

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6054963号
(P6054963)

(45) 発行日 平成28年12月27日(2016.12.27)

(24) 登録日 平成28年12月9日(2016.12.9)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 12 N 1/20	(2006.01)	C 12 N	1/20
C 12 P 7/64	(2006.01)	C 12 P	7/64
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21
C 12 N 9/04	(2006.01)	C 12 N	9/04

請求項の数 14 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2014-520721 (P2014-520721)
(86) (22) 出願日	平成24年7月13日 (2012.7.13)
(65) 公表番号	特表2014-520564 (P2014-520564A)
(43) 公表日	平成26年8月25日 (2014.8.25)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2012/051690
(87) 國際公開番号	W02013/011292
(87) 國際公開日	平成25年1月24日 (2013.1.24)
審査請求日	平成27年7月13日 (2015.7.13)
(31) 優先権主張番号	1112231.4
(32) 優先日	平成23年7月15日 (2011.7.15)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)
微生物の受託番号	NCIMB NCIMB 41808

(73) 特許権者	514012731 バーダント バイオプロダクツ リミティ ド イギリス国, ノーザンブトンシャー エヌ エヌ 17 5 ティーエックス, コービー, ウイットル ロード 11
(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】微生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系及び蟻酸を 5 以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を含有し、アクセッション番号 N C I M B 4 1 8 0 8 の酢酸菌 (Acetobacter) 株、又はこれに由来する微生物。

【請求項 2】

唯一の炭素供給源として二酸化炭素を使用する、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 3】

アクセッション番号 N C I M B 4 1 8 0 8 の酢酸菌株である、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の微生物。

10

【請求項 4】

脂肪族カルボン酸を生産するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の微生物の使用。

【請求項 5】

二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系及び蟻酸を 5 以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を含有する培地を使用して、脂肪族カルボン酸を生産する工程を含み、当該培地が、アクセッション番号 N C I M B 4 1 8 0 8 の酢酸菌株、又はこれに由来する微生物を含有する、脂肪族カルボン酸を生産する方法。

【請求項 6】

20

前記脂肪酸を生産する反応が、pHが3.0～8.5の範囲内で実施される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記脂肪酸を生産する反応が、温度が5～60 の範囲内で実施される、請求項5又は6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

二酸化炭素が唯一の炭素の供給源である、請求項5～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

二酸化炭素が培地に曝気される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記培地が油・水エマルジョンである、請求項5～9のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項11】

前記培地が二酸化炭素捕捉剤を含有する、請求項5～10のいずれか1項に記載の方法

。

【請求項12】

前記培地が酸化剤を含有する、請求項5～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

更に、培養後に微生物の細胞を除去し、又は死滅させる工程を含む、請求項5～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

更に、以下の工程：

20

- 1) 脂肪族カルボン酸を分離する工程；
 - 2) 当該脂肪族カルボン酸を濾過する工程；
 - 3) 当該脂肪族カルボン酸と他の燃料とを混合する工程；
 - 4) 当該カルボン酸を、例えばエステル、アルコール、ケトン又はアルデヒド等に化学的に改変する工程；及び
 - 5) 当該脂肪族カルボン酸から特定の成分を蒸留及び分離する工程；
- を含む、請求項5～13のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、二酸化炭素を蟻酸に変換し、当該蟻酸をより長い炭素鎖の脂肪族カルボン酸に変換する、微生物に関する。当該微生物中の特定の酵素は、これらの反応に関与する。本発明の更なる側面は、蟻酸及び脂肪族カルボン酸、並びに脂肪族カルボン酸自体に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、化石燃料の消費及び温室効果ガスの生産が問題となっている。世界の化石燃料への依存を減少する一つの方法は、再生可能資源からのバイオ燃料の開発である。バイオディーゼルやバイオエタノール等のバイオ燃料は、化石燃料のよりクリーンかつ環境フレンドリーな代替と考えられている。

40

【0003】

バイオ燃料は温室効果ガスの排出を減少する助けになり得るが、斯かる技術には問題がある。いわゆる「燃料用食物」の問題において、エネルギー源となる作物に対する需要は、穀物の流通価格を増大させると考えられている。他の重要な弊害は、生態学的に影響を受けやすい生態系、例えば熱帯雨林へのダメージであり、ダイズやパーム等のエネルギー作物の植栽は、生態系の大規模な破壊を引き起こしてきた。

【0004】

バイオ燃料産業は、これらの問題を克服する第二世代及び第三世代のバイオ燃料に転換しつつある。微生物による燃料の生産（1）や廃棄物の使用（2）は、重要な研究領域で

50

ある。二酸化炭素の燃料分子への変換も知られている。二酸化炭素は、化学的に(3)、電気化学的に(4)、及び微生物により直接的(5)又は間接的(6)に変換され得る。蟻酸、メタノール、ホルムアルデヒド、エチレン、メタン及びシュウ酸等の生産物が注目されている。しかしながら、これらの微生物は、二酸化炭素を蟻酸を介して脂肪族カルボン酸等のより長いエネルギー源に変換することは出来ない。

【0005】

U S 2 0 1 2 0 0 3 7 0 5において、二酸化炭素のバイオマスへの変換が記載され(7)、更に当該バイオマスが様々な商業的に有用な分子に加工される。しかしながら、これは二酸化炭素を蟻酸に固定する工程、及び当該蟻酸を脂肪族カルボン酸に変換する工程を経てなされるものではない。従来の二酸化炭素を燃料分子を生産する炭素源として使用する試みは、限定を有していた。二酸化炭素並びにその水和イオンである重炭酸塩及び炭酸塩は、本来安定であり、形成のギブス自由エネルギーは、炭素分子の中で最も電気陰性である。二酸化炭素を燃料分子に変換するために、大量のエネルギー(熱)の注入、極端な条件(圧力)及び高度に反応性の化学物質(触媒)を必要とする。収量はしばしば低く、反応速度は遅い。二酸化炭素の直接使用への化学的アプローチは、一般に経済的に困難と考えられている。同様に、化学無機栄養性細菌によるバイオマスの最初の生産は、増殖及びその後の処理の費用制約条件のため広く実施されていない。

10

【0006】

電極触媒の成功も限定的であった。二酸化炭素は水に溶解し難く(0.033M)、強い電気陰性ポテンシャルを有する(E0 = -0.61V)反応のエネルギー要求により、成績は限定的であった。電極触媒は、電極表面に高品質の金属を用いる高コストの技術でもある。長鎖生産物の生産は、Fischer-Tropsch型反応(8)の言葉で記述されるが、鎖の長さは限定される。放射線照射した半導体表面上での光還元は、一酸化炭素、蟻酸、メタノール、メタン、ホルムアルデヒド、シュウ酸及びグリオキサルを生産する。これも収率が低く高コストの技術である。

20

【0007】

細菌のギ酸デヒドロゲナーゼ等の酵素は二酸化炭素を蟻酸に還元することが知られていた(9)が、当該反応を駆動するのにNADPHが必要で、NADPの還元ポテンシャルは二酸化炭素よりもより陽性であるため、順反応(蟻酸を二酸化炭素に酸化する)が一般に優位である。そのような反応は、電子供与体及び受容体分子も必要となる。シントロフォトバクテリウム・フミオキシダンス(Syntrophobacterium fumicoxidans)のタンゲステン含有酵素(10)はこの反応を実施出来るが、効率的に機能するために電極触媒系に電極表面上への吸着が必要となる。更に、長鎖燃料分子は生産されない。本発明は、二酸化炭素が最初のプラットフォーム分子(蟻酸)に変換され、それが発酵又はバイオマスの生産及び加工を要しない迅速な形式で長鎖に組み込まれる点で、従来技術と比較して改善されている。これは、バイオマスの生産及び電子供与体及び受容体の再利用を必要とするU S 2 0 1 2 / 0 0 0 3 7 0 5(11)、並びに発酵プロセスを必要とするU S 2 0 1 0 / 0 3 1 7 0 7 4 1 A 1(12)、U S 2 0 1 2 / 0 0 0 3 7 0 6 A 1(13)、U S 2 0 1 2 / 0 0 3 7 0 7 A(14)及びU S 2 0 1 2 / 0 0 3 4 6 6 4 A 1(15)等の公知の方法を改善したものである。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

発明者らは、二酸化炭素を固定してそれを脂肪族カルボン酸エネルギー資源に変換する本発明の新規微生物を単離した。従って、一般に、本発明は、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系を含むそのような微生物に関する。当該微生物は、蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を有する。これは、生産されるカルボン酸が、その化合物中で合計5個以上の炭素原子を有することを意味する。加えて、第二の酵素系は、2、3、4の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸も生産する。これらのより短いカルボン酸は、5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カル

40

50

ポン酸に変換される。

【0009】

発明者らにより単離された微生物のアセトバクター・ロヴァニエンシス (*A c e t o b a c t e r l o v a n i e n s i s*) は、商業ベースの油の生産に適している。この微生物は、唯一の炭素源として二酸化炭素を使用し、様々な長さのカルボン酸を生産する。当該微生物が単一の炭素源として二酸化炭素を使用するという事実は、油の生産が、同一の生産を実施するのに炭化水素を添加しなければならない他の微生物よりも優れていることを意味する(16、17、18)。二酸化炭素を可燃燃料に変換するためにそのような微生物を使用することは、商業的に価値がある。更に、当該微生物は炭化水素を要求しないため、エネルギー作物の生産の必要性が除去される。

10

【0010】

本発明は、発酵又はバイオマスの生産及び加工を要さずに二酸化炭素を液体燃料生産物に変換されるように改善された方法を提供する。更に、当該二酸化炭素の燃料分子に変換するということは、再生可能な無料の炭素供給源を利用出来る点、及びその消費が環境に有利な効果をもたらす点で、非常に魅力的である。

【0011】

単離された微生物に関連する更なる長所として、以下のものが挙げられる：

- 1) 非病原性で Class 1 である；
- 2) 特別な増殖条件や藻類において要求されるような大型の増殖体積を必要としない；
- 3) 強力なヒドロゲナーゼ酵素系を有する；
- 4) 生産される油が細胞外に蓄積するため、回収が容易で商業的生産プロセスに適合する；
- 5) 生産される油は専ら調査カルボン酸で構成され、当該油は燃焼により直接エネルギー源として使用され得る他、バイオディーゼル、洗剤及び様々な油脂化学製品の生産等における様々な産業において供給原料として使用される；
- 6) 当該酵素系は油 - 水エマルジョン中で作用し、当該エマルジョン中の油が反応培地中の二酸化炭素の溶解度を増大させ、また鎖形成の起点として作用する点で、新しい生産ルートとして記載される；
- 7) 当該酵素系は、バイオマスの生産及び加工を要さずに実行される。

20

【0012】

30

本発明の他の側面は、蟻酸及び脂肪族カルボン酸エネルギー源を生産する方法及びそのエネルギー源自体に関する。

【0013】

本発明のこれらの更なる側面は、下記で更に詳細に説明される。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の一つの側面において、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系及び蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を含有する微生物が提供される。当該微生物は、二酸化炭素を蟻酸に変換し、当該蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換するものである限りの任意の適切な微生物であってもよい。好ましくは、当該微生物は原核生物である。より好ましくは、当該微生物は細菌である。一つの態様において、当該微生物は無機栄養性(*l i t h o t r o p h i c*)である。無機栄養性とは、生物が生合成又は好気若しくは嫌気呼吸によるエネルギー変換における還元同等物(*r e d u c i n g e q u i v a l e n t*)を取得する(例えば炭素固定)ために無機物を使用することを意味する。当該微生物は、無機独立栄養性(*l i t h o a u t o t r o p h i c*)であってもよい。無機独立栄養性とは、炭素源として大気中の二酸化炭素を使用することを意味する。当該微生物は、唯一の炭素源として二酸化炭素を使用するものであってもよい。当該微生物は、化学無機栄養性(*c h e m o l i t h o t r o p h i c*)であってもよい。化学無機栄養性生物は、好気若しくは嫌気呼吸に無機化合物を使用する。これらの化合物の酸化により生産されたエネルギーを

40

50

用いてATPが生産される。無機供与体から生じた電子の一部は、生合成にも用いられる。一つの態様において、当該微生物は化学無機独立栄養性(chemolithoautotrophic)である。

【0015】

上記「無機栄養性」、「無機独立栄養性」、「化学無機栄養性」、及び「化学無機独立栄養性」は、当該技術分野で周知の用語であり、それらの正確な意味は広く認識されている。その結果、当業者は、特定の微生物、例えば細菌が、これらの用語の1つ以上の定義に該当するか否かをただちに判別できる。更に、当業者は、関心のある何らかの微生物がこれらのカテゴリーの1つ以上に分類されるか否かを試験することも出来る。当業者は、5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸の油を生産出来るか否かを確認するために微生物を試験することも出来る。そのような試験を実施する適切な方法は、当業者にとって周知である。10

【0016】

一つの態様において、前記微生物は好気性微生物である。また、当業者は、特定の微生物が好気性微生物であるか否かを容易に判別出来る。本発明において、当該微生物、具体的には当該微生物の酵素系は、好気条件下で脂肪族カルボン酸を生産する。即ち酸素の存在は脂肪族カルボン酸を生産する反応において忍容される。

【0017】

前記微生物が細菌である場合、当該微生物は、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系及び蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を含有する任意の適切な細菌であってもよい。好ましくは、当該細菌は酢酸菌種である。一つの具体的な態様において、当該微生物はアセトバクター・ロヴァニエンシス(*Acetobacter lovaniensis*)である。当該微生物は、アクセッション番号NCIMB 41808(2011年1月12日にNCIMB Ltd.(Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA)にブダペスト条約の許可を受けて寄託された;以後FJ1株と表記する)を有する酢酸菌株に類似してもよい。「類似」とは、FJ1と機能的に同等の微生物を意味する。当該微生物は、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系を有し、FJ1と同一の条件下で増殖するものであるべきである。更に、当該微生物は、5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸を生産する同一又は類似の酵素系を有するべきである。当該微生物はFJ1に対して60%以上の配列の同一性を有してもよい。幾つかの態様において、当該微生物は、FJ1に対して65%以上、70%以上、75%以上、80%以上の配列の同一性を有してもよい。好ましくは、当該微生物は、FJ1に対して85%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上、99%以上の配列の同一性を有してもよい。異なる微生物間の配列の同一性を判定する方法は、当該技術分野で周知である。例えば16S rDNA解析が使用される。FJ1の培養に関する詳細な情報は下記に示す。従って、当業者は、ある微生物がFJ1に類似するか否かを判定することが出来る。一つの態様において、当該微生物はFJ1である。特定の態様において、当該微生物は組換え微生物、即ち遺伝子改変微生物である。当該微生物は、他の微生物種由来の核酸配列(例えばDNA)を有してもよい。特に、当該微生物は、ヒドロゲナーゼ酵素系をコードする異種遺伝子を含んでもよい。当該異種遺伝子は、微生物のプロモーター又は異種プロモーターと動作可能に連結してもよい。当該異種遺伝子は、プラスミドの一部であってもよい。当該ヘテロ遺伝子は、前記微生物有で発現して、当該微生物が二酸化炭素を蟻酸に変換するのを可能とする機能的なヒドロゲナーゼ酵素系を生産することを可能とする。関心のあるヌクレオチド配列(例えばDNA)を微生物細胞に導入する適切な方法は当業者に周知である(例えばSambrook, J. and Russell, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.Sを参照されたい)。3040

【0018】

50

あるいは、前記微生物は、天然に存在する微生物であってもよい。これは、遺伝的に置換又は改変されていない微生物である。

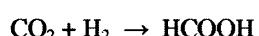
【0019】

一つの態様において、前記微生物はFJ1由来であってもよい。「由来」とは、FJ1が改変又は変異して、本発明に係る更なる微生物が生産されたことを意味する。例えば、遺伝子がFJ1に挿入され、又は除去されてもよい。FJ1由来の微生物は、FJ1と機能的に同等であり、二酸化炭素を蟻酸に変換するものであるべきである。更に、当該FJ1由来の微生物は、FJ1と同一の条件下で増殖可能であるべきである。更に、当該FJ1由来の微生物は、5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸を生産する同一又は類似の酵素経路を含有するべきである。当該FJ1由来の微生物は、FJ1と同一の方法で脂肪族カルボン酸を生産してもよい。幾つかの態様において、微生物は反復的な培養により、又は人工的選択プロセスにおける微生物の選択により樹立されてもよい。10

【0020】

前記ヒドロゲナーゼ酵素は、二酸化炭素を蟻酸に反応する任意の酵素系であってもよい。当該ヒドロゲナーゼ酵素系は、二酸化炭素を蟻酸に変換する反応を触媒する。当該ヒドロゲナーゼ酵素系は、水素を酸化して電子を生産することにより、二酸化炭素を還元して蟻酸を形成する。例えば以下の反応が起こる。

【化1】



20

【0021】

一般に、二酸化炭素を蟻酸に変換する触媒反応は、二酸化炭素が可溶性であるため、溶液中で起こる。溶液中で、二酸化炭素は炭酸 (H_2CO_3) に可逆的に変換される。溶液のpHに依存して、当該炭酸は、通常重炭酸塩 (HCO_3^-) 又は炭酸 (HCO_3^{2-}) として存在してもよい。従って、本発明の酵素系による二酸化炭素の蟻酸への変換は、重炭酸塩及び/又は炭酸塩の蟻酸への変換をも意図する。即ち、炭酸塩及び重炭酸塩は、本発明において二酸化炭素の形態と見なされる。重炭酸塩及び/又は炭酸塩（例えば重炭酸ナトリウム又は炭酸ナトリウム）は、これらの塩のレベルを増大させるために溶液に添加されてもよい。しかしながら、これは、脂肪族カルボン酸が生産される場合、塩イオン（例えばナトリウムイオン）により鹹化してしまうので好ましくない。30

【0022】

上記のように、二酸化炭素は炭素の唯一の供給源であることが好ましい。好ましくは、当該二酸化炭素は、何らかの安定な中間体を形成せずに直接蟻酸に変換される。即ち、当該反応は単一の工程で行われる。炭酸塩及び重炭酸塩は、二酸化炭素が溶解した状態と見なすので中間体ではない。従って、溶液に二酸化炭素を溶解して炭酸塩及び重炭酸塩を形成し、これらを蟻酸に変換することは、直接変換と見なされる。一方、二酸化炭素（又は炭酸及び/又は重炭酸イオン）をメタノールに変換して、然る後に蟻酸に変換する場合は、中間体としてメタノールが生産されているので、直接変換とは認められない。

【0023】

幾つかの態様において、蟻酸生産における最初の反応物は、水と二酸化炭素である。好ましい態様において、二酸化炭素と水以外に蟻酸生産において他の反応物は必要ではない。しかしながら、これは最初の反応混合物中に他の成分が存在する可能性を排除しない。例えば、前記反応の開始を加速するために、酸化剤が存在し得る。そのような他の成分は、蟻酸生産の反応物ではない。40

【0024】

前記ヒドロゲナーゼ酵素系は、蟻酸生産のために電子供与体及び受容体を必要としない。例えば、当該反応を信仰するのに、NADP及びNADPHは要求されない。実際に、5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸を生産する全ての反応は、電子供与体又は受容体を必要としない。

50

【0025】

前記ヒドロゲナーゼ酵素系は、蟻酸生産において発酵を使用しない。更に、第二の酵素系も、脂肪族カルボン酸を生産するために発酵を使用しない。発酵は、糖類等の有機化合物を、電子供与体及び／又は受容体を含む生化学プロセスを経て他の化合物に変換することである。

【0026】

前記ヒドロゲナーゼ酵素系は、蟻酸生産においてバイオマスを要求しない。従って、脂肪族カルボン酸の生産において、微生物に対してバイオマスを提供する必要は無い。バイオマスは、エネルギー源に変換され得る動物又は植物由来の生物学的有機材料である。

【0027】

本発明において、電極触媒等の電気化学的プロセスは、二酸化炭素を蟻酸に変換し、更にこれを脂肪族カルボン酸に変換するのに必要とされない。電気化学的プロセスは、電子伝導体（例えば金属又は半導体）及びイオン伝導体（電解質）の界面で溶液中で起こる化学反応で、電極と電解質又は溶液中の成分との間での電子の移動を含む。

【0028】

前記ヒドロゲナーゼ酵素系は、好ましくは酸素耐性である。これは、当該ヒドロゲナーゼ酵素系は、が、酵素系へのダメージや酵素系の活性への影響を受けずに比較的高いレベルの酸素を忍容することを意味する。好ましくは、当該ヒドロゲナーゼ酵素系は、約10%、より好ましくは約15%、尚もより好ましくは約20%～約21%、例えば大気中の酸素濃度（約20.95%）の酸素レベルで機能する。多くのヒドロゲナーゼ酵素は酸素の存在に感受性であり、酸素が存在すると動作を停止する。好ましくは、前記ヒドロゲナーゼ酵素系は、細胞外、即ち微生物の細胞の外側に存在する。即ち、前記ヒドロゲナーゼ酵素系は、細胞膜の外側に配置される。それは外側を向いている。好ましくは、前記ヒドロゲナーゼ酵素系は、完全に細胞外にあり、微生物には、細胞膜への結合等、いかなる形でも接触していない。これにより、当該微生物の外側で蟻酸形成が起こり得る。前記ヒドロゲナーゼ酵素系は、好ましくは、pH 3.0～7.5、より好ましくは pH 3.5～4.5で機能する。更に、当該ヒドロゲナーゼ酵素系は、好ましくは5～60、より好ましくは15～20で機能する。

【0029】

前記ヒドロゲナーゼ酵素系は、ヒドロゲナーゼ酵素に加えて、二酸化炭素の蟻酸への変換を補助する1つ以上の酵素を含んでもよい。

【0030】

1つの態様において、前記ヒドロゲナーゼ酵素系はFJ1のものである。本発明の他の態様において、FJ1のヒドロゲナーゼ酵素系が提供される。

【0031】

前記微生物は、蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系も有する。当該第二の酵素系は、蟻酸を5以降の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する任意の酵素系であってもよい。当該第二の酵素系は、蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する反応を触媒する。当該脂肪族カルボン酸は、エネルギー生産のために燃料として使用され得る。

【0032】

好ましくは、前記第二の酵素系は、細胞外即ち微生物の細胞の外側に存在する。即ち、前記第二の酵素系は、細胞膜の外側に配置される。当該第二の酵素系は細胞の外側に配向している。これは、蟻酸の脂肪族カルボン酸への変換が細胞外で起こることを意味する。これは、微生物の外側で生産された脂肪族カルボン酸が容易に抽出できる点で有利である。好ましくは、当該第二の酵素系は、完全に細胞外にあり、微生物には、細胞膜への結合等、いかなる形でも接触していない。

【0033】

一つの態様において、前記第二の酵素系はFJ1のものである。本発明の他の態様において、FJ1の第二の酵素系が提供される。

10

20

30

40

50

【0034】

上記のように、前記微生物は組換え微生物であってもよい。従って、当該微生物は、第二の酵素系をコードする異種遺伝子を含有してもよい。当該異種遺伝子は、異種プロモーター又は当該微生物のプロモーターと動作可能に連結してもよい。当該異種遺伝子は、プラスミドの一部であってもよい。当該異種遺伝子は、微生物内で発現して、蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する機能的な第二の酵素系を生産する。

【0035】

前記微生物により生産される脂肪族カルボン酸の具体的な性状は、部分的には、酵素反応の長さに依存し得る。

10

【0036】

前記微生物により生産される脂肪族カルボン酸の鎖の炭素原子長は5以上であってもよい。当該微生物により、2、3及び4の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸も生産され得る。当該生産される脂肪族カルボン酸は、脂肪酸であってもよい。当該脂肪族カルボン酸は、長鎖、中鎖又は短鎖カルボン酸、又はこれらの組み合わせであってもよい。

【0037】

前記脂肪族カルボン酸における「脂肪族」という用語は、カルボン酸の-COOH基に結合する基が、炭素原子の鎖を有しており、それらが当該基の骨格を形成することを意味する。この炭素骨格は分岐又は非分岐であってもよい。好ましくは、当該炭素骨格は非分岐である。当該炭素骨格は、飽和、単不飽和（即ち炭素二重結合を1つ有する）、又は複不飽和（即ち炭素二重結合を2つ以上有する）であってもよい。一つの態様において、当該炭素骨格は単不飽和である。当該炭素骨格は、一般に水素原子が結合している（-COOH基を除く）。しかしながら、1つ以上の水素原子に代えて、炭素骨格は、OH基等の他の基で置換されてもよい。好ましくは、当該炭素骨格は無置換、即ち-COOH基の他に水素原子のみ結合している。

20

【0038】

前記蟻酸から脂肪族カルボン酸を生産する微生物の第二の酵素系は、当該反応を段階的に行う。炭素原子は、脂肪族カルボン酸の炭素骨格に一時に追加される。これは、炭素骨格がC2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10等である範囲のカルボン酸を生産する。例えば、蟻酸（C1）から出発して、第二の酵素系は、蟻酸の炭素骨格に炭素原子を1つ追加して、酢酸（C2）を生産する。そして、第二の酵素系は、酢酸の炭素骨格に炭素原子を追加して、プロピオン酸（C3）を生産する。このプロセスは更に、酪酸（C4）、吉草酸（C5）、ヘキサン酸（C6）、ヘプタン酸（C7）、オクタン酸（C8）、ノナン酸（C9）、デカン酸（C10）等の生産に続く。従って、当該第二の酵素系は、蟻酸を、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上又は10以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する。当該第二の酵素系は、脂肪族カルボン酸の炭素鎖に炭素原子（例えばCH₂単位）を添加する反応を触媒し得る。

30

【0039】

このように、前記微生物の酵素系は、様々な炭素原子長の脂肪族カルボン酸を生産し得る。例えば、当該微生物は、約2～約24、約3～約24、約4～約24、約5～約24の長さの炭素原子骨格を有する脂肪族カルボン酸を生産し得る。更に、当該微生物は、約6～約24、約7～約24、約8～約24、約9～約24の長さの炭素原子骨格を有する脂肪族カルボン酸を生産し得る。加えて、当該微生物は、約10～約24、約11～約24、約12～約24、約13～約24の長さの炭素原子骨格を有する脂肪族カルボン酸を生産し得る。当該微生物が培養されるとき、当該微生物の培養期間が長い場合、前記酵素系が長期間活性であるため、炭化水素鎖は長くなる傾向がある。前記微生物が培養される期間は、炭素鎖の平均長を決定する。一つの態様において、C18として計算される脂肪族カルボン酸の含有量は、約70%～90%である。より好ましくは、C18として計算される脂肪族カルボン酸の含有量は、約80%である。

40

50

【0040】

好ましくは、前記微生物により生産される脂肪族カルボン酸は、可燃性である。好ましくは、前記微生物により生産される脂肪族カルボン酸は、油の形態をとる。そのため、当該脂肪酸の分離は容易である。当該油は、半乾性油である。油が半乾性であるか否かは、ヨード価から評価され得る。解析の標準的な方法は、例えばEN 14111に記載されている。好ましくは、前記油のヨード価は、85～95 mg I / 100 gである。より好ましくは、前記油のヨード価は、90～95 mg I / 100 gである。前記脂肪族カルボン酸は、単不飽和であってもよい。

【0041】

本発明の微生物により生産される脂肪族カルボン酸の赤外線走査の結果を、図1に示す。これは、当該油試料が、長鎖カルボン酸で構成され、脂肪族カルボン酸であることを示す。

【0042】

抽出された脂肪族カルボン酸は、下記の1つ以上の性質を有し得る。

【表1】

解析	典型的数値	解析の方法
灰 g/100g	0.025～0.050	ISO 3987
引火点 °C	>100	EN ISO 3679
動粘度 cSt @20°C	70～75	EN ISO 3104
@30°C	52～57	
@40°C	47～52	
@50°C	30～35	
@60°C	20～25	
@70°C	15～20	
@80°C	10～15	
@90°C	7～12	
粘度指数	55	ASTM D2270
含水量 g/100g	<0.5	EN ISO 12937
密度 kg/l @20°C	920～950	EN ISO 12185
酸価 mg KOH/g	140～160	EN 14104
ヨウ素価 mg I/100g	85～95	EN 14111
銅板腐食	1B	ASTM D849
酸化安定性 H	>48時間	ASTM D2274
硫黄 % m/m	<0.1(典型的には0.05)	ASTM D2622
過酸化物価 meq/kg	<3	AOAC 965.33
セタン指数	~50	ASTM D976
総発熱量 MJ/kg	>37	ASTM D5865
沈降電位	<0.2(典型的には0.08)	ASTM D-6469

10

20

30

40

【0043】

幾つかの態様において、40における動粘性率は(cSt)、20～25であってもよい。更には、引火点(flask point)は、180超であってもよい。

【0044】

前記脂肪族カルボン酸の酸化安定性は、バイオディーゼル等の他のバイオ燃料と比較して驚異的に高いことが判明した。通常のバイオディーゼルの酸化安定性は約30分である(ASTM D2274で試験した)。一方、本発明の脂肪族カルボン酸の酸化安定性は、48時間超である。

50

【0045】

異なる反応時間を経て生産された油の典型的な組成を、下記に示す。これらの表は、各分画の沸点を示している。脂肪族カルボン酸を分離させ、各分画を帯状に切り離し、それらの沸点を測定した。例えば、分画された最初の10%の脂肪族カルボン酸は、特定の沸点を有している。次の10%（即ち10～20%であり、以下20%と表記する）は他の沸点を有し、以下も同様である。

【表2】

1. 5時間の反応で生産された重い分画の典型的な蒸留範囲

10

蒸留物パーセンテージ	沸点 °C
最初の沸点	188
10%	232
20%	256
30%	272
40%	292
50%	306
60%	321
70%	332
80%	359
90%	391
最後の沸点	395

20

【表3】

0. 5時間の反応で生産された軽い分画の典型的な蒸留範囲

30

蒸留物パーセンテージ	沸点 °C
最初の沸点	99
10%	113
20%	115
30%	118
40%	118
50%	119
60%	121
70%	129
80%	308
90%	370
最後の沸点	395

40

【0046】

上記のように、前記微生物は、組換えで生産出来る。故に、本発明の更なる側面において、微生物を生産する方法が提供され、当該方法は、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系をコードする遺伝子を微生物に導入する工程を含み、当該遺伝子は、当該微生物中で発現する。

【0047】

前記方法は、更に、蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系をコードする遺伝子を導入する工程を含み、当該遺伝子は、当該微生物中で発現する。

50

【0048】

また、本発明は微生物を生産する方法も提供し、当該方法は、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系をコードする遺伝子を微生物に導入する工程を含み、当該微生物は、蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を含有し、かつ当該遺伝子は、当該微生物中で発現する。

【0049】

また、本発明は、微生物を生産する方法も提供し、当該方法は、蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系をコードする遺伝子を微生物に導入する工程を含み、当該微生物は、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系を含有し、かつ当該遺伝子は、当該微生物中で発現する。

10

【0050】

本発明の微生物及びその好ましい特徴に関する上記記載は、当該微生物を生産する方法に等しく適用される。例えば、微生物の性質に関する特定の特徴は、当該方法にも適用される。

【0051】

他の側面において、当該方法は、脂肪族カルボン酸を生産する方法を提供し、当該方法は、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系、及び蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を含有する微生物を培養する工程を含む。

【0052】

20

上記のように、様々な長さの炭素骨格を有する脂肪族カルボン酸が生産され得る。好ましくは、約5～約24の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸が生産される。より好ましくは、約10～約24の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸が生産される。なおより好ましくは約16～約20の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸が生産される。一つの態様において、当該脂肪族カルボン酸は、2、3、4、5、6、7、8、9又は10以上の長さの炭素骨格を有する。更に、当該脂肪族カルボン酸は、25以下の長さの炭素骨格を有する。あるいは、C18として計算された脂肪族カルボン酸の組成は、約70%～90%である。より好ましくは、C18として計算された脂肪族カルボン酸の組成は、約80%である。

【0053】

30

前記微生物の培養において、任意の適切な条件が使用され得る。当該微生物は、pH約3.0～約8.5、より好ましくは約3.5～約4.5で培養されてもよい。更に、当該微生物は、約5～約60、より好ましくは約15～約20の温度で培養されてもよい。

【0054】

当該培養溶液は、二酸化炭素を含有し得る。これは、大気から溶け込んだ二酸化炭素であってもよい。好ましくは、二酸化炭素ガスは曝気により培地に導入されて、反応可能な二酸化炭素のレベルを増大させられる。二酸化炭素が培地に曝気されるとき、当該ガスは圧縮ガスシリンダーから出たものであってもよい。例えば、燃焼で排出されたガスが培地に曝気されてもよい。幾つかの態様において、二酸化炭素（例えば燃焼で排出されたガス）が、微生物添加前の培地（任意で二酸化炭素捕捉剤を含有する）に曝気されてもよい。

40

【0055】

好ましくは、前記微生物は、二酸化炭素を唯一の炭素供給源として培養される。

【0056】

前記微生物の培養における培地は、任意の適切な培養培地であってもよい。好ましくは、当該培地中で、二酸化炭素が唯一の炭素供給源である（上記のように、炭酸塩及び重炭酸塩は、本発明において二酸化炭素の形態と見なされ、二酸化炭素の用語に包含される）。当該培地は、以下の成分：K₂HPO₄；MgSO₄·7H₂O；CaCO₃；CuSO₄；FeCl₃；MnCl₃；MoCl₃；及びZnCl₃の1つ以上を含有してもよい。更に、これらの成分は、下記の組成で培養培地中に存在し得る。

50

【表4】

成分	g/リットル
KH_2PO_4	1.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10
CaCO_3	0.10
CuSO_4	0.10
FeCl_3	0.01
MnCl_3	0.01
MoCl_3	0.01
ZnCl_3	0.01

10

【0057】

好ましくは、前記微生物は油 - 水エマルジョンの溶液中で培養される。これは、幾つかの油を培養培地に導入し、当該油 - 水混合物がエマルジョンを形成するように搅拌することにより取得され得る。例えば、反応混合物の循環が使用され得る。油 - 水エマルジョンの使用は、二酸化炭素の溶解度を増大させると考えられる。また、これは、脂肪族カルボン酸の鎖の伸長を助けることにより、脂肪族カルボン酸を溶液中で維持するのを助けるとも考えられている。

20

【0058】

好ましくは、二酸化炭素捕捉剤が前記反応混合物中に導入される。これは、反応混合物 / 溶液中の二酸化炭素のレベルを増大させるのを助け、反応の速度を維持 / 増大することが出来る。適切な二酸化炭素捕捉剤は、当該技術分野で周知であり、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、塩化バリウム、トリエタノールアミン、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン、アンモニア、メタノール、スルホラン、ポリエチレングリコールエーテル、ポリエチレングリコール、グリセロール等のアルカリ化合物や、Trition TXシリーズ等の界面活性剤が挙げられる。幾つかの適切な二酸化炭素捕捉剤は、にOrtrud Ashenbrenner and Peter Styring (2010) (21) 記載されている。好ましくは、二酸化炭素捕捉剤は、トリエタノールアミン又はポリエチレングリコールである。幾つかの態様において、二酸化炭素捕捉剤は、トリエタノールアミンである。他の態様において、二酸化炭素捕捉剤は、PEG 300 等のポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールは、二酸化炭素を放出する化学反応を要さず、潜在的に燃焼時にNOXを形成し得る窒素を含有せず、鹹化せず、最終産物中の灰を減少させる助けとなる点で有利である。

30

【0059】

好ましくは、前記反応混合物中に酸化剤が導入される。これは、反応プロセスを開始し、当該反応の開始を加速する助けとなる。適切な酸化剤として、次亜塩素酸ナトリウム及び水酸化ナトリウムが挙げられる。酸化剤は、穏和なものであるべきである。一つの態様において、酸化剤として漂白剤が使用され得る。

40

【0060】

前記方法は、更に、脂肪族カルボン酸を分離する工程を含む。

【0061】

他の態様において、本発明は、上記方法により生産された脂肪族カルボン酸を提供する。

【0062】

尚も更なる態様において、本発明は、蟻酸分子間の縮合反応から形成される脂肪族カルボン酸を提供する。

【0063】

上記のように、様々な長さの炭素骨格を有する脂肪族カルボン酸が生産され得る。好ま

50

しくは、約5～約24の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸である。より好ましくは、約10～約24の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸である。なおもより好ましくは約16～約20の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸である。あるいは、C18として計算された脂肪族カルボン酸の組成は、約70%～90%である。より好ましくは、C18として計算された脂肪族カルボン酸の組成は、約80%である。

【0064】

好ましくは、前記脂肪族カルボン酸は、油の形態をとる。これは、脂肪族カルボン酸エステルの分離を引き起こす。当該油は、半乾性油である。好ましくは、当該脂肪族カルボン酸は、単不飽和である。

【0065】

抽出された脂肪族カルボン酸は、好ましくは以下の特徴の1つ以上を有する。

【表5】

解析	典型的数値
灰 g/100g	0.025-0.050
密度@15°C	0.8483-0.8720
引火点 °C	>100
動粘度 cSt @20°C	70-75
@30°C	52-57
@40°C	47-52
@50°C	30-35
@60°C	20-25
@70°C	15-20
@80°C	10-15
@90°C	7-12
粘度指数	55
含水量 g/100g	1最大(好ましくは<0.5)
酸価 mg KOH/g	140-160
ヨウ素価 mg I/100g	85-95
銅板腐食	1B
酸化安定性 H	48+
硫黄 % m/m	<0.1
過酸化物価 meq/kg	<3
セタン指数	~50
総発熱量 MJ/kg	>37
沈降電位	<0.2(典型的には0.08)

10

20

30

【0066】

40

本発明は、上記微生物の脂肪族カルボン酸の生産のための使用を提供する。

【0067】

一つの態様において、二酸化炭素を蟻酸に変換し、更に脂肪族カルボン酸に変換する酵素は、微生物の外部に存在する。これらの酵素は、微生物の細胞の存否に拘らず機能する。従って、本発明の他の態様において、脂肪族カルボン酸を生産する方法が提供され、当該方法は、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドログナーゼ酵素系、及び蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を含有する。

【0068】

前記培地は、酵素系が培地中で生産されるように、一定期間微生物を培養することにより生産される。所望の場合、酵素を含有するが微生物細胞を含有しない無細胞抽出物を生

50

産出来る。これは、例えば超遠心分離の反復等、培養後に培地から微生物の細胞を回収すること等により行われる。あるいは、培地から微生物細胞を回収するのではなく、細胞を培地中に残し、それらを死滅させてもよい。例えば抗感染剤や抗生物質が培地に添加される。あるいは、微生物は培地中に残されてもよい。

【0069】

この方法は、更に、当該培地を使用して脂肪族カルボン酸を生産する前に培地を調製する工程を含む。

【0070】

脂肪族カルボン酸の生産において、適切な条件が使用され得る。例えば、水及び二酸化炭素が提供される。培地のpHは約3.0～8.5、好ましくは約6.0～7.0であつてもよい。更に、当該培地の温度は5～60°、より好ましくは約15～20°である。10

【0071】

最初の方法において、二酸化炭素は好ましくは炭素の唯一の供給源として使用され、反応培地に二酸化炭素ガスを曝気すること等により供給される。好ましくは、反応培地は、油・水エマルジョンである。更に、二酸化炭素捕捉剤が反応培地に添加されるのが好ましい。

【0072】

前記方法は、更に脂肪族カルボン酸を分離する工程を含む。

【0073】

上記脂肪族カルボン酸を生産する方法の全ての態様において、脂肪族カルボン酸が生産された後、様々な任意の工程が、脂肪族カルボン酸に対して実行され得る。例えば、前記方法は、任意で以下の工程の1つ以上を含む。20

- 1) 脂肪族カルボン酸を分離する工程；
- 2) 当該脂肪族カルボン酸を濾過する工程；
- 3) 当該脂肪族カルボン酸と他の燃料、好ましくは油性燃料とを混合する工程；
- 4) 当該カルボン酸を、例えばエステル、アルコール、ケトン又はアルデヒド等に化学的に改変する工程；及び
- 5) 当該脂肪族カルボン酸から特定の成分を蒸留及び分離する工程；

【0074】

他の側面において、本発明は、上記方法により生産された脂肪族カルボン酸を提供する。30

【0075】

また、本発明の一つの側面において、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系及び蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を含有する培地が提供される。

【0076】

二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系及び蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系を含有する培地から、様々な技術を使用して、含有される酵素を単離することが出来る。例えば、当該酵素は、ゲル濾過クロマトグラフィーや、分子サイズ及び活性に基づく選択等の既知の技術を使用して分離され得る。40

【0077】

また、本発明は、二酸化炭素を蟻酸に変換するヒドロゲナーゼ酵素系及び蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する第二の酵素系の、脂肪族カルボン酸を生産するための使用をも提供する。

【0078】

更に、本発明は、脂肪族カルボン酸を生産する方法を提供し、当該方法は、二酸化炭素を蟻酸に変換する工程及び蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する工程を含み、当該変換反応は、油・水エマルジョン中で起こる。

【0079】

10

20

30

40

50

上記方法の好ましい特徴は、上記脂肪族カルボン酸を生産する方法と同一である。例えば、生産される炭素骨格の長さの範囲、反応が実施される温度及びpH、二酸化炭素供給源、二酸化炭素捕捉剤、酸化剤等に関する特徴は、この方法の好ましい特徴である。

【0080】

例えば、前記エマルジョンは、二酸化炭素を含有し得る。これは、空気から溶解した二酸化炭素であってもよい。好ましくは、二酸化炭素ガスは、エマルジョンに曝氣されることにより、反応に利用可能な二酸化炭素のレベルを増大させられる。二酸化炭素がエマルジョンに曝氣されるとき、圧縮ガスシリンダーから出されてもよい。あるいは、他の供給源からのガス中に含有されていてもよい。例えば、燃焼からの排出ガスが、エマルジョンに曝氣されてもよい。

10

【0081】

幾つかの態様において、二酸化炭素（例えば燃焼排出ガス）が、エマルジョン（任意で二酸化炭素捕捉剤を含有する）に曝氣される。

【0082】

好ましくは、二酸化炭素は炭素の唯一の供給源である。

【0083】

好ましくは、二酸化炭素捕捉剤が、エマルジョン中に導入される。これは、反応混合物／溶液中の二酸化炭素のレベルを増大させるのを助け、反応の速度を維持／増大することが出来る。適切な二酸化炭素捕捉剤は、当該技術分野で周知であり、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、塩化バリウム、トリエタノールアミン、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン、アンモニア、メタノール、スルホラン、ポリエチレングリコールエーテル、ポリエチレングリコール、グリセロール等のアルカリ化合物や、Trition TXシリーズ等の界面活性剤が挙げられる。幾つかの適切な二酸化炭素捕捉剤は、にOrtrud Ashenbrenner and Peter Styring (2010) (21) 記載されている。好ましくは、二酸化炭素捕捉剤は、トリエタノールアミン又はポリエチレングリコールである。幾つかの態様において、二酸化炭素捕捉剤は、トリエタノールアミンである。他の態様において、二酸化炭素捕捉剤は、PEG300等のポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールは、二酸化炭素を放出する化学反応を要さず、潜在的に燃焼時にNOXを形成し得る窒素を含有せず、鹹化せず、最終産物中の灰を減少させる助けとなる点で有利である。

20

【0084】

好ましくは、酸化剤がエマルジョン中に導入される。これは、反応プロセスを開始し、当該反応の開始を加速する助けとなる。適切な酸化剤として、次亜塩素酸ナトリウム及び水酸化ナトリウムが挙げられる。酸化剤は、穏和なものであるべきである。一つの態様において、酸化剤として漂白剤が使用され得る。

30

【0085】

前記方法は、更に、脂肪族カルボン酸を分離する工程、又は上記加工工程のいずれか1つ以上を含む。

【0086】

加えて、前記方法は、5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸を生産する方法を提供し、当該方法は、二酸化炭素を蟻酸に変換する工程及び蟻酸を5以上の炭素原子長の鎖を有する脂肪族カルボン酸に変換する工程を含み、二酸化炭素を蟻酸に変換する反応を開始するために酸化剤が使用される。

40

【0087】

上記方法の好ましい特徴は、上記脂肪族カルボン酸を生産する方法と同一である。例えば、生産される炭素骨格の長さの範囲、反応が実施される温度及びpH、二酸化炭素供給源、二酸化炭素捕捉剤、エマルジョン等に関する特徴は、この方法の好ましい特徴である。

【0088】

例えば、一般に、蟻酸及び脂肪族カルボン酸は、溶液中で生産され得る。当該溶液は、

50

二酸化炭素を含有し得る。当該二酸化炭素は、大気から溶解したものであってもよい。好ましくは、二酸化炭素ガスは当該溶液に曝氣されて、反応に利用可能な二酸化炭素のレベルを増大させられる。二酸化炭素が溶液に曝氣されるとき、圧縮ガスシリンダーから出されてもよい。あるいは、他の供給源からのガス中に含有されていてもよい。例えば、燃焼からの排出ガスが、溶液に曝氣されてもよい。

【0089】

幾つかの態様において、二酸化炭素（例えば燃焼排出ガス）が、溶液（任意で二酸化炭素捕捉剤を含有する）に曝氣される。

【0090】

好ましくは、二酸化炭素は唯一の炭素供給源である。

10

【0091】

好ましくは、二酸化炭素捕捉剤が、溶液中に導入される。これは、反応混合物／溶液中の二酸化炭素のレベルを増大させるのを助け、反応の速度を維持／増大することが出来る。適切な二酸化炭素捕捉剤は、当該技術分野で周知であり、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、塩化バリウム、トリエタノールアミン、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン、アンモニア、メタノール、スルホラン、ポリエチレングリコールエーテル、ポリエチレングリコール、グリセロール等のアルカリ化合物や、Trition TXシリーズ等の界面活性剤が挙げられる。幾つかの適切な二酸化炭素捕捉剤は、にOrtrud Ashenbrenner and Peter Styring (2010) (21)記載されている。好ましくは、二酸化炭素捕捉剤は、トリエタノールアミン又はポリエチレングリコールである。幾つかの態様において、二酸化炭素捕捉剤は、トリエタノールアミンである。他の態様において、二酸化炭素捕捉剤は、PEG 300等のポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールは、二酸化炭素を放出する化学反応を要さず、潜在的に燃焼時にNOXを形成し得る窒素を含有せず、鹹化せず、最終産物中の灰を減少させる助けとなる点で有利である。

20

【0092】

好ましくは、前記反応は油 - 水エマルジョン中で起こる。

【0093】

前記方法は、更に、脂肪族カルボン酸を分離する工程、又は上記加工工程のいずれか1つ以上を含む。

30

【0094】

油を生産する方法は、新しい方法で「駆動する」。当該プロセスの第一の工程は、二酸化炭素の還元による蟻酸の生産である。蟻酸は還元剤である（酸化還元電位 - 0 . 25）。この最初の反応の工程は二酸化炭素を固定するが、プロセスの次の部分（鎖の構築）を駆動するのに充分な還元同等物（reducing equivalents）も生産する。このIn situの化学バッテリーの使用は、他の酸化還元反応を駆動するのに使用され得る。蟻酸（還元剤は、更に利用可能なカルボン酸（酸化剤）を還元し、成長している炭素鎖に炭素を1つ追加し、酸素をO₂として放出する。こうして、上記反応を駆動するために還元剤を添加する必要を免れ、炭素及び還元同等物は、最終産物中で隔絶されている。

40

【0095】

本発明は、例示のみを目的として下記図面を参照することにより、詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】図1は、本発明の微生物により生産されるエネルギー源の赤外線走査の結果である。当該エネルギー源は、脂肪族カルボン酸を含有する油産物であり、当該赤外線走査は、脂肪族カルボン酸に典型的な特徴を示す。

【0097】

【図2】図2は、本発明の油の生産に使用される第一のタンク系を示す。

【0098】

50

【図3】図3は、本発明の油の生産に使用される第二のタンク系を示す。

【0099】

【図4】図4は、第二のタンク系を使用して油を生産するプロセスを示すフローチャートである。

【実施例】

【0100】

下記の記載は、いかなる場合も本発明の範囲を限定しない。

【0101】

概観

本発明の以下の側面を論じる。

10

1) 細菌培養の特徴

2) 炭素構築ブロック(蟻酸)の生産

3) 構築ブロックの短鎖、中鎖及び長鎖脂肪族カルボン酸への組み込み

4) 生産物

【0102】

細菌培養

好ましくは、細菌培養は以下の特徴を有する。

・化学無機栄養性、好気性の微生物で、二酸化炭素を唯一の炭素供給源として使用する。

・細胞外に酸素耐性ヒドロゲナーゼ酵素系を有する。この酵素系は、pH 3.0 ~ 8.5 及び 5 ~ 6.0 で活性であるべきである。

20

・短鎖、中鎖及び長鎖のカルボン酸の官能基を有する炭化水素に蟻酸を組み込む細胞外酵素成分を有する。

・下記のような特徴的な価数を有する油状生産物を形成出来る。油は細胞外に合成され、反応培地の上層に物理的に分離されるべきである。

【0103】

一つの態様において、前記細菌はアセトバクター・ロヴァニエンシス(Acetobacter lovaniensis) FJ1である。

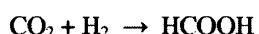
【0104】

炭素構築ブロック(蟻酸)の生産

前記微生物は、ヒドロゲナーゼ酵素系を使用して二酸化炭素を蟻酸に還元するべきである。以下のように水素が還元されて電子を生産し、二酸化炭素が蟻酸に還元される。

30

【化2】



【0105】

当該酵素系は、細胞外の活性を暗示する無細胞抽出物中で活性を有する。

【0106】

構築ブロックの短鎖、中鎖及び長鎖脂肪族カルボン酸への組み込み

前記微生物は、蟻酸を形成し、そして蟻酸の段階的な追加により更に複雑な分子を形成出来るべきである。高レベルの蟻酸が形成され、蟻酸の同等物のレベルが最低 250 g パーリットルに維持されるべきである。これは、この部分で酸性レベルが蟻酸として計算される。短鎖脂肪族カルボン酸が最初に形成される。

40

【表6】

揮発性酸	5日培養 mg/l	10日培養 mg/l
酢酸(C2)	152	619
プロピオン酸(C3)	406	1840
酪酸(C4)	276	1220
吉草酸(C5)	272	1250
イソ酪酸(C4)	<50	<50
イソ吉草酸(C5)	<50	<50

10

【0107】

C2、C3、C4及びC5脂肪族カルボン酸の存在は、偶数及び奇数の炭素数の鎖が存在するため、蟻酸の段階的追加を暗示する。イソ酪酸及びイソ吉草酸は存在しないか検出レベルを下回り、これは、直鎖脂肪族カルボン酸が形成されることを示す。脂肪族カルボン酸の量は、時間経過に伴い増大する。

【0108】

当該系は、蟻酸形成とより大きい分子の形成との間で平衡を成す。平衡状態において、形成される油の量（乾燥重量で測定される）は、蟻酸の同等物として測定された酸性度の5～10%である。空気と液体の境界の油層を回収し、等量の新鮮な培地を添加することにより、持続的に油の生産が行われる。上方の油層は保存及び濃縮される。

20

【0109】

油生産物は、様々な長さの鎖を有するカルボン酸の混合物である。当該鎖の長さは、最初の培養物から除去される速さにより調整される。生産される分子の鎖の長さ及び比率は、使用される反応条件の調整や装置の種類により変動する。使用され得る反応槽の種類は、限定されないが、バッチ、連続及び半連続を含む。反応槽の種類は、限定されないが、閉鎖槽、開放槽、パドル搅拌、循環及びガスリフトを含む。

【0110】

油の生産は、半連続的に行われてもよい。前記微生物は下記に詳述される最少培地を使用してバッチ培養中で維持されてもよい。これが「ストック培養物」である。

30

【表7】

成分	g/リットル
KH ₂ PO ₄	1.00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.10
CaCO ₃	0.10
CuSO ₄	0.01
FeCl ₃	0.01
MnCl ₃	0.01
MoCl ₃	0.01
ZnCl ₃	0.01

40

【0111】

培地のpHは4.0～0.2に調整される。ストック培養中の酸性度は蟻酸として計算して20～25%で維持される。

【0112】

反応タンクにおいて使用する前に、細胞培養培地は水で1/10に希釈され、中間タンクに保留される。これが動作培養物である。

50

【0113】

下記タンク系を含むが限定されない反応タンク中で油が生産される。二酸化炭素の供給源は、限定されないが、大気中の二酸化炭素、炭酸、重炭酸イオン、炭酸又は重炭酸イオンを含有する廃水、二酸化炭素を含有する圧縮ガス及び排気ガスが含まれる。

【0114】

タンク系 1

前記反応タンクは、プラスチック又はプラスチックで被覆した材料で構成された長細いタンクである。当該タンクの側面に適切なサイズの雌コネクターがあり、それらから培地の添加又は生産物の回収を行うことが出来る。典型的な寸法は、長さ 5、広さ 1 ~ 1 . 5、深さ 1 . 0 である。タンクの一方の端から 1 / 5 の位置に仕切りが設けられている。この仕切りは、タンクの高さの 4 / 5 である。各仕切りに循環ポンプとホースが繋がれている。内容物を再循環するための散布バーも各仕切りに繋がれている。ガスシリンダー及びラインを通じて、圧縮二酸化炭素が反応タンクに連続的に添加されてもよい。タンクの 2 つの区画の小さい方の上方に、ヒーター又はヒーターランプが配置されてもよい。10

【0115】

反応タンク内で油の生産を開始するために、反応容器の大きい方の区画がストック培養培地で充填される。当該培地は、pH が 5 ~ 7 になるまで循環され、油が表層に分離する。そしてポンプのスイッチが切られる。

【0116】

あるいは、反応タンク中でオイルの生産を開始するため、反応容器の大きい方の区画がストック培養培地で充填され、開始剤 (primer) として少量の油が添加される。この油とストック培地を混合して、エマルジョンを形成する。エマルジョンの油への変換が起こるまで、追加の二酸化炭素をポンプで反応混合物に通す。油への変換は、反応混合物中の水位の減少により測定される。20

【0117】

脂質回収器 (fat collector) を吸引し、又は上層にブーム (boom) を渡して油を回収し、当該油をタンクの小さい方の区画に移動させる。移動した体積は、等量の動作培養培地で置き換えられる。

【0118】

前記区画が満杯になり、反応が完了したら、油を縦型の沈殿タンクに移し立たせる。抗微生物剤が添加され、水が沈降する。下に配置されたバルブから水が排出される。30

【0119】

油は更に濾過又は解乳化フィルター又は乾燥剤を使用して特定のレベルまで水を除去することにより処理される。

【0120】

他の方法において、20%の細菌を含有する 2 l の培養培地を抗感染剤と混合して、油の生産を行う前に細菌を死滅させる。この場硫黄培地は、二酸化炭素を蟻酸に変換し、それを脂肪族カルボン酸に変換する酵素を含有する。

【0121】

前記酵素（及び死んだ細菌）を含有する培養培地を、200リットルの廃油を入れた反応タンクに添加する。当該反応タンクの液体が約 2000 リットルになるまで、1 時間に 50 l ずつ水を添加する。当該細菌酵素は、反応タンクが水よりも多くの油を含有するときにのみ、脂肪族カルボン酸を生産する。酵素が脂肪族カルボン酸を生産するにつれ、油のレベルは増大する。油が生産されるにつれ、水のレベルはタンク内で増大し、油が堰を超えて移動する。当該反応タンクは、油の生産を維持するために更に水で反復して補充される。40

【0122】

前記反応タンクの pH は約 6 . 5 に維持され、温度は約 15 ~ 20 に維持される。

【0123】

前記反応は、溶解したガスを放出し、系の電子バランスを再び平衡にするため、定期的

50

に停止される。

【0124】

反応タンク中で所望の長さの脂肪族カルボン酸が生産されたら、脂質回収器を吸引し、又は上層にブームを渡して油を回収して、当該油をタンクの小さい方の区画に移動させる。当該油の粘度は、脂肪族カルボン酸の炭素原子長の目安になる。当該油は隔離されたタンクに流し込まれ、更なる反応を起こさないように残留した水を排除することにより、炭素原子鎖長を所望の長さに維持する。油を濾過する前に、抗微生物剤も添加される。

【0125】

タンク系2

第二の選択肢は、下部が円錐形の縦型の混合タンク、ポンプによる再循環手段、温度を維持する浸漬ヒーター及び圧縮二酸化炭素ガスを導入するためのタンクの下方に配置された散布手段を備える(図3)。ストック酵素溶液、開始剤の少量の油、及び水がタンクに添加される。任意でトリエタノールアミンやPEG300等のCO₂捕捉剤が添加されてもよい。更に、穏和な酸化剤(例えば次亜塩素酸や水酸化ナトリウム)が、反応の開始を助けるために添加されてもよい。前記ヒーターは35にセットされ、内容物は循環せられてエマルジョンを形成する。二酸化炭素はタンク下部のガス散布手段により導入される。油-水エマルジョンの脂肪族カルボン酸油への変換から、再びタンク中の水のレベルが減少する。

10

【0126】

反応が終了したら、循環とガス注入を止め、成分を沈殿させる。水はタンク下部から捨てられ、油を20ミクリンフィルターを通して第二の沈殿タンクに移す。当該油の残留水を抜くために更に沈殿させる。廃水は再循環されるか、軽油等の有機溶媒を分離するように蒸留され得る(図3)。油は熱及び原動機の組み合わせを通じて燃焼されて、熱及び電力を生産する。原動機からの排気は、限定されないがポリエチレングリコール300(PEG300)等の適切な二酸化炭素捕捉化合物で構成される洗浄単位を介して再利用されてもよい。

20

【0127】

油は、更に濾過又は解乳化フィルター又は乾燥剤を使用して特定のレベルまで水を除去することにより処理されてもよい。

【0128】

30

タンク系1及び2は、油生産物を形成するのにかかる時間が相違する。タンク系1はエネルギー消費が低いが、反応時間が長く、タンク系2は、より迅速であるがエネルギーの要求が大きい。

【0129】

前記油は、指定限界まで試験される。

【0130】

前記油は、油が意図される用途に依存して更に加工される。幾つかの例において、油は、他方の油の性質/特徴を改変するため、他の油と混合されてもよい。

【0131】

油生産物

40

油生産物は、以下の標準値により取得される。

【表8】

解析	単位	数値	特徴(示唆)
IRによる同定	—	脂肪族カルボン酸	脂肪族カルボン酸
灰	m/m	0.03	0.025–0.050
含水量	m/m	2.7	0.05 max
引火点	°C	198	190 min
粘度@40°C	cSt	23.092	20–25(50 max)
粘度指数	—	55	50 min
密度@20°C	Kg/l	938	920–950
ヨウ素価	mg I/100g	90.6	85–95
酸価	mg KOH/g	147	140–160
過酸化物価	meg/kg	2.9	3 max
総発熱量	MJ/kg	38.12	37 min

10

【0132】

あるいは、油生産物は、以下の標準値により取得される。

【表9】

20

解析	単位	数値	特徴(示唆)
IRによる同定	—	脂肪族カルボン酸	脂肪族カルボン酸
灰	m/m	0.03	0.025–0.050
引火点	°C	105	100 min
粘度@40°C	cSt		50 max
密度@15°C	Kg/l	0.853	0.85–0.882
ヨウ素価	mg I/100g	90.6	85–95
酸価	mg KOH/g	147	140–160
過酸化物価	meg/kg	2.9	3 max
酸化安定性	H	48+	48 min
硫黄含量	m/m	0.08	0.10 max
総発熱量	MJ/kg	43.42	37 min
セタン指数		50	50 min
沈降電位	%質量/質量	<0.2(典型的には0.08)	

30

【0133】

油は、脂肪族カルボン酸からなる。

- 赤外線フィンガープリント(図1)は脂肪族カルボン酸に典型的なものである。
- 油はカルボン酸に典型的な化学反応を示す。

40

当該油は、短鎖、中鎖又は長鎖原料として使用出来る。

- 当該油は、典型的には、2より大きく24より小さい炭素原子長の鎖を有する。
- 当該油は、典型的にはヨウ素価が90~95mg I / 100gの单不飽和である。
- 当該油生産物は、他の商業的に有用な生産物を取得するための短鎖、中鎖又は長鎖原料として、カルボン酸の反応に供される。

これらの反応は、限定されないが、

a. リパーぜ、酸触媒又はアルカリ触媒を使用するアルコールとの反応によるエステルの生産。

b. エステル中間体を経て、又は Schmidt 反応により直接の、アミドの生産。

50

c . 限定されないがアルカリ水酸化物、炭酸塩又はヒドロキシ炭酸塩等の塩基を用いたカルボン酸塩の生産。

d . 限定されないがNNジメチルクロロエチル塩化アンモニウム及び水素化アルミニウムリチウム等の触媒を用いて、水素化により直接、又はアルデヒド中間体を経ての、アルコールへの還元。

e . 水素化により直接、又はRosenmund還元を採用する酸ハロゲン化物又はFukuyama還元を介したチオエステル等の中間体を介しての、アルデヒドの還元。

f . 二酸化硫黄オキシド、亜リン酸(V)塩化物及び亜リン酸三塩化物等を含む試薬を使用した酸塩化物の生産。

g . デカルボキシラーゼを用いて酵素的に、又はソーダ石灰を用いて、カルボン酸又は酸性塩を脱カルボキシル化して、等価の炭化水素を生産する。 10

h . Barbier-Wieeland分解によるサイズ縮小。

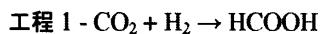
- 前記油は、直接生産され、バイオマスの生産やその後の加工を経ない。

- 前記油は、発酵により生産されない。

【0134】

前記油を生産する方法は、新しい方法で「駆動する」。当該プロセスの第一の工程は、二酸化炭素の還元による蟻酸の生産である。蟻酸は還元剤である（酸化還元電位 -0.25）。この最初の反応の工程は二酸化炭素を固定するが、プロセスの次の部分（鎖の構築）を駆動するのに充分な還元同等物（reducing equivalents）も生産する。このIn situの化学バッテリーの使用は、他の酸化還元反応を駆動するのに使用され得る。蟻酸（還元剤は、更に利用可能なカルボン酸（酸化剤）を還元し、成長している炭素鎖に炭素を1つ追加し、酸素をO₂として放出する。こうして、上記反応を駆動するために還元剤を添加する必要を免れ、炭素及び還元同等物は、最終産物中で隔離されている。 20

【化3】



30

【0135】

鎖を構築する最初の工程は、溶液中で蟻酸（及び最も短い鎖のカルボン酸）がダイマーを形成する傾向により促進される。

【0136】

参考文献

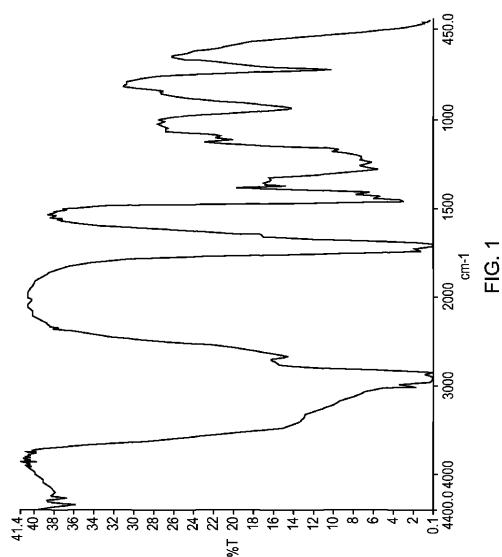
- (1) Qiang, L. et al. Applied Microbiology & Biotechnology (2008) pp 749-756
- (2) Haas, M.J. et al. Biodiesel Handbook (2005) Eds. Knothe, G., Krahl, J. And Gerpen, J.V. AOCS Press, Urbana, IL pp 42-61
- (3) Eliasson, B. et al. Ind Eng.Chem. Res. (1998) 37 pp 3350
- (4) Wenzhein, L. Advances in Carbon Dioxide Conversion and Utilization (2010) Edit Hu, Y Am Chem Soc, Washington D.C 40
- (5) Howell, K. Scientific American (2009) pp 22
- (6) Liao, J.C. et al. Nature Biotechnology 29 (2011) 346-351
- (7) Yin, S et al, (05.01.2012), USA Patent 2012003705
- (8) McCollom, R. et al. Origins of Life and Evolution in the Biosphere (1999) 29 153-166
- (9) Yoneyama, H. Catalysis Today (1997) 39 169-175
- (10) Reda, T et al. PNAS (2008) 105 10654-10658
- (11) Song Yin et al. (2012), US Patent 2012/0003705
- (12) Simpson, S.D (2010), US Patent 2010/0317074 A 1

50

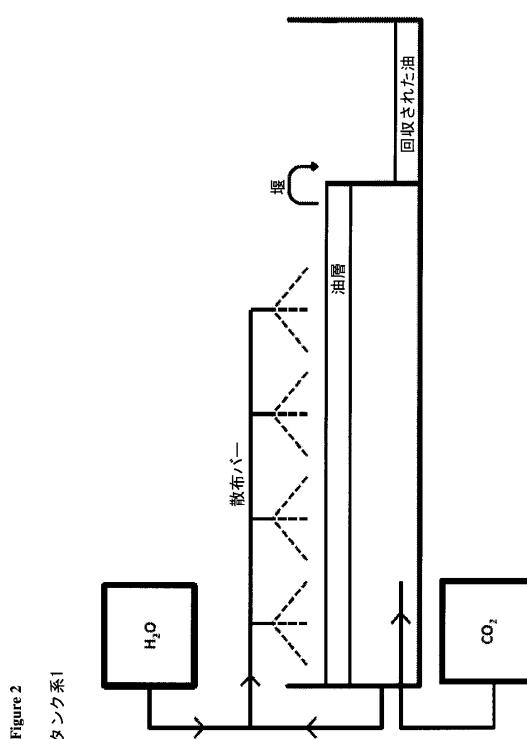
- (13) Hickey, R. (2012) US Patent 2012/0003706A1
 (14) Hickey, R (2012) US Patent 2012/0003707A1
 (15) Kohn, R.A and Kim S-W (2012) US Patent 2012/0034664 A 1
 (16) Worm, P et al. Microbiology (2011) 157 286-289
 (17) Molinari, F., Villa, R., Aragozzini, F., Cabella, P., Barbeni, M. and Squarcia, F. J. Chem. Biotechnol. (1997) 70 294-298
 (18) Fox, M.G.A, Fox, F., Dickinson, M and Ratledge, R. J. Gen. Microbiol. (1992) 138 1963-1972
 (19) Tosatto, S.C.E., Toppo, S., Carbonera, D., Giacometti, G.M. and Costantini, P. Int. J. Hydrogen Energy (2008) 33 570-578
 (20) Eberz, G., Hogrefe, C, Kortluke, C, Kamienski, A. And Friedrich, B. J. Bacteriol (1986) 168 636-641
 (21) Ortrud Ashenbrenner and Peter Styring (2010) Energy Environmental Science 3, 1106-1113

10

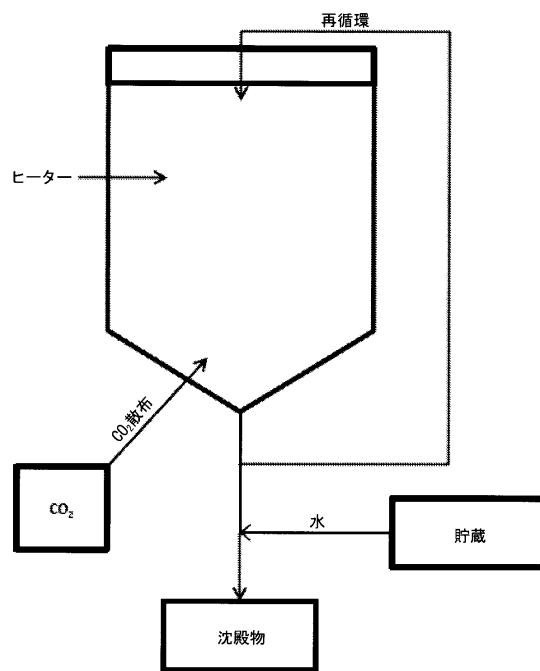
【図1】



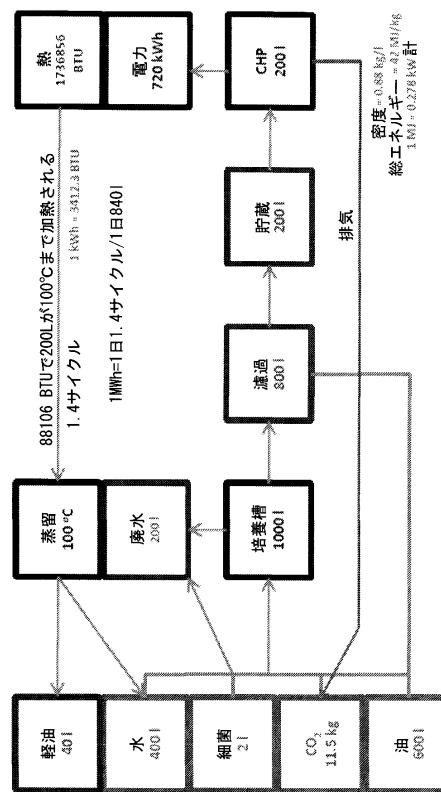
【図2】



【図3】

Figure 3
タンク系2

【図4】



フロントページの続き

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100182730

弁理士 大島 浩明

(72)発明者 アイリーン フィネガン

イギリス国, ノーザンプトンシャー エヌエヌ6 7エスキュー, クリック, ウエスト ハッドン
, サマー ファーム, シー / オー バーダント バイオプロダクツ リミティド

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0151543(US, A1)

特開昭60-133890(JP, A)

国際公開第2010/115054(WO, A1)

国際公開第2008/070561(WO, A1)

Cleenwerck I et, al., "Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology." 2008, international J food microbiology, , 125 (1), p p.2-14.

Bryan R Crable et al., "Formate formationand formate conversionin biological fules production." 2011, Enzyme research, , 41(1), pp.100-108.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 1 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d