

(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
2015年11月5日(05.11.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/166645 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/16 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/002175
- (22) 国際出願日: 2015年4月22日(22.04.2015)
- (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 2014-092206 2014年4月28日(28.04.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田1677-1 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: 山田 守(YAMADA, Mamoru); 〒7538511 山口県山口市吉田1677-1 国立大学法人山口大学農学部内 Yamaguchi (JP). ニチヨン スカンヤ(NITIYON, Sukanya); 〒7538511 山口県山口市吉田1677-1 国立大学法人山口大学農学部内 Yamaguchi (JP). ケオーウドネ チャンソム(KEO-LOUDONE, Chansom); POBox7322 ビエンチャン市サイタニー群ドンドクキャンパスラオス国立大学理学部内 Vientiane (LA).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目2番19号アドレビル6階 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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

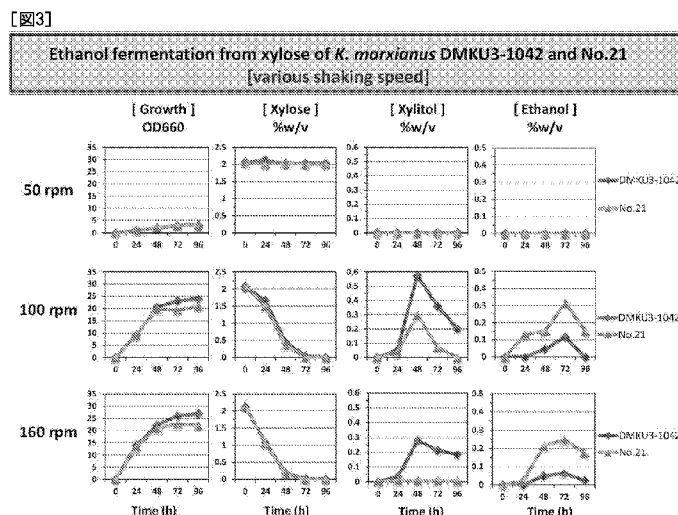
添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))

[続葉有]

(54) Title: YEAST HAVING XYLOSE ASSIMILATION ABILITY AND ETHANOL PRODUCTION ABILITY

(54) 発明の名称: キシロース資化能及びエタノール生産能を有する酵母



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a heat-resistant yeast that can assimilate xylose and produce ethanol, or of providing a mutant strain of said yeast, and of providing a method for assimilating xylose and producing ethanol. The present invention uses *Kluyveromyces marxianus* yeast strain No. 21 (deposit number NITE BP-01739) or uses a mutant strain thereof that has xylose assimilating ability and ethanol producing ability when cultured at 30°C under aerobic conditions from a culture medium that contains xylose as a sugar source. An ethanol production method that is characterized by culturing the yeast or the mutant strain thereof under aerobic conditions from a culture medium that includes xylose as a sugar source.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2015/166645 A1



-
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

キシロースを資化してエタノールを生産可能な耐熱性の酵母又はその変異株や、キシロースを資化してエタノールを生産する方法を提供することを課題とする。酵母*クワイペロマイセス・マルシアヌス* No. 21 株（受託番号：N I T E B P - O 1 7 3 9）、又は、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30℃で培養した場合にキシロース資化能及びエタノール生産能を有するその変異株を用いる。また、前記酵母又はその変異株を、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下で培養することを特徴とするエタノールの生産方法を行う。

明 細 書

発明の名称：

キシロース資化能及びエタノール生産能を有する酵母

技術分野

[0001] 本発明は、キシロース資化能及びエタノール生産能を有する酵母や、エタノールの生産方法に関し、より詳しくは、酵母クルイベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株（受託番号：NITE BP-01739）、又は、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30℃で培養した場合にキシロース資化能及びエタノール生産能を有するその変異株や、前記酵母又はその変異株を用いたエタノールの生産方法に関する。

背景技術

[0002] 地球温暖化が世界中で問題となっているなかで、微生物によって様々な原料から発酵生産されるバイオエタノールが注目されている。バイオエタノールはバイオマスから生成した糖を発酵して生産されるエタノールであり、再生可能な自然エネルギーであること、及びその燃焼によって大気中の二酸化炭素量を増やさないことから、化石燃料、特にガソリンに代替する燃料としての将来性が期待されている。

[0003] 現在、工業的なバイオエタノールの生産において、原料としては、サトウキビ、糖蜜等の糖質や、トウモロコシ、ジャガイモ、キャッサバ等のデンプンが用いられているため、食料や飼料の生産と競合するという問題が生じている。そこで、草本系や木質廃材等のリグノセルロース系バイオマスが次世代のバイオエタノール原料として着目されている。リグノセルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース、リグニン等から構成される。これまでにリグノセルロース系バイオマスを原料としたエタノール生産についての研究が進められ、リグノセルロースを物理的、化学的処理により糖化してエタノールを生産する方法として、例えば、雑草を使用し、前記雑草を緩衝液に浸漬して当該緩衝液に電圧を印加することにより雑草の通電処理物を得

る通電処理工程と、前記通電処理物を酵素により糖化物とする糖化工程と、前記糖化物を原料として酵母を添加してエタノール発酵を行う発酵工程とからなる処理方法（特許文献1参照）や、酵素糖化処理によって糖を製造し、さらにエタノール発酵によって糖からエタノールを製造する方法において、酵素糖化処理の前に、水酸化ナトリウム等の金属水酸化物のエタノール水溶液を用いて、リグノセルロース系バイオマスを蒸解処理することにより糖を製造することを特徴とする前処理方法（特許文献2参照）が提案されている。しかしながら、リグノセルロースの物理的、化学的処理はコストや環境負荷の問題が解決しておらず、未だ実用化には至っていない。

[0004] キシロースは五炭糖の一種であり、リグノセルロースの約25%を占める。かかるキシロースをバイオエタノール生産の原料とすることができれば、リグノセルロース系バイオマス活用が拡大すると期待される。しかしながら、一般的なエタノール生産酵母であるサッカロマイセス・セレビシエはキシロース資化能を有さないため、サッカロマイセス・セレビシエを用いた場合、キシロースをエタノール生産の原料とすることができない。

[0005] 近年、遺伝子組換え等によりキシロース資化能を付与した微生物、例えば、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物で形質転換し、キシロースを炭素源として利用する能力を付与された真菌宿主細胞（特許文献3参照）や、ADH1遺伝子及びADH4遺伝子を減弱化することで、キシロースからのエタノール収率を向上するように改変されたクルイベロマイセス属に属する変異体酵母（特許文献4参照）や、グリシン合成系タンパク質の遺伝子及び／又はメチオニン合成系タンパク質の遺伝子の発現機能を喪失させて、かつキシロース代謝酵素遺伝子を導入することで、キシロースの資化速度が上昇した微生物（特許文献5参照）が提案されている。

[0006] しかしながら、遺伝子組換え微生物は自然界に存在しない微生物であるため、生態系への影響の関係上、遺伝子組換え微生物を用いてエタノール生産を行なう場合には、エタノール生産を行った発酵タンクから遺伝子組換え微

生物が漏出しないように、気密性の高い設備を用意する必要がある等、いわゆる物理的封じ込めに関する多くの制約を生じる。さらに、漏出した場合に備えた付随装置も必要となると共に、発酵終了時には、完全に殺菌して廃棄しなければならない等のコスト高の要因となる。また、酵母では、グルコースの存在下で他の糖の代謝に係る経路が阻害される“グルコース抑制 (Glucose Repression)”の現象がよく知られており（非特許文献1参照）、グルコースを含む多様な糖で構成されるバイオマスからのエタノール生産における課題となっていた。

[0007] また、本発明者らは、耐熱性エタノール生産酵母であるクルイベロマイセス・マルシアヌスDMKU3-1042株を用い、糖源として様々な五炭糖や六炭糖を用いてエタノール生産を検討した（非特許文献2参照）。クルイベロマイセス・マルシアヌスDMKU3-1042株は耐熱性を有するため、高温での発酵が可能となる。したがって、クルイベロマイセス・マルシアヌスDMKU3-1042株を用いれば、発酵工程で生じた発酵熱により高温となった培養液を冷却するための設備に要するコストを低減できるが、五炭糖のみを糖源とするとエタノール生産性は非常に低いという問題があった。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特開2005-058055号公報
特許文献2：特開2013-042727号公報
特許文献3：特開2012-231794号公報
特許文献4：特開2012-210169号公報
特許文献5：特開2012-183013号公報

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Marian C (1999) Current Opinion in Microbiology 2:202-207
非特許文献2：Rodrussamee N et al. (2011) Appl. Microbiol. Biotechnol.

90:1573-1586

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 上述したように、微生物を利用して、キシロースを資化してエタノールを生産する方法が提案されているが、未だ低コストで効率よくキシロースを資化してエタノールを生産可能な株は得られていないのが現状であった。そこで、本発明の課題は、キシロースを資化してエタノールを生産可能な耐熱性の酵母又はその変異株や、キシロースを資化してエタノールを生産する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために、まずはラオス国内において47℃でも生育可能な耐熱性酵母を得た。かかる耐熱性酵母の性質をさらに調べたところ、グルコース存在下、40℃で培養した場合にキシロースを資化可能であること、及び、キシロースを唯一の糖源として好氣的条件下で培養した場合に、キシロースを資化してエタノールを生産可能であることを見だし、本発明を完成した。
- [0012] すなわち、本発明は、〔1〕酵母クルイベロマイセス・マルシアヌスNo. 21株（受託番号：NITE BP-01739）、又は、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30℃で培養した場合にキシロース資化能及びエタノール生産能を有するその変異株や、〔2〕上記〔1〕記載の酵母又はその変異株を、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下で培養することを特徴とするエタノールの生産方法に関する。

発明の効果

- [0013] 本発明によれば、キシロースを資化してエタノールを生産することが可能な耐熱性の酵母を提供することができる。また、本発明の酵母又はその変異株は40℃でもキシロースを資化可能であることから、本発明の酵母又はそ

の変異株を用いてエタノールを生産すれば、培養液を冷却するための設備に要するコストを低減することが可能となる。さらに、本発明の酵母又はその変異株はグルコース抵抗性を有することから、糖源としてリグノセルロース系バイオマス由来の糖化液を用いても効率よくエタノール生産を行うことが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] クルイベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株について、各種ストレス耐性試験を行った結果を示す図である。

[図2] クルイベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株について、グルコース抵抗性試験を行った結果を示す図である。

[図3] クルイベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株について、キシロースからのエタノール生産試験を行った結果を示す図である。

[図4] クルイベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株について、30℃又は37℃で培養してキシロースからのエタノール生産試験を行った結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の酵母クルイベロマイセス・マルシアヌス(*Kluyveromyces marxianus*) No. 21 株（以下、単に「No. 21 株」ともいう）は、本発明者らがラオス国内で分離した天然由来の株であり、受託番号 N I T E B P - 0 1 7 3 9 として、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 5 - 8 1 2 2 号室に所在する N I T E 独立行政法人製品評価技術基盤機構、特許微生物寄託センターに 2 0 1 3 年 1 0 月 2 4 日に寄託されている。No. 21 株は、キシロースを資化してエタノールを生産することが可能な耐熱性の酵母である。

[0016] 本発明の変異株としては、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30℃で培養した場合にキシロース資化能及びエタノール生産能を有する No. 21 株の変異株（以下、単に「本件変異株」ともいう）であれば特に制限されず、かかる本件変異株は、No. 21 株に対して紫外線や放射線を照射する方法や、変異原となる物質と接触させる方法等の公知の

変異処理方法を行い、キシロースを糖源として含有する培地により好気的条件下、30℃で培養した場合にキシロースを資化してエタノールを生産可能である株を選択することにより得ることができる。

[0017] 本発明において、キシロースを糖源として含有する培地としては、エタノール合成の基質となる糖成分として少なくともキシロースを含有する培地を挙げることができ、培地に含有するキシロース量としては、0.5～20%、好ましくは1.0～15%を挙げることができる。かかるキシロースを糖源として含有する培地としては、YPD培地（2%バクトペプトン、1%酵母エキス、2%グルコース）、YPAD培地（2%バクトペプトン、1%酵母エキス、2%グルコース、40μl/ml硫酸アデニン）、SD培地（2%グルコース、0.67%Lアミノ酸不含イーストニトロジェンベース）、YM培地（0.3%酵母エキス、0.3%麦芽抽エキス、0.5%ペプトン、1%グルコース）、YP培地（1%酵母エキス、2%ペプトン）等の酵母に一般的に用いられる培地にキシロースを加えた培地を挙げることができ、キシロースと共にグルコース、スクロース、又はフルクトースといった純粋な糖やそれらの混合物を加えてもよく、また、キシロースを唯一の糖源として加えてもよい。キシロースを唯一の糖源として加えるとは、エタノール合成の基質となる糖成分としてキシロースを含み、キシロース以外の糖類を加えないことを意味し、キシロースを唯一の糖源として含有する培地としては、YP培地にキシロースを加えたYPXy培地（1%酵母エキス、2%ペプトン、2%キシロース）を挙げることができる。なお、キシロースを糖源として含有する培地に、補助成分として硫酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、リン酸カリウム等の無機塩や、糖アルコールを加えてもよい。

[0018] さらに、キシロースを糖源として含有する培地としては、リグノセルロース系バイオマス由来の糖化液を加えた培地を用いてもよく、糖化液を作製する方法としては特に制限されないが、多糖類を分解する酵素を用いて資化可能な単糖類にまで分解することにより作製する方法や、多糖類を分解する能力を有する微生物により多糖類を加水分解し、資化可能な単糖類にまで分解

することにより作製する方法を挙げることができる。

[0019] 本発明において、好氣的条件下で培養するとは、分子状酸素の存在下で培養することをいい、振とう培養の場合、回転数60～400rpm (revolution per minute) での培養を挙げることができる。

[0020] 本件変異株において、キシロース資化能を有するとは、キシロースを代謝することが可能であることを意味する。かかるキシロース資化能は、キシロースを含有する培地で酵母を培養し、培養開始からの培地に含まれるキシロースの消費量を指標にして評価することができ、具体的にはY P X y I培地により好氣的条件下、30℃で酵母を48時間培養し、キシロースが50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上消費される場合に、前記酵母はキシロース資化能を有するということができる。なお、キシロースの消費量は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた公知の手法により測定することができる。

[0021] 本件変異株において、エタノール生産能を有するとは、エタノールを生産することが可能であることを意味する。かかるエタノール生産能は、酵母を培養し、培養開始からの培地に含まれるエタノールの生産量を指標にして評価することができ、具体的にはY P X y I培地により好氣的条件下、30℃で酵母を48時間培養し、エタノールが0.05% w/v以上、好ましくは0.1% w/v以上、より好ましくは0.2% w/v以上生産される場合に、前記酵母はエタノール生産能を有するということができる。なお、エタノールの生産量は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた公知の手法により測定することができる。

[0022] No. 21株や本件変異株（以下、総称して「本件酵母」ともいう）は、一般的に酵母の培養に用いられるY P D培地、Y P A D培地、S D培地、Y M培地等により培養することができる。

[0023] 本件酵母は、さまざまなストレスに対する耐性を有する。まず、本件酵母は、熱ストレスに対する耐性を有し、47℃という高温においても良好に生育することが可能である。また、本件酵母は、酸化ストレスに対する耐性を

有し、6 mMの H_2O_2 を含有する培地において良好に生育することが可能である。さらに、本件酵母は、浸透圧ストレスに対する耐性を有し、35%グルコースを含有する培地において良好に生育することが可能である。加えて、本件酵母は、エタノールストレスに対する耐性を有し、10%エタノールを含有する培地において良好に生育することが可能である。

[0024] また、本件酵母はグルコース抵抗性を有する。グルコース抵抗性とは、前述のグルコース抑制に対する抵抗性を意味する。すなわちグルコース抵抗性は、多様な糖を資化しこれをエタノールに変換する能力の指標である。本件酵母はグルコース抵抗性を有することから、リグノセルロース系バイオマス由来の糖化液等の様々な糖類を含有する液体を用いて効率よくエタノール生産を行うことが可能となる。

[0025] さらに、本件酵母はキシロースを資化して効率よくエタノールを生産することが可能である。本発明者らがタイ国内にて分離し、40℃以上で優れたエタノール生産性を示す耐熱性酵母株クルイベロマイセス・マルシアヌスDMKU3-1042株（受託番号：NITE BP-291、特許第5051727号公報：以下単に「3-1042株」ともいう）を用いてキシロースを資化した場合には、代謝産物としてエタノールよりもキシリトールが多く得られるため、エタノール生産効率が低い。しかしながら、本件酵母を用いてキシロースを資化した場合には、代謝産物としてキシリトールよりもエタノールが多く得られるため、エタノール生産効率が低い。特に通気性を高めて培養することにより、代謝産物のほとんどをエタノールとすることができ、加えて、エタノール生産時間の短縮も可能となる。

[0026] 本発明のエタノールの生産方法としては、本件酵母を、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下で培養する方法であれば特に制限されず、かかる本発明のエタノール生産方法により、キシロースからエタノールを効率的に生産することが可能となる。

[0027] なお、本件酵母は30℃以上の高温でのエタノール発酵が可能であることから、培地中でリグノセルロース系バイオマスの酵素による糖化处理とエタ

ノール発酵を同時に行ってもよい。

[0028] 本発明のエタノールの生産方法において、培養する温度としては特に制限されないが、好ましくは30～40℃、より好ましくは30～37℃を挙げることができる。また、培養方法としては、振とう培養、攪拌培養、振とう攪拌培養、連続培養、又はこれらの組み合わせを挙げることができ、振とう培養又は攪拌培養を好適に挙げることができる。振とう培養の場合の回転数は60～400rpm、好ましくは80～200rpmを挙げることができる。さらに、大量培養系における酵母の細胞密度を上げるためには0.1～0.3vvm (Vessel volume per minute) に相当するエアレーションを行ってもよい。通気性を高めることによって、キシロースを資化して得られた代謝産物としてキシリトールよりもエタノールの生産割合を高めることが可能となる。また、培養時間としては、1～10日、好ましくは2～7日、より好ましくは2～3日を挙げることができる。培地のpHとしては、pH4～8、好ましくはpH5～7を挙げることができる。

[0029] 本発明におけるエタノールの生産方法において、培地から生産されたエタノールを回収する方法としては、従来公知のいかなる方法も適用することができ、例えば、固液分離操作によってエタノールを含む液相と、酵母や固形成分を含有する固相とを分離し、その後、液相に含まれるエタノールを蒸留法によって分離・精製することで回収する方法を挙げることができる。

実施例

[0030] (酵母の単離)

ラオス国内4つの地域において、果実、野菜、草木の葉や土からサンプルを採取し、YPD培地に植え込み、37℃で3日間培養後、YPD寒天平板上に広げて37℃で1～2日間培養しコロニーとして分離した。かかる分離したコロニーから、耐熱性を有し、キシロース資化能が高い株をスクリーニングし、そのうちの1株をNo. 21と命名した。

[0031] (酵母の同定)

前述のスクリーニングで得られたNo. 21株について、その形態的、生

理的、生化学的性質を一般的な方法 (Kurtzman and Fell (1998)) 等により調べた。その結果、No. 21 株は、コロニーはクリーム色、湿光、隆起状態で、滑らかな縁を有し、粘着性があり、多極性に出芽しており、子嚢胞子は球形で、2~4 胞子/子嚢であった。また、かかる株は 45℃で生育し、グルコースからエタノールを生産した。さらに、No. 21 株からゲノム DNA を抽出し、サンガー法によりその 26S rDNA 塩基配列 (配列番号 1) を決定し、BLAST homology search を用いて酵母の既知種と比較した。その結果、クルイベロマイセス・マルシアヌスの既知株 (BM4 株、NBRC 1777 株等) と 100% 配列が一致した。したがって、No. 21 株はクルイベロマイセス・マルシアヌスと同定した。

[0032] (各種ストレス耐性)

No. 21 株の工業的な有用性を確認するため、酵母を用いた培養で起こりうる種々のストレスへの耐性を検討した。YPD 液体培地 (pH 7.0) に No. 21 株又は対照株として 3-1042 株を一白金耳植菌し、30℃、18 時間、好氣的条件下で培養して原菌液を調製した。次に YPD 寒天培地を用意し、No. 21 株、3-1042 株の原菌液を YP 液体培地によって 1 倍、10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍希釈してそれぞれ左から順に 5 箇所スポットし、30℃、45℃、47℃の 3 温度条件下で 18 時間培養して生育を調べた。また、上記の熱ストレス (物理的ストレス) の他、酸化ストレス (5 mM 又は 6 mM H_2O_2)、浸透圧ストレス (30% 又は 35% グルコース)、エタノールストレス (8% 又は 10% エタノール) の 3 種類の化学的なストレスを検討するため、各ストレス源を含有した YPD 寒天培地上に上述と同様に希釈した原菌液をそれぞれスポットして培養し、生育を比較した。

[0033] 図 1 に、各種ストレス耐性試験の結果を示す。図はマトリックスになっており、列は温度条件 (30℃、45℃、47℃) を、行は各種ストレス (1. 熱ストレス、2. 酸化ストレス、3. 浸透圧ストレス、4. エタノールストレス) をそれぞれ示している。1 枚の YPD 寒天培地プレートに対照株の

3-1042株（上段：DMKU3-1042と記載）とNo. 21株（下段）を並べてスポットし、1枚の写真に収めている。

- [0034] 熱ストレスに対しては、No. 21株は30℃、45℃、47℃いずれの温度条件下でも良好に生育し、特に47℃では耐熱性エタノール生産株である3-1042株よりも生育が良好であった。このことから、No. 21株は耐熱性の菌株として高温条件下で利用可能なことが明らかとなった。
- [0035] 酸化ストレスに対しては、No. 21株はすべての温度条件下で3-1042株よりも良好な生育を示した。5 mM H_2O_2 存在下で3-1042株はほとんど生育しなかった。一方、No. 21株は30℃、45℃では良好に生育し、47℃においても5 mMの H_2O_2 に対しては一定の抵抗性を持つことが明らかとなった。
- [0036] 浸透圧ストレスに対しては、No. 21株は3-1042株とほぼ同程度の抵抗性を示した。3-1042株にはわずかに劣るものの、45℃まではその生育が良好であることが示され、浸透圧ストレス下でも利用可能なことが明らかとなった。
- [0037] エタノールストレスに対しては、No. 21株は30℃において3-1042株よりも良好な生育を示した。45℃、47℃ではどちらの株も全く生育しなかった。30℃、8%エタノールでは、化学的なストレスの無い熱ストレスのみの場合と同程度の生育を示し、本菌株がエタノール耐性を有していることが示された。
- [0038] （グルコース抵抗性試験）
- 上述のNo. 21株及び3-1042株の原菌液をYP液体培地によって1倍、10倍、100倍、1000倍、10000倍希釈して、各種糖（グルコース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース）を唯一の糖源とするYPD寒天培地（各種糖をそれぞれ2%含有）にそれぞれ左から順に5箇所スポットし、2-デオキシグルコース（2-D OG）を0.01%となるように添加して30℃、37℃、40℃の3温度条件下で48時間培養してグルコース抵抗性を調べた。2-D OGはグルコーストランスポ

ーターによって取り込まれ、かつ解糖系において代謝されない物質であり、2-D O Gを添加することでグルコース抑制を誘導することができる。

[0039] 結果を図2に示す。図はマトリックスになっており、列は培養温度（30℃、37℃、40℃）と2-D O Gの有無に関する条件（[+0.01% 2-D O G]が2-D O G有）を、行は培地中の糖源（グルコース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース）をそれぞれ示している。1枚のYPD寒天培地プレートに対照の3-1042株（上段）とNo. 21株（下段）をそれぞれスポットし、撮影した写真を並べている。

[0040] グルコースは陽性対照であり、グルコースも2-D O Gも共に細胞が取り込むため、両者の間で生育に差は見られなかった。

[0041] ガラクトースについては、30℃、37℃、40℃の各温度で2-D O G存在下における生育が陽性対照のグルコースよりも悪くなっており、No. 21株及び3-1042株の両方でグルコース抑制がみられた。また、No. 21株と3-1042株との間で明確な差はみられなかった。

[0042] マンノースについては、No. 21株及び3-1042株の両方でグルコース抑制がみられなかった。これはマンノースの代謝がグルコースの存在によって影響を受けないという酵母の性質によるものと考えられた。また、No. 21株と3-1042株との間で明確な差はみられなかった。

[0043] キシロースについては、No. 21株及び3-1042株の両方でグルコース抑制がみられたが、No. 21株の方がその抑制効果は小さく、No. 21株はグルコース抵抗性を有する株であることが明らかになった。2-D O Gへの抵抗性は特に高温（37℃、40℃）で顕著であり、No. 21株は40℃付近という高温条件において、たとえグルコースが存在する培養液でもキシロースを資化する能力を有していることが明らかとなった。

[0044] アラビノースについては、No. 21株及び3-1042株の両方でグルコース抑制がみられたが、No. 21株は特に高温（37℃、40℃）において3-1042株より高いグルコース抵抗性を有していることが明らかとなった。アラビノースについても、No. 21株はグルコース存在下で資化

できることが示された。

[0045] (キシロースからのエタノール生産－1)

No. 21株が有するキシロースからのエタノール生産性を検討するため、キシロースを唯一の糖源として含有する液体YPXyI培地を用いたエタノール生産試験を行った。No. 21株及び3-1042株を30mLのYPXyI培地(pH7、キシロースを2%含有)に一白金耳植菌し、30℃で培養した。キシロース資化の酸素要求性を確認するため、50rpm、100rpm、150rpmの3条件で振とう培養し、生育とエタノール生産性を調べた。培養はそれぞれ96時間行い、24時間ごとに培養液を少量採取し、OD₆₆₀の吸収(生育の指標)、培養液中のキシロース濃度(キシロースの資化の指標)、培養液中のキシリトール濃度(エタノール発酵に使われなかったキシロースの指標)、培養液中のエタノール濃度(エタノール生産性の指標)をそれぞれ測定した。キシロース濃度、エタノール濃度は、培養液を遠心分離(14,000rpm、1分)し、上清をメンブレンフィルター(日本ポール社製)でろ過して検液とし、高速液体クロマトグラフィー(日立ハイテクノロジーズ社製)で測定することで求めた。培地中のエタノール濃度の測定における高速液体クロマトグラフィーの分析条件として、カラムはGel pack(登録商標)GL-C610-S(日立ハイテクノロジーズ社製)を使用した。

[0046] 結果を図3に示す。図はマトリックスになっており、列は左からOD₆₆₀の吸収(Growth OD660)、培養液中のキシロース濃度(Xylose %w/v)、培養液中のキシリトール濃度(Xylitol %w/v)、培養液中のエタノール濃度(Ethanol %w/v)をそれぞれ表している。行は振とう条件(50、100、150rpm)を示す。図中、No. 21株を薄い灰色実線(—▲—)、3-1042株を濃い灰色実線(—◆—)でそれぞれ表している。

[0047] 50rpmで振とう培養した場合は、両株ともほとんど生育せず、培養液中のキシロース濃度もほとんど変化が無く、エタノールも生産されなかった

。これは、キシロースの資化に酸素（通気）が必要であることを示している。

[0048] 100 rpmで振とう培養した場合は、両株とも良好に増殖した。培養液中のキシロース濃度も時間経過と共に減少し、それぞれの菌株がキシロースを資化したことを示している。一方、培養液中のキシリトール濃度は3-1042株の方が高く、反対にエタノール濃度はNo. 21株の方が高かった。この結果は、No. 21株がキシロースを資化してエタノール発酵を行ったのに対し、3-1042株はエタノール発酵以外の他の代謝にキシロースを使い、その結果、キシリトールが代謝産物として増加したと考えられた。また、No. 21株は、72時間で0.3% (w/v) のエタノールを生産した。

[0049] 150 rpmで振とう培養した場合でも、100 rpm同様に両株ともキシロースを資化し、良好に増殖した。No. 21株では、培養液中のキシリトールの濃度はほぼ0%であり、エタノール濃度は48時間でほぼ極大(0.2% w/v)に達した。十分な通気により、No. 21株ではキシロースの資化が早く進み、エタノールが効率よく生産されたことが示された。なお、3-1042株においては、エタノールはほとんど生産されず(<0.1%)、その代わりにキシリトールが培養液中に蓄積した。

[0050] これらの結果より、No. 21株は培養液中のキシロースを唯一の糖源として資化し、ここからエタノールを生産する能力を有している株であることが示された。キシロースは植物系バイオマスに豊富に含まれる五炭糖である。これまでは酵母の資化性に問題があり、かかる問題が植物系バイオマスからのエタノール生産を阻害する要因になっていたが、本発明の酵母であるNo. 21株はこの技術課題を解決する優れた酵母株であることが示された。

[0051] (キシロースからのエタノール生産-2)

No. 21株が37℃でもキシロースからのエタノール生産性を有することを以下の方法で確認した。No. 21株、3-1042株及びキシロースを資化してエタノールを生産する能力が高いピキア・スチピチス (*P. stipiti*

s) 株を30 mLのYPXyl培地(pH7、キシロースを2%含有)に一白金耳植菌し、30℃又は37℃、160 rpmで培養して生育とエタノール生産性を調べた。培養はそれぞれ120時間行い、12時間ごとに培養液を少量採取し、OD₆₆₀の吸収(生育の指標)及び培養液中のキシロース濃度(キシロースの資化の指標)、培養液中のエタノール濃度(エタノール生産能の指標)をそれぞれ測定した。キシロース濃度、エタノール濃度は、上述と同様の方法で測定することで求めた。

[0052] 結果を図4に示す。各図中、培養液中のエタノール濃度(%w/v)を薄い灰色実線(—▲—)、培養液中のキシロース濃度(g/L)を濃い灰色実線(—◆—)、OD₆₆₀の吸収を濃い灰色実線(—■—)でそれぞれ表している。また、各図中、上段の軸はOD₆₆₀の吸収や、培養液中のキシロース濃度(g/L)、下段の軸は培養液中のエタノール濃度(%w/v)を表す。

[0053] No. 21株を培養した場合には、30℃だけでなく37℃でもキシロースを糖源としてエタノールを効率よく生産するが、3-1042株やピキア・スチピチス株を培養した場合には、30℃ではキシロースを糖源としてエタノールを効率よく生産するものの、37℃ではキシロースを糖源としたエタノールの生産効率が低いことが明らかとなった。

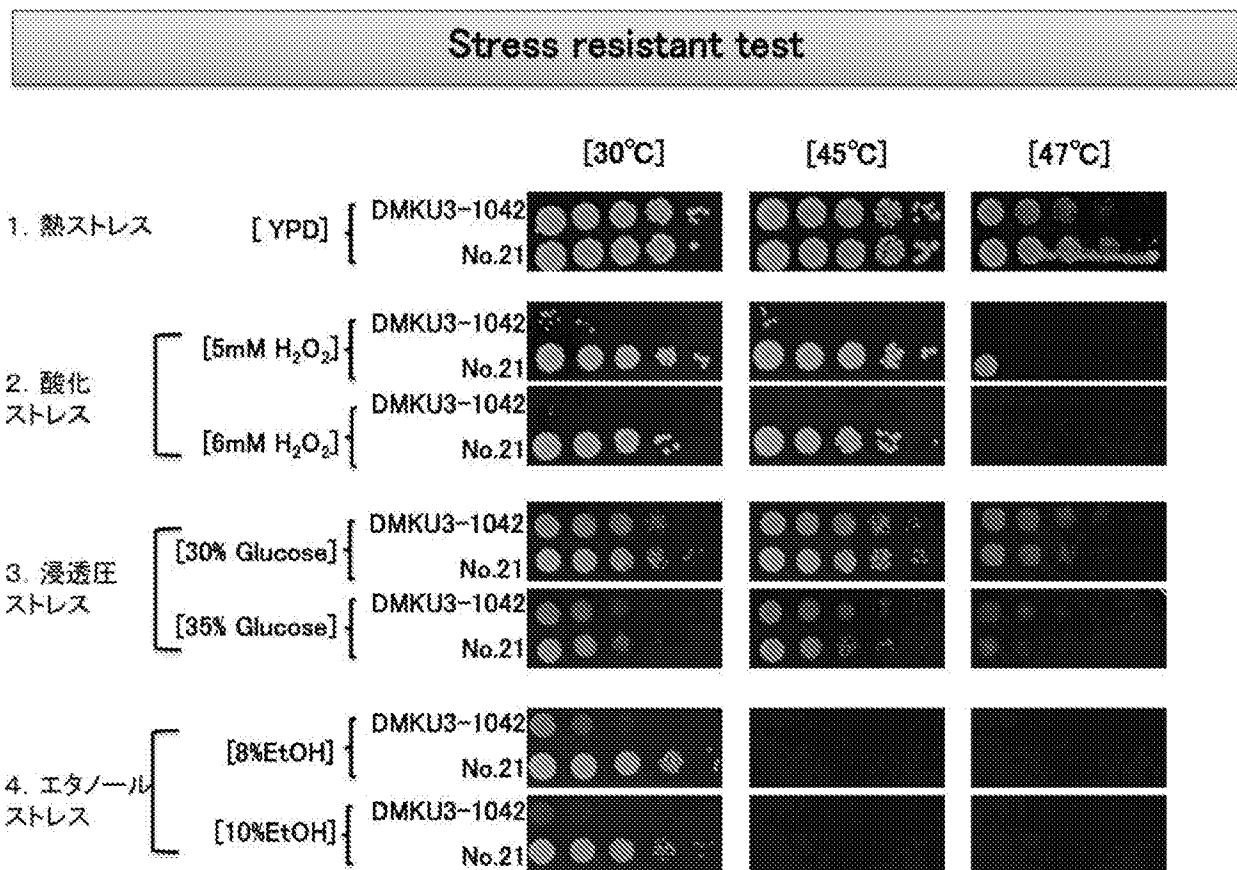
産業上の利用可能性

[0054] 本発明の酵母を用いれば、キシロースを資化してエタノールを効率的に生産することが可能であり、エタノール生産分野において有用である。

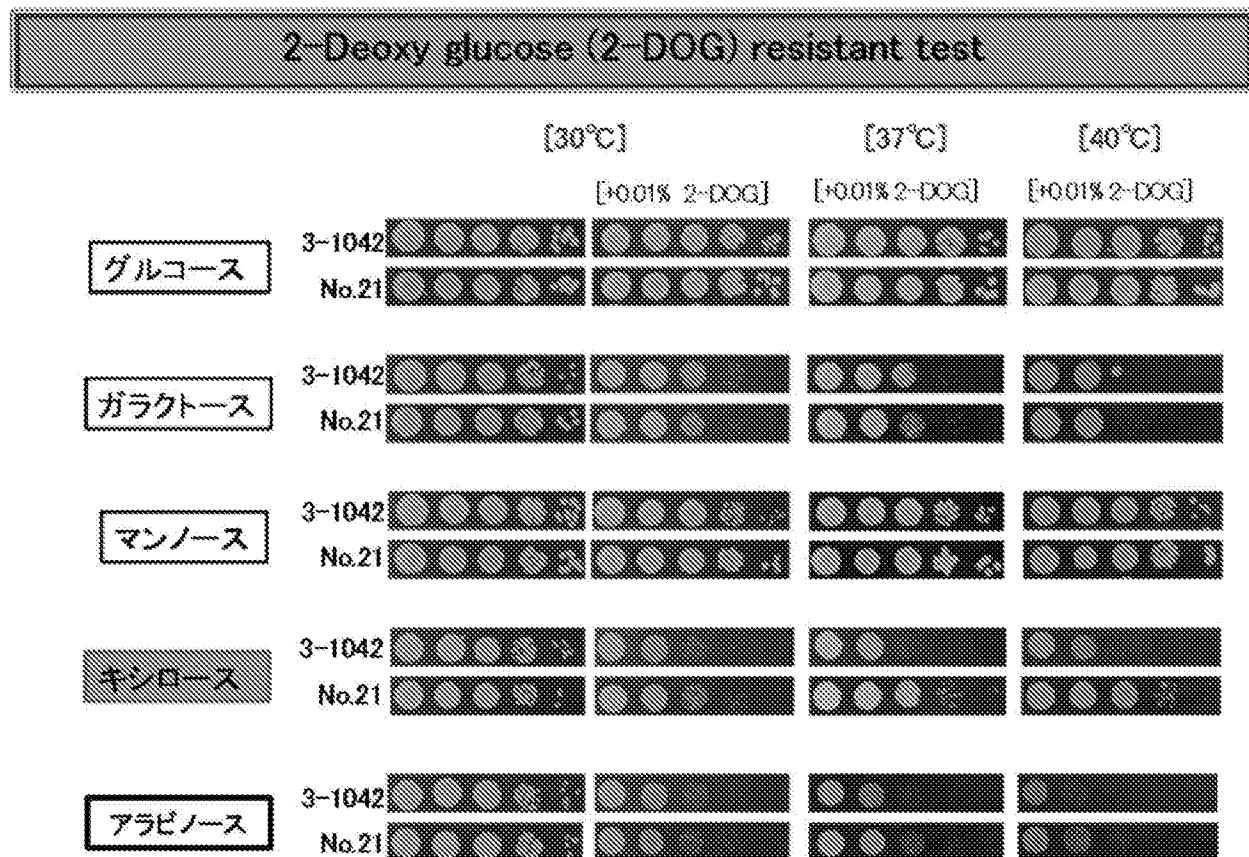
請求の範囲

- [請求項1] 酵母クルイベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株（受託番号：NITE BP-01739）、又は、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30℃で培養した場合にキシロース資化能及びエタノール生産能を有するその変異株。
- [請求項2] 請求項1記載の酵母又はその変異株を、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下で培養することを特徴とするエタノールの生産方法。

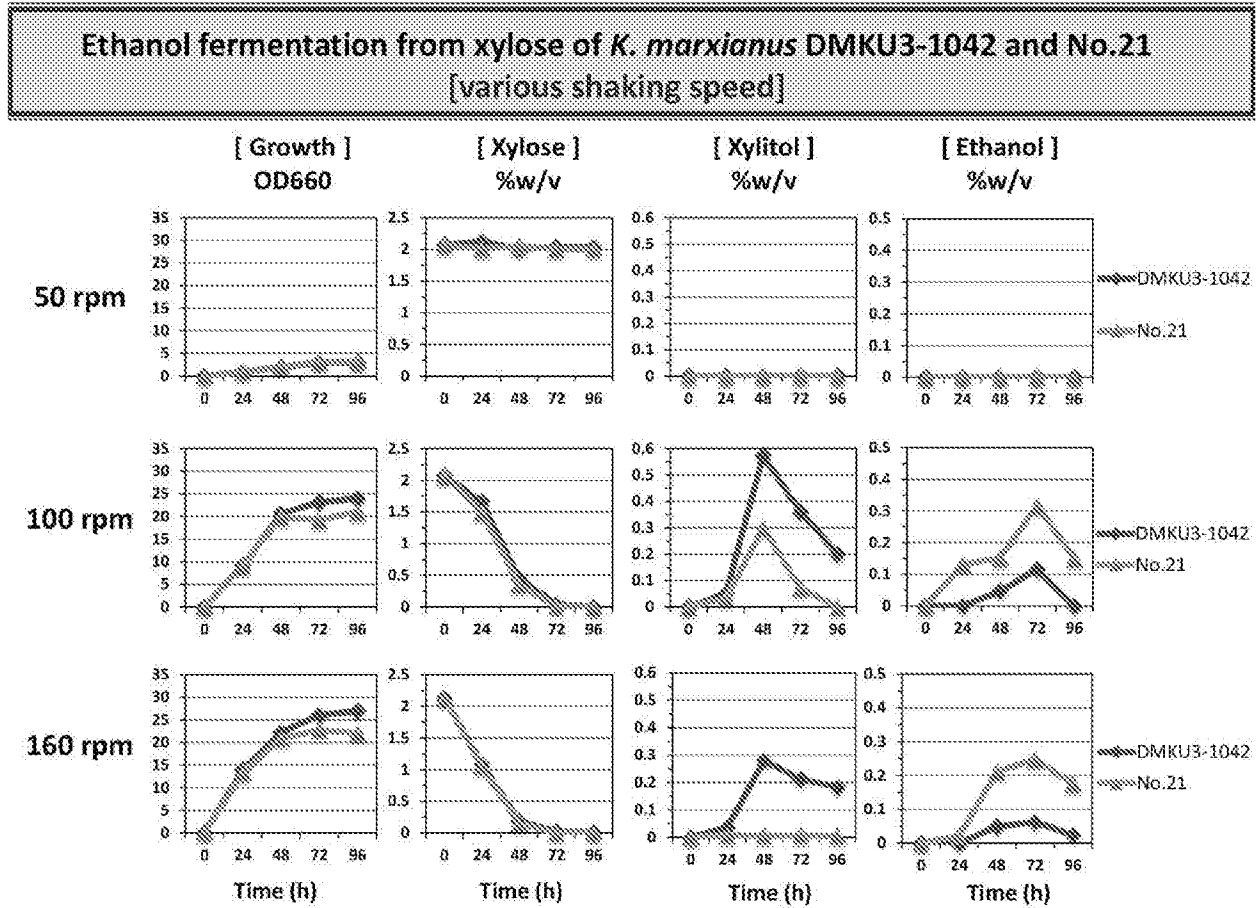
[図1]



[図2]

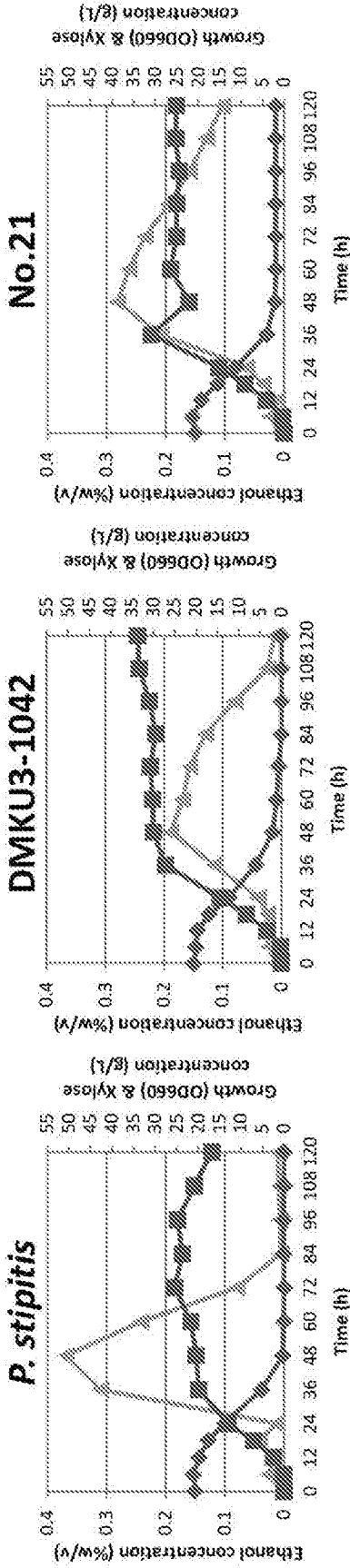


[図3]

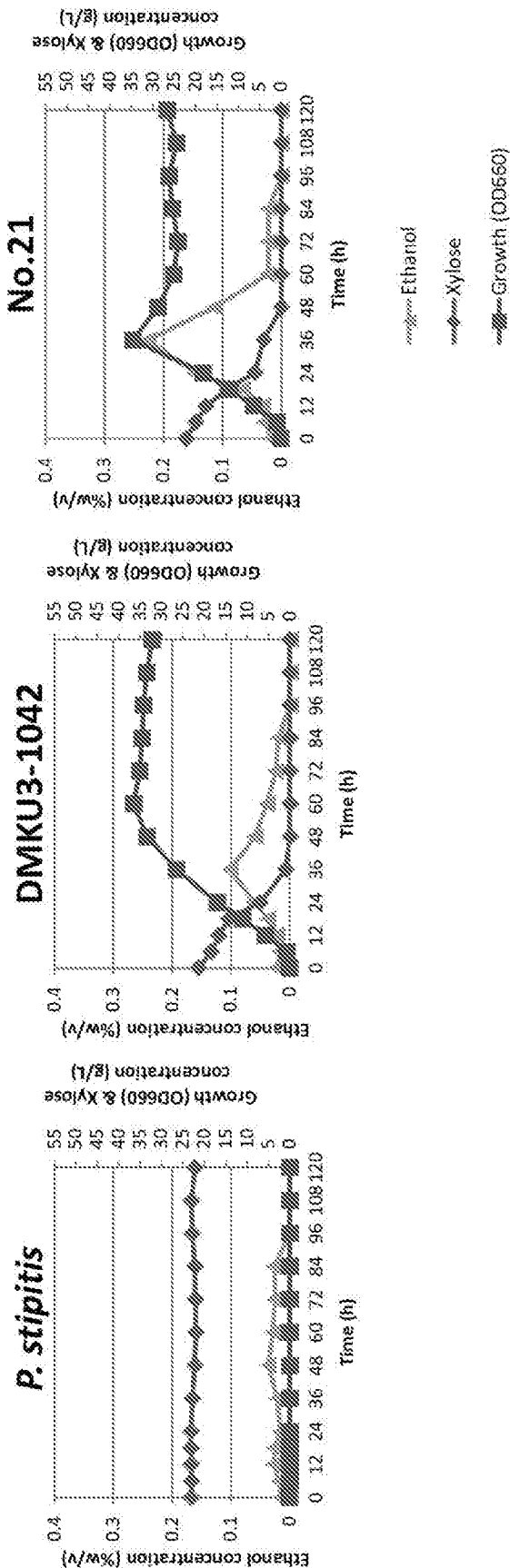


[4]

YP+2%Xylose/ 30°C /160 rpm/rotary shaking



YP+2%Xylose/ 37°C /160 rpm/rotary shaking



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/16(2006.01)i, C12P7/06(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)

C12N1/00-7/08, C12P1/00-41/00

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 1996-2015

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

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

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NONKLANG, Sanom et al., High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042, Appl. Environ. Microbiol., 2008, Vol. 74, pp. 7514-7521, page 7516, right column, line 6 to page 7517, left column, line 2, fig. 1A	1, 2
A	RODRUSSAMEE, Nadchanok et al., Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> , Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, Vol. 90, pp. 1573-1586, page 1576, left column, line 23 to right column, line 34, fig. 2	1, 2

☒ 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
19 May 2015 (19.05.15)Date of mailing of the international search report
02 June 2015 (02.06.15)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/002175

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-210169 A (Toyota Motor Corp.), 01 November 2012 (01.11.2012), examples & US 2014/0024097 A1 & CN 103459588 A	1, 2
A	JP 2013-021947 A (Toyota Motor Corp.), 04 February 2013 (04.02.2013), examples (Family: none)	1, 2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/16(2006.01)i, C12P7/06(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. C12N1/00-7/08, C12P1/00-41/00

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 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 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）

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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
A	NONKLANG, Sanom et al., High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042, Appl. Environ. Microbiol., 2008, Vol. 74, pp. 7514-7521 第 7 5 1 6 頁右欄第 6 行－第 7 5 1 7 頁左欄第 2 行、F i g . 1 A	1, 2

☒ 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

1 9 . 0 5 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 2 . 0 6 . 2 0 1 5

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）

戸来 幸男

4 B

5 8 0 3

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	RODRUSSAMEE, Nadchanok et al., Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> , Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, Vol. 90, pp. 1573-1586 第 1 5 7 6 頁左欄第 2 3 行－右欄第 3 4 行、F i g . 2	1, 2
A	JP 2012-210169 A (トヨタ自動車株式会社) 2012.11.01, 実施例 & US 2014/0024097 A1 & CN 103459588 A	1, 2
A	JP 2013-021947 A (トヨタ自動車株式会社) 2013.02.04, 実施例 (ファミリーなし)	1, 2