

(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
2017年11月16日(16.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/195888 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/38 (2006.01) *C12N 1/28* (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/018039

(22) 国際出願日: 2017年5月12日(12.05.2017)

(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 2016-095992 2016年5月12日(12.05.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP). 株式会社グリーンデイ (GREENDAY CORPORATIONS) [JP/JP]; 〒3001152 茨城県稲敷郡阿見町荒川本郷1343-91 Ibaraki (JP).

(72) 発明者: 正木 春彦 (MASAKI, Haruhiko); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 納庄 一樹 (NOSHO, Kazuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 大隅 一興 (OSUMI, Kazuoki); 〒3001152 茨城県稲敷郡阿見町荒川本郷1343-91 株式会社グリーンデイ内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目2番19号 アドレスビル6階 Tokyo (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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, 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, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR POTENTIATION OF MICROORGANISM PROLIFERATION CAPABILITY IN SOLID CULTURE MEDIUM

(54) 発明の名称: 固体培地での微生物の増殖能を増強する方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for potentiation of microorganism proliferation capability, a potentiator for microorganism proliferation capability, and the like, with enable stronger potentiation of microorganism proliferation capability. According to the present invention, a C5 or higher fatty acid encapsulated in cyclodextrin is used. Specifically, potentiation of the proliferation capability of a microorganism becomes possible by culturing the microorganism in a medium containing the cyclodextrin-encapsulated fatty acid.

(57) 要約: 本発明の目的は、微生物の増殖能をより強く増強することのできる、微生物の増殖能を増強する方法や、微生物の増殖能の増強剤等を提供することにある。本発明によれば、シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を用いる。具体的には、かかるシクロデキストリン包接脂肪酸を含有する培地で微生物を培養することにより、微生物の増殖能を増強することができる。



WO 2017/195888 A1

明 細 書

発明の名称： 固体培地での微生物の増殖能を増強する方法

技術分野

[0001] 本発明は、微生物の増殖能を増強する方法や、微生物の増殖能の増強剤等に関する。

背景技術

[0002] 寒天等の固体培地上で微生物を増殖させてコロニーを形成させ、そこから微生物を分離する純粋培養法は、コッホの時代に確立されて現在に至るまで、すべての微生物研究の第一歩となっている。実験微生物学や公衆衛生学では、生きている微生物を、コロニー形成能を有する微生物と定義し、その微生物が形成するコロニー数を計数することによって、生きている微生物を計数することが一般に行われている。食品及び臨床検査分野では、寒天平板培地に微生物懸濁液を塗布し、一定温度で培養することにより、寒天平板培地上に微生物コロニーを形成させ、食品又は臨床検査検体中に存在する微生物を検出又は分離して、微生物汚染又は感染の有無を検出することが行われている。また、土壌サンプル等の自然界のサンプル中の産業上に有用な微生物は、寒天平板培地上に成育した微生物コロニーから分離している。しかし、寒天等の固体培地を用いたコロニー法によって分離・培養できる微生物は、天然に存在する微生物のごく一部に過ぎない（非特許文献1）。

[0003] 近年、固体培地上での微生物の増殖能を向上させてそのコロニー形成能を向上させる種々の試みがなされている。例えば、低濃度の栄養培地を用いる方法（非特許文献2）、活性酸素の発生を抑制する方法（非特許文献3、4）、寒天のかわりに固化剤としてゲラン・ガムを用いる方法（非特許文献5、6）が報告されている。また、固体培地を用いずに微生物を分離する方法も試みられている。例えば、液体培地中に成育した微生物を液体限界希釈法（最適数Most Probable Number（MPN）法の原理で96穴マルチプレートを用いることにより、菌数推定だけでなく分離も行う方法）を用いて分離す

る方法（非特許文献 7）や、マイクロ流体チップを用いて分離する方法（非特許文献 8）が報告されている。しかしながら、いまだに多くの種類の微生物は培養・増殖することさえ困難である（非特許文献 9、10）。

[0004] 1979年に木暮らは、海洋バクテリアについて、液体培地中で伸張分裂できる細胞数を顕微鏡下に計測する DVC (direct count of viable bacterial cells) 法を考案し、その数が固体培地上でのコロニー形成数より格段に多いことを示した（非特許文献 11）。このことは、液体培地は潜在的に固体培地よりもより多くの自然界に生息する微生物を検出することが出来ることを示している。本発明者の一人である正木らは、海洋バクテリアを分離する際に、液体限界希釈法を用いて、コロニー法の場合の約 10 倍の数の菌を分離することができた（非特許文献 12）。

[0005] また、Colwellらは固体培地で成育できる大腸菌やコレラ菌を、培養後に食塩水や水に懸濁して低温飢餓状態に置くと、DVCが高く保たれているが時間経過とともに固体培地上でのコロニー形成数が落ちていく現象を観察し、これらの細菌が生きているものの増殖できない Viable but non-culturable (VBNCあるいはVNC) という状態に有ることを示した（非特許文献 13）。このVBNC概念は拡大されて、環境中のほとんどのバクテリア細胞がコロニーを分離できない難培養状態、難増殖状態にあることのモデルとして期待されているが、試料となる細菌が培養によってそもそも入手できないため、そのVBNC状態の実態の解明は進んでいない。

[0006] しかし、VBNCの実験は、もともと固体培地上で増殖してコロニーを形成することができるバクテリアであっても、生きているのに固体培地上で増殖できず、コロニーを形成できない状態に陥ることを実演した点で重要であり、固体培地上でコロニーを形成できることが、単に生きていることと同じではなく、生きていること以上に特殊な状態であることを示している。本発明者の一人である正木らは、低温飢餓に晒した大腸菌野生株の成育に対するオレイン酸の影響を比較したところ、オレイン酸の添加のみで、前述の大腸菌のコロニー形成能を 10 倍以上に増強できることを示した（非特許文献 1

4)。

[0007] 本発明者の一人である正木らは、固体培地で成育できる大腸菌の中から、液体培地では成育できるが固体培地ではコロニーを形成できない変異株を取得することを目的として、大腸菌の温度感受性変異株のコレクション（非特許文献15）から5株の変異株を得た。これら変異株を解析することにより、脂肪酸合成酵素サイクルの縮合酵素遺伝子 *f a b B* の変異株を取得した（非特許文献16）。この結果は *f a b B* 遺伝子の機能が、固体培地上での増殖能やコロニー形成能に重要であることを示している。しかし、これらの変異株は変異原メチルニトロニトロソグアニジンを用いて取得された株であるため、*f a b B* 遺伝子以外に多数の変異を含み、遺伝的背景が複雑で未知の部分も多い。

[0008] ところで、シクロデキストリンとは、通常、5分子以上のD-グルコースが α （1→4）グルコシド結合によって結合し、環状構造をとった環状オリゴ糖の一種である。一般的に用いられるシクロデキストリンは、6～8分子のグルコースが結合したものであり、6分子のグルコースが結合したものが α -シクロデキストリン、7分子のグルコースが結合したものが β -シクロデキストリン、8分子のグルコースが結合したものが γ -シクロデキストリンと呼ばれている。シクロデキストリンは、その環状構造の内部の空孔に他の分子（ゲスト分子）を取り込んでゲスト分子を包接する作用を有することが知られている。シクロデキストリンの環状構造の外側は親水性であるのに対し、環状構造の内側の空孔は疎水性である。シクロデキストリンの包接作用を利用して、ゲスト分子の匂いをマスキングしたり、ゲスト分子を安定化したり、疎水性のゲスト分子を可溶化するために用いられることがある。しかし、シクロデキストリン、特にメチルー β -シクロデキストリンは、細胞に接触させると細胞膜の脂質を除去する性質があり、細胞の生存率が低下することが、動物細胞を用いた実験により明らかとなっていた（非特許文献17、18）。

[0009] 以上のようなことがこれまで知られていたが、シクロデキストリンに包接

された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する培地で微生物を培養すると、その微生物のコロニー増殖能を増強させることができることは、これまでに知られていなかった。

先行技術文献

非特許文献

- [0010] 非特許文献1 : Staley, J.T et. al., Annual Review of Microbiology 1985, 39:321-346
- 非特許文献2 : Ohta, H. et. al., Soil Sci. Plant Nutr. 1980, 26: 99-107
- 非特許文献3 : Mizuno, Y. et. al., Arch. Microbiol. 1999, 172: 63-67
- 非特許文献4 : Tanaka, T. et. al., Appl. Environ. Microbiol. 2014, 80: 7659-7666
- 非特許文献5 : Janssen, P.H. et. al., Appl. Environ. Microb. 2002, 68: 2391-2396
- 非特許文献6 : Tamaki, H. et. al., Environ. Microbiol. 2009, 11: 1827-1834
- 非特許文献7 : Shigematsu, T. et. al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007, 71, : 3093-3097
- 非特許文献8 : Nichols, D. et. al., Appl. Environ. Microbiol. 2010, 76: 2445-2450
- 非特許文献9 : Rappe, M.S. et. al., Annu. Rev. Microbiol. 2003, 57: 369-394
- 非特許文献10 : Schloss, P.D. et. al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004, 68: 686-691
- 非特許文献11 : Kogure, K. et. al., Canadian J. Microbiology 1979, 25: 415-420
- 非特許文献12 : Shigematsu, T. et. al., FEMS Microbiology Letters 2009, 293: 240-247
- 非特許文献13 : Xu, H.S. et. al., Microbial Ecology 1982, 8: 323-323

非特許文献14：日本農芸化学会 2015年度大会講演要旨集 講演番号4A3

4p07、公益社団法人日本農芸化学会、2015年3月15日発行

非特許文献15：Isono, K. et. al., Mol. Gen. Genet. 1976, 149: 297-302

非特許文献16：Masaki, H., IF0 Res Commun, 2014, 28: 15-20

非特許文献17：Joel E., et.al., Neurotoxicology. 2007, 28(3): 613-621

非特許文献18：Laura M., et. al., Journal of Controlled Release 2008, 126: 10-16

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 自然環境中の多くの微生物は生きていても、固体培地上で増殖できず、コロニーを形成できない状態で存在しており、固体培地上でコロニーを形成できることと微生物が活着していることは同じではない。そのため、DNAでは存在が確認されている微生物でも、ほとんどは未分離の状態である。これまでに、本発明者の一人である正木らは、オレイン酸を固体培地に添加することにより微生物のコロニー形成能を増強できることを見いだしている。この増強方法を用いると従来よりも多くの種類の微生物を分離することが可能となるため、食品・臨床検査分野での微生物汚染の検出率の向上が期待できる。また、産業に有用な微生物を選択する際のスクリーニング効率の向上も期待できる。

[0012] しかし、オレイン酸は水に不溶性であるため、本発明者の一人である正木らは、前述の増強方法では、界面活性剤（Triton X-100）にオレイン酸を懸濁し、エマルションを形成させた状態で、固化前の液体状の培地に添加し、その後、その液体状の培地を固化することにより、固体培地にオレイン酸を添加していた。しかし、このような添加方法には、以下の（a）～（c）のような問題点があった。

（a）界面活性剤とオレイン酸がエマルションを形成しているため、そのエマルションを滅菌濾過法で無菌化することは困難である点。

（b）液体状の培地が固化する間にエマルションの分布が偏るため、オレイ

ン酸が均一に懸濁した固体培地を作製することが困難である点。

(c) 高濃度のオレイン酸をエマルジョン化するには高濃度の界面活性剤が必要になるところ、界面活性剤はそれ自体が微生物に対して毒性を発揮するため、高濃度のオレイン酸を含有する固体培地を作製することが困難である点。

[0013] また、上述したようなエマルジョン化したオレイン酸を含む固体培地ではなく、エマルジョン化したオレイン酸を含む液体培地においても、前述の(c)と同様の欠点がある。

[0014] 本発明の課題は、オレイン酸等の炭素数5以上の脂肪酸を培地に添加する際の上記の(a)～(c)の問題点等を改善した、微生物の増殖能をより強く増強することのできる、微生物の増殖能を増強する方法や、微生物の増殖能の増強剤等を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0015] 炭素数5以上の脂肪酸は、通常、水(培養液)への溶解性がきわめて低く、培地に直接添加することができない。本発明者らは、前述の脂肪酸をシクロデキストリン包接させて可溶化したもの(以下、「シクロデキストリン包接脂肪酸」とも表示する)を用いることにより、上記課題を解決できることを見いだした。

[0016] 背景技術に記載したように、メチルー β -シクロデキストリン等のシクロデキストリンは、細胞に接触させると細胞膜の脂質を除去する性質があり、細胞の生存率が低下することが、動物細胞を用いた実験により明らかとなっていた(非特許文献17)。そのため、微生物の増殖能の増強を目的とする際に、メチルー β -シクロデキストリン等のシクロデキストリンを用いることは適切でないと考えられていた。しかし、本発明者らは、メチルー β -シクロデキストリン等のシクロデキストリンが、細菌等の微生物の増殖能を阻害しないことを見いだした。

[0017] 本発明者らは、以上のような知見を見だし、本発明を完成するに至った。すなわち、シクロデキストリン包接脂肪酸は滅菌濾過法により無菌化する

ことができ、また、固化する前の液体状の培地にも上記のエマルションよりも均一に懸濁することができ、また、シクロデキストリンには界面活性剤のように細菌等の微生物への毒性がない。そのため、滅菌濾過法による無菌化したシクロデキストリン包接脂肪酸をより高濃度にかつ、より均一に含有する脂肪酸含有固体培地を作製することが可能となった。かかる固体培地の場合と同様に、液体培地の場合も、シクロデキストリン包接脂肪酸を用いることにより、シクロデキストリン包接脂肪酸をより高濃度にかつ、より均一に含有する脂肪酸含有液体培地を作製することが可能となった。そして、これらの脂肪酸含有固体培地や脂肪酸含有液体培地で微生物を培養することにより、微生物の増殖能をより強く増強することが可能となった。

[0018] すなわち、本発明は、

(1) シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する培地で微生物を培養する工程を含むことを特徴とする微生物の増殖能を増強する方法や、

(2) 培地が固体培地であり、微生物の増殖能が固体培地での微生物の増殖能であることを特徴とする上記(1)に記載の微生物の増殖能を増強する方法や、

(3) シクロデキストリンが、メチルー β -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルー β -シクロデキストリン、 α -シクロデキストリン及び γ -シクロデキストリンから選択される1種又は2種以上であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の微生物の増殖能を増強する方法や、

(4) 炭素数5以上の脂肪酸が、炭素数5～30の範囲内の脂肪酸からなる群から選択される1種又は2種以上であることを特徴とする上記(1)～(3)のいずれかに記載の微生物の増殖能を増強する方法や、

(5) 脂肪酸が、オレイン酸、パルミトレイン酸、シス-バクセン酸、カプロレイン酸、リンデル酸、ミリストレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ミード酸、ジホモリノレン酸、アラキドン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸及びネルボン酸から選択される1種又

は2種以上であることを特徴とする上記（4）に記載の微生物の増殖能を増強する方法や、

（6）培地が固体培地である場合は、培地中の炭素数5以上の脂肪酸の合計濃度が $0.075 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内であり、培地が液体培地である場合は、培地中の炭素数5以上の脂肪酸の合計濃度が $0.05 \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内であることを特徴とする上記（1）～（5）のいずれかに記載の微生物の増殖能を増強する方法や、

（7）シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸におけるシクロデキストリンと脂肪酸の重量比が、シクロデキストリン100重量部に対して脂肪酸0.2～45重量部の範囲内であることを特徴とする上記（1）～（6）のいずれかに記載の微生物の増殖能を増強する方法や、

（8）微生物が、真正細菌、古細菌及び真核生物からなる群から選択されることを特徴とする上記（1）～（7）のいずれかに記載の微生物の増殖能を増強する方法に関する。

[0019] また、本発明は、

（9）シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する培地で微生物を培養する工程を含むことを特徴とする微生物を増殖する方法に関する。

[0020] さらに、本発明は、

（10）シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する微生物の増殖能の増強剤に関する。

発明の効果

[0021] 本発明によれば、微生物の増殖能をより強く増強することのできる、微生物の増殖能の増強方法等を提供することができる。本発明によれば、より多数又はより多種の微生物を増殖、検出又は分離することが可能となるため、より多数又はより多種の微生物を増殖させてその微生物の分子生態学的、生化学的な解析を可能にすることや、食品・臨床検査分野で微生物汚染又は感染の検出率を向上させることや、自然界から有用な微生物のスクリーニング

の分野でスクリーニング効率を向上させることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1] 図1 Aは、大腸菌野生株 (MG 1 6 5 5) を、Triton X-100でエマルジョン化したオレイン酸 (以下、「エマルジョン化オレイン酸」ということがある) を含む固体培地中で培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。図1 Bは、MG 1 6 5 5株を、エマルジョン化オレイン酸を含む液体培地中で培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。図1 C及びDは、大腸菌の脂肪酸合成酵素 (F a b B) 遺伝子欠損 (Δ f a b B) 株を、それぞれエマルジョン化オレイン酸を含有する固体培地及び液体培地中で培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。

[図2] Δ f a b B株を、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ (オレイン酸濃度) エマルジョン化オレイン酸を含み、Triton X-100濃度が $20 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ の液体培地中で培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。

[図3] メチルー β -シクロデキストリン濃度が $0 \sim 6000 \mu\text{g}/\text{mL}$ である固体培地中で、MG 1 6 5 5株を培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。図中の「CD」はメチルー β -シクロデキストリンを表す。

[図4] Δ f a b B株を、 $20 \sim 180 \mu\text{g}/\text{mL}$ (オレイン酸換算濃度) のメチルー β -シクロデキストリン包接オレイン酸を含む固体培地中で培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。

[図5] 脂肪酸合成酵素 (F a b B等) 阻害剤であるセルレニンを所定濃度含む又は含まないM9-CAGlc液体培地で、大腸菌野生株 (MG 1 6 5 5) を培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。グラフの横軸の数値は、培地中のセルレニンの濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を表し、縦軸の数値は、増殖可能細胞数を表す。また、セルレニンの各濃度において、左側の黒い棒グラフは、前述の培養後の培養液を、固体培地に播種して計測したCFU (colony forming unit) を表し、右側の薄いグレーの棒グラフは液体培地で培養した場合にMPN法で計測した増殖可能細胞数を表す。

[図6] 脂肪酸合成酵素阻害剤であるセルレニンを所定濃度含む又は含まないS

PMM-CAGIc液体培地で、枯草菌（バシラス・サティリス）168株を培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。グラフの横軸の数値は、培地中のセルレニンの濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を表し、縦軸の数値は、増殖可能細胞数を表す。また、セルレニンの各濃度において、左側の黒い棒グラフは、前述の培養後の培養液を、固体培地に播種して計測したCFUを表し、右側の薄いグレーの棒グラフは液体培地で培養した場合にMPN法で計測した増殖可能細胞数を表す。

[図7]脂肪酸合成酵素（FabI）阻害剤であるトリクロサンを所定濃度含む又は含まないM9-CAGIc液体培地で、大腸菌野生株（MG1655）を培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。グラフの横軸の数値は、培地中のトリクロサン濃度（ ng/mL ）を表し、縦軸の数値は、増殖可能細胞数を表す。また、トリクロサンの各濃度において、左側の黒い棒グラフは、前述の培養後の培養液を、固体培地に播種して計測したCFUを表し、右側の薄いグレーの棒グラフは液体培地で培養した場合にMPN法で計測した増殖可能細胞数を表す。

[図8]脂肪酸合成酵素（FabI）阻害剤であるトリクロサンを所定濃度含む又は含まないCM2B液体培地で、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株を培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。グラフの横軸の数値は、培地中のトリクロサン濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を表し、縦軸の数値は、増殖可能細胞数を表す。また、トリクロサンの各濃度において、左側の黒い棒グラフは、前述の培養後の培養液を、固体培地に播種して計測したCFUを表し、右側の薄いグレーの棒グラフは液体培地で培養した場合にMPN法で計測した増殖可能細胞数を表す。また、 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ のトリクロサンと共に、 $60\mu\text{g}/\text{mL}$ （オレイン酸濃度換算）のシクロデキストリン包接オレイン酸を添加した場合の結果を、右から1番目と2番目のグラフに示す。

[図9]脂肪酸合成酵素（FabI）阻害剤であるトリクロサンを所定濃度含む又は含まないCM2B液体培地で、コリネバクテリウム・グルタミカムAT

CC13032株を培養したときの増殖可能細胞数を解析した結果を示す。グラフの横軸の「Triclosan」の数値は、培地中のトリクロサン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を表し、「Fatty acid」の数値は、シクロデキストリン包接脂肪酸の添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (脂肪酸濃度換算) を表し、縦軸の数値は、CFUを表す。また、「C16:1」は、シクロデキストリン包接パルミトレイン酸を添加した結果を表し、「C18:1」は、シクロデキストリン包接オレイン酸を添加した結果を表す。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明は、シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する培地で微生物を培養する工程を含むことを特徴とする微生物の増殖能を増強する方法（以下、「本発明の増強方法」とも表示する。）や、シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する培地で微生物を培養する工程を含むことを特徴とする微生物を増殖する方法（以下、「本発明の増殖方法」とも表示する。）からなる。また、本発明は、シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する微生物の増殖能の増強剤（以下、「本発明の増強剤」とも表示する。）からなる。

[0024] 本発明の増強方法や、本発明の増殖方法としては、シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する培地で微生物を培養する工程を含んでいる限り特に制限されないが、かかる培養工程に加えて、かかる培養工程により増殖した微生物の全部又は一部を、単離する工程を含んでもよい。かかる単離工程としては、公知の単離方法を用いることができる。また、かかる単離工程は、微生物の種類や、所望の活性の有無、程度や、所望の性質の有無、程度等を指標に行ってもよい。

[0025] 本明細書における「シクロデキストリン」には、狭義のシクロデキストリンのほか、包接作用を有するシクロデキストリンの誘導体も含まれる。かかる狭義のシクロデキストリンとしては、 α -シクロデキストリン、7分子のグルコースが結合したものが β -シクロデキストリン、8分子のグルコースが結合したものが γ -シクロデキストリンが好ましく挙げられる。また、上

記のシクロデキストリンの誘導体には、狭義のシクロデキストリンを構成するグルコースの一部またはすべての2位、3位、6位の水酸基を、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基などのアルキル基；ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基などのヒドロキシアルキル基；アセチル基；等によって修飾した化合物や、狭義のシクロデキストリンを構成するグルコースの一部またはすべての2位、3位、6位の水酸基を、1級アミン、2級アミン、3級アミン、4級アンモニウム、アミド化合物、カルボニル化合物、エステル化合物、エーテル化合物、ハロゲン化物、カルボン酸等に誘導した化合物も含まれ、中でも、狭義のシクロデキストリンを構成するグルコースの一部またはすべての2位、3位、6位の水酸基を、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基などのアルキル基；ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基などのヒドロキシアルキル基；アセチル基；等によって修飾した化合物が好ましく挙げられ、中でも、狭義のシクロデキストリンを構成するグルコースの一部またはすべての2位、3位、6位の水酸基を、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基などのアルキル基；ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基などのヒドロキシアルキル基；によって修飾した化合物がより好ましく挙げられ、中でも、狭義のシクロデキストリンを構成するグルコースの一部またはすべての2位、3位、6位の水酸基を、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基及びヒドロキシプロピル基からなる群から選択される1種又は2種以上の基によって修飾した化合物がさらに好ましく挙げられ、中でも、狭義のシクロデキストリンを構成するグルコースの一部またはすべての2位、3位、6位の水酸基を、メチル基によって修飾した化合物（メチルー β -シクロデキストリン）や、狭義のシクロデキストリンを構成するグルコースの一部またはすべての2位、3位、6位の水酸基を、ヒドロキシプロピル基によって修飾した化合物（ヒドロキシプロピルー β -シクロデキストリン）がより好ましく挙げられ、中でも、メチルー β -シクロデキストリンが特に好ましく挙げられる。

[0026] 本発明において、シクロデキストリンは1種を用いてもよいし、2種以上を併用してもよい。各種のシクロデキストリンは市販品を用いてもよいし、化学的手段や生物学的手段により調製してもよい。

[0027] 上記の「炭素数5以上の脂肪酸」としては、炭素数5以上の脂肪酸である限り、不飽和脂肪酸であっても飽和脂肪酸であってもよいが、不飽和脂肪酸が好ましく、直鎖不飽和脂肪酸がより好ましい。また、かかる脂肪酸は、直鎖脂肪酸、分岐脂肪酸、環状脂肪酸であってもよいが、直鎖脂肪酸が好ましく挙げられる。脂肪酸の炭素数としては、5以上であれば特に制限されないが、好ましくは5～30の範囲内、より好ましくは8～28の範囲内、さらに好ましくは10～26の範囲内、より好ましくは12～22の範囲内が挙げられる。不飽和脂肪酸の炭素間の二重結合の数としては、1つであってもよいし、2つ以上であってもよいが、1～5の範囲内が好ましく、1～4の範囲内がより好ましい。

[0028] 炭素数5以上の直鎖不飽和脂肪酸として具体的には、カプロレイン酸 (C 10 : 1)、リンデル酸 (C 12 : 1)、ミリストレイン酸 (C 14 : 1)、パルミトレイン酸 (C 16 : 1)、オレイン酸 (C 18 : 1)、シスーバクセン酸 (C 18 : 1)、リノール酸 (C 18 : 2)、リノレン酸 (C 18 : 3)、ミード酸 (C 20 : 3)、ジホモリノレン酸 (C 20 : 3)、アラキドン酸 (C 20 : 4)、エイコサテトラエン酸 (C 20 : 4)、エイコサペンタエン酸 (C 20 : 5)、ドコサヘキサエン酸 (C 22 : 6)、ネルボン酸 (C 24 : 1) 等が挙げられ、中でも、パルミトレイン酸 (C 16 : 1)、オレイン酸 (C 18 : 1)、シスーバクセン酸 (C 18 : 1)、リノール酸 (C 18 : 2)、リノレン酸 (C 18 : 3)、ミード酸 (C 20 : 3)、ジホモリノレン酸 (C 20 : 3)、アラキドン酸 (C 20 : 4)、エイコサテトラエン酸 (C 20 : 4) が好ましく挙げられ、中でも、オレイン酸、パルミトレイン酸、シスーバクセン酸が特に好ましく挙げられる。

[0029] 炭素数5以上の直鎖飽和脂肪酸として具体的には、カプロン酸 (C 6 : 0)、エナント酸 (C 7 : 0)、カプリル酸 (C 8 : 0)、ペラルゴン酸 (C

9 : 0)、カプリン酸 (C 1 0 : 0)、ラウリン酸 (C 1 2 : 0)、ミリスチン酸 (C 1 4 : 0)、ペンタデシル酸 (C 1 5 : 0)、パルミチン酸 (C 1 6 : 0)、マルガリン酸 (C 1 7 : 0)、ステアリン酸 (C 1 8 : 0)、アラキジン酸 (C 2 0 : 0)、ヘンイコシル酸 (C 2 1 : 0)、ベヘン酸 (C 2 2 : 0)、リグノセリン酸 (C 2 4 : 0)、セロチン酸 (C 2 6 : 0)、モンタン酸 (C 2 8 : 0)、メリシン酸 (C 3 0 : 0) 等が挙げられ、中でも、ミリスチン酸 (C 1 4 : 0)、パルミチン酸 (C 1 6 : 0)、ステアリン酸 (C 1 8 : 0)、アラキジン酸 (C 2 0 : 0)、ベヘン酸 (C 2 2 : 0) 等が好ましく挙げられ、中でも、リスチン酸 (C 1 4 : 0)、パルミチン酸 (C 1 6 : 0)、ステアリン酸 (C 1 8 : 0) 等がより好ましく挙げられる。

[0030] 炭素数 5 以上の環状脂肪酸として具体的には、ヒドノカルビン酸 (C 1 6)、ショールムーグリン酸 (C 1 8)、ゴルリン酸 (C 1 8) 等が挙げられる。

[0031] 炭素数 5 以上の分岐脂肪酸として具体的には、2-エチルブタン酸、イソペンタン酸、2-メチルペンタン酸、2-エチルペンタン酸、12-ヒドロキシステアリン酸、イソステアリン酸、イソノナン酸等が挙げられる。

[0032] 本発明において、炭素数 5 以上の脂肪酸は 1 種を用いてもよいし、2 種以上を併用してもよい。なお、脂肪酸として、脂肪酸含有物を用いてもよい。また、各種の脂肪酸は市販品を用いてもよいし、脂肪酸を含む食品材料（動物性油脂、食部性油脂等）から抽出等したものをを用いてもよい。

[0033] 本発明において、「シクロデキストリンに包接された物質 X」とは、物質 X（ゲスト分子）の全部又は一部が、シクロデキストリン（ホスト分子）の環状構造の内側の疎水性の空孔に取り込まれていることを意味する。物質 X がシクロデキストリンに包接されているかどうかは、溶液状態においては円二色性スペクトルや NMR スペクトルを用い、固体状態においては熱分析 DSC、粉末 X 線などで、シクロデキストリン単独、ゲスト分子単独、物理的混合物と CD 包接体を比較するなどして確認することができる。

[0034] 本発明における、シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸（シクロデキストリン包接脂肪酸）中の、シクロデキストリンと脂肪酸の重量比としては、対象となる微生物の増殖能を増殖し得る限り特に制限さないが、例えば、シクロデキストリン100重量部に対して脂肪酸を0.1～90重量部の範囲内、好ましくは0.2～45重量部の範囲内、より好ましくは0.3～30重量部の範囲内、さらに好ましくは1～9重量部の範囲内、さらにより好ましくは1.5～6重量部の範囲内、特に好ましくは2～4.5重量部の範囲内とすることができる。

[0035] 本発明におけるシクロデキストリン包接脂肪酸を調製する方法としては、特に制限されず、例えば混練法、飽和水溶液法、乳化法、混合粉碎法等の公知の方法を用いることができる。上記の混練法としては、ホスト分子に少量の水を添加してペースト状にし、そこに一定量のゲスト分子を添加して混練機等でよく練って、ホスト分子に包接されたゲスト分子を得る方法が挙げられる。上記の飽和水溶液法としては、ホスト分子の飽和水溶液を作製し、その後一定量のゲスト分子を添加・混合し、30分間～数日間、攪拌混合して、ホスト分子に包接されたゲスト分子を沈殿させて得る方法が挙げられる。上記の乳化法としては、ホスト分子の20～50%懸濁液を作製し、そこに一定量のゲスト分子を添加し、ホモジナイザーで乳化させて、ホスト分子に包接されたゲスト分子を得る方法が挙げられる。上記の混合粉碎法としては、ホスト分子とゲスト分子を振動ミルに入れ、粉碎して、ホスト分子に包接されたゲスト分子を得る方法が挙げられる。なお、上述の混練法、飽和水溶液法、乳化法において、固体状のシクロデキストリン包接脂肪酸を得る場合は、それぞれの方法で得られるシクロデキストリン包接脂肪酸を含む液体を乾燥（好ましくは凍結乾燥）すればよい。保存は、常温であってもよいが、より長期間の保存を可能にする観点から、4℃以下の温度で行うことが好ましい。

[0036] 本発明における培地は、シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸（シクロデキストリン包接脂肪酸）を含有する培地である限り特に

制限されないが、そのほかに、微生物の成育に必要な成分を含んでいる。本発明の培地は、固体培地でも液体培地であってもよいが、食品・臨床検査分野で微生物汚染又は感染の検出率を向上させることや、自然界から有用な微生物のスクリーニングの分野でスクリーニング効率を向上させることが可能となるなど、本発明の意義がより大きい点で、固体培地が好ましく挙げられる。

[0037] 本発明における培地中のシクロデキストリン包接脂肪酸の濃度としては、対象となる微生物の増殖能を増強し得る限り特に制限さないが、培地が固体である場合は、脂肪酸濃度換算で（脂肪酸の濃度に換算して）、例えば0.075～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、好ましくは0.1～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは1～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、さらに好ましくは5～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは10～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、さらに好ましくは20～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは40～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、さらに好ましくは60～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは80～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、さらに好ましくは100～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは120～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内が挙げられ、また、コストの観点から、培地中のシクロデキストリン包接脂肪酸の濃度の上限を、脂肪酸濃度換算で400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下としてもよい。他方、培地が液体である場合は、脂肪酸濃度換算で、例えば0.05～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、好ましくは0.075～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは0.1～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、さらに好ましくは1～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは5～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、さらに好ましくは10～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは20～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、さらに好ましくは40～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは60～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、さらに好ましくは80～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、より好ましくは100～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内、さらに好ましくは120～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内が挙げられ、また、コストの

観点から、培地中のシクロデキストリン包接脂肪酸の濃度の上限を、脂肪酸濃度換算で $400\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下としてもよい。シクロデキストリン包接脂肪酸の濃度が高いほど、それと同濃度の脂肪酸をTritonX-100で培地に懸濁させる場合の、TritonX-100の微生物への毒性が問題となりやすいため、本発明の意義がより大きくなる。

[0038] 本発明における培地中のシクロデキストリン包接脂肪酸以外の成分としては、培養対象である微生物の育成に必要な成分が挙げられ、かかる成分としては、その微生物が資化し得る炭素源、窒素源、アミノ酸、無機塩類（特に、リン化合物、マグネシウム化合物、マンガン化合物、鉄化合物等）が挙げられる。本発明の培地中のシクロデキストリン包接脂肪酸以外の成分からなる培地としては、後述の参考例2に記載するM9-CAGIc培地（M9最少培地にグルコースとカザミノ酸（カゼインの塩酸加水分解中和物）を添加した培地）や、後述の実施例2に記載するSPMM-CAGIc培地、CM2B培地や、L-broth培地やNutrient broth培地などが挙げられる。本発明における培地中のシクロデキストリン包接脂肪酸以外の成分は、培養対象となる微生物や増殖させたい微生物の種類等に応じて、適宜選択することができる。また、本発明における培地中には、シクロデキストリン包接脂肪酸以外にも、微生物の増殖能を増強する成分を添加してもよい。

[0039] 本発明における微生物の種類としては、シクロデキストリン包接脂肪酸で増殖能が増強される限り特に制限されず、真正細菌（Bacteria）、古細菌（Archaea）、真核生物（Eucarya）が挙げられ、中でも、真正細菌、古細菌、酵母が好ましく挙げられ、中でも、真正細菌、古細菌がより好ましく挙げられる。また、本発明における微生物としては、グラム陽性の細菌（好ましくは真正細菌）、グラム陰性の細菌（好ましくは真正細菌）が挙げられる。グラム陽性の真正細菌としては、フィルイクテス門、放線菌門の真正細菌が好ましく挙げられる。フィルイクテス門の真正細菌としては、バシラス属、ラクトバシラス属、クロストリジウム属、テルモアナエロバクテル属、ハロアナ

エロビウム属、ナトラナエロビウス属、エリシペロトリクス属、セレノモナス属、テルモリトバクテル属の細菌が好ましく挙げられ、中でも、バシラス属、ラクトバシラス属がより好ましく挙げられ、バシラス属がさらに好ましく挙げられる。放線菌門の真正細菌としては、コリネバクテリウム属、マイコバクテリウム属、ロドコッカス属、プロピオニバクテリウム属、ストレプトマイセス属、ビフィドバクテリウム属、ミクロコッカス属、フランキア属が挙げられ、中でも、コリネバクテリウム属、マイコバクテリウム属、ロドコッカス属、プロピオニバクテリウム属、ストレプトマイセス属、ビフィドバクテリウム属がより好ましく挙げられ、中でも、コリネバクテリウム属、マイコバクテリウム属、ロドコッカス属がさらに好ましく挙げられる。また、本発明は、本発明における微生物（シクロデキストリン包接脂肪酸で増殖能が増強される微生物）を少なくとも一部に含む微生物群（例えば、自然界から採取した微生物群）に適用してもよい。そのように用いることによって、自然界から有用な微生物のスクリーニングを行う際に、スクリーニング効率を向上させることが可能となる。

[0040] 本発明における培地で微生物を培養する工程としては、かかる培地で微生物を培養する限り、培養期間、培養温度、湿度、酸素濃度などの培養条件等について特に制限されず、培養する微生物の種類等に応じて培養条件を適宜設定することができる。培養期間として例えば、5時間～2週間の範囲内、8時間～1週間の範囲内が挙げられ、培養温度として例えば5～50℃の範囲内、10～40℃の範囲内が挙げられる。

[0041] 本発明において「微生物の増殖能が増強している」とは、シクロデキストリン包接脂肪酸を含有させないこと以外は同じ組成の脂肪酸不含有培地（例えばM9-CAGI培地、SPMM-CAGI培地又はCM2B培地）で、同じ培養条件で培養した場合と比較して、シクロデキストリン包接脂肪酸含有培地で培養した場合の微生物の増殖可能細胞数が多いことを意味する。本発明において「微生物の増殖能が増強している」ことには、シクロデキストリン包接脂肪酸を含有させないこと以外は同じ組成の脂肪酸不含有培地

(例えばM9-CAGIc培地、SPMM-CAGIc培地又はCM2B培地)で、同じ培養条件(好ましくは、その微生物に好適な培養条件)で例えば30時間培養した場合と比較して、シクロデキストリン包接脂肪酸含有培地で培養した場合の微生物の増殖可能細胞数が、割合として好ましくは10%以上、より好ましくは20%以上、さらに好ましくは30%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは100%以上増加していることが含まれる。また、本発明において「微生物の増殖能が増強している」ことに含まれる別の態様として、シクロデキストリン包接脂肪酸を含有させることに代えて、それに含まれる脂肪酸と同濃度の脂肪酸をTritonX-100で培地に懸濁させたこと以外は同じ組成の培地(脂肪酸を含有させる前の培地として例えばM9-CAGIc培地、SPMM-CAGIc培地又はCM2B培地)で、同じ培養条件(好ましくは、その微生物に好適な培養条件)で培養した場合と比較して、シクロデキストリン包接脂肪酸含有培地で培養した場合の微生物の増殖可能細胞数が多いことが含まれ、より好ましくは、シクロデキストリン包接脂肪酸を含有させることに代えて、それに含まれる脂肪酸と同濃度の脂肪酸をTritonX-100で培地に懸濁させたこと以外は同じ組成の培地(脂肪酸を含有させる前の培地として例えばM9-CAGIc培地、SPMM-CAGIc培地又はCM2B培地)で、同じ培養条件(好ましくは、その微生物に好適な培養条件)で例えば30時間培養した場合と比較して、シクロデキストリン包接脂肪酸含有培地で培養した場合の微生物の増殖可能細胞数が、割合として好ましくは10%以上、より好ましくは20%以上、さらに好ましくは30%以上、さらにより好ましくは50%以上、特に好ましくは80%以上、特により好ましくは100%以上、特にさらに好ましくは150%以上、特にさらにより好ましくは200%以上、より好ましくは400%、さらに好ましくは600%以上、より好ましくは800%以上増加していることが含まれる。

[0042] 本発明において、培養後の「微生物の増殖可能細胞数」とは、その培養後の微生物のうち、増殖が可能である微生物の細胞数を意味する。かかる増殖

可能細胞数は、具体的には以下の方法により計測、算出することができる。

例えば、「固体培地X」による培養後の、その「固体培地X」上の増殖可能細胞数を計測、算出する場合は、その固体培地X全体の微生物を擦り取って、緩衝液に懸濁し、その懸濁液を希釈し及び／又は一部を新たな固体培地X上に播種して培養し、該固体培地上に形成されたコロニー形成単位 (colony-forming unit: CFU) を計測し、希釈率等に基づいて、そのCFU値から固体培地X上の増殖可能細胞数を算出することができる。一方、「液体培地Y」による培養後の、その「液体培地Y」中の増殖可能細胞数を算出する場合は、その液体培地Yを希釈し及び／又は一部を、その液体培地Yに対応する新たな固体培地 (液体培地Yの組成にアガロースを添加して作製した固体培地) 上に播種して培養し、該固体培地上に形成されたコロニー形成単位 (colony forming unit: CFU) を計測し、希釈率等に基づいて、そのCFU値から前述の液体培地Y中の増殖可能細胞数を算出することができる。なお、微生物の増殖能の増強は、培養後の「微生物の増殖可能細胞数」の増加に代えて、培養後の微生物の粒子数の増加により確認することもできる。微生物の粒子数は、コールターカウンターやセルソーターなどにより簡便に計測することができる。

[0043] 本発明の増強剤としては、シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有している限り特に制限されない。本発明の増強剤は、液体状であってもよいし、固体状であってもよいが、保存性の観点から固体状であることが好ましい。

[0044] 本発明の増強剤は、微生物の培養用培地に適量を添加して用いることができるため、本発明の増強剤におけるシクロデキストリン包接脂肪酸の濃度としては特に制限されないが、本発明の増強剤全量に対して、例えば0.001～100重量%の範囲内、好ましくは0.1～95重量%の範囲内、より好ましくは1～80重量%の範囲内、さらに好ましくは2～50重量%の範囲内が挙げられる。

[0045] 本発明の増強剤は、シクロデキストリン包接脂肪酸のみを含有していても

よいし、他の成分を含有していてもよい。他の成分としては、水等の液状の溶媒や、固体状の増量剤などが挙げられるほか、培養対象である微生物の成育に必要な成分が挙げられ、かかる成分としては、その微生物が資化し得る炭素源、窒素源、アミノ酸、微量成分（無機塩類等、特に、リン化合物、マンガ化合物、鉄化合物等）が挙げられる。微生物の成育に必要な成分を含んでいる本発明の増強剤は、微生物の増殖能を増強するための培地添加剤、あるいは、微生物の増殖能を増強するための培地として使用することもできる。

[0046] [参考例 1] $\Delta f a b B$ 株の構築

背景技術に記載したように、非特許文献 16 の変異株は、変異原メチルトロトロソグアニジンを用いて取得された株であるため、 $f a b B$ 遺伝子以外に多数の変異を含み、遺伝的背景が複雑で未知の部分も多い。そこで、大腸菌の野生株 MG 1655 から $f a b B$ 遺伝子だけを欠損させた変異株（ $f a b B$ 遺伝子欠損株： $\Delta f a b B$ ）の取得を試みた。

[0047] pRed/ET Recombination system (Gene Bridges GmbH 社製) を用いた相同組換えによって、大腸菌の野生株 MG 1655 の $f a b B$ ORF を、Tn5 由来カナマイシンホストランスメラーゼ遺伝子の ORF で置換し、 $f a b B$ 遺伝子欠損株（ $\Delta f a b B$ ）を構築した。

[0048] [参考例 2]

（エマルション化オレイン酸含有培地における $\Delta f a b B$ 株の増殖能 1）

エマルション化オレイン酸含有培地（固体培地及び液体培地）における $\Delta f a b B$ 株の増殖能を調べるために、Triton X-100 でエマルション化したオレイン酸 0.01 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む、脂肪酸不含の合成液体培地（M9-CAGIc 培地；0.6% Na_2HPO_4 、0.3% KH_2PO_4 、0.1% NH_4Cl 、0.1% NaCl 、1mM MgSO_4 、0.1mM CaCl_2 、0.5% カザミノ酸、0.4% D-グルコース）（以下、「エマルション化オレイン酸含有液体培地」という）、又は合成固体培地（以下、「エマルション化オレイン酸含有固体培地」という）を用いて細胞増殖レベル

を解析した。細胞増殖レベルは、増殖可能細胞数を指標とした。増殖可能細胞数の算出方法は、上記の「発明を実施するための形態」に記載した方法を用いた。なお、 $0.01 \sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ （オレイン酸濃度）エマルション化オレイン酸含有液体培地は、 1% Triton X-100に $2 \text{mg}/\text{mL}$ オレイン酸を添加して、激しく攪拌した後、M9-CAGIc培地で $100 \sim 200000$ 倍（オレイン酸の最終濃度 $20 \sim 0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）希釈することにより調製した。また、エマルション化オレイン酸含有固体培地は、エマルション化オレイン酸含有液体培地に 1.5% となるようにアガロースを添加して調製した。また、コントロールとして $\Delta fabB$ 株をエマルション化オレイン酸不含の培地中で培養する実験や、野生株（MG1655株）をエマルション化オレイン酸含有又は不含の培地中で培養する実験も行った。

[0049] その結果、野生株であるMG1655株は、培地中のオレイン酸の有無やオレイン酸濃度によらず、増殖可能細胞数はほぼ同様であり、ほぼ同じレベルで増殖することが確認された（図1A及びB参照）。一方、 $\Delta fabB$ 株は、オレイン酸を $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含む液体培地中で培養した場合、増殖しなかったが、液体培地中のオレイン酸濃度を $0.075 \mu\text{g}/\text{mL}$ から $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで順次上昇させるのに依存して、液体培地中で増殖レベルが顕著に上昇すること（増殖能が顕著に増強すること）（図1D参照）、及び、それに反して固体培地上では、細胞の増殖が強く抑制されること（図1C参照）が確認された。

[0050] [参考例3]

（エマルション化オレイン酸含有培地における $\Delta fabB$ 株の増殖能 2）

参考例2で調製したエマルション化オレイン酸含有培地に含まれるTriton X-100が、 $\Delta fabB$ 株の増殖能に影響を与えるかどうか調べた。具体的には、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ エマルション化オレイン酸含有液体培地におけるTriton X-100濃度が、 $20 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように培地を調製し、 $\Delta fabB$ 株の細胞増殖レベル（増殖可能細胞数）を解析した。

[0051] その結果、 $\Delta fabB$ 株は、培地中のTriton X-100濃度が $100 \mu\text{g}/\text{m}$

L 以下の場合、ほぼ同じレベルで増殖することが確認された（図 2 参照）。一方、培地中の Triton X-100 濃度が $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の場合、 $\Delta f a b$ B 株の増殖レベルは低下し、特に培地中の Triton X-100 濃度が $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の場合、 $\Delta f a b$ B 株の増殖レベルは大幅に低下した（図 2 参照）。この結果は、 $\Delta f a b$ B 株をエマルション化オレイン酸含有培地で効率よく培養するためには、培地中の Triton X-100 濃度は $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下（オレイン酸で換算すると $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下）に抑える必要があることを示している。

[参考例 4]

[0052] （メチルー β -シクロデキストリン含有培地における MG 1655 株の増殖能）

参考例 3 の結果から、Triton X-100 でエマルション化したオレイン酸を培地に添加する方法では、Triton X-100 が大腸菌の増殖レベルを低下させる効果を有するため、培地中のオレイン酸は、最大でも $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でしか添加することができない。そこで、オレイン酸を培地に添加する方法として、Triton X-100 でオレイン酸をエマルション化する方法に代えて、メチルー β -シクロデキストリンでオレイン酸を抱接する方法を検討した。それに先立ち、まず、メチルー β -シクロデキストリンが MG 1655 株の増殖能に与える影響を調べた。

[0053] M9-CAGIc 固体培地におけるメチルー β -シクロデキストリン濃度が、 $0 \sim 6000 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように培地を調製し、MG 1655 株の細胞増殖レベルを解析した。

[0054] その結果、培地中に含まれるメチルー β -シクロデキストリン濃度が、少なくとも $6000 \mu\text{g}/\text{mL}$ までの場合、MG 1655 株の細胞増殖レベル（増殖可能細胞数）は低下しないことが示された（図 3 参照）。なお、動物細胞を用いた実験では、シクロデキストリン、特にメチルー β -シクロデキストリンは、細胞に接触させると細胞膜の脂質を除去する性質があり、細胞の生存率が低下することが知られていた（非特許文献 17、18）ことを考

慮すると、メチルー β -シクロデキストリンが大腸菌の増殖レベルを低下させないことは、当該分野の研究者等にとって意外であった。

実施例 1

[0055] (抱接オレイン酸含有培地における $\Delta f a b B$ 株の増殖能)

参考例4の結果から、大腸菌の増殖能は $6000\mu\text{g}/\text{mL}$ のメチルー β -シクロデキストリンによっても低下しないことが示された。そこで、オレイン酸を培地に添加する方法として、Triton X-100でオレイン酸をエマルション化する方法に代えて、メチルー β -シクロデキストリンでオレイン酸を抱接する方法を試みた。

[0056] まず、 1g メチルー β -シクロデキストリンを 5mL 脱イオン水に溶解した後、 20mg オレイン酸を添加し、激しく攪拌して、メチルー β -シクロデキストリン包接オレイン酸（以下、単に「シクロデキストリン包接オレイン酸」という）を調製した。かかるシクロデキストリン包接オレイン酸を、 1.5% アガロースを含有するM9-CAGIc培地で希釈することによって、 $20\sim 180\mu\text{g}/\text{mL}$ （オレイン酸濃度換算の濃度）のシクロデキストリン抱接オレイン酸を含有するM9-CAGIc固体培地（以下、「抱接オレイン酸含有固体培地」という）を調製し、 $\Delta f a b B$ 株の増殖レベル（増殖可能細胞数）を解析した。なお、コントロールとして、 $\Delta f a b B$ 株を $20\mu\text{g}/\text{mL}$ （オレイン酸濃度）エマルション化オレイン酸含有固体培地中に培養する実験を行った。なお、図1Cの固体培養では、一夜培養した定常期の $\Delta f a b B$ 菌株を洗浄した後、固体培地に播種して培養を行ったのに対し、この実験では、対数増殖期の $\Delta f a b B$ 菌株を洗浄した後、固体培地に播種して培養を行った。

[0057] この実験における $\Delta f a b B$ 株の増殖可能細胞数を以下の表1に示し、それをグラフにしたものを図4に示す。

[0058]

[表1]

$\Delta fabB$ 株の固体培養の結果 (増殖可能細胞数/plate)					
オレイン酸 ($\mu\text{g/mL}$)		20	20	60	180
Triton ($\mu\text{g/mL}$)		100	—	—	—
シクロデキストリン ($\mu\text{g/mL}$)		—	666.7	2000	6000
培養時間 (hours)	0	2.53×10^4	2.53×10^4	2.53×10^4	2.53×10^4
	10	8.10×10^5	2.37×10^6	1.61×10^6	4.05×10^6
	20	4.80×10^7	3.39×10^8	4.10×10^8	4.90×10^8
	30	5.72×10^8	2.40×10^9	8.90×10^9	1.56×10^{10}
	40	1.86×10^8	1.22×10^{10}	2.94×10^{10}	5.51×10^{10}

[0059] 表1及び図4の結果から分かるように、 $\Delta fabB$ 株を、抱接オレイン酸含有固体培地中で培養することにより、オレイン酸濃度が $20 \mu\text{g/mL}$ 以上でもその濃度依存的に $\Delta fabB$ 株の増殖レベル（増殖可能細胞数）が上昇することが示された。また、 $\Delta fabB$ 株を $20 \mu\text{g/mL}$ シクロデキストリン抱接オレイン酸含有固体培地中で培養した場合、 $20 \mu\text{g/mL}$ エマルション化オレイン酸含有固体培地中で培養した場合と比べ、増殖可能細胞（菌体）数が、2.9倍（培養開始後10時間）、7.1倍（培養開始後20時間）、4.2倍（培養開始後30時間）、65.6倍（培養開始後40時間）と、顕著に多いことも示された（表1及び図4参照）。この結果は、 $\Delta fabB$ 株等の脂肪酸飢餓状態の微生物を、メチルー β -シクロデキストリン等のシクロデキストリンで抱接したオレイン酸を含む培地中で培養すると、従来技術である界面活性剤（Triton X-100等）でエマルション化したオレイン酸を含む培地中で培養した場合と比べ、細胞増殖能が顕著に増強し、また、コロニー形成効率が顕著に上昇することを示している。

実施例 2

[0060] （脂肪酸合成酵素阻害剤の添加による、細菌のコロニー形成能等の増殖能の低下）

固体培地上でコロニー形成能が低下した大腸菌変異株は脂肪酸合成酵素FabB遺伝子欠損株であった。そこで、各種微生物の野生株を用いた際に、脂肪酸合成酵素阻害剤を添加することにより、コロニー形成能等の増殖能が

低下するかどうかを、増殖可能細胞数を指標に検討した。CFUは微生物を液体培養して得られた培養液の一部を固体培地に播種し、培養して形成されたコロニー数を計測し、MPNは前述の培養液を常法にしたがって希釈して菌数を計測した。

[0061] 脂肪酸合成酵素 (FabB等) 阻害剤であるセルレニン (Sclerotinin) を M9-CAGIc 液体培地に添加し、グラム陰性細菌である大腸菌野生株 MG1655 株を 37℃ で 3 日間培養したところ、セルレニン濃度が高くなると大腸菌の CFU が MPN よりも強く阻害を受け、液体培地での増殖に比べてコロニー形成能が大きく低下することが示された (図 5)。また、セルレニン (Sclerotinin) を SPMM-CAGIc 液体培地 (SPMM-CAGIc 液体培地; 14 g/L K_2HPO_4 (国産化学株式会社製)、6 g/L KH_2PO_4 (国産化学株式会社製)、2 g/L $(NH_4)_2SO_4$ (和光純薬工業株式会社製)、1 g/L クエン酸三ナトリウム二水和物 (国産化学株式会社製)、0.2 g/L $MgSO_4$ (米山薬品工業株式会社製)、5 g/L D-グルコース (国産化学株式会社製)、50 mg/L D-トリプトファン (株式会社 ペプチド研究所製)、5 g/L Casamino Acids-Vitamin Assay (ベクトン・ディッキンソン社製)) に添加し、グラム陽性細菌である枯草菌 (バシラス・サティリス) 168 株を 37℃ で 4 日間 (枯草菌) 培養したところ、枯草菌では大腸菌よりも広いセルレニン濃度範囲にわたって、CFU が MPN よりも強く阻害を受け、液体培地での増殖に比べてコロニー形成能が大きく低下することが示された (図 6)。

[0062] また、別の脂肪酸合成酵素 (FabI) 阻害剤であるトリクロサン (Trichloroethane) を M9-CAGIc 液体培地に添加し、グラム陰性細菌である大腸菌野生株 MG1655 株を 37℃ で 3 日間培養したところ、トリクロサンの広い濃度範囲にわたって、MPN が高く保たれるのに対し CFU だけが強く阻害を受け、液体培地での増殖に比べてコロニー形成能が大きく低下することが示された (図 7)。また、トリクロサン (Trichloroethane) を CM2B 液体培地 (CM2B 液体培地; 10 g/L ハイポリペプトン (日本製薬株式会社製)、10 g/L Bacto Yea

st Extract（ベクトン・ディッキンソン社製）、5 g/L NaCl（国産化学株式会社製））に添加し、グラム陽性細菌であるコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 株を、30℃で3日間（枯草菌）培養したところ、トリクロサン濃度が2 µg/mLを越えると、MPNが高く保たれるのに対しコロニーが全く見られなくなり、コリネバクテリウム・グルタミカムでもコロニー形成能が特に大きく低下することが示された（図8）。

実施例 3

[0063] （シクロデキストリン包接脂肪酸の添加による、コロニー形成能等の増殖能の回復）

脂肪酸合成酵素阻害剤の添加により低下した細菌のコロニー形成能等の増殖能が、シクロデキストリン包接脂肪酸の添加により回復するかどうかを検討した。シクロデキストリン包接脂肪酸としては、上記実施例1で作製したシクロデキストリン包接オレイン酸を用いた。

[0064] CM2B液体培地にトリクロサン4 µg/mLを添加して、コロニー形成能が低下する条件とした培地に、シクロデキストリン包接オレイン酸60 µg/mL（オレイン酸濃度換算）をさらに添加した培地で、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 株を30℃で4日間培養した。その結果、トリクロサンで低下したコリネバクテリウム・グルタミカムのCFUが完全に回復し（図8）、コロニー形成能の低下が脂肪酸欠乏だけに起因する現象であったことが示された。

[0065] また、シクロデキストリン包接オレイン酸に代えて、シクロデキストリン包接パルミトレイン酸を用いた場合にも同様の効果が得られるかを確認するために、シクロデキストリン包接パルミトレイン酸を用いた実験も行った。シクロデキストリン包接パルミトレイン酸は、1 g メチルーβ-シクロデキストリンを5 mL 脱イオン水に溶解した後、20 mg パルミトレイン酸を添加し、激しく攪拌して調製した。

[0066] CM2B液体培地にトリクロサン4 µg/mLを添加して、コロニー形成能が低下する条件とした培地に、シクロデキストリン包接パルミトレイン酸

又はシクロデキストリン包接オレイン酸 $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ （脂肪酸濃度換算）をさらに添加した培地で、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 株を 30°C で 4 日間培養した。その結果、トリクロサンで低下したコリネバクテリウム・グルタミカムの CFU は、シクロデキストリン包接オレイン酸（「C18 : 1」）を添加した場合と同様に、シクロデキストリン包接パルミトレイン酸（「C16 : 1」）を添加した場合でも完全に回復した（図 9）。

[0067] これらの結果から、微生物の低下したコロニー形成能等の増殖能は、培地にシクロデキストリン包接脂肪酸を添加することにより回復することが示された。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明によれば、微生物の増殖能をより強く増強することのできる、微生物の増殖能の増強方法等を提供することができる。本発明によれば、より多数又はより多種の微生物を増殖、検出又は分離することが可能となるため、より多数又はより多種の微生物を増殖させてその微生物の分子生態学的、生化学的な解析を可能にすることや、食品・臨床検査分野で微生物汚染又は感染の検出率を向上させることや、自然界から有用な微生物のスクリーニングの分野でスクリーニング効率を向上させることが可能となる。

請求の範囲

- [請求項1] シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する培地で微生物を培養する工程を含むことを特徴とする微生物の増殖能を増強する方法。
- [請求項2] 培地が固体培地であり、微生物の増殖能が固体培地での微生物の増殖能であることを特徴とする請求項1に記載の微生物の増殖能を増強する方法。
- [請求項3] シクロデキストリンが、メチルー β -シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルー β -シクロデキストリン、 α -シクロデキストリン及び γ -シクロデキストリンから選択される1種又は2種以上であることを特徴とする請求項1又は2に記載の微生物の増殖能を増強する方法。
- [請求項4] 炭素数5以上の脂肪酸が、炭素数5～30の範囲内の脂肪酸からなる群から選択される1種又は2種以上であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の微生物の増殖能を増強する方法。
- [請求項5] 脂肪酸が、オレイン酸、パルミトレイン酸、シスバクセン酸、カプロレイン酸、リンデル酸、ミリストレイン酸、リノール酸、リノレン酸、ミード酸、ジホモリノレン酸、アラキドン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸及びネルボン酸から選択される1種又は2種以上であることを特徴とする請求項4に記載の微生物の増殖能を増強する方法。
- [請求項6] 培地が固体培地である場合は、培地中の炭素数5以上の脂肪酸の合計濃度が0.075～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内であり、培地が液体培地である場合は、培地中の炭素数5以上の脂肪酸の合計濃度が0.05～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の微生物の増殖能を増強する方法。
- [請求項7] シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸におけるシクロデキストリンと脂肪酸の重量比が、シクロデキストリン100

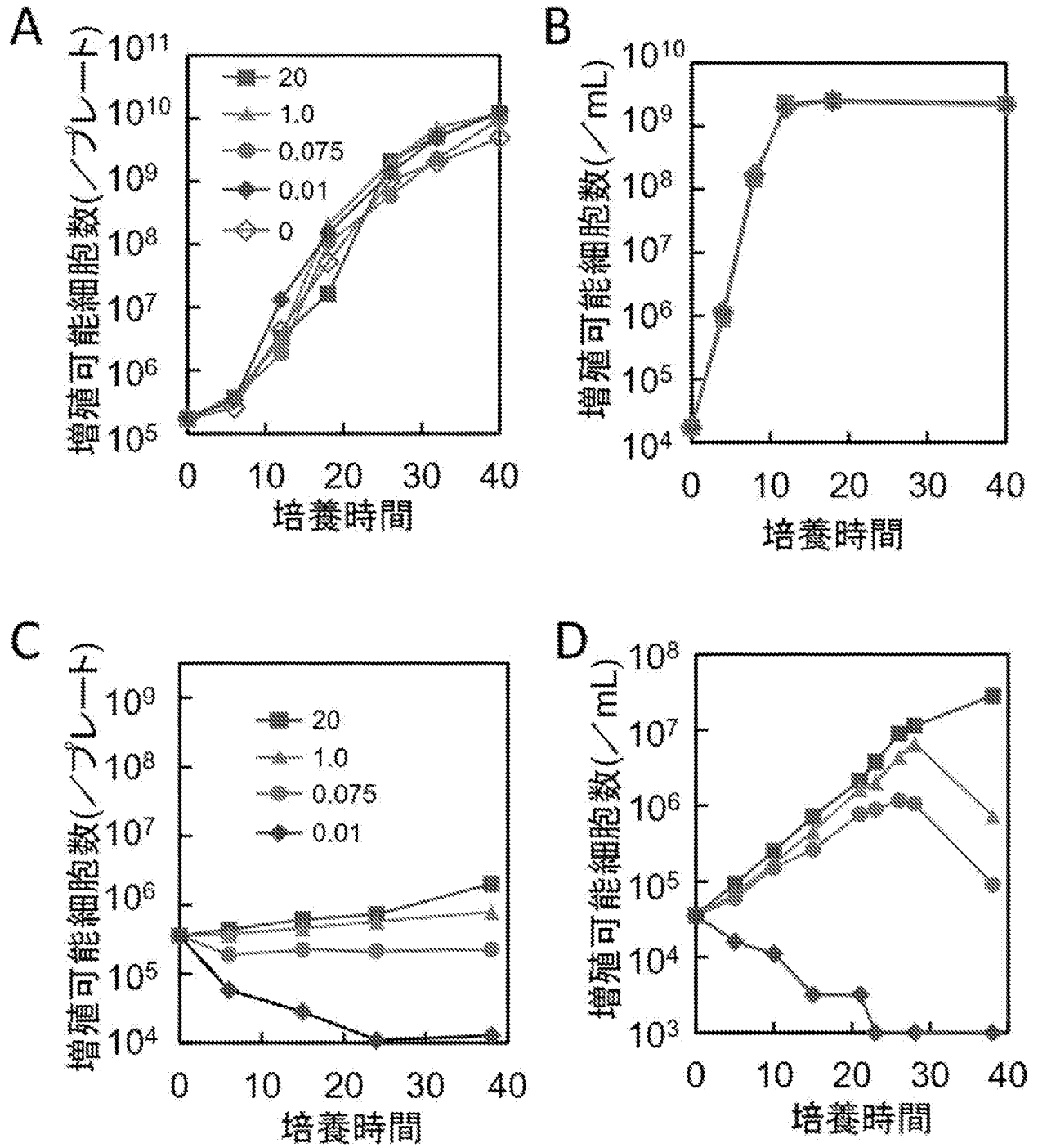
重量部に対して脂肪酸0.2～4.5重量部の範囲内であることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載の微生物の増殖能を増強する方法。

[請求項8] 微生物が、真正細菌、古細菌及び真核生物からなる群から選択されることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の微生物の増殖能を増強する方法。

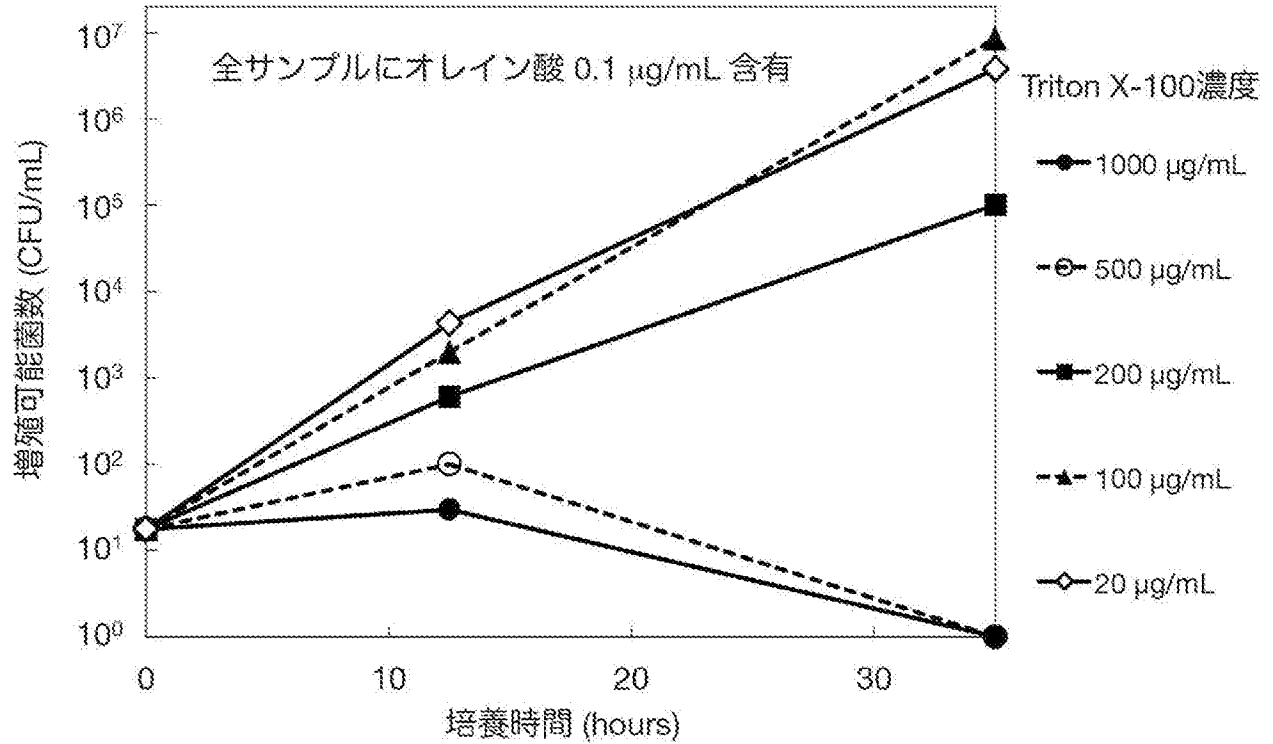
[請求項9] シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する培地で微生物を培養する工程を含むことを特徴とする微生物を増殖する方法。

[請求項10] シクロデキストリンに包接された、炭素数5以上の脂肪酸を含有する微生物の増殖能の増強剤。

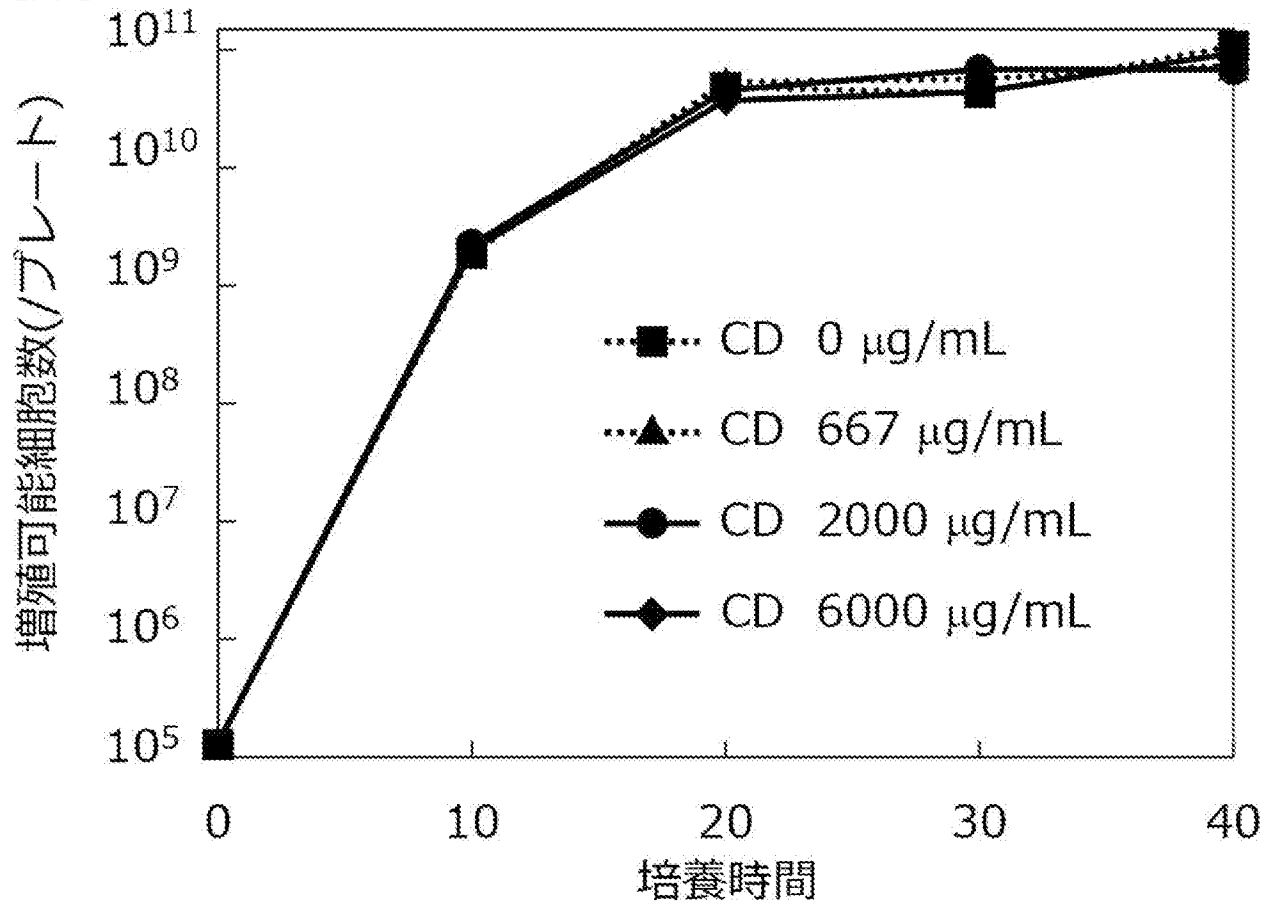
[図1]



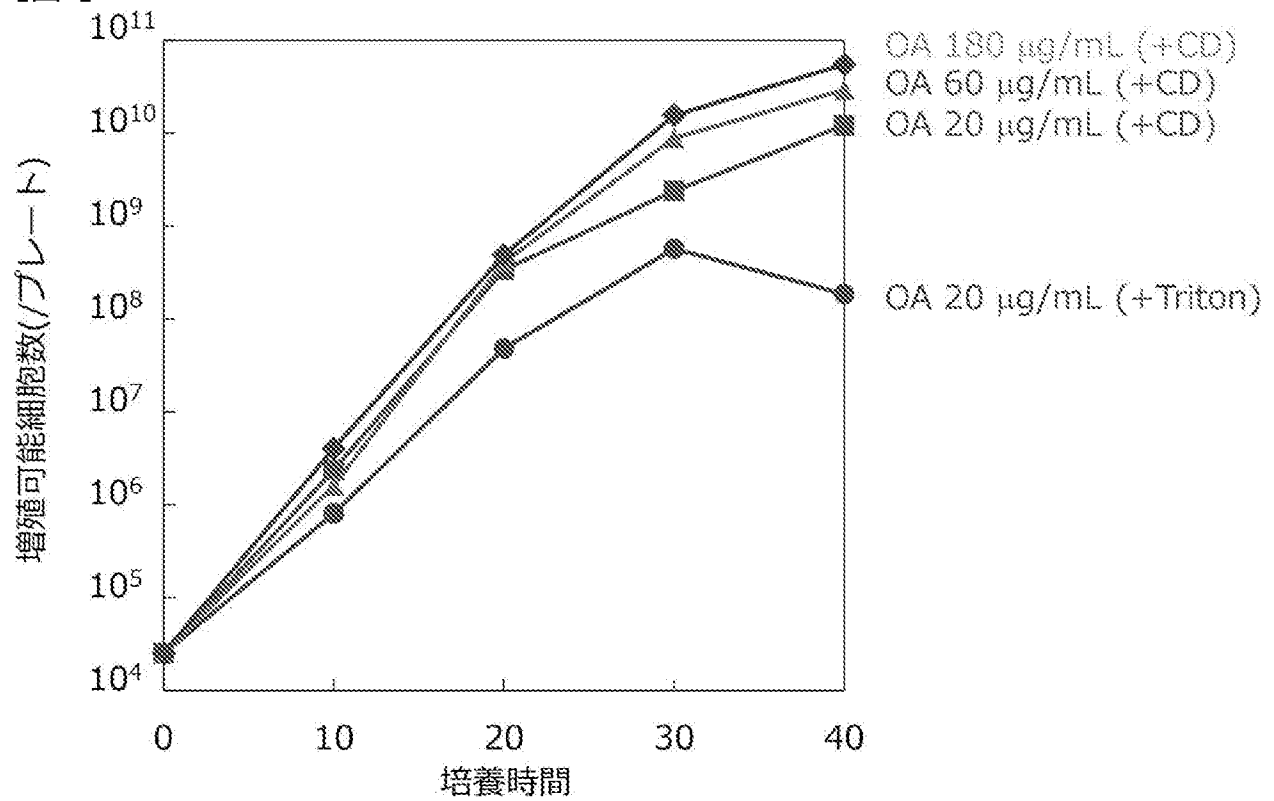
[図2]



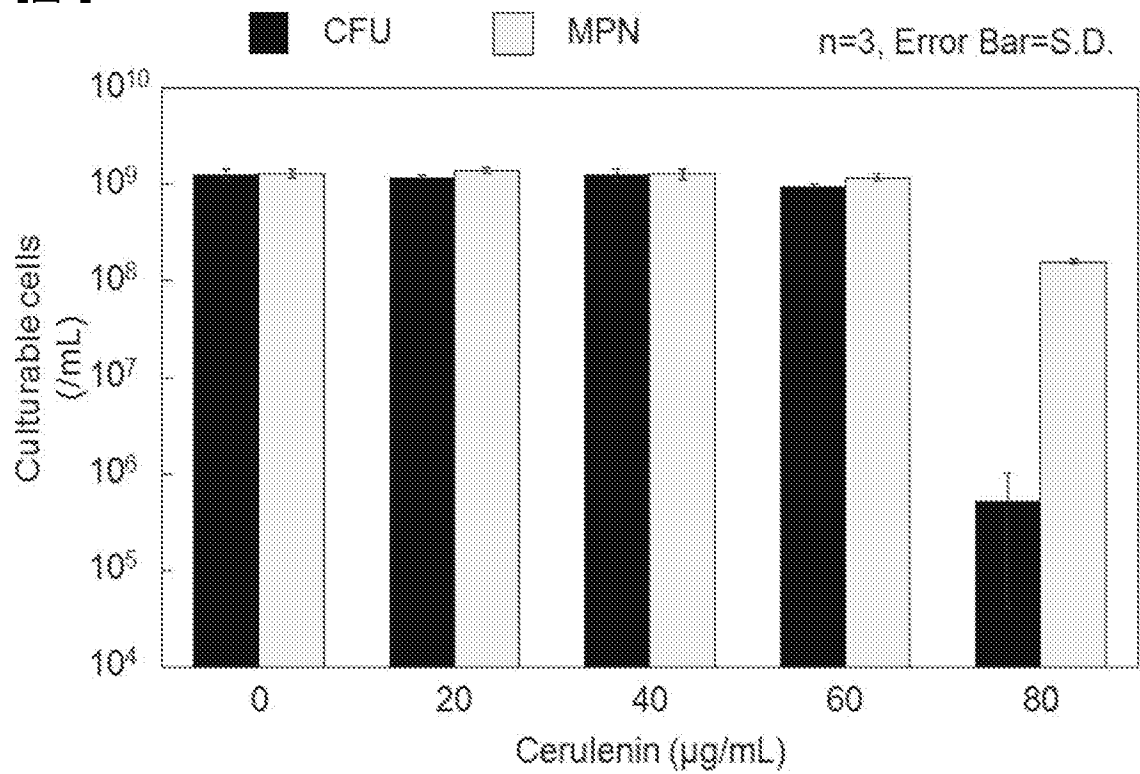
[図3]



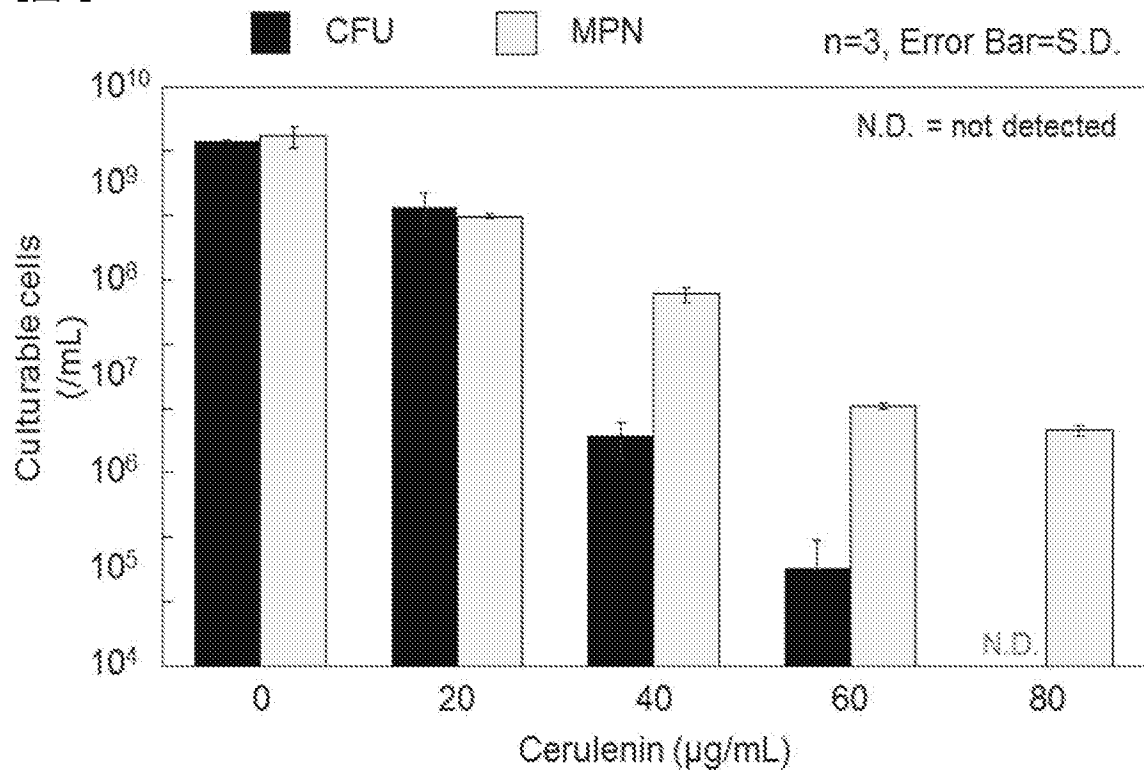
[図4]



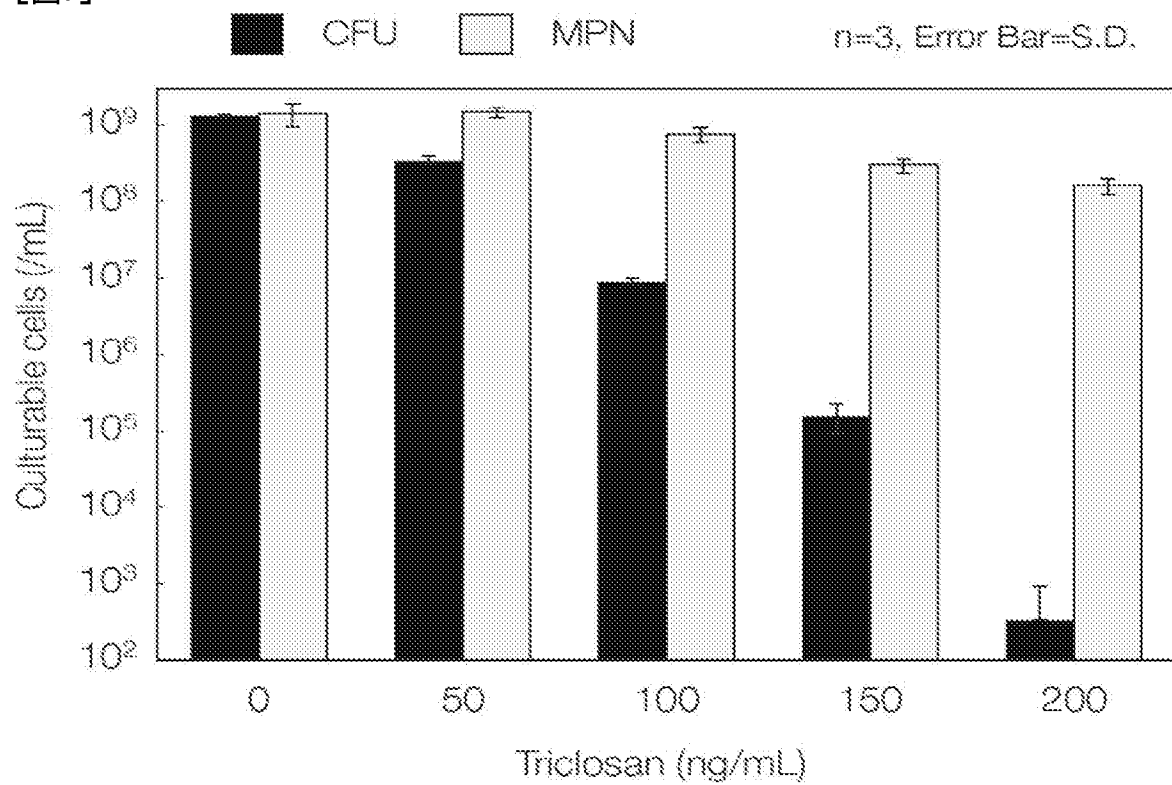
[図5]



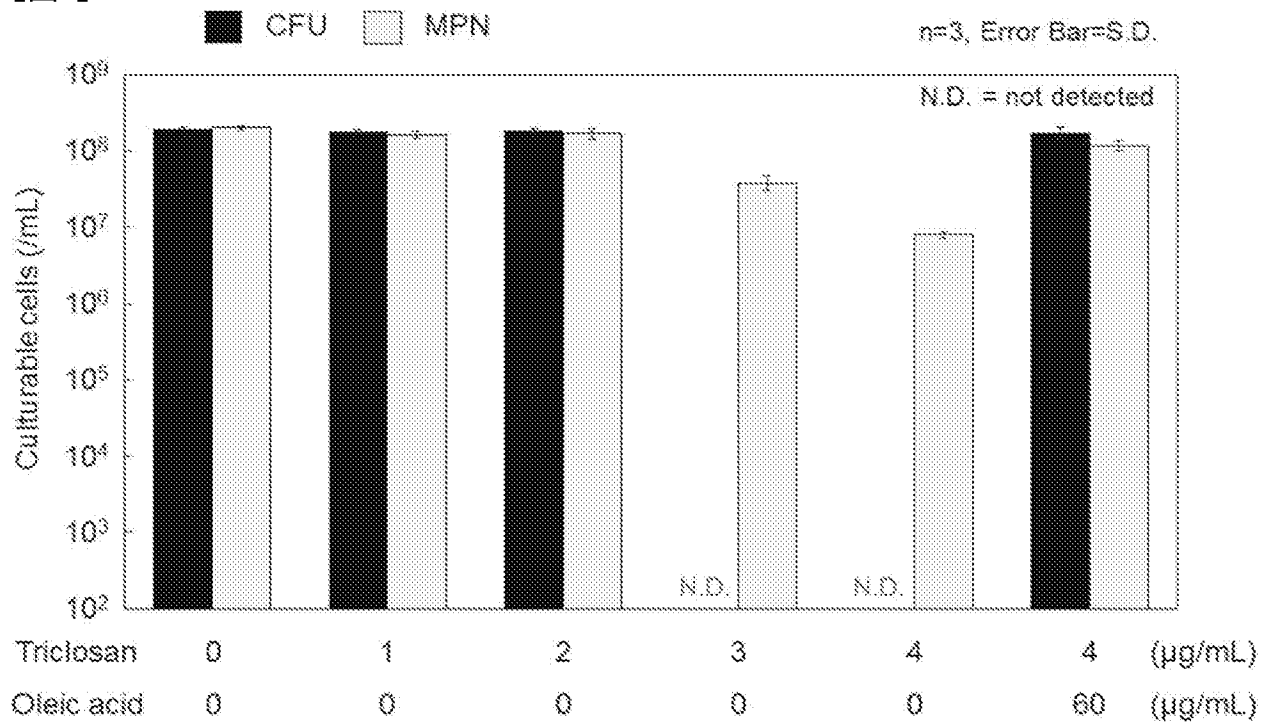
[図6]



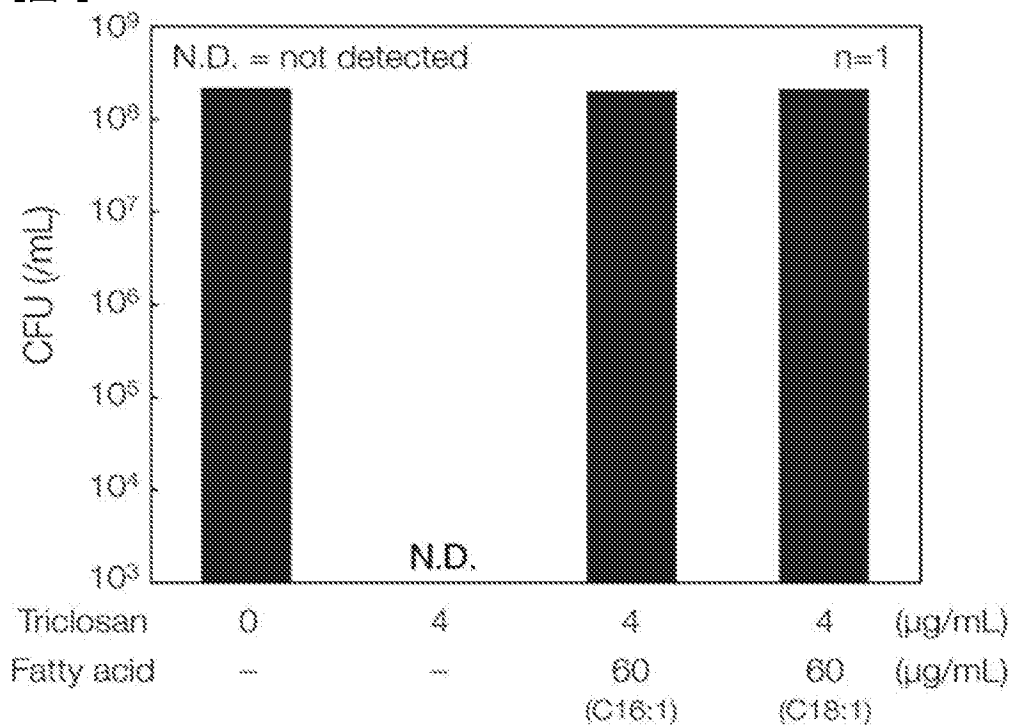
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/018039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/38(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N1/28(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)

C12N1/38, C12N1/00, C12N1/28

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 57-194787 A (Ajinomoto Co., Inc.), 30 November 1982 (30.11.1982), claims; page 2, upper left column; page 2, lower left column, lines 7 to 12; page 2, lower right column, lines 11 to 14; fig. 1; examples & US 4533637 A claims; column 2, lines 48 to 55; column 3, lines 13 to 27; fig. 1; examples & EP 66284 A2 & DE 3274884 D & AU 8417282 A	1, 3-10 1-10

☒ 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
13 July 2017 (13.07.17)

Date of mailing of the international search report
01 August 2017 (01.08.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/018039

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2010-000088 A (Life Technologies Corp.), 07 January 2010 (07.01.2010), claims; examples; paragraph [0086] & US 2003/0153079 A1 claims; examples; paragraph [0116] & WO 2003/048313 A2 & EP 2251417 A1 & DE 60235835 D	1, 3-10 1-10
Y	Kazuki NOSHO et al., "Daichokin ni Okeru Shibosan Kyokyu Fuzen to Colony Keiseino no Kankei", 2015 Nen Proceedings of the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 05 March 2015 (05.03.2015), lecture no.4A34p07	1-10
Y	JP 57-138385 A (Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), 26 August 1982 (26.08.1982), table 3 & US 4451457 A table 3 & GB 2092890 A & DE 3205018 A & FR 2499854 A & AU 6252486 A	1-10
Y	JP 59-187778 A (Teijin Ltd.), 24 October 1984 (24.10.1984), examples (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N1/38(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N1/28(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. C12N1/38, C12N1/00, C12N1/28

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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）

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

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 A	JP 57-194787 A (味の素株式会社) 1982. 11. 30, 特許請求の範囲、第2頁左上欄、第2頁左下欄第7-12行、第2頁右下欄第11-14行、図1、実施例 & US 4533637 A, 特許請求の範囲、第2欄第48-55行、第3欄第13-27行、図1、実施例 & EP 66284 A2 & DE 3274884 D & AU 8417282 A	1, 3-10 1-10

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

13.07.2017

国際調査報告の発送日

01.08.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

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）

布川 莉奈

4 B

6220

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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 A	JP 2010-000088 A (ライフ テクノロジーズ コーポレーション) 2010.01.07, 特許請求の範囲、実施例、段落 [0086] & US 2003/0153079 A1, 特許請求の範囲、実施例、段落[0116] & WO 2003/048313 A2 & EP 2251417 A1 & DE 60235835 D	1, 3-10 1-10
Y	納庄一樹 ほか, 大腸菌における脂肪酸供給不全とコロニー形成能 の関係, 日本農芸化学会 2 0 1 5 年度大会講演要旨集, 2015.03.05, 講演番号 4 A 3 4 p 0 7	1-10
Y	JP 57-138385 A (呉羽化学工業株式会社) 1982.08.26, 表 3 & US 4451457 A, 表 3 & GB 2092890 A & DE 3205018 A & FR 2499854 A & AU 6252486 A	1-10
Y	JP 59-187778 A (帝人株式会社) 1984.10.24, 実施例 (ファミリー なし)	1-10