(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 7 月 3 日(03.07.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/104318 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 19/04 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/085163

(22) 国際出願日: 2013 年 12 月 27 日(27.12.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-289043 2012 年 12 月 28 日(28.12.2012) JP

(71) 出願人: 日本甜菜製糖株式会社(NIPPON BEET SUGAR MANUFACTURING., CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1080073 東京都港区三田三丁目１２番１４号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(71) 出願人 : 田島 健次(TAJIMA Kenji) [JP/JP]; 〒0608628 北海道札幌市北区北１３条西８丁目 国立大学法人北海道大学 大学院工学研究院内 Hokkaido (JP). 小瀬 亮太(KOSE Ryota) [JP/JP]; 〒1838509 東京都府中市幸町３－５－８ 国立大学法人東京農工大学 大学院農学研究院内 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 櫻井 博章(SAKURAI Hiroaki); 〒0800831 北海道帯広市稲田町南９線西１３番地 日本甜菜製糖株式会社 総合研究所内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 佐川 慎悟, 外(SAGAWA Shingo et al.); 〒0600042 北海道札幌市中央区大通西５丁目１１番１号 電通恒産札幌ビル３階 佐川慎悟国際特許事務所 Hokkaido (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

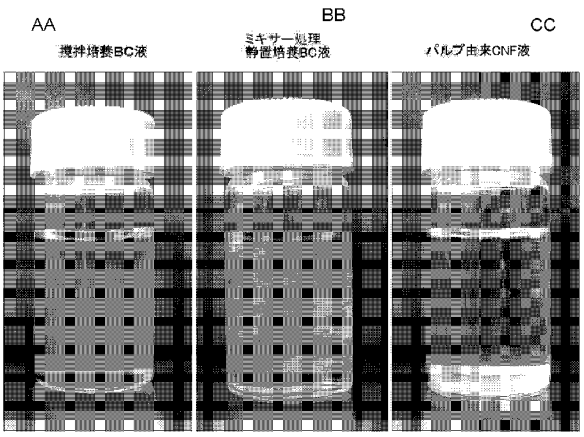
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[続葉有]

(54) **Title**: BACTERIAL CELLULOSE AND BACTERIUM PRODUCING SAME

(54) 発明の名称 : バクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌

[図5]



AA Liquid containing BC obtained by agitation culture
BB Mixer-treated liquid containing BC obtained by stationary culture
CC Liquid containing CNF originating in pulp

(57) **Abstract**: [Problem] To provide a bacterial cellulose which is highly dispersible in a liquid, shows excellent molding properties and high miscibility with other materials when applied to materials, and, therefore, has a high applicability as a practical material, and a bacterium which produces the bacterial cellulose. [Solution] A bacterial cellulose, water that contains said bacterial cellulose at a final concentration of 0.1±0.006 (w/w) showing a light transmittance at a wavelength of 500 nm of 35% or greater, and a bacterium producing the bacterial cellulose. According to the present invention, the bacterial cellulose that is uniformly dispersible in a liquid such as water can be obtained. The bacterial cellulose shows excellent molding properties and high miscibility with other materials and, therefore, can contribute to the improvement in the qualities of a final product or production efficiency thereof or to the reduction of production cost.

(57) 要約: 【課題】 液体中での分散性が高く、材料応用する上での成形性や他の材料との混合性もよく、実用材料としての応用性に優れたバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌に提供する。 【解決手段】 終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率が３５％以上であるバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌。本発明によれば、水などの液体中に均一に分散するバクテリアセルロースを得ることができ、係るバクテリアセルロースは成形性や他の物質との混合性に優れることから、最終製品の品質や生産効率の向上あるいは生産コストの低減に寄与することができる。

WO 2014/104318 A1

NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示（規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： バクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌

技術分野

[0001] 本発明は、バクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌に関し、特に液体中での分散性に優れたバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌に関する。

背景技術

[0002] バクテリアセルロースは、一般に、幅約５０ｎｍの微細な繊維（ナノファイバー）からなり、高い機械的強度や生体適合性、生分解性などの特性を有することから、様々な産業分野で活用しうる素材として注目されている。バクテリアセルロースは、一般的に酢酸菌などの細菌を静置培養することにより培地表面にゲル状物質からなる膜（以下、「ゲル状膜」という。）として得られるが、このゲル状膜は材料応用する上で成形性や他の物質との混合性が乏しく、また生産効率が低いためコスト高になることから、実用材料としての応用性に乏しいといった問題がある。

[0003] このような問題に対し、ゲル状膜ではなく、材料としての応用性に優れた、液体中に分散するバクテリアセルロースが望まれている。例えば、非特許文献１には、Ａｃｅｔｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ｓｕｂｓｐ．ｓｕｃｒｏｆｅｒｍｅｎｔａｎｓを通気撹拌培養することにより得られるバクテリアセルロースが開示されており、また非特許文献２には、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ＪＣＭ１０１５０株をカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）が添加された培地中で回転振とう培養することにより得られるバクテリアセルロースが開示されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：吉永ら、化学と生物、Ｖｏｌ．３５、Ｎｏ．１１、第７～１４頁、１９９７年

非特許文献2：Ｓ．Ｗａｒａｓｈｉｎａら、セルロース学会代１７回年次大会　２０１０　ｃｅｌｌｕｌｏｓｅ　Ｒ＆Ｄ 講演要旨集、第９８頁、２０１０年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、非特許文献１に記載のバクテリアセルロースは、バクテリアセルロースの分散性の向上効果を有するＣＭＣを添加した培地を用いて生産されたものでないこと、および、水中で「小さな粒状または繊維状」に分散（同文献；第９頁右欄）しているとの記載からも明らかなように、水中での分散性が高いものではない。よって、実用化のための成形性や他の物質との混合性の点で不十分である。また、非特許文献２に記載のバクテリアセルロースは、ＣＭＣの培地への添加量が０．５％、１％、２％であるところ、いずれの場合も当該バクテリアセルロースを含む水は上部より下部の方が白濁性が高くて沈殿が観察されること、および、セルロースの粒が視認できるほど大きいことから（同文献；Ｆｉｇ．１）、水中での分散性が高いものではない。よって、実用化に必要な成形性や他の物質との混合性の点で不十分である。

[0006] 従って、非特許文献１および非特許文献２のいずれに記載のバクテリアセルロースも、材料としての成形性や他の材料との混合性が不十分であり、材料の生産効率の点においても実用性に乏しい。

[0007] 本発明は、このような問題点を解決するためになされたものであって、液体中での分散性が高く、実用化する上での成形性や他の材料との混合性もよく、実用材料としての応用性に優れたバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意研究の結果、植物油からバイオディーゼル燃料を製造する際に生じるグリセロールを含有する副産物（Ｂｉｏ Ｄｉｅｓｅｌ Ｆｕｅｌ Ｂｙ－ｐｒｏｄｕｃｔ；ＢＤＦ－Ｂ、廃グリセリン）や試薬グリセロールあるいは糖蜜を炭素源として、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎ

ｔｅｒｍｅｄｉｕｓの新規な菌株であるＳＩＩＤ９５８７株（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）（以下、「ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）」という場合がある。）を、ＣＭＣを含む培地で撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースが、水中で高い分散性を有することを見出し、下記の各発明を完成した。

[0009] （１）本発明に係るバクテリアセルロースは、終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率が３５％以上の物性を有している。

[0010] （２）本発明に係るバクテリアセルロースは、さらに下記ｉ）～ｖｉ）の条件下で行うゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムのピークトップの保持容量が２．５ｍＬ以上３．０ｍＬ未満である物性を有している。

ｉ）カラム；粒子径９μｍのメタクリレートポリマーを充填した内径６．０ｍｍおよび長さ１５ｃｍのカラム、ｉｉ）ガードカラム；内径４．６ｍｍ、長さ３．５ｃｍ、ｉｉｉ）カラム温度；３５℃、ｉｖ）送液速度；０．０７ｍＬ／分、ｖ）溶離液；４０～４２％（ｗ／ｗ）水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液、ｖｉ）溶離液におけるバクテリアセルロースの終濃度；０．２％（ｗ／ｗ）。

[0011] （３）本発明に係るバクテリアセルロースは、ＢＤＦ－Ｂを資化して生産されることが望ましい。

[0012] （４）本発明に係るバクテリアセルロースは、砂糖、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物およびこれらの加水分解物ならびに異性化糖からなる群から選択される１または２以上を資化して生産されることが望ましい。

[0013] （５）本発明に係るバクテリアセルロースが、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物を資化して生産される場合は、前記副産物は糖蜜であることが望ましい。

[0014] （６）本発明に係るバクテリアセルロースは、グルコンアセトバクター インターメディウス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉ

ｕｓ）により生産されたものであってもよい。

[0015] （７）本発明に係るバクテリアセルロースは、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）により生産されたものであってもよい。

[0016] （８）本発明に係る細菌は、前記（１）～（５）のいずれかに記載のバクテリアセルロースを生産することを特徴としている。

[0017] （９）本発明に係る細菌は、前記（１）～（５）のいずれかに記載のバクテリアセルロースを生産するＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）であってもよい。

発明の効果

[0018] 本発明に係るバクテリアセルロースによれば、水などの液体中にほぼ均一に分散するバクテリアセルロースを得ることができ、このバクテリアセルロースは成形性や他の物質との混合性に優れていることから、最終製品の品質や生産効率の向上あるいは生産コストの低減に寄与することができる。また、本発明によれば、ミキサーによる微細化などの工程を必要とせず、緩和な条件下での精製により、液体中にほぼ均一に分散するバクテリアセルロースを得ることができ、比較的大きな平均分子量を有するバクテリアセルロースを得ることができる。さらに、本発明によれば、炭素源としてＢＤＦ－Ｂや糖蜜などの砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物を用いることにより、資源の有効活用に寄与するとともに、バクテリアセルロースの低価格化を達成することができる。さらにまた、本発明によれば、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓあるいはＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）を用いて生産することにより、効率よく大量のバクテリアセルロースを得ることができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]ＢＤＦ－Ｂを資化してバクテリアセルロースを生産する細菌を単離する手順を示す図である。図中、バクテリアセルロースはＢＣと略記する。

[図2-1]ＳＩＩＤ９５８７株とＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列の一致点および相違点を示す図である。図中、塩基配列の一致点を＊印で、相違点を四角の囲みでそれぞれ示す。また、図中、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓはＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株を示す。

[図2-2]ＳＩＩＤ９５８７株とＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列の一致点および相違点を示す図である。図中、塩基配列の一致点を＊印で、相違点を四角の囲みでそれぞれ示す。また、図中、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓはＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株を示す。

[図3]ＳＩＩＤ９５８７株の菌学的性状を示す図である。

[図4]ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を静置培養することにより得られたバクテリアセルロース（上段図）、ならびに、ＢＤＦ－Ｂおよび試薬グリセロールを炭素源として通気撹拌培養することにより得られた生産物（中段図および下段図）のＩＲスペクトルを示す図である。

[図5]ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を通気撹拌培養および静置培養することにより得られたバクテリアセルロース（左図および中央図）、ならびに、パルプ由来バクテリアセルロースナノファイバー（右図）をそれぞれ含む水の外観を示す図である。

[図6]糖蜜および試薬グリセロールをそれぞれ炭素源として、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を通気撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率ならびにバクテリアセルロースの生産量（ＢＣ生産量）および生産速度（ＢＣ生産速度）を示す図である。

[図7]ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）、ならびに既知のバクテリアセルロース生産菌であるＧ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇ

．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＪＣＭ１０１５０株、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＤＳＭ１１８０４株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＫＣＣＭ４０２７４株を通気撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率、ならびにＢＣ生産量、ＢＣ生産速度およびＢＣ生産速度の比率を示す図である。

[図8]ＢＤＦ－Ｂを炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を旋回培養することにより得られたバクテリアセルロース（サンプルＢ）、パルプ由来セルロースナノファイバー（パルプ由来ＣＮＦ液）およびプルランのゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す図である。

[図9]ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を、通気撹拌培養（撹拌培養ＢＣ液）および静置培養（ミキサー処理静置培養ＢＣ液）することにより得られたバクテリアセルロースの繊維幅および透過型電子顕微鏡による観察画像を示す図である。

[図10]ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を通気撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロース（撹拌培養ＢＣ液）およびパルプ由来セルロースナノファイバー（パルプ由来ＣＮＦ液）の透過型電子顕微鏡による観察画像を示す図である。

[図11]ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を通気撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロース（撹拌培養ＢＣ液）およびパルプ由来セルロースナノファイバー（パルプ由来ＣＮＦ液）の偏光顕微鏡による観察画像を示す図である。

[図12]ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）ならびに既知のバクテリアセルロース生産菌であるＧ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株を、試薬グリセロールまたはＢＤＦ－Ｂを炭素源として静置培養することにより得られた

バクテリアセルロースの重量を示す図である。

[図13]ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）ならびに既知のバクテリアセルロース生産菌であるＡＴＣＣ５３５８２株およびＡＴＣＣ２３７６９株を、試薬グリセロールまたはＢＤＦ－Ｂを炭素源として振とう培養することにより得られたバクテリアセルロースの重量を示す図である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明に係るバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌について詳細に説明する。本発明におけるバクテリアセルロースとは、細菌により生産されたセルロースをいう。

[0021] 本発明において、バクテリアセルロースが水などの液体中に「分散する」とは、バクテリアセルロースが液体中に浮遊あるいは懸濁することをいう。また、分散性が高いとは、分散質としてのバクテリアセルロースの液体中における粒子径や繊維幅が比較的小さいことや、分散質としてのバクテリアセルロースが液体中で比較的均一に浮遊あるいは懸濁していることなどをいう。

[0022] 本発明に係るバクテリアセルロースは液体中にほぼ均一に分散するほど高い分散性を有している。ここで、バクテリアセルロースを分散させる液体は、有機溶媒および水系溶媒のいずれも用いることができるが、水系溶媒が好ましい。

[0023] バクテリアセルロースの分散性の高低は、例えば、光の透過率を指標として測定することができ、光の透過率が大きいほど分散性が高く、光の透過率が小さいほど分散性が低いという関係が成り立つ。光の透過率は、所定の濃度のバクテリアセルロースを含む水を分光光度計に供して所定の波長の光を照射し、透過した光の量を測定することにより求めることができる。

[0024] 本発明に係るバクテリアセルロースは、終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率が３５％以上の物性を有している。ここで、本発明における終濃度０．１±０．

００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率としては、３５％以上のほか、例えば、３６％以上、３７％以上、３８％以上、３９％以上、４０％以上、３５％以上９９％以下、３６％以上９９％以下、３７％以上９９％以下、３８％以上９９％以下、４０％以上９９％以下、３５％以上９５％以下、３６％以上９５％以下、３７％以上９５％以下、３８％以上９５％以下、４０％以上９５％以下、３５％以上９０％以下、３６％以上９０％以下、３７％以上９０％以下、３８％以上９０％以下、４０％以上９０％以下、３５％以上８５％以下、３６％以上８５％以下、３７％以上８５％以下、３８％以上８５％以下、４０％以上８５％以下、３５％以上８０％以下、３６％以上８０％以下、３７％以上８０％以下、３８％以上８０％以下、４０％以上８０％以下などを挙げることができる。

[0025] また、本発明に係るバクテリアセルロースは、パルプ由来セルロースナノファイバーなどの植物由来のセルロースと比較して大きい平均分子量を有していてもよい。セルロースの平均分子量は、例えば、ゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムを指標として測定することができ、係るクロマトグラムのピークトップの保持容量が大きいほど平均分子量が小さく、保持容量が小さいほど平均分子量が大きいという関係が成り立つ。すなわち、本発明に係るバクテリアセルロースは、下記ｉ）～ｖｉ）の条件下で行うゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムのピークトップの保持容量が２．５ｍＬ以上３．０ｍＬ未満である物性を有していてもよい。ｉ）カラムが粒子径９μｍのメタクリレートポリマーを充填した内径６．０ｍｍおよび長さ１５ｃｍであること、ｉｉ）ガードカラムが内径４．６ｍｍ、長さ３．５ｃｍであること、ｉｉｉ）カラム温度が３５℃であること、ｉｖ）送液速度が０．０７ｍＬ／分であること、ｖ）溶離液が４０～４２％（ｗ／ｗ）水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液であること、ｖｉ）溶離液におけるバクテリアセルロースの終濃度が０．２％（ｗ／ｗ）であること。

[0026] また、本発明に係るバクテリアセルロースは、例えば、適当な炭素源を含有する培地中で細菌を培養してバクテリアセルロースを生産させることによ

り製造することができる。

[0027] ここで、炭素源としては、例えば、グルコースやフルクトースなどの単糖、スクロースやマルトース、ラクトースなどの二糖、オリゴ糖、砂糖、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物、これらの加水分解物、異性化糖、澱粉加水分解物などの糖類やマンニトール、エタノール、酢酸、クエン酸、グリセロール、ＢＤＦ－Ｂなどを挙げることができ、細菌の種類や培養条件、製造コストなどにより適宜設定することができる。なお、ＢＤＦ－Ｂは、一般的な組成として、グリセロール４１．５％、脂肪酸２１．４％、メタノール１２．４％、強熱残分６．３％、その他１８．４％（財団法人日本食品分析センター）からなり、細菌の炭素源として利用可能なグリセロールを多く含む組成物である。

[0028] ここで、砂糖とは、スクロースを主成分とする甘味料をいい（広辞苑第６版）、本発明においては、化学合成されたものでもよく、サトウキビや甜菜（砂糖大根）、サトウカエデ、サトウヤシ（オウギヤシ）、スイートソルガム（サトウモロコシ）などの天然物を原料として製造されたものでもよい。本発明における砂糖としては、例えば、黒砂糖や白下糖、カソナード（赤砂糖）、和三盆、メープルシュガーなどの含蜜糖や、粗糖や精製糖などの分蜜糖を挙げることができる。精製糖としては、例えば、白双糖や中双糖、グラニュー糖などのザラメ糖、上白糖や三温糖などの車糖、角砂糖や氷砂糖、粉砂糖、顆粒糖などの加工糖のほか、液糖などを挙げることができる。

[0029] また、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物とは、砂糖の製造工程において生じる副産物のうちスクロースを含有するものをいい、具体的には、例えば、上述のサトウキビや甜菜などの天然物原料の絞りかすや、糖蜜、濾過やイオン交換樹脂による精製工程で生じる残渣を挙げることができる。

[0030] また、二糖やオリゴ糖、砂糖、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物の加水分解物とは、二糖やオリゴ糖、砂糖、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物に対して、酸性溶液中で加熱するなど

の加水分解処理を施して得られる物をいう。

[0031] 炭素源以外の培地の成分は、細菌の培養に用いられる公知の培地と同様のものを用いることができ、ＣＭＣを含有することが好ましい。具体的には、例えば、ＣＭＣ、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミンなどの有機微量栄養素を含有する通常の栄養培地を挙げることができ、窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウムなどのアンモニウム塩、硝酸塩、尿素、ペプトンなどの有機あるいは無機の窒素源を挙げることができる。また、無機塩類としては、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩などを、有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、さらには、これらの栄養素を含むペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆蛋白加水分解物などを挙げることができ、生育にアミノ酸を要求する栄養要求性変異株を用いる場合には、要求される栄養素をさらに補添することができる。

[0032] また、細菌としては、バクテリアセルロースを生産することができる細菌であれば特に限定されないが、撹拌培養や通気培養によりバクテリアセルロースを生産することができる細菌が好ましく、ＢＤＦ－Ｂを資化する細菌がより好ましい。具体的には、例えば、アセトバクター属細菌やグルコンアセトバクター属細菌、シュードモナス属細菌、アグロバクテリウム属細菌、リゾビウム属細菌、エンテロバクター属細菌などを挙げることができ、より具体的には、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓやＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｈａｎｓｅｎｉｉ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｓｗｉｎｇｓｉｉ、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｐａｓｔｅｕｒｉａｎｕｓ、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ａｃｅｔｉ、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ、Ａｃｅｔｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ｓｕｂｓｐ．ｓｕｃｒｏｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ、Ａｃｅｔｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ｓｕｂｓｐ．ｎｏｎａｃｅｔｏｘｉｄａｎｓ、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｒａｎｓｅｎｓ、Ｓａｒｃｉｎａ ｖｅｎｔｒｉｃｕｌｉ、Ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｘｙｌｏｉｄｅｓ、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．などを挙げることが

できるが、これらのうち、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓが好ましい。よりさらに具体的には、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株やＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｓｗｉｎｇｓｉｉ ＢＰＲ３００１Ｅ株、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ＪＣＭ１０１５０株、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．ＣＪＦ－００２株などを挙げることができ、これらのうち、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）が好ましい。

[0033] 培養方法としては、例えば、撹拌培養や通気培養などを挙げることができる。撹拌培養として、具体的には、ファーメンターを用いた通気を行わない培養（無通気撹拌培養）やファーメンターを用いた通気を行う培養（通気攪拌培養）、羽根付きフラスコを用いた左右に揺れる培養（振とう培養）、羽根付きフラスコを用いた回転式培養（旋回培養）などを挙げることができる。また、培養条件は上述の細菌の培養に用いられる公知の培養条件とすることができ、例えば、通気量１～１０Ｌ／分、回転数１００～８００ｒｐｍ、温度２０～４０℃、培養期間１日～７日間の培養条件を挙げることができる。

[0034] また、本発明に係るバクテリアセルロースの製造においては、必要に応じて、炭素源の前処理工程、前々培養工程、前培養工程、バクテリアセルロースの精製、乾燥、懸濁工程などを行うことができる。

[0035] 本発明に係るバクテリアセルロースは、例えば、紙力増強剤や食品の増粘剤、懸濁安定化剤などの添加物として用いることができる。

[0036] 次に、本発明に係る細菌は、前述したバクテリアセルロースを生産するも

のである。本発明に係るバクテリアセルロースを生産する細菌において、上述した本発明に係るバクテリアセルロースと同一または相当する構成については、再度の説明を省略する。

[0037] 以下、本発明に係るバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌について、各実施例について説明する。なお、本発明の技術的範囲は、これらの実施例によって示される特徴に限定されない。

実施例

[0038] ＜実施例１＞細菌の単離および同定

（１）細菌の単離

ＢＤＦ－Ｂを資化してバクテリアセルロースを生産する細菌を単離した。具体的には、図１に示す手順により、まず、リンゴおよびプルーンを分離源として、ヘストリン－シュラム(Ｈｅｓｔｒｉｎ－Ｓｃｈｒａｍｍ)標準培地（組成；ｂａｃｔｏ ｐｅｐｔｏｎ ０．５％（ｗ／ｖ）、ｙｅａｓｔ ｅｘｔｒａｃｔ ０．５％（ｗ／ｖ）、Na_2HPO_4 ０．２７％（ｗ／ｖ）、クエン酸 ０．１１５％（ｗ／ｖ）、グルコース ２％（ｗ／ｖ）；ＨＳ培地）においてグルコースの代わりに２％（ｗ／ｖ）の試薬グリセロール（試薬特級；和光純薬株式会社）を含む培地（ＨＳ／グリセロール培地）を用いて集積培養を行った。これを、セルロース染色試薬を含むＨＳ／グリセロール培地に植菌して３０℃でプレート培養し、バクテリアセルロースを生産する菌株を１５種選択した。続いて、これらの菌株を２％（ｗ／ｖ）の試薬グリセロール（試薬特級；和光純薬株式会社）を含むＬＢ培地（組成；トリプトン １％（ｗ／ｖ）、ｙｅａｓｔ ｅｘｔｒａｃｔ ０．５％（ｗ／ｖ）、塩化ナトリウム ０．５％（ｗ／ｖ））に植菌して３０℃で静置培養し、ゲル状膜を生成させた。ゲル状膜の乾燥重量（以下、「乾燥膜重量」という。）を測定して、乾燥膜重量が大きい菌株を、グリセロールを資化し、かつバクテリアセルロース生産能が高い菌として８種選択した。次に、ＢＤＦ－Ｂを含むＬＢ培地に植菌して３０℃でプレート培養し、さらに、ＨＳ培地に植菌して３０℃で静置培養することによりゲル状膜を生成させた。このうち乾燥膜重量が大

きい菌株を選択して、グリセロールを含むＬＢ培地またはＨＳ／グリセロール培地にてプレート培養した後、ＨＳ培地で静置培養する操作を繰り返し行い、ＢＤＦ－Ｂ資化性を有し、かつバクテリアセルロース生産能が高い菌株を１種選定し、これをＳＩＩＤ９５８７株とした。

[0039] （２）細菌の同定

本実施例１（１）のＳＩＩＤ９５８７株について、常法に従ってシークエンスを行い、全長１６Ｓ ｒＤＮＡの塩基配列（１３６７ｂｐ；配列番号１）を決定した。続いて、株式会社テクノスルガ・ラボにおいて１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列解析および菌学的性状試験を行った。

[0040] ［２－１］１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列解析

１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列解析は、ソフトウェアとしてアポロン２．０（テクノスルガ・ラボ社）を、データベースとしてアポロンＤＢ－ＢＡ ６．０（テクノスルガ・ラボ社）および国際塩基配列データベース（ＧｅｎＢａｎｋ／ＤＤＢＪ／ＥＭＢＬ）を用いて行った。アポロンＤＢ－ＢＡ６．０に対する相同性検索の結果、ＳＩＩＤ９５８７株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列（配列番号１）は、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ属の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に対し高い相同性を示し、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株（アクセッション番号Ｙ１４６９４）の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に対し、相同率９９．８％の最も高い相同性を示した。また、ＧｅｎＢａｎｋ／ＤＤＢＪ／ＥＭＢＬに対する相同性検索の結果においても、ＳＩＩＤ９５８７株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列（配列番号１）は、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ属の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に対し高い相同性を示し、基準株では、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株（アクセッション番号ＮＲ＿０２６４３５）の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に対し、相同率９９．８％の高い相同性を示した。なお、アクセッション番号Ｙ１４６９４の配列とアクセッション番号ＮＲ＿０２６４３５の配列とは、同一である。ＳＩＩＤ９５８７株とＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株（アクセッション番号Ｙ１４６９４、ＮＲ＿０２６４３５）の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列比較の結果を図２－１および図２－２

に示す。図２－１および図２－２に示すように、両者の間には４塩基の相違点があった。また、アポロンＤＢ－ＢＡ６．０に対する相同性検索において、相同性が高かった上位１５株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に基づく簡易分子系統解析の結果、ＳＩＩＤ９５８７株は、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ属の種で形成されるクラスター内に含まれた。

[0041] ［２－２］菌学的性状試験

菌学的性状試験の結果を図３に示す。図３に示すように、ＳＩＩＤ９５８７株は、５％酢酸含有培地で生育しない点で、既知のＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓとは性状が異なり、他の性状は一致した（ＢＲＥＮＮＥＲら、Ｂｅｒｇｅｙ’ｓ ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ．Ｖｏｌ．Ｔｗｏ．Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ，Ｐａｒｔ Ｃ ＴｈｅＡｌｐｈａ－，Ｂｅｔａ－，Ｄｅｌｔａ－，ａｎｄ Ｅｐｓｉｌｏｎｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ．２００５．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ．ｐ７２－７７）。

[0042] 以上の本実施例１（２）［２－１］および［２－２］の結果から、ＳＩＩＤ９５８７株は、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓに帰属することが明らかになった。一方、ＳＩＩＤ９５８７株とＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓの基準株であるＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株との間には、１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列および菌学的性状において上記のとおり相違点が存在することから、ＳＩＩＤ９５８７株は、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓの新規の菌株であることが明らかになった。そこで、この菌株を、平成２４年（２０１２年）１２月２１日に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（ＮＩＴＥ－ＩＰＯＤ；〒２９２－０８１８日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８１２２号室）に受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５として寄託した。以下、このＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）をＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）という。

[0043] （３）生産物の確認

ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）の前培養を行い、菌体を増殖させた。続いて、前培養を行って得られた培養液（前培養液）をＨＳ培地（炭素源；グルコース）に加えて、３０℃で約８日間静置培養することにより本培養を行い、培地表面にゲル状膜を生成させた。ゲル状膜について、常法に従い赤外分光法（ＩＲ）のスペクトルおよびＸ線回折プロファイルを得て解析を行った。その結果、ゲル状膜はＩ型の結晶構造を持つセルロースであることが明らかになった。また、常法に従い、走査型電子顕微鏡画像を得て解析を行った結果、ゲル状膜では、ナノオーダーの幅のセルロース繊維（セルロースナノファイバー）がネットワーク構造を形成していることが明らかとなった。これらの結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）はセルロースを生産することが確認された。

[0044] ＜実施例２＞通気撹拌培養による生産物の評価

（１）通気撹拌培養による生産物の調製

ＢＤＦ－Ｂを中和処理し、さらにオートクレーブ処理を行うことにより、前処理したＢＤＦ－Ｂを得た。

[0045] ２％（ｗ／ｖ）のＣＭＣ（化学用；和光純薬株式会社）を含むＨＳ培地において、炭素源としてグルコースの代わりに試薬グリセロール（試薬特級；和光純薬株式会社）を添加したもの、および、グルコースの代わりに前処理したＢＤＦ－Ｂを濃度が２％（ｗ／ｖ）となるように添加したものを調製して、それぞれをグリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地とした。そして、まずＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）の前培養を行い、菌体を増殖させた。次に、前培養液を５Ｌのグリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地にそれぞれ植菌して、ファーメンターを用いて、通気量 ７～１０Ｌ／分、回転数２００～８００ｒｐｍ、温度３０℃の条件下で通気撹拌培養を４日間行うことにより本培養を行った。本培養を行って得られた培養液（本培養液）に１％（ｗ／ｖ）ＮａＯ

Ｈ水溶液を加えて６０℃、８０ｒｐｍで４～５時間振とうすることにより菌体を溶解した。これを遠心分離に供した後、上清を除去して沈殿物を回収することにより、水溶性の菌体成分を除去した。そこに超純水を加えて遠心分離を行った後、上清を除去する操作を、湿潤状態で沈殿物のｐＨが７以下となるまで繰り返し行うことにより生産物を精製し、これを撹拌培養ＢＣ液とした。

[0046] （２）静置培養によるバクテリアセルロースの調製

実施例１（３）に記載の方法によりゲル状膜を得て、約１ｃｍ×１ｃｍの大きさに裁断した。続いて、１％（ｗ／ｖ）ＮａＯＨ水溶液を加えて６０℃、８０ｓｔｒｏｋｅｓ／分で４～５時間振とうした後、２０℃で一晩振とうした。金網を用いて濾過することにより液体を除去してゲル状膜を回収した。そこに、超純水を加えて、２０℃で一晩振とうする操作を、ｐＨが７以下になるまで繰り返し行うことにより精製した後、ミキサーを用いて数分間懸濁処理し、これをミキサー処理静置培養ＢＣ液とした。

[0047] （３）解析

シリコン板の上に、本実施例２（１）の撹拌培養ＢＣ液および本実施例２（２）のミキサー処理静置培養ＢＣ液をそれぞれ滴下して乾燥させた後、赤外分光光度計（ＦＴ／ＩＲ－４２００；日本分光株式会社）に供して、積算回数３２回、分解能２ｃｍ$^{-1}$または ４ｃｍ$^{-1}$で測定を行い、ＩＲスペクトルを得た。その結果を図４に示す。図４に示すように、ＢＤＦ－Ｂ本培養培地およびグリセロール本培養培地を用いて得られた撹拌培養ＢＣ液のＩＲスペクトルは、ミキサー処理静置培養ＢＣ液のＩＲスペクトルと同様の形状であった。この結果から、ＢＤＦ－Ｂや試薬グリセロールを炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られた生産物は、セルロースであることが確認された。

[0048] ＜実施例３＞バクテリアセルロースの水中での分散性

（１）バクテリアセルロースを含む水の外観

実施例２（１）のＢＤＦ－Ｂ本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液および実

施例２（２）のミキサー処理静置培養ＢＣ液を用意した。また、市販のパルプ由来セルロースナノファイバーを水に添加して分散させ、これをパルプ由来ＣＮＦ液とした。撹拌培養ＢＣ液、ミキサー処理静置培養ＢＣ液およびパルプ由来ＣＮＦ液を１日静置した後、外観を観察した。その結果を図５に示す。

[0049] 図５に示すように、パルプ由来ＣＮＦ液ではセルロースの沈殿が観察された。また、ミキサー処理静置培養ＢＣ液では、塊状のバクテリアセルロースが観察され、バクテリアセルロースの分散状態が不均一であった。これに対して、撹拌培養ＢＣ液では沈殿や塊状のバクテリアセルロースは観察されず、バクテリアセルロースが均一に分散している様子が観察された。これらの結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースは、パルプ由来セルロースナノファイバーやＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を静置培養することにより得られたバクテリアセルロースと比較して分散性が高く、水などの液体中に均一に分散することが明らかになった。

[0050] （２）バクテリアセルロースを含む水の光の透過率

［２－１］静置培養のバクテリアセルロースおよびパルプ由来セルロースとの比較

実施例２（１）に記載の方法において、本培養としてファーメンターに代えて羽根付きフラスコを用いて１５０ｒｐｍ、温度３０℃の条件下で３日間旋回培養を行って撹拌培養ＢＣ液を調製し、これをサンプルＡ（グリセロール本培養培地を用いたもの）およびサンプルＢ（ＢＤＦ－Ｂ本培養培地を用いたもの）とした。また、実施例２（１）のＢＤＦ－Ｂ本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液をサンプルＣ、グリセロール本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液をサンプルＤとした。また、実施例２（２）のミキサー処理静置培養ＢＣ液および実施例３（１）のパルプ由来ＣＮＦ液をそれぞれ用意した。これらのセルロースの終濃度を０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）となるように調

製した後、セルに１ｍＬずつ加えて、分光光度計（Ｕ－２００１形ダブルビーム分光光度計；株式会社日立製作所）に供して波長５００ｎｍの光の透過率を測定した。セルにはポリスチレン製ディスポーザブルキュベット（セミミクロ、光路長１０ｍｍ、光路幅４ｍｍ）を使用し、リファレンスには超純水を使用した。その結果を表１に示す。

[0051] [表1]

	培養方法	炭素源	セルロースの終濃度 (%(w/w))	透過率(%)
サンプルA	撹拌培養(羽根付きフラスコ)	試薬グリセロール	0.10505	74.75
サンプルB	撹拌培養(羽根付きフラスコ)	BDF-B	0.10309	70.53
サンプルC	撹拌培養(ファーメンター)	BDF-B	0.09570	63.82
サンプルD	撹拌培養(ファーメンター)	試薬グリセロール	0.10375	49.66
ミキサー処理静置培養BC液	静置培養	グルコース	0.09964	19.19
パルプ由来CNF液			0.10514	12.72

[0052] 表１に示すように、サンプルＡ、Ｂ、ＣおよびＤの透過率は、それぞれ７４．７５％、７０．５３％、６３．８２％および４９．６６％であり、ミキサー処理静置培養ＢＣ液の１９．１９％およびパルプ由来ＣＮＦ液の１２．７２％と比較して顕著に大きく、概ね４０％以上８０％以下の範囲であった。

[0053] ［２－２］培地中のＣＭＣの有無における比較

実施例２（１）に記載の方法において、２％（ｗ／ｖ）のＣＭＣを含むＨＳ培地とＣＭＣを含まないＨＳ培地とをそれぞれ用いて撹拌培養ＢＣ液を得た。ただし、炭素源としてグルコースの代わりに糖蜜を用いた。また、糖蜜を炭素源とした場合は、本培養３日目で培地中の炭素源がほとんどなくなったため、本培養の日数は、４日間に代えて３日間とした。続いて、本実施例３（２）［２－１］に記載の方法により、バクテリアセルロースを含む水の光の透過率を測定した。その結果を下記の表２に示す。

[0054] [表2]

培地中のCMC	培養方法	炭素源	透過率(%)
含む	撹拌培養	糖蜜	57
含まない	撹拌培養	糖蜜	18

[0055] 表２に示すように、ＣＭＣを含むＨＳ培地を用いた場合の透過率は５７％

であったのに対して、ＣＭＣを含まないＨＳ培地を用いた場合の透過率は１８％であった。

[0056] 以上の本実施例３（２）［２－１］および［２－２］の結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）をＣＭＣを含む培地で撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースを、終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）で含む水の波長５００ｎｍの光の透過率は、４０％以上８０％以下であることが明らかになった。すなわち、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）をＣＭＣを含む培地で撹拌培養することにより、液体中での分散性が顕著に高く、液体中に均一に分散するバクテリアセルロースが得られることが明らかになった。

[0057] ＜実施例４＞炭素源が異なる場合の透過率およびバクテリアセルロースの生産速度の比較

実施例２（１）に記載の方法により撹拌培養ＢＣ液を得た。ただし、炭素源としてグルコースの代わりに糖蜜および試薬グリセロールを用いた。また、糖蜜を炭素源とした場合は、本培養の日数は４日間に代えて３日間とした。続いて、実施例３（２）［２－１］に記載の方法により、バクテリアセルロースを含む水の光の透過率を測定した。また、撹拌培養ＢＣ液を乾燥させてバクテリアセルロースの絶乾重量を測定し、測定結果に基づいて培地１Ｌ当たりのバクテリアセルロースの濃度を算出して、これをバクテリアセルロースの生産量（ＢＣ生産量；ｇ／Ｌ）とした。また、ＢＣ生産量を本培養の日数で除した値を算出し、これをバクテリアセルロースの生産速度（ＢＣ生産速度；ｇ／Ｌ／日）とした。その結果を図６に示す。

[0058] 図６の表および左側の棒グラフに示すように、糖蜜を炭素源として用いた場合の透過率は５７％であり、試薬グリセロールを炭素源として用いた場合の５７％と同じ値であった。この結果から、糖蜜を炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養することにより、試薬グリセロールを炭素源とした場合と同様に、終濃度０．１±０

．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率が顕著に高いバクテリアセルロースが得られることが明らかになった。すなわち、糖蜜を炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養することにより、分散性が高く、液体中に均一に分散するバクテリアセルロースが得られることが示された。

[0059] また、図６の表および右側の棒グラフに示すように、糖蜜を炭素源として用いた場合のＢＣ生産速度は１．４８ｇ／Ｌ／日であり、試薬グリセロールを炭素源として用いた場合の０．９５ｇ／Ｌ／日よりも約１．５倍大きかった。この結果から、糖蜜を炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養することにより、分散性が高いバクテリアセルロースを短期間で大量に得られることが明らかになった。

[0060] ＜実施例５＞細菌が異なる場合の透過率およびバクテリアセルロース生産速度の比較

実施例２（１）に記載の方法により撹拌培養ＢＣ液を得た。ただし、炭素源としてグルコースの代わりに糖蜜を用いた。また、細菌としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）ならびに既知のバクテリアセルロース生産菌であるＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＪＣＭ１０１５０株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＤＳＭ１１８０４株およびＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＫＣＣＭ４０２７４株を、それぞれ用いた。また、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を用いた場合は、本培養３日目で培地中の炭素源がほとんどなくなったため、本培養の日数は４日間に代えて３日間とした。一方、ＤＳＭ１１８０４株を用いた場合は、本培養４日目でも培地中の炭素源の減少の程度が小さかったため、本培養の日数は４日間に代

えて５日間とした。続いて、実施例３（２）［２－１］に記載の方法により、バクテリアセルロースを含む水の光の透過率を測定した。また、実施例４に記載の方法により、ＢＣ生産量（ｇ／Ｌ）およびＢＣ生産速度（ｇ／Ｌ／日）を算出し、透過率およびＢＣ生産速度については、数値を棒グラフに表した。その結果を図７に示す。

[0061] 図７の表および左側の棒グラフに示すように、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を用いた場合の透過率は５７％であったのに対して、Ｇ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＪＣＭ１０１５０株、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＤＳＭ１１８０４株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＫＣＣＭ４０２７４株を用いた場合の透過率は、それぞれ、２０％、３３％、２９％、２７％、９％および１３％であった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養して得られたバクテリアセルロースを終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）で含む水の波長５００ｎｍの光の透過率は、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）以外を培養して得られたバクテリアセルロースを含む水の当該透過率と比較して顕著に大きく、３５％以上であることが明らかになった。すなわち、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養することにより、分散性が高く、液体中に均一に分散するバクテリアセルロースが得ることができることが示された。

[0062] また、図６の表および右側の棒グラフに示すように、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を用いた場合のＢＣ生産速度は１．４８ｇ／Ｌ／日であったのに対して、Ｇ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＪＣＭ１０１５０株、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＤＳＭ１１８０４株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＫＣＣＭ４０２７４株を用いた場合のＢＣ生産速度

は、それぞれ、１．０５ｇ／Ｌ／日、１．０３ｇ／Ｌ／日、１．１１ｇ／Ｌ／日、１．１０ｇ／Ｌ／日、０．４２ｇ／Ｌ／日および０．４３ｇ／Ｌ／日であった。すなわち、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を用いた場合のＢＣ生産速度は、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）以外を用いた場合のＢＣ生産速度と比較して顕著に大きかった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養することにより、分散性が高いバクテリアセルロースを短期間で大量に得ることができることが示された。

[0063] ＜実施例６＞バクテリアセルロースの分子量

実施例３（２）のサンプルＡ、Ｂ、ＣおよびＤならびにパルプ由来ＣＮＦ液を試料として用意した。これらの試料を凍結乾燥し、５７～５９％水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液に加えて３５℃で静置して溶解させた後、水酸化テトラブチルホスホニウムの濃度が４０～４２％（ｗ／ｗ）、試料の濃度が０．２％（ｗ／ｗ）となるように水を加えた。続いて、遠心分離を行うことにより不純物を沈殿させて、上清を回収した。この上清を、下記の条件下でゲル浸透クロマトグラフィーに供してクロマトグラムのピークトップの保持容量を測定した。同上清を同条件下で３回測定した。その結果を表３に示すとともに、任意に選択したクロマトグラムを図８に示す。

[0064] ゲル浸透クロマトグラフィーの条件

機器；高速液体クロマトグラフ（株式会社島津製作所）

カラム；粒子径９μｍのメタクリレートポリマーを充填した内径６．０ｍｍおよび長さ１５ｃｍのカラム（ＴＳＫｇｅｌ ｓｕｐｅｒ ＡＷＭ－Ｈ；東ソー社）

ガードカラム；内径４．６ｍｍ、長さ３．５ｃｍ（ＴＳＫ ｇｕａｒｄｃｏｌｕｍ ｓｕｐｅｒ ＡＷ－Ｈ；東ソー社）

カラム温度；３５℃

送液速度；０．０７ｍＬ／分

サンプル注入量；１０μＬ

溶離液；４０～４２％（ｗ／ｗ）水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液

溶離液におけるバクテリアセルロースの終濃度；０．２％（ｗ／ｗ）

対照サンプル；分子量８５．３×１０^{4}のプルラン（Ｓｈｏｄｅｘ ｓｔａｎｄａｒｄ Ｐ－８２）

[0065] [表3]

	保持時間/分	保持容量/mL	平均/mL	標準偏差/mL
サンプルA(1回目)	40.4	2.828	2.79	0.05
サンプルA(2回目)	39.1	2.737		
サンプルA(3回目)	40	2.8		
サンプルB(1回目)	39.8	2.786	2.81	0.03
サンプルB(2回目)	39.9	2.793		
サンプルB(3回目)	40.7	2.849		
サンプルC(1回目)	40.1	2.807	2.82	0.02
サンプルC(2回目)	40.5	2.835		
サンプルC(3回目)	40.1	2.807		
サンプルD(1回目)	39.2	2.744	2.76	0.02
サンプルD(2回目)	39.4	2.758		
サンプルD(3回目)	39.8	2.786		
パルプ由来CNF液(1回目)	42.9	3.003	3.04	0.04
パルプ由来CNF液(2回目)	43.4	3.038		
パルプ由来CNF液(3回目)	43.9	3.073		
プルラン(1回目)	45.7	3.199	3.24	0.04
プルラン(2回目)	46.8	3.276		
プルラン(3回目)	46.4	3.248		

[0066] 表３および図８に示すように、サンプルＡ、Ｂ、ＣおよびＤのピークトップの保持容量は平均で見るとそれぞれ２．７９ｍＬ、２．８１ｍＬ、２．８２ｍＬおよび２．７６ｍＬであり、パルプ由来ＣＮＦ液の３．０４ｍＬおよびプルランの３．２４ｍＬと比較して小さかった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースの平均分子量は、パルプ由来のセルロースよりも大きく、プルラン換算で８５．３×１０^{4}よりも大きいことが示された。また、表３に示すように、サンプルＡ、Ｂ、ＣおよびＤのピークトップの保持容量は、２．７３７～２．８４９ｍＬの範囲であったことから、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースを上記の条件下でゲル浸透クロマトグラフィーに供した場合は、クロマトグラムのピークトッ

プの保持容量が２．５ｍＬ以上３．０ｍＬ未満となることが示された。

[0067] ＜実施例７＞バクテリアセルロースの形態

（１）繊維幅の測定

実施例２（１）のグリセロール本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液および実施例２（２）のミキサー処理静置培養ＢＣ液を用意した。これらのセルロース濃度を約０．００１％（ｗ／ｗ）に調製した後、ホルムバール被覆した銅グリッド上に１０μＬずつ滴下して風乾させた。続いて、５％（ｗ／ｖ）酢酸ガドリニウム水溶液を５μＬ滴下し、１０秒後に余分な液をろ紙で除去することによりネガティブ染色した。透過型電子顕微鏡を用いて、加速電圧８０ｋＶ、観察倍率３０，０００倍で観察し、観察画像に基づいてセルロース繊維の幅を測定した。その結果を図９に示す。

[0068] 図９に示すように、セルロース繊維の幅は撹拌培養ＢＣ液では１７±８ｎｍであり、ミキサー処理静置培養ＢＣ液の５５±２２ｎｍと比較して顕著に小さく、かつ、標準偏差も小さかった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースは、細く、繊維間で幅のばらつきが小さい均一な繊維であることが明らかになった。

[0069] （２）繊維幅の均一性および凝集状態の確認

実施例２（１）のＢＤＦ－Ｂ本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液および実施例３（１）のパルプ由来ＣＮＦ液を用意した。これらのセルロース濃度を約０．０１％（ｗ／ｗ）に調製した後、ホルムバール被覆した銅グリッド上にスプレーしてドライヤーを用いて乾燥させる操作を１０回繰り返し行った。続いて、５％（ｗ／ｖ）酢酸ガドリニウム水溶液を５μＬ滴下し、余分な液をろ紙で除去した。さらに、５μＬの超純水を滴下した後、余分な液をろ紙で除去する一連の操作を２回繰り返し行った後、風乾することによりネガティブ染色した。透過型電子顕微鏡を用いて、加速電圧８０ｋＶ、観察倍率１０，０００倍で観察した。その結果を図１０に示す。また、偏光顕微鏡を用いてクロスニコルで観察した。その結果を図１１に示す。

[0070] 図１０に示すように、撹拌培養ＢＣ液では、ナノスケールで同等の幅のセルロース繊維が多数観察されたのに対し、パルプ由来ＣＮＦ液では、様々な幅のセルロース繊維が観察され、大きいものでは繊維幅が約５００ｎｍ以上のものが観察された。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースは、ナノスケールで均一な幅の繊維であることが再度確認された。

[0071] また、図１１に示すように、パルプ由来ＣＮＦ液では、矢印で示すように比較的太い繊維が明確に観察されたのに対して、撹拌培養ＢＣ液では、点線で囲んだ部分にぼんやりと像が観察された。この結果から、パルプ由来のセルロースでは、サブマイクロファイバーやマイクロファイバーなどの比較的太い繊維が存在しているのに対して、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースは、ナノスケールで細い繊維が均一に分散していることが明らかになった。

[0072] ＜実施例８＞バクテリアセルロース生産能の評価

（１）静置培養での生産能

ＬＢ培地において、炭素源としてグルコースの代わりに前処理したＢＤＦ－Ｂおよび試薬グリセロールを添加したものを調製し、ＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地およびＬＢ／グリセロール培地とした。ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株およびＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株をＬＢ／グリセロール培地およびＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地に植菌して、３０℃で７日間静置培養することによりゲル状膜を生成させた。これに１％（ｗ／ｖ）ＮａＯＨ水溶液を加え、オートクレーブ処理する操作をゲル状膜が白色になるまで繰り返した。その後、水を加えてオートクレーブ処理する操作

をｐＨが７以下になるまで繰り返して、精製を行った。精製後に、乾燥させることにより得られたバクテリアセルロースの絶乾重量を測定した。その結果を図１２に示す。

[0073] 図１２に示すように、Ｇ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株は、ＬＢ／グリセロール培地およびＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地のいずれにおいてもバクテリアセルロースの重量が小さかった。また、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株は、ＬＢ／グリセロール培地では比較的バクテリアセルロースの重量が大きかったものの、ＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地ではバクテリアセルロースの生産が認められなかった。これに対して、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）はＬＢ／グリセロール培地およびＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地のいずれにおいてもバクテリアセルロースの重量が同等に大きかった。これらの結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）は試薬グリセロールのみならずＢＤＦ－Ｂを炭素源としても静置培養により効率的にバクテリアセルロースを生産できることが示された。ＢＤＦ－Ｂを炭素源としてバクテリアセルロースを生産できるという特徴は、他の比較した株にはない特徴であって、副産物を利用できるという実用面でも有利であり、かつ生産コスト低減にも大きく貢献するものである。

[0074] （２）撹拌培養での生産能

１０ｍＬのＨＳ培地にＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）、ＡＴＣＣ５３５８２株およびＡＴＣＣ２３７６９株を植菌し、３０℃で３日間静置培養することにより前々培養を行った。続いて、前々培養を行って得られた培養液を１０ｍＬのＨＳ培地に植菌し、３０℃で３日間静置培養することにより前培養を行った。次に、羽根付き三角フラスコに実施例２（１）のグリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地を１００ｍＬ入れて、各菌株につき同じ菌体数に相当する量の前培養液を植菌し、１５０ｒｐｍ、３０℃の条件下で３日間振とう培養することにより

本培養を行った。続いて、本培養液中のバクテリアセルロースを実施例２（１）に記載の方法により精製した。ただし、６０℃、８０ｒｐｍで４～５時間振とうした後、さらに２０℃で一晩振とうした。精製したバクテリアセルロースは乾燥させて絶乾重量を測定した。その結果を図１３に示す。

[0075] 図１３に示すように、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株は、グリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地のいずれにおいても、バクテリアセルロースの生産が認められなかった。また、Ｇ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株は、グリセロール本培養培地ではバクテリアセルロースの絶乾重量が比較的大きかったものの、ＢＤＦ－Ｂ本培養培地ではバクテリアセルロースの生産が認められなかった。これに対して、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）は、グリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地のいずれにおいても、バクテリアセルロースの絶乾重量が大きかった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）は、試薬グリセロールのみならずＢＤＦ－Ｂを炭素源として、静置培養のみならず撹拌培養によっても、効率的にバクテリアセルロースを生産することができることが示された。

請求の範囲

[請求項1] 細菌により生産された、下記（ａ）の物性を有するバクテリアセルロース；

（ａ）終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率が３５％以上である。

[請求項2] 下記（ｂ）の物性を有する、請求項１に記載のバクテリアセルロース；

（ｂ）下記ｉ）～ｖｉ）の条件下で行うゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムのピークトップの保持容量が２．５ｍＬ以上３．０ｍＬ未満である；

ｉ）カラム；粒子径９μｍのメタクリレートポリマーを充填した内径６．０ｍｍおよび長さ１５ｃｍのカラム、

ｉｉ）ガードカラム；内径４．６ｍｍ、長さ３．５ｃｍ、

ｉｉｉ）カラム温度；３５℃、

ｉｖ）送液速度；０．０７ｍＬ／分、

ｖ）溶離液；４０～４２％（ｗ／ｗ）水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液、

ｖｉ）溶離液におけるバクテリアセルロースの終濃度；０．２％（ｗ／ｗ）。

[請求項3] 前記細菌により植物油からバイオディーゼル燃料を製造する際に生じるグリセロールを含有する副産物を資化して生産された、請求項１または請求項２に記載のバクテリアセルロース。

[請求項4] 前記細菌により砂糖、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物およびこれらの加水分解物ならびに異性化糖からなる群から選択される１または２以上を資化して生産された、請求項１または請求項２に記載のバクテリアセルロース。

[請求項5] 前記副産物が糖蜜である、請求項４に記載のバクテリアセルロース。

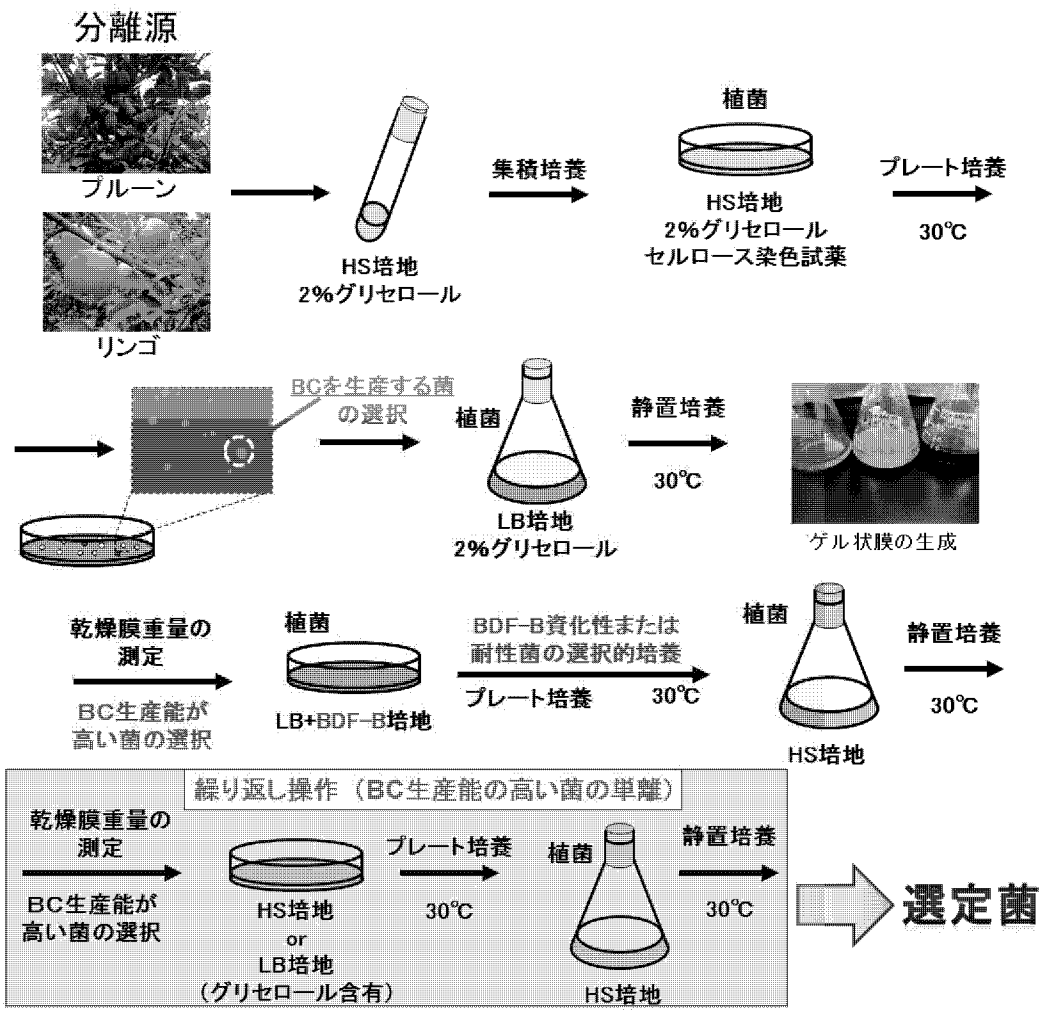
[請求項6] 前記細菌がグルコンアセトバクター インターメディウス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ）である、請求項１から請求項５のいずれかに記載のバクテリアセルロース。

[請求項7] 前記細菌がグルコンアセトバクター インターメディウス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ） ＳＩＩＤ９５８７株（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）である、請求項１から請求項５のいずれかに記載のバクテリアセルロース。

[請求項8] 請求項１から請求項５のいずれかに記載のバクテリアセルロースを生産する細菌。

[請求項9] 請求項１から請求項５のいずれかに記載のバクテリアセルロースを生産するグルコンアセトバクター インターメディウス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ） ＳＩＩＤ９５８７株（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）。

[図1]


分離源
プルーン
リンゴ
HS培地
2%グリセロール
集積培養
植菌
HS培地
2%グリセロール
セルロース染色試薬
プレート培養
30℃
BCを生産する菌
の選択
植菌
LB培地
2%グリセロール
静置培養
30℃
ゲル状膜の生成
乾燥膜重量の
測定
BC生産能が
高い菌の選択
植菌
LB+BDF-B培地
BDF-B資化性または
耐性菌の選択的培養
プレート培養
30℃
植菌
HS培地
静置培養
30℃
繰り返し操作（BC生産能の高い菌の単離）
乾燥膜重量の
測定
BC生産能が
高い菌の選択
HS培地
or
LB培地
（グリセロール含有）
プレート培養
30℃
植菌
HS培地
静置培養
30℃
選定菌

[図2-1]


SIID9587 1:CATGCA-GTCGCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGAT 59
G. intermedius 1:CATGCAAGTCGCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGAT 60
SIID9587 60:CTATCCACGGGTGGGGGATAACTTTGGGAAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGG 119
G. intermedius 61:CTATCCACGGGTGGGGGATAACTTTGGGAAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGG 120
SIID9587 120:GTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 179
G. intermedius 121:GTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 180
SIID9587 180:AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT 239
G. intermedius 181:AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT 240
SIID9587 240:GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA 299
G. intermedius 241:GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA 300
SIID9587 300:GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGC 359
G. intermedius 301:GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGC 360
SIID9587 360:GGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC 419
G. intermedius 361:GGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC 420
SIID9587 420:GGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG 479
G. intermedius 421:GGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG 480
SIID9587 480:TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGC 539
G. intermedius 481:TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGC 540
SIID9587 540:GACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT 599
G. intermedius 541:GACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT 600
SIID9587 600:GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCGCGAAA 659
G. intermedius 601:GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAA 660
SIID9587 660:GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG 719
G. intermedius 661:GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG 720

[図2-2]


SIID9587 720:GATGTTGGGTGACTTTGTCATTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGG 779
G. intermedius 721:GATGTTGGGTGACTTTGTCATTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGG 780
SIID9587 780:AGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC 839
G. intermedius 781:AGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC 840
SIID9587 840:ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCTGT 899
G. intermedius 841:ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCCGT 900
SIID9587 900:GTCCAGAGATGGGCATTTCTCGCAAGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC 959
G. intermedius 901:GTCCAGAGATGGGCATTTCTCGCAAGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC 960
SIID9587 960:AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTT 1019
G. intermedius 961:AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTT 1020
SIID9587 1020:GCCATCACGTTTGGGTGGGCACTCTAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGG 1079
G. intermedius 1021:GCCATCACGTTTGGGTGGGCACTCTAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGG 1080
SIID9587 1080:GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGG 1139
G. intermedius 1081:GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGG 1140
SIID9587 1140:TGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA 1199
G. intermedius 1141:TGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA 1200
SIID9587 1200:TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC 1259
G. intermedius 1201:TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC 1260
SIID9587 1260:CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTT 1319
G. intermedius 1261:CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTT 1320
SIID9587 1320:GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCGCAAGGACGCAGCCGACCACG-TCG 1366
G. intermedius 1321:GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCGCAAGGACGCAGCCGACCACGGTCG 1368

[図3]

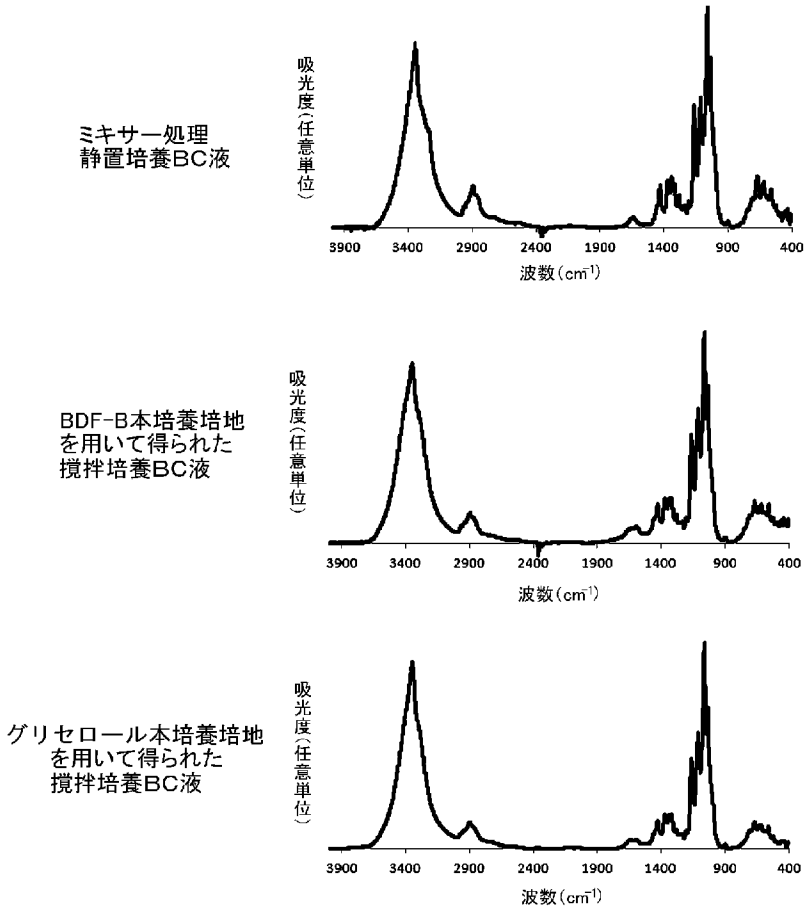
試験項目		SIID9587
培養温度(℃)		30
細胞形態		桿菌 (0.7-0.8×1.5-2.5 μm)
グラム染色性		−
胞子の有無		−
運動性		−
コロニー形態		培地：GYC 寒天
		培養時間：48 hr
		直径：1.0-2.0 mm
		色調：クリーム色
		形：円形
		隆起状態：半球状
		周縁：全縁
		表面の形状など：スムーズ
		透明度：不透明
		粘稠度：バター様
生育温度試験(℃)	37	+
	45	−
カタラーゼ反応		+
オキシダーゼ反応		−
グルコースからの酸/ガス産生(酸産生/ガス産生)		NT
O/F テスト(酸化/発酵)		NT

+：陽性、−：陰性 NT: Not test

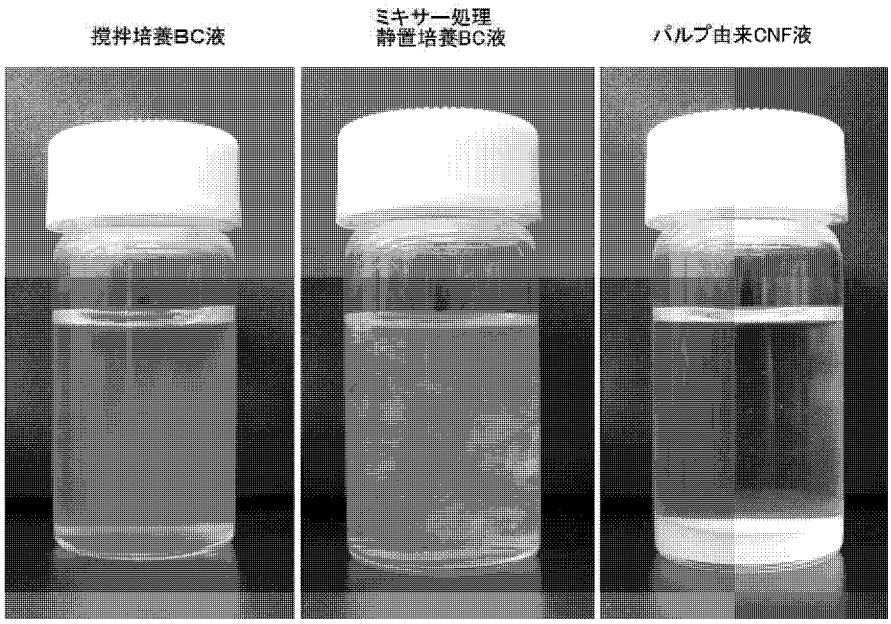
試験項目	
GYC 培地での色素の産生	−
嫌気条件下での生育	−
酢酸ナトリウムの CO_2 への分解	+
酸化	
n-プロパノール	+
グルコース	+
エタノール	+
資化	
エタノール	+
グリセリン	+
乳酸ナトリウム	+
サッカロース	+w
3%エタノールでの生育	+
5%酢酸での生育	−
30%グルコース含有培地での生育	+
MRS 寒天での生育	+

+：陽性 −：陰性

[図4]

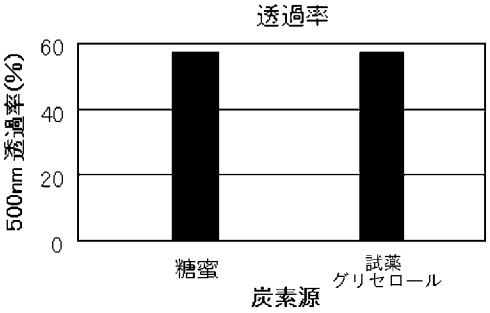

ミキサー処理
静置培養BC液
吸光度（任意単位）
3900 3400 2900 2400 1900 1400 900 400
波数（cm-1）
BDF-B本培養培地
を用いて得られた
撹拌培養BC液
吸光度（任意単位）
3900 3400 2900 2400 1900 1400 900 400
波数（cm-1）
グリセロール本培養培地
を用いて得られた
撹拌培養BC液
吸光度（任意単位）
3900 3400 2900 2400 1900 1400 900 400
波数（cm-1）

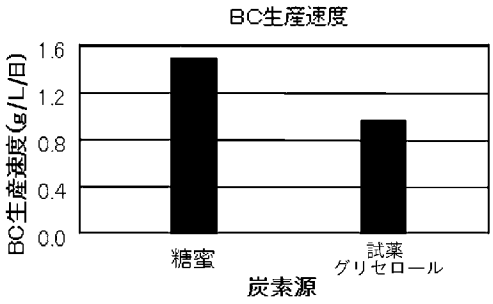
[図5]


撹拌培養BC液
ミキサー処理
静置培養BC液
パルプ由来CNF液

[図6]

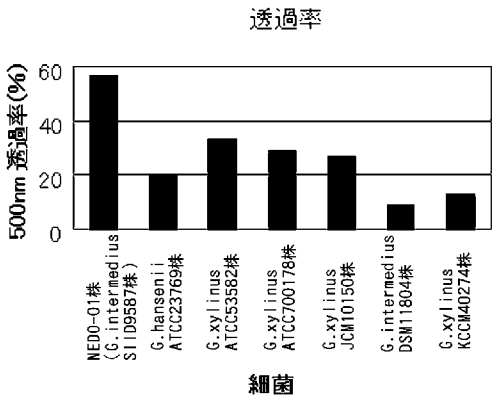
炭素源	透過率 (%)	本培養の日数	BC生産量 (g/L)	BC生産速度 (g/L/日)
糖蜜	57	3	4.45	1.48
試薬グリセロール	57	4	3.80	0.95

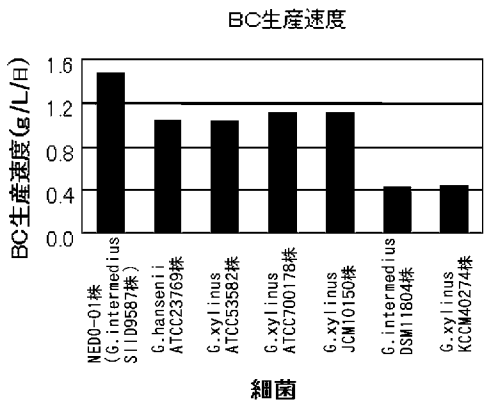




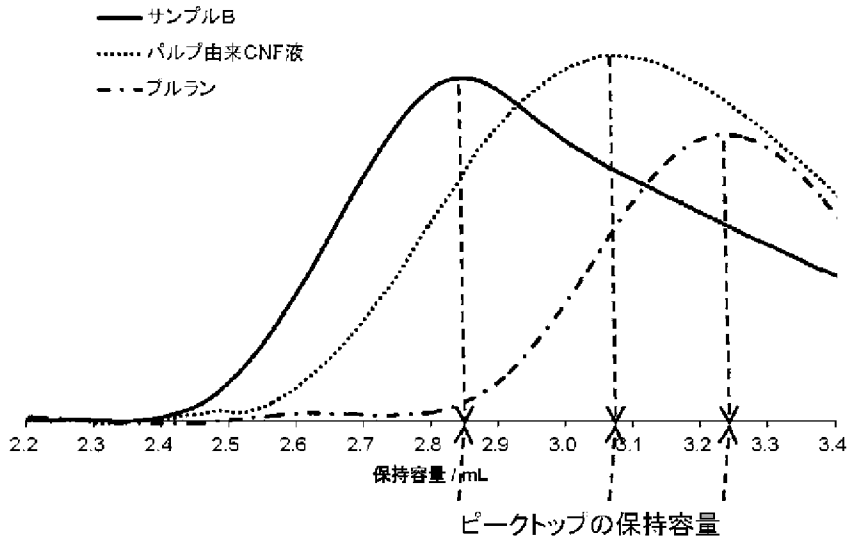
[図7]

細菌	透過率 (%)	本培養の日数	BC生産量 (g/L)	BC生産速度 (g/L/日)
NEDO-01株 (G. intermedius SIID9587株)	57	3	4.45	1.48
G. hansenii ATCC23769株	20	4	4.19	1.05
G. xylinus ATCC53582株	33	4	4.12	1.03
G. xylinus ATCC700178(BPR2001)株	29	4	4.44	1.11
G. xylinus JCM10150株	27	4	4.39	1.10
G. intermedius DSM11804株	9	5	2.08	0.42
G. xylinus KCCM40274株	13	4	1.72	0.43

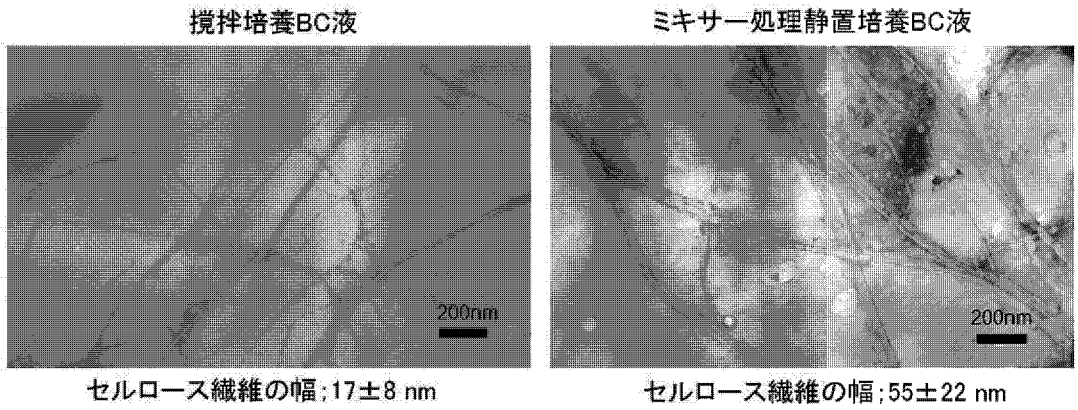




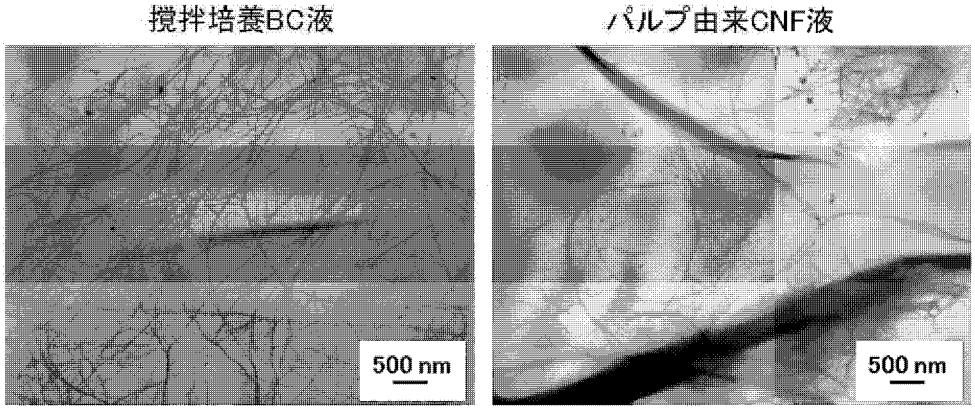
[図8]


サンプルB
パルプ由来CNF液
プルラン
2.2
2.3
2.4
2.5
2.6
2.7
2.8
2.9
3.0
3.1
3.2
3.3
3.4
保持容量 /mL
ピークトップの保持容量

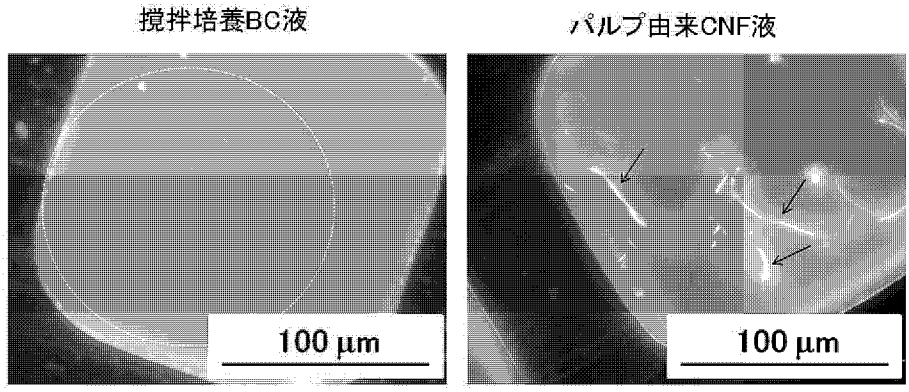
[図9]


撹拌培養BC液
ミキサー処理静置培養BC液
200nm
200nm
セルロース繊維の幅;17±8 nm
セルロース繊維の幅;55±22 nm

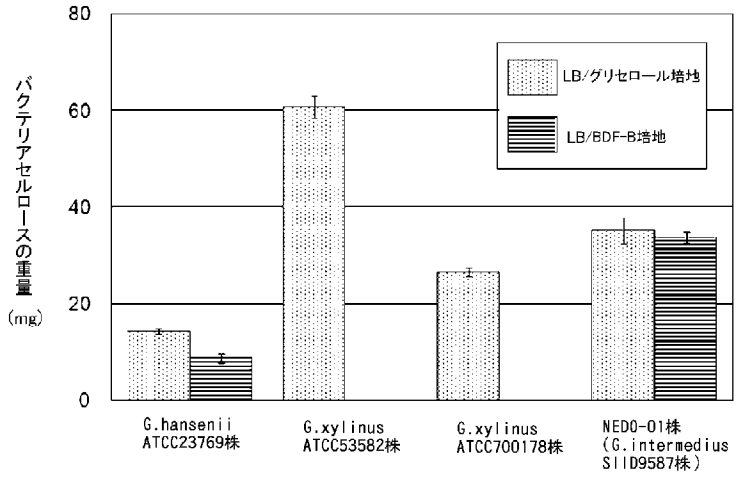
[図10]


撹拌培養BC液
パルプ由来CNF液
500 nm
500 nm

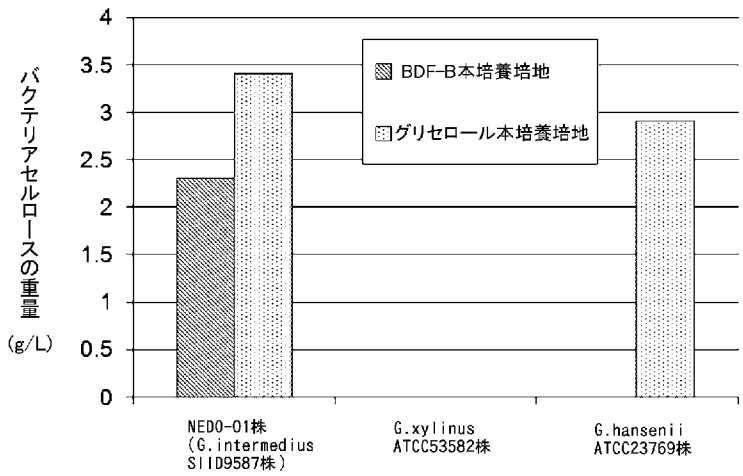
[図11]


撹拌培養BC液
パルプ由来CNF液
100 μm
100 μm

[図12]


バクテリアセルロースの重量
(mg)
80
60
40
20
0
LB/グリセロール培地
LB/BDF-B培地
G.hansenii ATCC23769株
G.xylinus ATCC53582株
G.xylinus ATCC700178株
NEDO-01株 (G.intermedius SIID9587株)

[図13]


バクテリアセルロースの重量
(g/L)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
BDF-B本培養培地
グリセロール本培養培地
NEDO-01株 (G.intermedius SIID9587株)
G.xylinus ATCC53582株
G.hansenii ATCC23769株

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/085163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P19/04(2006.01)i, *C12N1/20*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P19/04, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2011-177172 A (Samsung Electronics Co., Ltd.), 15 September 2011 (15.09.2011), entire text & US 2011/0218297 A1 & US 2013/0059067 A1 & KR 10-2011-0100139 A	1-9
X	CN 102168056 A (Zhejiang Academy of Agricultural Sciences), 31 August 2011 (31.08.2011), entire text (Family: none)	1-9
X	JP 2005-82704 A (Kansai University), 31 March 2005 (31.03.2005), claims (Family: none)	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 February, 2014 (28.02.14)	11 March, 2014 (11.03.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/085163

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/063854 A1 (National University Corporation Hokkaido University), 07 June 2007 (07.06.2007), paragraph [0007] (Family: none)	1-9
X	JP 8-291201 A (Bio-Polymer Research Co., Ltd.), 05 November 1996 (05.11.1996), paragraph [0002] (Family: none)	1-9
P,X	Kose R et al, One-step production of nanofibrillated bacterial cellulose (NFBC) from waste glycerol using Gluconacetobacter intermedius NEDO-01, Cellulose, Vol.20, p.2971-2929(2013)	1-9

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０８５１６３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P19/04(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P19/04, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN),JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),PubMed

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2011-177172 A (三星電子株式会社) 2011.09.15, 全文 & US 2011/0218297 A1 & US 2013/0059067 A1 & KR 10-2011-0100139 A	1-9
X	CN 102168056 A (浙江省農業科学院) 2011.08.31, 全文 (ファミリーなし)	1-9
X	JP 2005-82704 A (学校法人　関西大学) 2005.03.31, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２８．０２．２０１４	１１．０３．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３２３１
櫛引　明佳
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2007/063854 A1 (国立大学法人　北海道大学) 2007.06.07, 【0007】 (ファミリーなし)	1-9
X	JP 8-291201 A (株式会社バイオポリマー・リサーチ) 1996.11.05, 【0002】 (ファミリーなし)	1-9
P,X	Kose R et al, One-step production of nanofibrillated bacterial cellulose (NFBC) from waste glycerol using Gluconacetobacter intermedius NEDO-01, Cellulose, Vol.20, p.2971-2929(2013)	1-9