

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6921098号
(P6921098)

(45) 発行日 令和3年8月18日(2021.8.18)

(24) 登録日 令和3年7月29日(2021.7.29)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 B
C 0 7 K 1/30 (2006.01)	C 0 7 K 1/30
C 0 7 K 7/00 (2006.01)	C 0 7 K 7/00
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04 C
C 0 7 H 1/06 (2006.01)	C 0 7 H 1/06

請求項の数 15 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2018-545605 (P2018-545605)	(73) 特許権者 507124988 バイエル クロップサイエンス エルピー BAYER CROPSCIENCE L P アメリカ合衆国63167ミズーリ州セン トルイス、ノース・リンドバーグ・ブル バード800番
(86) (22) 出願日 平成29年3月1日(2017.3.1)	(74) 代理人 100114188 弁理士 小野 誠
(65) 公表番号 特表2019-506881 (P2019-506881A)	(74) 代理人 100119253 弁理士 金山 賢教
(43) 公表日 平成31年3月14日(2019.3.14)	(74) 代理人 100124855 弁理士 坪倉 道明
(86) 国際出願番号 PCT/US2017/020157	(74) 代理人 100129713 弁理士 重森 一輝
(87) 国際公開番号 W02017/151742	
(87) 国際公開日 平成29年9月8日(2017.9.8)	
審査請求日 令和2年2月26日(2020.2.26)	
(31) 優先権主張番号 62/303,171	
(32) 優先日 平成28年3月3日(2016.3.3)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	
微生物の受託番号 NRRL NRRL B-50972	
微生物の受託番号 NRRL NRRL B-21661	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物細胞培養物からの殺菌剤化合物及びエキソ多糖類の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

微生物細胞培養物中のリポペプチドを富化する方法であって、

a) 両親媒性スルホネート及びノ又は両親媒性サルフェートを前記細胞培養物と混合して、リポペプチドを含む凝集体の形成を誘発すること；

b) 前記細胞培養物を遠心して、上清画分及びペレット画分を得ること；

c) 前記ペレット画分を前記上清画分から分離すること；及び

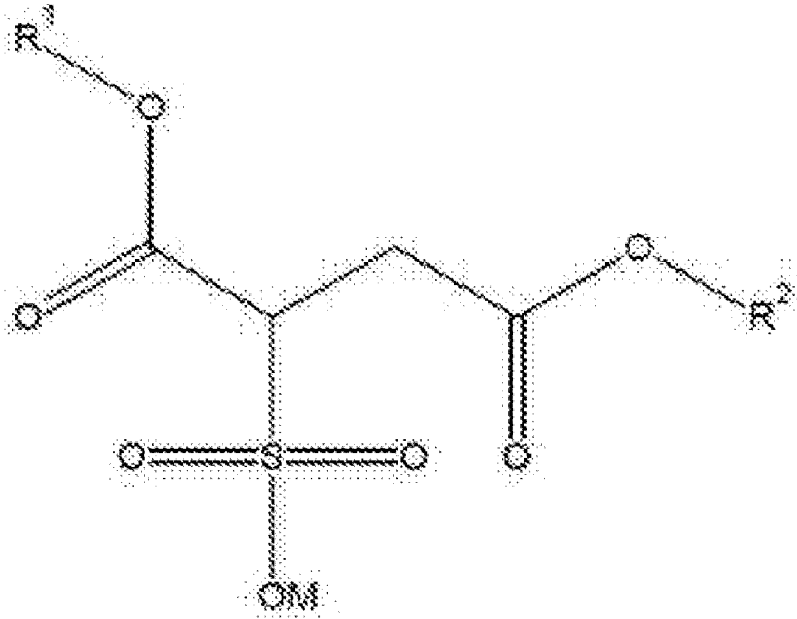
d) 前記ペレット画分をポリオキシエチレングリコールアルキルエーテルと混合することで、前記リポペプチドを前記凝集体から放出させること

を含み、

前記両親媒性スルホネートが、下記式(I)：

【化 1】

(I)



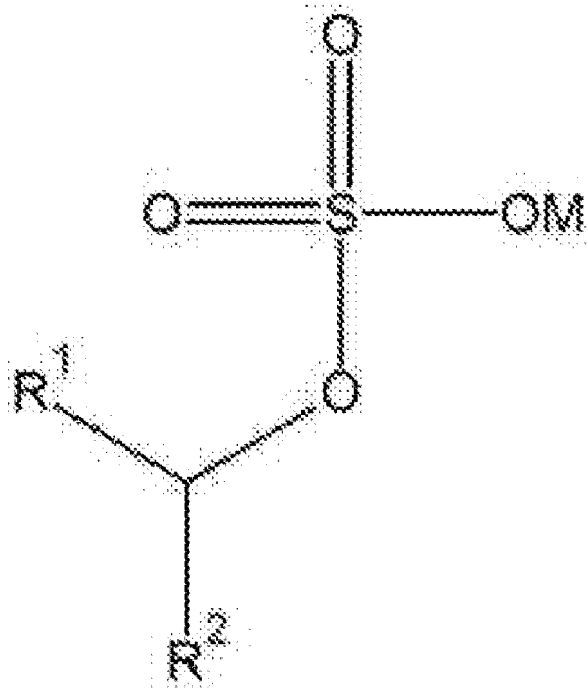
10

20

[式中、
R¹ 及び R² は独立に、直鎖若しくは分岐の C₁ - C₂₀ アルキル又は直鎖若しくは分岐
 の C₂ - C₂₀ アルケンであり；
M は H⁺、Li⁺、Na⁺、K⁺ 又は (C₁ - C₈ アルキル)₄N⁺ である。]
の化合物であり、および/または、
前記両親媒性サルフェートが、下記式 (II) :

【化2】

(II)



10

20

【式中、

R^1 及び R^2 は独立に、H、直鎖若しくは分岐の C_{1-20} アルキル、又は直鎖若しくは分岐の C_{2-20} アルケンであり；

M は H^+ 、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 又は $(C_{1-8} \text{アルキル})_4 N^+$ であり；

ただし R^1 及び R^2 は両方とも H であることはない。】

30

のアルキルサルフェートである、方法。

【請求項2】

前記リポペプチドが、イツリン型化合物、フェンギシン型化合物、サーファクチン型化合物、フサリシジン型化合物、及びこれらの組み合わせ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3】

前記リポペプチドがフサリシジン型化合物である請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記フサリシジン型化合物が、フサリシジンA、フサリシジンB、フサリシジンC、フサリシジンD、LI-F03、LI-F04、LI-F05、LI-F06、LI-F07、LI-F08、パエニセリン(Paeniserine)A1、パエニセリンA2、パエニセリンA3、パエニセリンA4、パエニセリンB1、パエニセリンB2、パエニセリンB3、パエニセリンB4、パエニセリンC1、パエニセリンC2、パエニセリンC3、パエニセリンC4、パエニプロリキシン(Paeniprolixin)A1、パエニプロリキシンA2、パエニプロリキシンB1、パエニプロリキシンB2、パエニプロリキシンC1、パエニプロリキシンC2、パエニプロリキシンD1、パエニプロリキシンD2、パエニプロリキシンE1、パエニプロリキシンE2、パエニプロリキシンF1、パエニプロリキシンF2、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項3に記載の方法。

40

【請求項5】

50

式(I)の前記両親媒性スルホネートが細胞培養物と混合される請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

式(I)の R_1 及び R_2 が独立に直鎖若しくは分岐の C_8 アルキルである請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記スルホネートがジオクチルスルホスクシネート；1,4-ビス(2-エチルヘキソキシ)-1,4-ジオキソブタン-2-スルホネート；又はその Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 又は(C_{1-8} アルキル) $_4N^+$ 塩である請求項6に記載の方法。

【請求項8】

式(II)の前記両親媒性サルフェートが細胞培養物と混合される請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

式(II)の R^1 及び R^2 が独立して分岐の C_{3-20} アルキルであるか、又は、 R^1 がHであり且つ R^2 が分岐の C_{3-20} アルキルである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記アルキルサルフェートが、7-エチル-2-メチル-4-ウンデカニルサルフェート、2-エチルヘキシルサルフェート又はその Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 若しくは(C_{1-8} アルキル) $_4N^+$ 塩である請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテルが、 $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$ の分子式を有する化合物であり、

m が1~120の整数であり；

n が1~20の整数である、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

両親媒性スルホネート及び/又は両親媒性サルフェートと混合する前に、前記微生物細胞培養物のpHを約4~約7に調節する、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

遠心前に、前記微生物細胞培養物に、塩を約0.5%~約5%の濃度で加える、請求項1~12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

前記微生物細胞培養物が、パエニバシラス属種(*Paenibacillus* sp.)、バシラス属種(*Bacillus* sp.)及び/又はシュードモナス属種(*Pseudomonas* sp.)の菌株を含む、請求項1~13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記微生物細胞培養物が、パエニバシラス属種(*Paenibacillus* sp.)株NRRL B-50972、バチラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)株NRRL B-21661、及び/又は個々の菌株の全ての識別特性を有するそれらの真菌突然変異株を含む、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2016年3月3日出願の米国暫定特許出願第62/303,171号(参照によって、全体が本明細書に組み込まれる。)に対する優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、微生物細胞培養物を処理して、微生物細胞によって産生されるリポペプチド類及びエキソ多糖類を濃縮又は精製する方法に関するものである。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0003】

殺菌剤には無数の用途があり、例えば作物保護；食品、飼料及び化粧品の保存剤として；及びヒト及び動物の両方の用途用の治療剤としてである。作物収量減少、食物媒介の疾患並びにヒト及び動物の両方の真菌感染は、先進国及び発展途上国の両方において問題となっている。

【0004】

合成殺虫剤又は殺菌剤は多くの場合で非特異的であることから、他の天然の有益な生物を含む標的生物以外の生物に対して作用し得る。化学性質のため、それらは有害で非生物分解性でもあり得る。世界的に、特に食品における化学物質の残留物に関連する可能な環境問題及び健康問題について消費者の意識が高まっている。そのため、化学（すなわち合成）農薬の使用又は少なくとも量を減らすようにという消費者の圧力が大きくなってきた。従って、効果的な病害生物防除を可能としていながら、食物連鎖上の要件を管理する必要性がある。

【0005】

合成殺虫剤又は殺菌剤の使用によって生じるさらなる問題は、殺虫剤又は殺菌剤の繰り返し及び独占的施用によって、多くの場合で、抵抗性病原微生物の選択が生じてしまうことである。通常、そのような菌株は、同じ作用機序を有する他の有効成分に対しても交差抵抗性である。これによって、活性化化合物による病原体の効果的な防除ができなくなる。しかしながら、新たな作用機序を有する有効成分は開発が困難であるとともに費用のかさむものである。

【0006】

病原体群における抵抗性発達のリスク並びに環境及びヒト健康上の懸念により、植物病害を管理するための合成殺虫剤及び殺菌剤に代わるのを確認することに関心が向けられるようになった。生物防除剤の使用が一つの選択肢である。

【0007】

フサリシジン類などの非リボソームペプチドが、その抗微生物特性の故に良く認識されており、作物保護の分野で使用されてきた。それが有する作用機序の故に、それは生物薬剤及び他のバイオテクノロジー用途で使用される可能性も有する。フサリシジン類は、パエニバシラス属種（*Paenibacillus* sp.）から単離することができ、15-グアニジノ-3-ヒドロキシペンタデカノン酸に加えて6個のアミノ酸残基から構成される環構造を有する。パエニバシラス・ポリミキサ（*Paenibacillus polymyxa*）から単離されるフサリシジン類には、LI-F03、LI-F04、LI-F05、LI-F07及びLI-F08（Kurusu K, Ohba K, Arai T and Fukushima K., *J. Antibiotics*, 40:1506-1514, 1987）などがあり、さらに別のフサリシジンA、B、C及びDが報告されている（Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 49:129-135, 1996; Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 50:220-228, 1997）。

【0008】

ある種のフサリシジン類は、フザリウム・オキシスポルム（*Fusarium oxysporum*）、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）、アスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）及びペニシリウム・トミー（*Penicillium thomii*）などの植物病原性真菌に対する殺菌活性を有することが知られている。一部のフサリシジン類は、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）などのグラム陽性菌に対しても殺菌活性を有する（Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 49:129-135, 1996; Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 50:220-228, 1997）。さらに、特定のフサリシジン類がアブラナの黒根腐病を引き起こすレプトス

10

20

30

40

50

フェリア・マクランズ (*Leptosphaeria maculans*) に対して抗真菌活性を有することが見出されている (Beatty PH and Jensen SE., *Can. J. Microbiol.*, 48:159-169, 2002)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Kurusu K, Ohba K, Arai T and Fukushima K., *J. Antibiotics*, 40:1506-1514, 1987

10

【非特許文献2】Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 49:129-135, 1996

【非特許文献3】Kajimura Y and Kaneda M., *J. Antibiotics*, 50:220-228, 1997

【非特許文献4】Beatty PH and Jensen SE., *Can. J. Microbiol.*, 48:159-169, 2002

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

発酵プロセス中でフサリシジン類などの活性化化合物を富化する効率的な方法を確認する必要がある。そのような発酵プロセスが、プロセスの粘度を高めることで富化プロセスをより困難なものとするエキソ多糖類 (EPS) 及び他のバイオポリマーを高レベルで含むことが多いため、これは特に困難なものとなり得る。

20

【0011】

EPSは、糖残基からなり、多くの微生物によって周囲の環境中に分泌される高分子量ポリマーである。微生物は、広いスペクトルの多官能性多糖類、例えば細胞内多糖類、莢膜多糖類及び細胞外多糖類 (EPS) を合成する。エキソ多糖類は通常、修飾された単糖類並びに、一時的に、いくつかの非炭水化物置換基、例えばアセテート、ピルベート、スクシネート及びホスフェートからなる。

【0012】

30

多くのEPS、例えばグルカン類及びフルクタン類が、それぞれ、主要基質として二糖類であるショ糖を用いるグリコシルトランスフェラーゼまたはフルクトシルトランスフェラーゼの活性によって細胞外で産生され、微生物によって培地中に分泌される。これらの酵素は、第1段階でショ糖を開裂させ、その後、ブドウ糖又は果糖を、グルカン類又はフルクタン類を形成する成長する糖ポリマーに送る。その後、残った遊離糖モノマーは代謝される。

【0013】

商業的目的のため、EPSは現在、アルコール沈殿などの下流プロセスによるバイオマス分離後に発酵プロセスから単離される (Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., & Schorr-Galindo, S., *Carbohydrate Polymers*, 87:951-962, 2012)。発酵プロセス中の活性化化合物からEPSを分離する現行の下流処理はコストが高くなり、活性化化合物の分解を生じる可能性がある。粘稠バイオポリマーが合成されることで、発酵プロセス (すなわち、攪拌及び酸素化) 並びに高度に精製された分子の回収が妨げられる。活性化化合物の活性を保存しながら、発酵プロセス中の活性化化合物から粘稠バイオポリマーを分離するコスト効果が高い効率的な方法が必要とされている。

40

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、微生物細胞培養物中のリポペプチドを富化する方法であって、a) 両親媒性スルホネート及び/又は両親媒性サルフェートを前記細胞培養物と混合して、リポペプチ

50

ドを含む凝集体の形成を誘発すること； b) 前記細胞培養物を遠心して、上清画分及びペレット画分を得ること； c) 前記ペレット画分を前記上清画分から分離すること； 及び d) 前記ペレット画分をポリオキシエチレングリコールアルキルエーテルと混合することで、前記リポペプチドを前記凝集体から放出させることを含む方法に関するものである。

【 0 0 1 5 】

ある種の態様において、前記リポペプチドは、イツリン型化合物、フェンギシン型化合物、サーファクチン型化合物、フサリシジン型化合物、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。 1 態様において、前記リポペプチドはフサリシジン型化合物である。

【 0 0 1 6 】

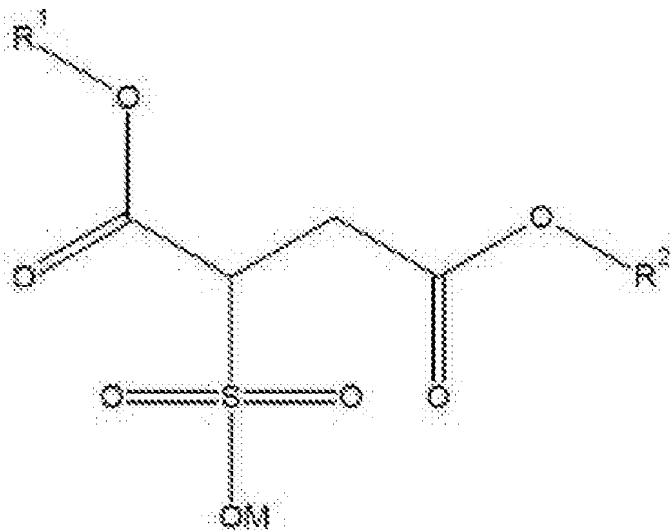
一部の実施形態において、前記フサリシジン型化合物は、フサリシジン A、フサリシジン B、フサリシジン C、フサリシジン D、LI - F 0 3、LI - F 0 4、LI - F 0 5、LI - F 0 6、LI - F 0 7、LI - F 0 8、パエニセリン (Paeniserine) A 1、パエニセリン A 2、パエニセリン A 3、パエニセリン A 4、パエニセリン B 1、パエニセリン B 2、パエニセリン B 3、パエニセリン B 4、パエニセリン C 1、パエニセリン C 2、パエニセリン C 3、パエニセリン C 4、パエニプロリキシン (Paeniprolixin) A 1、パエニプロリキシン A 2、パエニプロリキシン B 1、パエニプロリキシン B 2、パエニプロリキシン C 1、パエニプロリキシン C 2、パエニプロリキシン D 1、パエニプロリキシン D 2、パエニプロリキシン E 1、パエニプロリキシン E 2、パエニプロリキシン F 1、パエニプロリキシン F 2、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【 0 0 1 7 】

他の実施形態では、両親媒性スルホネートを細胞培養物と混合し、前記両親媒性スルホネートは、下記式 (I) の化合物である。

【 化 1 】

(I)



【 0 0 1 8 】

式中、R¹ 及び R² は独立に、直鎖若しくは分岐の C₁ - C₂₀ アルキル又は直鎖若しくは分岐の C₂ - C₂₀ アルケンであり； M は H⁺、Li⁺、Na⁺、K⁺ 又は (C₁ - C₈ アルキル)₄N⁺ である。 1 態様において、R¹ 及び R² は独立に直鎖若しくは分岐の C₈ アルキルである。別の態様において、前記スルホネートはジオクチルスルホスクシネート； 1, 4 - ビス (2 - エチルヘキソキシ) - 1, 4 - ジオキソブタン - 2 - スルホネート； 又はその Li⁺、Na⁺、K⁺ 又は (C₁ - C₈ アルキル)₄N⁺ 塩である。

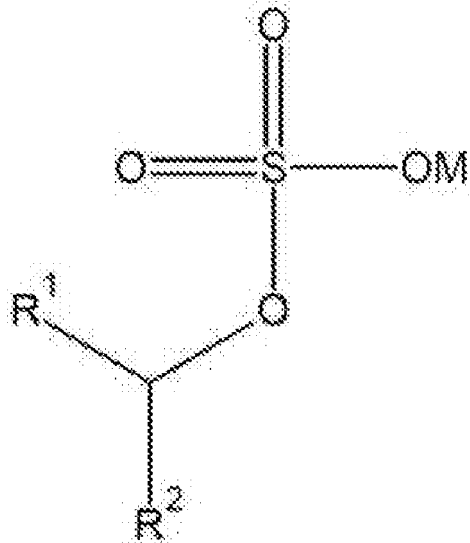
【 0 0 1 9 】

他の実施形態において、両親媒性サルフェートを細胞培養物と混合し、両親媒性サルフ

エートはアルキルサルフェートである。1実施形態において、前記アルキルサルフェートは、下記式(II)の化合物である。

【化2】

(II)



10

20

【0020】

式中、 R^1 及び R^2 は独立に、H、直鎖若しくは分岐の C_{1-20} アルキル、又は直鎖若しくは分岐の C_{2-20} アルケンであり；Mは H^+ 、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 又は $(C_{1-8}$ アルキル) $_4N^+$ であり；ただし R^1 及び R^2 が両方ともHではない。1態様において、 R^1 及び R^2 は独立に、分岐の C_{3-20} アルキルである。別の態様において、前記アルキルサルフェートは、7-エチル-2-メチル-4-ウンデカニルサルフェート又はその Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 若しくは $(C_{1-8}$ アルキル) $_4N^+$ 塩である。さらに別の態様において、 R^1 はHであり、 R^2 は分岐の C_{3-20} アルキルである。1実施形態において、前記アルキルサルフェートは2-エチルヘキシルサルフェート又はその Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 若しくは $(C_{1-8}$ アルキル) $_4N^+$ 塩である。

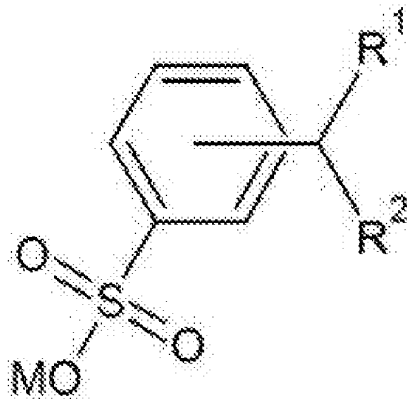
30

【0021】

他の実施形態において、両親媒性スルホネートを細胞培養物と混合し、前記両親媒性スルホネートは直鎖アルキルベンゼンスルホネート又は分岐のアルキルベンゼンスルホネートである。ある種の実施形態において、前記両親媒性スルホネートは、下記式(III)の直鎖アルキルベンゼンスルホネートである。

【化3】

(III)



10

【0022】

式中、R¹及びR²は独立に、H又は直鎖C₁-₂₀アルキルであり；MはH⁺、Li⁺、Na⁺、K⁺又は(C₁-₈アルキル)₄N⁺であり；ただしR¹及びR²は両方ともHであることはない。1実施形態において、R¹及びR²がC₁₀-₁₆アルキル鎖を形成している。別の実施形態において、前記直鎖アルキルベンゼンスルホネートはドデシルベンゼンスルホネート又はそのLi⁺、Na⁺、K⁺若しくは(C₁-₈アルキル)₄N⁺塩である。

20

【0023】

ある種の態様において、前記ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテルは、C_nH_{2n+1}(OCH₂CH₂)_mOHの分子式を有する化合物であり、mは1~120の整数であり；nは1~20の整数である。一部の態様において、nは8、10、12、14、16、18又は20である。1態様において、nは12又は18である。さらに別の態様において、mは5~100の整数である。1実施形態において、mは25である。別の実施形態において、mは100である。

【0024】

さらに別の実施形態において、本発明は、微生物細胞培養物からエキソ多糖類(EPS)を精製する方法であって、a)両親媒性スルホネート及び/又は両親媒性サルフェートを前記細胞培養物と混合して、凝集体の形成を誘発すること；b)前記細胞培養物を遠心して、上清画分及びペレット画分を得ること；c)前記上清画分を前記ペレット画分から分離すること；d)アルコールを前記上清画分に加えることで、前記EPSを沈殿させること；及びe)前記沈殿したEPSを前記上清画分から取り出すことを含む方法に関するものである。

30

【0025】

ある種の態様において、EPSは、グルカン、フルクタン、カードラン、ジェラン、キサンタン、エミュルサン、デキストラン、セルロース、及びこれらの組み合わせから選択される。

40

【0026】

さらに別の実施形態において、本発明は、水溶性のバイオポリマーを微生物細胞培養物から精製する方法であって、a)両親媒性スルホネート及び/又は両親媒性サルフェートを前記細胞培養物と混合させて、凝集体の形成を誘発すること；b)前記細胞培養物を遠心することで、上清画分及びペレット画分を得ること；c)前記上清画分を前記ペレット画分から分離すること；d)アルコールを前記上清画分に加えることで、前記バイオポリマーを沈殿させること；及びe)前記沈殿バイオポリマーを前記上清画分から取り出すことを含む方法に関するものである。

【0027】

50

さらに別の態様において、両親媒性スルホネート及び/又は両親媒性サルフェートと混合する前に、微生物細胞培養物のpHを約4～約7に調節する。1態様では、微生物細胞培養物のpHを約6に調節する。

【0028】

さらに他の実施形態では、遠心前に、微生物細胞培養物に、塩を約0.5%～約5%の濃度で加える。1実施形態では、塩化ナトリウム又は塩化カリウムを、微生物細胞培養物に、約2%の濃度で加える。

【0029】

別の態様では、前記微生物細胞培養物は、パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.)、バシラス属種 (*Bacillus* sp.) 及び/又はシュードモナス属種 (*Pseudomonas* sp.) の菌株を含む。1実施形態では、前記微生物細胞培養物は、パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) 株 NRRL B-50972、バチラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 株 NRRL B-21661、及び/又は個々の菌株の全ての識別特性を有するそれらの真菌突然変異株を含む。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】ボトリチス・シネレア (*Botrytis cinerea*) (BOTRCI) を接種した若い植物を用いて測定した抗真菌活性を描いた図である。パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロス (「WB」) 並びに24,790×gのRCFでの全ブロスの遠心後に形成されるペレット画分 (「ペレット」) 及び上清画分 (「Sup」) の抗真菌活性を、未処理対照 (「水」) と比較した。

【図2】「WB-SDOS」とラベル表示した遠心助剤を用いずに遠心したパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロス、及び「WB+SDOS」とラベル表示したGEROPON (登録商標) (SDOS) と混合して遠心した全ブロスからのペレットの写真を描いた図である。

【図3】比較的高レベルのEPSを産生することが知られている別のパエニバシラス (*Paenibacillus*) 株からの、全ブロスの、GEROPON (登録商標) (SDOS) を用いた若しくは用いない17,000×gのRCFで5分間の遠心後に形成されたペレットを描いた図である。

【図4】GEROPON (登録商標) (SDOS) 又は精製SDOSを含むペレット及び上清画分中のフサリジジンAの相対的定量を描く図である。

【図5A】GEROPON (登録商標) (SDOS) を用いて又は用いずに遠心したパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスから得られたブロス濃縮物及び上清の粒径分析を示す図である。

【図5B】GEROPON (登録商標) (SDOS) を用いて又は用いずに遠心したパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスから得られたブロス濃縮物及び上清の粒径分析を示す図である。

【図5C】GEROPON (登録商標) (SDOS) を用いて又は用いずに遠心したパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスから得られたブロス濃縮物及び上清の粒径分析を示す図である。

【図5D】GEROPON (登録商標) (SDOS) を用いて又は用いずに遠心したパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスから得られたブロス濃縮物及び上清の粒径分析を示す図である。

【図5E】GEROPON (登録商標) (SDOS) を用いて又は用いずに遠心したパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスから得られたブロス濃縮物及び上清の粒径分析を示す図である。

【図6】pH3、6若しくは10に調節し、GEROPON (登録商標) (SDOS) とともに遠心したパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL

10

20

30

40

50

B - 5 0 9 7 2 全ブロスから形成されたペレットの写真を描く図である。

【図7A】GEROPON（登録商標）（SDOS）以外の他の化合物とのパエニバシラス属種（*Paenibacillus* sp.）NRRL B - 5 0 9 7 2 全ブロスの場合に形成されたペレットの写真を描いた図である。

【図7B】NIAPROOF（登録商標）4（ナトリウム7 - エチル - 2 - メチル - 4 - ウンデカニルサルフェート）がGEROPON（登録商標）（SDOS）と同様の効果を生じることを確認する、より規模の大きい実験でのペレット及び上清画分の写真を描いた図である。

【図8】GEROPON（登録商標）（SDOS）を単独で又はポリオキシエチレン（25）ドデシルエーテル（C12EO25とも称される）若しくはBRIJ（登録商標）L 23（ポリオキシエチレン（23）ドデシルエーテル；C12EO23とも称される）と組み合わせて含む上清画分及びペレット画分中のフサリシジンAの相対的定量を描いた図である。

【図9】単独で又は放出助剤として作用するいくつかの化合物のうちの一つと組み合わせてGEROPON（登録商標）（SDOS）を含むペレット画分中のフサリシジンAの相対的定量を描いた図である。

【図10】放出助剤C12EO25を加えた後のペレット画分の懸濁性を描いた図である。

【図11】遠心助剤としてGEROPON（登録商標）（SDOS）及び放出助剤としてBRIJ（登録商標）S100（ポリオキシエチレン（100）オクタデシルエーテル）を用いる、パエニバシラス属種（*Paenibacillus* sp.）NRRL B - 5 0 9 7 2 全ブロス及び相当するブロス濃縮物の5個のバッチでのフサリシジンAの相対的定量を描いた図である。

【図12】バチラス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）株NRRL B - 2 1 6 6 1 からの粘稠全ブロス（WB）のGEROPON（登録商標）（SDOS）を用いた又は用いない1,500×gのRCFでの5分間の遠心後に形成されたペレットを描いた図である。

【図13】パエニバシラス属種（*Paenibacillus* sp.）NRRL B - 5 0 9 7 2 及び他の二つのパエニバシラス（*Paenibacillus*）株で、遠心助剤としてGEROPON（登録商標）（SDOS）及び放出助剤としてBRIJ（登録商標）S100（ポリオキシエチレン（100）オクタデシルエーテル）を用いて得られた全ブロス（「WB」）及び相当する上清（「Sup」）及びブロス濃縮物（「BC」）中のフサリシジンAの相対的定量を描いた図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本明細書で使用される場合、本記述及び特許請求の範囲で使用される「含む」という動詞及びその活用形は、その非限定的意味で、その言葉に続く事項が含まれるが、具体的に言及されていない事項が排除されるわけではないことを意味するのに用いられる。さらに、不定冠詞「a（一つの）」又は「an（一つの）」は、一つ及び一つのみ要素があることが文脈上で明瞭に要求されていない限り、その要素が複数存在している可能性を排除するものではない。従って、不定冠詞「a（一つの）」または「an（一つの）」は、通常、「少なくとも一つ」を意味する。

【0032】

本明細書で使用される場合、「両親媒性」という用語は、親水性及び疎水性の両方を有する化合物を説明するものである。

【0033】

ある種の態様において、両親媒性スルホネート及び/又は両親媒性サルフェートを、約0.01%～約1.0%；例えば、約0.01%～約1.0%の範囲、例えば約0.01%～約0.5%、約0.05%～約0.2%、約0.1%～約0.2%などの濃度（重量/体積%）で細胞培養物と混合する。

10

20

30

40

50

【0034】

他の態様において、両親媒性スルホネート及び/又は両親媒性サルフェートを、少なくとも0.01%、少なくとも0.02%、少なくとも0.03%、少なくとも0.04%、少なくとも0.05%、少なくとも0.06%、少なくとも0.07%、少なくとも0.08%、少なくとも0.09%、少なくとも0.10%、少なくとも0.12%、少なくとも0.14%、少なくとも0.16%、少なくとも0.18%、又は少なくとも0.20%の濃度(重量/体積%)で細胞培養物と混合する。

【0035】

ある種の態様では、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテルを、約0.01%~約1.0%;例えば、約0.01%~約1.0%の範囲、例えば約0.01%~約0.5%、約0.05%~約0.2%、約0.1%~約0.2%などの濃度(重量/体積%)でペレット画分又は上清画分と混合する。

10

【0036】

他の態様では、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテルを、少なくとも0.01%、少なくとも0.02%、少なくとも0.03%、少なくとも0.04%、少なくとも0.05%、少なくとも0.06%、少なくとも0.07%、少なくとも0.08%、少なくとも0.09%、少なくとも0.10%、少なくとも0.12%、少なくとも0.14%、少なくとも0.16%、少なくとも0.18%、又は少なくとも0.20%の濃度(重量/体積%)でペレット画分又は上清画分と混合する。

【0037】

さらに別の態様では、両親媒性スルホネート及び/又は両親媒性サルフェートの細胞培養物又はそれに由来する画分と混合されるポリオキシエチレングリコールアルキルエーテルに対する比率(重量比)は、約50:1~約1:50;例えば、約50:1~約1:50の範囲、例えば約40:1~約1:40、約30:1~約1:30、約25:1~約1:25、約20:1~約1:20、約15:1~約1:15、約10:1~約1:10、約5:1~約1:5、又は約2:1~約1:2である。

20

【0038】

一部の態様において、両親媒性スルホネート及び/又は両親媒性サルフェートの細胞培養物又はそれに由来する画分と混合されるポリオキシエチレングリコールアルキルエーテルに対する比率(重量比)は、約10:1、約9:1、約8:1、約7:1、約6:1、約5:1、約4:1、約3:1、約1:1、約1:2、約1:3、約1:4、約1:5、約1:6、約1:7、約1:8、約1:9、又は約1:10である。

30

【0039】

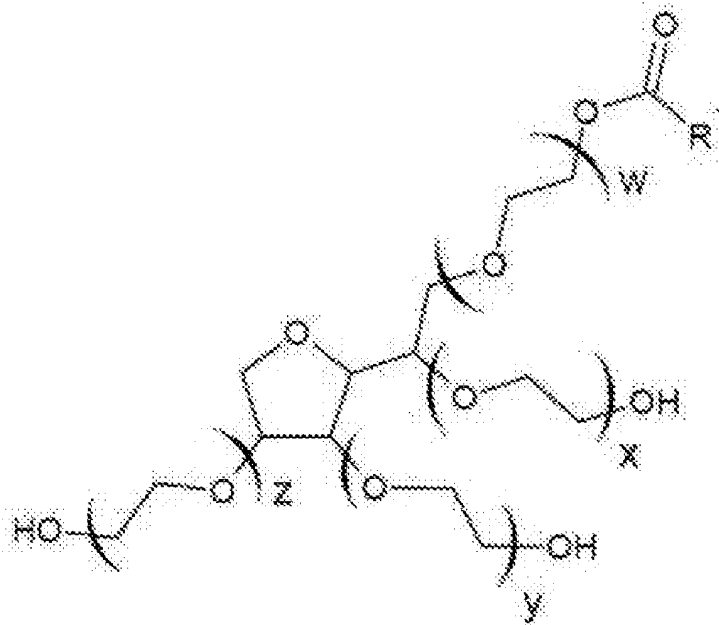
一部の実施形態では、細胞培養物を、少なくとも5,000RCF、少なくとも10,000RCF、少なくとも15,000RCF、少なくとも20,000RCF、少なくとも25,000RCF、少なくとも30,000RCF、少なくとも35,000RCF、又は少なくとも40,000RCFの速度で遠心する。

【0040】

ある種の態様では、ペレット画分を、カルボン酸のソルピタンエステルのポリオキシエチレン誘導体と混合して、凝集体からリポペプチドを放出させる。1実施形態では、カルボン酸のソルピタンエステルのポリオキシエチレン誘導体は、下記式(IV)の化合物である。

40

【化4】



(IV)

10

【0041】

式中、 R^1 は、 C_{6-18} アルキル又は C_{6-18} アルケニルであり、 $w + x + y + z = 20$ である。1実施形態において、式(IV)の化合物は、TWEEN(登録商標)80(2-[2-[3,4-ビス(2-ヒドロキシエトキシ)オキソラン-2-イル]-2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]エチル(E)-オクタデカ-9-エノエート;ポリオキシエチレンソルビタンオレエートとも称される)である。

20

【0042】

ナトリウムジオクチルスルホスクシネートは、GEROPONDOS(登録商標)、AEROSOL(登録商標)OT、TERMUL(登録商標)3667、TERMUL(登録商標)3665、LANKROPOL(登録商標)KPH70、及びSYNERGEN(登録商標)W10などのいくつかの商業名で市販されている。

30

【0043】

リポペプチド類には、各種細菌、例えばバシラス属種(*Bacillus* sp.)、パエニバシラス属種(*Paenibacillus* sp.)、シュードモナス属種(*Pseudomonas* sp.)、及びストレプトマイセス属種(*Streptomyces* sp.)から得ることができる両親媒性環状ペプチド類などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0044】

1態様において、微生物細胞培養物は、パエニバシラス属種(*Paenibacillus* sp.)の菌株を含む。別の態様において、微生物細胞培養物は、次のパエニバシラス(*Paenibacillus*)属種：*P. アガレクセデンス*(*P. agarexedens*)、*P. アガリデボランス*(*P. agaridevorans*)、*P. アルギノリチクス*(*P. alginolyticus*)、*P. アルカリテラエ*(*P. alkali terrae*)、*P. アルベイ*(*P. alvei*)、*P. アミロリチクス*(*P. amylolyticus*)、*P. アナエリアカヌス*(*P. anaericanus*)、*P. アンタルクチクス*(*P. antarcticus*)、*P. アッサメンシス*(*P. assamensis*)、*P. アゾレスセス*(*P. azoreducens*)、*P. アゾトフィキサンス*(*P. azotofixans*)、*P. バルシノネンシス*(*P. barcinonensis*)、*P. ボレアリス*(*P. borealis*)、*P. ブラシリエンシス*(*P. brasiliensis*)、*P. ブラシカエ*(*P. brassicae*)、*P. カムピナセンシス*(*P. campinasensis*)、*P. チンジュエンシス*(*P. chin*

40

50

juensis)、P.チチノリチクス(P.chitinolyticus)、P.コンドロイチヌス(P.chondroitinus)、P.シネリス(P.cineris)、P.クッキー(P.cookie)、P.クルドラノリチクス(P.curdlanolyticus)、P.デジェオネンシス(P.daejeonensis)、P.デンドリチホルミス(P.dendritiformis)、P.デュラム(P.durum)、P.エヒメンシス(P.ehimensis)、P.エルギイ(P.elgii)、P.ファビスポルス(P.favisporus)、P.グルカノリチクス(P.glucanolyticus)、P.グリカニリチクス(P.glycanilyticus)、P.ゴルドナエ(P.gordoniae)、P.グラミニス(P.graminis)、P.グラニボランス(P.granivorans)、P.ホドガエンシス(P.hodogayensis)、P.イリノイセンシス(P.illinoisensis)、P.ジャミラエ(P.jamilae)、P.コベンシス(P.kobensis)、P.コレオボランス(P.koleovorans)、P.コレエンシス(P.koreensis)、P.クリッペンシス(P.kribbensis)、P.ラクチス(P.lactis)、P.ラルバエ(P.larvae)、P.ラウツス(P.lautus)、P.レンチモルブス(P.lentimorbus)、P.マセランス(P.macerans)、P.マックアリエンシス(P.macquariensis)、P.マッシリエンシス(P.massiliensis)、P.メンデリイ(P.mendelii)、P.モトブエンシス(P.motobuensis)、P.ナフタレノボランス(P.naphthalenovorans)、P.ネマトフィルス(P.nematophilus)、P.オドリフェル(P.odorifer)、P.パブリ(P.pabuli)、P.ペオリアエ(P.peoriae)、P.フォエニシス(P.phoenicis)、P.フィロスファエラエ(P.phyllosphaerae)、P.ポリミキサ(P.polymyxa)、P.ポピリアエ(P.popilliae)、P.ブルビファシエンシス(P.pulvificiens)、P.リゾスファエラエ(P.rhizosphaerae)、P.サングイニス(P.sanguinis)、P.ステリフェル(P.stellifer)、P.テッラエ(P.terrae)、P.チアミノリチクス(P.thiaminolyticus)、P.チモネンシス(P.timoneensis)、P.チロピリ(P.tylopili)、P.ツリセンシス(P.turicensis)、P.バリツス(P.validus)、P.ボルテクス(P.vortex)、P.ブルネリス(P.vulneris)、P.ウィンニイ(P.wynnii)、P.キシラニリチクス(P.xylanilyticus)及びこれらの組み合わせのうちいずれか一つからの菌株を含む。

【0045】

別の態様では、微生物細胞培養物は、バシラス属種(Bacillus sp.)の菌株を含む。ある種の態様において、微生物細胞培養物は、次のバシラス(Bacillus)属種のうちいずれか：B.アシジセラ(B.acidiceler)、B.アシジコラ(B.acidicola)、B.アシジプロツセンス(B.acidiproducens)、B.アエオリウス(B.aeolius)、B.アエリウス(B.aerius)、B.アエロフィルス(B.aerophilus)、B.アガラダエレンス(B.agaradhaerens)、B.アイジンゲンシス(B.aidingensis)、B.アキバイ(B.akibai)、B.アルカロフィルス(B.alcalophilus)、B.アルギコラ(B.algicola)、B.アルカリニトリクス(B.alkalinitrilicus)、B.アルカリセジミニス(B.alkalisediminis)、B.アルカリテルリス(B.alkaliteluris)、B.アルチツジニス(B.altitudinis)、B.アルベアユエンシス(B.alveayuensis)、B.アミロリクエファシエンシス(B.amyloliquifaciens)、B.アントラシス(B.anthraxis)、B.アクイマリス(B.aquimaris)、B.アルセニクス(B.arsenicus)、B.アリヤバッタイ(B.aryabhattai)、B.アサヒイ(B.asahii)、B.

10

20

30

40

50

アトロファエウス (*B. atrophaeus*)、*B. アウランチアクス* (*B. aurantiacus*)、*B. アゾトフォルマンス* (*B. azotiformans*)、*B. バジウス* (*B. badius*)、*B. バルバリクス* (*B. barbaricus*)、*B. バタビエンシス* (*B. bataviensis*)、*B. ベイジンゲンシス* (*B. beijingensis*)、*B. ベンゾエボランス* (*B. benzoavorans*)、*B. ベベリジェイ* (*B. beveridgei*)、*B. ボゴリエンシス* (*B. bogoriensis*)、*B. ボロニフィルス* (*B. boroniphilus*)、*B. ブタノリボランス* (*B. butanolivorans*)、*B. カナベラリウス* (*B. canaveralius*)、*B. カルボニフィルス* (*B. carboniphilus*)、*B. セセンベンシス* (*B. cecembensis*)、*B. セルロシリチクス* (*B. cellulolyticus*)、*B. セレウス* (*B. cereus*)、*B. チャガンノレンシス* (*B. chagannorensis*)、*B. チュンガンゲンシス* (*B. chungangensis*)、*B. シビ* (*B. cibi*)、*B. シルクランス* (*B. circulans*)、*B. クラルキイ* (*B. clarkii*)、*B. クラウシイ* (*B. clausii*)、*B. コアグラン* (*B. coagulans*)、*B. コアフリレンシス* (*B. coahuilensis*)、*B. コーニイ* (*B. cohnii*)、*B. デシシフロンジス* (*B. decisifrondis*)、*B. デコロラチオニス* (*B. decolorationis*)、*B. ドレンテンシス* (*B. drentensis*)、*B. ファラギニス* (*B. farraginis*)、*B. ファスチジオス* (*B. fastidiosus*)、*B. フィルムス* (*B. firmus*)、*B. フレクサス* (*B. flexus*)、*B. ホラミニス* (*B. foraminis*)、*B. フォルジイ* (*B. fordii*)、*B. フォリス* (*B. foris*)、*B. フマリオリ* (*B. fumaricoli*)、*B. フニクルス* (*B. funiculus*)、*B. ガラクトシジリチクス* (*B. galactosidilyticus*)、*B. ガリシエンシス* (*B. galliciensis*)、*B. ゲラチニ* (*B. gelatini*)、*B. ギブソニイ* (*B. gibsonii*)、*B. ギンセンギ* (*B. ginsengi*)、*B. ギンセンギフミ* (*B. ginsengihumi*)、*B. グラミニス* (*B. graminis*)、*B. ハルマパルス* (*B. halmapalus*)、*B. ハロチャレス* (*B. halochares*)、*B. ハロズランス* (*B. halodurans*)、*B. ヘミセルロシリチクス* (*B. hemicellulolyticus*)、*B. ヘルベルツテイネンシス* (*B. herbertsteinensis*)、*B. ホリコシ* (*B. horikoshi*)、*B. ホルネキアエ* (*B. horneckiae*)、*B. ホルチ* (*B. horti*)、*B. フミ* (*B. humi*)、*B. ファジンポエンシス* (*B. hwajinpoensis*)、*B. イドリエンシス* (*B. idriensis*)、*B. インジクス* (*B. indicus*)、*B. インファンチス* (*B. infantis*)、*B. インフェルヌス* (*B. infernus*)、*B. イサベリアエ* (*B. isabeliae*)、*B. イスロネンシス* (*B. isronensis*)、*B. ジェオツガリ* (*B. jeotgali*)、*B. コレエンシス* (*B. koreensis*)、*B. コルレンシス* (*B. korlensis*)、*B. クリッペンシス* (*B. kribbensis*)、*B. クルルウィチアエ* (*B. krulwichiae*)、*B. レヘンシス* (*B. lehensis*)、*B. レンツス* (*B. lentus*)、*B. リフェニフォルミス* (*B. licheniiformis*)、*B. リトラリス* (*B. litoralis*)、*B. ロシサリス* (*B. locisalis*)、*B. ルシフェレンシス* (*B. luciferensis*)、*B. ルテオルス* (*B. luteolus*)、*B. マカウエンシス* (*B. macauensis*)、*B. マシアエ* (*B. macyae*)、*B. マンナニリチクス* (*B. mannanylityticus*)、*B. マリフラビ* (*B. mariflavi*)、*B. マルマレンシス* (*B. marmarensis*)、*B. マッシリエンシス* (*B. massiliensis*)、*B. メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B. メタノリクス* (*B. methanolicus*)、*B. メチロトロフィックス* (*B. methylotrophicus*)、*B. モジャベンシス* (*B. mojavenensis*)、*B. ムラリス* (*B. muralis*)、*B. ムリマルチニ* (*B. murimartini*)、*B. ミコイデス* (*B. mycoi*

des)、B.ナンハイエンズビス(B. nanhaiensis)、B.ナンハイ
 セジミニス(B. nanhaiisediminis)、B.ネアルソニイ(B. nealsonii)、B.ネイゾウエンシス(B. neizhouensis)、B.ニアベ
 ンシス(B. niabensis)、B.ニアシニ(B. niacini)、B.ノバリ
 ス(B. novalis)、B.オセアニセジミニス(B. oceanisedimin
 is)、B.オディッセイ(B. odysseyi)、B.オクヘンシス(B. okhe
 nsis)、B.オクヒデンシス(B. okuhidensis)、B.オレロニウス(
 B. oleronius)、B.オシメンシス(B. oshimensis)、B.パナ
 シテラエ(B. panaciterrae)、B.パタゴニエンシス(B. patago
 niensis)、B.ペルセポレンシス(B. persepolensis)、B.ブ
 ラコルチジス(B. plakortidis)、B.ポチエオネンシス(B. poche
 onensis)、B.ポリゴニ(B. polygoni)、B.シュードアルカリフィ
 ルス(B. pseudoalcaliphilus)、B.シュードフィルムス(B. p
 seudofirmus)、B.シュードミコイデス(B. pseudomycoide
 s)、B.サイクロサッカロリチクス(B. psychrosaccharolytic
 us)、B.プミルス(B. pumilus)、B.キングダオネンシス(B. qing
 daonensis)、B.リグイ(B. rigui)、B.ルリス(B. ruris)
 、B.サフェンシス(B. safensis)、B.サラリウス(B. salarius
)、B.サリフィルス(B. saliphilus)、B.シュレゲリイ(B. schl
 egelii)、B.セレナタルセナチス(B. selenatarsenatis)、
 B.セレニチレズセンス(B. selenitireducens)、B.セオハエアネ
 ンシス(B. seohaeanensis)、B.シャクレトニイ(B. shackle
 tonii)、B.シアメンシス(B. siamensis)、B.シンプレクス(B.
 simplex)、B.シラリス(B. siralis)、B.スミチイ(B. smit
 hii)、B.ソリ(B. soli)、B.ソリサルシ(B. solisalsi)、B
 .ソノレンシス(B. sonorensis)、B.スポロテルモズランス(B. spo
 rothermodurans)、B.ストラトスフェリクス(B. stratosph
 ericus)、B.スブテラネウス(B. subterraneus)、B.スブチリ
 ス(B. subtilis)、B.タエアンシス(B. taeansis)、B.テクイ
 レンシス(B. tequilensis)、B.テルマンタルクチクス(B. therm
 antarcticus)、B.テルモアミロボランス(B. thermoamylov
 orans)、B.テルモクロアカエ(B. thermocloacae)、B.テルモ
 ラクチス(B. thermolactis)、B.チオパランス(B. thiopara
 ns)、B.チューリングエンシス(B. thuringiensis)、B.トリボキ
 シリコラ(B. tripoxylicola)、B.ツスシアエ(B. tusciae)
 、B.パリスモルチス(B. vallismortis)、B.ベッデリ(B. vedd
 eri)、B.ビエトナメンシス(B. vietnamensis)、B.ビレチ(B.
 vireti)、B.ワコエンシス(B. wakoensis)、B.ウェイヘンステフ
 アネンシス(B. weihenstephanensis)、B.キシアオキシエンシス
 (B. xiaoxiensis)、及びこれらの組み合わせからの菌株を含む。

【0046】

別の態様において、微生物細胞培養物は、シュードモナス属種(Pseudomonas sp.)の菌株を含む。ある種の態様において、微生物細胞培養物は、次のシュード
 モナス(Pseudomonas)属種：P.アンタルクチカ(P. antarctica)、P.アゾトホルマンズ(P. azotoformans)、P.ブラチフォルダエ
 (P. blatchfordae)、P.ブラシカセアルム(P. brassicacearum)、P.ブレッネリ(P. brenneri)、P.セドリナ(P. cedrina)、P.コルガテ(P. corrugate)、P.フルオレセンス(P. fluorescens)、P.ゲッサルジイ(P. gessardii)、P.リバネンシス
 (P. libanensis)、P.マンデリイ(P. mandelii)、P.マルギ

ナリス (*P. marginalis*)、*P. メジテラネア* (*P. mediterranea*)、*P. メリジアン* (*P. meridian*)、*P. ミグラエ* (*P. migulae*)、*P. ムシドレンス* (*P. mucidolens*)、*P. オリエンタリス* (*P. orientalis*)、*P. パナシス* (*P. panacis*)、*P. プロテゲンス* (*P. protegens*)、*P. プロテオリチカ* (*P. proteolytica*)、*P. ローデシアエ* (*P. rhodesiae*)、*P. シンキサント* (*P. synxantha*)、*P. チベルバレンシス* (*P. thivervalensis*)、*P. トラアシイ* (*P. toltaasi*)、*P. ベロニイ* (*P. veronii*)、及びこれらの組み合わせのいずれか一つからの菌株を含む。

【0047】

本明細書で使用される場合、「リポペプチド」という用語は、両親媒性環状ペプチド類及び抗細菌性ペプチド類を指すことができる。

【0048】

両親媒性環状ペプチド類は通常、 α -アミノ又は ω -ヒドロキシ脂肪酸に連結されたいくつかの α -アミノ酸からなり、フェンギシン型化合物、イツリン型化合物、サーファクチン型化合物、フサリジジン類、ビスコシン類、アンフィシン類、トラアシン類、シリノゴマイシン類、及びブチソルピン類などがあるが、これらに限定されるものではない。イツリン型化合物は、いくつかのアミノ酸からなり、 ω -アミノ脂肪酸に連結されている。ある種のリポペプチド類の脂肪酸鎖の長さは、C14 ~ C17 で変動する。これらの化合物は、スブチリス (*subtilis*) 及びアミロリクエファシエンス (*amyloliquefaciens*) などのバシラス (*Bacillus*) の各種属種から得ることができる。イツリン類及びそれらの変異体が、Ongena, et al., "Bacillus Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol," *Trends in Microbiology*, 16(3): 115-125, (2007) に記載されている。

【0049】

本発明のイツリン型化合物には、次の化合物：バシロマイシンD、バシロマイシンF、バシロマイシンL、バシロマイシンLC (バシロペプチンとも称される)、マイコスブチリン、イツリンA、イツリンAL、及びイツリンC (本明細書で言及の後者3化合物は総称して、イツリン類と称される。)のうちの1以上などがある。

【0050】

フェンギシン型化合物は、C14 ~ C18 の長さで変動する鎖を有する ω -ヒドロキシ脂肪酸に連結されている10個のアミノ酸からなる。これらの化合物は、スブチリス (*subtilis*)、アミロリクエファシエンス (*amyloliquefaciens*)、セレウス (*cereus*) 及びチューリングイエンス (*thuringiensis*) などのバシラス (*Bacillus*) の各種属種から、及びストレプトマイセス属種 (*Streptomyces* sp.) から得ることができる。フェンギシン型化合物は、上記のOngenaに記載されている。本明細書に記載の組成物に好適なフェンギシン型化合物には、フェンギシンA、フェンギシンB、プリパスタチンA、プリパスタチンB、Kimura, et al., SNA 60-367-New Peptide Enzyme Inhibitors Against Aromatase, *Journal of Antibiotics*, 50(6): 529-531, (1997) に記載のストレプトマイセス属種 (*Streptomyces* sp.) からのプリパスタチン類、及び米国特許第6,291,426号に記載のアグラストチン類 (本明細書で言及された後者4個のリストは総称してプリパスタチン類と称される。)などがある。

【0051】

サーファクチン型化合物は、C13 ~ C16 の長さで変動する鎖を有する ω -ヒドロキシ脂肪酸に連結されたいくつかのアミノ酸からなる。これらの化合物は、スブチリス (*subtilis*)、アミロリクエファシエンス (*amyloliquefaciens*)

10

20

30

40

50

、コアグランズ (coagulans)、プミルス (pumilus) 及びリチェニホルミス (licheniformis) などのバシラス (Bacillus) の各種属種から得ることができる。サーファクチンファミリーの化合物が、上記の Ongena に記載されている。本発明のサーファクチン型化合物には、次の化合物：エスペリン (esperin)、リケナイシン、プミラシジン及びサーファクチンのうちの1以上などがある。

【0052】

フサリシジン型化合物は、15-グアニジノ-3-ヒドロキシペンタデカン酸に連結した6個のアミノ酸からなる。これらの化合物は、ポリミキサ (polymyxa) などのパエニバシラス属種 (Paenibacillus sp.) から得ることができる。フサリシジンファミリーの化合物は、Choi, S-K, et al., "Identification and Functional Analysis of the Fusaricidin Biosynthetic Gene of Paenibacillus polymyxa E681, Biochemical and Biophysical Research Communications, 365: 89-95, (2008) に記載されている。本発明のフサリシジン型化合物には、次の化合物：フサリシジンA、B、C及びD並びにフサリシジンLI-F03、LI-F04、LI-F05、LI-F06、LI-F07及びLI-F08のうちの1以上などがある。追加のフサリシジン型化合物には、2015年9月24日出願の米国特許出願第62/232,205号(参照によって本明細書に組み込まれる)に記載のパエニセリン類及びパエニプロリキシン類などがある。パエニセリン類及びパエニプロリキシン類の例には、パエニセリンA1、パエニセリンA2、パエニセリンA3、パエニセリンA4、パエニセリンB1、パエニセリンB2、パエニセリンB3、パエニセリンB4、パエニセリンC1、パエニセリンC2、パエニセリンC3、パエニセリンC4、パエニプロリキシンA1、パエニプロリキシンA2、パエニプロリキシンB1、パエニプロリキシンB2、パエニプロリキシンC1、パエニプロリキシンC2、パエニプロリキシンD1、パエニプロリキシンD2、パエニプロリキシンE1、パエニプロリキシンE2、パエニプロリキシンF1、及びパエニプロリキシンF2などがある。

【0053】

ビスコシン類、アンフィシン類、トラアシン類、シリngoマイシン類、及びブチソルピン類は、Raaijmakers, et al., (2006) Molecular Plant-Microbe Interactions 19(7): 699-710 に記載の植物関連シュードモナス (Pseudomonas) 属種によって産生される。ビスコシン類には、ビスコシン、ビスコシン-アミド、マッセトリドA、マッセトリドD、WLIP、シュードフォミン (pseudophomin) A、及びシュードフォミン (pseudophomin) Bなどがある。アンフィシン類には、アンフィシン、テンシン、ホリペプチンA、ロキシン、及びアルスロファクチン (arthrofactin) などがある。トラアシン類には、トラアシン、FP-B、コルペプチンA、SP22、及びSP25Aなどがある。シリngoマイシン類には、シリngoマイシン、シリngoスタチン、シリngotoksin (syringotoxin)、シュードマイシンA、及びコルマイシンAなどがある。ブチソルピン類には、ブチソルピンI及びブチソルピンIIなどがある。

【0054】

抗微生物性ペプチドが、Wang & Wang (2004) Nucleic Acids Research 32: D590-D592 に記載されている。その抗微生物性ペプチドは、非リボソーム合成ペプチド又はリボソーム合成ペプチド (RAMPS) であることができる。非リボソーム合成ペプチドは、細菌及び真菌で認められる。これらの抗微生物性ペプチドは、リボソームに基づく合成とは対照的にペプチド合成酵素によって構築される。グラミシジン (例えば、グラミシジンS、グラミシジンD)、バシトラシン、ポリミキシンB、メリチン、セクロピン、及びバンコマイシンが、非リボソーム合成抗微生物ペプチドの例である。Zeitler, et al. (2013) PLOS

10

20

30

40

50

One 8 (8) : e71687。さらなるパントシンA、パントシンB、ポリオキシシン類、ニココマイシン類、リゾシチン、バシリシン、プラストサイジン、及びミルディオマイシンはいずれも、特許請求の組成物又は方法で使用可能な植物病原体に対して活性な抗微生物性ペプチドである。PEP6、PAF26、BPC194、PEP3、PEP11、BP76、CAMEL、イセガナン、D4E1、TYP、ESF12、ESF1、ペキシガナン、MSI-99、MB-39、Pen4-1、及びD32Rはいずれも、特許請求の組成物又は方法で使用可能な植物病原体に対する活性を有する合成抗微生物性ペプチドである。さらに、セクロピンA、B、タキプレシン、ヘリオマイシン (helioomicin) / ドロソマイシン (drosomycin)、サクロトキシン (sacrotoxin) IA、イガイ・ディフェンシン (mussel defensin)、マゲニン、エスクレンチン (esculentin) - 1、Rs-AFP2、Alf-AFP、Spi1、DRR230-a、BSD1、WT1、Dm-AMP1、Mj-AMP1、Pn-AMP、ホルドンチオニン (hordonthionin)、-チオニン、AFP、SB-37、Shiva-1、SB37、MB-39、Msra1、MSI-99、Myp30、Rev4、及びD4E1はいずれも、病原体に対する少なくとも部分的な抵抗性を与え、本明細書に記載の組成物及び方法で用いることができるトランスジェニック植物で発現されている。Montesinos (2007) FEMS Microbiol Lett 270:1-11。

【0055】

本明細書で開示の方法で精製可能であるEPS類の例には、アセタン (アセトバクター・キシリナム (Acetobacter xylinum)) ; アルギン酸類 (アゾトバクター・ビネランジイ (Azotobacter vinelandii)) ; セルロース (アセトバクター・キシリナム (Acetobacter xylinum)) ; キトサン (ケカビ属種 (Mucorales spp.)) ; カードラン (アルカリゲネス・フェーカリス (Alcaligenes faecalis) 変種ミキソゲネス (myxogenes)) ; シクロソフォラン類 (cyclosporans) (アグロバクテリウム属種 (Agrobacterium spp.)、リゾビウム属種 (Rhizobium spp.) 及びキサントモナス属種 (Xanthomonas spp.)) ; デキストラン (ロイコノストク・メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides)、ロイコノストク・デキストラニクム (Leuconostoc dextranicum) 及びラクトバチルス・ヒルガルジイ (Lactobacillus hilgardii)) ; エミュルサン (アシネトバクター・カルコアセチクス (Acinetobacter calcoaceticus)) ; ガラクトグルコ多糖類 (galactoglucopolysaccharides) (アクロモバクター属種 (Achromobacter spp.)、アグロバクテリウム・ラジオバクター (Agrobacterium radiobacter)、シュードモナス・マルギナリス (Pseudomonas marginalis)、リゾビウム属種 (Rhizobium spp.) 及びズーグレア属種 (Zooglea spp.)) ; ガラクトサミノガラクトン (galactosaminogalactan) (アスペルギルス属種 (Aspergillus spp.)) ; ジェラン (オーレオモナス・エロデア (Aureomonas elodea) 及びスフィンゴモナス・パウシモビリス (Sphingomonas paucimobilis)) ; グルクロナン (シノリゾビウム・メリロチ (Sinorhizobium meliloti)) ; N-アセチルグルコサミン (スタフィロコッカス・エピデルミジス (Staphylococcus epidermidis)) ; N-アセチル-ヘパロサン (エシェリキア・コリ (Escherichia coli)) ; ヒアルロン酸 (ストレプトコッカス・エクイ (Streptococcus equi)) ; インジカン (ベイジェリンキア・インディカ (Beijerinckia indica)) ; ケフィラン (ラクトバチルス・ヒルガルジイ (Lactobacillus hilgardii)) ; レンチナン (レンチヌス・エロデス (Lentinus edodes)) ; レバン (アルカリゲネス・ビスコスス (Alcali

10

20

30

40

50

genes viscosus)、ジモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)、パチラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)；プルラン(アウレオバシジウム・プルランス(*Aureobasidium pullulans*))；スクレログルカン(スクレロチウム・ロルフシイ(*Sclerotium rolfsii*)、スクレロチウム・デルフィニイ(*Sclerotium delfinii*)及びスクレロチウム・グルカニウム(*Sclerotium glucanicum*))；シゾフィラン(スキゾフィルム・コムネ(*Schizophyllum commune*))；ステワルトン(*stewartan*) (パントエア・ステワルチイ(*Pantoea stewartii*) 下位属種ステワルチイ(*stewartii*))；スクシノグリカン(アルカリゲネス・フェーカリス(*Alcaligenes faecalis*) 変種ミキソゲネス(*myxogenes*)、シノリゾビウム・メリロチ(*Sinorhizobium meliloti*))；キサントン(キサントモナス・カンペストリス(*Xanthomonas campestris*))；及びウエラン(アルカリゲネス属種(*Alcaligenes spp.*))などがあるが、これらに限定されるものではない。

10

【0056】

開示の方法は、当業界で公知の方法に従って微生物株(例えば、パエニバシラス属種(*Paenibacillus spp.*)株NRRL B-50972、パチラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)株NRRL B-21661、又はそれ由来の真菌突然変異体(株))を培養することで得られる組成物とともに用いることができる。従来の大規模微生物培養プロセスには、液内発酵、固体発酵又は液体表面培養などがある。発酵終了に向かって、栄養分が枯渇してくると、細胞は増殖期から孢子形成期への移行を開始することで、発酵の最終産物は、かなりの部分が孢子、代謝物及び残留発酵培地である。孢子形成は、パエニバシラス(*Paenibacillus*)の自然なライフサイクルの一部であり、栄養制限に応じて細胞によって開始される。発酵は、高レベルの孢子形成のコロニー形成単位を得て、孢子形成を促進するように構成される。発酵によって得られる細菌細分、孢子及び代謝物を、直接用いることができるか、工業的方法、例えば遠心、接線流濾過、深層濾過、及び留去によって濃縮することができる。

20

【0057】

そのような組成物は、発酵産物を含む。一部の実施形態において、濃縮した発酵プロセスを、例えばダイアフィルトレーション法によって洗浄して、残留発酵プロセス及び代謝物を除去する。本明細書で使用される「プロセス濃縮液」という用語は、本明細書に記載の工業的方法によって濃縮されているが、液体形態のままである全プロセス(発酵プロセス)を指す。本明細書で使用される「発酵固体」という用語は、発酵プロセスを乾燥させた後の残る固体材料を指す。本明細書で使用される「発酵産物」という用語は、全プロセス、プロセス濃縮液及び/又は発酵固体を指す。本発明の方法を用いて、発酵産物を含む組成物を作ることができる。

30

【0058】

発酵プロセス又はプロセス濃縮液は、噴霧乾燥、凍結乾燥、箱型乾燥、流動床乾燥、ドラム乾燥又は留去などの従来の乾燥プロセス又は方法を用い、担体を加えて又は加えずに濃縮物を乾燥することができる。

40

【0059】

得られた乾燥生成物を、製粉又は造粒などによってさらに処理して、特定の粒径又は物理形態を得ることができる。下記に記載の担体は、乾燥後に加えることもできる。

【0060】

発酵プロセスの抽出、遠心及び/又は濾過などの当業界で公知の手段によって、本発明の菌株の発酵プロセスの無細胞調製物を得ることができる。いわゆる無細胞調製物が、細胞を持たないのではなく、細胞を除去するのに使用される技術に応じて(例えば、遠心速度)、ほぼ無細胞又は実質的に無細胞であることができることは、当業者であれば明らかであろう。得られた無細胞調製物を乾燥し、及び/又は植物若しくは植物成長培地に施用する

50

のを助ける成分とともに製剤することができる。発酵ブロスについて上記で記載の濃縮方法及び乾燥技術を、無細胞調製物に適用することもできる。

【0061】

一部の実施形態において、開示の方法は、液体製剤である組成物を製造するものである。液体製剤の例には、懸濁剤及び油分散液などがあるが、これらに限定されるものではない。他の実施形態において、本発明の組成物は、固体製剤である。液体製剤の例には、凍結乾燥粉末及び噴霧乾燥粉末などがあるが、これらに限定されるものではない。

【0062】

本発明の方法で製造される組成物は、効力、安定性及び有用性を改善し、及び/又は処理、包装及び最終用途使用を容易にするために細胞、無細胞調製物又は代謝物を含む組成物に加えられる製剤不活性成分を含むことができる。そのような製剤不活性成分及び製剤成分には、担体、安定剤、栄養素又は物理特性調節剤などがあり得るものであり、それは個別に又は組み合わせることで加えることができる。一部の実施形態において、担体には、水、オイル及び他の有機若しくは無機溶媒などの液体材料、並びにミネラル類、ポリマー類若しくは生物的に若しくは化学合成によって誘導されるポリマー複合体などの固体材料などがあり得る。一部の実施形態において、担体は、種子若しくは根などの植物部分への組成物の付着を促進する結合剤又は接着剤である。例えば、Taylor, A.G., et al., Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments, Annu. Rev. Phytopathol. 28:321-339 (1990)を参照する。安定化剤には、凝固阻止剤、酸化防止剤、乾燥剤、保護剤又は保存剤などがあり得る。栄養素には、炭素源、窒素源及びリン源、例えば糖類、多糖類、オイル、タンパク質、アミノ酸、脂肪酸及びリン酸塩などがあり得る。物理特性調節剤には、増量剤、湿展剤、増粘剤、pH調節剤、レオロジー調節剤、分散剤、佐剤、界面活性剤、凍結防止剤又は着色剤などがあり得る。一部の実施形態において、発酵によって産生される細胞、無細胞調製物又は代謝物を含む組成物を、他の製剤調製物を用いずに、希釈剤としての水を用い又は用いずに直接用いることができる。一部の実施形態において、製剤不活性物質を、発酵ブロス濃縮後、及び乾燥時及び/又は乾燥後に加える。

【0063】

寄託情報

本発明のパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) 株のサンプルは、2014年8月28日にブダペスト条約下に、米国農務省農業研究局国立農業利用研究センター (NRRL) [1815 North University Street, Peoria, IL 61604, U.S.A.] にある the Agricultural Research Service Culture Collection に寄託しており、次の受託番号: NRRL B-50972 を割り当てられている。本発明のバチラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 株のサンプルは、1997年5月7日にブダペスト条件下に NRRL に寄託しており、次の受託番号: NRRL B-21661 を割り当てられている。

【0064】

パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) 株及びバチラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 株は、培養物へのアクセスが、本特許出願の係属中に、37 C.F.R. § 1.14 及び 35 U.S.C. § 122 下に資格を有すると特許商標庁が決定した者に入手可能となるようにする条件下で寄託されている。その寄託物は、寄託されたパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) 株の実質的に純粋な培養物を代表するものである。寄託物は、該当する出願の対応物又はその子孫が提出されている国における外国特許法による要求に応じて入手可能である。しかしながら、理解すべき点として、寄託物を入手できても、それが、行政措置によって付与された特許権から逸脱した該当する発明を実施する許可を構成するものではない。

【0065】

以下の実施例は、純粋に例示を目的として提供されるものであり、本発明を限定するためのものではない。

【0066】

実施例

実施例1．パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972 の全ブロスからのペレット及び上清画分におけるフサリシジンAレベル及び殺菌活性

パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972 を大豆系培地で増殖させて、全ブロス培養物を得た。次に、全ブロス培養物の一部を相対遠心力 (RCF) 24,790 × g で10分間遠心して、ペレット画分 (すなわち、ブロス濃縮液) 及び上清を得た。この速度での遠心は、少量 (約30 mL) についてのみ可能であり、柔らかいペレット画分及び相対的に濁った上清が得られた。ペレット画分は元の体積の1/4 ~ 1/3 を占め、上清画分が残りの部分を占めていた。ペレット画分及び上清画分は、それ以上の希釈や濃縮を行わずにその体積で分析した。

【0067】

最大遠心速度が RCF 17,000 × g に制限された更に大きい体積 (約1000 mL) では、パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972 全ブロス培養物が粘稠であって、ペレット画分を上清画分から分離することはできなかった。パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972 全ブロス培養物の大規模遠心には、より低い遠心速度でペレット画分及び上清画分を分離することができるように全ブロス培養物を調整する必要があることは明らかであった。

【0068】

超高速液体クロマトグラフィー/質量分析三重飛行時間 (UPLC/MS Triple TOF) を用いるクロマトグラフィー法を用いて、画分中の公知の殺菌剤化合物、フサリシジンAの相対量を評価した [カラム: ZORBAX (商標名) Eclipse Plus、2.1 × 100 mm、1.8 μm; 水 (0.1% FA) 及びアセトニトリル (0.1% FA); 勾配 (% B) : 0 - 5分 10 - 95%; 洗浄]。フサリシジンAの同定は、その固有の保持時間及び質量によって行った。スペクトラムにおけるフサリシジンピークの相対シグナル強度を表1に示してあり、各強度は全ブロススペクトラムに存在するものに対して正規化されている。フサリシジンAはペレット画分中に集中しており、上清画分中には少量が残っていた。

【0069】

各画分中に存在するコロニー形成単位も、全ブロス培養物、上清画分及びペレット画分の連続希釈を行い、固体培地上にその希釈液を蒔くことによっても定量した。得られたコロニーをカウントし、記録した (表1参照)。予想通り、大部分の細胞が、遠心によってペレット画分に移動した。

【0070】

表1．パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972 のコロニー形成単位 (CFU) 及び全ブロス培養液中のフサリシジンAの相対量

【表1】

サンプル	フサリシジンAの相対量	CFU/g
全ブロス	1.00	2.0×10^7
上清	0.11	1.3×10^5
ペレット (ブロス濃縮液)	2.16	9.4×10^7
独立の発酵からの全ブロス	0.93	未測定

【0071】

画分の殺菌活性を、ボトリチス・シネレア (*Botrytis cinerea*) (BOTRCI) を用いるイン・ピボアッセイでも測定した。パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロス並びに相当する上清及びペレット画分をそれぞれ水で希釈して、同等の最終体積とした。その希釈した全ブロス、上清画分、及びペレット画分を若い植物に施用し、次にその植物を、ボトリチス・シネレア (*Botrytis cinerea*) (BOTRCI) の接種物に曝露した。植物病原体の接種物への曝露から数日後に、各植物について、未処理対照植物と比較した病原体の防除パーセントを評点した。各処理とも、数連で評価した。

【0072】

図1に示した結果は、最大殺菌活性が全ブロス(「WB」)及びペレット画分(「ペレット」)にあるが、上清画分(「Sup」)では、未処理対照(「水」)と比較してほとんど観察できないほどの殺菌活性が得られたことを示している。

10

【0073】

これらの実験データは、パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロス中の殺菌剤化合物が、全ブロスの遠心及び得られたペレットからの上清の除去によって富化又は濃縮され得ることを示している。

【0074】

実施例2. パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロス用の遠心処理補助剤の確認

パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスは、エキソ多糖類 (EPS) などの粘稠性バイオポリマーを含むことから、遠心によってコンパクトなペレット画分を作るのが困難となる。このことは、図2で「WB-SDOS」とラベル表示された処理補助剤を加えずに遠心した全ブロスからのペレットの写真でわかる。各種化学薬剤が遠心時にコンパクトなペレット画分の形成を誘発する能力を調べたところ、GEROPON (登録商標) (ナトリウムジオクチルスルホスクシネート; SDOSとも称される) が確認された。

20

【0075】

GEROPON (登録商標) (SDOS) を、0.1%~0.5% (重量/体積) の濃度でパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロス(「WB」)に加えた場合、混合物を遠心することで、コンパクトなペレット画分及び粒子状材料を比較的含まない上清が得られた。このことは、図2で「WB+SDOS」とラベル表示されたGEROPON (登録商標) (SDOS) と混合した遠心全ブロスの写真からわかる。

30

【0076】

実施例3. 別のパエニバシラス (*Paenibacillus*) 株からの全ブロスでの遠心処理補助剤の効果

GEROPON (登録商標) (SDOS) が他のEPS産生株との遠心時にコンパクトなペレット画分の形成を誘発するか否かを調べるため、比較的高レベルのEPSを産生することが知られている別のパエニバシラス (*Paenibacillus*) 株を大豆系培地で増殖させた。全ブロスのいくつかの調製物を、0.1%~0.5% (重量/体積) の濃度でGEROPON (登録商標) (SDOS) の非存在下及び存在下に、RCF17,000×gで5分間遠心した。

40

【0077】

図3に示したように、EPS産生性パエニバシラス (*Paenibacillus*) 株からの全ブロスにGEROPON (登録商標) (SDOS) を加えることで、コンパクトなペレット画分及び透明な上清画分が常に得られた。対照的に、GEROPON (登録商標) (SDOS) の非存在下での同じ全ブロスの遠心では、概して、拡散したペレット画分及び濁った上清画分が得られた。

【0078】

実施例4. SDOSがコンパクトなペレット画分の形成を誘発することの確認並びにペ

50

レット及び上清画分中のフサリシジンAの測定

GEROPON (登録商標) (SDOS) は、Solvay (Brussels, Belgium) から入手可能な市販品である。GEROPON (登録商標) 中のSDOSが遠心効果を起こすものであり、前記市販品中の別の化学成分ではないことを確認するため、SDOSの精製調製物を、Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri) から購入した。GEROPON (登録商標) (SDOS) を全ブロスに最終濃度0.1%まで加え、又は精製したSDOSを最終濃度0.1%又は0.5%まで加えて、実施例2に記載の実験を繰り返した。コンパクトなペレット画分を、GEROPON (登録商標) (SDOS) 又は精製SDOSを用いて得た。

【0079】

10

次に、実施例1に記載の分析方法を用いて、GEROPON (登録商標) (SDOS) 若しくは精製SDOSを含む全ブロス並びにペレット及び上清画分中のフサリシジンAの相対レベルを求めた。等体積の全ブロス、ペレット画分及び上清画分を、フサリシジンAレベルについて分析し、それを全ブロス中のフサリシジンAによって生じたシグナルに正規化した。フサリシジンAの大半がペレット画分中に分離され、上清画分中にはごくわずかしが残っていなかった(図4参照)。

【0080】

これらの実験でのペレット画分は元の体積の1/4~1/3に相当し、上清画分は実施例1で認められた残留体積を占めていた。ペレット画分は全ブロスの濃縮型を表すことから、ペレット画分中のフサリシジンAの相対量が全ブロスで検出される量よりかなり高いと予想されたであろう(例えば、表1中の全ブロス及びペレット画分におけるフサリシジンAレベルを参照)。しかしながら、GEROPON (登録商標) (SDOS) で形成されたペレット画分では、これは当てはまらなかった(図4中の全ブロス及びペレット画分におけるフサリシジンAレベルを比較する)。これらの結果は、GEROPON (登録商標) (SDOS) が比較的低い遠心速度での全ブロスからのコンパクトなペレット画分の形成を促進するが、それによって、実施例1に記載のクロマトグラフィー法で検出可能なフサリシジンAの量も低下させることを示唆していた。この分析方法は、クロマトグラフィーカラムがフサリシジンAを他の化合物から分離する能力によるものであり、大きい不溶性凝集体で結合したフサリシジンAを検出しないものと考えられる。

20

【0081】

30

実施例5. GEROPON (登録商標) (SDOS) を含む及びそれを含まないパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 培養ブロスにおける粒径の分析

実験結果は、GEROPON (登録商標) (SDOS) がパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスでの孢子、フサリシジンA、及び他の材料の大きい凝集体の形成を誘発し、これらの凝集体が比較的低速での遠心時にコンパクトなペレット画分を与えたことを示唆していた。GEROPON (登録商標) (SDOS) で凝集が生じているか否かを調べるため、粒径分析 (PSA) を行った。

【0082】

40

PSAは、懸濁液サンプルにおける粒径分布を測定するものである。レーザー光を液体粒子懸濁液に通す。レーザー光がそのサンプルを通る時に、散乱光の強度における角度変化を記録する。この角度強度依存性を用いて、粒径分布を得る。得られたデータ曲線は、その粒径の粒子の群の関数としての粒径を表す。

【0083】

PSAを、パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロス、GEROPON (登録商標) (SDOS) を含む若しくは含まないブロス濃縮液、並びにGEROPON (登録商標) (SDOS) を含む若しくは含まないパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスからの上清画分で行った。ブロス濃縮液は、GEROPON (登録商標) (S

50

DOS)を含まない高速遠心後、又はペレットからの除去が困難であった少量の上清でのGEROPON(登録商標)(SDOS)を含む低速遠心後のパエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)NRRL B-50972全ブロスからのペレット画分から構成されていた。得られたデータ曲線を、図5A~5Eに示してある。各グラフにおける二つの曲線は、各サンプルで得た二つの測定値を表す。

【0084】

GEROPON(登録商標)(SDOS)を含むブロス濃縮液についてのPSAデータ曲線は、GEROPON(登録商標)(SDOS)を含まないブロス濃縮液で認められたものより大きい直径を有する粒子の群を確認するものであった。GEROPON(登録商標)(SDOS)を含むブロス濃縮液からの粒子の大半が、6 μ m以上の直径を示した。対照的に、GEROPON(登録商標)(SDOS)を含まないブロス濃縮液からの粒子のほとんどが6 μ m未満の直径を示した(図5B及び図5Cを比較する)。これらの結果は、GEROPON(登録商標)(SDOS)が大きい凝集体の形成を誘発するという仮説を裏付けるものであった。

10

【0085】

GEROPON(登録商標)(SDOS)を含む及び含まない上清画分の分析も、この仮説を裏付けるものであった。GEROPON(登録商標)(SDOS)を含む全ブロスからの上清画分中の粒子の大半が0.4 μ m未満の直径を示したが、GEROPON(登録商標)(SDOS)を含まない全ブロスからの上清画分中の粒子のほとんどが0.4 μ mより大きい直径を有していた(図5D及び図5Eを比較する)。これらのデータは、GEROPON(登録商標)(SDOS)をパエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)NRRL B-50972全ブロスに加えることで、大きい凝集体の形成が誘発され、それが遠心時に上清画分から効果的に除去され、ペレット画分とともに沈殿することを示唆している。

20

【0086】

実施例6. ペレット形成及びフサリシジンAレベルに対するpH及び塩濃度の効果

フサリシジンAなどの殺菌剤化合物は多くの場合、それらが溶解している溶液のpHによって影響を受けるイオン性基を有する。これらのイオン性基の電荷は、その殺菌剤化合物が溶液中で他の化合物とどのように相互作用するかに影響を与える。GEROPON(登録商標)(SDOS)がパエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)NRRL B-50972全ブロス中での凝集体の形成を誘発する能力を改善するpHを確認するため、遠心前に塩酸及び水酸化ナトリウムを加えることで、全ブロスのpHを3~10に調節した。

30

【0087】

pH3、6若しくは10でのGEROPON(登録商標)(SDOS)を含む全ブロスでの低速遠心後のペレット画分の観察で、pH6でコンパクトなペレット画分と透明上清が生じることが示された(図6参照)。この実験を、pH3、4、5、6、7、8、9若しくは10に調節したGEROPON(登録商標)(SDOS)を含むパエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)NRRL B-50972全ブロスで繰り返した。遠心後、ペレット画分を上清画分から分離し、ペレット画分中での相対フサリシジンAレベルを実施例1に記載の方法で求めた。4~7のpHでの全ブロスからのペレット画分で、最高フサリシジンAレベルが検出された。

40

【0088】

塩濃度が、溶液のイオン強度に影響する。高い塩濃度は、双極子相互作用を遮断し、極性化合物の水和を減らすことで、溶液からのこれら化合物の「塩析」を可能と得る。各種濃度の塩(例えば、塩化ナトリウム又は塩化カリウム)を、パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)NRRL B-50972に加えて、GEROPON(登録商標)(SDOS)を含む低速遠心後のコンパクトなペレット画分形成に対するそれらの効果を確認した。約2%~約10%の塩濃度が、コンパクトなペレット画分の形成を促進した。

50

【0089】

実施例7．パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスを用いる別の遠心処理助剤の確認

GEROPON (登録商標) (SDOS) を確認した後、追加の化学剤について、パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスと同様の効果を生じる能力を評価した。50 mL 円錐バイアル中、各化学剤を0.1%~0.5% (重量/体積) の濃度で全ブロスと混合し、RCF3,000 × g を生じる比較的低速遠心速度で5分間遠心した。

【0090】

次に、各種化学剤と混合した遠心全ブロスを、化学剤を全く含まない遠心全ブロスと比較した (すなわち、図7A中の最も左の円錐バイアル)。いくつかの化学剤が、低速遠心 (すなわち、RCF3,000 × g) 後に透明上清を生じ、それらについてさらに調べた。実施例1に示したように、これらの化学剤の非存在下で識別可能なペレット画分を形成するのに、RCF24,790 × g での遠心が必要であった。

10

【0091】

全ブロスからのペレット画分の充填を改善する化学剤を、より大きい体積で調べて、この効果を確認した。GEROPON (登録商標) (SDOS) を、陽性対照としてこれらの確認実験に含めた。図7Bは、NIAPROOF (登録商標) 4 (ナトリウム7-エチル-2-メチル-4-ウンデカニルサルフェート) がGEROPON (登録商標) (SDOS) で認められる効果と同様の効果を生じることを確認する一つのそのような実験からのペレット及び上清画分の写真を示す図である。

20

【0092】

NIAPROOF (登録商標) 4 (ナトリウム7-エチル-2-メチル-4-ウンデカニルサルフェート); NIAPROOF (登録商標) 8 (ナトリウム2-エチルヘキシルサルフェート); 及び直鎖アルキルベンゼンスルホネート、ナトリウムドデシルベンゼンスルホネートによって、パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 全ブロスの低速遠心後にコンパクトなペレット画分の形成が可能となった。

【0093】

実施例8．パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972 ペレット画分中の殺菌剤化合物の放出助剤の確認

30

GEROPON (登録商標) (SDOS) を含む又は含まないブロス濃縮液及び上清画分のPSA分析は、遠心助剤 (例えば、GEROPON (登録商標) (SDOS)) の添加が遠心時にコンパクトなペレット画分をより容易に形成する凝集体の形成を誘発することを示した (図5A~5Eを参照)。結果的に、遠心及びペレット画分の単離後に加えた放出助剤が凝集体を乱し、殺菌剤化合物の生物学的利用能及び得られる発酵産生物の効力を高める可能性がある。

【0094】

いくつかの化合物について、ペレット画分で、放出助剤として作用する能力を調べた。放出助剤としての化合物の効力を評価するため、実施例2に記載の方法に従って、全ブロスから、GEROPON (登録商標) (SDOS) を用いてペレット画分を形成した。次に、ペレット画分の部分をその各種化合物と混合し、各サンプル中に存在するフサリシジンAの量を、実施例1に記載の分析方法を用いて求めた。フサリシジンAの全ての測定値を、出発材料全ブロス中に存在する量に正規化した。GEROPON (登録商標) (SDOS) のみを含むペレット画分を対照として含めた。

40

【0095】

いくつかのポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル化合物が、ペレット画分に存在するフサリシジンAの相対量を増加させることが認められた。これらの化合物には、ポリオキシエチレン (25) ドデシルエーテル (C12EO25とも称される) 及びBRIJ (登録商標) L23 (ポリオキシエチレン (23) ドデシルエーテル; C12EO

50

23とも称される)などがあった(図8を参照)。さらなる実験によって、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル化合物C12EO6(ポリオキシエチレン(6)ドデシルエーテル)及びBRIJ(登録商標)S100(ポリオキシエチレン(100)オクタデシルエーテル)も、ペレット画分中に存在するフサリジジンAの相対量を増やすことが示された(図9参照)。TWEEN(登録商標)80(2-[2-[3,4-ビス(2-ヒドロキシエトキシ)オキソラン-2-イル]-2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]エチル(E)-オクタデカ-9-エノエート;ポリオキシエチレンソルビタンオレエートとも称される)も、放出助剤として機能することが認められた(図9参照)。

【0096】

実施例9. 放出助剤を加えた後のペレット画分の懸濁性上昇

GEROPON(登録商標)(SDOS)単独を含む、又はGEROPON(登録商標)(SDOS)及びC12EO25の両方を含むペレット画分の物理特性を調べた。調べた物理特性のうちの一つは、濃縮ペレット画分の懸濁性であった。

【0097】

パエニバシラス属種(*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972を大豆系培地で培養し、GEROPON(登録商標)(SDOS)を含んだ低速遠心を行って、ペレット画分を得た。そのペレット画分を二つの画分に分離し、C12EO25をその画分の一つと混合した。両方の画分からの小分けサンプルを15mL円錐バイアル中にて水と混合して、10倍希釈液を作った。希釈されたペレット画分を、数分間にわたり室温で平衡化した。

【0098】

平衡化後、C12EO25を含まないペレット画分を二つの層に分離し、上層が透明層であり、下層が濁った層であった(図10中の左の円錐バイアルを参照)。対照的に、C12EO25を含むペレット画分は、平衡化後に単一懸濁液のままであった(図8中の右の円錐バイアルを参照)。これらの結果は、C12EO25が水で希釈した場合にパエニバシラス属種(*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972ブロス濃縮液の懸濁性を上昇させることを示していた。

【0099】

実施例10. 遠心助剤及び放出剤を加えることによる、パエニバシラス属種(*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972全ブロスの殺菌活性上昇

パエニバシラス属種(*Paenibacillus* sp.) NRRL B-50972を大豆系培地で培養して全ブロスを得た。0.1%GEROPON(登録商標)(SDOS)及び2%KClを全ブロスの一部に加え、pHを6に調節した。全ブロスのこの部分を遠心してペレット画分(すなわち、ブロス濃縮液)を得て、上清画分は除去した。次に、ペレット画分の一部を放出助剤であるC12EO25と混合した。

【0100】

全ブロス、GEROPON(登録商標)(SDOS)のみを含むペレット画分、並びにGEROPON(登録商標)(SDOS)及びC12EO25の両方を含むペレット画分を水で希釈して、濃度10%、5%、2.5%、及び1.25%とした。希釈した全ブロスを若い植物に施用し、次に、それらの植物をアルテルナリア・ソラニ(*Alternaria solani*)(ALTESO)又はボトリチス・シネレア(*Botrytis cinerea*)(BOTRCI)の接種物に曝露させた。植物病原体の接種物への曝露から数日後に、各植物について、未処理対照(UTC)植物と比較した病原体の防除パーセントを評点した。各処理とも、3連で評価し、平均防除パーセントを報告した(表2~3参照)。

【0101】

各アッセイにおいて、GEROPON(登録商標)(SDOS)のみを含むペレット画分は、全ブロスより大きい殺菌活性を有しており、GEROPON(登録商標)(SDOS)及びC12EO25の両方を含むペレット画分が最大殺菌活性を有していた。これらの実験データは、パエニバシラス属種(*Paenibacillus* sp.) NRRL

10

20

30

40

50

B - 5 0 9 7 2 全ブロスへのGEROPON（登録商標）（SDOS）の添加が低速濃縮時のペレット画分における殺菌剤化合物の富化又は濃縮を可能とし、C 1 2 E O 2 5 の添加が、このペレット画分の殺菌活性を高めることを示している。

【0102】

GEROPON（登録商標）（SDOS）及びC 1 2 E O 2 5 も、ペレット画分の場合と同様の最終施用量で若い植物にそれぞれ施用した。その後、その若い植物に真菌病原体を接種し、各植物について、UTC植物と比較した病原体の防除パーセントを評点した。これらの対照処理は、GEROPON（登録商標）（SDOS）及びC 1 2 E O 2 5 が、UTC植物との比較後に確認され得る固有の殺菌活性を持たないことを示した。

【0103】

表2. 10%、5%、2.5%及び1.25%の希釈率でのパエニバシラス属種（*Paenibacillus* sp.）NRRL B - 5 0 9 7 2 全ブロス、GEROPON（登録商標）（SDOS）を含む再懸濁ペレット画分、及びGEROPON（登録商標）（SDOS）及びC 1 2 E O 2 5 を含む再懸濁ペレット画分によって達成されたアルテルナリア・ソラニ（*Alternaria solani*）（ALTESO）の防除

【表2】

処理	施用量	平均防除パーセント
全ブロス	10%	98
	5%	78
	2.5%	78
	1.25%	57
ペレット画分 + GEROPON（登録商標）（SDOS）	10%	98
	5%	96
	2.5%	80
	1.25%	82
ペレット画分 + GEROPON（登録商標）（SDOS） + C12E025	10%	99
	5%	96
	2.5%	94
	1.25%	93

【0104】

表3. 10%、5%、2.5%、及び1.25%の希釈率でのパエニバシラス属種（*Paenibacillus* sp.）NRRL B - 5 0 9 7 2 全ブロス、GEROPON（登録商標）（SDOS）を含む再懸濁ペレット画分、及びGEROPON（登録商標）（SDOS）及びC 1 2 E O 2 5 を含む再懸濁ペレット画分で達成されたボトリス・シネレア（*Botrytis cinerea*）（BOTRCI）の防除

10

20

30

【表 3】

処理	施用量	平均防除パーセント
全ブロス	10%	63
	5%	75
	2.5%	68
	1.25%	28
ペレット画分 + GEROPON (登録商標) (SDOS)	10%	89
	5%	93
	2.5%	60
	1.25%	73
ペレット画分 + GEROPON (登録商標) (SDOS) + C12E025	10%	100
	5%	98
	2.5%	94
	1.25%	75

10

【0105】

実施例 11 . 遠心助剤及び放出助剤を用いるパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972 ブロス濃縮液の大規模調製でのフサリシジン A レベル

20

パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972 全ブロスからのブロス濃縮液の五つの大きいバッチを、遠心助剤として GEROPON (登録商標) (SDOS) 及び放出助剤として BRIJ (登録商標) S100 (ポリオキシエチレン (100) オクタデシルエーテル) を用いて、実施例 10 に記載の方法に従って調製した。各バッチは、数リットルの材料からなるものであった。各バッチからの全ブロス及び得られたブロス濃縮液におけるフサリシジンレベルを、実施例 1 に記載の方法に従って定量した。結果は全て、-80 で保存したパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972 全ブロス (すなわち、「WB 標準」) 中のフサリシジン A レベルに対して正規化した。

30

【0106】

図 11 は、フサリシジン A 測定値における 95% 信頼区間を示すグラフ上のエラーバーとともに結果を表す図である。ブロス濃縮液中のフサリシジン A レベルは、相当する全ブロスで検出される値の 3.5 倍であった。

【0107】

実施例 12 . バチラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) NRRL B - 21661 全ブロスでの遠心処理助剤の効果

バチラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 株 NRRL B - 21661 を、大豆系培地で増殖させた。得られた粘稠全ブロスを、0.1% ~ 0.5% (重量/体積) の濃度での GEROPON (登録商標) (SDOS) とともに又はそれを含みずに RCF1, 500 × g で 5 分間遠心した。

40

【0108】

GEROPON (登録商標) (SDOS) のバチラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 株 NRRL B - 21661 全ブロスへの添加によって、よりコンパクトなペレット画分及びより透明な上清画分が得られた (図 12 参照)。対照的に、GEROPON (登録商標) (SDOS) を含まない同じ全ブロスの遠心によって、相対的に拡散性の画分及び濁った上清画分が得られた。

【0109】

実施例 13 . 遠心助剤及び放出助剤を含むパエニバシラス属種 (*Paenibacillus*

50

1 us sp.) NRRL B - 50972 全ブロスの殺菌活性上昇及び用量応答の確認
 パエニバシラス属種 (Paenibacillus sp.) NRRL B - 5097
 2 全ブロス、実施例 10 に記載の方法に従って調製及び処理した。得られた全ブロス、
 GEROPON (登録商標) (SDOS) のみを含むペレット画分、並びに GEROPON
 (登録商標) (SDOS) 及び C12E025 の両方を含むペレット画分を連続希釈し
 て、出発材料の 1 倍、0.5 倍、0.25 倍及び 0.125 倍濃度を有するサンプルを調
 製した。次に、連続希釈サンプルを、0.625% の施用量で若い植物に施用した。その
 植物に、真菌病原体アルテルナリア・ソラニ (Alternaria solani) を
 接種し、次に、UTC 植物と比較した疾病防除について評価した。報告の疾病防除値は、
 独立の 3 連の試験の平均である。

10

【0110】

表 4 に示したように、GEROPON (登録商標) (SDOS) のみを含むペレット画
 分は、全ブロスより高い殺菌活性を有しており、GEROPON (登録商標) (SDOS
) 及び C12E025 の両方を含むペレット画分が最大の殺菌活性を有していた。さらに
 、明らかな用量応答が各サンプル横断的に認められ、1 倍サンプルで最高活性が認められ
 、0.125 倍サンプルで最小活性が認められた。

【0111】

表 4 . 各サンプルの 1 倍、0.5 倍、0.25 倍及び 0.125 倍連続希釈液でのパエ
 ニバシラス属種 (Paenibacillus sp.) NRRL B - 50972 全ブ
 ロス、GEROPON (登録商標) (SDOS) を含む再懸濁ペレット画分、並びに GE
 ROPON (登録商標) (SDOS) 及び C12E025 を含む再懸濁ペレット画分で達
 成されたアルテルナリア・ソラニ (Alternaria solani) (ALTES
 O) の防除。サンプルはいずれも、0.625% の施用量で植物に施用した。

20

【表 4】

処理	連続希釈	平均防除パーセン ト
全ブロス	1X	61
	0.5X	26
	0.25X	16
	0.125X	0
ペレット画分 + GEROPON (登録商標) (SDOS)	1X	93
	0.5X	81
	0.25X	39
	0.125X	7
ペレット画分 + GEROPON (登録商標) (SDOS) + C12E025	1X	97
	0.5X	88
	0.25X	70
	0.125X	32

30

40

【0112】

実施例 14 . 三つの異なるパエニバシラス (Paenibacillus) 株からの全
 ブロス、ブロス濃縮液及び上清におけるフサリジジン A レベル

パエニバシラス属種 (Paenibacillus sp.) NRRL B - 5097
 2 全ブロスからの、そして二つの別のパエニバシラス (Paenibacillus) 株
 からの全ブロスからのブロス濃縮液を、遠心助剤として GEROPON (登録商標) (S
 DOS) 及び放出助剤として BRIJ (登録商標) S100 (ポリオキシエチレン (10
 0) オクタデシルエーテル) を用いて、実施例 10 に記載の方法に従って調製した。各全
 ブロス並びにブロス濃縮液の製造時に除去した上清のサンプルを分析用に保存した。各菌

50

株からの全ブロス並びに得られたブロス濃縮液及び上清中のフサリシジンレベルを、実施例 1 に記載の方法に従って定量した。結果は全て、- 80 で保存したパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972 全ブロス中のフサリシジン A レベルに正規化した。

【0113】

図 13 は、フサリシジン A 測定値における 95% 信頼区間を示すグラフ上のエラーバーとともに結果を表す図である。全ブロスからブロス濃縮液に行くフサリシジン A の有効濃度が 3 種類全ての株横断的に認められ、ブロス濃縮液中での濃度は、相当する全ブロス中で検出されたレベルの 7 倍の高さになった。いずれの上清においても、検出可能なフサリシジン A は認められなかった。

10

【0114】

全ブロス、ブロス濃縮液及び上清について、実施例 10 に記載の方法に従って、アルテルナリア・ソラニ (*Alternaria solani*) に対する殺菌活性を分析した。BRAVO (登録商標) (クロロタロニル) による処理を、陽性対照として含めた。表 5 で提供の結果は、殺菌活性が全ブロス及びブロス濃縮液で認められ、上清では検出可能な殺菌活性はほとんど認められなかったことを示している。

【0115】

別段の定義がない限り、本明細書における全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する業界の当業者によって共通に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと同様若しくは等価である方法及び材料を本発明の実施又は試験で用いることができるが、本明細書においては、好ましい方法及び材料を記載している。引用されている全ての刊行物、特許及び特許公開は、参照によって、あらゆる点に関してその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0116】

本明細書で記述の刊行物は、単に本願の出願日以前のそれらの開示内容のために提供されるものである。本明細書におけるいかなる内容も、本発明が、先行発明により、そのような刊行物に先行する資格を持たないとの承認と解釈すべきではない。

【0117】

開示の発明が、変動可能であると記載されている特定の method、プロトコール及び材料に限定されないことは明らかである。本明細書で使用される用語が、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定するものではないことも明らかである。

30

【0118】

当業者であれば、通常の実験のみを用いて、本明細書に記載の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識するであろうし、又は確認することが可能であろう。そのような均等物は、添付の特許請求の範囲に包含されるものである。

【0119】

表 5 . 希釈率 5%、2.5% 及び 1.25% でのパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) NRRL B - 50972、パエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) 株 A、及びパエニバシラス属種 (*Paenibacillus* sp.) 株 B からの全ブロス、ブロス濃縮液、及び上清によって達成されたアルテルナリア・ソラニ (*Alternaria solani*) (ALTESO) の防除

40

【表 5】

処理	施用量	平均防除パーセント
パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)NRRL B-50972 全ブロス	5%	73
	2.50%	73
	1.25%	81
パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)NRRL B-50972 ブロス濃縮液	5%	93
	2.50%	93
	1.25%	92
パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)NRRL B-50972 上清	5%	54
	2.50%	31
	1.25%	0
パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)株A 全ブロス	5%	92
	2.50%	92
	1.25%	90
パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)株A ブロス濃縮液	5%	95
	2.50%	95
	1.25%	95
パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)株A 上清	5%	0
	2.50%	0
	1.25%	0
パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)株B 全ブロス	5%	93
	2.50%	94
	1.25%	90
パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)株B ブロス濃縮液	5%	95
	2.50%	96
	1.25%	95
パエニバシラス属種(Paenibacillus sp.)株B 上清	5%	0
	2.50%	0
	1.25%	0
BRAVO (登録商標) (クロロタロニル)	128ppm	98
BRAVO (登録商標) (クロロタロニル)	32ppm	92

10

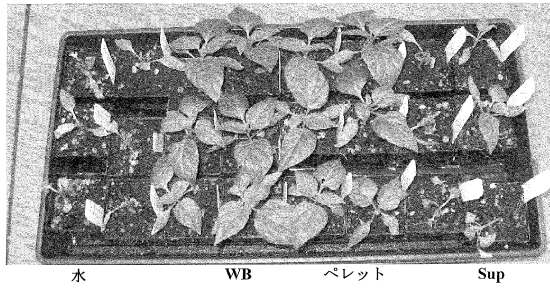
20

30

40

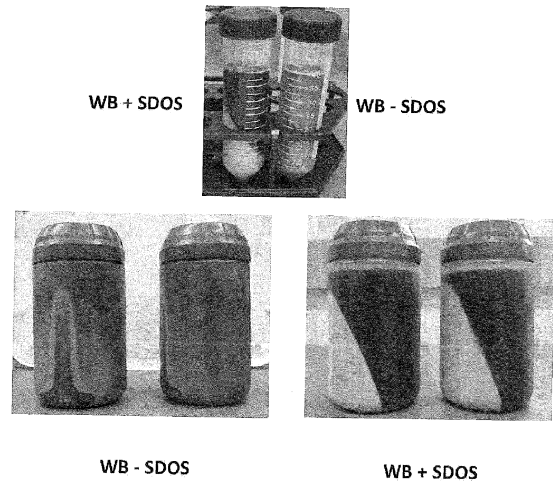
【 図 1 】

FIG. 1



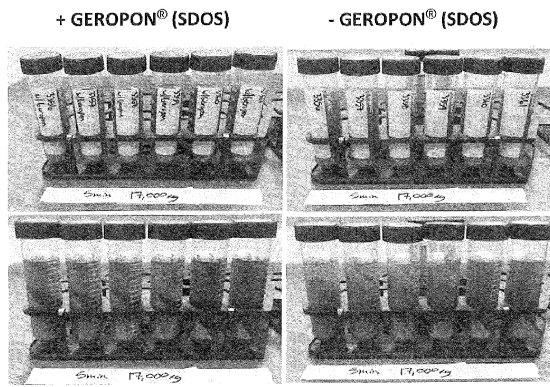
【 図 2 】

FIG. 2



【 図 3 】

FIG. 3



上図：正面図；下図：背面図

【 図 4 】

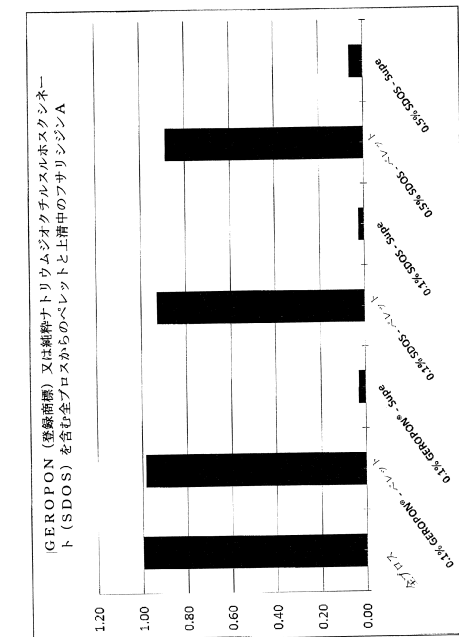
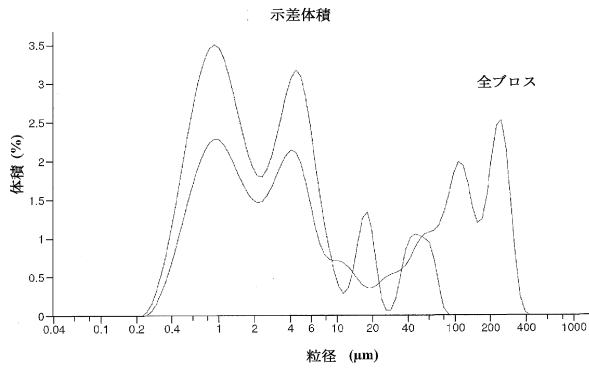


FIG. 4

【図 5 A】

FIG. 5A

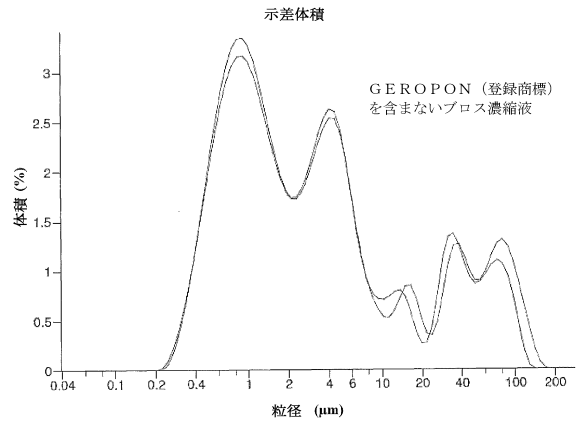


体積統計 (算術)
0.040 μm ~ 2000 μm の計算

平均	S.D.	分散	d10	d50	d90
μm	μm	μm ²	μm	μm	μm
55.9	85.4	7.302	0.709	5.02	210
7.22	13.6	186	0.578	2.12	18.6

【図 5 B】

FIG. 5B

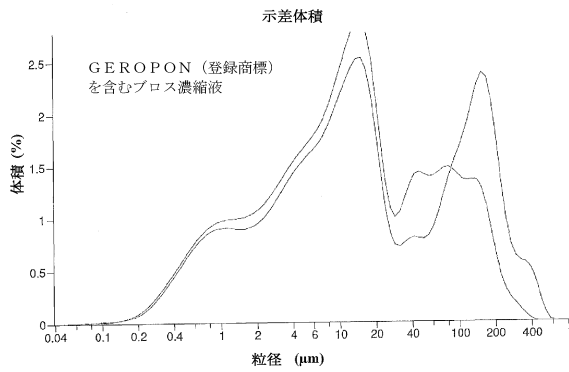


体積統計 (算術)
0.040 μm ~ 2000 μm の計算

平均	S.D.	分散	d10	d50	d90
μm	μm	μm ²	μm	μm	μm
14.3	26.7	713	0.572	2.53	53.7
11.6	21.7	472	0.572	2.33	41.0

【図 5 C】

FIG. 5C

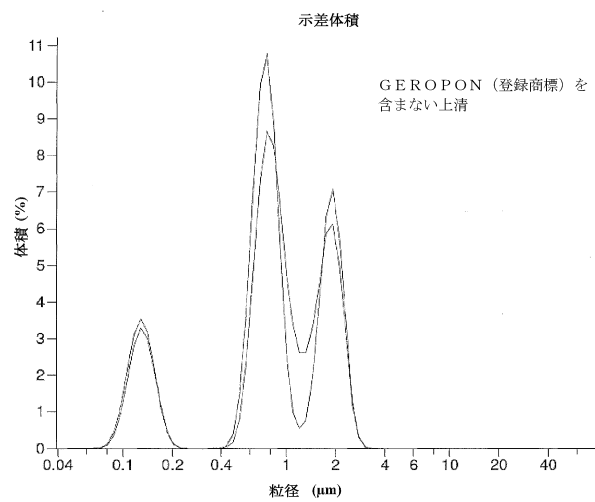


体積統計 (算術)
0.040 μm ~ 2000 μm の計算

平均	S.D.	分散	d10	d50	d90
μm	μm	μm ²	μm	μm	μm
57.3	85.5	7310	1.09	13.8	177
33.7	51.5	2655	1.02	11.8	106

【図 5 D】

FIG. 5D

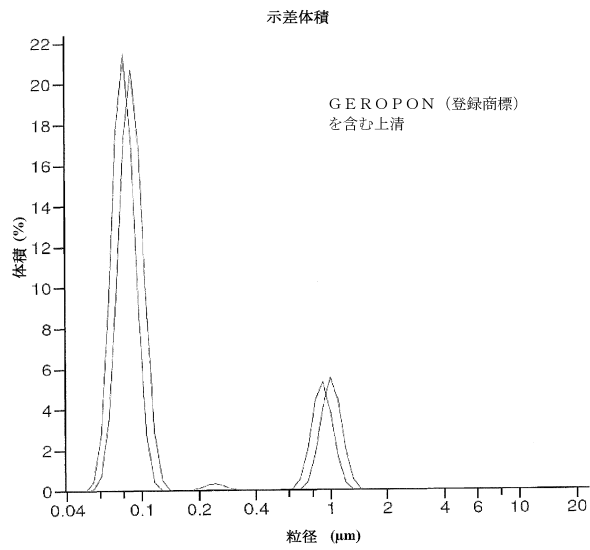


体積統計 (算術)
0.040 μm ~ 2000 μm の計算

平均	S.D.	分散	d10	d50	d90
μm	μm	μm ²	μm	μm	μm
1.03	0.656	0.430	1.333	0.866	2.00
1.02	0.673	0.454	0.137	0.791	2.05

【 図 5 E 】

FIG. 5E



体積統計 (算術)

0.040 μm ~ 2000 μm の計算

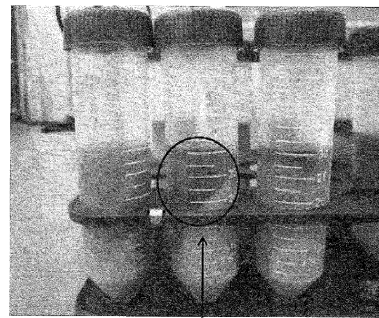
平均	S.D.	分散	d10	d50	d90
μm	μm	μm ²	μm	μm	μm
0.263	0.366	0.134	0.074	0.092	0.997
0.234	0.323	0.104	0.068	0.064	0.888

【 図 6 】

FIG. 6



正面図

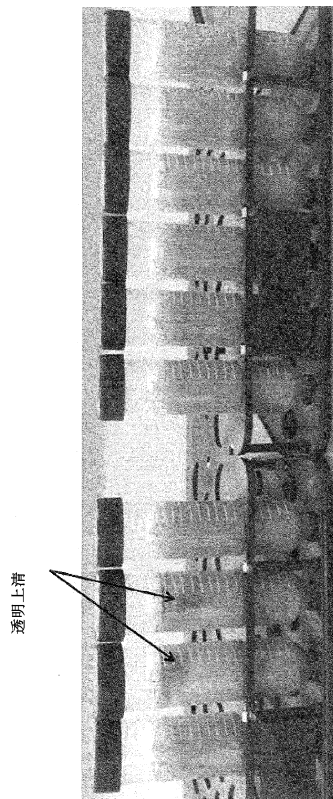


背面図

最も透明な上清

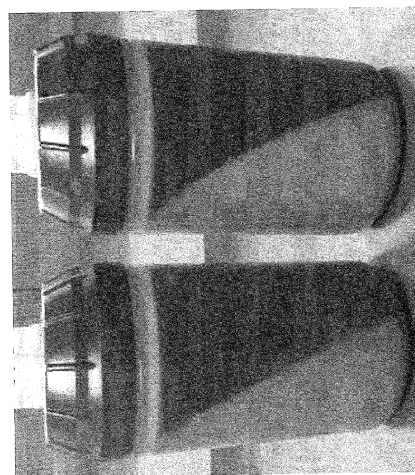
【 図 7 A 】

FIG. 7A



【 図 7 B 】

FIG. 7B



GEROPON®
 ナトリウムジソクサリル硫酸エステル
 NIAPROOF® 4
 ナトリウム7-エチル-2-メチル-4-
 ウンデカニル硫酸エステル

【 図 8 】

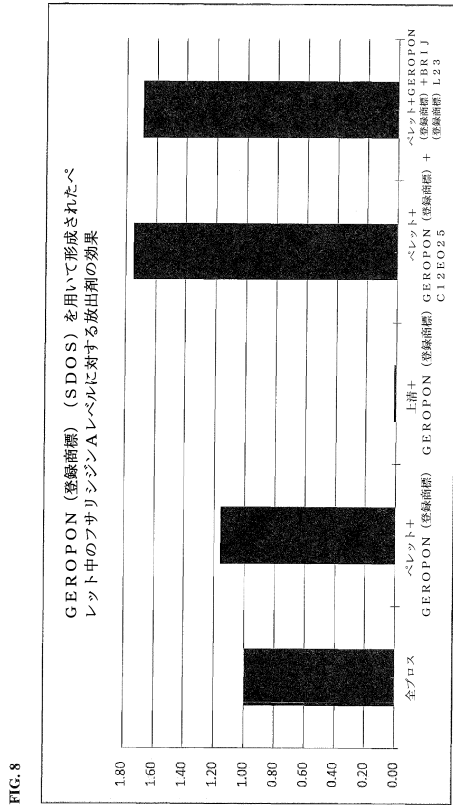


FIG. 8

【 図 9 】

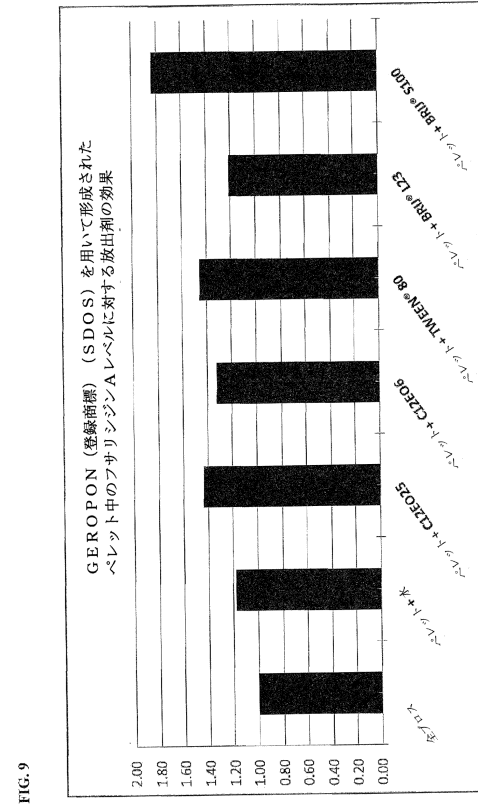
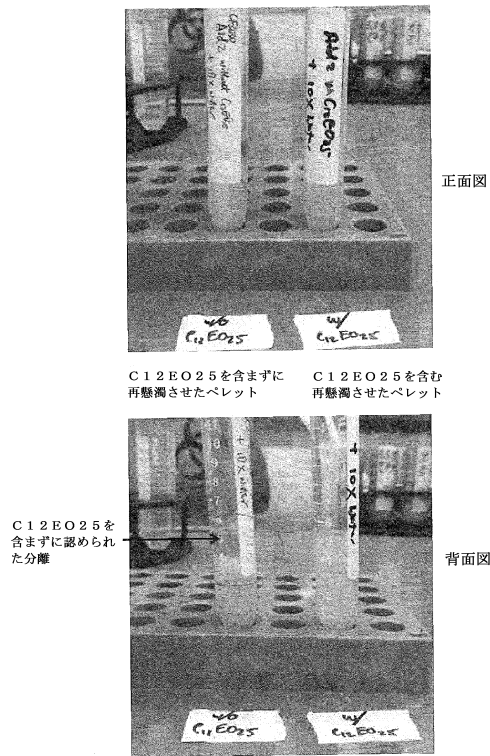


FIG. 9

【 図 10 】

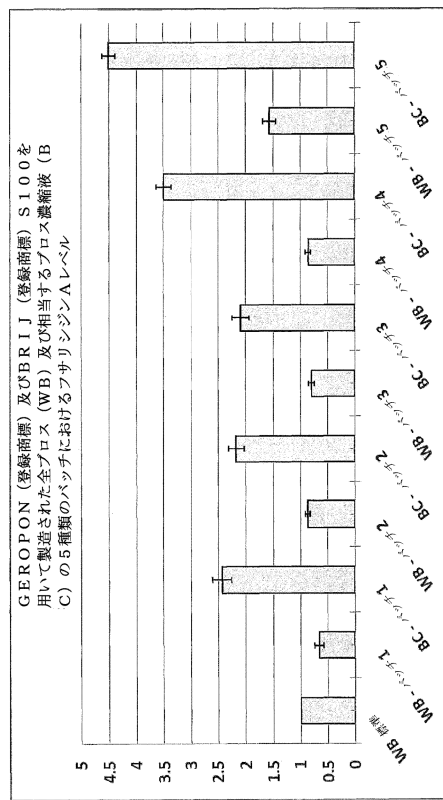
FIG. 10



C12E025を含まずに認められた分離

【 図 11 】

FIG. 11

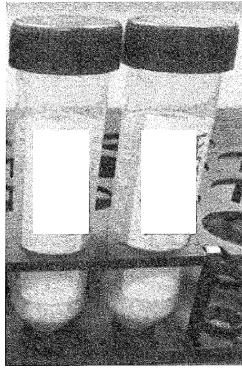


GEROPON (登録商標) 及びBRIJ (登録商標) S100を用いて製造された全プロス (WB) 及び相当するプロス濃縮液 (BC) の5種類のバッチにおけるフサリジジンAレベル

【 図 1 2 】

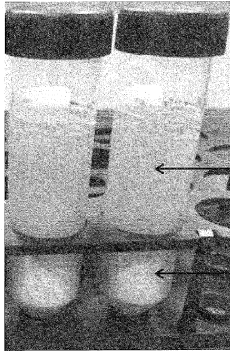
FIG. 12

正面図



NRRL B-21661 WB - GEROPON® NRRL B-21661 WB + GEROPON®

背面図



より透明な上清

よりコンパクトなペレット

【 図 1 3 】

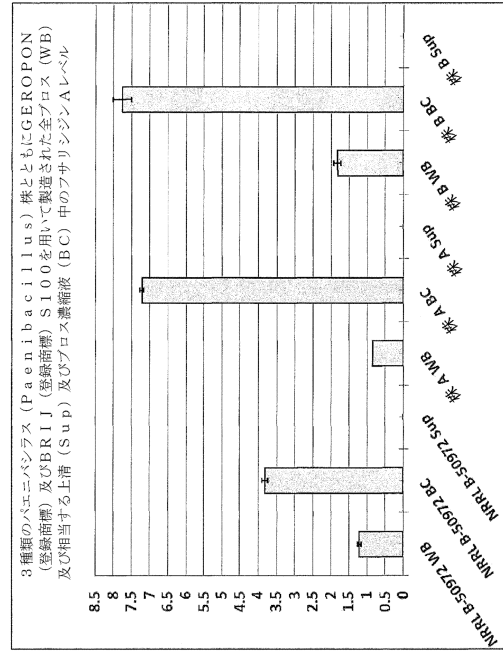


FIG. 13

フロントページの続き

- (74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博
- (74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100203035
弁理士 五味淵 琢也
- (74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和
- (74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 キメルシュー, チャド
アメリカ合衆国、5 0 0 1 4・アイオワ、エイムズ、スクール・ロード・1 1 1 1
- (72)発明者 リー, ヤン
アメリカ合衆国、9 5 6 1 0・カリフォルニア、シトラス・ハイツ、ドラル・コート・8 0 1 3
- (72)発明者 テイラー, コリーン・エス
アメリカ合衆国、9 5 6 3 0・カリフォルニア、フォルソム、ケナー・ウェイ・1 1 2
- (72)発明者 ジュー, ホン
アメリカ合衆国、9 5 6 9 1・カリフォルニア、ウェスト・サクラメント、ブリットン・プレイス
・3 8 5 5

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 英国特許出願公開第0 2 2 9 6 2 4 9 (GB, A)
特開2 0 0 2 - 1 7 6 9 9 6 (JP, A)
国際公開第2 0 1 5 / 0 4 1 2 9 9 (WO, A 1)
国際公開第2 0 1 5 / 1 8 4 1 7 0 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 P 2 1 / 0 0
C 0 7 K 1 / 3 0
C 0 7 K 7 / 0 0
C 1 2 P 1 9 / 0 4
C 0 7 H 1 / 0 6
C 1 2 N 1 / 1 4 - 1 / 1 5

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)