

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年12月15日(15.12.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/199858 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 7/44 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/067231
- (22) 国際出願日: 2016年6月9日(09.06.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-117345 2015年6月10日(10.06.2015) JP
- (71) 出願人: 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)
[JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 磯部 匡平(ISOBE, Kyohei); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 河村 健司(KAWAMURA, Kenji); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 伊藤 正照(ITO, Masateru); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 勝成(YAMADA, Katsushige); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人谷川国際特許事務所(TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒
- 1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目7番10号山京別館801 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING α -HYDROMUCONIC ACID

(54) 発明の名称: α -ヒドロムコン酸の製造方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing α -hydromuconic acid by employing a metabolic pathway of a microorganism. This method for producing α -hydromuconic acid involves a step for culturing at least one type of microorganism capable of producing α -hydromuconic acid, the microorganism being selected from the group consisting of microorganisms of the genus Escherichia, microorganisms of the genus Pseudomonas, microorganisms of the genus Hafnia, microorganisms of the genus Bacillus, microorganisms of the genus Cupriavidus, microorganisms of the genus Acinetobacter, microorganisms of the genus Alcaligenes, microorganisms of the genus Delftia, and microorganisms of the genus Shimwellia.

(57) 要約: 微生物の代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造する方法が開示されている。 α -ヒドロムコン酸の製造方法は、Escherichia属微生物、Pseudomonas属微生物、Hafnia属微生物、Bacillus属微生物、Cupriavidus属微生物、Acinetobacter属微生物、Alcaligenes属微生物、Delftia属微生物、Shimwellia属微生物からなる群から選択される α -ヒドロムコン酸の生産能を有する少なくとも1種の微生物を培養する工程を含む。



WO 2016/199858 A1

明 細 書

発明の名称： α -ヒドロムコン酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、微生物を利用した α -ヒドロムコン酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] α -ヒドロムコン酸（IUPAC名：(E)-hex-2-enedioic acid）は、炭素数6、分子量144.13のジカルボン酸である。 α -ヒドロムコン酸は多価アルコールと重合することでポリエステルとして、また多価アミンと重合することでポリアミドの原料として用いることができる。また、 α -ヒドロムコン酸の末端にアンモニアを付加してラクタム化することで、単独でもポリアミドの原料になり得る。

[0003] 微生物を利用した α -ヒドロムコン酸の製造方法に関連する報告としては、スクシニル-CoAとアセチル-CoAを出発原料とした天然には存在しない微生物によるアジピン酸を製造する方法の過程で、アジピン酸生合成経路の中間体として3-ヒドロキシアジピン酸（3-ヒドロキシアジペート）が酵素反応によって脱水し（3-ヒドロキシアジピン酸デヒドラターゼによる脱水反応）、 α -ヒドロムコン酸（ヘキサ-2-エンジオエート）が生成しうるとの報告がある（特許文献1、図3）。

[0004] また、*Desulfovirga adipica*がアジピン酸を分解し増殖するのに伴い、17日間で0.86mg/Lの α -ヒドロムコン酸が生成する例が報告されている（非特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO2009/151728

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Int J Syst Evol Microbiol. 2000 Mar; 50 Pt 2: 639-44.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1には、アジピン酸を製造できるように人為的に改良した微生物において、製造対象であるアジピン酸の中間体として3-ヒドロキシアジピン酸(3-ヒドロキシアジペート)が酵素反応によって脱水し、 α -ヒドロムコン酸(ヘキサ-2-エンジオエート)が生成しうることについての記載はあるが、一方で、3-ヒドロキシアジピン酸から α -ヒドロムコン酸への3-ヒドロキシアジピン酸デヒドラターゼによる脱水反応の直接的証拠は一切確認されていないとの記載もあり、実際に微生物の代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸が製造できるかどうかの検証はなされていない。さらに、当業者にとって3-ヒドロキシアジピン酸デヒドラターゼなる酵素は周知ではなく、特許文献1の記載に従ってスクシニル-COAとアセチル-COAを出発原料として α -ヒドロムコン酸を製造することはできなかった。

[0008] また、非特許文献1には自然界に存在する微生物によって α -ヒドロムコン酸が生成することの報告はあるものの、その生産性は著しく低いものであり、 α -ヒドロムコン酸の製造方法であるとは言えるものではない。

[0009] このように、実際のところ微生物の代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造する方法は存在していなかった。そこで本発明では、微生物の代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造することができる微生物が自然界に存在することを見出し、以下の本発明に到達した。

[0011] すなわち本発明は、次の(1)～(13)を提供する。

(1) *Escherichia*属微生物、*Pseudomonas*属微生物、*Hafnia*属微生物、*Bacillus*属微生物、*Cupriavidus*属微生物、*Acinetobacter*属微生物、*Alcaligen*

es属微生物、Delftia属微生物、Shimwellia属微生物からなる群から選択される α -ヒドロムコン酸の生産能を有する少なくとも1種の微生物を培養する工程を含む、 α -ヒドロムコン酸の製造方法。

(2) 前記微生物が、Cupriavidus属微生物、Acinetobacter属微生物、Delftia属微生物、Shimwellia属微生物、Escherichia属微生物およびPseudomonas属微生物からなる群から選択される少なくとも1種である(1)記載の方法。

(3) 前記Escherichia属微生物が、Escherichia fergusoniiまたはEscherichia coliである、(1)又は(2)記載の方法。

(4) 前記Pseudomonas属微生物が、Pseudomonas fluorescens、Pseudomonas putida、Pseudomonas azotoformansまたはPseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciensである、(1)又は(2)記載の方法。

(5) 前記Hafnia属微生物が、Hafnia alveiである、(1)記載の方法。

(6) 前記Bacillus属微生物が、Bacillus badiusである、(1)記載の方法。

(7) 前記Cupriavidus属微生物が、Cupriavidus metallidurans、Cupriavidus numazuensisまたはCupriavidus oxalaticusである、(1)又は(2)記載の製造方法。

(8) 前記Acinetobacter属微生物が、Acinetobacter baylyiまたはAcinetobacter radiorensistensである、(1)又は(2)記載の方法。

(9) 前記Alcaligenes属微生物が、Alcaligenes faecalisである、(1)記載の方法。

(10) 前記 *Delftia* 属微生物が、*Delftia acidovorans* である、(1) 記載の方法。

(11) 前記 *Shimwellia* 属微生物が、*Shimwellia blattae* である、(1) 又は (2) 記載の方法。

(12) 前記微生物を培養する培地が、糖類、コハク酸、2-オキソグルタル酸およびグリセロールからなる群から選択される少なくとも1種の炭素源を含む、(1) ~ (11) のいずれか1項に記載の方法。

(13) 前記微生物を、フェルラ酸、p-クマル酸、安息香酸、*cis, cis*-ムコン酸、プロトカテク酸およびカテコールからなる群から選択される少なくとも1種の誘導物質を含む培地で培養する、(1) ~ (12) のいずれか1項に記載の方法。

発明の効果

[0012] 本発明により、微生物の代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を得ることができる。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の α -ヒドロムコン酸の製造方法は、 α -ヒドロムコン酸の生産能を有する微生物を培養する工程を含むことを特徴とする。より詳しくは、 α -ヒドロムコン酸の生産能を有する微生物を培養することによって、該微生物の代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造することを特徴とする。

[0014] 本発明の方法で用いられる α -ヒドロムコン酸の生産能を有する微生物としては、以下の微生物から選択される。

- ・ *Cupriavidus* 属微生物
- ・ *Acinetobacter* 属微生物
- ・ *Delftia* 属微生物
- ・ *Shimwellia* 属微生物
- ・ *Escherichia* 属微生物
- ・ *Pseudomonas* 属微生物
- ・ *Alcaligenes* 属微生物

- ・ *Bacillus* 属微生物
- ・ *Hafnia* 属微生物。

[0015] α -ヒドロムコン酸の生産能を有する *Cupriavidus* 属微生物の具体例としては、*Cupriavidus metallidurans*, *Cupriavidus numazuensis*, *Cupriavidus oxalaticus* が挙げられる。*Capriavidus* 属微生物が代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造しうるメカニズムについては明らかではないが、*Capriavidus* 属はベンゼン、トルエン、キシレン等の石油製品由来の炭化水素類を分解することや（特開 2007-252285 号公報参照）、金属耐性を有することが知られていることもあり（*Antonie van Leeuwenhoek*, 2009, 96, 2, 115-139）、*Capriavidus* 属微生物は、物質生産に一般的に利用される微生物（例えば、*Corynebacterium* 属微生物）とは異なった複雑な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき α -ヒドロムコン酸を生成することが推定される。

[0016] α -ヒドロムコン酸の生産能を有する *Acinetobacter* 属微生物の具体例としては、*Acinetobacter baylyi* が挙げられる。*Acinetobacter* 属微生物が代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造しうるメカニズムについても明らかではないが、*Acinetobacter* 属はベンゼンや燃料油、潤滑油などの鉱物油類を分解し環境浄化に用いられることが知られていることもあり（特開 2013-123418 号公報参照）、*Capriavidus* 属と同様、*Acinetobacter* 属微生物も、物質生産に一般的に利用される微生物（例えば、*Corynebacterium* 属微生物）とは異なった複雑な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき α -ヒドロムコン酸を生成することが推定される。

[0017] α -ヒドロムコン酸の生産能を有する *Delftia* 属微生物の具体例としては、*Delftia acidovorans* が挙げられる。*Delftia* 属微生物が代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造しうるメカ

ニズムについても明らかではないが、*Delftia*属はベンゼンや燃料油、潤滑油などの鉱物油類を分解し環境浄化に用いられることや（特開2013-123418号公報参照）、金属耐性が知られていることもあり（*Journal of Water Resource and Protection*, 2012, 4, 4, 207-216）、*Capriavidus*属や*Acinetobacter*属と同様、*Delftia*属微生物も、物質生産に一般的に利用される微生物（例えば、*Corynebacterium*属微生物）とは異なった複雑な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき α -ヒドロムコン酸を生成することが推定される。

[0018] α -ヒドロムコン酸の生産能を有する*Shimwellia*属微生物の具体例としては、*Shimwellia blattae*が挙げられる。*Shimwellia*属微生物が代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造しうるメカニズムについても明らかではないが、*Shimwellia*属は放射性ラドン濃度の高い場所でも生息していることもあり（*Radiation Protection and Environment*, 2014, 37, 1, 21-24参照）、*Capriavidus*属、*Acinetobacter*属、*Delftia*属と同様、*Shimwellia*属微生物も、物質生産に一般的に利用される微生物（例えば、*Corynebacterium*属微生物）とは異なった特殊な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき α -ヒドロムコン酸を生成することが推定される。

[0019] α -ヒドロムコン酸の生産能を有する*Escherichia*属微生物の具体例としては、*Escherichia fergusonii*、*Escherichia coli*が挙げられる。*Escherichia*属微生物が代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造しうるメカニズムについても明らかではないが、*Escherichia*属は炭化水素分解能や重金属耐性を有することが知られていることもあり（*Bioresource Technology*, 2011, 102, 19, 9291-9295参照）、*Capriavidus*属、*Acinetobacter*属、*Delf*

*tia*属、*Shimwellia*属と同様、*Escherichia*属微生物も、物質生産に一般的に利用される微生物（例えば、*コリネバクテリウム*属微生物）とは異なった複雑な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき α -ヒドロムコン酸を生成することが推定される。

[0020] α -ヒドロムコン酸の生産能を有する*Pseudomonas*属微生物の具体例としては、*Pseudomonas putida*が挙げられる。*Pseudomonas*属微生物が代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造しうるメカニズムについても明らかではないが、*Pseudomonas*属は芳香族炭化水素系溶剤、石油系炭化水素系溶剤、エステル系溶剤、アルコール系溶剤などを分解することが知られていることもあり（特開2010-130950号公報参照）、*Capriavidus*属、*Acinetobacter*属、*Delftia*属、*Shimwellia*属、*Escherichia*属と同様、*Pseudomonas*属微生物も、物質生産に一般的に利用される微生物（例えば、*コリネバクテリウム*属微生物）とは異なった複雑な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき α -ヒドロムコン酸を生成することが推定される。

[0021] α -ヒドロムコン酸の生産能を有する*Alcaligenes*属微生物の具体例としては、*Alcaligenes faecalis*が挙げられる。*Alcaligenes*属微生物が代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造しうるメカニズムについても明らかではないが、*Alcaligenes*属はフェノール類化合物含有排水の浄化に利用されていることもあり（特開2016-41392参照）、物質生産に一般的に利用される微生物とは異なった複雑な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき α -ヒドロムコン酸を生成することが推定される。

[0022] α -ヒドロムコン酸の生産能を有する*Bacillus*属微生物の具体例としては、*Bacillus badius*、*Bacillus magisterium*、*Bacillus roseus*が挙げられる。*Bacillus*属微生物が代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造しうるメカ

ニズムについても明らかではないが、*Bacillus*属は廃水を活性汚泥で生物処理する廃水処理システムに利用されていることもあり（特開2006-305455参照）、物質生産に一般的に利用される微生物とは異なった複雑な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき α -ヒドロムコン酸を生成することが推定される。

[0023] α -ヒドロムコン酸の生産能を有する*Hafnia*属微生物の具体例としては、*Hafnia alvei*が挙げられる。*Hafnia*属微生物が代謝経路を利用して α -ヒドロムコン酸を製造しうるメカニズムについても明らかではないが、*Hafnia*属は廃水に含まれるクロム酸に耐性を持ち、分解することが知られていることもあり（*J. bio-sci.* 17: 71-76, 2009参照）、物質生産に一般的に利用される微生物とは異なった複雑な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき α -ヒドロムコン酸を生成することが推定される。

[0024] 前記微生物は、いずれも自然界に存在する微生物として公知のものであり、土壌等の自然環境から単離することができる。また、ATCC等の微生物分与機関から購入することもできる。

[0025] 前記微生物は、 α -ヒドロムコン酸を生産する限り、公知の手法にしたがって遺伝子を組換えたものであってもよく、また、人為的変異手段により変異させたものであってもよい。

[0026] 前記微生物が α -ヒドロムコン酸の生産能を有することの確認は、培養液の上清を適当な分析手法、例えば高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）、高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）、ガスクロマトグラフィー（GC）、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）などを用いて培養液上清に含まれる α -ヒドロムコン酸を検出することで確認することができる。そして本発明では、20時間から48時間培養して得られる培養液上清中に1.0mg/L以上の α -ヒドロムコン酸を生産できる微生物を、 α -ヒドロムコン酸の生産能を有する微生物として使用することが好ましい

- 。
- [0027] 本発明の方法では、上記した各微生物を、 α -ヒドロムコン酸が生産される条件下で培養する。本発明では、前記微生物を、用いる微生物に好適な培地、例えば、通常の微生物が代謝し得る炭素源を含有する培地、好ましくは液体培地中において培養する。ここで、本発明における「代謝」とは、微生物が細胞外から取り入れた、あるいは細胞内で別の化学物質より生じたある化学物質が、酵素反応により別の化学物質へと変換されることを指す。培養により微生物を増殖させる場合には、培養する微生物が同化し得る炭素源を培地が含むことが好ましい。
- [0028] 使用される微生物が代謝しうる炭素源の他には、代謝（好ましくは同化）し得る窒素源、無機塩および必要に応じてアミノ酸やビタミンなどの有機微量栄養素を程よく含有した培地を用いる。上記栄養源を含有していれば天然培地、合成培地のいずれでも利用できる。
- [0029] 前記微生物が代謝しうる炭素源としては、糖類を好ましく用いることができる。また、糖以外にも、前記微生物が単一炭素源として生育に利用可能なものであれば好ましく用いることができる。具体例としては、グルコース、シュクロース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース等の単糖類、これら単糖類が結合した二糖類や、多糖類、これら糖類を含有する澱粉糖化液、糖蜜、セルロース含有バイオマス糖化液、更には酢酸、コハク酸、乳酸、フマル酸、クエン酸、プロピオン酸、リンゴ酸、マロン酸、アジピン酸、2-オキソグルタル酸、ピルビン酸等の有機酸、メタノール、エタノール、プロパノールなどの一価アルコール類、およびグリセリン、エチレングリコール、プロパンジオールなどの多価アルコール類、炭化水素、脂肪酸、油脂などが挙げられる。上記に挙げた炭素源は、一種類のみ用いてもよいし、組み合わせて用いてもよい。具体的には、前記微生物は、これら炭素源の中でも糖類、コハク酸、2-オキソグルタル酸、グリセロールからなる群より選択される1種または2種以上を代謝することで効率よく α -ヒドロムコン酸を製造することができる。培地中の糖類の濃度は、

特に限定されず、培養する微生物の種類や糖類の種類等に応じて適宜設定することができるが、通常、5 g/L～300 g/L程度である。

[0030] 前記微生物の培養に用いる同化し得る窒素源としては、例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンステープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用される。培地中の窒素源の濃度は、特に限定されず、培養する微生物の種類や窒素源の種類等に応じて適宜設定することができるが、通常、0.1 g/L～50 g/L程度である。

[0031] 前記微生物の培養に用いる無機塩類としては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩およびマンガン塩等を適宜添加使用することができる。

[0032] α -ヒドロムコン酸を製造するための前記微生物の培養条件は、前記成分組成の培地、培養温度、攪拌速度、pH、通気量、植菌量などを、使用する生産菌の種類および外部条件などに応じて、適宜調節あるいは選択して設定することができる。液体培養において発泡がある場合には、鉱油、シリコーン油および界面活性剤などの消泡剤を適宜培地に配合することができる。これらの培養条件は、各微生物について公知であり、下記実施例にも具体的に記載されている。

[0033] 上記に示した培地および培養条件で、前記微生物を用いた培養により α -ヒドロムコン酸を製造することができるが、 α -ヒドロムコン酸を製造するために必要な代謝経路を活性化した状態で前記微生物を培養することで、より効率的に α -ヒドロムコン酸を製造することができる。前記代謝経路を活性化する方法は特に限定されないが、例えば、代謝経路を活性化する物質（以下、誘導物質ともいう。）を含む培地で前記微生物を培養することで α -ヒドロムコン酸を製造するための代謝経路中の酵素遺伝子（群）の発現を誘導する方法、遺伝子改変技術により酵素遺伝子（群）のコーディング領域お

よび／またはその周辺の機能性領域を改変する方法、酵素遺伝子（群）のコピー数を増加させる方法、副生成物の生合成経路中の酵素遺伝子機能を破壊する方法などが挙げられるが、誘導物質により α -ヒドロムコン酸を製造するための代謝経路中の酵素遺伝子（群）の発現を誘導する方法が好ましい。

[0034] 誘導物質としては、 α -ヒドロムコン酸の製造に必要な代謝経路が活性化される物質であれば特に限定されないが、例えば、通常3-オキソアジピン-CoAを中間体としてより炭素数の少ない化合物へと代謝される、芳香族化合物あるいは炭素数6以上、好ましくは、炭素数6以上、30以下の脂肪族化合物を用いることができる。炭素数6以上の脂肪族化合物として好ましくは、炭素数6以上、好ましくは炭素数6以上、30以下のジカルボン酸を用いることができる。このような化合物の例は、例えばKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) などのデータベースを用いて知ることができるが、具体的には、アジピン酸、安息香酸、cis, cis-ムコン酸、テレフタル酸、プロトカテク酸、カテコール、バニリン、クマル酸、フェルラ酸などが挙げられ、好ましい例としては、アジピン酸、フェルラ酸、p-クマル酸が挙げられる。

[0035] 上記の誘導物質は α -ヒドロムコン酸製造に用いる前記微生物に応じて単独で使用してもよいし、2種以上を組み合わせ使用してもよい。また、上記誘導物質は α -ヒドロムコン酸製造の前段階として前記微生物を増殖させるために行う培養（前培養）に用いる培地に含まれていてもよいし、 α -ヒドロムコン酸製造に用いる培地に含まれていてもよい。1種又は2種以上の誘導物質が培地中に含まれる場合、誘導物質の濃度（複数の誘導物質が含まれる場合には、それらの合計濃度）は、特に限定されず、微生物の種類や誘導物質の種類等に応じて適宜設定されるが、通常、1 mg/L ~ 10 g/L、好ましくは、5 mg/L ~ 1 g/Lである。

[0036] 前記微生物の培養物中に、 α -ヒドロムコン酸が回収可能な量まで生産された後、生産された α -ヒドロムコン酸を回収することができる。生産された α -ヒドロムコン酸の回収、例えば単離は、蓄積量が適度に高まった時点

で培養を停止し、その培養物から、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行うことができる。具体的には、例えば、遠心分離、ろ過などにより菌体を分離したのち、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭処理、結晶化、膜分離などにより、 α -ヒドロムコン酸を培養物から単離することができる。より具体的には、好ましい回収方法として、培養物を逆浸透膜やエバポレーターなどを用いた濃縮操作により水を除去して α -ヒドロムコン酸の濃度を高めた後、冷却結晶化や断熱結晶化により α -ヒドロムコン酸および／または α -ヒドロムコン酸の塩の結晶を析出させ、遠心分離やろ過などにより α -ヒドロムコン酸および／または α -ヒドロムコン酸の塩の結晶を得る方法、培養物にアルコールを添加して α -ヒドロムコン酸エステルとした後、蒸留操作により α -ヒドロムコン酸エステルを回収後、加水分解により α -ヒドロムコン酸を得る方法等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

実施例

[0037] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0038] 参考例1 α -ヒドロムコン酸の調製

後述の実施例の分析に用いた α -ヒドロムコン酸は化学合成により準備した。まず、コハク酸モノメチルエステル13.2g(0.1mol)(和光純薬株式会社製)に超脱水テトラヒドロフラン1.5L(和光純薬株式会社製)を加え、攪拌しながらカルボニルジイミダゾール16.2g(0.1mol)(和光純薬株式会社製)を添加し、窒素雰囲気下、1時間室温で攪拌した。この懸濁液にマロン酸モノメチルエステルカリウム塩15.6g(0.1mol)および塩化マグネシウム9.5g(0.1mol)を添加し、窒素雰囲気下1時間室温で攪拌した後、40℃で12時間攪拌した。反応終了後、1mol/L塩酸を0.05L加え、酢酸エチルにより抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=1:5)で分離精製することで、純粋な3-オキソヘキサジカルボン酸ジメチルエステル

13. 1 gを得た。収率70%。

[0039] 得られた3-オキソヘキサンジカルボン酸ジメチルエステル10 g (0.05 mol) にメタノール0.1 L (国産化学株式会社製) を加え、攪拌しながら水素化ホウ素ナトリウム2.0 g (0.05 mol) (和光純薬株式会社製) を添加し、室温で1時間攪拌した。次いで、5 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液0.02 Lを添加し、室温で2時間攪拌した。反応終了後、5 mol/Lの塩酸でpH1に調整し、ロータリーエバポレーターで濃縮後、水で再結晶することで、純粋な α -ヒドロムコン酸7.2 gを得た。収率95%。

[0040] α -ヒドロムコン酸の¹H-NMRスペクトル:

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) : δ 2.48 (m, 4H)、 δ 5.84 (d, 1H)、 δ 6.96 (m, 1H)。

[0041] 実施例1 コハク酸を用いた α -ヒドロムコン酸生産試験

微生物培養

表1に示した微生物(いずれの微生物も微生物分与機関より購入。購入先は株名に記載。)の α -ヒドロムコン酸の生産能を調べた。トリプトン10 g/L、酵母エキス5 g/L、塩化ナトリウム5 g/L、アジピン酸0.5 g/L、pH7からなる培地5 mLに、それぞれの微生物を一白金耳植菌し、十分懸濁するまで30°Cで振とう培養した(前培養)。その培養液に10 mLの0.9%塩化ナトリウムを加え、菌体を遠心分離したのち上清を完全に取り除くことで菌体を洗浄する操作を3回行ったのち、菌体を1 mLの0.9%塩化ナトリウムに懸濁した。懸濁液0.5 mLを、コハク酸を炭素源とする以下に示した組成の培地5 mLに添加し、30°Cで20時間振とう培養した(本培養)。本培養液より菌体を遠心分離した上清を、LC-MS/MSにて分析した。

[0042] 本培養の培地組成:

コハク酸20 g/L

硫酸アンモニウム2 g/L

リン酸カリウム 100 mM
硫酸マグネシウム 0.05 g/L
硫酸鉄 0.125 mg/L
硫酸マンガン 5.4 mg/L
塩化カルシウム 0.66 mg/L
酵母エキス 0.25 g/L
pH 6.5。

[0043] α -ヒドロムコン酸の定量分析

LC-MS/MSによる α -ヒドロムコン酸の定量分析は以下の条件で行った。

・HPLC: 1290 Infinity (Agilent Technologies社製)

カラム: Synergi hydro-RP (Phenomenex社製)

、長さ100mm、内径3mm、粒径2.5 μ m

移動相: 0.1%ギ酸水溶液/メタノール=70/30

流速: 0.3 mL/分

カラム温度: 40°C

LC検出器: DAD (210nm)

・MS/MS: Triple-Quad LC/MS (Agilent Technologies社製)

イオン化法: ESI ネガティブモード。

[0044] 培養上清中に蓄積した α -ヒドロムコン酸の濃度は表1のとおりで、いずれの微生物も α -ヒドロムコン酸の生産能を有することを確認することができた。

[0045]

[表1]

供試微生物	α -ヒドロムコン酸 (mg/L)
Cupriavidus metallidurans NBRC101272	1.1
Cupriavidus numazuensis NBRC100056	1.1
Cupriavidus oxalaticus NBRC13593	1.0
Cupriavidus sp. NBRC102508	2.4
Acinetobacter baylyi ATCC33305	1.3
Acinetobacter sp. NBRC100985	2.9
Delftia acidovorans ATCC11299	1.0
Shimwellia blattae NBRC105725	1.2
Escherichia fergusonii NBRC102419	1.4
Escherichia coli NBRC12713	1.5
Pseudomonas sp. NBRC12691	1.0
Pseudomonas putida NBRC12996	2.3
Pseudomonas sp. ATCC15915	1.8

[0046] 実施例2 α -ヒドロムコン酸の製造例

実施例1で α -ヒドロムコン酸の生産能を有する微生物であることが確認できたCupriavidus metallidurans NBRC101272を、LB培地5mLに一白金耳植菌し、十分懸濁するまで30℃で振とう培養した（前々培養）。前々培養液2mLをトリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L、アジピン酸0.5g/L、pH7からなる培地100mLに添加し、十分懸濁するまで30℃で振とう培養した（前培養）。前培養液を200mLの0.9%塩化ナトリウムで実施例1と同様に3回洗浄したのち、菌体を10mLの0.9%塩化ナトリウムに懸濁した。懸濁液10mLを実施例1と同様のコハク酸を炭素源とする本培養の培地100mLに添加し、30℃で20時間振とう培養した（本培養）。本培養液より菌体を遠心分離した上清を、実施例1と同様にLC-MS/MSにて分析した結果、培養上清中に蓄積した α -ヒドロムコン酸の濃度は13mg/Lであった。

[0047] 次に本培養の上清を減圧濃縮し、 α -ヒドロムコン酸の濃度が120mg/Lの濃縮液を11mL得た。この濃縮液を、分取装置を連結したHPLCに注入し、 α -ヒドロムコン酸の標品と一致する溶出時間の画分を採取した

。この作業を10回繰り返し、培養液中の不純物が除去された α -ヒドロムコン酸水溶液を得た。なお、 α -ヒドロムコン酸の採取に用いた分取HPLCは以下の条件にて行った。

[0048] HPLC : SHIMADZU 20A (株式会社島津製作所製)

カラム : Synergi hydro-RP (Phenomenex社製)
、長さ250mm、内径10mm、粒径4 μ m

移動相 : 5mM ギ酸水溶液 / アセトニトリル = 98 / 2

流速 : 4mL / 分

注入量 : 1mL

カラム温度 : 45 $^{\circ}$ C

検出器 : UV-VIS (210nm)

分取装置 : FC204 (Gilson社製)。

[0049] 続いて α -ヒドロムコン酸水溶液を減圧濃縮し、1.1mgの結晶を得た。結晶を 1 H-NMRで分析した結果、得られた結晶が α -ヒドロムコン酸であることを確認できた。

[0050] 比較例1 α -ヒドロムコン酸の生産能を有さない微生物

表2に示した微生物の α -ヒドロムコン酸の生産能を確認するべく、実施例1と同様の条件で培養し、 α -ヒドロムコン酸の定量分析をした結果、培養上清中に α -ヒドロムコン酸は検出されなかった。

[0051] [表2]

供試微生物	α -ヒドロムコン酸 (mg/L)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	N. D.
<i>Zymomonas mobilis</i> NBRC13756	N. D.

[0052] 比較例2 炭素源を添加しない培養

表1に示した微生物を、コハク酸を含まない組成の培地を用いた他は実施例1と同様の条件で培養し、 α -ヒドロムコン酸の定量分析をした結果、培養上清中に α -ヒドロムコン酸は検出されなかった。このことより実施例1において定量した α -ヒドロムコン酸が、コハク酸が代謝された結果生成し

たものであることを確認した。

[0053] 実施例3 様々な微生物を用いた α -ヒドロムコン酸生産試験

表3に示した微生物（いずれも微生物分与機関より購入。購入先は株名に記載。）を対象に、誘導物質として、前培養培地にフェルラ酸、p-クマル酸、安息香酸、cis, cis-ムコン酸、プロトカテク酸およびカテコールをそれぞれ2.5mMとなるように添加した以外は実施例1と同様の条件で前培養および菌体洗浄を行った。洗浄後の懸濁液0.5mLを以下に示した組成の培地5mLに添加し、30℃で48時間振とう培養した。

[0054] コハク酸10g/L

グルコース10g/L

グリセロール10g/L

硫酸アンモニウム1g/L

リン酸カリウム50mM

硫酸マグネシウム0.025g/L

硫酸鉄0.0625mg/L

硫酸マンガン2.7mg/L

塩化カルシウム0.33mg/L

塩化ナトリウム1.25g/L

Bactoトリプトン2.5g/L

酵母エキス1.25g/L

pH6.5。

[0055] 培養上清中に蓄積した α -ヒドロムコン酸の定量分析を行った結果をそれぞれ表3に示す。これらの結果から、いずれの微生物も α -ヒドロムコン酸の生産能を有することを確認することができた。

[0056]

[表3]

供試微生物	α -ヒドロムコン酸 生産量 (mg/L)
<i>Acinetobacter radioresistens</i> NBRC102413	1. 1
<i>Alcaligenes faecalis</i> NBRC13111	2. 8
<i>Bacillus badius</i> ATCC 14574	1. 1
<i>Escherichia coli</i> NBRC12713	3. 3
<i>Hafnia alvei</i> ATCC 9760	12. 0
<i>Hafnia alvei</i> NBRC3731	14. 8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NBRC3081	2. 4
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC12653	17. 4
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC3738	5. 6
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC17642	6. 1
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC12996	2. 2
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC15070	1. 5
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC15175	4. 0
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC8209	5. 7
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC17472	1. 0
<i>Pseudomonas azotoformans</i> NBRC12693	1. 0
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> NBR C3521	7. 2
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC100650	2. 5

[0057] 実施例4 誘導物質を添加しない α -ヒドロムコン酸生産試験

表4に示した微生物を対象に、実施例3で用いた誘導物質を添加しなかった以外は実施例3と同様の条件で前培養および菌体洗浄を行った。洗浄後の懸濁液0.5 mLを以下に示した組成の培地5 mLに添加し、30°Cで48時間振とう培養した。

[0058] コハク酸10 g/L

グルコース10 g/L

硫酸アンモニウム1 g/L

リン酸カリウム50 mM

硫酸マグネシウム0.025 g/L

硫酸鉄0.0625 mg/L

硫酸マンガン2.7 mg/L

塩化カルシウム0.33 mg/L

塩化ナトリウム 1.25 g/L

Bactoトリプトン 2.5 g/L

酵母エキス 1.25 g/L

pH 6.5。

[0059] 培養上清中の α -ヒドロムコン酸の定量分析をした結果をそれぞれ表4に示す。

これらの結果から、表4に示した微生物は誘導物質を添加せずに前培養を行った場合でも α -ヒドロムコン酸の生産能を有することを確認することができた。

[0060] [表4]

供試微生物	α -ヒドロムコン酸 生産量 (mg/L)
<i>Alcaligenes faecalis</i> NBRC13111	1.3
<i>Escherichia coli</i> NBRC12713	1.2
<i>Hafnia alvei</i> NBRC3731	1.4
<i>Hafnia alvei</i> ATCC9760	2.4
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC12653	1.0
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC3738	1.1
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC15175	1.0
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC8209	1.2
<i>Pseudomonas azotoformans</i> NBRC12996	1.3
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> NBRC3521	1.2

[0061] 実施例5 p-クマル酸あるいはフェルラ酸を誘導物質として用いた α -ヒドロムコン酸生産試験

表5に示した微生物を対象に、実施例3で誘導物質として前培養培地に添加した物質の中から、p-クマル酸あるいはフェルラ酸をそれぞれ0.5 mMとなるように添加した以外は実施例4と同様の条件で前培養および菌体洗浄を行った。洗浄後の懸濁液0.5 mLを以下に示した組成の培地5 mLに添加し、30°Cで48時間振とう培養した。培養上清中の α -ヒドロムコン酸の定量分析をした結果をそれぞれ表5に示す。これらの結果から、p-クマル酸あるいはフェルラ酸のみを誘導物質として前培養培地に添加した場合

でも、添加しなかった場合と比べて、 α -ヒドロムコン酸の生産量が向上することがわかった。

[0062] [表5]

供試微生物	α -ヒドロムコン酸 生産量 (mg/L)		
	非添加	p-クマル 酸添加	フェルラ酸 添加
<i>Alcaligenes faecalis</i> NBRC13111	1.3	1.6	1.7
<i>Escherichia coli</i> NBRC12713	1.2	1.9	2.0
<i>Hafnia alvei</i> NBRC3731	1.4	5.6	2.0
<i>Hafnia alvei</i> ATCC9760	2.4	3.3	3.7
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC12653	1.0	2.1	2.3
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC3738	1.1	1.5	2.3
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC15175	1.0	3.0	3.4
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC8209	1.2	1.9	2.5
<i>Pseudomonas azotoformans</i> NBRC12996	1.3	1.6	1.7
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> NBRC3521	1.2	1.6	1.7

産業上の利用可能性

[0063] 本発明によれば、微生物を利用して α -ヒドロムコン酸を製造することができる。得られた α -ヒドロムコン酸は各種ポリマー原料として利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] *Escherichia*属微生物、*Pseudomonas*属微生物、*Hafnia*属微生物、*Bacillus*属微生物、*Cupriavidus*属微生物、*Acinetobacter*属微生物、*Alcaligenes*属微生物、*Delftia*属微生物、*Shimwellia*属微生物からなる群から選択される α -ヒドロムコン酸の生産能を有する少なくとも1種の微生物を培養する工程を含む、 α -ヒドロムコン酸の製造方法。
- [請求項2] 前記微生物が、*Cupriavidus*属微生物、*Acinetobacter*属微生物、*Delftia*属微生物、*Shimwellia*属微生物、*Escherichia*属微生物および*Pseudomonas*属微生物からなる群から選択される少なくとも1種である請求項1記載の方法。
- [請求項3] 前記*Escherichia*属微生物が、*Escherichia fergusonii*または*Escherichia coli*である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 前記*Pseudomonas*属微生物が、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas azotoformans*または*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項5] 前記*Hafnia*属微生物が、*Hafnia alvei*である、請求項1記載の方法。
- [請求項6] 前記*Bacillus*属微生物が、*Bacillus badius*である、請求項1記載の方法。
- [請求項7] 前記*Cupriavidus*属微生物が、*Cupriavidus metallidurans*、*Cupriavidus numazuensis*または*Cupriavidus oxalaticu*

sである、請求項1又は2記載の製造方法。

[請求項8] 前記 *Acinetobacter* 属微生物が、*Acinetobacter baylyi* または *Acinetobacter radiosistens* である、請求項1又は2記載の方法。

[請求項9] 前記 *Alcaligenes* 属微生物が、*Alcaligenes faecalis* である、請求項1記載の方法。

[請求項10] 前記 *Delftia* 属微生物が、*Delftia acidovorans* である、請求項1記載の方法。

[請求項11] 前記 *Shimwellia* 属微生物が、*Shimwellia blattae* である、請求項1又は2記載の方法。

[請求項12] 前記微生物を培養する培地が、糖類、コハク酸、2-オキソグルタル酸およびグリセロールからなる群から選択される少なくとも1種の炭素源を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

[請求項13] 前記微生物を、フェルラ酸、p-クマル酸、安息香酸、cis, cis-ムコン酸、プロトカテク酸およびカテコールからなる群から選択される少なくとも1種の誘導物質を含む培地で培養する、請求項1～12のいずれかに記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/067231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P7/44(2006.01) i

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)
C12P7/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2011-512868 A (DSM IP Assets B.V.), 28 April 2011 (28.04.2011), paragraphs [0065] to [0079], [0162], [0164], [0192] & US 2011/0091944 A1 paragraphs [0065] to [0079], [0162], [0164], [0192] & WO 2009/113853 A2 & EP 2252698 A & AU 2009224087 A & CN 102027125 A	1-12/1-13
X/Y	WO 2014/043182 A2 (BIOAMBER INC.), 20 March 2014 (20.03.2014), page 1, lines 21 to 22; page 3, line 31 to page 4, line 9; page 12, line 16 to page 13, line 13; fig. 1, Step E & US 2015/0225329 A1 & EP 2895613 A & CA 2880726 A & CN 104603277 A	1-12/1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 25 August 2016 (25.08.16)	Date of mailing of the international search report 06 September 2016 (06.09.16)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/067231

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-515111 A (Genomatica, Inc.), 19 May 2011 (19.05.2011), paragraph [0057]; example III; fig. 3 & US 2013/0073231 A1 paragraph [0065]; example III; fig. 3 & WO 2012/149571 A2 & EP 2702422 A & CA 2834554 A & KR 10-2014-0041507 A	1-13
Y	HARWOOD, C. S. and PARALES R. E., THE β - KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF- IDENTITY, Annu. Rev. Microbiol., 1996, Vol. 50, pp. 553-590, fig. 2, 3	13
A	HYLAND, P., Development of a Platform Strain for Production of Adipic Acid Yields Insights into the Localized Redox Metabolism of <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , Master of Applied Science, Graduate Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, University of Toronto, [online], 2013, [retrieval date 2016.08.17], Internet: <URL: https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/70012/5/Hyland_Patrick_B_201311_MASc_thesis.pdf >, page 6, '1.3.1', fig. 3(A), (B), (E)	1-13
A	WO 2014/055649 A1 (BRASKEM S/A AP 09), 10 April 2014 (10.04.2014), [00110] to [00119]; fig. 6 to 10 & US 2014/0134687 A1	1-13
P,X	WO 2016/068108 A1 (Toray Industries, Inc.), 06 May 2016 (06.05.2016), paragraph [0028] (Family: none)	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/44(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/44

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	JP 2011-512868 A (ディーエスエム アイピー アセツ ビー. ブイ.) 2011.04.28, [0065]-[0079]、[0162]、[0164]、[0192] & US 2011/0091944 A1, [0065]-[0079], [0162], [0164], [0192] & WO 2009/113853 A2 & EP 2252698 A & AU 2009224087 A & CN 102027125 A	1-12/ 1-13

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.08.2016

国際調査報告の発送日

06.09.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 崇之

4B

4152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	WO 2014/043182 A2 (BIOAMBER INC.) 2014.03.20, 第1頁第21-22行、第3頁第31行-第4頁第9行、第12頁 第16行-第13頁第13行、図1のStep E & US 2015/0225329 A1 & EP 2895613 A & CA 2880726 A & CN 104603277 A	1-12/ 1-13
Y	JP 2011-515111 A (ジェノマティカ, インコーポレイテッド) 2011.05.19, [0057]、実施例III、図3 & US 2013/0073231 A1, [0065], Example III, Fig. 3 & WO 2012/149571 A2 & EP 2702422 A & CA 2834554 A & KR 10-2014-0041507 A	1-13
Y	HARWOOD, C. S. and PARALES R. E., THE β -KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY, Annu. Rev. Microbiol., 1996, Vol. 50, pp. 553-590, 図2、図3等	13
A	HYLAND, P., Development of a Platform Strain for Production of Adipic Acid Yields Insights into the Localized Redox Metabolism of <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , Master of Applied Science, Graduate Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, University of Toronto, [オ ンライン], 2013, [検索日 2016.08.17], インターネット:<URL: https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/70012/5/Hy land_Patrick_B_201311_MASc_thesis.pdf>, 第6頁「1.3.1」、図3(A)、(B)、及び(E)	1-13
A	WO 2014/055649 A1 (BRASKEM S/A AP 09) 2014.04.10, [00110]-[00119]、図6-10 & US 2014/0134687 A1	1-13
P, X	WO 2016/068108 A1 (東レ株式会社) 2016.05.06, [0028] (ファミリーなし)	1-12