

(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
2010年12月23日(23.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/147218 A1

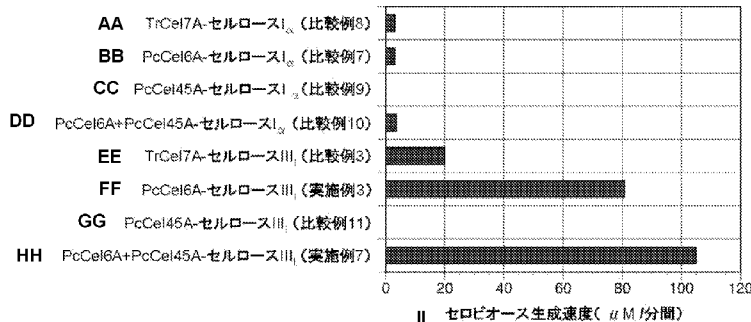
- (51) 国際特許分類:
C12P 19/14 (2006.01) C12P 7/56 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/060385
- (22) 国際出願日: 2010年6月18日(18.06.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-146466 2009年6月19日(19.06.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京大学 (The University of Tokyo) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 五十嵐 圭日子 (IGARASHI, Kiyohiko) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 鮫島 正浩 (SAMEJIMA, Masahiro) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 廣田 浩一, 外 (HIROTA, Koichi et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木2-2-13 新宿TRビル4階 山の手合同国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: BIOMASS FEEDSTOCK PROCESSING METHOD, SUGAR PRODUCTION METHOD, ETHANOL PRODUCTION METHOD, AND LACTIC ACID PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: バイオマス原料の処理方法、並びに糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法

[図7]



AA TrCel7A-CelluloseI_α (comparative example 8)
BB PcCel6A-CelluloseI_α (comparative example 7)
CC PcCel45A-CelluloseI_α (comparative example 9)
DD PcCel6A+PcCel45A-CelluloseI_α (comparative example 10)
EE TrCel7A-CelluloseIII (comparative example 3)
FF PcCel6A-CelluloseIII (working example 3)
GG PcCel45A-CelluloseIII (comparative example 11)
HH PcCel6A+PcCel45A-CelluloseIII (working example 7)
II Cellobiose Generation Rate (μM/minute)

(57) Abstract: Provided is a biomass feedstock processing method that is characterized by involving: (a) a process for obtaining reformed biomass feedstock by processing biomass feedstock with a processing agent that comprises ammonia, and (b) a process for performing enzymatic saccharification on said reformed biomass feedstock with a cellobiohydrolase II (Cel6A).

(57) 要約: (a) バイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理することにより、改質バイオマス原料を得る工程、(b) 該改質バイオマス原料を、セロビオヒドロラーゼII (Cel6A) で酵素糖化する工程、を含むことを特徴とするバイオマス原料の処理方法である。

WO 2010/147218 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 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：

バイオマス原料の処理方法、並びに糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、バイオマス原料の処理方法、並びに糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、地球温暖化対策の一環で、化石燃料の代替燃料として、植物資源から生産されるバイオエタノールが着目されてきている。

[0003] 従来、バイオエタノールの原料としては、主にサトウキビなどの糖質や、穀物などのデンプン質が用いられていたが、これらの原料は、食物や飼料としても利用可能なものが多いため、各原料を用いたバイオエタノールの生産量を増加させると、食料や飼料の供給に影響を及ぼすことが懸念される。

[0004] 一方、樹木や草、廃棄物などは、食料生産と競合しないため、エネルギー利用に有用なバイオマス原料である。

植物に由来するセルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース、及びリグニンを主成分として含む。前記セルロースは、グルコースが β -1, 4-グルコシド結合して直鎖状に形成されている繊維状の多糖類であり、植物の細胞壁を構成する主要な成分である。前記ヘミセルロースは、前記セルロースと共に植物の細胞壁などを構成する多糖類である。前記リグニンは、ヒドロキシフェニルプロパンを基本単位として重合した高分子物質である。これらの中でも、前記セルロースは、地球上で最も存在量の多い天然高分子である。

そこで、近年、木質バイオマスや草本バイオマスなどのセルロースを含む原料を糖化し、各種燃料や化学原料として利用しようとする試みが広く行われている。

[0005] バイオマス原料からのエタノールの製造は、例えば、収集したバイオマス原料を糖化工程において糖に分解した後、発酵工程において酵母などの微生物を用いてエタノールに変換することにより行うことができる。

セルロース系バイオマスから糖を抽出するための糖化工程は、植物体内に高分子で存在しているセルロースと、ヘミセルロースとを可溶化すると同時に、グルコースなどの単糖類に分解する必要がある。糖化方法としては、従来、濃硫酸や濃塩酸などの強酸を用いて行われることが多かったが、環境負荷低減の観点から、これらの強酸の使用は避けることが望まれている。

[0006] そこで、近年、濃硫酸や濃塩酸などの強酸による糖化に代わる手段として酵素を用いたバイオマス原料の糖化が広く研究されている。

酵素による糖化は、環境負荷低減、生成物の選択性、及び反応条件の穏和さの観点から望ましい手段であるが、セルロース系バイオマスの糖化に用いられる酵素は、既に実用化されているデンプンの酵素糖化に必要なアミラーゼ添加量と比較して、セルロースを糖化するために必要なセルラーゼの添加量が著しく多いことから、糖変換コストの増大が問題となっている。

[0007] また、この酵素糖化のためには、酵素を作用させ易くする目的から、予めバイオマス原料に対して前処理を行うことが必要となる。このバイオマス原料の前処理方法として様々な方法が知られているが、これらの中でも、希硫酸、加圧熱水などによる蒸煮処理などが一般的である（特許文献 1～4 参照）。しかしながら、前述したように硫酸の使用は好ましくない。また、バイオマス原料にこれらの前処理を行い、得られた処理物を酵素糖化に供する場合では、所望の程度の酵素糖化効率を得るためには該前処理を多段で行う必要があることや、200℃以上の高温にしなければならないことなどの点で問題である。

バイオマス原料を物理的手段により微細に粉砕することにより、化学的、生物化学的反応性が向上することも知られているが、粉砕のみにより十分な酵素糖化効率を得ようとする、粉砕工程に多大なエネルギーを要し、経済合理性を失うおそれがある点で問題である。

更に、バイオマス原料をアンモニアあるいは有機アミンを用いて前処理することにより、その化学的、生物化学的反応性が向上することが知られている（特許文献5参照）が、前記前処理されたバイオマスであっても、その酵素糖化効率は未だ充分とはいえない点で問題である。

[0008] したがって、より酵素糖化効率を高めることのできる酵素糖化技術の開発、及び前記酵素糖化に適したバイオマス原料の前処理技術の開発が、未だ望まれているのが現状である。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：特開2006-075007号公報
特許文献2：特開2004-121055号公報
特許文献3：特開2002-541355号公報
特許文献4：特開2002-159954号公報
特許文献5：欧州特許公開第77287号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、従来における前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、酵素糖化を効率的に行うことができ、そのため、糖の生産効率、エタノールの生産効率、及び乳酸の生産効率を向上させることが可能な、糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法、並びに前記糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法に用いられるバイオマス原料の処理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

- [0011] 前記課題を解決するため、本発明者らは鋭意検討した結果、以下のような知見を得た。即ち、天然型セルロースであるセルロースⅠ型を含むバイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理することにより得られる改質バイオマス原料を、セロビオヒドロラーゼⅠⅠ（Cel6A）を用いて酵素糖化

することにより酵素糖化を効率的に行うことができ、したがって、糖の生産効率、エタノールの生産効率、及び乳酸の生産効率を格段に向上させることができるという知見である。

[0012] なお、本発明者らは以前に、天然型セルロースであるセルロースⅠ型よりも低い結晶密度を有するセルロース（例えばセルロースⅠⅠⅠ₁型）を酵素糖化の対象物として用いることにより、酵素糖化を効率的に行うことができること、及びセルロースⅠ型を含むバイオマス原料を、アンモニア、特に超臨界アンモニアで処理することにより、セルロースⅠⅠⅠ₁型を含む酵素糖化用セルロースを効率的に得ることができることを特許出願している（特開2008-161125号公報参照。）。

[0013] バイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理した後に、セロビオヒドロラーゼⅠⅠ（Ce16A）を用いて酵素糖化することにより、バイオマス原料の酵素糖化効率を格段に向上させることができることは、従来知られておらず、本発明者らによる新たな知見である。

[0014] 本発明は、本発明者らによる前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

<1> (a) バイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理することにより、改質バイオマス原料を得る工程、(b) 該改質バイオマス原料を、セロビオヒドロラーゼⅠⅠ（Ce16A）で酵素糖化する工程、を含むことを特徴とするバイオマス原料の処理方法である。

<2> バイオマス原料が、セルロースⅠ型を含む前記<1>に記載のバイオマス原料の処理方法である。

<3> バイオマス原料が、木質バイオマスである前記<1>から<2>のいずれかに記載のバイオマス原料の処理方法である。

<4> 工程(a)が、超臨界アンモニア流体で処理することを含む前記<1>から<3>のいずれかに記載のバイオマス原料の処理方法である。

<5> 改質バイオマス原料とセロビオヒドロラーゼⅠⅠ（Ce16A）とが加水分解反応を行う表面密度が0.9以下のとき、該セロビオヒドロラー

ゼ I I (C e l 6 A) 1 分子あたりの加水分解速度が 1 分間に 5 回以上である前記< 1 >から< 4 >のいずれかに記載のバイオマス原料の処理方法である。

< 6 > 前記< 1 >から< 5 >のいずれかに記載のバイオマス原料の処理方法により糖を得ることを特徴とする糖の製造方法である。

< 7 > 前記< 6 >に記載の糖の製造方法により得られた糖を発酵させてエタノールを得ることを特徴とするエタノールの製造方法である。

< 8 > 前記< 6 >に記載の糖の製造方法により得られた糖を発酵させて乳酸を得ることを特徴とする乳酸の製造方法である。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、従来における前記諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、酵素糖化を効率的に行うことができ、そのため、糖の生産効率、エタノールの生産効率、及び乳酸の生産効率を向上させることが可能な、糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法、並びに前記糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法に用いられるバイオマス原料の処理方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] 図 1 は、P c C e l 6 A と、セルロース I I I_I との反応液中のセロビオース濃度の経時変化を示した図である。

[図2] 図 2 は、T r C e l 7 A と、セルロース I I I_I との反応液中のセロビオース濃度の経時変化を示した図である。

[図3] 図 3 は、P c C e l 6 A－セルロース I I I_I の加水分解、T r C e l 7 A－セルロース I I I_I の加水分解、P c C e l 6 A－セルロース I_α の加水分解、及び T r C e l 7 A－セルロース I_α の加水分解における、それぞれの反応液中のセロビオース生成量と、反応表面密度との関係を示した図である。

[図4] 図 4 は、P c C e l 6 A－セルロース I I I_I の加水分解、T r C e l 7 A－セルロース I I I_I の加水分解、P c C e l 6 A－セルロース I_α の加

水分解、及び TrCel7A -セルロース I_α の加水分解における、それぞれの吸着酵素 1 分子あたりの加水分解速度と、反応表面密度との関係を示した図である。

[図5] 図5は、 PcCel6A -セルロース II_1 の加水分解反応、 TrCel7A -セルロース II_1 の加水分解反応、 PcCel6A -セルロース I_α の加水分解反応、 TrCel7A -セルロース I_α の加水分解反応における、加水分解反応中のそれぞれのセルロースに吸着した PcCel6A 量又は TrCel7A 量を示した図である。

[図6] 図6は、 TrCel7A -セルロース I_α の加水分解反応、 PcCel6A -セルロース II_1 の加水分解反応、 TrCel7A -セルロース II_1 の加水分解反応、及び $\text{PcCel6A} + \text{PcCel45A}$ -セルロース II_1 の加水分解反応における、それぞれの反応液中のセロビオース濃度の経時変化を示した図である。

[図7] 図7は、 TrCel7A -セルロース I_α の加水分解反応、 PcCel6A -セルロース I_α の加水分解反応、 PcCel45A -セルロース I_α の加水分解反応、 $\text{PcCel6A} + \text{PcCel45A}$ -セルロース I_α の加水分解反応、 TrCel7A -セルロース II_1 の加水分解反応、 PcCel6A -セルロース II_1 の加水分解反応、 PcCel45A -セルロース II_1 の加水分解反応、及び $\text{PcCel6A} + \text{PcCel45A}$ -セルロース II_1 の加水分解反応におけるセロビオース生成速度を示した図である。

発明を実施するための形態

[0017] (バイオマス原料の処理方法)

本発明のバイオマス原料の処理方法は、(a) バイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理することにより、改質バイオマス原料を得る工程、(b) 該改質バイオマス原料を、セロビオヒドロラーゼ II (Cel6A) で酵素糖化する工程、を含み、必要に応じて、更にその他の処理を含む。

[0018] <工程 (a)>

前記工程 (a) は、バイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理す

ることにより、改質バイオマス原料を得る工程である。

[0019] ーバイオマス原料ー

前記バイオマス原料としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、セルロースⅠ型を含むバイオマス原料が好ましい。

前記セルロースⅠ型を含むバイオマス原料としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、農業や林業などの生産活動に伴う残渣として得られる「廃棄物系バイオマス」や、エネルギーなどを得る目的で意図的に栽培して得られる「資源作物系バイオマス」などを使用することができる。

前記「廃棄物系バイオマス」としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、廃建材、間伐材、稲わら、麦わら、もみ殻、サトウキビバガスなどが挙げられる。

また、前記「資源作物系バイオマス」としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、サトウキビ、トウモロコシなどの食物としても栽培される糖質乃至デンプン系作物、及びセルロース類の利用を目的として栽培されるユーカリ、ポプラ、アカシア、ヤナギ、スギ、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサス、ミスカンサス、ススキなどが挙げられる。

[0020] 前記セルロースⅠ型を含むバイオマス原料は、木を原料とした「木質バイオマス」、草を原料とした「草本バイオマス」などにも分類される。本発明においては、木質バイオマス及び草本バイオマス共に使用することができるが、本発明の効果がより顕著に得られるとの観点から、セルロース含有量の多いバイオマスが好ましく使用される。

[0021] 前記セルロースⅠ型を含むバイオマス原料としては、前記したような各種バイオマスから精製などを行うことにより得られたセルロースⅠ型そのものであってもよい。

また、前記セルロースⅠ型を含むバイオマス原料は、１種単独で使用してもよいし、２種以上を併用してもよい。なお、天然型セルロースであるセル

ロース I 型は、セルロース I_α 型とセルロース I_β 型とに分類されるが、前記バイオマス原料に含まれるセルロース I 型としては、これらのいずれであってもよく、またこれらの両者であってもよい。

[0022] 前記バイオマス原料の状態としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、収集されたものをそのまま使用してもよく、裁断、粉碎などにより適宜ある程度以下の大きさにしてから使用してもよい。

[0023] ーアンモニアを含む処理剤ー

前記アンモニアを含む処理剤としては、少なくともアンモニアを含有していれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、必要に応じて、更にその他の化合物を含有する。

[0024] 前記セルロース I 型を含むバイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記アンモニアを含む処理剤で処理することにより、バイオマス原料中のセルロース I 型の少なくとも一部が、より酵素糖化効率の高いセルロース I_{II} 型へと変態する。

前記アンモニアとしては、特に制限はなく、目標とする糖化率、消費エネルギーなどを勘案し、それぞれに適した条件での処理を適宜選択することができ、例えば、液相、気相、亜臨界状態、超臨界状態などが挙げられるが、超臨界状態が、前記変態効率を向上する観点から好ましい。

[0025] ー超臨界アンモニア流体による処理ー

前記超臨界アンモニア流体を用いて処理する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記セルロース I 型を含むバイオマス原料と、アンモニアとをオートクレーブなどの反応器内に導入し、前記反応器内を加熱加圧して、アンモニアを超臨界状態にすることにより行うことができる。

[0026] 前記処理において、前記セルロース I 型を含むバイオマス原料としては、収集されたものをそのまま使用してもよいが、ある程度小さくしてから使用

することが、処理に必要なエネルギーを抑えることができる点で望ましい。

前記バイオマス原料のサイズとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、5 mm径以下が好ましく、1 mm径以下がより好ましく、0.1 mm径以下が更に好ましい。前記サイズが5 mm径を超えると、処理が不十分となることがある。一方、前記サイズが前記更に好ましい範囲内であると、処理時間が短縮できる、使用するアンモニアの容量を少なくできるなどの点で有利である。

[0027] 前記アンモニアを含む処理剤で処理を行う際の、前記アンモニアの使用量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記セルロース I 型を含むバイオマス原料 1 g に対して、10 mg ~ 300 g が好ましく、100 mg ~ 150 g がより好ましく、1 g ~ 50 g が更に好ましい。

前記アンモニアの使用量が、前記セルロース I 型を含むバイオマス原料 1 g に対して 10 mg 未満であると処理が不十分となることがあり、300 g を超えると処理の効率が悪くなることがある。一方、その使用量が前記更に好ましい範囲内であると、処理時間が短縮できる、使用する処理剤の量を少なくできるなどの点で有利である。

前記処理温度及び処理圧力としては、特に制限はなく、アンモニアが超臨界状態となる範囲内で、目的に応じて適宜選択することができるが、0 MPa ~ 12.5 MPa が好ましい。

前記アンモニアを含む処理剤で処理を行う処理温度としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、-35℃ ~ 140℃ が好ましい。

[0028] 前記アンモニアを含む処理剤で処理を行う時間としては、特に制限はなく、用いる前記セルロース I 型を含むバイオマス原料の量、前記処理圧力、前記処理温度などに応じ、所望の程度のセルロース I 型からセルロース III 型への変態が進行する範囲内で適宜選択することができるが、5 分間 ~ 10

時間が好ましく、10分間～5時間がより好ましく、30分間～2時間が更に好ましい。

前記処理時間が、5分間未満であると所望の程度のセルロースⅠ型からセルロースⅠⅠⅠ_Ⅰ型への変態が進行しないことがあり、10時間を超えるとそれ以上セルロースⅠ型からセルロースⅠⅠⅠ_Ⅰ型への変態は進行せず、全体として非効率となることがある。一方、前記処理時間が、前記より好ましい範囲内であると、効率よく、セルロースⅠ型からセルロースⅠⅠⅠ_Ⅰ型への変態を進行させることができる点で有利である。

[0029] ーその他の化合物ー

前記アンモニアを含む処理剤中のその他の化合物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、二酸化炭素、窒素、エチレン、メタン、エタン、プロパン、ブタン、ペンタン、ヘキサン、トルエン、ベンゼン、フェノール、ジオキサン、キシレン、アセトン、クロロホルム、四塩化炭素、エタノール、メタノール、プロパノール、ブタノールなどが挙げられる。

なお、前記その他の化合物としては、水は使用しないことが好ましい。前記水を使用すると、得られたセルロースⅠⅠⅠ_Ⅰ型が、セルロースⅠ型に戻ってしまう場合がある。

前記その他の化合物の含有量としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0030] ー改質バイオマス原料ー

前記改質バイオマス原料は、前記アンモニアを含む処理剤で処理を行うことにより得ることができる。

本願における「改質バイオマス原料」とは、セルロースⅠ型を含むバイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤により処理したものを意味するが、バイオマス原料中に含まれるセルロースⅠ型の少なくとも一部がセルロースⅠⅠⅠ_Ⅰ型へと変態したものであることが好ましい。前記セルロースⅠⅠⅠ_Ⅰ型は、前記セルロースⅠ型より結晶密度の低いセルロースである。前記セルロ

ース I I I_I型は、その結晶密度の低さから、酵素が作用し易い点で有利である。

また、前記改質バイオマス原料は、前記処理により前記バイオマス原料に含まれるヘミセルロースが改質され、より酵素が作用し易い状態へと変化しているため、酵素糖化効率を向上させることが可能となる。

[0031] 前記改質バイオマス原料中の前記セルロース I I I_I型の割合としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記セルロース I I I_I型が多い程、優れた酵素糖化効率を得られる点で好ましい。

また、前記改質バイオマス原料は、前記セルロース I I I_I型以外にも、例えば、セルロース I 型（セルロース I_α型、セルロース I_β型）や、その他の成分、例えば、ヘミセルロース、リグニンなどが含まれていてもよい。ただし、酵素糖化の効率向上の観点から、ヘミセルロース、リグニンは含まれない、あるいはその含有量が少ないことが好ましい。

[0032] 前記改質バイオマス原料において、前記セルロース I 型の少なくとも一部が前記セルロース I I I_I型へと変換されたことを確認する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、X線回折、FT-IR、固体NMRなどにより確認することができる。

[0033] なお、前記改質バイオマス原料において、セルロースは、その分子構造の間に他の化合物を有していてもよい。例えば、改質バイオマス原料は、前記したように、天然型セルロースであるセルロース I 型を含むバイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理することにより得ることができるが、その処理工程で生成するセルロースと、アンモニアとの複合体（以下、「セルロース・アンモニア複合体」と称することがある。）の状態であってもよい。しかしながら、前記セルロース・アンモニア複合体は、酵素糖化時における pH の調整が困難であり、また、水の作用を受けることによりセルロース I 型に戻ってしまう性質を有することなどから、酵素糖化時には、前記セルロース・アンモニア複合体からアンモニアを除去した状態の改質バイオマス原料を使用することが好ましい。

[0034] したがって、前記アンモニアによる処理の後には、前記セルロース・アンモニア複合体から、アンモニアを除去する除去工程を設けることが好ましい。

前記アンモニアの除去方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記アンモニアによる処理後、得られた前記セルロース・アンモニア複合体を含む改質バイオマス原料を、メタノール、エタノール、アセトンなどで洗浄する方法、減圧乾燥する方法、処理剤の沸点以上の温度で乾燥させる方法などが挙げられる。これらの中でも、アンモニアの沸点以上の温度（例えば、常温～50℃）で、常圧又は減圧下にて乾燥させる方法が、有機溶媒を使用せず、安全性に優れる点で好ましい。

[0035] <工程（b）>

前記工程（b）は、前記改質バイオマス原料を、セロビオヒドロラーゼ I I（Ce16A）で酵素糖化する工程である。

[0036] セロビオヒドロラーゼ I I（Ce16A）

前記酵素糖化は、セルラーゼによって行われる。前記セルラーゼとは、セルロースを加水分解する酵素の総称で、大きく分けて、セルロースの末端からセロビオースを遊離するエキソ型のセロビオヒドロラーゼ、結晶セルロースは分解できないが、非結晶セルロース（アモルファスセルロース）鎖をランダムに切断するエンド型のエンドグルカナーゼ、及びセロビオースや短い鎖（セロオリゴ糖）の末端からグルコースを生成するエキソ型の β -グルコシダーゼの3種が存在し、更にそれぞれに多種類の酵素が存在する。

前記セロビオヒドロラーゼ I I（Ce16A）は、前記エキソ型のセロビオヒドロラーゼの一種であり、セルロースを構成する β -1, 4-グルカンのグリコシド結合を加水分解する酵素である。

[0037] 前記セロビオヒドロラーゼ I I（Ce16A）の由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、細菌、子囊菌、担子菌などが挙げられる。

前記細菌としては、前記セロビオヒドロラーゼ I I（Ce16A）を産生

できれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、セルロモナス フィミ (C e l l u l o m o n a s f i m i)、サーモビフィダ フスカ (T h e r m o b i f i d a f u s c a) などが挙げられる。

前記子嚢菌としては、前記セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) を産生できれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、トリコデルマ リーセイ (T r i c h o d e r m a r e e s e i)、トリコデルマ ビリデ (T . v i r i d e) フミコーラ インソレンス (H u m i c o l a i n s o l e n s)、フミコーラ グリセア (H . g r i s e a)、ケトミウム サーモフィラム (C h a e t o m i u m t h e r m o p h i l u m)、タラロマイセス エメルソニー (T a l a r o m y c e s e m e r s o n i i) などが挙げられる。

前記担子菌としては、前記セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) を産生できれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、担子菌門 ハラタケ亜門に属する担子菌が好ましく、担子菌門 ハラタケ亜門 ハラタケ綱に属する担子菌がより好ましく、担子菌門 ハラタケ亜門 ハラタケ綱 コウヤクタケ目に属する担子菌が更に好ましく、ファネロケーテ クリソスポリウム (P h a n e r o c h a e t e c h r y s o s p o r i u m) が特に好ましい。

[0038] 前記セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) を入手する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記担子菌を培養し、NCBIなどのデータベースより入手した前記セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) の遺伝子配列を用いてクローニングすることにより、セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) の組換え体タンパク質を得る方法が好ましい。また、市販品を用いることもできる。

[0039] 前記担子菌の培養の方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、寒天培地を用いた固体培養方法、液体培地を用いた液体培養方法などが挙げられる。これらの中でも、液体培養方法が、セ

ロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) を多く製造できる点で好ましい。

前記液体培地としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、セルロースを含有する K r e m e r a n d W o o d 培地 (K r e m e r, S. M., a n d P. M. W o o d., 1992, E v i d e n c e t h a t c e l l o b i o s e o x i d a s e f r o m P h a n e r o c h a e t e c h r y s o s p o r i u m i s p r i m a r i l y a n F e (I I I) r e d u c t a s e. K i n e t i c c o m p a r i s o n w i t h n e u t r o p h i l N A D P H o x i d a s e a n d y e a s t f l a v o c y t o c h r o m e b₂, E u r. J. B i o c h e m., 205 : 133-138.) などが挙げられる。

[0040] 前記培養の温度としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、20℃～45℃が好ましく、30℃～40℃がより好ましく、37℃が更に好ましい。前記培養の温度が20℃未満であると、担子菌の生育が遅くなることがあり、45℃を超えると担子菌が成育しないことがある。一方、前記培養の温度が前記更に好ましい範囲であると、セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) を効率よく製造できる点で有利である。

[0041] 前記培養の日数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、1日～30日が好ましく、2日～14日がより好ましく、3日～7日が更に好ましい。前記培養の日数が1日未満であると、担子菌数が少なく、セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) の製造量が少ないことがあり、30日を超えると、死菌となる担子菌数が多くなったり、製造されたセロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) が分解されてしまうことがある。一方、前記培養の日数が前記更に好ましい範囲であると、セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) を効率よく製造できる点で有利である。

[0042] ー ー 酵素糖化 ー ー

前記酵素糖化の際の前記セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) の使用量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、

例えば、改質バイオマス原料 1 g に対して、1 mg ~ 1, 000 mg が好ましく、2 mg ~ 500 mg がより好ましく、5 mg ~ 200 mg が更に好ましい。前記酵素の使用量が、前記酵素糖化用原料 1 g に対して 1 mg 未満であると酵素糖化が不十分となることがあり、1, 000 mg を超えると酵素使用量が増大し効率が悪くなる。一方、前記酵素の使用量が、前記更に好ましい範囲内であると酵素添加量に対して得られる糖の量が多い点で有利である。

[0043] 前記酵素糖化の際の温度としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、10℃~70℃が好ましく、20℃~60℃がより好ましく、30℃~50℃が更に好ましい。前記温度が、10℃未満であると酵素糖化が十分に進行しないことがあり、70℃を超えると酵素が失活することがある。一方、前記温度が、前記更に好ましい範囲内であると酵素添加量に対して得られる糖の量が多い点で有利である。

[0044] 前記酵素糖化の際の pH としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、2~8 が好ましく、3~7 がより好ましく、4~6 が更に好ましい。前記 pH が、2 未満又は 8 を超えると酵素が失活することがある。一方、前記 pH が、前記更に好ましい範囲内であると酵素添加量に対して得られる糖の量が多い点で有利である。

[0045] なお、前記酵素の加水分解速度としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記改質バイオマス原料と、前記セロビオヒドロラーゼ I I (Cel6A) とが加水分解反応を行う表面密度が 0.9 以下のとき、該セロビオヒドロラーゼ I I (Cel6A) 1 分子あたりの加水分解速度が 1 分間に 5 回以上であることが好ましい。

[0046] <その他の工程>

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記バイオマス原料を裁断、粉砕する工程、前記改質バイオマス原料を粉砕する工程などが挙げられる。

[0047] ーバイオマス原料を裁断、粉砕する工程ー

前記アンモニアを含む処理剤による処理において、前記セルロースⅠ型を含むバイオマス原料が、予め裁断、粉砕されていると、アンモニアを含む処理剤による処理が効率的に進行する点で好ましい。また、後述する改質バイオマス原料の粉砕の際に、より微細な、酵素糖化効率に優れる微粉末状の改質バイオマス原料を効率的に得ることができる点でも好ましい。

前記裁断、粉砕に用いる機器としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ウィレーミル、カッターミル、ハンマーミル、ピンミルなどが挙げられる。

[0048] ー改質バイオマス原料を粉砕する工程ー

前記工程（b）において、改質バイオマス原料が予め粉砕されていると、より酵素糖化効率を向上させることができる点で好ましい。

前記改質バイオマス原料の粉砕を行う方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、平臼、遊星型ボールミル、振動ボールミル、ビーズミル、ジェットミルなどの粉砕機を用いて行うことができる。これらの中でも、前記粉砕機としては、微細な、酵素糖化効率に優れる微粉末状の酵素糖化用原料を、比較的低エネルギーにて得ることができる点で、平臼が好ましい。

前記粉砕を行う条件としては、特に限定されず、粉砕機の種類、改質バイオマス原料の種類、得ようとする粉砕物の平均粒径などによって適宜選択することができる。

[0049] （糖の製造方法）

本発明の糖の製造方法は、前述した本発明のバイオマス原料の処理方法により糖を得ること（糖取得工程）を含み、必要に応じて、更にその他の工程を含む。

[0050] ＜糖取得工程＞

前記糖取得工程は、前記セロビオヒドロラーゼⅠⅠ（Ce16A）を用いて、バイオマス原料から糖を得る工程であり、必要に応じて、更にその他のセルラーゼを用いることができる。

[0051] ーバイオマス原料ー

前記バイオマス原料としては、前述した改質バイオマス原料を用いることが好ましく、前記改質バイオマス原料は、粉碎された状態であることが、酵素糖化効率を向上させることができる点でより好ましい。

[0052] ーセロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) ー

前記糖取得工程における、前記セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) の使用量、反応温度、pH、反応時間などについては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0053] ーその他のセルラーゼー

前記その他のセルラーゼとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ファネロケーテ クリソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium) の C e l 4 5 A などが挙げられる。

前記その他のセルラーゼを更に使用する場合、該セルラーゼの使用量としては、特に制限はなく、改質バイオマス原料の量や前記セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) の添加量などに応じて適宜選択することができるが、前記セロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A) と、前記セルラーゼとの比が、100 : 1 ~ 1 : 100 が好ましく、10 : 1 ~ 1 : 10 がより好ましく、2 : 1 ~ 1 : 2 が更に好ましい。

[0054] 前記糖取得工程により、例えば、セルロース由来の糖であるグルコースを含む糖液を得ることができる。また、前記糖取得工程により得られた糖液は、好ましくはヘミセルロース由来の糖をも含む。前記ヘミセルロース由来の糖としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、キシロース、アラビノースといった五炭糖や、グルコース、ガラクトース、マンノースといった六炭糖などが挙げられる。

[0055] <その他の工程>

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記糖液を、後述する発酵工程に適切となるようなp

Hに調整する工程などが挙げられる。

[0056] <用途>

前記糖液は、例えば、後述する本発明のエタノールの製造方法にそのまま供してもよいし、以下のようなその他の工程を経て、後述する本発明のエタノールの製造方法に供してもよい。

[0057] (エタノールの製造方法)

本発明のエタノールの製造方法は、前述した本発明の糖の製造方法により得られた糖を発酵させて、エタノールを得る工程（発酵工程）を含み、必要に応じて、更にその他の工程を含む。

[0058] <発酵工程（アルコール発酵工程）>

前記エタノールの製造方法において、前記糖を発酵させる方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記糖を含む溶液に酵母などのアルコール発酵微生物を添加して、アルコール発酵を行わせる方法が好ましい。

[0059] ー酵母ー

前記酵母としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、サッカロマイセス属酵母などが挙げられる。なお、前記酵母は、天然酵母であってもよいし、遺伝子組換え酵母であってもよい。前記エタノール発酵微生物の具体的な例としては、サッカロマイセス セルビスイエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、クルイベロマイセス フラジリス (*Kluyveromyces fragilis*)、クルイベロマイセス ラクティス (*K. lactis*)、クルイベロマイセス ルキシアヌス (*K. marxianus*)、ピキア スティピティス (*Pichia stipitis*)、ピキア パストリス (*P. pastoris*)、パチソレン タンノフィルス (*Pachysolen tannophilus*)、カンジダ グラビラータ (*Candida Glabrata*)などの酵母又はこれらの遺伝子組換え体、ザイモモナズ モビリス (*Zymomonas mobilis*)、サイモバクター パルメ (*Zymobacter palm*)

cter palmae)、クロストリジウム サーモセラム (Clostridium thermocellum)、クロストリジウム ルジュングダーリ (C. ljungdahlii) などの細菌又はこれらの遺伝子組換え体を用いることが出来る。

[0060] 前記発酵の際の、前記酵母の使用量、発酵温度、pH、発酵時間などについては、特に制限はなく、例えば、アルコール発酵に供する糖の量、使用する酵母の種類などに応じて適宜選択することができる。

[0061] <その他の工程>

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記発酵工程により得られたエタノールを分離精製する工程などが挙げられる。前記分離精製の方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、蒸留などが挙げられる。

[0062] <用途>

前記エタノールの製造方法により得られたエタノールは、例えば、燃料用エタノール、工業用エタノールなどとして好適に利用可能である。前記エタノールは前記バイオマス原料から得ることができるので、前記バイオマス原料となる植物を生産できる限りは再生産が可能であり、また、前記植物は栽培時に大気中の二酸化炭素を吸収するため、前記エタノールを燃焼させて二酸化炭素が発生したとしても、大気中の二酸化炭素濃度を増加させることにはならない。したがって、前記エタノールは、地球温暖化防止に望ましいエネルギー源とすることができる。また、このようなエタノールは、近年特に、ガソリンに混合し、環境に優しい自動車燃料として使用することが期待されている。

[0063] 本発明の糖の製造方法により得られる糖を前記エタノールを産生する酵母などに代えて、それぞれ目的とするアルコール類を産生する微生物を使用して発酵せしめることにより、エタノール以外のアルコール類を製造することもできる。例えば、アセトン・ブタノール菌を使用した発酵を行うことにより、ブタノールを製造することができる。

[0064] (乳酸の製造方法)

本発明の乳酸の製造方法は、前述した本発明の糖の製造方法により得られた糖を発酵させて、乳酸を得る工程（発酵工程）を含み、必要に応じて、更にその他の工程を含む。

[0065] <発酵工程（乳酸発酵工程）>

前記乳酸の製造方法において、前記糖を発酵させる方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記糖を含む溶液に乳酸菌などの乳酸発酵微生物を添加して、乳酸発酵を行わせる方法が好ましい。

[0066] ー乳酸菌ー

前記乳酸菌としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ラクトバチルス マニホティヴォランス (Lactobacillus manihotivorans)、ラクトバチルス プランタラム (Lactobacillus plantarum)、ストレプトコッカス サーモフィルス (Streptococcus thermophilus)、ラクトバチルス ブルガリカス (Lactobacillus bulgaricus) などが挙げられる。なお、前記乳酸菌は、天然の乳酸菌であってもよいし、遺伝子組換え乳酸菌であってもよい。

[0067] 前記発酵の際の、前記乳酸菌の使用量、発酵温度、pH、発酵時間などについては、特に制限はなく、例えば、乳酸発酵に供する糖の量、使用する乳酸菌の種類などに応じて、適宜選択することができる。

[0068] <その他の工程>

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記発酵工程により得られた乳酸を分離精製する工程などが挙げられる。前記分離精製の方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0069] <用途>

前記乳酸の製造方法により得られた乳酸は、例えば、化学的に重合させて

、ポリ乳酸を製造することに好適に利用可能である。現在は、トウモロコシなどのデンプンから製造されることが多い乳酸を、食料には供し得ないセルロースを含むバイオマス原料から生産可能になることが望ましく、前記乳酸の製造方法によれば、このようなセルロースを含むバイオマス原料からの効率的なポリ乳酸の製造を可能とすることができる。

[0070] 本発明の糖の製造方法により得られる糖を、前記乳酸菌に代えて、それぞれ目的とする有機酸を産生する微生物を使用して発酵せしめることにより、乳酸以外の有機酸、例えば、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、シュウ酸などを製造することもできる。

実施例

[0071] 以下に本発明の実施例及び比較例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

[0072] (実施例 1 ～ 6)

< C e l 6 A によるバイオマス原料の処理 >

ー工程 (a) ー

後述する方法により、バイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理することにより、改質バイオマス原料を得た。

[0073] ーバイオマス原料ー

緑藻のシオグサ細胞壁 (セルロース I_{α} 型 / I_{β} 型 = 7 : 3) をバイオマス原料として用いた。

セルロースの精製は、5.0 質量%水酸化カリウム水溶液中にて室温で一晩浸漬させる処理と、pH 4.9 の酢酸緩衝液で緩衝した 0.3 質量% $NaClO_2$ 水溶液中にて 80 °C で 3 時間処理する操作とを 3 回繰り返して行った。精製後、水洗し、凍結乾燥して保存した (以下、「セルロース I_{α} 」と称することがある。)。

前記セルロース I_{α} は、後述するセルロース III_1 を含む改質バイオマス原料の調製に用いた。

[0074] ー超臨界アンモニア流体処理 (セルロース III_1 を含む改質バイオマス原

料の調製) —

前記セルロース I_αを、以下の操作により、超臨界状態のアンモニアによる処理に供した。

30 mL容ポータブルリアクターに、前記シオグサ200 mgを入れ、ドライアイス入りのメタノールバスで−13℃に冷却した。このリアクターにアンモニアガスを0.5 MPaの定圧で30分間流入し、試料を完全に液体アンモニアに浸漬させた。リアクターの蓋を閉め、室温で15分間程放置した。次いで、140℃のオイルバス中にて1時間処理した。このとき、リアクター中の圧力はゆっくりと上昇して、20分間後に13 MPaに達し、その後は一定であった(アンモニアの臨界温度 $T_c = 405.6$ K、臨界圧力 $P_c = 11.28$ MPa)。前記処理後、リアクターをオイルバスから取り出し、ドラフト中で直ちにアンモニアガスをリークした。前記処理後のセルロースをメタノールで洗浄し、乾燥させることにより、セルロース I I I_I型を含む改質バイオマス原料を得た(以下、「セルロース I I I_I」と称することがある。)

[0075] —工程 (b) —

後述する方法で製造したセロビオヒドロラーゼ I I (C e l 6 A)を用い、前記改質バイオマス原料(セルロース I I I_I)を酵素糖化する(糖取得工程)ことにより糖を得た。

[0076] —組換え C e l 6 A の製造—

ファネロケーテ クリソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium) C e l 6 A の組換え体タンパク質(以下、「P c C e l 6 A」と称することがある。)を、以下の方法で製造した。

[0077] — C e l 6 A 遺伝子のクローニング—

ファネロケーテ クリソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium) K-3株を、2質量%セルロース(CF11; Whatman社製)を含有するKremer and Wood培地(Kremer, S. M., and P. M. Wood., 199

2, Evidence that cellobiose oxidase from Phanerochaete chrysosporium is primarily an Fe(III) reductase. Kinetic comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome b₂, Eur. J. Biochem., 205 : 133-138.) で、Habu, N., K. Igarashi, M. Samejima, B. Pettersson, and K. E. Eriksson., 1997, Enhanced production of cellobiose dehydrogenase in cultures of Phanerochaete chrysosporium supplemented with bovine calf serum., Biotechnol. Appl. Biochem., 26 : 98 の記載に基づいて、3日間培養した。

[0078] 前記培養後の培養液をろ過し、ガラス繊維濾紙（ADVANTEC（登録商標）GA-100；東洋濾紙（株）製）を用いて菌糸体を分離した。次いで、分離した菌糸体を液体窒素で凍結し、ISOGEN（（株）ニッポンジーン製）を用いて、製造者のマニュアルに基づいて、全RNAを約200mg抽出した。

前記抽出された全RNA 1μgから、Oligotex（TM）-dT30<Super>（タカラバイオ（株）製）を用いてmRNAを精製した。

次いで、前記mRNAから、逆転写酵素（ReverTraAce；東洋紡績（株）製）と、3' RACEアダプタープライマー（Invitrogen社製）とを用いて、製造者のマニュアルに基づいて、First-strand cDNAを合成した。

[0079] NCBIデータベース上にあるファネロケーテ クリソスポリウム（Phanerochaete chrysosporium）由来Cel6A遺

伝子 (A A B 3 2 9 4 2) (配列番号 : 1) をもとに、以下のプライマーを設計した。

プライマー :

P c C e l 6 A - E c o R I - F : T T T G A A T T C C A G G C G T
C G G A G T G G G G A C A G (配列番号 : 2) (配列中、「G A A T T C
C」は制限酵素E c o R I 切断配列)

P c C e l 6 A - N o t I - R : T T T G C G G C C G C C T A C A G
C G G C G G G T T G G C A G C (配列番号 : 3) (配列中、「G C G G C
C G C」は制限酵素N o t I 切断配列)

[0080] 上記プライマーと、ポリメラーゼとしてKOD-Plus (version 2 ; 東洋紡績 (株) 製) とを用い、前記のように調製したcDNAを鋳型としてPCRを行う (94℃、2分間を1サイクル、98℃、10秒間・68℃、1分30秒間を25サイクル、4℃で終了) ことで、P c C e l 6 A の成熟体タンパク質をコードする遺伝子 (21番アミノ酸以降) を得た。

上記で得られたPCR産物は、Zero Blunt (登録商標) TOPO (登録商標) PCR cloning kit (Invitrogen社製) と、大腸菌E. coli JM109株 (タカラバイオ (株) 製) とを用いてクローン化した。

[0081] ー組換ベクター (発現ベクター) の作製ー

ミニプレップを行って調製したP c C e l 6 A 遺伝子を含むTOPOベクター、及び酵母発現用ベクターpPICZαA (Invitrogen社製) を、制限酵素E c o R I、及びN o t I (タカラバイオ (株) 製) によって切断し、得られたフラグメントをアガロース電気泳動で分離した後、ゲル抽出により前記フラグメントを得た。

制限酵素処理されたpPICZαAと、P c C e l 6 A 遺伝子とを、それぞれ20ng用い、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ (株) 製) によってライゲーションし、大腸菌E. coli JM109株 (タカラバイオ (株) 製) を用いてクローン化した。

ミニプレップを行って調製したP c C e l 6 A遺伝子を含む酵母発現用ベクターp P I C Z α A（以下、「p P I C Z α A / P c C e l 6 A」と称することがある。）から、S t e 1 3シグナル切断サイトを切除するために、以下のプライマーを設計し、p P I C Z α A / P c C e l 6 Aを鋳型としてPCRを行った（94℃、2分間を1サイクル、98℃、10秒間・68℃、1分30秒間を15サイクル、4℃で終了）。

プライマー：

P c C e l 6 A - K e x 2 - F : G A A G G G G T A T C T C T C G A
G A A A A G A C A G G C G T C G G A G T G G G G A C A G（配列番号：
4）

P c C e l 6 A - K e x 2 - R : C T G T C C C C A C T C C G A C G
C C T G T C T T T T C T C G A G A G A T A C C C C T T C（配列番号：
5）

[0082] 前記プライマーを用いたPCRにより増幅された遺伝子断片を、制限酵素D p n Iによって処理し、大腸菌E. c o l i J M 1 0 9株（タカラバイオ（株）製）を用いてクローン化した。

[0083] ــــــــ形質転換体の作製ــــــــ

前記ミニプレップにより得られた、S t e 1 3シグナル切断サイトを切除したp P I C Z α A / P c C e l 6 A - S t e（一）を、制限酵素B s t X I（タカラバイオ（株）製）によって直鎖化し、エレクトロポレーション法によって酵母（P i c h i a p a s t o r i s KM-71H）株に導入した。形質転換体の選抜は、抗生物質（Z e o c i n）耐性を指標に行った。

[0084] ــــــــ形質転換酵母の培養ــــــــ

上述の形質転換体を、25 μ g / m L の Z e o c i n を含む Y P G 培地（1質量%イースト エクストラクト、2質量%ポリペプトン、1質量%グリセロール）10 mLで30℃、300 r p mの条件により、往復振とう培養器で24時間培養した後、200 mLのY P G培地の入った三角フラスコに

接種し、回転振とう培養器（30℃、150rpm）で更に24時間培養した。遠心分離（3,000g、10分）によって菌体を回収した後、50mLのYPM培地（1質量%イースト エクストラクト、2質量%ポリペプトン、1質量%メタノール）に菌体を移し、24時間ごとに終濃度1質量%となるようにメタノールを加えながら、更に回転振とう培養器（26.5℃、150rpm）で96時間培養した。遠心分離（3,000g、10分）によって得られた培養上清を粗酵素液とした。

[0085] ———PcCeI6Aの製造及び精製———

前述のようにして得られた粗酵素液に、硫酸アンモニウムを70質量%飽和となるように加え、遠心分離（15,000g、30分）によって沈殿を回収した。前記沈殿を、1M硫酸アンモニウムを含む20mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）に溶解させた。

1Mの硫酸アンモニウムを含有する20mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）で平衡化したPhenyl-Toyopearl 650Sカラム（26mm×120mm、東ソー（株）製）を用いて、前記溶液を分画した。得られたPcCeI6Aは、300mLの逆勾配で、20mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）へ溶出した。

その後、前記PcCeI6Aを含む分画を集め、20mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）に対して平衡化した。次いで、20mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）で平衡化したSuperQ-Toyopearl 650Sカラム（9mm×120mm、東ソー（株）製）に前記平衡化したPcCeI6Aを含む溶液を加えた。PcCeI6Aは、0M～0.5Mの塩化ナトリウム100mLの直線勾配でカラムから溶出した。

得られたPcCeI6Aは、SDS-PAGE（12質量%ポリアクリルアミドゲル）で、単一のバンドを与えた。また、得られたPcCeI6AのN末端のアミノ酸配列は、プロテインシーケンサー（Model 491cLc; Applied Biosystems社製）により確認した。

その結果、形質転換酵母で得られたPcCeI6AのN末端アミノ酸配列

は、Q A S E W G Q C G G I G（配列番号：6）であり、担子菌ファネロケ
ーテ クリソスポリウム（Phanerochaete chrysosporium）由来のC e l 6 Aと同じであることが認められた。

精製したP c C e l 6 Aは、50mM酢酸緩衝液（pH5.0）に緩衝液
交換し、以下の糖取得工程に用いた。

[0086] ー糖取得工程、及び糖の定量ー

前記セルロースⅢ_Iを、終濃度が0.1質量%となるように50mM酢
酸ナトリウム溶液（pH5.0）250μL中に添加した。次いで、前記P
c C e l 6 Aを、下記表1に従って添加し、30℃にて最大360分間反応
させた。

反応終了後、反応液を5分間遠心分離（×15,000g）して反応を停
止した後に得られた上澄みを、アセトニトリル／H₂O（60／40～50／
50、体積／体積）の直線勾配で、Shodex（登録商標）Asahi
pak NH2P-50（昭和電気（株）製）で分離した。前記分離された
糖の量は、重合度（DP）＝2～7のセロオリゴ糖（生化学工業（株）製）
を標準として用いて定量した。なお、HPLCの装置は、Corona（登
録商標）Chaged Aerosol Detector（登録商標）
（ESA Biosciences社製）を用いたLC-2000（日本分
光（株）製）を使用した。

[0087] [表1]

実施例	PcCel6A 終濃度(μM)	基質	反応液
1	0.25	セルロースⅢ _I (0.1質量%)	50mM 酢酸ナトリウム (pH5.0)
2	0.5		
3	1.0		
4	2.0		
5	4.0		
6	8.0		

[0088] 図1に、P c C e l 6 Aと、超臨界アンモニア処理をしたシオグサ由来セ
ルロース（セルロースⅢ_I）との反応液中のセロビオース濃度（μM）の

経時変化を示す。

図 1 中、「■」は P c C e l 6 A が 0. 25 μ M の場合（実施例 1）を示し、

「●」は P c C e l 6 A が 0. 5 μ M の場合（実施例 2）を示し、

「▲」は P c C e l 6 A が 1. 0 μ M の場合（実施例 3）を示し、

「□」は P c C e l 6 A が 2. 0 μ M の場合（実施例 4）を示し、

「○」は P c C e l 6 A が 4. 0 μ M の場合（実施例 5）を示し、

「△」は P c C e l 6 A が 8. 0 μ M の場合（実施例 6）を示す。

[0089] （比較例 1～6）

< C e l 7 A によるバイオマス原料の処理 >

前記工程（a）で得られた改質バイオマス原料（セルロース I I I₁）を、下記の方法により精製したセロビオヒドロラーゼ I（C e l 7 A）を用いて酵素糖化し、得られた糖の定量を行った。

[0090] — C e l 7 A の精製 —

前記トリコデルマ リーセイ（Trichoderma reesei）

C e l 7 A（以下、「T r C e l 7 A」と称することがある。）は、セルラーゼ製剤（セルクラスト、ノボザイム社製）より、カラムクロマトグラフィーにより精製した。

即ち、セルラーゼ製剤を、20mM トリス塩酸緩衝液（pH 8. 0）に対して平衡化した。次いで、20mM トリス塩酸緩衝液（pH 8. 0）で平衡化した S u p e r Q - T o y o p e a r l 650S カラム（9mm×120mm、東ソー（株）製）に前記平衡化した T r C e l 7 A を含む溶液を加えた。T r C e l 7 A は、0M～0. 5M の塩化ナトリウム 100mL の直線勾配でカラムから溶出した。

その後、前記 T r C e l 7 A を含む分画を集め、1M 硫酸アンモニウムを含む 20mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5. 0）に対して平衡化した。次いで、1M の硫酸アンモニウムを含有する 20mM の酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5. 0）で平衡化した P h e n y l - T o y o p e a r l 650S

カラム（26mm×120mm、東ソー（株）製）を用いて、前記溶液を分画した。得られたTrCel7Aは、300mLの逆勾配で、20mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）へ溶出した。

精製したTrCel7Aは、50mM酢酸緩衝液（pH5.0）に懸濁し、以下の糖取得工程に用いた。

[0091] 一糖の製造、及び糖の定量

前記セルロースIII₁を、終濃度が0.1質量%となるように50mM酢酸ナトリウム溶液（pH5.0）250μL中に添加した。次いで、前記TrCel7Aを、下記表2に従って添加し、30℃にて最大360分間反応させた。

反応終了後、反応液を5分間遠心分離（×15,000g）して反応を停止した後、得られた上澄みを、実施例1～6と同様の方法で定量した。

[0092] [表2]

比較例	TrCel7A 終濃度(μM)	基質	反応液
1	0.25	セルロースIII ₁ (0.1質量%)	50mM 酢酸ナトリウム (pH5.0)
2	0.5		
3	1.0		
4	2.0		
5	4.0		
6	8.0		

[0093] 図2に、TrCel7Aと、超臨界アンモニア処理をしたシオグサ由来セルロース（セルロースIII₁）との反応液中のセロビオース濃度（μM）の経時変化を示す。

図2中、「■」はTrCel7Aが0.25μMの場合（比較例1）を示し、

「●」はTrCel7Aが0.5μMの場合（比較例2）を示し、

「▲」はTrCel7Aが1.0μMの場合（比較例3）を示し、

「□」はTrCel7Aが2.0μMの場合（比較例4）を示し、

「○」はTrCel7Aが4.0μMの場合（比較例5）を示し、

「△」は $TrCel7A$ が $8.0 \mu M$ の場合（比較例 6）を示す。

[0094] 図 1（実施例 1～6）及び図 2（比較例 1～6）より、セルロース II_1 を、 $PcCel6A$ を用いて加水分解した場合（実施例 1～6）も、 $TrCel7A$ を用いて加水分解した場合（比較例 1～6）も、酵素濃度依存的に加水分解産物（セロビオース）の量が増加した。しかしながら、セロビオース生成量は、 $TrCel7A$ を用いて加水分解した場合と比較して、 $PcCel6A$ を用いて加水分解した場合の方が、顕著に多かった。また、 $PcCel6A$ を用いて加水分解した場合は、 $TrCel7A$ を用いて加水分解した場合と比較して反応速度も速かった。

[0095]（実施例 3、及び比較例 3、7～8）

< $PcCel6A$ 及び $TrCel7A$ によるセルロース I_α 及びセルロース II_1 の糖化>

ーセロビオース生成速度及び吸着酵素 1 分子あたりの加水分解速度の検討ー

$PcCel6A$ と、 $TrCel7A$ とのセルロースの糖化効率を比較するため、実施例 3 及び比較例 3 と同様の方法でセルロース II_1 の糖化を行なった。

また、 $PcCel6A$ 及び $TrCel7A$ によるセルロース I_α の糖化効率を検討するため、セルロース II_1 をセルロース I_α に変えた以外は、実施例 3 及び比較例 3 と同様の方法でセルロース I_α の糖化を行なった。

即ち、セルロース I_α 又はセルロース II_1 を、下記表 3 に従って終濃度が 0.1 質量%となるように $50 mM$ 酢酸ナトリウム溶液（ $pH 5.0$ ） $250 \mu L$ 中に添加した。次いで、実施例 1～6 で調製した $PcCel6A$ $1.0 \mu M$ 又は比較例 1～6 で調製した $TrCel7A$ $1.0 \mu M$ を、下記表 3 に従って添加し、 $30^\circ C$ にて最大 360 分間反応させた。

反応終了後、反応液を 5 分間遠心分離（ $\times 15,000 g$ ）して反応を停止した後に得られた上澄みを、実施例 1～6 と同様の方法で定量し、セロビオース生成量（図 3）、及び基質（セルロース I_α 又はセルロース II_1 ）に吸着した酵素 1 分子あたりの加水分解速度（図 4）を求めた。

[0096] [表3]

		PcCel6A 終濃度 (μ M)	TrCel7A 終濃度 (μ M)	基質	反応液
実施例	3	1.0	—	セルロースⅢ _I (0.1質量%)	50mM 酢酸ナトリウム (pH5.0)
比較例	3	—	1.0		
	7	1.0	—	セルロースⅠ _α (0.1質量%)	
	8	—	1.0		

[0097] 図3は、PcCel6Aとセルロース III_I（以下「PcCel6A-セルロース III_I」と称することがある）との加水分解反応（実施例3）、TrCel7Aとセルロース III_I（以下「TrCel7A-セルロース III_I」と称することがある）との加水分解反応（比較例3）、PcCel6Aとセルロース I _{α} （以下「PcCel6A-セルロース I _{α} 」と称することがある）との加水分解反応（比較例7）、及びTrCel7Aとセルロース I _{α} （以下「TrCel7A-セルロース I _{α} 」と称することがある）（比較例8）との加水分解反応における、それぞれの反応液中のセロビオースの生成量 (μ M/分間) と、反応表面密度 (ρ) との関係を示す。

図3中、「●」はPcCel6A-セルロース III_Iの加水分解反応（実施例3）を示し、

「○」はTrCel7A-セルロース III_Iの加水分解反応（比較例3）を示し、

「■」はPcCel6A-セルロース I _{α} の加水分解反応（比較例7）を示し、

「□」はTrCel7A-セルロース I _{α} の加水分解反応（比較例8）を示す。

[0098] 図4は、PcCel6A-セルロース III_Iの加水分解反応（実施例3）、TrCel7A-セルロース III_Iの加水分解反応（比較例3）、PcCel6A-セルロース I _{α} の加水分解反応（比較例7）、及びTrCel7A-セルロース I _{α} の加水分解反応（比較例8）における、それぞれの吸着酵素

1分子あたりの加水分解速度 (min^{-1}) と、反応表面密度 (ρ) との関係を示す。

図4中、「●」はP c C e l 6 A-セルロース I I I_Iの加水分解反応（実施例3）を示し、

「○」はT r C e l 7 A-セルロース I I I_Iの加水分解反応（比較例3）を示し、

「■」はP c C e l 6 A-セルロース I _{α} の加水分解反応（比較例7）を示し、

「□」はT r C e l 7 A-セルロース I _{α} の加水分解反応（比較例8）を示す。

[0099] 図3より、P c C e l 6 A-セルロース I _{α} の加水分解反応（比較例3）及びT r C e l 7 A-セルロース I _{α} の加水分解反応（比較例8）では、いずれもほとんどセロビオースの生成は認められなかった。T r C e l 7 A-セルロース I I I_Iの加水分解反応（比較例3）はセロビオースの生成は認められたものの、その生成速度は遅かった。一方、P c C e l 6 A-セルロース I I I_Iの加水分解反応（実施例3）によるセロビオースの生成速度は、比較例3、7～8と比較して顕著に速かった。

[0100] 図4は、セロビオースの生成量の向上が、単に加水分解反応を行うセルロース I I I_Iの反応表面密度が広がったことによるものではないことを確認するため、基質（セルロース I _{α} 又はセルロース I I I_I）に吸着した酵素1分子あたりの加水分解速度を求めたグラフである。図4より、セルロース I I I_Iの反応表面密度が0.4のとき、T r C e l 7 A 1分子あたりの加水分解速度が1分間に2.5回であった（比較例3）のに対し、P c C e l 6 A 1分子あたりの加水分解速度は1分間あたり11.5回であった（実施例3）。これらの結果より、P c C e l 6 Aでは、酵素1分子あたりの加水分解速度が顕著に速いことが認められた。

[0101] 一酵素量の定量—

前記P c C e l 6 A-セルロース I I I_Iの加水分解反応（実施例3）、T

TrCel7A-セルロース I I I_I の加水分解反応（比較例 3）、PcCel6A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例 7）、及び TrCel7A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例 8）において、それぞれ反応中にセルロース I I I_I 又はセルロース I_α に吸着した PcCel6A 又は TrCel7A の量を、DEAE-5PW（東ソー製）で分離し、定量した。緩衝液は、A：20mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0）、B：20mM トリス塩酸緩衝液（pH8.0）+0.5M塩化ナトリウムを用い、A/B=100/0（体積/体積）を5分間、A/B=100/0~40/60（体積/体積）の直線勾配で10分間、A/B=0/100（体積/体積）を5分間で分離した。なお、タンパク質定量用のHPLC装置は、可視紫外検出器（UV-2075）を用いたLC-2000（日本分光（株）製）を使用した。

図5は、反応液中の遊離タンパク質量濃度（μM）と、吸着酵素量（nmol/mg-セルロース）との関係を示す。

図5中、「●」はPcCel6A-セルロース I I I_I の加水分解反応後の PcCel6A 量（実施例3）を示し、

「○」はTrCel7A-セルロース I I I_I の加水分解反応後の TrCel7A 量（比較例3）を示し、

「■」はPcCel6A-セルロース I_α の加水分解反応後の PcCel6A 量（比較例7）の場合を示す。

「□」はTrCel7A-セルロース I_α の加水分解反応後の TrCel7A 量（比較例8）を示す。

[0102] 図5より、PcCel6A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例7）で吸着した PcCel6A 量及び TrCel7A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例8）で吸着した TrCel7A 量は同程度であり、その酵素量は少なかった。

一方、図3より、PcCel6A-セルロース I I I_I の加水分解反応（実施例3）は、セロビオース生成速度が速かったにも関わらず、PcCel6A-セルロース I I I_I の加水分解反応（実施例3）で吸着した PcCel6A

A量は、T r C e l 7 A-セルロース I I I₁の加水分解反応（比較例 3）で吸着したT r C e l 7 A量と比較して顕著に少なかった。

これらの結果より、P c C e l 6 Aをセルロース I I I₁と反応させた場合は、吸着したP c C e l 6 Aの酵素 1 分子あたりの活性が上昇していると考えられる。

[0103] （実施例 3、7、及び比較例 7～11）

<P c C e l 6 AとP c C e l 4 5 Aとの相乗効果>

酵素としては、P c C e l 6 Aと、メタノール資化性酵母（P i c h i a p a s t o r i s）で発現させた組換ファネロケーテ クリソスポリウム（P h a n e r o c h a e t e c h r y s o s p o r i u m） C e l 4 5 Aとを用い、基質としては、実施例 1～6のセルロース I I I₁及びセルロース I_αのいずれかを用いた場合の加水分解生成物について調べ、P c C e l 6 AとP c C e l 4 5 Aとの相乗効果を以下のようにして試験した。

[0104] ー組換P c C e l 4 5 Aの製造ー

ファネロケーテ クリソスポリウム（P h a n e r o c h a e t e c h r y s o s p o r i u m） C e l 4 5 Aの組換体タンパク質（以下、「P c C e l 4 5 A」と称することがある。）を、以下の方法で製造した。

[0105] ーP c C e l 4 5 A遺伝子のクローニングー

N C B I データベース上にあるファネロケーテ クリソスポリウム（P h a n e r o c h a e t e c h r y s o s p o r i u m）由来C e l 4 5 A遺伝子（AB378504）をもとに、以下のプライマー（P c c e l 4 5 A-F1、P c c e l 4 5 A-F2）を設計した。また、リバープライマー（Invitrogen社製）は、以下の配列を用いた。

プライマー：

P c c e l 4 5 A-F1：ATGGCGAAGCTGTCTGATGTTCTTGGG（配列番号：7）

P c c e l 4 5 A-F2：CTGACCGTCTCCGAGAAGCGTG（配列番号：8）

リバースプライマー：Abridged Universal Amplification Primer (Invitrogen社製)

[0106] 上記プライマーを用い、PcCel6Aと同様に調製したcDNAを鋳型にしてPCRを行い（94℃、2分間を1サイクル、98℃、10秒間・68℃、1分30秒間を25サイクル、4℃で終了）、前記PcCel45Aをコードする領域と3'非翻訳領域をPCRによって増幅した。

[0107] また、5'非翻訳領域の塩基配列は、GeneRacer（トレードマーク）Kit（Invitrogen社製）と、SuperScript（登録商標）III RT（Invitrogen社製）と、以下の遺伝子特異的プライマーとを用いて増幅した（94℃、2分間を1サイクル、98℃、10秒間・70℃、30秒間を5サイクル、98℃、10秒間・68℃、30秒間を5サイクル、98℃、10秒間・66℃、30秒間・68℃、30秒間を20サイクル、4℃で終了）。

得られたPCR産物は、前記PcCel6Aと同様の方法でクローン化した。

プライマー：

PcCel45A-5' -R1：CAGCCTTGCCGCAAGCAGGAGAGCCGC（配列番号：9）

PcCel45A-5' -R2：CGCAAGCAGGAGAGCCGCAGCCCGAAT（配列番号：10）

[0108] ー組換えベクター（発現ベクター）の作製ー

PcCel45Aの成熟体の塩基配列に基づいて、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。

オリゴヌクレオチドプライマー

PcCel45A-XhoI-F：TTTCTCGAGAAAAGACTGACCGTCTCCGAGAAGCGTG（配列番号：11）

PcCel45A-NotI-R：TTTTGCGGCGCTCACGAAGGGGCAGTCCCCTTGTT（配列番号：12）

[0109] P c C e l 4 5 A 遺伝子を含む T O P O ベクターを鋳型とし、上記オリゴヌクレオチドプライマーと、ポリメラーゼとして K O D - P l u s とを用いて P C R を行い（94℃、2分間を1サイクル、98℃、10秒間・68℃、30秒間を20サイクル、4℃で終了）、発現ベクターに挿入するDNA断片を増幅した。

前記増幅したDNA断片を酵母の発現ベクター p P I C Z α の X h o I と N o t I 部位に挿入し、組換えベクター（発現ベクター）を得た。

[0110] ー形質転換体の作製ー

上記で得られた発現ベクター約5 μ g を、B p u 1 1 0 2 I （タカラバイオ（株）製）を用いて、直鎖化した。次いで、エレクトロポレーションにより、酵母（P i c h i a p a s t o r i s KM71H株）へ、前記直鎖化した組換えベクターを導入した後、形質転換体の選別を行った。前記エレクトロポレーション、及び形質転換体の選別は、E a s y S e l e c t （トレードマーク） P i c h i a e x p r e s s i o n k i t (v e r s i o n n G ; I n v i t r o g e n 社製) のマニュアルに基づいて行った。これにより、前記発現ベクターにより形質転換された形質転換体を得た。

[0111] ー形質転換酵母の培養ー

上述の形質転換体を、実施例1～6と同様の方法で培養し、遠心分離（3,000g、10分）によって得られた培養上清を粗酵素液とした。

[0112] ーP c C e l 4 5 A の製造及び精製ー

前述のようにして得られた粗酵素液を、実施例1～6と同様の方法で精製した。

得られたP c C e l 4 5 A のN末端のアミノ酸配列は、プロテインシーケンサーにより確認した。

その結果、形質転換酵母で得られたP c C e l 4 5 A のN末端アミノ酸配列は、A T G G Y V Q Q A T （配列番号：13）であり、担子菌ファネロケータ クリソスポリウム（P h a n e r o c h a e t e c h r y s o s p o r i u m）で得られた天然のものと同じであることが認められた。

PcCel45Aは、50mM酢酸緩衝液（pH5.0）に緩衝液交換し、以下の相乗効果試験に用いた。

[0113] ー相乗効果試験ー

前記セルロース I_α又は前記セルロース III₁を、下記表4に従って終濃度が0.1質量%となるように50mM酢酸ナトリウム溶液（pH5.0）250μL中に添加した。次いで、実施例1～6で調製したPcCel6A、比較例1～6で調製したTrCel7A、及びPcCel6A+PcCel45Aのいずれかを添加し、30℃にて最大360分間反応させた。なお、前記PcCel6A及びTrCel7Aの終濃度は、それぞれ1.0μM、PcCel6A+Cel45Aの全酵素濃度は2.0μM（PcCel6A 1.0μMに、Cel45A 1.0μMを添加して調製した）で行った。

反応終了後、反応液を5分間遠心分離（×15,000g）して反応を停止した後に得られた上澄みを、実施例1～6と同様の方法で分析した。

[0114] [表4]

		PcCel6A 終濃度 (μ M)	TrCel7A 終濃度 (μ M)	PcCel45A 終濃度 (μ M)	基質	反応液
比較例	8	—	1.0	—	セルロースⅠ _α (0.1質量%)	50mM 酢酸ナトリウム (pH5.0)
	7	1.0	—	—		
	9	—	—	1.0		
	10	1.0	—	1.0		
	3	—	1.0	—		
実施例	3	1.0	—	—	セルロースⅢ ₁ (0.1質量%)	
比較例	11	—	—	1.0		
実施例	7	1.0	—	1.0		

[0115] 図6は、TrCel7Aーセルロース I_αの加水分解反応（比較例8）、PcCel6Aーセルロース III₁の加水分解反応（実施例3）、TrCel7Aーセルロース III₁の加水分解反応（比較例3）、及びPcCel6A+PcCel45Aとセルロース III₁（以下「PcCel6A+PcCel45Aーセルロース III₁」）と称することがある）の加水分解反応（実施例7）における、反応液中のセロビオース濃度（μM）の経時変化を示す。

図6中、「■」はTrCel7Aーセルロース I_αの加水分解反応（比較例

8) を示し、

「▲」は P c C e l 6 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（実施例 3）を示し、

「●」は T r C e l 7 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（比較例 3）を示し、

「◆」は P c C e l 6 A + P c C e l 4 5 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（実施例 7）を示す。

なお、P c C e l 6 A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例 7）、P c C e l 4 5 A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例 9）、P c C e l 6 A + P c C e l 4 5 A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例 10）、及び P c C e l 4 5 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（比較例 11）は、反応液中のセロビオース濃度（μM）が低い、若しくはセロビオースが生成していないため、図 6 には示していない。

[0116] 図 7 は、T r C e l 7 A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例 8）、P c C e l 6 A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例 7）、P c C e l 4 5 A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例 9）、P c C e l 6 A + P c C e l 4 5 A-セルロース I_α の加水分解反応（比較例 10）、T r C e l 7 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（比較例 3）、P c C e l 6 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（実施例 3）、P c C e l 4 5 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（比較例 11）、及び P c C e l 6 A + P c C e l 4 5 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（実施例 7）の、それぞれの加水分解反応におけるセロビオース生成速度（μM/分間）を示す。

[0117] 図 6 より、P c C e l 6 A + P c C e l 4 5 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（実施例 7）では、P c C e l 6 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（実施例 3）と比較して、セロビオースが多く得られた。

また、図 7 より、P c C e l 4 5 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（比較例 11）ではセロビオースの生成は全く認められなかったが、P c C e l 6 A + P c C e l 4 5 A-セルロース I I I_I の加水分解反応（実施例 7）

におけるセロビオース生成速度は、P c C e l 6 A-セルロース I I I_Iの加水分解反応（実施例 3）におけるセロビオース生成速度と比較して顕著に早かった。一方、P c C e l 6 A + P c C e l 4 5 A-セルロース I_αの加水分解反応（比較例 10）におけるセロビオースの生成速度は遅かった。

これらの結果から、P c C e l 6 Aは、他のセルラーゼと併用するとセルロース I I I_Iの分解に関し、相乗効果を有することが認められた。P c C e l 4 5 Aは、P c C e l 6 Aの活性を増強すると考えられる。

産業上の利用可能性

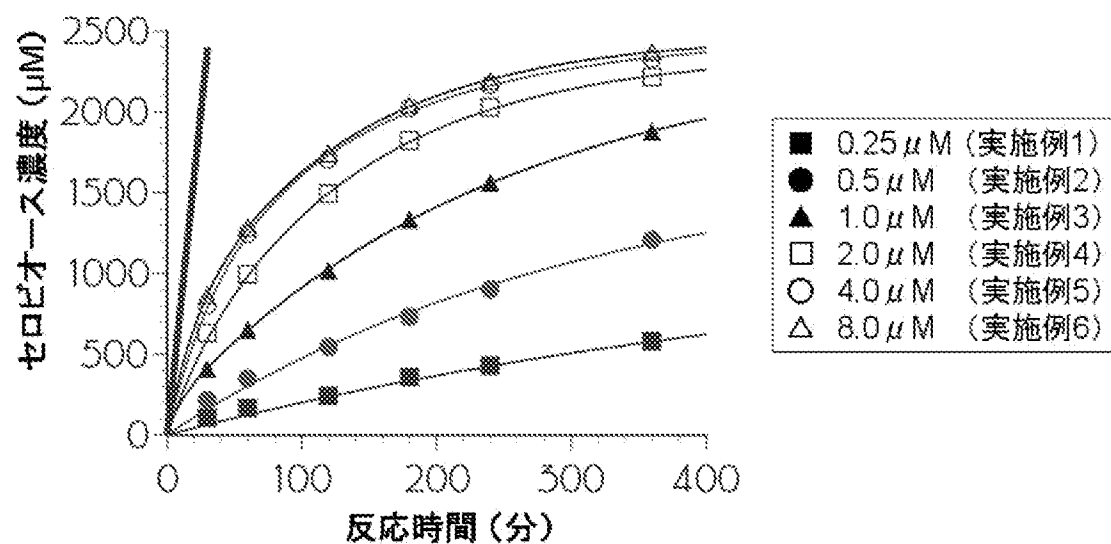
[0118] 本発明の、バイオマス原料の処理方法、糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法によれば、糖の生産効率、エタノールの生産効率、及び乳酸の生産効率を格段に向上させることができる。

したがって、本発明の、バイオマス原料の処理方法、糖の製造方法、エタノールの製造方法、及び乳酸の製造方法は、近年注目されている、環境に優しい燃料を産出することを目的としたバイオマス原料からのエタノール製造に、また環境に優しい生分解性プラスチックの製造などに好適に利用可能である。

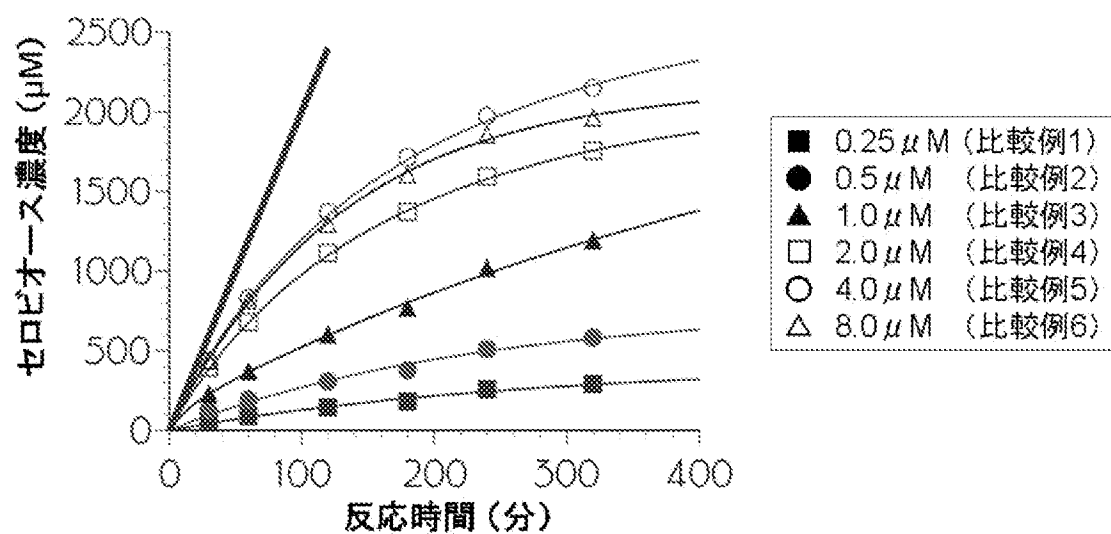
請求の範囲

- [請求項1] (a) バイオマス原料を、アンモニアを含む処理剤で処理することにより、改質バイオマス原料を得る工程、
- (b) 該改質バイオマス原料を、セロビオヒドロラーゼ I I (C e I 6 A) で酵素糖化する工程、
- を含むことを特徴とするバイオマス原料の処理方法。
- [請求項2] バイオマス原料が、セルロース I 型を含む請求項 1 に記載のバイオマス原料の処理方法。
- [請求項3] 工程 (a) が、超臨界アンモニア流体で処理することを含む請求項 1 から 2 のいずれかに記載のバイオマス原料の処理方法。
- [請求項4] 改質バイオマス原料とセロビオヒドロラーゼ I I (C e I 6 A) とが加水分解反応を行う表面密度が 0.9 以下のとき、該セロビオヒドロラーゼ I I (C e I 6 A) 1 分子あたりの加水分解速度が 1 分間に 5 回以上である請求項 1 から 3 のいずれかに記載のバイオマス原料の処理方法。
- [請求項5] 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のバイオマス原料の処理方法により糖を得ることを特徴とする糖の製造方法。
- [請求項6] 請求項 5 に記載の糖の製造方法により得られた糖を発酵させてエタノールを得ることを特徴とするエタノールの製造方法。
- [請求項7] 請求項 5 の記載の糖の製造方法により得られた糖を発酵させて乳酸を得ることを特徴とする乳酸の製造方法。

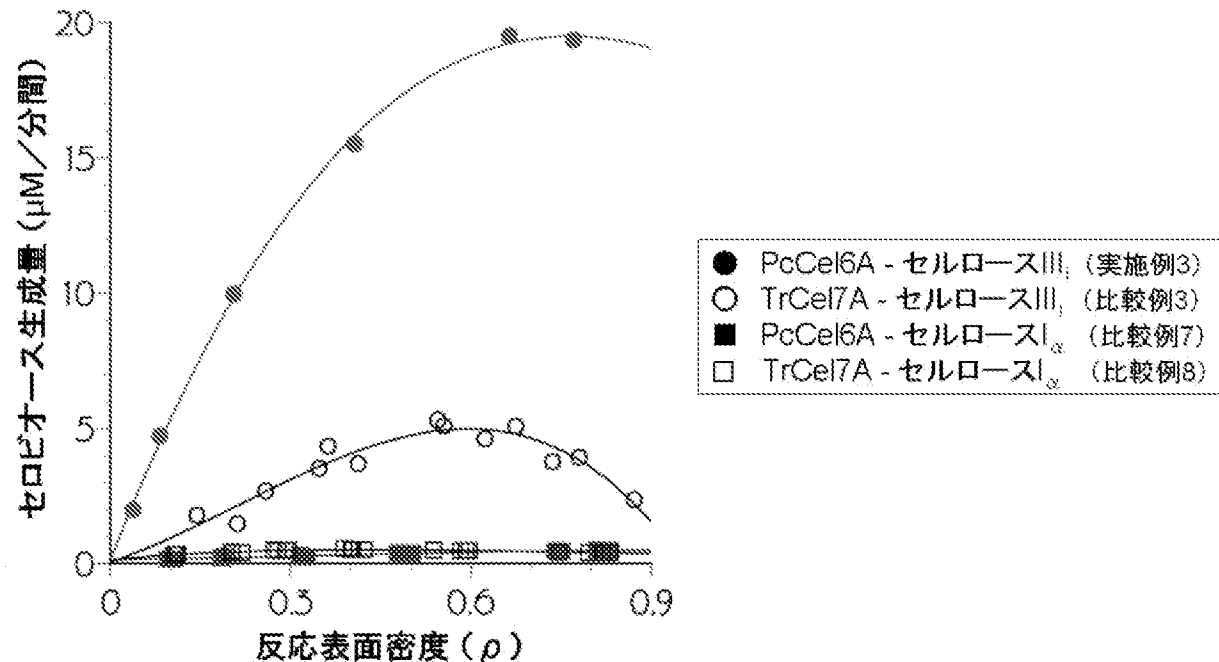
[図1]



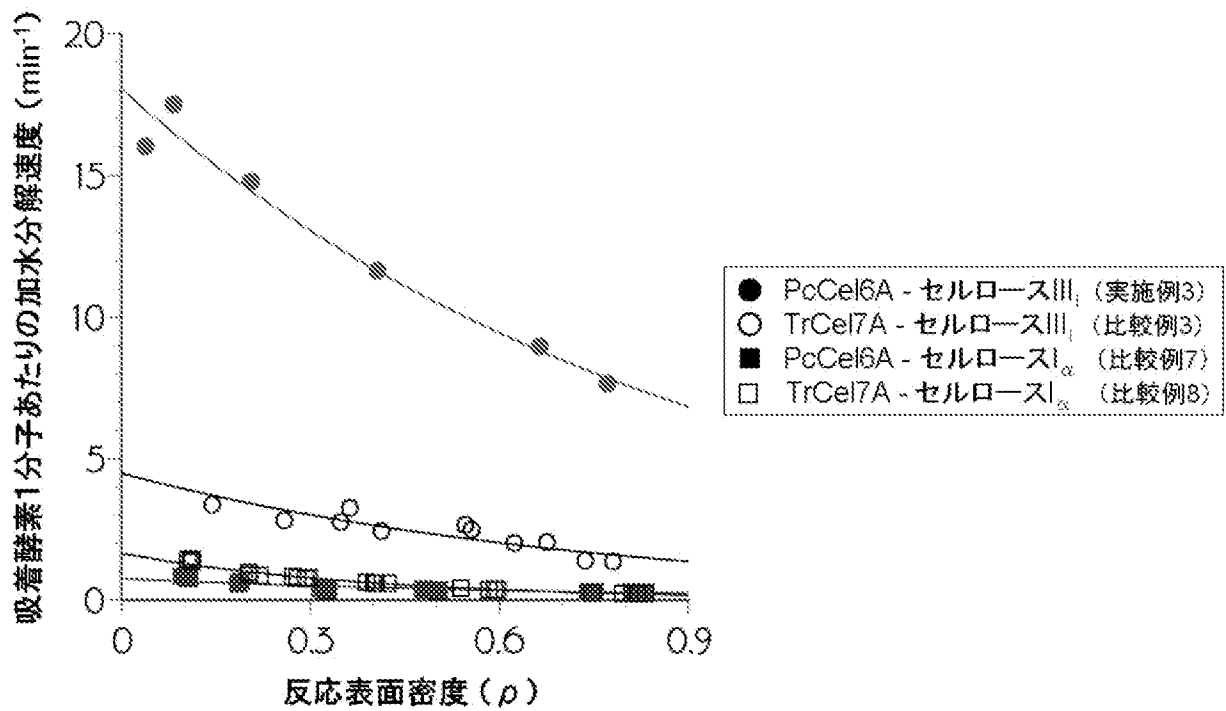
[図2]



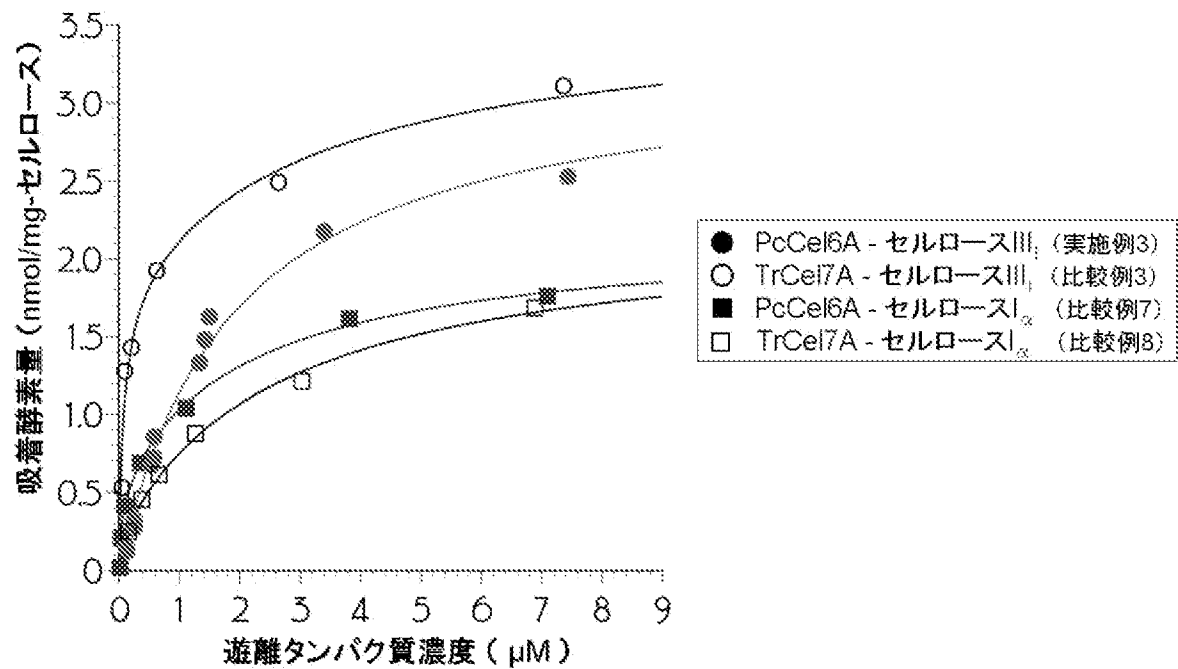
[図3]



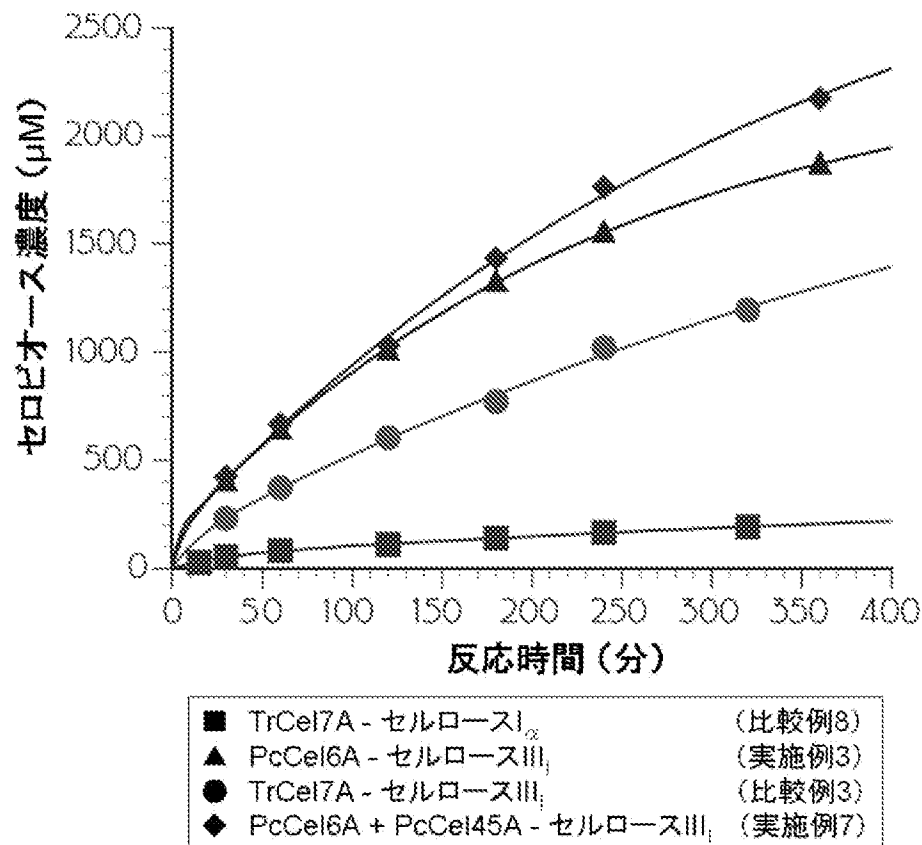
[図4]



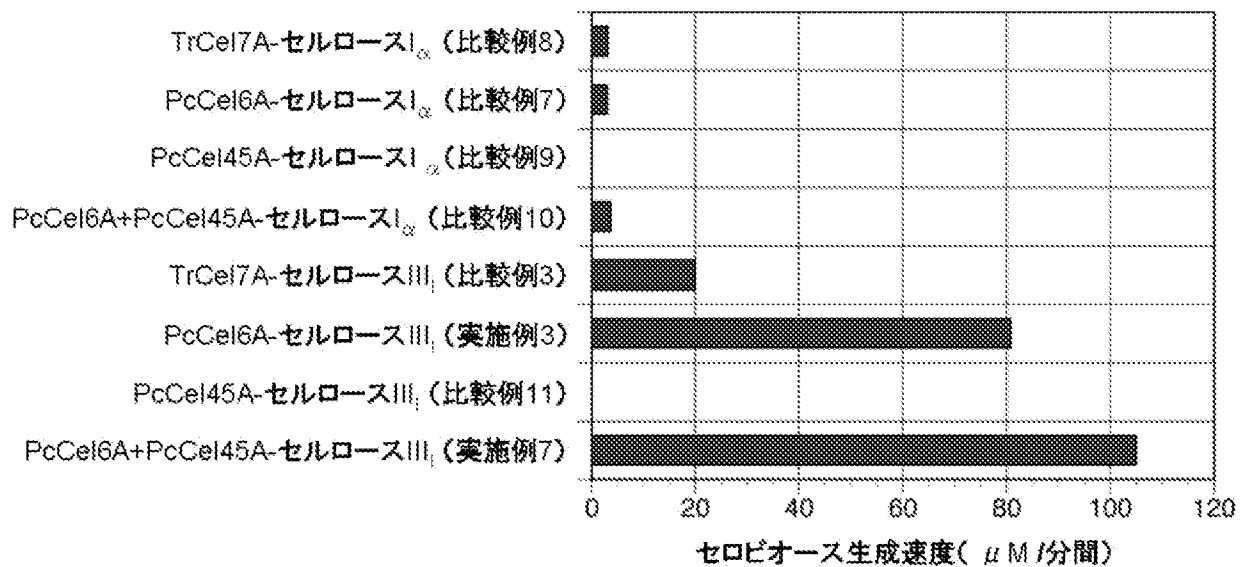
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060385

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P19/14(2006.01)i, C12P7/10(2006.01)i, C12P7/56(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P19/14, C12P7/10, C12P7/56, C12N15/09

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-161125 A (The University of Tokyo), 17 July 2008 (17.07.2008), examples (Family: none)	1-7
Y	IGARASHI Kiyohiko.et al., Characterization of an Endoglucanase Belonging to a New Subfamily of Glycoside Hydrolase Family 45 of the Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium, Applied And Environmental Microbiology, 2008, Vol.74, p.5628-5634	1-7
A	Masahiro SAMEJIMA, "Ima ga Chance : Bio Nenryo Seisan ni Taisuru Jidaiteki Yosei to Tomoni Shinka suru Cellulase Kagaku", The Japanese Society of Applied Glycoscience Higashinihon Shibu Symposium, 2008, vol.2008, pages 1 to 5	1-7



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

02 August, 2010 (02.08.10)

Date of mailing of the international search report

10 August, 2010 (10.08.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P19/14(2006.01)i, C12P7/10(2006.01)i, C12P7/56(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P19/14, C12P7/10, C12P7/56, C12N15/09

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

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2008-161125 A (国立大学法人 東京大学) 2008.07.17, 実施例 (ファミリーなし)	1 - 7
Y	IGARASHI Kiyohiko, et al., Characterization of an Endoglucanase Belonging to a New Subfamily of Glycoside Hydrolase Family 45 of the Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium, Applied And Environmental Microbiology, 2008, Vol.74, p.5628-5634	1 - 7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 2 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 8 . 2 0 1 0

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)

松原 寛子

4 N

4 1 5 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 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	鮫島正浩, 今がチャンス: バイオ燃料生産に対する時代的要請とともに進化するセルラーゼ科学, 日本応用糖質科学会東日本支部シンポジウム, 2008, Vol. 2008, p. 1-5	1 - 7