

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4720975号
(P4720975)

(45) 発行日 平成23年7月13日 (2011. 7. 13)

(24) 登録日 平成23年4月15日 (2011. 4. 15)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	1/20	(2006. 01)	C 1 2 N 1/20 Z N A A
A 2 3 L	1/00	(2006. 01)	A 2 3 L 1/00 J
C 1 2 P	7/56	(2006. 01)	C 1 2 P 7/56

請求項の数 5 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2004-560550 (P2004-560550)	(73) 特許権者	501321992
(86) (22) 出願日	平成15年12月10日 (2003. 12. 10)		アンスティテュ ドゥ ルシェルシュ ブ
(65) 公表番号	特表2006-509522 (P2006-509522A)		ール ル デヴロップマーン (イ エー
(43) 公表日	平成18年3月23日 (2006. 3. 23)		ル デ)
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/003665		フランス国 1 O セデクス パリー リ
(87) 国際公開番号	W02004/055173		ュ ラ ファイエット 2 1 3
(87) 国際公開日	平成16年7月1日 (2004. 7. 1)	(74) 代理人	100083149
審査請求日	平成18年10月30日 (2006. 10. 30)		弁理士 日比 紀彦
(31) 優先権主張番号	0215865	(74) 代理人	100060874
(32) 優先日	平成14年12月13日 (2002. 12. 13)		弁理士 岸本 瑛之助
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100079038
微生物の受託番号	CNCM 1-2962		弁理士 渡邊 彰
		(74) 代理人	100069338
			弁理士 清末 康子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エグジゴバクテリウム (*Exiguobacterium*) 属の細菌株、培養方法および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エグジゴバクテリウム属であり、かつ、DNA配列の少なくとも一部が、2002年12月5日に、第I-2962号のもとで、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C. N. C. M) (英語名: French national collection of microorganism cultures) に寄託された株のゲノムDNAまたはプラスミドDNAとハイブリダイズするDNA配列を有し、これらの株は、40～50℃程度の温度、5.4～9.15のpHで成育する熱抵抗性、糖分解性およびペプチド分解性であり、かつL (+) ラクテートを生成することが可能であり、40～50℃程度の温度、5.4～9.15のpHの生育特性を有し、45℃の至適成育温度を有し、DNAにおけるグアニンおよびシトシンを合わせた含有率が約50mol%であることを特徴とし、さらに、16S rRNAについてのDNAの配列番号1:

【化 1】

GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCCGTCTGAACCCTTCGGGGGACGACGGTGGAATGA
 GCGGCGGACG
 GGTGAGTAACACGTAAAGAACCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGAT
 GTGTCATCGG
 ACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTT
 GGTGGGGTAA
 CGGCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
 AAGGCTTTTCG
 GGTTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGC
 GAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGCGCGCGCA
 GCGGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTT
 GAGTATAGGA
 GAGAAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCG
 ACTCTTTGGC
 CTATAACTGACGCTGAGGCTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGA
 GTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
 ACGGTCGCAA
 GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACG
 CGAAGAACCT
 TACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGGGACGGGGTGACAGGT
 GGTGCATGGT
 TGTCGTACGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCC
 AGCATTAAGT
 TGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
 TTATGAGTTG
 GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAG
 CCGTTCTCAG
 TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCG
 GTGAATACGT
 TCCCGGGTCTTGTAACACCCGCCGTACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCG
 TAAGGAGCCA
 CCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGA

10

20

30

または配列番号 1 と 97% 超の類似度を有する配列によって特徴付けられる細菌株。

【請求項 2】

2002 年 12 月 5 日に番号 I-2962 のもとで C. N. C. M に寄託された、請求項 1 に記載の細菌株。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の細菌株を培養する方法であって、

該方法は、通性嫌気性条件下に、37℃で 5.4～9.15 の pH で、この株によってエネルギー源として用いられる糖を含む基本培地において行われることを特徴とする、方法。

【請求項 4】

食物発酵処理における請求項 1 または 2 に記載の細菌株の使用。

【請求項 5】

L (+) ラクトート等の代謝物を生成する方法であって、

請求項 1 または 2 に記載の細菌株を、その成長および所望の代謝物の生成に適した条件下に培養する工程と、

生成された代謝物を回収し、所望の代謝物を単離し、そして、それを精製する工程とを包含することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

50

本発明は、エグジゴバクテリウム属の新株に関する。

【0002】

本発明はまた、これらの株を培養する方法およびそれらの工業的利用に関する。

【0003】

本発明は、より詳細には、深海水熱系から生じたサンプルから単離されたような細菌株に関する。

【背景技術】

【0004】

非特許文献1には、Drancourtらが、種々の供給源からの177の単離物の採集の研究およびrRNAに基礎としたそれらの同定の研究の結果を報告している。

10

しかしながら、この目録において与えられた種は、本発明の株とは全く異なっている。

非特許文献2において出版された論文には、Farrowらが、種々の種間の比較研究を記載する。エグジゴバクテリウム (*Exiguobacterium*) 属が言及されているが、種に関しては特定化されていない。

非特許文献3におけるFruhlingらによる論文は、海水 (pond water) から単離された*Exiguobacterium undae* sp.nov.および*Exiguobacterium antarcticum* sp.nov.の株を報告する。

与えられた*Exiguobacterium*属のこれらの株および他の種は、本発明の株とははっきり区別される系統発生論的な位置を有する。

EMBLデータベースドキュメントのアクセション番号D55730号は、*Exiguobacterium acetylicum* クローンの16S rRNAを与え、これもまた、本発明ものとは異なる種に対応する。

20

これらの文書はそれぞれ*Exiguobacterium auriantiacum* (NDCCO) および*Exiguobacterium undae*の16S rRNAの配列を報告する。データベースドキュメントに関連して上記に与えられた説明も利用する。

本発明者らによる得られたサンプルの研究によって、種々の工業分野において非常に興味深い性質を示すエグジゴバクテリウムの新種を単離するに至った。

【0005】

【非特許文献1】ドランコート (Drancourt) ら著, 「ジャーナル・オブ・クリニカル・ミクロバイオロジー (Journal of Clinical Microbiology)」, 2000年10月, 第38巻, 第10号, pp 3623-30

30

【非特許文献2】ファロー (Farrow) ら著, 「インターナショナル・ジャーナル・オブ・システマティック・バクテリオロジー (International Journal of Systematic Bacteriology)」, 1994年, 第44巻, 第1号, pp 74-82

【非特許文献3】フリューリング (Fruhling) ら著, 「インターナショナル・ジャーナル・オブ・システマティック・アンド・エボリューション・ミクロバイオロジー (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology)」, 2002年7月, 第52巻, 第4号, pp 1171-1176

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0006】

したがって、本発明の目的はこの新種の株を提供することである。

【0007】

本発明はまた、これらの株を培養し、かつ、細胞および／またはある種の代謝物、より詳細にはL(+)ラクテートを好適に生成することを可能にする物理化学的条件および培養培地の組成を明記するプロトコルを提供することを目的とする。

【0008】

別の局面によると、本発明は、種々の工業分野でのこれら株の直接的な使用、またはそれらの代謝物の使用を目的とする。

【課題を解決するための手段】

50

【0009】

本発明の細菌株は、DNA配列のうち少なくとも一部が200年12月5日に第I-2962号のもとにCollection Nationale de Culture de Microorganismes (C. N. C. M) [英語名: French national collection of microorganism], 25 rue du Docteur Roux, 75015 Parisに寄託された株のゲノムDNAまたはプラスミドDNAとハイブリダイズしてもよいDNA配列を有することを特徴とする。

【0010】

有利には、本発明の株のゲノムの少なくとも70%が寄託された株のDNAとハイブリダイズしてもよい。

【0011】

本発明は、16S rRNAの下記配列番号1または配列番号1と97%を超える類似度を有する配列によって特徴付けられる上記の細菌株を特に目的とする。

【化1】

```

GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCCGTCTGAACCCCTTCGGGGGGACGACGGTGGAATGA
GCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTAAAGAACCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGAT
GTGTCATCGG
ACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAA
CGGCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGGCTTTTCG
GGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCGAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGC
GAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCA
GGCGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTT
GAGTATAGGA
GAGAAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
ACTCTTTGGC
CTATAACTGACGCTGAGGCTGCGAAAGCGTGCGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGA
GTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAA
GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACG
CGAAGAACCT
TACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGT
GGTGCATGGT
TGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTGCC
AGCATtnAGT
TGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGAGTTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAG
CCGTTCCTCAG
TTCGATTGACGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCG
GTGAATACGT
TCCCGGGTCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCG
TAAGGAGCCA
GCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGA

```

【0012】

別の局面によると、これらの株は熱抵抗性、糖分解性およびデンプン分解性であり、かつ／またはラクテートを生成可能であることを特徴とする。

【0013】

なお、有利には、生成されたラクテートは95%超がL(+)ラクテートである。

【0014】

「熱抵抗性」との表現は、細菌株が40～50℃程度の温度、5.4～9.15のpHで、生育にとって至適には45℃、約7のpHで生育できることを意味することが意図さ

10

20

30

40

50

れている。

【0015】

本発明はより詳細には、16SリボゾームRNAフラクションの配列の比較によって示されるようなエグジゴバクテリウム (Exiguobacterium) 属の株を目的とする。

【0016】

これらの株はまた、スルフェート、チオスルフェート、硫黄またはスルファイト (sulfite) を還元しないことを特徴とする。

【0017】

本発明の細菌株はまた、グラム陽性であることを特徴とする。

【0018】

さらに別の提供によると、本発明の細菌株のDNAのグアニンとシトシンとを合わせた含有率は50mol%程度である。

【0019】

本発明は特に、2002年12月5日に第1-2962号のもとにC. N. C. Mに寄託された細菌株を目的とする。

【0020】

この株の識別参照は10Cである。これを表すために用いられる分類名は、Exiguobacterium lactigenes sp.nov.であろう。

【0021】

寄託された株のゲノムDNAとハイブリダイズするための容量を少なくとも70%維持するとすれば上記規定に対応する株の突然変異体も本発明の範囲内である。

【0022】

本発明によると、上記規定の細菌株は、通性嫌気性条件下、5.4~9.15のpH、37℃で、下記に規定されるようなこれらの株によってエネルギー源として用いられ得る糖を含む基本培地 (basic medium) 中で培養することによって得られる。

【0023】

本発明の細菌株は、有利には、食物発酵処理 (food fermentation process) に用いられる。それらの発酵および酵素特性により、有利には、通常用いられる乳酸細菌に属するものにとって代わるおよび／またはそれを補足することが可能になる。

【0024】

多種の糖、特に、D-グルコース、D-フルクトース、D-ガラクトース、D-マンノース、マンニトール、D-リボース、D-スクロースおよびD-マルトース、およびデンプンを発酵させる本発明の株の能力は、かなりの利点を構成する。エネルギー基質として潜在的に用いられ得るこれら糖の一部 (グルコース、フルクトース、スクロース) は、実際、大量に、特に、発酵糖ジュース中に入手可能である。

【0025】

培地の物理化学パラメータ (pH、糖／ペプチド比) を制御することによってこれらの株が代謝を行うことができれば、それらの用途領域は幅広いものとなる。このため、例えば、細胞および細胞代謝物、例えば酵素を生成するために直接発酵させることが可能である。

【0026】

したがって、本発明はまた、代謝物、特にL(+)ラクテートを生成する方法を目的とし、該方法は、
-その成長および所望の代謝物の生成に適した条件下に、上記規定の細菌株を培養する工程と、
-生成された代謝物を回収し、次いで、所望の代謝物を単離し、それを精製する工程とを包含する。

【0027】

95%を超えるL(+)ラクテートからなり、D(-)ラクテートが自然界において毒であるのに対してL(+)ラクテートはより高等な生物によって吸収され得るので、本発

10

20

30

40

50

明の株によって生成された乳酸は非常に有利である。

【0028】

それは培養から分離され、例えば、乾固に適した場合には蒸発によって濃縮される。

【0029】

濃縮または乾固生成物はそのままで用いられるか、または乳酸の所望の誘導体を形成するように処理される。

【0030】

乳酸またはそれらのエステル体および他の誘導体の使用は多くの分野に関連する。

【0031】

このため、乳酸は、これを飲料、ビール、乳製品（クリーム、チーズ、バターまたはアイスクリーム）またはジャム等に組み込むことによって農業食物工業において用いられる。

10

【0032】

例えば、乳酸モノおよびジグリセライドまたは乳酸ステアリルナトリウムの形態で界面活性剤としてパン製造およびウィーンパン菓子製造（Viennese pastry-making）において有利に用いられるだろう。

【0033】

医薬工業では、乳酸カリウムが、塩化ナトリウムの代用品を構成し得、高血圧の場合に特に貴重である。

【0034】

20

欠乏症治療のために、その錯体形成特性、特に、鉄およびカルシウムとの錯体形成用にも用いられる。

【0035】

最後に、化学工業における乳酸およびその塩および誘導体の使用の中で、プラスチック樹脂、接着剤、殺虫剤または織物原料の開発、または塗料、希釈剤および溶媒において、または金属の表面処理のためにその使用の言及がなされるだろう。

【0036】

ポリラクチドおよび／または例えばポリアルケン酸化物、多価アルコール、グリコール酸、ヒドロキシカルボン酸、エチレンおよびプロピレンの共重合体、ブチルゴムまたは熱可塑性ポリウレタンエラストマーとの共重合体を製造するために用いられる場合には、重合体化学において乳酸の大きな利点が強調されるだろう。種々の物品がこれらの重合体および／または共重合体から、特に包帯を製造するための医療使用のための包装、薄膜または他の外科縫合糸用の被覆材料のために製造され得る。

30

【0037】

本発明の他の特徴および利点が以下の説明中に説明され、実施例によって与えられる。実施例は、上記に言及され、第1-2962号のもとにC. N. C. Mに寄託された株10Cに関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

（a. 株10Cを単離するためのプロトコール）

40

単離は深海水熱系のサンプルを用いて行われた。

【0039】

・培地および方法

1 gの NH_4Cl 、0.3 gの KH_2PO_4 、0.3 gの K_2HPO_4 、25 gの NaCl 、0.2 gの CaCl_2 、0.1 gの KCl 、3 gの MgCl_2 、0.5 gの CH_3COONa 、0.5 gのシステイン-HCl、0.1 gの酵母菌抽出物（Difco Laboratories）、10 mlのBalchミネラル溶液（1）および1 mgのレザズリンを（蒸留水1リットルあたりに）含む基本培地（basic medium）が用いられる。pHは10M KOHを用いて7.3に調整され、培地は窒素流下に煮沸され、周囲温度に冷却される。

【0040】

50

B a l c h ミネラル溶液および B a l c h 微量元素溶液の組成は以下の通りである。

【0041】

B a l c h ミネラル溶液

KH ₂ PO ₄	6	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	6	g
NaCl	12	g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	2.6	g
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.16	g
蒸留H ₂ O十分量	1000	ml

10

B a l c h 微量元素溶液

ニトリロ酢酸	1.5	g
MnSO ₄ ・2H ₂ O	0.5	g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	3	g
NaCl	1	g
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.1	g
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.1	g
CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.1	g
ZnCl ₂	0.1	g
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.01	g
AlK(SO ₄) ₂	0.01	g
H ₃ BO ₃	0.01	g
Na ₂ MoO ₄	0.01	g
蒸留H ₂ O十分量	1000	ml

20

培地のpHは10M KOHを用いて7.3に調整される。

【0042】

続いて、培地は煮沸され、次いで、周囲温度に冷却され、そして、窒素流下にハンゲートチューブ (Hungate tubes) に1チューブあたり5mlの割合で、窒素および二酸化炭素流 (80:20; v/v) 下に血清フラスコに20mlの割合で、分配される。

【0043】

30

密封された容器をオートクレーブ内にて110℃で45分間処理した後、Na₂S・9H₂O、Na₂CO₃およびグルコースが滅菌された溶液から加えられ、これにより、0.04%、0.2%および20mMの濃度をそれぞれ与える。

【0044】

培養の濃厚化を開始するために、培地の20mlサンプルが接種され、37℃でインキュベートされる。培養は、寒天1lあたり15gを含む凝固された培地によるハンゲートロールチューブ法を用いて精製される。

【0045】

(b. 株の説明)

株10Cは、非孢子形成性、通性嫌気性、グラム陽性の棹形態の細菌であり、45℃、pH7および0~2%のNaClで至適に生育する。

40

【0046】

これは、糖を発酵させるために酵母菌抽出物を要求する従属栄養性株である。

【0047】

株を生育させるための温度は、5.4~9.1のpH、0~12%のNaClの濃度で12~50℃である。

【0048】

至適な生育は、45℃、pH7およびNaCl0~2%で観察される。

【0049】

生育を促進するために、ペプチド、例えば、酵母菌抽出物が、有利には、炭水化物、特

50

にグルコースをエネルギー源として含む培地に加えられる。

【0050】

(代謝特性)

糖の発酵は、L (+) ラクテートを必然的に生成する (発酵されたグルコースのモルあたりラクテートの約 2 モル)。適切な生育条件下に、ホルメート (formate)、アセテートおよびエタノールの生成物が観察される。

【0051】

(一般的な特徴)

株 10C は DNA 中の (グアニン + シトシン) 含有率が 50.4 mol % であることを特徴とする。

10

【0052】

DNA の精製および抽出、16S rRNA の増幅および配列決定は、(2)、(3) および (4) にしたがって行われた。Cashion らの方法 (5) に従いヒドロキシアパタイトを用いたクロマトグラフィーによって DNA は単離された。DNA-DNA のハイブリダイゼーションは、De Ley ら (6) により記載されたようにして、Huss ら (7) および Escara および Hutton (8) により記載されたように修飾しながら、2527-R サーモプログラマ (thermoprogrammer) を備えたスペクトル光度計モデル 2600 (Gilford Instrument Laboratories Inc., Oberlin, Ohio, USA) を用いて行われた。

【0053】

16S rRNA の配列は、上記配列番号 1 に対応する。

20

【0054】

(c. 株 10C と E. オーランティアカム (E. aurantiacum) との基質における相違の表)

【表 1】

基質	10℃	エクシス・オーランディアカム
ラクテート	—	—
ベンゾエート	—	—
グルコース	+	+
フルクトース	+	—
ガラクトース	+	+
D-キシロース	—	—
マンノース	+	—
マンニトール	+	+
グリセロール	—	+
フマレート	—	+
ピルベート	—	—
アラビノース	—	—
リボース	+	+
ソルボース	—	—
スクロース	+	+
マルトース	+	+
アセテート	—	—
ブチレート	—	—
プロピオネート	—	—
カサミノ酸	—	—
ズルシトール	—	—
ラクトース	—	—
ラムノース	—	—
メレジトース	—	—

【0055】

(d. 培養方法および使用)

(1. 糖の発酵によるバイオマスの生成)

方法は、非再生培地 (non-renewed medium) で行われる。

【0056】

発酵は、アルカリ性溶液 (例えば水酸化ナトリウム) を用いて pH 7 に、45℃の温度に調節される。下記組成に対応する培地が用いられる。

【0057】

グルコース

計算値

酵母菌抽出物／プロテインヒドロリザーゼ (protein hydrolyzate)

計算値

NH₄Cl

1 g / l

NaCl

0.5 g / l

KH₂PO₄

0.3 g / l

K₂HPO₄

0.3 g / l

10	
20	
30	
40	
50	

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.2 g/l

KCl

0.1 g/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.1 g/l

糖および酵母菌抽出物の濃度は得ることが望まれる細胞の濃度に依存する。

【0058】

糖は培地の他の部分とは別に高圧滅菌 (autoclave) される。これは、ある種のミネラル塩が高圧滅菌の間に沈積物を形成するからである。続いて、それらは、培地の他の部分 (酵母菌抽出物+ミネラル (一緒に高圧滅菌された)) に無菌で加えられ、次いで、最終容積が高圧滅菌された蒸留水を用いて調節される。下記実施例は、培地を調製するプロトコルをより明瞭に理解することを可能にする。

10

【0059】

40 g/l のスクロースおよび 3 g/l の酵母菌抽出物を含む培地 16 リットルの調製の実施例：

1°) 測定および高圧滅菌

【表 2】

	濃度	測定されるべき質量	
スクロース	40 g/l	640 g	約 500 ml 蒸留水中。 高圧滅菌 110℃、20～30 分
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/l	3.2 g	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g/l	1.6 g	
酵母菌抽出物	3 g/l	48 g	
NH_4Cl	1 g/l	16 g	
KH_2PO_4	0.3 g/l	4.8 g	約 15 l 蒸留水中。 高圧滅菌 121℃、1 時間 30 分
K_2HPO_4	0.3 g/l	4.8 g	
NaCl	0.5 g/l	8 g	
KCl	0.1 g/l	1.6 g	

20

30

【0060】

注意：スクロースの加水分解を避けるために糖は小容量の液体中かつ 20 分間のみ 110℃ で高圧滅菌される。マグネシウムおよびカルシウム塩は、あらゆる沈積を避けるために他の塩および酵母菌抽出物とは別に高圧滅菌される。

【0061】

2°) アセンブリ：糖をベースとする溶液が酵母菌抽出物を含む培地 15 リットルに移され、次いで、滅菌された蒸留水が加えられて 16 リットルに増量される。全てのこれら移送は、滅菌して、ブンゼンバーナーのフラーム周囲で、液体を膨張させる (propel) ために空にされた建浴槽 (vat) に適用される窒素過圧により行われる。

【0062】

40

3°) 均一化：窒素 N_2 流が培地にバブリングされ、このため、要素全てを混合し、嫌気性を保証するために集められる。

【0063】

(2. 発酵方式)

複数のバッチを一緒に連結することによって連続して形成されたバッチ方式で研究が行われた。これは、「供給-採取 (feed-harvest)」または「繰り返しバッチ (repeat batch)」システムであり、これは、発酵槽を新しい培地で充填する工程、次いで、細菌をバッチ培養する工程、次いで、発酵マスト (must) を空にして、次のバッチのインキュベーションのためにタンクを開始時の状態にし、再度充填等をする工程の 3 工程を一緒に連続的に連結することによって概略的に表され得る。

50

【0064】

実際上の観点から、このシステムの利点は、2つのバッチ間の発酵槽の洗浄および滅菌を構成する工程が除かれるという事実、および処理が自動化される可能性にある。実際に、装置を調整することによってライン上で取得されたパラメータの値に従って空にするおよび充填する操作を誘引する自動化された装置をプログラムすることが可能である。

【0065】

(I I. デンプンの発酵によるバイオマスの生成)

他の実験では、上記のデンプン基質および緩衝された培地（ただし、リットルあたり10 gのデンプンを有する）を用いて、95%超のL（+）ラクテートおよび痕跡量のホル

10

【0066】

引用文献の参照

【化2】

(1) Balch W.E. et al, 1979, Microbiol. Rev. 43,260-296,

(2) Andrews K.T. & Patel B.K.C., 1996, Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 265-269,

(3) Love C.A. et al, 1993, Syst. Appl. Microbiol. 16, 244-251,

20

(4) Redburn A.C. & Patel B.K.C., 1993, FEMS Microbiol. Lett. 113, 81-86.

(5) Cashion P., 1977, Anal. Biochem, 81:461-466.

(6) De Ley J, 1970, Eur. J. Biochem, 12:133-142,

(7) Huss V.A.R., 1983, J. Syst. Appl. Microbiol, 4: 184-192,

30

(8) Escara J.F., 1980, Biopolymers, 19: 1315-1327.

【配列表】

0004720975000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ファルド マリー ロール
フランス国 レ ペンネ ミラボ シュマン ドゥ ベルペール (番地なし)
- (72)発明者 コーベ ブラン ヤニック
フランス国 マルセイユ リュ ドラゴン 21
- (72)発明者 オリヴィエ ベルナール
フランス国 ロクヴェール カルティエ ヴァルクロ (番地なし)

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 J. Gen. Microbiol., 1983年, 129(7), p.2037-2042
Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol., 2002年 5月, 102nd, p.331, N-148
J. Clin. Microbiol., 2000年, 38(10), p.3623-3630
Int. J. Syst. Bacteriol., 1994年, 44(1), p.74-82
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2002年 7月, 52, p.1171-1176
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2005年, 55, p.885-889

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/20
C12N 15/09-15/90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
WPI