

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-535956

(P2013-535956A)

(43) 公表日 平成25年9月19日 (2013.9.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/62 (2006.01)	C 1 2 P 7/62	2 B 1 5 O
C 1 2 P 7/16 (2006.01)	C 1 2 P 7/16	4 B O 6 4
C 1 2 P 7/40 (2006.01)	C 1 2 P 7/40	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 P 7/02 (2006.01)	C 1 2 P 7/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 172 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-515543 (P2013-515543)	(71) 出願人	310011310 ビュータマックス・アドバンスド・バイオ フューエルズ・エルエルシー アメリカ合衆国デラウェア州19880. ウィルミントン. パウダーミルロード20 0. イクスペリメンタルステーション ビ ー268/アール226
(86) (22) 出願日	平成23年6月17日 (2011.6.17)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(85) 翻訳文提出日	平成25年2月1日 (2013.2.1)	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/040856	(72) 発明者	ダグラス・ロバート・アントン アメリカ合衆国デラウェア州19803. ウィルミントン. パースドライブ6
(87) 国際公開番号	W02011/159998		
(87) 国際公開日	平成23年12月22日 (2011.12.22)		
(31) 優先権主張番号	61/368,451		
(32) 優先日	平成22年7月28日 (2010.7.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	13/160,766		
(32) 優先日	平成23年6月15日 (2011.6.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/440,034		
(32) 優先日	平成23年2月7日 (2011.2.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルコール発酵の際のアルコールエステルの生成および原位置生成物除去

(57) 【要約】

カルボン酸 (例えば、脂肪酸)、およびカルボン酸とともにブタノールなどの生成物アルコールをエステル化して、アルコールエステルを形成することが可能な触媒 (例えば、リパーゼ) を含む発酵培地中での生成物アルコールのエステル化によるアルコールエステルの生成を含む、アルコール発酵プロセスおよび組成物。アルコールエステルは、発酵培地から抽出され、生成物アルコールがアルコールエステルから回収され得る。カルボン酸は、発酵培地からアルコールエステルを除去するための抽出剤としても働き得る。

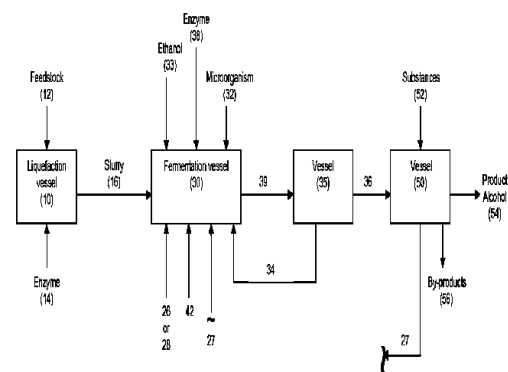


FIG.1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブチルエステルを生成するための方法であって：

発酵プロセスにおいて生成されるブタノールを、少なくとも 1 種のカルボン酸、および前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも 1 種の触媒と接触させる工程であって；

前記発酵プロセスにおける前記カルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程を含む方法。

【請求項 2】

ブタノールの前記生成およびブチルエステルの前記生成が、同時にまたは連続して行われる、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記発酵プロセスの原料が、1 種またはそれ以上の発酵性糖を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記発酵プロセスの前記原料が、トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、牧草、稲わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物に由来する 1 種またはそれ以上の発酵性糖を含む、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 5】

天然油を提供する工程と、前記油を 1 種またはそれ以上の酵素と接触させることによって、前記天然油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記カルボン酸が脂肪酸を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記カルボン酸が 12 ～ 22 個の炭素を含む、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 8】

前記カルボン酸が、カルボン酸の混合物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記カルボン酸の前記ブチルエステルが、脂肪酸のブチルエステルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記触媒が、前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 10 に記載の方法。 40

【請求項 12】

原料からブタノールおよびブチルエステルを生成するための方法であって：

(a) 原料を提供する工程と；

(b) 前記原料を液化して、オリゴ糖を含む液化されたバイオマスを生成する工程と；

(c) 前記原料スラリーを分離して、オリゴ糖を含む水流、油流、および固体を含む生成物を生成する工程と；

(d) 前記水流を、発酵プロセスを含む発酵槽に加える工程と；

(e) 前記水流の前記オリゴ糖を糖化する工程と；

(f) 前記水流中に存在する前記オリゴ糖糖化の前記生成物を発酵させて、ブタノール 50

を生成すると同時に、前記ブタノールを、少なくとも１種のカルボン酸、および前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも１種の触媒と接触させる工程であって、前記カルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程とを含み；

場合により、工程（e）および（f）が同時に行われる方法。

【請求項１３】

前記油流から油を得る工程と、前記油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

前記原料スラリーが、デカンターボウル遠心分離、トリカンター遠心分離、ディスクスタック遠心分離、ろ過遠心分離、デカンター遠心分離、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるい分けろ過、ふるい分け分離、格子、多孔質格子、浮遊法、ハイドロクロン、フィルタープレス、スクリュープレス、重力沈降器、ボルテックス分離器、またはそれらの組合せによって分離される、請求項１２に記載の方法。

【請求項１５】

前記カルボン酸が脂肪酸を含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１６】

前記カルボン酸が１２～２２個の炭素を含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１７】

前記油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する前記工程の前に、前記油を前記発酵槽に加える工程をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１８】

さらなるカルボン酸を前記発酵槽に加える工程をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１９】

前記さらなるカルボン酸を加える工程の後、前記油が、カルボン酸に転化される、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

前記カルボン酸が、トウモロコシ油脂肪酸、大豆油脂肪酸、またはトウモロコシ油脂肪酸と大豆油脂肪酸との混合物である、請求項１８に記載の方法。

【請求項２１】

前記油流から得られる前記油が、グリセリドを含み、前記１種またはそれ以上の触媒が、前記グリセリドを脂肪酸へと加水分解する、請求項１２に記載の方法。

【請求項２２】

前記カルボン酸のブチルエステルが、脂肪酸のブチルエステルである、請求項１２に記載の方法。

【請求項２３】

前記触媒が、前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である、請求項１２に記載の方法。

【請求項２４】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

前記固体を溶媒で洗浄する工程をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項２６】

前記溶媒が、ヘキサン、イソブタノール、イソヘキサン、エタノール、石油エーテルなどの石油蒸留物、またはそれらの混合物から選択される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記固体が、動物飼料製品を形成するように処理される、請求項２６に記載の方法。

【請求項２８】

10

20

30

40

50

前記固体が、動物飼料製品を形成するように処理される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 29】

前記動物飼料製品が、1 種またはそれ以上の粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、脂肪酸イソブチルエステル、リジン、中性デタージェント繊維（NDF）、および酸性デタージェント繊維（ADF）を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記動物飼料製品が、1 種またはそれ以上のビタミン、ミネラル、香料、または着色料をさらに含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記動物飼料製品が、20～35 質量%の粗タンパク質、1～20 質量%の粗脂肪、0～5 質量%のトリグリセリド、4～10 質量%の脂肪酸、および 2～6 質量%の脂肪酸イソブチルエステルを含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記原料スラリーから前記固体を分離する前記工程が、前記発酵プロセスから前記抽出剤への前記ブタノールの液液物質移動係数を高めることによって、前記ブタノール生成の効率を高めるか；抽出剤により前記ブタノールの抽出効率を高めることによって、前記ブタノール生成の効率を高めるか；前記発酵プロセスと抽出剤との間の相分離の速度を上げることによって、前記ブタノール生成の効率を高めるか；抽出剤の回収および再利用を増加させることによって、前記ブタノール生成の効率を高めるか；または抽出剤の流量を減少させることによって、前記ブタノール生成の効率を高める、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 33】

原料からブタノールおよびブチルエステルを生成するための方法であって：

（a）原料を提供する工程と；

（b）前記原料を液化して、オリゴ糖を含む液化されたバイオマスを生成する工程と；

（c）前記原料スラリーを分離して、オリゴ糖および油を含む流れ、および固体を生成する工程と；

（d）前記流れを、発酵プロセスを含む発酵槽に加える工程と；

（e）前記流れの前記オリゴ糖を糖化する工程と；

（f）前記流れ中に存在する前記オリゴ糖糖化の前記生成物を発酵させて、ブタノールを生成すると同時に、前記ブタノールを、少なくとも 1 種のカルボン酸、および前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも 1 種の触媒と接触させる工程であって、前記カルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程とを含み；

場合により、工程（e）および（f）が同時に行われる方法。

【請求項 34】

前記油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程をさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記原料スラリーが、デカンターボウル遠心分離、トリカンター遠心分離、ディスクスタック遠心分離、ろ過遠心分離、デカンター遠心分離、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるい分けろ過、ふるい分け分離、格子、多孔質格子、浮遊法、ハイドロクロン、フィルタープレス、スクリュープレス、重力沈降器、ボルテックス分離器、またはそれらの組合せによって分離される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記カルボン酸が脂肪酸を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

前記カルボン酸が 12～22 個の炭素を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 38】

油を前記発酵槽に加える工程をさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 39】

さらなるカルボン酸を前記発酵槽に加える工程をさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 40】

前記さらなるカルボン酸を加える前記工程の後、前記油が、カルボン酸に転化される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 41】

前記カルボン酸が、トウモロコシ油脂肪酸、大豆油脂肪酸、またはトウモロコシ油脂肪酸と大豆油脂肪酸との混合物である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 42】

前記油が、グリセリドを含み、前記 1 種またはそれ以上の触媒が、前記グリセリドを脂肪酸へと加水分解する、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 43】

前記カルボン酸のブチルエステルが、脂肪酸のブチルエステルである、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 44】

前記触媒が、前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 45】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記固体を溶媒で洗浄する工程をさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 47】

前記溶媒が、ヘキサン、イソブタノール、イソヘキサン、エタノール、石油エーテルなどの石油蒸留物、またはそれらの混合物から選択される、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記固体が、動物飼料製品を形成するように処理される、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 49】

前記固体が、動物飼料製品を形成するように処理される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 50】

前記動物飼料製品が、1 種またはそれ以上の粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、脂肪酸イソブチルエステル、リジン、中性デタージェント繊維（NDF）、および酸性デタージェント繊維（ADF）を含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記動物飼料製品が、1 種またはそれ以上のビタミン、ミネラル、香料、または着色料をさらに含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記動物飼料製品が、20～35 質量%の粗タンパク質、1～20 質量%の粗脂肪、0～5 質量%のトリグリセリド、4～10 質量%の脂肪酸、および 2～6 質量%の脂肪酸イソブチルエステルを含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 53】

前記原料スラリーから前記固体を分離する前記工程が、前記発酵プロセスから前記抽出剤への前記ブタノールの液液物質移動係数を高めることによって、前記ブタノール生成の効率を高めるか；抽出剤により前記ブタノールの抽出効率を高めることによって、前記ブタノール生成の効率を高めるか；前記発酵プロセスと抽出剤との間の相分離の速度を上げることによって、前記ブタノール生成の効率を高めるか；抽出剤の回収および再利用を増加させることによって、前記ブタノール生成の効率を高めるか；または抽出剤の流量を減少させることによって、前記ブタノール生成の効率を高める、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 54】

ブタノールを生成するための方法であって：

(a) 発酵プロセスにおいて生成されるブタノールを、少なくとも1種のカルボン酸、および前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも1種の触媒と接触させる工程であって；

前記発酵プロセスにおける前記カルボン酸が、水相およびブチルエステル含有有機相を含む二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程と；

(b) 前記水相から前記ブチルエステル含有有機相を分離する工程と；

(c) 前記ブチルエステルからブタノールを回収する工程とを含む方法。

【請求項55】

前記ブチルエステルからブタノールを回収する工程が、前記エステルを、カルボン酸およびブタノールへと加水分解する工程を含む、請求項54に記載の方法。

10

【請求項56】

前記ブチルエステルが、加水分解触媒の存在下で加水分解される、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記ブチルエステルが、水の存在下で加水分解され、前記加水分解触媒が、酸触媒、有機酸、無機酸、水溶性酸、または不水溶性酸を含む、請求項55に記載の方法。

【請求項58】

前記加水分解触媒が、前記ブチルエステルを加水分解して、カルボン酸およびブタノールを形成することが可能な酵素を含む、請求項56に記載の方法。

【請求項59】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項58に記載の方法。

20

【請求項60】

酵素反応条件が、エステル化より酵素加水分解に有利に働く、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

前記酵素反応条件が共溶媒を含む、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

脂肪酸ブチルエステル、脂肪酸、イソブタノール、および水が、前記共溶媒に可溶であり、遊離脂肪酸が、前記共溶媒と反応しない、請求項61に記載の方法。

30

【請求項63】

前記共溶媒が、アセトン、tert-ブタノール、2-Me-2-ブタノール、2-Me-2-ペンタノール、および3-Me-3-ペンタノールから選択される、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

前記酵素反応条件が最終生成物除去を含む、請求項60に記載の方法。

【請求項65】

前記最終生成物が、イソブタノールまたは脂肪酸である、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

イソブタノールが、真空蒸留、パーバレーション、選択透過性ろ過、またはガスのスパージによって除去される、請求項65に記載の方法。

40

【請求項67】

前記脂肪酸が、沈殿、選択透過性ろ過、または電気泳動法によって除去される、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

前記加水分解反応が、反応槽中で起こる、請求項55に記載の方法。

【請求項69】

前記ブチルエステルからブタノールを回収する工程が、前記ブチルエステルを、ブタノールおよび脂肪酸アルキルエステルまたはアシルグリセリドへとエステル交換する工程を含む、請求項54に記載の方法。

50

【請求項 70】

前記脂肪酸アルキルエステルが、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸エチルエステル、または脂肪酸プロピルエステルを含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

天然油を提供する工程と、前記油を 1 種またはそれ以上の酵素と接触させることによって、前記天然油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 72】

前記酵素が、前記ブチルエステルを加水分解またはエステル交換してブタノールを形成することが可能な酵素である、請求項 71 に記載の方法。

10

【請求項 73】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記カルボン酸が脂肪酸を含む、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 75】

前記カルボン酸が、12～22 個の炭素の範囲の炭素鎖長を有する、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 76】

ブタノールの少なくとも約 10 % が、前記ブチルエステルから回収される、請求項 54 に記載の方法。

20

【請求項 77】

ブタノールの少なくとも約 50 % が、前記ブチルエステルから回収される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 78】

ブタノールの少なくとも約 90 % が、前記ブチルエステルから回収される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 79】

カルボン酸が、前記ブチルエステルから回収される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 80】

30

抽出剤流として前記発酵装置からブタノールを除去する工程と；

前記抽出剤流を 2 つまたはそれ以上の蒸留塔に加える工程とをさらに含む、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 81】

前記蒸留塔が、蒸気加熱されるリボイラーを備えた過圧蒸留塔である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記蒸留塔から水および溶媒を回収する工程と；前記水および溶媒を再利用する工程とをさらに含む、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 83】

40

前記蒸留プロセスから熱を回収する工程と；水を蒸発させるために前記熱を再利用する工程とをさらに含む、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 84】

原料からブタノールを生成するための方法であって；

(a) 原料を提供する工程と；

(b) 前記原料を液化して、原料スラリーを生成する工程と；

(c) 前記原料スラリーを分離して、水流、油流、および固体を含む生成物を生成する工程と；

(d) 前記水流を、発酵ブロスを含む発酵槽に加える工程と；

(e) 前記水流を糖化する工程と；

50

(f) 前記糖化された水流を発酵させて、ブタノールを生成すると同時に、前記ブタノールを、少なくとも１種のカルボン酸、および前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも１種の触媒と接触させる工程であって、前記カルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程と；

(g) 前記水相から前記ブチルエステル含有有機相を分離する工程と；

(h) 前記ブチルエステルからブタノールを回収する工程とを含み；

場合により、工程(e)および(f)が同時に行われる方法。

【請求項 85】

前記油流から油を得る工程と、前記油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む、請求項 84 に記載の方法。 10

【請求項 86】

前記原料スラリーが、遠心分離、ろ過、またはデカンテーションによって分離される、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 87】

前記カルボン酸が脂肪酸を含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 88】

前記カルボン酸が、12～22個の炭素の範囲の炭素鎖長を有する、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 89】

前記油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する前記工程の前に、前記油を前記発酵槽に加える工程をさらに含む、請求項 84 に記載の方法。 20

【請求項 90】

さらなるカルボン酸を前記発酵槽に加える工程をさらに含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 91】

前記さらなるカルボン酸を加える前記工程の後、前記油が、カルボン酸に転化される、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

前記カルボン酸が、トウモロコシ油脂肪酸、大豆油脂肪酸、またはトウモロコシ油脂肪酸と大豆油脂肪酸との混合物である、請求項 84 に記載の方法。 30

【請求項 93】

前記油流から得られる前記油が、グリセリドを含み、前記１種またはそれ以上の触媒が、前記グリセリドを脂肪酸へと加水分解する、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 94】

前記カルボン酸のブチルエステルが、脂肪酸のブチルエステルである、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 95】

前記触媒が、前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である、請求項 84 に記載の方法。 40

【請求項 96】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

前記固体が、動物飼料製品を形成するように処理される、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 98】

前記ブチルエステルからブタノールを回収する工程が、前記エステルを、カルボン酸およびブタノールへと加水分解する工程を含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 99】

前記ブチルエステルが、加水分解触媒の存在下で加水分解される、請求項 98 に記載の方法。 50

方法。

【請求項 100】

前記ブチルエステルが、水の存在下で加水分解され、前記加水分解触媒が、酸触媒、有機酸、無機酸、水溶性酸、または不水溶性酸を含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記加水分解触媒が、前記ブチルエステルを加水分解して、カルボン酸およびブタノールを形成することが可能な酵素を含む、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 102】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

前記加水分解反応が、反応槽中で起こる、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 104】

前記ブチルエステルからブタノールを回収する工程が、前記ブチルエステルを、ブタノールおよび脂肪酸アルキルエステルまたはアシルグリセリドへとエステル交換する工程を含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 105】

前記脂肪酸アルキルエステルが、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸エチルエステル、または脂肪酸プロピルエステルを含む、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

天然油を提供する工程と、前記油を 1 種またはそれ以上の酵素と接触させることによって、前記天然油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 107】

前記酵素が、前記ブチルエステルを加水分解またはエステル交換してブタノールを形成することが可能な酵素である、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

原料からブタノールおよびブチルエステルを生成するための方法であって：

(a) 原料を提供する工程と；

(b) 前記原料を液化して、オリゴ糖を含む液化されたバイオマスを生成する工程と；

(c) 前記原料スラリーを分離して、オリゴ糖および油を含む水流、および固体を生成する工程と；

(d) 前記水流を、発酵プロセスを含む発酵槽に加える工程と；

(e) 前記水流の前記オリゴ糖を糖化する工程と；

(f) 前記水流中に存在する前記オリゴ糖糖化の前記生成物を発酵させて、ブタノールを生成すると同時に、前記ブタノールを、少なくとも 1 種のカルボン酸、および前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも 1 種の触媒と接触させる工程であって、前記カルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程と；

(g) 前記水相から前記ブチルエステル含有有機相を分離する工程と；

(h) 前記ブチルエステルからブタノールを回収する工程とを含み；

場合により、工程 (e) および (f) が同時に行われる方法。

【請求項 110】

前記油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程をさらに含む、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 111】

前記原料スラリーが、遠心分離、ろ過、またはデカンテーションによって分離される、

10

20

30

40

50

請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

前記カルボン酸が脂肪酸を含む、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記カルボン酸が 1 2 ～ 2 2 個の炭素を含む、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

油を前記発酵槽に加える工程をさらに含む、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

さらなるカルボン酸を前記発酵槽に加える工程をさらに含む、請求項 1 0 9 に記載の方法。

10

【請求項 1 1 6】

前記さらなるカルボン酸を加える前記工程の後、前記油が、カルボン酸に転化される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記カルボン酸が、トウモロコシ油脂肪酸または大豆油脂肪酸である、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記カルボン酸が、トウモロコシ油脂肪酸と大豆油脂肪酸との混合物である、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記油が、グリセリドを含み、前記 1 種またはそれ以上の触媒が、前記グリセリドを脂肪酸へと加水分解する、請求項 1 0 9 に記載の方法。

20

【請求項 1 2 0】

前記カルボン酸のブチルエステルが、脂肪酸のブチルエステルである、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記触媒が、前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 1 2 1 に記載の方法。

30

【請求項 1 2 3】

前記固体が、動物飼料製品を形成するように処理される、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記ブチルエステルからブタノールを回収する工程が、前記エステルを、カルボン酸およびブタノールへと加水分解する工程を含む、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記ブチルエステルが、加水分解触媒の存在下で加水分解される、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記ブチルエステルが、水の存在下で加水分解され、前記加水分解触媒が、酸触媒、有機酸、水溶性酸、または不水溶性酸を含む、請求項 1 2 5 に記載の方法。

40

【請求項 1 2 7】

前記加水分解触媒が、前記ブチルエステルを加水分解して、カルボン酸およびブタノールを形成することが可能な酵素を含む、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記加水分解反応が、反応槽中で起こる、請求項 1 2 4 に記載の方法。

50

【請求項 1 3 0】

前記ブチルエステルからブタノールを回収する工程が、前記ブチルエステルを、ブタノールおよび他の脂肪酸アルキルエステルまたはアシルグリセリドへとエステル交換する工程を含む、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記他の脂肪酸アルキルエステルが、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸エチルエステル、または脂肪酸プロピルエステルを含む、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

天然油を提供する工程と、前記油を 1 種またはそれ以上の酵素と接触させることによって、前記天然油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む、請求項 1 0 9 に記載の方法。

10

【請求項 1 3 3】

前記酵素が、前記ブチルエステルを加水分解またはエステル交換してブタノールを形成することが可能な酵素である、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

アルコールエステルを生成するための方法であって：

発酵プロセスにおいて生成されるアルコールを、少なくとも 1 種のカルボン酸、および前記カルボン酸を前記アルコールとともにエステル化して、前記カルボン酸のアルコールエステルを形成することが可能な少なくとも 1 種の触媒と接触させる工程であって；

20

前記発酵プロセスにおける前記カルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程を含む方法。

【請求項 1 3 6】

前記アルコールの前記生成およびアルコールエステルの前記生成が、同時にまたは連続して行われる、請求項 1 3 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記発酵プロセスの原料が、1 種またはそれ以上の発酵性糖を含む、請求項 1 3 5 に記載の方法。

30

【請求項 1 3 8】

前記発酵プロセスの前記原料が、トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、牧草、稲わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物に由来する 1 種またはそれ以上の発酵性糖を含む、請求項 1 3 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

天然油を提供する工程と、前記油を 1 種またはそれ以上の酵素と接触させることによって、前記天然油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む、請求項 1 3 5 に記載の方法。

40

【請求項 1 4 0】

前記カルボン酸が脂肪酸を含む、請求項 1 3 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記カルボン酸が、1 2 ～ 2 2 個の炭素の範囲の炭素鎖長を有する、請求項 1 3 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

前記カルボン酸の前記アルコールエステルが脂肪酸のアルコールエステルである、請求項 1 3 5 に記載の方法。

50

【請求項 1 4 3】

前記触媒が、前記ブタノールとともに前記カルボン酸をエステル化して、前記カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である、請求項 1 3 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記アルコールが、 $C_2 \sim C_8$ のアルキルアルコールである、請求項 1 3 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記 $C_2 \sim C_8$ のアルキルアルコールが、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、または 2-メチル-1-ブタノールである、請求項 1 4 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

アルコールを生成するための方法であって：

(a) 発酵プロセスにおいて生成されるアルコールを、少なくとも 1 種のカルボン酸、および前記カルボン酸を前記アルコールとともにエステル化して、前記カルボン酸のアルコールエステルを形成することが可能な少なくとも 1 種の触媒と接触させる工程であって；前記発酵プロセスにおける前記カルボン酸が、水相およびアルコールエステル含有有機相を含む二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程と；

(b) 前記水相から前記アルコールエステル含有有機相を分離する工程と；

(c) 前記アルコールエステルからアルコールを回収する工程とを含む方法。

【請求項 1 4 8】

前記アルコールエステルからアルコールを回収する工程が、前記エステルをカルボン酸およびアルコールへと加水分解する工程を含む、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記アルコールエステルが、加水分解触媒の存在下で加水分解される、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記アルコールエステルが、水の存在下で加水分解され、前記加水分解触媒が、酸触媒、有機酸、水溶性酸、または不水溶性酸を含む、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記加水分解触媒が、前記ブチルエステルを加水分解して、カルボン酸およびブタノールを形成することが可能な酵素を含む、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

前記加水分解反応が、反応槽中で起こる、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

前記アルコールエステルから前記アルコールを回収する工程が、前記アルコールエステルを、アルコールおよび脂肪酸アルキルエステルまたはアシルグリセリドへとエステル交換する工程を含む、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

前記脂肪酸アルキルエステルが、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸エチルエステル、または脂肪酸プロピルエステルを含む、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

天然油を提供する工程と、前記油を 1 種またはそれ以上の酵素と接触させることによって、前記天然油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

10

20

30

40

50

前記酵素が、前記アルコールエステルを加水分解またはエステル交換してアルコールを形成することが可能な酵素である、請求項 1 5 6 に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

前記酵素が、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記カルボン酸が脂肪酸を含む、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

前記カルボン酸が、12～22 個の炭素の範囲の炭素鎖長を有する、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

前記アルコールが、 $C_2 \sim C_8$ のアルキルアルコールである、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

前記 $C_2 \sim C_8$ のアルキルアルコールが、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、または 2-メチル-1-ブタノールである、請求項 1 6 1 に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

カルボン酸が、前記ブチルエステルから回収される、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

(a) 生成物アルコールを生成することが可能な組み換え微生物と；

(b) 発酵性炭素基質と；

(c) 前記生成物アルコールとともに脂肪酸を、脂肪酸アルコールエステルへと細胞外でエステル交換することが可能な触媒と；

(d) 発酵中に生成される脂肪酸アルコールエステルを含む発酵ブロス。

【請求項 1 6 5】

アシलगリセリド、脂肪酸、生成物アルコール、またはオレイン酸のうちの 1 つまたはそれ以上をさらに含む、請求項 1 6 4 に記載の発酵ブロス。

【請求項 1 6 6】

触媒をさらに含む発酵ブロスであって、前記触媒が、アルコールとともに脂肪酸を脂肪酸アルコールエステルへとエステル化し、トリグリセリドを遊離脂肪酸へと加水分解する、請求項 1 6 4 に記載の発酵ブロス。

【請求項 1 6 7】

前記触媒が、1 種またはそれ以上のリパーゼ酵素である、請求項 1 6 6 に記載の発酵ブロス。

【請求項 1 6 8】

オリゴ糖を発酵性糖へと転化することが可能な糖化酵素をさらに含む、請求項 1 6 7 に記載の発酵ブロス。

【請求項 1 6 9】

前記糖化酵素がグルコアミラーゼを含む、請求項 1 6 8 に記載の発酵ブロス。

【請求項 1 7 0】

前記発酵性糖がモノマーグルコースを含む、請求項 1 6 9 に記載の発酵ブロス。

【請求項 1 7 1】

前記組み換え微生物が、ブタノールを生成することが可能である、請求項 1 6 4 に記載の発酵ブロス。

【請求項 1 7 2】

前記脂肪酸アルコールエステルが脂肪酸ブチルエステルである、請求項 1 6 4 に記載の発酵ブロス。

【請求項 1 7 3】

イソブタノールをさらに含む、請求項 1 6 4 に記載の発酵ブロス。

10

20

30

40

50

【請求項 174】

イソブタノール生合成経路を含む、イソブタノールを生成することが可能な組み換え酵母細胞であって、前記イソブタノール生合成経路が、以下の基質－生成物転化：

- i) ピルビン酸からアセト乳酸；
- ii) アセト乳酸から 2, 3-ジヒドロキシイソ吉草酸；
- iii) 2, 3-ジヒドロキシイソ吉草酸から α -ケトイソ吉草酸；
- iv) α -ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒド；および
- v) イソブチルアルデヒドからイソブタノール

のそれぞれを触媒する少なくとも 1 種の酵素を含み；

iii) の前記酵素または v) の前記酵素の少なくとも 1 つが、染色体中に組み込まれた異種のポリヌクレオチドによってコードされる組み換え酵母細胞。

10

【請求項 175】

前記酵母細胞が、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を実質的に有さない、請求項 174 に記載の組み換え酵母細胞。

【請求項 176】

pdc1、pdc5、および pdc6 遺伝子の欠失を含む、請求項 175 に記載の組み換え酵母細胞。

【請求項 177】

前記酵母細胞が、NAD 依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素を実質的に含まない、請求項 176 に記載の組み換え酵母細胞。

20

【請求項 178】

gpd2 の欠失を含む、請求項 177 に記載の組み換え酵母細胞。

【請求項 179】

iii) の前記酵素および iv) の前記酵素の両方が、染色体中に組み込まれた異種のポリヌクレオチドによってコードされる、請求項 178 に記載の組み換え酵母細胞。

【請求項 180】

前記イソブタノール生合成経路が、前記基質－生成物転化のそれぞれのための酵素をコードする少なくとも 1 種の異種のポリヌクレオチドを含む、請求項 179 に記載の組み換え酵母細胞。

【請求項 181】

pYZ090 の前記コード領域のそれぞれに対する少なくとも 80% の同一性を有するプラスミドまたは pLH468 の前記コード領域のそれぞれに対する少なくとも 80% の同一性を有するプラスミドをさらに含む、請求項 180 に記載の組み換え酵母細胞。

30

【請求項 182】

配列番号 1 のプラスミドまたは配列番号 2 のプラスミドあるいは両方を含む、請求項 180 に記載の組み換え酵母細胞。

【請求項 183】

(a) 発酵性炭素基質と；

(b) アルコールとともに遊離脂肪酸を脂肪酸アルキルエステルへとエステル化することが可能であり、そして場合によりグリセリドを遊離脂肪酸へと加水分解することが可能な触媒と；

40

(c) アルコールと；

(d) 遊離脂肪酸と；

(e) 前記触媒を用いた前記アルコールによる前記遊離脂肪酸のエステル化から原位置で形成される脂肪酸アルコールエステルとを含む発酵組成物。

【請求項 184】

グリセリドを含む油をさらに含む、請求項 183 に記載の組成物。

【請求項 185】

前記油、前記遊離脂肪酸、および前記発酵性炭素基質がバイオマスに由来する、請求項

50

184に記載の組成物。

【請求項186】

前記油および前記発酵性炭素基質が、同じバイオマス源または異なるバイオマス源に由来する、請求項185に記載の組成物。

【請求項187】

前記油の前記バイオマス源が、大豆またはトウモロコシ油であり、前記発酵性炭素基質のバイオマス源がトウモロコシである、請求項185に記載の組成物。

【請求項188】

前記(d)遊離脂肪酸がトウモロコシ油脂肪酸である、請求項183に記載の組成物。

【請求項189】

前記(d)遊離脂肪酸が、前記触媒を用いた前記油中の前記グリセリドの少なくとも一部の加水分解から形成される、請求項183に記載の組成物。

【請求項190】

前記触媒を用いた前記油中の前記グリセリドの一部の部分加水分解から形成されるジグリセリドおよびモノグリセリドのうちの少なくとも1つをさらに含む、請求項183に記載の組成物。

【請求項191】

グリセロールをさらに含む、請求項183に記載の組成物。

【請求項192】

前記発酵性炭素基質の前記バイオマス源に由来する非溶解固体をさらに含む、請求項183に記載の組成物。

【請求項193】

約25質量%未満の前記非溶解固体を含有する、請求項192に記載の組成物。

【請求項194】

でんぷんを発酵性糖へと転化することが可能な糖化酵素をさらに含み、前記アルコールがブタノールである、請求項183に記載の組成物。

【請求項195】

請求項1、12、33、54、84、および109に記載の方法によって生成されるブタノールを含む組成物。

【請求項196】

燃料添加剤、原料化学物質、試薬、溶媒、消毒剤、または食品グレードの抽出剤として使用される、請求項195に記載の組成物。

【請求項197】

燃料添加剤、原料化学物質、試薬、溶媒、消毒剤、または食品グレードの抽出剤としての、請求項1、12、33、54、84、および109に記載の方法によって生成されるブタノールの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2010年6月18日に出願された米国仮特許出願第61/356,290号；2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,451号；2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,436号、2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,444号；2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,429号；2010年9月2日に出願された米国仮特許出願第61/379,546号；および2011年2月7日に出願された米国仮特許出願第61/440,034号；2011年6月15日に出願された米国特許出願第13/160,766号の利益を主張するものであり；これらの内容全体が全て、参照により本明細書に援用される。

【0002】

本出願に関連する配列表は、E F S - W e bを介して電子書式で提出され、全体が参照

10

20

30

40

50

により本明細書に援用される。

【0003】

本発明は、エタノールおよびブタノールを含むアルコールの発酵生成、および全ての関連する副産物、および原位置生成物除去方法を用いてアルコール発酵を改良するための方法に関する。

【背景技術】

【0004】

アルコールには、飲料（すなわち、エタノール）、燃料、試薬、溶媒、および消毒剤などの、産業および科学における様々な用途がある。例えば、ブタノールは、再生可能な燃料添加剤として、プラスチック産業における原料化学物質として、ならびに食品および香料産業における食品グレードの抽出剤としての使用を含む様々な用途を有する重要な産業用化学物質およびドロップイン燃料（drop-in fuel）の成分であるアルコールである。したがって、ブタノールなどのアルコール、ならびに効率的でかつ環境に優しい生成方法に対する高い需要がある。

【0005】

微生物による発酵を用いたアルコールの生成は、1つのこのような環境に優しい生成方法である。ブタノールの生成において、特に、高収率でブタノールを生成するいくつかの微生物は、低いブタノール毒性閾値も有する。ブタノールが生成されるにつれてブタノールを発酵槽から除去することは、こうした低いブタノール毒性閾値を管理する手段である。したがって、発酵培地中のブタノール生成微生物の低いブタノール毒性閾値にもかかわらず、高収率でブタノールを生成するための効率的な方法およびシステムを開発することが引き続き必要とされている。

【0006】

原位置生成物除去（ISPR）（抽出発酵とも呼ばれる）を用いて、ブタノール（または他の発酵アルコール）を、それが生成されるにつれて発酵槽から除去し、それによって、微生物が高収率でブタノールを生成することが可能になり得る。当該技術分野で説明されている発酵アルコールを除去するための1つのISPR方法は、液液抽出（特許文献1）である。一般に、ブタノール発酵に関して、微生物を含む発酵培地は、ブタノール濃度が有毒なレベルに達する前の時点で、有機抽出剤と接触される。有機抽出剤および発酵培地は、二相混合物を形成する。ブタノールが有機抽出剤相中に分離し、微生物を含有する水相中のブタノールの濃度が低下し、それによって、抑制性のブタノールへの微生物の曝露が抑えられる。技術的および経済的に実行可能であるために、液液抽出は、抽出剤中への生成物アルコールの効率的な物質移動のための抽出剤と発酵プロセスとの間の接触；発酵プロセスからの抽出剤の相分離（発酵中および／または発酵後）；抽出剤の効率的な回収および再利用；および長期間の運転にわたる抽出剤の分配係数の低下が最小限であることを必要とする。

【0007】

抽出剤は、例えば、加水分解性でんぶんの原料として発酵槽に供給されるバイオマス中に存在する脂質の蓄積によって、再利用ごとに時間の経過とともに汚染され得る。例として、ブタノールへのグルコースの転化の際、30重量%の乾燥トウモロコシ固体で発酵槽に充填される液化トウモロコシマッシュは、同時糖化発酵（グルコースを生成するためのグルコアミラーゼの添加による発酵中に、液化されたマッシュの糖化が起こる）によって生成される約1.2重量%のトウモロコシ油を含有する発酵プロセスをもたらし得る。ISPRの際の抽出剤として働くオレイルアルコール（OA）へのトウモロコシ油脂質の溶解により、OAの再利用ごとに脂質濃度が増加し、OA中の脂質濃度がOAの再利用ごとに増加するにつれて、OA中の生成物アルコールのための分配係数が低下され得る。

【0008】

さらに、抽出発酵中の非溶解固体の存在は、アルコール生成の効率に悪影響を与え得る。例えば、非溶解固体の存在は、発酵槽の内部の物質移動係数を低下させることがあり、発酵槽中の相分離を妨げることがあり、抽出剤中の非溶解固体からのトウモロコシ油の蓄

積を生じ、時間の経過とともに抽出効率の低下を招くことがあり、溶媒が固体に捕捉され、可溶物含有乾燥穀類蒸留粕（DDGS）として最終的に除去されるため、溶媒の損失を増加することがあり、発酵プロセスからの抽出剤液滴の離脱を遅くすることがあり、および／または発酵槽体積効率を低下させることがある。

【0009】

抽出発酵に使用される抽出剤の分配係数の低下を抑えるためのいくつかの方法は、湿式粉碎、分画、および固体の除去を含んでいた。湿式粉碎は、各副産物から別々に価値を得るために、バイオマス（例えば、トウモロコシ）をその主要な構成要素（胚芽、種皮繊維、でんぷん、およびグルテン）に分離する高コストの多工程プロセスである。このプロセスにより、精製されたでんぷん流が得られるが；このプロセスはコストがかかり、バイオマスを、発酵アルコール生成に不要なその非でんぷん構成要素に分離することを含む。分画により、磨砕された全粒トウモロコシ中に存在する脂質の大部分を含有する繊維および胚芽が除去され、より高いでんぷん（胚乳）含量を有する分画されたトウモロコシが得られる。乾式分画は、胚芽を繊維から分離しないため、湿式粉碎よりコストが低い。しかしながら、分画は、繊維または胚芽の全体を除去せず、固体を完全に除去しない。さらに、分画の際にでんぷんをいくらか損失する。トウモロコシの湿式粉碎は、乾式分画よりさらにコストが高いが、乾式分画は、分画されていないトウモロコシの乾式磨砕よりコストが高い。例えば、2010年6月18日に出願された、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第61/356,290号明細書に記載されるように、発酵に使用する前に、液化されたマッシュから、脂質を含有する胚芽を含む固体を除去すると、非溶解固体を実質的に除去することができる。しかしながら、非溶解固体の実質的に全ての分画または除去さえ行わずに、脂質による汚染によって引き起こされる抽出剤の分配係数の低下を抑えることができれば有利であろう。液化されたマッシュ中に存在する脂質の、ISPRに使用され得る抽出剤への転化は、例えば、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第61/368,436号明細書および米国仮特許出願第61/368,444号明細書（両方とも2010年7月28日に出願された）に記載されるように、発酵槽に供給される脂質の量を減少させる別の方法である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許出願公開第2009/0305370号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

微生物に対するブタノールなどの生成物アルコールの毒性作用を減少させるための手段として、発酵培地とISPR抽出剤とに分液する必要なく、発酵生成物抽出剤の分配係数の低下も抑えることができる代替的な抽出発酵方法が引き続き必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

微生物に対する毒性が少ない物質への、発酵培地中で微生物から生成されるブタノールなどのアルコールの転化により、所与の発酵槽体積についての、ブタノールなどのアルコールの生成を増加させることができる。アルコールエステルは、発酵培地中のアルコールを、カルボン酸（例えば、脂肪酸）、およびカルボン酸とともにアルコールをエステル化することが可能な触媒と接触させることによって形成され得る。さらに、カルボン酸は、アルコールエステルが中に分離するISPR抽出剤として働き得る。カルボン酸は、発酵槽に供給され、および／または発酵性炭素原料を発酵槽に供給するバイオマスに由来し得る。原料中に存在する脂質は、カルボン酸に触媒により加水分解され得、同じ触媒（例えば、酵素）が、カルボン酸を、アルコール（例えば、ブタノール）とともにエステル化することができ；脂質も、触媒によって直接エステル交換されて、アルコールエステルが生成され得る。触媒は、発酵前に原料に供給され得、または原料を供給する前またはそれと

同時に発酵槽に供給され得る。触媒が発酵槽に供給される場合、アルコールエステルは、脂質をカルボン酸へと加水分解することおよび発酵槽中に存在するブタノールとともにカルボン酸を同時にエステル化することによって得られ；脂質も、触媒によってブタノールとともに直接エステル交換されて、アルコールエステルが生成され得る。上記の原料に由来しないカルボン酸および／または天然油も、発酵槽に直接供給することができ、天然油は、カルボン酸へと加水分解される。上記の原料に由来しないカルボン酸および／または天然油は、有機相および水相を含む二相混合物が形成されるように十分な量で発酵槽に供給され得る。したがって、ある実施形態において、アルコールとともにエステル化されない任意のカルボン酸が、I S P R抽出剤またはその一部として働き得る。アルコールエステルを含有する抽出剤は、発酵培地から分離され得、アルコールは、抽出剤から回収され得る。抽出剤は、発酵槽に再利用され得る。したがって、例えばブタノール生成の場合、ブタノールのエステルへの転化により、発酵培地中の遊離ブタノール濃度を低下し、増加するブタノール濃度の有毒な作用から微生物を保護する。さらに、脂質がカルボン酸に触媒により加水分解され、それによって、I S P R抽出剤中の脂質の増加の速度を低下させることができるため、分画されていない穀類を、その中の脂質を分離することなく原料として使用することができる。

10

【0013】

本発明は、ブチルエステルを生成するための方法であって、発酵プロセスにおいて生成されるブタノールを、少なくとも1種のカルボン酸、およびブタノールとともにカルボン酸をエステル化して、カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも1種の触媒と接触させる工程であって；発酵プロセスにおけるカルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程を含む方法に関する。一実施形態において、ブタノールの生成およびブチルエステルの生成が、同時にまたは連続して行われる。一実施形態において、発酵プロセスの原料が、1種以上の発酵性糖を含む。別の実施形態において、発酵プロセスの原料が、トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、牧草、稲わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物に由来する1種以上の発酵性糖を含む。一実施形態において、本方法は、天然油を提供する工程と、油を1種以上の酵素と接触させることによって、天然油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む。一実施形態において、カルボン酸は脂肪酸を含む。別の実施形態において、カルボン酸は12～22個の炭素を含む。一実施形態において、カルボン酸は、カルボン酸の混合物である。別の実施形態において、カルボン酸のブチルエステルは、脂肪酸のブチルエステルである。一実施形態において、触媒は、ブタノールとともにカルボン酸をエステル化して、カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である。別の実施形態において、酵素は、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである。

20

30

【0014】

本発明は、原料からブタノールおよびブチルエステルを生成するための方法であって：(a)原料を提供する工程と；(b)原料を液化して、オリゴ糖を含む液化されたバイオマスを生成する工程と；(c)原料スラリーを分離して、オリゴ糖を含む水流、油流、および固体を含む生成物を生成する工程と；(d)水流を、発酵プロセスを含む発酵槽に加える工程と；(e)水流のオリゴ糖を糖化する工程と；(f)水流中に存在するオリゴ糖糖化の生成物を発酵させて、ブタノールを生成すると同時に、ブタノールを、少なくとも1種のカルボン酸、およびブタノールとともにカルボン酸をエステル化して、カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも1種の触媒と接触させる工程であって、カルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程とを含み；任意に、工程(e)および(f)が同時に行われる方法にも関する。一実施形態において、本方法は、油流から油を得る工程と、油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程と

40

50

をさらに含む。一実施形態において、原料スラリーは、デカンターボウル遠心分離、トリカンター (tricanter) 遠心分離、ディスクスタック遠心分離、ろ過遠心分離、デカンター遠心分離、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるい分けろ過、ふるい分け分離、格子 (grating)、多孔質格子、浮遊法 (floatation)、ハイドロクロン、フィルタープレス、スクリュープレス、重力沈降器、ボルテックス分離器 (vortex separator)、またはそれらの組合せによって分離される。別の実施形態において、カルボン酸は脂肪酸を含む。一実施形態において、カルボン酸は 12~22 個の炭素を含む。一実施形態において、本方法は、油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程の前に、油を発酵槽に加える工程をさらに含む。一実施形態において、本方法は、さらなるカルボン酸を発酵槽に加える工程をさらに含む。一実施形態において、さらなるカルボン酸を加える工程の後、油は、カルボン酸に転化される。別の実施形態において、カルボン酸は、トウモロコシ油脂肪酸、大豆油脂肪酸、またはトウモロコシ油脂肪酸と大豆油脂肪酸との混合物である。一実施形態において、油流から得られる油は、グリセリドを含み、1 種以上の触媒は、グリセリドを脂肪酸へと加水分解する。別の実施形態において、カルボン酸のブチルエステルは、脂肪酸のブチルエステルである。一実施形態において、触媒は、ブタノールとともにカルボン酸をエステル化して、カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である。一実施形態において、酵素は、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである。一実施形態において、本方法は、固体を溶媒で洗浄する工程をさらに含む。一実施形態において、溶媒は、ヘキサン、イソブタノール、イソヘキサン、エタノール、石油エーテルなどの石油蒸留物、またはそれらの混合物から選択される。別の実施形態において、固体は、動物飼料製品を形成するように処理される。一実施形態において、固体は、動物飼料製品を形成するように処理される。一実施形態において、動物飼料製品は、1 種以上の粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、脂肪酸イソブチルエステル、リジン、中性デタージェント繊維 (NDF)、および酸性デタージェント繊維 (ADF) を含む。別の実施形態において、動物飼料製品は、1 種以上のビタミン、ミネラル、香料、または着色料をさらに含む。一実施形態において、動物飼料製品は、20~35 重量%の粗タンパク質、1~20 重量%の粗脂肪、0~5 重量%のトリグリセリド、4~10 重量%の脂肪酸、および 2~6 重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含む。一実施形態において、原料スラリーから固体を分離する工程は、発酵プロセスから抽出剤へのブタノールの液液物質移動係数を高めることによって、ブタノール生成の効率を高め；抽出剤によりブタノールの抽出効率を高めることによって、ブタノール生成の効率を高め；発酵プロセスと抽出剤との間の相分離の速度を上げることによって、ブタノール生成の効率を高め；抽出剤の回収および再利用を増加させることによって、ブタノール生成の効率を高め；または抽出剤の流量を減少させることによって、ブタノール生成の効率を高める。

【0015】

本発明は、原料からブタノールおよびブチルエステルを生成するための方法であって：
(a) 原料を提供する工程と；(b) 原料を液化して、オリゴ糖を含む液化されたバイオマスを生成する工程と；(c) 原料スラリーを分離して、オリゴ糖および油を含む流れ、および固体を生成する工程と；(d) 流れを、発酵プロセスを含む発酵槽に加える工程と；(e) 流れのオリゴ糖を糖化する工程と；(f) 流れ中に存在するオリゴ糖糖化の生成物を発酵させて、ブタノールを生成すると同時に、ブタノールを、少なくとも 1 種のカルボン酸、およびブタノールとともにカルボン酸をエステル化して、カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも 1 種の触媒と接触させる工程であって、カルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程とを含み；任意に、工程 (e) および (f) が同時に行われる方法にも関する。一実施形態において、本方法は、油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程をさらに含む。一実施形態において、原料スラリーは、デカンターボウル遠心分離、トリカンター遠心分離、ディスクスタック遠心分離、ろ過遠心分離、デカンター遠心分離、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるい分けろ過、ふるい分け分離、格子、多孔質格子、浮遊法、ハイドロクロン、フ

10

20

30

40

50

ィルタープレス、スクリュープレス、重力沈降器、ボルテックス分離器、またはそれらの組合せによって分離される。別の実施形態において、カルボン酸は脂肪酸を含む。一実施形態において、カルボン酸は12～22個の炭素を含む。一実施形態において、本方法は、油を発酵槽に加える工程をさらに含む。一実施形態において、本方法は、さらなるカルボン酸を発酵槽に加える工程をさらに含む。一実施形態において、さらなるカルボン酸を加える工程の後、油は、カルボン酸に転化される。一実施形態において、カルボン酸は、トウモロコシ油脂肪酸、大豆油脂肪酸、またはトウモロコシ油脂肪酸と大豆油脂肪酸との混合物である。一実施形態において、油は、グリセリドを含み、1種以上の触媒は、グリセリドを脂肪酸へと加水分解する。一実施形態において、カルボン酸のブチルエステルは、脂肪酸のブチルエステルである。一実施形態において、触媒は、ブタノールとともにカルボン酸をエステル化して、カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である。一実施形態において、酵素は、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである。一実施形態において、本方法は、固体を溶媒で洗浄する工程をさらに含む。一実施形態において、溶媒は、ヘキサン、イソブタノール、イソヘキサン、エタノール、石油エーテルなどの石油蒸留物、またはそれらの混合物から選択される。一実施形態において、固体は、動物飼料製品を形成するように処理される。一実施形態において、固体は、動物飼料製品を形成するように処理される。ある実施形態において、動物飼料製品は、1種以上の粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、脂肪酸イソブチルエステル、リジン、中性デタージェント繊維（NDF）、および酸性デタージェント繊維（ADF）を含む。ある実施形態において、動物飼料製品は、1種以上のビタミン、ミネラル、香料、または着色料をさらに含む。ある実施形態において、動物飼料製品は、20～35重量%の粗タンパク質、1～20重量%の粗脂肪、0～5重量%のトリグリセリド、4～10重量%の脂肪酸、および2～6重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含む。ある実施形態において、原料スラリーから固体を分離する工程は、発酵プロセスから抽出剤へのブタノールの液液物質移動係数を高めることによって、ブタノール生成の効率を高め；抽出剤によりブタノールの抽出効率を高めることによって、ブタノール生成の効率を高め；発酵プロセスと抽出剤との間の相分離の速度を上げることによって、ブタノール生成の効率を高め；抽出剤の回収および再利用を増加させることによって、ブタノール生成の効率を高め；または抽出剤の流量を減少させることによって、ブタノール生成の効率を高める。

10

20

30

【0016】

本発明は、ブタノールを生成するための方法であって、（a）発酵プロセスにおいて生成されるブタノールを、少なくとも1種のカルボン酸、およびブタノールとともにカルボン酸をエステル化して、カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも1種の触媒と接触させる工程であって；発酵プロセスにおけるカルボン酸が、水相およびブチルエステル含有有機相を含む二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程と；（b）水相からブチルエステル含有有機相を分離する工程と；（c）ブチルエステルからブタノールを回収する工程とを含む方法にも関する。ある実施形態において、ブチルエステルからブタノールを回収する工程は、エステルを、カルボン酸およびブタノールへと加水分解する工程を含む。ある実施形態において、ブチルエステルは、加水分解触媒の存在下で加水分解される。ある実施形態において、ブチルエステルは、水の存在下で加水分解され、加水分解触媒は、酸触媒、有機酸、無機酸、水溶性酸、または不水溶性酸を含む。ある実施形態において、加水分解触媒は、ブチルエステルを加水分解して、カルボン酸およびブタノールを形成することが可能な酵素を含む。ある実施形態において、酵素は、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである。ある実施形態において、酵素反応条件は、エステル化より酵素加水分解に有利に働く。ある実施形態において、酵素反応条件は共溶媒を含む。ある実施形態において、脂肪酸ブチルエステル、脂肪酸、イソブタノール、および水が、共溶媒に可溶であり、遊離脂肪酸が、共溶媒と反応しない。ある実施形態において、共溶媒は、アセトン、tert-ブタノール、2-Me-2-ブタノール、2-Me-2-ペンタノール、および3-Me-3-ペンタノールを含む。

40

50

ールから選択される。ある実施形態において、酵素反応条件は最終生成物除去を含む。ある実施形態において、最終生成物は、イソブタノールまたは脂肪酸である。ある実施形態において、イソブタノールは、真空蒸留、パーベーパーレーション、選択透過性ろ過、またはガスのスパージによって除去される。ある実施形態において、脂肪酸は、沈殿、選択透過性ろ過、または電気泳動法によって除去される。ある実施形態において、加水分解反応は、反応槽中で起こる。ある実施形態において、ブチルエステルからブタノールを回収する工程は、ブチルエステルを、ブタノールおよび脂肪酸アルキルエステルまたはアシルグリセリドへとエステル交換する工程を含む。ある実施形態において、脂肪酸アルキルエステルは、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸エチルエステル、または脂肪酸プロピルエステルを含む。ある実施形態において、本方法は、天然油を提供する工程と、油を1種以上の酵素と接触させることによって、天然油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む。ある実施形態において、酵素は、ブチルエステルを加水分解またはエステル交換してブタノールを形成することが可能な酵素である。ある実施形態において、酵素は、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである。ある実施形態において、カルボン酸は脂肪酸を含む。ある実施形態において、カルボン酸は、12～22個の炭素の範囲の炭素鎖長を有する。ある実施形態において、ブタノールの少なくとも約10%が、ブチルエステルから回収される。ある実施形態において、ブタノールの少なくとも約50%が、ブチルエステルから回収される。ある実施形態において、ブタノールの少なくとも約90%が、ブチルエステルから回収される。ある実施形態において、カルボン酸が、ブチルエステルから回収される。ある実施形態において、本方法は、抽出剤流として発酵装置からブタノールを除去する工程と；抽出剤流を2つ以上の蒸留塔に加える工程とをさらに含む。ある実施形態において、蒸留塔は、蒸気加熱されるリボイラーを備えた過圧（super-atmospheric）蒸留塔である。ある実施形態において、本方法は、蒸留塔から水および溶媒を回収する工程と；水および溶媒を再利用する工程とをさらに含む。ある実施形態において、本方法は、蒸留プロセスから熱を回収する工程と；水を蒸発させるために熱を再利用する工程とをさらに含む。

【0017】

本発明は、原料からブタノールを生成するための方法であって、（a）原料を提供する工程と；（b）原料を液化して、原料スラリーを生成する工程と；（c）原料スラリーを分離して、水流、油流、および固体を含む生成物を生成する工程と；（d）水流を、発酵プロスを含む発酵槽に加える工程と；（e）水流を糖化する工程と；（f）糖化された水流を発酵させて、ブタノールを生成すると同時に、ブタノールを、少なくとも1種のカルボン酸、およびブタノールとともにカルボン酸をエステル化して、カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な少なくとも1種の触媒と接触させる工程であって、カルボン酸が、二相混合物を生成するのに十分な濃度で存在する工程と；（g）水相からブチルエステル含有有機相を分離する工程と；（h）ブチルエステルからブタノールを回収する工程とを含み；任意に、工程（e）および（f）が同時に行われる方法にも関する。ある実施形態において、本方法は、油流から油を得る工程と、油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む。ある実施形態において、原料スラリーは、遠心分離、ろ過、またはデカンテーションによって分離される。ある実施形態において、カルボン酸は脂肪酸を含む。ある実施形態において、カルボン酸は、12～22個の炭素の範囲の炭素鎖長を有する。ある実施形態において、本方法は、油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程の前に、油を前記発酵槽に加える工程をさらに含む。ある実施形態において、本方法は、さらなるカルボン酸を発酵槽に加える工程をさらに含む。ある実施形態において、さらなるカルボン酸を加える工程の後、油は、カルボン酸に転化される。ある実施形態において、カルボン酸は、トウモロコシ油脂肪酸、大豆油脂肪酸、またはトウモロコシ油脂肪酸と大豆油脂肪酸との混合物である。ある実施形態において、油流から得られる油は、グリセリドを含み、1種以上の触媒は、グリセリドを脂肪酸へと加水分解する。ある実施形態において、カルボン酸のブチルエステルは、脂肪酸のブチルエステルである。ある実施形態において、触媒は、ブタノールとともにカルボン酸をエステル化して、

10

20

30

40

50

カルボン酸のブチルエステルを形成することが可能な酵素である。ある実施形態において、酵素は、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである。ある実施形態において、固体は、動物飼料製品を形成するように処理される。ある実施形態において、ブチルエステルからブタノールを回収する工程は、エステルを、カルボン酸およびブタノールへと加水分解する工程を含む。ある実施形態において、ブチルエステルは、加水分解触媒の存在下で加水分解される。ある実施形態において、ブチルエステルは、水の存在下で加水分解され、加水分解触媒は、酸触媒、有機酸、無機酸、水溶性酸、または不水溶性酸を含む。ある実施形態において、加水分解触媒は、ブチルエステルを加水分解して、カルボン酸およびブタノールを形成することが可能な酵素を含む。ある実施形態において、酵素は、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである。ある実施形態において、加水分解反応は、反応槽中で起こる。ある実施形態において、ブチルエステルからブタノールを回収する工程は、ブチルエステルを、ブタノールおよび脂肪酸アルキルエステルまたはアシルグリセリドへとエステル交換する工程を含む。ある実施形態において、脂肪酸アルキルエステルは、脂肪酸メチルエステル、脂肪酸エチルエステル、または脂肪酸プロピルエステルを含む。ある実施形態において、本方法は、天然油を提供する工程と、油を1種以上の酵素と接触させることによって、天然油の少なくとも一部をカルボン酸へと転化する工程とをさらに含む。ある実施形態において、酵素は、ブチルエステルを加水分解またはエステル交換して、ブタノールを形成することが可能な酵素である。ある実施形態において、酵素は、エステラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、またはリゾホスホリパーゼである。

10

20

【0018】

他の実施形態において、発酵方法は、バイオマスから得られる水性原料流を提供する工程であって、水性原料流が、水、バイオマスに由来する発酵性炭素源、および油を含む工程と；水性原料流を触媒と接触させ、それによって、油の少なくとも一部が、遊離脂肪酸へと加水分解されて、遊離脂肪酸および触媒を含む触媒で処理された原料流が形成される工程と；触媒で処理された原料流を、発酵槽中の発酵プロスと接触させる工程と；発酵槽中の発酵性炭素源を発酵させて、生成物アルコールを生成する工程と；発酵槽中の遊離脂肪酸および生成物アルコールのエステル化を触媒して、脂肪酸のアルコールエステルを生成するように、発酵の際に、生成物アルコールを、遊離脂肪酸および触媒と接触させる工程とを含み得る。ある実施形態において、原料流を、触媒および発酵プロスと接触させる工程および発酵させる工程および生成物アルコールを、遊離脂肪酸および触媒と接触させる工程は、同時に行われ得る。ある実施形態において、生成物アルコールはブタノールであり、脂肪酸のアルコールエステルは、脂肪酸のブチルエステルである。

30

【0019】

本発明は、発酵の際に、発酵培地からアルコールを除去するための方法であって：発酵培地中でアルコールを生成する微生物を含む発酵培地を提供する工程と；発酵の際に、発酵培地を、カルボン酸、およびカルボン酸とともにアルコールをエステル化して、アルコールエステルを形成することが可能な触媒と接触させる工程とを含む方法を提供する。ある実施形態において、微生物によって生成されるアルコールはブタノールであり、アルコールエステルはブチルエステルである。ある実施形態において、発酵培地は、発酵培地に実質的に不溶のカルボン酸、およびカルボン酸とともにアルコールをエステル化して、アルコールエステルを形成することが可能な触媒と接触される。

40

【0020】

本発明は、発酵プロセスの際に、脂肪酸のアルコールエステルを生成するための方法であって：アルコール、発酵性炭素源、および遊離脂肪酸を含む発酵培地を提供する工程と；発酵培地を、アルコールとともに遊離脂肪酸をエステル化することが可能な1種以上の酵素と接触させ、それによって、遊離脂肪酸が、アルコールとともにエステル化されて、脂肪酸のアルコールエステルが形成される工程とを含む方法も提供する。ある実施形態において、発酵性炭素源は、バイオマスに由来する。ある実施形態において、発酵培地の微生物は組み換え微生物である。ある実施形態において、アルコールはブタノールであり、

50

脂肪酸のアルコールエステルは、脂肪酸のブチルエステルである。

【0021】

別の実施形態において、生成物アルコールを生成するための方法が、水、発酵性炭素源、および油を含むバイオマス原料を提供する工程であって、油がアシルグリセリドを含む工程と；バイオマス原料を液化して、オリゴ糖を含む液化されたバイオマスを生産する工程と；バイオマス原料または液化されたバイオマスを、アシルグリセリドの少なくとも一部を遊離脂肪酸へと転化することが可能な1種以上の酵素を含む組成物と接触させ、それによって、遊離脂肪酸が抽出剤を形成する工程であって、1種以上の酵素が、生成物アルコールとともに遊離脂肪酸を、脂肪酸のアルコールエステルへとエステル化することも可能である工程と；液化されたバイオマスを、オリゴ糖を発酵性糖へと転化することが可能な糖化酵素と接触させる工程と；液化されたバイオマスを、発酵性糖を生産物アルコールに転化することが可能な組み換え微生物と接触させ、それによって、生成物アルコールを含む発酵生成物が生成される工程と；遊離脂肪酸および生成物アルコールのエステル化を触媒して、脂肪酸のアルコールエステルを生産するように、生成物アルコールを、遊離脂肪酸および1種以上の酵素と接触させる工程と；発酵生成物を抽出剤と接触させる工程とを含み得る。実施形態において、抽出剤との接触により、水相および抽出剤相を含む二相混合物が形成され、脂肪酸のアルコールエステルは、抽出剤相中に分離して、エステル含有抽出剤相を形成する。ある実施形態において、生成物アルコールはブタノールであり、脂肪酸のアルコールエステルは、脂肪酸のブチルエステルである。

10

【0022】

別の実施形態において、生成物アルコールを生成するための方法が、水、発酵性炭素源、および油を含むバイオマス原料を提供する工程であって、油がアシルグリセリドを含む工程と；バイオマス原料を液化して、オリゴ糖を含む液化されたバイオマスを生産する工程と；液化されたバイオマスを、アシルグリセリドの少なくとも一部を遊離脂肪酸へと転化することが可能な1種以上の酵素を含む組成物と接触させる工程であって、1種以上の酵素が、生成物アルコールとともに遊離脂肪酸を、脂肪酸のアルコールエステルへとエステル化することも可能である工程と；液化されたバイオマスを、オリゴ糖を発酵性糖へと転化することが可能な糖化酵素と接触させる工程と；糖化されたバイオマスを、発酵の際に、発酵性糖を生産物アルコールに転化することが可能な組み換え微生物と接触させ、それによって、生成物アルコールを含む発酵培地が生成される工程と；発酵の際に、発酵培地をカルボン酸抽出剤と接触させる工程であって、発酵培地が、生成物アルコールとともに遊離脂肪酸をエステル化して、脂肪酸のアルコールエステルを形成することが可能な1種以上の酵素を含む工程とを含み得る。本方法のさらなる実施形態において、発酵培地は、発酵培地に実質的に不溶のカルボン酸、およびカルボン酸とともにアルコールをエステル化して、アルコールエステルを形成することが可能な触媒と接触される。本方法の他の実施形態において、微生物によって生成されるアルコールはブタノールであり、アルコールエステルはブチルエステルである。

20

30

【0023】

本発明は、原料から生成物アルコールを生成するための方法であって：原料中のでんぷんまたは発酵性炭素源を液化して、オリゴ糖を有するスラリーを生産する工程と；原料スラリーを遠心分離して、(i)オリゴ糖を含む水層、(ii)油層、および(iii)固体を含む遠心分離生成物を生成する工程と；水層を、発酵プロセスを含む発酵槽に供給する工程と；水層を発酵させて、生成物アルコールを生産する工程とを含む方法も提供する。次に、生成物アルコールは、カルボン酸および触媒と接触され、それによって、カルボン酸は、生成物アルコールとともにエステル化されて、アルコールエステルが形成される。ある実施形態において、油は植物由来油である。他の実施形態において、生成物アルコールはブタノールであり、カルボン酸のアルコールエステルは、脂肪酸のブチルエステルである。

40

【0024】

ある実施形態において、生成物アルコールを生成するための方法が、水、でんぷん、お

50

よび／または発酵性炭素源を含む分画されたバイオマス原料、ならびにバイオマスの分画の後に残るわずかな残留量の油を提供する工程であって、残留油がアシルグリセリドを含む工程と；分画されたバイオマス原料を液化して、オリゴ糖を含む液化された、分画されたバイオマスを生成する工程と；液化された、分画されたバイオマスを、残留アシルグリセリドの少なくとも一部を遊離脂肪酸へと転化することが可能な1種以上の酵素を含む組成物と接触させる工程であって、1種以上の酵素が、生成物アルコールとともに遊離脂肪酸をエステル化して、脂肪酸のアルコールエステルを形成することも可能である工程と；液化された、分画されたバイオマスを、オリゴ糖を発酵性糖へと転化することが可能な糖化酵素と接触させる工程と；糖化されたバイオマスを、発酵の際に、発酵性糖を生成物アルコールに転化することが可能な組み換え微生物と接触させ、それによって、生成物アルコールを含む発酵培地が生成される工程と；発酵の際に、発酵培地をカルボン酸抽出剤と接触させる工程であって、発酵培地が、生成物アルコールとともに遊離脂肪酸をエステル化して、脂肪酸のアルコールエステルを形成することが可能な1種以上の酵素を含む工程とを含む。本方法のさらなる実施形態において、発酵培地は、発酵培地中のカルボン酸、およびカルボン酸とともにアルコールをエステル化して、アルコールエステルを形成することが可能な触媒と接触される。さらなる実施形態において、カルボン酸は、発酵培地に実質的に不溶であり得る。本方法の他の実施形態において、微生物によって生成されるアルコールはブタノールであり、アルコールエステルはブチルエステルである。

10

【0025】

本発明は、バイオマスから形成され、水および発酵性糖を含むマッシュと；アルコールとともに遊離脂肪酸を、脂肪酸アルキルエステルへとエステル化することが可能であり、かつ任意にアシルグリセリドを遊離脂肪酸へと加水分解することが可能な触媒と；アルコールと；遊離脂肪酸と；触媒によるアルコールによる遊離脂肪酸のエステル化から原位置で形成される脂肪酸アルコールエステルとを含む組成物も提供する。ある実施形態において、アルコールはブタノールであり、脂肪酸アルコールエステルは脂肪酸ブチルエステルである。

20

【0026】

本発明は、アルコールを生成することが可能な組み換え微生物と；発酵性炭素源と；脂肪酸アルコールエステルとを含む発酵ブロスであって、脂肪酸アルコールエステルが、発酵の際に生成される発酵ブロスも提供する。ある実施形態において、組み換え微生物は、ブタノールを生成することが可能である。ある実施形態において、脂肪酸アルコールエステルは脂肪酸ブチルエステルである。ある実施形態において、発酵性炭素源は糖を含む。ある実施形態において、発酵性炭素源はメタンを含み、組み換え微生物は、メタノールを生成することが可能であり、脂肪酸アルコールエステルは脂肪酸メチルエステルである。

30

【0027】

生成物アルコールの生成に有用な組み換え酵母細胞も本明細書において提供される。実施形態において、本明細書に開示される組み換え宿主細胞は、遺伝子組み換えおよび組み換え遺伝子発現に有用な、任意の細菌、酵母または真菌宿主であり得る。他の実施形態において、組み換え宿主細胞は、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ザイモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、エルウイニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルスロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロマイセス属 (*Schizosaccharomyces*)、クルイベロマイセス属 (*Kluyveromyces*)、ヤロウイア属 (*Y*

40

50

arrowia)、ピヒア属(Pichia)、カンジダ属(Candida)、ハンゼヌラ属(Hansenula)、イサタケンキア属(Issatchenkia)、またはサッカロマイセス属(Saccharomyces)のメンバーであり得る。他の実施形態において、宿主細胞は、サッカロマイセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロマイセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、クルイベロマイセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)、クルイベロマイセス・サーモトレランス(Kluyveromyces thermotolerans)、クルイベロマイセス・マルシアヌス(Kluyveromyces marxianus)、カンジダ・グラブラタ(Candida glabrata)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、ピヒア・スチピチス(Pichia stipitis)、ヤロウイア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)、大腸菌(E. coli)、またはL. プランタルム(L. plantarum)であり得る。さらに他の実施形態において、宿主細胞は酵母宿主細胞である。ある実施形態において、宿主細胞は、サッカロマイセス属(Saccharomyces)のメンバーである。ある実施形態において、宿主細胞は、クルイベロマイセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)、カンジダ・グラブラタ(Candida glabrata)またはシゾサッカロマイセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)である。ある実施形態において、宿主細胞は、サッカロマイセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)である。S. セレビスエ(S. cerevisiae)酵母が、当該技術分野において公知であり、米国培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)(Rockville, MD)、Centraalbureau voor Schimmelcultures(CBS)Fungal Biodiversity Centre、LeSaffre、Gert Strand AB、Ferm Solutions、North American Bioproducts、Martrex、およびLallemandを含むがこれらに限定されない様々な供給元から入手可能である。S. セレビスエ(S. cerevisiae)としては、以下に限定はされないが、BY4741、CEN. PK 113-7D、Ethanol Red(登録商標)酵母、Gert Strand Prestige Turbo酵母、Ferm Pro(商標)酵母、Bio-Ferm(登録商標)XR酵母、Gert Strand Distillers酵母、FerMax(商標)Green酵母、FerMax(商標)Gold酵母、Thermosacc(登録商標)酵母、BG-1、PE-2、CAT-1、CBS7959、CBS7960、およびCBS7961が挙げられる。

【0028】

イソブタノールを生成する方法であって：イソブタノール生合成経路を含む組み換え宿主細胞を提供する工程であって、 α -ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒドへの基質一生成物転化を触媒する酵素またはイソブチルアルデヒドからイソブタノールへの基質一生成物転化を触媒する酵素の少なくとも一方が、染色体中に組み込まれた異種のポリヌクレオチドによってコードされる工程と；組み換え宿主細胞を発酵性炭素源と接触させて、イソブタノールが生成される条件下で発酵プロセスを形成する工程とを含む方法も提供される。ある実施形態において、本方法は、抽出剤を加えて、二相混合物を形成する工程をさらに含む。他の実施形態において、抽出剤はカルボン酸を含む。ある実施形態において、抽出剤は脂肪酸を含む。他の実施形態において、本方法は、カルボン酸によるイソブタノールのエステル化を触媒することが可能なエステル化酵素を加える工程をさらに含む。

【0029】

生成物アルコール、水、発酵性炭素源、および生成物アルコールを生成する微生物を含む発酵培地を提供する工程と；発酵の際に、発酵培地を抽出剤と接触させて、水相および有機相を含む二相混合物を形成する工程と；発酵培地を、カルボン酸、および生成物アルコールとともにカルボン酸をエステル化することが可能な酵素と接触させる工程とを含む

方法も本明細書において提供される。ある実施形態において、抽出剤はカルボン酸を含む。ある実施形態において、カルボン酸は、バイオマス原料から、油の加水分解によって生成される。ある実施形態において、発酵性炭素およびカルボン酸は、同じバイオマス原料源に由来する。ある実施形態において、カルボン酸は、12～22個の炭素を有する飽和、単不飽和、多価不飽和カルボン酸、およびそれらの混合物を含む。ある実施形態において、発酵培地を、抽出剤およびカルボン酸および酵素と接触させる工程は同時に行われる。ある実施形態において、微生物は、遺伝子組み換え微生物（例えば、組み換え微生物または組み換え酵母細胞などの宿主細胞）である。

【0030】

P N Y 1 5 0 4、P N Y 2 2 0 5、または組み換え宿主細胞；抽出剤；および任意にエステル化酵素を含む組成物も本明細書において提供される。P N Y 1 5 0 4、P N Y 2 2 0 5、または組み換え宿主細胞およびブチルエステルを含む組成物も本明細書において提供される。

10

【0031】

イソブタノールの生成のための、P N Y 1 5 0 4、P N Y 2 2 0 5、または他の組み換え酵母細胞、および組み換え酵母細胞を含む組成物の使用も本明細書においてさらに提供される。

【0032】

本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を成す添付の図面は、本発明を例示し、さらに、本明細書とともに、本発明の原理を説明し、関連技術分野の当業者が本発明を行い、使用できるようにする働きを果たす。

20

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】アルコールエステル化のための触媒が、カルボン酸および／または天然油とともに発酵槽に供給される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図2】天然油が、触媒を用いてカルボン酸へと転化され、カルボン酸および触媒が発酵槽に供給される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図3】液化バイオマスが、発酵の前に脂質加水分解のための触媒と接触される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図4】液化され、糖化されたバイオマスが、発酵の前に脂質加水分解のための触媒と接触される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

30

【図5】所定の量の脂質および非溶解固体が、発酵の前に液化されたバイオマスから除去され、除去された脂質が、触媒を用いてカルボン酸へと転化され、カルボン酸および触媒が発酵槽に供給される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図6】炭素源としてのスクロースを用いた発酵によって生成されるイソブタノールの水相および溶媒相の濃度を示す。水相力価（パネルA）が、g/Lの単位で報告され、溶媒相種（イソブタノール、パネルBおよびF A B Eとしてのイソブタノール、パネルC。パネルDは、溶媒相中の全イソブタノールである）は、重量パーセントの単位で報告される。

【図7】経時的なイソブタノールの有効力価（g/L）を示す。この例における有効力価を、接種後の水性発酵プロセスの初期体積に基づいて、テキストに記載されるように計算した。

40

【図8】経時的なグルコース当量で報告される糖類の消費を示す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

特に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾が生じた場合、定義を含めて本出願が優先するものとする。また、文脈上異なる解釈を要する場合を除き、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。本明細書に記載される全ての刊行物、特許、および他の参照文献は、あらゆる目的の

50

ために、全体が参照により本明細書に援用される。

【0035】

特に規定されない限り、以下の略語が本明細書において使用される場合、それらは以下の意味を有する：

A D H	アルコールデヒドロゲナーゼ	
A L S	アセト乳酸シンターゼ	
A Q	水性画分	
B u O - C O F A	トウモロコシ油脂肪酸のブチルエステル	
C A L B	カンジダ・アンタークティカ (C a n d i d a a n t a r c	
t i c a) リパーゼ B		10
C O F A	トウモロコシ油脂肪酸	
D D G S	可溶物含有乾燥穀類蒸留粕	
D G	ジグリセリド	
D H A D	ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ	
E O R	実行終了	
E t O H	エタノール	
E t O - C O F A	トウモロコシ油脂肪酸のエチルエステル	
F A B E	脂肪酸ブチルエステル	
F A E E	脂肪酸エチルエステル	
F A M E	脂肪酸メチルエステル	20
F F A	遊離脂肪酸	
F O A	フルオロオロチン酸	
H A D H	ウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ	
I B A	イソブタノール	
i - B u O H	イソブタノール	
i - B u O - C O F A	トウモロコシ油脂肪酸のイソブチルエステル	
i - B u O - オレエート	オレイン酸イソブチル	
i - P r O H	イソプロパノール	
i - P r O - C O F A	トウモロコシ油脂肪酸のイソプロピルエステル	
I S P R	原位置生成物除去	30
K A R I	ケトール酸レダクトイソメラーゼ	
K i v D	ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ	
M A G	モノアシルグリセリド	
M e B O H	2-メチル-1-ブタノール	
M e B O - C O F A	トウモロコシ油脂肪酸の2-メチル-1-ブチルエステル	
M e O H	メタノール	
M e O - C O F A	トウモロコシ油脂肪酸のメチルエステル	
M G	モノグリセリド	
n - B u O H	n-ブタノール	
O A	オレイルアルコール	40
O R G	有機画分	
P e n O H	1-ペンタノール	
P e n O - C O F A	トウモロコシ油脂肪酸の1-ペンチルエステル	
P r O H	1-プロパノール	
P r O - C O F A	トウモロコシ油脂肪酸の1-プロピルエステル	
S O F A	大豆油脂肪酸	
S S F	同時糖化発酵	
t - B u O H	t e r t -ブチルアルコール	
T G	トリグリセリド	
3 M 3 P	3-M e - 3-ペンタノール	50

【0036】

本発明をさらに定義するために、以下の用語および定義が、本明細書において提供される。

【0037】

本明細書において使用される際の「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (has)」、「有する (having)」、「含有する (contains)」、または「含有する (containing)」という用語、またはそれらの任意の他の活用形は、記載される整数または整数の群を包含するが、任意の他の整数または整数の群を除外しないことを意味することが理解されよう。例えば、要素の列挙を含む組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置は、必ずしもそれらの要素のみに限定されるわけではなく、明示的に列挙されていないかあるいはこのような組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置に固有の他の要素を含み得る。さらに、相反する明示的な記載がない限り、「または」は、排他的な「または」ではなく包括的な「または」を指す。例えば、条件 A または B は、以下のうちの 1 つによって満たされる：A が真であり（または存在する）かつ B が偽である（または存在しない）、A が偽であり（または存在しない）かつ B が真である（または存在する）、A および B の両方とも真である（または存在する）。

10

【0038】

また、本発明の要素または構成要素の前にある不定冠詞「a」および「an」は、事例の数、すなわち、要素または構成要素の出現の数に関して限定されないことが意図される。したがって、「a」または「an」は、1 つまたは少なくとも 1 つを含むものと読まれるべきであり、要素または構成要素の単数語形は、数値が単数であることを明白に意味しない限り、複数も含む。

20

【0039】

本明細書において使用される際の「発明」または「本発明」の用語は、非限定的な用語であり、特定の発明の任意の 1 つの実施形態を指すことは意図されず、本出願に記載される考えられる全ての実施形態を包含する。

【0040】

本明細書において使用される際の、用いられる本発明の成分または反応剤の量を修飾する「約」という用語は、例えば、現実の世界で濃縮物または溶液を作製するのに使用される典型的な測定および液体処理手順によって；これらの手順における不注意による誤りによって；組成物を作製するかまたは方法を行うのに用いられる成分の製造、供給源、または純度の差などによって起こり得る数量の変動を指す。「約」という用語は、特定の初期混合物から得られる組成物のための平衡条件が異なるために異なる量も包含する。「約」という用語によって修飾されているか否かにかかわらず、特許請求の範囲は、量に対する均等物を含む。一実施形態において、「約」という用語は、報告される数値の 10 % 以内、あるいは報告される数値の 5 % 以内を意味する。

30

【0041】

本明細書において使用される際の「バイオマス」は、トウモロコシ、サトウキビ、小麦、セルロース系またはリグノセルロース系材料ならびにセルロース、ヘミセルロース、リグニン、でんぷん、オリゴ糖、二糖類および／または単糖類、およびそれらの混合物を含む材料などの天然資源に由来する任意の糖類およびでんぷんを含む発酵性糖を提供する加水分解性多糖類を含有する天然産物を指す。バイオマスは、タンパク質および／または脂質などのさらなる成分も含み得る。バイオマスは、1 つの供給源に由来してもよく、またはバイオマスは、2 つ以上の供給源に由来する混合物を含み得る。例えば、バイオマスは、トウモロコシの穂軸とトウモロコシの茎葉との混合物、または草と葉との混合物を含み得る。バイオマスとしては、以下に限定はされないが、バイオエネルギー作物、農業残渣、都市固形廃棄物、産業固形廃棄物、製紙からの汚泥、庭ごみ、サトウキビ廃棄物、木くずおよび林業廃棄物が挙げられる。バイオマスの例としては、以下に限定はされないが、

40

50

トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、牧草、稲わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物が挙げられる。例えば、マッシュ、絞り汁、糖蜜、または加水分解物が、粉碎、処理、および／または液化などによる発酵のためのバイオマスを処理するための当該技術分野において公知の任意の処理によって、バイオマスから形成され得、発酵性糖を含み、水を含み得る。例えば、セルロース系および／またはリグノセルロース系バイオマスは、当業者に公知の任意の方法によって発酵性糖を含有する加水分解物を得るように処理され得る。参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2007/0031918A1号明細書に開示されている低アンモニア前処理が特に有用である。セルロース系および／またはリグノセルロース系バイオマスの酵素的糖化は、通常、セルロースおよびヘミセルロースを分解して、グルコース、キシロース、およびアラビノースを含む糖類を含有する加水分解物を生成するために酵素群 (consortium) を利用する。(セルロース系および／またはリグノセルロース系バイオマスに適した糖化酵素は、Lynd, et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:506-577, 2002) に概説されている。

10

【0042】

マッシュ、絞り汁、糖蜜、または加水分解物は、本明細書に記載される原料12および原料スラリー16を含み得る。水性原料流が、粉碎、処理、および／または液化などによる発酵のためのバイオマスを処理するための当該技術分野において公知の任意の処理によって、バイオマスから誘導または形成され得、発酵性炭素基質 (例えば、糖) を含み、水を含み得る。水性原料流が、本明細書に記載される原料12および原料スラリー16を含み得る。

20

【0043】

本明細書において使用される際の「バイオマス収量」は、生成される炭素基質のグラム当たり生成されるバイオマス (すなわち、細胞バイオマス生成) のグラムを指す。

【0044】

本明細書において使用される際の「原料」は、発酵プロセスにおける原料であって、非溶解固体を含むかまたは含まずに発酵性炭素源を含有し、該当する場合、発酵性炭素源がでんぷんから遊離されたかあるいは液化、糖化、または他のプロセスなどによるさらなる処理によって複合糖類を分解することから得られる前または後に発酵性炭素源を含有する原料を意味する。原料は、バイオマスを含むかまたはバイオマスに由来する。好適な原料としては、以下に限定はされないが、ライ麦、小麦、トウモロコシ、トウモロコシマッシュ、サトウキビ、サトウキビマッシュ、大麦、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、またはそれらの混合物が挙げられる。「原料油」に言及される場合、この用語が、所与の原料から生成される油を包含することが理解されよう。

30

【0045】

本明細書において使用される際の「発酵培地」は、水と、糖類と、溶解固体と、任意にアルコールを生成する微生物と、生成物アルコールと、存在する微生物による、アルコール、水、および二酸化炭素 (CO_2) への糖類の反応によって生成物アルコールが作製される発酵槽中に保持される材料の全ての他の成分との混合物を意味する。場合により、本明細書において使用される際の「発酵プロセス」および「発酵された混合物」という用語は、「発酵培地」と同義に使用することができる。

40

【0046】

本明細書において使用される際の「発酵性炭素源」または「発酵性炭素基質」は、発酵アルコールを生成するための、本明細書に開示される微生物によって代謝されることが可能な炭素源を意味する。好適な発酵性炭素源としては、以下に限定はされないが、グルコースまたはフルクトースなどの単糖類；ラクトースまたはスクロースなどの二糖類；オリゴ糖；でんぷんまたはセルロースなどの多糖類；キシロースおよびアラビノースなどの C

50

5 糖類；メタンを含む一炭素基質；およびそれらの混合物が挙げられる。

【0047】

本明細書において使用される際の「発酵性糖」は、発酵アルコールを生成するための、本明細書に開示される微生物によって代謝されることが可能な1種以上の糖類を指す。

【0048】

本明細書において使用される際の「発酵槽」は、発酵反応が行われ、それによって、ブタノールなどの生成物アルコールが糖類から作製される槽を意味する。

【0049】

本明細書において使用される際の「液化槽」は、液化が行われる槽を意味する。液化は、オリゴ糖が原料から遊離されるプロセスである。原料がトウモロコシである、ある実施形態において、オリゴ糖は、液化中にトウモロコシでんぷん含有物から遊離される。

10

【0050】

本明細書において使用される際の「糖化槽」は、糖化（すなわち、オリゴ糖の単糖類への分解）が行われる槽を意味する。発酵および糖化が同時に行われる場合、糖化槽および発酵槽は、同じ槽であってもよい。

【0051】

本明細書において使用される際の「糖」は、オリゴ糖、二糖類、単糖類、および／またはそれらの混合物を指す。「糖」という用語は、でんぷん、デキストラン、グリコーゲン、セルロース、ペントサン、ならびに糖類を含む炭水化物も含む。

【0052】

本明細書において使用される際の「糖化酵素」は、多糖類および／またはオリゴ糖、例えば、グリコーゲン、またはでんぷんの $\alpha-1, 4$ -グルコシド結合を加水分解することが可能な1種以上の酵素を意味する。糖化酵素は、セルロース系またはリグノセルロース系材料を加水分解することが可能な酵素も含み得る。

20

【0053】

本明細書において使用される際の「非溶解固体」は、原料の非発酵性部分、例えば、胚芽、繊維、およびグルテンを意味する。例えば、原料の非発酵性部分は、原料の固体として残る部分を含み、発酵プロセスから液体を吸収し得る。

【0054】

本明細書において使用される際の可溶物含有乾燥穀類蒸留粕（DDGS）は、原料またはバイオマスの発酵（例えば、生成物アルコールを生成する穀類または穀類混合物の発酵）からの副産物または副生成物を指す。ある実施形態において、DDGSは、生成物アルコール（例えば、ブタノール、イソブタノールなど）を作製する方法から生成される動物飼料製品も指す。

30

【0055】

本明細書において使用される際の「生成物アルコール」は、発酵性炭素基質の供給源としてバイオマスを用いる発酵プロセスにおいて微生物によって生成され得る任意のアルコールを指す。生成物アルコールとしては、以下に限定はされないが、 $C_1 \sim C_8$ のアルキルアルコールが挙げられる。ある実施形態において、生成物アルコールは $C_2 \sim C_8$ のアルキルアルコールである。他の実施形態において、生成物アルコールは $C_2 \sim C_5$ のアルキルアルコールである。 $C_1 \sim C_8$ のアルキルアルコールとしては、以下に限定はされないが、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、およびペンタノールが挙げられることが理解されよう。同様に、 $C_2 \sim C_8$ のアルキルアルコールとしては、以下に限定はされないが、エタノール、プロパノール、ブタノール、およびペンタノールが挙げられる。「アルコール」はまた、生成物アルコールに関連して本明細書において使用される。

40

【0056】

本明細書において使用される際の「ブタノール」は、特に、ブタノール異性体1-ブタノール（1-BuOH）、2-ブタノール（2-BuOH）、tert-ブタノール（tert-BuOH）、および／またはイソブタノール（iBuOHまたはi-BuOHまたはI

50

－BUOH、2－メチル－1－プロパノールとしても知られている）を、個々にまたはそれらの混合物として指す。場合により、ブタノールのエステルに言及される場合、「ブチルエステル」および「ブタノールエステル」という用語は、同義に使用することができる。

【0057】

本明細書において使用される際の「プロパノール」は、プロパノール異性体イソプロパノールまたは1－プロパノールを指す。

【0058】

本明細書において使用される際の「ペンタノール」は、ペンタノール異性体1－ペンタノール、3－メチル－1－ブタノール、2－メチル－1－ブタノール、2，2－ジメチル－1－プロパノール、3－ペンタノール、2－ペンタノール、3－メチル－2－ブタノール、または2－メチル－2－ブタノールを指す。

10

【0059】

本明細書において使用される際の「アルコール当量」という用語は、アルコールエステルの完全な加水分解および所定の量のアルコールエステルからのアルコールのその後の回収によって得られるであろうアルコールの重量を指す。

【0060】

本明細書において使用される際の「水相力価」という用語は、発酵プロセス中の特定のアルコール（例えば、ブタノール）の濃度を指す。

【0061】

本明細書において使用される際の「有効力価」という用語は、発酵によって生成される特定のアルコール（例えば、ブタノール）または発酵培地のリットル当たりの、アルコールエステル化によって生成されるアルコールエステルのアルコール当量の総量を指す。例えば、発酵の単位体積におけるブタノールの有効力価は：（i）発酵培地中のブタノールの量；（ii）有機抽出剤から回収されるブタノールの量；（iii）ガストリッピングが使用される場合、気相から回収されるブタノールの量；および（iv）有機相または水相中のブチルエステルのアルコール当量を含む。

20

【0062】

本明細書において使用される際の「有効率（effective rate）」という用語は、有効力価を発酵時間で除算した値である。

30

【0063】

本明細書において使用される際の「有効収量」という用語は、消費されるグルコースのグラム当たり生成される生成物アルコールの合計グラムである。

【0064】

本明細書において使用される際の「原位置生成物除去（ISPR）」は、生成物が生成される際に、生物学的プロセスにおける生成物濃度を制御するために、発酵などの生物学的プロセスから特定の発酵生成物を選択的に除去することを意味する。

【0065】

本明細書において使用される際の「抽出剤」または「ISPR抽出剤」は、ブタノールなどの任意の生成物アルコールを抽出するのに使用され、または生成物アルコールおよびカルボン酸または脂質から触媒によって生成される任意の生成物アルコールエステルを抽出するのに使用される有機溶媒を意味する。場合により、本明細書において使用される際の「溶媒」という用語は、「抽出剤」と同義に使用することができる。本明細書に記載される方法では、抽出剤は水不混和性である。

40

【0066】

「水不混和性」または「不溶性」という用語は、1つの液相を形成するように、発酵プロセスなどの水溶液と混合することができない抽出剤または溶媒などの化学成分を指す。

【0067】

本明細書において使用される際の「水相」という用語は、発酵プロセスを水不混和性有機抽出剤と接触させることによって得られる二相混合物の水相を指す。発酵抽出を含む本明

50

細書に記載されるプロセスの一実施形態において、「発酵プロセス」という用語は、この場合、二相性発酵抽出における水相を特に指す。

【0068】

本明細書において使用される際の「有機相」という用語は、発酵プロセスを水不混和性有機抽出剤と接触させることによって得られる二相混合物の非水相を指す。

【0069】

本明細書において使用される際の「カルボン酸」という用語は、一般化学式 —COOH （式中、炭素原子が、カルボニル基（ —C=O ）を構成するために二重結合によって酸素原子に結合され、単結合によってヒドロキシル基（ —OH ）に結合される）で表される任意の有機化合物を指す。カルボン酸は、プロトン化したカルボン酸の形態、カルボン酸の塩の形態（例えば、アンモニウム塩、ナトリウム塩、またはカリウム塩）、またはプロトン化したカルボン酸とカルボン酸の塩との混合物としての形態であってもよい。カルボン酸という用語は、単一の化学種（例えば、オレイン酸）または例えば、バイオマス由来の脂肪酸エステルまたはトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、およびリン脂質の加水分解によって生成され得るカルボン酸の混合物を表し得る。

【0070】

本明細書において使用される際の「脂肪酸」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{28}$ の炭素原子（最も一般的には $\text{C}_{12} \sim \text{C}_{24}$ の炭素原子）を有するカルボン酸（例えば、脂肪族モノカルボン酸）を指す。脂肪酸はまた、分枝鎖状または非分枝鎖状であってもよい。脂肪酸は、動物性または植物性脂肪、油、またはワックスに由来するか、あるいはそれらの中にエステル化された形態で含まれ得る。脂肪酸は、脂肪および脂肪油中のグリセリドの形態で天然に存在するものであってもよく、あるいは脂肪の加水分解によってまたは合成によって得られる。脂肪酸という用語は、単一の化学種または脂肪酸の混合物を表し得る。さらに、脂肪酸という用語は、遊離脂肪酸も包含する。

【0071】

本明細書において使用される際の「脂肪アルコール」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{22}$ の炭素原子の脂肪族鎖を有するアルコールを指す。

【0072】

本明細書において使用される際の「脂肪アルデヒド」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{22}$ の炭素原子の脂肪族鎖を有するアルデヒドを指す。

【0073】

本明細書において使用される際の「脂肪アミド」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{22}$ の炭素原子の脂肪族長鎖を有するアミドを指す。

【0074】

本明細書において使用される際の「脂肪酸エステル」という用語は、飽和または不飽和のいずれかである、 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{22}$ の炭素原子の脂肪族長鎖を有するエステルを指す。

【0075】

本明細書において使用される際の「天然油」は、植物（例えば、バイオマス）または動物から得られる脂質を指す。本明細書において使用される際の「植物由来油」は、特に植物から得られる脂質を指す。場合により、「脂質」は、「油」および「アシルグリセリド」と同義に使用することができる。天然油としては、以下に限定はされないが、獣脂、トウモロコシ油、キャノーラ油、カプリン酸／カプリル酸トリグリセリド、ヒマシ油、ヤシ油、綿実油、魚油、ホホバ油、ラード、亜麻仁油、牛脚油、オイチシカ油、パーム油、ピーナッツ油、ナタネ油、米油、ベニバナ油、大豆油、ヒマワリ油、キリ油、ジャトロファ油、および植物油ブレンドが挙げられる。

【0076】

本明細書において使用される際の「分離」という用語は、「回収」と同義であり、初期混合物から化学化合物を除去して、初期混合物中の化合物の純度または濃度より高い純度またはより高い濃度の化合物を得ることを指す。

【0077】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される際の「ブタノール生合成経路」という用語は、1-ブタノール、2-ブタノール、またはイソブタノールを生成するための酵素経路を指す。

【0078】

本明細書において使用される際の「1-ブタノール生合成経路」という用語は、アセチル-CoA補酵素A（アセチル-CoA）から1-ブタノールを生成するための酵素経路を指す。

【0079】

本明細書において使用される際の「2-ブタノール生合成経路」という用語は、ピルビン酸塩から2-ブタノールを生成するための酵素経路を指す。

【0080】

本明細書において使用される際の「イソブタノール生合成経路」という用語は、ピルビン酸塩からイソブタノールを生成するための酵素経路を指す。

【0081】

「遺伝子」という用語は、任意に、コード配列の前の調節配列（5'非コード配列）および後の調節配列（3'非コード配列）を含む、特定のタンパク質として発現可能な核酸断片を指す。「天然遺伝子」は、それ自体の調節配列を有する自然に見出される遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」は、自然と一緒に見出されない調節配列およびコード配列を含む、天然遺伝子ではない（すなわち、その天然状態から改変されるかまたは別の源に由来する）任意の遺伝子を指す。したがって、キメラ遺伝子は、異なる源に由来する調節配列およびコード配列または同じ源に由来するが、自然に見出されるのとは異なる様式で配置される調節配列およびコード配列を含み得る。「内在性遺伝子」は、生物のゲノム内のその自然な位置にある天然遺伝子を指す。「外来遺伝子」または「異種遺伝子」は、宿主生物の天然遺伝子として通常見出されないが、遺伝子導入によって宿主生物に導入される遺伝子を指す。外来遺伝子は、非天然生物に挿入された天然遺伝子またはキメラ遺伝子を含み得る。

【0082】

本明細書において使用される際の「コード領域」という用語は、特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列を指す。「好適な調節配列」は、コード配列の上流に位置するヌクレオチド配列（5'非コード配列）、内部に位置するヌクレオチド配列、または下流に位置するヌクレオチド配列（3'非コード配列）を指し、関連するコード配列の転写、RNAプロセッシングまたは安定性、あるいは翻訳に影響を与える。調節配列としては、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセッシング部位、エフェクター結合部位、およびステム・ループ構造が挙げられる。

【0083】

「コドン最適化」という用語は、様々な宿主の形質転換のための核酸分子の遺伝子またはコード領域に言及する場合、DNAによってコードされるポリペプチドを変化させずに、宿主生物の典型的なコドン使用を反映するように、核酸分子の遺伝子またはコード領域におけるコドンの改変を指す。コドン最適化は、当業者の技能の範囲内である。

【0084】

「ポリヌクレオチド」という用語は、1つの核酸ならびに複数の核酸を包含することが意図され、核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）またはプラスミドDNA（pDNA）を指す。本明細書において使用される際の「遺伝子」は、ポリヌクレオチドである。ポリヌクレオチドは、非翻訳5'および3'配列ならびにコード配列を含む、完全長cDNA配列またはその断片のヌクレオチド配列を含み得る。ポリヌクレオチドは、非修飾RNAまたはDNAあるいは修飾されたRNAまたはDNA（例えば、異種DNA）であり得る、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、および一本鎖および二本鎖領域の混合であるRNA、一本鎖または、より典型的に、二本鎖または一本鎖および二本鎖領域の混合であり得るDNAおよびRNAを含む混成分子から構成され得

10

20

30

40

50

る。「ポリヌクレオチド」は、化学的に、酵素的に、または代謝的に修飾された形態を包含する。

【0085】

ポリヌクレオチド配列は、その自然環境から取り出された「単離された (isolated)」ものとして言及され得る。例えば、ベクターに含まれるジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドまたはポリペプチド断片をコードする異種のポリヌクレオチドは、本発明の目的のために単離されると考えられる。単離されたポリヌクレオチドの他の例としては、溶液中の異種宿主細胞あるいは (部分的にまたは実質的に) 精製されたポリヌクレオチド中に維持される組み換えポリヌクレオチドが挙げられる。本発明に係る単離されたポリヌクレオチドまたは核酸は、合成により産生されるこのような分子をさらに含む。DNAのポリマーの形態の単離されたポリヌクレオチド断片は、cDNA、ゲノムDNA、または合成DNAの1つ以上のセグメントを含み得る。

【0086】

本明細書において使用される際の「ポリペプチド」という用語は、1つの「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合 (ペプチド結合としても知られている) によって線状に結合されるモノマー (アミノ酸) から構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の1つまたは複数の鎖を指し、特定の長さの産物を指すものではない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」あるいは2つ以上のアミノ酸の1つまたは複数の鎖を指すのに使用される任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかの代わりに、すなわちこれらの用語と同義に使用することができる。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来しても、または組み換え技術によって産生されてもよいが、指定の核酸配列から必ずしも翻訳されるわけではない。ポリペプチドは、化学合成を含む任意の方法で生成され得る。

【0087】

「単離された」ポリペプチドまたはその断片、その変異体、または誘導体とは、その自然環境にないポリペプチドが意図される。精製の具体的なレベルは必要とされない。例えば、単離されたポリペプチドは、その天然または自然環境から取り出され得る。宿主細胞中で発現される、組み換えによって産生されたポリペプチドおよびタンパク質は、任意の好適な技術によって、分離、分画、または部分的にまたは実質的に精製された天然または組み換えポリペプチドであるように、本発明の目的のために単離されると考えられる。

【0088】

本明細書において使用される際の「組み換え微生物」は、例えば、ブタノールなどのアルコールを生成するための生合成経路などの生合成経路を含むように宿主細胞を改変することによる、組み換えDNA技術の使用によって改変される、細菌または酵母などの微生物を指す。

【0089】

本発明は、微生物に対する生成物アルコール (ブタノールなど) の毒性作用を減少させる手段として、生成物アルコールを発酵培地とISPR抽出剤とに分液することを必要としない代替的な抽出発酵方法の必要性を満たす。本発明は、ブタノールなどのアルコールを生成するための方法であって、生成物アルコールが、微生物に対する毒性が低くなり得るアルコールエステルへと転化され、ここで、発酵生成物抽出剤の分配係数の低下の同時の減少が実現され、アルコール (発酵培地からの分離後にアルコールに再び転化され得る遊離アルコールとアルコールエステルとの組合せとして) の生成収率の改良をもたらす方法を提供することによって、発酵生成物ISPR抽出剤の分配係数の低下を抑える必要性も満たす。さらに、本明細書の方法を、既存の方法 (例えば、固体除去) と組み合わせ、経済的および環境的に有利に生成物除去を増加させることができるように、本発明は、別のアルコール生成物除去方法の欠点に対する解決法を提供する。したがって、本発明は、以下の実施形態の説明によって明らかになるであろうように、さらなる関連する利点を

提供する。

【0090】

本発明は、カルボン酸とともにアルコールをエステル化し、得られたアルコールエステルを発酵培地から抽出することによって、発酵培地からアルコールを除去するための方法であって、その後、アルコールをアルコールエステルから回収することができる方法を提供する。酸は、遊離脂肪酸として直接発酵培地に加えられてもよく、または油から誘導されてもよい。本発明は、原料に由来する油を、アルコールのエステル化に使用することができ、および／またはアルコールエステルを抽出するための I S P R 抽出剤または I S P R 抽出剤の成分として働き得るカルボン酸へと加水分解することによって、アルコール発酵プロセスから油を除去するかまたは減少させるための方法も提供する。

10

【0091】

反応系中に存在する水の量の減少、あるいは単一または複数の非水性溶媒を使用する反応系の利用が、リパーゼなどの酵素によって触媒される場合のカルボン酸によるアルコールのエステル化に通常必要とされてきた。リパーゼ酵素が、発酵性炭素源の発酵の際のカルボン酸による生成物アルコールのエステル化を効果的に触媒して、生成物アルコールを生成することができるという意外な発見が本明細書に記載されている。発酵の際のカルボン酸による生成物アルコールのエステル化により、発酵性能を改良することができるという意外な発見も本明細書に記載されている。それは、例えば、エステル形態で生成される生成物アルコール（例えば、ブタノール）を捕捉することによって、水相中の生成物アルコールの濃度を効果的に低下させ、したがって、グルコース消費および生成物生成に対する生成物アルコールの毒性作用を軽減する。

20

【0092】

本発明は、図を参照して説明される。図 1 は、本発明の一実施形態に係る、エタノールまたはブタノールなどの発酵アルコールの生成のための例示的なプロセス流れ図を示す。図示されるように、原料 12 は、液化槽 10 の入口に導入され、液化されて、原料スラリー 16 が生成され得る。原料 12 は、発酵性炭素基質（例えば、グルコースなどの発酵性糖）を供給する加水分解性多糖類を含有し、以下に限定はされないが、ライ麦、小麦、サトウキビまたはトウモロコシなどのバイオマスであり得るか、あるいはバイオマスに由来し得る。ある実施形態において、原料 12 は、分画されたバイオマスの 1 種以上の成分であり得、他の実施形態において、原料 12 は、粉碎された、分画されていないバイオマスであり得る。ある実施形態において、原料 12 は、乾式粉碎された、分画されていないトウモロコシの実などのトウモロコシであり得、非溶解粒子は、胚芽、繊維、およびグルテンを含み得る。非溶解固体は、原料 12 の非発酵性部分である。図に示される実施形態を参照した本明細書における説明のために、原料 12 は、非溶解固体が分離されていない、粉碎された、分画されていないトウモロコシであるものとして説明されることが多い。しかしながら、当業者に明らかなように、本明細書に記載される例示的な方法およびシステムは、分画されるか否かにかかわらず様々な原料向けに変更することができることを理解されたい。さらに、当業者が理解することができるように、原料含量（例えば、トウモロコシ含量）を最大にすると、糖含量ならびに生成物力価を最大にすることができる。ある実施形態において、原料 12 は、高オレイン酸トウモロコシであり得るため、それに由来するトウモロコシ油は、少なくとも約 55 重量%のオレイン酸のオレイン酸含量を有する高オレイン酸トウモロコシ油である。ある実施形態において、約 24 重量%である通常のトウモロコシ油中のオレイン酸含量と比較して、高オレイン酸トウモロコシ油中のオレイン酸含量は、最大で約 65 重量%であり得る。油の加水分解により、発酵プロセスと接触させるための高いオレイン酸含量を有する遊離脂肪酸が得られるため、高オレイン酸油は、本発明の方法に使用するのにいくつかの利点を提供し得る。

30

40

【0093】

原料 12 を液化するプロセスは、原料 12 中の多糖を、例えば、デキストリンおよびオリゴ糖を含む糖類へと加水分解することを含み、従来のプロセスである。酸プロセス、酸一酵素プロセス、または酵素プロセスを含むがこれらに限定されない、当業界で通常用い

50

られる任意の公知の液化プロセス、ならびに対応する液化槽が使用され得る。このようなプロセスは、単独でまたは組み合わせて使用され得る。ある実施形態において、酵素プロセスを用いることができ、適切な酵素 14、例えば、 α -アミラーゼが、液化槽 10 の入口に導入される。水も液化槽 10 に導入することができる。ある実施形態において、糖化酵素、例えば、グルコアミラーゼも、液化槽 10 に導入され得る。さらなる実施形態において、油の 1 つ以上の成分の、遊離脂肪酸への転化を触媒するために、リパーゼも液化槽 10 に導入され得る。

【0094】

原料 12 を液化することから生成される原料スラリー 16 は、原料に由来する、発酵性炭素基質（例えば、糖）、油、および非溶解固体を含む。原料スラリー 16 は、液化槽 10 の出口から排出され得る。ある実施形態において、原料 12 は、トウモロコシまたはトウモロコシの実であるため、原料スラリー 16 はトウモロコシマッシュスラリーである。ある実施形態において、原料 12 は、リグノセルロース系原料であるため、原料スラリー 16 は、リグノセルロース系加水分解物であり得る。ある実施形態において、原料 12 はサトウキビである。

【0095】

原料スラリー 16 は、微生物 32 とともに発酵槽 30 に導入される。発酵槽 30 は、スラリー 16 を発酵させて、アルコールを生成するように構成される。特に、微生物 32 が、スラリー 16 中の発酵性糖を代謝し、生成物アルコールを排出する。微生物 32 は、細菌、シアノバクテリア、糸状菌、および酵母からなる群から選択される。ある実施形態において、微生物 32 は、大腸菌（*E. coli*）などの細菌であり得る。ある実施形態において、微生物 32 は、発酵性組み換え微生物であり得る。スラリーは、例えば、オリゴ糖の形態の糖、および水を含んでいてもよく、ある実施形態において、約 20 g/L 未満のモノマーグルコース、約 10 g/L 未満、または約 5 g/L 未満のモノマーグルコースを含み得る。モノマーグルコースの量を決定するための好適な方法は、当該技術分野において周知である。当該技術分野において公知のこのような好適な方法は、HPLC を含む。

【0096】

ある実施形態において、スラリー 16 中の複合糖類（例えば、オリゴ糖）を、微生物 32 によって容易に代謝され得る単糖類へと分解するために、スラリー 16 が、糖化プロセスに供される。酸プロセス、酸-酵素プロセス、または酵素プロセスを含むがこれらに限定されない、当業界で通常用いられる任意の公知の糖化プロセスが使用され得る。ある実施形態において、同時糖化発酵（SSF）は、図 1 に示されるように、発酵槽 30 の内部で行われ得る。ある実施形態において、でんぷんまたはオリゴ糖を、微生物 32 によって代謝可能なグルコースに分解するために、グルコアミラーゼなどの酵素 38 が、発酵槽 30 の入口に導入され得る。

【0097】

カルボン酸 28 および／または天然油 26 が、触媒 42 とともに、発酵槽 30 に導入される。触媒 42 は、酵素 38 の前、後、またはそれと同時に導入され得る。したがって、ある実施形態において、酵素 38 および触媒 42 の添加は段階的であり得（例えば、触媒 42、次に酵素 38、または逆の場合もある）またはほぼ同時（すなわち、人または機械が一回で添加を行うのにかかる時間と全く同じ時間で、あるいは人または機械が 2 回で添加を行うのにかかる時間と同じように 1 つの酵素／触媒の直後に他の触媒／酵素を添加する）であり得る。触媒 42 は、カルボン酸 28 とともに生成物アルコールをエステル化して、アルコールエステルを形成することが可能である。例えば、ブタノール生成の場合、触媒 42 は、カルボン酸 28 とともにブタノールをエステル化して、ブチルエステルを形成することが可能である。

【0098】

天然油 26 が発酵槽 30 に供給される場合、油 26 を触媒 42 と接触させることによって、油 26 中のアシルグリセリドの少なくとも一部が、カルボン酸 28 へと加水分解され

10

20

30

40

50

得る。油 26 の加水分解から得られる酸／油組成物は、通常、少なくとも約 17 重量％のカルボン酸 28（遊離脂肪酸として）である。ある実施形態において、油 26 の加水分解から得られる酸／油組成物は、少なくとも約 20 重量％のカルボン酸、少なくとも約 25 重量％のカルボン酸、少なくとも約 30 重量％のカルボン酸、少なくとも約 35 重量％のカルボン酸、少なくとも約 40 重量％のカルボン酸、少なくとも約 45 重量％のカルボン酸、少なくとも約 50 重量％のカルボン酸、少なくとも約 55 重量％のカルボン酸、少なくとも約 60 重量％のカルボン酸、少なくとも約 65 重量％のカルボン酸、少なくとも約 70 重量％のカルボン酸、少なくとも約 75 重量％のカルボン酸、少なくとも約 80 重量％のカルボン酸、少なくとも約 85 重量％のカルボン酸、少なくとも約 90 重量％のカルボン酸、少なくとも約 95 重量％のカルボン酸、または少なくとも約 99 重量％のカルボン酸である。ある実施形態において、得られる酸／油組成物は、油中のアシルグリセリドの部分加水分解からのモノグリセリドおよび／またはジグリセリドを含む。ある実施形態において、得られる酸／油組成物は、アシルグリセリド加水分解の副生成物であるグリセロールを含む。あるさらなる実施形態において、得られる酸／油組成物は、油中のリン脂質の部分加水分解からのリゾリン脂質を含む。

10

【0099】

ある実施形態において、油 26 中のアシルグリセリドの加水分解の後、油 26 からの残留アシルグリセリドは、発酵ブロス組成の約 0 重量％～少なくとも約 2 重量％である。あるさらなる実施形態において、油 26 中のアシルグリセリドの加水分解の後、油 26 からの残留アシルグリセリドは、発酵ブロス組成の少なくとも約 0.5 重量％である。したがって、ある実施形態において、油 26 からのアシルグリセリドは、触媒 42 を用いてカルボン酸 28 に触媒により加水分解され得、触媒 42 は、生成物アルコールとともにカルボン酸 28 をエステル化することもできる。ある実施形態において、第 2 の触媒（図示せず）が、アシルグリセリドの加水分解のために発酵槽に導入され得る。さらに、原料 12 に由来し、スラリー 16 中に存在する油中のアシルグリセリドは、カルボン酸 28' へと加水分解することもできる（例えば、図 3 の実施形態を参照）。ある実施形態において、発酵槽中のカルボン酸（脂肪酸など）の濃度は、水相中の溶解限度を超え、有機相および水相を含む二相発酵混合物が生成される。ある実施形態において、発酵ブロス中のカルボン酸の濃度は、通常、約 0.8 g/L 以下であり、ブロス中のカルボン酸の溶解性によって制限される。

20

30

【0100】

ある実施形態において、触媒 42 および第 2 の触媒は、使用される場合、1 種以上の酵素、例えば、リパーゼ酵素であり得る。ある実施形態において、触媒 42 は、1 種以上の酵素、例えば、リパーゼ酵素などの加水分解酵素であり得る。使用されるリパーゼ酵素は、例えば、アブシディア属（*Absidia*）、アクロモバクター属（*Achromobacter*）、アエロモナス属（*Aeromonas*）、アルカリゲネス属（*Alcaligenes*）、アルテルナリア属（*Alternaria*）、アスペルギルス属（*Aspergillus*）、アクロモバクター属（*Achromobacter*）、アウレオバシジウム属（*Aureobasidium*）、バチルス属（*Bacillus*）、ビューベリア属（*Beauveria*）、プロクトリックス属（*Brochothrix*）、カンジダ属（*Candida*）、クロモバクター属（*Chromobacter*）、コプリナス属（*Coprinus*）、フザリウム属（*Fusarium*）、ゲオトリクム属（*Geotricum*）、ハンゼヌラ属（*Hansenula*）、フミコーラ属（*Humicola*）、ハイホジーマ属（*Hyphozyma*）、乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）、メタリジウム属（*Metarhizium*）、ケカビ属（*Mucor*）、ネクトリア属（*Nectria*）、アカパンカビ属（*Neurospora*）、ペシロマイセス属（*Paecilomyces*）、ペニシリウム属（*Penicillium*）、シュードモナス属（*Pseudomonas*）、リゾクトニア属（*Rhizoctonia*）、リゾムコール属（*Rhizomucor*）、クモノスカビ属（*Rhizopus*）、ロドスポリジウム属（*Rhodosporiidium*）、ロドトルラ属（*Rhodoto*

40

50

rula)、サッカロマイセス属 (*Saccharomyces*)、イノシシ属 (*Sus*)、スロボロマイセス属 (*Sporobolomyces*)、サーモマイセス属 (*Thermomyces*)、チアロスポレラ (*Thiarosporella*)、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、バーティシリウム属 (*Verticillium*)、および／またはヤロウイア属 (*Yarrowia*) の菌株を含む任意の供給原に由来し得る。好ましい態様において、リパーゼの供給源は、アブシディア・ブラケスレーナ (*Absidia blakesleena*)、アブシディア・コリムビフェラ (*Absidia corymbifera*)、アクロモバクター・イオフアガス (*Achromobacter iophagus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes* sp.)、アルタナリア・ブラシキコラ (*Alternaria brassiciola*)、アスペルギルス・フラブス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*)、アウレオバシジウム・プルランス (*Aureobasidium pullulans*)、バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ブロコトリクス・サーモソハタ (*Brochothrix thermosohata*)、カンジダ・キリンドラケア (*Candida cylindracea*) (カンジダ・ルゴサ (*Candida rugosa*))、カンジダ・パラリポリティカ (*Candida paraliipolytica*)、カンジダ・アンタークティカ (*Candida Antarctica*) リパーゼA、カンジダ・アンタークティカ (*Candida antarctica*) リパーゼB、カンジダ・エルノビ (*Candida ernobii*)、カンジダ・デフォルマンズ (*Candida deformans*)、クロモバクター・ビスコスム (*Chromobacter viscosum*)、ネナガヒトヨタケ (*Coprinus cinerius*)、フザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)、フザリウム・ソラニ (*Fusarium solani*)、フザリウム・ソラニ・ピシ (*Fusarium solani pisi*)、フザリウム・ロゼウム・クルモルム (*Fusarium roseum culmorum*)、ゲオトリクム・ペニシラツム (*Geotricum penicillatum*)、ハンゼヌラ・アノマラ (*Hansenula anomala*)、フミコーラ・ブレビスポラ (*Humicola brevispora*)、フミコーラ・ブレビス変種サーモイデア (*Humicola brevis* var. *thermoidea*)、フミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、ラクトバチルス・クルヴァトゥス (*Lactobacillus curvatus*)、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*)、ペニシリウム・シクロピウム (*Penicillium cyclopium*)、ペニシリウム・クラストサム (*Penicillium crustosum*)、ペニシリウム・エキспанザム (*Penicillium expansum*)、ペニシリウム属 (*Penicillium* sp.) I、ペニシリウム属 (*Penicillium* sp.) II、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・アルカリゲネス (*Pseudomonas alcaligenes*)、シュードモナス・セパシア (*Pseudomonas cepacia*) (バークホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) と同義)、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・フラギ (*Pseudomonas fragi*)、シュードモナス・マルトフィリア (*Pseudomonas maltophilia*)、シュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*)、シュードモナス・メフィティカ・リポリティカ (*Pseudomonas mephitica lipolytica*)、シュードモナス・アルカリゲネス (*Pseudomonas alcaligenes*)、シュードモナス・プランタリイ (*Pseudomonas plantarii*)、シュードモナス・シュードアルカリゲネス (*Pseudomonas pseudoalcalig*

enes)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・スツツツェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、およびシュードモナス・ウィスコンシネンシス (*Pseudomonas wisconsinensis*)、紋枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*)、リゾプス・ジャポニクス (*Rhizopus japonicus*)、リゾプス・ミクロスポラス (*Rhizopus microsporus*)、リゾプス・ノドス (*Rhizopus nodosus*)、ロドスポリジウム・トルロイデス (*Rhodosporiidium toruloides*)、ロドトルラ・グルチニス (*Rhodotorula glutinis*)、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、スポロボロマイセス・シバタヌス (*Sporobolomyces shibatanus*)、イノシシ (*Sus scrofa*)、サーモマイセス・ラヌギノス (*Thermomyces lanuginosus*) (以前はフミコーラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*))、チアロスボレラ・ファセオリナ (*Thiarosporella phaseolina*)、トリコデルマ・ハルジアヌム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、およびヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) からなる群から選択される。さらなる好ましい態様において、リパーゼは、サーモマイセス・ラヌギノス (*Thermomycyces lanuginosus*) リパーゼ、アスペルギルス属 (*Aspergillus* sp.) リパーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) リパーゼ、アスペルギルス・ツビンゲンシス (*Aspergillus tubingensis*) リパーゼ、カンジダ・アンタークティカ (*Candida antarctica*) リパーゼB、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) リパーゼ、ペニシリウム・ロックフォルティ (*Penicillium roqueforti*) リパーゼ、ペニシリウム・カメンベルティ (*Penicillium camemberti*) リパーゼ、ムコール・ジャバニクス (*Mucor javanicus*) リパーゼ、バークホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) リパーゼ、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes* sp.) リパーゼ、カンジダ・ルゴサ (*Candida rugosa*) リパーゼ、カンジダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*) リパーゼ、カンジダ・デフォルマン (*Candida deformans*) リパーゼ、ゲオトリクム・カンジドゥム (*Geotrichum candidum*) に由来するリパーゼAおよびB、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) リパーゼ、ネクトリア・ハエマトコカ (*Nectria haematococca*) リパーゼ、フザリウム・ヘテロスポラム (*Fusarium heterosporum*) リパーゼ、リゾプス・デレマ (*Rhizopus delemar*) リパーゼ、リゾムコール・ミエヘイ (*Rhizomucor miehei*) リパーゼ、リゾプス・アリズ (*Rhizopus arrhizus*) リパーゼ、およびリゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) リパーゼからなる群から選択される。触媒42として適した好適な市販のリパーゼ調製物としては、以下に限定はされないが、Novozymesから入手可能な、Lipolase (登録商標) 100 L、Lipex (登録商標) 100 L、Lipoclean (登録商標) 2000 T、Lipozyme (登録商標) CALB L、Novozyme (登録商標) CALA L、およびPalatase 20000 L、あるいはSigmaAldrichから入手可能な、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・セパシア (*Pseudomonas cepacia*)、ムコール・ミエヘイ (*Mucor miehei*)、ブタ膀胱、カンジダ・キリンドラケア (*Candida cylindracea*)、リゾプス・ニベウス (*Rhizopus niveus*)、カンジダ・アンタークティカ (*Candida antarctica*)、カンジダ・ルゴサ (*Candida rugosa*)、リゾプス・アリズ (*Rhizopus arrhizus*) またはアスペルギルス属 (*Aspergillus*) に由来

するリパーゼが挙げられる。

【0101】

ホスホリパーゼは、リン脂質のエステル結合を加水分解する酵素であるが、多くのホスホリパーゼは、トリグリセリド、ジグリセリド、およびモノグリセリドも加水分解することができる（脂質アシルヒドロラーゼ（L A H）活性）。本明細書において使用される際の「ホスホリパーゼ」という用語は、任意のホスホリパーゼ活性を有し、例えば、原油または植物油などの油中の、例えば、グリセロールリン酸エステル結合を開裂させる（グリセロールリン酸エステル結合の加水分解を触媒する）酵素を包含する。本発明のホスホリパーゼ活性は、水で抽出可能なリン酸化塩基およびジグリセリドを生成し得る。ホスホリパーゼ活性は、ホスホリパーゼ C（P L C）活性；P I－P L C 活性、ホスホリパーゼ A 1 またはホスホリパーゼ A 2 活性などのホスホリパーゼ A（P L A）活性；リゾホスホリパーゼ（L P L）活性および／またはリゾホスホリパーゼートランスアシラーゼ（L P T A）活性を含む、ホスホリパーゼ B 1 またはホスホリパーゼ B 2 活性などのホスホリパーゼ B（P L B）活性；ホスホリパーゼ D 1 またはホスホリパーゼ D 2 活性などのホスホリパーゼ D（P L D）活性；および／またはパタチン活性あるいはそれらの任意の組合せを含み得る。

【0102】

「ホスホリパーゼ」という用語は、リゾホスホリパーゼ活性を有する酵素も包含し、ここで、この酵素の2つの基質は、2－リゾホスファチジルコリンおよび H_2O であり、その2つの生成物は、グリセロホスホコリンおよびカルボキシレートである。ホスホリパーゼ A 1（P L A 1）酵素は、1位脂肪酸を除去して、遊離脂肪酸および1－リゾ－2－アシルリン脂質を生成する。ホスホリパーゼ A 2（P L A 2）酵素は、2位脂肪酸を除去して、遊離脂肪酸および1－アシル－2－リゾリン脂質を生成する。P L A 1 および P L A 2 酵素は、細胞内または細胞外、膜結合型または可溶性であり得る。ホスホリパーゼ C（P L C）酵素は、ホスフェート部分を除去して、1，2 ジアシルグリセロールおよびリン酸エステルを生成する。ホスホリパーゼ D（P L D）酵素は、1，2－ジアシルグリセロホスフェートおよび塩基（base group）を生成する。本発明に有用なホスホリパーゼは、様々な生物学的供給源、例えば、以下に限定されないが、F．クルモルム（F．culmorum）、F．ヘテロスポラム（F．heterosporum）、F．ソラニ（F．solani）、またはF．オキシスポルム（F．oxy sporum）の菌株などのフザリウム属（Fusarium）内の糸状菌種；あるいはアワモリコウジカビ（Aspergillus awamori）、アスペルギルス・フォエティダス（Aspergillus foetidus）、アスペルギルス・ジャポニクス（Aspergillus japonicus）、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）またはアスペルギルス・オリゼ（Aspergillus oryzae）の菌株などの、アスペルギルス属（Aspergillus）内の糸状菌種から得られる。市販品の Lecitase（登録商標）Ultra（Novozymes A/S，Denmark）などのサーモマイセス・ラヌギノス（Thermomyces lanuginosus）ホスホリパーゼ変異体も本発明に有用である。1種以上のホスホリパーゼが、凍結乾燥粉末として、固定化された状態でまたは水溶液に溶解させて適用され得る。

【0103】

1種以上の発酵性糖の発酵によって生成されるアルコール（例えば、ブタノール）は、カルボン酸がアルコールとともにエステル化される酵素触媒反応によって、カルボン酸エステルに転化され得る。リパーゼ、ホスホリパーゼ、およびリゾホスホリパーゼなどの酵素は、この反応を触媒し得るが；これらの酵素は、以下に限定はされないが、流体力学的せん断または気液界面および液液界面における不活性化を含む1つ以上の要因によって不活性化され得る。オリゴ糖が1種以上の発酵性糖にさらに転化される発酵において、オリゴ糖を発酵性糖（例えば、グルコアミラーゼ）に転化する酵素はまた、これらの上記の要因のうちの1つ以上によって不活性化され得る。

10

20

30

40

50

【0104】

発酵プロセスの通気 (aeration) から生じるか、および／または1つ以上の発酵性糖の発酵の際のプロセス中の気体二酸化炭素の発生によって生成される、気液界面における酵素の不活性化 (例えば、発酵プロセスによって気泡の界面で起こり得る) は、当該技術分野において周知である。ニワトリ卵白リゾチームおよびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) (Novozymes Lipolase (登録商標)) 中で生成されるサーモマイセス・ラヌギノス (*Thermomyces lanuginosus*) リパーゼの不活性化が、3つの異なる反応機構: 気泡塔、パッフルを備えた攪拌槽 (ガスのスパージによる通気なし)、および流下フィルム (Ghadge, et al., Chem. Eng. Sci. 58: 5125-5134, 2003) の気液界面において観察された。パッフル付きの攪拌タンク反応器 (ガスのスパージによる通気なし) 中の気液界面におけるサーモマイセス・ラヌギノス (*Thermomyces lanuginosus*) リパーゼ (アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 中で生成される; Novozymes Lipolase 100 L (登録商標)) の不活性化の機構が、報告されている (Patil, et al., AIChE J. 46: 1280-1283, 2000)。

10

【0105】

Stahmann, et al. (Eur. J. Biochem. 244: 220-225, 1997) は、アシュビア・ゴシッピ (*Ashbya gossypii*) リパーゼが、攪拌されたガス/水、トリオレオイルグリセロール/水またはオレイン酸/水混合物中で、気/液または液/液界面のいずれかにおける界面の不活性化により、数分以内で不活性化されたことを報告した。Elias, et al. (Adv. Biochem. Engineering/Biotechnology 59: 47-71, 1998) は、(i) いくつかの酵素が、気液界面が存在しない場合でさえ流体力学的せん断によって不活性化され; (ii) 流体力学的せん断によって不活性化される酵素について、不活性化の速度が、気液界面の存在下で上昇し; (iii) いくつかの酵素が、加えられる流体力学的せん断の有無にかかわらず、気液界面が存在しない場合、不活性化されず; (iv) 不活性化のために気液界面を必要とする酵素について、不活性化の速度が、流体力学的せん断の増加とともに上昇することを報告した。Ross, et al. (J. Mol. Catal. B: Enzymatic 8: 183-192, 2000) は、気泡塔装置において溶媒液滴を酵素水溶液に通すことによって、様々な水性/有機溶媒混合物に溶解させた、 α -キモトリプシン、 β -キモトリプシン、パパイン、およびブタ肝臓エステラーゼの界面の不活性化を記載した。攪拌タンク反応器におけるカンジダ・キリンドラケア (*Candida cylindracea*) リパーゼのせん断による不活性化の動力学および機構も報告されており、ここで、不活性化の機構は、せん断に起因する気液界面効果によるものであることが分かった (Lee, et al., Biotechnol. Bioeng. 33: 183-190, 1989)。

20

30

【0106】

本明細書に記載されるいくつかの方法に用いられる発酵条件下で、流体力学的せん断ならびに気液界面および液液界面は、それぞれ、発酵の間に存在し、酵素の不活性化を引き起こすことができる。本明細書に記載される条件下における発酵の際に、二相混合物 (例えば、発酵プロセスおよびカルボン酸) 中に存在する酵素 (例えば、グルコアミラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、およびリゾホスホリパーゼ) のうちの1つ以上の安定性および活性に対するこれらの要因のそれぞれの潜在的影響は、従来技術に基づいて予測することができなかった。これらの要因のそれぞれが、発酵混合物中の1種以上の酵素の不活性化をもたらした得たが、カルボン酸エステルを生成するための、カルボン酸による生成物アルコールのエステル化を触媒するのに十分な酵素活性を、発酵の間に維持した。グルコアミラーゼも、発酵プロセスおよびカルボン酸の二相発酵混合物中に存在する反応において、十分な酵素活性 (すなわち、オリゴ糖を発酵性糖に転化するための) も維持した。

40

【0107】

50

カルボン酸 28 は、ブタノールまたはエタノールなどの生成物アルコールとともにエステル化して、カルボン酸のアルコールエステルを生成することが可能な任意のカルボン酸であり得る。例えば、ある実施形態において、カルボン酸 28 は、遊離脂肪酸であり得、ある実施形態において、カルボン酸または遊離脂肪酸は、4～28 個の炭素、他の実施形態において 4～22 個の炭素、他の実施形態において 8～22 個の炭素、他の実施形態において 10～28 個の炭素、他の実施形態において 7～22 個の炭素、他の実施形態において 12～22 個の炭素、他の実施形態において 4～18 個の炭素、他の実施形態において 12～22 個の炭素、さらに他の実施形態において 12～18 個の炭素を有する。ある実施形態において、カルボン酸 28 は、以下の脂肪酸：アゼライン酸、カプリン酸、カプリル酸、ヒマシ油、ヤシ油（すなわち、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、カプリル酸、カプリン酸、ステアリン酸、カプロン酸、アラキジン酸、オレイン酸、およびリノール酸を含む脂肪酸の天然に存在する組合せとして）、イソステアリン酸、ラウリン酸、亜麻仁油、ミリスチン酸、オレイン酸、パーム油、パルミチン酸、パーム核油、ペラルゴン酸、リシノール酸、セバシン酸、大豆油、ステアリン酸、トール油、獣脂、および #12 ヒドロキシステアリン酸のうちの 1 つ以上である。ある実施形態において、カルボン酸 28 は、二酸の 1 つ以上である。

【0108】

ある実施形態において、カルボン酸 28 は、2 種以上の異なる脂肪酸の混合物であり得る。ある実施形態において、カルボン酸 28 は、化学的または酵素加水分解を含む当該技術分野において公知の任意の方法によって、アシルグリセリドの加水分解から誘導される遊離脂肪酸を含む。上述したある実施形態において、カルボン酸 28 は、触媒 42 として酵素を用いた油グリセリドの酵素加水分解によって、天然油 26 から誘導され得る。ある実施形態において、脂肪酸またはそれらの混合物は、不飽和脂肪酸を含む。不飽和脂肪酸の存在は、融点を低下させ、取り扱いの際の利点を提供する。不飽和脂肪酸のうち、単不飽和であるもの、すなわち、1 つの炭素-炭素二重結合を有するものが、プロセス検討の際に好適な熱安定性および酸化安定性を犠牲にせずに融点に関する利点を提供し得る。

【0109】

ある実施形態において、天然油 26 は、獣脂、トウモロコシ、キャノーラ油、カプリン酸／カプリル酸トリグリセリド、ヒマシ油、ヤシ油、綿実油、魚油、ホホバ油、ラード、亜麻仁油、牛脚油、オイチシカ油、パーム油、ピーナッツ油、ナタネ油、米油、ベニバナ油、大豆油、ヒマワリ油、キリ油、ジャトロファ油、カボチャ油、グレープシードオイル、および植物油ブレンド（またはより高い濃度の異なる鎖長およびレベルの不飽和（すなわち、18：1）へと精製され得る油）であり得る。ある実施形態において、天然油 26 は、例えばパーム油と大豆油との混合物などの 2 種以上の天然油の混合物である。ある実施形態において、天然油 26 は植物由来油である。ある実施形態において、植物由来油は、必ずしもではないが、発酵プロセスに使用され得るバイオマスに由来し得る。バイオマスは、原料 12 が得られる同じかまたは異なる供給源であり得る。したがって、例えば、ある実施形態において、油 26 はトウモロコシに由来し得るが、原料 12 はサトウキビであり得る。例えば、ある実施形態において、油 26 は、トウモロコシに由来し得、原料 12 のバイオマス源もトウモロコシである。当業者に明らかであるはずであるように、原料 12 に対して油 26 の異なるバイオマス源の考えられるあらゆる組合せを使用することができる。ある実施形態において、油 26 は、発酵プロセスに使用されるバイオマスに由来する。したがって、ある実施形態において、図 3 を参照して後述されるように、油 26 は、油 26' として、原料 12 から直接誘導される。例えば、原料 12 がトウモロコシである場合、油 26' は、原料の成分であるトウモロコシ油である。

【0110】

任意に、エタノール 33 が、発酵プロセスに含まれるべく、発酵槽 30 に供給され得る。ある実施形態において、ブタノール合成経路を有し、および／またはピルビン酸デカルボキシラーゼの発現が減少または消失された組み換え微生物が、微生物 32 として使用される場合、微生物 32 は、生存し、成長するために 2-炭素基質、例えば、エタノールの

10

20

30

40

50

補充を必要とし得る。したがって、ある実施形態において、エタノール 33 が、発酵槽 30 に供給され得る。

【0111】

しかしながら、脂肪酸などのカルボン酸が発酵槽中に存在する本発明の方法が、組み換え微生物の生命力を損なうことなく、所与の組み換え微生物に通常供給されるエタノール 33 の量を減少させることができることが意外にも分かった。さらに、本発明の方法のある実施形態において、エタノールを補充しないアルコール（例えば、ブタノール）生成速度を、エタノール 33 が補充される場合に実現され得る生成速度と同等にすることができる。以下の実施例 1～14 に示される比較例によってさらに示されるように、発酵槽中に脂肪酸はあるもののエタノールがない場合のブタノール生成速度は、発酵槽中に脂肪酸もエタノールもない場合のブタノール生成速度と同等かまたはそれより高くなり得る。したがって、ある実施形態において、エタノール 33 の補充の量が、従来のプロセスと比較して減少される。例えば、2-炭素基質の補充を必要とする微生物のために発酵槽に加えられるエタノールの通常量は、約 5 g/L の無水エタノール（すなわち、発酵培地のリットル当たり 5 g の無水エタノール）である。ある実施形態において、発酵にエタノール 33 が一切補充されない。後者の場合、エタノール 33 の流れ全体が、発酵槽から除外される。したがって、本発明のある実施形態において、補充するエタノール 33 に付随するコスト、ならびに大量のエタノール 33 の貯蔵およびブタノール発酵中または生存し、成長するために 2-炭素基質の補充を必要とし得る微生物を用いる他のアルコール発酵中の発酵槽へのエタノールの供給に付随する不都合を低減するかまたはなくすることが可能である。

【0112】

さらに、エタノールの補充に関係なく、ある実施形態において、本発明の方法は、発酵中の脂肪酸の存在のために、微生物 32 によるより高いグルコース取り込み率を提供することができる。脂肪酸は、カルボン酸 28 として発酵槽 30 に導入され得、供給される油 26 から加水分解され得、および/またはスラリー 16 の成分のバイオマス油の加水分解から得られる。遊離脂肪酸がプロセス中の工程で生成され、微生物成長速度およびグルコース消費を向上するために発酵槽中の微生物培地と接触される発酵プロセスから生成物アルコールを生成するための方法が、全体が参照により本明細書に援用される、2010 年 7 月 28 日に出願された、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第 61/368,451 号明細書に記載されている。

【0113】

発酵槽 30 において、微生物 32 によって生成されるアルコールは、触媒 42 を用いてカルボン酸 28 とともにエステル化されて、アルコールエステルが形成される。例えば、ブタノール生成の場合、微生物 32 によって生成されるブタノールは、触媒 42 を用いてカルボン酸 28 とともにエステル化されて、ブチルエステルが形成される。原位置生成物除去（ISPR）を用いて、発酵プロセスからアルコールエステルを除去することができる。本明細書に示されるように、ISPR とともにエステルを形成するために触媒を使用すると、発酵の性能を向上することができる。ある実施形態において、ISPR（例えば、液液抽出など）とともにエステルを形成するために触媒を使用すると、エステルを形成する触媒なしで ISPR を用いた同様の発酵における有効力価と比較して、少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 100% だけ有効力価を増加することができる。同様に、ある実施形態において、ISPR（例えば、液液抽出など）とともにエステルを形成するために触媒を使用すると、エステルを形成する触媒なしで ISPR を用いた同様の発酵における有効率（例えば、実施例 9 および 11～14、表 3 を参照）と比較して、少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 100% だけ有効率を増加することができる。ある実施形態

において、有効収量は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、または少なくとも約50%だけ増加される。ある実施形態において、アルコールエステル化の後に得られる発酵ブ罗斯は、遊離（すなわち、非エステル化）アルコールを含み得、ある実施形態において、生成物アルコールがブタノールである場合、アルコールエステル化の後の発酵ブ罗斯中の遊離アルコールの濃度は、1、3、6、10、15、20、25、30、25、40、45、50、55、または60 g/L以下であり、または生成物アルコールがエタノールである場合、アルコールエステル化の後の発酵ブ罗斯中の遊離アルコールの濃度は、15、20、25、30、25、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100 g/L以下である。ある実施形態において、発酵槽中のアルコールエステル対アルコールの比率は、約1:1であり得る。ある実施形態において、アルコールの有効力価の少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%が、アルコールエステルに転化される。

10

【0114】

ある実施形態において、少なくとも約50 g/L、少なくとも約75 g/L、または少なくとも約100 g/Lの最終的な有効力価を得るのに十分な濃度における水に対する穀類の充填が、ブタノールなどのアルコールを生成することが可能な微生物を含む穀類マッシュ発酵に使用され得る。他の実施形態において、穀類マッシュ発酵は、同時糖化発酵（SSF）を使用してもよく、グルコースの濃度は比較的低いままであり得、例えば、発酵の間、発酵ブ罗斯相中でグルコースのL当たり少なくとも約75 gである。

20

【0115】

ある実施形態において、脂肪酸は、発酵装置の体積の約70%未満、発酵装置の体積の約50%未満、または発酵装置の体積の約30%未満の量で発酵装置に加えられ得る。発酵装置に加えられる脂肪酸の量は、発酵の際のブタノールの水相力価を維持するための手段であり得る。他の実施形態において、ブタノールの水相力価は、発酵ブ罗斯のL当たり約35 g未満、発酵ブ罗斯のL当たり約25 g未満、または発酵ブ罗斯のL当たり約20 g未満のレベルに維持され得る。他の実施形態において、発酵ブ罗斯中の活性なエステル化酵素の量は、約100 ppm未満、約50 ppm未満、または約10 ppm未満の活性酵素であり得る。ある実施形態において、発酵ブ罗斯に用いられる細胞質量は、約50 g d c w/L未満、約20 g d c w/L未満、または約10 g d c w/L未満であり得る。他の実施形態において、発酵プロセスは、少なくとも約30時間～少なくとも約100時間、少なくとも約40時間～少なくとも約80時間、または少なくとも約50時間～少なくとも約70時間実行され得る。

30

【0116】

ある実施形態において、発酵ブ罗斯相のリットル当たり少なくとも約30 gのブタノール、発酵ブ罗斯相のリットル当たり少なくとも約45 gのブタノール、または発酵ブ罗斯相のリットル当たり少なくとも約60 gのブタノールの最終的な有効力価を得るのに十分な濃度での水におけるブリックスが、ブタノールを生成することが可能な微生物を含むサトウキビ発酵に使用され得る。ある実施形態において、脂肪酸は、発酵装置の体積の約70%未満、発酵装置の体積の約50%未満、または発酵装置の体積の約30%未満の量で発酵装置に加えられ得る。発酵装置に加えられる脂肪酸の量は、発酵の際のブタノールの水相力価を維持するための手段であり得る。他の実施形態において、ブタノールの水相力価は、発酵ブ罗斯のL当たり約35 g未満、発酵ブ罗斯のL当たり約25 g未満、または発酵ブ罗斯のL当たり約15 g未満のレベルに維持され得る。他の実施形態において、発酵ブ罗斯中の活性なエステル化酵素の量は、約200 ppm未満、約100 ppm未満、または約20 ppm未満の活性酵素であり得る。ある実施形態において、発酵ブ罗斯に用いられる細胞質量は、最初に、発酵装置の体積の少なくとも約30%を占める初期充填量で、ブ罗斯のリットル当たり少なくとも約100 gの細胞であり得る。3～7時間の発酵の後、細胞質量は、サトウキビ原料を加えることによって、発酵ブ罗斯のリットル当たり

40

50

少なくとも約 25 g の細胞になるまで希釈され得る。細胞は、全発酵時間のうちの 8 ～ 15 時間にわたって、発酵プロセスのリットル当たり少なくとも約 30 g の細胞になるまで増殖し続け得る。

【0117】

ある実施形態において、発酵プロセスは、発酵の際に抽出剤と接触されて、水相および有機相を含む二相混合物が形成される。このような実施形態において、液液抽出を含む I S P R が、好都合に行われ得る。液液抽出は、開示内容の全体が、本明細書に援用される米国特許出願公開第 2009/0305370 号明細書に記載される方法にしたがって行われ得る。米国特許出願公開第 2009/0305370 号明細書には、液液抽出を用いて発酵プロセスからブタノールを生成し、回収するための方法が記載されており、この方法は、発酵プロセスを水不混和性抽出剤と接触させて、水相および有機相を含む二相混合物を形成する工程を含む。通常、抽出剤は、飽和、単不飽和、多価不飽和（およびそれらの混合物） $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルコール、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸のエステル、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルデヒド、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アミド、およびそれらの混合物からなる群から選択される有機抽出剤であり得る。抽出剤はまた、飽和、単不飽和、多価不飽和（およびそれらの混合物） $C_4 \sim C_{22}$ の脂肪アルコール、 $C_4 \sim C_{28}$ の脂肪酸、 $C_4 \sim C_{28}$ の脂肪酸のエステル、 $C_4 \sim C_{22}$ の脂肪アルデヒド、およびそれらの混合物からなる群から選択される有機抽出剤であり得る。本明細書に記載される方法とともに使用する場合、アルコール抽出剤によるカルボン酸 28 の触媒によるエステル化によって、発酵槽 30 中のカルボン酸 28 の消費を避け、それによって、より少ないカルボン酸が、生成物アルコールによるエステル化に利用可能であろうように、I S P R 用の抽出剤は、通常、非アルコール抽出剤である。以下の実施例 24 にさらに示されるように、例えば、オレイルアルコールが I S P R 抽出剤として使用される場合、カルボン酸のオレイルアルコールエステルが、活性触媒 42 の存在のために、発酵槽中で生成され得る。

【0118】

図 1 の実施形態を参照して、カルボン酸 28 は、I S P R 抽出剤 28 またはその成分としても働き得る。上述したように、天然油 26 が発酵槽 30 に供給される場合、カルボン酸 28 は、原位置で供給および／または形成され得、および／または原料 16 が加水分解され得る油を含む場合、原位置で形成される。ある実施形態において、I S P R 抽出剤 28 は遊離脂肪酸を含む。ある実施形態において、I S P R 抽出剤 28 はトウモロコシ油脂脂肪酸 (C O F A) を含む。ある実施形態において、油 26 はトウモロコシ油であり、それによって、I S P R 抽出剤 28 は C O F A である。I S P R 抽出剤 (カルボン酸) 28 は、発酵プロセスと接触し、水相 34 および有機相を含む二相混合物を形成する。発酵槽中で形成される生成物アルコールエステルは、優先的に有機相中に分離して、エステル含有有機相 36 が形成される。すなわち、生成物アルコールエステルは、水相 34 中に存在するアルコールエステルの平衡濃度を超える濃度で生成され、したがって、優先的に有機相中に分離する。発酵プロセス中の任意の遊離生成物アルコールも、優先的にエステル含有有機相中に分離する。二相混合物は、流れ 39 として発酵槽 30 から除去され、槽 35 に導入され得、槽 35 において、エステル含有有機相 36 は、水相 34 から分離される。エステル含有有機相 36 および水相 34 への二相混合物 39 の分離は、以下に限定はされないが、サイフォニング、吸入、デカンテーション、遠心分離、重力沈降器の使用、膜支援相分離、ハイドロサイクロンなどを含む当該技術分野において公知の任意の方法を用いて行われ得る。水相 34 の全てまたは一部が、発酵培地（図示される）として発酵槽 30 中に再利用されるかあるいは廃棄され、新しい培地と交換されるか、または残っている生成物アルコールを除去するために処理され、次に発酵槽 30 へと再利用され得る。

【0119】

図 1 を参照して、エステル含有有機相 36 が、槽 50 に導入され、槽 50 において、アルコールエステルは、1 種以上の物質 52 と反応されて、生成物アルコール 54 が回収される。生成物アルコール 54 は、アルコールエステルからアルコールを得るための当該技

術分野において公知の任意の方法を用いて回収され得る。例えば、ある実施形態において、生成物アルコールは、塩基を用いた加水分解とその後の酸性化によって、アルコールエステルから回収され得る。他の実施形態において、生成物アルコールエステルは、物質 52 としての加水分解触媒の存在下で、水によって加水分解され得る。例えば、ある実施形態において、生成物アルコールエステルからアルコールおよびカルボン酸 28（例えば、カルボン酸 28 が脂肪酸である場合は脂肪酸）への加水分解は、物質 52 としての、リパーゼ、水溶性酸、無機酸、有機酸、または固体酸触媒を用いて行われ得る。例えば、硫酸は、アルコールエステル加水分解のための無機酸触媒として使用され得る。いくつかの好適な加水分解触媒は、リパーゼ酵素；エステラーゼ酵素；硫酸、塩酸、またはリン酸などの強無機酸；トルエンスルホン酸またはナフタレンスルホン酸などの強有機酸；または A m b e r l y s t（登録商標）スルホン化ポリスチレン樹脂などの固体酸触媒、またはゼオライトである。ある実施形態において、アルコールエステルの加水分解は、温度を上昇させることによって、および／または圧力をかけることによって、物質 52 としての蒸気を用いて行われ得る。ある実施形態において、アルコールエステルの加水分解は、例えば、反応蒸留塔などの塔において行われ得る。実施例 45～54 および 56～58 は、アルコールエステルから生成物アルコールを回収するためのいくつかの方法を示す。ある実施形態において、副生成物 56 が、生成物アルコール 54 の回収から得られる。副生成物 56 は、アルコールエステルの加水分解から回収され得るカルボン酸 28 を含まない。

10

【0120】

ある実施形態において、エステル含有有機相 36 中に存在する脂肪酸のアルコールエステルの、生成物アルコールおよび遊離脂肪酸への加水分解は、約 10：1～約 1：10 の脂肪酸対水の比率で、または他の実施形態において、約 100：1～約 1：100 の脂肪酸対水の比率で行われる。ある実施形態において、脂肪酸のアルコールエステルは、約 100℃未満の温度で、水を用いて加水分解される。ある実施形態において、加水分解は、100℃超、150℃超、200℃超、または250℃超の温度で行われる。

20

【0121】

例えば、ある実施形態において、アルコールエステルは、エステル交換されて、生成物アルコール 54 が生成され得、ある実施形態において、第 2 級（second）アルコールエステル 56、例えば、脂肪酸アルキルエステルも、副生成物 56 として生成され得る。このようなエステル交換を行うために、アルコールエステルは、アルコールエステルをエステル交換して、ブタノールを放出することが可能な触媒と接触され得る。ある実施形態において、アルコールエステルは、グリセロールを用いてエステル交換されて、生成物アルコール 54 および副生成物 56 としてのアシルグリセリドが生成され得る。生成されるアシルグリセリドは、モノーおよびジアシルグリセリドを含み得る。エステル交換反応のためのいくつかの好適な触媒は、例えば、リパーゼ酵素、特に第 2 級アルコールのアルコキシド塩、チタン酸アルキル、硫酸およびリン酸などの可溶性無機酸、トルエンスルホン酸およびナフタレンスルホン酸などの可溶性有機酸、および A m b e r l y s t（登録商標）スルホン化ポリスチレン樹脂などの固体酸、またはゼオライトである。エステル交換または加水分解のための好適なリパーゼとしては、以下に限定はされないが、バークホルデリア・セパシア（*Burkholderia cepacia*）、サーモマイセス・ラヌギノサ（*Thermomyces lanuginosa*）、またはカンジダ・アンタラクティカ（*Candida antarctica*）に由来するリパーゼが挙げられる。ある実施形態において、リパーゼは、当業者に周知の方法を用いて、可溶性または不溶性の担体上に固定化される（例えば、Immobilization of Enzymes and Cells；Gordon F. Bickerstaff, Editor；Humana Press, Totowa, NJ, USA, 1997 を参照）。酵素の固定化は、1）共有結合担体、物理吸着、静電結合、または親和結合による、多孔質または非多孔質のキャリア担体への酵素の結合；2）二官能性または多官能性の試薬による架橋；3）ゲル母材、ポリマー、エマルジョン、またはある形態の膜への閉じ込め；および 4）これらの方法のいずれかの組合せを含む様々な技術を用いて行われ得る。他の実施

30

40

50

形態において、リパーゼは、固定化されなくてもよい。ある実施形態において、リパーゼは可溶性である。脂肪酸アルキルエステル56は、例えば脂肪酸メチルエステルを含み得る。他の脂肪酸アルキルエステル56は、例えば、 $C_2 \sim C_{12}$ の直鎖状、分枝鎖状、および環式アルコールエステルを含み得る。次に、生成物アルコール54は、例えば蒸留などの当該技術分野において公知の任意の分離手段を用いて、副生成物56を含む反応混合物から分離され得る。他の好適な分離機構は、例えば、抽出および膜分離を含み得る。

【0122】

ある実施形態において、生成物アルコールの少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または少なくとも約99%が、アルコールエステルから回収される。

10

【0123】

ISPR抽出剤（カルボン酸）28が、生成物アルコール54を回収するためのアルコールエステルの反応の前に、アルコールエステルから分離され得る。あるいは、アルコールエステルの反応の後、ISPR抽出剤28は、生成物アルコールおよび何らかの副生成物から分離され得る。次に、得られる回収された希薄な抽出剤27は、通常、アルコールエステルのさらなる生成および／または抽出のための新鮮な補給（make-up）抽出剤28（供給される場合、油26に由来し得る）と組み合わせて、発酵槽30に戻って再利用され得る。あるいは、新鮮な抽出剤28（または油26）は、二相混合物流39において除去される抽出剤の代わりにするために、発酵槽に連続して加えられ得る。

20

【0124】

ある実施形態において、触媒42が、二相混合物39から回収され、発酵自体または生成物アルコールの回収などの発酵プロセス中の工程において再利用され得る。

【0125】

ある実施形態において、1種以上のさらなるISPR抽出剤29（図2を参照）が、発酵槽30に導入されて、水相および有機相を含む二相混合物が形成され得る。このような実施形態において、ISPR抽出剤29は、オレイルアルコール、ベヘニルアルコール、セチルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、ステアリルアルコール、1-ウンデカノール、オレイン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸メチル、オレイン酸メチル、ウンデカノール、ラウリン酸アルデヒド、20-メチルウンデカノール、およびそれらの混合物などの外部からの有機抽出剤であり得る。しかしながら、上述した理由のため、ISPR抽出剤29は、好ましくはアルコールでない。むしろ、ISPR抽出剤29は、好ましくはカルボン酸（例えば遊離脂肪酸）である。ある実施形態において、ISPR抽出剤29はCOFAである。ある実施形態において、ISPR抽出剤29は、アマニ油脂肪酸、大豆油脂肪酸、ジャトロファ油脂肪酸、あるいはパーム油、ヒマシ油、オリーブ油、ヤシ油、ピーナッツ油、または任意の種油に由来する脂肪酸である。ある実施形態において、ISPR抽出剤29は、例えば、参照により本明細書に援用される、2010年7月28日に出願された、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第61/368,436号明細書に記載されるようなバイオマス脂質などの天然油の化学的転化から得られる、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル（特に、アルコール部分に1~8個の炭素原子を含むもの、例えば、脂肪酸メチルエステルおよび脂肪酸のより低級のアアルコールエステル）、脂肪酸グリコールエステル、水酸化トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される脂肪酸抽出剤であり得る。ある実施形態において、ISPR抽出剤29は、バイオマス脂質の化学的加水分解によって得られる遊離脂肪酸である。ある実施形態において、ISPR抽出剤29は、例えば、参照により本明細書に援用される、2010年7月28日に出願された、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第61/368,444号明細書に記載されるようなバイオマス脂質などの天然油の酵素加水分解から生成される遊離脂肪酸であり得る。

30

40

【0126】

50

原位置生成物除去は、発酵槽 30 中でバッチモードまたは連続モードで行われ得る。原位置生成物除去の連続モードにおいて、生成物が、槽（または反応器）から連続して除去される。原位置生成物除去のバッチモードにおいて、ある体積の有機抽出剤が、発酵槽に加えられ、抽出剤は、プロセス中に除去されない。原位置生成物除去では、有機抽出剤を、発酵の開始時に発酵培地と接触させ、二相発酵培地を形成することができる。あるいは、微生物が所望の量の増殖（培地の光学密度を測定することによって決定され得る）を達成した後、有機抽出剤を発酵培地と接触させることができる。さらに、発酵培地中の生成物アルコールレベルが、予め選択したレベルに達した時点で、有機抽出剤を発酵培地と接触させることができる。本発明のある実施形態に係るブタノール生成の場合、ブタノール濃度が有毒なレベルに達する前の時点で、カルボン酸抽出剤を、発酵培地と接触させて、カルボン酸とともにブタノールをエステル化して、ブチルエステルを生成することができる。ある実施形態において、水相およびブチルエステルを含む有機相を含む二相混合物を生成することができる。したがって、発酵槽中のブタノールの濃度が低下され、結果として、微生物に対するブタノールの毒性作用を最小限に抑える。次に、ブチルエステルの所望の有効力価が達成された後、エステル含有有機相は、発酵槽から除去され得る（そして、水相を構成する発酵ブロスから分離され得る）。例えば、ある実施形態において、ブチルエステルの有効力価が、発酵ブロスの k g 当たり約 10 g を超えた後、エステル含有有機相は、発酵ブロスから分離され得る。他の実施形態において、ブチルエステルの有効力価が、発酵ブロスの k g 当たり約 230 g 超、発酵ブロスの k g 当たり約 300 g 超、発酵ブロスの k g 当たり約 400 g 超、発酵ブロスの k g 当たり約 500 g 超、または発酵ブロスの k g 当たり約 600 g 超になった後、エステル含有有機相は、発酵培地から分離され得る。別の実施形態において、C O F A の転化率 % が、少なくとも約 10 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 75 %、または少なくとも約 100 % になった後、エステル含有有機相は、発酵培地から分離され得る。ある実施形態において、発酵槽中の利用可能な発酵性糖の発酵が実質的に完了した後、エステル含有有機相は水相から分離される。

【0127】

図 1 に記載される実施形態の例において、アルコールエステルは、発酵ブロスから原位置で抽出され、二相混合物 39 の分離が、別個の槽 35 で起こる。ある実施形態において、二相混合物の分離は、後述される図 3 および 4 の実施形態の例に示されるように、発酵槽で行うことができ、これらの図では、エステル含有有機相流 36 が発酵槽 30 から直接出る。水相流 34 も発酵槽 30 から直接出ることができ、一切の残っているアルコールエステルまたは生成物アルコールを除去するように処理され、再利用され、または廃棄され、新しい発酵培地と交換され得る。有機抽出剤によるアルコールエステルおよび生成物アルコールの抽出は、発酵ブロスからの微生物 32 の除去を伴うかまたは伴わずに行うことができる。微生物 32 は、以下に限定はされないが、ろ過または遠心分離を含む、当該技術分野において公知の手段によって、発酵ブロスから除去され得る。例えば、水相流 34 は、酵母などの微生物 32 を含み得る。微生物 32 は、例えば、遠心分離機（図示せず）において、水相流から容易に分離され得る。その後、微生物 32 は、発酵槽 30 に再利用することができ、発酵槽 30 は、時間の経過とともにアルコール生成の生成速度を上げ、それによって、アルコール生成の効率を高めることができる。

【0128】

当業者に明らかであるはずであるように、ある実施形態において、図 1 のシステムおよび方法は、発酵槽 30 中の同時糖化発酵が、発酵槽 30 の前に別個の糖化槽 60 に置き換えられるように変更され得る（例えば、図 4 の実施形態を参照）。

【0129】

さらに他の実施形態において、例えば、図 2 の実施形態の例に示されるように、（発酵槽 30 に直接供給される代わりに）天然油 26 が、触媒 42 も供給される槽 40 に供給され、それによって、油 26 中のアシルグリセリドの少なくとも一部が加水分解されて、カルボン酸 28 が形成される。次に、カルボン酸 28 および触媒 42 を含有する槽 40 から

の生成物流が、発酵槽 30 に導入される。カルボン酸 28 および触媒 42 は、発酵培地中で生成される生成物アルコールと接触し、それによって、生成物アルコールのアルコールエステルが、図 1 を参照して上述したのと同じ方法で、生成物アルコールによるカルボン酸の触媒されたエステル化から原位置で形成される。カルボン酸 28 は、I S P R 抽出剤として働くこともでき、ある実施形態において、十分なカルボン酸 28 および／または 1 種以上のさらなる I S P R 抽出剤 29 が、発酵槽 30 に導入されて、水相および有機相を含む二相混合物が形成され得、アルコールエステルが、有機相中に分離する。図 2 の実施形態の残りのプロセス作業は、図 1 と同一であるため、再度詳細に説明しない。

【0130】

本発明のある実施形態において、例えば、図 3 の実施形態に示されるように、触媒 42 は、原料 12 を形成するバイオマスに由来する油 26' を含む原料スラリー 16 に加えられ得る。示される実施形態において、触媒 42 は、油 26' 中のグリセリドを遊離脂肪酸 28' へと加水分解することができる。したがって、原料スラリー 16 への触媒 42 の導入の後、油 26' 中のグリセリドの少なくとも一部が加水分解され、遊離脂肪酸 28' および触媒 42 を有する原料スラリー 18 が得られる。例えば、原料 12 がトウモロコシである場合、油 26' は、原料の成分であるトウモロコシ油であり、遊離脂肪酸 28' はトウモロコシ油脂肪酸 (C O F A) である。

【0131】

原料スラリー 18 は、発酵培地に含まれるべく、アルコール生成微生物 32 とともに発酵槽 30 に導入される。ある実施形態において、グルコアミラーゼなどの酵素 38 も、スラリー 18 中の糖の糖化および発酵槽 30 の内部のアルコールの発酵を同時に行うために、発酵槽に導入され得る。発酵槽中の触媒 42 (スラリー 18 を介して導入される) の存在により、遊離脂肪酸 28' (スラリー 18 を介して導入される) によるアルコールのエステル化が触媒されて、図 1 を参照して上述されるのと同じ方法で、脂肪酸アルコールエステルが原位置で形成される。ある実施形態において、ブタノール生成では、ブタノール生成微生物 32 が、原料スラリー 18 とともに発酵槽 30 に導入される。発酵槽中の触媒 42 (スラリー 18 を介して導入される) が、遊離脂肪酸 28' (スラリー 18 を介して導入される) によるブタノールのエステル化を触媒して、脂肪酸ブチルエステル (F A B E) を原位置で形成する。遊離脂肪酸 28' は、I S P R 抽出剤として働くこともできる。例えば、遊離脂肪酸 28' が C O F A である場合、C O F A のアルコールエステルが原位置で形成され、C O F A は、I S P R 抽出剤またはその一部として働く。

【0132】

ある実施形態において、1 種以上のさらなる I S P R 抽出剤 29 が、アルコールエステル (および任意の遊離アルコール) を水相から優先的に分離するために、発酵槽 30 に導入され得る。ある実施形態において、I S P R 抽出剤 29 は、図 1 および 2 の実施形態を参照して記載されるカルボン酸 28 であり得る。ある実施形態において、I S P R 抽出剤 29 は、油 26 として発酵槽 30 に導入され、次に、I S P R 抽出剤 29 になるために、触媒 42 によって脂肪酸へと加水分解される。ある実施形態において、油 26 はトウモロコシ油であり、それによって、I S P R 抽出剤 29 は C O F A である。ある実施形態において、図 1 および 2 の実施形態を参照して上述したように、I S P R 抽出剤 29 は、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、脂肪酸エステル (特に、アルコール部分に 1 ~ 8 個の炭素原子を含むもの、例えば、脂肪酸メチルエステルおよび脂肪酸のより低級のアルコールエステル)、脂肪酸グリコールエステル、水酸化トリグリセリド、およびそれらの混合物からなる群から選択される脂肪酸抽出剤であり得る。さらに他の実施形態において、I S P R 抽出剤 29 は、バイオマス脂質の化学的または酵素加水分解によって得られる遊離脂肪酸であり得る。このような実施形態において、抽出剤 29 を生成するためのバイオマス脂質は、原料 12 が得られる同じかまたは異なるバイオマス源に由来し得る。例えば、ある実施形態において、抽出剤 29 を生成するためのバイオマス脂質が、大豆に由来し得るが、原料 12 のバイオマス源はトウモロコシである。当業者に明らかであるはずであるように、原料 12 に対する抽出剤 29 のための異なるバイオマス源の考えられるあらゆる

組合せを使用することができる。図 2 の実施形態の残りのプロセス作業は、図 1 と同一であるため、再度詳細に説明しない。

【0133】

非限定的なデータの裏づけのない (prophetic) 実施例として、図 3 の実施形態を参照して、約 4 重量%のトウモロコシ油を通常含有し得る、磨砕された全粒トウモロコシ (原料 12 としての) の水性懸濁液が、約 85℃~120℃で 30 分間~2 時間にわたって、アミラーゼ (液化酵素 14 としての) で処理され得、得られた液化されたマッシュ 16 が、65℃~30℃に冷却され、pH 4.5~7.5 (ある実施形態において、pH 5.5~6.5) で、脂質中の利用可能な脂肪酸含量の、遊離脂肪酸への転化率が少なくとも 30%から少なくとも 99%もの高さになるのに十分な時間にわたって、0.1 ppm~10 ppm (ある実施形態において、0.5 ppm~1.0 ppm) のリパーゼ (触媒 42 としての) で処理され得る。液化され、リパーゼ処理されたマッシュ 18 は、(例えば、熱交換器を用いて) 約 30℃に冷却され、約 25%~30 重量%の乾燥トウモロコシ固体で発酵槽 30 に充填され得る。グルコアミラーゼ (糖化酵素 38 としての) の添加による発酵中の液化されたマッシュ 18 の糖化により、グルコースが生成され得る。得られた発酵ブ罗斯は、リパーゼ 42 で処理されていない液化されたマッシュを用いて、ブ罗斯中に存在し得るトウモロコシ油 (例えば、約 1.2 重量%のトウモロコシ油) の量よりかなり少ない量含有し得る。特に、リパーゼ 42 処理により、トウモロコシ油脂質 26' (トリグリセリド (TG)) を、COFA 28' (おおよびいくらかのジグリセリド (DG) またはモノグリセリド (MG)) に転化し、COFA I SPR 抽出溶媒 28' または 29 中の脂質 26' の蓄積の速度を低下させることができる。リパーゼ 42 処理により、発酵中に生成されるブタノールを、COFA のブチルエステルに転化することもでき、ここで、COFA のブチルエステルは、液液抽出 I SPR の際の COFA 相 36 中への溶解についての高い分配係数を有する。発酵の終了時、COFA のブチルエステルを含有する COFA 相 36 は、(槽 30/35 において) 発酵ブ罗斯から分離され得、ブタノール 54 は、限定はされないが、例えば、リパーゼ 52、固体酸触媒 52 または蒸気 52 を用いたエステルの加水分解を含むいくつかの方法のうちの 1 つを用いて、(槽 50 において) この有機混合物 36 から回収されて、ブタノール 54 および COFA 27 が生成され得る。

【0134】

さらに他の実施形態において、例えば、図 4 の実施形態に示されるように、図 3 のシステムおよび方法は、発酵槽 30 中の同時糖化発酵 (SSF) が、発酵槽 30 の前に別個の糖化槽 60 に置き換えられるように変更され得る。図 4 は、酵素 38 を受け入れる別個の糖化槽 60 を含み、触媒 42 が、液化され、糖化された原料流 62 に導入される以外は図 3 とほぼ同一である。原料スラリー 16 が、グルコアミラーゼなどの酵素 38 とともに糖化槽 60 に導入され、それによって、スラリー 16 中のオリゴ糖の形態の糖類が、単糖類へと分解され得る。液化され、糖化された原料流 62 が、糖化槽 60 を出て、それに触媒 42 が導入される。原料流 62 は、原料に由来する、単糖類、および油 26' および非溶解固体を含む。油 26' は、触媒 42 の導入によって加水分解され、遊離脂肪酸 28' および触媒 42 を有する液化され、糖化された原料スラリー 64 が得られる。

【0135】

あるいは、ある実施形態において、図 1 の実施形態における SSF のための発酵槽 30 への酵素 38 と触媒 42 の導入と同様に、触媒 42 が、糖化酵素 38 とともに加えられて、グルコースを生成すると同時に、油脂質 26' を遊離脂肪酸 28' に加水分解することができる。酵素 38 および触媒 42 の添加は段階的であり得 (例えば、触媒 42、次に酵素 38、または逆の場合もある) または同時であり得る。しかしながら、SSF の際の発酵槽 30 への触媒 42 の添加も、生成物アルコールをアルコールエステルにほぼ同時に転化する図 1 の実施形態と対照的に、触媒 42 を含有するスラリー 64 が発酵槽 30 に導入されるまで、アルコールエステルは形成されない。あるいは、ある実施形態において、スラリー 62 が発酵槽 30 に導入され得、触媒 42 が発酵槽 30 に直接加えられる。

【0136】

図4の実施形態において、スラリー64が、単糖類を代謝して生成物アルコールを生成するアルコール生成微生物32とともに発酵槽30に導入される。発酵槽中の触媒42（スラリー64を介して導入される）の存在により、遊離脂肪酸28'（スラリー62を介して導入される）によるアルコールのエステル化が触媒されて、図1を参照して上述したのと同じ方法で、脂肪酸アルコールエステルが原位置で形成される。遊離脂肪酸28'は、アルコールエステル（および任意の遊離アルコール）を水相から優先的に分離するためのISPR抽出剤として働くこともできる。ある実施形態において、図3を参照して上述したように、1種以上のさらなるISPR抽出剤29も、発酵槽30に導入することができる。図4の実施形態の残りのプロセス作業は、図3と同一であるため、再度詳細に説明しない。

10

【0137】

図1～4を参照して上述した実施形態のいずれかを含むある実施形態において、非溶解固体が、発酵槽30に導入される前に、原料スラリー16から除去され得る。例えば、図5の実施形態に示されるように、原料スラリー16が、非溶解固体を固相またはウェットケーキ24として排出するように構成される分離器20の入口に導入される。例えば、ある実施形態において、分離器20は、原料スラリー16から非溶解固体を分離するための、フィルタープレス、真空ろ過、機械的加圧ろ過、または遠心分離機（例えば、デカンター遠心分離機）を含み得る。ある実施形態において、例えば、デカンターボウル遠心分離機、トリカンター遠心分離機、ディスクスタック遠心分離機、ろ過遠心分離機、またはデカンター遠心分離機を含む、当業界で用いられる任意の従来の遠心分離機を用いて、非溶解固体を分離することができる。ある実施形態において、原料スラリー16からの非溶解固体の除去は、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるいをういたろ過、ふるい分け分離、火格子（grate）または格子、多孔質格子、浮遊法、ハイドロクロン、フィルタープレス、スクリュープレス、重力沈降器、ボルテックス分離器、または液体から固体を分離するのに使用され得る任意の方法によって行われ得る。任意に、ある実施形態において、分離器20は、原料スラリー16中に存在する油26'の一部または実質的に全てを除去するように構成することもできる。このような実施形態において、分離器20は、以下に限定はされないが、サイフォニング、デカンテーション、遠心分離、重力沈降器の使用、膜支援相分離などを含む、水性原料流から油を除去するための、当該技術分野において公知の任意の好適な分離器であり得る。糖および水を含む残りの原料は、水流22として発酵槽30に排出される。

20

30

【0138】

例えば、ある実施形態において、分離器20は、糖および水を含有する水層（すなわち、流れ22）、非溶解固体を含有する固体層（すなわち、ウェットケーキ24）、および油層（すなわち、油流26'）を含む遠心分離生成物を生成するように原料スラリー16を攪拌または回転させるトリカンター遠心分離機20を含む。このような場合、触媒42が、除去された油26'と接触されて、遊離脂肪酸28'および触媒42の流れが生成され得る。次に、遊離脂肪酸28'および触媒42の流れは、発酵培地と接触させるために発酵槽30に導入され得、それによって、発酵培地中の生成物アルコールの、脂肪酸アルコールエステルへの触媒によるエステル化が、図1を参照して上述したのと同じ方法で、原位置で行われ得る。

40

【0139】

遊離脂肪酸28'は、ISPR抽出剤28'として働くこともでき、1種以上のさらなるISPR抽出剤29も、発酵槽30に導入することができる。したがって、原料油26'は、カルボン酸へと触媒により加水分解され、それによって、ISPR抽出剤も生成しつつ、ISPR抽出剤中に存在する脂質の量を減少させることができる。エステル含有有機相36は、槽35において二相混合物39の水相34から分離され得、生成物アルコールは、槽50（図1を参照）においてアルコールエステルから回収され得る。図5の実施形態の残りのプロセス作業は、図3と同一であるため、再度詳細に説明しない。

50

【0140】

ウェットケーキ24が遠心分離機20によって除去される場合、ある実施形態において、原料がトウモロコシである場合、トウモロコシ油などの原料12に由来する油の一部が、ウェットケーキ24中に残る。水溶液22が遠心分離機20から排出されてから、ウェットケーキ24は、遠心分離機においてさらなる水で洗浄され得る。ウェットケーキ24の洗浄により、ウェットケーキ中に存在する糖（例えば、オリゴ糖）を回収し、回収された糖および水は、液化槽10に再利用され得る。洗浄後、ウェットケーキ24は、任意の好適な公知の方法によって、可溶物と組み合わせられ、次に、乾燥されて、可溶物含有乾燥穀類蒸留粕（DDGS）が形成され得る。遠心分離機20において形成されるウェットケーキ24からのDDGSの形成にはいくつかの利点がある。非溶解固体が発酵槽に送られないため、DDGSは、抽出剤および／またはブタノールなどの生成物アルコールを捕捉せず、DDGSは、発酵槽の条件に供されず、発酵槽中に存在する微生物と接触しない。全てのこれらの利点が、例えば、動物飼料としてのDDGSの処理および販売をより容易にする。ある実施形態において、油26'は、ウェットケーキ24から別々に排出されず、油26'は、ウェットケーキ24の一部として含まれ、最終的にDDGS中に存在する。このような場合、油は、DDGSから分離され、同じかまたは異なるアルコール発酵プロセスにおいてその後の使用のためにISPR抽出剤29に転化され得る。遠心分離によって原料スラリー16から非溶解固体を除去するための方法およびシステムが、全体が参照により本明細書に援用される、2010年6月18日に出願された、同時係属中の、同一出願人が所有する米国仮特許出願第61／356,290号明細書に詳細に記載されている。

10

20

【0141】

上述したように、油26'は、例えば、溶媒抽出プロセスを含む任意の好適な公知の方法を用いてDDGSから分離され得る。本発明の一実施形態において、DDGSは、抽出槽に充填され、ヘキサンなどの溶媒で洗浄されて、油26'が除去される。用いられ得る他の溶媒としては、例えば、イソブタノール、イソヘキサン、エタノール、石油エーテルなどの石油蒸留物、またはそれらの混合物が挙げられる。油26'の抽出の後、DDGSは、一切の残留溶媒を除去するように処理され得る。例えば、DDGSは、当該技術分野において公知の任意の方法を用いて、一切の残留溶媒を蒸発させるように加熱され得る。溶媒を除去した後、DDGSは、一切の残留水を除去するように乾式処理に供され得る。処理されたDDGSは、家禽、家畜、およびペットなどの動物用の補足飼料として使用され得る。

30

【0142】

DDGSからの抽出の後、得られる油26'および溶媒混合物は、溶媒から油26'を分離するために収集され得る。一実施形態において、油26'／溶媒混合物は、蒸発によって処理されてもよく、それによって、溶媒は蒸発され、収集され、再利用され得る。回収された油は、同じかまたは異なるアルコール発酵プロセスにおいてその後の使用のためにISPR抽出剤29に転化され得る。

【0143】

固体の回収に加えて、発酵プロセスの他の副生成物を回収することが所望され得る。一実施形態において、例えば、脂肪酸エステル（例えば、脂肪酸イソブチルエステル）は、炭水化物の、生成物アルコール（例えば、ブタノール）への収率を高めるために回収され得る。これは、例えば、溶媒を用いて、例えば、いくつかの副生成物流を組み合わせる混合し、組み合わせる混合する工程の生成物を乾燥させることによって形成される副生成物から脂肪酸イソブチルエステルを抽出することによって行われ得る。DDGSからトウモロコシ油トリグリセリドを回収するためのこのような溶媒系の抽出システムは、米国特許出願公開第2010／0092603号明細書に記載されており、その教示内容が、参照により本明細書に援用される。

40

【0144】

脂肪酸エステルの溶媒抽出の一実施形態において、固体が、全蒸留廃液から分離され得

50

る（「分離された固体」）が、これは、その流れが、組み合わせられない副生成物流中の脂肪酸エステル の最も多い割合を含有し得るためである。次に、これらの分離された固体は、抽出器に供給され、溶媒で洗浄され得る。一実施形態において、分離された固体の全ての側が溶媒で確実に洗浄されるように、分離された固体は、少なくとも1回、回転される。洗浄後、ミセラとして知られている、脂質と溶媒との得られる混合物が、溶媒からの抽出される脂質の分離のために収集される。例えば、脂質と溶媒との得られる混合物は、さらなる処理のために分離器に堆積され得る。抽出プロセスの際、溶媒が分離された固体を洗浄するにつれて、溶媒は、脂質を溶液に入れるだけでなく、固体微粒子も収集する。これらの「微粒子」は、一般に、ミセラ中の望ましくない不純物であり、一実施形態において、ミセラは、ミセラから微粒子を分離するかまたは洗い落とす（scrub）装置によって、抽出器または分離器から排出され得る。

10

【0145】

ミセラ中に含まれる脂質および溶媒を分離するために、ミセラは、蒸留工程に供され得る。この工程において、ミセラは、例えば、蒸発器によって処理することができ、蒸発器は、溶媒を蒸発させるのに十分に高いが、抽出される脂質に悪影響を与えるかまたは蒸発させるほど十分高くはない温度にミセラを加熱する。溶媒が蒸発するにつれて、溶媒は、例えば、凝縮器に収集され、将来の使用のために再利用され得る。ミセラからの溶媒の分離により、粗脂質の蓄積が得られ、これは、水、脂肪酸エステル（例えば、脂肪酸イソブチルエステル）、脂肪酸、およびトリグリセリドを分離するようにさらに処理され得る。

【0146】

20

脂質の抽出の後、固体は、抽出器の外に送られ、残留溶媒を除去するストリップングプロセスに供され得る。残留溶媒の回収は、プロセス経済性にとって重要である。一実施形態において、湿潤固体は、溶媒が脱溶媒器（desolventizer）に送られる際に湿潤固体から一時的に蒸発する溶媒を貯蔵し、収集するための気密（vapor tight）環境に送られ得る。固体が脱溶媒器に入る際、固体は加熱されて、残留溶媒が蒸発され、除去され得る。固体を加熱するために、脱溶媒器は、固体を1つ以上のトレイに分配するための機構を含んでもよく、固体は、加熱された空気または蒸気との直接接触などによって、直接加熱されるか、あるいは食事を運ぶトレイを加熱することなどによって間接的に加熱され得る。1つのトレイから別のトレイへの固体の移動を容易にするために、固体を運ぶトレイは、固体を1つのトレイから次のトレイへと送らせる開口部を含み得る。脱溶媒器から、固体は、任意に、混合器に送られてもよく、ここで、固体は、乾燥器に送られる前に、他の副生成物と混合される。固体抽出の例が、実施例63に記載されている。この例では、固体は、脱溶媒器に供給され、ここで、固体は、蒸気によって接触される。一実施形態において、脱溶媒器中の蒸気および固体の流れは、逆行していてもよい。次に、固体は、脱溶媒器を出て、乾燥器または任意に混合器に供給されてもよく、ここで、様々な副生成物が混合され得る。脱溶媒器を出る蒸気は凝縮され、任意にミセラと混合され、次にデカンターに供給され得る。デカンターを出る水富化相は、蒸留塔に供給されてもよく、ここで、ヘキサンが、水富化流から除去される。一実施形態において、ヘキサン減損水富化流は、蒸留塔の塔底を出て、発酵プロセスに戻って再利用されてもよく、例えば、それは、磨砕されたトウモロコシ固体をスラリー化するために使用され得る。別の実施形態において、塔頂および塔底生成物は、発酵プロセスに再利用され得る。例えば、脂質富化塔底物は、加水分解装置の原料に加えられ得る。塔頂物は、例えば、凝縮され、デカンターに供給され得る。このデカンターを出るヘキサン富化流は、抽出器への溶媒原料の一部として任意に使用され得る。このデカンターを出る水富化相は、ヘキサンを水から取り除く塔に供給され得る。当業者が理解することができるように、本発明の方法は、ブタノールなどの生成物アルコールの生成のための発酵プロセスを最適化するために様々な方法で変更され得る。

30

40

【0147】

脂肪酸エステルの溶媒抽出の別の実施形態において、固体は、異種混合物としてプレフラッシュ塔（preflash column）に導入される前に発酵から排出されるビ

50

ールおよび溶媒から分離され得る。これらの固体のウェットケーキが、ふるい分けフィルターまたは遠心分離機などの分離装置を用いて形成され得る。固体のふるい分けされたケーキが、含水イソブタノールを用いて置換洗浄されて、湿潤固体中に保持された脂肪酸エステルが除去され得る。あるいは、固体の遠心分離されたケーキが、含水イソブタノール中で再パルプ化され、湿潤固体中に保持された脂肪酸エステルの除去を行うために再度分離され得る。固体抽出のこの実施形態の例が、実施例 6 3 に記載されている。

【0148】

さらなる実施形態において、副生成物（または副産物）が、発酵プロセスに使用されるマッシュから得られる。例えば、トウモロコシ油は、マッシュから分離され得、このトウモロコシ油は、トリグリセリド、遊離脂肪酸、ジグリセリド、モノグリセリド、およびリン脂質（例えば、実施例 6 6 を参照）を含有し得る。トウモロコシ油は、様々な率で、他の副生成物（または副産物）に任意に加えられてもよく、したがって、例えば、得られる副生成物中のトリグリセリドの量を変化させる能力を生み出す。このように、得られる副生成物の脂肪含量は、例えば、高脂肪製品と比較して乳牛の必要性によく適合するであろうより低脂肪で高タンパク質の動物飼料が得られるように制御され得る。

【0149】

一実施形態において、マッシュから分離された粗トウモロコシ油は、消費者用途向けの食用油へとさらに処理されてもよく、またはその高いトリグリセリド含量により代謝エネルギーの優れた供給源となり得るため、動物飼料の成分としても使用され得る。別の実施形態において、この粗トウモロコシ油は、バイオディーゼルまたは再生可能ディーゼルの原料としても使用され得る。

【0150】

一実施形態において、抽出剤副生成物は、動物飼料副生成物の成分として、全てまたは部分的に使用されてもよく、またはバイオディーゼルまたは再生可能ディーゼルの原料として使用され得る。

【0151】

さらなる実施形態において、固体は、マッシュから分離されてもよく、トリグリセリドおよび遊離脂肪酸を含み得る。これらの固体（または流れ）は、動物飼料として使用されてもよく、遠心分離からの排出としてまたは乾燥後のいずれかで回収される。固体（またはウェットケーキ）は、利用可能なリジンおよびバイパスまたは第一胃非分解性タンパク質の含量が高いため、反すう動物（例えば、乳牛）の飼料として特に適し得る。例えば、これらの固体は、高タンパク質、低脂肪の飼料に特に有用であり得る。別の実施形態において、これらの固体は、基剤として使用されてもよく、すなわち、シロップなどの他の副生成物が、動物飼料として使用され得る生成物を形成するためにこの固体に加えられてもよい。別の実施形態において、様々な量の他の副生成物が、得られる生成物の特性が特定の動物種の必要性を満たすように調整するために固体に加えられてもよい。

【0152】

実施例 6 2 に記載される全蒸留廃液から分離される固体の組成物は、例えば、粗タンパク質、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。一実施形態において、この組成物（または副生成物）は、動物飼料として湿潤または乾燥した状態で使用されてもよく、その場合、例えば、高タンパク質（例えば、高リジン）、低脂肪、および高い繊維含量が所望される。別の実施形態において、より高脂肪、低繊維の動物飼料が所望される場合、例えば、別の副生成物流から、脂肪がこの組成物に加えられてもよい。一実施形態において、このより高脂肪、低繊維の動物飼料は、ブタまたは家禽に使用され得る。さらなる実施形態において、凝縮蒸留可溶物（Condensed Distillers Soluble）（CDS）（例えば、実施例 6 6 を参照）の非水性組成物は、例えば、タンパク質、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルならびに塩および炭水化物などの他の溶解および懸濁固体を含み得る。この CDS 組成物は、例えば、動物飼料として湿潤または乾燥した状態で使用されてもよく、その場合、高タンパク質、低脂肪、高無機塩の飼料成分が所望される。一実施形態において、この組成物は、乳牛の飼料の成分として使用

されてもよい。

【0153】

別の実施形態において、発酵プロセスからの油が、蒸発によって回収され得る。この非水性組成物は、脂肪酸イソブチルエステルおよび脂肪酸（例えば、実施例66を参照）を含んでいてもよく、この組成物（または流れ）は、イソブタノールおよび脂肪酸を回収するために加水分解装置に供給され得る。さらなる実施形態において、この流れは、バイオディーゼル生成の原料として使用され得る。

【0154】

発酵プロセスによるアルコール（例えば、ブタノール）の生成によって生成される様々な流れは、いくつかの副産物を生成するために多くの方法で組み合わせられ得る。例えば、マッシュからの粗トウモロコシを用いて、抽出剤として用いられる脂肪酸を生成し、脂質が、他の目的のために蒸発器によって抽出される場合、残りの流れが、組み合わせられ、粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルを含む副産物組成物を生成するように処理され得る。一実施形態において、この組成物は、少なくとも約20～35重量%の粗タンパク質、少なくとも約1～20重量%の粗脂肪、少なくとも約0～5重量%のトリグリセリド、少なくとも約4～10重量%の脂肪酸、および少なくとも約2～6重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。特定の一実施形態において、副産物組成物は、約25重量%の粗タンパク質、約10重量%の粗脂肪、約0.5重量%のトリグリセリド、約6重量%の脂肪酸、および約4重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。

【0155】

別の実施形態において、脂質は、蒸発器によって抽出され、脂肪酸は、他の目的のために使用され、マッシュからの粗トウモロコシの約50重量%および残りの流れが、組み合わせられ、処理され、得られる副産物組成物は、粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。一実施形態において、この組成物は、少なくとも約25～31重量%の粗タンパク質、少なくとも約6～10重量%の粗脂肪、少なくとも約4～8重量%のトリグリセリド、少なくとも約0～2重量%の脂肪酸、および少なくとも約1～3重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。特定の一実施形態において、副産物組成物は、約28重量%の粗タンパク質、約8重量%の粗脂肪、約6重量%のトリグリセリド、約0.7重量%の脂肪酸、および約1重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。

【0156】

別の実施形態において、全蒸留廃液から分離される固体およびマッシュから抽出されるトウモロコシ油の50重量%が、組み合わせられ、得られる副産物組成物は、粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、脂肪酸イソブチルエステル、リジン、中性デタージェント繊維（NDF）、および酸性デタージェント繊維（ADF）を含み得る。一実施形態において、この組成物は、少なくとも約26～34重量%の粗タンパク質、少なくとも約15～25重量%の粗脂肪、少なくとも約12～20重量%のトリグリセリド、少なくとも約1～2重量%の脂肪酸、少なくとも約2～4重量%の脂肪酸イソブチルエステル、少なくとも約1～2重量%のリジン、少なくとも約11～23重量%のNDF、および少なくとも約5～11重量%のADFを含み得る。特定の一実施形態において、副産物組成物は、約29重量%の粗タンパク質、約21重量%の粗脂肪、約16重量%のトリグリセリド、約1重量%の脂肪酸、約3重量%の脂肪酸イソブチルエステル、約1重量%のリジン、約17重量%のNDF、および約8重量%のADFを含み得る。この副産物組成物の高脂肪、高トリグリセリド、および高リジン含量およびより低い繊維含量は、ブタおよび家禽の飼料として望ましいことがある。

【0157】

上述したように、発酵プロセスによるアルコール（例えば、ブタノール）の生成によって生成される様々な流れは、粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルを含む副産物組成物を生成するために多くの方法で組み合わせられ

得る。例えば、少なくとも約 6 % の粗脂肪および少なくとも約 28 % の粗タンパク質を含む組成物が、乳畜の動物飼料製品として用いられ得る。少なくとも約 6 % の粗脂肪および少なくとも約 26 % の粗タンパク質を含む組成物が、フィードロット牛の動物飼料製品として用いられ得る一方、少なくとも約 1 % の粗脂肪および少なくとも約 27 % の粗タンパク質を含む組成物が、越冬牛の動物飼料製品として用いられ得る。少なくとも約 13 % の粗脂肪および少なくとも約 27 % の粗タンパク質を含む組成物が、家禽の動物飼料製品として用いられ得る。少なくとも約 18 % の粗脂肪および少なくとも約 22 % の粗タンパク質を含む組成物が、単胃動物の動物飼料製品として用いられ得る。したがって、様々な流れは、特定の動物種向けに飼料製品をカスタマイズするように組み合わせられ得る。

【0158】

一実施形態において、発酵プロセスによるアルコール（例えば、ブタノール）の生成によって生成される 1 つ以上の流れが、バイオディーゼルなどの燃料源として使用され得る。少なくとも約 90 % の C O F A を含む組成物を生成するために多くの方法で組み合わせられ得る。

【0159】

本発明の方法の一実施形態の例として、粉碎された穀類（例えば、ハンマーミルによって処理されたトウモロコシ）および 1 種以上の酵素が組み合わせられて、スラリー化された穀類が生成される。このスラリー化された穀類は、調理され、液化され、任意にフラッシュ蒸気でフラッシュされて、調理されたマッシュが得られる。次に、調理されたマッシュはろ過されて、懸濁固体が除去され、ウェットケーキおよびろ液が生成される。ろ過は、遠心分離、ふるい分け、または真空ろ過などのいくつかの方法によって行うことができ、このろ過工程は、少なくとも約 80 % ～少なくとも約 99 % の懸濁固体をマッシュから除去し得る。

【0160】

ウェットケーキは、水を用いて再スラリー化され、再ろ過されて、さらなるでんぷんが除去され、洗浄されたろ過ケーキが生成される。再スラリー化プロセスは、何回か、例えば、1 ～ 5 回繰り返され得る。ウェットケーキを再スラリー化するのに使用される水は、発酵プロセス中に生成される再利用水であってもよい。再スラリー化／再ろ過プロセスによって生成されるろ液は、最初の混合工程に戻されて、粉碎された穀類とともにスラリーが形成され得る。ろ液は、混合工程の前に加熱または冷却され得る。

【0161】

洗浄されたろ過ケーキは、生成プロセスの際にいくつかの段階でビールを用いて再スラリー化され得る。例えば、洗浄されたろ過ケーキは、発酵装置の後、プレフラッシュ塔の前、または蒸留器の穀類乾燥器への供給点において、ビールを用いて再スラリー化され得る。洗浄されたろ過ケーキは、他の副生成物と別々に乾燥されてもよく、または D D G S または動物飼料製品の生成のためのウェットケーキとして直接使用されてもよい。

【0162】

最初の混合工程の結果として生成されるろ液は、本明細書に記載されるようにさらに処理され得る。例えば、ろ液は、蒸気またはプロセス間熱交換（process to process heat exchange）を用いて加熱され得る。糖化酵素が、ろ液に加えられてもよく、ろ液の溶解されたでんぷんは、部分的にまたは完全に糖化され得る。糖化されたろ液は、プロセス間交換、冷却水による交換、または冷水による交換などのいくつかの手段によって冷却され得る。

【0163】

次に、冷却されたろ液は、発酵装置ならびにアルコール生成に適した微生物、例えば、ブタノールを生成することが可能な組み換え酵母に加えられ得る。さらに、アンモニアおよび再利用流も、発酵装置に加えられ得る。このプロセスは、少なくとも 1 つの発酵装置、少なくとも 2 つの発酵装置、少なくとも 3 つの発酵装置、または少なくとも 4 つの発酵装置を含み得る。大気放出（例えば、ブタノール大気放出）を減少させ、生成物の収率を高めるために、発酵中に生成される二酸化炭素がスクラバーに排気され得る。

【0164】

溶媒が、再利用ループを介して発酵装置に加えられてもよく、または発酵装置に直接加えられてもよい。溶媒は、アルコール（例えば、ブタノール）を溶解させるかまたはそれと反応することができ、かつ水への限られた溶解性を有し得る1種以上の有機化合物であり得る。溶媒は、1つの液相としてまたは2つの液相材料として連続して発酵装置から取り出されてもよく、または溶媒は、1つまたは2つの液相材料としてバッチ式に引き抜かれ得る。

【0165】

ビールが脱気され得る。ビールは、例えば、高温マッシュによるプロセス間交換またはプレフラッシュ塔の塔頂物によるプロセス間交換によって、脱気の前に加熱され得る。蒸気が、凝縮器、次に、スクラバーに排気されてもよい。脱気されたビールは、例えば、蒸留領域中の他の流れによるプロセス間熱交換によってさらに加熱され得る。

【0166】

予め加熱されたビールおよび溶媒は、従来の乾式磨砕燃料エタノールプラントのビール塔から改造され得るプレフラッシュ塔に入り得る。この塔は、大気圧より低い圧力で運転され、一連の蒸発器からまたはマッシュ調理工程から取り出された水蒸気によって駆動され得る。プレフラッシュ塔の塔頂物は、冷却水と、プレフラッシュ塔原料による熱交換を含むプロセス間熱交換とのいくつかの組み合わせによる熱交換によって凝縮され得る。液体凝縮物は、アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）に送られ得る。

【0167】

プレフラッシュ塔の塔底物は、溶媒デカンターに進められ得る。プレフラッシュ塔の塔底物は、遊離アルコール（例えば、ブタノール）を実質的に取り除かれ得る。デカンターは、スチルウェル（still well）、遠心分離機、またはハイドロクロンであり得る。水が、このデカンター中の溶媒相から実質的に分離され、水相が生成される。懸濁され、溶解された固体を含む水相は、遠心分離されて、ウェットケーキおよび希薄な蒸留廃液（thin stillage）が生成され得る。ウェットケーキは、他の流れと組み合わせられ、乾燥されて、DDGSが生成され得、それは、DDGSを生成する他の流れと別個に、乾燥され、販売され得るか、またはそれはウェットケーキとして販売され得る。水相は、上記のろ過ケーキを再スラリー化するために部分的に使用される逆流（back set）を提供するために分割され得る。分割は、希薄な蒸留廃液も提供し、これは、さらなる処理のために蒸発器に注入され得る。

【0168】

溶媒デカンター中で生成される有機相は、アルコール（例えば、ブタノール）のエステルであり得る。溶媒は、加水分解されて、反応性溶媒が再生され、さらなるアルコール（例えば、ブタノール）が回収され得る。あるいは、有機相は、ろ過され、製品として販売され得る。加水分解は、熱によって推進され、均一触媒によるか、または不均一触媒により得る。加水分解はまた、酵素反応によって起こり得る。このプロセスへの熱注入は、加熱炉、高温油、電氣的熱注入、または高圧蒸気であり得る。加水分解を推進するために加えられる水は、再利用された水流、新鮮な水、または蒸気に由来し得る。

【0169】

冷却され、加水分解された溶媒は、大気圧より低い圧力の溶媒塔に注入されてもよく、ここで、溶媒は、蒸気によってアルコール（例えば、ブタノール）を実質的に取り除かれ得る。この蒸気は、蒸発器からの水蒸気であってもよく、マッシュプロセスのフラッシュ工程からの蒸気であってもよく、またはボイラーからの蒸気であってもよい（例えば、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2009/0171129号明細書を参照）。従来の乾式磨砕エタノールプラントからの整流塔が、溶媒塔として適し得る。整流塔は、溶媒塔として働くように改造され得る。溶媒塔の塔底物は、例えば、冷却水またはプロセス間熱交換によって冷却され得る。冷却された塔底物は、残留水を除去するためにデカントされてもよく、この水は、このプロセスを含む他の工程に再利用されてもよく

、またはマッシュ工程に再利用されてもよい。

【0170】

溶媒塔の塔頂物は、冷却水による交換によってまたはプロセス間熱交換によって冷却されてもよく、凝縮物が、プレフラッシュ塔の塔頂物と共用され得る排気されたアルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）に送られ得る。スクラバー塔底物および脱気工程からの凝縮物を含む、他の混合される水およびアルコール（例えば、ブタノール）流が、このデカンターに加えられてもよい。二酸化炭素を含む排気が、水スクラバーに送られてもよい。このデカンターの水層はまた、溶媒塔に供給されてもよく、または小型の専用の蒸留塔中でアルコール（例えば、ブタノール）を取り除かれ得る。水層は、プレフラッシュ塔の塔頂物、溶媒塔の塔頂物、または溶媒塔の塔底物によるプロセス間交換によって予め加熱され得る。この専用の塔は、従来の乾式磨砕燃料エタノールプロセスのサイドストリッパーから改造され得る。

10

【0171】

アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）の有機層は、アルコール（例えば、ブタノール）塔に注入され得る。この塔は、過圧塔であってもよく、リボイラー内の蒸気凝縮によって駆動され得る。塔を運転するためのエネルギー需要を減少させるために、塔への原料がプロセス間熱交換によって加熱され得る。このプロセス間熱交換器は、プレフラッシュ塔の分縮器、溶媒塔の分縮器、加水分解装置の生成物、蒸発器からの水蒸気、またはブタノール塔の塔底物を含み得る。アルコール（例えば、ブタノール）塔の蒸気の凝縮物は、冷却されてもよく、アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）に戻されてもよい。アルコール（例えば、ブタノール）塔の塔底物は、アルコール（例えば、ブタノール）塔原料による交換を含むプロセス間熱交換によって冷却されてもよく、冷却水によってさらに冷却され、ろ過され、生成物アルコール（例えば、ブタノール）として販売され得る。

20

【0172】

上述されるプレフラッシュ塔の塔底物から生成される希薄な蒸留廃液は、多重効用蒸発器に送られ得る。この蒸発器は、2つ、3つ、またはそれ以上の段階を有し得る。蒸発器は、燃料エタノールプラントの従来の設計と同様の2つの効用部による4つの本体の構成を有してもよく、3つの効用部による3つの本体を有してもよく、または他の構成を有してもよい。希薄な蒸留廃液は、複数の効用部のいずれかに入り得る。第1の効用部本体の少なくとも1つが、過圧アルコール（例えば、ブタノール）塔からの蒸気によって加熱され得る。蒸気は、最も圧力の低い効用部から取り出されて、水蒸気の形態の熱が、大気圧より低い圧力のプレフラッシュ塔および溶媒塔に与えられ得る。蒸発器からのシロップが、蒸留器の穀類乾燥器に加えられてもよい。

30

【0173】

発酵装置、脱気装置（degasser）、アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）および他の供給源からの二酸化炭素放出は、水スクラバーに送られ得る。このスクラバーの上部に供給される水は、新鮮な補給水であってもよく、または再利用水であってもよい。再利用水は、揮発性有機化合物を除去するために処理（例えば、生物学的に消化）され、急冷され得る。スクラバーの塔底物は、アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）、溶媒塔に送られてもよく、または他の再利用水とともに使用されて、上記のウェットケーキが再スラリー化されてもよい。蒸発器からの凝縮物は、嫌気性の生物学的消化または他のプロセスによって処理されて、ろ過ケーキを再スラリー化するために再利用する前に水が精製され得る。

40

【0174】

トウモロコシが、粉碎された穀類の供給源として使用される場合、トウモロコシ油は、いくつかの点のいずれかにおいてプロセス流から分離され得る。例えば、遠心分離機が、調理されたマッシュのろ過の後にトウモロコシ油流を生成するように運転されてもよく、またはプレフラッシュ塔水相遠心分離機が、トウモロコシ油流を生成するように運転されてもよい。最終的なシロップのための中間の濃縮シロップが遠心分離されて、トウモロコ

50

シ油流が生成され得る。

【0175】

本発明の方法の一実施形態の別の例において、発酵装置から排出される材料は、遠心分離機、沈降機、ハイドロサイクロンなど、およびそれらの組合せなどの装置を含む分離システムにおいて処理されて、直接またはいくらかの再調整の後に次の発酵バッチにおける再度の使用のために再利用され得る濃縮された形態の生酵母が回収され得る。この分離システムは、発酵から生成される脂肪酸エステル（例えばイソブチル脂肪酸エステル）およびアルコール（例えば、イソブタノール）を含む有機流ならびにわずかな微量レベルの不混和性有機物を含む水流も生成し得る。この水流は、液化されたマッシュから分離され、洗浄された低でんぷん固体を再パルプ化し、注入するために、アルコール（例えば、イソブタノール）含有物を取り除く前または後に使用され得る。これには、本来であれば、液化領域から穀類乾燥およびシロップ混合領域へとこれらの固体を移動するための長いベルトで駆動される搬送システムであり得るものを回避するという利点がある。さらに、アルコール（例えば、イソブタノール）が取り除かれた後に得られるこの全蒸留廃液は、既存のまたは新規な分離装置を用いて、希薄な蒸留廃液とウェットケーキ画分とに分離される必要があり、この希薄な蒸留廃液は、発酵性マッシュの新しいバッチを調製するために調理水と組み合わせるために戻る逆流を部分的に形成することになる。この実施形態の別の利点は、液化されたマッシュから分離される固体の水分中に保持された任意の残留溶解でんぷんの一部が捕捉され、この逆流を通して回収され得ることである。あるいは、固体流に含まれる酵母は、生育不能とみなされ、水流に再分配され得、この組み合わせられた流れは、発酵から残っているあらゆるアルコール（例えば、ブタノール）含有物を蒸留によって取り除かれる。生育不能の有機物は、繁殖（propagation）プロセスにおける栄養として使用するためにさらに分離され得る。

【0176】

別の実施形態において、多相材料が、プレフラッシュ塔の塔底を出て、上述したように分離システムにおいて処理され得る。濃縮された固体は、水流に再分配され得、この組み合わせられた流れは、液化されたマッシュから分離され、洗浄された低でんぷん固体を再パルプ化し、注入するのに使用され得る。

【0177】

上記のプロセスならびに本明細書に記載される他のプロセスは、Aspenモデル化などの計算機モデル化を用いて実証され得る（例えば、米国特許第7,666,282号明細書を参照）。例えば、市販のモデル化ソフトウェアAspen Plus（登録商標）（Aspen Technology, Inc., Burlington, MA）は、統合されたブタノール発酵、精製、および水管理プロセスのためのAspenモデルを作り出すために、American Institute of Chemical Engineers, Inc.（New York, NY）から入手可能なDIPPRなどの物理的特性データベースとともに使用され得る。このプロセスモデル化は、多くの基礎工学的計算、例えば、物質収支およびエネルギー収支、気／液平衡、および反応速度計算を行うことができる。Aspenモデルを生成するために、情報入力、例えば、実験データ、含水量および原料の組成、マッシュの調理およびフラッシュのための温度、糖化条件（例えば、酵素原料、でんぷん転化率、温度、圧力）、発酵条件（例えば、微生物原料、グルコース転化率、温度、圧力）、脱気条件、溶媒塔、プレフラッシュ塔、凝縮器、蒸発器、遠心分離機などを含み得る。

【0178】

本発明は、バイオマスの処理生産性および費用対効果を高めつつ、発酵によって生成物アルコールなどの発酵生成物を生成するためのシステムおよび方法を提供する。ある実施形態において、生成物アルコールはブタノールである。原料は、液化されて、原料スラリーを生成することができ、ここで、原料スラリーは、可溶性糖および非溶解固体を含む。原料スラリーが、発酵装置に直接供給される場合、非溶解固体は、発酵装置からの、ブタノールなどの生成物アルコールの効率的な除去および回収を妨げ得る。特に、液液抽出が

、発酵ブロスからブタノールを抽出するのに用いられる場合、非溶解粒子の存在は、抽出剤と発酵ブロスとの接触を妨げることによって、抽出剤へのブタノールの物質移動速度を低下させること；発酵装置中でエマルジョンを生成し、それによって、抽出剤および発酵ブロスの良好な相分離を妨げること；抽出剤およびブタノールの少なくとも一部が、DDGSとして最終的に除去される固体に「捕捉される」ため、抽出剤を回収し、再利用する効率を低下させること；発酵装置中の体積を占める固体があるため、また、発酵ブロスからの抽出剤の離脱がより遅いため、発酵装置体積効率がより低いこと；およびトウモロコシ油による汚染によって抽出剤の寿命が短縮されることを含むがこれらに限定されないシステムの非効率を招き得る。これらの影響は全て、資本コストおよび運転コストを増加させる。さらに、DDGSに「捕捉される」抽出剤は、DDGS値および動物飼料として販売するための必要条件から外れ得る。したがって、これらの問題を回避し、および／または最小限に抑えるために、非溶解粒子（または固体）の少なくとも一部が、原料スラリー中に存在する糖を発酵装置に加える前に原料スラリーから除去される。ブタノール生成の抽出活性および効率が、非溶解粒子が除去されていない水溶液を含有する発酵ブロスにおいて行われる抽出と比べて、非溶解粒子が除去された水溶液を含有する発酵ブロスにおいて抽出が行われる場合に高められる。

10

【0179】

非溶解固体の存在のない抽出発酵は、発酵ブロスから抽出剤への生成物アルコールのより高い物質移動速度、発酵装置の内部または外部の発酵からの抽出剤のより良好な相分離、およびより高い抽出剤液滴上昇速度の結果としての抽出剤のより低い保持（hold up）をもたらす得る。また、例えば、発酵の際に発酵ブロス中に保持される抽出剤液滴は、発酵ブロスからより速く、より完全に離脱し、それによって、発酵ブロス中の遊離抽出剤が少なくなり、プロセス中に喪失される抽出剤の量を減少させることができる。さらに、例えば、微生物は再利用することができ、例えば、ビール塔および／または全蒸留廃液遠心分離機の一部または全てなどの、下流の処理におけるさらなる設備を省略することができる。さらに、例えば、抽出剤がDDGS中で喪失される可能性がなくなる。また、例えば、微生物を再利用する能力は、生成物アルコール生成の全体速度を上げ、全力価要件を低下させ、および／または水性力価要件を低下させ、それによって、より健康な微生物およびより高い生成速度をもたらすことができる。さらに、例えば、資本コストを削減するために発酵装置における攪拌器を省略し；保持される抽出剤が最小限に抑えられ、非溶解固体が存在しないために体積がより効率的に使用されるため、発酵装置の生産性を向上し；および／または未建設のプラントにおいて連続発酵またはより小型の発酵装置を使用することが可能であり得る。

20

30

【0180】

向上した抽出効率の例としては、例えば、安定化した分配係数、向上した（例えば、より速いまたはより完全な）相分離、向上した液液物質移動係数、より低い力価での運転、向上したプロセス流再利用性、向上した発酵体積効率、向上した原料（例えば、トウモロコシ）負荷供給、微生物（例えば、組み換え微生物）の向上したブタノール力価耐性、水の再利用、エネルギーの減少、抽出剤の増加した再利用、および／または微生物の再利用が挙げられる。

40

【0181】

例えば、発酵装置中で固体が占める体積が減少される。したがって、発酵に利用可能な発酵装置の有効体積が増加され得る。ある実施形態において、発酵に利用可能な発酵装置の体積は、少なくとも約10%だけ増加される。

【0182】

例えば、分配係数の安定化があり得る。発酵装置中のトウモロコシ油が、発酵の前に原料スラリーから固体を除去することによって減少され得るため、抽出剤は、より少ないトウモロコシ油に曝される。トウモロコシ油は、抽出剤と組み合わせられて、十分な量で存在する場合に分配係数を低下させ得る。したがって、発酵装置に導入されるトウモロコシ油の減少により、発酵装置における抽出剤相の分配係数がより安定する。ある実施形態にお

50

いて、分配係数は、10回の発酵サイクルにわたって約10%未満だけ減少される。

【0183】

例えば、発酵プロセスから抽出剤への生成物アルコールのより高い物質移動速度（例えば、より高い物質移動係数の形態における）があり、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られるため、抽出剤によるブタノールの抽出効率の向上があり得る。ある実施形態において、物質移動係数は、少なくとも2倍増加される（実施例4および5を参照）。

【0184】

さらに、発酵プロセスと抽出剤との間の相分離の向上があり得、これは、放出物の形成の可能性を減少させ、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られる。例えば、相分離は、より速く行うことができ、またはより完全であり得る。ある実施形態において、感知できる相分離が24時間予め観察されなかった場合に相分離が行われ得る。ある実施形態において、相分離は、固体が除去されなかった場合の相分離と比較して、少なくとも約2倍速く、少なくとも約5倍速く、または少なくとも約10倍速く行われる（実施例6および7を参照）。

【0185】

さらに、抽出剤の回収および再利用の増加があり得る。抽出剤は、DDGSとして最終的に除去され得る固体中に「捕捉」されず、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られる（実施例8および9を参照）。また、トウモロコシ油による抽出剤の希釈が少なくなり、抽出剤の劣化が少なくなり得る（実施例10を参照）。

【0186】

また、抽出剤の流量が減少され得るため、運転コストが低下し、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られる。

【0187】

さらにまた、抽出剤の保持が、抽出剤液滴がより高い速度で上昇する結果として減少され、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られる。発酵装置中の非溶解固体の量の減少は、生成物アルコール生成の向上した効率ももたらす。

【0188】

さらに、非溶解固体を懸濁させる必要がもはやないため、攪拌器を、発酵装置から除去することができ、それによって、資本コストおよびエネルギーを減少させ、生成物アルコール生成の効率を高める。

【0189】

図1～5は、アルコールエステルが原位置で生成され、発酵培地から抽出され、反応されて生成物アルコールが回収される発酵プロセスを含む方法およびシステムの様々な非限定的な実施形態を提供する。図1～5は、生成物アルコールとともにエステル化され得ると同時にISPR抽出剤として働き得るカルボン酸を用いた方法およびシステムの様々な非限定的な実施形態も提供する。図1～5は、原料中の脂質を、生成物アルコールとともにエステル化され得ると同時にISPR抽出剤として働き得るカルボン酸に転化する方法およびシステムの様々な非限定的な実施形態も提供する。

【0190】

図1～5を参照して記載される上述した実施形態のいずれかを含むある実施形態において、発酵槽30中の発酵プロセスは、少なくとも1つの発酵性炭素源からの生合成経路を介してブタノールを生成するように遺伝子組み換え（すなわち、遺伝子操作）された少なくとも1種の組み換え微生物32を含む。特に、組み換え微生物は、好適な炭素基質を含有する発酵プロセス中で増殖され得る。さらなる炭素基質としては、以下に限定はされないが、フルクトースおよびガラクターゼなどの単糖類；ラクトース、マルトース、またはスクロースなどのオリゴ糖；でんぷんまたはセルロースなどの多糖類；あるいはそれらの混合物、ならびに乳清透過液、コーンステープリカー、サトウダイコン糖蜜、および大麦麦芽などの再生可能な原料からの精製されていない混合物が挙げられる。他の炭素基質としては、エタノール、乳酸塩、コハク酸塩、またはグリセロールが挙げられる。

【0191】

さらに、炭素基質は、主要な生化学中間体への代謝的転化が示された、二酸化炭素またはメタノールなどの一炭素基質でもあり得る。一炭素基質および二炭素基質に加えて、メチロトロフ生物は、メチルアミン、グルコサミン、および代謝活性のための様々なアミノ酸などのいくつかの他の炭素含有化合物を用いることも知られている。例えば、メチロトロフ酵母は、メチルアミンからの炭素を用いて、トレハロースまたはグリセロールを形成することが知られている (Bellion, et al., Microb. Growth C1 Compd., [Int. Symp.], 7th (1993), 415-32, Editor(s): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, UK)。同様に、カンジダ属 (*Candida*) の様々な種が、アラニンまたはオレイン酸を代謝する (Sulter, et al., Arch. Microbiol. 153: 485-489, 1990)。したがって、本発明に用いられる炭素の供給源が、多種多様な炭素含有基質を包含してもよく、生物の選択のみによって限定され则认为られる。

【0192】

上記の炭素基質およびそれらの混合物の全てが好適であると考えられるが、ある実施形態において、炭素基質は、グルコース、フルクトース、およびスクロース、あるいはこれらと、C5糖類を使用するように改変された酵母細胞のためのキシロースおよび／またはアラビノースなどのC5糖類との混合物である。スクロースは、サトウキビ、サトウダイコン、キャッサバ、スイートソルガム、およびそれらの混合物などの再生可能な糖源に由来し得る。グルコースおよびデキストロースは、トウモロコシ、小麦、ライ麦、大麦、オート麦、およびそれらの混合物などの穀類を含むでんぷんベースの原料の糖化によって、再生可能な穀類源から誘導され得る。さらに、発酵性糖は、例えば、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2007/0031918 A1号明細書に記載されるような、前処理および糖化のプロセスによって、再生可能なセルロース系またはリグノセルロース系バイオマスから誘導され得る。適切な炭素源（水流22からの）に加えて、発酵プロセスは、培養物の成長および生成物アルコールの生成のための酵素経路の促進に適した、当業者に公知の、好適な無機物、塩、補因子、緩衝液および他の成分を含有しなければならない。

【0193】

上記の説明および実施例から、当業者は、本発明の本質的な特徴を確認することができ、本発明から逸脱せずに様々な用途および条件に適合させるように、本発明の様々な変形および変更を行うことができる。例えば、ある実施形態において、本発明に係るアルコールのエステル化および抽出は、発酵前、すなわち、発酵槽30中の発酵の前の微生物32のシード培養中に用いられ得る。当該技術分野において公知であるように、通常、酵母などの微生物32は、採取され、発酵槽30に接種される前に、所望の細胞濃度になるようにシード培地から増殖され得る。

【0194】

炭素源原料は、酵母生成などの微生物生成における重要なコスト要因であるため、糖類に対するバイオマス収量は、重要な最適化基準である。アルコール発酵からのATP収量は、呼吸による糖の異化からのATP収量よりはるかに少ないため、アルコール発酵の発生は、バイオマス収量に悪影響を与え、酵母生成（すなわち、シード培養）の際には回避しようとしてされている。それにもかかわらず、シード培地中の微生物の培養により、アルコールを含む所定の量の発酵生成物を生成することができる。例えば、*S. cerevisiae*（*S. cerevisiae*）酵母において、比増殖速度（ μ ）および／または好気性培地中の糖濃度が基準値を超える場合は常に、アルコール発酵および呼吸は同時に起こる（例えば、van Hoek, et al., Biotechnol. Bioeng. 68: 517-523, 2000を参照）。高いバイオマス収量を得るために、酵母の増殖は、通常、例えば、シード培養のための流加発酵技術を用いた呼吸条件によって制御される。糖代謝が実質的に呼吸によるものであり得るように、例えば、糖が低い速度で供給され、培

地中の低い糖濃度および糖の低い取り込み率が得られる。これらの条件下で、高いバイオマス収量が得られ、毒性生成物の蓄積が最小限に抑えられ得る。実際には、大規模な流加産業プロセスにおいて、非効率的な混合のために細胞で濃度勾配が生じることがある（例えば、Enfors, et al., J. Biotechnol. 85:175-185, 2001を参照）。発酵副生成物の生成および再吸収（reassimilation）は、実験室規模と比較して大規模な生物反応器において、グルコース当たりのバイオマス収量の減少の理由の1つであり得る。

【0195】

しかしながら、これらの条件で、ブタノール生成酵母を培養する場合、例えば、ブタノールを含む発酵生成物は再吸収されることはなく、高濃度で微生物に対して有毒であり得る培地中に蓄積し得る。生成物の蓄積が、限界細胞増殖抑制濃度を超える（例えば、細胞増殖が、原料によって抑えられ得る増殖より低い）場合、流加制御の喪失が起こり得る。本発明によれば、アルコールのエステル化および抽出を用いて、培地からブタノールを除去すると、非効率的な混合およびブタノールの毒性に関する問題にもかかわらず、流加発酵を進行させることが可能になる。

【0196】

したがって、ある実施形態によれば、シード培地は、触媒42およびカルボン酸28と接触され、生成物アルコールのエステル化によるアルコールエステルの生成および最終的に、大規模な生物反応器におけるグルコース当たりのバイオマス収量の向上につながり得る。さらに、培地中の生成物アルコールの濃度が、アルコールのエステル化によって制御されるため、微生物に対する生成物アルコールの悪影響を最小限に抑えるかまたは回避することができる。ある実施形態において、発酵槽30からのアルコールエステルの抽出および生成物アルコール54の回収に関して上述したのと同じ方法で、アルコールエステルが、シード培地から抽出され、アルコールが、アルコールエステルから回収され得る。ある実施形態において、本発明に係るアルコールのエステル化を用いて、シード培地および発酵培地の両方における生成物アルコールをエステル化することができる。このような実施形態において、概して、発酵培地からアルコールエステル（および遊離生成物アルコール）を回収するだけでなく、シード培養の際に生成されるアルコールエステルも回収する（例えば、繁殖タンクからアルコールエステルおよび／または生成物アルコールを回収する）ことによって、発酵プロセスについて、生成物アルコールのより高い収率が達成され得る。ある実施形態において、本発明に係るアルコールエステル化は、シード培地からのアルコールの除去のために発酵前に用いられ得る一方、生成物アルコールの従来のISPRは、発酵槽30中の発酵の際の生成物アルコールの除去に用いられ得る。

【0197】

したがって、本発明に係るアルコールのエステル化および抽出が、本発明から逸脱せずに、アルコール発酵プロセスの様々な段階で用いられ得ることが明らかであるはずである。

【0198】

本発明の方法によって生成されるアルコール生成物には、例えば、試薬、溶媒、および燃料としてのいくつかの用途がある。権利請求される方法によって生成されるブタノールは、ディーゼルまたはバイオディーゼル燃料、プラスチック産業における原料化学物質、化粧品などの配合製品の成分、および化学中間体として使用され得るエステルの生成に使用される、燃料（例えば、バイオ燃料）、燃料添加剤、アルコールとして直接使用され得る。ブタノールは、塗料、コーティング、ワニス、樹脂、ガム、染料、脂肪、ワックス、樹脂、シェラック、ゴム、およびアルカロイドのための溶媒としても使用され得る。したがって、本発明は、これらの産業用化学物質に対する高い需要を支え得る、ブタノールを含むアルコールを生成するための代替的な方法を提供する。

【0199】

組み換え微生物およびブタノール生合成経路

理論によって制約されるのを望むものではないが、本明細書に記載される方法は、任意

10

20

30

40

50

のアルコール生成微生物、特に、それらの耐性レベルを超える力価でアルコールを生成する組み換え微生物に関連して有用であると考えられる。

【0200】

アルコール生成微生物は、当該技術分野において公知である。例えば、メタン資化性細菌（例えば、メチロサイナス・トリコスポリウム（*Methylosinus trichosporium*））によるメタンの発酵酸化により、メタノールが生成され、メタノール（C₁アルキルアルコール）を、カルボン酸およびメタノールとともにカルボン酸をエステル化することが可能な触媒と接触させることにより、カルボン酸のメタノールエステルが形成される。酵母菌株 CEN. PK113-7D（CBS 8340, the Centraal Buro voor Schimmelculture; van Dijk, et al., *Enzyme Microb. Technol.* 26:706-714, 2000）により、エタノールが生成され得、エタノールを、カルボン酸およびエタノールとともにカルボン酸をエステル化することが可能な触媒と接触させることにより、エチルエステルが形成される（例えば、実施例36を参照）。

【0201】

アルコールを生成する組み換え微生物も、当該技術分野において公知である（例えば、Ohta, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 57:893-900, 1991; Underwood, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1071-1081, 2002; Shen and Liao, *Metab. Eng.* 10:312-320, 2008; Hahnai, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7814-7818, 2007; 米国特許第5,514,583号明細書; 米国特許第5,712,133号明細書; PCT出願公開番号国際公開第1995/028476号パンフレット; Feldmann, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:354-361, 1992; Zhang, et al., *Science* 267:240-243, 1995; 米国特許出願公開第2007/0031918 A1号明細書; 米国特許第7,223,575号明細書; 米国特許第7,741,119号明細書; 米国特許出願公開第2009/0203099 A1号明細書; 米国特許出願公開第2009/0246846 A1号明細書; および PCT出願公開番号国際公開第2010/075241号パンフレット、これらは全て参照により本明細書に援用される）。

【0202】

ブタノールを生成することが可能な好適な組み換え微生物は、当該技術分野において公知であり、ブタノールを生成することが可能な特定の好適な微生物が本明細書に記載される。生合成経路を介してブタノールを生成する組み換え微生物としては、クロストリジウム属（*Clostridium*）、ザイモモナス属（*Zymomonas*）、エシェリキア属（*Escherichia*）、サルモネラ属（*Salmonella*）、セラチア属（*Serratia*）、エルウニア属（*Erwinia*）、クレブシエラ属（*Klebsiella*）、赤痢菌属（*Shigella*）、ロドコッカス属（*Rhodococcus*）、シュードモナス属（*Pseudomonas*）、バチルス属（*Bacillus*）、乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）、エンテロコッカス属（*Enterococcus*）、アルカリゲネス属（*Alcaligenes*）、クレブシエラ属（*Klebsiella*）、パエニバチルス属（*Paenibacillus*）、アルスロバクター属（*Arthrobacter*）、コリネバクテリウム属（*Corynebacterium*）、ブレヴィバクテリウム属（*Brevibacterium*）、シズサッカロマイセス属（*Schizosaccharomyces*）、クルイペロマイセス属（*Kluyveromyces*）、ヤロウイア属（*Yarrowia*）、ピヒア属（*Pichia*）、カンジダ属（*Candida*）、ハンゼヌラ属（*Hansenula*）、イサタケンキア属（*Issatchenkia*）、またはサッカロマイセス属（*Saccharomyces*）のメンバーが挙げられる。一実施形態において、組み換え微生物は、大腸菌（*Escherichia coli*）、ラクトバチルス・プランタルム（*Lactobac*

illus plantarum)、クルイベロマイセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)、クルイベロマイセス・マルシアヌス(Kluyveromyces marxianus)、およびサッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)からなる群から選択され得る。一実施形態において、組み換え微生物は酵母である。一実施形態において、組み換え微生物は、サッカロマイセス属(Saccharomyces)、ジゴサッカロマイセス属(Zygosaccharomyces)、シゾサッカロマイセス属(Schizosaccharomyces)、デッケラ属(Dekkera)、トルロプシス属(Torulopsis)、ブレタノマイセス属(Brettanomyces)、およびカンジダ属(Candida)のいくつかの種から選択されるクラブトリ陽性酵母である。クラブトリ陽性酵母種としては、以下に限定はされないが、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、サッカロマイセス・クルイベリ(Saccharomyces kluyveri)、シゾサッカロマイセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、サッカロマイセス・バイアヌス(Saccharomyces bayanus)、サッカロマイセス・ミカタエ(Saccharomyces mikatae)、サッカロマイセス・パラドキシス(Saccharomyces paradoxus)、ジゴサッカロマイセス・ルーキシイ(Zygosaccharomyces rouxii)、およびカンジダ・グラブラタ(Candida glabrata)が挙げられる。

10

【0203】

20

ある実施形態において、宿主細胞は、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)である。S. セレビシエ(S. cerevisiae)酵母が、当該技術分野において公知であり、米国培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)(Rockville, MD)、Centraalbureau voor Schimmelcultures(CBS) Fungal Biodiversity Centre、LeSaffre、Gert Strand AB、Ferm Solutions、North American Bioproducts、Martrex、およびLallemandを含むがこれらに限定されない様々な供給元から入手可能である。S. セレビシエ(S. cerevisiae)としては、以下に限定はされないが、BY4741、CEN. PK 113-7D、Ethanol Red(登録商標)酵母、Ferm Pro(商標)酵母、Bio-Ferm(登録商標)XR酵母、Gert Strand Prestige Batch Turboアルコール酵母、Gert Strand Pot Distillers酵母、Gert Strand Distillers Turbo酵母、FerMax(商標)Green酵母、FerMax(商標)Gold酵母、Thermosacc(登録商標)酵母、BG-1、PE-2、CAT-1、CBS7959、CBS7960、およびCBS7961が挙げられる。

30

【0204】

微生物による発酵を用いたブタノールの生成、ならびにブタノールを生成する微生物は、例えば、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2009/0305370号明細書に開示されている。ある実施形態において、微生物は、ブタノール生成経路を含む。ある実施形態において、経路の基質→生成物転化を触媒する少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのポリペプチドが、微生物中の異種のポリヌクレオチドによってコードされる。ある実施形態において、経路の基質→生成物転化を触媒する全てのポリペプチドが、微生物中の異種のポリヌクレオチドによってコードされる。ある実施形態において、微生物は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性の減少または消失を含む。ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を実質的に有さない微生物が、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2009/0305363号明細書に記載されている。GPD2などのNAD依存性グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素を実質的に含まない微生物も、この文献に記載されている。

40

50

【0205】

ブタノールの生成に適した生合成経路は、当該技術分野において公知であり、特定の好適な経路が本明細書に記載される。ある実施形態において、ブタノール生合成経路は、宿主細胞に対して異種の少なくとも1つの遺伝子を含む。ある実施形態において、ブタノール生合成経路は、宿主細胞に対して異種の2つ以上の遺伝子を含む。ある実施形態において、ブタノール生合成経路は、生合成経路のあらゆる工程に対応するポリペプチドをコードする異種遺伝子を含む。

【0206】

指定の基質－生成物転化を触媒する能力を有する特定の好適なタンパク質が本明細書に記載され、他の好適なタンパク質が、当該技術分野において提供される。例えば、参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第2008/0261230号明細書、同第2009/0163376号明細書、および同第2010/0197519号明細書は、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼを記載しており；参照により援用される米国特許出願公開第2010/0081154号明細書は、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼを記載しており；アルコールデヒドロゲナーゼが、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2009/0269823号明細書に記載されている。

【0207】

多くのレベルの配列同一性が、他の種からポリペプチドを同定するのに有用であり、このようなポリペプチドが、同じかまたは同様の機能または活性を有し、本明細書に記載される組み換え微生物に使用するのに適していることが、当業者によってよく理解される。パーセント同一性の有用な例としては、以下に限定はされないが、75%、80%、85%、90%、または95%が挙げられ、あるいは75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%などの、75%～100%の任意の整数パーセンテージが、本発明を説明する際に有用であり得る。

【0208】

1－ブタノール生合成経路

1－ブタノールならびに使用され得る好適なポリペプチドおよびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの生成のための生合成経路が、参照により本明細書に援用されるDonaldson, et al. による米国特許出願公開第2008/0182308 A1号明細書に記載されている。この生合成経路は、以下の基質－生成物転化を含む：

a) 例えば、アセチル－CoAアセチルトランスフェラーゼによって触媒され得る、アセチル－CoAからアセトアセチル－CoA；

b) 例えば、3－ヒドロキシブチリル－CoAデヒドロゲナーゼによって触媒され得る、アセトアセチル－CoAから3－ヒドロキシブチリル－CoA；

c) 例えば、クロトナーゼによって触媒され得る、3－ヒドロキシブチリル－CoAからクロトニル－CoA；

d) 例えば、ブチリル－CoAデヒドロゲナーゼによって触媒され得る、クロトニル－CoAからブチリル－CoA；

e) 例えば、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒され得る、ブチリル－CoAからブチルアルデヒド；および

f) 例えば、1－ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒され得る、ブチルアルデヒドから1－ブタノール。

【0209】

ある実施形態において、1－ブタノール生合成経路は、酵母細胞に対して異種の、少なくとも1つの遺伝子、少なくとも2つの遺伝子、少なくとも3つの遺伝子、少なくとも4つの遺伝子、または少なくとも5つの遺伝子を含む。ある実施形態において、組み換え宿主細胞は、1－ブタノール生合成経路の各基質－生成物転化のための異種遺伝子を含む。

【0210】

2-ブタノール生合成経路

2-ブタノールならびに使用され得る好適なポリペプチドおよびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの生成のための生合成経路が、全て参照により本明細書に援用される、Donaldson, et al. による米国特許出願公開第2007/0259410 A1号明細書および同第2007/0292927 A1号明細書、およびPCT出願公開番号国際公開第2007/130521号明細書に記載されている。1つの2-ブタノール生合成経路が、以下の基質-生成物転化を含む：

a) 例えば、アセト乳酸シンターゼによって触媒され得る、ピルビン酸塩から α -アセト乳酸；

b) 例えば、アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒され得る、 α -アセト乳酸からアセトイン；

c) 例えば、ブタンジオールデヒドロゲナーゼによって触媒され得る、アセトインから2, 3-ブタンジオール；

d) 例えば、ブタンジオールデヒドラターゼによって触媒され得る、2, 3-ブタンジオールから2-ブタノン；および

e) 例えば、2-ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒され得る、2-ブタノンから2-ブタノール。

【0211】

ある実施形態において、2-ブタノール生合成経路は、酵母細胞に対して異種の、少なくとも1つの遺伝子、少なくとも2つの遺伝子、少なくとも3つの遺伝子、または少なくとも4つの遺伝子を含む。ある実施形態において、組み換え宿主細胞は、2-ブタノール生合成経路の各基質-生成物転化のための異種遺伝子を含む。

【0212】

イソブタノール生合成経路

イソブタノールならびに使用され得る好適なポリペプチドおよびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの生成のための生合成経路が、参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第2007/0092957 A1号明細書およびPCT出願公開番号国際公開第2007/050671号明細書に記載されている。1つのイソブタノール生合成経路が、以下の基質-生成物転化を含む：

a) 例えば、アセト乳酸シンターゼによって触媒され得る、ピルビン酸塩からアセト乳酸塩；

b) 例えば、アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼによって触媒され得る、アセト乳酸塩から2, 3-ジヒドロキシイソ吉草酸；

c) 例えば、アセトヒドロキシ酸デヒドラターゼによって触媒され得る、2, 3-ジヒドロキシイソ吉草酸から α -ケトイソ吉草酸；

d) 例えば、分枝鎖状ケト酸デカルボキシラーゼによって触媒され得る、 α -ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒド；および

e) 例えば、分枝鎖状アルコールデヒドロゲナーゼによって触媒され得る、イソブチルアルデヒドからイソブタノール。

【0213】

イソブタノール生合成経路の基質-生成物転化を触媒する酵素をコードする好適なポリペプチド配列ならびに指定の経路工程に適した酵素に対応するE. C. 番号としては、以下に限定はされないが、表AAおよびBBに記載されるものが挙げられる。所与のE. C. 番号に関連する好適な酵素が、例えば、BRENDAデータベース(<http://www.brenda-enzymes.org/>)によって、当業者に容易に入手される。

【0214】

10

20

30

40

【表 1】

表 AA: ポリペプチドの例

経路工程	酵素	配列番号:
a) ピルビン酸塩からアセト乳酸塩	枯草菌(<i>Bacillus subtilis</i>)alsS (アセト乳酸シンターゼ、「ALS」)	144
b) アセト乳酸塩から 2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸	乳酸連鎖球菌(<i>Lactococcus lactis</i>)ilvC (ケトール酸レダクトイソメラーゼ、「KARI」)	145
c) 2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸から α -ケトイソ吉草酸	ミュータンス連鎖球菌(<i>Streptococcus mutans</i>)ilvD(ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、「DHAD」)	146
d) α -ケトイソ吉草酸から イソブチルアルデヒド	コドン最適化された乳酸連鎖球菌(<i>Lactococcus lactis</i>)kivD(分枝鎖状 α -ケト酸デカルボキシラーゼ)	147
e) イソブチルアルデヒドから イソブタノール	ウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ (「ADH」)	148
e) イソブチルアルデヒドからイソブタノール	アクロモバクター・キシロソキシダンス(<i>Achromobacter xylosoxidans</i>)sadB	149

【0215】

【表 2】

表 BB: E.C.番号

経路工程	E.C.番号:
a) ピルビン酸塩からアセト乳酸塩	2.2.1.6
b) アセト乳酸塩から 2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸	1.1.1.86
c) 2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸から α -ケトイソ吉草酸	4.2.1.9
d) α -ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒド	4.1.1.72 または 4.1.1.1
e) イソブチルアルデヒドからイソブタノール	1.1.1.265、1.1.1.1 または 1.1.1.2

【0216】

工程 a) ～ e) (上記) を含むイソブタノール生合成経路を含む組み換え微生物が本明細書において提供され、ここで、工程 c) を触媒する酵素および工程 e) を触媒する酵素からなる群から選択される酵素の少なくとも一方が、微生物の染色体に組み込まれる異種のポリヌクレオチドによってコードされる。ある実施形態において、工程 c) を触媒する酵素が、微生物の染色体に組み込まれる異種のポリヌクレオチドによってコードされ、かつ工程 e) を触媒する酵素が、微生物の染色体に組み込まれる異種のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0217】

イソブタノール生合成経路などのブタノール生合成経路を含む組み換え微生物に適した

ポリヌクレオチドが本明細書において提供される。このようなポリヌクレオチドは、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に由来する *alsS* 遺伝子のコード領域 (配列番号 1 の nt 位置 457~2172) および乳酸連鎖球菌 (*Lactococcus lactis*) に由来する *ilvC* 遺伝子のコード領域 (配列番号 1 の nt 3634~4656) ならびにいずれかまたは両方を含むプラスミドを含む。ALS の発現のために、酵母 CUP1 プロモーター (配列番号 1 の nt 2~449)、続いて CYC1 ターミネーター (配列番号 1 の nt 2181~2430) から発現される枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に由来する *alsS* 遺伝子のコード領域 (配列番号 1 の nt 位置 457~2172) を有するキメラ遺伝子、および KARI の発現のために、酵母 ILV5 プロモーター (配列番号 1 の 2433~3626)、続いて ILV5 ターミネーター (配列番号 1 の nt 4682~5304) から発現される乳酸連鎖球菌 (*Lactococcus lactis*) に由来する *ilvC* 遺伝子のコード領域 (配列番号 1 の nt 3634~4656) を有するキメラ遺伝子、ならびにいずれかまたは両方のキメラ遺伝子を含むプラスミドも適している。

10

【0218】

好適なポリヌクレオチドは、ミュータンス連鎖球菌 (*Streptococcus mutans*) に由来する *ilvD* 遺伝子のコード領域 (配列番号 2 の nt 位置 3313~4849)、コドン最適化されたウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼのコード領域 (配列番号 2 の nt 6286~7413)、乳酸連鎖球菌 (*Lactococcus lactis*) に由来するコドン最適化された *kivD* 遺伝子のコード領域 (配列番号 2 の nt 9249~10895) ならびにそれらの任意のまたは全てのまたは任意の組合せを含むプラスミドを含む。DHAD の発現のために、*S. cerevisiae* (S. cerevisiae) FBA1 プロモーター (配列番号 2 の nt 2109~3105)、続いて FBA1 ターミネーター (配列番号 2 の nt 4858~5857) から発現されるミュータンス連鎖球菌 (*Streptococcus mutans*) に由来する *ilvD* 遺伝子のコード領域 (配列番号 2 の nt 位置 3313~4849) を有するキメラ遺伝子; ADH の発現のために、*S. cerevisiae* (S. cerevisiae) GPM1 プロモーター (配列番号 2 の nt 7425~8181)、続いて ADH1 ターミネーター (配列番号 2 の nt 5962~6277) から発現されるコドン最適化されたウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼに由来するコード領域 (配列番号 2 の nt 6286~7413) を有するキメラ遺伝子; および *kivD* の発現のために、TDH3 プロモーター (配列番号 2 の nt 10896~11918)、続いて TDH3 ターミネーター (配列番号 2 の nt 8237~9235) から発現される乳酸連鎖球菌 (*Lactococcus lactis*) に由来するコドン最適化された *kivD* 遺伝子のコード領域 (配列番号 2 の nt 9249~10895) を有するキメラ遺伝子ならびにこのようなキメラ遺伝子の任意の、全ての、または任意の組合せを含むプラスミドも適している。さらに、好適なポリヌクレオチドとしては、コード領域および規定されるキメラ遺伝子、ならびにこのようなポリヌクレオチドを含むプラスミドに対して少なくとも約 75% の同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

20

30

【0219】

ある実施形態において、イソブタノール生合成経路は、酵母細胞に対して異種の、少なくとも 1 つの遺伝子、少なくとも 2 つの遺伝子、少なくとも 3 つの遺伝子、または少なくとも 4 つの遺伝子を含む。ある実施形態において、組み換え宿主細胞は、イソブタノール生合成経路の各基質-生成物転化のための異種遺伝子を含む。

40

【0220】

好適な菌株としては、参照により本明細書に引用され、援用される特定の出願ならびに 2010 年 9 月 7 日に出版された米国仮特許出願第 61/380,563 号明細書に記載されるものが挙げられる。実施例に使用されるものを含む特定の好適な菌株の作成が、本明細書において提供される。

【0221】

50

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 株BP1083 (「NGCI-070」; PNY1504) の作成

株BP1064は、CEN. PK 113-7D (CBS 8340; Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, Netherlands) から得られ、以下の遺伝子の欠失を含む: URA3、HIS3、PDC1、PDC5、PDC6、およびGPD2。BP1064を、プラスミドpYZ090 (配列番号1、米国仮特許出願第61/246, 844号明細書に記載される) およびpLH468 (配列番号2) で形質転換して、株NGCI-070 (BP1083、PNY1504) を生成した。

【0222】

標的遺伝子および形質転換体の選択のためのG418耐性マーカーまたはURA3遺伝子のいずれかの上流および下流の相同領域を含むPCR断片による相同的組み換えによって、全コード配列を完全に除去した欠失を作り出した。loxP部位が側面にあるG418耐性マーカーを、Creリコンビナーゼを用いて除去した。URA3遺伝子を相同的組み換えによって除去して、無瘢痕 (scarless) 欠失を作り出し、またはloxP部位が側面にある場合、Creリコンビナーゼを用いて除去した。

【0223】

無瘢痕欠失の手順を、Akada, et al., (Yeast 23:399-405, 2006) から適応させた。一般に、各無瘢痕欠失のためのPCRカセットを、PCRを重複させることによって、4つの断片、A-B-U-Cを組み合わせることによって作製した。PCRカセットは、プロモーター (URA3遺伝子上流の250bp) およびターミネーター (URA3遺伝子下流の150bp) とともに、天然CEN. PK 113-7D URA3遺伝子からなる、選択可能な/対抗選択可能な (counter-selectable) マーカー、URA3 (断片U) を含有していた。それぞれ長さ500bpの断片AおよびCは、標的遺伝子のすぐ上流の500bp (断片A) および標的遺伝子の3' 500bp (断片C) に対応していた。断片AおよびCを、相同的組み換えによる、染色体へのカセットの組み込みに使用した。断片Bに対応する配列の直接の繰り返しは、染色体へのカセットの組み込みの際に生成された際、断片B (長さ500bp) は、標的遺伝子のすぐ下流の500bpに対応し、それを、相同的組み換えによる、染色体からのURA3マーカーおよび断片Cの切除に使用した。PCR産物ABUCカセットを用いて、URA3マーカーを、相同的組み換えによって、まず染色体に組み込み、次に染色体から切除した。最初の組み込みにより、3' 500bpを除いて、遺伝子を欠失させた。切除の際、遺伝子の3' 500bp領域も欠失させた。この方法を用いた遺伝子の組み込みでは、組み込まれる遺伝子が、断片AとBとの間のPCRカセットに含まれていた。

【0224】

URA3の欠失

内因性URA3コード領域を欠失させるために、ura3::loxP-kanMX-loxPカセットを、pLA54鋳型DNA (配列番号3) からPCRで増幅した。pLA54は、K. ラクチス (*K. lactis*) TEF1プロモーターおよびkanMXマーカーを含有し、Creリコンビナーゼによる組み換えおよびマーカーの除去を可能にするloxP部位が側面にある。Phusion (登録商標) DNAポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) ならびにプライマーBK505およびBK506 (配列番号4および5) を用いて、PCRを行った。loxP-kanMX-loxPマーカーの組み込みが、URA3コード領域の置換をもたらすように、各プライマーのURA3部分を、URA3プロモーターの上流の5' 領域およびコード領域の下流の3' 領域から得た。標準的な遺伝子組み換え技術 (Method in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202) を用いて、PCR産物をCEN. PK 113-7Dへと

10

20

30

40

50

形質転換し、30℃でG418 (100 µg/mL) を含有するYPDにおいて形質転換体を選択した。プライマーLA468およびLA492 (配列番号6および7) ならびに指定されるCEN. PK 113-7D Δura3::kanMXを用いたPCRによって、形質転換体をスクリーニングして、正確な組み込みを確認した。

【0225】

HIS3の欠失

無癬痕HIS3欠失のためのPCRカセットの4つの断片を、Phusion (登録商標) High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) およびGentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact、キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製された、鋳型としてのCEN. PK 113-7DゲノムDNAを用いて増幅した。HIS3断片Aを、HIS3断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP452 (配列番号14) およびプライマーoBP453 (配列番号15) を用いて増幅した。HIS3断片Bを、HIS3断片Aの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP454 (配列番号16)、およびHIS3断片Uの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP455 (配列番号17) を用いて増幅した。HIS3断片Uを、HIS3断片Bの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP456 (配列番号18)、およびHIS3断片Cの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP457 (配列番号19) を用いて増幅した。HIS3断片Cを、HIS3断片Uの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP458 (配列番号20)、およびプライマーoBP459 (配列番号21) を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。HIS3断片AおよびHIS3断片Bを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP452 (配列番号14) およびoBP455 (配列番号17) を用いて増幅することによって、HIS3断片ABを生成した。HIS3断片UおよびHIS3断片Cを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP456 (配列番号18) およびoBP459 (配列番号21) を用いて増幅することによって、HIS3断片UCを生成した。得られたPCR産物を、アガロースゲル、続いてGel Extractionキット (Qiagen, Valencia, CA) において精製した。HIS3断片ABおよびHIS3断片UCを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP452 (配列番号14) およびoBP459 (配列番号21) を用いて増幅することによって、HIS3 ABUCカセットを生成した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。

【0226】

CEN. PK 113-7D Δura3::kanMXのコンピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II (商標) キット (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) を用いてHIS3 ABUC PCRカセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養 (plate) した。Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact、キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP460 (配列番号22) およびoBP461 (配列番号23) によるPCRによって、his3ノックアウトを有する形質転換体をスクリーニングした。正確な形質転換体を、株CEN. PK 113-7D Δura3::kanMX Δhis3::URA3として選択した。

【0227】

Δura3部位からのKanMXマーカー除去およびΔhis3部位からのURA3マーカー除去

Frozen-EZ Yeast Transformation II (商標) キット (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) を用いて、pRS423::PGAL1-cre (配列番号 66、米国仮特許出願第 61/290,639 号明細書に記載される) で CEN. PK 113-7D Δura3::kanMX Δhis3::URA3 を形質転換し、30℃で2%のグルコースが補充されたヒスチジンおよびウラシル欠損合成完全培地において平板培養することによって、KanMX マーカーを除去した。形質転換体を、30℃で約6時間にわたって1%のガラクトースが補充されたYP中で増殖させて、Cre リコンビナーゼおよびKanMX マーカー切除を誘発し、回収のために30℃でYPD (2%のグルコース) プレートに平板培養した。分離株を、YPD中で一晚増殖させ、30℃で5-フルオロオロチン酸 (5-FOA、0.1%) を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3 マーカーを喪失した分離株を選択した。5-FOA 耐性分離株を、pRS423::PGAL1-cre プラスミドを除去するために、YPDにおいて増殖させ、平板培養した。YPD+G418 プレート、ウラシル欠損合成完全培地のプレート、およびヒスチジン欠損合成完全培地のプレートにおける増殖をアッセイすることによって、KanMX マーカー、URA3 マーカー、およびpRS423::PGAL1-cre プラスミドの損失について分離株を調べた。G418 に対して感受性であり、かつウラシルおよびヒスチジンに対して栄養要求性であった正確な分離株を、株 CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 として選択し、BP857 として表した。Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、Δura3 についてはプライマー oBP450 (配列番号 24) および oBP451 (配列番号 25)、および Δhis3 についてはプライマー oBP460 (配列番号 22) および oBP461 (配列番号 23) によるPCRおよび配列決定によって、欠失およびマーカー除去を確認した。

【0228】

PDC6 の欠失

無瘢痕 PDC6 欠失のためのPCRカセットの4つの断片を、Phusion (登録商標) High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) およびGentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製された、鋳型としてのCEN. PK 113-7DゲノムDNAを用いて増幅した。PDC6断片Aを、PDC6断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP440 (配列番号 26) およびプライマー oBP441 (配列番号 27) を用いて増幅した。PDC6断片Bを、PDC6断片Aの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP442 (配列番号 28)、およびPDC6断片Uの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP443 (配列番号 29) を用いて増幅した。PDC6断片Uを、PDC6断片Bの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP444 (配列番号 30)、およびPDC6断片Cの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP445 (配列番号 31) を用いて増幅した。PDC6断片Cを、PDC6断片Uの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP446 (配列番号 32)、およびプライマー oBP447 (配列番号 33) を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。PDC6断片AおよびPDC6断片Bを混合することによってPCRを重複させ、プライマー oBP440 (配列番号 26) および oBP443 (配列番号 29) を用いて増幅することによって、PDC6断片ABを生成した。PDC6断片UおよびPDC6断片Cを混合することによってPCRを重複させ、プライマー oBP444 (配列番号 30) および oBP447 (配列番号 33) を用いて増幅することによって、PDC6断片UCを生成した。得られたPCR産物を、アガロースゲル、続いてGel Extractionキット (Qiagen, Valencia, CA) において

10

20

30

40

50

精製した。PDC6断片ABおよびPDC6断片UCを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP440（配列番号26）およびoBP447（配列番号33）を用いて増幅することによって、PDC6 ABUCカセットを生成した。PCR産物を、PCR Purificationキット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて精製した。

【0229】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3のコンピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II（商標）キット（Zymo Research Corporation, Irvine, CA）を用いてPDC6 ABUC PCRカセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養した。pdc6ノックアウトを有する形質転換体を、Gentra（登録商標）Puregene（登録商標）Yeast/Bact. キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP448（配列番号34）およびBP449（配列番号35）によるPCRによってスクリーニングした。正確な形質転換体を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6::URA3として選択した。

【0230】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6::URA3を、YPD中で一晚増殖させ、30℃で5-フルオロオロチン酸（0.1%）を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3マーカを喪失した分離株を選択した。Gentra（登録商標）Puregene（登録商標）Yeast/Bact. キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP448（配列番号34）およびoBP449（配列番号35）によるPCRおよび配列決定によって、欠失およびマーカ除去を確認した。PDC6、oBP554（配列番号36）およびoBP555（配列番号37）のコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性PCR結果によって、分離株からのPDC6遺伝子がないことを実証した。正確な分離株を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6として選択し、BP891として表した。

【0231】

PDC1欠失ilvDSm組み込み

PDC1遺伝子を欠失させ、ミュータンス連鎖球菌（Streptococcus mutans）ATCC No. 700610に由来するilvDコード領域で置換した。A断片、続いて、PDC1欠失-ilvDSm組み込みのためのPCRカセットのミュータンス連鎖球菌（Streptococcus mutans）に由来するilvDコード領域を、Phusion（登録商標）High Fidelity PCR Master Mix（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA）およびGentra（登録商標）Puregene（登録商標）Yeast/Bact. キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて調製された、鋳型としてのNYLA83ゲノムDNAを用いて増幅した。NYLA83は、米国特許出願公開第2009/0305363号明細書（全体が参照により本明細書に援用される）に記載されるPDC1欠失-ilvDSm組み込みを有する株（全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2011/0124060号明細書に記載される作成）である。PDC1断片A-ilvDSm（配列番号141）を、PDC1断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP513（配列番号38）およびプライマーoBP515（配列番号39）を用いて増殖した。PDC1欠失-ilvDSm組み込みのためのPCRカセットのB、U、およびC断片を、Phusion（登録商標）High Fidelity PCR Master Mix（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA）およびGentra（登録商標）Puregene（登録商標）Yeast/Bact. キット（Qiagen, Val

10

20

30

40

50

encia, CA)を用いて調製された、鋳型としてのCEN. PK 113-7DゲノムDNAを用いて増幅した。PDC1断片Bを、PDC1断片A-ilvDSmの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP516 (配列番号40)、およびPDC1断片Uの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP517 (配列番号41)を用いて増幅した。PDC1断片Uを、PDC1断片Bの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP518 (配列番号42)、およびPDC1断片Cの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP519 (配列番号43)を用いて増幅した。PDC1断片Cを、PDC1断片Uの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP520 (配列番号44)、およびプライマーoBP521 (配列番号45)を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA)を用いて精製した。PDC1断片A-ilvDSmおよびPDC1断片Bを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP513 (配列番号38)およびoBP517 (配列番号41)を用いて増幅することによって、PDC1断片A-ilvDSm-Bを生成した。PDC1断片UおよびPDC1断片Cを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP518 (配列番号42)およびoBP521 (配列番号45)を用いて増幅することによって、PDC1断片UCを生成した。得られたPCR産物を、アガロースゲル、続いて、Gel Extractionキット (Qiagen, Valencia, CA)において精製した。PDC1断片A-ilvDSm-BおよびPDC1断片UCを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP513 (配列番号38)およびoBP521 (配列番号45)を用いて増幅することによって、PDC1 A-ilvDSm-BUCカセット (配列番号142)を生成した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA)を用いて精製した。

【0232】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6のコピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II (商標)キット (Zymo Research Corporation, Irvine, CA)を用いてPDC1 A-ilvDSm-BUC PCRカセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養した。pdc1ノックアウトilvDSm組み込みを有する形質転換体を、Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP511 (配列番号46)およびoBP512 (配列番号47)によるPCRによってスクリーニングした。PDC1、oBP550 (配列番号48)およびoBP551 (配列番号49)のコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性PCR結果によって、分離株からのPDC1遺伝子がないことを実証した。正確な形質転換体を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm-URA3として選択した。

【0233】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm-URA3を、YPD中で一晚増殖させ、30℃で5-フルオロオロチン酸 (0.1%) を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3マーカーを喪失した分離株を選択した。PDC1の欠失、ilvDSmの組み込み、およびマーカー除去を、Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP511 (配列番号46)およびoBP512 (配列番号47)によるPCRおよび配列決定によって確認した。正確な分離株を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSmとして選択し、BP907として表した。

【0234】

PDC5 欠失 *sadB* 組み込み

PDC5 遺伝子を欠失させ、アクロモバクター・キシロソキシダンス (*Achromobacter xylosoxidans*) に由来する *sadB* コード領域で置換した。PDC5 欠失-*sadB* 組み込みのための PCR カセットのセグメントを、まずプラスミド pUC19-URA3 MCS にクローニングした。

【0235】

pUC19-URA3 MCS は、pUC19 をベースとしており、多重クローニング部位 (MCS) に位置するサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来する URA3 遺伝子の配列を含む。pUC19 は、pMB1 レプリコンおよび大腸菌 (*Escherichia coli*) における複製および選択のための β -ラクタマーゼをコードする遺伝子を含む。URA3 のためのコード配列に加えて、この遺伝子の上流および下流の配列が、酵母における URA3 遺伝子の発現のために含まれていた。ベクターを、クローニングプロセスに使用することができ、酵母組み込みベクターとして使用することができる。

【0236】

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) CEN. PK 113-7D ゲノム DNA に由来する URA3 コード領域の上流の 250 bp および下流の 150 bp とともに URA3 コード領域を含む DNA を、Phusion (登録商標) High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) を用いて、BamHI、AscI、PmeI、および FseI 制限部位を含有するプライマー oBP438 (配列番号 12)、および XbaI、PacI、および NotI 制限部位を含有する oBP439 (配列番号 13) を用いて増幅した。ゲノム DNA を、Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製した。PCR 産物および pUC19 (配列番号 150) を、BamHI および XbaI による消化の後、T4 DNA リガーゼを用いてライゲートして、ベクター pUC19-URA3 MCS を生成した。プライマー oBP264 (配列番号 10) および oBP265 (配列番号 11) による PCR および配列決定によって、ベクターを確認した。

【0237】

sadB および PDC5 断片 B のコード配列を、pUC19-URA3 MCS にクローニングして、PDC5 A-*sadB*-BUC PCR カセットの *sadB*-BU 部分を生成した。AscI 制限部位を含有するプライマー oBP530 (配列番号 50)、および PDC5 断片 B の 5' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP531 (配列番号 51) とともに、鋳型として pLH468-*sadB* (配列番号 67) を用いて、*sadB* のコード配列を増幅した。PDC5 断片 B を、*sadB* の 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP532 (配列番号 52)、および PmeI 制限部位を含有するプライマー oBP533 (配列番号 53) を用いて増幅した。PCR 産物を、PCR Purification キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。*sadB* および PDC5 断片 B PCR 産物を混合することによって PCR を重複させ、プライマー oBP530 (配列番号 50) および oBP533 (配列番号 53) を用いて増幅することによって、*sadB*-PDC5 断片 B を生成した。得られた PCR 産物を、AscI および PmeI によって消化させ、適切な酵素による消化の後、T4 DNA リガーゼを用いて pUC19-URA3 MCS の対応する部位にライゲートした。得られたプラスミドを、PDC5 断片 C の 5' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP536 (配列番号 54) および oBP546 (配列番号 55) を用いて、*sadB*-断片 B-断片 U の増幅のための鋳型として使用した。PDC5 断片 C を、PDC5 *sadB*-断片 B-断片 U の 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP547 (配列番号 56)、およびプラ

イマー oBP539 (配列番号57) を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。PDC5 sadB-断片B-断片UおよびPDC5断片Cを混合することによってPCRを重複させ、プライマー oBP536 (配列番号54) および oBP539 (配列番号57) を用いて増幅することによって、PDC5 sadB-断片B-断片U-断片Cを生成した。得られたPCR産物を、アガロースゲル、続いて、Gel Extractionキット (Qiagen, Valencia, CA) において精製した。天然のPDC5コード配列のすぐ上流の50ヌクレオチドに対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP542 (配列番号58)、および oBP539 (配列番号57) を用いてPDC5 sadB-断片B-断片U-断片Cを増幅することによって、PDC5 A-sadB-BUCカセット (配列番号143) を生成した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。

【0238】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSmのコンピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II (商標) キット (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) を用いてPDC5 A-sadB-BUC PCRカセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で1%のエタノール (グルコースではない) が補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養した。pdc5ノックアウトsadB組み込みを有する形質転換体を、Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) によって調製されたゲノムDNAを用いて、プライマー oBP540 (配列番号59) および oBP541 (配列番号60) によるPCRによってスクリーニングした。PDC5、oBP552 (配列番号61) および oBP553 (配列番号62) のコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性PCR結果によって、分離株からのPDC5遺伝子がないことを実証した。正確な形質転換体を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB-URA3として選択した。

【0239】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB-URA3を、YPE (1%のエタノール) 中で一晚増殖させ、エタノール (グルコースではない) が補充され、かつ30℃で5-フルオロオロチン酸 (0.1%) を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3マーカーを喪失した分離株を選択した。PDC5の欠失、sadBの組み込み、およびマーカー除去を、Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマー oBP540 (配列番号59) および oBP541 (配列番号60) によるPCRによって確認した。正確な分離株を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadBとして選択し、BP913として表した。

【0240】

GPD2の欠失

内因性GPD2コード領域を欠失させるために、gpd2::loxP-URA3-loxPカセット (配列番号151) を、鋳型DNAとしてloxP-URA3-loxP (配列番号68) を用いて、PCRで増幅した。loxP-URA3-loxPは、loxPリコンビナーゼ部位が側面にある (ATCC No. 77107) に由来するURA3マーカーを含有する。Phusion (登録商標) DNAポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) ならびにプライマーLA512およびLA513 (配列番号8および9) を用いて、PCRを行った。loxP

—URA3—loxPマーカの組み込みが、GPD2コード領域の置換をもたらすように、各プライマーのGPD2部分を、GPD2コード領域の上流の5'領域およびコード領域の下流の3'領域から得た。PCR産物をBP913に形質転換し、形質転換体を、1%のエタノール（グルコースではない）が補充されたウラシル欠損合成完全培地において選択した。プライマーoBP582およびAA270（配列番号63および64）を用いたPCRによって、形質転換体をスクリーニングして、正確な組み込みを確認した。

【0241】

pRS423::PGAL1-cre（配列番号66）を用いた形質転換、および30℃で1%のエタノールが補充されたヒスチジン欠損合成完全培地における平板培養によって、URA3マーカを再利用した。形質転換体を、1%のエタノールが補充され、かつ5-フルオロオロチン酸（0.1%）を含有する合成完全培地においてストリークし（streak）、30℃で培養して、URA3マーカを喪失した分離株を選択した。5-FOA耐性分離株を、pRS423::PGAL1-creプラスミドの除去のためにYPE（1%のエタノール）中で増殖させた。欠失およびマーカ除去を、プライマーoBP582（配列番号63）およびoBP591（配列番号65）によるPCRによって確認した。正確な分離株を、株CEN.PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB Δgpd2::loxPとして選択し、PNY1503（BP1064）として表した。

【0242】

BP1064を、プラスミドpYZ090（配列番号1）およびpLH468（配列番号2）で形質転換して、株NGCI-070（BP1083；PNY1504）を生成した。

【0243】

サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）株PNY2205の作成

株PNY2205は、上述したPNY1503（BP1064）から得られた。

【0244】

標的遺伝子および形質転換体の選択のためのURA3遺伝子の上流および下流の相同領域を含むPCR断片による相同的組み換えによって、一般に全コード配列を除去した欠失を作り出した。URA3遺伝子を相同的組み換えによって除去して、無瘢痕（scarless）欠失を作り出した。遺伝子組み込みを、同様に生成した。

【0245】

無瘢痕欠失の手順を、Akada et al., (Yeast, 23:399, 2006) から適応させた。一般に、各無瘢痕欠失のためのPCRカセットを、PCRを重複させることによって、4つの断片、A-B-U-Cを組み合わせることによって作製した。場合によっては、個々の断片を、カセット全体が欠失／組み込み手順のためのPCRによって増幅される前に、まずプラスミドにクローニングした。PCRカセットは、プロモーター（URA3遺伝子の上流の250bp）およびターミネーター（URA3遺伝子の下流の150bp）領域とともに、天然CEN.PK 113-7D URA3遺伝子からなる、選択可能な／対抗選択可能な（counter-selectable）マーカ、URA3（断片U）を含有していた。それぞれ一般に長さ500bpの断片AおよびCは、標的遺伝子のすぐ上流の500bp（断片A）および標的遺伝子の3'500bp（断片C）に対応していた。断片AおよびCを、相同的組み換えによる、染色体へのカセットの組み込みに使用した。断片Bに対応する配列の直接の繰り返しは、染色体へのカセットの組み込みの際に生成された際、断片B（長さ500bp）は、標的遺伝子のすぐ下流の500bpに対応し、それを、相同的組み換えによる、染色体からのURA3マーカおよび断片Cの切除に使用した。

【0246】

PCR産物ABCカセットを用いて、URA3マーカを、相同的組み換えによって、まず染色体に組み込み、次に染色体から切除した。最初の組み込みにより、3'500

b pを除いて、遺伝子を欠失させた。切除の際、遺伝子の3'500bp領域も欠失させた。この方法を用いた遺伝子の組み込みでは、組み込まれる遺伝子が、断片AとBとの間のPCRカセットに含まれていた。

【0247】

FRA2の欠失

FRA2欠失を、コード配列の3'末端から250ヌクレオチドを欠失させるように設計し、FRA2コード配列の最初の113ヌクレオチドを無傷のまま残した。インフレーム終止コドンは、欠失の下流の7ヌクレオチドに存在していた。無瘢痕FRA2欠失のためのPCRカセットの4つの断片を、Phusion (登録商標) High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) およびGentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製された、鋳型としてのCEN. PK 113-7DゲノムDNAを用いて増幅した。FRA2断片Aを、FRA2断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP594 (配列番号152) およびプライマーoBP595 (配列番号153) を用いて増幅した。FRA2断片Bを、FRA2断片Aの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP596 (配列番号154)、およびFRA2断片Uの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP597 (配列番号155) を用いて増幅した。FRA2断片Uを、FRA2断片Bの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP598 (配列番号156)、およびFRA2断片Cの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP599 (配列番号157) を用いて増幅した。FRA2断片Cを、FRA2断片Uの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP600 (配列番号158)、およびプライマーoBP601 (配列番号159) を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。FRA2断片AおよびFRA2断片Bを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP594 (配列番号152) およびoBP597 (配列番号155) を用いて増幅することによって、FRA2断片ABを生成した。FRA2断片UおよびFRA2断片Cを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP598 (配列番号156) およびoBP601 (配列番号159) を用いて増幅することによって、FRA2断片UCを生成した。得られたPCR産物を、アガロースゲル、続いてGel Extractionキット (Qiagen, Valencia, CA) において精製した。FRA2断片ABおよびFRA2断片UCを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP594 (配列番号152) およびoBP601 (配列番号159) を用いて増幅することによって、FRA2 ABUCカセットを生成した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。

【0248】

PNY1503のコンピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II (商標) キット (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) を用いてFRA2 ABUC PCRカセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で1%のエタノールが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養 (plate) した。Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP602 (配列番号160) およびoBP603 (配列番号161) によるPCRによって、fra2ノックアウトを有する形質転換体をスクリーニングした。正確な形質転換体を、YPE (酵母抽出物、ペプトン、1%のエタノール) 中で増殖させ、30℃で5-フルオロオロチン酸 (0.1%) を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3マーカーを喪失した分離株を選択した。Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yea

st/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP602 (配列番号160) およびoBP603 (配列番号161) によるPCRによって、欠失およびマーカー除去を確認した。FRA2、oBP605 (配列番号162) およびoBP606 (配列番号163) の欠失されたコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性PCR結果によって、分離株からのFRA2遺伝子がないことを実証した。正確な分離株を、株CEN. PK 113-7D MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD_Sm-PDC1t pdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB_Ax-PDC5t gpd2Δ::loxP fra2Δとして選択し、P NY1505 (BP1135) として表した。

10

【0249】

ADH1欠失およびkivD_L1(y)組み込み

ADH1遺伝子を欠失させ、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) における発現についてコドン最適化された乳酸連鎖球菌 (*Lactococcus lactis*) に由来するkivDコード領域で置換した。参照により本明細書に援用される、2010年6月18日に出願された米国仮特許出願第61/356,379号明細書に記載されるように、ADH1欠失-kivD_L1(y)組み込みのための無痕痕カセットを、プラスミドpUC19-URA3MCSにまずクローニングした。ベクターはpUC19をベースとしており、多重クローニング部位 (MCS) に位置するサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) CEN. PK 113-7Dに由来するURA3遺伝子の配列を含む。pUC19は、pMB1レプリコンおよび大腸菌 (*Escherichia coli*) における複製および選択のためのβ-ラクタマーゼをコードする遺伝子を含む。URA3のためのコード配列に加えて、この遺伝子上流 (250bp) および下流 (150bp) の配列が、酵母におけるURA3遺伝子の発現のために存在する。

20

【0250】

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) における発現についてコドン最適化された乳酸連鎖球菌 (*Lactococcus lactis*) に由来するkivDコード領域を、PmeI制限部位を含むプライマーoBP562 (配列番号164)、およびADH1断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP563 (配列番号165) を鋳型として用いて、pLH468 (2009年9月29日に出願された米国仮特許出願第61/246,709号明細書) を用いて増幅した。ADH1断片Bを、kivD_L1(y)の3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP564 (配列番号166)、およびFseI制限部位を含むプライマーoBP565 (配列番号167) を用いて上記のように調製されたゲノムDNAから増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて精製した。kivD_L1(y) およびADH1断片B PCR産物を混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP562 (配列番号164) およびoBP565 (配列番号167) を用いて増幅することによって、kivD_L1(y)-ADH1断片Bを生成した。得られたPCR産物を、PmeIおよびFseIによって消化させ、適切な酵素による消化の後、T4 DNAリガーゼを用いてpUC19-URA3MCSの対応する部位にライゲートした。ADH1断片Aを、SacI制限部位を含むプライマーoBP505 (配列番号168)、およびAscI制限部位を含むプライマーoBP506 (配列番号169) を用いて、ゲノムDNAから増幅した。ADH1断片A PCR産物を、SacIおよびAscIによって消化させ、T4 DNAリガーゼを用いて、kivD_L1(y)-ADH1断片Bを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。ADH1断片Cを、PacI制限部位を含むプライマーoBP507 (配列番号170)、およびSalI制限部位を含むプライマーoBP508 (配列番号171) を用いて、ゲノムDNAから増幅した。ADH1断片C PCR産物を、PacIおよびSalIによって消化させ、T4

30

40

50

DNAリガーゼを用いて、ADH1断片A-k i v D__L l (y)-ADH1断片Bを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。ハイブリッドプロモーターUAS (PGK1)-P_{FBA1}を、Asc I制限部位を含むプライマーoBP674 (配列番号173)、およびPme I制限部位を含むプライマーoBP675 (配列番号174)を用いて、ベクターpRS316-UAS (PGK1)-P_{FBA1}-GUS (配列番号172)から増幅した。UAS (PGK1)-P_{FBA1} PCR産物を、Asc IおよびPme Iによって消化させ、T4 DNAリガーゼを用いて、k i v D__L l (y)-ADH1断片ABCを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。全組み込みカセットを、プライマーoBP505 (配列番号168)およびoBP508 (配列番号171)を用いて、得られたプラスミドから増幅し、PCR Purificationキット (Qiagen, Valencia, CA)を用いて精製した。

【0251】

PNY1505のコンピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II (商標)キット (Zymo Research Corporation, Irvine, CA)を用いて上記で作成されたADH1-k i v D__L l (y) PCRカセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で1%のエタノールが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養した。形質転換体を、YPE (1%のエタノール)中で増殖させ、30℃で5-フルオロオロチン酸 (0.1%)を含む合成完全培地において平板培養して、URA3マーカーを喪失した分離株を選択した。Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、外部プライマーoBP495 (配列番号175)およびoBP496 (配列番号176)およびk i v D__L l (y) 特異的プライマーoBP562 (配列番号164)および外部プライマーoBP496 (配列番号176)によるPCRによって、ADH1の欠失およびk i v D__L l (y)の組み込みを確認した。正確な分離株を、株CEN. PK113-7D MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|i l v D__Sm-PDC1tpdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB__Ax-PDC5t gp d2Δ::loxP fra2Δ adh1Δ::UAS (PGK1) P[FBA1]-k i v D__L l (y)-ADH1tとして選択し、PNY1507 (BP1201)として表した。PNY1507を、イソブタノール経路プラスミドpYZ090 (配列番号1)およびpBP915 (後述される)で形質転換した。

【0252】

pRS316-UAS (PGK1)-FBA1p-GUSベクターの作成

カセットUAS (PGK1)-FBA1p (配列番号177)をクローニングするために、まず、602bpのFBA1プロモーター (FBA1p)を、プライマーT-FBA1 (Sal I) (配列番号178)およびB-FBA1 (Spe I) (配列番号179)を用いて、CEN. PKのゲノムDNAからPCR増幅し、PGK1pプロモーターがプラスミドをSal I/Spe I消化によって除去した後、プラスミドpWS358-PGK1p-GUS (配列番号180)におけるSal IおよびSpe I部位にクローニングし、pWS358-FBA1p-GUSを得た。PGK1pおよびβ-グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) DNA断片を、pRS423ベクターから誘導されたpWS358の多重クローニング部位に挿入することによって、pWS358-PGK1p-GUSプラスミドを生成した (Christianson, et al., Gene 110:119-122, 1992)。第2に、得られたpWS358-FBA1p-GUSプラスミドを、Sal IおよびSac Iによって消化させ、FBA1pプロモーターを含むDNA断片、GUS遺伝子、およびFBAターミネーターをゲル精製し、pRS316におけるSal I/Sac I部位にクローニングして、pRS316-FBA1p-GUSを生成した。第3に、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK1) オープンリーディングフレームの上流の位置-519~-402に位置する上流活性化配列 (UAS)、すなわちU

AS (PGK1)を含む118bpのDNA断片を、プライマーT-U/PGK1 (KpnI) (配列番号181)およびB-U/PGK1 (SalI) (配列番号182)を用いて、CEN. PKのゲノムDNAからPCR増幅した。PCR産物を、KpnIおよびSalIによって消化させ、pRS316-FBA1p-GUSにおけるKpnI/SalI部位にクローニングして、pRS316-UAS (PGK1)-FBA1p-GUSを生成した。

【0253】

組み込みベクターpUC19-kan::pdc1::FBA-alsS::TRX1の作成

1. 7kbのBbvCI/PacI断片を、pRS426::GPD::alsS::CYC (米国特許出願公開第2007/0092957号明細書) から、pRS426::FBA::ILV5::CYC (米国特許出願公開第2007/0092957号明細書、BbvCI/PacIを用いて予め消化されて、ILV5遺伝子が放出される)へと移動させることによって、FBA-alsS-CYCtカセットを作成した。ライゲーション反応物を、大腸菌 (E. coli) TOP10細胞へと形質転換し、形質転換体を、プライマーN98SeqF1 (配列番号183)およびN99SeqR2 (配列番号184)を用いたPCRによってスクリーニングした。FBA-alsS-CYCtカセットを、AflII部位 (Klenow断片を用いて、ライゲーションに適合する末端を作製した)においてpUC19-URA3::ilvD-TRX1 (参照により本明細書に援用される、2010年6月18日に出願された米国仮特許出願第61/356, 379号明細書に記載される、クローン「B」)にクローニングするために、BglIIおよびNotIを用いてベクターから単離した。ベクター中で両方の配向でalsSカセットを含む形質転換体を得て、構造「A」についてはプライマーN98SeqF4 (配列番号185)およびN1111 (配列番号186)を用いて、および構造「B」についてはN98SeqF4 (配列番号185)およびN1110 (配列番号187)を用いて、PCRによって確認した。次に、ジェネティシン (geneticin) 選択可能な形態の「A」構造ベクターを、URA3遺伝子 (1.2kbのNotI/NaeI断片)を除去し、上述したジェネティシンカセット (参照により本明細書に援用される、2010年6月18日に出願された米国仮特許出願第61/356, 379号明細書に記載の配列番号655)を加えることによって作製した。Klenow断片を用いて、ライゲーションに適合する全ての末端を作製し、形質転換体をPCRによってスクリーニングして、プライマーBK468 (配列番号188)およびN160SeqF5 (配列番号189)を用いて、前のURA3マーカーと同じ配向のジェネティシン耐性遺伝子を有するクローンを選択した。得られたクローンは、pUC19-kan::pdc1::FBA-alsS::TRX1 (クローンA) (配列番号190)と称された。

【0254】

上記のpUC19-kan::pdc1::FBA-alsS組み込みベクターを、PmeIを用いて線状化し、PNY1507 (上記)へと形質転換した。PmeIは、クローニングされたpdc1-TRX1組み込み領域内でベクターを切断し、それによって、当該位置において標的化された組み込みをもたらす (Rothstein, Methods Enzymol. 194:281-301, 1991)。形質転換体を、YPEプラス50μg/mlのG418において選択した。パッチされた形質転換体を、プライマーN160SeqF5 (配列番号189)およびoBP512 (配列番号47)を用いて、組み込み事象のためのPCRによってスクリーニングした。2つの形質転換体を、イソブタノールを作製する株の能力を評価することによって、アセト乳酸シンターゼの機能について間接的に試験した。このために、さらなるイソブタノール経路遺伝子を、大腸菌 (E. coli) -酵母シャトルベクター (後述されるpYZ090ΔalsSおよびpBPP915)に供給した。1つのクローン、株MATa ura3Δ::loxP his3Δ pdc6Δ pdc1Δ::P[PDC1]-DHAD|ilvD_Sm-PDC1t-pUC19-loxP-kanMX-loxP-P[FBA1]-ALS|alsS

__Bs-CYC1 t pdc5Δ::P[PDC5]-ADH|sadB__Ax-PDC5 t gpd2Δ::loxP fra2Δ adh1Δ::UAS(PGK1)P[FBA1]-kivD__L1(y)-ADH1 tを、PNY2204として表した。PNY2205は、pYZ090ΔalsSおよびpBP915プラスミドで形質転換されたPNY2204である。

【0255】

イソブタノール経路プラスミド(pYZ090ΔalsSおよびpBP915)

pYZ090(配列番号1)を、SpeIおよびNotIによって消化させて、CUP1プロモーターのほとんどおよびalsSコード配列およびCYCターミネーターの全てを除去した。次に、ベクターを、Klenow断片による処理の後、セルフライゲートさせ、大腸菌(E.coli)Stbl3細胞へと形質転換し、アンピシリン耐性を選択した。DNA領域の除去を、プライマーN191(配列番号191)を用いたPCRによってライゲーション接合部にわたってDNA配列決定することによって、2つの独立したクローンについて確認した。得られたプラスミドはpYZ090ΔalsS(配列番号192)と称された。

【0256】

kivDの上流のTDH3プロモーターのkivD遺伝子および957塩基対を欠失させることによって、pBP915を、pLH468(配列番号2;2009年9月29日に出願された米国仮特許出願第61/246,709号明細書)から作成した。pLH468を、SwaIによって消化させ、大きい断片(12896bp)を、アガロースゲル、続いてGel Extractionキット(Qiagen, Valencia, CA)において精製した。DNAの単離された断片を、T4 DNAリガーゼによってセルフライゲートさせ、それを用いて、エレクトロコンピテントTOP10大腸菌(Escherichia coli)(Invitrogen, Carlsbad, CA)を形質転換した。形質転換体からのプラスミドを単離し、SwaI制限酵素を用いた制限分析によって適切な欠失について調べた。分離株も、プライマーoBP556(配列番号193)およびoBP561(配列番号194)を用いて、欠失部位にわたって配列決定した。適切な欠失を有するクローンは、pBP915(pLH468ΔkivD)(配列番号195)と称された。

【0257】

株NYLA74、NYLA83、およびNYLA84の作成

S.セレヴィシエ(S.cerevisiae)の内因性PDC1およびPDC6遺伝子の挿入不活化。PDC1、PDC5、およびPDC6遺伝子は、以下に記載されるピルビン酸デカルボキシラーゼの3つの主なアイソザイムをコードする:

【0258】

pRS425::GPM-sadBの作成

アクロモバクター・キシロソキシダンス(Achromobacter xylosoxidans)に由来するブタノールデヒドロゲナーゼをコードするDNA断片(配列番号70)(米国特許出願公開第2009/0269823号明細書に開示されている)をクローニングした。第2級アルコールデヒドロゲナーゼのためのsadBと呼ばれるこの遺伝子のコード領域(配列番号69)を、それぞれ順方向および逆方向プライマーN473およびN469(配列番号74および75)を用いてグラム陰性菌のために推奨されるプロトコルにしたがって、Gentra(登録商標)Puregene(登録商標)キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製される、A.キシロソキシダンス(A.xylosoxidans)ゲノムDNAから、標準条件を用いて増幅した。PCR産物を、pCR(登録商標)4BLUNT(Invitrogen(商標), Carlsbad, CA)へとTOPO(登録商標)-Bluntでクローニングを行って、pCR4Blunt::sadBを生成し、それを、大腸菌(E.coli)Mach-1細胞へと形質転換した。次に、プラスミドを4つのクローンから単離し、配列を確認した。

10

20

30

40

50

【0259】

sadBコード領域を、pCR4Blunt::sadBからPCR増幅した。PCRプライマーは、酵母GPM1プロモーターおよびADH1ターミネーター（配列番号76および77として提供されるN583およびN584）と重複し得る追加の5'配列を含んでいた。次に、PCR産物を、以下のように、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）における「ギャップ修復（gap repair）」方法を用いてクローニングした（Ma, et al., Gene 58:201-216, 1987）。GPM1プロモーター（配列番号72）、乳酸連鎖球菌（*Lactococcus lactis*）に由来するkivDコード領域（配列番号71）、およびADH1ターミネーター（配列番号73）を含有する酵母一大腸菌（*E. coli*）シャトルベクターpRS425::GPM::kivD::ADH（米国特許出願公開第2007/0092957 A1号明細書の実施例17に記載される）を、BbvCIおよびPacI制限酵素で消化して、kivDコード領域を放出した。約1μgの残っているベクター断片を、1μgのsadB PCR産物とともに、*S. cerevisiae*株BY4741へと形質転換した。形質転換体を、ロイシン欠損合成完全培地において選択した。pRS425::GPM-sadBを生成する適切な組み換え事象を、プライマーN142およびN459（配列番号108および109）を用いたPCRによって確認した。

10

【0260】

pdc6::PGPM1-sadB組み込みカセットの作成およびPDC6の欠失：
pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t-URA3r組み込みカセットを、pRS425::GPM-sadB（配列番号78）に由来するGPM-sadB-ADH1tセグメント（配列番号79）を、pUC19-URA3rに由来するURA3r遺伝子に結合することによって作製した。pUC19-URA3r（配列番号80）は、インビボでの相対的組み換えおよびURA3マーカーの除去を可能にする、75bpの相同反復配列が側面にあるpRS426（ATCC No. 77107）に由来するURA3マーカーを含む。2つのDNAセグメントを、Phusion（登録商標）DNAポリメラーゼ（New England BioLabs Inc., Ipswich, MA）およびプライマー114117-11A~114117A-11D（配列番号81、82、83、および84）、ならびに114117-13Aおよび114117-13B（配列番号85および86）とともに、pRS425::GPM-sadBおよびpUC19-URA3rプラスミドDNAを鋳型として用いたSOE PCR（Horton, et al., Gene 77:61-68, 1989に記載される）によって結合した。

20

30

【0261】

SOE PCR（114117-13Aおよび114117-13B）のための外部プライマーは、それぞれPDC6プロモーターおよびターミネーターの上流および下流の領域に相同な約50bpの5'および3'領域を含んでいた。標準的な遺伝子組み換え技術（Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202）を用いて、完成されたカセットPCR断片を、BY4700（ATCC No. 200866）へと形質転換し、形質転換体を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地上で維持した。形質転換体を、プライマー112590-34Gおよび112590-34H（配列番号87および88）、ならびに112590-34Fおよび112590-49E（配列番号89および90）を用いたPCRによってスクリーニングして、PDC6コード領域の欠失を有するPDC6遺伝子座における組み込みを確認した。標準プロトコルにしたがい、URA3rマーカーを、30℃で2%のグルコースおよび5-FOAが補充された合成完全培地において平板培養することによって再利用した。5-FOAプレートからのコロニーを、SD-URA培地上にパッチして、増殖がないことを確認することによって、マーカーの除去を確認した。得られた同定株は、遺伝子型：BY4700 pdc6::PGPM1

40

50

— s a d B — A D H 1 t を有する。

【0262】

p d c 1 : : P P D C 1 — i l v D 組み込みカセットの作成および P D C 1 の欠失：

Phusion (登録商標) DNAポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) ならびにプライマー 114117-27A ~ 114117-27D (配列番号 111、112、113、および 114) とともに、pLH468 および pUC19-URA3r プラスミド DNA を鋳型として用いた SOE PCR (Horton, et al., Gene 77:61-68, 1989 によって記載される) によって、pLH468 (配列番号 2) に由来する i l v D - F B A 1 t セグメント (配列番号 91) を、pUC19-URA3r に由来する URA3r 遺伝子に結合することによって、p d c 1 : : P P D C 1 — i l v D - F B A 1 t - U R A 3 r 組み込みカセットを作製した。

10

【0263】

SOE PCR (114117-27A および 114117-27D) のための外部プライマーは、PDC1 プロモーターの下流および PDC1 コード配列の下流の領域に相同な約 50 bp の 5' および 3' 領域を含んでいた。標準的な遺伝子組み換え技術 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202) を用いて、完成されたカセット PCR 断片を、BY4700 p d c 6 : : P G P M 1 — s a d B — A D H 1 t へと形質転換し、形質転換体を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地上で維持した。形質転換体を、プライマー 114117-36D および 135 (配列番号 92 および 93)、ならびにプライマー 112590-49E および 112590-30F (配列番号 90 および 94) を用いた PCR によってスクリーニングして、PDC1 コード配列の欠失を有する PDC1 遺伝子座における組み込みを確認した。標準プロトコルにしたがい、URA3r マーカーを、30℃で2%のグルコースおよび 5-FOA が補充された合成完全培地において平板培養することによって再利用した。5-FOA プレートからのコロニーを SD-URA 培地上にパッチして、増殖がないことを確認することによって、マーカーの除去を確認した。得られた同定株「NYLA67」は、遺伝子型：BY4700 p d c 6 : : P G P M 1 — s a d B — A D H 1 t p d c 1 : : P P D C 1 — i l v D - F B A 1 t を有する。

20

30

【0264】

H I S 3 の欠失

内因性 H I S 3 コード領域を欠失させるために、h i s 3 : : U R A 3 r 2 カセットを、URA3r 2 鋳型 DNA (配列番号 95) から PCR 増幅した。URA3r 2 は、インビボでの相同的組み換えおよび URA3 マーカーの除去を可能にする、500 bp の相同反復配列が側面にある pRS426 (ATCC No. 77107) に由来する URA3 マーカーを含む。Phusion (登録商標) DNAポリメラーゼ (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA) ならびにプライマー 114117-45A および 114117-45B (配列番号 96 および 97) を用いて PCR を行い、約 2.3 kb の PCR 産物を生成した。各プライマーの H I S 3 部分は、URA3r 2 マーカーの組み込みが H I S 3 コード領域の置換をもたらすように、H I S 3 プロモーターの上流の 5' 領域およびコード領域の下流の 3' 領域から得られた。標準的な遺伝子組み換え技術 (Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202) を用いて、PCR 産物を、NYLA67 へと形質転換し、形質転換体を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地上で選択した。形質転換体をスクリーニングして、30℃で2%のグルコースが補充されたヒスチジン欠損合成完全培地において形質転換体をレプリカ平板培養することによって、正確な組み込みを確認した。標準プロトコルにしたがい、30

40

50

℃で2%のグルコースおよび5-FOAが補充された合成完全培地において平板培養することによって、URA3rマーカーを再利用した。5-FOAプレートからのコロニーをSD-URA培地上にパッチして、増殖がないことを確認することによって、マーカーの除去を確認した。NYLA73と呼ばれる得られた同定株は、遺伝子型：BY4700 pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t pdc1::PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3を有する。

【0265】

pdc5::kanMX組み込みカセットの作成およびPDC5の欠失：

pdc5::kanMX4カセットを、Phusion（登録商標）DNAポリメラーゼ（New England BioLabs Inc., Ipswich, MA）ならびにプライマーPDC5::KanMXFおよびPDC5::KanMXR（配列番号98および99）を用いて株YLR134W染色体DNA（ATCC No. 4034091）からPCR増幅し、約2.2 kbのPCR産物を生成した。各プライマーのPDC5部分は、kanMX4マーカーの組み込みがPDC5コード領域の置換をもたらすように、PDC5プロモーターの上流の5'領域およびコード領域の下流の3'領域から得られた。標準的な遺伝子組み換え技術（Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202）を用いて、PCR産物を、NYLA73へと形質転換し、形質転換体を、30℃で1%のエタノールおよびジェネティシン（geneticin）（200 μg/mL）が補充されたYP培地上で選択した。形質転換体をPCRによってスクリーニングして、プライマーPDC5kofforおよびN175（配列番号100および101）を用いたPDC5コード領域の置換によりPDC遺伝子座における正確な組み込みを確認した。同定された正確な形質転換体は、遺伝子型：BY4700 pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t pdc1::PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3 pdc5::kanMX4を有する。株はNYLA74と称された。

【0266】

プラスミドベクターpRS423::CUP1-alsS+FBA-budAおよびpRS426::FBA-budC+GPM-sadBを、NYLA74へと形質転換して、ブタンジオール生成株（NGCI-047）を生成した。

【0267】

プラスミドベクターpLH475-Z4B8（配列番号140）およびpLH468をNYLA74へと形質転換して、イソブタノール生成株（NGCI-049）を生成した。

【0268】

HXK2（ヘキソキナーゼII）の欠失：

hxk2::URA3rカセットを、Phusion（登録商標）DNAポリメラーゼ（New England BioLabs Inc., Ipswich, MA）ならびにプライマー384および385（配列番号102および103）を用いてURA3r2鑄型（上記）からPCR増幅し、約2.3 kbのPCR産物を生成した。各プライマーのHXK2部分は、URA3r2マーカーの組み込みがHXK2コード領域の置換をもたらすように、HXK2プロモーターの上流の5'領域およびコード領域の下流の3'領域から得られた。標準的な遺伝子組み換え技術（Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202）を用いて、PCR産物を、NYLA73へと形質転換し、形質転換体を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地上で選択した。形質転換体をPCRによってスクリーニングして、プライマーN869およびN871（配列番号104および105）を用いたHXK2コード領域の置換によりHXK2遺伝子座における正確な組み込みを確認した。標準プロトコルにしたがい、30℃で2%のグルコースおよび5-FO

10

20

30

40

50

Aが補充された合成完全培地において平板培養することによって、URA3 r2 マーカーを再利用した。5-FOAプレートからのコロニーをSD-URA培地上にパッチして、増殖がないことを確認することによって、およびPCRによって、プライマーN946およびN947（配列番号106および107）を用いて正確なマーカーの除去を確認することによって、マーカーの除去を確認した。NYLA83と称される、得られた同定株は、遺伝子型：BY4700 pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t pdc1::PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3 Δh x k2を有する。

【0269】

pd c 5::kanMX組み込みカセットの作成およびPDC5の欠失：

pd c 5::kanMX4カセットを、上述したようにPCR増幅した。上述したように、PCR断片をNYLA83へと形質転換し、形質転換体を選択し、スクリーニングした。NYLA84と称される、同定された正確な形質転換体は、遺伝子型：BY4700 pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t pdc1::PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3 Δh x k2 pdc5::kanMX4を有する。

【0270】

標準的な遺伝子組み換え技術（Methods in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）を用いて、プラスミドベクターpLH468およびpLH532を、株NYLA84（BY4700 pdc6::PGPM1-sadB-ADH1t pdc1::PPDC1-ilvD-FBA1t Δhis3 Δh x k2 pdc5::kanMX4）へと同時に形質転換し、得られた「ブタノロジェンNYLA84」を、30℃で1%のエタノールが補充されたヒスチジンおよびウラシル欠損合成完全培地上で維持した。

【0271】

発現ベクターpLH468

pLH468プラスミド（配列番号2）を、酵母中のDHAD、KivD、およびHADHの発現のために作成し、これは、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2009/0305363号明細書に記載されている。DHADの発現のために、S. セレヴィシエ（S. cerevisiae）FBA1プロモーター（nt 2109～3105）、続いてFBA1ターミネーター（nt 4858～5857）から発現されるミュータンス連鎖球菌（Streptococcus mutans）に由来するilvD遺伝子のコード領域（nt 位置3313～4849）を有するキメラ遺伝子；ADHの発現のために、S. セレヴィシエ（S. cerevisiae）GPM1プロモーター（nt 7425～8181）、続いてADH1ターミネーター（nt 5962～6277）から発現されるコドン最適化されたウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼのコード領域（nt 6286～7413）を有するキメラ遺伝子；およびKivDの発現のために、TDH3プロモーター（nt 10896～11918）、続いてTDH3ターミネーター（nt 8237～9235）から発現される乳酸連鎖球菌（Lactococcus lactis）に由来するコドン最適化されたkivD遺伝子のコード領域（nt 9249～10895）を有するキメラ遺伝子を含むようにpLH486を作成した。

【0272】

乳酸連鎖球菌（Lactococcus lactis）のケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ（KivD）およびウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ（HADH）のためのコード領域（それぞれ配列番号71および118）を、サッカロマイセス・セレビスエ（Saccharomyces cerevisiae）における発現のために最適化されたコドンに基づいて、DNA2.0, Inc.（Menlo Park, CA）によって合成し、プラスミドpKivDy-DNA2.0およびpHadhY-DNA2.0において提供した。コードされるタンパク質は、それぞれ配列番号117および119である。KivDおよびHADHのための個々の発現ベクターを作成した。pLH467（pRS426::PTDH3-kivDy-TDH3t）を構築するために、ベクターpNY

8 (配列番号121; pRS426. GPD-a1d-GPDtとも称され、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2008/0182308号明細書の実施例17に記載されている)を、AscIおよびSfiI酵素で消化し、それによって、GPDプロモーターおよびa1dコード領域を切断した。5'プライマーOT1068および3'プライマーOT1067 (配列番号123および124)を用いて、5'末端にAscI部位および3'末端にSpeI部位を付加するために、pNY8に由来するTDH3プロモーター断片 (配列番号122)をPCR増幅した。AscI/SfiIで消化されたpNY8ベクター断片を、AscIおよびSpeIで消化されたTDH3プロモーターPCR産物とライゲートし、コドン最適化されたkivDコード領域を含むSpeI-SfiI断片を、ベクターpKivD-DNA2.0から単離した。3通りのライゲーションにより、ベクターpLH467 (pRS426::PTDH3-kivDy-TDH3t)が生成された。pLH467を、制限マッピング (restriction mapping) および配列決定によって確認した。

10

【0273】

pLH435 (pRS425::PGPM1-Hadh-y-ADH1t)は、参照により本明細書に援用される米国仮特許出願第61/058,970号明細書の実施例3に記載されるベクターpRS425::GPM-sadB (配列番号78)から得られた。pRS425::GPM-sadBは、GPM1プロモーター (配列番号72)、アクロモバクター・キシロソキシダンス (*Achromobacter xylosoxidans*) のブタノールデヒドロゲナーゼに由来するコード領域 (sadB; DNA配列番号69; タンパク質配列番号70; 米国特許出願公開第2009/0269823号明細書に開示されている)、およびADH1ターミネーター (配列番号73)を含むキメラ遺伝子を有するpRS425ベクター (ATCC No. 77106)である。pRS425::GPMp-sadBは、sadBコード領域の5'および3'末端においてそれぞれBbvIおよびPacI部位を含む。プライマーOT1074およびOT1075 (配列番号126および127)を用いた部位特異的突然変異誘発法によって、NheI部位をsadBコード領域の5'末端に付加して、ベクターpRS425-GPMp-sadB-NheIを生成し、それを配列決定によって確認した。pRS425::PGPM1-sadB-NheIをNheIおよびPacIで消化して、sadBコード領域を除外し、ベクターpHadh-y-DNA2.0に由来するコドン最適化されたHADHコード領域を含むNheI-PacI断片とライゲートして、pLH435を生成した。

20

30

【0274】

単一のベクター中でkivDおよびHADH発現カセットを組み合わせるために、酵母ベクターpRS411 (ATCC No. 87474)を、SacIおよびNotIで消化し、3通りのライゲーション反応において、PGPM1-Hadh-y-ADH1tカセットを含むpLH435に由来するSalI-NotI断片とともに、PTDH3-kivDy-TDH3tカセットを含むpLH467に由来するSacI-SalI断片とライゲートした。これにより、ベクターpRS411::PTDH3-kivDy-PGPM1-Hadh-y (pLH441)が生成され、それを制限マッピングによって確認した。

40

【0275】

低級イソブタノール経路における全ての3つの遺伝子: ilvD、kivDy、およびHadh-yのための同時発現ベクターを生成するために、ilvD遺伝子の供給源として、米国特許出願公開第2010/0081154号明細書に記載されるpRS423 FBA ilvD (Strept) (配列番号128)を使用した。このシャトルベクターは、大腸菌 (*E. coli*)における維持のためのF1複製起点 (nt 1423~1879) および酵母における複製のための2ミクロンの起点 (nt 8082~9426)を含む。ベクターは、FBA1プロモーター (nt 2111~3108; 配列番号120) およびFBAターミネーター (nt 4861~5860; 配列番号129)を有する。さらに、ベクターは、酵母における選択のためのHisマーカー (nt 504~11

50

63) および大腸菌 (*E. coli*) における選択のためのアンピシリン耐性マーカー (nt 7092~7949) を有する。ミュータンス連鎖球菌 (*Streptococcus mutans*) UA159 (ATCC No. 700610) に由来する *ilvD* コード領域 (nt 3116~4828; 配列番号115; タンパク質配列番号116) は、FBAプロモーターとFBAターミネーターとの間にあり、発現のためのキメラ遺伝子を形成する。さらに、*ilvD* コード領域 (nt 4829~4849) に融合された *lumio* タグがある。

【0276】

第1の工程は、*SacI* および *SacII* (*SacII* 部位はT4 DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化された) を用いて、pRS423 FBA *ilvD* (*Streptococcus mutans*) (*pRS423-FBA(SpeI)-ilvD* (ミュータンス連鎖球菌 (*Streptococcus mutans*)) - *Lumio* と呼ばれる) を線状化して、9,482bpの全長を有するベクターを得ることであった。第2の工程は、*SacI* および *KpnI* (*KpnI* 部位はT4 DNAポリメラーゼを用いて平滑末端化された) を用いて、*kivDy-hADHy* カセットをpLH441から単離し、6,063bpの断片を得ることであった。この断片を、pRS423-FBA(*SpeI*)-*ilvD* (ミュータンス連鎖球菌 (*Streptococcus mutans*)) - *Lumio* に由来する9,482bpのベクター断片とライゲートした。これにより、ベクターpLH468 (*pRS423::PFBA1-ilvD(Strept)Lumio-FBA1t-PTDH3-kivDy-TDH3t-PGPM1-hadhy-ADH1t*) が生成され、それを、制限マッピングおよび配列決定によって確認した。

【0277】

pLH532の作成

pLH532プラスミド (配列番号130) を、酵母中のALSおよびKARIの発現のために作成した。pLH532は、以下のキメラ遺伝子: 1) CUP1プロモーター (配列番号139)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に由来するアセト乳酸シンターゼコード領域 (*AlsS*; 配列番号137; タンパク質配列番号138) およびCYC1ターミネーター2 (配列番号133); 2) ILV5プロモーター (配列番号134)、Pf5. *ilvC* コード領域 (配列番号132) およびILV5ターミネーター (配列番号135); ならびに3) FBA1プロモーター (配列番号136)、*S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*) KARIコード領域 (*ILV5*; 配列番号131); およびCYC1ターミネーターを含むpHR81ベクター (ATCC No. 87541) である。

【0278】

Pf5. *ilvC* コード領域は、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2009/0163376号明細書に記載された、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) に由来するKARIをコードする配列である。

【0279】

Pf5. *ilvC* コード領域を、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) における発現のために最適化されたコドンに基づいて、DNA2.0, Inc. (Menlo Park, CA; 配列番号132) によって合成した。

【0280】

pYZ090の作成

pYZ090 (配列番号1) は、pHR81 (ATCC No. 87541) 骨格をベースとし、ALSの発現のために、酵母CUP1プロモーター (nt 2~449)、続いてCYC1ターミネーター (nt 2181~2430) から発現される枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に由来する *alsS* 遺伝子のコード領域 (nt 位置457~2172) を有するキメラ遺伝子、およびKARIの発現のために、酵母ILV5プロモーター (2433~3626)、続いてILV5ターミネーター (nt 4682

～5304) から発現される乳酸連鎖球菌 (*Lactococcus lactis*) に由来する *ilvC* 遺伝子のコード領域 (nt 3634～4656) を有するキメラ遺伝子を含むように作成される。

【0281】

pYZ067の作成

pYZ067を、以下のキメラ遺伝子：1) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (DHAD) の発現のために、酵母FBA1プロモーター (nt 1161～2250)、続いてFBAターミネーター (nt 4005～4317) から発現されるミュータンス連鎖球菌 (*S. mutans*) UA159に由来する *ilvD* 遺伝子のコード領域 (nt 位置2260～3971)、2) アルコールデヒドロゲナーゼの発現のために、酵母GPMプロモーター (nt 5819～6575)、続いてADH1ターミネーター (nt 4356～4671) から発現されるウマ肝臓ADHのためのコード領域 (nt 4680～5807)、および3) ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼの発現のために、酵母TDH3プロモーター (nt 8830～9493)、続いてTDH3ターミネーター (nt 5682～7161) から発現される乳酸連鎖球菌 (*Lactococcus lactis*) に由来する *KivD* 遺伝子のコード領域 (nt 7175～8821) を含むように作成した。

【0282】

pRS423::CUP1-*alsS*+FBA-*budA*およびpRS426::FBA-*budC*+GPM-*sadB*およびpLH475-Z4B8の作成

pRS423::CUP1-*alsS*+FBA-*budA*およびpRS426::FBA-*budC*+GPM-*sadB*およびpLH475-Z4B8の作成が、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2009/0305363号明細書に記載されている。

【0283】

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 株PNY2242の作成

株PNY2242を、PNY1507 (上記) からいくつかの工程で作成した。まず、FBA1プロモーター、*alsS*コード領域、およびCYC1ターミネーターを含むキメラ遺伝子を、TRX1遺伝子上流の染色体XIIに組み込んだ。修飾された遺伝子座の配列を、配列番号196として示す。次に、ウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の2つのコピーを、染色体VIIおよびXVIに組み込んだ。染色体VIIにおいて、PDC1プロモーター、*hADH*コード領域、およびADH1ターミネーターを含むキメラ遺伝子を、*fra2Δ*遺伝子座に入れた (*FRA2*の元の欠失が上述されている)。修飾された遺伝子座の配列を、配列番号197として示す。染色体XVIにおいて、PDC5プロモーター、*hADH*コード領域、およびADH1ターミネーターを含むキメラ遺伝子を、長期反復要素 (*long term repeat element*) YPRCデルタ15が元々占める領域に組み込んだ。修飾された遺伝子座の配列を、配列番号198として示す。次に、天然遺伝子YMR226cおよびALD6を欠失させた。YMR226cの消失は、コード領域のみの無瘢痕欠失であった。修飾された遺伝子座の配列を、配列番号199として示す。上流の配列のALD6コード領域プラス700bpを、CRE-loxで媒介されるマーカー除去 (上記の方法) を用いて欠失させ、それによって、得られる遺伝子座は、1つのloxP部位を含む。修飾された遺伝子座の配列を、配列番号200として示す。最後に、プラスミドを、KARI (pLH702、配列番号201) およびDHAD (pYZ067D*kivD*hADH、配列番号202) の発現のために株に導入し、株PNY2242を得た。

【0284】

組み換え微生物がイソブタノールを生成する場合、特定の実施形態において、微生物は、より高い比生産性を示す。さらに、体積速度が約50%だけ向上された。

【0285】

理論によって制約されるのを望むものではないが、本明細書に記載される方法は、生成物アルコールの生成収率が向上された抽出発酵方法を提供すると考えられる。上述したように、微生物による発酵を用いたアルコール生成は、微生物のアルコール毒性閾値のため非効率になり得る。ある実施形態において、本明細書の方法は、生成物アルコールを、微生物に対する毒性の低い物質へと転化する手段を提供する。例えば、生成物アルコールは、カルボン酸とともにアルコールをエステル化し、それによって、微生物に対する毒性の低いアルコールエステルを生成する触媒の存在下で、カルボン酸と接触され得る。さらに、生成物アルコールからのアルコールエステルの生成は、発酵培地中のより低濃度の生成物アルコールをもたらす。生成物アルコールの濃度が低下されると、微生物に対する生成物アルコールの毒性作用が最小限に抑えられるため、生成物アルコールの生成収率が向上される。

10

【0286】

カルボン酸は抽出剤として働き得、アルコールエステルは抽出剤中に分離し得る。しかしながら、抽出剤の分配係数は、脂質の汚染によって低下され得る。抽出剤の分配係数の低下を抑えるために、発酵培地中に存在する脂質が抽出剤に転化され、次に、脂質濃度が最小限に抑えられ得る。ある実施形態において、本明細書の方法は、脂質をカルボン酸へと触媒により加水分解することによって、原料またはバイオマス中に存在する脂質を抽出剤へと転化する手段を提供する。この加水分解によって生成されるカルボン酸は、抽出剤として働き得、または生成物アルコールとともにエステル化されてアルコールエステルが形成され得る。したがって、本明細書に記載される方法は、抽出剤の分配係数を保つための手段（例えば、脂質加水分解）ならびに生成物アルコールの毒性作用を最小限に抑えるための手段（例えば、生成物アルコールのエステル化）を提供する。

20

【0287】

カルボン酸が、発酵槽に供給され、または発酵槽に供給される脂質（例えば、バイオマス）から加水分解によって誘導され得る。カルボン酸の量は、有機相および水相を含む二相混合物を形成するのに十分である必要がある。すなわち、適切な濃度のカルボン酸（すなわち、抽出剤）が発酵ブロスと接触し、二相混合物を形成する。発酵ブロス中で形成されるアルコールエステルは、優先的に有機相中に分離し、その理由は、これらのエステルが、水相の平衡濃度を超える濃度で形成されるためである。アルコールエステル含有有機相は、発酵ブロスから分離され得、生成物アルコールは、有機相から回収され得、抽出剤は、発酵槽に再利用され得る。

30

【0288】

さらに、本発明の様々な実施形態を上記説明してきたが、それらは例として示されたに過ぎず、限定するものではないことを理解されたい。本発明の趣旨および範囲から逸脱せずに本発明の形態および細部の様々な変更を行うことができることが、関連技術の当業者に明らかであろう。したがって、本発明の広さおよび範囲は、上述した例示的实施形態のいずれによって限定されるものでもなく、以下の特許請求の範囲およびそれらの均等物のみにしたがって規定されるものである。

【0289】

本明細書に記載される全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明に関する技術分野の当業者の技能のレベルを示し、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が参照により援用されることが具体的にかつ個々に示されているのと同程度に、参照により本明細書に援用される。

40

【実施例】

【0290】

以下の非限定的な実施例は、本発明をさらに例示する。以下の実施例は、原料としてのトウモロコシおよびカルボン酸としてのCOFAを含むが、本発明から逸脱せずに、他のバイオマス源を原料に使用することができ、COFA以外の酸がカルボン酸として働き得ることを理解されたい。さらに、以下の実施例は、ブタノールおよびブチルエステルの生成を含むが、本発明から逸脱せずに、エタノールを含む他のアルコール、およびアルコー

50

ルエステルが生成され得る。

【0291】

本明細書において使用される際、使用される略語の意味は以下のとおりであった：「g」はグラムを意味し、「kg」はキログラムを意味し、「L」はリットルを意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「 μ L」はマイクロリットルを意味し、「mL/L」はミリリットル／リットルを意味し、「mL/分」はミリリットル／分を意味し、「DI」は脱イオン化されていることを意味し、「uM」はマイクロメートルを意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「w/v」は重量／体積を意味し、「OD」は光学密度を意味し、「OD₆₀₀」は600nmの波長における光学密度を意味し、「dcw」は乾燥菌体重量を意味し、「rpm」は毎分回転数を意味し、「℃」は摂氏温度を意味し、「℃/分」は摂氏温度／分を意味し、「slpm」は標準リットル／分を意味し、「ppm」は百万分率を意味し、「pdc」はピルビン酸デカルボキシラーゼ酵素を意味し、後ろに酵素番号が付く。

10

【0292】

一般的な方法

シードフラスコ増殖 (Seed Flask Growth)

pdc1が欠損した、pdc5が欠損した、およびpdc6が欠損した、炭水化物源からイソブタノールを生成するように改変されたサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 株を、凍結された培地からのシードフラスコ中で0.55~1.1g/L dcw (OD₆₀₀ 1.3~2.6—Thermo Helios a Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) まで増殖させた。培地を、300rpmで回転する培養器中、23~26℃で増殖させた。凍結した培地を-80℃で予め貯蔵した。第1のシードフラスコ培地の組成は以下のとおりであった：

20

3.0~5.0g/Lのデキストロース

3.0~3.5g/Lの無水エタノール

3.7g/LのFormedium (商標) Synthetic Complete Amino Acid (Kaiser) Drop-Out: HISなし、URAなし (参照番号DSCK162CK)

アミノ酸を含まない6.7g/LのDifco Yeast Nitrogen Base (番号291920)。

30

【0293】

第1のシードフラスコ培地からの8~12ミリリットルを、2Lのフラスコに移し、300rpmで回転する培養器中、30℃で増殖させた。第2のシードフラスコは、220mLの以下の培地を有する：

30.0g/Lのデキストロース

5.0g/Lの無水エタノール

3.7g/LのFormedium (商標) Synthetic Complete Amino Acid (Kaiser) Drop-Out: HISなし、URAなし (参照番号DSCK162CK)

40

アミノ酸を含まない6.7g/LのDifco Yeast Nitrogen Base (番号291920)

pH 5.5~6.0に滴定された0.2MのMES緩衝液。

【0294】

培地を、0.55~1.1g/L dcw (OD₆₀₀ 1.3~2.6) で増殖させた。200g/Lのペプトンおよび100g/Lの酵母抽出物を含有するさらなる30mLの溶液を、この細胞濃縮物に加えた。次に、さらなる250~300mLの0.2uMのろ過滅菌されたHD OCENO L (登録商標) 90/95オレイルアルコール (Cognis, Monheim, DE) をフラスコに加えた。4g/L dcw超 (OD₆₀₀ >10) まで培地を増殖させ続けてから、採取し、発酵に加えた。

50

【0295】

発酵の調製

初期の発酵槽の調製

ガラスの被覆された2 Lの発酵槽 (Sartorius AG, Goettingen, Germany) に、家庭用水を、66%の液化重量になるまで投入した。pHプローブ (Hamilton Easyferm Plus K8、部品番号: 238627、Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland) を、Sartorius DCU-3 Control Tower Calibrationメニューによって校正した。pH=7でゼロ校正を行った。pH=4でスパン校正を行った。次に、プローブを、ステンレス鋼のヘッドプレートを通して発酵槽に入れた。溶解された酸素プローブ (pO₂ プローブ) も、ヘッドプレートを通して発酵槽に入れた。栄養、シード培地、抽出溶媒、および基剤を送達するのに使用される管をヘッドプレートに取り付け、端部に箔を被せた (foil)。発酵槽全体をSteris (Steris Corporation, Mentor, Ohio) オートクレーブに入れ、液体サイクル中で30分間滅菌した。

10

【0296】

発酵槽をオートクレーブから取り出し、ロードセル上に設置した。ジャケット水供給および戻り配管を、それぞれ家庭用水および排水管 (clean drain) に連結した。流入水および流出水の配管を冷却する凝縮器を、7℃で運転される6 Lの再循環温度浴に連結した。発酵槽からのガスを移送する通気管路を、Thermo質量分析計 (PrimadB, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) に連結された移送管路に連結した。スパーージャ管路をガス供給管路に連結した。栄養、抽出溶媒、シード培地、および基剤を加えるための管を、ポンプを通して配管し (plumb)、またはしっかりと固定した。

20

【0297】

発酵槽温度を、熱電対および家庭用水循環ループを用いて55℃に制御した。湿潤したトウモロコシの実 (#2イエローデント) を、1.0 mmのふるいを備えたハンマーミルを用いて磨砕し、次に、得られた、磨砕された全粒トウモロコシの実を、29~30% (乾燥トウモロコシ固体重量) の液化反応塊の投入量で発酵槽に加えた。

【0298】

液化前のリパーゼ処理

リパーゼ酵素原液を、最終的なリパーゼ濃度が10 ppmになるように発酵槽に加えた。発酵槽を、55℃、300 rpm、および0.3 slpmのN₂ 重層 (overlay) で6時間超にわたって保持した。リパーゼ処理が完了した後、後述されるように液化を行った (液化)。

30

【0299】

液化

滅菌した家庭用N₂ をスパーージャによって0.3 slpmで加えつつ、発酵槽を300~1200 rpmで混合しながら、 α -アミラーゼを、その仕様書どおりに発酵槽に加えた。温度設定点を、55℃から85℃に変化させた。温度が80℃を超える場合、液化調理時間を開始し、液化サイクルを、90~120分間80℃超に保持した。液化サイクルが完了した後、発酵槽温度設定点を、30℃の発酵温度に設定した。化学的消泡剤を加えずに発泡を防ぐために、N₂ をスパーージャからヘッドスペースへと向け直した。

40

【0300】

液化後のリパーゼ処理

液化サイクルが完了した後 (液化)、発酵槽温度を30℃の代わりに55℃に設定した。必要に応じて酸または塩基のボラス添加を行うことによって、pHをpH=5.8に手作業で制御した。リパーゼ酵素原液を、最終的なリパーゼ濃度が10 ppmになるように発酵槽に加えた。発酵槽を、55℃、300 rpm、および0.3 slpmのN₂ 重層で6時間超にわたって保持した。リパーゼ処理が完了した後、発酵槽温度を30℃に設定

50

した。

【0301】

リパーゼの熱による失活処理（加熱殺菌処理方法）

発酵槽温度を、15分間より長く80℃超に保持して、リパーゼを失活させた。熱による失活処理が完了した後、発酵槽温度を30℃に設定した。

【0302】

接種の前の栄養添加

接種の直前にエタノール（6.36mL/L、接種後の体積、200プルフ、無水）を発酵槽に加えた。最終濃度が20mg/Lになるようにチアミンを加え、接種の直前に100mg/Lのニコチン酸も加えた。

【0303】

接種の前のオレイルアルコールまたはトウモロコシ油脂肪酸の添加

接種の直後に1L/L（接種後の体積）のオレイルアルコールまたはトウモロコシ油脂肪酸を加えた。

【0304】

発酵作業

発酵槽の接種

N₂を発酵槽に加えながら、発酵槽pO₂プローブをゼロに較正した。発酵槽pO₂プローブを、300rpmにおける滅菌空気スパーズを用いてそのスパンに較正した。第2のシードフラスコが4g/L dcw超になった後、発酵槽に接種した。振とうフラスコを培養器／振とう器から5分間取り出して、オレイルアルコール相と水相との相分離を可能にした。水相（110mL）を滅菌した接種ボトルに移した。接種材料を、蠕動ポンプを通して発酵槽に注入した。

【0305】

発酵槽の運転条件

発酵槽を、増殖および生成段階全体について30℃で運転した。pHを、酸を全く加えずに5.7～5.9のpHから5.2の制御設定点まで低下させた。増殖および生成段階の残りでは、水酸化アンモニウムを用いて、pHをpH=5.2に制御した。増殖および生成段階の残りでは、無菌の空気を、スパージャを介して、0.3slpmで発酵槽に加えた。DCU-3 Control Box PID制御ループによって、攪拌制御のみを用いて、攪拌器を最小で300rpmに設定し、最大で2000rpmに設定して、pO₂を、3.0%に制御されるように設定した。α-アミラーゼ（グルコアミラーゼ）を加えることによって、液化トウモロコシマッシュの同時糖化発酵によってグルコースを供給した。でんぷんが糖化に利用できる限り、グルコースを過剰（1～50g/L）に保った。

【0306】

分析

ガスの分析

処理空気を、Thermo Prima (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) 質量分析計で分析した。これは、滅菌してから各発酵槽に加えたのと同じ処理空気であった。各発酵槽のオフガスを、同じ質量分析計で分析した。このThermo Prima dBは、毎週月曜の午前6:00に較正チェックを実行する機能を有する。較正チェックを、質量分析計に関連するGas Works v1.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) ソフトウェアによってスケジューリングした。較正されるガスは以下のとおりであった：

【0307】

10

20

30

40

【表 3】

ガス	較正濃度モル%	較正頻度
窒素	78%	週 1 回
酸素	21%	週 1 回
イソブタノール	0.2%	年 1 回
アルゴン	1%	週 1 回
二酸化炭素	0.03%	週 1 回

【0308】

10

二酸化炭素を、他の公知のボトル入りのガスを用いて、較正サイクル中 5 % および 15 % でチェックした。酸素を、他の公知のボトル入りのガスを用いて 15 % でチェックした。各発酵槽のオフガスの分析に基づいて、ストリップングされたイソブタノール、消費された酸素、およびオフガスに吸入された二酸化炭素の量を、質量分析計のモル分率分析および発酵槽に入るガス流量（質量流制御装置）を用いて測定した。1 時間当たりのガス速度を計算し、次に、発酵の間のその速度を積分した。

【0309】

バイオマスの測定

0.08 % の Trypan Blue 溶液を、1 × PBS による、NaCl (VWR BDH 8721-0) 中の 0.4 % の Trypan Blue の 1 : 5 の希釈液から調製した。1.0 mL の試料を、発酵槽から引き抜き、1.5 mL の Eppendorf 遠心分離機管に入れ、Eppendorf, 5415 において、14,000 rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離の後、上部の溶媒層を、20 ~ 200 μL の BioHit ピペット先端を有する m200 Variable Channel BioHit ピペットを用いて除去した。溶媒と水層との間の層を除去しないように注意した。溶媒層を除去してから、試料を、2700 rpm に設定された Vortex-Genie（登録商標）を用いて再懸濁した。

20

【0310】

血球計計数のための理想的な濃度を準備するために、一連の希釈が必要とされた。OD が 10 であった場合、理想的な量（20 ~ 30）の細胞が平方当たり計数されるようにし得る 0.5 の OD を得るために、1 : 20 の希釈を行い得る。トウモロコシの固体による、希釈の不正確性を低下させるために、カットされた 100 ~ 1000 μL の BioHit ピペット先端を用いた複数回の希釈が必要とされた。先端が詰まるのを防いで開口を広げるために、約 1 cm を先端からカットした。1 : 20 の最終的な希釈の場合、発酵試料および 0.9 % の NaCl 溶液の初期の 1 : 1 の希釈液を調製した。次に、前の溶液の 1 : 1 の希釈液（すなわち、初期の 1 : 1 の希釈液）および 0.9 % の NaCl 溶液（第 2 の希釈液）を生成した後、第 2 の希釈液および Trypan Blue 溶液の 1 : 5 の希釈液を生成した。試料を各希釈の間にボルテックスし、カットされた先端を 0.9 % の NaCl および Trypan Blue 溶液に入れてすすいだ。

30

【0311】

カバースリップを、血球計 (Hausser Scientific Bright-Line 1492) の上部に注意深く入れた。2 ~ 20 μL の BioHit ピペット先端を有する m200 Variable Channel BioHit ピペットを用いて、アリコート (10 μL) を、最終的な Trypan Blue 希釈液から抜き取り、血球計に注入した。血球計を 40 倍の倍率の Zeiss Axioskop 40 顕微鏡に設置した。中央の 4 分の 1 (center quadrant) を 25 個の方形に分割し、次に、両方のチャンバーにおける 4 隅および中央の方形 (center square) を計数し、記録した。両方のチャンバーを計数した後、平均値を取り、希釈係数 (20) を乗算し、次に血球計における中央の 4 分の 1 における方形の数の 25 を乗算し、次に計数された 4 分の 1 の体積である 0.0001 mL で除算した。この計算の合計は、mL 当

40

50

たりの細胞の数である。

【0312】

水相中の発酵生成物のLC分析

試料を処理の準備ができるまで冷蔵した。試料を、冷蔵から取り出して、室温にした（約1時間）。約300 μ Lの試料を、100～1000 μ LのBioHitピペット先端を有するm1000 Variable Channel BioHitピペットを用いて、0.2 μ mの遠心分離機フィルター（Nanosep（登録商標）MFの改造されたナイロン遠心分離機フィルター）に移し、次にEppendorf, 5415Cを用いて、14,000rpmで5分間遠心分離した。約200 μ Lのろ過された試料を、ポリマーフィート（feet）とともに250 μ Lのガラス容器挿入部（insert）を備えた1.8オートサンプラー容器に移した。PTFE隔壁を備えたねじ蓋を用いて容器に蓋をしてから、2700rpmに設定されたVortex-Genie（登録商標）を用いて試料をボルテックスした。

【0313】

次に、試料を、バイナリアイソクラティックポンプ、真空脱気装置、加熱されたカラム区画、サンプラー冷却システム、UV DAD検出器およびRI検出器を備えたAgilent 1200シリーズLCで実験した。使用されたカラムは、Bio-Rad Cation Hリフィル、30X4.6ガードカラムを備えたAminex HPLC-87H, 300X7.8であった。カラム温度は、0.01Nの硫酸の移動相を用いて、0.6mL/分の流量で40分間、40℃であった。結果を表1に示す。

【0314】

【表4】

表1: 水相中の発酵生成物の保持時間

10 μ Lの注入に標準化した HPLC 302/310	FW	RID 保持時間 (分)	標準の範囲 (g/L)	UV 保持時間 (分)
クエン酸	192.12	8.025	0.3～17	7.616
グルコース	180.16	8.83	0.5～71	
ピルビン酸(Na)	110.04	9.388	0.1～5.2	8.5
A-Kiv(Na)	138.1	9.91	0.07～5.0	8.55
2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸 (Na)	156.1	10.972	0.2～8.8	10.529
コハク酸	118.09	11.561	0.3～16	11.216
乳酸(Li)	96.01	12.343	0.3～17	11.948
グリセロール	92.09	12.974	0.8～39	
ギ酸	46.03	13.686	0.2～13	13.232
酢酸塩(Na)	82.03	14.914	0.5～16	14.563
メソ-ブタンジオール	90.12	17.583	0.1～19	
(+/-)-2,3-ブタンジオール	90.12	18.4	0.2～19	
イソ酪酸	88.11	19.685	0.1～8.0	19.277
エタノール	46.07	21.401	0.5～34	
イソブチルアルデヒド	72.11	27.64	0.01～0.11	
イソブタノール	74.12	32.276	0.2～15	
3-OH-2-ブタノン(アセトイン)	88.11		0.1～11	17.151

【0315】

試料を処理の準備ができるまで冷蔵した。試料を、冷蔵から取り出して、室温にした（約1時間）。約150 μ Lの試料を、100～1000 μ LのBioHitピペット先端を有するm1000 Variable Channel BioHitピペットを用いて、ポリマーフィートとともに250 μ Lのガラス容器挿入部を備えた1.8オートサンプラー容器に移した。PTFE隔壁を備えたねじ蓋を用いて容器に蓋をした。

【0316】

次に、試料を、7683B注入器およびG2614Aオートサンプラーを備えたAgilent 7890A GCで実験した。カラムは、HP-Innowaxカラム(30m×0.32mmの内径(ID)、0.25μmのフィルム)であった。キャリアガスは、一定の上部圧力を用いて45℃で測定される1.5mL/分の流量でヘリウムであり；注入器スプリットは、225℃で1：50であり；オープン温度は、1.5分間45℃、10℃/分で0分間、45℃～160℃、次に29分間の実行時間について、35℃/分で14分間、230℃であった。炎イオン化検出を、40mL/分のヘリウムメイクアップガスを用いて260℃で使用した。結果を表2に示す。

【0317】

【表5】

表2: 溶媒相中の発酵生成物の保持時間

10μLの注入に標準化した GC 302/310	FW	溶媒保持時間 (分)	標準の範囲 (g/L)
イソブチルアルデヒド	72.11	2.75	0.7~10.4
エタノール	46.07	3.62	0.5~34
イソブタノール	74.12	5.53	0.2~16
3-OH-2-ブタノン(アセトイン)	88.11	8.29	0.1~11
(+/-)-2,3-ブタンジオール	90.12	10.94	0.1~19
イソ酪酸	88.11	11.907	0.1~7.9
メソ-ブタンジオール	90.12	11.26	0.1~6.5
グリセロール	92.09	16.99	0.8~9

【0318】

脂肪酸ブチルエステルについて分析される試料を、7683B注入器およびG2614Aオートサンプラーを備えたAgilent 6890 GCで実験した。カラムは、HP-DB-FFAPカラム(15メートル×0.53mmの内径(Megabore)、1-ミクロンのフィルム厚さのカラム(30m×0.32mmの内径、0.25μmのフィルム)であった。キャリアガスは、一定の上部圧力を用いて45℃で測定される3.7mL/分の流量でヘリウムであり；注入器スプリットは、225℃で1：50であり；オープン温度は、2.0分間100℃、10℃/分で100℃～250℃、次に、26分間の実行時間について、9分間250℃であった。炎イオン化検出を、40mL/分のヘリウムメイクアップガスを用いて300℃で使用した。以下のGC標準(Nu-Chek Prep; Elysian, MN)を用いて、脂肪酸イソブチルエステル生成物：パルミチン酸イソブチル、ステアリン酸イソブチル、オレイン酸イソブチル、リノール酸イソブチル、リノレン酸イソブチル、アラキドン酸イソブチルの属性を確認した。

【0319】

実施例1～14は、権利請求される方法に使用され得る様々な発酵条件を説明する。例として、液化前のリパーゼ処理を行う発酵もあれば、液化後のリパーゼ処理を行う発酵もあった。他の実施例では、発酵に熱による失活処理を行った。発酵の後、有効イソブタノール力価(有効イソ力価)、すなわち、水性体積のリットル当たり生成されるイソブタノールの合計グラムを測定した。結果を表3に示す。

【0320】

実施例1-(対照)

実験識別子2010Y014は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後0.1～1.0時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンはNGCI-070であった。

【0321】

実施例 2

実験識別子 2010Y015 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、液化後のリパーゼ処理方法、接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは N G C I - 070 であった。

【0322】

実施例 3

実験識別子 2010Y016 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、液化後のリパーゼ処理方法、エタノールの除外を除いた接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは N G C I - 070 であった。

【0323】

実施例 4

実験識別子 2010Y017 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、液化後の加熱殺菌処理方法、エタノールの除外を除いた接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは N G C I - 070 であった。

【0324】

実施例 5

実験識別子 2010Y018 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、液化後に 7.2 ppm のリパーゼを加えたことのみを除いた液化後のリパーゼ処理方法、液化後の加熱殺菌処理方法、接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは N G C I - 070 であった。

【0325】

実施例 6 - (対照)

実験識別子 2010Y019 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、液化後の加熱殺菌処理方法、接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは N G C I - 070 であった。

【0326】

実施例 7 - (対照)

実験識別子 2010Y021 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化前のリパーゼ処理方法、液化方法、液化中の加熱殺菌処理、接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは N G C I - 070 であった。

【0327】

実施例 8

実験識別子 2010Y022 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは N G C I - 070 であった。

【0328】

実施例 9

実験識別子 2010Y023 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、液化後のリパーゼ処理方法、加熱殺菌処理なし、接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。粗トウモロコシ油から作製されるトウモロコシ油脂肪酸を、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは NGCI-070 であった。

【0329】

実施例 10

実験識別子 2010Y024 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化前のリパーゼ処理方法、液化方法、液化中の加熱殺菌処理、エタノールを加えなかったことを除いた接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは NGCI-070 であった。

10

【0330】

実施例 11

実験識別子 2010Y029 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化前のリパーゼ処理方法、液化方法、液化中の加熱殺菌処理、接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。粗トウモロコシ油から作製されるトウモロコシ油脂肪酸を、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは NGCI-070 であった。

【0331】

20

実施例 12

実験識別子 2010Y030 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化前のリパーゼ処理方法、液化方法、液化中の加熱殺菌処理、エタノールを加えなかったことを除いた接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。粗トウモロコシ油から作製されるトウモロコシ油脂肪酸を、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは NGCI-070 であった。

【0332】

実施例 13 - (対照)

実験識別子 2010Y031 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、液化後のリパーゼ処理方法、加熱殺菌処理なし、エタノールを加えなかったことを除いた接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。粗トウモロコシ油から作製されるトウモロコシ油脂肪酸を、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは NGCI-070 であった。

30

【0333】

実施例 14

実験識別子 2010Y032 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、液化後のリパーゼ処理方法、加熱殺菌処理なし、接種方法の前の栄養添加、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。粗トウモロコシ油から作製されるトウモロコシ油脂肪酸を、接種後 0.1～1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは NGCI-070 であった。

40

【0334】

【表 6】

表 3: 実施例 1~14 の発酵条件

実施例 番号	実験識別子	リパーゼ	最大 細胞数 $\times 10^7$	エタノール (g/L)	溶媒	リパーゼの 加熱殺菌	有効 イソブタノール 力価(g/L)*	最高有効 イソブタノール 速度(g/L/時)
1	2010Y014	なし	27.2	5	オレイル アルコール	なし	56.0	0.79
2	2010Y015	10 ppm	31.5	5	オレイル アルコール	なし	52.4	0.74
3	2010Y016	10 ppm	6.7	0	オレイル アルコール	なし	25.9	0.36
4	2010Y017	なし	7.9	0	オレイル アルコール	液化後	17.2	0.25
5	2010Y018	7.2 ppm	16.2	5	オレイル アルコール	液化後	45.8	0.66
6	2010Y019	なし	17.5	5	オレイル アルコール	液化後	48.1	0.69
7	2010Y021	10 ppm	21.2	5	オレイル アルコール	液化中	46.8	0.82
8	2010Y022	なし	9	5	オレイル アルコール	液化中	56.2	0.87
9	2010Y023	10 ppm	12.8	5	トウモロコシ 油脂脂肪酸	なし	60.3	1.3
10	2010Y024	10 ppm	25.3	0	オレイル アルコール	液化中	19.8	0.33
11	2010Y029	10 ppm	21.2	5	トウモロコシ 油脂脂肪酸	液化中	28.36	0.52
12	2010Y030	10 ppm	9	0	トウモロコシ 油脂脂肪酸	液化中	12.71	0.24
13	2010Y031	10 ppm	12.8	0	トウモロコシ 油脂脂肪酸	なし	18.86	0.35
14	2010Y032	10 ppm	25.3	5	トウモロコシ 油脂脂肪酸	なし	53.36	0.92

*「有効イソブタノール力価(g/L)」= 水性体積のリットル当たり生成されるイソブタノールの合計グラム

【0335】

実施例 15 および 16 は、液化後のリパーゼ処理がある場合とない場合の発酵およびイソブタノール生成の比較を示す。結果を表 4 および 5 に示す。

【0336】

実施例 15

実験識別子 2010Y026 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、液化後のリパーゼ処理方法、接種の前の栄養添加方法、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。粗トウモロコシ油から作製されたトウモロコシ油脂脂肪酸を、接種後 0.1~1.0 時間、単一のバッチに加えた。トウモロコシ油脂脂肪酸抽出溶媒を、ブロスの体積と等しい体積で加えた。ブタノロジェン (butanologen) は、PNY2205 であった。トウモロコシマッシュから作製されたグルコースがほとんど欠失されたため、46 時間~61 時間の発酵時間で、274 g の 50% w/w の滅菌したグルコース溶液の添加を行った。

【0337】

実施例 16

実験識別子 2010Y027 は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、初期の発酵槽の調製方法、液化方法、接種の前の栄養添加方法、発酵槽の接種方法、発酵槽の運転条件方法、および分析方法の全て。HD OCENO L (登録商標) 90/95 (オレイルアルコール、CAS 番号 143-28-2、Cognis, Monheim, DE) を、接種後 0.1~1.0 時間、単一のバッチに加えた。オレイルアルコール抽出溶

媒を、ブロスの体積と等しい体積で加えた。ブタノロジェンは、PNY 2205であった。

【0338】

【表7】

表4

実験識別番号 (ID)	リパーゼの 添加	抽出溶媒	消費される グルコース (g)	生成される バイオマス (cfu/mL)
2010Y026	あり	トウモロコシ油脂肪酸	326.3	34.2×10^7
2010Y027	なし	オレイルアルコール	234.9	33.0×10^7

10

【0339】

【表8】

表5

実験識別番号 (ID)	リパーゼの 添加	水溶液中の 最大残留 <i>i</i> -BuOH (g/L)	有効 <i>i</i> -BuOH 力価 (g/L)	最高有効 <i>i</i> -BuOH 生成速度 g/L/時 (水性体積)	収率 g <i>i</i> -BuOH/ g グルコース
2010Y026	あり	4.7	72.2	1.41	0.26
2010Y026	なし	10.0	55.4	1.19	0.25

20

【0340】

実施例17～22は、発酵およびイソブタノール生成への、再利用される抽出剤に対する新鮮な抽出剤の影響の比較を示す。結果を表6に示す。これらの実施例では、2Lおよび10Lの発酵を、後述されるように調製した。

【0341】

10Lのプレシードフラスコ増殖

30

pdc1が欠損した、pdc5が欠損した、およびpdc6が欠損した、炭水化物源からイソブタノールを生成するように改変されたサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 株 (上記の株 PNY 2242) を、凍結された培地からのシードフラスコ (125mLの通気式フラスコ中、10mLの合成培地) 中で0.6～0.7g/L dcw (OD₆₀₀ 1.5～2.5—Thermo Helios α Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) まで増殖させた。培地を260rpmで回転する培養器中、29～31℃で増殖させた。凍結された培地を-80℃で予め貯蔵した。合成シードフラスコ培地の組成は以下のとおりであった：

10.0g/Lのデキストロース

40

3.5mL/Lの無水エタノール

3.7g/LのFormedium (商標) Synthetic Complete Amino Acid (Kaiser) Drop-Out: HISなし、URAなし (参照番号 DSC K162CK)

アミノ酸を含まない6.7g/LのDifco Yeast Nitrogen Base (番号291920)

1:1:: Tween 80:エタノール中1%のエルゴステロール。

【0342】

第1のシードフラスコ培地からの2ミリリットルを、250mLの通気式フラスコ中の25mLに移し、260rpmで回転する培養器中、29～31℃で増殖させた。第2の

50

シードフラスコは、上記で使したものと同一合成培地をを使うする。

【0343】

培地を、0.6~0.7 g/L dcw (OD₆₀₀ 1.0~3.0) まで増殖させた。次に、8 mLのこの第2のフラスコ培地を、200 mLの合成培地を含む3つのフラスコ(2 Lのフラスコ、通気式フラスコ、バッフル付きフラスコ)に加えた。培地を、培養器中、29~31℃で18~24時間増殖させた。3つのシードフラスコは、始めの2つのシードフラスコに使用されるのと同じ合成培地をを使うする。これらの3つのフラスコ(600 mLのフラスコブロス)を用いて、6 Lの最終的な水性体積で繁殖タンクに接種する。

【0344】

10 Lの繁殖タンク液化

10 Lの、B. Braun BioStat C発酵装置をを使うするために準備した。インラインpHプローブを発酵装置に入れた。pH=7でゼロ較正を行った。pH=4でスパン較正を行った。次に、プローブを、サイドポートを通して発酵槽に入れた。溶解された酸素プローブ(pO₂プローブ)も、サイドポートを通して発酵装置に入れた。栄養、シード培地、抽出溶媒、および基剤を送達するのに使用される管をヘッドプレートに取り付け、端部に箔を被せた(foil)。取り入れ、採取するための弁を、低圧蒸気および121℃超で20分間超にわたる蒸気トラップで滅菌した。

【0345】

発酵槽温度を、熱電対および家庭用水循環ループを用いて、30℃に制御した。湿潤したトウモロコシの実(#2イエローデント)を、1.0 mmのふるいを備えたハンマーミルを用いて磨砕し、次に、得られた、磨砕された全粒トウモロコシの実を、10~20% (乾燥トウモロコシ固体重量)の液化反応塊の投入量で発酵槽に加えた。Difco Yeast Extractを、0.5% w/wの全バッチ重量で発酵装置に加えた。

【0346】

滅菌した家庭用N₂をスパージャによって1~2 slpmで加えつつ、発酵槽を300~1500 rpmで混合しながら、 α -アミラーゼを、その仕様書どおりに発酵槽に加えた。温度設定点を、各段階で5~15分間の保持を伴う5℃の段階的变化で55℃から95℃に変化させて、十分な混合を確実にした。温度が90℃を超える場合、液化調理時間を開始し、液化サイクルを、60分間90℃超に保持した。液化サイクルが完了した後、発酵槽温度設定点を、30℃の発酵温度に設定した。化学的消泡剤を加えずに発泡を防ぐために、N₂をスパージャからヘッドスペースへと向け直した。

【0347】

10 Lの繁殖タンク運転

N₂を発酵槽に加えながら、発酵槽pO₂プローブをゼロに較正した。発酵槽pO₂プローブを、400 rpmにおける滅菌空気スパージを用いてそのスパンに較正した。プレシードフラスコ増殖工程の最終段階から発酵槽に接種した。3つの振とうフラスコを、培養器/振とう器から取り出し、滅菌した槽に加えた。滅菌した槽の内容物を、繁殖タンク液化方法中に作製された、5.3~5.5 Lの液化されたマッシュに加えた。

【0348】

発酵温度を29~31℃に制御した。攪拌速度を400 rpmに固定した。空気を2.0 slpmで発酵全体についてスパージした。発酵装置のためのNH₄OHおよびPID制御ループを用いて、pHを5.4~5.5に制御した。背圧制御弁を制御するPIDループによって制御される、0.3~0.5 バールの背圧が発酵装置において設定された。

【0349】

接種後16~20時間の時点で、グルコアミラーゼ(1.8 mLのDistillase (登録商標) L-400, Genencor, Palo Alto, CA)を加えて、同時糖化発酵を開始し、溶解されたでんぷんからグルコースを放出した。また、5.5 LのHD OCENOL (登録商標) 90/95 (オレイルアルコール, Cognis, Monheim, DE)を発酵装置に加えた。34~36時間の時点で、攪拌器速度を10

10

20

30

40

50

0 rpmまで低下させた。10分後、攪拌器をオフにし、発酵装置への空気流をスパージモードからオーバーレイ (overlay) モードに変更した。

【0350】

10 Lの生成タンク液化

10 Lの生成タンク液化を上述したように行った。発酵槽温度を、熱電対および家庭用水循環ループを用いて、30℃に制御した。湿潤したトウモロコシの実 (#2 イエローデント) を、1.0 mmのふるいを備えたハンマーミルを用いて磨砕し、次に、得られた、磨砕された全粒トウモロコシの実を、25~35% (乾燥トウモロコシ固体重量) の液化反応塊の投入量で発酵槽に加えた。100倍ビタミン溶液 (100X Vitamin Solution) (2 g/Lのチアミンおよび10 g/Lのニコチン酸) の75 mLを発酵装置に添加した。α-アミラーゼを、上述したように発酵槽に加えた。また、発酵装置が30℃に戻された後、6~7 mL/Lの無水エタノールを発酵装置に添加した。

10

【0351】

10 Lの生成タンク運転

N₂を発酵槽に加えながら、発酵槽 pO₂ プロブをゼロに校正した。発酵槽 pO₂ プロブを、400 rpmにおける滅菌空気スパージを用いてそのスパンに校正した。発酵槽を繁殖タンクから接種した。繁殖タンク中の増殖時間の36時間後に、無菌の移動を繁殖タンクから行い、発酵攪拌を、10分間超にわたってオフにした。これにより、オレイルアルコールと水相とのかなりの分離が可能になった。無菌の移動を、繁殖タンクにおける採取弁 (この発酵装置の底部に位置する) から行った。移動後のタンクの最終的な非溶媒体積を基準にして、約10% v/vを生成タンクに加えた。

20

【0352】

発酵温度を29~31℃に制御した。攪拌速度を400 rpmに固定した。空気を2.0 slpmで発酵全体についてスパージした。発酵装置のためのNH₄OHおよびPID制御ループを用いて、pHを5.2~5.3に制御した。背圧制御弁を制御するPIDループによって制御される、0.3~0.5バールの背圧が発酵装置において設定された。

【0353】

接種の直前に、25~35% v/vのCognis Emery (登録商標) 610大豆脂肪酸を、発酵装置に無菌で加えた。10 Lの繁殖タンク運転方法が完了した後、発酵装置に10% v/vの発酵ブロスを接種した。接種の直後、グルコアミラーゼ (Distillase (登録商標) L-400) を加えて、でんぶんからグルコースを放出した。グルコース過剰を維持するために必要な場合、さらなるグルコアミラーゼの添加を行った。接種の直後、リパーゼ (Novozymes Lipolase (登録商標) 100 L) を、4~15 ppmで発酵装置に加えた。

30

【0354】

2 Lのプレシードフラスコ増殖

2 Lのプレシードフラスコ増殖を、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 株 (上記の株 PNY 2242) を用いて調製し、凍結された培地からのシードフラスコ (125 mLの通気式フラスコ中、10 mLの合成培地) 中で0.6~0.7 g/L dcw (OD₆₀₀ 1.5~2.5-Thermo Helios α Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) まで増殖させた。培地を、260 rpmで回転する培養器中、29~31℃で増殖させた。凍結された培地を-80℃で予め貯蔵した。合成シードフラスコ培地の組成は以下のとおりであった：

40

10.0 g/Lのデキストロース

3.5 mL/Lの無水エタノール

3.7 g/LのFormedium Synthetic Complete Amino Acid (Kaiser) Drop-Out: HISなし、URAなし (参照番号 D SCK 162CK)

アミノ酸を含まない6.7 g/LのDifco Yeast Nitrogen Ba

50

se (No. 291920)

1 : 1 : : Tween 80 : エタノール中 1 % のエルゴステロール。

【0355】

第1のシードフラスコ培地からの2ミリリットルを、250 mLの通気式フラスコ中の25 mLに移し、260 rpmで回転する培養器中、29～31℃で増殖させた。第2のシードフラスコは、上記で使

【0356】

培地を、0.6～0.7 g/L dcw (OD₆₀₀ 1.0～3.0)まで増殖させた。次に、4 mLのこの第2のフラスコ培地を、2 Lのフラスコ中の100 mLのトウモロコシマッシュ遠心分離液に加えた。培地を、培養器中、29～31℃で18～24時間増殖させた。次に、500 mLのHD OCE NOL (登録商標) 90/95 (オレイルアルコール、Cognis, Monheim, DE)をフラスコに加えた。フラスコを、6～8時間増殖させた。次に、80 mLの脱イオン水中の2 mLの1.2 gのDistillase (登録商標) L-400、(Genencor, Palo Alto, CA)を遠心分離液に加えて、遠心分離液中の溶解されたでんぷんからグルコースを放出した。培地を18～24時間増殖させ続けた。最終的なバイオマス濃度は、6～12 g/L dcwであった。

【0357】

以下の処方

1150 g の水道水

340.5 g の1 mmのふるいでふるい分けされた、磨砕されたトウモロコシ

13.5 g の酵母抽出物 (Difco 番号 9102333、低粉塵性 (low dusting))

27 g のペプトン

4.1 g の尿素

40.5 mg のニコチン酸

40.5 mg のチアミン。

【0358】

次に、材料を、Sorval RC5C遠心分離機中で30分間遠心分離した。上清を固体ベレットから分離した。上清を、Sterisオートクレーブ中で5分間の液体サイクルにわたって加熱した。これを遠心分離液として定義する。

【0359】

2 L の発酵調製

2 L の初期の発酵槽調製物

2 Lの初期の発酵槽調製物を、上述したように調製した。発酵槽温度を、熱電対および家庭用水循環ループを用いて、55℃に制御した。湿潤したトウモロコシの実(#2イエローデント)を、1.0 mmのふるいを備えたハンマーミルを用いて磨砕し、次に、得られた、磨砕された全粒トウモロコシの実を、25～30% (乾燥トウモロコシ固体重量)の液化反応塊の投入量で発酵槽に加えた。さらに、液化を上述したように行った。滅菌した家庭用N₂をスパージャによって0.3 slpmで加えつつ、発酵槽を300～1200 rpmで混合しながら、α-アミラーゼを、その仕様書どおりに発酵槽に加えた。

【0360】

接種の前の2 Lの添加

以下の栄養を、接種の前、液化後に、接種後の体積基準で発酵槽に加えた：

30 mg/L のニコチン酸

30 mg/L のチアミン

1 : 1 : Tween 80 : エタノール中の1 mL/Lの1%のエルゴステロール w/v 溶液

6.3 mL/L のエタノール

2 g / L の尿素。

【0361】

2 L の発酵槽接種

N₂ を発酵槽に加えながら、発酵槽 pO₂ プローブをゼロに較正した。発酵槽 pO₂ プローブを、300 rpm における滅菌空気スパーズを用いてそのスパンに較正した。プレシードフラスコ増殖工程の最終段階から発酵槽に接種した。振とうフラスコを培養器／振とう器から取り出し、30 分間遠心分離した。液体（オレイルアルコールおよび水性上清）を廃棄し、細胞ペレットを、プレシードフラスコ増殖培地（合成培地）中で再懸濁した。100 mL の水相を、滅菌した接種ボトルに移した。接種材料を、蠕動ポンプを通して発酵槽に注入した。

10

【0362】

接種後の 2 L のリパーゼ添加

Lipolase（登録商標）溶液（100 L のストック溶液）を、1.2 ~ 1.4 mg / mL の酵素濃度で調製した。非溶媒体積を基準にして所望の百万分率濃度まで発酵装置に接種した後、溶液を発酵に加えた。添加時間は、発酵装置を接種した後 1 時間未満にわたった。

【0363】

2 L の大豆油脂肪酸添加

発酵槽に、0 ~ 30 重量パーセントの脂肪酸ブチルエステルを含有する未使用の Cognis Emery（登録商標）610 大豆脂肪酸または再利用される Cognis Emery（登録商標）610 大豆脂肪酸のいずれかを 0.1 ~ 0.5 L / L（接種後の体積）加えた。

20

【0364】

2 L の発酵槽運転条件

発酵槽を、増殖および生成段階全体について 30 °C で運転した。pH を、酸を全く加えずに 5.7 ~ 5.9 の pH から 5.25 の制御設定点まで低下させた。増殖および生成段階の残りでは、水酸化アンモニウムを用いて、pH を pH = 5.2 に制御した。増殖および生成段階の残りでは、無菌の空気を、スパージャを介して、0.2 ~ 0.3 slpm で発酵槽に加えた。pO₂ を制御しなかった。攪拌器を 300 rpm で一定の rpm に設定した。攪拌軸は、液面の下に 2 つの Rushton 羽根車および液面の上に 1 つの傾斜した羽根車を有していた。グルコアミラーゼを加えることによって、液化トウモロコシマッシュの同時糖化発酵によってグルコースを供給した。でんぷんが糖化に利用できる限り、グルコースを過剰（1 ~ 50 g / L）に保った。

30

【0365】

5 ~ 20 mL の試料を、発酵槽から引き抜き、遠心分離管に入れ、上記の手順を用いて細胞質量測定のために遠心分離した。さらに、ガス分析ならびに水相中の発酵生成物の LC 分析および溶媒相中の発酵生成物の GC 分析などの分析方法を、上述したように行った。

【0366】

実施例 17 ~ 22 の発酵条件が以下に示され、結果の概要（脂肪酸ブチルエステルを含む未使用の大豆油脂肪酸および再利用される大豆脂肪酸）が表 6 に示される。

40

【0367】

実施例 17

実験識別子 GLNOR1050 は以下のものを含んでいた：10 L のプレシードフラスコ増殖、10 L の繁殖タンク液化、10 L の繁殖タンク運転、10 L の生成タンク液化、10 ppm の Lipolase（登録商標）100 L（Genencor）が発酵装置に加えられる 10 L の生成タンク運転、抽出剤：未使用の Cognis Emery（登録商標）610 大豆脂肪酸（未使用の大豆油脂肪酸）。液体溶媒および非溶媒材料を、Sorval RC-12 遠心分離機中で分離した、および全ての分析方法。

【0368】

50

実施例 18

実験識別子 G L N O R 1 0 5 1 は以下のものを含んでいた：10 L のプレシードフラスコ増殖、10 L の繁殖タンク液化、10 L の繁殖タンク運転、10 L の生成タンク液化、4 ppm の L i p o l a s e（登録商標）100 L（G e n e n c o r）が発酵装置に加えられる10 L の生成タンク運転、抽出剤：未使用の C o g n i s E m e r y（登録商標）610 大豆脂肪酸（未使用の大豆油脂肪酸）。液体溶媒および非溶媒材料を、S o r v a l R C - 1 2 遠心分離機中で分離した、および全ての分析方法。

【0369】

実施例 19

識別子 2 0 1 1 Y 0 2 9 は以下のものを含んでいた：2 L のプレシードフラスコ増殖、2 L の発酵調製、2 L の液化、接種の前の 2 L の添加、2 L の発酵槽接種、10 ppm の最終濃度における、接種後の 2 L のリパーゼ添加、2 L の再利用される大豆油脂肪酸添加（再利用される C o g n i s E m e r y（登録商標）610 大豆脂肪酸および実施例 56 A からの脂肪酸ブチルエステル—50% v/v の溶媒充填）、2 L の発酵槽運転条件、および全ての分析方法。

10

【0370】

実施例 20

識別子 2 0 1 1 Y 0 3 0 は以下のものを含んでいた：2 L のプレシードフラスコ増殖、2 L の発酵調製、2 L の液化、接種の前の 2 L の添加、2 L の発酵槽接種、10 ppm の最終濃度における、接種後の 2 L のリパーゼ添加、20～30% の脂肪酸ブチルエステルを含む 0.4 L/L（接種後の体積）の未使用の C o g n i s E m e r y（登録商標）610 大豆脂肪酸の添加、2 L の発酵槽運転条件、および全ての分析方法。

20

【0371】

実施例 21

識別子 2 0 1 1 Y 0 3 1 は以下のものを含んでいた：2 L のプレシードフラスコ増殖、2 L の発酵調製、2 L の液化、接種の前の 2 L の添加、2 L の発酵槽接種、10 ppm の最終濃度における、接種後の 2 L のリパーゼ添加、2 L の再利用される大豆油脂肪酸添加（再利用される C o g n i s E m e r y（登録商標）610 大豆脂肪酸および実施例 56 B からの脂肪酸ブチルエステル—10% v/v の溶媒充填）、2 L の発酵槽運転条件、および全ての分析方法。

30

【0372】

実施例 22

識別子 2 0 1 1 Y 0 3 2 は以下のものを含んでいた：2 L のプレシードフラスコ増殖、2 L の発酵調製、2 L の液化、接種の前の 2 L の添加、2 L の発酵槽接種、10 ppm の最終濃度における、接種後の 2 L のリパーゼ添加、0.4 L/L（接種後の体積）の未使用の C o g n i s E m e r y（登録商標）610 大豆脂肪酸の添加、2 L の発酵槽運転条件、および全ての分析方法。

【0373】

【表 9】

表 6

実験識別 番号 (ID)	リパーゼ ppm	最大 細胞数 $\times 10^7$	溶媒充填 体積%	最大 i-BuOH (水溶液) g/L	EOR 体積速度 g/L/時	抽出剤
GLNOR 1050	10	21.3	28%	6.9	0.97	未使用の 大豆油脂肪酸
GLNOR 1051	4	20.9	28%	8.9	0.83	未使用の 大豆油脂肪酸
2011Y029	10	20.9	50%	8.2	0.85	再利用される大豆油 脂肪酸および脂肪酸 ブチルエステル
2011Y030	10	24.4	40%	9.8	0.88	未使用の大豆油脂 肪酸および脂肪酸 ブチルエステル
2011Y031	10	9.8	10%	12.7	0.42	再利用される大豆油 脂肪酸および脂肪酸 ブチルエステル
2011Y032	10	26.5	40%	6.8	0.94	未使用の 大豆油脂肪酸

【0374】

実施例 23

以下の実施例は、発酵性炭素源としてスクロースを用いた発酵によるイソブタノールの生成を説明する。

【0375】

バイオマスの生成

接種材料：イソブタノロジェンの増殖を開始させるためのシード培地を準備した。シード培地の組成は以下のとおりであった：硫酸アンモニウム、5 g/L；リン酸二水素カリウム、3 g/L；硫酸マグネシウム七水和物、0.5 g/L；エタノール、3.2 g/L；酵母抽出物（BBL）、5 g/L；グルコース、10 g/L；MES 緩衝液、150 mmol/L；ビオチン、50 μ g/L；および 1 L の水中に、15 g の EDTA、4.5 g の硫酸亜鉛七水和物、0.8 g の無水塩化マンガン、0.3 g の塩化コバルト六水和物、0.3 g の硫酸銅五水和物、0.4 g の無水モリブデン酸二ナトリウム、4.5 g の塩化カルシウム二水和物、3 g の硫酸鉄七水和物、1 g のホウ酸、0.1 g のヨウ化カリウムを含有する微量元素溶液、1 mL/L。pH を 5.5 に調整し、次に、培地フィルターを、0.22 μ の滅菌フィルター装置によって滅菌した。

【0376】

バイオマス生成のための 10 L の発酵装置の調製

イソブタノロジェン PNY 2205 の 1 つのバイアルを、30 °C で一晩の増殖および 260 rpm の振とうのために、125 mL の通気式フラスコ中 15 mL のシード培地に無菌で移した。培地を、30 °C で一晩の増殖および 260 rpm の振とうのために、2 L のバッフル付きの通気式フラスコ中 500 mL の同じ培地に無菌で移し、培地が OD₆₀₀ 7 に達したときに、準備された 10 L の Sartorius C 発酵装置（Sartorius AG, Goettingen, Germany）に移した。

【0377】

6 L の初期体積の増殖培地を含む 10 L の Sartorius C 発酵装置を調製した。増殖培地の組成および調製は以下のとおりであった：滅菌の前に、硫酸アンモニウム、1 g/L；リン酸二水素カリウム、5 g/L；硫酸マグネシウム七水和物、2 g/L；酵母抽出物（Amberex（商標）695）、2 g/L；Antifoam Sigma 204、0.5 mL/L；ビオチン、100 μ g/L；および 1 mL/L の微量元素溶

液（1 Lの水中で調製される：15 gのEDTA、4.5 gの硫酸亜鉛七水和物、0.8 gの無水塩化マンガン、0.3 gの塩化コバルト六水和物、0.3 gの硫酸銅五水和物、0.4 gの無水モリブデン酸ニナトリウム、4.5 gの塩化カルシウム二水和物、3 gの硫酸鉄七水和物、1 gのホウ酸、0.1 gのヨウ化カリウム）。所定の位置における121℃での蒸気滅菌の後、槽を冷却し、60 gの原料培地を加えた。原料培地を以下のとおりに調製した：スクロース、50%の溶液、2.97 L；ビオチン、1.4 mg；34 mLの微量元素溶液；5 Nの水酸化ナトリウムを用いてpH 7.5まで滴定し、蒸気滅菌し；滅菌後に冷却し、130 mLのエタノールおよび酵母抽出物（Amberex（商標）695）の320 mLの20%（w/v）のろ過滅菌された溶液を加えた。ここで、10 Lの発酵装置中の初期の糖濃度は、3.7 g/Lのスクロース、0.8 g/Lのグルコース、および0.8 g/Lのフルクトースであった。

10

【0378】

発酵を、pH 5.5（水酸化アンモニウムの添加による）、30℃、2.0標準リットル/分における空気流、撹拌制御によって30%で溶解される酸素、および0.5バールの背圧に制御した。接種後、グルコースの残留測定が、0.1 g/L未満になるまで糖を消費し、次に供給プログラムを開始し；これを、11時間の経過発酵時間で行った。0.1/時のプログラムされた増殖速度で20のOD₆₀₀（約8 g/Lの乾燥細胞重量）が達成されるまでスクロース限度を保つようにプログラムを設定した。この実験の実際の測定される増殖速度は、0.18/時であった。20時間の発酵時間の後、目標のOD₆₀₀が達成された。

20

【0379】

目標を達成したら、培地を無菌で採取し、Sorvall RC12BP遠心分離機中で遠心分離した。得られたペレットを、後述されるイソブタノール生成培地とともに最終的な体積が300 mLになるように再懸濁した。この培地を、イソブタノール生成発酵装置のための接種材料として使用した。

【0380】

イソブタノールの生成

生成発酵装置の調製：Sartorius BioStat B Plus Twin制御ユニット（Sartorius AG, Goettingen, Germany）を備えた2つの1リットルのガラスApplikon（Applikon, Inc, Holland）発酵装置を、イソブタノール生成に使用した。発酵装置を1 Lの脱イオン水を用いて調製し、121℃で30分間オートクレーブすることによって滅菌した。発酵装置が冷めたら、水を無菌で除去し、表7に示されるようなろ過滅菌された生成培地の体積を加えた。生成培地の組成は以下のとおりであった：アミノ酸を含まない酵母窒素ベース（Difco）、6.7 g/L；ヒスチジン、ロイシン、トリプトファン、およびウラシルを含まない酵母合成ドロップアウト培地補充物（Sigma）、2.70 g/L；トリプトファン、1.6 mg/L；ロイシン、8 mg/L；エタノール、2.8 g/L；Antifoam Sigma 204、0.2 mL/L；スクロース、25 g/L。接種の直前に、ろ過滅菌したリパーゼ溶液は、表7に示されるとおりであった。pH 7の、10 mMのリン酸カリウム緩衝液中のLipolase（登録商標）L100（Sigma）を、1.25 mgのタンパク質/mLの最終濃度まで希釈することによって、リパーゼ溶液を調製した。溶液を調製し、発酵装置に加える前に、5℃で1日貯蔵した。

30

40

【0381】

【表 10】

表 7

発酵装置	発酵ブロス (mL)	SOFA (mL)	リパーゼ (mg/L)
A	440	320	0
B	440	320	10
C	520	240	10
D	520	240	25

10

【0382】

発酵装置を、pH 5.2 (20%の水酸化カリウムの添加による)、30℃、0.2 標準リットル／分における空気流、および攪拌制御によって3%で溶解された酸素に制御した。

【0383】

発酵装置にそれぞれ、初期OD₆₀₀ 2.0~2.5 (約8~10 g/Lの乾燥細胞重量)まで、40 mLの濃縮されたバイオマスを接種した。表7に示されるろ過滅菌された大豆油脂脂肪酸 (SOFA) の体積と同様に、4 mLのろ過滅菌されたビタミン溶液 (水中、チアミン-HCl、1 mg/mL; ニコチン酸、1 mg/mL) の添加を接種時に追加した。試料 (5~10 mL) を、2~3時間ごとに抜き取り、YSI Select Biochemistry Analyzer (YSI, Inc., Yellow Springs, Ohio) によって、グルコースおよびスクロースについて検定した。スクロースが消費されるにつれて、5~30 g/Lの濃度を維持するために50%のスクロース (w/w) の原料を加えた。試料の水相および有機相を分離し、Agilent 1100 HPLCによる上記のHPLC方法によって分析した。有機酸およびアルコールの分析のために、Shodex (登録商標) Sugar SH1011カラムを、0.01 Nの硫酸移動相とともに使用した。スクロース、グルコース、およびフルクトースの分析のために、0.01 MのNa₂HPO₄ (pH 8) 移動相とともにBioRad Aminex (登録商標) HPLC-87 Nカラムを使用した。

20

30

【0384】

リパーゼが加えられた発酵装置のそれぞれは、水相中のイソブタノールおよび溶媒相中の遊離イソブタノールのより低い濃度を有していた。イソブタノールの水相および溶媒相の濃度が、図6に示される。また、同じ溶媒充填量でより多くのリパーゼを加えることにより、イソブタノールのより低い水性力価および溶媒中のより低い遊離イソブタノール、およびより多いFABEとしてのイソブタノールが得られた。

【0385】

リパーゼを含む培地では、リパーゼを含まない対照の発酵装置より高い、イソブタノールの有効力価が得られた。図7は、イソブタノールの有効力価を示す。この実施例では、有効力価を、接種後の発酵装置中のブロスの初期測定重量および発酵装置に投入される溶媒の初期測定重量に基づいて計算した。発酵全体にわたって、溶媒密度は、0.88 g/mLであると仮定され、水性ブロス密度は、1.00 g/mLであると仮定された。より低い溶媒充填量におけるより多いリパーゼの添加により、イソブタノールのより高い有効力価 (D対C) が得られたが、溶媒の相対体積 (C対B) の増加ほど多くはなかった。

40

【0386】

図8に示されるように、グルコース当量で計算される、消費される糖は、リパーゼを加えた発酵装置においてより高い。消費されるグルコース当量を、スクロースの各モルをグルコース2モルと数え、およびフルクトースの各モルをグルコース1モルと数えて、発酵装置に供給されて残っている測定される糖から計算し、次に、グルコースの分子量によってグラムに換算した。消費されるグルコース当量の濃度も、接種後の発酵ブロスの初期体

50

積に基づいて計算する。

【0387】

実施例 24

オレイルアルコールを用いた原位置生成物除去を用いた同時糖化発酵のための液化トウモロコシマッシュのリパーゼ処理

実施例 1、2、および 3 において上述したように実行された発酵から取られたブロスおよびオレイルアルコールの試料を、E. G. Bligh および W. J. Dyer (Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37: 911-17, 1959、以後、参考文献 1) によって記載される方法にしたがって、脂質の重量% (脂肪酸メチルエステル、FAMEとして誘導体化される) および遊離脂肪酸の重量% (FFA、脂肪酸メチルエステル、FAMEとして誘導体化される) について分析した。3つの発酵のそれぞれについて調製された液化トウモロコシマッシュも、Lipolase (登録商標) 100 L (Novozymes) (30重量%の磨砕されたトウモロコシの実を含有する液化反応塊のkg当たり10ppmのLipolase (登録商標) 全可溶性タンパク質 (BCAタンパク質分析、Sigma Aldrich)) による処理の後、脂質の重量%およびFFAの重量%について分析した。実施例 1 (対照) の液化トウモロコシマッシュにリパーゼを加えず、リパーゼ (リパーゼの熱による失活なし) で処理された、液化トウモロコシマッシュを含有する実施例 2 および 3 に記載される発酵は、エタノールを実施例 3 に記載される発酵に加えなかったことを除いて同一であった。

【0388】

実施例 2 および 3 に記載されるように実行された発酵のために調製された、リパーゼ処理された液化トウモロコシマッシュの FFA の% は、リパーゼ処理しなかった場合 (実施例 1) の 31% と比較して、それぞれ 88% および 89% であった。70 時間 (実行終了 (EOR)) の時点で、実施例 2 および 3 (活性リパーゼを含有する) に記載されるように実行された発酵の OA 相中の FFA の濃度は、それぞれ 14% および 20% であり、対応する脂質の増加 (トウモロコシ油脂肪酸メチルエステル誘導体として測定される) は、GC/MS によって、OA による COFA のリパーゼ触媒エステル化に起因することが分かり、その際、液化トウモロコシマッシュ中のトウモロコシ油のリパーゼ触媒加水分解によって COFA がまず生成され; パルミチン酸オレイル、ステアリン酸オレイル、およびオレイン酸オレイルの生成を GC/MS によって確認し、第 4 のエステルを、リノール酸オレイルとして暫定的に特定した。FFA および脂質分析の結果を表 8 に示す。

【0389】

【表 1 1】

表 8: ISPR 抽出としてのオレイルアルコールおよび活性リパーゼを含有する発酵における脂質および遊離脂肪酸含量

発酵	リパーゼ	時間(時)、試料	脂質 (重量%)	FFA (重量%)	脂質 (g)	FFA (g)	脂質+ FFA (g)	% FFA
実施例 1	なし	液化されたマッシュ	0.61	0.28	5.3	2.4	7.7	31
実施例 1	なし	0.8 時間、ブロス	0.49	0.22	5.5	2.5	8.0	31
実施例 1	なし	31 時間、ブロス	0.19	0.03	2.1	0.3	2.4	13
実施例 1	なし	31 時間、OA	0.36	0.21	3.4	2.0	5.3	37
実施例 1	なし	70 時間、ブロス	0.15	0.03	1.7	0.3	2.0	15
実施例 1	なし	70 時間、OA	0.57	0.25	5.3	2.3	7.7	31
実施例 2	10 ppm	液化されたマッシュ	0.13	0.97	1.1	8.5	9.6	88
実施例 2	10 ppm	0.8 時間、ブロス	0.15	0.62	1.7	7.0	8.7	81
実施例 2	10 ppm	31 時間、ブロス	0.16	0.05	1.8	0.5	2.3	23
実施例 2	10 ppm	31 時間、OA	0.37	0.23	3.5	2.2	5.7	38
実施例 2	10 ppm	70 時間、ブロス	0.17	0.02	1.9	0.3	2.2	13
実施例 2	10 ppm	70 時間、OA	0.60	0.10	5.7	1.0	6.7	14
実施例 3	10 ppm	液化されたマッシュ	0.12	0.97	1.0	8.5	9.5	89
実施例 3	10 ppm	0.8 時間、ブロス	0.32	0.40	3.6	4.5	8.1	56
実施例 3	10 ppm	31 時間、ブロス	0.17	0.05	1.9	0.6	2.5	24
実施例 3	10 ppm	31 時間、OA	0.38	0.22	3.6	2.1	5.7	37
実施例 3	10 ppm	70 時間、ブロス	0.15	0.02	1.7	0.2	1.9	13
実施例 3	10 ppm	70 時間、OA	0.46	0.12	4.4	1.1	5.6	20

【0390】

実施例 2 5

トウモロコシ油遊離脂肪酸のオレイルアルコールエステルの生成を制限するための、リパーゼ処理される液化トウモロコシマッシュ中のリパーゼの熱による失活

水道水（918.4 g）を、被覆された 2 L の樹脂ケトルに加え、次に、474.6 g の湿重量（417.6 g の乾燥重量）の磨砕された全粒トウモロコシの実（ハンマーミルにおける 1.0 mm のふるい）を攪拌しながら加えた。混合物を、300 rpm で攪拌しながら 55℃ まで加熱し、2 N の硫酸を用いて pH を 5.8 に調整した。混合物に 0.672 g の Spezyme（登録商標）-FRED L（Genencor（登録商標）、Palo Alto, CA）を含有する 14.0 g の水溶液を加え、混合物の温度を、600 rpm で攪拌しながらおよび pH 5.8 で、85℃ まで上昇させた。85℃ で 120 分後、混合物を 50℃ に冷却し、得られた液化トウモロコシマッシュの 45.0 mL のアリコート、50 mL のポリプロピレン遠心分離機管に移し、-80℃ で冷凍貯蔵した。

【0391】

第 1 の反応において、上述したように調製された 50 g の液化トウモロコシマッシュを、10 ppm の Lipolase（登録商標）100 L（Novozymes）と、55℃ で 6 時間混合し、85℃ で 1 時間のリパーゼの失活を行わず、混合物を 30℃ に冷却した。第 2 の反応において、50 g の液化トウモロコシマッシュを、10 ppm の Lipolase（登録商標）と、55℃ で 6 時間混合し、次に 1 時間にわたって 85℃ まで加熱し（リパーゼの失活）、次に 30℃ に冷却した。第 3 の反応において、リパーゼを加えない 50 g の液化トウモロコシマッシュを、55℃ で 6 時間混合し、85℃ で 1 時間の加熱を行わず、混合物を 30℃ に冷却し、38 g のオレイルアルコールを加え、得られた混合物を 30℃ で 73 時間攪拌した。第 4 の反応において、リパーゼを加えない 50 g の液化トウモロコシマッシュを、55℃ で 6 時間混合し、次に 1 時間にわたって 85℃ まで加熱し、次に 30℃ に冷却した。4 つの反応混合物のそれぞれを、6 時間の時点で採取し、次に、38 g のオレイルアルコールを加え、得られた混合物を 30℃ で攪拌し、25 時間

および 73 時間の時点で採取した。参照文献 1 によって記載される方法にしたがって、試料（液化されたマッシュおよびオレイルアルコール（OA）の両方）を、脂質の重量％（脂肪酸メチルエステル、FAMEとして誘導体化される）および遊離脂肪酸の重量％（FFA、脂肪酸メチルエステル、FAMEとして誘導体化される）について分析した。

【0392】

OA 添加の前にリパーゼの熱による失活を伴って実行された第 2 の反応の OA 相中の FFA の％は、リパーゼ処理される液化トウモロコシマッシュ中のリパーゼを熱により失活させなかった場合（第 1 の反応）の、25 時間および 73 時間の時点におけるわずか 40 % の FFA および 21 % の FFA と比較して、25 時間で 99 % および 73 時間で 95 % であった。リパーゼを加えない 2 つの対照反応において FFA の％の大きな変化は観察されなかった。結果を表 9 に示す。

【0393】

【表 12】

表 9: 活性リパーゼまたは熱により失活されたリパーゼの存在下または非存在下における液化されたトウモロコシマッシュとオレイルアルコールとの混合物の脂質および遊離脂肪酸含量

反応条件	時間(時)、試料	脂質 (重量%)	FFA (重量%)	脂質 (mg)	FFA (mg)	脂質+FFA (mg)	% FFA
10 ppmの活性リパーゼ、 85℃の熱処理なし	6時間、液化されたマッシュ	0.08	0.71	41	345	386	89
	25時間、液化されたマッシュ	0.22	0.06	105	27	132	20
	25時間、OA	0.58	0.39	212	143	355	40
	73時間、液化されたマッシュ	0.25	0.05	121	22	143	18
	73時間、OA	0.91	0.24	333	88	420	21
10 ppmの不活性なリパーゼ、 85℃の熱処理	6時間、液化されたマッシュ	0.06	0.45	28	224	252	89
	25時間、液化されたマッシュ	0.10	0.11	49	54	103	53
	25時間、OA	0.02	0.96	8	366	374	99
	73時間、液化されたマッシュ	0.24	0.15	117	72	189	62
	73時間、OA	0.06	1.11	23	424	447	95
リパーゼなし、 85℃の熱処理なし	6時間、液化されたマッシュ	0.80	0.40	401	199	599	33
	25時間、液化されたマッシュ	0.30	0.05	147	25	173	15
	25時間、OA	0.55	0.36	212	139	351	40
	73時間、液化されたマッシュ	0.23	0.05	117	26	143	23
	73時間、OA	0.79	0.42	305	162	467	34
リパーゼなし、 85℃の熱処理	6時間、液化されたマッシュ	0.74	0.36	370	183	553	33
	25時間、液化されたマッシュ	0.31	0.05	156	27	183	15
	25時間、OA	0.60	0.35	233	136	369	37
	73時間、液化されたマッシュ	0.20	0.05	99	23	121	23
	73時間、OA	0.84	0.41	326	159	486	33

【0394】

実施例 26

オレイルアルコールを用いた原位置生成物除去を用いた同時糖化発酵のためのリパーゼ処理される液化トウモロコシマッシュ中のリパーゼの熱による失活

3 つの発酵を、実施例 4、5、および 6 において上述したように実行した。実施例 4 および 6 の液化トウモロコシマッシュには、発酵前にリパーゼを加えず、実施例 5 に記載される発酵における液化トウモロコシマッシュのリパーゼ処理（7.2 ppm の Lipolase（登録商標）全可溶性タンパク質を用いて）の直後に、熱による失活処理（リパーゼを完全に失活させるため）を行い、その後、接種の前の栄養添加および発酵を行った。実施例 4 および 6 に記載されるように実行された発酵のためにリパーゼ処理なしで調製された液化トウモロコシマッシュの FFA の％は、リパーゼ処理を伴う場合（実施例 5）の

８９％と比較して、それぞれ３１％および３４％であった。表１０に列挙される発酵の間、ＯＡ相中のＦＦＡの濃度は、熱により失活したリパーゼを含有するものを含む３つの発酵のいずれにおいても低下しなかった。実施例５（発酵前にリパーゼの熱による失活を伴う）にしたがって実行された発酵のＯＡ相中のＦＦＡの％は、液化トウモロコシマッシュをリパーゼで処理しなかった残りの２つの発酵（実施例４および６）についてのわずか３３％のＦＦＡと比較して、７０時間（実行終了（ＥＯＲ））の時点で９５％であった。結果を表１０に示す。

【０３９５】

【表１３】

表 10: ISPR 抽出としてのオレイルアルコールおよび熱により失活されたリパーゼを含有する発酵における脂質および遊離脂肪酸含量(液化されたマッシュのリパーゼ処理後)

発酵	リパーゼ	時間(時)、試料	脂質 (重量%)	FFA (重量%)	脂質 (g)	FFA (g)	脂質+ FFA (g)	% FFA
実施例 4	なし	液化されたマッシュ	0.65	0.30	7.2	3.3	10.4	31
実施例 4	なし	0.2 時間、ブロス	0.56	0.28	6.6	3.3	9.9	33
実施例 4	なし	4.3 時間、ブロス	0.28	0.09	3.3	1.0	4.4	24
実施例 4	なし	4.3 時間、OA	0.45	0.27	4.0	2.4	6.4	37
実施例 4	なし	30 時間、ブロス	0.17	0.05	2.0	0.6	2.7	24
実施例 4	なし	30 時間、OA	0.63	0.29	5.7	2.6	8.3	32
実施例 4	なし	53 時間、ブロス	0.13	0.04	1.5	0.5	2.0	23
実施例 4	なし	53 時間、OA	0.67	0.32	6.0	2.9	8.9	32
実施例 4	なし	70 時間、ブロス	0.13	0.04	1.5	0.4	1.9	23
実施例 4	なし	70 時間、OA	0.64	0.31	5.8	2.8	8.5	33
実施例 5	7.2 ppm	液化されたマッシュ	0.11	0.89	1.3	9.9	11.2	89
実施例 5	7.2 ppm	0.2 時間、ブロス	0.25	0.83	2.9	9.8	12.8	77
実施例 5	7.2 ppm	4.3 時間、ブロス	0.14	0.17	1.6	2.1	3.7	56
実施例 5	7.2 ppm	4.3 時間、OA	0.02	0.84	0.2	7.9	8.1	97
実施例 5	7.2 ppm	30 時間、ブロス	0.08	0.18	1.0	2.1	3.1	68
実施例 5	7.2 ppm	30 時間、OA	0.04	0.92	0.3	8.6	8.9	96
実施例 5	7.2 ppm	53 時間、ブロス	0.07	0.11	0.9	1.3	2.2	61
実施例 5	7.2 ppm	53 時間、OA	0.08	0.95	0.7	8.9	9.6	93
実施例 5	7.2 ppm	70 時間、ブロス	0.08	0.10	0.9	1.2	2.1	55
実施例 5	7.2 ppm	70 時間、OA	0.05	0.94	0.4	8.8	9.2	95
実施例 6	なし	液化されたマッシュ	0.66	0.34	7.3	3.8	11.1	34
実施例 6	なし	0.2 時間、ブロス	0.63	0.34	7.6	4.0	11.6	34
実施例 6	なし	4.3 時間、ブロス	0.33	0.10	3.9	1.2	5.1	23
実施例 6	なし	4.3 時間、OA	0.45	0.27	4.0	2.4	6.4	38
実施例 6	なし	30 時間、ブロス	0.17	0.06	2.1	0.8	2.8	26
実施例 6	なし	30 時間、OA	0.69	0.33	6.2	3.0	9.1	32
実施例 6	なし	53 時間、ブロス	0.14	0.05	1.6	0.5	2.2	25
実施例 6	なし	53 時間、OA	0.72	0.35	6.4	3.1	9.5	33
実施例 6	なし	70 時間、ブロス	0.15	0.05	1.8	0.6	2.4	25
実施例 6	なし	70 時間、OA	0.70	0.34	6.2	3.0	9.2	33

【０３９６】

実施例 27

液化の前の磨砕された全粒トウモロコシの実のリパーゼ処理

水道水（１３７７．６ｇ）を、２つの被覆された２Ｌの樹脂ケトルのそれぞれに加え、次に、７１１．９ｇの湿重量（６２５．８ｇの乾燥重量）の磨砕された全粒トウモロコシの実（ハンマーミルにおける１．０mmのふるい）を、攪拌しながら各ケトルに加えた。各混合物を、３００rpmで攪拌しながら５５℃まで加熱し、２Nの硫酸を用いてpHを５．８に調整した。各混合物に、１．００８ｇのSpezyme（登録商標）－FRED

10

20

30

40

50

L (Genencor (登録商標), Palo Alto, CA) を含有する 21.0 g の水溶液を加えた。次に、1つの混合物に、Lipolase (登録商標) 100 L 溶液 (21 mg の全可溶性タンパク質、10 ppm のリパーゼ最終濃度) の 10.5 mL の水溶液を加え、第2の混合物に、Lipolase (登録商標) 100 L 溶液 (2.1 mg の全可溶性タンパク質、1.0 ppm のリパーゼ最終濃度) の 1.05 mL の水溶液を加えた。55℃で1時間、2時間、4時間および6時間の時点で試料を各反応混合物から抜き取り、次に、混合物の温度を、600 rpm で攪拌しながら、pH 5.8 で 85℃まで上昇させ、混合物が最初に 85℃に達したときに試料を採取した。85℃で120時間後、試料を採取し、混合物を 50℃に冷却し、得られた液化トウモロコシマッシュの最終的な試料を 50 mL のポリプロピレン遠心分離機管に移し；全ての試料を -80℃で冷凍貯蔵した。

【0397】

2つの別個の反応において、上述したように調製された、10 ppm のリパーゼで処理される液化トウモロコシマッシュの 50 g の試料または 1.0 ppm のリパーゼで処理される液化トウモロコシマッシュの 55 g の試料を、オレイルアルコール (OA) (38 g) と、30℃で20時間混合し、次に、各反応混合物中の液化されたマッシュおよび OA を遠心分離によって分離し、参照文献 1 によって記載される方法にしたがって、各相を、脂質の重量% (脂肪酸メチルエステル、FAMEとして誘導体化される) および遊離脂肪酸の重量% (FFA、脂肪酸メチルエステル、FAMEとして誘導体化される) について分析した。液化中の 10 ppm のリパーゼの熱による失活を用いて調製された、液化されたマッシュ/OA 混合物の OA 相中の FFA の%は、液化中の 1.0 ppm のリパーゼの熱による失活を用いて調製された、液化されたマッシュ/OA 混合物の OA 相中のわずか 62% の FFA と比較して、20時間で98%であった。結果を表 11 に示す。

【0398】

【表 14】

表 11: 液化の前に磨砕トウモロコシ懸濁液のリパーゼ処理(液化中のリパーゼの熱による失活)を用いた、液化されたトウモロコシマッシュとオレイルアルコールとの混合物の脂質および遊離脂肪酸含量

反応条件	時間(時)、試料	脂質 (重量%)	FFA (重量%)	脂質 (mg)	FFA (mg)	脂質 +FFA (mg)	% FFA
85℃における液化の前に、 55℃における10 ppmのリパーゼ、 20時間にわたってOAと混合	1時間、液化前	0.226	0.627	112	311	424	74
	2時間、液化前	0.199	0.650	99	323	422	77
	4時間、液化前	0.151	0.673	75	334	410	82
	6時間、液化前	0.101	0.700	50	348	398	87
	0時間、85℃、液化された マッシュ	0.129	0.764	64	380	444	86
	2時間、85℃、液化 されたマッシュ	0.129	0.751	64	373	437	85
	20時間、30℃、液化され たマッシュ	0.074	0.068	37	34	71	48
	20時間、30℃、OA	0.015	1.035	5.7	394	400	98
85℃における液化の前に、 55℃における1.0 ppmのリパーゼ、 20時間にわたってOAと混合	1時間、液化前	0.408	0.480	226	266	492	54
	2時間、液化前	0.401	0.424	222	235	457	51
	4時間、液化前	0.299	0.433	165	240	405	58
	6時間、液化前	0.346	0.453	192	251	442	57
	0時間、85℃、液化された マッシュ	0.421	0.407	233	225	458	49
	2時間、85℃、液化された マッシュ	0.424	0.429	235	237	472	50
	20時間、30℃、液化され たマッシュ	0.219	0.054	121	30	151	20
	20時間、30℃、OA	0.344	0.573	140	233	373	62

【0399】

実施例 28

液化の前の磨砕された全粒トウモロコシの実の処理のためのリパーゼのスクリーニング

pH 5.8 で水道水 (67.9 g) および磨砕された全粒トウモロコシの実 (35.1 g の湿重量、ハンマーミルを用いて 1.0 mm のふるいで磨砕されたもの) を含有する 7 つの反応混合物を、栓をしたフラスコ中で 55℃ で攪拌した。3 mL の試料 (t = 0 時間) を、各フラスコから取り出し、試料をドライアイスですぐに凍結させ、次に、以下のリパーゼ (Novozymes) : Lipolase (登録商標) 100 L、Lipex (登録商標) 100 L、Lipoclean (登録商標) 2000T、Lipozyme (登録商標) CALB L、Novozyme (登録商標) CALA L、および Palatase 20000L のうちの 1 つの 1 mg の全可溶性タンパク質 (反応混合物中 10 ppm の最終濃度) を含有する約 0.5 mL の 10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を、各フラスコのうちの 1 つに加え; 7 つ目のフラスコにはリパーゼを加えなかった。得られた混合物を、栓をしたフラスコ中で 55℃ で攪拌し、3 mL の試料を、1 時間、2 時間、4 時間および 6 時間の時点で各反応混合物から引き抜き、参考文献 1 によって記載される方法にしたがって、脂質の重量% (脂肪酸メチルエステル、FAME として誘導体化される) および遊離脂肪酸の重量% (FFA、脂肪酸メチルエステル、FAME として誘導体化される) について分析するまで、ドライアイスですぐに凍結させ、遊離脂肪酸含量のパーセントを、脂質および遊離脂肪酸を合わせた全濃度に対して計算し、各試料について測定した。結果を表 12 に示す。

【0400】

【表 15】

表 12: 液化の前に 55℃ におけるリパーゼ処理を用いた、磨砕された全粒トウモロコシの実の混合物の遊離脂肪酸含量のパーセント(% FFA)

時間	% FFA				
	0 時間	1 時間	2 時間	4 時間	6 時間
Lipolase® 100L	33	56	74	76	79
Lipex® 100L	34	66	81	83	83
Lipoclean® 2000T	38	55	73	69	65
Lipozyme® CALB L	39	38	37	43	41
Novozyme® CALA L	37	40	44	44	45
Palatase® 20000L	37	49	59	62	66
酵素なし	38	33	37	41	42

【0401】

実施例 29

オレイルアルコールを用いた原位置生成物除去を用いた同時糖化発酵の前の磨砕された全粒トウモロコシの実のリパーゼ処理

3 つの発酵を、実施例 7、8、および 10 に上述したように実行した。実施例 7 および 10 に記載されるように実行された発酵では、リパーゼ (10 ppm の Lipolase (登録商標) 全可溶性タンパク質) を、磨砕トウモロコシの懸濁液に加え、液化の前に 55℃ で 6 時間加熱して、熱により失活したリパーゼを含有する液化トウモロコシマッシュを生成した。実施例 8 に記載される発酵のための液化トウモロコシマッシュを調製するのに使用される磨砕トウモロコシの懸濁液にはリパーゼを加えなかったが、この懸濁液に、液化の前に 55℃ における同じ加熱工程を行った。実施例 7 および 10 に記載されるように実行された発酵のために調製された、リパーゼ処理される液化トウモロコシマッシュ中

の F F A の % は、リパーゼ処理を行わない場合（実施例 8）の 41 % と比較して、それぞれ 83 % および 86 % であった。発酵の間、F F A の濃度は、熱により失活したリパーゼを含有するものを含む発酵のいずれにおいても低下しなかった。実施例 7 および 10（発酵の前にリパーゼの熱による失活を伴う）にしたがって実行された発酵の O A 相中の F F A の % は、磨砕された全粒トウモロコシの実を液化の前にリパーゼで処理しなかった実施例 8 にしたがって実行された発酵についてのわずか 49 % の F F A と比較して、70 時間（実行終了（E O R））の時点でそれぞれ 97 % であった。結果を表 13 に示す。

【0402】

【表 16】

表 13: ISPR 抽出としてのオレイルアルコールおよび熱により失活されたリパーゼ(液化の前に磨砕トウモロコシ懸濁液のリパーゼ処理)を含有する発酵における脂質および遊離脂肪酸含量

発酵	リパーゼ	時間(時)、試料	脂質 (重量%)	FFA (重量%)	脂質 (g)	FFA (g)	脂質+ FFA (g)	% FFA
実施例 7	10 ppm	リパーゼ処理前/液化前	0.65	0.22	7.1	2.4	9.4	25
実施例 7	10 ppm	リパーゼ処理後/液化前	0.22	0.65	2.4	7.0	9.5	74
実施例 7	10 ppm	液化されたマッシュ	0.17	0.79	1.8	8.5	10.3	83
実施例 7	10 ppm	0.3 時間、ブロス	0.16	0.79	1.8	8.9	10.7	83
実施例 7	10 ppm	4.8 時間、ブロス	0.14	0.31	1.6	3.5	5.1	69
実施例 7	10 ppm	4.8 時間、OA	0.04	0.68	0.3	5.4	5.6	95
実施例 7	10 ppm	29 時間、ブロス	0.10	0.12	1.2	1.3	2.5	53
実施例 7	10 ppm	29 時間、OA	0.03	1.05	0.2	8.2	8.4	98
実施例 7	10 ppm	53 時間、ブロス						
実施例 7	10 ppm	53 時間、OA	0.07	1.14	0.5	9.0	9.5	95
実施例 7	10 ppm	70 時間、ブロス	0.11	0.07	1.2	0.8	2.0	39
実施例 7	10 ppm	70 時間、OA	0.03	1.10	0.2	8.7	8.9	97
実施例 8	なし	リパーゼ処理前/液化前	0.62	0.23	6.7	2.5	9.2	27
実施例 8	なし	リパーゼ処理前/液化前	0.57	0.26	6.2	2.8	9.0	31
実施例 8	なし	液化されたマッシュ	0.52	0.36	5.6	4.0	9.6	41
実施例 8	なし	0.3 時間、ブロス	0.50	0.33	5.7	3.8	9.4	40
実施例 8	なし	4.8 時間、ブロス	0.47	0.14	5.3	1.6	6.9	24
実施例 8	なし	4.8 時間、OA	0.12	0.32	1.0	2.9	3.9	73
実施例 8	なし	29 時間、ブロス	0.30	0.05	3.4	0.6	4.0	16
実施例 8	なし	29 時間、OA	0.31	0.46	2.7	4.1	6.9	60
実施例 8	なし	53 時間、ブロス						
実施例 8	なし	53 時間、OA	0.47	0.50	4.2	4.4	8.6	51
実施例 8	なし	70 時間、ブロス	0.22	0.04	2.5	0.5	3.0	17
実施例 8	なし	70 時間、OA	0.40	0.39	3.6	3.5	7.0	49
実施例 10	10 ppm	リパーゼ処理前/液化前	0.67	0.23	7.4	2.5	9.9	25
実施例 10	10 ppm	リパーゼ処理前/液化前	0.19	0.69	2.1	7.6	9.7	78
実施例 10	10 ppm	液化されたマッシュ	0.14	0.85	1.6	9.4	11.0	86
実施例 10	10 ppm	0.3 時間、ブロス	0.13	0.82	1.5	9.4	10.9	86
実施例 10	10 ppm	4.8 時間、ブロス	0.11	0.29	1.3	3.3	4.6	72
実施例 10	10 ppm	4.8 時間、OA	0.04	0.60	0.3	5.2	5.6	94
実施例 10	10 ppm	29 時間、ブロス	0.09	0.14	1.0	1.6	2.6	61
実施例 10	10 ppm	29 時間、OA	0.01	0.96	0.1	8.4	8.5	99
実施例 10	10 ppm	53 時間、ブロス						
実施例 10	10 ppm	53 時間、OA	0.02	0.95	0.2	8.3	8.4	98
実施例 10	10 ppm	70 時間、ブロス	0.09	0.08	1.1	0.9	1.9	45
実施例 10	10 ppm	70 時間、OA	0.03	0.99	0.3	8.7	9.0	97

【0403】

実施例 30

トウモロコシ油脂肪酸（C O F A）を用いた原位置生成物除去を用いた同時糖化発酵のた

10

20

30

40

50

めの磨砕された全粒トウモロコシの実または液化トウモロコシマッシュのリパーゼ処理

5つの発酵を、実施例9、11、12、13、および14に上述したように実行した。実施例9、13、および14に記載されるように実行された発酵では、リパーゼ（10 ppmのLipolase（登録商標）全可溶性タンパク質）を液化後に加え、リパーゼの熱による失活は行わなかった。実施例9および14に記載されるように実行された発酵には、接種の前に5 g/Lのエタノールが加えられた一方、実施例13に記載されるように実行された発酵にはエタノールが加えられなかった。実施例11および12に記載されるように実行された発酵は、液化の前の磨砕トウモロコシの懸濁液への10 ppmのLipolase（登録商標）全可溶性タンパク質の添加を用いて、液化中にリパーゼを熱により失活させた。実施例11に記載されるように実行された発酵には、接種の前に5 g/Lのエタノールが加えられた一方、実施例12に記載されるように実行された発酵には、エタノールが加えられなかった。活性リパーゼを含有する発酵のCOFA相中に存在するイソブタノール（i-BuOH）の最終的な合計グラムは、不活性なリパーゼを含有する発酵のCOFA相中に存在するi-BuOHの最終的な合計グラムよりかなり多かった。活性リパーゼを含有する発酵プロセス中に存在するイソブタノール（i-BuOH）の最終的な合計グラムは、不活性なリパーゼを含有する発酵プロセス（水相）中に存在するi-BuOH（FABEとして存在するi-BuOHを含む）の最終的な合計グラムより若干少なく、それによって、i-BuOH（遊離i-BuOHおよびCOFAのイソブチルエステル（FABE）の組合せとして）の全体の生成が、熱により失活したリパーゼの存在下で得られるものと比較して、活性リパーゼの存在下でかなり多かった。結果を表14および15に示す。

【0404】

【表17】

表 14: 活性リパーゼの存在(実施例9、13、および14)または非存在(実施例11 および12)に対する、ISPR 抽出としてのトウモロコシ油脂肪酸(COFA)を含有する発酵中の遊離イソブタノール(i-BuOH) および COFA のイソブチルエステル(FABE)の生成の依存度(COFA 相分析)

発酵	発酵時間 (時)	g i-BuOH/ kg COFA	g FABE/ kg COFA	FABE からの i-BuOH の g/ kg COFA	i-BuOH の 合計 g / kg COFA
実施例 9	4.5	2.4	0.0	0	2.4
実施例 9	28.8	5.4	70.9	16.5	22.0
実施例 9	52.4	8.9	199.0	46.4	55.3
実施例 9	69.3	4.9	230.9	53.9	69.3
実施例 11	6.6	2.3	0.0	0.0	2.3
実施例 11	53.5	25.1	2.9	0.6	25.7
実施例 11	71.1	24.4	6.3	1.4	25.8
実施例 12	6.6	2.3	0.0	0.0	2.3
実施例 12	53.5	12.8	1.6	0.4	13.2
実施例 12	71.1	12.8	3.0	0.7	13.5
実施例 13	6.6	2.3	0.0	0.0	2.3
実施例 13	53.5	4.9	72.1	16.0	20.9
実施例 13	71.1	4.6	91.4	20.3	24.9
実施例 14	6.6	2.1	0.0	0.0	2.1
実施例 14	53.5	9.8	197.2	43.8	53.6
実施例 14	71.1	4.9	244.5	54.3	59.2

【 0 4 0 5 】

【 表 1 8 】

表 15: 活性リパーゼの存在(実施例 9、13、および 14)または非存在(実施例 11 および 12)に対する、ISPR 抽出としてのトウモロコシ油脂肪酸(COFA)を含有する発酵中の遊離イソブタノール(*i*-BuOH)および COFA のイソブチルエステル(FABE)の生成の依存度(発酵ブロスの分析)

試料	発酵時間 (時)	g <i>i</i> -BuOH/ kg ブロス	g FABE/ kg ブロス	FABE からの <i>i</i> -BuOH の g/ kg ブロス	<i>i</i> -BuOH の 合計 g/ kg ブロス
実施例 9	4.5	0.0	0.0	0	0
実施例 9	28.8	0.0	12.6	2.9	2.9
実施例 9	52.4	0.0	30.3	7.1	7.1
実施例 9	69.3	0.0	24.7	5.8	5.8
実施例 11	6.6	0.0	0.0	0	0.0
実施例 11	53.5	9.8	0.0	0	9.8
実施例 11	71.1	9.5	0.0	0	9.5
実施例 12	6.6	0.0	0.0	0	0
実施例 12	53.5	3.8	0.0	0.0	3.8
実施例 12	71.1	5.1	0.0	0.0	5.1
実施例 13	6.6	0.0	0.0	0	0
実施例 13	53.5	2.1	3.0	0.7	2.8
実施例 13	71.1	2.1	7.4	1.6	3.7
実施例 14	6.6	0.0	0.0	0	0.0
実施例 14	53.5	2.9	22.4	5.0	7.9
実施例 14	71.1	3.3	19.3	4.3	7.6

10

20

【 0 4 0 6 】

実施例 3 1

イソブタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸 (COFA) のホスホリパーゼ触媒反応によるイソブチルCOFAエステルの生成

水性 2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸緩衝液 (0.20 M、pH 5.3)、イソブタノール (2-メチル-1-プロパノール)、ホスホリパーゼ (ホスホリパーゼ A ; Sigma Aldrich, L3295-250) およびトウモロコシ油から調製されるトウモロコシ油脂肪酸を含有する反応混合物 (表 16) を 30 °C で攪拌し、試料を所定の時点で各反応混合物から抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、イソブタノール (*i*-BuOH) およびトウモロコシ油脂肪酸のイソブチルエステル (*i*-BuO-COFA) (表 17) について分析した。

【 0 4 0 7 】

【 表 1 9 】

30

40

表 16: トウモロコシ油脂肪酸のイソブチルエステル(*i*-BuO-COFA)へのイソブタノール(*i*-BuOH)の転化のための反応条件

反応	MES緩衝液 (0.2 M) (g)	<i>i</i> -BuOH (g)	COFA (g)	リパーゼ (ppm)
1	46.1	3.6	14.7	10
2	46.1	3.6	14.7	3
3	46.1	3.6	14.7	0

50

【0408】

【表20】

表 17. 表 16 に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在する
イソブタノール(*i*-BuOH)およびトウモロコシ油脂肪酸のイソブチルエステル(*i*-BuO-COFA)の重量

反応	時間(時)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (AQ)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	遊離 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA からの <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
1	0.1	1.29	2.39	2.39	0.00	0.00
1	2	1.24	2.44	2.38	0.06	0.26
1	20	1.25	2.43	2.22	0.21	0.96
1	24	1.26	2.42	2.19	0.23	1.03
1	44	1.27	2.41	2.13	0.28	1.28
1	48	1.22	2.46	2.15	0.31	1.41
2	0.1	1.27	2.34	2.34	0.00	0.00
2	2	1.25	2.35	2.33	0.02	0.08
2	20	1.24	2.37	2.30	0.07	0.30
2	24	1.22	2.38	2.31	0.07	0.32
2	44	1.33	2.28	2.18	0.10	0.44
2	48	1.23	2.38	2.27	0.11	0.48
3	0.1	1.27	2.33	2.33	0.00	0.00
3	2	1.26	2.34	2.34	0.00	0.00
3	20	1.22	2.38	2.37	0.01	0.07
3	24	1.25	2.35	2.33	0.02	0.08
3	44	1.24	2.36	2.32	0.04	0.18
3	48	1.24	2.36	2.32	0.04	0.18

10

20

【0409】

実施例 3 2

リパーゼ触媒反応に対する水性／COFA比率に対するイソブチル-COFAエステル濃度の依存度

30

水性 2 - (N-モルホリン) エタンスルホン酸緩衝液 (0.20 M、pH 5.2)、イソブタノール (2-メチル-1-プロパノール)、リパーゼ (Lipolase (登録商標) 100 L; Novozymes) およびトウモロコシ油から調製されるトウモロコシ油脂肪酸 (表 18) を含有する反応混合物を、30℃で攪拌し、試料を所定の時点で各反応混合物から抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、イソブタノール (*i*-BuOH) およびトウモロコシ油脂肪酸のイソブチルエステル (*i*-BuO-COFA) (表 19) について分析した。

【0410】

【表 2 1】

表 18: トウモロコシ油脂肪酸のイソブチルエステル(*i*-BuO-COFA)へのイソブタノール (*i*-BuOH)の転化のための反応条件

反応番号	MES緩衝液 (0.2 M)(g)	<i>i</i> -BuOH (g)	COFA (g)	リパーゼ (ppm)
1	45.96	3.6	43.4	10
2	45.96	3.6	21.7	10
3	45.96	3.6	10.85	10
4	45.96	3.6	43.4	4
5	45.96	3.6	43.4	0

10

【 0 4 1 1】

【表 2 2】

表 19: 表 18 に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在する
イソブタノール(*i*-BuOH)およびトウモロコシ油脂肪酸のイソブチルエステル(*i*-BuO-COFA)の重量

反応	時間(時)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (AQ)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	遊離 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA からの <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO- COFA (g) (ORG)
1	0.1	0.77	2.83	2.77	0.05	0.24
1	1	0.76	2.84	2.58	0.25	1.13
1	2	0.74	2.86	2.41	0.44	2.00
1	4	0.66	2.94	2.05	0.89	4.03
1	6	0.63	2.97	1.43	1.54	6.93
1	21.5	0.28	3.32	0.34	2.98	13.4
1	25.5	0.23	3.37	0.29	3.08	13.8
2	0.1	1.17	2.43	2.36	0.07	0.30
2	1	1.09	2.51	2.26	0.24	1.10
2	2	1.07	2.53	2.19	0.34	1.52
2	4	1.03	2.57	1.99	0.59	2.64
2	6	1.00	2.60	1.70	0.90	4.04
2	21.5	0.75	2.85	0.58	2.27	10.2
2	25.5	0.59	3.01	0.49	2.52	11.4
3	0.1	1.56	2.04	1.98	0.06	0.27
3	1	1.55	2.05	1.77	0.28	1.24
3	2	1.49	2.11	1.65	0.46	2.08
3	4	1.45	2.15	1.28	0.87	3.92
3	6	1.33	2.27	0.96	1.31	5.92
3	21.5	1.12	2.48	0.26	2.22	10.0
3	25.5	0.88	2.72	0.26	2.46	11.1
4	0.1	0.84	2.76	2.75	0.02	0.07
4	1	0.78	2.82	2.73	0.09	0.40
4	2	0.83	2.77	2.59	0.17	0.79
4	4	0.78	2.82	2.44	0.38	1.71
4	6	0.78	2.82	2.10	0.72	3.25
4	21.5	0.58	3.02	1.12	1.90	8.57
4	25.5	0.51	3.09	0.97	2.11	9.51
5	0.1	0.90	2.70	2.70	0.00	0.00
5	1	0.90	2.70	2.70	0.00	0.00
5	2	0.92	2.68	2.68	0.00	0.00
5	4	0.89	2.71	2.70	0.00	0.02
5	6	0.92	2.68	2.62	0.06	0.29
5	21.5	0.90	2.70	2.62	0.08	0.37
5	25.5	0.89	2.71	2.62	0.09	0.41

10

20

30

40

【0412】

実施例 3 3

リパーゼ触媒反応におけるエステル化アルコールに対するブチルーCOFAエステル濃度の依存度

水性 2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸緩衝液 (0.20 M、pH 5.2)、イソブタノール (2-メチル-1-プロパノール) または n-ブタノール、リパーゼ (Lipolase (登録商標) 100 L; Novozymes) およびトウモロコシ油から調

50

製されるトウモロコシ油脂肪酸（表 2 0）を含有する反応混合物を 3 0 °C で攪拌し、試料を所定の時点で各反応混合物から抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、イソブタノール（*i*-BuOH）または *n*-ブタノール（*n*-BuOH）およびトウモロコシ油脂肪酸のイソブチル-またはブチルエステル（BuO-COFA）（表 2 1）について分析した。

【 0 4 1 3 】

【表 2 3】

表 20: トウモロコシ油脂肪酸のブチルエステル(BuO-COFA)へのイソブタノール(*i*-BuOH) または *n*-ブタノール(*n*-BuOH)の転化のための反応条件

10

反応	ブタノール	MES緩衝液 (0.2 M)(g)	ブタノール (g)	COFA (g)	リパーゼ (ppm)
6	イソ-ブタノール	45.96	3.6	13.5	10
7	<i>n</i> -ブタノール	45.96	3.6	13.5	10
8	イソ-ブタノール	45.96	3.6	13.5	0
9	イソブタノール	45.96	3.6	13.5	4

【 0 4 1 4 】

【表 2 4】

表 21: 表 20 に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在するイソブタノール(*i*-BuOH)または *n*-ブタノール(*n*-BuOH)およびトウモロコシ油脂肪酸のブチルエステル(BuO-COFA)の重量

反応	時間(時)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (AQ)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA からの <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)
6	0.1	1.46	2.14	2.11	0.04	0.16
6	2	1.41	2.19	1.63	0.56	2.51
6	4	1.27	2.33	1.31	1.02	4.58
6	21	0.66	2.94	0.29	2.65	12.0
6	25	0.60	3.00	0.26	2.73	12.3
6	46	0.54	3.06	0.22	2.83	12.8

		全 <i>n</i> -BuOH (g) (AQ)	全 <i>n</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>n</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>n</i> -BuO-COFA からの <i>n</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>n</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
7	0.1	1.31	2.29	2.26	0.03	0.11
7	2	1.26	2.34	1.89	0.45	2.03
7	4	1.20	2.40	1.66	0.74	3.35
7	21	0.81	2.79	0.50	2.29	10.3
7	25	0.77	2.83	0.40	2.43	11.0
7	46	0.50	3.10	0.23	2.87	12.9

		全 <i>i</i> -BuOH (g) (AQ)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA からの <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
8	0.1	1.62	1.98	1.98	0.00	0.01
8	2	1.56	2.04	2.04	0.00	0.00
8	4	1.59	2.01	2.01	0.00	0.00
8	21	1.59	2.01	2.00	0.01	0.04
8	25	1.55	2.05	2.04	0.01	0.04
8	46	1.45	2.15	2.12	0.02	0.11

		全 <i>i</i> -BuOH (g) (AQ)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA からの <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-COFA (g) (ORG)
9	0.1	1.57	2.03	2.02	0.01	0.04
9	2	1.54	2.06	1.86	0.19	0.86
9	4	1.44	2.16	1.79	0.36	1.64
9	21	1.14	2.46	0.95	1.51	6.82
9	25	1.10	2.50	0.83	1.67	7.50
9	46	0.78	2.82	0.44	2.37	10.7

【0 4 1 5】

実施例 3 4

イソブタノールおよびオレイン酸のリパーゼ触媒反応によるオレイン酸イソブチルの生成

水性 2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸緩衝液 (0.20 M、pH 5.2)、イソブタノール (2-メチル-1-プロパノール)、リパーゼ (0 ppm または 10 ppm の Lipolase (登録商標) 100 L; Novozymes) およびオレイン酸 (Alfa Aesar) (表 2 2) を含有する反応混合物を 30℃ で攪拌し、試料を所定の時点で各反応混合物から抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、イソブタノール (*i*-BuOH) およびオレイン酸イソブチル (*i*-BuO-オレート) (表 2 3) について分析した。

【0 4 1 6】

【表 2 5】

表 22: オレイン酸イソ-ブチル(*i*-BuO-オレエート)へのイソブタノール(*i*-BuOH)の
転化のための反応条件

反応番号	MES緩衝液 (0.2 M)(g)	<i>i</i> -BuOH (g)	オレイン酸 (g)	リパーゼ (ppm)
10	46.11	3.64	14.62	10
11	46.10	3.59	14.40	0

10

【0 4 1 7】

【表 2 6】

表 23: 表 22 に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在する
イソブタノール(*i*-BuOH)およびオレイン酸イソ-ブチル(*i*-BuO -COFA)の重量

反応	時間(時)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (AQ)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO-オレエート からの <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO- オレエート (g) (ORG)
10	0.1	1.37	2.28	2.24	0.04	0.18
10	2	1.30	2.34	1.95	0.40	1.81
10	4	1.28	2.37	1.82	0.55	2.53
10	6	1.22	2.42	1.71	0.72	3.27
10	23	0.92	2.72	0.71	2.01	9.20
10	27	0.89	2.75	0.65	2.11	9.62
10	47	0.81	2.84	0.55	2.29	10.5
10	51	0.82	2.83	0.54	2.29	10.5
11	0.1	1.44	2.16	2.16	0.00	0.00
11	2	1.45	2.15	2.15	0.00	0.00
11	4	1.44	2.16	2.16	0.00	0.00
11	6	1.43	2.16	2.16	0.00	0.00
11	23	1.49	2.10	2.10	0.01	0.02
11	27	1.46	2.14	2.13	0.01	0.04
11	47	1.48	2.12	2.09	0.02	0.10
11	51	1.52	2.07	2.05	0.02	0.11

20

30

【0 4 1 8】

実施例 3 5

イソブタノールおよびオレイン酸のリパーゼ触媒反応によるオレイン酸イソ-ブチルの生成の比較

水性 2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸緩衝液 (MES、0.20 M、pH 5.2)、イソブタノール (2-メチル-1-プロパノール)、オレイン酸 (Alpha Aesar)、ならびに Novozymes 製の、Lipolase (登録商標) 100 L、Lipex (登録商標) 100 L、Lipozyme (登録商標) CALB L、Novozyme (登録商標) CALA L、Palatase (登録商標) に由来するリパーゼ (10 ppm)、あるいは Sigma Aldrich 製の、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、シュドモナス・セパシア (*Pseudomonas cepacia*)、ムコール・ミエヘイ (*Mucor miehei*)、ブタ臍臓、カンジダ・キリンドラケア (*Candida cylindracea*)、リゾプス・ニベウス (*Rhizopus niveus*)、カンジダ・アンタークティカ (*Candida antarctica*)、リゾプス・アリズス (*Rhizopus arrhizus*) またはアスペルギルス属 (*Aspergillus*) に由来するリパーゼ (10 ppm) (表 2 4) を含有する反応混合物を 30 °C で攪拌し、試料を所定の時点で各反応混

40

50

合物から抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、イソブタノール（*i*-BuOH）およびオレイン酸イソブチル（*i*-BuO-オレエート）（表25）について分析した。

【0419】

【表27】

表24: オレイン酸イソブチル(*i*-BuO-オレエート)へのイソブタノール(*i*-BuOH)の転化のための反応条件

MES緩衝液 (0.2 M)(g)	<i>i</i> -BuOH (g)	オレイン酸 (g)	リパーゼ (ppm)
46.105	3.601	13.72	10

10

【0420】

【表28】

表25: 表24に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在するイソブタノール(*i*-BuOH)およびオレイン酸イソブチル(*i*-BuO-オレエート)の重量

リパーゼ	時間 (時)	全 <i>i</i> - BuOH (g) (AQ)	全 <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO- オレエート からの <i>i</i> -BuOH (g) (ORG)	<i>i</i> -BuO- オレエート (g) (ORG)
Lipolase [®] 100L	23	0.92	2.72	0.71	2.01	9.20
Lipex [®] 100L	23	0.65	2.95	0.30	2.65	12.09
Lipozyme [®] CALB L	23	1.01	2.59	0.82	1.77	8.08
Novozyme [®] GALA L	23	1.39	2.22	2.16	0.06	0.27
Palatase [®]	23	1.27	2.33	1.43	0.91	4.14
蛍光菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	23	1.38	2.22	1.97	0.25	1.14
シュードモナス・セパシア (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	23	1.39	2.21	1.95	0.26	1.20
ムコール・ミエヘイ(<i>Mucor miehei</i>)	23	1.29	2.31	1.57	0.75	3.42
ブタ膝臓	23	1.40	2.20	2.19	0.01	0.04
カンジダ・キリンドラケア (<i>Candida cylindracea</i>)	23	1.15	2.45	1.08	1.37	6.25
リゾプス・ニベウス (<i>Rhizopus niveus</i>)	23	1.39	2.21	2.19	0.02	0.11
カンジダ・アンタークティカ (<i>Candida antarctica</i>)	23	1.37	2.24	2.08	0.15	0.69
リゾプス・アリスス (<i>Rhizopus arrhizus</i>)	23	1.01	2.59	0.81	1.78	8.12
アスペルギルス属 (<i>Aspergillus</i>)	23	1.36	2.24	2.06	0.18	0.82
リパーゼなし	23	1.49	2.10	2.10	0.01	0.02

20

30

40

【0421】

エタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸（COFA）のリパーゼ触媒反応によるエチルーCOFAエステルの生成

水性2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸緩衝液（0.20M、pH5.5）、エタノール、リパーゼ（Lipolase（登録商標）100LまたはLipozyme（登録商標）CALB L；Novozymes）およびトウモロコシ油から調製されるトウモロコシ油脂肪酸を含有する反応混合物（表26）を30℃で攪拌し、試料を所定の時

50

点で各反応混合物から撹拌しながら抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、エタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸のエチルエステル（EtO-COFA）（表27）について分析した。

【0422】

【表29】

表26: トウモロコシ油脂肪酸のエチルエステル(EtO-COFA)へのエタノール(EtOH)の転化のための反応条件

反応	MES緩衝液 (0.2 M) (g)	エタノール (g)	COFA (g)	リパーゼ	リパーゼ (ppm)
12	46.11	3.60	14.48	Lipolase [®] 100L	10
13	46.10	3.60	14.47	Lipozyme [®] CALB L	10
14	46.11	3.61	14.47	リパーゼなし	0

10

【0423】

【表30】

表27: 表26に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在するエタノール(EtOH)およびトウモロコシ油脂肪酸のエチルエステル(EtO-COFA)の重量

20

反応	時間(時)	全EtOH (g) (AQ)	全EtOH (g) (ORG)	EtOH (g) (ORG)	EtO-COFA からのEtOH (g) (ORG)	ETO- COFA (g) (ORG)
12	0	2.94	0.655	0.634	0.021	0.01
12	2	3.09	0.504	0.105	0.398	0.81
12	20	2.74	0.854	0.030	0.824	4.46
12	24	2.43	1.167	0.032	1.135	5.25
12	44	2.37	1.230	0.022	1.208	7.28
12	48	2.24	1.360	0.022	1.338	7.63
13	0	2.94	0.659	0.635	0.024	0.01
13	2	2.83	0.773	0.074	0.699	1.88
13	20	2.10	1.501	0.000	1.501	9.72
13	24	2.07	1.532	0.000	1.532	10.14
13	44	1.94	1.673	0.014	1.659	10.93
13	48	1.72	1.882	0.016	1.865	11.05
14	0	2.96	0.646	0.624	0.023	0.01
14	2	2.93	0.679	0.661	0.018	0.01
14	20	2.75	0.857	0.779	0.079	0.02
14	24	2.87	0.738	0.662	0.075	0.03
14	44	2.79	0.813	0.688	0.126	0.04
14	48	2.82	0.785	0.671	0.114	0.05

30

40

【0424】

実施例37

酵母の発酵の際のエタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸（COFA）のリパーゼ触媒反応によるエチル-COFAエステルの生成

野生型酵母株CEN. PK113-7Dを、アミノ酸を含まない酵母窒素ベース（6.7 g/L）、デキストロース（25 g/L）、およびMES緩衝液（pH 5.5で0.1 M）を含有する培地中で一晚繁殖させた。600 nmで得られる光学密度が0.1になるように、一晚培養物を新鮮な培地に希釈した。希釈された培地を、フラスコ当たり25 mLずつ、6つの250 mLの密閉キャップ振とうフラスコ中に等分した。培地のうちの4

50

つに、培地中の最終的なリパーゼ濃度が10ppmになるように2種のリパーゼ酵素ストック溶液（Lipozyme（登録商標）CALB LまたはLipolase（登録商標）100Lの10mMのリン酸緩衝液（pH7.0）のmL当たり2mgのタンパク質）のいずれかを補充した。トウモロコシ油脂肪酸（COFA）を、フラスコの3つの水性培地（酵素なし、CALB L、またはLipolase（登録商標）100L）に1：1の体積比で加えた。1つのフラスコは補充物を有さなかった。培地を、30℃で温度制御された振とう培養器で、250rpmの振とう速度で23時間増殖させた。細胞質量測定用の試料を、15mLの円錐底管中で相分離させた。600nmにおける試料の光学密度を、生理食塩水中での20倍の希釈で測定した。クロマトグラフ分析用の試料（5mLの水性または10mLの培地／COFAエマルジョン）を、15mLの円錐底管中のTX-400スイングバケットローターにおいて4000rpmで5分間、直ぐに遠心分離した。水性試料については、0.22μmのスピンフィルターを分析の前に使用した。水性試料を、50℃で0.01Mの硫酸移動相および1分当たり0.5mLの流量を用いて、SH-Gガードカラムを備えたShodex SH1011カラムにおいて分析した。糖類およびアルコールの検出は、屈折率および210nmの吸収によるものであり、標準曲線を用いて定量化を行った。試料を、水性培地（COFAの添加なし）または培地／COFAエマルジョンから取り、COFAのエチルエステルについての前の実施例に記載されるように分析した。結果を表28および29に示す。

【0425】

【表31】

表 28: 23 時間の発酵からの水性培地(AQ)中に存在する、エタノール(EtOH)、グルコースおよび発酵副生成物の重量

	グルコース (g/L)	グリセロール (g/L)	酢酸塩 (g/L)	アセトイン (g/L)	EtOH (g/L)
培地	0	0.62	1.01	0.08	9.98
培地 + CALB L	0	0.72	0.94	0.06	9.94
培地 + Lipolase® 100L	0	0.61	0.99	0.05	9.87
培地 + COFA	0	0.68	0.32	0.15	7.73
培地 + COFA + CALB L	0	0.74	0.09	0.11	3.92
培地 + COFA + Lipolase® 100L	0	0.63	0.23	0.18	7.19

【0426】

【表32】

表 29: 23 時間の発酵の際に水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在するエタノール(EtOH)およびトウモロコシ油脂肪酸のエチルエステル(EtO-COFA)の重量

反応	EtOH (g/L) (AQ)	EtOH (g/L) (ORG)	EtO-COFA からのEtOH (g/L) (ORG)	ETO-COFA (g/L) (ORG)
培地 + COFA	6.7	0	0.18	1.2
培地 + COFA + CALB L	3.4	0	4.52	30.0
培地 + COFA + Lipolase® 100L	6.1	0	0.72	4.8

【0427】

実施例 38

メタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸（COFA）のリパーゼ触媒反応によるメチル-COFAエステルの生成

水性2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸緩衝液（0.20M、pH5.5）、メタノール、リパーゼ（Lipolase（登録商標）100 L（Novozymes）、Lipozyme（登録商標）CALB L（Novozymes）、リゾプス・アリ

ズス (*Rhizopus arrhizus*) リパーゼ (*Sigma Aldrich*)、およびカンジダ・キリンドラケア (*Candida cylindracea*) リパーゼ (*Sigma Aldrich*) およびトウモロコシ油から調製されるトウモロコシ油脂肪酸を含有する反応混合物 (表 30) を 30 °C で攪拌し、試料を所定の時点で各反応混合物から攪拌しながら抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、エタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸のエチルエステル ($\text{EtO}-\text{COFA}$) (表 31) について分析した。

【0428】

【表 33】

表 30: トウモロコシ油脂肪酸のメチルエステル($\text{MeO}-\text{COFA}$)へのメタノール(MeOH)の転化のための反応条件

反応	MES緩衝液 (0.2 M) (g)	メタノール (g)	COFA (g)	リパーゼ	リパーゼ (ppm)
15	46.11	3.60	14.51	Lipolase® 100L	10
16	46.10	3.59	14.49	Lipozyme® CALB L	10
17	46.11	3.60	14.49	<i>R. アリズス</i> (<i>R. arrhizus</i>)	10
18	46.10	3.60	14.48	<i>C. キリンドラケア</i> (<i>C. cylindracea</i>)	10
19	46.10	3.60	14.51	リパーゼなし	10

【0429】

10

20

【表 3 4】

表 31: 表 30 に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在するメタノール (MeOH)およびトウモロコシ油脂肪酸のメチルエステル(MeO-COFA)の重量

反応	時間(時)	全MeOH (g) (AQ)	全MeOH (g) (ORG)	MeOH (g) (ORG)	MeO-COFA からのMeOH (g) (ORG)	MeO- COFA (g) (ORG)
15	0	3.33	0.26	0.05	0.01	0.02
15	2	3.09	0.50	0.05	0.13	0.16
15	4	3.09	0.51	0.04	0.33	0.73
15	20	2.81	0.79	0.04	0.70	3.03
15	24	2.72	0.87	0.04	0.79	3.47
15	44	2.53	1.06	0.03	1.00	4.97
15	48	2.48	1.12	0.03	1.05	5.18
16	0	3.07	0.53	0.04	0.02	0.02
16	2	3.01	0.59	0.04	0.20	0.22
16	4	2.92	0.67	0.03	0.56	1.32
16	20	2.54	1.06	0.03	0.99	5.25
16	24	2.43	1.16	0.03	1.09	5.90
16	44	2.28	1.32	0.02	1.27	7.63
16	48	2.22	1.37	0.03	1.32	7.89
17	0	3.09	0.52	0.04	0.02	0.02
17	2	3.05	0.56	0.06	0.05	0.06
17	4	2.98	0.63	0.04	0.25	0.24
17	20	3.03	0.57	0.04	0.32	0.49
17	24	2.98	0.63	0.04	0.35	0.52
17	44	2.99	0.62	0.04	0.38	0.62
17	48	2.94	0.67	0.04	0.40	0.61
18	0	3.17	0.43	0.05	0.02	0.02
18	2	3.12	0.49	0.04	0.02	0.02
18	4	2.96	0.64	0.00	0.64	1.24
18	20	2.64	0.96	0.03	0.89	3.97
18	24	2.58	1.03	0.03	0.95	4.49
18	44	2.37	1.23	0.03	1.18	6.40
18	48	2.30	1.30	0.03	1.25	6.71
19	0	3.08	0.52	0.04	0.03	0.02
19	2	3.08	0.52	0.04	0.02	0.02
19	4	3.04	0.56	0.04	0.03	0.02
19	20	3.08	0.53	0.04	0.03	0.03
19	24	3.04	0.56	0.05	0.03	0.04
19	44	3.01	0.59	0.04	0.06	0.04
19	48	2.95	0.65	0.05	0.06	0.04

10

20

30

【0 4 3 0】

実施例 3 9

1-プロパノールおよびトウモロコシ油脂肪酸 (COFA) のリパーゼ触媒反応による 1-プロピル-COFA エステルの生成

水性 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝液 (0.20 M、pH 5.5)、1-プロパノール、リパーゼ (Lipolase (登録商標) 100 L (Novozymes)、Lipozyme (登録商標) CALB L (Novozymes)、リゾプス・アリズス (Rhizopus arrhizus) リパーゼ (SigmaAldrich)、およびカンジダ・キリンドラケア (Candida cylindracea) リパーゼ (SigmaAldrich) およびトウモロコシ油から調製されるトウモロコシ油脂肪酸を含有する反応混合物 (表 3 2) を 30℃ で攪拌し、試料を所定の時点で各反応混合物から攪拌しながら抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、1-ブ

40

50

ロパノールおよびトウモロコシ油脂肪酸の1-プロピルエステル(PrO-COFA) (表33)について分析した。

【0431】

【表35】

表32: トウモロコシ油脂肪酸の1-プロピルエステル(PrO-COFA)への1-プロパノール(PrOH)の転化のための反応条件

反応	MES緩衝液 (0.2 M) (g)	1-プロパノール (g)	COFA (g)	リパーゼ	リパーゼ (ppm)
20	46.11	3.60	14.47	Lipolase [®] 100L	10
21	46.12	3.60	14.48	Lipozyme [®] CALB L	10
22	46.10	3.60	14.48	<i>R. アリズス(R. arrhizus)</i>	10
23	46.13	3.62	14.49	<i>C. キリンドラケア(C. cylindracea)</i>	10
24	46.13	3.60	14.48	リパーゼなし	0

10

【0432】

【表 3 6】

表 33: 表 32 に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在する
1-プロパノール(PrOH)およびトウモロコシ油脂肪酸の 1-プロピルエステル(PrO-COFA)の重量

反応	時間(時)	全PrOH (g) (AQ)	全PrOH (g) (ORG)	PrOH (g) (ORG)	PrO-COFAから のPrOH (g) (ORG)	PrO-COFA (g) (ORG)
20	0	2.54	1.05	0.80	0.00	0.02
20	2	2.39	1.20	0.70	0.11	0.44
20	4	2.00	1.60	0.61	0.55	1.88
20	20	1.65	1.95	0.31	1.50	6.96
20	24	1.51	2.08	0.28	1.69	7.97
20	44	1.13	2.46	0.16	2.23	11.09
20	48	1.09	2.51	0.15	2.29	11.27
21	0	2.44	1.16	0.79	0.00	0.02
21	2	2.38	1.22	0.65	0.13	0.49
21	4	2.07	1.53	0.52	0.73	2.94
21	20	1.16	2.43	0.17	2.18	10.80
21	24	1.08	2.51	0.16	2.28	11.26
21	44	1.00	2.60	0.13	2.40	11.86
21	48	0.98	2.62	0.13	2.42	11.91
22	0	2.49	1.11	0.80	0.00	0.02
22	2	2.42	1.18	0.76	0.10	0.38
22	4	2.23	1.37	0.71	0.29	1.08
22	20	2.09	1.51	0.56	0.71	2.96
22	24	2.06	1.54	0.54	0.77	3.17
22	44	1.87	1.73	0.47	0.58	1.75
22	48	1.88	1.73	0.46	0.60	1.82
23	0	2.49	1.13	0.80	0.00	0.02
23	2	2.45	1.17	0.77	0.07	0.29
23	4	2.35	1.27	0.71	0.21	0.82
23	20	2.00	1.61	0.50	0.89	3.74
23	24	1.93	1.68	0.49	0.99	4.23
23	44	1.57	2.04	0.33	1.56	6.83
23	48	1.49	2.13	0.31	1.67	7.33
24	0	2.49	1.11	0.81	0.00	0.02
24	2	2.47	1.13	0.81	0.00	0.02
24	4	2.38	1.21	0.78	0.01	0.03
24	20	2.46	1.14	0.79	0.01	0.05
24	24	2.42	1.17	0.79	0.01	0.05
24	44	2.41	1.19	0.76	0.02	0.09
24	48	2.32	1.28	0.77	0.03	0.10

【0 4 3 3】

実施例 4 0

1-ペンタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸 (COFA) のリパーゼ触媒反応による 1-ペンチル-COFA エステルの生成

水性 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝液 (0.20 M、pH 5.5)、1-ペンタノール、リパーゼ (Lipolase (登録商標) 100 L (Novozymes)、Lipozyme (登録商標) CALB L (Novozymes)、リゾプス・アリズス (Rhizopus arrhizus) リパーゼ (SigmaAldrich)、およびカンジダ・キリンドラケア (Candida cylindracea) リパーゼ (SigmaAldrich) およびトウモロコシ油から調製されるトウモロコシ油脂肪酸を含有する反応混合物 (表 3 4) を 30℃で攪拌し、試料を所定の時点で各反応混

10

20

30

40

50

合物から攪拌しながら抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、1-ペンタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸の1-ペンチルエステル(PenO-COFA) (表35)について分析した。

【0434】

【表37】

表34: トウモロコシ油脂肪酸の1-ペンチルエステル(PenO-COFA)への1-ペンタノール(PenOH)の転化のための反応条件

反応	MES緩衝液 (0.2 M) (g)	1-ペンタノール (g)	COFA (g)	リパーゼ	リパーゼ (ppm)
25	46.11	3.60	14.47	Lipolase® 100L	10
26	46.12	3.60	14.48	Lipozyme® CALB L	10
27	46.10	3.60	14.48	<i>R. アリズス</i> (<i>R. arrhizus</i>)	10
28	46.13	3.62	14.49	<i>C. キリンドラケア</i> (<i>C. cylindracea</i>)	10
29	46.13	3.60	14.48	リパーゼなし	0

10

【0435】

【表 3 8】

表 35: 表 34 に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在する 1-ペンタノール(PenOH)およびトウモロコシ油脂肪酸の 1-ペンチルエステル(PenO-COFA)の重量

反応	時間(時)	全PenOH (g) (AQ)	全PenOH (g) (ORG)	PenOH (g) (ORG)	PenO-COFA からのPenOH (g) (ORG)	PenO- COFA (g) (ORG)
25	0	0.364	3.238	3.091	0.002	0.006
25	2	0.339	3.264	2.745	0.446	1.760
25	4	0.373	3.229	2.761	0.557	2.196
25	20	0.336	3.266	1.833	1.002	3.953
25	24	0.325	3.277	1.575	1.257	4.960
25	44	0.226	3.377	0.921	2.383	9.400
25	48	0.206	3.396	0.723	2.524	9.957
26	0	0.364	3.243	3.105	0.002	0.006
26	2	0.317	3.290	2.462	0.512	2.019
26	4	0.320	3.287	2.287	0.652	2.574
26	20	0.130	3.477	0.387	3.007	11.860
26	24	0.094	3.513	0.215	3.251	12.823
26	44	0.075	3.532	0.165	3.312	13.067
26	48	0.081	3.526	0.165	3.326	13.120
27	0	0.384	3.216	3.102	0.002	0.006
27	2	0.356	3.244	2.957	0.437	1.725
27	4	0.333	3.267	2.912	0.388	1.532
27	20	0.363	3.237	2.664	0.433	1.707
27	24	0.367	3.233	2.597	0.665	2.623
27	44	0.366	3.234	2.473	0.549	2.166
27	48	0.347	3.253	2.473	0.559	2.205
28	0	0.369	3.244	3.086	0.002	0.006
28	2	0.329	3.284	2.523	0.435	1.717
28	4	0.332	3.281	2.496	0.493	1.944
28	20	0.304	3.309	1.575	1.321	5.209
28	24	0.270	3.343	1.292	1.868	7.367
28	44	0.186	3.427	0.596	2.722	10.735
28	48	0.162	3.451	0.509	2.846	11.224
29	0	0.375	3.239	3.102	0.001	0.006
29	2	0.366	3.248	3.117	0.009	0.034
29	4	0.377	3.237	3.099	0.023	0.089
29	20	0.380	3.234	3.092	0.032	0.125
29	24	0.379	3.235	3.058	0.039	0.154
29	44	0.374	3.240	3.013	0.053	0.209
29	48	0.373	3.241	2.950	0.059	0.233

10

20

30

40

【0436】

実施例 4 1

2-メチル-1-ブタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸(COFA)のリパーゼ触媒反応による2-メチル-1-ブチル-COFAエステルの生成

水性2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝液(0.20M、pH5.5)、2-メチル-1-ブタノール、リパーゼ(Lipolase(登録商標)100L(Novozymes)、Lipozyme(登録商標)CALB L(Novozymes)、リゾプス・アリズス(Rhizopus arrhizus)リパーゼ(Sigma Aldrich)、およびカンジダ・キリンドラケア(Candida cylindracea)リパーゼ(Sigma Aldrich)およびトウモロコシ油から調製されるトウモロコシ油脂肪酸を含有する反応混合物(表36)を30℃で攪拌し、試料を所定の時

50

点で各反応混合物から撹拌しながら抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、2-メチル-1-ブタノールおよびトウモロコシ油脂肪酸の2-メチル-1-ブチルエステル (MeBO-COFA) (表37) について分析した。

【0437】

【表39】

表 36: トウモロコシ油脂肪酸の 2-メチル-1-ブチルエステル(MeBO-COFA)への 2-メチル-1-ブタノール (MeBOH)の転化のための反応条件

反応	MES緩衝液 (0.2 M) (g)	2-メチル-1-ブタノール (g)	COFA (g)	リパーゼ	リパーゼ (ppm)
30	46.27	3.60	14.48	Lipolase® 100L	10
31	46.14	3.60	14.48	Lipozyme® CALB L	10
32	46.12	3.60	14.47	<i>R. アリズス</i> (<i>R. arrhizus</i>)	10
33	46.11	3.49	14.47	<i>C. キリンドラケア</i> (<i>C. cylindracea</i>)	10
34	46.18	3.60	14.47	リパーゼなし	0

10

【0438】

【表 4 0】

表 37: 表 36 に記載される反応についての水性画分(AQ)および有機画分(ORG)中に存在する 2-メチル-1-ブタノール(MeBOH)およびトウモロコシ油脂肪酸の 2-メチル-1-ブチルエステル(MeBO-COFA)の重量

反応	時間(時)	全MeBOH (g) (AQ)	全MeBOH (g) (ORG)	MeBOH (g) (ORG)	MeBO-COFA からのMeBOH (g) (ORG)	MeBO- COFA (g) (ORG)
30	0	0.000	3.603	3.103	0.002	0.008
30	2	0.009	3.593	2.919	0.630	2.484
30	4	0.058	3.545	2.766	0.673	2.653
30	20	0.005	3.598	2.041	1.331	5.250
30	24	0.029	3.574	1.967	1.418	5.594
30	44	0.017	3.585	1.218	2.174	8.577
30	48	0.008	3.595	1.099	2.085	8.224
31	0	0.000	3.595	3.129	0.003	0.010
31	2	0.003	3.592	2.665	0.692	2.730
31	4	0.012	3.583	2.510	0.839	3.308
31	20	0.001	3.594	1.408	1.932	7.622
31	24	0.005	3.590	1.293	2.082	8.214
31	44	0.006	3.589	0.970	2.437	9.612
31	48	0.007	3.588	0.918	2.495	9.840
32	0	0.000	3.597	3.100	0.003	0.011
32	2	0.017	3.580	2.855	0.588	2.321
32	4	0.000	3.597	2.783	0.675	2.664
32	20	0.000	3.597	2.392	1.027	4.051
32	24	0.000	3.597	2.337	1.081	4.266
32	44	0.001	3.596	2.209	1.191	4.697
32	48	0.000	3.597	2.174	1.216	4.798
33	0	0.000	3.597	3.093	0.002	0.008
33	2	0.001	3.596	1.756	1.398	5.514
33	4	0.003	3.594	2.116	1.026	4.046
33	20	0.027	3.570	0.607	2.865	11.302
33	24	0.000	3.597	0.429	3.097	12.216
33	44	0.007	3.590	0.205	3.345	13.194
33	48	0.003	3.594	0.202	3.353	13.228
34	0	0.000	3.485	3.014	0.003	0.011
34	2	0.000	3.485	2.991	0.021	0.083
34	4	0.000	3.485	3.020	0.012	0.046
34	20	0.000	3.485	2.970	0.029	0.115
34	24	0.002	3.483	2.949	0.037	0.148
34	44	0.000	3.485	2.912	0.047	0.185
34	48	0.000	3.485	2.909	0.051	0.200

10

20

30

【0439】

40

実施例 4 2

イソプロパノールおよびトウモロコシ油脂肪酸 (COFA) のリパーゼ触媒反応によるイソプロピル-COFA エステルの生成

水性 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝液 (0.20M、pH 5.5)、イソプロパノール (2-プロパノール)、リパーゼ (Lipolase (登録商標) 100

L (Novozymes)、Lipozyme (登録商標) CALB L (Novozymes)、リゾプス・アリズス (Rhizopus arrhizus) リパーゼ (Sigma Aldrich)、およびカンジダ・キリンドラケア (Candida cylindracea) リパーゼ (Sigma Aldrich) およびトウモロコシ油から調製されるトウモロコシ油脂肪酸を含有する反応混合物 (表 38) を 30℃で攪拌し、試料

50

を所定の時点で各反応混合物から撹拌しながら抜き取り、すぐに遠心分離し、水層と有機層とを分離し、イソプロパノールおよびトウモロコシ油脂肪酸のイソプロピルエステル（ $i\text{-PrO-COFA}$ ）（表 39）について分析した。

【0440】

【表 41】

表 38: トウモロコシ油脂肪酸のイソプロピルエステル($i\text{-PrO-COFA}$)へのイソプロパノール($i\text{-PrOH}$)の転化のための反応条件

反応	MES緩衝液 (0.2 M) (g)	イソプロパノール (g)	COFA (g)	リパーゼ	リパーゼ (ppm)
35	46.14	3.60	14.48	Lipozyme® CALB L	10
36	46.11	3.49	14.47	C. キリンドラケア(<i>C. cylindracea</i>)	10
37	46.18	3.60	14.47	リパーゼなし	0

10

【0441】

【表 42】

表 39: 表 38 に記載される反応についての有機画分(ORG)中に存在するイソプロパノール($i\text{-PrOH}$)およびトウモロコシ油脂肪酸のイソプロピルエステル($i\text{-PrO-COFA}$)の重量

反応	時間(時)	$i\text{-PRO-COF}$ Aからの $i\text{-PrOH}$ (g) (ORG)	$i\text{-PrO-}$ COFA (g) (ORG)
35	0	0.001	0.00
35	2	0.013	0.07
35	4	0.038	0.20
35	20	0.132	0.71
35	24	0.177	0.94
35	44	0.291	1.55
35	48	0.301	1.61
36	0	0.001	0.01
36	2	0.051	0.27
36	4	0.163	0.87
36	20	0.532	2.84
36	24	0.652	3.48
36	44	0.916	4.89
36	48	0.959	5.12
37	0	0.001	0.01
37	2	0.001	0.01
37	4	0.003	0.02
37	20	0.009	0.05
37	24	0.011	0.06
37	44	0.016	0.09
37	48	0.023	0.12

20

30

40

【0442】

実施例 43

水と抽出剤との間のイソブタノールのための分配係数の比較

イソブタノール（30 g/L）の水溶液を、トウモロコシ油脂肪酸（COFA）、またはオレイン酸またはトウモロコシ油トリグリセリドと混合し、それらの測定された分配係数を、オレイルアルコールについて測定された分配係数と比較して表中で報告した。結果を表 40 に示す。

50

【0443】

【表43】

表40: 水と抽出剤との間のイソブタノール(30 g/L)のための相対的な分配係数

抽出剤	オレイルアルコールに対する イソブタノールの分配係数
オレイルアルコール	100 %
トウモロコシ油脂脂肪酸	91 %
トウモロコシ油脂脂肪酸イソブチルエステル	43 %
トウモロコシ油トリグリセリド	10 %

10

【0444】

実施例44

トウモロコシ油脂脂肪酸の生成

機械的攪拌器、熱電対、加熱マントル、凝縮器および窒素ティー（nitrogen tee）を備えた5リットル（5 L）の丸底フラスコに、750 gの粗トウモロコシ油（非食品グレード、エタノール発酵設備から回収される）、2112 gの水および285 gの50%の水酸化ナトリウム溶液を投入した。混合物を90℃まで加熱し、2時間保持し、その間に、混合物は、1つの高粘度の、エマルジョン状の単相になった。この時間の終了時に、TLCは、混合物中に残っているトウモロコシ油がないことを示す。次に、混合物を74℃に冷却し、900 gの25%の硫酸を加えて、混合物を酸性化した。次に、混合物を50℃に冷却し、水層を排出した。油層を、1500 mLの40℃の水で2回洗浄し、次に1リットルの飽和塩水で1回洗浄した。それを硫酸マグネシウム上で乾燥させ、セライトを通してろ過した。収量は610 gの透明の赤色の油であった。AOC S方法Ca 5a-40による遊離脂肪酸の滴定により、オレイン酸として表される95%の脂肪酸含量が示される。104 mgを1 mLの乾燥ピリジン中の100 μ LのN-メチルーN-（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミドと反応させることによって、試料をシラン処理した。シラン処理された生成物のガスクロマトグラフィー質量分析（GCMS）は、16:0、18:2、18:1、18:0、および20:0の酸のTMS誘導体の存在を示す。

20

30

【0445】

実施例45

FABEの化学合成

3 Lのフラスコは、機械的攪拌器、熱電対、窒素入口、加熱マントルおよび凝縮器を備えていた。フラスコに、COFA（595 g）（実施例44のように調製される）、イソブタノール（595 g）、および硫酸（12 g）を投入した。混合物を1.5時間還流させ、その時間で、凝縮器を取り外し、スチルヘッドと取り替えた。蒸留物を、90℃の初期ヘッド温度および105℃の最終ヘッド温度で3時間にわたって収集した。次に、混合物を室温に冷まし、500 mLの脱イオン水を加えた。層を分離し、有機層を500 mLの脱イオン水で5回洗浄した。次に、それを500 mLの10%の塩化カルシウム溶液で1回洗浄した後、500 mLの脱イオン水で6回洗浄した。次に、油を硫酸マグネシウム上で乾燥させ、セライト床を通してろ過したところ、601 gの透明の赤色の油が得られた。GC分析は、0.36重量%のイソブタノールの存在を示す。GC/MS分析は、パルミチン酸イソブチル、ステアリン酸イソブチル、オレイン酸イソブチル、リノール酸イソブチル、およびリノレン酸イソブチルの存在を示す。

40

【0446】

実施例46

無機酸触媒を用いたブタノールの回収

機械的攪拌ならびにスチルヘッドおよび窒素入口を上にも備えたラシヒリングが装着され

50

た 12 インチカラムを備えた 1 リットルの丸底フラスコを使用した。フラスコに、実施例 45 のように合成された 254 g の F A B E、255 g の C O F A、100 mL の水、および 5 g の硫酸を投入し、93℃のポット温度まで加熱した。ヘッド温度は 89.7℃で平衡化した。第 1 の留分を、89～94℃のヘッド温度を維持する還流比で収集した。

【0447】

反応物を冷却し、室温で 3 日間静置させた。ポットの G C 分析は、ポット中の合計 1 g のイソブタノールを示す。蒸留を再開し、3 つ以上の留分を、それぞれ 25 mL ずつ、収集した。留分 # 2 を収集した後、100 mL の水をポットに加えた。4 つの留分を収集し、分析し、結果を表 41 に示す。

【0448】

G C 分析を、30 m の F F A P カラムを用いた H e w l e t t P a c k a r d 6890 G C を用いて行った。試料をイソプロパノールに溶解させ、1-ペンタノールを、内部標準として加えた。イソブタノール、パルミチン酸イソブチル、ステアリン酸イソブチル、オレイン酸イソブチル、リノール酸イソブチル、リノレン酸イソブチル、アラキドン酸イソブチル、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸についての標準曲線を作成した。F A B E 含量をブチルエステルの合計として報告し、C O F A 含量を脂肪酸の合計として報告した。

【0449】

【表 44】

表 41: 収集された留分の組成分析

	i-BuOH mg/ml	mL	i-BuOH の 重量
留分 1	60	43	2.6
留分 2	41	23.4	1
留分 3	29	24.2	0.7
留分 4	30	27	0.8
合計		117.6	5.1

【0450】

実施例 47

有機酸触媒を用いたブタノールの回収

マグネチックスターラー、熱電対、滴下漏斗およびスチルヘッドを備えた 1 リットルの三つ口丸底フラスコを使用した。フラスコに、実施例 45 のように合成された 100 g の F A B E、100 g の C O F A、5 g の p-トルエンスルホン酸、および 25 mL の水を投入した。初期ポットのイソブタノール分析は、1.1 g のイソブタノールが存在する (F A B E 中の汚染物質) ことを示す。ポットを 125℃まで加熱した。ポットが 116℃に達したとき、ヘッド温度は 96℃であり、125 mL の水を 2.5 時間にわたって加えた。水を加えた時間にわたって 6 つの留分を収集し、それらを、実施例 46 のように G C

【0451】

【表 4 5】

表 42: 収集された留分の組成分析

留分	ポット温度	ヘッド温度	加えられる 水の mL	留分中の <i>i</i> -uOH (mg/ml)	mL	留分中の <i>i</i> -BuOH(g)
#1	116	96	25	53	13	0.7
#2	117	98	47	52	26	1.4
#3	117	99	70	37	24	0.9
#4	117	99	95	30	22	0.7
#5	117	99	125	23	31	0.7
#6	117	99		39	41	1.6
合計						5.9

【0 4 5 2】

残りのスチルポットのブタノール分析は、0.9 g の遊離イソブタノールが存在することを示す。分析される初期の C O F A : F A B E 混合物は、45 重量%の F A B E であった。分析される最終的なポットは、32 重量%の F A B E であった。

【0 4 5 3】

実施例 4 8

高温における水による F A B E の加水分解

1 リットルのオートクレーブに、実施例 4 5 のように合成された F A B E、300 mL および 300 mL の水を投入した。オートクレーブを密閉し、窒素でパージした。攪拌を開始し、次に、45 分間にわたって 250 °C まで加熱し、温度に達した後、試料を 1 時間ごとに取り出した。試料を、実施例 4 6 のように G C によって分析した。油相試料は、表 4 3 に示される時間に応じた組成を示した。

【0 4 5 4】

【表 4 6】

表 43: 試料の有機相の組成

時間	<i>i</i> -BuOH (重量%)	FABE (重量%)	COFA (重量%)
0	0	97	2
1	3	76	18
2	6	50	41
3	7	36	45
4	7	34	48
5	7	35	51

【0 4 5 5】

実施例 4 9

高温における希酸による F A B E の加水分解

1 リットルのオートクレーブに、実施例 4 5 のように合成された F A B E と、C O F A との 450 g の 75 / 25 混合物および 150 g の 2 % の硫酸を投入した。オートクレーブを密閉し、窒素でパージした。攪拌を開始し、次に、それを 45 分間にわたって 225 °C まで加熱し、温度に達した後、試料を 1 時間ごとに取り出した。試料を、実施例 4 6 のように G C によって分析した。油相試料は、表 4 4 に示される時間に応じた組成を示した。

【0 4 5 6】

【表 4 7】

表 44: 収集された留分の組成分析

時間 (時)	<i>i</i> -BuOH (重量%)	FABE (重量%)	COFA (重量%)
0	2.2	61.8	34.1
1	3.8	47.8	42.0
2	5.2	38.4	48.2
3	5.3	38.4	53.5
4	5.1	33.4	48.2
5	5.1	31.9	43.3
6	5.5	35.2	51.7

10

【0 4 5 7】

実施例 5 0

1 0 0 °Cにおける溶媒中の硫酸による F A B E の加水分解

実施例 4 5 のように合成された 5 g の F A B E、5 g の 2 5 % の硫酸、および 6 0 g のジエチレングリコールジメチルエーテルの溶液を調製した。1 0 g の溶液を、5 つのバイアルのそれぞれに加え、次にそれを密閉した。バイアルの全てを 1 0 0 °C まで加熱し、1 つのバイアルを加熱器から取り出し、1 時間ごとに分析した。得られた組成物を、G C (

20

【0 4 5 8】

【表 4 8】

表 45: 収集された留分の組成分析

時間 (時)	<i>i</i> -BuOH (重量%)	FABE (重量%)	COFA (重量%)
0	0.11	5.74	0
1	1.1	1.72	1.23
2	1.32	0.96	1.77
3	1.35	0.76	1.8
4	1.38	0.7	1.81
5	1.37	0.72	1.82
15	1.37	0.84	2.12

30

【0 4 5 9】

実施例 5 1

反応蒸留による F A B E の加水分解

1 2 リットルのフラスコは、原料入口およびスチルヘッドを上にも備えた絶縁された 2 インチ×3 0 インチのカラムを備えていた。カラムに、1 リットルの P r o - p a k (登録商標) (3 1 6 S S 0 . 1 6 インチ) 蒸留器充填材 (s t i l l p a c k i n g) および 5 0 0 g の A m b e r l y s t (登録商標) 3 6 固体酸触媒 (D o w) をランダムに充填した。フラスコに、6 リットルの水を投入し、沸騰させた。熱を、約 1 . 8 m L / 分の水蒸留速度を有するように制御した。実施例 4 5 に記載される方法どおりに合成された F A B E を、2 g / 分の速度でカラムの上部に加えた。合計 6 0 分間、供給し続けた。さらに 3 0 分間、蒸留し続けた。合計 1 9 4 g の蒸留物を収集したところ、2 . 1 g のイソブタノールを含有していた。供給された F A B E の量に基づいて、これは、ブタノールへの F A B E の 9 % の転化率を表す。

40

【0 4 6 0】

実施例 5 2

逆流蒸気による F A B E の加水分解

50

実施例 50 に記載される装置を、蒸留塔の周囲に巻き付けられた熱テープ (heat tape) の追加によって変更した。塔の上半分の温度を 115℃ に調整し、塔の下半分の温度を 104℃ に調整した。ポットを沸騰させ、ポットの熱を、水が 1.5~2 mL / 分の速度で蒸留するまで調整した。蒸留を続けながら、実施例 45 に記載される方法どおりに合成された F A B E (346 g) を、3 時間かけて充填カラムの上部に供給した。供給期間の後、蒸留をさらに 90 分間続けた。合計 486 g の蒸留物を収集したところ、30.1 g のイソブタノールを含有していた。これは、39% の、イソブタノールへの F A B E の転化率を表す。

【0461】

実施例 53

不水溶性有機酸によって触媒される加水分解

油浴、機械的攪拌器、窒素入口、表面下 (subsurface) 水入口、およびスチルヘッドを備えた 1 リットルの三つ口丸底フラスコに、150 g の F A B E、50 g の水、および 5 g のドデシルベンゼンスルホン酸を投入した。油浴を 95~100℃ まで加熱し、ゆっくりとした窒素掃引を開始した。蒸留物留分を、合計 5 時間にわたって 30 分ごとに収集した。3 時間後、水を、15 mL / 時の速度でスチルポットに供給した。蒸留物留分を、実施例 46 に記載される G C 方法によってイソブタノール含量について分析し、結果を表 46 に示す。F A B E に含まれるイソブタノールの約 44% を 5 時間にわたって収集した。

【0462】

【表 49】

表 46

試料	収集される累積 <i>i</i> -BuOH(g)
1	0.80
2	1.47
3	2.46
4	3.99
5	5.71
6	7.75
7	9.16
8	10.33
9	13.76
10	14.37

【0463】

実施例 54

固体酸触媒によって触媒される加水分解

油浴、機械的攪拌器、表面下窒素入口、表面下水入口、およびスチルヘッドを備えた 1 リットルの三つ口丸底フラスコに、150 g の F A B E および 50 g の乾燥 Amberlyst 15 固体酸触媒を投入した。フラスコを油浴によって 110℃ まで加熱し、水を 15 mL / 時の速度でシリンジポンプを介して加えた。蒸留物留分を、合計 5 時間にわたって 30 分ごとに収集した。留分を、実施例 46 に記載される G C 方法によってイソブタノール含量について分析し、結果を表 47 に示す。F A B E に含まれるイソブタノールの理論量の約 44% を 5 時間にわたって収集した。

【0464】

【表 5 0】

表 47

試料	収集される累積 <i>i</i> -BuOH(g)
1	0.3
2	0.9
3	2.3
4	3.4
5	4.4
6	5.5
7	6.3
8	6.9
9	7.4
10	8.0

10

【0 4 6 5】

実施例 5 5

20

水溶性有機酸触媒によって触媒される加水分解

機械的攪拌器、表面下窒素入口、表面下水入口、およびスチルヘッドを備えた 1 リットルのフラスコに、200 g の F A B E および 10 g の p-トルエンスルホン酸を投入した。フラスコを攪拌し、油浴によって 110 °C まで加熱し、その時間に、水を、シリンジポンプを介して 20 mL / 時の速度で加えた。蒸留留分を、合計 3 時間にわたって 30 分ごとに収集した。留分を、実施例 4 6 に記載される G C 方法によってイソブタノール含量について分析し、結果を表 4 8 に示す。F A B E に含まれるイソブタノールの理論量の約 30 % を 5 時間にわたって収集した。

【0 4 6 6】

【表 5 1】

30

表 48

留分	イソブタノールの累積量
1	1.0
2	4.0
3	7.2
4	9.5
5	11.8
6	13.4

40

【0 4 6 7】

実施例 5 6

発酵からの溶媒相の加水分解

A. 溶媒相 1

実施例 1 7 に示される発酵からの溶媒相を、実施例 4 6 に示される G C 方法によって分析し、結果を表 4 9 に示す。分析は、F A E E と一致する保持時間を有する少量の材料とともに主に F A B E および脂肪酸を示す。ブチルエステルおよび酸のみの分析は、62 % の F A B E および 39 % の脂肪酸の比率を示す。

50

【0468】

溶媒相（1.25リットル、1090g）および1.25リットルの水を1ガロンのオートクレーブに投入した。オートクレーブを密閉し、250℃まで加熱し、その温度で4時間保持した。次に、オートクレーブを冷却し、開放し、エマルジョンを得た。混合物を、セライト床を通してろ過し、層を分離した。有機層を、1リットルの水で3回洗浄した。次に、試料を50℃まで加熱し、6時間、窒素でパージした。GC分析は、i-BuOHがないことおよび33%のFABEおよび67%の脂肪酸の比率を示す。琥珀色の油（993.9g）が得られた。発酵の実施例17からの元の溶媒相および加水分解後の溶媒相の詳細な組成分析を表50に示す。

【0469】

10

B. 溶媒相2

実施例18に示される発酵からの溶媒相を、実施例46に示されるGC方法によって分析し、結果を表49に示す。分析は、FAEEと一致する保持時間を有する少量の材料とともに主にFABEおよび脂肪酸を示す。ブチルエステルおよび酸のみの分析は、45%のFABEおよび55%の脂肪酸の比率を示す。

【0470】

溶媒（1.25リットル、1100g）および1.25リットルの水を、1ガロンのオートクレーブに投入した。オートクレーブを密閉し、250℃まで加熱し、その温度で4時間保持した。次に、オートクレーブを冷却し、開放し、エマルジョンを得た。混合物を、セライト床を通してろ過し、層を分離した。有機層を、1リットルの水で3回洗浄した。次に、試料を50℃まで加熱し、6時間、窒素でパージした。GC分析は、i-BuOHがないことおよび28%のFABEおよび72%の脂肪酸の比率を示す。琥珀色の油（720.5g）が得られた。

20

【0471】

【表52】

表 49

試料	加水分解前		加水分解後	
	FABE (%)	脂肪酸(%)	FABE (%)	脂肪酸(%)
溶媒相 1	62	39	33	67
溶媒相 2	45	55	28	72

30

【0472】

【表 5 3】

表 50

	溶媒相 1 (重量%)	加水分解後の組成 (重量%)
パルミチン酸イソブチル	7.28	4.24
ステアリン酸イソブチル	3.41	2.25
オレイン酸イソブチル	13.92	7.69
リノール酸イソブチル	33.09	17.73
リノレン酸イソブチル	2.78	
パルミチン酸	3.79	7.3
ステアリン酸	2.58	4.07
オレイン酸	9.14	16.61
リノール酸	19.06	33.54
リノレン酸	2.3	2.65

10

【0 4 7 3】

実施例 5 7

生成物アルコールの回収ーリパーゼ触媒を用いた加水分解

20

F A B E を、実施例 4 4 に記載される方法どおりにトウモロコシ油脂肪酸から合成した。Novozyme 435 (Novo 435、カンジダ・アンタークティカ (Candida Antarctica) リパーゼ B、アクリル樹脂上に固定化される) を、Sigma Aldrich (St. Louis, Mo) から購入した。カンジダ・アンタークティカ (Candida Antarctica) リパーゼ B を、Novozymes (Franklinton, NC) から購入した。t-BuOH、アセトン、エタノール、メタノール、およびグリセロールを、全て Sigma Aldrich (St. Louis, Mo) から購入した。ガスクロマトグラフィー (GC) 分析では、使用されるガスクロマトグラフは、Hewlett Packard 5890 Series II GC クロマトグラムであり、ペンタデカン酸メチルを内部標準として使用した。

30

【0 4 7 4】

A. 大気圧、40℃

2 mL の F A B E と 5 mL の水との混合物に、40 mg の Novozyme 435 を加え、反応混合物を 20 mL のバイアルに入れ、回転式振とう器 (300 rpm) 中で 40℃ で培養した。反応混合物を、24 時間の反応中に GC を用いて分析して、表 5 1 に示される以下の転化率 % プロファイルを生成した：

【0 4 7 5】

【表 5 4】

表 51: 実施例 57A の転化率 % プロファイル

40

反応時間(時)	FABE 転化率%
0	0
1	6.7
1.5	10.5
2	15.1
4	17.0
6	17.4
8	17.7
24	18.2

【0 4 7 6】

50

B. 大気圧、40℃、65℃および80℃、有機溶媒なし

この実施例のパートAとともに、これらのデータは、温度とともに平衡がどのように変化するかを示す。

【0477】

1 mLのFABEと2 mLの水との混合物に、20 mgのNovozyme 435を加え、反応混合物を、6 mLの隔壁キャップ付き(septum-capped)バイアル中で、40℃で45時間回転させた。GCを用いて反応混合物を分析したところ、平衡状態でFABEの18.2%の転化率が示された。

【0478】

1 gのFABEと2 mLの水との混合物に、20 mgのNovozyme 435を加え、反応混合物を、6 mLの隔壁キャップ付きバイアル中で、65℃で42時間回転させた。GCを用いて反応混合物を分析したところ、平衡状態でFABEの19.8%の転化率が示された。

【0479】

1 gのFABEと2 mLの水との混合物に、20 mgのNovozyme 435を加え、反応混合物を、6 mLの隔壁キャップ付きバイアル中で、80℃で42時間回転させた。GCを用いて反応混合物を分析したところ、平衡状態でFABEの21.4%の転化率が示された。

【0480】

C. 平衡状態に対する有機溶媒(t-BuOH)の影響を示す実施例

0.25 mLのFABE、0.75 mLのt-BuOH、および0.1~0.3 mLの水を含有する3種の反応混合物に、20 mgのNovozyme 435を加え、混合物を、6 mLの隔壁キャップ付きバイアル中で、それらが平衡状態に達した時点で、40℃で一晩回転させておいた。反応の24時間後にGCを用いて反応混合物を分析したところ、表52に示される77~82%のFABE転化率が得られた。同様の反応条件下でt-BuOHを3-Me-3-ペンタノールに置き換えると、70~80%のFABE加水分解収率が得られた。

【0481】

【表55】

表 52: 実施例 57C の転化率%プロファイル

反応混合物	Novozyme 435 の 充填量	FABE 転化率%
0.75 mL の t-BuOH、0.25 mL の FABE、0.1 g の H ₂ O	20 mg	77%
0.75 mL の t-BuOH、0.25 mL の FABE、0.2 g の H ₂ O	20 mg	81%
0.75 mL の t-BuOH、0.25 mL の FABE、0.3 g の H ₂ O	20 mg	82%

【0482】

D. 溶媒としてのアセトン

0.25 mLのFABE、0.75 mLのアセトン、および0.1~0.3 mLの水を含有する3種の反応混合物に、20 mgのNovozyme 435を加え、混合物を、6 mLの隔壁キャップ付きバイアル中で、それらが平衡状態に達した時点で、40℃で一晩回転させておいた。反応の24時間後にGCを用いて反応混合物を分析したところ、表53に示される71~78%のFABE転化率が示された。

【0483】

【表 5 6】

表 53: 実施例 57D の転化率%プロファイル

反応混合物	Novozyme 435 の 充填量	FABE 転化率%
0.75 mL のアセトン、0.25 mL の FABE、0.1 g の H ₂ O	20 mg	71%
0.75 mL のアセトン、0.25 mL の FABE、0.2 g の H ₂ O	20 mg	74%
0.75 mL のアセトン、0.25 mL の FABE、0.3 g の H ₂ O	20 mg	78%

10

【0 4 8 4】

E. FABE 転化率に対する、加水分解中に *i*-BuOH を除去することの影響を示す実施例—大気圧における窒素バージ

25 mL の丸底フラスコに、2 mL の FABE、5 mL の水、および 40 mg の Novozyme 435 を投入した。反応混合物を 95 °C まで加熱し、反応中に形成される *i*-BuOH を、反応混合物に窒素をバブリングすることによって除去した。反応中に混合物から試料を取り、GC を用いて有機相を分析した。表 5 4 に示されるように 6 時間後に 94 % の転化率が得られた：

20

【0 4 8 5】

【表 5 7】

表 54: 実施例 57E の FABE 転化率プロファイル

反応時間(時)	COFA + FABE 中の COFA のモル%
0	1
1	62
2	76
3	86
4	90
6	94

30

【0 4 8 6】

F. 転化率に対する、加水分解中に *i*-BuOH を除去することの影響を示す実施例—真空蒸留

25 mL の丸底フラスコに、3 mL の FABE、7.5 mL の水、および 60 mg の Novozyme 435 を投入した。フラスコを真空蒸留装置に取り付け、圧力を 91 mm Hg に設定した。次に、反応混合物を 74 °C まで加熱し、反応中に形成される *i*-BuOH を、蒸留により取り除いた。反応中に混合物から試料を取り、GC を用いて有機相を分析した。表 5 5 に示されるように、10 時間後に 91 % の転化率が得られた。

【0 4 8 7】

40

【表 58】

表 55: 実施例 57F の転化率%プロファイル

反応時間(時)	FABE 転化率%
0	0
1	16
2	37
3	57
5	72
7	83
10	91

10

【0488】

G. 転化率に対する、加水分解中に i -BuOH を除去することの影響を示す実施例－真空蒸留実施例－可変の FABE / COFA 出発比率：23% の FABE：77% の COFA v / v

25 mL の丸底フラスコに、0.69 mL の FABE、2.31 mL の COFA、7.5 mL の水、および 60 mg の Novozyme 435 を投入した。フラスコを真空蒸留装置に取り付け、圧力を 91 mm Hg に設定した。次に、反応混合物を 74 °C まで加熱し、反応中に形成される i -BuOH を、蒸留により取り除いた。反応中に混合物から試料を取り、GC を用いて有機相を分析した。表 56 に示されるように、10 時間後に 98% の転化率が得られた。

20

【0489】

【表 59】

表 56: 実施例 57G の FABE 転化率プロファイル

反応時間(時)	COFA + FABE 中の COFA のモル%
0	77
1	83
2	86
3	90
4	92
6	93
7	96
10	98

30

【0490】

H. 転化率に対する、加水分解中に i -BuOH を除去することの影響を示す実施例－真空蒸留実施例－可変の FABE / COFA 出発比率：70% の FABE：30% の COFA v / v

25 mL の丸底フラスコに、2.1 mL の FABE、0.9 mL の COFA、7.5 mL の水、および 60 mg の Novozyme 435 を投入した。フラスコを真空蒸留装置に取り付け、圧力を 91 mm Hg に設定した。次に、反応混合物を 74 °C まで加熱し、反応中に形成される i -BuOH を、蒸留により取り除いた。反応中に混合物から試料を取り、GC を用いて有機相を分析した。表 57 に示されるように、10 時間後に 96% の転化率が得られた：

40

【0491】

【表 60】

表 57: 実施例 57H の F A B E 転化率プロフィール

反応時間(時)	COFA + F A B E 中の COFA のモル%
0	30
1	52
2	64
5	84
7	89
10	96

10

【0492】

I. 真空蒸留条件下での F A B E 加水分解の際の遊離 C a l B 酵素を示す実施例

2つの丸底フラスコに、3 mL (2.7 g) の F A B E および 7.5 mL の H₂O をそれぞれ投入した。一方の混合物に 5.9 mg のカンジダ・アンタールクティカ (Candida Antarctica) リパーゼ B を加え、他方に 0.59 mg の酵素を加えた。反応フラスコを別々に蒸留装置に連結し、91 mm Hg の圧力にかけた。反応混合物を 65~68 °C まで加熱した。試料を 10 時間かけて反応混合物から取り、ガスクロマトグラフィーを用いて分析した。最終的な F A B E 転化率はそれぞれ 96 および 78 % であった。実験は、酵素濃度の量が 10 分の 1 に減少すると、速度および転化率がそれぞれ 3 分の 1 におよび 18 % だけ低下することを示す。結果を表 58 に示す。

20

【0493】

【表 61】

表 58: 実施例 57I の F A B E 転化率プロフィール

反応時間(時)	5.9mg の CALB/2.7g の F A B E を含む COFA + F A B E 中の COFA のモル%	0.59mg の CALB/2.7g の F A B E を含む COFA + F A B E 中の COFA のモル%
0	0	0
1	44	21
2	62	31
6	89	61
10	96	78

30

【0494】

実施例 58

生成物アルコールの回収—エステル交換

F A B E を、実施例 44 に記載される方法どおりにトウモロコシ油脂肪酸から合成し；Novozyme 435 (カンジダ・アンタールクティカ (Candida Antarctica) リパーゼ B、アクリル樹脂上に固定化される) を、Sigma Aldrich (St. Louis, Mo) から購入した。カンジダ・アンタールクティカ (Candida Antarctica) リパーゼ B を、Novozymes (Franklin, NC) から購入した。t-BuOH、アセトン、エタノール、メタノール、およびグリセロールを、全て Sigma Aldrich (St. Louis, Mo) から購入した。GC 分析では、使用されるガスクロマトグラフは、Hewlett Packard 5890 Series II GC クロマトグラムであり、ペンタデカン酸メチルを内部標準として使用した。

40

【0495】

A. リパーゼの試験—F A B E から F A M E

使用される試薬は、t-BuOH (Aldrich)；MeOH (Aldrich)；Novozyme 435 (Aldrich)；PS30 (バークホルデリア・セパシア (Burkholderia cepacia)、Amano Enzymes, Inc

50

, Elgin, IL); Lipolase (登録商標) 100T (サーモマイセス・ラヌギノサ (Thermomyces lanuginosa)、シリカ上に固定化される、Novozymes, Franklinton, NC); Lipolase (登録商標) 100L (サーモマイセス・ラヌギノサ (Thermomyces lanuginosa)、Novozymes, Franklinton, NC); Lipozyme (登録商標) TLIM (固定化されたサーモマイセス・ラヌギノサ (Thermomyces lanuginosa)、Novozymes, Franklinton, NC); Lipoclean (登録商標) 2000T (リパーゼの固定化された混合物; Novozymes, Franklinton, NC); NZL-103-LYO (リゾムコール・ミエヘイ (Rhizomucor miehi) に由来するリパーゼ、Novozymes, Franklinton, NC) であった。

10

【0496】

6 mL のバイアルに、500 mg の F A B E (1.48 mmol)、400 μ L の *t*-BuOH、60 μ L の MeOH (1.48 mmol)、3 μ L の水、および 2.5 mg のリパーゼ (表 57 を参照) を加えた。得られた混合物を培養器／振とう器に入れ、40 $^{\circ}$ C で一晩放置した。反応混合物の GC 分析により、9 ~ 56 % の転化率が示された。結果を表 59 に示す。

【0497】

【表 62】

20

表 59: 平衡濃度[mg/mL]および異なるリパーゼを用いた F A B E $\rightarrow$ F A M E の転化率%

リパーゼ	F A B E (mg/mL)	COFA (mg/mL)	<i>i</i> -BuOH (mg/mL)	転化率%
PS30	471	2.48	11.2	9.73%
NOVOZYME 435	224	16.8	63.7	56.30%
LTLIM	266	15.9	67.7	53.50%
L100T	455	1.8	8.9	8.80%
2000T	452	1.8	9.1	8.31%
NZL-103-LYO	429	3.94	15.3	13.90%

30

【0498】

B. F A B E から F A M E への形質転換—メタノールの量の最適化

6 mL のバイアルに、500 mg の F A B E (1.48 mmol)、400 μ L の *t*-BuOH、60 ~ 240 μ L の MeOH (1.48 ~ 5.92 mmol)、3 μ L の水、および 2.5 mg の Novozyme 435 を加えた。得られた混合物を培養器／振とう器に入れ、40 $^{\circ}$ C で一晩放置した。反応混合物の GC 分析により、表 60 に示されるように 53 ~ 73 % の転化率が示された。

40

【0499】

【表 6 3】

表 60: 実施例 58B の転化率%プロファイル

MeOH 当量	FABE (mg/mL)	COFA (mg/mL)	<i>i</i> -BuOH (mg/mL)	転化率%
1.2	232	2.4	66.9	56.64
1.4	168	2.4	70.4	65.50
1.6	167	0	72.1	66.17
1.8	184	0	80.3	66.41
2.0	131	0	72.4	71.46
2.2	134	1.2	81	73.25
2.4	136	0	80	72.71
2.6	161	0	78	68.70
2.8	168	0	73	66.31
3.0	155	0	74	68.38
3.2	180	0	73	64.75
3.4	161	0	78	68.70
3.6	192	0	66	60.89
3.8	236	0	63	54.74
4.0	243	0	61	53.21

10

20

【0500】

C. 酵素の量の最適化－FABEからFAME

6 mLのバイアルに、500 mgのFABE (1.48 mmol)、400 μ Lの*t*-BuOH、132 μ LのMeOH (3.26 mmol)、および5～25 mgのNovozyme 435を加えた。得られた混合物を培養器／振とう器に入れ、40℃で一晩放置した。反応混合物のGC分析により、表61に示されるように76～79%の転化率が示された。

30

【0501】

【表 6 4】

表 61: 実施例 58C の転化率%プロファイル

Novozyme 435 (mg)	FABE (mg/mL)	COFA (mg/mL)	<i>i</i> -BuOH (mg/mL)	転化率%
5 mg	129.4	0	88	75.49
7.5 mg	119.3	0	89.2	77.21
10 mg	110.9	0	89	78.43
12.5 mg	109.2	0	84.9	77.89
15 mg	112.4	0	86.1	77.63
17.5 mg	108.4	0	87.4	78.51
20 mg	115.6	0	91.8	78.25
22.5 mg	108.6	0	87.7	78.53
25 mg	111.6	0	89	78.32

10

【0 5 0 2】

20

D. 溶媒 (*t*-BuOH) の量の最小化—FABE から FAME

6 mL のバイアルに、500 mg の FABE (1.48 mmol)、0 ~ 300 μ L の *t*-BuOH、132 μ L の MeOH (3.26 mmol)、および 10 mg の Novozyme 435 を加えた。得られた混合物を培養器／振とう器に入れ、40 °C で一晩放置した。反応混合物の GC 分析により、表 6 2 に示されるように 30 ~ 81 % の転化率が示された。

【0 5 0 3】

【表 6 5】

表 62: 実施例 58D の転化率%プロファイル

30

量	FABE (mg/mL)	COFA (mg/mL)	<i>i</i> -BuOH (mg/mL)	転化率%	FAME (mg/mL)
300 μ L の <i>t</i> -BuOH	94.3	0	83	79.95	295
200 μ L の <i>t</i> -BuOH	94.1	0	83.2	80.02	295
100 μ L の <i>t</i> -BuOH	91.7	0	84.2	80.62	300
50 μ L の <i>t</i> -BuOH	92.9	0	81	79.80	290.8
50 μ L 未満の <i>t</i> -BuOH	137	0	70.5	69.98	249.4
<i>t</i> -BuOH なし	322.7	1.39	30.2	29.77	98.1

40

【0 5 0 4】

E. 溶媒 (3-Me-3-ペンタノール) の量の最小化—FABE から FAME

6 mL のバイアルに、500 mg の FABE (1.48 mmol)、0 ~ 300 μ L の 3-Me-3-ペンタノール、132 μ L の MeOH (3.26 mmol)、および 10 mg の Novozyme 435 を加えた。得られた混合物を培養器／振とう器に入れ、40 °C で一晩放置した。反応混合物の GC 分析により、表 6 3 に示されるように 30 ~ 7

50

8 % の転化率が示された。

【0505】

【表66】

表 63: 実施例 58E の転化率%プロフィール

量	FABE (mg/mL)	COFA (mg/mL)	<i>i</i> -BuOH (mg/mL)	転化率%	FAME (mg/mL)
0.3 mL の 3M3P	115.6	3.75	81.4	76.13	296
0.2 mL の 3M3P	106.3	3.13	80	77.32	294
0.1 mL の 3M3P	104.8	2.36	80.8	77.74	296
0.05 mL の 3M3P	102.9	2.3	79.6	77.80	295
浸漬 3M3P	102.5	2.4	79.9	77.93	296
3M3P なし	322.7	1.39	30.2	29.77	98.1

10

【0506】

F. 溶媒を用いない FABE から FAME への転化

FABE (500 mg、1.48 mmol) とメタノール (0.13 μ L、3.25 mmol) との混合物に、40 mg の Novozyme 435 を加え、反応混合物を 40 $^{\circ}$ C で一晩攪拌した。次に、混合物をろ過し、GC によって分析したところ、76 % の転化率が示された。

20

【0507】

G. 酵素の再利用 - FABE から FAME

6 mL のバイアルに、500 mg の FABE (1.48 mmol)、400 μ L の *t*-BuOH、132 μ L の MeOH (3.26 mmol)、および 10 mg の Novozyme 435 を加えた。得られた混合物を培養器／振とう器に入れ、40 $^{\circ}$ C で一晩放置した。その後、反応混合物をろ過し、GC を用いて転化率について分析し、固定化酵素を含有するろ過ケーキを、FABE から FAME への別の転化に使用した。このプロセスを 10 回繰り返した (表 64)。実験は、一晩の反応で転化率を低下させずに最大 10 回まで酵素を再利用することが可能であることを示す。

30

【0508】

【表67】

表 64: 実施例 58G の濃度(mg/mL)における酵素再利用についての転化率%プロフィール

FABE から FAME	FABE	COFA	<i>i</i> -BuOH	転化率%	FAME
1 回目	115.8	5.29	82.1	76.26	298.1
2 回目	124	5.36	82.7	75.13	293.2
3 回目	112	4.82	85	77.47	303.1
4 回目	111	9.06	85.1	77.64	306.3
5 回目	99.4	5.1	82.1	78.91	284.5
6 回目	98.2	6	81.2	78.93	283.8
7 回目	115.6	6.8	78.9	75.56	262.7
8 回目	114.8	6.5	77.6	75.38	257.2
9 回目	99	5.7	78	78.12	241
10 回目	109	8.6	73.7	75.39	226.7

40

【0509】

50

H. F A B E から F A E E への転化

6 mL の隔壁キャップ付きバイアルに、0.8 mL の F A B E (2.08 mmol) および 0.2 mL の E t O H (3.43 mmol) を加えて、単相を形成した。酵素を加えないかまたは 20 mg の N o v o z y m e 435 をバイアルに加えた。次に、バイアルを、培養振とう器 (300 rpm) 中 25℃ および 40℃ で 17 時間培養し、その後、溶液を、ガスクロマトグラフィーによって分析して、表 65 に示される含量および F A B E から F A E E への転化率パーセントを得た。

【0510】

【表 68】

表 65

試料	FABE (mg/mL)	<i>i</i> -BuOH (mg/mL)	COFA (mg/mL)	転化率%
EtOH/FABE + 酵素、25℃	93.2	38.5	0	41.6
EtOH/FABE、酵素なし、25℃	159.6	3.5	0.75	0
EtOH/FABE + 酵素、40℃	90	35.7	0	43.3
EtOH/FABE、酵素なし、40℃	158.7	3.1	0.75	0

【0511】

実施例 59

F A B E のグリセロール分解

6 mL の隔壁キャップ付きバイアルに、0.75 mL の *t*-B u O H、0.25 mL の F A B E、0.1 mL (0.126 g) のグリセロール + 4 μ L の H₂O、酵素 20 mg をそれぞれ加えて、単相を形成した。反応物を、300 rpm における回転式振とう器中 40℃ で、様々なリパーゼを用いて培養した。20 時間後、試料をガスクロマトグラフィーによって分析して、表 66 に示される含量を得た。C O F A および F A B E 含量の比較により、生成物が、*i*-B u O H および C O F A とアシルグリセロールとの混合物（モル基準で約 64% のアシルグリセロール / 36% の C O F A）であることを示す。

【0512】

【表 69】

表 66: COFA とアシルグリセロールとの混合物への FABE の転化率パーセント

リパーゼ	FABE (mg/mL)	COFA (mg/mL)	<i>i</i> -BuOH (mg/mL)	FABE の転化率 パーセント
Amano PS-30 粉末	73	43	32	64%
IM-20、粉末	162.4	10.2	10.9	19%
固定化された Lipolase [®] 100T	190	0	4	約 0%
固定化された Novozyme 435	73	39.5	30.8	64%
固定化された Lipozyme [®] TL IM	101.7	29	26.1	49%
固定化された Lipoclean [®] 2000T	200.9	0	3.9	約 0%

【0513】

A. 水およびグリセロール / F A B E に対する依存度

6 mL の隔壁キャップ付きバイアルに、0.75 mL の *t*-B u O H、0.25 mL の F A B E、0.1 または 0.2 g のグリセロール + A m a n o P S - 30 または N o v

o z y m e 4 3 5 のいずれかのそれぞれ 2 0 m g を加えて、単相を形成した。水は加えなかった。反応物を、3 0 0 r p m における回転式振とう器において 4 0 °C で培養した。2 0 時間後、試料をガスクロマトグラフィーによって分析して、表 6 7 に示される含量を得た。C O F A および F A B E 含量の比較により、生成物が *i*-B u O H および主にアシルグリセロール（大部分はモノグリセリド）であることが示される。前の実施例と比べて、アシルグリセロールの形態の生成物のパーセントは、加えられる水がない場合およびグリセロール／F A B E の増加とともに増加する（1．6 グリセロール／F A B E、モル／モルの場合、モル基準で約 9 1 % のアシルグリセロール／9 % の C O F A および 3．2 グリセロール／F A B E、モル／モルの場合、モル基準で約 9 5 % のアシルグリセロール／5 % の C O F A）。加えられる水がないと、A m a n o P S - 3 0 の酵素活性が消失される。しかしながら、固定化されるアクリル樹脂中に水（約 3 % w / w）を有する N o v o z y m e 4 3 5 には、まだ活性がある。

【 0 5 1 4 】

【表 7 0】

表 67: アシルグリセリドへの F A B E の転化率パーセント

リパーゼ	グリセロール	F A B E (mg/mL)	C O F A (mg/mL)	<i>i</i> -B u O H (mg/mL)	F A B E の 転化率 パーセント
Amano PS-30 粉末	0.1 g	209	1.2	4.4	約 0%
固定化された Novozyme 435	0.1 g	84.2	10.7	28.6	58%
Amano PS-30 粉末	0.2 g	182	0.74	3.8	約 0%
固定化された Novozyme 435	0.2 g	61.5	7.1	30.6	約 69%

【 0 5 1 5 】

B. 酵素濃度に対する依存度

6 m L の隔壁キャップ付きバイアルに、0．7 5 m L の *t*-B u O H、0．2 5 m L の F A B E、0．2 g のグリセロール（グリセロール／F A B E 3．2 / 1、モル／モル）+ 2 または 2 0 m g の N o v o z y m e 4 3 5（N o v o 4 3 5）を加えた。水は加えなかった。反応物を、3 0 0 r p m における回転式振とう器において 4 0 °C で培養し、ガスクロマトグラフィーによって、反応を、時間の関数として追跡した。収率を表 6 8 に示す。モル基準で反応した F A B E の約 9 7 % がアシルグリセロール（大部分はモノグリセリド）に転化された。

【 0 5 1 6 】

【表 7 1】

表 68

時間 (時)	FABE 転化率% 2 mg の Novo 435	FABE 転化率% 20 mg の Novo 435
0	0	0
0.167		13.2
0.333		38
0.5	3.37	42.9
1	10.8	59.1
2	21.9	65.5
4	31.6	67.1
6.5	32.1	
7	45.7	67.1
24	64	67.3

10

【0 5 1 7】

反応の速度は、酵素濃度に対して線形の関係にあり、2 mg および 20 mg の Novozyme 435 の $t_{1/2}$ がそれぞれ 208 分間および 20 分間である。しかしながら、反応は、24 時間後に FABE の転化のほぼ同じ収率に達する。

20

【0 5 1 8】

これらの最後の反応を、0.75 mL の *t*-BuOH の代わりに 0.75 mL の 3-メチル-3-ペンタノールを用いて繰り返した。24 時間後に得られる FABE 加水分解の程度は、両方の溶媒について同じであった。3-メチル-3-ペンタノールの利点は、122 °C の沸点で、*i*-BuOH が最初に純粋な形態（沸点 108 °C）で留去され得ることである。次に、3-メチル-3-ペンタノールが留去され、加水分解反応に再利用され、保持液アシルグリセロール、COFA、およびグリセロール中に残って、FABE の生成に再度使用するために発酵タンクに再利用され得る。第 3 級アルコールは単独で溶媒として働き、CALB の存在下で脂肪酸アルキルエステルを形成するように脂肪酸と反応しないという利点を有する。

30

【0 5 1 9】

C. 有機共溶媒を用いない場合の FABE のグリセロール分解（FABE から COFA + アシルグリセロール）-グリセロール濃度に対する依存度

1 g の FABE を、2 mL の 50、70、90、および 100 % (w/w) のグリセロールと混合し、20 mg の Lipobond (Sprin Technologies, Trieste, Italy) の存在下で 6 mL の隔壁で密閉したバイアルに入れた。バイアルを 62 °C で 24 時間回転させた (tumbled end-over-end)。水相中のグリセロール濃度が上がるにつれて、アシルグリセロールの形態の生成物（表 69、大部分はモノグリセリド）のパーセントが上がる。しかしながら、FABE 転化の程度は、グリセロール濃度に対する依存度を示さない。

40

【0 5 2 0】

【表 7 2】

表 69

条件 (水相中の グリセロール%)	FABE 転化率 %	生成物中の COFA の% (モル基準)	生成物中の アシルグリセロールの% (モル基準)
50	18	100	0
70	17	84	16
90	17	34	66
100	17	3	97

10

【0521】

実施例 60

COFA から FABE およびモノアシルグリセロールへの転化

以下の実施例は、COFA が、固定化酵素を用いた穏やかな条件で高収率で、EtOH またはグリセロールとともにエステル化され得ることを示す。

【0522】

Novozyme 435 (カンジダ・アンタールクティカ (Candida Antarctica) リパーゼ B、アクリル樹脂上に固定化される) を、Sigma Aldrich (St. Louis, Mo) から購入した。アセトン、*t*-BuOH、エタノール、メタノール、およびグリセロールを、全て Sigma Aldrich (St. Louis, Mo) から購入した。GC 分析では、使用されるガスクロマトグラフは、Hewlett Packard 5890 Series II GC クロマトグラムであり、ペンタデカン酸メチルを内部標準として使用した。

20

【0523】

A. エタノールを用いた COFA から FABE + *i*-BuOH への転化

トウモロコシ油脂肪酸 (COFA、0.25 g) を、2.0 mL の EtOH に溶解させて単相を形成した。アクリル樹脂上に固定化された 20 mg のカンジダ・アンタールクティカ (Candida Antarctica) リパーゼ B (CALB) (Novozyme 435) を加え (1.7 mg の酵素を含有する)、懸濁液を、隔壁キャップで密封された 6 mL のガラスバイアル中で、回転式振とう器 (300 rpm) において 40 °C で 24 時間培養した。反応を実際に完了させたところ、98 % の COFA が FABE (脂肪酸エチルエステル) に転化された。24 時間後の GC 分析は、表 70 に示されるように脂肪酸エチルエステルへの COFA の 98 % の転化率を示した。

30

【0524】

【表 7 3】

表 70: 実施例 60A の転化率%プロファイル

反応混合物 EtOH の沸点 = 78.1 °C	Novozyme 435 の 充填量	COFA から FAEE への転化率%	相
2.0 mL の EtOH + 0.25 g の COFA EtOH のモル量/COFA のモル量 = 38.7	20 mg (1.7 mg の CALB を含有する)	98	全体を通して 1

40

【0525】

B. グリセロールを用いた COFA からモノアシルグリセリド (MAG) + *i*-BuOH への転化

トウモロコシ油脂肪酸 (COFA、0.25 g) および 0.325 g のグリセロールを、2.0 mL のアセトンに溶解させた。成分のほとんどが溶解された大きい上相および小

50

さい残りのグリセロール含有相があった。アクリル樹脂上に固定化された 20 mg のカンジダ・アンタークティカ (*Candida Antarctica*) リパーゼ B (CALB) (Novozyme 435) を加え (1.7 mg の酵素を含有する)、懸濁液を、隔壁キャップで密閉された 6 mL のガラスバイアル中で、回転式振とう器 (300 rpm) において 40 °C で 24 時間培養した。上相の GC は、COFA の 87 % が、アシルグリセリド (大部分がモノアシルグリセリドであると予想される) に転化されたことを示した。結果を表 71 に示す。

【0526】

【表 74】

10

表 71: 実施例 60B の転化率%プロファイル

反応混合物 アセトンの沸点 = 56°C	Novozyme 435 の充填量	COFA から アシルグリセリド への転化率% (大部分は MAG)	相
2.0 mL のアセトン + 0.25 g の COFA + 0.325 g のグリセロール グリセロールのモル量/COFA のモル量 = 4	20 mg (1.7 mg の CALB を含有する)	87	40°C で 全体を通して少量の グリセロール相

【0527】

20

実施例 61

COFA から FAME への転化

以下の実施例は、COFA が、固定化されたりリパーゼを用いた穏やかな条件で高収率で、MeOH、EtOH、およびグリセロールとともにエステル化され得ることを示す。

【0528】

A. 溶媒を用いない場合の COFA から FAME への転化

6 mL のバイアルに、500 mg の COFA (1.48 mmol)、132 μ L の MeOH (3.26 mmol)、および 10 mg の Novozyme 435 を加えた。得られた混合物を培養器／振とう器に入れ、40 °C で一晩放置した。反応混合物の GC 分析により、95 % の転化率が示された。

30

【0529】

B. COFA から FAME への反応の経時的測定

6 mL のバイアルに、500 mg の COFA (1.48 mmol)、132 μ L の MeOH (3.26 mmol)、および 10 mg の Novozyme 435 を加えた。試料を、培養器／振とう器中 40 °C で培養し、反応の際の時点を取り、GC を用いて分析した。結果を表 72 に示す。

【0530】

【表 7 5】

表 72

時間	COFA [mg/mL]	FAME [mg/mL]	転化率 [%]
0 分間	377	0	0%
10 分間	242.2	135	35%
20 分間	173.6	231.8	56%
30 分間	122.8	274.3	68%
1 時間	59.2	373.2	86%
2 時間	18.2	389.9	95%
3 時間	16.8	406.2	96%
4 時間	15.6	404.4	96%
7 時間	16	411.2	96%

10

【0 5 3 1】

20

C. COFA → FAME 反応へのより多くの MeOH の添加

6 mL のバイアルに、500 mg の COFA (1.48 mmol)、180、240、300、または 1320 μL の MeOH (4.44、5.92、7.41、および 14.82 mmol)、および 10 mg の Novozyme 435 を加えた。得られた混合物を培養器／振とう器に入れ、40 °C で一晩放置した。反応混合物の GC 分析により、96 ~ 97 % の転化率が示された。結果を表 7 3 に示す。

【0 5 3 2】

【表 7 6】

表 73

30

MeOH [当量]	COFA [mg/mL]	FAME [mg/mL]	転化率 %
3	13.26	377	96.44%
4	13.15	398.9	96.65%
5	12.12	391.8	96.85%
10	12.65	399.5	96.78%

【0 5 3 3】

40

実施例 6 2

この実施例は、蒸留廃液からの固体の除去ならびに脂肪酸、エステル、およびトリグリセリドを固体から回収するための脱溶媒器による抽出を示した。発酵中、固体を全蒸留廃液から分離し、脱溶媒器に供給し、脱溶媒器において固体を 1.1 トン／時の蒸気と接触させる。全蒸留廃液のウェットケーキ（抽出器原料）、溶媒、抽出器のミセラ、および抽出器の排出固体の流量は、表 7 4 に示されるとおりである。表の値の単位は、ショートトン／時である。

【0 5 3 4】

【表 77】

表 74

	全蒸留廃液 からの固体	溶媒	ミセラ	抽出剤排出 固体
脂肪酸	0.099	0	0.0982	0.001
非溶解固体	17.857	0	0.0009	17.856
脂肪酸ブチルエステル	2.866	0	2.837	0.0287
ヘキサン	0	11.02	10.467	0.555
トリグリセリド	0.992	0	0.982	0.0099
水	29.762	0	29.464	0.297

10

【0535】

脱溶媒器を出る固体を、乾燥器に供給する。脱溶媒器を出る蒸気は、0.55トン／時のヘキサンおよび1.102トン／時の水を含有する。この流れを凝縮し、デカンターに供給する。デカンターを出る水富化相は、約360ppmのヘキサンを含有する。この流れを蒸留塔に供給し、蒸留塔において、ヘキサンを水富化流から除去する。蒸留塔の上部を出るヘキサン富化流を凝縮し、デカンターに供給する。デカンターを出る有機物富化流を蒸留塔に供給する。蒸気（11.02トン／時）を、蒸留塔の塔底に供給する。この塔の塔頂および塔底生成物の組成を表75に示す。表の値の単位は、トン／時である。

20

【0536】

【表 78】

表 75

	塔底物	塔頂物
脂肪酸	0.0981	0
脂肪酸ブチルエステル	2.8232	0
ヘキサン	0.0011	11.12
トリグリセリド	0.9812	0
水	0	11.02

30

【0537】

実施例 63

固体の抽出

含水イソブタノールの調製

100mLの容量フラスコ中に、65gの無水試薬グレードイソブタノール（Aldrichから供給される）を、10gの蒸留水と組み合わせて、無色透明の均一な相が得られるまで振とうした。さらなる10gの蒸留水を容量フラスコに加え、再度振とうしたところ、2つの粘性の無色透明の液体層が得られた。上層は、通常20重量%の水分を含有する含水イソブタノールであると考えられ、底層は、主に、通常8重量%の溶解されたアルコールを含む水である。

40

【0538】

ふるい分けろ過および置換洗浄を用いた抽出

再利用される脂肪酸（実施例19）を用いて発酵を完了した。得られる異種混合物を代表する185gの分量を取り出し、下側にわずかな減圧（水柱－20インチ）を用いて、Nalgene（登録商標）プラスチックろ過漏斗内に支持され、密閉された80MES Hふるい皿に5分間にわたって通した。ろ液は、90.5gの赤褐色の油相と、分散した微粒子を含有するが粒子状物質の沈降はない50.9gの濁った水相とに分離した。ふるい皿上にウェットケーキが残った。この未洗浄のウェットケーキの1.5gの試料を取り出し、空気乾燥させた。含水イソブタノール（23g）を、容量フラスコ内の上層から抜

50

き取り、さらなる液滴が収集されなくなるまでふるい皿の下側に弱い減圧を保ちながら、5分間にわたってウェットケーキに通した。18 gの全ろ液質量は、少量の不混和性の底部の濁った水層および黄色の透明の含水イソブタノール層からなっていた。ウェットケーキをふるい皿から取り出し、38.4 gの全質量を取り出した。この洗浄されたウェットケーキ1.5 gの試料を取り出し、空気乾燥させた。未洗浄の固体の乾燥試料を分析したところ、トリグリセリド基準で53.35重量%の全脂肪を含有することが分かり、洗浄された固体の乾燥試料を分析したところ、トリグリセリド基準で15.9重量%の全脂肪を含有することが分かった。

【0539】

遠心分離および再スラリー洗浄を用いた抽出

再利用される脂肪酸（実施例19）を用いて発酵を完了した。得られる異種混合物を代表する225 gの分量を取り出し、10,000 rpmで10分間、Beckman Coulter Allegra 64R機械を用いて遠心分離した。合計で67.2 gになる透明の赤褐色の油相をデカントにより取り除いた。残りの材料を再度遠心分離し、95.1 gの濁った水性ろ液をデカントにより取り除いた。湿潤固体の1.5 gの試料を取り出し、空気乾燥させ、56.5 gを回収し、400 mLのビーカーに移した。容量フラスコ内の上層から抜き取られた含水イソブタノール（20 g）をビーカーに加えて、湿潤固体を再パルプ化し、攪拌を5分間行った。32 gの遠心分離液とともにさらなる32 gの含水イソブタノールを加え、固体を、静止（quiescent）有機層の下の水性懸濁液中で5分間攪拌した。次に、混合物を、10,000 rpmで10分間遠心分離して、透明の黄色の含水イソブタノール層をデカントにより取り除き、洗浄された湿潤固体の1.5 gの試料を単離し、乾燥させるために再度遠心分離した。未洗浄の湿潤固体の乾燥試料を分析したところ、トリグリセリド基準で21.6重量%の全脂肪を含有することが分かり、洗浄された湿潤固体の乾燥試料を分析したところ、トリグリセリド基準で4.04重量%の全脂肪を含有することが分かった。

【0540】

実施例64

非溶解固体を除去することによるトウモロコシ油の除去

約1000 gの液化されたトウモロコシマッシュを、1 Lのガラスの被覆された樹脂ケトル中で調製した。ケトルは、機械的攪拌、温度制御、およびpH制御を備えていた。以下のプロトコルを使用した：磨碎トウモロコシを水道水と混合し（乾燥量基準で26重量%のトウモロコシ）、スラリーを、攪拌しながら55℃まで加熱し、NaOHまたはH₂SO₄のいずれかを用いてpHを5.8に調整し、 α -アミラーゼ（乾燥トウモロコシ基準で0.02重量%）を加え、85℃まで加熱し続け、pHを5.8に調整し、pHを5.8に保ちながら85℃で2時間保持し、25℃に冷却した。使用されるトウモロコシは、Pioneer製の全粒イエローコーン（3335）であった。トウモロコシを、1 mmのふるいを用いて、ハンマーミルで磨碎した。磨碎トウモロコシの水分含量は約11.7重量%であり、磨碎トウモロコシのでんぷん含量は、乾燥トウモロコシ基準で約71.4重量%であった。 α -アミラーゼ酵素は、Novozymes（Franklinston, NC）製のLiquozyme（登録商標）SCDSであった。使用される成分の総量は：294.5 gの磨碎トウモロコシ（11.7%の水分）、705.5 gの水道水、および0.059 gのLiquozyme（登録商標）SCDSであった。酵素を希釈するためにH₂O（4.3 g）を加え、pHを制御するために合計2.3 gの20%のNaOH溶液を加えた。約952 gのマッシュを回収した。ケトルおよびCFボトルの壁へのマッシュの付着のための損失があったことに留意されたい。

【0541】

液化されたトウモロコシマッシュを、40℃で30分間、5000 rpm（7260 g's）で遠心分離して、オリゴ糖の水溶液から非溶解固体を除去した。遠心分離によって固体を除去すると、水相の上部の別個の有機液体層としてフリートウモロコシ油も除去される。約1.5 gのトウモロコシ油を、水相の上部に浮遊する有機層から回収した。液化

されたマッシュを生成するのに使用される磨砕トウモロコシは、乾燥トウモロコシ基準で約 3.5 重量%のトウモロコシ油を含有していたことが、ヘキサン抽出によって分かった。これは、磨砕トウモロコシを含む、液化プロセスに供給される約 9 g のトウモロコシ油に相当する。

【0542】

約 1 g のトウモロコシ油を、水相の上部に浮遊する有機層から回収した。約 617 g の液化でんぷん溶液を回収したところ、約 334 g のウェットケーキが残った。ウェットケーキは、液化されたマッシュ中にあった非溶解固体の大部分を含有していた。液化でんぷん溶液は、約 0.2 重量%の非溶解固体を含有していた。ウェットケーキは、約 21 重量%の非溶解固体を含有していた。ウェットケーキを 1000 g の水道水で洗浄して、ケーキ中に残っているオリゴ糖を除去した。ケーキを水と混合して、スラリーを形成することによって、これを行った。次に、洗浄された固体を回収するために、元のマッシュを遠心分離するのに使用されるのと同じ条件下でスラリーを遠心分離した。遠心分離によって洗浄された固体を除去すると、水相の上部における別個の有機液体層としてのいくらかのさらなるフリートウモロコシ油も除去された。トウモロコシ油を、水相の上部に浮遊する有機層から回収した。

【0543】

湿潤固体を、毎回 1000 g の水道水を用いてさらに 2 回洗浄して、液化でんぷんの実質的に全てを除去した。最終的な洗浄固体を、真空オーブン中で一晚、80℃および約 20 水銀柱イン치의真空下で乾燥させた。乾燥固体中に残っている（おそらく胚芽中に残っている）トウモロコシ油の量を、ヘキサン抽出によって測定した。比較的乾燥した固体（約 2 重量%の水分）の 3.60 g の試料が、0.22 g のトウモロコシ油を含有していたことが測定された。この結果は、乾燥固体の g 当たり 0.0624 g のトウモロコシ油に相当する。これは、湿潤固体中に残留オリゴ糖がないことを意味する洗浄された固体の場合であった。液化されたトウモロコシマッシュを遠心分離して、フリートウモロコシ油の層およびオリゴ糖の水溶液をウェットケーキから分離した後、約 21 重量%の非溶解固体を含有する約 334 g のウェットケーキが残っていたことが分かった。これは、約 70.1 g の非溶解固体を含むウェットケーキに相当する。乾燥固体の g 当たり 0.0624 g のトウモロコシ油において、ウェットケーキ中の固体は、約 4.4 g のトウモロコシ油を含有するはずである。

【0544】

実施例 65

脂質の分析

エステル交換によって、様々な脂肪酸含有化合物種を、脂肪酸メチルエステル（「FAME」）に転化することによって、脂質の分析を行った。グリセリドおよびリン脂質を、メタノール中のナトリウムメトキシドを用いてエステル交換した。グリセリド、リン脂質、および遊離脂肪酸を、メタノール中の塩化アセチルを用いてエステル交換した。得られた FAME を、トルエン／ヘキサン（2：3）中での希釈の後、30-m×0.25 mm（内径）OMEGAWAX（商標）（Supelco, SigmaAldrich, St. Louis, MO）カラムを備えた Agilent 7890 GC を用いたガスクロマトグラフィーによって分析した。オープン温度を、5℃／分で 160℃から 200℃まで、次に 10℃／分で 200℃から 250℃（10 分間保持した）まで上昇させた。GC 分析によって記録された FAME ピークを、公知のメチルエステル（ME）の保持時間と比較したときの、それらの保持時間によって特定し、FAME ピーク面積を、公知の量の内部標準（C15：0 のトリグリセリド、試料によるエステル交換手順によって取られた）の面積と比較することによって定量化した。したがって、概算量（mg）の任意の脂肪酸 FAME（「mg FAME」）を、下式にしたがって計算する：（所定の脂肪酸についての FAME ピークの面積／15：0 の FAME ピークの面積）*（内部標準 C15：0 の FAME の mg）。次に、FAME の結果を、1.052 の適切な分子量換算係数で除算することによって、対応する脂肪酸の mg に補正することができる。全ての内部標準

および参照標準は、N u - C h e k P r e p , I n c . から入手される。

【0545】

メタノール中のナトリウムメトキシドを用いてエステル交換された試料から得られる脂肪酸の結果を、1.045の分子量換算係数を乗算することによって、対応するトリグリセリドレベルに換算する。トリグリセリドは、一般に、この実施例について調べられた試料中のグリセリドの約80～90%を占め、残りはジグリセリドである。モノグリセリドおよびリン脂質含量は一般にごくわずかである。メタノール中の塩化アセチルを用いてエステル交換された試料について得られる全脂肪酸の結果を、ナトリウムメトキシド手順を用いて同じ試料について決定された脂肪酸を減算することによって、グリセリド含量について補正する。結果は、試料の遊離脂肪酸含量である。

10

【0546】

グリセリド含量（モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、およびリン脂質）の分布を、薄層クロマトグラフィーを用いて決定した。6：1のクロロホルム／メタノールに溶解される油の溶液を、シリカゲルで予め被覆されたガラスプレートの底部の近くに垂らした。次に、そのスポット（spot）を、70：30：1のヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸溶媒系を用いたプレート上でクロマトグラフにかける。次に、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、およびリン脂質に対応する分離されたスポットを、ヨウ素蒸気でプレートを染色することによって検出する。次に、スポットをプレートから落とし、メタノール手順で塩化アセチルを用いてエステル交換し、ガスクロマトグラフィーによって分析する。全てのスポットの合計ピーク面積に対する各スポットの合計ピーク面積の比率が、様々なグリセリドの分布である。

20

【0547】

実施例66

この実施例は、マッシュからの副生成物の回収を示す。トリカンター遠心分離機（Flo tt we g Z 2 3 - 4 ボウル直径、230mm、長さ対直径の比率4：1）をこれらの条件で使用したことを除いて、実施例64に記載される条件下でトウモロコシ油をマッシュから分離した：

- ・ボウル速度：5000rpm
- ・差速：10rpm
- ・供給速度：3ガロン／分
- ・相分離機ディスク：138mm
- ・羽根車の設定：144mm。

30

【0548】

分離されたトウモロコシ油は、実施例65に記載される方法および薄層クロマトグラフィーによって測定した際に、81%のトリグリセリド、6%の遊離脂肪酸、4%のジグリセリド、および合計5%のリン脂質およびモノグリセリドを有していた。

【0549】

上記の条件下でマッシュから分離された固体は、乾燥時の重量損失によって測定した際に58%の水分含量を有し、実施例65に記載される方法によって測定した際に1.2%のトリグリセリドおよび0.27%の遊離脂肪酸を有していた。

40

【0550】

表78中の全蒸留廃液から分離された固体、蒸発器段階の間に抽出された油、副生成物抽出剤および凝縮蒸留可溶物（CDS）の組成を、表76に示される全蒸留廃液の組成を前提とし、表77（トリカンター遠心分離機における分離）を前提として計算した。表75の値を、Aspen Plus（登録商標）モデル（Aspen Technology, Inc., Burlington, MA）から得た。このモデルは、トウモロコシ油がマッシュから抽出されていないことを前提としている。細胞、溶解固体、および懸濁固体の乾燥量基準でのタンパク質含量が、それぞれ約50%、22%、および35.5%であることが推定される。副生成物抽出剤の組成は、乾燥量基準で70.7%の脂肪酸および29.3%の脂肪酸イソブチルエステルであることが推定される。

50

【 0 5 5 1 】

【 表 7 9 】

表 76

成分	質量%
水	57.386%
細胞	0.502%
脂肪酸	6.737%
脂肪酸のイソブチルエステル	30.817%
トリグリセリド	0.035%
懸濁固体	0.416%
溶解固体	4.107%

10

【 0 5 5 2 】

【 表 8 0 】

表 77

	加水分解装置 の原料	希薄な 蒸留廃液	固体
有機物	99.175%	0.75%	0.08%
水および溶解固体	1%	96%	3%
懸濁固体および細胞	1%	2%	97%

20

【 0 5 5 3 】

【 表 8 1 】

表 78

流れ	C.タンパク質	トリグリセリド	FFA	FABE
全蒸留廃液のウェットケーキ	40%	微量	0.5%	2.2%
蒸発器における油	0%	0.08%	16.1%	73.8%
CDS	22%	微量%	0.37%	1.71%

30

【 0 5 5 4 】

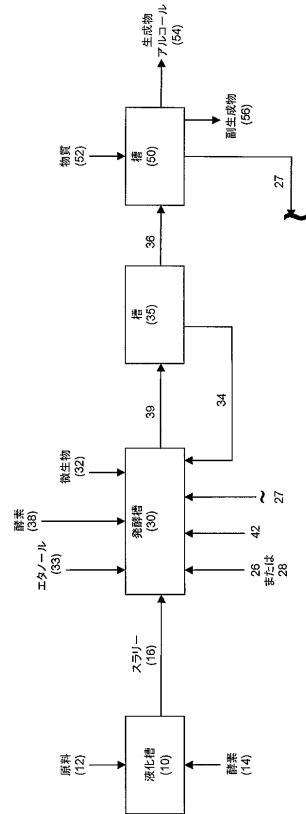
本発明の様々な実施形態を上にも説明してきたが、それらは例として示されたに過ぎず、限定するものではないことを理解されたい。本発明の趣旨および範囲から逸脱せずに本発明の形態および細部の様々な変更を行うことができることが、関連技術の当業者に明らかであろう。したがって、本発明の広さおよび範囲は、上述した例示的实施形態のいずれによって限定されるものでもなく、以下の特許請求の範囲およびそれらの均等物のみにしたがって規定されるものである。

40

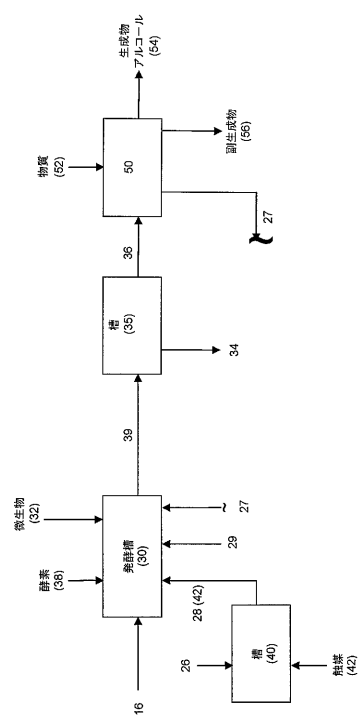
【 0 5 5 5 】

本明細書に記載される全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明が関する技術分野の当業者の技能のレベルを示し、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が参照により援用されることが具体的にかつ個々に示されているのと同程度に、参照により本明細書に援用される。

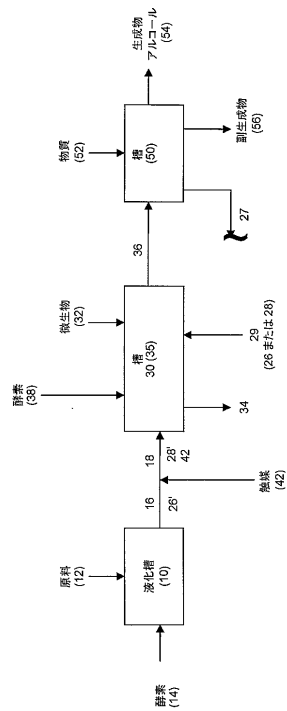
【図 1】



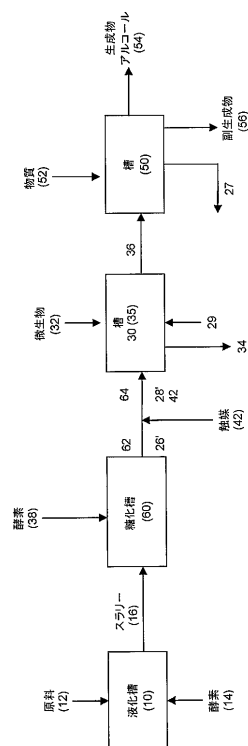
【図 2】



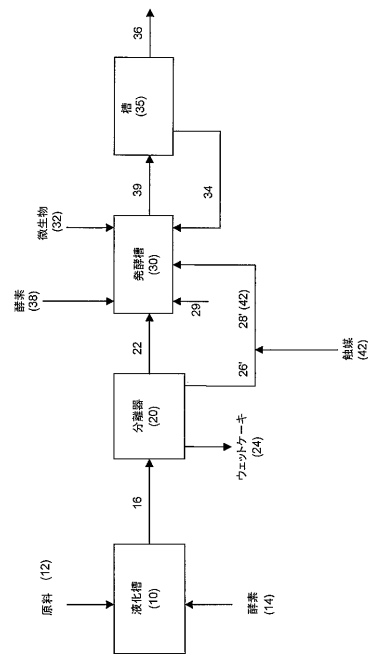
【図 3】



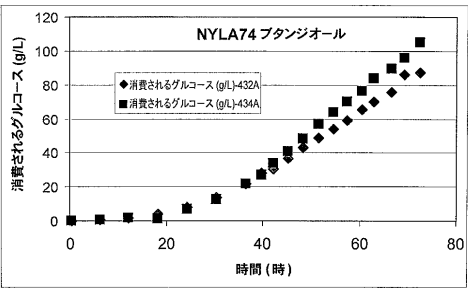
【図 4】



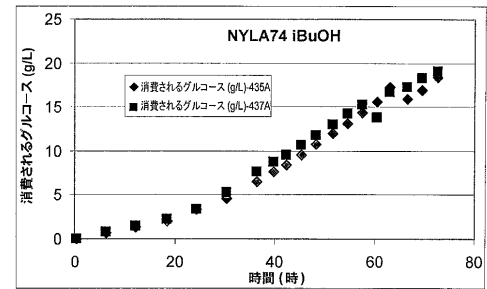
【図 5】



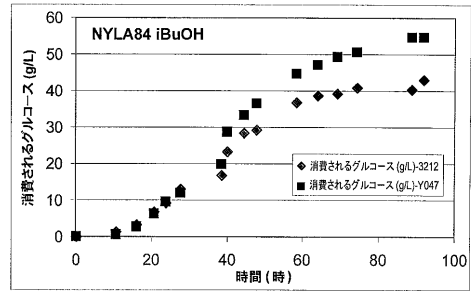
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

2013535956000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/040856

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12P7/16 C11C1/04 C07C29/86
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P C11C C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MALINOWSKI J J: "Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 19, no. 7, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 525-538, XP004329170, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/S0734-9750(01)00080-5 page 530 - page 531 ----- -/-	1-173, 183-197

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2011

Date of mailing of the international search report

29/12/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schneider, Patrick

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/040856

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHUGERL K: "Integrated processing of biotechnology products", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 18, no. 7, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 581-599, XP004317587, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00051-3 the whole document -----	1-173, 183-197
X	WO 2009/149270 A2 (DU PONT [US]; GRADY MICHAEL CHARLES [US]; JAHIC MEHMEDALIJA [US]; PATN) 10 December 2009 (2009-12-10) the whole document -----	195-197
A		1-173, 183-194
X,P	WO 2011/063402 A2 (BUTAMAX TM ADVANCED BIOFUELS LLC [US]; PATNAIK RANJAN [US]; GRADY MICH) 26 May 2011 (2011-05-26) page 46 -----	1-173, 183-197

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/040856**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-173, 183-197

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2011/ 040856

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-173, 183-197

fermentation and compositions comprising contacting an alcohol or butanol as the product of a fermentation process with a lipase as a catalyst to esterify said alcohol with a carboxylic acid which at the same time composes a second phase to simultaneously extract the alcohol ester

2. claims: 174-182

A recombinant yeast comprising genes of the isobutanol biosynthetic pathway and wherein certain genes are inactivated

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/040856

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009149270 A2	10-12-2009	AU 2009256148 A1 CA 2723877 A1 CN 102177243 A EP 2283141 A2 JP 2011522543 A KR 20110015045 A US 2009305370 A1 US 2011294179 A1 WO 2009149270 A2	10-12-2009 10-12-2009 07-09-2011 16-02-2011 04-08-2011 14-02-2011 10-12-2009 01-12-2011 10-12-2009
WO 2011063402 A2	26-05-2011	US 2011136193 A1 WO 2011063402 A2	09-06-2011 26-05-2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 P	7/06	(2006.01)	C 1 2 P	7/06
A 2 3 K	1/00	(2006.01)	A 2 3 K	1/00 1 0 1
C 1 2 P	7/64	(2006.01)	C 1 2 P	7/64

(31)優先権主張番号 61/379,546
 (32)優先日 平成22年9月2日(2010.9.2)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/368,444
 (32)優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/368,436
 (32)優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/368,429
 (32)優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/356,290
 (32)優先日 平成22年6月18日(2010.6.18)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ロバート・ディコジーモ
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州19317-9720. チャッツフォード. マスターズウェイ1607

(72)発明者 ブルース・エー・ダイナー
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州19317. チャッツフォード. フェアヴィルロード295

(72)発明者 マイケル・チャールズ・グラディ
 アメリカ合衆国ニュージャージー州08107. オークリン. ヘザーロード147

(72)発明者 ブライアン・マイケル・ローシュ
 アメリカ合衆国デラウェア州19709. ミドルタウン. ベッツィーロールズドライブ103

(72)発明者 ステファーン・フランソワ・バザナ
 アメリカ合衆国デラウェア州19805. ウィルミントン. ノースクレイトンストリート829

(72)発明者 キース・エイチ・バーリユー
 アメリカ合衆国デラウェア州19709. ミドルタウン. バーナムレーン502

(72)発明者 エレナ・ツィラコヴィッチ
 アメリカ合衆国メリーランド州21286. タウンソン. プレザントプレインズロード8109

(72)発明者 フランシス・ジェイ・ウェルナー
 アメリカ合衆国デラウェア州19701. ベア. コーンウェルドドライブ241

Fターム(参考) 2B150 AA01 AA02 AA03 AA05 AA06 AD07 AD08 CE01 CE02 CE04
 CE05 CE07 DE01 DF09 DF11 DF15

4B064	AC01	AC03	AC04	AD61	AD85	CA21	CC30	DA10	DA11	DA16
4B065	AA72X	BB22	CA05	CA06	CA12	CA41	CA43			