

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-201962

(P2017-201962A)

(43) 公開日 平成29年11月16日(2017.11.16)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 D	4 B 0 6 5
	C 1 2 N 1/20	
	C 1 2 N 1/20 C	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2016-97159 (P2016-97159)	(71) 出願人	899000057
(22) 出願日	平成28年5月13日 (2016.5.13)		学校法人日本大学 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
		(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100126882 弁理士 五十嵐 光永
		(74) 代理人	100175824 弁理士 小林 淳一
		(72) 発明者	岩淵 範之 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
		(72) 発明者	砂入 道夫 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有機溶媒処理用微生物製剤、有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法及び有機溶媒の処理方法

(57) 【要約】

【課題】 常温で保存可能であり、環境負荷が少ない乳化技術で作製された、高い有機溶媒分解能を有する新規有機溶媒処理用微生物製剤を提供する。

【解決手段】 本発明の有機溶媒処理用微生物製剤は、有機溶媒によりミセル封入化された有機溶媒分解菌を含有することを特徴とする。本発明の有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法は、有機溶媒分解菌と、有機溶媒と、培地とを混合し、前記有機溶媒分解菌が成育可能な条件で超音波処理を行い、前記有機溶媒によりミセル封入化された前記有機溶媒分解菌を得るミセル封入化工程を備えることを特徴とする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有機溶媒によりミセル封入化された有機溶媒分解菌を含有することを特徴とする有機溶媒処理用微生物製剤。

【請求項 2】

前記有機溶媒が常温及び常圧下で液体である、請求項 1 に記載の有機溶媒処理用微生物製剤。

【請求項 3】

前記有機溶媒が炭素数 13 以上 16 以下のアルカンである、請求項 1 又は 2 に記載の有機溶媒処理用微生物製剤。

10

【請求項 4】

前記有機溶媒分解菌がロドコッカス属に属する細菌である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の有機溶媒処理用微生物製剤。

【請求項 5】

前記ミセルの平均粒径が 1 μm 以上 100 μm 以下である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の有機溶媒処理用微生物製剤。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の有機溶媒処理用微生物製剤を用いることを特徴とする有機溶媒の処理方法。

【請求項 7】

有機溶媒分解菌と、有機溶媒と、培地とを混合し、前記有機溶媒分解菌が成育可能な条件下で超音波処理を行い、前記有機溶媒によりミセル封入化された前記有機溶媒分解菌を得るミセル封入化工程を備えることを特徴とする有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法。

20

【請求項 8】

前記有機溶媒が常温及び常圧下で液体である、請求項 7 に記載の有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法。

【請求項 9】

前記有機溶媒が炭素数 13 以上 16 以下のアルカンである、請求項 7 又は 8 に記載の有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法。

【請求項 10】

前記有機溶媒分解菌がロドコッカス属に属する細菌である、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、有機溶媒処理用微生物製剤、有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法及び有機溶媒の処理方法に関する。

【背景技術】

【0002】

有機溶媒分解菌であるロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌は、土壌や海洋などにありふれて存在するグラム陽性細菌、高 G + C 含量のコリネ型細菌の一種である。ロドコッカス属細菌には、石油系炭化水素やポリ塩化ビフェニール類 (PCB) などをはじめとした数多くの難分解性化合物に対して分解及び資化能力をもつことに加え、アクリルアミドや有用酵素群、又は細胞外多糖をはじめとした機能性バイオポリマーなどの生産菌が多く存在することが知られている。

40

そのため、産業的に重要な菌群として位置づけられており、低エネルギー化や環境負荷を削減できるバイオプロセスによる環境浄化又は物質生産への応用などが期待されている。

【0003】

特に、バイオプロセスを考える場合、応用が期待される微生物には、有機溶媒を含む特

50

殊な環境下での良好な成育や活発な代謝活動などの性質が求められる。また、石油流出事故などによる石油汚染環境の浄化に必要な微生物にも、高濃度難揮発性化合物存在下でこれらの分解を行いながら良好な成育を示すために、これらに対する分解能だけでなく、共存する難揮発性化合物の毒性に対する耐性能が高いことが求められる。

これらの性質を解析するためには、まず、その切り口として微生物の有機溶媒耐性が重要であり、特にバイオプロセスにおいては、高濃度有機溶媒存在下での成育が求められる。

【0004】

本発明者らは、ロドコッカス・ロドクラウス (*Rhodococcus rhodochrous*) S-2 株が高濃度石油耐性石油分解菌であることを見出し (例えば、非特許文献1参照。)、その石油耐性に検討を加えた結果、同菌の生産する細胞外多糖 (以下、「EPS」という) が長鎖アルカンなどの難揮発性有機溶媒の耐性に深く関与していることを明らかにした。

さらに、ロドコッカス属細菌のコロニー形態と溶媒耐性について検討したところ、EPS生産量の少ないラフ型菌は溶媒に親和性が高く結果的に溶媒感受性であり、一方で、EPS生産量の多いムコイド型菌は耐性を示したことから、同属細菌においては、コロニー形態と有機溶媒耐性に高い相関があることを明らかにした。

また、EPSは溶媒に感受性のラフ型菌にも溶媒耐性を与えることが示されており、これらのことから、ムコイド型コロニーの形成が同属細菌の溶媒耐性を考える上での一つの指標であることが見出された。

【0005】

ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) PR4 株 (以下、「PR4株」と称することがある。) は、分岐鎖状のアルカンの一種であるプリスタン (2, 6, 10, 14-tetramethyl-pentadecane) 分解菌として単離された株であり (例えば、非特許文献2参照。)、培養の経過と共にEPSの生産に基づいた自身のコロニー形態をラフ型 ムコイド型 ラフ型へと変化させる株である。また、同株は難揮発性有機溶媒に耐性を示すことが知られている。

【0006】

一般に、有機溶媒を細菌で処理する場合、有機溶媒と培地成分を含む水性溶媒との二層培養系で行う。しかしながら、水性溶媒中に添加された細菌は、有機溶媒-水性溶媒界面でしか反応できないため、バイオプロセスによる環境浄化又は物質生産への応用には、菌体の親油性を改善し、菌体がアルカンに転移するようにしての処理効率を向上させる必要がある。

【0007】

PR4株は培地/アルカンの二層培養系において、添加するアルカンの炭素数によって、アルカン粒子表面へ吸着する「吸着型」とアルカン粒子内へ転移する「転移型」の二つの異なる局在性を示す株であり (例えば、非特許文献3参照。)、バイオリメディエーションやバイオプロセスの宿主として期待されている。

【0008】

本発明者らは、PR4株が前記炭素数14以上のテトラデカン、ペンタデカン、ヘキサデカン、プリスタン、スクワラン等に転移して、これらのアルカンを代謝及び分解できることを明らかにした。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Iwabuchi, N. et al., "Relationships between Colony Morphotypes and Oil Tolerance in *Rhodococcus rhodochrous*", *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 66, No.11, p5073-5077, 2000.

【非特許文献2】Komukai-Nakamura, S. et al., "Construction of bacterial consortia which degrade Arabian light crude oil", *J. Ferment. Bioeng.*, Vol. 82, p 570-

10

20

30

40

50

574, 1996.

【非特許文献3】Iwabuchi, N. et al., "Role of Interfacial Tensions in the Translocation of Rhodococcus erythropolis during Growth in a Two Phase Culture", System Environmental Science & Technology, vol. 43, p8290-8294, 2009.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

ロドコッカス属細菌を利用して微生物製剤を開発するにあたり、1)前培養を伴わない分解酵素を誘導するための対策、2)分解酵素の発現を維持したままの細菌の保存、維持管理、移動の手軽さ等のための対策、3)製剤投与後の培地/アルカンの二層培養系全体への親和性を高めるための対策等、いくつかの課題が存在する。

10

【0011】

通常、水/油混合系における乳化技術としては、界面活性剤や乳化安定剤を利用する化学的手法と、機械的エネルギーを利用する物理的手法との2つに分類することができる。前者の化学的手法では、界面活性剤等は難分解性の物質であり、河川や海に流出してしまうと残留し、環境汚染の原因となる虞がある。

【0012】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、常温で保存可能であり、環境負荷が少ない乳化技術で作製された、高い有機溶媒分解能を有する新規有機溶媒処理用微生物製剤を提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、有機溶媒分解菌を含む培地/アルカンの二層培養系を超音波処理によりミセル化することを見出し、本発明を完成させた。

【0014】

すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[1]有機溶媒によりミセル封入化された有機溶媒分解菌を含有することを特徴とする有機溶媒処理用微生物製剤。

[2]前記有機溶媒が常温及び常圧下で液体である、[1]に記載の有機溶媒処理用微生物製剤。

30

[3]前記有機溶媒が炭素数13以上16以下のアルカンである、[1]又は[2]に記載の有機溶媒処理用微生物製剤。

[4]前記有機溶媒分解菌がロドコッカス属に属する細菌である、[1]~[3]のいずれか一つに記載の有機溶媒処理用微生物製剤。

[5]前記ミセルの平均粒径が1 μ m以上100 μ m以下である、[1]~[4]のいずれか一つに記載の有機溶媒処理用微生物製剤。

[6][1]~[5]のいずれか一つに記載の有機溶媒処理用微生物製剤を用いることを特徴とする有機溶媒の処理方法。

[7]有機溶媒分解菌と、有機溶媒と、培地とを混合し、前記有機溶媒分解菌が成育可能な条件下で超音波処理を行い、前記有機溶媒によりミセル封入化された前記有機溶媒分解菌を得るミセル封入化工程を備えることを特徴とする有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法。

40

[8]前記有機溶媒が常温及び常圧下で液体である、[7]に記載の有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法。

[9]前記有機溶媒が炭素数13以上16以下のアルカンである、[7]又は[8]に記載の有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法。

[10]前記有機溶媒分解菌がロドコッカス属に属する細菌である、[7]~[9]のいずれか一つに記載の有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法。

【発明の効果】

【0015】

50

本発明によれば、常温で保存可能であり、環境負荷が少ない乳化技術で作製された、高い有機溶媒分解能を有する有機溶媒処理用微生物製剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】実施例1における各種有機溶媒（C12、C15、C16、C19）を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤を位相差顕微鏡により撮影した画像である。

【図2】実施例1における有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤をDAPI試薬及びCTC試薬を用いて二重染色して、位相差顕微鏡により撮影した画像である。

【図3】実施例1における有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤での超音波処理直後の平均粒径及び平均転移数を、位相差顕微鏡を用いて目視により測定した結果を示すグラフである。

【図4】実施例1における有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤での超音波処理後から1日目～7日目の平均粒径及び平均転移数を、位相差顕微鏡を用いて目視により測定した結果を示すグラフである。

【図5】実施例2における有機溶媒としてC19を、水性溶媒としてMM培地を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤を位相差顕微鏡により撮影した画像である。

【図6】実施例3における有機溶媒としてC19を、水性溶媒としてNP培地を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤を位相差顕微鏡により撮影した画像である。

【図7】(A)実施例4における有機溶媒としてC16を、水性溶媒としてMM培地を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤と、有機溶媒としてC16を、水性溶媒としてMM培地を用いて製造したコントロールミセルとを位相差顕微鏡により撮影した画像である。(B)実施例4における有機溶媒としてC16を、水性溶媒としてMM培地を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤と、有機溶媒としてC16を、水性溶媒としてMM培地を用いて製造したコントロールミセルとについて、レーザー回折式粒度分布測定装置により計測した粒径を示すグラフである。

【図8】試験例1における各分解条件（パターン1～3）での処理後のweathered-crude oil (w-oil)のC16以外の各種残存成分を、パターン4をコントロールとしてGC-MS解析（SIM条件）した結果を示すグラフである。

【図9】試験例1における各分解条件（パターン1～3）での処理後のweathered-crude oil (w-oil)の残存成分（C16）を、パターン4をコントロールとしてGC-MS解析（SIM条件）した結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

<<有機溶媒処理用微生物製剤>>

一実施形態において、本発明は、有機溶媒によりミセル封入化された有機溶媒分解菌を含有する有機溶媒処理用微生物製剤を提供する。

【0018】

本実施形態の有機溶媒処理用微生物製剤は、常温で保存可能であり、環境負荷が少ないものである。さらに、本実施形態の有機溶媒処理用微生物製剤は、高い有機溶媒分解能を有し、環境浄化又は物質生産へ利用することができる。

【0019】

<有機溶媒>

本実施形態において、ミセル封入化に用いられる有機溶媒は、特別な限定はなく、例えば、常温及び常圧下で固体であるものであってもよく、常温及び常圧下で液体であるものであってもよい。常温及び常圧下で固体であるものを用いる場合、常温及び常圧下で液体である有機溶媒の存在により、前記常温及び常圧下で固体である有機溶媒を溶解し、液体とすることができればよい。中でも、ミセルの保存安定性の観点から、本実施形態においてミセル封入化に用いられる有機溶媒は、常温及び常圧下で液体であるものが好ましい。

【0020】

10

20

30

40

50

本明細書において、「常温」とは、特に冷やしたり、熱したりしない温度、すなわち平常の温度を意味し、例えば、15～25の温度等が挙げられる。

また、本明細書において、「常圧」とは、特別に減圧も加圧もしないときの圧力、すなわち大気圧に等しい圧力を意味し、例えば、1気圧(1 atm、101,325 Pa)程度等が挙げられる。

【0021】

また、本実施形態において、ミセル封入化に用いられる有機溶媒は、炭素数13以上のアルカンを含むことが好ましい。炭素数12以下のアルカンでは、通常有機溶媒分解菌を有機溶媒中へ転移させることが難しい。よって、前記ミセル封入化に用いられる有機溶媒としては、炭素数13以上のアルカン以外に炭素数12以下の炭化水素又はその他の疎水性物質が含まれていてもよく、炭素数13以上のアルカンで100%占められていてもよい。炭素数12以下のアルカンを含む場合は、有機溶媒の全量を基準として、炭素数13以上のアルカンが20%(v/v)以上含まれることが好ましく、40%(v/v)以上含まれることがより好ましく、60%(v/v)以上含まれることがさらに好ましい。

中でも、ミセル封入化に用いられる有機溶媒としては、炭素数13以上のアルカンで100%占められていることが好ましい。

【0022】

よって、常温及び常圧下で液体であり、有機溶媒分解菌が有機溶媒中に転移可能である有機溶媒としては、例えば、炭素数13以上16以下の直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカン等が挙げられる。

【0023】

前記炭素数13以上16以下の直鎖状のアルカンとしては、例えば、n-トリデカン(C13)、n-テトラデカン(C14)、n-ペンタデカン(C15)、n-ヘキサデカン(C16)等が挙げられる。

【0024】

前記炭素数13以上16以下の分岐鎖状のアルカンとしては、例えば、2,2,7-トリメチルデカン(C13)、2,6,8-トリメチルデカン(C13)、2,4,6-トリメチルデカン(C13)、3,5-ジメチルウンデカン(C13)、4,7-ジメチルウンデカン(C13)、2,5,5-トリメチルデカン(C13)、5,7-ジメチルウンデカン(C13)、2,8-ジメチルウンデカン(C13)、4,8-ジメチルウンデカン(C13)、2,3-ジメチルウンデカン(C13)、2,2,9-トリメチルデカン(C13)、5-メチル-5-プロピルノナン(C13)、2,5,6-トリメチルデカン(C13)、[R,(-)]-3-メチルドデカン(C13)、3,3,5-トリメチルデカン(C13)、3,3-ジエチル-4,5,5-トリメチルオクタン(C13)、4,4-ジプロピルヘプタン(C13)、2,2,3,3-テトラメチルノナン(C13)、2,4-ジメチル-3,3-ジイソプロピルペンタン(C13)、2-メチルトリデカン(C14)、7-メチルトリデカン(C14)、3,8-ジエチルデカン(C14)、(6R,7S)-6,7-ジメチルドデカン(C14)、3,3,4,4-テトラエチルヘキサン(C14)、2,2,3,3,4,4,5,5-オクタメチルヘキサン(C14)、5-ブチルデカン(C14)、2,5-ジメチル-3,4-ジイソプロピルヘキサン(C14)、2,2,3,3,5,6,6-ヘプタメチルヘプタン(C14)、3-tert-ブチル-2,2,5,5-テトラメチルヘキサン(C14)、4-メチルテトラデカン(C15)、2,7,10-トリメチルドデカン(C15)、7-メチルテトラデカン(C15)、6-プロピルドデカン(C15)、ファルネサン(C15)、[R,(-)]-3-メチルテトラデカン(C15)、2,6-ジメチル-3,5-ジイソプロピルヘプタン(C15)、5-ブチルウンデカン(C15)、5-ペンチルデカン(C15)、(R)-5-エチル-5-プロピルウンデカン(C16)、2,2,4,4,5,5,7,7-オクタメチルオクタン(C16)、3,5,9-トリメチルトリデカン(C16)、7-プロピルトリデカン(C16)、5,8-ジエチルドデカン(C16)、4-メチルペンタデカン(C16)、3,3,6,6-テトラエチルオクタン(C16)

10

20

30

40

50

、2, 4, 6 - トリメチルトリデカン (C 16)、3 - メチルペンタデカン (C 16)、6 - ペンチルウンデカン (C 16)、4, 6 - ジエチルドデカン (C 16)、2, 2, 4, 4, 6, 6, 7 - ヘプタメチルノナン (C 16)、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8 - ヘプタメチルノナン (C 16) 等が挙げられ、これらに限定されない。

【0025】

前記炭素数13以上16以下の環状のアルカンとしては、例えば、シクロトリデカン (C 13)、シクロテトラデカン (C 14)、1, 1, 3, 5 - テトラメチルシクロヘキサン (C 14)、3 - シクロヘキシル - 4 - メチルヘプタン (C 14)、シクロペンタデカン (C 15)、シクロヘキサデカン (C 16) 等が挙げられ、これらに限定されない。

【0026】

これらの前記直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカンは1種又は2種以上を混合して用いてもよい。さらに、これら直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカンの1個以上の水素原子が、ハロゲン原子又は水酸基で置換されていてもよい。ここで、水素原子を置換するハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられる。

ミセル封入化に用いられる有機溶媒が炭素数13以上16以下の直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカンであることにより、有機溶媒分解菌は、前記有機溶媒中に転移することができる。さらに、有機溶媒分解菌は、ミセル封入化に用いられた有機溶媒自体についても分解及び代謝することができるため、ミセル封入化に用いられた有機溶媒が残らず、環境負荷を低減することができる。

【0027】

< 有機溶媒分解菌 >

本明細書において、「有機溶媒分解菌」とは、有機溶媒を分解することができ、有機溶媒中で成育可能であって、有機溶媒の表面に吸着するのではなく、転移した状態、すなわち有機溶媒中に潜り込んだ状態で存在する菌を意味する。有機溶媒分解菌としては、特別な限定はなく、例えば、ロドコッカス属に属する細菌等が挙げられる。

ロドコッカス属に属する細菌として、より具体的には、例えば、ロドコッカス・アウストラリス (*Rhodococcus australis*) ATCC 35215 株、ロドコッカス・コプロフィラス (*Rhodococcus coprophilus*) ATCC 29080 株、ロドコッカス・コプロフィラス JCM 3200 株、ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) ATCC 27854 株、ロドコッカス・エリスロポリス ATCC 47072 株、ロドコッカス・エリスロポリス DSM 1069 株、ロドコッカス・エリスロポリス JCM 3201 株、ロドコッカス・エリスロポリス PR 4 株 (以下、「PR 4 株」と称することがある。)、ロドコッカス・グロベルラス (*Rhodococcus globerulus*) ATCC 14346 株、ロドコッカス・グロベルラス ATCC 15076 株、ロドコッカス・グロベルラス ATCC 21292 株、ロドコッカス・グロベルラス ATCC 25669 株、ロドコッカス・グロベルラス ATCC 25688 株、ロドコッカス・グロベルラス ATCC 3110 株、ロドコッカス・グロベルラス ATCC 14898 株、ロドコッカス・ジョスティ (*Rhodococcus jostii*) RHA 1 株、ロドコッカス・オパカス (*Rhodococcus opacus*) ATCC 17039 1 株、ロドコッカス・オパカス ATCC 51881 株、ロドコッカス・オパカス ATCC 51882 株、ロドコッカス・オパカス JCM 9703 株、ロドコッカス・ペルコラタス (*Rhodococcus percolatus*) JCM 10087 株、ロドコッカス・ロドニ (*Rhodococcus rhodnii*) ATCC 35071 株、ロドコッカス・ロドクラウス (*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC 271 株、ロドコッカス・ロドクラウス ATCC 999 株、ロドコッカス・ロドクラウス ATCC 4001 株、ロドコッカス・ロドクラウス ATCC 13808 株、ロドコッカス・ロドクラウス ATCC 14348 株、ロドコッカス・ロドクラウス ATCC 14349 株、ロドコッカス・ロドクラウス ATCC 15905 株、ロドコッカス・ロドクラウス ATCC 15906 株、ロドコッカス・ロドク

10

20

30

40

50

ラウスATCC184株、ロドコッカス・ロドクラウスATCC17041株、ロドコッカス・ロドクラウスATCC19150株、ロドコッカス・ロドクラウスATCC12674株、ロドコッカス・ロドクラウスJCM2156株、ロドコッカス・ロドクラウスJCM2157株、ロドコッカス・ロドクラウスR-1株、ロドコッカス・ロドクラウスR-2株、ロドコッカス・ロドクラウスS-1株、ロドコッカス・ロドクラウスS-2株、ロドコッカス・ルーバー(*Rhodococcus ruber*)IFO15591株、ロドコッカス スピーシーズPG7-2株、ロドコッカス スピーシーズJCM3376株、ロドコッカス スピーシーズJCM3391株、ロドコッカス・ゾフィ(*Rhodococcus zopfi*)ATCC51349株、ロドコッカス・ゾフィJCM9919株等が挙げられ、これらに限定されない。

10

中でも、本実施形態において用いられる有機溶媒分解菌としては、ロドコッカス・エリスロポリス属に属する細菌であることが好ましく、PR4株であることがより好ましい。

本実施形態における有機溶媒分解菌は、天然に由来する菌株であってもよく、有機溶媒を分解及び代謝する性質を維持又は向上させた形質転換体であってもよい。

【0028】

<ミセル>

本実施形態の有機溶媒処理用微生物製剤において、有機溶媒がミセルとして分散しており、前記ミセル内に有機溶媒分解菌が封入されている。

前記ミセルの平均粒径としては、1 μ m以上100 μ m以下であることが好ましく、1 μ m以上50 μ m以下であることがより好ましく、5 μ m以上30 μ m以下であることがさらに好ましい。ミセルの平均粒径は上記範囲であることにより、少なくとも1つの有機溶媒分解菌を内包することができ、ミセルとして安定して分散させることができる。

20

【0029】

また、ミセル内に封入される有機溶媒分解菌の菌体数としては、少なくとも1以上であることが好ましく、1以上10以下であることがより好ましく、2以上8以下であることがさらに好ましく、3以上6以下であることが特に好ましく、4以上5以下であることが最も好ましい。ミセル内に封入される有機溶媒分解菌の菌体数が上記範囲であることにより、有機溶媒分解菌を封入した状態でミセルを安定して分散させることができ、さらに効率的に有機溶媒を分解することができる。

30

【0030】

<水性溶媒>

本実施形態の有機溶媒処理用微生物製剤に用いられる水性溶媒としては、特別な限定なく、有機溶媒分解菌を培養することができる培地であればよい。前記培地としては、一般的に細菌を培養するために用いられる培地であればよく、例えば、IB2液体培地、YG液体培地、LB培地、マリンプロス、ニュートリエントプロス、トリプトソイプロス、MM培地、NP培地等が挙げられる。中でも、培地としては、IB2液体培地、MM培地又はNP培地を用いることが好ましい。

【0031】

培地としてIB2液体培地を用いる場合、有機溶媒分解菌が水性溶媒、又はミセル封入化に用いられた有機溶媒から、処理対象である有機溶媒に移行するために、IB2液体培地中に酵母エキスを含むことが好ましい。IB2液体培地中に酵母エキスを含むことで、有機溶媒分解菌が水性溶媒、又はミセル封入化に用いられた有機溶媒から、処理対象である有機溶媒へスムーズに移行することができる。

40

前記水性溶媒中の前記酵母エキスの添加量は、水性溶媒の全量を基準(100%)としたときに、0.05%(w/w)以上であることが好ましく、0.5%(w/w)以上5%(w/w)以下であることがより好ましく、1%(w/w)程度であることがさらに好ましい。

【0032】

本明細書において、「有機溶媒中へ移行する」とは、水性溶媒中に存在していた有機溶媒分解菌が、水性溶媒、又はミセル封入化に用いられた有機溶媒から、処理対象である有

50

機溶媒に吸着又は転移することを意味する。

【0033】

本実施形態の有機溶媒処理用微生物製剤において、通常有機溶媒分解菌は炭素数12以下のアルカンに転移することが難しいが、水性溶媒に添加される無機塩の濃度を制限することにより、有機溶媒分解菌を炭素数12以下のアルカンに転移させることができる。

前記無機塩の水性溶媒中の濃度は88.5 nM以下であることが好ましく、8.9 nM以下であることがより好ましく、0.9 nM以下であることがさらに好ましい。前記無機塩としては、例えば、マグネシウム塩が挙げられ、より具体的には、例えば、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウムが挙げられる。

【0034】

本実施形態の有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法については、後述の<<有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法>>において、示す。

【0035】

本実施形態の有機溶媒処理用微生物製剤の保存条件については、有機溶媒分解菌が死滅しない温度であって、ミセル封入化に使用する有機溶媒又は水性溶媒が固化する温度よりも高い温度で保存すればよく、例えば、常温で保存してもよく、例えば、常温より高い温度又は常温未満の温度で保存してもよく、例えば、冷蔵(4以下)又は冷凍(-20以下)等で保存してもよい。中でも、ミセルの安定性の観点から、常温で保存することが好ましい。

【0036】

<<有機溶媒の処理方法>>

一実施形態において、本発明は、上述の有機溶媒処理用微生物製剤を用いた有機溶媒の処理方法を提供する。

【0037】

本実施形態の処理方法によれば、簡便且つ効率的に有機溶媒を処理することができる。

【0038】

本明細書において、「有機溶媒の処理」とは、有機溶媒分解菌が分解及び代謝可能な有機溶媒を、上述の有機溶媒処理用微生物製剤中に添加することを意味する。

【0039】

<処理対象となる有機溶媒>

本実施形態において、上述の有機溶媒処理用微生物製剤を用いて処理対象となる有機溶媒としては、特別な限定はなく、有機溶媒分解菌が分解及び代謝可能なものであればよい。前記処理対象となる有機溶媒としては、例えば、炭素数6以上の直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカン等が挙げられる。有機溶媒分解菌が形質転換されたものである場合、炭素数6以上12以下の直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカンでも成育可能であり、且つ、これら低炭素数のアルカンに少なくとも吸着することができるため、前記低炭素数のアルカンを代謝及び分解することができる。

さらに、アルカンの炭素数の上限は制限されない、例えば、常温及び常圧下で固体であるものであっても、常温及び常圧下で液体であるアルカンの存在により、前記常温及び常圧下で固体であるアルカンを溶解し、液体とすることができればよい。

また、前記炭素数6以上の直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカンを1種又は2種以上含んでいてもよい。

【0040】

前記炭素数6以上の直鎖状のアルカンとしては、例えば、n-ヘキサン、n-ヘプタン、n-オクタン、n-ノナン、n-デカン、n-ウンデカン、n-ドデカン、n-トリデカン、n-テトラデカン(C14)、n-ペンタデカン(C15)、n-ヘキサデカン(C16)、n-ヘプタデカン(C17)、n-オクタデカン(C18)、n-ノナデカン(C19)、n-イコサン(C20)、n-ペンタコサン(C25)、n-トリアコンタン(C30)等が挙げられ、これらに限定されない。

【0041】

10

20

30

40

50

前記炭素数 6 以上の分岐鎖状のアルカンとしては、例えば、以下のようなもの等が挙げられ、これらに限定されない。

炭素数 6 : 2 - メチルペンタン、2, 3 - ジメチルブタン、3 - メチルペンタン、3 - メチルペンタン、ジメチルブタン、2, 2 - ジメチルブタン

炭素数 7 : 3 - メチルヘキサン、3, 3 - ジメチルペンタン、2, 2, 3 - トリメチルブタン、2, 3 - ジメチルペンタン、3 - エチルペンタン、2 - メチルヘキサン、2, 2 - ジメチルペンタン、2, 4 - ジメチルペンタン

炭素数 8 : (3R, 4S) - 3, 4 - ジメチルヘキサン、2, 2, 3, 3 - テトラメチルブタン、(S) - 3 - メチルヘプタン、3, 4 - ジメチルヘキサン、3 - メチルヘプタン、3 - エチルヘキサン、3 - メチル - 3 - エチルペンタン、2 - メチル - 3 - エチルペンタン、2, 3, 3 - トリメチルペンタン、イソオクタン、2 - メチルヘプタン、4 - メチルヘプタン、2, 3, 4 - トリメチルペンタン、2, 2, 3 - トリメチルペンタン、2, 4 - ジメチルヘキサン、2, 3 - ジメチルヘキサン

炭素数 9 : 2, 2, 4, 4 - テトラメチルペンタン、3 - エチルヘプタン、3, 3, 4 - トリメチルヘキサン、2, 2 - ジメチルヘプタン、2, 4 - ジメチルヘプタン、3 - エチル - 2, 3 - ジメチルペンタン、2, 3, 4 - トリメチルヘキサン、2, 2, 3, 4 - テトラメチルペンタン、4 - エチルヘプタン、3, 5 - ジメチルヘプタン

炭素数 10 : 2, 4 - ジメチル - 3 - イソプロピルペンタン、2, 3, 5 - トリメチルヘプタン、2, 2 - ジメチルオクタン、2, 2, 4, 5 - テトラメチルヘキサン、5 - エチル - 2 - メチルヘプタン、2 - メチル - 3, 3 - ジエチルペンタン、2, 3, 3, 5 - テトラメチルヘキサン、2, 2, 5 - トリメチルヘプタン、4 - メチルノナン、2, 4, 5 - トリメチルヘプタン、2, 4, 6 - トリメチルヘプタン、3, 4 - ジエチルヘキサン

炭素数 11 : 4 - イソプロピルオクタン、3, 6 - ジメチルノナン、2, 2, 6, 6 - テトラメチルヘプタン、3, 4 - ジエチルヘプタン、2, 6 - ジメチルノナン、2, 3, 7 - トリメチルオクタン、2, 4, 6 - トリメチルオクタン、3, 3, 5, 5 - テトラメチルヘプタン、4 - エチル - 4 - メチルオクタン、3, 5 - ジエチルヘプタン、2, 3, 6 - トリメチルオクタン、2, 2, 6 - トリメチルオクタン、2 - メチルデカン、2, 2, 3, 3, 4, 4 - ヘキサメチルペンタン、3, 3 - ジエチルヘプタン、2, 5, 6 - トリメチルオクタン

炭素数 12 : 3, 7 - ジメチルデカン、5, 6 - ジメチルデカン、5 - メチルウンデカン、2, 2, 4, 6, 6 - ペンタメチルヘプタン、4 - エチルデカン、2, 3, 5 - トリメチルノナン、2, 9 - ジメチルデカン、5 - プロピルノナン、2 - メチルウンデカン、3, 4 - ジメチルデカン、2, 2, 7, 7 - テトラメチルオクタン、2, 4, 5, 7 - テトラメチルオクタン、2, 2 - ジメチルデカン、2, 2, 4, 4, 6 - ペンタメチルヘプタン、2, 2 - ジブチルブタン

炭素数 13 : 2, 2, 7 - トリメチルデカン、2, 6, 8 - トリメチルデカン、2, 4, 6 - トリメチルデカン、3, 5 - ジメチルウンデカン、4, 7 - ジメチルウンデカン、2, 5, 5 - トリメチルデカン、5, 7 - ジメチルウンデカン、2, 8 - ジメチルウンデカン、4, 8 - ジメチルウンデカン、2, 3 - ジメチルウンデカン、2, 2, 9 - トリメチルデカン、5 - メチル - 5 - プロピルノナン、2, 5, 6 - トリメチルデカン、[R, (-)] - 3 - メチルドデカン、3, 3, 5 - トリメチルデカン、3, 3 - ジエチル - 4, 5, 5 - トリメチルオクタン、4, 4 - ジプロピルヘプタン、2, 2, 3, 3 - テトラメチルノナン、2, 4 - ジメチル - 3, 3 - ジイソプロピルペンタン

炭素数 14 : 2 - メチルトリデカン、7 - メチルトリデカン、3, 8 - ジエチルデカン、(6R, 7S) - 6, 7 - ジメチルドデカン、3, 3, 4, 4 - テトラエチルヘキサン、2, 2, 3, 3, 4, 4, 5, 5 - オクタメチルヘキサン、5 - ブチルデカン、2, 5 - ジメチル - 3, 4 - ジイソプロピルヘキサン、2, 2, 3, 3, 5, 6, 6 - ヘプタメチルヘプタン、3 - tert - ブチル - 2, 2, 5, 5 - テトラメチルヘキサン

炭素数 15 : 4 - メチルトetraデカン、2, 7, 10 - トリメチルドデカン、7 - メチルトetraデカン、6 - プロピルドデカン、ファルネサン、[R, (-)] - 3 - メチルテ

10

20

30

40

50

トラデカン、2, 6 - ジメチル - 3, 5 - ジイソプロピルヘプタン、5 - ブチルウンデカン、5 - ペンチルデカン

炭素数 16 : (R) - 5 - エチル - 5 - プロピルウンデカン、2, 2, 4, 4, 5, 5, 7, 7 - オクタメチルオクタン、3, 5, 9 - トリメチルトリデカン、7 - プロピルトリデカン、5, 8 - ジエチルドデカン、4 - メチルペンタデカン、3, 3, 6, 6 - テトラエチルオクタン、2, 4, 6 - トリメチルトリデカン、3 - メチルペンタデカン、6 - ペンチルウンデカン、4, 6 - ジエチルドデカン、2, 2, 4, 4, 6, 6, 7 - ヘプタメチルノナン、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8 - ヘプタメチルノナン

炭素数 17 : 4, 6, 8, 10 - テトラメチルトリデカン、5, 9 - ジメチルペンタデカン、2, 5 - ジメチルペンタデカン、(S) - 3 - メチルヘキサデカン、5, 5 - ジブチルノナン、4, 4 - ジプロピルウンデカン、6 - ペンチルドデカン、2, 6, 10 - トリメチルテトラデカン、2, 2, 4, 4 - テトラメチル - 3, 3 - ジ - tert - ブチルペンタン、2 - メチルヘキサデカン

10

炭素数 18 : 2 - メチルヘプタデカン、3 - メチルヘプタデカン、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 - オクタメチルデカン、7, 9 - ジメチルヘキサデカン、4, 9 - ジプロピルドデカン、2, 2, 5, 5 - テトラメチル - 3, 4 - ジ - tert - ブチルヘキサン、4 - メチルヘプタデカン、8 - メチルヘプタデカン、2, 2, 4, 9, 11, 11 - ヘキサメチルドデカン、7 - メチルヘプタデカン、4, 5, 6, 7 - テトラエチルデカン、7 - ブチルテトラデカン

炭素数 19 : プリスタン、2, 6 - ジメチルヘプタデカン、3 - メチルオクタデカン、3, 3 - ジメチルヘプタデカン、(7R, 11S) - 7, 11 - ジメチルヘプタデカン、5, 9 - ジメチルヘプタデカン、5 - メチルオクタデカン、2, 6, 10, 13 - テトラメチルペンタデカン、7 - ヘキシルトリデカン、5, 5, 7, 7 - テトラエチルウンデカン、2 - メチルオクタデカン

20

炭素数 20 : フィタン、2 - メチルノナデカン、3 - メチルノナデカン、8 - tert - ブチルヘキサデカン、4 - メチルノナデカン、7, 11 - ジメチルオクタデカン、2, 6 - ジメチルオクタデカン、9 - メチルノナデカン、4 - プロピルヘプタデカン、3 - メチル - 3 - エチルヘプタデカン、2, 6, 11, 15 - テトラメチルヘキサデカン、5 - ブチルヘキサデカン

炭素数 25 : 9 - オクチルヘプタデカン、10 - ヘキシルノナデカン、2, 6, 10, 15, 19 - ペンタメチルイコサン、2, 6, 10, 14, 19 - ペンタメチルイコサン、7, 7 - ジヘキシルトリデカン、9 - (2 - エチルヘキシル)ヘプタデカン、ハシアン、2 - メチルテトラコサン、2, 2, 8, 8 - テトラメチル - 5, 5 - ビス(3, 3 - ジメチルブチル)ノナン、2, 6, 10, 14, 18 - ペンタメチルイコサン

30

炭素数 30 : スクワラン、2, 10 - ジメチルオクタコサン、7 - メチルノナコサン、11 - ノニルヘニコサン、(R) - 3 - メチルノナコサン、8, 12 - ジメチルオクタコサン、3 - メチルノナコサン、9 - オクチルドコサン、7, 12 - ジヘキシルオクタデカン、リザン、2, 6 - ジメチルオクタコサン

【0042】

前記炭素数 6 以上の環状のアルカンとしては、例えば、シクロヘキサン(C6)、シクロヘプタン(C7)、シクロオクタン(C8)、シクロノナン(C9)、シクロデカン(C10)、1, 1, 3, 3 - テトラメチルシクロヘキサン(C10)、1 - メチル - 2, 4 - ジエチルシクロペンタン(C10)、1, 5 - ジメチルシクロオクタン(C10)、シクロウンデガン(C11)、シクロドデカン(C12)、1 - エチル - 2 - ペンチルシクロペンタン(C12)、1 - メチルシクロウンデカン(C12)、ブチルシクロオクタン(C12)、シクロトリデカン(C13)、シクロテトラデカン(C14)、1, 1, 3, 5 - テトラメチルシクロヘキサン(C14)、1, 2, 4, 5 - テトラエチルシクロヘキサン(C14)、3 - シクロヘキシル - 4 - メチルヘプタン(C14)、1, 1, 2 - トリメチルシクロウンデカン(C14)、イソプロピルシクロウンデカン(C14)、シクロペンタデカン(C15)、シクロヘキサデカン(C16)、(1 - プロピルヘプチ

40

50

ル)シクロヘキサン(C16)、1-ブチルシクロドデカン(C16)、メチルシクロペンタデカン(C16)、シクロヘプタデカン(C17)、シクロオクタデカン(C18)、(1-ペンチルヘプチル)シクロヘキサン(C18)、ドデカメチルシクロヘキサン(C18)、シクロノナデカン(C19)、セムبران(C20)、シクロイコサン(C20)、テトラデシルシクロヘキサン(C20)、シクロペンタコサン(C25)、(1-ノニルデシル)シクロヘキサン(C25)、9-(3-シクロペンチルプロピル)ヘプタデカン(C25)、シクロトリアコンタン(C30)、イコサメチルシクロデカン(C30)、ペンタコシルシクロペンタン(C30)等が挙げられ、これらに限定されない。

【0043】

<使用用途>

本実施形態の処理方法は、有機溶媒を含む汚染環境処理のために使用することができる。汚染環境処理としては、例えば、生活排水の処理、又は工業用水の処理等が挙げられる。

また、本実施形態の処理方法は、物質の生産のために使用することができる。物質の生産としては、例えば、分子量の大きい直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカンを基質として、分子量の小さい直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカンを生産すること等が挙げられる。

【0044】

本実施形態の処理方法において、使用される上述の有機溶媒処理用微生物製剤は、界面活性剤等の乳化剤を含まず、有機溶媒処理用微生物製剤自体に含まれる有機溶媒も有機溶媒分解菌によって分解及び代謝可能なものであるため、環境負荷を低減することができる。

【0045】

本実施形態の処理方法において、使用される上述の有機溶媒処理用微生物製剤は、有機溶媒の分解速度の傾きが大きく、初速が急激に上昇するものである。すなわち、使用される上述の有機溶媒処理用微生物製剤は、有機溶媒の分解能が高く、分解速度が速い。よって、例えば、汚水の浄化に適用する場合、通常、浄化槽等に含まれる汚水は2～3日程度で入れ替わるが、本実施形態の処理方法によれば、浄化開始時から、上述の有機溶媒処理用微生物製剤は有機溶媒に対して高い親和性を有し、分解速度が速いため、限られた期間の中で、効率よく対象となる有機溶媒を分解及び代謝し、汚水を浄化することができる。

【0046】

<<有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法>>

一実施形態において、本発明は、有機溶媒分解菌と、有機溶媒と、培地とを混合し、前記有機溶媒分解菌が成育可能な条件で超音波処理を行い、前記有機溶媒によりミセル封入化された前記有機溶媒分解菌を得るミセル封入化工程を備える有機溶媒処理用微生物製剤の製造方法を提供する。

【0047】

本実施形態の製造方法によれば、常温で保存可能であり、環境負荷が少なく、高い有機溶媒分解能を有する有機溶媒処理用微生物製剤を簡便に得ることができる。

【0048】

<ミセル封入化工程>

まず、有機溶媒分解菌と、有機溶媒と、培地とを混合し、前記有機溶媒分解菌が成育可能な条件で超音波処理を行う。

【0049】

本実施形態において使用する有機溶媒分解菌としては、上述の<<有機溶媒処理用微生物製剤>>において例示されたものと同様のものが挙げられる。中でも、本実施形態において使用する有機溶媒分解菌としては、ロドコッカス・エリスロポリス属に属する細菌であることが好ましく、PR4株であることがより好ましい。

本実施形態における有機溶媒分解菌は、天然に由来する菌株であってもよく、有機溶媒を分解及び代謝する性質を維持又は向上させた形質転換体であってもよい。

【0050】

10

20

30

40

50

本実施形態において有機溶媒としては、常温及び常圧下で液体であり、有機溶媒分解菌が有機溶媒中に転移可能である有機溶媒であることが好ましく、例えば、炭素数13以上16以下の直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカン等が挙げられる。炭素数13以上16以下の直鎖状、分岐鎖状又は環状のアルカンとしては、上述の<<有機溶媒処理用微生物製剤>>において例示されたものと同様のものが挙げられる。

【0051】

本実施形態において使用する培地としては、上述の<<有機溶媒処理用微生物製剤>>において例示されたものと同様のものが挙げられる。中でも、本実施形態において使用する培地としては、IB2液体培地、MM培地又はNP培地であることが好ましい。

【0052】

本実施形態において有機溶媒と培地との混合割合としては、例えば1:1~1:20程度であればよい。有機溶媒が培地よりも少ない量混合することにより、容易に有機溶媒分解菌をミセル封入化することができる。

また、有機溶媒分解菌の混合溶液中の濃度は、有機溶媒分解菌の種類、作製するミセル1個あたりに封入させたい菌体数、超音波処理の条件等に応じて、適宜調整することができる。例えば、有機溶媒1mL及び培地10mLに対し、有機溶媒分解菌が 1.0×10^7 cells/mLとなるように混合すればよい。

【0053】

本明細書において、「成育可能な条件」とは、超音波処理によって、前記有機溶媒分解菌が死滅しない、又は菌体が損傷せず、成育が妨げられない条件であることを意味する。

「成育可能な条件」での超音波処理としては、例えば、4Lの水を含む超音波洗浄機（アズワンUSD-4R）を用いて、有機溶媒分解菌 1.0×10^7 cells/mLと、有機溶媒1mLと、培地10mLとの混合溶液11mLを含む試験管等の容器に対し、常温及び常圧下において、40kHzで15分間処理する条件等が挙げられる。このとき、容器中の混合溶液の液面が、超音波洗浄機の水面よりも1.5cm~2.0cm程度下であることが好ましい。

超音波処理は、有機溶媒分解菌と、有機溶媒と、培地との混合溶液に直接的に行ってもよく、有機溶媒分解菌と、有機溶媒と、培地との混合溶液を含む容器を介して間接的に行ってもよい。中でも、有機溶媒分解菌が死滅しない、又は菌体が損傷せず、成育が妨げられない条件であることから、有機溶媒分解菌と、有機溶媒と、培地との混合溶液を含む容器を介して間接的に行うことが好ましい。

使用する超音波発生装置としては、特別な限定なく、例えば、振動子が平板（振動板）に装着されている定在波型（洗浄器型）超音波発生装置、振動子の先端に円筒状のホーンが装着されているホーン型（ホモジナイザー型）超音波発生装置等が挙げられる。中でも、有機溶媒分解菌が死滅しない、又は菌体が損傷せず、成育が妨げられない条件であることから、定在波型（洗浄器型）超音波発生装置を用いることが好ましい。

【0054】

作製された有機溶媒処理用微生物製剤について、ミセル内に封入された有機溶媒分解菌の菌体数は、例えば、位相差顕微鏡等を用いる方法により確認することができる。また、ミセルの平均粒径は、例えば、位相差顕微鏡等を用いて目視で計測する方法、又はレーザー回折式粒度分布測定装置等を用いて計測する方法等で確認することができる。

【0055】

作製された有機溶媒処理用微生物製剤の保存条件については、有機溶媒分解菌が死滅しない温度であって、ミセル封入化に使用する有機溶媒又は水性溶媒が固化する温度よりも高い温度で保存すればよく、例えば、常温で保存してもよく、例えば、常温より高い温度又は常温未満の温度で保存してもよく、例えば、冷蔵（4℃以下）又は冷凍（-20℃以下）等で保存してもよい。また、冷蔵（4℃以下）又は冷凍（-20℃以下）等で保存した場合に、有機溶媒が固化することによりミセルが壊れて、有機溶媒相及び培地相に分離しても、再度上述の<ミセル封入化工程>を行うことにより、有機溶媒分解菌をミセル封入化することができる。

10

20

30

40

50

中でも、再度の超音波処理を必要とせず、ミセルを安定して保存できることから、常温で保存することが好ましい。

【実施例】

【0056】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0057】

[材料]

1. 使用菌株

以下の実施例において、*Rhodococcus erythropolis* PR4 株（以下、「PR4株」と称することがある。）を用いた。 10

【0058】

2. 使用培地

以下の実施例において、使用した培地の作製方法は以下のとおりである。

2-1. IB2寒天培地

ミリQ水800mLに8gのグルコース（和光純薬工業社製）、8gのyeast extract（Becton, Dickinson and company社製）、0.16gの $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ （和光純薬工業社製）、0.08gの $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ （和光純薬工業社製）、0.08gのNaCl（和光純薬工業社製）、0.016gの $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ （和光純薬工業社製）、0.4gの $(NH_4)_2SO_4$ （和光純薬工業社製）を加えた。続いて、pH7.2に調整後、さらに12gのアガー（和光純薬工業社製）を加えた。続いて、121で15分間オートクレーブし、冷却した。 20

【0059】

2-2. IB2液体培地

ミリQ水500mLに5gのグルコース（和光純薬工業社製）、5gのyeast extract（Becton, Dickinson and company社製）、0.09gの $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ （和光純薬工業社製）、0.05gの $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ （和光純薬工業社製）、0.05gのNaCl（和光純薬工業社製）、0.01gの $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ （和光純薬工業社製）、0.25gの $(NH_4)_2SO_4$ （和光純薬工業社製）を加えた。続いて、pH7.2に調整後、121で15分間オートクレーブし、冷却した。 30

【0060】

2-3. MM培地

ミリQ水500mLに0.09gの $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ （和光純薬工業社製）、0.05gの $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ （和光純薬工業社製）、0.05gのNaCl（和光純薬工業社製）、0.01gの $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ （和光純薬工業社製）、0.25gの $(NH_4)_2SO_4$ （和光純薬工業社製）、0.25gの K_2HPO_4 （和光純薬工業社製）を加えた。続いて、121で15分間オートクレーブし、冷却した。

【0061】

2-4. NP培地 40

ミリQ水500mLに0.25gの $(NH_4)_2SO_4$ （和光純薬工業社製）、0.25gの K_2HPO_4 （和光純薬工業社製）を加えた。続いて、121で15分間オートクレーブし、冷却した。

【0062】

3. 使用試薬

PR4株の生死を確認するために、DAPI（4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride）試薬（和光純薬工業社製）及びCTC（5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride）試薬（同仁堂社製）を用いた。

【0063】 50

また、以下の実施例において使用した有機溶媒は、下記の通りである。

- n - ドデカン（以下、「C12」と称することがある。）（和光純薬工業社製）
- n - テトラデカン（以下、「C14」と称することがある。）（和光純薬工業社製）
- n - ペンタデカン（以下、「C15」と称することがある。）（和光純薬工業社製）
- n - ヘキサデカン（以下、「C16」と称することがある。）（和光純薬工業社製）
- プリスタン（以下、「C19」と称することがある。）（ACROSS社製）

【0064】

また、培地に添加した各種無機塩類は、以下のように調製した。

3 - 1 . MgCl₂ 溶液

ミリQ水に18.4gのMgCl₂・6H₂O（和光純薬工業社製）を加え、100mLまでメスアップした。続いて、121 で15分間オートクレーブし、冷却した。 10

【0065】

3 - 2 . CaCl₂ 溶液

ミリQ水に10gのCaCl₂・2H₂O（和光純薬工業社製）を加え、100mLまでメスアップした。続いて、121 で15分間オートクレーブし、冷却した。

【0066】

3 - 3 . NaCl 溶液

ミリQ水に10gのNaCl（和光純薬工業社製）を加え、100mLまでメスアップした。続いて、121 で15分間オートクレーブし、冷却した。

【0067】

3 - 4 . FeCl₂ 溶液

ミリQ水に1.7gのFeCl₂・4H₂O（和光純薬工業社製）を加え、100mLまでメスアップした。続いて、121 で15分間オートクレーブし、冷却した。

【0068】

3 - 5 . (NH₄)₂SO₄ 溶液

ミリQ水に50gの(NH₄)₂SO₄（和光純薬工業社製）を加え、100mLまでメスアップした。続いて、121 で15分間オートクレーブし、冷却した。

【0069】

[実施例1] 各種有機溶媒（C12、C15、C16、C19）を用いた有機溶媒処理微生物用剤の製造 30

(1) PR4株の前培養液の作製

予め乾熱滅菌を180、30分間行った試験管を用意し、これにオートピペッター及び10mLメスピペットを用いて、5mLのIB2液体培地を加えた。続いて、PR4株をディスポスティックでIB2寒天培地から適量掻き取り、植菌した。続いて、これらのPR4株が植菌された試験管を28、110rpmで2~3日間振盪培養したものを前培養液として用いた。

【0070】

(2) PR4株のミセル封入化

続いて、予め乾熱滅菌を180、30分間行った試験管を用意し、これにオートピペッター及び10mLメスピペットを用いて、IB2液体培地を10mL加えた。続いて、ピペットマンP-1000を用いて、C12、C15、C16、C19をそれぞれ1mLずつ加えた。続いて、ピペットマンP-200を用いて、(1)で作製したPR4株の前培養液を100μL加え、これを28、110rpmで1日振盪培養した。培養後の菌体濃度は、1.0×10⁷ cells/mLであった。続いて、4Lの水量を含む超音波洗浄機（USD-4R、アズワン社製）を用いて、常温及び常圧下において、40kHzで15分間超音波処理した。超音波処理において、試験管中の溶液の液面が、超音波洗浄機の水面よりも1.5cm~2.0cm程度下になるようにして行った。続いて、超音波処理後の溶液を100μLサンプリングした。サンプリングした溶液は、位相差顕微鏡を用いて観察を行った。観察は、溶液を、ピペットマンP-20を用いて、各8μLずつレパラートに滴下し、カバーガラスをのせ、イマジジョンオイルを1滴垂らしたものを、 40 50

位相差顕微鏡（オリンパス社製）のステージ上に乗せ、対物レンズの倍率を100倍にして行った。結果を図1に示す。

【0071】

図1から、有機溶媒としてC12を、水性溶媒としてIB2液体培地を用いた場合には、局在性が吸着型となり、PR4株が有機溶媒の表面に吸着しており、PR4株をミセル封入化することができなかった。

一方、有機溶媒としてC15、C16又はC19を、水性溶媒としてIB2液体培地を用いた場合には、局在性が転移型となり、PR4株をミセル封入化することができた。また、各ミセル内には、PR4株が1～5細胞程度転移している状態が確認された。

【0072】

(3) 超音波処理によるPR4株への影響の確認

また、有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤について、DAPI、CTCによる二重染色を行った。

二重染色は次のように行った。有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤各100 μ Lに、ピペットマンP-2を用いて、Enhancing reagent B液（同仁堂社製）を0.5 μ Lずつ、CTC試薬を1.5 μ Lずつ加え、ボルテックスで十分に攪拌した。続いて、37 $^{\circ}$ Cに設定したTHERMO MINDER 50 mini（TAITEC社製）で15分間培養した。続いて、ピペットマンP-2を用いてDAPI試薬を1 μ Lずつ加え、ボルテックスで十分に攪拌した後、室温で15分間放置した。続いて、位相差顕微鏡を用いてサンプルを観察した。DAPI試薬は対比染色として用いた核染色試薬であり、CTC試薬は生菌選択的蛍光染色試薬である。結果を図2に示す。

【0073】

図2から、有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤について、CTC染色による赤い蛍光が検出された。また、詳細なデータは示さないが、超音波処理の有無でのPR4株のコロニー数を比較したところ、超音波処理（上述の条件）を行ったPR4株は、超音波処理を行っていないPR4株と同程度のコロニーを形成していることが確かめられた。このことから、コロニー形成能に対する超音波処理の影響はないことが確かめられた。

以上のことから、超音波処理を行っても、PR4株は呼吸活性を有することが確認できた。すなわち、上述の条件の超音波処理では、PR4株は死滅しないことが確かめられた。

【0074】

(4) ミセルの平均粒径及びPR4株の平均転移数の測定

また、有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤（各4サンプルずつ）について、位相差顕微鏡を用いて目視にて、独立して3回ずつ測定を行い、ミセルの平均粒径および平均転移数を算出した。結果を図3に示す。

【0075】

図3から、有機溶媒としてC16を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤について、4つのサンプル間で平均粒径及び平均転移数に大きな差は見られなかった。また、4つのサンプルを用いて平均粒径及び平均転移数の平均値を求めたところ、平均粒径12.27 μ m、平均転移数3.27であった。

また、有機溶媒としてC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤について、C16のときと同様に、4つのサンプル間で平均粒径及び平均転移数に大きな差は見られなかった。また、4つのサンプルを用いて平均粒径及び平均転移数の平均値を求めたところ、平均粒径13.26 μ m、平均転移数4.23であった。

以上のことから、局在性が転移型である有機溶媒分解菌を用いることで、有機溶媒の種類を選ばず、1～5細胞程度の菌体をミセル封入化できることが確かめられた。

【0076】

(5) ミセルの安定性の検討

10

20

30

40

50

さらに、(4)で用いた有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤について、ミセルの安定性を検討した。方法としては、28で振盪培養又は常温で静置培養した有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤を用いて、超音波処理後1日目、3日目、5日目、7日目にサンプリングを行い、位相差顕微鏡を用いて目視にて、平均粒径及び平均転移数を経時的に測定することによって、安定性があるか否か検討した。結果を図4に示す。

【0077】

図4から、有機溶媒としてC16を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤について、平均粒径及び平均転移数は、培養日数が経過しても大きく変化しなかった。振盪培養と静置培養の2つの培養法を用いて安定性の比較を行ったところ、静置培養の方が平均粒径、平均転移数ともに安定していた。このことから、振盪することによって近くにあるミセル同士が結合する等の影響があったと推察された。

また、有機溶媒としてC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤について、C16のときと同様に、平均粒径及び平均転移数は、培養日数が経過しても大きく変化しなかった。C19においても、C16のときと同様に、振盪培養と静置培養の2つの培養法を用いて安定性の比較を行ったところ、静置培養の方が平均粒径、平均転移数ともに安定していた。このことから、振盪することによって近くにあるミセル同士が結合する等の影響があったと推察された。

以上のことから、有機溶媒としてC16又はC19を用いて製造した有機溶媒処理微生物用製剤について、1週間程度は常温で保存可能であることが確かめられた。

【0078】

[実施例2] 水性溶媒としてMM培地を用いた有機溶媒処理用微生物製剤の製造

(1) 菌体洗浄

実施例1の(1)で調製した前培養液を、2.0mLエッペンチューブにピペットマンP-1000を用いて、500 μ L加えた。続いて、10000g、4で10分間遠心分離を行い、上清を除去した。続いて、500 μ Lの滅菌ミリQ水を加え、十分に攪拌し、再び10000g、4で10分間遠心分離を行った。この作業を計4回繰り返し、500 μ Lの滅菌ミリQ水に懸濁後、続く(2)で用いた。

【0079】

(2) PR4株のミセル封入化

有機溶媒としてC19を、IB2液体培地の代わりにMM培地を用いた以外は、実施例1の(2)と同様の方法を用いて、超音波処理した。続いて、超音波処理後の溶液を100 μ Lサンプリングした。サンプリングした溶液は、位相差顕微鏡を用いて観察を行った。結果を図5に示す。

【0080】

図5から、PR4株がミセル内に封入化されていることが確かめられた。このことから、局在性が転移型である有機溶媒分解菌を用いることで、培地の種類を選ばず、1~5細胞程度の菌体をミセル封入化できることが確かめられた。

【0081】

[実施例3] 水性溶媒としてNP培地を用いた有機溶媒処理用微生物製剤の製造

(1) 菌体洗浄

実施例2の(1)と同様の方法を用いて、前培養液中の菌体を洗浄し、500 μ Lの滅菌ミリQ水に懸濁後、続く(2)で用いた。

【0082】

(2) PR4株のミセル封入化

有機溶媒としてC19を、IB2液体培地の代わりにMM培地を用いた以外は、実施例1の(2)と同様の方法を用いて、超音波処理した。続いて、超音波処理後の溶液を100 μ Lサンプリングした。サンプリングした溶液は、位相差顕微鏡を用いて観察を行った。結果を図6に示す。

【0083】

10

20

30

40

50

図 6 から、P R 4 株がミセル内に封入化されていることが確かめられた。このことから、局在性が転移型である有機溶媒分解菌を用いることで、培地の種類を選ばず、1 ~ 5 細胞程度の菌体をミセル封入化できることが確かめられた。

【 0 0 8 4 】

[実施例 4] レーザー回折式粒度分布測定装置を用いた有機溶媒処理用微生物製剤の粒径の解析

(1) 菌体洗浄

実施例 2 の (1) と同様の方法を用いて、前培養液中の菌体を洗浄し、500 μ L の滅菌ミリQ水に懸濁後、続く (2) で用いた。

【 0 0 8 5 】

(2) P R 4 株のミセル封入化

有機溶媒として C 1 6 を、I B 2 液体培地の代わりに M M 培地を用いた以外は、実施例 1 の (2) と同様の方法を用いて、超音波処理した。また、P R 4 株を含有せずに超音波処理を行い、コントロールミセルを作製した。続いて、超音波処理後の溶液を 100 μ L サンプルングした。サンプルングした溶液は、位相差顕微鏡を用いて観察を行った。結果を図 7 (A) に示す。

【 0 0 8 6 】

図 7 (A) から、有機溶媒処理用微生物製剤では、P R 4 株がミセル封入化されていることが確かめられた。

【 0 0 8 7 】

(3) 粒径の解析

さらに、(2) で作製した有機溶媒処理用微生物製剤及びコントロールミセルについて、島津レーザー回折式粒度分布測定装置 (S A L D - 2 3 0 0 、島津製作所製) を用いて、粒径を測定した。結果を図 7 (B) に示す。

【 0 0 8 8 】

図 7 (B) から、コントロールミセルでは、粒径が 0 . 7 ~ 3 μ m に分布しており、平均粒径は 1 . 5 8 \pm 0 . 0 7 μ m であった。一方、有機溶媒処理用微生物製剤では、粒径が 0 . 9 ~ 4 0 0 μ m に分布しており、平均粒径は 2 3 . 4 0 \pm 3 . 7 6 μ m であった。

【 0 0 8 9 】

[試験例 1] 有機溶媒処理用微生物製剤を用いた weathered - crude oil (w - oil) の分解試験

(1) 分解条件

有機溶媒として、C 1 6 を、水性溶媒として、M M 培地を用いた。また、分解対象として、1mg / mL の weathered - crude oil (w - oil) を用いた。w - oil とは、アラビアンライト原油の加熱処理産物であって、汚染環境下において残存する不揮発油と想定して使用した。初期菌体量は、 1.0×10^6 cells / mL であった。また、以下の 4 つの分解条件のサンプルを準備し、28 \pm 2 で 48 時間振盪培養した。

パターン 1 : M M 培地に P R 4 株と C 1 6 とを別々に投入し、超音波処理していないもの

パターン 2 : 予め超音波処理した P R 4 株及び M M 培地と、予め超音波処理した C 1 6 及び M M 培地とを混合したもの (超音波の条件は、実施例 1 の (2) と同様である)

パターン 3 : 有機溶媒として C 1 6 を、I B 2 液体培地の代わりに M M 培地を用いた以外は、実施例 1 の (2) と同様の方法を用いて、超音波処理したもの

パターン 4 : 有機溶媒として C 1 6 を、I B 2 液体培地の代わりに M M 培地を用い、P R 4 株を含有せずに、実施例 1 の (2) と同様の方法を用いて、超音波処理したもの

【 0 0 9 0 】

(2) G C - M S を用いた残存成分の解析

(1) での分解処理後の各サンプルの培養液から、クロロホルムを用いて残存成分を抽出し、G C - M S (島津製作所製) を用いて解析を行った。なお、各サンプルについて、

10

20

30

40

50

C 1 6 が w - o i l 中の他のアルカンと比較して非常に多く含有しているため、同じ強度では示せないため、C 1 6 以外の成分と、C 1 6 とを分けて測定し、S I M 解析した。いずれにおいても、パターン 4 をコントロールとして（各種残存成分の残存量を 1 0 0 % として）、相対残存率として表した。結果を図 8 及び図 9 に示す。

【 0 0 9 1 】

図 8 から、w - o i l 中の C 1 6 以外の各種成分について、パターン 1 及びパターン 2 の分解条件と比較して、パターン 3 の分解条件では、いずれのアルカンも分解が進み相対残存率が低下したことが確かめられた。また、パターン 2 では、C 1 6 を含まず超音波処理を行ったため、P R 4 株がダメージを受けてしまい、分解速度が低下したと推察された。

10

【 0 0 9 2 】

また、図 9 から、有機溶媒及び w - o i l 由来の C 1 6 について、パターン 1 及びパターン 2 の分解条件と比較して、パターン 3 の分解条件では、分解が進み相対残存率が低下したことが確かめられた。よって、本発明の有機溶媒処理用微生物製剤は、製剤中に含まれる有機溶媒も分解することができ、残存しないため、環境負荷が少ないと推察された。

【 0 0 9 3 】

以上のことから、本発明の有機溶媒処理用微生物製剤は、常温で保存可能であり、環境負荷が少なく、高い有機溶媒分解能を有することが明らかとなった。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 9 4 】

本発明によれば、常温で保存可能であり、環境負荷が少ない乳化技術で作製された、高い有機溶媒分解能を有する有機溶媒処理用微生物製剤を提供することができる。さらに、本発明の有機溶媒処理用微生物製剤を用いることで、環境浄化又は物質生産へ利用することができる。

20

【 図 1 】

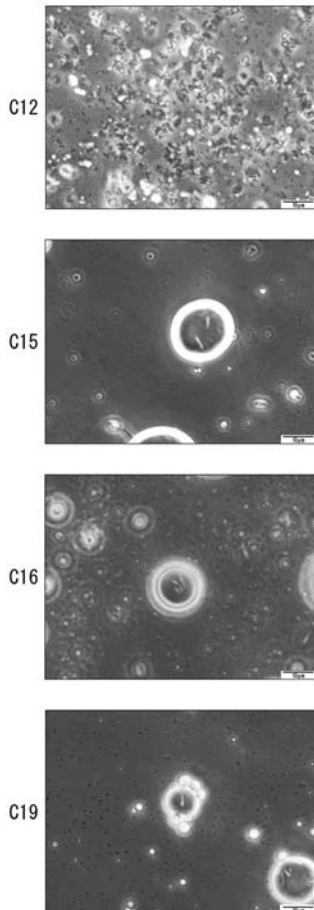


図 1

【 図 2 】

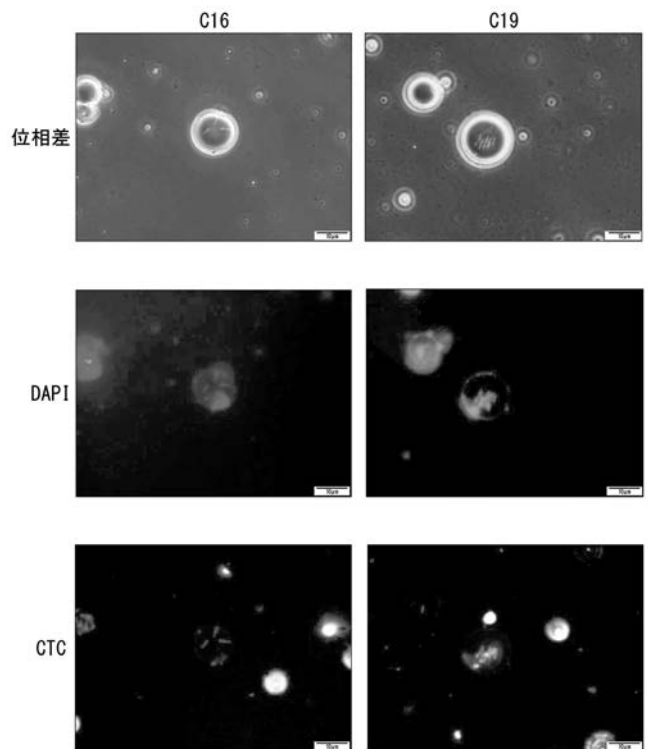


図 2

【 図 3 】

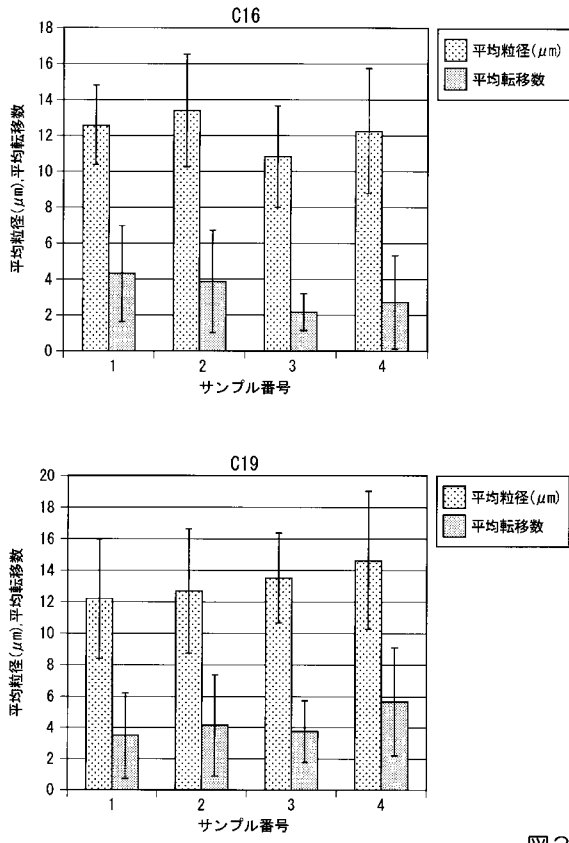


図 3

【 図 4 】

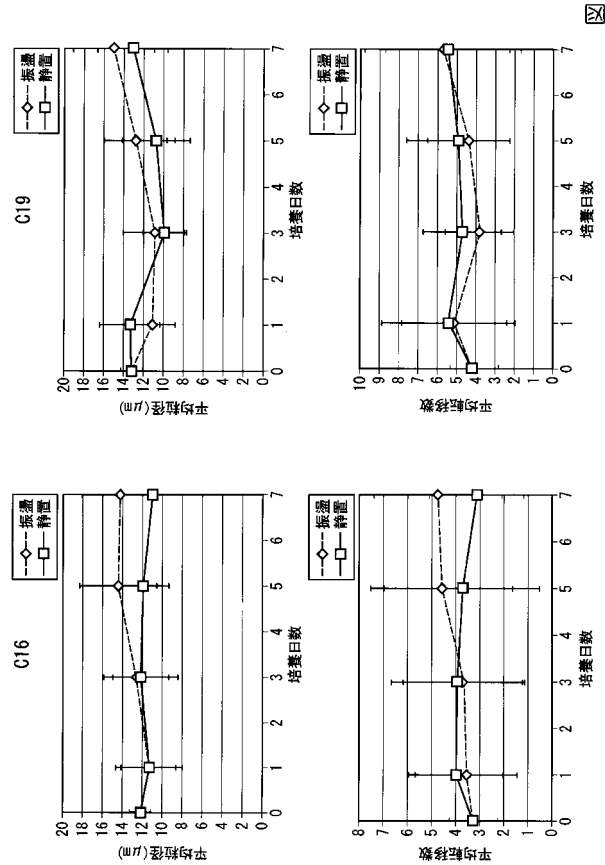


図 4

【 図 5 】

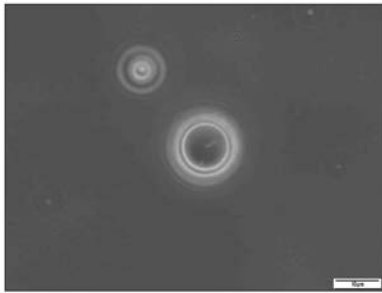


図 5

【 図 6 】

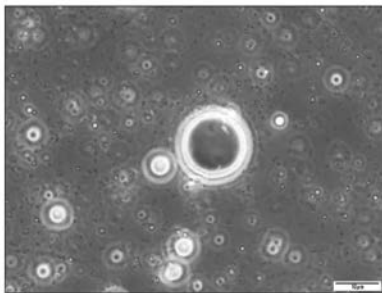


図 6

【 図 7 】

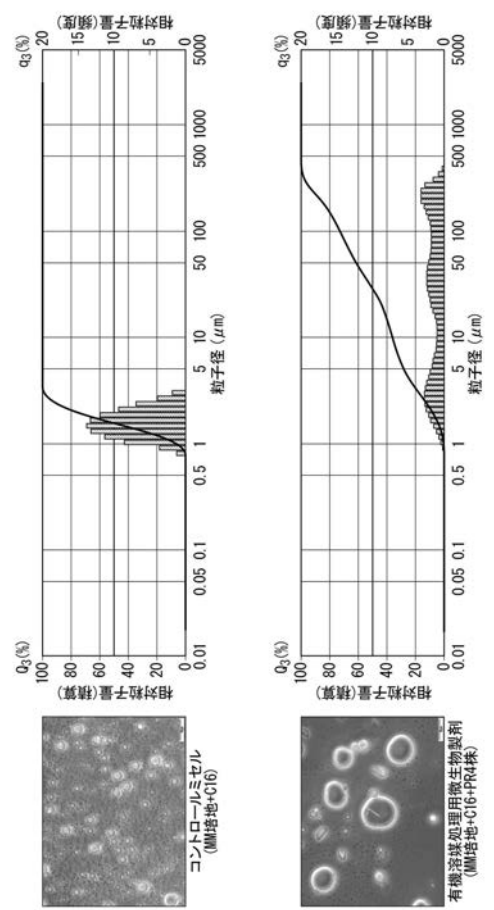


図 7

【 図 8 】

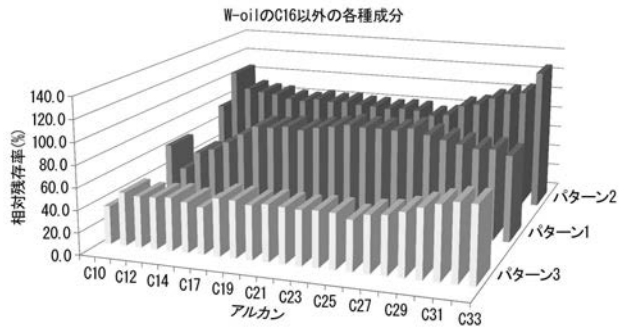


図8

【 図 9 】

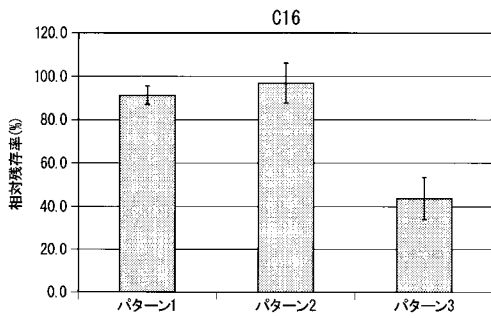


図9

フロントページの続き

(72)発明者 牧 紘平

東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

Fターム(参考) 4B065 AA45X AC20 BA30 BB10 BD50 CA56