

(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2017-516470

(P2017-516470A)

(43) 公表日 平成29年6月22日(2017.6.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 13/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 13/02	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁)

(21) 出願番号 特願2016-567353 (P2016-567353)  
 (86) (22) 出願日 平成27年5月5日 (2015.5.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年12月27日 (2016.12.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/059786  
 (87) 国際公開番号 W02015/173059  
 (87) 国際公開日 平成27年11月19日 (2015.11.19)  
 (31) 優先権主張番号 14168174.2  
 (32) 優先日 平成26年5月13日 (2014.5.13)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 501073862  
 エボニック デグサ ゲーエムベーハー  
 Evonik Degussa GmbH  
 ドイツ連邦共和国 エッセン レリングハウザー シュトラッセ 1-11  
 Rellinghauser Strasse 1-11, D-45128 Essen, Germany  
 (74) 代理人 100098682  
 弁理士 赤塚 賢次  
 (74) 代理人 100131255  
 弁理士 阪田 泰之  
 (74) 代理人 100125324  
 弁理士 渋谷 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナイロンの製造方法

(57) 【要約】

合成ガスからアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを製造する方法であって、A. 前記合成ガスを、Wood-Ljungdahl経路及び/又はエタノール-カルボキシレート発酵を実施することができる少なくとも1種の細菌と接触させてヘキサン酸を製造する工程と、B. 前記ヘキサン酸を遺伝子組み換え細胞と接触させてアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを製造する工程と、を含み、前記遺伝子組み換え細胞は、その野生型と比較して、アルカンモノオキシゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及び -トランスアミナーゼに関して高い活性を有することを特徴とする方法を提供する。

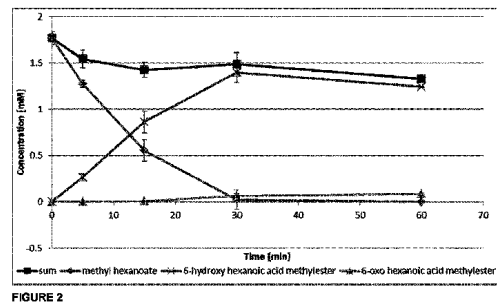


FIGURE 2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

合成ガスからアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを製造する方法であって、

A．前記合成ガスを、Wood-Ljungdahl 経路及び/又はエタノール-カルボキシレート発酵を実施することができる少なくとも 1 種の細菌と接触させてヘキサン酸を製造する工程と、

B．前記ヘキサン酸を遺伝子組み換え細胞と接触させてアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを製造する工程と、

を含み、

前記遺伝子組み換え細胞は、その野生型と比較して、アルカンモノオキシゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及び - トランスアミナーゼに関して高い活性を有することを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

前記工程 A で得られたヘキサン酸のエステル化を行って C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> ヘキサン酸エステルを製造する工程をさらに含み、前記 C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> ヘキサン酸エステルを前記工程 B において前記遺伝子組み換え細胞と接触させることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記エステル化を行う工程が、前記工程 A で得られたヘキサン酸を少なくとも 1 種の C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルコールと接触させて C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> ヘキサン酸エステルを生成することを含むことを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記エステル化を行う工程を、少なくとも 1 種のエステル化細菌によって触媒させることを特徴とする、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記工程 B において使用する前記遺伝子組み換え細胞内において、Pseudomonas putida に由来する AlkBGT 遺伝子によって前記アルカンモノオキシゲナーゼがコードされており、Pseudomonas putida に由来する AlkJ 遺伝子によって前記アルコールデヒドロゲナーゼがコードされており、及び/又は、前記 - トランスアミナーゼが、Chromobacterium violaceum DSM 30191 に由来する - トランスアミナーゼ CV2025 であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記アミノヘキサン酸エステルをアミノヘキサン酸に転化させる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記アミノヘキサン酸エステルからアミノヘキサン酸への転化を、Pseudomonas fluorescens に由来するリパーゼ LipA (Q76D26) によって触媒させることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記工程 B において使用する細胞が、遺伝子組み換え Escherichia coli 細胞、遺伝子組み換え Corynebacterium glutamicum 細胞及び遺伝子組み換え Pseudomonas putida 細胞からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記工程 A において使用する、Wood-Ljungdahl 経路を実施することができる細菌が、Acetoanaerobium notera (ATCC 35199)、Acetonema longum (DSM 6540)、Acetobacterium carbinolicum (DSM 2925)、Acetobacterium malicum (DSM 4132)、Acetobacterium specie

10

20

30

40

50

s no. 446、*Acetobacterium wieringae* (DSM 1911)、*Acetobacterium woodii* (DSM 1030)、*Alkalibaculum bacchi* (DSM 22112)、*Archaeoglobus fulgidus* (DSM 4304)、*Blautia producta* (DSM 2950)、*Butyribacterium methylotrophicum* (DSM 3468)、*Clostridium aceticum* (DSM 1496)、*Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061、DSM 19630及びDSM 23693)、*Clostridium carboxidivorans* (DSM 15243)、*Clostridium coskati* (ATCC no. PTA-10522)、*Clostridium drakei* (ATCC BA-623)、*Clostridium formicoaceticum* (DSM 92)、*Clostridium glycolicum* (DSM 1288)、*Clostridium ljungdahlii* (DSM 13528)、*Clostridium ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988)、*Clostridium ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380)、*Clostridium ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989)、*Clostridium mayombeii* (DSM 6539)、*Clostridium methoxybenzovorans* (DSM 12182)、*Clostridium ragsdalei* (DSM 15248)、*Clostridium scatologenes* (DSM 757)、*Clostridium species* ATCC 29797、*Desulfotomaculum kuznetsovii* (DSM 6115)、*Desulfotomaculum thermobezoicum* subsp. *thermosyntrophicum* (DSM 14055)、*Eubacterium limosum* (DSM 20543)、*Methanosarcina acetivorans* C2A (DSM 2834)、*Moorella* sp. HUC22-1、*Moorella thermoacetica* (DSM 521)、*Moorella thermoautotrophica* (DSM 1974)、*Oxobacter pfennigii* (DSM 322)、*Sporomusa aerivorans* (DSM 13326)、*Sporomusa ovata* (DSM 2662)、*Sporomusa silvacetica* (DSM 10669)、*Sporomusa sphaeroides* (DSM 2875)、*Sporomusa termitida* (DSM 4440)及び*Thermoanaerobacter kivui* (DSM 2030)からなる群から選択される酢酸生成細菌であることを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

エタノール-カルボキシレート発酵を実施することができる前記細菌が、*Clostridium kluyveri*及び*C. Carboxidivorans*からなる群から選択されることを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコールがメタノールであることを特徴とする、請求項3～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記合成ガスから製造されたヘキサノ酸を、前記C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコールと接触させる前に抽出することを特徴とする、請求項3～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記細胞が、前記工程Bにおいてアミン供与体として機能するアミノ酸を含む培地に含まれることを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

触媒作用によって前記アミノヘキサノ酸からナイロンを形成することを特徴とする、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

前記ナイロンが、ナイロン 6, 6、ナイロン 6、ナイロン 6, 9、ナイロン 6, 10 及びナイロン 6, 12 からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、合成ガスをヘキサン酸に転化させた後、ヘキサン酸メチルに化学的に転化させ、ヘキサン酸メチルをアミノヘキサン酸及び/又はそのエステルに転化させる細胞と接触させる、合成ガスからのポリアミド（特にナイロン）の生物工学的製造に関する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

ポリアミドは、繰り返し単位（モノマー）がアミド基を有することを特徴とする合成ポリマーである。「ポリアミド」という名称は、通常は商業的に利用可能な合成熱可塑性ポリマーに使用され、化学的に関連するタンパク質とは区別される。重要なポリアミドのほとんどは、「-CO-NH-」で表される官能基を繰り返し単位中に含む第一級アミンに由来する。また、第二級アミン（-CO-NR-（式中、R は有機残基である。））からなるポリアミドも知られている。ポリアミドを製造するためのモノマーとしては、アミノカルボン酸、ラクタム及び/又はジアミン並びにジカルボン酸が使用されている。

## 【0003】

20

アミド結合間の繰り返し単位が実質的に脂肪族である場合には、ナイロンと呼ばれるポリアミドが形成される。ナイロンは、ジアミンと二酸との間の縮合反応によって生成することが知られている。ナイロンは優れた特性を有しており、最も広く使用されているポリマーの 1 つである。具体的には、ナイロンは高い弾性及び耐久性を有する。そのため、ナイロン繊維は、衣服用生地、包装紙、カーペット、楽器の弦、配管、ロープ、機械部品等を含む多くの用途で使用されている。

## 【0004】

一般に入手可能なナイロンポリマーとしては、例えば、ナイロン 6, 6、ナイロン 6、ナイロン 11、ナイロン 12、ナイロン 4, 6、ナイロン 6, 12、ナイロン 6, 10 等が挙げられる。これらのうち、ナイロン 6, 6 及びナイロン 6 は、より一般的に使用されているポリマーである。ナイロンは、逐次重合又は連鎖重合によって製造することができる。ジアミン及び二酸又はアミノ酸からナイロンを製造する場合には逐次重合を使用し、ラクタムからナイロンを製造する場合には通常は連鎖重合を使用する。連鎖重合はモノマーから開始するため、モノマーは迅速に高分子量のポリマーを形成し、重合プロセスはより効率的となる。また、中間的な二量体、三量体及びその他のオリゴマーの形成が減少する。そのため、連鎖重合は逐次重合よりも好ましい。

30

## 【0005】

カプロラクタムは、連鎖重合を使用してナイロン 6 を製造する際の原料である。通常、カプロラクタムを製造する場合には、シクロヘキサノンをヒドロキシルアミンの硫酸水素塩又は塩酸塩と反応させてシクロヘキサノンオキシムを生成する。次に、通常は濃硫酸を触媒として使用し、シクロヘキサノンオキシムを Beckmann 転位によって転化させてカプロラクタムを得る。通常、原料であるシクロヘキサノンは、シクロヘキサンを大気中の酸素で接触酸化させて製造し、シクロヘキサンは、ベンゼンの水素化によって得られる。

40

## 【0006】

現在利用可能なナイロンの製造方法にはいくつかの欠点がある。オキシムの Beckmann 転位によってラクタムを製造する際の欠点としては、大量の塩（例えば、硫酸ナトリウム）が副生成物として生成するために処理が必要となることが挙げられる。その他の公知のラクタムの製造方法として、特許文献 1 には、ジニトリルからラクタムを製造する方法であって、ジニトリルを水素化してアミノニトリルを得、アミノニトリルを環化加水

50

分解によって転化させてラクタムを得る方法が開示されている。環化加水分解のための触媒としては、酸性ゼオライト、珪酸塩及び非ゼオライト系モレキュラーシーブ等のモレキュラーシーブ、金属リン酸塩、金属酸化物又は複合金属酸化物を使用する。この方法には、環化加水分解によるアミノニトリルの転化選択性がかなり低く、大量の副生成物が生成するという欠点がある。

【0007】

また、石油系中間体を使用してナイロンを製造することも知られている。例えば、シクロヘキサンを使用してアジピン酸及びカプロラクタムを製造する。ブタジエン及び天然ガスは、ヘキサメチレンジアミンを製造するための重要な原料である。また、ナイロン12もブタジエンを原料として製造する。そのため、従来のラクタムの製造方法のほとんどでは、環境に悪影響を与えるガソリン又は石油の分解によって得られるベンゼン又はブタジエン等の炭化水素を使用している。また、これらの出発材料のコストは石油価格に応じて変化する。石油価格が将来的に上昇することが予想されているため、ナイロン価格は原油価格の上昇に応じて上昇する可能性がある。

10

【0008】

従って、ナイロンを製造するための出発材料として、より持続可能であって、環境に与える影響が少ない、純粋な石油系原料以外の原料が求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

20

【特許文献1】欧州特許第0748797号

【発明の概要】

【0010】

本発明は、合成ガスからアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを製造する方法であって、

A．前記合成ガスを少なくとも1種の酢酸生成細菌及び/又は水素酸化細菌と接触させてヘキサン酸を製造する工程と、

B．前記ヘキサン酸を遺伝子組み換え細胞と接触させてアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを製造する工程と、

を含み、

30

前記遺伝子組み換え細胞は、その野生型と比較して、アルカンモノオキシゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及び - トランスアミナーゼからなる群から選択される少なくとも1種の酵素に関して高い活性を有することを特徴とする方法を提供する。

【0011】

具体的には、本発明の一態様は、合成ガスからアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを製造する方法であって、

A．前記合成ガスを、Wood-Ljungdahl経路及び/又はエタノール-カルボキシレート発酵を実施することができる少なくとも1種の細菌と接触させてヘキサン酸を製造する工程と、

B．前記ヘキサン酸を遺伝子組み換え細胞と接触させてアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを製造する工程と、

40

を含み、

前記遺伝子組み換え細胞は、その野生型と比較して、アルカンモノオキシゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及び - トランスアミナーゼに関して高い活性を有することを特徴とする方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、アルカンモノオキシゲナーゼ(AlkBGT)のための発現ベクターpBT10(A)(Schrewe et al., 2011)及びアルコールデヒドロゲナーゼAlkJのための発現ベクターPJ10(B)を示す。

50

【図2】図2は、*E. coli* JM101 (pBT10)を使用したヘキサン酸からヘキサン酸メチルへの全細胞反応(水酸化)を示すグラフである(ヘキサン酸メチル、6-ヒドロキシヘキサン酸メチル(6-ヒドロキシヘキサン酸メチルエステル)及びオキソヘキサン酸メチル(6-オキソヘキサン酸メチルエステル)の総濃度を測定)。細胞集団濃度： $0.68 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{CDWL}}^{-1}$  (1% (w/v) グルコースを含むKPi緩衝液 (pH: 7.4))。データは、2回の生物学的反復実験で測定。

【図3】図3は、全細胞反応における特異的活性を示すグラフである(第1の工程は、*E. coli* JM101 (pBT10)を使用したヘキサン酸からヘキサン酸メチルへの水酸化であり、第2の工程は、アルコール酸化工程である)。細胞集団濃度： $0.68 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{CDWL}}^{-1}$  (1% (w/v) グルコースを含むKPi緩衝液 (pH: 7.4))。データは、2回の生物学的反復実験で測定。

【図4】図4は、*E. coli* JM101 (pBT10)を使用した6-ヒドロキシヘキサン酸メチルからオキソヘキサン酸メチルへの全細胞反応を示すグラフである(6-ヒドロキシヘキサン酸メチル(6-ヒドロキシヘキサン酸メチルエステル)及びオキソヘキサン酸メチル(6-オキソヘキサン酸メチルエステル)の総濃度を測定)。細胞集団濃度： $0.86 \text{ g}_{\text{CDWL}}^{-1}$  (1% (w/v) グルコースを含むKPi緩衝液 (pH: 7.4))。データは、2回の生物学的反復実験で測定。

【図5】図5は、アルコール酸化工程(6-ヒドロキシヘキサン酸メチル(6-ヒドロキシヘキサン酸メチルエステル)及びオキソヘキサン酸メチル(6-オキソヘキサン酸メチルエステル))の全細胞反応における特異的活性を示すグラフである。細胞集団濃度： $0.86 \text{ g}_{\text{CDWL}}^{-1}$  (1% (w/v) グルコースを含むKPi緩衝液 (pH: 7.4))。データは、2回の生物学的反復実験で測定。

【図6】図6は、*E. coli* JM101 (pJ10)を使用した6-ヒドロキシヘキサン酸メチルからオキソヘキサン酸メチルへの全細胞反応を示すグラフである(6-ヒドロキシヘキサン酸メチル(6-ヒドロキシヘキサン酸メチルエステル)及びオキソヘキサン酸メチル(6-オキソヘキサン酸メチルエステル)の総濃度を測定)。細胞集団濃度： $0.91 \text{ g}_{\text{CDWL}}^{-1}$  (1% (w/v) グルコースを含むKPi緩衝液 (pH: 7.4))。データは、2回の生物学的反復実験で測定。

【図7】図7は、*E. coli* JM101 (pJ10)を使用した6-ヒドロキシヘキサン酸メチルからオキソヘキサン酸メチルへの水酸化の全細胞反応における特異的活性を示すグラフである。細胞集団濃度： $0.91 \text{ g}_{\text{CDWL}}^{-1}$  (1% (w/v) グルコースを含むKPi緩衝液 (pH: 7.4))。データは、2回の生物学的反復実験で測定。

【図8】図8は、alkBGT5の増幅のためのテンプレートとして使用したプラスミドpGec47を示す。

【図9】図9は、使用したプライマー及び得られたPCR産物alkBFG及びalkTを示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

通常、生成物の収率を最適化すると共にタールの生成を回避するために、ガス化プロセスによって得られた合成ガスの一部を最初に処理する。合成ガス中の望ましくないタール及びCOの分解は、石灰及び/又はドロマイトを使用して行うことができる。このようなプロセスは、例えば、Reed, 1981に詳細に記載されている。

【0014】

合成ガスは、少なくとも1種の酢酸生成細菌及び/又は水素酸化細菌の存在下においてヘキサン酸に転化させることができる。この場合、公知の任意の方法を使用することができる。ヘキサン酸は、少なくとも1種の原核生物によって合成ガスから製造することができる。具体的には、原核生物は、*Escherichia coli*等の*Escherichia*属菌；*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium carboxidivorans*及び*Clostridium kluyveri*等の*Clostridia*

10

20

30

40

50

属菌；*Corynebacterium glutamicum*等の*Corynebacteri*  
*teria*属菌；*Cupriavidus necator*及び*Cupriavidus*  
*metallidurans*等の*Cupriavidus*属菌；*Pseudomonas*  
*fluorescens*、*Pseudomonas putida*及び*Pseudo*  
*monas oleovorans*等の*Pseudomonas*属菌；*Delftia*  
*acidovorans*等の*Delftia*属菌；*Bacillus subtilis*  
 等の*Bacillus*属菌；*Lactobacillus delbrueckii*等  
 の*Lactobacillus*属菌；及び*Lactococcus lactis*等の*L*  
*actococcus*属菌からなる群から選択されてもよい。

【0015】

あるいは、ヘキサン酸は、少なくとも1種の真核生物によって合成ガスから製造するこ  
 とができる。本発明の方法において使用する真核生物は、*Aspergillus niger*等の*Aspergillus*属菌；*Saccharomyces cerevis*  
*iae*等の*Saccharomyces*属菌；*Pichia pastoris*等の*Sa*  
*ccharomyces*属菌；*Yarrowia lipolytica*等の*Yarro*  
*wia*属菌；*Issathenkia orientalis*等の*Issat*  
*chenk*  
*ia*属菌；*Debaryomyces hansenii*等の*De*  
*baryomyces*  
 属菌；*Arxula adenoinivorans*等の*Arxula*属菌；及び*Klu*  
*yveromyces lactis*等の*Kluyveromyces*属菌からなる群か  
 ら選択されてもよい。

【0016】

より具体的には、ヘキサン酸は、Steinbusch, 2011、Zhang, 20  
 13、van Eerten-Jansen, M.C.A.A, 2013、Ding H  
 .et al., 2010、Barker H.A., 1949、Stadtman E  
 .R., 1950、Bornstein B.T., et al., 1948等  
 に記載されている方法によって合成ガスから製造することができる。さらに具体的には、ヘキサン  
 酸は、少なくとも*Clostridium kluyveri*の存在下において合成ガス  
 から製造することができる。

【0017】

本願明細書において使用する「酢酸生成細菌」という用語は、Wood-Ljungd  
 ahl経路によってCO、CO<sub>2</sub>及び/又は水素を酢酸塩に転化させることができる微生物  
 を意味する。これらの微生物には、野生型ではWood-Ljungdahl経路を有  
 していないが、遺伝子組み換えによってWood-Ljungdahl経路を有するよう  
 になる微生物も含まれる。そのような微生物としては、例えば、*E. coli*細胞が挙  
 げられる。また、これらの微生物は、カルボキシ栄養細菌(carboxydotrop  
 hic bacteria)としても知られている。現在、21種類の酢酸生成細菌が知  
 られており(Drake et al., 2006)、クロストリジウム属細菌も含まれ  
 る場合がある(Drake & Kusel, 2005)。これらの細菌は、炭素源とし  
 て二酸化炭素又は一酸化炭素を使用し、エネルギー源として水素を使用することが  
 できる(Wood, 1991)。また、アルコール、アルデヒド、カルボン酸及び多くのヘキソ  
 ースも炭素源として使用することができる(Drake et al., 2004)。酢  
 酸塩を生成する還元経路は、アセチル-CoA又はWood-Ljungdahl経路と  
 呼ばれる。酢酸生成細菌は、*Acetoanaerobium notera*(ATCC  
 35199)、*Acetonema longum*(DSM 6540)、*Aceto*  
*bacterium carbinolicum*(DSM 2925)、*Acetoba*  
*cterium malicum*(DSM 4132)、*Acetobacterium*  
*species no. 446*(Morinaga et al., 1990、J.B  
 iotechnol., Vol. 14、p. 187-194)、*Acetobacter*  
*ium wieringae*(DSM 1911)、*Acetobacterium w*  
*oodii*(DSM 1030)、*Alkalibaculum bacchi*(DSM

10

20

30

40

50

22112)、*Archaeoglobus fulgidus* (DSM 4304)、*Blautia producta* (DSM 2950、(旧称：*Ruminococcus productus*)) (旧称：*Peptostreptococcus productus*))、*Butyrivacterium methylotrophicum* (DSM 3468)、*Clostridium aceticum* (DSM 1496)、*Clostridium autoethanogenum* (DSM 10061、DSM 19630及びDSM 23693)、*Clostridium carboxidivorans* (DSM 15243)、*Clostridium coskati* (ATCC no. PTA-10522)、*Clostridium drakei* (ATCC BA-623)、*Clostridium formicoaceticum* (DSM 92)、*Clostridium glycolicum* (DSM 1288)、*Clostridium ljungdahlii* (DSM 13528)、*Clostridium ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988)、*Clostridium ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380)、*Clostridium ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989)、*Clostridium mayombeii* (DSM 6539)、*Clostridium methoxybenzovorans* (DSM 12182)、*Clostridium ragsdalei* (DSM 15248)、*Clostridium scatologenes* (DSM 757)、*Clostridium species* ATCC 29797 (Schmidt et al., 1986, Chem. Eng. Commun., Vol. 45, p. 61-73)、*Desulfotomaculum kuznetsovii* (DSM 6115)、*Desulfotomaculum thermobezoicum* subsp. *thermosyntrophicum* (DSM 14055)、*Eubacterium limosum* (DSM 20543)、*Methanosarcina acetivorans* C2A (DSM 2834)、*Moorella* sp. HUC22-1 (Sakai et al., 2004, Biotechnol. Lett., Vol. 29, p. 1607-1612)、*Moorella thermoacetica* (DSM 521、(旧称：*Clostridium thermoaceticum*))、*Moorella thermoautotrophica* (DSM 1974)、*Oxobacter pfennigii* (DSM 322)、*Sporomusa aerivorans* (DSM 13326)、*Sporomusa ovata* (DSM 2662)、*Sporomusa silvacetica* (DSM 10669)、*Sporomusa sphaeroides* (DSM 2875)、*Sporomusa termitida* (DSM 4440)及び*Thermoanaerobacter kivui* (DSM 2030、(旧称：*Acetogenium kivui*))からなる群から選択されてもよい。

#### 【0018】

より具体的には、*Clostridium carboxidivorans*のATCC BAA-624株を使用することができる。さらに具体的には、例えば、米国特許出願公開第2007/0275447号及び米国特許出願公開第2008/0057554号に記載されている、*Clostridium carboxidivorans*の「P7」及び「P11」株を使用することができる。

#### 【0019】

また、*Clostridium ljungdahlii*も特に好適な微生物である。具体的には、*Clostridium ljungdahlii* PETC、*Clostridium ljungdahlii* ERI2、*Clostridium ljungdahlii* COL及び*Clostridium ljungdahlii* O-52からなる群から選択される株を、合成ガスからヘキサン酸への転化に使用することができる。これらの株は、例えば、国際公開第98/00558号、国際公開第00/68407号、ATCC 49587、ATCC 55988及びATCC 55989に記載

されている。

【0020】

酢酸生成細菌は、水素酸化細菌と共に使用することができる。例えば、酢酸生成細菌と水素酸化細菌の両方を使用して合成ガスからヘキサン酸を製造することができる。あるいは、酢酸生成細菌のみを使用して合成ガスの代謝を行って合成ガスからヘキサン酸を製造することができる。あるいは、水素酸化細菌のみを上記反応に使用することができる。

【0021】

水素酸化細菌は、Achromobacter、Acidithiobacillus、Acidovorax、Alcaligenes、Anabena、Aquifex、Arthrobacter、Azospirillum、Bacillus、Bradyrhizobium、Cupriavidus、Derxia、Helicobacter、Herbaspirillum、Hydrogenobacter、Hydrogenobaculum、Hydrogenophaga、Hydrogenophilus、Hydrogenothermus、Hydrogenovibrio、Ideonella sp. O1、Kyrpidia、Metallosphaera、Methanobrevibacter、Myobacterium、Nocardia、Oligotropha、Paracoccus、Pelomonas、Polaromonas、Pseudomonas、Pseudonocardia、Rhizobium、Rhodococcus、Rhodopseudomonas、Rhodospirillum、Streptomyces、Thiocapsa、Treponema、Variovorax、Xanthobacter及びWautersiaからなる群から選択されてもよい。

10

20

【0022】

合成ガスからのヘキサン酸の製造では、細菌の組み合わせを使用することができる。2種以上の酢酸生成細菌を1種以上の水素酸化細菌と組み合わせて使用することができる。あるいは、2種以上の酢酸生成細菌のみを使用することができる。あるいは、2種以上の水素酸化細菌のみを使用することができる。カプロン酸とも呼ばれるヘキサン酸は、一般式： $C_5H_{11}COOH$ で表される。

【0023】

本発明の各態様に係る方法は、前記工程Aで得られたヘキサン酸のエステル化を行って $C_1 - C_4$ ヘキサン酸エステルを製造する工程をさらに含むことができ、前記 $C_1 - C_4$ ヘキサン酸エステルは前記工程Bにおいて前記遺伝子組み換え細胞と接触させる。エステル化では、工程Aで得られたヘキサン酸を少なくとも1種の $C_1 - C_4$ アルコールと接触させて $C_1 - C_4$ ヘキサン酸エステルを生成する。

30

【0024】

あるいは、合成ガスからのヘキサン酸の製造では、酢酸生成細菌を、ヘキサン酸を生成することができる、エタノール-カルボキシレート発酵を使用する細菌と共に使用することができる。例えば、酢酸生成細菌と水素酸化細菌の両方を使用して合成ガスからヘキサン酸を製造することができる。*Clostridium ljungdahlii*を*Clostridium kluyveri*と共に使用することができる。あるいは、酢酸生成細菌のみを使用して合成ガスの代謝を行って合成ガスからヘキサン酸を製造することができる。この場合、酢酸生成細菌は、エタノール-カルボキシレート発酵経路とWood-Ljungdahl経路の両方を実施することができるものであってもよい。例えば、酢酸生成細菌は、Wood-Ljungdahl経路とエタノール-カルボキシレート発酵経路の両方を行うことができる*C. carboxidivorans*であってもよい。

40

【0025】

エタノール-カルボキシレート発酵経路については、少なくともSeedorf, H. et al., 2008に詳細に記載されている。微生物は、*Clostridium kluyveri*、*C. Carboxidivorans*等からなる群から選択されてもよい。これらの微生物には、野生型ではエタノール-カルボキシレート発酵経路を有し

50

ていないが、遺伝子組み換えによってエタノール - カルボキシレート発酵経路を有するようになる微生物も含まれる。具体的には、微生物は *Clostridium kluyveri* であってもよい。

【0026】

例えば、本発明の各態様に係る工程 A を実施する際に使用する細胞は、遺伝子組み換え微生物であってもよい。遺伝子組み換え細胞又は微生物は、野生型細胞又は微生物と遺伝子的に異なるものであってもよい。本発明の各態様に係る遺伝子組み換え微生物と野生型微生物との遺伝子的差異は、野生型微生物には存在していない場合がある、遺伝子組み換え微生物における完全な遺伝子、アミノ酸、ヌクレオチド等の存在であってもよい。例えば、本発明の各態様に係る遺伝子組み換え微生物は、微生物がヘキサ酸を生成することを可能とする酵素を含むことができる。野生型微生物は、本発明の遺伝子組み換え微生物と比較して、遺伝子組み換え微生物がヘキサ酸を生成することを可能とする酵素の検出可能な活性が見られないものであってもよい。本願明細書において、「遺伝子組み換え微生物」という用語は、「遺伝子組み換え細胞」という用語と同義で使用する。本発明の各態様に係る遺伝子組み換えは、微生物の細胞に対して行うことができる。

10

【0027】

例えば、微生物は、 $E_1 \sim E_{10}$ （ここで、 $E_1$  は、アルコールデヒドロゲナーゼ (adh) であり、 $E_2$  は、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ald) であり、 $E_3$  は、アセトアセチル - CoA チオラーゼ (thl) であり、 $E_4$  は、3 - ヒドロキシブチリル - CoA デヒドロゲナーゼ (hbd) であり、 $E_5$  は、3 - ヒドロキシブチリル - CoA デヒドラターゼ (crt) であり、 $E_6$  は、ブチリル - CoA デヒドロゲナーゼ (bcd) であり、 $E_7$  は、電子伝達フラビンタンパク質サブユニット (etf) であり、 $E_8$  は、補酵素 A 転移酵素 (cat) であり、 $E_9$  は、酢酸キナーゼ (ack) であり、 $E_{10}$  は、ホスホトランスアセチラーゼ (pta) である) から選択される少なくとも 1 種の酵素を発現する野生型微生物であってもよい。具体的には、本発明の各態様に係る野生型微生物は、少なくとも  $E_2$ 、 $E_3$  及び  $E_4$  を発現する微生物であってもよい。より具体的には、本発明の各態様に係る野生型微生物は、少なくとも  $E_4$  を発現する微生物であってもよい。

20

【0028】

あるいは、本発明の各態様に係る微生物は、野生型微生物と比較して、 $E_1 \sim E_{10}$ （ここで、 $E_1$  は、アルコールデヒドロゲナーゼ (adh) であり、 $E_2$  は、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ald) であり、 $E_3$  は、アセトアセチル - CoA チオラーゼ (thl) であり、 $E_4$  は、3 - ヒドロキシブチリル - CoA デヒドロゲナーゼ (hbd) であり、 $E_5$  は、3 - ヒドロキシブチリル - CoA デヒドラターゼ (crt) であり、 $E_6$  は、ブチリル - CoA デヒドロゲナーゼ (bcd) であり、 $E_7$  は、電子伝達フラビンタンパク質サブユニット (etf) であり、 $E_8$  は、補酵素 A 転移酵素 (cat) であり、 $E_9$  は、酢酸キナーゼ (ack) であり、 $E_{10}$  は、ホスホトランスアセチラーゼ (pta) である) から選択される少なくとも 1 種の酵素を高発現する遺伝子組み換え微生物であってもよい。具体的には、本発明の各態様に係る遺伝子組み換え微生物は、少なくとも  $E_2$ 、 $E_3$  及び  $E_4$  を発現する微生物であってもよい。より具体的には、本発明の各態様に係る遺伝子組み換え微生物は、少なくとも  $E_4$  を発現する微生物であってもよい。酵素  $E_1 \sim E_{10}$  は、*Clostridium kluyveri* から単離されてもよい。

30

40

【0029】

本発明の各態様によれば、 $E_1$  はエタノールデヒドロゲナーゼであってもよい。具体的には、 $E_1$  は、アルコールデヒドロゲナーゼ 1、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、アルコールデヒドロゲナーゼ 3、アルコールデヒドロゲナーゼ B 及びそれらの組み合わせからなる群から選択されてもよい。より具体的には、 $E_1$  は、CKL\_\_1075、CKL\_\_1077、CKL\_\_1078、CKL\_\_1067、CKL\_\_2967、CKL\_\_2978、CKL\_\_3000、CKL\_\_3425 及び CKL\_\_2065 からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも 50% の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には

50

、 $E_1$  は、CKL\_\_1075、CKL\_\_1077、CKL\_\_1078 及び CKL\_\_1067 からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98 又は100%の配列相同性を有していてもよい。

【0030】

本発明の各態様によれば、 $E_2$  はアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼであってもよい。具体的には、 $E_2$  は、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ1、アルコールデヒドロゲナーゼ2 及びそれらの組み合わせからなる群から選択されてもよい。より具体的には、 $E_2$  は、CKL\_\_1074、CKL\_\_1076 等からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には、 $E_2$  は、CKL\_\_1074 及び CKL\_\_1076 からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98 又は100%の配列相同性を有していてもよい。

10

【0031】

本発明の各態様によれば、 $E_3$  は、アセトアセチル - CoAチオラーゼA1、アセトアセチル - CoAチオラーゼA2、アセトアセチル - CoAチオラーゼA3 及びそれらの組み合わせからなる群から選択されてもよい。より具体的には、 $E_3$  は、CKL\_\_3696、CKL\_\_3697、CKL\_\_3698 等からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には、 $E_3$  は、CKL\_\_3696、CKL\_\_3697 及び CKL\_\_3698 からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98 又は100%の配列相同性を有していてもよい。

20

【0032】

本発明の各態様によれば、 $E_4$  は、3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドロゲナーゼ1、3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドロゲナーゼ2 等であってもよい。より具体的には、 $E_4$  は、ポリペプチドCKL\_\_0458、CKL\_\_2795 等に対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には、 $E_4$  は、ポリペプチドCKL\_\_0458 又はCKL\_\_2795 に対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98 又は100%の配列相同性を有していてもよい。

30

【0033】

本発明の各態様によれば、 $E_5$  は、3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドラターゼ1、3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドラターゼ2 又はそれらの組み合わせであってもよい。より具体的には、 $E_5$  は、CKL\_\_0454、CKL\_\_2527 等からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には、 $E_5$  は、CKL\_\_0454 及びCKL\_\_2527 からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98 又は100%の配列相同性を有していてもよい。

【0034】

本発明の各態様によれば、 $E_6$  は、ブチリル - CoAデヒドロゲナーゼ1、ブチリル - CoAデヒドロゲナーゼ2 等からなる群から選択されてもよい。より具体的には、 $E_6$  は、CKL\_\_0455、CKL\_\_0633 等からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には、 $E_6$  は、CKL\_\_0455 及びCKL\_\_0633 からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98 又は100%の配列相同性を有していてもよい。

40

【0035】

本発明の各態様によれば、 $E_7$  は、電子伝達フラビンタンパク質 サブユニット1、電子伝達フラビンタンパク質 サブユニット2、電子伝達フラビンタンパク質 サブユニット1 及び電子伝達フラビンタンパク質 サブユニット2 からなる群から選択されてもよい

50

。具体的には、E<sub>7</sub>は、CKL\_\_3516、CKL\_\_3517、CKL\_\_0456、CKL\_\_0457等からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には、E<sub>7</sub>は、CKL\_\_3516、CKL\_\_3517、CKL\_\_0456及びCKL\_\_0457からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98又は100%の配列相同性を有していてもよい。

【0036】

本発明の各態様によれば、E<sub>8</sub>は補酵素トランスフェラーゼ(c a t)であってもよい。具体的には、E<sub>8</sub>は、プチリル-CoA:酢酸CoAトランスフェラーゼ、スクシニル-CoA:補酵素A転移酵素、4-ヒドロキシプチリル-CoA:補酵素A転移酵素等からなる群から選択されてもよい。より具体的には、E<sub>8</sub>は、CKL\_\_3595、CKL\_\_3016、CKL\_\_3018等からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には、E<sub>8</sub>は、CKL\_\_3595、CKL\_\_3016及びCKL\_\_3018からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98又は100%の配列相同性を有していてもよい。

10

【0037】

本発明の各態様によれば、E<sub>9</sub>は酢酸キナーゼA(a c k A)であってもよい。具体的には、E<sub>9</sub>は、CKL\_\_1391等のポリペプチド配列に対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には、E<sub>9</sub>は、CKL\_\_1391のポリペプチドに対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98又は100%の配列相同性を有していてもよい。

20

【0038】

本発明の各態様によれば、E<sub>10</sub>はホスホトランスアセチラーゼ(p t a)であってもよい。具体的には、E<sub>10</sub>は、CKL\_\_1390等のポリペプチド配列に対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さらに具体的には、E<sub>10</sub>は、CKL\_\_1390のポリペプチドに対して少なくとも50、60、65、70、75、80、85、90、91、94、95、98又は100%の配列相同性を有していてもよい。

【0039】

例えば、野生型又は遺伝子組み換え微生物はE<sub>1</sub>~E<sub>10</sub>を発現する。具体的には、本発明の各態様に係る微生物は、野生型微生物と比較して、E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>、E<sub>4</sub>、E<sub>5</sub>、E<sub>6</sub>、E<sub>7</sub>、E<sub>8</sub>、E<sub>9</sub>、E<sub>10</sub>又はそれらの組み合わせを高発現する微生物であってもよい。例えば、遺伝子組み換え微生物は、野生型微生物と比較して、E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>、E<sub>4</sub>、E<sub>5</sub>、E<sub>6</sub>、E<sub>7</sub>、E<sub>8</sub>、E<sub>9</sub>及びE<sub>10</sub>を高発現する。より具体的には、微生物には任意の酵素E<sub>1</sub>~E<sub>10</sub>の組み合わせが存在し、少なくとも1種のカルボン酸を生成することができるのものであってもよい。例えば、本発明の各態様において使用する遺伝子組み換え微生物は、微生物が少なくとも1種又は2又は3種のカルボン酸を(同時に)生成することを可能とする任意の酵素E<sub>1</sub>~E<sub>10</sub>の組み合わせを含むことができる。例えば、微生物は、ヘキサン酸、酪酸及びノ又は酢酸を同時に生成することができるのものであってもよい。同様に、微生物は、1種又は2種以上のカルボン酸を生成することを可能とする酵素E<sub>1</sub>~E<sub>10</sub>の組み合わせを発現するように遺伝子組み換えされていてもよい。いずれの場合にも、微生物は野生型又は遺伝子組み換え微生物のいずれであってもよい。

30

40

【0040】

例えば、本発明の各態様に係る遺伝子組み換え微生物は、野生型微生物と比較して、ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質及びノ又は電子伝達複合タンパク質を高発現する。具体的には、ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質(h y d)は、h y d E、h y d F及びh y d Gからなる群から選択されてもよい。より具体的には、ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質(h y d)は、CKL\_\_0605、CKL\_\_2330、CKL\_\_3829等からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも50%の配列相同性を有していてもよい。さ

50

らに具体的には、本発明の各態様に係るヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質 ( h y d ) は、C K L \_ 0 6 0 5、C K L \_ 2 3 3 0 及び C K L \_ 3 8 2 9 からなる群から選択されるポリペプチドに対して少なくとも 5 0、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 1、9 4、9 5、9 8 又は 1 0 0 % の配列相同性を有していてもよい。

【 0 0 4 1 】

本願明細書において、データベースコードは、特記しない限りにおいて、N C B I データベースから入手可能な配列、より具体的には 2 0 1 4 年 6 月 1 2 日のオンラインバージョンを意味し、配列がヌクレオチド配列である場合には、ヌクレオチド配列を翻訳することによって得られたポリペプチド配列を含む。

【 0 0 4 2 】

本発明の各態様に係る方法は、前記工程 A で得られたヘキサン酸のエステル化を行って C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> ヘキサン酸エステルを製造する工程をさらに含むことができ、前記 C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> ヘキサン酸エステルは前記工程 B において前記遺伝子組み換え細胞と接触させる。

【 0 0 4 3 】

例えば、エステル化は化学的プロセスによって行うことができる。公知の任意の化学反応を使用してヘキサン酸を C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルコールヘキサン酸エステルに転化させることができる。より具体的には、ヘキサン酸をアルコールと反応させる。ヘキサン酸を少なくとも 1 種の短鎖アルコールと接触させてヘキサン酸エステルを生成することができる。具体的には、短鎖アルコールは C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルコールであってもよい。短鎖アルコールは、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール及び / 又はブチルアルコールであってもよい。具体的には、アルコールは、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール及び / 又はブチルアルコールからなる群から選択され、ヘキサン酸メチル、エチル、プロピル又はブチルを生成することができる。この反応は、少なくとも 1 種の触媒の存在下で実施することができる。触媒は、通常は、スルホン酸等の酸性触媒、水酸化アルカリ又はアルカリアルコラート等の塩基、金属酸化物又は金属アルキレートである。具体的には、ヘキサン酸を代謝させて C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルコールヘキサン酸エステルを生成することができる。触媒は、Z r O C l<sub>2</sub> · 8 H<sub>2</sub> O であってもよい。

【 0 0 4 4 】

例えば、Z r O C l<sub>2</sub> · 8 H<sub>2</sub> O の存在下でヘキサン酸をメタノールと反応させてヘキサン酸メチルを生成する。

【 0 0 4 5 】

本発明の各態様に係る方法は、合成ガスから製造されたヘキサン酸を、少なくとも 1 種の C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルコールと接触させる前に抽出する工程を含むことができる。ヘキサン酸は、公知の任意の方法を使用して抽出することができる。例えば、ヘキサン酸の抽出方法は、B y o u n g , S . J e t a l . , 2 0 1 3 のセクション 2 . 3 に記載されている。別の抽出方法としては、K i e u n C . , e t a l . , 2 0 1 3 の「E x t r a c t i o n M o d e l」に記載されている方法が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

あるいは、エステル化は生化学的プロセスによって行うことができる。この場合、少なくとも 1 種の酵素によってエステル化プロセスを促進することができる。エステル化のための酵素は、チオエステラーゼ酵素、アシル - C o A シンテターゼ酵素、エステルシンテターゼ酵素及びリパーゼからなる群から選択されてもよい。これらの酵素の少なくとも 1 種を、本発明の方法の工程 A の細菌によって発現させてもよい。例えば、酢酸生成細菌及び / 又は水素酸化細菌が、ヘキサン酸のエステル化に使用することができるエステル化酵素を過剰発現してもよい。あるいは、エステル化酵素を発現する細胞を本発明の方法の工程 A の後に使用してヘキサン酸をヘキサン酸エステルにエステル化してもよい。

【 0 0 4 7 】

本発明の方法の工程 A で得られたヘキサン酸は、アミノヘキサン酸及び / 又はアミノヘキサン酸エステルに直接的に転化させることができる。あるいは、本発明の方法の工程 A で得られたヘキサン酸は、化学的又は生化学的にヘキサン酸エステルにエステル化させて

10

20

30

40

50

もよい。得られたヘキサン酸エステルを、本発明の方法の工程Bで使用する遺伝子組み換え細胞と接触させる。例えば、化学的プロセスと生化学的プロセスを順次又は同時に組み合わせてヘキサン酸をエステル化する。

【0048】

次に、 $C_1 - C_4$  アルコールヘキサン酸エステルを遺伝子組み換え細胞と接触させてアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを生成する。遺伝子組み換え細胞は、その野生型と比較して、アルカンモノオキシゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及び - トランスアミナーゼからなる群から選択される少なくとも1種の酵素に関して高い活性を有する。

【0049】

本発明の各態様に係る細胞は、その野生型と比較して、 $C_1 - C_4$  アルコールヘキサン酸エステルからより多くのアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを生成することができるように遺伝子組み換えされている。そのような細胞を使用して、 $C_1 - C_4$  アルコールヘキサン酸エステルからの発酵によってアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを生成することができる。

【0050】

「その野生型と比較して、 $C_1 - C_4$  アルコールヘキサン酸エステルからより多くのアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを生成することができる」とは、遺伝子組み換え細胞の野生型細胞がアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを生成することができない場合も含む。また、遺伝子組み換え細胞の野生型細胞がアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを少なくとも検出可能な量で生成することができない場合であって、野生型細胞の遺伝子組み換えによって、アミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを検出可能な量で生成することができる、本発明の方法で使用する細胞が得られる場合も含む。

【0051】

本願明細書において細胞に関連して使用する「野生型」という用語は、天然に見られる型であるゲノムを有する細胞を意味する。「野生型」という用語は、細胞全体及び各遺伝子の両方に使用する。従って、「野生型」という用語は、遺伝子組み換え法を使用して遺伝子配列が少なくとも部分的に人為的に変更された細胞又は遺伝子には適用されない。

【0052】

具体的には、遺伝子組み換え細胞は、所定の時間、例えば2時間、特に8時間、特に24時間以内に、野生型細胞と比較して、少なくとも2倍、特に少なくとも10倍、特に少なくとも100倍、1,000倍又は10,000倍のアミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステルを生成するように遺伝子組み換えされていてもよい。生成物の生成量の増加は、例えば、本発明の方法において使用する細胞及びその野生型細胞を、適当な培地内において、同一の条件(同一の細胞密度、栄養培地及び培養条件)で所定の時間にわたって培養し、培地中における目的生成物(アミノヘキサン酸及び/又はアミノヘキサン酸エステル)の量を測定することによって測定することができる。

【0053】

本発明の方法において使用する細胞は、原核生物又は真核生物であってもよい。本発明の方法において使用する細胞は、哺乳動物の細胞(ヒト細胞又は非ヒト細胞等)、植物細胞又は酵母、菌類又は細菌等の微生物であってもよい。微生物は細菌であってもよい。より具体的には、微生物は酵母であってもよい。

【0054】

適当な細菌、酵母又は菌類としては、細菌、酵母又は菌類株としてDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Culture)) に寄託されている細菌、酵母又は菌類が挙げられる。本発明の方法において使用することができる適当な細菌としては、<http://www.dsmz.de/species/bacteria>.

10

20

30

40

50

htmlに記載されている属に属する細菌が挙げられる。本発明の方法において使用することができる適当な酵母としては、<http://www.dsmz.de/species/yeasts.html>に記載されている属に属する酵母が挙げられる。本発明の方法において使用することができる適当な菌類としては、<http://www.dsmz.de/species/fungi.html>に記載されている属に属する菌類が挙げられる。

【0055】

具体的には、本発明の方法において使用することができる遺伝子組み換えされていてもよい細胞は、*Corynebacterium*、*Brevibacterium*、*Bacillus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Candida*、*Pichia*、*Kluyveromyces*、*Saccharomyces*、*Escherichia*、*Zymomonas*、*Yarrowia*、*Methylobacterium*、*Ralstonia*、*Pseudomonas*、*Burkholderia*及び*Clostridium*属から選択されてもよい。より具体的には、本発明の方法において使用することができる細胞は、*Escherichia coli*、*Corynebacterium glutamicum*及び*Pseudomonas putida*からなる群から選択されてもよい。さらに具体的には、本発明の方法において使用することができる細胞は*Escherichia coli*であってもよい。*E. coli*としては、公知の任意の株を使用することができる。特に、JM101株を使用することができる。

10

【0056】

具体的には、本発明の方法に係る遺伝子組み換え細胞は、その野生型と比較して、以下の酵素の少なくとも1種に関して高い活性を示すものであってもよい：

- i) カルボン酸又はカルボン酸エステルから対応する - ヒドロキシカルボン酸及び/又は - ヒドロキシカルボン酸エステルへの転化を促進するアルカンモノオキシゲナーゼ；
- ii) - ヒドロキシカルボン酸及び/又は - ヒドロキシカルボン酸エステルから対応する - オキソカルボン酸又は - オキソカルボン酸エステルへの転化を促進するアルコールデヒドロゲナーゼ；及び/又は
- iii) - オキソカルボン酸又は - オキソカルボン酸エステルから対応する - アミノカルボン酸又は - アミノカルボン酸エステルへの転化を促進する - トランスアミナーゼ。

20

30

【0057】

本願明細書において使用する「酵素に関して高い活性を示す」とは、当該酵素に関して高い細胞内活性を示すことを意味する。基本的に、酵素活性は、強力なプロモーターを使用するか、高い活性を有する酵素をコードする遺伝子又は対立遺伝子を使用するか、これらの手段を組み合わせることにより、酵素をコードする遺伝子配列のコピー数を増加させることによって高めることができる。本発明に係る方法に使用する遺伝子組み換え細胞は、例えば、所望の遺伝子、所望の遺伝子の対立遺伝子又はその一部を含むベクター及び遺伝子の発現を可能とするベクターを使用した形質転換、形質導入、接合又はこれらの組み合わせによって得ることができる。異種発現は、遺伝子又は対立遺伝子を、細胞の染色体又は染色体外複製ベクターに導入することによって達成される。

40

【0058】

本発明の各態様に係る細胞は、公知の任意の方法によって遺伝子的に形質転換する。具体的には、細胞は、国際公開第2009/077461号に開示されている方法によって得ることができる。

【0059】

本願明細書において、「遺伝子組み換え細胞は、その野生型と比較して、酵素に関して高い活性を示す」とは、各酵素の活性が、少なくとも2倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1,000倍又は少なくとも10,000倍高められていることを意味する。

【0060】

50

本発明の各態様によれば、細胞は、アルカンモノヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、 $\alpha$ -トランスアミナーゼ又はそれらの組み合わせに関して高い活性を有していてもよい。具体的には、細胞は、アルカンモノヒドロゲナーゼ及びアルコールデヒドロゲナーゼ又はアルカンモノヒドロゲナーゼ及び $\alpha$ -トランスアミナーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼ及び $\alpha$ -トランスアミナーゼに関して高い活性を有していてもよい。より具体的には、細胞は、アルカンモノヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及び $\alpha$ -トランスアミナーゼに関して高い活性を有していてもよい。

【0061】

アルカンモノオキシゲナーゼは、*Pseudomonas putida* GPO1のAlkBGT遺伝子によってコードされていてもよい。AlkBGT遺伝子配列の単離については、例えば、van Beilen et al., 2002に記載されている。また、チトクロームP450モノオキシゲナーゼ、特に*Candida tropicalis*等の*Candida*又はヒヨコマメ(*Cicer arietinum* L.)等の植物に由来するチトクロームP450モノオキシゲナーゼをアルカンモノオキシゲナーゼとして使用することもできる。例えば、*Candida tropicalis*に由来する適当なチトクロームP450モノオキシゲナーゼの遺伝子配列は国際公開第00/20566号に開示されており、ヒヨコマメに由来する適当なチトクロームP450モノオキシゲナーゼの遺伝子配列はBarz et al., 2000に記載されている。AlkB遺伝子のその他の同族体は、van Beilen et al., 2003に記載されている。キシレンモノオキシゲナーゼのための適当な遺伝子としては、例えば、xy1M又はxy1A遺伝子が挙げられ、これらの遺伝子を含むプラスミドはGENBANKに寄託されている(受託番号M37480)。アルカンモノオキシゲナーゼをコードする遺伝子配列は*Pseudomonas oleovorans*に由来する遺伝子配列であってもよく、SEQ ID NO: 1(表1)で表される配列を含むか、SEQ ID NO: 1で表される配列であってもよい。

10

20

【0062】

アルコールデヒドロゲナーゼは、*Pseudomonas putida* GPO1、*Alcanivorax borkumensis*、*Bordetella parapertussis*、*Bordetella bronchiseptica*及び*Roseobacter denitrificans*のAlkJ遺伝子(EC 1.1.99-2)によってコードされていてもよい。具体的には、AlkJ遺伝子は*Pseudomonas oleovorans*によってコードされていてもよい。AlkJ遺伝子によってコードされたアルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子配列は、例えば、KEGG遺伝子データベースに寄託されている。AlkJ遺伝子をコードする遺伝子配列は、SEQ ID NO: 2(表1)で表される配列を含むか、SEQ ID NO: 2で表される配列であってもよい。

30

【0063】

$\alpha$ -トランスアミナーゼは、米国特許出願公開第2007/0092957号の配列番号248、250、252及び254によって特徴付けられる $\alpha$ -トランスアミナーゼから選択されてもよい。

40

【0064】

あるいは、 $\alpha$ -トランスアミナーゼは植物から単離してもよい。植物に由来する $\alpha$ -トランスアミナーゼは、*Arabidopsis thaliana*、*Avena sativa*、*Beta vulgaris*、*Glycine max*、*Hordeum vulgare*、*Lotus japonicus*、*Solanum lycopersicum*、*Manihot esculenta*、*Oryza sativa*、*Traetium aestivum*、*Zea mays*、*Spinacia oleracea*、*Arum maculatum*、*Mercurialis perennis*及び*Urtica dioica*からなる群から選択される植物に由来するものであってもよい。

【0065】

50

具体的には、Chromobacterium violaceum DSM30191に由来する - トランスアミナーゼCV2025を本発明の方法において使用する遺伝子組み換え細胞に使用することができる。より具体的には、 - トランスアミナーゼは、SEQ ID NO: 3 (表1)の遺伝子配列によってコードされたChromobacterium violaceum DSM30191 (Kaulmann et al., 2007)に由来する - トランスアミナーゼである。

【0066】

【表1】

本発明の全ての場面に係る細胞の遺伝子組み換えに用いられる遺伝子のヌクレオチド配列

SEQ ID NO:	ヌクレオチド配列
1	CTTGAGAAACACAGAGTTCTGGATTCCGCTCCAGAGTACGTAGATAAAAAGAAATATCTC TGGATACTATCAACTTTGTGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGGCTTGCAAATGAA ACTGGTTGGGGGATTTTTATGGGCTGGTATTGCTCGTATGGTACGGCGCACTTCCATTG CTTGATGCGATGTTTGGTGAGGACTTTAATAATCCGCCTGAAGAAGTGGTGCCGAACTA GAGAAGGAGCGGTA CTATCGAGTTTTGACATATCTAACAGTTCCTATGCATTACGCTGCA TTAATTGTGTCAGCATGGTGGGTCGGA ACTCAGCCAATGTCTTGGCTTGAAATTGGTGCG CTTGCCTTGTCACTGGGTATCGTGAACGGACTAGCGCTCAATACAGGACACGAACTCGGT CACAAGAAGGAGACTTTTGATCGTTGGATGGCCAAAATTGTGTTGGCTGTCGTAGGGTAC GGTCACTTCTTTATTGAGCATAATAAGGGTCATCACCGTGATGTCGCTACACCGATGGAT CCTGCAACATCCCGGATGGGAGAAAGCATTATAAGTTTTCAATCCGTGAGATCCCAGGA GCATTTATTCGTGCTTGGGGGCTTGAGGAACAACGCCTTCGCGCCGTGGCCAAAGCGTT TGGAGTTTCGATAATGAAATCCTCCAACCAATGATCATCACAGTTATTCTTTACGCCGTT CTCCTTGCTTGTGGACCTAAGATGCTGGTGTTCCTGCCGATTCAAATGGCTTTCGGT TGGTGGCAGCTGACCAGTGCGA ACTATATTGAACATTACGGCTTGCTCCGTCAAAAAATG GAGGACGGTTCGATATGAGCATCAAAAGCCGCACCATTCTTGAATAGTAATCACATCGTC TCTAATCTAGTCTGTTCCACCTTCAGCGCACTCGGATCACCACGCGCATCCAACACGT TCTTATCAGTCACTTCGGGATTTCCCGGCCTGCCGGCTCTCCGACGGGTTACCCTGGT GCATTTTTGATGGCGATGATTCCTCAGTGGTTTAGATCAGTTATGGATCCCAAGGTAGTA GATTGGGCTGGTGGTGACCTTAATAAGATCCAAATTGATGATTCGATGCGAGAAACCTAT TTGAAAAATTTGGCACTAGTAGTGCTGGTCATAGTTCGAGTACCTCTGCGGTAGCATCG TAG

10

20

30

【0067】

【表 2】

2	<p>ATGTACGACTATATAATCGTTGGTGGCTGGATCTGCAGGATGTGTGCTTGCTAATCGTCTT  TCGGCCGACCCCTCTAAAAGAGTTTGTACTTTGAAGCTGGGCCGCGAGATACGAATCCG  CTAATTCATATGCCGTTAGGTATTGCTTTGCTTTCAAATAGTAAAAAGTTGAATTGGGCT  TTTCAAACCTGCGCCACAGCAAAATCTCAACGGCCGGAGCCTTTTCTGGCCACGAGGAAAA  ACGTTAGGTGGTTCAAGCTCAATCAACGCAATGGTCTATATCCGAGGGCATGAAGACGAT  TACCACGCATGGGAGCAGGCGGCCGCGCTACTGGGGTTGGTACCGGGCTCTTGAGTTG  TTCAAAGGCTTGAATGCAACCAGCGATTCGATAAGTCCGAGCACCATGGGGTTGACGGA  GAATTAGCTGTTAGTGATTTAAAATATATCAATCCGCTTAGCAAAGCATTTCGTGCAAGCC  GGCATGGAGGCCAATATTAATTTCAACGGAGATTTCAACGGCGAGTACCAGGACGGCGTA  GGGTTCTATCAAGTAACCCAAAAAATGGACAACGCTGGAGCTCGGCGCGTGCAATTCTTG  CACGGTGTACTTTCCAGACCAAATCTAGACATCATTACTGATGCGCATGCATCAAAAATT  CTTTTTGAAGACCGTAAGGCGGTTGGTGTTCCTTATATAAAGAAAAATATGCACCATCAA  GTCAAGACAACGAGTGGTGGTGAAGTACTTCTTAGTCTTGGCGCAGTCGGCACGCCTCAC  CTTCTAATGCTTTCTGGTGTGGGGCTGCAGCCGAGCTTAAGGAACATGGTGTTCCTCTA  GTCCATGATCTTCCTGAGGTGGGGAAAAATCTCAAGATCATTTGGACATCACATTGATG  TGCGCAGCAAATTCGAGAGAGCCGATAGGTGTTGCTCTTTCTTTCATCCCTCGTGGTGTC  TCGGGTTTGTTCATATGTGTTTAAAGCGGAGGGGTTTCTACTAGTAACGTGGCAGAG  TCGGGTGGTTTTGTAAAAGTTCTCCTGATCGTGATCGGCCCAATTTGCAGTTTCATTTT  CTTCCAATTATCTTAAAGATCACGGTCGAAAAATAGCGGGTGGTTATGGTTATACGCTA  CATATATGTGATCTTTTGCCTAAGAGCCGAGGCAGAATTGGCCTAAAAAGCGCCAATCCA  TTACAGCCGCCTTAATTGACCCGAACCTATCTTAGCGATCATGAAGATATTAACCATG  ATTGCGGGTATTAAGATAGGGCGCGCTATTTTGCAGGCCCATCGATGGCGAAGCATTTT  AAGCATGAAGTAGTACCGGGCCAGGCTGTAAAAGTATGATGAAATAATCGAAGATATT  CGTAGGCGAGCTGAGACTATATACCATCCGGTAGGTACTTGTAGGATGGGTAAAGATCCA  GCGTCAGTTGTTGATCCGTGCCTGAAGATCCGTGGGTTGGCAAATATTAGAGTCGTTGAT  GCGTCAATTATGCCGCACTTGGTTCGCGGGTAACACAAACGCTCCAATTATTGATTGCA  GAAAATGCGGCAGAAATAATTATGCGGAATCTTGATGTGGAAGCATTAGAGGCTAGCGCT  GAGTTTGCTCGCGAGGGTGCAGAGCTAGAGTTGGCA</p>
---	---

10

20

30

【表 3】

3	<p>ATGCAGAAACAGCGTACCACCTCTCAGTGGCGTGAACTCGATGCGGCGCATCATCTCCAT  CCGTTTACCGATACCGCGAGCCTCAATCAGGCGGGTGC GCGTGTGATGACCCGTGGCGAA  GGCGTGTATCTCTGGGATAGCGAAGGCAACAAAATTATTGATGGCATGGCGGGCCTCTGG  TGCGTGAACGTGGGCTATGGCCGTAAGATTTTGC GGAAGCGGCGCGTCGTGATGGAA  GAACTCCCGTTTTATAACACCTTCTTTAAAACCACCCATCCGGCGGTGGTGGAACTCAGC  AGCCTCCTCGCCGAAGTTACCCCGGCAGTTTTT GATCGTGTGTTTTATACCAACAGCGGC  AGCGAAAGCGTGGATACCATGATTGATGTTGCGT GCGTATTGGGATGTGCAGGGCAA  CCGGAACAAAAACCCTCATTGGCCGTTGGAACGGCT ATCACGGCAGCACCATTGGCGGT  GCGAGCCTCGGCGGCATGAAATATATGCATGAACAG GGGCGATCTCCCGATTCCGGGCATG  GCGCATATTGAACAGCCGTGGTGGTATAAACATGGC AAAGATATGACCCCGGATGAATTT  GGCGTGGTTGCGGCGCGTTGGCTCGAAGAAAAAAT TCTCGAAATCGGCGCGGATAAAGTG  GCGGCGTTTGTGGGCGAACCGATTGAGGGTGC GGGCGGTGTGATTGTTCCGCCGGCAACC  TATTGGCCGAAATTGAACGTATTTGCCGAAATATGAT GTGCTCCTCGTTGCGGATGAA  GTGATTTGCGGCTTTGGCCGTACCGGCGAATGGTTT GGCCATCAGCATTGTTGCTTTTCAG  CCGGACCTCTTACC GCGGCGAAAGGCCTCAGCAGCGGCTATCTCCCGATTGGCGCGGTG  TTTGTGGGCAAACGTGTTGCGGAAGGTCTCATTGCG GGGCGGTGATTTAAACCATGGCTTT  ACCTATAGCGGCCATCCGGTGTGTGCGGCGGTGGCGC ATGCGAATGTTGCGGCGCTCCGT  GATGAAGGCATTGTGCAGCGTGTGAAAGATGATATTG GCCCGTATATGCAGAAACGTTGG  CGTGAACCTTTAGCCGTTTTGAACATGTGGATGATGT GCGTGGCGTGGGCATGGTGCAG  GCGTTTACCCTCGTGAACAAAGCGAAACGTGAACTCTT TCCGGATTTTGGCGAAATT  GGCACCCTCTGCCGCGATATTTTTTTTCGCAACAACCT CATTATGCGTGCCTGCGGCGAT  CACATTGTGCTGCACCGCCGCTCGTTATGACCCGTGC GGAAGTGGATGAAATGCTCGCC  GTGGCGGAACGTTGCCTCGAAGAATTTGAACAGACCCTC AAAGCGCGTGGCCTCGCCTAA</p>
---	---

10

20

【 0 0 6 9 】

30



(BLAST Manual、Altschul S. et al., 1990)から入手することができる。

【0072】

また、周知のSmith-Watermanアルゴリズムを使用してヌクレオチド相同性を決定することもできる。

【0073】

ヌクレオチド比較のためのパラメータは、以下のパラメータを含むことができる。

アルゴリズム：Needleman and Wunsch, 1970

比較マトリックス

マッチ = +10

ミスマッチ = 0

ギャップペナルティ = 50

ギャップ長ペナルティ = 3

【0074】

また、GAPプログラムも上記パラメータとの使用に適している。これらのパラメータは、通常はヌクレオチド配列比較におけるデフォルトパラメータである。

【0075】

また、-Ala：ピルビン酸トランスアミナーゼのサブグループに由来する酵素も適している。-Ala：ピルビン酸トランスアミナーゼのサブグループとしては、例えば、*Pseudomonas putida* W619 (gi:119860707, gi:119855857, gi:119856278)、*Pseudomonas putida* KT2440 (gi:24984391)、*Pseudomonas aeruginosa* PA01 (gi:15595330, gi:15600506, gi:15595418, gi:9951072)、*Streptomyces coelicolor* A3(2) (gi:3319731)、*Streptomyces avermitilis* MA 4680 (gi:29831094, gi:29829154)及び*Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (gi:34102747)に由来するトランスアミナーゼが挙げられる。本願明細書において、データベースコードは、特記しない限りにおいて、NCBIデータベースから入手可能な配列、より具体的には2014年2月20日のオンラインバージョンを意味し、配列がヌクレオチド配列である場合には、ヌクレオチド配列を翻訳することによって得られたポリペプチド配列を含む。

【0076】

本発明の各態様に係る方法は、アミノヘキサン酸エステルをアミノヘキサン酸に転化させる工程をさらに含むことができる。具体的には、-アミノヘキサン酸エステルを対応する-アミノヘキサン酸に転化させる。本発明の方法に係る遺伝子組み換え細胞は、-アミノヘキサン酸エステルから対応する-アミノヘキサン酸への転化を触媒する酵素の活性を高めることができるものであってもよく、酵素は、細胞によって分泌されるエステラーゼであってもよい。細胞によるエステラーゼの分泌には、エステル結合が細胞外においてのみ切断されるという利点がある。-アミノヘキサン酸エステルの膜透過性は-アミノヘキサン酸よりも高いため、-アミノヘキサン酸エステルは細胞から細胞を取り囲む培養液に入ることができる。細胞外のエステラーゼは、-アミノヘキサン酸エステルから-アミノヘキサン酸への転化をより効率的に触媒する。

【0077】

具体的には、使用するエステラーゼはリパーゼであってもよい。例えば、適当なりパーゼとしては、*Pseudomonas fluorescens* HU380 (ACC Code Q76D26、Kojima and Shimizu, 2003)に由来するリパーゼLipAが挙げられる。エステラーゼは確実に細胞から分泌されるように、エステラーゼには、分泌を行わせる対応するシグナル配列を組み込むことができる。例えば、*Pseudomonas fluorescens* HU380に由来するリパーゼL

10

20

30

40

50

ipAをE.coli内において過剰発現させる場合には、Pseudomonas aeruginosaの細胞表面に自然に生じるエステラーゼ(EstA)に由来するシグナル配列を組み込むことが有利である(Becker et al., 2005)。その他の適当な酵素としては、C.antarctica、M.miehei及びP.cepaciaに由来するリパーゼが挙げられる(Vaysse et al., 2002)。

【0078】

あるいは、けん化(水酸化物(水酸化ナトリウム等)の水溶液を使用した -アミノヘキサン酸エステルの加水分解)によって分泌された -アミノヘキサン酸エステルを開裂させて -アミノヘキサン酸を得ることもできる。

【0079】

例えば、 -アミノヘキサン酸をラクタムに転化させることができる。ラクタムは、ポリアミドを製造するために使用することができる環状アミドである。具体的には、ラクタムの開環重合によってナイロンを製造することができる。より具体的には、6-ヘキサノラクタムを重合させてナイロン-6を製造することができる。

【0080】

-アミノヘキサン酸、 -アミノヘキサン酸エステル又は -アミノヘキサン酸に由来するラクタムの製造では、以下の工程を実施する。

I)本発明の各態様に係る細胞を、細胞が -アミノヘキサン酸、 -アミノヘキサン酸エステル及び/又は -アミノヘキサン酸又はC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ヘキサン酸エステルに由来するラクタムを生成することができる条件下において、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ヘキサン酸エステルを含む培地又はC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ヘキサン酸エステルを含む有機相に隣接する培地と接触させる;及び/又は

II)得られた -アミノヘキサン酸、 -アミノヘキサン酸エステル及び/又は -アミノヘキサン酸に由来するラクタムを単離する。

【0081】

本発明の方法において使用する遺伝子組み換え細胞は、 -アミノヘキサン酸又は -アミノヘキサン酸に由来するラクタムを製造するために、回分処理又は反復流加培養処理によって連続的又は非連続的に培養液を接触させる(培養する)ことができる。半連続処理も使用することができる(英国特許出願公開第1009370A号を参照)。Chmiel's textbook, 1991又はStorhas 1994に公知の培養方法が記載されている

【0082】

使用する培地は、各株に関する要件を適切に満たしていなければならない。様々な微生物に使用する培地については、「Manual of Methods for General Bacteriology」に記載されている。

【0083】

窒素源としては、ペプトン等の有機含窒素化合物、酵母抽出物、肉抽出物、麦芽抽出物、コーンステープリカー、大豆粉、尿素、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウム等の無機化合物を使用することができる。これらの窒素源は、1種単独又は混合物として使用することができる。

【0084】

例えば、本発明の各態様において、少なくとも -アミノヘキサン酸、 -アミノヘキサン酸エステル及び/又は -アミノヘキサン酸に由来するラクタムを生成する際に、工程I)において使用する培地は、 -オキシヘキサン酸及び/又は -オキシヘキサン酸エステルから対応する -アミノヘキサン酸及び/又は -アミノヘキサン酸エステルへのトランスアミナーゼ触媒転化においてアミン供与体として機能するアミノ基供与体(例えば、アンモニア又はアンモニウムイオン又はアミノ酸(アラニン又はアスパラギン酸塩))を含む。

【0085】

リン源としては、リン酸、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム及び対応する

10

20

30

40

50

ナトリウム含有塩を使用することができる。培地は、増殖に必要な金属の塩（例えば、硫酸マグネシウム及び／又は硫酸鉄）をさらに含むことができる。上述した物質に加えて、増殖に必須の物質、例えば、アミノ酸及び／又はビタミンを使用することもできる。また、適当な前駆体を培地に添加することもできる。上述した物質は、培地に同時に添加するか、培養時に適当な方法で添加することができる。

【0086】

培養物のpHを制御するために、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア及びアンモニア水等の塩基性化合物又はリン酸又は硫酸等の酸性化合物を適当な方法で使用することができる。発泡を制御するために消泡剤（例えば、脂肪酸ポリグリコールエステル）を使用することができる。適当な抗生物質を培地に添加することによってプラスミド安定性を維持することができる。好気性条件を維持するために、酸素又は含酸素気体混合物（空気等）を培養物に導入することができる。培養物の温度は、20～45又は25～40である。

10

【0087】

例えば、 $\alpha$ -アミノヘキサン酸、 $\beta$ -アミノヘキサン酸エステル及び／又は $\gamma$ -アミノヘキサン酸に由来するラクタムを製造するための本発明に係る方法では、E. coliに由来する遺伝子組み換え細胞を、アンピシリン、クロラムフェニコール及びカナマイシンを添加した鉱物塩培地において使用する（Riesenberg et al., 1990）。

20

【0088】

例えば、本発明に係る方法では、細胞集団（biomass）を形成するために、細胞をC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ヘキサン酸エステルを含まない培養液内において培養する。細胞集団が得られた後に、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ヘキサン酸エステルを培養液に添加及び／又は細胞をC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ヘキサン酸エステルを含む新たな培養液に接触させる。 $\alpha$ -アミノヘキサン酸、 $\beta$ -アミノヘキサン酸エステル及び／又は $\gamma$ -アミノヘキサン酸に由来するラクタムの製造時におけるC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ヘキサン酸エステルの量は、1～200g/L、特に20～200g/Lである。

【0089】

本発明の一実施形態によれば、本発明に係る方法は、水相及び有機相を含む二相系において実施する。工程I)における遺伝子組み換え細胞による $\alpha$ -アミノヘキサン酸、 $\beta$ -アミノヘキサン酸エステル又は $\gamma$ -アミノヘキサン酸に由来するラクタムの生成は水相において生じる。生成した $\alpha$ -アミノヘキサン酸、 $\beta$ -アミノヘキサン酸エステル及び／又は $\gamma$ -アミノヘキサン酸に由来するラクタムは有機相に蓄積する。これにより、生成した $\alpha$ -アミノヘキサン酸、 $\beta$ -アミノヘキサン酸エステル及び／又は $\gamma$ -アミノヘキサン酸に由来するラクタムをin situで抽出することができる。

30

【0090】

有機相としては、中程度の分子鎖長を有し、log P値が>4（気泡形成が少ない）のアルカン又は物理的に類似した芳香族化合物又は芳香族エステルを使用することができる。

【0091】

本発明に係る方法の工程II)では、生成した $\alpha$ -アミノヘキサン酸、 $\beta$ -アミノヘキサン酸エステル及び／又は $\gamma$ -アミノヘキサン酸に由来するラクタムを必要に応じて単離する。単離は、以下の工程を含む2段階精製工程によって行うことができる。

40

a)  $\alpha$ -アミノヘキサン酸、 $\beta$ -アミノヘキサン酸エステル及び／又は $\gamma$ -アミノヘキサン酸に由来するラクタムを培地から抽出する抽出工程。

b) 工程a)で得られた抽出物を、蒸留処理又は選択的結晶化によって精製して少なくとも99.8%の純度を有する $\alpha$ -アミノヘキサン酸相、 $\beta$ -アミノヘキサン酸エステル相及び／又はラクタム相を得る精密精製工程。

【0092】

工程a)における抽出は、 $\alpha$ -アミノヘキサン酸、 $\beta$ -アミノヘキサン酸エステル及び

50

ノ又は - アミノヘキサン酸に由来するラクタムを製造するための本発明に係る方法の工程 I ) 及び I I ) を同時に実施する「*in situ*」抽出として設計することができる。

【0093】

工程 I I ) における精密精製は、例えば、蒸留又は結晶化によって実施することができる。

【0094】

例えば、公知の化学的に類似した処理を使用してアミノヘキサン酸エステルをアミノヘキサン酸に転化させることができる。

【0095】

別の酵素によって - アミノカルボン酸から対応するラクタムへの転化を触媒させることができる。この場合も、当該酵素が細胞によって分泌される場合には有利である。これにより、細胞によって直接形成された - アミノカルボン酸又は - アミノカルボン酸エステルの細胞外性開裂後に形成された - アミノカルボン酸を対応するラクタムに転化させ、必要に応じて目的物を容易に精製することができる。

【0096】

あるいは、アミノヘキサン酸に対する直接的な触媒作用によってナイロンをすることができる。「ナイロン」という用語は、脂肪族ポリアミドについて一般に使用される用語である。ナイロン6、ナイロン6,6及びナイロン6,10等の一般的な脂肪族ポリアミドは、高い機械的強度、靱性及び耐薬品性を示し、延伸によって高強度繊維を形成することができる。ナイロンは、ナイロン6,6、ナイロン6,9、ナイロン6,10及びナイロン6,12からなる群から選択されてもよい。具体的には、ナイロンは、ナイロン6,6、ナイロン6,9、ナイロン6,10又はナイロン6,12であってもよい。より具体的には、ナイロンはナイロン6であってもよい。例えば、反応によって2種以上のナイロンを製造することができる。

【0097】

ナイロンは、公知の任意の方法を使用して、アミノヘキサン酸及びノ又はアミノヘキサン酸エステルから製造することができる。例えば、ナイロンは、 - アミノヘキサン酸に由来するラクタムから製造することができる。

【0098】

ラクタムからのポリアミドの製造は、例えば、ドイツ特許第1495198号、ドイツ特許第2558480号、欧州特許第0129196号又は「*Polymerization Processes*」, 1977に記載されているような周知の方法によって行うことができる。

【0099】

あるいは、ナイロンは、 - アミノヘキサン酸及びノ又は - アミノヘキサン酸に由来するラクタムの重縮合によって直接製造することができる。

【0100】

具体的には、ナイロンは、少なくとも10重量%、少なくとも25重量%、少なくとも50重量%又は少なくとも75重量%が、 - アミノヘキサン酸、 - アミノヘキサン酸エステル及びノ又は - アミノヘキサン酸に由来するラクタムからなるものであってもよい。

【0101】

本発明の別の態様は、本発明の方法によって得られるアミノヘキサン酸及びノ又はアミノヘキサン酸エステルを提供する。また、本発明の方法によって製造されるアミノヘキサン酸に由来するラクタムを提供する。

【0102】

本発明の一態様は、アミノヘキサン酸及びノ又はアミノヘキサン酸エステルからなるナイロンの製造方法であって、本発明の各態様に係る方法によってアミノヘキサン酸及びノ又はアミノヘキサン酸エステルを製造することと、前記アミノヘキサン酸及びノ又はアミ

10

20

30

40

50

ノヘキサン酸エステルを重合させてナイロンを得ることと、を含む方法を提供する。

【0103】

本発明の別の態様は、本発明の各態様に係る方法によって得られるナイロンを提供する。

【実施例】

【0104】

好適な実施形態について説明したが、好適な実施形態について、請求項の範囲から逸脱することなく、設計、構成又は操作に関して様々な変更又は変形を行うことができる。これらの変更又は変形も請求項の範囲に含まれる。

【0105】

実施例 1

合成ガスからのエタノール及び酢酸塩の製造

【0106】

合成ガス(66%の $H_2$ 、33%の $CO_2$ )を生体内変化させてエタノール及び酢酸塩を製造するために、細菌である*Clostridium ljungdahlii*を使用した。培養工程は、ブチルゴム製栓によって気密的に密閉可能な耐圧ガラス瓶内において嫌氣的条件下で実施した。

【0107】

*C. ljungdahlii*を細胞培養するために、5 mLの凍結培養物を、50 mLのATCC1754培地(pH:6.0、20 g/LのMES、1 g/Lの酵母抽出物、0.8 g/LのNaCl、1 g/Lの $NH_4Cl$ 、0.1 g/LのKCl、0.1 g/Lの $KH_2PO_4$ 、0.2 g/Lの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.02 g/Lの $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、20 mg/Lのニトリロ三酢酸、10 mg/Lの $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、8 mg/Lの $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 、2 mg/Lの $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、2 mg/Lの $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.2 mg/Lの $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.2 mg/Lの $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、0.2 mg/Lの $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.2 mg/Lの $Na_2SeO_4$ 、0.2 mg/Lの $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 、20 g/Lのd-ビオチン、20  $\mu g$ /Lの葉酸、100  $\mu g$ /LのピリドキシンHCl、50  $\mu g$ /Lのチアミン-HCl $\cdot H_2O$ 、50 g/Lのリボフラビン、50 g/Lのニコチン酸、50 g/Lのパントテン酸カルシウム、1 g/Lのビタミン $B_{12}$ 、50 g/Lのp-アミノ安息香酸、50  $\mu g$ /Lのリボ酸、約67.5 mg/LのNaOH、400 mg/LのL-システイン塩酸塩、400 mg/Lの $Na_2S \cdot 9H_2O$ 、5 g/Lのフルクトース)内で嫌氣的に成長させた。10 mLの培養物を採取し、100 mLのATCC1754培地に播種して培養を開始した。培養は35℃で3日間行った。

【0108】

製造段階では、培養物から細胞を採取し、製造培地(production medium)で洗浄した。次に、細胞ペレットを、不燃性無菌ガラス瓶(容量:250 mL)に入れた75 mLの製造培地(DM4培地、pH:5.8、15 mg/Lの $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 、2 g/Lの $(NH_4)H_2PO_4$ 、0.2 g/LのNaCl、0.15 g/LのKCl、0.5 mg/Lのリザズリン、3 mg/Lの $H_3BO_3$ 、2 mg/Lの $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、1 mg/Lの $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、300  $\mu g$ /Lの $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、300  $\mu g$ /Lの $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、200  $\mu g$ /Lの $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、100  $\mu g$ /Lの $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 、100  $\mu g$ /Lの $Na_2SeO_3$ 、106  $\mu g$ /Lのd-ビオチン、5  $\mu g$ /Lの葉酸、2.5  $\mu g$ /Lのピリドキシン-HCl、266  $\mu g$ /Lのチアミン-HCl、12.5  $\mu g$ /Lのリボフラビン、12.5  $\mu g$ /Lのニコチン酸、413  $\mu g$ /LのCa-パントテン酸塩、12.5  $\mu g$ /Lのビタミン $B_{12}$ 、12.5  $\mu g$ /Lのp-アミノ安息香酸、15.0  $\mu g$ /Lのリボ酸、0.5 g/Lの $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ 、0.2 g/Lの $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )に再懸濁させ、*C. ljungdahlii*の製造段階を開始した。合成ガス(66%の $H_2$ 、33%の $CO_2$ 、1.8パール)を入れた状態でブチルゴム製栓でキャップし、113.75時間放

10

20

30

40

50

置し、35 で培養を行い、100rpmで振盪した。培養時には、気相を毎日取り替え、サンプルを毎日採取して光学濃度及びNMR分析物を測定した。その結果、生成した酢酸塩の量は0.02g/Lから1.2g/Lに増加し、生成したエタノールの量は0.01g/Lから0.1g/Lに増加した。ヘキサン酸及び酪酸を検出されなかった。

【0109】

実施例2

合成ガスからの酪酸及びヘキサン酸の製造

【0110】

合成ガスを生体内変化させて酪酸及びヘキサン酸を製造するために、*Clostridium ljungdahlii*及び*Clostridium kluyveri*の共培養物を製造段階で使用した。*Clostridium ljungdahlii*により、雰囲気中の $H_2$ 及び $CO_2$ を酢酸塩及びエタノールに転化させた。水相から生成物を取り出し、*Clostridium kluyveri*によって酪酸及びヘキサン酸に転化させた。

10

【0111】

培養工程は、ブチルゴム製栓によって気密的に密閉可能な耐圧ガラス瓶内において嫌気的条件下で実施した。

【0112】

*C. ljungdahlii*を細胞培養するために、10mLの凍結培養物を、100mLのATCC1754培地(pH:6.0、20g/LのMES、1g/Lの酵母抽出物、0.8g/LのNaCl、1g/Lの $NH_4Cl$ 、0.1g/LのKCl、0.1g/Lの $KH_2PO_4$ 、0.2g/Lの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.02g/Lの $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、20mg/Lのニトリロ三酢酸、10mg/Lの $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、8mg/Lの $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 、2mg/Lの $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、2mg/Lの $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.2mg/Lの $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.2mg/Lの $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、0.2mg/Lの $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.2mg/Lの $Na_2SeO_4$ 、0.2mg/Lの $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 、20g/Lのd-ビオチン、20 $\mu g$ /Lの葉酸、100 $\mu g$ /LのピリドキシンHCl、50 $\mu g$ /Lのチアミン-HCl $\cdot H_2O$ 、50g/Lのリボフラビン、50g/Lのニコチン酸、50g/Lのパントテン酸カルシウム、1g/Lのビタミン $B_{12}$ 、50g/Lのp-アミノ安息香酸、50 $\mu g$ /Lのリボ酸、約67.5mg/LのNaOH、400mg/LのL-システイン塩酸塩、400mg/Lの $Na_2S \cdot 9H_2O$ 、5g/Lのフルクトース)内で嫌氣的に成長させた。培養は35 で2日間行った。

20

30

【0113】

*Clostridium kluyveri*を細胞培養するために、10mLの*Clostridium kluyveri*連続培養物を、100mLのDMSZ52培地(pH:6.98、10g/Lの $CH_3COOK$ 、0.31g/Lの $K_2HPO_4$ 、0.23g/Lの $KH_2PO_4$ 、0.25g/Lの $NH_4Cl$ 、0.20g/Lの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1g/Lの酵母抽出物、0.50mg/Lのリザズリン、10 $\mu L$ /LのHCl(25%、7.7M)、1.5mg/Lの $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 、70g/Lの $ZnCl_2 \cdot 7H_2O$ 、100g/Lの $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、6g/Lの $H_3BO_3$ 、190 $\mu g$ /Lの $COCl_2 \cdot 6H_2O$ 、2g/Lの $CuCl_2 \cdot 6H_2O$ 、24g/Lの $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、36g/Lの $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$ 、0.5mg/LのNaOH、3g/Lの $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ 、4 $\mu g$ /Lの $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 、100g/Lのビタミン $B_{12}$ 、80g/Lのp-アミノ安息香酸、20g/LのD(+)-ビオチン、200 $\mu g$ /Lのニコチン酸、100g/LのD-Ca-パントテン酸塩、300 $\mu g$ /Lの塩酸ピリドキシン、200 $\mu L$ /Lのチアミン-HCl $\cdot 2H_2O$ 、20mL/Lのエタノール、2.5g/Lの $NaHCO_3$ 、0.25g/Lのシステイン-HCl $\cdot H_2O$ 、0.25g/Lの $Na_2S \cdot 9H_2O$ )内で成長させた。培養は35 で2日間行った。

40

50

## 【0114】

製造段階では、各培養物から細胞を採取し、製造培地 (production medium) で洗浄した。次に、細胞ペレットを、不燃性無菌ガラス瓶 (容量: 250 mL) に入れた 35 mL の製造培地 (PETC 培地、pH: 6.0、10 g/L の MES、2.4 g/L の NaCl、3 g/L の  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.3 g/L の  $\text{KCl}$ 、0.3 g/L の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.6 g/L の  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.12 g/L の  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20 mg/L のニトリロ三酢酸、10 mg/L の  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、8 mg/L の  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2 mg/L の  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2 mg/L の  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L の  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L の  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L の  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L の  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ 、0.2 mg/L の  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2 g/L の d-ピオチン、2 g/L の葉酸、10 g/L のピリドキシン HCl、5 g/L のチアミン-HCl $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、5 g/L のリボフラビン、5 g/L のニコチン酸、5 g/L の Ca-パントテン酸塩、5  $\mu\text{g}$ /L のビタミン B<sub>12</sub>、5 g/L の p-アミノ安息香酸、5  $\mu\text{g}$ /L のリボ酸、10 g/L の MESNA、約 67.5 mg/L の NaOH、300 mg/L のシステイン-HCl $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、300 mg/L の  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) に再懸濁させた。合成ガス (66% の  $\text{H}_2$ 、33% の  $^{13}\text{C}$  標識  $\text{CO}_2$ 、1.8 バール) を入れた状態でブチルゴム製栓でキャップし、191 時間放置し、35 で培養を行い、100 rpm で振盪した。培養時には、気相を毎日取り替え、サンプルを毎日採取して光学濃度及び NMR 分析物を測定した。

10

20

## 【0115】

生成物の量は、混合製造による無菌濾過上清の準定量式  $^1\text{H}$ -NMR 分光法を使用して測定した。サンプルはリン酸緩衝液で希釈し ( $\text{D}_2\text{O}$ )、水を抑制した状態で測定した。測定は、 $^{13}\text{C}$  カップリングを抑制した状態及び  $^{13}\text{C}$  カップリングを抑制しない状態で行った。内部定量化標準としては、トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム (TSP) を使用した。

## 【0116】

その結果、生成した酢酸塩の量は 0.05 g/L から 1.7 g/L に増加し (生成した酢酸塩の総量の 93 mol% は  $^{13}\text{C}$  標識)、生成したエタノールの量は 0.05 g/L から 0.12 g/L に増加した (生成したエタノールの総量の 92 mol% は  $^{13}\text{C}$  標識)。また、ヘキサン酸の濃度は 0.02 g/L から 0.13 g/L に増加し (生成したヘキサン酸の総量の 63 mol% は  $^{13}\text{C}$  標識)、酪酸の濃度は 0.01 g/L から 0.07 g/L に増加した (生成した酪酸の総量の 63 mol% は  $^{13}\text{C}$  標識)。これにより、生成したヘキサン酸及び酪酸の多くが合成ガスの C 供給源に由来することが確認された。

30

## 【0117】

## 実施例 3

エタノール及び酢酸塩からのヘキサン酸及び酪酸の製造

## 【0118】

エタノール及び酢酸塩を生体内変化させてヘキサン酸及び酪酸を製造するために、細菌である *Clostridium kluyveri* を使用した。培養工程は、ブチルゴム製栓によって気密的に密閉可能な耐圧ガラス瓶内において嫌氣的条件下で実施した。

40

## 【0119】

*Clostridium* の凍結培養物を含む 5 mL の DMSZ 52 培地 (pH: 6.98、10 g/L の  $\text{CH}_3\text{COOK}$ 、0.31 g/L の  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.23 g/L の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.25 g/L の  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.20 g/L の  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 g/L の酵母抽出物、0.50 mg/L のリザズリン、10  $\mu\text{L}$ /L の HCl (25%、7.7 M)、1.5 mg/L の  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、70  $\mu\text{g}$ /L の  $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100  $\mu\text{g}$ /L の  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、6  $\mu\text{g}$ /L の  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、190  $\mu\text{g}$ /L の  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2  $\mu\text{g}$ /L の  $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、24  $\mu\text{g}$ /L の  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、36  $\mu\text{g}$ /L の  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 mg/L の NaOH、

50

3  $\mu\text{g/L}$  の  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、4  $\mu\text{g/L}$  の  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、100  $\text{g/L}$  のビタミン  $\text{B}_{12}$ 、80  $\text{g/L}$  の *p*-アミノ安息香酸、20  $\text{g/L}$  の  $\text{D}(+)$ -ピオチン、200  $\mu\text{g/L}$  のニコチン酸、100  $\mu\text{g/L}$  の  $\text{D-Ca}$ -パントテン酸塩、300  $\mu\text{g/L}$  の塩酸ピリドキシン、200  $\mu\text{L/L}$  のチアミン- $\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20  $\text{mL/L}$  のエタノール、2.5  $\text{g/L}$  の  $\text{NaHCO}_3$ 、0.25  $\text{g/L}$  のシステイン- $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.25  $\text{g/L}$  の  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) を250  $\text{mL}$  の瓶に入れ、50  $\text{mL}$  の  $\text{DSMZ52}$  培地を添加した。培養は35 で3日間行った。次に、10  $\text{mL}$  の培養物を100  $\text{mL}$  の  $\text{DSMZ52}$  培地に播種して予備培養物を得た。予備培養物を35 で3日間培養した。本培養物の製造では、500  $\text{mL}$  の瓶内において、予備培養物の細胞の5%を200  $\text{mL}$  の  $\text{DSMZ52}$  培地に播種した。ブチルゴム製栓でキャップし、35 で98時間培養を行った。培養期間の最初と最後にサンプルを採取し、光学濃度及び  $\text{NMR}$  分析物を測定した。 $\text{OD}_{600}$  は、0.01以下から最大で0.35~0.37に増加した。酢酸塩の量は4.9  $\text{g/L}$  から2.4  $\text{g/L}$  に減少し、エタノールの量は12.5  $\text{g/L}$  から9.2  $\text{g/L}$  に減少した。また、ヘキサン酸の量は0.1  $\text{g/L}$  から6.85  $\text{g/L}$  に増加し、酪酸の量は0.1  $\text{g/L}$  から2.9  $\text{g/L}$  に増加した。

【0120】

#### 実施例4

*C. carboxidivorans* を使用した合成ガスからのヘキサン酸の製造

【0121】

野生株 *Clostridium carboxidivorans* (受託番号:  $\text{DSM15243}$ ) を、 $\text{DSMZ}$  (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) から入手し、独立栄養培養して合成ガスからヘキサン酸を製造した。培養工程は、ブチルゴム製栓によって気密的に密閉可能な耐圧ガラス瓶内において嫌気的条件下で実施した。

【0122】

細胞は、複合培地を使用して培養した。複合培地としては、3  $\text{g/L}$  の  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.3  $\text{g/L}$  の  $\text{KCl}$ 、0.6  $\text{g/L}$  の  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.3  $\text{g/L}$  の  $\text{NaCl}$ 、0.3  $\text{g/L}$  の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、120  $\text{mg/L}$  の  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、10  $\text{g/L}$  の  $\text{MES}$ 、1  $\text{g/L}$  の酵母抽出物、0.4  $\text{g/L}$  の  $\text{L}$ -システイン- $\text{HCl}$ 、20  $\text{mg/L}$  のニトリロ三酢酸、10  $\text{mg/L}$  の  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、8  $\text{mg/L}$  の  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2  $\text{mg/L}$  の  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2  $\text{mg/L}$  の  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2  $\text{mg/L}$  の  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2  $\text{mg/L}$  の  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2  $\text{mg/L}$  の  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.2  $\text{mg/L}$  の  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ 、0.2  $\text{mg/L}$  の  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20  $\mu\text{g/L}$  の *d*-ピオチン、20  $\mu\text{g/L}$  の葉酸、100  $\mu\text{g/L}$  のピリドキシン- $\text{HCl}$ 、50  $\mu\text{g/L}$  のチアミン- $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、50  $\mu\text{g/L}$  のリボフラビン、50  $\mu\text{g/L}$  のニコチン酸、50  $\mu\text{g/L}$  の  $\text{Ca}$ -パントテン酸、50  $\mu\text{g/L}$  のビタミン  $\text{B}_{12}$ 、50  $\mu\text{g/L}$  の *p*-アミノベンゾエート、50  $\mu\text{g/L}$  のリボ酸及び100  $\mu\text{g/L}$  の  $\text{MESNA}$  を含む培地 ( $\text{pH}$ : 6.0) を使用した。

【0123】

独立栄養培養は、500  $\text{mL}$  の複合培地と *Clostridium carboxidivorans* 株を入れた1  $\text{L}$  のセプタム付き瓶内で行った。培養は、開放水浴振盪機 (*New Brunswick Scientific* 社製「*Innova3100*」) (振盪周波数: 100  $\text{min}^{-1}$ ) を使用して37で行った。培地にトラップされた気体を10  $\mu\text{m}$  の細孔径を有するスパージャー (反応器の中央に配置) によって除去した。培養は、 $\text{pH}$  を制御せずに行った。反応器は、大気圧において、スパージャーを使用して67%の  $\text{H}_2$  及び33%の  $\text{CO}_2$  からなる混合気体混合物でパージした (通気速度: 3  $\text{L/h}$  (0.1  $\text{vvm}$ ))。

【0124】

フルクトースによって従属栄養性としてグリセリン (10%) に播種した5  $\text{mL}$  の  $\text{Cl}$

*ostriidium carboxidivorans* の凍結培養物を、上記複合培地内において、 $O_2$  が存在しない状態で培養した。培養は、35 で46時間行った。

【0125】

5 mL の各サンプルを採取して  $OD_{600}$ 、pH 及び生成物のスペクトルを測定した。生成物の濃度は、準定量式  $^1H$ -NMR 分光法を使用して測定した。内部定量化標準としては、トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム (T(M)SP) を使用した。

【0126】

その結果、 $OD_{600}$  は 0.01 から 0.18 に増加し、pH は 5.75 から 5.51 に減少した。また、酢酸塩の濃度は 7 mg/L から 0.8 g/L に増加し、エタノールの濃度は 0 g/L から 0.16 g/L に増加し、酪酸塩の濃度は 0 g/L から 0.19 g/L に増加した。また、上記期間に 63 mg/L のヘキサン酸が生成した。

10

【0127】

実施例 5

ヘキサン酸メチル及び/又はヒドロキシヘキサン酸メチルの酸化のための全細胞触媒 (whole cell catalyst) としての *E. coli* JM101 (pBT10)

【0128】

Schrewe et al., 2011 及び国際公開第 2009/077461 A1 号に従って、*Pseudomonas putida* に由来する 3 種類の遺伝子であるアルカンヒドロキシラーゼ (AlkB)、ルブレドキシシン (AlkG) 及びルブレドキシシンレダクターゼ (AlkT) を発現するプラスミド pBT10 (図 1A) を導入した組み換え *E. coli* 株 JM101 細胞を作成した。

20

【0129】

簡単に説明すると、以下の工程を行った。

【0130】

alkBGT 発現ベクターの構築

アルデヒドへの酸化に必要な *Pseudomonas putida* に由来するアルカンヒドロキシラーゼ (AlkB)、ルブレドキシシン (AlkG) 及びルブレドキシシンレダクターゼ (AlkT) を含むコンストラクト pBT10 (図 1A、SEQ ID NO: 1) を pCOM 系を使用して作成した (Smits et al., 2001)。これらの 3 種類の遺伝子の発現のために、alkBFG 遺伝子配列を alkB - プロモーターによって制御し、alkT 遺伝子を alkS - プロモーター (SEQ ID NO: 9) によって制御した。

30

【0131】

クローニング方法

alkB 及び alkG のクローニングを簡略化するために、alkB と alkG の間に位置する遺伝子 alkF を増幅し、alkB 及び alkG と共にクローニングした。AlkF は、触媒する反応には重要ではない。

【0132】

alkB の上流の NdeI 切断部位及び alkG の下流の SalI 切断部位により、フラグメント alkBFG = 2524 bp (SEQ ID NO: 2 (alkB) 及び SEQ ID NO: 3 (alkG) を参照) の PCR 増幅を行った。プライマーの配列を表 2 に示す。

40

【0133】

【表 6】

フラグメント *alkT* (2958bp) (SEQ ID NO:4 (*alkT*)) のPCR増幅

SEQ ID NO	配列	記
5	AAGGGAATTCCATATGCTTGAGAAACACAGAGTTC	<i>alkBFG</i> フォワード
6	AAAATTCGCGTCGACAAGCGCTGAATGGGTATCGG	<i>alkBFG</i> リバース
7	TGAGACAGTGGCTGTTAGAG	<i>alkT</i> フォワード
8	TAATAACCGCTCGAGAACGCTTACCGCCAACACAG	<i>alkT</i> リバース

*alkBFG* 及び *alkT* の増幅に用いられるプライマー

10

## 【0134】

フラグメント *alkBFG* 及び *alkT* のPCR増幅を行った。プラスミド pGEC47 (図8) (Eggink et al. (1987)) をテンプレートとして使用した。

## 【0135】

クローニングは、線形化され、平滑末端を有し、各平滑末端PCR産物(図9)でリゲートされたサブクローニングベクター pSMARTR HCKan (Lucigen社製) を使用して行った。

## 【0136】

次に、制限酵素 *NdeI* 及び *SalI* を有する *alkBFG* フラグメント及び制限酵素 *PacI* 及び *XhoI* を有する *alkT* フラグメントをサブクローニングベクターから切断した。フラグメントをアガロースゲル(1%)内で分離し、アガロースゲルから取り出し、ゲル抽出キットを使用して単離した。

20

## 【0137】

フラグメントを順番にリゲートしてベクター pCOM10とした(Smits, T.H. et al., 2001)。第1の工程では、切断部位 *NdeI* 及び *SalI* を介して *alkBFG* を pCOM10 に挿入し、第2の工程では、切断部位 *PacI* 及び *XhoI* を介して *alkT* をクローニングした。

## 【0138】

組み換えプラスミドを *E. coli* DH5 に形質転換した。プラスミド含有クローンは、カナマイシン含有LB培地上で選択した。単離したプラスミドを切断解析(restriction analysis)及び配列解析によって調べた。このプラスミドを pBT10 (図1A) という。生体内変化(biotransformation)のために、プラスミド pBT10 を化学的能力を有する *E. coli* 株 JM101 内において、42℃で2分間にわたって熱刺激によって形質転換した。

30

## 【0139】

全ての細胞アッセイは、以下の条件を使用して行った。

## 【0140】

*E. coli* 株 JM101 細胞は、M9培地(6.8g/Lの  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.4g/Lの  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.4g/Lの  $\text{NaCl}$ 、1.6g/Lの  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.5g/Lの  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1mLの微量元素溶液US3(36.5g/Lの37%塩酸、1.91g/Lの  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1.87g/Lの  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.84g/Lの  $\text{Na-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.3g/Lの  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、0.25g/Lの  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、4.7g/Lの  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、17.3g/Lの  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.15g/Lの  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )内において30℃で成長させた。OD<sub>450</sub> = 0.2の時に播種した。細胞を成長させ、OD<sub>450</sub> が0.5に達した時に、0.025%(v/v)ジシクロプロピルケトン(DCPK)(アルカンヒドロキシラーゼ活性の強力な無償性誘導物質)を使用して遺伝子発現を誘導した。細胞をさらに4時間培養した。次に、細胞を遠心分離によって採取し、細胞ペレットを50mMリン酸カリウム緩衝液(KPi、pH:7.4、1%(w/v)グルコース

40

50

を含む)に再懸濁させ、バイオリアクターに入れた。40  $\mu$ Lの10% (v/v) 過塩素酸によって成長を停止させ、エーテルによる反応混合物の抽出が可能となるように、得られた酸へのプロトン化を生じさせた。

#### 【0141】

次に、ジエチルエーテルによって反応混合物の抽出を行い、ガスクロマトグラフィーによって基質と生成物濃度の測定を行った。各遺伝子組み換え細胞を静止細胞アッセイにおいてヘキサン酸メチルと接触させ、長期間にわたってサンプルを採取した。

#### 【0142】

静止状態の *E. coli* JM101 (pBT10) は、ヘキサン酸メチルからヒドロキシヘキサン酸メチルへの転化を効率的に触媒した (図2及び図3を参照)。ヒドロキシヘキサン酸メチルからオキソヘキサン酸メチルへの *AlkBG*T 触媒酸化がわずかに生じた。

10

#### 【0143】

表3に示すように、水酸化反応 (第1の工程) の最大特異的活性は約90  $U g_{CDW}^{-1} h^{-1}$  であり、アルコール酸化工程 (第2の工程) の最大特異的活性は約6  $U g_{CDW}^{-1} h^{-1}$  だった。

#### 【0144】

ヒドロキシヘキサン酸メチルを *E. coli* JM101 (pBT10) の基質として使用した場合には、アルコールヒドロキシヘキサン酸メチルからオキソヘキサン酸メチルへの転化は遅く、非効率的だった。ヒドロキシヘキサン酸メチルを *E. coli* JM101 (pBT10) の基質として使用した場合にも同様な挙動が観察された (図4及び図5を参照)。ヒドロキシヘキサン酸メチルの最大酸化率は25  $U g_{CDW}^{-1} h^{-1}$  であり、かなりの量の基質が存在していたが、オキソヘキサン酸メチルの蓄積は15分後に終了した。これは、*AlkBG*T は、アルコールヒドロキシヘキサン酸メチルからオキソヘキサン酸メチルへの酸化には効率的ではないことを示している。

20

#### 【0145】

#### 実施例6

ヒドロキシヘキサン酸メチルの酸化のための全細胞触媒としての *E. coli* JM101 (pJ10)

#### 【0146】

*Pseudomonas putida* GPo1 に由来するアルカンヒドロキシラーゼ系 *alkJ* を使用してヘキサン酸又はヘキサン酸メチルの水酸化を行った。アルデヒドを得る第2の工程は、アルコールデヒドロゲナーゼ *alkJ* によって触媒した。

30

#### 【0147】

*P. putida* (図1B) に由来するアルコールデヒドロゲナーゼ *alkJ* をコードする遺伝子を発現するプラスミド pJ10 を含有する第2の組み換え *E. coli* 株 JM101 細胞を作成した。

#### 【0148】

アルコールデヒドロゲナーゼ *alkJ* を *E. coli* JM101 に導入することにより、ヒドロキシヘキサン酸メチルのより効率的な酸化が達成された。*alkJ* 含有 *E. coli* JM101 (pJ10) の酸化能を静止細胞アッセイにおいて調べた。ヒドロキシヘキサン酸メチルを基質として使用した場合の結果を図6及び図7に示す。表3に示すように、ヒドロキシヘキサン酸メチルの酸化は200  $U g_{CDW}^{-1} h^{-1}$  を超えていた。これは、*alkJ* はアルコールの酸化を触媒し、上記反応の触媒に関して *AlkBG*T よりも効率的であることを示している。従って、*alkJ* は、6-オキソアミノヘキサン酸メチルエステルを介した6-アミノヘキサン酸メチルエステルの製造のための全細胞触媒の開発において重要な成分である。

40

#### 【0149】

## 【表 7】

静止 *E. coli* JM101 (pBT10)及び *E. coli* JM101 (pJ10)を用いたヘキサン酸メチル及び  
6-ヒドロキシヘキサン酸メチルの製造における最大特異性活性の測定  
細胞集団濃度:0.68–0.91g<sub>CDW</sub>L<sup>-1</sup>(1%(w/v)グルコースを含む KPi 緩衝液(pH:7.4))

プラスミド	基質	工程 1	工程 2
		[U/g <sub>CDW</sub> ]	[U/g <sub>CDW</sub> ]
pBT10	ヘキサン酸メチルエステル	90 ± 10	6 ± 2
	6-ヒドロキシヘキサン酸メチルエステル	-	25 ± 2
pJ10	6-ヒドロキシヘキサン酸メチルエステル	-	232 ± 39

10

## 【 0 1 5 0 】

アルコールからアルデヒドへの効率的な酸化のためには、Alk J の存在が必要である  
と思われる。

## 【参考文献】

## 【 0 1 5 1 】

Altschul, s. et al., Journal of Molecular Biology 215 (1990), 403-410頁

Barker H.A., HARVEY LECT THE HARVEY LECTURES HARVEY LECTURES, Series 45 / , 242-59  
1949,

20

Barz et al. Plant Science, Vol. 155, 101-108頁 (2000)。

Becker et al., FEBS Letters, Vol. 579, 1177-1182頁 (2005)

“Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik” [Bioprocess Techniques 1. Introduction to Bioprocess Engineering] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)

30

Bornstein b. T., et al., J. Biol. Chem. 1948, 172:659-669。

Byoung, s.J. et al., Enzyme and Microbial Technology 53 (2013) 143-151

de Lorenzo et al., J Bacteriol., Vol. 172 (11), 6568-6572頁 and 6557-6567頁 (1990)

Deveroy, J. et al., Nucleic Acid Research 12 (1984), 387頁, Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison (WI)

40

Ding H. et al, Bioresource Technology 101 (2010) 9550-9559,

Drake et al., 2004. Strict and Facultative Anaerobes: Medical and Environmental Aspects. 251-281頁, Horizon Scientific Press, United Kingdom

Drake & Kusel, 2005 Acetogenic clostridia. In: Durre, P. (ed.), Handbook on Clostridia, 719-746頁. CRC Press, Boca Raton, Florida.

50

- Drake et al., 2006, Acetogenic prokaryotes. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W and Gerhardt, P et al (ed) American Society for Microbiology, Washington, DC. 248 - 277頁
- Eggink et al. (1987) J. Biol. Chem. 262, 17712 - 17718
- Kaulmann et al., 2007; Enzyme and Microbial Technology, Vol. 41, 628 - 637頁 10
- Kieun C., Appl Biochem Biotechnol (2013) 171:1094 - 1107
- Kojima and Shimizu, Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume 96 (3), 219 - 226頁 (2003)。
- “Manual of Methods for General Bacteriology” of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)
- Needleman and Wunsch, Journal of Molecular Biology 48 (1970), 443 - 453頁 20
- Panke et al., Appl and Environm. Microbiol., (1999) 5619 - 5623頁
- “Polymerization Processes”, Interscience, New York, 1977, 424 - 467頁, 特に444 - 446頁。
- Reed, TB, 1981, Biomass gasification: principles and technology, Noves Data Corporation, Park Ridge, NJ.
- Riesenberg, D Appl Microbiol and Biotechnol, Vol. 34 (1), 77 - 82頁 (1990)
- Seedorf, H. et al. (2008): In: Proc Natl Acad Sci USA. 105(6); 2128 - 2133 30
- Smits, T. H. M., Seeger, M. A., Witholt, b. & van Beilen, J. b. (2001) Plasmid 46, 16 - 24
- Stadtman E. R., et al., J. Biol. Chem. 1950, 184:769 - 794
- Steinbusch K.J.J, et al, Energy Environ. Sci., 2011, 4, 216 - 224
- Storhas (“Bioreaktoren und periphere einrichtungen” [Bioreactors and Peripheral Equipment], Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)。
- van Beilen et al. Journal of Bacteriology, Vol. 184 (6), 1733 - 1742頁 (2002)
- van Beilen et al. in “Oil & Gas Science and Technology”, Vol. 58 (4), 427 - 440頁 (2003)
- Van Eerten-Jansen, M. C. A. A et al., ACS Sustainable Chem. Eng. 2013, 1, 513 - 518 40

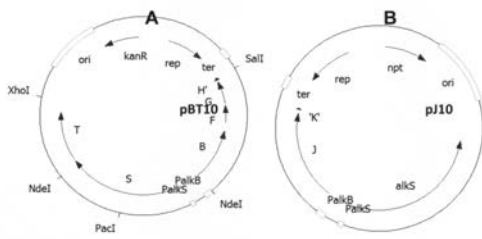
Vaysse et al., "Enzyme and Microbial Technology", Vol. 31, 648-655頁 (2002).

Wood, 1991 Life with Co or Co2 and H2 as a source of carbon and energy. FASEB J. 5:156-163

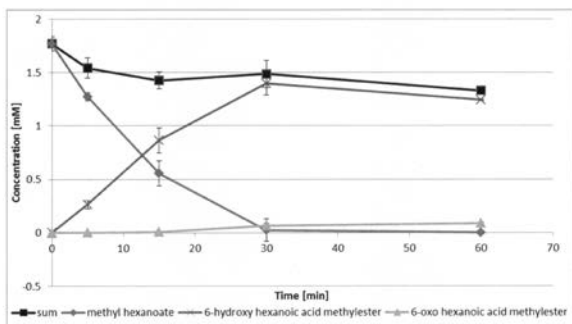
Zhang, F., et al., Water Research (2013)

WO 98/00558, WO 00/68407, ATCC 49587, ATCC 55988 及び ATCC 55989, WO2009/077461, EP0748797, U.S. 2007/0275447, U.S. 2008/0057554, WO 00/20566, US2007/0092957, GB1009370A, DE1495198, DE2558480, EP0129196

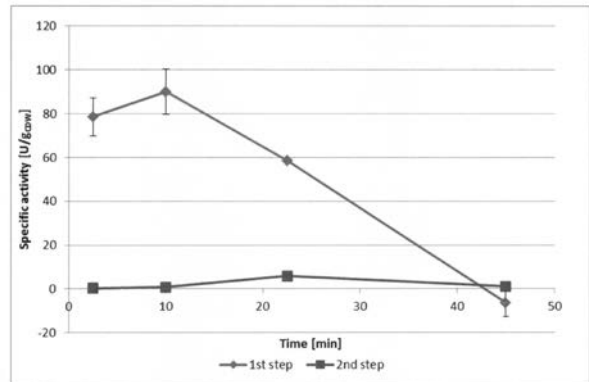
【 図 1 】



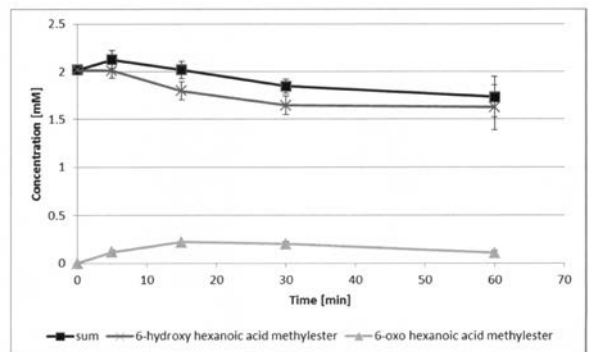
【 図 2 】



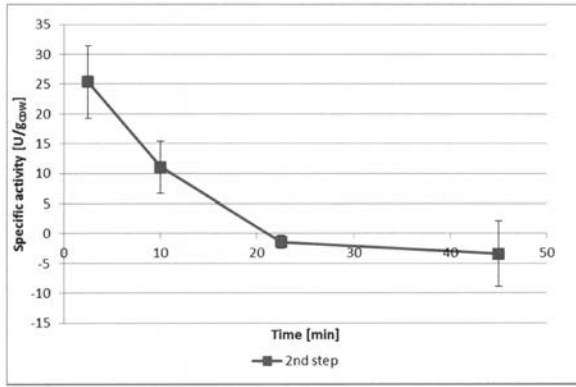
【 図 3 】



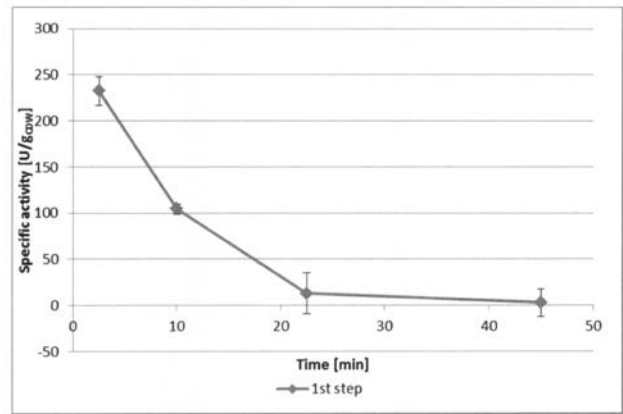
【 図 4 】



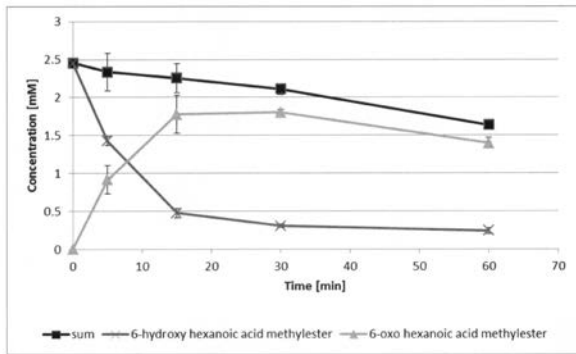
【 図 5 】



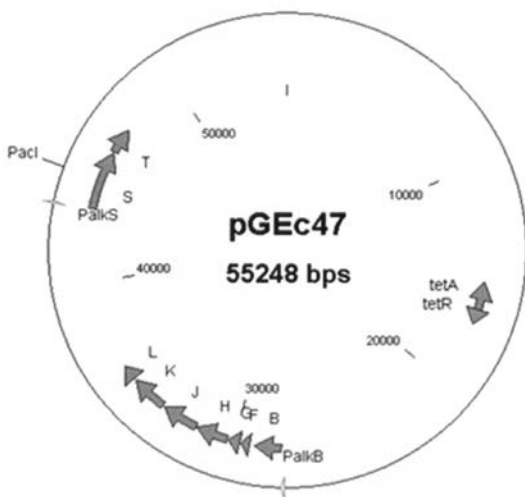
【 図 7 】



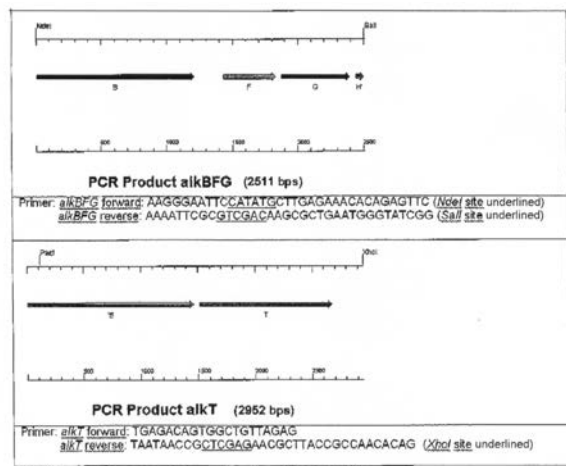
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2017516470000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/059786
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12P13/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/024114 A2 (EVONIK DEGUSSA GMBH [DE]; SCHAFFER STEFFEN [DE]; DECKER NICOLE [DE]; G) 21 February 2013 (2013-02-21) -----	1-15
X	US 2013/183728 A1 (BOTES ADRIANA L [GB] ET AL) 18 July 2013 (2013-07-18) claims; figure 1-3, 5; par.3, 14, 26-28, 33-34, 107, 116, 131, 133, 135) -----	1-15
A	WO 2013/167663 A2 (EVONIK INDUSTRIES AG [DE]; HAAS THOMAS [DE]; WITTMANN EVA MARIA [DE]) 14 November 2013 (2013-11-14) -----	1-15
A	US 2014/011249 A1 (BURGARD ANTHONY P [US] ET AL) 9 January 2014 (2014-01-09) -----	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 July 2015		13/07/2015
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
		Behrens, Ralf

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2015/059786

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a.  forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/059786

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013024114 A2	21-02-2013	CN 103857793 A	11-06-2014
		EP 2744897 A2	25-06-2014
		US 2014256904 A1	11-09-2014
		WO 2013024114 A2	21-02-2013
-----			
US 2013183728 A1	18-07-2013	US 2013183728 A1	18-07-2013
		WO 2014093865 A2	19-06-2014
-----			
WO 2013167663 A2	14-11-2013	CA 2872914 A1	14-11-2013
		CN 104271751 A	07-01-2015
		DE 102012207921 A1	14-11-2013
		EP 2847340 A2	18-03-2015
		KR 20150016231 A	11-02-2015
		US 2015125912 A1	07-05-2015
		WO 2013167663 A2	14-11-2013
-----			
US 2014011249 A1	09-01-2014	US 2011207189 A1	25-08-2011
		US 2011212507 A1	01-09-2011
		US 2014011249 A1	09-01-2014
-----			

## フロントページの続き

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

(72)発明者 トーマス ハース

ドイツ連邦共和国 4 8 1 6 1 ミュンスター バッケンカンブ 9

(72)発明者 エヴァ マリア エクル

ドイツ連邦共和国 4 5 7 6 8 マール スティンシュトラセ 2 3 エー

(72)発明者 シモン ベック

ドイツ連邦共和国 4 8 1 6 3 ミュンスター カークヘイドウエグ 2 1

Fターム(参考) 4B064 AE02 CA19 CB17 CD01 DA20

4B065 AA01Y AA02X AA23X AA43Y AA44Y AB01 BA02 BB02 CA10 CA16  
CA60