(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
2020年1月2日(02.01.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/004473 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 9/42 (2006.01) *C12P 7/06* (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/025404

(22) 国際出願日： 2019年6月26日(26.06.2019)

(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 2018-122997 2018年6月28日(28.06.2018) JP

(71) 出願人: 関西化学機械製作株式会社 (**KANSAI CHEMICAL ENGINEERING CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒6600053 兵庫県尼崎市南七松町２丁目９番７号 Hyogo (JP). Ｂｉｏ－ｅｎｅｒｇｙ株式会社 (**BIO-ENERGY CORPORATION**) [JP/JP]; 〒6600053 兵庫県尼崎市南七松町２丁目９番７号 Hyogo (JP).

(72) 発明者: ▲濱▼ 真司(**HAMA, Shinji**); 〒6600053 兵庫県尼崎市南七松町２丁目９番７号 Ｂｉｏ－ｅｎｅｒｇｙ株式会社内 Hyogo (JP). 木原 真希(**KIHARA, Maki**); 〒6600053 兵庫県尼崎市南七松町２丁目９番７号 Ｂｉｏ－ｅｎｅｒｇｙ株式会社内 Hyogo (JP). 野田 秀夫(**NODA, Hideo**); 〒6600053 兵庫県尼崎市南七松町２丁目９番７号 関西化学機械製作株式会社内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 中道 佳博, 外(**NAKAMICHI, Yoshihiro** et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満３丁目２番９号翁ビル５階 創樹国際特許事務所 Osaka (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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,

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING CELLULASE AGENT, AND METHOD FOR PRODUCING SACCHARIFICATION/FERMENTATION PRODUCT IN WHICH SAID CELLULASE AGENT IS USED

(54) 発明の名称： セルラーゼ剤の製造方法ならびに当該セルラーゼ剤を用いた糖化発酵産物の製造方法

(57) **Abstract:** Disclosed is a method for producing a cellulase agent. This method includes a step for culturing microorganisms of the genus Trichoderma at a pH of at least 1 and less than 5 in a medium containing a polysaccharide that has at least two β-1,4-bonded glucoses to produce a cellulase agent, the ratio of the β-glucosidase activity in the cellulase agent to the filter paper decomposition activity of the cellulase agent being lower than 3. Also disclosed are a method for producing a saccharification/fermentation product and a method for culturing surface layer presentation microorganisms using a culture medium that contains a cellulose material treated by a cellulase agent produced by the above method. These methods make it possible to produce a saccharification/fermentation product efficiently from a cellulose-based biomass irrespective of the location environment and production scale of a manufacturer.

(57) 要約：セルラーゼ剤を製造する方法を開示する。この方法は、トリコデルマ属微生物を、ｐＨ１以上かつ５未満にて、少なくとも２つのグルコースがβ－１，４結合した多糖を含有する培地にて培養し、セルラーゼ剤を生産させる工程を含み、該セルラーゼ剤の濾紙分解活性に対する該セルラーゼ剤におけるβ－グルコシダーゼ活性の比率が３より低い。さらに、上記方法で製造されたセルラーゼ剤で処理したセルロース材料を含有する培地を用いる、糖化発酵産物の製造方法および表層提示微生物の培養方法を開示する。これらの方法によれば、製造者の立地環境や生産規模に関わらず、セルロース系バイオマスから糖化発酵産物を効率よく製造し得る。

WO 2020/004473 A1

［続葉有］

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：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　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)）

明　細　書

発明の名称 ：

セルラーゼ剤の製造方法ならびに当該セルラーゼ剤を用いた糖化発酵産物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、セルラーゼ剤の製造方法ならびに当該セルラーゼ剤を用いた糖化発酵産物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] セルロース系バイオマスの酵素糖化を工業的に利用するにあたり、エタノールなどの糖化発酵産物の製造地と酵素生産の立地的関係が注目されている（非特許文献１）。糖化発酵産物の製造者が、酵素糖化に用いられる高性能酵素を当該酵素の供給者から入手するには、大容量の酵素の運搬を要し、場合によっては長距離となるため輸送コストがかかる。さらに、製造者の生産規模によっては、糖化発酵産物の製造への使用までの酵素の保管を要する。このため、エタノールなどの糖化発酵産物の製造者の立地環境および生産規模に淘汰が生じ得、当該糖化発酵産物の生産技術の普及または拡大の阻害につながり得る。

[0003] 一方、糖化発酵産物を製造する性能を高めるための酵素配合、高いセルラーゼ生産能力を示す菌株の作出やプロセスの開発などの種々の試みがなされている。

[0004] 非特許文献２には、Celluclast 1.5L（ノボザイムズ社製：主にエンド型およびエキソ型のグルカナーゼを含む。非改良型セルラーゼ製剤）を、Novozyme 188（ノボザイムズ社製：主にβ-グルコシダーゼを含む）とブレンドして酵素糖化に用いる方法が記載されている。

[0005] 非特許文献３には、カルボキシメチルセルロースの加水分解に際し、Celluclast 1.5Lに対するβ－グルコシダーゼ（Novozyme 188相当）のブレンド比率（酵素の質量濃度を基準にした）が、例えば0.5あるいは1.0であることが

記載されている。この方法では、β－グルコシダーゼを、セルラーゼに対して非常に多くの量で補充する。

[0006] 非特許文献４には、セルラーゼに補充するβ－グルコシダーゼを、アルギン酸カルシウムへの固定化により再利用することが示されている。

[0007] 非特許文献５には、トリコデルマ・リーセイ（Trichoderma reesei）がセルラーゼ生産菌としてよく用いられること、また、親株のトリコデルマ・リーセイQM6aに比べて突然変異を誘発したトリコデルマ・リーセイRUT-C30などが、親株より高いセルラーゼ生産能力を示すことが記載されている。

[0008] 非特許文献６には、トリコデルマ・リーセイRUT-C30の培養液に、それと同等量の市販のセルラーゼ、すなわちCellic CTec2またはCellic HTec2（ともにノボザイムズ社製：改良型セルラーゼ製剤）と、Novozyme 188とを添加することにより、バイオマスの分解活性が高められ、その結果、改良型セルラーゼ製剤の使用量を抑えられることが報告されている。

[0009] 非特許文献７には、低いβ－グルコシダーゼ活性（約8FPU/mLに対してほぼ0に近いβ-グルコシダーゼ活性）を示すトリコデルマ・リーセイを、β－グルコシダーゼを生産するアスペルギルス（Aspergillus）属糸状菌と共培養すると、その培養液のセルラーゼ活性（アビセラーゼ活性）に対するβ-グルコシダーゼの活性の比率を、Celluclast 1.5LとNovozyme 188との混合液と同等にできることが示されている。

[0010] 特許文献１には、アスペルギルス属微生物のβ－グルコシダーゼ遺伝子をトリコデルマ属微生物のプロモーター制御下で発現する形質転換体を得ることにより、セルロース系バイオマスを糖化する方法が記載されている。本文献では、β－グルコシダーゼをコードする遺伝子と連結する種々のプロモーターを検討し、最適化を図っている。

[0011] 非特許文献８には、トリコデルマ・リーセイにおいて目的のβ-グルコシダーゼを発現するプロモーターの選定と最適化には制約があるため、β－グルコシダーゼを分泌発現するように形質転換した酵母をセルロース系バイオマスからのエタノール生産に利用することが記載されている。

[0012] しかし、上記非特許文献および特許文献のいずれに記載の技術を用いたとしても、依然として、酵素提供者に対する製造者の立地環境や生産規模による淘汰の懸念は存在する。このため、製造者の立地環境や生産規模に関わらず、セルロース系バイオマスから糖化発酵産物を効率よく製造し得る新たな技術開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：国際公開第２０１３／１１５３０５号

非特許文献

[0014] 非特許文献1：E. Johnsonら, Biofuels. Bioprod. Bioref 10:164-174 (2016)

非特許文献2：Rosales-Calderonら, PeerJ 2:e402 (2014)

非特許文献3：V Braboら, J Chem Technol Biotechnol 2002, 77:15-20

非特許文献4：Chien-Tai TsaiおよびAnne S. Meyer, Molecules 2014, 19, 19390-19406

非特許文献5：Robyn PetersonおよびHelena Nevalainen, Microbiology (2012), 158, 58-68

非特許文献6：Rana V and Ahring BK, Molecular Enzymology and Drug Targets, 2015, volume 1, issue 1:3

非特許文献7：Kolasaら、Bioresource Technology 169 (2014) 143-148

非特許文献8：T. Treebupachatsakulら, Journal of Bioscience and Bioengineering, VOL. 121 No. 1, 27-35, 2016

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 本発明は、製造者の立地環境や生産規模に関わらず、セルロース系バイオマスから糖化発酵産物を効率よく製造し得る方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明は、セルラーゼ剤を製造する方法を提供し、この方法は、

トリコデルマ属微生物を、ｐＨ１以上かつ５未満にて、少なくとも２つのグルコースがβ－１，４結合した多糖を含有する培地にて培養し、セルラーゼ剤を生産させる工程

を含み、

該セルラーゼ剤の濾紙分解活性に対する該セルラーゼ剤におけるβ－グルコシダーゼ活性の比率が３より低い。

[0017] １つの実施形態では、上記トリコデルマ属微生物はトリコデルマ・リーセイである。

[0018] １つの実施形態では、上記トリコデルマ属微生物は、セルラーゼ剤に関して非遺伝子組換えの微生物である。

[0019] １つの実施形態では、上記セルラーゼ剤は、セロビオヒドロラーゼおよびエンドグルカナーゼを含む。

[0020] １つの実施形態では、上記セルラーゼ剤は、キシラナーゼをさらに含む。

[0021] 本発明は、糖化発酵産物の製造方法を提供し、この方法は、

上記方法で製造されたセルラーゼ剤で処理したセルロース材料を含有する培地を用いて、β－グルコシダーゼ表層提示微生物を培養し、糖化発酵産物を得る工程

を含む。

[0022] １つの実施形態では、上記β－グルコシダーゼ表層提示微生物の酵素力価は、上記セルラーゼ剤の濾紙分解活性に対する該微生物のβ－グルコシダーゼ活性の比率として、０．０２～２．５である。

[0023] １つの実施形態では、上記セルロース材料は、セルロース系バイオマスである。

[0024] １つの実施形態では、上記糖化発酵産物はエタノールである。

[0025] １つの実施形態では、上記β－グルコシダーゼ表層提示微生物はβ－グルコシダーゼ表層提示酵母である。

[0026] １つの実施形態では、上記糖化発酵産物は乳酸である。

[0027] １つの実施形態では、上記β－グルコシダーゼ表層提示微生物はβ－グルコシダーゼ表層提示乳酸菌である。

[0028] １つの実施形態では、上記糖化発酵産物の製造方法は、上記セルラーゼ剤を、上記セルラーゼ剤の製造方法により製造する工程をさらに含む。

[0029] 本発明はさらに、糖化発酵産物の製造方法を提供し、この方法は、

上記方法で製造されたセルラーゼ剤で処理したキシロース含有多糖を含む材料を含有する培地を用いて、キシロースを代謝しかつキシロシダーゼを表層提示する微生物を培養し、糖化発酵産物を得る工程を含む。

[0030] １つの実施形態では、上記糖化発酵産物の製造方法は、上記セルラーゼ剤を、上記セルラーゼ剤の製造方法により製造する工程をさらに含む。

[0031] 本発明はさらに、表層提示微生物の培養方法を提供し、この方法は、

上記方法で製造されたセルラーゼ剤で該セルラーゼ剤が分解する多糖を含む材料を処理する工程、および

該処理された材料を含む培地で該表層提示微生物を培養する工程

を含み、

該表層提示微生物は、該処理された材料から該微生物が代謝する糖を生成する酵素を表層提示する。

発明の効果

[0032] 本発明によれば、セルロース系バイオマスからの糖化発酵産物の製造に有用なセルラーゼ剤を製造する方法が提供される。本発明によれば、製造者の立地環境や生産規模に関わらず、セルロース系バイオマスから糖化発酵産物を効率よく製造し得る。

図面の簡単な説明

[0033] [図1]実施例１におけるトリコデルマ・リーセイＲＵＴ－Ｃ３０の本培養の培養期間にわたるｐＨ変化および培養上清のセルラーゼ活性（濾紙分解活性「ＦＰＵ」）とタンパク質濃度の変化を示すグラフである。

[図2]実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤（５ロット分）および市販の改

良型セルラーゼ製剤のＳＤＳ－ＰＡＧＥによるタンパク質の分離および検出（クマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）染色による）の結果を示す電気泳動図である。

[図3]実施例１におけるトリコデルマ・リーセイＲＵＴ－Ｃ３０の本培養においてｐＨ３．５調整およびｐＨ５．０調整のそれぞれの場合について、本培養の培養開始から１７１時間後の培養上清中のβ－グルコシダーゼ活性（ＢＧＬ）、セロビオヒドロラーゼ活性（ＣＢＨ）およびセルラーゼ活性（ＦＰＡ）を示すグラフである。

[図4]実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したセルロース系バイオマスを用いて湿重量２ｇおよび２０ｇ（発酵液１Ｌあたり）の酵母（野生型酵母（ａ）またはβ－グルコシダーゼ表層提示酵母（ｂ））を培養した場合の、培養液中のエタノール濃度およびセロビオース濃度の経時変化を示すグラフである。

[図5]実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したセルロース系バイオマスを用いて野生型酵母またはβ－グルコシダーゼ表層提示酵母（ＢＧＬ表層提示酵母）の繰り返し発酵培養を行った場合の培養液中のエタノール濃度（ａ）およびセロビオース濃度（ｂ）の経時変化を示すグラフである。

[図6]実施例５におけるトリコデルマ・リーセイＲＵＴ－Ｃ３０の本培養の培養期間にわたるｐＨ変化および培養上清のセルラーゼ活性（濾紙分解活性：ＦＰＵ／ｍＬ）とタンパク質濃度（ｍｇ／ｍＬ）の変化を示すグラフである。

[図7]実施例５の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したセルロース系バイオマスを用いて野生型酵母ＴＪ１４またはそのβ－グルコシダーゼ表層提示酵母ＴＪ１４－ＢＧＬ（ＳＥＤ１）を培養した場合の、培養液中のエタノール濃度（ａ）およびセロビオース濃度（ｂ）の経時変化を示すグラフである。

[図8]実施例５の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したセルロース系バイオマスを用いて野生型酵母（野生型（ＢＹ４７４１））またはそのβ－グルコシダーゼ表層提示酵母（ＢＧＬ表層提示酵母（ＢＹ４７４１））を培養した

場合の、培養液中のエタノール濃度（Ａ）およびセロビオース濃度（Ｂ）の経時変化を示すグラフである。

[図9]実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したキシランを用いた、キシロース代謝性酵母（Ｘ３株）およびキシロース代謝性キシロシダーゼ表層提示酵母（Ｘ３－Ｘｙｄ　＃１株）のエタノール生産の結果を示す。

[図10]実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したセルロース系バイオマスを用いて湿重量２０ｇ（培養液１Ｌあたり）のβ－グルコシダーゼ表層提示乳酸菌（ｐＣＵＡ－Ｒｕｍａｌ２８１６株）を培養した場合の、培養液中の乳酸濃度（Ａ）およびセロビオース濃度（Ｂ）の経時変化を示す。

発明を実施するための形態

[0034]　（セルラーゼ剤の製造方法）

本明細書において「セルラーゼ剤」とは、セルロースを含む植物細胞壁成分の分解能を有する酵素のうち、少なくとも１つの酵素を含み、セルラーゼ剤全体として植物細胞壁成分の分解能を有する組成物をいう。セルラーゼ剤が分解能を有する細胞壁成分としては、セルロースおよびヘミセルロース、ならびにそれらの分解物が挙げられ、この「分解物」は、二糖以上からなる糖である。セルロースは、グルコースがβ－１，４グリコシド結合（「β－１，４結合」ともいう）により直鎖状に重合した高分子である。ヘミセルロースは、植物細胞壁成分のうち、セルロースおよびペクチン以外の不溶性食物繊維の総称であり、キシラン、マンナン、ガラクタンなどから構成される。

[0035]　細胞壁成分の分解能を有する酵素としては、例えば、セルラーゼおよびヘミセルラーゼが挙げられる。

[0036]　本明細書において「セルラーゼ」とは、β－１，４－グルカン（例えば、セルロース）のβ－１，４結合を加水分解する酵素をいう。本明細書における「セルラーゼ」は、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼおよびβ－グルコシダーゼのいずれもを包含していう。

[0037]　本明細書において、エンドグルカナーゼ（エンドβ１，４－グルカナーゼ

）は、狭義にて「セルラーゼ」とも称される酵素であり、セルロースを分子内部から切断し、グルコース、セロビオース、および／またはセロオリゴ糖（重合度が３以上であり、そして好ましくは１０以下であるが、これに限定されない）を生じる。

[0038] 本明細書において、セロビオヒドロラーゼ（エキソグルカナーゼ）は、セルロースをその還元末端または非還元末端のいずれかから分解し、セロビオースを遊離する。

[0039] 本明細書において、β－グルコシダーゼは、セルロースにおいては、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である。β－グルコシダーゼは、アグリコンまたは糖鎖とβ－Ｄ－グルコースとのβ－１，４結合を切断し、セロビオースまたはセロオリゴ糖を加水分解してグルコースを生成する。β－グルコシダーゼは、セロビオースまたはセロオリゴ糖を加水分解する酵素の一つの例である。

[0040] 本明細書において「ヘミセルラーゼ」とは、ヘミセルロースを分解する酵素の総称である。ヘミセルラーゼにはキシラン分解酵素が含まれ、キシラン分解酵素として、例えば、キシラナーゼおよびキシロシダーゼが挙げられる。本明細書において「キシラン」は、キシロースがβ－１，４結合により直鎖状に重合した高分子を主鎖とし、種々の糖を側鎖に有するヘテロ糖である。本明細書において、キシラナーゼ（β１，４－キシラナーゼ）」は、キシランのβ－１，４結合を加水分解する酵素をいう。キシラナーゼは、キシランの主鎖部分を内部からランダムに切断し、キシロース、キシロビオースおよび／またはキシロオリゴ糖（重合度が３以上であり、そして好ましくは１０以下であるが、これに限定されない）を生じる。本明細書において、キシロシダーゼ（β－キシロシダーゼ）は、キシランを非還元末端からそのβ－１，４結合を加水分解してキシロースを遊離する酵素をいう。

[0041] 本明細書において「セルラーゼ活性」とは、セルロースのβ－１，４結合を加水分解する活性であり、例えば、濾紙分解活性（Filter Paper Unit：ＦＰＵ）がその指標とされる。濾紙分解活性は、Industrial Crops and Produc

ts 20 (2004) 49-57に記載のように、Mandelsら(1976)の方法に基づき測定され得る。濾紙分解活性は、濾紙（例えば、Advantec No.1：東洋濾紙株式会社）を基質として用いて１分間に１μｍｏｌのグルコースを遊離する酵素量を１ユニット（ＦＰＵ）として表される。β－グルコシダーゼ活性は、Journal of Bioscience and Bioengineering, VOL.111 No.2, 121-127, 2011に記載のように、ｐ－ニトロフェニルβ－Ｄ－グルコピラノシド（ｐＮＰＧ）を基質として用いて、BerghemおよびPetterssonの方法に基づいて測定され得る。β－グルコシダーゼ活性は、１分間に基質ｐ－ニトロフェニルβ－Ｄ－グルコピラノシド（ｐＮＰＧ）から１μｍｏｌのニトロフェノールを遊離する酵素量を１ユニット（Ｕ）として表される。セロビオヒドロラーゼ活性は、基質としてｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－セロビオースに用いた以外はβ－グルコシダーゼ活性と同様にして測定され得る。セロビオヒドロラーゼ活性は、１分間に基質ｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－セロビオースから１μｍｏｌのニトロフェノールを遊離する酵素量を１ユニット（Ｕ）として表される。

[0042] 本発明において「トリコデルマ属微生物」とは、トリコデルマ（Trichoderma）属に属する微生物をいう。「トリコデルマ属微生物」は、セルラーゼ剤を生産可能なものであれば特に制限はない。１つの実施形態では、トリコデルマ属微生物は、トリコデルマ・リーセイ（Trichoderma reesei）、トリコデルマ・ハルジアナム（Trichoderma harzianum）、トリコデルマ・ロンギブラキアタム（Trichoderma longibrachiatum）、トリコデルマ・ビリデ（Trichoderma viride）などである。好ましくは、トリコデルマ・リーセイＱＭ６ａおよびその派生株である（非特許文献５）。トリコデルマ・リーセイＱＭ６ａは例えばＡＴＣＣより入手可能（ＡＴＣＣ１３６３１）であり、その派生株として、例えばトリコデルマ・リーセイＲＵＴ－Ｃ３０（ＡＴＣＣ５６７６５）やトリコデルマ・リーセイＱＭ９４１４（ＡＴＣＣ２６９２１）が入手可能である。なお、製品評価技術基盤機構（ＮＩＴＥ）からもトリコデルマ・リーセイＱＭ６ａ（ＮＢＲＣ３１３２６）およびトリコデルマ・リーセイＱＭ９４１４（ＮＢＲＣ３１３２９）などが入手可能である。１つの実

施形態では、トリコデルマ属微生物は、セルラーゼ剤に関して非遺伝子組換え菌株である。

[0043] トリコデルマ属微生物を培養してセルラーゼ剤を生産させる。トリコデルマ属微生物の培養では、通常、マンデルス培地が用いられる。マンデルス培地は、例えば、M.MandelsおよびR.E.Andreotti, Problems and Challenges in the Cellulose to Cellulase Fermentation. Process Biochem 13 (1978) 6-13に記載の方法に従って調製され得る。トリコデルマ属微生物の培養培地は、少なくとも２つのグルコースがβ－１，４結合した多糖を含む。これにより、トリコデルマ属微生物のセルラーゼ剤の生産を誘導し得る。「少なくとも２つのグルコースがβ－１，４結合した多糖」としては、セロビオース、セロビオオリゴ糖、セルロース（例えば、結晶性セルロース（例えば、Avicel（アビセル））などが挙げられる。「少なくとも２つのグルコースがβ－１，４結合した多糖」は、以下に説明するようなセルロース系バイオマスであってもよく、例えば、サトウキビバガスを水蒸気で蒸煮したものが用いられ得る。トリコデルマ属微生物の培養培地は、トリコデルマ属微生物の培養に通常用いられる他の成分（例えば、ペプトン）をさらに含んでもよい。

[0044] 本発明においては、トリコデルマ属微生物をｐＨ１以上５未満にて培養する。好ましくは、ｐＨ３以上５未満である。上記所定のｐＨは塩の添加によって調整され得、このような塩としては、微生物培養の際にｐＨ調整に通常用いられる塩（例えば、水酸化ナトリウム）である。上記所定のｐＨでの培養前にｐＨを調整することなく培養を行ってもよく、本発明はこのような培養も包含する。例えば、トリコデルマ属微生物を「少なくとも２つのグルコースがβ－１，４結合した多糖」を含有する培地で培養を開始した際、培養培地のｐＨは５以上（例えば５～６付近）になり得るが、培養の進行につれてｐＨは５未満（例えば３．５付近）に低下し得る。その後、その低下したｐＨに調整しながらトリコデルマ属微生物の培養を行ってよい。

[0045] 上記所定のｐＨ範囲でトリコデルマ属微生物を培養することにより、トリコデルマ属微生物により、濾紙分解活性に対するβ－グルコシダーゼ活性の

比率が３より低いセルラーゼが生産され得る。１つの実施形態では、生産されるセルラーゼは、その濾紙分解活性に対するβ－グルコシダーゼ活性の比率が、１より低い、０．５より低い、０．３より低い、０．２より低い、０．１より低い、０．０６より低い、０．０４より低い、０．０３より低いまたは０．０２より低いものである。上記比率の数値は、β－グルコシダーゼ活性を５０℃（液化に通常用いられ得る温度）にて測定した場合に得られる値である。５０℃で測定したβ－グルコシダーゼ活性は、３５℃で測定した場合に比べると高い活性を示す傾向にある。生産されるセルラーゼ剤は、好ましくは、エンドグルカナーゼおよびセロビオヒドロラーゼを含む。ｐＨ１未満であれば、トリコデルマ属微生物の生育を抑制するおそれがある。ｐＨ５以上であると、生産されるセルラーゼ剤において、β－グルコシダーゼ活性を高め得ても、セルラーゼ総体としての分解能力を示す濾紙分解活性およびセロビオヒドロラーゼ活性を損ない得る。１つの実施形態では、生産されるセルラーゼ剤は、キシラナーゼをさらに含む。生産されるセルラーゼ剤にはキシロシダーゼもまた含まれ得る。

[0046] 培養の際の温度、通気、細胞量等の培養条件は、トリコデルマ属微生物の培養で通常用いる条件を用いることができる。培養時間は、初期細胞量または回収する最終セルラーゼ活性に依存するが、例えば、２４時間～２４０時間、好ましくは、７２時間～１９２時間である。トリコデルマ属微生物の培養は、セルラーゼ剤の製造および回収のための培養（「本培養」）を行う前に、予備的な培養（「前培養」）を行ってもよい。

[0047] 上記セルラーゼ剤の製造方法で製造されたセルラーゼ剤を、本明細書中では、「ＴＰセルラーゼ剤」ともいう。この「ＴＰセルラーゼ剤」は、例えば、固液分離（例えば、遠心分離およびフィルタ濾過）により、トリコデルマ属微生物の培養液から回収され得る。「ＴＰセルラーゼ剤」は、回収後、必要に応じて、当業者が通常用いる方法（例えば、エバポレーターの使用）によって濃縮されたものであってもよい。

[0048] （表層提示微生物の作製）

本発明において用いられる「表層提示微生物」について以下に説明する。表層提示微生物は、目的分子（例えば、酵素のようなタンパク質）をその菌体細胞の表層に提示する微生物をいう。

[0049] β－グルコシダーゼ表層提示微生物は、β－グルコシダーゼをその菌体細胞の表層で提示する微生物をいう。例えば、β－グルコシダーゼ遺伝子を含む表層提示カセットを用いて宿主微生物の形質転換を行うことにより、β－グルコシダーゼ表層提示形質転換微生物（単に「β－グルコシダーゼ表層提示微生物」ともいう）が作出される。β－グルコシダーゼは現在、２種類知られており、それぞれβ－グルコシダーゼ１、β－グルコシダーゼ２と称される。β－グルコシダーゼとしては、例えば、アスペルギルス・アクレアタス（Aspergillus aculeatus）由来β－グルコシダーゼ（特に、ＢＧＬ１）（例えば、国際公開第２０１５／３３９４８号）、ルミノコッカス・アルブス（Ruminococcus albus）由来のβ－グルコシダーゼ遺伝子（GenBank Sequence ID:Ｘ１５４１５．１）が挙げられるが、これに限定されない。

[0050] キシロシダーゼ表層提示微生物は、キシロシダーゼをその菌体細胞の表層で提示する微生物をいう。キシロシダーゼとして、例えば、アスペルギルス・オリゼ（Aspergillus oryzae）由来β－キシロシダーゼ（ＸｙｌＡ）が挙げられる。キシロシダーゼ表層提示微生物は、キシロースを代謝する微生物を用いて作出される。キシロースを代謝するキシロースを代謝することができるように遺伝子組換えされた微生物であってもよい。そのような遺伝子組換え微生物として、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）（通常は六炭糖のグルコースを代謝し、五炭糖のキシロースは代謝することができない）が、キシロース代謝性遺伝子を有するように形質転換され得る。キシロース資化性遺伝子としては、キシロース代謝系酵素の遺伝子、例えば、キシロースレダクターゼ（ＸＲ）遺伝子（例えば、ピチア・スチピチス（Pichia stipitis）由来：ＩＮＳＤアクセッション番号Ｘ５９４６５またはＡ１６１６４）、およびキシリトールデヒドロゲナーゼ（ＸＤＨ）遺伝子（例えば、ピチア・スチピチス由来：ＩＮＳＤアクセッション番

号Ｘ５５３９２またはＡ１６１６６）、およびキシルロキナーゼ（ＸＫ）遺伝子（例えば、サッカロマイセス・セレビシエ由来：ＩＮＳＤアクセッション番号Ｘ８２４０８）が挙げられる。これらの３つの遺伝子を発現するように遺伝子組換えされたサッカロマイセス・セレビシエが、キシロシダーゼ表層提示微生物の作製のために好ましく用いられ得る。

[0051] 表層提示微生物は、β－グルコシダーゼおよびキシロシダーゼを共に表層提示するものであってもよい。β－グルコシダーゼおよびキシロシダーゼを共に表層提示する微生物は、例えば、微生物を培養する培地がセルロースおよびヘミセルロースを含む場合に有用である。「β－グルコシダーゼ表層提示微生物」は、β－グルコシダーゼを表層提示する限り、他のタンパク質（例えば、キシロシダーゼ）をさらに表層提示する微生物もまた包含する。「キシロシダーゼ表層提示微生物」は、キシロシダーゼを表層提示する限り、他のタンパク質（例えば、β－グルコシダーゼ）をさらに表層提示する微生物もまた包含する。

[0052] 宿主微生物は、特に限定されないが、例えば、酵母、乳酸菌、糸状菌、コリネ菌、大腸菌、ザイモナス菌などが挙げられる。アルコール製造への利用の観点からは、アルコール（例えば、エタノール）の発酵能を有する微生物が好ましく、このような微生物としては例えば、酵母が挙げられる。乳酸製造への利用の観点からは、好ましくは乳酸菌である。

[0053] 酵母としては、例えば、サッカロマイセス属（Saccharomyces）、ピキア属（Pichia）、シゾサッカロマイセス属（Schizosaccharomyces）、クルイベロマイセス属（Kluyveromyces）、カンジダ属（Candida）などが挙げられる。サッカロマイセス属に属する酵母が好ましく、サッカロマイセス・セレビシエがさらに好ましい。サッカロマイセス・セレビシエの菌株としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエＮＢＲＣ１４４０株（独立行政法人製品評価技術基盤機構から入手可能）、サッカロマイセス・セレビシエＴＪ１４株（Moukamnerdら、Appl. Microbiol. Biotechnol.、2010年、第88巻、p.87-94）、サッカロマイセス・セレビシエＢＹ４７４１株（EUROSCARF等より入手

可能）およびサッカロマイセス・セレビシエＫＦ－７株（Tingら、Process Biochem.、2006年、第41巻、p.909-914）が挙げられる。さらに、酵母としては、以下の菌株も挙げられる：ピキア・パストリス（Pichia pastoris）ＧＳ１１５（Invitrogen社製）およびピキア・アノマラ（Pichia anomala）ＮＢＲＣ１０２１３株、シゾサッカロマイセス・ポンベ（Schizosaccharomyces pombe）ＮＢＲＣ１６２８株、クルイベロマイセス・ラクテイス（Kluyveromyces lactis）ＮＢＲＣ１２６７株およびクルイベロマイセス・マルシアヌス（Kluyveromyces marxianus）ＮＢＲＣ１７７７株（Yanaseら、Appl Microbiol Biotechnol、2010年、第88巻、p.381-388）、カンジダ・ユチリス（Candida utilis）ＮＢＲＣ０９８８株（Tomitaら、PLoS One. 2012; 7(5): e37226）（ＮＢＲＣ株はいずれも独立行政法人製品評価技術基盤機構から入手可能）。

[0054] 「乳酸菌」とは、代謝または発酵によって糖類から乳酸を産生する細菌の総称である。乳酸菌は、主として、ビフィズス菌、エンテロコッカス菌、ラクトバチルス菌、ストレプトコッカス菌の４種に分類され得る。好ましくは、ラクトバチルス菌が用いられ得る。乳酸菌としては、ストレプトコッカス属（Streptococcus）、ラクトバチルス属（Lactobacillus）、ビフィドバクテリウム属（Bifidobacterium）、ラクトコッカス属（Lactococcus）、ペディオコッカス属（Pediococcus）、またはリューコノストック属（Leuconostoc）に属する菌が挙げられる。乳酸菌としては、例えば、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）、ストレプトコッカス・クレモリス（Streptococcus cremoris）、ストレプトコッカス・フェカーリス（Streptococcus faecalis）、ストレプトコッカス・ラクテイス（Streptococcus lactis）、ラクトバチルス・ブルカリカス（Lactobacillus bulgaricus）、ラクトバチルス・アシドフィルス（Lactobacillus acidophilus）、ラクトバチルス・カゼイ（Lactobacillus casei）、ラクトバチルス・デルブルツキイ（Lactobacillus delbrueckii）、ラクトバチルス・アラビノーススス（Lactobacillus arabinosus）、ラクトバチルス・カウカシクス（Lactobaci

llus caucasicus）、ラクトバチルス・ラクテイス（Lactobacillus lactis）、ラクトバチルス・ライシュマニ（Lactobacillus Leishmanni）、ラクトバチルス・ムシカス（Lactobacillus musicus）、ラクトバチルス・サーモフィルス（Lactobacillus thermophilus）、ラクトバチルス・プランタルム（Lactobacillus plantarum）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（Bifidobacterium bifidum）、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス（Bifidobacterium adolescentis）、ビフィドバクテリウム・ロンガム（Bifidobacterium longum）、ビフィドバクテリウム・ブレーベ（Bifidobacterium breve）、ビフィドバクテリウム・インファンティス（Bifidobacterium infantis）、ラクトコッカス・ラクテイス（Lactococcus lactis）、ラクトコッカス・クレモリス（Lactococcus cremoris）、ペディオコッカス・ダムノサス（Pediococcus damnosus）、およびロイコノストック・メゼンテロイデス（Leuconostoc mesenteroides）などが挙げられる。乳酸菌には、有胞子性乳酸菌もまた包含される。有胞子性乳酸菌は、有胞子性の乳酸菌の総称である。有胞子性乳酸菌としては、例えば、バチルス属（Bacillus）に属する菌が挙げられる。バチルス属に属する有胞子性乳酸菌は、耐熱性（例えば４５℃のような高熱下にて生育可能）、高い発酵速度、および広い糖資化性を有するものであり得る。バチルス属（Bacillus）に属する菌としては、例えば、バチルス・コアグランス（Bacillus coagulans、「スポロ乳酸菌」としても知られる）およびバチルス・リンチェニフォルマイス（Bacillus lincheniformis）が挙げられる。

[0055] 乳酸菌は、遺伝子組換えがされたものであってもよい。例えば、Ｌ－またはＤ－乳酸合成酵素遺伝子のいずれかを組み込むあるいは破壊した組換え微生物が挙げられる。遺伝子組換え微生物として、例えば、ラクトバチルス・プランタルムldhL1::amyA株（Okanoら, Appl. Environ. Microbiol. 2009, Vol.75, 462-467）、およびラクトバチルス・プランタルムΔldhL1::PxylAB-xpk1::tkt-Δxpk2::PxylAB株（Yoshidaら, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, Vol.92, 67-76）が挙げられる。ラクトバチルス・プランタルムldhL1::

amyA株は、α－アミラーゼを分泌しグルコースからＤ－乳酸を生成する組換え株であり、ラクトバチルス・プランタルムΔldhL1::PxylAB-xpk1::tkt-Δxpk2::PxylAB株は、グルコースとキシロースの両方からＤ－乳酸を生成する組換え株である。

[0056] 表層提示微生物の作出のために用いられる、各種宿主微生物に関する表層提示技術としては、例えば、特開平１１－２９００７８号公報、国際公開第０２／０８５９３５号、国際公開第２０１５／０３３９４８号、国際公開第２０１６／０１７７３６号、Biotechnology for Biofuels, 7(1):8 (2014)、およびK. Onoderaら, Biochemical Engineering Journal 128 (2017) 195-200（酵母）；生物工学会誌，第89巻，第4号，154-160 (2011)、化学工学会第70年会研究発表講演要旨集、セッションＩＤ　Ｆ１２３ (http://doi.org/10.11491/scej.2005.0.255.0)、Appl. Environ. Microbiol., 72(1), 269-275 (2006)およびAppl. Environ. Microbiol., 74(4), 1117-1123 (2008)（乳酸菌）などに記載の技術を用いることができる。表層提示技術では表層提示カセットが用いられ、この表層提示カセットは、アンカータンパク質のアンカードメインをコードするＤＮＡおよび分泌シグナルをコードするＤＮＡを、表層提示されるべきβ－グルコシダーゼをコードするＤＮＡと共に、適切な配置で含み得る。表層提示カセットは、プロモーターとターミネーターとの間に配置され得る。アンカードメインおよび分泌シグナルに関してもまた、上記文献に記載される。アンカードメインとしては、例えば、酵母について、ＧＰＩアンカータンパク質（例えば、ＳＥＤ１、α－またはａ－アグルチニン（ＡＧα１、ＡＧＡ１）、ＦＬＯ１など）のアンカードメイン、乳酸菌については、ペプチドグリカン結合タンパク質ＡｃｍＡのＣＡドメインおよびバシルス・ズブチリス（Baccilus subtilis）由来のポリ－γ－グルタミン酸生合成酵素複合体（ＰｇｓＢＣＡ）のサブユニットであるＰｇｓＡタンパク質などが挙げられる。

[0057] 表層提示微生物は、担体に固定されてもよい。そのことにより、下述する方法において再使用が可能となる。固定する担体および方法は、当業者が通

常用いる担体および方法が用いられる。固定方法としては、例えば、担体結合法、包括法、架橋法などが挙げられる。担体としては、多孔質体が好ましく用いられる。例えば、ポリビニルアルコール、ポリウレタンフォーム、ポリスチレンフォーム、ポリアクリルアミド、ポリビニルフォルマール樹脂多孔質体、シリコンフォームなどの発泡体あるいは樹脂が好ましい。多孔質体の開口部の大きさは、用いる微生物およびその大きさを考慮して決定され得るが、実用酵母の場合、５０～１０００μｍの範囲内が好ましい。また、担体の形状は問わない。担体の強度、培養効率などを考慮すると、球状あるいは柱状（例えば、立方体状）が好ましい。大きさは、用いる微生物により決定すればよいが、一般には、球状の場合、直径が２～５０ｍｍ、柱状の場合、２～５０ｍｍ角が好ましい。

[0058] （表層提示微生物の培養方法および糖化発酵産物の製造方法）

本発明においては、上記のセルラーゼの製造方法で製造されたセルラーゼ剤（「ＴＰセルラーゼ剤」）で、ＴＰセルラーゼ剤が分解する多糖基質を含む材料（「ＴＰセルラーゼ剤分解基質含有材料」）を処理し、この処理物から該微生物が代謝する糖を生成する酵素を表層提示する微生物の培養に用いることができる。「ＴＰセルラーゼ剤分解基質含有材料」として、例えば、セルロース材料およびキシロース含有多糖を含む材料ならびにこれらの混合物が挙げられる。例えば、ＴＰセルラーゼ剤でセルロース材料を処理し、この処理物をβ－グルコシダーゼ表層提示微生物の培養に用いることができる。β－グルコシダーゼ表層提示微生物は、このような培養によって、糖化発酵産物を生産し得る。ＴＰセルラーゼ剤で、キシロース含有多糖を含む材料を処理し、この処理物を、キシロースの代謝能を有しかつキシロシダーゼを表層提示する微生物（「キシロース代謝キシロシダーゼ表層提示微生物」）の培養に用いることができる。「キシロース含有多糖」とは、キシロースを構成成分に含む多糖をいい、少なくとも二糖のキシロースを含む。例えば、キシロース代謝キシロシダーゼ表層提示微生物は、このような培養によって、糖化発酵産物を生産し得る。

[0059] セルロース材料とは、セルロースを含む任意の材料をいう。キシロース含有多糖としては、例えば、キシラン、キシランを含むヘミセルロースが挙げられる。セルロースおよびキシロース含有多糖はともに、加水分解によってより低分子の糖が生じる（例えば、セルロースからグルコースまたはセロビオース、キシロース含有多糖からキシロースまたはキシロビオース）（この反応を「糖化」ともいう）。糖化反応により得られるグルコースまたはキシロース、あるいはその両方を、発酵微生物（例えば、酵母、乳酸菌など）が基質として利用し、発酵産物（例えば、エタノール、乳酸など）を生産し得る（この反応を「発酵」または「発酵生産」ともいう）。糖化および当該糖化により得られる糖を基質に用いた微生物による発酵を合わせて「糖化発酵」ともいう。糖化発酵によって得られる産物を、本明細書では、「糖化発酵産物」ともいう。

[0060] セルロース材料として、セルロース系バイオマスが挙げられる。セルロース系バイオマスとは、生物資源に由来する材料であって、セルロースを含むものをいう。セルロース系バイオマスの利用は、食糧と競合しない点で好ましい。キシロース含有多糖を含む材料としては、例えば、キシランを含む材料およびヘミセルロースを含む材料が挙げられる。セルロース系バイオマスとして植物バイオマスが挙げられる。植物バイオマスは、セルロースおよびヘミセルロースを含み、よって、セルロース材料としても、キシロース含有多糖を含む材料としても用いられ得る。セルロース系バイオマスまたは植物バイオマスとしては、コメ、ムギ、トウモロコシ、サトウキビ、パーム、木材（パルプ）、ネピアグラスなどの生物材料の処理に際して生じる廃棄物などが挙げられる。セルロース系バイオマスまたは植物バイオマスとしては、例えば、稲ワラ、麦ワラ、パーム空果房、バガス（サトウキビ搾汁後の残渣）などが挙げられる。

[0061] ＴＰセルラーゼ剤分解基質含有材料は、前処理が施されたものであってもよい。前処理とは、酵素で基質を分解する前に、その基質を含む材料に対して行う処理であり、これにより、その材料中に含まれていた基質への酵素の

作用を容易にする。例えば、セルロースをグルコースまで加水分解するために、セルロース加水分解酵素で処理する前に、酵素のセルロースへの作用を容易にするために、酵素反応の前にセルロースをセルロース材料（例えば、バイオマス）から分離し、露出させる処理をいう。前処理法としては、特に限定されない。例えば、水熱分解、圧搾、蒸煮などが挙げられ、これらの方法を組み合わせて用いてもよい。水熱分解法では、例えば、セルロース系バイオマスを、必要に応じて粉砕し、例えば、約２０質量％（乾燥質量）の含量となるように水と混合し、この混合物を熱処理する。水熱処理は、１２０℃～３００℃、好ましくは１５０℃～２８０℃、より好ましくは１８０℃～２５０℃にて、１５秒間～１時間行われる。処理温度および時間は用いるバイオマスによって変動し得、処理温度の上昇は処理時間を短縮し得る。なお、熱処理中に加圧してもよい。圧搾としては、特に限定されないが、例えば、油圧式圧搾機、スクリュープレス、採肉機、プレス脱水機、または遠心分離機等によりセルロース系バイオマスを圧搾する方法が挙げられる。蒸煮方法としては、特に限定されないが、例えば、セルロース系バイオマスを高温の水蒸気により蒸煮する方法が挙げられる。蒸煮するための条件としては、特に限定されないが、例えば、リグノセルロース系バイオマスに対して１質量％～５質量％の硫酸を含浸させて、１．０Ｍｐａ～１．６Ｍｐａの圧力下、１８０℃～２００℃にて５分～３０分間蒸煮する条件が挙げられる。植物バイオマスの場合、前処理によって得られるセルロースおよびヘミセルロースの量を調整することができる。材料が植物バイオマスである場合、例えば、植物バイオマスを必要に応じて脱リグニン処理後、シュウ酸アンモニウムで処理してペクチンを除去し、次いでアルカリで処理してヘミセルロースを得ることができる。例えば、アンモニア爆砕処理、粉砕処理、イオン液体処理のような前処理法を用いる場合、植物バイオマスからセルロースおよびヘミセルロースを取得することができる。

[0062] ＴＰセルラーゼ剤でＴＰセルラーゼ剤分解基質含有材料を処理する。この処理は、ＴＰセルラーゼ剤とＴＰセルラーゼ剤分解基質含有材料とを、好ま

しくは撹拌下、混合することによりなされ得る。ＴＰセルラーゼ剤でのＴＰセルラーゼ剤分解基質含有材料の処理について、当該材料の固形分が液化されれば、処理条件は限定されない。例えば、ＴＰセルラーゼ剤のセルロース材料に対する量は、用いるセルロース材料の種類に依存するが、例えば、１～５０ＦＰＵ／ｇ乾燥材料重量、好ましくは５～２０ＦＰＵ／ｇ乾燥材料重量である。例えば、ＴＰセルラーゼ剤のキシロース含有多糖を含む材料に対する量は、用いる材料の種類に依存するが、例えば、１０～２０００ｇ／ｋｇ乾燥材料重量、好ましくは５０～８００ｇ／ｋｇ乾燥材料重量である。処理の温度は、例えば、２５～７０℃、好ましくは、３５～５５℃である。

[0063] β－グルコシダーゼ表層提示微生物は、ＴＰセルラーゼ剤で処理されたセルロース材料を含有する培地にて培養される。このような培養によって、β－グルコシダーゼ表層提示微生物は、糖化発酵産物を生産し得る。１つの実施形態では、β－グルコシダーゼ表層提示微生物の酵素力価は、セルロース材料の処理のために（当該微生物の外部から）添加したセルラーゼ（本方法では、ＴＰセルラーゼ剤）の濾紙分解活性に対する該微生物のβ－グルコシダーゼ活性の比率として表した場合、０．０２～２．５、好ましくは、０．１～０．７である。上記数値は、β－グルコシダーゼ表層提示微生物が示すβ－グルコシダーゼ活性を３５℃（糖化発酵のための微生物培養に通常用いられ得る温度）にて測定した場合に得られる値である。このようなこの酵素力価の比率の範囲内にあることで、β－グルコシダーゼ表層提示微生物による糖化発酵産物の製造を効率的に行い得る。β－グルコシダーゼ表層提示微生物の酵素力価、すなわちＴＰセルラーゼ剤の濾紙分解活性に対する該微生物のβ－グルコシダーゼ活性の比率は、β－グルコシダーゼ表層提示微生物の種類、培養（例えば、糖化発酵のための培養）の際の初期菌体濃度および温度（例えば、β－グルコシダーゼ表層提示酵母の場合３５℃または５０℃に設定し得る）によって調整され得る。この酵素力価の比率は、β－グルコシダーゼ活性の測定に通常用いられる温度である５０℃にて測定した活性値を用いて求めた場合、例えば、下記の実施例に示すような、より高い値を示

し得る。

[0064] キシロシダーゼ表層提示微生物は、ＴＰセルラーゼ剤で処理されキシロース含有多糖を含む材料を含有する培地にて培養される。このような培養によって、キシロシダーゼ表層提示微生物は、糖化発酵産物を生産し得る。

[0065] この培養培地は、処理されたＴＰセルラーゼ剤分解基質含有材料およびＴＰセルラーゼ剤を含むものであってよい。培養培地は、表層提示微生物の培養において通常用いる他の成分をさらに含んでもよい。ＴＰセルラーゼ剤でのＴＰセルラーゼ剤分解基質含有材料の処理は、表層提示微生物の培養前に予め行い得る。また、ＴＰセルラーゼ剤でのＴＰセルラーゼ剤分解基質含有材料の処理と、表層提示微生物の培養とを並行して行ってもよい。

[0066] 表層提示微生物の培養条件は、宿主の微生物の種類に依存するが、当該微生物の生育速度、当該微生物による糖化発酵産物の生産量、および表層提示された酵素（β－グルコシダーゼ、キシロシダーゼなど）の活性などを考慮して適宜設定され得る。培養の条件について、β－グルコシダーゼ表層提示微生物がβ－グルコシダーゼ表層提示酵母である場合を例示して以下に説明するが、これに限定されない。開始時の菌体濃度は特に限定されず、例えば、２ｇ～２０ｇ湿重量／Ｌ（１×１０^{7}個／ｍＬ～１×１０^{8}個／ｍＬ）程度が挙げられる。培養条件は特に限定されず、通常、グルコースを基質としてエタノール発酵する際の条件であってよい。培養温度は、例えば、３０℃～３７℃であり、培養ｐＨは、例えば、４～８である。培養時間は、例えば、２日間～３日間である。発酵の終了は、例えば、炭酸ガスの発生量が発酵開始時の１０分の１以下になったことなどを目安に判断する。

[0067] 表層提示微生物は、培養終了後に回収し、次の培養に繰り返し利用してもよい。このような微生物の回収および繰り返し培養について、例えば、国際公開第２０１３／１４６５４０号に記載された方法が用いられ得る。

[0068] 本発明は、糖化発酵産物の製造方法もまた提供する。上記に説明した表層提示微生物の培養の工程により、当該微生物によって、セルロース材料からの糖化発酵産物が生産され得る。糖化発酵産物は、培養する表層提示微生物

の種類に依存するが、例えばエタノール（例えば、表層提示酵母の培養により）、乳酸（例えば、表層提示乳酸菌の培養により）などが挙げられる。例えば、表層提示微生物が酵母である場合、糖化発酵産物としてエタノールを製造し得るが、これに限定されない。表層提示微生物は、上記のような表層提示技術以外の改変（例えば、遺伝子組換えによる）を行ってもよい。このような改変として、例えば、生産される糖化発酵産物の変更または糖化発酵産物の生産効率の改善などを目的とした、発酵の代謝系の改変が挙げられる。例えば、複数種のタンパク質（例えば、酵素の組合せ（例えば、β－グルコシダーゼおよびキシロシダーゼ））を表層提示する微生物もまた用いることができる。

[0069] １つの実施形態では、上記の糖化発酵産物の製造方法は、上記のセルラーゼ剤製造方法によりセルラーゼ剤を製造する工程をさらに含む。例えば、糖化発酵産物（例えば、エタノール）を製造する際に用いるセルラーゼ剤を上記セルラーゼ剤の製造方法により製造することによって、当該糖化発酵産物を製造する現場でセルラーゼ剤の調製を行うことができる。

[0070] 上記表層提示微生物の培養により得られた糖化発酵産物は、当業者が通常用いる方法によって微生物培養培地から回収され、必要に応じて分離および精製され得る。

[0071] 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。

実施例

[0072] （測定方法）

本実施例においては、種々の測定を下記のように行った。

[0073] セルラーゼ活性として、濾紙分解活性（ＦＰ活性）をIndustrial Crops and Products 20 (2004) 49-57に記載のように、Mandelsら(1976)の方法に基づき測定した。より詳細には、１ｃｍ×６ｃｍの濾紙（Advantec No.1：東洋濾紙株式会社）を基質として用いて、これを試料溶液（0.5mLの希釈セルラーゼ液（培養上清）および１．０ｍＬの０．０５Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ５．０

）を含む）に添加し、５０℃にて６０分間置いた後、３ｍＬのＤＮＳ試薬を添加して反応を停止させた。この混合物の還元糖量をＤＮＳ法でアッセイした。ＤＮＳ法では、混合物を１００℃にて５分間加熱した後、５分間氷冷し、ボルテックス後に１５０００ｒｐｍにて５分間遠心分離し、上清を０．２ｍＬ得た。次いでこの上清を蒸留水２．５ｍＬに添加してＯＤ＝５４０にて測定した。濾紙分解活性は、この方法で１分間に１μｍｏｌのグルコースを遊離する酵素量を１ＦＰＵ／ｍＬとして表した。

[0074] タンパク質濃度をQuick Start™ Bradford(Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用いてブラッドフォード法にて測定した（検量線の基質としてウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を用いた）。

[0075] β－グルコシダーゼ活性（ＢＧＬ活性）をJournal of Bioscience and Bioengineering, VOL.111 No.2, 121-127, 2011に記載のように、ｐ－ニトロフェニルβ－Ｄ－グルコピラノシド（ｐＮＰＧ）を基質として用いて、BerghemおよびPetterssonの方法に基づいて行った。より詳細には、１００μＬの３ｍＭ　ｐＮＰＧ、１５μＬの１Ｍ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）、１５５μＬの滅菌水および３０μＬの酵素希釈液からなる反応液を５０℃または３５℃にて１０分間撹拌した後、０．３ｍＬの１Ｍ炭酸ナトリウムを添加して反応を停止させた。遊離したｐ－ニトロフェノールをマイクロプレートリーダー（SH-1000Lab、株式会社日立ハイテクサイエンス）を用いて４００ｎｍにて測定した。β－グルコシダーゼ活性は、１分間に基質から１μｍｏｌのニトロフェノールを遊離する酵素量を１ユニット（Ｕ）として表した。

[0076] セロビオヒドロラーゼ活性（ＣＢＨ活性）は、基質としてｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－セロビオースを用いた以外はβ－グルコシダーゼ活性と同様にして測定した。セロビオヒドロラーゼ活性は、１分間に基質から１μｍｏｌのニトロフェノールを遊離する酵素量を１ユニット（Ｕ）として表した。エンドグルカナーゼ活性（ＥＧ活性）は、基質としてｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）を用いた以外はβ－グルコシダーゼ活性と同様にして測定した。エンドグルカナーゼ活性は、１分間に

基質から１μｍｏｌのニトロフェノールを遊離する酵素量を１ユニット（Ｕ）として表した。

[0077] キシラナーゼ活性（Ｘｙｎ活性）の測定では、１．５ｍＬチューブに０．１ｍＬの希釈した試料と０．１ｍＬの２（ｗ／ｖ）％キシラン基質溶液とを加え、撹拌しながら５０℃で３０分間反応させ、ＤＮＳ試薬０．６ｍＬを加えて反応を停止し、１００℃で５分間加熱し、発色させた。氷上に置き急冷した後、遠心分離（１５０００ｒｐｍ、５分、４℃）で上清０．４ｍＬを２ｍＬのイオン交換水と混合し、５４０ｎｍにおける吸光度を測定し、生成した遊離還元糖をキシロース量に換算した。２（ｗ／ｖ）％キシラン基質溶液は２（ｗ／ｖ）％のブナ（Beechwood）由来キシラン（ＳＩＧＭＡ社製）を０．１Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ５．０）に懸濁し、４℃で１６時間撹拌したものを遠心分離（１００００×ｇ、１０分、４℃）により不溶性のキシランを集め１０ｍＬの同緩衝液に懸濁し、キシラナーゼ活性測定用の基質溶液とした。コントロール値は５０℃で３０分間撹拌した試料に２（w/v）％キシラン基質溶液を加え５０℃でのインキュベーションを行わずに発色させたものとした。キシラナーゼ活性は、１分間に基質からキシロースを１μｍｏｌ生成する酵素量を１ユニット（Ｕ）として表した。

[0078] キシロシダーゼ活性（Ｘｙｄ活性）の測定では、１．５ｍＬチューブに試料と合成基質ｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－キシロピラノシド（和光純薬工業株式会社製）とを加え、１ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）を５０ｍＭになるように調整し、５０℃で３０分間撹拌しながら反応させ、同量の１Ｍ炭酸ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、発色させた。遠心分離（１５０００ｒｐｍ、５分、４℃）後の上清を４４０ｎｍにおける吸光度を測定し、生じたｐ－ニトロフェノール量を換算した。コントロール値は５０℃でのインキュベーション操作を行わずに発色させたものとした。キシロシダーゼ活性は、１分間に基質から１μｍｏｌのｐ－ニトロフェノールを生成する酵素量を１ユニット（Ｕ）として表した。

[0079] 微生物菌体の酵素活性の測定では、基質との反応のために、酵素希釈液と

して培養上清または菌体懸濁液を用い、５０℃または３５℃にて行った。培養上清は、以下に示す７２時間フラスコ培養後の菌体培養液を１ｍＬ分取し、３５００ｒｐｍにて５分間の遠心分離により上清を得ることで調製した。菌体懸濁液は、７２時間フラスコ培養後の菌体培養液を１ｍＬ分取し、３５００ｒｐｍにて５分間の遠心分離して沈殿物を得、これを滅菌水で洗浄後、湿菌体重量を測定し、このペレットを滅菌水１ｍＬに懸濁して調製した。菌体の酵素活性を、菌体の湿重量１ｇあたりの酵素活性（Ｕ／ｇ）として決定した。

[0080] 液化液および糖化発酵培養液中のエタノール濃度および糖（例えば、セロビオース、グルコース、キシロースおよび還元糖）濃度は、ＨＰＬＣ（High performance liquid chromatographyシステム；株式会社日立ハイテクフィールディング、LaChrom Elite）により定量した。ＨＰＬＣの分離用カラムにはULTRON PS-80H（信和化工株式会社，３００ｍｍ（Ｌ）×８ｍｍ（ＩＤ））を用い、移動相には超純水（日本ミリポア株式会社製Milli-Qによる精製水）に過塩素酸を添加した３ｍＭ過塩素酸水を用い、そして検出器には屈折率検出器を用いた。ＨＰＬＣの条件は、送液量０．７ｍＬ／分およびカラム温度８０℃とした。

[0081] 糖化発酵培養液中の乳酸濃度は、サンプルと同量の２Ｎ塩酸にて乳酸カルシウムを乳酸に変換し、この量をＨＰＬＣ（High performance liquid chromatographyシステム；株式会社日立ハイテクフィールディング、LaChrom Elite）により定量した。ＨＰＬＣの分離用カラムにはGL-C610H-S（株式会社日立ハイテクサイエンス，３００ｍｍ（Ｌ）×７．８ｍｍ（ＩＤ））を用い、移動相には超純水（日本ミリポア株式会社製Milli-Qによる精製水）に過塩素酸を添加したｐＨ２．１の３ｍＭ過塩素酸水を用い、そして検出器には紫外検出器を用いた（検出波長：ＵＶ４００ｎｍ）。ＨＰＬＣの条件は、送液量０．７ｍＬ／分およびカラム温度８０℃とした。乳酸のＤＬ比を、重量希釈上清を希釈して、イオン交換クロマトグラフィー（Sys1）により決定した。分離用カラムにはMCIGEL CRS15W（三菱ケミカル株式会社製）を用い、移動相

には２ｍＭ硫酸銅水を用い、そして検出器には紫外検出器を用いた（検出波長：ＵＶ２５４ｎｍ）。

[0082] 培養後の生菌数を、培養液の一部をＹＰＤプレートに散布して３０℃でインキュベートした後に出現するコロニーを計数することにより求めた。

[0083] （調製例１：β－グルコシダーゼ表層提示酵母の調製）

β－グルコシダーゼ表層提示酵母の調製のため、宿主酵母としてサッカロマイセス・セレビシエＴＪ１４株（Moukamnerdら、Appl. Microbiol. Biotechnol.、2010年、第88巻、p.87-94）を用いた。プラスミドpAUR101-SED1p-OptBGL-SED1-SAG1t（K. Onoderaら, Biochemical Engineering Journal 128 (2017) 195-200：アスペルギウス・アクレアータス由来のβ－グルコシダーゼ遺伝子を含む）をＳｔｕＩで切断後、酢酸リチウム法によりＴＪ１４株を形質転換し、β－グルコシダーゼ表層提示酵母を得た。

[0084] （実施例１：トリコデルマ・リーセイＲＵＴ－Ｃ３０によるセルラーゼの生産）

トリコデルマ・リーセイＲＵＴ－Ｃ３０（ＡＴＣＣ５６７６５）の菌株の７日培養菌糸懸濁液５ｍＬを、５００ｍＬバッフル付き三角フラスコ中に入れた前培養培地（マンデルス培地に１（ｗ／ｖ）％アビセル（結晶性セルロース）を添加したもの）１００ｍＬに接種し、２８℃にて１７５ｒｐｍで３日間、前培養した。次いで、この前培養液５０ｍＬを、３Ｌジャー中の本培養培地（マンデルス培地に０．２（ｗ／ｖ）％ペプトンおよび２（ｗ／ｖ）％アビセルを添加したもの）１Ｌに接種し、通気条件０．２Ｌ／分にて上記菌株を培養した。

[0085] なおマンデルス培地は、M.MandelsおよびR.E.Andreotti, Problems and Challenges in the Cellulose to Cellulase Fermentation. Process Biochem 13 (1978) 6-13に記載の方法に従って調製した。すなわち（NH_4）$_2SO_4$：２．１ｇ／Ｌ、KH_2PO_4：２．０ｇ／Ｌ、ｕｒｅａ：０．３ｇ／Ｌ、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$：０．４ｇ／Ｌ、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$：０．３ｇ／Ｌ、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$：０．００５ｇ／Ｌ、$CoCl_2 \cdot 6H_2O$：０．００３７ｇ

／Ｌ、$MnSO_4 \cdot 5H_2O$：０．００１７ｇ／Ｌおよび$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$：０．００１４ｇ／Ｌになるようイオン交換水に混合して使用した。

[0086] 本培養では、培養開始後しばらくはｐＨを制御せず、ｐＨが３．５まで低下した後、ＮａＯＨにてｐＨを３．５に維持するという操作を行った。本培養を１７１時間続けた。培養開始時、２４時間後、４８時間後、７２時間後、９６時間後および１７１時間後（終了時）に、培養上清のセルラーゼ活性として濾紙分解活性（「ＦＰＵ」）と、タンパク質濃度とを測定した。

[0087] 図１は、本培養の培養期間にわたるｐＨ変化および培養上清のセルラーゼ活性（濾紙分解活性「ＦＰＵ」）とタンパク質濃度の変化を示すグラフである。ｐＨは、培養開始から４８時間後には３．５に維持した。濾紙分解活性とタンパク質濃度とはほぼ連動して増大した。培養開始から１７１時間後には、濾紙分解活性とタンパク質濃度とはそれぞれ１．３９ＦＰＵ／ｍＬ、１．４３ｇ／Ｌに達した。

[0088] １７１時間後の培養上清を８０００ｇにて１０分間遠心分離後、ナイロンフィルター（１１μｍ）を通して濾液を回収し、次いでこの濾液をエバポレーターで濃縮した。得られた濃縮液は、濾紙分解活性が２２．７ＦＰＵ／ｍＬ、タンパク質濃度が２２．３ｇ／Ｌであった。また、同様にセルラーゼの生産および濃縮を行ったところ、濾紙分解活性が２５．４ＦＰＵ／ｍＬ、タンパク質濃度が２７．４ｇ／Ｌの濃縮液が得られた。このようにして得られた濃縮液をセルラーゼ剤として用いた。

[0089] （実施例２：実施例１のセルラーゼ剤および各種セルラーゼ製剤の酵素組成および酵素活性の検討）

（２－１：ＳＤＳ－ＰＡＧＥによるタンパク質の組成検討）

実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤（５ロット分）および市販の改良型セルラーゼ製剤（セルラーゼSS（ナガセケムテックス株式会社製）およびCellic CTec2（ノボザイムズ社製：本明細書中では単に「CTec2」ともいう））をＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、タンパク質の組成を調べた。図２は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによるタンパク質の分離および検出（クマシーブリリアントブル

ー（ＣＢＢ）染色による）の結果を示す電気泳動図である（レーンＭ１およびＭ２：分子量マーカー、レーン１：セルラーゼSS、レーン２：CTec2、ならびにレーン３～７：実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤（５ロット分））。

[0090] 既報（D. Tanedaら, Bioresource Technology 121 (2012) 154-160）に基づいて分子量から酵素種（エンドグルカナーゼＥＧ、セロビオヒドロラーゼＣＢＨ、β－グルコシダーゼＢＧＬ）を推定すると、ＢＧＬ（７８ｋＤａ）、ＣＢＨ１（６３ｋＤａ）、ＣＢＨ２（５８ｋＤａ）、ＥＧ１（５５ｋＤａ）およびＥＧ２（４３ｋＤａ）となる。実施例１の方法で得られたセルラーゼは、図２では分子量マーカーの４０ｋＤａから６６．２ｋＤａの範囲にほとんどのタンパク質が含まれていることから、ＣＢＨおよびＥＧを主体とするセルラーゼであることが分かる。

[0091] 一方で、各種の改良が施されている市販セルラーゼ製剤（セルラーゼSSとCTec2）のレーンでは、４０ｋＤａから６６．２ｋＤａの範囲以外にも著量のタンパク質が検出された。特に、CTec2のレーンでは、上記の範囲より高い分子量および低い分子量の両方で、数多くのバンドが検出される傾向があった。本酵素はさまざまなバイオマス種に対して高い糖化能力を示すセルラーゼ製剤であり、上記で推定された酵素種（ＣＢＨ１（６３ｋＤａ）、ＣＢＨ２（５８ｋＤａ）、ＥＧ１（５５ｋＤａ）およびＥＧ２（４３ｋＤａ））以外にも、セルロース系バイオマスの糖化を直接的に触媒する、あるいは間接的に触媒を介助するさまざまなタンパク質を含むものと考えられる。

[0092] 実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤は、図２のレーン３～７に見られるように、トリコデルマ属セルラーゼの主要な酵素のファミリー７に属するＣＢＨ１を最も多く含み、さらに同じくトリコデルマ属セルラーゼの主要な酵素種であるＣＢＨ２、ＥＧ１、およびＥＧ２と推定されるバンドも比較的多い傾向がみられた。このように、実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤は、煩雑なセルラーゼ蛋白質群（アクセサリー酵素と呼ばれるマイナーな酵素種を含む）の混合比の調整を伴うことなく、主要なセルラーゼ群が大部分

を占める酵素であるということが分かった。

[0093] （２－２：酵素活性の検討）

実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤の中で濾紙分解活性が２５．４ＦＰＵ／ｍＬを示したロット（「２－２」中においては「実施例１のセルラーゼ剤」）について、β－グルコシダーゼ活性（５０℃にて測定）を測定した。濾紙分解活性（ＦＰＵ）（「Ａ」）に対するβ－グルコシダーゼ活性（Ｕ）（「Ｂ」）の比率（「Ｂ／Ａ」）を算出した。以下の表１に示す市販セルラーゼ製剤とトリコデルマ・リーセイの他の菌株および遺伝子改変株については、それらを記載する文献値に基づき同様にＢ／Ａを求めた。この結果を併せて表１に示す（表１中の文献Ａは、Hsieh et al. Biotechnology for Biofuels (2015) 8:52であり、および文献Ｂは、Moreno et al. Biotechnology for Biofuels 2013, 6:160である）。

[0094]

[表1]

自家生産／非改良型のセルラーゼ製剤							実施例1
酵素活性（単位容量または単位重量あたり）	Celluclast 1.5L	T. reesei PC-3-7	T. reesei QM6a	T. reesei QM9414	T. reesei NG-14	T. reesei RUT-C30	T. reesei RUT-C30
A：濾紙分解活性（FPU）	62	1.1	5	10	15	14	25.4
B：β-グルコシダーゼ活性（U）	15	0.12	0.3	0.6	0.6	0.3	0.3
B／A	0.24	0.11	0.06	0.06	0.04	0.02	0.01
参照文献	文献A	特許文献1	非特許文献5	非特許文献5	非特許文献5	非特許文献5	実施例2

改良型のセルラーゼ製剤							
酵素活性（単位容量または単位重量あたり）	CTec2	CTec2	CTec2	Accellerase 1500	T. reesei PC-3-7 (modified by cbh1 promoter)	T. reesei PC-3-7 (modified by egl1 promoter)	セルラーゼSS
A：濾紙分解活性（FPU）	120	100	1.5	1.6	1.9	1.9	65.3
B：β-グルコシダーゼ活性（U）	2731	3950	40	5.6	40	12	214.1
B／A	22.76	39.50	26.67	3.50	21.05	6.32	3.28
参照文献	文献A	文献B	特許文献1	特許文献1	特許文献1	特許文献1	実施例2

[0095] 表１に見られるように、各種セルラーゼ製剤および菌株生産セルラーゼにおいて、濾紙分解活性に対するβ－グルコシダーゼ活性の比率「Ｂ／Ａ」を算出することにより、セルラーゼ製剤の酵素力価（総力価：濾紙分解活性が該当する）においてβ－グルコシダーゼ活性がどの程度高められているのか

を相対的に比較した。

[0096] 実施例１のセルラーゼ剤は、市販の非改良型のセルラーゼ製剤（Celluclast 1.5Lなど）および非組換えトリコデルマ・リーセイ菌株と同様に、低いβ-グルコシダーゼ活性／濾紙分解活性（Ｂ／Ａ）を有することが分かった。他のトリコデルマ・リーセイ菌株と比べて、実施例１のセルラーゼ剤は、β－グルコシダーゼ活性当たりで評価すると、濾紙分解活性が高められた。他方、改良型のセルラーゼ製剤では、CTec2が文献値で２２～３９と極めて高いＢ／Ａを示し、比較的Ｂ／Ａが低い改良型セルラーゼ製剤のセルラーゼSSであっても３．２８を示した。

[0097] （２－３：トリコデルマ・リーセイ培養条件がセルラーゼ活性に与える影響）

実施例１の本培養にて調整していた培養時ｐＨを３．５から５．０に変更し、生産される酵素の活性に影響があるかを調べた。図３は、本培養の培養開始から１７１時間後の培養上清中の各酵素活性（β－グルコシダーゼ活性（ＢＧＬ：Ｕ／ｍＬ）、セロビオヒドロラーゼ活性（ＣＢＨ：Ｕ／ｍＬ）および濾紙分解活性（ＦＰＡ：ＦＰＵ／ｍＬ））の結果を示す。各酵素活性について、ｐＨ５．０調整（左）および３．５調整（右）の結果を示す。

[0098] 図３に示されるように、ｐＨを５．０に調整した場合、ｐＨを３．５に調整した場合と比べて培養上清のβ－グルコシダーゼ活性は増加したが、セロビオヒドロラーゼ活性およびセルラーゼ総体としての分解能力（濾紙分解活性）は減少した。

[0099] （実施例３：実施例１のセルラーゼ剤を用いたセルロース系バイオマスの糖化発酵）

サトウキビバガスを２００℃にて３０分間水蒸気により蒸煮し、さらに水洗後の水不溶画分を水分が約７０重量％になるまで濾布を用いて脱水した固形分（蒸煮バガス）をセルロース系バイオマスとして使用した。実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤を、セルロース系バイオマスの糖化発酵の際に使用した。糖化発酵を以下のように行った。

[0100] ヘリカルリボン翼付きのスリーワンモーターを備え付けた全容３００ｍＬのガラス容器内に蒸煮バガス（セルロース系バイオマス）を入れた。このガラス容器をウォーターバスにて５０℃で保温しながら、セルラーゼ剤を１０ＦＰＵ／ｇ（乾燥バイオマス重量）となるよう添加し、５０ｒｐｍで４時間撹拌し、バイオマス固形分を液化させた。この液化液は約２４重量%の固形分を含み、約１２ｇ／Ｌのグルコースと約３０ｇ／Ｌのセロビオース（バイオマスから酵素糖化により遊離した糖）が存在していた。

[0101] 別途、ＹＰＤ培地１００ｍＬを含む三角フラスコに酵母を植菌し、３０℃、３日間、１５０ｒｐｍで培養しておき、その後、遠心分離により培養液中の菌体濃度が２００ｇ（湿重量）／Ｌとなるような酵母液を調製した。

[0102] バイオマス固形分の液化液をｐＨ５．４に調製しておき、この液化液（１００ｍＬのガラス容器内）に上記の酵母液を湿重量２ｇまたは２０ｇ（発酵液１Ｌあたり）となるように添加し、ウォーターバスにて３５℃で保温しマグネティックスターラーにより２００ｒｐｍで撹拌しながら酵母を培養し、糖化発酵を開始した。この条件では、培養液（液化液と酵母液との合計）中のバイオマス固形分は２１．７重量%であり、もともと蒸煮バガスの乾燥固形分にグルコース成分（セルロースとして存在）が５１．８重量%含まれることを考慮すると、理論上は５７．３ｇ／Ｌのエタノールが酵母による発酵で生成することになる。培養液中のエタノール濃度およびセロビオース濃度を経時的に測定した。

[0103] 図４は、実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したセルロース系バイオマスを用いて湿重量２ｇおよび２０ｇ（発酵液１Ｌあたり）の酵母を培養した場合の、培養液中のエタノール濃度およびセロビオース濃度の経時変化を示す（ａ：野生型酵母（ＴＪ１４株）およびｂ：β－グルコシダーゼ表層提示酵母）。

[0104] β－グルコシダーゼ表層提示酵母（図４ｂ）では、初期酵母濃度にかかわらずセロビオース濃度が低下し、７２時間培養でのエタノール濃度は５２．１～５２．５ｇ／Ｌに達した（理論収率の９０．９～９１．６%）。初期酵

母濃度が２０ｇ（湿重量）／Ｌに比べると、２ｇ（湿重量）／Ｌの場合は発酵速度が若干遅いために２４時間培養でのエタノール濃度はやや低いものの、４８時間培養では同等のエタノール濃度４９．５ｇ／Ｌに到達していた。すなわち、エタノール生産速度の目標設定値を１ｇ／（Ｌ×時間）にする場合、初期酵母濃度は２ｇ（湿重量）／Ｌであっても問題ないことが分かった。

[0105] 野生型酵母（図４ａ）では、発酵液あたりの初期酵母濃度にかかわらずセロビオースの蓄積は顕著であり、７２時間培養でのエタノール濃度は１８．３～１９．７ｇ／Ｌに留まった（理論収率の３１．９～３４．４％）。

[0106] 実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤とβ－グルコシダーゼ表層提示酵母との併用により、エタノール生産収率（糖化発酵収率）の向上が見られた。

[0107] さらに、糖化発酵培養前に調製した酵母液（７２時間フラスコ培養の酵母）のβ－グルコシダーゼ活性（Ｕ／ｇ（湿重量）：酵母の湿重量１ｇあたりのβ－グルコシダーゼ活性（Ｕ／ｇ）として求めた）を３５℃または５０℃の各場合において測定した。表層提示酵母では培養上清への酵素の分泌が極めて少ないため、培養上清ではなく、酵母懸濁液を調製して菌体側のβ－グルコシダーゼ活性を測定した（表２）。ＴＪ１４株（野生株）では検出限界以下（Not detected）の活性値であり、β－グルコシダーゼを表層提示するように形質転換した酵母の方が顕著に高い活性値を示した。

[0108] [表2]

	反応温度	
	35℃	50℃
野生株	N.D.	N.D.
BGL表層提示酵母	204.6±1.8	306.5±25.3
表層提示酵母が示すBGL活性／実施例1のセルラーゼの濾紙分解活性	0.17	0.25

[0109] 上記２－２と同様にして、濾紙分解活性（ＦＰＵ）に対するβ－グルコシ

ダーゼ活性（Ｕ）の比率を算出した。但し、「外部添加セルラーゼの濾紙分解活性に対する、酵母のβ－グルコシダーゼ活性の比率」として見積もった。本実施例では、実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤を外部添加セルラーゼとして扱った。この外部添加セルラーゼは、セルロース（乾燥物）濃度２４重量％にて１０ＦＰＵ／ｇ（乾燥バイオマス）にて反応しているので、培養液１Ｌ中では２４００ＦＰＵの濾紙分解活性を含むと想定した。糖化発酵の培養で表層提示酵母を湿重量２ｇ／Ｌで用いたため、培養液１Ｌに含まれるβ－グルコシダーゼ活性は４０９．２Ｕ（３５℃の場合）および６１３．０Ｕ（５０℃の場合）となる。従って、濾紙分解活性（ＦＰＵ）に対するβ－グルコシダーゼ活性（Ｕ）の比率は、β－グルコシダーゼ表層提示酵母を用いた場合に０．１７（３５℃での評価）および０．２５（５０℃での評価）を示す。この比率は表１で示したCelluclast　１．５Ｌやトリコデルマ・リーセイ（T. reesei）の非組換え株の値（Ｂ／Ａ）と大きな違いは無いにもかかわらず、糖化発酵において顕著な糖化発酵収率の向上がみられるという、予想外の結果が示された。

[0110]　（実施例４：酵母回収を伴うセルロース系バイオマスの繰り返し発酵）

実施例３は１バッチ発酵培養であったが、本実施例では酵母菌体回収を伴う７バッチの繰り返し発酵培養を行った。手順は、以下の点を変更した以外は、実施例３と同様である。

[0111]　バイオマス固形分を液化する際に、コーンスティープリカー（ＣＳＬ）をあらかじめ添加し、糖化発酵開始時のＣＳＬ濃度が１．５重量％となるように調製した。また、糖化発酵のための培養開始時の酵母濃度を４ｇ（湿重量）／Ｌとし、１バッチを４８時間培養とし、各バッチ培養終了時の液を２，４００×ｇで２分間遠心分離し、沈殿したスラリーの上部を次バッチの発酵液の１０重量％となるように添加した。

[0112]　各バッチ培養の間に培養液中のエタノール濃度およびセロビオース濃度を経時的に測定した。この結果を図５に示す（ａ：エタノール濃度およびｂ：セロビオース濃度）。

[0113] 野生株の場合は、発酵液中のセロビオースの蓄積が顕著であり、エタノール濃度も１０．３～１７．３ｇ／Ｌに留まった。一方、β－グルコシダーゼ表層提示酵母はセロビオースの蓄積が抑えられ、繰り返し発酵においても各バッチ内でエタノール濃度は４７．０～５１．８ｇ／Ｌを維持した。すなわち、表層提示されたβ－グルコシダーゼは酵母とともに容易に回収・再利用できることが分かった。

[0114] また、各バッチ培養終了時に回収したスラリー中の酵母生菌数を測定した。この結果を表３に示す。

[0115] [表3]

	酵母を含むスラリー1gあたりの生菌数(個/g)	
	野生型酵母	BGL表層提示酵母
1バッチ終了後	4.7×10^{7}	1.1×10^{8}
2バッチ終了後	2.8×10^{7}	6.9×10^{7}
3バッチ終了後	3.0×10^{7}	9.4×10^{7}
4バッチ終了後	3.5×10^{7}	7.6×10^{7}
5バッチ終了後	3.9×10^{7}	1.1×10^{8}
6バッチ終了後	3.8×10^{7}	9.7×10^{7}

[0116] 各バッチ終了後、野生型酵母の場合はセロビオースが蓄積し糖が効率よく酵母に取り込まれないため、酵母を含むスラリー１ｇあたりの生菌数は２．８×１０^{7}～３．９×１０^{7}個に留まった。一方、β－グルコシダーゼ表層提示酵母は、セロビオースも分解して糖を効率よく酵母に取り込むため、酵母を含むスラリー１ｇあたりの生菌数は６．９×１０^{7}～１．１×１０^{8}個に達した。よって、実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したセルロース含有培地を用いることにより、β－グルコシダーゼ表層提示酵母では野生型酵母よりも高い生菌数が得られ、よって、β－グルコシダーゼ表層提示酵母が良好に培養し得ることが分かった。

[0117] （実施例５：バガスを用いたトリコデルマ・リーセイＲＵＴ－Ｃ３０によるセルラーゼの生産）

実施例３に記載のように調製した蒸煮バガスをアビセルの代わりに用いた以外は、実施例１と同様にして、トリコデルマ・リーセイＲＵＴ－Ｃ３０の前培養および本培養を行った。本実施例では、本培養を１６８時間行った。前培養で１（ｗ／ｖ）％の蒸煮バガスを、本培養で蒸煮バガス中のセルロース含量を考慮して４（ｗ／ｖ）％の蒸煮バガスを添加した。

[0118] 図６は、本培養の培養期間にわたるｐＨ変化および培養上清のセルラーゼ活性（濾紙分解活性（ＦＰＵ／ｍＬ））とタンパク質濃度（ｍｇ／ｍＬ）の変化を示すグラフである。ｐＨは、培養開始から４８時間後には３．５～４の間に維持した。濾紙分解活性とタンパク質濃度とはほぼ連動して増大し、濾紙分解活性は１．２５ＦＰＵ／ｍＬの培養上清が得られた。これを実施例１に記載のように濃縮して、以下の実施例に用いた。

[0119] （実施例６：実施例５のセルラーゼ剤を用いたセルロース系バイオマスの糖化発酵）

実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤の代わりに、実施例５の方法で得られたセルラーゼ剤を用いたこと以外は、実施例３と同様に糖化発酵を行った。糖化発酵の培養における初期酵母濃度を２ｇ（湿重量）／Ｌとした。結果を図７に示す（ａ：エタノール濃度およびｂ：セロビオース濃度）。

[0120] 実施例５の方法で得られたセルラーゼ剤を用いた場合でも、β－グルコシダーゼ表層提示酵母では、セロビオース濃度が低下し、７２時間培養でのエタノール濃度は５０ｇ／Ｌに達した。安価な材料（バガス）を用いて製造されたセルラーゼ製剤であっても、β－グルコシダーゼ表層提示酵母と組み合わせることで、セロビオースの蓄積が十分に抑えられ、野生型酵母よりも高いエタノール濃度に到達することが分かった。

[0121] （実施例７：実施例５のセルラーゼ剤を用いたセルロース系バイオマスの糖化発酵）

実験室酵母サッカロマイセス・セレビシエＢＹ４７４１株を宿主に用いた以外は、調製例１と同じ方法にてβ－グルコシダーゼ表層提示酵母を調製した。このβ－グルコシダーゼ表層提示酵母と、野生型酵母サッカロマイセス

・セレビシエＢＹ４７４１株とを用いたこと以外は、実施例６と同様に糖化発酵を行った。結果を図８に示す（Ａ：エタノール濃度およびＢ：セロビオース濃度）。

[0122] 実施例３と同様にして、β－グルコシダーゼ表層提示酵母（ＢＹ４７４１株）のβ－グルコシダーゼ活性を３５℃にて測定したところ、培養液１Ｌ当たりβ－グルコシダーゼ活性が６３．６Ｕの値を得た。さらに、実施例３と同様にして、「外部添加セルラーゼの濾紙分解活性に対する、酵母のβ－グルコシダーゼ活性の比率」を求めたところ、外部添加セルラーゼは培養液１Ｌ中では２４００ＦＰＵの濾紙分解活性を含むため、この比率は０．０２であった。

[0123] 図８は、β－グルコシダーゼ表層提示酵母（ＢＹ４７４１株）と、野生型酵母ＢＹ４７４１株とを用いた糖化発酵の結果を示す（Ａ：エタノール濃度およびＢ：セロビオース濃度）。図８においても、β－グルコシダーゼ表層提示酵母を用いた場合にセロビオースの蓄積が抑えられ、野生型酵母よりも高いエタノール濃度に到達した。本実施例の「外部添加セルラーゼの濾紙分解活性に対する、酵母のβ－グルコシダーゼ活性の比率」は、実施例３と比較して低い値（０．０２）であるにも関わらず、エタノール生産効率に関してβ－グルコシダーゼ表層提示酵母の野生型酵母に対する優位性がみられた。

[0124] （調製例２：キシロース代謝キシロシダーゼ表層提示酵母の調製）

宿主酵母として、ウラシルおよびロイシン栄養要求性マーカーを付与したサッカロマイセス・セレビシエＴＪ１４株を用いた。この宿主酵母は、サッカロマイセス・セレビシエＴＪ１４株（Moukamnerdら、Appl. Microbiol. Biotechnol.、2010年、第88巻、p.87-94）において、ウラシル生合成遺伝子破壊用プライマー対（ＵＲＡ３破壊用フォワードプライマー（配列番号１）およびリバースプライマー（配列番号２））とロイシン生合成遺伝子破壊用プライマー対（Ｌｅｕ２破壊用フォワードプライマー（配列番号３）およびリバースプライマー（配列番号４））を使用して、ＩｏｘＰ配列で挟まれた薬

剤耐性マーカーを有するｐＵＧ６系プラスミド（ＥＵＲＯＳＣＡＲＦより入手）をテンプレートにしたＰＣＲによって得られたＰＣＲ断片を導入し、酵母のウラシル生合成遺伝子およびロイシン生合成遺伝子の一部を相同組換えすることによって調製した。キシロース代謝遺伝子（ピチア・スチピチス由来キシロースレダクターゼ（ＸＲ）遺伝子、ピチア・スチピチス由来キシリトールデヒドロゲナーゼ（ＸＤＨ）遺伝子、およびサッカロマイセス・セレビシエ由来キシルロキナーゼ（ＸＫ）遺伝子）を含むプラスミドｐＩＵ－Ｘ３（Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006 Oct;72(6):1136-43に記載のプラスミドｐＩＵＸ１Ｘ２ＸＫ）をＰｓｔＩで切断後、酢酸リチウム法により宿主酵母を形質転換した。ウラシル要求性を相補した株のスクリーニングにより、キシロース代謝能力を有するＴＪ１４ΔＬ－Ｘ３（キシロース代謝酵母：この株を「Ｘ３株」ともいう）を取得した。続いて、ＧＡＰＤＨプロモーター支配下にアスペルギルス・オリゼ（Aspergillus oryzae）由来のキシロシダーゼ遺伝子（ｘｙｄ）（Katahiraら（APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept.2004, p.5407-5414に記載のXylA遺伝子）をα－アグルチニンと融合するように発現する表層提示型プラスミドｐＲＳ４０５－ＸｙｄをＨｐａＩで切断してＴＪ１４ΔＬ－Ｘ３株を形質転換した。このｐＲＳ４０５－Ｘｙｄは、ｐＲＳ４０５（ロイシン合成遺伝子を含む）（Stratageneより入手）をＮｏｔＩで消化し、ＧＡＰＤＨプロモーター（配列番号５）、リゾプス・オリゼ（R.oryzae）由来グルコアミラーゼ分泌シグナル（ＳＳ）遺伝子（塩基配列（配列番号６）およびコードされる分泌シグナルペプチドのアミノ酸配列（配列番号７））、アスペルギルス・オリゼ由来β－キシロシダーゼ遺伝子（塩基配列（配列番号８）およびコードされるタンパク質のアミノ酸配列（配列番号９））、α－アグルチニン遺伝子（塩基配列（配列番号１０）は、Ｃ末端から３２０アミノ酸（配列番号１１）をコードする領域を含む）およびＧＡＰＤＨターミネーター（配列番号１２）を含むＤＮＡ（配列番号１３）を、上記ＮｏｔＩで消化したｐＲＳ４０５に挿入して得た。ロイシン要求性を相補した株のスクリーニングにより、キシロース代謝能力と

キシロオリゴ糖の分解能力の両方を有するＴＪ１４－Ｘ３－Ｘｙｄ株（キシロース代謝キシロシダーゼ表層提示酵母：この株を「Ｘ３－Ｘｙｄ　＃１株」ともいう））を取得した。

[0125] （実施例８：実施例１のセルラーゼ剤を用いたキシラン液化発酵）

（８－１：キシラン液化発酵）

５０ｍＬコーニング管に、５×ＹＰ培地２ｍＬ（２ｇ）、キシラン２ｇ、滅菌水２ｍＬ（２ｇ）および実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤３ｍＬ（３ｇ）を入れ、サーモブロックローテーターによる回転（目盛５）下にて５０℃にて４時間混合し、液化液を得た。液化液について、混合開始時では、約４．４ｇ／ｋｇのグルコース、約１３．７ｇ／ｋｇのキシロース、および約４７．３ｇ／ｋｇの還元糖が存在していたのに対し、混合終了時には、約６．２ｇ／ｋｇのグルコース、約３２．４ｇ／ｋｇのキシロース、および約７３．２ｇ／ｋｇの還元糖が存在していた。

[0126] 別途、Ｘ３株およびＸ３－Ｘｙｄ　＃１株についてそれぞれの酵母液を調製した。前培養培地（ＹＰ－キシロース２重量％）５ｍＬにＹＰＤプレート酵母培養コロニーを１白金耳接種し、３０℃、６時間、１５０ｒｐｍで培養しておき、次いで本培養培地（ＹＰ－キシロース２重量％）１００ｍＬに前培養液５ｍＬを接種し、３０℃、３日間、１５０ｒｐｍで培養し、その後、遠心分離により培養液中の菌体濃度が２００ｇ（湿重量）／Ｌとなるような酵母液を調製した。

[0127] ５０ｍＬコーニング管中の液化液８．９８ｇに対して酵母液０．９９９ｍＬ（０．９９９ｇ）を加え、コーニング管を針付きシリコンゴム栓で栓をし、サーモブロックローテーターによる回転（目盛５）下にて３５℃にて発酵培養を行った。液化開始時の濃度は、５×ＹＰ培地を１×として、キシラン２０重量％、実施例１のセルラーゼ剤３０重量％であり、当該濃度で得られた液化液を用いた発酵開始時の濃度は、酵母液１０重量％（菌体２０ｇ／ｋｇ（培養液））であった。培養液中のエタノール濃度を経時的に測定した。結果を図９に示す。

[0128] 図９は、実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したキシランを用いた、キシロース代謝酵母（Ｘ３株）およびキシロース代謝キシロシダーゼ表層提示酵母（Ｘ３－Ｘｙｄ　＃１株）のエタノール生産の結果を示す。図９から明らかなように、実施例１のセルラーゼ剤とキシロース代謝キシロシダーゼ表層提示酵母（Ｘ３－Ｘｙｄ　＃１株）とを組み合わせることで、キシロース代謝能力のみ付与したキシロース代謝酵母（Ｘ３株）より高いエタノール濃度を得た。実施例１のセルラーゼ剤を酵母に表層提示されたキシロオリゴ糖分解酵素（キシロシダーゼ）と併用することで、エタノール収率が向上した。したがって、キシラン、キシロオリゴ糖、キシロースのようなＣ５糖を含むバイオマスに対しても実施例１のセルラーゼ剤を適用することができ、さらにキシロシダーゼのようなキシロオリゴ糖分解酵素を表層提示する酵母との併用によってエタノール収率を向上させることができる。

[0129] （８－２：セルラーゼ剤およびキシロシダーゼ表層提示酵母の酵素活性）

実施例１と同様に１７１時間後の培養上清を濃縮して得られた濃縮液について、酵素活性を測定した。濾紙分解活性が２４．４ＦＰＵ／ｍＬ、ＢＧＬ活性が４．８Ｕ／ｍＬ（５０℃）または２．２Ｕ／ｍＬ（３５℃）、ＥＧ活性が６１４．５Ｕ／ｍＬ、ＣＢＨ活性が４．６Ｕ／ｍＬ、Ｘｙｎ活性が１２．３Ｕ／ｍＬ、Ｘｙｄ活性が５．８Ｕ／ｍＬ、そしてタンパク質濃度が２７．５ｍｇ／ｍＬであった。キシラナーゼおよびキシロシダーゼについては、本実施例のキシラン液化および酵素活性で示されるように、セルラーゼ剤中に明らかに含まれることを確認した。

[0130] 酵母液（３日培養後の酵母）のＸｙｄ活性を３５℃において測定した。Ｘ３株およびＸ３－Ｘｙｄ　＃１株とも、酵母液上清では活性は検出されなかった。Ｘ３－Ｘｙｄ　＃１株は、菌体におけるＸｙｄ活性が０．１７Ｕ／ｍＬであるのに対し、Ｘ３株では検出されなかった。

[0131] （調製例３：β－グルコシダーゼ表層提示乳酸菌の調製）

ラクトバチルス・プランタルムΔldhL1::PxylAB-xpk1::tkt-Δxpk2::PxylAB株（Yoshidaら, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, Vol.92, 67-76：「

ＰｘｙｌＡＢ株」）に、ｐＣＵＡ－Ｒｕｍａｌ２８１６（ｐＣＵＡのＢａｍＨＩ－ＥｃｏＲＩ間にルミノコッカス・アルブス（Ruminococcus albus）由来のβ－グルコシダーゼ遺伝子（GenBank Sequence ID:Ｘ１５４１５．１）をクローニングしたプラスミド（ｐＣＵプラスミド（Okanoら, Appl Microbiol Biotechnol、2007年、第75巻、p.1007-1013）のＮｄｅＩ－ＢａｍＨＩ間にＰｇｓＡアンカー（バシルス・ズブチリス由来のポリ－γ－グルタミン酸生合成酵素複合体ＰｇｓＢＣＡのサブユニット）を挿入したプラスミド（ｐＣＵＡ）を用意し、このｐＣＵＡのＢａｍＨＩ－ＥｃｏＲＩ間に上記β－グルコシダーゼ遺伝子をクローニングして作製した）をエレクトロポレーション法により導入し、エリスロマイシン５μｇ／ｍＬを含むＭＲＳ培地で形質転換体のコロニーを取得し、形質転換乳酸菌株（β－グルコシダーゼ表層提示乳酸菌：この株を「ｐＣＵＡ－Ｒｕｍａｌ２８１６株」ともいう）を得た。本形質転換乳酸菌株の菌体β－グルコシダーゼ活性は、１日培養時点で１．４１Ｕ／ｇ（乳酸菌湿重量）であった。

[0132] （実施例９：実施例１のセルラーゼ剤を用いた乳酸発酵）

実施例３と同様にして、実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤を用いてバガス液化液を調製した。この液化液は約２４重量％の固形分を含み、約２１ｇ／Ｌのグルコースと約３２ｇ／Ｌのセロビオース（バイオマスから酵素糖化により遊離した糖）が存在していた。本ロットのセルラーゼ剤は、濾紙分解活性が２９．２ＦＰＵ／ｍＬであり、ＢＧＬ活性が０．８Ｕ／ｍＬ（５０℃）または０．２１Ｕ／ｍＬ（３５℃）であった。

[0133] 別途、ｐＣＵＡ－Ｒｕｍａｌ２８１６株の乳酸菌液を調製した。エリスロマイシン５μｇ／ｍｌを添加したＭＲＳ培地２０ｍＬに継代液２ｍＬ接種し、３７℃にて８時間静置後、新たなＭＲＳ培地（エリスロマイシン５μｇ／ｍｌを添加）４００ｍＬにこの前培養液２０ｍＬを接種し、３７℃にて１日静置して培養し、培養液中の菌体濃度が２０ｇ（湿重量）／Ｌとなるような乳酸菌液を得た。

[0134] 液化液が７５重量％となるようにＭＲＳ培地（但し糖を含まない：プロテ

アーゼペプトンＮｏ．３　１０ｇ、牛エキス１０ｇ、酵母エキス５ｇ、Ｔｗｅｅｎ８０　１０ｇ、クエン酸水素二アンモニウム２ｇ、酢酸ナトリウム５ｇ、酢酸マグネシウム・７H_2O　０．２ｇ、硫酸マンガン・５H_2O　０．０７ｇ、リン酸二カリウム２ｇを１００ｍＬ中に含む）とガラス容器内で混合し、上記乳酸菌液を湿重量２０ｇ（培養液１Ｌあたり）となるように添加し、ウォーターバスにて３５℃で保温しマグネティックスターラーにより２００ｒｐｍで撹拌しながら乳酸菌を培養し、糖化発酵を開始した。培養開始時の初発ｐＨを５ぐらいに設定し、培養中は、炭酸カルシウムによりｐＨを５ぐらいに調整した。培養液中の乳酸濃度およびセロビオース濃度を経時的に測定した。

[0135] 図１０は、実施例１の方法で得られたセルラーゼ剤で処理したセルロース系バイオマスを用いて湿重量２０ｇ（培養液１Ｌあたり）のβ－グルコシダーゼ表層提示乳酸菌（ｐＣＵＡ－Ｒｕｍａｌ２８１６株）を培養した場合の、培養液中の乳酸濃度（Ａ）およびセロビオース濃度（Ｂ）の経時変化を示す。

[0136] バガス液化液の量を発酵培養液全体の７５重量％の仕込み量として、β－グルコシダーゼ表層提示乳酸菌（ｐＣＵＡ－Ｒｕｍａｌ２８１６株）を培養することにより、セロビオースの蓄積も少なく、９８．８ｇ／Ｌの乳酸濃度を得た。製造された乳酸のＤ－乳酸過剰率は９４．２％であった。したがって、実施例１のセルラーゼ剤をβ－グルコシダーゼ表層提示乳酸菌と併用して、乳酸発酵を行うこともできる。

産業上の利用可能性

[0137] 本発明は、エタノール、乳酸等の製造、ならびにエタノール、乳酸等を原材料とする食品、医薬品および各種工業製品の製造に有用である。

請求の範囲

[請求項1] セルラーゼ剤を製造する方法であって、

トリコデルマ属微生物を、ｐＨ１以上かつ５未満にて、少なくとも２つのグルコースがβ－１，４結合した多糖を含有する培地にて培養し、セルラーゼ剤を生産させる工程

を含み、

該セルラーゼ剤の濾紙分解活性に対する該セルラーゼ剤におけるβ－グルコシダーゼ活性の比率が３より低い、

方法。

[請求項2] 前記トリコデルマ属微生物がトリコデルマ・リーセイである、請求項１に記載のセルラーゼ剤を製造する方法。

[請求項3] 前記トリコデルマ属微生物が、セルラーゼ剤に関して非遺伝子組換えの微生物である、請求項１または２に記載のセルラーゼ剤を製造する方法。

[請求項4] 前記セルラーゼ剤がセロビオヒドロラーゼおよびエンドグルカナーゼを含む、請求項１から３のいずれかに記載のセルラーゼ剤を製造する方法。

[請求項5] 前記セルラーゼ剤がキシラナーゼをさらに含む、請求項１から４のいずれかに記載のセルラーゼ剤を製造する方法。

[請求項6] 糖化発酵産物の製造方法であって、

請求項１から５のいずれかの方法で製造されたセルラーゼ剤で処理したセルロース材料を含有する培地を用いて、β－グルコシダーゼ表層提示微生物を培養し、糖化発酵産物を得る工程

を含む、方法。

[請求項7] 前記β－グルコシダーゼ表層提示微生物の酵素力価が、前記セルラーゼ剤の濾紙分解活性に対する該微生物のβ－グルコシダーゼ活性の比率として、０．０２～２．５である、請求項６に記載の方法。

[請求項8] 前記セルロース材料がセルロース系バイオマスである、請求項６ま

たは７に記載の方法。

[請求項9] 前記糖化発酵産物がエタノールである、請求項６から８のいずれかに記載の方法。

[請求項10] 前記β－グルコシダーゼ表層提示微生物がβ－グルコシダーゼ表層提示酵母である、請求項６から９のいずれかに記載の方法。

[請求項11] 前記糖化発酵産物が乳酸である、請求項６から８のいずれかに記載の方法。

[請求項12] 前記β－グルコシダーゼ表層提示微生物がβ－グルコシダーゼ表層提示乳酸菌である、請求項６から８、および１１のいずれかに記載の方法。

[請求項13] 前記セルラーゼ剤を、請求項１から５のいずれかの方法により製造する工程をさらに含む、請求項６から１２のいずれかに記載の方法。

[請求項14] 糖化発酵産物の製造方法であって、

請求項１から５のいずれかの方法で製造されたセルラーゼ剤で処理したキシロース含有多糖を含む材料を含有する培地を用いて、キシロースを代謝しかつキシロシダーゼを表層提示する微生物を培養し、糖化発酵産物を得る工程

を含む、方法。

[請求項15] 前記セルラーゼ剤を、請求項１から５のいずれかの方法により製造する工程をさらに含む、請求項１４に記載の方法。

[請求項16] 表層提示微生物の培養方法であって、この方法は、

請求項１から５のいずれかの方法により製造されたセルラーゼ剤で該セルラーゼ剤が分解する多糖を含む材料を処理する工程、および

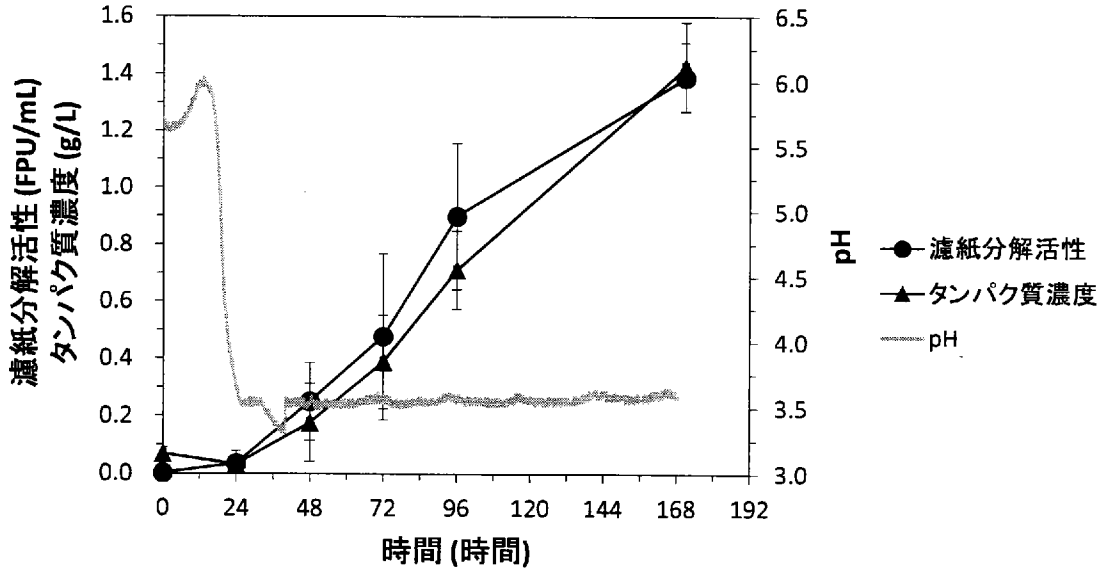
該処理された材料を含む培地で該表層提示微生物を培養する工程

を含み、

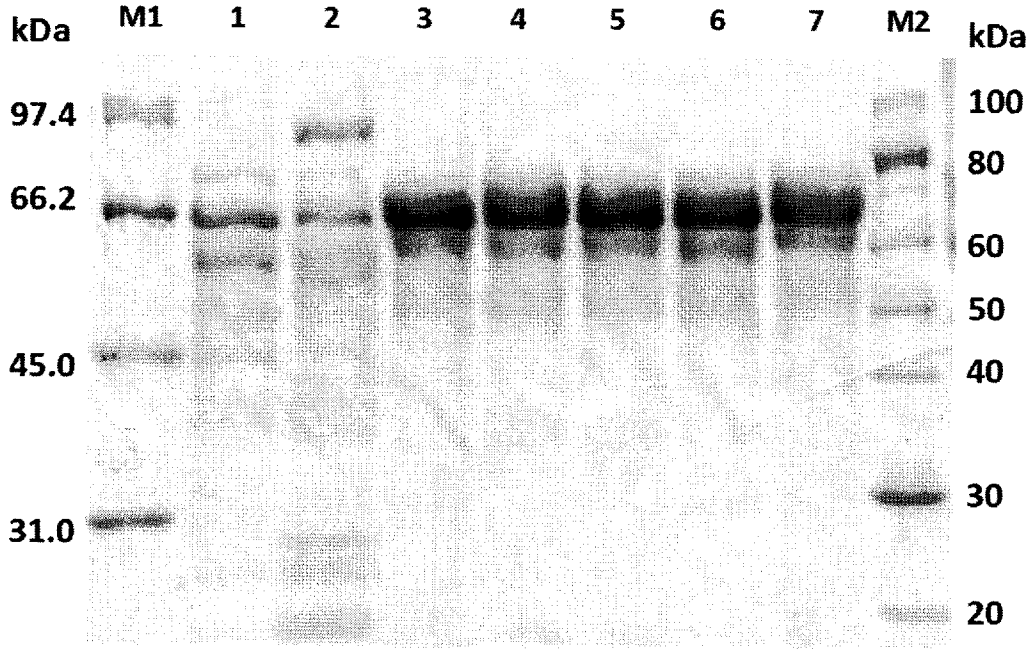
該表層提示微生物が、該処理された材料から該微生物が代謝する糖を生成する酵素を表層提示する、

方法。

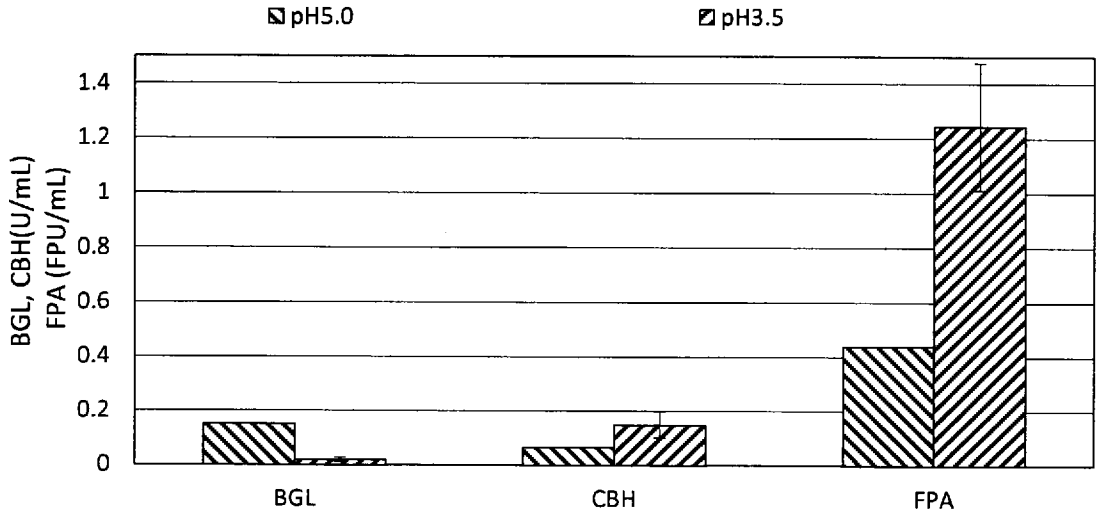
[図1]


濾紙分解活性 (FPU/mL)
タンパク質濃度 (g/L)
pH
時間 (時間)
濾紙分解活性
タンパク質濃度
pH
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
0
24
48
72
96
120
144
168
192

[図2]

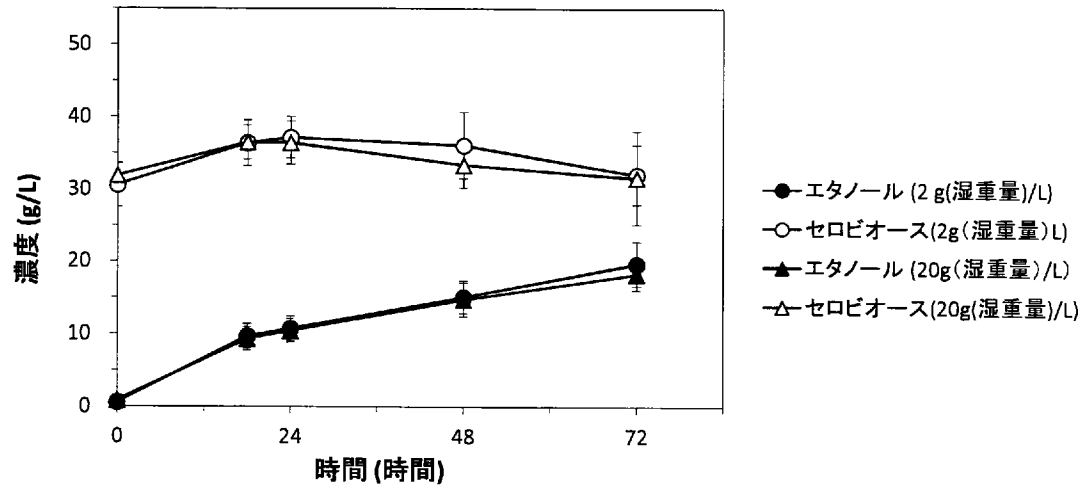

kDa
M1
1
2
3
4
5
6
7
M2
kDa
97.4
66.2
45.0
31.0
100
80
60
50
40
30
20

[図3]

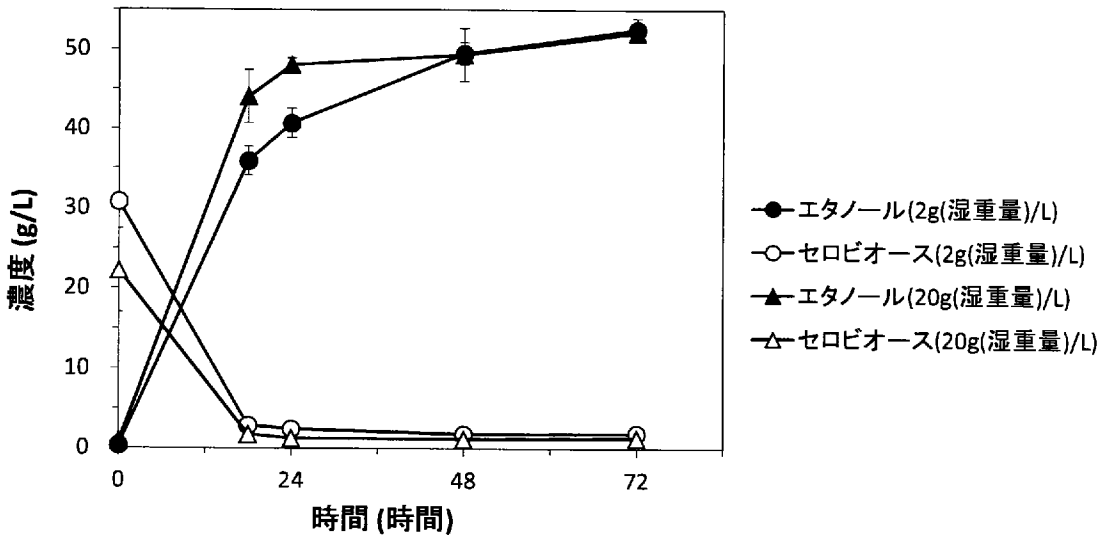


[図4]

（ａ）野生型酵母（ＴＪ１４株）

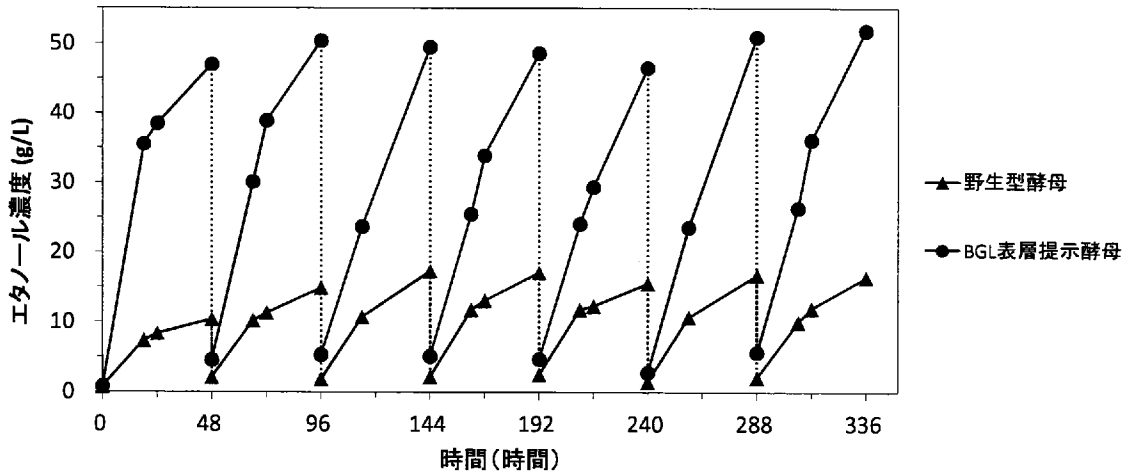


（ｂ）β－グルコシダーゼ表層提示酵母

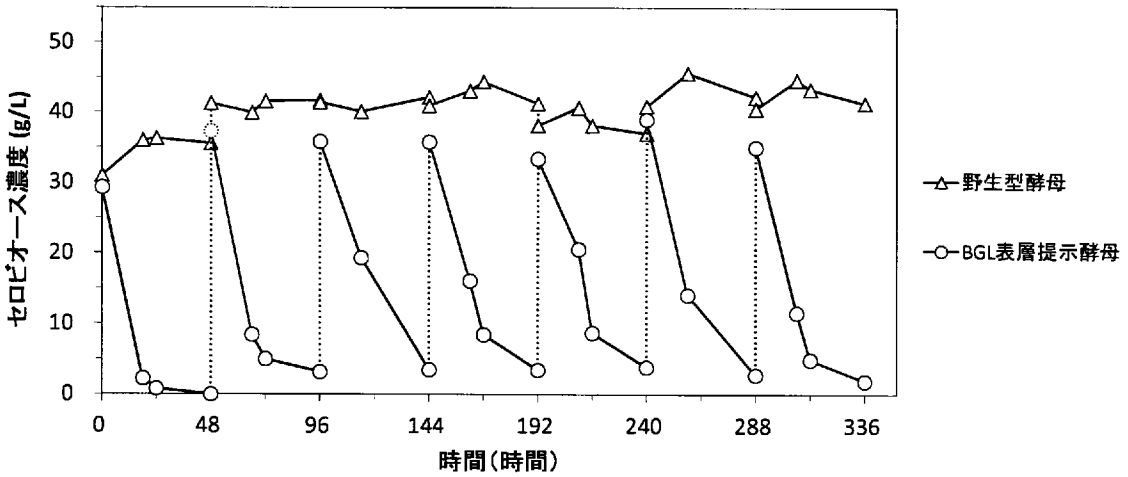


[図5]

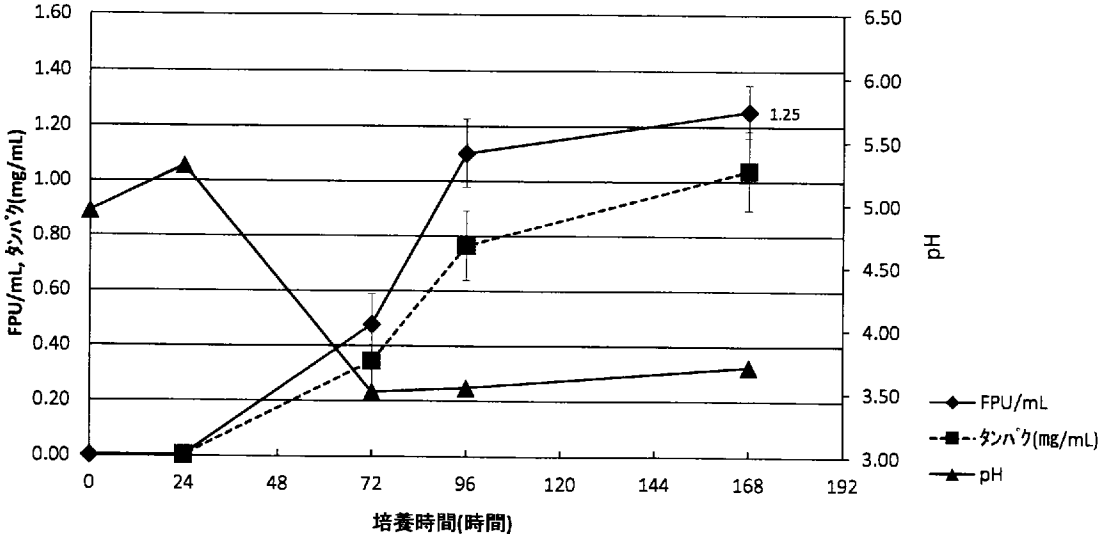
(a)


エタノール濃度 (g/L)
50
40
30
20
10
0
0
48
96
144
192
240
288
336
時間(時間)
野生型酵母
BGL表層提示酵母

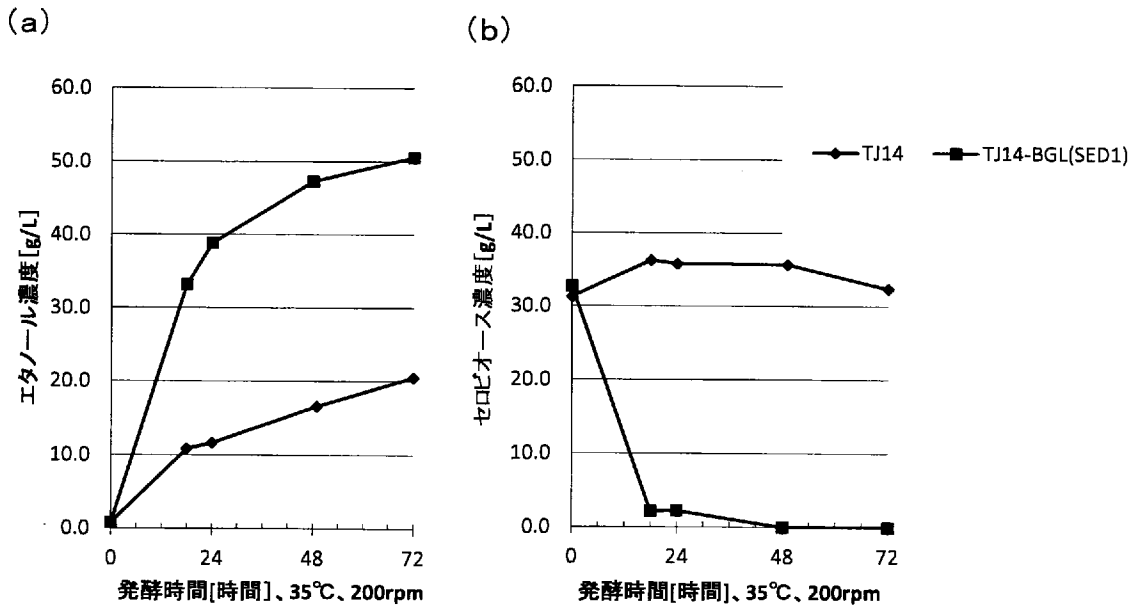
(b)


セロビオース濃度 (g/L)
50
40
30
20
10
0
0
48
96
144
192
240
288
336
時間(時間)
野生型酵母
BGL表層提示酵母

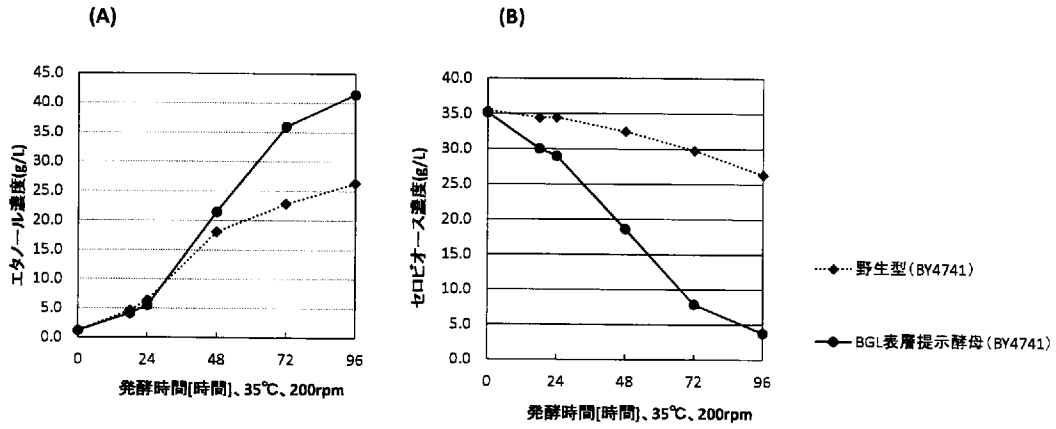
[図6]


FPU/mL, タンパク(mg/mL)
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
pH
6.50
6.00
5.50
5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
1.25
0
24
48
72
96
120
144
168
192
培養時間(時間)
FPU/mL
タンパク(mg/mL)
pH

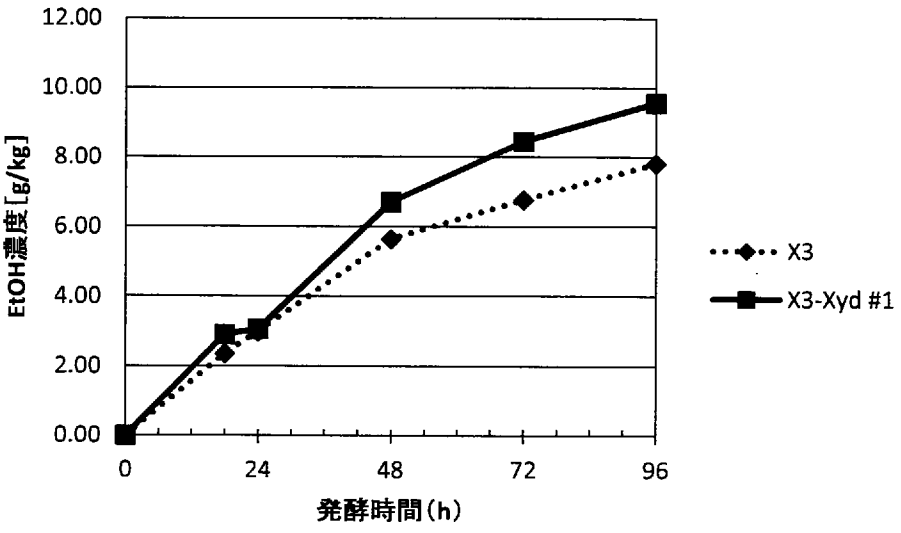
[図7]


(a)
(b)
エタノール濃度[g/L]
セロビオース濃度[g/L]
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
0
24
48
72
発酵時間[時間]、35℃、200rpm
TJ14
TJ14-BGL(SED1)

[図8]

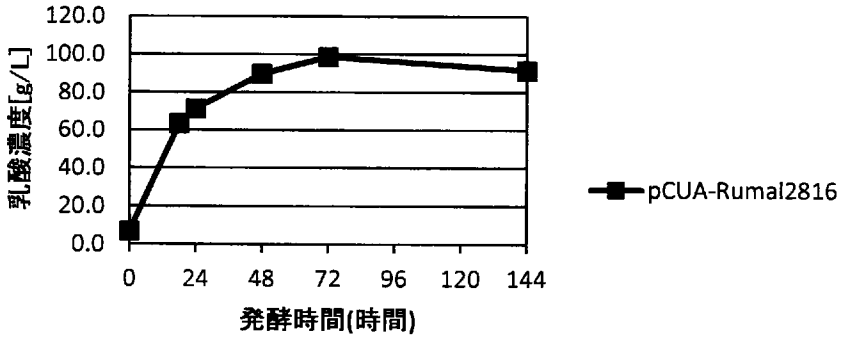

(A)
(B)
エタノール濃度(g/L)
セロビオース濃度(g/L)
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0
24
48
72
96
発酵時間[時間]、35℃、200rpm
野生型(BY4741)
BGL表層提示酵母(BY4741)

[図9]

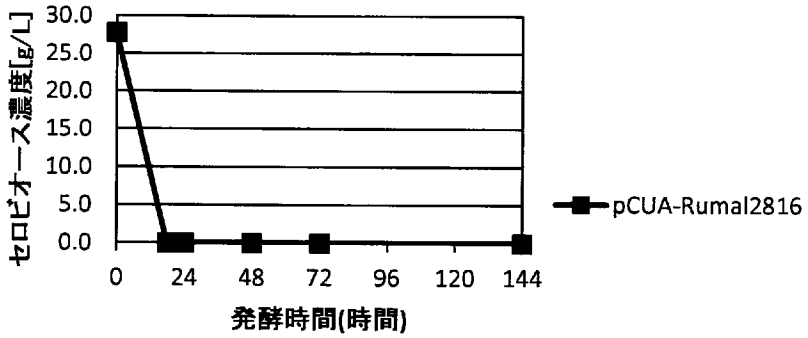

EtOH濃度[g/kg]
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
0
24
48
72
96
発酵時間(h)
X3
X3-Xyd #1

[図10]

(A)


120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
乳酸濃度[g/L]
0
24
48
72
96
120
144
発酵時間(時間)
pCUA-Rumal2816

(B)


30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
セロビオース濃度[g/L]
0
24
48
72
96
120
144
発酵時間(時間)
pCUA-Rumal2816

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/025404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12N9/42(2006.01)i, 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)
Int.Cl. C12N9/42, C12N1/16, C12P7/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922–1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971–2019
Registered utility model specifications of Japan	1996–2019
Published registered utility model applications of Japan	1994–2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/WPIDS/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2006-296358 A (ASAHI KASEI CHEMICALS CORP.) 02 November 2006, claims, paragraphs [0017], [0018], examples 3, 4, comparative example 1, table 2 (Family: none)	1-5 6-16
X Y	WO 2006/011479 A1 (ASAHI KASEI CHEMICALS CORP.) 02 February 2006, claims, paragraphs [0029], [0030], production example 1, examples 13, 14, table 4 & US 2007/0207108 A1, claims, paragraphs [0092], [0094], [0095], production example 1, examples 13, 14, table 4 & EP 1811038 A1	1-5 6-16

☒ 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	Date of mailing of the international search report
22 August 2019 (22.08.2019)	17 September 2019 (17.09.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/025404

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2014-521359 A (IFP ENERGIES NOUVELLES) 28 August 2014, claims, paragraphs [0006], [0038], [0054], [0059], [0063], examples 1-3 & WO 2013/026964 A1, claims, p. 2, lines 21-27, p. 7, line 36, examples 1-3 & US 2014/0302587 A1	1-5 6-16
X Y	JP 2010-536390 A (IOGEN ENERGY CORPORATION) 02 December 2010, claims, paragraphs [0004], [0037], tables 2, 3, examples 2-4 & WO 2009/026716 A1, claims, paragraphs [0004], [0041], tables 2, 3, examples 2-4 & US 8093019 B2	1-5 6-16
X Y	TARGONSKI, Z. et al., "Effect of pH on biosynthesis of cellulase, xylanase and lytic enzymes by Trichoderma reesei M-7 in fed-batch culture", Acta Microbiologica Polonica, 1993, vol. 42, no. 3/4, pp. 281-289, in particular, microorganism of material and methods, p. 283, paragraph [0002], fig. 1	1-5 6-16
X Y	JP 2010-536391 A (IOGEN ENERGY CORPORATION) 02 December 2010, example 7 & WO 2009/026722 A1, example 7 & US 8017361 B2	1-5 6-16
X Y	BAILEY, M. J. et al., "Effect of pH on production of xylanase by Trichoderma reesei on xylan- and cellulose-based media", Appl. Microbiol. Biotechnol., 1993, vol. 40, pp. 224-229, in particular, summary, fig. 1	1-5 6-16
X Y	LI, C. et al., "Effect of pH on cellulase production and morphology of Trichoderma reesei and the application in cellulosic material hydrolysis", J. Biotechnol., 2013, vol. 168, pp. 470-477, in particular, summary, 2.3.1., fig. 1, 2, 3.1.	1-5 6-16
Y	SAKAMOTO, T. et al., "Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae cells", J. Biotechnol., 2012, vol. 158, pp. 203-210, in particular, summary	6-16
Y	WO 2015/033948 A1 (KANSAI CHEMICAL ENGINEERING CO., LTD.) 12 March 2015, claims & US 2016/0201092 A1, claims	6-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/025404

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	岡野憲司 他, PgsA タンパク質を用いた大腸菌および乳酸菌細胞表層提示システムの開発, 化学工学会第 70 年会 研究発表講演要旨集, 2005, F123, in particular, introduction, non-official translation (OKANO, Kenji et al., "Development of cell surface display system for Escherichia coli and lactic acid bacteria using PgsA protein", Lecture abstracts of 70th annual research presentation of the Society of chemical engineers, Japan)	12,13
Y	NARITA, J. et al., "Display of α-Amy lase on the Surface of Lactobacillus casei Cells by Use of the PgsA Anchor Protein, and Production of Lactic Acid from Starch", Appl. Environ. Microbiol., 2006, vol. 72, no. 1, pp. 269-275, in particular, summary	12,13

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０２５４０４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N9/42(2006.01)i, 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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N9/42, C12N1/16, C12P7/06

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９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）

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

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 Y	JP 2006-296358 A (旭化成ケミカルズ株式会社) 2006.11.02, 特許請求の範囲、[0017]、[0018]、実施例３、４、比較例１、表２（ファミリーなし）	1-5 6-16
X Y	WO 2006/011479 A1 (旭化成ケミカルズ株式会社) 2006.02.02, 特許請求の範囲、[0029]、[0030]、製造例１、実施例１３、１４、表４ & US 2007/0207108 A1, 特許請求の範囲, [0092], [0094], [0095], 製造例１, 実施例１３, １４, 表４ & EP 1811038 A1	1-5 6-16

☑　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	国際調査報告の発送日
２２．０８．２０１９	１７．０９．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
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）　４Ｂ　３１２６
松田　芳子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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
X Y	JP 2014-521359 A (イエフペ　エネルジ　ヌヴェル) 2014.08.28, 特許請求の範囲、[0006]、[0038]、[0054]、[0059]、[0063]、実施例１－３ & WO 2013/026964 A1, 特許請求の範囲, p.2 第 21-27 行, p.7 第 36 行, 実施例 1-3 & US 2014/0302587 A1	1-5 6-16
X Y	JP 2010-536390 A (アイオジェン　エナジー　コーポレイション) 2010.12.02, 特許請求の範囲、[0004]、[0037]、表２、３、実施例２－４ & WO 2009/026716 A1, 特許請求の範囲, [0004], [0041], 表２, ３, 実施例２－４ & US 8093019 B2	1-5 6-16
X Y	TARGONSKI, Z. et al., Effect of pH on biosynthesis of cellulase, xylanase and lytic enzymes by Trichoderma reesei M-7 in fed-batch culture, Acta Microbiologica Polonica, 1993, vol.42, no.3/4, p.281-289, 特に Material and Methods の Microorganism, p.283 第２段落, Fig.1	1-5 6-16
X Y	JP 2010-536391 A (アイオジェン　エナジー　コーポレイション) 2010.12.02, 実施例７ & WO 2009/026722 A1, 実施例７ & US 8017361 B2	1-5 6-16
X Y	BAILEY, M. J. et al., Effect of pH on production of xylanase by Trichoderma reesei on xylan- and cellulose-based media, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1993, vol.40, p 224-229, 特に要旨, Fig.1	1-5 6-16
X Y	LI, C. et al., Effect of pH on cellulase production and morphology of Trichoderma reesei and the application in cellulosic material hydrolysis, J. Biotechnol., 2013, vol.168, p.470-477, 特に要旨, 2.3.1., Fig.1, 2, 3.1.	1-5 6-16
Y	SAKAMOTO, T. et al., Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae cells, J. Biotechnol., 2012, vol.158, p.203-210, 特に要旨	6-16
Y	WO 2015/033948 A1 (関西化学機械製作株式会社) 2015.03.12, 特許請求の範囲 & US 2016/0201092 A1, 特許請求の範囲	6-16

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
Y	岡野憲司 他，PgsA タンパク質を用いた大腸菌および乳酸菌細胞表層提示システムの開発，化学工学会第 70 年会　研究発表講演要旨集，2005，F123，特に緒言	12，13
Y	NARITA，J. et al.，Display of α-Amylase on the Surface of Lactobacillus casei Cells by Use of the PgsA Anchor Protein, and Production of Lactic Acid from Starch，Appl. Environ. Microbiol.，2006，vol.72，no.1，p.269-275，特に要旨	12，13