

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3763005号
(P3763005)

(45) 発行日 平成18年4月5日(2006.4.5)

(24) 登録日 平成18年1月27日(2006.1.27)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/20 (2006.01)
C O 2 F 3/34 (2006.01)
C 1 2 P 7/06 (2006.01)
C 1 2 P 7/40 (2006.01)
C 1 2 P 7/54 (2006.01)

C 1 2 N 1/20 A
 C O 2 F 3/34 Z A B Z
 C 1 2 P 7/06
 C 1 2 P 7/40
 C 1 2 P 7/54

請求項の数 17 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-518886
 (86) (22) 出願日 平成7年1月18日(1995.1.18)
 (65) 公表番号 特表平9-508013
 (43) 公表日 平成9年8月19日(1997.8.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR1995/000056
 (87) 国際公開番号 W01995/019425
 (87) 国際公開日 平成7年7月20日(1995.7.20)
 審査請求日 平成13年11月27日(2001.11.27)
 (31) 優先権主張番号 94/00485
 (32) 優先日 平成6年1月18日(1994.1.18)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

微生物の受託番号 CNCM I-1378

(73) 特許権者
 アンスティテュ ドゥ リシエルシュ プ
 ール ル デヴロブマーン
 フランス国 パリー 75480 リュ
 ラファイエット 213
 (74) 代理人
 弁理士 岸本 瑛之助
 (74) 代理人
 弁理士 岸本 守一
 (74) 代理人
 弁理士 渡辺 彰
 (74) 代理人
 弁理士 日比 紀彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳酸桿菌属に表現型が密接に関係した桿菌属の細菌株、培養方法および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カタラーゼ陽性であり、発酵生成物として L (+) - 乳酸塩を生産し、25 ~ 58 . 5
 で増殖し、最適な増殖は 47 ~ 53 であり、NO³⁻を還元しない、桿菌属 (genus Baci
 llus) の単離された細菌株 (CNCM I - 1378 菌株) 。

【請求項 2】

最適増殖 pH が 5 . 4 ~ 8 . 5 である、請求項 1 に記載の株。

【請求項 3】

最適増殖 pH が 6 . 8 ~ 7 . 2 である、請求項 2 に記載の株。

【請求項 4】

前記増殖の温度が 50 ~ 58 . 5 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の株。

【請求項 5】

ギ酸塩、酢酸塩およびエタノールを生産する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の株。

【請求項 6】

前記株のゲノムのグアニンおよびシトシン含有量が 40 mol % 以上であり、かつ、50
 mol % より低い、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の株。

【請求項 7】

チトクロームを含まない、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の株。

【請求項 8】

孢子を形成しない、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の株。

10

20

【請求項 9】

ヤシ酒に由来する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の株。

【請求項 10】

1993 年 1 月 24 日に I - 1378 という番号で C . N . C . M に寄託された単離された細胞株 (genus *Bacillus*)。

【請求項 11】

グラム陽性であることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のうちのいずれか 1 項による細菌株。

【請求項 12】

嫌気性条件下、あるいは上方に空気が存在する液体培地中で、pH 5 . 4 ~ 8 . 5 で、株によりエネルギー源として使用され得る糖、および窒素源としてのペプチドを含有する基本培地中で行われることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 のうちのいずれか 1 項の細菌株の培養方法。

10

【請求項 13】

炭水化物がエネルギー源および炭素源として使用され、かつペプチドが窒素源として使用されることを特徴とする、請求項 13 による方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 11 のうちの 1 項による細菌株の使用から成ることを特徴とする、汚染除去を目的とする、産業廃水の処理方法。

【請求項 15】

食品発酵方法における、請求項 1 ~ 11 のうちの 1 項による細菌株の使用方法。

20

【請求項 16】

株と乳酸菌と桿菌との間の遺伝物質の移動によって、変異体を発生させるための、請求項 1 ~ 11 のうちの 1 項による株の使用方法。

【請求項 17】

L (+) - 乳酸塩、酢酸塩、ギ酸塩およびエタノールのような代謝生成物の生産方法において、

該方法が、

- 株の発育および必要な代謝生成物の生産に適した条件下での、請求項 1 ~ 11 のうちの 1 項による細菌株の培養、および
- 生産された代謝生成物の回収、所望の代謝生成物の単離およびその精製から成ることを特徴とする方法。

30

【発明の詳細な説明】

本発明は、乳酸桿菌属 (genus *Lactobacillus*) に表現型が密接に関係した細菌株に関する。

本発明は、これらの株の培養方法およびそれらの産業上の使用にも関する。

本発明は、より詳細には、ヤシ酒から単離される細菌株に関する。

ヤシ酒が、ヤシ科に属する木の樹液の自然発酵に由来するアルコール飲料であることは知られている。この樹液は、約 10 ~ 15 % (w / v) のショ糖、数種類のアミノ酸およびビタミンを含有する。

40

現在までに行われてきた微生物学的研究は、数種類の細菌および酵母菌から成る多くの中温性植物相 (mesophilic flora) の存在を証明してきた。

本発明者らは、セネガル産のヤシ酒中に存在する好熱性嫌気性植物相の研究によって、未だに同定されておらず、様々な産業分野において非常に有利な性質を有する株を単離するに至った。

本発明の目的は、このように、この型の新しい株を提供することである。

本発明は、細胞および/または、例えば L (+) - 乳酸塩のような一定の代謝生成物の有利な生産を可能にする物理化学的条件および培地の組成を規定する、これらの株の培養報告書を提供することにも関する。

もう一つの態様によれば、本発明は、様々な産業における、これらの株の直接の使用、あ

50

るいはそれらの代謝生成物の直接の使用に関する。

もう一つの態様によれば、これらの株は、中程度に好熱性であり、デンプンを加水分解する性質を有し、および／または炭水化物から乳酸塩を生産できることを特徴とする。生産される乳酸塩が、有利には95%を越える程度にL(+) - 乳酸塩であることが指摘される。

「中程度に好熱性」という表現は、25～58.5 程度の温度、最適には47 から 53 の間で増殖できる細菌株を意味するものとして理解される。

本発明は、より詳細には、リボソームの16S分画のRNA配列の比較によって証明されるように、桿菌属 (genus *Bacillus*) の株に関する。

この型の株は、ヘテロ乳酸性 (heterolactic) であること、すなわち培地の物理化学的条件に従って、特にpHおよび糖/ペプチド比に従って、炭水化物からL(+) - 酸塩以外の化合物、特にエタノール、ギ酸塩および酢酸塩を生産できることも特徴とする。

このような株は、チトクロームを持たず、かつ硝酸塩および硫酸塩を終末電子受容体として使用できないことも特徴とする。これらの株はカタラーゼを有し、それらの代謝は通性嫌気性である。

本発明のもう一の実施態様によれば、低い酸素分圧がこれらの株の増殖を刺激する。

それらの増殖は、pH 5.4～8.5でより特異的に起こり、増殖に至適のpHは約6.8～7.2である。

本発明の細菌株は、グラム陽性であることも特徴とする。

本発明のもう一つの実施態様によれば、細菌株は、突出した (peritrichous) 鞭毛を有する桿状の細胞、孤立している細胞、あるいは鎖状になっている3個または4個の細胞、胞子が形成されない細胞によって特徴付けられる。

もう一つの実施態様によれば、本発明の細菌株のDNA中のグアニン+シトシンの含有量は、50mol%より低く、特に40mol%程度である。

本発明は特に、1993年11月24日にI-1378という番号でC.N.C.M.に寄託された細菌株に関する。

この株の同定の対照標準はDKPである。分類上の名称として*Bacillus thermoamylovorans* gen.nov.sp.novが使用されるであろう。以前の名称は*Lactobacter thermoamylovorans* gen.nov.sp.novであった。

本発明に従って、上記定義の細菌株は、嫌気性条件下、あるいは低酸素分圧下、pH約5.4～8.5で、これらの株によりエネルギー源として使用され得る糖、および窒素源としてのペプチドを含有する基本培地中、温度25～58.5 での培養によって得られる。

低酸素分圧下での培養は、例えば上方に空気が存在する液体培地中で行われる培養を意味するものとして理解される。

培養は、有利には、pH 6.8～7.2および温度47～53 で行われる。

至適のpHおよび温度条件下では、バイオマス (生物量) の倍加時間は、約40～45分である。

株の増殖のために、炭素源およびエネルギー源である化合物としての炭水化物、より詳細にはグルコース、窒素源としてのペプチド、および増殖因子が主に使用される。

ペプチドおよび増殖因子は、例えば酵母抽出物中、およびカゼインあるいはゼラチンのトリプシン加水分解物中に存在する。

ビタミンの添加は増殖が加速されるのを可能にするが、必須ではない。

一般にバイオトリプターゼ (Biotryptase) (登録商標) と呼ばれるような、トリプシンの作用によって得られるカゼインの加水分解物、あるいは酵母抽出物が培地に添加されるならば、特に有利である。

上記の条件下での培養の約48時間後に形成される細菌集落は、純粋培養物を得るために、液体培地で別々に取り上げられる。

本発明の株の種々の性質を上記説明中に示してきた。これらの性質は、非常に多様な分野に応用される。

10

20

30

40

50

これらの株は、有利には、非常に稀薄な媒質中でも発現する、好熱性およびデンプンを加水分解する性質の故に、汚染除去の目的で、産業廃水に添加される。

本発明は、このように、上記定義の細菌株の使用から成ることを特徴とする、汚染除去を目的とする、産業廃水の処理方法に関する。

本発明の株が、桿菌属に属する種に系統的に近いこと、および乳酸菌に生理的に類似していることは、食品発酵方法に有利に利用される。これらの株の発酵的および酵素的性質によって、乳酸菌および桿菌に起因する性質を有利に置換および/または補足することがここで可能になる。

これらの株はまた、これらの株と乳酸菌と桿菌との間の遺伝物質の移動によって、変異体の発生に非常に有利であり、そのことによって、これらの細菌に共通の性質の範囲を累積することが可能になる。

10

本発明の株の中程度の好熱性、通性嫌気性および好中性も、純粋培養における使用の点から非常に有利である。実際に、58.5℃まで拡大した温度での培養の可能性は、他の微生物による汚染源を制限し、細胞代謝の動力学を加速し、かつ培地の成分の溶解度を増加させることを可能にする。更に、この温度で、溶存酸素の低い濃度は、これらの通性嫌気性の株の増殖を抑制するのではなく刺激する。そのことは、嫌気的生活(anaerobiosis)に関係する全ての技術的拘束を避けて、培養の使用を相当容易にする。株の好中性は、乳酸菌の好酸性に関して重要であり、腐食の問題を避け、かつ装置の寿命を延長することを可能にする。

本発明の株が、多様な糖、特にデンプン、乳糖およびショ糖を発酵する能力は、重要なボーナス効果である。これらの三種の糖は、潜在的にエネルギー基質として使用できるが、実際に種々の形態で大量に入手できる。

20

培地の物理化学的パラメーター(pH、糖/ペプチド比)を制御することによって、これらの株の代謝に影響を及ぼす可能性は、それらの株の使用分野を広げる。例えば、このように、発酵を細胞の生産および酵素のような細胞代謝生成物に向けることができる。乳酸塩の生産、あるいは酢酸塩、エタノールおよびギ酸塩の生産を促進することによって、株のエネルギー代謝を方向付けることもできる。

従って、本発明は、L(+)-乳酸塩、酢酸塩、ギ酸塩およびエタノールのような代謝生成物の生産方法において、該方法が、

- 株の発育および必要な代謝生成物の生産に適した条件下での、上記定義の細菌株の培養、および

30

- 生産された代謝生成物の回収、次いで所望の代謝生成物の単離およびその精製から成ることを特徴とする方法にも関する。

本発明の株によって生産された乳酸は、95%を超える程度に、優れた生物体によって同化されるL(+)-乳酸塩から成るので、非常に有利である。一方、D(-)-乳酸塩は毒性を有する。

乳酸は、培養物から分離され、例えば蒸発によって濃縮され、適切ならば乾固される。

濃縮物あるいは乾燥生成物は、そのまま使用され、あるいは処理されて所望の乳酸誘導体を生成する。

乳酸あるいはそのエステルおよび他の誘導体には非常に幅広い用途があることが知られている。

40

このように乳酸は、飲料、ビール、クリーム、チーズあるいはバターのような乳製品、アイスクリームあるいはジャムにも混合されることによって、農産食品工業に使用される。乳酸は、有利には、界面活性剤として、例えば乳酸モノグリセリド、乳酸ジグリセリド、および乳酸ステアリルナトリウムの形態で、パン製造およびウィーンパン(Vinnesse bread)に使用されるであろう。

製薬工業において、乳酸カリウムは、高血圧の場合に特に貴重な塩化ナトリウムの代用品となってもよい。

乳酸カリウムは、特に鉄およびカルシウムと錯体を形成する性質のために、鉄およびカルシウムの欠乏症の治療にも使用される。

50

最後に、乳酸およびその塩および誘導体の化学工業における用途のうちで、プラスチック用樹脂、接着剤、農薬、紡績繊維、更に塗料、希釈剤および溶剤、あるいは金属表面の処理への用途が挙げられ得る。

乳酸のポリマーの化学における優れた利点が強調され得る。ポリマーの化学において、乳酸は、ポリラクチドおよび/または、例えばポリアルキレンオキシド、多価アルコール、グリコール酸、ヒドロキシカルボン酸、エチレンとプロピレンとのコポリマー、ブチルゴムあるいは熱可塑性ポリウレタンエラストマーとのコポリマーの製造に使用される。種々の製品、特に包装用製品、包帯製造用の医学的用途のフィルム、更に縫合糸用のコーティング剤がこれらのポリマーおよび/またはコポリマーから製造されてもよい。

L(+) - 乳酸塩の生産のために、本発明の株の工業的用途に推奨される培地は、乳酸菌に必須の増殖因子を含有する酵母抽出物あるいはトウモロコシ浸漬液の価格を考慮すると、乳酸菌に通常使用される培地より価格が低いという利点を有する。実際、乳酸菌は、乳酸に関して、優れた生産性のために増殖因子を非常に必要とするので、糖/増殖因子の比が1である培地の使用が推奨される。これに対して、本発明の株については、この比は2でなければならない。

本発明の他の特徴および利点は、後述の、I - 1378という番号でC. N. C. M. に寄託された、DKP株と呼ばれる上記の株に関する実施例として挙げられた説明中に述べられる。

ここで図1～3を参照する。これらの図は、光学顕微鏡(図1)、および20,000倍(図2)および80,000倍(図3)の電子顕微鏡によるこの細菌の細胞の写真を示す。

a. 株の濃縮および単離方法

・培地および方法

下記の培地が使用される：

グルコース	10 g	
酵母抽出物	5 g	
バイオトリプターゼ	5 g	
KH ₂ PO ₄	1 g	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.4 g	
NH ₄ Cl	1 g	30
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5 mg	
ボルチ(Balch)無機溶液(下記)	25 ml	
ボルチ微量元素溶液(下記)	1 ml	
トゥイーン(Tween) 80	1 ml	
十分量の蒸留水	1000 ml	

ボルチ無機溶液およびボルチ微量元素溶液の組成は下記の通りである：

ボルチ無機溶液		
KH ₂ PO ₄	6 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	6 g	
NaCl	12 g	40
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.6 g	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.16 g	
十分量の蒸留水	1000 ml	
ボルチ微量元素溶液		
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	50

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
ZnCl_2	0.1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	0.01 g
H_3BO_3	0.01 g
Na_2MoO_4	0.01 g
十分量の蒸留水	1000 ml

培地の pH は、滅菌前に 10 M の KOH を用いて pH 7.5 に調節される。

培地は、次いで窒素気流下で沸点まで加熱され、続いて冷却され、

・ペニシリン型の瓶あるいは血清瓶に 1 瓶当たり 20 ml の量で、

・ハンゲート (Hungate) 管に管当たり 10 ml の量で、および

・管当たり 4.5 ml の 3.5 % 寒天培地を含有するハンゲート管に分配される。

オートクレープ中、110 °C の 45 分間の処理の後、下記のもので添加される：

- 血清瓶に 1 ml の 10 % NaHCO_3 + 0.2 ml の 2 % $\text{Na}_2\text{S} / 9\text{H}_2\text{O}$ 、

- 10 ml の培地を含有するハンゲート管に 0.5 ml の 10 % NaHCO_3 + 0.1 ml の 2 % $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、および

- 寒天を含有するハンゲート管に 0.25 ml の 10 % NaHCO_3 + 0.05 ml の 2 % $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。

使用される NaHCO_3 および Na_2S 溶液は無菌である。

最初の二つの場合には液体であり、最後の場合には固体である培地は、接種の準備ができ

・濃縮方法：

上記定義のように、嫌氣的に調製され、ヤシ酒の試料を接種された培地を含有する瓶は、50 °C の温度でインキュベーションを受ける。数回の継代培養後、ヤシ酒に初めに存在する嫌気性かつ好熱性植物相は、優位になっている。

・ハンゲートおよびマシー (Macy) (1) および (2) の方法による回転管の技術による単離方法：

- 回転管の作製

ハンゲート管は、固体培地を融解する目的で 90 °C に加熱される。これらの管は、次いで寒天を溶融状態に維持しながら 50 °C に冷却される。

管は、上記で得られた最終濃縮培地を、各管につき 0.5 ml の量で接種される。

溶融した寒天は、遠心分離によって管の壁に接する部分に分配され、冷却によって凝固する。

- 単離

回転管を 50 °C で 48 時間インキュベートした後、各集落は、液体培地を含有する一連のハンゲート管中、相次いで再度懸濁され、希釈される。

管は 50 °C で 24 時間インキュベートされる。

液体培地を含有する血清瓶は、次いで増殖を示す最終希釈から接種され、瓶は 50 °C で 24 時間インキュベーションを受ける。

全ての細胞が同じであることが、光学顕微鏡によって確認される。

この単離方法は少なくとも一回繰り返され、全ての集落が同じ特徴を有することが確認される。

得られた培養物は純粋である。

b. 株の描写

・形態学的特徴

回転管の 48 時間のインキュベーション後、DKP 株と呼ばれる、得られた株は、直径 1 ~ 1.5 mm の滑らかな白色の集落の形をしている。孤立している、あるいは 3 個または 4 個が鎖状になっている (写真 1 参照)、胞子が形成されない細胞は、直径 0.35 ~ 0.4 μm および長さ 3 ~ 4 μm の桿状で、突出した鞭毛を有する (写真 2 参照)。細胞壁は、グラム陽性細菌の特徴を有する (写真 3 参照)。

10

20

30

40

50

・生化学的特徴および代謝特性

- 培地の要素

ペプチド、例えば酵母抽出物は、有利には増殖を促進するためにエネルギー源として、炭水化物、特にグルコースを含有する培地に添加される。酵母抽出物の代わりにゼラチンあるいはカゼインが使用されるならば、増殖は観察されない。しかしながら、酵母抽出物の代わりにアミノ酸が添加されるならば、僅かな増殖が見出される。

- 増殖条件および代謝特性

増殖は、嫌気条件下、あるいは低酸素分圧下で起こる。集落は、必ずしも好気的生活 (aerobiosis) 下でインキュベートされるペトリ皿では見出されない。細胞はカタラーゼを有するが、チトクロームを有しない。NO₃⁻およびSO₄²⁻は還元されず、インドール、H₂SあるいはH₂の生産は観察されない。エネルギー源としてアルギニンを有する培地では、NH₃は生産されるが、増殖は観察されない。

増殖のためのpH値は5.4 ~ 8.5で、至適には7.0である。

増殖のための至適温度は約50℃で、58.5℃が上限温度である。

エネルギー源として酵母抽出物およびグルコースを含有する培地中、pH 7.0および温度50℃で、バイオマスの最長の倍加時間は、40 ~ 45分である。

グルコースの発酵生成物は、酢酸塩、エタノール、ギ酸塩および乳酸塩である。生産される乳酸塩は、96%程度のL(+)-乳酸塩である。酢酸塩、エタノールおよびギ酸塩のモル比は、それぞれ1:1:2の程度である。一方、これら3種の生成物に対する乳酸塩の割合は、培養条件(pHおよびグルコース/ペプチド比)に従って変化する。

- 発酵可能な糖

下記の糖は24時間以内に発酵される：L-アラビノース、リボース、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、ラムノース、アミグダリン、アルブチン、エスクリン、サリシン、セロピオース、マルトース、トレハロース、デンプン、グリコーゲン、β-ゲンチオピオースおよびグルコン酸塩。

D-キシロース、ガラクトース、N-アセチル-D-グルコサミン、乳糖、ショ糖、メレチトースおよびD-ツラノースについては、48 ~ 96時間のより遅い発酵が観察される。

グリセロール、エリスリトール、D-アラビノース、L-キシロース、アドニトール、L-ソルボース、ズルシトール、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、メチル-D-マンノシド、メチル-D-グルコシド、メリピオース、イヌリン、D-ラフィノース、キシリトール、D-リキソース、D-タガトース、D-およびL-フコース、D-アラビトールおよびL-アラビトールについては、発酵は観察されない。

- ビタミンの所要量：

チアミン、D,L-ピオチン、並びにプリンおよびピリミジン塩基については、細菌株の増殖への刺激が観察される。これに対して、ビタミンB12、ピリドキシン、ニコチン酸、p-アミノ安息香酸、D-パントテン酸カルシウム、葉酸およびリボフラビンについては、重要な効果は現れない。

遺伝的特徴：

DKP株は、メッシュバー(Meshbah)ら(3)の方法により、HPLCによって定量された、38.8 ± 0.2%のグアニン+シトシンの含有量によって特徴付けられる。

c. 分析技術

細菌の増殖は、嫌気性培養用のハンゲート管中で、島津UV160A分光光度計を用いて、600nmにおける濁り度の増加を測定することによって追跡される。

発酵分布は、無菌条件下、試験される炭水化物を最終濃度0.3%(w/v)まで、かつ0.017%のプロモチモールブルーを添加した基本培地を用いて決定される。連続的に二回繰り返す培養は、別々に濾過滅菌された各炭水化物について行われる。

ビタミンの所要量は、ビタミンを含有せず、最終濃度0.3%(w/v)までグルコースが追加された、化学的に規定された培地を用いて決定される。

ビタミン、並びにプリンおよびピリミジン塩基は、無菌条件下、下記の最終濃度まで添加

10

20

30

40

50

される：ニコチン酸、チアミン塩酸塩、D - パントテン酸カルシウム、リボフラビン、 $92 \mu\text{g} / \text{l}$ ；p - アミノ安息香酸、 $551 \mu\text{g} / \text{l}$ ；ピリドキシン、 $1984 \mu\text{g} / \text{l}$ ；ビタミンB12、 $1 \mu\text{g} / \text{l}$ ；D, L - ビオチン、 $10 \mu\text{g} / \text{l}$ ；葉酸、 $1 \mu\text{g} / \text{l}$ ；アデニン、グアニン、ウラシル、キサンチン、 $5157 \mu\text{g} / \text{l}$ 。9パーミルのNaClを含有する無菌生理的溶液で二回洗浄した細菌懸濁液が接種に使用される。各ビタミンについて、培養は三回連続で行われる。

抵抗型（孢子）は、80 での20分間の殺菌後、顕微鏡による観察および株の培養によって検討された。

増殖の温度範囲は、種々の温度に調節された水浴中でインキュベートされた管培養において規定された。

カタラーゼ活性は、3%（v/v）過酸化水素溶液を用いて試験された。インドールおよびアンモニウム塩の生産は、それぞれコバックス（Kovacs）試薬およびネスラー試薬を用いて定量される。グリース試薬は、硝酸塩の還元を検出するのに使用される。

H_2S は、50 mMのHClおよび50 mMの CuSO_4 から成る混合物との反応後、コロイド状のCuSとして測光法によって測定される。

グルコース、乳酸塩、酢酸塩、エタノールおよびギ酸塩は、“Analprep 93”ポンプおよびORH801型カラムを使用するHPLCによって、希釈された試料の状態に定量される。流速0.6 ml / 分、注入ループ体積20 μl およびカラム温度35 が使用される。使用される検出器は、示差屈折計（クネーベル（Knauer）社、ベルリン、ドイツ）である。水素の量は、熱伝導率検出器を備えた“Girdel 30”系ガスクロマトグラフによって 20 定量される。カラムは“Carbosphere SS”（メッシュ60 / 80）で充填される。

L（+）- 乳酸塩およびD（-）- 乳酸塩脱水素酵素は、グルコースの発酵によって生産される乳酸の立体異性体の型を決定するのに使用される（ベーリンガー・マンハイム（Boehringer Mannheim）酵素キット）。

チトクロームの分析のために、3 gの細胞は、10 mlの20 mMトリス塩酸緩衝液（pH 7.6）中で音波処理を受ける；破碎された細胞の懸濁液は、30,000 gで5 で45分間遠心分離され、細胞の破片が除去される。生じた上清は、140,000 gの2時間の遠心分離によって、上清と粒子部分とに分離される。上清は可溶性部分と見なされる。黒色のゼラチン状のペレットは、同様の緩衝液に再び懸濁され、粒子部分を再提供する。細胞を含有しない抽出物の試験は、チトクロームについて、島津UV300型分光光度計によって行われる。 30

d. 培養方法および使用

1 - バイオマスの生産

バイオマスの生産のために、二つの培養技術が使用される：

1. 交換されない培地中

発酵はアルカリ溶液（例えば炭酸ナトリウム）によってpH 7に、かつ温度50 に調節される。下記の組成に相当する培地が使用される：

グルコース	計算すべき
酵母抽出物 / 蛋白質加水分解物	計算すべき
NH_4Cl	3 g / l
KH_2PO_4	3 g / l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.4 g / l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 ml / l
トウイーン80	5 g / l

グルコースおよび増殖因子の濃度は、必要な細胞濃度の関数である。発酵の終りのバイオマス中の濃度を概算するために、下記の関係が使用され得る：

$$1/X = 2.07/F + 3.78/G$$

・ Xはg / lで表される細胞濃度である（1リットル当たりの細胞の乾量）。

・ Gはg / lで表されるグルコース濃度である。

・ Fは50%酵母抽出物と50%蛋白質加水分解物（例えばトリプシンによって加水分解 50

されたカゼイン)とから成る混合物中に含まれる増殖因子を表す。F は g / l で表される混合物の濃度である。

上記の関係は、それぞれ $5 \sim 60 \text{ g} / \text{l}$ および $1 \sim 30 \text{ g} / \text{l}$ の範囲にある、グルコースおよび増殖因子の濃度範囲について証明された。

一例として、 7.6 g の細胞(乾量)を得るために、 60 g のグルコースおよび 30 g の増殖因子が使用される。上記の操作条件下、発酵は約 $7 \sim 9$ 時間続き、乳酸の最終濃度は、約 40 重量%の最終産物を表し、細胞の生産性は $1 \text{ g} / \text{l} \cdot \text{h}$ である。

2. 交換される培地中

培養は $\text{pH} 7$ および温度 50 に調節される。発酵槽には、増殖因子(F)およびグルコースの濃度が、必要な細胞濃度に依存する、上記の培地が連続的に供給される。バイオマスを生産するために、増殖を制限する栄養因子としてのエネルギー源(グルコースあるいは他の炭水化物)と共に、 1 h^{-1} の希釈レベルを選択することが望ましい。グルコースをエネルギー源として使用すれば、約 0.75 のグルコース/F比を選択することが適切であろう。増殖因子(F)およびグルコースの濃度を計算するために、下記の2つの特定された必要条件が使用される。

$$q_F = 6.6 \text{ g} / \text{g} \cdot \text{h}$$

$$q_G = 3.5 \text{ g} / \text{g} \cdot \text{h}$$

・ q_F は増殖因子の特定の必要条件であり、細胞 1 g (乾量) および 1 時間当たりの g 数で表される。

・ q_G はグルコースの特定の必要条件であり、細胞 1 g (乾量) 当たりのグルコースの g 数で表される。

一例として、グルコースおよび増殖因子の濃度がそれぞれ $20 \text{ g} / \text{l}$ および $40 \text{ g} / \text{l}$ である培地を使用し、希釈レベルを 1 h^{-1} (1時間の水保持時間)に固定すれば、発酵槽1リットルおよび1時間当たり 6 g の細胞の生産性を伴う、細胞濃度が $6 \text{ g} / \text{l}$ (乾量)である発酵液が得られる。これらの条件下、発酵液は、乳酸約 $2.5 \text{ g} / \text{l}$ 、酢酸 $5.5 \text{ g} / \text{l}$ 、エタノール $4.2 \text{ g} / \text{l}$ およびギ酸 $8.4 \text{ g} / \text{l}$ を含有する。

2 - 乳酸の生産

交換される培地中

培養は $\text{pH} 6$ および温度 50 に調節される。発酵槽には、増殖因子(F)およびグルコースの濃度が、必要な細胞濃度に依存する培地が連続的に供給される。乳酸を生産するために、制限栄養素としての増殖因子(F)と共に、 0.4 h^{-1} の希釈レベルを選択することが望ましい。グルコースをエネルギー源として使用すれば、約 2 のグルコース/F比を選択することが適切である。増殖因子(F)およびグルコースの濃度を計算するために、下記の2つの特定の必要条件が使用される。

$$q_F = 2.5 \text{ g} / \text{g} \cdot \text{h}$$

$$q_G = 5 \text{ g} / \text{g} \cdot \text{h}$$

・ q_F は増殖因子の特定の必要条件であり、細胞 1 g (乾量) および 1 時間当たりの g 数(50%酵母抽出物と50%カゼイン加水分解物(トリプシンによって加水分解されたカゼイン)とから成る混合物)で表される。

・ q_G はグルコースの特定の必要条件であり、細胞 1 g (乾量) 当たりのグルコースの g 数で表される。

乳酸濃度を計算するために、消費されるグルコースに関して80%程度の収率が使用されるであろう。

一例として、グルコースおよび増殖因子の濃度がそれぞれ $63 \text{ g} / \text{l}$ および $31 \text{ g} / \text{l}$ である培地を使用し、希釈レベルを 0.4 h^{-1} (2.5時間の水保持時間)に固定すれば、細胞濃度が $5 \text{ g} / \text{l}$ (乾量)であり、乳酸濃度が $50 \text{ g} / \text{l}$ である発酵液が得られる。これらの条件下、乳酸の生産性は、発酵槽1リットルおよび1時間当たり 20 g である。

参考文献目録

(1) Hungate et al., J.R. Norris and D.W. Ribbons (ed.), Methods in Microbiology. Academic Press, New York, 1969, Vol. 3B, p. 117-132.

10

20

30

40

50

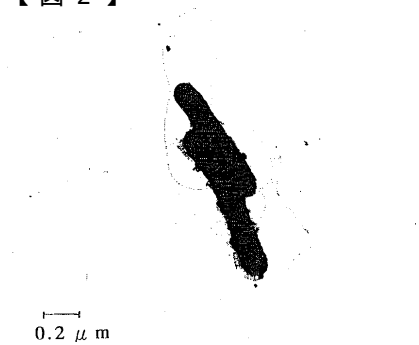
(2) Macy et al., *Amer. J. Clin. Nutr.*, 26, 1318-1323 (1972)

(3) Meshbah et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 159-167 (1989) .

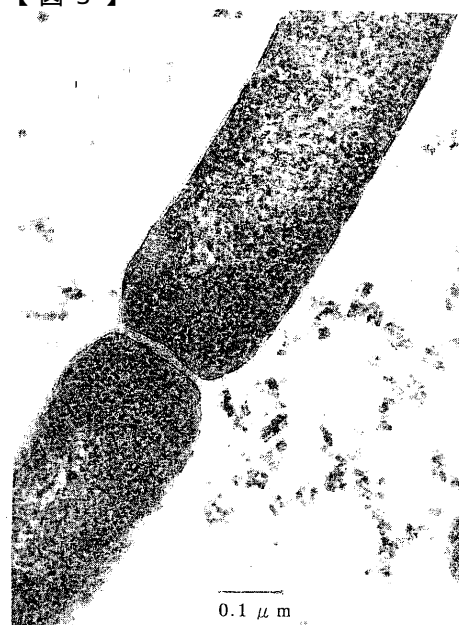
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 P 7/56 (2006.01) C 1 2 P 7/56
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 コンベ ブラン ヤニック
 フランス国 マルセイユ 1 3 0 0 5 リュ ドゥ ロリヴィエ 6 2
 (72)発明者 オリヴィエ ベルナル
 フランス国 ロクヴェール 1 3 3 6 0 カルチェ ヴァルクロ (番地なし)

(72)発明者 ガルシャ ジャン ルイ
 フランス国 エク サーン プロヴァーンス 1 3 0 9 0 レジダーンズ ラ フィジエール エ
 フ 4 (番地なし)

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 特開昭 5 9 - 1 0 6 2 9 1 (J P , A)
 特開平 0 1 - 2 4 0 1 8 7 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 1/20
 C12P 7/06
 C12P 7/40
 C12P 7/54
 C12P 7/56
 C12N 15/09
 BIOSIS/WPI (DIALOG)