

(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2025-500941
(P2025-500941A)

(43)公表日 令和7年1月15日(2025.1.15)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 P	7/18	(2006.01)	C 1 2 P	7/18	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	1/14	(2006.01)	C 1 2 N	1/14	B	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/02	(2006.01)	C 1 2 N	1/02		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)	
(21)出願番号 特願2024-536995(P2024-536995)	(71)出願人 522499069
(86)(22)出願日 令和4年12月15日(2022.12.15)	コンツィル エステート ゲーエムベーハー
(85)翻訳文提出日 令和6年8月15日(2024.8.15)	
(86)国際出願番号 PCT/EP2022/086137	ドイツ連邦共和国 7 8 3 5 1 ポートマ
(87)国際公開番号 W02023/117685	ンールートヴィヒスハーフェン, シュロス
(87)国際公開日 令和5年6月29日(2023.6.29)	ストラーセ 1 1
(31)優先権主張番号 21216448.7	(74)代理人 110002572
(32)優先日 令和3年12月21日(2021.12.21)	弁理士法人平木国際特許事務所
(33)優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)	
最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 エリスリトールをバイオ技術的に生産する方法

(57)【要約】

本発明は、エリスリトールのバイオ技術による生産のための方法、特に、窒素源及び高濃度の炭素原を含む培地中で少なくとも1種の腐生菌を培養することによるエリスリトールのバイオ技術による生産のための方法に関する。

【選択図】 図 1

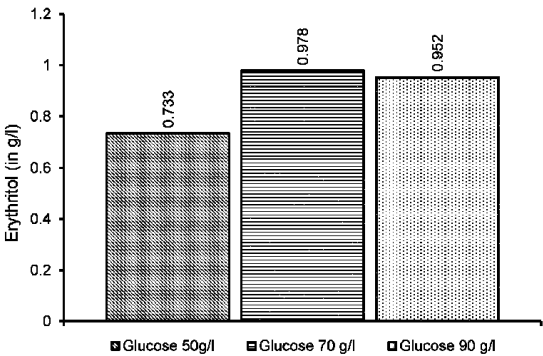


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エリスリトールを生産する方法であって、

a)少なくとも40 g/Lの濃度の炭素源及び窒素源を含む培地中で少なくとも1種の腐生菌を培養して、培地中でエリスリトールを得る工程、

b)培地からエリスリトールを回収する工程、
を含む方法。

【請求項 2】

培地が40～200g/L、好ましくは70～90g/Lの濃度の炭素源を含む、請求項 1 に記載の方法

10

【請求項 3】

培地が、少なくとも50mM、好ましくは少なくとも60mM、好ましくは少なくとも70mMの濃度の窒素源を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

培地がリグノセルロースを含む加水分解物を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

炭素源がグルコース又はキシロースである、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法

【請求項 6】

炭素源が、セルロース、ヘミセルロース及び/又はデンプンを含む原材料の熱水処理により得られる加水分解物を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

窒素源が尿素である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも1種の腐生菌が、ボタнтаケ属(*Hypocrea*)、トリコデルマ属(*Trichoderma*)、ジベレラ属(*Gibberella*)、フザリウム属(*Fusarium*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)又はペニシリウム属(*Penicillium*)に由来する糸状菌である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

腐生菌が、ボタнтаケ(*Hypocrea jecorina*)(トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*))、赤カビ(ジベレラ・ゼアエ(*Gibberella zeae*))、麦類赤カビ(フザリウム・グラミネアラム(*Fusarium graminearum*))、クロコウジカビ(アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*))、コウジカビ(アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*))、黄麹菌(アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*))及びアオカビ(ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*))からなる群から選択される、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

腐生菌が、ボタнтаケ(*Hypocrea jecorina*)(トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*))である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 11】

工程a)において、少なくとも1種の腐生菌が、培地が少なくとも250mg/L、好ましくは少なくとも500mg/L、好ましくは少なくとも1g/Lの濃度のエリスリトールを含有するまで培地中で培養される、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

工程a)において、少なくとも1種の腐生菌が、2～7、好ましくは3～5.5の範囲のpHの培地中で培養される、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

エリスリトールが結晶化によって工程b)において回収される、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項14】

工程b)におけるエリスリトールの回収が、

i) バイオマスの除去、好ましくは、遠心分離及び膜濾過によるバイオマスの除去、

ii) 培地の脱色、好ましくは活性炭による培地の脱色、

iii) 培地の脱塩、好ましくは電気透析による培地の脱塩及び脱色、

iv) 分取クロマトグラフィー、好ましくは、イオン排除及びサイズ排除機構を使用した逆相クロマトグラフィー、並びに

v) エリスリトールの濃縮及び結晶化

の工程を含む、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

熱変性工程が、工程i)の前、間又は後に行われる、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エリスリトールをバイオ技術的に生産する方法、特に、窒素源及び高濃度の炭素原を含む培地中で少なくとも1種の腐生菌を培養することによるエリスリトールをバイオ技術的に生産する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、人々のライフスタイルや糖分を多く含む食品の摂取の増加により、2型糖尿病(DMT2)等の血糖に関連する疾患や障害が急激に増加している。今日、低GI食品を摂取すること(low-glycaemic nutrition)及び血糖値の過度の上昇を避けることは、特定の慢性疾患の発症リスクを低減し、健康の維持及び増進、並びに多くの血糖関連疾患や障害の治療及び/又は予防に有益であると考えられている。

【0003】

エリスリトールは、自然界に存在する炭素数4個の糖アルコールで、その特異な性質と多様な応用範囲から、食品産業において重要性が高まっている。エリスリトールは、梨、ぶどう及びメロン等の数種の果物、きのこ類、アルコール飲料(ビール、ワイン及び日本酒等)、並びに醤油及び味噌等の発酵食品に含まれるが、水晶体組織、血清、血漿、胎脂(fetal fluid)及び尿等のヒトや動物の生体液(biofluid)にも天然に含まれている。エリスリトールは分子量が小さいため、腸上部で吸収されやすく、そのため食品産業で使用される他の糖アルコールに比べて消化不良を起こすことが少ない。摂取されたエリスリトールの大部分は人体内で代謝されず、血糖値やインスリン値を変化させることなく尿中にそのまま排泄される(Regnat et al., Erythritol as sweetener-wherefrom and whereto?, 2018, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.102)。更に、エリスリトールは、非飮食原性で、熱に安定で、よく結晶化し、ショ糖よりも吸湿性が低い。エリスリトールは負の溶解エンタルピーを持つため、摂取すると口腔内で冷却感が得られる。エリスリトールの10%(w/v)溶液は、同じ濃度のショ糖の60~80%の甘味を持つ。

【0004】

しかし、ソルビトール、キシリトール、マンニトール、ラクチトール、及びマルチトール等の他の糖アルコールが長年にわたり砂糖の代替物として確立されているのとは対照的に、今のところエリスリトールは商業的に価値のある方法で化学的に製造することができない。高温でのニッケル触媒を用いたジアルデヒドデンブンプンからのエリスリトールの製造は、満足できない低い収率に留まる(Moon et al. Biotechnological production of erythritol and its applications, 2010, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.86)。

【0005】

酵母や菌類では、エリスリトールはいわゆるペントースリン酸経路で産生される。これは、D-エリスロース-4-リン酸からエリスロースの脱リン酸化とそれに続く還元を経て合成されるものである。これに基づき、バイオ技術によるエリスリトールの製造には、オーレオバシジウム属(Aureobasidium sp.)、トリコスポロノイデス属(Trichosporonoides sp.)

10

20

30

40

50

、及びカンジダ・マグノリアエ(*Candida magnoliae*)等の浸透性酵母が適しているかどうか、幾つかの研究で検討されている(Ishizuka et al., Breeding of a mutant of *Aureobasidium* sp. with high erythritol production, 1989, J. Ferm. Bioeng., Vol. 68(5); US4939091A; US5962287 A; Oh et al., Increased erythritol production in fedbatch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration, 2001, JIM&B, Vol.26; Koh et al., Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*, 2003, Biotechnol. Lett., Vol.25; Ryu et al., Optimization of erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture, 2000, JIM&B, Vol.25)。より最近の研究では、糸状菌によるエリスリトール製造の可能性が検討された(Jovanovic et al., 2013)。しかし、種々の菌株(the different strains)から得られたエリスリトールの収量は、工業規模の製造には満足できるものではなかった。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、バイオ技術による収量の高いエリスリトールの製造方法が必要とされている。本発明は、独立請求項の主題によって、具体的には本発明によるエリスリトールの製造方法によって、先行技術の方法の欠点を克服するものである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、特に、エリスリトールを生産する方法であって、

20

a)少なくとも40g/Lの濃度の炭素源及び窒素源を含む培地中で少なくとも1種の腐生菌を培養して、培地中でエリスリトールを得る工程、

b)培地からエリスリトールを回収する工程、

を含む方法に関する。

【0008】

本発明の好ましい実施形態では、培地は、少なくとも50g/L、好ましくは少なくとも60g/L、好ましくは少なくとも70g/Lの濃度の炭素源を含む。

【0009】

本発明の更に好ましい実施形態では、培地は、多くとも150g/L、好ましくは多くとも125g/L、好ましくは多くとも100g/L、好ましくは多くとも95g/L、好ましくは多くとも90g/Lの濃度の炭素源を含む。

30

【0010】

本発明の好ましい実施形態によれば、培地は、40g/L～200g/L、好ましくは45～175g/L、好ましくは50～150g/L、好ましくは55～125g/L、好ましくは60～100g/L、好ましくは65～95g/L、好ましくは70～90g/Lの濃度の炭素源を含む。

【0011】

好ましくは、培地は、40～160g/L、好ましくは40～150g/L、好ましくは40～140g/L、好ましくは45～130g/L、好ましくは45～120g/L、好ましくは45～110g/L、好ましくは50～100g/L、好ましくは50～95g/L、好ましくは50～90g/L、好ましくは60～90g/L、好ましくは65～90g/L、好ましくは70～90g/Lの濃度の炭素源を含む。

40

【0012】

本発明の更に好ましい実施形態では、培地は、少なくとも50mM、好ましくは少なくとも55mM、好ましくは少なくとも60mM、好ましくは少なくとも65mM、好ましくは少なくとも70mMの濃度の窒素源を含む。

【0013】

好ましくは、培地は、多くとも150mM、好ましくは多くとも140mM、好ましくは多くとも130mM、好ましくは多くとも120mM、好ましくは多くとも110mM、好ましくは多くとも100mMの濃度の窒素源を含む。

【0014】

特に好ましくは、培地は、50～140mM、好ましくは55～130mM、好ましくは60～120mM、好

50

ましくは65~110mM、好ましくは70~100mMの濃度の窒素源を含む。

【0015】

本発明の好ましい実施形態によれば、培地は、合成培地である。好ましくは、培地は、合成培地ではない。

【0016】

本発明の更に好ましい実施形態では、培地は、セルロース、ヘミセルロース及び/又はデンプンを含む原材料の熱水処理により得られる加水分解物を含む。

【0017】

特に好ましくは、培地は、リグノセルロースを含む加水分解物を含む。

【0018】

本発明の更に好ましい実施形態では、加水分解物、好ましくは、セルロース、ヘミセルロース及び/又はデンプンを含む原材料の熱水処理により得られる加水分解物、特に、リグノセルロースを含む加水分解物は、農工業残渣に由来する。

【0019】

本発明の好ましい実施形態によれば、培地は、藁の加水分解物、特に、麦藁の加水分解物を含む。更に好ましい実施形態では、培地は、ふすまの加水分解物を含む。好ましくは、培地は、ジャガイモ果肉の加水分解物を含む。

【0020】

本発明の好ましい実施形態では、炭素源は、モノマー又はオリゴマーC-5及び/又はC-6糖又はその混合物である。好ましくは、炭素源は、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース及びフルクトースから選択されるモノマー又はオリゴマーC-5及び/又はC-6糖である。更に好ましい実施形態によれば、炭素源は、モノマー及びオリゴマーC-5及び/又はC-6糖の混合物、好ましくは、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース及びフルクトースから選択されるモノマー及びオリゴマーC-5及び/又はC-6糖の混合物である。

【0021】

更に好ましい実施形態では、炭素源は、グルコース又はキシロースである。特に好ましくは、炭素源は、グルコースである。好ましくは、炭素源は、キシロースである。

【0022】

好ましい実施形態によれば、培地中のC-5糖の含量は、少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも25%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%に達する(培地中の合計炭水化物に基づく)。

【0023】

好ましくは、培地中のC-6糖の含量は、少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも25%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%に達する(培地中の合計炭水化物に基づく)。

【0024】

本発明の好ましい実施形態によれば、培地中のグルコース含量は、少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも25%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%に達する(培地中の合計炭水化物に基づく)。

【0025】

別の好ましい実施形態によれば、培地中のキシロース含量は、少なくとも10%、好ましく

10

20

30

40

50

は少なくとも15%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも25%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%に達する(培地中の合計炭水化物に基づく)。

【0026】

好ましくは、培地中のモノマーC-5及びC-6糖の含量は、少なくとも1%、好ましくは少なくとも2%、好ましくは少なくとも3%、好ましくは4%、好ましくは少なくとも5%、好ましくは少なくとも6%、好ましくは少なくとも7%、好ましくは少なくとも8%、好ましくは少なくとも9%、好ましくは少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%に達する(培地中の合計炭水化物に基づく)。

【0027】

本発明の好ましい実施形態によれば、培地中のオリゴマーC-5及びC-6糖の含量は、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%に達する(培地中の合計炭水化物に基づく)。

【0028】

本発明の好ましい実施形態によれば、窒素源は、アンモニウム塩、硝酸塩、酵母抽出物及び尿素から選択される。特に好ましくは、窒素源は、アンモニウム塩又は尿素である。好ましくは、アンモニウム塩は、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、コハク酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、シュウ酸アンモニウム、及びリンゴ酸アンモニウムから選択される。

【0029】

本発明の特に好ましい実施形態では、窒素源は尿素である。

【0030】

好ましくは、培地は、少なくとも8mM、好ましくは少なくとも10mM、好ましくは少なくとも15mM、好ましくは少なくとも20mM、好ましくは少なくとも25mM、好ましくは少なくとも30mM、好ましくは少なくとも35mM、好ましくは少なくとも40mM、好ましくは少なくとも45mM、好ましくは少なくとも50mM、好ましくは少なくとも55mM、好ましくは少なくとも60mM、好ましくは少なくとも65mM、好ましくは少なくとも70mM、好ましくは少なくとも80mMの濃度の尿素を含む。

【0031】

本発明の好ましい実施形態によれば、培地は、多くとも160mM、好ましくは多くとも150mM、好ましくは多くとも140mM、好ましくは多くとも130mM、好ましくは多くとも120mM、好ましくは多くとも110mM、好ましくは多くとも100mM、好ましくは多くとも90mMの濃度の尿素を含む。

【0032】

好ましい実施形態では、培地は、8~160mM、好ましくは10~150mM、好ましくは20~140mM、好ましくは30~130mM、好ましくは40~120mM、好ましくは50~110mM、好ましくは60~100mM、好ましくは65~100mM、好ましくは70~100mM、最も好ましくは70~90mMの濃度の尿素を含む。

【0033】

本発明の更に好ましい実施形態によれば、少なくとも1種の腐生菌は、糸状菌である。好

10

20

30

40

50

ましくは、糸状菌は、ボタнтаケ属(*Hypocrea*)、トリコデルマ属(*Trichoderma*)、ジベレラ属(*Gibberella*)、フザリウム属(*Fusarium*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、及びペニシリウム属(*Penicillium*)からなる群から選択される。

【0034】

好ましい実施形態では、腐生菌は、ボタнтаケ(*Hypocrea jecorina*)(トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*))、赤カビ(ジベレラ・ゼアエ(*Gibberella zeae*))、麦類赤カビ(フザリウム・グラミネアラム(*Fusarium graminearum*))、クロコウジカビ(アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*))、コウジカビ(アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*))、黄麹菌(アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*))及びアオカビ(ペニシリウム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*))からなる群から選択される。特に好ましくは、腐生菌は、ボタнтаケ(*Hypocrea jecorina*)(トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*))である。

10

【0035】

本発明の好ましい実施形態によれば、少なくとも1種の腐生菌は、天然に存在する腐生菌であり、特に、遺伝子改変された腐生菌ではない。

【0036】

本発明の別の好ましい実施形態では、少なくとも1種の腐生菌は、遺伝子改変されている。

【0037】

本発明の特に好ましい実施形態では、遺伝子改変された腐生菌は、ボタнтаケ(*Hypocrea jecorina*)(トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*))である。好ましくは、遺伝子改変された腐生菌は、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株QM6a Δ tmus53をベースとするものである。

20

【0038】

好ましくは、少なくとも1種の遺伝子改変された腐生菌は、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子及びマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの不活化された遺伝子を含む。

【0039】

本発明の更に好ましい実施形態では、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、fps1、特にコドン最適化fps1(codon-optimized fps1)である。好ましくは、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)由来のfps1、特にサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)由来のコドン最適化fps1である。

30

【0040】

更なる好ましい実施形態では、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド配列を含み、特に配列番号1のヌクレオチド配列からなる。

【0041】

本発明の好ましい実施形態では、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、配列番号1に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。好ましくは、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、配列番号1に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる。

40

50

【0042】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌の膜結合型アルジトールトランスポーターは、配列番号2のアミノ酸配列を含み、特に配列番号2のアミノ酸配列からなる。

【0043】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌の膜結合型アルジトールトランスポーターは、配列番号2に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。更なる好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の膜結合型アルジトールトランスポーターは、配列番号2に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

10

【0044】

本発明の別の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の膜結合型アルジトールトランスポーターは、配列番号2に定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じる(naturally occurring)アミノ酸により置換されている配列を含む。特に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の膜結合型アルジトールトランスポーターは、配列番号2に定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

20

【0045】

本発明の好ましい実施形態では、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、err1、特にコドン最適化err1である。好ましくは、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)又は赤カビ病菌(フザリウム・グラミネアラム(*Fusarium graminearum*))由来のerr1、特にコドン最適化err1である。

30

【0046】

好ましい実施形態において、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、配列番号3のヌクレオチド配列を含み、特に配列番号3のヌクレオチド配列からなる。

【0047】

好ましくは、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、配列番号3に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。本発明の別の好ましい実施形態では、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子をコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、配列番号3に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる。

40

【0048】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスロースレダクターゼは、配列番号4のアミノ酸配列を含み、特に、配列番号4のアミノ酸配列からなる。

【0049】

50

好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のエリスロースレダクターゼは、配列番号4に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスロースレダクターゼは、配列番号4に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0050】

10

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスロースレダクターゼは、配列番号4に定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のエリスロースレダクターゼは、配列番号4で定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

【0051】

20

本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの不活性化された遺伝子は、mpdhである。

【0052】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号9のヌクレオチド配列を含んでいたものであり、特に不活性化前に配列番号9のヌクレオチド配列からなっていた。

【0053】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号9に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいた。別の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号9に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなっていた。

30

【0054】

好ましくは、不活性化前の配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼは、配列番号10のアミノ酸配列を含み、特に配列番号10のアミノ酸配列からなる。

40

【0055】

好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼは、配列番号10に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、不活性化前の配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼは、配列番号10に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好

50

ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0056】

好ましくは、不活性化前の配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼは、配列番号10で定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。本発明の好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号9番のヌクレオチド配列によってコードされるマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼは、配列番号10で定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

10

【0057】

本発明の更に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの不活性化された遺伝子は欠失している。

【0058】

本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの不活性化された遺伝子は、非機能性である。

20

【0059】

特に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの不活性化された遺伝子は、遺伝子ノックアウト、特に遺伝子置換により不活性化される。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの不活性化された遺伝子は、欠失カセットを用いた遺伝子置換により不活性化される。

【0060】

本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のマンニトール-1-リン酸-5-デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、ゲノム編集によって、特にメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFNs)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALENs)によって、又はクラスター化された規則的な間隔の短いパンドローム反復(CRISPR)系によって不活性化される、特に非機能化される。

30

【0061】

特に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つ、好ましくは少なくとも4つ、好ましくは少なくとも5つの、更なる不活性化された遺伝子を含む。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1)(Dhaps-1)をコードする遺伝子、エリスリトール利用因子(erythritol utilization factor(EUF))をコードする遺伝子、エリスルロースキナーゼ(EYK1)をコードする遺伝子、エリスリトールデヒドロゲナーゼ(EYD1)をコードする遺伝子、エリスリトールイソメラーゼ1(EYI1)をコードする遺伝子、及びエリスリトールイソメラーゼ2(EYI2)をコードする遺伝子からなる群より選択される。

40

【0062】

本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps-1)をコードする遺伝子である。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号11のヌクレオチド配列を含んでいたものであり、特に、不活性化前に配列番号11のヌクレオチド配列からなっていた。

50

【0063】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号11に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいた。更なる好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号11に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなっていた。

10

【0064】

好ましくは、不活性化前の配列番号11のヌクレオチド配列によってコードされるホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps1)は、配列番号12のアミノ酸配列を含み、特に配列番号12のアミノ酸配列からなる。

【0065】

好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号11のヌクレオチド配列によってコードされるホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps1)は、配列番号12に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、不活性化前の配列番号11のヌクレオチド配列によってコードされるホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps1)は、配列番号12と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

20

【0066】

好ましくは、不活性化前の配列番号11のヌクレオチド配列によってコードされるホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps1)は、配列番号12で定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。本発明の好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号11のヌクレオチド配列によってコードされるホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps1)は、配列番号12で定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

30

【0067】

本発明の別の実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、エリスリトール利用因子(EUF)をコードする遺伝子である。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトール利用因子(Euf1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号13のヌクレオチド配列を含んでおり、特に不活性化前の配列番号13のヌクレオチド配列からなっていた。

40

【0068】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトール利用因子(Euf1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号13に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

50

99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいた。特に好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトール利用因子(Euf1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号13に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなっていた。

【0069】

好ましくは、不活性化前の配列番号13のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトール利用因子(Euf1)は、配列番号14のアミノ酸配列を含み、特に配列番号14のアミノ酸配列からなる。

【0070】

好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号13のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトール利用因子(Euf1)は、配列番号第14に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、不活性化前の配列番号13のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトール利用因子(Euf1)は、配列番号14に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0071】

好ましくは、不活性化前の配列番号13のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトール利用因子(Euf1)は、配列番号14に定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。本発明の好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号13のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトール利用因子(Euf1)は、配列番号14に定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

【0072】

本発明の特に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、エリスルロースキナーゼ(EYK1)をコードする遺伝子である。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスルロースキナーゼ(Eyk1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号15のヌクレオチド配列を含んでおり、特に不活性化前の配列番号15のヌクレオチド配列からなっていた。

【0073】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、遺伝子組換え腐生菌のエリスルロースキナーゼ(Eyk1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号15に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいた。特に好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスルロースキナーゼ(Eyk1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号15に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなっていた。

【0074】

好ましくは、不活性化前の配列番号15のヌクレオチド配列によってコードされるエリスルロースキナーゼ(Eyk1)は、配列番号16のアミノ酸配列を含み、特に配列番号16のアミノ酸配列からなる。

【0075】

好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号15のヌクレオチド配列によってコードされるエリスルロースキナーゼ(Eyk1)は、配列番号16に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、不活性化前の配列番号15のヌクレオチド配列によってコードされるエリスルロースキナーゼ(Eyk1)は、配列番号16に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0076】

好ましくは、不活性化前の配列番号15のヌクレオチド配列によってコードされるエリスルロースキナーゼ(Eyk1)は、配列番号16に定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。本発明の好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号15のヌクレオチド配列によってコードされるエリスルロースキナーゼ(Eyk1)は、配列番号16に定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

【0077】

本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、エリスリトールデヒドロゲナーゼ(EYD1)をコードする遺伝子である。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールデヒドロゲナーゼ(Eyd1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号17のヌクレオチド配列を含んでおり、特に不活性化前に配列番号17のヌクレオチド配列からなっていた。

【0078】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールデヒドロゲナーゼ(Eyd1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号17に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいた。本発明の別の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールデヒドロゲナーゼ(Eyd1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号17に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなっていた。

【0079】

好ましくは、不活性化前に配列番号17のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールデヒドロゲナーゼ(Eyd1)は、配列番号18のアミノ酸配列を含み、特に配列番号18のアミノ酸配列からなる。

【0080】

好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号17のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールデヒドロゲナーゼ(Eyd1)は、配列番号18に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは

くは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、不活性化前の配列番号17のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールデヒドロゲナーゼ(Eyd1)は、配列番号18に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0081】

好ましくは、不活性化前の配列番号17のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールデヒドロゲナーゼ(Eyd1)は、配列番号18で定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。本発明の好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号17のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールデヒドロゲナーゼ(Eyd1)は、配列番号18で定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

【0082】

本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、エリスリトールイソメラーゼ1(EYI1)をコードする遺伝子である。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ1(Eyi1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号19のヌクレオチド配列を含んでおり、特に不活性化前に配列番号19のヌクレオチド配列からなっていた。

【0083】

特に好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ1(Eyi1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号19に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいた。本発明の更に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ1(Eyi1)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号19に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなっていた。

【0084】

好ましくは、不活性化前の配列番号19のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ1(Eyi1)は、配列番号20のアミノ酸配列を含み、特に配列番号20のアミノ酸配列からなる。

【0085】

好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号19のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ1(Eyi1)は、配列番号20に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、不活性化前の配列番号19のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ1(Eyi1)は、配列番号20に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有す

るアミノ酸配列からなる。

【0086】

好ましくは、不活性化前の配列番号19のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ1(Eyi1)は、配列番号20で定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。本発明の好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号19のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ1(Eyi1)は、配列番号20で定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

10

【0087】

本発明の別の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、エリスリトールイソメラーゼ2(EYI2)をコードする遺伝子である。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ2(Eyi2)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号21のヌクレオチド配列を含んでおり、特に不活性化前に配列番号21のヌクレオチド配列からなっていた。

【0088】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ2(Eyi2)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号21に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでいた。本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ2(Eyi2)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、不活性化前に配列番号21に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなっていた。

20

30

【0089】

好ましくは、不活性化前の配列番号21のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ2(Eyi2)は、配列番号22のアミノ酸配列を含み、特に配列番号22のアミノ酸配列からなる。

【0090】

好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号21のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ2(Eyi2)は、配列番号22に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、不活性化前の配列番号21のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ2(Eyi2)は、配列番号22に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

40

【0091】

好ましくは、不活性化前の配列番号21のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ2(Eyi2)は、配列番号22に定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により

50

置換されている配列を含む。本発明の好ましい実施形態では、不活性化前の配列番号21のヌクレオチド配列によってコードされるエリスリトールイソメラーゼ2(Eyi2)は、配列番号22で定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

【0092】

本発明の更に好ましい実施形態では、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps-1)をコードする遺伝子、エリスリトール利用因子(EUF)をコードする遺伝子、エリスルロースキナーゼ(EYK1)をコードする遺伝子、エリスリトールデヒドロゲナーゼ(EYD1)をコードする遺伝子、エリスリトールイソメラーゼ(EYI1)をコードする遺伝子、及び遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ(EYI2)をコードする遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、欠失している。

10

【0093】

好ましくは、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps-1)をコードする遺伝子、エリスリトール利用因子(EUF)をコードする遺伝子、エリスルロースキナーゼ(EYK1)をコードする遺伝子、エリスリトールデヒドロゲナーゼ(EYD1)をコードする遺伝子、エリスリトールイソメラーゼ(EYI1)をコードする遺伝子、及び遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ(EYI2)をコードする遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、非機能性である。

20

【0094】

特に好ましい実施形態では、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps-1)をコードする遺伝子、エリスリトール利用因子(EUF)をコードする遺伝子、エリスルロースキナーゼ(EYK1)をコードする遺伝子、エリスリトールデヒドロゲナーゼ(EYD1)をコードする遺伝子、エリスリトールイソメラーゼ(EYI1)をコードする遺伝子、及び遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ(EYI2)をコードする遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、遺伝子ノックアウト、特に遺伝子置換によって不活性化される。好ましくは、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps-1)をコードする遺伝子、エリスリトール利用因子(EUF)をコードする遺伝子、エリスルロースキナーゼ(EYK1)をコードする遺伝子、エリスリトールデヒドロゲナーゼ(EYD1)をコードする遺伝子、エリスリトールイソメラーゼ(EYI1)をコードする遺伝子、及び遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ(EYI2)をコードする遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、欠失カセットを用いた遺伝子置換によって不活性化される。

30

【0095】

本発明の好ましい実施形態では、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ1(Dhaps-1)をコードする遺伝子、エリスリトール利用因子(EUF)をコードする遺伝子、エリスルロースキナーゼ(EYK1)をコードする遺伝子、エリスリトールデヒドロゲナーゼ(EYD1)をコードする遺伝子、エリスリトールイソメラーゼ(EYI1)をコードする遺伝子、及び遺伝子組換え腐生菌のエリスリトールイソメラーゼ(EYI2)をコードする遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの更なる不活性化された遺伝子は、ゲノム編集によって、特にメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFNs)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALENs)、又はクラスター化された規則的な間隔の短いパンドローム反復(CRISPR)系によって不活性化、特に非機能化される。

40

【0096】

本発明の更に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を更に含む。好ましくは、少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、tkl1、特にコドン最適化されたtkl1である。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、T. reesei由来のtkl1、特にT.

50

reesei由来のコドン最適化されたtkl1をコードする少なくとも1つの遺伝子を更に含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、配列番号5のヌクレオチド配列を含み、特に配列番号5のヌクレオチド配列からなる。

【0097】

本発明の更なる好ましい実施形態では、少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、配列番号5に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。好ましくは、少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、配列番号5に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる。

【0098】

好ましくは、少なくとも1つのトランスケトララーゼは、配列番号6のアミノ酸配列を含み、特に配列番号6のアミノ酸配列からなる。

【0099】

本発明の別の好ましい実施形態では、少なくとも1つのトランスケトララーゼは、配列番号6に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、少なくとも1つのトランスケトララーゼは、配列番号6に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0100】

本発明の更に好ましい実施形態では、少なくとも1つのトランスケトララーゼは、配列番号6で定義されたアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。特に好ましい実施形態では、少なくとも1つのトランスケトララーゼは、配列番号6に定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

【0101】

本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を更に含む。好ましくは、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、tal1、特にコドン最適化されたtal1である。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、T. reesei由来のtal1、特にT. reesei由来のコドン最適化されたtal1をコードする少なくとも1つの遺伝子を更に含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、配列番号7のヌクレオチド配列を含み、特に配列番号7のヌクレオチド配列からなる。

【0102】

別の好ましい実施形態では、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、配列番号7に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同

一性を有するヌクレオチド配列を含む。好ましくは、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子は、配列番号7に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる。

【0103】

好ましくは、少なくとも1つのトランスアルドラーゼは、配列番号8のアミノ酸配列を含み、特に配列番号8のアミノ酸配列からなる。

【0104】

特に好ましくは、少なくとも1つのトランスアルドラーゼは、配列番号8に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、少なくとも1つのトランスアルドラーゼは、配列番号8に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0105】

本発明の別の好ましい実施形態では、少なくとも1つのトランスアルドラーゼは、配列番号8に定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。特に好ましい実施形態では、少なくとも1つのトランスアルドラーゼは、配列番号8に定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

【0106】

本発明の更に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの遺伝子を更に含む。好ましくは、少なくとも1つのエリスリトール利用因子をコードする少なくとも1つの遺伝子は、euf1、特に、コドン最適化されたeuf1である。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、T. reesei由来のeuf1、特にT. reesei由来のコドン最適化されたeuf1をコードする少なくとも1つの遺伝子を更に含む。好ましい実施形態において、少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、配列番号13のヌクレオチド配列を含み、特に配列番号13のヌクレオチド配列からなる。

【0107】

好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つのエリスリトール利用因子をコードする少なくとも1つの遺伝子は、配列番号13に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。好ましくは、少なくとも1つのエリスリトール利用因子をコードする少なくとも1つの遺伝子は、配列番号13に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる。

【0108】

好ましくは、少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)は、配列番号14のアミノ酸配列を含み、特に配列番号14のアミノ酸配列からなる。

【0109】

更なる好ましい実施形態において、少なくとも1つのエリスリトール利用因子は、配列番号14に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、少なくとも1つのエリスリトール利用因子は、配列番号14に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0110】

本発明の更に好ましい実施形態では、少なくとも1つのエリスリトール利用因子は、配列番号14に定義されるアミノ酸配列において1個、好ましくは2個、好ましくは3個、好ましくは5個、好ましくは6個、好ましくは7個、好ましくは8個、好ましくは9個、好ましくは10個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。特に好ましい実施形態では、少なくとも1つのエリスリトール利用因子は、配列番号14に定義されるアミノ酸配列において多くとも10個、好ましくは多くとも9個、好ましくは多くとも8個、好ましくは多くとも7個、好ましくは多くとも6個、好ましくは多くとも5個、好ましくは多くとも4個、好ましくは多くとも3個、好ましくは多くとも2個、好ましくは多くとも1個のアミノ酸が、他の天然に生じるアミノ酸により置換されている配列を含む。

【0111】

本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスケトラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、及び/又は少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、外来ポリヌクレオチド配列である。

【0112】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスケトラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、及び/又は少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、内因性ポリヌクレオチド配列である。

【0113】

更なる好ましい実施形態において、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの外来遺伝子を含む。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む。

【0114】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの外来遺伝子を含む。別の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む。

【0115】

更に好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのトランスケトラーゼをコードする少なくとも1つの外来遺伝子を含む。本発明の好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのトランスケトラーゼをコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む。

【0116】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードす

10

20

30

40

50

る少なくとも1つの外来遺伝子を含む。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む。

【0117】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの外来遺伝子を含む。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌は、少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの内因性遺伝子を含む。

【0118】

本発明の好ましい実施形態では、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、及び/又は少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、遺伝子組換え腐生菌のゲノム内に安定的に又は一時的に導入される。

10

【0119】

本発明の特に好ましい実施形態では、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、及び/又は少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、過剰発現する。

20

【0120】

好ましくは、遺伝子組換え腐生菌の、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの遺伝子、特に少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの外来若しくは内因性遺伝子は、過剰発現する。更なる好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、特に少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの外来若しくは内因性遺伝子は、過剰発現する。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌の、少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、特に少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの外来若しくは内因性遺伝子は、過剰発現する。更に好ましくは、遺伝子組換え腐生菌の、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、特に少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの外来若しくは内因性遺伝子は、過剰発現する。好ましくは、遺伝子組換え腐生菌の、少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの遺伝子、特に少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの外来若しくは内因性遺伝子は、過剰発現する。

30

【0121】

本発明の更に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスケトララーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、及び/又は少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする少なくとも1つの遺伝子は、構成的若しくは誘導性プロモーターの制御下にある。好ましい実施形態では、構成的若しくは誘導性プロモーターは、天然に生じるプロモーターである。更なる好ましい実施形態では、構成的若しくは誘導性プロモーターは、合成プロモーターである。好ましくは、構成的プロモーターは、pki、tef、gpdから選択される。好ましくは、誘導性プロモーターは、bgal、bxl1、cbh1、cbh2、xyn1、xyn2から選択される。好ましくは、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーター

40

50

をコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、pki、tef、gpdから選択されるプロモーターの制御下にあり、好ましくはpkiプロモーターの制御下にある。好ましくは、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、pki、tef、gpdから選択されるプロモーターの制御下にあり、好ましくは、tefプロモーターの制御下にある。好ましくは、少なくとも1つのトランスケトラーゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、pki、tef、gpdから選択されるプロモーターの制御下にあり、好ましくは、tefプロモーターの制御下にある。好ましくは、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、pki、tef、gpdから選択されるプロモーターの制御下にあり、好ましくは、tefプロモーターの制御下にある。好ましくは、少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、pki、tef、gpdから選択されるプロモーターの制御下にあり、好ましくは、tefプロモーターの制御下にある。

【0122】

本発明の更に好ましい実施形態では、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスケトラーゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子、及び/又は少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子は、プラスミド上に存在する。好ましくは、少なくとも1つの膜結合型アルジトールトランスポーターをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのエリスロースレダクターゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスケトラーゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子、少なくとも1つのトランスアルドラーゼをコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子、及び/又は少なくとも1つのエリスリトール利用因子(EUF)をコードする遺伝子組換え腐生菌の少なくとも1つの遺伝子はそれぞれ、別個のプラスミド上に存在する。

【0123】

本発明の特に好ましい実施形態では、遺伝子組換え腐生菌は、ウェステルダイク真菌多様性研究所(Westerdijk Fungal Biodiversity Institute)にCBS番号146708で寄託されているトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株である。

【0124】

本発明の好ましい実施形態によれば、少なくとも1種の腐生菌は、工程a)において、少なくとも5L、好ましくは少なくとも10L、好ましくは少なくとも25L、好ましくは少なくとも50L、好ましくは少なくとも100L、好ましくは少なくとも250L、好ましくは少なくとも500L、好ましくは少なくとも1,000L、好ましくは少なくとも2,500L、好ましくは少なくとも7,500L、好ましくは少なくとも10,000L、好ましくは少なくとも25,000L、好ましくは少なくとも50,000L、好ましくは少なくとも75,000L、好ましくは少なくとも100,000Lの容積で培養される。

【0125】

本発明の更に好ましい実施形態では、少なくとも1種の腐生菌は、工程a)において、培地が少なくとも250mg/L、好ましくは少なくとも300mg/L、好ましくは少なくとも350mg/L、好ましくは少なくとも400mg/L、好ましくは少なくとも450mg/L、好ましくは少なくとも500mg/L、好ましくは少なくとも600mg/L、好ましくは少なくとも700mg/L、好ましくは少なくとも800mg/L、好ましくは少なくとも900mg/L、好ましくは少なくとも1g/L、好ましくは少なくとも2g/L、好ましくは少なくとも3g/L、好ましくは少なくとも4g/L、好ましくは少なくとも5g/L、好ましくは少なくとも6g/L、好ましくは少なくとも7g/L、好ましくは少なくとも8g/L、好ましくは少なくとも9g/L、好ましくは少なくとも10g/L、好ましくは少なくとも15g/L、好ましくは少なくとも20g/L、好ましくは少なくとも25g/L、好ましくは少

なくとも30g/L、好ましくは少なくとも35g/L、好ましくは少なくとも40g/Lの濃度のエリスリトールを含有するまで培地中で培養される。

【0126】

特に好ましくは、少なくとも1種の腐生菌は、培地が250mg/L～40g/L、好ましくは500mg/L～40g/L、好ましくは750mg/L～40g/L、好ましくは1g/L～40g/Lの濃度のエリスリトールを含有するまで培地中で培養される。

【0127】

更に好ましい実施形態では、少なくとも1種の腐生菌は、培地が5g/L～40g/L、好ましくは10g/L～40g/L、好ましくは15g/L～40g/L、好ましくは20g/L～40g/L、好ましくは25g/L～40g/L、好ましくは30g/L～40g/Lの濃度のエリスリトールを含有するまで培地中で培養される。

10

【0128】

本発明の好ましい実施形態によれば、エリスリトールの収量は、少なくとも3mg/g、好ましくは少なくとも4mg/g、好ましくは少なくとも5mg/g、好ましくは少なくとも6mg/g、好ましくは少なくとも7mg/g、好ましくは少なくとも8mg/g、好ましくは少なくとも9mg/g、好ましくは少なくとも10mg/g、好ましくは少なくとも11mg/g、好ましくは少なくとも12mg/g、好ましくは少なくとも13mg/g、好ましくは少なくとも14mg/g、好ましくは少なくとも15mg/g、好ましくは少なくとも17.5mg/g、好ましくは少なくとも20mg/g、好ましくは少なくとも25mg/g、好ましくは少なくとも30mg/g、好ましくは少なくとも40mg/g、好ましくは少なくとも50mg/g、好ましくは少なくとも75mg/g、好ましくは少なくとも100mg/gである(それぞれ消費された炭素源1gあたりのエリスリトールのmg数、特に、消費されたグルコース1gあたりのエリスリトールのmg数に基づく)。

20

【0129】

好ましい実施形態では、エリスリトールの収量は、3～100mg/g、好ましくは4～100mg/g、好ましくは5～100mg/g、好ましくは6～100mg/g、好ましくは7～75mg/g、好ましくは8～75mg/g、好ましくは9～75mg/g、好ましくは10～75mg/g、好ましくは15～50mg/gである(それぞれ消費された炭素源1gあたりのエリスリトールのmg数、特に、消費されたグルコース1gあたりのエリスリトールのmg数に基づく)。

【0130】

本発明の特に好ましい実施形態では、少なくとも1種の腐生菌は、工程a)において、2～7、好ましくは2.5～6.5、好ましくは2.5～6、好ましくは3～5.5の範囲のpHの培地中で培養される。特に好ましくは、少なくとも1種の腐生菌は、多くとも7、好ましくは多くとも6.5、好ましくは多くとも6、好ましくは多くとも5.5、好ましくは多くとも5のpHの培地中で培養される。

30

【0131】

本発明の好ましい実施形態によれば、少なくとも1種の腐生菌は、工程a)において、25～35℃、好ましくは26～34℃、好ましくは27～33℃、好ましくは28～32℃、好ましくは29～31℃、好ましくは30℃の温度の培地中で培養される。

【0132】

本発明の好ましい実施形態では、少なくとも1種の腐生菌は、工程a)において、少なくとも15℃、好ましくは少なくとも20℃、好ましくは少なくとも25℃、好ましくは少なくとも26℃、好ましくは少なくとも27℃、好ましくは少なくとも28℃の温度の培地中で培養される。

40

【0133】

更に好ましい実施形態では、少なくとも1種の腐生菌は、工程a)において、多くとも35℃、好ましくは多くとも34℃、好ましくは多くとも33℃、好ましくは多くとも32℃、好ましくは多くとも31℃の温度の培地中で培養される。

【0134】

好ましくは、少なくとも1種の腐生菌は、工程a)において、少なくとも24時間、好ましくは少なくとも36時間、好ましくは少なくとも48時間、好ましくは少なくとも60時間、好ま

50

しくは少なくとも72時間、好ましくは少なくとも84時間、好ましくは少なくとも96時間、好ましくは少なくとも108時間、好ましくは少なくとも120時間、好ましくは少なくとも132時間、好ましくは少なくとも144時間、好ましくは少なくとも156時間、好ましくは少なくとも168時間にわたって培地中で培養される。

【0135】

本発明の更に好ましい実施形態では、少なくとも1種の腐生菌は、工程a)において、多くとも240時間、好ましくは多くとも216時間、好ましくは多くとも192時間、好ましくは多くとも180時間、好ましくは多くとも168時間、好ましくは多くとも156時間、好ましくは多くとも144時間、好ましくは多くとも132時間、好ましくは多くとも120時間、好ましくは多くとも108時間、好ましくは多くとも96時間、好ましくは多くとも84時間、好ましくは多くとも72時間にわたって培地中で培養される。

10

【0136】

本発明の好ましい実施形態によれば、工程a)における少なくとも1種の腐生菌の培養は、培養中に浸透圧的に有効な薬剤を添加せずに、特に、培養中に少なくとも1種の塩を添加せずに行われる。特に好ましくは、工程a)における少なくとも1種の腐生菌の培養は、培養中に塩化ナトリウム(NaCl)を添加せずに行われる。

【0137】

本発明の好ましい実施形態では、工程a)における少なくとも1種の腐生菌の培養は、バッチモードで行われる。好ましくは、工程a)における少なくとも1種の腐生菌の培養は、フェドバッチモードで行われる。別の好ましい実施形態では、工程a)における少なくとも1種の腐生菌の培養は、連続モードで行われる。

20

【0138】

本発明の更に好ましい実施形態では、エリスリトールは、結晶化によって工程c)において回収される。

【0139】

本発明の特に好ましい実施形態では、工程b)におけるエリスリトールの回収は、
i) バイオマスの除去、好ましくは、遠心分離及び膜濾過によるバイオマスの除去、
ii) 培地の脱色、好ましくは活性炭による培地の脱色、
iii) 培地の脱塩、好ましくは電気透析による培地の脱塩及び脱色、
iv) 分取クロマトグラフィー、好ましくは、イオン排除及びサイズ排除機構を使用した逆相クロマトグラフィー、並びに
v) エリスリトールの濃縮及び結晶化の工程を含む。

30

【0140】

本発明の好ましい実施形態によれば、熱変性工程は、工程i)の前、間又は後に行われる。好ましくは、熱変性工程は、工程i)の前に行われる。更に好ましい実施形態では、熱変性工程は、工程i)の間に行われる。好ましくは、熱変性工程は、工程i)の後に行われる。

【0141】

特に好ましくは、熱変性工程は、少なくとも45℃、好ましくは少なくとも50℃、好ましくは少なくとも55℃、好ましくは少なくとも60℃、好ましくは少なくとも65℃、好ましくは少なくとも70℃、好ましくは75℃、好ましくは少なくとも80℃、好ましくは少なくとも85℃、好ましくは少なくとも90℃、好ましくは少なくとも95℃の温度に培地を加熱することを含む。

40

【0142】

本発明の好ましい実施形態では、培地は、少なくとも10秒、好ましくは少なくとも20秒、好ましくは少なくとも30秒、好ましくは少なくとも40秒、好ましくは少なくとも50秒、好ましくは少なくとも1分、好ましくは少なくとも2分、好ましくは少なくとも3分、好ましくは少なくとも4分、好ましくは少なくとも5分、好ましくは少なくとも6分、好ましくは少なくとも7分、好ましくは少なくとも8分、好ましくは少なくとも9分、好ましくは少なくとも10分にわたって熱変性かけられる。

50

【0143】

熱変性工程は主に、更なる回収工程を行う前に培地中のタンパク質及び酵素を熱不活化するのに役立つ。

【0144】

本発明の特に好ましい実施形態では、工程b)において回収されるエリスリトール、特に、工程v)において得られるエリスリトールは、少なくとも90%、好ましくは少なくとも92%、好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも97%、好ましくは少なくとも97.5%、好ましくは少なくとも98%、好ましくは少なくとも98.5%、好ましくは少なくとも99%、好ましくは少なくとも99.5%の純度を有する。

【0145】

本明細書で使用する用語「遺伝子組換え」及びその文法的同等物は、核酸(例えば、生物のゲノム内、特に腐生菌のゲノム内の核酸)の1つ以上の改変を意味する。「遺伝子組換え」腐生菌は、(特に不活性化された)遺伝子において、付加、欠失及び/又は改変された腐生菌を指すことができる。

【0146】

本発明の文脈において、用語「エリスロースレダクターゼ」は、アルドースのアルジトールへの可逆的還元を触媒する任意の酵素であって、エリスロースのエリスリトールへの還元に対して主に特異的活性を有する酵素に関する。そのため、本発明による「エリスロースレダクターゼ」は、基質であるエリスロースに対して高い特異性及び親和性を示す。特に、「エリスロースレダクターゼ」は、グリセロール等の任意の他の基質に対するよりもエリスロースに対して高い特異性を有する。

【0147】

本明細書で使用する「膜結合型アルジトールトランスポーター」という用語は、外膜を透過してアルジトールを可逆的に輸送するのに適した、特に細胞内で生成されたアルジトールを培地へと輸送するのに適した、膜タンパク質を指す。本発明によれば、「膜結合型アルジトールトランスポーター」は、細胞内で生成されたエリスリトールを、膜を透過して培地へと輸送するのに適している。

【0148】

本発明の文脈では、「トランスケトララーゼ」という用語は、ケトース供与体から受容体アルドペントースへのC-2ユニットのチアミン依存的可逆的転移を触媒する、ペントースリン酸経路の酵素を指す。特に、「トランスケトララーゼ」は、キシロース-5-リン酸からリボース-5-リン酸へのC-2ユニットの転移を触媒し、セドヘプツロース-7-リン酸(seduheptulose-7-phosphate)及びグリセルアルデヒド-3-リン酸を形成する。

【0149】

「トランスアルドラーゼ」という用語は、ケトース供与体から受容体アルドースへのC-3ユニットの可逆的転移を触媒する、ペントースリン酸経路の非酸化的过程の酵素を指す。特に、「トランスケトララーゼ」は、セドヘプツロース-7-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸へのC-3ユニットの転移を触媒し、エリスロース-4-リン酸及びフルクトース-6-リン酸を形成する。

【0150】

本発明の文脈では、「不活性化された」遺伝子は、一時的又は永久的に転写されることができない遺伝子、或いは転写され得るがその転写物が遺伝子翻訳のためにアクセスできない遺伝子である。本発明によれば、遺伝子の不活性化には、部分的又は完全な遺伝子欠失、部分的又は完全な遺伝子置換、遺伝子抑制、遺伝子挿入、及び遺伝子の突然変異による不活性化が含まれるが、これらに限定されない。本発明の文脈における「不活性化」は、転写物が遺伝子産物へと翻訳されるのを阻害する、(特にRNAi又はsiRNAによる)任意の転写後遺伝子調節を更に含む。

【0151】

本発明の文脈では、「非機能性」遺伝子は、生物のゲノム又は生物中のプラスミドに存在する遺伝子であって、その遺伝子は転写されないか、又は転写されるがその転写物は遺伝

10

20

30

40

50

子産物へと翻訳されないものである。

【0152】

本発明の文脈では、「削除された」遺伝子とは、以前は生物のゲノム又は生物中のプラスミドに存在していたが、生物のゲノム又は生物中のプラスミドから完全に欠失している遺伝子である。

【0153】

本発明の文脈では、「過剰発現させる」という動詞は、遺伝子を人工的に増量して発現させることを意味する。これには、誘導性プロモーターを用いた制御可能な遺伝子の誘導性過剰発現と、構成的プロモーターを用いた遺伝子の常時過剰発現とが含まれる。

【0154】

「オリゴマー糖」又は「オリゴマーC-5及びC-6糖」という用語は、本明細書中、少なくとも2つのモノマーで構成される、好ましくはC-5及びC-6糖から選択される少なくとも2つのモノマーで構成される二糖、オリゴ糖、及び多糖について使用される。

【0155】

本発明の文脈において、「1つの」という用語は、「1つの」又は「1つ以上の」という意味を包含する。

【0156】

本発明の文脈では、「含む(comprising)」という用語は、好ましくは「含有する(Containing)」又は「含む(including)」の意味を有し、更なる要素の存在を排除することなく、具体的に特定された要素を含むことを意味する。しかしながら、好ましい実施形態では、「含む(comprising)」という用語は、「から本質的になる(consisting essentially of)」の意味も有すると理解され、更に好ましい実施形態では、「からなる(consisting of)」の意味も有すると理解される。

【0157】

本明細書では、「及び/又は」という用語は、リスト内に連ねられた個々の要素の任意の組み合わせの開示を表現するために使用される。単なる例として、「A、B、及び/又はC」という表現は、Aのみ、Bのみ、Cのみ、(A及びB)、(B及びC)、(A及びC)、並びに(A、B及びC)を意味し得る。

【0158】

本発明の更に好ましい実施形態は、従属項の主題である。

【0159】

以下の実施例及び添付の図面によって、本発明を更に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0160】

【図1】図1は、炭素源として50g/L、70g/L又は90g/Lのグルコース及び窒素源として80mMの尿素を含む培地中での168時間のインキュベーション後のトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)によるエリスリトール産生に対する、培地中の炭素源濃度の影響を示す。

【図2】図2は、炭素源として70g/Lのグルコース及び窒素源として20mM、60mM又は80mMの尿素を含む培地中での168時間のインキュベーション後のトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)によるエリスリトール産生に対する、培地中の窒素源濃度の影響を示す。

【図3】図3は、炭素源として10g/L、50g/L又は100g/Lのグルコース及び窒素源として20mMの硫酸アンモニウムを含む培地中での24、48、72、96及び120時間のインキュベーション後の、遺伝子改変された株QM6a Δ tmus53 fps1(Reas11) err1(Rep4) Δ mpdh(「改変株」)及び対応する親株QM6a Δ tmus53(「PS」)によるエリスリトール産生に対する初期炭素源濃度の影響を示す。

【図4】図4は、炭素源として50g/Lのグルコースを含む培地中での96時間の培養後の、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)(QM6a Δ tmus53)のエリスリトール産生に対する、20mM又は80mMの濃度の異なる窒素源の効果を示す。

【図5】図5は、炭素源として50g/Lのグルコース及び20mM又は80mMのそれぞれの窒素源を

10

20

30

40

50

含む培地中で96時間の培養後のトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)(QM6a Δ tmus53)のバイオマス生成(乾燥重量)に対する窒素源の影響を示す。

【図6】図6は、70g/Lのグルコース及び60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM若しくは120mMの尿素を含む培地又は50g/Lのグルコース及び80mMの尿素を含む培地(右側のバー)中での168時間の培養後のトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)(QM6a Δ tmus53)のエリスリトール産生に対する尿素濃度の影響を示す。

【0161】

(実施例)

1. エリスリトールのバイオ技術による生産

1.1 エリスリトール産生に対する炭素源濃度の影響

トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)を、炭素源として50g/L、70g/L又は90g/Lのグルコース及び窒素源として80mMの尿素を含有する100mLの培地をそれぞれ含む250mLのフラスコ中で培養した。

【0162】

168時間の培養後、エリスリトール濃度を、試料の培地中で測定した。試料中のエリスリトールの平均濃度は、0.733g/L(50g/Lグルコース)、0.978g/L(70g/Lグルコース)、及び0.952g/L(90g/Lグルコース)であった(図1を参照されたい)。

【0163】

1.2 エリスリトール産生に対する窒素源濃度の影響

同様の実験において、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)を、炭素源として70g/Lのグルコース及び窒素源として20mM、60mM又は80mMの尿素を含有する100mLの培地をそれぞれ含む250mLのフラスコ中で培養した。

【0164】

168時間の培養後、試料の培地中のエリスリトール濃度を測定した。試料中のエリスリトールの平均濃度は、0.051g/L(20mM尿素)、0.55g/L(60mM尿素)、及び0.978g/L(80mM尿素)であった(図2を参照されたい)。

【0165】

1.3 遺伝子改変された株及び対応する親株によるエリスリトールの産生に対する初期グルコース濃度の影響

トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株QM6a Δ tmus53 fps1(Reas11) err1(Repyr4) Δ mpdh(「改変株」)及び対応する親株QM6a Δ tmus53(「PS」)を、炭素源として10g/L、50g/L又は100g/Lのグルコース及び窒素源として20mMの硫酸アンモニウムを含有する100mLの培地をそれぞれ含む250mLのフラスコ中で培養した。

【0166】

24、48、72、96、及び120時間の培養後、エリスリトール濃度を、試料の培地中で測定した(表1及び図3を参照されたい)。10g/Lのグルコースを含有する培地中でのみ、エリスリトールを検出することができなかった。

【0167】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1: エリスリトール濃度

インキュベーション 時間	エリスリトール濃度 [g/L]					
	改変株 10 g/L	親株 (PS) 10 g/L	改変株 50 g/L	親株 (PS) 50 g/L	改変株 100 g/L	親株 (PS) 100 g/L
24 時間	0	0	0	0	0	0
48 時間	0	0	0.0045	0.0025	0.0075	0.002
72 時間	0	0	0.014	0.011	0.016	0.01
96 時間	0	0	0.0255	0.023	0.018	0.012
120 時間	0	0	0.0305	0.026	0.0225	0.016

10

【0168】

1.4 トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)によるエリスリトール産生に対する異なる窒素源の影響

トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)のエリスリトール産生に対する異なる窒素源の効果を調査するために、炭素源として50g/Lのグルコース及び窒素源として20mM又は80mMの硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、又は尿素のいずれかを含む100mLの培地を含む250mLのフラスコ中で、QM6a△tmus53株を培養した。

20

【0169】

96時間の培養後、エリスリトール濃度を、試料の培地中で測定した。試料中のエリスリトールの平均濃度は、0.018g/L(50g/Lグルコース、20mM NH_4^+)、0.028g/L(50g/Lグルコース、80mM NH_4^+)、及び0.03g/L(50g/Lグルコース、20mM尿素)、0.301g/L(50g/Lグルコース、80mM尿素)であった。窒素源として20又は80mMの NO_3^- を用いた場合において96時間後に培地中でエリスリトールを検出することができなかった(図4を参照されたい)。

【0170】

1.5 トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)の増殖に対する異なる窒素源の影響
炭素源として50g/Lのグルコース及び窒素源として20mM又は80mMの硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、又は尿素のいずれかを含む100mLの培地をそれぞれ含む250mLのフラスコ中で、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)(QM6a△tmus53)を培養した。

30

【0171】

96時間の培養後、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)の乾燥重量を、異なる試料中で測定した。平均重量は、0.384g(50g/Lグルコース、20mM NH_4^+)、0.417g(50g/Lグルコース、80mM NH_4^+)、0.107g(50g/Lグルコース、20mM NO_3^-)、0.117g(50g/Lグルコース、80mM NO_3^-)、0.557g(50g/Lグルコース、20mM尿素)、及び1.007g(50g/Lグルコース、80mM尿素)であった(図5を参照されたい)。

【0172】

1.6 エリスリトールの収量に対する培地中の尿素濃度の効果

培養の間にトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)(QM6a△tmus53)によって消費されるグルコースの量を参照した、エリスリトールの収量に対する培地中の尿素濃度の影響を調査した。この目的のために、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)を、炭素源として70g/Lのグルコース及び窒素源として60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM又は120mMの尿素を含む100mLの培地を含む250mLのフラスコ中で培養した。炭素源として50g/Lのグルコース及び窒素源として80mMの尿素を含む100mLの培地の存在下でのトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)の培養についても、エリスリトールの収量を測定した。

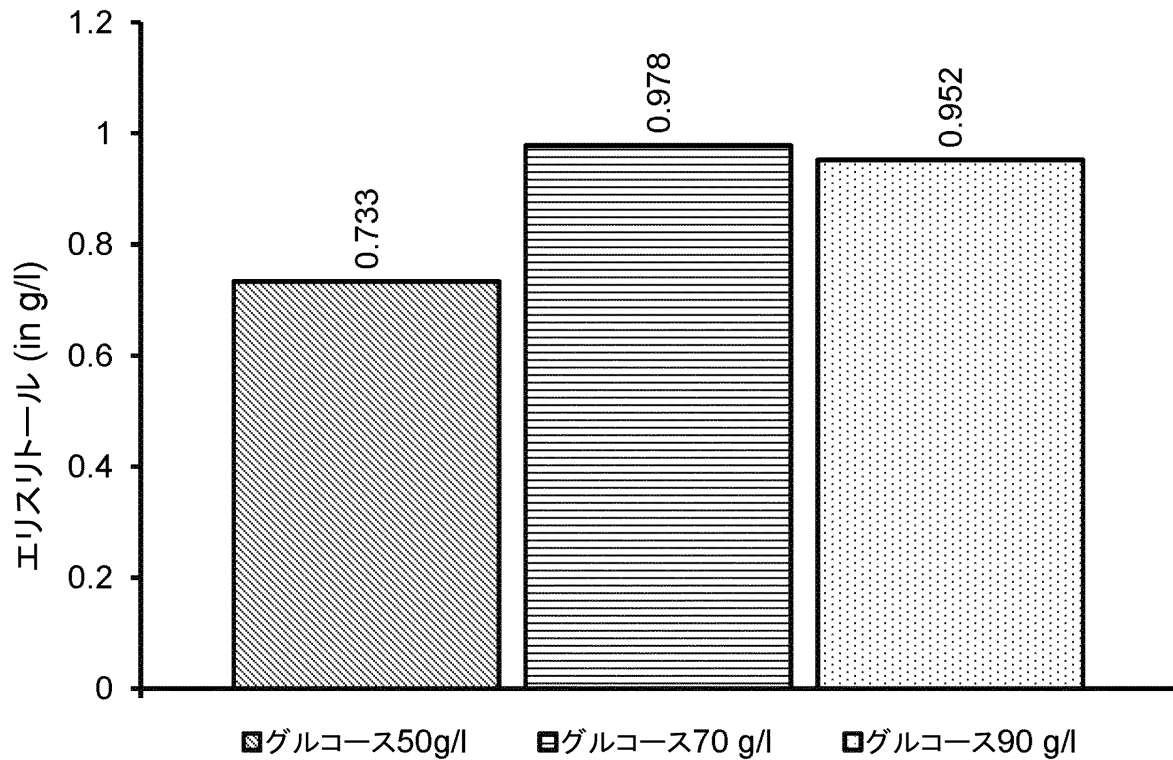
40

。【0173】

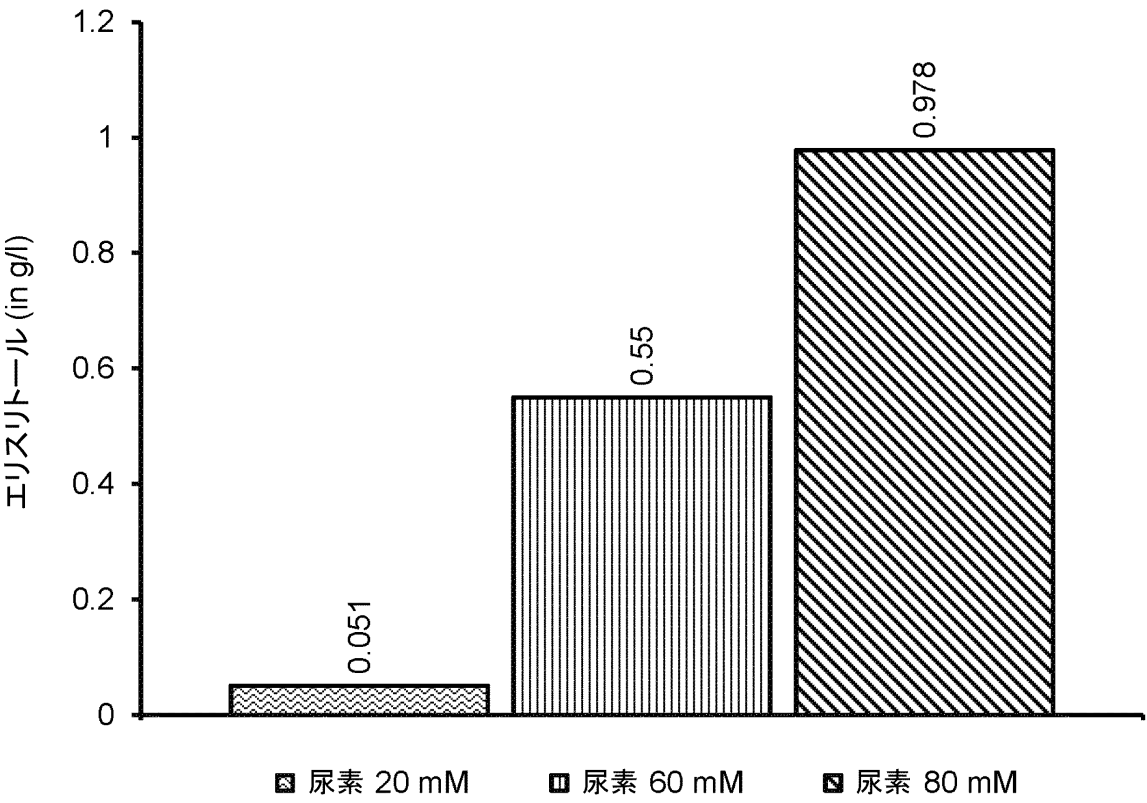
50

168時間の培養後、培地中のエリスリトール濃度及びグルコース濃度の低下を、異なる試料中で測定した。エリスリトールの平均収量(消費されたグルコース1 gあたりのエリスリトールのmg数)は、3.03mg/g(70g/Lグルコース、60mM尿素)、18.59mg/g(70g/Lグルコース、70mM尿素)、15.2mg/g(70g/Lグルコース、80mM尿素)、14.3mg/g(70g/Lグルコース、90mM尿素)、9.92mg/g(70g/Lグルコース、100mM尿素)、8.47mg/g(50g/Lグルコース、110mM尿素)、5.23mg/g(70g/Lグルコース、120mM尿素)及び15.43mg/g(50g/Lグルコース、80mM尿素)であった(図6を参照されたい)。

【図1】



【図 2】



10

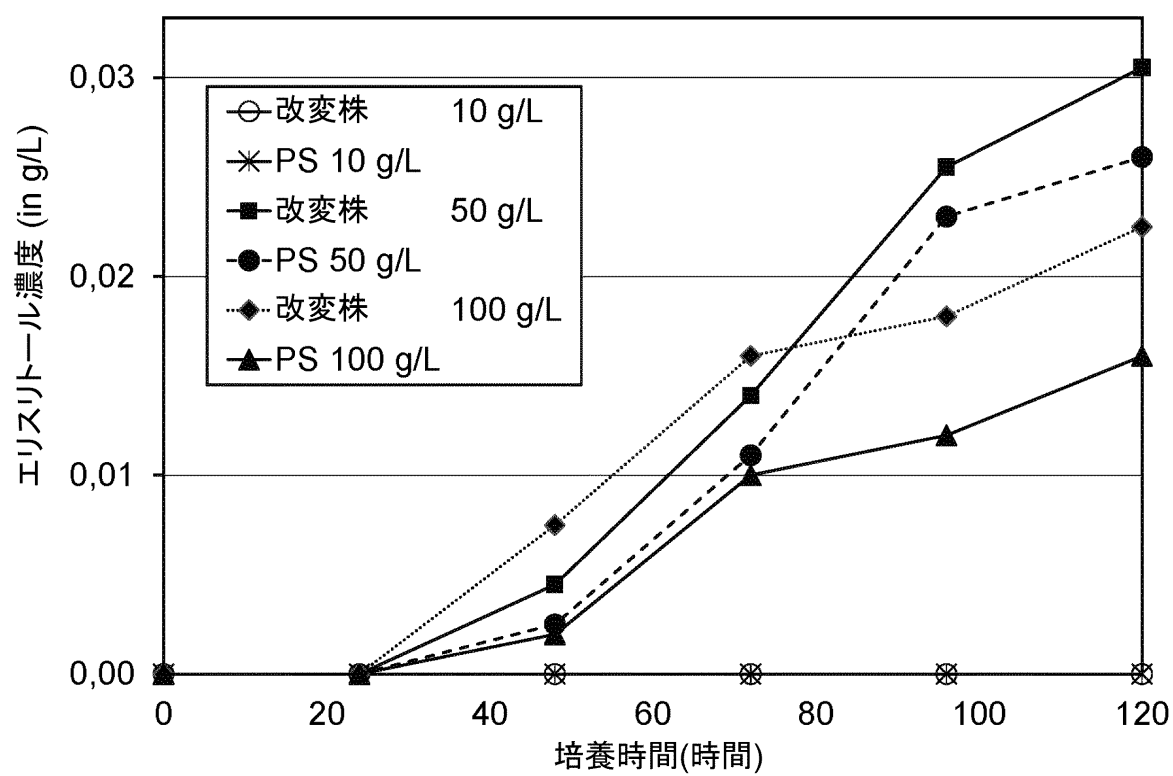
20

30

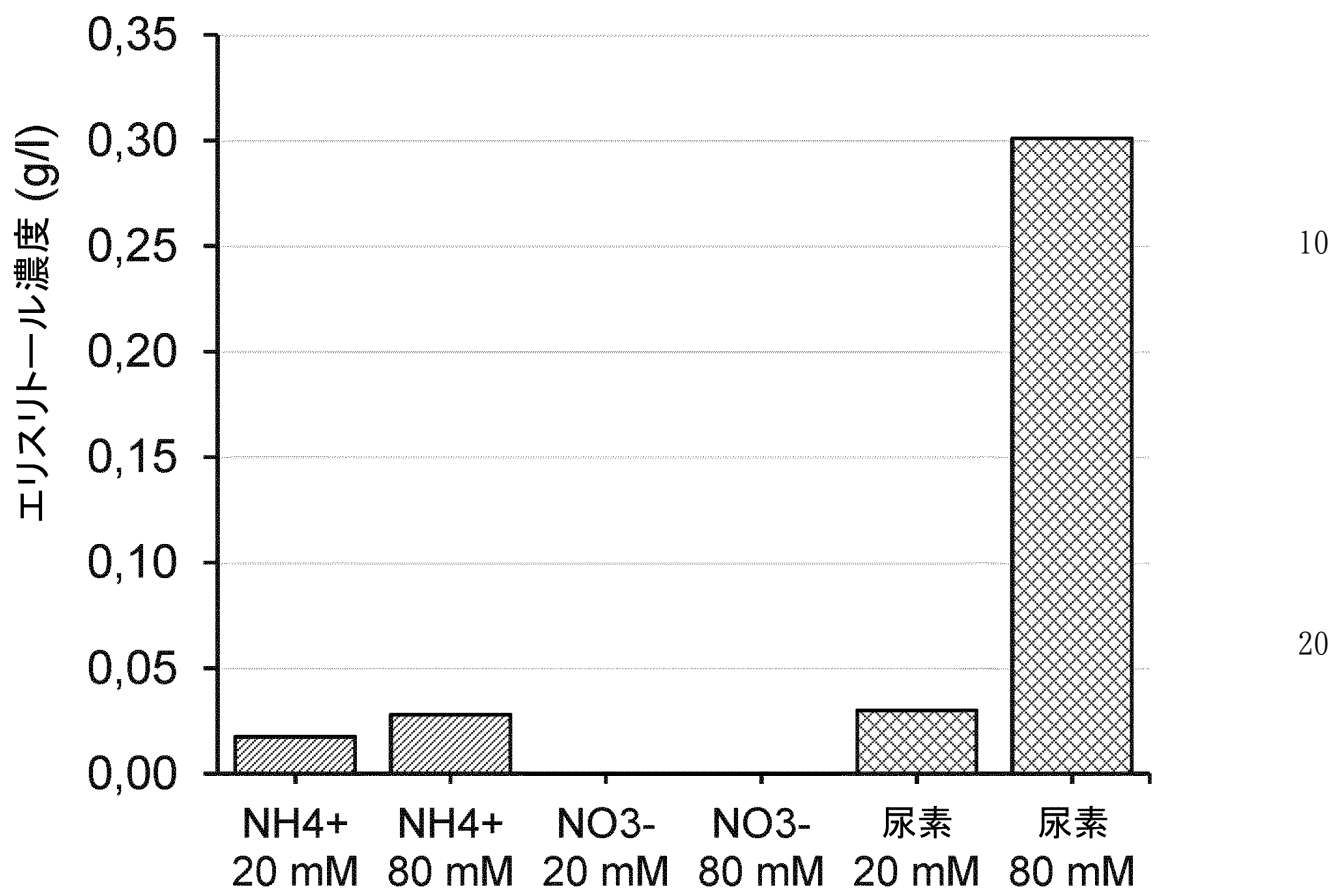
40

50

【図 3】



【図 4】

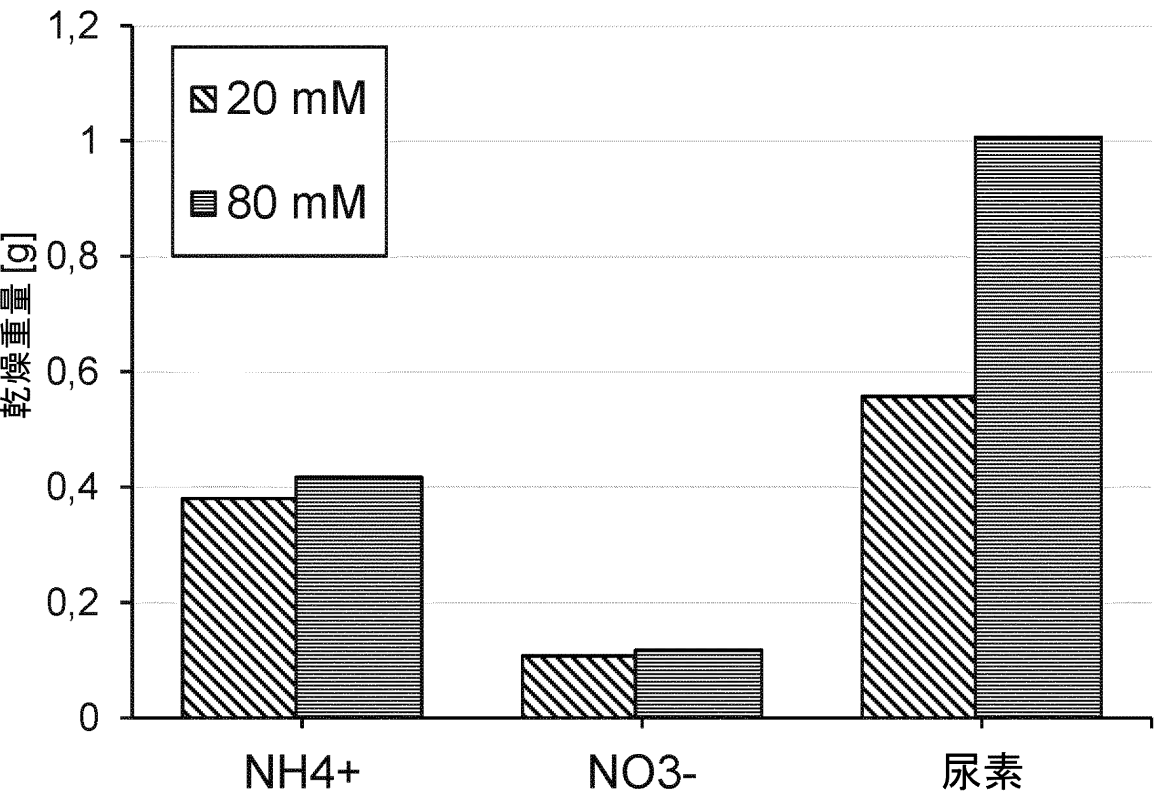


30

40

50

【図 5】



10

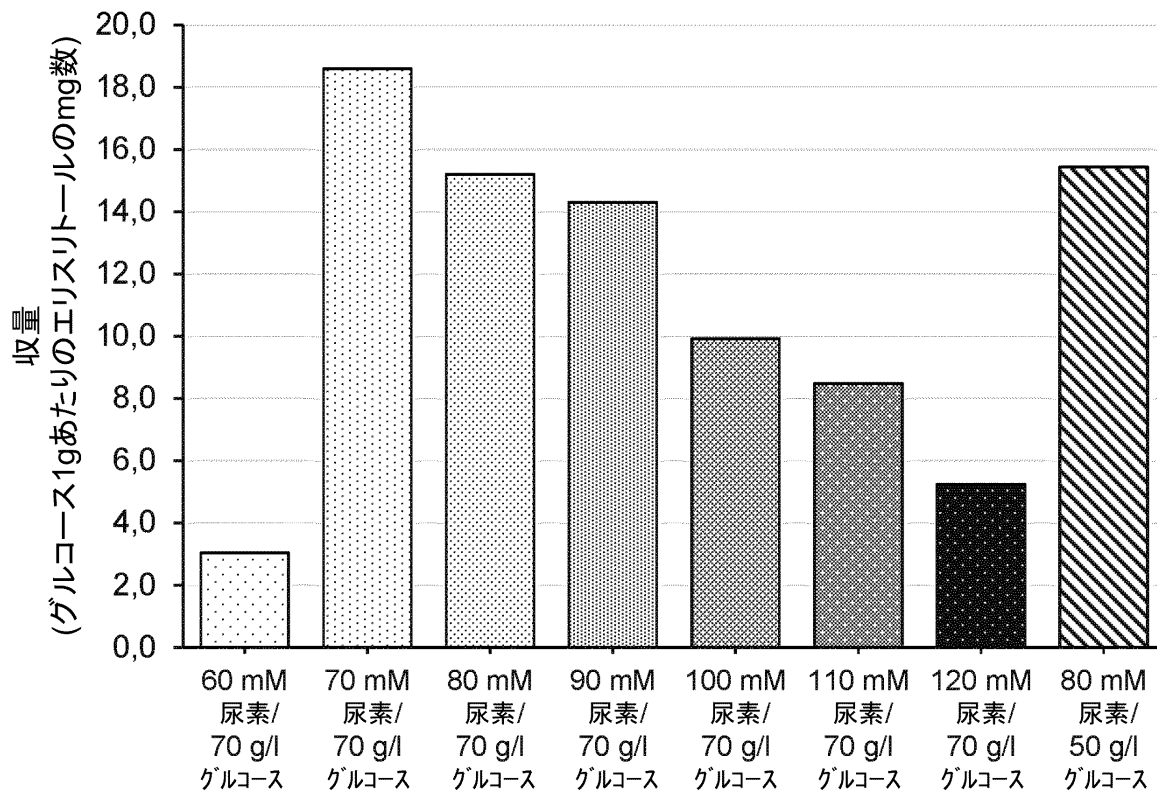
20

30

40

50

【図 6】



【配列表】

2025500941000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2022/086137
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P7/18 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		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, 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	LEE K J ET AL: "Optimized conditions for high erythritol production by Penicillium sp. KJ-UV29, mutant of Penicillium sp. KJ81", BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING, KOREAN SOCIETY FOR BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, SEOUL, KR, vol. 8, no. 3, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 173-178, XP008086830, ISSN: 1226-8372	1-3, 5, 7, 8, 11, 12
Y	abstract; table 2 page 176 - page 177; figure 4 ----- -/--	4, 6, 9, 10, 13-15
☒ 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 21 April 2023		Date of mailing of the international search report 03/05/2023
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 Schröder, Gunnar

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/086137

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOVANOVIĆ BIRGIT ET AL: "Erythritol production on wheat straw using <i>Trichoderma reesei</i> ", AMB EXPRESS , vol. 4, no. 1 1 December 2014 (2014-12-01), page 34, XP055927743, DOI: 10.1186/s13568-014-0034-y Retrieved from the Internet: URL:https://amb-express.springeropen.com/t rack/pdf/10.1186/s13568-014-0034-y.pdf abstract page 4 -----	4, 6, 9, 10
Y A	WO 2013/096693 A1 (XYLECO INC [US]) 27 June 2013 (2013-06-27) abstract; claims 1-26; examples 1-6 paragraphs [0044], [0129] -----	4, 6, 13, 14 7
Y	WO 2012/041894 A1 (ANNIRKI GMBH [AT]; MACH-AIGNER ASTRID [AT]; MACH ROBERT [AT]) 5 April 2012 (2012-04-05) abstract; claims 1, 2, 7, 8 penultimate paragraph; page 3 example; page 8 - page 9 -----	4, 6, 9, 10
Y	DAVID HELGA ET AL: "CreA influences the metabolic fluxes of <i>Aspergillus nidulans</i> during growth on glucose and xylose", MICROBIOLOGY , vol. 151, no. 7 1 July 2005 (2005-07-01), pages 2209-2221, XP055927826, Reading ISSN: 1350-0872, DOI: 10.1099/mic.0.27787-0 Retrieved from the Internet: URL:https://www.microbiologyresearch.org/d ocserver/fulltext/micro/151/7/mic1512209.p df?expires=1654247773&id=id&accname=guest& checksum=8BBE37D4EFFBE5F5336B066B0EF7EC08 abstract; table 1 paragraph "Growth medium"; page 151, right-hand column ----- -/--	9, 10

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/086137

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEE-JUNG MOON ET AL: "Biotechnological production of erythritol and its applications", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 86, no. 4, 26 February 2010 (2010-02-26), pages 1017-1025, XP019800001, ISSN: 1432-0614 the whole document -----	4, 6, 13, 14
Y	EP 0 327 016 A2 (MITSUBISHI CHEM IND [JP]; NIKKEN CHEMICALS CO LTD [JP]) 9 August 1989 (1989-08-09) abstract; claims 1-7; examples 1, 2 -----	13-15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 3 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2022/086137
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/086137

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013096693 A1	27-06-2013	AU 2012358368 A1	12-06-2014
		AU 2017200438 A1	16-02-2017
		AU 2018260890 A1	29-11-2018
		BR 112014015296 A2	13-06-2017
		CA 2858286 A1	27-06-2013
		CN 104011215 A	27-08-2014
		CN 108220347 A	29-06-2018
		CN 108315360 A	24-07-2018
		EA 201490895 A1	30-12-2014
		EA 201890345 A2	29-06-2018
		EP 2794892 A1	29-10-2014
		JP 6595769 B2	23-10-2019
		JP 2015500661 A	08-01-2015
		JP 2018029593 A	01-03-2018
		KR 20140111670 A	19-09-2014
		MX 348055 B	25-05-2017
		MX 366769 B	24-07-2019
		MY 169799 A	16-05-2019
		MY 171298 A	07-10-2019
		NZ 625335 A	26-02-2016
		NZ 716083 A	23-12-2016
		NZ 719871 A	27-10-2017
		PH 12014501148 A1	28-07-2014
		SG 10201607158U A	28-10-2016
		SG 11201402958W A	26-09-2014
		UA 116098 C2	12-02-2018
		US 2014004574 A1	02-01-2014
		US 2018216150 A1	02-08-2018
		US 2020017894 A1	16-01-2020
		WO 2013096693 A1	27-06-2013
WO 2012041894 A1	05-04-2012	EP 2436772 A1	04-04-2012
		US 2013210099 A1	15-08-2013
		WO 2012041894 A1	05-04-2012
EP 0327016 A2	09-08-1989	DE 68911158 T2	19-05-1994
		EP 0327016 A2	09-08-1989
		US 4906569 A	06-03-1990

 フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 マッハーアイグナー, アストリッド

オーストリア国 1060 ウィーン, グンペンドルファー シュトラーセ 1アー, テクニーシェ ユニヴェルジテート ウィーン, インスティテュート フュール フェアファーレンステクニク, ウムヴェルトテクニク, ウント テクニーシェ バイオヴィッセンシャフテン

(72)発明者 マッハ, ロベルト

オーストリア国 1060 ウィーン, グンペンドルファー シュトラーセ 1アー, テクニーシェ ユニヴェルジテート ウィーン, インスティテュート フュール フェアファーレンステクニク, ウムヴェルトテクニク, ウント テクニーシェ バイオヴィッセンシャフテン

(72)発明者 マシ, オードリ

オーストリア国 1060 ウィーン, グンペンドルファー シュトラーセ 1アー, テクニーシェ ユニヴェルジテート ウィーン, インスティテュート フュール フェアファーレンステクニク, ウムヴェルトテクニク, ウント テクニーシェ バイオヴィッセンシャフテン

(72)発明者 ダサ セルナ, ローラ ヴァネッサ

オーストリア国 1060 ウィーン, グンペンドルファー シュトラーセ 1アー, テクニーシェ ユニヴェルジテート ウィーン, インスティテュート フュール フェアファーレンステクニク, ウムヴェルトテクニク, ウント テクニーシェ バイオヴィッセンシャフテン

(72)発明者 フリートル, アントン

オーストリア国 1060 ウィーン, ゲトライデマルクト 9, テクニーシェ ユニヴェルジテート ウィーン, インスティテュート フュール フェアファーレンステクニク, ウムヴェルトテクニク, ウント テクニーシェ バイオヴィッセンシャフテン

(72)発明者 シュタルク, ゲオルク

オーストリア国 1060 ウィーン, グンペンドルファー シュトラーセ 1アー, テクニーシェ ユニヴェルジテート ウィーン, インスティテュート フュール フェアファーレンステクニク, ウムヴェルトテクニク, ウント テクニーシェ バイオヴィッセンシャフテン

Fターム(参考) 4B064 AC05 CA05 CC03 CC10 CD09 CD12 CD19 CE00 DA10

4B065 AA62X AA63X AA68X AA70X BB12 BB15 BB17 BB18 CA07 CA41