

(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2017-86065

(P2017-86065A)

(43) 公開日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/42 (2006.01)	C 1 2 P 7/42 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2016-193359 (P2016-193359)	(71) 出願人	390014856 日本乳化剤株式会社 東京都中央区日本橋小舟町4番1号
(22) 出願日	平成28年9月30日(2016.9.30)	(71) 出願人	801000027 学校法人明治大学 東京都千代田区神田駿河台1-1
(31) 優先権主張番号	特願2015-217773 (P2015-217773)	(74) 代理人	100098121 弁理士 間山 世津子
(32) 優先日	平成27年11月5日(2015.11.5)	(74) 代理人	100107870 弁理士 野村 健一
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	前田 理久 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1 明治大学生田キャンパス内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルキレングリコールモノアルキルエーテル類を分解することができる微生物及びその使用

(57) 【要約】

【課題】微生物により、アルキレングリコールモノアルキルエーテル類を分解することで、アルキレンオキサイド付加反応の副生成物並びに廃棄物の削減を可能とすること。

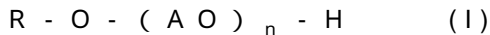
【解決手段】Cupriavidus属の微生物を用いて、アルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解する方法。Cupriavidus属の微生物を用いて、アルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産する方法。アルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産することができるCupriavidus属の微生物。染色体DNAの16SrRNAが配列番号1のヌクレオチド配列又は配列番号1のヌクレオチド配列と97%以上の同一性を有するヌクレオチド配列で表される、Cupriavidus属の微生物。染色体DNAの16SrRNAが配列番号2のヌクレオチド配列又は配列番号2のヌクレオチド配列と97%以上の同一性を有するヌクレオチド配列で表される、Cupriavidus属の微生物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

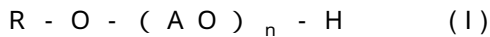
Cupriavidus属の微生物を用いて、下記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解する方法。



(式中、Rは炭素数1～18のアルキル基であり、Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは、1～50の整数である。)

【請求項 2】

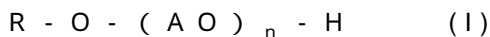
Cupriavidus属の微生物を用いて、下記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産する方法。



(式中、Rは炭素数1～18のアルキル基であり、Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは、1～50の整数である。)

【請求項 3】

下記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産することができるCupriavidus属の微生物。



(式中、Rは炭素数1～18のアルキル基であり、Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは、1～50の整数である。)

【請求項 4】

染色体DNAの16SrRNAが配列番号1のヌクレオチド配列又は配列番号1のヌクレオチド配列と97%以上の同一性を有するヌクレオチド配列で表される、Cupriavidus属の微生物。

【請求項 5】

染色体DNAの16SrRNAが配列番号2のヌクレオチド配列又は配列番号2のヌクレオチド配列と97%以上の同一性を有するヌクレオチド配列で表される、Cupriavidus属の微生物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルキレングリコールモノアルキルエーテル類を分解することができる微生物及びその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

アルキレングリコールモノアルキルエーテル類(以下、単にグリコールエーテルとも称する)の合成法の一つとして、アルキレンオキサイド(例えば、酸化エチレン、酸化プロピレン、酸化ブチレン)付加反応が挙げられる。同合成法においては目的物合成の際、所望のモル数のみを付加した目的物を合成することは不可能であり、付加モル数に幅がある分布品として得られることが知られている。当分布品から目的物を得るためには、蒸留等の精製工程が必要であり、目的物が含まれる主留分以外の留分(初留分、後留分、釜残など)は、その後の利用価値の少ないものが多く、再利用、廃棄共に処理を必要とするものが多い。

【0003】

グリコールエーテル類は、アルキレンオキサイド付加反応における副生成物の一つであるが、微生物の分解を受けにくく、グリコールエーテル類分解微生物の報告例は殆ど知られていない。トリエチレングリコールモノブチルエーテル(BTG)のように炭素鎖が長く、反応性が低いと推測されるグリコールエーテル類においては、微生物で分解することはさらに困難であった。

【0004】

一方で、生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の製造に関し、微生物による合成が知られている。例えば、特許文献1では、ラウリン酸含量の高い油脂からPHAをカプリアビダス属細菌より生産する方法が報告されており、特許文献2

10

20

30

40

50

では、酢酸を炭素源としてシュードモナス属細菌によりPHAを生産する方法が報告されている。

【0005】

しかしながら、微生物による分解を受けにくいグリコールエーテル類を微生物により分解、すなわちグリコールエーテル類を炭素源とし、PHAを生産する方法は知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2013-009627号公報

10

【特許文献2】特開2001-178484号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、微生物により、グリコールエーテル類を分解することで、副生成物並びに廃棄物の削減を可能とすることを目的とする。

【0008】

更に、同微生物により、グリコールエーテル類を原料とし、生分解性バイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を合成することで、環境配慮型のグリーンサステイナブル技術の開発を目指した。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

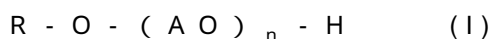
本発明者らは、グリコールエーテル類が豊富な環境下から微生物を単離することにより、グリコールエーテル類分解微生物を獲得することに成功した。また、単離したグリコールエーテル類分解微生物の中にポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を合成する微生物がいることを確認し、そのPHA蓄積率は50~80wt%であることが示された。さらに、この微生物はグリコールエーテル類からPHAを生産することを確認した。

【0010】

本発明の要旨は以下の通りである。

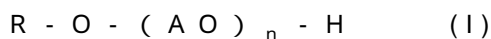
(1) Cupriavidus属の微生物を用いて、下記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解する方法。

30



(式中、Rは炭素数1~18のアルキル基であり、Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは、1~50の整数である。)

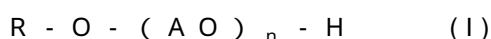
(2) Cupriavidus属の微生物を用いて、下記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産する方法。



(式中、Rは炭素数1~18のアルキル基であり、Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは、1~50の整数である。)

(3) 下記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産することができるCupriavidus属の微生物。

40



(式中、Rは炭素数1~18のアルキル基であり、Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは、1~50の整数である。)

(4) 染色体DNAの16SrRNAが配列番号1のヌクレオチド配列又は配列番号1のヌクレオチド配列と97%以上の同一性を有するヌクレオチド配列で表される、Cupriavidus属の微生物。

(5) 染色体DNAの16SrRNAが配列番号2のヌクレオチド配列又は配列番号2のヌクレオチド配列と97%以上の同一性を有するヌクレオチド配列で表される、Cupriavidus属の微生物。

50

【発明の効果】

【0011】

本発明により、処理に手間のかかる難分解性のグリコールエーテル類を分解し、PHAへと転換することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】同定した菌（NNM17,19,23,25,26,27,31,48）の系統樹を示す。

【図2】同定した菌（NNM17,19,23,25,26,27,31,48）の16SrRNAの配列のアライメントを示す。

【発明を実施するための形態】

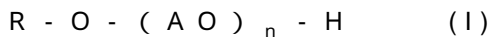
10

【0013】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0014】

本発明は、Cupriavidus属の微生物を用いて、下記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解する方法を提供する。



(式中、Rは炭素数1～18のアルキル基であり、Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは、1～50の整数である。)

Rは炭素数1～18のアルキル基であるが、このうち、炭素数1～13のアルキル基が適当であり、炭素数1～6のアルキル基が好ましく、炭素数1～4のアルキル基がより好ましい。

20

【0015】

Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であるが、このうち、エチレン基が好ましい。

【0016】

nは、1～50の整数であるが、このうち、1～30の整数が適当であり、1～8の整数が好ましく、1～3の整数がより好ましい。

【0017】

アルキレングリコールモノアルキルエーテルは、1種類であっても、複数種類の混合物であってもよい。

30

アルキレングリコールモノアルキルエーテルの分解に関するニーズの大きさと分解の容易さの観点から、アルキレングリコールモノアルキルエーテルのうち、トリエチレングリコールモノブチルエーテルが原料として好ましく、トリエチレングリコールモノブチルエーテルと他のグリコールエーテルとの混合物であってもよい。

【0018】

Cupriavidus属の微生物は、上記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解できるものであればよい。例えば、後述の微生物を用いるとよい。

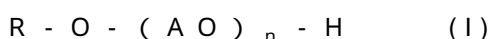
【0019】

例えば、アルキレングリコールモノアルキルエーテル（濃度：0.02～20wt%）を含む無機塩選択培地（培地組成は後述の実施例参照）にて、25～37の温度、好氣的条件下で、0～2日間、Cupriavidus属の微生物を培養することにより、上記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解することができる。

40

【0020】

また、本発明は、Cupriavidus属の微生物を用いて、下記の式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産する方法を提供する。



(式中、Rは炭素数1～18のアルキル基であり、Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは、1～50の整数である。)

R、A及びnについては、上述した通りである。

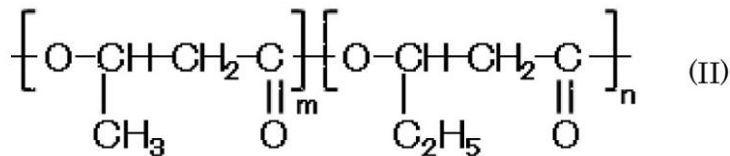
50

【0021】

ポリヒドロキシアルカン酸 (Polyhydroxyalkanoate; PHA) は、脂肪族ポリエステルである。微生物にとってPHAは、貧栄養時に備えて蓄える炭素およびエネルギー貯蔵物質であり、これを蓄えることで生育環境中での生存性を高めることができる。一方でPHAは、生分解性や生体適合性などの機能性を有し、かつ、天然由来の物質としては珍しく熱可塑性を示すバイオプラスチックでもある。

【0022】

本発明の方法により生産されるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、下記の式(II)で表わされる共重合体である。



10

(式中、mおよびnはポリマーのモノマー単位を表し、1以上の整数である。)

後述の実施例では、本発明の方法により生産されるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、(R)-3-ヒドロキシブタン酸 (C4とも称する) を主として形成されていたが、(R)-3-ヒドロキシ吉草酸 (C5とも称する) も含まれていることが確認された。(R)-3-ヒドロキシブタン酸と(R)-3-ヒドロキシ吉草酸の比率は、8:2~9:1であるとよい。他の構成単位として、(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸 (C6とも称する) が挙げられる。

20

【0023】

Cupriavidus属の微生物は、上記の式(I)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産できるものであればよい。例えば、後述の微生物を用いるとよい。

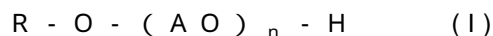
【0024】

例えば、アルキレングリコールモノアルキルエーテル (濃度: 0.02~20wt%) を含む無機塩選択培地 (培地組成は後述の実施例参照) にて、25~37の温度、好気的条件下で、0~2日間、Cupriavidus属の微生物を培養することにより、上記の式(I)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産することができる。

30

【0025】

さらに、本発明は、下記の式(I)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産することができるCupriavidus属の微生物を提供する。



(式中、Rは炭素数1~18のアルキル基であり、Aは、それぞれ、独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは、1~50の整数である。)

R、A及びnについては、上述した通りである。

【0026】

ポリヒドロキシアルカン酸も、上述した通りである。

40

【0027】

本発明の微生物は、アルキレングリコールモノアルキルエーテルから、ポリヒドロキシアルカン酸を生産することができるので、有用である。また、本発明の微生物は、アルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解することができるので、有用である。

【0028】

本発明の微生物は、Cupriavidus属であり、以下のような科学的性質を有する。

[形態的性質]

(1)細胞の形及び大きさ: 球桿菌、700-1200nm

(2)細胞の他形性の有無: なし

50

(3)運動性の有無：あり、鞭毛の着生状態は未確認

(4)胞子の有無：なし

[培養的性質]

・寒天培地

生育の様相：球状

色：クリーム色

光沢：なし

拡散性色素：なし

・液体培地

表面発育の有無：なし

培地の混濁状態：透明 白濁 (660nm、1.5)

[生理学的性質]

(1)グラム染色性：なし (グラム陰性菌)

(10)無機窒素源の利用：硫酸アンモニウム塩

(13)オキシダーゼ：+

(14)カタラーゼ：+

(16)酸素に対する態度：好気性

本発明の微生物は、土壌などから単離することができ、例えば、土壌中の土をスプーン等により剥くって、採取することができる。定法に従って、微生物の染色体DNAを抽出し、定法に従って、抽出した染色体DNAの16SrRNAを解析し、インターネットサイト「BLAST」により相同性検索を行なうことにより、微生物の同定を行うことができる。

【 0029 】

本発明の微生物は、好気性細菌に用いられる一般的な培地を用いることができる。より具体的には、無機塩選択培地や富栄養寒天培地などの培地にて、25～37の温度、好气的条件下で、0～2日間培養することができる。

【 0030 】

本発明の微生物としては、本発明者らが土壌から分離したCupriavidus sp. NNM23株 (受託番号NITE P-02114)、Cupriavidus sp. NNM27株 (受託番号NITE P-02115) を例示することができるが、これらに限定されるわけではない。Cupriavidus sp. NN23株及びNN27株は、それぞれ、平成27年9月4日付けで独立行政法人製品評価技術基盤機構 (〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8) へ寄託した (受託番号：NITE P-02114, NITE P-02115) 。

Cupriavidus sp. NNM23株の染色体DNAの16SrRNAのヌクレオチド配列を配列番号1に示す。

Cupriavidus sp. NNM27株の染色体DNAの16SrRNAのヌクレオチド配列を配列番号2に示す。

【 0031 】

Cupriavidus sp. NNM23株 (受託番号NITE P-02114)、Cupriavidus sp. NNM27株 (受託番号NITE P-02115) は、新種の菌株であると考えられる。

【 0032 】

Cupriavidus sp. NNM23株 (受託番号NITE P-02114) とCupriavidus sp. NNM27株 (受託番号NITE P-02115) の資化性を下記の表にまとめた。

【 0033 】

10

20

30

40

【表 1】

	NNM23	NNM27
D-グルコース	-	-
D-アラビノース	-	-
D-マンノース	-	-
D-マンニトール	-	-
N-アセチル-グルコサミン	-	-
D-マルトース	-	-
グルコン酸カリウム	+	+
カプリン酸	+	+
アジピン酸	+	+
リンゴ酸塩	+	+
クエン酸三ナトリウム	+	+
酢酸フェニル	+	+

10

【0034】

20

本発明は、また、染色体DNAの16SrRNAが配列番号1のヌクレオチド配列又は配列番号1のヌクレオチド配列と97%以上の同一性を有するヌクレオチド配列で表される、*Cupriavidus*属の微生物を提供する。この微生物は、アルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解することができるので、有用である。また、アルキレングリコールモノアルキルエーテルからPHAを生産することができるので、有用である。

【0035】

30

本発明は、染色体DNAの16SrRNAが配列番号2のヌクレオチド配列又は配列番号2のヌクレオチド配列と97%以上の同一性を有するヌクレオチド配列で表される、*Cupriavidus*属の微生物も提供する。この微生物は、アルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解することができるので、有用である。また、アルキレングリコールモノアルキルエーテルからPHAを生産することができるので、有用である。

【0036】

以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の単なる例示であって、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0037】

〔実施例1〕

I. 神奈川県川崎市の土壌よりトリエチレングリコールモノブチルエーテル（以下、「BTG」と記す。）を単一炭素源として生育する菌を獲得した。

〔土壌からの微生物単離〕

40

1. 土壌からサンプルを採取した。
2. 土壌サンプル1.0g、イオン交換水1.0gを15mLディスポチューブ内で混合した。
3. 混合したディスポチューブを遠心分離した（3,000rpm, 3min）。
4. 遠心分離後、上清を培養液（2mL）に50 μ L入れ、培養を開始した（30 ° C）。この際、炭素源ごとに培養液は分けておいた。
5. 数日後、菌体が生育してきたら、培養液（2mL）を作製し、生育してきた培養液から20 μ Lとり、植え継ぎを行なった。この作業を4回行なった。
6. 植え継ぎ4回目の培養液を10⁴~10⁷希釈を行ない、その希釈液を固体培地（富栄養寒天培地）上に培養した。
7. 固体培地上での生育を確認した。

50

8. 固体培地上のコロニーから炭素源を限定した培養液 (= 無機塩選択培養液) で培養を行なった。
9. 生育してきた培養液2mLを80%グリセロール溶液1mLと混合し、80℃で冷凍保存した (= グリセロールストック)。
10. 冷凍保存されたグリセロールストック溶液から白金耳などを用いて固体培地上に培養した。
11. 固体培地上での生育を確認した。
12. 固体培地上のコロニーから無機塩選択培養液で培養を行なった。
13. 生育してきた培養液2mLを80%グリセロール溶液1mLと混合し、80℃で冷凍保存した。以上の操作により、グリコールエーテル分解菌を獲得した。

10

【0038】

・無機塩選択培養液組成

【0039】

【表2】

	添加濃度(mM)		添加濃度(μM)
(NH ₄) ₂ SO ₄	37.9	CuSO ₄ ・5H ₂ O	4.3
KH ₂ PO ₄	21.5	H ₃ BO ₃	0.06
K ₂ HPO ₄	33.7	MnSO ₄ ・5H ₂ O	0.22
NaCl	34.2	CoCl ₃ ・6H ₂ O	0.02
CaCl ₂	0.3	NiSO ₄ ・7H ₂ O	0.13
FeSO ₄	0.1	MoO ₃	0.03
MgSO ₄	2.5	ZnSO ₄ ・5H ₂ O	0.03

20

炭素源 終濃度 0.1%

【0040】

・富栄養寒天培地組成 (100mL)

トリプトン	1g
イーストエキストラクト	0.5g
塩化ナトリウム	0.5g
寒天	0.8g

30

【0041】

II. 獲得した菌はCupriavidus属に属する微生物であった。以下、獲得した菌を、それぞれ、NNM17,19,23,25,26,27,31及び48と称す。

[グリコールエーテル分解菌の同定]

1. 定法に従って、グリコールエーテル分解菌の染色体DNAを抽出した。
2. 定法に従って、抽出した染色体DNAの16SrRNAを解析した。
3. インターネットサイト「BLAST」により相同性検索を行なった結果、Cupriavidus属と99%の相同性を示した。なお、NNM27については、公益財団法人 実験動物中央研究所にも同定を依頼し、上記と同等結果が得られている。

40

【0042】

III. 獲得した菌はBTGを単一炭素源とし、生育下でポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を生産することを確認した。

[PHA生産培養 (グリコールエーテルの分解)]

1. グリコールエーテル分解菌を単一炭素源 (例: BTG) を含む無機塩選択培地 (上述の無機塩選択培養液) で、温度は25~37℃、好气的条件で培養した。
2. 十分に培養をした後 (2日~3日)、培養液を液量に合わせて集菌した。
3. 上清を取り除き、窒素源をゼロにした無機塩選択培地に溶かした。

50

4. 3,000rpm、3~5min、遠心分離した。

5. 上清を取り除き、窒素源をゼロにした無機塩選択培地1mLに溶かし、窒素源をゼロにした単一炭素源を含む無機塩選択培地を加え、培養を温度は25~37℃、好氣的条件で24時間行なった。

【0043】

[PHA分析]

「PHAモノマー化処理」

1. 上記で培養したサンプルを5,000rpm、10minで集菌した。

2. 集菌したサンプルを2mLの100%メタノールを加え、混合した。

3. 6,000rpm、2min、遠心分離した。

10

4. 上清を取り除き、2mLの50%メタノールを加え、混合した。

5. 6,000rpm、5min、遠心分離した。

6. 上清を取り除き、2mLの滅菌水を加え、混合した。

7. あらかじめ重量を測定したネジつきガラス試験管に菌体液を移した。

8. 6,000rpm、5min、遠心分離した。

9. 上清を取り除き、凍結乾燥機にて、48時間凍結乾燥した。

10. 乾燥後、試験管の重量を測定し、乾燥菌体重量(CDW)を算出した。

11. 凍結乾燥後のサンプルにクロロホルム2mL、100%メタノール1.7mL、濃硫酸0.3mL加えた。

12. 100℃のヒートブロックに140分かけ、反応させた。

20

13. 反応液が常温になったら滅菌水1mL加え、6,000rpm、10min、遠心分離した。

14. 下層を1000~2000μLとり、フィルター処理をした。

15. 新しい容器にクロロホルム1,000μL、安息香酸メチル1μLとり混合した。

16. 15と14のサンプル抽出液をそれぞれ150μLずつ合わせてGCサンプルとした。

【0044】

「PHA蓄積率計算」

ガスクロマトグラフィー(GC)で検出された積分値からPHA蓄積率を算出した。

$$\text{PHA蓄積率 (wt\%)} = K \times \frac{C4 \times X + C5 \times Y}{m \times s} \times 100$$

30

X、Y：C4、C5の補正係数 K：補正係数 m：乾燥菌体重量(mg)

s：内部標準物質(安息香酸メチル)のGCにおける積分値

K：補正係数はあらかじめ、C4標準物質である3-ヒドロキシブタン酸メチルを用いて求めた。

【0045】

C4、C5の補正係数は各標準物質である3-ヒドロキシブタン酸メチル、3-ヒドロキシバレリル酸メチルを用いて求めた。

【0046】

・GC分析条件

測定機器：SHIMADZU GC-2014

40

カラム：Inertcap 1 30m×0.32mmID×0.25μm、サンプル注入量：1.0μL

キャリアガス：He 線速度：30cm/sec スプリット：1/100

INJ：300 DET：300

カラム：100 (0min) 20 /min 300 (5min) 合計15.0min

【0047】

IV. 生産されたPHAは(R)-3-ヒドロキシブタン酸を主として形成されていたが、(R)-3-ヒドロキシ吉草酸も含まれていることが確認された。

【0048】

「PHA組成比計算」

GCで検出された積分値より生産されたPHAの組成比を求めた。

50

V・I～IVの結果より、同定した菌（NNM17,19,23,25,26,27,31,48）の系統樹を図1に、PHA生産（グリコールエーテル分解）に関する結果を下記の表3に纏めた。

【0049】

〔実施例2〕

獲得した菌をNNM27に固定し、トリエチレングリコールモノメチルエーテル（以下、「MTG」と記す。）を単一炭素源とした以外は、実施例1と同様に行った。結果を下記の表3に纏めた。

【0050】

〔実施例3〕

獲得した菌をNNM27に固定し、ジエチレングリコールモノヘキシルエーテル（以下、「HeDG」と記す。）を単一炭素源とした以外は、実施例1と同様に行った。結果を下記の表3に纏めた。

10

【0051】

〔実施例4〕

獲得した菌をNNM27に固定し、ジエチレングリコールモノドデシルエーテル（以下、「DDG」と記す。）を単一炭素源とした以外は、実施例1と同様に行った。結果を下記の表3に纏めた。

【0052】

【表 3】

	GE 分解工程	PHA 合成工程				
	基質 GE 濃度 (%)	菌体重量 (g/L)	PHA 量 (g/L)	PHA 蓄積率 (wt%)	PHA 組成(%)	
					C4	C5
NNM25	基質 : BTG					
培養開始時(※1)	0.100	0.2425	0.03	14.2	88.9	11.1
培養 24 時間後	0.020	0.2620	0.09	36.2	96.2	3.8
NNM26	基質 : BTG					
培養開始時	0.100	0.2125	0.04	17.2	93.7	6.3
培養 24 時間後	0.031	0.3100	0.09	27.4	98.7	1.3
NNM48	基質 : BTG					
培養開始時	0.100	0.2575	0.04	17.3	93.5	6.5
培養 24 時間後	0.024	0.3840	0.13	34.3	98.6	1.4
NNM17	基質 : BTG					
培養開始時	0.100	0.2425	0.04	15.0	84.2	5.8
培養 24 時間後	0.008	0.3400	0.17	37.5	98.1	1.9
NNM19	基質 : BTG					
培養開始時	0.100	0.3050	0.05	16.0	91.2	8.8
培養 24 時間後	0.009	0.3400	0.19	42.0	97.9	2.1
NNM31	基質 : BTG					
培養開始時	0.100	0.3450	0.06	16.4	91.4	8.6
培養 24 時間後	0.012	0.4680	0.19	41.1	98.5	1.5
NNM27	基質 : BTG					
培養開始時	0.100	0.2325	0.02	26.8	81.7	18.3
培養 24 時間後	0.001	0.6540	0.22	34.3	95.4	4.6
NNM27	基質 : MTG					
培養開始時	0.100	0.2100	0.04	10.3	55.6	44.4
培養 24 時間後	0.069	0.3520	0.06	8.3	51.3	48.7
NNM27	基質 : HeDG					
培養開始時	0.100	0.2550	0.04	7.2	57.5	42.5
培養 24 時間後	0.001	0.3360	0.08	11.3	72.3	27.7
NNM27	基質 : DDG					
培養開始時	0.100	0.2000	0.04	9.0	63.5	36.5
培養 24 時間後	0.001	0.8280	0.26	31.5	94.5	5.5
<i>Cupriavidusalkaliphilus</i> strain ASC-732						
NNM23	基質 : BTG					
培養開始時	0.100	0.2350	0.02	7.7	67.6	32.4
培養 24 時間後	0.001	0.5400	0.18	33.0	96.5	3.5
<i>Cupriaviduspinatubonensis</i> strain 1243						
<i>Cupriavidusmetallidurans</i>						
<i>Cupriavidusnecator</i> N-1						
<i>Ralstoniaeutropha</i> H16						
<i>Cupriavidusbasilensis</i>						
<i>Ralstoniaeutropha</i> JMP134						
<i>Cupriavidustaiwanensis</i> strain LMG1942						

※1 : 窒素源濃度を調整して培養を開始した時を示す。

獲得した菌については、グレーの欄 (NNM17, 19, 31, 27, 23) が好ましい形態と見受けられる。

また、グレーの欄より上の欄 (NNM25, 26, 48) は性能を発揮するが、若干劣るものであ

10

20

30

40

50

るように思われる。

更に、獲得した菌をNNM27とし、単一炭素源（基質）の種類を変更しても、同様の性能を発揮する。

【0053】

〔実施例5〕

「生育速度測定」

獲得した菌をNNM27に固定してMTGを単一炭素源とし、実施例1で使用した無機塩選択培養液を使用し、前培養液から1%植菌を行ない、生育曲線が培養開始から定常期に入るまでの時間を測定した。結果を下記の表4に纏めた。また、炭素源濃度に応じた生育速度の変化を小型振とう培養装置を使用して測定した。

測定機器：TVS062CA（ADVANTEC）

測定条件：吸光度測定(660nm)	1時間毎
振とう速度	40rpm
測定時間	50～120時間
測定温度	30
炭素源濃度	0.1%

結果を表5に纏めた。

【0054】

〔実施例6〕

獲得した菌をNNM27に固定し、BTGを単一炭素源とした以外は、実施例5と同様に行った。結果を下記の表4に纏めた。

【0055】

〔実施例7〕

獲得した菌をNNM27に固定し、DDGを単一炭素源とした以外は、実施例5と同様に行った。結果を下記の表4に纏めた。

【0056】

〔調製例〕

アルキレングリコールモノアルキルエーテル類（以下、単にグリコールエーテルとも称する）の合成法の一つとして、アルキレンオキサイド（例えば、酸化エチレン、酸化プロピレン、酸化ブチレン）の付加反応が挙げられる。

（1）混合物1では、原料として炭素数10～16アルコール（平均炭素数：12.5）を用いた。ここに塩基性触媒として（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、ナトリウムメトキシド、トリエチルアミン）を加え、所定温度まで加熱昇温を行った。続いて原料のアルコール1モルに対して酸化エチレンを10モル分付加することにより混合物1を得た。

（2）混合物2では、原料として炭素数16～18アルコール（平均炭素数：17.7）を用いた。ここに塩基性触媒として（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、ナトリウムメトキシド、トリエチルアミン）を加え、所定温度まで加熱昇温を行った。続いて原料のアルコール1モルに対して酸化エチレンを7モル分付加することにより混合物2を得た。

（3）混合物3では、原料として炭素数10～16アルコール（平均炭素数：12.5）を用いた。ここに塩基性触媒として（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、ナトリウムメトキシド、トリエチルアミン）を加え、所定温度まで加熱昇温を行った。続いて原料のアルコール1モルに対して酸化プロピレンを3モル分付加することにより混合物3を得た。

【0057】

〔実施例8〕

獲得した菌をNNM27に固定し、ポリオキシエチレンアルキルエーテル(上記の式(1)中、Rは炭素数10～16のアルキル基であり、Aはそれぞれ独立にエチレン基であり、nは平均で10の整数である。(以下、「混合物1」(調製例(1))と記す))を単一炭素源とした以外は、実施例5と同様に行った。結果を下記の表4に纏めた。

【0058】

〔実施例9〕

10

20

30

40

50

獲得した菌をNNM27に固定し、ポリオキシエチレンステアリルエーテル(上記の式(1)中、Rは炭素数16~18のアルキル基であり、Aはそれぞれ独立にエチレン基であり、nは平均で7の整数である。(以下、「混合物2」(調製例(2))と記す))を単一炭素源とした以外は、実施例5と同様に行った。結果を下記の表4に纏めた。

【0059】

〔実施例10〕

獲得した菌をNNM27に固定し、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル(上記の式(1)中、Rは炭素数10~16のアルキル基であり、Aはそれぞれ独立にプロピレン基であり、nは平均で3の整数である。(以下、「混合物3」(調製例(3))と記す))を単一炭素源とした以外は、実施例5と同様に行った。結果を下記の表4に纏めた。

10

【表4】

	MTG	BTG	DDG	混合物1	混合物2	混合物3
炭素源濃度	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
時間(hr)	100	35	30	40	80	50

生育速度(表4)より、本発明で獲得した菌(代表としてNNM27)は、上記(1)式のアルキレングリコールモノアルキルエーテル(例として実施例5~10で示す6種)を炭素源としてどの基質でも生育することを確認した。

【0060】

20

〔実施例11〕

獲得した菌をNNM27に固定し、混合物1を単一炭素源として、実施例1で使用した無機塩選択培養液にて生育速度測定を行った。結果を下記の表5に纏めた。

【表5】

炭素源濃度(%)	0.1	1.0	10.0	20.0
時間(hr)	30	50	50	50

上記(1)式のアルキレングリコールモノアルキルエーテル(例として実施例11で示す1種)を炭素源とし、更に濃度を0.1-20.0%と変化させても、本発明で獲得した菌(代表としてNNM27)が生育することを確認した。

30

【0061】

表3より、アルキレングリコールモノアルキルエーテルやポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の濃度を測定したところ、アルキレングリコールモノアルキルエーテルが分解され、後にPHAが生成することを確認した。

【0062】

炭素源となりうるアルキレングリコールモノアルキルエーテルは、上記式(1)で表されるアルキレングリコールモノアルキルエーテル(式中、Rは炭素数1~18のアルキル基であり、Aはそれぞれ独立に、エチレン基、プロピレン基又はブチレン基であり、nは1~50の整数である)の範囲であり、炭素源濃度は0.1%-20.0%が好適である。また、本発明で獲得した菌はアルキレングリコールモノアルキルエーテルを分解してPHAを生産することができる。

40

【産業上の利用可能性】

【0063】

アルキレンオキサイド付加反応において生じる、利用価値の少ない副生成物や廃棄物を微生物により分解処理することが可能になった。焼却処理や、化学的処理などが不要なく、目的物の水溶液に微生物を混入するだけで処理することが可能である。またその過程でポリヒドロキシアルカン酸を合成することが可能であり、環境配慮の観点から新しい技術の確立がなされた。

【配列表フリーテキスト】

50

【 0 0 6 4 】

< 配列番号 1 >

配列番号 1 は、NNM23の16SrRNAのヌクレオチド配列を示す。

CGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGCTTC
 GGCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAG
 CTAATACCGCATAACGACCTGAGGGTAAAAGCGGGGACCGGTAACGGCCTCGCGCGACAGGAGCGGCCGATGTCTGATTA
 GCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTG
 TGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAAGAAAAGCGCGCTGGTTAATACCTGGCGTGATGACGGT
 ACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTG
 GCGTAAAGCGTGCAGCGCGGTTTGTAAAGACAGGCGTAAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGT
 CAGGCTAGAGTATGTCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGC
 GAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTTTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGG
 GAGTACGGTGCAGGATTAATACTAAAAGCAATGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGC
 AACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATCAGGTGCCCCGAAAAGGGAAAAGTGGACA
 CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAG
 TTGCTACGCAAGAGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCC
 TTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTGCCTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAA
 CGCATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG
 GTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTTCCAGAAGTAGTTAGCCTAACCG
 CAAGGAGGGCGATTACCACGGCAGGGTTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGG
 ATCACCTCCTT

10

20

< 配列番号 2 >

配列番号 2 は、NNM27の16SrRNAのヌクレオチド配列を示す。

CGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGCTTC
 GGCCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAG
 CTAATACCGCATAACGACCTGAGGGTAAAAGCGGGGACCGTAAGGCCCTCGCGCGATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGC
 TAGTTGGTGGGGTAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTG
 TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAAGAAAATGGCCTGGGCTAATACCTCGGGTCGATGACGGTAC
 CGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
 CGTAAAGCGTGCAGCGCGGTTTGTAAAGACAGGCGTAAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGTCA
 GGCTAGAGTATGTCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
 AGGCAGCCCCCTGGGACGTCACTGACGCTCATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 GCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTTTCAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGG
 GTACGGTGCAGGATTAATACTAAAAGCAATGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAA
 CGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATCAGGTGCCCCGAAAAGGGAAAAGTGGACACA
 GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTAGTT
 GCTACGAAAAGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTT
 ATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTGCCTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACG
 CATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
 GAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTTCCAGAAGTAGTTAGCCTAACCGCA
 AGGAGGGCGATTACCACGGCAGGGTTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGAT
 CACCTCCTTAATCG

30

40

< 配列番号 3 >

配列番号 3 は、NNM25の16SrRNAのヌクレオチド配列を示す。

AGAGTTTATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGCTTCGGCCT
 GCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAAT
 ACCGCATACGACCTGAGGGTAAAAGCGGGGACCGGTAACGGCCTCGCGGATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAG

50

TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGAAG
 AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAAGAAATGGCCCTGGCTAATACCCGGGGTCGATGACGGTACCGGAA
 GAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAA
 AGCGTGCGCAGGCGGTTTGATAAGACAGGCGTGAAATCCCCGGCTCAACCTGGGAATGGCGCTTGTGACTGTCAGGCTA
 GAGTGCCTCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCA
 GCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCT
 AAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTTCTTCAGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGA
 AAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATCAGGTGCCGAAAAGGGAAAGTGGACACAGGTGC
 TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTAATCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCTCTAGTTGCTA
 CGCAAGAGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTATGG
 GTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATC
 GTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
 ACGTTCCCGGGTCTTGACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGGA
 GGGCGATTACCACGGCAGGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACC
 TCCTTAATC

10

< 配列番号 4 >

配列番号 4 は、NNM26の16SrRNAのヌクレオチド配列を示す。

AGAGTTTATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGGGCTTCGGCCT
 GGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCGTGGGGATAACTAGTCGAAAAGATTAGCTAAT
 ACCGCATACGACCTGAGGGTAAAAGCGGGGACCGGTAACGGCCTCGCGGATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAG
 TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGA
 AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAAGAAATGGCTCTGGCTAATACCCGGGGTCGATGACGGTACCGG
 AAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGT
 AAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGATAAGACAGGCGTGAAATCCCCGGCTCAACCTGGGAATGGCGCTTGTGACTGTCAGGC
 TAGAGTGCCTCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
 CAGCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCC
 CTAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTTCTTCAGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTA
 CGGTCGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGC
 GAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATCAGGTGCCGAAAAGGGAAAGTGGACACAGGT
 GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCTCTAGTTGCT
 ACGCAAGAGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTATG
 GGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCAT
 CGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
 TACGTTCCCGGGTCTTGACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGG
 AGGGCGATTACCACGGCAGGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCAC
 CTCCTT

20

30

< 配列番号 5 >

配列番号 5 は、NNM48の16SrRNAのヌクレオチド配列を示す。

AGAGTTTATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGGGCTTCGGCCT
 GGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCGTGGGGATAACTAGTCGAAAAGATTAGCTAAT
 ACCGCATACGACCTGAGGGTAAAAGCGGGGACCGCAAGGCCTCGCGGATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTT
 GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAG
 AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAAGAAATGGCTCTGGCTAATACCCGGGGTCGATGACGGTACCGGAA
 GAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAA
 AGCGTGCGCAGGCGGTTTGATAAGACAGGCGTGAAATCCCCGGCTCAACCTGGGAATGGCGCTTGTGACTGTCAGGCTA
 GAGTGCCTCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCA

40

50

GCCCCCTGGGACGTGACTGACGCTCATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
 AAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTTCAGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGA
 AAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATCAGGTGCCCGAAAAGGGAAAAGTGACACAGGTGC
 TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTAGTTGCTAC
 GCAAGAGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGG
 TAGGGCTTCACACGTCATAACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCG
 TAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
 CGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGGAG
 GCGATTACCACGGCAGGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTTGATCACCT
 CCTT

10

< 配列番号 6 >

配列番号 6 は、NM17の16SrRNAのヌクレオチド配列を示す。

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGCTTCGGCCT
 GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAAT
 ACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGCAAGGCCTCGCGCTACAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTT
 GGTGGGGTAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCGTATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAG
 AAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAAGAAATGGCCTGGGTGAATACCCCGGGTCGATGACGGTACCGGAA
 GAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAA
 AGCGTGCGCAGGCGTTTTGTAAAGACAGGCGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGCAAGGCTA
 GAGTATGTCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCA
 GCCCCCTGGGACGTCACTGACGCTCATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
 AAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTTCAGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGA
 AAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATTAGGTGCCCGAAAAGGGAAAAGTGACACAGGTGC
 TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTAGTTGCTAC
 GAAAGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGG
 TAGGGCTTCACACGTCATAACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCG
 TAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
 CGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGGAG
 GCGATTACCACGGCAGGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTTGATCACCT
 CCTT

20

30

< 配列番号 7 >

配列番号 7 は、NM19の16SrRNAのヌクレオチド配列を示す。

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGCTTCGGCCT
 GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTGCTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAAT
 ACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGTAACGGCCTCGCGCTACAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAG
 TTGGTGGGGTAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAG
 GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCGTATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGA
 AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAAGAAATGGCCTGGGTGAATACCCCGGGTCGATGACGGTACCGG
 AAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGT
 AAAGCGTGCGCAGGCGTTTTGTAAAGACAGGCGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGCAAGGC
 TAGAGTATGTCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
 CAGCCCCCTGGGACGTCACTGACGCTCATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
 CTAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTTCAGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTA
 CGTTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGC
 GAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATTAGGTGCCCGAAAAGGGAAAAGTGACACAGGT
 GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTAGTTGCT
 ACGAAAAGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATG

40

50

GGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCAT
CGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA
TACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGG
AGGGCGATTACCACGGCAGGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCAC
CTCCTT

< 配列番号 8 >

配列番号 8 は、NNM31の16SrRNAのヌクレオチド配列を示す。

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGCTTCGGCCT
GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAAGATTAGCTAAT
ACCGCATACGACCTGAGGGTAAAAGCGGGGACCGCAAGGCCTCGCGCTACAGGAGTGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAAGAAATGGCTCTGGTTAATACCCGGGGTCGATGACGGTACCGGAA
GAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAA
AGCGTGCGCAGGCGTTTTGTAAGACAGGCGTAAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGCAAGGCTA
GAGTATGTCAGAGGGGGTAAACTCCACGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCA
GCCCCCTGGGACGTCACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
AAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTTCTTCAGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
GTCGCAAGATTAAGTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGA
AAAACCTTACCTACCCTTGACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATCAGGTGCCGAAAAGGGAAAAGTGGACACAGGTGC
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGTCTCTAGTTGCTAC
GAAAGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGG
TAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACGCATCG
TAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAGAAGTAGTTAGCCTAACCGCAAGGAG
GGCGATTACCACGGCAGGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT
CCTT

10

20

フロントページの続き

(72)発明者 宮崎 達

神奈川県川崎市川崎区千鳥町1番1号 日本乳化剤株式会社内

Fターム(参考) 4B064 AC01 AD32 CB01 DA16

4B065 AA01X CA11 CA54