

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6813354号  
(P6813354)

(45) 発行日 令和3年1月13日(2021.1.13)

(24) 登録日 令和2年12月21日(2020.12.21)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 1/20	(2006.01)
C 12 P 1/04	(2006.01)
C 12 P 7/04	(2006.01)
C 12 P 7/16	(2006.01)
C 12 P 7/18	(2006.01)
	C 12 N 1/20
	C 12 P 1/04
	C 12 N 1/20
	C 12 P 1/04
	C 12 P 7/04

請求項の数 14 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-501752 (P2016-501752)
(86) (22) 出願日	平成26年3月12日 (2014.3.12)
(65) 公表番号	特表2016-511009 (P2016-511009A)
(43) 公表日	平成28年4月14日 (2016.4.14)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/025128
(87) 國際公開番号	W02014/151158
(87) 國際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)
審査請求日	平成28年12月7日 (2016.12.7)
審判番号	不服2019-3143 (P2019-3143/J1)
審判請求日	平成31年3月6日 (2019.3.6)
(31) 優先権主張番号	61/791,065
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	510119555 ランザテク・ニュージーランド・リミテッド ニュージーランド国 1010 オークラ ンド, ショートランド ストリート 41 , レベル 11, ティーエムエフ グループ内
(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】微生物発酵における代謝産物生成を制御するためのシステム及び方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 1 つのカルボキシド栄養性 (carboxydotrophic) の酢酸產生微生物を含む発酵培養物の代謝プロファイルを制御するための方法であって、

a. C O 及び C O <sub>2</sub> を含むガス状基質を、液体栄養培地中の前記微生物の培養物を含む第 1 のバイオリアクターに流入させ、アセチル C o A に由来する少なくとも 1 つの生成物と、ピルビン酸塩に由来する少なくとも 1 つの生成物とを生成することと、

b. 前記液体栄養培地中に溶解する C O <sub>2</sub> の量を調整することと、を含み、

ここで前記液体栄養培地中に溶解する C O <sub>2</sub> の前記量を増加させて、ピルビン酸塩に由来する生成物の生成を増加させることによって、ピルビン酸塩に由来する生成物のアセチル C o A に由来する生成物に対する比を増加させるか、又は、前記液体栄養培地中に溶解する C O <sub>2</sub> の前記量を減少させて、ピルビン酸塩に由来する生成物の生成を減少させることによって、ピルビン酸塩に由来する生成物のアセチル C o A に由来する生成物に対する比を減少させ、

前記液体栄養培地中に溶解する C O <sub>2</sub> の前記量が、

- (i) 前記バイオリアクターへの C O <sub>2</sub> の前記流入を制御すること、
- (ii) 流入ガス中の C O <sub>2</sub> 濃度を制御すること、及び
- (iii) 前記バイオリアクター中の圧を制御すること、

からなる群から選ばれる少なくとも 1 つによって調整される、方法。

## 【請求項 2】

10

20

前記バイオリアクター中の前記圧を250kPa<sup>g</sup>超にして、前記液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の濃度を増加させる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記バイオリアクター中の前記圧を200kPa<sup>g</sup>未満にして、前記液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の濃度を減少させる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の前記量が、前記培養により消費されたCOの量を制御することによって調整される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記バイオリアクターに提供される前記ガス状基質中のCO<sub>2</sub>の濃度が、15%～65%である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記バイオリアクターに提供される前記ガス状基質中のCO<sub>2</sub>の濃度が、経時的に徐々に増加する、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

ピルビン酸塩に由来する前記少なくとも1つの生成物が、2,3-ブタンジオール、乳酸塩、コハク酸塩、メチルエチルケトン(MEK)、2-ブタノール、プロパンジオール、2-プロパノール、イソプロパノール、アセトイン、イソブタノール、シトラマル酸塩、ブタジエン、及びポリ乳酸(PLA)からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項8】

前記バイオリアクター内の前記培養物によって利用されるCO<sub>2</sub>の前記量を監視するために、前記バイオリアクターから流出する流出流における前記CO<sub>2</sub>濃度を監視することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記第1のバイオリアクターから流出するCO<sub>2</sub>含有流出ガスは、基質として使用するために、前記第1のバイオリアクターに戻されるか、又は第2のバイオリアクターに渡されることをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記第2のバイオリアクターが、前記第1のバイオリアクターよりも、アセチルCoA由来生成物とピルビン酸塩由来生成物との低い比を生じる、請求項9に記載の方法。

30

【請求項11】

前記少なくとも1つのカルボキシド栄養性の酢酸産生微生物が、ムーレラ属(Moorella)、クロストリジウム属(Clostridium)、ルミノコッカス属(Ruminococcus)、アセトバクテリウム属(Acetobacterium)、ユーバクテリウム属(Eubacterium)、ブチリバクテリウム属(Butyribacterium)、オキソバクター属(Oxobacter)、メタノサルチナ属(Methanosarcina)、及びデスルホトマクルム属(Desulphotomaculum)からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

40

前記少なくとも1つの微生物が、クロストリジウム・オートエタノゲナム(Clostridium autoethanogenum)、クロストリジウム・ルジュングダーリイ(Clostridium ljungdahlii)、クロストリジウム・ラグスダレイ(Clostridium ragsdalei)、クロストリジウム・カルボキシディボランス(Clostridium carboxydovorans)、及びクロストリジウム・コスカチイ(Clostridium coskati)からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の前記量が11.05mM超であり、これにより、ピルビン酸塩に由来する少なくとも1つの生成物が少なくとも2.18g/L/day

50

の速度で生成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記液体栄養培地中に溶解する  $\text{CO}_2$  の前記量が 26.1 mM 超であり、これにより、ピルビン酸塩に由来する少なくとも 1 つの生成物が少なくとも 8 g / L / day の速度で生成される、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的には、微生物発酵による 1 つ以上の生成物の生成を制御するための方法に関する。特に、本発明は、微生物培養に提供される二酸化炭素の量を制御するための方法に関する。特定の実施形態では、培養物に提供される溶解  $\text{CO}_2$  の量を制御することによって、発酵工程の代謝プロファイルが制御される。

10

【背景技術】

【0002】

エタノールは、世界中で、主要な水素豊富液体交通燃料に急速になりつつある。2002 年のエタノールの世界的規模での消費は、推定 10 億 8 千万ガロンであった。欧州、日本、米国及びいくつかの新興国において関心が高まっているために、燃料エタノール産業の世界市場もまた、将来的に急激に成長することが予測されている。

20

【0003】

例えば、米国では、エタノールは、E10、すなわちガソリン中のエタノールの 10 % 混合物を生成するために使用されている。E10 配合物中では、エタノール成分は、燃焼の効率を改善しつつ大気汚染物質の生成を減少させる、酸素添加剤として作用する。ブラジルでは、エタノールは、ガソリン中に配合される酸素添加剤として、またはそれ自体が純粋な燃料としての両方で、交通燃料需要のおよそ 30 % を満たしている。また欧州では、温室効果ガス (GHG) 排出の結果を取り巻く環境上の懸念が、欧州連合 (EU) を誘起し、加盟国にバイオマス誘導エタノール等の持続性交通燃料の消費に対する義務的な目標値を設定させた。

【0004】

大部分の燃料エタノールは、主要な炭素源として、サトウキビから抽出されたショ糖または穀粒作物から抽出されるデンプン等の穀物由来の炭水化物を使用する従来の酵母系発酵工程を介して生成される。しかしながら、これらの炭水化物供給原料のコストは、ヒトの食物または動物用飼料としてのこれらの価値によって影響を受け、一方でエタノール生産のためのデンプンまたはショ糖生産穀物の収穫は、全ての地理的条件において経済的に持続可能であるわけではない。したがって、より低コストの及び / またはより大量の炭素資源を燃料エタノールに変換するための技術を開発することは興味深いことである。

30

【0005】

$\text{CO}_2$  は、石炭または石油もしくは石油由来製品等の有機材料の不完全燃焼の主な自由エネルギーに富む副生成物である。例えば、オーストラリアの鉄鋼業界は、年間 500,000 トンを超える  $\text{CO}_2$  を生成し、大気中に放出することが報告されている。

40

【0006】

触媒プロセスを使用して、主として  $\text{CO}_2$  及び / または  $\text{CO}$  ならびに水素 ( $\text{H}_2$ ) からなるガスを種々の燃料及び化学物質に変換し得ることが長い間認識されてきた。しかしながら、微生物を使用して、これらのガスを燃料及び化学物質に変換することもできる。これらの生物学的プロセスは、一般的に化学反応よりも遅いが、より高い特異性、より高い収率、より低いエネルギーコスト、及び被毒に対するより大きな抵抗性を含む、触媒プロセスを超えるいくつかの利点を有する。

【0007】

微生物が唯一の炭素源としての  $\text{CO}_2$  上で増殖する能力は、1903 年に初めて発見された。これは、独立栄養増殖のアセチルコエンザイム A (アセチル  $\text{CoA}$ ) 生化学的経路 (

50

Woods - Jungdahl 経路及び一酸化炭素デヒドロゲナーゼ / アセチルCoA シンターゼ (CODH / ACS) 経路としても知られる) を使用する微生物の特性であることが後に決定された。カルボキシド栄養性 (carboxydrophic) 菌、光合成菌、メタン生成菌及び酢酸產生菌を含む多数の嫌気性菌が、COを種々の最終産物、すなわち、CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>、メタン、n-ブタノール、酢酸塩、及びエタノールに代謝することが示されている。COを唯一の炭素源として使用しながら、全てのこうした微生物は、これらの最終産物のうちの少なくとも2つを生成する。

【0008】

クロストリジウム (Clostridium) 属からのもの等の嫌気性細菌は、アセチルCoA生化学的経路を介して、CO、CO<sub>2</sub>及びH<sub>2</sub>からエタノールを生成することが立証されている。例えば、ガスからエタノールを生成するクロストリジウム・ルジュングダーリイ (Clostridium jungdahlii) の様々な菌株が、WO 00/68407号、EP 117309号、米国特許第5,173,429号、同第5,593,886号、及び同第6,368,819号、WO 98/00558号及びWO 02/08438号に記載されている。細菌クロストリジウム・オートエタノゲナム菌種 (Clostridium autoethanogenum sp.) もまたガスからエタノールを生成することが知られている (Archives of Microbiology 161, pp 345-351 (1994))。

【0009】

しかしながら、ガスの発酵による微生物でのエタノール生成は、常に酢酸塩及び/または酢酸の同時生成を伴う。利用可能な炭素の一部が、エタノールよりはむしろ酢酸塩 / 酢酸に変換されるために、こうした発酵工程を使用するエタノール生成の効率は、望ましいものよりも低い場合がある。さらに、酢酸塩 / 酢酸副生成物がいくつかの他の目的に使用され得ない限り、これは廃棄物処理問題が生じる。酢酸塩 / 酢酸は、微生物によってメタンに変換され、したがって、温室効果ガス排出に寄与する可能性を有する。

【0010】

発酵用に使用されるバイオリアクター内で細菌または微生物を培養するために使用される液体栄養培地のパラメータを制御することの重要性は、当該技術分野において認識されている。2007年7月18日に出願され、参照により本明細書に組み込まれるNZ 556615号は、特に、こうした液体栄養培地のpH及び酸化還元電位の操作を記載している。例えば、嫌気性酢酸產生細菌の培養において、培養物の酸化還元電位を低レベル (-400mV以下) にて維持しつつ、培養物のpHを約5.7より高く上昇させることによって、細菌は発酵の副生成物として生成された酢酸塩を、より低いpH条件下での場合よりもはるかに高い速度でエタノールに変換する。NZ 556615号は、異なるpHレベル及び酸化還元電位が、細菌が実行する主要な役割 (すなわち、増殖すること、酢酸塩及びガス状CO含有基質からエタノールを生成すること、または基質を含有するガス体からエタノールを生成すること) に応じて、条件を最適化するために使用され得ることをさらに認識している。

【0011】

US 7,078,201号及びWO 02/08438号はまた、発酵が行われている液体栄養培地の条件 (例えば、pH及び酸化還元電位) を変化させることによって、エタノールを生成するための発酵工程を改善することを記載している。

【0012】

液体栄養培地のpHは、1つ以上のpH調節剤または緩衝液を培地に添加することによって調整されてもよい。例えば、NaOHなどの塩基及び硫酸などの酸が、要求に応じてpHを増加または減少させるために使用されてもよい。酸化還元電位は、1つ以上の還元剤 (例えば、メチルビオロゲン) または酸化剤を添加することによって調整されてもよい。あるいは、培地のpHは、微生物がガスによって「過剰供給される」ように、過剰量のガス状基質を発酵物に提供することによって調整されてもよい。

【0013】

10

20

30

40

50

当業者には明白であるように、同様なプロセスがブタノールなどの他のアルコールを生成するために使用されてもよい。

#### 【0014】

上記の不利点を克服する方向へと少なくともある程度向かうシステム及び／またはプロセスを提供すること、または少なくとも公衆に有用な選択肢を提供することが、本発明の目的である。

#### 【発明の概要】

#### 【0015】

本発明の第1の態様において、少なくとも1つのカルボキシド栄養性の酢酸産生微生物を含む発酵培養物の代謝プロファイルを制御するための方法が提供され、本方法は、

10

a. C O 及び C O 2 を含むガス状基質を、液体栄養培地中の微生物の培養物を含むバイオリアクターに流し込むこと、

b. 培養物の代謝が変更されるように、培養物中に溶解する C O 2 の量を調整すること、を含む。

#### 【0016】

一実施形態では、液体栄養培地中に溶解する C O 2 の量は、バイオリアクターへの C O 2 の流量を制御することによって調整される。一実施形態では、液体栄養培地中に溶解する C O 2 の量を増加させることは、ピルビン酸塩に由来する1つ以上の生成物の生成が増加するように微生物の代謝を変更させる。一実施形態では、液体栄養培地中に溶解する C O 2 の量を減少させることは、ピルビン酸塩に由来する1つ以上の生成物の生成が減少するように微生物の代謝を変更させる。

20

#### 【0017】

一実施形態では、ピルビン酸塩に由来する1つ以上の生成物は、2,3-ブタンジオール(2,3-BDO)、乳酸塩、コハク酸塩、メチルエチルケトン(MEK)、2-ブタノール、プロパンジオール、2-プロパノール、イソプロパノール、アセトイソブタノール、シトラマル酸塩、ブタジエン、及びポリ乳酸(PLA)からなる群から選択される。

#### 【0018】

一実施形態では、発酵は、液体栄養培地中に溶解する C O 2 の濃度が増加するように、約250～約450 k P a g (または500 k P a g 超)圧力で行われる。特定の実施形態では、圧力は、250 k P a g 超、または300 k P a g 超、または350 k P a g 超、または400 k P a g 超、または450 k P a g 超、または500 k P a g 超である。

30

#### 【0019】

代替実施形態では、リアクター内の圧力は、ピルビン酸塩に由来する1つ以上の生成物と比べて、アセチル c o A に由来する1つ以上の生成物の生成を促進するために、減少されまたは最小限に抑えられる。特定の実施形態では、バイオリアクター内の圧力は、およそ大気圧から約200 k P a g までであるか、または200 k P a g 以下、もしくは150 k P a g 未満、もしくは100 k P a g 未満、もしくは50 k P a g 未満、もしくは大気圧に維持される。

#### 【0020】

40

一実施形態では、液体栄養培地中に溶解する C O 2 の量を増加させるために、 C O 2 分圧を増加させる。

#### 【0021】

一実施形態では、液体栄養培地中に溶解する C O 2 の量は、発酵に提供されるガス状基質中の C O 2 の量を増加させることによって、増加される。一実施形態では、バイオリアクターに提供される基質中の C O 2 の濃度は、少なくとも10%、または少なくとも15%、または少なくとも18%、または少なくとも20%、または少なくとも25%、または少なくとも30%、または少なくとも35%、または少なくとも40%、または少なくとも45%である。特定の実施形態では、バイオリアクターに提供される基質中の C O 2 の濃度は、15%～65%、または約20%～約50%、または約25%～約45%であ

50

る。圧力が発酵物にかけられる実施形態においては、発酵物によって要求されるCO<sub>2</sub>の量を減少させる。約50kPa超の圧力の存在下では、基質流中に提供されるCO<sub>2</sub>の量は、大気圧で提供される場合よりも実質的に少ない。特定の実施形態では、バイオリアクターに提供される基質中のCO<sub>2</sub>の濃度は、約50kPa超の圧力で供給されるとき、約1%～約50%である。

#### 【0022】

本発明の第2の態様では、ピルビン酸塩に由来する少なくとも1つの生成物の生成を増加させるための方法が提供され、本方法は、

a. 液体栄養培地中に少なくとも1つのカルボキシド栄養性の酢酸產生微生物の培養物を含むバイオリアクターに、CO及びCO<sub>2</sub>を含む基質を流し込むことと、

b. 液体栄養培地中に提供される溶解CO<sub>2</sub>の量を増加させるように、バイオリアクターに流されるCO<sub>2</sub>の量を調整することと、を含む。

#### 【0023】

本発明の第3の態様では、ピルビン酸塩由来生成物とアセチルCo-A由来生成物との比を制御するための方法が提供され、本方法は、

a. 液体栄養培地中に少なくとも1つのカルボキシド栄養性の酢酸產生微生物の培養物を含むバイオリアクターに、CO及びCO<sub>2</sub>を含む基質を流し込むことと、

b. バイオリアクターへの二酸化炭素の流量を調整し、その結果、液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の量が、それによって、ピルビン酸塩由来生成物とアセチルCoA由来生成物との比を制御するようにすることと、を含む。

#### 【0024】

本発明の一実施形態では、液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の量を増加させることは、ピルビン酸塩由来生成物の生成を増加させることによって、ピルビン酸塩由来生成物とアセチルCoA由来生成物との比を増加させる。一実施形態では、液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の量を減少させることは、ピルビン酸塩由来生成物の生成を減少させることによって、ピルビン酸塩由来生成物とアセチルCoA由来生成物との比を減少させる。

#### 【0025】

第4の態様では、少なくとも1つのカルボキシド栄養性の酢酸產生微生物を含む発酵培養物の代謝プロファイルを制御するための方法が提供され、本方法は、

a. 液体栄養培地中に微生物の培養物を含むバイオリアクターに、CO及びCO<sub>2</sub>を含むガス状基質を流し込むことと、

b. バイオリアクターを出る流出流中のCO<sub>2</sub>濃度を監視することと、

c. 培養物の代謝が制御されるように、液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の量を調整することと、を含む。

#### 【0026】

第5の態様では、1つ以上の生成物の生成を増加させるための方法が提供され、本方法は、

a. COを含む基質を、液体栄養培地中に1つ以上の微生物の培養物を収容するバイオリアクターに提供することと、

b. 基質を発酵させ、1つ以上の液体生成物とCO<sub>2</sub>とを生成することと、を含む。

#### 【0027】

一実施形態では、培養物によって消費されるCOの量及び培養物によって生成されるCO<sub>2</sub>の量を増加させるために、1つ以上の発酵条件が調整される。一実施形態では、培養物によって消費されるCOの量は、発酵における質量移動を変更することによって、増加される。一実施形態では、培養物によって消費されるCOの量は、バイオリアクターへのガス状基質の流速を増加させることによって、増加される。一実施形態では、培養物によって消費されるCOの量は、バイオリアクター内の液体栄養培地の攪拌の速度を増加させることによって、増加される。一実施形態では、培養物によって消費されるCOの量は、気泡表面積を増加させることによって、増加される。

#### 【0028】

10

20

30

40

50

一実施形態では、微生物培養によって消費されるCOの量を増加させることは、バイオリアクターを出る出口流中のCO<sub>2</sub>の量を増加させる。一実施形態では、出口流中のCO<sub>2</sub>の量は、少なくとも30%、または少なくとも35%、または少なくとも40%、または少なくとも45%、または少なくとも50%である。

【0029】

第6の態様では、少なくとも1つの微生物の培養物を含む液体栄養培地中の溶解CO<sub>2</sub>の量を増加させるための方法が提供され、本方法は、

a. COを含む供給ガス流及び液体栄養培地を少なくとも1つのバイオリアクターに導入し、発酵プロスを形成すること（このバイオリアクターは、バイオリアクターの頂部近くのポイントからバイオリアクターの底部近くのポイントまで発酵プロスの一部を循環させるための下降管をさらに備える）と、

b. バイオリアクター内でCOを液体生成物とCO<sub>2</sub>を含むガス流出流とに発酵させることと、

c. ガス流出流の少なくとも一部に、バイオリアクターの頂部近くに位置するガス流出流のソースであるバイオリアクターの下降管をまたは第2のバイオリアクターのいずれかを通過させることと、

d. ガス流出流と液体栄養培地を下降管に沿って混合し、ガス-液体混合物を形成し、それによって、ガス-液体混合物の上の静圧を増加させることで、流出ガス流からのCO<sub>2</sub>を下降管の底部において液体栄養培地に溶解させることと、を含む。

【0030】

特別な実施形態において、バイオリアクターからの流出ガス流は、第2のバイオリアクターの下降管まで渡される。別の実施形態では、第1のバイオリアクターからの流出ガス流は、第1のバイオリアクターの下降管に再循環される。あるいは、第1のバイオリアクターからの流出ガス流は、第1または第2のバイオリアクターのいずれかのガス流入口に渡される。さらに、第2のリアクターへの供給流は、任意選択的に新鮮な供給ガス流と混合された、第1のリアクターからの流出ガス流または排ガス流の一部であり得る。追加のバイオリアクターは、直列に追加することができ、流出ガス流は、上述のように同一または異なるバイオリアクターを通過させることができる。

【0031】

さらなる態様では、ガス状基質の微生物発酵によって1つ以上の生成物を生成するための方法が提供され、本方法は、

a. 液体栄養培地中の1つ以上のカルボキシド栄養性微生物の培養物を含む第1のリアクターにおいて、COを含むガス状基質を受け取ることと、

b. COを含むガス状基質を発酵させて、1つ以上の液体生成物とCO<sub>2</sub>を含む流出ガスとを生成することと、

c. CO<sub>2</sub>を含む流出ガスを第2のバイオリアクターに供給すること（該第2のバイオリアクターは、液体栄養培地中の1つ以上のカルボキシド栄養性微生物の培養物を含む）と、

d. CO<sub>2</sub>を含む流出ガスを発酵させて、1つ以上の生成物を生成することと、を含む。

【0032】

一実施形態では、CO<sub>2</sub>を含む流出ガスは、第2のバイオリアクターに供給される前に、1つ以上のガス状基質とブレンドされる。一実施形態では、追加のガス状基質は、微生物発酵における基質として使用するために第2のバイオリアクターに添加される。

【0033】

一実施形態では、第1のバイオリアクター及び第2のバイオリアクター内で提供される1つ以上の微生物は同一である。一実施形態では、微生物発酵は、少なくとも2つの生成物を生成する。一実施形態では、2つの生成物の生成比は、第1のバイオリアクターと第2のバイオリアクター間で異なる。一実施形態では、発酵は少なくとも1つのアルコールと少なくとも1つの副生成物とを生成する。一実施形態では、少なくとも1つの生成物と

10

20

30

40

50

少なくとも 1 つの副生成物との比は、第 1 及び第 2 のバイオリアクターで異なる。一実施形態では、生成物はエタノールであり、副生成物は 2,3-ブタンジオール (2,3-BDO) である。一実施形態では、エタノール (EtOH) と 2,3-BDO の比は、第 2 のバイオリアクターにおいてより低い。

【0034】

一実施形態では、1 つ以上の微生物は、クロストリジウム・オートエタノゲナム (Clostridium autoethanogenum)、クロストリジウム・ルジュングダーリイ (Clostridium ljungdahlii)、クロストリジウム・ラグスダレイ (Clostridium ragsdalei)、クロストリジウム・カルボキシディボランス (Clostridium carboxydovorans)、及びクロストリジウム・コスカチイ (Clostridium coskati) からなる群から選択される。

【0035】

一実施形態では、第 2 のバイオリアクターから流出する排ガスは、基質として使用するために第 1 のバイオリアクターに再循環され得る。

【0036】

本発明のさらなる態様では、少なくとも 1 つのカルボキシド栄養性の酢酸產生微生物を含む発酵培養物の代謝プロファイルを制御するための方法が提供され、本方法は、

a. CO を含むガス状基質を、液体栄養培地中に微生物の培養物を含むバイオリアクターに流し込み、発酵プロスを提供することと、

b. フェレドキシン依存性一酸化炭素デヒドロゲナーゼを介して CO 酸化の速度を増加させて、発酵プロス中の還元フェレドキシンのレベルを増加させることと、を含み、

還元フェレドキシンのレベルの増加は、アセチル-CoA からのピルビン酸塩発酵の速度を増加させる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図 1】本発明の微生物の代謝経路を示す。

【図 2】圧力の発酵中の代謝産物濃度に及ぼす効果を示すグラフである。

【図 3】液体栄養培地中の溶解 CO<sub>2</sub> の 2,3-ブタンジオール生成に及ぼす効果を示すグラフである。

【図 4】実施例 2 の微生物培養物中の CO の利用率を示すグラフである。

【図 5】実施例 3 A についての入口流中の CO<sub>2</sub> 濃度の代謝産物濃度に及ぼす効果を示す図である。

【図 6】実施例 3 A についての微生物培養物による CO、CO<sub>2</sub> 及び H<sub>2</sub> の取り込みを示すグラフである。

【図 7】実施例 3 B についての経時的な代謝産物の濃度を示すグラフである。

【図 8】実施例 3 B についてのガス組成を示すグラフである。

【図 9】微生物培養物による実施例 3 C の入口ガス流の種々の成分の取り込みを示すグラフである。

【図 10】実施例 3 C についての入口ガス流中の CO<sub>2</sub> を段階的に増加させることの代謝産物濃度に及ぼす効果を示すグラフである。

【図 11】実施例 3 D に従って、入口流中の CO<sub>2</sub> の濃度が循環される場合の代謝産物濃度を示すグラフである。

【図 12】微生物培養物による入口流中の種々の成分の取り込みを示すグラフである。

【図 13】実施例 3 E についての代謝産物濃度を示すグラフである。

【図 14】微生物培養物による実施例 3 E の入口流中の種々の成分の取り込みを示すグラフである。

【図 15】実施例 4 についての代謝産物濃度を示すグラフである。

【図 16】計算された溶解 CO<sub>2</sub> 対 2,3-ブタンジオール生成速度のプロットである。

【図 17】本発明の一実施形態によるシステムの表現である。

10

20

30

40

50

【図18】微生物培養物による実施例4の入口流中の種々の成分の取り込みを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明者は、1つ以上のカルボキシド栄養性の酢酸産生微生物の培養物によって生成される代謝生成物を制御するための方法及びシステムを発見した。特に、本発明者は、発酵工程においてピルビン酸塩に由来する1つ以上の生成物の生成を増加させるための方法を見出した。

【0039】

以下は、一般的な用語で示す、本発明の好ましい実施形態を含む、本発明の説明である。本発明は、以下の本発明の見出し「実施例」のもとに示す開示においてさらに例示され、実施例は、本発明を支援する実験データ、本発明の態様の具体例、及び本発明を実行する手段を提供する。

用語の定義

【0040】

本明細書で使用される「ブタンジオール」は、1,2-ブタンジオール、1,3-ブタンジオール、1,4-ブタンジオールならびに2,3-ブタンジオール及びその立体異性体を含む、全てのジオールの構造異性体を指す。用語「2,3-ブタンジオール」は、(R,R)、(S,S)ならびにメソ型、ラセミ体のもの、部分的に立体異性体的に純粋な形態及び/または実質的に立体異性体的に純粋な形態を含む、全てのエナンチオマー及びジアステレオマー形態を含むと解釈されるべきである。

【0041】

用語「バイオリアクター」は、1つ以上の容器及び/またはタワーもしくは配管配置からなる発酵装置を含み、連続攪拌槽リアクター(CSTR)、固定化菌体リアクター(ICR)、細流床リアクター(TBR)、気泡塔、ガスリフト型発酵槽、静的ミキサー、またはガス-液体接触に好適な他の容器もしくは他の装置を含む。本明細書で以降記載されるように、いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、第1の増殖リアクター及び第2の発酵リアクターを備えてよい。然る故に、基質、例えば一酸化炭素を含む基質のバイオリアクターまたは発酵反応への添加を言及するとき、必要に応じて、これらのリアクターのいずれかまたは両方への添加を含むと理解されるべきである。

【0042】

用語「一酸化炭素を含む基質」及び同様な用語は、その中の一酸化炭素が、細菌の1つ以上の菌株にとって、例えば増殖及び/または発酵のために利用可能である任意の基質を含むと理解されるべきである。

【0043】

「一酸化炭素を含むガス状基質」は、あるレベルの一酸化炭素を含有する任意のガスを含む。ガス状基質は、典型的には、大部分を占めるCO、好ましくは、少なくとも約15%~約95体積%のCOを含有するであろう。

【0044】

「CO<sub>2</sub>を含む基質」は、あるレベルの二酸化炭素を含有する任意の基質流を含む。しかしながら、ガス状基質は代替形態で提供されてもよいことを理解するべきである。例えば、CO<sub>2</sub>を含むガス状基質は、液体中に溶解されて提供されてもよい。要するに、液体は二酸化炭素含有ガスで飽和され、その後この液体がバイオリアクターに添加される。これは、標準的な手法を使用して達成することができる。例として、マイクロバブル懸濁液発生装置(Hensiri Isak et al. Scale-up of micro bubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 101, Number 3/October, 2002)を使用することができる。さらなる例として、CO<sub>2</sub>及びH<sub>2</sub>を含有するガス状基質は、固体支持体上に吸着されてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0045】

用語「効率を増加させる」、「効率の増加」等は、発酵工程に関して使用されるとき、限定されるものではないが、発酵を触媒する微生物の増殖の速度、高濃度のブタンジオールにおける増殖速度及び／または生成物生成速度、消費される基質1体積当たりで生成される所望の生成物の体積、所望の生成物の生成の速度または生成のレベル、及び発酵の他の副生成物と比べての生成された所望の生成物の相対的比率のうちの1つ以上を増加させることを含む。

## 【0046】

用語「生産性」または「生産速度」は、生成物の体積測定生産性である。連続システムにおいては、体積測定生産性は、生成物の定常状態濃度と液体保持時間との比として計算される。バッチシステムにおいては、体積測定生産性は、濃度とバッチシステムにおいて該濃度を生成するために必要とされる時間として計算される。体積測定生産性は、g/L/日として報告される。

10

## 【0047】

文脈が他のことを要求する場合を除いて、言い回し「発酵すること」、「発酵工程」または「発酵反応」及び同様のものは、本明細書において使用される際、プロセスの成長段階と生成物生合成段階の両方を包含することが意図される。

## 【0048】

本明細書で使用される用語「ピルビン酸塩由来の生成物」または同様な用語は、ピルビン酸塩前駆体を有する発酵生成物を包含することが意図される。これらの生成物は、限定されるものではないが、2,3-ブタンジオール、乳酸塩、コハク酸塩、メチルエチルケトン（M E K）、2-ブタノール、プロパンジオール、2-プロパノール、イソプロパノール、アセトイン、イソ-ブタノール、シトラマル酸塩、ブタジエン、及びポリ乳酸（P L A）を含む。

20

## 【0049】

本明細書で使用される用語「アセチルCoA由来生成物」、「アセチルCoAに由来する生成物」または同様な用語は、アセチルCoA前駆体を有する発酵生成物を包含することが意図される。これらの生成物は、限定されるものではないが、エタノール、酢酸、アセトン、ブタノール、3-ヒドロキシブチレートならびにイソブチレン、3-ヒドロキシプロピオネート（3HP）、及び脂肪酸を含む。

30

## 【0050】

発酵工程における2,3-ブタンジオールの生成は、微生物培養物が、ストレスの徵候を呈する時間中に増加することが発見されている。本発明者は、2,3-ブタンジオールの量における増加と一致するストレスのいくつかの指標を特定し、これらは、微生物培養物による乳酸塩の生成、微生物培養物のpHの増加、及び微生物培養物のバイオマス濃度の減少を含む。興味深いことに、本発明者は、微生物培養物による2,3-ブタンジオールの生成がストレスの指標ではないこと、及び2,3-ブタンジオールの生産性の増加を有する、健常かつ安定した微生物培養物を提供することが可能であることを立証した。

## 【0051】

2,3-ブタンジオール生産性の増加は、微生物培養物による水素消費の速度によって影響されることが以前に示されている（WO 2012131627号）。

40

CO<sub>2</sub>の発酵に及ぼす効果

## 【0052】

本発明者は、微生物培養物に提供されるCO<sub>2</sub>の量を変更することによって、微生物の代謝経路が影響を受けることを見出した。微生物培養物に提供されるCO<sub>2</sub>の量を変更することによって、培養物の代謝は操作され得る。

## 【0053】

本発明者は、驚くべきことに、ピルビン酸塩由来生成物の生成が、増加した量の二酸化炭素が微生物培養物に提供されるときに増加することを示した。同様に、微生物培養物中に溶解するCO<sub>2</sub>の量が減少するとき、アセチルCoAに由来する生成物の生成が増加し

50

、ピルビン酸由来生成物の生成が減少することを見出した。

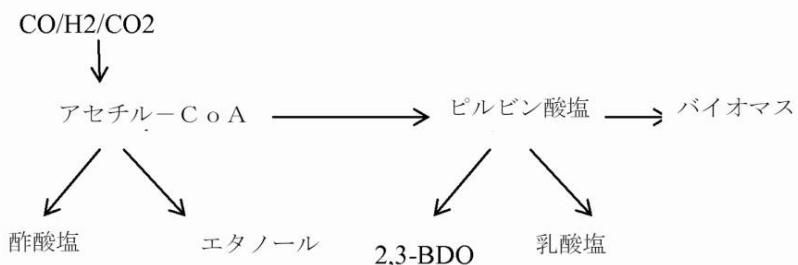
【0054】

発酵条件下で、カルボキシド栄養性菌培養物にCO及び任意選択的に水素を含む基材を提供することが、アルコール及び酸の生成をもたらすことが以前に示されている。エタノールの生成が、2,3-ブタンジオール及び酢酸を含む追加の副生成物を伴うことも以前に立証されている。

【0055】

本発明者は、ここで、微生物培養物に二酸化炭素を追加的に供給することによって、代謝経路のピルビン酸塩アームの代謝が制御され得ることを発見した。上述の代謝経路を図1及び以下に詳細に示す。

【化1】



10

【0056】

カルボキシド栄養性アセトゲンは、炭素を、酢酸ならびにエタノールなどの生成物のための及び脂肪酸合成のための前駆体としての役目を果たすアセチル-CoAに固定するために、Wood-Ljungdahl経路を使用する(Drake, Kuse1, Matthies, Wood, & Ljungdahl, 2006; Wood, 1991)。アセチル-CoA以外の、細胞中の他の重要な中間体は、2,3-ブタンジオール、乳酸、もしくはコハク酸、ならびに増殖及びバイオマス形成に必要とされるアミノ酸、ビタミン、または核酸のような生成物に対して前駆体として働くピルビン酸塩(ピルビン酸)である。アセチル-CoAは、ピルビン酸塩:フェレドキシンオキシドレダクターゼ(PFOR) (時として、ピルビン酸塩シンターゼ(EC 1.2.7.1)とも呼ばれる)によって触媒される単一の可逆的酵素ステップにおいて、ピルビン酸塩に直接変換され得る(逆もまた同様)。PFOR反応は、以下の反応1の通りである。

(1)  $\text{Acetyl-CoA} + \text{CO}_2 + \text{還元フェレドキシン} + 2\text{H} \rightleftharpoons \text{ピルビン酸塩} + \text{酸化フェロドキシン}$

$\underline{G^{\circ}} = -4.6 \text{ kcal/mol} (19.2 \text{ kJ/mol})$  (Thauer, Jungermann, Decker, & Pi, 1977)。

【0057】

独立栄養的に増殖するカルボキシド栄養性アセトゲンでは、全ての生成されたピルビン酸塩は、まず初めにアセチル-CoAを経験せねばならない。アセチル-CoAはC2化合物であり、ピルビン酸塩はC3化合物であるので、CO<sub>2</sub>の分子は組み込まれる必要がある(反応1)。この反応のエネルギーは、還元フェレドキシンによりもたらされる( $E^{\circ} = -398 \text{ mV}$ )。

【0058】

ピルビン酸塩形成の速度を増加させるための戦略は、この反応における遊離体または反応体のレベルを増加させることである(動的平衡)。例えば、供給ガス中のCO<sub>2</sub>のレベルを増加させることは、アセチル-CoAからのピルビン酸塩形成速度を増加させることになり、一方逆の反応は、反応がピルビン酸塩形成の方向において実質的に不可逆的であるポイントまで減少する。同様に、還元フェレドキシンのレベルは、例えば、フェレドキシン依存性一酸化炭素デヒドロゲナーゼを介してCOの酸化を増加させることによって、

30

40

50

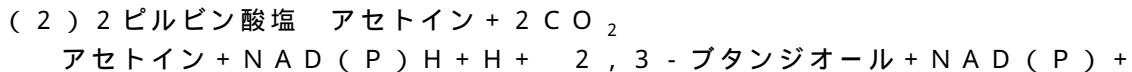
10

20

増加させることができる。

【0059】

ピルビン酸塩（ピルビン酸）は、2.5の非常に低いpKaを有する酸であり、したがって、より高い濃度においては、ATP形成に必要とされ膜を横切る重要なプロトン濃度勾配を破壊することで、細菌には脅威である（Kopke & Durre, 2011）。細菌についてのシンクは、ピルビン酸を中和させ細胞を守ることになる2,3-ブタンジオールを生成することである。供給ガス中のCO<sub>2</sub>のレベルを増加させることは、したがって、ピルビン酸塩形成の速度の増加を介して間接的に2,3-ブタンジオール形成を増加させることになる。ピルビン酸塩からの2,3-ブタンジオールの生成についての反応は、反応2の通りである。



【0060】

乳酸及びコハク酸は、別のシンクを表すピルビン酸塩由来生成物であり、これらは非常に弱い酸（それぞれ、pKa 4.2及び5.6）ではあるが、これらはまた、より高いレベルで細菌への脅威を引き起こす。一方、これらの生成を制限することは、ピルビン酸塩の貯留を増加させ、2,3-ブタンジオール生成の増加をもたらす。

【0061】

本発明者は、リアクター内のCO<sub>2</sub>の濃度を増加させることによって及び／またはリアクター内のCOの濃度もしくは還元フェレドキシンのレベルの増加につながるCODHによるCO酸化の速度を増加させることによって、ピルビン酸塩のアセチル-C<sub>o</sub>Aに対する生成を増加させることができることを示した。

【0062】

特に、本発明者は、アセチル-C<sub>o</sub>A由来生成物、例えばエタノールと、ピルビン酸塩由来生成物、例えば2,3-ブタンジオールとの比は、リアクターの液体培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の濃度を増加させることによって、増加させることができることを立証した。液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の量は、発酵に提供されるガス状基質中のCO<sub>2</sub>の量を増加させることによって、増加させることができる。一実施形態では、バイオリアクターに提供される基質中のCO<sub>2</sub>の濃度は、少なくとも10%、または少なくとも15%、または少なくとも18%、または少なくとも20%、または少なくとも25%、または少なくとも30%、または少なくとも35%、または少なくとも40%、または少なくとも45%である。特定の実施形態では、バイオリアクターに提供される基質中のCO<sub>2</sub>の濃度は、15%～65%、または約20%～約50%、または約25%～約45%である。

【0063】

培養物に提供される、低い溶解CO<sub>2</sub>濃度（例えば、入口ガス流中の0～10%のCO<sub>2</sub>）は、エタノールを2,3-ブタンジオールに対して、約30:1～約20:1の比で生成することになるが、本発明者は、培養物に提供されるCO<sub>2</sub>濃度の増加（例えば、入口ガス流中の10～65%のCO<sub>2</sub>）は、エタノールを2,3-ブタンジオールに対して、約20:1～約1:1、好ましくは10:1～1:1の比で生成することになることを示した。

【0064】

ピルビン酸塩由来生成物の低い生成が望ましい例では、低い溶解CO<sub>2</sub>濃度が標的とされてもよい。この方法は、アセチル-C<sub>o</sub>A由来生成物の生成を増加させるためにも用いられ得る。例えば、入口ガス流中0～10%のCO<sub>2</sub>を伴うガス入口流は、エタノールの2,3-ブタンジオールに対する高い比をもたらすことになる。

【0065】

さらに、培養物によって消費されるCOの量を増加させることができ、生成されるCO<sub>2</sub>の量を増加させ、これが転じてピルビン酸由来生成物の生成を増加させることを見出した。培養物によって消費されるCOの量は、発酵における質量移動を変更し、バイオリアクターへのガス状基質の流速を増加させることによって及び／またはバイオリアクター内の液

10

20

30

40

50

液体栄養培地の搅拌の速度を増加させることによって、増加させることができる。培養物によって消費されるCO<sub>2</sub>の量はまた、気泡表面積を増加させることによっても増加させることができる。典型的には、高質量移動は、ガス状基質を細かい気泡として導入することによって達成され得る。当業者であれば、スパージャなどのガス状基質を導入するための手段を理解するであろう。

溶解CO<sub>2</sub>及び圧力

【0066】

本発明者は、発酵の代謝プロファイルを制御するために、微生物培養物に提供される溶解CO<sub>2</sub>の量を制御かつ調整するための多くの方法を特定した。液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の量を調整するための1つのこうした方法は、システムに対する圧力を調整することを含む。

10

【0067】

本発明者は、バイオリアクター内の圧力を増加させることができ、発酵培地中の溶解CO<sub>2</sub>の量の増加をもたらすことになることを立証した。ピルビン酸塩由来生成物の生成を増加させるために、発酵は約250～約450kPa<sub>g</sub>（または500kPa<sub>g</sub>超）の圧力で行われるべきであり、それによって、液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の濃度が増加される。特定の実施形態では、圧力は250kPa<sub>g</sub>超、または300kPa<sub>g</sub>超、または350kPa<sub>g</sub>超、または400kPa<sub>g</sub>超、または450kPa<sub>g</sub>超、または500kPa<sub>g</sub>超である。

20

【0068】

CO<sub>2</sub>が、50kPa<sub>g</sub>以上の圧力でリアクターに提供される例では、より高いレベルのピルビン酸塩由来生成物を生成するために、基質中においてより低い濃度のCO<sub>2</sub>が必要とされる。培養物はCO<sub>2</sub>の利用率を通してCO<sub>2</sub>を生成するので、圧力が実質的に高い場合には、最小のCO<sub>2</sub>濃度を伴う入口ガス流がリアクターに供給され得る。特定の実施形態では、50kPa<sub>g</sub>以上の圧力でリアクターに提供されるCO<sub>2</sub>の量は、10%未満、または5%未満、または1%未満である。特定の実施形態では、50kPa<sub>g</sub>以上の圧力においては、CO<sub>2</sub>はリアクターに実質的に提供されない。好ましくは、50kPa<sub>g</sub>以上の圧力で供給される入口ガス流のCO<sub>2</sub>濃度は、約0%～50%である。

【0069】

本発明者は、2,3-ブタンジオールの生成が、発酵槽中のCO<sub>2</sub>の分圧の量によって影響を受け、これが転じて液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の量を変更することを示した。ガス流のより高いCO<sub>2</sub>分圧が、液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>の量を増加させることになる。好ましい実施形態では、CO<sub>2</sub>は、約50kPa<sub>g</sub>～約500kPa<sub>g</sub>の分圧でリアクターに供給されることになる。

30

【0070】

さらに、本発明者は、リアクターに供給されるCO<sub>2</sub>の量を徐々に増加させることによって、溶解CO<sub>2</sub>の量を徐々に増加させることも可能であることを立証した。

【0071】

一部のガス状流中のCO<sub>2</sub>の量は、液体栄養培地中の溶解CO<sub>2</sub>の十分な量を可能にするのに十分でない場合がある。この問題を克服するために、本発明者は、バイオリアクターの出口からバイオリアクターの入口まで排ガスまたは流出ガスを再循環させることによって、CO<sub>2</sub>の量を増加させるための方法及びシステムを提供した。CO<sub>2</sub>分圧の量、したがって溶解CO<sub>2</sub>の量を変更するために、CO<sub>2</sub>分圧及び全圧力から独立して、流出ガス/排ガスは同じリアクターに再循環され得る。リアクター内部の発酵工程は、CO<sub>2</sub>及びH<sub>2</sub>の高変換をもたらすことになり、したがって、排ガスは、主としてCO<sub>2</sub>及び任意の不活性ガス種から構成されることになる。このようなことから、排ガスを再循環させることは、CO<sub>2</sub>分圧がCO<sub>2</sub>分圧及び全圧力から独立して制御されることを可能にする。

40

【0072】

二リアクターシステムは、第1のバイオリアクターから流出するCO<sub>2</sub>を含む流出ガスが、第2のバイオリアクターまで渡されることを可能にする。CO<sub>2</sub>を含む流出ガスを、

50

リアクター容器よりはむしろ第2のバイオリアクターの下降管に送り込むことによって、リアクター内のCO<sub>2</sub>の分圧が増加される。CO<sub>2</sub>-液体混合物が下降管を下に移動すると、静水頭が増加し、それによって溶液中に溶解するCO<sub>2</sub>の量が増加される。

#### 【0073】

排ガスを第1のリアクターから第2のリアクターまでもしくは受取リアクターまで再循環させるためには、第1のリアクターのヘッドスペースの圧力は、ライン損失及びスパージャ圧下降を克服するように、受取リアクターの下降管における圧力よりもわずかに高い必要がある。「排ガス」をそれ自体のヘッドスペースから再循環させるためには、排ガスはガス入口または下降管のいずれかに再循環されることが可能であり、この下降管は排ガスを捕捉する（排ガスを搬入するために下降管内の液体流を使用して）ためにエダクタを必要とする。下降管に再循環されるCO<sub>2</sub>の量は、液体栄養培地中に溶解するCO<sub>2</sub>がランピング時に最適化されるように、制御されることになる。図17は、下降管に提供されるCO<sub>2</sub>富化基質で循環されるループリアクターの表現を提供し、ここでは（1）は上昇管であり、（2）は下降管であり、（3）は供給ガスであり、（4）は排ガス／流出ガスであり、（5）は別個のリアクターまたは同一のリアクターのいずれかからの排ガスからのCO<sub>2</sub>富化ガスが下降管に入るポイントであり、及び（6）は、ガス／液体混合物を、上昇管及び下降管を経て循環させるループポンプである。

#### バイオリアクター

#### 【0074】

発酵は、連続攪拌槽リアクター（CSTR）、固定化菌体リアクター、ガスリフト型リアクター、気泡塔リアクター（BCR）、中空纖維膜バイオリアクター（HFM）などの膜反応器または細流床リアクター（TBR）などの任意の好適なバイオリアクター内で行われてもよい。また、本発明のいくつかの実施形態では、バイオリアクターは、その中で微生物が培養される第1の増殖リアクターと、増殖リアクターからの発酵プロセスが送り込まれることができ、その中で発酵生成物（例えば、エタノール及び酢酸塩）の大部分が產生され得る第2の発酵リアクターとを備えてもよい。本発明のバイオリアクターは、CO及び／またはH<sub>2</sub>含有基質を受け取るよう適合されている。

#### 発酵基質

#### 【0075】

一酸化炭素と、水素または二酸化炭素のうちの少なくとも1つとを含む基質が、本発明の方法において1つ以上の生成物を生成するために、発酵反応において使用される。好ましくは、この基質はガス状基質である。ガス状基質は、工業プロセスの副生成物として得られた廃棄ガス、または内燃機関（例えば、自動車）の排気ガスからなどのいくつかの他の供給源によるものであってもよい。特定の実施形態では、工業プロセスは、製鋼工業などの鉄金属製品製造過程、非鉄金属製品製造過程、石油精製処理、石炭ガス化、電力生産、カーボンブラック生産、アンモニア生産、メタノール生産、コークス製造及び天然ガス改質からなる群から選択される。これらの実施形態では、ガス状基質は、これが大気中に放出される前に、任意の通常的な方法を使用して、工業プロセスから捕捉され得る。ガス状基質の組成に応じて、それを発酵に導入する前に、塵埃粒子などのいかなる望ましくない不純物も除去するために、ガス状基質を処理することが望ましい場合もある。例えば、ガス状基質は、既知の方法を用いて濾過されるかまたは洗浄されてもよい。

#### 【0076】

本発明の他の実施形態では、ガス状基質は、バイオマスのガス化を発生源としてもよい。ガス化のプロセスは、空気または酸素の制限された供給におけるバイオマスの部分的燃焼を伴う。得られたガスは、典型的には、最小体積のCO<sub>2</sub>、メタン、エチレン及びエタンと共に、主としてCO及びH<sub>2</sub>を含む。例えば、サトウキビからの糖、またはトウモロコシもしくは穀類からのデンプンなどの食料の抽出及び処理中に得られるバイオマス副生成物、あるいは山林業によって発生した非食物バイオマス廃棄物がガス化され、本発明における使用に好適なCO含有ガスを生成してもよい。

#### 【0077】

10

20

30

40

50

CO含有基質は、典型的には、少なくとも約15%～約100体積%のCO、40%～95体積%のCO、40%～60体積%のCO、及び45%～55体積%のCOなどの、主比率のCOを含有する。特定の実施形態では、基質は約25%、または約30%、または約35%、または約40%、または約45%、または約50%のCO、または約55%のCO、または約60体積%のCOを含む。H<sub>2</sub>もCO<sub>2</sub>も存在するとき、6%などのCOのより低い濃度を有する基質が適切な場合もある。

#### 【0078】

典型的には、一酸化炭素は、ガス状態で発酵反応に添加されることになる。しかしながら、本発明は、この状態における基質の添加に限定されるものとみなされるべきではない。例えば、一酸化炭素は、液体で提供されることが可能である。例えば、液体は、一酸化炭素含有ガスで飽和され、その後この液体がバイオリアクターに添加されてもよい。これは、標準的手法を使用して達成することができる。例として、上述のマイクロバブル懸濁液発生装置が使用され得る。

#### 【0079】

一実施形態では、二酸化炭素は、ガス状態で発酵に添加される。代替実施形態では、二酸化炭素は、炭酸塩または重炭酸塩として提供される。

#### 【0080】

本発明の一実施形態では、2つまたはそれ以上の異なる基質の組み合わせが、発酵反応において使用されてもよい。

#### 【0081】

さらに、基質流のCO濃度（またはガス状基質中のCO分圧）を増加させること、したがって、COが基質である発酵反応の効率を増加させることが望ましい場合が多い。ガス状基質中のCO分圧を増加させることは、発酵培地へのCO質量移動を増加させる。発酵反応を供給するために使用されるガス流の組成は、この反応の効率及び／またはコストに対してかなりの影響を有する。例えば、O<sub>2</sub>は、嫌気性発酵工程の効率を低下させ得る。発酵の前後の発酵工程の段階における望ましくないまたは不必要的ガスの処理は、こうした段階に対する負担を増加させ得る（例えば、ガス流がバイオリアクターに流入する前に圧縮される場合、不必要的エネルギーが、発酵においては必要とされないガスを圧縮するために使用され得る）。したがって、望ましくない成分を除去しつつ望ましい成分の濃度を増加させるように、基質流、特に工業発生源に由来する基質流を処理することが望ましい場合がある。

#### 【0082】

特定の実施形態では、水素がCO含有基材に提供されることはほとんどない。

流れのブレンド化

#### 【0083】

発酵反応の効率、アルコール產生及び／または全体の炭素捕捉を改善するために、CO及びH<sub>2</sub>を含む改質された基質流を、1つ以上のさらなる流れとブレンドすることが望ましい場合がある。理論に縛られるわけではないが、本発明のいくつかの実施形態においては、カルボキシド栄養性細菌は、以下に従ってCOをエタノールに変換する。



しかしながら、H<sub>2</sub>の存在下では、全体の変換は以下の通りであり得る。



#### 【0084】

この結果、発酵効率を最適化するために、高CO含有量を有する流れは、CO及びH<sub>2</sub>を含む改質された基質とブレンドされ、CO：H<sub>2</sub>比を増加させることができる。例として、製鋼工場からの排ガスなどの工業的廃棄流は、高CO含有量を有するが、最小のH<sub>2</sub>を含むかまたはH<sub>2</sub>を含まない。このように、ブレンドされた基質流を発酵槽に提供する前に、CO及びH<sub>2</sub>を含む1つ以上の流れを、COを含む廃棄流とブレンドすることは望ましい可能性がある。発酵の全体的効率、アルコール生産性及び／または全体的炭素捕捉は、ブレンドされた流れ内のCO及びH<sub>2</sub>の化学量論組成に依存することになる。しかし

10

20

30

40

50

ながら、特別な実施形態では、ブレンドされた流れは、以下のモル比：20：1、10：1、5：1、3：1、2：1、1：1、または1：2で、CO及びH<sub>2</sub>を実質的に含んでもよい。

#### 【0085】

さらに、発酵の異なる段階において、CO及びH<sub>2</sub>を特定比で提供することが望ましい場合もある。例えば、比較的高いH<sub>2</sub>含有量（1：2のCO：H<sub>2</sub>など）を有する基質流が、運転開始時及び／または急速な微生物増殖相の間の発酵段階に提供されてもよい。しかしながら、増殖相がゆっくりであるとき、培養が実質的に定常状態の微生物密度を維持するように、CO含有量を増加させてもよい（例えば、少なくとも1：1もしくは2：1またはそれ以上、この場合、H<sub>2</sub>濃度はゼロよりも大きいかまたはゼロに等しくてもよい）。

10

#### 【0086】

流れのブレンド化はまた、特にCOを含む廃棄流が本質的に間欠性である例では、さらなる利点を有し得る。COを含む間欠流は、実質的に連続性のCO及びH<sub>2</sub>を含む改質された基質流とブレンドされ、発酵槽に提供されることができる。本発明の特別な実施形態では、実質的に連続性の混合流の組成及び流量は、実質的に連続性の組成及び流量の基質流の発酵槽への提供を維持するために、間欠流に従って変化してもよい。

培地

#### 【0087】

1つ以上の微生物の増殖及び基質のエタノール及び／または酢酸塩への発酵が起こるために、この基質に加えて、好適な栄養培地がバイオリアクターに供給される必要があることを理解されるであろう。栄養培地は、使用される微生物の増殖を許容するのに十分なビタミン及びミネラルなどの成分を含有することになる。例示のためのみであるが、A b r i n i et a l ( *Clostridium autoethanogenum*, sp. N o v . , A n A n a e r o b i c B a c t e r i u m T h a t P r o d u c e s E t h a n o l F r o m C a r b o n M o n o x i d e ; A r c h . M i c r o b i o l . , 1 6 1 : 3 4 5 - 3 5 1 ( 1 9 9 4 ) ) に よ つ て 記 載 さ れ る よ う に 、 ク ロ ス ト リ ジ ュ ム ・ オ ー ト エ タ ノ ゲ ナ ム ( *Clostridium autoethanogenum* ) の 増 殖 に 好 適 な 嫌 気 性 培 地 は 、 当 該 技 術 分 野 に お い て 既 知 で あ る 。 本 明 細 書 の 「 実 施 例 」 の 部 分 は 、 後 に 好 適 な 培 地 の さ ら な る 例 を 提 供 す る 。

20

発酵

#### 【0088】

エタノール及び他のアルコールをガス状基質から生成するためのプロセスは既知である。例示のプロセスは、例えば、それぞれが、参照により本明細書に組み込まれる、WO 2007/117157号、WO 2008/115080号、WO 2009/022925号、WO 2009/064200号、US 6,340,581号、US 6,136,577号、US 5,593,886号、US 5,807,722号、及びUS 5,821,111号に記載されているものを含む。

30

発酵条件

#### 【0089】

基質のエタノール及び／または酢酸塩への発酵が起こるために適切な条件下で発酵は行われるべきである。考慮されるべきである反応条件は、基質レベルが制限されるようにならず、かつ最大生成物濃度が生成物阻害を引き起こすことを回避することを保証するための、温度、培地流量、pH、培地酸化還元電位、攪拌速度（連続攪拌槽リアクターを使用する場合）、接種原レベル、最大基質濃度、及びバイオリアクターへの基質の導入の速度を含む。

40

#### 【0090】

最適な反応条件は、使用される特定の微生物に部分的には依存することになる。しかしながら、一般には、周囲圧よりも高い圧力で発酵が行われることが好ましい。増加した圧力における運転は、ガス相から、COがエタノールの生成用の炭素源として微生物によつ

50

て取り込まれ得る液相までのCO移動の速度における著しい増加を可能にする。このことは、転じて、保持時間（投入ガス流量によって除算するバイオリアクター内の液体体積として定義）が、バイオリアクターが周囲圧よりはむしろ高圧で維持されるときに低下することを意味する。

【0091】

また、所定のCOの生成物に対する変換率が、一部分は基質保持時間の関数であり、所望の保持時間を達成することが、転じてバイオリアクターの必要とされる体積を決定するので、加圧システムの使用は、必要とされるバイオリアクターの容積を大きく低減することができ、その結果、発酵設備の資本コストを大きく低減することができる。米国特許第5,593,886号で提供される実施例によると、リアクター容積は、リアクター運転圧力における増加に直線的に比例して低減させることができ、すなわち、10気圧の圧力で運転されるバイオリアクターは、1気圧の圧力で運転されるもののわずか10分の1の容積だけを必要とする。

【0092】

高圧においてガスの生成物への発酵を行うことの利点は、別の文献でも記載されている。例えば、WO 02/08438号は、30 psig及び75 psigの圧力下で行われるガスのエタノールへの発酵が、それぞれ150 g / l / 日及び369 g / l / 日のエタノール生産性をもたらすことを記載している。しかしながら、大気圧で同様な培地及び投入ガス組成を使用して行われた例示の発酵では、10~20倍少ない一日当たりのエタノール毎リットルを生成することが認められた。

【0093】

COを含む基質の嫌気的発酵に好適な発酵条件の例は、WO 2007/117157号、WO 2008/115080号、WO 2009/022925号、及びWO 2009/064200号に詳説されている。これらに報告される発酵条件は、本発明の方法に従って容易に修正できることが認識される。

微生物

【0094】

種々の実施形態では、発酵は、カルボキシド栄養性細菌の1つ以上の菌株の培養物を使用して行われる。種々の実施形態では、カルボキシド栄養性細菌は、ムーレラ属(*Moorella*)、クロストリジウム属(*Clostridium*)、ルミノコッカス属(*Ruminococcus*)、アセトバクテリウム属(*Acetobacterium*)、ユーバクテリウム属(*Eubacterium*)、ブチリバクテリウム属(*Butyribacterium*)、オキソバクター属(*Oxobacter*)、メタノサルチナ属(*Methanosaarcina*)、メタノサルチナ属(*Methanosaarcina*)、及びデスルホトマクルム属(*Desulphotomaculum*)から選択される。多くの嫌気性細菌は、COの、n-ブタノールならびにエタノールを含むアルコール、及び酢酸への発酵を行うことができることが知られていて、本発明のプロセスにおける使用に好適である。本発明における使用に好適であるこうした細菌の例は、クロストリジウム・ルジュングダーリイ(*Clostridium jungdahlii*) (WO 00/68407号、EP 117309号、米国特許第5,173,429号、同第5,593,886号、ならびに同第6,368,819号、WO 98/00558号及びWO 02/08438号に記載されているものを含む)、クロストリジウム・カルボキシディボランス(*Clostridium carboxydivorans*) (Liou et al., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 33: pp 2085-2091)、クロストリジウム・ラグスダレイ(*Clostridium ragsdalei*) (WO/2008/028055号)及びクロストリジウム・オートエタノゲナム(*Clostridium autoethanogenum*) (Abrini et al., Archives of Microbiology 161: pp 345-351)などの菌種などのクロストリジウム属(*Clostridium*)のもの

10

20

30

40

50

を含む。他の好適な細菌は、ムーレラ菌種 (*Moorella* sp) HUC22-1 (Sakai et al, *Biotechnology Letters* 29: pp 1607-1612) を含むムーレラ属 (*Moorella*) のもの、及びカルボキシドサーマス属のもの (Svetlichny, V. A., Sokolova, T. G. et al (1991), *Systematic and Applied Microbiology* 14: 254-260) を含む。さらなる例は、ムーレラ・サーモアセチカ (*Moorella thermoacetica*)、ムーレラ・サーモトロフィカ (*Moorella thermoautotrophica*)、ルミノコッカス・プロダクツ (*Ruminococcus productus*)、アセトバクテリウム・ウッディ (*Acetobacterium woodii*)、ユーバクテリウム・リモスム (*Eubacterium limosum*)、ブチリバクテリウム・メチロトロフィカム (*Butyribacterium methylotrophicum*)、オキソバクター・フェニジイ (*Oxobacter pfennigii*)、メタノサルチナ・バルケリ (*Methanosaeca barkeri*)、メタノサルチナ・アセチボランス (*Methanosaeca acetivorans*)、デスルホトマクルム・クズネツオビイ (*Desulfovotomaculum kuznetsovii*) (Simpson et al. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2006 Vol. 26. Pp 41-65) を含む。さらに、当業者に理解されるように、他の酢酸產生嫌気性細菌も本発明に適用可能であり得ることを理解されたい。本発明は、2つまたはそれ以上の細菌の混合培養に適用されてもよいことも理解されるであろう。

#### 【0095】

一実施形態において、微生物は、クロストリジウム・オートエタノゲナム、クロストリジウム・リュングダリイ、クロストリジウム・ラグスダレイ、クロストリジウム・カルボキシジボランス、クロストリジウム・ドラケイ、クロストリジウム・スカトロゲネス、クロストリジウム・アセチクム、クロストリジウム・フォルミコアセチクム、クロストリジウム・マグナム、アセトバクテリウム・ウーディ (*Acetobacterium woodii*)、アルカリバクラム・バッティ (*Alkalibaculum bacchii*)、ムーレラ・サーモアセチカ (*Moorella thermoacetica*)、スプロミュサ・オヴァタ (*Sporomusa ovata*)、ブチリバクテリウム・メチロトロフィカム (*Butyribacterium methylotrophicum*)、プラウティア・プロダクタ (*Blautia producta*)、ユーバクテリウム・リモーサム (*Eubacterium limosum*)、サーモアナEROバクター・キウヴィ (*Thermoanaerobacter kiuvi*) 種を含む酢酸生成性カルボキシド栄養性生物の群から選択される。

#### 【0096】

これらのカルボキシド栄養性アセトゲンは、アセチル-CoA、アセテート及び他の生成物を形成する嫌気条件下でエネルギー源として、ガス状の1つの炭素 (C1) 源、例えば一酸化炭素 (CO) ならびに一酸化炭素 (CO) 及び / または水素 (H2) を有する二酸化炭素 (CO2) などの上で化学自己栄養的に利用して成長するそれらの能力によって定義される。それらは、発酵の同じ形態、Wood-Ljungdahl または還元的なアセチル-CoA 経路を共有しており、ならびに一酸化炭素デヒドロゲナーゼ (CODH)、ヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、ホルミル-テトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メチレン-テトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ、ホルミル-テトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレン-テトラヒドロ葉酸レダクター、及び一酸化炭素デヒドロゲナーゼ / アセチル-CoAシンターゼ (CODH / ACS) からなる酵素の組の存在によって定義されており、その組み合わせは、この種の細菌に特有であって固有である (Drake, Kusele, Matthies, Wood, & Ljungdahl, 2006)。

#### 【0097】

基質をバイオマス、二次代謝産物及びピルビン酸塩 (これから、その後生成物が形成さ

10

20

30

40

50

れる（アセチル - C o A を介してまたは直接的に）に変換する糖発酵細菌のカルボキシド栄養性増殖とは対照的に、アセトゲンにおいては、基質がアセチル - C o A に直接搬送され、その後、これから生成物、バイオマス、及び二次代謝産物が形成される。

【0098】

さらなる実施形態において、微生物は、C. オートエタノゲナム、C. リュングダリイ、及び「C. ラグスダレイ」種ならびに関連した分離株を含むカルボキシド栄養性クロストリジウムのクラスターから選択される。

【0099】

これらは、限定されるものではないが、C. オートエタノゲナム J A I - 1 T (DSM 10061) (A brini, N aveau, & N yns, 1994)、C. オートエタノゲナム L B S 1560 (DSM 19630) (WO / 2009 / 064200)、C. オートエタノゲナム L B S 1561 (DSM 23693)、C. リュングダリイ P E T C T (DSM 13528 = ATCC 55383) (Tanner, Miller, & Yang, 1993)、C. リュングダリイ E R I - 2 (ATCC 55380) (米国特許第5,593,886号)、C. リュングダリイ C - 01 (ATCC 55988) (米国特許第6,368,819号)、C. リュングダリイ O - 52 (ATCC 55989) (米国特許第6,368,819号)、または「C. ラグスダレイ P 11 T」(ATCC BAA - 622) (WO 2008 / 028055) 株、及び関連した分離株、例えば「C. コスカチャイ (C. coskati i)」(米国特許第2011 / 0229947号)、「クロストリジウム sp. MT 351」(Tyurin & Kiriukhin, 2012)、「クロストリジウム sp. MT 653」(Berzin, Kiriukhin, & Tyurin, 2012a)、「クロストリジウム sp. MT 683」(Berzin, 2012)、「クロストリジウム sp. MT 962」(Berzin, Kiriukhin, & Tyurin, 2013)、「クロストリジウム sp. MT 1121」(Berzin, Kiriukhin, & Tyurin, 2012b)、「クロストリジウム sp. MT 1230」(Kiriukhin & Tyurin, 2013)、または「クロストリジウム sp. MT 1962」(Berzin, Tyurin, & Kiriukhin, 2013)など、及びそれらの突然変異株、例えば C. リュングダリイ O T A - 1 (Tirado - Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using Clostridium ljungdahlii. PhD thesis, North Carolina State University, 2010) または「クロストリジウム sp. MT 896」(Berzin, Kiriukhin, & Tyurin, 2012c)などを含む。

【0100】

これらの株は、16S rRNA 遺伝子レベル上で少なくとも 99% の同一性を有するものの、DNA - DNA 再結合や DNA 指紋採取実験によって決定されるような (WO 2008 / 028055 号、米国特許第2011 / 0229947号) 異なる種である、クロストリジウム属の rRNA クラスター I 内にサブクラスターを形成する (Collins et al., 1994)。

【0101】

このクラスターの株は、類似の遺伝子型と表現型の両方を有する、共通の特徴によって定義されており、それらは全て、エネルギー変換及び発酵性代謝の同じ形態を共有する。このクラスターの株は、シトクロムを欠いており、エネルギーを Rnf 複合体によって保存する。

【0102】

このクラスターの全ての株は、4.2 MBp 周辺のゲノムサイズを有する類似の遺伝子型 (Kopke et al., 2010) 及び 32 mol% 周辺の GC 組成 (A brini et al., 1994; Kopke et al., 2010; Tanner et al., 1993) (WO 2008 / 028055 号; 米国特許出願第2011 / 0229947号) を有し、Wood - Ljungdah1 経路の酵素 (一酸化炭素デ

10

20

30

30

30

40

ヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ、及び一酸化炭素デヒドロゲナーゼ／アセチル-CoAシンターゼ)、ヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、Rnf複合体(rnfCDGЕAB)、ピルビン酸塩：フェレドキシンオキシドレダクターゼ、アルデヒド：フェレドキシンオキシドレダクターゼ(Kopke et al., 2010, 2011)をコード化する必須の重要な遺伝子オペロンを保存している。ガスの取り込みに関する、Wood-Ljungdahl経路遺伝子の構成や数は、核酸及びアミノ酸配列における差にもかかわらず、全種において同じであることが分かっている(Kopke et al., 2011)。

## 【0103】

10

株は全て、類似の形態やサイズを有しており(対数的に成長する細胞は、0.5~0.7×3~5μmの間にあり)、中温性(30~37の間の最適の成長温度)であり、厳密に嫌気性生物である(Abrini et al., 1994, Tanner et al., 1993)(WO 2008/028055号)。さらには全て、同一のpH範囲(5.5~6の最適な初期pHを伴う、pH4~7.5の)、類似の増殖速度を伴うCO含有ガス上の強力な独立栄養増殖、及び主要な発酵最終産物としてエタノールならびに酢酸、及び特定の条件下で形成される少量の2,3-ブタンジオールならびに乳酸を伴う類似の代謝プロファイルなどの同じ主要な系統発生的形質を共有する(Abrini et al., 1994; Kopke et al., 2011; Tanner et al., 1993)(WO 2008/028055号)。

20

インドールの生成が、全ての株で観察された。しかしながら、これらの種は、種々の糖(例えば、ラムノース、アラビノース)、酸(例えば、グルコン酸塩、クエン酸塩)、アミノ酸(例えば、アルギニン、ヒスチジン)、または他の基質(例えば、ベタイン、ブタノール)の基質利用率で差がある。さらに、種の一部は、特定のビタミン(例えば、チアミン、ビオチン)に対して栄養要求性株であり、一方その他のものは栄養要求性株ではないことが確認されている。また、カルボン酸のその対応するアルコールへの還元も、これらの微生物のある範囲で示されている(Perez, Richter, Loftus, & Angenent, 2012)。したがって、これらの形質は、C.オートエタノゲナム(C. autoethanogenum)またはC.リュングダリイ(C. ljungdahlii)のような1つの微生物に特異的ではなく、性能差が存在し得るが、むしろカルボキシド栄養性のエタノール合成クロストリジウム菌に一般的な形質であり、機構がこれらの株全体で同様に作用し得ることが予測される(Perez et al., 2012)。

30

## 【0104】

本発明における使用で好適な、1つの例示の微生物は、クロストリジウム・オートエタノゲナム(Clostridium autoethanogenum)である。一実施形態では、クロストリジウム・オートエタノゲナム(Clostridium autoethanogenum)は、識別受託番号19630のもと、German Resource Centre for Biological Material(DSMZ)において受託された株の識別特性を有するクロストリジウム・オートエタノゲナム(Clostridium autoethanogenum)である。別の実施形態では、DSMZ受託番号DSMZ10061の識別特性を有するクロストリジウム・オートエタノゲナム(Clostridium autoethanogenum)である。これらの株は、基質組成における変化、特にH<sub>2</sub>及びCOに対して特定の耐容性を有し、よって、水蒸気改質プロセスとの組み合わせにおける使用に特に適切である。

40

## 【0105】

本発明の一態様による、CO<sub>2</sub>とH<sub>2</sub>とを含む基質からの酢酸塩の生成における使用に好適な1つの例示の微生物は、アセトバクテリウム・ウッディ(Aacetobacterium woodii)である。

## 【0106】

本発明の方法で使用される細菌の培養は、嫌気性細菌を使用して基質を培養し発酵させ

50

るために当該技術分野において既知のいくつものプロセスを使用して行われてもよい。例として、発酵用にガス状基質を用いる以下の文献において一般的に記載されるプロセスが利用されてもよい。すなわち、(i) K. T. Klasson, et al. (1991). Bioreactors for synthesis gas fermentations resources. Conservation and Recycling, 5; 145 - 165; (ii) K. T. Klasson, et al. (1991). Bioreactor design for synthesis gas fermentations. Fuel, 70. 605 - 614; (iii) K. T. Klasson, et al. (1992). Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. Enzyme and Microbial Technology, 14; 602 - 608; (iv) J. l. Vega, et al. (1989). Study of Gaseous Substrate Fermentation: Carbon Monoxide Conversion to Acetate. 2. Continuous Culture. Biotech. Bioeng. 34. 6. 785 - 793; (v) J. l. Vega, et al. (1989). Study of gaseous substrate fermentations: Carbon monoxide conversion to acetate. 1. Batch kurre. Biotechnology and Bioengineering, 34. 6. 774 - 784; (vi) J. l. Vega, et al. (1990). Design of Bioreactors for Coal Synthesis Gas Fermentations. Resources, Conservation and Recycling, 3. 149 - 160 (これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる)。

#### 発酵生成物

##### 【0107】

本発明の方法は、種々の炭化水素生成物のいずれかを生成するために使用され得る。この炭化水素としては、アルコール、酸及び/またはジオールを含む。より具体的には、本発明は、酪酸塩、プロピオン酸塩、カプロン酸塩、エタノール、プラパノール、ブタノール、2,3-ブタンジオール、プロピレン、ブタジエン、イソ-ブチレン及びエチレンを生成するための発酵に適用可能であり得る。一実施形態では、本発明は、限定されるものではないが、プロパノール及びブタノールを含むアルコールを生成するために使用され得る。アルコール(複数可)は、次いで酢酸塩と反応させ、酢酸プロピルまたは酢酸ブチルを含む生成物(複数可)を生成することができる。当業者であれば、本発明が言及されたアルコール及び生成物に限定されるものではなく、任意の適切なアルコール及び/または酸が生成物を生成するために使用され得ることを理解するであろう。

##### 【0108】

これらの及び他の生成物は、プラスチック、医薬品及び農薬の生成などの沢山の他のプロセス用に価値のあるものであり得る。一実施形態では、発酵生成物は、ガソリンレンジの炭化水素(約8個の炭素)、ディーゼル炭化水素(約12個の炭素)またはジェット燃料炭化水素(約12個の炭素)を生成するために使用される。

##### 【0109】

本発明の方法はまた、好気性発酵に、及び限定されないがイソプロパノールを含む他の生成物の嫌気性または好気性発酵に適用され得る。本発明の方法はまた、好気性発酵に、及び限定されないがイソプロパノールを含む他の生成物の嫌気性または好気性発酵に適用され得る。

##### 【0110】

本発明はまた、発酵によって生成された炭化水素生成物の少なくとも一部が、水蒸気改質プロセスにおいて再利用されることも提供する。これは、 $\text{CH}_4$ 以外の炭化水素が触媒の上方で水蒸気と反応し、 $\text{H}_2$ 及び $\text{CO}$ を生成することができるために、行われる場合がある。特別な実施形態では、エタノールは、水蒸気改質プロセス用の供給原料として使用

10

20

30

40

50

されるよう再循環される。さらなる実施形態では、炭化水素供給原料及び／または生成物は、これらが水蒸気改質プロセスで使用される前に、前改質装置を通過させる。前改質装置を通過させることは、水蒸気改質プロセスの水蒸気改質ステップを部分的に完了させ、これは、水素生成の効率を増加させ、蒸気改質炉の必要とされる容積を減少させることができる。

【0111】

本発明の方法はまた、好気性発酵に、及び限定されないがイソプロパノールを含む他の生成物の嫌気性または好気性発酵に適用され得る。

【0112】

より具体的には、本発明は、エタノール及び／または酢酸塩の発酵に適用可能であり得る。これらの生成物は、その後反応させ、エステルを含む化学生成物と一緒に生成する。本発明の一実施形態では、発酵によって生成されたエタノール及び酢酸塩は、一緒に反応させて、酢酸エチルを生成する。酢酸エチルは、表面コーティング及び稀釀剤を含む溶媒の生成などの多くの他のプロセスに、同様に医薬品及び香料ならびにエッセンスの製造において価値があり得る。

生成物回収

【0113】

発酵反応の生成物は、既知の方法を使用して回収され得る。例示の方法は、WO 07 / 117157号、WO 08 / 115080号、U.S. 6,340,581号、U.S. 6,136,577号、U.S. 5,593,886号、U.S. 5,807,722号及びU.S. 5,821,111号に記載されているものを含む。しかしながら、簡単にかつ例示としては、エタノールは、分別蒸留発酵または蒸発などの方法によって、及び抽出発酵によって、発酵プロセスから回収されてもよい。

【0114】

エタノールの発酵プロセスからの蒸留は、エタノール及び水の共沸混合物（すなわち、95%のエタノール及び5%の水）をもたらす。無水エタノールが、当該技術分野において周知である、分子篩エタノール脱水技術の使用を通して引き続いて得られる。

【0115】

抽出発酵手法は、エタノールを希釀発酵プロセスから回収するために、発酵微生物に対して低い毒性リスクで存在する水混和性溶媒の使用を伴う。例えば、オレイルアルコールは、このタイプの抽出プロセスにおいて使用され得る溶媒である。オレイルアルコールは、発酵槽に連続的に導入され、この溶媒が発酵槽の頂部において層を形成しながら上昇する際に、これが連続的に抽出され、遠心機に送り込まれる。次いで、水及び細胞がオレイルアルコールから容易に分離され、発酵槽に戻され、一方エタノールを含む溶媒は、フラッシュ蒸発ユニットに送り込まれる。エタノールの大部分は蒸発され、濃縮され、一方オレイルアルコールは非揮発性であるため、発酵における再利用のために回収される。

【0116】

発酵反応において副生成物として生成され得る酢酸塩もまた、当該技術分野において既知の方法を使用して、発酵プロセスから回収され得る。

【0117】

例えば、活性炭フィルターを伴う吸着システムが使用されてもよい。この場合、微生物細胞が、好適な分離ユニットを使用して、発酵プロセスから先ず初めに除去されることが好ましい。生成物回収用の無細胞発酵プロセスを生成する多数の濾過に基づく方法が、当該技術分野において既知である。次いで、無細胞のエタノール及び酢酸塩を含有する透過液に、活性炭を収容するカラムを通過させ、酢酸塩を吸着させる。塩（酢酸塩）形態よりはむしろ酸形態での酢酸塩（酢酸）は、活性炭によってより容易に吸着される。したがって、酢酸塩の大部分を酢酸形態に変換するために、発酵プロセスに活性炭カラムを通過させる前に、発酵プロセスのpHを約3未満に低下させることが好ましい。

【0118】

活性炭に吸着された酢酸は、当該技術分野において既知の方法を使用する溶出によって

10

20

30

40

50

回収されてもよい。例えば、結合酢酸塩を溶出するために、エタノールを使用することができる。特定の実施形態において、発酵工程によって生成されたエタノールそれ自体を、酢酸塩を溶出するために使用してもよい。エタノールの沸点は 78.8 であり、酢酸の沸点は 107 であるために、エタノール及び酢酸塩は、蒸留などの揮発性に基づく方法を使用して、互いから容易に分離され得る。

#### 【0119】

発酵プロスから酢酸塩を回収するための他の方法もまた当該技術分野において既知であり、これらを使用してもよい。例えば、米国特許第 6,368,819 号及び同第 6,753,170 号は、発酵プロスからの酢酸の抽出用に使用され得る溶媒及び共溶媒系を記載している。エタノールの抽出発酵について記述されるオレイルアルコールに基づく系の例と同様に、米国特許第 6,368,819 号及び同第 6,753,170 号に記載される系は、酢酸生成物を抽出するために、発酵微生物の存在下または不在下のいずれかで発酵プロスと混合され得る水混和性溶媒 / 共溶媒を記述している。次いで、酢酸生成物を含有する溶媒 / 共溶媒が、蒸留によってプロスから分離される。その後、第 2 の蒸留ステップが、溶媒 / 共溶媒系から酢酸を精製するために使用されてもよい。

10

#### 【0120】

発酵反応の生成物（例えば、エタノール及び酢酸塩）は、発酵バイオリアクターからプロスの一部を連続的に取り出し、微生物細胞をプロスから分離し（通常、濾過によって）、1つ以上の生成物をプロスから同時にまたは逐次的に回収することによって、発酵プロスから回収され得る。エタノールの場合には、これは蒸留によって好都合に回収され得、酢酸塩は上述の方法を使用して、活性炭上の吸着によって回収され得る。分離された微生物細胞は、発酵バイオリアクターに戻されることが好ましい。エタノール及び酢酸塩が取り出された後に残る無細胞透過液もまた、発酵バイオリアクターに戻されることが好ましい。無細胞透過液がバイオリアクターに戻される前に、栄養培地を補充するために、追加の栄養素（ビタミン B など）が無細胞透過液に添加されてもよい。また、プロスの pH が、活性炭に対する酢酸の吸着を強めるために上記したように調整された場合、その pH は、バイオリアクターに戻される前に、発酵バイオリアクターにおけるプロスのそれに類似の pH に再調整されるべきである。

20

#### 【0121】

バイオリアクターから回収されたバイオマスは、バイオマス生成物、好ましくはメタンを生成するために、消化において嫌気性消化を受けてもよい。このバイオマス生成物は、水蒸気改質プロセス用の供給原料として使用されてもよく、または本明細書で定義される反応のうちの1つ以上を進行させるための補助熱を発生させるために使用されてもよい。

30

#### 【実施例】

#### 【0122】

本発明は、以下の実施例を通して、ここでさらに説明される。

#### 実施例 1：マイクロアレイ実験

#### 発酵

#### 【0123】

C. オートエタノゲナム (C. autoethanogenum) DSM 23693 による発酵を、以下に記載される通りに、1.5 L のバイオリアクター内で 37 にて、及び CO 含有ガスを唯一のエネルギーならびに炭素源として行った。1 リットル当たり Mg Cl、CaCl<sub>2</sub> (2 mM)、KCl (25 mM)、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5 mM)、Fe (100 μM)、Ni、Zn (5 μM)、Mn、B、W、Mo、Se (2 μM) を含有する規定液体培地を、培養増殖に使用した。培地をバイオリアクターに移し、ビタミン B 溶液で補充し、0.2 mM の Cr (II) 溶液で還元した。嫌気性状態を達成するために、リアクター容器を窒素でスパージした。接種前に、ガスを 30 % の CO 及び 70 % の N<sub>2</sub> を含有するガス混合物に切り替え、リアクターに連続的に送り込んだ。ガス流量は、100 ml / 分に設定し、攪拌を 300 rpm に設定した。Na<sub>2</sub>S を 0.3 ml / 時でバイオリアクターに投入した。発酵の増殖期中、攪拌を 50 rpm の間隔で 900 rpm まで増大さ

40

50

せた。バッチモードにおける0.8日後に、バイオリアクターを、1.8 ml/分の液体速度（希釈速度1.7 d<sup>-1</sup>）の連続モードに切り替えた。ガス流量を、順次調整して、4 mol/L/dのCO取り込みに到達させた。最大ガス流量は、発酵槽容積当たり43.5 ml/Lであった。定常状態に達した後に、CO<sub>2</sub>濃度を0%から25%まで変化させることによって、実験を開始した。CO取り込みにおけるいかなる変化も回避するために、CO<sub>2</sub>及びN<sub>2</sub>流量を互いに対し調整しつつ、CO流量及び総ガス流量を一定に保持した。ガス組成は、データが分析用に抽出され得るように、前の供給領域からの代謝産物の95%が洗浄され、代謝産物が少なくとも2日間にわたって新しいレベルで再度安定化された時にだけ切り替えられた。培地サンプルは、バイオマス及び代謝産物を測定するために採取され、流入ガス及び流出ガスのヘッドスペース分析を、規則的な間隔で行った。

10

サンプリング手順

【0124】

サンプルを、前冷却したチューブを用いてバイオリアクターから採取し、採取されたサンプルの量は、600 nmで測定されたOD<sub>2</sub>と等価であった。異なるEtOH:BD<sub>O</sub>比について、ガス組成及び遺伝子発現プロファイルにわたる時間効果を比較するために、3つのサンプルをマイクロアレイ分析用にバイオリアクターから採取した。第1のサンプルは、CO 30%及びN<sub>2</sub> 70%のガス混合物及びリアクター内に存在する23:1のEtOH:BD<sub>O</sub>比から採取した。第2のサンプルは、13:1のEtOH:BD<sub>O</sub>比を伴うCO 30%、N<sub>2</sub> 40%及びCO<sub>2</sub> 30%のガス混合物から採取し、このサンプルは、ガス組成が変更された後7時間で採取した。第3のサンプルは、第2のサンプルと同じガス混合物から採取したが、これは4:1のEtOH:BD<sub>O</sub>比を伴い、このサンプルは、ガス組成物へのCO<sub>2</sub>の添加後3日で採取した。採取後、サンプルを4にて4000 RPMで10分間遠心分離し、上澄みを除去し、続いてペレットを液体窒素中で急速凍結し、使用するまで-80で保存した。

20

RNA抽出

【0125】

サンプルを-80から取り出した後に、RiboPure (商標) - Bacteria Kit (Ambion, 部品番号AM1925) を用いて、サンプルを抽出した。

マイクロアレイ分析

【0126】

30

マイクロアレイ分析を、標準的手法を用いてRocheによって行った。

実施例2：圧力の発酵に及ぼす効果

【0127】

図2、図3及び図4は、発酵プロセス中に存在する溶解CO<sub>2</sub>の量、及び発酵によって生成された代謝産物の濃度の双方に及ぼす効果を立証するための、低圧及び高圧の両方で行われた発酵からの結果を示す。これらの実験のそれぞれでは、液体栄養培地を含むバイオリアクターに、クロストリジウム・オートエタノゲナム (Clos tridium aut oethanogenum) の培養物を接種した。CO及びCO<sub>2</sub>を含むガス状基質をバイオリアクターに提供した。

【0128】

40

図2は、第1の実験からの結果を示し、ここでは発酵を異なる圧力で行い、圧力の溶解CO<sub>2</sub>の量に及ぼす効果及びリアクター内で生成された2,3-ブタンジオール (2,3-BDO) の濃度に及ぼす効果を立証した。

【0129】

図2は、高圧において、0日目から6日目まで (リアクターのヘッドスペースにおいて320 kPa g、及びリアクターの底部において約420 kPa g)、発酵プロセス中の溶解CO<sub>2</sub>の量、及び生成された2,3-BDOの濃度の両方が増加したこと示している。発酵が低圧で運転されたとき、6日目から22日目まで (ヘッドスペースにおいて50 kPa g、及び底部において約150 kPa g)、発酵プロセス中の溶解CO<sub>2</sub>の量、及び2,3-BDOの濃度の両方が減少した。

50

## 【0130】

図3は、発酵プロス中の溶解CO<sub>2</sub>の量と2,3-ブタンジオール濃度との間の相関を明らかに示している。

## 【0131】

図4は、COのCO<sub>2</sub>への変換の発酵に及ぼす効果を立証している。細菌によるCO消費の量が増加するように発酵が運転されたとき、CO<sub>2</sub>が発酵の副生成物として生成された。CODH(一酸化炭素デヒドロゲナーゼ)によるCOのCO<sub>2</sub>への変換は、還元フェレドキシンを生じさせた。高レベルの還元フェレドキシンは、アセチルCoAをピルビン酸塩に変換するために必要とされ、これは2,3-ブタンジオール生成の増加、及びピルビン酸塩に由来する他の生成物の生成の増加をもたらした。

10

実施例3：溶解CO<sub>2</sub>濃度を増加させること

## 【0132】

発酵物中の溶解CO<sub>2</sub>のレベルが、2,3-ブタンジオールの生成の増加をもたらすことを立証する1組の実験を行った。

3A：2,3-BDO生成を増加させる方法としてのCO<sub>2</sub>入口濃度における変化

## 【0133】

この実験中に、発酵プロスへの入口ガスのCO<sub>2</sub>濃度を、28日間の運転後1段階で0%から25%まで変化させた。CO取り込みを実験全体で一定に保持し、入口ガスにおけるCOの濃度を30%で保持した。図5に示すように、CO<sub>2</sub>を0%から25%まで変化させたとき、2,3-ブタンジオール生成の大幅な増加が観察された。

20

## 【0134】

図6は、25日目～31日目の発酵プロス中のCO<sub>2</sub>濃度における変化を描写する。25日目には、発酵物に提供された入口流中のCO<sub>2</sub>の量は0%であった。28日目には、入口流のCO<sub>2</sub>濃度は、25%まで増加した。図6は、CO<sub>2</sub>が増加後にCO取り込みは同じままであることを明白に示し、このことは、以下に詳説されるBDO生成の増加は、システムに流入するより多量の炭素では説明することができないことを示唆している。さらに、CO<sub>2</sub>生成は、その増加後には同じ状態のままであった。図5は、発酵の代謝産物生成における対応する変化を明確に立証している。CO<sub>2</sub>が発酵プロスに添加されたとき、2,3-BDO濃度は、28日目の0.6g/L周辺から31日目の2.0g/Lまで増加した。エタノール濃度は減少し、エタノールと2,3-BDOとの比は、20日目の約20:1から31日目の約5:1まで低下した。

30

3B：開始時の高CO<sub>2</sub>入口濃度

## 【0135】

この実験は、CO<sub>2</sub>が発酵の開始時に存在するときの高CO<sub>2</sub>濃度の2,3-BDOの生成に及ぼす影響を示すよう設計された。図7に示すように、安定運転条件に一旦到達すると、2:1でのエタノール:2,3-BDO比で、相当量の2,3-BDO生成が存在した。平均入口CO<sub>2</sub>濃度は42%であって、平均出口CO<sub>2</sub>濃度は67.4%であった。実験全体を通して、50%のCOが使用され、ガス流量及びCO取り込みは、エタノール及び2,3-BDO生成を最大化するよう調整された。数日間にわたる流出ガス流中のCO、CO<sub>2</sub>及びH<sub>2</sub>の濃度を図8に示す。

40

3C：CO<sub>2</sub>入口濃度における段階的増加

## 【0136】

CO<sub>2</sub>が発酵物の代謝産物生成プロファイルに及ぼす効果を決定するために、この実験の持続時間にわたって、発酵プロスへの入口ガス流中のCO<sub>2</sub>の濃度を逐次増加させた。図10は、入口流中のCO<sub>2</sub>の増加の代謝産物濃度に及ぼす効果を示している。CO<sub>2</sub>濃度は、6日目で0%から10%まで、9日目で10%から15%まで、及び13日目で15%から20%まで増加した。入口流中のCO<sub>2</sub>濃度における各増加において、2,3-BDO濃度の対応する増加が観察された。図9は、実験の持続時間にわたる微生物培養物のCO、CO<sub>2</sub>及びH<sub>2</sub>の取り込みを示している。

3D：CO<sub>2</sub>の循環

50

## 【0137】

CO<sub>2</sub>入口濃度を循環させる効果を決定するために、この実験を行った。入口流中のCO<sub>2</sub>の量が毎時0%から20%まで循環されるように、発酵を設定した。図11は、実験の過程にわたる代謝産物生成を示している。CO<sub>2</sub>入口濃度の循環は、2,3-BDOの生成をわずかに増加した濃度で維持するための効果を有した。図12は、実験の持続時間にわたる微生物培養物による入口ガスの種々の成分の取り込みを示している。

3E：二リアクターシステムの第2のリアクターへのCO<sub>2</sub>濃度における増加

## 【0138】

第1のバイオリアクターからの流出ガス流を第2のバイオリアクターの入口流まで渡し、それによってCO<sub>2</sub>濃度を増加させる効果を立証するために、この実験を設計した。図13は、発酵工程の14日目から20日目の二リアクターシステムの第2のバイオリアクター内の代謝産物濃度のプロットを示している。14日目には、第1のバイオリアクターから第2のバイオリアクターに提供されたCO<sub>2</sub>の量は、CO<sub>2</sub>の総量が第2のバイオリアクター内で17.8%から43.8%まで進むように、増加した。14日目から21日目まででは、リアクター内の2,3-BDOの濃度は、約8g/Lから約14g/Lまで増加した。エタノールと2,3-BDOとの比は、14日目の4:1から20日目周辺の2:1まで減少し、実験の残りの期間中は比較的一定のままであった。図14は、発酵の過程にわたる微生物培養物についてのCO、CO<sub>2</sub>及びH<sub>2</sub>の取り込みを示している。

実施例4：CO利用率を制御することによる2,3-BDO生成の増加

ガス流量及び搅拌の代謝産物生成に及ぼす効果の立証

## 【0139】

この実験は、質量移動における変化の微生物培養物の代謝産物生成に及ぼす効果を立証するよう設計した。実験の過程にわたって、搅拌速度及びガス流量を変化させ、リアクターに流入するガス、及び発酵の代謝産物プロファイルに変更をもたらした。

## 【0140】

図15を参照すると、2,3-BDO濃度における増加を、6日目から8日目に見ることができ、これはバイオリアクター内の搅拌速度における増加及びリアクターへのガス流量における減少に一致した。図18に示すように、5.6日目に、CO取り込みは一定に保持されたが、COの利用率は改善され、したがって、出口ガス中のCO<sub>2</sub>は増加した。これは、搅拌速度(rpm)を増加することによって、及び出口ガス中のCOが26%から12.5%まで減少するように、ガス流量を減少させることによってなされた。COの取り込みは、ガス流量が240ml/min/Lから160ml/min/Lまで低下されても、同じ状態のままであった。出口流中のCO<sub>2</sub>は、37%から48%まで増加した。CO利用率は、53%から79%まで増加した。この増加の結果として、溶解CO<sub>2</sub>は、CO取り込みにおけるいかなる増加もなく、増加した。CO利用率における増加が、より高いCO利用率がより多くの溶解CO<sub>2</sub>に対応するために、CO利用率における増加は、2,3-BDO生成における増加に正相関した。

発酵プロス中の溶解CO<sub>2</sub>の2,3-ブタンジオール生産性に及ぼす効果

## 【0141】

発酵プロス中の溶解CO<sub>2</sub>の2,3-ブタンジオールの生成に対する関係を示すために、異なるヘッドスペースの圧力において異なる出口CO<sub>2</sub>濃度を用いた多くの実験からの組み合されたデータをプロットした。図16は、溶解CO<sub>2</sub>対2,3-BDO生成速度のプロットである。このプロットは、発酵プロス中の溶解CO<sub>2</sub>の量の増加が、2,3-ブタンジオールの生産性の増加に一致することを示している。

## 【0142】

この表は、いくつかの実験からの結果を提示し、溶解CO<sub>2</sub>及び2,3-BDOの濃度と生産性との間の相関を再び示す。

10

20

30

40

【表1】

運転 #	計算値 溶解 CO2 mM*	CO2 流出%	BDO g/L	入口 CO2 %	CO 取り込み mM/L/日	データ 点	表	生成速度 g/L/日	正規化生成 速度(4 mol CO 取り込 み)
							正規化 BDOg/L(4 mol CO 取 り込み)		
1	2.39	10.62	0.5	0	-4280	平均 約3日 間	0.47	0.92	0.86
2	4.58	20.3	0.88	10	-4201	平均 約3日 間	0.84	1.6	1.52
3	5.76	25.5	0.96	15	-4234	平均 約3日 間	0.91	1.71	1.62
4	7	31.1	1.37	20	-4071	平均 約3日 間	1.35	2.58	2.54
5	8.5	37	0.86	18.5	-3597	平均 約3日 間	0.96	1.36	1.51
6	11.05	49	1.38	18.8	-3595	平均 約3日 間	1.54	2.18	2.43
7	14.89	66	2.22	50	-4055	クラッシュ 前	2.19	3.89	3.84
8	26.1	50	5.3	19.2	-5000	平均 9~12日 目	4.24	8	6.40
9	39.7	49.8	10.38	20.5	-5051	平均 4.3~6.0 日目	8.22	13.3	10.53
10	40.9	48	6.48	18.5	-6500	平均 7~8日 目	3.99	13.75	8.46
11	41.1	46	10.38	22.3	-5319	平均 6.3~9.3 日目	7.81	13.4	10.08

## 【0143】

本発明は、本明細書の読者が過度の実験を要することなく本発明を実施することを可能にするために、特定の好ましい実施形態を参照して記述された。当業者であれば、本発明が、全てのこうした変形形態及び修正形態を含む発明の影響下にあることを理解するであろう。さらに、表題、見出し等は、本文書の読者の理解力を高めるために提供されるものであって、本発明の範囲を限定するものとして読み取られるべきではない。

## 【0144】

上記及びもしあれば下記で引用される全ての出願、特許、及び刊行物の開示全体は、参考により本明細書に組み込まれる。

## 【0145】

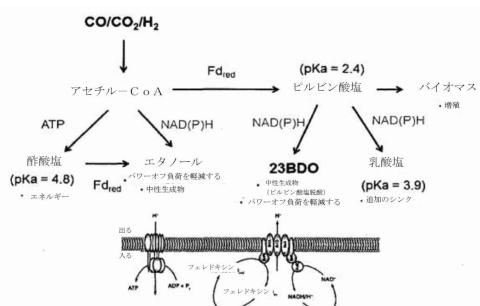
本明細書における任意の先行技術に対する言及は、この先行技術がアメリカ合衆国または世界のいかなる国においても周知の一般知識の一部を形成するという承認または任意の

形態の示唆ではなく、またそのように受け取られるべきではない。

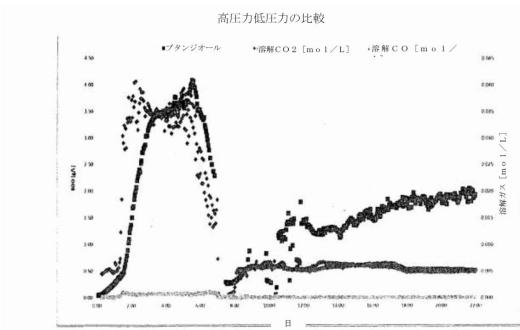
【0146】

この明細書及び後続する任意の特許請求の範囲全体を通して、文脈が他のものを要求する場合を除いて、文言「含む (comprise)」、「含んでいる (comprising)」及び同様のものは、排他的な意味とは対照的に包括的な意味に、すなわち、「限定されるものではないが、～を含む」という意味に、解釈されることになる。

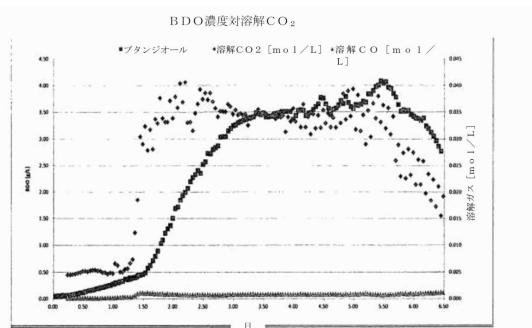
【図1】



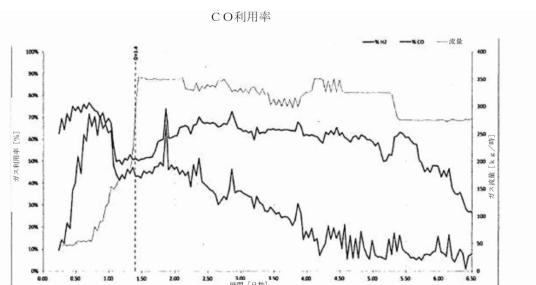
【図2】



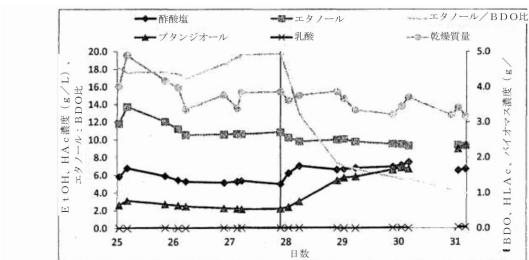
【図3】



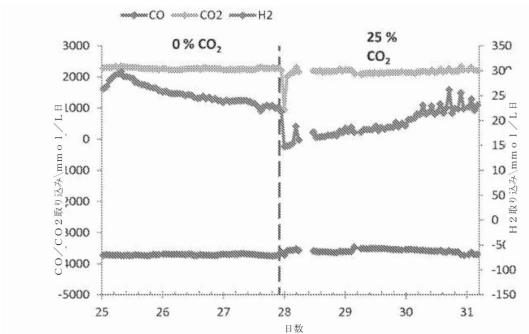
【図4】



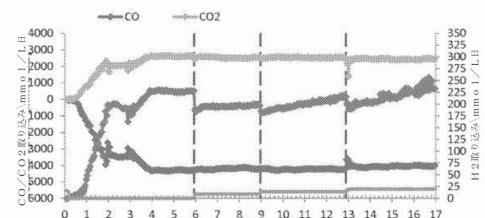
【図5】



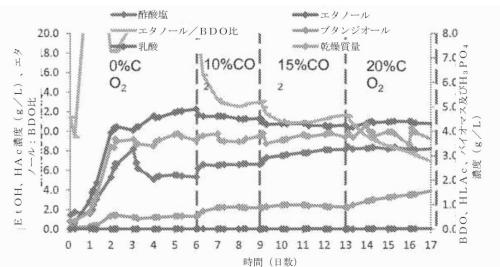
【図6】



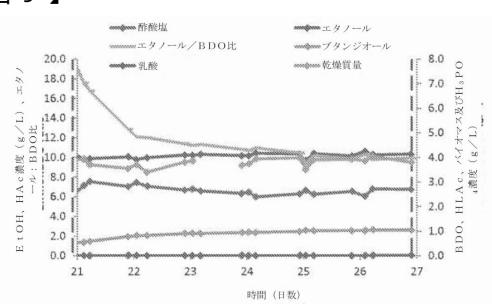
【図7】



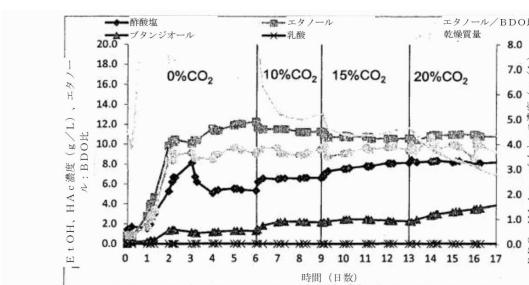
【図8】



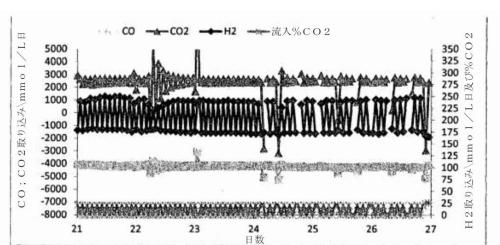
【図9】



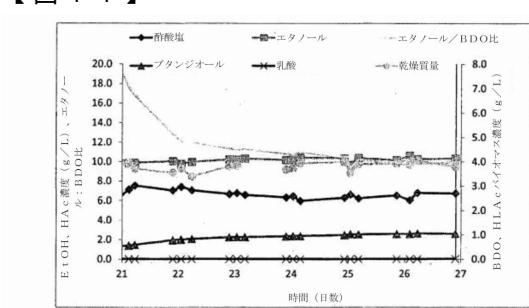
【図10】



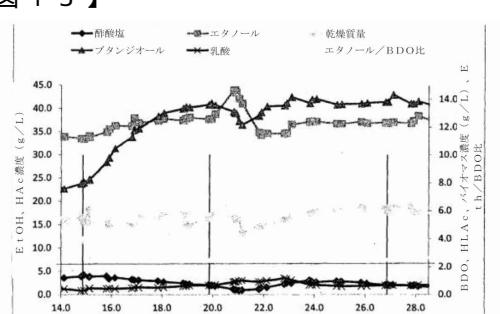
【図12】



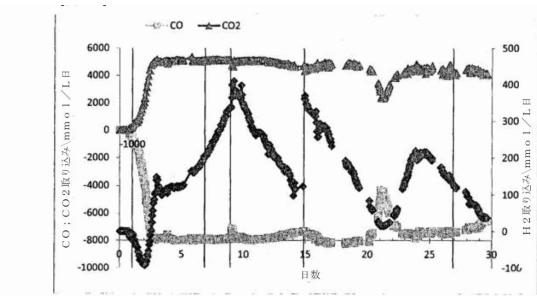
【図11】



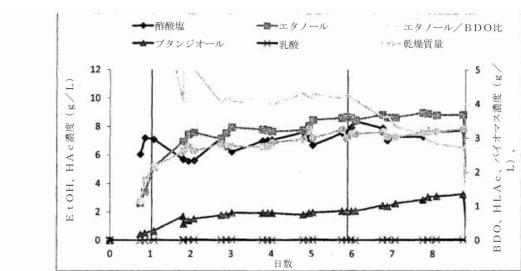
【図13】



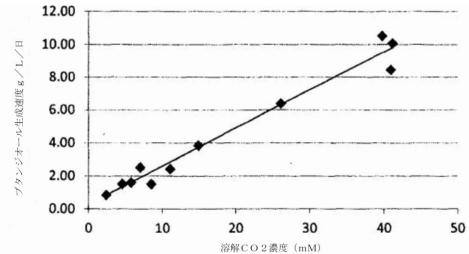
【図14】



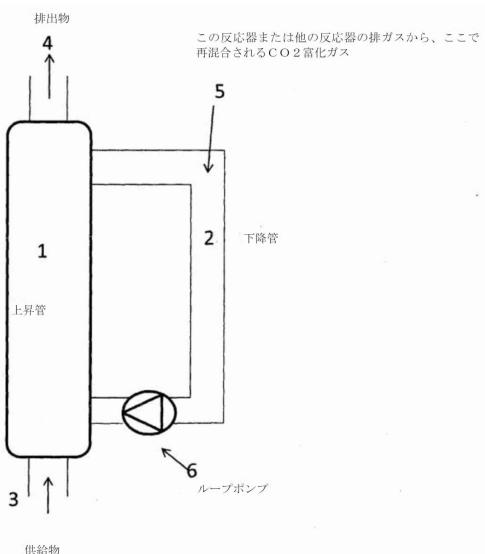
【図15】



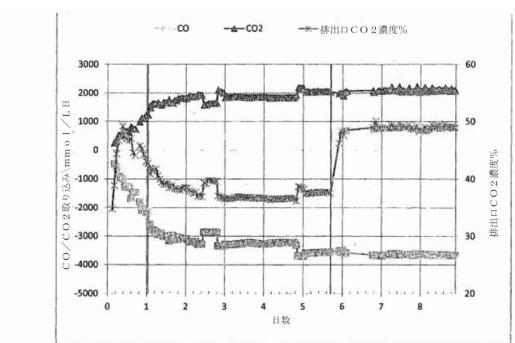
【図16】



【図17】



【図18】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 12 P	7/26 (2006.01)	C 12 P	7/16
C 12 P	7/44 (2006.01)	C 12 P	7/18
C 12 P	7/46 (2006.01)	C 12 P	7/26
C 12 P	7/56 (2006.01)	C 12 P	7/44
C 12 P	7/62 (2006.01)	C 12 P	7/46
		C 12 P	7/56
		C 12 P	7/62

(72)発明者 シンプソン, シーン, デニス

ニュージーランド国 1052 オークランド, パーネル, パルフォー ロード 24

(72)発明者 コエブケ,マイケル

ニュージーランド国 1052 オークランド, パーネル, パルフォー ロード 24

(72)発明者 スマート, キャサリーン, フランシス

ニュージーランド国 1052 オークランド, パーネル, パルフォー ロード 24

(72)発明者 トラン, ローン, フォン

ニュージーランド国 1052 オークランド, パーネル, パルフォー ロード 24

(72)発明者 セクリスト, ポール

アメリカ合衆国 60172 イリノイ州, ローゼル, イースト アーヴィング パーク ロード  
725 - シー

## 合議体

審判長 田村 聖子

審判官 山本 晋也

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 国際公開第2011/112103 (WO, A1)

国際公開第2010/064933 (WO, A1)

J. Biol. Chem., 2000年, Vol. 275, No. 37, pp. 28494 - 28499

Appl. Environ. Microbiol., 2011年, Vol. 77, No. 15, pp. 5467 - 5475

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 7/00-7/66

C12P 1/04

C12N 1/20

Caplus / BIOSIS / MEDLINE / EMBASE / WPIDS (STN)

JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed