

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年2月27日 (27.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/016524 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/19, C12P 7/06 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 関西化学機械製作株式会社 (KANSAI CHEMICAL ENGINEERING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒660-0053 兵庫県 尼崎市 南七松町 2 丁目 9 番 7 号 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/01980
- (22) 国際出願日: 2002年3月4日 (04.03.2002) (72) 発明者; および
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福田 秀樹 (FUKUDA, Hideki) [JP/JP]; 〒655-0871 兵庫県 神戸市 垂水区松風台 1 丁目 8 番 1 3 号 Hyogo (JP). 近藤 昭彦 (KONDO, Akihiko) [JP/JP]; 〒657-0015 兵庫県 神戸市 灘区篠原伯母野山町 1 丁目 1 番 2-8 0 6 号 Hyogo (JP). 田中 渥夫 (TANAKA, Atsuo) [JP/JP]; 〒619-0224 京都府 相楽郡 木津町兜台 7 丁目 9 番 7 号 Kyoto (JP). 植田 充美 (UEDA, Mitsuyoshi) [JP/JP]; 〒665-0033 兵庫県 宝塚市 伊子志 3 丁目 2 番 4 7 号 Hyogo (JP). 佐
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-247134 2001年8月16日 (16.08.2001) JP

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ALCOHOL FROM STARCH

(54) 発明の名称: デンプンからアルコールを製造する方法

(57) Abstract: An alcohol can be directly and efficiently obtained from starch via fermentation by integrating a plasmid, which is constructed so as to present glucoamylase on the surface layer and secret α -amylase, to a yeast and growing the resultant yeast using starch as a substrate. Compared with a yeast presenting glucoamylase and α -amylase on the cell surface layer, a yeast presenting α -amylase on the cell surface layer and secreting glucoamylase or a yeast presenting glucoamylase on the surface layer, the above-described yeast has an excellent capability of alcohol fermentation and shows an alcohol yield of 40%, i.e., being comparable to alcohol fermentation from glucose. Use of α -amylase originating in *Streptococcus bovis* makes it possible to produce ethanol directly from uncooked starch (raw starch).

(57) 要約:

グルコアミラーゼを表層に提示し、かつ α -アミラーゼを分泌するように構築したプラスミドを酵母に組み込み、この酵母をデンプンを基質として生育させることにより、デンプンから直接かつ効率よくアルコール発酵できる。この酵母は、グルコアミラーゼと α -アミラーゼとを細胞表層に提示する酵母、 α -アミラーゼを細胞表層に提示しグルコアミラーゼを分泌する酵母、およびグルコアミラーゼを細胞に提示する酵母に比べて、デンプンからのアルコール発酵の能力に優れ、そして、そのアルコールの収率は40%と、グルコースからのアルコール発酵と遜色ない能力を有している。さらに、*Streptococcus bovis*由来の α -アミラーゼを用いると、無蒸煮デンプン(生デンプン)から直接的にエタノールを生産させることも可能である。



WO 03/016524 A1



藤 英一 (SATO, Eiichi) [JP/JP]; 〒352-0006 埼玉県 新座市 新座 2-17-8 Saitama (JP).

(74) 代理人: 南條 博道 (NANJO, Hiromichi); 〒530-0047 大阪府 大阪市 北区 西天満 3丁目 2番 9号 翁ビル 5階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

デンプンからアルコールを製造する方法

5 技術分野

本発明は、デンプンからのエタノールの製造方法に関する。詳しくは、グルコアミラーゼを細胞表面に提示し、かつ α -アミラーゼを分泌する酵母を用いる、エタノールの製造方法に関する。さらに詳しくは、上記のような酵母を用いて無蒸煮デンプンからエタノールを製造する方法に関する。

10

背景技術

新しいエネルギー資源としてのバイオマスの利用が、近年注目されている。植物起源のセルロースおよびデンプン性物質は、最も豊富に存在する利用可能なバイオマス資源である。特に、デンプン資源から生産されるエタノールは、再生可能な環境調和型エネルギー資源として注目され、今後その需要が増加すると予想されている。

15

現在の発酵法によるデンプンからのエタノール生産は、デンプンの蒸煮後、アミラーゼを分泌する麹菌などでの処理によるデンプン質の糖化、および酵母によって発酵するという2段階の工程で行われている。これは、酵母はアミラーゼ類を有しないため、デンプンを分解して糖化することができないからである。

20

酵母に糖化型のアミラーゼ（グルコアミラーゼ）をコードする遺伝子を導入して糖化型のアミラーゼを分泌させるようにし、この酵母をデンプンを唯一の炭素源として生育させ、アルコール発酵を試みた例がある（Nakamuraら、*Biotechnol. Bioeng.*, 53:21-25(1997)）。しかし、酵母の生育が良好ではなく、エタノール生産量も低く、実用的ではなかった。さらに、グルコアミ

25

ラーゼを酵母の細胞表層に固定化し、この酵母をデンプンを唯一の炭素源として生育させ、エタノールを生産する試みがなされ、エタノールの生産量を増加させること成功している（植田ら、Appl. Environ. Microbiol., 63:1362-1366 (1997)）が、未だ実用化されるに至っていない。

5

発明の開示

そこで、本発明は、デンプンから直接的に、より高い効率でエタノールを生産できる酵母の構築およびそれを利用してエタノールを製造する方法を提供することを目的とする。

10 本発明者らは、デンプンからの効率的なエタノールの生産について種々検討した結果、グルコアミラーゼを細胞表面に提示し、かつ α -アミラーゼを分泌するように酵母を形質転換することによって、エタノール生産性が顕著に向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

したがって、本発明は、グルコアミラーゼを細胞表層に提示し、かつ α -アミラーゼを分泌する酵母を提供する。

15

好適な実施態様では、上記酵母は凝集性酵母である。

好適な実施態様では、上記 α -アミラーゼはStreptococcus bovis 148由来である。

本発明はまた、上記酵母を、デンプンを含む培地で培養する工程を含む、アルコールの製造方法を提供する。

20

好適な実施態様では、上記デンプンは無蒸煮である。

図面の簡単な説明

図1は、 α -アミラーゼを細胞表層に提示するプラスミドpAA12の構築を示す模式図である。

25

図2は、 α -アミラーゼを分泌するプラスミドpSAA11の構築を示す

模式図である。

図3は、グルコアミラーゼを分泌するプラスミドpSGA11の構築を示す模式図である。

図4は、プラスミドpBAA1の模式図である。

5 図5は、プラスミドpSBAA2の模式図である。

図6は、各種組換え酵母細胞を好氣的条件下で培養した場合の、デンプン濃度および細胞密度の経時変化を示すグラフである。

図7は、無蒸煮コーンスターチ培地を用いてアルコール発酵した場合の、培地中のデンプン濃度およびエタノール濃度の経時変化を示すグラフである。

10 図8は、種々の濃度の無蒸煮コーンスターチを用いた場合の、培地中のデンプン濃度およびエタノール濃度の経時変化を示すグラフである。

図9は、種々の濃度の酵母YF207/[pGA11, pSBAA2]を用いた場合の、培地中のデンプン濃度およびエタノール濃度の経時変化を示すグラフである。

15

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、グルコアミラーゼとは、デンプンの非還元末端からグルコース単位を切り離していくエキソ型の加水分解酵素をいう。このような活性を有していれば、その起源は限定されず、例えばRhizopusおよびAspergillusなどのカビ由来のグルコアミラーゼが用いられる。例えば、植田ら (Appl. Environ. Microbiol. 63:1362-1366(1997)) に記載のように、Rhizopus oryzae由来のグルコアミラーゼが好適に用いられる。

20

本発明において、 α -アミラーゼとは、デンプンの α 1,4-グルコシド結合を加水分解するエンド型の酵素をいう。この活性を有していればその起源は限定されず、例えば、動物（唾液、膵臓など）、植物（麦芽など）、および微生物由来の α -アミラーゼが用いられる。本発明においては、微生物

25

由来の α アミラーゼが好適に用いられ、例えば、*Bacillus stearothermophilus*、*Streptococcus bovis*などに由来するものが挙げられる。後述するように、特に、無蒸煮デンプンを炭素源とする場合には、*Streptococcus bovis*由来の α -アミラーゼが好ましい。

5 本発明の酵母は、グルコアミラーゼを細胞表層に提示し、かつ α -アミラーゼを分泌するように形質転換された酵母である。このような酵母は、グルコアミラーゼを細胞表層に提示するように組換えられたDNAと、 α -アミラーゼを分泌するように組換えられたDNAとを酵母に導入することにより、得られる。

10 まず、細胞表層に酵素を提示する一般的な方法について説明する。細胞表層に酵素を提示する方法には、(a) 細胞表層局在タンパク質のGPIアンカーを介して酵素を細胞表層に提示する方法、および(b) 細胞表層局在タンパク質の糖鎖結合タンパク質ドメインを介して酵素を細胞表層に提示する方法がある。

15 用いられ得る細胞表層局在タンパク質としては、酵母の性凝集タンパク質である α -またはa-アグルチニン、FLOタンパク質（例えば、FLO1、FLO2、FLO4、FLO5、FLO9、FLO10、およびFLO11）、アルカリホスファターゼなどが挙げられる。

(a) GPIアンカーを利用する方法

20 GPIアンカーにより細胞表層に局在するタンパク質をコードする遺伝子は、N末端側から順に、分泌シグナル配列、細胞表層局在タンパク質（糖鎖結合タンパク質ドメイン）、およびGPIアンカー付着認識シグナル配列をそれぞれコードする遺伝子を有している。細胞内でこの遺伝子から発現された細胞表層局在タンパク質（糖鎖結合タンパク質）は、分泌シグナルにより
25 細胞膜外へ導かれ、その際、GPIアンカー付着認識シグナル配列は、選択的に切断されたC末端部分を介して細胞膜のGPIアンカーと結合して細胞

膜に固定される。その後、P I - P L Cにより、G P Iアンカーの根元部が切断され、細胞壁に組み込まれて細胞表層に固定され、細胞表層に提示される。

ここで、G P Iアンカーとは、グリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) と呼ばれるエタノールアミンリン酸-6マンノース α 1-2マンノース α 1-6マンノース α 1-4グルコサミン α 1-6イノシトールリン脂質を基本構造とする糖脂質をいい、P I - P L Cとは、ホスファチジルイノシトール依存性ホスホリパーゼCをいう。

G P Iアンカー付着認識シグナル配列とは、G P Iアンカーが細胞表層局在タンパク質と結合する際に認識される配列であり、通常、細胞表層局在タンパク質のC末端あるいはその近傍に位置する。G P Iアンカー付着シグナル配列としては、例えば酵母の α -アグルチニンのC末端部分の配列が好適に用いられる。上記 α -アグルチニンのC末端から320アミノ酸の配列のC末端側には、G P Iアンカー付着認識シグナル配列が含まれるので、上記方法に使用する遺伝子としては、このC末端から320アミノ酸の配列をコードするDNA配列が特に有用である。

従って、例えば、分泌シグナル配列をコードするDNA-細胞表層局在タンパク質をコードする構造遺伝子-G P Iアンカー付着認識シグナルをコードするDNA配列を有する配列において、この細胞表層局在タンパク質をコードする構造遺伝子の全部または一部の配列を、目的とする酵素の構造遺伝子の配列で置換することにより、G P Iアンカーを介して目的の酵素を細胞表層に提示する組換えDNAが得られる。細胞表層局在タンパク質が α -アグルチニンである場合、上記 α -アグルチニンのC末端から320アミノ酸の配列をコードする配列を残すように、目的の酵素遺伝子を導入することが好ましい。

この目的とする酵素の構造遺伝子として、グルコアミラーゼ遺伝子を用い

ると、G P Iアンカーを介して細胞表層にグルコアミラーゼを提示する組換えDNAが得られる。

(b) 糖鎖結合タンパク質ドメインを利用する方法

細胞表層局在タンパク質が糖鎖結合タンパク質である場合、その糖鎖結合
5 タンパク質ドメインは、複数の糖鎖を有し、この糖鎖が細胞壁中の糖鎖と相
相互作用または絡み合うことによって、細胞表層に留まることが可能である。
例えば、レクチン、レクチン様タンパク質などの糖鎖結合部位などが挙げら
れる。代表的には、G P Iアンカータンパク質の凝集機能ドメインが挙げら
れる。G P Iアンカータンパク質の凝集機能ドメインとは、G P Iアンカリ
10 ングドメインよりもN末端側にあり、複数の糖鎖を有し、凝集に関与してい
ると考えられているドメインをいう。

この細胞表層局在タンパク質（凝集機能ドメイン）と目的の酵素とを結合
することにより、細胞表層に酵素が提示される。目的の酵素の種類により、
細胞表層局在タンパク質（凝集機能ドメイン）の（1）N末端側に酵素を結
15 合させる、（2）C末端側に酵素を結合させる、および（3）N末端側および
C末端側の両方に、同一または異なる酵素を結合させることができる。

従って、例えば、

- 20 (1) 分泌シグナル配列をコードするDNA—目的とする酵素の構造遺伝子—
細胞表層局在タンパク質（凝集機能ドメイン）をコードする構造遺伝子—
G P Iアンカー付着認識シグナル配列をコードするDNA、
- (2) 分泌シグナル配列をコードするDNA—細胞表層局在タンパク質（凝
集機能ドメイン）をコードする構造遺伝子—目的とする酵素の構造遺伝子—
G P Iアンカー付着認識シグナル配列をコードするDNA、
- (3) 分泌シグナル配列をコードするDNA—目的とする酵素の構造遺伝子—
25 細胞表層局在タンパク質（凝集機能ドメイン）をコードする構造遺伝子—
目的とする酵素の構造遺伝子—G P Iアンカー付着認識シグナル配列をコー

ドするDNA、などのDNA配列を作成することにより、細胞表層に目的の酵素を提示する組換えDNAが得られる。凝集機能ドメインを利用する場合、GPIアンカーは細胞表層の提示には関与しないので、組換えDNA中に、GPIアンカー付着認識シグナル配列をコードするDNA配列は、存在して

5 もよいし、存在しなくてもよい。

この目的とする酵素の構造遺伝子として、グルコアミラーゼ遺伝子を用いると、糖鎖結合タンパク質を利用して、細胞表層にグルコアミラーゼを提示する組換えDNAが得られる。

上記組換えDNAに用いられる分泌シグナル配列は、細胞表層局在タンパク質の分泌シグナル配列を用いてもよいし、発現した酵素を細胞外へ導くことができる他の分泌シグナル配列を用いてもよい。例えば、グルコアミラーゼの分泌シグナル配列、酵母の α -または α -アグルチニンの分泌シグナル配列、リパーゼの分泌シグナル配列が好適に用いられる。酵素活性に影響を及ぼさないのであれば、細胞表層提示後に分泌シグナル配列およびプロ配列

10 の一部または全部がN末端に残ってもよい。

次に、酵母にアミラーゼ類（グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼなど）を分泌させる方法は、当業者には周知である。上記分泌シグナル配列をコードするDNAに、グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼなどの目的の酵素の構造遺伝子を連結した組換えDNAを作成し、酵母に導入すればよい。

上記の各種配列を含むDNAの合成および結合は、当業者が通常用い得る技術で行われ得る。例えば、分泌シグナル配列とグルコアミラーゼあるいは α -アミラーゼの構造遺伝子との結合は、部位特異的突然変異法を用いて行うことができる。この方法を用いることにより、正確な分泌シグナル配列の切断および活性なグルコアミラーゼあるいは α -アミラーゼの発現が可能で

20 ある。

上記の目的とする配列（組換えDNA）は、好ましくは、ベクターに組み

25

込まれる。DNAの取得を容易にする点からは、大腸菌とのシャトルベクターであることが好ましく、例えば、酵母の2 μ mプラスミドの複製起点(ori)とColE1の複製起点とを有し、さらに酵母選択マーカー（例えば、薬剤耐性遺伝子、TRP、LEU2など）および大腸菌の選択マーカー（薬剤耐性遺伝子など）を有することがさらに好ましい。

グルコアミラーゼあるいは α -アミラーゼ構造遺伝子を発現させるために、この遺伝子の発現を調節するオペレーター、プロモーター、ターミネーター、エンハンサーなどのいわゆる調節配列を含んでいることが望ましい。例えば、GAPDH（グリセルアルデヒド3'-リン酸デヒドロゲナーゼ）プロモーターとGAPDHターミネーターとを含むプラスミドpYGA2270またはpYE22m、あるいはUPR-ICL（イソクエン酸リアーゼ上流領域）配列とTerm-ICL（イソクエン酸リアーゼのターミネーター領域）配列とを含むプラスミドpWI3が挙げられる。

酵母の細胞表層に酵素を提示する場合、最も好適には、プラスミドpYGA2270またはpYE22mのGAPDHプロモーターとGAPDHターミネーターの配列の間に、分泌シグナル配列をコードするDNAと、グルコアミラーゼまたは α -アミラーゼの構造遺伝子配列を有する配列と、 α -アグルチニンのC末端から320アミノ酸をコードする配列とを結合した配列を挿入すれば、酵母に導入するためのベクターが製造される。

ベクターは、マルチコピー型および染色体組込み型がある。どの型のベクターにどの遺伝子を組み込むかは、当業者が適宜決定すればよい。細胞表層に提示される酵素と分泌される酵素とは、同一のベクターに組み込まれてもよく、それぞれ異なるベクターに組み込まれてもよい。

宿主の酵母としては、糖を資化してアルコール発酵能を有する酵母であれば、どのような酵母でもよい。非凝集性および凝集性の酵母が用いられる。凝集性の酵母が、反応後の分離が簡単である点で、あるいは簡単に固定でき

るため連続反応を行い得る点で好ましい。

非凝集性の酵母としては、特に制限はないが、例えば、*Saccharomyces cerevisiae* MT 8-1などが挙げられる。

凝集性の酵母としては、*Saccharomyces diastaticus* ATCC60715、同ATCC60712、*Saccharomyces cerevisiae* IF01953、同CG1945、同HF7Cなどが挙げられる。また、新たな凝集性酵母を構築してもよい。例えば、後述の実施例の「A. 実験材料の調製」に示すように、M. D. Roseら (Methods in Yeast Genetics, 1990, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) の方法に従って、凝集性酵母ATCC60712と非凝集性酵母W303-1Bとの接合による二倍体から、凝集性酵母Y F 2 0 7およびこれと同等の性質を有する酵母を得ることができる。本発明者らが取得した凝集性酵母Y F 2 0 7株は、プラスミドの保持安定性に優れ、さらに発酵能が非常に高い。従って、グルコアミラーゼを細胞表層に提示しかつ α -アミラーゼを分泌するように組換えられた凝集性酵母Y F 2 0 7株を用いた場合は、エタノールの生産性は非常に高くなる。

本発明のグルコアミラーゼを細胞表層に提示しかつ α -アミラーゼを分泌する酵母（以下、本発明の酵母という）は、上記それぞれの酵素をコードするDNAを有する組換えDNA（ベクター）を、酵母に同時にまたは別々に導入することにより得られる。DNAの導入の方法には、形質転換、形質導入、トランスフェクション、コトランスフェクション、エレクトロポレーションなどの方法があり、具体的には、酢酸リチウムを用いる形質転換方法、プロトプラスト法などがある。

組換えDNA（ベクター）が導入された酵母は、選択マーカー（例えばTRP、URA）で選択される。グルコアミラーゼが細胞表層に提示されていることは、細胞を洗浄した後に、例えば抗グルコアミラーゼ抗体とFITC標識抗体とを用いる免疫抗体法によって確認し得る。また、 α -アミラーゼが分泌され

ていることも、細胞を除去した培養液について、例えば抗 α -アミラーゼ抗体を用いる免疫抗体法によって確認し得る。

本発明の酵母は、担体に固定化されていてもよい。固定されていると、繰り返し回分発酵または連続発酵における使用に便利である。酵母の固定化は、
5 当業者が通常酵母に対して用いる方法が、適用される。固定化された酵母は、担体に付着した状態で、浮遊状態で培養されるか、カラムなどに充填されて、いわゆるバイオリアクターとして用いることもできる。連続的にあるいは回分（バッチ）で繰り返し培養および発酵させた場合でも、活性が低下したあるいは死滅した酵母が脱離していくので、酵母としての活性が低下することはなく、有効に利用することができる。

以下、本発明の酵母をデンプン存在下で発酵させて、エタノールを製造する方法を説明する。

本発明の酵母を、まず、好氣的条件下で培養して、その数を増加させる。培地は、選択培地であっても非選択培地であってもよい。この酵母は、デンプン
15 炭素源として生育可能であり、培養時の培地中のデンプン濃度は、可溶性デンプンを用いる場合、好ましくは約1～約10g/l、より好ましくは約2～約6g/l、最も好ましくは約4g/lである。また、無蒸煮デンプンを用いる場合、培地中のデンプン濃度は、約1～約50g/l、好ましくは約2～約40g/l、さらに好ましくは約10～約20g/lである。培養時の培地のpHは、好ま
20 しくは約4.0～約6.0、最も好ましくは約5.0である。好氣的培養時の培地中の溶存酸素濃度は、好ましくは約0.5～約6ppm、より好ましくは約1～約4ppm、最も好ましくは約2.0ppmである。また、培養時の温度は、約20～約45°C、好ましくは約25～約35°C、最も好ましくは約30°Cである。培養は、菌体濃度が10g/l以上になるまで培養することが好ましい。

25 次いで、本発明の酵母を、嫌氣的条件下で発酵させて、エタノールを生産させる。この発酵工程の形式としては、回分（バッチ）工程、流加回分工程、

繰り返し回分工程、連続工程などが挙げられるが、これらのいずれであってもよい。

回分発酵工程とは、予め発酵槽内に入れられた培地に酵母を接種することによって行われる閉鎖的発酵法である。流加回分工程とは、上記回分工程に対し、栄養培地を供給しながら発酵させるが、目的生産物はある時期に至るまで抜き取らない方法である。繰り返し回分工程とは、上記回分工程を、繰り返して行う工程である。具体的には、1回目の回分工程後、培地と酵母とを分離して、培地を抜き出し、その後新鮮培地を新たに添加して発酵工程を行う、という操作が繰り返して行われる。連続発酵工程とは、発酵槽に新鮮な培地を連続的に供給しながら、同時に生産物（すなわち、エタノール）を含む培地を発酵槽から抜き取っていく工程である。

回分式（回分、流加回分、繰り返し回分）工程の場合、培地中のデンプン濃度は、好ましくは約40～約150g/lである。特に、デンプン濃度は、より好ましくは約50～約120g/l、最も好ましくは約60g/lである。また、連続工程の場合、添加デンプン濃度は、好ましくは約40～約300g/l、より好ましくは約60～約250g/l、最も好ましくは約200g/lで維持される。また、無蒸煮デンプンを用いる場合、培地中の仕込みデンプン濃度は、約50～約500g/l、好ましくは約50～約400g/l、さらに好ましくは約150～約250g/lである。発酵時の培地のpHは、好ましくは約4.0～約6.0、最も好ましくは約5.0である。

嫌氣的発酵時の培地中の溶存酸素濃度は、宿主となる酵母により異なるが、好ましくは約1.0ppm以下、より好ましくは約0.1ppm以下、最も好ましくは約0.05ppm以下である。また、発酵時の温度は、約20～約45℃、好ましくは約25～約35℃、最も好ましくは約30℃である。

嫌氣的発酵時の培地中の初期細胞濃度（仕込み濃度）は、酵母の種類、培地中のデンプン濃度などにより異なるが、好ましくは初期OD₆₀₀は、10～300、より好ましくは30～100である。

発酵の進行とともに上記の発酵条件が変化するので、これらを一定の範囲に調節することが好ましい。発酵の経時変化は、例えば、ガスクロマトグラフィ、HPLCなどの当業者が通常用いる手段でモニターすればよい。

5 発酵工程中または終了後、エタノールを含む培地を発酵槽から抜き取り、例えば、遠心分離機による分離操作および蒸留操作などの当業者が通常用いる分離工程によって、エタノールが単離される。

以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

10 実施例

参考例 実験材料の調製

(参考例 1 宿主酵母の育種)

凝集性酵母である*Saccharomyces diastaticus* ATCC60712 (MATa leu2-3, 12 his2 lys2 stal FL08) および非凝集性酵母であるW303-1B (MAT α ura3-52 trp1 Δ 2 leu2-3, 112 his3-11 ade2-1 can1-100) を用い、M. D. Roseら
15 (前出) の方法に従って、トリプトファン栄養要求性の新たな凝集性の菌株 Y F 2 0 7 (MATa ura3-52 trp1 Δ 2 his ade2-1 can1-100 stal FL08) を得た。

20 (参考例 2 実施例および比較例に用いる各種プラスミドの調製)

[a-1] *Rhizopus oryzae*由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示するために用いるプラスミドの調製

*Rhizopus oryzae*由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示するマルチコピー型プラスミド p G A 1 1 は、発明者である田中および植田らの文献 (Appl. and Environmental Microbiology (1997) 63:1362-1366) に記載のもの
25 を用いた。

[a-2] *Bacillus stearothermophilus*由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示するために用いるプラスミドの調製

*Bacillus stearothermophilus*由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示するプラスミドpAA12は、プラスミドpIAA Δ 11を出発材料として調製した。図1にその構築の模式図を示す。プラスミドpIAA Δ 11をXhoIで処理し、長断片と短断片とに分離した。

長断片をセルフライゲーションして得られるプラスミドをNotIおよびKpnIで切断し、平滑化した後、約860bpの断片を得た。この断片はGAPDHプロモーター配列および α -アグルチニンの3'側から320アミノ酸残基をコードする遺伝子配列を有する。他方、マルチコピー型プラスミドpMT34(+3)を、PvuIIおよびBamHIで切断し、平滑化した後、上記約860bpの断片を組込んで、プラスミドpUGP12を得た。

プラスミドpIAA Δ 11をXhoIで処理して得られた短断片は、約2000bpの酵母の α -ファクターの分泌シグナル配列および*Bacillus stearothermophilus*由来の α -アミラーゼの成熟タンパク質配列を有している。この断片を、上記プラスミドpUGP12のXhoI部位に導入して、 α -アミラーゼを細胞表層に提示するために用いるプラスミドpAA12を得た。

[a-3] *Bacillus stearothermophilus*由来の α -アミラーゼを分泌するために用いるプラスミドの調製

*Bacillus stearothermophilus*由来の α -アミラーゼを分泌するプラスミドpSAA11は、発明者である田中および植田らの文献(Muraiら、Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 51:65-70)に記載の染色体組込み型プラスミドpIAA11から α -アミラーゼ遺伝子を単離し、これをマルチコピープラスミドpUGP3(Takahashiら、Appl. Microbiol. Biotechnol. (2

001) 55:454-462) に組込むことにより調製した。図 2 にその構築の模式図を示す。p I A A 1 1 をテンプレートとし、5' -ATGCGAGCTCATGAGATTTCTCCA ATTTTACTGCAG-3' (配列番号 1) および 5' -ATGCGAGCTCTCAAGGCCATGCCACCAAC CGTGGTTCGG-3' (配列番号 2) をプライマーとして用いて、P C R を行い、
5 S a c I で切断して約 2 0 0 0 b p の長さの断片を得た。この断片は、酵母の α -ファクターの分泌シグナル配列および α -アミラーゼの成熟タンパク質配列を有していた。得られた配列を、予め S a c I 処理した p U G P 3 に連結し、プラスミド p S A A 1 1 を得た。

10 [a-4] *Rhizopus oryzae* 由来のグルコアミラーゼを分泌するために用いるプラスミドの調製

Rhizopus oryzae 由来のグルコアミラーゼを分泌するプラスミド p S G A 1 1 は、図 3 に示す方法で作成した。p G A 1 1 をテンプレートとし、プライマーとして、5' -ATCGGGATCCATGCAACTGTTCAATTTGCCATTGAAAGTT-3' (配列番号 3) 、および 5' -ATCGGTCTGACTTAAGCGGCAGGTGCACCAGCCTTAGCGTA-3' (配列番号 4) を用いて P C R 増幅を行い、制限酵素 B a m H I および S a l I で切断して、約 1 8 0 0 b p の B a m H I - S a l I 断片を得た。この断片は、グルコアミラーゼの分泌シグナル配列およびグルコアミラーゼの成熟タンパク質配列を有している。他方、マルチコピー型プラスミド p U G P 3 (Taka
15 hashiら、同上) を制限酵素 B a m H I および S a l I で切断し、そこに上記約 1 8 0 0 b p の B a m H I - S a l I 断片を連結して、グルコアミラーゼを分泌するために用いるプラスミド p S G A 1 1 を作成した。

25 [a-5] *Streptococcus bovis* 由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示するために用いるプラスミドの調製

Streptococcus bovis 148 由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示するプ

ラスミド p B A A 1 は、上記 [a-2] で得られたラスミド p A A 1 2 を出発材料として調製した。図 4 にラスミド p B A A 1 の模式図を示す。ラスミド p A A 1 2 を X h o I で処理し、長断片 (6.9kb) と短断片 (1.7kb) とに分離した。

- 5 長断片をセルフライゲーションして得られるラスミドを N o t I および K p n I で切断し、平滑化した後、約 8 6 0 b p の断片を得た。この断片は G A P D H プロモーター配列および α -アミラーゼの 3' 側から 3 2 0 アミノ酸残基をコードする遺伝子配列を有する。他方、マルチコピー型ラスミド p M T 3 4 (+3) を、P v u I I および B a m H I で切断し、平滑化した後、上記約 8 6 0 b p の断片を組込んで、ラスミド p U G P 1 2 を得た。

- ラスミド p Q E 3 1 (キアゲン社) に *Streptococcus bovis* 418 由来の α -アミラーゼ遺伝子 (E. Satoh ら、Appl. Environ. Microbiol. 63:4593-4596 (1997)) が挿入されたラスミド p Q E 3 1 :: a m y A を作成した。
- 15 これを S a c I I および X h o I で切断して、*S. bovis* 418 由来の α -アミラーゼ遺伝子を含む断片を得た。次いで、ラスミド p C A S 1 (*S. Shibasaki* ら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 55:471-475 (2001)) を S a c I I および X h o I で切断し、そこに *S. bovis* 418 由来の α -アミラーゼ遺伝子断片を挿入して、ラスミド p C A S 1 :: a m y A を得た。このラスミド
- 20 p C A S 1 :: a m y A をテンプレートとして、5'-AATACTCGAGATGCAACTGTTCAATTGCCATTGAAAGT-3' (配列番号 5) および 5'-CTGCCCATGGGGTTTTAGCCCATCTTATTATAGTTTCC-3' (配列番号 6) のプライマーを用いる P C R によって増幅し、X h o I で処理し、グルコアミラーゼ遺伝子の分泌シグナル配列および *Streptococcus bovis* 148 由来の α -アミラーゼ遺伝子を含む 2. 2 k b の
- 25 DNA 断片を得た。この断片を、上記ラスミド p U G P 1 2 の X h o I 部位に導入して、*Streptococcus bovis* 由来の α -アミラーゼを細胞表層に提

示するために用いるプラスミド p B A A 1 を得た。

[a-6] *Streptococcus bovis*由来の α -アミラーゼを分泌するために用いるプラスミドの調製

- 5 *Streptococcus bovis* 148由来の α -アミラーゼを分泌するプラスミド p S B A A 2 の模式図を、図 5 に示す。プラスミド p C A S 1 :: a m y A をテンプレートとして、プライマーとして、5'-AATAGAGCTCATGCAACTGTTCAATTTGC
CATTGAAAGT-3' (配列番号 7) および 5'-TGGCGGTACCTTATTTTAGCCCATCTTTATTATTA
10 TAGTTTC-3' (配列番号 8) のプライマーを用いる PCR によって増幅し、制限酵素 S a c I および K p n I で切断し、グルコアミラーゼの分泌シグナル配列およびグルコアミラーゼの成熟タンパク質配列を有する 2.2 kb の DNA 断片を得た。他方、マルチコピー型プラスミド p U G P 3 (Takahashi
ら、同上) を制限酵素 S a c I および K p n I で切断し、そこに上記 S a c I - K p n I 断片を連結して、*Streptococcus bovis*由来の α -アミラーゼ
15 を分泌するために用いるプラスミド p S B A A 2 を作成した。

(実施例 1 : *Rhizopus oryzae*由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示しかつ *Bacillus stearothermophilus*由来の α -アミラーゼを分泌する酵母の作成)

- 20 *Rhizopus oryzae*由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示するためのプラスミド p G A 1 1 と *Bacillus stearothermophilus*由来の α -アミラーゼを分泌するためのプラスミド p S A A 1 1 とを、Yeast Maker (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) を用いた酢酸リチウム法によって、同時に酵母 Y F 2 0 7 に導入した。これを、選択培地として、L-トリプトファン
25 およびウラシルを含まない適切なアミノ酸および塩基を補充した S D 寒天培地 (6.7g/l Yeast nitrogen base w/o amino acids (Difco Laboratories

製)、2%グルコース、0.02g/l 硫酸アデニン、0.02g/l L-ヒスチジン・HCl、0.03g/l L-ロイシン、0.02g/l L-リジン) を用いて、培養した。生育した酵母を選択し、YF 207 / pGA11 + pSAA11 と命名した。

5 (比較例1 : Rhizopus oryzae由来のグルコアミラーゼおよびBacillus stearothermophilus由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示する酵母の作成)

Rhizopus oryzae由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示するためのプラスミド pGA11 と Bacillus stearothermophilus由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示するためのプラスミド pAA12 とを、実施例1と同様に
10 酵母YF 207に同時に導入し、得られた酵母をYF 207 / pGA11 + pAA12 と命名した。

(比較例2 : Rhizopus oryzae由来のグルコアミラーゼを分泌しかつBacillus stearothermophilus由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示する酵母の
15 作成)

グルコアミラーゼを分泌するためのプラスミド pSGA11 と α -アミラーゼを細胞表層に提示するためのプラスミド pAA12 とを、実施例1と同様に酵母YF 207に同時に導入し、得られた酵母をYF 207 / pSGA
20 11 + pAA12 と命名した。

(比較例3 : Rhizopus oryzae由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示する酵母の作成)

Rhizopus oryzae由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示するためのプラスミド pGA11 を用い、選択培地にウラシル10g/lを加えた以外は実施
25 例1と同様にして、プラスミド pGA11 を酵母YF 207に導入し、得られた酵母をYF 207 / pGA11 と命名した。

(実施例 2、比較例 4～6)

実施例 1、比較例 1～3 で得られた形質転換酵母各 5 ml を、1 % カザミノ酸 (Difco Laboratories 製) を含む S D 培地 100 ml にそれぞれ接種し、30℃
5 にて 48 時間振とうすることによって、種培養を行った。

次いで、各 50 ml の種培養物を、1 L の 4 % YPS 培地 (10 g/l 酵母エキストラクト (Difco Laboratories 製)、20 g/l ポリペプトン (和光純薬(株)製)、40 g/l デンプン (可溶性) (和光純薬(株)製)、5 g/l グルコース) を予め入れた 2 L のジャーファーマンター (BMJ-02PI、Biott Corp., 東京) にそれぞれ入れ、30℃ にて好氣的条件下で培養した。培地の pH を、硫酸および水酸化ナトリウムの添加によって 5.0 に維持し、そして溶存酸素濃度 (DO) を、攪拌速度を調節することによって 2.0 ppm に維持した。乾燥菌体重量が約 15 g/l に達した後、培地を抜き取って、5000 rpm での 10 分間の遠心分離によって菌体を回収した。

15 なお、用いた酵母の宿主である酵母 Y F 2 0 7 株は、この培地では、ほとんど生育しなかった。

得られた酵母菌株を用いて、それぞれ回分発酵を行いエタノールを生産させた。すなわち、回収した各酵母ペレットを、ジャーファーマンター中の 1 L の 6 % YPS 培地 (すなわち、60 g/l のデンプンを含む) に接種し、pH 5.0、
20 30℃ にて嫌氣的条件下で緩やかに攪拌 (150 rpm) しながら約 35 時間発酵を行った。培養および発酵工程を通して、デンプン濃度、乾燥菌体重量、およびエタノール濃度を測定した。

デンプン濃度は、以下のように測定した。1.0 ml の試料から、5000 rpm で 5 分間遠心分離によって菌体を分離し、上清を蒸留水で希釈して、デンプン濃度測定に使用した。Aspergillus niger 由来のグルコアミラーゼ溶液 (6100
25 ユニット/ml、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を蒸留水で 100 倍希釈

し、0.9mlの希釈した試料に0.1mlのグルコアミラーゼ溶液を加えて、30℃にて30分間インキュベートした。反応を10分間の煮沸によって停止した後、溶液中のグルコース濃度を、グルコースCIIテストワコー（和光純薬(株)製）を用い、分光光度計（U-2001、日立製）を使用して測定し、デンプン濃度に換算した。

また、エタノール濃度は、水素炎イオン化検出器を装着したガスクロマトグラフ（Model GC-8；島津製作所製）を使用して測定した。測定条件は以下のとおりであった：カラム、3.0mm×3.1mのガラスに充填されたUnisole 3000（GL Science Inc.）；カラム温度、210℃；インジェクター／検出器の温度、270℃；キャリアガス、窒素（流速：25ml/分）。

各種酵母の増殖および流加回分培養によるアルコール発酵の結果を表1に示す。なお、表1中、feed 1、feed 2とあるのは、それぞれ、36時間目および72時間目のデンプン濃度測定後に追加したデンプン量（g）を意味し、それ以外の数字は、培地中のデンプン濃度（g/l）を意味する。

表 1

	プラスミド	増殖フェーズ				発酵フェーズ										
		GA ^{*1}	AA ^{*2}	菌体量 (g/l)		テンポン濃度(g/l)				アルコール濃度 (g/l)				アルコール収率 ^{*3} (%)		
				0hr	24hr	0hr	36hr	72hr	72hr	110hr	110hr	36hr	72hr		110hr	
実施例2	表層 分泌			42	28	14	14	15	60	16	70	20	32	50	77	40
比較例4	表層 表層			40	24	14	14	18	60	20	60	30	30	42	62	34
比較例5	分泌 表層			40	25	13	13	18	60	19	60	32	29	42	61	34
比較例6	表層 なし			33	19	11	11	20	60	19	60	35	25	38	55	31

*1 GA: グルコアミラーゼ

*2 AA: α-アミラーゼ

*3 (アルコール生産量 / 添加テンポン量) × 100

5

10

15

20

25

実施例1の酵母、比較例1～3の酵母ともに、デンプンを炭素源として生育し、アルコール発酵したことは、各表層に提示された酵素および分泌された酵素がデンプンを分解してグルコースを生成し、これが利用されたことを示している。

- 5 本発明の、グルコアミラーゼを表層に提示し、 α -アミラーゼを分泌する酵母は、増殖フェーズにおいては、他の酵母と大差はなかったものの、驚くべきことに、アルコール発酵の能力が、他の酵母に比べて優れていることが見出された（実施例2）。すなわち、他の酵母と比べて、デンプンの分解速度が早く、しかも残存するデンプン量が少なく、アルコール発酵の速度も大きいことが判明した。本発明の酵母のアルコール生産量は、約77g/lであり、
10 添加したデンプンの約40%がアルコールに変換されたことになる。この値は、グルコースを基質とした場合と遜色なく、実用性があることが立証された。なお、他の酵母のアルコール収率は、グルコアミラーゼと α -アミラーゼとを細胞表層に提示する酵母では34%、 α -アミラーゼを細胞表層
15 に提示し、グルコアミラーゼを分泌する酵母では34%、グルコアミラーゼを細胞に提示する酵母では31%であった。このことは、本発明の酵母がデンプンから直接アルコール発酵をするのに適しており、実用性が高いことを示している。

- また、反応終了後、実施例3で用いた本発明の酵母をトリプトファンとウ
20 ラシルを含まないSD培地で希釈し、そしてYPDプレートおよび、トリプトファンとウラシルを含まないSDプレートに播き、30℃にて48時間のインキュベーション後、両方のプレート上のコロニー数をカウントしたところ、80%以上の酵母が、プラスミドを安定に保持していた。

- 25 （実施例3：Rhizopus oryzae由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示しかつStreptococcus bovis由来の α -アミラーゼを分泌する酵母の作成）

Rhizopus oryzae由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示するためのプラスミド pGA11 と Streptococcus bovis 由来の α -アミラーゼを分泌するためのプラスミド pSBAA2 とを、実施例 1 と同様に酵母 YF207 に同時に導入し、得られた酵母を YF207 / [pGA11, pSBAA2] と命名した。

(比較例 7 : Rhizopus oryzae 由来のグルコアミラーゼおよび Streptococcus bovis 由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示する酵母の作成)

Rhizopus oryzae 由来のグルコアミラーゼを細胞表層に提示するためのプラスミド pGA11 と Streptococcus bovis 由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示するためのプラスミド pBAA1 とを、実施例 1 と同様に酵母 YF207 に同時に導入し、得られた酵母を YF207 / [pGA11, pBAA1] と命名した。

(比較例 8 : Streptococcus bovis 由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示する酵母の作成)

Streptococcus bovis 由来の α -アミラーゼを細胞表層に提示するためのプラスミド pBAA1 を、実施例 1 と同様に酵母 YF207 に導入し、得られた酵母を YF207 / pBAA1 と命名した。

(比較例 9 : Streptococcus bovis 由来の α -アミラーゼを分泌する酵母の作成)

Streptococcus bovis 由来の α -アミラーゼを分泌するためのプラスミド pSBAA2 を、実施例 1 と同様に酵母 YF207 に導入し、得られた酵母を YF207 / pSBAA2 と命名した。

なお、実施例 3 および比較例 7~9 で得られた酵母について、プラスミド

pGA11によるグルコアミラーゼの細胞表層発現をフローサイトメトリー分析によって確認し、そしてプラスミドpBAA1による細胞表層発現およびpSBAA2による分泌発現の α -アミラーゼ活性をブルースターチプレートによって確認した。

5

(実施例4、比較例10～13)

実施例3、比較例3および7～9で得られた形質転換酵母各200 μ lを、5g/l D-グルコースを含む100mlのYSP培地(10g/l 酵母エキストラクト、20g/l ポリペプトン、20g/l 蒸煮コーンスターチ)に接種し、そして酵母細胞を、30°Cにて好氣的条件下で48時間振とうしながら培養して、増殖させた。結果を、図6に示す。

10

Streptococcus bovis由来の α -アミラーゼのみを提示または分泌するYF207/pBAA1およびYF207/pSBAA2は両方とも、蒸煮コーンスターチを炭素源として増殖し得、そして48時間後にOD₆₀₀は14に達した。一方、グルコアミラーゼ提示酵母YF207/pGA11は、わずかに増殖したにすぎなかった。

15

また、Rhizopus oryzae由来のグルコアミラーゼを提示しかつStreptococcus bovis由来の α -アミラーゼを分泌するYF207/[pGA11, pSBAA2]は、蒸煮コーンスターチ培地で増殖し、そして48時間後にOD₆₀₀は25に達した。グルコアミラーゼおよび α -アミラーゼを共提示するYF207/[pGA11, pBAA1]も、蒸煮コーンスターチで良好に増殖していた。これらの2種の組換え酵母は、48時間の培養で、培地中のデンプンの消費量も多かった。

20

次に、無蒸煮コーンスターチ培地を用いた場合のアルコール発酵について検討した。上記5種の組換え酵母細胞を、それぞれ30°Cにて好氣的条件下で48時間、SDC培地(適切なアミノ酸およびヌクレオチドを追加した6.7g/l ye

25

ast nitrogen base、10g/l カザミノ酸、20g/l グルコース) で増殖し、500
0×gでの10分間の遠心分離によって回収した。得られた細胞ペレットを、50
mlのYPS培地 (10g/l 酵母エキストラクト、20g/l ポリペプトン、50g/l 無
蒸煮コーンスターチに、初期OD₆₀₀=60の酵母細胞濃度で接種した。次いで、
5 30℃にて嫌氣的条件下で攪拌 (100rpm) しながらアルコール発酵を行った。
結果を図7に示す。

図7からわかるように、50g/lの無蒸煮コーンスターチを炭素源として用
いた場合、*Rhizopus oryzae*由来のグルコアミラーゼを提示しかつ*Streptoco*
*ccus bovis*由来の α -アミラーゼを分泌するYF207/[pGA11, p
10 SBAA2]のみが、デンプンを消費しそしてエタノールを生産し得た。一
方、他の組換え酵母細胞では、エタノールの生産量は非常に少なく、ほとん
ど増殖していなかった。

そこで、無蒸煮デンプンからエタノールを生産し得るYF207/[pG
A11, pSBAA2]を使用して、アルコール発酵における仕込みデンプ
15 ン濃度の影響を検討した。なお、初期OD₆₀₀は60とした。図8に示すように、
仕込みデンプン濃度が高くなるにつれて、生産されるエタノール濃度が高
くなった。250g/lの無蒸煮コーンスターチでは約80時間で50g/lのエタノール
濃度に達した。

さらに、250g/lの無蒸煮コーンスターチ培地を用いる場合の仕込み時のY
20 F207/[pGA11, pSBAA2]の細胞濃度について検討した。図
9に示すように、初期OD₆₀₀が高くなるにつれて、初期エタノール生産速度
は上昇するが、最終エタノール濃度は減少していた。一方、初期OD₆₀₀=30
に酵母細胞濃度を低下させると、エタノール濃度は60g/lに達したが、50g/l
エタノールに達するまでには、初期OD₆₀₀=60の場合よりも時間を要した。

産業上の利用可能性

本発明の、グルコアミラーゼを表層に提示し、かつ α -アミラーゼを分泌する酵母は、デンプンを基質として生育する場合、グルコアミラーゼと α -アミラーゼを細胞表層に提示する酵母、 α -アミラーゼを細胞表層に提示し

5 グルコアミラーゼを分泌する酵母、およびグルコアミラーゼを細胞に提示する酵母と大差はないが、デンプンからのアルコール発酵の能力が、他の酵母に比べて優れている。そのアルコールの収率は40%と、グルコースからのアルコール発酵と遜色ないため、デンプンから直接エタノールを生産するために有用である。特に、分泌させる α -アミラーゼとしてStreptococcus bo

10 vis由来のものを用いると、無蒸煮デンプンを炭素源とした場合でも高収率でのアルコール生産が可能である。したがって、生デンプンを蒸煮することなく、より効率的にエタノールを生産できる。

請求の範囲

1. グルコアミラーゼを細胞表層に提示し、かつ α -アミラーゼを分泌する酵母。

5

2. 前記酵母が凝集性酵母である請求項1に記載の酵母。

3. 前記 α -アミラーゼがStreptococcus bovis由来である、請求項1または2に記載の酵母。

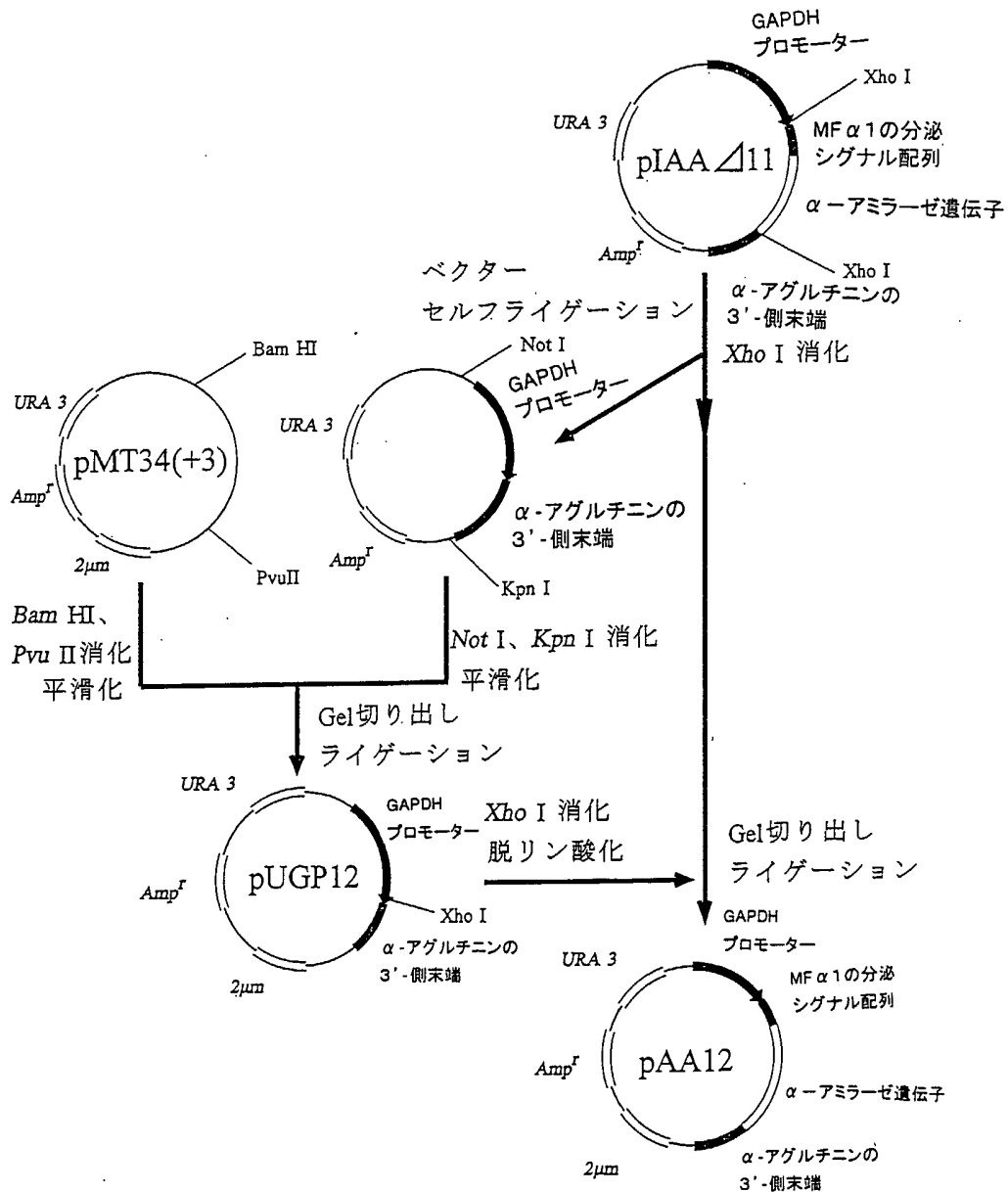
10

4. 請求項1から3のいずれかに記載の酵母を、デンプンを含む培地で培養する工程を含む、アルコールの製造方法。

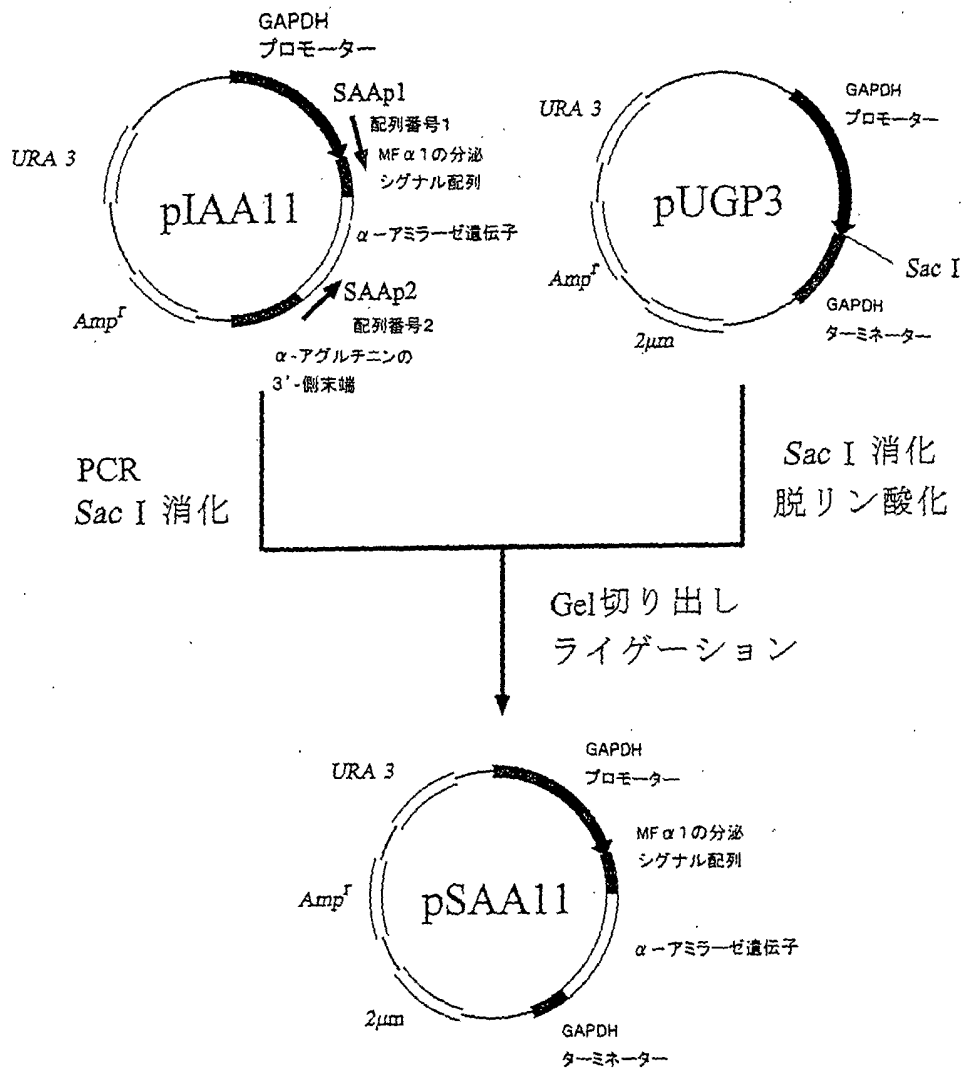
5. 前記デンプンが無蒸煮である、請求項4に記載の方法。

15

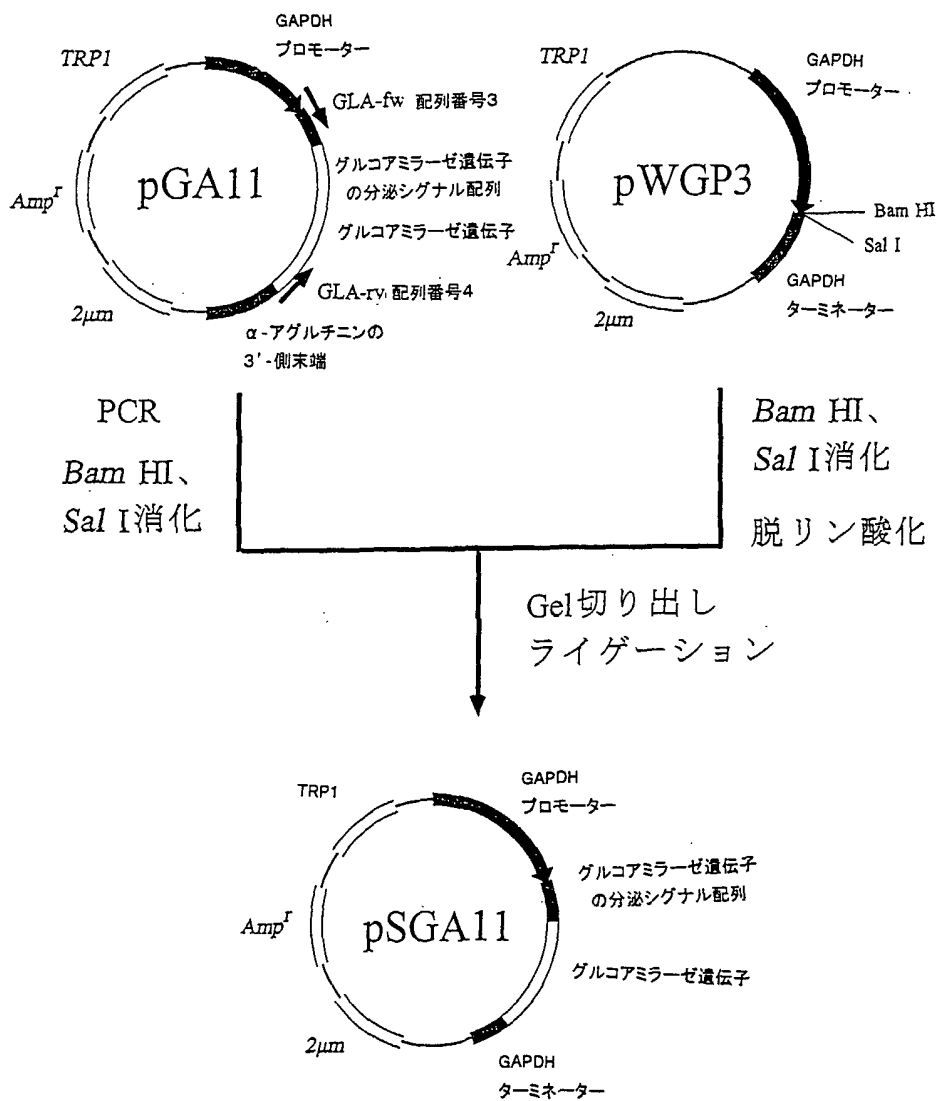
第1図



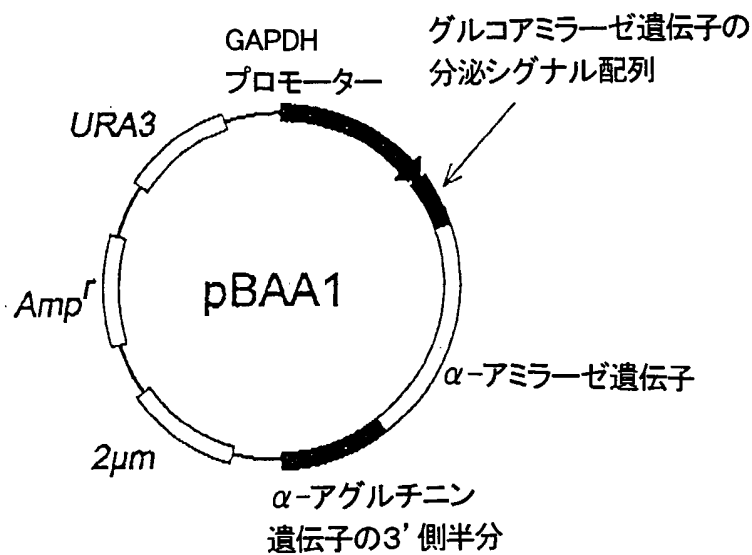
第2図



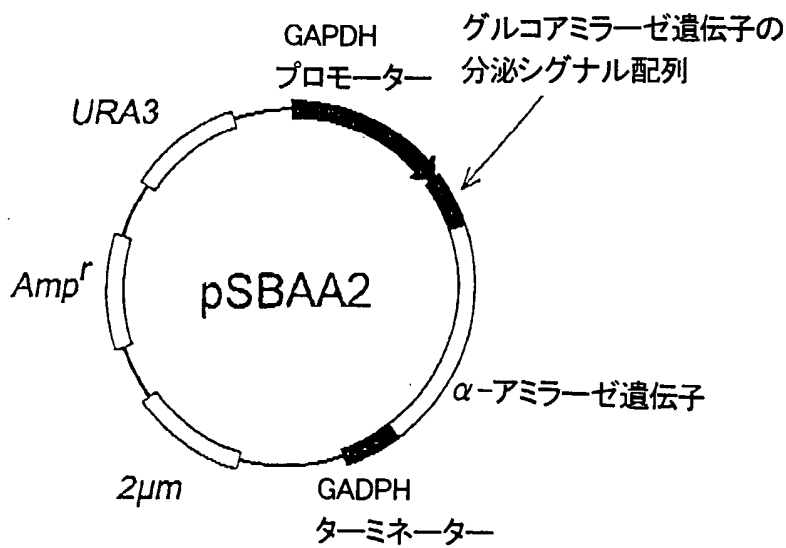
第3図



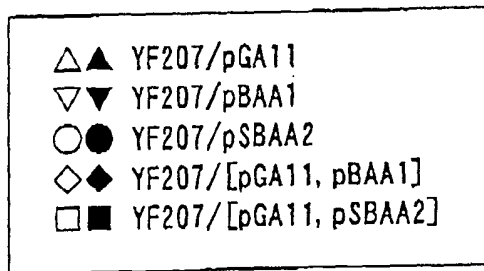
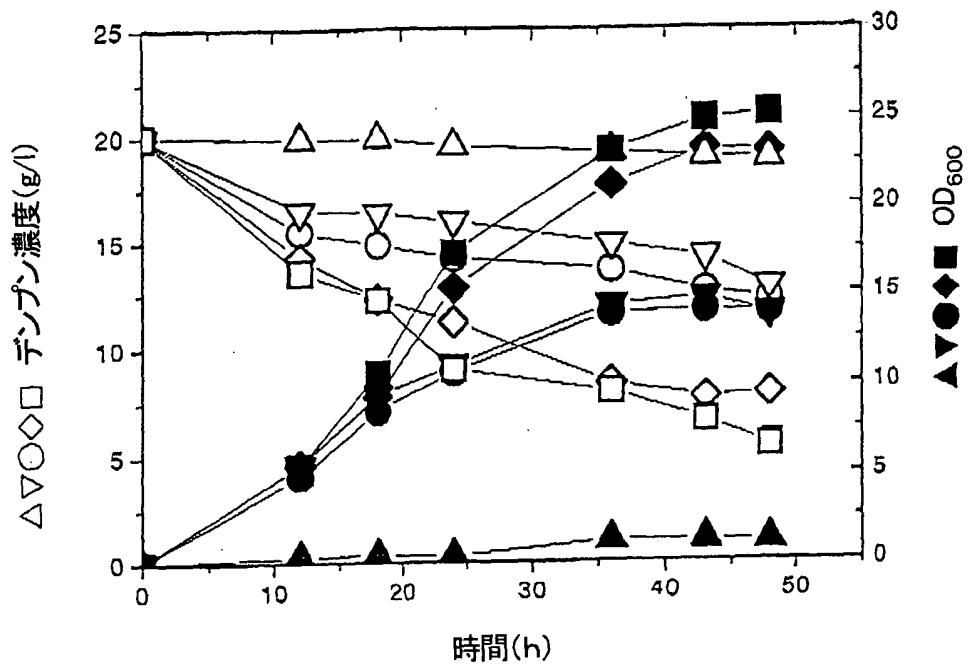
第4図



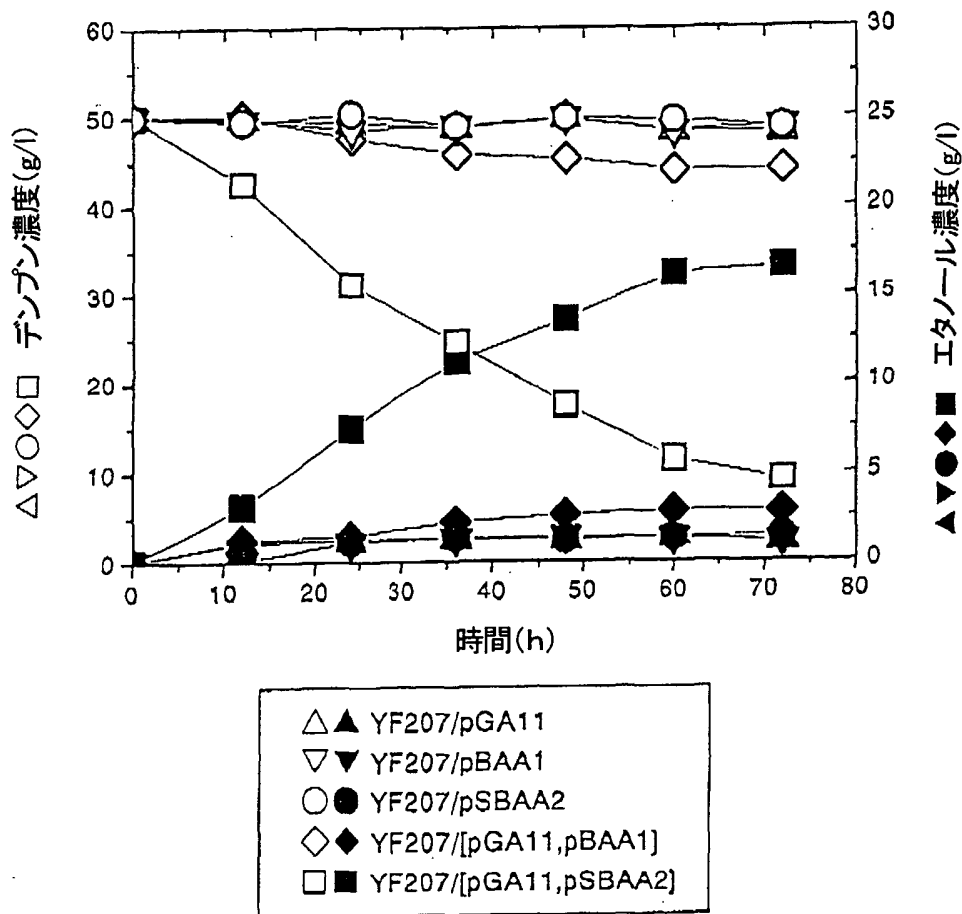
第5図



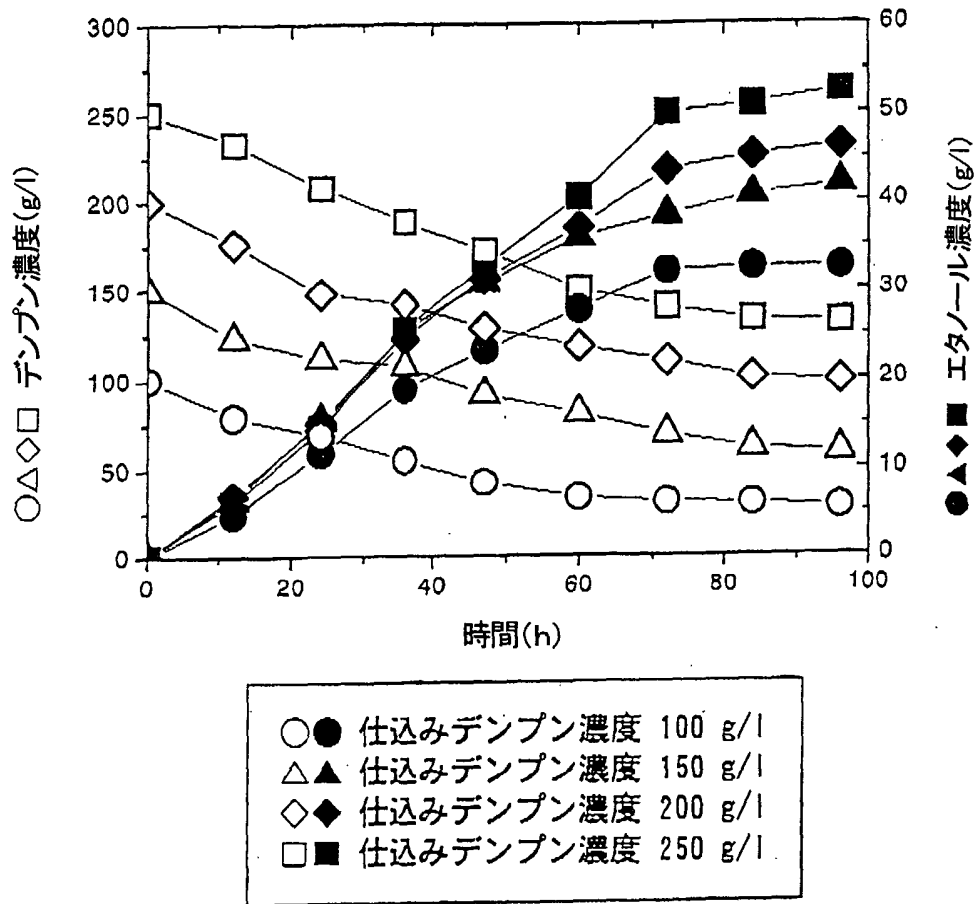
第6図



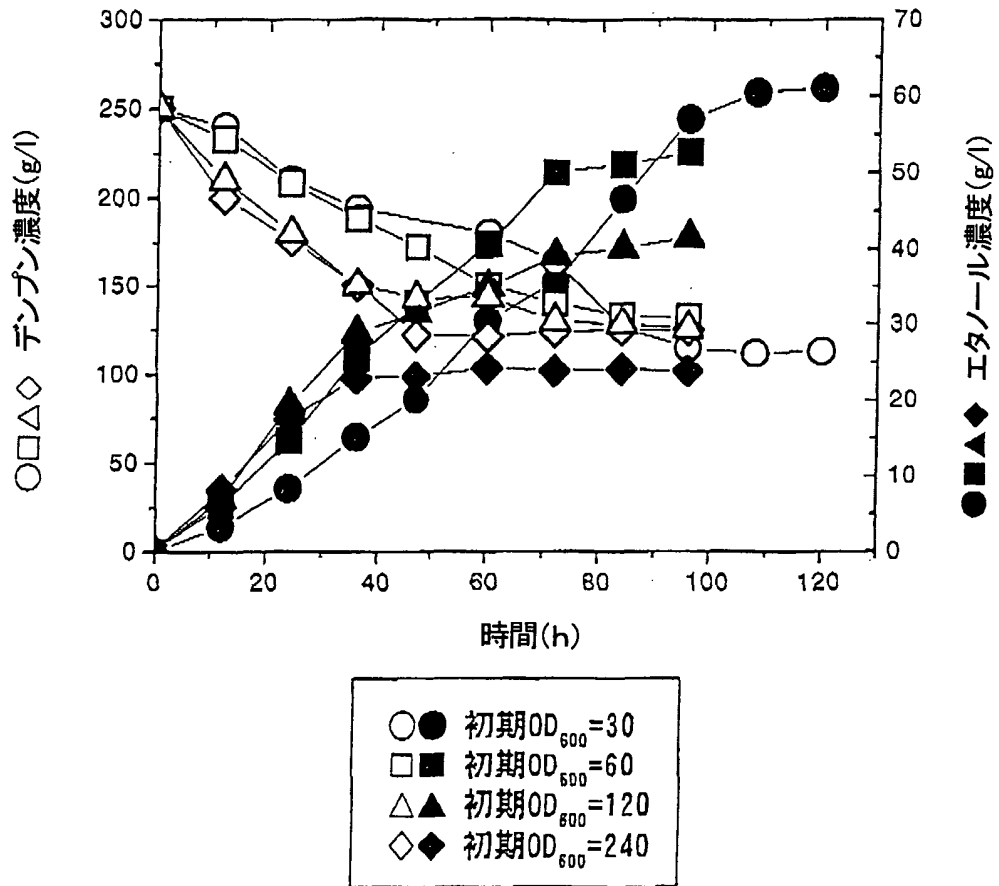
第7図



第8図



第9図



SEQUENCE LISTING

<110> Kansai Chemical Engineering Co., Ltd.
<120> A method for alcohol production from starch
<130> P2-02K02034
<160> 8
<210> 1
<211> 38
<212> DNA
<213> artificial
<400> 1
atgcgagctc atgagatttc ctccaatttt tactgcag 38
<210> 2
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial
<400> 2
atgcgagctc tcaaggccat gccaccaacc gtggttcgg 39
<210> 3
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial
<400> 3
atcgggatcc atgcaactgt tcaatttgcc attgaaagt 40
<210> 4
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial
<400> 4
atcggtcgac ttaagcggca ggtgcaccag ccttagcgta 40

<210> 5
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial
<400> 5
aatactcgag atgcaactgt tcaattgcc attgaaagt 39
<210> 6
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial
<400> 6
ctgcccattgg ggttttagcc catctttatt atagttcc 39
<210> 7
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial
<400> 7
aatagagctc atgcaactgt tcaattgcc attgaaagt 39
<210> 8
<211> 39
<212> DNA
<213> artificial
<400> 8
tggcgggtacc ttatttttagc ccatctttat tatagtttc 39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/01980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, 1/19, C12P7/06

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)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C12N1/19, C12P7/06, C12C11/02, C12G3/02

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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	YANAKA A. et al., Evaluation of the function of arming yeast displaying glucoamylase on its cell surface by direct fermentation of corn to ethanol. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86(6), pages 569 to 572	1, 4, 5 2, 3
Y A	JP 5-236942 A (Director General of Basic Industries Bureau of Ministry of International Trade and Industry), 17 September, 1993 (17.09.93), (Family: none)	2 1, 3-5
Y A	SATOH E. et al., Molecular cloning and expression of two alpha-amylase genes from Streptococcus bovis 148 in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol, 1993, Nov., 59(11), p.3669-73	3 1, 2, 4, 5

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
09 April, 2002 (09.04.02)Date of mailing of the international search report
28 May, 2002 (28.05.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/01980

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANAKA A. et al., Cell surface engineering of yeast: Construction of arming yeast with biocatalyst. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(2), pages 125 to 136	1-5
A	NAKAMURA Y. et al., Alcohol fermentation of starch by a genetic recombinant yeast having glucoamylase activity. Biotechnology and bioengineering, 1997, 53, pages 21 to 25	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/09, 1/19, C12P7/06		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/00-15/90, C12N1/19, C12P7/06, C12C11/02, C12G3/02		
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		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) JICST (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	YANAKA A. et al., Evaluation of the function of arming yeast displaying glucoamylase on its cell surface by direct fermentation of corn to ethanol. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86 (6), p. 569-572	1, 4, 5 2, 3
Y A	JP 5-236942 A (通商産業省基礎産業局長) 1993. 09. 17 (ファミリーなし)	2 1, 3-5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	09. 04. 02	国際調査報告の発送日
		28.05.02
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4B 9838
日本国特許庁 (ISA/JP)	伏見 邦彦	
郵便番号 100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3448
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	SATOH E. et al., Molecular cloning and expression of two alpha-amylase genes from Streptococcus bovis 148 in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol, 1993 Nov, 59(11), p. 3669-73	3 1, 2, 4, 5
A	TANAKA A. et al., Cell surface engineering of yeast: Construction of arming yeast with biocatalyst. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(2), p. 125-136	1-5
A	NAKAMURA Y. et al., Alcohol fermentation of starch by a genetic recombinant yeast having glucoamylase activity. Biotechnology and bioengineering, 1997, 53, p. 21-25	1-5