

【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23年12月22日 (2011.12.22)

【公表番号】特表2011-515067(P2011-515067A)  
 【公表日】平成23年5月19日 (2011.5.19)  
 【年通号数】公開・登録公報2011-020  
 【出願番号】特願2010-532229(P2010-532229)  
 【国際特許分類】

C 1 2 P 7/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 7/06 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】  
 【提出日】平成23年10月31日 (2011.10.31)

【手続補正 1】  
 【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】

キシロースを含む混合糖類培地からエタノールを産生する方法であって：

(a) キシロースを資化してエタノールを産生することが可能な組み換えザイモモナス株を提供する工程であって、前記株は、組み込み宿主因子 サブユニットタンパク質 (H i m A) の発現を減少させる少なくとも 1 つの遺伝子改変を含む工程と；

(b) キシロースを含む混合糖類培地において (a) の株を培養する工程であって、それによって、キシロースは、前記株によってエタノールを産生するための炭素源として使用される工程と、

を含む、方法。

【請求項 2】

培養が、約 4 . 5 ~ 7 . 5 の範囲の pH を有する培地において約 2 5 ~ 約 4 0 の温度範囲にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記遺伝子改変が、挿入、欠失、変異、共抑制、およびアンチセンス R N A 発現からなる群から選択される h i m A 遺伝子の改変である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記遺伝子改変が、h i m A 遺伝子を非機能的にする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記培地がアセテートをさらに含み、かつ、前記組み換えザイモモナス株が、h i m A 発現を減少させる遺伝子改変を有しない親株のザイモモナス株と比較して増加した量のエタノールを産生する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

産生される前記増加した量のエタノールが、前記ザイモモナス株の酢酸耐性に起因する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記培地が、キシロースを含む少なくとも約 1 2 0 g / L の混合糖類、約 2 m M ~ 約 1 0 0 m M の最終濃度でソルビトール、マンニトール、ガラクトール、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、ならびに少なくとも約 6 g / L のアセテートを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記糖アルコールが、約 5 mM ~ 約 20 mM の濃度にある、請求項 7 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0119

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0119】

この実験の結果は、ZW801-4::himA および AcR#3 の両方とも、試験系において同一に挙動するため、himA 遺伝子不活化が、それ自体単独で発酵性能の改善を担うことを実証する。これらの 2 つの株はまた、図 5 に示す実験に使用した同じ条件を使用して、酢酸耐性についてそれらを試験した場合（図 12）、識別不能であった。明らかに、AcR#3 の himA 遺伝子への Pgap プロモーターの組み込み、およびこの株に施される変異体富化プロセスの延長は、所望の himA 表現型にほとんどまたは全く影響を及ぼさない。

次に、本発明の態様を示す。

1. キシロースを含む混合糖類培地からエタノールを産生する方法であって：

（a）キシロースを資化してエタノールを産生することが可能な組み換えザイモモナス株を提供する工程であって、前記株は、組み込み宿主因子 サブユニットタンパク質（HimA）の発現を減少させる少なくとも 1 つの遺伝子改変を含む工程と；

（b）キシロースを含む混合糖類培地において（a）の株を培養する工程であって、それによって、キシロースは、前記株によってエタノールを産生するための炭素源として使用される工程と、

を含む、方法。

2. 培養が、約 4.5 ~ 7.5 の範囲の pH を有する培地において約 25 ~ 約 40 の温度範囲にある、上記 1 に記載の方法。

3. 前記温度が約 30 ~ 37 である、上記 2 に記載の方法。

4. 前記 pH が約 5.8 ~ 7.0 である、上記 2 に記載の方法。

5. 前記遺伝子改変が、挿入、欠失、変異、共抑制、およびアンチセンス RNA 発現からなる群から選択される himA 遺伝子の改変である、上記 1 に記載の方法。

6. 前記遺伝子改変が、himA 遺伝子を非機能的にする、上記 5 に記載の方法。

7. 前記遺伝子改変が、相同組み換えによって himA 遺伝子に導入される、上記 6 に記載の方法。

8. 前記組み換えザイモモナス株が、ZW801-4::himA または株 AcR#3 である、上記 1 に記載の方法。

9. 前記培地がアセテートをさらに含み、かつ、前記組み換えザイモモナス株が、himA 発現を減少させる遺伝子改変を有しない親株のザイモモナス株と比較して増加した量のエタノールを産生する、上記 1 に記載の方法。

10. 産生される前記増加した量のエタノールが、前記ザイモモナス株の酢酸耐性に起因する、上記 9 に記載の方法。

11. 前記培地が、キシロースを含む少なくとも約 120 g / L の混合糖類、約 2 mM ~ 約 100 mM の最終濃度でソルビトール、マンニトール、ガラクトール、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、ならびに少なくとも約 6 g / L のアセテートを含む、上記 9 に記載の方法。

12. 前記糖アルコールが、約 5 mM ~ 約 20 mM の濃度にある、上記 11 に記載の方法