РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 654 675**(13) **C2**

(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12R 1/02 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/20 (2006.01); C12P 19/04 (2006.01); C12R 1/02 (2006.01)

(21)(22) Заявка: **2015131154, 27.12.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.12.2013

Дата регистрации:
21.05.2018

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
28.12.2012 JP 2012-289043

(43) Дата публикации заявки: **03.02.2017** Бюл. № **4**

(45) Опубликовано: **21.05.2018** Бюл. № **15**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **28.07.2015**

(86) Заявка PCT:
JP 2013/085163 (27.12.2013)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2014/104318 (03.07.2014)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):
ТАДЗИМА Кендзи (JP),
КОСЕ Риота (JP),
САКУРАИ Хироаки (JP)

(73) Патентообладатель(и):
ТАДЗИМА Кендзи (JP),
КОСЕ Риота (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **JP 2011177172 A, 15.09.2011. CHAWLA P.R. ET AL., "Microbial cellulose: fermentative production and applications"// Food Technol. Biotechnol., 2009, N47, p. 107-124. RU 2464307 C1, 20.10.2012.**

(54) БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЦЕЛЛЮЛОЗА И ПРОДУЦИРУЮЩАЯ ЕЕ БАКТЕРИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Штамм Gluconacetobacter intermedius, продуцирующий бактериальную целлюлозу, депонирован в Национальном Институте передовой промышленной науки и технологии (Япония) под регистрационным номером SIID 9587. Предложены способ получения бактериальной целлюлозы, включающий культивирование штамма Gluconacetobacter intermedius SIID 9587, и бактериальная целлюлоза с коэффициентом пропускания света 35% при длине волны 500 нм в случае воды, содержащей бактериальную целлюлозу в конечной концентрации 0,1±0,006% (масс./масс.). Изобретения обеспечивают получение бактериальной целлюлозы, обладающей высокой диспергируемостью. 3 н. и 4 з.п. ф-лы, 13 ил., 3 табл., 8 пр.

RU 2654675 C2

RU 2654675 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 654 675**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12R 1/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 1/20 (2006.01); C12P 19/04 (2006.01); C12R 1/02 (2006.01)

(21)(22) Application: **2015131154, 27.12.2013**

(24) Effective date for property rights:
27.12.2013

Registration date:
21.05.2018

Priority:
(30) Convention priority:
28.12.2012 JP 2012-289043

(43) Application published: **03.02.2017** Bull. № **4**

(45) Date of publication: **21.05.2018** Bull. № **15**

(85) Commencement of national phase: **28.07.2015**

(86) PCT application:
JP 2013/085163 (27.12.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/104318 (03.07.2014)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3, OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
TADZIMA Kendzi (JP),
KOSE Riota (JP),
SAKURAI Khiroaki (JP)

(73) Proprietor(s):
TADZIMA Kendzi (JP),
KOSE Riota (JP)

RU 2654675 C2

(54) BACTERIAL CELLULOSE AND BACTERIUM PRODUCING SAME

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology. Gluconacetobacter intermedius strain, which produces bacterial cellulose, was deposited at the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan) under the registration number SIID 9587. Method for producing bacterial cellulose, comprising culturing a Gluconacetobacter intermedius SIID 9587 strain, and bacterial cellulose with a light transmittance of 35 % at a wavelength of 500 nm in the case of water, containing bacterial cellulose at a final concentration of 0.1±0.006 % (w/w).

EFFECT: invention provides bacterial cellulose having high dispersibility.

7 cl, 13 dwg, 3 tbl, 8 ex

RU 2654675 C2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к бактериальной целлюлозе и продуцирующей ее бактерии и, в частности, к бактериальной целлюлозе, которая обладает превосходной диспергируемостью в жидкостях, и к продуцирующей ее бактерии.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактериальная целлюлоза обычно состоит из тонкого волокна (нановолокна) диаметром приблизительно 50 нм и привлекла внимание в качестве материала, который может быть использован в различных отраслях промышленности, поскольку она обладает такими свойствами, как высокая механическая прочность и биосовместимость, и способность к биологическому разложению. Бактериальную целлюлозу обычно получают в виде пленки, состоящей из гелеобразного вещества (далее называемого «пленкой в гелеобразной форме»), на поверхности культуральной среды посредством подвергания бактерии, такой как уксуснокислая бактерия, стационарному культивированию; однако пленка в гелеобразной форме обладает недостатком, таким как недостаточное применение в качестве практического материала из-за ее низкой формуемости и плохой смешиваемости с другими веществами при использовании материалов и высокая стоимость из-за низкой эффективности продукции.

Для решения этой проблемы требуется бактериальная целлюлоза, находящаяся не в форме гелеобразной пленки, а диспергируемая в жидкостях и, следовательно, имеющая превосходную применимость. Например, в непатентном документе 1 описывается бактериальная целлюлоза, полученная посредством подвергания Acetobacter xylinum подвида sucrofermentans культивированию при аэрировании и перемешивании, а в непатентном документе 2 также описывается бактериальная целлюлоза, полученная посредством подвергания Gluconacetobacter xylinum штамма JCM10150 культивированию на ротационном шейкере в среде для культивирования, содержащей карбоксиметилцеллюлозу (CMC).

СПИСОК ПРОТИВОПОСТАВЛЕННЫХ МАТЕРИАЛОВ

Непатентный документ 1: Yoshinaga et al., Kagaku To Seibutsu (Chemistry and Biology), vol. 35, no. 11, p. 7-14, 1997.

Непатентный документ 2: Warashina et al., 2010 Cellulose R&D Abstracts at the 17th Annual Meeting of the Cellulose Society, p. 98, 2010.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая трудность

Однако бактериальная целлюлоза, описанная в непатентном документе 1, не обладает высокой диспергируемостью в воде, как следует из описания, что она не является целлюлозой, продуцируемой с использованием содержащей CMC культуральной среды, с эффектом увеличения диспергируемости бактериальной целлюлозы, и что она диспергируется «в виде очень маленьких частиц или волокон» в воде (тот же документ, страница 9, правый столбец). Следовательно, бактериальная целлюлоза является неудовлетворительной по показателю формуемости и смешиваемости с другими веществами для практического использования. Бактериальная целлюлоза, описанная в непатентном документе 2, также не обладает высокой диспергируемостью в воде, поскольку содержащая бактериальную целлюлозу вода имеет большую мутность белого цвета на дне, чем наверху, и в ней отмечается осадок, и частицы целлюлозы являются явно большими (тот же документ, фиг. 1) в любом из случаев, когда добавленное в культуральную среду количество CMC составляет 0,5%, 1% и 2%. Следовательно, эта бактериальная целлюлоза является неудовлетворительной по показателю формуемости и смешиваемости с другими веществами, которые необходимы для практического

использования.

Таким образом, бактериальная целлюлоза, описанная и в непатентном документе 1, и в непатентный документ 2, является неудовлетворительной по формуемости в качестве материала и смешиваемости с другими веществами, а также имеет недостаточную применимость, исходя из эффективности продукции материала. Для решения этих проблем было сделано настоящее изобретение, и его задачей является обеспечение бактериальной целлюлозы, обладающей высокой диспергируемостью в жидкостях, подходящей по формуемости и смешиваемости с другими материалами при практическом использовании и имеющей превосходную применимость в качестве фактического материала, и продуцирующей бактериальную целлюлозу бактерии.

Решение проблемы

В результате обширных исследований авторы настоящего изобретения установили, что в высокой степени диспергируемой в воде является бактериальная целлюлоза, которая получена посредством подвергания штамма SIID9587 в качестве нового штамма Gluconacetobacter intermedius (номер доступа NITE BP-01495) (ниже иногда называемого «штаммом NEDO-01 (штаммом SIID9587 G. intermedius») культивированию при перемешивании в содержащей CMC культуральной среде, используя содержащий глицерин побочный продукт при производстве биодизельного топлива из растительных масел (Bio Diesel Fuel By-product; BDF-B, отработанный глицерин), реагент глицерин или мелассу в качестве источника углерода, совершив тем самым следующие изобретения.

(1) Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением обладает физическим свойством - составляющим 35% или более коэффициентом пропускания света с длиной волны 500 нм в случае воды, содержащей бактериальную целлюлозу в конечной концентрации, составляющей 0,1±0,006% (масс./масс.).

(2) Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением обладает, кроме того, физическим свойством - составляющим от 2,5 мл включительно до 3,0 мл исключительно удерживаемым объемом, необходимым для получения максимума пика хроматограммы при гельпроникающей хроматографии при ее проведении в следующих условиях i)-vi):

i) колонка: колонка с внутренним диаметром 6,0 мм и длиной 15 см, заполненная метакрилатом с диаметром частиц = 9 мкм, ii) защитная колонка: внутренний диаметр 4,6 мм и длина 3,5 см, iii) температура колонки: 35°C; iv) скорость подачи: 0,07 мл/мин; v) элюент: 40-42% (масс./масс.) раствор гидроксида тетрабутилфосфония в воде, и vi) конечная концентрация бактериальной целлюлозы в элюенте: 0,2% (масс./масс.).

(3) Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно продуцируется в результате ассимиляции BDF-B.

(4) Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно продуцируется в результате ассимиляции 1 или 2 или более веществ, выбираемых из группы, состоящей из сахара, содержащего сахарозу побочного продукта, образуемого при производстве сахара, и их гидролизатов, и изомеризованного сахара.

(5) Предпочтительно побочным продуктом является меласса, когда бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением продуцируется в результате ассимиляции содержащего сахарозу побочного продукта, образуемого при производстве сахара.

(6) Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой бактериальную целлюлозу, продуцированную Gluconacetobacter

intermedius.

(7) Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой бактериальную целлюлозу, продуцированную штаммом SIID9587 Gluconacetobacter intermedius (штаммом NEDO-01) (номер доступа NITE BP-01495).

(8) Бактерия в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что она продуцирует бактериальную целлюлозу по любому из пп.(1)-(5) выше.

(9) Бактерия в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой штамм SIID9587 Gluconacetobacter intermedius (штамм NEDO-01) (номер доступа NITE BP-01495), продуцирующий бактериальную целлюлозу по любому из пп.(1)-(5) выше.

ПОЛЕЗНЫЕ ЭФФЕКТЫ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактериальной целлюлозой в соответствии с настоящим изобретением может являться бактериальная целлюлоза, почти равномерно диспергируемая в жидкостях, таких как вода, и она может вносить вклад в улучшение качества конечного продукта и увеличение эффективности продукции или снижение стоимости продукции, поскольку эта бактериальная целлюлоза обладает превосходной формуемостью и смешиваемостью с другими веществами. Настоящим изобретением может обеспечиваться бактериальная целлюлоза, почти равномерно диспергируемая в жидкостях, в результате очистки в мягких условиях без необходимости стадии очистки с использованием смесителя и т.п., и может обеспечиваться бактериальная целлюлоза, обладающая относительно большей средней молекулярной массой. Кроме того, настоящее изобретение может вносить вклад в эффективное использование ресурсов в результате использования содержащего сахарозу побочного продукта, образуемого в ходе производства сахара, такого как BDF-B или меласса, в качестве источника углерода, и позволяет достичь снижения себестоимости бактериальной целлюлозы. Кроме того, настоящим изобретением может эффективно обеспечиваться большое количество бактериальной целлюлозы путем продукции с использованием Gluconacetobacter intermedius или штамма SIID9587 Gluconacetobacter intermedius (штамма NEDO-01).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1 представляет собой схему, иллюстрирующую протокол выделения бактерии, продуцирующей бактериальную целлюлозу, в результате ассимиляции BDF-B.

Фиг. 2-1 представляет собой схему, демонстрирующую идентичные и различные позиции при сравнении между нуклеотидными последовательностями 16S рДНК штамма SIID9587 и штамма TF2 G. intermedius. На этой фигуре идентичные позиции в нуклеотидных последовательностях отмечены звездочками, а различные позиции показаны прямоугольниками. На этой фигуре G. intermedius означает штамм TF2 G. intermedius.

Фиг. 2-2 представляет собой схему, демонстрирующую идентичные и различные позиции при сравнении между нуклеотидными последовательностями 16S рДНК штамма SIID9587 и штамма TF2 G. intermedius. На этой фигуре идентичные позиции в нуклеотидных последовательностях отмечены звездочками, а различные позиции показаны прямоугольниками. На этой фигуре G. intermedius означает штамм TF2 G. intermedius.

Фиг. 3 представляет собой пару таблиц, демонстрирующих бактериологические свойства штамма SIID9587.

Фиг. 4 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих ИК-спектры бактериальной целлюлозы, полученной посредством подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) стационарному культивированию (верхний график), и продуктов, полученных путем культивирования при аэрировании и перемешивании,

используя BDF-B и реагент глицерин в качестве источников углерода (графики посередине и внизу).

Фиг. 5 представляет собой ряд фотографий, демонстрирующих внешний вид каждой из вод, содержащих бактериальные целлюлозы, полученные посредством подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) культивированию при аэрировании и перемешивании и стационарному культивированию (слева и посередине), и бактериальное целлюлозное нановолокно, происходящее из целлюлозной массы (справа).

Фиг. 6 представляет собой ряд чертежей, показывающих коэффициент пропускания света с длиной волны 500 нм в случае вод, содержащих бактериальные целлюлозы, полученные посредством подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) культивированию при аэрировании и перемешивании, используя мелассу и реагент глицерин в качестве источников углерода, соответственно, и количество продуцированной бактериальной целлюлозы (количество продуцированной BC), и скорость ее продукции (скорость продукции BC).

Фиг. 7 представляет собой ряд чертежей, показывающих коэффициент пропускания света с длиной волны 500 нм в случае вод, содержащих бактериальные целлюлозы, полученные посредством подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) и известных продуцирующих бактериальные целлюлозы бактерий: штамма ATCC23769 G. hansenii, штамма ATCC53582 G. xylinus, штамма ATCC700178 (BPR2001) G. xylinus, штамма JCM10150 xylinus, штамма DSM11804 G. intermedius и штамма KCCM40274 G. xylinus культивированию при аэрировании и перемешивании, и количество продуцированной BC, скорость продукции BC и отношение скоростей продукции BC.

Фиг. 8 представляет собой график, на котором представлены хроматограммы гельпроникающей хроматографии бактериальной целлюлозы, полученной посредством подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) культивированию на ротационном шейкере, используя BDF-B в качестве источника углерода (образца B), происходящего из целлюлозной массы целлюлозного нановолокна (содержащей происходящее из целлюлозной массы CNF жидкости) и пуллулана.

Фиг. 9 представляет собой пару фотографий, демонстрирующих диаметры волокон и полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа изображения бактериальных целлюлоз, полученных путем подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) культивированию при аэрировании и перемешивании (содержащей BC жидкости, полученной при культивировании при перемешивании), и стационарному культивированию (содержащей BC жидкости, полученной при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя).

Фиг. 10 представляет собой пару фотографий, демонстрирующих полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа изображения бактериальной целлюлозы, полученной путем подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) культивированию при аэрировании и перемешивании (содержащей BC жидкости, полученной при культивировании при перемешивании), и происходящего из целлюлозной массы целлюлозного нановолокна (содержащей происходящее из целлюлозной массы CNF жидкости).

Фиг. 11 представляет собой пару фотографий, демонстрирующих полученные с помощью поляризационного микроскопа изображения бактериальной целлюлозы, полученной путем подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) культивированию при аэрировании и перемешивании (содержащей BC жидкости, полученной при культивировании при перемешивании), и происходящего из целлюлозной массы целлюлозного нановолокна (содержащей происходящее из целлюлозной массы

CNF жидкости).

Фиг. 12 представляет собой диаграмму, демонстрирующую количество бактериальных целлюлоз, полученных посредством подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) и известных продуцирующих бактериальные целлюлозы бактерий: штамма ATCC23769 G. hansenii, штамма ATCC53582 G. xylinus и штамма ATCC700178 (BPR2001) G. xylinus стационарному культивированию, используя реагент глицерин или BDF-B в качестве источника углерода.

Фиг. 13 представляет собой диаграмму, демонстрирующую количество бактериальных целлюлоз, полученных посредством подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) и известных продуцирующих бактериальные целлюлозы бактерий, штамма ATCC53582 и штамма ATCC23769, культивирование на качалке, используя реагент глицерин или BDF-B в качестве источника углерода.

ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Ниже будет подробно описана бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением и продуцирующая ее бактерия. Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением относится к целлюлозе, продуцируемой бактерией.

С целью настоящего изобретения бактериальная целлюлоза, «диспергированная» в жидкости, такой как вода, относится к бактериальной целлюлозе, плавающей или суспендированной в жидкости. Высокая диспергируемость относится, например, к диаметру частиц или диаметру волокна бактериальной целлюлозы в качестве дисперсной частицы, являющейся относительно небольшой в жидкости, или бактериальной целлюлозы в качестве дисперсной частицы, относительно равномерно плавающей или суспендированной в жидкости.

Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением обладает высокой диспергируемостью в такой степени, что она почти равномерно диспергируется в жидкости. Здесь жидкостью для диспергирования бактериальной целлюлозы может быть любой органический растворитель и водный растворитель, однако предпочтительным является водный растворитель.

Насколько высокой или низкой является диспергируемость бактериальной целлюлозы, можно определить, например, используя коэффициент пропускания света в качестве показателя; сохраняет силу взаимосвязь: более высокая диспергируемость имеет следствием большее значение коэффициента пропускания света, а более низкая диспергируемость имеет следствием меньшее значение коэффициента пропускания света. Коэффициент пропускания света можно определить посредством доставки воды, содержащей бактериальную целлюлозу в заранее заданной концентрации, в спектрофотометр, облучения воды светом с заданной длиной волны и измерения величины пропускаемого света.

Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением обладает физическим свойством - составляющим 35% или более коэффициентом пропускания света с длиной волны 500 нм в случае воды, содержащей бактериальную целлюлозу в конечной концентрации, составляющей 0,1±0,006% (масс./масс.). Здесь примеры коэффициента пропускания света с длиной волны 500 нм в случае воды, содержащей бактериальную целлюлозу в конечной концентрации, составляющей 0,1±0,006% (масс./масс.), в соответствии с настоящим изобретением могут включать 35% или более, а также 36% или более, 37% или более, 38% или более, 39% или более, 40% или более, от 35% до 99% (включая оба значения), от 36% до 99% (включая оба значения), от 37% до 99% (включая оба значения), от 38% до 99% (включая оба значения), от 40% до 99% (включая оба значения), от 35% до 95% (включая оба значения), от 36% до 95% (включая

оба значения), от 37% до 95% (включая оба значения), от 38% до 95% (включая оба значения), от 40% до 95% (включая оба значения), от 35% до 90% (включая оба значения), от 36% до 90% (включая оба значения), от 37% до 90% (включая оба значения), от 38% до 90% (включая оба значения), от 40% до 90% (включая оба значения), от 35% до 85% (включая оба значения), от 36% до 85% (включая оба значения), от 37% до 85% (включая оба значения), 38% до 85% (включая оба значения), от 40% до 85% (включая оба значения), от 35% до 80% (включая оба значения), от 36% до 80% (включая оба значения), от 37% до 80% (включая оба значения), от 38% до 80% (включая оба значения) и от 40% до 80% (включая оба значения).

Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением может также иметь большую среднюю молекулярную массу по сравнению с целлюлозой растительного происхождения, такой как происходящее из целлюлозной массы целлюлозное нановолокно. Среднюю молекулярную массу целлюлозы можно определить, используя, например, хроматограмму гельпроникающей хроматографии в качестве показателя; сохраняет силу взаимосвязь: меньшая молекулярная масса имеет следствием больший удерживаемый объем, необходимый для получения максимума пика такой хроматограммы, а более большая молекулярная масса имеет следствием меньший удерживаемый объем. В частности, бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением может обладать физическим свойством - составляющим от 2,5 мл включительно до 3,0 мл исключительно удерживаемым объемом, необходимым для получения максимума пика хроматограммы при гельпроникающей хроматографии при ее проведении в следующих условиях i)-vi): i) колонкой является колонка с внутренним диаметром 6,0 мм и длиной 15 см, заполненная метакрилатом с диаметром частиц = 9 мкм; ii) защитная колонка имеет внутренний диаметр 4,6 мм и длину 3,5 см, iii) температура колонки составляет 35°C, iv) скорость подачи составляет 0,07 мл/мин; v) элюентом является 40-42% (масс./масс.) раствор гидроксида тетрабутилфосфония в воде, и vi) конечная концентрация бактериальной целлюлозы в элюенте составляет 0,2% (масс./масс.).

Бактериальную целлюлозу в соответствии с настоящим изобретением можно продуцировать, например, заставляя бактерию продуцировать бактериальную целлюлозу путем культивирования в среде для культивирования, содержащей подходящий источник углерода.

Здесь примеры источника углерода могут включать моносахариды, такие как глюкоза и фруктоза, дисахариды, такие как сахароза, мальтоза и лактоза; олигосахариды, сахар, содержащие сахарозу побочные продукты, образуемые в процессе производства сахара, их гидролизаты и изомеризованный сахар; сахариды, такие как гидролизат крахмала, маннит, этанол, уксусную кислоту, лимонную кислоту, глицерин и BDF-B. Источник углерода может быть правильно задан в зависимости от типа бактерии, условий культивирования, стоимости продукции и т.п. BDF-B состоит из глицерина 41,5%, жирной кислоты 21,4%, метанола 12,4%, зольного остатка 6,3% и прочего 18,4% (Japan Food Research Laboratories) в качестве типичной композиции и представляет собой композицию, содержащую большое количество глицерина, доступного в качестве источника углерода для бактерии.

Здесь сахар означает подсластитель, состоящий в основном из сахарозы (Kojien, 6th Ed.), и с целью настоящего изобретения может быть сахаром, который является химически синтезированным, или сахаром, полученным с использованием природного продукта, такого как сахарный тростник, сахарная свекла (сахарный буряк), кленовый сахар, аренга (Borassus flabellifer) и сахарное сорго (Sorghum bicolor dulciusculum) в

качестве сырья. Примеры сахара в соответствии с настоящим изобретении могут включать сахар не с центрифуги, такой как неочищенный тростниковый сахар, shiroshita-to, casonade (коричневый сахар), Wasanbon или кленовый сахар, и сахар с центрифуг, такой как сахар-сырец и рафинированный сахар. Примеры рафинированного сахара могут включать твердый сахар, такой как shiroshita-to, крупнокристаллический среднемягкий сахар или гранулированный сахар; мягкий сахар, такой как белый мягкий сахар высокого качества или желтый мягкий сахар, подвергнутый обработке сахар, такой как прессованный сахар, кристаллический сахар, сахарный песок или сахарная глазурь, и жидкий сахар.

Содержащий сахарозу побочный продукт, образуемый в ходе производства сахара, относится к побочному продукту, содержащему сахарозу, среди побочных продуктов, образующихся на стадии производства сахара, и его конкретные примеры могут включать жмых природных исходных материалов, таких как сахарный тростник и сахарная свекла, которые описаны выше; мелассу и отходы, образующиеся на стадии очистки с использованием фильтрации или ионообменной смолы.

Гидролизат дисахарида, олигосахарида, сахара или содержащего сахарозу побочного продукта, образуемого в процессе производства сахара, относится к гидролизату, полученному путем подвергания дисахарида, олигосахарида, сахара и содержащего сахарозу побочного продукта, образуемого в процессе производства сахара, гидролитической обработке, такой как нагревание в кислотном растворе.

Компоненты среды для культивирования, отличные от источника углерода, могут быть такими же, как и компоненты хорошо известных сред для культивирования, используемых для культивирования бактерий, и предпочтительно содержат СМС. Конкретные примеры такой среды для культивирования могут включать общепринятые питательные среды для культивирования, содержащие СМС, источники азота, неорганические соли и, при необходимости, органические питательные микроэлементы, такие как аминокислоты и витамины. Примеры источника азота могут включать органические или неорганические источники азота, такие как аммониевые соли (например сульфат аммония, хлорид аммония и фосфат аммония), нитраты, мочевину или пептон. Примеры неорганической соли могут также включать фосфаты, соли магния, соли кальция, соли железа и соли марганца. Примеры органического питательного микроэлемента могут включать аминокислоты, витамины, жирные кислоты, нуклеиновые кислоты и, кроме того, пептон, казаминовые кислоты, дрожжевые экстракты и соевые белковые гидролизаты, содержащие питательные вещества. При использовании ауксотрофного мутанта, для роста которого требуются аминокислоты, могут дополнительно добавляться необходимые питательные вещества.

Бактерия особенно не ограничивается при условии, что она может продуцировать бактериальную целлюлозу; однако предпочтительной является бактерия, способная продуцировать бактериальную целлюлозу при культивировании при перемешивании или культивировании при аэрировании, более предпочтительна бактерия, ассимилирующая BDF-B. Ее конкретные примеры могут включать бактерии рода Acetobacter, рода Gluconacetobacter, рода Pseudomonas, рода Agrobacterium, рода Rhizobium и рода Enterobacter. Ее более конкретные примеры могут включать Gluconacetobacter intermedius, Gluconacetobacter hansenii, Gluconacetobacter swingsii, Acetobacter pasteurianus, Acetobacter aceti, Acetobacter xylinum, Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans, Acetobacter xylinum subs. nonacetoxidans, Acetobacter ransens, Sarcina ventriculi, Bacterium xyloides и Enterobacter sp.; однако среди них Gluconacetobacter intermedius является предпочтительной. Ее еще более конкретные примеры могут включать Gluconacetobacter

intermedius штамм SIID9587 (штамм NEDO-01) (номер доступа NITE BP-01495), Gluconacetobacter xylinus штамм ATCC53582, Gluconacetobacter hansenii штамм ATCC23769, Gluconacetobacter xylinus штамм ATCC700178 (BPR2001), Gluconacetobacter swingsii штамм BPR3001E, Acetobacter xylinum штамм JCM10150 и Enterobacter sp. штамм CJF-002; среди них предпочтительным является Gluconacetobacter intermedius штамм SIID9587 (штамм NEDO-01) (номер доступа NITE BP-01495).

Способы культивирования могут включать, например, культивирование при перемешивании и культивирование при аэрировании. Конкретные примеры культивирования при перемешивании могут включать культивирование с использованием ферментера, не включающее аэрирование (культивирование при перемешивании и без аэрирования), культивирование с использованием ферментера, включающее аэрирование (культивирование при перемешивании и аэрировании), культивирование при качании из стороны в сторону, используя крыльчатую колбу (культивирование на качалке), и культивирование на ротационном шейкере, используя крыльчатую колбу (культивирование с вращением). Условия культивирования могут быть хорошо известными условиями культивирования, используемыми для культивирования вышеуказанных бактерий; их примеры могут включать следующие условия культивирования: величина аэрирования 1-10 л/мин, число вращений 100-800 оборотов в минуту, температура 20-40°C и период культивирования от 1 дня до 7 дней.

При продукции бактериальной целлюлозы в соответствии с настоящим изобретением может выполняться, в случае необходимости, стадия предварительной обработки источника углерода, стадия пре-прекультивирования, стадия очистки, сушки и суспендирования бактериальной целлюлозы, и т.п.

Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением может использоваться, например, в качестве добавки к средствам для упрочнения бумаги, загустителям для пищевых продуктов, стабилизаторам суспензий и т.п.

Исходя из изложенного выше, бактерия в соответствии с настоящим изобретением продуцирует вышеописанную бактериальную целлюлозу. В случае бактерий, которые продуцируют бактериальную целлюлозу в соответствии с настоящим изобретением, компоненты, идентичные или соответствующие таковым бактериальной целлюлозы в соответствии с настоящим изобретением, не будут описываться снова.

Бактериальная целлюлоза в соответствии с настоящим изобретением и продуцирующая ее бактерия будут описаны ниже, основываясь на примерах. Однако технический объем настоящего изобретения, как предполагается, не ограничивается признаками, которые демонстрируют эти примеры.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: выделение и идентификация бактерий

(1) Выделение бактерий

Были выделены бактерии, продуцирующие бактериальную целлюлозу в результате ассимиляции BDF-B. А именно используя представленный на фиг. 1 протокол, сначала выполняли обогатительное культивирование с использованием среды для культивирования, содержащей 2% (масс./об.) реагента глицерина (чистого для анализа реагента от Wako Pure Chemical Industries Ltd.) вместо глюкозы в стандартной среде для культивирования Hestrin-Schramm (имеющей состав: бактопептон - 0,5% (масс./об.), дрожжевой экстракт - 0,5% (масс./об.), Na_2HPO_4 - 0,27% (масс./об.), лимонная кислота - 0,115% (масс./об.), глюкоза - 2% (масс./об.); среде для культивирования HS) (среде для культивирования HS/c глицерином), используя яблоко и чернослив в качестве источников выделения. Получающиеся в результате бактерии засевали в среду для культивирования

HS/с глицерином, содержащую реагент для окрашивания целлюлозы, и подвергали культивированию на чашках при 30°C, и отбирали 15 бактериальных штаммов, продуцирующих бактериальные целлюлозы. Впоследствии эти штаммы засевали в среду для культивирования LB (имеющую состав: трипсин - 1% (масс./об.), дрожжевой экстракт - 0,5% (масс./об.) и хлорид натрия - 0,5% (масс./об.)), содержащую 2% (масс./об.) реагента глицерина (чистого для анализа реагента от Wako Pure Chemical Industries Ltd.), и подвергали стационарному культивированию при 30°C, с образованием пленок в гелеобразной форме. Определяли сухую массу пленок в гелеобразной форме (ниже называемую «сухой массой пленки»), и в качестве бактерий, ассимилирующих глицерин и обладающих высокой способностью к продуцированию бактериальной целлюлозы, были отобраны 8 штаммов, в случае которых сухая масса пленки была большей. Затем эти штаммы засевали в среду для культивирования LB, содержащую BDF-B, и подвергали культивированию на чашках при 30°C, а в дальнейшем засевали в среду для культивирования HS и подвергали стационарному культивированию при 30°C, с образованием пленок в гелеобразной форме. Процесс отбора среди указанных бактерий бактериального штамма, в случае которого сухая масса пленки была большей, культивирование на чашках с использованием содержащей глицерин среды для культивирования LB или среды для культивирования HS/с глицерином и затем подвергание результирующего продукта стационарному культивированию в среде для культивирования HS повторяли для отбора одного бактериального штамма, обладающего способностью к ассимиляции BDF-B и обладающего высокой способностью к продуцированию бактериальной целлюлозы, который был назван штаммом SIID9587.

(2) Идентификация бактерий

Секвенирование выполняли в соответствии с обычным способом для штамма SIID9587 1(1) этого примера для определения нуклеотидной последовательности полноразмерной 16S рДНК (1367 п.о.; SEQ ID NO: 1). Впоследствии анализ нуклеотидной последовательности 16S рДНК и исследование бактериологических свойств проводили в TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.

[2-1] Анализ нуклеотидной последовательности 16S рДНК

Анализ нуклеотидной последовательности 16S рДНК проводили с использованием Aporon 2.0 (TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd) в качестве программного обеспечения и Aporon DB-BA 6.0 (TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd) и International Nucleotide Sequence Databases (GenBank/DDBJ/EMBL) в качестве баз данных. В результате поиска гомологии с использованием Aporon DB-BA 6.0 было установлено, что нуклеотидная последовательность 16S рДНК для штамма SIID9587 (SEQ ID NO: 1) обладает высокой степенью гомологии с нуклеотидной последовательности 16S рДНК для рода Gluconacetobacter и обладает наибольшей степенью гомологии с нуклеотидной последовательностью 16S рДНК для штамма TF2 G. intermedius (номер доступа: Y14694) (степень гомологии: 99,8%). В результате поиска гомологии с использованием GenBank/DDBJ/EMBL было также установлено, что нуклеотидная последовательность 16S рДНК для штамма SIID9587 (SEQ ID NO: 1) обладает высокой степенью гомологии с нуклеотидной последовательности 16S рДНК для рода Gluconacetobacter, и такая нуклеотидная последовательность для этого штамма, как было установлено, обладает высокой степенью гомологии с нуклеотидной последовательности 16S рДНК для штамма TF2 G. intermedius (номер доступа: Y14694) (степень гомологии: 99,8%). Последовательность с номером доступа Y14694 идентична последовательности с номером доступа NR_026435. Результаты сравнения между нуклеотидной

последовательностью 16S рДНК для штамма SIID9587 и таковой для штамма TF2 G. intermedius (номер доступа: Y14694 или NR_026435) представлены на фиг. 2-1 и 2-2. Как показано на фиг. 2-1 и 2-2, обе последовательности отличались 4 нуклеотидами. При поиске гомологии с использованием Aporon DB-BA 6.0, в результате упрощенного молекулярного филогенетического анализа на основе нуклеотидных последовательностей 16S рДНК для верхних 15 штаммов, обладающих высокой степенью гомологии, было установлено, что штамм SIID9587 содержится в кластере, образованном видами рода Gluconacetobacter.

[2-2] Исследование бактериологических свойств

Результаты исследования бактериологических свойств представлены на фиг. 3. Как следует из фиг. 3, штамм SIID9587 отличался по свойству, касающемуся отсутствия роста в содержащей 5% уксусную кислоту среде для культивирования, от известного G. intermedius и не отличался по другим свойствам от него (BRENNER et al., Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. The Proteobacteria, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. 2005. Springer. p. 72-77).

Вышеприведенные результаты (2) [2-1] и [2-2] этого примера 1 показали, что штамм SIID9587 относится к Gluconacetobacter intermedius. С другой стороны, было установлено, что штамм SIID9587 является новым штаммом G. intermedius, поскольку существуют различия по нуклеотидной последовательности 16S рДНК и бактериологическим свойствам между штаммом SIID9587 и штаммом TF2 Gluconacetobacter intermedius в качестве типового штамма для G. intermedius, описанного выше. Соответственно, этот бактериальный штамм был депонирован в National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depositary (NITE-IPOD; #122, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Япония) под входящим номером NITE BP-01495 21 декабря 2012 года.

(3) Определение продукта

Штамм NEDO-01 (штамм SIID9587 G. intermedius) подвергали предкультивированию для пролиферации бактериальных клеток. Впоследствии культуральную жидкость, полученную при прекультивировании (прекультуральную жидкость), добавляли в среду для культивирования HS (источник углерода: глюкоза), которую затем подвергали стационарному культивированию при 30°C в течение приблизительно 8 дней для выполнения основного культивирования с образованием пленки в гелеобразной форме на поверхности среды для культивирования. Спектр, полученный с использованием инфракрасной (ИК) спектроскопии, и рентгенодифракционный профиль пленки в гелеобразной форме получали и анализировали в соответствии с обычным способом. В результате было установлено, что пленкой в гелеобразной форме является целлюлоза с кристаллической структурой I типа. В результате получения и анализа изображения, полученного с помощью сканирующей электронной микроскопии в соответствии с обычным способом, было установлено, что целлюлозные волокна диаметром нанопорядка (целлюлозные нановолокна) образуют сетчатую структуру в пленке в гелеобразной форме. Исходя из этих результатов было подтверждено, что штамм NEDO-01 (штамм SIID9587 G. intermedius) продуцирует целлюлозу.

Пример 2: оценка продукта, полученного с помощью культивирования при аэрировании и перемешивании

(1) Приготовление продукта с помощью культивирования при аэрировании и перемешивании

BDF-B подвергали обработке для нейтрализации и в дальнейшем подвергали автоклавированию для обеспечения предварительно обработанного BDF-B.

Были приготовлены среды для культивирования, в которых реагент глицерин (чистый

для анализа реагент от Wako Pure Chemical Industries Ltd.) добавляли вместо глюкозы в качестве источника углерода в среде для культивирования HS, содержащей 2% (масс./об.) CMC (со степенью чистоты химических реактивов от Wako Pure Chemical Industries Ltd.), и в которых предварительно обработанный BDF-B добавляли до концентрации, составляющей 2% (масс./об.) вместо глюкозы в содержащей CMC среде для культивирования HS, и они были названы средой для основного культивирования с глицерином и средой для основного культивирования с BDF-B, соответственно. Штамм NEDO-01 (G. intermedius штамм SIID9587) сначала подвергали прекультивированию для пролиферации бактериальных клеток. Затем прекультуральную жидкость засевали в 5 л каждой из среды для основного культивирования с глицерином и среды для основного культивирования с BDF-B и, используя ферментер, подвергали культивированию при аэрировании и перемешивании в течение 4 дней в следующих условиях: величина аэрирования 7-10 л/мин, число вращений 200-800 оборотов в минуту и температура 30°C для выполнения основного культивирования. Водный 1% (масс./об.) раствор NaOH добавляли к культуральной жидкости, полученной при основном культивировании (основной культуральной жидкости), которую затем встряхивали при 60°C и 80 оборотов в минуту в течение 4-5 часов для лизиса бактериальных клеток. После подвергания результирующего продукта центрифугированию супернатант удаляли с получением осадка для удаления водорастворимых компонентов бактериальных клеток. Процесс добавления к нему воды сверхвысокой чистоты, выполнения центрифугирования, а затем удаления супернатанта повторяли до тех пор, пока pH осадка во влажном состоянии не достигал 7 или менее, для очистки продукта, и результирующий продукт был назван содержащей BC жидкостью, полученной при культивировании при перемешивании.

(2) Приготовление бактериальной целлюлозы с помощью стационарного культивирования

Пленку в гелеобразной форме получали с помощью способа, описанного в (3) примера 1 и отрезали часть размером приблизительно 1×1 см. Впоследствии к ней добавляли 1% (масс./об.) раствор NaOH в воде, который затем встряхивали при 60°C и 80 ударов/мин в течение 4-5 часов, а затем встряхивали в течение ночи при 20°C. Жидкость удаляли с помощью фильтрования, используя металлическую сетку для извлечения пленки в гелеобразной форме. Процесс добавления к ней воды сверхвысокой чистоты и встряхивания результирующего продукта в течение ночи при 20°C повторяли до тех пор, пока pH не достигал 7 или менее, для очистки, с последующей обработкой суспензии, используя смеситель, в течение нескольких минут, и результирующий продукт был назван содержащей BC жидкостью, полученной при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя.

(3) Анализ

Каждую из содержащей BC жидкости, полученной при культивировании при перемешивании, (1) и содержащей BC жидкости, полученной при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя (2) этого примера 2 добавляли по каплям на кремниевую пластину, сушили, а затем доставляли в инфракрасный спектрофотометр (FT/IR-4200; JASCO Corporation), и осуществляли измерения с использованием накопленного количества раз = 32 и при разрешении = 2 $см^{-1}$ или 4 $см^{-1}$, для получения ИК-спектра. Результаты представлены на фиг. 4. Как показано на фиг. 4, ИК-спектры содержащих BC жидкостей, полученных при культивировании при перемешивании, которые были получены с использованием среды для основного культивирования с BDF-B и среды для основного культивирования с

глицерином, были схожи по форме с ИК-спектром для содержащей ВС жидкости, полученной при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя. Исходя из этих результатов было подтверждено, что продуктом, полученным в результате подвергания штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) культивированию при перемешивании, используя BDF-B или реагент глицерин в качестве источника углерода, является целлюлоза.

Пример 3: диспергируемость в воде бактериальной целлюлозы

(1) Внешний вид воды, содержащей бактериальную целлюлозу

Были предоставлены содержащая ВС жидкость, полученная при культивировании при перемешивании, используя раствор для основного культивирования с BDF-B, (1) примера 2 и содержащая ВС жидкость, полученная при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя (2) примера 2. Имеющиеся в продаже целлюлозные нановолокна, происходящие из целлюлозной массы, добавляли в воду для получения дисперсии, и результирующий продукт был назван содержащей происходящее из целлюлозной массы CNF жидкостью. Допускали выдерживание содержащей ВС жидкости, полученной при культивировании при перемешивании, содержащей ВС жидкости, полученной при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя и содержащей происходящее из целлюлозной массы CNF жидкости в течение 1 дня, с последующим осмотром их внешнего вида. Результаты представлены на фиг. 5.

Как показано на фиг. 5, осаждение целлюлозы наблюдалось в содержащей происходящее из целлюлозной массы CNF жидкости. В содержащей ВС жидкости, полученной при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя наблюдалась плотная бактериальная целлюлоза, что указывает на то, что дисперсионное состояние бактериальной целлюлозы было неоднородным. В противоположность этому, в содержащей ВС жидкости, полученной при культивировании при перемешивании, осаждение бактериальной целлюлозы или плотная бактериальная целлюлоза не отмечались, а отмечалось, что бактериальная целлюлоза находится в состоянии равномерного диспергирования. Эти результаты показали, что бактериальная целлюлоза, полученная путем подвергания штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) культивированию при перемешивании, имела высокий коэффициент диспергируемости и была равномерно диспергирована в жидкости, такой как вода, по сравнению с бактериальной целлюлозой, полученной путем подвергания происходящих из целлюлозной массы целлюлозных нановолокон или штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) стационарному культивированию.

(2) Коэффициент пропускания света в случае воды, содержащей бактериальную целлюлозу

[2-1] Сравнение бактериальной целлюлозой, полученной при стационарном культивировании, и целлюлозы, происходящей из целлюлозной массы

В способе, описанном в (1) примера 2, культивирование на ротационном шейкере выполняли в условиях вращения со скоростью 150 оборотов в минуту и температуры = 30°C в течение 3 дней, используя крыльчатую колбу вместо ферментера, в качестве основного культивирования для приготовления содержащих ВС жидкостей, полученных при культивировании при перемешивании, которые были названы образцом A (полученным с использованием среды для основного культивирования с глицерином) и образцом B (полученным с использованием среды для основного культивирования с BDF-B). Содержащая ВС жидкость, полученная при культивировании при перемешивании, используя среду для основного культивирования с BDF-B, (1) примера

2 была названа образцом C, а содержащая BC жидкость, полученная при культивировании при перемешивании, используя среду для основного культивирования с глицерином, была названа образцом D. Были предоставлены содержащая BC жидкость, полученная при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя (2) примера 2 и содержащая происходящее из целлюлозной массы CNF жидкость (1) примера 3. Эти жидкости доводили до конечной концентрации целлюлозы, составляющей 0,1±0,006% (масс./масс.), и 1 мл каждого из них добавляли в ячейки и доставляли в спектрофотометр (двулучевой спектрофотометр U-2001; Hitachi, Ltd.) для определения коэффициента пропускания света с длиной волны 500 нм. Полиэтиленовую кювету одноразового использования (полу-микро, с оптической длиной пути = 10 мм и оптический шириной пути = 4 мм) использовали в качестве каждой ячейки, и воду сверхвысокой чистоты использовали в качестве контроля. Результаты представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

	Способ культивирования	Источник углерода	Конечная концентрация целлюлозы (% (масс./масс.))	Коэффициент пропускания света (%)
Образец A	Культивирование при перемешивании (крыльчатая колба)	Реагент глицерин	0,10505	74,75
Образец B	Культивирование при перемешивании (крыльчатая колба)	BDF-B	0,10309	70,53
Образец C	Культивирование при перемешивании (ферментер)	BDF-B	0,09570	63,82
Образец D	Культивирование при перемешивании (ферментер)	Реагент глицерин	0,10375	49,66
Содержащая BC жидкость, полученная при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя	Стационарное культивирование	Глюкоза	0,09964	19,19
Содержащая происходящее из целлюлозной массы CNF жидкость			0,10514	12,72

Как показано в таблице 1, коэффициент пропускания для образцов A, B, C и D составлял 74,75%, 70,53%, 63,82% и 49,66%, соответственно, что заметно больше по сравнению с 19,19% для содержащей BC жидкости, полученной при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя и 12,72% для содержащей происходящее из целлюлозной массы CNF жидкости; и находится приблизительно в диапазоне от 40% до 80% (включая оба значения).

[2-2] Сравнение между присутствием и отсутствием CMC в среде для культивирования

В способе, описанном в (1) примера 2, каждую из среды для культивирования HS, содержащей 2% (масс./об.) CMC, и среды для культивирования HS, не содержащей CMC, использовали для обеспечения содержащих BC жидкостей, полученных при культивировании при перемешивании. Однако мелассу использовали вместо глюкозы в качестве источника углерода. При использовании мелассы в качестве источника углерода число дней в основной культуре было установлено на значении = 3 дня вместо 4 дней, поскольку источник углерода в среде для культивирования практически исчезал в день 3 основного культивирования. Впоследствии коэффициент пропускания света для содержащих бактериальную целлюлозу вод определяли с помощью способа,

описанного в (2) [2-1] примера 3. Результаты представлены в следующей таблице 2.

ТАБЛИЦА 2

СМС в среде для культивирования	Способ культивирования	Источник углерода	Коэффициент пропускания света (%)
Содержится	Культивирование при перемешивании	Меласса	57
Не содержится	Культивирование при перемешивании	Меласса	18

Как показано в таблице 2, коэффициент пропускания в случае использования среды для культивирования HS, содержащей СМС, составлял 57%, в то время как коэффициент пропускания в случае использования среды для культивирования HS, не содержащей СМС, составлял 18%.

Вышеприведенные результаты (2) [2-1] и [2-2] этого примера 3 показали, что вода, содержащая бактериальную целлюлозу, полученную посредством подвергания штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) культивированию при перемешивании в среде для культивирования, содержащей СМС, в конечной концентрации, составляющей 0,1±0,006% (масс./масс.), имеет коэффициент пропускания света с длиной волны 500 нм в диапазоне от 40% до 80% (включая оба значения). Другими словами, было установлено, что культивирование при перемешивании штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius) в СМС-содержащей среде для культивирования дает бактериальную целлюлозу, обладающую значительно большей диспергируемостью в жидкости и равномерно диспергируемую в жидкости.

Пример 4: сравнение коэффициента пропускания и скорости продукции бактериальной целлюлозы, когда источник углерода отличается

Каждая из содержащих ВС жидкостей, полученных при культивировании при перемешивании, была получена с помощью способа, описанного в (1) примера 2. Однако меласса и реагент глицерин были использованы в качестве источника углерода вместо глюкозы. При использовании мелассы в качестве источника углерода число дней в основной культуре было установлено на значении = 3 дня вместо 4 дней. Впоследствии коэффициент пропускания света для каждой содержащей бактериальную целлюлозу воды определяли с помощью способа, описанного в (2) [2-1] примера 3. Содержащую ВС жидкость, полученную при культивировании при перемешивании, подвергали высушиванию для определения массы абсолютно сухого материала - бактериальной целлюлозы, и концентрацию бактериальной целлюлозы в 1 л среды для культивирования рассчитывали на основе результатов измерений и определяли как количество продуцированной бактериальной целлюлозы (количество продуцированной ВС; г/л). Рассчитывали значение, определяемое делением количества продуцированной ВС на число дней в основной культуре, и это значение определяли как скорость продукции бактериальной целлюлозы (скорость продукции ВС; г/л/день). Результаты представлены на фиг. 6.

Как показано в таблице и на левой гистограмме фиг. 6, коэффициент пропускания при использовании мелассы в качестве источника углерода составлял 57% и имел то же значение (57%) при использовании реагента глицерина в качестве источника углерода. Эти результаты показывали, что культивирование штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius), используя мелассу в качестве источника углерода, давало бактериальную

целлюлозу, имеющую высокий коэффициент пропускания света с длиной волны 500 нм в случае воды, содержащей бактериальную целлюлозу в конечной концентрации, составляющей 0,1±0,006% (масс./масс.), и которая имела то же значение при использовании реагента глицерина в качестве источника углерода. Другими словами, было установлено, что культивирование штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius), используя мелассу в качестве источника углерода, давало бактериальную целлюлозу, обладающую высокой степенью диспергируемости и равномерно диспергируемую в жидкости.

Как показано в таблице и на правой гистограмме фиг. 6, скорость продукции BC при использовании мелассы в качестве источника углерода составляла 1,48 г/л/день и была приблизительно в 1,5 раза больше скорости продукции BC (0,95 г/л/день) при использовании реагента глицерина в качестве источника углерода. Эти результаты показывали, что культивирование штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius), используя мелассу в качестве источника углерода, давало бактериальную целлюлозу, обладающую высокой степенью диспергируемости, в больших количествах за короткий период времени.

Пример 5: сравнение коэффициента пропускания и скорости продукции бактериальной целлюлозы, когда бактерия отличается

Содержащая BC жидкость, полученная при культивировании при перемешивании, была получена с помощью способа, описанного в (1) примера 2. Однако мелассу использовали в качестве источника углерода вместо глюкозы. Штамм NEDO-01 (G. intermedius штамм SIID9587) и Gluconacetobacter hansenii штамм ATCC23769, Gluconacetobacter xylinus штамм ATCC53582, Gluconacetobacter xylinus штамм ATCC700178 (BPR2001), Gluconacetobacter xylinus штамм JCM10150, Gluconacetobacter intermedius штамм DSM11804 и Gluconacetobacter xylinus штамм KCCM40274 в качестве известных продуцирующих бактериальную целлюлозу бактерий были использованы в качестве бактерий, соответственно. При использовании штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) число дней в основной культуре было установлено на значении = 3 дня вместо 4 дней, поскольку источник углерода в среде для культивирования практически исчезал в день 3 основного культивирования. С другой стороны, при использовании штамма DSM11804 число дней в основной культуре было установлено на значении = 5 дней вместо 4 дней, поскольку степень уменьшения источника углерода в культуральной среде была небольшой даже в день 4 основного культивирования. Впоследствии коэффициент пропускания света для каждой содержащей бактериальную целлюлозу воды определяли с помощью способа, описанного в (2) [2-1] примера 3. Количество продуцированной BC (г/л) и скорость продукции BC (г/л/день) рассчитывали с помощью способа, описанного в примере 4, и коэффициент пропускания и скорость продукции BC представляли в количественной форме на гистограммах. Результаты представлены на фиг. 7.

Как показано в таблице и на левой гистограмме фиг. 7, коэффициент пропускания при использовании штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) составлял 57%, тогда как коэффициент пропускания при использовании G. hansenii штамма ATCC23769, G. xylinus штамма ATCC53582, G. xylinus штамма ATCC700178 (BPR2001), G. xylinus штамма JCM10150, G. intermedius штамма DSM11804 и G. xylinus штамма KCCM40274 составлял 20%, 33%, 29%, 27%, 9% и 13%, соответственно. Эти результаты показывали, что коэффициент пропускания света с длиной волны 500 нм для воды, содержащей бактериальную целлюлозу, полученную при культивировании штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587), в конечной концентрации, составляющей 0,1±0,006%

(масс./масс.), был заметно больше (35% или более) коэффициента пропускания света для воды, содержащей бактериальную целлюлозу, полученную при культивировании каждого из штаммов, отличных от NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587). Другими словами, было установлено, что культивирование штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) может дать бактериальную целлюлозу, обладающую высокой степенью диспергируемости и равномерно диспергируемую в жидкости.

Как показано в таблице и на правой гистограмме на фиг. 6, скорость продукции BC при использовании штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) составляла 1,48 г/л/день, в то время как скорость продукции BC при использовании G. hansenii штамма ATCC23769, G. xylinus штамма ATCC53582, G. xylinus штамма ATCC700178 (BPR2001), G. xylinus штамма JCM10150, G. intermedius штамма DSM11804 и G. xylinus штамма KCCM40274 составляла 1,05 г/л/день, 1,03 г/л/день, 1,11 г/л/день, 1,10 г/л/день, 0,42 г/л/день и 0,43 г/л/день, соответственно. Другими словами, скорость продукции BC при использовании штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) была заметно больше скорости продукции BC при использовании штаммов, отличных от NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587). Эти результаты показывали, что культивирование штамма NEDO-01 (штамма SIID9587 G. intermedius SIID9587) смогло дать бактериальную целлюлозу, обладающую высокой степенью диспергируемости, в больших количествах за короткий период времени.

Пример 6: молекулярная масса бактериальной целлюлозы

В качестве образцов были предоставлены образцы A, B, C и D, а также содержащая происходящее из целлюлозной массы CNF жидкость (2) примера 3. Каждый из этих образцов лиофилизировали, добавляли к 57-59% раствору гидроксида тетрабутилфосфония в воде и растворяли при стоянии при 35°C, с последующим добавлением воды до концентрации гидроксида тетрабутилфосфония, составляющей 40-42% (масс./масс.), и концентрации образца, составляющей 0,2% (масс./масс.). Впоследствии осуществляли центрифугирование для осаждения примесей с получением супернатанта. Супернатант подвергали гельпроникающей хроматографии в следующих условиях для определения удерживаемого объема, необходимого для получения максимума пика хроматограммы. Супернатант измеряли 3 раза в одних и тех же условиях. Результаты представлены в таблице 3, а наугад выбранная хроматограмма представлена на фиг. 8.

Условия для гельпроникающей хроматографии

Инструментальное средство: высокоэффективный жидкостный хроматограф (Shimadzu Corporation)

Колонка: колонка с внутренним диаметром 6,0 мм и длиной 15 см, заполненная метакрилатом с диаметром частиц = 9 мкм (TSKgel super AWPM-H; Tosoh Corp.)

Защитная колонка: внутренний диаметр 4,6 мм и длина 3,5 см (TSK guardcolum super AW-H; Tosoh Corp.)

Температура колонки: 35°C

Скорость подачи: 0,07 мл/мин

Объем вводимого образца: 10 мкл

Элюент: 40-42% (масс./масс.) раствор гидроксида тетрабутилфосфония в воде

Конечная концентрация бактериальной целлюлозы в элюенте: 0,2% (масс./масс.)

Контрольный образец: пуллулан с молекулярной массой, составляющей $85{,}3\times10^4$ (Shodex standard P-82).

ТАБЛИЦА 3

	Время удерживания /минуты	Удерживаемый объем/мл	Среднее значение /мл	Средне квадратическое отклонение/мл
Образец A (1-ое измерение)	40,4	2,828	2,79	0,05
Образец A (2-ое измерение)	39,1	2,737		
Образец A (3-ье измерение)	40	2,8		
Образец B (1-ое измерение)	39,8	2,786	2,81	0,03
Образец B (2-ое измерение)	39,9	2,793		
Образец B (3-ье измерение)	40,7	2,849		
Образец C (1-ое измерение)	40,1	2,807	2,82	0,02
Образец C (2-ое измерение)	40,5	2,835		
Образец C (3-ье измерение)	40,1	2,807		
Образец D (1-ое измерение)	39,2	2,744	2,76	0,02
Образец D (2-ое измерение)	39,4	2,758		
Образец D (3-ье измерение)	39,8	2,786		
Содержащая происходящее из целлюлозной массы CNF жидкость (1-ое измерение)	42,9	3,003	3,04	0,04
Содержащая происходящее из целлюлозной массы CNF жидкость (2-ое измерение)	43,4	3,038		
Содержащая происходящее из целлюлозной массы CNF жидкость (3-ье измерение)	43,9	3,073		
Пуллуан (1-ое измерение)	45,7	3,199	3,24	0,04
Пуллуан (2-ое измерение)	46,8	3,276		
Пуллуан (3-ье измерение)	46,4	3,248		

Как показано в таблице 3 и на фиг. 8, удерживаемый объем, необходимый для получения максимума пика, соответствующего каждому из образцов A, B, C и D, составлял в среднем 2,79 мл, 2,81 мл, 2,82 мл и 2,76 мл, соответственно, и был меньше по сравнению с 3,04 мл для содержащей происходящее из целлюлозной массы CNF жидкости и 3,24 мл для пуллулана. Эти результаты показывали, что средняя молекулярная масса бактериальной целлюлозы, полученной путем подвергания штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) культивированию при перемешивании, была больше таковой целлюлозы из целлюлозной массы и больше, чем $85{,}3\times10^4$, исходя из пуллулана. В таблице 3 также показано, что, когда бактериальную целлюлозу, полученную путем подвергания штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) культивированию при перемешивании, подвергали гельпроникающей хроматографии в тех же условиях, удерживаемый объем, необходимый для получения максимума пика хроматограммы, достигал от 2,3 мл (включительно) до 3,0 мл (исключительно), поскольку удерживаемый объем, необходимый для получения максимума пика, соответствующего каждому из образцов A, B, C и D, находился в диапазоне от 2,737 до 2,849 мл.

Пример 7: морфология бактериальной целлюлозы

(1) Измерение диаметра волокна

Были предоставлены содержащая BC жидкость, полученная при культивировании при перемешивании, используя среду для основного культивирования с глицерином, (1) примера 2 и содержащая BC жидкость, полученная при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя (2) примера 2. Каждую из этих содержащих целлюлозу жидкостей доводили до концентрации, составляющей приблизительно 0,001% (масс./масс.), а затем 10 мкл каждой жидкости добавляли по каплям на покрытую поливинилформальдегидом медную сетку и сушили на воздухе. Впоследствии к ней по каплям добавляли 5 мкл 5% (масс./об.) водного раствора ацетата

гадолиния, и избыточное количество раствора удаляли с помощью фильтровальной бумаги через 10 секунд для негативного контрастирования. Продукт наблюдали под просвечивающим электронным микроскопом при ускоряющем напряжении, равном 80 кВ, и 30000-кратном увеличении изображения для определения диаметра целлюлозных волокон на основе наблюдаемого изображения. Результаты представлены на фиг. 9.

Как показано на фиг. 9, диаметр целлюлозных волокон составлял 17±8 нм в случае содержащей BC жидкости, полученной при культивировании при перемешивании, был заметно меньше по сравнению с 55±22 нм в случае содержащей BC жидкости, полученной при стационарном культивировании, с обработкой с использованием смесителя, и имел небольшое среднеквадратическое отклонение. Эти результаты показали, что бактериальная целлюлоза, полученная путем подвергания штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) культивированию при перемешивании образовывала тонкие и однородные волокна, демонстрирующие небольшие отклонения по диаметру между волокнами.

(2) Определение постоянства диаметра волокон и степени агрегации

Были предоставлены содержащая BC жидкость, полученная при культивировании при перемешивании, используя среду для основного культивирования с BDF-B, (1) примера 2 и содержащая CNF из целлюлозной массы жидкость (1) примера 3. Каждую из этих содержащих целлюлозу жидкостей доводили до концентрации, составляющей приблизительно 0,001% (масс./масс.), а затем процесс распыления раствора на покрытую поливинилформальдегидом медную сетку и его сушки, используя сушилку, повторяя 10 раз. Впоследствии к ней по каплям добавляли 5 мкл 5% (масс./об.) водного раствора ацетата гадолиния, и избыточное количество раствора удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Кроме того, ряд операций, состоящий из добавления по каплям 5 мкл воды сверхвысокой чистоты, а затем удаления избыточного количества раствора с помощью фильтровальной бумаги, повторяли 2 раза, с последующим негативным контрастированием с использованием сушки на воздухе. Продукт наблюдали под просвечивающим электронным микроскопом при ускоряющем напряжении, равном 80 кВ, и 10000-кратном увеличении изображения. Результаты представлены на фиг. 10. Также осуществляли наблюдение с помощью призмы Николя, используя поляризационный микроскоп. Результаты представлены на фиг. 11.

Как показано на фиг. 10, множество целлюлозных волокон с соизмеримыми диаметрами на наноуровне наблюдали в содержащей BC жидкости, полученной при культивировании при перемешивании, тогда как целлюлозные волокна с различными диаметрами, включая диаметры вплоть до 500 нм или более, наблюдали в содержащей CNF из целлюлозной массы жидкости. Исходя из этих результатов было снова подтверждено, что бактериальная целлюлоза, полученная путем подвергания штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) культивированию при перемешивании, образует волокна с соизмеримым диаметром на наноуровне.

Как показано на фиг. 11, относительно толстые волокна, на которые указывают стрелки, отчетливо наблюдались в содержащей CNF из целлюлозной массы жидкости, тогда как неяркие изображения были в части, окруженной пунктирной линией, в содержащей BC жидкости, полученной при культивировании при перемешивании. Эти результаты показали, что относительно толстые волокна, такие как субмикроволокна и микроволокна, присутствуют в случае происходящей из целлюлозной массы целлюлозы, тогда как тонкие волокна на наноуровне были равномерно диспергированы в случае бактериальной целлюлозы, полученной посредством подвергания штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) культивированию при перемешивании.

Пример 8: оценка способности к продукции бактериальной целлюлозы

(1) Способность к продукции при стационарном культивировании

Были приготовлены культуральные среды, в которые добавляли предварительно обработанный BDF-B и реагент глицерин, соответственно, вместо глюкозы в качестве источника углерода в среде для культивирования LB, и они были названы средой для культивирования LB/BDF-B и средой для культивирования LB/глицерин, соответственно. Каждый из штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587), Gluconacetobacter xylinus штамма ATCC53582, Gluconacetobacter hansenii штамма ATCC23769 и Gluconacetobacter xylinus штамма ATCC700178 (BPR2001) засевали в каждую из среды для культивирования LB/глицерин и среды для культивирования LB/BDF-B и подвергали стационарному культивированию при 30°C в течение 7 дней с образованием пленки в гелеобразной форме. Процесс добавления к ней 1% (масс./об.) водного раствора NaOH и выполнения автоклавирования повторяли до тех пор, пока гелеобразная пленка не становилась белой. После этого процесс добавления воды и выполнения автоклавирования повторяли до тех пор, пока pH не достигнет значения 7 или менее, для очистки. Измеряли массу абсолютно сухого материала - бактериальной целлюлозы, полученной путем сушки после очистки. Результаты представлены на фиг. 12.

Как показано на фиг. 12, G. hansenii штамм ATCC23769 продуцировал небольшие количества бактериальной целлюлозы и в среде для культивирования LB/глицерин, и в среде для культивирования LB/BDF-B. G. xylinus штамм ATCC53582 и G. xylinus штамм ATCC700178 (BPR2001) продуцировали относительно большие количества бактериальных целлюлоз в среде для культивирования LB/глицерин, тогда как в среде для культивирования LB/BDF-B продукция бактериальной целлюлозы не отмечалась. В отличие от этого, штамм NEDO-01 (G. intermedius штамм SIID9587) продуцировал сравнительно большие количества бактериальных целлюлоз и в среде для культивирования LB/глицерин, и в среде для культивирования LB/BDF-B. Эти результаты показали, что штамм NEDO-01 (G. intermedius штамм SIID9587) мог эффективно продуцировать бактериальную целлюлозу при подвергании стационарному культивированию, используя или реагент глицерин, или BDF-B в качестве источника углерода. Его отличительная особенность, заключающаяся в способности продуцировать бактериальную целлюлозу, используя BDF-B в качестве источника углерода, является особенностью, которой другие сравниваемые штаммы не обладают, является также выгодной в практическом аспекте, в котором побочный продукт может использоваться, и вносит также огромный вклад в снижении производственных затрат.

(2) Способность к продукции при культивировании при перемешивании

Каждый из штаммов NEDO-01 (G. intermedius штамм SIID9587), штамм ATCC53582 и штамм ATCC23769 засевали в 10 мл среды для культивирования HS и подвергали стационарному культивированию при 30°C в течение 3 дней для получения пре-прекультуры. Впоследствии культуральную жидкость, полученную при пре-прекультивировании, засевали в 10 мл среды для культивирования HS и подвергали стационарному культивированию при 30°C в течение 3 дней для получения. Затем 100 мл каждой из среды для основного культивирования с глицерином и среды для основного культивирования с BDF-B (1) примера 2 помещали в снабженную лопастями колбу Эрленмейера, и прекультуральную жидкость засевали в количестве, соответствующем одному и тому же количеству бактериальных клеток для каждого бактериального штамма, и подвергали культивированию на качалке в течение 3 дней в условиях 150 оборотов в минуту и 30°C для получения основной культуры. Впоследствии бактериальную целлюлозу в жидкости, полученной при основном культивировании,

очищали с помощью способа, описанного в (1) примера 2. Однако встряхивание выполняли при 60°C и 80 оборотов в минуту в течение 4-5 часов, с последующим дальнейшим встряхиванием при 20°C в течение ночи. Очищенную бактериальную целлюлозу сушили и измеряли массу абсолютно сухого материала. Результаты представлены на фиг. 13.

Как показано на фиг. 13, не наблюдалась продукция штаммом ATCC53582 G. xylinus бактериальной целлюлозы в каждой из среды для основного культивирования с глицерином и среды для основного культивирования с BDF-B. В случае штамма ATCC23769 G. hansenii масса абсолютного сухого материала - бактериальной целлюлозы была относительно большей при использовании среды для основного культивирования с глицерином, но продукция бактериальной целлюлозы не наблюдалась при использовании среды для основного культивирования с BDF-B. В отличие от этого, в случае штамма NEDO-01 (G. intermedius штамма SIID9587) масса абсолютного сухого материала - бактериальной целлюлозы была большей при использовании каждой из среды для основного культивирования с глицерином и среды для основного культивирования с BDF-B. Эти результаты показали, что штамм NEDO-01 (G. intermedius штамм SIID9587) мог эффективно продуцировать бактериальную целлюлозу или при стационарном культивировании, или при культивировании при перемешивании, используя или реагент глицерин, или BDF-B в качестве источника углерода.

(57) Формула изобретения

1. Штамм Gluconacetobacter intermedius SIID9587 (номер доступа NITE BP-01495), продуцирующий бактериальную целлюлозу.

2. Способ получения бактериальной целлюлозы, включающий стадию культивирования штамма по п. 1 для получения бактериальной целлюлозы.

3. Бактериальная целлюлоза, продуцируемая штаммом по п.1, обладающая высокой диспергируемостью, которая обеспечивается физическим свойством - (a), указанным ниже:

(a) составляющим 35% или более коэффициентом пропускания света с длиной волны 500 нм в случае воды, содержащей бактериальную целлюлозу в конечной концентрации, составляющей 0,1±0,006% (масс./масс.).

4. Бактериальная целлюлоза по п.3, которая обладает физическим свойством - (b), указанным ниже:

(b) составляющим от 2,5 мл включительно до 3,0 мл исключительно удерживаемым объемом, необходимым для получения максимума пика хроматограммы при гельпроникающей хроматографии при ее проведении в следующих условиях i)-vi):

i) колонка: колонка с внутренним диаметром 6,0 мм и длиной 15 см, заполненная метакрилатом с диаметром частиц равно 9 мкм;

ii) защитная колонка: внутренний диаметр 4,6 мм и длина 3,5 см;

iii) температура колонки: 35°C;

iv) скорость подачи: 0,07 мл/мин;

v) элюент: 40-42% (масс./масс.) раствор гидроксида тетрабутилфосфония в воде, и

vi) конечная концентрация бактериальной целлюлозы в элюенте: 0,2% (масс./масс.).

5. Бактериальная целлюлоза по п.3 или 4, которая продуцируется в результате ассимиляции содержащего глицерин побочного продукта, образуемого при производстве биодизельного топлива из растительных масел, используя бактерию.

6. Бактериальная целлюлоза по п.3 или 4, которая продуцируется в результате ассимиляции одного или двух или более веществ, выбираемых из группы, состоящей

из сахара, содержащего сахарозу побочного продукта, образуемого при производстве сахара, и их гидролизатов, и изомеризованного сахара, используя бактерию.

7. Бактериальная целлюлоза по п.6, причем побочным продуктом является меласса.

1

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Nippon Beet Sugar Manufacturing., Co., LTD.
Tajima, Kenji
Kose, Ryota

<120> БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЦЕЛЛЮЛОЗА И ПРОДУЦИРУЮЩАЯ ЕЕ БАКТЕРИЯ

<130> PCT0614

<150> JP2012-289043
<151> 2012-12-28

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1367
<212> ДНК
<213> Gluconobacter intermedius SIID9587

<400> 1
catgcagtcg cacgaacctt tcggggttag tggcggacgg gtgagtaacg cgtagggatc 60

tatccacggg tgggggataa ctttgggaaa ctgaagctaa taccgcatga cacctgaggg 120

tcaaaggcgc aagtcgcctg tggaggaacc tgcgttcgat tagctagttg gtggggtaaa 180

ggcctaccaa ggcgatgatc gatagctggt ctgagaggat gatcagccac actgggactg 240

agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaag 300

cctgatccag caatgccgcg tgtgtgaaga aggttttcgg attgtaaagc actttcagcg 360

gggacgatga tgacggtacc cgcagaagaa gccccggcta acttcgtgcc agcagccgcg 420

gtaatacgaa gggggcaagc gttgctcgga atgactgggc gtaaagggcg cgtaggcggt 480

tgacacagtc agatgtgaaa ttcccgggct taacctgggg gctgcatttg atacgtggcg 540

actagagtgt gagagagggt tgtggaattc ccagtgtaga ggtgaaattc gtagatattg 600

ggaagaacac cggtggcgaa ggcggcaacc tggctcataa ctgacgctga ggcgcgaaag 660

cgtggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ctgtaaacga tgtgtgctgg 720

atgttgggtg actttgtcat tcagtgtcgt agttaacgcg ataagcacac cgcctgggga 780

gtacggccgc aaggttgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca 840

tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgcagaac cttaccaggg cttgacatgc ggaggctgtg 900

tccagagatg ggcatttctc gcaagagacc tccagcacag gtgctgcatg gctgtcgtca 960

gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg cctttagttg 1020

ccatcacgtt tgggtgggca ctctaaagga actgccggtg acaagccgga ggaaggtggg 1080

gatgacgtca agtcctcatg gcccttatgt cctgggctac acacgtgcta caatggcggt 1140

2

2

gacagtggga agccaggtgg tgacaccgag ccgatctcaa aaagccgtct cagttcggat 1200

tgcactctgc aactcgagtg catgaaggtg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc 1260

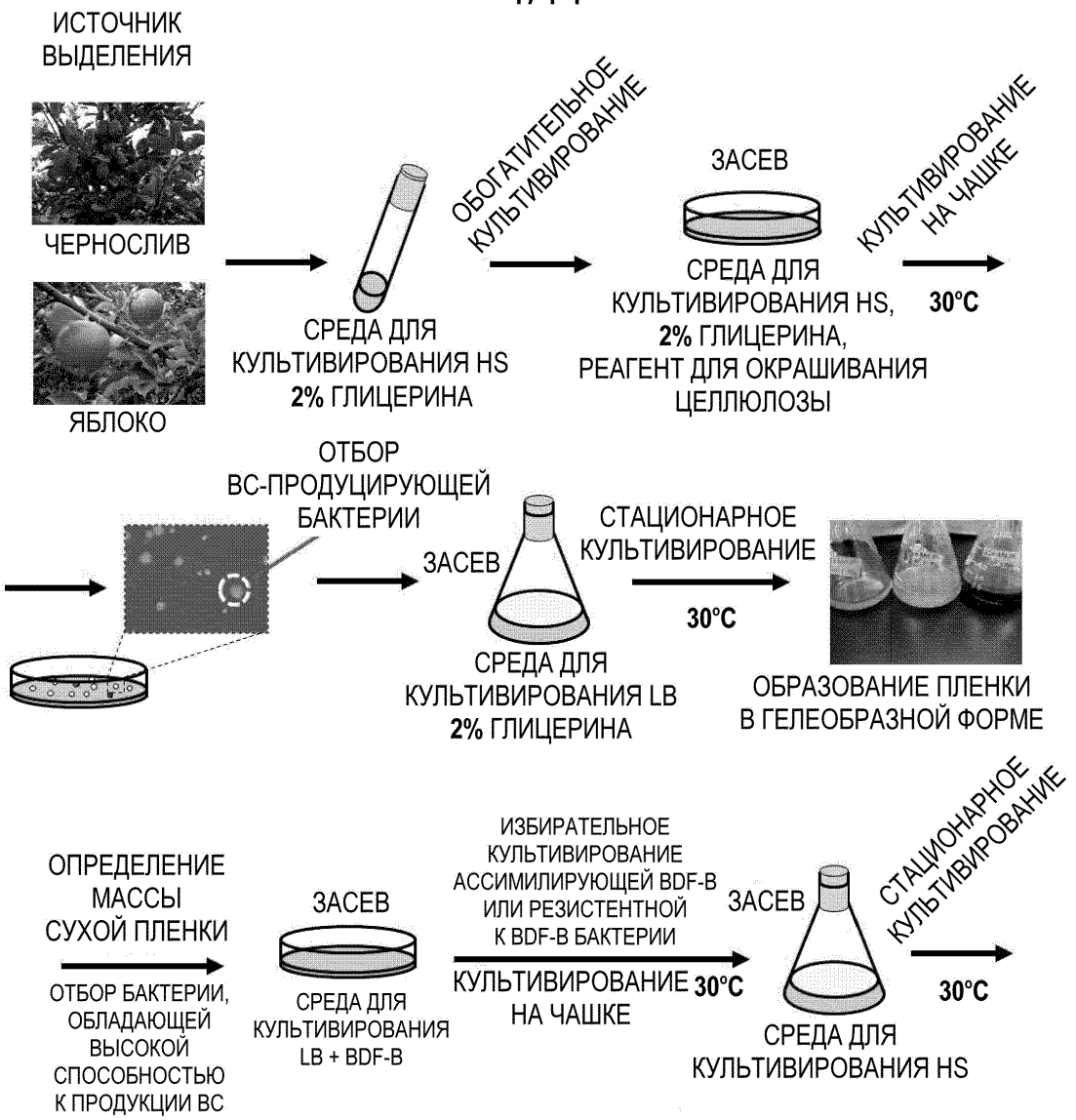
gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc acaccatggg agttggtttg 1320

accttaagcc ggtgagcgaa ccgcaaggac gcagccgacc acgtcgt 1367

3

526638

1/14



ФИГ.1

4

```
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
                    ************************************************************

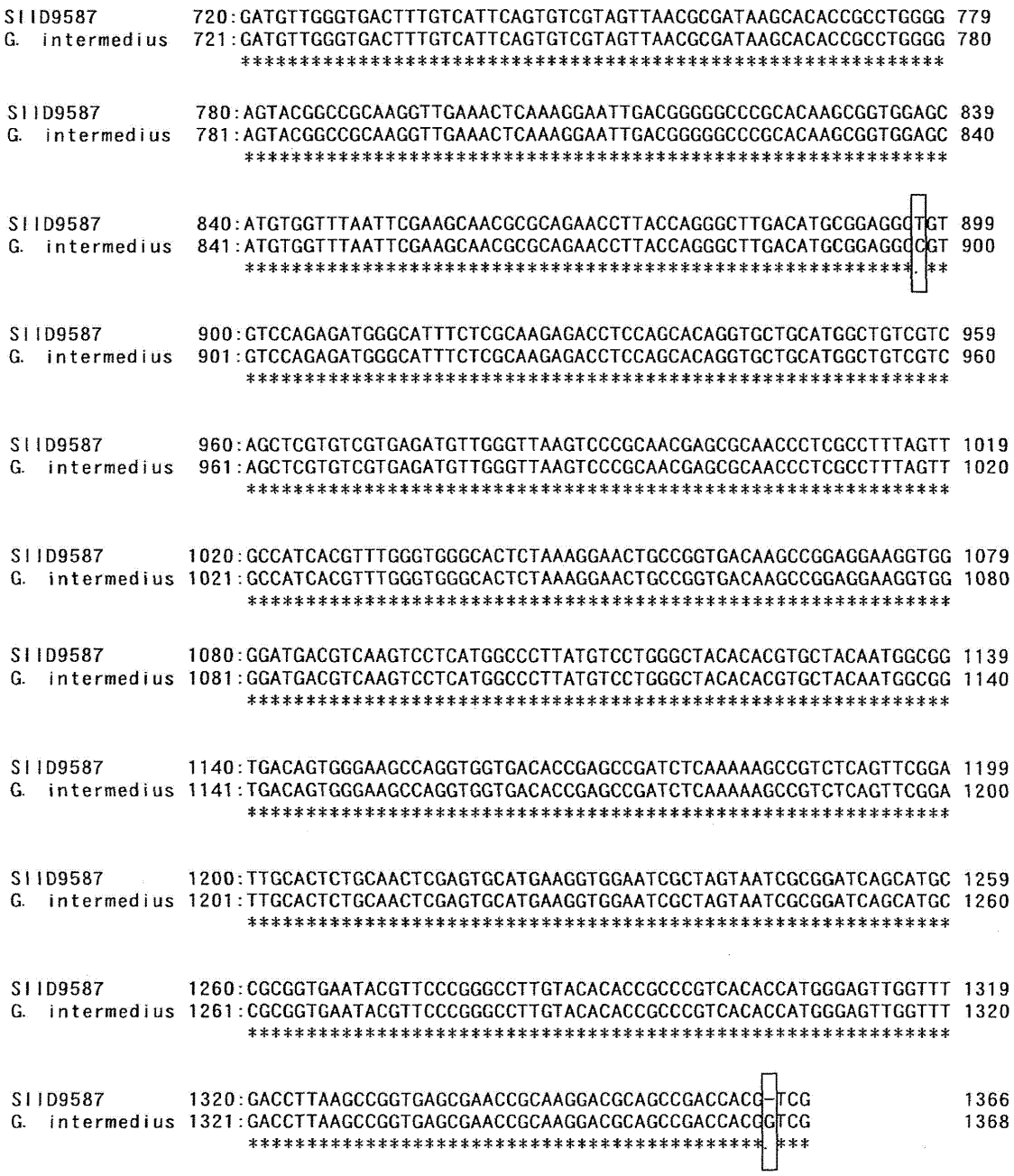
SIID9587        480:TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGC 539
G. intermedius  481:TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGC 540
                    ************************************************************

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
                    ************************************************************
```

ФИГ.2-1


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

ФИГ.2-2

6

ИССЛЕДУЕМЫЙ ОБЪЕКТ		SIID9587
ТЕМПЕРАТУРА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ (°C)		30
МОРФОЛОГИЯ КЛЕТОК		BACILLUS (0,7-0,8 × 1,5-2,5 мкм
ОКРАШИВАЕМОСТЬ ПО ГРАМУ		-
ПРИСУТСТВИЕ ИЛИ ОТСУТСТВИЕ СПОР		-
ПОДВИЖНОСТЬ		-
МОРФОЛОГИЯ КОЛОНИЙ		СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ: GYC AGAR
		ПЕРИОД ВРЕМЕНИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ: 48 ч
		ДИАМЕТР: 1,0-2,0 мм
		ХРОМАТИЧЕСКИЙ ТОН: КРЕМОВЫЙ
		ФОРМА: КРУГЛАЯ
		РЕЛЬЕФНАЯ ФОРМА: ПОЛУСФЕРИЧЕСКАЯ
		ОКРУЖНОСТЬ: ПОЛНАЯ
		ФОРМА И П.П. ПОВЕРХНОСТИ: ГЛАДКАЯ
		СТЕПЕНЬ ПРОЗРАЧНОСТИ: НЕПРОЗРАЧНЫЙ
		ВЯЗКОСТЬ: МАСЛОПОДОБНАЯ
ИССЛЕДУЕМАЯ ТЕМПЕРАТУРА РОСТА (°C)	37	+
	45	-
КАТАЛАЗНАЯ РЕАКЦИЯ		+
ОКСИДАЗНАЯ РЕАКЦИЯ		-
ПРОДУКЦИЯ КИСЛОТЫ/ГАЗА ИЗ ГЛЮКОЗЫ (ПРОДУКЦИЯ КИСЛОТЫ/ПРОДУКЦИЯ ГАЗА)		NT
ТЕСТ НА ОКИСЛЕНИЕ/ФЕРМЕНТАЦИЮ		NT

+: ПОЗИТИВНЫЙ; -: НЕГАТИВНЫЙ; NT: НЕ ПРОВЕРЕНО

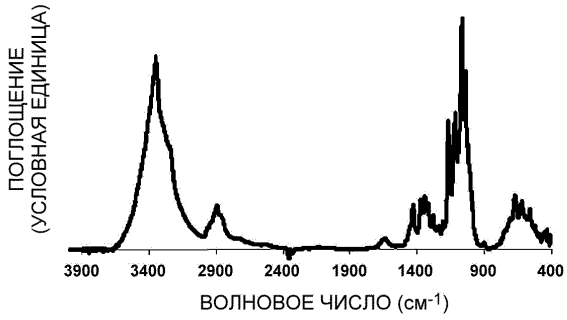
ИССЛЕДУЕМЫЙ ОБЪЕКТ	
ПРОДУКЦИЯ КРАСИТЕЛЯ В СРЕДЕ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ GYC	-
РОСТ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ	-
РАЗЛОЖЕНИЕ АЦЕТАТА НАТРИЯ НА CO_2	+
ОКИСЛЕНИЕ	
н-ПРОПАНОЛ	+
ГЛЮКОЗА	+
ЭТАНОЛ	+
АССИМИЛЯЦИЯ	
ЭТАНОЛ	+
ГЛИЦЕРИН	+
ЛАКТАТ НАТРИЯ	+
САХАРОЗА	+w
РОСТ В 3% ЭТАНОЛЕ	+
РОСТ В 5% УКСУСНОЙ КИСЛОТЕ	-
РОСТ В СРЕДЕ, СОДЕРЖАЩЕЙ 30% ГЛЮКОЗЫ	+
РОСТ НА MRS AGAR	+

+: ПОЗИТИВНЫЙ; -: НЕГАТИВНЫЙ

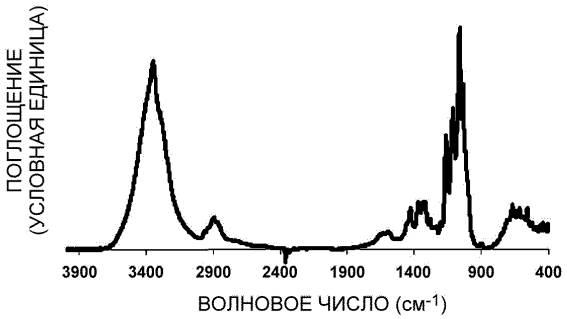
ФИГ.3

7

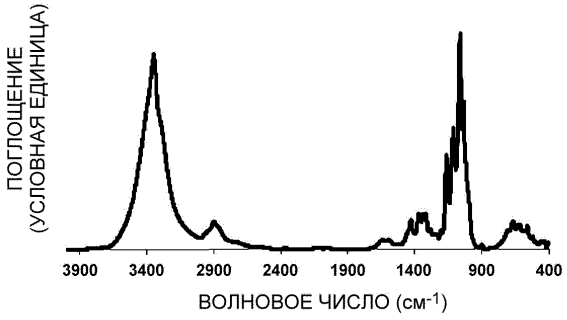
СОДЕРЖАЩАЯ ВС ЖИДКОСТЬ, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ СТАЦИОНАРНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ, С ОБРАБОТКОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМЕСИТЕЛЯ



СОДЕРЖАЩАЯ ВС ЖИДКОСТЬ, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРИ ПЕРЕМЕШИВАНИИ, ИСПОЛЬЗУЯ СРЕДУ ДЛЯ ОСНОВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С BDF-B

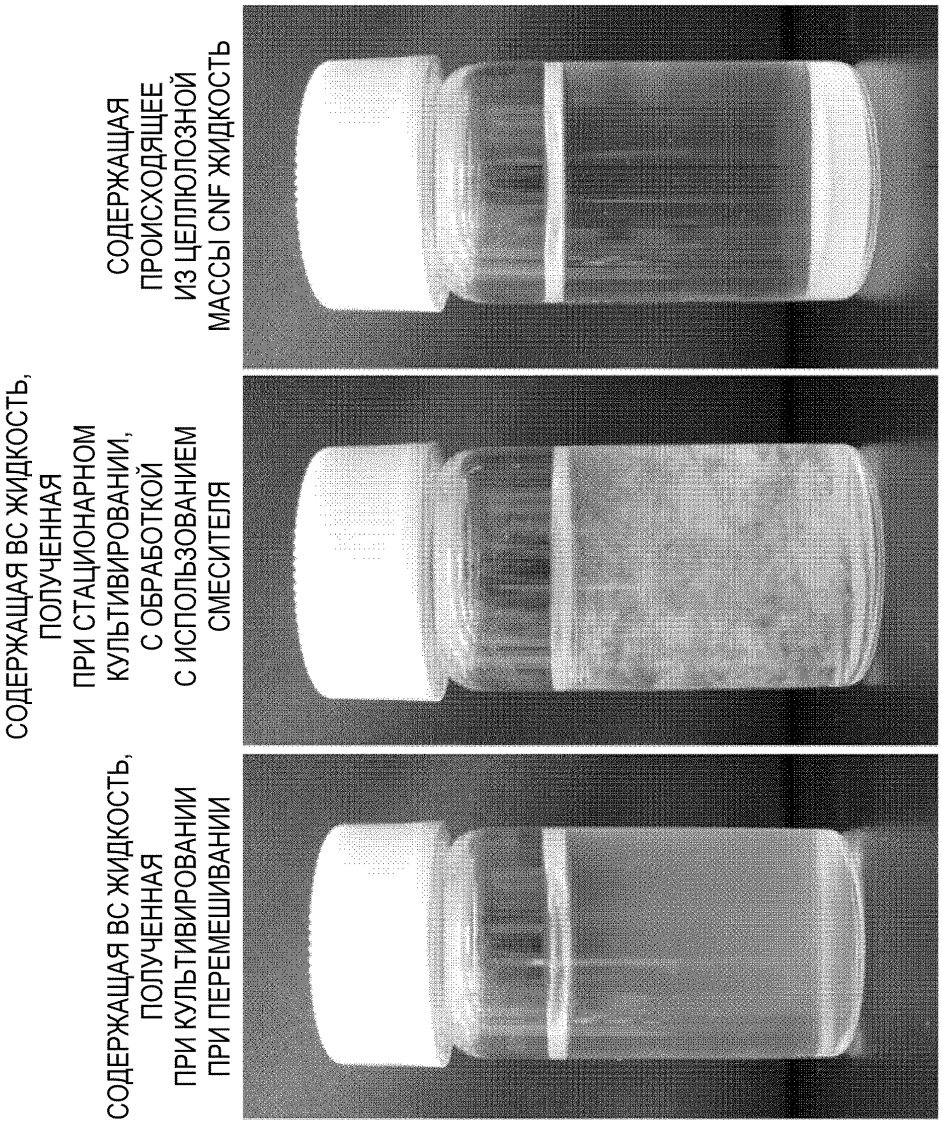


СОДЕРЖАЩАЯ ВС ЖИДКОСТЬ, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРИ ПЕРЕМЕШИВАНИИ, ИСПОЛЬЗУЯ СРЕДУ ДЛЯ ОСНОВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ГЛИЦЕРИНОМ



ФИГ.4

8

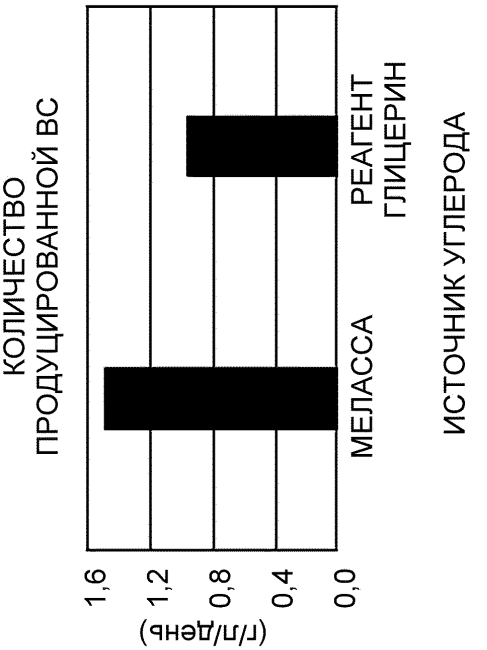

СОДЕРЖАЩАЯ ВС ЖИДКОСТЬ, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРИ ПЕРЕМЕШИВАНИИ
СОДЕРЖАЩАЯ ВС ЖИДКОСТЬ, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ СТАЦИОНАРНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ, С ОБРАБОТКОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМЕСИТЕЛЯ
СОДЕРЖАЩАЯ ПРОИСХОДЯЩЕЕ ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МАССЫ CNF ЖИДКОСТЬ

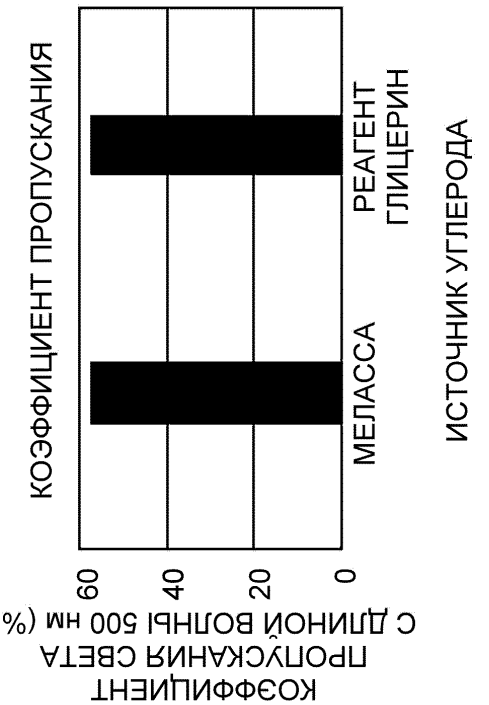
ФИГ.5

9

7/14

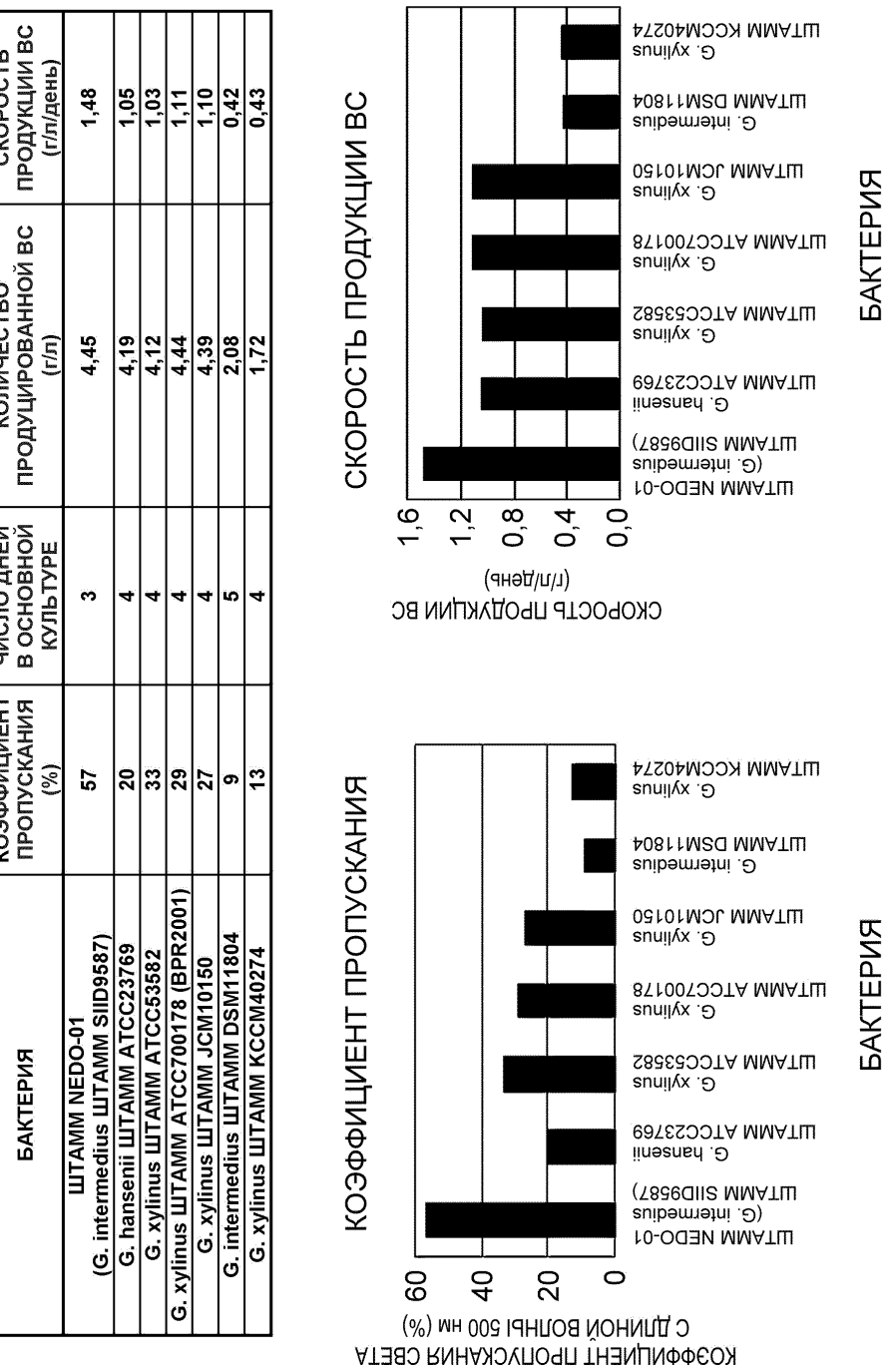
ИСТОЧНИК УГЛЕРОДА	КОЭФФИЦИЕНТ ПРОПУСКАНИЯ (%)	ЧИСЛО ДНЕЙ В ОСНОВНОЙ КУЛЬТУРЕ	КОЛИЧЕСТВО ПРОДУЦИРОВАННОЙ ВС (г/л)	СКОРОСТЬ ПРОДУКЦИИ ВС (г/л/день)
МЕЛАССА	57	3	4,45	1,48
РЕАГЕНТ ГЛИЦЕРИН	57	4	3,80	0,95





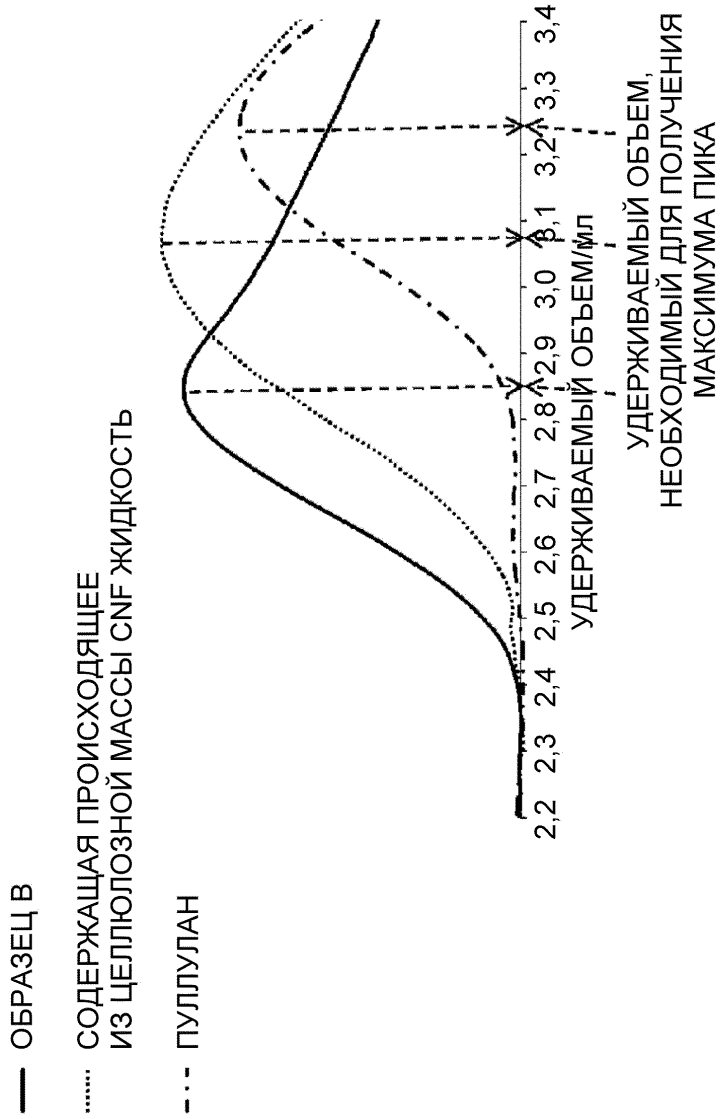
ФИГ.6

БАКТЕРИЯ	КОЭФФИЦИЕНТ ПРОПУСКАНИЯ (%)	ЧИСЛО ДНЕЙ В ОСНОВНОЙ КУЛЬТУРЕ	КОЛИЧЕСТВО ПРОДУЦИРОВАННОЙ ВС (г/л)	СКОРОСТЬ ПРОДУКЦИИ ВС (г/л/день)
ШТАММ NEDO-01 (G. intermedius ШТАММ SIID9587)	57	3	4,45	1,48
G. hansenii ШТАММ ATCC23769	20	4	4,19	1,05
G. xylinus ШТАММ ATCC53582	33	4	4,12	1,03
G. xylinus ШТАММ ATCC700178 (BPR2001)	29	4	4,44	1,11
G. xylinus ШТАММ JCM10150	27	4	4,39	1,10
G. intermedius ШТАММ DSM11804	9	5	2,08	0,42
G. xylinus ШТАММ KCCM40274	13	4	1,72	0,43

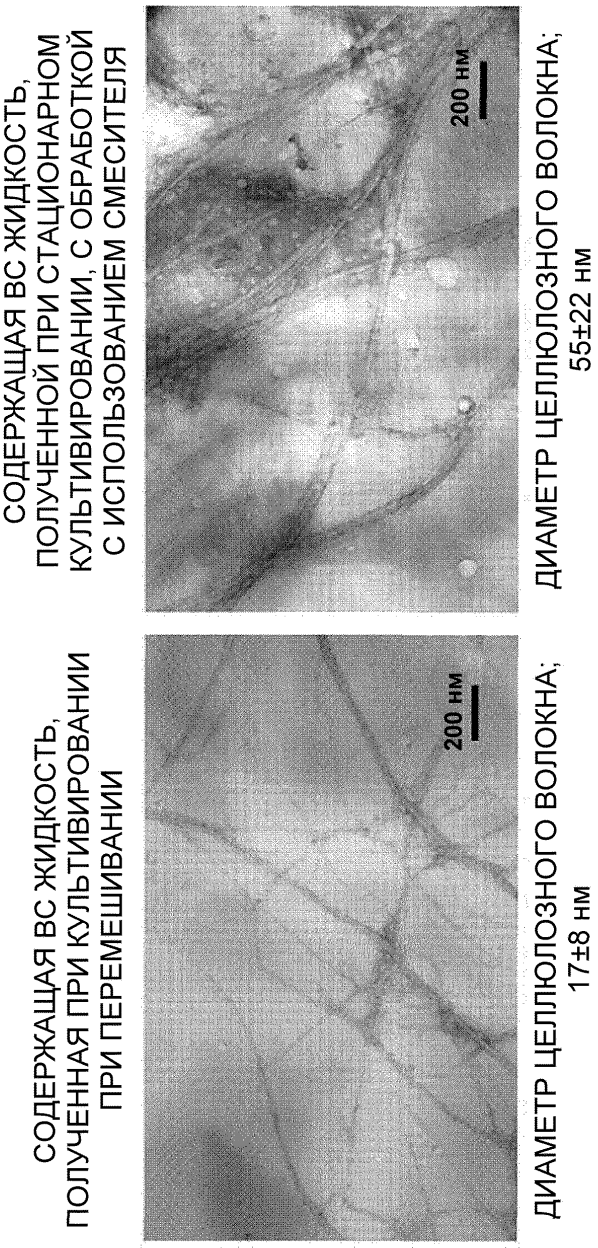


ФИГ.7

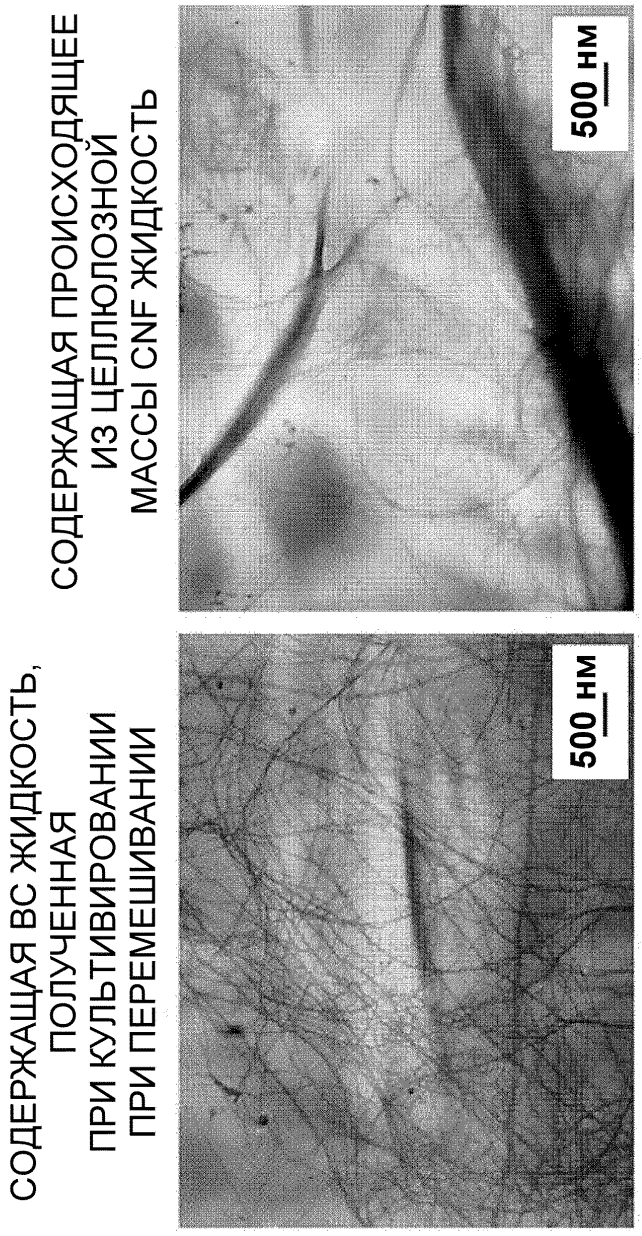
11


ОБРАЗЕЦ В
СОДЕРЖАЩАЯ ПРОИСХОДЯЩЕЕ ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МАССЫ CNF ЖИДКОСТЬ
ПУЛЛУЛАН
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
УДЕРЖИВАЕМЫЙ ОБЪЕМ/мл
УДЕРЖИВАЕМЫЙ ОБЪЕМ, НЕОБХОДИМЫЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МАКСИМУМА ПИКА

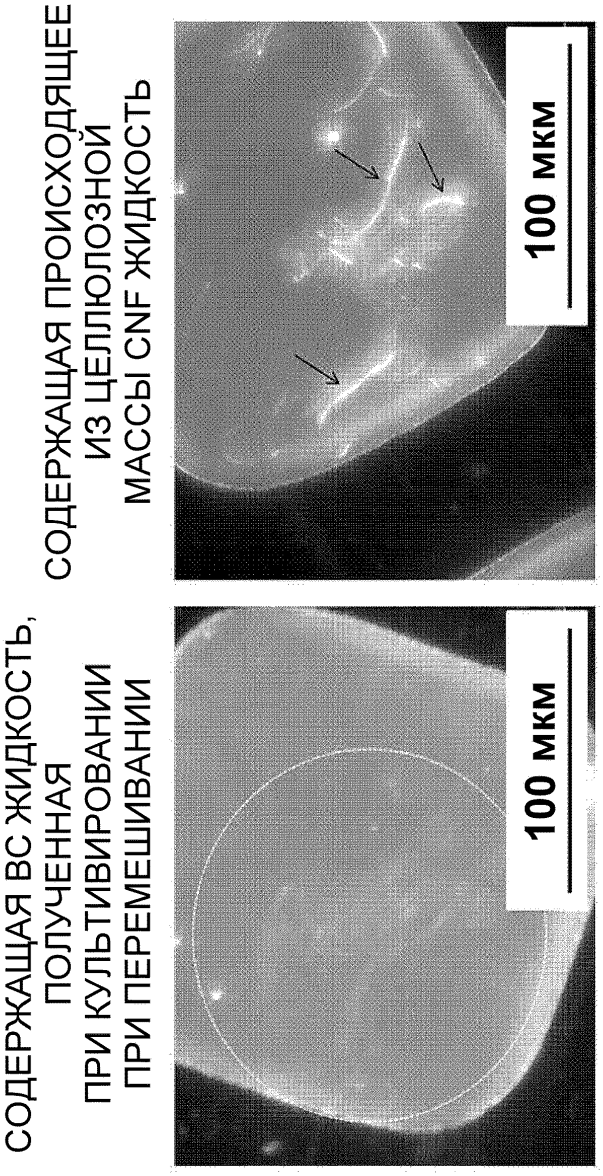
ФИГ.8


СОДЕРЖАЩАЯ ВС ЖИДКОСТЬ, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРИ ПЕРЕМЕШИВАНИИ
200 НМ
ДИАМЕТР ЦЕЛЛЮЛОЗНОГО ВОЛОКНА; 17±8 НМ
СОДЕРЖАЩАЯ ВС ЖИДКОСТЬ, ПОЛУЧЕННОЙ ПРИ СТАЦИОНАРНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ, С ОБРАБОТКОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СМЕСИТЕЛЯ
200 НМ
ДИАМЕТР ЦЕЛЛЮЛОЗНОГО ВОЛОКНА; 55±22 НМ

ФИГ.9

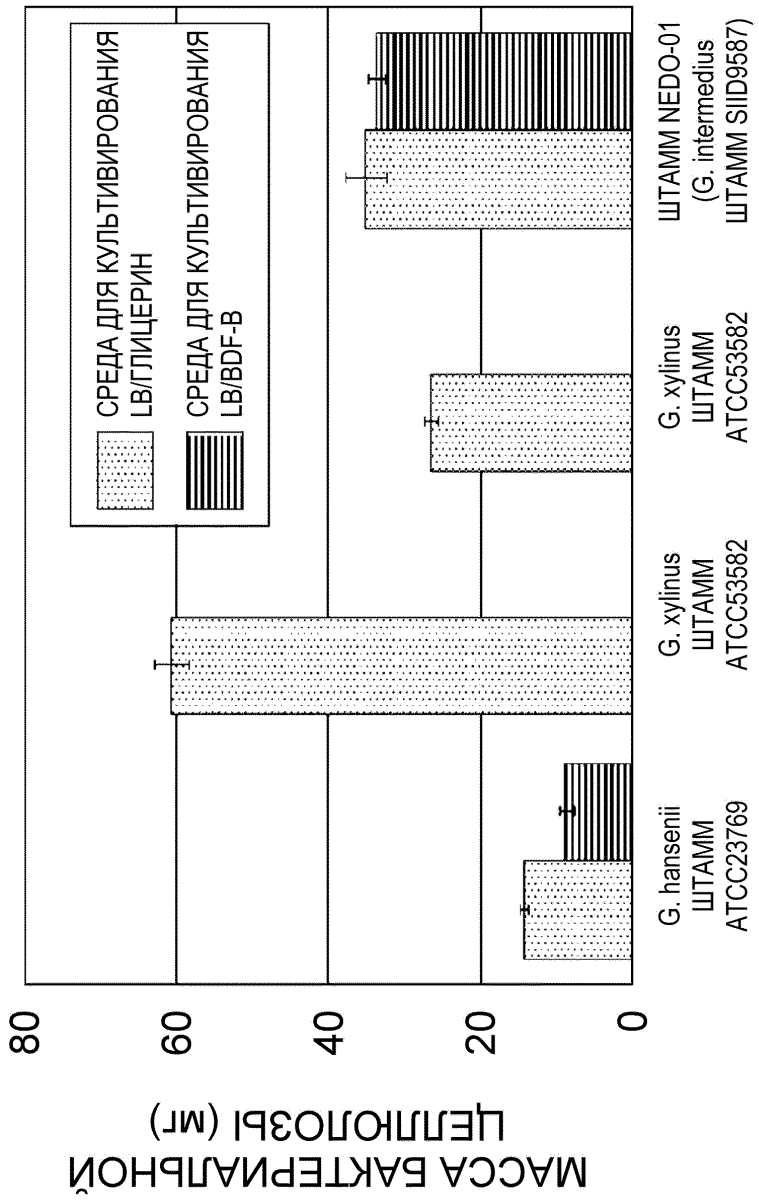

СОДЕРЖАЩАЯ ВС ЖИДКОСТЬ, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРИ ПЕРЕМЕШИВАНИИ
500 нм
СОДЕРЖАЩАЯ ПРОИСХОДЯЩЕЕ ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МАССЫ CNF ЖИДКОСТЬ
500 нм

ФИГ.10


СОДЕРЖАЩАЯ ВС ЖИДКОСТЬ, ПОЛУЧЕННАЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРИ ПЕРЕМЕШИВАНИИ
100 мкм
СОДЕРЖАЩАЯ ПРОИСХОДЯЩЕЕ ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МАССЫ CNF ЖИДКОСТЬ
100 мкм

ФИГ.11

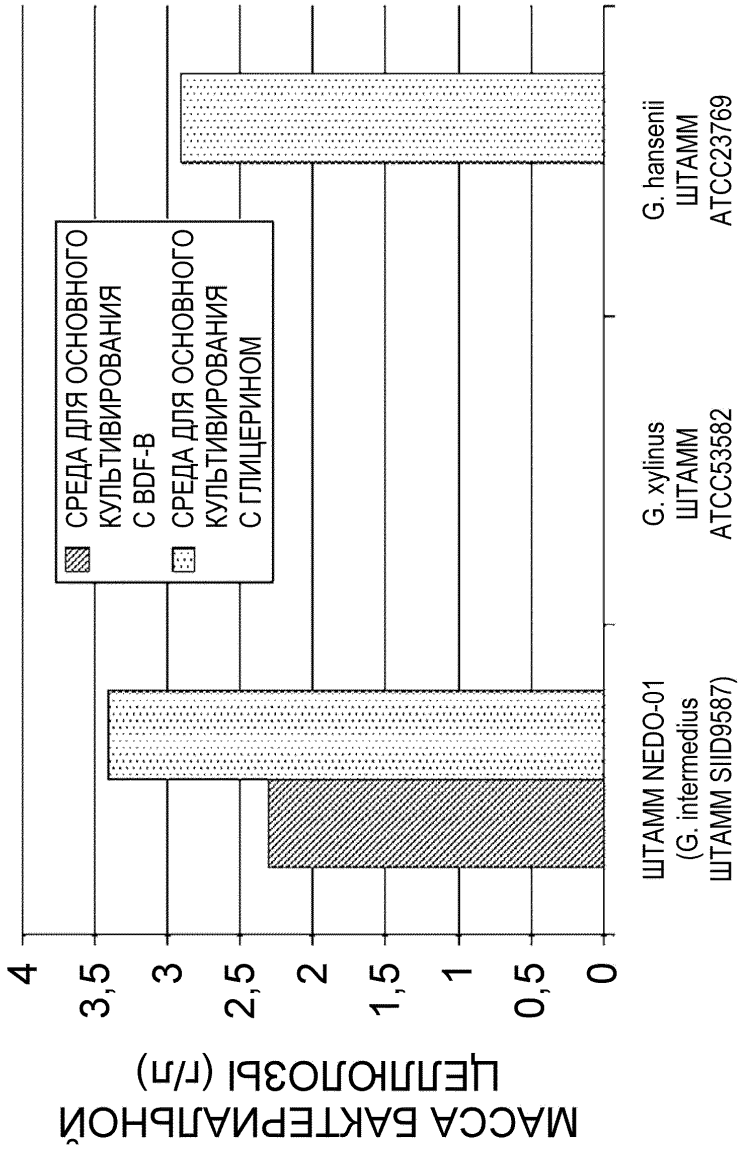
15


МАССА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ (мг)
0
20
40
60
80
СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ LB/ГЛИЦЕРИН
СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ LB/BDF-B
G. hansenii ШТАММ ATCC23769
G. xylinus ШТАММ ATCC53582
G. xylinus ШТАММ ATCC53582
ШТАММ NEDO-01 (G. intermedius ШТАММ SIID9587)

ФИГ.12

16

14/14


МАССА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ (г/л)
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
СРЕДА ДЛЯ ОСНОВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С BDF-B
СРЕДА ДЛЯ ОСНОВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ГЛИЦЕРИНОМ
ШТАММ NEDO-01 (G. intermedius ШТАММ SIID9587)
G. xylinus ШТАММ ATCC53582
G. hansenii ШТАММ ATCC23769

ФИГ.13