

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011 年 5 月 19 日(19.05.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/059082 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 19/14 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/070267
- (22) 国際出願日: 2010 年 11 月 15 日(15.11.2010)
- (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 2009-260837 2009 年 11 月 16 日(16.11.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 花王株式会社 (KAO CORPORATION) [JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目 1 4-1 O Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山田 泰司 (YAMADA, Yasushi) [JP/JP]; 〒3140103 茨城県神栖市東深芝 2 O 花王株式会社研究所内 Ibaraki (JP). 花木 恵悟 (HANAKI, Keigo) [JP/JP]; 〒3140103 茨城県神栖市東深芝 2 O 花王株式会社研究所内 Ibaraki (JP). 西田 真人 (NISHIDA, Masato) [JP/JP]; 〒3140103 茨城県神栖市東深芝 2 O 花王株式会社研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT

OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, LR, 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 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF MONOSACCHARIDE, DISACCHARIDE AND/OR OLIGOSACCHARIDE

(54) 発明の名称: 単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖の製造方法

(57) Abstract: A process for producing a monosaccharide, a disaccharide and/or an oligosaccharide, comprising allowing a hydrolase to act on a polysaccharide in the presence of a fatty acid.

(57) 要約: 多糖類に脂肪酸の存在下、加水分解酵素を作用させる単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖の製造方法。



WO 2011/059082 A1

明 細 書

発明の名称：単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖の製造方法 技術分野

[0001] 本発明は、多糖類、特にバイオマスから単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖（以下、総称して「分解糖」ともいう）を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、化石資源に代えてセルロース系、デンプン系、或いは糖質系のバイオマスからエタノールや乳酸等の有用物質を製造する技術の開発が望まれている。とりわけ、非食糧資源であるセルロース系バイオマスを有効利用する技術への関心が高まっている。

バイオマスからのエタノール等の製造は、バイオマスを糖化工程において糖に分解した後、これを発酵工程においてエタノール等に変換することにより行うことができる。糖化は、硫酸等を用いる酸糖化と酵素糖化に大別される。

[0003] 酵素糖化は、酸糖化に比して緩和な条件で加水分解できる等の利点があるが、特にセルロース系バイオマスを利用する場合、反応速度が非常に遅く、糖化率の向上が大きな課題になっている。

糖化率向上のための技術として、糖化工程に先立って予めバイオマスを前処理する方法が検討されている。前処理方法としては、例えば、硫酸法、有機溶媒法、水熱処理法、機械的破碎等が知られている。

[0004] また、酵素反応時に第3成分を添加して糖化率を向上させる検討も行われ、例えば、リグノセルロース系植物材料を粉碎処理した後、小麦フスマ及び界面活性剤を添加して糖化酵素により糖化处理する方法（特許文献1）；リグニンと親和性の高い物質、例えばタンパク質を予め添加した後、加水分解酵素により反応を開始するセルロースの糖化方法（特許文献2）；ポリエチレングリコールを添加してセルラーゼによりバイオマスを加水分解する方法（非特許文献1）等が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2007-97575号公報

特許文献2：特開2009-72144号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Enzyme Microb. Technol., 40, 754(2007)

発明の概要

[0007] 本発明は、多糖類に脂肪酸の存在下、加水分解酵素を作用させる単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖の製造方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

[0008] [図1] 図1は、木材パルプの粉碎物にセルラーゼを作用させた時の糖化率に及ぼす脂肪酸の影響を示した図である。

発明を実施するための形態

[0009] セルロース系バイオマスを機械的破碎等で前処理した後に酵素糖化に供した場合でも、経時的に反応速度が低下し、十分な糖化率が得られない場合があることが判明した。

一方で、従来の酵素反応時に界面活性剤を添加する方法では、加水分解率を高めるため添加量を多くすると酵素が失活してしまい、却って糖化率が低下する場合がある。また、上記いずれの添加成分も水溶性であるため加水分解後の糖溶液からの除去が困難で、操作が煩雑になる。

従って、本発明は、反応速度の低下を抑制し、効率よく多糖類から分解糖を製造することのできる方法を提供することに関する。

[0010] 本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意検討したところ、多糖類に脂肪酸の存在下で加水分解酵素を作用させることにより、反応速度の低下が抑制され、糖化率が向上し、効率よく分解糖を製造できることを見出した。

セルロース系バイオマスは、通常、植物を構成する細胞壁や細胞間層にリグニンを多量に含み、これがセルラーゼによる加水分解を阻害していると考え

えられている。そのため、上記従来技術では、原料に含まれるリグニンをマスキングすることにより、セルラーゼのリグニンへの吸着を抑制し、セルロースにセルラーゼを作用させ易くして糖化率向上を試みている。これに対し、本発明者らは、脂肪酸の存在下で酵素による加水分解反応を行えば、リグニンを含む原料だけでなく、リグニンを含まない原料であっても高い糖化率が得られることを見出した。

[0011] 本発明によれば、糖化率を向上させることができ、分解糖を効率よく製造することが可能になる。本発明方法は、多糖類を含むバイオマスにも適用可能であり、バイオマスからのエタノール等有用物質の製造を高効率化する技術として期待できる。

[0012] 本発明で用いられる多糖類としては、例えば、セルロース、ヘミセルロース、キシログルカン、ペクチン、澱粉、マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、キチン、キトサン、イヌリン、アルギン酸、寒天、フコイダン、ラミナリン、 β -グルカン、プルラン等の天然多糖又はこれらの誘導体が挙げられる。これらは単独で又は2種以上を組み合わせる用いることができる。なかでも、安価かつ分解後の発酵生産により有用物質に変換可能である点から、セルロース、ヘミセルロース、キチン、キトサンが好ましく、特にセルロース、ヘミセルロースが好ましい。本発明で用いられる多糖類の分子量は、特に限定されないが、一般的には1,000以上5,000,000以下であることが好ましい。

[0013] また、本発明における多糖類として、前記多糖類を含む原料、例えば、バイオマスを用いることもできる。バイオマスとは、生物由来の有機資源で、化石資源を除いたものである。バイオマスとしては、セルロース系、デンプン系、或いは糖質系のバイオマスが挙げられ、これらは単独で又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

なかでも、資源の有効活用の点から、セルロースを含有するセルロース系バイオマスを用いることが好ましい。

[0014] セルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース及びリグニンを

主成分とするものであり、例えば、綿、木材系パルプ、ケナフ、麻、小径木、間伐材、おが屑、木屑、古紙、新聞紙、包装紙、ティッシュペーパー、トイレットペーパー、ダンボール等の木質系；バガス、スイッチグラス、エレファントグラス、稲ワラ、ムギワラ等の草木系のバイオマスが挙げられる。また、デンプン系バイオマスとしては、例えば、米、麦、トウモロコシ、イモ等が挙げられ、糖質系バイオマスとしては、サトウキビ、テンサイ、海藻、エビ殻、カニ殻等の糖質系バイオマスが挙げられる。

[0015] 多糖類としてバイオマスを用いる場合は、加水分解反応に先立って前処理を施してもよい。前処理方法としては、特に制限されず、例えば、硫酸法、有機溶媒法、水熱処理法、機械的破碎等が挙げられる。なかでも、乾燥、粉碎、細断等を行うのが好ましい。

乾燥は通気式バンド乾燥機、棚段式熱風乾燥機等を用いることができる。粉碎、細断は、例えば公知の回転ボールミル、遊星型ボールミル、ディスクミル、ロッドミル等を用いることができる。バイオマスの粉碎、細断は、加水分解酵素との接触表面積を大きくする点から、 $800\mu\text{m}$ 以下、特に $3\sim300\mu\text{m}$ のサイズまで行うのが好ましい。

バイオマスは、粉碎等の前処理により非晶化が進行し、非晶化されたバイオマスは酵素糖化に有利である。非晶化の程度は、実施例記載の結晶化度の算出により測定できる。バイオマスの結晶化度は 80% 以下が好ましく、 50% 以下がより好ましく、 20% 以下がさらに好ましく、ゼロであるものが特に好ましい。

[0016] 本発明において、多糖類の酵素による加水分解反応は脂肪酸の存在下で行われる。ここで、脂肪酸としては、直鎖又は分岐鎖状の飽和又は不飽和の脂肪酸が挙げられる。脂肪酸の融点は、 60°C 以下、更に $-10\sim50^{\circ}\text{C}$ 、特に $-5\sim30^{\circ}\text{C}$ であるのが、加水分解後の糖溶液からの分離・回収が容易である点、取扱が容易である点、分散効率の点、及び糖化率向上の点から好ましい。また、脂肪酸の炭素数に特に制限はないが、同様の理由から、炭素数 $6\sim24$ 、更に炭素数 $6\sim22$ 、特に炭素数 $6\sim20$ 、殊更に炭素数 $6\sim1$

2であるのが好ましい。具体的には、カプロン酸、エナント酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、イソステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等が挙げられる。なかでも、カプリル酸が好ましい。

[0017] 脂肪酸の使用量は、糖化率向上の点から、基質である多糖類の乾燥固形分に対する質量比として0.005～2.0が好ましく、更に0.008～1.0、特に0.009～0.8、殊更0.01～0.29が好ましい。

[0018] 多糖類はスラリー状にして用いるのが好ましく、スラリー中の多糖類の含有量は、流動性の点から、1～200 g/L、更に5～150 g/L、特に8～100 g/Lとするのが好ましい。スラリーとしては、水、各種緩衝液等が挙げられる。水としては、水道水、蒸留水、イオン交換水、精製水が例示される。緩衝液としては、pH 3～8の範囲に緩衝能を有するものが好ましく、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリス緩衝液等が例示される。

脂肪酸は、この多糖類を含むスラリーへ添加するのが好ましく、添加のタイミングは、加水分解酵素を添加する前でも後でもよい。

[0019] 本発明で用いられる加水分解酵素としては、多糖類に対して加水分解活性を有する酵素であれば特に制限はないが、例えば、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、マンノシダーゼ、アガラーゼ、ラクトーゼ、ムタナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ等が挙げられる。

加水分解酵素は、その起源に限定はなく、さらに、遺伝子組み換え技術、部分加水分解等による人工酵素であってもよい。

また、加水分解酵素の形態は特に限定されず、酵素蛋白質の乾燥物、酵素蛋白質を含む粒子、及び酵素蛋白質を含む液体等を用いることができる。

[0020] 加水分解酵素の使用量は、加水分解反応の条件、多糖類の種類等によって異なるが、例えば、セルラーゼの場合、多糖類1 gあたり1～200 FPU

が好ましく、特に5～50 FPUが好ましい。ここでFPU活性は以下に示すIU PAC法により測定される。まず、濾紙（ワットマンNo. 1）50 mgを基質とし、これに酵素液0.5 mLと0.05 Mクエン酸緩衝液（pH 4.8）1.0 mLを加え、50℃で1.0時間酵素反応を行った後、ジニトロサリチル酸試薬3.0 mLを加え、100℃で5.0分間加熱し発色させる。冷却後、これにイオン交換水20 mLを加え540 nmの波長で比色定量する。1分間に1 μ molのグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量を1ユニット（FPU）とする。

[0021] 多糖類と加水分解酵素との反応は、使用する酵素の特性に合わせて温度やpHを選択することが可能であるが、例えば、セルラーゼを用いる場合、pH 3～8、特にpH 4～7とすることが好ましく、温度は10～80℃、特に20～60℃とすることが好ましい。また、反応温度は、脂肪酸が液体で存在する条件であることが好ましい。

[0022] 反応時間は、多糖類の種類等によって異なるが、糖化率及び生産効率の点から、例えば、1～240時間が好ましく、更に2～200時間、特に3～140時間が好ましい。

[0023] 加水分解反応終了後、反応液を分解糖を含む糖溶液と脂肪酸とに分離してもよい。分解糖を含む糖溶液と脂肪酸とを分離する方法としては、特に制限されず、例えば遠心分離やデカンテーションにより行うことができる。回収した脂肪酸は、再利用してもよい。

[0024] かくして、加水分解反応により得られる単糖類としては、例えば、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、キシロース、アラビノース等が挙げられる。また、二糖類としては、セロビオース、マルトース、ジ-N-アセチルキトビオース等が挙げられ、オリゴ糖としては3～10の単糖単位を有するものをいい、例えば、セロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオース、セロヘキサオース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、トリ-N-アセチルキトトリオース、テトラ-N-アセチルキトテトラオース、ペンタ-N-アセチ

ルキトペンタオース、ヘキサーN-アセチルキトヘキサオース等が挙げられる。

[0025] 本発明方法によれば、10～100%、更に15～100%、特に20～100%の糖化率で多糖類から分解糖を製造することができる。なお、糖化率とは、加水分解反応により生成した水溶性糖（グルコースに代表される単糖類、二糖類とオリゴ糖）の合計質量を、原料多糖類の質量で割った値を云い、後記記載の方法で求めることができる。

[0026] 得られる分解糖は、これら分解糖を糖源として、微生物発酵を行ったり、化学変換したりすることにより、エタノール、ポリ乳酸、アミノ酸、キシリトールやエリスリトール等の有用物質を製造することができる。

実施例

[0027] <水溶性糖濃度（単糖類濃度、二糖類濃度、オリゴ糖濃度）の測定>

日立製作所製高速液体クロマトグラフを用い、昭和電工製カラムAsahiapak NH2P-50 4E（4.5mmφ×250m）を装着し、カラム温度20℃でグラジエント法により行った。移動相A液はアセトニトリル、B液は30%メタノール水とし、1.00mL/分で送液した。グラジエント条件は以下のとおりである。

時間（分）	A液（%）	B液（%）
0	20	80
45	50	50
45.1	20	80
55	20	80

試料注入量は5μL、検出はESA Biosciences社製コロナCAD検出器を用いた。

[0028] <糖化率の算出>

糖化率は次式（1）により算出した。

$$\text{糖化率（\%）} = \{ (\text{反応後の水溶性糖質量}) - (\text{反応前の水溶性糖質量}) \} / \text{原料多糖類の質量} \times 100 \quad (1)$$

[0029] <結晶化度の算出>

セルロース I 型結晶化度は、X 線回折法による回折強度値から S e g a l 法により算出したもので、次式 (2) により定義される。

$$\text{セルロース I 型結晶化度 (\%)} = \left[(I_{22.6} - I_{18.5}) / I_{22.6} \right] \times 100$$

(2)

[$I_{22.6}$ は、X 線回折における格子面 (002 面) (回折角 $2\theta = 22.6^\circ$) の回折強度、 $I_{18.5}$ は、アモルファス部 (回折角 $2\theta = 18.5^\circ$) の回折強度を示す]

なお、上記式 (2) で定義されたセルロース I 型結晶化度では計算上マイナスの値になる場合があるが、マイナスの値の場合はセルロース I 型結晶化度は 0% とする。

[0030] 実施例 1

微結晶粉末セルロース (シグマアルドリッチ製、含水率 5%、結晶化度 70%) 1.05 g を pH 5.0 の 0.1 M クエン酸緩衝溶液 19.95 g に分散させた。これにカプリル酸 0.29 g とセルラーゼ (ノボザイムズ製セルクラスト 1.5 L) 125 μ L を添加した (基質 1 g あたりの添加は 8.75 FPU)。加水分解は 50°C の恒温槽中、110 r/min で振とうしながら 72 時間行った。反応終了後、反応液をフィルターでろ過し、水溶性糖濃度を測定した。水溶性糖としては、グルコース、セロビオース、キシロースが測定された。反応条件と結果を表 1 に示す。

[0031] 実施例 2

カプリル酸の代わりにオレイン酸 0.18 g を使用した以外は実施例 1 と同様に反応を行った。反応条件と結果を表 1 に示す。

[0032] 比較例 1

脂肪酸を添加しない以外は実施例 1 と同様に反応を行った。反応条件と結果を表 1 に示す。

[0033]

[表1]

	実施例 1	実施例 2	比較例 1
多糖類(a)の種類	微結晶粉末セルロース	微結晶粉末セルロース	微結晶粉末セルロース
脂肪酸(b)の種類	カプリル酸	オレイン酸	なし
(b)/(a)*1 比 [g/g]	0.29	0.18	-
反応時間 [h]	72	72	72
糖化率 [%]	22.9	21.0	16.4

*1: 乾燥固形分換算(以下、同じ)

[0034] 実施例 3

シート状木材パルプ (Borregard社製Blue Bear Ultra Ether、セルロース含有量96質量%)を振動ロッドミル(φ30mm×13本)を用いて30分乾式粉碎した。処理後のセルロースの結晶化度はゼロであった。この非晶化セルロース(含水率14%)1.14gをpH5.0の0.1Mクエン酸緩衝溶液19.86gに分散させた。これにカプリル酸0.01gとセルラーゼ(ノボザイムズ製セルクラスト1.5L)を125μL添加した(基質1gあたりの添加は8.75FPU)。加水分解は50℃の恒温槽中で110r/minで振とうしながら240時間反応を行った。反応中、随時反応液のサンプリングを行い、各反応液をフィルターでろ過し、水溶性糖濃度を測定した。水溶性糖としては、グルコース、セロビオース、キシロースが測定された。反応条件と120時間反応させた時の結果を表2に示す。また、糖化率の経時変化を図1に示す。

[0035] 比較例 2

脂肪酸を添加しない以外は実施例3と同様に反応を行った。反応条件と結果を表2に示す。また、糖化率の経時変化を図1に示す。

[0036] [表2]

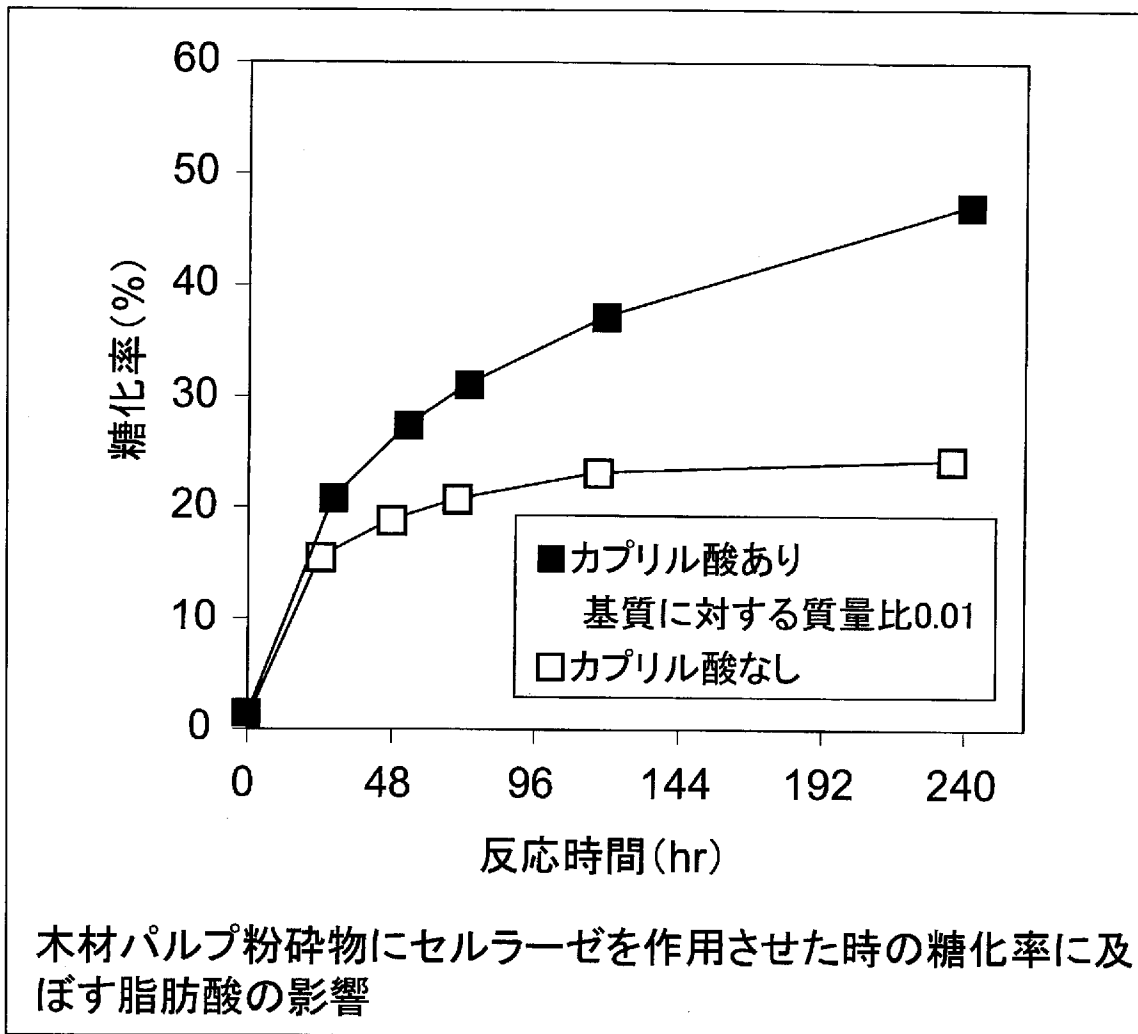
	実施例3	比較例 2
多糖類(a)の種類	非晶化セルロース	非晶化セルロース
脂肪酸(b)の種類	カプリル酸	なし
(b)/(a)比 [g/g]	0.01	-
反応時間 [h]	120	120
糖化率 [%]	37.3	23.2

[0037] 表 1 及び 2 から明らかなように、多糖類を脂肪酸の存在下で酵素加水分解した実施例 1 ～ 3 では、脂肪酸無添加の比較例 1 及び 2 に比べていずれも糖化率が向上した。特に、表 2 及び図 1 から明らかなように、非晶化された多糖類を用いることでより高い糖化率が得られた。

請求の範囲

- [請求項1] 多糖類に脂肪酸の存在下、加水分解酵素を作用させる単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖の製造方法。
- [請求項2] 多糖類の乾燥固形分に対する脂肪酸の質量比が0.005～2.0である請求項1記載の単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖の製造方法。
- [請求項3] 脂肪酸の融点が60℃以下である請求項1又は2記載の単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖の製造方法。
- [請求項4] 脂肪酸の炭素数が6～24である請求項1～3のいずれか1項記載の単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖の製造方法。
- [請求項5] 多糖類としてセルロース含有バイオマスを用いる、請求項1～4のいずれか1項記載の単糖類、二糖類、及び／又はオリゴ糖の製造方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/070267

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P19/14 (2006.01) i

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)

C12P19/14

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-274247 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 13 November 2008 (13.11.2008), entire text & WO 2008/123419 A1 & EP 2133366 A1 & US 2010/0151527 A	1-5

☐ 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
08 February, 2011 (08.02.11)

Date of mailing of the international search report
15 February, 2011 (15.02.11)

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（I P C））

Int.Cl. C12P19/14(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. C12P19/14

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 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）

CA/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII)

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 請求項の番号
X	JP 2008-274247 A（独立行政法人産業技術総合研究所）2008.11.13, 全文 & WO 2008/123419 A1 & EP 2133366 A1 & US 2010/0151527 A	1-5

☐ 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

の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

0 8 . 0 2 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

1 5 . 0 2 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

高堀 栄二

4 N

9 2 8 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8