

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年4月9日 (09.04.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/044868 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) C12P 7/08 (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/068073
- (22) 国際出願日: 2008年10月3日 (03.10.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-261860 2007年10月5日 (05.10.2007) JP
- (74) 代理人: 田中 光雄, 外(TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 I M P ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人鳥取大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOTTORI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 Tottori (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 築瀬 英司 (YANASE, Hideshi) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内 Tottori (JP). 岡本 賢治 (OKAMOTO, Kenji) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内 Tottori (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: BACTERIUM CAPABLE OF FERMENTING GLUCOSE, MANNOSE AND XYLOSE SIMULTANEOUSLY, AND METHOD FOR PRODUCTION OF BIOETHANOL USING THE BACTERIUM

(54) 発明の名称: グルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌およびそれを用いるバイオエタノールの製造方法

(57) Abstract: The object is to develop a bacterium capable of fermenting glucose, mannose and xylose simultaneously, which can ferment a saccharified solution of a cellulose-type or lignocellulose-type biomass resource to produce ethanol, and to construct an energy-saving high-efficiency bioethanol conversion process. Thus, disclosed is a *Zymomonas mobilis* bacterium which is prepared by integrating a gene encoding a phosphomannose isomerase derived from *Escherichia coli* into a levansucrase gene located on the chromosome by the double cross-over by means of a homologous recombination method, and then introducing recombinant DNA prepared by binding a DNA fragment containing genes encoding a xylose isomerase, a xylulokinase, a transaldolase and a transketolase, respectively, all derived from *Escherichia coli* to a vector. Also disclosed is a method for producing ethanol by continuously fermenting a saccharified solution of a cellulose-type biomass resource in a system on which the *Zymomonas mobilis* bacterium is immobilized.

(57) 要約: セルロース系、リグノセルロース系バイオマス資源の糖化液を発酵してエタノールを生産できるグルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌を創製し、バイオエタノールの省エネルギー型高効率転換プロセスを構築することを目的として、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来のホスホマンノースイソメラーゼをコードする遺伝子を相同組換え法によるダブルクロスオーバーによって染色体上のレバンスクララーゼ遺伝子内に組み込み、かつ、エシェリヒア・コリ由来のキシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片をベクターに結合させてなる組換えDNAを導入してなるザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*)、および当該ザイモモナス・モビリスを固定化した系でセルロース系バイオマス資源の糖化液を連続的に発酵させるエタノールの製造方法を提供する。

WO 2009/044868 A1

明 細 書

グルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌およびそれを用いるバイオエタノールの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、グルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌およびそれを用いるセルロース系やリグノセルロース系バイオマスからのバイオエタノールの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 我が国において、森林間伐材、建築廃材、稲藁・籾殻、および古紙・廃紙などの未利用バイオマス資源、すなわちセルロース系産業(一般)廃棄物の排出量は年間5千万トンにも達している。これらバイオマスのエネルギー源としての利用は、地球規模でのCO₂ バランスを崩さないことから「カーボンニュートラル」とされ、温室効果ガス削減に貢献するエネルギー資源として大いに期待されている。このような事情の下、未利用のセルロース系やリグノセルロース系バイオマス資源からバイオ燃料としてエタノールを製造し、製造したバイオエタノールをガソリン添加用含酸素化合物や化成品合成原料として、さらには地域の熱源および電力源として利用することが提案、研究されている。

しかし、セルロース系やリグノセルロース系バイオマス資源を直接分解・発酵してエタノールを生産する発酵菌は自然界に存在しない。そのために、代謝工学(メタボリック・エンジニアリング)技術と細胞表層提示技術を用いてセルロースおよびヘミセルロースの酸処理糖化液に混在するセルロース部分分解物(セロオリゴ糖)、キシロース、マンノースを同時にエタノールに発酵転換できる発酵菌を創製するとともに、育種発酵菌を触媒素子とした連続発酵装置を組み込んだ革新的な省エネルギー型高効率転換プロセスの構築が期待されている。

本発明者らは、先に、ペントースを資化することができないザイモバクター(Zymobactor)属の微生物に、キシロースイソメラーゼ、キシロロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼから選ばれる少なくとも1種の酵素をコードする外来遺伝子

を導入することにより、ペントースからエタノールを生産できる形質転換微生物の創製に成功した(特許文献1)。また、マンノースを含有する原料からのエタノールの効率的な生産のために、ホスホマンノースイソメラーゼをコードする外来遺伝子をザイモモナス(*Zymomonas*)属細菌の染色体に組み込み、安定したマンノース発酵性を付与した組換え微生物の創製にも成功した(特許文献2)。

特許文献1:特開2005-261421号公報

特許文献2:特開2007-14306号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0003] 本発明は、草本系はもとより、特に木質系のセルロース系、リグノセルロース系バイオマス資源からの糖化液中に存在するセロオリゴ糖、キシロース、マンノースを同時にエタノールに発酵転換してエタノールを生産できるグルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌を創製し、実用に適したバイオエタノールの革新的な省エネルギー型高効率転換プロセスの構築を目的とする。

課題を解決するための手段

- [0004] ザイモモナス属の細菌は、テキーラの醸造菌として知られており、伝統的な醸造用酵母と比較してエタノール発酵速度と生産性が3倍～5倍も優れており、単位菌体当たりのエタノール生産性も酵母に比べて優れている。しかしながら、ザイモモナス属の細菌は、セルロース系やリグノセルロース系バイオマス資源の糖化液中に存在するマルトースやキシロースをエタノールに発酵することはできない。

本発明者らは、ザイモモナス属の優れたエタノール生産性に着目し、上記の本発明者らの特許文献1および2に記載の技術を応用することによって、グルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌を創製することができ、上記目的が達成できると考え、鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

- [0005] すなわち、本発明は、

(1) エシエリヒア・コリ(*Escherichia coli*)由来のホスホマンノースイソメラーゼをコードする遺伝子を相同組換え法によるダブルクロスオーバーによって染色体上のレバンスクララーゼ遺伝子内に組み込み、かつ、エシエリヒア・コリ由来のキシロースイソメラー

ゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片をベクターに結合させてなる組換えDNAを導入したザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) であるグルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌、

(2) レバンスクララーゼ高産生株を宿主株とする上記(1)記載の発酵性菌、

(3) 宿主株がザイモモナス・モビリス ZMcs (FERM BP-11024) である上記(2)記載の発酵性菌、

(4) ザイモモナス・モビリス ZM mx42 (FERM BP-11025) である上記(3)記載の発酵性菌、

(5) 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資源の糖化液を、固定化担体に固定化した請求項1記載のグルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌と接触させて発酵させ、得られる発酵液からエタノールを回収することを特徴とするエタノールの製造方法、

(6) 発酵性菌が、ザイモモナス・モビリス ZM mx42 (FERM BP-11025) である上記(5)記載のエタノールの製造方法、

(7) バイオマス資源が木質系バイオマス資源である上記(5)記載のエタノールの製造方法、

(8) 固定化した発酵性菌を充填したリアクターに、糖化液を連続的に導入して発酵性菌と接触させ、発酵液を連続的に収集し、エタノールを回収する上記(5)記載のエタノールの製造方法等を提供するものである。

発明の効果

[0006] 木質系および草本系のバイオマス資源の酸処理糖化液からの効率のよいエタノール生産においては、糖化液中に混在するセルロースやヘミセルロースに由来する、グルコース、マンノース、キシロースの並行発酵性の付与が重要であるが、ザイモモナス・モビリスは、強力なグルコース発酵性を示すものの、マンノースやキシロースの発酵性を示さない。

[0007] マンノース発酵性について、ザイモモナス・モビリスは、マンノースの代謝に不可欠なマンノースキナーゼとホスホマンノースイソメラーゼ、特にホスホマンノースイソメラ

ーゼの発現が不十分であるので、本発明に従って、エシェリヒア・コリ由来のホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子(manA)を導入して発現させることにより、マンノース発酵性を付与でき、染色体への組み込みにより安定なマンノース発酵性が付与できる。また、細菌におけるキシロース代謝には、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼと、ペントースリン酸経路の主要酵素であるトランスアルドラーゼ、トランスケトラーゼの4つの酵素が必要であるが、ザイモモナス・モビリスはキシロースイソメラーゼとキシロキナーゼを欠損しており、キシロースを利用できない。そこで、本発明に従って、エシェリヒア・コリ由来のキシロースイソメラーゼ遺伝子(xylA)、キシロキナーゼ遺伝子(xylB)、トランスアルドラーゼ遺伝子(tal)、トランスケトラーゼ遺伝子(tktA)を導入することで、ザイモモナス・モビリスにキシロース発酵性を付与することができる。かくして、manA遺伝子とキシロース代謝酵素系遺伝子の導入により、ザイモモナス・モビリスにグルコース・キシロース・マンノースの3種の糖質の発酵性を付与することができる。

[0008] このようにして創製されたグルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌を固定化担体上に固定化し、バイオエタノール連続製造リアクターを構成し、バイオマス資源の糖化液を連続的にリアクターに導入し、発酵性菌と接触させることにより、効率よくエタノール発酵が行なえる。

図面の簡単な説明

- [0009] [図1]染色体DNAへのmanA組み込み手順を示す図。
[図2]E. coli由来のmanAのクローニング操作を示す図。
[図3]染色体DNA組み込み用組換えプラスミドpUZE2d'-manAの構築操作を示す制限酵素地図。
[図4]pUC118-xylABの構築操作を示す制限酵素地図。
[図5]pUC118-talの構築操作を示す制限酵素地図。
[図6]pUC118-tktの構築操作を示す制限酵素地図。
[図7]pUC118-tal+tktの構築操作を示す制限酵素地図。
[図8]pZA22-xtの構築操作を示す制限酵素地図。
[図9]実施例2(4)におけるキシロース発酵性試験の結果を示すグラフ。
[図10]グルコース・マンノース・キシロース並行発酵性の付与操作を示す図。

[図11a]実施例3における育種株の発酵性試験の結果を示すグラフ。

[図11b]実施例3における育種株の発酵性試験の結果を示すグラフ。

[図12a]実施例4における肺木材糖化液の発酵性試験の結果を示すグラフ。

[図12b]実施例4における肺木材糖化液の発酵性試験の結果を示すグラフ。

[図13]実施例5における連続発酵の条件を示すリアクターの模式図。

[図14]実施例6のモデル酸処理糖化液の連続発酵における結果を示すグラフ。

[図15]実施例6のモデル酸処理糖化液の連続発酵における培地初発pHの影響を示すグラフ。

[図16]実施例6の廃木材酸処理糖化液の連続発酵における結果を示すグラフ。

[図17]実施例6の酸処理糖化液の連続エタノール生産における結果を示すグラフ。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 宿主株

本発明に従ってマンノース発酵性を付与するザイモモナス・モビリス宿主としては、通常、エタノール生産に使用されるザイモモナス・モビリスでよいが、キシロース発酵性を高める点で、後に述べる、野性型株よりもレバンスクララーゼを大量に生産する自然突然変異により生じたレバンスクララーゼ高生産株が好ましい。

[0011] マンノース発酵性付与

マンノース発酵性付与のために使用するホスホマンノースイソメラーゼをコードする遺伝子(manA)は、マンノース分解能を有する供与体微生物であるエシェリヒア・コリから得ることができる。

供与体微生物のホスホマンノースイソメラーゼをコードするDNAを分離、精製した後、種々の方法で切断して得られるDNA断片を調製する。さらに同様にして得られるベクターDNA断片とを、例えばDNAリガーゼなどにより結合させ、ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子を含有する組換えDNAを形成する。DNAの分離、精製、DNA断片の調製、DNAリガーゼによる結合等は、市販のDNA抽出キットなどを用い、当該分野で公知の方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 3rd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)に記載の方法などに従って行なうことができる。

[0012] 染色体への組み込みは、公知の相同組換え法によるダブルクロスオーバーによって行うことができる。すなわち、ザイモナス・モビリスの染色体上の標的遺伝子として、レバンスクララーゼ遺伝子をクローニングした後、試験管内でクローン化した該染色体標的遺伝子の中にホスホマンノースイソメラーゼをコードする外来遺伝子を挿入し、この外来遺伝子の上流と下流に標的遺伝子の一部が連結されたDNAを調製し、これをザイモナス・モビリスの染色体上の標的遺伝子内に組み込む。例えば、図1に示すごとく、ザイモナス・モビリスの染色体DNA上には、レバンスクララーゼ遺伝子(以下E2と称する)とインベルターゼ遺伝子(以下、E3と称する)が配位しており、この二つの酵素はザイモナス・モビリスの細胞表層に提示され、スクロースを基質としてフルクトースを遊離し、転移反応を触媒してレバンを形成する。そのE2部位をターゲットにして、相同組換え法を用いたダブルクロスオーバーによりホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子組み込み、E2を欠損させる。その結果、レバンを形成するフルクトースからエタノールの生産が可能となり、一方では、ベクター導入株とは違い、導入した遺伝子の安定性が増し、マーカー等の薬剤の必要性がなくなる。

[0013] キシロース発酵性付与のための組み換えベクター構築

キシロース分解能を有する微生物として、エシェリヒア・コリをDNA供与体として用い、それからキシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼをコードするDNAを分離、精製した後、種々の方法で切断することにより、該酵素をコードするDNA断片を調製する。このDNA断片を適当なベクターDNA断片と、例えばDNAリガーゼなどにより結合させ、キシロースイソメラーゼ遺伝子、キシロキナーゼ遺伝子、トランスアルドラーゼ遺伝子およびトランスケトラーゼ遺伝子を含む組換えDNAを形成する。

[0014] 供与体からのDNAの分離、精製は、それ自体既知の方法、例えば、斉藤・三浦らの方法(Biochem.Biophys.Acta,Vol.72,619 ~629,1963)やその変法、さらには市販のDNA抽出キットなどを用いる方法などにより行うことができる。

得られる供与体微生物のDNAを制限酵素などにより分解し、蔗糖密度勾配法により1kbp未満のDNA断片を除いたものを、供与体DNA断片として用いることができる。このときに用いる制限酵素は特に限定はなく、また、上記の酵素法以外にも超音波

処理や物理的剪断力などを用いてDNAを切断することも可能である。その際、例えば、クレンーフラグメントやDNAポリメラーゼ、マングビーンヌクレアーゼなどの酵素で供与体DNA断片の末端を処理しておく、後のベクターDNAとの結合効率が上がり好ましい。さらに、供与体微生物のDNAやその断片をテンプレートとしてPCR増幅したものについても、そのままあるいは上記の処理を行うことにより供与体DNA断片として使用することができる。

[0015] ベクターDNA断片としては、特に限定するものではないが、シャトルベクターpZA2 2等が好適に使用できる。

得られるベクターDNA断片は、上記の供与体DNA断片との結合反応に先立ち、アルカリ性フォスファターゼ処理することができる。これにより、該断片と供与体DNA断片との結合効率が向上する。さらに、PCR増幅により供与体DNA断片を調製する場合には、予め増幅断片の両末端にEcoRIなどの制限酵素部位付与プライマーを用い、その制限酵素切断したDNA断片と同じ制限酵素で切断したベクター断片を用いると、結合効率を上げることができる。供与体DNA断片とベクターDNA断片との結合反応は、公知のDNAリガーゼを使用する方法等の常法を用いて行うことができ、例えば、供与体DNA断片とベクターDNA断片とをアニーリングした後、生体外で適当なDNAリガーゼの作用により組換えDNAを作成することができる。また、必要に応じて、アニーリングした後、宿主微生物に導入し、生体内のDNA修復能を利用して組換えDNAにすることもできる。

[0016] グルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌の創製

キシロースイソメラーゼ遺伝子、キシロキナーゼ遺伝子、トランスアルドラーゼ遺伝子およびトランスケトラーゼ遺伝子を含む組換えDNAベクターを、上記で得られたマンノース発酵性を付与したザイモモナス・モビリスに導入する。

組み換えDNAベクターを導入する方法は、特に制限されないが、エレクトロポレーションなどの電氣的刺激を利用する方法による組換えDNAの導入が好適である。

組換えDNAベクター導入株をキシロース平板培地上で培養し、形成したコロニーを、キシロースおよびマンノースを炭素源とした液体培地で培養し、その生育を観察し、キシロースとマンノースのいずれの炭素源においても高い生育を示した形質転換

株を選択することにより、所望のグルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌が得られる。

[0017] バイオマス資源からの糖化液の連続発酵リアクターの構築

本発明の発酵性菌は、木質系、草本系いずれのバイオマス資源の糖化液からのエタノール製造にも使用できるが、その高いエタノール生産性から、木質系バイオマス資源の糖化液からのエタノール生産に好適に使用できる。

例えば、原料となる木質を化学的あるいは物理的に処理することにより加水分解して糖化液を調製し、これを発酵原料とする。この木質糖化液には、木質の構成成分であるセルロースとヘミセルロースに由来するグルコース、キシロース、およびマンノースが混在する。

従来は、木質糖化液に対して伝統的な醸造菌として利用される酵母を用いてバイオエタノールを回分式あるいは連続式にて発酵・製造していた。この製造法では、木質糖化液中に含まれるキシロースやマンノース(約20%)はバイオエタノールに変換できない。そのために、木質糖化液からのバイオエタノール回収はグルコース成分(約50%)のみ限定され、バイオエタノールのコスト上昇の一要因になっていた。

本発明では、上記発酵性菌を使用し、これを固定化担体に固定化、充填したリアクターに木質糖化液を連続的に供給して、当該発酵性菌と接触させることにより高速度、且つ高回収でバイオエタノールを製造することができる。これにより、従来の方法と比較してキシロースとマンノース量に相当する約20%のバイオエタノールの回収と低コスト化を達成することが可能となる。

[0018] 固定化担体への固定化は、それ自体既知の方法によって行うことができ、例えば、包括法、物理的吸着法、共有結合法等が挙げられる。

担体としては、中空状、凹凸状、多孔質状等の形態で単位体積当たりの表面積が大きいもの或いは水を吸収して膨潤するものであって、流動性を持ち、容易に反応系から流出しない粒径および比重を有するものが好適であり、担体形状としては、例えば、板状体、繊維状体、円筒などの特殊形状体、スポンジ状体、粒・塊状体、立方体状などいずれでもよいが、中でも、流動性と十分な表面積を確保しやすい微小な粒状体が好ましい。担体素材としては、微生物や酵素などの担体材料として従来か

ら用いられている各種の有機・無機材料を用いることができ、例えば、粒状活性炭、破碎活性炭、木炭、ゼオライト、雲母、砂粒等の無機材料；光硬化性樹脂、ポリウレタン、ポリビニルアルコール、ポリエチレン、ポリアクリルアミド、ポリエステル、ポリプロピレン、寒天、アルギン酸、カラギーナン、セルロース、デキストラン、アガロース、イオン交換樹脂等の樹脂材料；シリカゲル等の多孔質セラミックス；アンストラサイト；ケイソウ土；樹脂材料に活性炭等を混入したものなどが挙げられ、これらはそれぞれ単独でもしくは2種以上組合せて用いることができる。

[0019] 上記固定化担体は、通常、バイオリクター内に充填されて用いられる。発酵に用いられるバイオリクターとしては、その形式の違いから、完全混合槽型、充填層型、膜型、流動層型、横型等のリアクターが挙げられる。このようなバイオリクターを用いると、連続発酵が可能となり、微生物等の投入・回収が不要となるので好適である。

[0020] 上記のアルコール発酵の際には、微生物の種々の栄養源を必要に応じて糖液中に配合することができ、例えば、窒素源として酵母エキス、コーンステープリカー、ペプトン、肉エキス、カツオエキスなどを使用することができる。

以下に、実施例を挙げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

[0021] ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子 (manA) の組込み

(1) エシエリヒア・コリ (E. coli) 由来のホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子 (manA) のクローニング

公知のザイモモナス・モビリス (Zm. mobilis) 由来グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子配列 (J. Bacteriol. Vol.169 (12), 5653-5662, 1987)、公知の E. coli 由来の manA の塩基配列 (Gene 32 (1-2), 41-48 (1984)) に基づいて設計した表 1 に示す合成オリゴヌクレオチドの組み合わせにより、目的遺伝子を含む DNA 断片を PCR により増幅した。

まず、Zm. mobilis の野生株 (IFO13756) のクロモゾーム DNA (Chr. DNA) を鋳型として 1 次 PCR を行い、gap プロモーターを増幅させた。同様に、E. coli K12 株の Chr. DNA を鋳型とし、manA を増幅させた。次に、2 つの PCR 産物を用いてヘテロ二本鎖を形

成し、2次PCRを行い、gap-manA断片を構築して、ベクターpUC118のHincIIサイトにライゲーションさせ、E. coli JM109株へ形質転換した。

挿入断片のシーケンスを行った結果、データベースに登録されているmanAの塩基配列と一致したことからpUC118-manAとした。

図2にこのクローニング操作をまとめる。

[0022] [表1]

manAプライマー

manA(1)(配列番号1):CGGAATTCGTTTCGATCAACAACCCGAATCCTATCG

manA(2)(配列番号2):CTTAATAAGTTAGGAGAATAAACATGCAAAAACCTCATT
AACTCAGTGCAA

manA(3)(配列番号3):TTGCACTGAGTTAATGAGTTTTTGCATGTTTATTCTCC
TAACTTATTAAG

manA(4)(配列番号4):CGCGGATCCTTACAGCTTGTTGTAAACACGCGCTA

[0023] (2) 染色体組込み用ベクターpUZE2d'-manAの構築

染色体組込み用ベクターをE2部位をターゲットにして行った構築図を図3に示す。

ベクターpUZE2d(4.8 kb)をNdeI処理、平滑化、ついでBAPP処理してDNAを切出した。また、pUC118-manA(4.8 kb)からPgap-manA(1.5 kb)をBamHIとEcoRIで消化し、平滑化し、manA断片を切出した。その後ライゲーション・ハイ(Ligation high)とT4リガーゼを用いて4°C、16°Cで一晩ライゲーションさせ、ヒート・ショック(Heat shock)法によりE. coli JM109の形質転換を行い、プラスミド抽出を行った。その抽出したプラスミドから、公知のZn. mobilisゲノムE2配列(Biosci. Biotech. Biochem., 59(2), 289-293 (1995) DNAのAccession number D17524 (DDBJ, EMBL))に基づいて設計した表2に示すmanA(1)およびmanA(4)プライマーを用いて1.5 kbpのmanA断片をPCRにより確認した。さらに、EcoRVとKpnIで消化したところ、E2遺伝子と順方向であることを示す4.8 kbp、1.5 kbp断片であることを示す5.3 kbp断片のバンドを検出した。このことから、これをプラスミドpUZE2d'-manAとした。

[0024] [表2]

E2プライマー

E2(1) (配列番号5):ACTTAATAAGTTAGGAGAATAAACATGTTGAATAAAGCA
GGCATTGCAGA

E2(2) (配列番号6):GCTCTAGATCATTATTTATTCAATAAAGACAGGGC

E2(3) (配列番号7):AGCAAATAATTTCTGGGATTTCCGC

E2(4) (配列番号8):AGGCCGCTCCGTCTGG

[0025] (3) *Zm. mobilis*染色体DNAへのmanAの組込み確認

Zm. mobilis IFO13756が自然突然変異によりレバンスクラーズを大量に生産するようになった株(以下、ZM ms株と称する)を宿主株として選択し、高濃度のプラスミド溶液を用いたエレクトロポレーション法により形質転換を行った。次に、3回の継代培養を行い2%マンノース-RMプレートに塗布した。その後3日から約2週間培養を続け、生育した大きなコロニーを任意に選び出し、2%マンノース-RM液体培地に接種した。生育した菌体懸濁液を集菌し、一度滅菌MilliQ水で洗浄後、1mLの滅菌MilliQ水に懸濁してDNA抽出用サンプルとした。その抽出液50 μ Lの内1 μ LからmanAプライマーmanA(1)、manA(4)およびE2プライマーE2(1)、E2(2)によるPCR増幅を行った。その結果、manAプライマーによる増幅では、manA断片(1.5 kbp)が、また、E2プライマーによる増幅では2.8 kbpにバンドが検出された。これは、E2(1.3 kbp)にmanA(1.5 kbp)を組込んだ断片の2.8 kbpに合致することから、染色体DNA上のE2部位にmanAが挿入されたことが裏付けられた。

ZM ms株は、平成19年8月13日から、ブタペスト条約の下、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6の、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-11204で寄託してある。

実施例 2

[0026] キシロース並行発酵性の付与

*E. coli*由来のキシロース代謝系酵素遺伝子を*Zm. mobilis*に導入するために、まず、*E. coli*内でベクターpUC118を用いてxylA、xylB、tal、tktAの遺伝子をクローニング後、*E. coli*と*Zm. mobilis*のシャトルベクター、pZA22に挿入して組換えプラスミドpZA22-xtを構築した。次いで、manAを染色体に組み込むことによりマンノース発酵性を付与した*Zm. mobilis*にpZA22-xtを導入して、グルコース、キシロースおよびマンノースの

並行発酵性を付与した。

(1)pUC118-xylABの構築

*E. coli*のゲノムDNAからPCRを用いてクローニングした。また、導入した4種の酵素遺伝子を*Zm. mobilis*細胞内で発現させるために、*Zm. mobilis*細胞内で大量発現が報告されているグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の発現を制御するプロモーター遺伝子(GAP promoter)を利用した。

*E. coli*由来キシロースイソメラーゼ遺伝子とキシロキナーゼ遺伝子はPCRによりクローニングした。すなわち、*Zm. mobilis*由来グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子のプロモーター遺伝子の下流に*E. coli*由来キシロースイソメラーゼ遺伝子とキシロキナーゼ遺伝子をタンデムに連結し、かつ、そのDNA断片の両末端にクローニングのためのEcoRI制限酵素切断部位を付与したDNA断片を調製するために、公知の*Zm. mobilis*由来グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子配列(J. Bacteriol. Vol.169 (12), 5653-5662, 1987)と公知の*E. coli*由来キシロースイソメラーゼ遺伝子とキシロキナーゼ遺伝子の塩基配列(Appl. Environ. Microbiol., Vol.47 (1), 15-21, 1984)に基づき、表3に示す4種のPCRプライマーを設計した。

[0027] [表3]

XYLプライマー

XYL1 (配列番号9):CGGAATTCGTTTCGATCAACAACCCGAATCCTATCG

XYL2 (配列番号10):TACTGGAATAAATGGTCTTCGTTATGCAAGCCTATTTT
GACCAGCCTCGAT

XYL3 (配列番号11):ATCGACTGGTCAAAATAGGCTTGCATAACGAAGACCA
TTTATTCCAGTA

XYL4 (配列番号12):CGGAATTCATGCATAGTTGCCAAAAGTTGCTGTCA

[0028] 一次PCRとして、*Zm. mobilis*菌体から調製したゲノムDNAをテンプレートにプライマーXYL1とXYL3を用いて、プロモーターとキシロースイソメラーゼ遺伝子のN末部位を含む約300bp DNA断片を増幅した。一方、*E. coli*ゲノムDNAをテンプレートにプライマーXYL2とXYL4を用いて、プロモーター遺伝子の一部とキシロースイソメラーゼ遺伝子とキシロキナーゼ遺伝子を含む約3.0kbp DNA断片を増幅した。次に、プ

ロモーター遺伝子を含むDNA断片とキシロースイソメラーゼ遺伝子とキシロキナーゼ遺伝子を含むDNA断片を混合して94°Cで20分間加熱後、37°Cで15分間保持することによりヘテロデュプレックスを形成させた後、TaqDNAポリメラーゼ存在下、72°Cで3分間反応させた。この反応液に、プライマーXYL1とプライマーXYL4を添加して二次PCRを行い、Gapプロモーター遺伝子、キシロースイソメラーゼ遺伝子、キシロキナーゼ遺伝子の順に連結した約3.2kbp DNA断片を増幅させた。このDNA断片の両末端を平滑化反応後、E. coli用ベクタープラスミドDNA、pUC118のHincII制限酵素切断片と混合してT4リガーゼにより連結させて組換えプラスミドDNAを作製した。作製した組換えプラスミドを用いてE. coli JM109を常法に従い形質転換した後、形質転換株を50 µg/mlのアンピシリン、0.1mMイソプロピルーβ-D-チオガラクトシド、20 µg/mlの5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルーβ-D-ガラクトピラノシドを含むLB平板培地(1% Bacto Trypton、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天)に塗布して、コロニーを形成させた。白色コロニーを形成した形質転換株から抽出した組換えプラスミドをpUC118-xyLABとした。

図4にこの操作をまとめる。

[0029] (2)pUC118-talTktAの構築

E. coliゲノムDNA上ではトランスアルドラーゼ遺伝子とトランスケトララーゼ遺伝子はオペロンを構成せず、お互いに離れた位置に配座している。そのため、トランスアルドラーゼとトランスケトララーゼを個々にクローニングした後に、Zm. mobilis由来GAPプロモーター制御下になるように連結した。そのため、公知のZm. mobilis由来エノラーゼ酵素遺伝子配列と公知のE. coli由来トランスアルドラーゼ遺伝子(Nucleic Acids Res., Vol.20, 3305-3308, 1992)に基づき、表4に示す4種のPCRプライマーを設計した。

[0030] [表4]

TALプライマー

TAL1 (配列番号13):CGGAATTCTCGAGCTCCAGTTACTCAATACGTAACAA
TAA

TAL2 (配列番号14):AAGATTTTAAGAAAGGTTTCGATATGACGGACAAATT
GACCTCCCTTCGT

TAL3 (配列番号15): ACGAAGGGAGGTCAATTTGTCCGTCATATCGAAACCT
TTCTTAAAATCTT

TAL4 (配列番号16): CATTTTGACTACCAGATCTAGATTACAGCAGATCGCC
GATCATTTTTTCC

[0031] 一次PCRとして、*Zm. mobilis*菌体から調製したゲノムDNAをテンプレートにプライマーTAL1とTAL3を用いて、プロモーターとトランスアルドラーゼ遺伝子のN末部位を含み、そのプロモーター遺伝子上流末端にXhoI制限酵素切断部位を付加した約300bp DNA断片を増幅した。一方、*E. coli*ゲノムDNAをテンプレートにプライマーTAL2とTAL4を用いて、プロモーター遺伝子の一部とトランスアルドラーゼ遺伝子を含み、そのトランスアルドラーゼ遺伝子のC末端にXbaI制限酵素切断部位を付加した約1.2kbp DNA断片を増幅した。次に、プロモーター遺伝子を含むDNA断片とトランスアルドラーゼ遺伝子を含むDNA断片を混合して94°Cで20分間加熱後、37°Cで15分間保持することによりヘテロデュプレックスを形成させた後、TaqDNAポリメラーゼ存在下、72°Cで3分間反応させた。この反応液に、プライマーTAL1とプライマーTAL4を添加して二次PCRを行い、*Eno*プロモーター遺伝子とトランスアルドラーゼ遺伝子の順に連結した約1.3kbp DNA断片を増幅させた。このDNA断片の両末端を平滑化反応後、大腸菌用ベクタープラスミドDNA、pUC118のHincII制限酵素切断片と混合してT4リガーゼにより連結させて組換えプラスミドDNAを作製した。作製した組換えプラスミドを用いて*E. coli* JM109を常法に従い形質転換した後、形質転換株を50 µg/mlのアンピシリン、0.1mMイソプロピル-β-D-チオ-ガラクトシド、20 µg/mlの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシドを含むLB平板培地(1% Bacto Trypton、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天)に塗布して、コロニーを形成させた。白色コロニーを形成した形質転換株から抽出した組換えプラスミドをpUC118-talとした。

図5にこの操作をまとめる。

[0032] 次に、トランスケトラーゼ遺伝子のPCRによる増幅を行った。公知のトランスケトラーゼ遺伝子の塩基配列(*J. Bacteriol.*, Vol.174, 1707-1708, 1992)に基づき、表5に示す2種のプライマーを合成した。

[0033] [表5]

TKTプライマー

TKT1 (配列番号17): CGGAATTCTCGAGCTCCAGTTACTCAATACGTAACAA
TAA

TKT2 (配列番号18): CGGCATGCCTCGAGGCAAACGGACATTATCAAGGTAA
TAAAAAAGGTCGC

[0034] 一次PCRとして、E. coliの菌体から調製したゲノムDNAをテンプレートにプライマーTKT1とTKT2を用いて、トランスケトラーゼ遺伝子のN末端上流にXbaI制限酵素切断部位とそのC末端下流にXhoI制限酵素切断部位を付与した約2.1kbpDNA断片を増幅させた。このDNA断片の両末端を平滑化反応後、E. coli用ベクタープラスミドDNA、pUC118のHincII制限酵素切断片と混合してT4リガーゼにより連結させて組換えプラスミドDNAを作製した。作製した組換えプラスミドを用いてE. coli JM109を常法に従い形質転換した後、形質転換株を50 μ g/mlのアmpiシリン、0.1mMイソプロピルー β -D-チオーガラクトシド、20 μ g/mlの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルー β -D-ガラクトピラノシドを含むLB平板培地(1% Bacto Tripton、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天)に塗布して、コロニーを形成させた。白色コロニーを形成した形質転換株から抽出した組換えプラスミドをpUC118-tktとした。

図6にこの操作をまとめる。

[0035] 次に、GAPプロモーター遺伝子とトランスアルドラーゼ遺伝子とトランスケトラーゼ遺伝子が連結したDNA断片を含む組換えプラスミドを作製した。すなわち、組換えプラスミドpUC118-talを、そのトランスアルドラーゼ遺伝子のC末端下流域に存在するXbaI制限酵素切断部位とSphI制限酵素制限酵素切断部位により切断したDNA断片と組換えプラスミドpUC118-tktをXbaIとSphIにより切断して調製したトランスケトラーゼ遺伝子を含む約2.1kbpDNA断片を混合してT4リガーゼにより連結させて組換えプラスミドDNAを作製した。作製した組換えプラスミドを用いてE. coli JM109を常法に従い形質転換した後、形質転換株を50 μ g/mlのアmpiシリンを含むLB平板培地(1% Bacto Tripton、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天)に塗布して、コロニーを形成させた。コロニーを形成した形質転換株から抽出した組換えプラスミドにEno

プロモーター遺伝子、トランスアルドラーゼ遺伝子、トランスケトラーゼ遺伝子が、この順番でタンデムに連結したことを確認して、pUC118-tal+tktとした。

図7にこの操作をまとめる。

[0036] (3)pZA22-xyの構築

4種のキシロース代謝系酵素遺伝子をZm. mobilisに導入して発現させるために、これら遺伝子をシャトルベクターに挿入して組換えプラスミドを作製した。組換えプラスミドpUC118-tal+tktをXhoI制限酵素を用いて切断することにより、Enoプロモーター遺伝子、トランスアルドラーゼ遺伝子、およびトランスケトラーゼ遺伝子含む約3.3kbp DNA断片を調製した。この断片と制限酵素SalIにより切断したシャトルベクターpZA22と混合してT4リガーゼにより連結させて組換えプラスミドを作製した。作製した組換えプラスミドを用いてE. coli JM109を常法に従い形質転換した後、形質転換株を50 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB平板培地(1% Bacto Tripton、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天)に塗布して、コロニーを形成させた。コロニーを形成した形質転換株から抽出した組換えプラスミドに、Enoプロモーター、トランスアルドラーゼ遺伝子、トランスケトラーゼ遺伝子が、この順番で連結していることを確認した。一方、pUC118-xylAxy1BをEcoRI制限酵素によりGAPプロモーター遺伝子、キシロースイソメラーゼ遺伝子、およびキシロキナーゼ遺伝子を含む約3.4kbp DNA断片を切り出し、その両切断末端を平滑化して調製した。次に、調製したDNA断片をトランスアルドラーゼ遺伝子とトランスケトラーゼ遺伝子を挿入して作製したpZA22組換えプラスミドをEcoRV制限酵素により切断したもの混合してT4リガーゼにより連結させて組換えプラスミドDNAを作製した。作製した組換えプラスミドを用いてE. coli JM109を常法に従い形質転換した後、形質転換株を50 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB平板培地(1% Bacto Tripton、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天)に塗布して、コロニーを形成させた。コロニーを形成した形質転換株から抽出した組換えプラスミドに、GAPプロモーター、キシロースイソメラーゼ遺伝子、キシロキナーゼ遺伝子、Enoプロモーター、トランスアルドラーゼ遺伝子、トランスケトラーゼ遺伝子が、この順番で連結していることを確認して、pZA22-xtとした。

図8にこの操作をまとめる。

[0037] (4) *Zm. mobilis*へのキシロース発酵性の付与

xylABとtaltktA遺伝子をプラスミドpZA22にタンデムに挿入した組換えプラスミドpZA22-xtを用いてキシロース発酵性株の育種を検討した。

操作は組換えプラスミドpZA22-xtを用いて、*Zm. mobilis* IFO13756に常法に従い形質転換を行い、形質転換株をグルコース-RM平板培地(2%グルコース、1.0%酵母エキス、0.2%KH₂PO₄、1.5%寒天、100 μg/mlクロラムフェニコール、pH6.0)に塗布して選択した。コロニーを形成した形質転換株をキシロース-RM培地(2%キシロース、1.0%酵母エキス、0.2%KH₂PO₄、100 μg/mlクロラムフェニコール、pH6.0)に植菌して、キシロースを炭素源とした生育とエタノール発酵性を検討した。しかし、形質転換株はキシロース-RM培地において微弱な生育に留まり、エタノール発酵性を示さなかった。そこで、上記ZM msを宿主株として選択し、pZA22-xtを形質転換してZM ms[pZA22-xt]株を得た。グルコース-RM平板培地に生育したZM ms[pZA22-xt]株をキシロース-RM培地に植菌して、キシロースを炭素源とした生育とエタノール発酵性を検討した。その結果、ZM ms[pZA22-xt]株はキシロースを炭素源としての生育が認められた。

ZM ms[pZA22-xt]株の4%キシロース培地での発酵性試験を実施した。比較対象として、野生株にpZA22-xtを導入した株(ZM [pZA22-xt])の発酵性試験を実施した。ZM ms[pZA22-xt]株では、4%キシロースを48時間で完全に利用して、理論収率のエタノールを生産した。一方、ZM [pZA22-xt]株では、微弱な生育に伴う一部のキシロース分解は認められたが、エタノール生成は全く認められなかった(図9)。

実施例 3

[0038] グルコース・マンノース・キシロース並行発酵性の付与

*Zm. mobilis*の染色体DNAにmanAを組み込み、マンノースとグルコースの並行発酵性の付与に成功したことから、次に、キシロースの並行発酵性付与を検討した。

(1) *E. coli*由来キシロース代謝系酵素遺伝子とマンノース代謝系酵素遺伝子の共存株の構築

上記実施例1で得られた、manAを染色体に組み込んだZM ms[E2:manA]のコンピテントセルを調製してpZA22-xtで形質転換を行った(図10)。形質転換株はキシロー

ス平板培地上でコロニー形成として選択した。次に、得られたコロニーをキシロース、マンノースを炭素源とした液体培地での生育を観察した。キシロースとマンノースのいずれの炭素源においても高い生育を示した形質転換株を発酵性試験に用いることとした。

[0039] (2) 育種株におけるキシロース代謝系酵素遺伝子とマンノース代謝系酵素遺伝子の発現

発酵性試験用いる共存株におけるキシロース代謝系酵素遺伝子とマンノース代謝系酵素遺伝子の発現を検討した。Zm. mobilis野生株では内因性のフルクトキナーゼ活性は認められたが、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼ、およびホスホマンノースイソメラーゼの酵素活性は認められなかった。しかし、ZM ms[E2::manA]株ではホスホマンノースイソメラーゼの活性が、またZm ms [pZA22-xt]では導入したキシロース代謝系酵素遺伝子の発現指標としたキシロキナーゼとトランスアルドラーゼの活性発現が、さらに共発現株ではキシロース代謝系酵素遺伝子とmanAの遺伝子の発現を確認するとともに、これら遺伝子の発現レベルが大腸菌に比べて高いことも確認できた。すなわち、導入した遺伝子が安定して、効率よく発現していることが明らかになった。

導入した遺伝子の発現を確認した結果を表6示す。

[0040] [表6]

| 菌株 | C源 | 活性 (U / m g) | | |
|-----------------------------|-------|------------------|------------------|-------------------|
| | | XK ¹⁾ | TA ²⁾ | PMI ³⁾ |
| E. coli JM109 | - | 0.141 | 0.259 | 0.198 |
| ZM ms E2::manA | マンノース | 0 | 0 | 2.666 |
| ZM ms/pZA22-xt | キシロース | 0.907 | 2.915 | 0.036 |
| ZM ms E2::manA/ pZA22-xt | キシロース | 1.179 | 2.597 | 1.631 |

注1)XK:キシロキナーゼ、1U=1分間にNADH1 μmol減少させる酵素活性

TA:トランスアルドラーゼ、1U=1分間にNADH1 μmol減少させる酵素活性

PMI:ホスホマンノースイソメラーゼ、1U=1分間にNADPH1 μmol生産する酵素活性

[0041] (3) 3種混合糖での発酵性試験(バッチ発酵条件下)

染色体にmanAを、プラスミドとしてxylA、xylB、tal、tktAを導入した育種株の発酵性を評価した。図11aおよび図11bに示すように、2%のグルコース、キシロースまたはマンノースを単一炭素源した場合では、グルコースの発酵速度に比べて若干の低下は認められるものの、キシロースとマンノースの速やかな消費に伴う生育と理論収率のエタノール生産を示した。また、グルコース混在でのキシロースやマンノースにおいても速やかなエタノール生産性を示した。グルコース、キシロース、およびマンノース混在下での糖消費においては、グルコース消費が進行した後に、キシロース、マンノースの順に消費され、理論収率のエタノール生成が認められた。

以上のように、酸処理糖化液に含まれる主要な糖質であるグルコース、キシロース、マンノースを効率よくエタノールに変換できるZm. mobilisの育種に成功した。

育種株は、ZM mx42と命名し、ブタペスト条約の下、平成19年8月13日から、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6の、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-11025で寄託してある。

実施例 4

[0042] 廃木材酸処理糖化液の発酵性試験(バッチ発酵条件下)

育種株(ZM ms42 [sucZE2::manA, pZA22-xt])の廃木材酸処理糖化液に対する発酵性試験を実施した。廃木材酸処理糖化液は常法(Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol 98-100, 899-907, 2002)に従い調製された、建築廃材の濃硫酸処理糖化液を用いた。

酸処理糖化液の1容量に対して2倍濃度のRM培地(C源2%、酵母エキス1%、KH₂PO₄ 0.2%、pH6.0~6.5)を1容量添加した場合、あるいは酸処理糖化液の9容量に対して10倍濃度のRM培地を1容量添加した場合の発酵性試験をおこなった。結果を図12aおよび図12bに示した。図12aではグルコース、マンノース、キシロースは消費され、理論収率に近いエタノールを生産した。また、酸処理糖化液の原液に近い場合においても図12bに示すように、ZM ms[pZA22-xt]が3種の糖を速やかに発酵して高収率のエタノールを生産した。

実施例 5

[0043] バイオエタノール製造リアクター

(1) 付着固定化増殖菌体とリアクターの調製

付着固定化増殖菌体の調製とそれを充填した発酵用リアクターの調製を以下に示す。

(a) 酸処理糖化液培地の調製

1) 酸処理糖化液(約pH1.0)を CaCO_3 によって、pH5.5付近まで中和させた。

2) 中和した酸処理糖化液は吸引ろ過によって、沈殿を取り除き4°Cで保存した。

3) 酸処理糖化液を80°Cで1日以上、低温殺菌し、同時に余分な沈殿を沈降させた。

4) 連続発酵試験、発酵性試験の培地に用いるため、2倍、2.5倍、10倍のC源を加えていないRM培地およびT培地を調製し、低温殺菌した酸処理糖化液と混ぜ、生成する沈殿を遠心分離(25°C、8000rpm、60分)して取り除いた。

T培地は、C源2%、酵母エキス1%、 KH_2PO_4 1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (pH6.0)の組成を有する培地である。

(b) 付着固定化増殖菌体の調製

1) 大量培養する際に、適当な糖の入った500mlRM培地(T培地)に表7に示す担体を加えてオートクレーブした。

[0044] [表7]

| 担体名 | 採取量 | 担体直径 |
|-------------|------|----------|
| シラン (SIRAN) | 20 g | 2 ~ 3 mm |
| 精製ケイソウ土 | 13 g | 3 ~ 5 mm |

2) 室温まで冷却した後、これに植菌し30°C、2日間以上静置培養した。この時、菌体が付着した担体を固定化菌体として用いた。

(d) リアクターを用いた連続発酵試験

カラムに70%の固定化増殖菌体を充填し、上昇法で流動槽型リアクターを用いた。

図13および表8にリアクターの模式図と連続発酵の条件を示す。

[表8]

| カラムサイズ | 流量 (ml / 時) | 恒温槽温度 (°C) |
|----------------------------|-------------|------------|
| 内径 : 2.5 mm 長さ : 130 mm | 1.6, 3.2 | 30 |
| 内径 : 2.5 mm 長さ : 260 mm | 1.3, 1.6 | 30 |

[0045] (c) 発酵液の分析方法

糖およびエタノール

経時的にサンプリングしたリアクターからの溶出液に含まれるエタノールの生産、糖成分の減少を分析した。この時、カラム抽出液1mlは遠心分離(4°C、15000rpm、15分)を行い、HPLCによって分析を行った。

HPLC分析条件を以下に示した。

条件1

使用カラム: BIO-RAD Aminex HPX-87P

流量 : 0.4ml / 分

カラム温度: 80°C

抽出液 : 脱気蒸留水

サンプル量: 5 μ l

条件2

使用カラム: Shodex SUGAR KS-801

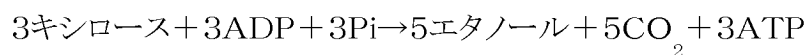
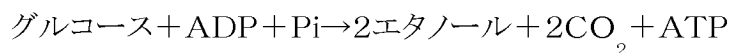
流量 : 0.5ml / 分

カラム温度: 50°C

抽出液 : 脱気蒸留水

サンプル量: 5 μ l

エタノールの収率は次に示す反応式から求めた。



理論エタノール収量 = 0.51%エタノール / %グルコースまたはキシロース

実施例 6

[0046] 廃木材酸処理糖化液の連続発酵

(1)モデル酸処理糖化液の連続発酵

実施例5に記載したような組換えザイモモナスの固定化増殖菌体を充填したリアクターを用い、グルコース、マンノースおよびキシロースが混在するモデル糖液からのエタノール連続発酵を評価した。まず、ZM ms42 [sucZE2::manA,pza22-xy]を充填したリアクターでの連続発酵性試験を、6%グルコース+2%マンノース+2%キシロースモデル糖液、30°C、pH6.5、D=0.2/時で検討した結果、図14に示すごとく、グルコースおよびマンノースの完全な消費に伴う理論収率のエタノール生産が観察された。しかし、発酵液中にはキシロースが残糖として認められ、3種の糖質の連続並行発酵が困難であることが明らかになった。そこで、キシロース発酵性低下の原因を究明したところ、発酵液のpHがキシロース発酵性に影響を与えることが明らかになった。図15には、育種株による糖発酵性と発酵液初発pHの相関を観察した結果を示す。ZM ms42 [sucZE2::manA,pza22-xy]では、グルコースとマンノースの発酵においては初発pHの影響は認められないが、キシロースの発酵性には糖液の初発pHが著しく影響を与え、pH5以下ではキシロース発酵性の低下が明らかになった。これらの結果は、混合糖液の連続発酵においてpHコントロールが必要であることを示唆している。

[0047] (2)廃木材酸処理糖化液の連続発酵

希釈・酸処理糖化液の連続エタノール生産：

附着固定化法によるZM ms42 [sucZE2::manA,pza22-xy]の固定化増殖菌体の調製を方法で上記したように行い、カラム(内径25mm、長さ130mm)に気泡が入らないように充填後、1:1酸処理糖化液RM培地(pH6.5)を上記の方法で調整し、これを用いて流量16ml/時、D=0.25/時、30°Cの恒温槽で連続発酵を行った。結果を図16のaに示す。

この結果より、残糖は始めの頃はマンノースが残っていたが、最終的には残糖はほとんど無く、エタノール平均濃度は1.97%、収率88.79%、エタノール生成速度5.18g/1・時となった。このことから、理論収量に近いエタノールの生産がされた。

そこで、糖濃度を上昇させ、その他は同様に連続発酵試験を行った。図16の結果bから、残糖は無く、エタノール平均濃度は2.45%、収率96.16%、エタノール生

成速度6.24g/1・時となった。このことから、理論収量のエタノールが生産された。

[0048] (3) 酸処理糖化液の連続エタノール生産

これらの結果により、建築廃材酸処理糖化液の連続エタノール発酵が可能であることが明らかになったことから、実用レベルでの酸処理糖化液からの連続エタノール生産を検討した。

すなわち、原液に近い濃度(10:1)で流量16ml/時、D=0.25/時、30°C条件下での連続発酵試験結果を行った。その結果、残糖は少なく理論収量のエタノールが生産され、エタノール平均濃度は3.73%、収率92.20%、エタノール生成速度10.27g/1・時となった(図17のa)。さらに、高速度エタノール連続発酵を検討するために、酸処理糖化液の糖濃度は同様に、流量32ml/時、D=0.50/時、30°Cの恒温槽で連続発酵を行った。結果より、グルコースとキシロースは消費され、マンノースにおいても微量が残存した。エタノール平均濃度は3.83%、収率86.56%、エタノール生成速度20.88g/1・時となった(図17のb)。このことから、希釈率0.50/時でも理論収量に近いエタノールを生産した。

産業上の利用可能性

[0049] 以上記載したごとく、本発明によれば、セルロース系、リグノセルロース系バイオマス資源の糖化液を発酵してエタノールを生産できるグルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌を使用し、バイオエタノールの省エネルギー型高効率転換プロセスを構築することができる。

配列表フリーテキスト

[0050] 配列番号1:E. coliのmanAをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド
・プライマー。

配列番号2:E. coliのmanAをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド
・プライマー。

配列番号3:E. coliのmanAをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド
・プライマー。

配列番号4:E. coliのmanAをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド
・プライマー。

配列番号5: *Zm. mobilis*の染色体E2部位をコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号6: *Zm. mobilis*の染色体E2部位をコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号7: *Zm. mobilis*の染色体E2部位をコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号8: *Zm. mobilis*の染色体E2部位をコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号9: *E. coli*のxylA、BをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号10: *E. coli*のxylA、BをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号11: *E. coli*のxylA、BをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号12: *E. coli*のxylA、BをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号13: *E. coli*のtalをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号14: *E. coli*のtalをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号15: *E. coli*のtalをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号16: *E. coli*のtalをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

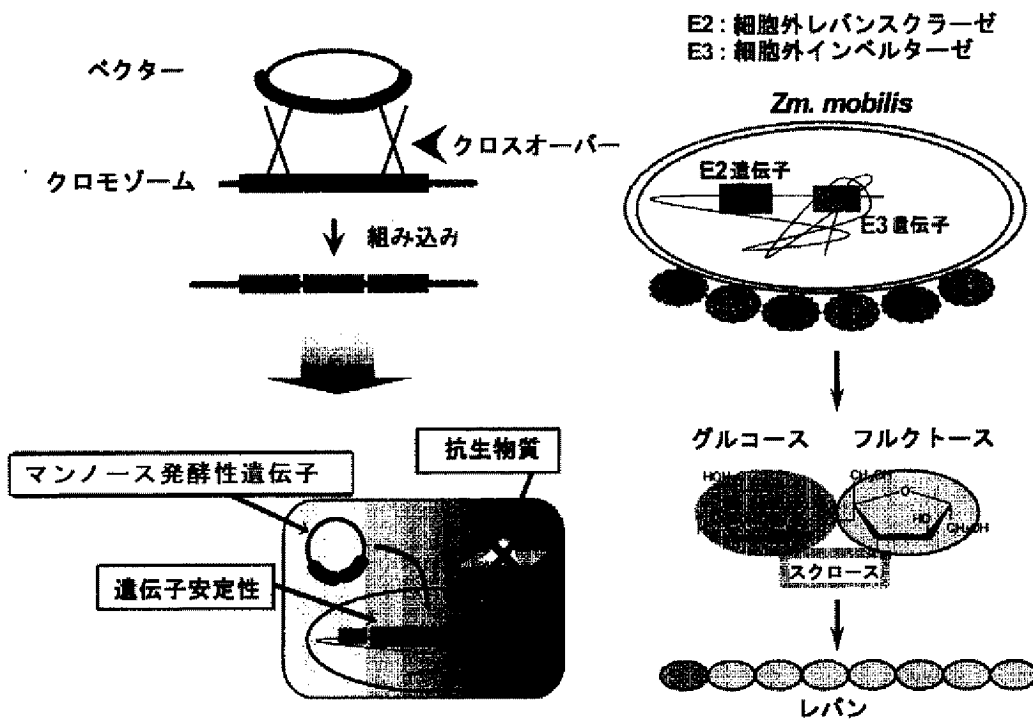
配列番号17: *E. coli*のtktをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

配列番号18: *E. coli*のtktをコードするDNA増幅用に設計したオルゴヌクレオチド・プライマー。

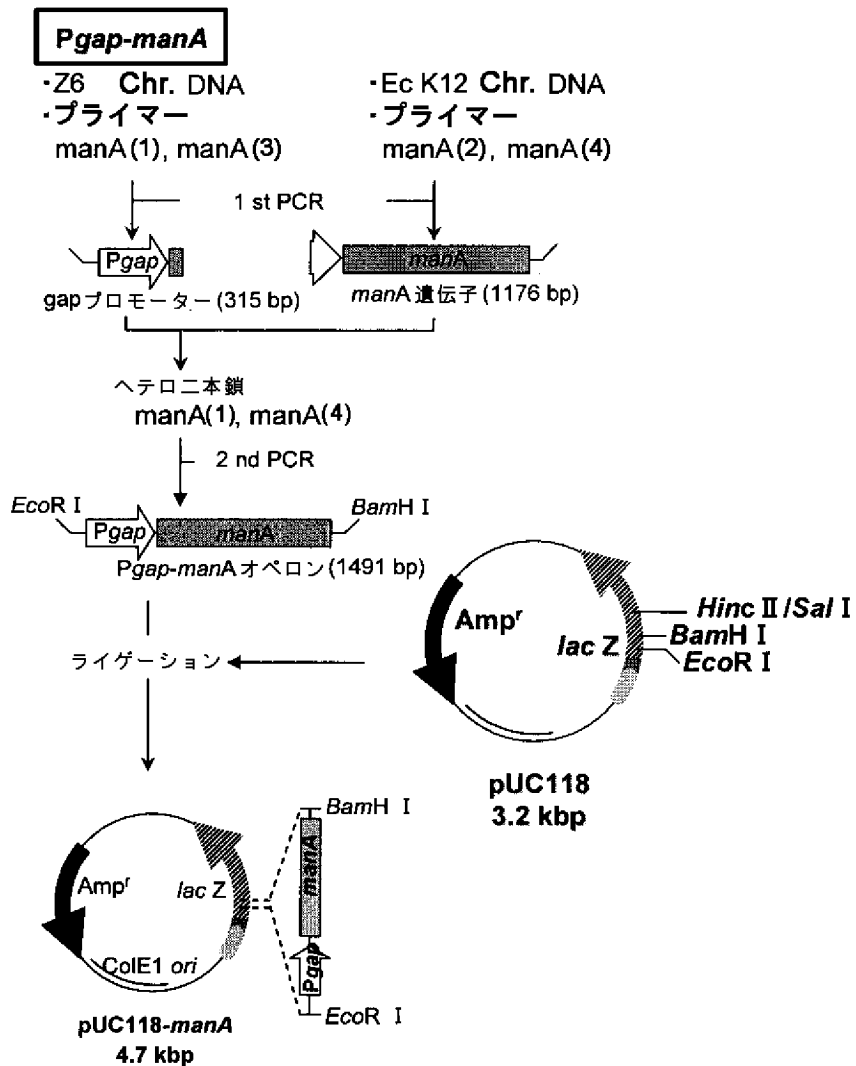
請求の範囲

- [1] エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来のホスホマンノースイソメラーゼをコードする遺伝子を相同組換え法によるダブルクロスオーバーによって染色体上のレバンスクララーゼ遺伝子内に組み込み、かつ、エシエリヒア・コリ由来のキシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼをコードする遺伝子を含有するDNA断片をベクターに結合させてなる組換えDNAを導入したザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) であるグルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌。
- [2] レバンスクララーゼ高産生株を宿主株とする請求項1記載の発酵性菌。
- [3] 宿主株がザイモモナス・モビリス ZMcS (FERM BP-11024) である請求項2記載の発酵性菌。
- [4] ザイモモナス・モビリス ZM mx42 (FERM BP-11025) である請求項3記載の発酵性菌。
- [5] 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資源の糖化液を、固定化担体に固定化した請求項1記載のグルコース・マンノース・キシロース並行発酵性菌と接触させて発酵させ、得られる発酵液からエタノールを回収することを特徴とするエタノールの製造方法。
- [6] 発酵性菌が、ザイモモナス・モビリス ZM mx42 (FERM BP-11025) である請求項5記載のエタノールの製造方法。
- [7] バイオマス資源が木質系バイオマス資源である請求項5記載のエタノールの製造方法。
- [8] 固定化した発酵性菌を充填したリアクターに、糖化液を連続的に導入して発酵性菌と接触させ、発酵液を連続的に収集し、エタノールを回収する請求項5記載のエタノールの製造方法。

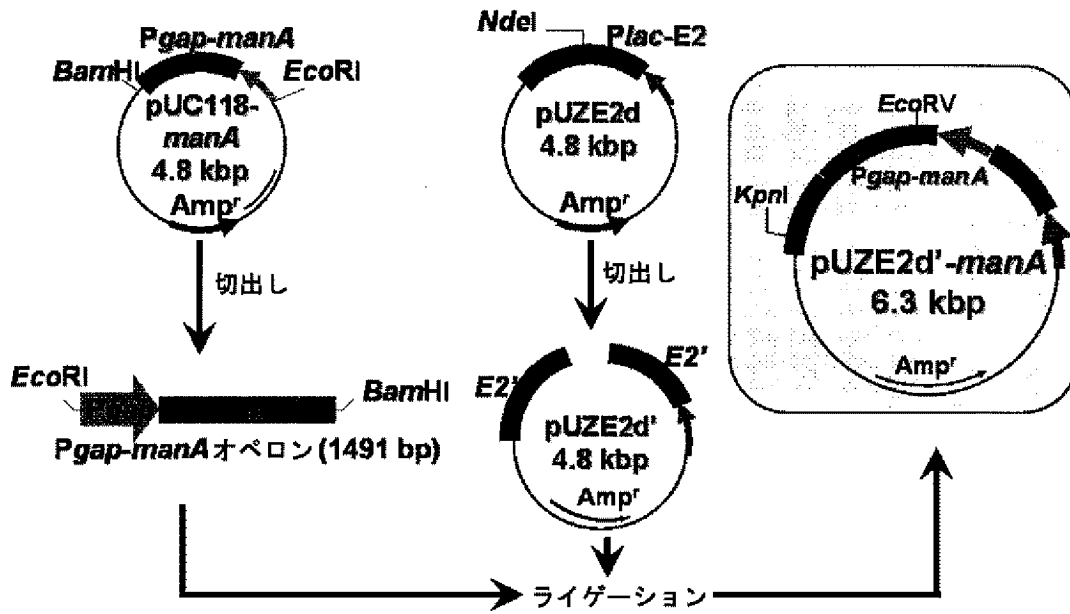
[図1]



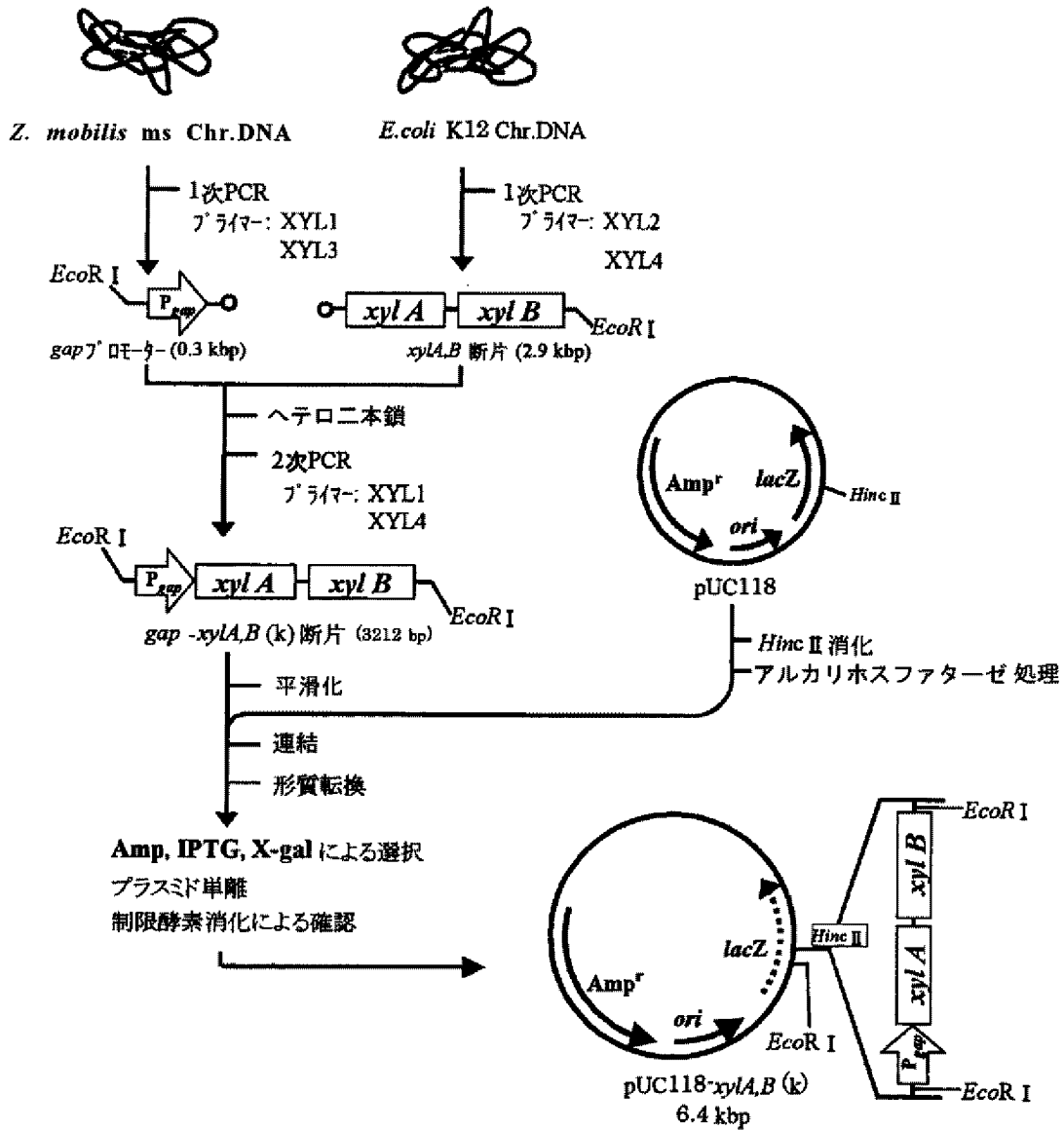
[図2]



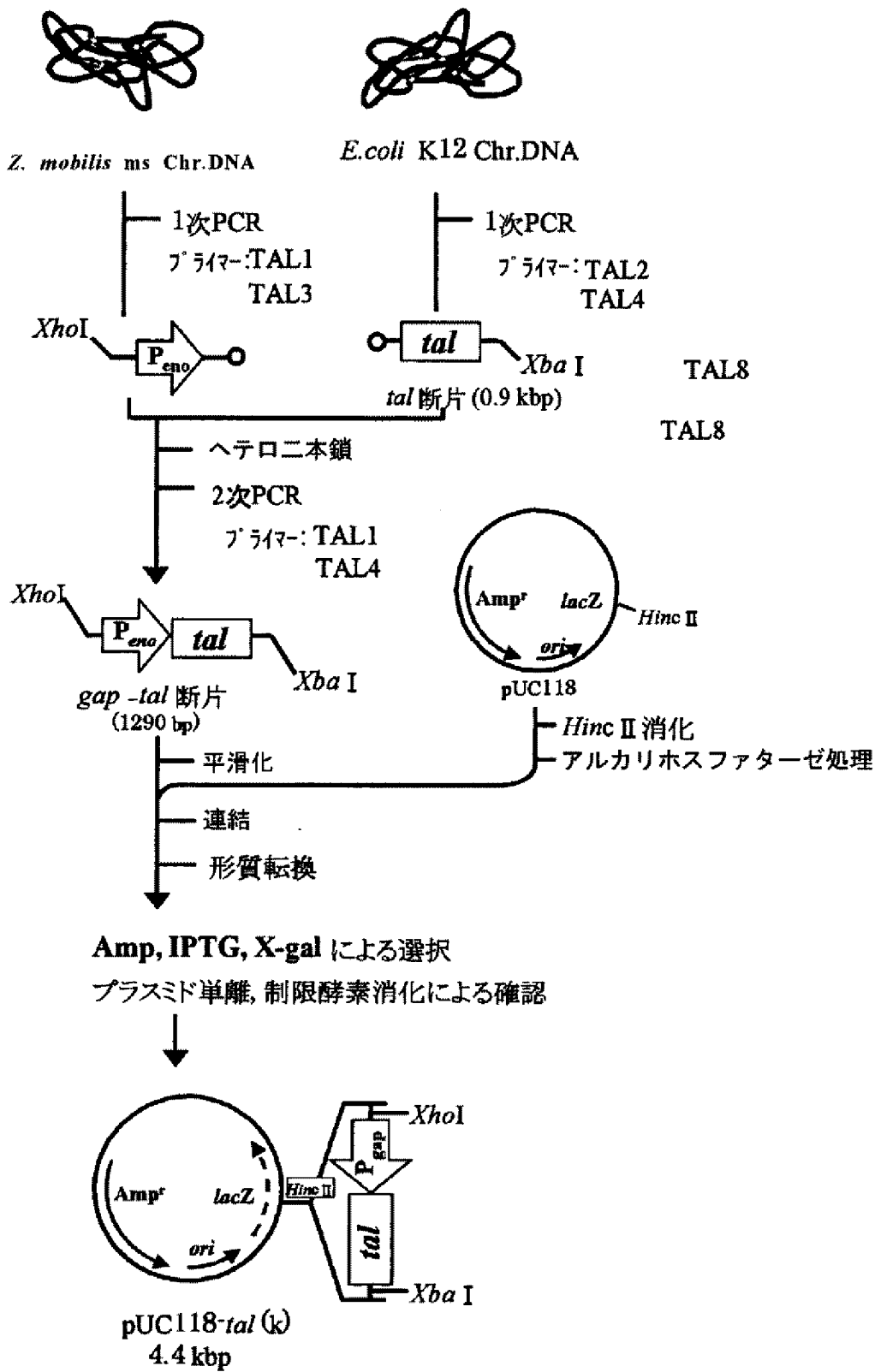
[図3]



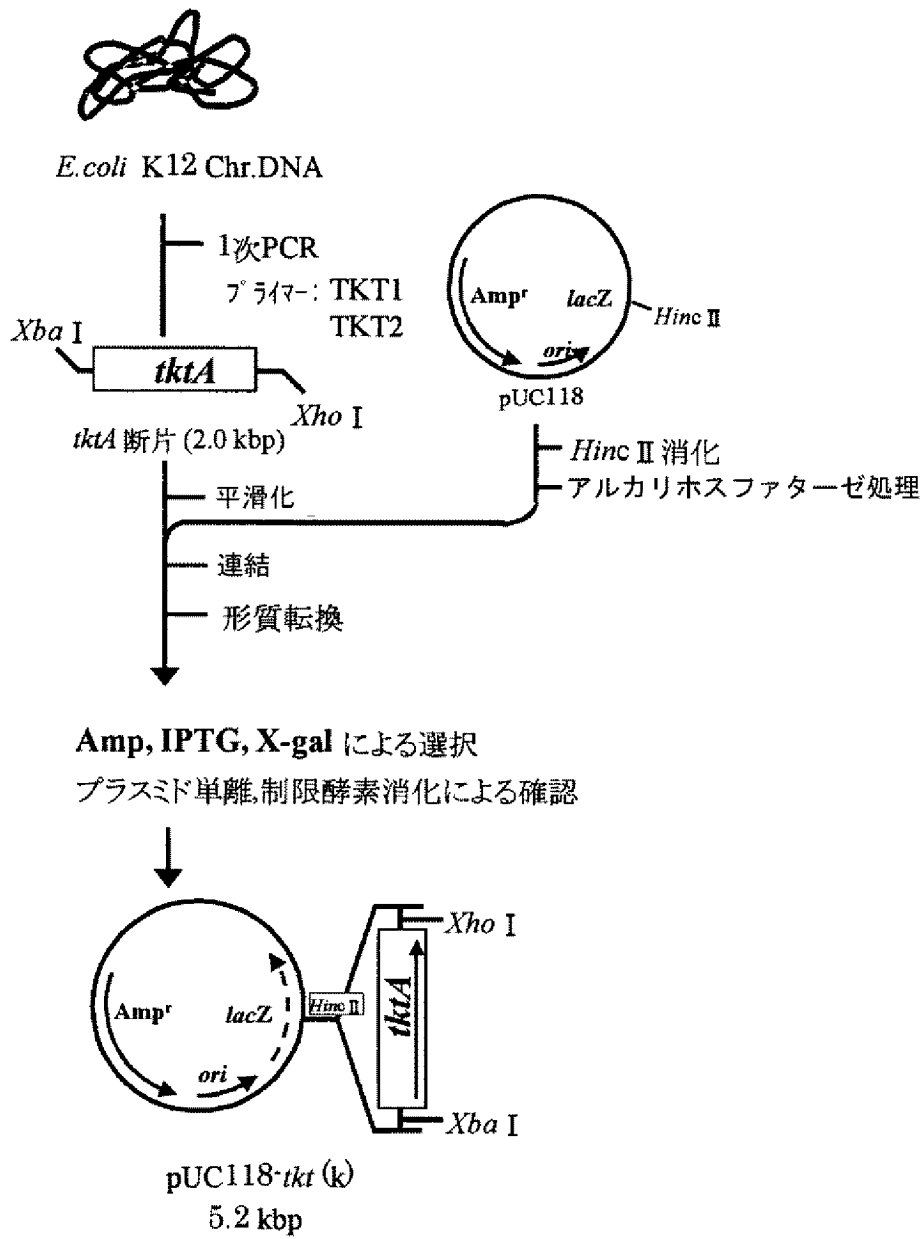
[図4]



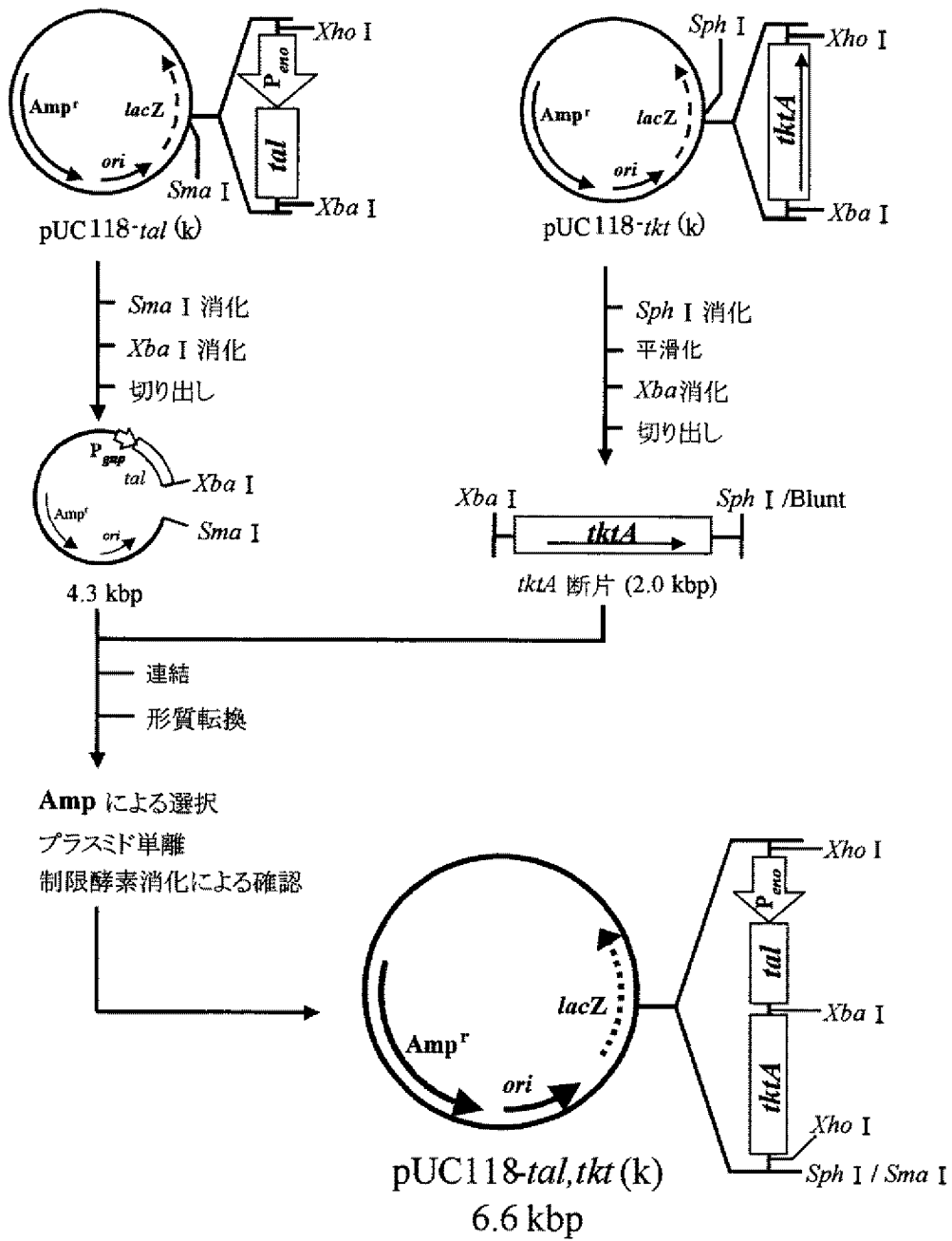
[図5]



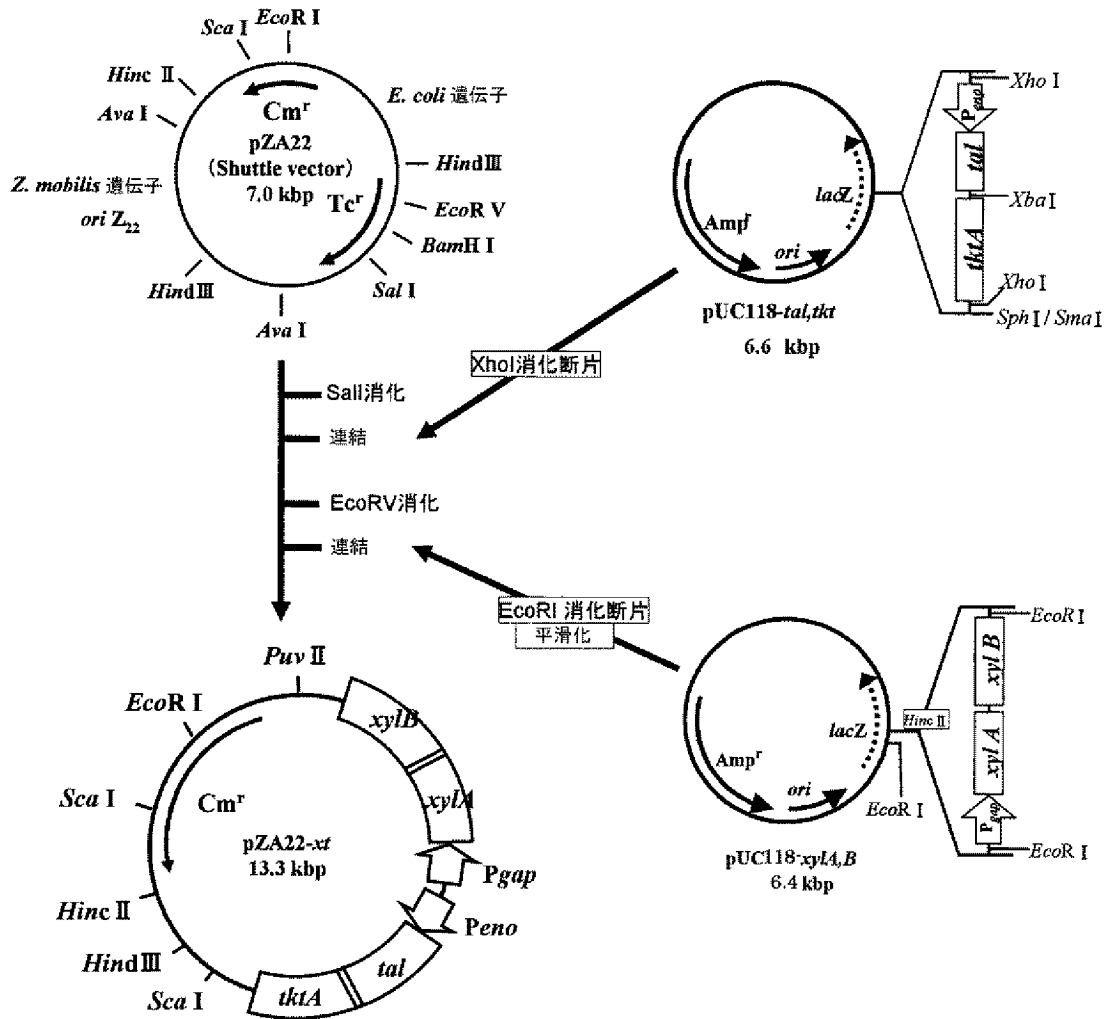
[図6]



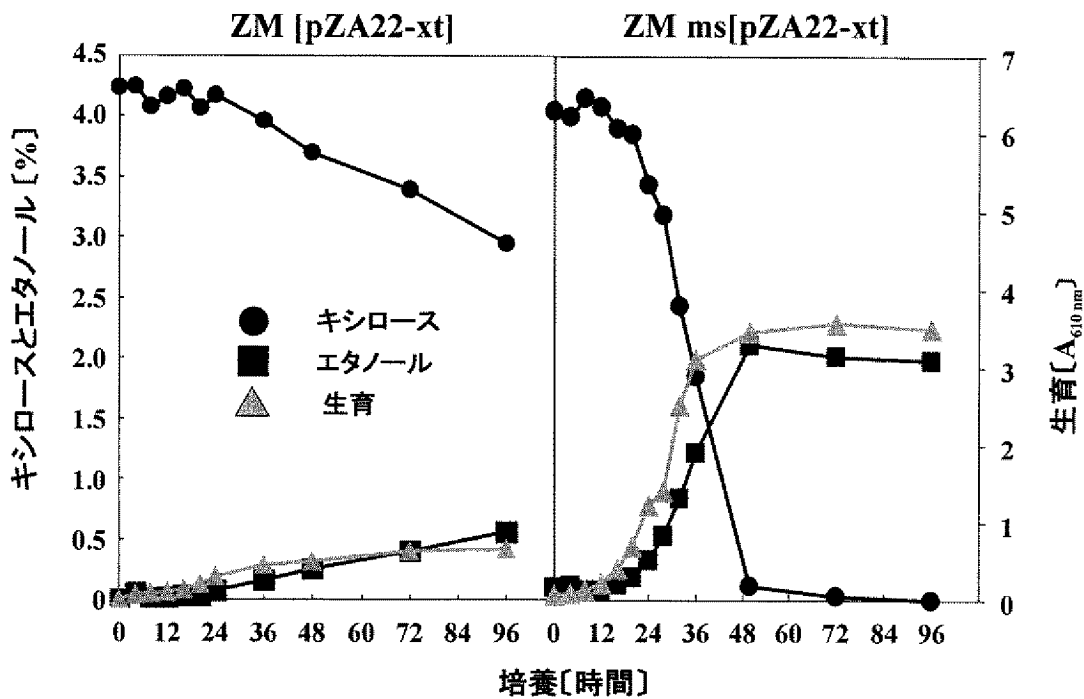
[図7]



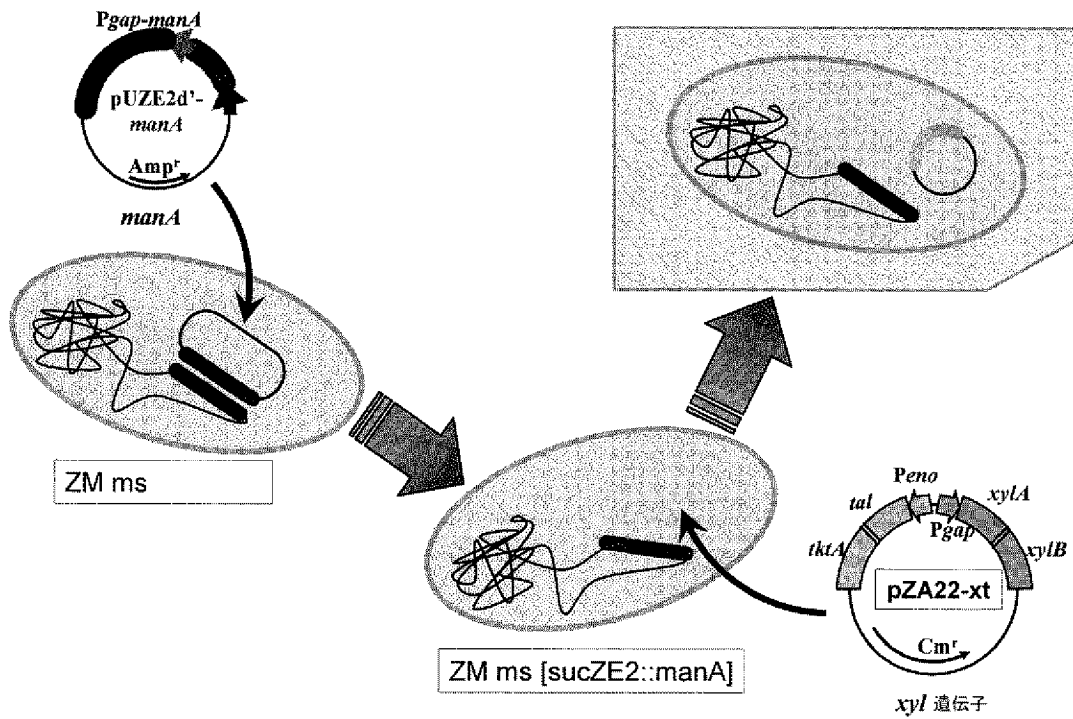
[図8]



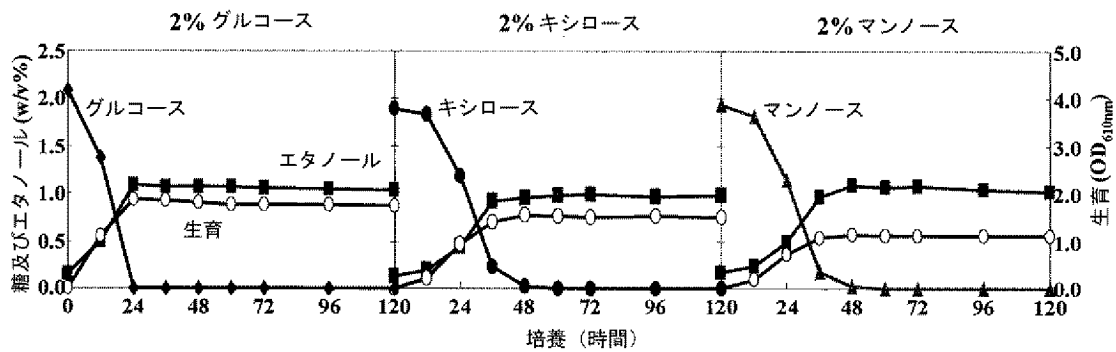
[図9]



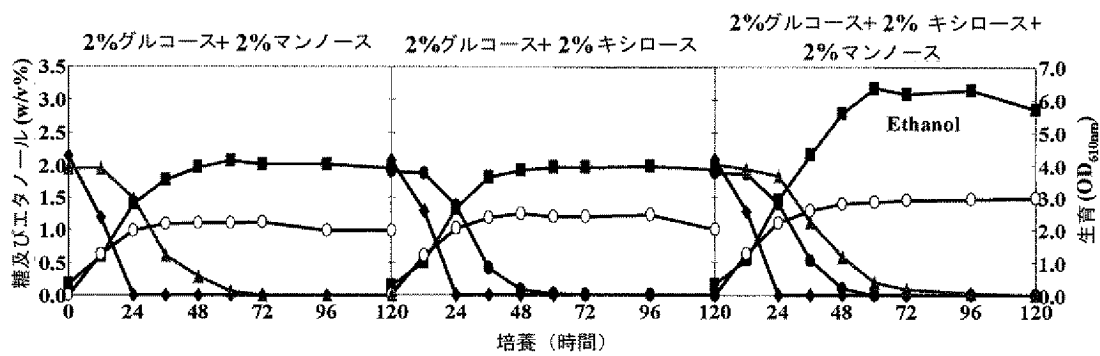
[図10]



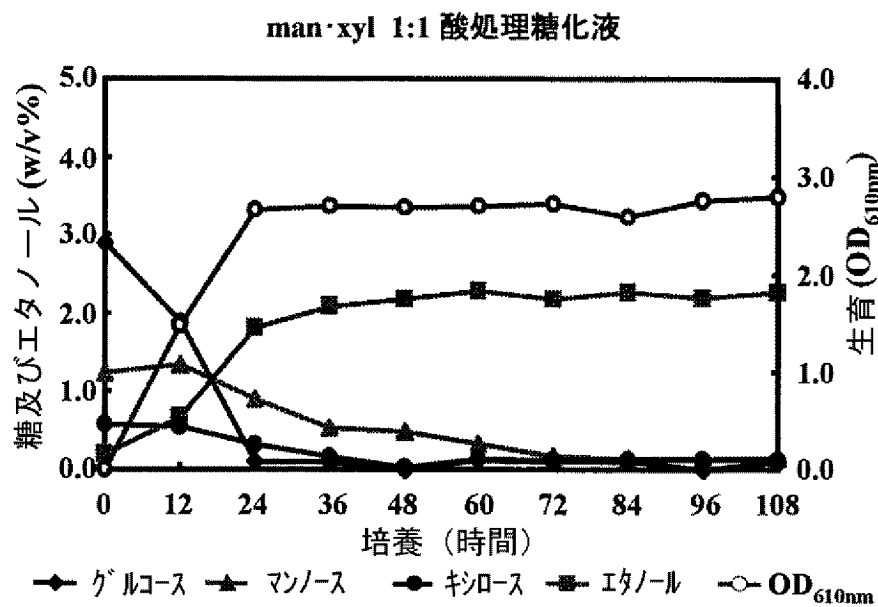
[図11a]



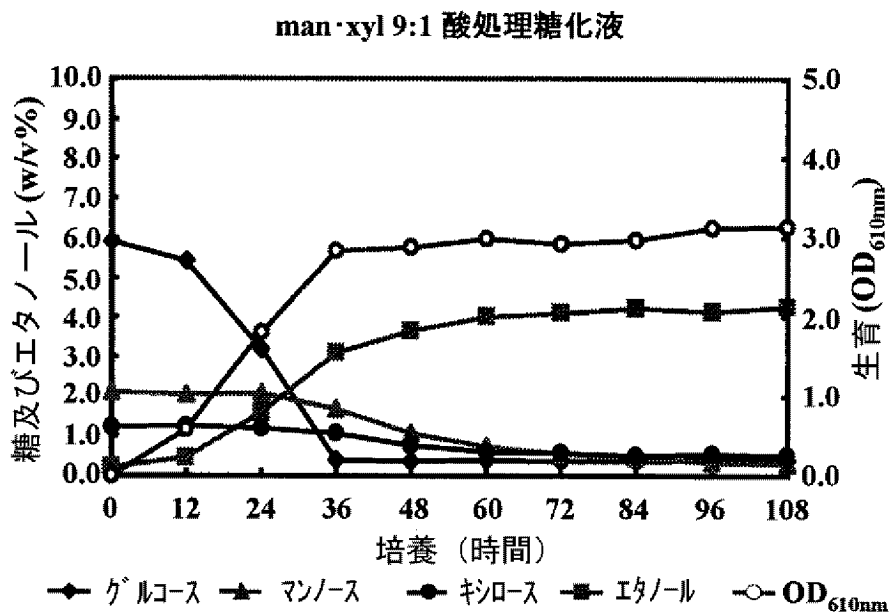
[図11b]



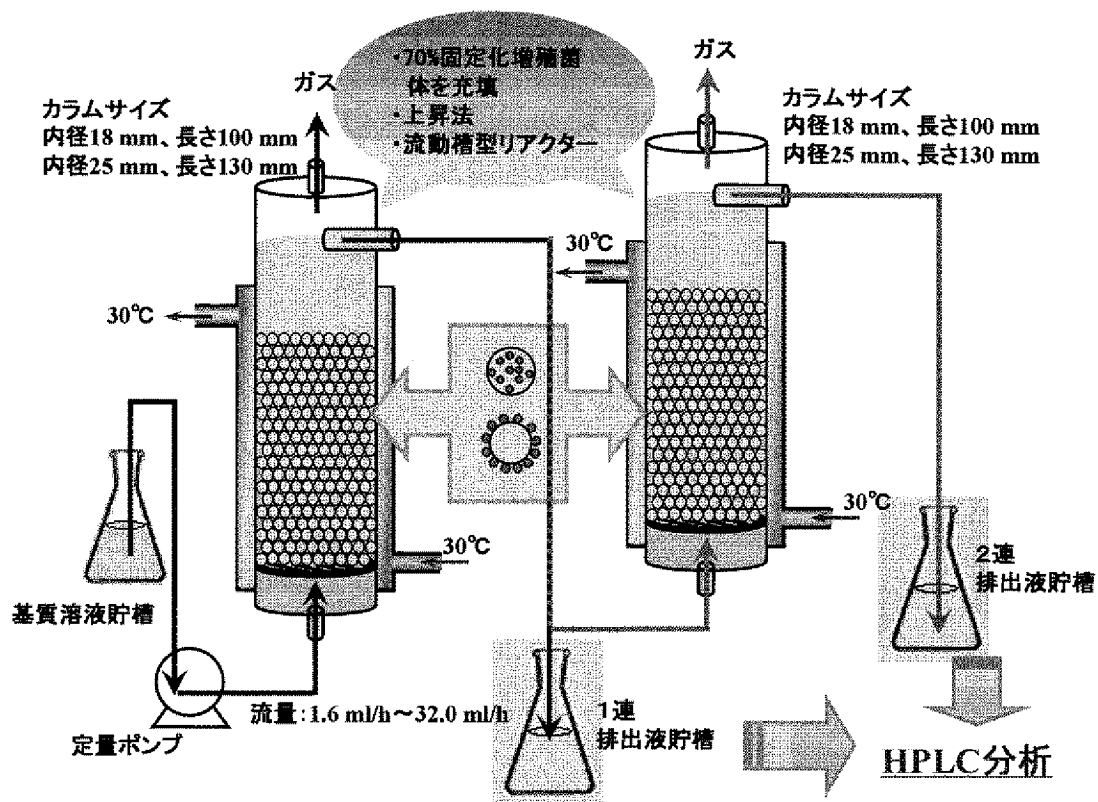
[図12a]



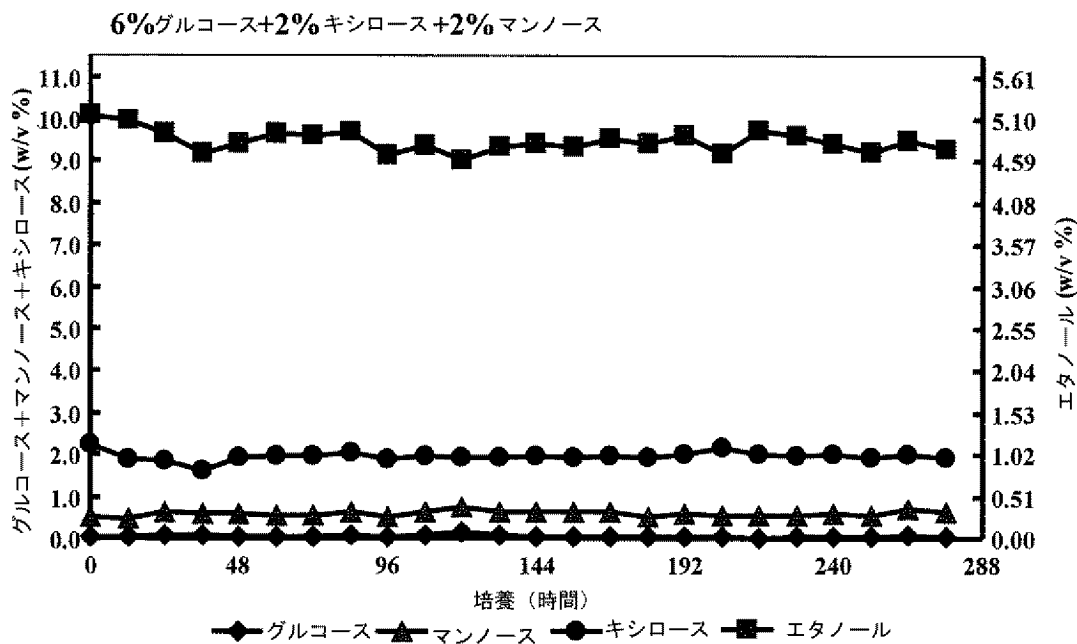
[図12b]



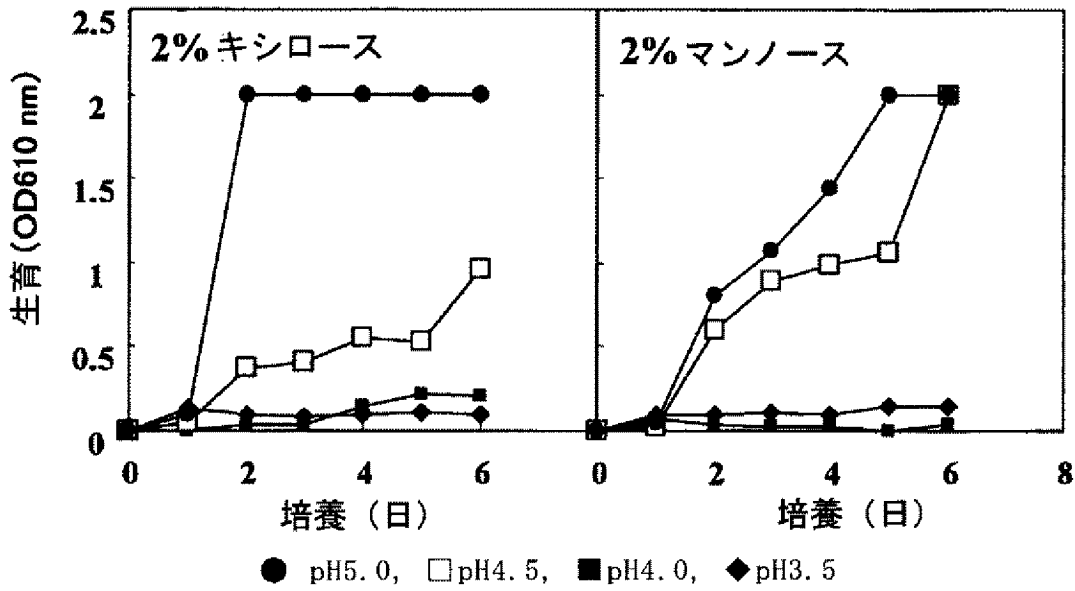
[図13]



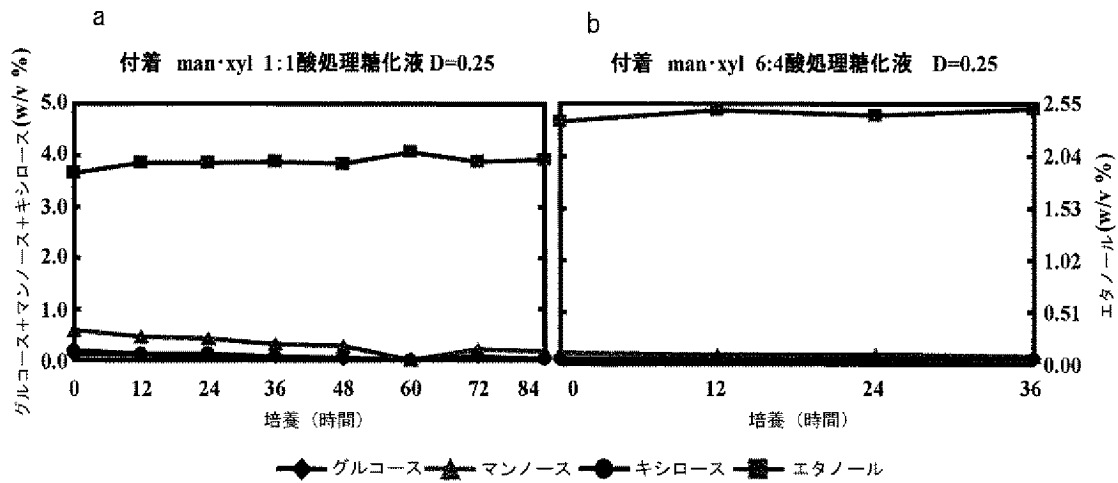
[図14]



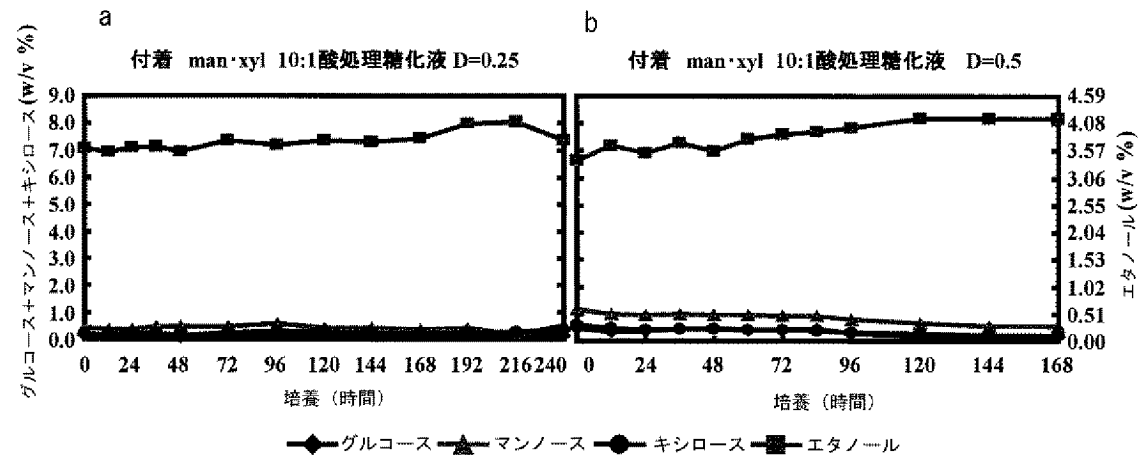
[図15]



[図16]



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/068073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/21(2006.01)i, C12N1/22(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/08(2006.01)i, C12R1/01(2006.01)n

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)

C12N1/21, C12N1/22, C12N15/09, C12P7/08, C12R1/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2008 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2008 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2008 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-------------------------------------|
| X/Y/A | Akinori KAWAKAMI et al., "Kumikae <i>Zymomonas mobilis</i> ni yoru Hemicellulose Hakko", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 2005, Vol.2005, page 179 | 1, 2, 5, 7, 8/1, 2, 5, 7, 8/3, 4, 6 |
| Y/A | WEISSER P et al, Expression of the <i>Escherichia coli pmi</i> gene, encoding phosphomannose-isomerase in <i>Zymomonas mobilis</i> , leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker., Appl Environ Microbiol, 1996, Vol.62, No.11, p.4155-4161 | 1, 2, 5, 7, 8/3, 4, 6 |
| Y/A | DIEN BS et al, Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status., Appl Microbiol Biotechnol, 2003, Vol.63, No.3, p.258-266 | 1, 2, 5, 7, 8/3, 4, 6 |

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 application or patent 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
01 December, 2008 (01.12.08)

Date of mailing of the international search report
09 December, 2008 (09.12.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N1/21(2006.01)i, C12N1/22(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/08(2006.01)i, C12R1/01(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N1/21, C12N1/22, C12N15/09, C12P7/08, C12R1/01

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2008年
 日本国実用新案登録公報 1996-2008年
 日本国登録実用新案公報 1994-2008年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|---|
| X/Y/A | 川上昭徳他, 組換え <i>Zymomonas mobilis</i> によるヘミセルロース発酵, 日本生物工学会大会講演要旨集, 2005, Vol. 2005, p. 179 | 1, 2, 5, 7, 8/ 1, 2, 5, 7, 8/ 3, 4, 6 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

| | |
|---|--|
| 国際調査を完了した日 01.12.2008 | 国際調査報告の発送日 09.12.2008 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|---------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y/A | WEISSER P et al, Expression of the <i>Escherichia coli pmi</i> gene, encoding phosphomannose-isomerase in <i>Zymomonas mobilis</i> , leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker., Appl Environ Microbiol, 1996, Vol. 62, No. 11, p. 4155-4161 | 1, 2, 5, 7, 8/ 3, 4, 6 |
| Y/A | DIEN BS et al, Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status., Appl Microbiol Biotechnol, 2003, Vol. 63, No. 3, p. 258-266 | 1, 2, 5, 7, 8/ 3, 4, 6 |