

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5248139号
(P5248139)

(45) 発行日 平成25年7月31日 (2013. 7. 31)

(24) 登録日 平成25年4月19日 (2013. 4. 19)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 1/20 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 R 1/01 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20 A
	C 1 2 R 1:01

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2008-45183 (P2008-45183)	(73) 特許権者	000005902
(22) 出願日	平成20年2月26日 (2008. 2. 26)		三井造船株式会社
(65) 公開番号	特開2009-201387 (P2009-201387A)		東京都中央区築地5丁目6番4号
(43) 公開日	平成21年9月10日 (2009. 9. 10)	(73) 特許権者	504145342
審査請求日	平成22年9月30日 (2010. 9. 30)		国立大学法人九州大学
微生物の受託番号	NPMD NITE P-471		福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
		(74) 代理人	100101340
			弁理士 丸山 英一
		(72) 発明者	遠山 正幸
			千葉県市原市八幡海岸通1番地 三井造船
			株式会社 千葉事業所内
		(72) 発明者	高岡 一栄
			千葉県市原市八幡海岸通1番地 三井造船
			株式会社 千葉事業所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規微生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一酸化炭素、または二酸化炭素と水素からなる合成ガスを基質として導入し、嫌気的環境下で、エタノール生成能を有する、*Veillonella* sp. Strain G 1 1 (寄託番号 N I T E P - 4 7 1) として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されている新規微生物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規な微生物に関し、詳しくは一酸化炭素、または二酸化炭素と水素を基質として、エタノールを生成する能力を有する新種の微生物に関する。

【背景技術】

【0002】

温暖化対策や、化石燃料の消費抑制のため、新たなエネルギーに関する研究が進められている。

【0003】

産業廃ガスや木質系バイオマスのガス化・改質にともなって排出されるガスに含まれる気体状の二酸化炭素や一酸化炭素などを原料として、微生物による発酵を行い、酢酸やエタノールなどの有用物を回収する技術がある。

【0004】

10

20

特に、エタノールは近年、燃料としての需要が高まっており、有用物としての価値が高い。さらに、二酸化炭素は温暖化ガスのひとつであるので、二酸化炭素を炭素源として利用できる菌が得られれば、温暖化ガスの削減効果が期待できる。

【特許文献１】特開平１－９８４７２号公報 アセトバクテリウム (*Acetobacterium*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属

【特許文献２】米国特許第５１７３４２９号明細書 クロストリジウム (*Clostridium*) 属

【特許文献３】特表２００２－５４３７９３号公報 クロストリジウム (*Clostridium*) 属

【特許文献４】特開２００３－３３９３７１号公報 クロストリジウム (*Clostridium*) 属又はその派生属

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

二酸化炭素や一酸化炭素を基質として酢酸やエタノールなどの有用物を生産する微生物としては、主にクロストリジウム属菌が知られているに過ぎなかった（特許文献１～４）。

【０００６】

本発明者らは、微生物の単離とスクリーニングを重ね、二酸化炭素や一酸化炭素を基質として、エタノールを生成する能力を有する微生物を選抜し、本発明を完成させるに至った。

20

【０００７】

すなわち、本発明の課題は、エタノールを生成する能力を有する新規微生物を提供することにある。

【０００８】

本発明の他の課題は以下の記載によって明らかになる。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

上記課題は以下の各発明によって解決される。

【００１０】

30

（請求項１）

一酸化炭素、または二酸化炭素と水素からなる合成ガスを基質として導入し、嫌気的環境下で、エタノール生成能を有する、*Veillonella* sp. Strain G11（寄託番号NITE P-471）として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されている新規微生物。

【発明の効果】

【００１２】

本発明によれば、エタノール生成能を有する新規微生物を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１３】

40

以下、本発明の実施の形態を説明する。

【００１４】

本発明のバイロネラ (*Veillonella*) 属に属する新規微生物は、以下、必要に応じて「本菌株」と称する。

【００１５】

本菌株は、福岡市下水処理場のメタン発酵処理分画より単離した菌株であり、二酸化炭素や一酸化炭素を基質として酢酸の他にエタノールを生成する能力を持つ、バイロネラ (*Veillonella*) 属に属する新種である。

【００１６】

本菌株は、*Veillonella* sp. Strain G11（寄託番号NITE

50

E P - 471)として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されており、以下のような性質を有する。なお、+は陽性又は有を示し、-は陰性又は無を示している。

【0017】

A. 形態的性質

- (1) 細胞の形及び大きさ：約0.3 μmの球菌
- (2) 運動性の有無：-
- (3) 胞子の有無：-

【0018】

B. 培養的性質

10

- (1) *Clostridium ljungdahlii* (CL) 培地寒天平板培養 (1)

37℃、培養日数2日で直径1~2mmの円形のコロニーを形成する

i) 色：白色

ii) 表面の形状：スムーズ

iii) 透明度：半透明

iv) 変異によるコロニー形態の変化：-

v) 培養条件や生理的状态によるコロニー形態の変化：-

- 1 *C. ljungdahlii* 培地の培地組成を下記に示す。

NH ₄ Cl	1.00 g	20
KCl	0.10 g	
MgSO ₄	0.20 g	
NaCl	0.80 g	
KH ₂ PO ₄	0.10 g	
CaCl ₂	0.02 g	
Na ₂ WO ₄	0.20 mg	
Yeast Extract	1.00 g	
NaHCO ₃	1.00 g	
Fructose	5.00 g	
Cysteine-HCl	0.30 g	30
Na ₂ S	0.30 g	
Trace element solution (I)	10 ml	
Vitamin solution (II)	10 ml	
Distilled water	1000 ml	
Agar	15 g	
pH	5.9	

なお、上記の(I) Trace element solution及び(II) Vitamin solutionは以下の組成である。

(I) Trace element solution

Nitrilotriacetic acid	1.5 g	40
MgSO ₄	3.0 g	
MnSO ₄	0.5 g	
NaCl	1.0 g	
FeSO ₄	0.1 g	
CoSO ₄	0.18 g	
CaCl ₂	0.1 g	
ZnSO ₄	0.18 g	
CuSO ₄	0.01 g	
KAl(SO ₄) ₂	0.02 g	
H ₃ BO ₃	0.01 g	50

Na ₂ MoO ₄	0.01 g	
NiCl ₂	0.025 g	
Na ₂ SeO ₃	0.3 mg	
Distilled water	1000 ml	
(II) Vitamin solution		
Biotin	2.0 mg	
Folic acid	2.0 mg	
Pyridoxine - HCl	10 mg	
Thiamine - HCl	5.0 mg	
Riboflavin	5.0 mg	10
Nicotinic acid	5.0 mg	
D - Ca - pantothenate	5.0 mg	
Vitamin B ₁₂	0.1 mg	
P - Aminobenzoic acid	5.0 mg	
Lipoic acid	5.0 mg	
Distilled water	1000 ml	
(2) ゼラチン穿刺培養		
i) ゼラチン液化: -		
(3) リトマス・ミルク		
i) 反応: リトマス還元		20
ii) 凝固: +		
(4) B.C.P. ミルク		
i) 反応: アルカリ性		
【0019】		
C. 生理学的性質		
(1) グラム染色性: -		
(2) 硝酸塩の還元: +		
(3) インドールの生成: -		
(4) 硫化水素の生成: -		
(5) デンプンの加水分解: -		30
(6) ウレアーゼ: -		
(7) カタラーゼ: -		
(8) 生育の範囲		
i) 至適 pH: 7.2		
ii) 温度: 20 ~ 42 で良好に生育		
(9) 酸素に対する態度: 偏性嫌気性		
(10) O - F テスト: 酸化型		
(11) 糖類からの酸及びガスの生成		
i) L - アラビノース: 酸 (-) / ガス (-)		
ii) D - キシロース: 酸 (-) / ガス (-)		40
iii) グルコース: 酸 (+) / ガス (-)		
iv) D - マンノース: 酸 (-) / ガス (-)		
v) フラクトース: 酸 (+) / ガス (-)		
vi) マルトース: 酸 (-) / ガス (-)		
vii) ラクトース: 酸 (-) / ガス (-)		
viii) D - トレハロース: 酸 (-) / ガス (-)		
ix) D - ソルビトール: 酸 (-) / ガス (-)		
x) D - マンニトール: 酸 (-) / ガス (-)		
xi) グリセリン: 酸 (-) / ガス (-)		
xii) D - セロビオース: 酸 (-) / ガス (-)		50

x i i i) エスクリン：酸 (-) / ガス (-)
 x i v) サリシン：酸 (-) / ガス (-)
 x v) D - メレチトース：酸 (-) / ガス (-)
 x v i) D - ラフィノース：酸 (-) / ガス (-)
 x v i i) L - ラムノース：酸 (+) / ガス (-)

【 0 0 2 0 】

D . 酵素反応

i) アルギニンジヒドロラーゼ： +
 i i) - ガラクトシダーゼ： -
 i i i) - ガラクトシダーゼ： -
 i v) - ガラクトシダーゼ - 6 - フォスフェート： -
 v) - グルコシダーゼ： -
 v i) - グルコシダーゼ： -
 v i i) - アラピノシダーゼ： -
 v i i i) N - アセチル - - グルコサミニダーゼ： -
 i x) グルタミン酸デカルボキシラーゼ： -
 x) - フッコシダーゼ： -
 x i) アルカリフォスファターゼ： -
 x i i) アルギニンアリルアミダーゼ： -
 x i i i) p - プロリンアリルアミダーゼ： -
 x i v) ロイシルグリシンアリルアミダーゼ： -
 x v) フェニルアラニンアリルアミダーゼ： -
 x v i) ロイシンアリルアミダーゼ： -
 x v i i) ピログルタミン酸アリルアミダーゼ： -
 x v i i i) チロシンアリルアミダーゼ： -
 x i x) アラニンアリルアミダーゼ： -
 x x) グリシンアリルアミダーゼ： -
 x x i) ヒスチジンアリルアミダーゼ： -
 x x i i) グルタミルグルタミン酸アリルアミダーゼ： -
 x x i i i) セリンアリルアミダーゼ： -

10

20

30

【 0 0 2 1 】

E . 1 6 S r D N A の塩基配列に基づく分子系統解析

1 6 S r D N A の塩基配列を決定し、DNA データベース (D D B J) にアクセスし、B R A S T プログラムを用いて 1 6 S r D N A の塩基配列の相同性検索を行った結果、いずれの *V e i l l o n e l l a* 属細菌とも 1 6 S r D N A の相同性が 9 7 % 未満であった。

【 0 0 2 2 】

F . 分類・同定の結果

本菌株の表現形質による分類学的性質に基づき、B e r g e y ' s M a n u a l o f S y s t e m a t i c B a c t e r i o l o g y , V o l . 1 , N . R . K r i e g , J . G . H o l t (e d) , W i l l i a m s & W i l k i n s , B a l t i m o r e (1 9 8 4) および B e r g e y ' s M a n u a l o f D e t e r m i n a t e B a c t e r i o l o g y (9 t h e d .) , J . G . H o l t , N . R . K r i e g , P . H . A . S n e a t h , J . T . S t a l e y , S . T . W i l l i a m s (e d) , W i l l i a m s & W i l k i n s , B a l t i m o r e (1 9 9 4) を参考に分類・同定を行った結果、本菌株は *V e i l l o n e l l a* 属と同定された。

40

【 0 0 2 3 】

V e i l l o n e l l a 属には基準種 *V . p a r v u l a* の他に、*V . a t y p i c a*、*V . d i s a p a r*、*V . c r i c e t i*、*V . r a t t i* などが知られている。知られている *V e i l l o n e l l a* 属菌は、*V . c r i c e t i* にのみフルクトース発酵能

50

があるが、一般的には糖類を発酵することなく、ピルビン酸や乳酸などの有機酸の発酵能を有するのみである。

【0024】

一方、本菌株は、フルクトースで生育可能（発酵能有）であり、さらにグルコースに対しても発酵能を有する点で他の *Veillonella* 属菌と分類学的に異なる。

【0025】

また、一般に、16S rDNA の塩基配列に基づく分子系統解析では、相同性が 95 % 以上であれば同属、97 % 以上であれば類縁関係があり、99 % 以上であれば同種とみなすことができるとされている。

【0026】

本菌株の 16S rDNA の結果では、他の *Veillonella* 属の菌との相同性は 97 % 未満であったので、公知の *Veillonella* 属菌株とは別の種であることが示された。

【0027】

本菌株は、グルコース、フラクトースから酢酸の他にエタノールを生成するほか、一酸化炭素、または二酸化炭素と水素を基質として、酢酸の他にエタノールを生成することを特徴とする。

【0028】

本菌株を用いて、エタノールを生産する方法は、特に限定されない。

【0029】

一酸化炭素、または二酸化炭素と水素を基質として、エタノールを生産する方法としては、嫌気状態で、微生物に一酸化炭素、または二酸化炭素と水素からなる合成ガスを供給して行う方法が挙げられる。

【0030】

エタノール生成機構は以下の通りである。

【0031】

図 1 は本菌株が備えていると考えられているエタノール生成経路の模式図である。

【0032】

この経路をもつ多くの微生物は、アセチル CoA から、酢酸または細胞を形成する有機物を生成するのみであるが、本菌株は、酢酸の他にエタノールも生成することができる。

【実施例】

【0033】

以下に本発明の実施例を説明するが、本発明はかかる実施例によって限定されない。

【0034】

実施例 1

本菌株によるエタノール生成能を確認した。

【0035】

まず、本菌株を接種した滅菌済 CL 培地 20 ml を 50 ml 耐圧バイアルに入れ CO / CO₂ ガス (CO : CO₂ = 8 : 2) を封入し、150 rpm で振とうしながら 37 °C で 24 ~ 48 時間培養し、培養液を作製した。

【0036】

培養液を、図 2 に示す実験装置（発酵槽の実効体積 1 L）に加圧状態のまま移し、CO / CO₂ ガスを再封入した。pH を 7.0、温度 37 °C、攪拌を 100 rpm とし、CO / CO₂ ガス循環が 0.1 vvm の条件で 3 日間エタノール生成実験を行った。

【0037】

微生物の細胞 1 g につき、1 日あたり 0.46 g のエタノールを得ることができた。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図 1】エタノール生成経路の模式図

【図 2】実施例に用いたエタノール生産を行う装置を示す図

10

20

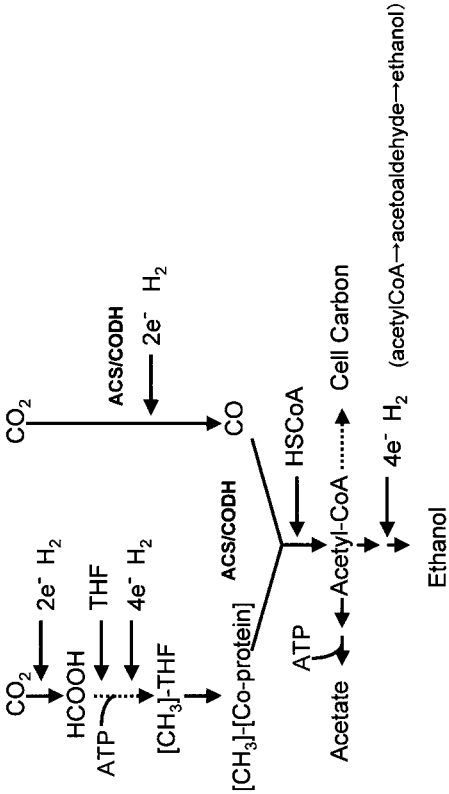
30

40

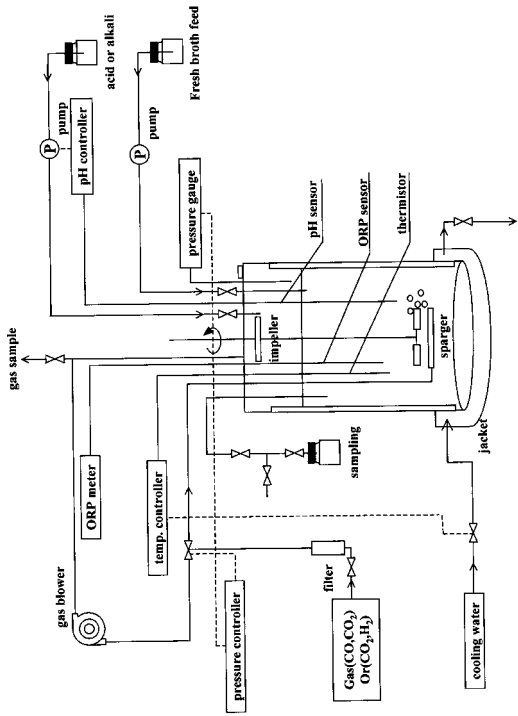
50

【 図 1 】

CO/CO₂、CO₂/H₂ (synthetic gas) からの酢酸、エタノールの生成



【 図 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 吉野 貞蔵

福岡県福岡市東区箱崎六丁目 10 番 1 号 国立大学法人九州大学内

審査官 幸田 俊希

(56)参考文献 特開平 01 - 098472 (JP, A)

特表 2002 - 543793 (JP, A)

特開 2003 - 339371 (JP, A)

米国特許第 05173429 (US, A)

遠山正幸ら, 合成ガスを原料とするエタノール製造技術の開発。 , 三井造船技報 , 2009年
6月, Vol.197, pp.23-8

SAKAI, S. et al. , Acetate and Ethanol Production from H₂ and CO₂ by *Moorella* sp. Using
a Repeated Batch Culture. , J. Biosci. Bioeng. , 2005年 4月 9日, Vol.99, No.3, p
p.252-8

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 1/00

PubMed

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)