

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6373190号
(P6373190)

(45) 発行日 平成30年8月15日(2018.8.15)

(24) 登録日 平成30年7月27日(2018.7.27)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 P	7/02	(2006.01)	C 1 2 P	7/02	Z N A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 5 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2014-545161 (P2014-545161)	(73) 特許権者	501073862
(86) (22) 出願日	平成24年11月22日(2012.11.22)		エボニック デグサ ゲーエムベーハー
(65) 公表番号	特表2015-500642 (P2015-500642A)		Evonik Degussa GmbH
(43) 公表日	平成27年1月8日(2015.1.8)		ドイツ連邦共和国 エッセン レリングハウザー シュトラッセ 1-11
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/073334		Rellinghauser Strasse 1-11, D-45128 Essen, Germany
(87) 国際公開番号	W02013/083412	(74) 代理人	100114890
(87) 国際公開日	平成25年6月13日(2013.6.13)		弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
審査請求日	平成27年10月16日(2015.10.16)	(74) 代理人	100116403
(31) 優先権主張番号	11191910.6		弁理士 前川 純一
(32) 優先日	平成23年12月5日(2011.12.5)	(74) 代理人	100135633
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 二宮 浩康
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A l k Bアルカン1ーモノオキシゲナーゼを用いた、アルカンの酸化法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酸素の存在下、アルカンの酸化生成物混合体を製造するための、A l k B型酸化還元酵素の使用であって、前記A l k B型酸化還元酵素が全細胞触媒の形で提供され、かつ、プセウドモナス・プチダ (Pseudomonas putida) GPo1から得られる酵素、又はその変異体であり、その際、前記変異体のアミノ酸配列は、相当する野生型のアミノ酸配列に対して90%又はそれ以上の配列同一性を有し、かつ、前記野生型と実質的に同一の酵素活性を有するものであり、前記酸化生成物におけるカルボン酸対アルコールの比が、20超：1であり、かつ前記アルカンが、炭素数1～5のアルカンである、前記使用。

【請求項 2】

前記アルカンが、炭素数1～4のアルカンである、請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

前記アルカンが、ブタンである、請求項2に記載の使用。

【請求項 4】

前記アルカンが、分枝鎖状アルカンである、請求項1から3までのいずれか1項に記載の使用。

【請求項 5】

前記酸化生成物におけるカルボン酸対アルコールの比が、40超：1である、請求項1から4までのいずれか1項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルカンと、A l k B型酸化還元酵素とを接触させる工程を含むアルカンの酸化法、並びに、アルカンの酸化生成物混合体を製造するための、A l k B型酸化還元酵素の使用に関し、ここで酸化生成物におけるカルボン酸対アルコールの比は、好ましくは1超：1である。

【0002】

アルカンは、化学工業における最も重要な原料の1つである。アルカンを得るためには通常、化石原料から出発するのだが、一方でまた、再生原料からアルカンを得る方法も公知である。アルカンは特に、エネルギー担体としての使用により（例えば短鎖アルカンは気体の形で、長鎖アルカンは液状の形で）知られている一方、工業では特に原料としての役割、又は日常生活の重要な製品（例えばプラスチック若しくは医薬品）につながる多くの合成のための溶剤としての役割が不可欠である。

10

【0003】

このような目的のためにアルカンを使用する基本条件は、ヘテロ原子含有官能基（例えばヒドロキシ官能基、ケト官能基、及びカルボキシ官能基）を酸化によってアルカン炭化水素鎖に導入することである。というのもアルカン自体は、自身が飽和しているため、化学的には相対的に反応が不活性だからである。しかしながらこの際、アルカンを加熱剤として使用する場合は異なり、アルカンが完全に酸化されて二酸化炭素にはならず、ヘテロ原子含有官能基は、選択的に、かつ制御して導入しなければならない。

20

【0004】

ヘテロ原子含有官能基で置換されたアルカンの合成を説明するためには、多数の反応が公知であり、それは例えば紫外光の作用下でのアルカンのハロゲン化であり、その生成物は、多くの化合物を合成するための原料として用いることができる。よってアルコールは、ハロゲン置換されたアルカンの求核置換によって得ることができる。しかしながらこのような反応には、毒性のある、及び/又は環境に悪影響を与える物質（例えば塩素ガス）を用いなければならない、この塩素ガスは安価なため、ハロゲン化のために工業的にしばしば使用される。

【0005】

ヘテロ原子（特に酸素原子）含有官能基をアルカンに導入する生物工学的な方法もまた、公知である。そこでExxon (EP 98137)の特許では、アルトロバクター・ペトロレオファガス (*Arthrobacter petroleophagus*) 及びその他の野生株によって、プロパンをアセトンに変換する方法が記載されている。Grant et al. (2011)は、長鎖アルカンを酸化するために、組み換え型大腸菌細胞を使用している。

30

【0006】

こうした背景から本発明の課題は、アルカンの末端炭素原子を選択的に酸化してカルボン酸にするために適した、アルカンを酸化するための生物工学的な方法を開発することである。

【0007】

本発明の課題はさらに、末端位の炭素原子が選択的に酸化された、アルカンの様々な酸化生成物を製造するために適した方法を開発することであり、ここで生成物の量又は比率は影響を受けることがある。

40

【0008】

さらに本発明の課題は、末端の炭素原子の酸化を触媒して、アルコール、アルデヒド、及びカルボン酸を含む群からの全ての酸化段階にすることができる酸化還元酵素系を提供することであり、ここで触媒活性を有する唯一のポリペプチドを、基質のアルカン、又はその中間生成物と接触させる。

【0009】

本発明の課題はさらに、脂肪酸の物質代謝とは別個に、各酸化系の過剰発現により特徴付けられる系であって、アルカンの末端を選択的に酸化するためのものを提供することで

50

ある。

【0010】

本発明のさらなる課題は、アルカンを主に、又は、主にアルコールに酸化するだけでなく、改善された収率でカルボン酸にするために適した、アルカンの酸化法、好ましくは気体状アルカンの酸化法を提供することである。

【0011】

これらの課題、及びさらなる課題は、本願の対象によって、特にまた添付した従属請求項の対象によって解決され、ここでこれらの実施態様は、従属請求項に記載されている。

【0012】

第一の態様において本発明の基礎となる問題は、酸素の存在下で、アルカンとA1kB型酸化還元酵素とを接触させる工程を有する、アルカンの酸化法によって解決される。

10

【0013】

第一の態様の第一の実施形態では、アルカンが炭素数1～5のアルカンである。

【0014】

第一の態様の第二の実施形態では（第一の態様の第一の実施形態の1実施形態でもある）、アルカンが、炭素数1～4のアルカン（好ましくはブタン）である。

【0015】

第一の態様の第三の実施形態では（第一の態様の第二の実施形態の1実施形態でもある）、アルカンが、分枝鎖状のアルカン（好ましくは炭素数が4又は5であり、さらに好ましくはイソブタン）である。

20

【0016】

第一の態様の第四の実施形態では（第一の態様の第三の実施形態の1実施形態でもある）、A1kB型の酸化還元酵素が、*プセウドモナス・プチダ*（*Pseudomonas putida*）GPO1、又はその変異体である。

【0017】

第一の態様の第五の実施形態では（第一の態様の第四の実施形態の1実施形態でもある）、A1kB型の酸化還元酵素が、全細胞触媒の形で提供される。

【0018】

第一の態様の第六の実施形態では（第一の態様の第五の実施形態の1実施形態でもある）、A1kB型の酸化還元酵素が、精製されたポリペプチドの形で提供される。

30

【0019】

第二の態様において本発明の基礎となる問題は、酸素の存在下で、アルカンの酸化生成物混合体を製造するために、A1kB型酸化還元酵素を用いることによって解決され、ここで酸化生成物におけるカルボン酸対アルコールの比は、好ましくは1超：1である。

【0020】

第二の態様の第一の実施形態では、アルカンが、炭素数1～5のアルカンである。

【0021】

第二の態様の第二の実施形態では（第二の態様の第一の実施態様の1実施形態でもある）、アルカンが、炭素数1～4のアルカン（好ましくはブタン）である。

【0022】

第二の態様の第三の実施形態では（第二の態様の第一及び第二の実施態様の1実施形態でもある）、アルカンが、分枝鎖状アルカン、好ましくは炭素数が4又は5の分枝鎖状アルカンであり、さらに好ましくはイソブタンである。

40

【0023】

第二の態様の第四の実施形態では（第二の態様の第一～第三の実施形態の1実施形態でもある）、A1kB型の酸化還元酵素が、*プセウドモナス・プチダ*（*Pseudomonas putida*）GPO1、又はその変異体である。

【0024】

第二の態様の第五の実施形態では（第二の態様の第一～第四の実施形態の1実施形態でもある）、A1kB型の酸化還元酵素が、全細胞触媒の形で提供される。

50

【0025】

第二の態様の第六の実施形態では（第二の態様の第一～第四の実施形態の1実施形態でもある）、A1k B型の酸化還元酵素が、精製されたポリペプチドの形で提供される。

【0026】

第二の態様の第七の実施形態では（第二の態様の第一～第六の実施形態の1実施形態でもある）、酸化生成物におけるカルボン酸対アルコールの比が、5超：1、好ましくは12超：1であり、さらに好ましくは20超：1、最も好ましくは、40超：1である。

【0027】

本発明の発明者らは、文献では主にあまり酸化されていない生成物を製造するための触媒として知られるA1k B型の酸化還元酵素が、意外なことに、アルカン（特に気体状のアルカン）から、酸化状態がより高い生成物（特にカルボン酸）を主に製造するために、使用可能なことを確認した。特に、製造されたカルボン酸対、製造されたアルコールの比率は、意外なことに高い。さらに、発明者らは意外なことに、このような酸化還元酵素がアルカンを選択的に酸化できることを発見し、この際に予測される副生成物（特に末端ではない炭素原子が酸化されたアルカン）は、予測に反して非常に僅かしか、又は検出可能な量ではそもそも全く製造されないのである。

【0028】

本発明によればアルカン、好ましくは気体状のアルカンは、A1k B型の酸化還元酵素を用いて、酸素の存在下で酸化される。A1k Bとは、最初はプセウドモナス・プチダG p o 1 (Pseudomonas putida Gpo1)のA1k B G T系から知られるようになった酸化還元酵素であり、これは第二のさらなるポリペプチドであるA1k G、及びA1k Tに依存している。A1k Tは、FAD依存性のルブレドキシ還元酵素として同定され、この酵素は、NADHからA1k Gへと電子を渡すものである。A1k Gとは、ルブレドキシ、すなわち鉄含有レドックス系タンパク質であって、A1k Bに対して直接の電子供与体として作用するものである。好ましい実施形態では、「A1k B型酸化還元酵素」という用語自体が、プセウドモナス・プチダG p o 1（データバンクコード：CAB54050.1、このデータバンクコードは、本願で使用される他の全ての従来技術と同様に、従来技術のNCBIデータバンクから得られるものであり、詳細には、2011年11月15日付けのオンラインリリース版である）のA1k B配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、又は99%の配列相同性を有するポリペプチドであり、これはアルカンを酸化する能力を有する。特に好ましい実施形態では、A1k B型の酸化還元酵素は、プセウドモナス・プチダG p o 1から得られるA1k G (CAB54052.1)のポリペプチド、及びA1k T (CAB54063.1)のポリペプチドと官能的に相互作用を有するアルカン酸化性の酸化還元酵素である。好ましい実施形態では、A1k B型の酸化還元酵素は、A1k Bが、プセウドモナス・プチダG p o 1から得られるA1k B G T系からのA1k Bであるか、又はその変異体である。

【0029】

本発明の教示は、ここに記載した生物学的マクロ分子の正確なアミノ酸配列又は核酸配列を用いてのみ説明できるのみならず、欠失、付加、又は置換により1つ以上のアミノ酸又は核酸として得られるこのようなマクロ分子の変異体を用いても、説明できる。好ましい実施形態において、核酸配列又はアミノ酸配列の「変異体」とは、以下では「同族体」という用語と同義、かつ交換可能に使用され、他の核酸配列又はアミノ酸配列（これらも同じ意味で使用する）は、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、又は99%又はそれ以上のパーセンテージを有し、ここで好ましくは、触媒活性中心を形成するアミノ酸、又は構造若しくは折りたたみに不可欠なアミノ酸以外は、欠失若しくは置換されているか、又は単純に保存的に置換されている（例えば、アスパルタートの代わりにグルタマート、又はバリンの代わりにロイシン）。配列がその長さ全体にわたって、対応する高度な相同性を有している必要はなく、本発明によればまた、融合タンパク質、又は対応する相同性及び/又は活性を有する部位を有するコード核酸も使用できる。従来技術は、2つの配列の相同性の程度を計算するために使用可能なアルゴ

10

20

30

40

50

リズムを記載している（例えばArthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, 3rd edition.）。本発明のさらに好ましい実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列の変異体は、好ましくは上記配列同一性に加えて、実質的に野生型分子又はプロトタイプ分子の酵素活性が同じである。例えば、タンパク質分解酵素として酵素活性を有するポリペプチドの変異体は、ポリペプチド酵素と実質的に同じタンパク質分解活性を有する（すなわち、ペプチド結合の加水分解を触媒可能）。特に好ましい実施形態では、「実質的に同じ酵素活性を有する」との記載は、野生型ポリペプチドの基質に関して活性を有することを意味する。この基質は明らかにバックグラウンド活性を超え、かつ/又は3桁未満、好ましくは2桁未満、さらに好ましくは1桁のオーダーで K_M 値及び/又は k_{cat} 値が異なり、同一の基質に関して野生型ポリペプチドを有する。さらなる好ましい実施形態において、核酸配列又はアミノ酸配列の「変異体」という用語は、核酸配列又はアミノ酸配列の活性部位又はフラグメントを少なくとも1つ有することを含む。さらなる好ましい実施形態において、「活性部位」という用語はここでさらに、アミノ酸配列の完全な長さより短い、又はアミノ酸配列の完全な長さよりも短くコードするアミノ酸配列又は核酸配列を意味し、ここで、野生型のアミノ酸配列よりも長さが短いアミノ酸配列又はコードされたアミノ酸配列は、野生型ポリペプチド若しくはその変異体と実質的に同じ酵素活性を有する（例えばアルコール脱水素酵素、モノオキシゲナーゼ、又はトランスアミラーゼ）。特別な実施形態では、核酸の「変異体」という用語は、核酸、その相補鎖を、好ましくは非常にストリンジентな条件下で野生型の核酸に結合することを包含する。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーは、当業者であれば容易に測定可能であり、一般的にはプローブの長さ、洗浄時の温度、及び塩の濃度に依存する。一般的に長いプローブは、ハイブリダイゼーションのためにより高温を必要とし、これに対して短い試料は、低温で済む。ハイブリダイゼーションが起こるかどうかは一般的に、変性されたDNAの性質に依存し、（特に溶融温度未満で）その周囲に存在する相補鎖とアニーリングする。ハイブリダイゼーション反応のストリンジャンシー、及び相応する条件は、Ausubel et al. (1995) に詳細に記載されている。好ましい実施形態において核酸の「変異体」という用語は、ここで使用するように、本来の核酸と同じアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列の変異体を、遺伝子コードの縮重の範囲でコードする任意の核酸配列を含む。

【0030】

多くの適用のために、A1kB型の酸化還元酵素は、全細胞触媒の一部として、選択的な実施形態である。と言うのもこの酵素は、酸化還元酵素又はその活性の少なくとも完全な精製を必要としないか、又は精製を全く必要としないからである。好ましい実施形態において「全細胞触媒」という用語は、ここで使用するように、物質代謝活性細胞であると理解され、これは酵素活性が重要であり、好ましくはA1kB型の酸化還元酵素を有し、好ましくは野生型よりも相対的に高く、有利にはA1kB型の組み換え酸化還元酵素をプラスミド上で過剰発現させることによって、又は遺伝子内に統合できる。当業者には、全細胞触媒を製造するためのシステムが多数、例えばDE 60216245から知られている。好ましい実施形態では、全細胞触媒として、又は発現系として使用される細胞が、原核生物細胞、好ましくはバクテリア細胞である。さらなる好ましい実施形態において、これは哺乳動物細胞である。さらなる好ましい実施形態において、これは低級真核細胞、好ましくは酵母細胞である。原核細胞に含まれるのは例えば、エシェリキア (Escherichia)、特に大腸菌、及び pseudomonas 属、及びジフテリア菌である。低級真核細胞に含まれるのは例えば、サッカロミセス属 (Saccharomyces)、カンジダ、ピチア、ヤロウイア (Yarrowia)、シゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces)、特に好ましくはカンジダ・トロピカリス、シゾサッカロミセス・ボンベ、ピチア・パストリス、ヤロウイア・リポリティカ、及びサッカロミセス・セリビシアエである。細胞は、本発明により使用される酵素のためにコードする1つ以上の核酸配列を、プラスミド上に、又はその遺伝子内に統合して含有する。このようなプラスミド又は細胞の製造方法は、当業者が日常的に実施できる。こうした製造方法は、分子生物学、生化学、遺伝子学、及び微生物学の教科書と試験実施要項に記載されている（例えばSambrook et al. (1989)）。

10

20

30

40

50

【0031】

さらなる好ましい実施形態において、これはA1k B型の酸化還元酵素であるが、精製された酵素である。これは、本発明により使用される全ての酵素活性ポリペプチドの場合と同様に、酵素活性なポリペプチド又はその溶解産物、又はポリペプチドの試料を精製段階全体で（未精製の溶解産物から純粋なポリペプチドまで）含有する細胞であり得る。好ましい実施形態では、「精製された」酵素とは、ここで用いるように、好ましい実施形態において、完全な細胞、又は加工されていない細胞抽出物を触媒作用のために使用せず、酵素を一部、又は完全に精製することである。特に好ましい実施形態において、「精製された」酵素とは、ここで用いるように、試料のSDSゲル上で好ましくは、目に見えるタンパク質の少なくとも約80%、85%、95%、98%、又は好ましくは99%まで、酵素を精製することである。さらに好ましい実施形態では、認識可能な唯一のポリペプチドを、相応する試料のSDSゲル上で精製する。この分野の当業者には、酵素活性を有するポリペプチドを適切な細胞で過剰発現させ、精製若しくは単離可能な多数の方法が公知である。そこで、ポリペプチドを発現するために、全体的に、当業者に手に入る発現系が使用でき、それは例えばpET又はpGEXのベクターである。精製するためには、クロマトグラフ法が考慮され、例えば、タグを有する組み換えタンパク質のアフィニティークロマトグラフ精製法は、ヒスチジンタグの場合には固定された配位子（例えばニッケルイオン）を用いて、目的とするタンパク質に融合されたグルタチオン-S-トランスフェラーゼの場合には固定化されたグルタチオンを用いて、又はマルトース結合性タンパク質を含有するタグの場合には、固定されたマルトースを用いて行われる。

10

20

【0032】

精製された酵素活性を有するポリペプチドは、溶解型で、又は固定化して使用できる。当業者には、ポリペプチドによって、有機若しくは無機の固相と共有結合又は非共有結合で固定するための適切な方法は知られている（例えば、スルホヒドリルカップリング化学によって、Pierce社のキット等）。

【0033】

本発明による教示は、多数のアルカンに適用できる。好ましい実施形態において、「アルカン」とは、ここで用いるように、直鎖状、及び分枝鎖状の式 C_nH_{2n+2} の炭化水素、並びに式 C_nH_{2n} の環状炭化水素を含む群から選択される飽和炭化水素であり得、ここでnは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、及びそれ以上であり、好ましくは1~5であり、さらに好ましくは1~4である。炭素数が1~4のアルカンには例えば、メタン、エタン、プロパン、ブタン、及びイソブタンという化合物が含まれる。これらのアルカンには、直鎖状アルカン、例えばメタン、エタン、プロパン、及びブタンを含む群が含まれる。特に好ましい実施形態では、アルカンが分枝鎖状アルカンであり、好ましくは、イソブタン、2-メチルブタン、及びネオペンタンを含む群から選択されるアルカンである。さらに好ましい実施形態では、アルカンがブタン及びイソブタンを含む群から選択されるアルカンである。特に好ましい実施形態において、これはメチルシクロブタンである。

30

【0034】

本発明による方法を実施するためには、様々な条件が考慮される。重要なのは、酸化剤として分子状酸素が存在することである。酸素は酸素源の形で（例えば過酸化水素又は過マンガン酸カリウム）、存在することができ、またこれらからその場で形成することもできるが、特に好ましいのは酸素ガスの導入であり、さらに好ましくは空気の形で、酸化還元酵素を含有する液状反応培地に導入する。ただし、この際に温度は、生きている細胞又は適切な酵素の試料を用いる場合には、選択した細胞又は選択した酵素が生きられる、又は活性を示す温度でなければならず、これは20超、30超、40超、50超、60超、70超、又は80超であり、好ましくは最大100であり得る。当業者には、どの有機体がどの温度で生存可能かどうか知られており、例えばFuchs/Schlegel, 2007のような教科書に記載されている。生きている酵母細胞の場合、この温度は5~45、好ましくは15~42、さらに好ましくは20~30であり得る。グラム陰性菌

40

50

、好ましくは腸内細菌科（最も好ましいのは大腸菌）の場合、この温度は5～45、好ましくは15～42、さらに好ましくは20～30、最も好ましくは35～40であり得る。pH値は、AlkB型酸化還元酵素の活性が、少なくとも十分に長く得られる程度でなければならない。全細胞触媒を用いる場合、細胞は、十分に長く損なわれないうまででなければならない。pH値は例えば、3～12、好ましくは5～9、さらに好ましくは6～8であり得る。

【0035】

アルカンとAlkB型の酸化還元酵素との接触は好ましくは、固体若しくは液状のアルカンである場合には、精製された、又は全細胞触媒の形で存在するAlkB型の酸化還元酵素を、水溶液中で十分に安定的な形で存在させ、アルカンを穏やかに攪拌しながら、酸素と一緒に溶液に添加し、或いは気体の形態では、気体状アルカンである限り、水溶液中に導入する。当業者であれば、酵素又は全細胞触媒を、日常的な実験で安定化された形態で用意できる。適切な緩衝系の使用、適切な温度の調節、pH濃度及び塩濃度の値などの注意すべきヨウ素は、例えばCornish-Bowden, 1995のような文献に記載されている。

【0036】

本発明による細胞を培養するためには、多くの培養培地が考慮され、酵母細胞を用いる場合には、例えばYPD、YPN、及びYNBに、アミノ酸、例えば1Lあたり0.01gのトリプトファン、又はグルコースが、例えば1% (w/v) の濃度で補われていてよい。腸内細菌系の菌（好ましくは大腸菌）を用いる場合、培養のために考慮されるのは完全培地（例えばLB培地）、又は高密度細胞培地（HZD培地）であって、1Lあたり、NH₄SO₄ 1.76g、K₂HPO₄ 19.08g、KH₂PO₄ 12.5g、酵母抽出物6.66g、クエン酸三ナトリウム 1.96g、クエン酸鉄アンモニウム（1%）17ml、微量元素溶液US3 5ml、原料溶液（グルコース50% w/v、MgSO₄ [x7H₂O 0.5% w/v、30mlのNH₄Cl 2.2% w/v]）から成るものである。

【0037】

好ましい実施形態において、本発明による方法で使用される細胞は、アルカンの酸化に用いられるのとは異なる培地でも育成できる。特に好ましい実施形態において、培養のために使用される培地は完全培地であり、アルカン酸化のために使用される培地は、最少培地である。本発明による方法は、生存可能な細胞を用いて行われる限り、細胞の培養の後に、好ましくは反応緩衝液で行い、この緩衝液1Lは(NH₄)H₂PO₄ 8g、NaCl 0.5g、MgSO₄x7H₂O 0.48g、微量元素溶液 US3 15mlから成る。微量元素溶液US3 1Lは、37%のHCl 36.5g、MnCl₂x4H₂O 1.91g、ZnSO₄x7H₂O 1.87g、Na-EDTAx2H₂O 0.8g、H₃BO₃ 0.3g、Na₂MoO₄x2H₂O 0.25g、CaCl₂x2H₂O 4.7g、FeSO₄x7H₂O 17.8g、CuCl₂x2H₂O 0.15gから構成され、そのpHは5.4に調製される。さらなる実施形態において、アルカンの酸化は、M9培地で行う（グルコース15g、Na₂PO₄ 6.79g、KH₂PO₄ 3g、NaCl 0.5g、NH₄Cl 2g、酵母抽出物 15g、MgSO₄x7H₂O 0.49g、TE 1ml、及びカナマイシン50μgを、1000mlのフラスコに播種し、ここで、微量元素溶液（TE）1Lあたり、以下のように設定する：37%のHCl 36.5g、MnCl₂x4H₂O 1.91g、ZnSO₄x7H₂O 1.87g、Na-EDTAx2H₂O 0.84g、H₃BO₃ 0.3g、Na₂MoO₄x2H₂O 0.25g、CaCl₂x2H₂O 4.7g、FeSO₄x7H₂O 17.3g、及びCuCl₂x2H₂O 0.15g。

【0038】

本発明による方法は、大気圧下で行うことができる。しかしながら気体状のアルカン原料を用いる場合、AlkB型の酸化還元酵素は高圧下での反応を、気体混合物の存在下で触媒することができ、これは主にアルカンと酸素との混合物を含有し、その割合は好ましくは50体積%超、60体積%超、70体積%超、又は80体積%超である。好ましい実

10

20

30

40

50

施形態では、圧力は1.5 bar超、2 bar超、3 bar超、又は4 bar超である。さらなる好ましい実施形態では、圧力は0.5 ~ 4 bar、好ましくは1 ~ 3 bar、最も好ましくは1 ~ 1.5 barである。

【0039】

本発明による方法の特別な利点は、原料として使用するアルカンの酸化還元酵素の特定の比が得られることにある。アルカンは、AlkB型の酸化還元酵素によって、末端位の炭素原子（共有結合によって、最大1個のさらなる炭素原子とのみ、直接結合されている炭素原子）を基本的に3つの酸化段階に酸化することができる（すなわち、アルコール、アルデヒド、及びカルボン酸に酸化）。好ましい実施形態において、「酸化生成物のもとでカルボン酸対アルコールの比が1超：1である」という記載は、カルボン酸対アルコールの物質量の比が、好ましくは末端位の炭素原子の酸化により生じる物質量対、末端位の炭素原子の酸化により生じるアルコールの比が、1超：1であるということの意味する。すなわち、生成物混合体中で、末端位の炭素原子の酸化により生じるカルボン酸の分子が、末端位の炭素原子の酸化により生じるアルコールの分子よりも多く存在するという事

10

【0040】

好ましい実施形態においては、アルカン、好ましくは炭素数1 ~ 5のアルカン、さらに好ましくは炭素数1 ~ 4のアルカン、最も好ましくは炭素数が4のアルカンから、酸素の存在下、酸化生成物を製造するために、AlkB型の酸化還元酵素、好ましくはAlkB型の pseudomonas・putida GPo1を使用することができ、ここでカルボン酸対アルコールの比が、1超：1、好ましくは1.5 : 1、2 : 1、5 : 1、10 : 1、15 : 1、又は20 : 1である。

20

【0041】

本発明はさらに好ましい実施形態において、非環状アルカンの末端位の炭素原子を相応するアルデヒド及び/又は相応する末端位のモノカルボン酸にする方法を包含し、当該方法は、酸化剤の存在下で、アルカンと生物学的試薬（触媒活性を有する酸化還元酵素）とを接触させる工程を有し、ここで前記アルカンが、ブタン又はイソブタンであり、前記酸化還元酵素が、AlkB型の酸化還元酵素であり、さらに好ましくはモノオキシゲナーゼAlkBが、pseudomonas・putida GPo1からのものであるか、又はその同族体であり、前記酸化剤が酸素であり、また本発明は、AlkB型の酸化還元酵素、好ましくは pseudomonas・putida GPo1又はその同族体から得られるモノオキシゲナーゼを、非環状アルカンの末端位炭素原子の酸化によって、相応するアルデヒド、及び/又は相応する末端位のモノカルボン酸にするために用いる使用であって、前記アルカンがブタン又はイソブタンである使用を包含する。

30

【0042】

本発明をさらに、以下の図面と、非制限的な実施例を用いて説明するが、ここからさらなる特徴、実施形態、態様、及び利点を読み取ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】1 - ブタノールの濃度 (a)、2 - ブタノールの濃度 (b)、ブチルアルデヒドの濃度 (c)、又は酪酸の濃度 (d) を、pseudomonas・putida GPo1 から攪拌回転数500 ~ 800回転/分で得られるAlkBGTモノオキシゲナーゼ系により、ブタンと酸素との反応における時系列で示したものである。発酵槽 (F)、及び洗浄瓶 (WF) における濃度が示されている。

40

【図2】a) 及びb) は、pseudomonas・putida GPo1 から得られるAlkBGTモノオキシゲナーゼ系による大腸菌による酸化に対するバイオマス濃度の影響を示し、(a) は1 - ブタノールの濃度を、(b) は酪酸の濃度を時系列で示したものである。

【図3】a)、b)、c)、及びd) は、pseudomonas・putida GPo1 から得られるAlkBGTモノオキシゲナーゼ系による大腸菌によるブタンの酸化に対する微量元素 (TE) の濃度の影響を示し、(a) は1 - ブタノールの濃度、(b) は2 - ブタノールの

50

濃度、(c)はブチルアルデヒドの濃度、そして(d)酪酸の濃度を時系列で示したものである。

【図4】a)、b)、c)、及びd)は、*プセウドモナス・プチダ* GP o 1 から得られる *Alk BGT*モノオキシゲナーゼ系による、大腸菌 BL 2 1 と、大腸菌 3 1 1 0 との比較、並びに *プセウドモナス・プチダ* GP o 1 から得られる *Alk BGT*モノオキシゲナーゼ系による大腸菌によるブタンの酸化に対する影響を示し、(a)は1-ブタノールの濃度、(b)は2-ブタノールの濃度、(c)はブチルアルデヒドの濃度、そして(d)は酪酸の濃度を時系列で示したものである。

【図5】a)、b)、及びc)は、*プセウドモナス・プチダ* GP o 1 から得られる *Alk BGT*モノオキシゲナーゼ系による大腸菌によるイソブタンの酸化を示し、(a)は2-メチル-1-プロパノールの濃度、(b)はイソブチルアルデヒドの濃度、そして(c)はイソ酪酸の濃度を時系列で示したものである。

【図6】例7についてクローニングしたベクター p - LL - 3 0 を図式的に示す。

【図7】*アルカニボラックス・ボルクメンシス* (*Alcanivorax borkumensis*) から得られるモノオキシゲナーゼ系を用いた大腸菌によるブタンの酸化を示す(実施例7と同様に実施)。

【実施例】

【0044】

例1：*プセウドモナス・プチダ* GP o 1 から得られる *Alk BGT*モノオキシゲナーゼ系による、大腸菌によるブタンの酸化

大腸菌 BL 2 1 p COM 1 0 のグリセリン低温培養(対照プラスミド)、及び大腸菌 BL 2 1 p BT 1 0 (WO 2009/077461)を100 μ lを、LBアガープレート上でカナマイシン50 μ lとともに置き、24時間、37 でインキュベートする。LBプレートを酵母抽出物5g、ペプトン10g、NaCl 0.5g、アガーアガー15g、及びカナマイシン50 μ gの溶液1リットルから作製する。pHは、オートクレーブの前に5%のNH₄OHで7.4に調整する。

【0045】

これらのプレートから(反应用バッチのために)、2 \times 25 ml LBブロス(アガーアガーの無い上澄み溶液)を、カナマイシン50 μ lと一緒に、播種物を完全循環させる(容量10 μ l)じゃま板付きの三角フラスコ(100 ml)に、播種した。培養は24時間、37 で、200回転/分(振幅2.5 cm)でインキュベートする。

【0046】

その後、変性M9培地75 ml内にある培養液体25 mlごとに、1000 mlの三角フラスコに1 Lあたり以下の組成で播種する：グルコース15g、Na₂PO₄ 6.79g、KH₂PO₄ 3g、NaCl 0.5g、NH₄Cl 2g、酵母抽出物 15g、MgSO₄ \times 7H₂O 0.49g、TE 1ml、及びカナマイシン 50 μ g。微量元素溶液(TE)は、1 Lあたり以下のように作製する：37%のHCl 36.5g、MnCl₂ \times 4H₂O 1.91g、ZnSO₄ \times 7H₂O 1.87g、Na-EDTA \times 2H₂O 0.84g、H₃BO₃ 0.3g、Na₂MoO₄ \times 2H₂O 0.25g、CaCl₂ \times 2H₂O 4.7g、FeSO₄ \times 7H₂O 17.3g、及びCuCl₂ \times 2H₂O 0.15g。pHは、5%のNH₄OHで7.4に調整する。さらに、フラスコ1つあたりオートクレーブされた消泡剤(Delamex)3滴を添加する。

【0047】

フラスコは、2時間、37 で、180回転/分(振幅2.5 cm)でインキュベートする。この後、温度を25 に減少させる。25 で0.5時間後に、DCPK 0.4 mMを導入した。培地はさらに16時間、25 、180回転/分で振った。その後、Mono sepsisで顕微鏡試験を行った。

【0048】

これらの培地を1まとめにし、50 mlのファルコンチューブに満たし、10000 gの場合、25 で10分間、遠心分離した。残渣は廃棄する。培地200 mlからのペレ

10

20

30

40

50

ットを、反応緩衝液 10 ml に再懸濁させる。この反応緩衝液は、 Na^+ / K^+ のリン酸緩衝液 70 mM から成り、pH は 1 M の NaOH により 7 に調整され、 Na_2PO_4 6.79 g、 KH_2PO_4 3 g、 NaCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49 g、 TE 1 ml、及びカナマイシン 50 μg を有するか、又は $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 緩衝液 70 mM から成り、pH は $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 8 g により 7 に調整され、 NaCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49 g、 TE 1 ml、及びカナマイシン 50 μg から成る (1 L 当たり)。ここで pH の調整は、5% の NH_4OH により行う。

【0049】

オートクレーブされた消泡剤 (Delamex) 約 3 滴を入れた緩衝液 170 ml を、300 ml の発酵槽に装入する。この発酵槽に、ガス瓶からブタン 25%、合成空気 75% の気体混合物を初期圧力 5 bar で、孔径 0.2 μm の焼結ガラス perlator を通じ、流速 25 l/h でガスを送る。この発酵槽は、水浴中で 25 に温度調整し、マグネチックスターを用いて 500 回転/分で 2 時間、それから 800 回転/分で撹拌した。排気は、水 150 ml が充填された洗浄瓶を通じて排出する。

【0050】

この発酵槽に、再懸濁されたペレット 10 ml を播種する。これら 2 つの培地の OD は、約 1.0 である。反応は、グルコースを 1 体積% 添加することにより開始する。pH は選択的に、試験時間の間、制御しても、制御しなくてもよい。10 分後、45 分後、135 分後、及び 240 分後に、発酵槽と洗浄瓶からそれぞれ試料を 10 ml 取り出す。発酵槽からの試料中に、 HCl を 2 ml 入れて、反応を停止させる。発酵試料は、10000 g で 10 分、反応温度で遠心分離し、その残渣は 0.2 μm の装入型フィルターで濾過する。これらの試料は HPLC バイアルでの分析のために充填する。クロマトグラフ分析のために、Agilent Technologies 社の 1200 型装置の HPLC-RID を用いた。Aminex 社の HPX-87H 型カラム (30 mm \times 7.8 mm) を用いた。この装置は、 H_2SO_4 10 mM を溶離剤として、流速 0.6 ml/分、及びカラム温度 40 で稼働させた。分析すべき全ての物質の標準は、純水中で前処理し、同一の条件で測定した。評価は、保持時間の比較によって行った。さらに、それぞれの試料採取時点について、pH、OD、及びグルコース濃度を測定するために、発酵槽から試料を 2 ml 採取する。pH は、外部の pH 測定器で測定し、OD 分光分析は 600 nm で測定し、グルコース含分は生化学的な分析機 (Kreienbaum 社の YSI Select 2700) により測定する。

【0051】

結果

その結果が、図 1 a) ~ d) にまとめてある。大腸菌 BL21 pCOM10 (対照用プラスミド) による試験では、ブタン又は 1-ブタノールの酸化は起こらない。これに対して、大腸菌 BL21 pBT10 を使った場合には、n-ブタンの酸化生成物が生じる：1-ブタノール、酪酸、2-ブタノール、ブチルアルデヒド、1,4-ブタンジオール (定量化できず)、及びブチロラクトン (痕跡量) が検出された。

【0052】

全ての酸化生成物濃度は、試験時間全体にわたって、上昇する。グルコースが約 1 g/l h 消費され、pH 値は 7 から約 5 に低下する。

【0053】

例 2： pseudomonas・pachy GP01 からモノオキシゲナーゼ (AlkBT) による大腸菌による n-ブタンの酸化に対する、撹拌回転数の影響

試験は、例 1 と同様に行う。撹拌回転数は第二のバッチで最初から、900 回転/分で一定に調整する。OD は例 1 に比べて、二倍高い。TE 濃度は、1.5 倍である。最後の試料採取は、200 分後に行った。

【0054】

結果

発酵槽 (F) における 1-ブタノールの形成は、一定の高い回転数でより早く行い、最大回転数に達する。洗浄瓶 (WF) では、1-ブタノールの濃度が低い水準で、ほぼ同一

10

20

30

40

50

である。発酵槽（F）における2-ブタノールの濃度は、それぞれの攪拌数で試験時間全体にわたって上昇するが、その幅は僅かである。洗浄瓶において、2-ブタノールは、試験時間の終わりになって初めて、検出可能となる。ブチルアルデヒドの濃度は、高い攪拌数ではより早く上昇するが、113 hPa（20）という蒸気圧では、より早く稼働させる。ブチルアルデヒドは、定性的には検出できるが、定量的には検出できない。

【0055】

n-酪酸は、攪拌数が低い場合には、試験時間の終わりになって初めて形成される。攪拌回転数が高いと、濃度が連続的に上昇する。洗浄瓶では、n-酪酸は検出されない。

【0056】

例3： pseudomonas・butylograceusからのモノオキシゲナーゼ（AlkBT）による大腸菌によるn-ブタンの酸化に対する、バイオマス濃度の影響

10

試験は、例1と同様に行う。攪拌回転数は900回転/分と一定に保ち、TE濃度はそれぞれ15倍である。1xとは、約10のODを意味し、2xとは、20に相当する。

【0057】

結果

その結果が、図2a)とb)にまとめてある。最大濃度は、二倍のODでより早い試験時間の到達につながる。1-ブタノールも、より迅速に変換される。

【0058】

酪酸は発酵槽（F）でのみ検出され、洗浄瓶では検出できない。二倍のODにより、酪酸形成が開始され、早くも変換の開始につながる。通常量のODでは、これらの条件下では240分後になって初めて、酪酸が検出できる。この濃度は、二倍のODにおける最大濃度の約18%である。

20

【0059】

例4： pseudomonas・butylograceusからのモノオキシゲナーゼ（AlkBT）による大腸菌によるn-ブタンの酸化に対する、TE濃度の影響

試験は、例1と同様に行う。攪拌回転数は900回転/分と一定である。使用する大腸菌株はE. coli W3110 pBT10である。TEの濃度は、緩衝液1Lあたり1ml（1x）又は緩衝液1Lあたり15ml（15x）である。15倍の濃度の試験では、さらに30mg/lのMOPSが添加されている。

【0060】

30

結果

これらの結果が図3a)～d)に示されている。TEの濃度が15倍の場合、全ての酸化生成物はより迅速に、より高い濃度で形成される。

【0061】

例5： pseudomonas・butylograceusからのモノオキシゲナーゼ（AlkBT）による大腸菌株BL21と、大腸菌株W3110との比較

試験は例1と同様に、一定の攪拌回転数（900回転/分）で行う。TE濃度は、反応用緩衝液1Lあたり15mlである。

【0062】

結果

40

その結果が、図4a)～d)にまとめてある。大腸菌株W3110 pBT10は全ての酸化生成物を、大腸菌株BL21 pBT10より迅速に、かつ高濃度で形成する。

【0063】

例6： pseudomonas・butylograceusから得られるモノオキシゲナーゼAlkBT系による、大腸菌によるイソブタンの酸化

作業の経過は、例1と同様である。使用したのは、大腸菌株W3110 pBT10である。反応緩衝液は、Na⁺/K⁺のリン酸緩衝液70mM、pHは5%のNa₄OHにより7に調整され、Na₂PO₄ 6.79g、KH₂PO₄ 3g、NaCl 0.5g、MgSO₄×7H₂O 0.49g、TE 15ml、及びカナマイシン50μgから成る（1Lあたり）。

50

【 0 0 6 4 】

ガスの給送は例 1 と同様に、i - ブタン 2 5 % と、合成空気 7 5 % との混合物のみで行う。

【 0 0 6 5 】

結果

その結果が、図 5 a) ~ c) にまとめてある。i - ブタンの酸化生成物について、i - ブタノール、i - 酪酸、t - ブタノール、及び i - ブチルアルデヒドが検出される。

【 0 0 6 6 】

例 7 : アルカニボラックス・ボルクメンシスから得られる A l k B G T 型モノオキシゲナーゼ系による、大腸菌によるブタンの酸化

酸化のために使用される株は、アルカニボラックス・ボルクメンシス S K 2 (データベースコード CAL 18155.1、及び CAL 18156.1) からの A l k B 型モノオキシゲナーゼのための遺伝子情報を有するプラスミドを含有する。a l k S T、a l k L、並びに a l k S、及び A l k B についての遺伝子情報は、*プセウドモナス・プチダ G P o 1* に由来する。

【 0 0 6 7 】

目的ベクターのクローニング

数を増やすために、New England Biolabs社の 2 × Phusion HF Master Mix (NEB, M0531 S) を使用した (製造元記載による) 。ベクターと P C R 生成物を、純度に依存して、直接カラム精製し (Hilden 在、Qiagen 社、QiaQuick PCR Purification Kit) 、抽出した。P C R、アガロース - ゲル - 電気泳動、D N A の臭化エチジウム着色、及び P C R フラグメントサイズの測定の実施は、当業者に公知の手法で行った。両方の場合において、期待した大きさの P C R フラグメントを用意できた。P C R のためには、配列番号 1、2、3、及び 4 で示される配列を有するプライマーを使用した。

【 0 0 6 8 】

精製した P C R 生成物を、E c o R I - H F + A c / 1 で切断されたベクター p B T 1 _ a l k L 中に、ゲル洗浄の後、組み替えによって、インフュージョン - H D - クローニングキット (製造元 : 米国カリフォルニア州 Mountain View 在、Clontech Laboratories 社) を用いてクローニングした。化学的作用により被感染作用を有する大腸菌 DH10 (Frankfurt 在、New England Biolabs 社) の形質転換は、当業者に公知の手法で行った。目的配列の正確な挿入は、制限分析によって確認し、導入された配列の信頼性は、D N A 配列によって確認される。生成したベクターは、p - L L - 3 0 と呼ぶ (図 7) 。ベクターの配列は、配列プロトコルに配列番号 5 で記載されている。

10

20

30

提供組織と、提供遺伝子：

● プセウドモナス・プチダG Po 1

アクセッション AJ245436

alkB-遺伝子

一体膜 非ヘム鉄モノオキシゲナーゼ

タンパク質 ID="CAB54050.1

alkF-遺伝子

ルブレドキシン1

タンパク質 ID="CAB54051.1

alkG-遺伝子

ルブレドキシン2

タンパク質 ID="CAB54052.1

alkH-遺伝子

アルデヒド脱水素酵素

アクセッション AJ245436

alkT-遺伝子

ルブレドキシン還元酵素

タンパク質 ID="CAB54063.1

alkL-遺伝子

外膜タンパク質

タンパク質 ID="CAB54056.1

alkS-遺伝子

発現制御剤

タンパク質 ID="CAB54064.1"

10

20

● アルカニボラックス・ボルクメンシス

alkB Ab-遺伝子

アルカン 1-モノオキシゲナーゼ

CAL18155.1

alkG Ab-遺伝子

ルブレドキシン

CAL18156.1

【0069】

目的ベクターは、当業者に公知の手法で大腸菌W3110内でクローニングした。生成した株を大腸菌W3110AN-S-LL-16と呼ぶ。

30

【0070】

細胞の培養、及び生物的転化：

大腸菌W3110 EN-S-LL-16のグリセリン低温培養体100μlを、LBアガープレート上でカナマイシン50μlとともに置き、24時間、37℃でインキュベートする。LBプレートを酵母抽出物5g、ペプトン10g、NaCl 0.5g、アガーアガー15g、及びカナマイシン50μgの溶液1リットルから作製する。

【0071】

これらのプレートから、3×25mlのLBブロス（アガーアガーの無い上澄み溶液）を、カナマイシン50μlと一緒に、100mlのじゃま板付き三角フラスコに、プレートの各コロニーに播種した。培養は24時間、37℃で、200回転/分（振幅2.5cm）でインキュベートする。

40

【0072】

その後、変性M9培地175ml内にある培養液体25mlごとに、1000mlの三角フラスコに1Lあたり以下の組成で播種する：グルコース15g、Na₂PO₄ 6.79g、KH₂PO₄ 3g、NaCl 0.5g、NH₄Cl 2g、酵母抽出物 15g、MgSO₄×7H₂O 0.49g、TE 1ml、及びカナマイシン 50μg。微量元素溶液（TE）は、1Lあたり以下のように作製する：37%のHCl 36.5g、MnCl₂×4H₂O 1.91g、ZnSO₄×7H₂O 1.87g、Na-EDTA×2H₂O 0.84g、H₃BO₃ 0.3g、Na₂MoO₄×2H₂O 0.25g、CaCl₂×2H₂O 4.7g、FeSO₄×7H₂O 17.3g、及びCuCl₂×2H₂O

50

0.15 g。pHは、5%の NH_4OH で7.4に調整する。さらに、フラスコ1つあたりオートクレーブされた消泡剤 (Delamex) 3滴を添加する。

【0073】

フラスコは、2時間、37℃で、180回転/分(振幅2.5cm)でインキュベートする。その後、温度を25℃に減少させる。25℃で0.5時間後に、DCPK0.4 mMを導入した。培地はさらに16時間、25℃、180回転/分で振った。

【0074】

これらの培地を1まとめにし、50 mlのファルコンチューブに満たし、10000 gの場合、25℃で10分間、遠心分離した。残渣は廃棄する。培地600 mlからのペレットを、反作用緩衝液30 mlに再懸濁させる。反作用緩衝液は、リン酸アンモニウム緩衝液70 mM、pHは $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 8 gにより7に調整され、 NaCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49 g、TE 1 ml、及びカナマイシン50 μg から成る(1 Lあたり)。pHの調整は、25%のアンモニア溶液で行った。

【0075】

オートクレーブされた消泡剤 (Delamex) 約3滴を入れた緩衝液150 mlを、300 mlの発光槽に装入する。この発酵槽に、ブタン25%、合成空気75%の気体混合物を、孔径0.2 μm の焼結ガラスperlatorを通じ、6.5 $\text{l}_\text{N}/\text{h}$ でガスを送る。この発酵槽は、水浴中で30℃に温度調整し、マグネチックスターラを用いて900回転/分で攪拌する。排気は、水150 mlが充填された洗浄瓶を通じて排出する。

【0076】

この発酵槽に、再懸濁された予備培養ペレットを播種する。OD600は、約1.5である。pH値は、5%のアンモニア溶液によって7.0に制御する。グルコース供給速度は、1 g/l hである。様々な時点で、発酵槽と洗浄瓶からそれぞれ試料を5 ml取り出す。発酵試料は、10000 gで10分、反応温度で遠心分離し、その残渣は0.2 μm の装入型フィルターで濾過する。これらの試料はHPLCバイアルでの分析のために充填する。クロマトグラフ分析のために、Agilent Technologies社の1200型装置のHPLC-RIDを用いる。Aminex社のHPX-87H型カラム(30 mm x 7.8 mm)を用いる。この装置は、 H_2SO_4 10 mMを溶離剤として、流速0.6 ml/分、及びカラム温度40℃で稼働させる。分析すべき全ての物質の標準は、純水中で前処理し、同一の条件で測定する。評価は、保持時間の比較によって行う。さらに、それぞれの試料採取時点について、pH、OD、及びグルコース濃度を測定するために、発酵槽から試料を2 ml採取する。pHは外部のpH測定器で測定し、OD分光分析は600 nmで測定し、グルコース含分は生化学的な分析機 (Kreienbaum社のYSI Select 2700) により測定する。その結果が、表7にまとめてある。

・文献一覧

10

20

30

A. Cornish-Bowden (1995), Fundamentals of Enzym Kinetics, Portland Press Limited, 1995

DE 60216245 (2007): Functional Display of Polypeptides

Sambrook/Fritsch/Maniatis (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition

Fuchs/Schlegel (2007) Allgemeine Mikrobiologie, 2008, Georg Thieme Verlag

10

EP 98137 (1984) A microbiological process for the oxidation of alkanes, vinyl compounds and secondary alcohols

WO 2009/077461: ω-Aminocarbonsäuren oder ihre Lactame, herstellende, rekombinante Zellen

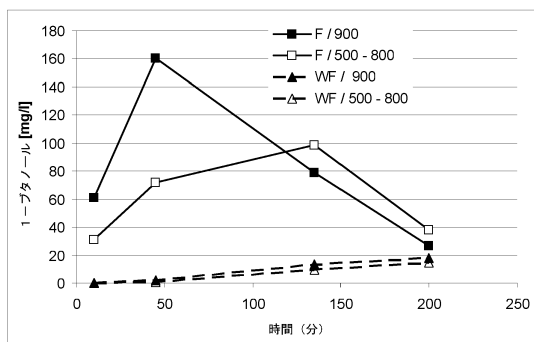
A. Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, 3rd edition

F. M. Ausubel (1995), Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

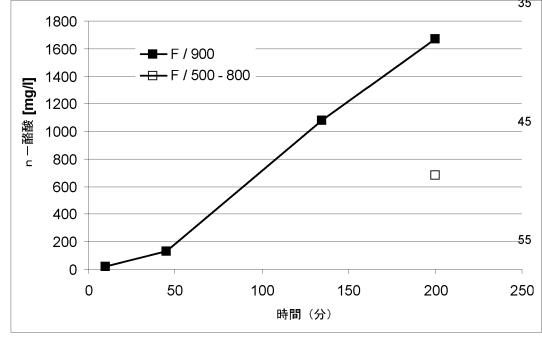
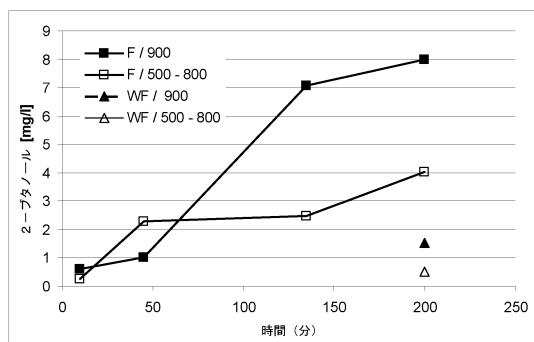
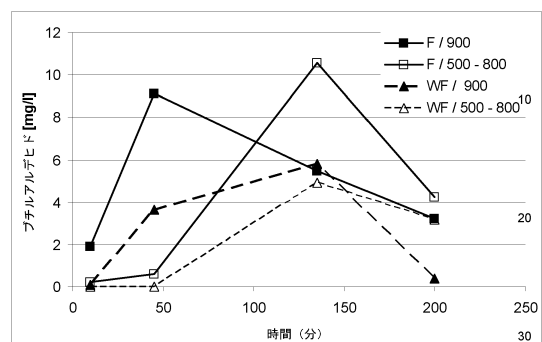
C Grant, J M Woodley, F Baganz (2011): Enzyme and Microbial Technology 48, 408-486

20

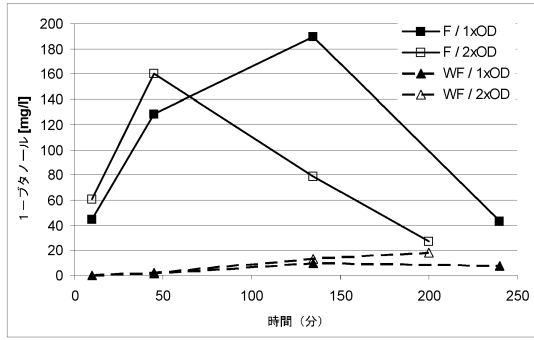
【 図 1 - 1 】



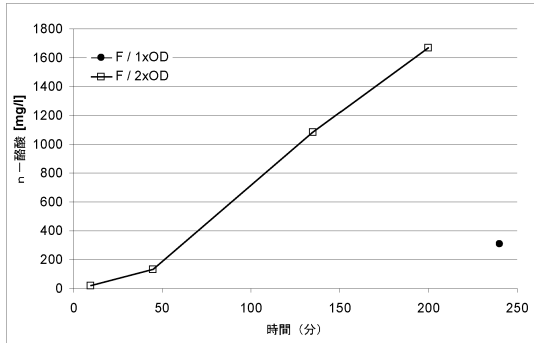
【 図 1 - 2 】



【 図 2 】

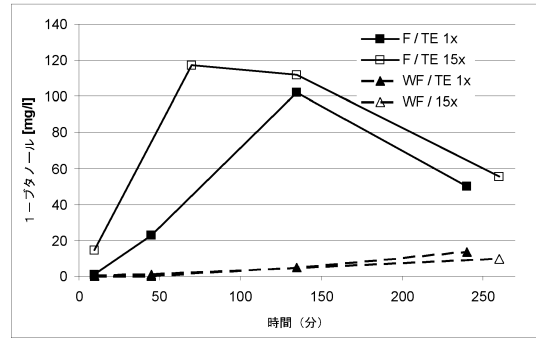


a)

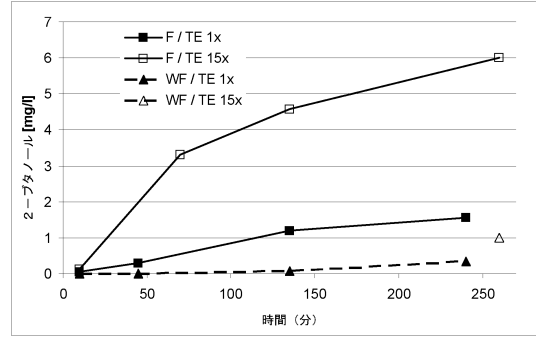


b)

【 図 3 - 1 】

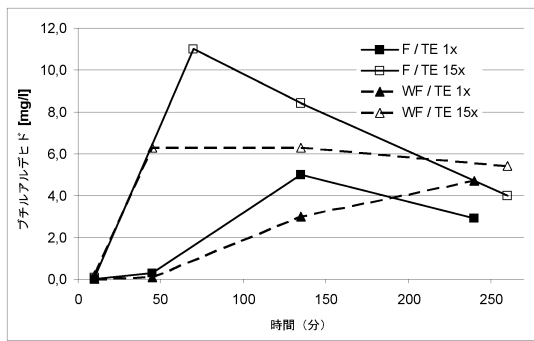


a)

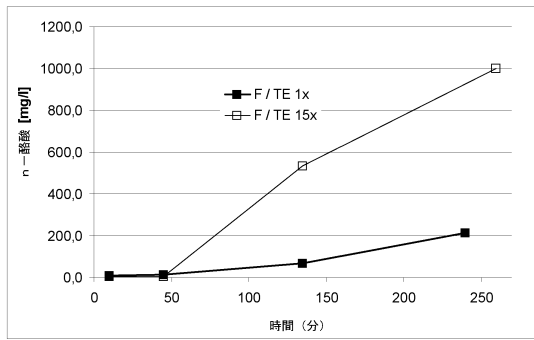


b)

【 図 3 - 2 】

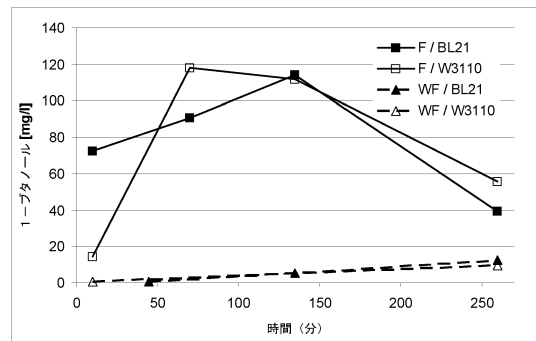


c)

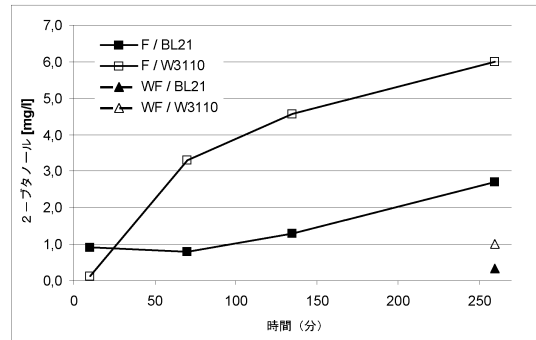


d)

【 図 4 - 1 】

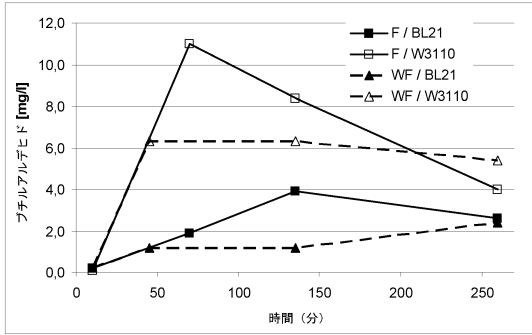


a)



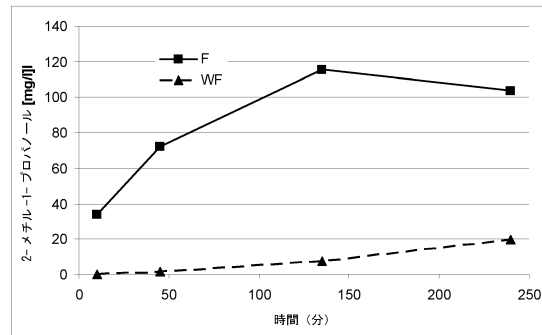
b)

【 図 4 - 2 】

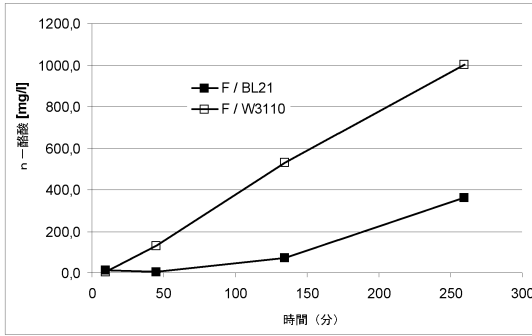


c)

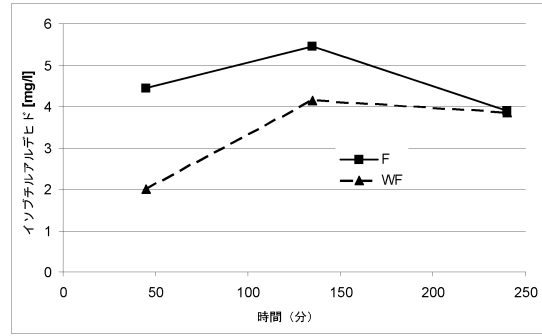
【 図 5 - 1 】



a)

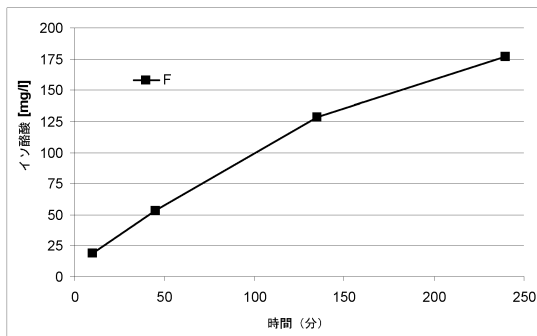


d)



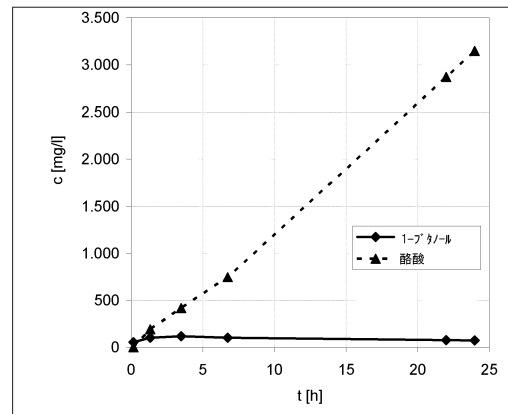
b)

【 図 5 - 2 】

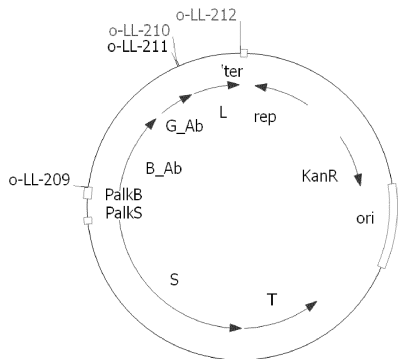


c)

【 図 7 】



【 図 6 】



【配列表】

0006373190000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100162880
弁理士 上島 類
- (72)発明者 ヤン クリストフ ブフェファー
ドイツ連邦共和国 ハーナウ ビューデスハイマー リング 8デー
- (72)発明者 トーマス ハース
ドイツ連邦共和国 ミュンスター バッケンカンブ 9
- (72)発明者 オリヴァー トウム
ドイツ連邦共和国 ラーティンゲン マイグナー ブッシュ 14
- (72)発明者 フランク エアハート
ドイツ連邦共和国 ビーレフェルト ヴィルブラントシュトラッセ 24
- (72)発明者 エーファ マリア ヴィットマン
ドイツ連邦共和国 トラウンロイト ティルズィター ヴェーク 22
- (72)発明者 クリスティアン ゲーリング
ドイツ連邦共和国 マール インスターブルガー シュトラッセ 62
- (72)発明者 ザビーネ ハフケマイアー
ドイツ連邦共和国 マール ミュンヒスヴェーク 16
- (72)発明者 トーマス ヒュラー
ドイツ連邦共和国 マール リングロットシュトラッセ 97

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 特表2011-505854(JP,A)
国際公開第2011/131420(WO,A1)
Appl. Environ. Microbiol., 2009年, vol.75, no.2, pp.337-344
Appl. Environ. Microbiol., 2006年, vol.72, no.1, pp.950-952
Enzyme Microb. Technol., 2011年 5月, vol.48, no.6-7, pp.480-486

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
C12N 9/00 - 9/08
C12P 7/00 - 7/66
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/
WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
PubMed