

(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2012-506716

(P2012-506716A)

(43) 公表日 平成24年3月22日(2012.3.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 P 13/06 (2006.01)	C 1 2 P 13/06 A	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2011-534730 (P2011-534730)	(71) 出願人	511108312
(86) (22) 出願日	平成21年10月28日 (2009.10.28)		ウィリアム マーシュ ライス ユニバー シティ
(85) 翻訳文提出日	平成23年6月14日 (2011.6.14)		アメリカ合衆国 テキサス 77005, ヒューストン, メイン ストリート
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/062440		6100, オフィス オブ テクノロジ ー トランスファー, エムエス 705
(87) 国際公開番号	W02010/051324		
(87) 国際公開日	平成22年5月6日 (2010.5.6)	(71) 出願人	511108116
(31) 優先権主張番号	61/109,018		グライコス バイオテクノロジーズ, イ ンコーポレイテッド
(32) 優先日	平成20年10月28日 (2008.10.28)		アメリカ合衆国 テキサス 77007, ヒューストン, リバークーン 711
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリセロールを化学物質に変換するための微好気性培養

(57) 【要約】

グリセロールまたは他の還元炭素源は、ある微好気性条件下で、化学製品の微生物生成のための供給原料として使用され得る。例えば、このような生成物は、電子受容体が、添加されるのと同様に迅速に、反応器中で消費される、微好気性または条件下で、生じ得る。このような反応において、反応生成物は、炭素源と少なくとも同程度に還元される。さらに、このような反応中、少なくともいくつかの炭素源を用いて、細胞集団を生じる。加えて、修飾されたゲノムを有する微生物が、本明細書の方法を実行するために提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

微生物内で還元炭素源から酸化還元中性または酸化した化学製品を製造するための方法であって、

電子受容体は、それらが提供されるのと少なくとも同様に迅速に消費される速度で、前記微生物に電子受容体を提供することと、

前記酸化還元中性または酸化した生成物および少なくともいくつかの細胞集団が、前記還元炭素源から生じ、前記還元炭素源が、前記細胞集団よりもさらに還元されるように、前記微生物の供給原料として前記還元炭素源を提供することと、を含み、

前記還元炭素源の前記還元化学製品への変換のための還元バランスの度合いは、ゼロ以上であり、細胞集団の炭素源への変換のための還元バランスの度合いは、ゼロを超える、方法。

10

【請求項 2】

前記還元炭素源はグリセロールを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記酸化還元中性または酸化した化学製品は、アルコール、有機酸、アミノ酸、またはラクトンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記酸化還元中性または酸化した化学製品は、コハク酸、プロピオン酸、エタノール、乳酸、またはアラニンを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記電子受容体は、大気、酸素、硝酸、亜硝酸、またはこれらの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記電子受容体は、1 時間当たり細胞集団 1 グラムにつき酸素 1 ミリグラムから 1 時間当たり細胞集団 1 グラムにつき酸素 15 ミリグラムの範囲内の速度で、前記微生物に提供される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記微生物は、エシェリキア属、バシラス属、バエニバチルス属、またはサッカロミセス属に属する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記化学製品は、コハク酸を含み、前記微生物は、

a) アセチル - C o A のエタノールへの変換に関与する遺伝子の破壊、アセチル - C o A のアセチル - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ピルビン酸の酢酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ピルビン酸の乳酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ホスホエノールピルビン酸のオキサロ酢酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ジヒドロキシアセトンのジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ピルビン酸のアセチル - C o A への変換に関与する遺伝子の破壊、ホスホエノールピルビン酸のピルビン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、グリセロールのジヒドロキシアセトンへの変換に関与する遺伝子の破壊、グリセロール - 3 - リン酸のジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、グリセロールのグリセロール - 3 - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ジヒドロキシアセトン - リン酸のメチルグリオキサールへの変換に関与する遺伝子の破壊、および

40

b) ジヒドロキシアセトンのジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子 (前記酵素は、補因子として A T P を使用し、副産物として A D P を生成する) 、グリセロール - 3 - リン酸のジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子 (前記酵素は、フマル酸へ還元当量を渡す) 、フマル酸のコハク酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子 (前記酵素は、グリセロール - 3 - リン酸の酸化からの還元当量を受容する) 、ピルビン酸および C O ₂ のオキサロ酢酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子 (前記酵素は、補因子として A T P を

50

使用し、副産物としてA D Pを生成する)、ホスホエノールビルビン酸およびC O₂のオキサロ酢酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子、ホスホエノールビルビン酸およびC O₂のオキサロ酢酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子(前記酵素は、補因子としてA D Pを使用し、副産物としてA T Pを生成する)、または、ビルビン酸およびC O₂のリンゴ酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子(前記酵素は、補因子としてN A D Hを使用する)のうちの1つまたはそれ以上を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記化学製品は、プロピオン酸を含み、前記微生物は、

a) アセチル - C o Aのエタノールへの変換に関与する遺伝子の破壊、アセチル - C o Aのアセチル - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ビルビン酸の酢酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ビルビン酸の乳酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ホスホエノールビルビン酸のオキサロ酢酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ジヒドロキシアセトンのジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ビルビン酸のアセチル - C o Aへの変換に関与する遺伝子の破壊、ホスホエノールビルビン酸のビルビン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、グリセロールのジヒドロキシアセトンへの変換に関与する遺伝子の破壊、グリセロール - 3 - リン酸のジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、グリセロールのグリセロール - 3 - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ジヒドロキシアセトン - リン酸のメチルグリオキサルへの変換に関与する遺伝子の破壊、および

b) ジヒドロキシアセトンのジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子(前記酵素は、補因子としてA T Pを使用し、副産物としてA D Pを生成する)、グリセロール - 3 - リン酸のジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子(前記酵素は、フマル酸へ還元当量を渡す)、フマル酸のコハク酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子(前記酵素は、グリセロール - 3 - リン酸の酸化からの還元当量を受容する)、ビルビン酸およびC O₂のオキサロ酢酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子(前記酵素は、補因子としてA T Pを使用し、副産物としてA D Pを生成する)、ホスホエノールビルビン酸およびC O₂のオキサロ酢酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子、ホスホエノールビルビン酸およびC O₂のオキサロ酢酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子(前記酵素は、補因子としてA D Pを使用し、副産物としてA T Pを生成する)、または、ビルビン酸およびC O₂のリンゴ酸への変換に関与する酵素を発現する外因性遺伝子(前記酵素は、補因子としてN A D Hを使用する)、スクシニル - C o Aをメチルマロニル - C o Aに、メチルマロニル - C o Aをプロピオニル - C o AおよびC O₂に、ならびにプロピオニル - C o Aおよびコハク酸をプロピオン酸およびスクシニル - C o Aに変換する酵素をコードする、外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現のうちの1つまたはそれ以上を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記化学製品は、エタノールを含み、前記微生物は、

a) アセチル - C o Aのアセチル - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ビルビン酸の酢酸への変換に関与する遺伝子の破壊、フマル酸のコハク酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ジヒドロキシアセトンのジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、グリセロールのジヒドロキシアセトンへの変換に関与する遺伝子の破壊、グリセロール - 3 - リン酸のジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、グリセロールのグリセロール - 3 - リン酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ギ酸のC O₂および水素への変換に関与する遺伝子の破壊、ビルビン酸の乳酸への変換に関与する遺伝子の破壊、ジヒドロキシアセトン - リン酸のメチルグリオキサルへの変換に関与する遺伝子の破壊、および

b) グリセロールのジヒドロキシアセトンへの変換に関与する外因性遺伝子、ジヒドロキシアセトンのジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に関与する外因性遺伝子もしくは内

10

20

30

40

50

在性遺伝子の過剰発現、グリセロールのグリセロール - 3 - P への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、またはグリセロール - 3 - P のジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、ピルビン酸のアセトアルデヒドおよび CO_2 への変換に關与する外因性遺伝子、ピルビン酸のアセチル - CoA 、 CO_2 、および NADH への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、ピルビン酸のアセチル - CoA およびギ酸への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、ギ酸の CO_2 および NADH への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記化学製品は、乳酸を含み、前記微生物は、

a) アセチル - CoA のエタノールへの変換に關与する遺伝子の破壊、アセチル - CoA のアセチル - リン酸への変換に關与する遺伝子の破壊、ピルビン酸の酢酸への変換に關与する遺伝子の破壊、フマル酸のコハク酸への変換に關与する遺伝子の破壊、ピルビン酸のアセチル - CoA への変換に關与する遺伝子の破壊、ジヒドロキシアセトン - リン酸のメチルグリオキサルへの変換に關与する遺伝子の破壊、ピルビン酸の D - 乳酸への変換に關与する遺伝子の破壊、および

b) グリセロールのジヒドロキシアセトンへの変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、ジヒドロキシアセトンのジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、グリセロールのグリセロール - 3 - P への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、グリセロール - 3 - P のジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、ピルビン酸の L - 乳酸もしくは D - 乳酸への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記化学製品は、乳酸を含み、前記微生物は、

a) アセチル - CoA のエタノールへの変換に關与する遺伝子の破壊、アセチル - CoA のアセチル - リン酸への変換に關与する遺伝子の破壊、ピルビン酸の酢酸への変換に關与する遺伝子の破壊、フマル酸のコハク酸への変換に關与する遺伝子の破壊、ピルビン酸のアセチル - CoA への変換に關与する遺伝子の破壊、ジヒドロキシアセトン - リン酸のメチルグリオキサルへの変換に關与する遺伝子の破壊、ピルビン酸の D - 乳酸への変換に關与する遺伝子の破壊、および

b) グリセロールのジヒドロキシアセトンへの変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、ジヒドロキシアセトンのジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、グリセロールのグリセロール - 3 - P への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、グリセロール - 3 - P のジヒドロキシアセトン - リン酸への変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現、ピルビン酸のアラニンへの変換に關与する外因性遺伝子もしくは内在性遺伝子の過剰発現のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

a d h E 遺伝子、p t a 遺伝子、p o x B 遺伝子、p p c 遺伝子、または d h K 遺伝子、

外因性シトロバクターフロインディ (*Citrobacter freundii*) d h a K L 遺伝子、および

外因性アクチノバチルスサクシノゲネス (*Actinobacillus succinogenes*) p c k A 遺伝子のうちの 1 つまたはそれ以上の破壊を含む、大腸菌株。

【請求項 1 4】

過剰発現される g l d A 遺伝子または過剰発現される d h a K L M オペロン、

f r d A、f r d B、f r d C、または f r d D 遺伝子のうちの少なくとも 1 つの破壊

10

20

30

40

50

、および

p t a 遺伝子の破壊または p o x B 遺伝子の破壊を含む、大腸菌。

【請求項 15】

過剰発現される g l d A 遺伝子または過剰発現される d h a K L M オペロン、および a d h E 遺伝子、p t a 遺伝子、p o x B 遺伝子；f r d A 遺伝子、f r d B 遺伝子、f r d C 遺伝子、または f r d D 遺伝子のうちの 1 つまたはそれ以上の破壊を含む、大腸菌。

【請求項 16】

代謝産物を生成するための細菌を培養する方法であって、

a . 代謝産物を生成することができる細菌を用いて、供給原料としてグリセロールを含む培養培地を接種するステップと、

b . 前記グリセロールを代謝産物に変換するために前記反応器中で、 $< 20 \text{ mg O}_2 / \text{L} / \text{時}$ の微好気性であるが、好気性あるいは嫌気性でない条件下で、前記細菌を育てるステップであって、グリセロールの代謝産物への変換は、それが生成するよりもさらに還元当量を消費しない、ステップと、を含む、方法。

【請求項 17】

前記細菌は、p t a、f r d A、ならびに過剰発現される g l d A および d h a K L M を含む大腸菌である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記代謝産物は、エタノール、乳酸、コハク酸、プロピオン酸、アラニン、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記代謝産物は、エタノール、乳酸、プロピオン酸、コハク酸、プロピオン酸、アラニン、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2008 年 10 月 28 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 109018 号に対し優先権を主張し、参照することによって本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府によって資金供給された研究に関する記述

本発明は、国立科学財団によって与えられた認可番号 C B E T - 0645188 の下、および米国農務省によって与えられた認可番号 2005 - 35504 - 16698 の下での米国政府の支援によってなされた。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

近年、バイオディーゼルおよびバイオエタノール等のバイオ燃料の生成および使用に著しい増加があり、一般的には、植物油または動物性脂肪およびアルコールを用いるエステル交換によって生成されている。この反応の副産物は、グリセロールであり、現今、バイオ燃料工場で生成された余剰の廃棄グリセロールがある。

【0004】

グリセロールは、処理するのが困難な粘稠液であり、概して、焼却または化学処理によって処分される。しかしながら、このような戦略は、バイオディーゼル燃料を用いる積極的な環境影響を否定する。例えば、グリセロールの焼却は、大気中に汚染物質を放出し得る。グリセロールを処分するよりはむしろ、グリセロールを別の化学的に有用な生成物に処理することがより良好であろう。

【0005】

グリセロールは、生物学的変換である、微生物が、グリセロールをエタノールまたは乳酸等の特定の化学製品に酵素的に変換する処理において原料として使用することができる

10

20

30

40

50

。グリセロールのエタノールまたは他の生成物への変換は、燃料または他の処理のための原料として価値があるため、有益である。

【 0 0 0 6 】

嫌気性発酵および好気性呼吸は、化学工業製品として使用され、グリセロールベースの培養用にこれまで適用されている 2 つの方法である。酸素富化呼吸は、非常に有効な細胞増殖（増殖率および収率）を提供し、二酸化炭素および細胞集団へ高率の炭素源を変換する（下表を参照）。一方、嫌気性発酵は、細胞増殖が不良であるが、高収率でいくつかの発酵生成物（例えば、乳酸、ギ酸、エタノール、プロピオン酸、コハク酸等）の合成をもたらす。

【 0 0 0 7 】

10

【 数 1 】

呼吸対発酵代謝			
変数	嫌気性発酵	嫌気性呼吸	好気性呼吸
増殖率	低い	中間	高い
細胞集団	低い	中間	高い
生成物収率	高い	高い/中間	低い
資本コスト	低い	低い	高い
エネルギー入力	低い	低い	高い

20

【 0 0 0 8 】

しかしながら、酸素富化工程によって化学物質を生成することは、2 つの理由で嫌気性方法を用いるよりもさらに費用がかかる。まず、好気性発酵槽は、単位当たりコスト高であり、規模の利益の減少に伴って、より小規模な発酵槽が必要となるため、構築するにはさらに費用を要する。第 2 に、好気性発酵槽は、酸素の難溶解性により、それらの嫌気性対照物を動作するよりもさらに費用がかかり、これは、同様に、細胞への酸素の適切な供給を確実にするために高エネルギー投入を必要とする。これは、汎用化学物質の生成において、特に関連があり、発酵にかかる費用は、総製造費の 5 0 ~ 9 0 % を示し得る。

【 0 0 0 9 】

30

したがって、嫌気性方法は、通常、可能であれば好ましく、好氣的に細胞を大数に増殖することは典型的であり、次いで、所望の分子の生成のために嫌気性培養にそれらの細胞を切り替える。近年、別の嫌気性方法は、嫌気性条件下で、エタノールおよび他の化学物質にグリセロールを生物学的に発酵するように開発された。この方法は、同時係属の特許文献 1 に記載されており、参照することによって、全ての目的のためにその全体が本明細書に組み込まれる。グリセロールの嫌気性発酵の利点は、所望の最終生成物の収率の増加であるが、不利点は、そのシステムにおいて酸素の欠如と関連する細菌増殖の遅さである。したがって、当技術分野において再度必要とされることは、高収率を得るために原料としてグリセロールを用いて、細菌を培養する、より良好なシステムである。

【 先行技術文献 】

40

【 特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 7 / 1 1 5 2 2 8 号パンフレット

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

低いが、測定可能な酸素を用いて、嫌気性培養の収率を向上するが、「微好気性」と称される、酸化還元バランスを維持するのに十分な、好気性発酵よりも費用がかからない、微好気性条件下で、細菌を増殖する方法を本明細書に提供する。供給原料としてグリセロールを用いて、最終的に、化学量論的に確定された経路において、基質の生成物への変換

50

のための酸化還元バランスが、ゼロ以上であり、基質の一部を用いて、細胞集団を生じるように、低酸素条件下であるが、少量の酸素、または硝酸もしくは亜硝酸等の他の電子受容体を伴って、細菌を増殖する。

【0012】

「微好気性」とは、 $1 \sim 20 \text{ mg O}_2 / \text{L} / \text{時}$ またはその同等物を意味する。好ましくは、 $2 \sim 15 \text{ O}_2 / \text{L} / \text{時}$ 、さらに好ましくは、 $3 \sim 10$ または $5 \text{ mg O}_2 / \text{L} / \text{時}$ を使用する。

【0013】

吸気流量の変化または吸気の組成に加えて、攪拌速度を低下させる（したがって、大量の培養の酸素化を低下させる）ことによって、または細胞密度（故に、より高い酸素必要量）を増加させるためにさらに供給原料を添加することによって、あるいはその組み合わせによって、微好気性条件を生成することもできる。

10

【0014】

「欠失」（「 \quad 」）または「破壊」とは、適切な対照株の活性の10%のみを保持するように、遺伝子またはタンパク質を変化させることを意味する。好ましくは、検出可能な活性は、保持しない。遺伝子は、不活性なタンパク質生成物を産出するために、部分的または完全に欠失する、または終止コドンで中断する、あるいは突然変異し得る。タンパク質はまた、阻害剤を用いて、または発現つまり翻訳等の抑制によって不活性化され得る。

【0015】

「過剰発現」とは、適切な対照株と比較した際、少なくとも150%の活性をもたらすように、遺伝子またはタンパク質を変化させることを意味する。好ましくは、2、5、または10倍の活性の増加を得る。過剰発現は、さらなる活性形態または阻害に耐性を示す形態を得るためにタンパク質を突然変異させることによって、阻害剤を除去することによって、または活性剤等を添加することによって達成することができる。過剰発現はまた、抑制剤を除去する、細胞に遺伝子の複数コピーを添加する、または内在性遺伝子等を上方調節することによって達成することもできる。

20

【0016】

製品を生成するための条件を提供することを含む、微生物における化学製品を生成するための方法を提供し、化学量論的に確定された経路における、基質の生成物への変換のための還元バランスの度合いは、ゼロ以上であり、基質の細胞集団への変換のための還元バランスの度合いは、ゼロを超え、基質の一部を用いて、細胞集団を生じる。加えて、基質の細胞集団への変換の還元バランスの度合いは、ゼロを超える。

30

【0017】

このように生成された化学製品は、乳酸、エタノール、およびコハク酸であり得るが、これらに限定されない。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】本技術に従って、コハク酸、エタノール、乳酸、および酢酸を生成するためのグルコース、キシロース、またはグリセロールの代謝によって産生される還元当量の生成物を例示する。

40

【図2】グリセロール、グリセロールから生成された化学製品、および細胞集団の間の関係、ならびに本技術に従う還元当量の純生成物を例示する。

【図3】本技術に従って、グリセロールからコハク酸を生成するための経路を例示する。

【図4】本技術に従って、グリセロールからエタノールを生成するための経路を例示する。

【図5】本技術に従って、グリセロールから乳酸を生成するための経路を例示する。

【図6A】微好気性条件および嫌気性条件下で、野生型の細菌株におけるグリセロールの発酵を比較するグラフである。

【図6B】微好気性条件下で、野生型の細菌株における溶解酸素、OTR（酸素移動速度の容量）、および細胞増殖（ OD_{550} ）の特性プロファイルを示すグラフである。

50

【図 7】微好気性条件下で、野生型の細菌株におけるグリセロール（黒い棒）、グルコース（白抜きの棒）、およびキシロース（灰色の棒）の発酵の生成物およびバイオマスの収率を比較する棒グラフである。データはまた、「酸素収率」も示し、特異的な基質の代謝において消費された酸素の量を示す。

【図 8 A】エタノールおよびギ酸の副産物用に改変された、株 S Y 0 4 [p Z S K L M g l d A] における、微好気性条件下（即ち、 p t a、 f r d A、 f d h F、 g l d A +、 d h a K L M + ）で、グリセロールからのエタノール、ギ酸、および有機酸の生成を比較するグラフである。

【図 8 B】エタノールおよび水素の副産物用に改変された、変異株 E H 0 5 (p Z S K L M g l d A) (即ち、 p t a、 f r d A、 l d h A、 g l d A +、 d h a K L M +) における、微好気性条件下で、グリセロールからのエタノール、ギ酸、およびコハク酸の生成を比較するグラフである。

【図 9 A】野生型 M G 1 6 5 5 および微好気性条件下で D - 乳酸の生成用に改変された、株 L A 0 1 (p Z S g l p K g l p D) (即ち、 p f l B、 f r d A、 g l p K +、 g l p D +) における、グリセロールの発酵の生成収率を比較する棒グラフである。

【図 9 B】野生型 M G 1 6 5 5 および微好気性条件下で L - 乳酸の生成用に改変された、株 L A 2 0 (p Z S g l p K g l p D) (即ち、 f r d A p t a a d h E m g s A l d h z A (l d h b o v i s)、 g l p K +、 g l p D +) における、グリセロールの発酵の生成物の濃度を比較する棒グラフである。

【図 9 C】野生型 M G 1 6 5 5 および微好気性条件下でコハク酸の生成用に改変された、株 S A 2 4 (p Z S p y c) (即ち、 a d h E p t a p o x B p p c、 p y c +) における、グリセロールの発酵の生成物の濃度を比較する棒グラフである。

【図 1 0】本技術に従って、例示的な変異誘発の微生物における、グリセロールからコハク酸の生成用に改変された、経路を例示する。

【図 1 1】本技術に従って、例示的な変異誘発の微生物における、グリセロールからエタノールの生成用に改変された、経路を例示する。

【図 1 2】本技術に従って、例示的な変異誘発の微生物における、グリセロールから乳酸の生成用に改変された、経路を例示する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 9 】

ある炭素源からの微生物細胞集団の合成は、有用な化学製品を生成するための適切な条件下で、利用され得る。グリセロール等のバイオマスよりもさらに還元される炭素源から細胞集団の微生物合成は、還元当量の純産生を生じる代謝工程である。実質的には、電子受容体を使用できない反応条件下で（例えば、微呼吸または微好気性条件下で）、供給原料の一部の還元生成物への変換は、反応物が酸化還元バランスを維持することを可能にする。還元生成物へのこの変換の活性は、炭素源からの細胞集団の合成において生じる過剰還元当量を消費することによって得られる酸化還元バランスを促進する。多くの例において、酸化還元バランスシステムは、微生物の増殖の増加を可能にし、同様に、反応物が所望の化学製品の増加量の生成を可能にする。

【 0 0 2 0 】

本技術は、炭素源の細胞バイオマスへの取り込みによって課せられた酸化還元拘束を解除し得、代謝工程は、炭素源が、バイオマスよりもさらに還元される場合、還元当量の産生をもたらす。例えば、微好気性条件下で利用可能な低レベルの酸素は、過剰の還元当量のシンクとしての機能を果たし得、ひいては、酸化還元バランスを改善し、さらに大きな画分のグリセロールを細胞集団に取り込み、さらなる A T P を産生する。本文脈において、「バイオマス」または「細胞集団」という用語は、既定の細胞培養、即ち、培地中で増殖する、つまり、活発に増殖している、あらゆる生物または生細胞の量に関する。一般に、細胞培養の細胞集団の収率は、培養培地の 1 リットル当たりで得られた細胞集団のグラムで測定され得る。

【 0 0 2 1 】

本技術は、どの好適な生成物の生成にも有用であり得ることが想定され、炭素源の化学製品への変換のための還元バランスの度合いが、ゼロ以上である、即ち、グリセロールの化学製品への変換は、それが生成するほど還元当量を消費しない。このような生成物は、アルコール、アルコール誘導体、糖アルコール（例えば、エタノール、プロパノール、ブタノール、ブタンジオール、アラビトール、キシリトール）、有機酸（例えば、ギ酸、コハク酸、プロピオン酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、プロピオン酸、ピルビン酸）、アミノ酸（例えば、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸）、またはラクトン（例えば、ガンマ - ブチロラクトン、カプロラクトン / ラクトン）を含み得る。

【 0 0 2 2 】

【表 1】

表 1 : グリセロールの細胞集団および選択された生成物への変換のための酸化還元バランスの分析。全ての場合において、生成物は、酸化還元中性経路または酸化還元を生じる経路を通して合成される。

経路	化学量論 ^a (κ^b)	$\Delta\kappa^c$ (H ^d)
グリセロール→細胞集団	$C_3H_8O_3(14/3) \rightarrow 3CH_{1.9}O_{0.5}N_{0.2}(4.3)^e$	1.1 (0.55H)
グリセロール→エタノール+ギ酸 ^f	$C_3H_8O_3(14/3) \rightarrow C_2H_6O(6) + CH_2O_2(2)$	0 (0H)
グリセロール→コハク酸	$C_3H_8O_3(14/3) + CO_2(0) \rightarrow C_4H_6O_4(14/4)$	0 (0H)
グリセロール→プロピオン酸	$C_3H_8O_3(14/3) \rightarrow C_3H_6O_2(14/3)$	0 (0H)
グリセロール→乳酸	$C_3H_8O_3(14/3) \rightarrow C_3H_6O_3(12/3)$	2 (1H)
グリセロール→アラニン	$C_3H_8O_3(14/3) \rightarrow C_3H_7NO_2(12/3)$	2 (1H)

^a経路の化学量論は、反応物と生成物の炭素バランスのみ計上する。^b炭素当たりの還元度Kは、他の箇所に記載されるように推定された (Nielsen, J., J. Villadsen, and G. Liden. 2003. Bioreaction engineering principles, p. 60–73. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York)。

^c還元バランス ($\Delta\kappa$) の度合いは、以下のように推定される。

$$\sum_i v_i c_i \kappa_i - \sum_j v_j c_j \kappa_j$$

i 反応物 j 生成物

式中、 v および c はそれぞれ、それぞれの化合物の化学量論の係数、および炭素原子数である。

^d純酸化還元ユニットHは、1モルグリセロール当たりで示す。

($H \equiv NAD(P)H = FADH_2 = "H_2"$)。

^e細胞集団の式は、細菌、酵母菌、および菌類を含む、異なる微生物に対して報告される平均である (Nielsen et al., 2003)。グリセロールの細胞集団への変換は、1-C代謝産物としての炭素損失を無視する。その結果、この場合、酸化還元バランスの度合いは、生じた酸化還元ユニットの最小量を示す。

^fグリセロールをエタノールに、およびグリセロールを $H_2 - CO_2$ に変換することを考慮することによって、同様の結果が得られる。

【 0 0 2 3 】

【表 2】

表 2 : グリセロールの細胞集団および選択された発酵生成物への変換に対する酸化還元バランスの分析

経路	化学量論 ^a (κ^b)	$\Delta\kappa^c$ (H ^d)
グリセロール→細胞集団	$C_3H_8O_3$ (14/3) \rightarrow $3CH_{1.9}O_{0.5}N_{0.2}$ (4.3) ^e	1.1 (0.55H)
グリセロール→1,2-PDO	$C_3H_8O_3$ (14/3) \rightarrow $C_3H_8O_2$ (16/3)	-2 (-1H)
グリセロール→1,3-PDO	$C_3H_8O_3$ (14/3) \rightarrow $C_3H_8O_2$ (16/3)	-2 (-1H)

a ~ f は上記と同様

10

【 0 0 2 4 】

【表 3】

表 3 : 糖の細胞集団および選択された発酵生成物への変換に対する酸化還元バランスの分析。細胞集団の合成は、還元当量(即ち、 $\Delta\kappa < 0$)の純消費を生じさせる。生成物は、還元当量(即ち、 $\Delta\kappa < 0$)または中性の経路(即ち、 $\Delta\kappa = 0$)のいずれかの純消費をもたらす経路を通して合成される。このような場合において酸化還元バランスは、電子受容体の不在下で、達成することができる。

経路	化学量論 ^a (κ^b)	$\Delta\kappa^c$ (H ^d)
グルコース→細胞集団	$C_6H_{12}O_6$ (4) \rightarrow $6CH_{1.9}O_{0.5}N_{0.2}$ (4.3) ^e	-1.8 (-0.9H)
グルコース→エタノール+ギ酸 ^f	$C_6H_{12}O_6$ (4) \rightarrow $2C_2H_6O$ (6) + $2CH_2O_2$ (2)	-4 (-4H)
グルコース→エタノール+CO ₂ ^f	$C_6H_{12}O_6$ (4) \rightarrow $2C_2H_6O$ (6) + $2CO_2$ (0)	0 (0H)
グルコース→コハク酸	$C_6H_{12}O_6$ (4) + $2CO_2$ (0) \rightarrow $2C_4H_6O_4$ (14/4)	-4 (-2H)
グルコース→プロピオン酸	$C_6H_{12}O_6$ (4) \rightarrow $2C_2H_6O_2$ (14/3)	-4 (-2H)
グルコース→乳酸	$C_6H_{12}O_6$ (4) \rightarrow $2C_2H_6O_3$ (12/3)	0 (1H)
グルコース→アラニン	$C_6H_{12}O_6$ (4) \rightarrow $2C_3H_7NO_2$ (12/3)	0 (1H)

a ~ e は上記と同様。

20

^f 2つの代替経路は、グルコースのエタノールへの変換を示し、エタノールと一緒に合成される副産物(二酸化炭素またはギ酸)および全体の酸化還元バランス(酸化還元消費または酸化還元中性)の点で異なる。

【 0 0 2 5 】

本技術は、グリセロール等の還元炭素源の嫌気性発酵およびグリセロールから化学製品の製造中に作製された副産物と関連する不利点に対処する。嫌気性条件下で、グリセロールの細胞集団への変換により、還元当量の純益が得られる(表 1)。グリセロールのコハク酸または乳酸への変換は、例えば、グリセロールの細胞集団への変換によって生じた過剰の還元当量を消費せず、グリセロールを乳酸に変換する場合に、酸化還元バランスは、2つの還元当量の純益によって、さらに混乱される。この酸化還元電位のアンバランスは、グリセロールからの化学的副産物の 1, 3 - プロパンジオール(1, 3 - PDO)を通して改善され、2つの還元当量の純消費が得られる。しかしながら、グリセロールの 1, 3 - PDO への変換は、酸化還元バランスの取れた条件を促進することによって細胞増殖を可能にする一方、生成物の混合物から所望の標的化学品の有効な分離を妨害し得る望ましくない副産物も作製する。本明細書に提供される本技術は、グリセロールの細胞集団へ

40

50

の取り込みによって生じる過剰な還元当量を消費する電子受容体の量を制限する使用を通して、望ましくない副産物の生成を削減もしくは排除し、および製品の収率の増加を可能にする。

【0026】

提案されている戦略を、図3、4、および5に例示し、これらは、グリセロールからコハク酸、またはエタノールおよびギ酸（エタノールおよび H_2 に変換される）、または乳酸の生成を図式的に示す。グリセロールを用いる利点は、グルコース等の他の糖類の生成物の合成を考慮する場合、グルコース、キシロース、または同様の糖類の使用が、理論的収率を明らかに制限する還元当量の不足をもたらすため、明白である。それ故に、グリセロールからのコハク酸の理論的最大収率は、グルコース等の糖類からのものよりも少なくとも15%高い。加えて、糖類からのエタノールの合成は、グルコースまたはキシロースが炭素源として使用されるか否かにかかわらず、理論的最大収率の約51% w/wが得られる。したがって、炭素源としてグリセロールの使用は、コハク酸およびエタノール等の生成物の収率の増加を提供する。しかしながら、ある実施形態において、反応のための原料として他の還元炭素源を使用することは有用であり得る。

【0027】

図6、図7、図8、および図9に示されるように、グリセロールは、野生型大腸菌によって、エタノール、乳酸、コハク酸を生成するために使用され得る。微好気性条件下で、野生型大腸菌株MG1655によるグリセロールの利用は、酢酸の量を、増加させたが、主要生成物として、還元化合物のエタノールおよびコハク酸の合成を生じた（図6および図7）。さらに、嫌気性条件下でのコハク酸生成物と比較した場合、より高濃度のコハク酸が、微好気性条件下で、得られ（図6）、生産収率が向上した（図7）。生産性に関して、10g/Lのグリセロールは、微好気性条件下で、約60時間で、MG1655野生株によって完全に消費され、これは、コハク酸の嫌気性生産に対して、コハク酸の微好気性生産の生産性の約2倍の増加に相当する。

【0028】

加えて、突然変異した細菌株は、生成物の合成が、還元当量の純産生または消費を生じない生成物を生成する能力について評価された。グリセロールのこれらの生成物への変換に関与する経路の還元分析の度合いは、還元バランスの度合いの $\Delta = 0$ を得る。例えば、エタノールの生成（副産物のギ酸または水素と一緒に）は、このカテゴリーの生成物の1つである。組み換え株SY03（pZSKLMgldA = pta、frdA、+gldA、+dhakLM）、酢酸（pta）、およびコハク酸（frdA）の合成を低減する突然変異体を含む大腸菌株MG1655の誘導体、ならびに酵素のグリセロールデヒドロゲナーゼ（gldA）およびジヒドロキシアセトンキナーゼ（dhakLM）の過剰発現の評価は、エタノールが、理論的に近い最大収率で、主要な発酵生成物として生成されたことを示した（図8A）。エタノールの収率は、利用したグリセロールの0.96モル/モルであり、利用したグリセロールおよびエタノール合成の容積生産性はそれぞれ、4.65モル/L/時および4.61モル/L/時であった（図8B）。実現された高生産性は、嫌気性条件の使用で得られたものと比較して、微好気性条件下で、細胞濃度および比速度がともに高い結果であった。使用された微好気性条件は、5mg O_2 /L/時の酸素移動速度の容積によって特徴付けられた。

【0029】

本技術に従って、微好気性条件下で生じ得る別の群の生成物は、グリセロールまたは他の還元炭素源からの合成により、還元当量（ $\Delta > 0$ ）の純産生を生じる、乳酸等のものである。このアプローチの実行可能性は、図9A、9B、および9Cに例示され、適当な微好気性条件と特定の遺伝子操作の組み合わせによって、乳酸およびコハク酸の生産の増加を示す。これらの実験に使用された微好気性条件は、20mg O_2 /L/時の酸素移動速度の容積によって特徴付けられた。

【実施例】

【0030】

10

20

30

40

50

実施例 1：微生物

アスペルギルス属、サッカロミセス属、チゴサッカロミセス属、ピチア属、クリベロミセス属、カンジダ属、ハンゼヌラ属、ドナリエラ属 (*Dunaliella*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、ムコール属、トリロプシス属 (*Torylopsis*)、バシラス属、パエニバシラス属、およびエシェリキア属のメンバーを含む、適切な微生物菌株のどの微生物菌株も、本技術を用いて使用され得ることが想定される。微生物合成工程のための好適な微生物菌株は、対象となる還元した化学化合物を生成することができるいずれの野生型株であり得る。加えて、好適な微生物菌株は、対象となる親株に古典的な突然変異処理または組み換え DNA 技術を実施することによって、採取、および / または改善され得る。さらに、このような株は、その後、代謝進化の順次選択工程に供され得、子孫株は、所望の反応条件下で、改善された性能について評価される。例えば、このような株は、高性能生体触媒に基づいて選択され得る。子孫株の改善された性能のマーカーは、グリセロール供給原料からの所望の化学製品の製造つまり産出を増加し得る。一実施形態において、代謝進化は、酸素、硝酸、亜硝酸、または他の電子受容体の減量の存在下で実行される。

10

【0031】

所望の化学製品の製造に正に影響を及ぼし得る遺伝子は、好適な宿主において発現し得る。例えば、野生型細胞において、現在、見出されるものよりもさらに高いレベルで、グリセロールからジヒドロキシアセトンへの経路および / または他の経路で、ある酵素を過剰に発現することは、非常に望ましいものであり得る。図 8 A および B、ならびに図 9 A、9 B、および 9 C に示されるように、競合経路に関与する酵素の阻害と組み合わせて、好適な微生物宿主における *gldA* の過剰発現は、コハク酸、エタノール、または乳酸の生成物を増加し得る。

20

【0032】

1 つまたはそれ以上の外因性ポリヌクレオチドコード配列、即ち、天然ではない、または内因性でない遺伝子配列を、宿主生物に発現するために遺伝的に改変されている組み換え生物はまた、本発明にも使用することができる。所望の遺伝子の過剰発現は、これらの酵素をコードする遺伝子を多コピープラスミドに選択的にクローニングすることによって、またはこれらの遺伝子を強力な誘導もしくは構成的プロモーターの下に置くことによって達成され得る。所望のタンパク質を過剰発現するための方法は、一般的であり、分子生物学の技術分野において公知である。表 4 に提供されるどの遺伝子も、微生物菌株において過剰発現され得ることが想定される。

30

【0033】

【表 4 - 1】

表 4：還元した化学化合物の生成に關与する遺伝子

タンパク質	遺伝子	GenBank アクセシ ョン番号	
グリセロールデヒドロゲナーゼ	gldA	ECK3937	
ジヒドロキシアセトンキナーゼサブユニット K	dhaK	ECK1186	10
ジヒドロキシアセトンキナーゼサブユニット L	dhaL	ECK1187	
ジヒドロキシアセトンキナーゼサブユニット M	dhaM	ECK1188	
グリセロールキナーゼ	glpK	ECK3918	
グリセロール-3-P デヒドロゲナーゼサブユニット A	glpA	ECK2233	
グリセロール-3-P デヒドロゲナーゼサブユニット B	glpB	ECK2234	
グリセロール-3-P デヒドロゲナーゼサブユニット C	glpC	ECK2235	
グリセロール-3-P デヒドロゲナーゼサブユニット D	glpD	ECK3412	
ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ	pckA	ECK3390	20
ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ	ppc	ECK3947	
ギ酸水素リアーゼ	fdhF	ECK4072	
ギ酸水素リアーゼサブユニット	hycC	ECK2718	
ギ酸水素リアーゼサブユニット	hycD	ECK2717	
乳酸デヒドロゲナーゼ	ldhA	ECK1377	
アルコールデヒドロゲナーゼ	adhE	ECK1235	
アルコールデヒドロゲナーゼ突然変異体(電子受容 体の存在下で活性がある突然変異体)	adhE*	ECK1235	30
グリセロールデヒドラターゼ(グリセロールをヒド ロキシアセトンまたは 3-ヒドロキシプロピオンアル デヒドに変換することができる)	dhaB(肺炎桿菌に 由来)	EF634063	
ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ	pckA(アクチノバ	Asuc_0221	

【 0 0 3 4 】

【表 4 - 2】

	シラスサクシノゲ ネスに由来)	
ジヒドロキシアセトンキナーゼサブユニット KL	dhaKL(シトロバ クターフロインデ イイに由来)	DQ473522
ピルビン酸カルボキシラーゼ	pyc(ラクトバシラ スラクティスに由 来)	AF068759
ピルビン酸カルボキシラーゼ	pyc(リゾビウムエ トリに由来)	U51439
ピルビン酸デカルボキシラーゼ	pdc(ザイモモナス モビリスに由来)	
ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ リンゴ酸酵素	pckA(大腸菌) maeA および maeB(大腸菌)	
メチルマロニル-CoA ムターゼ	scpA(大腸菌)	20
メチルマロニル-CoA デカルボキシラーゼ	scpB(大腸菌)	
プロピオニル-CoA:コハク酸 CoA トランスフェラー ゼ	scpC(大腸菌)	
メチルマロニル-CoA ムターゼと相互作用する GTP アーゼ	argK(大腸菌)	
ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の E1p 成分のサ ブユニット	aceE(大腸菌)	
リポ酸アセチルトランスフェラーゼ/ジヒドロリポ 酸アミドアセチルトランスフェラーゼ、ピルビン酸 デヒドロゲナーゼ多酵素複合体のサブユニット	aceF(大腸菌)	30
E3 モノマー、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ多酵素複 合体のサブユニット	lpdA(大腸菌)	
フマル酸レダクターゼ	frdABCD(大腸菌)	
ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ	ppc(大腸菌)	

【0035】

例示された細胞に加えて、本方法は、所望の最終生成物の生成を強化するために特別に設計された単一または多重突然変異を有する細胞を使用することができるであろうことが企図される。非生産的経路に炭素原料を通常流用する、または著しい異化代謝産物抑制を示す細胞は、突然変異させ、これらの表現型の欠如を回避することができた。例えば、多くの野生型細胞は、培地中のグルコースおよび副産物から異化代謝産物抑制を受け、これらの野生型生物の突然変異株が、本技術のある実施形態において、特に有用であり得ることが企図される。特に、表 5 中のどの遺伝子も、本技術で用いる微生物において、単独で、あるいは他の遺伝子と組み合わせて、突然変異されることが想定される。本明細書に定義されるように、表示された遺伝子を欠如する微生物は、その遺伝子が不活性化されている（その遺伝子のノックアウト）と考えられる。

【0036】

【表 5 - 1】

表 5 : 副産物経路に関する遺伝子

タンパク質	遺伝子	GenBank アクセッション 番号	
フマル酸レダクターゼ(サブユニット A～D)	frd	ECK4147-ECK4150	
乳酸デヒドロゲナーゼ	ldhA	ECK1377	10
D-乳酸デヒドロゲナーゼ、膜結合型	dld	ECK2126	
L-乳酸デヒドロゲナーゼ、膜結合型	lldD	ECK3595	
メチルグリオキサリシンターゼ	mgsA	ECK0954	
グリオキサラーゼ I	gloA	ECK1647	
グリオキサラーゼ II	gloB、gloC	ECK0212	
アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼサブユニット	aldA	ECK1408	20
アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼサブユニット	aldB	ECK3577	
リン酸アセチルトランスフェラーゼ	pta	ECK2291	
酢酸キナーゼ	ackA	ECK2290	
アルコールデヒドロゲナーゼ	adhE	ECK1235	
エタノールデヒドロゲナーゼ	adhP	ECK1472	
ピルビン酸ギ酸リアーゼ	pflB	ECK0894	30
ピルビン酸オキシダーゼ	poxB	ECK0862	
ピルビン酸デヒドロゲナーゼ	aceE、aceF、 lpdA	ECK0113-ECK0115	
亜硝酸レダクターゼ nrf オペロン	nrf	ECK4063-ECK4069	

【 0 0 3 7 】

【表 5 - 2】

	ABCDEFGG		
亜硝酸レダクターゼ nap オペロン	nap	ECK2194-ECK2200	
	CBHGADF		
亜硝酸/硝酸輸送体サブユニット ABD	nir	ECK3353-ECK3355	
硝酸/亜硝酸調節タンパク質	nar	ECK1215-ECK1221	
	LXKGHJI		10
ギ酸デヒドロゲナーゼ	fdnG	ECK1468	
ギ酸デヒドロゲナーゼ	fdoG	ECK3887	
ギ酸デヒドロゲナーゼ	fdhF	ECK4072	
トリオースリン酸イソメラーゼ	tpiA	ECK3911	
フマル酸レダクターゼ	fumA 、	ECK1607	
	fumB、fumC		
フマル酸レダクターゼ	fumA 、	ECK4115	
	fumB、fumC		20
フマル酸レダクターゼ	fumA 、	ECK1606	
	fumB、fumC		
F0F1-ATPase	atpF、atpD	ECK3729	
F0F1-ATPase	atpF、atpD	ECK3725	
ホスホエノールピルビン酸シンターゼ	pps	ECK1700	
ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ	pckA	ECK3390	
ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ	ppc	ECK3947	30
リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	mdh	ECK3225	

【 0 0 3 8 】

例えば、上述のように、図 10 は、本技術に従って、グリセロールからコハク酸またはプロピオン酸の生成の概略経路を示す。このような実施形態において、アセチル - C o A をエタノールに変換するための経路に關与する 1 つまたはそれ以上の遺伝子が、それらの遺伝子の触媒作用が還元されるようないくつかの方法において、突然変異または阻害される、生物を提供することは有利であり得る。特定の実施形態において、好適な微生物は、a d h E 遺伝子の突然変異を含み得る。さらなる突然変異は、酢酸形成に關与する p t a 、 a c k A、または p o x B 遺伝子、ホスホエノールピルビン酸のオキサロ酢酸への変換に關与する p p c 遺伝子、グリセロールのグリセロール - 3 - P を経るジヒドロキシアセトンリン酸への変換に關与する g l p A B C オペロン、g l p D、もしくは g l p K、またはジヒドロキシアセトンのジヒドロキシアセトンリン酸への変換に關与する d h a K L M の突然変異に關与し得る。これらの突然変異またはそれらの組み合わせは、大腸菌に由来する g l d A および他の生物に由来する類似の遺伝子、シトロバクターフロインディイに由来する d h a K L c、アクチノバシラスサクシノゲネスに由来する p e p c k、またはリゾビウムエトリに由来する p y c が挙げられるが、これらに限定されない、内因性または異種遺伝子のいずれか一方の遺伝子の過剰発現と組み合わせ得る。

【 0 0 3 9 】

別の実施形態において、図 1 1 に示されるように、グリセロールからのエタノールの生成は、酢酸およびコハク酸の副産物を生成する競合経路の阻害を通して増加し得る。これらの突然変異は、酢酸形成に関与する *p t a*、*a c k A*、または *p o x B* 遺伝子、コハク酸形成に関与する *f r d A B C D* オペロン、グリセロールのジヒドロキシアセトンリン酸への変換に関与する、*g l p A B C* オペロン、*g l p D*、もしくは *g l p K* の突然変異に関与し得る。これらの突然変異またはそれらの組み合わせは、大腸菌に由来する *g l d A* および他の生物に由来する類似の遺伝子、またはシトロバクターフロインディイに由来する *d h a K L c* が挙げられるが、これらに限定されない、内因性または異種遺伝子のいずれか一方の遺伝子の過剰発現と組み合わせ得る。

【 0 0 4 0 】

さらなる実施形態において、図 1 2 に示されるように、グリセロールからの乳酸の生成は、酢酸、コハク酸、およびエタノールの副産物を生成する競合経路の阻害を通して増加し得る。これらの突然変異は、酢酸形成に関与する *p t a*、*a c k A*、または *p o x B* 遺伝子、コハク酸産生に関与する *f r d A B C D* オペロン、エタノール形成に関与する *a d h E* 遺伝子の突然変異に関与し得る。さらに、遺伝子変化は、グリセロールのジヒドロキシアセトンリン酸への変換に関与する、*g l p A B C* オペロン、*g l p D*、または *g l p K* の過剰発現に関与し得る。

【 0 0 4 1 】

変異体を作製する方法は、一般的であり、当技術分野において公知である。例えば、野生型細胞は、放射線または化学的突然変異誘発物質等の様々な薬剤に曝され、次いで、所望の表現型を求めてスクリーニングされる。放射線または化学剤を用いて変異体を作製するための特定の方法は、当技術分野において十分に立証されている。突然変異誘発が生じた後、所望の表現型を有する変異体は、様々な方法によって選択され得る。ランダムスクリーニングが、最も一般的であり、突然変異を起こした細胞が、所望の生成物を生成する能力に対して選択される。代替として、変異体の選択的単離は、抵抗性コロニーのみが生育できる選択的培地上に突然変異を起こした集団を増殖させることによって実施することができる。一実施形態において、細胞は、代謝進化のために選択する前、またはその間に、突然変異が誘発される可能性がある。組み換え技術による標的突然変異誘発はまた、別個に、またはランダム変異誘発技術と併用して採用され得る。

【 0 0 4 2 】

実施例 2 : 培地および増殖条件

一部の細菌は、3 5、3 7、3 9、または 4 1 で、最適な温度を有するが、典型的に、細胞は、3 7 において適切な培地中で増殖される。本技術による好ましい増殖培地は、最少培地または最少塩培地を含み得る。例えば、好適な培地は、4 - モルホリノプロパンスルホン酸培地 (M O P S) を含み得る。ある実施形態において、培地中のリン酸塩は、ナトリウム塩と置き換えてもよい。グリセロール供給原料は、任意の好適な量で提供され得る。例えば、グリセロールは、1 0 g / L で提供され得る。

【 0 0 4 3 】

発酵に好適な pH は、p H 5 . 0 ~ 9 . 0 の範囲であり得る。アルカリ性 pH は、ある生成物の収率向上に適し得る一方、酸性 pH は、他の生成物の収率向上に適し得ることが想定される。例えば、酸性 pH は、エタノールおよび水素の生成を促進し得る一方、アルカリ性 pH は、エタノールおよびギ酸の生成を促進し得る。

【 0 0 4 4 】

発酵は、あらゆる好適な微好気性または微呼吸発酵システムにおいて実行され得る。大気、酸素、および / または窒素は、病原菌の増殖率が、対数期に近づくにつれ、実質的には、培養液中で検出可能な電子受容体がないように、好適な量、かつ好適な速度で、提供され得ることが想定される。

【 0 0 4 5 】

本工程は、バッチ発酵法を採用し得る。本明細書で使用されるように、「発酵」とは、グリセロールからの還元化学製品の製造に適している微好気性または微呼吸条件下で、微

10

20

30

40

50

生物の増殖を指し得る。古典的なバッチ発酵は、閉鎖システムであり得、そこでは、培地の組成が発酵の最初に設定され、発酵中に人為的变化を受けない。したがって、発酵の開始時に培地は、所望の生物を接種し、システムには何も添加しないで発酵を起こさせる。しかしながら、典型的には、「バッチ」発酵は、炭素源の添加に関するバッチであり、pHおよび酸素濃度等の因子の調節がなされることが多い。バッチシステムでは、システムの代謝産物およびバイオマス組成物は、発酵が停止する時点まで常に変化する。バッチ培養内で細胞は、静的な遅滞期から高い対数増殖期へ、そして最終的に成長率が減退または停止する静止期へと進む。

【0046】

連続発酵工程はまた、本発明にも適しており、発酵の進行と共に基質が段階的に添加されること以外は、典型的なバッチシステムを含む。流加バッチ戦略は、例えば、有利であり得る。流加バッチ発酵は、開放システムであり、発酵開始時に確定された発酵培地を添加し、所望の生物を接種し、発酵を起こさせる。バッチ発酵において、pHまたは酸素濃度に一般的になされる調節に加えて、例えば、流加バッチ発酵は、発酵工程中、発酵反応からの培養培地の除去がほとんどない、または全くない、炭素源およびあらゆる追加の栄養制限剤の周期的または連続添加を含む。

【0047】

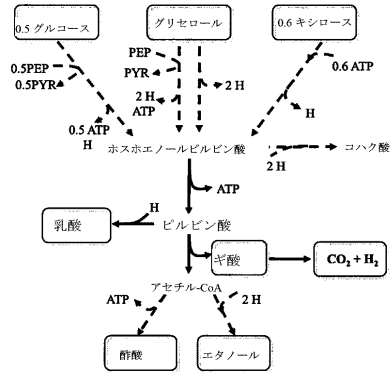
本技術はまた、持続的な発酵方法に適応し得ることも企図される。持続的な発酵は、開放システムであり、定義された発酵培地は、持続的に生物反応器に添加され、等量の条件付きの培地が、工程のために同時に除去される。持続的な発酵は、概して、細胞が主に対数増殖期にある培養を一定の高密度で維持する。持続的な発酵は、細胞増殖または最終生成物濃度に影響を及ぼす、1つの因子またはいくつもの因子のモジュレーションを可能にする。バッチ、流加バッチ、または持続的な工程のいずれかをを用いて、本発明を実施すること、およびあらゆる既知の発酵様式が適することが企図される。さらに、細胞を、全細胞触媒として基質上に固定化し、グリセロールから還元した生成物の生成の発酵条件に曝し得ることが企図される。

【0048】

本発明は、様々な修正および代替形態に影響を受けやすい一方、特定の実施形態は、図中の例によって示され、本明細書に詳細に記載されている。しかしながら、本発明は、開示される特定の形態に制限されることを意図しないことを理解すべきである。むしろ、本発明は、以下の添付の特許請求によって定義される本発明の趣旨および範囲内にある全ての修正、同等物、および代替物を網羅するものとする。

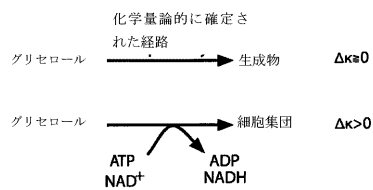
【図 1】

【図 1】



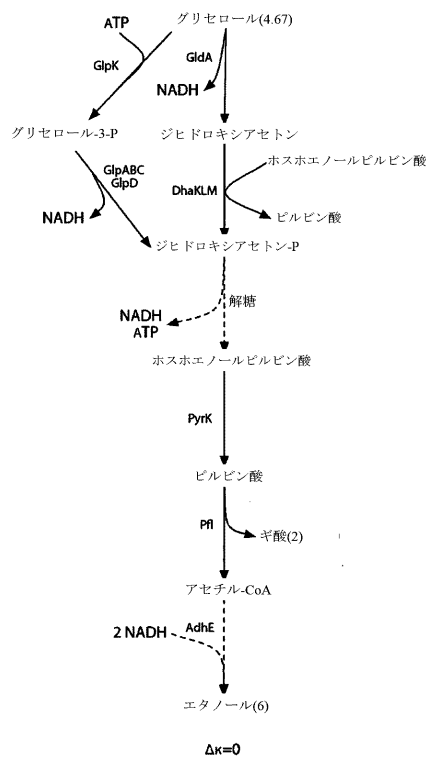
【図 2】

【図 2】



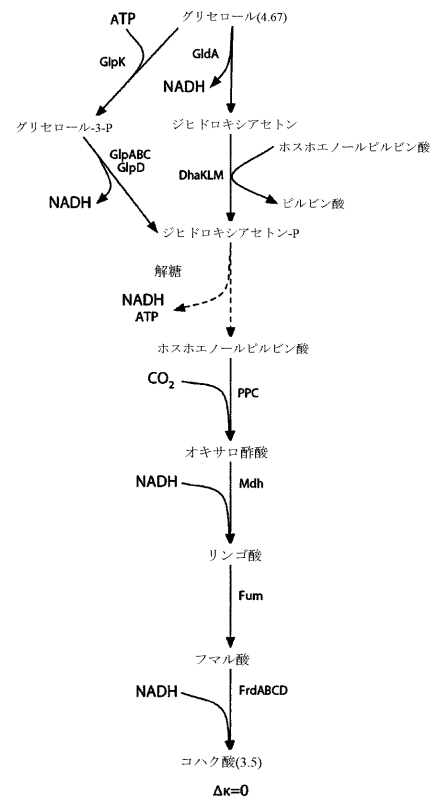
【図 4】

【図 4】



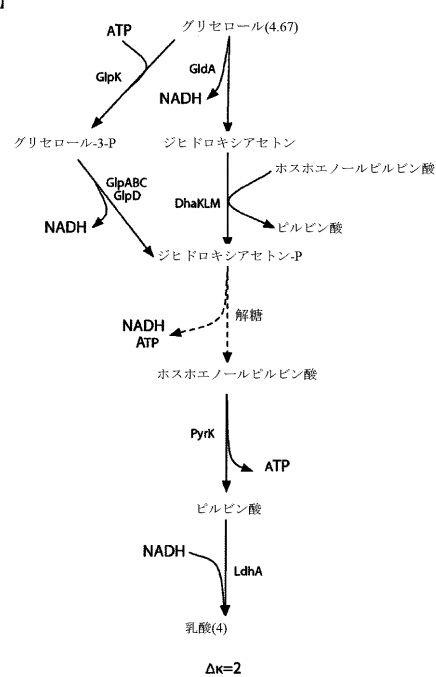
【図 3】

【図 3】



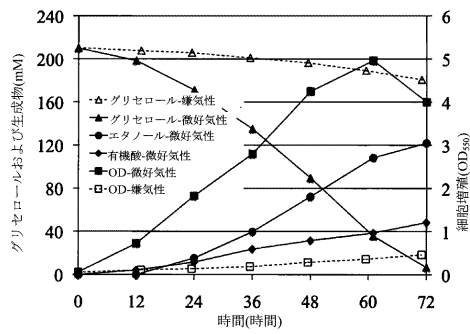
【図 5】

【図 5】



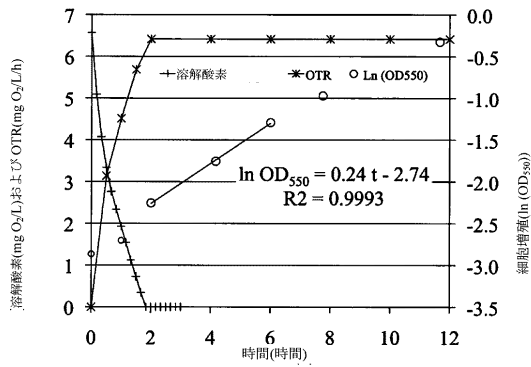
【図 6 A】

【図 6 A】



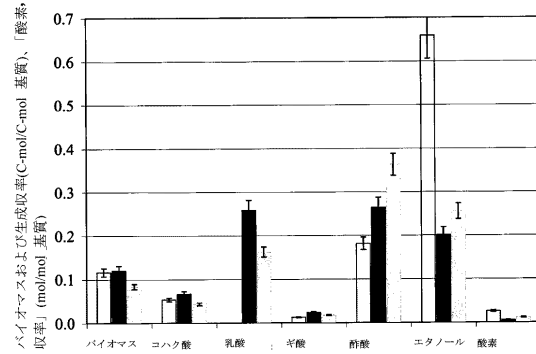
【図 6 B】

【図 6 B】



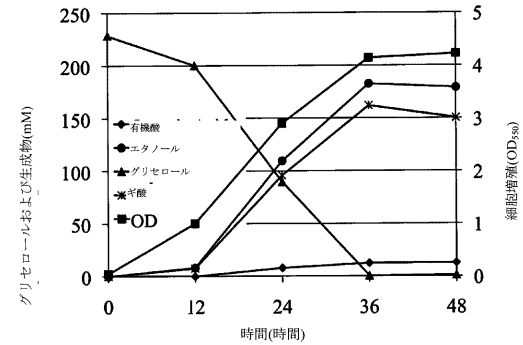
【図 7】

【図 7】



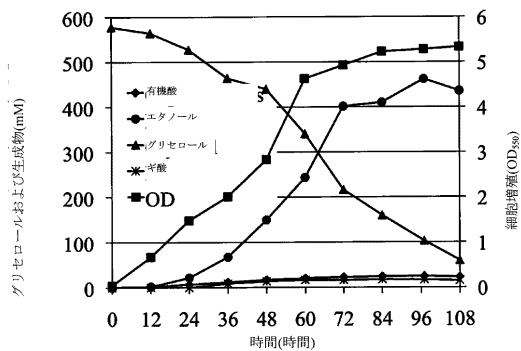
【図 8 A】

【図 8 A】



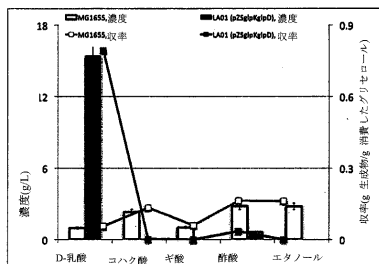
【図 8 B】

【図 8 B】



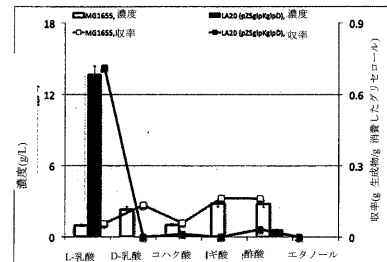
【図 9 A】

【図 9 A】



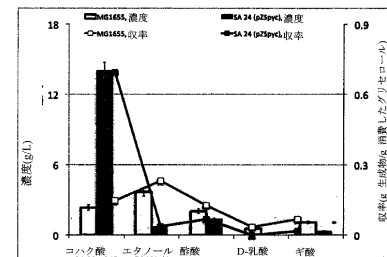
【図 9 B】

【図 9 B】

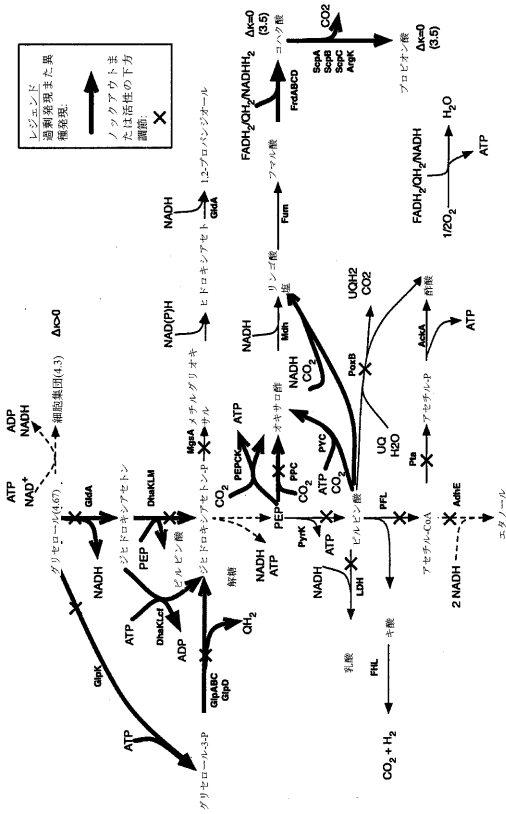


【図 9 C】

【図 9 C】

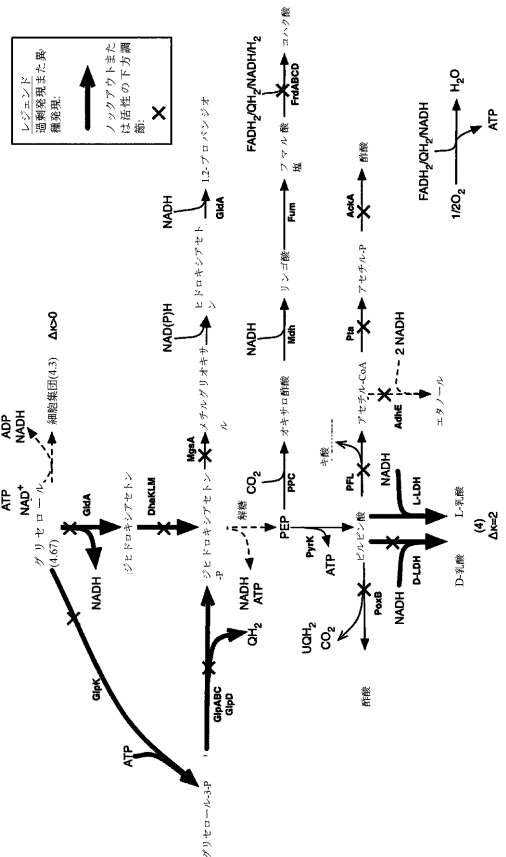


【図 10】



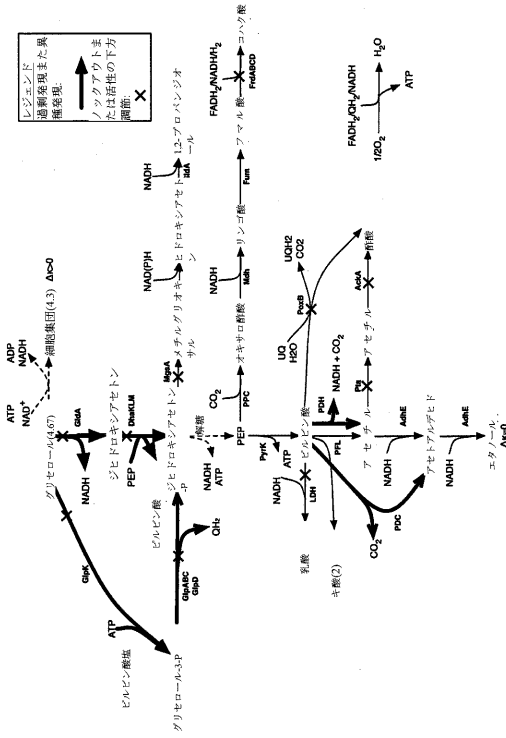
【図 10】

【図 12】



【図 12】

【図 11】



【図 11】

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/62440												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12P 7/20 (2009.01) USPC - 435/159 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) USPC: 435/159 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/7.32; 435/7.37; 435/190; 435/252.31; 435/252.33; 435/252.8; 435/254.21 (text search - see terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, USOC, EPAB, JPAB); Google Scholar Search Terms: alcohol, amino acid, carbon, disruption, electron, Escherichia, exogenous, feedstock, gene, glycerol, metabolize, microaerobic, microorganism, organic acid, overexpression, redox														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2007/115228 A2 (Gonzalez) 11 October 2007 (11.10.2007), pg 1, ln 12-16, 22-23; pg 2, ln 20 - pg 3, ln 2; pg 3, ln 14-16, 23-25; pg 9, ln 12-23; pg 11, ln 7-10; pg 14, ln 18-24; pg 16, ln 21-29; pg 17, ln 16 - pg 20, ln 2; pg 21, ln 20-22; pg 22, ln 1-3, 15-19</td> <td>13-15 ----- 1-12, 16-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2008/0199926 A1 (Burgard et al.) 21 August 2008 (21.08.2008), para [0003]; [0006]; [0007]; [0068]; [0101]; [0132]; [0134]</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2007/0048849 A1 (Laffend et al.) 1 March 2007 (01.03.2007), abstract; para [0012]; [0017]; [0058]-[0060]; [0194]</td> <td>5, 16-19</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2007/115228 A2 (Gonzalez) 11 October 2007 (11.10.2007), pg 1, ln 12-16, 22-23; pg 2, ln 20 - pg 3, ln 2; pg 3, ln 14-16, 23-25; pg 9, ln 12-23; pg 11, ln 7-10; pg 14, ln 18-24; pg 16, ln 21-29; pg 17, ln 16 - pg 20, ln 2; pg 21, ln 20-22; pg 22, ln 1-3, 15-19	13-15 ----- 1-12, 16-19	Y	US 2008/0199926 A1 (Burgard et al.) 21 August 2008 (21.08.2008), para [0003]; [0006]; [0007]; [0068]; [0101]; [0132]; [0134]	1-12	Y	US 2007/0048849 A1 (Laffend et al.) 1 March 2007 (01.03.2007), abstract; para [0012]; [0017]; [0058]-[0060]; [0194]	5, 16-19
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	WO 2007/115228 A2 (Gonzalez) 11 October 2007 (11.10.2007), pg 1, ln 12-16, 22-23; pg 2, ln 20 - pg 3, ln 2; pg 3, ln 14-16, 23-25; pg 9, ln 12-23; pg 11, ln 7-10; pg 14, ln 18-24; pg 16, ln 21-29; pg 17, ln 16 - pg 20, ln 2; pg 21, ln 20-22; pg 22, ln 1-3, 15-19	13-15 ----- 1-12, 16-19												
Y	US 2008/0199926 A1 (Burgard et al.) 21 August 2008 (21.08.2008), para [0003]; [0006]; [0007]; [0068]; [0101]; [0132]; [0134]	1-12												
Y	US 2007/0048849 A1 (Laffend et al.) 1 March 2007 (01.03.2007), abstract; para [0012]; [0017]; [0058]-[0060]; [0194]	5, 16-19												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>														
<table border="0"> <tr> <td> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family										
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search 9 December 2009 (09.12.2009)		Date of mailing of the international search report 18 DEC 2009												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 671-272-4300 PCT OSP: 671-272-7774												

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ゴンザレス, ラモン

アメリカ合衆国 テキサス 77005, ヒューストン, メイン ストリート 6100,
ライス ユニバーシティ

(72)発明者 キャンベル, ポール

アメリカ合衆国 テキサス 77007, ヒューストン, リバークーン 711, グライコ
ス バイオテクノロジーズ, インコーポレイテッド

Fターム(参考) 4B064 AC03 AD05 AD33 AD36 CA02 CA19 CC24 DA01 DA10 DA16