供給され水の脱離速度は早くなることが想定される。目的物を伝熱部と接触させるには、目的物を伝熱部に適用、塗布、滴下等すればよい。伝熱部の材料は、金属であってもよく、熱振動により加熱させるアクリル樹脂のような非金属性の材料であってもよい。伝熱部は十分な伝熱面積があればよく、平面、湾曲面、シリンダーの側面などの適当な形状のプレートとすることができる。伝熱部に接触させて乾燥させた目的物はシート状（膜状）となっており、場合によりヘラ等で掻き取ることができる。

10

【0031】

伝熱部と乾燥させる目的物とを接触させる時間は通常数分以下、例えば5分以下、4分以下、3分以下、2分以下、例えば60秒以下とすることができるがこれに限定されない。材料の加熱は常圧で行ってもよく、加圧下、減圧下または真空中で行ってもよい。伝熱部の温度は100より高い。ある実施形態において、伝熱部の温度は110、120、130、または140より高い。ある実施形態において伝熱部の温度は220以下、210以下、200以下、190以下、180以下、170以下、160以下、または150以下である。ある実施形態において、伝熱部の温度は140～160、例えば140～150である。

20

【0032】

ドラムドライヤーを用いる場合は、液状またはペースト状の目的物を加熱されたドラムの表面に塗布し、ドラムを回転させながら目的物を乾燥させる。ドラムドライヤーの種類としてはダブルドラム型とシングルドラム型が挙げられる。ダブルドラム型としては内回し式、外回し式、真空式がある。シングルドラム型としてはトップフィード型、ディップフィード型、スプラッシュフィード型がある。いずれの種類を用いても、得られる乾燥物はフレークもしくはシート状となる。

【0033】

ドラムドライヤーは、乾燥物が得られればどのような条件で運転してもよい。例えばドラム回転速度は1～5rpm、2～5rpm、2～4rpm、2～3rpmとすることができるがこれに限定されない。接触時間や伝熱部温度は上記のとおりである。

30

【0034】

ドラム乾燥等の伝熱受熱乾燥によりフレークもしくはシート状となった乾燥物は、乾燥後にハンマーミルなどの解砕工程により粉にすることができる。本明細書では便宜上これを解砕物ということがある。次いで、乾燥物またはその解砕物をジェットミル工程によりさらに細かく破碎することができる。本明細書では便宜上これを破碎物または微粉化物ということがある。解砕物も破碎物も、シート状の乾燥物を細かくしたものであることから、平面状の形態を残したまま細くなる。本明細書において乾燥菌体粉末というとき、これは伝熱受熱乾燥させた菌体粉末のみならず、その微粉化物も含むことがある。

【0035】

ある実施形態において、本発明の伝熱受熱により乾燥させた、例えばドラム乾燥させた乾燥菌体粉末は、ジェットミル破碎により微粉化することができる。破碎工程により粉末の粒径を例えば1 μ m～30 μ m、1 μ m～20 μ m、5 μ m～20 μ m、例えば7 μ m～20 μ mとすることができる。本明細書で粒径というとき、これは粒子を球体とみたときのその直径をいう。また本明細書で平均粒径というとき、これは体積粒子径D50をいう。体積粒子径D50とはメジアン径ともいい、粒子径分布を測定したときの累積値が50%となる粒子径をいう。粒子の粒径は公知の手法、例えばレーザー回折散乱法により測定することができる。

40

【0036】

本発明に係る乾燥菌体粉末またはその微粉化物は、養家禽飼料に添加することができる。家禽としては、鶏、鶉、七面鳥、ホロホロ鳥、鳩、アヒル、ガチョウ等が挙げられ、特に鶏が好ましい。例えば、Paracoccus属細菌の乾燥菌体1g中には2.1mg～2.5mg程度

50

のアスタキサンチンが含まれている。従って、本発明の乾燥菌体を飼料に使用することで、給餌した家禽から得られる卵の卵黄中のカロテノイド濃度、特にアスタキサンチン濃度が増大し色味が強化される。

【0037】

ある実施形態において本発明は、カロテノイド産生微生物の乾燥菌体粉末を添加する工程を含む養家禽飼料の製造方法を提供する。この飼料を家禽に給餌し、家禽を生育させ、採卵することで色味の強化された卵黄を有する卵が得られる。カロテノイド産生微生物中のアスタキサンチンを養家禽飼料100g当たり0.1mg以上、0.4mg以上、0.8mg以上、1mg以上、例えば0.4～50mg、例えば0.4～20mg添加できるように、カロテノイド産生微生物の乾燥菌体粉末を養家禽飼料に添加する。上記乾燥菌体粉末は例えば養家禽に使用される飼料に混合することができる。養家禽飼料における乾燥菌体粉末の量は、当該乾燥菌体に含まれるアスタキサンチンの含量によるが、例えば重量で好ましくは0.01%以上、0.05%以上、例えば0.01%～5%とすることができる。

10

【0038】

本発明の乾燥菌体粉末は家禽飼料に混合して給餌しうるが、ビタミン類等と共にプレミックス中に事前に混合して給餌してもよい。

【0039】

卵黄の色味には種々のカロテノイド化合物が寄与するが、一部の実施形態では、カロテノイドを代表するものとしてアスタキサンチンに着目して本発明を説明した。しかしながら、本発明の色味強化作用はアスタキサンチンによるものに限定されず、カロテノイド産生微生物、例えばパラコッカス菌体中に含まれるアスタキサンチンの代謝産物やアスタキサンチンの前駆物質などを含むあらゆるカロテノイド化合物の寄与の総和によるものである。

20

【0040】

本発明の乾燥菌体粉末を含んだ飼料を給餌した家禽は、カロテノイドの富化された卵を生産する。本方法によれば、例えば卵黄100gあたり0.1mg以上、0.2mg以上、0.3mg以上、例えば0.2mg～10mg、0.2mg～5mgで卵黄中にアスタキサンチンを含有する色味強化された家禽卵を得ることができる。

【0041】

本発明の乾燥菌体粉末は、スプレードライのような熱風受熱式乾燥機構ではなく、ドラムドライのような伝熱受熱乾燥機構により乾燥させたものである。本明細書において、スプレードライを用いて得られた乾燥菌体粉末のことをスプレードライ品ということがある。またドラムドライを用いて得られた乾燥菌体粉末のことをドラムドライ品ということがある。さらに、ドラムドライ品をジェットミルで破碎したものをドラムドライ微粉碎品ということがある。乾燥方式の違いを反映して、本発明に係る伝熱受熱により乾燥させた乾燥菌体粉末はスプレードライ品と形状が顕著に異なるのみならず、物性も異なる。

30

【0042】

本発明のドラムドライ品および微粉碎品は形状がシート状であることおよび100を超えの高温で乾燥させることから、得られる粉末に含有されるアスタキサンチンが外部に拡散しやすく、生体に吸収されやすいと考えられる。これに対してスプレードライ品は形状が主として球状であり、短時間で急激に乾燥されることから表面の孔が急速に縮小し表面硬化が生じていると考えられる。それゆえ、従来のスプレードライ品はこの構造がアスタキサンチン拡散の障壁となって、含有アスタキサンチンが相対的に生体に吸収されにくいと考えられる。

40

【0043】

この違いは例えば、本発明に係る伝熱受熱により乾燥させた乾燥菌体粉末、例えばドラムドライ品に含まれるアスタキサンチンを溶媒抽出（例えばエタノール抽出）することにより評価できる。また、本発明の伝熱受熱により乾燥させた乾燥菌体粉末、ドラムドライ品や微粉碎品をエタノール抽出に供したときのアスタキサンチン抽出速度を、スプレードライ品のアスタキサンチン抽出速度と比較することができる。溶媒抽出速度は温度に依存

50

することが知られているが、温度依存関係から乾燥物内からカロテノイド類が拡散放出される際の経路の途中に特別な障壁があるものであるか、ないものであるか、を決定することができる。

【 0 0 4 4 】

以下に本発明のアスタキサンチン含有乾燥パラコッカス菌体粉末の、エタノール抽出によるアスタキサンチン拡散係数Dの25 と35 との温度変化比 (b_{25} / b_{35}) について説明する。

【 0 0 4 5 】

乾燥菌体粉末からエタノールを用いてアスタキサンチンを抽出するときの抽出率を $E = C / C_e$ とする。式中、Cは外液(エタノール)中の抽出物アスタキサンチン濃度(A480)であり、 C_e は平衡濃度である。

10

【 0 0 4 6 】

表面濃度一定の拡散脱着過程は拡散一定の場合、以下の級数式で表される。

【数 1】

$$1 - E = 1 - \frac{\bar{C}_S}{C_{S0}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left[-\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4R^2} Dt \right] \quad (1)$$

式中、Dは抽出物の固体内拡散係数、Rは抽出物の半径である。固相内部の濃度を C_S とし、その平均濃度を

【数 2】

20

\bar{C}_S

とし、初期濃度(=全抽出濃度)を C_{S0} とする。外部媒体が十分大きく、最終平衡濃度 C_e が低いときは表面濃度一定の仮定は十分満足される。(1 - E)を無次元時間 tD/R^2 に対して片対数プロットすると(1 - E) < 0.8では直線となる。これは式(1)の級数項において第一項のみが支配的となり、式(2)となるためである。

【 0 0 4 7 】

【数 3】

$$1 - E = 1 - \frac{C_S}{C_{S0}} = 1 - \frac{C}{C_e} \approx \frac{8}{\pi^2} \exp \left[-\frac{\pi^2}{4} \frac{Dt}{R^2} \right] \quad (2)$$

30

【 0 0 4 8 】

したがって(1 - E) vs tの片対数プロットの傾きから、拡散係数Dを決定することができる。本明細書では便宜上、(1 - E) vs tの片対数プロットの傾きをbとし、25におけるbを b_{25} と表し、35におけるbを b_{35} と表す。

【 0 0 4 9 】

本明細書では、上記傾きbが総括物質移動係数 $K_S = D / R^2$ に対応すると考えて解析を行う。 K_S は拡散係数Dに比例するので、温度が変化しても、拡散支配機構ならば拡散係数の温度依存性のみで K_S が推定できると考えられる。

【 0 0 5 0 】

溶液中の拡散係数Dは絶対温度Tに対して以下の関係が成立する。

40

$D / T = \text{一定}$

【式中、 は溶液(希薄溶液では溶媒)の粘度である】

理想的な条件下では $\eta = 0.914 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (35、308 K)であり、 $\eta = 1.096 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (25、298 K)であるので、 $D / T = \text{一定}$ の関係から導かれる b_{25} / b_{35} の計算値は $(0.914 / 308) / (1.096 / 298) = 0.807$ となる。

【 0 0 5 1 】

すなわち、本明細書において、エタノール抽出によるアスタキサンチン拡散係数Dの25 と35 との温度変化比 (b_{25} / b_{35}) とは、
抽出率 $E = C / C_e$

50

[式中、Cはエタノール中のアスタキサンチン抽出物濃度、 C_e は平衡濃度を表す]

としたときの $(1 - E)$ と時間 t との片対数プロットの傾きを b とし、

b_{25} はエタノール抽出を25で行った場合における b を表し、

b_{35} はエタノール抽出を35で行った場合における b を表す場合に、

$D/T = \text{一定}$

[式中、 D は拡散係数、 η は溶液の粘度、 T は絶対温度である]

の関係から導かれる比をいう。ある測定試料について b_{25}/b_{35} が0.807に近い値となるのは、抽出の拡散係数に特別な障壁(抵抗)がない場合である。

【0052】

ある実施形態において、本発明のアスタキサンチン含有乾燥パラコッカス菌体粉末は、
体積粒子径 D_{50} が7~12 μm のときにエタノール抽出により抽出されるアスタキサンチ
ンの拡散係数 D の25と35との温度変化比(b_{25}/b_{35})が 0.807 ± 0.05 、例えば 0.80
 7 ± 0.04 、例えば 0.807 ± 0.03 、例えば 0.807 ± 0.02 、例えば 0.807 ± 0.01 、例えば 0.807 ± 0
.005、例えば 0.807 ± 0.004 、例えば 0.807 ± 0.003 、例えば 0.807 ± 0.002 、例えば $0.805 \sim 0$
.809、例えば $0.807 \sim 0.809$ である。

【0053】

次に本発明を、実施例を参照することにより説明する。本発明の技術的範囲は、以下の
実施例によって限定されない。

【実施例】

【0054】

カロテノイド類の定量は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて以下のように行
った。

【0055】

カラムはInertsil SIL-100A, 5 μm (4.6 \times 250mm)(GLサイエンス製)を2本連結して使用
した。溶出は、移動相である n -ヘキサン/テトラヒドロフラン/メタノール混合液(40:20:1
)を室温付近一定の温度にて毎分1.0mL流すことで行った。測定においては、サンプルをテ
トラヒドロフランで溶解し、移動相にて適当に希釈した液20 μL を注入量とし、カラム溶
離液の検出は波長470nmで行った。また、定量のための標準品としては、シグマ社製アス
タキサンチン(Cat.No.A9335)を用いた。アスタキサンチン標準品の定量は、分光光度計に
よる吸光度(477nm)とHPLC(470nm)による面積割合(純度)から算出した。標準液の47
7nmの吸光度(A)および上記条件でHPLC分析を行ったときのアスタキサンチンピークの面積
百分率%(B)を測定した後に、以下の式を用いて濃度の計算を行った。

【0056】

【数4】

$$\text{アスタキサンチンの濃度(mg/L)} = A \div 2150 \times B \times 100$$

【0057】

なお n -ヘキサン/テトラヒドロフラン/メタノール混合液(40:20:1)におけるアスタキサ
ンチンの比吸光係数は次のとおりである。

【0058】

【数5】

$$E^{1\%1\text{cm}} \text{値}(477\text{nm}) = 2150$$

【0059】

実施例における平均粒径(体積粒子径 D_{50})の測定は、光散乱式の粒径分布測定装置(
株式会社セイシン企業製のLMS-2000e)を用いて行った。

【0060】

実施例1 鶏卵色揚げ(乾燥方法による違い)

カロテノイド類を産生するパラコッカス菌体として、*Paracoccus carotinifaciens* E-3
96株(FERM BP-4283)からのニトロソグアニジン変異株を使用した。これをシード用フラ

スコ培地でまず培養し、次いで本培養用培地で、菌体濃度が最大になるまで、28℃で好気条件で培養した。次いでこれを遠心分離機で集菌し、回収した。

【0061】

スプレードライは、一般に、生じる乾燥粉末が微小な粒子となる。一方でドラムドライは生じる乾燥粉末が比較的大きい。よってスプレードライ品とドラムドライ品とを比較するために、ここでは造粒型スプレードライ品を用いた。造粒型スプレードライ品は、回収したパラコッカス菌体をそのまま造粒型スプレードライヤーで乾燥して製造した。造粒型スプレードライ品の平均粒径（体積粒子径D50）は385 μmである。

【0062】

ドラムドライ品は、回収したパラコッカス菌体を直接ダブルドラムドライヤーで乾燥して製造した。運転条件はドラム回転数3.5rpm、ドラム温度140℃、というものであった。ドラムドライ品の平均粒径（体積粒子径D50）はおよそ100～125 μmである。

【0063】

ドラムドライ品を、さらにジェットミル（株式会社セイシン企業社製）を用いて平均粒径（D50）が9 μmとなるように微粉化（粉碎）した。これをドラムドライ微粉碎品とした。

【0064】

中部飼料株式会社製の基礎飼料（レイヤーS7）に各乾燥菌体を添加し、飼料中アスタキサンチン濃度が約0.8mg/100gになるように飼料を調製した。

【0065】

産卵鶏3羽ずつ3区に分け、造粒型スプレードライ品添加区、ドラムドライ品添加区、ドラムドライ微粉碎品（平均粒径D50 9 μm）添加区として4週間飼育した。給餌量は100g/1日とした。

【0066】

給餌4週間後、各試験区から採卵し、得られた鶏卵の卵黄中のアスタキサンチン量を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

【0067】

結果を図1にまとめた。図1は飼料中アスタキサンチン濃度約8ppmのときの、鶏卵卵黄の増加したアスタキサンチン量を示す。造粒型スプレードライ品よりも、ドラムドライヤー乾燥品およびドラムドライ乾燥粉碎品の方が、卵黄中へのアスタキサンチン移行量が多かった。

【0068】

実施例2 エタノール抽出による乾燥菌体物性の把握
（実験方法）

試料

- A 微粉碎品（ドラムドライ微粉碎品）
- B ドラムドライ品
- C スプレードライ品
- D 造粒型スプレードライ品

A～Dは、実施例1の方法と同様に製造した。Aのドラムドライ微粉碎品の体積粒子径D50は9 μmである。Bのドラムドライ品の体積粒子径D50は125 μmである。

【0069】

抽出溶媒

エタノール（99.5%） C₂H₅OH（分子量46.07） 和光純薬（カタログ番号052-03343）

短時間の抽出挙動をマイクロプレートを用いた実験により解析した。

【0070】

手順

i) 濃度1mg（乾燥菌体重量）/mL（EtOH）の各A～Dサンプル液を2mL作製した（24ウェルプレート上、プレートはマルチウェルセルカルチャープレート 353047（ファルコン）を使用）。

ii) 振とうインキュベータ（S1-300C）を用いてプレートごとに振とうさせた（25℃、300 rpm、50分）。

10

20

30

40

50

rpm)。

iii) 振とう開始から3分後から分取を開始して、そこから5分ごとに上澄みを採取し、0.45nmフィルターにより、ろ過した。

iv) サンプルにエタノールを添加して2倍希釈し(サンプル0.1mL + 100%EtOH 0.1mL)、各サンプルの吸光度を測定した(1ウェルの最終容量は0.2mLとなる)。なお24ウェルプレートでサンプル容量を0.2mlと固定すると、液滴部分がレンズ状になり、その厚みが測定される光路長に匹敵する。

【0071】

結果を図2に示す。18分までの抽出速度は、A微粉碎品 > Bドラムドライ品 > Cスプレードライ品 > D造粒型スプレードライ品という順であった。

【0072】

エタノール抽出の温度依存性測定と抽出特性の評価

ここでは乾燥菌体量あたりのアスタキサンチン抽出量(A480で測定)は、平均値を用いて抽出平衡値とした。抽出実験は遮光瓶を用いて25℃と35℃で実施した。

【0073】

手順

i) 濃度0.1mg(乾燥菌体重量)/mL(EtOH)の各A~Dのサンプル液を30mL作製した(遮光瓶)。

ii) 恒温槽(EYELA NTT-2000, SS1000)中で振とうさせた(speed controller メモリ3)。このとき、測定前に溶媒を測定温度に到達させてから実験を開始した。

iii) 規定時間ごとに上澄みを採取した。振とう開始5分目から分取を開始した。

iv) 採取したサンプルをエタノール希釈し(サンプル0.1mL + 100% EtOH 0.2mL)、各サンプルの吸光度を測定した(24ウェルプレート、1ウェル0.2 mL)。

【0074】

抽出率は $E = C / C_e$ とした。式中、Cは外液(エタノール)中の抽出物濃度(A480)であり、 C_e は平衡濃度(35℃、21時間後のBサンプルのA480値とした)である。

【0075】

拡散モデルによる解析

表面濃度一定の拡散脱着過程は拡散一定の場合、以下の級数式で表される。

【0076】

【数6】

$$1 - E = 1 - \frac{\bar{C}_S}{C_{S0}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left[-\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4R^2} Dt \right] \quad (1)$$

式中、Dは抽出物の固体内拡散係数、Rは抽出物の半径である。固相内部の濃度を C_S とし、その平均濃度を

【数7】

$$\bar{C}_S$$

とし、初期濃度(=全抽出濃度)を C_{S0} とする。外部媒体が十分大きく、最終平衡濃度 C_e が低いときは表面濃度一定の仮定は十分満足される。(1-E)を無次元時間 tD/R^2 に対して片対数プロットすると(1-E) < 0.8では直線となる。これは式(1)の級数項において第一項のみが支配的となり、式(2)となるためである。

【0077】

【数8】

$$1 - E = 1 - \frac{C_S}{C_{S0}} = 1 - \frac{C}{C_e} \approx \frac{8}{\pi^2} \exp \left[-\frac{\pi^2 Dt}{4 R^2} \right] \quad (2)$$

【0078】

したがって(1-E) vs tの片対数プロットの傾きから、拡散係数Dを決定することが

10

20

30

40

50

できる。便宜上、 $(1 - E)$ vs t の片対数プロットの傾きを b とし、25 における b を b_{25} と表し、35 における b を b_{35} と表す。

【0079】

本実験系では、上記傾きが総括物質移動係数 $K_s = D / R^2$ に対応すると考えて解析する。 K_s は拡散係数 D に比例するので、温度が変化しても、拡散支配機構ならば拡散係数の温度依存性のみで K_s が推定できると考えられる。

【0080】

図3～5にサンプルの抽出実験における $(1 - E)$ を t に対して片対数プロットした結果を示す。直線近似できる領域が存在しており、最小二乗法の結果を図中に示した。溶液中の拡散係数 D は絶対温度 T に対して以下の関係が成立する。

$D / T = \text{一定}$

[式中、 η は溶液（希薄溶液では溶媒）の粘度である]

$\eta = 0.914 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (35、308 K) であり、 $\eta = 1.096 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ (25、298 K) であるので、 $D / T = \text{一定}$ の関係から導かれる傾きの比 b_{25} / b_{35} の計算値は $(0.914 / 308) / (1.096 / 298) = 0.807$ となる。図3の傾きの比 (b_{25} / b_{35}) は $0.00267 / 0.00330 = 0.809$ であり、実測値がほぼ計算値に対応する。この関係が成立するのは、抽出の拡散係数に特別な障壁（抵抗）がない場合である。

【0081】

他のサンプル（スプレードライ品C、造粒型スプレードライ品D）については、必ずしもこの関係が成立していない。また、傾き自体は抽出速度を表しており、温度が高くなれば抽出速度は大きくなるとともに、Bドラムドライ品 > Cスプレードライ品 > D造粒型スプレードライ品の順となっている。Aドラムドライ微粉碎品は抽出速度が非常に速く、データのばらつきが大きいため、傾きの比を算出する解析には使用しなかった。しかしながらドラムドライ品Bは上記傾きの比 (b_{25} / b_{35}) が0.809であり理想値に非常に近いが、そのBよりも抽出速度が非常に速いAドラムドライ微粉碎品は上記傾きの比がさらに理想値に近いと考えられる。よってAドラムドライ微粉碎品の上記傾きの比 (b_{25} / b_{35}) は0.07と0.809の間にあると考えられる。

【0082】

【表1】

表1 $\ln(1-E)$ vs. t プロットの傾き b

T (°C)	サンプル B	サンプル C	サンプル D
25	0.00267	0.00137	0.00096
35	0.0033	0.00288	0.00192
$b_{25}/b_{35} *$	0.809	0.476	0.500

* $D_{\eta} / T = \text{一定}$ の関係から計算される b_{25}/b_{35} は0.807である

【0083】

抽出の拡散係数についての特別な障壁とは、粒子の表面に殻のような不均一層があるような場合に、その殻を通過する際にその不均一層の抵抗を受けることをいう。逆に特別な障壁が無いとは、粒子表面が多孔質で固液界面に不均一な層がない場合をいう。図3～5および表1の結果からは、サンプルBは特別な障壁がないことが分かり、サンプルCおよびDには特別な障壁があることが分かる。したがってサンプルBは、サンプルCおよびDとは物性が異なる。またサンプルAは抽出速度が非常に速く、サンプルBをさらに微粉碎したものであることから、サンプルBと同様に抽出の拡散係数に特別な障壁がない蓋然性が高い。そのため、サンプルAもまた、サンプルCおよびDとは物性が異なると考えられる。

【0084】

本発明のドラムドライ品Bおよび微粉碎品Aは、電子顕微鏡観察すると乾燥菌体粉末の形状がシート状またはゲルが固まったような形状である。Bは上記のとおり抽出時のカク

10

20

30

40

50

テノイド類の拡散プロセス上に特別な障壁がない物性となっている。すなわち、粒子内が多孔質もしくは不均一層を形成しない状態のため、生体内で消化されやすく、生体に吸収されやすいと考えられる。Aについても同様と考えられる。これは図1に示すように微粉化品の生体へのアスタキサンチン吸収がよいことから裏付けられる。これに対してCおよびDは上記のとおりカロテノイド類の抽出時の拡散プロセス上に特別な障壁がみられた。その原因としてスプレードライ品CおよびDは電子顕微鏡観察すると形状が主に球状であり、また、短時間で急激にスプレー乾燥されることから球の表面の孔が急速に縮小し表面硬化がもたらされていると考えることができる。その結果、生体中での消化が遅くなることが考えられ、ドラムドライ品と比較してカロテノイド類（アスタキサンチン）が生体に吸収されにくいと考えられる。

10

【0085】

実施例3 鶏卵色揚げ（乾燥菌体粉末の粒径と卵黄色揚げとの間の相関関係）

ドラムドライ乾燥品をジェットミル（株式会社セイシン企業社製）で粉碎し、平均粒径の異なるドラムドライ微粉碎品をいくつか得た。

【0086】

中部飼料株式会社製の基礎飼料（マルチレイヤーRG）に得られた乾燥菌体を添加し、飼料中アスタキサンチン濃度が0.4mg/100gおよび0.8mg/100gになるように飼料を調製した。

産卵鶏5羽ずつ10区に分け4週間飼育した。表2を参照されたい。給餌量は100g/1日とした。

20

【0087】

【表2】

表2 試験区

試験区	サンプル	色素添加濃度 [mg/100g]	
1	ドラムドライ微粉碎品	アスタキサンチン	0.4
2	7μm		0.8
3	ドラムドライ微粉碎品		0.4
4	9μm		0.8
5	ドラムドライ微粉碎品		0.4
6	12μm		0.8
7	ドラムドライ微粉碎品		0.4
8	20μm		0.8
9	ドラムドライ品		0.4
10	100μm		0.8

30

【0088】

給餌4週間後、各試験区から採卵し、得られた鶏卵の卵黄中のアスタキサンチン量を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。結果を図6に示す。

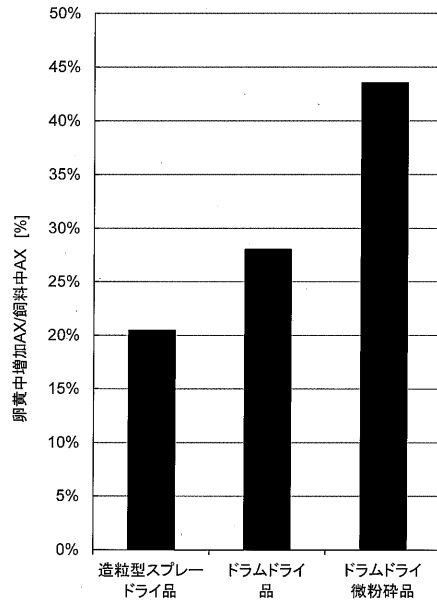
40

【産業上の利用可能性】

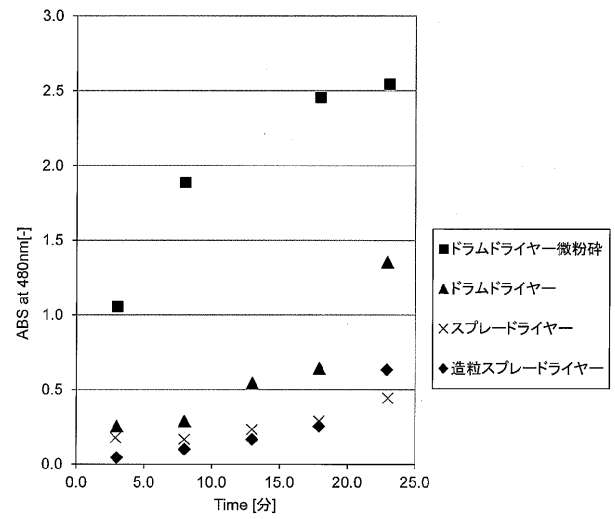
【0089】

本発明の製造方法により得られるカロテノイド含有乾燥菌体粉末は、家禽の卵黄の色味強化のために、養家禽飼料に用いることができる。

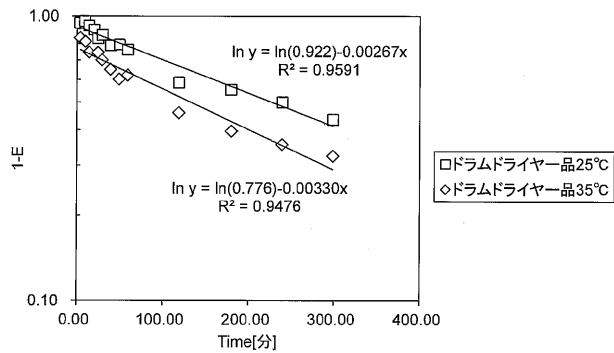
【 図 1 】



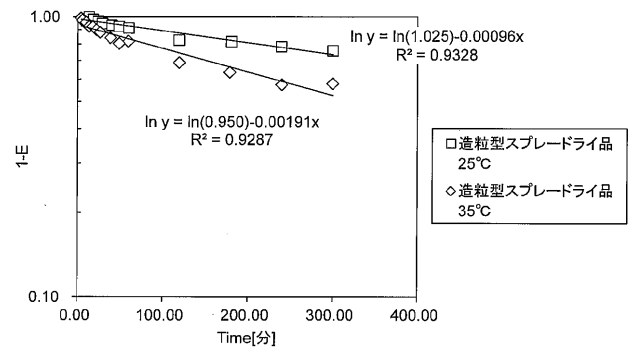
【 図 2 】



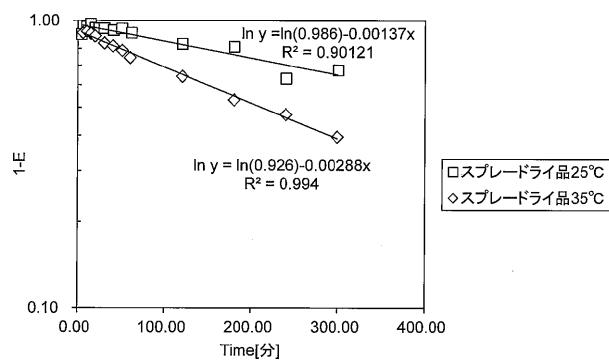
【 図 3 】



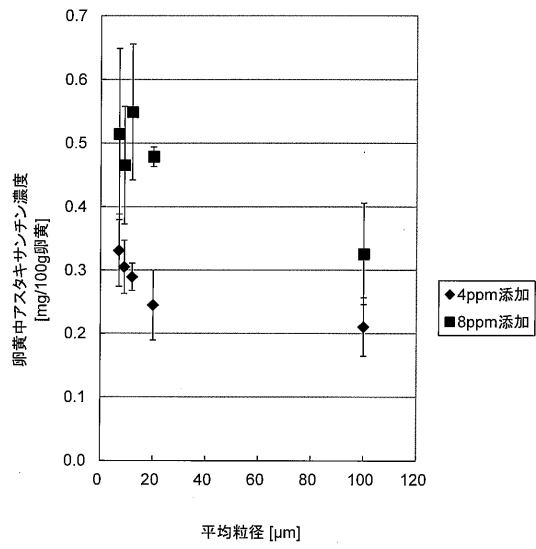
【 図 5 】



【 図 4 】



【図 6】



フロントページの続き

- (72)発明者 川嶋 祐貴
東京都千代田区大手町二丁目 6 番 3 号 J X 日鉱日石エネルギー株式会社内
- (72)発明者 砂田 太
東京都千代田区大手町二丁目 6 番 3 号 J X 日鉱日石エネルギー株式会社内
- (72)発明者 高橋 季之
東京都千代田区大手町二丁目 6 番 3 号 J X 日鉱日石エネルギー株式会社内
- (72)発明者 青柳 健一
東京都千代田区大手町二丁目 6 番 3 号 J X 日鉱日石エネルギー株式会社内
- F ターム(参考) 2B005 DA01 FA10 MB02
2B150 AA05 AB05 AB20 DD11
4B064 AH01 CA02 CE16 DA11
4B065 AA01X AC14 BD10 CA43 CA52