

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4822689号
(P4822689)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 M 1/00 (2006.01) C 1 2 M 1/00 Z
C 1 2 N 1/00 (2006.01) C 1 2 N 1/00 N

請求項の数 8 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2004-316316 (P2004-316316)	(73) 特許権者	591167430 株式会社 K R I
(22) 出願日	平成16年10月29日 (2004.10.29)		京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地
(65) 公開番号	特開2006-121998 (P2006-121998A)	(74) 代理人	100122471 弁理士 初井 孝文
(43) 公開日	平成18年5月18日 (2006.5.18)	(72) 発明者	藤井 泰久 京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地 京都 リサーチパーク 株式会社 K R I 内
審査請求日	平成19年10月26日 (2007.10.26)	(72) 発明者	市村 直也 京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地 京都 リサーチパーク 株式会社 K R I 内
		審査官	伊達 利奈

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物単離装置、微生物の単離方法および該方法で得られた微生物含有微粒子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それぞれがゲル化材料および所定の微生物を含む微生物供給液を含有する、少なくとも1つの微生物供給部と；

ゲル化開始成分を含み該微生物供給液と接触して微粒子を生成する接触液を含有する、接触液供給部と；

該少なくとも1つの微生物供給部からそれぞれ延び、該微生物供給液が通る少なくとも1つの微生物供給流路と；

該接触液供給部から延び、該接触液が通る接触液供給流路と；

該少なくとも1つの微生物供給流路と該接触液供給流路とが合流して形成され、該微生物供給液と該接触液とを接触させて微粒子を生成する、微粒子生成部とを備え、

該微生物供給流路の断面積に対する該接触液供給流路の断面積の比が 2 ~ 5 0 である、微生物含有微粒子製造装置。

【請求項 2】

ゲル化材料および所定の微生物を含む微生物供給液を含有する、1つの微生物供給部と；

ゲル化開始成分を含み該微生物供給液と接触して微粒子を生成する接触液を含有する、接触液供給部と；

該微生物供給部から延び、該微生物供給液が通る微生物供給流路と；

該接触液供給部から延び、該接触液が通る接触液供給流路と；

10

20

該微生物供給流路と該接触液供給流路とが合流して形成され、該微生物供給液と該接触液とを接触させて微粒子を生成する、微粒子生成部とを備え、

該微生物供給流路の断面積に対する該接触液供給流路の断面積の比が2～50である、請求項1に記載の微生物含有微粒子製造装置。

【請求項3】

前記生成される微粒子が、該微粒子内に微生物をそれぞれ実質的に1個だけ含む、請求項1または2に記載の微生物含有微粒子製造装置。

【請求項4】

請求項1または2に記載の微生物含有微粒子製造装置を用いる微生物含有微粒子の製造方法であって、

ゲル化材料および所定の微生物を含む微生物供給液を調製する工程と；

ゲル化開始成分を含み該微生物供給液と接触して微粒子を生成する接触液を調製する工程と；

該微生物供給液と該接触液とを接触させて微粒子を生成する工程とを含み、

該微生物供給液が通る微生物供給流路の断面積に対する該接触液が通る接触液供給流路の断面積の比が2～50である、

微生物含有微粒子の製造方法。

【請求項5】

前記生成される微粒子の体積が、0.5～500ピコリットルである、請求項4に記載の微生物含有微粒子の製造方法。

【請求項6】

前記生成される微粒子が、該微粒子内に微生物をそれぞれ実質的に1個だけ含む、請求項5に記載の微生物含有微粒子の製造方法。

【請求項7】

前記微生物供給液中における前記所定の微生物の濃度が、 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^9$ 個/mlである、請求項4から6のいずれかに記載の微生物含有微粒子の製造方法。

【請求項8】

前記所定の微生物が、真正細菌、古細菌、酵母および遺伝子組換え体からなる群から選択される少なくとも1つである、請求項4から7のいずれかに記載の微生物含有微粒子の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物単離装置、微生物の単離方法および該方法で得られた微生物含有微粒子に関する。より詳細には、本発明は、自然界に存在する微生物、特に生存するが培養困難な微生物を単離し得る微生物単離装置；多種類の微生物を個別に評価するために微生物を単離し得る微生物単離装置；および、微生物の単離方法；ならびに、そのような微生物を任意の個数、望ましくは実質的に1個だけ含有する微粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、自然界から微生物を分離し培養する方法として、平板培養法が広く知られている。平板培養法は、多種多様の微生物が混在する試料を平板培地（プレート）に播き、一定時間培養後プレート上に形成されたコロニーを単離することにより、微生物の単一コロニーまたは単一細胞を分離する方法である。平板培養法によれば、通常、単離した微生物（コロニー）の中から目的にかなった微生物が検索される。この平板培養法をベースとして様々な方法が開発され、それにより産業上有用な微生物が数多く分離され利用されている。

【0003】

10

20

30

40

50

1970年代後半になって、蛍光顕微鏡を用いる分離源中の全菌数計数法が確立された。このことにより、多種多様な微生物を計数する技術が開発されている。一方、自然界の分離源中の微生物に起因する生物活性を蛍光色素染色法で検出する技術が開発されている。これらの技術開発によって、上記の平板培養法では培養できない微生物が自然界に多く存在することが解明されてきている。すなわち、自然界には、通常の栄養培地で培養可能な微生物群と、生物活性を示すが培養困難な微生物群とが存在することが明らかになっている。このような生物活性を示すが培養困難な微生物群は、V B N C 状微生物（生きているが培養が困難な微生物）として知られるようになってきている。

【0004】

上記のようなV B N C 状微生物の中には、未知の微生物種（新種の微生物）の存在が想定され得る。さらに、深海などの極端な環境、またはヒト等の高等動物、昆虫、土壤原生動物もしくは海洋生物等の生物体内あるいは活性汚泥等の人工的環境中にも、未知の微生物種の存在が想定され得る。

10

【0005】

加えて、V B N C 状微生物は生きている細胞であるから、その中にはDNA遺伝子が存在している。したがって、V B N C 状微生物のDNA遺伝子の中には、未だ知られていない機能を有する未知の遺伝子が存在すると想定され得る。このような未知の遺伝子は、食品産業、医薬品産業、水質等の環境保全、医療等において有用となり得る可能性がある。

【0006】

しかし、上記のように、V B N C 状微生物は、平板培養法では培養できないので、このような微生物（場合によっては、その遺伝子）を単離することができない。

20

【0007】

このような問題を解決するために、通常の微生物とV B N C 状微生物が混在する微生物資源からV B N C 状微生物のみを分離する方法として、ゲルマイクロドロップ法と称する方法が提案されている（特許文献1参照）。この方法は、微生物を含む試料液を孔径約15 μmの多孔質膜を通過させ、W/Oエマルジョン化して直径約40 μmのゲル微粒子（ゲルマイクロドロップ）を形成する。このゲルマイクロドロップ集団を増殖環境下におく（特許文献1によれば、通常の微生物はゲル内で増殖しゲルは複数の細胞を含む一方で、V B N C 状微生物は増殖しないのでゲル内の細胞は1個のみであるとしている）。最後に、フローサイトメトリー法により、1個の微生物細胞を有するゲル微粒子（V B N C 化微生物）をセルソーターにより識別して分離する。このようにして、V B N C 状微生物が分離され得るとされている。

30

【0008】

しかし、この方法は、ゲル微粒子の生成に多孔質膜（いわゆる軽石状の孔構造を有する膜）を用いているので、得られる微粒子の粒径が非常に不均一である。さらに、孔の平均径が約15 μmと大きく、結果として得られる微粒子の平均径も直径約40 μmと大きい。その結果、1つの微粒子内に含まれる微生物（細胞）の数が不均一となり、分離の効率がきわめて不十分である。

【特許文献1】特開2000-197479号公報

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、上記従来の課題を解決するためになされたものであり、その目的とするところは、V B N C 状微生物および/または既知の微生物を非常に高い効率で単離し得る微生物単離装置および微生物の単離方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意検討した結果、所定の微生物を含む原料液体を流す微小流路にパルス状の圧力をかけ、当該原料液体を脈動させて微小流路の合流部に供給し、該合流部で瞬間的に物理的過程および/または化学的過程を起こさせて微粒子

50

を生成することにより上記目的を達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

本発明の微生物単離装置は、それぞれが所定の微生物を含む微生物供給液を含有する、少なくとも1つの微生物供給部と；該微生物供給液と接触して微粒子を生成する接触液を含有する、接触液供給部と；該少なくとも1つの微生物供給部からそれぞれ延び、該微生物供給液が通る少なくとも1つの微生物供給流路と；該接触液供給部から延び、該接触液が通る接触液供給流路と；該少なくとも1つの微生物供給流路と該接触液供給流路とが合流して形成され、該微生物供給液と該接触液とを接触させて微粒子を生成する、微粒子生成部とを備え、該生成される微粒子が、該微粒子内に該所定の微生物をそれぞれ所定の数だけ含む。

10

【0012】

好ましい実施形態においては、上記装置は、所定の微生物を含む微生物供給液を含有する、1つの微生物供給部と；該微生物供給液と接触して微粒子を生成する接触液を含有する、接触液供給部と；該微生物供給部から延び、該微生物供給液が通る微生物供給流路と；該接触液供給部から延び、該接触液が通る接触液供給流路と；該微生物供給流路と該接触液供給流路とが合流して形成され、該微生物供給液と該接触液とを接触させて微粒子を生成する、微粒子生成部とを備え、該生成される微粒子が、該微粒子内に該所定の微生物をそれぞれ所定の数だけ含む。

【0013】

別の好ましい実施形態においては、上記装置は、第1の微生物を含む第1の微生物供給液を含有する、第1の微生物供給部と；第2の微生物を含む第2の微生物供給液を含有する、第2の微生物供給部と；該第1および第2の微生物供給液と接触して微粒子を生成する接触液を含有する、接触液供給部と；該第1の微生物供給部から延び、該第1の微生物供給液が通る第1の微生物供給流路と；該第2の微生物供給部から延び、該第2の微生物供給液が通る第2の微生物供給流路と；該接触液供給部から延び、該接触液が通る接触液供給流路と；該第1および第2の微生物供給流路と該接触液供給流路とが合流して形成され、該第1および第2の微生物供給液と該接触液とを接触させて微粒子を生成する、微粒子生成部とを備え、該生成される微粒子が、該微粒子内に該所定の微生物をそれぞれ所定の数だけ含む。

20

【0014】

好ましい実施形態においては、上記生成される微粒子は、該微粒子内に微生物をそれぞれ実質的に1個だけ含む。

30

【0015】

好ましい実施形態においては、上記接触液供給流路は、上記微生物供給流路の断面積よりも大きい断面積を有する。

【0016】

本発明の別の局面によれば、微生物の単離方法が提供される。この方法は、所定の微生物を含む微生物供給液を調製する工程と；該微生物供給液と接触して微粒子を生成する接触液を調製する工程と；該微生物供給液と該接触液とを接触させて微粒子を生成する工程とを含み、該生成される微粒子が、該微粒子内に該所定の微生物をそれぞれ所定の数だけ含む。

40

【0017】

好ましい実施形態においては、上記生成される微粒子の体積は、0.5～500ピコリットルである。

【0018】

好ましい実施形態においては、上記微生物供給液はゲル化材料を含む。

【0019】

好ましい実施形態においては、上記微生物供給液中における上記所定の微生物の濃度は、 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^9$ 個/mlである。

【0020】

50

好ましい実施形態においては、上記接触液がゲル化開始成分を含む。

【0021】

好ましい実施形態においては、上記所定の微生物は、真正細菌、古細菌、酵母および遺伝子組換え体からなる群から選択される少なくとも1つである。

【0022】

本発明のさらに別の局面によれば、微生物含有微粒子が提供される。この微生物含有微粒子は、上記の方法で得られる。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、微小な領域で微量の微生物供給液を、当該微生物供給液と接触して微粒子を生成し得る接触液と接触させることにより、きわめて小さなサイズの微粒子を生成することができる。微生物供給液の濃度を調整することにより、上記微量の供給液中に実質的に1個の微生物を含有させることができる。したがって、生成される微粒子中に実質的に1個の微生物を含有させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明の好ましい実施形態について図面を参照して説明するが、本発明はこれらの実施形態には限定されない。

【0025】

A. 微生物単離装置

図1は、本発明の好ましい実施形態による微生物単離装置の全体的な構成を説明する概略斜視図である。簡単のため、図示例では単一の微生物供給部を有する場合について説明するが、本発明が2つ以上の微生物供給部を有する場合に適用され得ることはいうまでもない(2つ以上の微生物供給部を有する場合については、特徴的な部分のみを簡単に後述する)。図1の微生物単離装置100は、基板10上に形成された微生物供給部1aと、接触液供給部1bと、微生物供給部1aから延びる微生物供給流路2aと、接触液供給部1bから延びる接触液供給流路2bと、微生物供給流路2aと接触液供給流路2bとが合流して形成された微粒子生成部5とを備える。微生物供給部1aに含有された微生物供給液が微生物供給流路2aを通過して微粒子生成部5に供給される。同様に、接触液供給部1bに含有された接触液が接触液供給流路2bを通過して微粒子生成部5に供給される。微粒子生成部5において、微生物供給液と接触液との間に物理的過程および/または化学的過程を生じさせることにより、微粒子が生成される。物理的過程の代表例は相分離であり、化学的過程の代表例は化学反応(例えば、酸化、還元、塩の生成)である。なお、この装置における液体供給機構は、特開2003-220322号公報に記載の液体混合機構を応用したものであり、当該公報の開示は本明細書に参考として援用される。

【0026】

このような装置100の外形寸法は、代表的には、約25mm×30mm×0.5mmである。好ましくは、接触液供給流路2bは、微生物供給流路2aの断面積より大きい断面積を有する。このような構成を採用することにより、微生物供給液の1回ごとの供給量を非常に小さくすることができるので、結果として、微生物(細胞)を1個のみ含有する微粒子を生成できる確率が顕著に大きくなる。具体的には、微生物供給流路2aの幅は代表的には50~200μmであり、深さは代表的には30~120μmである。接触液供給流路2bの幅は代表的には100~500μmであり、深さは代表的には50~500μmである。微粒子生成部5は、実質的には接触液供給流路2bから連続的に延びており、その幅は代表的には100~500μmであり、深さは代表的には50~500μmである。微生物供給流路2aに対する接触液供給流路2bの断面積の比2b/2aは、好ましくは2~50である。好ましくは、微生物供給流路2aの幅は、接触液供給流路2bと合流する直前の部分において、狭くなっていることが望ましい。合流直前の微生物供給流路2aの幅は、代表的には10~50μmである。微生物供給流路2aはテーパ状に狭くなってもよく、段階的に狭くなってもよい。このような微小な領域で微量の微生物供

10

20

30

40

50

給液を接触液と接触させて微粒子を生成することが本発明の特徴の1つである。微量の微生物供給液を接触させることにより、従来は困難であったきわめて微小なサイズの粒子の製造が可能となる。その結果、微粒子に取り込まれる微生物（細胞）の数を非常に小さくする（代表的には、実質的に1個だけ取り込む）ことが可能となる。本発明においては、基板10は特に制限されず、任意の適切な基板が採用され得る。代表的には、シリコンウェハーが用いられる。基板10上の流路等の形成は、任意の適切な微細加工技術（例えば、フォトリソグラフィ）によって行われる。

【0027】

この装置100は、微生物供給流路2aおよび接触液供給流路2bにそれぞれ圧力発生機構3a、3bを有する。圧力発生機構としては、任意の適切な装置が採用され得、代表的には、マイクロポンプ（好ましくは、ディフューザー型マイクロポンプ）である。図2は、ディフューザー型マイクロポンプの流路方向の概略断面図である。マイクロポンプ3aは、ポンプ室31に対向する振動板32に、セラミック圧電材料であるPZT〔Pb(Zr, Ti)O₃〕33が貼り付けられてなる。PZT33は、駆動部34により駆動電圧が印加されるとポンプ室31側に湾曲し、ポンプ室31の容積が変動し、圧力が発生する。パルス状の駆動電圧を印加することにより、駆動電圧に対応したパルス状の圧力が発生する。圧力が発生すると、前後のディフューザー35、36の流路インピーダンスの差により原料液体が送液される。マイクロポンプ3bには一定の駆動電圧が印加され、当該駆動電圧に対応した一定圧力が発生し、その結果、一定量の接触液が連続的に供給され得る。接触液供給流路2bに一定量の接触液を連続的に流す手段としては、マイクロポンプ3bの代わりに、接触液供給部1bにシリンジポンプなどを接続してもよい。

【0028】

上記圧力のパルス形状は、目的に応じて適宜設定され得る。代表的には、当該パルス形状は、流路ごとに独立して設定され得る。具体的には、図3(a)に示すように、微生物供給流路2aには所定のパルス状圧力がかけられる。その結果、微生物供給液が間欠的に微粒子生成部に供給される。接触液供給流路2bについては、上記のようにおよび図3(a)に示すように、一定の圧力がかけられる。その結果、一定量の接触液が連続的に微粒子生成部に供給される。接触液供給流路2bに目的に応じて任意の適切なパルス状の圧力をかけて、接触液を微粒子生成部に間欠的に供給してもよいことは言うまでもない。

【0029】

特に好ましくは、上記圧力のパルス形状は、微生物供給液を微粒子生成部に供給する場合に対応する大きな圧力部分（液滴形成パルス）と該微生物供給液を該微粒子生成部に供給しない場合に対応する小さな圧力部分（逆流防止パルス）とを有する。すなわち、図3(b)に示すように、微生物供給液を微粒子生成部に供給しないときに小さな圧力（逆流防止パルス）を発生させる。このような小さな圧力を発生させることにより、微粒子生成部5から微生物供給流路2aへの逆流が防止できる。当該小さな圧力は、使用する微生物供給液の種類等に応じて適宜設定され得る。例えば、大きな圧力部分の圧力 P_L と小さな圧力部分の圧力 P_S との比 P_L/P_S は、 $1/2 \sim 1/100$ の範囲である。大きな圧力部分（液滴形成パルス）を発生させる印加電圧は、代表的には $5 \sim 40V$ であり、小さな圧力部分（逆流防止パルス）を発生させる印加電圧は、代表的には $1 \sim 10V$ である。本発明によれば、後述のように微生物供給液の供給の切り替え周期を非常に短くできるが、切り替え周期を短くすると逆流が起きやすく、微粒子生成の精度に非常に悪影響を与える。したがって、このような逆流防止手段を実現できたことは極微小なサイズの粒子の製造にとってきわめて重要であり、本発明の大きな成果の1つである。もちろん、図3に示すような形状以外に、目的に応じて任意の適切な形状のパルスを発生させることにより、微粒子生成部における微生物供給液の供給量および供給間隔を変更することが可能となる。

【0030】

図3(a)を参照して説明すると、上記パルスにおける液滴形成パルスSの周波数は、好ましくは $1 \sim 5kHz$ 、さらに好ましくは $8 \sim 13kHz$ である。パルスの切り替え周期は、好ましくは $10Hz \sim 10kHz$ 、さらに好ましくは $100Hz \sim 5kHz$ であ

10

20

30

40

50

る。このようなきわめて短い切り替え周期を達成できること（結果として、きわめて小さい供給量で微生物供給液を微粒子生成部に送ることができること）が、本発明の特徴の1つである。駆動素子が非常に短いので共振周波数を格段に大きくすることができるからである。微粒子供給液をきわめて短い切り替え周期で（きわめて小さい供給量で）微粒子生成部に供給することにより、接触空間または反応空間のスケールが非常に小さくなる。その結果、非常に小さく、かつ非常にシャープな粒度分布を有する微粒子を製造することができる。その結果、微粒子内に微生物を所定の数だけ含ませる統計的な精度が格段に高くなる。しかも、微粒子供給液と接触液との接触機会をきわめて増大させることができるので、生産性がきわめて大きい。加えて、装置スケール（反応スケール）がきわめて小さいので、きわめて小さな消費電力で微粒子を製造することができる。

10

【0031】

図4は、微生物供給流路2aと接触液供給流路2bの合流部（微粒子生成部5の最上流部）における微粒子形成過程のメカニズムを説明する模式図である。上記圧力のパルス形状に応じて、微生物供給液の塊（層）41が接触液の流れ42に供給される。微生物供給液の溶媒（分散媒）と接触液とを適切に選択することにより、微生物供給液の塊（層）41は接触液の流れ42と接触した瞬間にゲル状微粒子43を形成する（なお、微生物供給液および接触液の詳細は、後述のB項で説明する）。ゲル状微粒子43は接触液の流れに乗って下流へと移動する。例えば、微生物供給液における微生物の濃度を $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ 個/mlに設定し、1パルスごとの微生物供給液の供給量を0.5~10ピコリットルに設定すると、微生物供給液1パルスあたり実質的に1個の微生物が含まれることとなる。本明細書において、「実質的に1個の微生物が含まれる」とは、微生物が同種の他の微生物および/または他種の微生物の影響を実質的に受けないで増殖・成長し得るような個数で1パルスの供給液中または生成微粒子中に存在することを意味する。当該1パルス分の供給液が接触液と接触することにより、約10~27 μm の平均粒径を有するゲル状微粒子が得られる。微生物供給液と接触液の液-液界面は微生物供給液の濃度分布および接触度合いがきわめて均一であるので、非常にシャープな粒度分布を有する微粒子が得られる。得られる微粒子のCV値（粒度分布の指標であり、標準偏差/平均粒径 $\times 100$ （%）で表される）は、代表的には2%~20%、好ましくは5%~15%である。非常にシャープな粒度分布を有する微粒子を形成することにより、微粒子1個に実質的に1個の微生物が存在する統計的な確率が格段に大きくなる。

20

30

【0032】

好ましくは、微粒子生成部5に温度制御部（図示せず）が設けられる。温度制御部は、任意の適切な温度制御手段で構成される。代表的な温度制御手段は、流路基板10の裏面に薄膜抵抗体である TaSiO_2 や Ta_2N が形成されてなる。また、流路基板にSiを使用する場合には、不純物ドーパSi抵抗体を使用することもできる。温度制御の仕方は、目的に応じて適宜設定され得る。例えば、微粒子生成部5の全体を一定温度に制御してもよく、上流から下流に向かって正（または負）の温度勾配を形成してもよく、微粒子生成部5の任意の部分のみを高温（または低温）に制御してもよい。このようにして、微粒子生成過程を精密かつ良好にコントロールすることができる。

【0033】

好ましくは、微粒子生成部5の下流に微粒子捕集部6が設けられている。微粒子捕集部6は、微粒子のサイズおよび/または物理的特性を利用して微粒子を捕集（回集）する。微粒子のサイズを利用する手段としては、流路に予め加工しておいたフィルター手段（例えば、孔、柱）、遠心分離機構などが挙げられる。微粒子の物理的特性を利用する手段としては、誘電率または電荷などを利用する手段が挙げられる。具体的には、流路に予め加工しておいた電極パターン、撥水・親水パターンなどを利用して、誘電泳動、電気泳動などによって捕集する。

40

【0034】

図5は、本発明の別の実施形態による微生物単離装置の流路形状を説明する概略平面図である。この実施形態は、2つの微生物供給流路2aおよび2cが形成されている場合で

50

ある。図5のような流路を用いる場合には、第1の微生物供給部1aに微生物を含有する第1の微生物供給液を入れ、第2の微生物供給部1cに微生物を含有する第2の微生物供給液を入れることにより、微生物と微生物を実質的に1個ずつ含む微粒子を形成することができる。図6は、このような実施形態における微生物供給流路と接触液供給流路の合流部での微粒子形成過程のメカニズムを説明する模式図である。圧力発生機構に印加された圧力のパルス形状に応じて、第1の微生物供給液の塊(層)61が微生物供給流路2aに供給される。第1の微生物供給液の濃度および1パルスあたりの供給量を調整することにより、塊(層)61中には実質的に1個の微生物が含有される。同様に、第2の微生物供給液の塊(層)64が微生物供給流路2cに供給される。第2の微生物供給液の濃度および1パルスあたりの供給量を調整することにより、塊(層)64中には実質的に1個の微生物が含有される。微生物供給流路2aと2cの合流点で、塊(層)61と塊(層)64とが合流し、塊(層)65を形成する。パルスのタイミングを調整することにより、塊(層)61と塊(層)64とが適切に合流することができる。塊(層)65は、接触液の流れ62と接触した瞬間にゲル状微粒子63を形成する。ゲル状微粒子63は接触液の流れに乗って下流へと移動する。例えば、第1の微生物供給液における微生物の濃度を $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ 個/mlに設定し、1パルスごとの微生物供給液の供給量を0.5~10ピコリットルに設定すると、塊(層)61の1個あたりに実質的に1個の微生物が含まれることとなる。同様にして、塊(層)64の1個あたりに実質的に1個の微生物を含めることができる。その結果、微生物と微生物を実質的に1個ずつ含有する塊(層)65が形成され、最終的には、微生物と微生物を実質的に1個ずつ含有するゲル状微粒子63が生成され得る。この場合の塊(層)65の体積は1.0~2.0ピコリットルとなり、得られる微粒子の平均粒径は約12~34 μm となる。微生物供給液の濃度および1パルスごとの供給量を制御することにより、ゲル上微粒子に含有される微生物の数を目的に応じて適宜設定できる。例えば、(1個、2個)、(2個、1個)、(2個、2個)、(3個、2個)、(2個、3個)のような任意の組み合わせが採用され得る。なお、目的に応じて3つ以上の微生物供給部を有する実施形態が採用され得ることは言うまでもない。また、2つ以上の微生物供給流路の合流形態も、目的に応じて任意の適切な形態が採用され得る。

【0035】

B. 微生物の単離方法

次に、本発明の微生物の単離方法の好ましい一例を説明する。簡単のため、1種の微生物を単離する場合についてのみ説明する。

【0036】

最初に、所定の微生物を含む微生物供給液を調製する。微生物供給液は、微生物を所定の液体に分散させることにより調製される。液体には、必要に応じて、分散剤(例えば、界面活性剤)等が添加され得る。このプロセスは、従来と同様の手順に従って行われる。一例は以下の通りである。分離源(例えば、土壌)を採取する。土壌1g中に、 $10^5 \sim 10^9$ 個の微生物が存在すると言われている。この微生物濃度が、微生物供給液の濃度や1パルスあたりの供給量を決定する基礎となる。採取した土壌を水に懸濁し、不純物を物理的手段(代表的には、フィルター)で除去する。次いで、不純物を除去した懸濁液を、目的に応じた適切な液体を用いて、所定の濃度まで多段階で希釈して微生物供給液を調製する。微生物を分散させる液体の具体例としては、アルギン酸が挙げられる。アルギン酸を用いる場合には、微生物供給液中の微生物濃度は、好ましくは $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^9$ 個/mlに設定され得る。この場合の微生物供給液の粘度は、代表的には1~3cpsである。好ましくは、微生物供給液は、ゲル化材料を含有する。本明細書において、ゲル化材料とは、外部からの物理的および/または化学的な刺激により、自身がゲルを形成し得る材料をいう。ゲル化材料の具体例としては、アルギン酸、カラギーナン、ペクチン、セルロース、シアノアクリレート、多糖アミノ酸カーバメート誘導体、ポリビニルアルコール、ケイ酸ナトリウム、アルキル基含有シリカマトリックスなどが挙げられる。

【0037】

次に、接触液を調製する。接触液としては、上記微生物供給液と接触して微粒子（代表的には、ゲル状微粒子）を生成し得る任意の適切な液体が採用され得る。代表的には、接触液は、ゲル化開始成分を含む。本明細書において、ゲル化開始成分とは、物理的および/または化学的刺激により上記ゲル化材料のゲル化を引き起こす物質をいう。ゲル化開始成分の具体例としては、塩化カルシウム水溶液が挙げられる。塩化カルシウム水溶液を用いる場合、その粘度は代表的には1～3 c p sである。

【0038】

次に、図1に示すような装置を用いる。微生物供給部1aに微生物供給液を入れ、接触液供給部1bに接触液を入れる。微生物供給流路2aにはマイクロポンプで所定の電圧（10 K H z、10 V）を印加し、パルス状の圧力（液滴形成パルス）を発生させる。この
10
ような圧力を発生させることにより、1パルスごとの微生物供給液の供給量を0.5～10ピコリットルに設定することができる。このようにして、1パルスごとの微生物供給液中に実質的に1個の微生物を含有させることができる。一方、接触液供給流路2bには、例えば50 n l / sの流量で整流を発生させ、一定量で連続的に接触液を流す。

【0039】

次に、微生物供給流路2aと接触液供給流路2bの合流部において、微生物供給液と接触液とを接触させる。そうすると、図4に示したようなメカニズムでゲル状微粒子を生成する。上記のように、1パルスごとの微生物供給液中には実質的に1個の微生物が含まれているので、得られる微粒子中にも実質的に1個の微生物が含まれるようになる。微生物供給液の濃度および1パルスあたりの供給量を制御することにより、任意の適切な数の微生物を微粒子中に含ませることができる。
20

【0040】

このようにして得られた微粒子を回収し、所定の環境で増殖および/または成長させる。このようにすることにより、V B N C状微生物を単離できる可能性が飛躍的に増大し得る。また、既知の微生物に関しても、他の微生物の影響を排除することにより、培養効率を格段に高めることができる。

【0041】

本発明に用いられ得る既知の微生物の具体例としては、土壌や河川などの自然環境、生活空間環境、消化管内に存在する真性細菌、古細菌、酵母、遺伝子組換え体が挙げられる。真性細菌の具体例としては、Rhodococcus属、Norcardia属、Alcaligenes属、Lactococcus属、Acetobacter属、Pseudomonas属、Sphingomonas属、Corynebacterium属、Synechococcus属、Botryococcus属、Chlamydomonas属、Zymomonas属、Methanosarcina属、Methylo-
30

inus属、Bacillus属、Gordonia属、Actinobacteria属、放線菌類が挙げられる。酵母の具体例としては、Candida属、Cryptococcus属が挙げられる。遺伝子組換え体の具体例としては、Escherichia

coli、Bacillus subtilisが挙げられる。これらを所定の数（代表的には、実質的に1個）含む微粒子は、各種バイオリクターにきわめて好適に用いられ得る。このような微粒子によれば、粒子内での拡散が速いので、リアクターの生産効率が格段に向上し得るからである。より具体的には、Rhodococcus属は、例えば油分分解、ニトリル分解、シアノ基加水分解に好適に用いられる。Candida属は、例えば炭化水素の酸化、リパーゼ反応、光学異性化に好適に用いられる。Norcardia属は、例えばシアノ基加水分解に好適に用いられる。Alcaligenes属は、例えばレトロアルドール反応、PHB生成に好適に用いられる。Lactococcus属は、例えばポリ乳酸の原料生成に好適に用いられる。Acetobacter属は、例えばセルロース生成に好適に用いられる。Escherichia

coliおよびBacillus subtilisは、例えば遺伝子組み換え菌株として好適に用いられる。Pseudomonas属およびSphingomonas属は、例えば汚染有機化合物の分解に好適に用いられる。Corynebacterium属は、例えば廃水処理、二酸化炭素の回収に好適に用いられる。Synechococcus属およびBotryococcus属は、例えば光合成（油分合成）に好適に用いられる。Chlamydomonas属は、例えば水素生成に好適に用いられる。Cryptococcus属は、例えばバ
40
50

イオディーゼル製造に好適に用いられる。Zymomonas属は、例えばエタノール生成に好適に用いられる。Methanosarcina属は、例えばメタン生成に好適に用いられる。Methylosinus属は、例えばメタノール生成、塩素化合物生成に好適に用いられる。

【0042】

本発明において利用され得る微生物は上記に限定されず、目的に応じて任意の適切な微生物が採用され得る。本発明によって分離された微生物は、種々の物質（例えば、医薬品、診断薬、ファインケミカル、光学活性体、汎用樹脂、エタノール、メタン、油脂）の生産用途；ならびに、排水・下水・生ごみ処理、好気有機廃棄物処理・嫌気有機廃棄物処理による土壌処理などの環境保全・環境浄化・衛生管理に好適に利用され得る。

【産業上の利用可能性】

10

【0043】

本発明の微生物単離装置は、例えば、創薬の材料、食品・化成品などの材料、環境浄化・環境センシング材料などの有用微生物の探索や評価に好適に利用され得る。分離された微生物は、微生物リアクターに好適に利用され得る。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】本発明の好ましい実施形態による微生物単離装置の全体的な構成を説明する概略斜視図である。

【図2】本発明の好ましい実施形態による微生物単離装置に用いられるディフューザー型マイクロポンプの流路方向の概略断面図である。

20

【図3】(a)および(b)は、流路にかけられるパルス状圧力のパルス形状を説明する模式図である。

【図4】流路の合流部における微粒子形成過程のメカニズムを説明する模式図である。

【図5】本発明の別の実施形態による微生物単離装置の流路形状を説明する概略平面図である。

【図6】図5の実施形態における流路の合流部での微粒子形成過程のメカニズムを説明する模式図である。

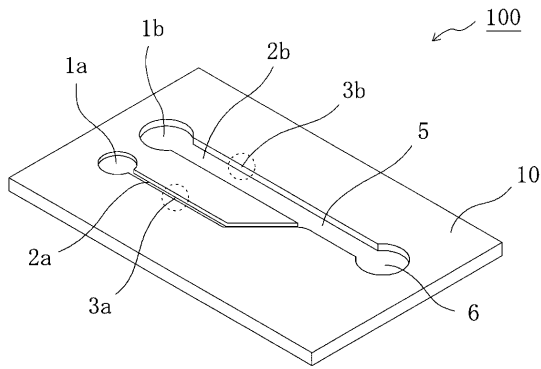
【符号の説明】

【0045】

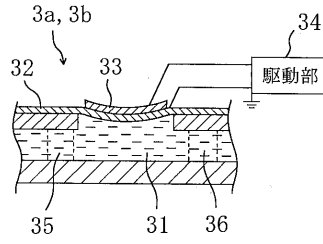
- 100 微生物単離装置
- 1a 微生物供給部
- 1b 接触液供給部
- 2a 微生物供給流路
- 2b 接触液供給流路
- 5 微粒子生成部

30

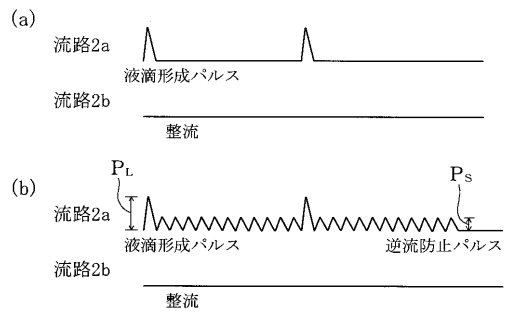
【図1】



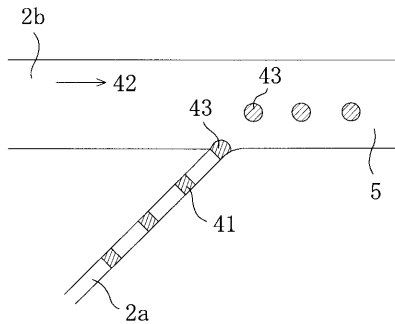
【図2】



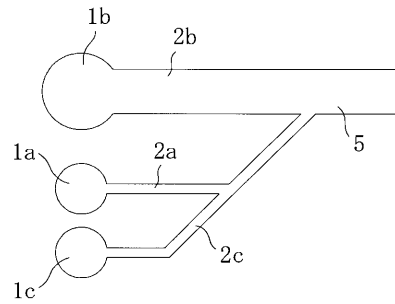
【図3】



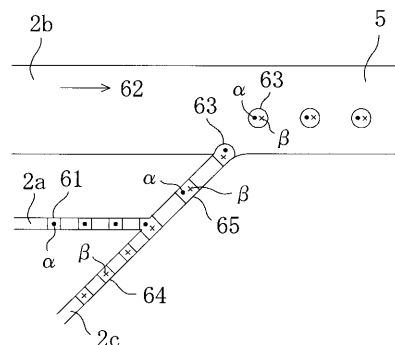
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平05 - 103658 (JP, A)
特表2002 - 531056 (JP, A)
特開2003 - 284544 (JP, A)
特開2003 - 220322 (JP, A)
特開2004 - 089106 (JP, A)
特開2004 - 243308 (JP, A)
特開2005 - 199238 (JP, A)
特開2005 - 144356 (JP, A)
日本農芸化学雑誌, 2003, Vol.77, No.2, pp.58-61
日本農芸化学雑誌, 2003, Vol.77, No.12, pp.1227-1229

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 1/42
C12M 3/00 - 3/10

PubMed

JSTPlus (JDreamII)

JST7580 (JDreamII)