

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第6999641号

(P6999641)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和3年12月24日(2021.12.24)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

A

C 1 2 P 7/18 (2006.01)

C 1 2 P 7/18

C 1 2 P 7/26 (2006.01)

C 1 2 P 7/26

C 1 2 P 7/56 (2006.01)

C 1 2 P 7/56

請求項の数 6 (全21頁)

(21)出願番号 特願2019-503347(P2019-503347)

(86)(22)出願日 平成29年7月18日(2017.7.18)

(65)公表番号 特表2019-520849(P2019-520849  
A)

(43)公表日 令和1年7月25日(2019.7.25)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/068117

(87)国際公開番号 WO2018/019656

(87)国際公開日 平成30年2月1日(2018.2.1)

審査請求日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(31)優先権主張番号 16382347.9

(32)優先日 平成28年7月19日(2016.7.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
欧州特許庁(EP)

微生物の受託番号 CECT CECT 9139

(73)特許権者 519016468

フンダシオン テクナリア リサーチ ア  
ンド イノベーションスペイン国、ドノスティア - サン セバ  
スティアン 2 0 0 0 9 , ミケレテヒ パ  
セアレクア , 2 , バルケ サイエнти  
フィコ イ テクノロジコ デ ギブスコア

(74)代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74)代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 2 , 3 - ブタンジオール及び他の代謝物を産生する細菌株

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

受託番号 C E C T 9 1 3 9 下で Spanish Type Culture Collection に寄託された株である、ラクトコッカス・ラクティス。

## 【請求項 2】

2 , 3 - ブタンジオールを産生する方法であって、請求項 1 に記載の細菌株による炭水化物リッチ培地の好気性発酵を含み、当該方法が以下のステップ：

( a ) 請求項 1 に記載の株を予備培養するステップと、

( b ) ステップ ( a ) で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、

( c ) 2 0 ~ 4 0 、 p H 5 . 5 ~ 6 . 0 及び 5 ~ 1 0 0 % の溶解酸素濃度において、ステップ ( b ) で接種された前記培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップとを含む、方法。

## 【請求項 3】

ステップ ( d ) から得られた前記無細胞発酵培養液中に存在する前記 2 , 3 - ブタンジオールを精製するステップをさらに含む、請求項 2 に記載の 2 , 3 - ブタンジオールを産生する方法。

## 【請求項 4】

アセトインを産生する方法であって、請求項 1 に記載の細菌株による炭水化物リッチ培地の好気性発酵を含み、当該方法が以下のステップ：

(a) 請求項 1 に記載の株を予備培養するステップと、  
(b) ステップ (a) で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、  
(c) 20 ~ 40 、 pH 6 . 5 ~ 7 . 5 及び 30 ~ 100 % の溶解酸素濃度において、  
ステップ (b) で接種された前記培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、  
(d) ステップ (c) から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップと  
を含む、方法。

【請求項 5】

ステップ (d) から得られた前記無細胞発酵培養液中に存在する前記アセトインを精製するステップをさらに含む、請求項 4 に記載のアセトインを産生する方法。

【請求項 6】

乳酸を産生する方法であって、請求項 1 に記載の細菌株による炭水化物リッチ培地の嫌気性発酵を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2016年7月19日に出版された欧州特許出願公開第16382347.9号の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、遺伝子操作によって得られる微生物の分野に属する。特に、本発明は、化学、医薬品及びバイオ燃料産業における広範囲の用途を有する分子である 2 , 3 - ブタンジオール及びアセトインを産生する高い能力によって特徴付けられる、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 種に属する新しい乳酸菌株に関する。

【背景技術】

【0003】

背景技術

2 , 3 - ブタンジオール ( 2 , 3 - BDO ) は、広範囲の化学物質の製造における構成要素としての使用を含む、燃料及び化学の分野において大きい可能性を示す化学物質である。それは、溶媒、不凍剤、液体燃料並びに多数の合成高分子及び樹脂の製造のための単量体として用いることができる。それは、エタノールの発熱量 ( 29 , 100 J g<sup>-1</sup> ) 及びメタノールの発熱量 ( 22 , 100 J g<sup>-1</sup> ) に類似し、27 , 200 J g<sup>-1</sup> の発熱量を有することから、液体燃料及び燃料添加剤として好適となる。さらに、それは、その高オクタン数から、ガソリンにおけるオクタンプースターとして役立ち得る。2 , 3 - BDO は、印刷インク、芳香剤、燻蒸剤、スパンデックス、湿潤剤及び柔軟剤、可塑剤の生産において、また医薬品用担体としてもさらなる有望な用途が見出される。

【0004】

特に重要であるのは、アセトイン及びジアセチル、メチルエチルケトン、2 - ブタノール、ブテン、1 , 3 - ブタジエン及びプラスチック ( ポリエステル、ポリカーボネート及びポリウレタン ) を含む、貴重な化成物の合成における構成要素として、すなわち前駆物質としての 2 , 3 - BDO の使用である。それらの中で、1 , 3 - ブタジエンは、主にタイヤの製造に使用される合成ゴムの合成のための単量体であることから、特に注目に値する。さらに、上記誘導体の一部は、オリゴマー形成、縮合及び水素付加反応により、ジェット燃料を含む ( バイオ ) 燃料としての有望な用途を有するより高級な炭化水素に変換され得る。

【0005】

商業的に、2 , 3 - BDO の主な下流製品は、約 430 億ドルの販売価格で約 3200 万トン / 年の潜在的なグローバル市場を有する。

【0006】

現在、2 , 3 - BDO の工業生産は、主に複雑且つ高価なプロセスによって石油化学原料から作られる。精油中、クラックガスからのブタジエン及びイソブテンの除去後、約 77

10

20

30

40

50

%のブテンと約23%のブタン及びイソブタンの混合物とを含有する、C4ラフィネートIIと称されるC4炭化水素画分が得られる。塩素の水溶液によるこの画分のクロロヒドリン化と、その後のクロロヒドリンの水酸化ナトリウムによる環化とにより、以下の組成物：55%のトランス-2,3-ブテンオキシド、30%のシス-2,3-ブテンオキシド及び15%の1,2-ブテンオキシドのブテンオキシド混合物が得られる。50バールの圧力下、160～220℃でのこの混合物の加水分解により、真空分画によって分離されるブタンジオールの混合物が得られる。この反応シーケンスにより、メソ-2,3-ブタンジオールは、トランス-2-ブテンからトランス-2,3-ブテンオキシドを介して得られ、R,R-及びS,S-2,3-ブタンジオールのラセミ混合物は、同様にシス-2-ブテンからシス-2,3-ブテンオキシドを介して形成される。

10

#### 【0007】

2,3-BDOは、現在、その化学合成のコストが高いため、魅力のない市場セグメントである。合成2,3-BDOを使用することの原料価格及び環境影響は、2,3-BDOのグローバル市場の成長に対する主要な障壁として作用している。これらの懸念が理由で、より環境に優しく、コスト競争力のある代替物を探求する方向へ動向が変化しており、特に2,3-BDOの生物学的生成が優位に位置しているように思われる (<http://www.transparencymarketresearch.com>; Butanediol (1,4 BDO & 2,3 BDO), 1,3 Butadiene and MEK Market: Applications (THF, PU, PBT, SBR, ABS, NBR etc.), Bio-based Alternatives, Downstream Potential, Market Size and Forecast, 2010-2018)。

20

#### 【0008】

多数の微生物が2,3-BDOを産生することが知られているが、それを潜在的に工業的に重要と考えるのに十分に多い量で作製するのは、そのごく一部である。最良の産生者は、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、バチルス属 (*Bacillus*) 及びセラチア属 (*Serratia*)、特に肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 及びクレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) に属する細菌である。

#### 【0009】

2,3-BDOの生合成に關与する代謝経路は、糖代謝から得られるピルビン酸から開始し、3つのステップを含む。最初のステップでは、チアミン依存性酵素の - アセト乳酸シンターゼがピルビン酸の2分子の縮合を触媒し、 - アセト乳酸の分子を生成し、CO<sub>2</sub>の分子を放出する。次に、 - アセト乳酸は、 - アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒される脱炭酸反応により、アセトインに変換される。最後に、アセトインは、補助因子としてNADHを用いて、アセトインレダクターゼ/2,3-BDOデヒドロゲナーゼによって2,3-BDOに還元される。

30

#### 【0010】

発酵による2,3-BDOの工業規模生産に関して、最良の産生者である肺炎桿菌 (*K. pneumoniae*) 及びK. オキシトカ (*K. oxytoca*) が病原菌 (リスクグループ2 - RG2) であるという事実は、強い懸念要因である。工業規模発酵プロセスは、以下の厳重な安全性対策を必要とし、それは、RG2微生物の使用が前記発酵プロセスの工業開発にとって障壁であることを意味する。RG2微生物を用いて10Lを超える容量を発酵させるとき、Biosafety Level 2 Large Scale (BSL2 - LS) の封じ込め施設設計及び特別な操作手順を含む適切なバイオセーフティー対策が採用される必要がある。これらのすべてのバイオセーフティー対策は、産生コストを大幅に増加させることから、産生コストは、発酵槽の基準原価のみを考慮すると、封じ込めレベルにおける各増分あたり10～30%増加すると見積もられている。

40

#### 【0011】

したがって、上記のRG2細菌と同程度に効率的に2,3-BDOを産生可能なRG1微生物 (安全) に対する需要がある。幾つかのRG1細菌が2,3-BDOを産生することが報告されているが、一般に、それらの効率は、経済的プロセスとして低過ぎる。一部の重要な例外としては、パエニバシラス・ポリミキサ (*Paenibacillus polymyxa*) (Haes

50

sler, T., et al. "Enhanced fed-batch fermentation of 2, 3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365" *Bioresource technology* 2012 vol.124, pp. 237-244) 及びバチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) (Ge, Y., et al. "Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis*" *Green Chemistry*, 2016) 細菌が挙げられる。

#### 【0012】

代替として、2, 3-BDOの産生は、細菌では大腸菌 (*Escherichia coli*) (Nielsen, D.R., et al. "Metabolic Engineering of Acetoin and meso-2,3-Butanediol Biosynthesis in *E. coli*." *Biotechnol. J.* 2010, vol. 5, pp. 274-284) 及び酵母では出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Lian, J., et al. "Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R, 3R)-butanediol" *Metabolic engineering* 2014, vol. 23, pp. 92-99) において設計されている。考慮すべき別の可能性は、それらの2, 3-BDOの合成能力を改善するRG1天然産生者の使用である。この最終的な代替物の範囲内において、乳酸細菌のラクトコッカス・ラクティスは、可能性のある候補と思われる。

#### 【0013】

L.ラクティスは、工業プロセスで用いられる幾つかの有利な特徴を示す。それは、幾つかの株において配列決定されている小型の十分に特徴付けられたゲノムを有する。広範囲のツールがその遺伝子操作のために利用可能である。それは、好気性又は嫌気性条件下のいずれかで迅速な増殖を示す。それは、高い解糖フラックスを示す。それは、かなり単純なエネルギー及び炭素代謝を有する。それは、興味深い化学物質の産生に対する異なる代謝経路を有する。それは、病原体でなく、GRAS (一般に安全と認識された) 生物と考えられ、それにより食品用途において使用可能になる。食品用途は別にして、それは、固有の特徴を有し、これらのすべての特徴から、L.ラクティスは、発酵による貴重な化学物質の効率的な工業生産を目的とした細胞工場の開発に非常に適した宿主となる。

#### 【0014】

L.ラクティスは、炭水化物発酵 (ホモ乳酸発酵) の主生成物として乳酸を産生することによって特徴付けられる通性嫌気性菌である。それにもかかわらず、特定の条件下では、この細菌は、2, 3-BDOを含む異なる特性の代謝物を産生するヘテロ乳酸又は混酸発酵を行うこともできる。しかし、L.ラクティスは、2, 3-BDO生合成のための完全代謝経路を有するが、一般に、この代謝物の天然生成が残存する。

#### 【0015】

L.ラクティス (Platteeuw C, et al. "Metabolic engineering of *Lactococcus lactis* - influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate-dehydrogenase as a function of culture conditions", *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, vol. 61, pp. 3967-71; Gaspar P, et al. "High yields of 2,3-butanediol and mannitol in *Lactococcus lactis* through engineering of NAD (+) cofactor recycling", *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, vol. 77, pp. 6826-35; Liu J, et al. "Combining metabolic engineering and biocompatible chemistry for high-yield production of homo-diacetyl and homo-(S,S)-2,3-butanediol", *Metabolic engineering* 2016, vol. 36, pp. 57-67) 及び他の乳酸菌 (Enhanced pyruvate to 2,3-butanediol conversion in lactic acid bacteria、PCT/米国特許出願公開第2009/058834号) における2, 3-BDOの産生を増加させるための代謝設計の使用について記述する報告が幾つか存在する。それらの全部は、一方では競合経路、特にL-乳酸脱水素酵素の不活性化に関与し、且つ他方では2, 3-BDO経路の遺伝子の過剰発現に関与する。

#### 【0016】

これらの組換え株による2, 3-BDOの産生は、それらが、培地に導入される外来遺伝子材料を維持するための抗生物質及び/若しくは遺伝子発現の増強を誘導するナインな

10

20

30

40

50

どの化合物、又は増殖を維持するためのヘミン及び  $Fe^{3+}$  を含有する培地中で培養されることを必要とする。いずれの場合でも、培地は、運用コストを、経済的に効率的な工業プロセスにほとんど匹敵しないレベルまで高める高価な成分を添加される必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

したがって、従来技術では、再生可能なバイオマス原料から高濃度の 2, 3 - BDO を高い収率及び生産性で得ることを可能にする R G 1 微生物駆動発酵による、持続可能なバイオテクノロジーによる 2, 3 - BDO の産生についての効率的な方法が欠如している。

【課題を解決するための手段】

【0018】

発明の詳細な説明

この欠点を解決することを意図して、本発明は、2, 3 - BDO を産生する向上した能力を有する R G 1 細菌株と、前記株を得るための方法と、高い収率及び生産性を有し且つ工業的に実現可能である、前記株を用いる効率的な発酵方法とを提供する。さらに、驚くべきことに、この同じ株は、用いられる培養条件に応じて他の代替的な代謝物、特にアセトイン及び乳酸を産生することが見出されている。

【0019】

本発明は、培養条件に応じて 2, 3 - BDO、アセトイン及び乳酸などの代謝物を産生する高い能力を示す、R G 1 に属する L . ラクティス株を提供する。その株は、代謝物の産生に関して著しい多用途性を示し、その生存度及び機能性に影響を及ぼさない。

【0020】

下記に例示されるように、本発明の株は、培地条件に応じて、上記代謝物の産生に関して高度に効率的且つ特異的である。例えば、炭水化物リッチ培地を発酵させるための株を用い、且つ単に pH 及び酸素濃度パラメータを調節することで、本発明の株は、主に 2, 3 - BDO、アセトイン又は乳酸のいずれかを産生することができる。これら特徴が、培地に前記生成物の合成を促進する抗生物質、ナイシンなどの化合物を添加する必要性なく達成されることを示すことは重要である。この点は、それが生成コストの低下、プロセスの処理及び発酵ステップの簡素化を可能にすることから非常に重要である。結論として、それは、代謝物の工業規模での生成を容易にする。

【0021】

本発明の株を入手するため、本発明者らは、2つの遺伝子組換え L . ラクティス株のプロトプラスト融合を含む方法を開発している。この方法は、ゲノム混合として知られており、2つの突然変異体の遺伝的組換えを可能にする (Zhang YX, et al. "Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria", Nature 2002, vol. 415, p p. 644-646)。驚くべきことに、このプロトプラスト融合により、代謝物を産生する高い能力を有する L . ラクティスの新しい株が見出されている。有利には、プロトプラスト融合の技術を用いることで、外因性 DNA 配列の細菌への挿入又は遺伝子発現の化学誘導因子の使用のいずれも不要である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

したがって、本発明の第1の態様は、ラクトコッカス・ラクティス細菌の修飾株を産生するための方法であって、2つのラクトコッカス・ラクティス親株であって、好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、(a) アセトイン及び/又は 2, 3 - ブタンジオールを産生する増大した能力と、(b) 乳酸を産生する低下した能力とを示す2つのラクトコッカス・ラクティス親株からの2つのプロトプラストを融合するステップを含む方法である。

【0023】

提供される実験データによって開示される通り、この方法から得られる株は、培養条件に応じて、その親株と比較して 2, 3 - BDO を産生する増大した能力と、逆に乳酸を産生

10

20

30

40

50

する低下した能力とを示し得る。

【 0 0 2 4 】

本発明の第 1 の態様の特定の実施形態では、好気性条件下で培養されるとき、アセトイン及び / 又は 2 , 3 - B D O を産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する上記 L . ラクティス親株の各々は、L . ラクティスの野生型株に突然変異誘発を施すことによって得られる。

【 0 0 2 5 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、突然変異誘発処理は、ランダム突然変異誘発によって実施される。

【 0 0 2 6 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、突然変異誘発処理は、化学変異原を用いて実施される。

【 0 0 2 7 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、突然変異誘発処理は、エチルメタンスルホン酸 ( E M S ) を用いて実施される。

【 0 0 2 8 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、突然変異誘発処理は、放射線を用いて実施される。

【 0 0 2 9 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、突然変異誘発処理は、組換え D N A 技術又は遺伝子工学を用いて実施される。

【 0 0 3 0 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、突然変異誘発処理から得られる株は、緩衝化能が低下し、2 , 3 , 5 - トリフェニルテトラゾリウムが添加された酸性寒天栄養培地で選択される ( 特許フランス特許第 2 7 7 7 9 0 5 号及びスペイン特許第 2 3 5 2 6 3 3 B 1 号に記載の通り ) 。この選択培地中で成長する高乳酸産生細菌は、ピンク色コロニーを形成し、低乳酸産生者が赤色 / 褐色コロニーとして出現することが予想される。

【 0 0 3 1 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、好気性条件下で培養されるとき、親株の一方は、アセトインを産生する増大した能力を有し、及び他方は、2 , 3 - B D O を産生する増大した能力を有する ( 両方とも野生型株と比較される ) 。

【 0 0 3 2 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、突然変異誘発処理を受ける最初の野生型株は、National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria ( U K ) に寄託されたラクトコッカス・ラクティス N C I M B 7 0 2 1 1 8 株である。

【 0 0 3 3 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、プロトプラスト融合ステップにおいて用いられる 2 つの親株の一方は、好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、アセトインを産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有するラクトコッカス・ラクティス C M L B 4 株である。ラクトコッカス・ラクティス C M L B 4 株は、Universidad de Valencia, Edificio de Investigacion, Campus de Burjassot, 46100 Burjasot (Valencia) Spain に位置する Coleccion Espanola de Cultivos Tipo ( C E C T ) に 2 0 0 9 年 4 月 2 1 日、ブダペスト条約に従って本出願人によって寄託された。L . ラクティスのこの株は、参照のラクトコッカス・ラクティスの亜種ラクティス ( lactis ) C M L B 4 として寄託者によって同定され、受託番号 C E C T 7 5 1 2 を受け、さらに生存可能として公表された。

【 0 0 3 4 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、プロトプラスト融合ステップにおいて用いられる 2 つの親株の一方は、好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、2 , 3 - B D O 及びアセトインを産生する増大した能力と、乳

10

20

30

40

50

酸を産生する低下した能力とを有するラクトコッカス・ラクティス C M L B 3 株である。

【 0 0 3 5 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、アセトインを産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する、プロトプラスト融合ステップにおいて用いられる親株は、受託番号 C E C T 7 5 1 2 下で Spanish Type Culture Collection に寄託されたラクトコッカス・ラクティス C M L B 4 株であり、及び好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、2, 3 - B D O を産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する、プロトプラスト融合ステップにおいて用いられる親株は、ラクトコッカス・ラクティス C M L B 3 株である。

10

【 0 0 3 6 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、アセトインを産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する、プロトプラスト融合ステップにおいて用いられる親株は、受託番号 C E C T 7 5 1 2 下で Spanish Type Culture Collection に寄託されたラクトコッカス・ラクティス C M L B 4 株であり、及び好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、2, 3 - B D O を産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する、プロトプラスト融合ステップにおいて用いられる親株は、ラクトコッカス・ラクティス C M L B 3 株であり、ここで、C M L B 4 及び C M L B 3 株の両方は、野生型株 N C I M B 7 0 2 1 1 8 に由来する。

20

【 0 0 3 7 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、方法は、以下のステップを含む： 1 ) L . ラクティス野生型株が突然変異誘発処理を受け、2 ) ステップ 1 ) で得られた 2 つの株であって、好気性条件下で培養されるとき、野生型株と比べて、アセトイン及び / 又は 2, 3 - B D O を産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する 2 つの株が選択され、3 ) ステップ 2 ) で選択された 2 つの株がプロトプラスト融合ステップにおける親株として用いられる。

【 0 0 3 8 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、方法は、以下のステップを含む： 1 ) L . ラクティス野生型株 N C I M B 7 0 2 1 1 8 が突然変異誘発処理を受け、2 ) ステップ 1 ) で得られた 2 つの株であって、好気性条件下で培養されるとき、野生型株と比べて、アセトイン及び / 又は 2, 3 - B D O を産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する 2 つの株が選択され、3 ) ステップ 2 ) で選択された 2 つの株がプロトプラスト融合ステップにおける親株として用いられる。

30

【 0 0 3 9 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、方法は、以下のステップを含む： 1 ) L . ラクティス野生型株 N C I M B 7 0 2 1 1 8 が E M S への曝露によって化学的突然変異誘発処理を受け、2 ) ステップ 1 ) で得られた 2 つの株であって、好気性条件下で培養されるとき、野生型株と比べて、アセトイン及び / 又は 2, 3 - B D O を産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する 2 つの株が選択され、3 ) ステップ 2 ) で選択された 2 つの株がプロトプラスト融合ステップにおける親株として用いられる。

40

【 0 0 4 0 】

本発明の第 1 の態様の別の特定の実施形態では、方法は、以下のステップを含む： 1 ) L . ラクティス野生型株 N C I M B 7 0 2 1 1 8 が E M S への曝露によって化学的突然変異誘発処理を受け、2 ) ステップ 1 ) で得られた 2 つの株であって、好気性条件下で培養されるとき、その一方は、アセトインを産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有し、及び他方は、2, 3 - B D O を産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する（両方とも野生型株と比べられる）、2 つの株が選択され、3 ) ステップ 2 ) で選択された 2 つの株がプロトプラスト融合ステップにおける親株として用いられる。

50

## 【 0 0 4 1 】

本発明の第 2 の態様は、本発明の第 1 の態様に記載の方法によって入手可能な L . ラクティス細菌の修飾株である。

## 【 0 0 4 2 】

本発明の第 2 の態様の特定の実施形態では、株は、好気性条件下で培養されるとき、野生型株によって産生される量の少なくとも 1 0 倍の 2 , 3 - B D O を産生する増大した能力を有する。

## 【 0 0 4 3 】

本発明の第 2 の態様の別の特定の実施形態では、株は、好気性条件下で培養されるとき、野生型株によって産生される量の少なくとも 2 0 倍の 2 , 3 - B D O を産生する増大した能力を有する。

10

## 【 0 0 4 4 】

本発明の第 2 の態様の別の特定の実施形態では、株は、好気性条件下で培養されるとき、野生型株によって産生される量の少なくとも 1 0 倍のアセトインを産生する増大した能力を有する。

## 【 0 0 4 5 】

本発明の第 2 の態様の別の特定の実施形態では、株は、好気性条件下で培養されるとき、野生型株によって産生される量の少なくとも 2 0 倍のアセトインを産生する増大した能力を有する。

## 【 0 0 4 6 】

本発明の第 2 の態様の別の特定の実施形態では、株は、好気性条件下で培養されるとき、野生型株によって産生される量の少なくとも 1 0 倍の乳酸を産生する低下した能力を有する。

20

## 【 0 0 4 7 】

本発明の第 2 の態様の別の特定の実施形態では、株は、好気性条件下で培養されるとき、野生型株によって産生される量の少なくとも 2 0 倍の乳酸を産生する低下した能力を有する。

## 【 0 0 4 8 】

本発明の第 2 の態様の別の特定の実施形態では、株は、好気性条件下で培養されるとき、野生型株によって産生される量の少なくとも 1 0 倍の 2 , 3 - B D O を産生する増大した能力と、野生型株によって産生される量の少なくとも 1 0 倍の乳酸を産生する低下した能力とを有する。

30

## 【 0 0 4 9 】

本発明の第 2 の態様の別の特定の実施形態では、株は、好気性条件下で培養されるとき、野生型株によって産生される量の少なくとも 2 0 倍の 2 , 3 - B D O を産生する増大した能力と、野生型株によって産生される量の少なくとも 2 0 倍の乳酸を産生する低下した能力とを有する。

## 【 0 0 5 0 】

本発明の第 2 の態様の別の特定の実施形態では、L . ラクティス細菌の株は、受託番号 C E C T 9 1 3 9 下で Spanish Type Culture Collection ( C E C T ) に寄託されたラクトコッカス・ラクティス 4 3 1 0 3 として同定されている。本発明の L . ラクティスの株は、Universidad de Valencia C.P 46980 Catedratico Agustin Escardino, num. 9 , Paterna, Valencia (Spain) に位置する Spanish Type Culture Collection ( C E C T ) において、2 0 1 6 年 4 月 1 9 日、ブダペスト条約の要件に従い、Parque Tecnológico de San Sebastian, Mikeletegi Pasealekua, num. 2, E-20009 Donostia-San Sebastian (Spain) に位置する寄託者 Fundacion Tecnalia Research & Innovation によって寄託された。L . ラクティスの株は、参照の 4 3 1 0 3 として寄託者によって同定され、受託番号 C E C T 9 1 3 9 を受け、さらに生存可能として公表された。その名称は、詳細には L . ラクティス 4 3 1 0 3 である。

40

## 【 0 0 5 1 】

50



本発明の第３の態様は、２，３－ＢＤＯを産生する方法であって、本発明の第２の態様の細菌株による炭水化物リッチ培地の好気性発酵を含む方法である。

【００５２】

本発明の第３の態様の特定の実施形態では、２，３－ＢＤＯを産生する方法は、以下のステップ：

- (a) 本発明の第２の態様に定義されるような株を予備培養するステップと、
- (b) ステップ(a)で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、
- (c) ２０～４０、pH ５．０～７．５及び５～１００％の溶解酸素濃度において、ステップ(b)で接種された培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、
- (d) ステップ(c)から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップとを含む。

10

【００５３】

溶解酸素濃度が培地飽和濃度(medium saturation concentration)に対する％として表されることは注目されるべきである。

【００５４】

本発明の第３の態様の別の特定の実施形態では、２，３－ＢＤＯを産生する方法は、以下のステップ：

- (a) 本発明の第２の態様に定義されるような株を予備培養するステップと、
- (b) ステップ(a)で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、
- (c) ２０～４０、pH ５．０～７．５及び１０～９０％の溶解酸素濃度において、ステップ(b)で接種された培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、
- (d) ステップ(c)から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップとを含む。

20

【００５５】

本発明の第３の態様の別の特定の実施形態では、２，３－ＢＤＯを産生する方法は、以下のステップ：

- (a) 本発明の第２の態様に定義されるような株を予備培養するステップと、
- (b) ステップ(a)で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、
- (c) ２０～４０、pH ５．５～６．０及び５～１００％の溶解酸素濃度において、ステップ(b)で接種された培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、
- (d) ステップ(c)から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップとを含む。

30

【００５６】

本発明の第３の態様の別の特定の実施形態では、２，３－ＢＤＯを産生する方法は、以下のステップ：

- (a) 本発明の第２の態様に定義されるような株を予備培養するステップと、
- (b) ステップ(a)で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、
- (c) ２０～４０、pH ５．５～６．０及び１０～９０％の溶解酸素濃度において、ステップ(b)で接種された培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、
- (d) ステップ(c)から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップとを含む。

40

【００５７】

本発明の第３の態様の別の特定の実施形態では、２，３－ＢＤＯを産生する方法は、ステップ(d)から得られた無細胞発酵培養液中に存在する２，３－ＢＤＯを精製するステップをさらに含む。

【００５８】

本発明の第３の態様の別の特定の実施形態では、ステップ(c)で実施される発酵は、連続モードである。

【００５９】

本発明の第３の態様の別の特定の実施形態では、ステップ(c)で実施される発酵は、フ

50

エドバッチモードである。

【 0 0 6 0 】

本発明の第 3 の態様の別の特定の実施形態では、ステップ ( c ) で実施される発酵は、バッチモードである。

【 0 0 6 1 】

2 , 3 - B D O は、接種時に行われる培養の開始から 1 5 ~ 4 8 時間、好ましくは 2 0 ~ 4 0 時間にわたって発酵培養液中に蓄積される。微生物が炭素源として利用可能なすべての炭水化物を消費した直後に生じる最大の 2 , 3 - B D O の産生が達成されるとき、発酵は、完了したと考えることができる。発酵が完了すると、本発明の第 2 の態様の株の細胞は、発酵培養液から分離され得る。この過程は、好ましくは、物理的方法、例えば遠心分離、濾過又は任意の他の当該技術分野で利用可能な方法を用いて実施することができる。

10

【 0 0 6 2 】

発酵産生された 2 , 3 - B D O は、清澄化された発酵培養液中に溶解され、次に回収若しくは精製されるか、又は水溶液として使用され得、後者の場合、さらなる修飾の不在又は濃縮過程後のいずれかである。精製は、実施されるとき、限定はされないが、蒸留、透析蒸発、限外濾過、ナノ濾過、直接浸透、液体 - 液体抽出、固相抽出、超臨界抽出、クロマトグラフィー及びその他を含む当該技術分野で公知の任意の方法を、単独で又はその一部を組み合わせ用いて行うことができる。

【 0 0 6 3 】

本発明の第 4 の態様は、アセトインを産生する方法であって、本発明の第 2 の態様の細菌株による炭水化物リッチ培地の好気性発酵を含む方法である。

20

【 0 0 6 4 】

驚くべきことに、本発明の第 2 の態様の株の代謝物の産生特性が培養条件に大きく依存することが見出されている。それは、主に、発酵が 5 . 5 ~ 6 . 0 の弱酸性 p H 値の好気性条件下で実施されるときに 2 , 3 - B D O を産生する。しかし、発酵が、同様に好気性条件下であるが、中性付近のより高い p H 値で実施されるとき、主な発酵生成物は、アセトインである。「主に」は、参照される代謝物が発酵生成物全体の 4 5 ~ 9 5 % 、好ましくは 6 5 ~ 9 5 % を占めることとして理解される。特に、発酵生成物の 7 0 ~ 9 5 % 、好ましくは 8 0 ~ 9 5 % は、発酵が p H 5 . 5 ~ 6 . 0 で実施されるときに 2 , 3 - B D O に対応する。発酵が p H 6 . 5 ~ 7 . 0 で実施されるとき、株は、発酵生成物の 4 5 ~ 9 5 % 、好ましくは 6 5 ~ 8 0 % に対応する量でアセトインを産生する。

30

【 0 0 6 5 】

本発明の第 4 の態様の特定の実施形態では、アセトインを産生する方法は、以下のステップ：

- ( a ) 本発明の第 2 の態様に定義されるような株を予備培養するステップと、
- ( b ) ステップ ( a ) で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、
- ( c ) 2 0 ~ 4 0 % 、 p H 6 . 5 ~ 7 . 5 及び 3 0 ~ 1 0 0 % の溶解酸素濃度において、
- ステップ ( b ) で接種された培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、
- ( d ) ステップ ( c ) から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップとを含む。

40

【 0 0 6 6 】

本発明の第 4 の態様の別の特定の実施形態では、アセトインを産生する方法は、ステップ ( d ) から得られた無細胞発酵培養液中に存在するアセトインを精製するステップをさらに含む。

【 0 0 6 7 】

本発明の第 4 の態様の別の特定の実施形態では、ステップ ( c ) で実施される発酵は、連続モードである。

【 0 0 6 8 】

本発明の第 4 の態様の別の特定の実施形態では、ステップ ( c ) で実施される発酵は、フェドバッチモードである。

50

## 【 0 0 6 9 】

本発明の第 4 の態様の別の特定の実施形態では、ステップ ( c ) で実施される発酵は、バッチモードである。

## 【 0 0 7 0 】

アセトインは、接種時に行われる培養の開始から 1 5 ~ 4 0 時間、好ましくは 1 8 ~ 2 4 時間にわたって発酵培養液中に蓄積される。微生物が炭素源として利用可能なすべての炭水化物を消費した直後に生じる最大のアセトインの産生が達成されるとき、発酵は、完了したと考えることができる。

## 【 0 0 7 1 】

本発明の第 5 の態様は、乳酸を産生する方法であって、本発明の第 2 の態様の細菌株による炭水化物リッチ培地の嫌気性発酵を含む方法である。

10

## 【 0 0 7 2 】

本発明の第 5 の態様の特定の実施形態では、乳酸を産生する方法は、以下のステップ：

( a ) 本発明の第 2 の態様に定義されるような株を予備培養するステップと、

( b ) ステップ ( a ) で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、

( c ) 2 0 ~ 4 0 、 p H 6 . 0 ~ 7 . 5 及び嫌気性条件下において、ステップ ( b ) で接種された培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップと

を含む。

## 【 0 0 7 3 】

本発明の第 5 の態様の別の特定の実施形態では、乳酸を産生する方法は、ステップ ( d ) から得られた無細胞発酵培養液中に存在する乳酸を精製するステップをさらに含む。

20

## 【 0 0 7 4 】

本発明の第 5 の態様の別の特定の実施形態では、ステップ ( c ) で実施される発酵は、連続モードである。

## 【 0 0 7 5 】

本発明の第 5 の態様の別の特定の実施形態では、ステップ ( c ) で実施される発酵は、フェドバッチモードである。

## 【 0 0 7 6 】

本発明の第 5 の態様の別の特定の実施形態では、ステップ ( c ) で実施される発酵は、バッチモードである。

30

## 【 0 0 7 7 】

乳酸は、接種時に行われる培養の開始から 1 5 ~ 4 0 時間、好ましくは 2 0 ~ 3 0 時間にわたって発酵培養液中に蓄積される。微生物が炭素源として利用可能なすべての炭水化物を消費した直後に生じる最大の乳酸の産生が達成されるとき、発酵は、完了したと考えることができる。

## 【 0 0 7 8 】

本発明の第 3 、第 4 及び第 5 の態様の特定の実施形態では、発酵性炭水化物は、目的を限定することなく、グルコース、キシロース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、スクロース、ラクトース、糖蜜及びそれらの混合物の群から選択される。

40

## 【 0 0 7 9 】

本発明の第 3 、第 4 及び第 5 の態様の別の特定の実施形態では、発酵培地は、目的を限定することなく、酵母抽出物、肉抽出物、コーンステープリカー ( C S L ) 、肉、大豆又はカゼインペプトン、タンパク質リッチな農業食品副産物からのタンパク質加水分解物、例えば大豆粕 / 小麦粉、乳清、穀類蒸留粕 ( D D G S ) 及びそれらの混合物の群から選択される窒素源を含有する。

## 【 0 0 8 0 】

本発明の第 3 、第 4 及び第 5 の態様の別の特定の実施形態では、培地は、細菌増殖を支援し、2 , 3 - B D O の産生を促進するため、追加的な栄養分及び増殖因子、例えばビタミン及び無機塩を添加され得る。用いられるビタミンは、特にピリドキサミン、ビオチン、

50

ニコチン酸、パントテン酸カルシウム、リボフラビン及びリボ酸（純粋なビタミンと公知の組成物との人工混合物又はそれらを含む複雑な天然製剤又は抽出物のいずれかとして添加され得る）、例えば酵母抽出物、ＣＳＬなどを含む。無機塩は、好ましくは、リン酸塩並びにカリウム及びマグネシウム塩の群から選択され得る。

【００８１】

本発明の第３、第４及び第５の態様の別の特定の実施形態では、炭水化物リッチ培地はまた、発酵全体を通じた過剰な泡状物の形成のため、必要に応じて消泡剤、例えばシリコンに基づくもの、植物油、ポリエチレングリコールなどを当該技術分野で公知の手順に従って添加され得る。

【００８２】

本発明の第３及び第４の態様の別の特定の実施形態では、炭水化物リッチ培地中における本発明の第２の態様の株の培養は、任意の標準の好気性培養技術を用いて実施され得る。液体培地中での培養方法、特に振盪フラスコ培養又は発酵槽若しくはケモスタット様反応器内培養が好ましい。

【００８３】

本発明の第３及び第４の態様の別の特定の実施形態では、培養の好気性は、空気、純酸素又はそれらの混合物のいずれかの形態での酸素の培地への十分な供給によって達成され得る。振盪フラスコ培養の場合、酸素供給は、１００～５００ｒｐｍ、好ましくは２００～３００ｒｐｍの頻度での培養フラスコの振盪を通して達成される。培養反応器の場合、酸素供給は、空気、純酸素又はそれらの混合物のいずれかの流れを、溶解酸素濃度が飽和濃度の５～１００％、好ましくは１０～９０％であるように培地に通過させることによって達成され得る。培地の混合は、２５０～１０００ｒｐｍ、好ましくは５００～７５０ｒｐｍで作動する攪拌器又は羽根車のいずれかを用いて実施され得る。

【００８４】

本発明の第５の態様の別の特定の実施形態では、炭水化物リッチ培地中における本発明の第２の態様の株の培養は、任意の標準の嫌気性培養技術を用いて実施され得る。液体培地中での培養方法、特にフラスコ培養又は発酵槽若しくはケモスタット様反応器内培養が好ましい。

【００８５】

本発明の第５の態様の別の特定の実施形態では、培養の嫌気性は、周囲酸素から培地を単離することによって達成され得る。フラスコ培養の場合、単離は、それらを振盪しないか又は密閉することによって達成され得る。培養反応器の場合、単離は、それらを密閉し、及び／又は酸素を含まない気体の流れを培地に通過させることによって達成され得る。培養反応器内での培地の混合は、２５０～１０００ｒｐｍ、好ましくは４００～６００ｒｐｍで作動する攪拌器又は羽根車のいずれかを用いて実施され得る。

【００８６】

本発明の第３、第４及び第５の態様の別の特定の実施形態では、培地のｐＨ制御は、固定値でｐＨを維持することが必要である場合、緩衝剤（通常、その目的で用いられるものの中で選択されたもの）の使用、又は培養の特定要件に応じたアルカリ若しくは酸のいずれかの添加（それぞれ微生物増殖を生じさせ得る酸性化若しくはアルカリ化に対抗するため）のいずれかによって達成され得る。

【００８７】

そのため、本発明はまた、好気性条件下で培養されるとき、その由来元である野生型株によって産生される量の少なくとも１０倍、好ましくは２０倍の２，３－ＢＤＯを産生する増大した能力と、その由来元である野生型株によって産生される量の少なくとも１０倍、好ましくは２０倍のアセトインを産生する増大した能力と、その由来元である野生型株によって産生される量の少なくとも１０倍の乳酸を産生する低下した能力とを有するラクトコッカス・ラクティスの修飾株を提供する。代替的又は追加的に、本発明の株は、培養液のｐＨに応じて主に２，３－ＢＤＯ又はアセトインを産生する。例えば、本発明の株は、炭水化物リッチ培地上において２０～４０、ｐＨ５．５～６．０及び５～１００％の溶

10

20

30

40

50

解酸素濃度で培養されるとき、全発酵生成物の70～95%に対応する量で2,3-BDOを産生し、且つ炭水化物リッチ培地上において20～40、pH6.5～7.5及び30～100%の溶解酸素濃度で培養されるとき、発酵生成物の45～80%に対応する量でアセトインを産生する。好ましくは、本発明の株は、炭水化物リッチ培地上において20～40、pH5.5～6.0及び10～90%の溶解酸素濃度で培養されるとき、全発酵生成物の80～95%に対応する量で2,3-BDOを産生し、且つ炭水化物リッチ培地上において20～40、pH6.8～7.2（例えば、pH7）及び30～100%の溶解酸素濃度で培養されるとき、発酵生成物の65～80%に対応する量でアセトインを産生する。ラクトコッカス・ラクティスの野生型株は、ラクトコッカス・ラクティスNCIMB 702118であり得る。さらに、本発明の株は、2,3-BDO及び/又はアセトインを過剰産生する、上に開示されるような野生型株に由来する2つのL・ラクティス親株のプロトプラスト融合によって入手可能である。野生型株は、ラクトコッカス・ラクティスNCIMB 702118であり得る。

10

**【0088】**

本明細書で記載される主題の明確性を高めることを意図して、以下の定義が提供され、それらは、本明細書全体を通して、特に特許請求の範囲内で適用されるべきである。

**【0089】**

用語「ゲノム混合」は、本明細書で用いられるとき、プロトプラスト融合及び組換えプロセス後の2つ以上の株又は微生物の1つへのゲノムの混合に基づく方法を指す。組換えは、最終的に無作為に生じ、それにより広範囲のゲノム及び表現型を示す組換え誘導体株の大規模ライブラリーの作製が可能になる。探求された表現型の特徴及び特性が授けられた株のみを単離するため、組換え株は、選択又はスクリーニングプロセスをさらに受け得る。典型的には、「ゲノム混合」は、幾らかの遺伝的多様性を示す2つ以上の突然変異体株を用いて実施され、これら多様性の有利な組み合わせが探索される。

20

**【0090】**

用語「野生型株」は、本明細書で用いられるとき、天然に見出されるような微生物株、すなわちその遺伝的及び表現型の特徴を修飾するように何らかの技術を通して人によって操作されていない株を指す。

**【0091】**

用語「予備培養」は、本明細書で用いられるとき、発酵が行われることになる培養液に接種するために用いられる株の予備的な小規模培養を指す。本発明の第2の態様の株の予備培養は、一般的方法のセクションにおいて下記に説明される好気性培養条件下においてYEC培地中で24時間実施され得る。

30

**【0092】**

用語「炭水化物リッチ培地」は、本明細書で用いられるとき、本発明の第2の態様の株によって吸収可能であるエネルギー、炭素源及び窒素源を含有し、且つ株による培養条件に応じたその増殖及び2,3-BDO、アセトイン又は乳酸のいずれかの高産生を可能にする任意の培地を指す。例えば、目的を限定することなく、好適な炭素源及びエネルギー源の中でも、グルコース、キシロース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、スクロース、ラクトース、糖蜜及びそれらの混合物が見出される。好適な窒素源として、限定はされないが、酵母抽出物、肉抽出物、コーンステープリカー(CSL)、肉、大豆又はカゼインペプトン、タンパク質リッチな農業食品副産物からのタンパク質加水分解物、例えば大豆粕/小麦粉、乳清、穀類蒸留粕(DDGS)及びそれらの混合物を挙げることができる。

40

**【0093】**

用語「プロトプラスト」は、本明細書で用いられるとき、浸透圧的に安定化された培地中で酵素処理によって細胞壁が失われた細菌細胞を指す。

**【0094】**

用語「好気性発酵」は、本明細書で用いられるとき、好気性条件下、すなわち酸素の存在下で実施される発酵を指す。用語「嫌気性発酵」は、本明細書で用いられるとき、嫌気性

50

条件下、すなわち酸素の不在下で実施される発酵を指す。発酵は、広義には、炭水化物を様々な生物学的製剤に変換する代謝過程である。

【0095】

用語「L.ラクティスの野生型株と比べたアセトイン及びノ又は2,3-BDOを産生する増大した能力」は、修飾株について本明細書で用いられるとき、上記株が、一般的方法セクションに記載の方法を用いることにより、本発明中に提示される例において検出される場合、野生型株よりも大量にかかる代謝物（アセトイン及びノ又は2,3-BDO）を産生するという事実を指す。

【0096】

用語「L.ラクティスの野生型株と比べた乳酸を産生する低下した能力」は、修飾株について本明細書で用いられるとき、上記株が、一般的方法セクションに記載の方法を用いることにより、本発明中に提示される例において検出される場合、野生型株よりも少量にかかる代謝物（乳酸）を産生するという事実を指す。

【実施例】

【0097】

実施例

本発明は、あくまで例示目的で与えられ、決して本発明を限定するように意図されない以下の実施例により、さらに例示される。

【0098】

一般的方法

微生物：本発明で用いられる微生物は、L.ラクティスCML B4（スペイン特許第2352633B1号）、L.ラクティスCML B3及びL.ラクティス43103細菌株であった。これらのすべての株は、L.ラクティス野生型株NCIMB 702118に由来する。

【0099】

培地：振盪フラスコ培養は、YEC培地中で実施し、その組成物は、次の通りである：10g/Lのグルコース、5g/Lの酵母抽出物及び20mMのクエン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）。

【0100】

発酵槽培養は、炭水化物リッチ培地中で実施した。用語「炭水化物リッチ培地」は、本明細書で用いられるとき、L.ラクティス43103株によって吸収可能なエネルギー、炭素源及び窒素源を含有し、且つ株による培養条件に応じたその増殖及び2,3-BDO、アセトイン又は乳酸のいずれかの高産生を可能にする当該技術分野で公知の任意の培地を指す。具体的には、本発明で提供する実施例で用いる炭水化物リッチ培地は、100g/Lの初期炭水化物濃度をグルコース又はスクロース（純粋又はてんさい糖蜜由来のいずれか）の形態で含有する。

【0101】

培養方法：以下のタイプの培養物を、本発明全体を通して用いた。

【0102】

A. 振盪フラスコ培養：好気性振盪フラスコ培養は、室温及び250rpmの回転振盪において、20mLのYEC培地を含有する100mLのエrlenmeyerフラスコ内で実施した。培養は、YEC寒天培地のプレート上で3日間増殖させた株のコロニーの接種後、24時間にわたって増殖させたYEC培地での予備培養として得られた1%（v/v）接種材料を培地に接種することによって開始した。

【0103】

B. 発酵槽培養（バッチ）：発酵槽バッチ培養は、1L反応器を備え、炭水化物リッチ培地750mLを含有する実験室発酵槽を用いて実施した。発酵は、30及び500又は750rpmの攪拌速度で実施した。好気性培養では、溶解酸素濃度は、1L/L/分の気流で単独又は酸素濃縮のいずれかで培地を通過させることにより、培地飽和濃度に対して10～30%に設定した。嫌気性培養では、攪拌速度を500rpmに設定し、供給空

10

20

30

40

50

気を除去した。発酵 pH は、実験間で異なる値に設定し、5 M NaOH の自動添加を通して維持した。発酵は、- 80 、10 % グリセロール中で保存した株のクライオバイアル 1 mL の接種後、500 mL のエルレンマイヤーフラスコ内で 24 時間にわたって増殖させた YEC 培地中の予備培養物 100 mL を培地に接種することによって開始した。

#### 【0104】

C . 発酵槽培養 (フェドバッチ) : 発酵槽フェドバッチ培養は、炭素源が消耗間近であるとき、100 g / L のグルコースのさらなる供給を含むこと以外、方法 B のように実施した。

#### 【0105】

代謝物濃度の測定 : 発酵培養液中の 2 , 3 - BDO 、アセトイン、乳酸、酢酸、エタノール及びグルコース又はスクロースの濃度を、以下の条件 : 移動相、0 . 01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 流速、0 . 7 mL / 分 ; カラム温度、55 ; 検出器温度、35 で 300 × 7 . 8 mm の Aminex HPX-87H (Bio Rad) カラム及び Microguard Cation H Refill Cartridge プレカラムを用いて HPLC により測定した。屈折率検出器を用いてピーク定量化を行った。

#### 【0106】

細菌増殖の測定 : YEC 培地中の細菌増殖又はバイオマス濃度を、適切に希釈した細胞懸濁液の 600 nm での光学密度 (OD<sub>600</sub>) として測定した。培養を炭水化物リッチ培地中で実施したとき、バイオマスは、測定値に干渉する不可溶性粒子の培地中での存在に起因して測定できなかった。

#### 【0107】

##### 実施例 1

L . ラクティス突然変異体株 B3 の単離

L . ラクティス野生型株 NCIMB 702118 の単一コロニーを、1 % グルコース添加 M17 培地 (Terzaghi BE, Sandine WE, "Improved medium for Lactic Streptococci and their bacteriophages", Appl. Microbiol., 1975, vol. 29, pp. 807-813 ; 組成物 : トリプトン、2 . 5 g / L ; 肉ペプトン、2 . 5 g / L ; 大豆ペプトン、5 . 0 g / L ; 肉抽出物、5 . 0 g / L ; 酵母抽出物、2 . 5 g / L ; グリセロリン酸ナトリウム、19 . 0 g / L ; 硫酸マグネシウム、0 . 25 g / L ; 及びアスコルビン酸、0 . 50 g / L ) を 10 mL 含有する 100 mL のエルレンマイヤーフラスコ内において、30 (250 rpm) で 24 時間培養した。細菌細胞を 100 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7 . 5) 中での遠心分離 / 再懸濁により 2 回洗浄し、最後に同じ緩衝液 1 mL に再懸濁した。これに化学変異原エチルメタンスルホン酸 (EMS) の濃縮細胞懸濁液 120 µL を添加し、得られた懸濁液をゆっくりと振盪させながら 25 で 15 分間インキュベートした。次に、細胞を再び同じリン酸カリウム緩衝液 10 mL で 2 回洗浄し、1 % グルコースを有する M17 培地 10 mL に再懸濁し、振盪下で 1 時間インキュベートした。

#### 【0108】

最後に、得られた細胞懸濁液の適切な希釈物を選択培地寒天プレートに蒔いた。選択培地は、より低い緩衝化能 (標準的なものの場合のわずか 5 %) を有し、さらに 100 mg / L の 2 , 3 , 5 - トリフェニルテトラゾリウムを添加した修飾 M17 培地であった。この選択培地上で野生型株がピンクコロニーを形成する一方、低い乳酸産生株は、赤色 / 褐色コロニーとして出現することが予想される。

#### 【0109】

選択培地上に蒔いた全部で 26 , 000 のコロニーから 4 つの赤色コロニーを単離し、代謝物の産生について分析した (方法 A) 。これらの単離したコロニーの中で、L . ラクティス B3 株は、最高の 2 , 3 - BDO 及び最低の乳酸の産生を示したことから、最終的に選択した。増殖及び代謝物の産生を表 1 に示す。

#### 【0110】

##### 実施例 2

L . ラクティス 43103 株の単離

L . ラクティス 4 3 1 0 3 株は、突然変異体株 L . ラクティス B 4 及び B 3 のプロトプラストの融合を通じたゲノム混合の方法を用いて得た。

【 0 1 1 1 】

2 0 時間増殖させた L . ラクティス B 4 及び B 3 株の Y E C 培地中の振盪フラスコ培養物からそれぞれ 1 m L を別々に採取し、1 4 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した。細胞を P M ( プロトプラスト用培地 ( Protoplasting medium ) : 1 0 m M の トリス - H C l ( p H 7 . 0 ) 、 2 0 m M の C a C l 2 及び 0 . 5 M の スクロース ) で 3 回洗浄し、最後に、5 m g / m L の リゾチーム及び 1 0 0 U / m L の ムタノリシンを添加した P M 6 5 0 μ L に再懸濁した。細菌懸濁液をゆっくりと振盪させながら 3 7 ° で 2 時間インキュベートし、それらの各々のプロトプラストを得た。プロトプラストを P M で 2 回洗浄し、同じ培地 0 . 5 m L に再懸濁した。

10

【 0 1 1 2 】

L . ラクティス B 4 株のプロトプラスト懸濁液の試料 1 0 0 μ L をウォーターバス内において 6 0 ° で 3 0 分間加熱し、プロトプラストを不活性化した。

【 0 1 1 3 】

1 . 5 m L の エッペンドルフチューブ内で L . ラクティス B 4 ( 熱不活性化したもの ) 及び B 3 ( 不活性化していないもの ) 株のプロトプラスト懸濁液を 5 0 μ L ずつ混合し、次に 5 0 % P E G 6 0 0 0 を添加した P M 9 0 0 μ L を緩やかに混合しながら添加し、3 7 ° で 1 0 分間インキュベートし、プロトプラスト融合を誘導した。次に、懸濁液を P M で 2 回洗浄し、プロトプラスト融合過程を停止した。得られた全懸濁液を用いて、R M ( 再生培地 : 1 % グルコース、5 g / L の酵母抽出物、2 0 m M のクエン酸 ( p H 7 . 0 ) 、 2 5 m M の M g C l 2 、 2 5 m M の C a C l 2 、 2 . 5 % ゼラチン、0 . 5 M のスクロース ) 5 m L を含有する 1 0 0 m L のエルレンマイヤーフラスコに接種し、室温 ( 1 2 5 r p m ) で一晩培養した。

20

【 0 1 1 4 】

上記培養の適切な希釈物を、1 0 0 m g / L の 2 , 3 , 5 - トリフェニルテトラゾリウムを添加した非緩衝 Y E C 培地プレート ( クエン酸塩を有しない ) に蒔き、コロニーの出現まで 4 8 時間インキュベートした。異なる態様を示す全部で 1 8 のコロニーを同じ培地の新しいプレートに単離し、次に増殖及び代謝物の産生について分析し ( 方法 A ) 、 L . ラクティス B 4 、 B 3 及び野生型株と比較した。すべての単離株の中で、L . ラクティス 4 3 1 0 3 と称されるそれらの 1 つは、アセトイン / 2 , 3 - B D O / 乳酸の産生に関して最良の特徴を示した。結果を表 1 に示す。

30

【 0 1 1 5 】

【表 1】

表 1.YEC 培地中での L . ラクティス ( *L.lactis* ) の野生型並びに B4、B3 及び 43103 突然変異体株による増殖及び代謝物の産生 ( 方法 A )

株	DO <sub>600</sub>	アセトイン	2,3-BDO	乳酸
野生型*	2.3	<1.0	<0.5	40.5
B4	4.5	52.8	2.9	8.5
B3	4.0	27.4	14.2	34.4
43103	4.3	44.5	11.9	6.8

40

代謝物濃度は mM として表される

\* 50% を超えるグルコースが培地の制限された緩衝化及び乳酸の高産生の結果として未使用状態で残存する

【 0 1 1 6 】

実施例 3 ~ 6

異なる p H 値での L . ラクティス 4 3 1 0 3 株によるてんさい糖蜜培地の好気性発酵

50



一般的方法セクションに記載の方法 B に従い、*L* . ラクティス 4 3 1 0 3 株を用いて、7 . 0 ~ 5 . 5 の異なる pH 値において、炭素源としててんさい糖蜜を含有する炭水化物リッチ培地の一連の好気性発酵を実施した。溶解酸素濃度を 3 0 %、攪拌速度を 7 5 0 r p m に設定した。代謝物の産生の結果を表 2 に示す。

【 0 1 1 7 】

【表 2】

表 2.異なる pH 値での *L* . ラクティス(*L.lactis*)43103 株によるてんさい糖蜜培地の好気性発酵における代謝物の産生(方法 B)

pH	アセトイン	2,3-BDO	乳酸
7.0	376	99	90
6.5	365	216	214
6.0	183	378	205
5.5	57	371	75

代謝物濃度は mM として表される

10

【 0 1 1 8 】

実施例 7 ~ 1 1

p H 5 . 5 並びに溶解酸素濃度及び攪拌速度の異なる値での *L* . ラクティス 4 3 1 0 3 株によるてんさい糖蜜培地の好気性発酵

一般的方法セクションに記載の方法 B に従い、*L* . ラクティス 4 3 1 0 3 株を用いて、p H 5 . 5 並びに 1 0 ~ 3 0 % の溶解酸素濃度及び 5 0 0 ~ 7 5 0 r p m の攪拌速度の異なる値において、炭素源としててんさい糖蜜を含有する炭水化物リッチ培地の一連の好気性発酵を実施した。代謝物の産生の結果を表 3 に示し、ここで、過去に 3 0 % の溶解酸素及び 7 5 0 r p m で得られた値を参照として含める。

【 0 1 1 9 】

【表 3】

表 3.pH5.5 並びに溶解酸素濃度及び攪拌速度の異なる値での *L* . ラクティス(*L.lactis*)43103 株によるてんさい糖蜜培地の好気性発酵における代謝物の産生(方法 B)

DO <sup>1</sup>	攪拌速度 <sup>2</sup>	アセトイン	2,3-BDO	乳酸
30%	750	57	371	75
20%	750	43	479	77
10%	750	35	589	132
30%	500	53	436	95
20%	500	57	556	121
10%	500	42	515	113

代謝物濃度は mM として表される

<sup>1</sup>DO, 培地飽和濃度に対して%で表される溶解酸素濃度

<sup>2</sup>攪拌速度, rpm として表される攪拌速度

30

40

【 0 1 2 0 】

実施例 1 2 ~ 1 4

p H 5 . 5 での *L* . ラクティス 4 3 1 0 3 株による異なる炭素源を含有する培地の好気性発酵

50

一般的方法セクションに記載の方法 B に従い、L . ラクティス 4 3 1 0 3 株を用いて、pH 5 . 5、1 0 % の溶解酸素濃度及び 7 5 0 r p m の攪拌速度において、炭素源として純粋なグルコース、グルコースシロップ又は純粋なスクロースのいずれかを含有する炭水化物リッチ培地の一連の好気性発酵を実施した。代謝物の産生の結果を表 4 に示す。

【 0 1 2 1 】

【表 4】

表 4.pH5.5 での *L. ラクティス(L.lactis)*43103 株によるグルコース、グルコースシロップ又はスクロース培地の好気性発酵における代謝物の産生(方法 B)

炭素源	アセトイン	2,3-BDO	乳酸
グルコース	65	491	33
グルコースシロップ	14	556	90
スクロース	35	578	71

代謝物濃度は mM として表される

10

【 0 1 2 2 】

実施例 1 5

pH 6 . 0 での L . ラクティス 4 3 1 0 3 株によるグルコースを含有する培地の好気性フェドバッチ発酵

20

一般的方法セクションに記載の方法 C に従い、L . ラクティス 4 3 1 0 3 株を用いて、pH 6 . 0、1 0 % の溶解酸素濃度及び 7 5 0 r p m の攪拌速度において、炭素源としてグルコースを含有する炭水化物リッチ培地のフェドバッチモード下で好気性発酵を実施した。代謝物の産生の結果を表 5 に示す。

【 0 1 2 3 】

【表 5】

表 5.pH6.0 での *L. ラクティス(L.lactis)*43103 株によるグルコース培地の好気性フェドバッチ発酵における代謝物の産生(方法 C)

炭素源	アセトイン	2,3-BDO	乳酸
グルコース	40	851	47

代謝物濃度は mM として表される

30

【 0 1 2 4 】

実施例 1 6

L . ラクティス 4 3 1 0 3 株によるてんさい糖蜜培地の嫌気性発酵

一般的方法セクションに記載の方法 B に従い、L . ラクティス 4 3 1 0 3 株を用いて、炭素源としててんさい糖蜜を含有する炭水化物リッチ培地の嫌気性発酵を実施した。代謝物の産生の結果を表 5 に示す。

【 0 1 2 5 】

【表 6】

表 6.*L. ラクティス(L.lactis)*43103 株によるてんさい糖蜜培地の嫌気性発酵における代謝物の産生(方法 B)

酸素	アセトイン	2,3-BDO	乳酸
嫌気生活	7	79	975

代謝物濃度は mM として表される

40

【 0 1 2 6 】

本願中に引用される参考文献

50

Haessler, T., et al. "Enhanced fed-batch fermentation of 2, 3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365" *Bioresource technology* 2012 vol.124, pp. 237-244

Ge, Y., et al. "Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis*". *Green Chemistry*, 2016  
Nielsen, D.R., et al. "Metabolic Engineering of Acetoin and meso-2,3-Butanediol Biosynthesis in *E. coli*.", *Biotechnol. J.* 2010, vol. 5, pp. 274-284

Lian, J., et al. "Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R, 3R)-butanediol" *Metabolic engineering* 2014, vol. 23, pp. 92-99

Platteeuw C, et al. "Metabolic engineering of *Lactococcus lactis* - influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate-dehydrogenase as a function of culture conditions", *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, vol. 61, pp. 3967-71

Gaspar P, et al. "High yields of 2,3-butanediol and mannitol in *Lactococcus lactis* through engineering of NAD (+) cofactor recycling", *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, vol. 77, pp. 6826-35

Liu J, et al. "Combining metabolic engineering and biocompatible chemistry for high-yield production of homo-diacetyl and homo-(S,S)-2,3-butanediol", *Metabolic engineering* 2016, vol. 36, pp. 57-67

P C T / 米国特許出願公開第 S 2 0 0 9 / 0 5 8 8 3 4 号

Zhang YX, et al. "Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria", *Nature* 2002, vol. 415, pp. 644-646

フランス特許第 2 7 7 7 9 0 5 号

スペイン特許第 2 3 5 2 6 3 3 B 1 号

Terzaghi BE, Sandine WE, "Improved medium for Lactic Streptococci and their bacteriophages", *Appl. Microbiol.*, 1975, vol. 29, pp. 807-813

【 0 1 2 7 】

#### 条項

1. ラクトコッカス・ラクティス細菌の修飾株を産生するための方法であって、2つのラクトコッカス・ラクティス親株であって、好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、(a) アセトイン及び/又は2, 3-ブタンジオールを産生する増大した能力と、(b) 乳酸を産生する低下した能力とを示す2つのラクトコッカス・ラクティス親株からの2つのプロトプラストを融合するステップを含む方法。

2. ラクトコッカス・ラクティス親株の各々は、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株に突然変異誘発処理を施すことによって得られる、請求項1に記載の方法。

3. 突然変異誘発処理は、エチルメタンサルホン酸 (EMS) を用いて実施される、請求項2に記載の方法。

4. 好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、ラクトコッカス・ラクティス親株の一方は、アセトインを産生する増大した能力を有し、及び他方は、2, 3-ブタンジオールを産生する増大した能力を有する、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

5. プロトプラスト融合ステップを受ける2つのラクトコッカス・ラクティス親株の一方は、好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、アセトインを産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下した能力とを有する、受託番号 C E C T 7 5 1 2 下で Spanish Type Culture Collection に寄託されたラクトコッカス・ラクティス C M L B 4 株である、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

6. プロトプラスト融合ステップを受ける2つのラクトコッカス・ラクティス親株の一方は、好気性条件下で培養されるとき、ラクトコッカス・ラクティスの野生型株と比べて、2, 3-ブタンジオール及びアセトインを産生する増大した能力と、乳酸を産生する低下

10

20

30

40

50

した能力とを有する、ラクトコッカス・ラクティス C M L B 3 株である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

7 . 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法によって入手可能なラクトコッカス・ラクティス細菌の修飾株。

8 . 受託番号 C E C T 9 1 3 9 下で Spanish Type Culture Collection に寄託されている、請求項 7 に記載のラクトコッカス・ラクティス細菌の修飾株。

9 . 2 , 3 - ブタンジオールを産生する方法であって、請求項 7 ~ 8 のいずれか一項に定義される細菌株による炭水化物リッチ培地の好気性発酵を含む方法。

10 . 以下のステップ：

( a ) 請求項 7 ~ 8 のいずれか一項に定義される株を予備培養するステップと、  
( b ) ステップ ( a ) で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、  
( c ) 20 ~ 40 、 p H 5 . 5 ~ 6 . 0 及び 5 ~ 100 % の溶解酸素濃度において、ステップ ( b ) で接種された培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、  
( d ) ステップ ( c ) から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップと  
を含む、請求項 9 に記載の 2 , 3 - ブタンジオールを産生する方法。

10

11 . ステップ ( d ) から得られた無細胞発酵培養液中に存在する 2 , 3 - ブタンジオールを精製するステップをさらに含む、請求項 10 に記載の 2 , 3 - ブタンジオールを産生する方法。

12 . アセトインを産生する方法であって、請求項 7 ~ 8 のいずれか一項に定義される細菌株による炭水化物リッチ培地の好気性発酵を含む方法。

20

13 . 以下のステップ：

( a ) 請求項 7 ~ 8 のいずれか一項に定義される株を予備培養するステップと、  
( b ) ステップ ( a ) で得られた予備培養物を炭水化物リッチ培地に接種するステップと、  
( c ) 20 ~ 40 、 p H 6 . 5 ~ 7 . 5 及び 30 ~ 100 % の溶解酸素濃度において、ステップ ( b ) で接種された培地中に存在する炭水化物を発酵させるステップと、  
( d ) ステップ ( c ) から得られた発酵培養液から細胞を分離するステップと  
を含む、請求項 12 に記載のアセトインを産生する方法。

14 . ステップ ( d ) から得られた無細胞発酵培養液中に存在するアセトインを精製するステップをさらに含む、請求項 13 に記載のアセトインを産生する方法。

15 . 乳酸を産生する方法であって、請求項 7 ~ 8 のいずれか一項に定義される細菌株による炭水化物リッチ培地の嫌気性発酵を含む方法。

30

40

50

## フロントページの続き

- (72)発明者    オチョア ゴメス, ホセ ラモン  
                   スペイン国, ミナノ 01510, 11, シー・レオナルド ダ ヴィンチ, パルケ テクノロジコ  
                   デ アラバ
- (72)発明者    ブリエト フェルナンデス, ソラヤ  
                   スペイン国, ミナノ 01510, 11, シー・レオナルド ダ ヴィンチ, パルケ テクノロジコ  
                   デ アラバ
- (72)発明者    ロンカル マルティネス, トーマス  
                   スペイン国, ドノスティア - サン セバスティアン 20009, ミケレテヒ パセアレクア, 2,  
                   パルケ サイエンティフィコ イ テクノロジコ デ ギブスコア
- (72)発明者    カバレロ ローマン, スザナ  
                   スペイン国, ドノスティア - サン セバスティアン 20009, ミケレテヒ パセアレクア, 2,  
                   パルケ サイエンティフィコ イ テクノロジコ デ ギブスコア
- (72)発明者    ディアス デ グエレニユ ザバルテ, マリア デル マー  
                   スペイン国, ドノスティア - サン セバスティアン 20009, ミケレテヒ パセアレクア, 2,  
                   パルケ サイエンティフィコ イ テクノロジコ デ ギブスコア
- (72)発明者    リンコン アロヨ, イネス  
                   スペイン国, ドノスティア - サン セバスティアン 20009, ミケレテヒ パセアレクア, 2,  
                   パルケ サイエンティフィコ イ テクノロジコ デ ギブスコア
- 審査官    坂崎 恵美子
- (56)参考文献    国際公開第2016/097268 (WO, A1)  
                   スペイン国特許出願公開第2352633 (ES, A1)  
                   国際公開第98/007843 (WO, A1)  
                   Applied and Environmental Microbiology, 米国, American Society for Microbiology, 199  
                   7年, Vol. 63, No.6, p.2293-2299  
                   Applied and Environmental Microbiology, 米国, American Society for Microbiology, 201  
                   1年, Vol. 77, No. 19, p.6826-6835  
                   Acetoin overproduction by a mutant strain of Lactococcus lactis, tecnaliala, 2014年, 10.1  
                   3140/RG.2.1.1973.5921
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
                   C12N    1 / 20  
                   C12P    7 / 18  
                   C12P    7 / 26  
                   C12P    7 / 56  
                   JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)  
                   CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)