

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-521980
(P2016-521980A)

(43) 公表日 平成28年7月28日(2016.7.28)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 1/20 (2006.01)	C 12 N 1/20	A 2B 150
A01G 7/00 (2006.01)	A01G 7/00	605Z 4B065
A23K 40/30 (2016.01)	A23K 40/30	Z
A23K 10/18 (2016.01)	A23K 10/18	
A23K 10/30 (2016.01)	A23K 10/30	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2016-517037 (P2016-517037)
(86) (22) 出願日	平成26年5月30日 (2014.5.30)
(85) 翻訳文提出日	平成28年2月1日 (2016.2.1)
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/040218
(87) 国際公開番号	W02014/194189
(87) 国際公開日	平成26年12月4日 (2014.12.4)
(31) 優先権主張番号	61/829,987
(32) 優先日	平成25年5月31日 (2013.5.31)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人 514305965
 ニューリーフ シンバイオティクス イン
 コーポレイテッド
 NewLeaf Symbiotics,
 Inc.
 アメリカ合衆国 ミズーリ セントルイス
 ノースウォーソンロード 1005 ビ
 ー・アール・ディー・ジー パーク
 BRDG Park, 1005 N
 orth Warson Road, St.
 Louis, MO 63132, U
 nited States of Ame
 rica

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細菌の発酵法及び組成物

(57) 【要約】

本発明は、メチロバクテリウム属の細菌の培養方法を提供する。特に、前記方法は、それらの細菌の効率的で安価な培養のための方法を提供する。さらに、本発明は植物農業を改良するためのこれらの細菌培養の使用のための方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

連続相と、連続相中で不混和性であるか又は部分的にのみ混和性である分散相とを含むエマルション中でメチロバクテリウム (*Methylobacterium*) を成長させ、それによってメチロバクテリウム調製物を得ることを含む、メチロバクテリウム調製物を得るための方法。

【請求項 2】

前記メチロバクテリウムが、メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(a) 分散相が非水性液体を含み、かつ連続相が水性液体を含み、又は (b) 分散相が水性液体を含み、かつ連続相が非水性液体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記非水性液体が、25でn-ペントノールの混和性以下である水中での混和性を有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記連続相に相応する液体を含む非エマルション中で成長させることを除いて同一の条件下でメチロバクテリウムを成長させることによって得られる収率と比較して、分散相が前記メチロバクテリウムの増加した収率を提供する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

さらに、培地中で成長させたメチロバクテリウムを採取することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記エマルションが、さらに、エマルションを安定化するために十分な量で乳化剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記乳化剤が、増粘剤、界面活性剤及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記非水性液体が、アルコール、アルデヒド、ケトン、脂肪酸、リン脂質、又はそれらのあらゆる組合せを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

前記アルコールが、少なくとも5個の炭素を含む脂肪族アルコール及びステロールからなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記非水性液体が、動物油、微生物油、合成油又は植物油の1つ以上を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 12】

前記植物油が、トウモロコシ、大豆、綿、ピーナッツ、ヒマワリ、オリーブ、亜麻、ココナッツ、ヤシ、菜種、ゴマ種子、ベニバナ、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記エマルションが、光合成微生物を含まず、又は前記エマルションが、さらに、メチロバクテリウム以外の予め決められた同一性の光合成微生物でない微生物の1種以上を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記分散相が、少なくとも約0.02質量%～約20質量%のエマルションを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記非水性液体が、農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤である、請求項

10

20

30

40

50

3に記載の方法。

【請求項16】

前記成長が、前記メチロバクテリウムを前記エマルションに接種し、前記接種されたエマルションを、前記メチロバクテリウムの成長を提供するために十分な条件下でインキュベートするステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記メチロバクテリウムが、M.アミノボランス (*M. aminovorans*)、M.クロロメタニカム (*M. chloromethanicum*)、M.ジクロロメタニカム (*M. dichloromethanicum*)、M.エキストロクエンス (*M. extorquens*)、M.フジサワエンス (*M. fujisawaense*)、M.メソフィリカム (*M. mesophilicum*)、M.オルガノフィラム (*M. organophilum*)、M.ラジオトレランス (*M. radiotolerans*)、M.ロデシアナム (*M. rhodesianum*)、M.ロジナム (*M. rhodinum*)、M.チオシアナツム (*M. thiocyanatum*)、M.ノデュランス (*M. nodulans*)、M.セラスチイ (*M. cerastii*)、M.ゴジピコーラ (*M. gossipiicola*)、メチロバクテリウム種の株LMG6378、M.フィロスフェラ (*M. phyllospheae*)、M.オリゼ (*M. oryzae*)、M.プラタニ (*M. platani*)、M.ポプリ (*M. populi*)、及びM.ザトマニイ (*M. zatmanii*)からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記エマルションが、実質的に微生物の混入を有さない、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記採取が、メチロバクテリウムの全て又は一部をエマルションから回収することを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項20】

前記方法が、さらに、回収したメチロバクテリウムの一部を脱水することを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

請求項1から20までのいずれか1項に記載の方法によって得られるメチロバクテリウム調製物であって、分散相又は連続相のいずれかが、25でn-ペントノールの混和性以下である水中での混和性を有する非水性液体を含む、前記メチロバクテリウム調製物。

【請求項22】

植物又は植物の一部に、請求項21に記載のメチロバクテリウム調製物を含有する組成物を適用するステップを含む、植物又は植物の一部をメチロバクテリウムで処理するための方法。

【請求項23】

前記組成物が、さらに、農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記組成物は固体物質がない、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記植物の一部が種子であり、かつ前記組成物が、前記組成物1グラムあたり少なくとも約 5×10^8 コロニー形成単位～前記組成物1グラムあたり約 5×10^{13} コロニー形成単位のメチロバクテリウム価を有する、請求項22に記載の方法。

【請求項26】

前記植物の一部が、種子、茎、根、花、子葉、子葉鞘、果実又は葉である、請求項22に記載の方法。

【請求項27】

前記植物又は植物の一部が、トウモロコシ、アブラナ種、アルファルファ、米、ライ麦、モロコシ、トウジンヒエ、キビ、アワ、シコクビエ、ヒマワリ、ベニバナ、大豆、タバコ、ジャガイモ、ピーナッツ、綿、サツマイモ、キャッサバ、コーヒー、ココナッツ、パイナップル、シトラスツリー、カカオ、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マン

10

20

30

40

50

ゴー、オリーブ、パパイア、カシュー、マカダミア、アーモンド、テンサイ、サトウキビ、オート麦、大麦、トマト、レタス、グリーンビーンズ、ライマメ、エンドウ、ウリ科、観葉植物、又は針葉樹の植物又は植物の一部である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

請求項 22 から 27 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られる植物又は植物の一部であって、メチロバクテリウム調製物で少なくとも部分的に被覆されている、前記植物又は植物の一部。

【請求項 29】

請求項 28 に記載の植物又は植物の一部から得られる加工された植物生成物であって、エマルションを含む、前記加工された植物生成物。

10

【請求項 30】

前記生成物が、ミール、ペースト、粉、フレーク又は飼料である、請求項 29 に記載の加工された植物生成物。

【請求項 31】

請求項 29 又は 30 に記載の加工された植物生成物であって、再生可能ではない、前記加工された植物生成物。

【請求項 32】

連続相と、連続相中で不混和性であるか又は部分的にのみ混和性である分散相とを含むエマルション、及びメチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物を含む発酵生成物。

20

【請求項 33】

(a) 分散相が非水性液体を含み、かつ連続相が水性液体を含み、又は (b) 分散相が水性液体を含み、かつ連続相が非水性液体を含む、請求項 32 に記載の発酵生成物。

【請求項 34】

前記非水性液体が、25 で n - ペンタノールの混和性以下である水中での混和性を有する、請求項 33 に記載の発酵生成物。

【請求項 35】

前記発酵生成物が、実質的に微生物の混入を有さない、請求項 32 に記載の発酵生成物。

【請求項 36】

前記発酵生成物が、さらに、メチロバクテリウム以外の予め決められた同一性の微生物の 1 種以上を含む、請求項 32 に記載の発酵生成物。

30

【請求項 37】

前記発酵生成物は固体物質がない、請求項 32 に記載の発酵生成物。

【請求項 38】

前記生成物が、光合成微生物を含まない、請求項 32 に記載の発酵生成物。

【請求項 39】

連続相と分散相とを含むエマルション、及びメチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物を含有する組成物であって、(a) 分散相が非水性液体を含み、かつ連続相が水性液体を含み、又は (b) 分散相が水性液体を含み、かつ連続相が非水性液体を含み、前記非水性液体が、25 で n - ペンタノールの混和性以下である水中での混和性を有する、前記組成物。

40

【請求項 40】

前記組成物が、実質的に微生物の混入を有さない、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記組成物が、さらに、農業的に認容性の助剤及び / 又は農業的に認容性の付形剤の少なくとも 1 つを含む、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 42】

前記組成物は固体物質がない、請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 43】

第二の液体が、アルコール、アルデヒド、ケトン、脂肪酸、リン脂質、又はそれらのあ

50

らゆる組合せを含む、請求項 3 9 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記アルコールが、少なくとも 5 個の炭素を含む脂肪族アルコール及びステロールからなる群から選択される、請求項 3 9 に記載の組成物。

【請求項 4 5】

第二の液体が、動物油、微生物油、合成油又は植物油の 1 つ以上を含む、請求項 3 9 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記植物油が、トウモロコシ、大豆、綿、ピーナッツ、ヒマワリ、オリーブ、亜麻、ココナッツ、ヤシ、菜種、ゴマ種子、ベニバナ、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 4 5 に記載の組成物。

10

【請求項 4 7】

前記固体物質が、さらに、農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤を含む、請求項 3 9 に記載の組成物。

【請求項 4 8】

前記組成物が、光合成微生物を含まない、請求項 3 9 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

前記組成物が、さらに、少なくとも 1 つの農薬及び / 又は少なくとも 1 つの静菌剤を含む、請求項 3 9 に記載の組成物。

20

【請求項 5 0】

前記農薬が、殺虫剤、殺真菌剤、殺線虫剤、及び殺菌剤からなる群から選択され、前記農薬が、実質的に前記メチロバクテリウムの成長を阻害しない、請求項 4 9 に記載の組成物。

【請求項 5 1】

植物又は植物の一部に、請求項 3 2 から 3 8 のいずれか 1 項に記載の発酵生成物又は請求項 3 9 から 5 0 のいずれか 1 項に記載の組成物を適用するステップを含む、植物又は植物の一部をメチロバクテリウムで処理するための方法。

【請求項 5 2】

前記植物の一部が、種子、茎、根、花、子葉、子葉鞘、果実又は葉である、請求項 5 1 に記載の方法。

30

【請求項 5 3】

前記植物又は植物の一部が、トウモロコシ、アブラナ種、アルファルファ、米、ライ麦、モロコシ、トウジンヒエ、キビ、アワ、シコクビエ、ヒマワリ、ベニバナ、大豆、タバコ、ジャガイモ、ピーナッツ、綿、サツマイモ、キャッサバ、コーヒー、ココナッツ、パイナップル、シトラスツリー、カカオ、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイア、カシュー、マカダミア、アーモンド、テンサイ、サトウキビ、オート麦、大麦、トマト、レタス、グリーンビーンズ、ライマメ、エンドウ、ウリ科、観葉植物、又は針葉樹の植物又は植物の一部である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

請求項 5 1 に記載の方法によって得られる植物であって、前記植物が、前記組成物の発酵生成物で少なくとも部分的に被覆される、前記植物。

40

【請求項 5 5】

請求項 5 1 に記載の方法によって得られる植物の一部であって、前記植物が、前記組成物の発酵生成物で少なくとも部分的に被覆される、前記植物の一部。

【請求項 5 6】

第一の水性液体、25 で n - ペンタノールの混和性以下である水中での混和性を有する第二の液体、及び外因性メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物を含有するエマルジョンで少なくとも部分的に被覆される、植物又は植物の一部。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年5月31日に出願された米国特許出願通し番号61/829,987号の利益を請求するものであり、その全体の開示は、参照をもって本明細書に組み込まれたものとする。

【0002】

背景技術

一炭素有機化合物、例えばメタン及びメタノールは、広範に自然に見出され、かつメタノトローフ及びメチロトローフとして分類される細菌による炭素源として使用される。メタノトローフ細菌は、メチロバクテリア (*Methylobacter*) 属、メチロモナス (*Methylomonas*) 属、メチロミクロビウム (*Methylomicrobium*) 属、メチロコッカス (*Methylococcus*) 属、メチロサイナス (*Methylosinus*) 属、メチロシスチス (*Methylocystis*) 属、メチロスフェラ (*Methylosphaera*) 属、メチロカルダム (*Methylocaldum*) 属、及びメチロセラ (*Methylocella*) 属における種を含む (Lidsstrom, 2006)。メタノトローフは、O₂からの酸素原子をメタンに組込みメタノールを形成する、メタンモノオキシゲナーゼ酵素を有する。全てのメタノトローフは、炭素-炭素結合を含む化合物を使用することができない偏性一炭素利用種である。一方で、メチロトローフは、より複雑な有機化合物、例えば有機酸、高級アルコール、糖等も使用できる。従って、メチロトローフ細菌は、通性メチロトローフである。メチロトローフ細菌は、メチロバクテリウム (*Methylobacterium*) 属、ハイフォミクロビウム (*Hyphomicrobium*) 属、メチロフィルス (*Methylophilus*) 属、メチロバチルス (*Methylobacillus*) 属、メチロファーガ (*Methylophaga*) 属、アミノバクター (*Aminobacter*) 属、メチロラブダス (*Methylorhabdus*) 属、メチロピラ (*Methylpila*) 属、メチロスルホノモナス (*Methylosulphonomonas*) 属、マリノスルホノモナス (*Marinosulphonomonas*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、キサントバクター (*Xanthobacter*) 属、アンシロバクター (*Ancyllobacter*) 属 (ミクロシクリス (*Microcyclicus*) 属として公知である)、チオバチルス (*Thiobacillus*) 属、ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、ロドバクター (*Rhodobacter*) 属、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属、アルトバクター (*Arthobacter*) 属及びノカルディア (*Nocardia*) 属における種を含む (Lidsstrom, 2006)。

【0003】

メチロバクテリウム属のほとんどのメチロトローフ細菌は、ピンク色素性である。それらは、通常PPFM細菌 (pink-pigmented facultative methylo troph (ピンク色素通性メチロトローフ)) といわれる。Green (2005, 2006) は、メチロバクテリウム属における12種の確認された種、特に、M.アミノボランス (*M. aminovorans*)、M.クロロメタニカム (*M. chloromethanicum*)、M.ジクロロメタニカム (*M. dichloromethanicum*)、M.エキストロクエンス (*M. ex torquens*)、M.フジサワエンス (*M. fujisawaense*)、M.メソフィリカム (*M. mesophilicum*)、M.オルガノフィラム (*M. organophilum*)、M.ラジオトレランス (*M. radiotolerans*)、M.ロデシアナム (*M. rhodesianum*)、M.ロジナム (*M. rhodinum*)、M.チオシアナツム (*M. thiocyanatum*)、及びM.ザトマニイ (*M. zatmanii*)を同定した。しかしながら、M.ニデュランス (*M. nidulans*)は、PPFMではない窒素固定メチロバクテリウムである (Syet al., 2001)。メチロバクテリウムは、自然に遍在し、土壤、粉塵、淡水、堆積物及び葉の表面において、並びに工業及び臨床的な環境において見出される (Green, 2006)。

【0004】

ほとんど(全てとは言わなくても)の植物(藻類、蘚類及び苔類、並びに被子植物類及び裸子植物類に及ぶ)の葉の表面の生着菌としてのPPFM細菌の存在は、PPFM細菌が、植物生理学において重要な役割を果たしうることを示唆している (Corpe and Rheem, 1989; Holland及びPolacco, 1994; Hol

10

20

30

40

50

land, 1997; Kutschera, 2007)。植物が、おそらく植物細胞壁の成長におけるペクチン代謝の老廃物として、メタノールを生成及び放出することは、植物が生成するメタノールを供給し、順に植物に対する正の利益を提供するPPFM細菌との共生関係が存在することがこれらの研究者に示唆された。植物生理学に対するPPFM細菌の示唆された利益は、PPFMで生じるサイトカイニン植物ホルモンの供給によって窒素代謝、種子発芽、及び植物成長の刺激に対する正の効果を含む。植物成長、植物収率、種子発芽、雄株の繁殖力、及び植物栄養の質を改良するためのPPFM細菌の使用は、米国特許5,512,069号、米国特許5,961,687号、米国特許6,174,837号、米国特許6,329,320号、米国特許7,435,878号、及び米国特許出願番号第2006/0228797号において開示されている。さらに、PPFM細菌は、栽培した海藻の収率を増加することを見出しており、海藻由来のバイオ燃料の製造にそれらを適用することを示唆している(米国特許出願番号第2011/0269219号)。

10

【0005】

条植え作物、野菜及び他の栽培した植物に対する、並びに海藻に基づくバイオ燃料の製造におけるメチロバクテリウムの広範な適用は、莫大な量のメチロバクテリウム培養菌の効率的な及び安価な培養を要求する。メチロバクテリウムの他の工業適用は、効率的なメチロバクテリウムの製造技術から利益を有してもよい。かかる工業適用は、環境汚染指示薬としての(あるメチロバクテリウムが煤上で成長できるため)、及び包装食品工業における放射品質管理モニターとしての(あるメチロバクテリウムがガンマ放射線に高い耐性を呈するため)、メチロバクテリウムの使用を含む。他の工業適用は、環境汚染物質を分解するためのメチロバクテリウムの使用(米国特許番号U.S.5,418,161号、U.S.5,487,834号、U.S.6,107,067号、U.S.7,214,509号)、有用な工業化合物、ポリマー前駆体、又はバイオポリマーを製造するためのメチロバクテリウムの使用(U.S.5,236,930号、U.S.5,686,276号、U.S.6,107,067号)、及び組換えタンパク質を製造するためのメチロバクテリウムの使用(米国特許出願番号第20060234336号)を含む。

20

【0006】

しかしながら、PPFM培養の対象範囲における種々の刊行物は、これらの細菌の効率的及び安価なラージスケールの培養を達成するために克服する重要な障害があることを示唆している。Holland及びPolacco(1994)は、栄養が豊富である培地である“単離されたPPFMは、植物組織培地上で良好に成長しない”こと、及び“PPFMが晩成植物である”ことを報告している。Madhaiyanら(2004)は、PPFM細菌について、“それらのゆっくりと成長する性質及び全体の植物に及ぶ分布が、成長点から離れて植物組織が拡大するために、それらの数が希釈によって単純に調整されることを示唆する”ことを挙げている。Abanda-Nkpwattら(2006)は、得られた力価(力価は1ミリリットルあたりの細菌細胞数又はコロニー形成単位を言う)を指定せずに“液体培地中で、その溶液が4~5日以内に混濁する”PPFM細菌の成長を報告している。

30

【0007】

晩成植物のこれらの一致した報告は、PPFM細菌が比較的低い力価に対して成長できるのみであることを示す他の研究によって、さらに確認及び詳説される。これらの成長の研究は、“無色透明”であるように故意に製造した標準液体微生物培地中であった。かかる培地は、肉眼で見える混濁度の発生として明白な、所望の及び所望でない(すなわち汚濁している)微生物成長の視覚的観察及び検出を可能にする。

40

【0008】

Corpe及びBasile(1982)は、広範な炭素源に対する種々のPPFM細菌の成長応答の組織的な調査を示している。彼らは、Stanierら(1966)によって使用した標準ミネラルベースをそれらのベース培地として使用した。この文献において、Stanierらは、それらのベース培地が“ニトロ酢酸及びEDTAで多量にキレ

50

ート化し、オートクレーブで豊富な沈殿物を形成する。その沈殿物は、培地冷却として再融解して、透明な溶液を形成する。”ことを挙げている。

【0009】

この“無色透明な”溶液をそれらのベース培地として使用して、Corpe及びBasile(1982)は、PPFM細菌の成長を指示するそれらの能力について種々の炭素源で試験した。それらは、他の全てより比較的良好であるいくつかの炭素源、すなわち、グリセロール、グルタメート、メタノール、グルコース、アスパルテート、スクシネート及びマレートを見出した。しかしながら、7日のインキュベート(それぞれの成長試験に割り当てられた時間)後でさえ、培養物は、0.7光学単位より大きい光学密度(660ナノメートルで、微生物成長を測定するための標準波長)を達成しない。Sylar(2005)は、約0.05光学単位の光学密度を有するPPFM細菌の懸濁液は、1ミリリットルあたり約 5×10^6 コロニー形成単位(CFU)を含むことを報告している。従って、Corpe及びBasileが彼らによって同定した最良の炭素源で1週間インキュベートした後に得た最大の力価は、1ミリリットルあたり約 7×10^7 コロニー形成単位であった。

10

【0010】

Sylar(2005)は、炭素源としてスクシネートを含む最小塩培地で、1ミリリットルあたり約 2.5×10^8 コロニー形成単位のM.エキストロクエンスの最終力価を達成したことも報告している。

20

【0011】

Corpe及びRheem(1989)は、PPFM細菌が“栄養ブイヨン及び他の通常の従属栄養培地中で、他の葉従属栄養生物よりも非常に長い倍加時間を有した”ことが報告され、かつ植物により製造されたメタノールが、は表面上で他の細菌で“PPFMをうまく競合させることを可能にする”と推論した。Corpe及びRheemが(明示されていないインキュベート期間後に)達成した最大力価は、1ミリリットルあたり約 3×10^8 コロニー形成単位であった。

20

【0012】

従って、これらの文献は、標準の“無色透明な”微生物成長培地において、PPFM細菌の成長がゆっくりであり、典型的に、1ミリリットルあたり約 3×10^8 コロニー形成単位の比較的低い最終力価で安定状態に達することを示す。

30

【0013】

条植え作物、野菜及び他の栽培した植物における、並びに藻類を基礎としたバイオ燃料の製造における通常の適用のためのPPFM細菌についての潜在的な要求を満たすために、製造能力は、膨大な量のこれらの細菌を製造する必要がある。

【0014】

単に一例としてトウモロコシについて、アメリカに年ごとに成長する約4000万ヘクタールのトウモロコシがある。単民族における及びこの一毛作での市場参入のそれぞれ1%(400000ヘクタール)について、PPFM細菌の必要性は、1ミリリットルあたり約 3×10^8 コロニー形成単位の力価でPPFM栽培の1ヘクタールあたり約30リットルの範囲で、種子処理として又は葉面散布として適用されることが推定される。これは、アメリカのトウモロコシ収穫物の1%を処理するために年ごとに要求される力価で、PPFM栽培の約1200万リットルに等しい。一回あたりの生産時間が7日であった場合に、全生産力(1年あたり約250日)で操作する市場に出ている最も多い容量の発酵槽(一回あたり60000リットル)を有する設備でさえ、これらの巨大な発酵槽の5個又は6個を必要とする(さらに、アメリカにおけるトウモロコシの1%の市場参入のための要求を満たすために)。かかる設備は、おそらく、商業的に現実的な方法で建築及び操作できない。

40

【0015】

従って、効率的で安価なメチロバクテリウムをラージスケールで生産する必要性が存在する。

50

【0016】

発明の要約

本明細書において、大量のメチロバクテリウムの効率的な製造のための方法が提供される。これらの方法は、高い力価のメチロバクテリウム培養をもたらすことができ、その際、1回あたりの製造時間は著しく減少する。本明細書において提供されるメチロバクテリウム製造の方法は、安価で容易に入手できる成分から構成される培地を使用することもできる。本明細書において、有用な、メチロバクテリウムを含む発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物及び組成物も提供される。植物又は植物の一部を処理するために、メチロバクテリウムを含む発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物及び組成物を使用する方法も本明細書において提供される。本明細書において提供される方法及び組成物を、植物又は植物の一部に適用するために、バイオレメディエーションにおける接種物として使用するために、有用な生成物の製造のために、及び組換えタンパク質の製造のために、大量のメチロバクテリウムを製造するために使用することができる。本明細書において提供される方法及び組成物によって得られる有用な生成物は、制限されることなく、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸、1,3-プロパンジオール、及びオキサゾピロロキノリンを含む。

10

【0017】

連続相と、連続相中で不混和性である又は部分的にのみ混和性である分散相とを含むエマルション中でメチロバクテリウムを成長することを含むメチロバクテリウム調製物を得るための方法が本明細書において提供される。ある実施態様において、前記メチロバクテリウムは、メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物である。ある実施態様において、(a) 分散相は非水性液体を含み、かつ連続相は水性液体を含み、又は(b) 分散相は水性液体を含み、かつ連続相は非水性液体を含む。ある実施態様において、非水性液体は、25でn-ペンタノールの混和性以下である水中での混和性を有する。ある実施態様において、分散相は、連続相に対応する液体を含む非エマルション中で成長させることを除いて同一の条件下で、メチロバクテリウムを成長させることによって得られる収率に関してメチロバクテリウムの増加した収率を提供する。ある実施態様において、前記方法は、さらに、培地中で成長させたメチロバクテリウムを採取することを含む。ある実施態様において、エマルションは、さらに、エマルションを安定化するために十分な量で乳化剤を含む。ある実施態様において、乳化剤は、増粘剤、界面活性剤及びそれらの組合せからなる群から選択される。前記方法のいずれかのある実施態様において、非水性液体は、アルコール、アルデヒド、ケトン、脂肪酸、リン脂質、又はそれらのあらゆる組合せを含む。ある実施態様において、アルコールは、少なくとも5個の炭素を含む脂肪族アルコール及びステロールからなる群から選択される。前記方法のいずれかのある実施態様において、非水性液体は、1つ以上の動物油、微生物油、合成油又は植物油を含む。ある実施態様において、植物油は、トウモロコシ、大豆、綿、ピーナッツ、ヒマワリ、オリーブ、亜麻、ココナッツ、ヤシ、菜種、ゴマ種子、ベニバナ、及びそれらの組合せからなる群から選択される。前記方法のいずれかのある実施態様において、エマルションは、光合成微生物を含まない。前記方法のいずれかのある実施態様において、エマルションは、さらに、メチロバクテリウム以外の予め決められた同一性の1種以上の光合成でない微生物を含む。

20

前記方法のいずれかのある実施態様において、分散相は、少なくとも約0.02%~約20% (質量) のエマルションを含む。前記方法のいずれかのある実施態様において、非水性液体は、農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤である。前記方法のいずれかのある実施態様において、成長は、前記メチロバクテリウムを前記エマルションに接種し、前記接種されたエマルションを、前記メチロバクテリウムの成長のために提供するために十分な条件下でインキュベートするステップを含む。前記方法のいずれかのある実施態様において、メチロバクテリウムは、M. アミノボランス、M. クロロメタニカム、M. ジクロロメタニカム、M. エキストロクエンス、M. フジサワエンス、M. メソフィリカム、M. オルガノフィラム、M. ラジオトレランス、M. ロデシアナム、M. ロジナム、M. チオシアナツム、M. ノデュランス (M. nodulans)、M. セラスチイ (M. cerasi)、M. ゴジピコーラ (M. gossipiiicola)、メチロバクテリウム種の株LMG 63

30

40

50

78、M. フィロスフェラ (M. phyllosphaerae)、M. オリゼ (M. oryzae)、M. プラタニ (M. platani)、M. ポブリ (M. populi)、及びM. ザトマニイからなる群から選択される。前記方法のいずれかのある実施態様において、エマルションは、実質的に微生物の混入がない。前記方法のいずれかのある実施態様において、前記方法は、さらに、メチロバクテリウムの全て又は一部をエマルションから回収することを含む。前記方法のいずれかのある実施態様において、前記方法は、さらに、回収したメチロバクテリウムの一部を脱水することを含む。

【0018】

前記方法のいずれかによって得られたメチロバクテリウム調製物も提供され、その際分散相又は連続相は、25でn-ペントノールの混和性以下である混和性を有する非水性液体を含む。

10

【0019】

植物又は植物の一部に、前記メチロバクテリウム調製物のいずれかを含む組成物を適用するステップを含む、植物又は植物の一部をメチロバクテリウムで処理するための方法も提供される。ある実施態様において、前記組成物は、さらに、農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤を含む。前記方法のいずれかのある実施態様において、前記組成物は、固体物質を欠く。ある実施態様において、植物の一部は種子であり、前記組成物は、前記組成物1グラムあたり少なくとも約 5×10^8 コロニー形成単位～前記組成物1グラムあたり約 5×10^{13} コロニー形成単位のメチロバクテリウム価を有する。ある実施態様において、前記植物の一部は、種子、茎、根、花、子葉、子葉鞘、果実又は葉である。ある実施態様において、植物又は植物の一部は、トウモロコシ、アブラナ種、アルファルファ、米、ライ麦、モロコシ、トウジンヒエ、キビ、アワ、シコクビエ、ヒマワリ、ベニバナ、大豆、タバコ、ジャガイモ、ピーナッツ、綿、サツマイモ、キヤッサバ、コーヒー、ココナッツ、パイナップル、シトラスツリー、カカオ、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイヤ、カシュー、マカダミア、アーモンド、テンサイ、サトウキビ、オート麦、大麦、トマト、レタス、グリーンビーンズ、ライマメ、エンドウ、ウリ科、観葉植物、又は針葉樹の植物又は植物の一部である。ある実施態様において、植物又は植物の一部は、少なくとも部分的に前記メチロバクテリウム調製物で被覆される。本明細書において、前記植物又は植物の一部のいずれかから得られる加工された植物生成物も提供され、その際加工された生成物は、エマルションを含む。ある実施態様において、加工された植物生成物は、ミール、ペースト、粉、フレーク又は飼料である。ある実施態様において、加工された生成物は再生可能ではない。

20

【0020】

本明細書において、連続相と、連続相中で不混和性である又は部分的にのみ混和性である分散相とを含むエマルション、及びメチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物を含む発酵生成物が提供される。ある実施態様において、(a) 分散相は非水性液体を含み、かつ連続相は水性液体を含み、又は(b) 分散相は水性液体を含み、かつ連続相は非水性液体を含む。ある実施態様において、非水性液体は、25でn-ペントノールの混和性以下である水中での混和性を有する。ある実施態様において、発酵生成物は、実質的に微生物の混入がない。ある実施態様において、発酵生成物は、さらに、メチロバクテリウム以外の予め決められた同一性の1種以上の微生物を含む。ある実施態様において、発酵生成物は、固体物質を欠く。ある実施態様において、発酵生成物は、光合成微生物を含まない。ある実施態様において、メチロバクテリウムは、1ミリリットルあたり少なくとも約 5×10^7 コロニー形成単位、1ミリリットルあたり少なくとも約 5×10^8 コロニー形成単位、1ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^9 コロニー形成単位、1ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^{10} コロニー形成単位、又は1ミリリットルあたり少なくとも約 3×10^{10} コロニー形成単位の力価である。ある実施態様において、メチロバクテリウムは、1ミリリットルあたり少なくとも約 5×10^7 コロニー形成単位から1ミリリットルあたり少なくとも約 6×10^{10} コロニー形成単位の力価である。ある実施態様において、メチロバクテリウムの少なくとも1つは、ピンク色素性通性メチロトローフ (PPF)

30

40

50

M)である。ある実施態様において、ピンク色素性通性メチロトローフ(PPFM)は、M.アミノボランス、M.クロロメタニカム、M.ジクロロメタニカム、M.エキストロクエンス、M.フジサワエンス、M.メソフィリカム、M.オルガノフィラム、M.ラジオトレランス、M.ロデシアナム、M.ロジナム、M.チオシアナツム、M.セラスチイ、M.ゴジビコーラ、メチロバクテリウム種の株LMG 6378、M.フィロスフェラ、M.オリゼ、M.プラタニ、M.ポプリ、及びM.ザトマニイからなる群から選択される。ある実施態様において、メチロバクテリウムの少なくとも1つは、M.ノデュランスである。

【0021】

連続相及び分散相を含むエマルション、並びにメチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物を含む組成物も提供される。ある実施態様において、(a)分散相は非水性液体を含み、かつ連続相は水性液体を含み、又は(b)分散相は水性液体を含み、かつ連続相は非水性液体を含む。ある実施態様において、非水性液体は、25でn-ペントノールの混和性以下である水中での混和性を有する。ある実施態様において、前記組成物は、実質的に微生物の混入がない。ある実施態様において、前記組成物は、さらに、農業的に認容性の助剤及び/又は農業的に認容性の付形剤の少なくとも1つを含む。ある実施態様において、前記組成物は、固体物質を欠く。ある実施態様において、第二の液体は、アルコール、アルデヒド、ケトン、脂肪酸、リン脂質、又はそれらのあらゆる組合せを含む。ある実施態様において、アルコールは、少なくとも5個の炭素を含む脂肪族アルコール及びステロールからなる群から選択される。ある実施態様において、非水性液体は、1つ以上の植物油を含む。ある実施態様において、植物油は、トウモロコシ、大豆、綿、ピーナツ、ヒマワリ、オリーブ、亜麻、ココナッツ、ヤシ、菜種、ゴマ種子、ベニバナ、及びそれらの組合せからなる群から選択される。ある実施態様において、前記固体物質は、さらに、農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤を含む。ある実施態様において、前記組成物は、光合成微生物を含まない。ある実施態様において、前記組成物は、さらに、少なくとも1つの農薬及び/又は少なくとも1つの静菌剤を含む。ある実施態様において、農薬は、殺虫剤、殺真菌剤、殺線虫剤、及び殺菌剤からなる群から選択され、その際農薬は、実質的にメチロバクテリウムの成長を阻害しない。

【0022】

本明細書において、植物又は植物の一部に、発酵生成物又は組成物のいずれかを適用するステップを含む、植物又は植物の一部をメチロバクテリウムで処理するための方法も提供される。前記方法のある実施態様において、前記植物の一部は、種子、茎、根、花、子葉、子葉鞘、果実又は葉であり、又は前記方法のある実施態様において、植物又は植物の一部は、トウモロコシ、アブラナ種、アルファルファ、米、ライ麦、モロコシ、トウジンヒエ、キビ、アワ、シコクヒエ、ヒマワリ、ベニバナ、大豆、タバコ、ジャガイモ、ピーナツ、綿、サツマイモ、キャッサバ、コーヒー、ココナッツ、パイナップル、シトラスツリー、カカオ、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイヤ、カシュー、マカダミア、アーモンド、テンサイ、サトウキビ、オート麦、大麦、トマト、レタス、グリーンビーンズ、ライマメ、エンドウ、ウリ科、観葉植物、又は針葉樹の植物又は植物の一部である。前記方法のある実施態様において、植物の一部は種子であり、前記組成物は、前記組成物1グラムあたり少なくとも約 5×10^7 コロニー形成単位～前記組成物1グラムあたり約 6×10^{10} 、 3×10^{12} 、 5×10^{12} 、 1×10^{13} 又は 5×10^{13} コロニー形成単位のメチロバクテリウム価を有する。

【0023】

前記組成物の発酵組成物で被覆された少なくとも一部である、前記方法によって得られた植物又は植物の一部も提供される。

【0024】

植物又は植物の一部は、第一の水性液体、n-ペントノールの混和性以下である水中での混和性を有する第二の液体、及び外因性メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物を含むエマルションで少なくとも部分的に被覆される。前記エマルション、発酵生成物

10

20

30

40

50

、発酵プロス、又は組成物のいずれかを含む、前記植物又は植物の一部のいずれかによって得られた植物又は植物の一部から得られた加工された生成物も、本明細書において提供される。ある実施態様において、加工された植物生成物は、ミール、ペースト、粉、フレーク又は飼料である。ある実施態様において、加工された植物生成物は再生可能ではない。

【0025】

連続相と連続相中で不混和性である又は部分的にのみ混和性である分散相とを含むエマルション中でメチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物を成長させること、及びメチロバクテリウムを成長させた後に工業製品を栽培することを含む、工業製品の製造方法も提供される。ある実施態様において、前記エマルションは、第一の水性液体と、第一の水性液体中で不混和性又は部分的にのみ混和性である第二の非水性液体とを含む。ある実施態様において、前記エマルションは、実質的に、固相、液相、又はそれらの組合せから、微生物の混入がない。前記方法のいずれかのある実施態様において、前記工業製品は、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸、1,3-プロパンジオール、ピロロキノリンキノン、又はオキサゾピロロキノリンである。前記方法のいずれかのある実施態様において、エマルションは、光合成微生物を含まない。

【0026】

説明

定義

本明細書において使用されるように、“それらに付着する (adhered thereto)”及び“付着性 (adherent)”の語句は、固体物質上で成長することにより又は成長されることにより固体物質に関連したメチロバクテリウムをいう。

【0027】

本明細書において使用されるように、“農業的に認容性の助剤”の語句は、植物及び/又は植物の一部の処理のために、組成物中で活性剤の性能を高める物質をいう。ある組成物において、活性剤は、メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物である。

【0028】

本明細書において使用されるように、“農業的に認容性の付形剤”の語句は、植物の処理のための組成物中で活性剤のための希釈液及び/又はキャリヤーとして使用できる実質的に不活性の物質をいう。ある組成物において、活性剤は、メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物である。

【0029】

本明細書において使用されるように、“藻類”的用語は、微小藻類又は大型藻類のいずれかのタイプをいう。

【0030】

本明細書において使用されるように、“メチロバクテリウム”的用語は、メチロバクテリウム属の通性メチロトローフである細菌をいう。本明細書において使用されるように、メチロバクテリウムの用語は、偏性メタノトローフであるメチロバクテリア属、メチロモナス属、メチロミクロビウム属、メチロコッカス属、メチロサイナス属、メチロシスチス属、メチロスフェラ属、メチロカルダム属、及びメチロセラ属における種を含まない。

【0031】

本明細書において使用されるように、“メチロバクテリウムの共生培養物”的用語は、少なくとも2株のメチロバクテリウム又は少なくとも2種のメチロバクテリウムを含むメチロバクテリウム培養物をいう。

【0032】

本明細書において使用されるように、“微生物の混入”的用語は、培養物、発酵プロス、発酵プロス生成物、組成物中に導入する前に同定されなかった、培養物、発酵プロス、発酵プロス生成物、組成物中の微生物をいう。

【0033】

本明細書において使用されるように、“エマルション”的用語は、2つの不混和性液体

10

20

30

40

50

のコロイド状混合物をいい、その際一方の液体は連続相であり、他方の液体は分散相である。ある実施態様において、連続相は水性液体であり、かつ分散相は、水性液体中で混和性でない非水性液体である。

【0034】

本明細書において使用されるように、“実質的に微生物の混入がない”の語句は、量又はタイプで、培養物、発酵プロス、発酵生成物又は組成物中に存在する微生物の少なくとも約95%が、所望のメチロバクテリウム又は予め定義された同一性を有する他の所望の微生物である、培養物、発酵プロス、発酵生成物又は組成物をいう。

【0035】

本明細書において使用されるように、“無生物の固体物質”の語句は、水中又は水溶液中で不溶性又は部分的に可溶性であり、誘導されるまだ生きている生物の一部ではない物質をいう。

【0036】

本明細書において使用されるように、“メチロバクテリウムの単独培養物”は、メチロバクテリウムの単一株からなるメチロバクテリウム培養物をいう。

【0037】

本明細書において使用されるように、“農薬”的用語は、殺虫剤、殺真菌剤、殺線虫剤、殺菌剤、又はそれらの組合せである作用剤をいう。

【0038】

本明細書において使用されるように、“静菌剤”的用語は、細菌の成長を阻害するが、細菌を殺さない作用剤をいう。

【0039】

本明細書において使用されるように、“農薬は実質的にメチロバクテリウムの成長を阻害しない”の語句は、メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物である発酵生成物を含む組成物中で提供される場合に、該組成物が植物又は植物の一部に適用される場合に農薬を欠いた組成物と比較してメチロバクテリウムの成長を50%以下阻害することをもたらす、あらゆる農薬をいう。ある実施態様において、農薬は、前記組成物が植物又は植物の一部に適用される場合に農薬を欠いた組成物と比較して、メチロバクテリウムの成長を40%、20%、10%、5%、又は1%以下阻害することをもたらす。

【0040】

本明細書において使用されるように、“PPFM細菌”的用語は、制限されることなく、M.ノデュランス以外のメチロバクテリウム属における細菌種をいう。

【0041】

本明細書において使用されるように、“固体物質”的用語は、水中又は水溶液中で不溶性又は部分的に可溶性である物質をいう。

【0042】

本明細書において使用されるように、“それらに懸濁されうる固体相”的用語は、搅拌によって液体中に分散できる固体物質をいう。

【0043】

本明細書において使用されるように、“再生可能でない”的用語は、植物全体中に再生できない植物の一部又は加工された植物生成物をいう。

【0044】

本明細書において使用されるように、“実質的に固体相の全てが液体相中に懸濁される”的用語は、固体相を含有する固体物質の少なくとも95%、98%又は99%が、搅拌によって液体中に分散されている媒体をいう。

【0045】

本明細書において使用されるように、“実質的に固体相の全てが液体相中に懸濁されない”的用語は、固体の5%、2%又は1%未満が、特に、搅拌によって媒体中に分散されている媒体をいう。

【0046】

10

20

30

40

50

本明細書において使用されるように、“収率”の用語は、発酵において得られるメチロバクテリウムに関して使用する場合に、得られたメチロバクテリウムの数をいう。かかる収率を測定するための方法は、制限されることなく、得られた材料の単位体積又は単位質量あたりのコロニー形成単位 (C F U) の数を測定すること、得られたメチロバクテリウムの湿潤質量を測定すること、及び／又は得られたメチロバクテリウムの乾燥質量を測定することを含む。

【0047】

前記定義のいずれかは、参照をもって本明細書に組み込まれるあらゆる特許文献又は非特許文献において、本明細書において挙げられたあらゆる特許文献又は非特許文献について、又はその他で見出されるあらゆる特許文献又は非特許文献において提供される定義に矛盾する範囲まで、前記定義を本明細書において使用することが理解される。

10

【0048】

メチロバクテリウムを培養するための方法、それらの組成物、及びそれらの使用

メチロバクテリウムを、エマルションを含有する培地中で培養する方法は、メチロバクテリウムを液体培地のみで培養する方法と比較して、メチロバクテリウムの生じた収率を著しく増加することが見出されている。ある実施態様において、前記方法は、成長したメチロバクテリウムについて提供する条件下で、エマルション中でメチロバクテリウムを成長することを含んでよい。エマルション及びメチロバクテリウムを含む培地は、制限されることなく、(a) エマルションを含む培地にメチロバクテリウムを接種すること、(b) 水性液体にメチロバクテリウムを接種し、非水性液体を導入し、そして混合してエマルションを形成すること、(c) 水性液体にメチロバクテリウムを接種し、非水性液体を導入し、そして混合してエマルションを形成すること、又は(d) (a)、(b) もしくは(c) のいずれかの組合せのいずれかを含む種々の方法によって得られる。ある実施態様において、成長は、培地にメチロバクテリウムを接種するステップ、及び接種された培地をメチロバクテリウムの成長のために提供されるために十分な条件下でインキュベートするステップを含む。ある実施態様において、メチロバクテリウムは、1ミリリットルあたり少なく約 5×10^4 コロニー形成単位から1ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^5 コロニー形成単位の力値で、培地中に接種される。ある実施態様において、メチロバクテリウムは、M. アミノボランス、M. クロロメタニカム、M. ジクロロメタニカム、M. エキストロクエンス、M. フジサワエンス、M. メソフィリカム、M. オルガノフィラム、M. ラジオトレランス、M. ロデシアナム、M. ロジナム、M. チオシアナツム、M. ノデュランス、M. セラスチイ、M. ゴジピコーラ、メチロバクテリウム種の株 L M G 6 3 7 8、M. フィロスフェラ、M. オリゼ、M. プラタニ、M. ポプリ、及びM. ザトマニイからなる群から選択される。前記方法は、さらに、メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物を採取するステップも含んでよい。メチロバクテリウムを採取するための方法は、制限されることなく、濾過、遠心分離、デカンテーション等によって、液相からメチロバクテリウムを分離することを含んでよい。

20

30

【0049】

使用されるかき混ぜ方法は、制限されることなく、攪拌、往復振盪、回転振盪、及びそれらの組合せを含む。ある実施態様において、かき混ぜは、少なくとも25、50、100、200、250、500、又は1000毎分回転数 (RPM) を提供する回転振盪器上にエマルションを含む培地を置くことを含んでよい。少なくとも25、50、100、200、250、500、又は1000毎分回転数 (RPM) に設定した回転振盪器によって提供されるに等しいかき混ぜも、攪拌、往復振盪、及び他の方法によって得られる。ある実施態様において、エマルション中の水性液体又は非水性液体の分離は、少なくとも25、50、100、200、250、500、又は1000毎分回転数 (RPM) に設定した回転攪拌機によって提供されるに等しいかき混ぜで除去又は減少できる。

40

【0050】

本明細書において提供される方法において使用されるエマルションを含有する発酵プロセスは、実質的に微生物の混入がない純粋培養であってよい。ある実施態様において、培地

50

、発酵プロス、発酵生成物又は本明細書において提供される組成物中で量又はタイプにより存在する少なくとも約95%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、又は100%の微生物は、所望のメチロバクテリウム又は予め決定した同一性の他の所望の微生物である。所望のメチロバクテリウム又は予め決定した同一性の他の所望の微生物は、純粋培養から得られる微生物である。かかる純粋培養を提供するために、エマルジョンを含有する培地中で使用される成分は、メチロバクテリウム及び/又は単独培養又は共生培養でのあらゆる追加の所望される微生物を接種する前に、滅菌されるか、又は実質的に滅菌形で得られる。エマルジョンを含有する培地の種々の成分の滅菌は、制限されることなく、オートクレーブ、放射線照射、濾過滅菌（液体について）等を含む方法によって達せられる。実質的に微生物の混入がない培地、発酵プロス、発酵生成物、又は組成物は、予め決定された同一性の所望の微生物の接種又は供給前に滅菌した培地、発酵プロス、発酵生成物、又は組成物の液体又は液体及びあらゆる追加の固体成分を、所望の微生物の成長中の培地の kontamination 又は組成物の kontamination を避けるために実施する場合に得られる。

10

【0051】

エマルジョンを含有する培地中でメチロバクテリウムを培養する、本明細書において提供される方法を、バッチ式発酵、フェドバッチ式発酵、又は連続発酵のいずれかで実施してよい。本明細書において提供される発酵プロス、発酵プロス生成物、及び組成物は、バッチ式発酵、フェドバッチ式発酵、又は連続発酵のいずれかからも得られる。ある実施態様において、因子、例えばpH及び酸素濃度は、本明細書において提供される方法において使用されるバッチ式発酵、フェドバッチ式発酵、又は連続発酵のプロセスのいずれかにおいて制御されうる。

20

【0052】

本明細書において提供される、メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物、並びに得られた発酵プロス、発酵プロス生成物及び組成物は、制限されることなく、M.アミノボランス、M.クロロメタニカム、M.ジクロロメタニカム、M.エキストロクエンス、M.フジサワエンス、M.メソフィリカム、M.オルガノフィラム、M.ラジオトレランス、M.ロデシアナム、M.ロジナム、M.チオシアナツム、M.ノデュランス、M.セラスチイ、M.ゴジピコーラ、メチロバクテリウム種の株LMG 6378、M.フィロスフェラ、M.オリゼ、M.プラタニ、M.ポプリ、及びM.ザトマニイを含む1つ以上のメチロバクテリウムを含んでよい。ある実施態様において、本明細書において提供される、メチロバクテリウムの単独培養物又は共生培養物、並びに得られた発酵プロス及び発酵プロス生成物は、1つ以上のメチロバクテリウムからなってよい。しかしながら、本明細書において提供される方法は、他のメチロバクテリウムで使用されてもよい。メチロバクテリウムは、種々の公表された方法 (Madhaiyan et al., 2007) によっても得られる。ある実施態様において、使用されうるかかる他のメチロバクテリウムは、他の公知のメチロバクテリウムの16S RNA配列に対して、少なくとも約60%、70%、80%、90%又は95%の配列同一性の16S RNAを有するメチロバクテリウムである。16S RNA配列比較の使用によるメチロバクテリウムの型は、少なくとも、Cao et al., 2011によって記載されている。ある実施態様において、単独培養物又は共生培養物及び得られた生成物は、植物及び/又は植物の一部をコロニー化できるメチロバクテリウムを含みうる。植物及び/又は植物の一部をコロニー化できるメチロバクテリウムは、制限されることなく、M.エキストロクエンス、M.ノデュランス、及びM.メソフィリカムを含む。植物及び/又は植物の一部をコロニー化できるメチロバクテリウムは、制限されることなく、メチロバクテリウム・セラスチイ種 (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ("DSMZ") 、 Braunschweig, Germany から DSM 23679 として入手できる代表的な株で)、メチロバクテリウム・ゴジピコーラ (USDA ARS, Peoria, IL., USA から N R R L B-51692 として入手できる代表的な株で)、メチ

30

40

50

ロバクテリウム種株 LMG 6378 (Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organisms / Laboratorium voor Microbiologie ("BCCLM") Ghent, Belgiumから入手できる)、メチロバクテリウム・フィロスフェラ種 (DSMZからDSM 19779Tとして入手できる代表的な株で)、メチロバクテリウム・オリゼ種 (DSMZからDSM 18207Tとして入手できる代表的な株で)、メチロバクテリウム・ノデュランス種 (BCCLMからLMG 21967として入手できる代表的な株で)、メチロバクテリウム・プラタニ種 (Korean Collection for Type Cultures, Yusong-Ku, Taejon, KR ("KCTC") からKCTC 12901として入手できる代表的な株で)、及びメチロバクテリウム・ポブリ種 (ATCCからATCC BAA-705として入手できる代表的な株で)も含む。従って、メチロバクテリウムが、M. エキストロクエンス、M. ノデュランス、M. メソフィリカム、M. セラスチイ、M. ゴジピコーラ、メチロバクテリウム種の株 LMG 6378、M. フィロスフェラ、M. オリゼ、M. プラタニ及びM. ポブリからなる群から選択される、植物及び/又は植物の一部をコロニー化できるメチロバクテリウムである、発酵プロス、発酵プロス生成物、組成物、それらの製造方法、及び制限されることなく、植物を処理する方法を含むそれらの使用方法が提供される。植物及び/又は植物の一部をコロニー化できる他のメチロバクテリウムを単離する方法は、種々の刊行物において記載されており、使用もできる (Madhaiyanら、及びそれらに挙げられた参考文献を参照)。理論に限定されることなく、本明細書において提供されるエマルションを含有する培地中でメチロバクテリウムを培養する方法は、植物及び/又は植物の一部、又は植物及び/又は植物の一部の表面から単離されたものをコロニー化できるメチロバクテリウムを成長するために特に有利であってよい。
10

【0053】

本明細書において提供される、発酵プロス、発酵プロス生成物、組成物及び関連する方法は、制限されることなく、表1のメチロバクテリウムを含む。

【0054】

20

【表 1 - 1】

表1. 代表的なメチロバクテリウム属

メチロバクテリウム属	株型についての受託番号
<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	AR27 = CCM 7305 = CECT 7069=DSM 17169T=KCTC 22099T
<i>Methylobacterium aerolatum</i>	DSM 19013 = JCM 16406 = KACC 11766
<i>Methylobacterium aminovorans</i>	ATCC 51358 = CIP 105328 = IFO (now NBRC) 15686 = JCM 8240 = VKM B-2145
<i>Methylobacterium aquaticum</i>	CCM 7218 = CECT 5998 = CIP 108333 = DSM 16371
<i>Methylobacterium brachiatum</i>	DSM 19569 = NBRC 103629 = NCIMB 14379
<i>Methylobacterium bullatum</i>	DSM 21893 = LMG 24788
<i>Methylobacterium cerastii</i>	CCM 7788 = CCUG 60040 = DSM 23679

10

20

【表1-2】

メチロバクテリウム属	株型の受託番号
<i>Methylobacterium chloromethanicum</i>	NCIMB 13688 = VKM B-2223
<i>Methylobacterium dichloromethanicum</i>	CIP 106787 = DSM 6343 = VKM B-2191
<i>Methylobacterium extorquens</i>	ATCC 43645 = CCUG 2084 = DSM 1337 = IAM 12631 = IFO (now NBRC) 15687 = JCM 2802 = NCCB 78015 = NCIB (now NCIMB) 9399 = VKM B-2064.
<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	ATCC 43884 = CIP 103775 = DSM 5686 = IFO (now NBRC) 15843 = JCM 10890 = NCIB (now NCIMB) 12417
<i>Methylobacterium gossypiicola</i>	CCM 7572 = NRRL B-51692
<i>Methylobacterium gregans</i>	DSM 19564 = NBRC 103626 = NCIMB 14376
<i>Methylobacterium hispanicum</i>	GP34 = CCM 7219 = CECT 5997 = CIP 108332 = DSM 16372
<i>Methylobacterium iners</i>	DSM 19015 = JCM 16407 = KACC 11765
<i>Methylobacterium isbiliense</i>	CCM 7304 = CECT 7068
<i>Methylobacterium jeotgali</i>	KCTC 12671 = LMG 23639
<i>Methylobacterium komagatae</i>	DSM 19563 = NBRC 103627 = NCIMB 14377
<i>Methylobacterium longum</i>	CECT 7806 = DSM 23933
<i>Methylobacterium lusitanum</i>	DSM 14457 = NCIMB 13779 = VKM B- 2239
<i>Methylobacterium marchantiae</i>	CCUG 56108 = DSM 21328
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	ATCC 29983 = CCUG 16482 = CIP 101129 = DSM 1708 = ICPB 4095 = IFO (now NBRC) 15688 = JCM 2829 = LMG 5275 = NCIB (now NCIMB) 11561 = NRRL B-14246
<i>Methylobacterium nodulans</i>	LMG 21967 = ORS 2060
<i>Methylobacterium organophilum</i>	ATCC 27886 = CIP 101049 = DSM 760 = HAMBI 2263 = IFO (now NBRC) 15689 =

10

20

30

40

【表1-3】

メチロバクテリウム属	株型の受託番号
	JCM 2833 = LMG 6083 = NCCB 78041 = VKM B-2066
<i>Methylobacterium oryzae</i>	DSM 18207 = JCM 16405 = KACC 11585 = LMG 23582
<i>Methylobacterium persicinum</i>	DSM 19562 = NBRC 103628 = NCIMB 14378
<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>	DSM 19779 = JCM 16408 = KACC 11716 = LMG 24361
<i>Methylobacterium platani</i>	JCM 14648 = KCTC 12901
<i>Methylobacterium podarium</i>	ATCC BAA-547 = DSM 15083
<i>Methylobacterium populi</i>	ATCC BAA-705 = NCIMB 13946
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	ATCC 27329 = CIP 101128 = DSM 1819 = IFO (now NBRC) 15690 = JCM 2831 = LMG 2269 = NCIB (now NCIMB) 10815 = VKM B-2144
<i>Methylobacterium rhodinum</i>	ATCC 14821 = CIP 101127 = DSM 2163 = IFO (now NBRC) 15691 = JCM 2811 = LMG 2275 = NCIB (now NCIMB) 9421 = VKM B-2065
<i>Methylobacterium suomiense</i>	DSM 14458 = NCIMB 13778 = VKM B- 2238
<i>Methylobacterium tardum</i>	DSM 19566 = NBRC 103632 = NCIMB 14380
<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>	ATCC 700647 = DSM 11490 = JCM 10893 = VKM B-2197
<i>Methylobacterium variabile</i>	CCM 7281 = CECT 7045 = DSM 16961
<i>Methylobacterium zatmanii</i>	ATCC 43883 = CCUG 36916 = CIP 103774 = DSM 5688 = IFO (now NBRC) 15845 = JCM 10892 = LMG 6087 = NCIB (now NCIMB) 12243 = VKM B-2161

10

20

30

40

受託キ-

ATCC : American Type Tissue Culture Collecti

50

on, Manassas, VA, USA

CCUG: Culture Collection, University of Göteborg, Sweden

CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, FR

DSM: DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ("DSMZ"), Braunschweig, Germany

JCM: Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan

LMG: Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organisms / Laboratorium voor Microbiologie ("BCCLM") Ghent, Belgium

NBRC: Biological Resource Center (NBRC), Chiba, Japan

NCIMB: National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria, UK

NRRL: USDA ARS, Peoria, IL., USA.

【0055】

ある実施態様において、単独培養物又は共生培養物並びに得られた発酵プロセス及び発酵プロセス生成物は、増加したレベルの有用な栄養物又は植物成長調節因子をもたらす、1つ以上のメチロバクテリウム単離物又は突然変異体を含んでよい。米国特許番号第8,153,118号は、本明細書において提供される方法及び組成物において使用できる増加したレベルのビタミンB-12及びアミノ酸をもたらす種々のメチロバクテリウムを開示している。1つ以上のメチロバクテリウム、例えば、ビタミンB-12を過剰生成する受託番号ATCC PTA-1561を有するメチロバクテリウム突然変異体B12-11、アミノ酸(トレオニン)を過剰生成するメチロバクテリウム・ロジナム(ATCC#43282)、アミノ酸(L-グルタミン酸)を過剰生成するメチロバクテリウム種(ATCC#21371)、アミノ酸(L-グルタミン酸)を過剰生成するメチロバクテリウム種(ATCC#21372)、アミノ酸(L-リジン)を過剰生成するメチロバクテリウム種(ATCC#21926)、アミノ酸(L-グルタミン酸)を過剰生成するメチロバクテリウム種(ATCC#21969)、アミノ酸(L-リジン、L-アスパラギン酸、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、及びL-アルギニン)を過剰生成するメチロバクテリウム種(ATCC#21927)、及び/又は単細胞タンパク質を生成するメチロバクテリウム種(ATCC#21438)を含む、発酵プロセス、発酵プロセス生成物、及び組成物も提供される。

【0056】

ある実施態様において、本明細書において提供される発酵プロセス、発酵プロセス生成物、又は組成物は、さらに、メチロバクテリウム以外の予め決められた同一性の1種以上の導入された微生物を含んでよい。添加されうる他の微生物は、制限されることなく、植物又は植物の一部に適用される場合にバイオ農薬であり又はいくつかの他の利益を提供する微生物を含む。従って、バイオ農薬又は他の効果的な微生物は、制限されることなく、バチルス(*Bacillus*)種、シュードモナス(*Pseudomonas*)種、コニオチリウム(*Coniothyrium*)種、パンテア(*Pantoea*)種、ストレプトミセス(*Streptomyces*)種、及びトリコデルマ(*Trichoderma*)種を含む。微生物バイオ農薬は、細菌、真菌、ウィルス、又は原生動物であってよい。特に有用な生物農薬微生物は、種々のバチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)、バチルス・スリンギエンシス(*Bacillus thuringiensis*)、バチルス・プミリス(*Bacillus pumilis*)、シュードモナス・シリング(*Pseudomonas syringae*)、トリコデルマ・ハルジアヌム(*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・ヴィレンス(*Trichoderma virens*)及びストレプトミセス・リディカス(*Streptomyces lydicus*)の株を

10

20

30

40

50

含む。追加される他の微生物は、遺伝子操作されてよく、又は純粋培養物として入手できる天然に生じる単離物であってよい。ある実施態様において、細菌微生物又は真菌微生物は、胞子の形で、発酵プロセス、発酵プロセス生成物、又は組成物中で提供されてよい。添加されうるさらに他の微生物は、制限されることなく、光合成微生物である微生物を含む。かかる光合成生物は、制限されることなく、藻類を含む。かかる藻類は、制限されることなく、プロトコッカス属 (*Protococcus*)、アオサ (*Ulva*)、ミル属 (*Codium*)、アオノリ (*Enteromorpha*)、ネオクロリス属 (*Neochloris*) 及び / 又はクラミドモナス属 (*Chlamydomonas*) を含んでよい。

【0057】

ある実施態様において、培地中で使用されるエマルションの水性液体成分は、制限されることなく、無機塩、例えばリン酸カリウム、硫酸マグネシウム等、炭素源、例えばグリセロール、メタノール、グルタミン酸、アスパラギン酸、コハク酸等、及びアミノ酸ブレンド、例えばペプトン、トリプトン等を含む、安価で容易に入手できる成分から製造される。使用されうる液体培地の例は、制限されることなく、アンモニウムミネラル塩 (AMS) 培地 (Whittenburyら、1970)、Vogel-Bonner (VB) 培地 (Vogel and Bonner, 1956) 及び LB 培地 ("Luria-Bertani Broth") を含む。

【0058】

ある実施態様において、前記エマルションは、水性液体と、水性液体中で不混和性又は部分的にのみ混和性である液体とを含む。水中で不混和性又は部分的にのみ混和性である非水性液体は、制限されることなく、次のいずれかを含む：(1) 25 で n-ペントノール、n-ヘキサノール、又は n-ヘプタノールの混和性以下である水中での混和性を有する液体；(2) アルコール、アルデヒド、ケトン、脂肪酸、リン脂質、又はそれらの任意の組合せを含む液体；(3) 少なくとも 5 個、6 個又は 7 個の炭素原子を含む脂肪族アルコール及びステロールからなる群から選択されるアルコール；(4) 動物油、微生物油、合成油、植物油、又はそれらの組合せ；及び / 又は(5) トウモロコシ、大豆、綿、ピーナッツ、ヒマワリ、オリーブ、亜麻、ココナッツ、ヤシ、菜種、ゴマ種子、ベニバナ、及びそれらの組合せからなる群から選択される植物油。ある実施態様において、不混和性又は部分的にのみ混和性の非水性液体は、少なくとも約 0.02% ~ 約 20% (質量) のエマルションを含みうる。ある実施態様において、不混和性又は部分的にのみ混和性の非水性液体は、少なくとも約 0.05%、0.1% ~ 0.5%、又は 1% ~ 約 3%、5%、10%、又は 20% (質量) のエマルションを含みうる。

【0059】

一般に、メチロバクテリウムの効率的な成長のために提供されるエマルションで使用される非水性液体成分は、水又は水溶液中で不混和性又は部分的にのみ混和性であるあらゆる非水性液体であってよい。かかる適した非水性液体は、液体培地中で提供される場合にメチロバクテリウムに関して、非殺菌性又は非静菌性である。ある実施態様において、かかる適した非水性液体は、滅菌の形で容易に得られ又は滅菌させた非水性液体でもある。本明細書において使用される非水性液体は、微生物の混入の除去を提供し、かつ従って、制限されることなく、オートクレーブ、照射、化学処理及びそれらの任意の組合せの方法を含むあらゆる方法によって滅菌されうる。

【0060】

本明細書において提供されるある実施態様において、固体物質を、本明細書において提供される方法、発酵生成物、又は組成物のエマルションに添加できる。液体及び固体を含有する二相性媒体中でメチロバクテリウムを成長するための方法及び組成物は、共同出願した米国特許番号第 13/907,161 号 (参照をもって本明細書中にその全体を組込まれたものとする)、及び共同出願した PCT/US13/43722 号 (参照をもって本明細書中にその全体を組込まれたものとする) において記載されている。これらの固体物質は、動物、植物、微生物、真菌、又は資源、人工物質、又は天然物質及び人工物質の組合せを含む。ある実施態様において、固体物質は、無生物固体物質である。動物、植

10

20

30

40

50

物、微生物、又は真菌の起源の無生物固体物質は、生存不能（すなわちもはや生きていな
い）であるか又は生存不能にさせた、動物、植物、微生物又は真菌から得られる。従って
、ケイ藻シェルは、以前に関連する珪藻類が除去されたか、そうでなければ生存不能にな
った場合に、無生物固体物質である。ケイ藻シェルが無生物固体物質である場合に、それ
らは、光合成生物又は光合成微生物であるとは考えられない。ある実施態様において、固
体物質は、制限されることなく、砂、シルト、土、粘土、灰、炭、珪藻土及び他の類似し
た鉱物、研磨ガラス又はガラスピーブ、セラミック材料、セラミックビーズ、ベントナイト、
カオリン、タルク、パーライト、雲母、バーミキュライト、シリカ、石英粉末、モンモリロナ
イト、及びそれらの組合せを含む。ある実施態様において、固体物質は、ポリマー又はポリマ
ー又はポリマービーズであってよい。固体物質として使用できるポリマーは、制限され
ることなく、水又は水溶液中で不溶性又は部分的にのみ可溶性である種々の多糖、例え
ばセルロースポリマー及びキチン質ポリマー、寒天（すなわちガラクタン）、及びそれらの組
合せを含む。ある実施態様において、固体物質は、不溶性又は部分的にのみ可溶性の食塩
結晶であってよい。使用できる食塩結晶は、制限されることなく、不溶性又は部分的にのみ可
溶性の炭酸塩、クロム酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、水酸化物、酸化物及び硫化物を含む。
ある実施態様において、固体物質は、微生物細胞、真菌細胞、微生物胞子又は真菌胞
子であってよい。ある実施態様において、固体物質は、微生物細胞又は微生物胞子であ
ってよく、その際微生物細胞又は微生物胞子は光合成微生物ではない。ある実施態様にお
いて、微生物細胞又は微生物胞子は、光合成微生物ではなく、その際、光合成微生物は、藻
類、シアノバクテリア、ケイ藻、ボツリオコッカス・ブラウニー (*Botryococcus braunii*)、
クロレラ、デュナリエラ・ターティオレクタ (*Dunaliella tertiolecta*)、オゴノリ
(*Gracilaria*)、プリュウロクリシス・カルテラ (*Pleurochrysis carterae*)、アカモク
(*Sargassum*)、及びアオサ (*Ulva*) からなる群から選択される。さらに他の実施態様に
おいて、ある実施態様において、固体物質は、不活性な（すなわち生存不能な）微生物細
胞、真菌細胞、微生物胞子又は真菌胞子であってよい。さらに他の実施態様において、ある
実施態様において、固体物質は、静止している（すなわち生きているが活発に分裂しな
い）微生物細胞、真菌細胞、微生物胞子又は真菌胞子であってよい。さらに他の実施態
様において、固体物質は、微生物起源の細胞デブリであってよい。さらに他の実施態
様において、固体物質は、植物の任意の部位からの特定の物質であってよい。固体物質を得る
ために使用できる植物部分は、制限されることなく、軸、殻皮、外皮、葉、根、花、茎、樹
皮、種子、及びそれらの組合せを含む。制限されることなく、バガス、ふすま、大豆グリ
ッソ、粉碎シードケーキ、わら等を含む加工した植物の一部から得られる生成物も使用で
きる。かかる植物の一部、加工した植物、及び／又は加工した植物の一部を、使用されう
る特定の形で固体材料を得るために粉碎してよい。ある実施態様において、制限され
ることなく、木材パルプ、おがくず、かんなくず等を含む木材又は木材生成物を使用でき
る。ある実施態様において、固体物質は、制限されることなく、骨粉、ゼラチン、粉碎した貝
殻又は粉末状貝殻、髪、ふやかした獸皮等を含む、動物からの特定の材料であってよい。
10 20 30 30

【0061】

ある実施態様において、エマルションに添加される固体物質は、培地中で固体物質の分
散を提供する特定の形で提供される。ある実施態様において、固体物質は、平均長さ又は
平均直径で約2ミクロン～約1000ミクロンの粒子から構成される。ある実施態様にお
いて、固体物質は、平均長さ又は平均直径で約1ミクロン～約1000ミクロンの粒子から
構成される。ある実施態様において、固体物質は、平均長さ又は平均直径で約1、2、
4、10、20、又は40ミクロン～約100、200、500、750、又は1000
ミクロンの粒子である。本明細書において提供される方法及び組成物において使用される
粒子の所望の特徴は、攪拌に対して培地中で粒子を懸濁するために適した湿潤性を含む
。

【0062】

ある実施態様において、本明細書において提供される発酵生成物、組成物、及び方法に
おいてエマルションに添加される液体又は固体は、エマルションの安定化のために提供さ
50

れる乳化剤である。かかる乳化剤は、制限されることなく、界面活性剤及び増粘剤を含んでよい。界面活性剤は、制限されることなく、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤、オルガノシリケート界面活性剤、及び／又は酸性化界面活性剤を含む種々のイオン性洗剤又は非イオン性洗剤を含んでよい。本明細書において提供される発酵生成物、組成物、及び方法において乳化剤として使用される浸水コロイドポリマーは、制限されることなく、寒天、アルギン酸塩、アラビノキシラン、カラゲナン、カルボキシメチルセルロース、セルロース、カードラン、ゼラチン、ジェラン、-グルカン、グアーゴム、アラビアゴム、ローカストビーンガム、ペクチン、デンプン、キサンタンゴム、及びそれらの混合物を含む。他の乳化剤は、制限されることなく、種々の粘土及びタンパク質を含む。本明細書及びその他において開示されている、ある農業的に認容性の助剤及び付形剤を、乳化剤として使用してもよい。

10

【0063】

ある実施態様において、乳化剤に添加される固体物質は、培地中で、発酵生成物又は組成物をコロイドとして提供し、その際連続相は液体であり、かつ不連続相は固体である。メチロバクテリウムを成長させるために使用される液体培地中でコロイドを形成するために使用できる適した固体は、制限されることなく、浸水コロイドともいわれる種々の固体を含む。本明細書において提供される培地、方法及び組成物において使用されるかかる浸水コロイドは、植物、動物、微生物又は合成源の親水性ポリマーであってよい。前記方法において使用される浸水コロイドポリマーは、多くのヒドロキシル基を含んでよく、及び／又は高分子電解質であってよい。本明細書において提供される組成物及び方法において使用される浸水コロイドポリマーは、制限されることなく、寒天、アルギン酸塩、アラビノキシラン、カラゲナン、カルボキシメチルセルロース、セルロース、カードラン、ゼラチン、ジェラン、-グルカン、グアーゴム、アラビアゴム、ローカストビーンガム、ペクチン、デンプン、キサンタンゴム、及びそれらの混合物を含む。ある実施態様において、本明細書において提供される培地、方法、及び組成物において使用されるコロイドは、浸水コロイドポリマー及び1種以上のタンパク質を含んでよい。

20

【0064】

ある実施態様において、エマルションに添加される固体物質は、固体物質上のメチロバクテリウムの付着成長を提供する固体物質であってよい。固体物質に付着するメチロバクテリウムは、成長培地で付着したメチロバクテリウムを有する固体物質を単純に洗浄することにより実質的に除去できないメチロバクテリウムであり、一方で付着していないメチロバクテリウムは、液体成長培地で固体物質を洗浄することにより実質的に除去できる。本記載内容において、“実質液に除去される”は、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、又は80%の存在するバクテリウムが、固体物質を液体成長培地の3容量で線上する場合に除去されることを意味する。かかる洗浄は、制限されることなく、洗浄される固体相から液体をデカンテーションすること、又は液体中で細菌の流通を可能にするフィルター上で固体相を通して液体を通過することを含む種々の方法によって実施してよい。ある実施態様において、固体に関連して付着するメチロバクテリウムは、固体に直接接着されるメチロバクテリウム、及び／又は固体物質に間接的に接着されるメチロバクテリウムの双方を含んでよい。固体物質に間接的に付着されるメチロバクテリウムは、制限されることなく、固体物質に接着される他のメチロバクテリウムに又は他の微生物に接着されるメチロバクテリウム、固体物質に付着される他の物質に付着されることにより固体物質に付着されるメチロバクテリウム等を含む。ある実施態様において、発酵プロス、発酵プロス生成物、又は組成物中で少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%又は99.9%のメチロバクテリウムが、固体物質に付着されるメチロバクテリウムである。ある実施態様において、付着するメチロバクテリウムは、発酵プロス、発酵プロス生成物、又は組成物中で、固体物質の表面に対して、少なくとも約1のメチロバクテリウム／20平方ミクロメートルの、少なくとも約1のメチロバクテリウム／10平方ミクロメートルの、少なくとも約1のメチロバクテリウム／10平方ミクロメートルの、少なくとも約1

30

40

50

のメチロバクテリウム / 5 平方ミクロメートルの、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 2 平方ミクロメートルの、又は少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 1 平方ミクロメートルの密度で存在する。ある実施態様において、付着するメチロバクテリウムは、発酵プロス、発酵プロス生成物、又は組成物中で、固体物質の表面に対して、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 20 平方ミクロメートル ~ 約 1 のメチロバクテリウム / 2 平方ミクロメートルの、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 10 平方ミクロメートル ~ 約 1 のメチロバクテリウム / 2 平方ミクロメートルの、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 10 平方ミクロメートル ~ 約 1 のメチロバクテリウム / 2 平方ミクロメートルの、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 5 平方ミクロメートル ~ 約 1 のメチロバクテリウム / 1 平方ミクロメートルの、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 2 平方ミクロメートル ~ 約 1 のメチロバクテリウム / 1 平方ミクロメートルの密度で存在する。ある実施態様において、付着するメチロバクテリウムは、発酵プロス、発酵プロス生成物、又は組成物中で、固体物質の表面に対して、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 20 平方ミクロメートル ~ 約 1 のメチロバクテリウム / 2 平方ミクロメートルの、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 10 平方ミクロメートル ~ 約 1 のメチロバクテリウム / 2 平方ミクロメートルの、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 10 平方ミクロメートル ~ 約 1 のメチロバクテリウム / 2 平方ミクロメートルの、少なくとも約 1 のメチロバクテリウム / 5 平方ミクロメートル ~ 約 1 のメチロバクテリウム / 2 平方ミクロメートルの密度で存在する。本明細書において提供される発酵生成物及び発酵プロスは、付着していないメチロバクテリウムを含む液相を含有してよい。ある実施態様において、液相中の付着していないメチロバクテリウムの力価は、約 100000、10000 又は 1000 CFU / ml 未満である。

【 0 0 6 5 】

提供される培養方法は、1 ミリリットルあたり少なくとも約 5×10^7 コロニー形成単位より多い力価、1 ミリリットルあたり少なくとも約 5×10^8 コロニー形成単位より多い力価、1 ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^9 コロニー形成単位より多い力価、1 ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^{10} コロニー形成単位より多い力価、1 ミリリットルあたり少なくとも約 3×10^{10} コロニー形成単位の力価で、メチロバクテリウムを有する発酵生成物を得ることができる。ある実施態様において、本明細書において提供される発酵プロスは、1 ミリリットルあたり少なくとも約 5×10^7 コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 3×10^{10} コロニー形成単位、1 ミリリットルあたり少なくとも約 5×10^7 コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 4×10^{10} コロニー形成単位、又は 1 ミリリットルあたり少なくとも約 5×10^7 コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 6×10^{10} コロニー形成単位の力価でメチロバクテリウムを含有してよい。ある実施態様において、本明細書において提供される発酵プロスは、1 ミリリットルあたり少なくとも約 3×10^{10} コロニー形成単位、1 ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^9 コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 3×10^{10} コロニー形成単位、1 ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^9 コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 4×10^{10} コロニー形成単位、又は 1 ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^{10} コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 6×10^{10} コロニー形成単位の力価でメチロバクテリウムを含有してよい。ある実施態様において、本明細書において提供される発酵プロスは、1 ミリリットルあたり少なくとも約 3×10^{10} コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^{10} コロニー形成単位、1 ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^{10} コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 4×10^{10} コロニー形成単位、又は 1 ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^{10} コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 6×10^{10} コロニー形成単位の力価でメチロバクテリウムを含有してよい。ある実施態様において、本明細書において提供される発酵プロスは、1 ミリリットルあたり少なくとも約 3×10^{10} コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 4×10^{10} コロニー形成単位、又は 1 ミリリットルあたり少なくとも約 1×10^{10} コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 6×10^{10} コロニー形成単位の力価でメチロバクテリウムを含有してよい。ある実施態様において、本明細書において提供される発酵プロスは、1 ミリリットルあたり少なくとも約 3×10^{10} コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 4×10^{10} コロニー形成単位、又は 1 ミリリットルあたり少なくとも約 6×10^{10} コロニー形成単位の力価でメチロバクテリウムを含有してよい。ある実施態様において、本明細書において提供される発酵プロスは、1 ミリリットルあたり少なくとも約 3×10^{10} コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 4×10^{10} コロニー形成単位 ~ 1 ミリリットルあたり少なくとも約 6×10^{10} コロニー形成単位の力価でメチロバクテリウムを含有してよい。

10

20

30

40

50

ウムを含有してよい。

【0066】

メチロバクテリウムを有するエマルションを含有する発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物、又は他の組成物を、植物又は植物の一部を処理するために有用な種々の組成物を製造するために使用してよい。代わりに、メチロバクテリウムを有するエマルションを含有する発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物、又は他の組成物を、植物又は植物の一部を処理するために使用してよい。従って、発酵プロス生成物又は組成物で少なくとも部分的に覆われている植物、植物の一部、及び特に植物種子が提供される。発酵プロス生成物又は組成物を含む加工した植物の一部も提供される。メチロバクテリウムを有するエマルションを含有する発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物、又は他の組成物は、植物種子を処理するために特に有用である。従って、発酵プロス生成物又は組成物で少なくとも部分的に覆われている種子が提供される。制限されることなく、本明細書において提供される発酵プロス生成物又は組成物を含む、ミール、粉、飼料、及びフレークを含む加工した種子生成物も提供される。ある実施態様において、加工した植物生成物は再生可能ではない（植物に発育することができない）。ある実施態様において、植物、植物の一部又は植物種子を少なくとも部分的に被覆する、又は加工した植物、植物の一部又は植物種子中で含まれる、発酵生成物又は組成物において使用されるエマルションは、処理した及び未処理の植物、植物の一部、植物種子、又は加工したそれらの生成物を比較することによって容易に同定されうる関連するメチロバクテリウムを含有する。

10

【0067】

メチロバクテリウムを有するエマルションを含有する発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物、又は他の組成物を、工業製品又は組換えタンパク質を製造するために、又はバイオレメディエーションにおいて使用してよい。

20

【0068】

メチロバクテリウムを含有するエマルションを含有する植物又は植物の一部を処理するために有用な組成物は、農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤を含んでもよい。農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤は、典型的に、植物又は植物の一部に曝される場合に、不相応な植物毒性又は他の逆効果を生じない成分である。ある実施態様において、エマルションは、メチロバクテリウムに対して殺菌性又は静菌性でない限り、それ自体、農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤であってよい。他の実施態様において、前記組成物は、さらに、農業的に認容性の助剤又は農業的に認容性の付形剤の少なくとも1つを含む。前記組成物のいずれかは、さらに殺虫剤も含んでもよい。組成物中で使用される殺虫剤は、制限されることなく、殺虫剤、殺真菌剤、殺線虫剤及び殺菌剤を含む。ある実施態様において、前記組成物中で使用される殺虫剤は、実質的にメチロバクテリウムの成長を阻害しない殺虫剤である。メチロバクテリウムがグラム陰性細菌であるため、前記組成物中で使用される適した殺菌剤は、制限されることなく、グラム陽性菌に対して活発に阻害するが、グラム陰性菌は阻害しない殺菌剤を含んでよい。本明細書において提供される組成物は、実質的にメチロバクテリウムの成長を阻害しない静菌剤も含んでよい。本明細書において提供される組成物中での使用に適した静菌剤は、制限されることなく、グラム陽性菌に対して活発に阻害するが、グラム陰性菌は阻害しない静菌剤を含む。前記組成物のいずれかは、本質的に乾燥生成物（すなわち、約5質量%以下の含水率を有する）、組成物とエマルションと混合物、又は懸濁液であってもよい。

30

【0069】

前記組成物中で使用される農学的に認容性の助剤は、制限されることなく、生成物効果を高める成分、及び/又は製品適用の容易さを高める生成物を含む。生成物効果を高める助剤は、植物の一部への接着を促進し植物の一部上で組成物を拡げる種々の湿潤剤/スプレッダー、植物の一部への接着を促進するステッカー、活性剤と内部組織との接触を促進できる浸透剤、環境悪化を阻害することにより活性剤の半減期を増加するエキステンダー、及び拡げた組成物の密度又は乾燥時間を増加する保湿剤を含んでよい。組成物中で使用される水/スプレッダーは、制限されることなく、非イオン性界面活性剤、アニオン性界

40

50

面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤、オルガノシリケート界面活性剤、及び／又は酸性化界面活性剤を含んでよい。組成物中で使用したステッカーは、制限されることなく、ラテックスベースの界面活性剤、テルペン／ピノレン、及びピロリドンベースの界面活性剤を含んでよい。浸透剤は、鉱物油、野菜油、エステル化野菜油、オルガノシリケート界面活性剤、及び酸性化界面活性剤を含んでよい。前記組成物中で使用されるエキステンダーは、制限されることなく、硫酸アンモニウム、又はメンテンベースの物質を含んでよい。前記組成物中で使用される保湿剤は、グリセロール、プロピレングリコール、及びジエチルグリコールを含んでよい。生成物適用を容易に改良する助剤は、制限されることなく、酸性化剤／緩衝剤、消泡剤／脱泡剤、相溶剤、ドリフト低減剤、染料、及び水質調節剤を含む。前記組成物中で使用される消泡剤／脱泡剤は、制限されることなく、ジメトポリシロキサンを含んでよい。前記組成物中で使用される相溶剤は、制限されることなく、硫酸アンモニウムを含んでよい。前記組成物中で使用されるドリフト低減剤は、制限されることなく、ポリアクリルアミド、及び多糖を含んでよい。前記組成物中で使用される水質調節剤は、制限されることなく、硫酸アンモニウムを含んでよい。

10

【0070】

発酵プロス、発酵プロス生成物、及び組成物で植物及び／又は植物の一部を処理する方法も本明細書において提供される。処理した植物、及びそれから得られた処理した植物の一部は、制限されることなく、トウモロコシ、アブラナ種（セイヨウアブラナ（*B. napus*）、*B. ラバ*（*B. rapa*）、セイヨウカラシナ（*B. juncea*））、アルファルファ、米、ライ麦、モロコシ、雑穀（例えばトウジンヒエ（ペニセタム・グラカム（*Pennisetum glaucum*））、キビ（*Panicum miliaceum*）、アワ（*Setaria italica*）、シコクヒエ（*Eleusine coracana*））、ヒマワリ、ベニバナ、大豆、タバコ、ジャガイモ、ピーナッツ、綿、サツマイモ（*Ipomoea batatas*）、キャッサバ、コーヒー、ココナッツ、パイナップル、シトラスツリー、カカオ、茶、バナナ、アボカド、イチジク、グアバ、マンゴー、オリーブ、パパイヤ、カシュー、マカダミア、アーモンド、テンサイ、サトウキビ、オート麦、大麦、トマト、レタス、グリーンピーンズ、ライマメ、エンドウ、ウリ科、例えばキュウリ、カンタロープ及びマスクメロン、観葉植物、及び針葉樹を含む。処理される植物の一部は、制限されることなく、葉、茎、花、根、種子、果実、塊茎、子葉鞘等を含む。処理されうる観葉植物及び植物の一部は、制限されることなく、アザレア、アジサイ、ハイビスカス、バラ、チューリップ、スイセン、ツクバネアサガオ、カーネーション、ポインセチア及びキクを含む。処理されうる針葉樹植物及び植物の一部は、制限されることなく、マツ、例えばタエダマツ、スラッシュマツ、ポンデローサマツ、及びモントレーマツ；アメリカトガサワラ；ベイツガ；シトカトウヒ；アメリカスギ；トドマツ、例えばヨーロッパモミ及びバルサムモミ；並びにヒマラヤスギ、例えばベイスギ及びアラスカヒノキを含む。処理されうる芝草植物及び植物の一部は、制限されることなく、スズメノカタビラ、一年生ライグラス、カナダブルーグラス、フェスキュー、ベントグラス、ウィートグラス、ケンタッキーブルーグラス、オーチャードグラス、ライグラス、レッドトップ、バミューダグラス、セントオーガスチングラス、及びノシバを含む。前記植物のいずれかの種子又は他の珠芽は、本明細書において提供される発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物、及び／又は組成物で処理されうる。

20

【0071】

ある実施態様において、植物及び／又は植物の一部は、噴霧で、発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物、及び組成物を適用することにより処理される。かかる噴霧適用は、制限されることなく、単独の植物の一部、又は植物の一部のあらゆる組合せの処理を含む。噴霧は、発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物、及び組成物を植物及び／又は植物の一部に分布するあらゆる装置で達成できる。有用な噴霧装置は、ブーム噴霧器、手動噴霧器又は背負式噴霧器、クロップダスター（すなわち空中噴霧）等を含む。発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物及び組成物を、向軸表面及び／又は背軸表面のいずれか又は双方に適用するために提供される噴霧装置及び噴霧方法を使用してもよい。メチオバクテリウムを有するエマルションを含有する発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物、及び／又は組成物で処理されうる。

30

40

50

物又は組成物のいずれかで少なくとも部分的に被覆された植物及び／又は植物の一部も本明細書において提供される。本明細書において、加工した植物生成物に付着するメチロバクテリウムを有する固体物質を含有する加工した植物生成物も提供される。

【0072】

ある実施態様において、種子は、本明細書において提供されるエマルションを含有する発酵プロス、発酵プロス生成物、発酵生成物、及び組成物に種子を曝すことによって処理される。種子を、制限されることなく、吸水、被覆、噴霧等を含む方法によって、本明細書において提供される発酵プロス、発酵プロス生成物、及び組成物で処理してよい。種子の処理を、連続及び／又はバッチ式の種子処理装置で実施してよい。ある実施態様において、被覆した種子を、メチロバクテリウムを有するエマルションを含有する提供される発酵プロス、発酵プロス生成物又は組成物で種子を覆うことによって、及び得られた生成物を空気乾燥することによって製造してよい。空気乾燥を、種子に又はメチロバクテリウムに有害ではない任意の温度で実施してよいが、しかし典型的には30以下である。エマルション及びメチロバクテリウムを含有するコーティングの割合は、制限されることなく、0.1～25質量%の種子、0.5～5質量%の種子、及び0.5～2.5質量%の種子の範囲を含む。ある実施態様において、さらに種子のコーティング又は処理において使用される固体物質を含有するエマルションは、それらに付着したメチロバクテリウムを有する。ある実施態様において、さらに種子のコーティング又は処理において使用される固体物質を含有するエマルションは、メチロバクテリウムに関連し、かつ本明細書において提供される方法によって得られる発酵プロス、発酵プロス生成物、又は組成物である。米国特許番号第5,106,648号、第5,512,069号、及び第8,181,388号において開示されている種々の種子処理組成物及び種子の処理のための方法は、参照をもってその全体を本明細書に組込まれたものとし、かつ本明細書において提供される発酵プロス、発酵プロス生成物又は組成物を含有する活性剤との使用に適していてよい。ある実施態様において、種子を処理するために使用される組成物は、制限されることなく、木粉、粘土、活性炭、ケイ藻土、微粒無機固体、炭酸カルシウム等を含む、農業的に認容性の付形剤を含んでよい。本明細書において提供される発酵プロス、発酵プロス生成物、又は組成物と使用されうる粘土及び無機固体は、制限されることなく、カルシウムベントナイト、カオリン、陶土、タルク、パーライト、雲母、バーミキュライト、シリカ、石英粉末、モンモリロナイト及びそれらの混合物を含む。使用されうる種子への粘着を促進する農業的に認容性の助剤は、制限されることなく、ポリ酢酸ビニル、ポリ酢酸ビニルコポリマー、加水分解ポリ酢酸ビニル、ポリビニルピロリドン・酢酸ビニルコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルコールコポリマー、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルメチルエーテル・無水マレイン酸コポリマー、ロウ、ラテックスポリマー、エチルセルロース及びメチルセルロースを含むセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、アルギン酸塩、デキストリン、マルトデキストリン、多糖、脂肪、油状物、タンパク質、カラヤゴム、ジャガーゴム(jaguar gum)、トラガカントゴム、多糖ゴム、ゴム糊、アラビアゴム、シェラック、塩化ビニリデンポリマー及びコポリマー、大豆ベースのタンパク質ポリマー及びコポリマー、リグニンスルホン酸塩、アクリル酸コポリマー、デンプン、ポリビニルアクリレート、ゼイン、ゼラチン、カルボキシメチルセルロース、キトサン、ポリエチレンオキシド、アクリルアミドポリマー及びコポリマー、ポリヒドロキシエチルアクリレート、メチルアクリルアミドモノマー、アルギン酸塩、エチルセルロース、ポリクロロブレン及びそれらのシロップ又は混合物を含む。コーティングを促進しうる他の有用な農業的に認容性の助剤は、制限されることなく、酢酸ビニルのポリマー及びコポリマー、ポリビニルピロリドン・酢酸ビニルコポリマー、及び水溶性ロウを含む。本明細書及び米国特許番号第8,181,388号において開示されている種々の界面活性剤、分散剤、固化防止剤、発泡調節剤、及び染料は、本明細書において提供される発酵プロス、発酵プロス生成物又は組成物を含有する活性剤との使用に適していてよい。

【0073】

10

20

30

40

50

実施例

次の実施例は、本発明の好ましい実施態様を証明するために含まれる。次の実施例において開示されている技術は、本発明の実施に良好に機能することが発明者によって発見された技術を示し、従ってその実施のために好ましい方法を構築すると考えられることが、当業者によって認識されている。しかしながら、当業者は、即時の開示を考慮して、多くの変更が開示されている特定の実施態様において実施できる一方で、本発明の範囲から逸脱することなく、同様の又は類似した結果をさらに得ることを認識すべきである。

【0074】

実施例1 板状固体寒天培地上でのPPFM細菌の成長

板状固体寒天培地上でPPFM細菌を成長させるために、種々の標準培地で試験した。

10

【0075】

使用した1つの培地は、アンモニウムミネラル塩(AMS)培地(Whittenbury et al., 1970)であった。AMS培地は、1リットルあたり、700ミリグラムの二塩基リン酸カリウム無水物、540ミリグラムの一塩基リン酸カリウム無水物、1グラムの硫酸マグネシウム七水和物、500ミリグラムの塩化アンモニウム無水物、200ミリグラムの塩化カルシウム脱水物、4ミリグラムの硫酸第二鉄七水和物、100マイクログラムの硫酸亜鉛七水和物、30マイクログラムの塩化マンガン四水和物、300マイクログラムのホウ酸無水物、200マイクログラムの塩化コバルト六水和物、10マイクログラムの塩化銅二水和物、20マイクログラムの塩化ニッケル六水和物、及び60マイクログラムのモリブデン酸ナトリウム二水和物を含む。

20

【0076】

AMS培地を、以下で挙げた4つのストック溶液から製造した。

ストック溶液 I: 1リットルについて50倍濃度

二塩基リン酸カリウム、無水物	35 グラム
一塩基リン酸カリウム、無水物	27 グラム

ストック溶液 II: 1リットルについて50倍濃度

硫酸マグネシウム七水和物	50 グラム
塩化アンモニウム、無水物	25 グラム

10

ストック溶液 III: 1リットルについて50倍濃度

塩化カルシウム二水和物	10 グラム
-------------	--------

微量金属ストック溶液 : 1リットルについて1000倍濃度

硫酸第二鉄七水和物	4 グラム
硫酸亜鉛七水和物	100 ミリグラム
塩化マンガン四水和物	30 ミリグラム
ホウ酸、無水物	300 ミリグラム
塩化コバルト六水和物	200 ミリグラム
塩化銅二水和物	10 ミリグラム
塩化ニッケル六水和物	20 ミリグラム
モリブデン酸ナトリウム二水和物	60 ミリグラム

20

30

【0077】
ストック溶液 I、II 及び III を別々にオートクレーブにかけた。微量金属ストック溶液は、オートクレーブ工程中にほとんどの塩を沈澱させるためオートクレーブにかけず、0.2ミクロメートルの濾過装置を介して濾過滅菌した。これらの工程は、溶液中の全ての成分を有する無色透明な AMS 培地の製造を確実にするために必須であった。Whittenbury et al. (1970) によって当初に記載されているように、AMS 培地のリン酸塩含有成分を、培地製造の仕上げ工程まで、他の成分から隔離し、不溶性リン酸マグネシウム及びリン酸カルシウム結晶の形成を妨げた。

40

【0078】
AMS ベースで 1 リットルの板状固体寒天培地を製造するために、15 グラムの寒天を、940 ml の蒸留水に添加し、そしてこの混合物をオートクレーブにかけた。オートクレーブ後に、それぞれ 20 ml のストック溶液 I、II 及び III を、1 ml の濾過滅菌した微量金属ストック溶液と共に、添加した。

40

【0079】
他の培地成分、例えば炭素源を導入すべきである場合に、ほとんどの部分について、これらを、オートクレーブ前に水と寒天の混合物に添加した。この例外の 1 つはメタノールであり、0.2 ミクロメートルの濾過装置を介して滅菌し、そしてベース培地をオートクレーブした後に添加した。

50

【0080】
使用した第二の培地は、Vogel - Bonner (VB) ミネラル培地 (Vogel and Bonner, 1956) であった。VB 培地は、1 リットルあたり、298

ミリグラムの硫酸マグネシウム七水和物、14.93グラムの無水二塩基硫酸カリウム、5.22グラムの硫酸アンモニウムナトリウム四水和物、及び2.73グラムの無水クエン酸（遊離酸形）を含む。

【0081】

Vogel-Bonnerミネラル培地を、塩及びクエン酸の25倍のストック溶液から製造した。この25倍ストック溶液を、挙げられた順序で、1リットルの蒸留水中で次の成分の以下の量を溶解し、そしてそれぞれが次を添加する前に完全に溶解したことを確認することによって製造した：7.46グラムの硫酸マグネシウム七水和物、68.23グラムの無水クエン酸、373.13グラムの無水二塩基硫酸カリウム、及び130.60グラムの硫酸アンモニウムナトリウム四水和物。硫酸マグネシウムを最初に溶解し、そしてクエン酸を添加することによって、マグネシウムイオンを、クエン酸イオンによってキレート化し、リン酸塩を添加した場合に不溶性リン酸マグネシウム結晶の形成を妨げた。これは、溶液中で全ての成分を有する無色透明な培地を製造することを確実にした。

10

【0082】

VBベースで1リットルの板状固体寒天培地を製造するために、15グラムの寒天を、960mlの蒸留水に添加し、そしてこの混合物をオートクレーブにかけた。オートクレーブ後に、40mlの25倍のVBストック溶液を添加した。

20

【0083】

他の培地成分、例えば炭素源を導入すべきである場合に、ほとんどの部分について、これらを、オートクレーブ前に水と寒天の混合物に添加した。この例外の1つはメタノールであり、0.2ミクロメートルの濾過装置を介して滅菌し、そしてベース培地をオートクレーブした後に添加した。

20

【0084】

使用した第三の培地はLBプロスであった。LBプロスは、1リットルあたり、10グラムのトリプトン、5グラムの酵母抽出物、及び10グラムの塩化ナトリウムを含む。全ての成分を1リットルの蒸留水中で溶解し、そしてオートクレーブにかけた。溶液中で全ての成分を有するこの培地は無色透明であった。

【0085】

LBベースで1リットルの板状固体寒天培地を製造するために、15グラムの寒天を、1リットルのLBプロスに添加し、そしてこの混合物をオートクレーブにかけた。

30

【0086】

Corpe及びBaseline(1982)は、種々の炭素源を含むAMS培地中で種々の株のPPFM細菌の成長の組織的な調査を実施した。試験した物質の多くは、PPFM細菌のどの成長にもほとんど支持しなかった。Corpe及びBaselineは、グリセロール及びグルタメートが、PPFM細菌について比較的良好な炭素源であり、かつメタノール、グルコース、アスパラギン酸塩、コハク酸塩及びリンゴ酸塩を、PPFM細菌についての炭素源として中間体であった。

【0087】

出願人は、LBプレート上で、並びに種々の炭素源を補ったAMS及びVBプレート上で、メチロバクテリウム・エキストロクエンスの成長を測定した。以下に挙げた炭素源を、AMSベース又はVBベースの塩培地に1リットルあたり10グラムで全て添加した。さらに、1リットルあたり10グラムでペプトンを含むいくつかの培地組成物を試験した。メチロバクテリウム・エキストロクエンスを、種々の寒天プレート上で画線培養し、そしてそれらを2週間までの間30でインキュベートした。成長を、完全サイズ（直径約2ミリメートル）になるまでコロニーが要求したインキュベート日数として測定し、それらの成長条件について、延長したインキュベート後にさらに完全サイズのコロニーが形成しなかった場合に、コロニーが、中間サイズ（直径で約1ミリメートル）又は小さいサイズ（直径で0.5ミリメートル以下）として記録した。観察した全てのコロニーは、PPFM細菌の特徴である、深い、飽和度に達したピンク色であった。

40

【0088】

50

結果は以下であった：

VB + アスパラギン酸塩	9日で小さいサイズ
VB + コハク酸塩	10日で小さいサイズ
VB + リンゴ酸塩	10日で小さいサイズ

LB	9日で完全サイズ
----	----------

AMS + グルコース	9日で完全サイズ
VB + グルコース	14日で完全サイズ

AMS + メタノール	6日で完全サイズ
VB + メタノール	10日で中間サイズ

AMS + グルタメート及びペプトン	5日で完全サイズ
--------------------	----------

AMS + グリセロール及びペプトン	5日で完全サイズ
VB + グリセロール及びペプトン	6日で完全サイズ

【0089】

試験した板状固体寒天培地上でのPPFM細菌メチロバクテリウム・エキストロクエンスの最も早く最も豊富な成長は、AMSとグリセロール及びペプトン、又はAMSとグルタメート及びペプトンであり、次に、AMSとメタノール又はVBとグリセロール及びペプトンが近かった。他の試験した培地に対する成長は著しく遅かった。

【0090】

実施例2 透明な単相液体培地中のPPFM細菌の成長

PPFM細菌メチロバクテリウム・エキストロクエンスの最も早く最も豊富な成長を支持していた実施例1において見出された4つの板状固体寒天培地について、相応する液体の種類（すなわち寒天を添加していないもの）を製造し、試験した。溶液中で全ての成分を有する、実施例1において記載されたように製造したこれらの4つの液体培地（唯一の例外はあらゆる寒天を含まないことであった）は、全て無色透明の液体であった。

【0091】

100ミリリットルのこれらの4つの液体培地を含むフラスコに、PPFM細菌メチロバクテリウム・エキストロクエンスを添加して、1ミリリットルあたり約 1×10^5 コロニー形成単位(CFU)の初期力値を得た。そのフラスコを、回転攪拌インキュベーター上に置き、そして30及び250rpmで5日間成長させた。5日のインキュベートの終了時点で、フラスコ中のPPFM細菌の力値を測定した。結果は以下であった：

10

20

30

40

<u>液体培地</u>	<u>PPFMの の力価</u>	<u>5日後の PPFMの力価</u>
AMS + グリセロール及びペプトン	1.4×10^5	4.5×10^5
AMS + グルタメート及びペプトン	2.0×10^5	3.8×10^5
AMS + メタノール	1.1×10^5	2.1×10^5
VB + グリセロール及びペプトン	1.7×10^5	1.3×10^5

【0092】

これらの結果の著しい様は、PPFM細菌が急速に豊富に成長する（実施例1において記載されたような）これらの培地の固体寒天プレート形で存在した、厳密に同じ栄養物の存在下での、全てのこれらの無色透明な培地中でのPPFM細菌の非常に乏しい成長である。代わりに、これらのフラスコの全てにおいて、混濁度がわずか又は見られず（細菌成長の典型的な徴候）、かつどんなピンクの色相も見られなかった。

【0093】

実施例3 不溶性塩の結晶を含有する二相培地中でのPPFM細菌の成長

二相培地の製造のために、液体AMS+グリセロール及びペプトンの培地を、リン酸マグネシウム及び/又はリン酸カルシウムの不溶性結晶を故意に形成することによって混濁させた（すなわち固体物質を提供した）。培地中で不溶性結晶を故意に形成するために、実施例1に記載された製造方法を以下のように変更した。微量金属ストック溶液を除く全ての成分を、オートクレーブ前に一緒に混合した。すなわち、940mlの蒸留水に、それぞれ20mlのストック溶液I、II及びIIIを、10グラムのグリセロール及び10グラムのペプトンに加えて添加した。オートクレーブ後に、培地を、1mlの濾過滅菌した微量金属ストック溶液の添加によって完成させた。オートクレーブ前に共に混合したストック溶液I、II及びIIIの成分のオートクレーブは、不溶性塩の結晶、おそらく主に二塩基性リン酸マグネシウム及び/又は二塩基性リン酸カルシウムの形成をもたらした。オートクレーブ後に、AMS+グリセロール及びペプトンの培地を、この製造方法によって製造し、これらの塩の結晶を有する非常に混濁した液体培地を得た。この新たな液体培地を、“混濁AMS+グリセロール及びペプトン”と表した。

【0094】

100ミリリットルの混濁AMS+グリセロール及びペプトンを含むフラスコに、PPFM細菌メチロバクテリウム・エキストロクエンスを添加して、1ミリリットルあたり約 1×10^5 コロニー形成単位(CFU)の初期力価を得た。そのフラスコを、回転攪拌インキュベーター上に置き、そして30及び250rpmで3日間成長させた。ちょうど2日後に、フラスコは、PPFM細菌の早く豊富な成長を示す、濃く、飽和したピンク色の混濁度を生じた。インキュベートの2日及び3日後に、フラスコ中のPPFM細菌の力価を測定した。結果は以下であった：

10

20

30

40

<u>PPFMの 液体培地</u>	<u>2日後の PPFMの力価</u>	<u>3日後の PPFMの力価</u>
混濁 AMS + グリセロール及びペプトン	1.7×10^5	1.3×10^8

【0095】

この結果の2つの顕著な態様は、PPFM細菌の非常に早い成長であり、透明なAMS +グリセロール及びペプトンの液体培地（実施例2において示されている）で得られた力価よりも、10000倍高い力価までPPFM細菌は成長した。 10

【0096】

実施例4 不溶性塩の結晶を含有する二相培地中でのPPFM細菌の成長
ケイ藻土が、PPFM細菌の早く豊富な成長の促進に効果的であるかどうかを試験するために、少量のケイ藻土を、AMS +グリセロール及びペプトンの液体培地に添加した。この液体培地を、実施例1において記載したように、すなわち、リン酸マグネシウム及びリン酸カルシウムの不溶性塩の結晶の形成を妨げることを設計した製造方法によって製造した。ケイ藻土を、オードクレープ前に水に添加した。試験したケイ藻土の量は、1リットルあたり、500ミリグラム、1グラム、1.5グラム、及び2グラムであった。これらの新たな液体培地を、“AMS +グリセロール及びペプトン及びケイ藻土”と表した。 20

【0097】

100ミリリットルのAMS +グリセロール及びペプトン及びケイ藻土を含むフラスコに、PPFM細菌メチロバクテリウム・エキストロクエンスを添加して、1ミリリットルあたり約 1×10^5 コロニー形成単位(CFU)の初期力価を得た。そのフラスコを、回転攪拌インキュベーター上に置き、そして30及び250rpmで3日間成長させた。ちょうど2日後に、フラスコは、PPFM細菌の早く過剰な成長を示す、濃く、飽和したピンク色の混濁度を全て生じた。インキュベートの2日及び3日後に、フラスコ中のPPFM細菌の力価を測定した。結果は以下であった：

<u>液体培地</u>	<u>PPFMの の力価</u>	<u>2日後の PPFMの力価</u>	<u>3日後の PPFMの力価</u>
AMS+ グリセロール及び ペプトン、 及び 500 mg ケイ藻土	1.0×10^5	1.8×10^8	1.1×10^9
AMS+ グリセロール及び ペプトン、 及び 1 mg ケイ藻土	1.8×10^5	3.0×10^8	8.4×10^8
AMS+ グリセロール及び ペプトン、 及び 1.5 mg ケイ藻土	1.4×10^5	4.0×10^8	1.7×10^9
AMS+ グリセロール及び ペプトン、 及び 2 mg ケイ藻土	1.7×10^5	3.4×10^8	2.0×10^9

10

20

30

【 0 0 9 8 】

この結果の 2 つの顕著な態様は、 P P F M 細菌の非常に早い成長であり、 透明な A M S + グリセロールとペプトンの液体培地（実施例 2 において示されている）で得られた力価よりも、 1 0 0 0 0 倍高い力価まで P P F M 細菌は成長した。 2 日の成長後に得られたデータは、 増加した量の成長を、 培地 1 0 0 m l あたり 0 . 5 グラム ~ 1 . 5 グラムの範囲内での観点の増加量に対応する。

【 0 0 9 9 】

実施例 5 培地中で種々の固体の存在下及び不在下での種々のメチロバクテリウムの力価

メチロバクテリウム属の 1 4 株を、 D S M Z (B r a u n s c h w e i g , G e r m a n y) 及び A T C C (M a n a s s a s , V A , U S A) から購入した。 これらの 1 4 株は、 異なる 1 2 種からなり、 これらは以下のセットにおいて 3 種の M . エキストロクエンスがあった。

1. DSM-6343 *Methylobacterium extorquens*
2. DSM-1819 *Methylobacterium radiotolerans*
3. DSM-13060 *Methylobacterium extorquens*
4. DSM-18172 *Methylobacterium organophilum*
5. DSM-1708 *Methylobacterium mesophilicum*
6. DSM-18207 *Methylobacterium oryzae*
7. DSM-19779 *Methylobacterium phyllosphaerae*
8. ATCC-14718 *Methylobacterium extorquens*
9. ATCC-14821 *Methylobacterium rhodinum*
10. ATCC-21611 *Methylobacterium rhodesianum*
11. ATCC-35065 *Methylobacterium fujisawaense*
12. ATCC-43883 *Methylobacterium zatmanii*
13. ATCC-51358 *Methylobacterium aminovorans*
14. ATCC-700647 *Methylobacterium thiocyanatum*

10

20

30

【0100】

以下の試験のために、接種物は、無色透明なA M S - G P 培地で成長させた培養物から得た。これらの培養物を、2 0 0 m l の無色透明なA M S - G P 培地で成長させ、力価を測定し、そして1 0 倍濃縮した。固体物質が存在しないこれらのP P F M 培養物を使用して、1 0 m l の無色透明なA M S - G P 培地、又は種々の固体物質添加したA M S - G P 培地を含有する試験管に植え付けた。2 0 m g の種々の固体物質を、それぞれ1 0 m l の管に添加し、1 リットルあたり2 グラム当量の固体物質濃度を得た。それぞれの管における標的物の初期濃度は、1 m l あたり約 $1 \times 1 0^5$ P P F M (細胞) であった。植え付けた試験管を、回転攪拌機上に置き、そして3 0 及び2 5 0 r p m で3 日間成長させた。成長の3 日後に、P P F M 培地の力価を測定した。

【0101】

無色透明なA M S - G P 液体培地中のP P F M 株の成長

		<u>最初の力価</u>	<u>3日後の力価 (CFU/mL)</u>	
DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	3.5×10^5	1.2×10^6	
DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	1.8×10^5	1.3×10^6	
DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	3.1×10^5	3.2×10^5	
DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	1.4×10^5	1.8×10^5	
DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	3.3×10^5	1.0×10^5	
DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	1.1×10^5	2.2×10^6	10
DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	2.1×10^5	1.1×10^6	
ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	2.0×10^5	1.7×10^5	
ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	4.4×10^5	2.9×10^5	
ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	1.8×10^5	1.4×10^5	
ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	1.3×10^5	1.9×10^6	
ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	5.0×10^5	1.9×10^5	
ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	9.5×10^4	1.7×10^5	20
ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	1.8×10^5	7.6×10^4	

【 0 1 0 2 】

不溶性塩の結晶を含有する混濁 A M S - G P 液体培地での P P F M 株の成長

		<u>最初の力価</u>	<u>3日後の力価 (CFU/mL)</u>	
DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	2.5×10^5	2.1×10^9	
DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	7.6×10^4	6.8×10^8	
DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	1.9×10^5	4.4×10^8	30
DSM-18172	<i>M. organophilum</i>	1.1×10^5	1.9×10^9	
DSM-1708	<i>M. mesophilicum</i>	1.4×10^5	9.3×10^8	
DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	7.3×10^4	2.4×10^8	
DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	1.8×10^5	7.5×10^8	
ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	9.3×10^4	2.0×10^9	
ATCC-14821	<i>M. rhodinum</i>	7.1×10^4	7.2×10^8	
ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	3.9×10^5	6.8×10^8	40
ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	8.2×10^4	2.3×10^8	
ATCC-43883	<i>M. zatmanii</i>	1.8×10^5	6.2×10^8	
ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	6.8×10^4	1.7×10^9	
ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	4.3×10^5	6.5×10^8	

【 0 1 0 3 】

実施例 6 エマルション中のメチロバクテリウムの成長

メチロバクテリウム P P F M 株を、200mLの無色透明な A M S - G P 培地中で成長させ、力価を測定し、そして 10 倍濃縮した。固体物質が存在しないこれらの P P F M 培

養物を使用して、無色透明な A M S - G P 培地及び油状物で製造したエマルションを含有する 10 ml の無色透明な A M S - G P 培地を含有する試験管に植え付けた。エマルションについて、油状物を、1 リットルあたり 20 ミリリットル当量の濃度で添加した。それぞれの管における標的物の初期濃度は、1 ml あたり約 1×10^5 P P F M コロニー形成単位であった。

【 0 1 0 4 】

エマルションを製造するために、2 つの滅菌した 60 ミリリットルのルアーローク注射器を、滅菌した 3 方向ルアーロークストップコック (Sigma - Aldrich Co. 社 (St. Louis, MO) のカタログ番号 S7521) に取り付けた。1 つの注射器を空にし、そして他は、49 ミリリットルの滅菌した無色透明な A M S - G P 液体培地及び 1 ミリリットルの滅菌油状物を含んだ。その液体を、2 つの注射器間で強制的に押し戻し、そして押し出した。ストップコックの小さい穴を介したこの強制的な混合は、2 つの液体のエマルションを製造した。

10

【 0 1 0 5 】

植え付けた試験管を、回転搅拌機上に置き、そして 30 及び 250 rpm で 3 日間成長させた。

【 0 1 0 6 】

a. ゴマ油で (1 リットルあたり 20 ミリリットルで) エマルション中に製造した A M S - G P 液体培地中での P P F M 株の成長

		<u>最初の力価</u>	<u>3日後の力価 (CFU/mL)</u>	20
DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	3.2×10^5	2.2×10^8	
DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	8.2×10^4	9.1×10^7	
DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	2.9×10^5	1.5×10^8	
DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	1.4×10^5	2.9×10^8	
DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	3.5×10^5	1.0×10^8	
ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	8.4×10^4	2.5×10^8	
ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	2.3×10^5	3.5×10^8	30
ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	6.7×10^4	8.6×10^7	
ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	5.7×10^4	2.7×10^8	
ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	8.6×10^4	8.6×10^7	

【 0 1 0 7 】

3 日間の成長後に、エマルションは、P P F M がエマルション中で良好に成長したことを示す、豊富なピンク色であった。それらを激しくボルテックスし、そして力価を測定した。得られた P P F M 細胞の力価は、透明な A M S - G P 液体培地中での P P F M の成長によって得られた力価よりも高かった (実施例 5 の比較結果を参照、無色透明な A M S - G P 液体中で 3 日間の P P F M の成長は、1 ml あたり 10^6 コロニー形成単位を超えたかった)。

40

【 0 1 0 8 】

b. ココナッツオイルで (1 リットルあたり 20 ミリリットルで) エマルション中に製造した A M S - G P 液体培地中での P P F M 株の成長

		<u>最初の力価</u>	<u>3日後の力価 (CFU/mL)</u>	
DSM-6343	<i>M. extorquens</i>	5.7×10^4	4.6×10^8	
DSM-1819	<i>M. radiotolerans</i>	9.3×10^4	5.5×10^7	
DSM-13060	<i>M. extorquens</i>	8.5×10^4	3.7×10^8	
DSM-18207	<i>M. oryzae</i>	2.5×10^5	7.8×10^7	
DSM-19779	<i>M. phyllosphaerae</i>	1.4×10^5	5.7×10^8	
ATCC-14718	<i>M. extorquens</i>	3.0×10^5	7.1×10^7	10
ATCC-21611	<i>M. rhodesianum</i>	6.8×10^4	9.3×10^7	
ATCC-35065	<i>M. fujisawaense</i>	8.9×10^4	4.5×10^8	
ATCC-51358	<i>M. aminovorans</i>	8.0×10^4	9.4×10^7	
ATCC-700647	<i>M. thiocyanatum</i>	7.5×10^4	4.7×10^8	

【0109】

3日間の成長後に、エマルションは、PPFMがエマルション中で良好に成長したことを示す、豊富なピンク色であった。それらを激しくボルテックスし、そして力価を測定した。得られたPPFM細胞の力価は、透明なAMS-GP液体培地中でのPPFMの成長によって得られた力価よりも高かった（実施例10の比較結果を参照、無色透明なAMS-GP液体中で3日間のPPFMの成長は、1mlあたり 10^6 コロニー形成単位を超えるなかった）。

20

【0110】

実施例7 制御したバイオリアクター中のPPFM細菌の成長

回転攪拌機でインキュベートしたフラスコ中の細菌の成長を、成長培地中で炭素源の代謝によってもたらされるpHの変化により制限する。制御したバイオリアクター（“発酵槽”又は“発酵容器”としても公知である）は、適宜、酸又は塩基の制御された添加によって所望のレベルでpHを維持することによってこの制限を避ける。細菌の成長を制限できる他の要因は、溶存酸素の可能性である。制御されたバイオリアクターは、反応容器中の空気流の制御された調整、容器の攪拌速度、及び容器内の空気圧によって、溶存酸素の適切なレベルを維持することによってこの制限を避ける。

30

【0111】

本明細書において開示された又は請求された、又は実施例6において記載された方法のいずれかによってエマルションを形成するために、さらに第二の不混和性液体を補った、実施例1において記載されたAMS+グリセロール及びペプトンの液体培地を含有する制御されたバイオリアクター中で成長させる場合に、得られたPPFM細菌の最終力価は、フラスコ中で得られた最終力価よりも少なくとも約10倍、又は少なくとも約30倍高い。

30

【0112】

実施例8 メチロバクテリウムを有するエマルションを含有する植物種子又は葉処理組成物

植物種子又は葉の処理に適した組成物を得るために、メチロバクテリウムを、本明細書において開示された又は請求された、又は実施例6において記載された方法のいずれかによってエマルション中で培養する。典型的に、メチロバクテリウムを、高い力価（すなわち、1mlあたり少なくとも 5×10^7 コロニー形成単位）まで培養する。そしてエマルション中でメチロバクテリウムを採取する。採取は、濾過、遠心分離、デカンテーション、及びそれらの組合せによって達せられる。採取した材料を、ある例において種子又は植物に直接適用できる。他の例において、採取した材料を、適用前に、凍結乾燥又は噴霧乾燥することによって乾燥させる。乾燥させた材料を、植物又は種子に適用する前に必ず

40

50

又は望ましくは、液体で再構成してもよい。メチロバクテリウムを含むエマルションを含有する発酵プロスのいずれかに、又は採取したメチロバクテリウムに、農業的に認容性の付形剤及び／又は助剤をさらに添加することも可能である。添加される付形剤は、木粉、粘土、活性炭、ケイ藻土、微粒無機固体、炭酸カルシウム等を含んでよい。付形剤として組成物中に添加してよい粘土及び無機固体は、カルシウムベントナイト、カオリン、陶土、タルク、パーライト、雲母、バーミキュライト、シリカ、石英粉末、モンモリロナイト及びそれらの混合物を含む。組成物に添加されうる種子又は他の植物の一部への粘着を促進する農業的に認容性の助剤は、ポリ酢酸ビニル、ポリ酢酸ビニルコポリマー、加水分解ポリ酢酸ビニル、ポリビニルピロリドン・酢酸ビニルコポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルコールコポリマー、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルメチルエーテル・無水マレイン酸コポリマー、ロウ、ラテックスポリマー、エチルセルロース及びメチルセルロースを含むセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、アルギン酸塩、デキストリン、マルトデキストリン、多糖、脂肪、油状物、タンパク質、カラヤゴム、ジャガーゴム、トラガカントゴム、多糖ゴム、ゴム糊、アラビアゴム、シェラック、塩化ビニリデンポリマー及びコポリマー、大豆ベースのタンパク質ポリマー及びコポリマー、リグニンスルホン酸塩、アクリル酸コポリマー、デンプン、ポリビニルアクリレート、ゼイン、ゼラチン、カルボキシメチルセルロース、キトサン、ポリエチレンオキシド、アクリルアミドポリマー及びコポリマー、ポリヒドロキシエチルアクリレート、メチルアクリルアミドモノマー、アルギン酸塩、エチルセルロース、ポリクロロブレン及びそれらのシロップ又は混合物を含む。種子又は他の植物の一部のコーティングを促進しうる他の有用な農業的に認容性の助剤は、酢酸ビニルのポリマー及びコポリマー、ポリビニルピロリドン・酢酸ビニルコポリマー、及び水溶性ロウを含む。これらの組成物を、乾燥形又は半乾燥形で維持してよく、又は所望される液体の添加によってスラリー中に配合してよい。そして、組成物を使用して、植物又は種子に噴霧又は被覆して、メチロバクテリウムの植物への適用に関連する有益な効果を得る。

【0113】

参考

Abanda-Nkpwatt, D., M. Musch, J. Tschiersch, M. Boettner, and W. Schwab. 2006.

Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57: 4025-4032.

Cao, Y-R, Wang, Q., Jin, R-X., Tang, S-K., He, W-X., Lai, H-X, Xu, L-H., and C-L Jiang. 2011. *Methylobacterium soli* sp. nov. a methanol-utilizing bacterium isolated from the forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek* (2011) 99:629–634.

Corpe, W.A., and D.V. Basile. 1982. Methanol-utilizing bacteria associated with green plants. *Devel. Industr. Microbiol.* 23: 483-493.

Corpe, W.A., and S. Rheem. 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 243-250.

10

20

30

40

50

Green, P.N. 2005. *Methylobacterium*. In Brenner, D.J., N.R. Krieg, and J.T. Staley (eds.). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume two, The Proteobacteria. Part C, The alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria." Second edition. Springer, New York. Pages 567-571.

Green, P.N. 2006. *Methylobacterium*. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 5. Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses." Third edition. Springer, New York. Pages 257-265.

Holland, M.A. 1997. *Methylobacterium* and plants. Recent. Res. Devel. in Plant Physiol. 1: 207-213.

Holland, M.A., and J.C. Polacco. 1994. PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 197-209.

Kutschera, U. 2007. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts. A hypothesis. Plant Signal Behav. 2: 74-78.

Lidstrom, M.E.. 2006. Aerobic methylotrophic prokaryotes. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 2. Ecophysiology and biochemistry." Third edition. Springer, New York. Pages 618-634.

Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, H.S. Lee, K. Hari, S.P. Sundaram, and T.M. Sa. 2005. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.) Biol. Fertil. Soils 41: 350-358.

Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, S. Seshadri, H. Chung, J. Yang, S. Sundaram, and T. Sa. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar C0-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 315-324.

Madhaiyan, M., S. Poonguzhali , and T. Sa. 2007. Influence of plant species and environmental conditions on epiphytic and endophytic pink-pigmented facultative methylotrophic bacterial populations associated with field-grown rice cultivars. *J Microbiol Biotechnol.* 2007 Oct;17(10):1645-54.

Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.

10

Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., and Dreyfus, B. 2001. Methylotrophic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. *Jour. Bacteriol.* 183(1):214-220,

Sy, A., A.C.J. Timmers, C. Knief, and J.A. Vorholt. 2005. Methylotrophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7245-7252.

20

Vogel, H.J., and D.M. Bonner. 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218: 97-106.

Whittenbury, R., S.L. Davies, and J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61: 205-218.

30

【 0 1 1 4 】

例証及び記載した本発明の原理について、かかる原理から逸脱せずに、本発明を並び替えて及び詳細に改変できることが当業者に明らかであるべきである。

【 0 1 1 5 】

本発明の材料及び方法は、種々の実施態様及び実施例に記載されているが、本発明の概念、趣旨及び範囲から逸脱せずに、本明細書において記載された材料及び方法にその変更を適用できることが当業者に明らかである。当業者に明らかである全てのかかる小さな置換及び改変は、付属の特許請求の範囲によって定義された本発明の趣旨、範囲及び概念の範囲内であると考える。

40

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/040218
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 1/30 (2014.01) CPC - C12N 1/30 (2014.09) 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) IPC(8) - C12N 1/26, 1/30, 1/32, 1/38; C02F 3/34 (2014.01) USPC - 424/93.1 ; 435/243, 247, 248, 250, 252.1, 858		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C12N 1/26, 1/30, 1/32, 1/38 ; C02F 3/34 ; Y10S 435/858 (2014.09)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,401,762 A (TELLIER et al) 30 August 1983 (30.08.1983) entire document	1-56
Y	US 5,013,665 A (SUZUKI et al) 07 May 1991 (07.05.1991) entire document	1-55
Y	US 5,512,069 A (HOLLAND et al) 30 April 1996 (30.04.1996) entire document	22-31, 51-56
Y	US 2007/0074451 A1 (PEARCE et al) 05 April 2007 (05.04.2007) entire document	49, 50
A	US 2005/0181059 A1 (JACOB et al) 18 August 2005 (18.08.2005) entire document	1-56
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 18 September 2014	Date of mailing of the international search report 16 OCT 2014	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス=ラインハルト

(74)代理人 100099483

弁理士 久野 琢也

(72)発明者 グレッグ ボゴジアン

アメリカ合衆国 ミズーリ クラークソンヴァリー ハーワース コート 374

F ターム(参考) 2B150 AB20 AC01 AD04 DD31 DJ01

4B065 AA01X BB02 BB09 BB36 BC50 CA49