

(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
2011 年 10 月 6 日(06.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/122616 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 23/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/057794
- (22) 国際出願日: 2011 年 3 月 29 日(29.03.2011)
- (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 2010-079415 2010 年 3 月 30 日(30.03.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): J
X 日鉱日石エネルギー株式会社(JX NIPPON OIL
& ENERGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008162 東
京都千代田区大手町二丁目 6 番 3 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平澤 和明
(HIRASAWA Kazuaki) [JP/JP]; 〒2310815 神奈川県
横浜市中区千鳥町 8 番 J X 日鉱日石エネ
ルギー株式会社内 Kanagawa (JP). 佐藤 博(SATO
Hiroshi) [JP/JP]; 〒2310815 神奈川県横浜市中区千
鳥町 8 番 J X 日鉱日石エネルギー株式会
社内 Kanagawa (JP). 米田 久(YONEDA Hisashi)
[JP/JP]; 〒2310815 神奈川県横浜市中区千鳥町 8
番 J X 日鉱日石エネルギー株式会社内 Kana
gawa (JP). 矢田 哲久(YATA Tetsuhisa) [JP/JP]; 〒
2310815 神奈川県横浜市中区千鳥町 8 番 J X
日鉱日石エネルギー株式会社内 Kanagawa (JP).
東 光利(AZUMA Mitsutoshi) [JP/JP]; 〒2310815 神
奈川県横浜市中区千鳥町 8 番 J X 日鉱日石
エネルギー株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.);
〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 2 0 号
神谷町MTビル 1 9 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出さ
れた、寄託された生物材料に関する表示 (規
則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD OF MANUFACTURING ZEAXANTHIN BY FERMENTATION

(54) 発明の名称: 発酵によるゼアキサンチンの製造法

(57) Abstract: Disclosed is a method of inexpensively manufacturing high concentrations of zeaxanthin microbiologically, while reducing production of gluconic acid. Specifically disclosed is a method of manufacture for a carotenoid containing zeaxanthin, characterised by a step wherein a bacterium which produces a carotenoid containing zeaxanthin is cultivated in a culture medium containing biotin, and when compared to a culture solution after culturing in a culture medium not containing biotin, the produced concentration of gluconic acid in the culture solution after culturing is lower and the produced concentration of zeaxanthin is higher.

(57) 要約: 本発明は、グルコン酸の生産を抑えつつ高濃度に且つ安価にゼアキサンチンを微生物学的に製造する方法を提供することを目的とし、具体的にはゼアキサンチンを含むカロテノイドを生産する細菌をビオチン含有培地で培養する工程を含み、ビオチン非含有培地における培養終了後の培養液と比較して、培養終了後の培養液におけるグルコン酸の生産濃度が低く、且つゼアキサンチンの生産濃度が高いことを特徴とする、ゼアキサンチンを含むカロテノイドを製造する方法に関する。



WO 2011/122616 A1

明 細 書

発明の名称：発酵によるゼアキサンチンの製造法

技術分野

[0001] 本発明は、ゼアキサンチンを含むカロテノイドを、微生物発酵により製造する方法に関するものである。

背景技術

[0002] カロテノイドは、飼料添加物、食品添加物、医薬品等として有用な天然色素である。カロテノイドには、例えばゼアキサンチン、 β -カロテン、 β -クリプトキサンチン、アスタキサンチン、カンタキサンチン、リコペン、フェニコキサンチン、アドニキサンチン、エキネノン、アステロイデノン及び3-ヒドロキシエキネノン等が含まれる。

[0003] カロテノイドの中でも、ゼアキサンチンはトウモロコシ等の種々の植物に含まれる天然の黄色色素として飼料に添加され、ニワトリ等の家禽類の卵黄、肉、表皮の色調を改善する用途及び食品の着色料としての用途が知られる。またゼアキサンチンは強力な抗酸化作用(非特許文献1)及び抗腫瘍効果(非特許文献2)を有することが報告されている。さらに、ゼアキサンチンはルテインとともに網膜及び水晶体に存在し、眼の健康維持に関与していることが知られている(非特許文献3)。これらの生理的效果に基づき、ゼアキサンチンは健康食品素材、化粧品素材及び医薬品素材として有用である。

[0004] β -クリプトキサンチンは柑橘類に含まれ、抗腫瘍効果を有することが知られ(非特許文献2)、また骨粗鬆症予防に効果があることが報告されており(非特許文献4)、健康食品素材及び飼料配合剤としての用途がある。

[0005] β -カロテンはプロビタミンA作用及び抗酸化作用を有し、飼料添加物、食品添加物、天然着色料等として広く使用されている。

[0006] ゼアキサンチン、 β -クリプトキサンチン又は β -カロテンは、ニワトリ等の家禽類の飼料に添加し、当該飼料を家禽類に与えると、卵黄に蓄積する。上述のような有効な生理作用を持つことから、これらカロテノイドを蓄積し

た卵黄は機能性卵として有用である。

[0007] 一方、ゼアキサンチンの製造法としては、例えばオキソイソホロンの不斉還元により得た光学活性なヒドロキシケトン为原料として用いる化学合成法(非特許文献5)及びトウモロコシの種子から抽出する方法が知られている。また、ゼアキサンチンをマリーゴールドから抽出する方法も知られるが(特許文献1)、マリーゴールド由来カロテノイドの主成分はルテインであり、ゼアキサンチンの含量は低い。

[0008] ゼアキサンチンを生産する微生物の例としては、スピルリナ藻類(特許文献2)、ナンノクロリス(*Nannochloris*)属微細藻類(特許文献3)、フレキシバクター(*Flexibacter*)属細菌(特許文献4)、アルテロモナス(*Alteromonas*)属細菌(特許文献5)、フラボバクテリウム(*Flavobacterium*)属細菌及び細菌アグロバクテリウム・オウランティアクム(*Agrobacterium aurantiacum*)(非特許文献6)が知られている。また、カロテノイド生産菌として知られるパラコッカス(*Paracoccus*)属細菌において、例えばパラコッカス・ゼアキサンチニファシエンス(*Paracoccus zeaxanthinifaciens*) ATCC 21588株(非特許文献7)、細菌パラコッカス・カロティニファシエンス(*Paracoccus carotinifaciens*) E-396株の変異株(特許文献6)、*Paracoccus*属細菌A-581-1株の変異株(特許文献6)及び*Paracoccus*属細菌の変異株(特許文献7)がゼアキサンチンを生産することが知られている。

[0009] しかしながら、前述のゼアキサンチン化学合成法は有機溶剤を使用するので安全性及び近年の天然物指向の面で問題がある。また藻類培養によるゼアキサンチン生産は生産性が低いので実用的でない。さらに、植物からのゼアキサンチン抽出では、ゼアキサンチン含量が低いためにコストがかかりすぎるうえに天候に左右されるので、安定供給が困難であるという欠点を有する。

[0010] 一方、パラコッカス属細菌は、増殖速度が速く、生産性が高い、抽出が容易である等の利点を有しているものの、培養液中にグルコン酸を著量生産するために、炭素源が無駄に使用されるうえに、蓄積したグルコン酸がゼアキ

サンチンの生産を抑制し、製造コスト的に十分な濃度のゼアキサンチンを蓄積生産することができなかった。このため、従来においてゼアキサンチンの安価で、安定供給可能な、安全性の高い製造方法が求められていた。

先行技術文献

特許文献

- [0011] 特許文献1：特開平8-92205号公報
特許文献2：特開平10-155430号公報
特許文献3：特開平7-59558号公報
特許文献4：特開平5-328978号公報
特許文献5：特開平5-49497号公報
特許文献6：特開2005-87097号公報
特許文献7：特開2007-151475号公報

非特許文献

- [0012] 非特許文献1：Nobuyoshi Shidzuら，「Fisheries Science」，1996年，第62巻，第1号，pp. 134-137
非特許文献2：Tsushima M. ら，「Biol. Pharm. Bull.」，1995年，第18巻，第2号，pp. 227-233
非特許文献3：「FOOD Style 21」，1999年，第3巻，第3号，pp. 50-53
非特許文献4：Yamaguchi M ら，「ACS Symp Ser (Am Chem Soc)」，2008年，第993号，pp. 408-418
非特許文献5：Paust J ら，「Pure Appl. Chem.」，1991年，第63巻，第1号，pp. 45-58
非特許文献6：Akihiro Yokoyama及びWataru Miki，「FEMS Microbiology Letters」，1995年，第128巻，pp. 139-144
非特許文献7：Alan Berryら，「International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology」，2003年，第53巻，pp. 231-238

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] 本発明は、このような実状に鑑みなされたものであり、その目的はグルコン酸の生産を抑えつつ高濃度に且つ安価にゼアキサンチンを微生物学的に製造する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0014] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、ゼアキサンチンを生産する細菌の培養において、培地にビオチンを添加することによりグルコン酸の生産濃度を低く維持しながら高濃度のゼアキサンチンの生産が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0015] 本発明は、以下を包含する。
- [0016] (1) ゼアキサンチンを含むカロテノイドを生産する細菌をビオチン含有培地で培養する工程を含み、ビオチン非含有培地における培養終了後の培養液と比較して、培養終了後の培養液におけるグルコン酸生産濃度が低く、且つゼアキサンチン生産濃度が高いことを特徴とする、ゼアキサンチンを含むカロテノイドを製造する方法。
- [0017] (2) 培養終了後の培養液におけるグルコン酸生産濃度が80g/L以下であることを特徴とする、(1)記載の方法。
- [0018] (3) 培養終了後の培養液におけるグルコン酸生産量が消費した炭素源の30%(w/w)以下であることを特徴とする、(1)記載の方法。
- [0019] (4) 生産されたカロテノイドが β -クリプトキサンチンを含有することを特徴とする、(1)記載の方法。
- [0020] (5) 生産されたカロテノイドが β -カロテンを含有することを特徴とする、(1)記載の方法。
- [0021] (6) ビオチンの培地当たりの濃度が0.001mg/L~50mg/Lであることを特徴とする、(1)記載の方法。
- [0022] (7) 培養終了後の培養液における乾燥菌体当たりのゼアキサンチン含量が2mg/g以上であることを特徴とする、(1)記載の方法。
- [0023] (8) 培養終了後の培養液における乾燥細胞当たりのポリ- β -ヒドロキシ

酪酸(PHB)含量が30%(w/w)以下であることを特徴とする、(1)記載の方法。

[0024] (9) 細菌がパラコッカス(Paracoccus)属に属する細菌であることを特徴とする、(1)記載の方法。

[0025] (10) 細菌がアスタキサンチンを産生するパラコッカス属細菌を変異処理してゼアキサンチンを産生するようにした変異株であることを特徴とする、(1)記載の方法。

[0026] (11) 細菌が親株と比較してグルコン酸生産能を低下させた変異株であることを特徴とする、(1)記載の方法。

[0027] (12) 細菌が親株と比較してPHB生産能を低下させた変異株であることを特徴とする、(1)記載の方法。

[0028] (13) 細菌が、16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1記載の塩基配列と実質的に相同である細菌であることを特徴とする、(1)記載の方法。

[0029] (14) 細菌が、E-396株(FERM BP-4283)又はA-581-1株(FERM BP-4671)に由来する変異株であることを特徴とする、(1)記載の方法。

[0030] (15) (1)記載の方法により製造されたゼアキサンチンを含むカロテノイドを含有するカロテノイド組成物であって、培養終了後の培養液における乾燥細胞当たりのPHB含量が30%(w/w)以下であることを特徴とする、前記組成物。

[0031] (16) (1)記載の方法により得られた培養液を乾燥することにより製造されたゼアキサンチンを含むカロテノイド含有乾燥菌体組成物であって、該組成物当たりのゼアキサンチン含量が2mg/g以上であることを特徴とする、前記組成物。

[0032] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2010-079415号の明細書に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0033] 本発明によれば、微生物学的生産においてグルコン酸の濃度を低く抑えな

がら高濃度のゼアキサンチンを低コストで製造することができる。本発明により製造されるゼアキサンチン含有カロテノイドは飼料用及び食品用の素材として有用である。

発明を実施するための形態

[0034] 以下、本発明をさらに詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に限定されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施し得る。

[0035] 本発明は、ゼアキサンチンを含むカロテノイドを生産する細菌（以下では、「カロテノイド産生細菌」や「ゼアキサンチン産生細菌」という場合がある）をビオチン含有培地で培養し、ゼアキサンチンを含むカロテノイドを製造する方法（以下、「本方法」という）に関する。本方法では、ビオチン非含有培地における培養終了後の同様のカロテノイド産生細菌の培養液と比較して、培養終了後の培養液におけるグルコン酸生産濃度が低く、且つゼアキサンチン生産濃度が高い。本方法では、培地にビオチンを添加することにより、グルコン酸の生産濃度を抑えながら高濃度のゼアキサンチンを低コストで製造することが可能になる。

[0036] 本方法に用いる細菌としては、ゼアキサンチンを産生する細菌であれば何ら限定されないが、好ましくはParacoccus属に属する細菌が用いられる。Paracoccus属に属する細菌の中では、パラコッカス・カロティニファシエンス(Paracoccus carotinifaciens)、パラコッカス・マークシイ(Paracoccus marcusii)、パラコッカス・ヘウンデンシス(Paracoccus haeundaensis)、パラコッカス・ゼアキサンチニファシエンス(Paracoccus zeaxanthinifaciens)が好ましく用いられ、特にParacoccus carotinifaciensが好ましく用いられる。Paracoccus属に属する細菌の具体的な菌株の例として、Paracoccus carotinifaciens E-396株(FERM BP-4283)及びParacoccus属細菌A-581-1株(FERM BP-4671)が挙げられ、またこれらの菌株を変異し、親株と比較してゼアキサンチンを優先的に産生するようにした変異株も本方法において好ましく用いられる。また、ゼアキサンチン産生細菌の具体的な菌株の別な例としてParacoccus ze

axanthinifaciens ATCC 21588株(非特許文献7)が挙げられる。

[0037] また、ゼアキサンチン産生細菌として、好ましくは16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1に記載されるE-396株の塩基配列と実質的に相同である細菌が用いられる。ここで、「実質的に相同である」とは、DNAの塩基配列決定の際のエラー頻度等を考慮し、塩基配列が好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上相同であることを意味する。相同性は、例えば、遺伝子解析ソフトClustal Wにより決定することができる。

[0038] また、「16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列」とは、16SリボソームRNAの塩基配列中のU(ウラシル)をT(チミン)に置き換えた塩基配列を意味する。

[0039] 当該16SリボソームRNAの塩基配列の相同性に基づいた微生物の分類法は、近年主流になっている。従来の微生物の分類法は、従来の運動性、栄養要求性、糖の資化性等の菌学的性質に基づいているため、自然突然変異による形質の変化等が生じた場合に、微生物を誤って分類する場合があった。これに対し、16SリボソームRNAの塩基配列は極めて遺伝的に安定であるので、その相同性に基づく分類法は従来の分類法に比べて分類の信頼度が格段に向上する。

[0040] *Paracoccus carotinifaciens* E-396株の16SリボソームRNAの塩基配列と、他のカロテノイド産生細菌*Paracoccus marcusii* DSM 11574株(International Journal of Systematic Bacteriology (1998), 48, 543-548)、*Paracoccus* 属細菌N-81106株(特開2007-244205号公報)、*Paracoccus haeundaensis* BC 74 171株(Jae Hyung Leeら, 「International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology」, 2004年, 第54巻, pp. 1699-1702)、*Paracoccus* 属細菌 A-581-1株、*Paracoccus zeaxanthinifaciens* ATCC 21588株及び*Paracoccus* sp. PC-1株(国際公開第2005/118812号パンフレット)の16SリボソームRNAの塩基配列との間の相同性は、それぞれ99.7%、99.7%、99.6%、99.4%、95.7%及び95.4%であり、これらは分類学上極めて近縁な菌株であることが分

かる。よって、これらの菌株はカロテノイドを産生する細菌として一つのグループを形成しているといえる。

[0041] また、本方法においては、アスタキサンチン生産細菌を変異処理し、親株と比較してゼアキサンチンを優先的に産生するようにした変異株も用いることができる。このような変異株としては、例えば特許文献6に開示される変異株、特許文献7に開示される変異株等が挙げられる。

[0042] アスタキサンチン生産細菌を変異処理し、ゼアキサンチンを優先的に産生する変異株を取得する方法を以下に例示する。

[0043] 変異の親株としてはアスタキサンチンを生産する細菌であれば何でもよいが、好ましくはParacoccus属に属する細菌が用いられる。アスタキサンチンを産生するParacoccus属に属する細菌の中では、Paracoccus carotinifaciens、Paracoccus marcusii、Paracoccus haeundaensisが好ましく用いられ、特にParacoccus carotinifaciensが好ましく用いられる。Paracoccus属に属する細菌の具体的な菌株の例として、Paracoccus carotinifaciens E-396株(FERM BP-4283)及びParacoccus属細菌A-581-1株(FERM BP-4671)が挙げられ、これらの菌株を変異し、アスタキサンチンの生産性が向上した変異株も親株として好ましく用いられる。また、変異の親株として用いるアスタキサンチン生産細菌として、好ましくは16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1に記載されるE-396株の塩基配列と実質的に相同である細菌が用いられる。ここで、「実質的に相同である」とは、DNAの塩基配列決定の際のエラー頻度等を考慮し、塩基配列が好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上相同であることを意味する。

[0044] アスタキサンチン生産細菌を変異処理する方法は、突然変異を誘発するものであれば特に限定されない。例えば、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)及びエチルメタンサルホネート(EMS)等の変異剤による化学的方法、紫外線照射及びX線照射等の物理的方法、遺伝子組換え及びトランスポゾン等による生物学的方法等を用いることができる。あるいは自然に起こる自

発的突然変異でも良い。この変異処理は1回でもよいし、また、例えばこの突然変異処理によりアスタキサンチンを高生産する変異体を得て、これをさらに突然変異処理するというように2回以上の変異処理を行ってもよい。本発明において変異処理後に固体培地上にコロニーを形成させ、ランダムにコロニーを拾うこともできるが、選抜効率を向上させるために親株の赤色～赤橙色のコロニーに比較して黄色～橙色を呈するコロニーを選択することが可能である。

[0045] アスタキサンチン生産細菌を変異処理して得られた変異株の中から生産するゼアキサンチンの総カロテノイド量に対する比率の特に高い変異株を選抜する方法は、変異株を培養して得られた培養液中のカロテノイド化合物を分析することにより達成される。この培養方法は、例えば次の通りである。すなわち、生産菌の生育に必要で、カロテノイド化合物を生成する成分を含む培地で培養を行う。培養方法は試験管、フラスコ等における振とう培養、通気攪拌培養等いずれの方法でもよい。カロテノイド化合物の分析方法は、カロテノイド化合物を分離検出できる方法なら何でも良いが、例えば、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー等を用いることができる。本発明においてゼアキサンチン生産細菌の取得は、ゼアキサンチンの総カロテノイド量に対する比率の高い変異株を選抜することにより行われる。ここで言う総カロテノイド量とは、アスタキサンチン、カンタキサンチン、アドニキサンチン、 β -カロテン、エキネノン、ゼアキサンチン、 β -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン等のカロテノイド化合物の総量を示す。その選抜の基準となるゼアキサンチンの比率は、変異前の親株のゼアキサンチン生産比率より高いことが最低限の条件であるが、生産される総カロテノイド量に対してゼアキサンチンを好ましくは20% (w/w) 以上、より好ましくは40% (w/w) 以上、さらに好ましくは60% (w/w) 以上のゼアキサンチン比率を示す変異株を選抜する。

[0046] 本方法では、ゼアキサンチン産生細菌を変異処理し、親株と比較してゼア

キサントンの生産性が向上した変異株を選択し、これを用いてもよい。ゼアキサントンの生産性が向上した変異株の具体的な取得方法としては、前述と同様な変異処理を行った後、例えば、寒天培地上で濃い橙色を呈するコロニーを選択し、個々の変異株を試験管、フラスコ等で培養し、ゼアキサントンを定量し、ゼアキサントン産生濃度の高い変異株を選抜する方法が挙げられる。

[0047] 本方法では、親株と比較してPHB(ポリ- β -ヒドロキシ酪酸)の生産能が低下した変異株を用いることができる。例えば、上述のParacoccus属に属する細菌から当該変異株を誘導することができる。ゼアキサントンを生産する細菌は貯蔵炭素源として細胞内にPHBを蓄積することが知られている。PHBを蓄積すればその分、培地炭素源を無駄に消費することになるので製造コスト低減のためにはPHBをできるだけ蓄積させないのが良い。従って、変異処理及びスクリーニングによりPHBの蓄積が少ないかあるいは全く蓄積しない変異株を取得することが有効である。PHB低生産株の具体的な取得方法としては、前述と同様な変異処理を行った後、例えば、個々の変異株を試験管、フラスコ、寒天培地等で培養し、PHBを定量し、PHBの生成量が少ない変異株を選抜する方法が挙げられる。

[0048] 本方法では、親株と比較してグルコン酸の生産能が低下した変異株を用いても良い。例えば、上述のParacoccus属に属する細菌から当該変異株を誘導することができる。グルコン酸を生成すれば、その分、培地炭素源を無駄に消費することになり、また、著量のグルコン酸を蓄積すれば、生育やカロテノイド生産を阻害することになる。従って、グルコン酸の生成をできるだけ少なくすることがカロテノイドの生産には有効である。グルコン酸低生産株の具体的な取得方法としては、前述と同様な変異処理を行った後、例えば、個々の変異株を試験管、フラスコ等で培養し、培養液のpHを測定してpHの低下が少ない変異株を選抜した後、さらに培養液のグルコン酸を測定してグルコン酸の生成量が少ない変異株を選抜する方法が挙げられる。

[0049] 上述のゼアキサントンの生産性が改良された変異株、PHBの生産能が低下し

た変異株、グルコン酸の生産能が低下した変異株等の好ましい性質が賦与された変異株は、それぞれ取得してもよいが、これらの2種以上の性質を合わせ持つように変異処理とスクリーニングを繰り返すこともできる。また、1度の変異処理に対し、2種以上のスクリーニングを組み合わせると同時に2種以上の性質が賦与された変異株を取得してもよい。これらの2種以上の好ましい性質を有する変異株を本方法で使用してもよい。

[0050] 本方法に使用するカロテノイド産生細菌の例として挙げられるE-396株は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに以下の通り国際寄託されている。

[0051] 国際寄託当局：独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター
(旧名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所)
〒305-8566

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6

識別のための表示：E-396

受託番号：FERM BP-4283

原寄託日：平成5年(1993年)4月27日

また、本方法に使用するカロテノイド産生細菌の他の例として挙げられるA-581-1株は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに以下の通り国際寄託されている。

[0052] 国際寄託当局：独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター
(旧名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所)
〒305-8566

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6

識別のための表示：A-581-1

受託番号：FERM BP-4671

原寄託日：平成6年(1994年)5月20日

なお、ゼアキサンチン以外に本方法により産生されるカロテノイドとしては、特に限定されないが、例えば、 β -カロテン、 β -クリプトキサンチン、

アスタキサンチン、カンタキサンチン、アドニキサンチン、フェニコキサンチン、エキネノン、アステロイデノン、3-ヒドロキシエキネノン及びリコペンが挙げられ、好ましくは、 β -カロテン及び β -クリプトキサンチンが挙げられる。本方法により製造されるカロテノイドは一種でもよいし、複数種が組み合わされていてもよい。

[0053] 本方法において上記細菌を培養する方法を以下に説明する。

[0054] 本方法において培養に用いるゼアキサンチン生産用培地は、ビオチンが添加された培地であって、且つ、ゼアキサンチン産生細菌が生育し、ゼアキサンチンを生産するものであるならば何れでもよいが、炭素源、窒素源、無機塩類及び必要に応じてビタミン類等を含有する培地が好ましく用いられる。すなわち、本方法においてビオチンは、ゼアキサンチン産生細菌が生育し、ゼアキサンチンを産生し得る培地に添加される。

[0055] 炭素源としては、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、フルクトース、トレハロース、マンノース、マンニトール及びマルトース等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、プロピオン酸、リンゴ酸、マロン酸及びピルビン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、イソブタノール及びグリセノール等のアルコール類、大豆油、ヌカ油、オリーブ油、トウモロコシ油、ゴマ油及びアマニ油等の油脂類等が挙げられ、中でも好ましくはグルコース又はシュークロースが用いられる。これらの炭素源の中で、1種又は2種以上を用いることができる。培養前の培地(始発培地)に添加する炭素源の量は、炭素源の種類により異なり適宜調整すれば足りるが、通常、培地1L当たり1~100g、好ましくは2~50gである。また、炭素源は始発培地に添加するだけでなく、培養途中に逐次的又は連続的に追加供給することも好ましく行われる。

[0056] 無機窒素源としては、例えば硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩類、硝酸カリウム等の硝酸塩類、アンモニア及び尿素等が挙げられ、これらの中で、1種又は2種以上が用いられる。添加量は、窒素源の種類により異なり適宜調整すれば足

りるが、通常、培地1Lに対し0.1g~20g、好ましくは0.2~10gである。

[0057] 有機窒素源としては、例えば、コーンステープリカー(ろ過処理物を含む)、ファーマメディア、大豆粕、大豆粉、ピーナツミール、グルタミン酸ナトリウム、ディスティラーズソルブル及び乾燥酵母等が挙げられ、これらの中で、1種又は2種以上が用いられる。添加濃度は窒素源の種類により異なり適宜調整すれば足りるが、通常、培地において0~80g/L、好ましくは0~30g/Lである。

[0058] 無機窒素源及び有機窒素源は、通常始発培地に添加するが、逐次的又は連続的に追加供給することも好ましく行われる。

[0059] 無機塩類としては、例えば、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸水素二ナトリウム等のリン酸塩類、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム等のマグネシウム塩類、硫酸鉄、塩化鉄等の鉄塩類、塩化カルシウム、炭酸カルシウム等のカルシウム塩類、炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム等のナトリウム塩類、硫酸マンガン等のマンガン塩類、塩化コバルト等のコバルト塩類、硫酸銅等の銅塩類、硫酸亜鉛等の亜鉛塩類、モリブデン酸ナトリウム等のモリブデン塩類、硫酸ニッケル等のニッケル塩類、セレン酸ナトリウム等のセレン塩類、ホウ酸及びヨウ化カリウム等が挙げられ、これらの中で、1種又は2種以上が用いられる。添加量は無機塩の種類により異なり適宜調整すれば足りるが、通常、培地1Lに対し0.0001~15gである。リン酸塩類、マグネシウム塩類、カルシウム塩類、ナトリウム塩類及び鉄塩類では、培地における濃度は、0.02~15g/Lが好ましく、マンガン塩類、コバルト塩類、銅塩類、亜鉛塩類、モリブデン塩類、ニッケル塩類、セレン塩類、ホウ酸、ヨウ化カリウム等を加える場合には、0.1~15mg/Lが好ましい濃度である。無機塩類は通常始発培地に添加するが、逐次的又は連続的に追加供給してもよい。

[0060] ビオチン以外のビタミン類としては、例えば、シアノコバラミン、リボフラビン、パントテン酸、ピリドキシン、チアミン、アスコルビン酸、葉酸、ナイアシン、p-アミノ安息香酸、イノシトール、コリン等を用いることがで

きる。添加割合はビタミン類の種類により異なり適宜調整すれば足りるが、通常、培地1Lに対し0.001~1000mgであり、好ましくは0.01~100mgである。ビタミン類は通常始発培地に添加するが、逐次的又は連続的に追加供給してもよい。

[0061] 本方法の特徴は、ビオチンを添加した培地中でゼアキサンチン産生細菌を培養することである。ビオチン添加培地でゼアキサンチン産生細菌を培養することにより、グルコン酸濃度を低く抑えながらゼアキサンチンを高濃度に製造することができる。

[0062] 本方法で用いるビオチンは、DL-体でもD-体でも良いが、好ましくはD-体が用いられる。ビオチンは通常始発培地に添加するが、培養途中に間欠的又は連続的に添加してもよく、また、始発培地に添加した上でさらに培養途中に間欠的あるいは連続的に追加添加してもよい。ビオチンは主培地と混合して殺菌してもよいが、別に殺菌して添加してもよい。ビオチンの殺菌方法は特に限定されず、加熱殺菌でもろ過滅菌でもよい。

[0063] 添加するビオチンの培地当たりの濃度は、特に下限はないが、好ましくは0.001mg/L以上、より好ましくは0.005mg/L以上、さらに好ましくは0.01mg/L以上、特に好ましくは0.02mg/L以上である。また、ビオチンの添加濃度は、特に上限はないが、好ましくは50mg/L以下、より好ましくは20mg/L以下、さらに好ましくは10mg/L以下、特に好ましくは5mg/L以下、最も好ましくは2mg/L以下である。

[0064] 本方法において、培養液の発泡を抑えるために消泡剤が好ましく用いられる。消泡剤の種類は泡の発生を抑制するか又は発生した泡を消す作用があり、且つ生産菌に対する阻害作用の少ないものであれば何れでもよい。例えば、アルコール系消泡剤、ポリエーテル系消泡剤、エステル系消泡剤、脂肪酸系消泡剤、シリコン系消泡剤、スルホン酸系消泡剤等を例示することができる。消泡剤の添加量は、消泡剤の種類により異なり適宜調整すれば足りるが、通常、培地1Lに対し0.01g~10gである。

[0065] 消泡剤は通常殺菌前の始発培地に添加する。さらに、消泡剤を培養途中に

連続的又は間欠的に追加添加してもよい。培養途中に消泡剤を添加する方法としては、例えばセンサーで泡を感知して自動添加する方法、プログラムタイマーで一定時間ごとに添加する方法、生育速度に連動するようにフィード用炭素源、窒素源又はpH調整剤等と混合して添加する方法等が挙げられる。始発培地に添加する消泡剤と培養途中に培養液に添加する消泡剤とは同種でもよいが、作用に合わせて異なる種類を用いることもできる。

[0066] 本方法において、培養開始時の培地のpHは2~12、好ましくは6~9、より好ましくは6.5~8.0に調整する。培養中も上記範囲のpHを維持することが好ましい。pHを維持する方法として、発酵槽内に設置したpH電極で培養液のpHをオンラインで測定し、アルカリを自動供給する方法が好ましい。pH調整剤としては、例えば水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、アンモニア水、アンモニアガス、硫酸水溶液又はこれらの混合物が挙げられる。

[0067] 本方法において、培地は殺菌処理した後、細菌の培養に用いられる。殺菌処理は、当業者であれば、適宜行うことができる。例えば、適切な容器中の培地をオートクレーブで加熱滅菌すればよい。あるいは、滅菌フィルターによりろ過滅菌すればよい。あるいは、ジャケット加熱とスチーム吹き込みにより滅菌すればよい。グルコース等の炭素源は他の培地成分と一緒に加熱殺菌すると褐変するので別に殺菌してもよい。ビタミン類や微量の金属類は主培地と一緒に加熱殺菌しても良いが、失活や沈殿化を防ぐために別に殺菌しても良い。

[0068] 本方法において、ゼアキサンチン産生細菌は、上記のように調製されたビオチン添加培地に植菌され、所定の条件で培養される。植菌は、試験管、フラスコあるいは発酵槽等を用いたシード培養により菌株を適宜増やし、得られた培養液をゼアキサンチン生産用ビオチン添加培地に加えることで行う。シード培養に用いる培地は、ビオチンを添加した培地でも、ビオチンを添加していない培地でも、ゼアキサンチン産生細菌が良好に増殖する培地であれば特に限定されない。

- [0069] 培養は、適切な培養容器において行われる。培養容器は培養容量により適宜選択することができ、例えば、試験管、フラスコ、発酵槽等を挙げることができる。
- [0070] 培養温度は、例えば15～40℃、好ましくは20～35℃、より好ましくは25℃～32℃である。また、培養期間を通常1日～20日間、好ましくは2～12日間、より好ましくは3～9日間、特に好ましくは4～7日間とし、好気条件で培養を行う。
- [0071] 好気条件としては、例えば、振とう培養又は通気攪拌培養等が挙げられるが、酸素が不足すればゼアキサンチン産生細菌の生育やカロテノイド生産に悪影響があるので、溶存酸素濃度を溶存酸素電極で常にモニターすることが好ましく行われる。酸素が枯渇しないように溶存酸素濃度を制御するのが好ましい。溶存酸素濃度の制御は、例えば、攪拌回転数、通気量、内圧、通気気体中の酸素濃度等を変化させることにより行うことができる。
- [0072] 培養液中の溶存酸素濃度は好ましくは0.5ppm以上、より好ましくは1ppm以上、さらに好ましくは1.5ppm以上に制御する。培養液中の溶存酸素濃度の制御範囲の上限は特に限定されないが、好ましくは8ppm以下、より好ましくは7ppm以下、さらに好ましくは6ppm以下、特に好ましくは5ppm以下である。
- [0073] 本方法で用いられる細菌は、培養液中にグルコン酸を生成する。グルコン酸を生成すれば、その分、培地炭素源を無駄に消費することになり、また、著量のグルコン酸を蓄積すれば、生育やカロテノイド生産を阻害することになる。従って、グルコン酸の生成をできるだけ少なくすることがカロテノイドの生産には有効である。本方法では、培地にビオチンを添加することによりグルコン酸の生成量を減少させることができる。最終的に得られる培養終了後の培養液中のグルコン酸生産濃度は、好ましくは80g/L以下であり、より好ましくは60g/L以下、さらに好ましくは40g/L以下であり、特に好ましくは20g/L以下であり、非常に好ましくは10g/L以下であり、下限は0g/Lである。また、培養終了後において、消費炭素源当たりのグルコン酸生産量は、好ましくは30% (w/w) 以下であり、より好ましくは20% (w/w) 以下、さらに好ましく

は10% (w/w) 以下、特に好ましくは5% (w/w) 以下であり、下限はない。

[0074] 本方法では、培地にビオチンを添加するとPHB(ポリ-β-ヒドロキシ酪酸)の生成を抑制することができる。最終的に得られる培養終了後の培養液中の乾燥細胞当たりのPHB含量は、好ましくは30% (w/w) 以下であり、より好ましくは20% (w/w) 以下、さらに好ましくは10% (w/w) 以下、特に好ましくは5% (w/w) 以下であり、下限は0% (w/w) である。特に、培養終了後の培養液中の乾燥細胞当たりのPHB含量が30% (w/w) 以下である培養液は、飼料添加用として好適に利用することができる。

[0075] 本方法において、ゼアキサンチン産生細菌を培養して得られる培養液中のカロテノイド、又は培養液から採取されたカロテノイドの定量は、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより行うことができる。

[0076] 上記のようにゼアキサンチン産生細菌を培養し、得られる培養液は、カロテノイドとしてそのまま使用してもよく、あるいは、培養液から例えば培養上清、菌体濃縮物(菌体濃縮液)、湿菌体、乾燥菌体、菌体溶解物等を調製して、これら調製物を使用してもよい。さらには、これら培養液又は調製物からカロテノイドを抽出、精製等により採取することができる。

[0077] 培養上清は、培養液を遠心処理又はろ過処理することで、培養液から菌体を除いて調製すればよい。菌体濃縮物(菌体濃縮液)は、培養液を遠心分離、膜ろ過濃縮又はデカンテーションすることにより得ることができる。湿菌体は、培養液を遠心又はろ過することにより得ることができる。乾燥菌体は、培養液、湿菌体又は菌体濃縮物(菌体濃縮液)を一般的な乾燥方法によって乾燥させることにより得ることができる。

[0078] 菌体濃縮物を得る工程において培養液のpHは特に限定されないが、カロテノイドが沈降しやすくするために、培養液を酸性にしてもよい。酸性条件は酸性域であればいずれのpHでもよいが、好ましくはpH6.5以下、より好ましくはpH5.5以下、さらに好ましくはpH5.0以下である。

[0079] 菌体濃縮物の培養液に対する濃縮率は特に限定されないが、好ましくは1.5倍～10倍、さらに好ましくは2倍～6倍である。ここで濃縮率とは、例えば濃

縮率2倍であれば菌体濃縮物の体積が培養液の体積の2分の1になることを意味する。濃縮工程において、不要な成分の除去効果を高めるために水で培養液を希釈してから濃縮することも好ましく行われる。また、遠心分離、ろ過分離又はデカンテーション等の濃縮操作の最中に水を加えることも可能である。濃縮後に水を加えて、再度濃縮してもよい。希釈のために加える水の量に制限はないが、好ましくは培養液体積の0~10倍、より好ましくは0.2~6倍、さらに好ましくは0.3~3倍である。

- [0080] 遠心分離に用いる遠心分離機は連続式でもバッチ式でもよいが、好ましくは連続式が用いられる。遠心分離機のタイプとしては、例えばかご型、多室型、デカンター型、ディスク型(ノズル型、ディスラッジ型)、チューブラー型、ローター型の遠心分離機が挙げられる。
- [0081] ろ過分離に用いられる膜ろ過装置はスタティック型でもクロスフロー型でも良いが、目詰まりを防止しやすいクロスフロー型が好ましい。膜の材質は、例えばろ紙、ろ布、化学繊維、セラミック等を例示することができる。
- [0082] 乾燥の方法は特に限定されないが、例えば噴霧乾燥、流動乾燥、噴霧流動造粒乾燥、ドラム乾燥、凍結乾燥等が挙げられる。乾燥後に微粉末化するために、乾燥菌体を粉砕することも好ましく行われる。粉砕の方法は特に限定されないが、例えばビータミル、ハンマーミル、ボールミル、ビーズミル等が挙げられる。
- [0083] このようにして得られたカロテノイド含有乾燥菌体組成物をそのまま飼料用又は食品用の添加物として用いることができる。
- [0084] 乾燥菌体組成物当たりのゼアキサンチン含量は、好ましくは2mg/g以上であり、より好ましくは4mg/g以上、さらに好ましくは6mg/g以上である。上限は特にないが、好ましくは50mg/g以下であり、より好ましくは40mg/g以下、さらに好ましくは30mg/g以下である。
- [0085] 本方法において、カロテノイドを上記培養液又は調製物から採取する方法は、特に限定されず、カロテノイドが安定に効率よく回収されるいずれの方法でもよい。これらの方法は、当業者であれば公知の抽出や精製技術から適

宜選択して行うことができる。

- [0086] また、抽出を行う前に、培養液又は調製物を、アルカリ試薬や界面活性剤等を用いた化学的処理、溶菌酵素、脂質分解酵素及びタンパク分解酵素等を用いた生化学処理、又は超音波若しくは粉碎等の物理的処理の中で、1つ又は2つ以上の処理に供してもよい。
- [0087] 例えば、カロテノイドを培養液又は調製物から抽出する場合、抽出及び洗浄に用いる溶媒としては、特に限定されないが、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール等の低級アルコール類、アセトン、テトラヒドロフラン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン、ジクロロメタン、クロロフォルム、ジメチルフォルムアミド、ジメチルスルフォキシド等が挙げられる。
- [0088] 抽出操作中のカロテノイドの酸化を極力防止したい場合には、窒素ガス等の不活性ガス雰囲気下で処理を行えばよい。また、医薬品や食品で用いられている酸化防止剤を選択して、適宜抽出溶媒に加えてもよい。あるいは、これらの処理を組み合わせてもよい。
- [0089] また、光によるカロテノイドの分解を極力防止するために、光を当てない条件下で抽出を行ってもよい。
- [0090] このように得られた抽出物をカロテノイドとしてそのまま用いることが可能であり、さらに精製して使用することもできる。
- [0091] 抽出操作後の抽出液等の抽出物から細菌等を分離する方法としては、特に限定されないが、例えば膜濾過、遠心分離、デカンテーション等が挙げられる。
- [0092] 抽出物からカロテノイド沈殿物を得る方法としては、一般的には加熱及び/又は減圧濃縮や晶析が挙げられる。この他、低温におけるカロテノイド色素の析出、酸・アルカリ薬剤や各種塩類による析出によってカロテノイド色素を濃縮せずに分離してもよい。工業的に用いる場合には、晶析することが望ましい。
- [0093] 得られたカロテノイド沈殿物は、洗浄のため必要に応じて少量の低級アル

コール類等の溶媒を用いて懸濁攪拌させてもよい。

[0094] 洗浄の手法は特に限定されないが、例えば、懸濁攪拌後に濾取する方法又は沈殿物の上から通液する方法等が実用的に好ましい方法として挙げられる。

[0095] 上記のように得られる培養液、調製物、抽出物又は精製物は、カロテノイドとしてそれぞれ単独で用いることもできるし、あるいはこれらを任意の割合で混合して用いることもできる。

実施例

[0096] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

[0097] なお、実施例におけるカロテノイド類の定量は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて以下のように行った。

[0098] カラムはInertsil SIL-100A, 5 μ m(ϕ 4.6 $\times$ 250mm) (GLサイエンス製)を2本連結して使用した。溶出は、移動相であるn-ヘキサン/テトラヒドロフラン/メタノール混合液(40:20:1)を室温付近一定の温度にて毎分1.0mL流すことで行った。測定においては、サンプルをテトラヒドロフランで溶解し、移動相にて100倍希釈した液20 μ Lを注入量とし、カラム溶離液の検出は波長470nmで行った。また、定量のための標準品としては、EXTRASYNTHES社製ゼアキサンチン(Cat. No. 0307 S)を用いた。標準液のゼアキサンチン濃度の設定は、標準液の453nmの吸光度(A)及び上記条件でHPLC分析を行ったときのゼアキサンチンピークの面積百分率%(B)を測定した後に、以下の式を用いて行った。

[0099] ゼアキサンチンの濃度(mg/L) = $A \div 2327 \times B \times 100$

〔実施例1〕

Paracoccus carotinifaciens E-396株(FERM BP-4283)をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで変異処理し、黄色～橙色のコロニーを選択した。選択された株の培養液中のカロテノイド濃度を測定し、ゼアキサンチン生産能が高い変異株ZX-3株を選択した。

[0100] 以下の組成の培地(シュークロース30g/L、コーンステープリカー30g/L、

リン酸二水素カリウム1.5g/L、リン酸水素二ナトリウム12水和物3.8g/L、塩化カルシウム2水和物5.0g/L、硫酸マグネシウム7水和物0.7g/L、硫酸鉄7水和物0.3g/L、pH7.2) 100mlを、500ml容量の綿栓付き三角フラスコに入れ、121°Cで20分間オートクレーブ殺菌し、シード用フラスコ培地を7本調製した。

[0101] 次に、以下の組成の培地(グルコース20g/L、コーンステイープリカー30g/L、硫酸アンモニウム0.5g/L、リン酸二水素カリウム2.25g/L、リン酸水素二ナトリウム12水和物5.7g/L、塩化カルシウム2水和物0.1g/L、硫酸マグネシウム7水和物0.5g/L、硫酸鉄7水和物5g/L、アルコール系消泡剤0.5g/L) 2.0Lを5L容量の発酵槽に入れ、これを7基準備した。当該発酵槽にD-ビオチンをそれぞれ0、0.001、0.01、0.1、1.0、10及び50mg/Lになるように添加し、121°Cで40分間オートクレーブ殺菌した。

[0102] 前述のParacoccus属ゼアキサンチン産生細菌ZX-3株を、上記シード用フラスコ培地に一白金耳植菌し、29°Cで2日間、100rpmで回転振とう培養を行った後、その培養液80mLを各上記発酵槽に植菌した。29°C、通気量1vvmの好気培養を120時間行った。培養中のpHが7.1を維持するように15%アンモニア水で連続的にpHを制御した。グルコースは枯渇しないように連続的にフィードした。また、最低攪拌回転数を100rpmとし、培養中期(微生物の酸素消費が最も活発な時期)における培養液中の溶存酸素濃度が2ppmを維持するように攪拌回転数を変化させた。気泡センサーで発泡を感知することによりアルコール系消泡剤を自動添加して発泡を抑えた。

[0103] 培養終了時の培養液のカロテノイド濃度、グルコン酸濃度及び乾燥細胞当たりのPHB含量を測定したところ、結果は表1に示す通りであった。ビオチンを0.001~50mg/L添加した実験区では、ビオチンを添加していない区に比較してゼアキサンチン濃度が高く、グルコン酸濃度が低いことが分かった。なお、表1における「対糖グルコン酸収率%(w/w)」は、消費したグルコースの総量に対する培養終了時のグルコン酸生成量の比率を意味する。

[表1]

ビオチン濃度 mg/L	0	0.001	0.01	0.1	1	10	50
β-カロテン mg/L	1.9	1.8	2.0	2.0	2.3	2.1	2.3
β-クリプトキサンチン mg/L	0.4	0.5	0.6	0.6	0.5	0.5	0.6
ゼアキサンチン mg/L	14.2	23.8	25.4	27.3	28.0	27.8	27.6
グルコン酸 g/L	122	75	58	44	43	24	36
対糖グルコン酸収率%(w/w)	49	27	20	17	16	10	13
PHB%(w/w)	35	26	22	25	23	27	24

[0104] [実施例 2]

Paracoccus属細菌A-581-1株(FERM BP-4671)をエチルメタンスルホネートにより変異処理し、黄色のコロニーを選択した。選択された株の培養液中のカロテノイドを分析し、ゼアキサンチンを産生する変異株ZX-5株を選択した。

[0105] 以下の組成の培地(シュクロース30g/L、コーンステープリカー30g/L、リン酸二水素カリウム1.5g/L、リン酸水素二ナトリウム12水和物3.8g/L、塩化カルシウム2水和物5.0g/L、硫酸マグネシウム7水和物0.7g/L、硫酸鉄7水和物0.3g/L、pH7.2)100mlを、500ml容量の綿栓付き三角フラスコに入れ、121℃で20分間オートクレーブ殺菌し、シード用フラスコ培地を2本調製した。

[0106] 次に、以下の組成の培地(シュクロース40g/L、コーンステープリカー30g/L、硫酸アンモニウム0.5g/L、リン酸二水素カリウム2.25g/L、リン酸水素二ナトリウム12水和物5.7g/L、塩化カルシウム2水和物0.1g/L、硫酸マグネシウム7水和物0.5g/L、硫酸鉄7水和物5g/L、アルコール系消泡剤0.5g/L)2.0Lを5L容量の発酵槽に入れ、これを2基準備した。当該発酵槽にD-ビオチンをそれぞれ0及び1.0mg/Lになるように添加し、121℃で30分間オートクレーブ殺菌した。

[0107] 上述のParacoccus属ゼアキサンチン産生株ZX-5株を、上記シード用フラスコ培地に一白金耳植菌し、28℃で2日間、100rpmで回転振とう培養を行った後、その培養液80mLを各上記発酵槽に植菌した。28℃、通気量1vvmの好気培養を140時間行った。培養中のpHが7.2を維持するように15%アンモニア水で連続的にpHを制御した。シュクロースは枯渇しないように逐次添加した。ま

た、最低攪拌回転数を200rpmとし、培養中期における培養液中の溶存酸素濃度が1ppmを維持するように攪拌回転数を変化させた。気泡センサーで発泡を感知することによりシリコン系消泡剤を自動添加して発泡を抑えた。

[0108] 培養終了時の培養液のカロテノイド濃度、グルコン酸濃度及び乾燥細胞当たりのPHB含量を測定したところ、結果は表2に示す通りであった。ビオチンを添加すると無添加に比較して高いゼアキサンチン濃度を示し、グルコン酸濃度は低くなった。なお、表2における「対糖グルコン酸収率%(w/w)」は、消費したシュクロースの総量に対する培養終了時のグルコン酸生成量の比率を意味する。

[表2]

ビオチン濃度	0	1mg/L
β-カロテン mg/L	0.4	0.6
β-クリプトキサンチン mg/L	0.1	0.2
ゼアキサンチン mg/L	5.3	9.8
グルコン酸 g/L	96	33
対糖グルコン酸収率%(w/w)	36	12
PHB%(w/w)	25	13

[0109] [実施例3]

以下の組成の培地(シュクロース30g/L、コーンステイープリカー30g/L、リン酸二水素カリウム1.5g/L、リン酸水素二ナトリウム12水和物3.8g/L、塩化カルシウム2水和物5.0g/L、硫酸マグネシウム7水和物0.7g/L、硫酸鉄7水和物0.3g/L、pH7.2) 100mlを、500ml容量の綿栓付き三角フラスコに入れ、121℃で20分間オートクレーブ殺菌し、シード用フラスコ培地を調製した。

[0110] 次に、以下の組成の培地(グルコース30g/L、コーンステイープリカー30g/L、硫酸アンモニウム0.5g/L、リン酸二水素カリウム2.25g/L、リン酸水素二ナトリウム12水和物5.7g/L、塩化カルシウム2水和物0.1g/L、硫酸マグネシウム7水和物0.5g/L、硫酸鉄7水和物5g/L、L-グルタミン酸ナトリウム1水和物6g/L、アルコール系消泡剤0.5g/L) 2.0Lを5L容量の発酵槽に入れ、これを2基準備した。当該発酵槽にD-ビオチンをそれぞれ0及び0.1mg/Lになるように添加し

、121℃で30分間オートクレーブ殺菌した。

[0111] *Paracoccus zeaxanthinifaciens* ATCC 21588株を、上記シード用フラスコ培地に一白金耳植菌し、27℃で2日間、100rpmで回転振とう培養を行った後、その培養液80mLを各上記発酵槽に植菌した。27℃、通気量1vvmの好気培養を120時間行った。培養中のpHが7.2を維持するように15%アンモニア水で連続的にpHを制御した。グルコースは枯渇しないように連続的に供給した。また、最低攪拌回転数を100rpmとし、培養中期における培養液中の溶存酸素濃度が3ppmを維持するように攪拌回転数を変化させた。気泡センサーで発泡を感知することによりアルコール系消泡剤を自動添加して発泡を抑えた。

[0112] 培養終了時の培養液のカロテノイド濃度、グルコン酸濃度及び乾燥細胞当たりのPHB含量を測定したところ、結果は表3に示す通りであった。ビオチンを添加すると無添加に比較して高いゼアキサンチン濃度、低いグルコン酸濃度を示した。なお、表3における「対糖グルコン酸収率%(w/w)」は、消費したグルコースの総量に対する培養終了時のグルコン酸生成量の比率を意味する。

[表3]

ビオチン濃度	0	0.1mg/L
β-カロテン mg/L	0.3	0.5
β-クリプトキサンチン mg/L	0.1	0.2
ゼアキサンチン mg/L	4.4	7.3
グルコン酸 g/L	116	61
対糖グルコン酸収率%(w/w)	48	26
PHB%(w/w)	33	18

[0113] [実施例4]

Paracoccus carotinifaciens E-396株(FERM BP-4283)を紫外線照射で変異処理し、黄色～橙色のコロニーを選択した。選択した菌株を試験管で培養し、培養液のpH低下が少ない変異株を選抜した。選抜された変異株の試験管培養液中のグルコン酸濃度及びカロテノイド濃度を測定し、グルコン酸生産能が低く、且つゼアキサンチン生産能が高い変異株ZX-6株を選択した。

- [0114] 以下の組成の培地(シュクロース30g/L、ファーマメディア10g/L、リン酸二水素カリウム0.8g/L、リン酸水素ナトリウム4.2g/L、塩化カルシウム2水和物1g/L、硫酸マグネシウム7水和物12g/L、硫酸鉄7水和物1g/L、pH7.2)100mlを、500ml容量の綿栓付き三角フラスコに入れ、121℃で20分間オートクレーブ殺菌し、シード用フラスコ培地を調製した。
- [0115] 次に、以下の組成の培地(シュクロース30g/L、ファーマメディア20g/L、硫酸アンモニウム1.5g/L、リン酸二水素カリウム1.5g/L、リン酸水素ナトリウム12水和物3.8g/L、塩化カルシウム2水和物0.1g/L、硫酸マグネシウム7水和物4.5g/L、硫酸鉄7水和物5g/L、L-グルタミン酸ナトリウム1水和物6g/L、シリコン系消泡剤1g/L)2.0Lを5L容量の発酵槽に入れ、これを2基準備した。当該発酵槽にD-ビオチンをそれぞれ0及び5mg/Lになるように添加し、121℃で30分間オートクレーブ殺菌した。
- [0116] 上記で選抜したParacoccus属ゼアキサンチン産生且つ低グルコン酸生成細菌ZX-6株を、上記シード用フラスコ培地に一白金耳植菌し、28℃で3日間、100rpmで回転振とう培養を行った後、その培養液80mLを各上記発酵槽に植菌した。28℃、通気量1vvmの好気培養を120時間行った。培養中のpHが7.2を維持するように25%アンモニア水で連続的にpHを制御した。シュクロースは枯渇しないように連続的に供給した。また、最低攪拌回転数を100rpmとし、攪拌回転数を変化させることにより培養液中の溶存酸素濃度を4ppmに制御した。一定間隔で一定量の脂肪酸系消泡剤を自動添加することにより気泡の発生を抑えた。
- [0117] 上記2条件で培養を行い、培養終了時(120時間)のカロテノイド濃度、グルコン酸濃度及び乾燥細胞当たりのPHB含量を測定した。結果を表4に示す。ビオチンを添加すると無添加に比較して高いゼアキサンチン濃度及び低いグルコン酸濃度を示した。なお、表4における「対糖グルコン酸収率%(w/w)」は、消費したシュクロースの総量に対する培養終了時のグルコン酸生成量の比率を意味する。

[表4]

ビオチン濃度	0	5mg/L
β-カロテン mg/L	2.7	3.0
β-クリプトキサンチン mg/L	0.9	1.2
ゼアキサンチン mg/L	52.5	89.1
グルコン酸 g/L	22	0
対糖グルコン酸収率%(w/w)	12	0
PHB%(w/w)	33	19

[0118] [実施例 5]

Paracoccus carotinifaciens E-396株 (FERM BP-4283) をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで変異処理し、赤色の濃いコロニーを選択した。選択した菌株を試験管で培養し、PHB含量及びカロテノイド濃度を測定し、PHB生産能が低く、且つアスタキサンチン生産能が高い変異株LP-26株を選択した。次にLP-26株をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで変異処理し、黄色～橙色のコロニーを選択した。選択した菌株を試験管で培養し、PHB含量及びカロテノイド濃度を測定し、PHB生産能が低く、且つゼアキサンチン生産能が高い変異株ZXA-7株を選択した。

[0119] 以下の組成の培地(シュクロース20g/L、コーンスティープリカー5g/L、リン酸二水素カリウム0.54g/L、リン酸水素二カリウム2.78g/L、塩化カルシウム2水和物5g/L、硫酸マグネシウム7水和物0.7g/L、硫酸鉄7水和物3g/L、pH 7.2) 100mlを、500ml容量の綿栓付き三角フラスコに入れ、121℃で20分間オートクレーブ殺菌し、シード用フラスコ培地を調製した。

[0120] 次に、以下の組成の培地(グルコース40g/L、コーンスティープリカー30g/L、硫酸アンモニウム0.5g/L、リン酸二水素カリウム2.25g/L、リン酸水素二ナトリウム12水和物5.7g/L、塩化カルシウム2水和物0.1g/L、硫酸マグネシウム7水和物0.5g/L、硫酸鉄7水和物5g/L、L-グルタミン酸ナトリウム1水和物6g/L、アルコール系消泡剤0.5g/L) 2.0Lを5L容量の発酵槽に入れたものを準備した。当該発酵槽にD-ビオチンをそれぞれ0及び0.5mg/Lになるように添加し、121℃で20分間オートクレーブ殺菌した。

[0121] 上述のPHB低生産且つゼアキサンチン高生産のParacoccus属細菌ZXA-7株を、上記シード用フラスコ培地に一白金耳植菌し、27℃で2日間、150rpmで回転振とう培養を行った後、その培養液80mLを上記発酵槽に植菌した。27℃、通気量1vvmの好気培養を120時間行った。培養中のpHが7.1を維持するように15%アンモニア水で連続的にpHを制御した。グルコースは枯渇しないように連続的に供給した。また、最低攪拌回転数を200rpmとし、攪拌回転数を変化させることにより培養中期における培養液中の溶存酸素濃度を6ppmに制御した。気泡センサーで発泡を感知することによりエステル系消泡剤を自動添加して発泡を抑えた。

[0122] 培養終了時のカロテノイド濃度、グルコン酸濃度及び乾燥細胞当たりのPHB含量を測定した結果を表5に示す。ビオチンを添加した場合には無添加の場合に比較して高いゼアキサンチン生産性を示した。なお、表5における「対糖グルコン酸収率%(w/w)」は、消費したグルコースの総量に対する培養終了時のグルコン酸生成量の比率を意味する。

[表5]

ビオチン濃度	0	0.5mg/L
β-カロテン mg/L	14	19
β-クリプトキサンチン mg/L	8	5
ゼアキサンチン mg/L	182	371
グルコン酸 g/L	84	35
対糖グルコン酸収率%(w/w)	34	14
PHB%(w/w)	25	5

[0123] [実施例 6]

実施例 1 で取得したゼアキサンチン生産変異株ZX-3株を用いて、実施例 1 と同じ培養条件下で、D-ビオチンの添加濃度を1mg/Lとして5L発酵槽で120時間の培養を行った。

[0124] 得られた培養液を硫酸でpH4.5に合わせて遠心分離し、得られた濃縮物に濃縮前の培養液と同体積になるように水を加えて懸濁した後、再度遠心分離を行った。次いで、濃縮物を凍結乾燥して菌体乾燥物を取得した。

[0125] 得られた菌体乾燥物当たりのゼアキサンチン含量は4.1mg/gであった。一方、比較のためにビオチンを添加しないで同様に培養及び乾燥して得られた菌体乾燥物当たりのゼアキサンチン含量は1.3mg/gであった。

[0126] 〔実施例 7〕

実施例 2 で得られたゼアキサンチン生産変異株 ZX-5 株を用いて、D-ビオチン添加濃度を 1mg/L として実施例 2 と同じ培養条件下で 5L 発酵槽における培養を行った。

[0127] 得られた培養液をマイクロザ精密ろ過膜 (旭化成ケミカルズ製) で 4 倍に濃縮し、濃縮液と等量の水を加えてさらにろ過濃縮した。得られた濃縮物をドラムドライヤーで乾燥し、菌体乾燥物を取得した。

[0128] 得られた菌体乾燥物当たりのゼアキサンチン含量は 2.0mg/g であった。

[0129] 〔実施例 8〕

実施例 4 において D-ビオチン添加濃度 5mg/L として 5L 容量の発酵槽における培養で得られた培養液を、80℃ で 30 分間殺菌処理した。次いで、培養液に硫酸を加えて pH を 4.6 に合わせ、培養液と等量の水を加えた後、遠心分離を行い、6 倍に濃縮した。

[0130] 濃縮物をスプレードライヤーで乾燥して得られた菌体乾燥物当たりのゼアキサンチン含量は 6.6mg/g であった。

[0131] 〔実施例 9〕

実施例 5 において D-ビオチンを 0.5mg/L となるように添加して得られた培養液を、クロスフロー型セラミックフィルターで 2.2 倍にろ過濃縮し、濃縮液と等量の水を加えた後、再度ろ過して濃縮液を取得した。

[0132] この濃縮液をドラム乾燥して得られた菌体乾燥物当たりのゼアキサンチン含量は 24mg/g であった。

[0133] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] ゼアキサンチンを含むカロテノイドを生産する細菌をビオチン含有培地で培養する工程を含み、ビオチン非含有培地における培養終了後の培養液と比較して、培養終了後の培養液におけるグルコン酸生産濃度が低く、且つゼアキサンチン生産濃度が高いことを特徴とする、ゼアキサンチンを含むカロテノイドを製造する方法。
- [請求項2] 培養終了後の培養液におけるグルコン酸生産濃度が80g/L以下であることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 培養終了後の培養液におけるグルコン酸生産量が消費した炭素源の30% (w/w) 以下であることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項4] 生産されたカロテノイドが β -クリプトキサンチンを含有することを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項5] 生産されたカロテノイドが β -カロテンを含有することを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項6] ビオチンの培地当たりの濃度が0.001mg/L～50mg/Lであることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項7] 培養終了後の培養液における乾燥菌体当たりのゼアキサンチン含量が2mg/g以上であることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項8] 培養終了後の培養液における乾燥細胞当たりのポリ- β -ヒドロキシ酪酸(PHB)含量が30% (w/w) 以下であることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項9] 細菌がパラコッカス(Paracoccus)属に属する細菌であることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項10] 細菌がアスタキサンチンを産生するパラコッカス属細菌を変異処理してゼアキサンチンを産生するようにした変異株であることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項11] 細菌が親株と比較してグルコン酸生産能を低下させた変異株であることを特徴とする、請求項1記載の方法。

- [請求項12] 細菌が親株と比較してPHB生産能を低下させた変異株であることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項13] 細菌が、16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1記載の塩基配列と実質的に相同である細菌であることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項14] 細菌が、E-396株(FERM BP-4283)又はA-581-1株(FERM BP-4671)に由来する変異株であることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項15] 請求項1記載の方法により製造されたゼアキサンチンを含むカロテノイドを含有するカロテノイド組成物であって、培養終了後の培養液における乾燥細胞当たりのPHB含量が30% (w/w) 以下であることを特徴とする、前記組成物。
- [請求項16] 請求項1記載の方法により得られた培養液を乾燥することにより製造されたゼアキサンチンを含むカロテノイド含有乾燥菌体組成物であって、該組成物当たりのゼアキサンチン含量が2mg/g以上であることを特徴とする、前記組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/057794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P23/00(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, C12N15/09(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)

C12P23/00, A23K1/16, C12N15/09

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 48-049989 A (Societe des Produits Nestle S.A.), 14 July 1973 (14.07.1973), & US 3841967 A & GB 1385274 A & DE 2252364 A & FR 2158296 A & BE 790289 A & BE 790289 A1	1-16
A	JP 05-508532 A (Applied Food Biotechnology, Inc.), 02 December 1993 (02.12.1993), & JP 11-206339 A & JP 2887848 B & US 5308759 A & US 5427783 A & EP 534955 A & WO 1991/003571 A1	1-16

☒ 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
10 June, 2011 (10.06.11)

Date of mailing of the international search report
21 June, 2011 (21.06.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/057794

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 09-023888 A (F. Hoffmann-LA Roche AG.), 28 January 1997 (28.01.1997), & JP 9-23888 A & US 6087152 A & US 6124113 A & US 6207409 B1 & US 6613543 B2 & EP 747483 A2	1-16
A	JP 2005-087097 A (Nippon Oil Corp.), 07 April 2005 (07.04.2005), & US 2007/0105189 A1 & EP 1676925 A1 & WO 2005/028661 A1	1-16
A	JP 2008-118525 A (Tosoh Corp.), 24 January 2008 (24.01.2008), & US 2008/0107060 A1 & EP 1921794 A2 & KR 10-2008-0041569 A & CN 101179496 A	1-16
P,A	JP 2010-172293 A (Nippon Oil Corp.), 12 August 2010 (12.08.2010), & WO 2010/087400 A1	1-16
P,A	JP 2010-193865 A (JX Nippon Oil & Energy Corp.), 09 September 2010 (09.09.2010), & WO 2010/098484 A1	1-16
P,A	WO 2010/044469 A1 (Nippon Oil Corp.), 22 April 2010 (22.04.2010), (Family: none)	1-16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12P23/00(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, C12N15/09(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（I P C））

Int.Cl. C12P23/00, A23K1/16, C12N15/09

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 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）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii

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
A	JP 48-049989 A（ソシエテ、デ、プロデュイ、ネツスル、ソシエテ、アノニム）1973.07.14, & US 3841967 A & GB 1385274 A & DE 2252364 A & FR 2158296 A & BE 790289 A & BE 790289 A1	1-16
A	JP 05-508532 A（アプライド フード バイオテクノロジー、インコーポレイテッド）1993.12.02, & JP 11-206339 A & JP 2887848 B & US 5308759 A & US 5427783 A & EP 534955 A & WO 1991/003571 A1	1-16

☒ 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

1 0 . 0 6 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 6 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / 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）

太田 雄三

4 B

3 9 5 9

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
A	JP 09-023888 A (エフ・ホフマンーラ ロシュ アーゲー) 1997.01.28, & JP 9-23888 A & US 6087152 A & US 6124113 A & US 6207409 B1 & US 6613543 B2 & EP 747483 A2	1-16
A	JP 2005-087097 A (新日本石油株式会社) 2005.04.07, & US 2007/0105189 A1 & EP 1676925 A1 & WO 2005/028661 A1	1-16
A	JP 2008-118525 A (東ソー株式会社) 2008.01.24, & US 2008/0107060 A1 & EP 1921794 A2 & KR 10-2008-0041569 A & CN 101179496 A	1-16
P, A	JP 2010-172293 A (新日本石油株式会社) 2010.08.12, & WO 2010/087400 A1	1-16
P, A	JP 2010-193865 A (J X 日鉱日石エネルギー株式会社) 2010.09.09, & WO 2010/098484 A1	1-16
P, A	WO 2010/044469 A1 (新日本石油株式会社) 2010.04.22, (ファミリーなし)	1-16

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. 提出手段

☐ 紙形式

☒ 電子形式

b. 提出時期

☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：