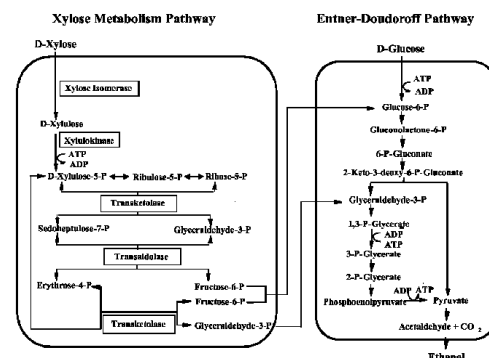




【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 細菌種によって汚染されている可能性を有する増殖培地を提供するステップと；
b) 安定化二酸化塩素の有効量を (a) の増殖培地に添加して、温度が約 33℃ を超える安定化二酸化塩素混合物を形成するステップと；
c) ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞が接種ブロスを生産するのに適した温度で、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞を b) の混合物に接種するステップと；
d) 前記ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞の増殖に適した条件下で、前記接種ブロスを発酵させるステップと
- を含んでなり、発酵中に細菌汚染が制御される、
ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 生体触媒を含んでなる発酵工程において細菌汚染を制御するための発酵方法。

10

【請求項 2】

前記増殖培地が、セルロース性バイオマス加水分解物を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞が、エタノール産生菌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ b) における第 1 の安定化二酸化塩素の有効量の添加から、ステップ c) におけるザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種までの時間が、少なくとも 6 時間である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

ステップ b) における第 1 の安定化二酸化塩素の有効量の添加から、ステップ c) におけるザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種までの時間が、少なくとも 8 時間である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ b) における第 1 の安定化二酸化塩素の有効量の添加から、ステップ c) におけるザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種までの時間が、少なくとも 16 時間である、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記増殖培地が、少なくとも 1 種のセルラーゼを含んでなる糖化反応スラリーである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記増殖培地がセルロース性バイオマス加水分解物を欠いて、i) 規定培地、ii) 非セルロース系生体材料糖原料を含有する培地、および iii) 清澄化セルロース性バイオマス加水分解物からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記接種ブロスの温度が、約 40℃ 未満である、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

(b) の混合物の pH が、約 7 未満である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記加水分解物が、トウモロコシ穂軸、トウモロコシ苞葉、トウモロコシ茎葉、牧草、小麦、麦藁、大麦藁、乾草、稲藁、スイッチグラス、古紙、サトウキビバガス、ソルガム、および木本セルロース成分からなる群から選択される、セルロース性バイオマスに由来する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ d) の接種ブロスが、前記ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞の増殖期間中に、約 5 g/L 未満の乳酸を含有する、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 13】

前記細菌汚染の原因が、乳酸産生菌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

ステップ b) の増殖培地中の安定化二酸化塩素濃度が、最初に少なくとも約 10 mg / kg である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

a) i) 規定培地、ii) 非セルロース系生体材料糖原料を含有する培地、および iii) 清澄化セルロース性バイオマス加水分解物からなる群から選択される、セルロース性バイオマス加水分解物を欠く種培地を提供するステップと；

b) ザイモモナス属 (*Zymomonas*) エタノール産生菌細胞を a) の種培地に接種して、種培養を形成するステップと；

c) 前記ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞を b) の種培養中で培養するステップと；

d) c) の種培養を発酵培地に接種して、接種発酵培地を生成するステップと；

e) 糖化反応スラリーを提供するステップと；

f) 前記接種発酵培地を前記糖化反応スラリーに混合して、発酵ビールを形成するステップと；

g) エタノールが生成する条件下で、前記ザイモモナス属 (*Zymomonas*) エタノール産生菌細胞を前記発酵ビール中で培養するステップと

を含んでなり、

前記発酵ビールおよび前記糖化反応スラリーのいずれか 1 つが、セルロース性バイオマス加水分解物を含有し；

安定化二酸化塩素が、i) ステップ a) の種培地、ii) ステップ e) の糖化反応スラリー、または iii) ステップ d) の発酵培地の少なくとも 1 つに添加され、

前記安定化二酸化塩素がステップ a) の種培地に添加される場合、前記種培地が、前記ザイモモナス属 (*Zymomonas*) エタノール産生菌の接種前に、少なくとも約 6 時間にわたり少なくとも約 33 °C の温度に維持され；

前記安定化二酸化塩素がステップ e) の糖化反応スラリーに添加される場合、前記糖化反応スラリーが、前記接種発酵培地との混合前に、少なくとも約 8 時間にわたり少なくとも約 33 °C の温度に維持され；

前記安定化二酸化塩素がステップ d) の発酵培地に添加される場合、前記発酵培地が、前記糖化反応スラリーとの混合前に、少なくとも約 8 時間にわたり少なくとも約 33 °C の温度に維持され；

ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞を含んでなる前記種培養、前記接種発酵培地または前記発酵ビールのいずれか 1 つが、前記ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞の増殖期間中に、約 5 g / L 未満の乳酸を含有する、

ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 生体触媒を含んでなる発酵工程において細菌汚染を制御するための発酵方法。

【請求項 16】

前記種培養、前記接種発酵培地、および前記発酵ビールが、約 40 °C 未満の温度に維持される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記糖化反応スラリーが、少なくとも 1 種のセルラーゼを含んでなる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記細菌汚染の原因が、乳酸産生菌である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記セルロース性バイオマスが、トウモロコシ穂軸、トウモロコシ苞葉、トウモロコシ茎葉、草本、小麦、麦藁、大麦藁、乾草、稲藁、スイッチグラス、古紙、サトウキビバガス、ソルガム、および木本セルロース成分からなる群から選択される、請求項 15 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 20】

ステップ a) の種培地、ステップ d) の糖化反応スラリー、またはステップ e) の発酵培地中の安定化二酸化塩素の濃度が、最初に少なくとも約 10 mg / kg である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

前記安定化二酸化塩素を含んでなる、ステップ d) の糖化反応スラリーまたはステップ e) の発酵培地が、バイオマス乾燥重量を基準にして、混合物総重量に対して少なくとも約 20 % 固形分の固形分を含有する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 22】

a) セルロース性バイオマス加水分解物を含んでなる発酵培地組成物；および
b) 安定化二酸化塩素
を含んでなる、発酵培地組成物。

【請求項 23】

a) セルロース性バイオマス；
b) 少なくとも 1 種のセルラーゼ酵素；および
c) 安定化二酸化塩素
を含んでなる、糖化反応スラリー組成物。

【請求項 24】

安定化二酸化塩素の濃度が、最初に少なくとも約 10 mg / kg であり、安定化二酸化塩素の量が、酸による安定化二酸化塩素の完全な活性化に際して放出され得る、二酸化塩素の量に関して示される、請求項 22 または 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記組成物が、バイオマス乾燥重量を基準にして、組成物総重量に対して少なくとも約 20 % 固形分の固形分を含有する、請求項 22 または 23 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記セルロース性バイオマスが、トウモロコシ穂軸、トウモロコシ苞葉、トウモロコシ茎葉、草本、小麦、麦藁、大麦藁、乾草、稲藁、スイッチグラス、古紙、サトウキビバガス、ソルガム、および木本セルロース成分からなる群から選択される、請求項 22 または 23 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物学および発酵の分野に関する。より正確には、加水分解物培地中で生体触媒としてザイモナス属 (*Zymomonas*) を使用する場合に、安定化二酸化塩素を使用して、発酵中で細菌汚染を制御するための方法が開発された。

【背景技術】

【0002】

再生可能資源から生成される燃料エタノールは、世界的な化石燃料不足、エネルギーコスト上昇、および大気二酸化炭素増大に関連している地球温暖化効果の長期解決策の 1 つである。再生可能資源由来の燃料エタノールは、生体触媒を使用する糖類発酵によって生産される。目下、酵母が、エタノール生産のために最も広く使用されている生体触媒である。発酵性糖類は、最も典型的には、トウモロコシ穀粒、甜菜、およびサトウキビをはじめとする、加工生体材料から得られる。代案の豊富な生体材料糖原料は、セルロース系またはリグノセルロース系バイオマスである。物理的、化学的、および／または酵素的処理を使用して、セルロース系およびリグノセルロース系バイオマスを加工し、発酵性糖類を生産する方法が開発されている。

【0003】

大規模発酵過程において、特に炭水化物源として生体材料を使用する場合、無菌性を維持することは困難である。大規模発酵工程は、典型的に、加工生体材料、装置、プロセス

10

20

30

40

50

水またはその他の起源に由来し得る、細菌によって汚染される。典型的に、汚染細菌は、乳酸桿菌属 (*Lactobacillus*) の種などの乳酸菌 (LAB) である。汚染細菌は、糖類を使用して、一次産物生体触媒の有効性を低下させることで、発酵産物の収率を低下させる。汚染細菌は、酢酸および乳酸などの望まれない産物を産生し、それは培養中のストレス状態を増大させて、生体触媒増殖の劣化および／または生体触媒産物生産の低下につながる。

【0004】

主に乳酸菌である汚染細菌は、典型的に、燃料用または醸造用双方のエタノールを生産するために、炭水化物源としてマッシュまたは糖蜜を使用する、生体触媒として酵母を利用する発酵で問題となっている。酵母および汚染細菌は、抗菌剤によっては感受性に差があるので、酵母発酵中の細菌を制御するために、いくつかの抗菌剤を使用し得る。LAB汚染を制御するために酵母発酵で成功裏に使用される抗菌剤としては、ペニシリン（非特許文献1）、バージニアマイシン（非特許文献2；非特許文献3；特許文献1）、ホップ酸（特許文献2）、エリスロマイシン、タイロシン、テトラサイクリン、および二酸化塩素（FermaSure（登録商標）；Dupont Company, Wilmington DE；非特許文献4）が挙げられる。

【0005】

発酵性炭水化物および酵母を含んでなる水性ストリームを ClO_2 ガスで処理して、有害な微生物濃度を低下させることは、特許文献3で開示される。酵母エタノール生産工程からの酵母スラリーを二酸化塩素で処理して、酵母の生存度を保ちながら微生物汚染物質を破壊することは、特許文献4で開示される。発酵性糖、種菌（酵母）、および細菌増殖を実質的に防止するのに使用される安定化二酸化塩素を含んでなる発酵工程が、特許文献5で開示される。炭水化物溶液を微生物から保護するための安定化二酸化塩素の使用が、特許文献6で開示される。

【0006】

グルコース利用に加えたキシロースおよびアラビノース利用、そして競合代謝経路の不活性化をはじめとする株の改善を設計することで、エタノールを生産する効果的な生体触媒として、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) が開発されている。さらにザイモモナス属 (*Zymomonas*) は、セルロース系バイオマス加水分解物中に存在する阻害物質に対する耐性を増大させることにより、加水分解物発酵培地中における使用のために適応されている。しかしこの生体触媒は細菌であり、優勢な汚染物質もまた細菌であることから、エタノール発酵のための生体触媒としてザイモモナス属 (*Zymomonas*) を使用することには、汚染制御における追加的な難題がある。したがって酵母および細菌に対する抗菌剤の差別的活性は、酵母生体触媒を使用してエタノールを生産する工程では、活用し得ない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】WO2007145857

【特許文献2】米国特許第20090042276号明細書

【特許文献3】国際公開第2007/097874号パンフレット

【特許文献4】米国特許第2009/0061490号明細書

【特許文献5】国際公開第2007/149450号パンフレット

【特許文献6】国際公開第2011038317号パンフレット

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Day et al. (1954) *Agricultural and Food Chemistry* 2:252-258

【非特許文献2】Hynes et al. (1997) *J. of Industrial Microbiology & Biotechnology* 18:284-29

10

20

30

40

50

1

【非特許文献3】Bischoff et al. (2009) Biotechnology and Bioengineering 103:117-122

【非特許文献4】Fatka, Feedstuffs (Nov. 3, 2008) p18

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

細菌ザイモナス属 (Zymomonas) 生体触媒を利用する発酵において、細菌汚染物質を制御する方法に対する必要性がなおもある。

【課題を解決するための手段】

10

【0010】

本発明は、ザイモナス属 (Zymomonas) が生体触媒である発酵中の細菌汚染を制御するための、組成物および方法を提供する。

【0011】

したがって本発明は、

- a) 細菌種によって汚染されている可能性を有する増殖培地を提供するステップと；
- b) 安定化二酸化塩素の有効量を (a) の増殖培地に添加して、温度が約 33℃を超える安定化二酸化塩素混合物を形成するステップと；
- c) ザイモナス属 (Zymomonas) 細胞が接種ブ罗斯を生成するのに適した温度で、ザイモナス属 (Zymomonas) 細胞を b) の混合物に接種するステップと；
- d) ザイモナス属 (Zymomonas) 細胞の増殖に適した条件下で、接種ブ罗斯を発酵させるステップと

20

を含んでなり、発酵中に細菌汚染が制御される、ザイモナス属 (Zymomonas) 生体触媒を含んでなる発酵工程において細菌汚染を制御するための発酵方法を提供する。

【0012】

一実施形態では、ザイモナス属 (Zymomonas) はエタノール産生菌であり、方法の発酵ブ罗斯中にエタノールが生成する。

【0013】

別の実施形態では、本発明は、

- a) セルロース性バイオマス加水分解物発酵培地；および
 - b) 安定化二酸化塩素
- を含んでなる発酵培地混合組成物を提供する。

30

【0014】

さらに別の実施形態では、本発明は、

- a) セルロース性バイオマス；
 - b) 少なくとも1種のセルラーゼ酵素；および
 - c) 安定化二酸化塩素
- を含んでなる、糖化反応スラリー混合組成物を提供する。

【0015】

本発明の別の態様では、

40

- a) i) 規定培地、ii) 非セルロース系生体材料糖原料を含有する培地、および iii) 清澄化セルロース性バイオマス加水分解物からなる群から選択される、セルロース性バイオマス加水分解物を欠く種培地を提供するステップと；
- b) ザイモナス属 (Zymomonas) エタノール産生菌細胞を種培地に接種して、種培養を形成するステップと；
- c) ザイモナス属 (Zymomonas) 細胞を b) の種培養中で培養するステップと；
- d) c) の種培養を糖化反応スラリーに接種して、接種糖化スラリーを生成するステップと；
- e) 接種糖化スラリーを発酵培地に混合して、発酵ビールを生成するステップと；

50

f) エタノールが生成する条件下で、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) エタノール産生菌細胞を発酵ビール中で培養するステップと
を含んでなり、

安定化二酸化塩素が、i) ステップ a) の種培地、i i) ステップ d) の糖化反応スラリー、または i i i) ステップ e) の発酵培地の少なくとも 1 つに添加され；

安定化二酸化塩素がステップ a) の種培地に添加される場合、種培地が、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) エタノール産生菌の接種前に、少なくとも約 6 時間にわたり少なくとも約 33℃ の温度に維持され；

安定化二酸化塩素がステップ d) の糖化反応スラリーに添加される場合、糖化反応スラリーが、種培養の接種前に、少なくとも約 8 時間にわたり少なくとも約 33℃ の温度に維持され；

安定化二酸化塩素がステップ e) の発酵培地に添加される場合、発酵培地が、糖化反応スラリーとの混合前に、少なくとも約 8 時間にわたり少なくとも約 33℃ の温度に維持され；

ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞を含んでなる種培養、接種糖化スラリーまたは発酵ビールのいずれか 1 つが、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞の増殖期間中に、約 5 g/L 未満の乳酸を含有する、

ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 生体触媒を含んでなる発酵工程における細菌汚染を制御するための発酵方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図 1】キシロース利用のために遺伝子操作された、ザイモモナス (*Zymomonas*) 中のエタノール発酵経路の略図を示す。

【図 2】異なる量の安定化二酸化塩素 (SCD) を含有する MRM3G10 培地中における、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞の増殖を示すグラフである。

【図 3】33℃でのザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種の 6 時間前に、298 mg/kg または皆無の SCD が添加され、33℃または 47℃のどちらかに維持された加水分解物培地中における、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞によるエタノール生成量を示すグラフである。

【図 4】151 mg/kg または 301 mg/kg の二酸化塩素が添加され、4 (A) 即座に接種された；または 4 (B) 47℃で 24 または 48 時間後に 33℃で接種された、加水分解物培地中のザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞によるエタノール生成量のグラフを示す。

【図 5】様々な量の SCD が糖化開始時に添加された糖化反応から生成する加水分解物に接種された、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞による (A) 乳酸生成量、および (B) エタノール生成量のグラフを示し、接種は初期 pH 5.3、47℃で 48 時間後に、33℃で実施した。追加的なサンプルでは、24 時間の糖化後に 316 mg/kg の SCD が添加され、47℃で 48 時間後に、33℃での接種が続いた。

【図 6】301 mg/kg の二酸化塩素が添加されて 33℃に維持され、次に 19.5 時間または 23 時間後に接種された、MRM3G6 培地中のザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞によるエタノール生成量グラフを示す。

【図 7】301 mg/kg の二酸化塩素が添加されて 47℃に維持され、次に 8、16、24 または 48 時間後に 33℃で接種された、培地中のザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞によるエタノール生成量のグラフを示し、(A) は加水分解物培地であり、(B) は MRM3G6 培地である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、エタノール生産などのために、生体触媒としてザイモモナス属 (*Zymomonas*) を利用する発酵中で、汚染細菌を制御するための抗細菌剤としての安定化二酸化塩素 (SCD) の使用に関する。炭水化物溶液またはスラリー中に存在する汚染細菌は

10

20

30

40

50

S C Dによって制御されるが、S C Dは、ザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞の増殖および産生に有害であることが、本明細書で分かった。安定化二酸化塩素を利用して、ザイモモナス属（*Zymomonas*）発酵中の汚染を制御する方法が開発された。特に、安定化二酸化塩素は、増殖培地（発酵培地または糖化反応スラリーを含んでもよい）に添加され、それは必要ならば、発酵に適した温度に温度を低下させる前に、33℃を超える温度に一定時間維持され、ザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞が接種されて発酵ブロスが形成する。S C D混合物が維持される温度が、発酵に適する温度より高い場合、温度を低下させる必要がある。S C Dの添加とザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞接種の間に、高温で時間経過させることで、S C Dの有害な影響が緩和されるので、ザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞は効果的に増殖し、エタノールを産生し得る。必要な時間の長さに影響を及ぼす一要因は、それにS C Dが添加される増殖培地または発酵培地のタイプ、またはS C Dが糖化反応スラリーに添加されるかどうか、およびスラリーのタイプである。

10

【0018】

燃料添加剤として使用するための、再生可能資源からの効率的なエタノール生産のために、この方法を使用して、化石燃料不足に対処し、エネルギーコストを低下させて、地球温暖化に影響を及ぼしてもよい。

【0019】

以下の定義と略語を特許請求の範囲と明細書の説明で使用する。

【0020】

本明細書の用法では、「comprises（含んでなる）」、「comprising（含んでなる）」、「includes（含む）」、「including（含む）」、「has（有する）」、「having（有する）」、「contains（含有する）」、または「containing（含有する）」という用語、またはそれらのあらゆるその他のバリエーションは、非排他的包含をカバーすることが意図される。例えば要素の一覧を構成する組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置は、必ずしもこれらの要素のみに限定されず、明示的に列挙されない、またはこのような組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置に固有のその他の要素を含んでもよい。さらに特に断りのない限り、「or」は排他的orでなく包括的orを指す。例えば条件AまたはBは、以下のいずれかによって満たされる：Aが真で（または存在し）Bが偽であり（または存在せず）、Aが偽で（または存在せず）Bが真であり（または存在する）、AおよびBの双方が真である（または存在する）。

20

30

【0021】

さらに本発明の構成要件または構成要素に先立つ不定冠詞「a」および「an」は、構成要件または構成要素の事例数（すなわち発生率）に関して、非制限的であることが意図される。したがって「a」または「an」は、1つまたは少なくとも1つを含むものと解釈すべきであり、構成要件または構成要素の単数語形は、数が単数であることを明らかに意味する場合を除いて、複数もまた含む。

【0022】

「発明」または「本発明」という用語は、本明細書の用法では非限定的用語であり、特定の発明の任意の単一実施形態を指すことは意図されず、本明細書および特許請求の範囲に記載される全ての可能な実施形態を包含する。

40

【0023】

本明細書の用法では、使用される本発明の成分または反応物質の量を修飾する「約」という用語は、例えば濃縮物または溶液を実際に作成するのに使用される、典型的な測定および液体取り扱い手順を通じて；これらの手順における不注意による誤りを通じて；組成物を作成しまたは方法を実施するのに用いられる成分の製造、起源または純度の違いを通じて、生じ得る数量の変動を指す。「約」という用語はまた、特定の最初の混合物から生じる組成物の異なる平衡条件のために、異なる量も包含する。「約」という用語によって修飾されるか否かを問わず、特許請求の範囲には量の同等物が含まれる。一実施形態では

50

、「約」という用語は、報告された数値の10%以内、好ましくは報告された数値の5%以内を意味する。

【0024】

「エタノール産生菌」という用語は、炭水化物源の代謝を通じて、エタノールを産生する生物を指す。

【0025】

「発酵性糖」という用語は、発酵過程において、微生物が炭素源として使用し得るオリゴ糖類および単糖類を指す。

【0026】

「同時糖化発酵（SSF）」という用語は、バイオマスが糖化され、糖化から生じる発酵性糖類が生体触媒によって使用され、全て同時に、典型的に、同一反応容器内で、生成物が生じる過程を指す。

【0027】

「セルロース系」という用語は、セルロースと、ヘミセルロースおよびリグニンをはじめとする追加的な成分とを含んでなる、組成物を指す。

【0028】

「リグノセルロース系」という用語は、リグニンとセルロースの双方を含んでなる組成物を指す。リグノセルロース系物質はまた、ヘミセルロースを含んでなってもよい。

【0029】

「糖化」という用語は、多糖類からの発酵性糖類の生成を指す。

【0030】

「生体材料」という用語は、生体触媒による発酵で使用されてもよい炭水化物源である、あらゆる生物由来材料を指す。生体材料としては、セルロース系バイオマス、ならびに穀物、マッシュ、糖蜜、および（甜菜やサトウキビなどからの）粗汁などの炭水化物源として使用される、その他の植物材料と植物由来材料が挙げられる。

【0031】

「スラリー」という用語は、不溶性物質と液体の混合物を指す。

【0032】

「セルロース性バイオマス糖化反応スラリー」という用語は、反応中にセルロースおよびその他の多糖類が加水分解されて発酵性糖類が生成する、セルロース性バイオマスと少なくとも1種のセルラーゼ酵素とを含んでなる混合物を指す。バイオマスはまた、糖化反応スラリーに含める前に、前処理されてもよい。混合物は不溶性物質と液体を含有し、したがってスラリーである。

【0033】

「前処理バイオマス」という用語は、糖化に先だって処理を受けたバイオマスを意味する。

【0034】

「セルロース系バイオマス」という用語は、セルロースを含んでなり、任意選択的に、ヘミセルロース、リグニン、デンプン、オリゴ糖類および／または単糖類をさらに含んでなる材料をはじめとする、あらゆるセルロース系またはリグノセルロース系材料を指す。セルロース系バイオマスはまた、タンパク質および／または脂質などの追加的な成分を含んでなってもよい。セルロース系バイオマスは、単一起源に由来してもよく、または2つ以上の起源に由来する混合物を含んでなり得る；例えば、セルロース系バイオマスは、トウモロコシ穂軸とトウモロコシ茎葉の混合物、または草と葉の混合物を含んでなることもあり得る。セルロース系バイオマスとしては、バイオエネルギー作物、農業残渣、都市固形廃棄物、産業固形廃棄物、製紙業汚泥、庭ごみ、木材および林業廃棄物が挙げられるが、これに限定されるものではない。セルロース系バイオマスの例としては、トウモロコシ穂軸、トウモロコシ苞葉などの作物残渣、トウモロコシ茎葉、草本、小麦、麦藁、大麦藁、乾草、稲藁、スイッチグラス、古紙、サトウキビバガス、ソルガムまたは大豆セルロース系植物材料、穀物製粉から得られるセルロース成分、樹木、枝、根、葉、木片、おがく

10

20

30

40

50

ず、灌木および低木（木本植物セルロース系成分）、野菜、果物、花卉、および家畜糞尿が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0035】

「セルロース系バイオマス加水分解物」という用語は、セルロース系またはリグノセルロース系バイオマスの糖化から生じる生成物を指す。バイオマスはまた、糖化に先だって前処理されてもよい。セルロース系バイオマス加水分解物は、バイオマス固形物を含有する生成物である。

【0036】

「清澄化セルロース系バイオマス加水分解物」または「清澄セルロース系バイオマス加水分解物」という用語は、処理されて固形分が除去されたセルロース系バイオマス加水分解物を指し、それはセルロース系バイオマス加水分解物とは見なされない。さらに、

10

【0037】

「糖化酵素」という用語は、バイオマス成分の発酵性糖類への変換を触媒し得る酵素を指す。典型的に、酵素は、バイオマスが前処理された場合に、より効果的である。

【0038】

「実質的汚染」という用語は、抗菌剤なしで発酵ブ罗斯を約40時間培養すると、乳酸の5 g/Lよりも多く生成する、発酵ブ罗斯中の乳酸菌汚染のレベルを指す。

【0039】

「乳酸菌」という用語は、炭水化物発酵の主な代謝最終産物として乳酸を産生する細菌を指す。乳酸菌（LAB）はグラム陽性細菌乳酸桿菌目（*Lactobacillales*）に属し、例えば、乳酸桿菌属（*Lactobacillus*）、ロイコノストック属（*Leuconostoc*）、ラクトコッカス属（*Lactococcus*）、ペディオコッカス属（*Pediococcus*）、ストレプトコッカス属（*Streptococcus*）、および腸球菌属（*Enterococcus*）が挙げられる。

20

【0040】

「増殖培地」という用語は、ザイモナス属（*Zymomonas*）生体触媒の増殖を支持する能力のある、液体培地を意味する。本発明で有用な典型的な増殖培地としては、セルロース性バイオマス加水分解物を含んでなってもよい、発酵培地および糖化反応スラリーが挙げられる。

【0041】

「発酵培地」という用語は、生体触媒として使用される微生物の増殖を支持する、栄養素などの成分を含んでなる組成物を指す。発酵培地は、小規模培養および大規模生産発酵をはじめとする、任意の規模で使用してもよい。

30

【0042】

「発酵ブ罗斯」という用語は、その中で発酵が起きているまたは起きた、発酵培地および生体触媒細胞を含んでなる組成物を指す。発酵ブ罗斯中における生体触媒の培養期間次第で、このブ罗斯はまた、エタノールなどの生体触媒によって生成される生成物も含んでもよい。

【0043】

「種培養」という用語は、発酵ブ罗斯を生成するより多量の発酵培地に接種するのに使用される、生体触媒細胞の培養である。典型的に、種培養は、発酵ブ罗斯の最終容積の約0.01%~20% v/vである。

40

【0044】

「汚染」という用語は、意図的に添加されたのではない微生物の存在を指す。典型的に、所望の生体触媒が、発酵ブ罗斯を生成する増殖培地に導入される。発酵ブ罗斯中に存在する、導入された生体触媒以外の微生物は、汚染と見なされる。

【0045】

本方法は、エタノール生産のための発酵などのザイモナス属（*Zymomonas*）細菌が生体触媒である、培養中の望まれない細菌の制御を提供する。望まれない汚染細菌は、典型的に、大規模工程中に、特に加工生体材料を含有する培地中に、存在する。培地

50

で使用される加工生体材料としては、トウモロコシまたは小麦マッシュ、甜菜またはサトウキビ糖蜜、およびリグノセルロース系バイオマス加水分解物などの炭水化物源が挙げられる。汚染細菌は、生体材料、加工装置、接種培養物、プロセス水、空気、またはその他の起源から、発酵過程に取り込まれることもある。生産発酵における汚染の制御は、典型的に、生体触媒が増殖して、汚染細菌存在下で得られるよりも高いレベルで生成物を生産できるようにして、より効率的で経済的な発酵過程を提供する。

【0046】

細菌汚染を制御するために二酸化塩素が一般的に使用されるが、ザイモナス属 (*Zymomonas*) が二酸化塩素に対して感受性であるにもかかわらず、生体触媒として細菌ザイモナス属 (*Zymomonas*) を使用する発酵中に汚染を制御するのに、安定化二酸化塩素 (SCD) を使用できるようにする方法が開発された。バイオマス由来炭水化物源を使用する大規模発酵中の優勢な汚染細菌は、乳酸桿菌属 (*Lactobacillus*) 株などの乳酸菌 (LAB) である。汚染細菌は、発酵性糖類について生体触媒と競合し、および／または乳酸などの、生体触媒の増殖および産生を阻害する物質を産生する。本方法では、ザイモナス属 (*Zymomonas*) 発酵のための発酵性糖類を提供するのに使用される潜在的に汚染された発酵培地または糖化反応スラリーに SCD を添加して、時間を通過させ、次に SCD 含有混合物にザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞を接種する。典型的な汚染細菌を制御するのに効果的な SCD レベルは、ザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞の増殖とエタノール産生に対しても阻害性であるが、SCD 添加とザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種の間に時間を経過させれば、ザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、発酵中に SCD 処理なしのものと同等の増殖および産物生成レベルを示す一方で、汚染は低いままであることが、本明細書で分かった。

【0047】

安定化二酸化塩素

本明細書において、さもないければ「SCD」と称される「安定化二酸化塩素」という用語は、1つまたは複数の二酸化塩素含有亜塩素酸塩複合体、1つまたは複数の亜塩素酸塩含有化合物、酸への曝露時に二酸化塩素を形成できる1つまたは複数のその他の実体、およびそれらの組み合わせを意味する。したがって安定化二酸化塩素は、二酸化塩素含有亜塩素酸塩複合体、亜塩素酸塩含有化合物、または酸への曝露時に液体培地中に二酸化塩素を形成できる実体の少なくとも1つを含んでなる。

【0048】

好ましい二酸化塩素含有亜塩素酸塩複合体の例は、二酸化塩素と炭酸塩の複合体、二酸化塩素と炭酸水素塩の複合体、およびそれらの混合物からなる群から選択される。亜塩素酸塩含有化合物の例としては、金属亜塩素酸塩、特にアルカリ金属およびアルカリ土類金属亜塩素酸塩が挙げられる。二酸化塩素前駆体として有用な亜塩素酸塩含有化合物の具体例は、工業等級亜塩素酸ナトリウムとして使用し得る、亜塩素酸ナトリウムである。

【0049】

SCD は、好ましくは、アルカリ金属またはアルカリ土類金属亜塩素酸塩、典型的には、亜塩素酸ナトリウム (NaClO_2) の水溶液である。溶液中の亜塩素酸ナトリウムは、一般に、7を超える pH で安定しているが、中性 (pH 7) 未満に pH が低下すると、活性二酸化塩素 (ClO_2) を放出する。SCD の活性化速度、すなわち、活性 ClO_2 が安定形態から遊離される速度は、pH 低下と共に増大する。

【0050】

SCD 組成物の多く、特に二酸化塩素含有亜塩素酸塩複合体の正確な化学組成は、完全に理解されていない。特定の二酸化塩素前駆体の製造または生産は、Gordon に付与された米国特許第 3, 585, 147 号明細書、および Lovely に付与された米国特許第 3, 591, 515 号明細書に記載される。市販の有用な安定化二酸化塩素調製物の特定例としては、例えば、E. I. du Pont de Nemours and Company (Wilmington, DE) から入手できる Anthium Diox

c i d e（登録商標）および F e r m a S u r e（登録商標）；および B i o - C i d e I n t e r n a t i o n a l, I n c.（Norman, OK）から入手できる O x i n e（登録商標）および P u r o g e n e（登録商標）が挙げられる。

【0051】

S C Dは、1つまたは複数の二酸化塩素含有オキシ塩素複合体、1つまたは複数の亜塩素酸塩含有化合物、酸への曝露時に二酸化塩素を形成できる1つまたは複数のその他の実体、およびそれらの組み合わせの溶液として提供されてもよい。溶液は、S C Dを、利用可能な二酸化塩素（ ClO_2 ）として、所定の活性種濃度で液体中に提供する。好ましくは、液体培地は、二酸化塩素含有亜塩素酸塩複合体、亜塩素酸塩含有化合物、酸への曝露時に二酸化塩素を形成できるその他の実体、およびそれらの組み合わせをはじめとする、液体培地総重量を基準にして、重量基準で約0.002%～約40%の範囲、好ましくは重量基準で約2%～約25%の範囲、より好ましくは重量基準で約5%～約15%の範囲の利用可能二酸化塩素濃度を有するのに、十分なS C Dを有する。

10

【0052】

S C Dは、アルカリ性またはアルカリ土類金属亜塩素酸塩粉末、不活性成分、および任意選択的に乾燥酸などの乾燥活性化剤を含んでなる組成物などの固形物質として、提供されてもよい。

【0053】

S C Dはまた、アルカリ性またはアルカリ土類金属亜塩素酸塩粉末と、追加的な固体アルカリ性またはアルカリ土類金属亜塩素酸塩粉末との飽和溶液を含んでなる混合物（またはスラリー）として提供されてもよい。このようなスラリーは、溶液形態で得られるよりも、より高い活性成分レベルを液体S C Dに提供する。

20

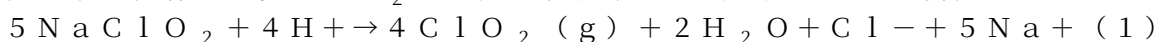
【0054】

一実施形態では、S C Dは、安定化アルカリ金属亜塩素酸塩、より具体的には亜塩素酸ナトリウム（ NaClO_2 ）であり、それは最も一般的な市販されるアルカリ金属亜塩素酸塩である。安定化アルカリ金属亜塩素酸塩とは、pH7を超え、好ましくはpH9～10の亜塩素酸塩の緩衝溶液を意味する。溶液は、典型的に、水中に5～22%w/wの亜塩素酸ナトリウムを含んでなるが、亜塩素酸ナトリウム濃度はまた、より高くてもまたはより低くてもよい。

【0055】

典型的に、亜塩素酸ナトリウムは、溶液重量を基準にして、水中に5～22重量%の亜塩素酸ナトリウムを含んでなる水溶液として、使用される。S C D濃度は、亜塩素酸塩が二酸化塩素に化学量論的に変換されると利用可能になる二酸化塩素（ ClO_2 ）の濃度、「利用可能 ClO_2 」に関して記述されてもよい。1gの亜塩素酸ナトリウム中の潜在的二酸化塩素含有量は、0.597gである。亜塩素酸ナトリウム溶液は、5～22重量%の亜塩素酸ナトリウムを含んでなり、したがって2.98～13.13%の利用可能二酸化塩素を含有する。 ClO_2 の生成は、以下の式（1）によって例証される：

30



式中、1個の NaClO_2 分子が、0.8個の ClO_2 分子を提供する。

【0056】

S C D濃度は、典型的に、酸による完全な活性化に際して、S C D調製物から放出され得る、二酸化塩素の量として規定される。これは、異なるpHの組成物で使用される、異なるS C D調製物で提供される二酸化塩素濃度を標準化する。

40

【0057】

S C Dが亜塩素酸ナトリウムの水溶液である場合、S C Dは、pH7を超えるpHを有する。亜塩素酸ナトリウム溶液は、pHの低下につれて、活性二酸化塩素を放出する。S C D水溶液からの二酸化塩素放出速度は、pHがpH約5～6.6から2.6に低下するにつれて増大する。この速度は、いくつかの要因次第で変動してもよい。例えば、異なる ClO_2 前駆体が、同一または同様のpHにおいて異なる速度で、 ClO_2 を放出してもよい。溶液の緩衝能力などのその他の要因は、S C D溶液からの ClO_2 放出速度に影響

50

響を及ぼしてもよい。これらの要因は、当業者に良く知られている。

【0058】

ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 発酵のための安定化二酸化塩素混合物

本方法では、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞生体触媒を混合物に接種する前に、発酵培地または糖化反応スラリーなどの発酵のための組成物にSCDを添加して、安定化二酸化塩素混合物を形成する。したがってSCDは、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞発酵のための発酵性糖類源である発酵培地または糖化反応スラリーに添加される。ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、二酸化塩素に対して感受性であるが、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞の接種前に時間が経過すれば、SCDをザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞発酵の糖供給源組成物に添加してもよいことが、本明細書で分かった。

10

【0059】

SCDは、生体触媒としてザイモモナス属 (*Zymomonas*) を用いる発酵中に、増殖および産生を支持するあらゆるタイプの増殖培地に添加してもよい。当業者は、以下の情報を考慮して、記載されるタイプの培地のいずれでも調製する方法を理解するであろう。一実施形態では、増殖培地は規定培地である。この培地は、グルコースなどの炭水化物源と、アミノ酸源と、酵母エキスのその他の栄養素と、微量成分、窒素、 KH_2PO_4 などのリン、および MgSO_4 を含んでもよいその他の成分とをはじめとする、典型的な購入された成分を含有する。規定培地は、実験室規模培養ならびに大規模発酵種菌として使用される種培養を培養するのに使用されることが多い。

20

【0060】

別の実施形態では、増殖培地は、マッシュ、粗汁、または糖蜜などの非セルロース系材料から得られる糖類を含有する。これらの糖類は、穀類（トウモロコシ、小麦、大麦、およびライ麦など）、および甜菜およびサトウキビなどの糖料作物などの生体材料から調製される。発酵のために使用される加水分解マッシュは、糊化温度を超える温度に加熱して、アルファアミラーゼで処理して液化し、グルコアミラーゼなどの酵素を使用して糖化することで、典型的に、穀類から製造される。発酵培地中では、甜菜およびサトウキビからの糖蜜または粗汁を糖原料として使用してもよい。糖原料は主にデンプンまたは糖汁であるので、この種の糖原料は、非セルロース系生体材料糖原料（リグノセルロース系をはじめとするセルロース系）である。この種の糖原料は、典型的に、種培養で、および生体触媒として酵母を使用するエタノール生産で、およびその他の非セルロース系大規模発酵中で使用される。

30

【0061】

非セルロース系起源からの糖を有する合成培地および培地には、（リグノセルロース系をはじめとする）セルロース系バイオマス加水分解物が欠如している。さらに、セルロース系バイオマスから得られて、高度に精製され固形物などのその他のセルロース成分が除去された、糖原料を含有する培地は、セルロース系バイオマス加水分解物が欠如した培地と見なされる。この種の培地は、清澄化セルロース系バイオマス加水分解物を含有する。

【0062】

さらに別の実施形態では、増殖培地は、（リグノセルロース系をはじめとする）セルロース系生体材料から調製された、セルロース系バイオマス加水分解物を含有する。セルロース系バイオマス加水分解物は、バイオマス固形物を含有する。セルロース系バイオマス加水分解物は、（リグノセルロース系をはじめとする）セルロース系バイオマスの糖化によって生成される。典型的に、バイオマスは、糖化に先だって前処理される。バイオマスは、当業者に知られているあらゆる方法によって処理され、加水分解物中に発酵性糖類を生じてもよい。典型的に、バイオマスは、物理的および／または化学的処理を使用して前処理され、酵素的に糖化される。物理的および化学的処理としては、粉碎、製粉、切断、アンモニアまたは NaOH などの塩基処理、および／または酸処理が挙げられる。特に有用なのは、アンモニアを含んでなる水溶液に、バイオマスを接触させて、バイオマスー水性アンモニア混合物を生成する低アンモニア前処理であり、参照によって本明細書に援用

40

50

する同一譲受人米国特許第7, 932, 063号明細書で開示されるように、アンモニア濃度は、バイオマスー水性アンモニア混合物のアルカリpHを維持するのに十分であるが、バイオマス乾燥重量に対して約12重量%未満であり、バイオマスの乾燥重量は、バイオマスー水性アンモニア混合物重量に対して少なくとも約15重量%固形分である。

【0063】

セルロース系またはリグノセルロース系バイオマスの酵素的糖化は、典型的に、酵素組成物または配合物を利用して、セルロースおよび／またはヘミセルロースを分解し、例えば、グルコース、キシロース、およびアラビノースなどの糖類を含有する加水分解物を生成する。糖化酵素は、Lynd, L. R., et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66:506-577, 2002)で概説される。少なくとも1つの酵素が使用され、典型的に、1つまたは複数のグリコシダーゼを含む糖化酵素配合物が使用される。グリコシダーゼは、二糖類、オリゴ糖類、および多糖類のエーテル結合を加水分解し、一般群「ヒドロラーゼ」(EC 3.)の酵素分類EC 3. 2. 1. x (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, CAと、付録1 (1993)、付録2 (1994)、付録3 (1995)、付録4 (1997)、および付録5 [それぞれEur. J. Biochem., 223:1-5, 1994; Eur. J. Biochem., 232:1-6, 1995; Eur. J. Biochem., 237:1-5, 1996; Eur. J. Biochem., 250:1-6, 1997; およびEur. J. Biochem., 264:610-650 1999])にある。本方法で有用なグリコシダーゼは、それらが加水分解するバイオマス構成要素によって分類し得る。本方法で有用なグリコシダーゼとしては、セルロース加水分解グリコシダーゼ (例えば、セルラーゼ、エンドグルカナーゼ、エキソグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、 β -グルコシダーゼ)、ヘミセルロース加水分解グリコシダーゼ (例えば、キシラナーゼ、エンドキシラナーゼ、エキソキシラナーゼ、 β -キシロシダーゼ、アラビノキシラナーゼ、マンナーゼ、ガラクターゼ、ペクチナーゼ、グルクロニダーゼ)、およびデンプン加水分解グリコシダーゼ (例えば、アミラーゼ、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、イソアミラーゼ) が挙げられる。さらに、ペプチダーゼ (EC 3. 4. x. y)、リパーゼ (EC 3. 1. 1. x および 3. 1. 4. x)、リグニナーゼ (EC 1. 11. 1. x)、またはフェルロイルエステラーゼ (EC 3. 1. 1. 73) などのその他の活性を糖化酵素共同体に添加して、バイオマスのその他の成分からの多糖類の放出を促進することが有用なこともある。多糖類加水分解酵素を産生する微生物が、異なる基質特異性を有するいくつかの酵素または一群の酵素によって触媒される、セルロース分解能力などの活性を往々にして示すことは、当該技術分野で公知である。したがって微生物からの「セルラーゼ」は、一群の酵素を含んでなくてもよく、その1つまたは複数またはその全てが、セルロース分解活性に貢献してもよい。セルラーゼなどの商業的または非商業的酵素製剤は、酵素を得るのに利用される精製スキーム次第で、多数の酵素を含んでなくてもよい。糖化で有用な多数のグリコシルヒドロラーゼ酵素およびその組成物が、国際公開第2011/038019号パンフレットで開示される。

【0064】

糖化酵素は、商業的に入手されてもよい。このような酵素としては、例えばSpezyme (登録商標) CPセルラーゼ、Multifec (登録商標) キシラナーゼ、Accellerase (登録商標) 1500、およびAccellerase (登録商標) DUE T (Danisco U. S. Inc., Genencor International, Rochester, NY)、およびNovosyme-188 (Novozymes, 2880 Bagsvaerd, Denmark) が挙げられる。さらに糖化酵素は、未精製であってもよく、細胞抽出物またはホールセル調製物として提供されてもよい。酵素は、1つまたは複数の糖化酵素を発現するように改変された組換え微生物を使用して生成されてもよい。例えば、前処理セルロース系バイオマス糖化のために本明細書で使用するH3Aタンパク質調製物は、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma

reesei) 遺伝子改変株によって産生される酵素の未精製調製物であり、セルラーゼおよびヘミセルラーゼの組み合わせを含み、参照によって本明細書に援用する、国際公開第2011/038019号パンフレットに記載される。

【0065】

さらに糖化のための酵素としては、例えば、GH3、GH39、GH43、GH55、GH10、およびGH11ファミリーメンバーなどのグリコシルヒドロラーゼが挙げられる。GHは、2つ以上の炭水化物間の、または炭水化物と非炭水化物部分間のグリコシド結合を加水分解する、一群の酵素である。GHファミリーは、配列類似性に基づいて分類されており、分類は、Carbohydrate-Active enzyme (CAZy) database (Cantarel et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37 (Database issue) D233-238) 中で利用できる。これらの酵素のいくつかは、様々な基質に作用でき、糖化酵素としての効力を実証した。グリコシドヒドロラーゼファミリー3 (「GH3」酵素は、例えば、 β -グルコシダーゼ (EC: 3. 2. 1. 21); β -キシロシダーゼ (EC: 3. 2. 1. 37); N-アセチル β -グルコサミニダーゼ (EC: 3. 2. 1. 52); グルカン-1, 3-グルコシダーゼ (EC: 3. 2. 1. 58); セロデキストリナーゼ (EC: 3. 2. 1. 74); エキソ-1, 3-1, 4-グルカナーゼ (EC: 3. 2. 1.); および/または β -ガラクトシダーゼ (EC 3. 2. 1. 23) 活性をはじめとする、いくつかの既知の活性を有する。グリコシドヒドロラーゼファミリー39 (「GH39」) 酵素はまた、例えば、 α -L-イブロンダーゼ (EC: 3. 2. 1. 76) および/または β -キシロシダーゼ (EC: 3. 2. 1. 37) 活性をはじめとする、いくつかの既知の活性を有する。グリコシドヒドロラーゼファミリー43 (「GH43」) 酵素は、例えば、L- α -アラビノフラノシダーゼ (EC 3. 2. 1. 55); β -キシロシダーゼ (EC 3. 2. 1. 37); エンドアラビナナーゼ (EC 3. 2. 1. 99); および/またはガラktan 1, 3- β -ガラクトシダーゼ (EC 3. 2. 1. 145) 活性をはじめとする、いくつかの既知の活性を有する。グリコシドヒドロラーゼファミリー51 (「GH51」) 酵素は、例えば、L- α -アラビノフラノシダーゼ (EC 3. 2. 1. 55) および/またはエンドグルカナーゼ (EC 3. 2. 1. 4) 活性を有することが知られている。グリコシドヒドロラーゼファミリー10 (「GH10」) は、Schmidt et al., 1999, Biochemistry 38: 2403-2412、およびLo Leggio et al., 2001, FEBS Lett 509 303-308) で詳細に記載され、グリコシドヒドロラーゼファミリー11 (「H11」) は、Hakouvainen et al., 1996, Biochemistry 35: 9617-24に記載されている。

【0066】

本発酵培地混合組成物は、セルロース性バイオマス加水分解物発酵培地とSCDとを含んでなる。「有効量」のSCDは、生体触媒を損傷することなく、汚染細菌種を殺滅するのに効果的なあらゆる量である。SCDの有効量は、使用される増殖培地のタイプに応じて変動する。一実施形態では、下でさらに詳しく説明するように、SCDの濃度は、最初に少なくとも約10mg/kgであり、安定化二酸化塩素の量は、酸による安定化二酸化塩素の完全な活性化に際して放出され得る、二酸化塩素の量に関して示される。下述するように、バイオマス加水分解物を含有する発酵培地は、1つまたは複数の追加的な糖類および/またはその他の添加成分がある、特定百分率の加水分解物を含有してもよく、または培地は、ソルビトールなどの微量添加がある、90%以上の加水分解物を含有してもよい。様々な実施形態では、セルロース系バイオマス加水分解物は、発酵プロセスの最終容積の少なくとも約50%、60%、79%、80%、90%または95%である。典型的に、発酵プロセスの最終容積の約10%は、種菌である。

【0067】

バイオマス加水分解物の固形分含量は、用いられる前処理および糖化方法次第で、典型的に、約10%~40%である。より典型的に、は、固形分は約25%であり、90%の

セルロース系バイオマス加水分解物を含有する培地は、約 23% の固形分を有する。一実施形態では、セルロース性バイオマス加水分解物発酵培地と SCD の混合物は、バイオマス乾燥重量を基準にして、混合物総重量に対して少なくとも約 20% の固形分を含有する。

【0068】

一実施形態では、SCD は、ザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞発酵の発酵性糖類源である糖化反応スラリーに添加される。糖化反応スラリーは、穀類 (トウモロコシ、小麦、大麦、およびライ麦など) およびセルロース系 (またはリグノセルロース系) バイオマスなどの、反応に不溶性固形分を寄与して反応スラリーを生じる、あらゆる生体材料を含有してもよい。さらに糖化反応スラリーは、上述したように、デンプン含有生体材料で使用されるグルコアミラーゼなどの少なくとも 1 種の糖生成酵素、またはセルロース性バイオマスで使用される少なくとも 1 種のセルラーゼを含有する。

10

【0069】

一実施形態では、本糖化反応スラリー混合組成物は、セルロース性バイオマス、少なくとも 1 種のセルラーゼ酵素、および安定化二酸化塩素を含んでなる。一実施形態では、下でさらに詳しく説明するように、SCD の濃度は、最初に少なくとも約 10 mg/kg であり、安定化二酸化塩素の量は、酸による安定化二酸化塩素の完全な活性化に際して放出され得る、二酸化塩素の量に関して示される。一実施形態では、混合物は、バイオマス乾燥重量を基準にして、混合物総重量に対して、少なくとも約 20% の固形分を含有する。

【0070】

SCD は、反応開始時、反応終了時、または反応中のいずれかの時点などの、糖化反応中のあらゆる時点で糖化反応スラリーに添加してもよい。SCD は、ハイブリッド糖化発酵 (HSF) が実施される場合、糖化反応スラリーに添加されてもよい。HSF 工程では、生体触媒の添加に先だって、部分的糖化が達成され、その後、糖化および発酵が同時に起こる。HSF が実施される場合、SCD は、下述するザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種に先だつ時間を得るのに十分な時点で、糖化中に添加される。

20

【0071】

ザイモナス属 (*Zymomonas*) 発酵において SCD を使用する方法

ザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は二酸化塩素に対して感受性であるが、発酵組成物への SCD 添加と、得られた SCD 混合物へのザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種の間に時間を経過させれば、細胞は、SCD 未添加培地に接種された細胞と同様に増殖してエタノールを産生し得ることが、本明細書で分かった。SCD 添加とザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種の間に経過させる時間は、SCD 混合物の pH および温度、SCD が添加される組成物のタイプ、および添加される SCD の量をはじめとする、複数の要因に左右される。

30

【0072】

上述したように、SCD 混合物の pH は 7 未満であり、二酸化塩素の放出を支持する。典型的に、SCD 混合物は、約 6 未満の pH を有する。例えばセルロース性バイオマス糖化反応は、典型的に約 5~6 の pH で実施され、加水分解物培地は、典型的に約 5~6 の pH でザイモナス属 (*Zymomonas*) 発酵で使用される。したがってこれらの組成物は、さらなる pH 調整なしに、SCD と共に直接使用してもよい。

40

【0073】

ザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種前の SCD 混合物の温度は、33℃ 以上に維持される。温度は、約 34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 50℃ 以上に維持されてもよい。温度は、発酵に必要な栄養素に有害なレベル未満に保たれる。様々な実施形態で、SCD 混合物の温度は、35℃ 以上、40℃ 以上、または約 47℃ に維持される。SCD 混合物が、ザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞に適するよりも高い温度である場合、ザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種に先だって、温度をザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞に適した温度に低下させる。ザイモナス属 (*Zymomonas*)

50

細胞に適した温度は、ザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞が生存する温度であり、発酵に最適でなくてもよい。ザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞は、発酵最適温度よりも高い温度で、混合物に接種してもよく、その後、得られた発酵ブросを発酵温度に冷却する。一実施形態では、接種時のSCD混合物の温度は、40℃未満である。別の実施形態では、温度は37℃以下、35℃以下、または33℃以下である。

【0074】

SCDが、セルロース性バイオマス加水分解物を含んでなる発酵培地組成物、または糖化反応スラリーに添加される場合、SCD添加とザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞接種の間の時間は、6時間を超える。様々な実施形態で、時間は、7、8、9、10、11、または12時間、またはそれ以上であってもよい。特定タイプのセルロース性バイオマス加水分解物培地または糖化反応スラリー、SCDの特定使用量、および特定温度で使用される特定の時間は、本明細書の実施例で例示されるように、接種に続くザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞の能力に基づいて、当業者によって容易に判定されてもよい。

【0075】

セルロース性バイオマス加水分解物を欠く発酵培地にSCDが添加される場合、SCD添加とザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞接種の間の時間は、8時間を超える。様々な実施形態で、時間は、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20時間、またはそれ以上であってもよい。セルロース性バイオマス加水分解物を欠く特定タイプの培地、SCDの特定使用量、および特定温度で使用される特定の時間は、本明細書の実施例で例示されるように、接種に続くザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞の能力に基づいて、当業者によって容易に判定されてもよい。

【0076】

SCDは、組成物へのザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞接種から生じる発酵ブрос中の汚染を制御するのに有効な量で、発酵のための組成物に添加される。上述したように、SCD濃度は、典型的に、酸による完全な活性化に際して、SCD調製物から放出され得る二酸化塩素（ ClO_2 ）の量として規定される。ザイモモナス属（*Zymomonas*）発酵ブрос中で汚染制御を提供するのに必要な ClO_2 の濃度は、使用されるザイモモナス属（*Zymomonas*）株の増殖および産生特性、（上述の）SCDが添加される発酵組成物のタイプ、温度、およびpH、そして初期汚染レベルなどの要因次第で変動する。汚染細菌の制御は、発酵ブрос中の乳酸レベルを測定することで評価してもよく、約40時間の発酵後でさえ約5g/L未満の乳酸の存在は、汚染が制御されていることを意味する。汚染は、発酵ブрос中で約5g/L未満の乳酸、または4g/Lまたは3g/Lまたは2g/Lまたは1g/L未満の乳酸に制御されてもよい。発酵ブрос中の乳酸の量は、典型的に、当業者に知られているように、HPLCによってアッセイされる。有効量のSCDは、少なくとも約10、25、50、75、100、125、150、175、200、250、275、300、350mg/kg、またはそれ以上であってもよい。規定条件下における発酵のために、特定組成物で使用される ClO_2 の有効量は、本明細書の実施例に記載される実験に基づいて、当業者によって容易に判定されてもよい。例えば約150mg/kgの濃度の ClO_2 が、本明細書の実施例4に記載される条件下で、約2の OD_{600} のL. プランタルム（*L. plantarum*）培養物の5または10容積%の加水分解物培地への接種を制御するのに使用される有効量である。

【0077】

ザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞種菌

本方法では、ザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞を接種することで、発酵ブросが生成する。接種は、増殖培養を開始するのに効果的な、あらゆるザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞源を使用してもよい。典型的に、ザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞は冷凍保存株として貯蔵され、細胞は、規定培地中の小規模培養で培養して復活させる。小規模培養は、発酵ブросまたは培養物を生成するための発酵培地に添加される種菌として使用される。小規模培養はまた、種培養に接種するのに使用してもよい。

ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、種培養中で培養され、それは次に種菌として、大規模発酵に添加される。種菌として使用される種培養は、無菌培地を含有してもよく、汚染制御のための抗菌剤を必要としない。代案としては、上述したように、種菌として使用される種培養は、加工装置または生体材料などによって汚染されていてもよいあらゆる発酵培地を含有してもよく、上述したようなザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞接種前に、SCDが使用されて汚染が制御される。接種は、典型的に、接種される培地の最終容積の1%~10%を使用する。

【0078】

ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞

あらゆるザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞株が、本方法で使用されてもよく、使用される培地タイプや所望の発酵過程の結果をはじめとする要因に基づいて、選択される。所望の生産工程の効果的生体触媒である、あらゆるザイモモナス属 (*Zymomonas*) 株を使用してもよい。例えばザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、グルコース、フルクトースおよび／またはスクロースを発酵基質として利用して、エタノールを自然に産生するが、キシロースは代謝しない。一実施形態では、本方法および組成物で使用されるザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、キシロース利用のために改変されており、それは発酵培地としてキシロースを含有するセルロース系バイオマス加水分解物を使用する場合に、特に所望される。

【0079】

Z. モビリス (*Z. mobilis*) などのエタノール産生ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 株が、キシロースを発酵してエタノールにするために改変されている。米国特許第5,514,583号明細書、米国特許第5,712,133号明細書、米国特許第6,566,107号明細書、国際公開第95/28476号パンフレット、Feldmann et al. ((1992) Appl Microbiol Biotechnol 38:354-361)、およびZhang et al. ((1995) Science 267:240-243)に記載されるようにして、キシロース代謝に関する酵素発現のために、典型的に、4つの遺伝子をZ. モビリス (*Z. mobilis*) に導入して、キシロース利用代謝経路 (図1) を作成する。これらとしては、キシロースのキシロースへの変換を触媒するキシロースイソメラーゼをコードする遺伝子、およびキシロースをリン酸化してキシロース-5-リン酸を形成するキシロキナーゼとをコードする遺伝子が挙げられる。ペントースリン酸経路の2つの酵素であるトランスケトラーゼとトランスアルドラーゼもさらに発現され、これらはキシロース-5-リン酸を中間体に変換し、それはペントース代謝を解糖エントナー・ドウドロフ (Entner-Doudoroff) 経路に連結して、キシロースのエタノールへの代謝を可能にする (図1を参照されたい)。これらの酵素をコードするDNA配列は、腸内細菌、およびある種の酵母や真菌などのキシロースを代謝できる多数の微生物のいずれかから得られてもよい。コード領域の起源としては、キサントモナス属 (*Xanthomonas*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、ロドバクター (*Rhodobacter*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*)、アセトバクター属 (*Acetobacter*)、グルコノバクター (*Glucobacter*)、リゾビウム属 (*Rhizobium*)、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、シュードモナス属 (*Pseudomonads*)、およびザイモモナス属 (*Zymomonas*) が挙げられる。大腸菌 (*E. coli*) のコード領域が、典型的に、使用される。

【0080】

コードDNA配列は、Z. モビリス (*Z. mobilis*) グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPプロモーター)、およびZ. モビリス (*Z. mobilis*) エノラーゼ (ENOプロモーター) プロモーターなどの、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞中で発現されるプロモーターと、作動可能に連結する。参照によって本明細書に援用する、米国特許第7,989,206号明細書で開示される、発現が増大

した変異GAPプロモーターもまた、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 中での発現に有用である。コード領域は、プロモーターから個別に発現されてもよく、または2つ以上のコード領域がオペロン中で連結して、同一プロモーターから発現されてもよい。結果として生じるキメラ遺伝子は、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞に導入してプラスミド上に保ってもよく、または例えば、相同的組換え、部位特異的組み込み、またはランダム組み込みを使用して、ゲノムに組み込んでよい。キシロース利用代謝経路を発現するように改変された株の例としては、CP4 (pZB5) (米国特許第5,514,583号明細書)、ATCC31821/pZB5 (米国特許第6,566,107号明細書)、8b (米国特許2003/0162271第号明細書; Mohagheghi et al., (2004) Biotechnol. Lett. 25; 321-325) およびZW658 (ATTCC#PTA-7858) が挙げられる。キシロース利用代謝経路の発現のために改変されたザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、唯一の糖としてキシロースを含有する培地中で増殖できるようになる前に、一般に、キシロース含有培地中における適応期間を要する。

【0081】

追加的な実施形態では、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、成長速度および/または細胞量を増大させ、キシロース利用を増大させ、および/またはアラビノースなどのその他の糖類の使用を可能にし、酢酸などの化合物に対する阻害耐性を増大させ、またはエタノール生産を増大させる修飾などの、株を改善する1つまたは複数の追加的な遺伝子修飾を有する。

【0082】

一実施形態では、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、参照によって本明細書に援用する、米国特許第5,843,760号明細書に記載されるアラビノース利用のために、さらに改変されてもよい。アラビノース利用を可能にするために、キシロース利用経路の遺伝子に加えて発現される遺伝子としては、1) L-アラビノースをL-リブローズに変換するL-アラビノースイソメラーゼ、2) L-リブローズをL-リブローズ-5-リン酸に変換するL-リブプロキナーゼ、および3) -リブローズ-5-リン酸をD-キシロースに変換するL-リブローズ-5-リン酸-4-エピメラーゼ (米国特許第5,843,760号明細書) が挙げられる。参照によって本明細書に援用する、米国特許第2011/0143408号明細書で開示されるように、アラビノース利用の改善は、araE遺伝子からのコード領域の発現などによって、アラビノースプロトン共輸送体をさらに発現することで達成されてもよい。

【0083】

別の実施形態では、参照によって本明細書に援用する、米国特許第7,897,396号明細書に記載されるように、組み込み宿主因子のサブユニットをコードする内在性himA遺伝子を遺伝子改変してその発現を低下させ、それは酢酸含有培地中の増殖を改善する。酢酸はバイオマス加水分解物中に存在し、したがってバイオマス加水分解物を含有する培地を使用する場合、この成分に対する耐性を増大させることが所望される。

【0084】

別の実施形態では、参照によって本明細書に援用する、米国特許第7,741,119号明細書に記載されるように、グルコースフルクトース酸化還元酵素 (GFOR) 活性を低下させる遺伝子修飾を施す。GFORならびにhimA遺伝子の発現低下は、アルドース還元酵素活性の低下について上で記載されるものなどのあらゆる方法によってもよい。

【0085】

別の実施形態では、参照によって本明細書に援用する、同一譲受人同時係属米国特許出願公開第13/161734号明細書で開示されるように、リボース-5-リン酸イソメラーゼ (RPI) 活性を増大させる遺伝子修飾が施される。RPIの発現増大は、天然プロモーターよりも高活性のプロモーターなどによって、内在性RPIをコードする遺伝子の発現を増大させることで、またはザイモモナス属 (*Zymomonas*) 中のリボース-5-リン酸イソメラーゼ活性によって、任意選択のタンパク質またはポリペプチドをコ

ードする異種遺伝子を発現させることで、達成されてもよい。米国特許出願第13／161734号明細書に記載されるように、RPI-AおよびRPI-Bと称される2つのリボス-5-リン酸イソメラーゼ酵素群があり、そのどちらが発現されてもよい。

【0086】

別の実施形態では、参照によって本明細書に援用する、米国特許第7,989,206号明細書および米国特許第7,998,722号明細書で開示される、高活性の変異プロモーターを使用して、キシロース利用代謝経路の一部として発現されるキシロースイソメラーゼが発現される。その中で開示される変異プロモーターは、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターである。

10

【0087】

別の実施形態では、キシロース利用代謝経路の一部として発現されるキシロースイソメラーゼは、同一譲受人同時係属米国特許出願公開第13／161749号明細書で開示されるように、EC 5.3.1.5によって同定される酵素クラスに含まれる、I群キシロースイソメラーゼである。その中では、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) において、2群キシロースイソメラーゼよりも活性が高い、アクチノプラネス・ミズリエンシス (*Actinoplanes missouriensis*) (ザイモモナス属 (*Zymomonas*) のコドン最適化コード領域：配列番号13) から単離されたコード領域から発現されるものなどのI群キシロースイソメラーゼが開示されている。その中で、I群キシロースイソメラーゼは、(PHYLIPI (Phylogeny Inference) パッケージ バージョン 3.5c; Felsenstein (1989) Cladistics 5:164-166) 中で実装されるPHYLIPI近隣結合アルゴリズム、GroupSim解析 (Capra and Singh (2008) Bioinformatics 24:1473-1480)、およびプロファイル隠れマルコフモデル (HMMERソフトウェアパッケージのhmmsearchアルゴリズム; Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VAを使用する) を使用して、分子系統バイオインフォマティクス解析によって、定義される。

20

【0088】

別の実施形態では、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、参照によって本明細書に援用する、米国特許出願公開第2011-0014670-A1号明細書で開示されるように、エタノールおよび酢酸アンモニウムを含有するストレス培養中での増殖に適応されている。酢酸耐性が改善されたこれらのザイモモナス属 (*Zymomonas*) 株は、酢酸を含有するセルロース系バイオマス加水分解物を含有する発酵培地を使用する場合に、特に有用である。

30

【0089】

上記参考文献で開示される株および本明細書に記載の株は、本方法で使用されてもよい株の例を提供し、ATCC31821/pZB5、ZW658 (ATCC#PTA-7858)、ZW800、ZW801-4、ZW801-4::ΔhimA、AcR#3、ZW705、AR3-7-321、およびZW1-XA111が挙げられる。

【0090】

ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 発酵

本方法では、あらかじめSCDで処理されて、次に一定時間後にザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞が接種された、したがって発酵ブロスである発酵培地または糖化反応スラリーを、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞の増殖に適した条件下に維持する。一実施形態では、ザイモモナス属 (*Zymomonas*) 細胞は、発酵で使用される条件下におけるエタノール生産の効果的生体触媒であるザイモモナス属 (*Zymomonas*) 株細胞であり、発酵ブロス中にエタノールが生成される。増殖が阻害される程度に発酵培地中の糖類濃度が高い場合、培地は、参照によって本明細書に援用する、同一譲受人の米国特許第7,629,156号明細書で開示されるように、ソルビトール、マンニトール、またはその混合物を含む。典型的に、ソルビトールまたはマンニトールが、約

40

50

5 mMの最終濃度で培地中に存在する。

【0091】

典型的に、約30℃～約37℃の温度と、約4.5～約6.5のpHの条件が使用される。典型的に、(嫌氣的、微好氣的、または微好氣性発酵などの条件を含んでもよい)培養物は、空気、酸素、またはその他の気体の補給なしで、少なくとも約20時間培養され、そして約25、30、35、40、45、50、55、60、65、70時間以上培養されてもよい。典型的に、種培養が約20時間培養されるのに対し、発酵生産培養物は、約40時間以上培養される。起泡を最小化するために、消泡剤(シリコーンベース、有機ベースなどの任意の種類)を必要に応じて培地に添加してもよい。

【0092】

商業的生産発酵培養物では、多様な培養手順を応用してもよい。例えば大規模生産は、バッチおよび連続培養手順の双方を使用してもよい。古典的バッチ培養法は、培地組成が培養開始時に設定されて、培養工程において人為的変更を受けない閉鎖系である。したがって所望の生物を培養工程開始時に培地に接種し、系に何も添加せずに、増殖または代謝活性を生じさせる。しかし典型的に、「バッチ」培養は、炭素源添加に関してバッチであり、pHおよび酸素濃度などの要素を制御する試みが頻繁になされる。バッチ系では、系の代謝産物組成とバイオマス組成は、培養を停止させる時点まで常に変化する。バッチ培養内では、細胞は、静的な遅滞期から高い対数増殖期へ、そして最後に、増殖速度が減退または停止する静止期へと減速する。処置を施さない場合、静止期にある細胞はやがて死滅する。対数期にある細胞は、往々にしてエタノール生産の大半に関与する。

【0093】

標準バッチ系の変法が、流加系である。流加培養工程もまた、本方法および組成物に適し、培養の進行と共に基質が徐々に添加されることを除いては、典型的なバッチ系を構成する。流加バッチ系の実際の基質濃度の測定は困難であるので、pH、およびCO₂のような排ガスの分圧などの測定可能要素の変化に基づいて推定する。バッチおよび流加培養法は、一般的で当該技術分野で周知であり、例は、Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Crueger, Crueger, and Brock, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA、またはDeshpande, Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol., 36, 227, (1992)にある。

【0094】

本方法はまた、連続培養工程を使用してもよい。連続培養は、バイオリアクターに培養液が継続的に添加される開放系であり、同時に等量の馴化培地が、加工のために取り出される。連続培養は、概して、細胞が主に対数増殖期にある、一定の高い液相密度に細胞を維持する。代案としては、固定化細胞を用いて連続培養を実施してもよく、その中では炭素および栄養素が継続的に添加されて、有価生成物、副産物または老廃物が、細胞集団から継続的に取り出される。細胞固定化は、当業者に知られているように、天然および/または合成材料から構成される幅広い固体支持体を使用して、実施してもよい。

【0095】

生産工程では、生産発酵培養は、典型的に、システムの掃除が必要になるまで相次いで実施される。

【0096】

本方法および組成物はまた、ハイブリッド糖発酵(HSF)工程で使用してもよく、その中では、ザイモモナス属(Zymomonas)細胞の添加に先だって、部分的糖化が実施され、次にさらなる糖化および発酵が同時に起こる。第2段階同時糖化発酵は、参照によって本明細書に援用する、国特許出願公開第2011-0318803号明細書に記載されるようであってもよい。この工程では、高濃度のエタノール生産のための同時糖化発酵反応において、ザイモモナス属(Zymomonas)細胞が、低いインペラ攪拌、および糖化発酵混合物中の高濃度の不溶性固形分の条件下で、培養される。

【実施例】

【0097】

以下の実施例で、本発明をさらに定義する。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しながら、例証としてのみ提供されるものと理解すべきである。上の考察およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的特性を見極めることができ、その精神と範囲を逸脱することなく、本発明に様々な変更と修正を加えて、それを様々な用途と条件に適応させ得る。

【0098】

略語の意味は、次の通りである。「hr」は時間を意味し、「min」は分を意味し、「sec」は秒を意味し、「d」は日を意味し、「L」はリットルを意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「μL」はマイクロリットルを意味し、「g」はグラムを意味し、「μg」はマイクログラムを意味し、「ng」はナノグラムを意味し、「g/L」は1リットルあたりグラムを意味し、「mM」はミリモル濃度を意味し、「μM」はマイクロモル濃度を意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「μmol」はマイクロモルを意味し、「pmol」はピコモルを意味し、「OD600」は600nmで評価された光学濃度を意味し、「EFT」は経過発酵時間を意味し、「ppm」は百万分率を意味し、「G+X」はセルロース系バイオマスサンプル中のグルカンおよびキシロースの総量を意味する。

【0099】

一般方法

ZW705株の説明

ザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) ZW705株は、ZW804-1株から作成した。ZW801-4は、参照によって本明細書に援用する、同一譲受人の米国特許第7,741,119号明細書に記載される、Z. モビリス (*Z. mobilis*) の組換えキシロース利用株である。ZW801-4株はZW800株に由来して、それはZW658株に由来し、これらは全て米国特許第7,741,119号明細書に記載される。ZW658は、逐次遺伝子転位事象によって、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼ、およびトランスケトラーゼをコードする、4つのキシロース利用遺伝子を含む2つのオペロン、*P_{gap} xy l A B*および*P_{gap} t a l t k t*をZW1 (ATCC31821)をゲノムに組み込み、続いてキシロース含有選択培地上で適応させて構築した (米国特許第7,629,156号明細書)。ZW658は、ATCCPTA-7858として寄託した。ZW658中で、宿主媒介二重交差相同的組換えを使用して、グルコースフルクトース酸化還元酵素 (*g f o r*) をコードする遺伝子を挿入的に不活性化し、スペクチノマイシン耐性を選択可能なマーカーとして、ZW800を作り出した (米国特許第7,741,119号明細書)。Creリコンビナーゼを使用した部位特異的組換えによって、*lox P*部位と境を接するスペクチノマイシン耐性マーカーを除去し、ZW801-4を作成した。

【0100】

参照によって本明細書に援用する、米国特許出願公開第2011-0014670号明細書に記載されるようにして、Z. モビリス (*Z. mobilis*) ZW801-4株の培養物を酢酸アンモニウムを含む培地のストレス条件下での増殖に適応させ、ZW705を作成した。250mlの攪拌されるpHおよび温度制御発酵槽 (*S i x f o r s ; B o t t m i n g e n , S w i t z e r l a n d*) 内で、ZW801-4の連続培養を実施した。発酵のための基礎培地は、5g/Lの酵母エキス、15mMのリン酸アンモニウム、1g/Lの硫酸マグネシウム、10mMのソルビトール、50g/Lのキシロース、および50g/Lのグルコースであった。高濃度の酢酸およびアンモニアの存在下における増殖への適応は、97日間にわたり、比希釈率によって測定される確立成長速度を維持しながら、上記連続培養培地に添加する酢酸アンモニウムの濃度を少しずつ増大させてもたらされた。酢酸アンモニウムは、160mMの濃度に増大された。アンモニウムイオン濃度のさらなる増大は、139日間の連続培養の終わりまでに、リン酸アンモニウムを2

10 mMの最終総アンモニウムイオン濃度に添加することで達成される。ZW705株は、単一コロニーへの播種と1個の選択コロニーの増幅によって、適応集団から単離された。

【0101】

AR3 7-31株の説明

ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) AR3 7-31株は、参照によって本明細書に援用する、同一譲受人同時係属米国特許出願公開第13/316597号明細書に記載されるようにして、タービドスタット中のZW705株の増殖に続いて単離された（その中ではAdapted 7-31とも称される）。この連続流動培養装置内では、加水分解物培地中の酢酸アンモニウムおよびエタノールの濃度が、経時的に増大した。AR3 7-31の全ゲノムは配列決定され、ZW705ゲノムの配列と比較された。AR3 7-31株は、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) ゲノムのzmol432読み取り枠 (NCBI参照: NC_006526.2) に、遺伝子修飾を有することが分かり、その中でzmol432は、「フザリン酸耐性タンパク質」をコードするとして注釈される。具体的には、AR3 7-31変異は、zmol432コード領域の350位にあり、その位置でCからTに変化している。この変異は、117位アミノ酸TC TからTT Tへのコドン変化をもたらし、117位アミノ酸のセリンからフェニルアラニンへの変化をもたらした。この変異の影響は、加水分解物培地中の株の挙動を改善するポリペプチドの発現であり、加水分解物中で様々な増殖インヒビターに対する株の耐性を増大させ、エタノール収率を増大させる。

【0102】

ZW1-XA111株

ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) ZW1-XA111株は、ZW1 (ATCC 31821) 株から作成された。ZW1は、ZW705について上述したように、xylA、xylB、tkt、およびtalの4つのキシロース利用経路遺伝子を発現するように、遺伝子操作された。xylAコード領域は、アクチノプラネス・ミズリエンシス (*Actinoplanes missouriensis*) (参照によって本明細書に援用する、米国特許第2011/0318801号明細書で開示される) に由来して、変種高活性Z. モビリス (*Z. mobilis*) グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーター (参照によって本明細書に援用する、米国特許第7,989,206号明細書で開示される) を使用して、xylAおよびatal/tktオペロンを発現した。xylAおよびxylB遺伝子の組み込みは、gfor遺伝子座を不活性化した (参照によって本明細書に援用する、米国特許第7,741,119号明細書)。株は、参照によって本明細書に援用する、同一譲受人同時係属米国特許出願公開第13/161734号明細書で開示されるようなリボース-5-リン酸イソメラーゼ (Rpi) と、参照によって本明細書に援用する、同一譲受人同時係属米国特許出願公開第61/577871号明細書で開示されるようなリブローース-リン酸3-エピメラーゼ (Rpe) の発現を増大させるために、遺伝子操作された。参照によって本明細書に援用する、米国特許第7,629,156号明細書に記載されるようにして、得られた株を適応のためにキシロース培地中で継代して4回倍加させ、その間に、キシロースをキシリトールに変換できるNADPH依存性キシロース還元酵素活性を有する酵素をコードする、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) ゲノムのzm00976読み取り枠 (NCBI参照: NC_006526.2) に遺伝子修飾が起こった (Agrawal and Chen (2011) Biotechnol Lett.; オンライン出版7/01/2011)。参照によって本明細書に援用する、米国特許出願第61/577879号明細書で開示されるように、zm00976の妨害は、NADPH依存性キシロース還元酵素活性を90%を超えて低下させ、キシロース含有培地上の増殖を改善する。

【0103】

株は、キシロース利用のために導入されたトランスケトラーゼおよびトランスアルドラ

ーゼ活性と併せて、アラビノース同化作用経路を提供する、Lーリブローズキナーゼ、Lーアラビノースイソメラーゼ、およびLーリブローズー5ーリン酸ー4ーエピメラーゼをそれぞれコードする大腸菌 (*E. coli*) *araBAD* オペロンを発現するように、遺伝子操作された (参照によって本明細書に援用する米国特許第 5, 843, 760 号明細書)。参照によって本明細書に援用する、同一譲受人同時係属米国特許出願公開第 61/577871 号明細書で開示されるように、*araBAD* オペロンの組み込みは、ポリヌクレオチドホスホリラーゼをコードする *pnp* 遺伝子を不活性化し、それによってキシロース利用およびエタノール産生の改善を提供した。米国特許第 7, 629, 156 号明細書に記載されるようにして、得られた株を適応のために、キシロース培地中で継代して 10 回倍加させた。

10

【0104】

キシロース利用をさらに改良するために、参照によって本明細書に援用する、米国特許第 2011/143408 号明細書で開示されるように、大腸菌 (*E. coli*) の *araE* 遺伝子によってコードされる異種アラビノースープロトン共輸送体を発現するように、株を遺伝子操作した。このステップで使用されたクロラムフェニコール耐性標識は、ZW1-XA111 株を生成するゲノムから除去された。

【0105】

穂軸組成物

国立再生可能エネルギー研究所 (National Renewable Energy Laboratory) (Golden, CO) Technical Report NREL/TP-510-42618 (2008 年 4 月改訂) で詳述されるように、ASTM E1758-01 「Standard method for the determination of carbohydrates by HPLC (HPLC による炭水化物測定標準法)」を使用して、出発トウモロコシ穂軸中のセルロースおよびキシランの量を測定した。組成物は、乾燥重量を基準にして、34.8%セルロース、29.2%キシラン、12.8%リグニンと判定された。

20

【0106】

茎葉組成物

出発茎葉中のセルロースおよびキシランの量は、Microbac Laboratories, Inc (Boulder, CO) によって測定された。組成は、乾燥重量を基準にして、34.8%セルロース、21.8%キシラン、16.9%リグニンと判定された。

30

【0107】

糖化酵素

Accelerase (登録商標) TRIO (Danisco U. S. Inc., Genencor International, Rochester, NY)

セルラーゼおよびヘミセルラーゼ産生株 H3A

H3A 株は、以下のように作成された、組換えトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 株である。米国特許第 7, 666, 648 号明細書に記載された四重欠損株 1A52 の誘導体である、米国特許第 2008/026376 号明細書に記載された四重欠損 T. リーゼイ (*T. reesei*) 株 (いずれの参考文献も参照によって本明細書に援用する) を、電気穿孔を使用して、βーグルコシダーゼ発現カセット (CBH1 プロモーター、βーグルコシダーゼ 1 コード領域、CBH1 ターミネーター、および *amdS* 遺伝子)、およびエンドキシラナーゼ発現カセット (CBH1 プロモーター、エンドキシラナーゼコード領域、および CBH1 ターミネーター) で同時形質転換した。1 つの形質転換体は、#229 株と称される。#229 株は、電気穿孔を使用して、βーキシロシダーゼ Fv3A 発現カセット (*cbh1* プロモーター、βーキシロシダーゼコード領域、*cbh1* ターミネーター、および *als* 遺伝子)、βーキシロシダーゼ Fv43D 発現カセット (*egl* プロモーター、βーキシロシダーゼコード領域、天然ターミネーター)、および Fv51A αーアラビノフラノシダーゼ発現カセット (*egl* プロモ-

40

50

ター、L-α-アラビノフラノシダーゼコード領域、天然ターミネーター)で同時形質転換した。H3A株は、この形質転換から単離された。

【0108】

H3A株の発酵中に生成される細胞外タンパク質を遠心分離によって細胞集団から分離し、分子量カットオフ10kDのMilliporeメンブレンを通過させて膜限外濾過によって濃縮し、pHを4.8に調節した。総タンパク質は、校正物質としてウシ血清アルブミンを使用して、WeichselbaumおよびGornallによる修正ビレット法を使用して測定した(Weichselbaum, 1960, Amer. J. Clin. Path. 16:40; Gornall et al., 1949 J. Biol. Chem 177:752)。本明細書でH3Aタンパク質と称されるこのH3A細胞外タンパク質調製物を、セルラーゼおよびヘミセルラーゼ併用調製物として使用して、複合糖質加水分解をもたらした。

10

【0109】

穂軸加水分解物FRF10

前処理

トウモロコシ穂軸は、酵素加水分解前に、米国特許第7,932,063号明細書に記載される低アンモニア法を使用して前処理した。容器本体周囲に蒸気を通過させるためのジャケットを含む、水平Littleford Day 130L反応器(Littleford Day, Inc., Florence, KY)を前処理のために使用して、SSL24と命名される前処理穂軸を生成した。湿潤穂軸ベースで44容積%の反応器充填に達するまで、種トウモロコシ加工からの穂軸(サイズ1mm未満)を容器に装入した(50.2ポンド; 22.77kg)。穂軸は、1.0mmの篩付き大型微粉碎機(型番号1SH、シリアル番号10019; Pulverizing Machinery Co., Summit, NJ)を使用して、1mm未満のサイズにした。必要に応じて、粉碎前に穂軸にドライアイスを追加して、機器が加熱するのを防止した。微粉碎機の主要駆動部分は、最大ローター速度9,600RPMの5h.p.のモーターである。それは6個の回転ハンマーと、シェルとを有し、対向する衝撃縁で被覆される。

20

【0110】

穂軸は、0.396g/cm³の湿潤嵩密度と、8重量%の水分を有した。容器上部近くへの28.9重量%の水酸化アンモニウム溶液(9.7ポンド; 4.4kg)および水(17.2ポンド; 7.8kg)の装入に先だって、0.1気圧に達するまで容器を真空にして、容器内に、乾燥重量バイオマスに対して6重量%のNH₃と60重量%固形分を得た。SSL25およびSSL26と命名される第2および第3の前処理バッチを同一様式で実施して、引き続く糖化のために十分な材料を生成した。全てのバッチ中で、反応器攪拌器を70rpmに設定し、容器のジャケットに蒸気を通過させた。容器が80℃の内部温度に達したら、容器の上部近くに蒸気を装入して、容器内部温度を145℃に上昇させた。この温度を20分間保った。この保持時間で15分目に、ジャケットを通過する蒸気を停止させた。前処理の終了時に、ベントコンデンサを通じて、大気圧に達するまで反応器を減圧させた。引き続いて、15分間にわたり真空(およそ1気圧未満; 101.3キロボスカ)にして、温度を60℃未満に低下させ、容器の底弁開放に先だって、前処理穂軸から追加的なアンモニアおよび水を除去し、前処理バイオマスを回収した。前処理穂軸バッチSSL24、SSL25、およびSSL26の固形分の最終重量%は、それぞれ61.1%、66.7%、および67.8%であった。

30

40

【0111】

糖化

FRF10加水分解物は、SSL24、SSL25、およびSSL26調製物からの前処理トウモロコシ穂軸の混合物を使用して、上述のH3A酵素系を用いて糖化させることで、200L発酵槽内で生成された。水の残留分(124.0kg)を発酵槽に添加して、ジャケットを121℃に加熱し、20分間滅菌した。水を47℃に冷却し、タンク上部のポートを通じて前処理穂軸混合物を添加し;この時点で21.0kgを添加した。1N

50

の H_2SO_4 によってpHを5.3に調節し、酵素を添加した。酵素の投入量は4.73 kgであり、それは反応器に添加された全穂軸中の1 gのグルカン+キシランあたり14 mgのタンパク質に相当した。続く12時間にわたり、3時間毎に4回、15.5 kgの穂軸を反応器に添加して、各添加後に、1 Nの H_2SO_4 でpHを5.3に調節した。この操作の標的固形物装入量は、25重量%であった。発酵槽は、およそ72時間にわたり47℃およびpH 5.3に制御した。この期間の終了時に、20リットルを抜き取ってこれらの実験で使用し、容器の残留内容物を発酵させた。加水分解物サンプルを分析し、残りは使用時まで冷蔵した。サンプル分析の結果は、表1に示される。

【0112】

【表1】

10

表 1:糖化終了時のFRF10の加水分解物特性

モノマーグルコース(g/L)	76.26
オリゴマーグルコース(g/L)	7.94
モノマーキシロース(g/L)	61.59
オリゴマーキシロース(g/L)	4.11
モノマーアラビノース(g/L)	5.58
オリゴマーアラビノース(g/L)	2.09
乳酸(g/L)	0.00
固形分(重量%)	23.6%

20

【0113】

穂軸加水分解物FRF19

前処理

50容積% (60.1ポンド; 27.3 kg) に達するまで容器に装入したこと以外は、穂軸加水分解物FRF10について上述したように、トウモロコシ穂軸を酵素加水分解前に前処理した。穂軸は、0.420 g/cm³の湿潤嵩密度と、10.9重量%の水分を有した。9.8ポンド (4.4 kg) の28.9重量%水酸化アンモニウム溶液、および18.1ポンドの水を添加した。最初のサンプルは、SSL52であり、5つの追加的なサンプルSSL53~SSL57を同一様式で調製して合わせた。前処理穂軸バッチSSL52、SSL53、SSL54、SSL55、SSL56、およびSSL27の固形分の最終重量%は、それぞれ70.3%、69.4%、68.8%、69.6%、68.7%、および70.6%であった。

30

【0114】

糖化

SSL52~SSL57の調製物からの前処理トウモロコシ穂軸の混合物を使用して、FRF19加水分解物を200 Lの発酵槽内で生成し、上で説明したH3A酵素系で処理した。糖化は、水残留分が111.0 kgであり、最初に20.0 kgの前処理穂軸が発酵槽に添加され、酵素用量が6.86 kg (反応器に添加される全穂軸中の1 gのグルカン+キシランあたり16 mgのタンパク質に相当する) であったこと以外は、上述したようであった。続く12時間にわたり、反応器に、16.0 kgの穂軸を3時間毎に4回添加した。この試行の標的固形分装入は、27.5重量%であった。サンプル加水分解物分析は、表2に記載される。

40

【0115】

【表 2】

表 2:糖化終了時の FRF19 の加水分解物特性

グルコース(g/L)	83.6
キシロース(g/L)	75.2
アラビノース(g/L)	7.0
乳酸(g/L)	<0.2

10

【0116】

茎葉加水分解物 Y018

前処理

トウモロコシ茎葉は、酵素加水分解前に、米国特許第 7, 932, 063 号明細書に記載される低アンモニア法を使用して前処理した。容器本体周囲に蒸気を通させるためのジャケットを含む水平 E i r i c h 340 L 反応器を前処理のために使用して、Y018 と命名される前処理穂軸を生成した。容器に、60 容積% (40.8 kg) に達するまで、茎葉を装入了。茎葉を 1/32 インチ (0.8 mm) 未満に縮小した。

【0117】

茎葉は、0.200 g/cm³ の湿潤嵩密度と、8.0 重量%の水分を有した。茎葉を装入了後、水酸化アンモニウム溶液の装入に先だって、-0.9 バール g (-90 キロパスカル g) に達するまで容器を真空にして、容器内に、乾燥重量バイオマスに対して 8 重量%の NH₃ と、65 重量%の固形分を得た。全てのバッチにおいて、反応器攪拌器は 40 Hz (42 rpm) に設定され、ジャケット上の蒸気圧力は 3.2 バール g であった。ひとたびアンモニア溶液を添加したら、16 バール g (1600 キロパスカル g) の蒸気を容器に添加して、容器内部温を 140 °C に上昇させて維持した。この温度を 30 分間保った。前処理の終了時、ベントコンデンサを通じて、大気圧に達するまで反応器を減圧させた。引き続いて、-0.9 バール g (-90 キロパスカル g) に達するまで真空にして、温度を低下させ、前処理茎葉から追加的なアンモニアおよび水を除去してから、容器の底弁を開放して前処理バイオマスを回収した。記載するように調製された前処理茎葉バッチ Y018-X、Y018-5、および Y018-10 の固形分の最終重量%は、それぞれ 55.5%、67.0%、および 64.4% であった。

20

30

【0118】

糖化

上で説明したバッチからの前処理トウモロコシ茎葉の混合物を使用して、A c c e l l e r a s e (登録商標) T R I O で処理し、1000 L 発酵槽内で Y018 加水分解物を生成した。水の残留分を発酵槽に添加し、ジャケットを 121 °C に加熱して 20 分間滅菌した。水を 47 °C に冷却して、タンク上部のポートを通じて前処理茎葉混合物を添加し；スラリーは、この時点でおおよそ 8 重量%の固形分であった。5 重量%の H₂SO₄ によって pH を 5.3 に調節し、酵素を添加した。酵素の投入量は、反応器に添加された全茎葉中の 1 g のグルカン+キシランあたり 14 mg のタンパク質に相当した。続く 24 時間にわたり、25 重量%固形分を目標として残りの茎葉を添加し、5 重量% H₂SO₄ によって pH を 5.3 に調節した。発酵槽は、おおよそ 72 時間にわたり 47 °C および pH 5.3 に制御した。この期間の終了時に、20 リットルを抜き取ってこれらの実験で使用し、容器の残留内容物を発酵させた。加水分解物サンプルを分析し、残りは使用時まで冷蔵した。サンプル分析の結果は、表 3 に示される。

40

【0119】

【表 3】

表 3:糖化終了時の Y018 の加水分解物特性

モノマーグルコース(g/L)	63.45
オリゴマーグルコース(g/L)	18.68
モノマーキシロース(g/L)	38.81
オリゴマーキシロース(g/L)	16.16
モノマーアラビノース(g/L)	8.02
オリゴマーアラビノース(g/L)	3.38
乳酸(g/L)	0.41
固形分(重量%)	25.0%

10

【0120】

HP196 前処理トウモロコシ茎葉

トウモロコシ茎葉は、酵素加水分解前に、米国特許第 7, 932, 063 号明細書に記載される低アンモニア法を使用して前処理した。容器本体周囲に蒸気を通させるためのジャケットを含む水平 E i r i c h 6. 7 L 反応器を前処理のために使用して、Y196 と命名される前処理穂軸を生成した。湿潤茎葉ベースで、70 重量%の反応器充填に達するまで、容器に茎葉を装入した (797. 5 g)。茎葉を 1 / 32 インチ (0. 8 mm) 未満に縮小した。

20

【0121】

茎葉は、0. 170 g / c m ³ の湿潤嵩密度と、9. 43 重量%の水分を有した。茎葉を装入した後、水酸化アンモニウム溶液の装入に先だって、-0. 9 バール g (-90 キロパスカル g) に達するまで容器を真空にして、容器内に、乾燥重量バイオマスに対して 8 重量%の NH₃ と、60 重量%の固形分を得た。全てのバッチにおいて、反応器攪拌器は 20 r p m に設定され、ジャケット上の蒸気圧力は 4. 1 バール g (410 キロパスカル g) であった。ひとたびアンモニア溶液を添加したら、4. 5 バール g (450 キロパスカル g) の蒸気を容器に添加して、容器内に 50 重量%の固形分を得た。ジャケット蒸気圧力を上昇させ、次に容器内部温を 140 °C に維持するように調節した。この温度を 20 分間保った。前処理の終了時、ベントコンデンサを通じて、大気圧に達するまで反応器を減圧させた。引き続いて、-0. 7 バール g (-70 キロパスカル g) に達するまで真空にして、温度を低下させ、前処理茎葉から追加的なアンモニアおよび水を除去してから、容器の底弁を開放して前処理バイオマスを回収した。前処理茎葉バッチ HP196 の固形分の最終重量%は、63. 55%であった。

30

【0122】

培養液

MRS = 10 g / L のペプトン、8 g / L の肉エキス、4 g / L の酵母エキス、20 g / L のグルコース、5 g / L の酢酸ナトリウム三水和物、1 g / L のツイーン 80、2 g / L の K₂HPO₄、2 g / L のクエン酸三アンモニウム、0. 2 g / L の MgSO₄ * 7H₂O、0. 05 g / L の MnSO₄ * 4H₂O、pH 6. 2

40

【0123】

MRM3G10 は、1 リットルあたり次を含有する：酵母抽出物 (10 g)、KH₂PO₄ (2 g)、および MgSO₄ * 7H₂O (1 g)、グルコース (100 g)、pH 5. 5

MRM3G6 は、1 リットルあたり次を含有する：酵母抽出物 (10 g)、KH₂PO₄ (2 g)、および MgSO₄ * 7H₂O (1 g)、グルコース (60 g)、pH 5. 5

50

【0124】

分析的

エタノール、乳酸のHPLC分析

発酵サンプルを設定間隔で収集し、Waters HPLC system (Alliance system, Waters Corp., Milford, MA)、またはAgilent 1100 Series LCのいずれかを使用して、条件=0.6 mL/分の0.01N H₂SO₄、注入容積=5 μL、オートサンプラー温度=10℃、カラム温度=55℃、稼働時間=25分間、屈折率による検出(40℃保持)で、EtOHと、残留糖類と、酢酸、乳酸、およびグリセロールなどのその他の代謝産物とについて分析した。HPLCカラムは、BioRad (Aminex HPLC-87H, BioRad Inc., Hercules, CA) から購入された。分析物を屈折率検出によって定量化し、既知の標準物質と比較した。

【0125】

実施例1

安定化二酸化塩素に対するザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) の感受性

スタータカルチャとして、Z. モビリス (*Z. mobilis*) ZW705株(一般方法を参照されたい)をMRM3G10中で増殖させた(一般方法を参照されたい)。FermaSure (登録商標) XL (E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DEから入手できる) 原液を使用して、MRM3G10培地サンプルに、安定化二酸化塩素(SCD)を0、7.5、15または224 mg/kgの二酸化塩素濃度で添加した。二酸化塩素は、酸による完全な活性化に際してFermaSure (登録商標) XL溶液中でSCDから放出され得る、二酸化塩素の量に関して記載される。ZW705スタータカルチャを使用して、0.1のOD₆₀₀に1%の最終容積で、SCD含有培地サンプル、ならびにSCD非含有対照サンプルに接種した。培養物を32℃でインキュベートして、OD₆₀₀で増殖をモニターした。図2に示されるように、ザイモナス属 (*Zymomonas*) 細胞増殖は、全ての二酸化塩素レベルで大幅に阻害された。7.5 mg/kgの二酸化塩素では、約27時間後に細胞がそれから回復する長い遅滞期があり、次にSCDが添加されない対照と同様に増殖した。Pより多くの二酸化塩素が添加されたサンプル中の細胞は、実験中に回復しなかった。

【0126】

実施例2

遅延接種後における安定化二酸化塩素に対するザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) の感受性

実験を実施して、SCD添加に続くZ. モビリス (*Z. mobilis*) 細胞接種前の遅滞期が、細胞に対する二酸化塩素毒性を低下し得るかどうかを判定した。FermaSure (登録商標) XL (E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DEから入手できる) 原液を使用して、11 mLのFRF10トウモロコシ穂軸加水分解物(pH 5.3; 一般方法を参照されたい)に、二酸化塩素を298 mg/kgの濃度で添加した。二酸化塩素は、酸による完全な活性化に際してFermaSure (登録商標) XL溶液中でSCDから放出され得る、二酸化塩素の量に関して示される。対照サンプルでは、FRF10トウモロコシ穂軸加水分解物に、FermaSure (登録商標) XLの代わりに水を添加した。次に加水分解物を33℃または47℃で6時間インキュベートした。次にサンプルを33℃に維持して、10 g/LのBBL酵母抽出物、2 g/LのKH₂PO₄、5 g/LのMgSO₄・7H₂O、10 mMのソルビトール、150 g/Lのグルコース、33℃でpH 5.5およびpH 5.5 (pH調節のための4 NのNH₄OH) 中で約10のOD₆₀₀に増殖させた、10容積% (最終容積) のZ. モビリス (*Z. mobilis*) AR37-31 (一般方法を参照されたい) 細胞培養物 (F0820) を、約1の開始OD₆₀₀に接種した。エ

タノール生成量は、HPLCによって培養物中でモニターした（一般方法を参照されたい）。図3は、対照サンプルが成功裏に発酵して、約50 g/Lのエタノールを含有した一方で、357 mg/kgの二酸化塩素を含有するサンプルが、わずか約15 g/Lのエタノールを含有したことを示す。したがってこれらの条件下では、ザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞から正常なエタノール生成レベルを得るのに、6時間の遅滞期は十分でなかった。

【0127】

実施例3

長期遅延接種後における安定化二酸化塩素に対するザイモモナス・モビリス（*Zymomonas mobilis*）の感受性

SCDと細胞添加の間のより長い遅延時間の影響を調べるために、FermaSure（登録商標）XL（E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DEから入手できる）原液を使用して、151 mg/kgまたは301 mg/kgの二酸化塩素をFRF19トウモロコシ穂軸加水分解物（一般方法を参照されたい）+10 mMソルビトール、pH 5.8に添加した。二酸化塩素は、酸による完全な活性化に際してFermaSure（登録商標）XL溶液中でSCDから放出され得る、二酸化塩素の量に関して示される。サンプルは、47℃で、24または48時間インキュベートした。次にサンプルを33℃に維持して、10 g/LのBBL酵母抽出物、2 g/LのKH₂PO₄、5 g/LのMgSO₄・7H₂O、10 mMのソルビトール、150 g/Lのグルコース、33℃でpH 5.5（pH調節のための4 NのNH₄OH）中で約10のOD₆₀₀に増殖させた、10容積%（最終容積）のZ. モビリス（*Z. mobilis*）AR37-31（一般方法を参照されたい）培養物（F1153）を、約1の開始OD₆₀₀に接種した。並行対照実験では、FRF19トウモロコシ穂軸加水分解物+10 mMソルビトール、pH 5.8に、0.151 mg/kgまたは301 mg/kgの二酸化塩素を添加して、即座にそれに、Z. モビリス（*Z. mobilis*）AR37-31を同一様式で接種した。エタノール生成量は、HPLCによって培養物中でモニターした（一般方法を参照されたい）。

【0128】

図4Aは、SCDの投入直後にZ. モビリス（*Z. mobilis*）を接種した培養物では、いずれの使用量でもエタノール生成が排除された一方で、未添加対照サンプルは、約80 g/Lのエタノールを含有したことを示す。図4Bは、Z. モビリス（*Z. mobilis*）の接種に先だって、151 mg/kgまたは301 mg/kgの二酸化塩素のどちらかを含有する培地を24または48時間インキュベーションした後に、エタノール量が、二酸化塩素を欠く対照中の量と同様であったことを示す。したがってpH 5.5の加水分解物培地中における47℃で24時間は、ザイモモナス属（*Zymomonas*）発酵中に正常なエタノール生成を可能にするのに十分な、SCD添加とザイモモナス属（*Zymomonas*）細胞接種の間の時間であった。

【0129】

実施例4

安定化二酸化塩素を使用した加水分解物培地中のL. プランタルム（*L. plantarum*）の制御

典型的なLAB汚染菌としてL. プランタルム（*L. plantarum*）ATCC 8014株を使用して、SCDが、セルロース性バイオマス加水分解物に混入した乳酸菌（LAB）を制御する能力を試験した。SCDは、FermaSure（登録商標）XL原液を使用して、Y018トウモロコシ茎葉加水分解物+10 mMソルビトール、pH 5.8に、151 mg/kgまたは301 mg/kgの二酸化塩素の濃度で添加した。二酸化塩素は、酸による完全な活性化に際してFermaSure（登録商標）XL溶液中でSCDから放出され得る、二酸化塩素の量に関して示される。次にこれらの培地サンプルを33℃に維持して、33℃でMRS培地中で増殖させた培養物から採取された、10または5容積%（最終容積）のL. プランタルム（*L. plantarum*）ATCC 801

4を、約2のOD₆₀₀に接種した。いずれのサンプルでも、接種前の遅延はなかった。経過発酵時間0、24、および48時間目に、HPLCによって、培地を乳酸含有量についてアッセイした（一般方法を参照されたい）。結果は、表4に示される。48時間後、SCDを添加した培養物は、いずれの接種量でも1g/L以下の乳酸形成を有した一方で、SCD未添加照培養物は>7g/Lの乳酸を生成した。これらの結果は、二酸化塩素が、一般的な汚染菌による、セルロース系加水分解物中の乳酸形成を阻止できることを示す。

【0130】

【表4】

表4:加水分解物培地中の乳酸生成量

二酸化塩素 mg/kg	種菌容積	温度℃	乳酸(g/L)		
			0EFT	24EFT	48EFT
0	なし**	33	0.000	0.000	0.000
0	1ml	33	0.371	5.825	11.347
151	1ml	33	0.322	0.766	1.000
301	1ml	33	0.319	0.000	0.000
0	0.5ml*	33	0.000	2.598	7.279
151	0.5ml*	33	0.000	0.497	0.673
301	0.5ml*	33	0.000	0.000	0.000

**1mlの滅菌水が添加された

*0.5mlの培養物および0.5mlの水が添加された

【0131】

実施例5

糖化とそれに続くZ. モビリス (Z. mobilis) 発酵中におけるSCD処理の効果
発酵で使用される加水分解物を生成する糖化中のSCD添加によって、ザイモモナス属 (Zymomonas) 発酵中にSCDを使用して汚染を制御することの有効性を試験した。前処理トウモロコシ茎葉 (サンプルHP196; 一般方法を参照されたい) を高圧蒸気滅菌した。次に未加工トウモロコシ茎葉を高圧蒸気滅菌前処理茎葉に、前処理茎葉総重量の1%で添加した。

【0132】

糖化は、以下の条件を使用して実施した: 47℃、初期pH5.3、25%固形分への流加、12mgのAccelerase (登録商標) TRIO/gG+X。1%の未加工茎葉バイオマスを含有する、2つの糖化を実行した。未加工茎葉は、天然汚染菌を含有する。1つの試行ではSCDを糖化開始時に添加し、別の試行ではSCDを添加しなかった。SCDは、FermaSure (登録商標) XL原液を使用して、糖化混合物に316mg/kgの二酸化塩素濃度で添加した。二酸化塩素は、酸による完全な活性化に際してFermaSure (登録商標) XL溶液中でSCDから放出され得る、二酸化塩素の量に関して示される。

【0133】

後48時間の糖化後、双方の糖化実験から生成した加水分解物のサンプルを乳酸分析のために採取し、次に加水分解物のpHを5.8に調節して、温度を33℃に低下させて、10容積% (最終容積) のZ. モビリス (Z. mobilis) ZW1-X111株 (一般方法を参照されたい) 培養物を添加した。接種のために使用されたZW1-X111培養物は、10g/LのBBL酵母抽出物、2g/LのKH₂PO₄、5g/LのMgSO₄・7H₂O、10mMのソルビトール、150g/Lのグルコース、33℃でpH5.5およびpH5.5 (pH調節のための4NのNH₄OH) 中で、約12.9のOD₆₀₀に増殖させた。発酵を33℃で継続し、24時間後に、培地をエタノールについてアッ

10

20

30

40

50

セイした。

【0134】

糖化終了時（48時間糖化サンプル）、SCD添加のない糖化試行からの加水分解物は、1.6 g/Lの乳酸を含有した。SCDを添加した糖化試行からの加水分解物は、検出可能な乳酸を有さず、汚染細菌の制御が示唆された。SCDが添加された加水分解物中の発酵は、24時間後に、約36.09 g/Lのエタノールに達し、好ましい発酵が示唆された。SCDが添加されない加水分解物中の発酵は、約34.95 g/Lのエタノールを含有した。

【0135】

実施例6

糖化とそれに続くZ. モビリス（*Z. mobilis*）発酵中におけるより低用量のSCD処理

糖化は、1%未加工トウモロコシ茎葉と混合された前処理トウモロコシ茎葉（サンプルYT08-P-2；一般方法を参照されたい）を使用して、実施例5と同様に実施した。SCDは、別の糖化実験開始時に、FermaSure（登録商標）XL原液を使用して、0、40、79、119、158、または316 mg/kgの二酸化塩素濃度で添加した。二酸化塩素は、酸による完全な活性化に際してFermaSure（登録商標）XL溶液中でSCDから放出され得る、二酸化塩素の量に関して示される。別の糖化試行では、糖化開始から24時間後に、316 mg/kgの二酸化塩素を添加した。48時間の糖化後、生成した加水分解物のpHを5.8に調節し、温度を33℃に低下させて、10 g/LのBBL酵母抽出物、2 g/LのKH₂PO₄、5 g/LのMgSO₄・7H₂O、10 mMのソルビトール、150 g/Lのグルコース、33℃でpH5.5およびpH5.5（pH調節のための4 NのNH₄OH）中で約1.4のOD₆₀₀に増殖させた、10容積%（最終容積）のZ. モビリス（*Z. mobilis*）株AR37-31培養物を添加した。次に乳酸分析のために、発酵0時間サンプルである、生成した加水分解物のサンプルを採取した（図5中）。発酵および糖化を33℃で継続し、24時間後に、培地をエタノールについてアッセイした。

【0136】

図5Aに示されるように、発酵0時間目（48時間の糖化後）に、SCD未添加加水分解物は、およそ6 g/Lの乳酸を含有した。同時点で、158 mg/kg以下の二酸化塩素を添加した加水分解物は、全て、乳酸形成にわずかな低下を有し；4~5 g/Lが生成された。316 mg/kgの二酸化塩素が添加された加水分解物中では、乳酸の形成が0時間目に<1 g/Lに低下して、発酵全体にわたり1 g/L未満のままであった。SCD処理は、糖化開始時または24時間の糖化後のどちらかに添加した場合（図5AおよびBの0/316 mg/kgサンプル）、316 mg/kgの二酸化塩素レベルで効果的であった。これらの発酵のどちらも、45時間後に>50 g/Lエタノールを含有した（図5B）。より少量のSCDを糖化に添加して生成された加水分解物を使用した発酵では、エタノール生成量が低下した（図5B）。

【0137】

実施例7

長期遅延接種後における安定化二酸化塩素に対するザイモナス・モビリス（*Zymomonas mobilis*）の感受性

SCDと細胞添加の間のより長い遅延時間の影響を調べるために、FermaSure（登録商標）XL（E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DEから入手できる）原液を使用して、Y018トウモロコシ茎葉加水分解物（一般方法を参照されたい）+10 mMソルビトール、pH5.8に、またはMRM3G6培地に、301 mg/kgの二酸化塩素を添加した。二酸化塩素は、酸による完全な活性化に際してFermaSure（登録商標）XL溶液中でSCDから放出され得る、二酸化塩素の量に関して示される。サンプルは、33℃または47℃で、様々な時間にわたりインキュベートした。次にサンプルを33℃にして、10 g/L

10

20

30

40

50

の B B L 酵母抽出物、2 g / L の KH_2PO_4 、1 g / L の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 mM のソルビトール、150 g / L のグルコース、33℃で pH 5.5 (pH 調節のための 4 N の NH_4OH) 中で約 10 の OD_{600} に増殖させた、10 容積% (最終容積) の Z. モビリス (Z. mobilis) ZW1-XA111 (一般方法を参照されたい) 培養物 (F1360) を約 1 の開始 OD_{600} (33℃インキュベーション実験用) で接種し、あるいは 10 g / L の B B L 酵母抽出物、2 g / L の KH_2PO_4 、1 g / L の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、60 g / L のグルコース、33℃で pH 5.5 中で約 2.5 の OD_{600} に増殖させた、10 容積% (最終容積) Z. モビリス (Z. mobilis) AR37-31 を約 0.3 の開始 OD_{600} (47℃インキュベーション実験用) で接種した。エタノール生成量は、HPLC によって培養物中でモニターした (一般方法を参照されたい)。

【0138】

図 6 は、SCD を添加して 33℃で 19.5 および 23 時間インキュベーションした後接種された MRM3G6 培地中では、エタノール生成の完全な阻害がもたらされた一方で、未添加対照は、20 時間目に 30 g / L 以上を含有したことを示す。

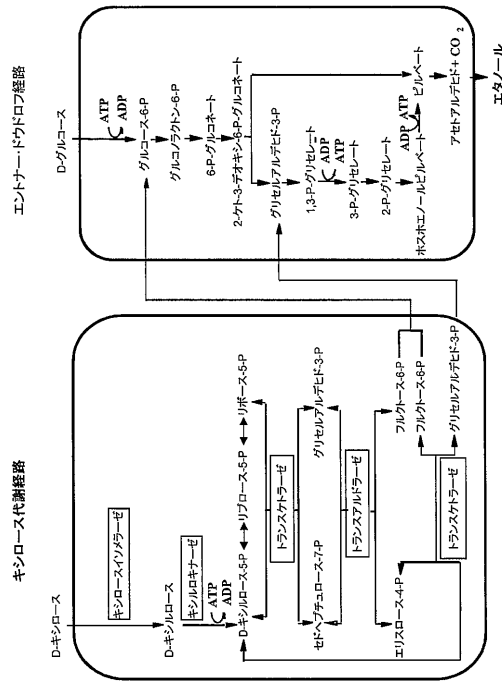
【0139】

図 7 A は、47℃では、Y018 トウモロコシ茎葉加水分解物中で、SCD を添加して 8 時間のインキュベーション後の接種が、未添加対照中、および接種に先だつより長いインキュベーション時間のサンプル中の生成レベルと同様のエタノール生成レベルを可能にしたことを示し、培地が Z. モビリス (Z. mobilis) 発酵に許容されるようにするのに、47℃で 8 時間が十分な遅延時間であったことが示唆される。MRM3G6 培地を使用する場合、SCD を添加して 47℃で 16 時間のインキュベーション後の接種が、エタノール生成レベルを未添加対照中および接種に先だつより長いインキュベーション時間のサンプル中の生成レベルと同様にするのに十分であった (図 7 B)。8 時間および 0 時間 (即時投入) のインキュベーション後に接種したサンプルは、いかなるエタノールも含有しなかった。

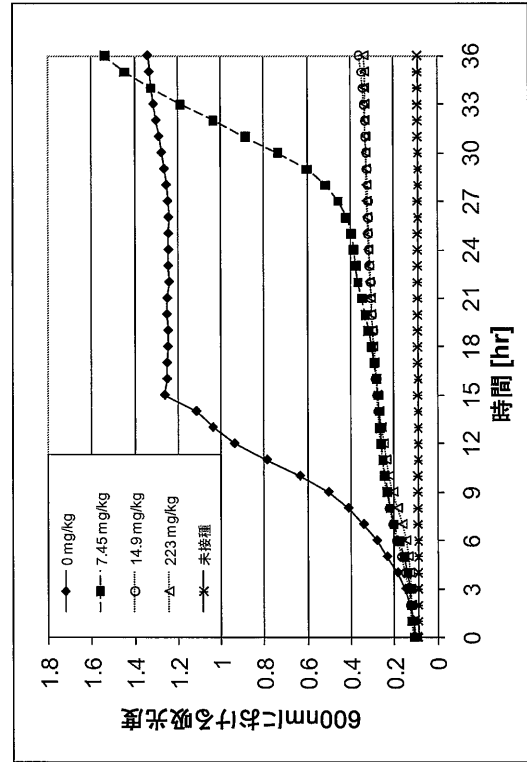
10

20

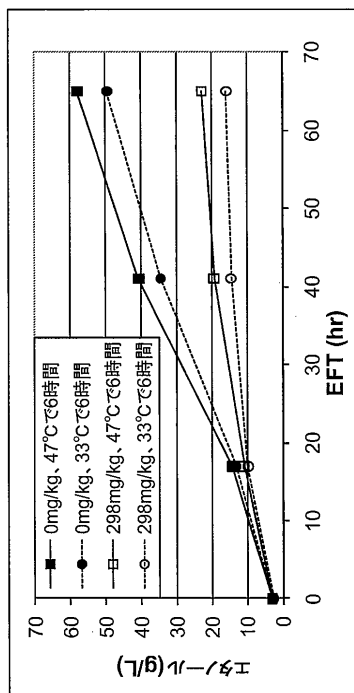
【図 1】



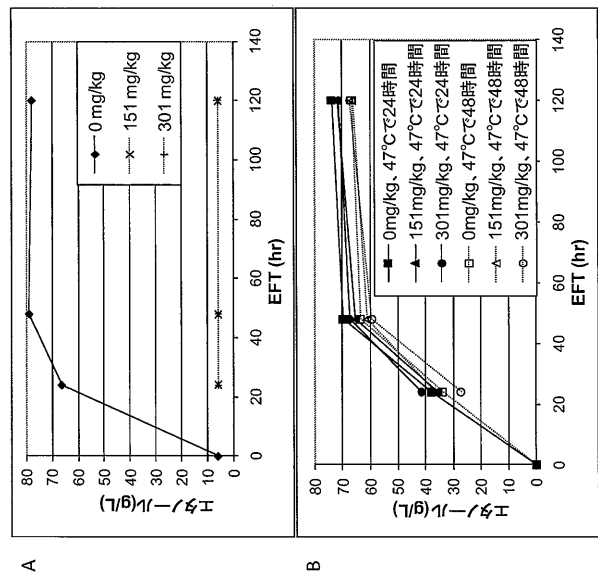
【図 2】



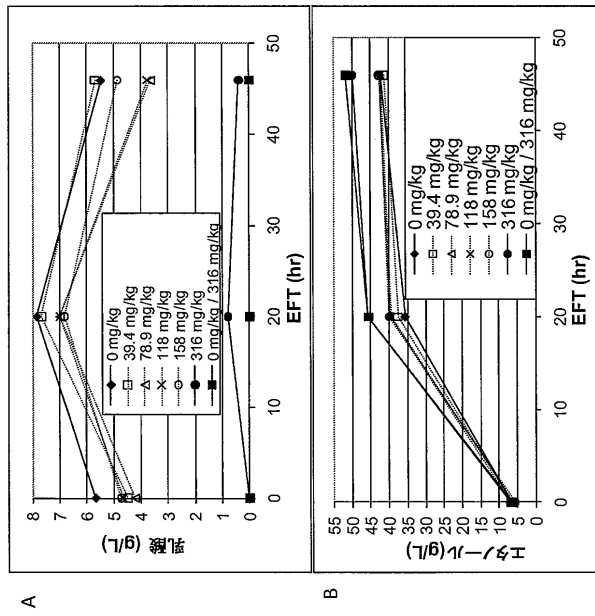
【図 3】



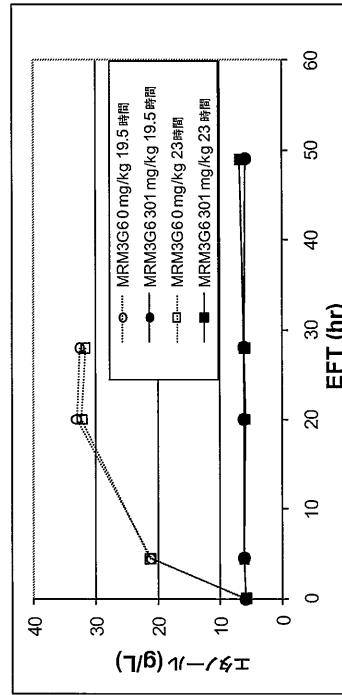
【図 4】



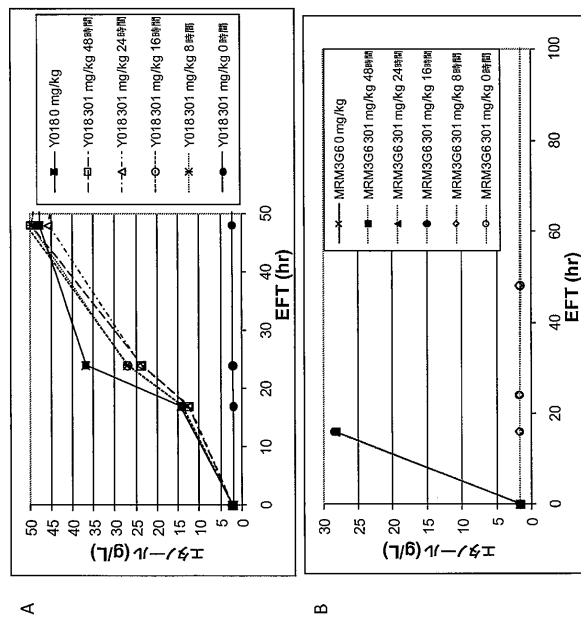
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/074235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12P7/06 C12N1/22 C08H8/00
ADD.

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 C08H

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, 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.
Y	RENU AGRAWAL ET AL: "Role of antimicrobial agents in simultaneous saccharification and fermentation of paddy malt mash to ethanol by mixed cultures of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PH03 and <i>Zymomonas mobilis</i> ZM4", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 18, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 673-678, XP002711139, ISSN: 1573-6776, DOI: 10.1007/BF00130764 [retrieved on 2013-08-09] abstract page 674, paragraph 1 - page 678, paragraph 1; tables 1,2 ----- -/-	1-3

☒ 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 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

5 March 2014

Date of mailing of the international search report

12/03/2014

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

Mateo Rosell, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/074235

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MING W LAU ET AL: "Comparing the fermentation performance of Escherichia coli K011, Saccharomyces cerevisiae 424(LNH-ST) and Zymomonas mobilis AX101 for cellulosic ethanol production", INTERNET CITATION, 27 May 2010 (2010-05-27), pages 1-10, XP002657983, Retrieved from the Internet: URL:http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/11 [retrieved on 2011-07-27] abstract page 3, left-hand column, paragraph 1; table 1 -----	1-3
Y	ARUNACHALAM MUTHAIYAN ET AL: "Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations", PROGRESS IN ENERGY AND COMBUSTION SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 37, no. 3 1 June 2011 (2011-06-01), pages 351-370, XP002711344, ISSN: 0360-1285, DOI: 10.1016/J.PECS.2010.06.005 Retrieved from the Internet: URL:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360128510000547 [retrieved on 2010-07-21] page 353, left-hand column, paragraph 2 - page 358, right-hand column, paragraph 4 page 361, left-hand column, last paragraph - page 364, right-hand column, paragraph 4 -----	1-3
Y	WO 2007/149450 A2 (DU PONT [US]; SUMNER ERIC GUY [US]; OKULL DERRICK [US]; DISCHERT DWAYN) 27 December 2007 (2007-12-27) cited in the application page 3, lines 10-30; example 2 ----- -/--	1-3, 22, 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/074235

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	"Association of Cereal Research Review and Summaries 2012; 8. European Technology Meeting Production and Certification Bioethanol production in Europe", European Bioethanol Technology Meeting in Detmold, 17 April 2012 (2012-04-17), pages 1-15, XP055105211, Retrieved from the Internet: URL: http://www.agfdt.de/de/veranstaltungen-rueckblick-leser/items/id-9-european-bioethanol-technology-meeting-2013.html?file=tl_files/dateien-nachrichten/2012-maerz/bioethanol-2012/Review_Summaries_Bioethanol_Technology_Meeting_2012.pdf [retrieved on 2014-03-03] "Fermasure, use of stabilized chlorine dioxide to control contamination in bioethanol production" M. Metayer; page 10	1-3
Y	----- US 2011/207192 A1 (PIGEAU GARY M [CA] ET AL) 25 August 2011 (2011-08-25) page 2, paragraph [0018] - page 3, paragraph [0021] page 4, paragraph [0039] - [0042] -----	22,23
Y	US 6 419 788 B1 (WINGERSON RICHARD C [US]) 16 July 2002 (2002-07-16) column 1, lines 5-10 column 4, line 55 - column 5, line 11; claim 7 -----	22,23
A	US 4 985 355 A (MILLICHIP ROBYN J [US]) 15 January 1991 (1991-01-15) examples 1-4 -----	22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/074235

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007149450 A2	27-12-2007	AU 2007261463 A1 EP 2192840 A2 ES 2401030 T3 WO 2007149450 A2	27-12-2007 09-06-2010 16-04-2013 27-12-2007
US 2011207192 A1	25-08-2011	CN 102791867 A DE 112011100663 T5 US 2011207192 A1 WO 2011103671 A1	21-11-2012 27-12-2012 25-08-2011 01-09-2011
US 6419788 B1	16-07-2002	AT 430832 T AU 8542401 A BR 0113278 A CA 2418726 A1 EP 1328679 A1 US 6419788 B1 US 2002148575 A1 WO 0214598 A1	15-05-2009 25-02-2002 08-07-2003 21-02-2002 23-07-2003 16-07-2002 17-10-2002 21-02-2002
US 4985355 A	15-01-1991	NONE	

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, 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, LT, 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 マリア・シー・レアナ

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 7 0 7. ホッケシン. クローバードライブ 2 0 2

(72)発明者 ブライアン・ジー・ルフューブル

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 3. ウィルミントン. タッカウェイドライブ 1 2 8

Fターム(参考) 4B050 CC04 CC07 DD02 KK01 KK15 LL05

4B064 AC03 AF01 CA02 CC03 DA16 DA20

4B065 AA01X AC14 BB02 BB14 BB37 BC01 CA06 CA55 CA60