

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成20年4月24日(2008.4.24)

【公表番号】特表2005-528111(P2005-528111A)

【公表日】平成17年9月22日(2005.9.22)

【年通号数】公開・登録公報2005-037

【出願番号】特願2004-510437(P2004-510437)

【国際特許分類】

C 1 2 P 7/56 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 7/56

C 1 2 N 1/19

【誤訳訂正書】

【提出日】平成20年2月27日(2008.2.27)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微生物が発酵基質を発酵させ、特定の酸素取り込み速度が、発酵プロセスの生産期の間モニタリングされ、そして、少なくとも 1 つの作動パラメータが、前記測定された酸素取り込み速度に応じて制御される、発酵プロセス。

【請求項 2】

前記溶存酸素濃度が、飽和量の 1 % 未満である、請求項 1 記載のプロセス。

【請求項 3】

前記作動パラメータが、通気速度、攪拌速度および通気ガス組成から選択された 1 以上のパラメータである、請求項 2 記載のプロセス。

【請求項 4】

前記微生物が、破壊された固有の P D C 経路を有する、遺伝子工学で設計された酵母である、請求項 2 記載のプロセス。

【請求項 5】

前記微生物が、細胞に所望の発酵産物を生産させることを可能にする、少なくとも 1 つの機能性外来遺伝子を有する、請求項 4 記載のプロセス。

【請求項 6】

前記外来遺伝子が、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子である、請求項 5 記載のプロセス。

【請求項 7】

前記微生物が、C a n d i d a 属または K l u y v e r o m y c e s 属である、請求項 6 記載のプロセス。

【請求項 8】

発酵微生物、微生物により発酵可能な基質を含む発酵培地において発酵プロセスを行う方法であって、

前記発酵培地が、多量の溶存酸素(D O)を有し、前記発酵が、特定の酸素取り込み(O U R)を示し、

a) 発酵の生産期の間、前記 O U R を測定する工程、

b) 発酵の前記生産期の間、飽和の 1 % 未満に D O を維持しながら、所定の範囲内に前記

O U R が維持されるような通気条件に調整する工程を含む、発酵プロセスを行う方法。

【請求項 9】

前記工程 b ) における O U R が、約  $0.8 \sim 3.0 \text{ mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$  の範囲に維持され、D O が、 $10 \mu \text{mol O}_2 / \text{L}$  未満に維持される、請求項 8 記載のプロセス。

【請求項 10】

前記微生物が、クラブトリー陰性表現型を示す酵母細胞である、請求項 9 記載のプロセス。

【請求項 11】

前記酵母細胞が、*K l u y v e r o m y c e s* 属または *C a n d i d a* 属である、請求項 10 記載のプロセス。

【請求項 12】

前記酵母細胞が、破壊された P D C 経路、および、前記細胞に所望の発酵産物を生産させることを可能にする少なくとも 1 つの機能性外来遺伝子を有する、請求項 11 記載のプロセス。

【請求項 13】

前記外来遺伝子が、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子である、請求項 12 記載のプロセス。

【請求項 14】

前記基質が、ヘキソース糖を含む、請求項 8 記載のプロセス。

【請求項 15】

前記ヘキソース糖が、グルコースを含む、請求項 14 記載のプロセス。

【請求項 16】

以下の工程を含むプロセス。

a ) 微生物が炭水化物を所望の発酵産物に発酵させる、O U R 値の至的範囲を決定する工程、

b ) 細胞が生育および繁殖 ( *r e p r o d u c e* ) しているときに、培地の溶存酸素濃度を飽和の 1 % 未満に減少させ、細胞が少なくとも  $10 \text{ mmol O}_2 / \text{g}$  (細胞の乾燥重量) / h (  $\text{mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$  ) である特定の酸素取り込み速度を示すように、前記培地に通気しながら、前記工学酵母細胞を、前記微生物が代謝可能である炭水化物および 1 以上の栄養素を含む培地で生育させる工程、および、それから

c ) 前記至的範囲内の特定の酸素取り込み速度 ( O U R ) での培養を提供するのに十分な微好気条件を含む発酵条件下、緩衝培地で細胞を培養する工程。

【請求項 17】

前記微生物が、クラブトリー陰性表現型 ( *C r a b t r e e n e g a t i v e p h e n o t y p e* ) を示す酵母細胞である、請求項 9 記載のプロセス。

【請求項 18】

前記酵母細胞が、*K l u y v e r o m y c e s* 属または *C a n d i d a* 属である、請求項 17 記載のプロセス。

【請求項 19】

前記酵母細胞が、破壊された P D C 経路、および、前記細胞に所望の発酵産物を生産されることを可能にする少なくとも 1 つの機能性外来遺伝子を有する、請求項 18 記載のプロセス。

【請求項 20】

前記外来遺伝子が、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子である、請求項 19 記載のプロセス。

【請求項 21】

工程 a ) における前記 O U R が、少なくとも  $1.8 \text{ mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$  である、請求項 16 記載のプロセス。

【請求項 22】

前記炭水化物が、ヘキソース糖を含む、請求項 21 記載のプロセス。

【請求項 23】

前記ヘキソース糖が、グルコースを含む、請求項 22 記載のプロセス。

【請求項 24】

以下の工程を含む発酵プロセス。

a) 細胞が生育および繁殖 (reproduce) しているときに、培地の溶存酸素濃度をゼロに減少させ、細胞が少なくとも  $10 \text{ mmol O}_2 / \text{g}$  (細胞の乾燥重量) / h ( $\text{mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$ ) である特定の酸素取り込み速度を示すように、前記培地に通気しながら、破壊された PDC 経路および細胞に所望の発酵産物を生産させることを可能にする外来遺伝子を有する遺伝子工学で設計された酵母細胞を、前記細胞が代謝可能である炭水化物を含む培地で生育させる工程、および

b) 約  $0.8 \sim 3.0 \text{ mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$  の特定の酸素取り込み速度 (OUR) での培養を提供するのに十分な微好気条件を含む発酵条件下、緩衝培地で細胞を培養する工程。

【請求項 25】

前記酵母細胞が、クラブトリー陰性表現型 (Crabtree negative phenotype) を示す酵母細胞である、請求項 24 記載のプロセス。

【請求項 26】

前記外来遺伝子が、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 遺伝子である、請求項 25 記載のプロセス。

【請求項 27】

前記酵母細胞が、Kluyveromyces 属または Candida 属である、請求項 26 記載のプロセス。

【請求項 28】

工程 a) における前記 OUR が、少なくとも  $18 \text{ mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$  である、請求項 24 記載のプロセス。

【請求項 29】

前記炭水化物が、ヘキソース糖を含む、請求項 24 記載のプロセス。

【請求項 30】

ヘキソース糖が、グルコースを含む、請求項 28 記載のプロセス。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0005

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0005】

Porroらは、S.cerevisiae、K.lactica、T.delbrueckiiおよびZ.bailii等の酵母細胞に外来LDH(乳酸デヒドロゲナーゼ)遺伝子を挿入し、前記細胞固有の乳酸経路を破壊することによって、乳酸生産酵母の設計を試みた。非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3を参照。Porroらは、乳酸を生産する組換え酵母を作製することができたが、その株は、商業上プロセスにおける手段として十分な程は、ほとんど機能しなかった。産業環境において使用できるためには、株は、優れた乳酸収率(例えば、乳酸への基質の高い変換)ならびに高い生産力(例えば、乳酸への基質の迅速な代謝)を示さなければならない。酵母は、高い乳酸滴定を示す培地に耐性であることが好ましい。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0007

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0007】

しかしながら、我々は、ある株が、厳密な嫌気条件下で、望まれるように十分な発酵を

行わないことを見出した。これは事実であり、例えば、ピルビンデカルボキシラーゼ（PDC）経路が欠損もしくは破壊された工学酵母株においてである。しかしながら、PDC経路の破壊は、生産されるエタノール量を減少させるため、このような工学設計された種の利用は、乳酸発酵において強く望まれている（所望の産物がエタノール以外のものも同様）。したがって、厳密な嫌気条件下で十分に発酵しない株に、経済的に望まれる発酵産物を生産させることができる、改良された発酵プロセスの提供が望まれている。

【誤訳訂正 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0011

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0011】

本発明は、他の形態において、発酵プロセスであり、以下の工程を含む。

a) 細胞が生育および繁殖（reproduce）し、培地の溶存酸素濃度を飽和の1%未満に減少させ、細胞が少なくとも10 mmol O<sub>2</sub>/g（細胞の乾燥重量）/h（mmol O<sub>2</sub>/g dw/h）である特定の酸素取り込み速度を示すように、前記培地に通気しながら、破壊されたPDC経路および前記細胞に所望の発酵産物を生産させることを可能にする外来遺伝子を有する工学酵母細胞を、前記細胞が代謝可能である炭水化物を含む培地で生育させる工程、および、

b) 約0.8～約3.0 mmol O<sub>2</sub>/g dw/hの特定の酸素取り込み速度（OUR）での培養を提供するのに十分な好気条件を含む発酵条件下、緩衝培地で細胞を培養する工程。

【誤訳訂正 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0012

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0012】

驚くことに、プロセス制御パラメータとして酸素取り込み速度を用いた好気条件の使用は、所望の発酵産物の高収率と良好な生産速度とをバランス化して発酵プロセスを最適化することを可能にする。OUR測定は、発酵プロセスの生産期において、最適な条件を維持するために、発酵プロセスのあるパラメータを確立し制御するために使用できる。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0015

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0015】

本発明の好ましい形態において、発酵細胞は、特定の種類の細胞について至適範囲のOURを実験的に確立するために様々な通気条件下で培養される。至適OURの範囲は、一般的に、様々なファクターを考慮に入れる。例えば、発酵基質からの所望の発酵産物の収率（通常、「g（産物）/g（消費基質）」で表される）、所望の発酵産物の特定の生産力（通常、「産物の重量/乾燥細胞の重量/単位時間」で表される）、および、基質消費速度（通常、「消費基質重量/単位時間」で表される）の3つが、主要なファクターである。これらのファクターは、通常、同じ通気条件下において、全てが最適化されているわけではない。例えば、基質消費速度は、時々、OURの増加に伴って増加するが、収率は落ちる傾向にある。そのため、より向上した生産速度を相殺して収率損失がより増大し、全面的にプロセスの経済が痛手をうける。OUR値の至適範囲の確立は、一般に、全面的なプロセス経済を最適化するため速度と収率のバランスを取ることを必要とする。一度OUR値の所望の範囲が確立されると、その範囲にOURを確立し維持するために、発酵条

件は発酵の生産期において選択される。すでに述べたように、O U R はプロセスの間で測定され、1 以上の発酵パラメータがO U R を前記範囲に維持するように制御される。

【誤訳訂正 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 7

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 7】

本発明の特に好ましい形態において、微生物は異なる生育条件および生産条件下において培養される。生育期において、微生物は好氣的に生育する。細胞は、水、生育期および生産期の両方において細胞が代謝できる炭水化物、および以下に示すような様々な栄養素を含む培地で生育させる。通気条件は、(1)細胞が少なくとも $10 \text{ mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$ である特定の酸素取り込み速度(O U R)を示し、かつ、(2)生育期の最後に、O U R を少なくとも $10 \text{ mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$ に維持しながら、培地中の溶解酸素(D O)濃度を飽和量の1%未満に減少させるように選択される。前記O U R は、好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも $18 \text{ mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$ である。生育期の間、O U R は細胞が発生できる程度に高いことが最も好ましい。そのため、最大O U R は使用される特定の工学酵母細胞に幾分か依存する。一般的に、最大O U R は、約 $20 - 30 \text{ mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$ と推測される。P D C 破壊および外来L D H 遺伝子を有するK m a r x i a n u s 細胞は、約 $20 - 22 \text{ mmol O}_2 / \text{g dw} / \text{h}$ の範囲に最大O U R を示す傾向にある。

【誤訳訂正 8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 2 0

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 2 0】

培養は、通気条件の変化によって生産期に切り替わる。生産期において、微好気条件は、上述のように、O U R が所定の範囲内で維持されるように選択される。数種の微生物は、

生産期において、一般的な細胞の生命力および健康を促進するために、少ない酸素量を代謝することが必要と思われる。このような生物の実験は、一般的にP D C 破壊を有し、特に、特定の発酵産物を生産することを可能とする外来遺伝子を有する、工学設計された酵母を含む。完全な嫌気条件において、これらの細胞が示す基質消費速度と発酵産物生産速度は、通常非常に低い。加えて、所望の発酵産物の収率も悪い。微好気条件下、特に特定の株に依存するあるO U R 値において、細胞はより迅速に基質を代謝することができる。これは、基質消費速度および所望の発酵産物生産速度が増加する結果となる。しかしながら、酸素消費がある値を超えて増加すると、基質が二酸化炭素に変換されて所望の産物の収率が減少する。これに加えて、ある値を超えてO U R が増加すると生産速度は横ばいの傾向もしくは減少の傾向となり、収率のロスが速度上昇により補償されなくなる。したがって、生産期の間ある範囲にO U R を維持することは、収率と生産速度との経済的に最適なバランスを達成することとなる。

【誤訳訂正 9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 3 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 3 1】

本発明のプロセスで使用される微生物は、(1)炭水化物を所望の発酵産物に発酵し、(2)厳密に嫌氣的な条件下よりも微好気性条件下でより効率よく発酵する。特に重要な

細胞は、(1)破壊されたPDC経路、および(2)所望の発酵産物を細胞に生産させることができる、少なくとも1つの機能性外来遺伝子、を有することにより特徴付けられた、遺伝的に工学設計されたある酵母細胞である。このような設計された酵母細胞は、例えば、Porro et al., "Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid", *Biotechnol. Prog.* 1995 May-Jun; 11(3): 294-8、Porro et al., "Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts", *Appl. Environ. Microbiol.* 1999 Sep; 65(9): 4211-5、およびBianchi et al., "Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces fragilis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene", *Appl. Environ. Microbiol.* 2001 Dec; 67(12): 5621-5、WO 00/71738、WO 02/42471、PCT/US 02/16223、および2002年5月20日出願された米国仮出願No. 60/384,333等に記載されている。前記細胞は、また、クラブトリー陰性表現型を示すことが好ましい。これは、高濃度グルコースの存在下や高い生育速度の通気条件において呼吸および生育できるためである。

【誤訳訂正10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0032

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0032】

「破壊された (disrupted)」は、PDC経路の機能が少なくとも90%減少するように変化していることを意味する。その機能を弱めもしくは取り除くように、経路(経路に関連する1以上の遺伝子)を変化させることにより、または経路が機能するために必要な1以上の遺伝子を取り除くことにより、破壊を達成できる。PDC遺伝子を欠損している細胞が好ましい。