

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4346692号  
(P4346692)

(45) 発行日 平成21年10月21日 (2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月24日 (2009.7.24)

(51) Int.Cl.  
C 1 2 P 23/00 (2006.01)F I  
C 1 2 P 23/00

請求項の数 13 (全 6 頁)

|               |                               |           |                      |
|---------------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願平10-547746                  | (73) 特許権者 | 500054868            |
| (86) (22) 出願日 | 平成10年4月29日 (1998.4.29)        |           | コニククリーク デーエスエム ナムロー  |
| (65) 公表番号     | 特表2001-523966 (P2001-523966A) |           | ゼ フェンノートシャップ         |
| (43) 公表日      | 平成13年11月27日 (2001.11.27)      |           | オランダ6411 テーエー・ヘールレン、 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP1998/002782             |           | ヘット・オーフェルローン1番       |
| (87) 国際公開番号   | W01998/050574                 | (74) 代理人  | 100094318            |
| (87) 国際公開日    | 平成10年11月12日 (1998.11.12)      |           | 弁理士 山田 行一            |
| 審査請求日         | 平成17年4月28日 (2005.4.28)        | (74) 代理人  | 100107456            |
| (31) 優先権主張番号  | 97201306.4                    |           | 弁理士 池田 成人            |
| (32) 優先日      | 平成9年5月2日 (1997.5.2)           | (72) 発明者  | シペイン ミエケ             |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    |           | オランダ エヌエルー3816 アーヴェー |
|               |                               |           | ー アメルスフォールト ポーストラット  |
|               |                               |           | 8                    |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物バイオマスからのカロテノイド結晶の単離

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブラケスレア・トリスポラ ( *B l a k e s l e a t r i s p o r a* ) 由来の微生物バイオマスからの - カロチン結晶の単離方法であって、

前記ブラケスレア・トリスポラの細胞壁を破壊する破壊工程、

前記破壊工程で得られた破壊細胞塊又は - カロチンを含有する残さを、低級アルコール又はアセトンで洗浄する洗浄工程、

細胞細片を前記残さから分離する分離工程、

前記分離工程で得られた前記 - カロチン結晶を水中に懸濁して前記 - カロチン結晶を浮遊させる懸濁工程、

前記 - カロチン結晶を回収する回収工程、

を含む事の特徴とする方法。

【請求項 2】

前記回収工程の後に、前記 - カロチン結晶を精製する精製工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞壁は、機械的、酵素的又は化学的に破壊される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

水と混和しない溶剤が、前記細胞壁の破壊前、破壊中又は破壊後、更なる処理がされる前に前記ブラケスレア・トリスポラの細胞に添加される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記

載の方法。

【請求項 5】

前記水と混和しない溶剤は、油、ヘキサン又は酢酸エチルである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞細片は、前記残さからデカンテーション又は遠心分離によって除去される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記残さは、前記洗浄工程で低級アルコール又はアセトンで洗浄される前に水で洗浄される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記分離工程は、1 回以上繰り返される、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記懸濁工程で前記 - カロチン結晶を浮遊させる為の水は、塩及び / 又は油を含有する、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記油は、植物油である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記懸濁工程における前記 - カロチン結晶の浮遊は、前記残さを水で懸濁した懸濁液中にガスを通して泡立たせる事によって改善される、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 ブラケスレア・トリスポラ由来の微生物バイオマス は、湿潤細胞塊の形態である、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 ブラケスレア・トリスポラ由来の微生物バイオマス は、乾燥形態である、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、微生物的に産生されるカロテノイド化合物の分野に関する。

発明の背景

現在、高純度（96%以上） - カロチン結晶は化学合成によって製造される。天然資源由来の場合は、 - カロチンは、主に、油状抽出物（パームオイル、藻類オイル）の形態である。又、天然資源、例えば、野菜（例えばニンジン）又は微生物（例えば、藻類デュナリエラ（*Dunaliella*）、又は菌類ブラケスレア（*Blakeslea*）、）から - カロチン結晶を得る事が出来るが、前記の天然資源から比較的純粋な結晶を得る為の現に利用可能な方法は、重大な欠点を有している。

天然資源からの - カロチン結晶の精製は、適当な抽出剤で前記資源から - カロチンを抽出する事を含み、任意に、更に、所望の純度が得られるまで追加の精製工程を含む。

抽出は、様々な抽出剤：有機溶剤、例えば、酢酸エチル、酢酸ブチル、ヘキサン；植物油、又は超臨界液体、例えば、プロパン、エチレン、炭酸ガスで行われる。続いて、 - カロチン結晶は、前記の天然資源の溶剤抽出後に得られた抽出物から、例えば、溶剤の蒸発によって直接結晶化される。

溶剤抽出方法の主な欠点は、 - カロチン結晶が先ず溶剤に溶解され、直ぐに、 - カロチン含有溶剤からバイオマス残さを分離した後、 - カロチンを再度結晶化しなければならない点である。更に、 - カロチンの相当な損失が簡単に起こされる。

- カロチンを溶解するのに必要な大量の溶剤の使用を回避する為には、 - カロチン或いはその他のカロテノイドを、結晶の形で、微生物バイオマスから直接単離する事が望ましい。

発明の説明

本発明は、微生物資源からのカロテノイド化合物の単離方法に関する。本発明方法は、カロテノイド化合物が結晶形態で存在する微生物資源に適用できる。本発明によれば、カロテノイド結晶は、微生物資源から直接分離される。本発明の重要な利点は、大量の溶剤の使用なしに適用可能である事である。特に、本発明方法で使用される溶剤の量は、通常の溶剤 - 抽出方法を使用してカロテノイドを溶解するのに必要とされる大量の溶剤に比較して実質的に減少される。

本発明方法は、微生物の細胞壁を破壊する工程、微生物資源、破壊された細胞塊、或いはカロテノイド含有残さを、脂質除去に適する溶剤で洗浄する事を含む、カロテノイド含有残さから細胞細片を分離する工程、得られたカロテノイド結晶を水中に浮遊させる工程、そして任意に、更に結晶を精製する工程を含む。

10

本発明方法の以下の工程を更に詳細に説明する。

カロテノイド含有微生物は、バクテリア、イースト、真菌又は藻類微生物である事が出来る。好ましくは、カロテノイド含有微生物はイースト、菌類又は藻類である。更に好ましくは、ファフィア (Phaffia) 属のイースト、ムコラテス (Mucorales) 目の菌類又はデュナリエラ (Dunaliella) 属の藻類である。

微生物カロテノイド含有生物資源は、上述の通り、選択されたカロテノイド産生微生物の適当な醗酵によって得られる。

本発明方法に掛けられる微生物バイオマスは、湿潤細胞塊の形態でも、乾燥形態であっても良い。経済的理由から、湿潤細胞塊の使用が好ましい。乾燥バイオマスは、例えば、W O 9 7 / 3 6 9 9 6 に記載されている様な押出物の形態であっても良い。

20

細胞破壊は、当該技術分野において公知の方法を介して引起こしても良い。破壊は、物理的に (機械的に)、酵素的に及び / 又は化学的に引起こしても良い。好ましくは、細胞破壊は、機械的手段によって行われる。機械的破壊は、例えば、高圧下にホモジナイザー中で微生物バイオマスをホモジナイズするか、或いはピーズミルを使用して、或いは超音波によって引起こしても良い。化学的破壊は、低い又は高い pH 環境で、或いは、オクタノールの様な溶剤の添加によって引起こしても良い。酵素的破壊は、微生物の細胞壁の構成物質を分解する酵素又は酵素混合物の作用によって引起こしても良い。

効率的な細胞破壊の為には、バイオマスは、一般に、約 1 0 ~ 約 2 0 0 g / l の乾燥物含有量を有しても良い。好ましくは、醗酵後に直接得られる、約 5 0 g / l の乾燥物含有量を有する醗酵ブロスが使用される。出発物質が乾燥バイオマスの時は、前記バイオマスは、上述の様な約 1 0 ~ 約 2 0 0 g / l の乾燥物含有量を得る為に十分な量の水と混合される。

30

本発明の回収方法の収率を改善する為に、水と混和しない有機溶剤が、任意に、更なる処理工程に掛けられる前に破壊された細胞塊に添加されても良い。適用される破壊方法のタイプによって、前記溶剤の添加は、細胞破壊の前、最中又は後の添加を含む。例えば、細胞がホモジナイジングで破壊される場合は、溶剤は、破壊工程の後に添加されるのが好ましい。油又は溶剤は、バイオマス懸濁液又は破壊細胞塊の量の 1 % ~ 1 0 0 %、好ましくはバイオマス懸濁液又は破壊細胞塊の量の 3 % ~ 1 0 % の量で添加される。水と混和しない適当な有機溶剤は、例えば、油、ヘキサン又は酢酸エチルである。好ましくは、油が破壊細胞塊に添加される。適当な油の例は、大豆油の様な植物油である。

40

得られる破壊細胞塊から、細胞細片の実質的な部分がデカンテーション又は遠心分離によって除去される。好ましくは、遠心分離工程が適用される。前記遠心分離は、上部が固体で、中間が液体で、下部は固体の層を生成し、固体上層はカロテノイド結晶を含有し、又、カロテノイド含有残さを伴う。カロテノイドの極少量がこの工程で失われるだけである。

任意に、カロテノイド結晶、微生物脂質及び残留細胞細片から本質的に成るカロテノイド含有残さを伴う固体上層は、水で一回以上洗浄して付随的な細胞細片を除去する。前記の水は、任意に、或る種の塩、例えば、塩化ナトリウムを含んでいても良い。塩は 2 5 % ( w / w ) までの濃度で存在しても良い。

本発明方法は、微生物脂質の実質的な部分及び、任意に、破壊細胞に前以って添加された

50

油を除去する為の適当な溶剤での洗浄工程を更に含む。

脂質除去の為の適当な溶剤は、脂質及び水混和性溶剤であって結晶カロテノイドの溶解が少ない溶剤である。好ましくは、前記溶剤は、低級アルコール、例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、又はアセトンである。更に好ましくは、前記溶剤はエタノールである。脂質除去の為に必要な溶剤の量は、微バイオマスからのカロテノイドの溶剤抽出の為に必要な量よりも実質的に少ない点に注目すべきである。

本発明の好ましい実施態様においては、細胞細片の分離後に得られるカロテノイド含有残さは、脂質除去の為の前記の適当な溶剤で洗浄される。前記の洗浄は、カロテノイド含有残さを都合のよい時間、例えば、約 10 分間、前記溶剤と共に攪拌し、遠心分離後に固体上層を回収する事によって行われる。任意に、前記溶剤での前記洗浄が、一回以上繰返される。

10

本発明のその他の実施態様では、脂質は、細胞破壊が起る前に微生物資源から除去する事が出来る。この選択的实施態様は、特に、出発バイオマスが乾燥形態である場合に適用できる。一般に、乾燥バイオマスは、溶剤 1 リットル当たり 10 g ~ 400 g のバイオマスの量で、選択された溶剤中に懸濁される。除去される脂質の量を増加させる為に、昇温、例えば、50 の温度を適用しても良い。この様に処理されたバイオマスは、脂質含有溶剤から、濾過又は遠心分離によって分離される。任意に、この処理が繰返される。

本発明での洗浄とは、選択された溶剤の適当な量で洗浄されるべき材料を懸濁又は攪拌する工程及びデカンテーション又は遠心分離工程並びにその後の適当な層の回収工程を含む。

20

細胞細片と脂質除去後に得られる結晶は、次いで、カロテノイド結晶を浮遊させる為に水中に懸濁される。結晶の浮遊は、懸濁液中にガスを通して泡立たせる事によって改善される。一般に、バッチ操作では、ガスバブルは、上層が実質的に無色となるまで続けられる。使用されるガスに制限はなく、例えば、空気又は窒素であっても良い。この浮遊工程に引続いて、結晶は、遠心分離又はデカンテーションによって回収される。この方法では、上層に存在する結晶は、中間の液層によって、下層に存在する残留細胞細片から分けられる。

結晶の浮遊は、粗結晶を懸濁する為の水に塩又は油を存在させて改善しても良い。従って、水は、任意に、塩、例えば、塩化ナトリウム、及び/又は植物油、例えば、大豆油を含んでも良い。塩は、25% (w/w) までの濃度で、油は2%までの濃度で存在しても良い。好ましくは、油は、カロテノイド結晶が懸濁されている水中に存在する。

30

溶剤洗浄と結晶の浮遊後に得られる粗結晶は、乾燥されるか、所望の純度水準まで更に精製される。

付加的精製工程は、適当な溶剤での付加的洗浄工程を含んでも良い。例えば、結晶の更なる処理は、結晶性カロテノイドが溶け難い溶剤を使用して有利に行われる。前記溶剤処理は、不純物の溶解を可能とするのに十分な時間の間、前記溶剤中で粗カロテノイド結晶を攪拌し、結晶を濾過し、新たな溶剤で数回結晶を洗浄する工程を含む。前記の攪拌は、約 20 ~ 80 の範囲内の所望の温度で行う事が出来る。攪拌が比較的高温度で行われる時は、混合物を、結晶を濾過する前に冷却する事が好ましい。

任意に、この処理は、一回以上繰返され、それによって処理は、同じ溶剤又は最初に使用された溶剤とは異なる溶剤でもって繰返す事が出来る。最終洗浄工程後に、残留溶剤は蒸発される。

40

更なる精製の為の適当な溶剤は、カロテノイドが溶け難い溶剤、即ち、25 でせいぜい 1 g/l の溶解度の溶剤である。好ましくは、溶剤は水又は有機溶剤である。水が使用される時は、水の pH は、7 以下が好ましいが処理の為の限定要因ではない。更に好ましくは、水の pH は 4 ~ 6 である。有機溶剤は、低級アルコール又はそれらの低級アシルエステルが好ましく、ここで低級とは 1 ~ 5 個の炭素原子を含むものであり、或いはアセトンである。更に好ましくは、有機溶剤は、エタノール又は酢酸エチルである。

本発明方法は、カロテノイド化合物が主に結晶形態で存在する微生物に有利に適用される。好ましくは、本発明方法は、少なくとも 50% が結晶形態にある、更に好ましくは、少

50

なくとも60%が、最も好ましくは少なくとも70%が結晶形態にあるカロテノイドを含有する微生物を使用して行われる。

細胞環境におけるそれらの低溶解性の故に、特に無極性カロテノイドは、細胞内で主に結晶形態で存在する。無極性カロテノイド化合物の例は、例えば或る種のファフィア・ロードチマ (*Phaffia rhodozyma*) 株中に存在するフィトエン、或いは、例えば、ブラケスリア・トリスポラ (*Blakeslea trispora*) 又はサイコマイセス・ブラケスレアヌス (*Phycomyces blakesleanus*) 中に存在する  $\beta$ -カロチンである。

本発明の適用によって得られるカロテノイド結晶は、高純度を有し、食品、薬剤又は化粧品組成物に有利に使用される。

#### 実施例 1

ブラケスリア・トリスポラ (*Blakeslea trispora*) からの  $\beta$ -カロチン結晶の直接単離

0.164% (w/w) の  $\beta$ -カロチンを含有するブラスケリア・トリポラス (*Blakeslea trispora*) の2リットルの醗酵ブrosを、800~1000 bar の圧力で二度ホモジナイズした。混合物の遠心分離後、上層を750mlの脱塩水と混合した。混合物を遠心分離に掛け、上層を750mlの脱塩水と再度混合した。混合物の遠心分離後、上層を750mlのエタノールと共に5分間攪拌した。遠心分離後、上層をデカントした。下層を連続的に4回エタノールで洗浄し(前述の様に)、700mlの脱塩水と共に10分間攪拌し(第一段階)、結晶を浮遊させた。遠心分離後に得られた結晶を真空下で乾燥した。

#### 実施例 2

塩又は油の存在での浮遊

脱塩水に代えて、塩化ナトリウム水溶液の塩水(25% (w/w)) 又は大豆油含有水(1%)を第一段階で添加した。この方法では、全体に高い  $\beta$ -カロチン収率が得られた。

#### 実施例 3

$\beta$ -カロチン結晶の更なる精製

最後の遠心分離(実施例1参照)後に得られた結晶懸濁液の7gの量を45mlの脱塩水と一度混合した。遠心分離後、300mlのエタノールを上層に添加し、混合物を混合して遠心分離に掛けた。上層をデカントし、下層を300mlのエタノールと混合した。再度上層をデカントし、その後、下層(結晶スラリー)を20mlの酢酸エチルと共に50℃で窒素下で30分間攪拌した。懸濁液を30分で5℃まで冷却した。結晶を連続的に濾過し、50℃の5mlの酢酸エチルで二度洗浄し、20mlのエタノールと共に50℃で窒素下で30分間攪拌した。懸濁液を30分で20℃まで冷却した。結晶を濾過し、5mlのエタノールで二度洗浄し、真空下で室温で乾燥し、HPLCにより93.9%の純度の  $\beta$ -カロチン1.22gを得た(92.8%のトランス  $\beta$ -カロチンと1.1%の13-シス  $\beta$ -カロチン)。全体の収率は35%であった。

10

20

30

---

フロントページの続き

(72)発明者 デ ペーター ロベルテュス マテウス  
オランダ エヌエル 2 6 1 3 ゼットエル デルフト フェカデストラート 6

審査官 福間 信子

(56)参考文献 米国特許第 0 3 2 6 8 6 0 6 ( U S , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C12P 1/00 - 23/00  
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)  
PubMed