

(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2013-533742
(P2013-533742A)

(43) 公表日 平成25年8月29日(2013.8.29)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 1/00 (2006.01)	C 12 N 1/00	Z N A P 4 B 0 2 4
C 12 P 7/02 (2006.01)	C 12 P 7/02	4 B 0 6 4
C 12 P 7/16 (2006.01)	C 12 P 7/16	4 B 0 6 5
C 07 C 67/31 (2006.01)	C 07 C 67/31	4 H 0 0 6
C 07 C 57/12 (2006.01)	C 07 C 57/12	4 H 0 3 9

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-515540 (P2013-515540)	(71) 出願人	310011310 ビュータマックス・アドバンスド・バイオ フューエルズ・エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成23年6月17日 (2011.6.17)		アメリカ合衆国デラウェア州19880. ウィルミントン. パウダーミルロード20 O. イクスペリメンタルステーション ビ -268/アール226
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月30日 (2013.1.30)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(86) 國際出願番号	PCT/US2011/040842	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(87) 國際公開番号	W02011/159991	(72) 発明者	ダグラス・ロバート・アントン アメリカ合衆国デラウェア州19803. ウィルミントン. パースドライブ6
(87) 國際公開日	平成23年12月22日 (2011.12.22)		
(31) 優先権主張番号	13/160, 766		
(32) 優先日	平成23年6月15日 (2011.6.15)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/440, 034		
(32) 優先日	平成23年2月7日 (2011.2.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/379, 546		
(32) 優先日	平成22年9月2日 (2010.9.2)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抽出発酵におけるアルコール除去のための、油に由来する抽出溶媒

(57) 【要約】

アルコール発酵プロセスにおいて、バイオマスに由来する油が、発酵プロセスからの、ブタノールなどの生成物アルコールの原位置除去のために利用可能な抽出剤へと化学的に転化される。油中のグリセリドは、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、および水酸化トリグリセリド、ならびにそれらの混合物などの反応生成物へと化学的に転化され得、これにより、生成物アルコールのためのバイオマスの油の分配係数より高い、生成物アルコールのための分配係数を有する発酵生成物抽出剤が形成される。アルコール発酵プロセスの原料に由来する油は、発酵生成物抽出剤へと化学的に転化され得る。油は、原料が発酵槽に供給される前に原料から分離され得、分離された油は、発酵生成物抽出剤に化学的に転化され得、次に、生成物アルコールを含む発酵生成物と接触され得、それによって、生成物アルコールは、発酵生成物から分離される。

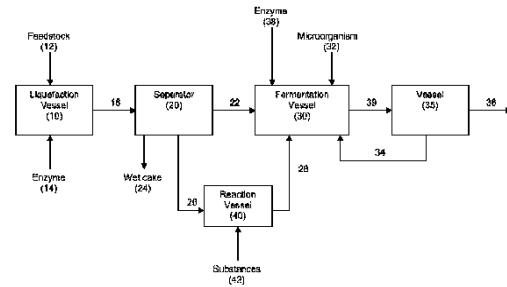


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

原料からアルコールを生成することが可能な組み換え微生物と；
 アルコールと；
 脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1種の抽出剤と
 を含む組成物であって；

前記抽出剤が、前記原料から生成される組成物。

【請求項 2】

前記抽出剤が、式 $R - (C = O) - N (R') (R'')$ の1種またはそれ以上の脂肪アミド 10
 を含み、式中、

R が、独立して、1つまたはそれ以上の二重結合で場合により介在される $C_3 \sim C_{27}$
 のアルキル基からなる群から選択され、

R' および R'' が、独立して、水素および1つまたはそれ以上のヒドロキシル基を場合
 により含む $C_1 \sim C_6$ のアルキル基からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物
 。

【請求項 3】

前記抽出剤は、式 $R - (C = O) - O C H R' C H R'' - O H$ の1種またはそれ以上の
 脂肪酸エステルを含み、式中、

R が、独立して、1つまたはそれ以上の二重結合で場合により介在される $C_3 \sim C_{27}$ 20
 のアルキル基からなる群から選択され、

R' および R'' が、独立して、水素および $C_1 \sim C_4$ のアルキル基からなる群から選択
 される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記抽出剤が、式 $R - (C = O) - O R'$ の1種またはそれ以上の脂肪酸エステルを含
 み、式中、

R が、独立して、1つまたはそれ以上の二重結合で場合により介在される $C_3 \sim C_{27}$
 のアルキル基からなる群から選択され、

R' が、8個以下の炭素を有するアルキル基である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

前記抽出剤が、脂肪アミドの混合物であり、脂肪アミドの前記混合物が、リノレアミド
 、オレアミド、パルミトアミド、またはステアルアミドを含む、請求項1に記載の組成物
 。

【請求項 6】

前記抽出剤が、脂肪アミドと脂肪酸との混合物であり、脂肪アミドと脂肪酸との前記混
 合物が、リノレアミド、リノール酸、オレアミド、オレイン酸、パルミトアミド、パルミ
 チン酸、ステアルアミド、またはステアリン酸を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 7】

前記抽出剤が、水酸化トリグリセリド、アルコキシ化トリグリセリド、水酸化脂肪酸、
 アルコキシ化脂肪酸、水酸化脂肪アルコール、およびアルコキシ化脂肪アルコールから選
 択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 8】

前記抽出剤が、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪アルコール、不飽和脂肪アルコー
 ル、飽和脂肪アミド、不飽和脂肪アミド、飽和脂肪酸エステル、不飽和脂肪酸エステル、
 およびそれらの混合物から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 9】

前記アルコールが、 $C_1 \sim C_8$ のアルキルアルコールである、請求項1に記載の組成物
 。

【請求項 10】

前記原料が、ライ麦、小麦、トウモロコシ、サトウキビ、大麦、セルロース系材料、リ

50

グノセルロース系材料、またはそれらの混合物を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 1】

抽出剤を生成するための方法であって：
油を含むバイオマスを提供する工程と；
脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される抽出剤へと前記油を化学的に転化することが可能な1種またはそれ以上の物質と前記油を接触させ、それによって、前記油の少なくとも一部が、前記抽出剤に転化される工程と
を含む方法。

【請求項 1 2】

前記1種またはそれ以上の物質が、水酸化アンモニウム水溶液、無水アンモニア、酢酸アンモニウム、アンモニア水、過酸化水素、トルエン、氷酢酸、リバーゼ、およびカチオン交換樹脂から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記抽出剤が、前記油が抽出剤に転化される前の生成物アルコールのための前記油の分配係数より高い、前記生成物アルコールのための分配係数を有する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記生成物アルコールが、C₁ ~ C₈ のアルキルアルコールである、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記油を前記1種またはそれ以上の物質と接触させる工程の前に、前記バイオマスから前記油を分離する工程をさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記バイオマスが、トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、牧草、稻わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

生成物アルコールを生成するための方法であって：
(a) オリゴ糖および油を含むバイオマスを提供する工程と；
(b) オリゴ糖を単糖類へと転化することが可能な糖化酵素と前記バイオマスを接触させる工程と；
(c) (a) または (b) の前記バイオマスから前記油を分離する工程と；
(d) 前記分離された油を、1種またはそれ以上の反応剤または溶媒と接触させて、抽出剤を形成する工程と；
(e) 前記単糖類を生成物アルコールに転化することが可能な組み換え微生物を含む発酵プロセスと前記バイオマスを接触させ、それによって、生成物アルコールが生成される工程と；
(f) 前記生成物アルコールを前記抽出剤と接触させる工程とを含み、
前記抽出剤が、前記生成物アルコールのための前記バイオマスの前記油の分配係数より高い、前記生成物アルコールのための分配係数を有する方法。

【請求項 1 8】

前記抽出剤が、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物から選択される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記抽出剤が、式 R (C = O) N (R') (R'') の1種またはそれ以上の脂肪アミドを含み、式中、

10

20

30

40

50

Rが、独立して、1つまたはそれ以上の二重結合で場合により介在されるC₃～C₂₇のアルキル基からなる群から選択され、

R'およびR"が、独立して、水素および1つまたはそれ以上のヒドロキシル基を場合により含むC₁～C₆のアルキル基からなる群から選択される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記抽出剤が、式R-(C=O)-OCHR'CHR"-OHの1種またはそれ以上の脂肪酸エステルを含み、式中、

Rが、独立して、1つまたはそれ以上の二重結合で場合により介在されるC₃～C₂₇のアルキル基からなる群から選択され、

R'およびR"が、独立して、水素およびC₁～C₄のアルキル基からなる群から選択される、請求項18に記載の組成物。

【請求項21】

前記抽出剤が、式R-(C=O)-OR'の1種またはそれ以上の脂肪酸エステルを含み、式中、

Rが、独立して、1つまたはそれ以上の二重結合で場合により介在されるC₃～C₂₇のアルキル基からなる群から選択され、

R'が、8個以下の炭素を有するアルキル基である、請求項18に記載の組成物。

【請求項22】

前記抽出剤が、水酸化トリグリセリド、アルコキシ化トリグリセリド、水酸化脂肪酸、アルコキシ化脂肪酸、水酸化脂肪アルコール、およびアルコキシ化脂肪アルコールから選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項23】

前記抽出剤が、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪アルコール、不飽和脂肪アルコール、飽和脂肪アミド、不飽和脂肪アミド、飽和脂肪酸エステル、不飽和脂肪酸エステル、およびそれらの混合物から選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項24】

前記1種またはそれ以上の反応剤または溶媒が、水酸化アンモニウム水溶液、無水アンモニア、酢酸アンモニウム、アンモニア水、過酸化水素、トルエン、氷酢酸、リパーゼ、およびカチオン交換樹脂から選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項25】

前記生成物アルコールが、C₁～C₈のアルキルアルコールである、請求項17に記載の方法。

【請求項26】

前記油が、獣脂油、トウモロコシ油、キャノーラ油、カプリン酸/カプリル酸トリグリセリド、ヒマシ油、ヤシ油、綿実油、魚油、ホホバ油、ラード、亜麻仁油、牛脚油、オイチシカ油、バーム油、ピーナッツ油、ナタネ油、米油、ベニバナ油、大豆油、ヒマワリ油、キリ油、ジャトロファ油、小麦油、ライ麦油、大麦油、および植物油ブレンドから選択される1種またはそれ以上の油を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項27】

生成物アルコールを生成するための方法であって：

(a) 発酵槽中で生成物アルコールを生成することが可能な組み換え微生物を含む発酵プロスを提供し、それによって、生成物アルコールが生成される工程；

(b) 前記発酵プロスを抽出剤と接触させて、水相および有機相を含む二相混合物を形成する工程であって、前記有機相が、前記生成物アルコールおよび前記油を含むように、前記生成物アルコールおよび前記油が、前記有機相中に分配される工程；

(c) 前記水相から前記有機相を分離する工程；

(d) 前記有機相から前記生成物アルコールを分離する工程とを含み；

場合により工程(b)および(c)が同時に行われる方法。

【請求項28】

10

20

30

40

50

前記抽出剤が、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物から選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記抽出剤が、水酸化トリグリセリド、アルコキシ化トリグリセリド、水酸化脂肪酸、アルコキシ化脂肪酸、水酸化脂肪アルコール、およびアルコキシ化脂肪アルコールから選択される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記抽出剤が、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪アルコール、不飽和脂肪アルコール、飽和脂肪アミド、不飽和脂肪アミド、飽和脂肪酸エステル、不飽和脂肪酸エステル、およびそれらの混合物から選択される、請求項 28 に記載の方法。

10

【請求項 31】

前記生成物アルコールが、C₁ ~ C₈ のアルキルアルコールである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 32】

原料スラリーを生成する工程と；

(i) 水層、(ii) 油層、および(iii) 固体層を生成するように前記原料スラリーを分離する工程と；

前記水層を前記発酵槽に供給する工程と
をさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

20

【請求項 33】

脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される抽出剤へと前記油を化学的に転化することが可能な1種またはそれ以上の物質と前記油層の前記油を接触させ、それによって、前記油の少なくとも一部が、前記抽出剤に転化される工程をさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 34】

前記抽出剤が、前記生成物アルコールのための前記油層の前記油の分配係数より高い、前記生成物アルコールのための分配係数を有する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 35】

前記生成物アルコールが、C₁ ~ C₈ のアルキルアルコールである、請求項 27 に記載の方法。

30

【請求項 36】

前記油が、獣脂油、トウモロコシ油、キャノーラ油、カプリン酸 / カプリル酸トリグリセリド、ヒマシ油、ヤシ油、綿実油、魚油、ホホバ油、ラード、亜麻仁油、牛脚油、オイチシカ油、バーム油、ピーナッツ油、ナタネ油、米油、ベニバナ油、大豆油、ヒマワリ油、キリ油、ジャトロファ油、小麦油、ライ麦油、大麦油、および植物油ブレンドから選択される1種またはそれ以上の油を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 37】

抽出剤を生成するための方法であって：

油を含むバイオマスを提供する工程と；

前記油の少なくとも一部を、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される抽出剤へと転化する工程と

40

を含む方法。

【請求項 38】

前記油を抽出剤へと転化する工程が、テトラヒドロフランおよび水素化アルミニウムリチウムの存在下で前記油をインキュベートする工程；前記油を、水酸化ナトリウムを用いてインキュベートする工程；前記油を、硫酸およびメタノールを用いてインキュベートする工程；前記油を、酢酸アンモニウムの存在下で、無水アンモニアを用いてインキュベートする工程；前記油を、アンモニア水を用いてインキュベートする工程；前記油を、トルエン、カチオン交換樹脂、冰酢酸、リパーゼ、および過酸化水素と接触させる工程；前記

50

油を高温条件下でインキュベートするか、または前記油を高圧条件下でインキュベートする工程のうちの1つまたはそれ以上を含む、請求項37に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2010年6月18日に出願された米国仮特許出願第61/356,290号；2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,451号；2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,436号、2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,444号；2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,429号；2010年9月2日に出願された米国仮特許出願第61/379,546号；および2011年2月7日に出願された米国仮特許出願第61/440,034号；2011年6月15日に出願された米国特許出願第13/160,766号の利益を主張するものであり；これらの内容全体が全て、参照により本明細書に援用される。

10

【0002】

本出願に関連する配列表は、EFS-Webを介して電子書式で提出され、全体が参照により本明細書に援用される。

【0003】

本発明は、ブタノールなどの発酵アルコールの生成、特に抽出発酵用の抽出溶媒およびバイオマスに由来する油を抽出溶媒へと転化するための方法に関する。

20

【背景技術】

【0004】

ブタノールは、燃料添加剤として、プラスチック産業における原料化学物質として、ならびに食品および香料産業における食品グレードの抽出剤としての使用を含む様々な用途を有する重要な産業用化学物質である。したがって、ブタノールならびに効率的でかつ環境に優しい生成方法に対する高い需要がある。

20

【0005】

微生物による発酵を用いたブタノールの生成は、1つの環境に優しい生成方法である。高収率でブタノールを生成するいくつかの微生物は、低いブタノール毒性閾値も有するため、ブタノールが生成されるにつれてブタノールを発酵槽から除去する必要がある。原位置生成物除去（ISP-R）（抽出発酵とも呼ばれる）は、ブタノールが生成されるにつれてブタノールを発酵槽から除去し、それによって、微生物が高収率でブタノールを生成することが可能になる。当該技術分野で説明されているISP-Rのための1つの方法は、液液抽出（特許文献1）である。技術的および経済的に実行可能であるために、理想的に、液液抽出は、抽出剤中への生成物アルコールの効率的な物質移動のための抽出剤と発酵プロスとの間の良好な接触；発酵プロスからの抽出剤の良好な相分離（発酵中および発酵後）；抽出剤の効率的な回収および再利用；抽出剤が生成物アルコールを抽出する能力の低下が最小限であること（例えば、抽出剤中への生成物アルコールのための分配係数の低下を防ぐことによって）および長期間の運転にわたって分配係数を低下させる脂質による抽出剤の汚染が最小限であることを必要とする。

30

【0006】

特に、抽出剤は、例えば、加水分解性でんぶんの原料として発酵槽に供給されるバイオマス中に存在する脂質の蓄積によって、再利用するごとに時間の経過とともに脂質により汚染され得る。例として、30重量%の乾燥トウモロコシ固体で発酵槽に充填される液化トウモロコシマッシュが、同時糖化発酵（SSF）（グルコースを生成するためのグルコアミラーゼの添加による発酵中に、液化されたマッシュの糖化が起こる）によるブタノールへのグルコースの転化の際に約1.2重量%のトウモロコシ油を含有する発酵プロスをもたらし得る。ISP-Rの際の抽出剤として働くオレイルアルコール（OA）へのトウモロコシ油脂質の溶解により、OAの再利用ごとに脂質濃度が増加し、OA中の脂質濃度がOAの再利用ごとに増加するにつれて、OA中の生成物アルコールのための分配係数が低

40

50

下され得る。

【0007】

さらに、抽出発酵中の非溶解固体の存在は、アルコール生成の効率に悪影響を与える。例えば、非溶解固体の存在は、発酵槽の内部の物質移動係数を低下させることがあり、発酵槽中の相分離を妨げることがあり、抽出剤中の非溶解固体からのトウモロコシ油の蓄積を生じ、時間の経過とともに抽出効率の低下を招くことがあり、溶媒が固体に捕捉され、可溶物含有乾燥穀類蒸留粕（DDGS）として最終的に除去されるため、溶媒の損失を増加することがあり、発酵プロセスからの抽出剤液滴の離脱を遅くすることがあり、および/または発酵槽体積効率を低下させることがある。

【0008】

抽出発酵に使用される抽出剤の分配係数の低下を抑えるためのいくつかの手法は、湿式粉碎、分画、および固体の除去を含んでいた。湿式粉碎は、各副産物から別々に価値を得るために、バイオマス（例えば、トウモロコシ）をその主要な構成要素の全て（胚芽、種皮纖維、でんぶん、およびグルテン）に分離する高コストの多工程プロセスである。このプロセスにより、精製されたでんぶん流が得られるが；このプロセスはコストがかかり、バイオマスを、発酵アルコール生成に不要なその非でんぶん構成要素に分離することを含む。分画により、磨碎された全粒トウモロコシ中に存在する脂質の大部分を含有する纖維および胚芽が除去され、より高いでんぶん（胚乳）含量を有するトウモロコシが得られる。乾式分画は、胚芽と纖維とを分離しないため、湿式粉碎よりコストが低い。しかしながら、分画は、纖維または胚芽の全体を除去せず、固体を完全に除去しない。さらに、分画の際にでんぶんをいくらか損失する。トウモロコシの湿式粉碎は、乾式分画よりさらにコストが高いが、乾式分画は、分画されていないトウモロコシの乾式磨碎よりコストが高い。例えば、2010年6月18日に出願された、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第61/356,290号明細書に記載されるように、発酵に使用する前に、液化されたマッシュから、脂質を含有する胚芽を含む固体を除去すると、非溶解固体を実質的に除去することができる。しかしながら、非溶解固体の分画または除去さえ行わずに抽出剤の分配係数の低下を抑えることができれば有利であろう。したがって、抽出剤の分配係数の低下が抑えられた抽出発酵によって、ブタノールなどの生成物アルコールを生成するためのより効率的な方法およびシステムを開発することが引き続き必要とされている。

【0009】

さらに、抽出剤（例えば、オレイルアルコール）は、通常、プロセス中の工程で生成されず、プロセスに加えられるため、抽出剤は原料コストである。抽出剤は、非発酵性固体上への吸着によって喪失され、プロセス中に導入される脂質によって希釈され得るため、アルコール生成プロセスの経済性は、抽出剤の回収および再利用の効率によって影響され得る。したがって、資本コストおよび/または運転コストを削減することによって、より経済的なプロセスを得ることができるISP-Rのための代替的な抽出剤が引き続き必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許出願公開第2009/0305370号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、ブタノールなどの生成物アルコールを生成するための方法であって、バイオマス中の脂質が、ISP-Rに使用され得る抽出剤へと転化され、原料とともに、および/または抽出剤の再利用の際に発酵槽に供給される脂質の量が減少される方法を提供することによって、上記の必要性を満たす。本発明は、以下の実施形態の説明によって明らかになるようなさらなる関連する利点を提供する。

10

20

30

40

50

【0012】

バイオマスに由来する脂質の、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、脂肪酸グリコールエステル、およびトリグリセリド、ならびにそれらの混合物を含む抽出剤（本明細書において、まとめて「脂肪酸抽出剤」と呼ばれる）への化学的転化により、ISP抽出剤中に存在する脂質の量を減少させることができる。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化（例えば、メトキシ化、エトキシ化）され得る。脂肪酸抽出剤は、抽出剤相中へのイソブタノールなどの生成物アルコールの分配係数を脂質ほど低下させると予想されない。さらに、脂肪酸抽出剤は、ISP抽出剤として使用することができる。脂肪酸抽出剤は、発酵槽に供給される発酵性炭素を供給するバイオマスに由来し得る。したがって、脂肪酸抽出剤は、アルコール生成プロセス中の工程において生成され、プロセス中に生成されない供給される外部からのISP抽出剤（外部から供給されるオレイルアルコールなど）の代わりに、またはそれに加えて使用され得、それによって、ISP抽出剤の原料コストを削減するかまたはなくすことさえできる。

10

【0013】

さらに、抽出剤はまた、高温および/または高圧条件を用いて、バイオマスに由来する油または原料を脂肪酸へと転化することによって生成され得る。さらに、バイオマスに由来する油または原料は、1つ以上のリパーゼで処理されて、脂肪酸が生成されるか、または水素化に供されて、脂肪アルコールが生成され得る。

20

【0014】

本発明は、原料からアルコールを生成することが可能な組み換え微生物と；アルコールと；脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1種の抽出剤とを含む組成物であって；抽出剤が、原料から生成される組成物に関する。一実施形態において、抽出剤は、脂肪アミドの混合物であり、さらなる実施形態において、脂肪アミドの混合物は、リノレアミド、オレアミド、パルミトアミド、またはステアルアミドを含む。別の実施形態において、抽出剤は、脂肪アミドと脂肪酸との混合物であり、さらなる実施形態において、脂肪アミドと脂肪酸との混合物は、リノレアミド、リノール酸、オレアミド、オレイン酸、パルミトアミド、パルミチン酸、ステアルアミド、またはステアリン酸を含む。一実施形態において、抽出剤は、水酸化トリグリセリド、アルコキシ化トリグリセリド、水酸化脂肪酸、アルコキシ化脂肪酸、水酸化脂肪アルコール、およびアルコキシ化脂肪アルコールから選択される。一実施形態において、トリグリセリドは、メトキシ化またはエトキシ化され得る。別の実施形態において、抽出剤は、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪アルコール、不飽和脂肪アルコール、飽和脂肪アミド、不飽和脂肪アミド、飽和脂肪酸エステル、不飽和脂肪酸エステル、およびそれらの混合物から選択される。一実施形態において、抽出剤は、液体または固体であり得る。さらなる実施形態において、抽出剤は、ビーズの形態であり得る。一実施形態において、アルコールは、C₁～C₈のアルキルアルコールである。別の実施形態において、原料は、ライ麦、小麦、トウモロコシ、サトウキビ、大麦、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、またはそれらの混合物を含む。

30

【0015】

一実施形態において、抽出剤は、式R(C=O)N(R')(R")の1種以上の脂肪アミドを含み、式中、

40

Rが、独立して、1つ以上の二重結合で任意に介在されるC₃～C₂₇のアルキル基からなる群から選択され、

R'およびR"が、独立して、水素および1つ以上のヒドロキシル基を任意に含むC₁～C₆のアルキル基からなる群から選択される。

【0016】

別の実施形態において、抽出剤は、式R-(C=O)-OCHR'CHR"-OHの1種以上の脂肪酸エステルを含み、式中、

Rが、独立して、1つ以上の二重結合で任意に介在されるC₃～C₂₇のアルキル基からなる群から選択され、

50

R' および R" が、独立して、水素および C₁ ~ C₄ のアルキル基からなる群から選択される。

【0017】

一実施形態において、抽出剤は、式 R - (C = O) - OR' の 1 種以上の脂肪酸エステルを含み、式中、

R が、独立して、1 つ以上の二重結合で任意に介在される C₃ ~ C₂₇ のアルキル基からなる群から選択され、

R' が、8 個以下の炭素を有するアルキル基である。

【0018】

本発明は、抽出剤を生成するための方法であって、油を含むバイオマスを提供する工程と；脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される抽出剤へと油を化学的に転化することが可能な 1 種以上の物質と油を接触させ、それによって、油の少なくとも一部が、抽出剤に転化される工程とを含む方法に関する。一実施形態において、トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化（例えば、メトキシ化、エトキシ化）され得る。一実施形態において、抽出剤は、液体または固体であり得る。さらなる実施形態において、抽出剤は、ビーズの形態であり得る。一実施形態において、本方法は、油を 1 種以上の物質と接触させる工程の前に、バイオマスから油を分離する工程をさらに含む。一実施形態において、1 種以上の物質は、水酸化アンモニウム水溶液、無水アンモニア、酢酸アンモニウム、アンモニア水、過酸化水素、トルエン、氷酢酸、リバーゼ、およびカチオン交換樹脂から選択される。別の実施形態において、抽出剤は、油が抽出剤に転化される前に、生成物アルコールのための油の分配係数より高い、生成物アルコールのための分配係数を有する。一実施形態において、生成物アルコールは、C₁ ~ C₈ のアルキルアルコールである。別の実施形態において、バイオマスは、トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、牧草、稻わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物を含む。

【0019】

本発明は、生成物アルコールを生成するための方法であって：(a) オリゴ糖および油を含むバイオマスを提供する工程と；(b) オリゴ糖を単糖類へと転化することが可能な糖化酵素とバイオマスを接触させる工程と；(c) (a) または (b) のバイオマスから油を分離する工程と；(d) 分離された油を、1 種以上の反応剤または溶媒と接触させて、抽出剤を形成する工程と；(e) 単糖類を生成物アルコールに転化することが可能な組み換え微生物を含む発酵プロセスとバイオマスを接触させ、それによって、生成物アルコールが生成される工程と；(f) 生成物アルコールを抽出剤と接触させる工程とを含み、抽出剤が、生成物アルコールのためのバイオマスの油の分配係数より高い、生成物アルコールのための分配係数を有する方法にも関する。一実施形態において、1 種以上の反応剤または溶媒は、水酸化アンモニウム水溶液、無水アンモニア、酢酸アンモニウム、アンモニア水、過酸化水素、トルエン、氷酢酸、リバーゼ、およびカチオン交換樹脂から選択される。一実施形態において、抽出剤は、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物から選択される。一実施形態において、抽出剤は、水酸化トリグリセリド、アルコキシ化トリグリセリド（例えば、メトキシ化、エトキシ化）、水酸化脂肪酸、アルコキシ化脂肪酸、水酸化脂肪アルコール、およびアルコキシ化脂肪アルコールから選択される。別の実施形態において、抽出剤は、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪アルコール、不飽和脂肪アルコール、飽和脂肪アミド、不飽和脂肪アミド、飽和脂肪酸エステル、不飽和脂肪酸エステル、およびそれらの混合物から選択される。一実施形態において、抽出剤は、液体または固体であり得る。さらなる実施形態において、抽出剤は、ビーズの形態であり得る。一実施形態において、アルコールは、C

10

20

30

40

50

$C_1 \sim C_8$ のアルキルアルコールである。別の実施形態において、油は、獣脂油、トウモロコシ油、キャノーラ油、カプリン酸/カプリル酸トリグリセリド、ヒマシ油、ヤシ油、綿実油、魚油、ホホバ油、ラード、亜麻仁油、牛脚油、オイチシカ油、パーム油、ピーナッツ油、ナタネ油、米油、ベニバナ油、大豆油、ヒマワリ油、キリ油、ジャトロファ油、小麦油、ライ麦油、大麦油、および植物油ブレンドから選択される 1 種以上の油を含む。

【0020】

一実施形態において、抽出剤は、式 $R - (C=O) - N(R') - (R'')$ の 1 種以上の脂肪アミドを含み、式中、

R が、独立して、1つ以上の二重結合で任意に介在される $C_3 \sim C_{27}$ のアルキル基からなる群から選択され、

R' および R'' が、独立して、水素および 1 つ以上のヒドロキシル基を任意に含む $C_1 \sim C_6$ のアルキル基からなる群から選択される。

【0021】

別の実施形態において、抽出剤は、式 $R - (C=O) - OCHR' - CHR'' - OH$ の 1 種以上の脂肪酸エステルを含み、式中、

R が、独立して、1つ以上の二重結合で任意に介在される $C_3 \sim C_{27}$ のアルキル基からなる群から選択され、

R' および R'' が、独立して、水素および $C_1 \sim C_4$ のアルキル基からなる群から選択される。

【0022】

一実施形態において、抽出剤は、式 $R - (C=O) - OR'$ の 1 種以上の脂肪酸エステルを含み、式中、

R が、独立して、1つ以上の二重結合で任意に介在される $C_3 \sim C_{27}$ のアルキル基からなる群から選択され、

R' が、8 個以下の炭素を有するアルキル基である。

【0023】

本発明は、生成物アルコールを生成するための方法であつて：(a)発酵槽中で生成物アルコールを生成することが可能な組み換え微生物を含む発酵プロセスを提供し、それによつて、生成物アルコールが生成される工程と；(b)発酵プロセスを抽出剤と接触させて、水相および有機相を含む二相混合物を形成する工程であつて、有機相が、生成物アルコールおよび油を含むように、生成物アルコールおよび油が、有機相中に分離する工程と；(c)水相から有機相を分離する工程と；(d)有機相から生成物アルコールを分離する工程とを含み；任意に工程 (b) および (c) が同時に行われる方法に関する。一実施形態において、本方法は、原料スラリーを生成する工程と；(i)水層、(ii)油層、および (iii) 固体層を生成するように原料スラリーを分離する工程と；水層を発酵槽に供給する工程とをさらに含む。別の実施形態において、本方法は、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される抽出剤へと油を化学的に転化することが可能な 1 種以上の物質と油層の油を接触させ、それによつて、油の少なくとも一部が、抽出剤に転化されることをさらに含む工程をさらに含む。

【0024】

一実施形態において、抽出剤は、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物から選択される。別の実施形態において、抽出剤は、水酸化トリグリセリド、アルコキシ化トリグリセリド(例えば、メトキシ化、エトキシ化)、水酸化脂肪酸、アルコキシ化脂肪酸、水酸化脂肪アルコール、およびアルコキシ化脂肪アルコールから選択される。一実施形態において、抽出剤は、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪アルコール、不飽和脂肪アルコール、飽和脂肪アミド、不飽和脂肪アミド、飽和脂肪酸エステル、不飽和脂肪酸エステル、およびそれらの混合物から選択される。一実施形態において、抽出剤は、液体または固体であり得る。さらなる実施形態において、抽出剤は、ビーズの形態であり得る。一実施形態において、生成物アルコールは

10

20

30

40

50

、C₁～C₈のアルキルアルコールである。別の実施形態において、抽出剤は、生成物アルコールのための油層の油の分配係数より高い、生成物アルコールのための分配係数を有する。一実施形態において、生成物アルコールは、C₁～C₈のアルキルアルコールである。別の実施形態において、油は、獣脂油、トウモロコシ油、キャノーラ油、カプリン酸/カプリル酸トリグリセリド、ヒマシ油、ヤシ油、綿実油、魚油、ホホバ油、ラード、亜麻仁油、牛脚油、オイチシカ油、パーム油、ピーナッツ油、ナタネ油、米油、ベニバナ油、大豆油、ヒマワリ油、キリ油、ジャトロファ油、小麦油、ライ麦油、大麦油、および植物油ブレンドから選択される1種以上の油を含む。

【0025】

ある実施形態において、発酵プロセスからバイオマスに由来する油を除去する方法は、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、トリグリセリドおよびそれらの混合物からなる群から選択される抽出剤へと油を化学的に転化することが可能な1種以上の物質と、所定の量の油を含むバイオマス原料流を接触させ、それによって、油の少なくとも一部が、抽出剤に転化される工程を含む。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化（例えば、メトキシ化、エトキシ化）され得る。抽出剤は、発酵アルコールのための油の分配係数より高い、発酵アルコールのための分配係数を有する。ある実施形態において、バイオマス原料流は、粉碎されたトウモロコシであり、油はトウモロコシ油である。ある実施形態において、本方法は、抽出剤を有するバイオマス原料流を、発酵アルコールを含む発酵プロセスと接触させる工程であって、発酵アルコールが抽出剤中に分離する工程も含む。

10

20

30

40

50

【0026】

本発明は、抽出剤を生成するための方法であって、油を含むバイオマスを提供する工程と；油の少なくとも一部を、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される抽出剤へと転化する工程とを含む方法に関する。一実施形態において、油を抽出剤へと転化する工程は、テトラヒドロフランおよび水素化アルミニウムリチウムの存在下で油を培養する工程；油を、水酸化ナトリウムを用いて培養する工程；油を、硫酸およびメタノールを用いて培養する工程；油を、酢酸アンモニウムの存在下で、無水アンモニアを用いて培養する工程；油を、アンモニア水を用いて培養する工程；油を、トルエン、カチオン交換樹脂、氷酢酸、リパーゼ、および過酸化水素と接触させる工程；油を高温条件下で培養するか、または油を高圧条件下で培養する工程のうちの1つ以上を含む。

【0027】

ある実施形態において、生成物アルコールの原位置除去のための抽出剤を生成する原位置方法は、(a)発酵性糖および油を含むバイオマスを提供する工程であって、油がトリグリセリドを含む工程と；(b)バイオマスから(a)の油を分離する工程と；(c)脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪アミドと脂肪酸との混合物、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される反応生成物を得るようにトリグリセリドを化学的に反応させることができ1種以上の反応剤または溶媒と、分離された油を接触させて、それによって、油中のトリグリセリドが、反応生成物へと転化される工程とを含む。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化（例えば、メトキシ化、エトキシ化）され得る。反応生成物は、生成物アルコールのためのバイオマスの油の分配係数より高い、生成物アルコールのための分配係数を有する発酵生成物抽出剤を形成する。

【0028】

ある実施形態において、ブタノールを生成するための方法は、(a)オリゴ糖および油を含むバイオマスを提供する工程であって、油がグリセリドを含む工程と；(b)オリゴ糖を単糖類へと転化することが可能な糖化酵素とバイオマスを接触させる工程と；(c)(a)または(b)のバイオマスから油を分離する工程と；(d)分離された油を、1種以上の反応剤または溶媒を含む組成物と接触させ、それによって、油中のグリセリドが抽出剤を形成する工程と；(e)単糖類をブタノールに転化することが可能な組み換え微生物

物とバイオマスを接触させ、それによって、ブタノールを含む発酵生成物が生成される工程と；(f)発酵生成物を、(d)の抽出剤と接触させ、それによって、ブタノールが、発酵生成物から分離される工程とを含む。抽出剤は、ブタノールのためのバイオマスの油の分配係数より高い、ブタノールのための分配係数を有する。ある実施形態において、工程(d)の抽出剤は、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪アミドと脂肪酸との混合物、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化(例えば、メトキシ化、エトキシ化)され得る。

【0029】

ある実施形態において、方法は、原料から生成物アルコールを生成するためのプロセス中の工程において、生成物アルコールのための植物由来油の分配係数より高い、生成物アルコールのための抽出剤分配係数を有する抽出剤に、植物由来油の少なくとも一部を転化する工程を含む。ある実施形態において、植物由来油は、上記の原料に由来する。

10

【0030】

ある実施形態において、生成物アルコールはイソブタノールであり、抽出剤分配係数は少なくとも約0.28である。ある実施形態において、イソブタノールのための抽出剤分配係数は少なくとも約1である。ある実施形態において、イソブタノールのための抽出剤分配係数は少なくとも約2である。

【0031】

ある実施形態において、原料から生成物アルコールを生成するための方法は、(a)原料スラリーを生成する工程と；(b)(i)水層、(ii)油層、および(iii)固体層を含む生成物を生成するように(a)の原料スラリーを分離する工程と；(c)(b)の水層を発酵槽に供給する工程とを含む。ある実施形態において、原料スラリーを分離する工程が、遠心分離によって行われる。ある実施形態において、油層は植物由来油層である。ある実施形態において、本方法は、植物由来油層から植物由来油の少なくとも一部を得る工程をさらに含む。

20

【0032】

ある実施形態において、本方法は、抽出剤を発酵槽に加えて、水相および生成物アルコール含有有機相を含む二相混合物を形成し、それによって、生成物アルコールが、生成物アルコール含有有機相中に分離する工程をさらに含む。

30

【0033】

ある実施形態において、本方法は、水相の糖を発酵させて、生成物アルコールを生成し、それによって、生成物アルコールが、生成物アルコール含有有機相中に分離する工程をさらに含む。

【0034】

ある実施形態において、発酵プロセスからバイオマスに由来する油を除去する方法は、(a)生成物アルコールおよびバイオマスに由来する油を含む発酵プロセスを提供する工程であって、油がグリセリドを含む工程と；(b)発酵プロセスを抽出剤と接触させて、水相および有機相を含む二相混合物を形成する工程であって、有機相が、生成物アルコールおよび油を含むように、生成物アルコールおよび油が、有機相中に分離する工程と；(c)水相から有機相を分離する工程と；(d)有機相から生成物アルコールを分離する工程と；(e)有機相を、1種以上の反応剤または溶媒を含む組成物と接触させ、それによって、油中のグリセリドが、さらなる抽出剤を形成する工程と；(f)発酵プロセスを、工程(e)のさらなる抽出剤と接触させることによって、工程(b)を繰り返す工程とを含む。

40

【0035】

ある実施形態において、さらなる抽出剤は、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化(例えば、メトキシ化、エトキシ化)され得る。

【0036】

50

ある実施形態において、生成物アルコールはブタノールである。

【0037】

ある実施形態において、原位置発酵用の抽出剤を形成する組成物は、(a)バイオマスに由来する油と；(b)脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、およびトリグリセリドからなる群から選択される1種以上の生成物へと油を化学的に転化することが可能な1種以上の物質と；(c)組成物の約50重量%～約99重量%の量である1種以上の生成物とを含む。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化(例えば、メトキシ化、エトキシ化)され得る。

【0038】

ある実施形態において、組成物は、ブタノールを生成することが可能な組み換え微生物と、ブタノールと、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される少なくとも1種の溶媒とを含む。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化(例えば、メトキシ化、エトキシ化)され得る。

10

【0039】

ある実施形態において、組成物は、ブタノールを生成することが可能な組み換え微生物、ブタノール、および脂肪アルコールを含む。

【0040】

ある実施形態において、組成物は、ブタノールを生成することが可能な組み換え微生物、ブタノール、および脂肪アミドの混合物を含み、脂肪アミドの混合物は、リノレアミド、オレアミド、パルミトアミド、およびステアルアミドを含む。

20

【0041】

ある実施形態において、組成物は、ブタノールを生成することが可能な組み換え微生物、ブタノール、およびトウモロコシ油を含む組成物を含み、トウモロコシ油は、約28%～約67%水酸化される。

【0042】

本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を成す添付の図面は、本発明を例示し、さらに、本明細書とともに、本発明の原理を説明し、関連技術分野の当業者が本発明を行い、使用できるようにする働きを果たす。

30

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】脂質が、発酵の前に、液化されたバイオマスから除去され、除去された脂質が、抽出剤へと転化され、発酵槽に供給される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図2】脂質が、発酵の前に、液化され、糖化されたバイオマスから除去され、除去された脂質が、抽出剤へと転化され、発酵槽に供給される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図3】脂質が、バイオマスから除去され、抽出剤へと転化され、それが発酵槽に供給される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図4】バイオマス原料流中の脂質が、抽出剤へと転化され、発酵槽に供給される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

40

【図5】発酵槽を出る第1の抽出剤中に存在する脂質が、第1の抽出剤から分離され、第2の抽出剤へと転化され、それが発酵槽に供給される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

【発明を実施するための形態】

【0044】

特に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾が生じた場合、定義を含めて本出願が優先するものとする。また、文脈上異なる解釈を要する場合を除き、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとす

50

る。本明細書に記載される全ての刊行物、特許、および他の参照文献は、あらゆる目的のために、全体が参照により本明細書に援用される。

【0045】

本発明をさらに定義するために、以下の用語および定義が、本明細書において提供される。

【0046】

本明細書において使用される際の「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (has)」、「有する (having)」、「含有する (contains)」、または「含有する (containing)」という用語、またはそれらの任意の他の活用形は、記載される整数または整数の群を包含するが、任意の他の整数または整数の群を除外しないことを意味することが理解されよう。例えば、要素の列挙を含む組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置は、必ずしもそれらの要素のみに限定されるわけではなく、明示的に列挙されていないあるい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他の要素を含み得る。さらに、相反する明示的な記載がない限り、「または」は、排他的な「または」ではなく包括的な「または」を指す。例えば、条件 A または B は、以下のうちの 1 つによって満たされる：A が真であり（または存在する）かつ B が偽である（または存在しない）、A が偽であり（または存在しない）かつ B が真である（または存在する）、A および B の両方とも真である（または存在する）。

10

20

30

40

【0047】

また、本発明の要素または構成要素の前にある不定冠詞「a」および「an」は、事例の数、すなわち、要素または構成要素の出現の数に関して限定されないことが意図される。したがって、「a」または「an」は、1つまたは少なくとも1つを含むものと読まれるべきであり、要素または構成要素の単数語形は、数値が単数であることを明白に意味しない限り、複数も含む。

【0048】

本明細書において使用される際の「発明」または「本発明」の用語は、非限定的な用語であり、特定の発明の任意の1つの実施形態を指すことは意図されず、本出願に記載される考えられる全ての実施形態を包含する。

30

【0049】

本明細書において使用される際の、用いられる本発明の成分または反応剤の量を修飾する「約」という用語は、例えば、現実の世界で濃縮物または溶液を作製するのに使用される典型的な測定および液体処理手順によって；これらの手順における不注意による誤りによって；組成物を作製するかまたは方法を行うのに用いられる成分の製造、供給源、または純度の差などによって起こり得る数量の変動を指す。「約」という用語は、特定の初期混合物から得られる組成物のための平衡条件が異なる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ているか否かにかかわらず、特許請求の範囲は、量に対する均等物を含む。一実施形態において、「約」という用語は、報告される数値の 10 % 以内、あるいは報告される数値の 5 % 以内を意味する。

40

【0050】

本明細書において使用される際の「バイオマス」は、トウモロコシ、サトウキビ、小麦、セルロース系またはリグノセルロース系材料ならびにセルロース、ヘミセルロース、リグニン、でんぷん、オリゴ糖、二糖類および / または単糖類、およびそれらの混合物を含む材料などの天然資源に由来する任意の糖類およびでんぷんを含む発酵性糖を提供する加水分解性多糖類を含有する天然産物を指す。バイオマスは、タンパク質および / または脂質などのさらなる成分も含み得る。バイオマスは、1つの供給源に由来してもよく、またはバイオマスは、2つ以上の供給源に由来する混合物を含み得る。例えば、バイオマスは、トウモロコシの穂軸とトウモロコシの茎葉との混合物、または草と葉との混合物を含み得る。バイオマスとしては、以下に限定はされないが、バイオエネルギー作物、農業残渣

50

、都市固形廃棄物、産業固形廃棄物、製紙からの汚泥、庭ごみ、木くずおよび林業廃棄物が挙げられる。バイオマスの例としては、以下に限定はされないが、トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、牧草、稻わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物が挙げられる。例えば、マッシュ、絞り汁、糖蜜、または加水分解物が、粉碎、処理、および／または液化などによる発酵のためのバイオマスを処理するための当該技術分野において公知の任意の処理によって、バイオマスから形成され得、発酵性糖を含み、水を含み得る。例えば、セルロース系および／またはリグノセルロース系バイオマスは、当業者に公知の任意の方法によって発酵性糖を含有する加水分解物を得るよう処理され得る。低アンモニア前処理が、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2007/0031918A1号明細書に開示されている。セルロース系および／またはリグノセルロース系バイオマスの酵素的糖化は、通常、セルロースおよびヘミセルロースを分解して、グルコース、キシロース、およびアラビノースを含む糖類を含有する加水分解物を生成するために酵素群（consortium）を利用する。（セルロース系および／またはリグノセルロース系バイオマスに適した糖化酵素は、L y n d , e t al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 506-577, 2002) に概説されている。

10

20

30

40

50

【0051】

マッシュ、絞り汁、糖蜜、または加水分解物は、本明細書に記載される原料12および原料スラリー16を含み得る。水性原料流が、粉碎、処理、および／または液化などによる発酵のためのバイオマスを処理するための当該技術分野において公知の任意の処理によって、バイオマスから誘導または形成され得、発酵性炭素基質（例えば、糖）を含み、水を含み得る。水性原料流が、本明細書に記載される原料12および原料スラリー16を含み得る。

【0052】

本明細書において使用される際の「原料」は、発酵プロセスにおける原料であって、非溶解固体を含むかまたは含まずに発酵性炭素源を含有し、該当する場合、発酵性炭素源がでんぶんから遊離されたかあるいは液化、糖化、または他のプロセスなどによるさらなる処理によって複合糖類を分解することから得られる前または後に発酵性炭素源を含有する原料を意味する。原料は、バイオマスを含むかまたはバイオマスに由来する。好適な原料としては、以下に限定はされないが、ライ麦、小麦、トウモロコシ、サトウキビ、大麦、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、またはそれらの混合物が挙げられる。「トウモロコシ油」に言及される場合、この用語が、本発明の他の実施形態において、所与の原料から生成される油を包含することが理解されよう。

【0053】

本明細書において使用される際の「発酵プロセス」は、水と、糖類と、溶解固体と、任意にアルコールを生成する微生物と、生成物アルコールと、存在する微生物による、アルコール、水、および二酸化炭素（CO₂）への糖類の反応によって生成物アルコールが作製される発酵槽中に保持される材料の全ての他の成分との混合物を意味する。場合により、本明細書において使用される際の「発酵培地」および「発酵された混合物」という用語は、「発酵プロセス」と同義に使用することができる。

【0054】

本明細書において使用される際の「発酵性炭素源」または「発酵性炭素基質」は、発酵アルコールの生成について本明細書に開示される微生物によって代謝されることが可能な炭素源を意味する。好適な発酵性炭素源としては、以下に限定はされないが、グルコースまたはフルクトースなどの单糖類；ラクトースまたはスクロースなどの二糖類；オリゴ糖；でんぶんまたはセルロースなどの多糖類；一炭素基質；およびそれらの混合物が挙げられる。

【0055】

本明細書において使用される際の「発酵性糖」は、発酵アルコールの生成について本明細書に開示される微生物によって代謝されることが可能な糖を指す。

【0056】

本明細書において使用される際の「発酵槽」は、ブタノールなどの生成物アルコールが糖類から作製される発酵反応が行われる槽を意味する。

【0057】

本明細書において使用される際の「液化槽」は、液化が行われる槽を意味する。液化は、オリゴ糖が原料から遊離されるプロセスである。原料がトウモロコシである、ある実施形態において、オリゴ糖は、液化中にトウモロコシでんぶん含有物から遊離される。

10

【0058】

本明細書において使用される際の「糖化槽」は、糖化（すなわち、オリゴ糖の单糖類への分解）が行われる槽を意味する。発酵および糖化が同時に行われる場合、糖化槽および発酵槽は、同じ槽で1つであり得る。

【0059】

本明細書において使用される際の「糖」は、オリゴ糖、二糖類、および／または单糖類を指す。

【0060】

本明細書において使用される際の「糖化酵素」は、多糖類および／またはオリゴ糖、例えば、グリコーゲン、またはでんぶんの-1,4-グルコシド結合を加水分解することが可能な1種以上の酵素を意味する。糖化酵素は、セルロース系またはリグノセルロース系材料を加水分解することが可能な酵素も含み得る。

20

【0061】

本明細書において使用される際の「非溶解固体」は、原料の非発酵性部分、例えば、胚芽、纖維、およびグルテンを意味する。

【0062】

本明細書において使用される際の「生成物アルコール」は、発酵性炭素基質の供給源としてバイオマスを用いる発酵プロセスにおいて微生物によって生成され得る任意のアルコールを指す。生成物アルコールとしては、以下に限定はされないが、C₁～C₈のアルキルアルコールが挙げられる。ある実施形態において、生成物アルコールはC₂～C₈のアルキルアルコールである。他の実施形態において、生成物アルコールはC₂～C₅のアルキルアルコールである。C₁～C₈のアルキルアルコールとしては、以下に限定はされないが、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、およびペンタノールが挙げられることが理解されよう。同様に、C₂～C₈のアルキルアルコールとしては、以下に限定はされないが、エタノール、プロパノール、ブタノール、およびペンタノールが挙げられる。「アルコール」はまた、生成物アルコールに関連して本明細書において使用される。

30

【0063】

本明細書において使用される際の「ブタノール」は、特に、ブタノール異性体1-ブタノール(1-BuOH)、2-ブタノール(2-BuOH)、および／またはイソブタノール(iBuOHまたはI-BuOH、2-メチル-1-プロパノールとしても知られている)を、個々にまたはそれらの混合物として指す。

40

【0064】

本明細書において使用される際の「プロパノール」は、プロパノール異性体イソプロパノールまたは1-プロパノールを指す。

【0065】

本明細書において使用される際の「ペンタノール」は、ペンタノール異性体1-ペンタノール、3-メチル-1-ブタノール、2-メチル-1-ブタノール、2,2-ジメチル-1-プロパノール、3-ペンタノール、2-ペンタノール、3-メチル-2-ブタノール、または2-メチル-2-ブタノールを指す。

50

【0066】

本明細書において使用される際の「アルコール当量」という用語は、所定の量のアルコールエステルの完全な加水分解および回収によって得られるであろうアルコールの重量を指す。

【0067】

本明細書において使用される際の「水相力価」という用語は、発酵プロセス中の特定のアルコール（例えば、ブタノール）の濃度を指す。

【0068】

本明細書において使用される際の「有効力価」という用語は、発酵によって生成される特定のアルコール（例えば、ブタノール）または発酵培地のリットル当たりの、アルコールエステル化によって生成されるアルコールエステルのアルコール当量の総量を指す。例えば、発酵の単位体積におけるブタノールの有効力価は：(i) 発酵培地中のブタノールの量；(ii) 有機抽出剤から回収されるブタノールの量；(iii) ガスストリッピングが使用される場合、気相から回収されるブタノールの量；および(iv) 有機相または水相中のブタノールエステルのアルコール当量を含む。

10

【0069】

本明細書において使用される際の「原位置生成物除去（ISP R）」は、生成物が生成される際に、生物学的プロセスにおける生成物濃度を制御するために、発酵などの生物学的プロセスから特定の発酵生成物を選択的に除去することを意味する。

20

【0070】

本明細書において使用される際の「抽出剤」または「ISP R 抽出剤」は、ブタノール異性体などの任意の生成物アルコールを抽出するのに使用される有機溶媒を意味する。抽出剤は、発酵温度において固体または液体であり得る。場合により、本明細書において使用される際の「溶媒」という用語は、「抽出剤」と同義に使用することができる。

30

【0071】

本明細書において使用される際の「脂肪酸抽出剤」は、天然油中のグリセリドを、1種以上の溶媒または反応剤と化学的に反応させて、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される1種以上の反応生成物を得ることによって、天然油から誘導される抽出剤を意味する。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化（例えば、メトキシ化、エトキシ化）され得る。

30

【0072】

本明細書において使用される際の「天然油」は、植物（例えば、バイオマス）または動物から得られる脂質を指す。本明細書において使用される際の「植物由来油」は、特に植物から得られる脂質を指す。場合により、「脂質」は、「油」および「グリセリド」と同義に使用することができる。天然油としては、以下に限定はされないが、獣脂、トウモロコシ油、キャノーラ油、カプリン酸／カプリル酸トリグリセリド、ヒマシ油、ヤシ油、綿実油、魚油、ホホバ油、ラード、亜麻仁油、牛脚油、オイチシカ油、パーム油、ピーナツ油、ナタネ油、米油、ベニバナ油、大豆油、ヒマワリ油、キリ油、ジャトロファ油、および植物油ブレンドが挙げられる。

40

【0073】

本明細書において使用される際の「脂肪酸」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、C₄ ~ C₂₈ の炭素原子（最も一般的にはC₁₂ ~ C₂₄ の炭素原子）を有するカルボン酸（例えば、脂肪族モノカルボン酸）を指す。脂肪酸はまた、分枝鎖状または非分枝鎖状であってもよい。脂肪酸は、動物性または植物性脂肪、油、またはワックスに由来するか、あるいはそれらの中にエステル化された形態で含まれ得る。脂肪酸は、脂肪および脂肪油中のグリセリドの形態で天然に存在するものであってもよく、あるいは脂肪の加水分解によってまたは合成によって得られる。脂肪酸という用語は、単一の化学種または脂肪酸の混合物を表し得る。さらに、脂肪酸という用語は、遊離脂肪酸も包含する。

【0074】

50

本明細書において使用される際の「脂肪アルコール」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、C₄～C₂₂の炭素原子の脂肪族長鎖を有するアルコールを指す。

【0075】

本明細書において使用される際の「脂肪アルデヒド」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、C₄～C₂₂の炭素原子の脂肪族長鎖を有するアルデヒドを指す。

【0076】

本明細書において使用される際の「脂肪アミド」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、C₄～C₂₂の炭素原子の脂肪族長鎖を有するアミドを指す。

【0077】

本明細書において使用される際の「脂肪酸エステル」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、C₄～C₂₂の炭素原子の脂肪族長鎖を有するエステルを指す。

10

【0078】

「水不混和性」という用語は、1つの液相を形成するように、発酵プロセスなどの水溶液と混合することができない抽出剤または溶媒などの化学成分を指す。

【0079】

本明細書において使用される際の「水相」という用語は、発酵プロセスを水不混和性有機抽出剤と接触させることによって得られる二相混合物の水相を指す。発酵抽出を含む本明細書に記載されるプロセスの一実施形態において、「発酵プロセス」という用語は、この場合、二相性発酵抽出における水相を特に指す。

20

【0080】

本明細書において使用される際の「有機相」という用語は、発酵プロセスを水不混和性有機抽出剤と接触させることによって得られる二相混合物の非水相を指す。

【0081】

本明細書において使用される際の「分離」という用語は、「回収」と同義であり、初期混合物から化学化合物を除去して、初期混合物中の化合物の純度または濃度より高い純度またはより高い濃度の化合物を得ることを指す。

【0082】

本明細書において使用される際の「組み換え微生物」は、例えば、ブタノールなどのアルコールを生成するための生合成経路などの生合成経路を含むように宿主細胞を改変することによる、組み換えDNA技術の使用によって改変される、細菌または酵母などの微生物を指す。

30

【0083】

本発明は、バイオマスに由来する油の化学的転化によって得られる抽出剤および抽出剤を生成する方法を提供する。特に、油中のグリセリドは、本明細書において、まとめて脂肪酸抽出剤と呼ばれる、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、およびトリグリセリド、ならびにそれらの混合物を含む1種以上の生成物へと化学的に転化され得る。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化（例えば、メトキシ化、エトキシ化）され得る。脂肪酸抽出剤は、発酵プロセスからの、ブタノールなどの生成物アルコールの原位置除去のための抽出剤として働き得る。したがって、本発明は、バイオマス油から生成された抽出剤を用いた抽出発酵によって、ブタノールなどの生成物アルコールを生成するための方法も提供する。本発明は、原料に由来する油を分離することによって、アルコール発酵プロセスから油を除去するための方法も提供する。原料は、油の除去のまえに、液化されて、スラリーが形成され得る。したがって、スラリーは、発酵性炭素源、油、および非溶解固体を含む。油、およびある実施形態において、非溶解固体は、スラリーが発酵槽に供給される前にスラリーから除去され得る。油およびある実施形態において、非溶解固体の除去により、発酵槽中の油（およびある実施形態において固体）の存在に起因する経時的な抽出剤の分配係数の減少、低下を抑えることができる。さらに、分離された油は、脂肪酸抽出剤へと化学的に転化され得、それが発酵槽に供給され得る。脂肪酸抽出剤は、発酵アルコールのための油の分配係数より高い、発酵アルコールのための分配係数を有し得る。さらに、脂肪酸抽出剤は、本発明の方法に

40

50

したがって上記原料から化学的に転化されなかったオレイルアルコールなどの市販の外部からの抽出剤の代わりにまたはそれに加えて使用され得る。したがって、本発明の方法により、原料に由来する油の化学的転化によって、発酵プロセス中の工程において抽出剤を生成することによって、外部からの抽出剤に関連する原料コストを削減することができる。

【0084】

本発明は、図を参照して説明される。図1は、本発明の一実施形態に係る発酵アルコールの生成のための例示的なプロセス流れ図を示す。図示されるように、原料12は、液化槽10の入口に導入され、液化されて、原料スラリー16が生成され得る。原料12は、発酵性炭素源（例えば、グルコースなどの発酵性糖）を供給する加水分解性でんぶんを含有し、以下に限定はされないが、ライ麦、小麦、トウモロコシ、サトウキビ、大麦、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、またはそれらの混合物などのバイオマスであり得、あるいはバイオマスに由来し得る。ある実施形態において、原料12は、分画されたバイオマスの1つ以上の成分であり得、他の実施形態において、原料12は、粉碎された、分画されていないバイオマスであり得る。ある実施形態において、原料12は、乾式粉碎された、分画されていないトウモロコシの実などのトウモロコシであり得、非溶解粒子は、胚芽、繊維、およびグルテンを含み得る。非溶解固体は、原料12の非発酵性部分である。図に示される実施形態を参照した本明細書における説明のために、原料12は、非溶解固体が分離されていない、粉碎された、分画されていないトウモロコシであるものとして説明されることが多い。しかしながら、当業者に明らかのように、本明細書に記載される例示的な方法およびシステムは、分画されるか否かにかかわらず様々な原料向けに変更することができることを理解されたい。ある実施形態において、原料12は、高オレイン酸トウモロコシであり得るため、それに由来するトウモロコシ油は、少なくとも約55重量%のオレイン酸のオレイン酸含量を有する高オレイン酸トウモロコシ油である。ある実施形態において、約24重量%である通常のトウモロコシ油中のオレイン酸含量と比較して、高オレイン酸トウモロコシ油中のオレイン酸含量は、最大で約65重量%であり得る。油の加水分解により、発酵プロセスと接触させるための高いオレイン酸含量を有する脂肪酸抽出剤を得ることができるために、高オレイン酸油は、本発明の方法に使用するのにいくつかの利点を提供し得る。ある実施形態において、脂肪酸またはその混合物は、不飽和脂肪酸を含む。不飽和脂肪酸のうち、単不飽和であるもの、すなわち、1つの炭素-炭素二重結合を有するものが、プロセス検討の際に好適な熱安定性および酸化安定性を犠牲にせずに融点に関する利点を提供し得る。

【0085】

原料12を液化するプロセスは、原料12中でのんぶんを、例えば、デキストリンおよびオリゴ糖を含む糖類へと加水分解することを含み、従来のプロセスである。酸プロセス、酸-酵素プロセス、または酵素プロセスを含むがこれらに限定されない、当業界で通常用いられる任意の公知の液化プロセス、ならびに対応する液化槽が使用され得る。このようなプロセスは、単独でまたは組み合わせて使用され得る。ある実施形態において、酵素プロセスを用いることができ、適切な酵素14、例えば、-アミラーゼが、液化槽10の入口に導入される。水も液化槽10に導入することができる。

【0086】

原料12の液化から生成される原料スラリー16は、原料に由来する糖、油、および非溶解固体を含む。原料スラリー16は、液化槽10の出口から排出され得る。ある実施形態において、原料12は、トウモロコシまたはトウモロコシの実であるため、原料スラリー16はトウモロコシマッシュスラリーである。

【0087】

原料スラリー16は、原料スラリー16中に存在する油の一部、または好ましくは実質的に全てを除去するように構成される分離器20の入口に導入される。除去された油は、流れ26として反応槽40に提供され、糖および水を含む残りの原料は、水流22として

10

20

30

40

50

発酵槽 30 に排出される。水流 22 は、スラリー 16 の非溶解固体を含み得るが、油 26 が分離器 20 によって除去されたため、発酵槽 30 中の発酵プロセスには、減少された量の油が残っている。分離器 20 から排出される油流 26 は、所定の量のグリセリド、特にトリグリセリドを有し、それが、反応槽 40 中で 1 種以上の物質 42 と接触される。物質 42 は、油 26 中のグリセリドの少なくとも一部を脂肪酸抽出剤 28 へと化学的に転化することが可能な反応剤または溶媒である。ある実施形態において、物質 42 によるグリセリドの化学的転化からの油中の脂肪酸抽出剤 28 の量は、少なくとも約 17 重量%、少なくとも約 20 重量%、少なくとも約 30 重量%、少なくとも約 40 重量%、少なくとも約 50 重量%、少なくとも約 60 重量%、少なくとも約 65 重量%、少なくとも約 70 重量%、少なくとも約 75 重量%、少なくとも約 80 重量%、少なくとも約 85 重量%、少なくとも約 90 重量%、少なくとも約 95 重量%、または少なくとも約 99 重量% であり得る。
10

【0088】

分離器 20 は、以下に限定はされないが、サイフォニング、吸入、デカンテーション、遠心分離、重力沈降器の使用、膜支援相分離などを含む、水性原料流から油を除去するための、当該技術分野において公知の任意の好適な分離器であり得る。ある実施形態において、分離器 20 は、原料スラリー 16 中の非溶解固体も除去し、非溶解固体を固相またはウェットケーキ 24 として排出し得る。例えば、ある実施形態において、分離器 20 は、フィルタープレス、真空ろ過、または原料スラリー 16 から非溶解固体を分離するための遠心分離機を含み得る。例えば、ある実施形態において、分離器 20 は、糖および水を含有する水層（すなわち、流れ 22）、非溶解固体を含有する固体層（すなわち、ウェットケーキ 24）、および油層（すなわち、油流 26）を含む遠心分離生成物を生成するように原料スラリー 16 を攪拌または回転させるトリカンター（tricanter）遠心分離機 20 を含む。スラリー 16 がトウモロコシマッシュスラリーである場合、油は 26 は、フリートウモロコシ油（free corn oil）である。本明細書において使用される際のフリートウモロコシ油という用語は、トウモロコシの胚芽を含まないトウモロコシ油を意味する。原料スラリー 16 としてのトウモロコシマッシュスラリーについて、ウェットケーキ 24 は、原料スラリー中に存在する少なくとも約 50 重量% の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 55 重量% の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 60 重量% の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 65 重量% の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 70 重量% の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 75 重量% の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 80 重量% の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 85 重量% の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 90 重量% の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 95 重量% の非溶解粒子、または原料スラリー中に存在する約 99 重量% の非溶解粒子を含む。
20

【0089】

ウェットケーキ 24 が、遠心分離機 20 によって除去される場合、ある実施形態において、原料がトウモロコシである場合トウモロコシ油などの原料 12 に由来する油の一部が、ウェットケーキ 24 中に残る。このような場合、ウェットケーキ 24 は、ウェットケーキ 24 の乾燥固体分の約 20 重量% 未満の量のトウモロコシ油を含む。ウェットケーキ 24 は、遠心分離機 20 の底部の近くに位置する出口から排出され得る。ウェットケーキ 24 は、発酵性炭素の一部および水も含み得る。水溶液 22 が遠心分離機 20 から排出されてから、ウェットケーキ 24 は、遠心分離機においてさらなる水で洗浄され得る。ウェットケーキ 24 の洗浄により、ウェットケーキ中に存在する糖（例えば、オリゴ糖）を回収し、回収された糖および水は、液化槽 10 に再利用され得る。洗浄後、ウェットケーキ 24 は、任意の好適な公知の方法によって、乾燥されて、可溶物含有乾燥穀類蒸留粕（DDGS）が形成され得る。遠心分離機 20 において形成されるウェットケーキ 24 からの DDGS の形成にはいくつかの利点がある。非溶解固体が発酵槽に送られず、DDGS は、捕捉された抽出剤および / またはブタノールなどの生成物アルコールを有さないため、発
30
40
50

酵槽の条件に供されず、発酵槽中に存在する微生物と接触しない。これらの利点により、例えば動物飼料としての D D G S の処理および販売が容易になる。遠心分離によって原料 16 から非溶解固体を除去するための方法およびシステムが、全体が参照により本明細書に援用される、2010年6月18日に出願された、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第 61/356,290 号明細書に詳細に記載されている。

【0090】

ある実施形態において、油 26 は、ウェットケーキ 24 から別々に排出されず、むしろ、油 26 は、ウェットケーキ 24 の一部として含まれ、最終的に D D G S 中に存在する。このような場合、油は、D D G S から分離され、同じかまたは異なるアルコール発酵プロセスにおいてその後の使用のために脂肪酸抽出剤に転化され得る。いずれの場合も、発酵槽中に存在する油が、I S P R 抽出剤を希釈し得、有機相中への発酵アルコールの分配係数を低下させ得るため、原料の油成分の除去が、ブタノール生成などのアルコール生成に有利である。また、油は、脂肪酸およびグリセリンへと分解され得、それが水中に蓄積し、システム全体を通して再利用のために利用可能な水の量を減少させ得る。したがって、原料の油成分の除去により、システムを通して再利用され得る水の量を増加させることによって、生成物アルコール生成の効率を高めることもできる。

【0091】

水流 22 および微生物 32 が、発酵槽 30 中に保持される発酵プロセスに含まれるべく発酵槽 30 に導入される。発酵槽 30 は、水流 22 を発酵させて、ブタノールなどの生成物アルコールを生成するように構成される。特に、微生物 32 は、スラリー 16 中の発酵性糖を代謝し、生成物アルコールを排出する。微生物 32 は、細菌、シアノバクテリア、糸状菌、および酵母からなる群から選択される。ある実施形態において、微生物 32 は、大腸菌 (E. coli) などの細菌であり得る。ある実施形態において、微生物 32 は、発酵性組み換え微生物であり得る。水溶液 22 は、例えばオリゴ糖の形態の糖、および水を含んでいてもよく、約 20 g / L 未満のモノマーグルコース、より好ましくは約 10 g / L 未満または約 5 g / L 未満のモノマーグルコースを含み得る。モノマーグルコースの量を決定するための好適な方法は、当該技術分野において周知である。当該技術分野において公知のこのような好適な方法は、H P L C を含む。

【0092】

ある実施形態において、流れ 22 中の複合糖類（例えば、オリゴ糖）を、微生物 32 によって容易に代謝され得る単糖類へと分解するために、水流 22 が、糖化プロセスに供される。酸プロセス、酸-酵素プロセス、または酵素プロセスを含むがこれらに限定されない、当業界で通常用いられる任意の公知の糖化プロセスが使用され得る。ある実施形態において、同時糖化発酵 (S S F) は、発酵槽 30 の内部で行われ得る。ある実施形態において、でんぶんを、微生物 32 によって代謝可能なグルコースに分解するために、グルコアミラーゼなどの酵素 38 が、発酵槽 30 の入口に導入され得る。

【0093】

原位置生成物除去 (I S P R) を用いて、生成物アルコールが微生物 32 によって生成されるにつれて、生成物アルコールを発酵槽 30 から除去することができる。抽出発酵では、このような I S P R は液液抽出を含む。液液抽出は、開示内容の全体が、本明細書に援用される米国特許出願公開第 2009/0305370 号明細書に記載される方法にしたがって行われ得る。米国特許出願公開第 2009/030537 号明細書には、抽出発酵を用いて発酵プロセスからブタノールを生成し、回収するための方法が記載され、この方法は、発酵プロセスを水不混和性抽出剤と接触させる工程を含む。通常、抽出剤は、水相および有機相を含む二相混合物を形成するための、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪アミドと脂肪酸との混合物、脂肪酸のエステル、脂肪アルデヒド、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、トリグリセリドおよびそれらの混合物からなる群から選択される有機抽出剤であり得る。図 1 の実施形態を参照すると、発酵槽 30 は、槽 40 からの脂肪酸抽出剤 28 を含む 1 種以上の水不混和性 I S P R 抽出剤を受け入れるための 1 つ以上の入口を有する。脂肪酸抽出剤 28 は、発酵プロセスと接触し、水相および有機相

10

20

30

40

50

を含む二相混合物を形成する。発酵プロセス中に存在する生成物アルコールは、有機相中に分離する。二相混合物は、流れ 3 9 として発酵槽 3 0 から除去され、槽 3 5 に導入され得、その中で、水相および有機相の分離が行われて、アルコール含有有機相 3 6 および水相 3 4 が生成される。アルコール含有有機相 3 6 は、以下に限定はされないが、サイフォニング、デカンテーション、遠心分離、重力沈降器の使用、膜支援相分離などを含む当該技術分野において公知の方法を用いて、二相混合物 3 9 の水相 3 4 から分離される。水相 3 4 の全てまたは一部が、発酵培地（図示される）として発酵槽 3 0 中に再利用されるか、あるいは廃棄され、新しい培地と交換されるか、または残っている生成物アルコールを除去するために処理され、次に発酵槽 3 0 へと再利用され得る。アルコール含有有機相 3 6 は、生成物アルコールを回収するように処理され、次に、得られたアルコール希薄抽出剤が、生成物アルコールのさらなる抽出のために、通常、新鮮な補給（make-up）抽出剤 2 8 と通常組み合わされて、発酵槽 3 0 中に戻されて再利用され得る（図示せず）。あるいは、新鮮な抽出剤 2 8 は、二相混合物流 3 9 中で除去された抽出剤の代わりに発酵槽に連続して加えられ得る。

10

【0094】

ある実施形態において、図 3～5 の実施形態に示される抽出剤 2 9 などの 1 種以上のさらなる I S P R 抽出剤は、発酵槽 3 0 に導入されて、水相および有機相を含む二相混合物が形成され得、生成物アルコールは、有機相中に分離する。このような 1 種以上のさらなる抽出剤 2 9 は、オレイルアルコール、ベヘニルアルコール、セチルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、ステアリルアルコール、1-ウンデカノール、オレイン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸メチル、オレイン酸メチル、ウンデカナール、ラウリン酸アルデヒド、2 0 - メチルウンデカナール、およびそれらの混合物などの別の脂肪酸抽出剤および／または外部からの有機抽出剤であり得る。ある実施形態において、I S P R 抽出剤 2 9 は、カルボン酸であり得、ある実施形態において、I S P R 抽出剤 2 9 は、遊離脂肪酸であり得る。ある実施形態において、カルボン酸または遊離脂肪酸は、4～2 8 個の炭素、他の実施形態において 4～2 2 個の炭素、他の実施形態において 8～2 2 個の炭素、他の実施形態において 1 0～2 8 個の炭素、他の実施形態において 7～2 2 個の炭素、他の実施形態において 1 2～2 2 個の炭素、他の実施形態において 4～1 8 個の炭素、他の実施形態において 1 2～2 2 個の炭素、さらに他の実施形態において 1 2～1 8 個の炭素の鎖を有し得る。

20

30

30

【0095】

ある実施形態において、I S P R 抽出剤 2 9 は、以下の脂肪酸：アゼライン酸、カプリン酸、カプリル酸、ヒマシ油、ヤシ油（すなわち、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、カプリル酸、カプリン酸、ステアリン酸、カプロン酸、アラキジン酸、オレイン酸、およびリノール酸を含む脂肪酸の天然に存在する組合せとして）、二量体酸、イソステアリン酸、ラウリン酸、亜麻仁油、ミリスチン酸、オレイン酸、パーム油、パルミチン酸、パーム核油、ペラルゴン酸、リシノール酸、セバシン酸、大豆油、ステアリン酸、トール油、獸脂、および # 1 2 ヒドロキシステアリン酸のうちの 1 つ以上である。ある実施形態において、I S P R 抽出剤 2 9 は、二酸、例えば、アゼライン酸およびセバシン酸のうちの 1 つ以上である。したがって、ある実施形態において、I S P R 抽出剤 2 9 は、2 種以上の異なる脂肪酸の混合物であり得る。ある実施形態において、I S P R 抽出剤 2 9 は、例えば、2 0 1 0 年 7 月 2 8 日に出願された、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第 6 1 / 3 6 8 , 4 4 4 号明細書に記載されるバイオマス脂質などの天然油の酵素加水分解から生成される遊離脂肪酸であり得る。このような実施形態において、抽出剤 2 9 を生成するためのバイオマス脂質は、原料 1 2 が得られる同じかまたは異なるバイオマス源に由来し得る。例えば、ある実施形態において、抽出剤 2 9 を生成するためのバイオマス脂質は、大豆に由来し得るが、原料 1 2 のバイオマス源はトウモロコシである。当業者に明らかであるはずであるように、原料 1 2 に対する抽出剤 2 9 のための異なるバイオマス源の考えられるあらゆる組合せを使用することができる。

40

【0096】

50

図1の実施形態において、生成物アルコールは、発酵プロセスから原位置で抽出され、二相混合物39の分離が、別個の槽35で起こる。原位置抽出発酵は、発酵槽30中でバッチモードまたは連続モードで行われ得る。原位置抽出発酵では、有機抽出剤を、発酵の開始時点で発酵培地と接触させ、二相発酵培地を形成することができる。あるいは、微生物が所望の量の増殖（培地の光学密度を測定することによって決定され得る）を達成した後、有機抽出剤を発酵培地と接触させることができる。さらに、発酵培地中の生成物アルコールレベルが、予め選択したレベルに達した時点で、有機抽出剤を発酵培地と接触させることができる。例えば、ブタノール生成の場合、ブタノール濃度が、有毒なレベルに達する前の時点で、ISP抽出剤を発酵培地と接触させることができる。発酵培地をISP抽出剤と接触させた後、ブタノール生成物が抽出剤中に分離し、微生物を含有する水相中のブタノールの濃度が低下し、それによって、抑制性のブタノール生成物への生成微生物の曝露が抑えられる。

10

【0097】

使用されるISP抽出剤の体積は、後述されるように、発酵培地の体積、発酵槽のサイズ、ブタノール生成物のための抽出剤の分配係数、および選択される発酵モードを含むいくつかの要因に応じて決まる。抽出剤の体積は、発酵槽の使用体積の約3%～約60%であり得る。抽出の効率に応じて、発酵培地中のブタノールの水相力価は、例えば、約5g/L～約85g/L、約10g/L～約40g/L、約10g/L～約20g/L、約15g/L～約50g/Lまたは約20g/L～約60g/Lであり得る。理論に制約されるものではないが、より高いブタノール力価は、抽出発酵方法を用いて、発酵培地から毒性ブタノール生成物を除去し、それによって、微生物に対して有毒なレベルより低いレベルを保つことから得られると考えられる。

20

【0098】

原位置抽出発酵のバッチモードにおいて、所定の体積の有機抽出剤が発酵槽に加えられ、抽出剤は、プロセス中に除去されない。このモードは、発酵培地中の抑制性のブタノール生成物の濃度を最小限に抑えるために、より大きい体積の有機抽出剤を必要とする。その結果、発酵培地の体積は、より小さく、生成される生成物の量は、連続モードを用いて得られる量より少ない。例えば、バッチ式モードにおける抽出剤の体積は、一実施形態において発酵槽の使用体積の20%～約60%であり、別の実施形態において約30%～約60%であり得る。

30

【0099】

ガスストリッピング（図示せず）を、有機抽出剤と同時に用いて、生成物アルコールを発酵培地から除去することができる。

【0100】

ある実施形態において、二相混合物の分離は、後述される図4および5の実施形態に示されるように、発酵槽で行うことができる。特に、原位置抽出発酵の連続モードにおいて、一実施形態において、抽出剤28は、発酵槽30に導入されて、その中で二相混合物が得られ、アルコール含有有機相流36が、発酵槽30から直接出る。水相流34も発酵槽30から直接出ることができ、一切の残っている生成物アルコールを除去するために処理され、再利用され、または廃棄され、新しい発酵培地と交換され得る。ISP抽出剤によるアルコール生成物の抽出は、発酵プロセスからの微生物32の除去を伴うかまたは伴わずに行うことができる。微生物32は、以下に限定はされないが、ろ過または遠心分離を含む、当該技術分野において公知の手段によって、発酵プロセスから除去され得る。例えば、水相流34は、酵母などの微生物32を含み得る。微生物32は、例えば、遠心分離機（図示せず）において、水相流から容易に分離され得る。その後、微生物32は、発酵槽30に再利用することができ、発酵槽30は、時間の経過とともにアルコール生成の生成速度を上げ、それによって、アルコール生成の効率を高めることができる。

40

【0101】

原位置抽出発酵の連続モードにおいて、抽出剤の体積は、一実施形態において発酵槽の使用体積の約3%～約50%であり、別の実施形態において約3%～約30%であり、別

50

の実施形態において 3 % ~ 約 20 % であり ; 別の実施形態において 3 % ~ 約 10 % であり得る。生成物は、反応器から連続して除去されるため、より小さい体積の抽出剤が必要とされ、より大きい体積の発酵培地の使用が可能になる。

【 0102 】

原位置抽出発酵の代わりとして、生成物アルコールは、発酵槽 30 の下流の発酵プロスから抽出され得る。このような場合、発酵プロスは、発酵槽 30 から除去され、槽 35 に導入され得る。次に、抽出剤 28 は、槽 35 に導入され、発酵プロスと接触されて、槽 35 中で二相混合物 39 が得られ、次に、これは、有機相 36 と水相 34 とに分離される。あるいは、抽出剤 28 は、槽 35 に導入される前に、別個の槽（図示せず）中で発酵プロスに加えられ得る。

10

【 0103 】

脂肪酸抽出剤 28 は、生成物アルコールのための油 26 の分配係数より高い、生成物アルコールのための分配係数を有する。例えば、原料 12 がトウモロコシである場合、トウモロコシ油 26 は、発酵プロス中に存在する場合、約 0.28 未満の生成物アルコールのための分配係数を有し得る一方、トウモロコシ油 26 に由来する脂肪酸抽出剤 28 は、約 0.28 以上の分配係数を有し得る。一実施形態において、脂肪酸抽出剤 28 は、少なくとも約 1、別の実施形態において少なくとも約 2、別の実施形態において少なくとも約 2.5、別の実施形態において少なくとも約 2.75、別の実施形態において少なくとも約 3 の、ブタノールなどの生成物アルコールのための分配係数を有する。したがって、原料の油成分の除去により、ISP R 抽出剤の分配係数の低下に対するそれを軽減するだけでなく、油自体より生成物アルコールを水相からより多く分離し得る脂肪酸抽出剤の生成のための原料としての役割も果たすことによって、抽出発酵における生成物アルコール生成の効率を高める。さらに、原料 12 中の油 26 に由来する脂肪酸抽出剤 28 は、単独または外部からの抽出剤（例えば、外部から供給されるオレイルアルコール）と組み合わせて使用することができ、それによって、外部からの抽出剤に関連するコストを削減するかまたはなくすことができる。

20

【 0104 】

さらに、脂肪酸抽出剤 28 が遊離脂肪酸を含む場合、発酵槽 30 中の微生物 32 によるグルコース消費率は、このような遊離脂肪酸がない場合よりこのような遊離脂肪酸の存在下でより高くなり得る。したがって、本発明のある実施形態において、発酵プロスは、遊離脂肪酸を有する脂肪酸抽出剤と接触させることができ、それによって、遊離脂肪酸は、遊離脂肪酸（例えば、オレイルアルコール）を伴わない ISP R 抽出剤が抽出発酵において使用される場合のグルコース取り込みと比較して、微生物 32 によるグルコース取り込みを増加させ得る。例えば、後述される実施例 2 の表 1 に示されるように、抽出発酵において脂肪酸抽出剤として使用される脂肪アミド / 脂肪酸混合物は、オレイルアルコールを抽出剤として用いた場合より、サッカロマイセス属（*Saccharomyces*）ブタノロジエン（*butanologen*）による高いグルコース取り込み率を提供し得る。発酵プロセスから生成物アルコールを生成するための方法であって、遊離脂肪酸がプロセス中の工程において生成され、微生物増殖速度およびグルコース消費を向上するために発酵槽中の微生物培地と接触される方法が、全体が参照により本明細書に援用される、2010 年 7 月 28 日に出願された、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第 61/368,451 号明細書に記載されている。

30

【 0105 】

当業者に明らかであるはずであるように、ある実施形態において、図 1 のシステムおよび方法は、発酵槽 30 中の同時糖化発酵が、分離器 20 と発酵槽 30 との間の別個の糖化槽 60 に置き換えられるように変更され得る。

40

【 0106 】

さらに他の実施形態において、例えば図 2 の実施形態に示されるように、糖化が、分離器 20 と液化槽 10 との間に位置する別個の糖化槽 60 で行われ得る。図 2 は、酵素 32 を受け入れる別個の糖化槽 60 を含み、油流 26 が、液化され、糖化された原料流 62 か

50

ら分離される以外は図1とほぼ同一である。原料スラリー16が、グルコアミラーゼなどの酵素38とともに糖化槽60に導入され、それによって、スラリー16中のオリゴ糖の形態の糖類が、単糖類へと分解され得る。液化され、糖化された原料流62が、糖化槽60を出て、分離器20に導入される。原料流62は、原料に由来する、単糖類、油、および非溶解固体を含む。分離器20において、原料流62は、油流26および実質的に水流23中に分離され、それが発酵槽30に供給される。示される実施形態において、水流23は非溶解固体を含む。あるいは、図1の実施形態を参照して記載されるように、固体は、分離器20においてウェットケーキ24として取り出され得る。分離器20から排出される油流26は、所定の量のグリセリド、特にトリグリセリドを有し、それが、反応槽40において1種以上の物質42と接触される。物質42は、油26に由来するグリセリドの少なくとも一部を脂肪酸抽出剤28へと化学的に転化し、それが、発酵槽30に供給される。図2の実施形態の残りのプロセス作業は、図1と同一であるため、再度詳細に説明しない。

10

【0107】

本発明のある実施形態において、例えば図3の実施形態に示されるように、抽出発酵は、原料12のバイオマス源と同じかまたは異なるバイオマス源に由来するが、原料12に含まれる実際の油に由来しない脂肪酸抽出剤28'を用い得る。例えば、原料12がトウモロコシである場合、脂肪酸抽出剤28'は、トウモロコシ油に由来し得るが、抽出剤28'を生成するトウモロコシ油は、原料12に含まれるトウモロコシ油ではなく、図1の実施形態において提供される反応槽40に分離される。別の例として、脂肪酸抽出剤28'は、バイオマス源としてのダイズ(または大豆)に由来し得る一方、原料12のバイオマス源はトウモロコシである。当業者に明らかであるはずであるように、原料12に対して抽出剤28'の異なるバイオマス源の考えられるあらゆる組合せを使用することができる。

20

【0108】

ある実施形態において、脂肪酸抽出剤28'は、任意の天然油に由来するため、バイオマス源あるいは、動物源のいずれかに由来し得る。

【0109】

図3の実施形態において、液化された水流22が、糖化酵素38および微生物32とともに発酵槽30に供給され、それによって、生成物アルコールが、同時糖化発酵(SSF)によって生成される。ある実施形態において、糖化は、例えば図2の実施形態を参照して記載されるものなどの別個の槽で行われ得る。ある実施形態において、好ましくは、液化された水流22は、分離器20(図1を参照)によって取り出された油26を少なくとも有し、ある実施形態において、発酵槽30(図1を参照)に導入する前に、ウェットケーキ24として取り出される非溶解固体も有する。植物由来油などの天然油が、油26'の少なくとも一部を脂肪酸抽出剤28'に化学的に転化するための物質42とともに流れ26'として反応槽40に導入される。油流26'は、上流の原料スラリー16(図1を参照)に由来する油26ではない。任意の植物由来油またはISP用の脂肪酸抽出剤28'に化学的に転化され得る他の天然油が、油流26'の供給源であり得る。次に、反応槽40からの脂肪酸抽出剤28'は、発酵槽30に導入され、それによって、生成物アルコールは、脂肪酸抽出剤28'中にかなり分離するため、生成物アルコールは、油26'が発酵槽中に存在する場合、その中に分離するであろう。

30

【0110】

したがって、ある実施形態において、生成物アルコールは、原料12によってプロセスに元々導入されるのと同じ油26ではない植物由来油26'から得られる脂肪酸抽出剤28'を用いて抽出される。任意に、1種以上のさらなる抽出剤29が、水相から生成物アルコールを優先的に分離するための発酵槽30に導入され得る。1種以上のさらなる抽出剤29は、プロセスにおいて生成されなかつた外部から供給されるオレイルアルコールなどの外部からの抽出剤であり得、および/または別の脂肪酸抽出剤であり得る。ある実施形態において、このような他の脂肪酸抽出剤29は、発酵槽原料流22および油流26'

40

50

のバイオマス源のいずれかと同じかまたは異なるバイオマス源に由来する油から生成され得る。

【0111】

図3の実施形態の残りのプロセス作業は、水相34が発酵槽30に戻って供給されるものとして示されていないことを除いて図1および2と同一であるため、再度詳細に説明しない。しかしながら、本明細書に示される実施形態のいずれにおいても、図1を参照して上述したように、水相34の全てまたは一部が再利用され、廃棄され、および/または生成物アルコールを除去するようにさらに処理され得ることを理解されたい。

【0112】

本発明のある実施形態において、原料12に由来する油は、分離器20において分離されないが、例えば、液化前または液化中のいずれかで原料12中で、スラリー16中で、または糖化流62(図2を参照)中で、原位置で脂肪酸抽出剤へと化学的に転化される。例えば図4の実施形態において、原料12は、原料12中でのんぶんを加水分解して、液化された原料を生成するための適切な酵素14、例えば、-アミラーゼとともに液化槽10に供給される。原料12の液化前、液化中、または液化後のいずれかに、原料12中に存在する油を脂肪酸抽出剤28に化学的に転化するための1種以上の物質42も液化槽10に導入される。物質42は、酵素14の添加前または添加後のいずれかに液化槽10に導入され得、原料12中の油は、原料12の液化前、液化中、または液化後のいずれかに、抽出剤28に転化され得る。いずれの場合も、二相流18が液化槽10を出るよう、原料12中の油が、脂肪酸抽出剤28に転化される。二相流18は、脂肪酸抽出剤28ならびに液化された水相22を形成する糖、水、および非溶解固体の両方を含む。ある実施形態において、脂肪酸抽出剤が脂肪酸を含む場合、二相流18の水相22は、油中のグリセリドの、脂肪酸への転化に由来するグリセロール(グリセリン)を含み得る。ある実施形態において、このようなグリセロールが存在する場合、それは、発酵槽30中に導入される前に流れ18から除去され得る。

【0113】

図4を参照すると、二相流18(すなわち、流れ22、28)が、発酵槽30中で発酵プロセスと接触されて、二相混合物が形成される。発酵槽30において、SSFによって生成される生成物アルコールは、脂肪酸抽出剤28を含む有機相中へと分離する。あるいは、ある実施形態において、プロセスは、図2に関連して説明されるように、別個の糖化槽を含むように変更され得る。二相混合物の分離は、発酵槽30中で行われ、それによって、アルコール含有有機相流36および水相流34が、発酵槽30から直接出る。あるいは、二相混合物の分離は、図1~3の実施形態において提供されるように、別個の槽35中で行われ得る。任意に、1種以上のさらなる抽出剤29が、発酵槽30に導入されて、水相から生成物アルコールを優先的に分離する有機相が形成され得る。図4の実施形態の残りのプロセス作業は、上述した図と同一であるため、再度詳細に説明しない。

【0114】

本発明のある実施形態において、原料12中に存在するバイオマス油は、アルコール発酵の後の工程においてプロセス流から分離され得る。次に、発酵後に分離された油は、脂肪酸抽出剤に転化され、発酵槽中でISP抽出剤として導入され得る。例えば図5の実施形態において、原料12は、液化されて、原料に由来する油26を含む原料スラリー16が生成される。原料スラリー16は、原料に由来する非溶解固体も含み得る。あるいは、非溶解固体は、遠心分離機(図示せず)などの分離器によってスラリー16から分離され得る。油26を含有する原料スラリー16は、糖化酵素38および微生物32を含む発酵プロセスを含む発酵槽30に直接導入される。生成物アルコールが、発酵槽30中のSSFによって生成される。あるいは、ある実施形態において、プロセスは、図2に関連して説明されるように、別個の糖化槽を含むように変更され得る。

【0115】

ISP抽出剤29が、発酵槽30に導入されて、二相混合物が形成され、生成物アルコールは、ISP抽出剤29の有機相中に分離することによって除去される。油26も

10

20

30

40

50

有機相中に分離する。I S P R 抽出剤 2 9 は、天然油（例えば、オレイルアルコール）に由来しない 1 種以上の脂肪酸抽出剤および / または外部からの有機抽出剤であり得る。抽出剤 2 9 が脂肪酸抽出剤である場合、抽出剤 2 9 は、原料 1 2 によってプロセスに元々導入されるのと同じ油ではない植物由来油などの天然油から生成される脂肪酸抽出剤 2 8'（図 3 を参照）であり得る。

【 0 1 1 6 】

二相混合物の分離は、発酵槽 3 0 中で行われ、それによって、アルコール含有有機相流 3 6 および水相流 3 4 が、発酵槽 3 0 から直接出る。あるいは、二相混合物の分離は、図 1 ~ 3 の実施形態において提供されるように、別個の槽 3 5 中で行われ得る。油 2 6 を含む有機相流 3 6 は、分離器 5 0 に導入されて、抽出剤 2 9 から生成物アルコール 5 4 が回収される。得られたアルコール希薄抽出剤 2 7 は、回収された抽出剤 2 9 および油 2 6 を含む。油 2 6 を含む抽出剤 2 7 は、反応槽 4 0 に導入され、1 種以上の物質 4 2（例えば、反応剤および / または溶媒）と接触され、それが、油 2 6 の少なくとも一部を脂肪酸抽出剤 2 8 へと化学的に転化する。

10

【 0 1 1 7 】

次に、脂肪酸抽出剤 2 8 を含む抽出剤 2 7 は、発酵槽 3 0 中に戻って再利用され得る。このような再利用される抽出剤流 2 7 は、別個の流れまたは新鮮な、補給抽出剤流 2 9 と組み合わされた流れであり得る。次に、アルコール含有有機相 3 6 の後の引き抜きは、油 2 6 および生成物アルコールに加えて、脂肪酸抽出剤 2 8 および I S P R 抽出剤 2 9 を含み得る。次に、有機相 3 6 は、生成物アルコールを回収するように処理され、油と反応して脂肪酸抽出剤を形成し、得られたアルコール希薄脂肪酸抽出剤 2 8 およびアルコール希薄抽出剤 2 9 として発酵槽 3 0 中に戻って再利用され得る。ある実施形態において、プロセス自体が生成物アルコールを抽出するための十分な量の脂肪酸抽出剤 2 8 を生成し得るため、発酵プロセスが時間とともに運転されるにつれて、抽出剤 2 9 の使用を段階的に停止することができる。したがって、I S P R 抽出剤は、反応槽 4 0 を介して補給 I S P R 抽出剤としての、再利用される抽出剤 2 7 および脂肪酸抽出剤 2 8 であり得る。

20

【 0 1 1 8 】

あるいは、ある実施形態において、油 2 6 を含む有機相流 3 6 が、分離器 5 0 中の生成物アルコールの回収 5 4 の前に、反応槽 4 0 に導入され得る。このような実施形態において、有機相流 3 6 は、反応槽 5 0 に導入され、脂肪酸抽出剤 2 8 を生成するための 1 種以上の物質 4 2 と接触され得る。次に、脂肪酸抽出剤 2 8 を含む得られた有機相流 3 6 は、分離器 5 0 に導入されて、生成物アルコール 5 4 が回収され得、次に、得られたアルコール希薄抽出剤が、脂肪酸抽出剤 2 8 を含む抽出剤流 2 7 として発酵槽 3 0 中に戻って再利用され得る。さらに他の実施形態において、脂肪酸抽出剤 2 8 を生成するための物質 4 2 と油 2 6 を接触させる前に、油 2 6 は、有機相流 3 6 または抽出剤流 2 7 から分離され得る。次に、脂肪酸抽出剤 2 8 は、発酵槽 3 0 、異なる発酵槽（例えば、アルコール製造プラント中で発酵槽 3 0 と並行してまたは連続して動作する）に供給される I S P R 抽出剤として使用され、または後の使用のために貯蔵され得る。

30

【 0 1 1 9 】

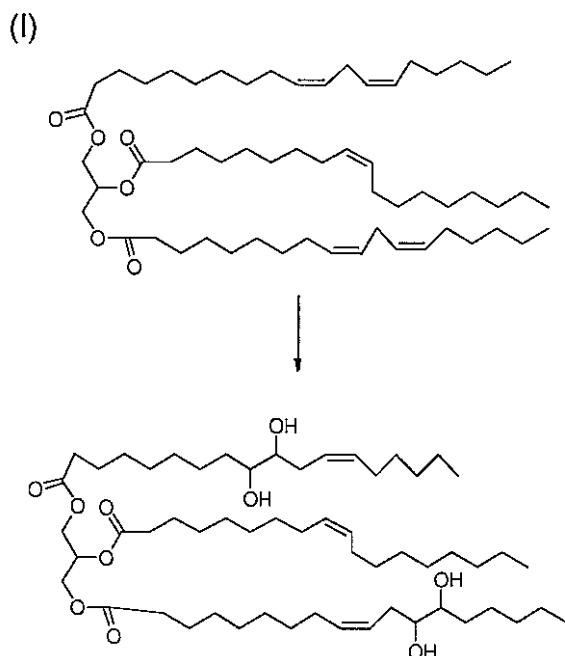
したがって、図 1 ~ 5 は、発酵プロセスを含む方法およびシステムの様々な非限定的な実施形態およびバイオマス由来の油 2 6 から生成される脂肪酸抽出剤 2 8 、および抽出発酵において生成物アルコールを除去するのに使用され得る植物由来油 2 6' などの天然油から生成される脂肪酸抽出剤 2 8' を提供する。これらの脂肪酸抽出剤 2 8 および 2 8' は、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸グリコールエステル、トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択され得る。トリグリセリドは、水酸化またはアルコキシ化（例えば、メトキシ化、エトキシ化）され得る。天然油から本明細書に記載される脂肪酸抽出剤へのグリセリドの化学的転化は、当該技術分野において公知の任意の反応スキームを用いて行うことができる。例えば、トウモロコシ油などの植物由来油に関して、ある実施形態において、脂肪酸抽出剤 2 8 または 2 8' としての水酸化トリグリセリドが、油 2 6 または 2 6' としてのトウモロコシ油を様々な反

40

50

応剤および溶媒 4 2 (詳細については以下の実施例 1 を参照) と接触させて、式 I に示される水酸化を行うことによって生成され得る :

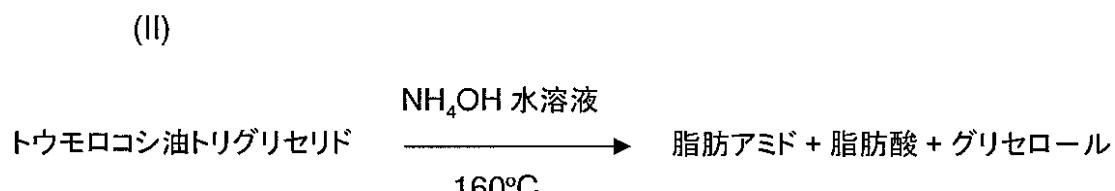
【化 1 】



【 0 1 2 0 】

ある実施形態において、例えば、 Roe, et al., Am. Oil Chem. Soc. 29: 18 - 22, 1952 に記載され、式 II に示されるように、油 26 または 26' としてのトウモロコシ油トリグリセリドが、反応剤 42 としての水酸化アンモニウム水溶液と反応されて、脂肪アミドおよび脂肪酸が得られ、それを一緒にまたは別々に、脂肪酸抽出剤 28 または 28' として使用することができる :

【化 2 】



【 0 1 2 1 】

ある実施形態において、水酸化アンモニウム水溶液は、約 28 重量 % のアンモニア水である。ある実施形態において、式 (II) にしたがって生成されるトウモロコシ油脂肪アミドとトウモロコシ油脂肪酸との混合物は、単一の脂肪酸抽出剤 28 または 28' を生成するのに使用され得る。ある実施形態において、脂肪アミドと脂肪酸との混合物は、リノアミド、リノール酸、オレアミド、オレイン酸、パルミトアミド、パルミチン酸、ステアラミド、およびステアリン酸を含み得る。このような実施形態において、このような混合物は、約 37 重量 % のリノアミド、約 18 % のリノール酸、約 19 重量 % のオレアミド、約 9 重量 % のオレイン酸、約 8.7 重量 % のパルミトアミド、約 4.3 重量 % のパルミチン酸、約 1.2 重量 % のステアラミド、および約 0.7 重量 % のステアリン酸から構成され得る。他の組成物の量が可能であり、使用されるトウモロコシ油中のリノール酸、オレイン酸、パルミチン酸、およびステアリン酸の天然に存在する量に応じて変わり得ることを理解されたい。例えば、油 26 または 26' としての高オレイン酸トウモロコシ油 (例えば約 65 重量 % 以下のオレイン酸含量を有し得る) は、オレイン酸含量が約 2

40

50

4重量%である通常のトウモロコシ油を用いた場合に生成され得るより、式(II)の反応にしたがって、オレアミドおよびオレイン酸がより多い混合物を生成するであろうことが予測されるであろう。ある実施形態において、式(II)にしたがって生成されるトウモロコシ油脂肪アミドおよびトウモロコシ油脂肪酸を、脂肪酸と混合して、脂肪酸抽出剤28または28'中の脂肪アミド対脂肪酸の比率を変化させることができる。ある実施形態において、脂肪アミド対脂肪酸の混合物は、約2:1~約1:2の混合物の比率であり得る。

【0122】

ある実施形態において、例えば、Kohlhase, et al., J. Am. Oil Chem. Soc. 48: 265-270, 1971に記載されるように、物質42として、反応剤としての無水アンモニアを、触媒としての酢酸アンモニウムとともに用いて、脂肪酸抽出剤28または28'としての純粋なトウモロコシ油脂肪アミドが、油26または26'としてのトウモロコシ油から合成され得る。ある実施形態において、純粋なトウモロコシ油脂肪アミドは、リノレアミド、オレアミド、パルミトアミド、およびステアラルアミドを含み得る。このような実施形態において、純粋なトウモロコシ油脂肪アミドは、約55重量%のリノレアミド、約28重量%のオレアミド、約13重量%のパルミトアミド、および約2重量%のステアラルアミドから構成され得る。上述したように、他の組成物の量が可能であり、使用されるトウモロコシ油中のリノール酸、オレイン酸、パルミチン酸、およびステアリン酸の天然に存在する量に応じて変わり得ることを理解されたい。

【0123】

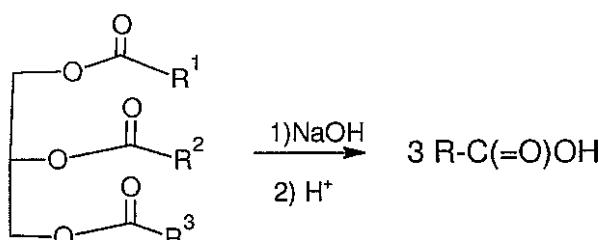
ある実施形態において、脂肪酸抽出剤28または28'は、式R(C=O)N(R')(R'')の脂肪アミドを含むことができ、式中、Rが、独立して、1つ以上の二重結合で任意に介在されるC₃~C₂₇のアルキル基からなる群から選択され、R'およびR''が、独立して、水素および1つ以上のヒドロキシル基を任意に含むC₁~C₆のアルキル基からなる群から選択される。

【0124】

ある実施形態において、脂肪酸抽出剤28または28'としてのトウモロコシ油脂肪酸は、例えば式IIIの反応にしたがって、物質42としてNaOHおよび水(例えば、以下の実施例4を参照)を用いた塩基加水分解によって、油26または26'としてのトウモロコシ油から合成され得る:

【化3】

(III)



【0125】

ある実施形態において、純粋なトウモロコシ油脂肪アミドおよび純粋なトウモロコシ油脂肪酸は、混合されて、単一の脂肪酸抽出剤28または28'が生成され得る。脂肪アミド対脂肪酸のこのような混合物は、例えば、2:1の混合物、他の実施形態において1:2の混合物であり得る。

【0126】

ある実施形態において、例えば式IVの反応にしたがって、物質42としてテトラヒドロフラン(THF)およびLiAlH₄(例えば、以下の実施例3を参照)を用いた還元によって、脂肪酸抽出剤28または28'としての脂肪アルコールは、油26または26'

10

20

30

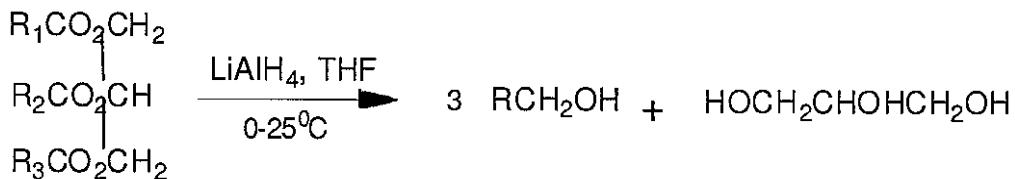
40

50

としてのトウモロコシ油から生成され得る：

【化4】

(IV)



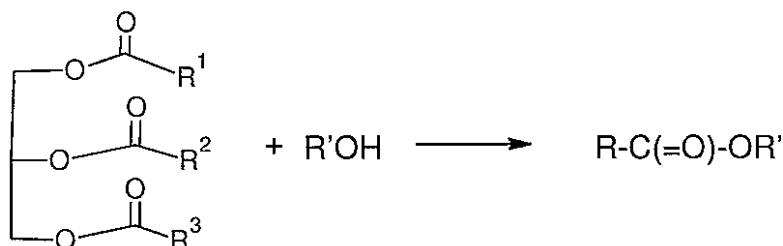
10

【0127】

ある実施形態において、油26または26' としてのトウモロコシ油は、物質42としてのメタノールおよび酸触媒と接触されて、脂肪酸抽出剤28または28' としての脂肪酸エステルが生成され得る。例えば、トウモロコシ油は、式Vの反応にしたがって、硫酸の存在下で、限定はされないが、8個以下の炭素を有するアルコールを含むアルコールと反応されて、脂肪酸エステル（例えば、以下の実施例4を参照）が得られる：

【化5】

(V)



20

【0128】

ある実施形態において、例えば式VIの反応にしたがって、脂肪酸メチルエステル（FAME）（上記の式Vを参照）を生成し、さらなる物質42（例えば、以下の実施例5を参照）としてのエチレングリコールとFAMEをさらに反応させることによって、油26または26' としてのトウモロコシ油は、脂肪酸抽出剤28または28' としてのトウモロコシ油エチレングリコールエステル（FAGE）に転化され得る：

【化6】

(VI)



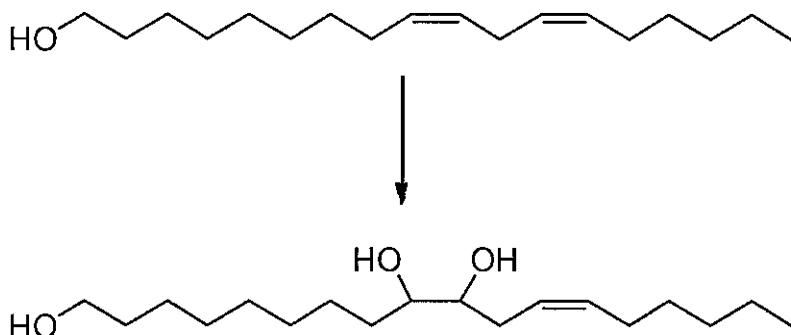
30

【0129】

ある実施形態において、脂肪アルコールは、水酸化されてもよく、抽出剤として使用され得る。例えば、脂肪アルコールは、過酢酸と、次に酸水溶液と反応されて、式VIIに示されるように、鎖に沿って二重結合が水酸化され得る（例えば、実施例8を参照）：

40

【化 7】



10

[0 1 3 0]

ある実施形態において、抽出剤は、液体またはビーズなどの固体であり得る。ビーズなどの固体の形態で得られるであろう抽出剤は、製造プロセス中、容易に取り扱うことができるであろう。さらに、生成物アルコール（例えば、ブタノール）は、例えば、ガストリッピング、別の溶媒への溶解、または当業者に公知の任意の他の利用可能な方法によって、この抽出剤から回収され得る。

[0 1 3 1]

図1～5を参照して記載される上述した実施形態のいずれかを含むある実施形態において、発酵槽30中の発酵プロセスは、少なくとも1つの発酵性炭素源からブタノールへの合成経路を介してブタノールを生成するように遺伝子組み換え（すなわち、遺伝子操作）された少なくとも1種の組み換え微生物32を含む。特に、組み換え微生物は、好適な炭素基質を含有する発酵プロセス内で増殖され得る。さらなる炭素基質としては、以下に限定はされないが、フルクトースなどの単糖類；ラクトース、マルトース、またはスクロースなどのオリゴ糖；でんぶんまたはセルロースなどの多糖類；あるいはそれらの混合物、ならびに乳清透過液、コーンスティーブリカー、サトウダイコン糖蜜、および大麦麦芽などの再生可能な原料からの精製されていない混合物が挙げられる。他の炭素基質としては、エタノール、乳酸塩、コハク酸塩、またはグリセロールが挙げられる。

20

[0 1 3 2]

さらに、炭素基質は、主要な生化学中間体への代謝的転化が示された、二酸化炭素またはメタノールなどの一炭素基質でもあり得る。一炭素基質および二炭素基質に加えて、メチロトローフ生物は、メチルアミン、グルコサミン、および代謝活性のための様々なアミノ酸などのいくつかの他の炭素含有化合物を用いることも知られている。例えば、メチロトローフ酵母は、メチルアミンからの炭素を用いて、トレハロースまたはグリセロールを形成することが知られている (Bellion, et al., *Microb. Growth Compd.*, [Int. Symp.], 7th (1993)、415-32, Editor(s): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, UK)。同様に、カンジダ属 (*Candida*) の様々な種が、アラニンまたはオレイン酸を代謝する (Sulter, et al., *Arch. Microbiol.* 153: 485-489, 1990)。したがって、本発明に用いられる炭素の供給源が、多種多様な炭素含有基質を包含してもよく、生物の選択のみによって限定されると考えられる。

30

【 0 1 3 3 】

上記の炭素基質およびそれらの混合物の全てが好適であると考えられるが、ある実施形態において、炭素基質は、グルコース、フルクトース、およびスクロース、あるいはこれらと、C5糖類を使用するように改変された酵母細胞のためのキシロースおよび/またはアラビノースなどのC5糖類との混合物である。スクロースは、サトウキビ、サトウダイコン、キャッサバ、スイートソルガム、およびそれらの混合物などの再生可能な糖源に由来し得る。グルコースおよびデキストロースは、トウモロコシ、小麦、ライ麦、大麦、オ

ート麦、およびそれらの混合物などの穀類を含むでんぷんベースの原料の糖化によって、再生可能な穀類源から誘導され得る。さらに、発酵性糖は、例えば、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2007/0031918 A1号明細書に記載されるような、前処理および糖化のプロセスによって、再生可能なセルロース系またはリグノセルロース系バイオマスから誘導され得る。適切な炭素源（水流22からの）に加えて、発酵プロセスは、培養物の成長およびジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（DHAD）を含む酵素経路の促進に適した、当業者に公知の、好適な無機物、塩、補因子、緩衝液および他の成分を含有しなければならない。

【0134】

生合成経路を介してブタノールを生成する組み換え微生物としては、クロストリジウム属（*Clostridium*）、ザイモモナス属（*Zymomonas*）、エシェリキア属（*Escherichia*）、サルモネラ属（*Salmonella*）、セラチア属（*Serratia*）、エルウェニア属（*Erwinia*）、クレブシエラ属（*Klebsiella*）、赤痢菌属（*Shigella*）、ロドコッカス属（*Rhodococcus*）、シュードモナス属（*Pseudomonas*）、バチルス属（*Bacillus*）、乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）、エンテロコッカス属（*Enterococcus*）、アルカリゲネス属（*Alcaligenes*）、クレブシエラ属（*Klebsiella*）、パエニバチルス属（*Paenibacillus*）、アルスロバクター属（*Arthrobacter*）、コリネバクテリウム属（*Corynebacterium*）、ブレビバクテリウム属（*Brevibacterium*）、シゾサッカロマイセス属（*Schizosaccharomyces*）、クルイベロマイセス属（*Kluyveromyces*）、ヤロウイア属（*Yarrowia*）、ピヒア属（*Pichia*）、カンジダ属（*Candida*）、ハンゼヌラ属（*Hansenula*）、またはサッカロマイセス属（*Saccharomyces*）のメンバーが挙げられる。一実施形態において、組み換え微生物は、大腸菌（*Escherichia coli*）、ラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）、およびサッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）からなる群から選択され得る。一実施形態において、組み換え微生物は、サッカロマイセス属（*Saccharomyces*）、ジゴサッカロマイセス属（*Zygosaccharomyces*）、シゾサッカロマイセス属（*Schizosaccharomyces*）、デッケラ属（*Dekkera*）、トルロプシス属（*Torulopsis*）、ブレタノマイセス属（*Brettanomyces*）、およびカンジダ属（*Candida*）のいくつかの種から選択されるクラブトリー陽性酵母である。クラブトリー陽性酵母の種としては、以下に限定はされないが、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、サッカロマイセス・クルイベリ（*Saccharomyces kluyveri*）、シゾサッカロマイセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、サッカロマイセス・バイアヌス（*Saccharomyces bayanus*）、サッカロマイセス・ミカタエ（*Saccharomyces mikatae*）、サッカロマイセス・パラドキサス（*Saccharomyces paradoxus*）、ジゴサッカロマイセス・ルーキシイ（*Zygosaccharomyces rouxii*）、およびカンジダ・グラブラタ（*Candida glabrata*）が挙げられる。例えば、微生物による発酵を用いたブタノールの生成、ならびにブタノールを生成する微生物は公知であり、例えば、参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第2009/0305370号明細書に開示されている。ある実施形態において、微生物は、ブタノール生合成経路を含む。好適なイソブタノール生合成経路は、当該技術分野において公知である（例えば、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2007/0092957号明細書を参照）。ある実施形態において、経路の基質・生成物転化を触媒する少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのポリペプチドが、微生物中の異種のポリヌクレオチドによってコードされる。ある実施形態において、経路の基質・生成物転化を触媒する全てのポリペプチドが

10

20

30

40

50

、微生物中の異種のポリヌクレオチドによってコードされる。ある実施形態において、微生物は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性の減少または消失を含む。ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を実質的に含まない微生物が、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2009/0305363号明細書に記載されている。GPD2などのNAD依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素を実質的に含まない微生物も、この文献に記載されている。

【0135】

実施例に使用されるものを含む特定の株の構造が、本明細書に提供される。

【0136】

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 株BP1064およびイソブタノロジエン (*isobutanologen*) BP1083 (NGCI-070) の作成

株BP1064は、CEN.PK 113-7D (CBS 8340; Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, Netherlands) から得られ、以下の遺伝子の欠失を含む：URA3、HIS3、PDC1、PDC5、PDC6、およびGPD2。BP1064を、プラスミドpYZ090 (配列番号1、その作成が、参照により本明細書に援用される、2009年9月29日に出願された米国仮特許出願第61/246,844号明細書に記載されている) およびpLH468 (配列番号2) で形質転換して、イソブタノロジエン株NGCI-070 (BP1083) を生成した。

【0137】

標的遺伝子および形質転換体の選択のためのG418耐性マーカーまたはURA3遺伝子のいずれかの上流および下流の相同領域を含むPCR断片による相同意組み換えによって、全コード配列を完全に除去した欠失を作り出した。10×P部位が側面にあるG418耐性マーカーを、Creリコンビナーゼを用いて除去した。URA3遺伝子を相同意組み換えによって除去して、無瘢痕 (scarless) 欠失を作り出し、または10×P部位が側面にある場合、Creリコンビナーゼを用いて除去した。

【0138】

無瘢痕欠失の手順を、Akada, et al. (Yeast 23:399-405, 2006) から適応させた。一般に、各無瘢痕欠失のためのPCRカセットを、PCRを重複させることによって、4つの断片、A-B-U-Cを組み合わせることによって作製した。PCRカセットは、プロモーター (URA3遺伝子の上流の250bp) およびターミネーター (URA3遺伝子の下流の150bp) とともに、天然CEN.PK 113-7D URA3遺伝子からなる、選択可能な/対抗選択可能な (counter-selectable) マーカー、URA3 (断片U) を含有していた。それぞれ長さ500bpの断片AおよびCは、標的遺伝子のすぐ上流の500bp (断片A) および標的遺伝子の3'500bp (断片C) に対応していた。断片AおよびCを、相同意組み換えによる、染色体へのカセットの組み込みに使用した。断片Bに対応する配列の直接の繰り返しが、染色体へのカセットの組み込みの際に生成された際、断片B (長さ500bp) は、標的遺伝子のすぐ下流の500bpに対応し、それを、相同意組み換えによる、染色体からのURA3マーカーおよび断片Cの切除に使用した。PCR産物ABUCカセットを用いて、URA3マーカーを、相同意組み換えによって、まず染色体に組み込み、次に染色体から切除した。最初の組み込みにより、3'500bpを除いて、遺伝子を欠失させた。切除の際、遺伝子の3'500bp領域も欠失させた。この方法を用いた遺伝子の組み込みでは、組み込まれる遺伝子が、断片AとBとの間のPCRカセットに含まれていた。

【0139】

URA3の欠失

内因性URA3コード領域を欠失させるために、ura3::10XP-kanMX-10XPカセットを、pLA54鑄型DNA (配列番号3) からPCRで増幅した。pL

10

20

30

40

50

A 54 は、 *K. lactis* (*K. lactis*) TEF1 プロモーターおよび kanMX マーカーを含有し、 Cre リコンビナーゼによる組み換えおよびマーカーの除去を可能にする loxP 部位が側面にある。 Phusion (登録商標) DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs Inc. , Ipswich , MA) ならびにプライマー BK505 および BK506 (配列番号 4 および 5) を用いて、 PCR を行った。 loxP - kanMX - loxP マーカーの組み込みが、 URA3 コード領域の置換をもたらすように、各プライマーの URA3 部分を、 URA3 プロモーターの上流の 5' 領域およびコード領域の下流の 3' 領域から得た。標準的な遺伝子組み換え技術 (Methods in Yeast Genetics , 2005 , Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , NY 、 pp. 201 - 202) を用いて、 PCR 産物を CEN.PK 113-7D へと形質転換し、 30 で G418 (100 μg / mL) を含有するYPDにおいて形質転換体を選択した。プライマー LA468 および LA492 (配列番号 6 および 7) ならびに指定される CEN.PK 113-7D ura3 : : kanMX を用いた PCR によって、形質転換体をスクリーニングして、正確な組み込みを確認した。

【 0140 】

HIS3 の欠失

無瘢痕 HIS3 欠失のための PCR カセットの 4 つの断片を、 Phusion (登録商標) High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs Inc. , Ipswich , MA) および Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast / Bact. キット (Qiagen , Valencia , CA) を用いて調製された、鑄型としての CEN.PK 113-7D ゲノム DNA を用いて増幅した。 HIS3 断片 A を、 HIS3 断片 B の 5' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP452 (配列番号 14) およびプライマー oBP453 (配列番号 15) を用いて増幅した。 HIS3 断片 B を、 HIS3 断片 A の 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP454 (配列番号 16) 、および HIS3 断片 U の 5' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP455 (配列番号 17) を用いて増幅した。 HIS3 断片 U を、 HIS3 断片 B の 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP456 (配列番号 18) 、および HIS3 断片 C の 5' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP457 (配列番号 19) を用いて増幅した。 HIS3 断片 C を、 HIS3 断片 U の 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP458 (配列番号 20) 、およびプライマー oBP459 (配列番号 21) を用いて増幅した。 PCR 産物を、 PCR Purification キット (Qiagen , Valencia , CA) を用いて精製した。 HIS3 断片 A および HIS3 断片 B を混合することによって PCR を重複させ、プライマー oBP452 (配列番号 14) および oBP455 (配列番号 17) を用いて増幅することによって、 HIS3 断片 AB を生成した。 HIS3 断片 U および HIS3 断片 C を混合することによって PCR を重複させ、プライマー oBP456 (配列番号 18) および oBP459 (配列番号 21) を用いて増幅することによって、 HIS3 ABUC カセットを生成した。 PCR 産物を、 PCR Purification キット (Qiagen , Valencia , CA) を用いて精製した。

【 0141 】

CEN.PK 113-7D ura3 : : kanMX のコンピテント細胞を作製し、 Frozen - EZ Yeast Transformation II (商標) キット (Zymo Research Corporation , Irvine , CA) を用

10

20

30

40

50

いて H I S 3 A B U C P C R カセットで形質転換した。形質転換混合物を、30で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養(plate)した。Gentra(登録商標)Puregene(登録商標)Yeast/Bact.キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP460(配列番号22)およびoBP461(配列番号23)によるPCRによって、his3ノックアウトを有する形質転換体をスクリーニングした。正確な形質転換体を、株CEN.PK 113-7D ura3::kanMX his3::URA3として選択した。

【0142】

ura3部位からのKanMXマーカー除去および his3部位からのURA3マーカー除去 10

Frozen-EZ Yeast Transformation II(商標)キット(Zymo Research Corporation, Irvine, CA)を用いて、pRS423::PGAL1-cre(配列番号66、米国仮特許出願第61/290,639号明細書に記載される)でCEN.PK 113-7D ura3::kanMX his3::URA3を形質転換し、30で2%のグルコースが補充されたヒスチジンおよびウラシル欠損合成完全培地において平板培養することによって、KanMXマーカーを除去した。形質転換体を、30で約6時間にわたって1%のガラクトースが補充されたYPD中で増殖させて、CreリコンビナーゼおよびKanMXマーカー切除を誘発し、回収のために30でYPD(2%のグルコース)プレートに平板培養した。分離株を、YPD中で一晩増殖させ、30で5-フルオロ-オロチン酸(5-FOA、0.1%)を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3マーカーを喪失した分離株を選択した。5-FOA耐性分離株を、pRS423::PGAL1-creプラスミドを除去するために、YPDにおいて増殖させ、平板培養した。YPD+G418プレート、ウラシル欠損合成完全培地のプレート、およびヒスチジン欠損合成完全培地のプレートにおける増殖をアッセイすることによって、KanMXマーカー、URA3マーカー、およびpRS423::PGAL1-creプラスミドの損失について分離株を調べた。G418に対して感受性であり、かつウラシルおよびヒスチジンに対して栄養要求性であった正確な分離株を、株CEN.PK 113-7D ura3::loxP his3として選択し、BP857として表した。Gentra(登録商標)Puregene(登録商標)Yeast/Bact.キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、ura3についてはプライマーoBP450(配列番号24)およびoBP451(配列番号25)、およびhis3についてはプライマーoBP460(配列番号22)およびoBP461(配列番号23)によるPCRおよび配列決定によって、欠失およびマーカー除去を確認した。 20

【0143】

PDC6の欠失

無瘢痕PDC6欠失のためのPCRカセットの4つの断片を、Phusion(登録商標)High Fidelity PCR Master Mix(New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)およびGentra(登録商標)Puregene(登録商標)Yeast/Bact.キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製された、鋳型としてのCEN.PK 113-7DゲノムDNAを用いて増幅した。PDC6断片Aを、PDC6断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP440(配列番号26)およびプライマーoBP441(配列番号27)を用いて増幅した。PDC6断片Bを、PDC6断片Aの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP442(配列番号28)、およびPDC6断片Uの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP443(配列番号29)を用いて増幅した。PDC6断片Uを、PDC6断片Bの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP444(配列番号30)、およびPDC6断片Cの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含む 30

10

20

30

40

50

プライマー o B P 4 4 5 (配列番号 3 1) を用いて増幅した。P D C 6 断片 C を、P D C 6 断片 U 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー o B P 4 4 6 (配列番号 3 2) 、およびプライマー o B P 4 4 7 (配列番号 3 3) を用いて増幅した。P C R 産物を、P C R P u r i f i c a t i o n キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) を用いて精製した。P D C 6 断片 A および P D C 6 断片 B を混合することによって P C R を重複させ、プライマー o B P 4 4 0 (配列番号 2 6) および o B P 4 4 3 (配列番号 2 9) を用いて増幅することによって、P D C 6 断片 A B を生成した。P D C 6 断片 U および P D C 6 断片 C を混合することによって P C R を重複させ、プライマー o B P 4 4 4 (配列番号 3 0) および o B P 4 4 7 (配列番号 3 3) を用いて増幅することによって、P D C 6 断片 U C を生成した。得られた P C R 産物を、アガロースゲル、続いて G e l E x t r a c t i o n キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) において精製した。P D C 6 断片 A B および P D C 6 断片 U C を混合することによって P C R を重複させ、プライマー o B P 4 4 0 (配列番号 2 6) および o B P 4 4 7 (配列番号 3 3) を用いて増幅することによって、P D C 6 A B U C カセットを生成した。P C R 産物を、P C R P u r i f i c a t i o n キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) を用いて精製した。
10

【 0 1 4 4 】

C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 のコンピメント細胞を作製し、F r o z e n - E Z Y e a s t T r a n s f o r m a t i o n I I (商標) キット (Z y m o R e s e a r c h C o r p o r a t i o n , I r v i n e , C A) を用いて P D C 6 A B U C P C R カセットで形質転換した。形質転換混合物を、3 0 で 2 % のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養した。p d c 6 ノックアウトを有する形質転換体を、G e n t r a (登録商標) P u r e g e n e (登録商標) Y e a s t / B a c t . キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) を用いて調製されたゲノム D N A を用いて、プライマー o B P 4 4 8 (配列番号 3 4) および B P 4 4 9 (配列番号 3 5) による P C R によってスクリーニングした。正確な形質転換体を、株 C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6 : : U R A 3 として選択した。
20

【 0 1 4 5 】

C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6 : : U R A 3 を、Y P D 中で一晩増殖させ、3 0 で 5 - フルオロ - オロチン酸 (0.1 %) を含有する合成完全培地において平板培養して、U R A 3 マーカーを喪失した分離株を選択した。G e n t r a (登録商標) P u r e g e n e (登録商標) Y e a s t / B a c t . キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) を用いて調製されたゲノム D N A を用いて、プライマー o B P 4 4 8 (配列番号 3 4) および o B P 4 4 9 (配列番号 3 5) による P C R および配列決定によって、欠失およびマーカー除去を確認した。P D C 6 、o B P 5 5 4 (配列番号 3 6) および o B P 5 5 5 (配列番号 3 7) のコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性 P C R 結果によって、分離株からの P D C 6 遺伝子がないことを実証した。正確な分離株を、株 C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6 として選択し、B P 8 9 1 として表した。
30

【 0 1 4 6 】

P D C 1 欠失 i l v D S m 組み込み

P D C 1 遺伝子を欠失させ、ミュータンス連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s m u t a n s) A T C C N o . 7 0 0 6 1 0 に由来する i l v D コード領域で置換した。A 断片、続いて、P D C 1 欠失 - i l v D S m 組み込みのための P C R カセットのミュータンス連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s m u t a n s) に由来する i l v D コード領域を、P h u s i o n (登録商標) H i g h F i d e l i t y P C R M a s t e r M i x (N e w E n g l a n d B i o L a b s I n c . , I p s w i c h , M A) および G e n t r a (登録商標) P u r e g e n e (登録商標) Y e a s t / B a c t . k i t (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) を用いて調製された、鋳型とし
40

10

20

30

40

50

ての N Y L A 8 3 (本明細書および米国仮特許出願第 6 1 / 2 4 6 , 7 0 9 号明細書に記載される) ゲノム D N A を用いて増幅した。 P D C 1 断片 A - i l v D S m (配列番号 1 3 8) を、 P D C 1 断片 B の 5 ' 末端に対して相同性を有する 5 ' テールを含むプライマー o B P 5 1 3 (配列番号 3 8) およびプライマー o B P 5 1 5 (配列番号 3 9) を用いて増殖した。 P D C 1 欠失 - i l v D S m 組み込みのための P C R カセットの B 、 U 、 および C 断片を、 Phusion (登録商標) H i g h F i d e l i t y P C R M a s t e r M i x (New England Biolabs Inc. , Ipswich , MA) および G e n t r a (登録商標) P u r e g e n e (登録商標) Y e a s t / B a c t . キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) を用いて調製された、 鑄型としての C E N . P K 1 1 3 - 7 D ゲノム D N A を用いて増幅した。 P D C 1 断片 B を、 P D C 1 断片 A - i l v D S m の 3 ' 末端に対して相同性を有する 5 ' テールを含むプライマー o B P 5 1 6 (配列番号 4 0) 、 および P D C 1 断片 U の 5 ' 末端に対して相同性を有する 5 ' テールを含むプライマー o B P 5 1 7 (配列番号 4 1) を用いて増幅した。 P D C 1 断片 U を、 P D C 1 断片 B の 3 ' 末端に対して相同性を有する 5 ' テールを含むプライマー o B P 5 1 8 (配列番号 4 2) 、 および P D C 1 断片 C の 5 ' 末端に対して相同性を有する 5 ' テールを含むプライマー o B P 5 1 9 (配列番号 4 3) を用いて増幅した。 P D C 1 断片 C を、 P D C 1 断片 U の 3 ' 末端に対して相同性を有する 5 ' テールを含むプライマー o B P 5 2 0 (配列番号 4 4) 、 およびプライマー o B P 5 2 1 (配列番号 4 5) を用いて増幅した。 P C R 産物を、 P C R P u r i f i c a t i o n キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) を用いて精製した。 P D C 1 断片 A - i l v D S m および P D C 1 断片 B を混合することによって P C R を重複させ、 プライマー o B P 5 1 3 (配列番号 3 8) および o B P 5 1 7 (配列番号 4 1) を用いて増幅することによって、 P D C 1 断片 A - i l v D S m - B を生成した。 P D C 1 断片 U および P D C 1 断片 C を混合することによって P C R を重複させ、 プライマー o B P 5 1 8 (配列番号 4 2) および o B P 5 2 1 (配列番号 4 5) を用いて増幅することによって、 P D C 1 断片 U C を生成した。 得られた P C R 産物を、 アガロースゲル、 続いて、 G e l E x t r a c t i o n キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) において精製した。 P D C 1 断片 A - i l v D S m - B および P D C 1 断片 U C を混合することによって P C R を重複させ、 プライマー o B P 5 1 3 (配列番号 3 8) および o B P 5 2 1 (配列番号 4 5) を用いて増幅することによって、 P D C 1 A - i l v D S m - B U C カセット (配列番号 1 3 9) を生成した。 P C R 産物を、 P C R P u r i f i c a t i o n キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) を用いて精製した。

【 0 1 4 7 】

C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6 のコンピテント細胞を作製し、 F r o z e n - E Z Y e a s t T r a n s f o r m a t i o n I I (商標) キット (Z y m o R e s e a r c h C o r p o r a t i o n , I r v i n e , C A) を用いて P D C 1 A - i l v D S m - B U C P C R カセットで形質転換した。 形質転換混合物を、 3 0 で 2 % のグルコースが補充されたウラシル欠損成完全培地において平板培養した。 p d c 1 ノックアウト i l v D S m 組み込みを有する形質転換体を、 G e n t r a (登録商標) P u r e g e n e (登録商標) Y e a s t / B a c t . キット (Q i a g e n , V a l e n c i a , C A) を用いて調製されたゲノム D N A を用いて、 プライマー o B P 5 1 1 (配列番号 4 6) および o B P 5 1 2 (配列番号 4 7) による P C R によってスクリーニングした。 P D C 1 、 o B P 5 5 0 (配列番号 4 8) および o B P 5 5 1 (配列番号 4 9) のコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性 P C R 結果によって、 分離株からの P D C 1 遺伝子がないことを実証した。 正確な形質転換体を、 株 C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6 p d c 1 : : i l v D S m - U R A 3 として選択した。

【 0 1 4 8 】

C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6 p d c 1 : : i l v D S m - U R A 3 を、 Y P D 中で一晩増殖させ、 3 0 で 5 - フルオ

10

20

30

40

50

口 - オロチン酸 (0.1%) を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3マークターを喪失した分離株を選択した。PDC1の欠失、i1vDSmの組み込み、およびマークター除去を、Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast / Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマー oBP511 (配列番号46) および oBP512 (配列番号47) によるPCRおよび配列決定によって確認した。正確な分離株を、株CEN.PK 113-7D ura3 :: loxP his3 pdc6 pdc1 :: i1vDSmとして選択し、BP907として表した。

【0149】

PDC5欠失 sadB組み込み

PDC5遺伝子を欠失させ、アクロモバクター・キシリソキシダンス (Achromobacter xylosoxidans) に由来するsadBコード領域で置換した。PDC5欠失 - sadB組み込みのためのPCRカセットのセグメントを、まずプラスミドpUC19-URA3MCSにクローニングした。

【0150】

pUC19-URA3MCSは、pUC19をベースとしており、多重クローニング部位 (MCS) に位置するサッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) に由来するURA3遺伝子の配列を含む。pUC19は、pMB1レプリコンおよび大腸菌 (Escherichia coli) における複製および選択のための - ラクタマーゼをコードする遺伝子を含む。URA3のためのコード配列に加えて、この遺伝子の上流および下流の配列が、酵母におけるURA3遺伝子の発現のために含まれていた。ベクターを、クローニングプロセスに使用することができ、酵母組み込みベクターとして使用することができる。

【0151】

サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) CEN.PK 113-7DゲノムDNAに由来するURA3コード領域の上流の250bpおよび下流の150bpとともにURA3コード領域を含むDNAを、Phusion (登録商標) High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) を用いて、BamHI、AscI、PmeI、およびFseI制限部位を含有するプライマー oBP438 (配列番号12)、およびXbaI、PacI、およびNotI制限部位を含有するoBP439 (配列番号13) を用いて増幅した。ゲノムDNAを、Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast / Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製した。PCR産物およびpUC19 (配列番号140) を、BamHIおよびXbaIによる消化の後、T4 DNAリガーゼを用いてライゲートして、ベクター pUC19-URA3MCSを生成した。プライマー oBP264 (配列番号10) および oBP265 (配列番号11) によるPCRおよび配列決定によって、ベクターを確認した。

【0152】

sadBおよびPDC5断片Bのコード配列を、pUC19-URA3MCSにクローニングして、PDC5 A-sadB-BUC PCRカセットの sadB-BU部分を生成した。AscI制限部位を含有するプライマー oBP530 (配列番号50)、およびPDC5断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP531 (配列番号51) とともに、鑄型としてpLH468-sadB (配列番号67) を用いて、sadBのコード配列を増幅した。PDC5断片Bを、sadBの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP532 (配列番号52)、およびPmeI制限部位を含有するプライマー oBP533 (配列番号53) を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。sadBおよびPDC5断片B PCR産物を混合することによってPCRを重複させ、プライマー oBP530 (配列番号50) および oBP531 (配列番号51) を用いて増幅した。

10

20

30

40

50

B P 5 3 3 (配列番号 5 3) を用いて増幅することによって、s a d B - P D C 5 断片 B を生成した。得られた P C R 産物を、A s c I および P m e I によって消化させ、適切な酵素による消化の後、T 4 DNA リガーゼを用いて p U C 1 9 - U R A 3 M C S の対応する部位にライゲートした。得られたプラスミドを、P D C 5 断片 C の 5' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー o B P 5 3 6 (配列番号 5 4) および o B P 5 4 6 (配列番号 5 5) を用いて、s a d B - 断片 B - 断片 U の増幅のための鑄型として使用した。P D C 5 断片 C を、P D C 5 s a d B - 断片 B - 断片 U の 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー o B P 5 4 7 (配列番号 5 6) 、およびプライマー o B P 5 3 9 (配列番号 5 7) を用いて増幅した。P C R 産物を、P C R P u r i f i c a t i o n キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。P D C 5 s a d B - 断片 B - 断片 U および P D C 5 断片 C を混合することによって P C R を重複させ、プライマー o B P 5 3 6 (配列番号 5 4) および o B P 5 3 9 (配列番号 5 7) を用いて増幅することによって、P D C 5 s a d B - 断片 B - 断片 U - 断片 C を生成した。得られた P C R 産物を、アガロースゲル、続いて、G e l E x t r a c t i o n キット (Qiagen, Valencia, CA) において精製した。天然の P D C 5 コード配列のすぐ上流の 50 ヌクレオチドに対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー o B P 5 4 2 (配列番号 5 8) 、および o B P 5 3 9 (配列番号 5 7) を用いて P D C 5 s a d B - 断片 B - 断片 U - 断片 C を増幅することによって、P D C 5 A - s a d B - B U C P C R カセット (配列番号 1 4 1) を生成した。P C R 産物を、P C R P u r i f i c a t i o n キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。
10
20

【0153】

C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6
 p d c 1 : : i l v D S m のコンピテント細胞を作製し、F r o z e n - E Z Y e a s t T r a n s f o r m a t i o n I I (商標) キット (Z y m o R e s e a r c h C o r p o r a t i o n , I r v i n e , C A) を用いて P D C 5 A - s a d B - B U C P C R カセットで形質転換した。形質転換混合物を、30 度 1% のエタノール (グルコースではない) が補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養した。p d c 5 ノックアウト s a d B 組み込みを有する形質転換体を、G e n t r a (登録商標) P u r e g e n e (登録商標) Y e a s t / B a c t . キット (Qiagen, Valencia, CA) によって調製されたゲノム D N A を用いて、プライマー o B P 5 4 0 (配列番号 5 9) および o B P 5 4 1 (配列番号 6 0) による P C R によってスクリーニングした。P D C 5 、 o B P 5 5 2 (配列番号 6 1) および o B P 5 5 3 (配列番号 6 2) のコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性 P C R 結果によって、分離株からの P D C 5 遺伝子がないことを実証した。正確な形質転換体を、株 C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6 p d c 1 : : i l v D S m p d c 5 : : s a d B - U R A 3 として選択した。
30

【0154】

C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6
 p d c 1 : : i l v D S m p d c 5 : : s a d B - U R A 3 を、Y P E (1% のエタノール) 中で一晩増殖させ、エタノール (グルコースではない) が補充され、かつ 30 度 5 - フルオロ - オロチン酸 (0.1%) を含有する合成完全培地において平板培養して、U R A 3 マーカーを喪失した分離株を選択した。P D C 5 の欠失、s a d B の組み込み、およびマーカー除去を、G e n t r a (登録商標) P u r e g e n e (登録商標) Y e a s t / B a c t . キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製されたゲノム D N A を用いて、プライマー o B P 5 4 0 (配列番号 5 9) および o B P 5 4 1 (配列番号 6 0) による P C R によって確認した。正確な分離株を、株 C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6 p d c 1 : : i l v D S m p d c 5 : : s a d B として選択し、B P 9 1 3 として表した。
40

【0155】

10

20

30

40

50

G P D 2 の欠失

内因性 G P D 2 コード領域を欠失させるために、g p d 2 : : l o x P - U R A 3 - 1 o x P カセット（配列番号 142）を、鑄型 DNA として l o x P - U R A 3 - 1 o x P（配列番号 68）を用いて、P C R で増幅した。l o x P - U R A 3 - 1 o x P は、l o x P リコンビナーゼ部位が側面にある（A T C C N o . 7 7 1 0 7）に由来する U R A 3 マーカーを含有する。Phusion（登録商標）DNAポリメラーゼ（New England BioLabs Inc., Ipswich, MA）ならびにプライマー L A 5 1 2 および L A 5 1 3（配列番号 8 および 9）を用いて、P C R を行った。l o x P - U R A 3 - 1 o x P マーカーの組み込みが、G P D 2 コード領域の置換をもたらすように、各プライマーの G P D 2 部分を、G P D 2 コード領域の上流の 5' 領域およびコード領域の下流の 3' 領域から得た。P C R 産物を B P 9 1 3 に形質転換し、形質転換体を、1% のエタノール（グルコースではない）が補充されたウラシル欠損合成完全培地において選択した。プライマー o B P 5 8 2 および A A 2 7 0（配列番号 63 および 64）を用いた P C R によって、形質転換体をスクリーニングして、正確な組み込みを確認した。

【0156】

p R S 4 2 3 : : P G A L 1 - c r e（配列番号 66）を用いた形質転換、および 30 で 1% のエタノールが補充されたヒスチジン欠損合成完全培地における平板培養によって、U R A 3 マーカーを再利用した。形質転換体を、1% のエタノールが補充され、かつ 5 - フルオロ - オロチニ酸（0.1%）を含有する合成完全培地においてストリークし（s t r e a k）、30 で培養して、U R A 3 マーカーを喪失した分離株を選択した。5 - F O A 耐性分離株を、p R S 4 2 3 : : P G A L 1 - c r e プラスミドの除去のために Y P E（1% のエタノール）の中で増殖させた。欠失およびマーカー除去を、プライマー o B P 5 8 2（配列番号 63）および o B P 5 9 1（配列番号 65）による P C R によって確認した。正確な分離株を、株 C E N . P K 1 1 3 - 7 D u r a 3 : : l o x P h i s 3 p d c 6 p d c 1 : : i l v D S m p d c 5 : : s a d B g p d 2 : : l o x P として選択し、P N Y 1 5 0 3（B P 1 0 6 4）として表した。

【0157】

B P 1 0 6 4 を、プラスミド p Y Z 0 9 0（配列番号 1）および p L H 4 6 8（配列番号 2）で形質転換して、株 N G C I - 0 7 0（B P 1 0 8 3；P N Y 1 5 0 4）を生成した。

【0158】

株 N Y L A 7 4 および N Y L A 8 3 の作成

S . セレヴィシエ（S . c e r e v i s i a e）の内因性 P D C 1 および P D C 6 遺伝子の挿入不活化。P D C 1、P D C 5、および P D C 6 遺伝子は、以下に記載されるビルビン酸デカルボキシラーゼの 3 つの主なアイソザイムをコードする：

【0159】

p R S 4 2 5 : : G P M - s a d B の作成

アクロモバクター・キシリソキシダンス（A c h r o m o b a c t e r x y l o s o x i d a n s）に由来するブタノールデヒドロゲナーゼをコードする DNA 断片（配列番号 70）（米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 2 6 9 8 2 3 号明細書に開示されている）をクローニングした。第 2 級アルコールデヒドロゲナーゼのための s a d B と呼ばれるこの遺伝子のコード領域（配列番号 69）を、それぞれ順方向および逆方向プライマー N 4 7 3 および N 4 6 9（配列番号 74 および 75）を用いてグラム陰性菌のために推奨されるプロトコルにしたがって、G e n t r a（登録商標）P u r e g e n e（登録商標）キット（Q i a g e n , V a l e n c i a , C A）を用いて調製される、A . キシリソキシダンス（A . x y l o s o x i d a n s）ゲノム DNA から、標準条件を用いて増幅した。P C R 産物を、p C R（登録商標）4 B L U N T（I n v i t r o g e n（商標）, C a r l s b a d , C A）へと T O P O（登録商標）- B l u n t でクローニングを行って、p C R 4 B l u n t : : s a d B を生成し、それを、大腸菌（E . c o l i ）M a c h - 1 細胞へと形質転換した。次に、プラスミドを 4 つのクローンから単離し、配列を確認

10

20

30

40

50

した。

【0160】

s a d B コード領域を、p C R 4 B l u n t : : s a d B から P C R 増幅した。 P C R プライマーは、酵母 G P M 1 プロモーターおよび A D H 1 ターミネーター（配列番号 7 6 および 7 7 として提供される N 5 8 3 および N 5 8 4 ）と重複し得る追加の 5' 配列を含んでいた。次に、P C R 産物を、以下のように、サッカロマイセス・セレビシエ（ S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e ）における「ギャップ修復（ g a p r e p a i r ）」方法を用いてクローニングした（ M a , e t a l . , G e n e 5 8 : 2 0 1 - 2 1 6 , 1 9 8 7 ）。 G P M 1 プロモーター（配列番号 7 2 ）、乳酸連鎖球菌（ L a c t o c o c c u s l a c t i s ）に由来する k i v D コード領域（配列番号 7 1 ） 10 、および A D H 1 ターミネーター（配列番号 7 3 ）を含有する酵母・大腸菌（ E . c o l i ）シャトルベクター p R S 4 2 5 : : G P M : : k i v D : : A D H （米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 9 2 9 5 7 A 1 号明細書の実施例 1 7 に記載される）を、 B b v C I および P a c I 制限酵素で消化して、 k i v D コード領域を放出した。約 1 μ g の残っているベクター断片を、 1 μ g の s a d B P C R 産物とともに、 S . セレヴィシエ（ S . c e r e v i s i a e ）株 B Y 4 7 4 1 へと形質転換した。形質転換体を、ロイシン欠損合成完全培地において選択した。 p R S 4 2 5 : : G P M - s a d B （配列番号 1 2 4 ）を生成する適切な組み換え事象を、プライマー N 1 4 2 および N 4 5 9 （配列番号 1 0 8 および 1 0 9 ）を用いた P C R によって確認した。

【0161】

p d c 6 : : P G P M 1 - s a d B 組み込みカセットの作成および P D C 6 の欠失：

p d c 6 : : P G P M 1 - s a d B - A D H 1 t - U R A 3 r 組み込みカセットを、 p R S 4 2 5 : : G P M - s a d B （配列番号 7 8 ）に由来する G P M - s a d B - A D H t セグメント（配列番号 7 9 ）を、 p U C 1 9 - U R A 3 r に由来する U R A 3 r 遺伝子に結合することによって作製した。 p U C 1 9 - U R A 3 r （配列番号 8 0 ）は、インビボでの相同的組み換えおよび U R A 3 マーカーの除去を可能にする、 7 5 b p の相同反復配列が側面にある p R S 4 2 6 (A T C C N o . 7 7 1 0 7) に由来する U R A 3 マーカーを含む。 2 つの D N A セグメントを、 Ph u s i o n (登録商標) D N A ポリメラーゼ (N e w E n g l a n d B i o L a b s I n c . , I p s w i c h , M A) および プライマー 1 1 4 1 1 7 - 1 1 A ~ 1 1 4 1 1 7 - 1 1 D (配列番号 8 1 、 8 2 、 8 3 、および 8 4) 、ならびに 1 1 4 1 1 7 - 1 3 A および 1 1 4 1 1 7 - 1 3 B (配列番号 8 5 および 8 6) とともに、 p R S 4 2 5 : : G P M - s a d B および p U C 1 9 - U R A 3 r プラスミド D N A を鑄型として用いた S O E P C R (H o r t o n , e t a l . , G e n e 7 7 : 6 1 - 6 8 , 1 9 8 9 に記載される) によって結合した。 20

【0162】

S O E P C R (1 1 4 1 1 7 - 1 3 A および 1 1 4 1 1 7 - 1 3 B) のための外部プライマーは、それぞれ P D C 6 プロモーターおよびターミネーターの上流および下流の領域に相同な約 5 0 b p の 5' および 3' 領域を含んでいた。標準的な遺伝子組み換え技術 (M e t h o d s i n Y e a s t G e n e t i c s , 2 0 0 5 , C o l d S p r i n g Harbor Laboratory Press , C o l d S p r i n g Harbor , N Y , p p . 2 0 1 - 2 0 2) を用いて、完成されたカセット P C R 断片を、 B Y 4 7 0 0 (A T C C N o . 2 0 0 8 6 6) へと形質転換し、形質転換体を、 3 0 で 2 % のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地上で維持した。形質転換体を、プライマー 1 1 2 5 9 0 - 3 4 G および 1 1 2 5 9 0 - 3 4 H (配列番号 8 7 および 8 8) 、ならびに 1 1 2 5 9 0 - 3 4 F および 1 1 2 5 9 0 - 4 9 E (配列番号 8 9 および 9 0) を用いた P C R によってスクリーニングして、 P D C 6 コード領域の欠失を有する P D C 6 遺伝子座における組み込みを確認した。標準プロトコルにしたがい、 U R A 3 r マーカーを、 3 0 で 2 % のグルコースおよび 5 - F O A が補充された合成完全培地において平板培養することによって再利用した。 5 - F O A プレートからのコロニーを、 S D - U R A 培地上にパッチして、増殖がないことを確認することによって、マーカーの 40

10

20

30

40

50

除去を確認した。得られた同定株は、遺伝子型： B Y 4 7 0 0 p d c 6 : : P G P M 1 - s a d B - A D H 1 t を有する。

【 0 1 6 3 】

p d c 1 : : P P D C 1 - i l v D 組み込みカセットの作成および P D C 1 の欠失： Phusion (登録商標) DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) ならびにプライマー-114117-27A~114117-27D (配列番号 110, 111, 112、および 113) とともに、pLH468 および pUC19-URA3r プラスミド DNA を鋳型として用いた SOE PCR (Horton, et al., Gene 77: 61-68, 1989 によって記載される) によって、pLH468 (配列番号 2) に由来する i l v D - F B A 1 t セグメント (配列番号 91) を、pUC19-URA3r に由来する URA3r 遺伝子に結合することによって、p d c 1 : : P P D C 1 - i l v D - F B A 1 t - U R A 3 r 組み込みカセットを作製した。 10

【 0 1 6 4 】

SOE PCR (114117-27A および 114117-27D) のための外部プライマーは、P D C 1 プロモーターの下流および P D C 1 コード配列の下流の領域に相同な約 50 bp の 5' および 3' 領域を含んでいた。標準的な遺伝子組み換え技術 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202) を用いて、完成されたカセット PCR 断片を、B Y 4 7 0 0 p d c 6 : : P G P M 1 - s a d B - A D H 1 t へと形質転換し、形質転換体を、30 で 2% のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地上で維持した。形質転換体を、プライマー-114117-36D および 135 (配列番号 92 および 93) 、ならびにプライマー-112590-49E および 112590-30F (配列番号 90 および 94) を用いた PCR によってスクリーニングして、P D C 1 コード配列の欠失を有する P D C 1 遺伝子座における組み込みを確認した。標準プロトコルにしたがい、URA3r マーカーを、30 で 2% のグルコースおよび 5-F OA が補充された合成完全培地において平板培養することによって再利用した。5-F OA プレートからのコロニーを SD-URA 培地上にパッチして、増殖がないことを確認することによって、マーカーの除去を確認した。得られた同定株「N Y L A 6 7」は、遺伝子型： B Y 4 7 0 0 p d c 6 : : P G P M 1 - s a d B - A D H 1 t p d c 1 : : P P D C 1 - i l v D - F B A 1 t を有する。 20

【 0 1 6 5 】

H I S 3 の欠失

内因性 H I S 3 コード領域を欠失させるために、h i s 3 : : U R A 3 r 2 カセットを、URA3r2 鋳型 DNA (配列番号 95) から PCR 増幅した。URA3r2 は、インビオでの相同的組み換えおよび URA3 マーカーの除去を可能にする、500 bp の相同反復配列が側面にある p R S 4 2 6 (ATCC No. 77107) に由来する URA3 マーカーを含む。Phusion (登録商標) DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) ならびにプライマー-114117-45A および 114117-45B (配列番号 96 および 97) を用いて PCR を行い、約 2.3 kb の PCR 産物を生成した。各プライマーの H I S 3 部分は、URA3r2 マーカーの組み込みが H I S 3 コード領域の置換をもたらすように、H I S 3 プロモーターの上流の 5' 領域およびコード領域の下流の 3' 領域から得られた。標準的な遺伝子組み換え技術 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202) を用いて、PCR 産物を、N Y L A 6 7 へと形質転換し、形質転換体を、30 で 2% のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地上で選択した。形質転換体をスクリーニングして、30 で 2% のグルコースが補充されたヒスチジン欠損合成完全培地において形質転換体をレプリカ平 30 40 50

板培養することによって、正確な組み込みを確認した。標準プロトコルにしたがい、30で2%のグルコースおよび5-FOAが補充された合成完全培地において平板培養することによって、URA3rマーカーを再利用した。5-FOAプレートからのコロニーをSD-URA培地上にパッチして、増殖がないことを確認することによって、マーカーの除去を確認した。NYLA73と呼ばれる得られた同定株は、遺伝子型：BY4700 pdc6 :: PGPM1-sadB-ADH1t pdc1 :: PPDC1-ilvD-FBA1t his3を有する。

【0166】

pdc5 :: kanMX組み込みカセットの作成およびPDC5の欠失：

pdc5 :: kanMX4カセットを、Phusion（登録商標）DNAポリメラーゼ（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA）ならびにプライマーPDC5 :: KanMXFおよびPDC5 :: KanMXR（配列番号98および99）を用いて株YLR134W染色体DNA（ATCC No. 4034091）からPCR增幅し、約2.2kbのPCR産物を生成した。各プライマーのPDC5部分は、kanMX4マーカーの組み込みがPDC5コード領域の置換をもたらすように、PDC5プロモーターの上流の5'領域およびコード領域の下流の3'領域から得られた。標準的な遺伝子組み換え技術（Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202）を用いて、PCR産物を、NYLA73へと形質転換し、形質転換体を、30で1%のエタノールおよびジェネティシン（geneticin）（200μg/mL）が補充されたYPD培地上で選択した。形質転換体をPCRによってスクリーニングして、プライマーPDC5koforおよびN175（配列番号100および101）を用いたPDC5コード領域の置換によりPDC遺伝子座における正確な組み込みを確認した。同定された正確な形質転換体は、遺伝子型：BY4700 pdc6 :: PGPM1-sadB-ADH1t pdc1 :: PPDC1-ilvD-FBA1t his3 pdc5 :: kanMX4を有する。株はNYLA74と称された。

【0167】

HXK2（ヘキソキナーゼII）の欠失：

hxk2 :: URA3rカセットを、Phusion（登録商標）DNAポリメラーゼ（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA）ならびにプライマー384および385（配列番号102および103）を用いてURA3r2鑄型（上記）からPCR增幅し、約2.3kbのPCR産物を生成した。各プライマーのHXK2部分は、URA3r2マーカーの組み込みがHXK2コード領域の置換をもたらすように、HXK2プロモーターの上流の5'領域およびコード領域の下流の3'領域から得られた。標準的な遺伝子組み換え技術（Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202）を用いて、PCR産物を、NYLA73へと形質転換し、形質転換体を、30で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地上で選択した。形質転換体をPCRによってスクリーニングして、プライマーN869およびN871（配列番号104および105）を用いたHXK2コード領域の置換によりHXK2遺伝子座における正確な組み込みを確認した。標準プロトコルにしたがい、30で2%のグルコースおよび5-FOAが補充された合成完全培地において平板培養することによって、URA3r2マーカーを再利用した。5-FOAプレートからのコロニーをSD-URA培地上にパッチして、増殖がないことを確認することによって、およびPCRによって、プライマーN946およびN947（配列番号106および107）を用いて正確なマーカーの除去を確認することによって、マーカーの除去を確認した。NYLA83と称される、得られた同定株は、遺伝子型：BY4700 pdc6 :: PGPM1-sadB-ADH1t pdc1 :: PPDC1-ilvD-FBA1t his3 hxk2を有する。

【0168】

N Y L A 9 3 の作成

S. セレビシエ (*S. cerevisiae*) の内在性 P D C 1、P D C 5、および P D C 6 遺伝子の挿入不活性化が後述される。P D C 1、P D C 5、および P D C 6 遺伝子は、ピルビン酸デカルボキシラーゼの 3 つの主要なアイソザイムをコードする。得られた P D C 不活性化株を、発現ベクター p Y Z 0 6 7 (配列番号 1 2 9) および p Y Z 0 9 0 (配列番号 1) のための宿主として使用した。その作成は、参照により本明細書に援用される、2009 年 9 月 29 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 2 4 6, 8 4 4 号明細書に記載されている。

【0169】

N A D 依存性グリセロール 3 - リン酸デヒドロゲナーゼの欠失

g p d 2 : : l o x P - U R A 3 - l o x P カセットを、Phusion (登録商標) DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) およびプライマー LA 512 および LA 513 (配列番号 8 および 9) を用いて p U C 1 9 : : l o x P - U R A 3 - l o x P プラスミド鑄型から P C R 増幅し、約 1.6 k b の P C R 産物を生成した。p U C 1 9 : : l o x P - U R A 3 - l o x P (配列番号 1 3 0) は、l o x P リコンビナーゼ部位が側面にある (ATCC No. 77107) からの U R A 3 マーカーを含む。各プライマーの G P D 2 部分は、l o x P - U R A 3 - l o x P マーカーの組み込みが G P D 2 コード領域の置換をもたらすように、G P D 2 プロモーターの上流の 5' 領域およびコード領域の下流の 3' 領域から得られた。標準的な遺伝子組み換え技術 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201 - 202) を用いて、P C R 産物を、N Y L A 8 3 へと形質転換し、形質転換体を、30 で 2 % のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地上で選択した。形質転換体を P C R によってスクリーニングして、プライマー LA 516 および N 175 (配列番号 1 3 2 および 1 0 1) を用いた H X K 2 コード領域の置換により G P D 2 遺伝子座における正確な組み込みを確認した。U R A 3 マーカーを、p R S 4 2 3 : : P G A L 1 - c re (配列番号 1 3 1) による形質転換および 30 で 2 % のグルコースが補充されたヒスチジン欠損合成完全培地における平板培養によって再利用した。コロニーを 30 で Y P (1 % のガラクトース) プレート上にパッチして、U R A 3 マーカーの除去を誘発し、回収のために 30 で Y P D プレートに移した。Y P D プレートからのコロニーをウラシル欠損合成完全培地上にパッチして、増殖がないことを確認することによって、U R A 3 マーカーの除去を確認した。同定された正確なクローンは、遺伝子型 : B Y 4 7 0 0 p d c 6 : : P G P M 1 - s a d B - A D H 1 t p d c 1 : : P P D C 1 - i l v D - F B A 1 t h i s 3 h x k 2 g p d 2 : : l o x P を有する。株は N Y L A 9 2 と称された。

【0170】

p d c 5 : : l o x P - k a n M X - l o x P 組み込みカセットの作成および P D C 5 の欠失

p d c 5 : : l o x P - k a n M X - l o x P カセットを、Phusion (登録商標) DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) およびプライマー LA 249 および LA 397 (配列番号 1 3 6 および 1 3 7) を用いてプラスミド p U C 1 9 : : l o x P - k a n M X - l o x P (配列番号 1 3 5) から P C R 増幅し、約 2.2 k b の P C R 産物を生成した。p U C 1 9 : : l o x P - k a n M X - l o x P (配列番号 1 3 5) は、p F A 6 に由来する k a n M X 遺伝子 (Wach, et al., Yeast 10: 1793 - 1808, 1994) ならびに l o x P リコンビナーゼ部位が側面にある K. ラクチス (*K. lactis*) T E F 1 プロモーターおよびターミネーターを含む。各プライマーの P D C 5 部分は、l o x P - k a n M X - l o x P マーカーの組み込みが P D C 5 コード領域の置換をもたらすように、P D C 5 プロモーターの上流の 5' 領域およびコード領域の下流の 3' 領域から得られ

10

20

30

40

50

た。標準的な遺伝子組み換え技術 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201 - 202) を用いて、PCR 産物を、NYLA92 へと形質転換し、形質転換体を、30 で 1% のエタノールおよびジエネティシン (200 µg / ml) が補充された YP 培地上で選択した。形質転換体を PCR によってスクリーニングして、プライマー LA363 および LA364 (配列番号 133 および 134) を用いた PDC5 コード領域の置換により PDC5 遺伝子座における正確な組み込みを確認した。同定された正確な形質転換体は、遺伝子型 : BY4700 pdc6 :: P_{GPM1}-sadB-ADH1t pdc1 :: P_{PDC1}-ilvD-FBA1t his3 hxk2 gpd2 :: loxP pdc5 : loxP-kanMX-loxP を有する。株は NYLA93 と称された。
10

【0171】

NYLA93 (pYZ067 / pYZ090)

プラスミドベクター pYZ067 および pYZ090 を、標準的な遺伝子組み換え技術 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) を用いて、株 NYLA93 (BY4700 pdc6 :: P_{GPM1}-sadB-ADH1t pdc1 :: P_{PDC1}-ilvD-FBA1t his3 hxk2 gpd2 :: loxP pdc5 : loxP-kanMX-loxP) へと同時に形質転換し、得られた株 (イソブタノロジエン NYLA93、NGCI-065 とも呼ばれる) を、30 で 1% のエタノールが補充されたヒスチジンおよびウラシル欠損合成完全培地において維持した。
20

【0172】

発現ベクター pLH468

pLH468 プラスミド (配列番号 2) を、酵母における DHAD、ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ (KivD) およびウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ (HADH) の発現のために作成した。

【0173】

乳酸連鎖球菌 (Lactococcus lactis) のケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ (KivD) およびウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ (HADH) のためのコード領域 (それぞれ配列番号 71 および 117) を、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) における発現のために最適化されたコドンに基づいて、DNA 2.0, Inc. によって合成し、プラスミド pKivDy-DNA 2.0 および pHadhy-DNA 2.0 において提供した。コードされるタンパク質は、それぞれ配列番号 116 および 118 である。KivD および HADH のための個々の発現ベクターを作成した。pLH467 (pRS426 :: PTDH3-kivDy-TDH3t) を構築するために、ベクター pNY8 (配列番号 120; pRS426.GPD-alad-GPDt とも称され、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第 2008/0182308 号明細書の実施例 17 に記載されている) を、AscI および SfiI 酵素で消化し、それによって、GPD プロモーターおよび alad コード領域を切断した。5' プライマー OT1068 および 3' プライマー OT1067 (配列番号 122 および 123) を用いて、5' 末端に AscI 部位および 3' 末端に SpeI 部位を付加するために、pNY8 に由来する TDH3 プロモーター断片 (配列番号 121) を PCR 増幅した。AscI / SfiI で消化された pNY8 ベクター断片を、AscI および SpeI で消化された TDH3 プロモーター PCR 産物とライゲートし、コドン最適化された kivD コード領域を含む SpeI-SfiI 断片を、ベクター pKivD-DNA 2.0 から単離した。3 通りのライゲーションにより、ベクター pLH467 (pRS426 :: PTDH3-kivDy-TDH3t) が生成された。pLH467 を、制限マッピング (restriction mapping) および配列決定によって確認した。
30
40
50

【0174】

p L H 4 3 5 (p R S 4 2 5 : : P G P M 1 - H a d h y - A D H 1 t) は、参照により本明細書に援用される米国仮特許出願第 6 1 / 0 5 8 9 7 0 号明細書の実施例 3 に記載されるベクター p R S 4 2 5 : : G P M - s a d B (配列番号 7 8) から得られた。 p R S 4 2 5 : : G P M - s a d B は、 G P M 1 プロモーター (配列番号 7 2) 、アクロモバクター・キシロソキシダンス (A c h r o m o b a c t e r x y l o s o x i d a n s) のブタノールデヒドロゲナーゼに由来するコード領域 (s a d B ; D N A 配列番号 6 9 ; タンパク質配列番号 7 0 : 米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 2 6 9 8 2 3 号明細書に開示されている) 、および A D H 1 ターミネーター (配列番号 7 3) を含むキメラ遺伝子を有する p R S 4 2 5 ベクター (A T C C N o . 7 7 1 0 6) である。 p R S 4 2 5 : : G P M p - s a d B は、 s a d B コード領域の 5' および 3' 末端においてそれぞれ B b v I および P a c I 部位を含む。プライマー O T 1 0 7 4 および O T 1 0 7 5 (配列番号 1 2 5 および 1 2 6) を用いた部位特異的突然変異誘発法によって、 N h e I 部位を s a d B コード領域の 5' 末端に付加して、ベクター p R S 4 2 5 - G P M p - s a d B - N h e I を生成し、それを配列決定によって確認した。 p R S 4 2 5 : : P G P M 1 - s a d B - N h e I を N h e I および P a c I で消化して、 s a d B コード領域を除外し、ベクター p H a d h y - D N A 2 . 0 に由来するコドン最適化された H A D H コード領域を含む N h e I - P a c I 断片とライゲートして、 p L H 4 3 5 を生成した。

10

【0175】

単一のベクターの中で K i v D および H A D H 発現カセットを組み合わせるために、酵母ベクター p R S 4 1 1 (A T C C N o . 8 7 4 7 4) を、 S a c I および N o t I で消化し、 3 通りのライゲーション反応において、 P G P M 1 - H a d h y - A D H 1 t カセットを含む p L H 4 3 5 に由来する S a l I - N o t I 断片とともに、 P T D H 3 - k i v D y - T D H 3 t カセットを含む p L H 4 6 7 に由来する S a c I - S a l I 断片とライゲートした。これにより、ベクター p R S 4 1 1 : : P T D H 3 - k i v D y - P G P M 1 - H a d h y (p L H 4 4 1) が生成され、それを制限マッピングによって確認した。

20

【0176】

低級イソブタノール経路における全ての 3 つの遺伝子 : i l v D 、 k i v D y 、および H a d h y のための同時発現ベクターを生成するために、 I l v D 遺伝子の供給源として、米国仮特許出願第 6 1 / 1 0 0 , 7 9 2 号明細書に記載される p R S 4 2 3 F B A i l v D (S t r e p) (配列番号 1 2 7) を使用した。このシャトルベクターは、大腸菌 (E . c o l i) における維持のための F 1 複製起点 (n t 1 4 2 3 ~ 1 8 7 9) および酵母における複製のための 2 ミクロソルの起点 (n t 8 0 8 2 ~ 9 4 2 6) を含む。ベクターは、 F B A 1 プロモーター (n t 2 1 1 1 ~ 3 1 0 8 ; 配列番号 1 1 9) および F B A ターミネーター (n t 4 8 6 1 ~ 5 8 6 0 ; 配列番号 1 2 8) を有する。さらに、ベクターは、酵母における選択のための H i s マーカー (n t 5 0 4 ~ 1 1 6 3) および大腸菌 (E . c o l i) における選択のためのアンピシリン耐性マーカー (n t 7 0 9 2 ~ 7 9 4 9) を有する。ミュータンス連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s m u t a n s) U A 1 5 9 (A T C C N o . 7 0 0 6 1 0) に由来する i l v D コード領域 (n t 3 1 1 6 ~ 4 8 2 8 ; 配列番号 1 1 5 4 ; タンパク質配列番号 1 1 5) は、 F B A プロモーターと F B A ターミネーターとの間にあり、発現のためのキメラ遺伝子を形成する。さらに、 i l v D コード領域 (n t 4 8 2 9 ~ 4 8 4 9) に融合された l u m i o タグがある。

30

【0177】

第 1 の工程は、 S a c I および S a c I I (S a c I I 部位は T 4 D N A ポリメラーゼを用いて平滑末端化された) を用いて、 p R S 4 2 3 F B A i l v D (S t r e p) (p R S 4 2 3 - F B A (S p e I) - I l v D (ミュータンス連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s m u t a n s)) - L u m i o とも呼ばれる) を線状化して、 9 , 4 8 2 b p の全長を有するベクターを得ることであった。第 2 の工程は、 S a c I および K

40

50

p n I (K p n I 部位は T 4 DNA ポリメラーゼを用いて平滑末端化された) を用いて、k i v D y - h A D H y カセットを p L H 4 4 1 から単離し、6,063 b p の断片を得ることであった。この断片を、p R S 4 2 3 - F B A (S p e I) - I l v D (ミュータンス連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s m u t a n s)) - L u m i o に由来する 9,482 b p のベクター断片とライゲートした。これにより、ベクター p L H 4 6 8 (p R S 4 2 3 : : P F B A 1 - i l v D (S t r e p) L u m i o - F B A 1 t - P T D H 3 - k i v D y - T D H 3 t - P G P M 1 - h a d h y - A D H 1 t) が生成され、それを、制限マッピングおよび配列決定によって確認した。

【0178】

p Y Z 0 9 0 および p Y Z 0 6 7

10

p Y Z 0 9 0 を、アセト乳酸シンターゼ (A L S) の発現のために、酵母 C U P 1 プロモーター (n t 2 ~ 4 4 9) 、続いて C Y C 1 ターミネーター (n t 2 1 8 1 ~ 2 4 3 0) から発現される枯草菌 (B a c i l l u s s u b t i l i s) に由来する a l s S 遺伝子のコード領域 (n t 位置 4 5 7 ~ 2 1 7 2) を有するキメラ遺伝子、およびケト酸レダクトイソメラーゼ (K A R I) の発現のために、酵母 I L V 5 プロモーター (2 4 3 3 ~ 3 6 2 6) 、続いて I L V 5 ターミネーター (n t 4 6 7 0 ~ 5 2 9 2) から発現される乳酸連鎖球菌 (L a c t o c o c c u s l a c t i s) に由来する i l v C 遺伝子のコード領域 (n t 3 6 3 4 ~ 4 6 5 6) を有するキメラ遺伝子を含むように作成した。

【0179】

20

p Y Z 0 6 7 を、以下のキメラ遺伝子：1) D H A D の発現のための、酵母 F B A 1 プロモーター (n t 1 1 6 1 ~ 2 2 5 0) 、続いて F B A ターミネーター (n t 4 0 0 5 ~ 4 3 1 7) から発現されるミュータンス連鎖球菌 (S . m u t a n s) U A 1 5 9 に由来する i l v D 遺伝子のコード領域 (n t 位置 2 2 6 0 ~ 3 9 7 1) 、2) アルコールデヒドロゲナーゼの発現のための、酵母 G P M プロモーター (n t 5 8 1 9 ~ 6 5 7 5) 、続いて A D H 1 ターミネーター (n t 4 3 5 6 ~ 4 6 7 1) から発現される H A D H のためのコード領域 (n t 4 6 8 0 ~ 5 8 0 7) 、および 3) ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼの発現のための、酵母 T D H 3 プロモーター (n t 8 8 3 0 ~ 9 4 9 3) 、続いて T D H 3 ターミネーター (n t 5 6 8 2 ~ 7 1 6 1) から発現される乳酸連鎖球菌 (L a c t o c o c c u s l a c t i s) に由来する K i v D 遺伝子のコード領域 (n t 7 1 7 5 ~ 8 8 2 1) を含むように作成した。

30

【0180】

さらに、本発明の様々な実施形態を上に説明してきたが、それらは例として示されたに過ぎず、限定するものではないことを理解されたい。本発明の趣旨および範囲から逸脱せずに本発明の形態および細部の様々な変更を行うことができる事が、関連技術の当業者に明らかであろう。したがって、本発明の広さおよび範囲は、上述した例示的実施形態のいずれによって限定されるものではなく、以下の特許請求の範囲およびそれらの均等物のみにしたがって規定されるものである。

【0181】

40

本明細書に記載される全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明が関する技術分野の当業者の技能のレベルを示し、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が参照により援用されることが具体的にかつ個々に示されているのと同程度に、参照により本明細書に援用される。

【実施例】

【0182】

以下の非限定的な実施例は、本発明をさらに例示し、実施例において、ブタノールのための脂肪酸抽出剤の分配係数が示される。上記の化学的転化および以下の実施例が、脂肪酸抽出剤を生成するための植物由来油としてトウモロコシ油を含む一方、本発明から逸脱せずに、植物由来油などの他の天然油が使用され得ることを理解されたい。上記の説明およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的な特徴を確認することができ、本発

50

明から逸脱せずに様々な用途および条件に適合させるように本発明の様々な変形および変更を行うことができる。

【0183】

本明細書において使用される際、使用される略語の意味は以下のとおりであった：「g」はグラムを意味し、「kg」はキログラムを意味し、「L」はリットルを意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「mL/L」はミリリットル/リットルを意味し、「mL/分」はミリリットル/分を意味し、「μL」はマイクロリットルを意味し、「DI」は脱イオン化していることを意味し、「uM」はマイクロメートルを意味し、「nM」はナノメートルを意味し、「w/v」は重量/体積を意味し、「GC」はガスクロマトグラフを意味し、「OD」は光学密度を意味し、「OD₆₀₀」は600nmの波長における光学密度を意味し、「dew」は乾燥菌体重量を意味し、「rpm」は毎分回転数を意味し、「」は摂氏温度を意味し、「/分」は摂氏温度/分を意味し、「s1pm」は標準リットル/分を意味し、「ppm」は百万分率を意味し、「pdc」はピルビン酸デカルボキシラーゼ酵素を意味し、後ろに酵素番号が付く。

10

【0184】

実施例1～6は、トウモロコシ油を以下の脂肪酸抽出剤へと化学的に転化するための例示的な方法を説明する：水酸化トリグリセリド（実施例1）、脂肪アミドおよび脂肪酸との混合物（実施例2）、脂肪アルコール（実施例3）、脂肪酸（実施例4）、脂肪酸メチルエステル（実施例5）；および脂肪酸グリコールエステル（実施例6）。例7は、表3および7～10に列挙される水不混和性抽出剤を用いて行った抽出発酵実験の一連の比較例を提供し、性能データが、表11にまとめられている。

20

【0185】

実施例1

トウモロコシ油に由来する水酸化トリグリセリド

A. トウモロコシ油の水酸化（63%の水酸化）

機械的攪拌器および滴下漏斗を備えた500mLの三つ口フラスコに、トウモロコシ油（50.0g）、トルエン（25.0mL）、Amberlyte IR-120樹脂（12.5g）、および氷酢酸（7.5g）を加えた。得られた混合物を60まで加熱し、次に、過酸化水素（水中41.8gの30%のH₂O₂）を1時間かけて滴下して加えた。混合物を60で2時間攪拌し、その時点で反応混合物を以下のように処理した：樹脂をろ過によって除去し、ろ液を酢酸エチル（75mL）と水（50mL）とに分液した。層を分離した後、有機層を、飽和NaHCO₃水溶液（50mL）、および塩水（50mL）で洗浄した。有機層を無水Na₂SO₄上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、48.9gの黄色の油が得られた。粗反応生成物の¹H NMR分析により、二重結合の63%がエポキシ化されたことが示された。

30

【0186】

500mLの丸底フラスコに、エポキシ化トウモロコシ油（20.0g）、テトラヒドロフラン（THF）（100.0mL）、および硫酸（50mLの1.7Mの水溶液）を加えた。濁った混合物を50で2時間攪拌し、次に、水（100mL）と酢酸エチル（200mL）とに分液することによって処理した。有機層を、水（3×50mL）、次に塩水（50mL）で洗浄した。有機層を無水Na₂SO₄上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、19.9gの暗黄色の油（63%の水酸化トウモロコシ油）が得られた。

40

【0187】

B. トウモロコシ油の水酸化（47%の水酸化）

機械的攪拌器および滴下漏斗を備えた500mLの三つ口フラスコに、トウモロコシ油（50.0g）、トルエン（25.0mL）、Amberlyte IR-120樹脂（12.5g）、および氷酢酸（7.5g）を加えた。得られた混合物を60まで加熱し、次に、過酸化水素（水中41.8gの30%のH₂O₂）を1時間かけて滴下して加えた。混合物を60で1時間攪拌し、その時点で反応混合物を以下のように処理した：樹脂をろ過によって除去し、ろ液を酢酸エチル（75mL）と水（50mL）とに分液した

50

。層を分離した後、有機層を、飽和 NaHCO_3 水溶液 (50 mL)、および塩水 (50 mL) で洗浄した。有機層を無水 Na_2SO_4 上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、49.8 g の黄色の油が得られた。粗反応生成物の ^1H NMR 分析により、二重結合の 47% がエポキシ化されたことが示された。

【0188】

500 mL の丸底フラスコに、エポキシ化トウモロコシ油 (20.0 g)、THF (100.0 mL)、および硫酸 (50 mL の 1.7 M の水溶液) を加えた。濁った混合物を 50 で 2 時間攪拌し、次に、水 (100 mL) と酢酸エチル (200 mL) とに分液することによって処理した。有機層を、水 (3×50 mL)、次に塩水 (50 mL) で洗浄した。有機層を無水 Na_2SO_4 上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、19.2 g の暗黄色の油 (47% の水酸化トウモロコシ油) が得られた。

10

【0189】

C. トウモロコシ油の水酸化 (28% の水酸化)

機械的攪拌器および滴下漏斗を備えた 500 mL の三つ口フラスコに、トウモロコシ油 (50.0 g)、トルエン (25.0 mL)、Amberlyte IR-120 樹脂 (12.5 g)、および氷酢酸 (7.5 g) を加えた。得られた混合物を 60 まで加熱し、次に、過酸化水素 (水中 41.8 g の 30% の H_2O_2) を 1 時間かけて滴下して加えた。混合物を 60 で 2 時間攪拌し、その時点で反応混合物を以下のように処理した：樹脂をろ過によって除去し、ろ液を酢酸エチル (75 mL) と水 (50 mL) とに分液した。層を分離した後、有機層を、飽和 NaHCO_3 水溶液 (50 mL)、および塩水 (50 mL) で洗浄した。有機層を無水 Na_2SO_4 上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、47.2 g の黄色の油が得られた。粗反応生成物の ^1H NMR 分析により、二重結合の 28% がエポキシ化されたことが示された。

20

【0190】

500 mL の丸底フラスコに、エポキシ化トウモロコシ油 (20.0 g)、THF (100.0 mL)、および硫酸 (50 mL の 1.7 M の水溶液) を加えた。濁った混合物を 50 で 2 時間攪拌し、次に、水 (100 mL) と酢酸エチル (200 mL) とに分液することによって処理した。有機層を、水 (3×50 mL)、次に塩水 (50 mL) で洗浄した。有機層を無水 Na_2SO_4 上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、20.3 g の暗黄色の油 (28% の水酸化トウモロコシ油) が得られた。

30

【0191】

分配係数の測定

5 mL の容器に、0.910 g の 67% の水酸化トウモロコシ油、および 0.910 mL の 3 重量% の $i\text{-BuOH}$ 水溶液を加えた。二相混合物を、Vortex Genie (登録商標) を用いて 10 分間、激しく攪拌した。混合した直後、Fisher Scientific Centrifuge 228 遠心分離機 (3300 rpm) を用いて混合物を 10 分間遠心分離することによって層の分離を補助した。0.100 g の両方の層を取った。有機上層を、エチレングリコールジエチルエーテル (10.1 mg/mL) のトルエン溶液で 1.00 mL まで希釈し、水層を、エチレングリコールジエチルエーテル (10.2 mg/mL) のメタノール溶液で 1.00 mL まで希釈した。両方の相中の $i\text{-BuOH}$ の濃度を、較正されたガスクロマトグラフ (GC) を用いて測定した。同じ手順を、47% および 28% の水酸化トウモロコシ油について繰り返した。このように測定された分配係数は、67% の水酸化トウモロコシ油について 3.2、47% の水酸化トウモロコシ油について 2.3、28% の水酸化トウモロコシ油について 2.1 であった。

40

【0192】

上で概説した手順を、6% の $i\text{-BuOH}$ 水溶液を用いて繰り返した。67%、47%、および 28% の水酸化トウモロコシ油についての分配係数は、それぞれ 2.9、2.9、および 2.0 であった。

【0193】

実施例 2

50

トウモロコシ油に由来する脂肪アミドおよび脂肪酸、および純粋な脂肪アミド

Roe, et al., J. Am. Oil Chem. Soc. 29: 18-22, 1952 によって記載されるのと同様の方法で、トウモロコシ油を、水酸化アンモニウム水溶液と反応させた。Mazola (登録商標) トウモロコシ油 (0.818 L, 755 g) を、1ガロンのステンレス鋼反応器に入れ、この反応器に、1.71 L (1540 g) の水酸化アンモニウム水溶液 (NH₃ として 28%) を加えた。反応器を、攪拌しながら 160 まで加熱し、攪拌しながら 7 時間その温度に保ち、その間に圧力が 400 psi に達した。反応器を冷却し、生成物である、乳白色の固体を取り出し、反応器を酢酸エチルですすいだ。生成物を、5 L の酢酸エチルに溶解させ、それぞれ 500 mL の水で 5 回洗浄し、それを H₂SO₄ で中和した。次に、酢酸エチルを無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させ、ロータリーエバボレータで溶媒を除去したところ、淡褐色の軟質の固体が残った。

【0194】

CDC₁₃ 中の ¹³C NMR により、生成物が脂肪アミド対脂肪酸の約 2:1 の比率を含み、生成物へのトウモロコシ油の転化が定量的であったことが示された。生成物は 57~58 の融点を有していたが、水で飽和される場合、約 11 低下した。

【0195】

触媒としての酢酸アンモニウムとともに無水アンモニアを用いて、Kohlhase, et al., J. Am. Oil Chem. Soc. 48: 265-270, 1971 にしたがって、純粋なトウモロコシ油脂肪アミドをトウモロコシ油から合成した。

【0196】

3 グラムの酢酸アンモニウムを、400 mL のステンレス鋼振とう器管に入れ、それに 51.8 g のトウモロコシ油を加えた。次に、無水アンモニア (89.7 g) を加え、反応器を密閉し、125 で 7 時間加熱し、その間に圧力が 1300 psi に達した。反応器を冷却し、淡色の固体を除去し、反応器を酢酸エチルですすいだ。次に、酢酸エチルに溶解させた生成物を、上記の脂肪アミド / 脂肪酸混合物の場合と同様に処理した。

【0197】

脂肪酸を、実施例 4 に後述されるように NaOH を用いた塩基加水分解によって、トウモロコシ油から合成した。

【0198】

3 つの調製物：(1) アンモニア水からのトウモロコシ油脂肪アミドとトウモロコシ油脂肪酸との 2:1 混合物、(2) 純粋なトウモロコシ油脂肪アミド：純粋なトウモロコシ油脂肪酸の 2:1 混合物、および(3) 純粋なトウモロコシ油脂肪アミド：トウモロコシ油脂肪酸の 1:2 混合物の全てを、3% の水溶液からイソブタノールを抽出するそれらの能力について試験した。それぞれ 700 ミリグラムを、20 mL のシンチレーション容器中の 3% のイソブタノールを含有する 2.1 mL の水に加え、30 で一晩回転振とう器に入れた。3 つの場合の全てにおいて、有機相は、この温度で液体になり、これは、イソブタノールの取り込みによる融点のさらなる低下を示す。50 マイクロリットルの上相を、GC 標準としてエチレングリコールジエチルエーテル (10.068 mg/mL) を含有する 200 μL のトルエンまたは同じ濃度のエチレングリコールジエチルエーテルを含有する 200 μL のイソプロパノールのいずれかで希釈した。50 マイクロリットルの下相を、同じ濃度のエチレングリコールジエチルエーテルを含有する 150 μL のメタノールおよび 50 μL のイソプロパノールで希釈した。両方の相中のイソブタノールの濃度を、較正された GC を用いて測定した。測定された分配係数は：(1) について 3.81、(2) について 4.31、(3) について 3.58 であった。

【0199】

脂肪アミド / 脂肪酸アンモニア水の調製物 (1)、および純粋なトウモロコシ油脂肪酸と 1:1 で混合された調製物 (1) によって構成される調製物 (1a) (1:2 の脂肪アミド：脂肪酸に相当する) を、3 部のプロス対 1 部のアミド / 酸混合物の比率でサッカロマイセス属 (Saccharomyces) ブタノロジエン NGC I - 070 を含有する発酵プロスを入れた振とうフラスコ中で培養した。調製物 (1) は軟質の固体であった。

10

20

30

40

50

方、調製物(1a)は30で液体であった。次に、8.35g/Lのグルコース濃度から開始して、振とうフラスコを、培養器振とう器において25時間培養し、グルコースの消費を、時間の関数として追跡した。表1は、両方の比率における脂肪アミド/脂肪酸混合物が、ブタノロジエンに対して有毒でなかったことを示し、オレイルアルコールを用いた場合より高いグルコース取り込み率も示した。

【0200】

【表1】

表24

フラスコ	グルコース濃度(g/L)		
	時間 = 0	18 時間	25 時間
オレイルアルコール	8.35	4.26	0
オレイルアルコール	8.35	4.46	0
2:1の合成された脂肪アミド:脂肪酸混合物 (調製物(1))	8.35	3.06	0
2:1の合成された脂肪アミド:脂肪酸混合物 (調製物(1))	8.35	3.22	0
1:1の合成された脂肪アミドと脂肪酸との混合物: 純粋な脂肪酸(調製物(1a))	8.35	2.73	0
1:1の合成された脂肪アミドと脂肪酸との混合物: 純粋な脂肪酸(調製物(1a))	8.35	2.73	0

10

20

30

40

50

【0201】

実施例3

トウモロコシ油に由来する脂肪アルコール

トウモロコシ油から脂肪アルコールを生成するための上式IVの反応を参考して、機械的攪拌器、N₂源を備えた還流冷却器、滴下漏斗、内部熱電対、およびゴム隔膜を備えた22Lの丸底フラスコを、窒素下で火力乾燥させた。フラスコに、132g(3.30モル)の95%水素化アルミニウムリチウム粉末を投入し、それをドライボックス中で秤量し、固体滴下漏斗に入れた。22Lのフラスコを氷浴で冷却し、9.0リットルの無水THFを、カニューレを介して反応器に加えた。得られたスラリーを、0~5に冷却し、1.00リットルの無水THF中の956g(1.10モル)のWesson(登録商標)トウモロコシ油の溶液を、反応温度を5~20に保持しながら2~3時間かけて滴下して加えた。トウモロコシ油を加えた後、スラリーを、周囲温度で一晩攪拌した。TLCクロマトグラフィーによって確認した際に、反応が終わったとき、370mLのTHFに溶解させた130gの水の溶液の滴下添加によってそれを急冷した。次に、130gの15%のNaOH水溶液を加えた後、400gの水を加えた。混合物を、室温に温めながら激しく攪拌し、白色の粒状の固体を生成した。フリットガラスのろ過用漏斗を用いて、固体をろ過して取り除き、さらなるTHFで洗浄した。THFをロータリーエバポレータで除去し、残渣を、3.00リットルの酢酸エチル中に取った。生成物溶液を、2×1.00Lの水、1×1.00Lの塩水で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥させ、ろ過し、減圧下で濃縮したところ、836g(97%)の脂肪アルコールが黄色の油として得られた。次に、粗脂肪アルコール混合物を蒸留し(140/1mmHg)、以下の分配係数の実験に使用した。

【0202】

分配係数の実験

5つの5mLの容器のそれぞれに、1mLの脂肪アルコール混合物、および1mLの3

50

重量%の*i*-BuOH水溶液を加えた。二相混合物を、Vortex Genie(登録商標)を用いて、それぞれ10分間、20分間、30分間、40分間、および60分間、激しく攪拌した。混合した直後、Fisher Scientific Centrifuge 228遠心分離機(3300 rpm)を用いて混合物を10分間遠心分離することによって層の分離を補助した。0.100 mLの両方の層を取った。有機上層を、エチレングリコールジエチルエーテルのトルエン溶液で1.00 mLまで希釈し、水層を、エチレングリコールジエチルエーテルのメタノール溶液で1.00 mLまで希釈した。両方の相中の*i*-BuOHの濃度を、較正されたGCを用いて測定した。このように測定された分配係数は2.70であった。

【0203】

10

上述したのと同じ分配係数の測定を、6重量%の*i*-BuOH濃度について実行した。このように測定された分配係数3.06であった。

【0204】

以下の実施例4～6において、抽出剤の分配係数を決定するのに使用される方法は、静的(quiet)方法であった。静的方法では、5mLの3%または6%(w/v)のいずれかの、水中のイソブタノールの溶液をバイアルに入れ、5mLの対象の溶媒を、物理相を混合しないように、水溶液の上に注意深く加えた。指定の期間の後、溶媒相および水相の透明部分の試料を取り出し、GCによってイソブタノール含量について分析した。あらゆるエマルジョン層をこの分析では無視した。GC分析では、100uLの試料を400uLのイソプロパノールに加えた。500uLの、ジエチレングリコールジエチルエーテルの溶液(内部標準)を加え、FID検出器を用いて溶液をCarbowax(登録商標)カラムに噴射し、イソブタノールの濃度を測定した。

20

【0205】

当該技術分野において公知の他の方法も、本発明にしたがって抽出剤の分配係数を決定するのに使用することができる。例えば、振とう方法を使用することができる。振とう方法の例として、5mLの、3%または6%(w/v)のいずれかの、水中のイソブタノールの溶液が、5mLの対象の溶媒とともに遠心分離管に加えられ得る。管は、1分間激しく振とうされ得る。次に、管は、遠心分離機において約12500Gで15分間回転され得る。透明の溶媒層および透明の水層の試料が、除去され、上記の方法によってイソブタノールについて分析され得る。

30

【0206】

実施例4

トウモロコシ油脂肪酸

丸底フラスコ(5L)は、機械的攪拌器、熱電対、加熱マントル、凝縮器、および窒素ティー(nitrogen tee)を備えていた。500gの食品グレードのトウモロコシ油、1Lの水および75gの水酸化ナトリウムを投入した。混合物を90まで加熱し、3時間保持し、その間に、混合物は、1つの高粘度の、エマルジョン状の単相になった。この時間の終了時に、TLCは、混合物中に残っているトウモロコシ油がないことを示す。次に、混合物を72に冷却し、500mLの25%の硫酸を加えて、混合物を酸性化した。次に、混合物を室温に冷まし、2Lのジエチルエーテルを加えた。エーテル層を、1%の硫酸で洗浄し(3×1L)、飽和塩水で洗浄し(1×1L)、MgSO₄上で乾燥させ、ろ過した。エーテルをロータリーエバボレータ(rotatevap)によって除去し、次に、油を窒素で一晩バージしたところ、470gの黄色の油が得られ、それを一晩部分的に結晶化させた。AOCS方法Ca-5a-40による遊離脂肪酸の滴定により、オレイン酸として表される95%の脂肪酸含量が示される。104mgを1mLの乾燥ピリジン中の100uLのN-メチル-N-(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドと反応させることによって、試料をシラン処理した。シラン処理された生成物のガスクロマトグラフィー-質量分析(GCMS)は、16:0、18:2、18:1、18:0、および20:0の酸のTMS誘導体の存在を示す。

40

【0207】

50

静的方法によって測定した際の 168 時間後の初期の 6 % の I - BuOH 濃度における COFA / 水系中のイソブタノールの分配係数は 2.8 である。

【0208】

実施例 5

トウモロコシ油脂肪酸メチルエステル (FAME)

丸底フラスコ (5 L) は、機械的攪拌器、熱電対、加熱マントル、凝縮器、および窒素ティーを備えていた。1500 g の食品グレードのトウモロコシ油、1500 g のメタノール、および 30 g の濃硫酸を投入した。混合物を 24 時間還流させた後、薄層クロマトグラフィーを行った。次に、反応物を冷却し、層を分離した。有機層を、水 (1 × 1 L)、飽和炭酸水素ナトリウム (1 × 1 L)、水 (2 × 1 L)、飽和塩水 (1 × 1 L) で洗浄し、次に MgSO₄ 上で乾燥させた。収量は 1416 g の淡黄色の油であった。GCMS 分析は、酸 16 : 0、18 : 2、18 : 1、18 : 0、20 : 1、および 20 : 0 のメチルエステルの存在を示す。AOCS 方法 Ca 5a-40 による遊離脂肪酸の滴定により、オレイン酸として表される 0.2 % の脂肪酸含量が示される。

【0209】

静的方法によって測定した際の 236 時間後の初期の 6 % の I - BuOH 濃度における FAME / 水系中のイソブタノールの分配係数は 1.06 である。

【0210】

実施例 6

トウモロコシ油エチレングリコールエステル (FAGE)

丸底フラスコ (3 L) は、機械的攪拌器、熱電対、加熱マントル、ディーン・スタークトラップ、凝縮器、窒素バージ、および窒素ティーを備えており；このフラスコに、1000 g のトウモロコシ油脂肪酸メチルエステル (FAME) および 1000 g のエチレングリコールを投入した。2 g の清浄なナトリウムを混合物に加え、60 ℃まで加熱する。90 分後、温度を 100 ℃まで上昇させ、窒素を反応物中に表面下でゆっくりとスパージする。メタノールを、ディーン・スタークトラップに収集する。温度を 3 時間かけて 160 ℃までゆっくりと上昇させると、メタノールは、反応物から蒸留し続ける。さらに 2 時間後、合計で 100 mL のメタノールを収集した。反応物を室温に冷まし、20 g の 25 % の硫酸で中和した。層を分離し、上層を 4 × 200 mL の 10 % の塩化カルシウム溶液で洗浄した。エマルジョンが形成されたが、時間とともに分離するであろう。有機層を、250 mL の飽和塩水で洗浄し、MgSO₄ 上で乾燥させ、ろ過したところ、916 g の透明の黄色の油が得られた。AOCS 方法 Ca 5a-40 による遊離脂肪酸の滴下により、オレイン酸として表される 2.9 % の酸が存在していることが示される。109 mg を、1 mL の乾燥ピリジン中の 100 uL の N - メチル - N - (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミドと反応させることによって、試料をシラン処理した。シラン処理された生成物の GCMS 分析は、16 : 0、18 : 2、18 : 1、および 18 : 0 のエチレングリコールモノエステルとともに、16 : 0、18 : 2、および 18 : 1 の酸の TMS 誘導体の存在を示す。

【0211】

静的方法によって測定した際の 192 時間後の初期の 6 % の I - BuOH 濃度における FAGE / 水系中のイソブタノールの分配係数は 2.3 である。

【0212】

例 7

発酵の比較例

表 2 に列挙される材料を、例 7 の比較例に使用した。全ての市販の試薬を、入手したままの状態で使用した。トウモロコシ油から合成された溶媒を、入手したままの状態で使用した。

【0213】

10

20

30

40

【表2】

表2

材料

<u>シードフラスコおよび発酵培地の成分</u>	
- アミノ酸を含まない酵母窒素ベース(Yeast Nitrogen Base), Becton Dickinson and Company	
- (291920)	
- 酵母ドロップアウト混合物(Yeast Dropout Mix), Sigma Aldrich (Y2001)	
- L-ロイシン, Sigma Aldrich(L8000)	
- L-トリプトファン, Sigma Aldrich(T0254)	
- 99.5%超のエタノール, Sigma Aldrich(459844)	
- 50% w/w のグルコース溶液	
- エルゴステロール, Fluka(45480)	
- Tween 80, Sigma Aldrich(P8074)	
- 酵母抽出物, Becton Dickinson and Company(212750)	
- ペプトン, Becton Dickinson and Company(211820)	
- ニコチン酸, Alfa Aesar(ストック番号 A12683 または L02659)	
- 塩酸チアミン, Sigma Aldrich(T4562)	
<u>市販の溶媒</u>	
- 90~95%のオレイルアルコール, Cognis, ロット番号 CE81210020	20
- オレイン酸, Sigma Aldrich(27728)	
- Isofol™ 12, Sasol North America, ロット番号 65604	
<u>合成された溶媒(上記の実施例 2~4 および 6 に記載される方法を用いた)</u>	
- トウモロコシ油脂肪酸	
- トウモロコシ油エチレンジリコールエステル	
- トウモロコシ油脂肪アルコール、調製物 A	
- トウモロコシ油脂肪アルコール、調製物 B	
- トウモロコシ油脂肪アミド/酸	
- トウモロコシ油脂肪アミド	
- トウモロコシ油脂肪酸メチルエステル + 1,2-プロパンジオール	30
<u>ストック溶液</u>	
- 10X YEP	
- 500 mL の温かい脱イオン水(diH ₂ O)(60°C)に 100 g/L の酵母抽出物および 200 g/L のペプトンを加える。溶液が 1 L の最終体積になるまで加熱し続け、次にろ過滅菌する。	
- 50:50 v/v のエタノール:Tween 80 中の 1%のエルゴステロール	
- 10 g/L のエルゴステロールを、50:50 のエタノール:Tween の温溶液(50°C)に加え、エルゴステロールが溶解するまで加熱し、ろ過滅菌する。	
- 100X ニコチン酸/塩酸チアミン	
- 10 g/L のニコチン酸および 2 g/L のチアミンを、脱イオン水(diH ₂ O)に加え、次にろ過滅菌する。	
<u>菌株</u>	
- NGCI-065	
- NGCI-070	

【0214】

一般的な方法

光学密度を、Amersham Biosciences Ultrospec 2100 Pro 分光光度計を用いて測定した。測定は、通常、600 ナノメートルの波長を行った。

10

20

30

40

50

【0215】

グルコース濃度を、Y S I L i f e S c i e n c e s 2 7 0 0 S e l e c t B i o c h e m i s t r y A n a l y z e r を用いて測定した。発酵試料を、1.7mLの微小遠心分離管において13,200 rpmで2分間遠心分離し、水性の上清をグルコース濃度について分析した。

【0216】

発酵条件：30%のpO₂；温度：30；pH 5.5（特に断りのない限り）；初期バッチグルコース：20g/L、これらは生成中に維持される。

【0217】

H P L C および G C 分析の両方を、それぞれ水相および溶媒相中のイソブタノールの量子化（quantization）に使用した。水相中のイソブタノールを、以下の条件下で、H P L C（Agilent 1100, Agilent, Santa Clara, CA）を用いて、0.2umのナイロンフィルターによるろ過の後に測定した：

カラム：Bio-Rad、Aminex H P X - 8 7 H、No. 1 2 5 - 0 1 4 3

移動相：0.01MのNa₂HPO₄、pH = 8.0

注入量：10uL

流量：0.6mL/分

実行時間：22.5分間

カラム温度：65

検出器：屈折率

10

検出器温度：40

UV検出：210nm、4nmの帯域幅、Ref 360nm、100nmの帯域幅。

20

【0218】

溶媒相を、以下の条件下で、G C (H P 6 8 9 0, Agilent, Santa Clara, CA)を用いて測定した：

カラム：J & W S c i e n t i f i c D B W a x t e r (50m x 0.32mmの内径 (ID)、1umのフィルム)

ガス担体：ヘリウム 4mL/分

注入量：2uL

補給流量：40mL/分

30

実行時間：29分間

オープン温度：40で5分間、10/分で40~230、230で5分間

注入器スプリット：250で1:5

炎イオン化検出：250。

【0219】

トウモロコシ油に由来する抽出剤およびそれらの成分の比較例：G L N O R 6 3 5 A ~ 6 4 0 A

一連の比較例を、表3に列挙される水不混和性抽出剤を用いて行った。発酵の期間にわたって培地を溶媒に曝す時間がゼロの時点で、抽出剤を発酵プロセスに加えた。水相および有機相の両方におけるイソブタノール濃度を測定して、抽出溶媒の分配係数を計算した。グルコースの利用を用いて、抽出剤に対する微生物の生体適合性を測定した。

40

【0220】

【表3】

表3

発酵例 GLNOR635~640A に使用される抽出剤の組成

例	抽出剤
GLNOR635A	オレイルアルコール
GLNOR636A	トウモロコシ油脂肪酸(COFA)
GLNOR637A	オレイン酸
GLNOR638A	オレイン酸
GLNOR639A	オレイン酸
GLNOR640A	オレイン酸

10

20

30

【0221】

発酵を、株 N G C I - 0 6 5 に関して記載されるように行った。接種材料を 2 段階で調製し、培養振とう器 (Innova 4200, New Brunswick Scientific, Edison, NJ) において 30 および 250 rpm で培養した。第 1 の段階またはプレシード (pre-seed) を、冷凍されたグリセロールシードストックから接種し、2 つのバイアルを、30 mL のろ過滅菌したプレシード培地 (表 4) を入れた 250 mL のフラスコに入れ、OD が約 2 になるまで 24 時間増殖させた。次に、24 時間培養する第 2 の段階のために、15 mL のプレシードを、270 mL のろ過滅菌したシード培地 (表 5) を入れた 2 L のフラスコに移した。次に、30 mL のろ過滅菌した 10 X YEP および 300 mL のろ過滅菌した 90 ~ 95 % のオレイルアルコールを加え、シード培地の水相中の最終的な OD が約 5 ~ 10 になるまでさらに 24 時間培養した。例 GLNOR639 および GLNOR640 では、pH は 4.5 であった。

【0222】

【表4】

表4

プレシード/段階 1 の培地の組成

プレシード培地の成分	リットル当たりの量
アミノ酸を含まない酵母窒素ベース	6.7 g
酵母ドロップアウト混合物	1.4 g
L-ロイシン(1% w/v のストック溶液)	20 mL
L-トリプトファン(1% w/v のストック溶液)	4 mL
エタノール	3.0 mL
50% w/w のグルコース溶液	5.4 mL

【0223】

40

【表5】

表5

シード/段階2の培地の組成

シード培地の成分	リットル当たりの量
アミノ酸を含まない酵母窒素ベース	6.7 g
酵母ドロップアウト混合物	2.8 g
L-ロイシン(1% w/v のストック溶液)	20 mL
L-トリプトファン(1% w/v のストック溶液)	4 mL
エタノール	3.0 mL
50% w/w のグルコース溶液	50.4 mL
MES 緩衝液	38.4 g
接種の24時間後の添加	フラスコ当たりの量
10X 酵母抽出物ペプトン(100g/L の酵母抽出物 および 200g/L のペプトン)	30 mL
90~95%のオレイルアルコール	300 mL

10

20

30

【0224】

発酵槽 (Applikon AD1010 Bioreactor, Applikon Biotechnology, Dover, NJ) を、脱イオン水 (diH₂O) で 30 分間殺菌した (Amsco Renaissance 3033 Revas Steam Sterilizer, Steris Corporation, Mentor, OH)。オートクレーブ中で槽の殺菌を終えてから、30 に冷却し、殺菌した脱イオン水 (diH₂O) を除去し、ろ過滅菌した発酵培地を、280 mL の体積に加えた。最終的な水性体積が 350 mL になるように、第2の段階のシードフラスコからの 70 mL の水相を発酵槽に加えた。接種の直後、最終的な溶媒対プロスの比率が約 1 : 1 になるように、450 mL のそれぞれの抽出溶媒だけでなく、100 mL の 10X YEP 培地の補充を追加した。発酵設定値条件は、30 の温度、pO₂ 30 %、GLNOR635A-638A について pH 5.5 および GLNOR639A~640A について pH 4.5 であった。発酵物を、接種の時点から約 8 時間ごとに採取して、グルコース濃度を監視し、それを、50% w/w のグルコース溶液の添加によって 5~20 g/L に維持し、水相および抽出剤相の両方におけるイソブタノール蓄積について分析した。各時点で十分な試料の体積を取って、相の両方からの試料を得て、次に、それらの試料を、それぞれの明確な輪郭を確実にするために遠心分離した。

【0225】

【表6】

表6
発酵培地の組成

発酵培地の成分	リットル当たりの量
アミノ酸を含まない酵母窒素ベース	6.7 g
酵母ドロップアウト混合物	2.8 g
L-ロイシン(1% w/v のストック溶液)	20 mL
L-トリプトファン(1% w/v のストック溶液)	4 mL
エタノール	4.5 mL
50% w/w のグルコース溶液	40.0 g
50:50(v/v)のエタノール:Tween 80 中の 1% のエルゴステロール	1.0 mL
接種後の添加	
10X 酵母抽出物ペプトン(100g/L の酵母抽出物および 200g/L のペプトン)	100 mL
90~95%のオレイルアルコール	450 mL

10

20

30

40

【0226】

トウモロコシ油に由来する抽出剤およびそれらの成分の比較例：GLNOR661A～666A

比較例 GLNOR661A～666Aを、表7に列挙される水不混和性抽出剤を用いて行った。この組の例を、菌株、pH、およびゼロの時点での補充添加を除いて、上記の例 GLNOR635A～640Aと同じように行った。株 NGC1-070を使用し、pH設定値は5.5であり、4mLのニコチン酸/チアミン培地の補充を、この一連の例についての100mLの酵母抽出物ペプトンの代わりに追加した。

【0227】

【表7】

表7

発酵例 GLNOR661～666Aに使用される抽出剤の組成

例	抽出剤
GLNOR661A	オレイルアルコール
GLNOR662A	溶媒なし
GLNOR663A	トウモロコシ油脂肪酸
GLNOR664A	トウモロコシ油脂肪酸
GLNOR665A	オレイン酸
GLNOR666A	オレイン酸

【0228】

トウモロコシ油に由来する抽出剤およびそれらの成分の比較例：GLNOR690A～695A

比較例 GLNOR690A～695Aを、表8に列挙される水不混和性抽出剤を用いて行った。この組の例を、上記の例 GLNOR661A～666Aと同じように行った。株 NGC1-070を使用した。

【0229】

【表8】

表8

発酵例 GLNOR690~695A に使用される抽出剤の組成

例	抽出剤
GLNOR690A	オレイルアルコール
GLNOR691A	オレイルアルコール
GLNOR692A	トウモロコシ油脂肪アルコール*
GLNOR693A	トウモロコシ油脂肪アルコール*
GLNOR694A	トウモロコシ油エチレングリコールエステル
GLNOR695A	トウモロコシ油エチレングリコールエステル

* 合成された脂肪アルコール、調製物 A

10

【0230】

トウモロコシ油に由来する抽出剤およびそれらの成分の比較例 GLNOR721A~726A

20

比較例 GLNOR721A~726Aを、表9に列挙される水不混和性抽出剤を用いて行った。この組の例を、上記の例 GLNOR690A~695Aと同じように行った。株

20

NGC I - 070 を使用した。

【0231】

【表9】

表9

発酵例 GLNOR721~726A に使用される抽出剤の組成

例	抽出剤
GLNOR721A	トウモロコシ油脂肪酸メチルエステル + 1,2-プロパンジオール
GLNOR722A	トウモロコシ油脂肪酸メチルエステル + 1,2-プロパンジオール
GLNOR723A	トウモロコシ油脂肪アルコール**
GLNOR724A	トウモロコシ油脂肪アルコール**
GLNOR725A	トウモロコシ油脂肪アミド/酸*
GLNOR726A	トウモロコシ油脂肪アミド/酸*

30

* 実施例2の2:1の合成された脂肪アミド:脂肪酸混合物(調製物(1))

** 合成された脂肪アルコール、調製物 B

【0232】

トウモロコシ油に由来する抽出剤およびそれらの成分の比較例： GLNOR749A~754A

40

比較例 GLNOR749A~754Aを、表10に列挙される水不混和性抽出剤を用いて行った。この組の例を、上記の例 GLNOR721A~726Aと同じように行った。株

NGC I - 070 を使用した。

【0233】

【表10】

表10

発酵例 GLNOR749～754A に使用される抽出剤の組成

例	抽出剤
GLNOR749A	Isofol™ 12**
GLNOR750A	Isofol™ 12
GLNOR751A	トウモロコシ油脂肪酸
GLNOR752A	トウモロコシ油脂肪酸
GLNOR753A	トウモロコシ油脂肪アミド/酸*
GLNOR754A	トウモロコシ油脂肪アミド/酸*

* 実施例2の1:1の合成された脂肪アミド脂肪酸混合物:純粋な脂肪酸(調製物(1a))

** Isofol™ 12:2-ブチル-1-オクタノール

10

20

【0234】

発酵例 GLNOR635A～640A、GLNOR661A～666A、GLNOR690A～695A、GLNOR721A～726A、GLNOR749A～754Aについての性能データが、表11にまとめられており、表11は、オレイルアルコールおよびIsofol(商標)の従来の市販の溶媒と比較した際の、例示的なトウモロコシ油に由来する抽出剤およびそれらの成分についての、水性イソブタノール濃度(g/L)、溶媒イソブタノール濃度(g/L)、および溶媒の分配係数(K_p)を示す。

【0235】

【表11】

表11

例	溶媒 (g/L)	水性 (g/L)	Kp
GLNOR635	21.5	6.4	3.38
GLNOR636	9.8	3.9	2.52
GLNOR637	5.6	2.1	2.64
GLNOR638	5.5	2.1	2.56
GLNOR639	3	1.2	2.54
GLNOR640	3	1.2	2.51
GLNOR661	19	5.7	3.35
GLNOR662	X	5.1	X
GLNOR663	16.3	5.9	2.76
GLNOR664	12.1	4.6	2.65
GLNOR665	12	4.6	2.61
GLNOR666	12.4	4.9	2.51
GLNOR690	14.1	3.8	3.74
GLNOR691	13.6	3.6	3.77
GLNOR692	NA	NA	NA
GLNOR693	NA	NA	NA
GLNOR694	13.4	5	2.68
GLNOR695	12.2	4	3.07
GLNOR721	12.7	4.4	2.85
GLNOR722	11.5	4.0	2.89
GLNOR723	14.5	5.0	2.88
GLNOR724	18.0	6.3	2.87
GLNOR725	NA	6.2	NA
GLNOR726	NA	NA	NA
GLNOR749	20.0	5.0	4.05
GLNOR750	20.1	4.8	4.22
GLNOR751	X	1.8	X
GLNOR752	14.3	6.0	2.38
GLNOR753	12.0	4.3	2.81
GLNOR754	19.5	7.2	2.71

【0236】

実施例8

脂肪アルコールの水酸化（65%の水酸化）

機械的攪拌器および滴下漏斗を備えた250mLの三つ口フラスコに、脂肪アルコール混合物（43g、0.16mmol）、トルエン（25.0mL）、Amberlyte

10

20

30

40

50

I R - 1 2 0 樹脂 (12.5 g)、および冰酢酸 (7.5 g) を加えた。得られた混合物を 60 まで加熱し、次に、過酸化水素 (41.8 g の水中 30% の H_2O_2) を、30 分間にわたって滴下して加えた。混合物を 60 で 2 時間攪拌し、その時点で反応混合物を処理した：樹脂をろ過によって除去し、ろ液を酢酸エチル (75 mL) と水 (50 mL) とに分液した。層を分離した後、有機層を、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液 (50 mL)、および塩水 (50 mL) で洗浄した。有機層を無水 Na_2SO_4 上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、50 g の黄色の油が得られた。粗反応生成物の 1H NMR 分析により、二重結合の 65% がエポキシ化されたことが示された。得られた混合物を、精製せずに次の工程に使用した。

【0237】

10

500 mL の丸底フラスコに、エポキシ化脂肪アルコール (14.5 g)、THF (200.0 mL)、および硫酸 (100 mL の 1.7 M の水溶液) を加えた。濁った混合物を 50 で一晩攪拌し、次に、水 (100 mL) と酢酸エチル (200 mL) とに分液することによって処理した。有機層を、水 (2 × 100 mL)、続いて飽和 $NaHCO_3$ 水溶液 (100 mL)、次に塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を無水 Na_2SO_4 上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、14.7 g の高粘度の透明の液体と白色の固体との混合物が得られた。

【0238】

20

分配係数の測定

水中の 3% の *i*-BuOH 溶液の 1 mL の溶液に、1 mL の水酸化脂肪アルコール混合物を加え、得られた二相混合物を、10 分間にわたってボルテックスを用いて激しく攪拌した。6% の *i*-BuOH 溶液においても同様に、実験を 2 通り行った。混合後、層を分離し、試料を両方の層から取って、GC を用いて *i*-BuOH 濃度を測定した (表 12)。3.7 の分配係数が観察された。

【0239】

【表 12】

表 12

水と水酸化脂肪アルコールとに分液する *i*-BuOH の分配係数の測定データ

30

試料	<i>i</i> -BuOH (量)	希釈係数 (20 倍)	分配係数	総濃度 (mg/mL)
有機層 <i>i</i> -BuOH、3%	1.13	22.6	3.53	29
有機層 <i>i</i> -BuOH、3%	1	20	3.45	25.8
水層 <i>i</i> -BuOH、3%	0.32	6.4		
水層 <i>i</i> -BuOH、3%	0.29	5.8		
有機層 <i>i</i> -BuOH、6%	2.15	43	3.91	54
有機層 <i>i</i> -BuOH、6%	1.96	39.2	3.84	49.4
水層 <i>i</i> -BuOH、6%	0.55	11		
水層 <i>i</i> -BuOH、6%	0.51	10.2		
			3.68	

【0240】

40

本発明の様々な実施形態を上に説明してきたが、それらは例として示されたに過ぎず、限定するものではないことを理解されたい。本発明の趣旨および範囲から逸脱せずに本発明の形態および細部の様々な変更を行うことができる事が、関連技術の当業者に明らかであろう。したがって、本発明の広さおよび範囲は、上述した例示的実施形態のいずれによって限定されるものではなく、以下の特許請求の範囲およびそれらの均等物のみにした

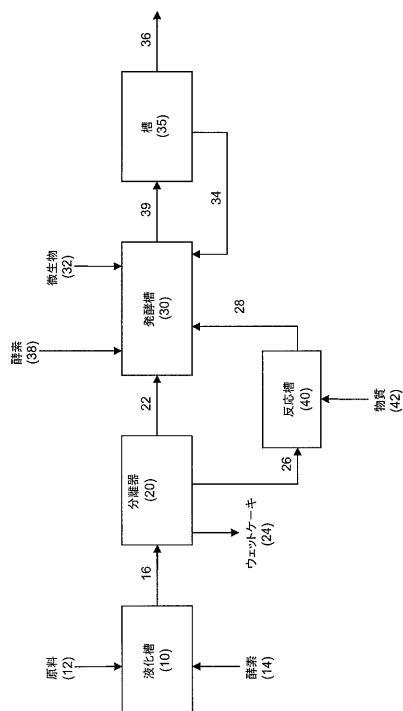
50

がって規定されるものである。

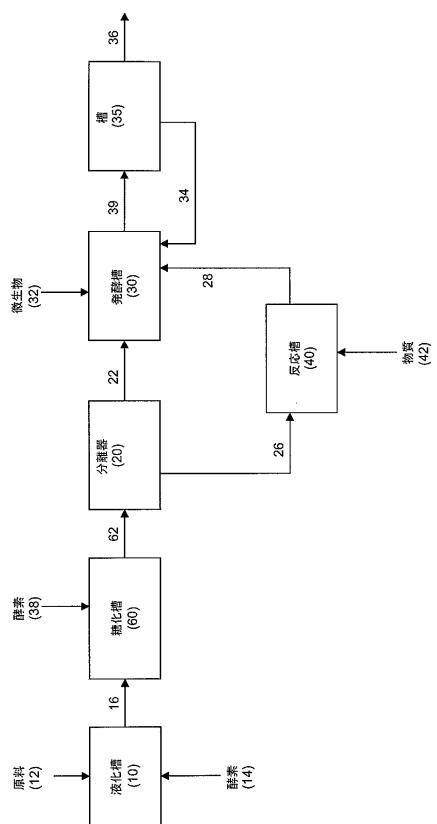
【 0 2 4 1 】

本明細書に記載される全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明が関する技術分野の当業者の技能のレベルを示し、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が参照により援用されることが具体的にかつ個々に示されているのと同程度に、参照により本明細書に援用される。

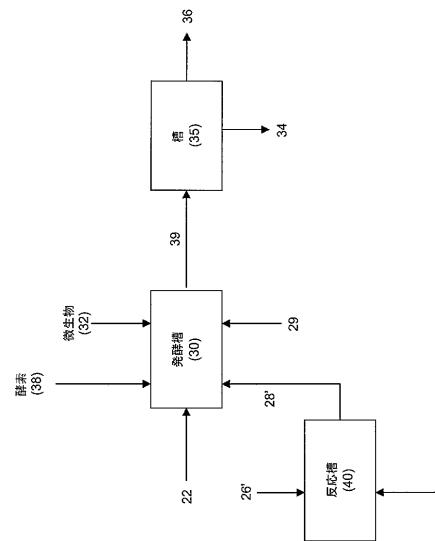
【図1】



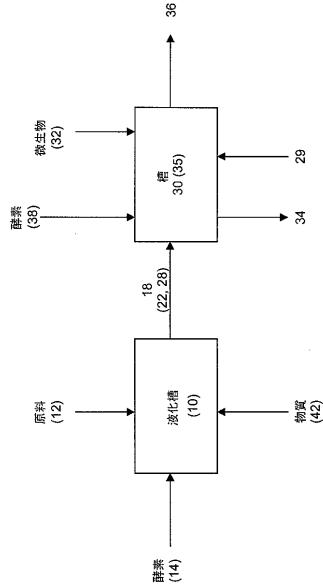
【 図 2 】



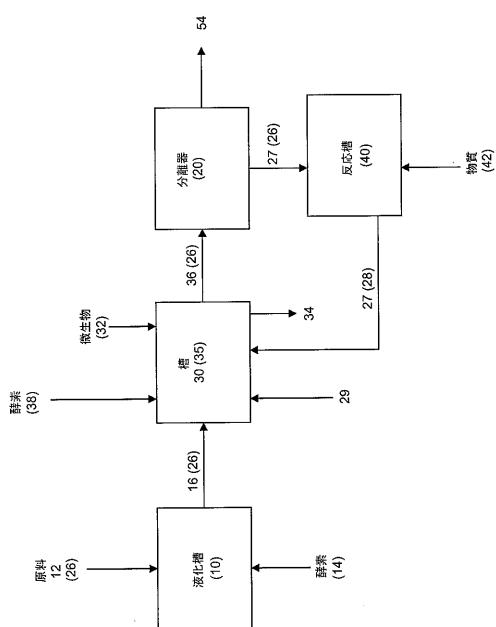
【図3】



【図4】



【図5】



【配列表】

2013533742000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2011/040842									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P7/16 C11C1/04 C07C29/86 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 C11C C07C											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;"> WO 2009/149270 A2 (DU PONT [US]; GRADY MICHAEL CHARLES [US]; JAHIC MEHMEDALIJA [US]; PATN) 10 December 2009 (2009-12-10) the whole document ----- </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> 1-10, 17-23, 25-32, 34-36 </td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;"> MALINOWSKI J J: "Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 19, no. 7, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 525-538, XP004329170, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/S0734-9750(01)00080-5 page 530 ----- </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> 1-38 -/-- </td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2009/149270 A2 (DU PONT [US]; GRADY MICHAEL CHARLES [US]; JAHIC MEHMEDALIJA [US]; PATN) 10 December 2009 (2009-12-10) the whole document -----	1-10, 17-23, 25-32, 34-36	A	MALINOWSKI J J: "Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 19, no. 7, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 525-538, XP004329170, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/S0734-9750(01)00080-5 page 530 -----	1-38 -/--
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 2009/149270 A2 (DU PONT [US]; GRADY MICHAEL CHARLES [US]; JAHIC MEHMEDALIJA [US]; PATN) 10 December 2009 (2009-12-10) the whole document -----	1-10, 17-23, 25-32, 34-36									
A	MALINOWSKI J J: "Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 19, no. 7, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 525-538, XP004329170, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/S0734-9750(01)00080-5 page 530 -----	1-38 -/--									
<input checked="" 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report									
29 September 2011		10/10/2011									
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 Schneider, Patrick									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/040842

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OUDSHOORN A ET AL: "Assessment of Options for Selective 1-Butanol Recovery from Aqueous Solution", INDUSTRIAL & ENGINEERING CHEMISTRY RESEARCH, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 48, no. 15, 5 August 2009 (2009-08-05), pages 7325-7336, XP002634202, ISSN: 0888-5885, DOI: 10.1021/IE900537W [retrieved on 2009-06-24] -----	1-38
X, P	WO 2011/063402 A2 (BUTAMAX TM ADVANCED BIOFUELS LLC [US]; PATNAIK RANJAN [US]; GRADY MICH) 26 May 2011 (2011-05-26) the whole document -----	1-38
X, P	WO 2010/119339 A2 (BUTAMAXTM ADVANCED BIOFUELS LL [US]; GRADY MICHAEL CHARLES [US]; HALLA) 21 October 2010 (2010-10-21) the whole document -----	1-10

1

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) [April 2005]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2011/040842

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2009149270	A2 10-12-2009	AU 2009256148	A1	10-12-2009
		CA 2723877	A1	10-12-2009
		CN 102177243	A	07-09-2011
		EP 2283141	A2	16-02-2011
		JP 2011522543	A	04-08-2011
		KR 20110015045	A	14-02-2011
		US 2009305370	A1	10-12-2009
WO 2011063402	A2 26-05-2011	US 2011136193	A1	09-06-2011
WO 2010119339	A2 21-10-2010	US 2011097773	A1	28-04-2011

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 C 27/02	(2006.01)	C 0 7 C 27/02
C 0 7 C 69/732	(2006.01)	C 0 7 C 69/732
C 0 7 C 233/09	(2006.01)	C 0 7 C 233/09
C 0 7 C 231/02	(2006.01)	C 0 7 C 231/02
C 0 7 C 33/02	(2006.01)	C 0 7 C 33/02
C 0 7 C 29/147	(2006.01)	C 0 7 C 29/147
C 0 7 C 67/03	(2006.01)	C 0 7 C 67/03
C 0 7 C 31/12	(2006.01)	C 0 7 C 31/12
C 0 7 C 29/86	(2006.01)	C 0 7 C 29/86
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00
C 0 7 B 61/00	(2006.01)	C 0 7 B 61/00 3 0 0

- (31) 優先権主張番号 61/368,429
 (32) 優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/368,444
 (32) 優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/368,451
 (32) 優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/356,290
 (32) 優先日 平成22年6月18日(2010.6.18)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/368,436
 (32) 優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,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,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,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

- (72) 発明者 エレナ・ツイラコヴィッチ
 アメリカ合衆国デラウェア州 19806. ウィルミントン. ギルピンアベニュー 1203. アパートメント 7
 (72) 発明者 ブルース・エー・ダイナー
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19317. チャップズフォード. フェアヴィルロード 295
 (72) 発明者 マイケル・チャールズ・グラディ
 アメリカ合衆国ニュージャージー州 08107. オークリン. ヘザーロード 147
 (72) 発明者 フランシス・ジェイ・ウェルナー
 アメリカ合衆国デラウェア州 19701. ベア. コーンウェルドライブ 241
 F ターム(参考) 4B024 AA03 AA05 BA77 BA80 CA01 CA09 CA11 CA20 DA05 DA11
 EA04 GA11 HA01 HA11

4B064 AC01 AC04 CA01 CA02 CA19 CC24 DA10 DA16
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AB01 AC14 BA01 BD29 BD30 BD43
CA05 CA41 CA50 CA60
4H006 AA02 AA03 AB80 AC41 AC46 AC53 AD16 BA34 BA51 BA72
BD70 BD84 BE10 BE14 BE22 BE32 BS10 BV31 FE11 FG30
KA03 KA31 KC14
4H039 CA66 CA71 CD40 CE10 CE20 CE30