

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6800908号
(P6800908)

(45) 発行日 令和2年12月16日 (2020. 12. 16)

(24) 登録日 令和2年11月27日 (2020. 11. 27)

(51) Int. Cl.	F 1	
C O 7 C 29/76 (2006. 01)	C O 7 C 29/76	
C O 7 C 31/20 (2006. 01)	C O 7 C 31/20	B
C O 7 C 29/80 (2006. 01)	C O 7 C 29/80	
C 1 2 P 7/18 (2006. 01)	C 1 2 P 7/18	

請求項の数 14 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2018-72881 (P2018-72881)	(73) 特許権者	511062818
(22) 出願日	平成30年4月5日 (2018. 4. 5)		ゲノマチカ, インク.
(62) 分割の表示	特願2016-177210 (P2016-177210) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 121 サン ディエゴ 4757 ネク サス センター ドライブ
原出願日	平成22年6月3日 (2010. 6. 3)	(74) 代理人	100097456
(65) 公開番号	特開2018-127474 (P2018-127474A)		弁理士 石川 徹
(43) 公開日	平成30年8月16日 (2018. 8. 16)	(72) 発明者	ウアルレン クルアルク
審査請求日	平成30年5月2日 (2018. 5. 2)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 121 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ 10520
(31) 優先権主張番号	61/184, 292	(72) 発明者	ミチャエル ジャブス
(32) 優先日	平成21年6月4日 (2009. 6. 4)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 121 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ 10520
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発酵プロセスの成分を分離する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1,4-ブタンジオール(1,4-BDO)を発酵プロセスから単離する方法であって、該方法が、
濾過からなる分離工程において、1,4-BDOに富む液体分画を、細胞を含む該発酵プロセス
の固体分画から分離する工程であって、該濾過が限外濾過からなり、該発酵プロセスが5重
量%～15重量%の1,4-BDOの濃度で1,4-BDOを含む、前記工程；

該液体分画から塩を除去する工程であって、該塩の除去がナノ濾過及びイオン交換を含
む、前記工程；

該液体分画から水を除去する工程；及び

該塩及び水の除去の後に、該液体分画から蒸留によって1,4-BDOを精製し、少なくとも
純度98%の1,4-BDO生成物を産生する工程からなる、前記方法。

10

【請求項 2】

前記限外濾過が、0.005～0.1ミクロンの細孔径を有する膜を通して濾過することを含む
、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記水を除去する工程が、1つ以上の効用を含む蒸発器系による蒸発により実施される
、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記蒸発器系が、二重又は三重効用蒸発器を含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

20

前記蒸発器系が、熱再圧縮機をさらに含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

前記蒸発器系が、機械的再圧縮機をさらに含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 7】

前記蒸発器系が、流下液膜式蒸発器、短路流下液膜式蒸発器、強制循環式蒸発器、プレート式蒸発器、循環式蒸発器、流動床蒸発器、上昇液膜式蒸発器、向流トリクル蒸発器、攪拌式蒸発器、及び螺旋管蒸発器からなる群から選択される蒸発器を含む、請求項 3 記載の方法。

【請求項 8】

前記蒸発器系が、真空を含む、請求項 3 記載の方法。

10

【請求項 9】

前記水の除去前に前記塩が除去される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記ナノ濾過が、0.0005～0.005ミクロンの細孔径を有する膜を通して濾過することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

前記水の除去後に前記塩が除去される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記塩が部分的に除去された後に、前記水が除去され、次いで、残りの塩が除去される、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 13】

前記塩の除去が、塩を結晶化することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

前記塩の除去が、水の除去により塩を沈殿することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2009年6月4日に出願された米国仮特許出願第61/184,292号の優先権の利益を主張し、その内容全体を引用により本明細書に組み込む。

30

【0002】

(発明の背景)

本発明は、全般的に発酵ブrosの成分の分離に関し、より詳細には、水より高い沸点を有する水混和性成分の、他の発酵ブros成分からの単離に関する。

【0003】

細胞集団、残存培地及び培地の塩、スクロース及び／又はグルコースなどの残存基質、並びに水を含む発酵物の成分を分離し、任意に再生利用する能力を持つプロセススキームを設計する環境面での動機及びコスト低減の動機が存在する。発酵の生産性を向上させる手段として細胞集団を再利用する努力もなされてきた。発酵に再使用するために残存培地及び培地の塩を回収する分野でなされた努力は少ない。この点で、努力のほとんどは、下流の回収よりも初期の培地コストを低減することに集中してきた。得られた「低コスト」培地は、細胞成長及び産物産生にとって最適でないことが多い。培地成分の回収に有効な方法を開発することにより、より最適な培地処方、初期の原材料コストに対する制限を少なくしながら利用可能である。

40

【0004】

有用な純度を持つ化合物の大規模な単離は、プロセス化学における複雑な問題である。規模が違うだけで、実験室のベンチトップ規模で開発された単離手順は、パイロットスケール又は商業スケールでは非現実的又は実行不可能にすらなる。複雑な混合物からの化合物の単離は、化合物が周囲温度で固体と液体のどちらであるか、化合物の沸点、密度、極性、pHに敏感な官能基の有無、水対有機溶媒への溶解度を含む多くの因子に依存する。こ

50

これらの因子は、目的とする化合物が単離される混合物の他の成分全てにも当てはまる。化合物、特に有機化合物の単離に含まれる他の性質は、水と有機溶媒との間など、2種の非混和性相の間でどのように分配するかである。特に極性の高い化合物は、抽出過程に使用される通常の有機溶媒よりも水に溶けやすいことが多い。いくつかの化合物は、その両親媒的な性質のため、抽出法により水から単離するのが特に困難である。両親媒性物質は、極性部分と親油性部分とを両方有する化合物である。これらの化合物は、処理しづらいエマルジョンを生み出すことにより、抽出による単離を複雑にすることがある。

【0005】

さらに、化合物が発酵物から製造される場合、水の量は、目的とする化合物よりも著しく多いことがあり、複雑な混合物からの少量成分の単離を必要とする。水よりも高温で沸騰する化合物の単離は、例えばエタノール発酵プロセスのように発酵ブロスから化合物を直接蒸留できないので、分離の複雑さ及びコストをさらに増す。この点で、目的とする化合物と水との間の相互作用は、2つの物質を、2つの純粋な成分とは異なる沸点で共沸混合物として共蒸留させることがある。共沸混合物の形成は容易に予測できない。このことは、目的の化合物を水から分離しようとするときにその回収を低下させ得る。化合物が極性官能基を有する場合、例えば塩及び金属イオンなどの水相に存在する他の化合物とどのように相互作用するのかも、別な関心事である。

10

【0006】

目的とする化合物に存在する官能基の性質は、塩の分離を複雑にすることがある。例えば、化合物の1つ以上の官能基は、カチオン又はアニオンと相互作用し、又はキレート化し得る。キレート化は、カチオン又はアニオンに対して大きさに依存して起こり、目的とする化合物の官能基の配置にも依存する。キレート化及び他の相互作用は、水の非存在下ですら、ある塩を液体化合物に可溶性にすることがある一方で、他の塩は、塩と相互作用できる官能基を持つ化合物が存在するにも関わらず水の非存在下で不溶性になり得る。塩の溶解度に対するこの種の作用は予測が難しい。補助溶媒の性質も、化合物と塩との間の相互作用の複雑さをさらに増す。例えば、水混和性である目的とする化合物の単離の間に、水素結合及び水との他の相互作用は、塩と目的とする化合物との間の相互作用を乱すことがある。そのため、いくつかの場合において、ある量の水の存在下で、化合物からより容易に塩を分離できる。しかし、目的とする化合物と塩との間のキレート化及び他の相互作用を乱す水の能力を維持しながら、例えば結晶化による塩の分離を可能にする塩の過飽和の釣り合いをとる水の量は、予測するのが困難である。

20

30

【0007】

さらに、単離方法を開発する際のさらなる問題は、有機酸、過剰な基質などの生合成副産物の潜在的な反応性である。加熱条件下で、過剰な基質は分解し、産物の望ましくない着色を起こすことがある。さらに、いくつかの副産物は目的とする産物と反応し、実際上単離収率を下げる可能性がある。これらの副産物には、発酵の間に形成されるもの並びに、例えば蒸留、水分蒸発などの間の高温での劣化プロセスによる単離手順自体の工程の間に形成される副生成物があり得る。

【0008】

そのため、他の発酵成分を再生利用する環境面及びコスト面の利益を考慮に入れながら、水よりも沸点が高い水混和性化合物の微生物発酵物からの単離を可能にする方法を開発する必要がある。本発明はこの必要性を満たし、関連する利点も提供する。

40

【発明の概要】

【0009】

いくつかの態様において、本明細書に開示される実施態様は、発酵ブロスから1,4-ブタンジオール(1,4-BDO)を単離する方法であって、細胞を含む固体分画から1,4-BDOに富む液体分画を分離すること、該液体分画から水を除去すること、該液体分画から塩を除去すること、及び1,4-BDOを精製することを含む方法に関する。

【0010】

他の態様において、本明細書に開示される実施態様は、発酵ブロスから1,4-BDOを単離

50

する方法であって、ディスクスタック遠心分離により固体の一部を除去して液体分画を与えること、限外濾過により該液体分画から固体のさらなる部分を除去すること、蒸発晶析により該液体分画から塩の一部を除去すること、イオン交換により該液体分画から塩のさらなる部分を除去すること、及び1,4-BDOを蒸留することを含む方法に関する。

【0011】

さらに他の態様において、本明細書に開示される実施態様は、発酵ブロスから1,4-BDOを単離する方法であって、ディスクスタック遠心分離により固体の一部を除去して液体分画を与えること、限外濾過により該液体分画から固体のさらなる部分を除去すること、ナノ濾過により該液体分画から塩の一部を除去すること、イオン交換により該液体分画から塩のさらなる部分を除去すること、水の一部を蒸発させること、及び1,4-BDOを蒸留することを含む方法に関する。

10

【0012】

なおさらに他の態様において、本明細書に開示される実施態様は、1,4-BDOを産生する方法であって、1,4-BDO産生微生物を発酵装置中で1,4-BDOを産生するのに十分な時間培養することを含む方法に関する。該1,4-BDO産生微生物には、1,4-BDO経路酵素をコードする1つ以上の外因性遺伝子及び／又は1つ以上の遺伝子破壊を含む1,4-BDO経路を有する微生物がある。該方法は、記載される単離方法により1,4-BDOを単離することをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、発酵ブロスから1,4-BDOを精製する方法における工程のブロックダイアグラムを示す。

20

【図2】図2は、ディスクスタック遠心分離機の断面図を示す。

【図3】図3は、デカンタ型遠心分離機の断面図を示す。

【図4】図4は、強制循環式晶析器のダイアグラムを示す。

【図5】図5は、横型熱交換器及び活性体積(active volume)中のバッフルを有する強制循環式晶析器のダイアグラムを示す。

【図6】図6は、ドラフトチューブバッフル晶析器のダイアグラムを示す。

【図7】図7は、誘導循環型晶析器のダイアグラムを示す。

【図8】図8は、閉鎖型オスロ型晶析器のダイアグラムを示す。

【図9】図9は、開放型オスロ型晶析器のダイアグラムを示す。

30

【図10】図10は、流下液膜式蒸発器の部分断面図を示す。

【図11】図11は、強制循環式蒸発器の部分断面図を示す。

【図12】図12は、プレート式蒸発器の部分断面図を示す。

【図13】図13は、循環式蒸発器のダイアグラムを示す。

【図14】図14は、流動床蒸発器のダイアグラムを示す。

【図15】図15は、1,4-BDOの産生及び単離の完全なスキームのフローダイアグラムを示す。

【図16】図16は、1,4-BDOの産生及び単離の他の完全なスキームのフローダイアグラムを示す。

【発明を実施するための形態】

40

【0014】

(発明の詳細な説明)

コモディティケミカルの発酵産生は、再生不能な化石燃料フィードストックを利用する従来の製造に代わる有用な代替法である。再生利用されたバイオマスなどの再生可能なフィードストックを利用する能力を持っているので、該方法は、化石燃料に基づく製造よりも経済的及び環境的に健全になり得る。発酵から生じた産物は多くの用途に有用なことがある。特定の実施態様において、本発明は、1,4-BDOの産生の方法を提供する。1,4-ブタンジオール(BDO)はポリマー中間体及び工業的な溶剤である。下流で、ブタンジオールはさらに変換されることがあり、例えば、酸化によりγ-ブチロラクトンになり、さらにピロリドン及びN-メチル-ピロリドンに転化され、或いは水素化分解を受けてテトラヒドロフ

50

ランになることがある。これらの化合物は、ポリマー中間体、溶剤、及び添加剤として種々の用途を有する。

【0015】

本発明は、任意に発酵ブrossの他の成分の再生利用を可能にすると同時に、水より高い沸点を有する水混和性化合物を発酵物から単離する方法を部分的に対象とする。該方法は細胞集団を分離できるが、これは、遺伝子挿入、遺伝子破壊、又は挿入と破壊との組み合わせにより遺伝子操作されて好適なフィードストックから有用な収率で化合物を産生する微生物を含み得る。

【0016】

細胞を含まないブross、又は液体分画は、塩の除去によりさらに処理することができる。これは、発酵ブrossから水の一部又は実質的に全てを除去する前又は後にいくつかの方法により実施可能である。上述のとおり、発酵法において塩が再生利用のために回収されることは多くない。通常、塩の回収は、培地塩などではなく、乳酸塩、クエン酸塩、又は他のカルボン酸塩産物などの所望の生合成産物の塩又はアミン含有産物のアンモニウム塩の形態を含む。本明細書に記載される方法は、培地塩の回収及び発酵へ戻す任意の再生利用を可能にする。単離方法は水の除去も含み、水は発酵系に再導入することができる。最終的な精製において、発酵により産生される化合物は、細胞、塩、及び水の除去後に残存する液体分画から蒸留、又は固体の場合再結晶化することができる。液体の場合、最終的な精製は、例えば分別蒸留により実施できる。

【0017】

いくつかの実施態様において、本発明は、発酵ブrossから、水より高い沸点を有する水混和性の目的とする化合物を単離する方法を対象とする。該方法は、(1)細胞を含む固体分画から、化合物に富む液体分画を分離すること；(2)該液体分画から水を除去すること；(3)該液体分画から塩を除去すること；及び(4)蒸留又は再結晶化により、目的とする化合物を精製することを含む。上記の工程(2)及び(3)は、どちらの順序でも、又はともに実施してもよい。

【0018】

発酵により得ることのできる、水より高い沸点を有する目的とする化合物は、中間の値を全て含んで、水よりも10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃、150℃、200℃、及び300℃高い沸点及びより高い沸点を有することがある。水より高い沸点を有する目的とする化合物は、例えば、1,4-BDO、1,3-BDO、2,3-BDO、1,3-PDO、1,2-PDO(メチルエチルグリコール)、1,2-エタンジオール(エチレングリコール)、 γ ブチロラクトン(GBL)、1,5-ペンタンジオール、1,6-ヘキサンジオールを含み得る。さらに、目的とする化合物には、水混和性であるものがある。いくつかの実施態様において、そのような水混和性化合物は従来の抽出手順では処理しづらいことがある。さらに、目的とする化合物には中性のものがある。本明細書では、中性の化合物は、アミン、カルボン酸、スルホン酸、ボロン酸などの、電荷を帯びることが可能な官能基を有さない化合物を意味する。最後に、目的とする化合物は、以下にさらに記載されるように、ナノ濾過膜を透過するほど十分に小さいことがある。例示的な化合物の種類には、アルコール、ジオール、グリセリンなどのトリオール、テトラオール、ポリオールなどがある。

【0019】

具体的な一実施態様において、目的とする化合物は1,4-BDOである。1,4-BDOは沸点が約230℃であり、水と完全に混和する。さらに、水から1,4-BDOを経済的に抽出できる特定された溶媒はない。中性の分子なので、塩形態の結晶化による単離は除外される。1,4-BDOは、以下の実施例IIIに記載されるとおり、ナノ濾過膜を通過するほど十分に分子量が低い。さらに、以下の実施例VIに記載されるとおり、純粋な1,4-BDOに対する種々の発酵培地塩の溶解度は比較的低い。

【0020】

いくつかの実施態様において、本発明は、発酵ブrossから1,4-ブタンジオール(1,4-BDO)を単離する方法であって、(1)細胞を含む固体分画から1,4-BDOに富む液体分画を分離す

10

20

30

40

50

ること；(2)該液体分画から水を除去すること；(3)該液体分画から塩を除去すること；及び(4)1,4-BDOを精製することを含む方法を提供する。

【0021】

当業者は、例示的な化合物1,4-BDOに関して本明細書で開示される教示の指導があるとすれば、水より高い沸点を有する他の水混和性の目的とする化合物も同じ手順を利用して単離できることを認識するだろう。例えば、本明細書に開示される方法は、1,3-ブタンジオールの単離が可能になるように容易に変更できる。したがって、多くの実施態様が1,4-BDOにより例示されているが、該方法は、水より高い沸点を有する他の水混和性の目的とする化合物に容易に適応できることが理解される。

【0022】

いくつかの実施態様において、本発明は、発酵ブロスから1,4-ブタンジオール(1,4-BDO)を単離する方法を対象とする。該方法は、細胞を含む固体分画から1,4-BDOに富む液体分画を分離することを含む。液体分画から塩を分離する前又は後に、液体分画から水が蒸発させられる。いくつかの実施態様において、1,4-BDOは、以下でさらに記載されるとおり水の除去後に結晶化された塩から分離される。分離された1,4-BDOが約98%塩を含まないように、塩は1,4-BDOに対する溶解度が低い。いくつかの実施態様において、塩は、以下にさらに記載されるとおり、特殊な濾過方法及び／又はイオン交換、又はクロマトグラフィー法により水の除去の前に分離される。

【0023】

本明細書では、「単離」は、実質的に精製された目的とする化合物を得る精製工程を含む方法を意味する。特別な実施態様において、目的とする化合物は1,4-BDOを含む。実質的に精製された化合物には、いくつかの実施態様において少なくとも98%塩を含まないもの、他の実施態様において少なくとも99%塩を含まないもの、及びさらに他の実施態様において少なくとも99.5%塩を含まないものがある。実質的に精製された化合物は、目的とする化合物が、いくつかの実施態様において少なくとも純度98%、他の実施態様において少なくとも純度99%、なおさらなる実施態様において少なくとも純度99.5%であるように塩に加えて他の不純物も含まないものを含む。

【0024】

本明細書では、「液体分画」という用語は、発酵ブロスから固形物を除去すると得られる遠心分離液又は上清液を意味する。固形物除去は、固形物の一部、実質的に全て、又は全てを含む。例えば、遠心分離において、液体分画は、固体から分離される遠心分離液又は上清である。液体分画は、膜による濾過後に得られる透過液又は上清である部分でもある。液体分画は、1つ以上の濾過方法が適用された後に得られる濾液又は上清である部分でもある。

【0025】

本明細書では、「固体分画」という用語は、不溶性物質を含む発酵ブロスの部分を意味する。そのような不溶性物質には、例えば、細胞、細胞片、沈殿したタンパク質、微粉などがある。微粉とは、小さく、通常アモルファスの固体を意味する。微粉は、結晶化の間、又は発酵ブロスからの水の除去の間に作られ得る。微粉は、溶解して再結晶化し得る、目的とする化合物でできていることがある。微粉は、膜濾過で捕捉するには小さすぎる固体分画の一部を含み得る。

【0026】

本明細書では、「塩」という用語は、培地塩及び発酵培地塩と交換可能に使用され、発酵ブロスに使用される溶解したイオン化合物を意味する。発酵ブロス中の塩は、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム、硫酸アンモニウム、及び緩衝剤、例えば、リン酸、クエン酸、酢酸、及びホウ酸のナトリウム及び／又はカリウム及び／又はアンモニウム塩を含み得る。

【0027】

本明細書では、水又は塩の除去に関連して使用される場合の「実質的に全て」という用語は、少なくとも95%の水又は塩の除去を意味する。「実質的に全て」は、少なくとも96%

10

20

30

40

50

、97%、98%、99%、又は99.9%の除去又はその中間の任意の値も意味し得る。

【0028】

明細書では、「遺伝子破壊」という用語又はその文法上の等価物は、コードされた遺伝子産物を不活性にする遺伝子変化を意味するものとする。遺伝子変化は、例えば、遺伝子全体の欠失、転写又は翻訳に必要な調節配列の欠失、トランケート型遺伝子産物を伴う遺伝子の部分の欠失であるか、コードされた遺伝子産物を不活性化する種々の突然変異戦略のいずれかによるものであり得る。遺伝子破壊の特に有用な方法は完全な遺伝子欠失であり、その理由は本発明の非天然微生物における遺伝子復帰の発生を低減又は排除するからである。

【0029】

本明細書では、「微生物」という用語は、顕微鏡的な大きさの原核又は真核の細胞又は生物を意味するものとする。該用語は、全ての種の細菌並びに酵母及び真菌などの真核生物を含むものとする。該用語は、生化学品の産生のために培養できる任意の種の細胞培養物も含む。

【0030】

本明細書では、「1,4-BDO産生微生物」という用語は、有用な量で1,4-BDOを生合成するように遺伝子操作された微生物を意味するものとする。遺伝子操作された生物は、プラスミド挿入及び／又は染色体挿入を含む遺伝子挿入を含み得る。遺伝子操作された生物は、1,4-BDO産生のための所望の経路を通る炭素フラックスをさらに最適化する遺伝子破壊も含むことがある。1,4-BDO産生生物は挿入と欠失との組みあわせを含み得る。

【0031】

本明細書で使用される「外因性」は、言及された分子又は言及された活性が宿主微生物に導入されることを意味するものとする。該分子は、例えば、宿主染色体への組み込みにより、又はプラスミドなどの非染色体遺伝物質として、コードする核酸を宿主遺伝物質へ導入することによって導入され得る。したがって、コードする核酸の発現に関して使用される該用語は、発現可能な形態のコードする核酸の微生物への導入を意味する。生合成活性に関して使用される場合、該用語は、宿主指標生物に導入される活性を意味する。源は、例えば、宿主微生物への導入後に言及される活性を発現する相同又は非相同のコードする核酸であり得る。したがって、「内因性」という用語は、宿主に存在する言及される分子又は活性を意味する。同様に、コードする核酸の発現に関連して使用される場合の該用語は、微生物内に含まれるコードする核酸の発現を意味する。「非相同」という用語は、言及される種以外の源から誘導される分子又は活性を意味し、「相同」は宿主微生物から誘導される分子又は活性を意味する。したがって、本発明のコードする核酸の外因性発現は、非相同又は相同のコードする遺伝子のいずれか又は両方を利用できる。

【0032】

いくつかの実施態様において、本発明は、発酵ブロスから目的とする化合物を精製する方法を提供する。適用できる化合物には、水より沸点が高く塩溶解度が低いものがある。目的とする化合物には、水混和性のものもある。目的とする例示的な化合物は1,4-BDOである。該方法は、細胞集団を含む固体分画から、目的とする産物を含む液体分画を分離することを含む。目的とする産物は、水よりも沸点が高い任意の化合物でよい。細胞集団は、目的とする化合物の産生に利用される微生物を含む。固体分画は、細胞片、微粉、タンパク質、及び発酵物由来の他の不溶性物質も含む。

【0033】

単離方法は、液体分画から塩及び水を除去することを含む。それらが除去される順番は重要でない。いくつかの実施態様において、塩の部分的な除去、それに次ぐ実質的に全ての水の除去、次いで残りの塩の除去があり得る。他の実施態様において、水の部分的な除去、それに次ぐ実質的に全ての塩の除去、次いで残りの水の除去があり得る。他の実施態様において、水は、発酵ブロスからの固体分画の分離前に部分的に除去されることがある。さらに他の実施態様において、実質的に全ての水の最終的な除去は、例えば蒸留により精製工程の一部として実施できる。以下の実施例VIに開示されるとおり、ニートの1,4-BD

10

20

30

40

50

0は、典型的な発酵培地塩を感知できるほどには可溶化しない。そのため、1,4-BDOは、液体分画からの水の蒸発により塩から分離され得る。以下の実施例Vに記載されるとおり、1,4-BDO濃度が約30重量%のとき塩が晶析し始める。いくつかの実施態様において、水の除去により結晶化又は沈殿した塩からの1,4-BDOの分離時に、1,4-BDOは少なくとも98%塩を含まない。実施例VIからわかるように、密接に関連する同族体エタンジオール及びプロパンジオールはなお感知できるほど発酵塩を可溶化する。そのため、他の方法を利用して、実質的に全ての水の除去後にすら塩を除去できる。

【0034】

最後に塩及び水が除去された時、残存する液体又は固体は最終的な精製を受けることができる。目的とする産物が液体である場合、精製は、例えば分別蒸留又は複式蒸留を含む蒸留により実施できる。目的とする産物が固体である場合、精製は再結晶化により実施できる。

【0035】

目的とする化合物を産生及び単離し、発酵プロセスの種々の成分を再生利用する全体的な方法は、図1のブロックフローダイアグラムにまとめられている。工程100は、スクロースなどの炭素フィードストックを利用する発酵による、目的とする化合物の産生である。工程110は、発酵プロセスからの細胞の分離及び液体分画の提供であり、工程115は細胞の任意の再生利用である。工程110は実施例I及びIIで例示されるが、細胞及び固体は遠心分離及び限外濾過により発酵プロセスから分離される。工程120において、塩は液体分画から分離され、工程125は塩の任意の再生利用である。工程120は実施例III-Vに例示されたが、ナノ濾過（実施例III）及びイオン交換（実施例IV）を説明し、水は液体分画にまだ存在している。実施例Vは、水の蒸発の間の結晶化による塩の分離を示す。工程130は蒸発による水の除去であり、工程135は水の任意の再生利用である。工程130は実施例Vにより例示されており、沈殿による塩の分離を促進する水の蒸発を示す。工程120及び130の順序は、以下にさらに記載されるとおり交換可能である。最後に工程140において、目的とする化合物は最終的な精製を受ける。

【0036】

いくつかの実施態様において、1,4-BDOを含む目的とする化合物を発酵プロセスから単離する方法は、目的とする化合物に富む液体分画を、細胞を含む固体分画から分離することを含む。目的とする化合物に富む液体分画を分離する際に、発酵プロセスの体積の全体まで及び中間の全ての値を含む、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%を含み、さらに発酵プロセスの総体積の1%未満の体積を含む任意の量の発酵プロセスを処理できる。当業者は、処理される発酵プロセスの量が、以下に詳述されるとおり回分、供給回分、又は連続などの発酵プロセスの種類に依存し得ることを認識するだろう。細胞及び他の固体副産物及び不純物を含む固体の発酵プロセスからの分離は、遠心分離、濾過、又はこれらの方法の組み合わせにより実施できる。

【0037】

いくつかの実施態様において、遠心分離を使用して、細胞集団を含む固体を実質的に含まない、1,4-BDOなどの目的とする化合物を含む液体分画を提供できる。遠心分離機の構成及び大きさにより、操作速度は500から12,000 rpmに変わることがあり、最大で重力の15,000倍の遠心力を生み出す。発酵プロセスから細胞及び固体を分離するための多くの遠心分離機構成が当分野に知られている。そのような構成の一つは、例えば、図2に示されるディスクスタック遠心分離機200である。

【0038】

ディスクスタック遠心分離機における分離は、回転ボウル210内で起こる。供給材料は、据え付けの入口管220により上部から回転ボウルに導入され、ディスクスタック240に入る前に、分配器230中で加速される。分配器は、液体供給材料を加速するように設計されている。

【0039】

液体-固体又は液体-液体-固体の分離はディスクの間で起こる。非混和性の油及び水相

10

20

30

40

50

などの二相系において、油相はディスクスタックを通して中心に動き、パイプ250を通して排出され、回収フレーム中に噴霧され得る。油から分離された水及び固体は外周部に動き、水はトップディスク260中の水管を通してパーリングチャンバー(paring chamber)に導かれ、そこで内蔵型パーリングディスク(paring disc)270により、ポンプでローターから吸い出される。

【0040】

固体は外周部で回収され、そこから遠心分離サイクロンにより断続的に排出できる。固体の排出は、事前設定された好適な間隔でスライディングボウル底部280を押し下げ、ボウル外周部の固体ポートを開ける油圧系により実施される。

【0041】

ディスクスタック遠心分離機は、典型的には連続プロセスで、固体と1つまたは2つの液相を互いに分離する。密度の高い固体は遠心力により外側に押し付けられるが、密度の低い液相は内部の同心円状の層を形成する。特殊な板（ディスクスタック）を挿入することにより、分離効率が向上する。固体は、手で、間欠的に、又は連続的に除去できる。いくつかの実施態様によると、細胞集団は、発酵物に戻して導入することができる。典型的なディスクスタック遠心分離装置では、液相はボウル上部の出口領域で別なチャンバーに流出する。

【0042】

ディスクスタック遠心分離機の操作中、供給材料はボウルの軸で導入され、多くの場合放射羽根アセンブリにより加速されて、密に並べられた多数の円錐状ディスクを通して流れる。ディスクの間隔は、流体から沈殿する粒子を分離するのに要する距離を減らすために、多くの場合0.5から3mmである。ディスクの角度は多くの場合40から50度であり、ディスク表面を通して固体収容スペースに落ちる固体の輸送を促進する。

【0043】

分離機構は、遠心力の影響下でのディスクの下面に対する固体の沈降及びディスクを滑る固体収容スペースへの落下に基づいている。同時に、清澄化された液体はディスク間の水路を上がり、求心ポンプにより遠心分離機を離れる。沈降した固体は、ノズルを通して連続的に、又はボウル外周部にあるポートを通して断続的に排出される。

【0044】

ディスクスタック遠心分離機を、発酵プロセス中の低い濃度及び粒径の細胞で使用する。ディスクスタック遠心分離機は、細胞及び他の固形物が、わずか約0.2%から約3重量%の発酵プロセスを含む場合に使用できる。ディスクスタック遠心分離機は、細胞及び他の固形物が、約0.2重量%未満、例えば中間の値全てを含み0.01%、0.05%、及び0.1重量%である場合に使用できる。ディスクスタック遠心分離機は、細胞及び他の固形物が3重量%を超え、例えば、中間の値全てを含み4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、及び15重量%である場合にも使用できる。細胞集団及び他の固体が合わせて約3%から約15重量%より多い場合、デカンタ型遠心分離機などの他の遠心分離構成を使用できる。

【0045】

細胞、及び約0.5ミクロンから約500ミクロンの範囲の柔らかく柔軟性があり研磨性でない他の固体粒子が、一般的にはディスク遠心分離に好適である。約0.5ミクロン未満の粒子状物質には、限外濾過が有用である。同様に、約500ミクロンを超えると、デカンタ型遠心分離機が有用になることがある。1,4-BDOを含む目的とする化合物を産生するために培養され得る典型的な原核細胞は、その大きさが約0.5ミクロンから約10ミクロンになり得るので、ディスクスタック遠心分離が好適な方法である。

【0046】

回分の後、又は供給回分もしくは連続発酵の間に、細胞及び不溶性の固体は、ディスクスタック遠心分離機により発酵プロセスから除去可能である。ディスクスタック遠心分離機から出てくるものは澄んだ（細胞のない）遠心分離液及び約5%から約50%の固体を含むアンダーフロー流である。ディスクスタック遠心分離機から出てくるアンダーフロー固体流は、回収可能な相当量の目的とする産物を含み得る。固体から追加の目的とする化合物

10

20

30

40

50

を回収する一方法は、遠心分離工程をさらに含むことである。目的とする化合物をより多く回収することに加え、多段遠心分離は細胞及び固体をさらに濃縮する役割も果たす。濃縮された細胞は発酵に戻して再生利用できる。細胞の再生利用は、遺伝子操作された貴重な生物が使用される場合、特に有用である。

【0047】

いくつかの実施態様において、デカンタ型遠心分離機を利用して、細胞及び固体を分離できる。デカンタ型遠心分離機による良好な性能は、約10ミクロンに近づく下限を有する粒径の固体で通常実現されるが、より小さい粒子も以下にさらに記載されるとおりその沈降速度によっては処理できる。培養物の細胞が典型的な原核生物の大きなサイズ範囲にある場合、この遠心分離機構成を利用できる。当業者は、真核細胞が原核細胞よりはるかに大きいことが多く、平均的な真核細胞の大きさが約10ミクロンから約100ミクロン又はそれ以上の範囲であることを認識するだろう。ディスクスタック遠心分離機はこのサイズの範囲で良好に操作できるが、デカンタ型遠心分離機は、より多量の固体を取扱いできるので有用である。そのため、細胞集団と他の固体の合計が塊の約3から約50重量%である場合、デカンタ型遠心分離機を使用できる。この濃縮は上述のディスクスタック遠心分離機のアンダーフローに適用されるので、デカンタ型遠心分離機は、細胞集団をさらに濃縮し追加の産物を回収するのに好適な方法である。

【0048】

デカンタ型、又はソリッドボウル遠心分離機は、沈降の原理で運転する。例示的な装置は米国特許第4,228,949号及び同第4,240,578号に記載されており、その全体を引用により本明細書に組み込む。図3に示されるそのような装置300において、機械の中心部分は回転ドラム310であり、独立に回転するスクリー320を含む。ディスクスタック遠心分離機から出たアンダーフローなどの、発酵ブロス又は固体含有供給材料は、入口管330により、スクリーの第1部分の中心にある混合チャンバー340へと供給される。次いで、ブロスは、混合チャンバー中のポートを通して、ドラムの外側の壁に向かって出る。脱水されたブロスは、スクリーにより機械を通して外に輸送される。遠心分離液350、又は上清は、遠心分離液管を通してポンド(pond)の内表面からデカンテーションされる。ドラム内の水位は、処理すべき材料の特性に合わせて調整できる。

【0049】

ドラム及びスクリーは、機械の種類及び大きさによって互いに独立に最大約3,600rpmの速度で回転する。利用される脱水の原理は、当業界に「並流」又は「向流」法として知られている。並流法は非常に低い差速を可能とする。差速は、ドラムの速度とスクリーの速度との間の差である。低い差速は、遠心分離機中のより長い滞留時間を意味し、より乾燥したスラッジ及び著しく少ない摩耗をもたらす。向流の原理は、脱水が容易な供給材料及び高容量が望ましい場合により好適になり得る。

【0050】

固体は、供給材料の液相部分におけるその沈降速度が十分であるとすれば、ソリッドボウル遠心分離機で分離され得る。沈降速度に影響する因子には、例えば、粒径、形状、細胞／固体と発酵ブロス液相との間の密度の差、及び粘度がある。ボウルの幾何学的形状、特に、長さ及び直径の間の関連は、特定の条件に合わせるように適合可能である。いくつかの実施態様において、良好な結果は、長さ直径比が約2:1から約3:1で得られる。

【0051】

操作時に、スクリーコンベヤーを備えた横型円錐円筒ボウル(horizontal conical cylindrical bowl)中で分離が起こる。発酵ブロスは、据え付けの入口管を通してボウルに供給され、入口分配器により加速される。遠心力は、ボウルの壁に固体が沈降する手段を与える。コンベヤーは、差速でボウルと同じ方向に回転し、固体を円錐端部に運ぶ。次いで、固体は液相を取り除かれ、回収水路に排出される前に遠心分離で脱水される。次いで、残った液相は、ボウルの円筒端部の開口部を通してハウジングに流れる。

【0052】

上述のとおり、細胞及び固体は多段遠心分離により分離されて、目的とする化合物の単

10

20

30

40

50

離収率を上げることができる。多段遠心分離は、例えば、2回、3回、4回、及び5回の遠心分離を含み得る。中間のアンダーフロー流は水で希釈されて、液体産物の回収をさらに増すことができる。上述のディスクスタックとデカンタ型の遠心分離の組み合わせなど、遠心分離構成の任意の組み合わせを使用して多段遠心分離を実施できる。遠心分離により分離されないさらなる固体は、限外濾過などの濾過プロセスにより除去できる。

【0053】

限外濾過は、最大で約145psi(10バール)の圧力を利用する、膜を通す選択的分離プロセスである。有用な構成には、スパイラル型、中空繊維型、又は平板型（カートリッジ）限外濾過要素を利用するクロスフロー濾過がある。これらの要素は、約200,000ダルトン未満の分画分子量を持つポリマー膜又はセラミック膜からなり、例えば以下の実施例Iで使用されるHydranautics 5K PES膜がある。セラミック限外濾過膜は、最長10年又は10年を超える長い動作寿命を持つので、やはり有用である。セラミックは、ポリマー膜よりもはるかに高価であるという欠点を有する。限外濾過は、約1,000ダルトンを超える分子量の懸濁している固体及び溶質を濃縮する。限外濾過は、約1,000ダルトンから約200,000ダルトンの名目上の分子量カットオフ（MWCO）を有する膜（約0.005から0.1ミクロンの細孔径）を通す濾過を含む。分子量カットオフという用語は、膜によりおよそ90%留められるタンパク質の大きさを定義するように使用される。限外濾過を利用すると、透過液は、1,4-BDOなどの低分子量有機溶質、培地塩、及び水を含むだろう。捕捉された固体は、例えば、残存する細胞片、DNA、及びタンパク質を含み得る。

【0054】

遠心分離の下流での限外濾過の使用に加え、限外濾過は精密濾過の下流でも使用できる。精密濾過は、遠心分離に代わる、細胞を分離する手段を与える。精密濾過は、通常、0.05-10ミクロンの範囲のコロイド状及び懸濁した粒子を分離する低压クロスフロー膜プロセスを含む。精密濾過は、細孔径が約0.05ミクロンから約5.0ミクロンである膜を通す濾過を含む。ポリマー性、セラミック、又はスチールの精密濾過膜を使用して細胞を分離できる。セラミック又はスチールの精密濾過膜は、最長10年又は10年を超える長い動作寿命を持つ。精密濾過は、発酵プロセスの清澄化に利用できる。限外濾過とは異なり、精密濾過は一般的に、残存する細胞片、DNA、及びタンパク質を捕捉しないだろう。しかし、濾過膜の汚損を避けるために、段階的に細孔径が小さくなる一連の濾過工程を利用することが有用である。これは濾過膜の再使用を最適化するために有用である。いくつかの実施態様において、単一の限外濾過工程が利用され、細胞集団（遠心分離又は精密濾過の代わりに）及び残存する細胞片、DNA、タンパク質などの両方を除去できる。セラミック限外濾過要素は、この操作様式に利用される頻繁な洗浄サイクルに耐える能力のために、この用途に有用である。

【0055】

いくつかの実施態様において、ナノ濾過と呼ばれるさらなる濾過法を使用して、特定の塩を分離できる。この処理工程は、例えば、事前に水を蒸発させずに特定の培地塩の回収を可能にする。ナノ濾過は、塩を分離し、色を除き、脱塩を与えることができる。ナノ濾過において、透過液は一般的に一価のイオン及び1,4-BDOにより例示される低分子量有機化合物を含む。ナノ濾過は、約100ダルトンから約2,000ダルトンの名目上の分子量カットオフ（MWCO）を有する膜（約0.0005から0.005ミクロンの細孔径）を通す濾過を含む。ナノ濾過の一方法は、スパイラル型要素を利用するクロスフロー濾過である。利用可能なナノ濾過膜が数種類あり、例えば、以下の実施例IIIで使用される薄膜複合ナノ濾過膜GE DKがある。ナノ濾過における物質移動機構は拡散である。ナノ濾過膜は、特定のイオン性溶質（ナトリウム及び塩化物など）、主に一価のイオン、並びに水の部分的な拡散を可能にする。二価及び多価のイオンを含む、より大きなイオン種及びより複雑な分子は実質的に留められる。

【0056】

一価のイオンは水と共にナノ濾過膜を通して部分的に拡散するので、膜の両側の溶液の間の浸透圧の差はそれほど大きくなく、このため通常、例えば逆浸透と比べてナノ濾過で

の幾分低い操作圧力を生み出す。

【0057】

ナノ濾過は無機塩の一部を除去するのみでなく、有機酸の塩も除去できる。有機酸副産物の除去は単離プロセスで重要になり得るが、その理由は、そのような酸が目的とする産物との望ましくない副反応を触媒し、又は反応物として作用することがあるからである。1,4-BDOの単離に関連する具体的な実施態様の状況において、例えば、下流の蒸発又は蒸留工程の高温の間ヒドロキシル基のエステル化などの反応を防止できるので、有機酸の除去は特に有用である。このようなエステル副産物は、典型的にはBDOより沸点が高く、蒸留中の重質流(heavies stream)にとって収率低下をもたらす。

【0058】

ナノ濾過は、目的とする産物からグルコース又はスクロース基質を分離でき、蒸発及び蒸留の間の分解反応を防止する。これらの分解反応は、目的とする化合物の着色をもたらすことがある。塩及び基質に富むナノ濾過濃縮水は、蒸発晶析から回収された塩流に比べて、発酵への再生利用により適していることがある。例えば、加熱を伴う方法の代わりに濾過法を使用すると、分解産物が少なくなることがある。そのような分解産物は、発酵生物にとって毒性を持つことがある。

【0059】

ナノ濾過及びイオン交換は両方とも、色形成化合物及びUV吸収化合物を除去できる。これは、目的とするいくつかの化合物の状況では有用になることがある。例えば、ポリマーグレードの1,4-BDOの産生において色の除去は有用である。

【0060】

留められる固体の大きさが段階的にますます緻密になる多数の濾過膜を連続的に使用できる。これは、膜の汚損を低減し、再生利用のために発酵プロセスの個別の成分の回収を助けるのに有用になり得る。例えば、一連の濾過は、精密濾過、それに次いで限外濾過、それに次いでナノ濾過を利用することがある。このように、精密濾過は細胞集団の回収を助け、限外濾過は細胞片、DNA、及びタンパク質などの大きな成分を除去し、ナノ濾過は塩の回収の助けになる。

【0061】

当業者は、種々の濾過タイプのいずれも、本明細書に与えられる教示及び手引きを考慮すれば、種々の発酵バイオリアクター構成の状況内に組み込めることを認識するだろう。いくつかの実施態様において、濾過はバイオリアクターの外部で起こる。この様式において、任意の量の発酵プロセスがバイオリアクターから除去され、別々に濾過される。真空法の利用により、又は陽圧の利用により、濾過を促進することができる。いくつかの実施態様において、細胞の濾過は、バイオリアクター内部の濾過要素により実施できる。そのような構成には、膜細胞再生利用バイオリアクター(membrane cell-recycle bioreactor) (MCRB)に見いだされるものがある。Changらの文献米国特許第6,596,521号は、2段階細胞再生利用連続リアクターを記載している。

【0062】

いくつかの実施態様において、細胞を、Yangらの文献(Biotechnol. Bioprocess. Eng., 7:357-361(2002))に記載される音響細胞沈降器(acoustic cell settler)により分離し、発酵混合物中に再生利用できる。音響細胞沈降は超音波を利用して、発酵プロセス中の細胞の懸濁液を濃縮する。この方法によりバイオリアクターに細胞を容易に戻すことができ、濾過タイプの細胞再生利用系を複雑にすることのある膜の汚損の問題を回避する。

【0063】

水の蒸発の前の塩の単離に関して、他の方法を、単独で、又は上述の例示的な濾過プロセスと組み合わせて利用できる。そのような他の方法には、例えば、イオン交換がある。例えば、Gongら(Desalination 191:1-3, 193-199 (2006))は、電気透析による1,3-プロパンジオール発酵プロセスの脱塩に対する、イオン交換膜の輸送特性の影響を記載している。

【0064】

イオン交換要素は、樹脂ビーズ並びに膜の形態をとり得る。しばしば、樹脂は多孔性ビ

10

20

30

40

50

ーズの形態で投じられる。樹脂は、電荷を帯びた部位の形態の活性基を有する架橋ポリマーでよい。これらの部位において、反対の電荷を持つイオンが引きつけられるが、その相対濃度及び該部位に対する親和性によって他のイオンにより置換され得る。イオン交換器は、例えば、カチオン性にもアニオン性にもなり得る。あるイオン交換樹脂の効率を決める因子には、あるイオンの優先度(favorability)及び利用可能な活性部位の数がある。活性部位を最大にするには、一般的に、大きな表面積が有用である。よって、小さい粒子は、その大きな表面積のために有用である。

【0065】

樹脂ポリマーは、例えば、約0.5から約15パーセント程度の架橋を含んでよい。温度及びpHもイオン交換の効率に影響する。例えば、pHは交換に利用できるイオンの数に影響を与えることがあり、温度はプロセスの反応速度に影響を与える。いくつかの実施態様において、イオン交換による塩の除去は、有機酸及び有機酸の塩の除去を含む。アニオン形態の有機酸は、アニオン交換活性部位に結合できる。いくつかの実施態様において、有機酸を結合するためのpHはその酸のpKa未満である。例えば、乳酸のpKaは約3.1である。有機酸の塩を除去する効果的な方法は、カチオン交換とそれに次ぐアニオン交換である。最初に、カチオン樹脂は、有機酸対イオン（カルシウム、ナトリウム、アンモニウムなど）を除去し、溶液のpHを下げる。次いで、アニオン樹脂が遊離の酸に結合する。

10

【0066】

イオン交換の有用な態様は、樹脂が再生できる容易さである。樹脂に水を流して交換されたイオンを除き、それに代わる望ましいイオンの溶液に接触させることができる。再生により、同じ樹脂ビーズが何回も使用でき、単離されたイオンは廃液に濃縮できる。多くの濾過方法と同様に、実施例IVに例示されるとおり連続的なイオン交換が実施可能である。そのため、供給材料を、任意の数のアニオン交換及びカチオン交換器の両方又は混合床交換器に任意の順序で通すことができる。

20

【0067】

いくつかの実施態様において、蒸発による水の除去が利用され、塩の回収を促進する。いくつかの実施態様において、塩は、水の除去の前に除去されている。いずれにしても、蒸発した水は、補給水として発酵に再生利用でき、プロセスの水要求量全体を最低限にする。塩が除去されていない場合、1,4-BDOに富む液相に対するその溶解度は十分に低いので、それらは水の除去後に結晶化し得る。いくつかの実施態様において、塩は1,4-BDOに

30

【0068】

蒸発晶析器を利用して沈殿した塩を生成でき、それを遠心分離、濾過、又は他の機械的手段により除去できる。1,4-BDO単離の状況において、蒸発晶析器は、発酵ブロスから水を除去して、発酵培地塩の過飽和及び残存液相又は母液におけるその後の結晶化を起こすほど十分な水を除去した液相をつくるように機能する。以下の実施例Vに示されるとおり、塩の結晶化は、1,4-BDOの濃度が約30重量%で始まる。

【0069】

母液は、結晶体におけるバルクの溶媒を意味する。母液は、種々の溶質を可溶化又は溶解する異なる能力を有する溶媒の組み合わせであることが多い。例えば、発酵ブロスからの1,4-BDOの精製の状況において、母液は、細胞除去後に得られた液体分画及び発酵ブロス由来の他の固体を含む。発酵ブロスから目的とする化合物を単離する状況において、主な溶質には発酵培地塩及び有機酸がある。

40

【0070】

結晶化における過飽和は、ある条件の温度及び圧力下で通常可能であるより、バルク溶媒中で溶質が濃縮されている状態を意味する。発酵ブロスのバルク溶媒は、例えば比較的少量の1,4-BDO並びに溶解した塩及び他の培地を含む水である。

【0071】

例示的な蒸発晶析器は、図5及び6に示される強制循環式(FC)晶析器である。FC晶析器は、例えば、引用により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第3,976,430号に記載され

50

ている。FC晶析器は水を蒸発させ、化合物に富む(1,4-BDOなど)液体分画中の塩の過飽和を増大させ、それにより塩を結晶化する。FC晶析器は高い蒸発速度を得るのに有用である。FC晶析器は、4つの基本要素、円錐底部部分を持つ晶析器容器、循環ポンプ、熱交換器、及び晶析器中で発生する蒸気を扱う真空装置からなる。晶析器容器から出るスラリーは熱交換器を通して循環し、再び晶析器容器に戻り、そこでスラリー中に存在する結晶への塩の堆積により過飽和が軽減される。蒸発した水は真空系に導かれ、そこで凝縮されて必要に応じて発酵ブロスに再生利用される。いくつかの実施態様において低真空があるが、FC晶析器をおよそ大気圧でも使用することが可能である。いくつかの実施態様において、FC晶析器は断熱蒸発冷却を利用して、塩の過飽和を発生させる。そのような実施態様において、FC晶析器は熱交換器を備える必要がない。

10

【0072】

いくつかの実施態様において、FC晶析器は、図6に示されるとおり内部バッフルをさらに備えて、液相の流出を処理し、結晶成長を阻害し得る微粉を低減できる。FC晶析器中で生成した塩は、任意のエルトリエーションレッグ(elutriation leg)によりサイズ選択することもできる。FC晶析器のこの部分は、晶析器容器の円錐部分の底部に見える。サイズ選択は、レッグを上る発酵流体の流れを与え、特定の沈降速度を有する粒子のみをこの流れに逆らって動かすことにより達成される。この沈降速度は、結晶の大きさ及び形状並びに流体の粘度に関連している。さらなる実施態様において、FC晶析器は産物の損失を減らす内部スクラバーを備えることもある。これは揮発性産物の回収の助けになる。

【0073】

20

図7に示される、タービュレンス型又はドラフトチューブバッフル「DTB」晶析器は、2種の放出流を与えるが、1つは結晶を含むスラリーであり、もう1つは少量の微粉を含む液相である。DTB晶析器の構成は、結晶成長を促進し、FC晶析器で得られるものより大きい平均サイズの結晶を生成できるようなものである。いくつかの実施態様において、DTB晶析器は、真空下又はわずかに過圧下で運転する。いくつかの実施態様において、DTB晶析器は冷却に真空を利用する。

【0074】

いくつかの実施態様において、DTB晶析器は低過飽和で運転する。当業者は、大きな結晶がこの枠組みで得られることを認識するだろう。このシステムは、任意に、微粉を溶解して結晶の大きさをさらに増すように構成され得る。DTB晶析器が発酵培地塩の回収に利用される場合、結晶の大きさは必ずしも優先事項ではない。

30

【0075】

DTB晶析器は結晶化において広く研究されてきており、正確に設計できる。成長と清澄化された液相が別な領域にあるので、速度パラメーターの定義が容易であり、そのため成長速度及び核化速度が容易に計算できる。これらの特徴により、DTB晶析器は数学的記述に好適であり、良好な操作制御を受ける。DTB晶析器は、FC晶析器と同様に、混合懸濁液混合生成物除去(MSMPR)デザインの一例である。

【0076】

DTB晶析器には、活性体積の外周部にある、沈降領域として機能する調節領域を含む。この領域は、液相及び微粉をさらに処理するために使用される。いくつかの実施態様において、微粉のさらなる処理があまり重要でない場合のように、調節領域は存在しない。そのような構成はドラフトチューブ晶析器として当分野に知られている。DTB晶析器は、通常供給溶液の入口の近傍の装置の底部に攪拌器を備えていることがある。FC晶析器のように、DTB晶析器は、任意にエルトリエーションレッグを備えている。いくつかの実施態様において、任意の外部加熱ループを使用して、蒸発速度を増すことができる。

40

【0077】

さらに他の晶析器構成は、図8に示される誘導循環型晶析器である。この構成は、活性体積のための追加の攪拌手段を提供する。この装置はドラフトチューブの使用に関してDTB晶析器と類似である。DTB装置とは違い、内部の攪拌器はない。代わりに、容器の円錐部分にある誘導器が、加熱された液体を再循環ポンプから導入する。他の晶析装置構成と同

50

様に、誘導循環型晶析器は、任意にエルトリエーションレグを備える。このタイプの晶析器に、任意にバッフルも利用できる。

【0078】

なおさらなる実施態様において、晶析器は、図9及び10に示されるオスロ型晶析器でもよい。このタイプの晶析器は、「成長」、「流動床」、又「クリスタル」型晶析器とも呼ばれる。オスロ型晶析器は、流動床内で結晶の成長を可能にし、機械的循環を受けない。オスロユニット内の結晶は、流動床中の滞留時間に比例する大きさに成長する。その結果として、オスロ型晶析器は他のほとんどの晶析器タイプより結晶を大きく成長させることができる。スラリーは、晶析器の流動床から除去されて、例えば遠心分離セクションに送られ得る。1,4-BDOを含む透明な液相は、晶析器の清澄化領域から除くことができる。

10

【0079】

分級晶析チャンバーはユニットの下の部分である。上の部分は、水の除去により過飽和が起こる液体蒸気分離領域である。わずかに過飽和の液相が中央のパイプを通して流れ落ち、結晶の流動床との接触により過飽和が軽減される。チャンバーの上部に回収される前に、循環する液相が分級床を通して上方に移動するにつれ段々に脱過飽和が起こる。残存する液体は循環パイプを通して離れ、新しい供給材料が添加された後、それは熱の補充が行われる熱交換器を通る。次いで、それは上部に再生利用される。

【0080】

いくつかの実施態様において、オスロ型晶析器は、任意に、上述のバッフル、エルトリエーションレグ、及びスクラバーを備えていてよい。成長している結晶は攪拌装置と全く接触しないので、破壊される微粉の量は一般的に少ない。オスロ型晶析器は、結晶除去期間の間の長い産生サイクルを可能にする。

20

【0081】

オスロ型晶析器は、発酵培地塩に見いだされるだろう数種の化学種の分離—結晶化に有用である。一実施態様において、オスロ型晶析ユニットは、図9に示されるとおり「閉鎖型」である。他の実施態様において、オスロ型晶析器は、図10に示されるとおり「開放型」である。後者の構成は、例えば広い沈降面積が必要である場合に有用である。

【0082】

上記の蒸発晶析装置の多くは、制御された結晶成長を可能にする。細胞除去の後の液体部分からの発酵培地塩の回収において、正確な結晶形態、大きさなどは一般的に重要でない。実際に、アモルファスな培地塩の回収が、1,4-BDOを含む目的とする化合物の精製において十分なことがある。そのため、いくつかの実施態様において、結晶成長自体を制御しない他の蒸発法を利用できる。

30

【0083】

ナノ濾過及び／又はイオン交換により塩が除去される場合、逆浸透(RO)膜濾過を利用して、蒸発の前に水の一部を除去できる。水はRO膜を浸透するが、1,4-BDOは留まる。いくつかの実施態様において、RO膜は、1,4-BDOなどの産物を約20%に濃縮できる。当業者は、産物1,4-BDOからの浸透圧が、RO膜を使用するさらなる濃縮がもはや実行可能でない点まで増すことを認識するだろう。それでもなお、RO膜の使用は、よりエネルギー集約的な水蒸発法の前に、目的とする産物を濃縮する有用な低エネルギー入力法である。そのため、大きい規模では、RO膜の利用は特に有用である。

40

【0084】

いくつかの実施態様において、実質的に全ての塩が、水の除去の前に除去される。他の実施態様において、実質的に全ての塩が、水の一部の除去前に除去される。除去される水の一部は、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、及び中間の全値を含む任意の量でよい。いくつかの実施態様において、実質的に全ての水の除去後に塩が除去される。実質的に全ての水は、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%及び中間の全値及び全ての水を含む。

【0085】

水の除去に利用可能な、多くの種類及び構成の蒸発器がある。蒸発器系を設計するため

50

の検討事項の1つは、エネルギー必要量を最低限にすることである。多重効用又は機械的蒸気再圧縮などの蒸発器構成は、エネルギー消費量の低減を可能にする。いくつかの実施態様において、水の除去は、1つ以上の効用を含む蒸発器系による蒸発により実施される。いくつかの実施態様において、二重又は三重効用蒸発器系を使用して、1,4-BDOなどの目的とする産物から水を分離できる。任意の数の多重効用蒸発器系を水の除去に利用できる。これらの装置は、水より沸点が高い任意の発酵産物にも適用できる。三重効用蒸発器、又は他の蒸発装置構成は、塩の回収のための蒸発晶析器である専用の効用、例えば、三重効用構成の最後の効用を含むことがある。

【0086】

蒸発器は、液体が沸騰して蒸気を与える熱交換器であり、低圧の蒸気発生器でもある。この蒸気を、他の「効用」と呼ばれる他の蒸発器においてさらなる加熱に使用できる。そのため、例えば、2つの蒸発器を、一方から出る蒸気ラインを他の蒸気室に接続して2つ又は二重効用蒸発器を与えるように接続できる。この構成を第3の蒸発器に広げて、例えば三重効用蒸発器を作ることができる。

【0087】

したがって、蒸発器は効用の数により分類することができる。単効用蒸発器では、蒸気は気化のためのエネルギーを与え、蒸気生成物は凝縮して系から除去される。二重効用蒸発器では、最初の効用を出た蒸気生成物は第2の気化ユニットのためのエネルギーを与えるために使用される。効用のカスケードリングは任意の数の段階に続けることができる。多重効用蒸発器は、単効用蒸発器に比べて、大量の溶媒をより効率的に除去できる。

【0088】

多重効用構成において、効用を離れる蒸気生成物の潜熱は、次の効用を加熱するために使用される。効用は、蒸気により加熱されるもの、効用Iから数えられる。第1の効用は最も高い圧力で作用する。効用Iから出た蒸気は、効用IIを加熱するために使用されるが、その結果としてより低い圧力で作用する。これはそれぞれの追加効用を通して続き、そのため圧力は一連の間に低下し、熱い蒸気は1つの効用から次の効用に移動する。

【0089】

いくつかの実施態様において、蒸発器中の全ての効用は、大きさ、構造、及び熱伝達面積において物理的に類似になり得る。熱損失が著しくない限り、それらは同じ容量を持つこともある。一連の蒸発器、直列に結合した効用は、いくつかの異なる方法で供給材料を受け取ることができる。前向き供給配列(forward feed arrangement)は、パターンI、II、及びIIIとなる。これらは単一の供給ポンプを使用する。この構成において、供給材料は効用Iで使用される最高操作温度に加熱される。最低操作温度は最後の効用中であり、そこで産物は最も濃縮されている。したがって、この構成は熱に敏感な産物に有用であるか、副反応の低減に有用である。

【0090】

他の実施態様において、後ろ向き供給配列(backward feed arrangement)、III、II、Iを利用できる。そのような構成において、多くのポンプが系の圧力低下に反して働くよう使用されるが、供給材料は徐々に加熱されるので、前向き供給構成よりも効率よくなり得る。この配列は系の中の粘度の違いも低減するので、粘性の発酵ブロスに有用である。いくつかの実施態様において、混合供給配列(mixed feed arrangement)が利用でき、供給材料は系の真ん中に、又は効用II、III、及びIに入る。最後の蒸発は最高温度で実施される。さらに、後ろ向き供給配列よりも必要なポンプが少ない。なおさらなる実施態様において、平行供給系(parallel feed system)が利用されて、供給材料流を分けて、各効用に一部が供給される。この構成は、産物がスラリーであると予測される晶析蒸発器において通常みられる。

【0091】

多くの蒸発器の設計がある。設計の任意の組み合わせを上記の効用として利用できる。ある蒸発器の設計は、流下液膜式蒸発器である。この装置は、垂直管形熱交換器を含み、図11に示されるとおり側方又は同心円状に配置された遠心分離機を持つ。

10

20

30

40

50

【0092】

蒸発させるべき液体は、管の内部表面に均一に分布される。液体は下方に流れて薄膜を形成し、蒸気により加えられる熱のためにそこから蒸発が起こる。蒸気は凝縮し、管の外部表面を流れ落ちる。多くの管がともに並んで組み立てられている。各端部で管は管板に固定されており、最終的に管の束はジャケット内に密閉されている。

【0093】

蒸気はジャケットを通して導入される。管と菅の間の空間は加熱セクションを形成する。管の内面は沸騰セクションと呼ばれる。それらは一緒にカランドリアを形成する。濃縮された液体及び蒸気は底部でカランドリアを離れ、そこから濃縮された液体の主な部分は排出される。残りの部分は蒸気に接して共に次の分離器に入る。分離された濃縮物は、通常カランドリアから出る濃縮物の大部分のためのポンプと同じポンプにより排出され、蒸気は上部から分離器を離れる。加熱する蒸気は、管の外部表面で凝縮し、加熱セクションの底部で凝縮液として回収され、そこから排出される。

10

【0094】

流下液膜式蒸発器は、加熱媒体と沸騰する液体との間の非常に低い温度差で運転でき、典型的には1パスあたり数秒ほどの非常に短い生成物接触時間を有する。これらの特性により、流下液膜式蒸発器は熱に敏感な生成物に特に好適である。小さい温度差による流下液膜式蒸発器の運転は、多重効用構成における使用又は機械的蒸気圧縮系と組み合わせた使用を促進する。

【0095】

20

カランドリアの管の加熱表面の十分な湿潤は、管を詰まらせることのあるドライパッチ及び水垢の回避を助ける。いくつかの実施態様において、湿潤速度は、蒸発器効用を拡張又は分割することにより上昇し得る。流下液膜式蒸発器は、例えば、エネルギー供給、真空、供給速度、及び濃度などのパラメーターの変化に非常に敏感である。いくつかの実施態様において、単効率、二重効率、三重効率、又は他の多重効用流下液膜式蒸発器構成は、先に詳述されたナノ濾過プロセスにより既に濾過された発酵ブロスを利用できる。水の蒸発の前の塩の低減は、カランドリアの管の中の水垢の防止をさらに助けることができる。

【0096】

いくつかの実施態様において、流下液膜式蒸発器は短路(short path)蒸発器である。運転時、液体分画は、分布系によりカランドリアの加熱管に均一に分布する。液体分画は、従来の流下液膜式蒸発器と同様に、内壁を薄膜となって流れ落ちる。カランドリア管中で形成された蒸気は、凝縮管の外部壁で蒸留物として凝固し、下方に流れる。水蒸留物及び富化された液体分画は別々に蒸発器の下部から排出される。

30

【0097】

もう1つの蒸発器構成は、強制循環式蒸発器である。この設計において、フラッシュ室又は分離器が、図12に示されるとおりカランドリア及び循環ポンプの上に配置されている。運転時、液体分画は循環ポンプによりカランドリアを通して循環する。液体は、カランドリア内で、通常の沸騰圧力より上の高沸騰圧力で過熱される。分離器に入ると、圧力は急激に低下し、液体の瞬間蒸発又は迅速な沸騰を起こす。循環ポンプで制御されている流速及び温度を利用して、水の除去プロセスを制御できる。この構成は、カランドリア管の汚損を回避するのに有用である。

40

【0098】

いくつかの実施態様において、多重の強制循環式蒸発器効用を上述のとおり利用できる。例えば、単効用強制循環式蒸発器の他に、二重、三重、及び多重効用強制循環式蒸発器を、発酵液の液体分画からの水の分離に利用できる。いくつかの実施態様において、1つ以上の強制循環式蒸発器を、1つ以上の流下液膜式蒸発器と組み合わせて利用できる。

【0099】

なおさらなる実施態様において、図13に示されるとおり、蒸発器はプレート式蒸発器でよい。この蒸発器はプレート熱交換器及び1つ以上の分離器を利用する。プレート及びフ

50

レーン構成は、加熱媒体及び発酵ブロスの液体分画を運ぶ交互の水路を持つプレートを使用する。運転時、液相及び加熱媒体はそのそれぞれの水路を向流で通過する。規定されたプレートの距離及び形状は乱流を発生させ、効率よい熱伝導を起こす。液体分画のある水路への熱伝導が水を沸騰させる。そのように形成された蒸気は、残りの液体をプレートアセンブリーの蒸気ダクトへ上昇する膜として駆り立てる。残りの液体及び蒸気は、下流の遠心分離器で分離される。広い流入ダクト及び上方への動きは熱交換器の断面にわたる良好な分布を助ける。プレート式蒸発器は、ナノ濾過膜を通る予備濾過とともに有用に運転して汚損を回避できる。このように、水垢に関して流下液膜式蒸発器と類似な考察事項が保障される。

【0100】

10

いくつかの実施態様において、多重効用プレート式蒸発器は、流下液膜式及び強制循環式蒸発器に関して上述されたのとほぼ同様に利用できる。多重効用構成で使用される場合、当業者は、液体分画がプレート式蒸発器に導入される前に強制循環式蒸発器及び／又はナノ濾過工程を利用する利点を認識するだろう。このように分離スキームは、例えば、ナノ濾過、それに次いで1つ以上の強制循環式蒸発器の多重効用蒸発構成、それに次いで1つ以上のプレート及び／又は流下液膜式蒸発器を含み得る。なおさらなる実施態様において、上述の蒸発晶析器のいずれも、多重効用構成と組み合わせて利用できる。

【0101】

いくつかの実施態様において、循環式蒸発器を利用して、図14に示されるとおり液体分画から水を除去できる。循環式蒸発器は、管の長さの短い垂直のカランドリアを、熱交換器の上に配置された側面の分離器とともに利用する。運転時、液体分画はカランドリアの底部に供給され、上部に上がる。カランドリアの管の中での加熱の間、水は沸騰し始めて蒸気を放出する。液体は、上方に動く蒸気に同伴されてカランドリアの上部に運ばれる。分離器に入ると、液体は蒸気から分離される。液体は、循環パイプにより蒸発器に戻り、引き続き循環する。カランドリアの加熱要素と分離器チャンバーの温度差が大きいと、液体分画からの水の蒸発の程度が大きくなる。液体部分が十分に1,4-BDOに富む場合、塩が液体分画から沈殿し始めるだろう。

20

【0102】

いくつかの実施態様において、循環式蒸発器の分離器は、それ自体の液体循環系をそれぞれ備えたいくつかの分離室に区切ることができる。これにより、液体分画から水を除去するのに必要な加熱表面を減らすことができる。

30

【0103】

流動床蒸発器は、液体分画からの水除去に利用できるさらに他の構成である。そのような系は、図15に示されているが、垂直の流動床交換器を備えている。熱交換器の管の面には、ガラスもしくはセラミックのビーズ、又はスチールワイヤー粒子などの固体粒子がある。

【0104】

流動床蒸発器は、強制循環式蒸発器と同様に運転する。液体の上向きの移動は固体粒子を同伴し、洗い流し(scouring)又は洗浄作用を与える。液体分画と共に、それらはカランドリア管を通過して移動する。カランドリアの上部で、固体粒子は液体から分離され、カランドリア入口室に再生利用される。過熱された流体は分離器中で沸点に瞬間蒸発し、蒸発による水の除去を可能にする。カランドリアの管中の固体の洗い流し作用は、運転時間を延ばし、管の汚損をさらに防止する。汚損する固体の形成が従来の強制循環式蒸発器系の使用を限定する場合に、これは有用になり得る。

40

【0105】

上昇液膜式蒸発器は、発酵ブロスから回収された液体分画からの水の除去に有用な、他の種類の蒸発器である。この系の構成は、垂直な管形熱交換器（カランドリア）の上に据え付けた蒸気分離器を有する。運転時、カランドリアの底部の液体分画は、蒸気分離器の上部に上がる。外部加熱により、液体分画中の水は、カランドリア管の内壁で沸騰する。蒸気の上向きの動きは液体分画をカランドリアの上部へと運ぶ。管を通る上昇の間に、さ

50

らに蒸気が形成される。分離器に入ると、蒸気と液相は分離される。上昇液膜式蒸発器は、粘性の液体と共に使用される場合、及び／又は多量の汚損する固体が予測される場合に特に有用である。

【0106】

向流トリクル(counterflow-trickle)蒸発器は、発酵プロセスの液体分画からの水除去に利用できる、さらに他の蒸発器である。この装置は、カランドリアの下部が上昇液膜式蒸発器のものより大きい、管形熱交換器（カランドリア）を有する。カランドリアの上には、上昇液膜式蒸発器と同様に、分離器が配置されている。この蒸発器では、分離器には液体分配系がさらに備えられている。

【0107】

運転時、液体は、流下液膜式蒸発器と同様に、蒸発器の上部に与えられる。液体は蒸発器の管にわたって分布するが、蒸気は液体に向流して上部に流れる。いくつかの実施態様において、このプロセスは、例えば、同伴を高めるために、不活性ガスの流れを含むことがある。このガスは、カランドリアの下部に導入することができる。

【0108】

攪拌式蒸発器は、発酵プロセスの液体分画からの水の除去に利用できる、さらに他の種類の蒸発器である。この装置は、攪拌機を備えた外部のジャケット加熱容器を含む。運転時、液体分画は、任意に回分式に、容器中に置かれる。水は、連続的な攪拌と共に沸騰することにより、所望の濃度まで蒸発する。この装置は、任意の浸漬加熱コイルを使用して加熱表面を増やすことにより、その蒸発速度を増すことができる。この種類の蒸発器は、発酵物が非常に粘性である場合に特に有用である。

【0109】

最後に、螺旋管蒸発器は、発酵プロセスの液体分画からの水の除去に利用できる、他の種類の蒸発器である。この設計は、螺旋型加熱管を備えた熱交換器及び底部据え付け遠心分離器を含む。運転時、液体分画は、蒸気の流れと平行に流れて、上部から底部に沸騰膜で流れる。膨張する蒸気は、剪断、又は液膜を押す作用を生み出す。流れの通路の曲りは、管の軸に沿った動きと干渉する二次的な流れを誘導する。この乱流は熱伝導を向上させ、粘性の液体に特に有用である。加熱管の螺旋構造は、非螺旋型の直管設計に比べて、高い加熱表面積対高さ比を通常与える。この装置は、単路運転を可能にする大きな蒸発速度を与える。

【0110】

上述のとおり、二重、三重、及び多重効用構成にある上述の任意の種類の多数の蒸発器を使用すると、蒸発の効率を高めることができる。運転の効率を高める他の方法には、例えば、熱及び機械的蒸気再圧縮がある。いくつかの実施態様において、多重効用構成、熱再圧縮、及び機械的再圧縮の任意の組み合わせを利用して、蒸発効率を高めることができる。

【0111】

熱蒸気再圧縮は、沸騰室（又は分離器）からの蒸気を高圧に再圧縮することを含む。加熱室圧力に相当する飽和蒸気温度はより高いので、蒸気は加熱に再使用できる。これは、スチームジェットポンプ原理に基づいて運転するスチームジェット蒸気再圧縮機により達成される。簡単に言うと、スチームジェット原理は蒸気のエネルギーを利用して、真空をつくりプロセスガスを取り扱う。圧力のかかっている蒸気がノズルに入り、高速のジェットをつくる。このジェットの作用が、ガスを引き込み同伴する真空をつくりだす。蒸気とガスとの混合物は、大気圧で排出される。駆動蒸気と呼ばれる、ある量の蒸気が、熱再圧縮機の運転に使用される。駆動蒸気は、次の効用又は凝縮器に移動する。過剰な蒸気のエネルギーは、およそ使用された量の駆動蒸気のエネルギーである。

【0112】

熱蒸気再圧縮機を備えた多重効用蒸発器において、第1のカランドリア中の加熱媒体は、蒸気エジェクターによってより高い温度レベルに圧縮された、関連する効用の1つから出た生成物蒸気である。その後の効用における加熱媒体は、その前のカランドリアで発生

10

20

30

40

50

した蒸気である。最後の効用から出た蒸気は、必要に応じて任意に冷却水を補われて、入ってくる生成物とともに凝縮する。回収された全ての水は、発酵プロセスに容易に再生利用される。

【0113】

機械的再圧縮機は、1つの蒸発器を離れる蒸気全てを利用する。蒸気は、蒸発器の対応する加熱蒸気温度の圧力に再圧縮される。運転原理はヒートポンプに類似している。蒸気凝縮物のエネルギーは、発酵プロセスの液体分画のさらなる部分を予備加熱するのに任意に使用できる。機械的再圧縮は、高圧ファン又はターボコンプレッサーの使用により供給される。これらのファンは高速で運転し、蒸気圧縮比約1:1.2から約1:2で大きな流量に適している。合理的な速度は、約3,000から約18,000rpmである。いくつかの実施態様において、特に高い圧力が有用な場合、多段圧縮機が利用できる。

10

【0114】

機械的蒸気再圧縮機を備えた蒸発器において、最初の効用における加熱媒体は、高圧ファンにより高温に圧縮された、同じ効用中で発生した蒸気である。高熱セクションから出た過剰の蒸気は任意に凝縮されるか、又は高濃縮器で使用できる。

【0115】

上述のとおり、多重効用、熱蒸気再圧縮、機械的蒸気再圧縮、又はこれらの組み合わせを含む種々のエネルギー効率の良い構成に配置できる、可能な蒸発の種類が多くある。最適な構成は多くの因子に依存し、例えば、培地塩が蒸発の前に除去されるか、又は蒸発の間の結晶化により除去されるかがある。蒸発の前に塩が除去される場合では、低コストの構成が有用である。例示的な構成には、流下液膜式三重効用蒸発器系又は機械的蒸気再圧縮系がある。蒸発の間に塩が結晶化する場合は、塩の沈殿による熱交換器表面のスケール発生の可能性のためにより複雑である。この場合の例示的な構成は、例えば、最初の2つの効用が流下液膜式蒸発器であり（結晶化の開始前）最後の段階が強制循環式蒸発晶析器である三重効用を含む。

20

【0116】

1,4-BDO精製は、特に、連続した2つの蒸留塔において起こり得るが、それより多くも利用できる。第1の塔は1,4-BDOから水及び他の軽質成分を分離するために使用され、第2の塔は、残存重質成分から1,4-BDOを蒸留するために使用される。蒸留塔を真空下で運転して、要求される温度を下げ、望ましくない反応、産物の分解、及び色の形成を低減できる。塔の間の圧力低下を最低限にして、底部再沸器中の低温を維持できる。例えば流下液膜式再沸器を利用することにより、再沸器中の滞留時間を最低限にして、望ましくない反応、産物の分解、及び色の形成も防止できる。

30

【0117】

当業者は、列挙された遠心分離、濾過、イオン交換、蒸発晶析器、蒸発器、及び蒸留装置の種々の構成が、1,4-BDOを含む目的とする化合物の精製に有用であることを認識するだろう。例示的な構成の1つには、例えば、図16のフロースキームダイアグラムに示されるディスクスタック遠心分離、限外濾過、蒸発晶析、イオン交換、及び蒸留がある。このように、いくつかの実施態様において、本発明は、1,4-BDOを発酵プロセスから単離する方法であって、固体の一部をディスクスタック遠心分離により除去して液体分画を与えること、固体のさらなる部分を限外濾過により該液体分画から除去すること、塩の一部を蒸発晶析により該液体分画から除去すること、塩のさらなる部分をイオン交換により該液体分画から除去すること、及び1,4-BDOを蒸留することを含む方法を提供する。

40

【0118】

図16に示されるとおり、細胞及び固体は、最初にディスクスタック遠心分離により除去される。細胞は、任意に発酵に戻して再生利用される。限外濾過は、細胞片、DNA、及び沈殿したタンパク質を除く。蒸発晶析は、培地塩の一部及び水を除くが、そのどちらも任意に発酵に戻して再生利用できる。蒸発晶析の後、残った液相はイオン交換カラムに通されて、さらなる塩が除去される。イオン交換後、水の一部を、上述のとおり蒸発器系で蒸発できる。軽質分画の蒸留に次いで1,4-BDOの蒸留が実施されて、実質的に純粋な1,4-BDO

50

を与える。

【0119】

もう1つの例示的な構成は、図17に示されるとおり、ディスクスタック遠心分離、限外濾過、ナノ濾過、イオン交換、蒸発、及び蒸留を含む。このように、いくつかの実施態様において、本発明は、1,4-BDOを発酵ブロスから単離する方法であって、固体の一部をディスクスタック遠心分離により除去して液体分画を与えること、固体のさらなる部分を限外濾過により該液体分画から除去すること、塩の一部をナノ濾過により該液体分画から除去すること、塩のさらなる部分をイオン交換により該液体分画から除去すること、水の一部を蒸発させること、及び1,4-BDOを蒸留することを含む方法を提供する。

【0120】

図17に示されるとおり、細胞及び固体は最初にディスクスタック遠心分離により除去される。細胞は、任意に発酵に戻して再生利用できる。限外濾過は、細胞片、DNA、及び沈殿したタンパク質を除去する。ナノ濾過は培地塩の一部を除去するが、これは任意に発酵に戻して再生利用できる。ナノ濾過の後、透過液はイオン交換カラムに通されて、さらなる塩が除去される。イオン交換後、上述のとおり、水の一部を蒸発器系中で蒸発できる。軽質分画の蒸留に次いで1,4-BDOの蒸留が実施され、実質的に純粋な1,4-BDOを与える。

【0121】

目的とする化合物は、微生物における生合成のために産物が遺伝子操作され得る任意の化合物でよい。本明細書に開示される方法は、沸点が水より高い目的とする化合物に適用可能である。具体的には、目的とする化合物は、約120℃から400℃の沸点を有することがある。他の性質には、水に対する高い溶解度又は混和性、及び感知できるほど塩を可溶化できないこと（蒸発晶析を利用する場合）、及び分子量が約100-150ダルトンより低い中性化合物（ナノ濾過による好適性）であることがある。

【0122】

本明細書に記載される方法及び原理は、目的とする化合物が上述の一般的性質を有する場合、発酵ブロスからの目的とする化合物の単離に適用できる。そのような方法は、目的とする化合物に富む液体分画を、細胞集団を含む固体分画から分離し、それに次いで水及び塩の除去、それに次いで精製を含む。

【0123】

いくつかの実施態様において、本発明は、発酵ブロスの成分を再生利用する方法も提供する。発酵ブロスは、1,4-BDO又は沸点が水よりも高い目的とする化合物、1,4-BDO又は目的とする化合物を産生できる細胞、培地塩、及び水を含み得る。該方法は、1,4-BDO又は目的とする化合物に富む液体分画を、細胞を含む固体分画から分離することを含む。次いで、細胞は発酵ブロスに再生利用される。水は、液体分画からの塩の分離の前又は後に除去できる。液体分画から蒸発された水は、発酵ブロスに再生利用される。液体分画から出た塩は、液体分画からの水の除去により塩を結晶化させることによるか、又はナノ濾過及び／或いはイオン交換のいずれかにより、除去されて発酵ブロスに再生利用することができる。次いで、ナノ濾過から分離された塩は、発酵ブロスに再生利用される。該方法は、例えば蒸留によりさらに精製できる1,4-BDO又は他の目的とする化合物を提供する。

【0124】

いくつかの実施態様において、1,4-BDOなどの目的とする化合物を産生する方法は、化合物を産生する微生物を発酵装置中で目的とする化合物を産生するのに十分な時間培養することを含む。該生物には、化合物経路酵素をコードする1つ以上の外因性遺伝子及び／又は1つ以上の遺伝子破壊を含む化合物経路を有する微生物がある。また、化合物を産生する方法は、目的とする化合物に富む液体分画を、細胞を含む固体分画から分離すること、該液体分画から水を除去すること、該液体分画から塩を除去すること、及び目的とする化合物を精製することを含む方法により化合物を単離する方法を含む。目的とする化合物は、水より高い沸点を有する。

【0125】

具体的な実施態様において、1,4-BDOを産生する方法は、1,4-BDO産生微生物を発酵装置

10

20

30

40

50

中で1,4-BDOを産生するのに十分な時間培養することを含む。該生物には、化合物経路酵素をコードする1つ以上の外因性遺伝子及び／又は1つ以上の遺伝子破壊を含む1,4-BDO経路を有する微生物がある。また、1,4-BDOを産生する方法は、目的とする化合物に富む液体分画を、細胞を含む固体分画から分離すること、該液体分画から水を除去すること、該液体分画から塩を除去すること、及び目的とする化合物を精製することを含む方法により化合物を単離することを含む。

【0126】

目的とする産物が1,4-BDOである特別な実施態様において、1セットの1,4-BDO経路酵素により1,4-BDOを産生できる微生物の培養で産生が始まる。例示的な微生物には、両方とも引用によりその全体が本明細書に組み込まれる米国公開特許第2009/0075351号及び米国公開特許第2009/0047719号に記載されているものがあるが、限定はされない。

10

【0127】

1,4-BDO経路における酵素をコードする1つ以上の外因性核酸を組み込む生物が提供され得る。そのような生物には、例えば、完全な1,4-BDO生合成経路を持つように遺伝子操作された非天然の微生物がある。そのような経路は、内因性核酸及び外因性核酸の両方によりコードされた酵素を含み得る。微生物宿主に通常存在しない酵素を、例えば、1つ以上の外因性核酸を含むことにより経路を完全にするために機能性に含むことができる。そのような1,4-BDO経路の1つは、4-ヒドロキシブタノアートデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA-依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチラート:CoAトランスフェラーゼ、4-ブチラートキナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、 α -ケトグルタラートデカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、又はアルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼをコードする酵素を含む。

20

【0128】

他の経路は、4-アミノブチラートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチラート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ（脱アミノ化）、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼをコードする1つ以上の外因性核酸を含むことがある。そのような経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことがある。

30

【0129】

さらに他の経路は、4-アミノブチラートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチラート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ（脱アミノ化）、又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードする1つ以上の外因性核酸を含むことがある。そのような経路は、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことがある。

【0130】

さらなる経路は、4-アミノブチラートキナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ（リン酸化）、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ（脱アミノ化）、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ（脱アミノ化）、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-ホスファートデヒドロゲナーゼ、又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ（リン酸化）をコードする1つ以上の外因性核酸を含むことがある。そのような経路は、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことがある。

40

【0131】

なおもさらなる経路は、 α -ケトグルタラート5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セ

50

ミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（リン酸化）、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、 α -ケトグルタラートCoAトランスフェラーゼ、 α -ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、 α -ケトグルタリル-CoAリガーゼ、 α -ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、 α -ケトグルタリル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ（脱炭酸）をコードする1つ以上の外因性核酸を含むことがある。そのような経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことがある。

【0132】

なおもさらなる経路は、グルタマートCoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタマート5-キナーゼ、グルタマート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（リン酸化）、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタマート-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ（脱アミノ化）、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ（脱炭酸）をコードする1つ以上の外因性核酸を含むことがある。そのような経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことがある。

【0133】

なおもさらなる経路は、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼをコードする1つ以上の外因性核酸を含むことがある。そのような経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことがある。

【0134】

なおもさらなる経路は、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノアートレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードする1つ以上の外因性核酸を含むことがある。そのような経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことがある。

【0135】

なおもさらなる経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ（リン酸化）をコードする1つ以上の外因性核酸を含むことがある。そのような経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチラートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチラートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことがある。

【0136】

なおもさらなる経路は、グルタマートデヒドロゲナーゼ、4-アミノブチラートオキシドレダクターゼ（脱アミノ化）、4-アミノブチラートトランスアミナーゼ、グルタマートデ

10

20

30

40

50

カルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ（リン酸化）をコードする1つ以上の外因性核酸を含むことがある。そのような経路は、 α -ケトグルタラートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチラートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチラートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ（アルコール形成性）、又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことがある。

【0137】

遺伝子挿入に加え、又はその代わりに、生物は、炭素フラックスを1,4-BDOを合成する方向に向ける遺伝子破壊を含み得る。そのような生物は、例えば、1,4-ブタンジオール産生を成長に結びつける1セットの代謝改変を有する非天然の微生物を含む。いくつかの実施態様において、1,4-ブタンジオール産生は成長に結びついていない。該セットの代謝改変は、1つ以上の遺伝子又はそのオルソログの破壊を含み得る。破壊は、いくつかの実施態様において、完全な遺伝子欠失を含み得る。破壊は、プロモーター配列などの除去による変更を含むこともある。1,4-BDO産生では、1セットの代謝改変は、例えば、adhE及びldhAの破壊を含み得る。他の破壊は遺伝子mdhを含み得る。さらに他の破壊は、mqo、aspA、sfcA、maeB、pntAB、及びgdhAを含む遺伝子のセットから選択される1つ以上の遺伝子を含むことがある。さらに他の破壊は、pykA、pykF、dhaKLM、deoC、edd、yiaE、ycdW、prpC、及びgskを含む遺伝子のセットから選択される1つ以上の遺伝子を含むことがある。さらに他の破壊は、pflABの破壊を含むことがある。破壊の例示的なセットは、遺伝子adhE、ldhA、pflAB、mdh、及びaspAのそれぞれの破壊を含む、adhE、ldhA、pflAB、mdh、及びaspAを含む遺伝子のセットから選択される1つ以上の遺伝子を含むことがある。

【0138】

さらなる例示的な破壊のセットは、

10

20

【化 1】

*adher, nadh6; adher, ppck; adher, sucd4; adher, atps4r; adher, fum; adher, mdh; adher, pfli, ppck; adher, pfli, sucd4; adher, ackr, nadh6; adher, nadh6, pfli; adher, aspt, mdh; adher, nadh6, ppck; adher, ppck, thd2; adher, atps4r, ppck; adher, mdh, thd2; adher, fum, pfli; adher, ppck, sucd4; adher, glcpts, ppck; adher, gludy, mdh; adher, gludy, ppck; adher, fum, ppck; adher, mdh, ppck; adher, fum, gludy; adher, fum, hex1; adher, hex1, pfli; adher, hex1, thd2; adher, frd2, ldh_d, mdh; adher, frd2, ldh_d, me2; adher, mdh, pgl, thd2; adher, g6pdhy, mdh, thd2; adher, pfli, ppck, thd2; adher, ackr, akgd, atps4r; adher, glcpts, pfli, ppck; adher, ackr, atps4r, sucoas; adher, gludy, pfli, ppck; adher, me2, pfli, sucd4; adher, gludy, pfli, sucd4; adher, atps4r, ldh_d, sucd4; adher, fum, hex1, pfli; adher, mdh, nadh6, thd2; adher, atps4r, mdh, nadh6; adher, atps4r, fum, nadh6; adher, aspt, mdh, nadh6; adher, aspt, mdh, thd2; adher, atps4r, glcpts, sucd4; adher, atps4r, gludy, mdh; adher, atps4r, mdh, ppck; adher, atps4r, fum, ppck; adher, aspt, glcpts, mdh; adher, aspt, gludy, mdh; adher, me2, sucd4, thd2; adher, fum, ppck, thd2; adher, mdh, ppck, thd2; adher, gludy, mdh, thd2; adher, hex1, pfli, thd2; adher, atps4r, g6pdhy, mdh; adher, atps4r, mdh, pgl; adher, ackr, frd2, ldh_d; adher, ackr, ldh_d, sucd4; adher, atps4r, fum, gludy; adher, atps4r, fum, hex1; adher, atps4r, mdh, thd2; adher, atps4r, frd2, ldh_d; adher, atps4r, mdh, pgl; adher, glcpts, ppck, thd2; adher, gludy, ppck, thd2; adher, fum, hex1, thd2; adher, atps4r, me2, thd2; adher, fum, me2, thd2; adher, glcpts, gludy, ppck; adher, me2, pgl, thd2; adher, g6pdhy, me2, thd2; adher, atps4r, frd2, ldh_d, me2; adher, atps4r, frd2, ldh_d, mdh; adher, aspt, ldh_d, mdh, pfli; adher, atps4r, glcpts, nadh6, pfli; adher, atps4r, mdh, nadh6, pgl; adher, atps4r, g6pdhy, mdh, nadh6; adher, ackr, fum, gludy, ldh_d; adher, ackr, gludy, ldh_d, sucd4; adher, atps4r, g6pdhy, mdh, thd2; adher, atps4r, mdh, pgl, thd2; adher, aspt, g6pdhy, mdh, pyk; adher, aspt, mdh, pgl, pyk; adher, aspt, ldh_d, mdh, sucoas; adher, aspt, fum, ldh_d, mdh; adher, aspt, ldh_d, mals, mdh; adher, aspt, icl, ldh_d, mdh; adher, frd2, gludy, ldh_d, ppck; adher, frd2, ldh_d, ppck, thd2; adher, ackr, atps4r, ldh_d, sucd4; adher, ackr, acs, ppc, ppck; adher, gludy, ldh_d, ppc, ppck; adher, ldh_d, ppc, ppck, thd2; adher, aspt, atps4r, glcpts, mdh; adher, g6pdhy, mdh, nadh6, thd2; adher, mdh, nadh6, pgl, thd2; adher, atps4r, g6pdhy, glcpts, mdh; adher, atps4r, glcpts, mdh, pgl; 及び
*adher, ackr, ldh_d, mdh, sucd4**

10

20

30

を含む。上述の遺伝子は、これらの遺伝子が触媒する反応と共に、以下の表1aにおいて、
 ノックアウト候補の広いリストに含まれている。

40

【表 1】

表 1a 大腸菌中の遺伝子ノックアウト候補

反応略語	反応化学量論*	各反応を触媒する 酵素(複数可)を コードする遺伝子
ACKr	$[c] : ac + atp \rightleftharpoons actp + adp$	(b3115 又は b2296 又は b1849)
ACS	$[c] : ac + atp + coa \rightarrow accoa + amp + ppi$	b4069
ACt6	$ac[p] + h[p] \rightleftharpoons ac[c] + h[c]$	非遺伝子関連
ADHEr	$[c] : etoh + nad \rightleftharpoons acald + h + nadh$ $[c] : acald + coa + nad \rightleftharpoons accoa + h + nadh$	(b0356 又は b1478 又は b1241) (b1241 又は b0351)
AKGD	$[c] : akc + coa + nad \rightarrow co_2 + nadh + succoa$	(b0116 及び b0726 及び b0727)
ASNS2	$[c] : asp-L + atp + nh_4 \rightarrow amp + asn-L + h + ppi$	b3744
ASPT	$[c] : asp-L \rightarrow fum + nh_4$	b4139
ATPS4r	$adp[c] + (4) h[p] + pi[c] \rightleftharpoons atp[c] + (3) h[c] + h_2o[c]$	((b3736 及び b3737 及び b3738) 及び (b3731 及び b3732 及び b3733 及び b3734 及び b3735)) 又は ((b3736 及び b3737 及び b3738) 及び (b3731 及び b3732 及び b3733 及び b3734 及び b3735) 及び b3739))
CBMK2	$[c] : atp + co_2 + nh_4 \rightleftharpoons adp + cbp + (2) h$	(b0521 又は b0323 又は b2874)
EDA	$[c] : 2ddg6p \rightarrow g3p + pyr$	b1850
ENO	$[c] : 2pg \rightleftharpoons h_2o + pep$	b2779
FBA	$[c] : fdp \rightleftharpoons dhap + g3p$	(b2097 又は b2925 又は b1773)
FBP	$[c] : fdp + h_2o \rightarrow f6p + pi$	(b4232 又は b3925)
FDH2	$for[p] + (2) h[c] + q8[c] \rightarrow co_2[c] + h[p] + q8h_2[c]$ $for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] \rightarrow co_2[c] + h[p] + mql8[c]$	((b3892 及び b3893 及び b3894) 又は (b1474 及び b1475 及び b1476))
FRD2	$[c] : fum + mql8 \rightarrow mqn8 + succ$ $[c] : 2dmmql8 + fum \rightarrow 2dmmq8 + succ$	(b4151 及び b4152 及び b4153 及び b4154)
FTHFD	$[c] : 10fthf + h_2o \rightarrow for + h + thf$	b1232
FUM	$[c] : fum + h_2o \rightleftharpoons mal-L$	(b1612 又は b4122 又は b1611)
G5SD	$[c] : glu5p + h + nadph \rightarrow glu5sa + nadp + pi$	b0243
G6PDHy	$[c] : g6p + nadp \rightleftharpoons 6pgl + h + nadph$	b1852

10

20

30

40

GLCpts	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 及び b1101 及び b2415 及び b2416)又は(b1817 及び b1818 及び b1819 及び b2415 及び b2416)又は(b2417 及び b1621 及び b2415 及び b2416))
GLU5K	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akc + h + nadph + nh4	b1761
GLYCL	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 及び b2903 及び b2905 及び b0116)
HEX1	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
ICL	[c] : icit --> glx + succ	b4015
LDH_D	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	(b2133又はb1380)
MALS	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014又はb2976)
MDH	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236
ME2	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
MTHFC	[c] : h2o + methf <==> 10fthf + h	b0529
NADH12	[c] : h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad [c] : h + nadh + q8 --> nad + q8h2 [c] : 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmql8 + nad	b1109
NADH6	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c] (4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c] 2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmql8[c] + (3) h[p] + nad[c]	(b2276 及び b2277 及び b2278 及び b2279 及び b2280 及び b2281 及び b2282 及び b2283 及び b2284 及び b2285 及び b2286 及び b2287 及び b2288)
PFK	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916又はb1723)
PFLi	[c] : coa + pyr --> accoa + for	((b0902 及び b0903) 及び b2579)又は(b0902 及び b0903)又は(b0902 及び b3114)又は(b3951 及び b3952))
PGDH	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGI	[c] : g6p <==> f6p	b4025
PGL	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	[c] : 2pg <==> 3pg	(b3612又はb4395又はb0755)
PPC	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
PPCK	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PRO1z	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014
PYK	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	b1854又はb1676)
PYRt2	h[p] + pyr[p] <==> h[c] + pyr[c]	非遺伝子関連
RPE	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301又はb3386)
SO4t2	so4[e] <==> so4[p]	(b0241又はb0929 又は b1377又はb2215)

10

20

30

40

SUCD4	[c] : q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 及び b0722 及び b0723 及び b0724)
SUCOAS	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 及び b0729)
SULabc	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 及び b2425 及び b2424 及び b2423)又は(b0763 及び b0764 及び b0765)又は (b2422 及び b2424 及び b2423 及び b3917))
TAL	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464 又は b0008)
THD2	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 及び b1603)
THD5	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962 又は(b1602 及び b1603))
TPI	[c] : dhap <==> g3p	b3919

10

【 0 1 3 9 】

表1aの代謝物の略語は、以下の表1bに示されている。

【表 2】

表 1b. 表1aに使用されている略語に対応する代謝物名

20

代謝物略語	代謝物名
10fthf	10-ホルミルテトラヒドロホラート
1pyr5c	1-ピロリン-5-カルボキシラート
2ddg6p	2-デヒドロ-3-デオキシ-D-グルコナート6-ホスファート
2dmmq8	2-デメチルメナキノン8
2dmmql8	2-デメチルメナキノール8
2pg	D-グリセラート2-ホスファート
3pg	3-ホスホ-D-グリセラート
6pgc	6-ホスホ-D-グルコナート
6pgl	6-ホスホ-D-グルコノ-1,5-ラクトン
ac	アセタート
acald	アセトアルデヒド
accoa	アセチル-CoA
actp	アセチルホスファート
adp	ADP
akg	2-オキソグルタラート
amp	AMP
asn-L	L-アスパラギン
asp-L	L-アスパルタート
atp	ATP
cbp	カルバモイルホスファート
co2	CO2
coa	コエンザイムA
dhap	ジヒドロキシアセトンホスファート
e4p	D-エリトロース4-ホスファート

30

40

etoh	エタノール
f6p	D-フルクトース6-ホスファート
fad	酸化型フラビンアデニンジヌクレオチド
fadh2	還元型フラビンアデニンジヌクレオチド
fdp	D-フルクトース1,6-ビスホスファート
for	ホルマート
fum	フマラート
g3p	グリセルアルデヒド3-ホスファート
g6p	D-グルコース6-ホスファート
glc-D	D-グルコース
glu5p	L-グルタマート5-ホスファート
glu5sa	L-グルタマート5-セミアルデヒド
glu-L	L-グルタマート
glx	グリオキシラート
gly	グリシン
h	H+
h2o	H2O
icit	イソシトラート
lac-D	D-ラクタート
mal-L	L-マラート
methf	5,10-メテニルテトラヒドロホラート
mlthf	5,10-メチレンテトラヒドロホラート
mql8	メナキノール8
mqn8	メナキノン8
nad	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
nadh	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド-還元型
nadp	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスファート
nadph	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスファート-還元型
nh4	アンモニウム
oaa	オキサロ酢酸
pep	ホスホエノールピルビン酸
pi	ホスファート
ppi	ジホスファート
pro-L	L-プロリン
pyr	ピルバート
q8	ユビキノン-8
q8h2	ユビキノール-8
ru5p-D	D-リブロース5-ホスファート
s7p	セドヘプツロース7-ホスファート
so4	サルファート
succ	スクシナート
succoa	スクシニル-CoA
thf	5,6,7,8-テトラヒドロホラート
xu5p-D	D-キシロース5-ホスファート

10

20

30

40

【0140】

上記の遺伝子破壊の任意の組み合わせを組み込んでいる非天然の微生物は、少なくとも1つの外因性核酸の遺伝子挿入も含むことがある。上述の遺伝子挿入経路のいずれも、遺伝子破壊と一体化され得る。例えば、遺伝子adhE、ldhA、pflAB、mdh、及びaspAの破壊を含む経路は、4-ヒドロキシブタノアートデヒドロゲナーゼ、CoA-非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンセターゼ、CoA-依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチラート:CoAトランスフェラーゼ、グルタマート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタマートデカルボキシラーゼ、CoA-非依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA-依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、又はアルコールデヒドロゲナーゼの挿入を含むことがある。以下の表2は、遺伝子破壊と遺伝

50

子挿入との組み合わせを組み込んだ1,4-BDO産生用の例示的な遺伝子操作された生物をまとめる。遺伝子挿入が、染色体挿入又はプラスミドの提供の形態であり得ることに留意されたい。

【表 3】

表 2. 1,4-BDO産生のための破壊-挿入設計の組み合わせ

株番号	宿主染色体	宿主の説明	プラスミド系
1	Δ ldhA	大腸菌 MG1655 の単一欠失誘導体	大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2
2	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB	スクシナート産生株; 大腸菌 MG1655 の単一欠失誘導体	大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2
3	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::クレブシエラ・ニューモニエ lpdA322	ビルビン酸デヒドロゲナーゼフラックスを増加させる lpdA の改良	大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2
4	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::クレブシエラ・ニューモニエ lpdA322		大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, クロストリジウム・アセトブチリカム buk1, クロストリジウム・アセトブチリカム ptb, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2
5	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::クレブシエラ・ニューモニエ lpdA322 Δ mdh Δ arcA	フラックスを酸化的TCA回路に向けるmdh及びarcAにおける欠失	大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2
6	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::クレブシエラ・ニューモニエ lpdA322 Δ mdh Δ arcA		マイコバクテリウム・ボビス sucA, 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2
7	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::クレブシエラ・ニューモニエ lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L	嫌気性活性を向上させるクエン酸シンターゼにおける突然変異	大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2
8	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::クレブシエラ・ニューモニエ lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L		マイコバクテリウム・ボビス sucA, 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2
9	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::クレブシエラ・ニューモニエ lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L		マイコバクテリウム・ボビス sucA, 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ペイジェリンキ Ald
10	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::クレブシエラ・ニューモニエ lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L fimD::大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd	ECKh-422に組み込まれた上流経路のコハク酸分岐	ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ペイジェリンキ Ald

10

20

30

40

11	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ クレブシエラ・ニューモニエ $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L fimD}::$ 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモ ナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイコバクテリウム・ボビス sucA, クロストリジウム・クルイペリ 4hbd	ECKh-422に組み込まれた コハク酸及び α -ケトグルタル 酸上流経路分岐	ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ベージェリンキ Ald
12	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ クレブシエラ・ニューモニエ $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L fimD}::$ 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモ ナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイコバクテリウム・ボビス sucA, クロストリジウム・クルイペリ 4hbd		クロストリジウム・アセトブチリカム buk1, クロストリジウム・アセトブチリカム ptb, クロストリジウム・ベージェリンキ Ald
13	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ クレブシエラ・ニューモニエ $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L } \Delta ackA \text{ fimD}::$ 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポル フィロモナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイコバクテリウム ・ボビス sucA, クロストリジウム・クルイペリ 4hbd	ECKh-432の酢酸キナーゼ 欠失	ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ベージェリンキ Ald
14	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ クレブシエラ・ニューモニエ $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L } \Delta ackA \Delta ppc::$ H.i.ppek fimD:: 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジ ンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイコバクテリウム・ボビス sucA, クロストリジウム・ クルイペリ 4hbd	ECKh-432の酢酸キナーゼ 欠失 及び PPC/PEPCK 置換	ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ベージェリンキ Ald
15	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ fnr-pfIB6-クレブシエラ・ ニューモニエ $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L}$ fimD:: 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイ コバクテリウム・ボビス sucA, クロストリジウム・クルイペリ 4hbd	ECKh-432における lpdA プロ モーターの嫌気性プロモータ ーによる置換	ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ベージェリンキ Ald
16	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ クレブシエラ・ニューモニエ $lpdA322 \Delta pdhR::$ fnr-pfIB6 $\Delta mdh \Delta arcA$ $\text{gltAR163L fimD}::$ 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイコバクテリウム・ボビス sucA, クロストリジウム・ クルイペリ 4hbd	ECKh-432における pdhR 及び aceEF プロモーターの嫌気性 プロモーターによる置換	ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ベージェリンキ Ald
17	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ クレブシエラ・ニューモニエ $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L fimD}::$ 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロ モナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイコバクテリウム・ ボビス sucA, クロストリジウム・クルイペリ 4hbd fimD:: クロストリジウム・アセトブチリカム buk1, クロストリジウム・ アセトブチリカム ptb	ECKh-432への BK/PTB の 組み込み	クロストリジウム・ベージェリンキ Ald
18	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ クレブシエラ・ニューモニエ $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L fimD}::$ 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロ モナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイコバクテリウム・ ボビス sucA, クロストリジウム・クルイペリ 4hbd fimD:: クロストリジウム・アセトブチリカム buk1, クロストリジウム・ アセトブチリカム ptb		クロストリジウム・ベージェリンキ Ald, ゲオバチルス・サーモグルコシダシウス adh1
19	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ クレブシエラ・ニューモニエ $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L fimD}::$ 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロ モナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイコバクテリウム・ ボビス sucA, クロストリジウム・クルイペリ 4hbd rrnC:: cscAKB	ECKh-432に挿入された 非-PTSスクロース遺伝子	ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ベージェリンキ Ald
20	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pfIB \Delta lpdA::$ クレブシエラ・ニューモニエ $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA \text{ gltAR163L fimD}::$ 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロ モナス・ジンジバリス 4hbd fimD:: マイコバクテリウム・ ボビス sucA, クロストリジウム・クルイペリ 4hbd rrnC:: cscAKB		クロストリジウム・アセトブチリカム buk1, クロストリジウム・アセトブチリカム ptb, クロストリジウム・ベージェリンキ Ald

* 記号デルタ (Δ) は遺伝子欠失を示す。

【 0 1 4 1 】

表2にまとめられた株は以下のとおりである：株1：内因性 ldhA を欠失した大腸菌 (E. coli) MG1655の単一欠失誘導体；大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス (P. gingivalis) sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス

10

20

30

40

50

ス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム(*C. acetobutylicum*) AdhE2のプラスミド発現。株2: 宿主株AB3、スクシナート産生株、内因性 adhE ldhA pflBを欠失した大腸菌 MG1655の誘導体; 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2のプラスミド発現。

【0142】

株3: 宿主株ECKh-138、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を持つクレブシエラ・ニューモニエ(*Klebsiella pneumoniae*) lpdAの染色体挿入; 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2のプラスミド発現; 株は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼフラックスを増加させるlpdAの改良を与える。株4: 宿主株ECKh-138、内因性adhE、ldhA、pflB、及びlpdAの欠失、Glu354Lys突然変異を持つクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入; プラスミド発現大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, クロストリジウム・アセトブチリカム buk1, クロストリジウム・アセトブチリカム ptb, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2。

10

【0143】

株5: 宿主株ECKh-401、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失; 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2のプラスミド発現; 株は、フラックスを酸化的TCA回路に向けるmdh及びarcAに欠失を有する。株6: 宿主株ECKh-401、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失; マイコバクテリウム・ボビス(*M. bovis*) sucA, 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2のプラスミド発現。

20

【0144】

株7: 宿主株ECKh-422、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換; 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2のプラスミド発現; 株は、クエン酸シンターゼに突然変異を有し、嫌気性活性が向上している。株8: 株ECKh-422、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換; マイコバクテリウム・ボビス sucA, 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・アセトブチリカム AdhE2のプラスミド発現。株9: 宿主株ECKh-422、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換; マイコバクテリウム・ボビス sucA, 大腸菌 sucCD, ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbd, ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ベイジェリンキ(*C. beijerinckii*) Aldのプラスミド発現。

30

40

【0145】

株10: 宿主株ECKh-426、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性

50

mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換；fimD座での大腸菌 sucCD，ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD，ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入；ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2，クロストリジウム・ベージェリンキ Aldのプラスミド発現；株は、fimD座でECKh-422株に組み込まれた上流経路のコハク酸分岐を有する。株11：宿主株ECKh-432、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換、fimD座での大腸菌 sucCD，ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD，ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、fimD座でのマイコバクテリウム・ボビス sucA，クロストリジウム・クルイベリ(C. kluuyveri) 4hbdの染色体挿入；ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2，クロストリジウム・ベージェリンキ Aldのプラスミド発現；株は、ECKh-422に組み込まれたコハク酸及び α -ケトグルタル酸上流経路分岐を有する。株12：宿主株ECKh-432、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換、fimD座での大腸菌 sucCD，ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD，ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、fimD座でのマイコバクテリウム・ボビス sucA，クロストリジウム・クルイベリ 4hbdの染色体挿入；クロストリジウム・アセトブチリカム buk1，クロストリジウム・アセトブチリカム ptb，クロストリジウム・ベージェリンキ Aldのプラスミド発現。

10

【0146】

20

株13：宿主株ECKh-439、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換；内因性ackAの欠失、fimD座での大腸菌 sucCD，ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD，ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、fimD座でのマイコバクテリウム・ボビス sucA，クロストリジウム・クルイベリ 4hbdの染色体挿入；ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2，クロストリジウム・ベージェリンキ Aldのプラスミド発現；株は、ECKh-432株において酢酸キナーゼ欠失を有する。株14：宿主株ECKh-453、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換、内因性ackAの欠失、内因性ppcの欠失及びppc座でのヘモフィラス・インフルエンザ(Haemophilus influenza) ppckの挿入、fimD座での大腸菌 sucCD，ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD，ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、fimD座でのマイコバクテリウム・ボビス sucA，クロストリジウム・クルイベリ 4hbdの染色体挿入；ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2，クロストリジウム・ベージェリンキ Aldのプラスミド発現；株は、ECKh-432株において酢酸キナーゼ欠失及びPPC/PEPCK置換を有する。

30

【0147】

株15：宿主株ECKh-456、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換、fimD座での大腸菌 sucCD，ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD，ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、fimD座でのマイコバクテリウム・ボビス sucA，クロストリジウム・クルイベリ 4hbdの染色体挿入、lpdAプロモーターのfnr結合部位、pflB-p6プロモーター、及びpflBのRBSによる置換；ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2，クロストリジウム・ベージェリンキ Aldのプラスミド発現；株は、ECKh-432株においてlpdAプロモーターの嫌気性プロモーターによる置換を有する。株16：宿主株ECKh-455、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失及びlpdA座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltAのgltA Arg163Leu突然変異による染色体置換、fimD座での大腸菌 sucCD，ポルフィロモナス・ジンジバリス sucD，ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、fimD座のマイコバクテリウム・ボ

40

50

ビス *sucA*, クロストリジウム・クルイベリ 4hbdIの染色体挿入、*pdhR*及び*ace* EFプロモーターの*fnr*結合部位、*pflB*-*p6*プロモーター、及び*pflB*のRBSによる置換；ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ベイジェリンキ Aldのプラスミド発現；株は、ECKh-432において*pdhR*及び*ace* EFプロモーターの嫌気性プロモーターによる置換を有する。

【0148】

株17：宿主株ECKh-459、内因性*adhE*、*ldhA*、*pflB*の欠失、内因性*lpdA*の欠失及び*lpdA*座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ *lpdA*の染色体挿入、内因性*mdh*及び*arcA*の欠失、*gltA*の*gltA* Arg163Leu突然変異による染色体置換、*fimD*座での大腸菌 *sucCD*, ポルフィロモナス・ジンジバリス *sucD*, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、*fimD*座でのマイコバクテリウム・ボビス *sucA*, クロストリジウム・クルイベリ 4hbdの染色体挿入、*fimD*座でのクロストリジウム・アセトブチリカム *buk1*, クロストリジウム・アセトブチリカム *ptb*の染色体挿入；クロストリジウム・ベイジェリンキ Aldのプラスミド発現；株は、ECKh-432株へのBK/PTBの組み込みを有する。株18：宿主株ECKh-459、内因性*adhE*、*ldhA*、*pflB*の欠失、内因性*lpdA*の欠失及び*lpdA*座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ *lpdA*の染色体挿入、内因性*mdh*及び*arcA*の欠失、*gltA*の*gltA* Arg163Leu突然変異による染色体置換、*fimD*座での大腸菌 *sucCD*, ポルフィロモナス・ジンジバリス *sucD*, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、*fimD*座でのマイコバクテリウム・ボビス *sucA*, クロストリジウム・クルイベリ 4hbdの染色体挿入、*fimD*座でのクロストリジウム・アセトブチリカム *buk1*, クロストリジウム・アセトブチリカム *ptb*の染色体挿入；クロストリジウム・ベイジェリンキ Ald, ゲオバチルス・サーモグルコシダシウス(*G. thermoglucosidasius*) *adh1*のプラスミド発現。

【0149】

株19：宿主株ECKh-463、内因性*adhE*、*ldhA*、*pflB*の欠失、内因性*lpdA*の欠失及び*lpdA*座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ *lpdA*の染色体挿入、内因性*mdh*及び*arcA*の欠失、*gltA*の*gltA* Arg163Leu突然変異による染色体置換、*fimD*座での大腸菌 *sucCD*, ポルフィロモナス・ジンジバリス *sucD*, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、*fimD*座でのマイコバクテリウム・ボビス *sucA*, クロストリジウム・クルイベリ 4hbdの染色体挿入、*rrnC*座での非-PTSスクロースオペロン遺伝子スクロースパーミアーゼ(*cscB*)、D-フルクトキナーゼ(*cscK*)、スクロースヒドロラーゼ(*cscA*)、及び*LacI*-関連スクロース特異的リプレッサー(*cscR*)の挿入；ポルフィロモナス・ジンジバリス Cat2, クロストリジウム・ベイジェリンキ Aldのプラスミド発現；株は、ECKh-432株に挿入された非-PTSスクロース遺伝子を有する。株20：宿主株ECKh-463内因性*adhE*、*ldhA*、*pflB*の欠失、内因性*lpdA*の欠失及び*lpdA*座でのGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ・ニューモニエ *lpdA*の染色体挿入、内因性*mdh*及び*arcA*の欠失、*gltA*の*gltA* Arg163Leu突然変異による染色体置換、*fimD*座での大腸菌 *sucCD*, ポルフィロモナス・ジンジバリス *sucD*, ポルフィロモナス・ジンジバリス 4hbdの染色体挿入、*fimD*座でのマイコバクテリウム・ボビス *sucA*, クロストリジウム・クルイベリ 4hbdの染色体挿入、*rrnC*座での非-PTSスクロースオペロンの挿入；クロストリジウム・アセトブチリカム *buk1*, クロストリジウム・アセトブチリカム *ptb*, クロストリジウム・ベイジェリンキ Aldのプラスミド発現。

【0150】

ホスホトランスフェラーゼ(PTS)系によりスクロースを利用するように遺伝子操作された株は、多量のピルビン酸塩を副産物として生み出す。したがって、非-PTSスクロース系を使用してピルビン酸塩の形成を低減できるが、その理由はスクロースの移入がホスホエノールピルビン酸塩(PEP)のピルビン酸塩への転化を伴わないだろうからである。これは、PEPプール及びPPC又はPEPCKによるオキザロ酢酸へのフラックスを増大させるだろう。

【0151】

非-PTSスクロースオペロンの*rrnC*領域への挿入を実施できる。*rrnC*領域に相同な領域を両側に持つ非-PTSスクロース遺伝子を含むPCR産物を生成するには、2つのオリゴを使用して、Mach1 (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド) 由来の*csc*遺伝子を

PCR増幅する。この株は、スクロースを異化できると知られている大腸菌株であるW株の子孫である(Orencio-Trejoらの文献Biotechnology Biofuels 1:8 (2008))。配列は、大腸菌W株KO11(受託番号AY314757)(Shuklaらの文献Biotechnol. Lett. 26:689-693 (2004))から誘導され、スクロースパーミターゼ(cscB)、D-フルクトキナーゼ(cscK)、スクロースヒドロラーゼ(cscA)、及びLacI-関連スクロース-特異的リプレッサー(cscR)をコードする遺伝子を含む。cscRの最初の53のアミノ酸は、プライマーの置換により有効に除去された。精製後、PCR産物は、pRedET (tet)により形質転換され製造業者の説明(www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf)に従って調製されたMG1655エレクトロコンピテントセルに電気穿孔される。PCR産物は、ゲノム中に、染色体のrrnC領域に組み込まれるように設計されている。それは、rrlC(23S rRNA)の上流の191のヌクレオチド、rrlC rRNA遺伝子の全て及びrrlCの下流の3ヌクレオチドを有効に除去し、スクロースオペロンにより置換する。rrnC::cscAKB領域全体は、P1トランスダクションによりBD0宿主株ECKh-432に移され(Sambrookらの文献Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)、ECKh-463を生み出す($\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $fimD::$ 大腸菌 $sucCD$, ポルフィロモナス・ジンジバリス $sucD$, ポルフィロモナス・ジンジバリス $4hbd$ $fimD::$ マイコバクテリウム・ボビス $sucA$, クロストリジウム・クルイベリ $4hbd$ $rrnC::cscAKB$)。リコンビナントは、スクロースでの成長により選択され、診断PCRにより確認される。

【0152】

化合物産生生物又は1,4-BD0-産生生物の培養に先立ち、スクロースシロップ及び培地成分などの原材料フィードストックを、製造バイオリアクターに加える前に、例えば加熱滅菌により処理して、生物学的な汚染物質を除くことができる。いくつかの実施態様によると、フィードストックは、例えば、BD0の発酵用にスクロース又はグルコースを含むことがある。いくつかの実施態様において、フィードストックは合成ガスを含むことがある。微生物の成長を助けるのに使用される追加の培地成分には、例えば、塩、窒素源、緩衝剤、微量金属、及びpH制御のための塩基がある。発酵プロセスのg/Lで表された、例示的な培地パッケージの主な成分を以下の表3に示す。

【表4】

表 3

区分	濃度
窒素源	3 g/L
緩衝剤	5 g/L
塩	0.65 g/L
塩基	1.4 g/L
	10.1 g/L

【0153】

炭素源の種類は大幅に変わることがあり、グルコース、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトデキストリン、スターチ、イヌリン、グリセロール、大豆油などの植物油、炭化水素、メタノール及びエタノールなどのアルコール、酢酸などの有機酸、合成ガス、CO、CO₂、及びH₂の類似の組み合わせを含み得る。「グルコース」という用語は、グルコースシロップ、すなわちグルコースオリゴマーを含むグルコース組成物を含む。植物及び植物から誘導されるバイオマス材料は、低コストのフィードストックの源になり得る。そのようなフィードストックには、例えば、コーン、大豆、綿、亜麻仁、菜種、サトウキビ、及びパーム油があり得る。バイオマスは、酵素媒介又は化学物質媒介の加水分解を受けて基質を遊離させ、それがさらに生体触媒作用により処理されて目的とする化学生成物を生み出すことができる。これらの基質には、炭水化物の混合物、並びに芳香族化合物及びバイオマスのセルロース性、ヘミセルロース性、及びリグニン性部分からまとめて誘

導される他の産物がある。バイオマスから生じる炭水化物は、例えば、スクロース、グルコース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、及びフルクトースを含む、5炭糖及び6炭糖の豊富な混合物である。

【0154】

炭素源は、固体、液体、又は気体として培地に加えることができる。炭素源は、栄養過剰による細胞に対するストレスを避けるため、制御された方法で加えることができる。この点で、供給回分及び連続培養は、以下でさらに議論されるとおり有用な培養様式である。

【0155】

窒素源の種類は大幅に変わることがあり、尿素、水酸化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムなどのアンモニウム塩、他の硝酸塩、グルタミン酸塩及びリジンなどのアミノ酸、酵母エキス、酵母自己消化物、酵母窒素原基礎培地、タンパク加水分解物（ペプトン、トリプトン及びカザミノ酸などのカゼイン加水分解物を含むが、これらに限定されない）、大豆油かす、Hy-Soy、トリプチックソイブロス、綿実油かす、麦芽エキス、コーンステーパーリカー、及び糖蜜があり得る。

【0156】

培地のpHは、酸又はアルカリを加えて制御できる。培養の間pHが低下することがあるので、必要に応じてアルカリを加えることができる。好適なアルカリの例にはNaOH及びNH₄OHがある。

【0157】

1,4-BDOなどの目的とする化合物の産生に利用される例示的な細胞成長手順には、回分発酵、回分分離のある供給回分発酵；連続分離のある供給回分発酵、連続分離のある連続発酵がある。これらの方法は全て当分野に周知である。生物設計によって、発酵は、好気性又は嫌気性の条件下で実施できる。いくつかの実施態様において、培地の温度は、約30から約45℃、例えば31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、及び44℃に保たれる。

【0158】

回分発酵において、発酵槽（又はバイオリアクター）は成長を支える調製された培地で満たされている。微生物発酵の温度及びpHは適切に調整され、追加の補給物が加えられる。1,4-BDO-産生生物の種菌が発酵槽に加えられる。回分発酵では、発酵は一般に決まった期間運転し、次いで発酵の産物が単離される。このプロセスを回分方式で繰り返すことができる。

【0159】

供給回分発酵において、新鮮な培地が連続的又は周期的に発酵バイオリアクターに加えられる。固定容量の供給回分発酵は、培養物を希釈することなく炭素源が供給される供給回分発酵の一種である。培養容量は、濃縮された液体又は気体として成長炭素源を供給することによりほぼ一定に保つこともできる。周期的供給回分培養と呼ばれることもある、他の種類の固定容量の供給回分培養において、培養物の一部が周期的に取り出され、さらなる供給回分プロセスの出発点として使用される。発酵がある段階に到達すると、培養物は除かれ、バイオマスは炭素供給基質を含む滅菌水又は培地により元の容量に希釈される。希釈によりバイオマスの濃度は低下し、比増殖速度の上昇につながる。その後、供給が続くにつれ、バイオマスが増加して容器内での最大持続量にもう一度近づくにつれて徐々に増殖速度は低下し、この時点で培養物を再び希釈できる。あるいは、供給回分発酵は可変容量であってもよい。可変容量様式では、発酵プロセスの一部を除去せずに栄養及び培地が断続的に培養物に加えられるので、発酵プロセスの容量は発酵時間と共に変化する。

【0160】

連続発酵において、新鮮な培地は、消費された培地の連続的な分離と共に一般的に断続的に加えられ、消費された培地は産物が分泌されている場合1,4-BDOなどの目的とする産物を含み得る。連続培養の特徴の1つは、微生物の挙動と環境条件との間の関係を決定で

10

20

30

40

50

きる時間非依存性定常状態が得られることである。この定常状態の達成は、ケモスタット又は類似のバイオリアクターにより得られる。ケモスタットは、培養液を連続的に除去すると同時に新鮮な培地を断続的に添加して培養容量を一定に保つことができる。培地がケモスタットに加えられる速度を変えることにより、微生物の増殖速度を制御できる。

【0161】

1,4-BDOなどの目的とする化合物の連続的及び／又は近連続的産生は、化合物産生生物を十分な栄養及び培地中で培養して、対数期における増殖を維持及び／又はおよそ維持することを含むことがある。そのような条件下での連続培養は、例えば、1日、2、3、4、5、6、又は7日以上を含むことがある。さらに、連続培養は、1週間、2、3、4、又は5週間以上、最大数か月を含むことがある。それに代わり、特別な用途に好適な場合には、目的とする化合物を産生する生物を数時間培養することもできる。また、連続及び／又は近連続培養条件が、これらの例示的な期間中の全ての時間間隔を含み得ることを理解できよう。化合物産生微生物を培養する時間は、所望の目的のための十分な量の産物を産生するために十分な期間であることもさらに理解される。

【0162】

いくつかの実施態様において、培養は好気性条件下で実施できる。培養物に対する酸素供給は制御できる。酸素は、空気として、富化された酸素として、純粋な酸素として、又はこれらの任意の組み合わせとして供給できる。酸素濃度を監視する方法は当分野に公知である。酸素は特定の供給速度で送ることができ、又は培養物の溶存酸素量を測定し一定の溶存酸素量を維持する意図により供給することにより、要求に応じて送ることもできる。他の実施態様において、培養は、実質的に嫌気性の条件下で実施できる。実質的に嫌気性は、酸素の量が、液体培地中の溶存酸素の飽和の約10%未満を意味する。嫌気性条件は、約1%未満の酸素の雰囲気により維持された液体又は固体の培地の密閉チャンバーを含む。

【0163】

発酵は嫌気性条件下で実施できる。例えば、最初に培地に窒素を注入し、次いで培養容器を密閉して（例えば、セプタム及びクリンキャップによりフラスコは密閉できる）、培養物を、実質的に酸素を含まないようにできる。微好気性条件も、限定された通気のために小さな穴を与えることにより利用できる。商業的な規模では、微好気性条件は、好気性の場合と同様だがはるかに低い速度で厳しく制御された攪拌とともに、発酵槽に空気又は酸素を注入することにより達成される。

【0164】

いくつかの実施態様において、1,4-BDOなどの目的とする化合物は、遺伝子改変された大腸菌を使用して嫌気性回分発酵で産生できる。発酵時に、フィードストック基質の一部が細胞増殖のために使用され、追加の基質が他の発酵副産物に転化される。塩、緩衝剤、窒素などの培地成分を発酵物に過剰に加えて、細胞増殖を支持できる。このため、発酵ブ罗斯は、水、目的とする化合物、副産物、残存培地、残存基質、及びフィードストック／培地不純物の複雑な混合物である。目的とする化合物が単離及び精製されるのは、この発酵ブ罗斯からである。例示的な発酵ブ罗斯組成は、以下の表4に示される。

【表4】

表 4*

量	成分
~100 g/L	1,4-BDO
~5 g/L	細胞集団
~10 g/L	副産物(エタノール、酢酸、4-ヒドロキシ酪酸、GBL、タンパク質)
<10 g/L	残存培地／塩
<1 g/L	残存スクロース／グルコース
<2 g/L	「非発酵物」(フィードストック／不純物)

* 残部は水である。

【0165】

約5～15重量%の1,4-BDOの産物濃度が、発酵系生合成製造プロセスにより達成できる。

【0166】

本発明の種々の実施態様の活性に実質的に影響しない改良も、本明細書に提供される発明の定義内に含まれることが理解される。したがって、以下の実施例は本発明を説明するが限定するものではない。

【実施例】

【0167】

(実施例I 発酵ブロスの遠心分離)

この実施例は、ディスクスタック遠心分離機を使用して、細胞集団及び他の固体を発酵ブロスから除去することを示す。

遺伝子改変された大腸菌により産生された1,4-ブタンジオール発酵ブロスを遠心分離により清澄化した。GEA-Westfaliaディスクスタック遠心分離機をこの工程のために使用した。ラボスケールの遠心分離機、CTC 1型Whispefugeのボウル容量は1.0リットル、固体収容空間は0.55リットルである。ボウルフード、分配器、ディスクスタック、プロセス水湿潤部品(process wetted parts)の全ては、高引張強度ステンレススチールで構成されている。遠心分離ユニットへの供給は、蠕動ポンプを利用して、およそ0.25リットル毎分で一定に保たれた流速に制御した。約15psi(103kPa)の背圧を、出口濃縮液流の調整弁を絞って系中に維持した。遠心分離機は12,000rpmで運転し、供給材料は室温であった。遠心分離機は、発酵ブロスから細胞バイオマス及び不溶性物質を除く。細胞バイオマス及び不溶性物質の濃度は、600nmでの光学濃度(OD)により測定される濁度により示される。供給発酵ブロス及び清澄化濃縮液の濁度データを表5に示す。供給材料は見てわかるほど濁っており、OD測定値が13.3であった。清澄化された濃縮液は外観上はるかに澄んでいて、OD測定値が0.18であった。全体として、濁度はおよそ99%低下し、ディスクスタック遠心分離機による優れた清澄化を表す。

【表5】

表 5. 600nmでの光学濃度(OD)により測定される濁度

	600nmでのOD
供給材料、発酵ブロス	13.3
清澄化された遠心分離液	0.18

【0168】

(実施例II 発酵ブロスの限外濾過)

この実施例は、実施例Iにおいて実施された遠心分離による細胞集団及び他の固体の除去の後の発酵ブロスの限外濾過を示す。

GEAラボスケール濾過ユニットModel Lを使用して、実施例1において産生された産物をさらに清澄化した。Model L濾過ユニットは、Hydranautics 5K PES平膜を備えていた。設置された膜総面積は0.144 m²であった。膜内外圧力は、入口流及び背圧調整弁の調整によりおよそ36 psi(248 kPa)に維持した。供給材料の温度は、入口熱交換器を利用しておよそ27℃に維持した。実験の経過全体にわたって透過液流速を測定して、流束を決定した。表6は、体積濃度因子(VCF)の関数としてリットル/m²/hで表した透過流束を表す。

【表 6】

表 6. 限外濾過流対VCF

VCF	流束
	リットル/m ² /h
1.18	15.02
1.44	15.37
1.86	15.29
2.60	15.34
4.33	15.06
6.50	14.79

10

【0169】

実験全体にわたって試料を抜き取り、透過液の質を測定した。供給材料及び透過液中のタンパク質濃度をBradfordアッセイを利用して測定した。表7は、供給材料、透過液、及び濃縮水中のタンパク質濃度を表す。タンパク質濃度は、供給材料に比べて透過液中でおよそ68%低下した。

【表 7】

表 7. Bradfordアッセイを利用して測定されたタンパク質濃度

タンパク質濃度	
	mg/L
供給材料、遠心分離されたブロス	84.09
UF透過液	27.11
UF濃縮水	248.90

20

【0170】

(実施例III 発酵ブロスのナノ濾過)

この実施例は、実施例IIにおいて実施された限外濾過の後の発酵ブロスのナノ濾過を示す。

30

GEAラボスケール濾過ユニットModel Lは、GE DKナノ濾過平膜を備えていた。設置された膜総面積は0.072m²であった。この構成を利用して、実施例2で得られたUF透過液を濾過した。膜内外圧力は、入口流及び背圧調整弁の調整によりおよそ270 psi(1861 kPa)に維持した。供給材料の温度は、入口熱交換器を利用しておよそ38℃に維持した。実験の経過全体にわたって透過液流を測定し、流束を決定した。表8は、体積濃度因子(VCF)の関数としてリットル/m²/hで表した流束を表す。

【表 8】

表 8. ナノ濾過流

VCF	流束
	リットル/m ² /h
1.33	14.69
1.74	13.41
2.50	10.42

40

【0171】

実験全体にわたって試料を抜き取り、透過液の質を測定した。有機酸はLC-MSを利用して測定し、塩イオンはクロマトグラフィー(IC)を利用して分析し、グルコースはAnalox G 6分析器で測定した。表9は、グルコース、イオン、及び有機酸の排除パーセントを示す。供給材料のpHにおいて、有機酸はその塩形態で存在すると予測される。ナノ濾過透過液は

50

、供給材料における明らかな黄色から、透過液産物における非常に薄い黄色へと、外観の色も薄くなった。

【表 9】

表 9. ナノ濾過によるグルコース、イオン、及び有機酸の排除パーセント

グルコース	一価カチオン	二価カチオン	アニオン	有機酸
88.57 %	72.80 %	100.00 %	82.45 %	64.39 %

10

【0172】

(実施例IV 発酵ブロスのイオン交換)

この実施例は、実施例IIIにおいて実施されたナノ濾過の後の発酵ブロスのイオン交換クロマトグラフィー精製を示す。

実施例IIIで得られたナノ濾過透過液をイオン交換工程で処理し、残っているイオンを除き、産物をさらに清澄化した。強酸カチオン交換樹脂であるAmberlite IR 120H及び弱塩基アニオン交換樹脂であるAmberlite IRA 67をこの工程に使用した。高さが2フィート(61cm)で直径が1インチ(2.5cm)である個々のカチオン及びアニオン交換カラムには、それぞれ 5.3×10^{-3} 立方フィート($0.15 \times 10^{-3} \text{m}^3$)のカチオン及びアニオン交換樹脂が充填されていた。ナノ濾過透過液は、10mL/分で40℃で、最初にカチオン交換カラムに供給され、次いでアニオン交換カラムに供給された。イオン交換は、ICによりイオン含量について分析した。残存イオンの全ては、0.1 mEq/L未満の濃度まで除去された。残存有機酸の全てもこの工程で除去された。産物は、外観上黄色が全くなく非常に澄んでいた。

20

【0173】

(実施例V 合成供給材料の蒸発晶析)

この実施例は、ロータリーエバポレーターによる実験室規模の蒸発晶析による、合成供給材料からの塩の除去を示す。

蒸発は、Buchi Rotavap R-205を、水浴温度50℃で約100mmHgの真空中で利用して実施した。合成供給材料は、およそ92 mEq/Lの一価カチオン、5 mEq/Lの二価カチオン、及び125 mEq/Lのアニオンを含む水の中の約8%のBDOにより製造した。塩のイオンを同時に溶液から沈殿させながら、この混合物から水を蒸発させた。イオンクロマトグラフィーによる分析のために少量のサンプルアリコートをとることにより、蒸発の間溶液中のイオン濃度を監視した。分析の前に、沈殿した固体は濾去した。表10は、BDOがおよそ10から95%に濃縮された時の溶解状態のイオンの濃度(供給材料試料における100%に規格化)を示す。イオン濃度は、溶液における飽和点まで上昇した(およそ30%BDO)。この点の後、さらなる蒸発が、塩の結晶化(沈殿)を押し進めた。全体として、この蒸発晶析工程は、塩イオンの97.5%をBDO溶液から沈殿させた。

30

【表 10】

表 10. 合成ブロスの蒸発晶析

時間, h	BDO wt%	% 一原子カチオン	% 二原子 カチオン	% アニオン
0	10.00	100.00	100.00	100.00
0.25	15.74	159.75	132.32	161.25
0.5	33.79	344.61	159.73	353.02
0.75	81.32	35.49	0.00	47.24
1.5	94.25	22.43	0.00	20.17

40

【0174】

50

(実施例VI 塩の溶解度)

この実施例は、1,4-BDOを含む種々の小さい炭素鎖ジオールにおける塩の溶解度プロフィールを示す。

さまざまな量の1,4-ブタンジオール(BDO)、1,3-プロパンジオール(PDO)、又は1,2-エタジオール(モノエチレングリコール、MEG)を含む異なる溶液での塩の溶解度を測定した。塩を、溶液が飽和するまで、10mLの溶液に加えた。飽和の塩の溶解度を、イオンクロマトグラフィーを利用して測定した。表11は、室温(およそ20℃)での4種の異なる塩の塩溶解度を示す。塩溶解度は、BDO濃度の上昇と共に著しく低下し、蒸発晶析を利用する塩の除去の可能性を示している。表12は、室温での異なる濃度の1,4-BDO、PDO、又はMEG溶液における3種の異なる塩の塩溶解度を示す。この結果は、MEGからPDOへ、1,4-BDOへと行く塩の溶解度の低下を示し、1,4-BDOが3種の化合物の間で蒸発晶析に最も適していることを示す。

【表 1 1】

表 11. 0から100%の1,4-ブタンジオール(1,4-BDO)を含む溶液中の4種の異なる塩の溶解度

溶液 (% 1,4-BDO)	測定された平均溶解度(重量%) ~約20℃			
	KH ₂ PO ₄	NaCl	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄
0 (水)	20.101	32.300	34.354	57.375
33	3.296	10.803	7.346	11.639
80	0.056	2.529	0.035	0.173
90	0.011	0.314	0.015	0.022
95	0.005	0.314	0.028	0.008
98	0.031	0.175	0.011	0.005
100	0.003	0.050	0.009	0.004

【表 1 2】

表 12. 50、80、又は100%の1,4-ブタンジオール(1,4-BDO)、1,3-プロパンジオール(PDO)、又は1,2-エタジオール(MEG)中の3種の異なる塩の溶解度

溶媒	溶液 (溶媒の%)	測定された平均溶解度(重量%) ~約20℃		
		KCl	Na ₂ SO ₄	(NH ₄)H ₂ PO ₄
BDO	50	8.21	0.63	2.97
	80	0.94	0.04	0.16
	100	0.05	0.00	0.01
PDO	50	8.70	2.38	3.62
	80	1.45	0.10	0.46
	100	0.30	0.01	0.09
MEG	50	14.11	9.42	8.06
	80	7.72	1.81	2.90
	100	4.76	0.69	1.22

【0 1 7 5】

本願全体で、種々の刊行物がかっこ内に引用された。これらの刊行物の開示の全体は、本発明が関連する技術的現状をより完全に説明するために、引用により本願に組み込まれる。

【0 1 7 6】

本発明は、開示された実施態様に関連して記載されてきたが、当業者は、先に詳述された具体的な実施例及び研究が本発明を説明するのみであることを容易に理解するだろう

。本発明の趣旨から逸脱せずに、種々の改良が実施可能であることを理解されたい。したがって、本発明は以下の請求項にのみ限定される。

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成 1)

1,4-ブタンジオール(1,4-BDO)を発酵ブロスから単離する方法であって、
濾過からなる分離工程において、1,4-BDOに富む該発酵ブロスの第一の液体分画を、細胞を含む該発酵ブロスの固体分画から分離する工程であって、該濾過が限外濾過からなり、該発酵ブロスが5重量%~15重量%の濃度の1,4-BDOを含む、前記工程；
該第一の液体分画から塩を除去し、第二の液体分画を生成する工程であって、該塩がナノ濾過及びイオン交換により除去される、前記工程；
該第二の液体分画から水を除去し、第三の液体分画を生成する工程；及び
該第三の液体分画から1,4-BDOを蒸留によって精製する工程；からなる、前記方法。

10

(構成 2)

限外濾過が、細孔径が0.005~0.1ミクロンである膜を通して濾過することを含む、構成 1 記載の方法。

(構成 3)

水を除去する工程が、1つ以上の効用を含む蒸発器系による蒸発により実施される、構成 1 記載の方法。

(構成 4)

前記蒸発器系が、二重又は三重効用蒸発器を含む、構成 3 記載の方法。

20

(構成 5)

前記蒸発器系が、熱再圧縮機をさらに含む、構成 3 記載の方法。

(構成 6)

前記蒸発器系が、機械的再圧縮機をさらに含む、構成 3 記載の方法。

(構成 7)

前記蒸発器系が、流下液膜式蒸発器、短路流下液膜式蒸発器、強制循環式蒸発器、プレート式蒸発器、循環式蒸発器、流動床蒸発器、上昇液膜式蒸発器、向流トリクル蒸発器、攪拌式蒸発器、及び螺旋管蒸発器からなる群から選択される蒸発器を含む、構成 3 記載の方法。

(構成 8)

前記蒸発器系が、真空を含む、構成 3 記載の方法。

30

(構成 9)

水の除去前に実質的に全ての塩が除去される、構成 1 記載の方法。

(構成 10)

ナノ濾過が、細孔径が0.0005~0.005ミクロンの膜を通して濾過することを含む、構成 1 記載の方法。

(構成 11)

細胞を含む前記固体分画が、前記発酵ブロスに再生利用される、構成 1 記載の方法。

(構成 12)

前記除去された水が、前記発酵ブロスに再生利用される、構成 1 記載の方法。

40

(構成 13)

前記除去された塩が、前記発酵ブロスに再生利用される、構成 1 記載の方法。

(構成 14)

1,4-BDOを精製する工程が、蒸留を含む、構成 1 記載の方法。

【図 1】

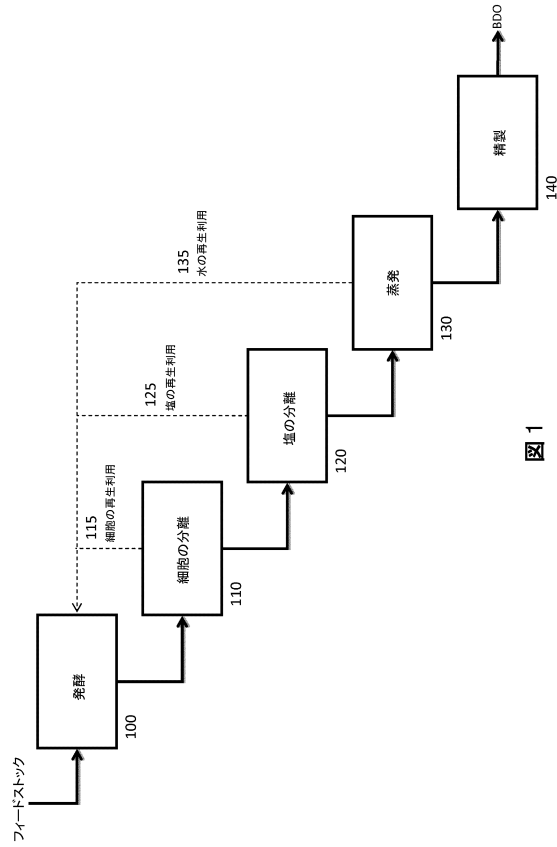


図 1

【図 2】

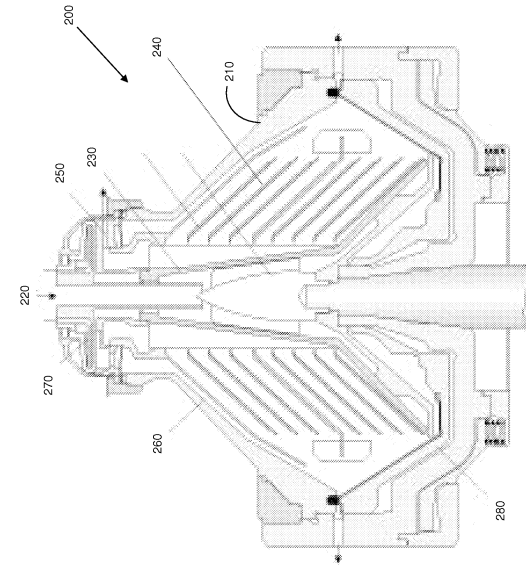


図 2

【図 3】

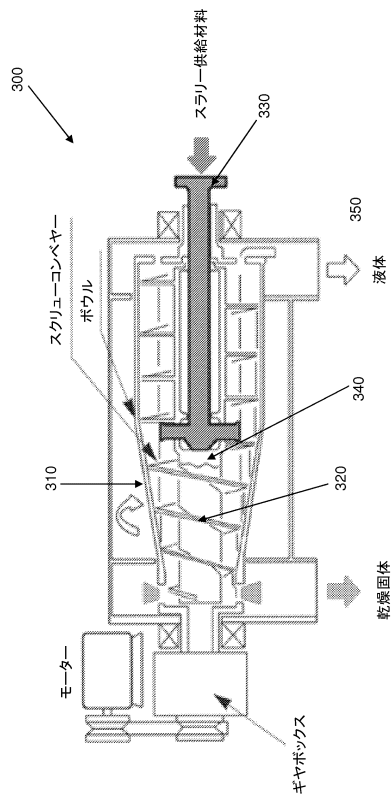


図 3

【図 4】

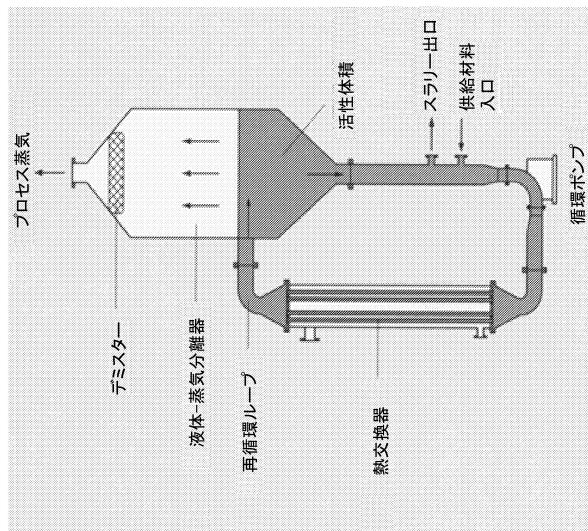


図 4

【図 5】

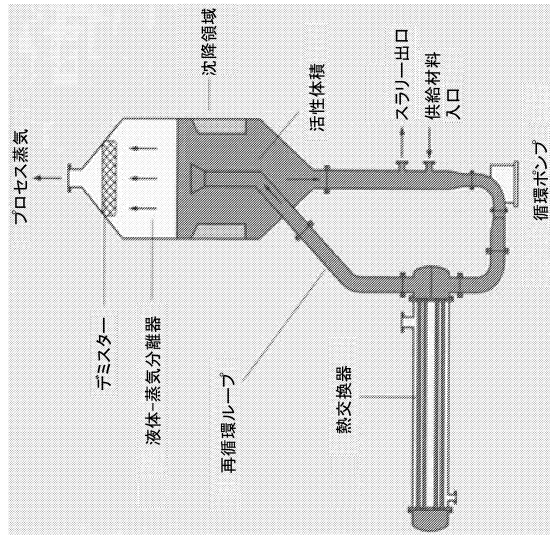


図 5

【図 6】

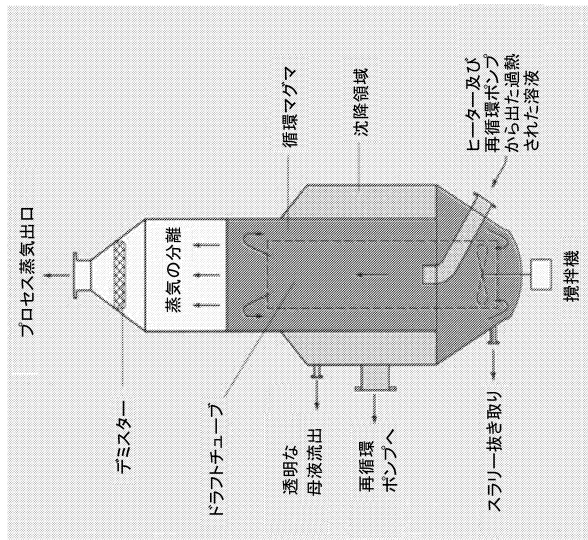


図 6

【図 7】

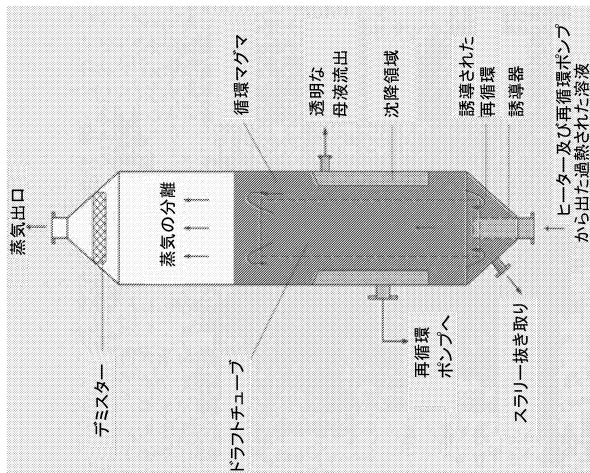


図 7

【図 8】

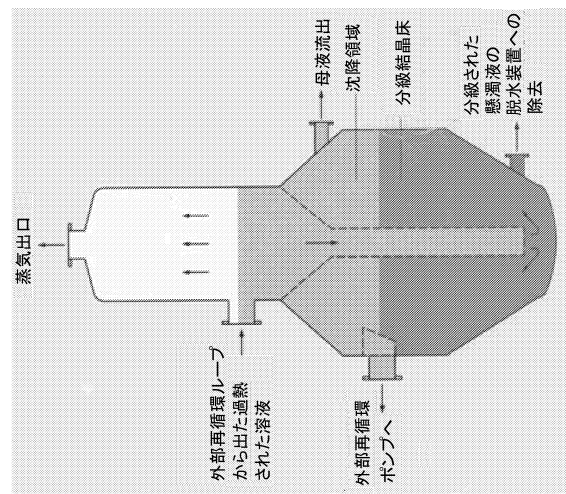


図 8

【図 9】

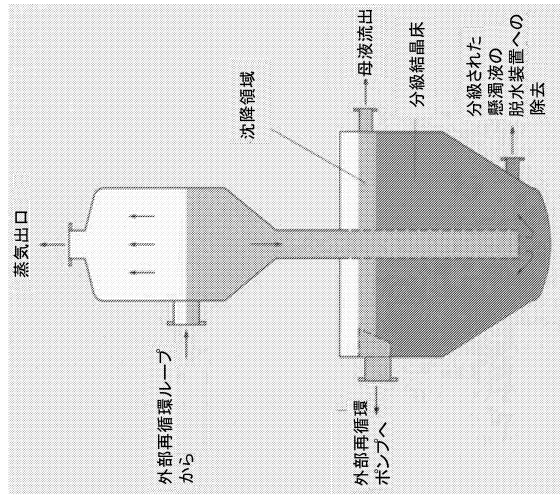


図 9

【図 10】

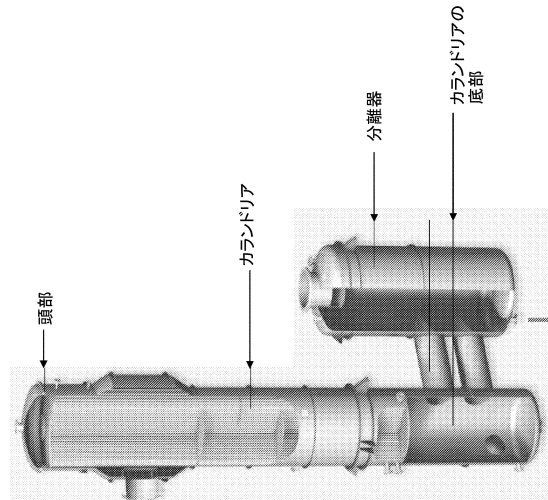


図 10

【図 11】

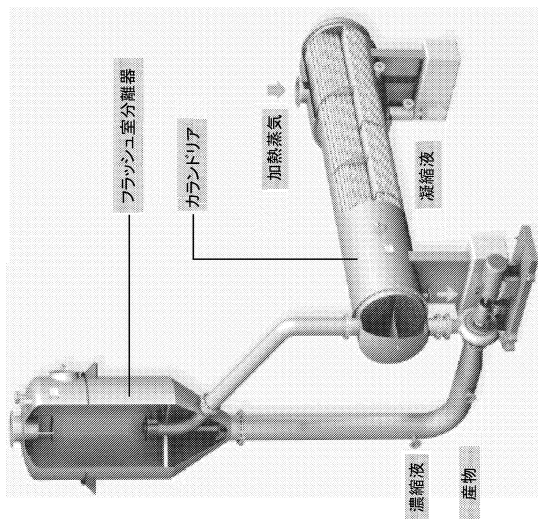


図 11

【図 12】

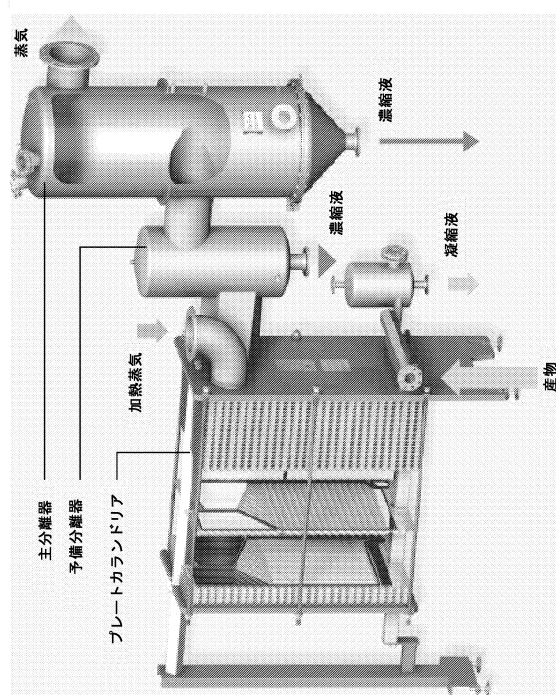


図 12

【図 13】

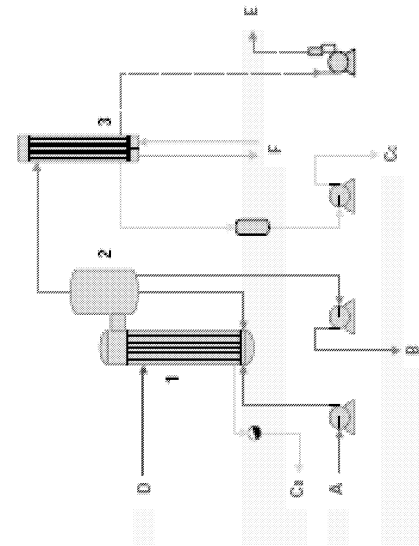


図 13

【図 14】

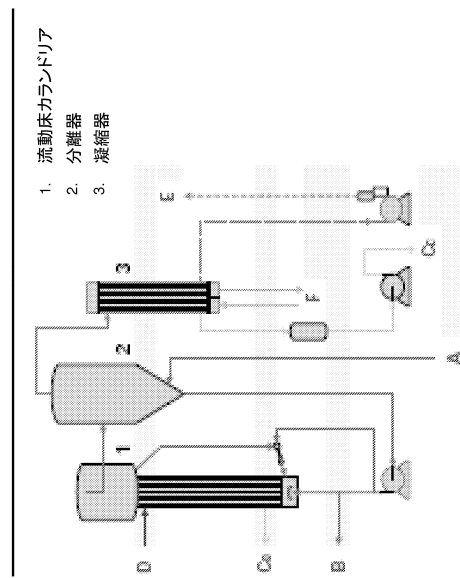


図 14

【図 15】

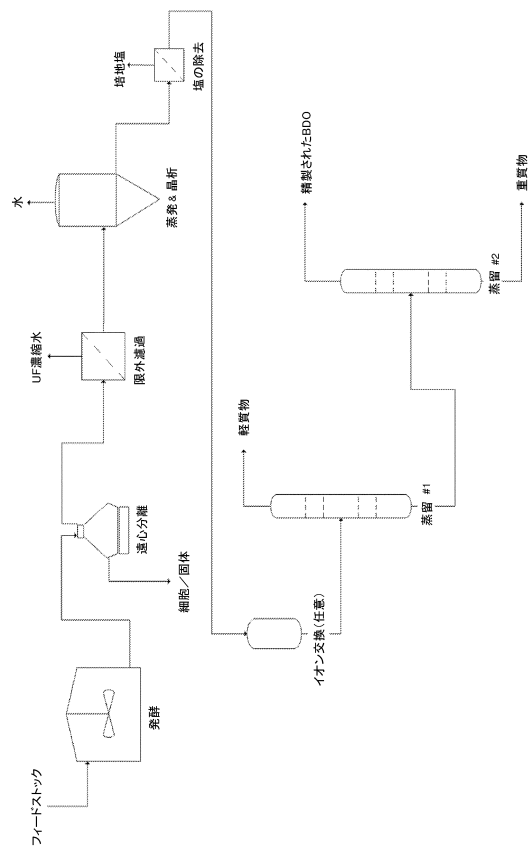


図 15

【図 16】

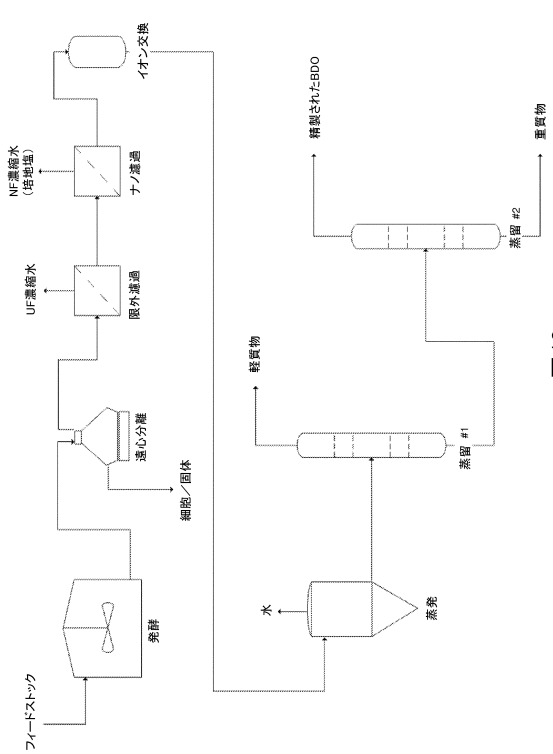


図 16

フロントページの続き

(72)発明者 マルク ジェイ. ブルク
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
1 0 5 2 0

審査官 池上 佳菜子

(56)参考文献 特開昭62-285779 (JP, A)
特表2007-502325 (JP, A)
特表2004-524852 (JP, A)
米国特許第06361983 (US, B1)
国際公開第2008/115840 (WO, A1)
特開2008-212156 (JP, A)
特開昭61-254177 (JP, A)
特表2003-511360 (JP, A)
特開平05-201899 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12P
C12N
C07C