

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5765859号
(P5765859)

(45) 発行日 平成27年8月19日 (2015. 8. 19)

(24) 登録日 平成27年6月26日 (2015. 6. 26)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 1/20 (2006. 01) C 1 2 N 1/20 Z N A A
C 1 2 P 19/04 (2006. 01) C 1 2 P 19/04 C

請求項の数 7 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2012-530094 (P2012-530094)	(73) 特許権者	505072650
(86) (22) 出願日	平成22年8月13日 (2010. 8. 13)		浙江大学
(65) 公表番号	特表2013-505709 (P2013-505709A)		中華人民共和国 310027 浙江省杭 州市西湖区浙大路38号
(43) 公表日	平成25年2月21日 (2013. 2. 21)	(73) 特許権者	511208911
(86) 国際出願番号	PCT/CN2010/001228		浙江帝斯曼中肯生物科技有限公司
(87) 国際公開番号	W02011/035530		中華人民共和国 浙江省 桐鄉市 高橋鎮 經濟園区
(87) 国際公開日	平成23年3月31日 (2011. 3. 31)	(74) 代理人	110000073
審査請求日	平成25年8月8日 (2013. 8. 8)		特許業務法人プロテック
(31) 優先権主張番号	200910153005.7	(74) 代理人	100167070
(32) 優先日	平成21年9月25日 (2009. 9. 25)		弁理士 狹武 哲詩
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		
微生物の受託番号	CCTCC CCTCC M 209198		

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) 【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
 AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGAACGACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGATCCTTCGGGGTCTAGT
 GGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCTTGGGGTTCGGAATAACTCCCCGAAAGGGGTGCTAATACCGGATGAT
 GTCGAAAGACCAAGATTTATCGCCCTGAGATGAGCCCGCGTAGGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGC
 GACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAGCTCT
 TTTACCCGGAAGATAATGACTGTACCGGGAGAATAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGG
 GGCTAGCGTTGTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAA
 CTCCAGAACTGCCTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTA
 GATATTCGGAAGAACCAGTGCGGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGTGCTTGGCACTTGGGTGGCGCAGC
 TAACGCATTAAGTTATCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCTGCACAAGCGG
 TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACTGGCAGAGATGCCT
 TTCTTCCCTTCGGGACCTACACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGC

10

20

AACGAGCGCAACCCTCGACTTTAGTTACCATCATTAAGTTGGGTACTTTAAAGTAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAAGTACAGTGGGCAGCAA
TCCC GCGAGGGTGAGCTAATCTCCAAAATTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTG
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。

【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1.5-5.0μm×0.8-1.0μm、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。

10

【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℃、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。

20

【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℃に昇温して、30min～2h保温した後、40℃～50℃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種以上の任意比率の組み合わせであることということを特徴とする請求項5に記載の使用。

30

【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を特徴とする請求項5に記載の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【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 10
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トガ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。

【0003】

ジェランゴムは、-1,3-D-ブドウ糖、-1,4-D-グルコン酸と-1,4-L-ラムノースに 20
モル比2:1:1で構成しており、または-1,3-D-ブドウ糖、-1,4-D-グルコン酸、-1,3-D-ブドウ糖、-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 30
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。

【0004】

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 40
効率が低くなるし、コストも増加する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

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】

【0006】

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 50

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。

【 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。

10

【 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、

```
AGAGTTTGTATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGATCCTTCGGGGTCTAGT
GGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCTTGGGGTTCGGAATAACTCCCCGAAAGGGGTGCTAATACCGGATGAT
GTCGAAAGACCAAAGATTTATCGCCCTGAGATGAGCCCGCGTAGGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGC
GACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAGCTCT
TTTACCCGGGAAGATAATGACTGTACCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGG
GGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGCGCGTAAAGCGCACGTAGCGCGCTTTGTAAGTCAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAA
CTCCAGAAGTGCCTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGATAGAGGTGAAATTCGTA
GATATTCGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGTGCTTGGCACTTGGGTGGCGCAGC
TAACGCATTAAGTTATCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCTGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACTGGCAGAGATGCCT
TTCTTCCCTTCGGGGACCTACACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTCGACTTTAGTTACCATCATTAAGTTGGTACTTTAAAGTAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAG
GTGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAAGTACAGTGGGCAGCAA
TCCCGCAGGGTGAGCTAATCTCCAAAACCTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGCGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTG
GGTTCACCCGAAGCGTTGCGCTAACTCGTAAGAGAGGCAGGCGACCACGGTGGGCTTAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAA
CAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT
```

20

30

【 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、

40

【 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

50

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、

10

【0013】

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。

20

【0014】

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。

40

【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

50

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、真っすくな棒な状態で、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 \times 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。

10

20

【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。

30

【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、麗博生物会社) 及び100gのアルカリ・プロテアーゼ (2万U/g、麗博生物会社) 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。

40

【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、

50

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度程度昇温して、繊維料を完全に溶解させて、85度の温度を維持して、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度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度で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】

0005765859000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 吳 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 2 4 2 房間
- (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

審査官 大久保 智之

- (56)参考文献 Journal of Microbiological Methods , 2 0 1 0 年 , 82 , 19-27
Acta Horticulturae , 2 0 0 5 年 , 693 , 263-270

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0

C 1 2 P 1 9 / 0 0

C A p l u s / B I O T E C H A B S / B I O S I S / W P I D S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

S c o p u s