

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年10月21日(2010.10.21)

【公表番号】特表2010-504756(P2010-504756A)

【公表日】平成22年2月18日(2010.2.18)

【年通号数】公開・登録公報2010-007

【出願番号】特願2009-530430(P2009-530430)

【国際特許分類】

C 12 P 7/06 (2006.01)

C 12 R 1/01 (2006.01)

【F I】

C 12 P 7/06

C 12 P 7/06

C 12 R 1:01

【手続補正書】

【提出日】平成22年8月18日(2010.8.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0192

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0192】

ZW801-4が少なくともZW800と同様に作動したことを示唆した振盪フラスコ実験の結果を確認するために、これらの2つの株を、pH制御条件下で比較した。種培養物を、75g/Lグルコース、25g/Lキシロース、10g/L酵母抽出物、2g/LのKH2PO4、1g/LのMgSO4を含有する培地において、30で増殖させた。OD600が約4.6に到達したら、種培養物の17m1アリコートを使用して、153m1の増殖培地を含有するpH制御バイオリアクターに播種した。最終的な170m1培養物は、105g/Lグルコース、100g/Lキシロース、10g/L酵母抽出物、2g/LのKH2PO4、1g/LのMgSO4、5mMソルビトールおよび7.2g/Lの酢酸塩を含有した。増殖は33で行い、そしてpHを、4NのKOHの自動化された添加によって5.5に維持した；混合速度は約150rpmであった。多様な時間において、上記のように、発酵プロセスのHPLC分析のために、バイオリアクターから培養物のアリコートを取り出し、そしてまた、OD600もモニターした。これらの実験条件下では、ZW800およびZW801-4の増殖曲線は、ほとんど重ね合わせることができた（図23A）。グルコースおよびキシロース消費の時間経過はまた、事実上同一であり、そして両方の株は、同様の動態で同じ量のエタノールを产生した（図23B）。さらに加えて、これらの株のいずれも、検出可能なキシリトールを何ら产生しなかった。これらの観察に基づいて、本発明者らは、GFORオープンリーディングフレームからspecr-カセットを取り出しても、GFOR酵素活性が回復または部分的に回復しなかったこと、およびこの操作は発酵性能に有害な影響を及ぼさなかったことを結論付けている。ZW800およびZW801-4は両方とも機能性GFOR酵素を有する親株（ZW658）より良好に作動したが、ZW801-4は抗生物質に対する耐性を付与する外来遺伝子を含有しないため、商業的アプリケーションに好適な株は、ZW801-4である。

ZW801-4由来のゲノムDNAの配列解析は、正確なCre切り出し事象が実際に生じた明白な証拠を提供した。ZW801-4における破壊されたGFORオープンリーディングの完全なヌクレオチド配列（本来の開始コドンから本来の終止コドンまで）を配列番号37に示し、そして図24は、翻訳された変異体配列と野生型GFORタンパク質

とのアライメントを示し；後者は、ジェンバンク（G e n B a n k ）受託番号A E 0 0 8 6 9 2 のn t 6 8 3 7 5 1 ~ 6 8 5 0 5 2 の逆相補鎖によってコードされる。予想したとおり、S p e c r - カセットのC r e 切り出しは、G F O R オープンリーディングフレームの中間において単一の野生型l o x P 部位を残し、そしてこの挿入事象は、タンパク質を未熟な状態で切り詰めるインフレーム終止コドンを生じた；「l o x s c a r 」の局在を、灰色で強調された残基によって示す。自殺構築物の設計の結果として、変異体又クレオチド配列もまた、同じ場所で生来の野生型G F O R ヌクレオチド配列のうち約7 2 b p を失っている。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 9 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 9 3】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1 . a) キシロースを資化して、エタノールを產生することができる組み換えザイモモナス株であって、グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を低下させる少なくとも1つの遺伝子改変を含む上記株を提供すること、および

b) キシロースを含む培地において(a)の株を培養し、それによって、キシロースをエタノールに変換させること

を含む、エタノールの生産方法。

2 . (a)の株が、グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を低下させる少なくとも1つの遺伝子改変を伴わない組み換えザイモモナス株に関連して、キシロースからエタノールへの変換を改善する、上記1に記載の方法。

3 . (a)の株が、グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を低下させる少なくとも1つの遺伝子改変を伴わない組み換えザイモモナス株に関連して、エタノールへのキシロース変換の速度、力価または収率の1つまたはそれ以上を改善する、上記2に記載の方法。

4 . (a)の株は、グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を低下させる少なくとも1つの遺伝子改変を伴わないザイモモナス株と比較して、キシロースをエタノールへ代謝する場合のキシリトールの產生量が少ない、上記1に記載の方法。

5 . (a)の株が、キシロースをエタノールへ代謝する場合、実質的にキシリトールを產生しない、上記4に記載の方法。

6 . (a)の組み換えザイモモナス株が、Z W 8 0 0 、Z W 8 0 1 - 4 およびZ W 8 0 1 - 6 からなる群から選択される、上記1に記載の方法。

7 . 培地は、キシロースを含む糖類と、ソルビトール、マンニトール、ガラクチトール、リビトール、およびそれらの混合物からなる群から選択される糖アルコールとの混合物を含み、ここで、糖類の混合物は、少なくとも約1 2 0 g / L の濃度で存在し、ここで、糖アルコールは、約2 m M と約1 0 0 m Mとの間にある最終濃度で存在する、上記1に記載の方法。

8 . 糖アルコールは、約5 m M と約2 0 m Mとの間にある濃度にある、上記7に記載の方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) キシロースを資化して、エタノールを產生することができる組み換えザイモモナス

株であって、グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を低下させる少なくとも 1 つの遺伝子改変を含む上記株を提供すること、および

b) キシロースを含む培地において (a) の株を培養し、それによって、キシロースをエタノールに変換させること
を含む、エタノールの生産方法。