(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5752332号
(P5752332)

(45)発行日　平成27年7月22日(2015.7.22)　(24)登録日　平成27年5月29日(2015.5.29)

(51)Int.Cl.		F I		
C08B 37/00	(2006.01)	C08B	37/00	ZNAP
C12N 1/20	(2006.01)	C12N	1/20	A
C12P 19/04	(2006.01)	C12P	19/04	C
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 9　(全 21 頁)

(21)出願番号　特願2014-551859 (P2014-551859)
(86)(22)出願日　平成25年12月27日 (2013.12.27)
(86)国際出願番号　PCT/JP2013/085163
(87)国際公開番号　WO2014/104318
(87)国際公開日　平成26年7月3日 (2014.7.3)
審査請求日　平成26年10月23日 (2014.10.23)
(31)優先権主張番号　特願2012-289043 (P2012-289043)
(32)優先日　平成24年12月28日 (2012.12.28)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

特許法第３０条第２項適用　セルロース学会第１９回年次大会２０１２　Ｃｅｌｌｕｌｏｓｅ　Ｒ&Ｄ　講演要旨集、第１２２頁、平成２４年７月１日

特許法第３０条第２項適用　セルロース学会第１９回年次大会、平成２４年７月１２～１３日

(73)特許権者　513003024
田島　健次
北海道札幌市北区北１３条西８丁目　国立大学法人北海道大学　大学院工学研究院内
(73)特許権者　513003035
小瀬　亮太
東京都府中市幸町３－５－８　国立大学法人東京農工大学　大学院農学研究院内
(73)特許権者　000231981
日本甜菜製糖株式会社
東京都港区三田三丁目１２番１４号
(74)代理人　100110766
弁理士　佐川　慎悟
(74)代理人　100133260
弁理士　小林　基子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
細菌により生産された、下記（ａ）の物性を有するバクテリアセルロース；
（ａ）終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率が３５％以上である。
【請求項２】
下記（ｂ）の物性を有する、請求項１に記載のバクテリアセルロース；
（ｂ）下記ｉ）～ｖｉ）の条件下で行うゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムのピークトップの保持容量が２．５ｍＬ以上３．０ｍＬ未満である；
ｉ）カラム；粒子径９μｍのメタクリレートポリマーを充填した内径６．０ｍｍおよび長さ１５ｃｍのカラム、
ｉｉ）ガードカラム；内径４．６ｍｍ、長さ３．５ｃｍ、
ｉｉｉ）カラム温度；３５℃、
ｉｖ）送液速度；０．０７ｍＬ／分、
ｖ）溶離液；４０～４２％（ｗ／ｗ）水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液、
ｖｉ）溶離液におけるバクテリアセルロースの終濃度；０．２％（ｗ／ｗ）。
【請求項３】
前記細菌により植物油からバイオディーゼル燃料を製造する際に生じるグリセロールを含有する副産物を資化して生産された、請求項１または請求項２に記載のバクテリアセルロース。

【請求項４】
前記細菌により砂糖、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物およびこれらの加水分解物ならびに異性化糖からなる群から選択される１または２以上を資化して生産された、請求項１または請求項２に記載のバクテリアセルロース。
【請求項５】
前記副産物が糖蜜である、請求項４に記載のバクテリアセルロース。
【請求項６】
前記細菌がグルコンアセトバクター インターメディウス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ）である、請求項１から請求項５のいずれかに記載のバクテリアセルロース。
【請求項７】
前記細菌がグルコンアセトバクター インターメディウス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ） ＳＩＩＤ９５８７株（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）である、請求項１から請求項５のいずれかに記載のバクテリアセルロース。
【請求項８】
グルコンアセトバクター インターメディウス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ） ＳＩＩＤ９５８７株（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）。
【請求項９】
請求項８に記載のグルコンアセトバクター インターメディウス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ） ＳＩＩＤ９５８７株（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）を培養してセルロースを生産させる工程を有する、バクテリアセルロースの製造方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、バクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌に関し、特に液体中での分散性に優れたバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌に関する。
【背景技術】
【０００２】
バクテリアセルロースは、一般に、幅約５０ｎｍの微細な繊維（ナノファイバー）からなり、高い機械的強度や生体適合性、生分解性などの特性を有することから、様々な産業分野で活用しうる素材として注目されている。バクテリアセルロースは、一般的に酢酸菌などの細菌を静置培養することにより培地表面にゲル状物質からなる膜（以下、「ゲル状膜」という。）として得られるが、このゲル状膜は材料応用する上で成形性や他の物質との混合性が乏しく、また生産効率が低いためコスト高になることから、実用材料としての応用性に乏しいといった問題がある。
【０００３】
このような問題に対し、ゲル状膜ではなく、材料としての応用性に優れた、液体中に分散するバクテリアセルロースが望まれている。例えば、非特許文献１には、Ａｃｅｔｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ｓｕｂｓｐ．ｓｕｃｒｏｆｅｒｍｅｎｔａｎｓを通気撹拌培養することにより得られるバクテリアセルロースが開示されており、また非特許文献２には、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ＪＣＭ１０１５０株をカルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）が添加された培地中で回転振とう培養することにより得られるバクテリアセルロースが開示されている。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００４】
【非特許文献１】吉永ら、化学と生物、Ｖｏｌ．３５、Ｎｏ．１１、第７～１４頁、１９９７年

【非特許文献２】Ｓ．Ｗａｒａｓｈｉｎａら、セルロース学会代１７回年次大会 ２０１０ ｃｅｌｌｕｌｏｓｅ Ｒ＆Ｄ 講演要旨集、第９８頁、２０１０年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

しかしながら、非特許文献１に記載のバクテリアセルロースは、バクテリアセルロースの分散性の向上効果を有するＣＭＣを添加した培地を用いて生産されたものでないこと、および、水中で「小さな粒状または繊維状」に分散（同文献；第９頁右欄）しているとの記載からも明らかなように、水中での分散性が高いものではない。よって、実用化のための成形性や他の物質との混合性の点で不十分である。また、非特許文献２に記載のバクテリアセルロースは、ＣＭＣの培地への添加量が０．５％、１％、２％であるところ、いずれの場合も当該バクテリアセルロースを含む水は上部より下部の方が白濁性が高くて沈殿が観察されること、および、セルロースの粒が視認できるほど大きいことから（同文献；Ｆｉｇ．１）、水中での分散性が高いものではない。よって、実用化に必要な成形性や他の物質との混合性の点で不十分である。

【０００６】

従って、非特許文献１および非特許文献２のいずれに記載のバクテリアセルロースも、材料としての成形性や他の材料との混合性が不十分であり、材料の生産効率の点においても実用性に乏しい。

【０００７】

本発明は、このような問題点を解決するためになされたものであって、液体中での分散性が高く、実用化する上での成形性や他の材料との混合性もよく、実用材料としての応用性に優れたバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明者らは、鋭意研究の結果、植物油からバイオディーゼル燃料を製造する際に生じるグリセロールを含有する副産物（Ｂｉｏ Ｄｉｅｓｅｌ Ｆｕｅｌ Ｂｙ－ｐｒｏｄｕｃｔ；ＢＤＦ－Ｂ、廃グリセリン）や試薬グリセロールあるいは糖蜜を炭素源として、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓの新規な菌株であるＳＩＩＤ９５８７株（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）（以下、「ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）」という場合がある。）を、ＣＭＣを含む培地で撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースが、水中で高い分散性を有することを見出し、下記の各発明を完成した。

【０００９】

（１）本発明に係るバクテリアセルロースは、終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率が３５％以上の物性を有している。

【００１０】

（２）本発明に係るバクテリアセルロースは、さらに下記ｉ）～ｖｉ）の条件下で行うゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムのピークトップの保持容量が２．５ｍＬ以上３．０ｍＬ未満である物性を有している。

ｉ）カラム；粒子径９μｍのメタクリレートポリマーを充填した内径６．０ｍｍおよび長さ１５ｃｍのカラム、ｉｉ）ガードカラム；内径４．６ｍｍ、長さ３．５ｃｍ、ｉｉｉ）カラム温度；３５℃、ｉｖ）送液速度；０．０７ｍＬ／分、ｖ）溶離液；４０～４２％（ｗ／ｗ）水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液、ｖｉ）溶離液におけるバクテリアセルロースの終濃度；０．２％（ｗ／ｗ）。

【００１１】

（３）本発明に係るバクテリアセルロースは、ＢＤＦ－Ｂを資化して生産されることが望ましい。

【００１２】
（４）本発明に係るバクテリアセルロースは、砂糖、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物およびこれらの加水分解物ならびに異性化糖からなる群から選択される１または２以上を資化して生産されることが望ましい。
【００１３】
（５）本発明に係るバクテリアセルロースが、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物を資化して生産される場合は、前記副産物は糖蜜であることが望ましい。
【００１４】
（６）本発明に係るバクテリアセルロースは、グルコンアセトバクター インターメディウス（Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ）により生産されたものであってもよい。
【００１５】
（７）本発明に係るバクテリアセルロースは、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）により生産されたものであってもよい。
【００１６】
（８）本発明に係る細菌は、前記（１）～（５）のいずれかに記載のバクテリアセルロースを生産することを特徴としている。
【００１７】
（９）本発明に係る細菌は、前記（１）～（５）のいずれかに記載のバクテリアセルロースを生産するＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）であってもよい。

【発明の効果】
【００１８】
本発明に係るバクテリアセルロースによれば、水などの液体中にほぼ均一に分散するバクテリアセルロースを得ることができ、このバクテリアセルロースは成形性や他の物質との混合性に優れていることから、最終製品の品質や生産効率の向上あるいは生産コストの低減に寄与することができる。また、本発明によれば、ミキサーによる微細化などの工程を必要とせず、緩和な条件下での精製により、液体中にほぼ均一に分散するバクテリアセルロースを得ることができ、比較的大きな平均分子量を有するバクテリアセルロースを得ることができる。さらに、本発明によれば、炭素源としてＢＤＦ－Ｂや糖蜜などの砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物を用いることにより、資源の有効活用に寄与するとともに、バクテリアセルロースの低価格化を達成することができる。さらにまた、本発明によれば、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓあるいはＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）を用いて生産することにより、効率よく大量のバクテリアセルロースを得ることができる。

【図面の簡単な説明】
【００１９】
【図１】ＢＤＦ－Ｂを資化してバクテリアセルロースを生産する細菌を単離する手順を示す図である。図中、バクテリアセルロースはＢＣと略記する。
【図２－１】ＳＩＩＤ９５８７株とＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列の一致点および相違点を示す図である。図中、塩基配列の一致点を＊印で、相違点を四角の囲みでそれぞれ示す。また、図中、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓはＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株を示す。
【図２－２】ＳＩＩＤ９５８７株とＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列の一致点および相違点を示す図である。図中、塩基配列の一致点を＊印で、相違点を四角の囲みでそれぞれ示す。また、図中、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓはＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株を示す。

【図３】ＳＩＩＤ９５８７株の菌学的性状を示す図である。
【図４】ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を静置培養することにより得られたバクテリアセルロース（上段図）、ならびに、ＢＤＦ－Ｂおよび試薬グリセロールを炭素源として通気撹拌培養することにより得られた生産物（中段図および下段図）のＩＲスペクトルを示す図である。
【図５】ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を通気撹拌培養および静置培養することにより得られたバクテリアセルロース（左図および中央図）、ならびに、パルプ由来バクテリアセルロースナノファイバー（右図）をそれぞれ含む水の外観を示す図である。
【図６】糖蜜および試薬グリセロールをそれぞれ炭素源として、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を通気撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率ならびにバクテリアセルロースの生産量（ＢＣ生産量）および生産速度（ＢＣ生産速度）を示す図である。
【図７】ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）、ならびに既知のバクテリアセルロース生産菌であるＧ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＪＣＭ１０１５０株、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＤＳＭ１１８０４株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＫＣＣＭ４０２７４株を通気撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率、ならびにＢＣ生産量、ＢＣ生産速度およびＢＣ生産速度の比率を示す図である。
【図８】ＢＤＦ－Ｂを炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を旋回培養することにより得られたバクテリアセルロース（サンプルＢ）、パルプ由来セルロースナノファイバー（パルプ由来ＣＮＦ液）およびプルランのゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムを示す図である。
【図９】ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を、通気撹拌培養（撹拌培養ＢＣ液）および静置培養（ミキサー処理静置培養ＢＣ液）することにより得られたバクテリアセルロースの繊維幅および透過型電子顕微鏡による観察画像を示す図である。
【図１０】ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を通気撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロース（撹拌培養ＢＣ液）およびパルプ由来セルロースナノファイバー（パルプ由来ＣＮＦ液）の透過型電子顕微鏡による観察画像を示す図である。
【図１１】ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を通気撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロース（撹拌培養ＢＣ液）およびパルプ由来セルロースナノファイバー（パルプ由来ＣＮＦ液）の偏光顕微鏡による観察画像を示す図である。
【図１２】ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）ならびに既知のバクテリアセルロース生産菌であるＧ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株を、試薬グリセロールまたはＢＤＦ－Ｂを炭素源として静置培養することにより得られたバクテリアセルロースの重量を示す図である。
【図１３】ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）ならびに既知のバクテリアセルロース生産菌であるＡＴＣＣ５３５８２株およびＡＴＣＣ２３７６９株を、試薬グリセロールまたはＢＤＦ－Ｂを炭素源として振とう培養することにより得られたバクテリアセルロースの重量を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００２０】
以下、本発明に係るバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌について詳細に説明する。本発明におけるバクテリアセルロースとは、細菌により生産されたセルロースを

いう。

【００２１】

本発明において、バクテリアセルロースが水などの液体中に「分散する」とは、バクテリアセルロースが液体中に浮遊あるいは懸濁することをいう。また、分散性が高いとは、分散質としてのバクテリアセルロースの液体中における粒子径や繊維幅が比較的小さいことや、分散質としてのバクテリアセルロースが液体中で比較的均一に浮遊あるいは懸濁していることなどをいう。

【００２２】

本発明に係るバクテリアセルロースは液体中にほぼ均一に分散するほど高い分散性を有している。ここで、バクテリアセルロースを分散させる液体は、有機溶媒および水系溶媒のいずれも用いることができるが、水系溶媒が好ましい。

【００２３】

バクテリアセルロースの分散性の高低は、例えば、光の透過率を指標として測定することができ、光の透過率が大きいほど分散性が高く、光の透過率が小さいほど分散性が低いという関係が成り立つ。光の透過率は、所定の濃度のバクテリアセルロースを含む水を分光光度計に供して所定の波長の光を照射し、透過した光の量を測定することにより求めることができる。

【００２４】

本発明に係るバクテリアセルロースは、終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率が３５％以上の物性を有している。ここで、本発明における終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率としては、３５％以上のほか、例えば、３６％以上、３７％以上、３８％以上、３９％以上、４０％以上、３５％以上９９％以下、３６％以上９９％以下、３７％以上９９％以下、３８％以上９９％以下、４０％以上９９％以下、３５％以上９５％以下、３６％以上９５％以下、３７％以上９５％以下、３８％以上９５％以下、４０％以上９５％以下、３５％以上９０％以下、３６％以上９０％以下、３７％以上９０％以下、３８％以上９０％以下、４０％以上９０％以下、３５％以上８５％以下、３６％以上８５％以下、３７％以上８５％以下、３８％以上８５％以下、４０％以上８５％以下、３５％以上８０％以下、３６％以上８０％以下、３７％以上８０％以下、３８％以上８０％以下、４０％以上８０％以下などを挙げることができる。

【００２５】

また、本発明に係るバクテリアセルロースは、パルプ由来セルロースナノファイバーなどの植物由来のセルロースと比較して大きい平均分子量を有していてもよい。セルロースの平均分子量は、例えば、ゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムを指標として測定することができ、係るクロマトグラムのピークトップの保持容量が大きいほど平均分子量が小さく、保持容量が小さいほど平均分子量が大きいという関係が成り立つ。すなわち、本発明に係るバクテリアセルロースは、下記ｉ）～ｖｉ）の条件下で行うゲル浸透クロマトグラフィーのクロマトグラムのピークトップの保持容量が２．５ｍＬ以上３．０ｍＬ未満である物性を有していてもよい。ｉ）カラムが粒子径９μｍのメタクリレートポリマーを充填した内径６．０ｍｍおよび長さ１５ｃｍであること、ｉｉ）ガードカラムが内径４．６ｍｍ、長さ３．５ｃｍであること、ｉｉｉ）カラム温度が３５℃であること、ｉｖ）送液速度が０．０７ｍＬ／分であること、ｖ）溶離液が４０～４２％（ｗ／ｗ）水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液であること、ｖｉ）溶離液におけるバクテリアセルロースの終濃度が０．２％（ｗ／ｗ）であること。

【００２６】

また、本発明に係るバクテリアセルロースは、例えば、適当な炭素源を含有する培地中で細菌を培養してバクテリアセルロースを生産させることにより製造することができる。

【００２７】

ここで、炭素源としては、例えば、グルコースやフルクトースなどの単糖、スクロースやマルトース、ラクトースなどの二糖、オリゴ糖、砂糖、砂糖を製造する際に生じるスク

ロースを含有する副産物、これらの加水分解物、異性化糖、澱粉加水分解物などの糖類やマンニトール、エタノール、酢酸、クエン酸、グリセロール、ＢＤＦ－Ｂなどを挙げることができ、細菌の種類や培養条件、製造コストなどにより適宜設定することができる。なお、ＢＤＦ－Ｂは、一般的な組成として、グリセロール４１．５％、脂肪酸２１．４％、メタノール１２．４％、強熱残分６．３％、その他１８．４％（財団法人日本食品分析センター）からなり、細菌の炭素源として利用可能なグリセロールを多く含む組成物である。

【００２８】

ここで、砂糖とは、スクロースを主成分とする甘味料をいい（広辞苑第６版）、本発明においては、化学合成されたものでもよく、サトウキビや甜菜（砂糖大根）、サトウカエデ、サトウヤシ（オウギヤシ）、スイートソルガム（サトウモロコシ）などの天然物を原料として製造されたものでもよい。本発明における砂糖としては、例えば、黒砂糖や白下糖、カソナード（赤砂糖）、和三盆、メープルシュガーなどの含蜜糖や、粗糖や精製糖などの分蜜糖を挙げることができる。精製糖としては、例えば、白双糖や中双糖、グラニュー糖などのザラメ糖、上白糖や三温糖などの車糖、角砂糖や氷砂糖、粉砂糖、顆粒糖などの加工糖のほか、液糖などを挙げることができる。

【００２９】

また、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物とは、砂糖の製造工程において生じる副産物のうちスクロースを含有するものをいい、具体的には、例えば、上述のサトウキビや甜菜などの天然物原料の絞りかすや、糖蜜、濾過やイオン交換樹脂による精製工程で生じる残渣を挙げることができる。

【００３０】

また、二糖やオリゴ糖、砂糖、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物の加水分解物とは、二糖やオリゴ糖、砂糖、砂糖を製造する際に生じるスクロースを含有する副産物に対して、酸性溶液中で加熱するなどの加水分解処理を施して得られる物をいう。

【００３１】

炭素源以外の培地の成分は、細菌の培養に用いられる公知の培地と同様のものを用いることができ、ＣＭＣを含有することが好ましい。具体的には、例えば、ＣＭＣ、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミンなどの有機微量栄養素を含有する通常の栄養培地を挙げることができ、窒素源としては、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などのアンモニウム塩、硝酸塩、尿素、ペプトンなどの有機あるいは無機の窒素源を挙げることができる。また、無機塩類としては、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩などを、有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、さらには、これらの栄養素を含むペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆蛋白加水分解物などを挙げることができ、生育にアミノ酸を要求する栄養要求性変異株を用いる場合には、要求される栄養素をさらに補添することができる。

【００３２】

また、細菌としては、バクテリアセルロースを生産することができる細菌であれば特に限定されないが、撹拌培養や通気培養によりバクテリアセルロースを生産することができる細菌が好ましく、ＢＤＦ－Ｂを資化する細菌がより好ましい。具体的には、例えば、アセトバクター属細菌やグルコンアセトバクター属細菌、シュードモナス属細菌、アグロバクテリウム属細菌、リゾビウム属細菌、エンテロバクター属細菌などを挙げることができ、より具体的には、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓやＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｈａｎｓｅｎｉｉ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｓｗｉｎｇｓｉｉ、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｐａｓｔｅｕｒｉａｎｕｓ、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ａｃｅｔｉ、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ、Ａｃｅｔｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ｓｕｂｓｐ. ｓｕｃｒｏｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ、Ａｃｅｔｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ｓｕｂｓｐ. ｎｏｎａｃｅｔｏｘｉｄａｎｓ、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｒａｎｓｅｎｓ、Ｓａｒｃｉｎａ ｖｅｎｔｒｉｃｕｌｉ、Ｂａｃｔｅｒｉｕｍ

ｘｙｌｏｉｄｅｓ、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ.などを挙げることができるが、これらのうち、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓが好ましい。よりさらに具体的には、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株やＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｓｗｉｎｇｓｉｉ ＢＰＲ３００１Ｅ株、Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｍ ＪＣＭ１０１５０株、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ.ＣＪＦ－００２株などを挙げることができ、これらのうち、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（ＮＥＤＯ－０１株）（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）が好ましい。

【００３３】

培養方法としては、例えば、撹拌培養や通気培養などを挙げることができる。撹拌培養として、具体的には、ファーメンターを用いた通気を行わない培養（無通気撹拌培養）やファーメンターを用いた通気を行う培養（通気攪拌培養）、羽根付きフラスコを用いた左右に揺れる培養（振とう培養）、羽根付きフラスコを用いた回転式培養（旋回培養）などを挙げることができる。また、培養条件は上述の細菌の培養に用いられる公知の培養条件とすることができ、例えば、通気量１～１０Ｌ／分、回転数１００～８００ｒｐｍ、温度２０～４０℃、培養期間１日～７日間の培養条件を挙げることができる。

【００３４】

また、本発明に係るバクテリアセルロースの製造においては、必要に応じて、炭素源の前処理工程、前々培養工程、前培養工程、バクテリアセルロースの精製、乾燥、懸濁工程などを行うことができる。

【００３５】

本発明に係るバクテリアセルロースは、例えば、紙力増強剤や食品の増粘剤、懸濁安定化剤などの添加物として用いることができる。

【００３６】

次に、本発明に係る細菌は、前述したバクテリアセルロースを生産するものである。本発明に係るバクテリアセルロースを生産する細菌において、上述した本発明に係るバクテリアセルロースと同一または相当する構成については、再度の説明を省略する。

【００３７】

以下、本発明に係るバクテリアセルロースおよびこれを生産する細菌について、各実施例について説明する。なお、本発明の技術的範囲は、これらの実施例によって示される特徴に限定されない。

【実施例】

【００３８】

＜実施例１＞細菌の単離および同定

（１）細菌の単離

ＢＤＦ－Ｂを資化してバクテリアセルロースを生産する細菌を単離した。具体的には、図１に示す手順により、まず、リンゴおよびプルーンを分離源として、ヘストリン－シュラム(Ｈｅｓｔｒｉｎ－Ｓｃｈｒａｍｍ)標準培地（組成；ｂａｃｔｏ ｐｅｐｔｏｎ ０.５％（ｗ／ｖ）、ｙｅａｓｔ ｅｘｔｒａｃｔ ０.５％（ｗ／ｖ）、Na_2HPO_4 ０.２７％（ｗ／ｖ）、クエン酸 ０.１１５％（ｗ／ｖ）、グルコース ２％（ｗ／ｖ）；ＨＳ培地）においてグルコースの代わりに２％（ｗ／ｖ）の試薬グリセロール（試薬特級；和光純薬株式会社）を含む培地（ＨＳ／グリセロール培地）を用いて集積培養を行った。これを、セルロース染色試薬を含むＨＳ／グリセロール培地に植菌して３０℃でプレート培養し、バクテリアセルロースを生産する菌株を１５種選択した。続いて、これらの菌株を２％（ｗ／ｖ）の試薬グリセロール（試薬特級；和光純薬株式会社）を含むＬＢ培地（組成；トリプトン １％（ｗ／ｖ）、ｙｅａｓｔ ｅｘｔｒａｃｔ ０.５％（ｗ／ｖ）

、塩化ナトリウム０．５％（ｗ／ｖ））に植菌して３０℃で静置培養し、ゲル状膜を生成させた。ゲル状膜の乾燥重量（以下、「乾燥膜重量」という。）を測定して、乾燥膜重量が大きい菌株を、グリセロールを資化し、かつバクテリアセルロース生産能が高い菌として８種選択した。次に、ＢＤＦ－Ｂを含むＬＢ培地に植菌して３０℃でプレート培養し、さらに、ＨＳ培地に植菌して３０℃で静置培養することによりゲル状膜を生成させた。このうち乾燥膜重量が大きい菌株を選択して、グリセロールを含むＬＢ培地またはＨＳ／グリセロール培地にてプレート培養した後、ＨＳ培地で静置培養する操作を繰り返し行い、ＢＤＦ－Ｂ資化性を有し、かつバクテリアセルロース生産能が高い菌株を１種選定し、これをＳＩＩＤ９５８７株とした。

【００３９】

（２）細菌の同定

本実施例１（１）のＳＩＩＤ９５８７株について、常法に従ってシークエンスを行い、全長１６Ｓ ｒＤＮＡの塩基配列（１３６７ｂｐ；配列番号１）を決定した。続いて、株式会社テクノスルガ・ラボにおいて１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列解析および菌学的性状試験を行った。

【００４０】

［２－１］１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列解析

１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列解析は、ソフトウェアとしてアポロン２．０（テクノスルガ・ラボ社）を、データベースとしてアポロンＤＢ－ＢＡ ６．０（テクノスルガ・ラボ社）および国際塩基配列データベース（ＧｅｎＢａｎｋ／ＤＤＢＪ／ＥＭＢＬ）を用いて行った。アポロンＤＢ－ＢＡ６．０に対する相同性検索の結果、ＳＩＩＤ９５８７株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列（配列番号１）は、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ属の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に対し高い相同性を示し、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株（アクセッション番号Ｙ１４６９４）の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に対し、相同率９９．８％の最も高い相同性を示した。また、ＧｅｎＢａｎｋ／ＤＤＢＪ／ＥＭＢＬに対する相同性検索の結果においても、ＳＩＩＤ９５８７株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列（配列番号１）は、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ属の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に対し高い相同性を示し、基準株では、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株（アクセッション番号ＮＲ＿０２６４３５）の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に対し、相同率９９．８％の高い相同性を示した。なお、アクセッション番号Ｙ１４６９４の配列とアクセッション番号ＮＲ＿０２６４３５の配列とは、同一である。ＳＩＩＤ９５８７株とＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株（アクセッション番号Ｙ１４６９４、ＮＲ＿０２６４３５）の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列比較の結果を図２－１および図２－２に示す。図２－１および図２－２に示すように、両者の間には４塩基の相違点があった。また、アポロンＤＢ－ＢＡ６．０に対する相同性検索において、相同性が高かった上位１５株の１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列に基づく簡易分子系統解析の結果、ＳＩＩＤ９５８７株は、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ属の種で形成されるクラスター内に含まれた。

【００４１】

［２－２］菌学的性状試験

菌学的性状試験の結果を図３に示す。図３に示すように、ＳＩＩＤ９５８７株は、５％酢酸含有培地で生育しない点で、既知のＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓとは性状が異なり、他の性状は一致した（ＢＲＥＮＮＥＲら、Ｂｅｒｇｅｙ’ｓ ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ．Ｖｏｌ．Ｔｗｏ．Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ，Ｐａｒｔ Ｃ ＴｈｅＡｌｐｈａ－，Ｂｅｔａ－，Ｄｅｌｔａ－，ａｎｄ Ｅｐｓｉｌｏｎｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ．２００５．Ｓｐｒｉｎｇｅｒ．ｐ７２－７７）。

【００４２】

以上の本実施例１（２）［２－１］および［２－２］の結果から、ＳＩＩＤ９５８７株は、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓに帰属することが明らかになった。一方、ＳＩＩＤ９５８７株とＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎ

ｔｅｒｍｅｄｉｕｓの基準株であるＧ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＴＦ２株との間には、１６Ｓ ｒＤＮＡ塩基配列および菌学的性状において上記のとおり相違点が存在することから、ＳＩＩＤ９５８７株は、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓの新規の菌株であることが明らかになった。そこで、この菌株を、平成２４年（２０１２年）１２月２１日に独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（ＮＩＴＥ－ＩＰＯＤ；〒２９２－０８１８日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８ １２２号室）に受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５として寄託した。以下、このＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株（受託番号ＮＩＴＥ ＢＰ－０１４９５）をＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）という。

【００４３】

（３）生産物の確認

ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）の前培養を行い、菌体を増殖させた。続いて、前培養を行って得られた培養液（前培養液）をＨＳ培地（炭素源；グルコース）に加えて、３０℃で約８日間静置培養することにより本培養を行い、培地表面にゲル状膜を生成させた。ゲル状膜について、常法に従い赤外分光法（ＩＲ）のスペクトルおよびＸ線回折プロファイルを得て解析を行った。その結果、ゲル状膜はＩ型の結晶構造を持つセルロースであることが明らかになった。また、常法に従い、走査型電子顕微鏡画像を得て解析を行った結果、ゲル状膜では、ナノオーダーの幅のセルロース繊維（セルロースナノファイバー）がネットワーク構造を形成していることが明らかとなった。これらの結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）はセルロースを生産することが確認された。

【００４４】

＜実施例２＞通気撹拌培養による生産物の評価

（１）通気撹拌培養による生産物の調製

ＢＤＦ－Ｂを中和処理し、さらにオートクレーブ処理を行うことにより、前処理したＢＤＦ－Ｂを得た。

【００４５】

２％（ｗ／ｖ）のＣＭＣ（化学用；和光純薬株式会社）を含むＨＳ培地において、炭素源としてグルコースの代わりに試薬グリセロール（試薬特級；和光純薬株式会社）を添加したもの、および、グルコースの代わりに前処理したＢＤＦ－Ｂを濃度が２％（ｗ／ｖ）となるように添加したものを調製して、それぞれをグリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地とした。そして、まずＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）の前培養を行い、菌体を増殖させた。次に、前培養液を５Ｌのグリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地にそれぞれ植菌して、ファーメンターを用いて、通気量 ７～１０Ｌ／分、回転数２００～８００ｒｐｍ、温度３０℃の条件下で通気撹拌培養を４日間行うことにより本培養を行った。本培養を行って得られた培養液（本培養液）に１％（ｗ／ｖ）ＮａＯＨ水溶液を加えて６０℃、８０ｒｐｍで４～５時間振とうすることにより菌体を溶解した。これを遠心分離に供した後、上清を除去して沈殿物を回収することにより、水溶性の菌体成分を除去した。そこに超純水を加えて遠心分離を行った後、上清を除去する操作を、湿潤状態で沈殿物のｐＨが７以下となるまで繰り返し行うことにより生産物を精製し、これを撹拌培養ＢＣ液とした。

【００４６】

（２）静置培養によるバクテリアセルロースの調製

実施例１（３）に記載の方法によりゲル状膜を得て、約１ｃｍ×１ｃｍの大きさに裁断した。続いて、１％（ｗ／ｖ）ＮａＯＨ水溶液を加えて６０℃、８０ｓｔｒｏｋｅｓ／分で４～５時間振とうした後、２０℃で一晩振とうした。金網を用いて濾過することにより液体を除去してゲル状膜を回収した。そこに、超純水を加えて、２０℃で一晩振とうする操作を、ｐＨが７以下になるまで繰り返し行うことにより精製した後、ミキサーを用いて数分間懸濁処理し、これをミキサー処理静置培養ＢＣ液とした。

【００４７】

（３）解析
シリコン板の上に、本実施例２（１）の撹拌培養ＢＣ液および本実施例２（２）のミキサー処理静置培養ＢＣ液をそれぞれ滴下して乾燥させた後、赤外分光光度計（ＦＴ／ＩＲ－４２００；日本分光株式会社）に供して、積算回数３２回、分解能２ｃｍ$^{-1}$または４ｃｍ$^{-1}$で測定を行い、ＩＲスペクトルを得た。その結果を図４に示す。図４に示すように、ＢＤＦ－Ｂ本培養培地およびグリセロール本培養培地を用いて得られた撹拌培養ＢＣ液のＩＲスペクトルは、ミキサー処理静置培養ＢＣ液のＩＲスペクトルと同様の形状であった。この結果から、ＢＤＦ－Ｂや試薬グリセロールを炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られた生産物は、セルロースであることが確認された。

【００４８】
＜実施例３＞バクテリアセルロースの水中での分散性
（１）バクテリアセルロースを含む水の外観
実施例２（１）のＢＤＦ－Ｂ本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液および実施例２（２）のミキサー処理静置培養ＢＣ液を用意した。また、市販のパルプ由来セルロースナノファイバーを水に添加して分散させ、これをパルプ由来ＣＮＦ液とした。撹拌培養ＢＣ液、ミキサー処理静置培養ＢＣ液およびパルプ由来ＣＮＦ液を１日静置した後、外観を観察した。その結果を図５に示す。

【００４９】
図５に示すように、パルプ由来ＣＮＦ液ではセルロースの沈殿が観察された。また、ミキサー処理静置培養ＢＣ液では、塊状のバクテリアセルロースが観察され、バクテリアセルロースの分散状態が不均一であった。これに対して、撹拌培養ＢＣ液では沈殿や塊状のバクテリアセルロースは観察されず、バクテリアセルロースが均一に分散している様子が観察された。これらの結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースは、パルプ由来セルロースナノファイバーやＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を静置培養することにより得られたバクテリアセルロースと比較して分散性が高く、水などの液体中に均一に分散することが明らかになった。

【００５０】
（２）バクテリアセルロースを含む水の光の透過率
［２－１］静置培養のバクテリアセルロースおよびパルプ由来セルロースとの比較
実施例２（１）に記載の方法において、本培養としてファーメンターに代えて羽根付きフラスコを用いて１５０ｒｐｍ、温度３０℃の条件下で３日間旋回培養を行って撹拌培養ＢＣ液を調製し、これをサンプルＡ（グリセロール本培養培地を用いたもの）およびサンプルＢ（ＢＤＦ－Ｂ本培養培地を用いたもの）とした。また、実施例２（１）のＢＤＦ－Ｂ本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液をサンプルＣ、グリセロール本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液をサンプルＤとした。また、実施例２（２）のミキサー処理静置培養ＢＣ液および実施例３（１）のパルプ由来ＣＮＦ液をそれぞれ用意した。これらのセルロースの終濃度を０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）となるように調製した後、セルに１ｍＬずつ加えて、分光光度計（Ｕ－２００１形ダブルビーム分光光度計；株式会社日立製作所）に供して波長５００ｎｍの光の透過率を測定した。セルにはポリスチレン製ディスポーザブルキュベット（セミミクロ、光路長１０ｍｍ、光路幅４ｍｍ）を使用し、リファレンスには超純水を使用した。その結果を表１に示す。

【００５１】

【表１】

	培養方法	炭素源	セルロースの終濃度（％(w/w)）	透過率(%)
サンプルA	撹拌培養(羽根付きフラスコ)	試薬グリセロール	0.10505	74.75
サンプルB	撹拌培養(羽根付きフラスコ)	BDF-B	0.10309	70.53
サンプルC	撹拌培養(ファーメンター)	BDF-B	0.09570	63.82
サンプルD	撹拌培養(ファーメンター)	試薬グリセロール	0.10375	49.66
ミキサー処理静置培養BC液	静置培養	グルコース	0.09964	19.19
パルプ由来CNF液			0.10514	12.72

【００５２】

表１に示すように、サンプルＡ、Ｂ、ＣおよびＤの透過率は、それぞれ７４．７５％、７０．５３％、６３．８２％および４９．６６％であり、ミキサー処理静置培養ＢＣ液の１９．１９％およびパルプ由来ＣＮＦ液の１２．７２％と比較して顕著に大きく、概ね４０％以上８０％以下の範囲であった。

【００５３】

［２－２］培地中のＣＭＣの有無における比較

実施例２（１）に記載の方法において、２％（ｗ／ｖ）のＣＭＣを含むＨＳ培地とＣＭＣを含まないＨＳ培地とをそれぞれ用いて撹拌培養ＢＣ液を得た。ただし、炭素源としてグルコースの代わりに糖蜜を用いた。また、糖蜜を炭素源とした場合は、本培養３日目で培地中の炭素源がほとんどなくなったため、本培養の日数は、４日間に代えて３日間とした。続いて、本実施例３（２）［２－１］に記載の方法により、バクテリアセルロースを含む水の光の透過率を測定した。その結果を下記の表２に示す。

【００５４】

【表２】

培地中のCMC	培養方法	炭素源	透過率(%)
含む	撹拌培養	糖蜜	57
含まない	撹拌培養	糖蜜	18

【００５５】

表２に示すように、ＣＭＣを含むＨＳ培地を用いた場合の透過率は５７％であったのに対して、ＣＭＣを含まないＨＳ培地を用いた場合の透過率は１８％であった。

【００５６】

以上の本実施例３（２）［２－１］および［２－２］の結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）をＣＭＣを含む培地で撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースを、終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）で含む水の波長５００ｎｍの光の透過率は、４０％以上８０％以下であることが明らかになった。すなわち、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）をＣＭＣを含む培地で撹拌培養することにより、液体中での分散性が顕著に高く、液体中に均一に分散するバクテリアセルロースが得られることが明らかになった。

【００５７】

＜実施例４＞炭素源が異なる場合の透過率およびバクテリアセルロースの生産速度の比較

実施例２（１）に記載の方法により撹拌培養ＢＣ液を得た。ただし、炭素源としてグルコースの代わりに糖蜜および試薬グリセロールを用いた。また、糖蜜を炭素源とした場合は、本培養の日数は４日間に代えて３日間とした。続いて、実施例３（２）［２－１］に記載の方法により、バクテリアセルロースを含む水の光の透過率を測定した。また、撹拌培養ＢＣ液を乾燥させてバクテリアセルロースの絶乾重量を測定し、測定結果に基づいて培地１Ｌ当たりのバクテリアセルロースの濃度を算出して、これをバクテリアセルロースの生産量（ＢＣ生産量；ｇ／Ｌ）とした。また、ＢＣ生産量を本培養の日数で除した値を算出し、これをバクテリアセルロースの生産速度（ＢＣ生産速度；ｇ／Ｌ／日）とした。その結果を図６に示す。

【００５８】

図６の表および左側の棒グラフに示すように、糖蜜を炭素源として用いた場合の透過率は５７％であり、試薬グリセロールを炭素源として用いた場合の５７％と同じ値であった。この結果から、糖蜜を炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養することにより、試薬グリセロールを炭素源とした場合と同様に、終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）でバクテリアセルロースを含む水の波長５００ｎｍの光の透過率が顕著に高いバクテリアセルロースが得られることが明らかになった。すなわち、糖蜜を炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養することにより、分散性が高く、液体中に均一に分散するバクテリアセルロースが得られることが示された。

【００５９】

また、図６の表および右側の棒グラフに示すように、糖蜜を炭素源として用いた場合のＢＣ生産速度は１．４８ｇ／Ｌ／日であり、試薬グリセロールを炭素源として用いた場合の０．９５ｇ／Ｌ／日よりも約１．５倍大きかった。この結果から、糖蜜を炭素源としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養することにより、分散性が高いバクテリアセルロースを短期間で大量に得られることが明らかになった。

【００６０】

＜実施例５＞細菌が異なる場合の透過率およびバクテリアセルロース生産速度の比較

実施例２（１）に記載の方法により撹拌培養ＢＣ液を得た。ただし、炭素源としてグルコースの代わりに糖蜜を用いた。また、細菌としてＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）ならびに既知のバクテリアセルロース生産菌であるＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＪＣＭ１０１５０株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＤＳＭ１１８０４株およびＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＫＣＣＭ４０２７４株を、それぞれ用いた。また、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を用いた場合は、本培養３日目で培地中の炭素源がほとんどなくなったため、本培養の日数は４日間に代えて３日間とした。一方、ＤＳＭ１１８０４株を用いた場合は、本培養４日目でも培地中の炭素源の減少の程度が小さかったため、本培養の日数は４日間に代えて５日間とした。続いて、実施例３（２）［２－１］に記載の方法により、バクテリアセルロースを含む水の光の透過率を測定した。また、実施例４に記載の方法により、ＢＣ生産量（ｇ／Ｌ）およびＢＣ生産速度（ｇ／Ｌ／日）を算出し、透過率およびＢＣ生産速度については、数値を棒グラフに表した。その結果を図７に示す。

【００６１】

図７の表および左側の棒グラフに示すように、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を用いた場合の透過率は５７％であったのに対して、Ｇ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＪＣＭ１０１５０株、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＤＳＭ１１８０４株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＫＣＣＭ４０２７４株を用いた場合の透過率は、それぞれ、２０％、３３％、２９％、２７％、９％および１３％であった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養して得られたバクテリアセルロースを終濃度０．１±０．００６％（ｗ／ｗ）で含む水の波長５００ｎｍの光の透過率は、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）以外を培養して得られたバクテリアセルロースを含む水の当該透過率と比較して顕著に大きく、３５％以上であることが明らかになった。すなわち、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を培養することにより、分散性が高く、液体中に均一に分散するバクテリアセルロースが得ることができることが示された。

【００６２】
また、図６の表および右側の棒グラフに示すように、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を用いた場合のＢＣ生産速度は１．４８ｇ／Ｌ／日であったのに対して、Ｇ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＪＣＭ１０１５０株、Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＤＳＭ１１８０４株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＫＣＣＭ４０２７４株を用いた場合のＢＣ生産速度は、それぞれ、１．０５ｇ／Ｌ／日、１．０３ｇ／Ｌ／日、１．１１ｇ／Ｌ／日、１．１０ｇ／Ｌ／日、０．４２ｇ／Ｌ／日および０．４３ｇ／Ｌ／日であった。すなわち、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を用いた場合のＢＣ生産速度は、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）以外を用いた場合のＢＣ生産速度と比較して顕著に大きかった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を培養することにより、分散性が高いバクテリアセルロースを短期間で大量に得ることができることが示された。

【００６３】
＜実施例６＞バクテリアセルロースの分子量
実施例３（２）のサンプルＡ、Ｂ、ＣおよびＤならびにパルプ由来ＣＮＦ液を試料として用意した。これらの試料を凍結乾燥し、５７～５９％水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液に加えて３５℃で静置して溶解させた後、水酸化テトラブチルホスホニウムの濃度が４０～４２％（ｗ／ｗ）、試料の濃度が０．２％（ｗ／ｗ）となるように水を加えた。続いて、遠心分離を行うことにより不純物を沈殿させて、上清を回収した。この上清を、下記の条件下でゲル浸透クロマトグラフィーに供してクロマトグラムのピークトップの保持容量を測定した。同上清を同条件下で３回測定した。その結果を表３に示すとともに、任意に選択したクロマトグラムを図８に示す。

【００６４】
ゲル浸透クロマトグラフィーの条件
機器；高速液体クロマトグラフ（株式会社島津製作所）
カラム；粒子径９μｍのメタクリレートポリマーを充填した内径６．０ｍｍおよび長さ１５ｃｍのカラム（ＴＳＫｇｅｌ ｓｕｐｅｒ ＡＷＭ－Ｈ；東ソー社）
ガードカラム；内径４．６ｍｍ、長さ３．５ｃｍ（ＴＳＫ ｇｕａｒｄｃｏｌｕｍ ｓｕｐｅｒ ＡＷ－Ｈ；東ソー社）
カラム温度；３５℃
送液速度；０．０７ｍＬ／分
サンプル注入量；１０μＬ
溶離液；４０～４２％（ｗ／ｗ）水酸化テトラブチルホスホニウム水溶液
溶離液におけるバクテリアセルロースの終濃度；０．２％（ｗ／ｗ）
対照サンプル；分子量８５．３×10^4のプルラン（Ｓｈｏｄｅｘ ｓｔａｎｄａｒｄ Ｐ－８２）

【００６５】

【表３】

	保持時間/分	保持容量/mL	平均/mL	標準偏差/mL
サンプルA(1回目)	40.4	2.828	2.79	0.05
サンプルA(2回目)	39.1	2.737		
サンプルA(3回目)	40	2.8		
サンプルB(1回目)	39.8	2.786	2.81	0.03
サンプルB(2回目)	39.9	2.793		
サンプルB(3回目)	40.7	2.849		
サンプルC(1回目)	40.1	2.807	2.82	0.02
サンプルC(2回目)	40.5	2.835		
サンプルC(3回目)	40.1	2.807		
サンプルD(1回目)	39.2	2.744	2.76	0.02
サンプルD(2回目)	39.4	2.758		
サンプルD(3回目)	39.8	2.786		
パルプ由来CNF液(1回目)	42.9	3.003	3.04	0.04
パルプ由来CNF液(2回目)	43.4	3.038		
パルプ由来CNF液(3回目)	43.9	3.073		
プルラン(1回目)	45.7	3.199	3.24	0.04
プルラン(2回目)	46.8	3.276		
プルラン(3回目)	46.4	3.248		

【００６６】

表３および図８に示すように、サンプルＡ、Ｂ、ＣおよびＤのピークトップの保持容量は平均で見るとそれぞれ２．７９ｍＬ、２．８１ｍＬ、２．８２ｍＬおよび２．７６ｍＬであり、パルプ由来ＣＮＦ液の３．０４ｍＬおよびプルランの３．２４ｍＬと比較して小さかった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースの平均分子量は、パルプ由来のセルロースよりも大きく、プルラン換算で８５．３×１０^{4}よりも大きいことが示された。また、表３に示すように、サンプルＡ、Ｂ、ＣおよびＤのピークトップの保持容量は、２．７３７～２．８４９ｍＬの範囲であったことから、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースを上記の条件下でゲル浸透クロマトグラフィーに供した場合は、クロマトグラムのピークトップの保持容量が２．５ｍＬ以上３．０ｍＬ未満となることが示された。

【００６７】

＜実施例７＞バクテリアセルロースの形態

（１）繊維幅の測定

実施例２（１）のグリセロール本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液および実施例２（２）のミキサー処理静置培養ＢＣ液を用意した。これらのセルロース濃度を約０．００１％（ｗ／ｗ）に調製した後、ホルムバール被覆した銅グリッド上に１０μＬずつ滴下して風乾させた。続いて、５％（ｗ／ｖ）酢酸ガドリニウム水溶液を５μＬ滴下し、１０秒後に余分な液をろ紙で除去することによりネガティブ染色した。透過型電子顕微鏡を用いて、加速電圧８０ｋＶ、観察倍率３０，０００倍で観察し、観察画像に基づいてセルロース繊維の幅を測定した。その結果を図９に示す。

【００６８】

図９に示すように、セルロース繊維の幅は撹拌培養ＢＣ液では１７±８ｎｍであり、ミキサー処理静置培養ＢＣ液の５５±２２ｎｍと比較して顕著に小さく、かつ、標準偏差も小さかった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースは、細く、繊維間で幅のばらつきが小さい均一な繊維であることが明らかになった。

【００６９】

（２）繊維幅の均一性および凝集状態の確認

実施例２（１）のＢＤＦ－Ｂ本培養培地を用いた撹拌培養ＢＣ液および実施例３（１）

のパルプ由来ＣＮＦ液を用意した。これらのセルロース濃度を約０．０１％（ｗ／ｗ）に調製した後、ホルムバール被覆した銅グリッド上にスプレーしてドライヤーを用いて乾燥させる操作を１０回繰り返し行った。続いて、５％（ｗ／ｖ）酢酸ガドリニウム水溶液を５μＬ滴下し、余分な液をろ紙で除去した。さらに、５μＬの超純水を滴下した後、余分な液をろ紙で除去する一連の操作を２回繰り返し行った後、風乾することによりネガティブ染色した。透過型電子顕微鏡を用いて、加速電圧８０ｋＶ、観察倍率１０，０００倍で観察した。その結果を図１０に示す。また、偏光顕微鏡を用いてクロスニコルで観察した。その結果を図１１に示す。

【００７０】

図１０に示すように、撹拌培養ＢＣ液では、ナノスケールで同等の幅のセルロース繊維が多数観察されたのに対し、パルプ由来ＣＮＦ液では、様々な幅のセルロース繊維が観察され、大きいものでは繊維幅が約５００ｎｍ以上のものが観察された。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースは、ナノスケールで均一な幅の繊維であることが再度確認された。

【００７１】

また、図１１に示すように、パルプ由来ＣＮＦ液では、矢印で示すように比較的太い繊維が明確に観察されたのに対して、撹拌培養ＢＣ液では、点線で囲んだ部分にぼんやりと像が観察された。この結果から、パルプ由来のセルロースでは、サブマイクロファイバーやマイクロファイバーなどの比較的太い繊維が存在しているのに対して、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）を撹拌培養することにより得られたバクテリアセルロースは、ナノスケールで細い繊維が均一に分散していることが明らかになった。

【００７２】

＜実施例８＞バクテリアセルロース生産能の評価

（１）静置培養での生産能

ＬＢ培地において、炭素源としてグルコースの代わりに前処理したＢＤＦ－Ｂおよび試薬グリセロールを添加したものを調製し、ＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地およびＬＢ／グリセロール培地とした。ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株およびＧｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株をＬＢ／グリセロール培地およびＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地に植菌して、３０℃で７日間静置培養することによりゲル状膜を生成させた。これに１％（ｗ／ｖ)ＮａＯＨ水溶液を加え、オートクレーブ処理する操作をゲル状膜が白色になるまで繰り返した。その後、水を加えてオートクレーブ処理する操作をｐＨが７以下になるまで繰り返して、精製を行った。精製後に、乾燥させることにより得られたバクテリアセルロースの絶乾重量を測定した。その結果を図１２に示す。

【００７３】

図１２に示すように、Ｇ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株は、ＬＢ／グリセロール培地およびＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地のいずれにおいてもバクテリアセルロースの重量が小さかった。また、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株およびＧ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ７００１７８（ＢＰＲ２００１）株は、ＬＢ／グリセロール培地では比較的バクテリアセルロースの重量が大きかったものの、ＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地ではバクテリアセルロースの生産が認められなかった。これに対して、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）はＬＢ／グリセロール培地およびＬＢ／ＢＤＦ－Ｂ培地のいずれにおいてもバクテリアセルロースの重量が同等に大きかった。これらの結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）は試薬グリセロールのみならずＢＤＦ－Ｂを炭素源としても静置培養により効率的にバクテリアセルロースを生産できることが示された。ＢＤＦ－Ｂを炭素源としてバクテリアセルロ

ースを生産できるという特徴は、他の比較した株にはない特徴であって、副産物を利用できるという実用面でも有利であり、かつ生産コスト低減にも大きく貢献するものである。

【００７４】

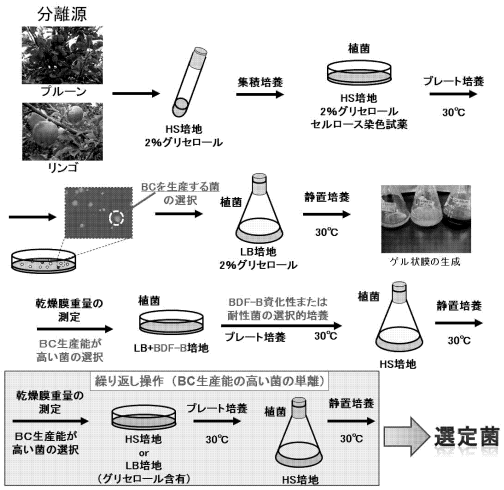
（２）撹拌培養での生産能

１０ｍＬのＨＳ培地にＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）、ＡＴＣＣ５３５８２株およびＡＴＣＣ２３７６９株を植菌し、３０℃で３日間静置培養することにより前々培養を行った。続いて、前々培養を行って得られた培養液を１０ｍＬのＨＳ培地に植菌し、３０℃で３日間静置培養することにより前培養を行った。次に、羽根付き三角フラスコに実施例２（１）のグリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地を１００ｍＬ入れて、各菌株につき同じ菌体数に相当する量の前培養液を植菌し、１５０ｒｐｍ、３０℃の条件下で３日間振とう培養することにより本培養を行った。続いて、本培養液中のバクテリアセルロースを実施例２（１）に記載の方法により精製した。ただし、６０℃、８０ｒｐｍで４～５時間振とうした後、さらに２０℃で一晩振とうした。精製したバクテリアセルロースは乾燥させて絶乾重量を測定した。その結果を図１３に示す。

【００７５】

図１３に示すように、Ｇ．ｘｙｌｉｎｕｓ ＡＴＣＣ５３５８２株は、グリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地のいずれにおいても、バクテリアセルロースの生産が認められなかった。また、Ｇ．ｈａｎｓｅｎｉｉ ＡＴＣＣ２３７６９株は、グリセロール本培養培地ではバクテリアセルロースの絶乾重量が比較的大きかったものの、ＢＤＦ－Ｂ本培養培地ではバクテリアセルロースの生産が認められなかった。これに対して、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）は、グリセロール本培養培地およびＢＤＦ－Ｂ本培養培地のいずれにおいても、バクテリアセルロースの絶乾重量が大きかった。この結果から、ＮＥＤＯ－０１株（Ｇ．ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ ＳＩＩＤ９５８７株）は、試薬グリセロールのみならずＢＤＦ－Ｂを炭素源として、静置培養のみならず撹拌培養によっても、効率的にバクテリアセルロースを生産することができることが示された。

【図１】



【図２－１】

```
SIID9587          1:CATGCAGTCGCCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGAT 59
G. intermedius    1:CATGCAAGTCGCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGAT 60
                  ******* ************************************************** 

SIID9587         60:CTATCCACGGGTGGGGGATAACTTTGGGAAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGG 119
G. intermedius   61:CTATCCACGGGTGGGGGATAACTTTGGGAAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGG 120
                 ************************************************************

SIID9587        120:GTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 179
G. intermedius  121:GTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA 180
                ************************************************************

SIID9587        180:AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT 239
G. intermedius  181:AGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT 240
                ************************************************************

SIID9587        240:GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA 299
G. intermedius  241:GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA 300
                ************************************************************

SIID9587        300:GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGC 359
G. intermedius  301:GCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGC 360
                ************************************************************

SIID9587        360:GGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC 419
G. intermedius  361:GGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGC 420
                ************************************************************

SIID9587        420:GGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG 479
G. intermedius  421:GGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGG 480
                ************************************************************

SIID9587        480:TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGC 539
G. intermedius  481:TTGACACAGTCAGATGTGAAATTCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGC 540
                ************************************************************

SIID9587        540:GACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGCAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT 599
G. intermedius  541:GACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGCAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT 600
                ************************************************************

SIID9587        600:GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATAACTGACGCTGAGGCCGCGAAA 659
G. intermedius  601:GGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCCGCGAAA 660
                ************************************************ ***********

SIID9587        660:GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG 719
G. intermedius  661:GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTG 720
                ************************************************************
```

【図２－２】

```
SIID9587         720:GATGTTGGGTGACTTTGTCATTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGG 779
G. intermedius   721:GATGTTGGGTGACTTTGTCATTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGG 780
                 ************************************************************

SIID9587         780:AGTACGGCCGCCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC 839
G. intermedius   781:AGTACGGCCGCCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC 840
                 ************************************************************

SIID9587         840:ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCTGT 899
G. intermedius   841:ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCCGT 900
                 ************************************************************ **

SIID9587         900:GTCCAGAGATGGGCATTTCTCGCAAGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC 959
G. intermedius   901:GTCCAGAGATGGGCATTTCTCGCAAGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC 960
                 ************************************************************

SIID9587         960:AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTT 1019
G. intermedius   961:AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTT 1020
                 ************************************************************

SIID9587        1020:GCCATCACGTTTGGGTGGGCACTCTAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGG 1079
G. intermedius  1021:GCCATCACGTTTGGGTGGGCACTCTAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGG 1080
                 ************************************************************

SIID9587        1080:GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGG 1139
G. intermedius  1081:GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGG 1140
                 ************************************************************

SIID9587        1140:TGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA 1199
G. intermedius  1141:TGACAGTGGGAAGCCAGGTGGTGACACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGA 1200
                 ************************************************************

SIID9587        1200:TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC 1259
G. intermedius  1201:TTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC 1260
                 ************************************************************

SIID9587        1260:CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGCTTT 1319
G. intermedius  1261:CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGCTTT 1320
                 ************************************************************

SIID9587        1320:GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCGCAAGGACGCAGCCGACCACG-TCG            1366
G. intermedius  1321:GACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCGCAAGGACGCAGCCGACCACGGTCG            1368
                 ********************************************** ***
```

【図３】

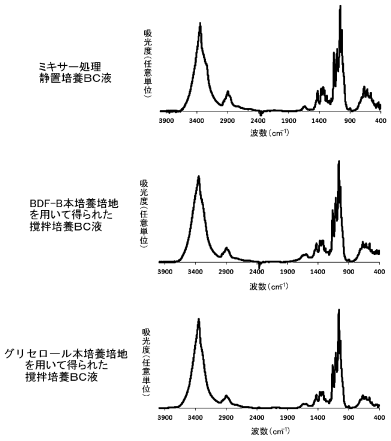
試験項目		SIID9587
培養温度(℃)		30
細胞形態		桿菌 (0.7-0.8×1.5-2.5 μm)
グラム染色性		−
胞子の有無		−
運動性		−
コロニー形態		培地：GYC 寒天 培養時間：48 hr 直径：1.0-2.0 mm 色調：クリーム色 形：円形 隆起状態：半球状 周縁：全縁 表面の形状など：スムーズ 透明度：不透明 粘稠度：バター様
生育温度試験(℃)	37	+
	45	−
カタラーゼ反応		+
オキシダーゼ反応		−
グルコースからの酸/ガス産生(酸産生/ガス産生)		NT
O/F テスト(酸化/発酵)		NT

+：陽性、−：陰性　NT: Not test

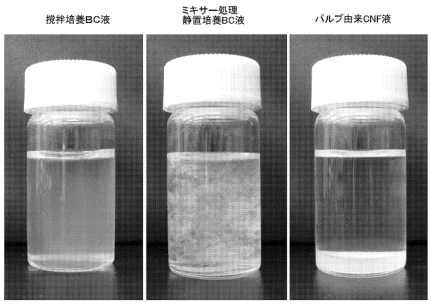
試験項目	
GYC 培地での色素の産生	−
嫌気条件下での生育	−
酢酸ナトリウムの CO_2 への分解	+
酸化	
n-プロパノール	+
グルコース	+
エタノール	+
資化	
エタノール	+
グリセリン	+
乳酸ナトリウム	+
サッカロース	+w
3%エタノールでの生育	+
5%酢酸での生育	−
30%グルコース含有培地での生育	+
MRS 寒天での生育	+

+：陽性　−：陰性

【図４】

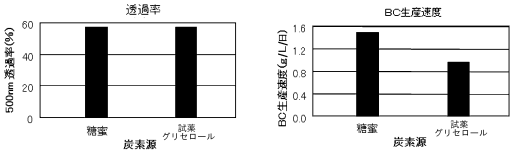


【図５】



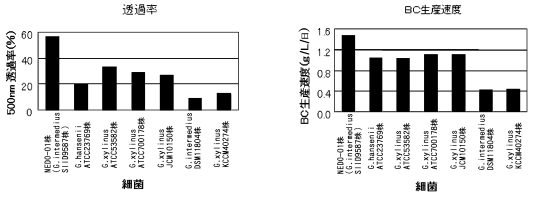
【図６】

炭素源	透過率（%）	本培養の日数	BC生産量（g/L）	BC生産速度（g/L/日）
糖蜜	57	3	4.45	1.48
試薬グリセロール	57	4	3.80	0.95

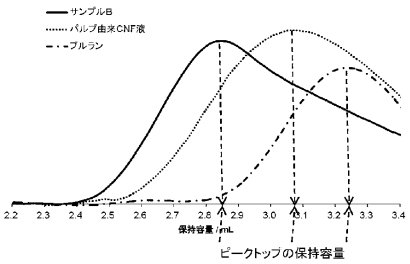


【図７】

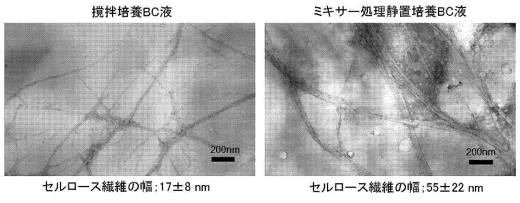
細菌	透過率（%）	本培養の日数	BC生産量（g/L）	BC生産速度（g/L/日）
NEDO-01株 (G. intermedius SIID9587株)	57	3	4.45	1.48
G. hansenii ATCC23769株	20	4	4.19	1.05
G. xylinus ATCC53582株	33	4	4.12	1.03
G. xylinus ATCC700178(BPR2001)株	29	4	4.44	1.11
G. xylinus JCM10150株	27	4	4.39	1.10
G. intermedius DSM11804株	9	5	2.08	0.42
G. xylinus KCCM40274株	13	4	1.72	0.43



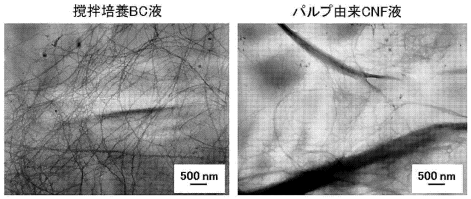
【図８】



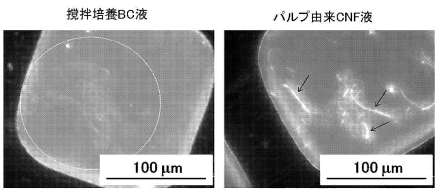
【図９】



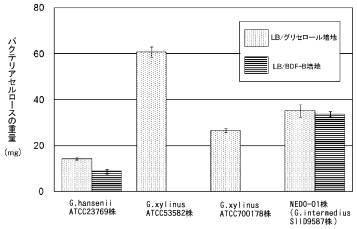
【図１０】



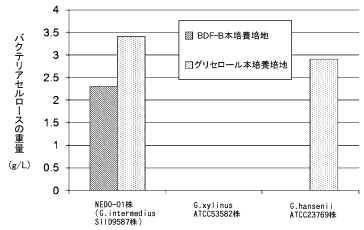
【図１１】



【図１２】



【図１３】



【配列表】

0005752332000001.app

フロントページの続き

特許法第３０条第２項適用　イノベーション・ジャパン２０１２、東京国際フォーラム、平成２４年9月２７～２８日
特許法第３０条第２項適用　ｈｔｔｐ：／／www．ｉｊ２０１２．ｎｅｔ／ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ－ｊａｐａｎ２０１２／ｉｊ／ｅｘｈｉｂｉｔｏｒ＿ｄｅｔａｉｌ．ｐｈｐ？ｉｄ＝２００１８、平成２４年7月２７日

微生物の受託番号　NPMD　NITE BP-01495

早期審査対象出願

(74)代理人　100169340
弁理士　川野　陽輔
(74)代理人　100195682
弁理士　江部　陽子
(72)発明者　田島　健次
北海道札幌市北区北１３条西８丁目　国立大学法人北海道大学　大学院工学研究院内
(72)発明者　小瀬　亮太
東京都府中市幸町３－５－８　国立大学法人東京農工大学　大学院農学研究院内
(72)発明者　櫻井　博章
北海道帯広市稲田町南９線西１３番地　日本甜菜製糖株式会社　総合研究所内

審査官　田中　耕一郎

(56)参考文献　特開２０１１－１７７１７２（ＪＰ，Ａ）
中国特許出願公開第１０２１６８０５６（ＣＮ，Ａ）
特開２００５－０８２７０４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００７／０６３８５４（ＷＯ，Ａ１）
特開平０８－２９１２０１（ＪＰ，Ａ）
特開平１０－２９８２０４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｐ　１／００－Ｃ１２Ｐ　４１／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）