

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-507992

(P2012-507992A)

(43) 公表日 平成24年4月5日(2012. 4. 5)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/18 (2006.01)	C 1 2 P 7/18	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2011-535012 (P2011-535012)	(71) 出願人	505311917
(86) (22) 出願日	平成20年11月7日 (2008. 11. 7)		メタボリック エクスプローラー
(85) 翻訳文提出日	平成23年6月23日 (2011. 6. 23)		フランス国サン、ボージュール、ピオボル、
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/065131		クレルモン - リマーニュ
(87) 国際公開番号	W02010/051849	(74) 代理人	100117787
(87) 国際公開日	平成22年5月14日 (2010. 5. 14)		弁理士 勝沼 宏仁
		(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
		(74) 代理人	100111730
			弁理士 伊藤 武泰
		(72) 発明者	フランソワ、フェルケ
			フランス国モンترون、レ、パン、リュ、
			イブ、モンタン、1 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1, 2-プロパンジオールの発酵製造のための基質としてのスクロースの使用

(57) 【要約】

本発明は、発酵により 1, 2 - プロパンジオールを製造する方法であって、1, 2 - プロパンジオールを生産する微生物を、スクロースの供給源を含んでなる適切な培地で培養すること、および生産された 1, 2 - プロパンジオールを回収することを含んでなり、該微生物が、1, 2 - プロパンジオールの生産のための唯一の炭素源としてスクロースを利用することができるものである方法に関する。本発明の好ましい態様では、スクロースの供給源は植物バイオマスから得られ、特に、サトウキビ果汁である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発酵により 1, 2 - プロパンジオールを製造する方法であって、

1, 2 - プロパンジオールを生産する微生物を、スクロースの供給源を含んでなる適切な培地で培養すること、および

生産された 1, 2 - プロパンジオールを回収すること

を含んでなり、該微生物が、1, 2 - プロパンジオールの生産のための唯一の炭素源としてスクロースを利用することができるものである、方法。

【請求項 2】

微生物が、唯一の炭素源としてスクロースを利用することができるように遺伝的に改変されている、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

微生物が、PTS スクロース利用系をコードする機能的遺伝子を有する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

微生物が、遺伝子 *scrKYABR* の導入により改変されている、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

微生物が、非 PTS スクロース利用系をコードする機能的遺伝子を有する、請求項 1 または 2 に記載の方法。 20

【請求項 6】

微生物が、遺伝子 *cscBKAR* の導入により改変されている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

微生物が、細菌、酵母および真菌からなる群から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

微生物が、腸内細菌科、バチルス科、クロストリジウム科、ストレプトミセス科およびコリネバクテリア科からなる群から選択される、請求項 7 に記載の微生物。

【請求項 9】

微生物が、大腸菌(*Escherichia coli*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、サーモアナエロバクター・サーモサッカロリチカム(*Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*)、クロストリジウム・スフェノイデス(*Clostridium sphenoides*)またはサッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*) からなる群から選択される、請求項 8 に記載の微生物。 30

【請求項 10】

スクロースの供給源が、バイオマス、特に、植物バイオマスから得られるものである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

スクロースの供給源が、サトウキビ、テンサイ、サトウモロコシ、サトウカエデ、サトウヤシおよびブルーアガベからなる群から選択される植物から得られるものである、請求項 10 に記載の方法。 40

【請求項 12】

スクロースの供給源が、果汁、濃縮果汁またはシロップ、清澄化果汁、糖蜜または結晶化スクロースの形態である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

スクロース源が、サトウキビまたはテンサイ工業の最終生成物、中間生成物または副生成物である、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

適切な培地がスクロースの供給源からなる、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方 50

法。

【請求項 15】

適切な培地が、スクロースの供給源に加えて、少なくともリン源および/または窒素源を含有する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

スクロース源が少なくとも 7 % のスクロースを含んでなる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

本発明は、発酵方法、発酵に有用な微生物および基質に関する。特に、本発明は、スクロース含有培地、特に、植物バイオマスからの発酵による 1, 2 - プロパンジオールの製造に関する。

10

【0002】

C3 ジアルコールである 1, 2 - プロパンジオールまたはプロピレングリコールは、広く用いられている化学物質である。これは、不飽和ポリエステル樹脂、液体洗剤、冷却剤、不凍剤および航空機の徐氷液の成分である。プロピレングリコールは、プロピレン誘導体より有毒であると認識されているエチレン誘導体の代替として 1993 ~ 1994 年以来、使用が増えてきた。

20

【0003】

1, 2 - プロパンジオールは現在、大量の水を消費するプロピレンオキシド水和法を用いた化学的手段により製造されている。プロピレンオキシドは、一方はエピクロロヒドリンを用い、他方はヒドロペルオキシドを用いる 2 つの方法のいずれかによって製造することができる。両経路とも、毒性が強い物質を用いる。さらに、ヒドロペルオキシド経路は、tert - ブタノールおよび 1 - フェニルエタノールなどの副生成物を生じる。プロピレンの製造を有利にするためには、これらの副生成物の用途を見出さなければならない。この化学的経路は一般的にラセミ 1, 2 - プロパンジオールを生成するが、2 つの立体異性体 (R) 1, 2 - プロパンジオールおよび (S) 1, 2 - プロパンジオールはそれぞれ、ある特定の適用 (例えば、特殊化学物質および医薬品のためのキラル出発材料) に関して注目されるものである。

30

【0004】

先行技術

これら 1, 2 - プロパンジオールの製造のための化学的方法の欠点に照らすと、生合成を魅力的な選択肢である。微生物による糖からの 1, 2 - プロパンジオールの天然生産に関して 2 つの経路が同定されている。1 つ目の経路では、6 - デオキシ糖 (例えば、L - ラムノースまたは L - フコース) がジヒドロキシアセトンリン酸および (S) - ラクトアルデヒドに開裂され、さらに (S) - 1, 2 - プロパンジオールへと還元することができる (Badia et al, 1985)。この経路は大腸菌 (*E. coli*) で機能するものの、デオキシヘキソースのコストが高いために経済上実現可能な方法をもたらす得ない。2 つ目の経路は、解糖経路とその後のメチルグリオキサル経路を介した汎用糖 (例えば、グルコースまたはキシロース) の代謝である。ジヒドロキシアセトンリン酸はメチルグリオキサルへ変換され、これがラクトアルデヒドまたはアセトールのいずれかへ還元され得る。その後、これら 2 つの化合物は 2 回目の還元反応を受け、1, 2 - プロパンジオールを生じ得る。この経路は、クロストリジウム・スフェノイデス (*Clostridium sphenoides*) およびサーモアナエロバクター・サーモサッカロリチカム (*Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*) などの天然 (R) - 1, 2 - プロパンジオール生産株によって用いられている。これらの 2 つの微生物は、種々の糖類、すなわち、単糖類 (六炭糖としては D - グルコース、D - マンノース、D - ガラクトース、および五炭糖としては D - キシロースまたは L - アラビノース) または二糖類 (ラクトースまたはセロビオース) または混合物から 1, 2 - プロパンジオールを製造するために用いられている (Tran Din and Gottschalk, 1985, Camero

40

50

n and Cooney, 1986, Sanchez-Rivera et al, 1987, Altaras et al, 2001)。得られた最高性能は力価 9 g/l であり、グルコースからの収率は 0.2 g/g であった (Sanchez-Rivera et al, 1987)。しかしながら、これらの生物で得られる性能の改良は、利用可能な遺伝的手段が不足しているために限られていると思われる。同じ合成経路が大腸菌または他の腸内細菌科でも機能的であり、この微生物における D - グルコースまたは D - フルクトースに限定された炭素源を用いた 1, 2 - プロパンジオールの製造に関するいくつかの検討がCameronのグループ (Cameron et al, 1998, Altaras and Cameron, 1999, Altaras and Cameron, 2000) およびBennettのグループ (Huang et al, 1999, Berrios-Rivera et al, 2003) によりなされた。嫌氣的流加発酵槽で得られた最良の結果は、1, 2 - プロパンジオールの生産率 4.5 g/l であり、グルコースからの収率は 0.19 g/g であった (Altaras and Cameron, 2000)。同じアプローチで得られたものでありながら、より低い力価および収率という結果も特許 WO 98 / 37204 に記載されているが、違う炭素源、すなわち、ガラクトース、ラクトース、スクロースおよびキシロースを用いたものであり、しなかながらグルコースもまた用いられていた。二糖類 (ラクトースおよびスクロース) で得られた力価は極めて低かった (それぞれ 6 mg/l および 7 mg/l)。特許出願 WO 2005 / 073364 には、合理的に設計され、進化させた大腸菌株を用い、より良好な製造結果が記載されている。 1.8 g/l の 1, 2 - プロパンジオール力価が得られ、収率は消費グルコース 1 g 当たり 0.35 g であった。また、特許 WO 99 / 28481 には、組換え酵母を用いた 1, 2 - プロパンジオールおよびヒドロキシアセトンの製造が記載されている。

【0005】

発酵培地に用いられた炭素源は一般に、炭水化物、ほとんどの場合、植物由来の炭水化物からなるものであった。スクロースはテンサイ、サトウキビ、サトウモロコシ、サトウカエデ、サトウヤシまたはブルーアガベなどの砂糖植物から得られる。デンプンは植物において最も多い貯蔵炭水化物である。最も重要なデンプン源は穀類 (トウモロコシ、コムギ、イネ)、キャッサバ、サツマイモおよびジャガイモである。デンプンはほとんどの微生物によっては代謝されないが、デンプン工業により発酵可能な原料へと加工することができる。インスリンまたはインスリン様ポリマー (主としてフルクトース単位からなる) は植物において2番目に多い貯蔵炭水化物であり、チコリー、キクイモまたはダリアに見られる。セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンからなるリグノセルロースバイオマスもまた有望な炭水化物源であるが、なお開発中である (Peters, 2006)。バイオテクノロジーにより製造される日用化学製品のコストは、主として、原料のコスト (すなわち、発酵基質のコスト) に関連するので、グルコースまたはスクロースなどの精製糖の使用コストは、工業規模での製造の経済的に持続可能な選択肢ではない。高含量の発酵可能な糖を保持する効果でない基質が必要とされる。この点で、精糖工業からのスクロース含有炭素源はよい選択肢となる。

【0006】

スクロースは、16 ~ 24 % のスクロースを含有するテンサイから数段階のテンサイ加工により製造される。清掃および洗浄したビートを、コセット (cossettes) と呼ばれる細長い片にスライスし、湯で拡散により抽出して、原果汁と呼ばれ、10 ~ 15 % のスクロースを含有するスクロース果汁を得る。第二の工程は、不純物を除去し、希薄果汁を得るための石灰および次いで二酸化炭素を用いたアルカリ化および炭酸飽充による原果汁の精製である。蒸発過程で、水を除去することで希薄果汁中のスクロース濃度が高まり、スクロース含量が50 ~ 65 % の濃厚果汁が得られる。この濃縮スクロース果汁を次に結晶化させ、結晶を遠心分離により分離した後、洗浄および乾燥させて純粋な糖を得る。1回以上の結晶化工程を適用して様々な純度のスクロースを得ることができる。テンサイ加工の副生成物としては、パルプ (廃棄コセット) および糖蜜 (結晶化からの残留母液で、なお40 ~ 60 % のスクロース含量を有する) が含まれる。

【0007】

スクロースはまた、サトウキビ (スクロース含量7 ~ 20 %) から精糖工業により製造

される。収穫したサトウキビを清掃した後、果汁抽出のための粉碎工程を行う。サトウキビの構造を破壊した後、粉碎すると同時にスクロースを水で抽出して原果汁を得る。糖を取った残りの破砕サトウキビはバガッセ(bagasse)と呼ばれる。この残渣は主としてプロセス蒸気を生成するための燃料源として用いられる。次に、この原果汁を、石灰を加え、加熱することにより清澄化し、沈殿物から清澄化果汁を分離する。このプロセスの最終工程である濃縮シロップを得るための蒸発と結晶化は、テンサイ加工の場合と本質的に同じである。サトウキビ加工の副生成物としては、バガッセ、原果汁の清澄化からの濾過ケーキおよび種々の糖蜜が含まれ、なお相当な量のスクロースを含有している。

【 0 0 0 8 】

精糖プロセスからの種々のスクロース含有中間体、生成物または副生成物（原果汁、希薄または清澄化果汁、濃厚果汁、スクロースシロップ、純粹スクロース、糖蜜）は発酵原料として役立ち得る。例えば、ブラジルの精糖工業では、ガソリンの代替として使用するため、エタノール製造用に清澄化サトウキビ果汁を用いている。未精製スクロース含有製品を用いた文献での最近の例としては、ザイモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)によるテンサイ拡散果汁からのエタノール生産(Beckers et al., 1999)、大腸菌による糖蜜からのD - 乳酸の生産(Shukla et al., 2004)およびラクトバチルス・デルブリッキー(*Lactobacillus delbrueckii*)によるサトウキビ糖蜜、サトウキビ果汁またはテンサイ果汁からのD - 乳酸の生産(Calabia et al., 2007)が挙げられる。

【 0 0 0 9 】

スクロース陽性細菌（すなわち、スクロースを利用可能な細菌）におけるスクロースの取り込みおよび利用に関して2つの異なる系が同定されている。

【 0 0 1 0 】

1つ目は、ホスホエノールピルビン酸（PEP）を供与体として用いてスクロースの取り込みとリン酸化を行い、細胞内スクロース - 6 - リン酸を生じる、ホスホエノールピルビン酸（PEP）依存性スクロースホスホトランスフェラーゼ系（スクロースPTS）に基づく。次いで、スクロース - 6 - リン酸はインペルターゼにより加水分解されてD - グルコース - 6 - リン酸およびD - フルクトースとなる。D - フルクトースはATP依存性フルクトキナーゼのよりさらにリン酸化されてD - フルクトース - 6 - リン酸となった後、中枢代謝に入ることができる。このような系はグラム陽性ならびにグラム陰性のいくつかの細菌種で記載されている。腸内細菌科の中では、野生型クレブシエラ属では90%を超えるものが、エシェリキア属では50%未満が、そしてサルモネラ菌属の株では10%未満がスクロース陽性である。

【 0 0 1 1 】

スクロースPTSをコードする遺伝子s c r K Y A B Rを担持する接合性プラスミドp U R 4 0 0が、サルモネラ菌属から単離されている(Schmid et al., 1982, Schmid et al., 1988)。

【 0 0 1 2 】

さらに最近になって、2つ目の非PTS系が大腸菌E C 3 1 3 2で発見された(Bockman et al., 1992)。この系はスクロース：プロトン共輸送系（C s c B）、フルクトキナーゼ（C s c K）、インペルターゼ（C s c A）およびスクロース特異的レプレッサー（C s c R）をコードする遺伝子c s c B K A Rを含む。

【 0 0 1 3 】

大腸菌(*Escherichia coli*) K 1 2およびその誘導体（M G 1 6 5 5を含む）はスクロースを利用することができない。しかしながら、この能力は、従前に記載した2つの系をコードする遺伝子の導入により付与することができる。このことは、大腸菌K 1 2におけるプラスミドp U R 4 0 0を導入(Schmid et al., 1982)または大腸菌のスクロース陰性株におけるc s c B K A R遺伝子を担持する種々のプラスミド（p K J L 1 0 1 - 1を含む）の導入(Jahreis et al., 2002)により実証されている。産業上の利用については、大腸菌K 1 2においてスクロースからのトリプトファン生産が報告され(Tsunekawa et al., 1992)、p U R 4 0 0 プラスミドを担持する大腸菌において水素生産が示され(Penfold and M

acaskie, 2004)、特許出願 E P 1 1 4 9 9 1 1 で、P T S および非 P T S の量系の導入による種々のアミノ酸の生産が報告されている。

【 0 0 1 4 】

スクロースからの 1 , 2 - プロパンジオールの製造は、Cameron and Cooney (1986) によりクロストリジウム・サーモサッカロリチカム (以下、T・サーモサッカロリチカムと呼ぶ) において述べられているが、微量が記録されているに過ぎず、一方、他の炭素源では 3 g / l より高い量が得られ、収率は 0 . 1 g / g (基質) であった。

【 0 0 1 5 】

スクロースからの 1 , 2 - プロパンジオールの製造は特許出願 W O 9 8 / 3 7 2 0 4 に
も述べられている。しかしながら、プラスミド p S E A R X で形質転換された大腸菌株 A
A 2 0 0 が生産するのは 1 0 g / l のスクロースから 7 m g / l の 1 , 2 - プロパンジオ
ールに過ぎず、一方、同じ微生物が単糖類からは 4 9 ~ 7 1 m g / l の 1 , 2 - プロパン
ジオールを生産する。これらの極めて低い生産計上の数値から、スクロースから 1 , 2 -
プロパンジオールを生産するこれらの微生物の能力は疑わしい。本発明者らの考えるところ
では、大腸菌 K 1 2 に由来する A A 2 0 0 株は、スクロースを輸送し、そして代謝する
能力を持たない。

10

【 0 0 1 6 】

これらの過去の報告は、当業者に、1 , 2 - プロパンジオールを製造するためのスクロ
ースの使用は良い選択肢ではないことを明らかに示している。

【 0 0 1 7 】

驚くべきことに、スクロースを利用できない大腸菌株にスクロース利用のための種々の
系を導入することにより、本発明者らは、スクロースからの 1 , 2 - プロパンジオール製
造に関して高い収率を得ることができた。

20

【 0 0 1 8 】

さらに、本発明者らは、植物原料からの果汁または糖蜜などのスクロース含有培地が、
1 , 2 - プロパンジオールの発酵性酸の基質として使用可能であることを実証した。

【発明の概要】

【 0 0 1 9 】

本発明は、発酵により 1 , 2 - プロパンジオールを製造する方法であって、
1 , 2 - プロパンジオールを生産する微生物を、スクロースの供給源を含んでなる適切
な培地で培養すること、および
生産された 1 , 2 - プロパンジオールを回収すること
を含んでなり、該微生物が、1 , 2 - プロパンジオールの生産のための唯一の炭素源とし
てスクロースを利用することができるものである方法に関する。

30

【 0 0 2 0 】

特に、本発明は、唯一の炭素源としてスクロースを利用することができる改変型の微生
物の使用を開示し、該スクロースはバイオマス、特に、植物バイオマスから得られる。

【発明の具体的説明】

【 0 0 2 1 】

本明細書において、特許請求の範囲および明細書の解釈に以下の用語を用いることがで
きる。

40

【 0 0 2 2 】

本発明によれば、「培養(cultivatin)」、「培養(culture)」、「増殖(growth)」および
「発酵」とは、単純炭素源を含有する適切な増殖培地での細菌の増殖を表すために互換的
に用いられる。発酵は、好気性、微好気性または嫌気性条件下で行うことができる従来か
らのプロセスである。

【 0 0 2 3 】

本発明によれば、「適切な培地」とは、微生物の増殖に適合された既知のモル組成の培
地を表す。特に、該培地は少なくともリン源と窒素源を含有する。該適切な培地は例え
ば、少なくとも 1 つの炭素源を含有し、用いる細菌に適合された既知セットの組成の無機培

50

養培地である。該適切な培地はまた、窒素源および／またはリン源を含んでなるいずれの液体も表し、該液体がスクロースの供給源に加えられ、かつ／または混合される。従って、特に、腸内細菌科のための無機増殖培地は、M 9 培地 (Anderson, 1946)、M 6 3 培地 (Miller, 1992) または Schaefer et al. (1999) により定義されたものなどの培地、特に、下記の M M L 1 1 P G 1 _ 1 0 0 と呼ばれる最小培養培地と同一または類似の組成のものであり得る。

【 0 0 2 4 】

【 表 1 】

表 1：炭素源としてグルコースを含む最小培地 M M L 1 1 P G 1 _ 1 0 0 の組成

10

成分	濃度 (g/l)
EDTA	0.0084
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0150
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0015
H_3BO_3	0.0030
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0025
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0130
クエン酸鉄 (III) H_2O	0.1064
クエン酸	1.70
KH_2PO_4	1.65
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.92
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.40
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.88
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.08
チアミン	0.01
グルコース	20.00
MOPS バッファー	40.00

20

30

【 0 0 2 5 】

培地の pH は水酸化ナトリウムで 6.8 に調整する。

【 0 0 2 6 】

この培地において炭素源「グルコース」は、他の任意の炭素源、特に、スクロースまたはサトウキビ果汁もしくはテンサイ果汁などの任意のスクロース含有炭素源で置き換えが可能である。

40

【 0 0 2 7 】

クロストリジウム科のための増殖培地は、クロストリジウム増殖培地 (CGM, Wiesenborn et al., 1987) または Monot et al. (1982) もしくは Vasconcelos et al. (1994) により示されている無機増殖培地と同一または類似の組成のものであり得る。

【 0 0 2 8 】

「スクロース」とは、分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ を有する、 $\alpha(1,2)$ グリコシド結合により結合したグルコースとフルクトースの二糖類を表す。その組織名は α -D-グルコピラノシル-(1 $\leftrightarrow$ 2)- β -D-フルクトフラノシドである。

【 0 0 2 9 】

「スクロース源」または「スクロースの供給源」とは、種々の濃度のスクロース、特に

50

、 1 ~ 100 % のスクロースを含有する任意の培地、液体または固体を表す。

【0030】

「1, 2 - プロパンジオールを製造する」とは、培養液中での微生物のその生産が当業者に既知の標準的な分析手段により明白に記録できることを意味する。この化合物の定量に使用される好ましい技術である H P L C の 1, 2 - プロパンジオールに関する定量限界は 25 mg / l である。よって、本発明によれば、「1, 2 - プロパンジオールを製造する」とは、生産レベルが 25 mg / l を超えなければならないことを意味する。

【0031】

「唯一の炭素源としてスクロースを利用することができる」とは、その微生物が、独自の炭素源とスクロースを含有する培地で増殖可能であることを示す。よって、「1, 2 - プロパンジオールの生産のための唯一の炭素源としてスクロースを利用することができる微生物」とは、その微生物が、唯一の炭素源としてスクロースを含有する培地で増殖された場合に、少なくとも 25 mg / l の 1, 2 - プロパンジオールを生産することができることを意味する。しかしながら、本発明による 1, 2 - プロパンジオールを製造する方法では、培養培地中のスクロース源はスクロースに加え、六炭糖類（グルコース、ガラクトースまたはラクトースなど）、五炭糖類、単糖類、二糖類（スクロース、セロビオースまたはマルトースなど）、オリゴ糖、デンプンまたはその誘導体、ヘミセルロース、グリセロールおよびその組合せといったさらなる炭素源を含んでなってもよいと理解される。

【0032】

本発明の好ましい態様によれば、微生物は 1, 2 - プロパンジオールの生産のために唯一の炭素源としてスクロースを利用することができるように遺伝的に改変されている。

【0033】

本発明の特定の実施形態では、微生物は P T S スクロース利用系をコードする機能的遺伝子を含んでなる。P T S スクロース利用系は、ホスホエノールビルビン酸（P E P）依存性スクロースホスホトランスフェラーゼ系（スクロース - P T S）によるスクロースの輸送に基づくスクロース利用のための系である。このホスホトランスフェラーゼ系は、糖（例えば、スクロースまたはグルコース）の輸送とリン酸供与体として P E P を用いる糖のリン酸化とを結び付ける。細胞へ輸送された後、スクロース - リン酸はインペルターゼによりグルコース - 6 - リン酸とフルクトースに開裂される。その後、フルクトースはフルクトキナーゼによりリン酸化されてフルクトース - 6 - リン酸となる。この P T S スクロース利用系をコードする遺伝子は調節タンパク質により制御可能である。

【0034】

本発明の好ましい態様では、微生物は、サルモネラ菌属由来の遺伝子：s c r K Y A B R（フルクトキナーゼをコードする s c r K、ポリンをコードする s c r Y、タンパク質 I I B C をコードする s c r A、スクロース - 6 - P インペルターゼをコードする s c r B、レプレッサーをコードする s c r K）を自然発現するか、またはこれらの遺伝子の導入により改変されている。該遺伝子 s c r K Y A B R を担持する接合性プラスミド p U R 4 0 0 を用いて微生物を形質転換させることができる。これらの遺伝子は総てを一緒に組み合わせで使用することもできるし、またはこれらの遺伝子の少なくとも 1 つを含んでなる任意の組合せで使用することもできる。特に、遺伝子 s c r K は省くことができる。

【0035】

本発明によればこれらの遺伝子の表記はより全般的な意味を有し、他の微生物の対応する遺伝子を包含する。当業者ならば、サルモネラ菌属由来のこれらの遺伝子の G e n B a n k 参照番号を用いれば、サルモネラ菌属以外の微生物における等価な遺伝子を特定することができる。

【0036】

相同配列および相同性 % の特定手段は当業者によく知られており、特に、ウェブサイト <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> で、そのウェブサイトを示されているデフォルトパラメーターとともに使用することができる B L A S T プログラムが挙げられる。得られた配列を、例えば、プログラム C L U S T A L W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) を、

10

20

30

40

50

これらのウェブサイトを示されているデフォルトパラメーターとともに用いて、利用（アライン）することができる。

【 0 0 3 7 】

P F A Mデータベース(protein families database of alignments and hidden Markov models <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>)は、タンパク質配列アライメントの大きなコレクションである。各 P F A Mにより、複数のアライメントを表示し、タンパク質ドメインを視認し、生物内での分布を評価し、他のデータベースにアクセスし、既知のタンパク質構造を表示することができる。

【 0 0 3 8 】

C O G(clusters of orthologous groups of proteins <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)は、14の主要な系統発生系統を表す、完全に配列決定された66の単細胞ゲノムに由来するタンパク質配列を比較することにより得られる。各 C O Gは少なくとも3系統から定義され、これにより、古くから保存されているドメインを同定することができる。

【 0 0 3 9 】

細菌株にDNAを導入するために、これまでにいくつかの技術が当業者のより用いられている。好ましい技術はエレクトロポレーションであり、当業者によく知られている。

【 0 0 4 0 】

本発明のもう1つの実施形態では、微生物は非 P T Sスクロース利用系をコードする機能的遺伝子を含んでなる。非 P T Sスクロース利用系は、ホスホエノールビルビン酸に依存しない系によるスクロース輸送に基づくスクロース利用のための系である。細胞に輸送されら後、スクロースはインペルターゼによりグルコースとフルクトースに開裂される。その後、フルクトースはフルクトキナーゼによりリン酸化されてフルクトース - 6 - リン酸となり、グルコースはグルコキナーゼのよりリン酸化されてグルコース - 6 - リン酸となる。この非 P T Sスクロース利用系をコードする遺伝子は調節タンパク質により制御可能である。本発明の好ましい態様では、微生物は、大腸菌 E C 3 1 3 2 由来の遺伝子、すなわち、スクロース：プロトン共輸送系 (c s c B)、フルクトキナーゼ (c s c K)、インペルターゼ (c s c A) およびスクロース特異的レプレッサー (c s c R) をコードする遺伝子 c s c B K A R を自然発現するか、またはこれらの遺伝子の導入により改変されている。これらの遺伝子は総てを一緒に組み合わせて使用することもできるし、またはこれらの遺伝子の少なくとも1つを含んでなる任意の組合せで使用することもできる。特に、遺伝子 c s c R は省くことができる。また、他の生物由来の相同遺伝子も使用可能である。

【 0 0 4 1 】

本発明によればこれらの遺伝子の表記はより全般的な意味を有し、他の微生物の対応する遺伝子を包含する。当業者ならば、大腸菌由来のこれらの遺伝子の G e n B a n k 参照番号を用いれば、大腸菌以外の微生物における等価な遺伝子を特定することができる。

【 0 0 4 2 】

本発明の特定の態様では、微生物は1, 2 - プロパンジオールの生合成経路の向上した活性を特徴とする。1, 2 - プロパンジオールの生産のために至適化された微生物は、引用することにより本明細書の一部とされる特許出願 W O 2 0 0 5 / 0 7 3 3 6 4、W O 2 0 0 8 / 1 1 6 8 5 3、W O 2 0 0 8 / 1 1 6 8 5 2 および W O 2 0 0 8 / 1 1 6 8 4 8 に包括的に開示されている。

【 0 0 4 3 】

本発明による微生物は細菌、酵母または真菌である。

【 0 0 4 4 】

好ましくは、微生物は腸内細菌科、バチルス科、クロストリジウム科、ストレプトミセス科およびコリネバクテリア科からなる群から選択される。

【 0 0 4 5 】

より好ましくは、微生物は大腸菌 (*Escherichia coli*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、サーモアナエロバクター・サーモサッカロリチカム (*Thermoanaerobacter thermosac*

10

20

30

40

50

harolyticum)、クロストリジウム・スフェノイデス(*Clostridium sphenoides*)またはサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) からなる群から選択される。

【0046】

発酵プロセスの培養条件は当業者により容易に定義することができる。特に、細菌は20 ~ 55 の間、好ましくは25 ~ 40 の間、好ましくは、クロストリジウム科では約35、腸内細菌科では約37 の温度で発酵される。

【0047】

このプロセスは回分法、流加法または連続法のいずれかで行うことができる。発酵は、好気性、微好気性または嫌気性条件下で行うことができる従来からのプロセスである。

【0048】

「好気性条件下」とは、液相に気体を溶解させることにより培養物に酸素を供給することを意味する。これは、(1)酸素含有気体(例えば、空気)を液相に散布するか、または(2)ヘッドスペースに含まれる酸素を液相に移行させるために培養培地を含む容器を振盪することにより得られる。嫌気性条件の代わりに好気性条件下で発酵させることの利点は、電子受容体としての酸素の存在がその株の、細胞プロセスのためにより多くのエネルギーをATPの形態で生産する能力を高めるということである。

【0049】

微好気性条件は、低パーセンテージの酸素(例えば、0.1 ~ 10 %の間の酸素を含有し、窒素で100 %とした混合物を使用)を液相に溶解させる培養条件として定義される。

【0050】

嫌気性条件は、酸素が培養培地に供給されない培養条件として定義される。厳密には、嫌気性条件は、微量の他の気体を除去するために培養培地に窒素などの不活性ガスを散布することにより得られる。株によるATP生産を高め、その代謝を高めるために電子受容体として硝酸塩が使用できる。

【0051】

本発明の特定の態様では、スクロース源はバイオマス、特に、植物バイオマスから得られる。植物全体または植物の任意の特定部分を用いて、スクロース源として用いられる原料を調製することができる。この調製は、スクロース含有植物バイオマスからスクロースを抽出するための当業者に既知の任意の処理に基づき得る。

【0052】

本発明の好ましい態様では、スクロース源はサトウキビ、テンサイ、サトウモロコシ、サトウカエデ、サトウヤシおよびブルーアガベからなる群から選択される植物から得られる。

【0053】

スクロースの供給源は特にサトウキビまたはテンサイから得ることができる。

【0054】

本発明によれば、果汁、濃縮果汁、シロップ、清澄化果汁、糖蜜または結晶化スクロースなどの種々の形態のスクロース源を使用することができる。

【0055】

好ましい形態は、何の処理も行わずに植物から直接抽出されたサトウキビ由来の原果汁である。要するに、収穫したサトウキビを清掃した後、果汁抽出のために粉碎する。サトウキビの構造を破壊した後、粉碎すると同時にスクロースを水で抽出して原果汁を得る。

【0056】

この原果汁を、石灰を加え、加熱することにより清澄化し、沈殿物から清澄化果汁を分離する。蒸発により濃縮シロップが得られる。

【0057】

本発明のもう1つの実施形態では、スクロース源はサトウキビまたはテンサイ工業の最終生成物、中間生成物または副生成物であり得る。

【0058】

10

20

30

40

50

いくつかの粗スクロース源として、特に、上述のようなバイオマスから得られるものは、炭素源に加えて微生物の増殖に用いられ得る他の栄養素を含み、微生物の増殖に適切な培地は、スクロース源だけを用いることによるか（すなわち、スクロース源からなる適切な培地）、またはスクロース源をリン源および／または窒素源で補うことによって設計することができる。

【0059】

好ましくは、スクロース源は少なくとも7%のスクロースを含んでなる。

【実施例】

【0060】

実施例1：1，2 - プロパンジオールを生産し、唯一の炭素源としてスクロースを使用することができる大腸菌2株の構築

10

大腸菌株MG1655 Δ tpiA、 Δ pflAB、 Δ adhE、 Δ ldhA::Cm、 Δ gloA、 Δ aldA、 Δ aldB、 Δ eddを嫌気性条件下、ケモスタット培養で進化させ、WO2008/116852に記載のように最小培地での増殖に適応させた。この株を進化株大腸菌MG1655 Δ tpiA、 Δ pflAB、 Δ adhE、 Δ ldhA::Cm、 Δ gloA、 Δ aldA、 Δ aldB、 Δ eddと呼んだ。

【0061】

該進化株からクロラムフェニコール耐性カセットを除去し、この株にこれまでに構築された改変の存在をWO2008/116852に従前に記載されているように確認した。

20

【0062】

該大腸菌株にスクロース利用能を付与するために2つのプラスミドを用いた。

・Schmid et al. (1982)に記載されているものなどのスクロース - PTS系をコードする遺伝子を担持するpUR400

・Jahreis et al. (2002)に記載されているものなどのスクロース透過酵素およびキナーゼ系をコードする遺伝子を担持するpKJL101.1

【0063】

これらのプラスミドをエレクトロポレーションにより進化した大腸菌株MG1655 Δ tpiA、 Δ pflAB、 Δ adhE、 Δ ldhA、 Δ gloA、 Δ aldA、 Δ aldB、 Δ eddにそれぞれ導入した。

30

【0064】

得られた2つの株をそれぞれ

・進化型大腸菌MG1655 Δ tpiA、 Δ pflAB、 Δ adhE、 Δ ldhA、 Δ gloA、 Δ aldA、 Δ aldB、 Δ edd(pUR400)および

・進化型大腸菌MG1655 Δ tpiA、 Δ pflAB、 Δ adhE、 Δ ldhA、 Δ gloA、 Δ aldA、 Δ aldB、 Δ edd(pKJL101.1)と呼んだ。

【0065】

実施例2：唯一の炭素源としてスクロースを用いた1，2 - プロパンジオールの製造

実施例1に記載されているように得られた株と対照として用いるプラスミドを含まない株を、エルレンマイヤーフラスコアッセイにて、好気性条件下、唯一の炭素源として20g/lグルコースまたはスクロースを含む最小培地MML11PG1_100（上記の組成を参照）中で培養した。炭素源としてのグルコースを対照として用いた。

40

【0066】

培養は34で行い、培養培地をMOPSで緩衝させることによりpHを維持した。

【0067】

培養の終了時に、1，2 - プロパンジオールおよび発酵培養液に残留するグルコースまたはスクロースをHPLCにより分析し、グルコースに対する1，2 - プロパンジオールの収率またはスクロースに対する1，2 - プロパンジオールの収率を計算した。

【0068】

50

【表 2】

表 2：炭素源としてグルコースまたはスクロースを用いた最小培地中での
1, 2-プロパンジオールの製造

株／炭素源	1, 2-プロパンジオール力価 (g/l)	1, 2-プロパンジオール収率 (g/g 炭素源)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> /スクロース	ND (n=1)	- (n=1)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pUR400) /グル コース	3.89 +/- 0.12 (n=3)	0.20 +/- 0.01 (n=3)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pUR400) /スク ロース	2.26 +/- 0.27 (n=6)	0.12 +/- 0.01 (n=6)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pKJL101.1) / グルコース	3.55 +/- 0.21 (n=3)	0.19 +/- 0.01 (n=3)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pKJL101.1) / スクロース	4.86 +/- 0.77 (n=6)	0.26 +/- 0.03 (n=6)

NDは、「検出されず」を意味する。

nは、同じ実験の繰り返し回数である。

示されている数値はn回の繰り返し替え実施例で得られた数値の平均値および標準偏差である。

【0069】

実施例 3：炭素源としてサトウキビ果汁を用いた 1, 2-プロパンジオールの製造

実施例 1 に記載されているように得られた株を、エルレンマイヤーフラスコアッセイにて、好気性条件下、炭素源としてサトウキビ果汁 (20 g / l スクロース当量) を含む最小培地 MML 11PG1 __ 100 中で培養した。

【0070】

この実験で使用したサトウキビ果汁は東南アジアの精糖所から得られたもので、原果汁の石灰による清澄化の直後に回収したものである。

【0071】

培養は 34 で行い、培養培地を MOPS で緩衝させることにより pH を維持した。培養の終了時に、1, 2-プロパンジオールおよび発酵培養液に残留するスクロース、グルコースおよびフルクトースを HPLC により分析し、合計炭素源に対する 1, 2-プロパンジオールの収率を計算した。

【0072】

10

20

30

40

【表 3】

表 3：スクロース源としてサトウキビ果汁を用いた最小培地中での
1, 2-プロパンジオールの製造

株／炭素源	1, 2-プロパンジオール力価 (g/l)	1, 2-プロパンジオール収率 (g/g 炭素源)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pUR400) /サトウ キビ果汁	3.43 +/- 0.22 (n=2)	0.15 +/- 0.01 (n=2)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pKJL101.1) /サ トウキビ果汁	3.94 +/- 0.94 (n=3)	0.26 +/- 0.01 (n=3)

10

nは、同じ実験の繰り返し回数である。

20

示されている数値はn回の繰り返し実施例で得られた数値の平均値および標準偏差である。

【0073】

実施例 4：サトウキビ果汁単独または栄養素を補給したサトウキビ果汁を用いた 1, 2-プロパンジオールの製造

実施例 1 に記載されているように得られた株を、エルレンマイヤーフラスコアッセイにて、好気性条件下、リン酸塩およびアンモニウム ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.5 g/l)、鉄 (クエン酸鉄、 H_2O 0.1 g/l) およびチアミン (0.02 g/l) を補給しない、または補給した、希釈サトウキビ果汁 (20 g/l スクロース当量) を含有する培地中で培養した。

30

【0074】

培養は 34 で行い、培養培地を MOPS (40 g/l) で緩衝させることにより pH を維持した。培養の終了時に、1, 2-プロパンジオールおよび発酵培養液に残留するスクロース、グルコースおよびフルクトースを HPLC により分析し、合計炭素源に対する 1, 2-プロパンジオールの収率を計算した。

【0075】

【表 4】

表 4：補給なしのサトウキビ果汁または補給したサトウキビ果汁における
1, 2-プロパンジオールの製造

株／炭素源	1, 2-プロパンジオール力価 (g/l)	1, 2-プロパンジオール収率 (g/g 炭素源)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pUR400) / サトウキビ果汁	0.42 (n=1)	0.05 (n=1)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pKJL101.1) / サトウキビ果汁	1.07 (n=1)	0.12 (n=1)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pUR400) / 補給したサトウキビ果汁	2.29 +/- 0.02 (n=2)	0.14 +/- 0.00 (n=2)
進化させた大腸菌株MG1655 <i>lpd*</i> , <i>tpiA</i> , <i>pflAB</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>gloA</i> , <i>aldA</i> , <i>aldB</i> , <i>edd</i> (pKJL101.1) / 補給したサトウキビ果汁	4.08 +/- 0.02 (n=2)	0.26 +/- 0.00 (n=2)

nは、同じ実験の繰り返し回数である。

示されている数値はn回の繰り返し実施例で得られた数値の平均値および標準偏差である。

【 0 0 7 6 】

10

20

30

【表 5】

参考文献（本明細書中に引用された順序で）

Badia J, Ros J, Aguilar J (1985), *J. Bacteriol.* **161**: 435-437

Tran Din K and Gottschalk G (1985), *Arch. Microbiol.* **142**: 87-92

Cameron DC and Cooney CL (1986), *Bio/Technology*, **4**: 651-654

Sanchez-Rivera F, Cameron DC, Cooney CL (1987), *Biotechnol. Lett.* **9**: 449-454

Altaras NE, Etzel MR, Cameron DC (2001), *Biotechnol. Prog.* **17**: 52-56

Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ (1998), *Biotechnol. Prog.* **14**: 116-125

Altaras NE and Cameron DC (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1180-1185

Altaras NE and Cameron DC (2000), *Biotechnol. Prog.* **16**: 940-946

Huang K, Rudolph FB, Bennett GN (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3244-3247

Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN (2003), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 34-40

Peters D (2006), *Biotechnol. J.* **1**: 806-814

Beckers M, Linde R, Danilevich A, Kaminska E, Upite D, Vigants A, Scherbaka R (1999), *Food Biotechnol.* **13**: 107-119

Shukla VB, Zhou S, Yomano LP, Shanmugam KT, Preston JF, Ingram LO (2004), *Biotechnol. Lett.* **26**: 689-693

Calabia BP and Tokiwa Y (2007), *Biotechnol. Lett.* **29**: 1329-1332

Schmid K, Schupfner M, Schmitt R (1982), *J. Bacteriol.* **151**: 68-76

10

20

30

40

Schmid K, Ebner R, Altenbuchner J, Schmitt R, Lengeler JW (1988), *Mol. Microbiol.* 2: 1-8

Schmid K, Schupfner M, Schmitt R (1982), *J. Bacteriol.* 151: 68-76

Bockmann J, Heuel H, Lengeler JW (1992), *Mol. Gen. Genet.* 235: 22-32

10

Jahreis K, Bentler L, Bockmann J, Hans S, Meyer A, Siepelmeyer J, Lengeler JW (2002), *J. Bacteriol.* 184: 5307-5316

Tsunekawa H, Azuma S, Okabe M, Okamoto R, Aiba S (1992), *Appl. Environ. Microbiol.* 58 2081-2088

Penfold DW and Macaskie LE (2004), *Biotechnol. Lett.* 26: 1879-1883

20

Anderson EH (1946), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128

Miller (1992), A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Schaefer U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz D (1999), *Anal. Biochem.* 270: 88-96

30

Wiesenborn DP, Rudolph RB, Papoutsakis ET (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 : 2717-2722

Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R (1982), *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1318-1324

40

Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P (1994), *J. Bacteriol.* 176: 1443-1450

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/065131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P7/18		
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) C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, FSTA, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAMERON ET AL: "A novel fermentation: The production of R(-)-1,2-propanediol and acetol by Clostridium thermosaccharolyticum" BIO/TECHNOLOGY, vol. 4, 1986, pages 651-654, XP002067773. cited in the application * See page 653 (Table 2 / sucrose) *	1,2,7-9, 14,16
A	WO 2004/087936 A (CJ CORP.) 14 October 2004 (2004-10-14) * See page 5 (line 3) and Claim 4 *	1-16
A	US 2007/072279 A1 (MEYNIAL-SALLES ET AL) 29 March 2007 (2007-03-29) * See page 4 ([0055]) *	1-16
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 document 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 3 August 2009		Date of mailing of the international search report 12/08/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Korsner, Sven-Erik

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/065131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/116853 A (METABOLIC EXPLORER) 2 October 2008 (2008-10-02) cited in the application * See pages 8-9 (PTS), 12 (maltose sucrose), and 14-15 (modifications) *	1-16
A	EP 1 318 196 A (AJINOMOTO CO., INC TOKYO) 11 June 2003 (2003-06-11) * See page 6 ([0044]) *	1-16
A	SOUCAILLE AND OH, RESPECTIVELY: PROGRAM / METABOLIC ENGINEERING VII: HEALTH AND SUSTAINABILITY, SEPTEMBER 14-19, 2008, PUERTO VALLARTA, MEXICO, August 2008 (2008-08), pages 1-16, XP002537942 Retrieved from the Internet: URL:www.engconfintl.org/pastconf/08ayfin.p df> [retrieved on 2009-07-20] * See pages 13 (poster 40) and 16 (poster 28); the full disclosure has to be established *	1-16
A	VOELKER ET AL: THE SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY (SIM) - 2008 ANNUAL MEETING, AUGUST 2008, SAN DIEGO, USA, August 2008 (2008-08), page 23 / 40, XP002537943 Retrieved from the Internet: URL:www.simhq.org/meetings/08annual/08Fina lProgram.pdf> [retrieved on 2009-07-20] * See page 40 (S23); the full disclosure has to be established *	1-16
A	PENFOLD ET AL: "Production of H ₂ from sucrose by Escherichia coli strains carrying the pUR400 plasmid, which encodes invertase activity" BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 26, 2004, pages 1879-1883, XP019230822 cited in the application * See pages 1879-1880 (Introduction) *	1-16
A	ALTARAS ET AL: "Metabolic engineering of a 1,2-propanediol pathway in Escherichia coli" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, 1999, pages 1180-1185, XP002293970 cited in the application * See page 1180 (Abstract and Introduction) *	1-16

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/065131

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAMERON ET AL: "Metabolic engineering of propanediol pathways" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 14, 1998, pages 116-125, XP002939239 cited in the application * See pages 119-121 (Production of 1,2-propanediol) *	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/065131

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004087936 A	14-10-2004	BR PI0408919 A CN 1780918 A EP 1616018 A1 KR 20040085886 A US 2004197881 A1	28-03-2006 31-05-2006 18-01-2006 08-10-2004 07-10-2004
US 2007072279 A1	29-03-2007	BR PI0506790 A CA 2547695 A1 CN 1910278 A EP 1704230 A2 FR 2864967 A1 WO 2005073364 A2 JP 2007517517 T KR 20060123490 A ZA 200605440 A	22-05-2007 11-08-2005 07-02-2007 27-09-2006 15-07-2005 11-08-2005 05-07-2007 01-12-2006 25-04-2007
WO 2008116853 A	02-10-2008	NONE	
EP 1318196 A	11-06-2003	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ライナー、フィゲ
フランス国ル、クレスト、リュ、デュ、ボスケ、4

(72)発明者 フィリップ、スカイユ
フランス国デーム、シャン、デュ、クク

Fターム(参考) 4B024 AA03 CA02 DA06 EA04 GA14
4B064 AC05 CA19 CC24 CD09 DA16
4B065 AA01X AA01Y AA26X AB01 AC14 BA03 BB14 CA05 CA55 CA60