

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4674657号
(P4674657)

(45) 発行日 平成23年4月20日 (2011.4.20)

(24) 登録日 平成23年2月4日 (2011.2.4)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
C O 2 F 3/34 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 D
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 F
C 1 2 R 1/01 (2006.01)	C O 2 F 3/34 Z A B Z
	C 1 2 N 1/00 R
請求項の数 10 (全 11 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2000-341325 (P2000-341325)	(73) 特許権者	591007826
(22) 出願日	平成12年11月9日 (2000.11.9)		イエフベ エネルギ ヌヴェル
(65) 公開番号	特開2001-186873 (P2001-186873A)		I F P E N E R G I E S N O U V E L
(43) 公開日	平成13年7月10日 (2001.7.10)		L E S
審査請求日	平成19年11月6日 (2007.11.6)		フランス国 9 2 8 5 2 リュエイユ マ
(31) 優先権主張番号	9914212		ルメゾン セデックス アヴニユ ド ボ
(32) 優先日	平成11年11月9日 (1999.11.9)		ワーブレオ 1 エ 4
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100060874
			弁理士 岸本 瑛之助
微生物の受託番号	CIP 1-2052	(74) 代理人	100024418
微生物の受託番号	CIP 1-2053		弁理士 岸本 守一
微生物の受託番号	CIP 1-1889	(74) 代理人	100079038
			弁理士 渡邊 彰
		(74) 代理人	100083149
			弁理士 日比 紀彦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 第3ブタノールまたは第3アミルアルコールの存在下でのBURKHOLDERIA CEPACIAの産生方法、産生した接種体、並びにこれらアルコールの分解方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの窒素源、第3ブタノール (T B A) および / または第3アミルアルコール (T A A) を含む培地の存在下に、空気または酸素の存在下に、Burkholderia cepacia CIP 1-2052を培養し、培養物を回収する前記バクテリアの産生方法において、前記培地が、少なくとも1つのコバルト塩を含むことを特徴とする、産生方法。

【請求項 2】

塩が、塩化物イオン、硫酸塩イオン、硝酸塩イオンおよびそれらの混合物からなる群から選ばれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

コバルト塩が、塩化コバルト・六水塩である、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

塩が、培地中の最終濃度 0 . 0 1 ~ 4 m g / リットル、好ましくは 0 . 0 5 ~ 0 . 1 m g / リットルで導入される、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 5】

第3ブタノールまたは第3アミルアルコールの濃度が 0 . 0 0 1 ~ 1 0 g / 培地 1 リットルである、請求項 1 ~ 4 のうちのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

前記バクテリアが、混合培養で使用される、請求項 1 ~ 5 のうちのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

コバルトが、2 価である、請求項 1 ~ 6 のうちのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のうちのいずれか 1 項記載の方法により産生された Burkholderia cepacia CIP 1-2052 を含む培養物。

【請求項 9】

好氣的条件下に請求項 8 記載の、あるいは請求項 1 ~ 7 のうちのいずれか 1 項記載の方法により産生された Burkholderia cepacia CIP 1-2052 の培養物を培養する、水性流出物中に含まれる第 3 ブタノールおよび/または第 3 アミルアルコールの分解方法。

【請求項 10】

第 3 ブタノールは、メチル第 3 ブチルエーテルとエチル第 3 ブチルエーテルとの分解産生質であり、また第 3 アミルアルコールは、第 3 アミルメチルエーテルの分解産生質であり、これらの分解は、好氣的条件下に Gordona terrae CIP 1-1889 と Rhodococcus equi CIP 1-2053 とからなる群から選ばれる少なくとも 1 つのバクテリアによるものである、請求項 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物、ブルクホルデリア セパシア (Burkholderia cepacia) (旧 シュードモナス セパシア Pseudomonas cepacia) CIP 1-2052 の産生方法、産生された接種体、および例えばエーテル・燃料と呼ばれるエーテルの分解の際に産生されたアルコールが水性流出物中に含まれる場合、該アルコールを分解するための方法におけるその適用に関する。これらのエーテルは、次の通りである：以下において用語 E T B E で指定されるエチル第 3 (tert-)ブチルエーテル、以下において用語 M T B E で指定されるメチル第 3 ブチルエーテルまたは以下において用語 T A M E で指定される第 3 アミルメチルエーテルである。分解の際に産生されたアルコールは、以下において用語 T B A で指定される第 3 ブタノールまたは以下において用語 T A A で指定される第 3 アミルアルコールである。

【0002】

本発明は、特に水処理産業に適用される。

【0003】

【従来の技術】

先行技術は、文献「Transformation of carbon tetrachloride by *Pseudomonas* sp; strain KC under denitrification conditions」Appl. Environ. Microbiol.; 56 巻、11 号、1990 年 11 月 (1990 - 11)、頁 3240 ~ 3246 と、ヨーロッパ特許 E P - 0237002 A、フランス特許 F R - 2735497 A およびフランス特許 F R - 2766478 とによって説明されている。

【0004】

T B A および T A A は、それぞれ、M T B E および E T B E と、T A M E の各々エーテルからの分解産生物である。これらエーテルは、オクタン価を高めるために、ガソリン中への添加剤として実際に使用されているか、あるいは使用されうるものである。例えば M T B E は 10 ~ 15 % (v/v) の割合でガソリンに添加されるので、該エーテルの使用量は大量である。従って、帯水層 (aquifer) 中でのこれらエーテルの存在は、次第にしばしば留意されるものである (Andrews C., 1998 年、「MTBE-A Long-Term Threat to Ground Water Quality」、Ground Water、36 : 705 - 706)。従って、例えば、帯水層中でのこれらエーテル・燃料の微生物による、自由に使用できる限定された酸素への部分分解は、二次的汚染物質として T B A および T A A の堆積をまねくおそれがある。

【0005】

さらに、T B A および T A A は、それら自体、オクタン価を高めるためにガソリン中への添加剤として使用されてよい。この場合、その使用は、第 1 汚染物質として環境中にその分散を誘発するものである。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

飲料水の供給に役立つ薄層状帯水層の水中に、あるいは精製ステーションに到着する残留水の中に T B A または T A A が存在するため、これらアルコールを分解することのできる特定の微生物の使用が必要とされる。該アルコールは、その分枝状構造により微生物分解に相対的に耐性である。

【 0 0 0 7 】

米国特許 U S - 4 8 5 5 0 5 1 によれば、土から単離されたバクテリア、B. coagulants ATCC 53595、A. globiformis ATCC 53596 および P. stutzeri ATCC 53602 は、無機系の最小培地に添加された T B A を分解することが可能である。さらに、米国特許 U S 5 8 1 1 0 1 0 によれば、バクテリア consortia は T B A を分解することが可能であるが、それら

10

【 0 0 0 8 】

本出願人は、炭素源として、および、T B A を二酸化炭素（無機元素含有状態）まで分解することによるエネルギー源として、T B A を使用する能力を有する好氣的バクテリア Burkholderia cepacia CIP I-2052 を単離した。このバクテリアは、Institut Pasteur collection (CNCM [Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, National Collection for Microorganism cultures], 25, rue du Docteur-Roux, F-75724 PARIS) に本出願人により寄託されている。本出願人のフランス特許出願 F R - 2 7 6 6 4 7 8 によれば、このバクテリアは、炭素源として、および、E T B E を T B A の段階まで分解することによるエネルギー源として、E T B E を使用することが可能なバクテリアと共に混合培養で使用されてよい。ついで、該 T B A は、培地中に堆積する。これは、こうして産生された T B A に作用する能力をもった Burkholderia cepacia CIP I-2052 の接種体の添加により、流出物中の E T B E の完全分解を行うことが可能になるからである。一般に、この基質に関するこれら微生物のインキュベーション期間は長く、例えば T B A の約 7 0 0 m g / リットルを分解させるために 4 0 0 時間必要である。工業的スケールでは充分な量のバイオマスを生産することが必須であることが明らかになる。

20

【 0 0 0 9 】

【 発明の開示 】

本発明の目的は、バクテリア Burkholderia cepacia CIP I-2052 の培地の改良について記載することである。この改良により、培地中に単独または混合物状でコバルト塩を添加することによって、炭素とエネルギーとの唯一の源として供給される T B A または T A A の存在下に該バクテリアの増殖の大幅な改善が可能になる。

30

【 0 0 1 0 】

より正確には、本発明は、バクテリア Burkholderia cepacia CIP I-2052 の産生方法に関する。この方法では、少なくとも 1 つの窒素源、第 3 ブタノール (T B A) および / または第 3 アミルアルコール (T A A) を含む培地の存在下に、かつ空気または酸素の存在下に、前記バクテリアを培養して、接種体を回収する。この方法は、前記培地が、少なくとも 1 つのコバルト塩を含むことを特徴とする。コバルトは、好ましくは二価形態で使用される。

40

【 0 0 1 1 】

本方法の特徴によれば、コバルト塩は、塩化物イオン、硫酸塩イオン、硝酸塩イオンおよびそれらの混合物からなる群から選ばれてよい。塩化コバルト・六水塩が、バクテリアによって産生されたバイオマスに関して大きな効果を有していたことが認められた。

【 0 0 1 2 】

本発明の別の実施態様によれば、バクテリア Burkholderia cepacia CIP I-2052 は、ビタミンを添加した塩溶液含有培地に接種されてよい。該ビタミン添加塩溶液含有培地に、塩化コバルトが、単独または他の微量元素との混合物状で、培地中の最終濃度 0 . 0 1 ~ 4 m g / リットル、有利には 0 . 0 3 ~ 2 m g / リットル、好ましくは 0 . 0 5 ~ 0 . 1 m

50

g / リットルで添加されている。これらの条件下に、Burkholderia cepacia CIP I-2052 の炭素含有基質、すなわち T B A または T A A は、培地中に濃度 0 . 0 0 1 ~ 1 0 g / リットル、好ましくは 0 . 2 ~ 5 g / リットルで添加されてよい。

【 0 0 1 3 】

これらの条件下に、既に認められている細胞密度よりも高い細胞密度を有する接種体が産生される。その最終バイオマス濃度は、T B A の当初濃度 1 g / リットルに対して、例えば乾燥重量で 0 . 6 g / 培養液 1 リットル程度である。こうして調製された接種体は、T B A または T A A を含む流出物を処理するために単独で使用されてもよいし、E T B E もしくは M T B E を T B A に分解するか、または T A M E を T A A に分解するバクテリアを用いる混合培養で使用されてもよい。

10

【 0 0 1 4 】

さらに、こうして本発明による方法によって大量に産生されたこの接種体は、T B A または T A A、または T B A と T A A との混合物を含む水性流出物を精製するために直接使用することができる。より正確には、本発明は、水性流出物中に含まれる T B A および / または T A A の分解方法に関する。この方法において、バクテリア Burkholderia cepacia CIP I-2052 の産生方法によって産生された接種体が好氣的条件下に使用される。

【 0 0 1 5 】

本出願人のフランス特許出願 F R - 9 8 / 1 6 5 2 0 によれば、T B A は、ゴルドナ テルラエ (Gordona terrae) CIP I-1889 または ロードコッカス エクイ (Rhodococcus equi) CIP I-2053 であってもよい少なくとも 1 つのバクテリアによる、水性流出物中に含まれる M T B E および / または E T B E の好氣的条件下での分解に由来するものであってよい。これらの同じバクテリアは好氣的条件下に T A M E を T A A に分解することもできる。

20

【 0 0 1 6 】

本発明は、本発明を説明する図面を検討して、より良く理解される。これら図面において、

・ 図 1 は、B. cepacia CIP I-2052 による T B A の分解と、時間に応じて、微量元素溶液の存在下でのその増殖 P (u f c / m L) とを表す。

【 0 0 1 7 】

・ 図 2 は、B. cepacia CIP I-2052 によるバイオマスの産生に関するいくつかの無機成分の添加効果を証明する。

30

【 0 0 1 8 】

【発明の実施の形態】

[実施例 1 A および実施例 1 B (比較例)]

炭素源およびエネルギー源としてグルコース (5 0 0 m g / l) が添加された塩溶液含有無機培地 M M 2 に株 B. cepacia CIP I-2052 接種した。培地 M M 2 は、次の組成を有した

:

・ K H ₂ P O ₄	1 . 4 g
・ K ₂ H P O ₄	1 . 7 g
・ N a N O ₃	1 . 5 g
・ M g S O ₄ ・ 7 H ₂ O	0 . 5 g
・ C a C l ₂ ・ 2 H ₂ O	0 . 0 4 g
・ F e C l ₃ ・ 6 H ₂ O	0 . 0 1 2 g
・ ビタミン類の溶液	1 m l
・ H ₂ O	q . s . p . 1 リットル

40

ビタミン類の溶液は、蒸留水 1 リットルに対して次の組成を有した :

・ ビオチン	2 0 0 m g
・ リボフラビン	5 0 m g
・ ニコチン酸	5 0 m g
・ パントテン酸塩	5 0 m g

50

- ・ p - アミノ安息香酸 5 0 m g
- ・ 葉酸 2 0 m g
- ・ チアミン 1 5 m g
- ・ シアノコバラミン 1 . 5 m g

3 0 で 2 4 時間のインキュベーション後に得られた培養物は、種々の濃度を有する炭素源およびエネルギー源として T B A 添加培地 M M 2 を 2 0 0 m l 含むフラスコ内に接種するために用いられる。これらフラスコ内に、1 0 m l / l (培地 M M 2) の割合で塩化コバルト・六水塩を含む微量元素溶液を添加した。比較例として、同じフラスコに微量元素溶液を添加しなかった。

【 0 0 1 9 】

10

微量元素溶液は、次の組成を有した：

- ・ ニトリロトリ酢酸 1 . 5 g
- ・ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0 . 2 g
- ・ Na_2SeO_3 0 . 2 g
- ・ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0 . 1 g
- ・ $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0 . 1 g
- ・ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0 . 1 g
- ・ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0 . 1 g
- ・ $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0 . 0 4 g
- ・ $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0 . 0 2 5 g
- ・ H_3BO_3 0 . 0 1 g
- ・ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0 . 0 1 g

20

q . s . p .

蒸留水 1 リットル

各フラスコは、得られた 3 % (v / v) 前培養物から接種され、ついで攪拌インキュベータにおいて 3 0 でインキュベートされた。

【 0 0 2 0 】

これら種々のフラスコにおいて、ガスクロマトグラフィーにより残留 T B A を分析するために、規則的な間隔でサンプルを採取した。さらに 6 0 0 n m の光学濃度を測定した。最後に、すべての当初 T B A が消費された場合、T B A の無機化の程度を示す全有機炭素 (T O C) の測定を行った。

30

【 0 0 2 1 】

種々の培養物を用いて得られた結果を表 1 に示した。この表により、炭素源としての T B A の存在下に B. cepacia CIP 1-2052 の増殖に関する微量元素の添加の効果が示される。

【 0 0 2 2 】

【表 1】

実施例	添加モード	当初 TBA ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	最終 TBA ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	最終 TOC ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	時間 (h)	当初光学 濃度 600nmで	最終光学 濃度 600nmで
1A	微量元素 添加	346.5	0	<10	72	0.116	0.54
	微量元素 添加	720	0	<10	139	0.117	0.95
	微量元素 添加	1000.5	0	<10	139	0.122	1.1
IB	微量元素 非添加	365.5	0	<10	150	0.1	0.156
	微量元素 非添加	755.1	77.5	ND*	400	0.1	0.132
	微量元素 非添加	986.8	156.2	ND*	400	0.1	0.076

【0023】

N . D . : 測定されなかった。

【0024】

この表からわかるように、コバルトを含む微量元素溶液の添加により、例えば1000mg / リットルの濃度まで供給TBAの完全分解を行って、必要なインキュベーション期間を大幅に短縮することが可能になった。さらに光学濃度の測定により示されるように、産生されたバイオマスは、非常に大量であった。従って、例えば数g / リットルまでもの大量のTBAを含む流出物の処理方法のための接種体を、より容易に調製することができる。

【0025】

[実施例2]

ただ 1 つの炭素源として供給される T B A における B. cepacia CIP I-2052 株の増殖を、4 リットルの発酵装置においてモニターした。

【 0 0 2 6 】

グルコースを含み (1 g / リットル)、かつ攪拌下に 3 0 で微量元素 (1 %、v / v) が添加された培地 M M 2 の 2 0 0 m l 上での P. cepacia CIP I-2052 の 2 4 時間の接種体を作成した。

【 0 0 2 7 】

発酵装置の培地は、1 % (v / v) の割合で実施例 1 に記載された微量元素溶液が添加された、実施例 1 に記載された培地 M M 2 であった。発酵装置における T B A の当初濃度は、3 0 0 m g / リットルであった。接種後、光学濃度は 0 . 0 5 であった。カウンティングは、連続的希釈後に培地 L u r i a 上に塗布されたコロニーをカウントすることにより行われ、 2.9×10^6 u f c . m l ⁻¹ の当初細胞密度を示した。

10

【 0 0 2 8 】

バッチ式でのこの発酵の操作条件は、次の通りであった：

- ・ 温度 = 3 0
- ・ 通気 = 4 リットル / リットル
- ・ p H = 6 . 8

T B A の分解の後に、培養上清におけるガスクロマトグラフィ分析を行った。さらに培地 L u r i a 上に塗布されたコロニーをカウントすることにより、および、光学濃度の測定により、バクテリア生物群の変動をモニターした。

20

【 0 0 2 9 】

結果を、図 1 に示す。この図では、基質の連続的添加を、5 0 時間、7 0 時間および 2 1 0 時間で行った。

【 0 0 3 0 】

5 0 時間の培養後、当初供給された全 T B A を消費した。従って、T B A の第 1 添加を、4 5 0 m g / リットルの濃度で行った。次いで消費後に、4 0 0 m g / リットルの第 2 添加と、3 8 0 m g / リットルの第 3 添加とを行った。

【 0 0 3 1 】

得られた最終生物群は、6 0 0 n m での最終 D . O . 7 . 0 について 3.5×10^9 u f c . m / リットルであった。

30

【 0 0 3 2 】

従って、この実施例において、例えば無機担体上のような担体上で得られる、例えばバクテリア固定化の後に、汚染流出物の処理の目的で使用される接種体を容易に得ることが可能であるのが認められた。本出願人によってフランス特許出願 F R - 2 7 8 7 7 8 3 に記載されている「生体フィルター」型を使用する場合には、処理すべき流出物をこのバクテリア固定化担体上に通過させた。

【 0 0 3 3 】

[実施例 3]

炭素およびエネルギーの源としてグルコース (5 0 0 m g / リットル) が添加された、実施例 1 に記載されている塩溶液含有無機培地 M M 2 に株 B. cepacia CIP I-2052 を接種した。この第 1 培養物は、T B A が添加され (7 5 0 m g / リットル)、微量元素が添加されない培地 M M 2 の 2 0 0 m l に接種するために使用される。この微量元素を添加しない前培養により、最終培養物中に微量元素の痕跡を持ち込まないように、培地中の無機元素を消費し尽くすことが可能になった。この痕跡により、得られた成果が損なわれることがある。

40

【 0 0 3 4 】

こうして 3 0 で 9 6 時間のインキュベーション後に得られた前培養物は、7 5 0 m g / リットルの濃度で炭素およびエネルギーの源として T B A が添加された培地 M M 2 を 2 0 0 m l 含むフラスコに接種するために使用される。フラスコの各々に、実施例 1 に記載されている微量元素溶液の組成に含まれる元素のうちの 1 つおよび 1 つのみを、溶液自体を

50

使用する場合と同じ最終濃度で、添加した。

【 0 0 3 5 】

各フラスコは、得られた 3 % (v / v) の前培養物から接種され、ついで攪拌インキュベーション器において 3 0 分でインキュベートされた。

【 0 0 3 6 】

これら種々のフラスコにおいて、7 2 時間のインキュベーション後に 6 0 0 n m で光学濃度を測定した。

【 0 0 3 7 】

種々の培養物を用いて得られた結果を、図 2 に示す。

【 0 0 3 8 】

この図において認められるように、微量元素溶液を添加することは、実施例 1 および実施例 2 において注目されるポジティブな効果を生じた。塩化コバルトのみの添加を用いて得られる最終光学濃度は、実施例 1 に記載されている、微量元素溶液を用いて得られる光学濃度よりも約 2 倍高いので、培地中での最終濃度 1 m g / リットルでの塩化コバルト・六水塩の添加により、増殖に関する大きな効果が証明された。

【 0 0 3 9 】

[実施例 4]

実施例 3 においてと同じ実験を行ったが、株 B. cepacia CIP 1-2052 における炭素およびエネルギーの源として T B A を使用する代わりに、実施例 3 においてと同じ割合で T A A を使用した。得られた結果を表 2 にまとめた。これらは、先行実施例において既に記載した結果と同一であった。

【 0 0 4 0 】

【表 2】

10

20

実施例	添加モード	当初 TBA ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	最終 TBA ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	時間 (h)	当初光学 濃度 600nm で	最終光学 濃度 600nm で
4A	微量元素 添加	700	0	96	0.117	0.85
4B	微量元素 非添加	725	90	400	0.1	0.132

10

20

30

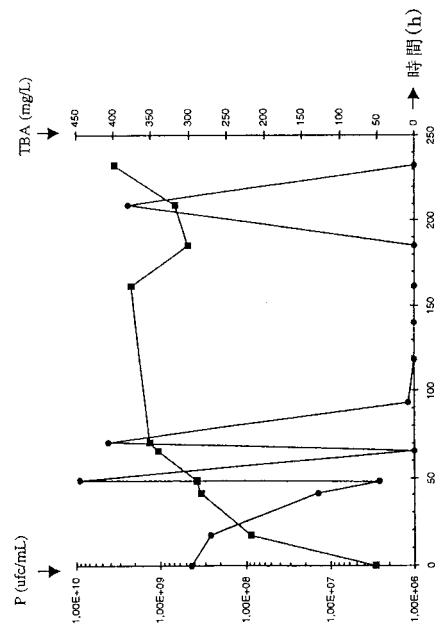
【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、*B. cepacia* CIP 1-2052 による T B A の分解と、時間に応じて、微量元素溶液の存在下でのその増殖 $P (\text{u f c} / \text{m L})$ とを表すグラフである。

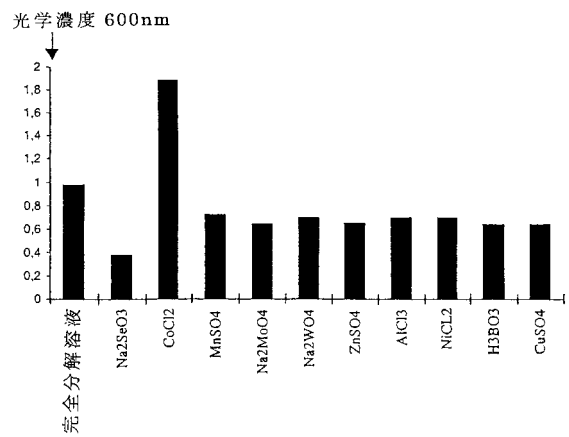
【図 2】図 2 は、*B. cepacia* CIP 1-2052 によるバイオマスの産生に関するいくつかの無機成分の添加効果を示すグラフである。

40

【図 1】



【図 2】



 フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
- | | | |
|---------|------|---|
| C 1 2 N | 1/20 | A |
| C 1 2 R | 1:01 | |
| C 1 2 N | 1/00 | R |
| C 1 2 R | 1:01 | |
- (72)発明者 パスカル ピーヴトー
フランス国 リイル マルメゾン アヴニュー シャトーピエ 2 5
- (72)発明者 フランソワーズ ファヨール
フランス国 クラマル アヴニュー エム ルノーダン 4 8
- (72)発明者 フレデリック モノ
フランス国 ナンテール アヴニュー ルイ ムニエ 3 9

審査官 山本 匡子

- (56)参考文献 米国特許第 0 5 8 1 4 5 1 4 (U S , A)
仏国特許出願公開第 0 2 7 6 6 4 7 8 (F R , A 1)
Appl Environ Microbiol. 1997 Nov;63(11):4216-22.

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- C12N 1/20
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
Science Direct
Wiley InterScience
CiNii