

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/140374

発行日 平成29年12月21日 (2017.12.21)

(43) 国際公開日 平成28年9月9日 (2016.9.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12P 5/02 (2006.01)	C12P 5/02 ZNA	4B064
C12N 1/12 (2006.01)	C12N 1/12 A	4B065
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 1/12 C	
	C12N 1/20 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁)

出願番号 特願2017-503746 (P2017-503746)	(71) 出願人 504203572 国立大学法人茨城大学 茨城県水戸市文京二丁目1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/057691	(74) 代理人 110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
(22) 国際出願日 平成28年3月4日 (2016.3.4)	(72) 発明者 朝山 宗彦 茨城県稲敷郡阿見町中央三丁目2番1号 国立大学法人茨城大学 農学部内
(31) 優先権主張番号 特願2015-43817 (P2015-43817)	Fターム(参考) 4B064 AB02 CA02 CA08 CC30 CD07 CD09 DA16 4B065 AA01X AA83X AC14 BA22 BB08 BB15 BB31 BC50 CA03 CA54
(32) 優先日 平成27年3月5日 (2015.3.5)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

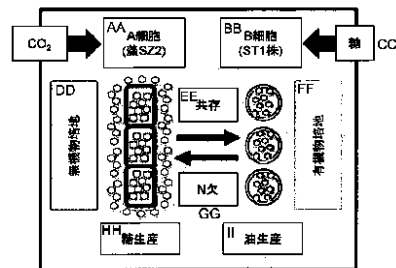
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 混合液混合種培養によるバイオ燃料生産技術

(57) 【要約】

本発明は、バイオ燃料を生産する新規の技術を提供することを目的とし、具体的には、光合成微生物と非光合成微生物とを含む混合微生物を、窒素源欠乏培地において共培養することを含む、バイオ燃料の製造方法に関する。

図 1



- AA A cell (algae S22)
- BB B cell (ST1 strain)
- CC Sugar
- DD Inorganic medium
- EE Co-exist
- FF Organic medium
- GG N deprived
- HH Sugar production
- II Oil production

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光合成微生物と非光合成微生物とを含む混合微生物を、窒素源欠乏培地において共培養することを含む、バイオ燃料の製造方法。

【請求項 2】

光合成微生物がハロミクロネマ (Halomicronema) 属に属する微生物である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ハロミクロネマ属に属する微生物が、受託番号 NITE BP - 01982 で特定されるハロミクロネマ・エスピー (Halomicronema sp.) SZ2 菌株又は糖生産能を有するその変異株である、請求項 2 記載の方法。

10

【請求項 4】

非光合成微生物がシノリゾビウム (Sinorhizobium) 属に属する微生物である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

シノリゾビウム属に属する微生物が、受託番号 NITE BP - 01981 で特定されるシノリゾビウム・エスピー (Sinorhizobium sp.) ST1 菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

培地が無機物培地と有機物培地とをさらに含有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 7】

培地が炭素源をさらに含有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

炭素源が酢酸ナトリウムである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

培地が糖源をさらに含有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

糖源がグルコースである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

共培養において所定の暗黒期間を設ける、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 12】

共培養後、共培養物を乾燥ストレス下で更に培養することを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】

バイオ燃料が短鎖アルカンである、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 14】

短鎖アルカンがヘプタデカンである、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

受託番号 NITE BP - 01982 で特定されるハロミクロネマ・エスピー SZ2 菌株又は糖生産能を有するその変異株。

40

【請求項 16】

受託番号 NITE BP - 01981 で特定されるシノリゾビウム・エスピー ST1 菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株。

【請求項 17】

請求項 15 記載のハロミクロネマ・エスピー SZ2 菌株又は糖生産能を有するその変異株と請求項 16 記載のシノリゾビウム・エスピー ST1 菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株とを含む混合微生物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、例えば光合成微生物と非光合成微生物との共培養により、バイオ燃料を生産する方法に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

エネルギーを化石燃料（天然ガス・石油・石炭等）に依存する日本の現状を鑑みると、将来、自国の技術により燃料を自力で生産できることが重要である。そこで、水と二酸化炭素を光合成により固定し、ブドウ糖等の有機物を生産することのできる光合成生物を利用してバイオ燃料を生産する試みが日本内外で大変注目されている。

シアノバクテリア（原核光合成微生物）を含む光合成微生物は、広義の意味で微細藻類に属するが、光合成能は植物のそれと比較して数十倍から百倍とも言われている。加えて、バイオ燃料生産に微細藻類を使用する場合、植物と比べて土や根茎等といった栽培後に不要となる廃棄物も出ない事から、次世代バイオ燃料生産に使用される生物として有望視されている。

ところで、バイオ燃料は、バイオディーゼルの原料となる中性脂肪（トリアシルグリセロール，TAG）や脂肪酸、炭化水素等に大別される。前者2つは化学構造に酸素（O）分子を有しているが、炭化水素は炭素（C）と水素（H）のみで構成されており、エンジン等に優しい燃料として石油産業界で好まれている。炭化水素燃料は炭素数とそれらを繋ぐ二重結合の数と位置により、燃料としての性質が規定される。このうち二重結合を含まない鎖式飽和炭化水素は、アルカン（ $C_n H_{2n+2}$ ）と呼ばれ、炭素数が1～20までの短鎖アルカンは、私達の身の回りで様々な燃料として役立っている。とりわけ炭素数が11～17又は12～17のアルカンは、標準（常温常圧）状態で液体であり、ジェット燃料や軽油相当の燃料として位置づけられる。

これまで微細藻類のうち、シアノバクテリア天然藻の一部の種で、炭素数15（ペンタデカン， $C_{15} H_{32}$ ）や17（ヘプタデカン， $C_{17} H_{36}$ ）のアルカンを生産する株が知られている（非特許文献1）。本発明者グループは、これまでシアノバクテリア天然藻を遺伝子操作により改変し、細胞乾燥重量当たり約50～60%に及び変異株を取得することに成功している（特許文献1）。これに限らず微細藻類の天然藻や遺伝子組換え藻を用いたバイオ燃料生産が試みられている。

それら従来技術では、単離純化された藻細胞を滅菌した培地中で無菌的あるいは無菌状態に近づけながら培養することによって、藻細胞内外へバイオ燃料を生産してきた。また、バイオエタノール生産等に見られるように、植物から生産されるブドウ糖を回収した後、酵母の発酵により目的物を得る2段階生産技術と比較して、光合成微生物を利用することのメリットは、前述したようにブドウ糖から目的有機物質（バイオ燃料等）を1段階（一つのバイオリクター内で同時に培養しながら）生産できる点にある。

一方、共培養による有用物質生産の従来法の例としては、アクチノタレア・ファーマンタス細菌と酵母を共培養することによりハロゲン化メチルを生産する系（特許文献2）、緑藻ボトリオコッカス培養液にアスティカカリウス・エキセントリカス菌株を添加し共培養することにより緑藻の増殖を促進させる系（特許文献3）、加水分解されたバイオマス原料からエタノール燃料を生産する系においてクロストリジウム・フィトフェルメンタス細胞あるいは更に他の微細物を含む共培養による方法（特許文献4）等が挙げられる。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 3 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 1 3 - 1 9 8 4 7 3 号 公 報

【 特許文献 2 】 特表 2 0 1 1 - 5 0 5 1 4 8 号 公 報

【 特許文献 3 】 特開 2 0 1 0 - 2 5 2 7 0 0 号 公 報

【 特許文献 4 】 特表 2 0 0 9 - 5 2 4 4 3 2 号 公 報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 4 】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Schirmer, A., Mathew, A. R., Li, X., Popova, E., and Cardayre S. B., Microbial biosynthesis of alkanes, Science, 2010年, 329(5991), pp. 559 - 562

【発明の概要】

【0005】

上述の実情に鑑み、本発明は、バイオ燃料を生産する新規の技術を提供することを目的とする。

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、光合成微生物と非光合成微生物とを同時に存在させ、混合種同士を同一空間で窒素源欠乏培地において培養（共培養）することにより、バイオ燃料を生産できることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

すなわち、本発明は、以下を包含する。

(1) 光合成微生物と非光合成微生物とを含む混合微生物を、窒素源欠乏培地において共培養することを含む、バイオ燃料の製造方法。

(2) 光合成微生物がハロミクロネマ (Halomicronema) 属に属する微生物である、(1)記載の方法。

(3) ハロミクロネマ属に属する微生物が、受託番号NITE BP - 01982で特定されるハロミクロネマ・エスピー (Halomicronema sp.) SZ2菌株又は糖生産能を有するその変異株である、(2)記載の方法。

(4) 非光合成微生物がシノリゾビウム (Sinorhizobium) 属に属する微生物である、(1)～(3)のいずれか1記載の方法。

20

(5) シノリゾビウム属に属する微生物が、受託番号NITE BP - 01981で特定されるシノリゾビウム・エスピー (Sinorhizobium sp.) ST1菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株である、(4)記載の方法。

(6) 培地が無機物培地と有機物培地とをさらに含有する、(1)～(5)のいずれか1記載の方法。

(7) 培地が炭素源をさらに含有する、(1)～(6)のいずれか1記載の方法。

(8) 炭素源が酢酸ナトリウムである、(7)記載の方法。

(9) 培地が糖源をさらに含有する、(1)～(8)のいずれか1記載の方法。

(10) 糖源がグルコースである、(9)記載の方法。

30

(11) 共培養において所定の暗黒期間を設ける、(1)～(10)のいずれか1記載の方法。

(12) 共培養後、共培養物を乾燥ストレス下で更に培養することを含む、(1)～(11)のいずれか1記載の方法。

(13) バイオ燃料が短鎖アルカンである、(1)～(12)のいずれか1記載の方法。

(14) 短鎖アルカンがヘプタデカンである、(13)記載の方法。

(15) 受託番号NITE BP - 01982で特定されるハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株又は糖生産能を有するその変異株。

(16) 受託番号NITE BP - 01981で特定されるシノリゾビウム・エスピーST1菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株。

40

(17) (15)記載のハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株又は糖生産能を有するその変異株と(16)記載のシノリゾビウム・エスピーST1菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株とを含む混合微生物。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015 - 043817号の開示内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】MCM5培養の概要を示す模式図である。

【図2】ハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株の顕微鏡写真である。

【図3】ハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株の糖生産を示す写真である。

50

【図4】ハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株とシノリゾビウム・エスピーST1菌株共存下でのシノリゾビウム・エスピーST1菌株による炭化水素生産を示す写真である。

【図5】炭化水素生産におけるハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株とシノリゾビウム・エスピーST1菌株の相性を示す図である。

【図6】炭化水素生産におけるシノリゾビウム・エスピーST1菌株の培養のための培地組成条件の検討結果を示す図である。

【図7】MCM S培養による5L規模のバイオ燃料生産におけるGC - MS分析結果を示す図である。

【図8】MCM S培養による燃料蓄積の経時変化を示すグラフである。

【図9】MCM S培養による油（ヘプタデカン）生産量を示すグラフである。

【図10】乾燥ストレスによるSZ2藻の油生産を示す図である。

【図11】乾燥ストレス藻SZ2細胞内の脂肪酸と炭化水素C₁₇H₃₆の蓄積を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明に係るバイオ燃料の製造方法（以下、「本方法」と称する）は、光合成微生物と非光合成微生物とを含む混合微生物を、窒素源欠乏培地において共培養する（同一空間で培養する）ことで、光合成微生物が糖を生産する一方、当該生産された糖を炭素源として利用し、非光合成微生物が油（炭化水素）等のバイオ燃料を生産する方法である。生産されるバイオ燃料としては、例えばヘプタデカン等の炭素数1～20個の短鎖アルカンが挙げられる。

図1に、混合液混合種培養（MCM S : Mixed - Culture Mixed - Species）の概要を示す。従来の細胞の培養方法は、目的とする細胞を純化し一種類の細胞を単純組成の培地で培養する（UCUS : Uni - Culture Uni - Species）ことを特徴としている。この場合、細胞株の純化が困難であったり、目的とする出口産物やそれを生産する培養条件が限定される場合がある。一方、本方法は、混合液混合種培養（MCM S : Mixed - Culture Mixed - Species）を特徴とする。混合液とは、無機物と有機物を成分とする培地であり、混合種とは、光合成微生物を含む2種類以上の細胞が共存することを意味する。特に、混合種培養は「共培養」と位置づけられる。共培養では、単一種純粋培養よりも培養条件や目的生産物の種類に多様性が与えられ、さらには昼夜を問わず油等のバイオ燃料の生産が可能であるので、バイオ燃料の生産量を向上させ、また経費を削減することができる。

本方法において、光合成微生物としては、水と二酸化炭素とを光合成により固定し、ブドウ糖等の有機物を生産する微生物であれば特に限定されないが、例えばシアノバクテリア（原核光合成微生物）が挙げられる。シアノバクテリアとしては、例えばハロミクロネマ属、マイクロキスティス属、リムノスリックス属、シュードアナベナ属等の属に属する微生物が挙げられる。また、ハロミクロネマ属に属する微生物としては、例えば、ハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株（以下、「SZ2菌株」等と称する場合がある）又は糖生産能を有するその変異株（例えば自然突然変異株、突然変異誘発処理株）等が挙げられる。

SZ2菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（NPM D）（〒292 - 0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2 - 5 - 8 122号室）に平成26年（2014年）12月12日付で寄託されており、その受託番号は、NITE P - 01982である。さらに、SZ2菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（NPM D）（〒292 - 0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2 - 5 - 8 122号室）に平成28年（2016年）2月12日付けで受託番号NITE BP - 01982として国際寄託へ移管されている。SZ2菌株は、下記の実施例に示す菌学的性質及び16SrRNA遺伝子の相同性分析等により、菌体表面に糖を生産する糸状性シアノバクテリアの一種ハロミクロネマ属に属する新菌株であると同定した。

10

20

30

40

50

一方、非光合成微生物としては、光合成微生物以外の糖等の炭素源を利用してバイオ燃料を生産する微生物であれば特に限定されないが、例えばシノリゾビウム属、シノリゾビウム属と近属のリゾビウム属、アゾリゾビウム属、メソリゾビウム属、アグロバクテリム属等に属する微生物が挙げられる。シノリゾビウム属に属する微生物としては、例えば、シノリゾビウム・エスピーST1菌株（以下、「ST1菌株」等と称する場合がある）又はヘプタデカン等の短鎖アルカン生産能を有するその変異株（例えば自然突然変異株、突然変異誘発処理株）等が挙げられる。

ST1菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（NPM D）（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に平成26年（2014年）12月12日付で寄託されており、その受託番号は、NIT E P-01981である。さらに、ST1菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構

特許微生物寄託センター（NPM D）（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に平成28年（2016年）2月12日付けで受託番号NIT E B P-01981として国際寄託へ移管されている。ST1菌株は、下記の実施例に示す菌学的性質及び16S rRNA遺伝子の相同性分析等により、根粒菌シノリゾビウムに属する新菌株であると同定した。

本方法においては、好ましくはSZ2菌株又は糖生産能を有するその変異株とST1菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株とを含む混合微生物を使用する。

先ず、本方法においては、光合成微生物と非光合成微生物とを準備する。

光合成微生物は、無機物培地で培養（前培養）し、調製することができる。ここで、無機物培地とは、例えばBG11培地のように栄養源として糖類を含まない培地を意味する。SZ2菌株の場合には、例えば無機物培地としてBG11液体培地〔培地組成：0.003mM $\text{Na}_2\text{-Mg EDTA}$ 、0.029mM クエン酸、0.18mM K_2HPO_4 、0.30mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.25mM $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.19mM Na_2CO_3 （無水）、0.03mM クエン酸鉄アンモニウム、1ml/L 微量栄養素（微量栄養素の組成：2.86g/L ホウ酸、1.81g/L $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.22g/L $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.39g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.08g/L $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.049g/L $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）、1.5g/L NaNO_3 〕を使用し、例えば20~40（好ましくは27~33）の温度下で7~90日間（好ましくは10~60日間）振盪（1~200rpm、好ましくは40~110rpm）又は静置培養することで、SZ2菌株培養物を準備することができる。

一方、非光合成微生物は、有機物培地で培養（前培養）し、調製することができる。ここで、有機物培地とは、栄養源としてグルコースなどの糖類（あるいは一酸化炭素や二酸化炭素などを除いた炭素を含む化合物の中で炭素と酸素から成るもの）を含有する培地を意味する。ST1菌株の場合には、例えば有機物培地としてLB液体（寒天）培地（培地組成： NaCl 10g/L、*Bacto Tryptone Peptone* 10g/L、粉末酵母エキス5g/L、寒天培地にする場合は以上に*Bacto Agar*を15g/Lの割合で添加し、これをオートクレーブ後、シャーレに注ぎ固化させる）を使用し、28~30の温度下で1~数日間（寒天培地の場合は数日~60日間）振盪（0~200rpm、好ましくは90~120rpm）培養することで、ST1菌株培養物を準備することができる。

次いで、本方法では、光合成微生物と非光合成微生物とを組み合わせる混合微生物とし、当該混合微生物を例えば窒素源欠乏培地において共培養する。なお、SZ2菌株には、自然界において共存菌としてST1菌株が共存しており、当該共存下の混合微生物を使用してもよい。

また、光合成微生物と非光合成微生物は、それぞれ単離したものであってよく、あるいは上述の前培養物自体を各微生物として使用することができる。前培養物を使用する場合には、共培養における窒素源欠乏培地に前培養に使用した無機物培地及び/又は有機物培地とが含有されることとなる。窒素源欠乏培地に対する前培養に使用した無機物培地及び

10

20

30

40

50

／又は有機物培地の割合としては、例えば0～100容量% (v/v)、好ましくは0.4～20容量% (v/v)が挙げられる。

混合微生物における光合成微生物と非光合成微生物との混合比としては、例えばSZ2菌株とST1菌株との場合において、2ヶ月間前培養した培養液50mLから集菌したSZ2菌株と前培養した培養液(OD₆₆₀ = 2)5mLから集菌したST1菌株とを1:1とすると、SZ2菌株:ST1菌株 = 1:0.04～1:2、好ましくは1:1程度が挙げられる。

共培養に使用される窒素源欠乏培地としては、窒素源を含まないか、又は通常の培地(例えば、BG11液体培地)中の窒素源に対して窒素源が乏しい(例えば、0～50%、好ましくは0～10%の窒素源を含む)培地である。窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、クエン酸鉄アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸カルシウム等が挙げられる。例えばSZ2菌株とST1菌株との混合微生物の共培養においては、窒素源欠乏培地としてBG11₀液体培地(培地組成:前記のBG11培地組成よりNaNO₃を全部抜いたもの)或いはNaNO₃を部分的(1割～9割程度)に抜いたBG11培地を使用することができる。なお、窒素源欠乏培地は、非滅菌の蒸留水等を使用して調製したものであってもよい。非滅菌の蒸留水を使用することで、培養コストを削減することができる。

さらに、窒素源欠乏培地には、炭素源及び／又は糖源を添加することが好ましい。炭素源を添加することで、更に炭素源を補強することができる。添加する炭素源としては、例えば酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、炭酸ナトリウム等が挙げられる。窒素源欠乏培地への炭素源の添加量は、例えば窒素源欠乏培地における最終濃度1～数100mM、好ましくは10mM程度となる量である。一方、糖源を添加することで、光合成微生物が生産する糖に加えて、添加した糖源を利用し、非光合成微生物がバイオ燃料を生産することができ、バイオ燃料生産量を向上させることができる。糖源としては、例えば単糖類であるグルコース、キシロース、アラビノース、キシロース、リボース、デオキシリボース、フルクトース、ガラクトース、マンノース等、二糖類であるラクトース、マルトース、トレハロース等、三糖類であるマルトトリス、ラフィノース等、オリゴ糖である、フラクトオリゴ(FOS)糖、ガラクトオリゴ糖(GOS)、マンナンオリゴ(MOS)糖等、多糖類であるグリコーゲン、デンプン、セルロース、デキストリン、グルカン、フルクタン、キチン質等、その他産業廃棄物(廃糖蜜、発酵液、糞尿液、下水等)に含まれる廃棄糖等が挙げられる。窒素源欠乏培地への糖源の添加量は、例えば窒素源欠乏培地における最終濃度0.01～数百mM、好ましくは0.1～20mM(本方法では0.5mM程度)となる量である。

共培養は、例えば20～30(好ましくは25～30)の温度条件、0～500μmol photons/m²/s¹(好ましくは10～100μmol photons/m²/s¹)の光強度条件(例えば、白色光照射下)、0.04～12%(好ましくは0.5～3%)の二酸化炭素ガス供給(0.01～50L/min、好ましくは0.1～20L/min)下等の条件下で数日～30日間(好ましくは5日間程度～20日間程度)静置又は振盪(10～200rpm、好ましくは30～50rpm)培養により行われる。

また、共培養において、所定の暗黒期間を設けることで、培養コストを削減することができる。例えば、照明12時間間隔(すなわち、明/暗(12時間/12時間)サイクル)条件下で共培養を行うことができる。

さらに、共培養後、共培養物を乾燥ストレス(例えば、培地液体の自然乾燥)下で更に培養することで、光合成微生物自身でもバイオ燃料の生産が可能となる。当該培養は、上述の共培養条件に準じた条件下で数日～数十日間(好ましくは2週間程度～2ヶ月間程度)静置培養により行われる。

以上に説明した本方法によれば、炭化水素(アルカン)等のバイオ燃料を高収量で生産することができる。例えば、共培養物を酢酸エチル等の溶媒抽出に供することで、バイオ燃料を回収することができる。また、MCM S系で連続的にヘプタデカン等を液体燃料と

10

20

30

40

50

して回収し、その後、培養の最後は共培養物を乾燥させると、乾燥菌体を固形燃料として使用でき、経済的にコスト安な燃料製造法となる。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例 1】

【0008】

ハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株の分離・単離及び当該菌株の分類学的性質

1-1. SZ2菌株の分離

日本国静岡県修善寺市の道端石垣より数グラム（一塊）の試料を採取し、これをBG11液体培地と混ぜて1ヶ月程度静置培養して藻細胞の生育を促した。この藻細胞液からSZ2株細胞を混釈重層法（Nishizawaら2010年, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 27巻1827-1835頁）により分離し、BG11寒天培地へ塗抹し、30（白色蛍光灯下）で培養した。寒天培地上に生育したSZ2株細胞塊をかき取り、新しいBG11液体培地に移して継代培養した。以上により得られた分離株（ST1細胞含む）をSZ2と命名した。

10

1-2. SZ2菌株の生理学的性質

ハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株をBG11液体培地で30（白色蛍光灯下）で静置培養（一日一回程度の攪拌を行う）すると、1細胞当たりの長辺が約3~5µmの細胞が連なった糸状性細胞形態を示す。SZ2株は、さらに上記培養条件下で約2週間以上培養すると、PAS（Periodic acid-Schiff stain）染色で観察される中性多糖を菌体外に生産する。この多糖の生産が数ヶ月続くとSZ2株細胞塊の回りは、バイオフィームで覆われ肉眼でも顕著な特徴として観察される。

20

1-3. 16S rRNA遺伝子（16S rDNA）配列によるSZ2菌株の分類特定

SZ2株を優先種とする培養液より菌体を回収し、細胞全DNAを抽出して16S rDNA塩基配列（配列番号1:862塩基対）を解読した。この配列をQueryとして遺伝子DNAデータベースと総当たり検索をしたところ、2015年3月時点でシアノバクテリアHalomicronema属株数種の有する16S rDNAと92%以上の相同性を有していた。またコンピューター解析ソフトMEGA4（Tamuraら2007年, *Molecular Biology and Evolution*, 24巻1596-1599頁）により分子系統樹を作成すると、SZ2株が糸状性シアノバクテリアの一種Halomicronema属クラスターに位置付けされる新種藻であることが明らかとなった。

30

【実施例 2】

【0009】

シノリゾビウム・エスピーST1菌株の単離及び当該菌株の分類学的性質

2-1. ST1菌株の単離

実施例1において前述した混釈重層法により得られたSZ2分離株（ST1株細胞を含む）のBG11培養液から約10マイクロリットルを採取し、これをLB寒天培地にクロスストリークしながら塗り広げた。この寒天培地を30で数日間培養し、生育したST1のコロニーを単離した。以上により得られた単離（純化）株をST1と命名した。

40

2-2. ST1菌株の生理学的性質

LB培地あるいはLB寒天培地で生育させる温度は、通常30前後である（37培養で生育は認められない）。1細胞当たりの長辺は、約0.7~2µmの単細胞性である。

2-3. 16S rRNA遺伝子配列によるST1菌株の分類特定

ST1単離（純化）株より細胞全DNAを抽出し、16S rDNA塩基配列（配列番号2:1,475塩基対）を解読した。この配列をQueryとして遺伝子DNAデータベースと総当たり検索をしたところ、2015年3月時点でSinorhizobium属株数種の有する16S rDNAと99%以上の相同性を有していた。またコンピューター解析ソフトMEGA4（前述）により分子系統樹を作成すると、ST1株がシノリゾ

50

ビウムやリゾビウム属クラスターに位置付けされる新種株であることが明らかとなった。

【実施例 3】

【0010】

ハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株とシノリゾビウム・エスピーST1菌株との共培養（MCM5培養）によるバイオ燃料生産

3-1. SZ2菌株

図2は、SZ2菌株の顕微鏡写真（x 1,000：（A）光学顕微鏡観察、（B）蛍光顕微鏡観察）である。図2において、棒は10 μ mである。SZ2菌株を、BG11液体培地50mLを含有する100mL容三角フラスコで3週間振盪（100rpm）培養した。以上の条件下では、優先種はSZ2藻細胞であり、ST1細胞（矢印）等の共存菌は僅かに観察される程度であった。1細胞当たりの長辺は、SZ2菌株では約3~5 μ mであり、ST1菌株では約0.7~2 μ mであった。蛍光顕微鏡（励起460-495nm/放射510nm, オリンパスBX53/DP72）観察では、光合成微生物特有の自家蛍光が認められた。SZ2細胞の凝集体では、糸状性細胞の周りに多糖と思われる物質の蓄積が認められた。

10

3-2. SZ2菌株の糖生産

図3は、SZ2菌株の糖生産を示す写真である。

PAS染色（Periodic acid-Schiff stain）は、中性多糖類（グリコーゲン、キチン、ヘパリン、粘液タンパク質、糖タンパク質、糖脂質等）の検出法である。過ヨウ素酸はグルコース残基を選択的に酸化してアルデヒドを生成し、シッフ試薬によって赤紫色を呈す。

20

図3（A）：SZ2菌株をBG11液体培地で4週間静置培養した後、培養液1mLを回収して遠心し、藻菌体を集菌した。蒸留水で藻を洗浄後、再び遠心して蒸留水を捨てた。集菌細胞に0.5%（w/v）過ヨウ素酸（periodic acid, 和光純薬製）水溶液を300 μ L加え懸濁後、3分放置した。その後、過ヨウ素酸水溶液を遠心して捨てた。これに蒸留水を加え洗浄し、遠心して蒸留水を捨てた。シッフ試薬（Schiff's reagent, 和光純薬製）を加え、藻を懸濁した。13分放置後、シッフ試薬を遠心して捨てた。これを3回繰り返した後、蒸留水を加え洗浄し遠心して、顕微鏡観察の試料とした。これを光学顕微鏡（オリンパスBX53/DP72）観察した。細胞内、細胞外表面に多糖の蓄積が観察された（図3（A）において、棒は10 μ mである）。

30

図3（B）：図3（A）に示す試料を更に2ヶ月間静置培養した後、多糖を生産した細胞を塊ごとシャーレに移した時の様子を示す。SZ2細胞塊の周りの白いフィルム様部分が蓄積した多糖である。（図3（B）において、棒は1cmである）。

3-3. SZ2菌株とST1菌株共存下でのST1菌株による炭化水素生産

図4は、SZ2菌株とST1菌株共存下でのST1菌株による炭化水素生産を示す写真である。

ST1菌株が共存しているSZ2藻細胞をBG11培地で3週間培養後（図2）、培養液50mLを回収し遠心して、細胞塊を新たな窒素欠乏BG11₀液体培地50mL（100mL用三角フラスコ内）へ移植した。BG11₀液体培地には炭素源の補強として、予め最終濃度10mMになるように酢酸ナトリウム（pH7.0）を添加しておいた。以上の培地を通常大気中で白色蛍光灯照射下（30 μ mol photons/m²/s¹）で10日間静置培養した後、液体培地1mLを回収した。炭化水素の蓄積を確認するため、Nile Red（和光純薬）を最終濃度10 μ Mになるよう培地に添加し細胞を染色し、これを光学顕微鏡（図4（A））並びに蛍光顕微鏡（励起460-495nm/放射510nm, 図4（B））で観察した。

40

光学顕微鏡観察の結果、窒素欠乏条件下で培養すると糸状性SZ2藻細胞を取り囲むようにしてST1細胞の増殖が認められた。これによりSZ2細胞とST1細胞の比率は、BG11培地での培養では圧倒的にSZ2細胞が優先種で占められているのに対し、BG11₀培地では相対的にST1細胞が増加していることが明らかとなった。一方、蛍光顕微鏡観察の結果、ST1細胞内に顕著な炭化水素の蓄積が認められた（図4（A）及び（

50

B)において、棒は10 μmである)。

3-4. 炭化水素生産におけるSZ2菌株とST1菌株の相性

SZ2株培養液より単離純化したST1株細胞の培養液を3種類のシアノバクテリア藻培養液に添加混合し、ST1株の相手となる藻細胞と「共培養」することにより、ST1株による炭化水素生産における相手藻細胞の相性を検証した。

結果を図5に示す。使用したシアノバクテリア3種のうち、SZ2株以外の2種はそれぞれ純化株を用いた。3週間BG11培地で前培養した各種藻細胞液50 mLに相当する菌体を遠心回収し、第3-3節で説明したBG11₀液体培地(酢酸ナトリウム=酢酸Na添加)へ懸濁した。これに予め一晚LB液体培地で培養(30、110 rpm振盪培養)したST1細胞培養液1 mL (OD₆₆₀ = 2)を遠心分離して集菌した量に相当する湿潤菌体を直接とって、上記50 mL BG11₀液体培地へ移植した。これを第3-3節で記述したように大気中(0.04% CO₂ガス含む)で5日間静置培養した。その後、細胞をNile Red染色して蛍光顕微鏡観察を行った。

その結果、BG11液体培地を使用してST1株と各種藻を共培養した場合は、いずれの共培養下でも炭化水素生産は殆ど認められなかった。一方、BG11₀(窒素源欠乏)培地で共培養した場合、ST1株による炭化水素生産量は、SZ2株 > PCC6803株 > ABRG5-3株との共培養の順に高かった。この結果から、ST1株による炭化水素生産時に共存させる相手藻に関しては特異性が認められ、元々自然界から分離された時のST1株と共存するSZ2藻との相性が一番良い事が明らかとなった。

図5において略語は以下を示す：SZ2, *Halomicronema* sp. SZ2; PCC6803, *Synechocystis* sp. PCC6803 (パスツール研究所(仏国, パリ)保存株; かずさDNA研究所(千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7)より分譲); ABRG5-3, *Limnothrix/Pseudanabaena* sp. ABRG5-3 (FERM P-22172; 特開2013-198473号公報)。また、図5において、棒は10 μmである。さらに、図5において、ST1株による炭化水素(油)生産の有無：有, +; 無, -。

3-5. 炭化水素生産における培地組成条件

SZ2株とST1株の菌体組み合わせ、培地中の窒素源の有無並びに酢酸ナトリウム(酢酸Na, 最終濃度10 mM)添加の有無について、第3-4節に示す培養条件により飼育した菌体をNile Redにより染色し、ST1株の炭化水素生産における培地組成条件について検証した。

結果を図6に示す。先ず、ST1細胞が炭化水素を一番効率良く生産する条件としては、SZ2藻細胞との共培養(MS: Mixed-Species)で窒素欠乏(BG11₀培地使用)条件下且つ培地に炭素源の補強剤として酢酸ナトリウムを添加した場合であった(図6上段左)。この組み合わせより培地を窒素欠乏にしなければ(BG11培地使用)、ST1細胞の炭化水素の顕著な蓄積は認められなかった(図6上段右)。このことは、ST1細胞の効率的な炭化水素生産にはSZ2藻細胞との共培養が有効であり、且つ窒素源欠乏培地で培養することが必須ということが明らかとなった。

次に、単離純化されたST1株のみを用いて同様の実験を行ったところ、窒素源欠乏培地で酢酸ナトリウムを添加した場合は、ST1株単独培養(UCUS: Uni-Culture Uni-Species)でも炭化水素を生産していた(図6中段左)。しかしながら、その生産量は、SZ2株と共培養した場合に比べて低かった。また酢酸ナトリウムを添加していても、培地が窒素欠乏になっていなければST1株の炭化水素生産は認められなかった(図6中段右)。

以上により、ST1株の炭化水素生産は、炭素源を供給し、且つ窒素源を欠乏した場合に限り可能なことが示唆された。従って、SZ2藻細胞との共培養では、SZ2藻細胞表面に生産された多糖をST1株が炭素源として利用し、炭化水素生産の効率を高めている(図6上段左)のではないかと推察された。ST1細胞の炭化水素生産に炭素源が必要な事は、単離純化したST1細胞のみを培養した場合、窒素欠乏の有無にかかわらず、培地へ炭素源となる酢酸ナトリウムを添加しなければ、生産が認められない事と矛盾しない(

10

20

30

40

50

図6下段左右)。

なお、図6において、棒は10 μ mである。また、図6において、ST1株による炭化水素(油)生産の有無：有，+；無，-。

3-6. MCM S培養による5L規模のバイオ燃料生産

SZ2株とST1株との共培養によるバイオ燃料生産の実用化に向けた基盤技術を確立するため更に、(1)5リットル(5L)規模でのMCM S培養技術、(2)MCM S培養により生産される油の成分について検証した。(1)に関しては、特に経費軽減のため、BG11₀培地作製には滅菌水の代わりに蒸留水を使用し、照明も12時間(12h)間隔の暗黒を設けることとした。以下に、培養と燃料成分分析について記述する。

藻株には本来ST1株が共存しているが、予め培養したSZ2株培養液に単離したST1株培養液を所定の濃度で添加することにより、炭化水素を蓄積生産することが可能であることは図5で示されている。MCM S培養に関しては、一ヶ月間BG11液体培地(無機物培地)で培養したSZ2藻株培養液1Lに対し、単離純化したST1株をLB液体培地(有機物培地)に接種し一晚30 \times で振盪培養(110rpm)したST1細胞(OD₆₆₀ 2)0.2Lを混合し、この1.2L混合種液を新しいBG11₀液体培地3.8L(滅菌処理はしていない蒸留水をベースに作製)へ移した(培地総量5LのMCM S培地に対し、10mMとなるよう酢酸ナトリウムを添加)。培養装置は、厚さ2mmの箱型プラスチック容器(縦20cm \times 横12cm \times 高さ16cm)であった。これに0.5%二酸化炭素ガス(15L/min)をシリコンチューブで供給した。この培地を、白色蛍光灯(30 μ mol photons/秒/m²)下、明暗(12h/12h)サイクル条件で19日間培養した。

培養後、培養液50mLを回収し、遠心により菌体を集めた。以後、酢酸エチルを用いて回収菌体から炭化水素を回収し(特開2013-198473号公報参照)、そのうち一部の試料をとってGC-MS分析に供した(特開2013-198473号公報参照)。

結果を図7に示す。上記試料液中に内標準物質(対照区)として最終濃度20ppmになるよう調製して添加されたエイコサン(C₂₀H₄₂)のピーク(retention time = 18.18min)に対し、アルカン(ヘプタデカン、C₁₇H₃₆)を示すretention time(14.60min)にメジャーなピークが観察された。このピーク面積と内標準物質のピーク面積との比[relative value(%)] = (value of C₁₇H₃₆ / value of C₂₀H₄₂) \times 100%は122%であり、これより計算されたSZ2+ST1細胞乾燥重量当たり占有するヘプタデカンの生産量は約5%であった。これに別の燃料物質と思われるマイナーなピークが幾つか観察され、これらを足し合わせると細胞乾燥重量当たり~約10%のバイオ燃料の生産量が確認された。乾燥重量当たりのヘプタデカンを含む燃料の生産量を10%とし、1トン規模のMCM S液体培地からの生産量を試算すると0.1kgのバイオ燃料生産量に相当する。ヘプタデカンは軽油相当であるので、1%燃料に混ぜる場合には約5~10Lの燃料としてトラック等の走行に使用可能と考えられる。

以上により、5L規模MCM S培養によりバイオ燃料アルカンを生産するに至った。培地の大部分を占めるBG11₀は未滅菌の蒸留水を用いたことからその分、経費軽減が達成された。また、その培養条件下では、SZ2株とST1株の両者が常に培養液中で優先種であった。更に、培地には0.5%(大気中の12.5倍)二酸化炭素ガスを培地に供給することにより、温室効果ガスの有効利用も期待された。一方、BG11₀(無機物培地)へのLB培地(有機物培地)の混合(=MC、Mixed Culture)では、12時間間隔の暗黒を入れながらもSZ2+ST1混合種(=MS、Mixed Species)培養でも燃料生産が成立する事から、これも培養経費軽減に繋がるものとして多いに期待された。

3-7. 燃料蓄積の経時変化

第3-6節に示したMCM S培養条件下でのバイオ燃料の経時的な蓄積に関して検証し、その結果を図8に示す。

10

20

30

40

50

図 8 において、グラフの横軸は培養日数を、縦軸は内標準物質であるエイコサン（最終濃度 20 ppm）に対するヘプタデカンの生産量の相対値 [relative value (%) = (value of C₁₇H₃₆ / value of C₂₀H₄₂) × 100%] を示す。また、白抜き丸のグラフは集菌細胞内のヘプタデカン蓄積量を示し、黒塗りの菱形のグラフはその時の細胞上澄液（培養液）に含まれるヘプタデカン量である。これにより 12 日目では 37%、17 日目では 133%、22 日目では 79% の蓄積率を示した。以上により、5 L 規模での MCM S 培養では、第 3 - 6 節に示した培養装置と培養条件下では、17 日前後でバイオ燃料の蓄積が良く、その辺りの時期が回収に適していることが明らかとなった。

3 - 8 . S Z 2 菌株と S T 1 菌株の混合比と燃料生産量

第 3 - 4 節に示す培地と培養条件を以下のように変更して試験した。2 ヶ月間 B G 1 1 培地で前培養した S Z 2 藻細胞液 50 mL に相当する菌体を遠心回収し、B G 1 1₀ 液体培地（酢酸ナトリウム添加）へ懸濁した。これに予め一晚 L B 液体培地で培養（30、110 rpm 振盪培養）した S T 1 細胞培養液 5 mL（OD₆₆₀ = 2）を遠心分離して集菌した量に相当する湿潤菌体を直接とって上記 50 mL B G 1 1₀ 液体培地へ移植した。これを S Z 2 量 : S T 1 量 = 1 : 1 とした。例えば、S Z 2 量 : S T 1 量 = 1 : 2 の場合は、上記 S T 1 細胞培養液 10 mL（OD₆₆₀ = 2）を遠心分離し集菌した。以上を 2% CO₂ ガス濃度に制御された培養インキュベーター内（12 h - 明 / 12 h - 暗）でレシプロ式振盪（40 rpm）しながら 5 日間培養した。培養後は、菌体を遠心して回収し、第 3 - 6 節と第 3 - 7 節で記述した方法により試料を調製し、GC - MS 分析によ

ってヘプタデカンの生産量を測定した。なお、単離純化した S T 1 株を培地に添加しない場合、生産されるヘプタデカンの量を値 100 とした。

結果を図 9 (A) に示す。なお、図 9 (A) において、縦軸は、内標準物質として添加したエイコサン（20 ppm）に対して生産されたヘプタデカンの生産量の相対値を示し、また、横軸は、S Z 2 株（50 mL に相当する菌体量）に添加した S T 1 株量（培養液 X mL を遠心して集菌し、これを S Z 2 培養液に添加）を示す。

図 9 (A) に示すように、濃度一定（20 ppm）で添加している内標準物質に対する相対的なヘプタデカンの合成量を調べたところ、S Z 2 量 : S T 1 量 = 1 : 1 の比率（50 mL S Z 2 培養液に対し 5 mL の S T 1 培養液に相当）で混合した場合が、最大の生産量（収穫率）を示した。これによりバイオ燃料を MCM S 培養系で生産させる場合、S Z 2 藻細胞培養液に添加する S T 1 細胞量にある特定の比率が有効であることが明らかとなった。

3 - 9 . 糖添加培地 / 明暗条件での油生産

MCM S 培養において培地に外部から糖（有機物）を添加し、暗黒 12 時間を含む（培養時の電力の節約に繋がる）12 h - 明 / 12 h - 暗（12 時間ずつ明暗）培養条件下での油生産量を検証した。

図 9 (A) に示す結果から、S Z 2 量（50 mL からの菌体量に相当） : S T 1 量（5 mL からの菌体量に相当） = 1 : 1、あるいは S T 1 株のみ（5 mL からの菌体量に相当）に設定し、第 3 - 8 節に示す培地と条件で培養する際、グルコース（Glucose = Glc）を所定の濃度で添加した。培養後は、菌体を遠心して回収し、第 3 - 6 ~ 3 - 8 節で記述した方法により試料を調製し、GC - MS 分析によってヘプタデカンの生産量を測定した。なお糖無添加の場合、生産されるヘプタデカンの量を値 100 とした。

結果を図 9 (B) 及び (C) に示す。なお、図 9 (B) 及び (C) において、縦軸は、内標準物質として添加したエイコサン（20 ppm）に対して生産されたヘプタデカンの生産量の相対値を示し、また、横軸は、培地へのグルコース（Glc）添加量（最終濃度）を示す。

図 9 (B) に示すように、濃度一定（20 ppm）で添加している内標準物質に対する相対的なヘプタデカンの合成量を調べたところ、S Z 2 + S T 1 混合培養系においては、糖無添加の場合と比較して、ブドウ糖を最終濃度で 0.5 mM 添加した明暗培養条件下で約 1.5 倍増加を示した。以上により MCM S 培養では、S Z 2 藻が生産する多糖に加え、

10

20

30

40

50

培地の外から添加する糖も燃料生産量を向上させる一因となり、且つ暗黒（照明電力の軽減に繋がる）を取り入れながら従属栄養条件下でも燃料生産が可能であることが実証された。

さらに、図9（C）に示すように、上記の培養条件下で、純化したST1株のみの培地（ST1単一培養系）にグルコースを添加した場合、同様に最終濃度0.5mMの時にヘプタデカン生産量が無添加の約1.6倍となった。また糖添加量と生産されるヘプタデカン生産量との関係は、SZ2+ST1混合培養系とST1単一培養系で似ていた。この結果は、SZ2+ST1混合培養系で主にヘプタデカンを生産しているのは、ST1細胞の方であるとする図4～7の結果を強く支持するものであった。またST1株単独でも窒素源欠乏培地に炭素源（酢酸Na）が添加されれば、炭化水素（ヘプタデカン）の蓄積量が増加するという図6の結果と矛盾しない。

以上により、MCMSC培養系においては、BG11培地で生育した50mL相当に対するSZ2株の液体培地（ST1株が潜在的に共存している）にLB培地で予め培養したST1株を5mL（SZ2培養液の10分の1に相当する菌体量）を添加し、これに有機物栄養源として酢酸Naを10mM、糖源としてグルコースを0.5mM程度で同時に混ぜ、さらに窒素欠乏培地で2%炭酸ガスを供給すると、共存菌であるST1株から昼夜（明暗）を問わず、ヘプタデカン油を効率良く生産する新技術が確立された。

3-10. 乾燥ストレスによるSZ2藻の油生産

図9（B）の試験後、綿栓付フラスコ内のSZ2+ST1菌体培養液から1週間ほど培養した菌体を回収し、顕微鏡観察を行い、炭化水素生産を確認した（図10の上段）。一方、SZ2（+ST1）藻を含む培養液を2ヶ月程度静置し、綿栓付フラスコ内の培地液体の自然乾燥を促した。その後、ほんの少しだけ水分を含んだ乾燥菌体を同様に顕微鏡観察した（図10の下段）。顕微鏡観察では、培養液（あるいは自然乾燥した菌体に少量のBG11₀培地を添加して混ぜた後）に蛍光染色剤Nile Redを最終濃度10μMになるように添加した。数分間放置後、菌体を遠心により集め、これを蛍光顕微鏡（OLYMPUS BX53/DP72）で観察した（図10において、棒は10μmである）。図10において、左列は光学フィルター（BF）で観察した結果であり、右列は青色蛍光フィルター（BW）で観察した結果である。図10中株名の太字は、その条件下で油を主に蓄積している菌体を示す。

Nile Red染色による蛍光顕微鏡観察では、図10の上段ではST1が、下段でSZ2細胞が優先して黄色に光って見え、油の蓄積が伺えた。

以上の結果、通常のMCMSC培養条件ではST1菌株が炭化水素生産を優先して行うが、乾燥ストレスはSZ2藻自身による油の生産を可能にすることが明らかとなった。

それ故、乾燥ストレスによりSZ2藻内に蓄積された油成分をFID（Flame Ionization Detector, 水素炎イオン化型検出器）により分析した。その結果を図11に示す。

図11（A）は、図10の下段に示したSZ2藻細胞内油組成をFIDにより分析した結果を示す。上3段は脂肪酸並びにヘプタデカンの内標準を供した。4段目は、SZ2株が優先種の試料をFID分析した結果である。検出されたバイオ燃料を「*」で示した。

図11（B）は、パネルAの結果より検出された脂肪酸並びにヘプタデカン（バイオ燃料）の蓄積量を相対値（%）で示した。

以上の結果、乾燥ストレス下のSZ2藻では、C16やC18の脂肪酸メチルエステル化合物及びヘプタデカン（C₁₇H₃₆）等バイオ燃料が検出された。

以上、本願によりMCMSC培養系でST1による効率の良い燃料の生産が可能である。更にMCMSC培養後、乾燥ストレスによりSZ2藻自身でもバイオ燃料の生産が可能である。実用化を考えると、MCMSC系で連続的にヘプタデカン等を液体燃料として回収し、その後、培養の最後はSZ2（+ST1）を乾燥させると、固形燃料として使用できる可能性があり、経済的にコスト安な燃料製造法となりえる。

【産業上の利用可能性】

【0011】

10

20

30

40

50

本発明によれば、炭化水素（アルカン）等のバイオ燃料を高収量で生産することができる。

【受託番号】

【0012】

N I T E B P - 0 1 9 8 2

N I T E B P - 0 1 9 8 1

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

- <110> Ibaraki University
- <120> Technique for Producing Biofuel with Mixed-Culture Mixed Species
Culturing
- <130> PH-6495-PCT 10
- <150> JP 2015-043817
- <151> 2015-03-05
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1 20
- <211> 862
- <212> DNA
- <213> Halomicronema sp. strain SZ2
- <400> 1
- agtttgatcc tggctcagaa tcaacgetgg cggegtgcct cacacatgca agtcgaacgg 60
- actcttcgga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtga ggatctgccc ttaggatggg 120 30
- gacaacgact ggaaaeggte getaataccc gatgtgccgg aaggtgaaag ctttagcgcc 180
- tgaggatgaa ctgcgctctg attagctagt tggtgaggta agggctcacc aaggcgacga 240
- tcagtagctg gtctgagagg atgacagcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc 300
- tacgggagcg agcagtgggg aattttccgc aatgggcgaa agcctgacgg agcaacgcc 360 40
- cgtgagggaa gaatgcctgt gggttgtaaa cctcttttct cagggaagaa gaactgacgg 420
- tacctgagga atcagcateg getaactccg tgccagcagc cgeggttaata cggaggatgc 480
- aagcgttatc cggaattatt gggcgtaaag cgtccgtagg cggtttttca agtctgctgt 540
- taaagcgtgc agcttaactg catataggca ggggaaactg agagactaga gtgtagtagg 600

ggtagagggga attceccagtg tagcgggtgaa atgcgtagat attgggaaga acaccgggtgg	660	
cgaaagecgt ctactgggct acaactgacg ctgatggacg aaagctaggg gagcgaaagg	720	
gattagatac cctgtagtc ctagecgtaa acgatggaca ctaggtgttg accgtatcga	780	
cccggtcagt gccgtagcca acgcgttaag tgteccgcct ggggagtacg ctgcgaagag	840	
tgaaactcaa aggaattgac gg	862	10
<210> 2		
<211> 1475		
<212> DNA		
<213> Sinorhizobium sp. strain ST1		
<400> 2		20
agtttgatcc tggetcagaa cgaacgctgg cggcaggett aacacatgca agtcgagcgc	60	
cccgaaggg gagcggcaga cgggtgagta acgcgtggga atctaccctt ttctacggaa	120	
taacgcaggg aaacttgtgc taatacegta tacgcccttc gggggaaaga tttatcggga	180	
aaggatgagc ccgcgttga ttagctagtt ggtggggtaa aggcctacca aggcgacgat	240	
ccatagetgg tctgagagga tgatcagcca cattgggaact gagacaeggc ccaaactcct	300	30
acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgcaa gccctgateca gccatgcegc	360	
gtgagtgatg aaggecctag ggttgtaaag ctctttcacc ggtgaagata atgacggtaa	420	
ccggagaaga ageccccgct aacttcgtgc cagcagccgc ggtaatacga agggggctag	480	
cgttgttcgg aattactggg cgtaaagcgc acgtagcgg acatttaagt caggggtgaa	540	
atccccgggc teaaccccg aactgccttt gatactgggt gtctagagta tggaagaggt	600	
gagtggaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt cggaggaaca ccagtggcga	660	
aggcggetca ctggtccatt actgacgctg aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat	720	
tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgaatgta gccgtcgggc agtttactgt	780	40

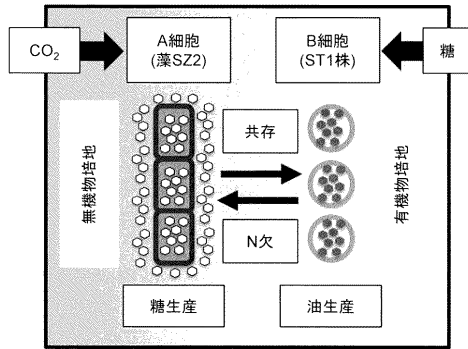
tcggtggcgc agctaacgca ttaaaccattc cgectgggga gtacggtcgc aagattaana	840
ctcaaaggaa ttgaeggagg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttogaagcaa	900
cgcgagaaac cttaccagcc cttgacatcc cgatcgcgga ttaeggagac gttttecttc	960
agttcggtcg gatcggagac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt	1020
tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct cgcccttagt tgccagcatt tagttgggca	1080
ctctaagggg actgcccgtg ataagccgag aggaaggtgg ggatgacgc aagtcctcat	1140
ggcccttaag ggcctgggcta caacgtgct acaatggtgg tgacagtggg cagcgagacc	1200
gcgaggtcga gctaatctcc aaaagccatc tcagttcgga ttgcactctg caactcgagt	1260
gcatgaagtt ggaategcta gtaatcgag atcagcatgc tgcggtgaat acgttcccgg	1320
gccttgata caaccgctt cacaccatgg gacttggctt taccggaagg tagtgcgcta	1380
accgcaagga ggcagctaac cacgtaggg tcagcgactg gggatgaagtc gtaacaaggt	1440
agccgtaggg gaacctgagg ctggatcacc tcctt	1475

10

20

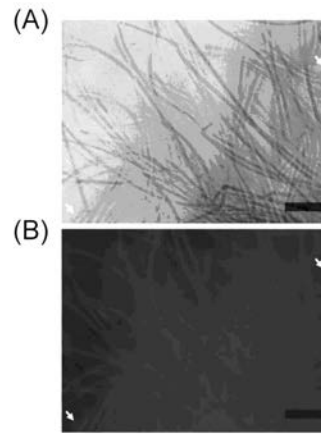
【 図 1 】

図 1



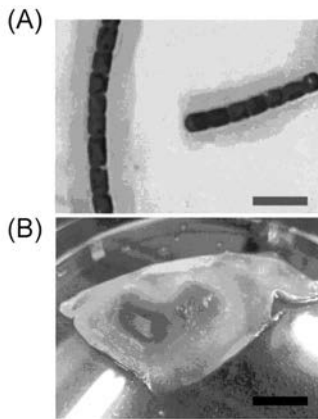
【 図 2 】

図 2



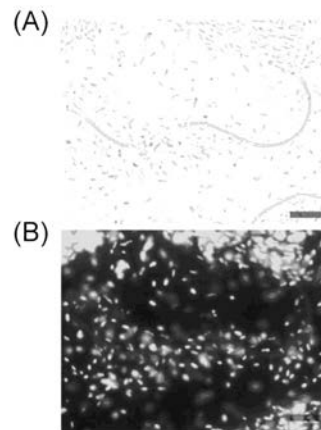
【 図 3 】

図 3



【 図 4 】

図 4



【 図 5 】

図 5

藻株名	培地 BG110 (-N)	ST1 油生産	培地 BG11 (+N)	ST1 油生産
ABRG5-3		+/-		-
PCC6803		++		-
SZ2		+++		+/-

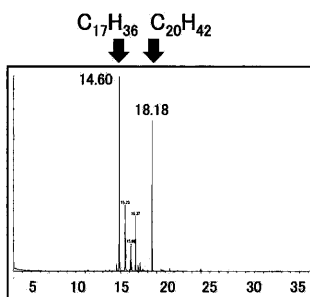
【 図 6 】

図 6

菌株名 (酢酸Na 添加の有無)	培地 BG110 (-N)	ST1 油生産	培地 BG11 (+N)	ST1 油生産
SZ2 + ST1 (+ 酢酸Na)		+++		+/-
ST1 (+ 酢酸Na)		+		-
ST1 (- 酢酸Na)		-		-

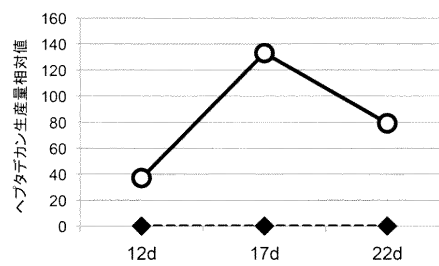
【 図 7 】

図 7

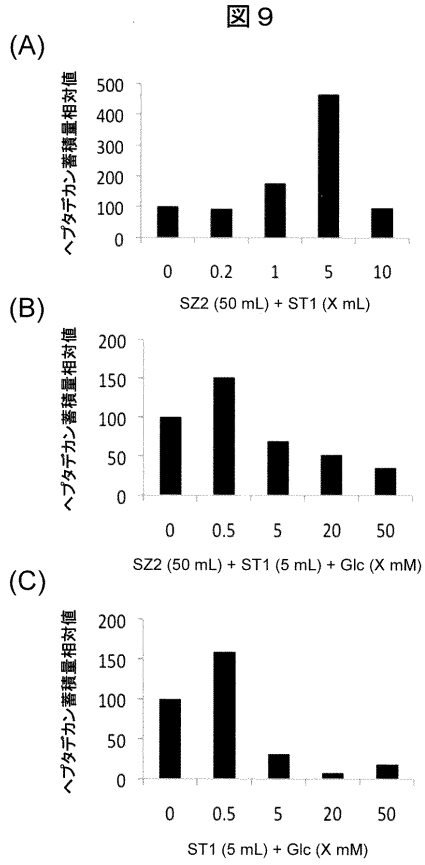


【 図 8 】

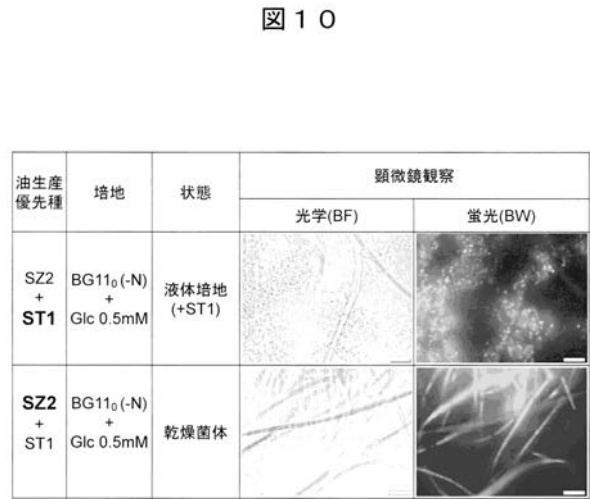
図 8



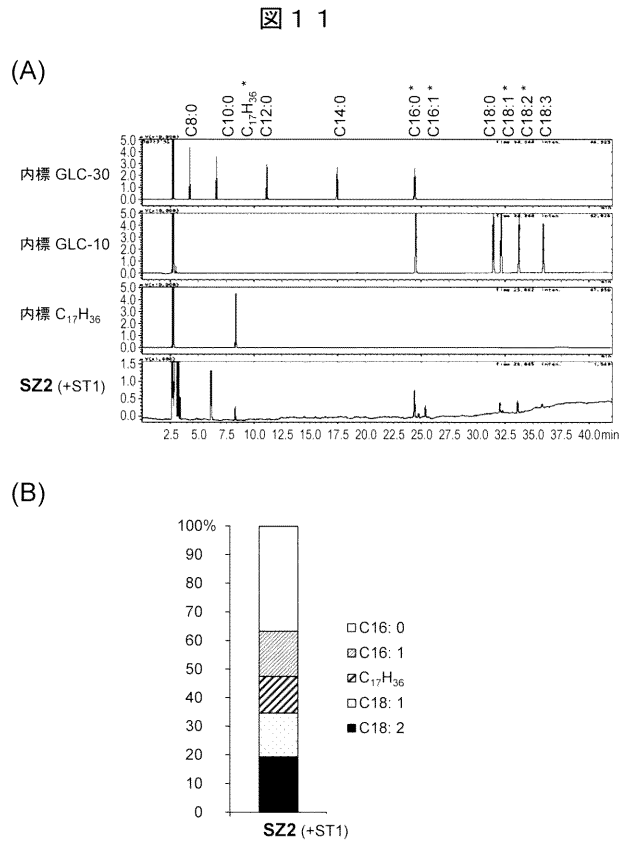
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【手続補正書】

【提出日】平成28年7月19日(2016.7.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

受託番号NITE BP-01982で特定されるハロミクロネマ・エスピー(Halomicronema sp.)SZ2菌株又は糖生産能を有するその変異株と受託番号NITE BP-01981で特定されるシノリゾビウム・エスピー(Sinorhizobium sp.)ST1菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株とを含む混合微生物を、窒素源欠乏培地において共培養することを含む、ヘプタデカンの製造方法。

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

(削除)

【請求項5】

(削除)

【請求項6】

培地が無機物培地と有機物培地とをさらに含有する、請求項1記載の方法。

【請求項7】

培地が炭素源をさらに含有する、請求項1又は6記載の方法。

【請求項8】

炭素源が酢酸ナトリウムである、請求項7記載の方法。

【請求項9】

培地が糖源をさらに含有する、請求項1及び6～8のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】

糖源がグルコースである、請求項9記載の方法。

【請求項11】

共培養において所定の暗黒期間を設ける、請求項1及び6～10のいずれか1項記載の方法。

【請求項12】

(削除)

【請求項13】

(削除)

【請求項14】

(削除)

【請求項15】

(削除)

【請求項16】

受託番号NITE BP-01981で特定されるシノリゾビウム・エスピーST1菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株。

【請求項17】

受託番号NITE BP-01982で特定されるハロミクロネマ・エスピーSZ2菌株又は糖生産能を有するその変異株と受託番号NITE BP-01981で特定されるシノリゾビウム・エスピーST1菌株又は短鎖アルカン生産能を有するその変異株とを含

む混合微生物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/057691
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P5/02(2006.01)i, C12N1/12(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12R1/01 (2006.01)n 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) C12P5/02, C12N1/12, C12N1/20, C12R1/01 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPI (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	ORTIZ-MARQUEZ J.C. et al., Association with an ammonium-excreting bacterium allows diazotrophic culture of oil-rich eukaryotic microalgae., Appl. Environ. Microbiol., 78(7)(2012), p.2345-2352, ISSN: 0099-2240 particularly, abstract, Fig. 3&4	1, 6, 7, 9, 10/ 1-15/16, 17
X/Y/A	WO 2008/130437 A2 (ARIZONA BOARD OF REGENTS FOR AND ON BEHALF OF ARIZONA STATE UNIVERSITY), 30 October 2008 (30.10.2008), & JP 2010-507369 A & US 2011/0053216 A1 & EP 2087096 A4 particularly, paragraphs [0056], [0057]	15/1-15/16, 17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 08 April 2016 (08.04.16)		Date of mailing of the international search report 26 April 2016 (26.04.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057691

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	YAMANE K. et al., Anaerobic coculture of microalgae with Thermosipho globiformans and Methanocaldococcus jannaschii at 68°C enhances generation of n-alkane-rich biofuels after pyrolysis., Appl. Environ. Microbiol., 79(3)(2013), p.924-930, ISSN: 0099-2240, particularly, abstract, TABLE 2&3	1-15/16,17
Y/A	Tadashi TOYAMA et al., "Sinorhizobium sp.SP4 enhances photosynthesis, biomass production and nutrient uptake of duckweed", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, vol.65th(2013), page 67, 1P-200, particularly, "Method and Result"	1-15/16,17
Y/A	JP 2013-198473 A (Ibaraki University), 03 October 2013 (03.10.2013), & JP 2015-109828 A particularly, paragraph [0107]	1-15/16,17
Y/A	JP 2014-14284 A (Hitachi, Ltd.), 30 January 2014 (30.01.2014), particularly, paragraphs [0008], [0016]; examples (Family: none)	1-15/16,17
PY/PA	Toru OKUBO et al., "Kanso Baiyo ni yoru Kisei Bisai Sorui Coccomyxa sp. o Mochiita Oil Seisan no Kento", The 17th Japanese Society for Marine Biotechnology Taikai Koen Yoshishu, vol.17 (30 May 2015 (30.5..2015)), P-B-30, particularly, "Results and Study"	1-15/16,17
A	LIANGQI Z. et al., Synthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) by a Sinorhizobium fredii strain., Lett. Appl. Microbiol., 42(2006), p.344-349, ISSN: 0266-8254	1-17
A	TIBBLES B.J. et al., Characterization of nitrogen-fixing bacteria from a temperate saltmarsh lagoon, including isolates that produce ethane from acetylene., Microb. Ecol., 27(1994), p.65-80, ISSN: 0095-3628	1-17

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 7 6 9 1													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P5/02(2006.01)i, C12N1/12(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12R1/01(2006.01)n															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P5/02, C12N1/12, C12N1/20, C12R1/01															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2016年														
日本国実用新案登録公報	1996-2016年														
日本国登録実用新案公報	1994-2016年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPI (STN)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
X/Y/A	ORTIZ-MARQUEZ J.C. et al., Association with an ammonium-excreting bacterium allows diazotrophic culture of oil-rich eukaryotic microalgae., Appl. Environ. Microbiol., 78(7)(2012), p.2345-2352, ISSN: 0099-2240 特に、要約、Fig.3&4	1, 6, 7, 9, 10/ 1-15/16, 17													
X/Y/A	WO 2008/130437 A2 (ARIZONA BOARD OF REGENTS FOR AND ON BEHALF OF ARIZONA STATE UNIVERSITY) 2008. 10. 30, & JP 2010-507369 A & US 2011/0053216 A1 & EP 2087096 A4, 特に、【0056】、【0057】	15/1-15/16, 17													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 08.04.2016		国際調査報告の発送日 26.04.2016													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 宮岡 真衣	4B 4044												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 7 6 9 1
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	YAMANE K. et al., Anaerobic coculture of microalgae with <i>Thermosiphoglobiformans</i> and <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> at 68° C enhances generation of n-alkane-rich biofuels after pyrolysis., <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 79(3) (2013), p.924-930, ISSN: 0099-2240, 特に、要約、TABLE 2&3	1-15/16, 17
Y/A	遠山 忠 他, <i>Sinorhizobium</i> sp.SP4 によるウキクサの光合成能力、バイオマス生産性と水質浄化機能の向上, 日本生物工学会大会講演要旨集, Vol. 65th(2013), p. 67, 1P-200, 特に、【方法・結果】	1-15/16, 17
Y/A	JP 2013-198473 A (国立大学法人茨城大学) 2013.10.03, & JP 2015-109828 A 特に、【0107】	1-15/16, 17
Y/A	JP 2014-14284 A (株式会社日立製作所) 2014.01.30, (ファミリーなし) 特に、【0008】、【0016】、実施例	1-15/16, 17
P Y / P A	大久保 亨 他, 乾燥培養における気生微細藻類 <i>Coccomyxa</i> sp. を用いたオイル生産の検討, 第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集, Vol. 17(2015.5.30), P-B-30, 特に、【結果および考察】	1-15/16, 17
A	LIANGQI Z. et al., Synthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) by a <i>Sinorhizobium fredii</i> strain, <i>Lett. Appl. Microbiol.</i> , 42(2006), p. 344-349, ISSN: 0266-8254	1-17
A	TIBBLES B.J. et al., Characterization of nitrogen-fixing bacteria from a temperate saltmarsh lagoon, including isolates that produce ethane from acetylene., <i>Microb. Ecol.</i> , 27(1994), p. 65-80, ISSN: 0095-3628	1-17

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(出願人による申告)平成24年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業個人型研究(さがけ)、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。