

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-505709

(P2013-505709A)

(43) 公表日 平成25年2月21日(2013.2.21)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)		C 1 2 N	1/20 Z N A A	4 B O 6 4
C 1 2 P 19/04 (2006.01)		C 1 2 P	19/04 C	4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2012-530094 (P2012-530094)	(71) 出願人	505072650 浙江大学 中華人民共和国浙江省杭州市浙大路38号
(86) (22) 出願日	平成22年8月13日 (2010. 8. 13)	(71) 出願人	511208911 浙江帝斯曼中肯生物科技有限公司 中華人民共和国 浙江省 桐郷市 高橋鎮 經濟園区
(85) 翻訳文提出日	平成23年8月26日 (2011. 8. 26)	(74) 代理人	110000073 特許業務法人プロテック
(86) 国際出願番号	PCT/CN2010/001228	(74) 代理人	100167070 弁理士 狭武 哲詩
(87) 国際公開番号	W02011/035530	(72) 発明者	呉 雪昌 中華人民共和国 浙江省 杭州市 西湖区 浙江大学紫金港校区生命科学学院242房 間
(87) 国際公開日	平成23年3月31日 (2011. 3. 31)		
(31) 優先権主張番号	200910153005.7		
(32) 優先日	平成21年9月25日 (2009. 9. 25)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 黄色色素生成欠陥スフィンゴリピドアエロモナス及びジェランゴム生産における使用

(57) 【要約】

本発明は黄色色素生成欠陥スフィンゴリピドアエロモナス (Sphingomonassp.ZD001) (一本) 及び微生物発酵ジェランゴム生成における応用を提供する。本菌株が中国典型培養物保存センターに保存されており、住所は中国武漢大学 (430072)、保存期日は2009年09月10日、保存番号はCCTCC No:M209198。有益効果が主に、本菌株発酵液には黄色色素がないためオパール色になり、少量のアルコール或いはイソプロパノールだけを使って多糖を沈殿すれば、無色、優良なジェランゴムが得られるため、ジェランゴム生産工程のアフターの浄化脱色工程を簡潔化させることができるし、効率を高めるし、生産コストも低減できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

中国典型培養物保存センターに保存されており、住所は中国 武漢 武漢大学 (430072) であり、保存期日は2009年09月10日であり、保存番号はCCTCC No : M 209198である黄色色素生成欠陥スフィンゴリピドアエロモナス (Sphingomonas sp.) ZD001。

【請求項 2】

記載のスフィンゴリピドアエロモナスの16S rDNAが

AGAGTTTGTATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGATCCTTCGGGGTCTAGT
GGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGGTTCGGAATAACTCCCCGAAAGGGGTGCTAATACCGGATGAT
GTCGAAAGACCAAAGATTTATCGCCCTGAGATGAGCCCGGTAGGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGC
GACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCT
TTTACCCGGGAAGATAATGACTGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGG
GGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAA
CTCCAGAATGCCTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGAGAGGTGAAATTCGTA
GATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGTGCTTGGCACTTGGGTGGCGCAGC
TAACGCATTAAGTTATCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCTGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACGACTGGCAGAGATGCCT
TTCTTCCCTTCGGGGACCTACACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTCGACTTTAGTTACCATCATTAAAGTTGGTACTTTAAAGTAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAAGTACAGTGGGCAGCAA
TCCCGGAGGGTGAGCTAATCTCCAAAACCTGTCTCAGTTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATC
GCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCAGGCCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTG
GGTTCACCCGAAGGCGTTGCGCTAACTCGTAAGAGAGGCAGGCGACCACGGTGGGCTTAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAA
CAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTという配列を持つことを特徴とする請求項1
に記載のスフィンゴリピドアエロモナスである。

10

20

【請求項 3】

スフィンゴリピドアエロモナス菌株が以下の通り、グラム陰性桿菌であり、芽胞が無い、真っすぐな棒状で、栄養寒天平板の上に細菌集まりがオパール色であり、オキシダーゼ試験が陽性、カタラーゼ試験が陽性、偏性好気性、ブドウ糖と果糖とキシロースと蔗糖を分解でき、でんぷん加水分解試験が陽性、ゼラチンカプセル液化不可能、43 で成長しない、菌糸体の大きさは1.5-5.0 μm × 0.8-1.0 μm、黄色色素が出ないことを特徴とする請求項1に記載のスフィンゴリピドアエロモナス。

30

【請求項 4】

微生物の発酵生成ジェランゴムのため請求項1に記載のスフィンゴリピドアエロモナスの使用。

【請求項 5】

スフィンゴリピドアエロモナス菌株を活性化し、種培養してから、スフィンゴリピドアエロモナスに適用できる発酵培養基に植菌して、28 ~ 32 °C、pH6.8 ~ 7.2で、32 ~ 60h揺動培養してから高次アシル基ジェランゴムを含むオパール色発酵液が得られることを特徴とする請求項4に記載の使用。

40

【請求項 6】

高次アシル基ジェランゴムを含む発酵液を分離かつ浄化し、高次アシル基ジェランゴムが得られることと、用いられた分離浄化方法は以下の通り、高次アシル基が含まれる発酵液のpH値を5.0 ~ 6.0に調整し、0 ~ 70 °Cに昇温して、30min ~ 2h保温した後、40 ~ 50 °Cに温度を下げ、pH7.0に調整して、リゾチームとアルカリ・プロテアーゼを入れて、1h ~ 3h保温して蛋白質を除去して、蛋白質除去済み後の発酵液に凝集剤溶液を入れて、凝集沈殿を行ってから、さらに分離しかつ乾燥して、記載の高次アシル基ジェランゴムが得られることと、また用いられた凝集剤がCaCl₂、MgCl₂、NaCl、KClから選ばれた一種或いは二

50

種以上の任意比率の組み合わせであることということの特徴とする請求項5に記載の使用。

【請求項7】

高次アシル基ジェランゴムを含む発酵液が脱アシル基処理されてから、分離浄化して、低次アシル基ジェランゴムが得られることと、低次アシル基ジェランゴムの生成方法が以下の通に、高次アシル基ジェランゴムが含まれる発酵液にアルカリ金属或いはアルカリ土類塩化物溶液を入れて、pHを11.0に調整して、固体液体分離してから繊維料1が生成して、その繊維料1を水と1:4~6体積比で混ぜて、pHを2.5~4.0に調整し、15min~1h洗濯して、濾過加圧した後繊維料2が得られて、その繊維料2を水と1:9~12体積比で均一になるように混ぜて、80~90まで昇温して、アルカリ性試薬を入れてpH9.5~10.5に調整して、そのまま8min~15min反応して、反応が終了した後、反応液のpHを中性に調整して、ろ過助剤を加入して、濾過して、ろ液に凝集剤を加入して凝集沈殿してからさらに分離かつ乾燥して、低次アシル基ジェランゴムが得られることと、用いられたアルカリ金属或いはアルカリ土類塩化物がCaCl₂、MgCl₂、NaCl、KClから選ばれた一種或いは二種以上の組み合わせ、用いられたアルカリ性試薬がNaOH、KOH、Na₃PO₄から選ばれた一種或いは二種以上の組み合わせ、用いられたろ過助剤が珪藻岩、真珠岩或いはその組み合わせ、用いられた凝集剤がCaCl₂、MgCl₂、NaCl、KClから選ばれた一種或いは二種以上の組み合わせであることということの特徴とする請求項5に記載の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、黄色色素生成欠陥があっても、質が標準に達するジェランゴムを生産できるスフィンゴリピドアエロモナス菌株ZD001 (Sphingomonas sp. ZD001) 及びその微生物生成発酵ジェランゴムのための使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ジェランゴム(Gellan Gum)は、スフィンゴモナス・パウチモビリス (Sphingomonas paucimobilis) をエアロビクス発酵して生成した微生物エキソ多糖類であり、アメリカKelco会社が1978年に開発に成功したのである。ジェランゴムはキサンタンゴムの後に開発された、もう一種の毒の無い、安全的な、物理的及び化学的性質が優れている微生物エキソ多糖類である。日本では、1988年にすでに食品に使われることを認可して、アメリカは1992年にFDAに認められて、食品に使われるようになった。我が国には、1996年、それが食品増粘剤、安定剤として使われることを認め、ほかにはもう十以上の国も、食品添加剤としての利用も認めた。近年、ジェランゴムがその独特な優良特徴を持つため、新型の乳化剤、懸濁化剤、増粘剤、安定剤、ゲル剤、徐放性製剤、製膜材料等として、日々幅広く食品、医薬、化工等の工業の分野に利用されており、応用潜在力が大きい。

30

【0003】

ジェランゴムは、 α -1,3-D-ブドウ糖、 α -1,4-D-グルコン酸と α -1,4-L-ラムノースにモル比2:1:1で構成しており、または α -1,3-D-ブドウ糖、 α -1,4-D-グルコン酸、 α -1,3-D-ブドウ糖、 α -1,4-L-ラムノースの順番で繋がって四糖単位を作る。四糖単位が重合して生成した糖長鎖骨架には、アシルが繋がっており、通常、分子量は $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ ダルトン程度である。ジェランゴムは主に二種の形で存在し、即ち未脱アシルの高次アシル基ジェランゴム(天然ジェランゴムでも呼ばれる)と物理化学方法に基づき人工で脱アシルの低次アシル基ジェランゴムである。高次アシル基天然ジェランゴムには二種のアシル基があり、即ちアセチル基とアシルグリセロール基で、通常的にはアセチル基が一番目のブドウ糖残基のC6位に繋がっているが、アシルグリセロール基が同じのブドウ糖残基のC2位に繋がっていて、通常的には四糖単位にあたり、平均的にはアシルグリセロール基一つとアセチル基0.5個が含まれている。低次アシル基ジェランゴムは、高次アシル基ジェランゴムが脱アシル基処理された後のアシル基の無い産物である。従って、ジェランゴム分子が脱アシル基したかどうかによって、また脱アシル基の程度が違ふことによって、分子

40

50

量の差異が割と大きく、現在食品工業において比較的多く利用されているのは分子量が比較的に低い低次アシル基ジェランゴムである。

【 0 0 0 4 】

今まで、生産用のジェランゴム生産細菌スフィンゴモナス・パウチモビリスの発酵に、同時に代謝副産物の黄色色素（主にはカロチ[テ]ノイド）が出るため、ジェランゴムと炭素源を奪い合って、発酵液を黄色にさせる。ジェランゴムの生成過程には、特に高次アシル基ジェランゴムの生成過程には、コロイド中の黄色色素を除去するにはジェランゴム抽出脱色に用いられるアルコール或いはイソプロパノールの使用量（普通には発酵液体積の3倍量のアルコールあるいはイソプロパノール）と操作時間を増やすため、抽出浄化の効率が低くなるし、コストも増加する。

10

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、黄色色素生成欠陥があっても、質が標準に達することができるジェランゴムを生産できるスフィンゴリピドアエロモナス菌株ZD001 (Sphingomonas sp. ZD001) 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 】

【 0 0 0 6 】

当ZD001菌株がすでに中国典型培養物保存センターに保存されており、保存センターの住所は中国 武漢 武漢大学（郵政番号430072）、保存期日は2009年9月10日、保存番号はCCTCC No : M209198。そのため、当菌株は以下にZD001 (CCTCC NO: M 209198) 菌株と呼ばれている。

20

【 0 0 0 7 】

以下のように、

ZD001 (CCTCC NO:M 209198) 菌株は本申請発明者が分離しかつ選んで育ちしてから得られたもの。その16S rDNAに対し、シーケンシングと分子比較を行う時、ZD001がスフィンゴモナス・パウチモビリス (Sphingomonas paucimobilis) 16S rDNAヌクレオチド配列との同族性が99%以上であるため、ZD001 (CCTCC NO: M 209198) 菌株が、既に報道されたジェランゴムの生産菌スフィンゴモナス・パウチモビリスの同種変異形であることが認められた。

30

【 0 0 0 8 】

スフィンゴリピドアエロモナスの16S rDNAが以下の通り、

AGAGTTTGCCTCGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGATCCTTCGGGGTCTAGT
GGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGGTTCGGAATAACTCCCCGAAAGGGGTGCTAATACCGGATGAT
GTCGAAAGACCAAAGATTTATCGCCCTGAGATGAGCCCGCGTAGGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGC
GACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCT
TTTACCCGGAAGATAATGACTGTACCGGGAAGATAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGG
GGCTAGCGTTGTTCGGAATTAAGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAA
CTCCAGAAGCTGCCTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGAGAGGTGAAATTCGTA
GATATTCGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGTGCTTGGCACTTGGGTGGCGCAGC
TAACGCATTAAGTTATCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCTGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTACATGGTAGGACGACTGGCAGAGATGCCT
TTCTTCCCTTCGGGACCTACACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCCTCGACTTTAGTTACCATCATTAAGTTGGGTACTTTAAAGTAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAG
GTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGCGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAAGTACAGTGGGCAGCAA
TCCCGGAGGGTGAAGTAACTCCAAAACCTTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCAGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTG
GGTTCACCCGAAGCGTTGCGCTAACTCGTAAGAGAGGCAGGCGACCACGGTGGGCTTAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAA

40

50

CAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT

【 0 0 0 9 】

ZD001 (CCTCC NO: M 209198) がグラム陰性桿菌であり、芽胞が無い、真っすぐな棒状で、栄養寒天平板の上に細菌集まりがオパール色であり、オキシダーゼ試験が陽性、カタラーゼ試験が陽性、偏性好気性、ブドウ糖と果糖とキシロースと蔗糖を分解でき、でんぷん加水分解試験が陽性、ゼラチンカプセル液化不可能、43 で成長しない、菌糸体の大きさは1.5~5.0 μm×0.8-1.0 μm、黄色色素が出ないということの特徴とする記載のZD001 (CCTCC NO:M 209198) 菌株であることと、

【 0 0 1 0 】

ZD001 (CCTCC NO: M 209198) が微生物の発酵生成ジェランゴムのための使用も関することを特徴とする本発明であることと、

10

【 0 0 1 1 】

具体的には、その使用としては、ZD001 (CCTCC NO:M 209198) 菌株を通常の方法で活性化し、種の培養してから、スフィンゴリピドアエロモナスに適用できる発酵培養基に植菌して、28~32、pH6.8~7.2で、32~60h揺動培養してから高次アシル基ジェランゴムを含む発酵液が得られること。当発酵液には、直接に分離浄化されてから高次アシル基ジェランゴムを得ることができるし、脱アシル基処理して低次アシル基ジェランゴムを作ることが可能であることと、

【 0 0 1 2 】

生成物は高次アシル基ジェランゴムである場合、方法は以下の通り、高次アシル基ジェランゴムを含む発酵液のpH値を5.0~6.0に調整し、50 ~70 に昇温(好ましくは60)、30min~2h保温(好ましくは1h)してから、40 ~50 までに温度を下げ、pH7.0にし、リゾチームとアルカリ・プロテアーゼに入れて、1h~3h(好ましくは2h)保温し、蛋白質を除去する。蛋白質除去済み後の発酵液に凝集剤溶液を入れて、凝集沈殿を行ってから(凝集剤溶液の加入量がタンパク質除去済み後の発酵液体積の約5%を占める)、さらに分離して(体積が発酵液体積の30%ほど体積の濃度の90%以上のイソプロパノール或いはアルコールを加入して、好ましくは95%イソプロパノールで、攪拌してプレート及びフレーム濾過加圧する)、乾燥して(90)、高次アシル基ジェランゴムが得られる。用いられた凝集剤(濃度普通は20%, w/v)がCaCl₂、MgCl₂、NaCl、KClから選ばれた一種或いは二種以上の任意比率の組み合わせであることと、

20

30

【 0 0 1 3 】

生成物は低次アシル基ジェランゴムである場合、方法は以下の通り、高次アシル基ジェランゴムが含まれる発酵液にアルカリ金属或いはアルカリ土類金属塩化物溶液(濃度普通は20%, w/v)を入れて、pHを11.0に調整して、固体液体分離(プレート及びフレーム固体液体分離)してから、繊維料1が生成して、その繊維料1を水と1:4~6体積比で混ぜて、pHを2.5~4.0に調整して(好ましくはpH3.0)、15min~1h洗濯して(好ましくは30min)、濾過加圧した後、繊維料2が得られて、その繊維料2を水と1:9~12体積比で均一になるように混ぜて、80 ~90 まで昇温して(好ましくは83 ~87)、アルカリ性試薬を入れてpH9.5~10.5に調整して(好ましくはpH9.8~10.2)、そのまま8min~15min(好ましくは10min~12min)反応して、反応が終了した後、反応液のpHを中性に調整して、ろ過助剤を加入して(添加量は1~3%で、w/vで、好ましくは2%)、濾過して、ろ液に凝集剤(好ましくは10%質量濃度、添加体積がろ液体積の5%)を加入して凝集沈殿してから、さらに分離かつ乾燥して、低次アシル基ジェランゴムが得られる、用いられたアルカリ金属或いはアルカリ土類金属塩化物がCaCl₂、MgCl₂、NaCl、KCl(好ましくはCaCl₂)から選ばれた一種或いはその中の二種以上の組み合わせ、用いられたアルカリ性試薬がNaOH、KOH、Na₃PO₄から選ばれた一種或いはその中の二種以上の組み合わせ、用いられたろ過助剤が珪藻岩、真珠岩或いはその組み合わせ、用いられた凝集剤がCaCl₂、MgCl₂、NaCl、KCl(好ましくはKCl)から選ばれた一種或いは二種以上の組み合わせであることが、用いられた技術方案であることを特徴とする本方案。

40

【 0 0 1 4 】

50

有益効果が主に、黄色色素生成欠陥のスフィンゴリピドアエロモナスZD001 (CCTCC NO: M 209198) 菌株 (その発酵液には黄色色素がないためオパール色になり、抽出する時にはアルコール或いはイソプロパノールの使用量も、工程を簡潔化にさせるし、効率を高めるし、コストも削減できるし、工業化生産を利用して優れているジェランゴムが得られる) を提供することにある本発明。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下には具体的な実施例を挙げて本発明に対し詳しく説明するが、本発明の説明に使われるだけで、本発明の保護範囲が限定されていない。

【0016】

実施例1: ZD001 (CCTCC NO: M 209198) 菌株の分離及び勘定

- 1、無菌で土壌サンプルを採集して、希釈してYM寒天培養基の平板に塗布するステップ、
- 2、該当平板を30℃の下で五日間培養するステップ、
- 3、違う形の細菌集まりを選んで、同じ培養基の平板に別々に線を劃して浄化分離して、30℃の下で五日間培養ステップを含むZD001 (CCTCC NO: M 209198) 菌株の分離。

【0017】

YM寒天培養基の最終濃度の構成としては、酵母抽出物0.30%、麦芽抽出物0.30%、ペプトン0.50%、ブドウ糖1.00%、寒天1.50%である。溶剤は蒸留水。

注: 本発明では、培養基の濃度はすべて質量体積百分率の濃度を指し、あるコンポーネントの濃度が1%であることは、100mL培養基に1gの該当物質を含むことを言う。

【0018】

選別してから、黄色色素生成欠陥のZD001 (CCTCC NO: M 209198) 菌株一本が得られる。以下のような、グラム陰性桿菌であり、芽胞が無く、真っすぐな棒な状態で、栄養寒天平板の上に細菌集まりがオパール色であり、オキシダーゼ試験が陽性、カタラーゼ試験が陽性、偏性好気性、ブドウ糖と果糖とキシロースと蔗糖を分解でき、でんぷん加水分解試験が陽性、液化ゼラチンカプセル不可能、43℃で成長しない、菌糸体の大きさは1.5-5.0 μm × 0.8-1.0 μm、黄色色素が出ないという特徴を持つ菌である。

【0019】

実施例2: ZD001 (CCTCC NO: M 209198) 菌株の発酵工程

- 1、純菌種をYPG培養基の斜面に接種して、30℃で72h培養するステップと、
- 2、斜面種を50mL一級種の培養基 (250mLフラスコにある) に接入して、30℃、200rpmで24hの振動培養をして、一級種の液が得られる一級種の培養と、
- 3、一級種の液を5%の体積比の量で100mLの二級種の培養基 (500mLフラスコにある) にして、30℃、200rpmで12hの振動培養をして、二級種の液が得られる二級種の培養と、
- 4、二級種の液を5%の体積比の量で発酵培養基に接入して、30℃、pH6.8~7.2の条件下で、1.0vvm通風して、回転速度300rpmで48時間培養する缶上発酵と、
- 5、缶上発酵に48時間で培養されたジェランゴムを含む発酵液を収集する発酵産物収集を含むZD001 (CCTCC NO: M 209198) の発酵工程。YPG斜面培養基の構成と最終濃度はとしては、ブドウ糖2.00%、ペプトン 0.50%、酵母抽出物0.30%、寒天1.50%、溶剤は蒸留水、pH7.2。

【0020】

一級種の培養基の最終濃度の構成としては、酵母膏0.20%、牛肉膏0.30%、ペプトン0.50%、塩化カリウム0.10%、溶剤は蒸留水、pH7.2。

【0021】

二級種の培養基の場合、ブドウ糖1.50%、酵母膏0.50%、ペプトン0.50%、燐酸二水素カリウム0.06%、燐酸水素二カリウム0.06%、硫酸マグネシウム0.06%、溶剤は蒸留水、pH7.2。

【0022】

発酵培養基の場合、ブドウ糖3.00%、酵母膏0.05%、ペプトン0.30%、燐酸二水素カリウ

10

20

30

40

50

－ム0.06%、燐酸水素二カリウム0.10%、硫酸マグネシウム0.06%、溶剤は蒸留水、pH7.2。

【0023】

実施例3：高次アシル基ジェランゴムの生成工程

1、発酵液100L、10% (v/v) のHClでpHを6.0に調整して、60 に昇温して、1h保温する発酵液前処理ステップと、

2、40 に温度を下げる時、10% (w/v) のNaOHをpHを7.0に調整して、50gのリゾチーム (20万U/g、雁博生物会社) 及び100gのアルカリ・プロテアーゼ (2万U/g、雁博生物会社) を加入して、2h保温する蛋白不純物除去と、

3、前処理及び蛋白不純物の除去処理後の発酵液に5Lの20% (w/v) 濃度のCaCl₂溶液を加入して、30min攪拌してから、30Lイソプロパノールを加入して、1h攪拌し続けてから、プレート及びフレームを濾過加圧する凝集沈殿分離と、

4、圧濾してから得られた繊維料を0 で2h乾燥した後に粉碎して、オパール色粉末、0.05~0.30%窒素含有量の高次アシル基ジェランゴム製品が得られる乾燥、粉碎を含む高次アシル基ジェランゴムの生成工程。

【0024】

実施例4：脱アシルジェランゴムの生成工程

1、条件がまとまった発酵液100Lを取って、20% (w/v) 濃度のCaCl₂溶液3Lに加入して、10min攪拌してから10%のNaOHでpHを11.0に調整して、3min攪拌してからプレートとフレーム圧濾して、繊維料が得られる発酵液前処理と、

2、前処理された後の繊維料を水と1：5の体積比で混ぜて、10%のHClでpHを3.0に調整して、30min攪拌してからプレートとフレーム圧濾して、繊維料が得られる洗濯と、

3、洗濯された後の繊維料を水と1：10の体積比で混ぜて、均一になるように混ぜて、90 程度昇温して、繊維料を完全に溶解させて、85 の温度を維持して、10% のNaOHの水溶液を加入して、pH値を9.5~10.5に調整した、10min反応してから10%のHClでpHを6.0に調整する脱アシル基処理と、

4、質量が料液体積の2%の珪藻岩を入れて、80 以上の温度を維持して、プレートとフレーム濾過した後に料液 (濾過液) 体積の5%のKCl溶液 (質量濃度が10%である) を入れて、プレートとフレーム圧搾と、

5、圧搾して得られたジェランゴム繊維料を90 で2h乾燥してから粉碎して、低次アシル基ジェランゴム製品が得られる。オパール色の粉末で強さ 800 g/cm²、透明度 80%低次アシル基ジェランゴムが得られる乾燥、粉碎を含む脱アシルジェランゴムの生成工程。

【配列表】

[2013505709000001.app](#)

10

20

30

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2010/001228
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C12N, C12P, C08B, C12S, C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
DATABASES: CNPAT(CPRS), CNKI, WPI, EPODOC, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ		
SEARCH TERMS: CCTCC, M209198, 209198, ZD001, Sphingomonas, sphingolipid aeromonas, gellan gum, flavochrome, yellow pigment?, carotinoid?, carotenoid?, deficien??. delet+, absent??. miss+, los+, disab+, disorder+, disturban+, block+, muta+; Sequence		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN101665778A (UNIV ZHEJIANG et al.), 10.March 2010(10.03.2010), see claims 1-7	1-7
A	CN1553957A (CP KELCO US INC), 08 October 2004(08.12.2004), see the whole document	1-7
A	CN1635132A (ZHANG, Yu), 06 July 2005(06.07.2005), see the whole document	1-7
A	CN1970738A (UNIV SHANDONG), 30 May 2007(30.05.2007), see claims 1-10, examples 1-5	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 22 October 2010 (22.10.2010)	Date of mailing of the international search report 18 Nov. 2010 (18.11.2010)	
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer ZHAO, Shuo Telephone No. (86-10)62411070	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001228

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US2003100078A1 (HARDING, Nancy E. et al.), 29 May 2003(29.05.2003), see the whole document	1-7
A	WO03068004A2 (MARS, INCORPORATED), 21 August 2003(21.08.2003), see the whole document	1-7
A	WANG, Qin-dan et al. Recent advance in gellan gum biosynthesis. Food Sciences, 31 May 2008(31.05.2008), Vol. 29, No. 10, pages 689-693, ISSN 1002-6630, see the whole document	1-7
A	ARSENIO, M. et al. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 28 May 2008(28.05.2008), Vol. 79, No. 6, pages 889-890, ISSN 0175-7598, see the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/001228

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101665778 A	10.03.2010	NONE	
CN1553957 A	08.12.2004	WO0164897 A2	07.09.2001
		AU4728101 A	12.09.2001
		EP1261717 A2	04.12.2002
		JP2003525045 T	26.08.2003
		US2006121578 A1	08.06.2006
		EP1261717 B1	07.05.2008
		DE60133882 E	19.06.2008
		US2008268527 A1	30.10.2008
CN1635132 A	06.07.2005	CN1269964 C	16.08.2006
CN1970738 A	30.05.2007	CN100451106 C	14.01.2009
US2003100078 A1	29.05.2003	NONE	
WO03068004 A2	21.08.2003	GB2385330 A	20.08.2003
		AU2917602 A	14.08.2003
		AU2003207318 A1	04.09.2003
		AU2003207318 A8	20.10.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001228

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20 (2006.01) i

C12P 19/04 (2006.01) i

C08B 37/00 (2006.01) i

C12R 1/01 (2006.01) i

C12S 3/02 (2006.01) n

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2010/001228
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C12N, C12P, C08B, C12S, C12R		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
数据库: CNPAT(CPRS), CNKI, WPI, EPODOC, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ		
检索词: 鞘脂单胞菌, 鞘氨醇单胞菌, 结冷胶, 吉兰糖胶, 吉兰胶, 吉兰糖, 黄色素, 类胡萝卜素, 缺陷, 缺失, 障碍, 突变, CCTCC, M209198, 209198, ZD001, Sphingomonas, sphingolipid aeromonas, gellan gum, flavochrome, yellow pigment?, carotinoid?, carotenoid?, deficien??. delet+, absent??. miss+, los+, disab+, disorder+, disturban+, block+, muta+; 对 SEQ ID No. 1 的检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN101665778A (浙江大学等), 10.3 月 2010(10.03.2010), 参见权利要求 1-7	1-7
A	CN1553957A (CP 凯尔科美国公司), 08.12 月 2004(08.12.2004), 参见全文	1-7
A	CN1635132A (张禹), 06.7 月 2005(06.07.2005), 参见全文	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。		<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 22.10 月 2010 (22.10.2010)		国际检索报告邮寄日期 18.11 月 2010 (18.11.2010)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 赵硕 电话号码: (86-10) 62411070

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2010/001228

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN1970738A (山东大学), 30.5 月 2007(30.05.2007), 参见权利要求 1-10, 实施例 1-5	1-7
A	US2003100078A1 (HARDING, Nancy E. et al.), 29.5 月 2003(29.05.2003), 参见全文	1-7
A	WO03068004A2 (MARS, INCORPORATED), 21.8 月 2003(21.08.2003), 参见全文	1-7
A	王琴丹等, 结冷胶的生物合成研究进展. 食品科学, 31.5 月 2008 (31.05.2008), 第 29 卷, 第 10 期, 第 689-693 页, ISSN 1002-6630, 参见全文	1-7
A	ARSENIO, M 等, Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 28. 5 月 2008(28.05.2008), 第 79 卷, 第 6 期, 第 889-900 页, ISSN 0175-7598, 参见全文	1-7

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/001228

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101665778 A	10.03.2010	无	
CN1553957 A	08.12.2004	WO0164897 A2	07.09.2001
		AU4728101 A	12.09.2001
		EP1261717 A2	04.12.2002
		JP2003525045T T	26.08.2003
		US2006121578 A1	08.06.2006
		EP1261717 B1	07.05.2008
		DE60133882E E	19.06.2008
		US2008268527 A1	30.10.2008
CN1635132 A	06.07.2005	CN1269964 C	16.08.2006
CN1970738 A	30.05.2007	CN100451106 C	14.01.2009
US2003100078 A1	29.05.2003	无	
WO03068004 A2	21.08.2003	GB2385330 A	20.08.2003
		AU2917602 A	14.08.2003
		AU2003207318 A1	04.09.2003
		AU2003207318 A8	20.10.2005

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/001228

A. 主题的分类

C12N 1/20 (2006.01) i

C12P 19/04 (2006.01) i

C08B 37/00 (2006.01) i

C12R 1/01 (2006.01) i

C12S 3/02 (2006.01) n

フロントページの続き

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

(72)発明者 吳 栄明

中華人民共和国 浙江省 桐郷市 高橋鎮經濟園区 帝斯曼中肯生物科技有限公司

(72)発明者 李 欧

中華人民共和国 浙江省 杭州市 西湖区浙江大学紫金港校区生命科学学院 2 4 2 房間

(72)発明者 朱 亮

中華人民共和国 浙江省 杭州市 西湖区浙江大学紫金港校区生命科学学院 2 4 2 房間

(72)発明者 陳 亜敏

中華人民共和国 浙江省 杭州市 西湖区浙江大学紫金港校区生命科学学院 2 4 2 房間

(72)発明者 錢 朝東

中華人民共和国 浙江省 杭州市 西湖区浙江大学紫金港校区生命科学学院 2 4 2 房間

(72)発明者 陳 梅

中華人民共和国 浙江省 桐郷市 高橋鎮經濟園区 帝斯曼中肯生物科技有限公司

Fターム(参考) 4B064 AF11 CA02 CC12 DA01 DA10 DA16 DA20

4B065 AA01X AC14 BA21 CA22 CA41 CA44 CA54 CA60