

(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
2017年10月5日(05.10.2017)



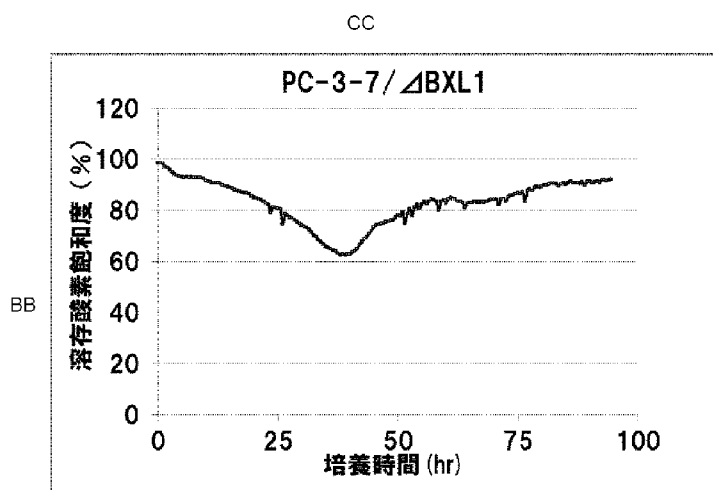
(10) 国際公開番号
WO 2017/170917 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C13K 1/02 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01) C13K 13/00 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/013377
- (22) 国際出願日: 2017年3月30日(30.03.2017)
- (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 2016-070584 2016年3月31日(31.03.2016) JP
- (71) 出願人: 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)
[JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 小林 宏治(KOBAYASHI, Koji); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 平松 紳吾(HIRAMATSU, Shingo); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 勝成(YAMADA, Katsushige); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手
- (74) 代理人: 特許業務法人谷川国際特許事務所 (TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目7番10号山京別館801 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, LT, LU, LV, MC,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PROTEIN

(54) 発明の名称: タンパク質の製造方法



AA Culturing time (hr)
 BB Degree of dissolved oxygen saturation (%)
 CC PC-3-7/ΔBXL1

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing protein by filamentous fungi with which it is possible to suppress a decrease in the degree of dissolved oxygen saturation during culturing, even when the culturing of filamentous fungi is scaled up. This method for producing protein comprises culturing a BXL1-gene-disrupted Trichoderma fungus by employing, as an inducer, a biomass including cellulose and xylan. By using a BXL1-gene-disrupted Trichoderma fungus, it is possible to suppress a decrease in the degree of dissolved oxygen saturation, even when xylose and cellulose are employed as an inducer.

(57) 要約: 要約 糸状菌培養において培養のスケールアップを行っても、培養中の溶存酸素飽和度の低下を抑制可能な、糸状菌によるタンパク質の製造方法が開示されている。タンパク質の製造方法は、セルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤としてBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を培養することを含む。BXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を用いると、キシロースとセルロースを誘導剤として使用しても、溶存酸素飽和度の低下を抑制することが可能となる。



WO 2017/170917 A1

MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, (規則 5.2(a))
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：タンパク質の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、トリコデルマ属真菌によるタンパク質の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 糸状菌はそのタンパク質分泌能力の高さから、タンパク質の生産に非常に適している。それゆえ、これまで糸状菌を使用したタンパク質生産方法が数多く行われてきた。しかしながら、糸状菌は好気微生物であるため、糸状菌を液体培養する際には、培地中に酸素を供給して、培養中は、培地中の溶存酸素飽和度を一定以上に保つ必要がある。糸状菌は菌糸を有するため、培養が進むにつれ培地の粘度が高まるという特徴を有している。粘度が高まると、酸素や栄養素の分布が不均一になり、糸状菌の生育や、タンパク質の生産性が低下してしまうので、糸状菌を培養して効率的にタンパク質を生産させるためには、培養液を攪拌したり、酸素供給量を増加させたりする必要がある。

[0003] また、培養槽が大型化すると、酸素移動容量係数が低くなるため、培養中の溶存酸素飽和度を一定以上に保つためには、攪拌数や酸素供給量を増やす必要がある。しかしながら、攪拌数を増やすと、菌体に大きなせん断ダメージを与えてしまうという課題があり、酸素供給量を増やすためにはより大きなエネルギーが必要になる課題がある。

[0004] 培養液の粘度を低下させる方法として、特許文献1では、培地に菌糸伸長阻害物質を添加して菌糸形態をペレット状にする方法が開示されており、特許文献2には粘度の原因物質となるタンパク質の分泌を抑制した糸状菌の変異株が開示されている。

[0005] 一方、糸状菌を使用してタンパク質の生産量を増加させるためには、タンパク質の生産を誘導する誘導剤を添加する方法が知られており、例えば、特許文献3には、タンパク質としてセルラーゼの生産性を向上させるために、

培地にセルロースや場合に応じてキシランなどを誘導剤として添加する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開平7-31467
特許文献2：WO2012027580
特許文献3：特開2014-150745

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 上述のように、糸状菌培養のスケールアップの主な課題は、スケールアップに伴う攪拌エネルギーの増大と、培養液への酸素供給量であった。また、実施例で後述するように、糸状菌であるトリコデルマ属真菌を培養する際、誘導剤としてセルロースとキシランを添加すると、セルロースまたはキシランを単独で添加する培養と比較して、酸素利用速度が高くなるという課題を新規に見出した。酸素利用速度が高くなると、培養中の溶存酸素飽和度は、さらに低下してしまう。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らが鋭意検討した結果、セルロースとキシランを誘導剤として使用しても、トリコデルマ属真菌の β -キシロシダーゼをコードするBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマを使用すると、トリコデルマ属真菌の酸素利用速度が低下し、培養中の溶存酸素飽和度の低下が抑制されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

- [0009] すなわち、本発明は以下の(1)～(16)を提供する。

(1) セルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤としてBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を培養することを含む、トリコデルマ属真菌によるタンパク質の製造方法。

(2) 前記誘導剤を5重量%(wt/wt)以上培地に添加して培養する、

- (1) に記載の方法。
- (3) 前記誘導剤に含まれるキシランの含有量が15～40重量%である(1)または(2)に記載の方法。
- (4) 前記トリコデルマ属真菌がトリコデルマ・リーセイである、(1)から(3)のいずれかに記載の方法。
- (5) 前記トリコデルマ・リーセイがカーボン・カタボライト・リプレッションが解除されている株である、(4)に記載の方法。
- (6) 前記タンパク質がセルラーゼ組成物である(1)から(5)のいずれかに記載の方法。
- (7) 前記セルラーゼ組成物の β -キシロシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.006U/mg protein以下、セロビオヒドロラーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-ラクトピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.1U/mg protein以上、 β -グルコシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.25U/mg protein以上である(6)に記載の方法。
- (8) 前記 β -キシロシダーゼ比活性が0.002U/mg protein以下、前記 β -グルコシダーゼ比活性が0.3U/mg protein以上である(7)記載の方法。
- (9) (6)～(8)のいずれか1項に記載の方法により製造されたセルラーゼ組成物でキシランとセルロースを含むバイオマスを加水分解する、キシロオリゴ糖の製造方法。
- (10) (6)～(8)のいずれか1項に記載の方法により製造されたセルラーゼ組成物でキシランとセルロースを含むバイオマスを加水分解する、キシロオリゴ糖とグルコースの製造方法。
- (11) セルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤としてトリコデル

マ属真菌を培養する際の溶存酸素飽和度の減少を抑制する方法であって、前記トリコデルマ属真菌として、BXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を用いる、溶存酸素飽和度の減少抑制方法。

(12) 以下の(a)～(d)の特徴を有するセルラーゼ組成物。

(a) β -キシロシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.006U/mg protein以下

(b) セロビオヒドロラーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-ラクTOPイラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.1U/mg protein以上

(c) β -グルコシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.25U/mg protein以上

(d) 該セルラーゼ組成物のタンパク質濃度が3g/L以上

(13) 前記タンパク質濃度が9g/L以上である、(12)に記載のセルラーゼ組成物。

(14) p-ニトロフェニル- β -D-キシロビオシドの分解活性が該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり5U/mg protein以上である、(12)または(13)に記載のセルラーゼ組成物。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、BXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を用いると、キシロースとセルロースを誘導剤として使用しても、溶存酸素飽和度の低下を抑制することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の比較例において測定した、BXL1遺伝子が破壊されていないトリコデルマ属真菌を培養した際の溶存酸素飽和度の経時変化を示す図である。

[図2]本発明の実施例において測定した、BXL1遺伝子が破壊されたトリコ

デルマ属真菌を培養した際の溶存酸素飽和度の経時変化を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0012] 本発明において誘導剤とは、糸状菌がタンパク質を生産するのを誘導し、タンパク質生産量を増加させる働きのあるものを指す。一般的にはセルロースなどが知られている。本発明において使用される誘導剤はセルロースとキシランを含むバイオマスである。キシランおよびセルロースを含有するバイオマスはキシランおよびセルロースを含有する植物由来の資源であれば特に限定されず、種子植物、シダ植物、コケ植物、藻類、水草などの植物の他、パルプ、廃建材なども用いることができる。種子植物は、裸子植物と被子植物に分類されるが、どちらも好ましく用いることができる。裸子植物の具体例としては、ソテツ、イチヨウ、マツ、モミ、トウヒ、スギなどが挙げられる。被子植物はさらに単子葉植物と双子葉植物に分類されるが、単子葉植物の具体例としては、バガス、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサス、コーンストーバー、コーンコブ、稲わら、麦わらなどが挙げられ、双子葉植物の具体例としては、ビートパルプ、ユーカリ、ナラ、シラカバなどが好ましく用いられる。
- [0013] これらの誘導剤は培養液に添加しやすいように、処理がされていても良い。具体的な処理方法には、酸処理、硫酸処理、希硫酸処理、アルカリ処理、水熱処理、亜臨界処理、微粉碎処理、蒸煮処理など公知の手法を用いることができる。
- [0014] 誘導剤であるバイオマスに含まれるキシラン含有量は、特に限定はされないがバイオマス固形分重量に対して5重量%以上が好ましく、より好ましくは10重量%以上、さらに好ましくは15重量%以上であり、さらに好ましくは15重量%以上50重量%以下であり、さらに好ましくは15重量%以上40重量%以下であり、さらに好ましくは15重量%以上30重量%以下である。また、セルロース含有量は、特に限定はされないがバイオマス固形分重量に対して50重量%以上が好ましく、より好ましくは60重量%以上、より好ましくは70重量%以上、さらに好ましくは80重量%以上である

。なお、当然ながら、キシラン含有量とセルロース含有量の合計が100重量%を超えることはない。また、バイオマスには、リグニンやヘミセルロース等、セルロースとキシラン以外の成分が含まれていてもよい。バイオマスに含まれるセルロース含有量、キシラン含有量の測定方法は特に限定されないが、具体的には以下の方法で測定することができる。まず、測定したいバイオマス試料を風乾後ウィレーミルなどにより粉碎し、適量を分取し、105℃で乾燥後の重量減から水分率（wt%）を算出する。その後、試料の適量（約0.3g）を天秤ではかりとり、72%硫酸3mLを加え、30℃でときどき攪拌しながら1時間放置する。この反応液を精製水84mLと混合した後、120℃で1時間オートクレーブで加熱分解する。加熱分解後、分解液と残渣をろ別し、ろ液と残渣の洗液を加えて100mLにメスアップし、高速液体クロマトグラフ法により単糖（グルコース、キシロース等）の定量を行う。得られた単糖濃度（グルコース、キシロース）と、試料分解量（水分率から無水ベース重量を算出）から、試料中の含有量（セルロース、キシラン）を算出する。

[0015] 本発明において誘導剤として使用するバイオマスの添加量は培地に対し終濃度として2重量%以上が好ましい。さらに、誘導剤の添加量が増加すればするほど親株よりも後述の培養期間中の溶存酸素濃度の最低飽和度がより高くなり、タンパク質の生産量が増加するため、より好ましいバイオマスの添加量は、終濃度として4重量%以上、さらに好ましくは5重量%以上、さらに好ましくは6重量%以上、さらに好ましくは7重量%以上、さらに好ましくは8重量%以上である。また、本発明のBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を培養し、得られたタンパク質をセルラーゼ組成物として使用する際にも、培養時に誘導剤として添加するバイオマスの添加量が増加するほどβ-グルコシダーゼ活性、セロビオヒドラーゼ活性が増加し、β-キシロシダーゼ活性が低下する。グルコースとキシロオリゴ糖の製造に適したセルラーゼ組成物を得るためのバイオマスの添加量は、終濃度として4重量%以上、さらに好ましくは5重量%以上、さらに好ましくは6重量%以上、

さらに好ましくは7重量%以上、さらに好ましくは8重量%以上、さらに好ましくは10重量%以上である。本発明においては酸素要求性の低い糸状菌を使用することで、誘導剤の添加量を増加させ、その結果、糸状菌が産生するタンパク質量を増加させ、糖化反応時にグルコースとキシロオリゴ糖を効率よく生産することができる。ここで、誘導剤を添加する時期については特に限定されないが、培養開始時には添加されてあるのが好ましい。また、誘導剤の添加量が多すぎると攪拌のエネルギーが増加するため、30重量%以下が好ましく、さらに好ましくは20重量%以下である。

[0016] 本発明で用いるトリコデルマ属真菌は、*Trichoderma*属に属し、タンパク質を生産する能力を有していれば特に制限はない。好ましくはトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) である。また、トリコデルマ属に由来し、変異剤あるいは紫外線照射などで変異処理を施し、タンパク質の生産性が向上した変異株を利用してもよい。例えば、トリコデルマ・リーセイに由来する公知の変異株であるQM6a株 (NBRC 31326)、QM9414株 (NBRC 31329)、PC-3-7株 (ATCC 66589)、QM9123株 (NBRC 31327)、RutC-30株 (ATCC 56765)、CL-847株 (Enzyme. Microbiol. Technol. 10, 341-346 (1988))、MCG77株 (Biotechnol. Bioeng. Symp. 8, 89 (1978))、MCG80株 (Biotechnol. Bioeng. 12, 451-459 (1982)) 及びこれらの派生株などが挙げられる。

[0017] さらに、本発明で用いるトリコデルマ属真菌は、カーボン・カタボライト・リプレッションが解除されていることが好ましい。カーボン・カタボライト・リプレッションが解除されている株は、セルラーゼなどのタンパク質の生産量が向上しているため、より多くのタンパク質を生産することが可能になる。さらに好ましくは、カーボン・カタボライト・リプレッサーIを介してなされるカーボン・カタボライト・リプレッションが解除されている株であることが好ましい。例えばカーボン・カタボライト・リプレッサーI遺伝子

(*cre1*) に変異が入ることによりカーボン・カタボライト・リプレッサー I を介してなされるカーボン・カタボライト・リプレッションが解除される。*cre1* 遺伝子がコードする CRE1 タンパク質はグルコースによるカタボライト・リプレッションにより、セルラーゼ遺伝子の発現を抑制することが知られている (FEBS Lett., 376, 103-107, 1995)。よって *cre1* 遺伝子に変異が入るとセルラーゼ遺伝子の発現抑制が解除され、セルラーゼの生産量が高まる。そのため、*cre1* 遺伝子に変異が入った株はよりタンパク質やセルラーゼ組成物の製造に適する。具体的なカーボン・*cre1* 遺伝子の変異の例としては、PC-3-7 株 (ATCC 66589) の *cre1* 遺伝子において、232 番目の A が C に置換され、その結果アミノ酸配列の 78 番目のスレオニンがプロリンに置換されていることが挙げられる。この変異が入ることにより、セルラーゼの生産量が向上することが知られている (Biosci. Biotechnol. Biochem., 77 (3), 534-543, 2013)。また、RutC-30 株 (ATCC 56765) では *cre1* 遺伝子が部分的に切断され、カーボン・カタボライト・リプレッションが解除されていることが知られている (BMC Genomics., 9, 327, 2008)。ここで *cre1* 遺伝子に変異が入っている株とは、遺伝子変異剤、紫外線照射、などにより *cre1* 遺伝子領域内の塩基の欠失若しくは挿入によるフレームシフト、又は塩基の置換によるストップコドン変異、又は塩基の切断が入っている株を含み、さらに組換えなどにより *cre1* 遺伝子の全部又は一部を除去又は他の遺伝子と置換している株も含まれる。具体的には、PC-3-7 株 (ATCC 66589) や RutC-30 株 (ATCC 56765) さらに、PC-3-7 株 (ATCC 66589) や RutC-30 株 (ATCC 56765) の特徴を引き継いだ株が好ましく用いられ、さらに好ましくは、PC-3-7 株 (ATCC 66589) または、PC-3-7 株 (ATCC 66589) の特徴を受け継いだ株である。ここで PC-3-7 (ATCC 66589) や RutC-30 株 (ATCC 56765) の特徴を引き継いだ株

には、PC-3-7株(ATCC66589)やRutC-30株(ATCC56765)の特徴を引き継いだ株に新たに変異を加えた株や組換えにより機能を向上させた株も含まれる。

[0018] 本発明ではBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を培養する。BXL1遺伝子は、 β -キシロシダーゼ活性を有する。 β -キシロシダーゼは、キシロースが β -1, 4-結合したキシロピオースを分解してキシロースを産生する酵素である。 β -キシロシダーゼ活性の測定方法は特に限定されないが、例えば、p-ニトロフェニル- β -キシロピラノシド(pNP-Xyl)を基質として活性を測定することができる。具体的には以下の通りである。セルラーゼの最適pHであるpH5.0に調整した50mM酢酸ナトリウム緩衝液に、1mMとなるようにp-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドを溶解したものを基質溶液として、90 μ Lの基質溶液に酵素液10 μ Lを添加し、30 $^{\circ}$ Cで静置反応させる。反応時間は30分間を基本とし、酵素活性の高さに応じて10~60分間まで適宜変更する。反応後、炭酸ナトリウム溶液10 μ Lを添加して反応を停止させ、405nmの吸光度を測定することでp-ニトロフェノールを定量する。上記反応系にて、1分間に1 μ molのp-ニトロフェノールを生成する酵素量を1Uとして定義する。本発明では活性は酵素液中に含まれるタンパク質1mg当たりのUとして算出する。

[0019] タンパク質濃度の測定方法は特に限定されないが、例えば、市販のタンパク質濃度測定試薬(Quick Start Bradfordプロテインアッセイ、Bio-Rad製)を使用して測定することができる。具体的には以下の通りである。室温に戻したタンパク質濃度測定試薬250 μ Lに希釈した酵素液を5 μ L添加し、室温で5分間~40分間静置後の595nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する。標準品としてBSAを使用し、検量線に照らし合わせてタンパク質濃度を算出する。

[0020] 本発明で「BXL1遺伝子が破壊された」とはBXL1遺伝子内に変異、挿入、欠失があり、 β -キシロシダーゼ活性が低下することを指す。

[0021] 本発明で、 β -キシロシダーゼ活性が低下するとは、BXL1遺伝子を破壊する前の親株と比較して、 β -キシロシダーゼ活性が低下していることを指す。 β -キシロシダーゼ活性は、BXL1遺伝子の破壊前に比べて、2分の1以下に低下していることが好ましく、より好ましくは5分の1以下、より好ましくは10分の1以下に低下、より好ましくは20分の1以下、さらに好ましくは50分の1以下、特に好ましくは80分の1以下、最も好ましくは100分の1以下である。BXL1遺伝子を破壊する方法は特に限定されないが、例えば、遺伝子変異剤、紫外線照射、などによる遺伝子変異処理、部位特異的変異法等により、BXL1遺伝子にフレームシフト変異を導入したり、ストップコドンを挿入したりすることにより行うことができ、また、遺伝子組換え（他の遺伝子との相同組み換え等、下記実施例参照）により、BXL1遺伝子の全部又は一部を除去又は他の遺伝子と置換することにより行うことができる。トリコデルマ属真菌のBXL1遺伝子（Gene ID ; 18483060）は公知であるので、BXL1遺伝子の破壊は常法により容易に行うことができる。

[0022] 次に本発明におけるトリコデルマ属真菌の培養方法について説明する。培養方法については特に制限はなく、タンパク質が生産される方法であれば良く、トリコデルマ属真菌の培養に常用されている方法を採用することができる。使用する培地に含まれる炭素源としては上述した誘導剤に用いるセルロースとキシランを含むバイオマスが好ましく使用される。窒素源としては、例えば、ポリペプトン、肉汁、CSL、大豆かすなどが用いられる。その他、この培地には目的とするセルラーゼを生産する上で必要とされる成分を添加することができる。培養には、振とう培養、攪拌培養、攪拌振とう培養、静置培養、連続培養など、様々な培養方式を採用しうるが、好ましくは、振とう培養または攪拌培養である。培養温度は、通常、20℃～35℃、好ましくは25℃～31℃である。

[0023] 本発明のBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌は、破壊される前の親株よりもタンパク質濃度が増加し、よりタンパク質の製造に適する。

タンパク質濃度の増加率は増加していれば特に限定はされないが0.01%以上であることが好ましく、さらに好ましくは0.02%以上、さらに好ましくは0.04%以上、さらに好ましくは0.05%以上、さらに好ましくは0.06%以上、さらに好ましくは0.08%以上、さらに好ましくは0.1%以上、さらに好ましくは0.5%以上、さらに好ましくは1%以上、さらに好ましくは2%以上、さらに好ましくは3%以上、さらに好ましくは4%以上、さらに好ましくは5%以上、さらに好ましくは6%以上、さらに好ましくは7%以上、さらに好ましくは8%以上、さらに好ましくは9%以上、さらに好ましくは10%以上、さらに好ましくは11%以上、さらに好ましくは12%以上である。

[0024] 本発明では、トリコデルマ属真菌のBXL1遺伝子を破壊することによって、セルロースとキシランを誘導剤として培地に添加して培養した際のトリコデルマ属真菌の酸素利用速度 (Oxygen Uptake Rate) が低下し、培養中の溶存酸素飽和度を抑制することができる。

[0025] セルロースとキシランを誘導剤として培地に添加して培養した際にBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌と、破壊される前の親株を同様の条件で培養すると、BXL1遺伝子が破壊された株は、破壊される前の親株と比べて、培養液中の酸素利用速度 (OUR) が顕著に低下し、培養中の溶存酸素飽和度は増加する。

[0026] 本発明における酸素利用速度 (mM/L/hr) は培養開始後24時間後の単位時間当たりの培養液1L当たりの酸素消費速度のことを指す。具体的な算出方法は、培養条件を一定に保って培養を行い、培養開始後24時間時点で酸素の供給を止め、溶存酸素 (mg/L) の値 (DO値) を10秒間ごとにプロットし、その曲線の中で対数的に減少している3点以上のプロットについて、その傾き (A) (単位; mg/L/sec) を求める。酸素利用速度の算出式は以下である。

[0027] 酸素利用速度 (mM/L/hr) = $(-A) \times (1/32) \times 60 \times 60 \dots$ (式1)。

D O 値の測定には市販の D O 計を使用することができる。使用する D O 計には特に制限はなく、D O 値を正確に測定できるものであれば良い。例として、密閉型 D O 電極（エイブル株式会社）や溶存酸素センサ（メトラー・トレド株式会社）などが挙げられる。D O 計は予め 0 点校正とスパン校正を行っておく。0 点校正は亜硫酸ソーダ 2 % 溶液を使用して行う。スパン校正は実際に培養する条件において菌体が存在しない状態で通気、攪拌を行い、溶存酸素が飽和になるまで待ち、その後計器の指示値が安定していることを確認し、その温度での飽和溶存酸素に合わせて校正を行う。また、培養槽を加圧して D O 測定を行う際は、圧補正を行う必要がある。さらに、培養槽が大きい場合は静水圧補正を行う必要がある。補正を行う際の計算式は以下である。

$$D = D O (1 + \alpha + \beta) \dots (\text{式 } 2)$$

D : 補正した飽和溶存酸素

D O : 1 気圧、純水中での飽和溶存酸素

α : ゲージ圧 (k g / c m²)

β : 静水圧 (D O 計取り付け位置の液深(m) / 10)

[0028] 溶存酸素飽和度は、培養開始前の飽和溶存酸素を 100% とした場合、飽和溶存酸素に対する培養期間中の溶存酸素の割合を溶存酸素飽和度として算出する。溶存酸素 (m g / L) は、水中に溶解している酸素の濃度を表す。飽和溶存酸素とは、実際に培養を行なう培養条件において、菌体が存在しない状態で通気、攪拌を行い、溶存酸素が一定になった状態での溶存酸素のことを指す。また、溶存酸素飽和度を算出する際は、培養期間中に通気条件など培養条件を変化させることはしないこととする。酸素要求性が低下すると、溶存酸素飽和度は増加する。溶存酸素飽和度の算出方法は以下である。

$$\text{溶存酸素飽和度 (\%)} = (\text{培養中の溶存酸素}) / (\text{培養開始前の飽和溶存酸素}) \times 100 \dots (\text{式 } 3)。$$

[0029] 本明細書中では、培養期間中の溶存酸素飽和度を経時的に測定した際、最も溶存酸素飽和度が低下した値を最低飽和度と記載する。最低飽和度の値が

高いほどスケールアップに適している。

[0030] 酸素利用速度や、溶存酸素飽和度を比較する場合には、培地、酸素供給量、攪拌速度、温度、培養容量、植菌量などの培養条件を揃えることが望ましい。植菌量は本培養液に対し、10% (v/v) で行うのが良い。

[0031] BXL1 遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌と、破壊される前の親株を同様の条件で培養すると、BXL1 遺伝子が破壊された株は、破壊されていない株に比べて、最低飽和度の値が高くなり、好ましくは1%以上、より好ましくは2%以上、より好ましくは4%以上、より好ましくは5%以上、さらに好ましくは6%以上、さらに好ましくは7%以上、さらに好ましくは8%以上、さらに好ましくは9%以上、さらに好ましくは10%以上、さらに好ましくは11%以上、さらに好ましくは12%以上、さらに好ましくは13%以上、さらに好ましくは14%以上、特に好ましくは15%以上高くなる。

[0032] 本発明ではタンパク質の製造方法を提供している。本発明におけるタンパク質としては特に限定はされないが、工業、医療、農業、食品などの分野で使用されるタンパク質が例として挙げられる。これらのタンパク質は糸状菌由来の天然タンパク質だけではなく、糸状菌由来以外の異種タンパク質を糸状菌で生産させても良い。具体的なタンパク質の例としては、セルラーゼ、キシラナーゼ、ペクチナーゼ、リアーゼ、プロテアーゼ、キナーゼ、アミラーゼ、プルラナーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、ペルヒドロラーゼ、トランスフェラーゼ、ラッカーゼ、カタラーゼ、オキシダーゼ、レダクターゼ、クロロフィラーゼ、ヒドロホピン、キモシン、炭酸脱水酵素、チミジル酸シンターゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、チロシンキナーゼ、多剤耐性タンパク質、カルミバル-Pシンターゼ、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ、ジヒドロオロターゼ、トポイソネラーゼ、リボヌクレオチドレダクターゼ、並びに抗体、糸状菌で発現することができる他の酵素および非酵素タンパク質が挙げられる。使用するプロモーターは特に限定はされないが、発現量が高いセロビオハイドラーゼ遺伝子やエンドグルカナーゼ遺伝子、キシラナーゼ

遺伝子のプロモーターを使用して、目的遺伝子を発現させるのが好ましい。

- [0033] 本発明ではさらに、本発明の製造方法で得られたタンパク質をセルラーゼ組成物として使用することも提供する。本発明におけるセルラーゼ組成物とは、 β -1, 4-グルカンのグリコシド結合を加水分解する種々の加水分解酵素の混合物である。セルラーゼに含まれる加水分解酵素とは例えば、セロビオヒドラーゼ、キシラナーゼ、エンドグルカナーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -キシロシダーゼ、アラビノフラノシダーゼ、キシランエステラーゼ、フェルラ酸エステラーゼ、 α -グルクロニダーゼ、キトサナーゼ、キチナーゼ、マンナナーゼ、マンノシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられる。
- [0034] 本発明のBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を培養して得られたセルラーゼ組成物は、破壊される前の親株を培養して得られたセルラーゼ組成物よりも β -グルコシダーゼ活性が増加し、糖化反応時のグルコース生産量が増加するため、グルコースの製造に適する。 β -グルコシダーゼ活性の増加率は増加していれば特に限定はされないが、0.5%以上が好ましく、より好ましくは1%以上、さらに好ましくは2%以上、さらに好ましくは3%以上、さらに好ましくは4%以上、さらに好ましくは5%以上である。
- [0035] 本発明で得られたセルラーゼ組成物の β -キシロシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、セロビオヒドラーゼ活性は以下のように定義される。 β -キシロシダーゼは上述したように測定することができ、その値は具体的には0.040U/mg protein以下であることが好ましく、さらに好ましくは0.030U/mg protein以下であり、さらに好ましくは0.020U/mg protein以下であり、さらに好ましくは0.01U/mg protein以下、さらに好ましくは0.0080U/mg protein以下であり、さらに好ましくは0.0060U/mg protein以下であり、さらに好ましくは0.0050U/mg protein以下であり、さらに好ましくは0.0040U/mg protein以下であり、さらに好ましくは0.003U/mg protein以下であ

り、さらに好ましくは $0.0020\text{ U/mg protein}$ 以下である。

[0036] β -グルコシダーゼ活性の測定方法は特に限定されないが、例えば、*p*-ニトロフェニル- β -グルコピラノシド (*p*NP-gyl) を基質として活性を測定することができる。具体的には以下の通りである。セルラーゼの最適pHであるpH5.0に調整した50mM酢酸ナトリウム緩衝液に、1mMとなるように4-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを溶解したものを基質溶液として、90 μ Lの基質溶液に酵素液10 μ Lを添加し、30°Cで静置反応させる。反応時間は10分間を基本とし、酵素活性の高さに応じて10~60分間まで適宜変更する。反応後、炭酸ナトリウム溶液10 μ Lを添加して反応を停止させ、405nmの吸光度を測定することで*p*-ニトロフェノールを定量する。上記反応系にて、1分間に1 μ molの*p*-ニトロフェノールを生成する酵素量を1Uとして定義する。本発明で得られたセルラーゼ組成物の β -グルコシダーゼ活性の値は $0.200\text{ U/mg protein}$ 以上であることが好ましく、さらに好ましくは $0.250\text{ U/mg protein}$ 以上であり、さらに好ましくは $0.280\text{ U/mg protein}$ 以上であり、さらに好ましくは $0.300\text{ U/mg protein}$ 以上であり、さらに好ましくは $0.320\text{ U/mg protein}$ 以上である。

[0037] セロビオヒドロラーゼ活性の測定方法は特に限定されないが、例えば、*p*-ニトロフェニル- β -ラクトピラノシド (*p*NP-lac) を基質として活性を測定することができる。具体的には以下の通りである。セルラーゼの最適pHであるpH5.0に調整した50mM酢酸ナトリウム緩衝液に、1mMとなるように*p*-ニトロフェニル- β -D-ラクトピラノシドを溶解したものを基質溶液として、90 μ Lの基質溶液に酵素液10 μ Lを添加し、30°Cで静置反応させる。反応時間は60分間を基本とし、酵素活性の高さに応じて10~60分間まで適宜変更する。反応後、炭酸ナトリウム溶液10 μ Lを添加して反応を停止させ、405nmの吸光度を測定することで4-ニトロフェノールを定量する。上記反応系にて、1分間に1 μ molの*p*-

ニトロフェノールを生成する酵素量を1 Uとして定義する。本発明で得られたセルラーゼ組成物のセロビオヒドロラーゼ活性の値は0.100 U/mg protein以上であることが好ましく、さらに好ましくは0.120 U/mg protein以上であり、さらに好ましくは0.150 U/mg protein以上であり、さらに好ましくは0.160 U/mg protein以上である。

[0038] 本発明で製造されたセルラーゼ組成物の使用方法は特に限定されないが、糖の製造に好ましく使用される。さらに好ましくはキシロオリゴ糖の製造に使用され、さらに好ましくはキシロオリゴ糖とグルコースの製造に使用される。

[0039] 本発明におけるキシロオリゴ糖とは、少なくともキシロースが2個以上β-グリコシド結合で連結したキシロオリゴ糖のことを指す。キシロオリゴ糖の重合度は、特に限定されないが、水溶性が高い2糖（キシロビオース）から6糖（キシロヘキサオース）であることが好ましい。最も好ましくは、腸内細菌が炭素源として資化しやすい、キシロビオース、キシロトリオース、キシロテトラオースを含むことが好ましい。

[0040] 本発明においてセルラーゼ組成物はトリコデルマ属真菌を培養して得られ、バイオマスの糖化反応に使用される。セルラーゼ組成物の調整方法は特に限定はされないが、培養液に含まれるトリコデルマ属真菌の菌体が除去、もしくは生育していないことが好ましい。これはセルラーゼ組成物とバイオマスを糖化反応する際に生じるグルコースやキシロオリゴ糖が菌体により消費されるのを防ぐためである。菌体の除去方法としては、遠心分離、膜分離などが例として挙げられる。菌体が生育しないようにする処理方法としては、熱処理、薬剤処理、酸・アルカリ処理、UV処理などが挙げられる。

[0041] トリコデルマ属真菌を培養して得られたセルラーゼ組成物を用いて糖を製造する方法は特に限定されないが、セルラーゼ組成物でバイオマスを糖化することができる。糖化反応に使用するバイオマスは上述したセルロースとキシランを含むバイオマスが利用できる。また、糖化反応に使用するバイオマ

スとはあらかじめ前処理を行っていても良い。前処理方法としては、特に限定されないが、具体的には、酸処理、硫酸処理、希硫酸処理、アルカリ処理、水熱処理、亜臨界処理、微粉碎処理、蒸煮処理など公知の手法を用いることができる。また、反応pHに関しても特に限定はされないが、pHが3から7付近が好ましく、より好ましくは4から6であり、より好ましくは5付近である。反応温度についても特に限定はされないが、40度から70度が好ましい。

[0042] 糖化反応によって、キシロオリゴ糖を得ることが出来る。またはキシロオリゴ糖とグルコースを得ることができる。キシロオリゴ糖とグルコース以外に、セルラーゼ組成物に含まれる加水分解酵素によって生じたマンノース、アラビノース、ガラクトースなどの単糖や、セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、マンノビオース、ガラクトビオースなどのオリゴ糖などが含まれていてもよい。

[0043] 本発明の糖化反応から製造される反応後液には、不純物として、無機塩、アミノ酸、タンパク質、リグニンなども含まれていてもよく、またこれらの不純物を除去するために、精製操作を行ってもよい。精製操作としては、イオン交換、膜分離、晶析、脱塩など公知の手法が適用できる。

[0044] 本発明により製造された単糖画分（グルコース、キシロース等）とキシロオリゴ糖等画分は後工程により分離されることが好ましい。グルコースは発酵原料として化学品の製造に好ましく使用され、キシロオリゴ糖は飼料や食品、化粧品用途に好ましく使用される。化学品の具体例としては、エタノール、1, 3-プロパンジオール、1, 4-ブタンジオール、グリセロールなどのアルコール、酢酸、乳酸、ピルビン酸、コハク酸、リンゴ酸、イタコン酸、クエン酸などの有機酸、イノシン、グアノシンなどのヌクレオシド、イノシン酸、グアニル酸などのヌクレオチド、カダベリンなどのアミン化合物を挙げることができる。一方、キシロースは発酵原料として使用できる微生物が限られている。さらにキシロースは飼料として豚等に与えると半分程度が尿として排出されてしまう。このため、キシランおよびキシロオリゴ糖が

らキシロースへの分解を最小限に抑え、キシロオリゴ糖収率を向上させることが好ましい。

[0045] 本発明で単糖画分とキシロオリゴ糖画分の分離方法は特に限定はされないが、膜分離が好ましく用いられる。この際にキシロースの割合が少ないほどキシロオリゴ糖、セロビオースなどオリゴ糖画分に混入するキシロースの量が低下するため、膜分離工程において有利に働く。

[0046] 本発明では更にキシロオリゴ糖とグルコースの製造に適したセルラーゼ組成物も提供する。本発明のセルラーゼ組成物は β -キシロシダーゼ活性、セロビオヒドラーゼ活性、 β -グルコシダーゼ活性、タンパク質濃度が以下の特徴を有するように定義される。 β -キシロシダーゼ活性は上述したように測定することができ、その値は具体的には該セルラーゼ組成物中のタンパク質1mg当たり0.006U/mg protein以下であり、さらに好ましくは0.005U/mg protein以下、さらに好ましくは0.004U/mg protein以下、さらに好ましくは0.003U/mg protein以下、さらに好ましくは0.002U/mg protein以下である。セロビオヒドラーゼ活性は上述したように測定することができ、その値は具体的には該セルラーゼ組成物中のタンパク質1mg当たり0.100U/mg protein以上であることが好ましく、さらに好ましくは0.120U/mg protein以上であり、さらに好ましくは0.150U/mg protein以上であり、さらに好ましくは0.160U/mg protein以上である。 β -グルコシダーゼ活性は上述したように測定することができ、その値は具体的には該セルラーゼ組成物中のタンパク質1mg当たり0.200U/mg protein以上であることが好ましく、さらに好ましくは0.250U/mg protein以上であり、さらに好ましくは0.280U/mg protein以上であり、さらに好ましくは0.300U/mg protein以上であり、さらに好ましくは0.320U/mg protein以上である。タンパク質濃度は上述したように測定することができ、その値は3g/L以上が好

ましく、さらに好ましくは4 g/L以上であり、さらに好ましくは5 g/L以上であり、さらに好ましくは6 g/L以上であり、さらに好ましくは7 g/L以上であり、さらに好ましくは8 g/L以上であり、さらに好ましくは9 g/L以上である。

[0047] 本発明のセルラーゼ組成物はp-ニトロフェニル-β-D-キシロピオシドの分解活性を定義することで更にキシロオリゴ糖とグルコースの製造に適したセルラーゼ組成物を提供する。p-ニトロフェニル-β-D-キシロピオシドの分解活性はp-ニトロフェニル-β-D-キシロピオシドを基質として活性を測定することができる。具体的には以下の通りである。セルラーゼの最適pHであるpH5.0に調整した50mM酢酸ナトリウム緩衝液に、0.5mMとなるようにp-ニトロフェニル-β-D-キシロピオシドを溶解したものを基質溶液として、90μLの基質溶液に酵素液10μLを添加し、30℃で静置反応させる。反応時間は30分間を基本とし、酵素活性の高さに応じて10~60分間まで適宜変更する。反応後、炭酸ナトリウム溶液10μLを添加して反応を停止させ、405nmの吸光度を測定することでp-ニトロフェノールを定量する。上記反応系にて、1分間に1μmolのp-ニトロフェノールを生成する酵素量を1Uとして定義する。本発明で得られたセルラーゼ組成物のp-ニトロフェニル-β-D-キシロピオシドの分解活性の値は2 U/mg protein以上であることが好ましく、さらに好ましくは3 U/mg protein以上であり、さらに好ましくは4 U/mg protein以上であり、さらに好ましくは5 U/mg protein以上であり、さらに好ましくは6 U/mg protein以上である。

[0048] 上記のとおり、本発明によりトリコデルマ属真菌によりタンパク質の製造することにより溶存酸素飽和度の減少が抑制されるので、本発明は、また、セルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤としてトリコデルマ属真菌を培養する際の溶存酸素飽和度の減少を抑制する方法であって、前記トリコデルマ属真菌として、BXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を用いる、溶存酸素飽和度の減少抑制方法をも提供するものである。

実施例

[0049] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0050] 参考例1 タンパク質濃度測定方法

市販のタンパク質濃度測定試薬 (Quick Start Bradford プロテインアッセイ、Bio-Rad 製) を使用した。室温に戻したタンパク質濃度測定試薬 250 μ L に希釈した糸状菌由来セルラーゼ溶液を 5 μ L 添加し、室温で 5 分間静置後の 595 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。標準品として BSA を使用し、検量線に照らし合わせてタンパク質濃度を算出した。

[0051] 参考例2 β -キシロシダーゼ活性測定方法

1 mM p-ニトロフェニル- β -キシロピラノシド (シグマアルドリッチジャパン社製) を含有する 50 mM 酢酸バッファー 90 μ L に酵素希釈液 10 μ L を添加し 30°C で 30 分間反応させた。その後、2 M 炭酸ナトリウム 10 μ L を加えてよく混合して反応を停止し、405 nm の吸光度の増加を測定した。1 分間あたり 1 μ mol の p-ニトロフェノールを遊離する活性を 1 U と定義した。ブランクは 1 mM p-ニトロフェニル- β -キシロピラノシドを含有する 50 mM 酢酸バッファー 90 μ L に 2 M 炭酸ナトリウム 10 μ L を加えてよく混合し、その後酵素希釈液 10 μ L を添加し 30°C で 30 分間反応させた。その後、405 nm の吸光度の増加を測定した。この際に 405 nm の吸光度が 1 を超えないように酵素液を希釈しておいた。また、検量線は p-ニトロフェノール溶液を濃度 0.1 mM、0.2 mM、1 mM、2 mM になるように調製し、酵素希釈液の代わりに 10 μ L を入れ、2 M 炭酸ナトリウム 10 μ L を加えてよく混合して発色させ、測定した吸光度から作成した。

[0052] 参考例3 β -グルコシダーゼ活性測定方法

1 mM p-ニトロフェニル- β -グルコピラノシド (シグマアルドリッチジャパン社製) を含有する 50 mM 酢酸バッファー 90 μ L に酵素希釈液 10 μ L

Lを添加して30℃で10分間反応させた。その後2M炭酸ナトリウム10μLを加えてよく混合して反応を停止し、405nmの吸光度の増加を測定した。1分間あたり1μmolのp-ニトロフェノールを遊離する活性を1Uと定義した。ブランクは1mMp-ニトロフェニル-β-グルコピラノシドを含有する50mM酢酸バッファー90μLに2M炭酸ナトリウム10μLを加えてよく混合し、その後酵素希釈液10μLを添加し30℃で30分間反応させた。その後、405nmの吸光度の増加を測定した。この際に405nmの吸光度が1を超えないように酵素液を希釈しておいた。また、検量線はp-ニトロフェノール溶液を濃度0.1mM、0.2mM、1mM、2mMになるように調製し、酵素希釈液の代わりに10μLを入れ、2M炭酸ナトリウム10μLを加えてよく混合して発色させ、測定した吸光度から作成した。

[0053] 参考例4 セロビオヒドロラーゼ活性測定方法

1mMp-ニトロフェニル-β-ラクトピラノシド（シグマアルドリッチジャパン社製）を含有する50mM酢酸バッファー90μLに酵素希釈液10μLを添加し30℃で60分間反応させた。その後、2M炭酸ナトリウム10μLを加えてよく混合して反応を停止し、405nmの吸光度の増加を測定した。1分間あたり1μmolのp-ニトロフェノールを遊離する活性を1Uと定義した。ブランクは1mMp-ニトロフェニル-β-ラクトピラノシドを含有する50mM酢酸バッファー90μLに2M炭酸ナトリウム10μLを加えてよく混合し、その後酵素希釈液10μLを添加し30℃で30分間反応させた。その後、405nmの吸光度の増加を測定した。この際に405nmの吸光度が1を超えないように酵素液を希釈しておいた。また、検量線はp-ニトロフェノール溶液を濃度0.1mM、0.2mM、1mM、2mMになるように調製し、酵素希釈液の代わりに10μLを入れ、2M炭酸ナトリウム10μLを加えてよく混合して発色させ、測定した吸光度から作成した。

[0054] 参考例5 p-ニトロフェニル-β-D-キシロピオシドの分解活性測定方法

0. 5 mM p-ニトロフェニル- β -ラクトピラノシド（社製）を含有する 50 mM 酢酸バッファー 90 μ L に酵素希釈液 10 μ L を添加し 50°C で 30 分間反応させた。その後、2 M 炭酸ナトリウム 10 μ L を加えてよく混合して反応を停止し、405 nm の吸光度の増加を測定した。1 分間あたり 1 μ mol の p-ニトロフェノールを遊離する活性を 1 U と定義した。ブランクは 1 mM p-ニトロフェニル- β -キシロピオシドを含有する 50 mM 酢酸バッファー 90 μ L に 2 M 炭酸ナトリウム 10 μ L を加えてよく混合し、その後酵素希釈液 10 μ L を添加し 30°C で 30 分間反応させた。その後、405 nm の吸光度の増加を測定した。この際に 405 nm の吸光度が 1 を超えないように酵素液を希釈しておいた。また、検量線は p-ニトロフェノール溶液を濃度 0. 1 mM、0. 2 mM、1 mM、2 mM になるように調製し、酵素希釈液の代わりに 10 μ L を入れ、2 M 炭酸ナトリウム 10 μ L を加えてよく混合して発色させ、測定した吸光度から作成した。

[0055] 参考例 6 糖濃度の測定

キシロオリゴ糖、グルコース、キシロースは、日立高速液体クロマトグラフ LaChrom Elite (HITACHI) を用いて、以下の条件で定量分析した。

[0056] キシロオリゴ糖であるキシロピオース、キシロトリオース、キシロテトラオース、キシロペンタオース、キシロヘキサオース、およびグルコース、キシロースの標品で作製した検量線をもとに、定量分析した。なお、本実施例で記すキシロオリゴ糖とは、キシロース単位が β グリコシド結合により 2～6 個結合したキシロオリゴ糖を指す。

カラム：KS802、KS803 (Shodex)

移動相：水

検出方法：RI

流速：0. 5 mL/min

温度：75°C

[0057] 実施例 1 PC-3-7 株の BXL1 遺伝子破壊組み換え株の作製

PC-3-7株のBXL1遺伝子のORF領域を、アセトアミドダーゼ（AmdS）遺伝子で置換することによって、PC-3-7/ Δ BXL1株を作製し、BXL1遺伝子が破壊された株として以下の実験に用いた。すなわち、AmdS遺伝子を含むDNA配列の上流及び下流に、BXL1遺伝子座の導入目的箇所に相同的な部分を付加するように破壊用プラスミドを作製し、デザインしたプライマー（配列番号1、配列番号2）を用いて相同領域を含んだAmdS遺伝子をPCRで増幅させ、得られたPCR断片をPC-3-7株に形質転換した。形質転換は、標準的な方法であるプロトプラスト-PEG法で行った。より具体的には、相同組み換え及び形質転換はGene, 61, 165-176 (1987)に記載されたようにして行った。

[0058] 比較例1 PC-3-7を用いたセルロースとキシランを含むバイオマス誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

前培養

トリコデルマ・リーセイ PC-3-7株の胞子を 1.0×10^7 /mLになるように生理食塩水で希釈し、その希釈胞子溶液2.5mLを1Lバツフル付フラスコに入れた表1に記した組成で構成される前培養液250mLへ接種させた。接種させた前培養液を28℃、160rpmの培養条件にて3日間培養を行った。この際の培養液当たりの乾燥菌体量を測定したところ、11mg/mLであった。

[0059] [表1]

成分	1L当たり
D-グルコース	20g
5×マンデルス**	200mL
10×酒石酸アンモニウム	100mL
コーンスティープリカー	15g
微量元素*	1mL
Tween 80	0.5mL
消泡剤 (PE-M)	1mL

*微量元素溶液は、0.3g/L H_3BO_3 、1.3g/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 、5g/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、2g/L $CuSO_4 \cdot$

5 H₂O、0.4 g/L MnCl₂ · 4 H₂O、10 g/L ZnCl₂を含む。

**マンデルスは、7 g/L (NH₄)₂SO₄、10 g/L KH₂PO₄、3 g/L CaCl₂、3 g/L MgSO₄ · 7 H₂Oを含む。

[0060] 本培養

トリコデルマ・リーセイ PC-3-7株の前培養液10 mLをそれぞれ200 mL容ミニジャーに入れた表2に示した本培養液100 mL (バイオマス10 gをさらに含む)へ接種させ、28℃、700 rpm、1 vvm、pH5の培養条件にて5日間培養を行った。培養開始時のバイオマスの添加量を測定した結果、8重量% (wt/wt)であった。中和は3.3%アンモニアと0.2 N硫酸を使用した。使用したバイオマスは、セルロースとキシランを含むArboce1 (登録商標) (J. Rettenmaier & Sohne)を使用した。DO計は密閉型溶存酸素電極SDOC-12F-L120 (エイブル株式会社)を使用した。また、培養槽の加圧は行わなかった。

[0061] [表2]

成分	1 L当たり
バイオマス***	100 g
5×マンデルス**	200 mL
コーンステープリカー	25 g
微量元素*	1 mL
Tween 80	0.5 mL
消泡剤 (PE-M)	1 mL

*微量元素溶液は、0.3 g/L H₃BO₃、1.3 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O、5 g/L FeCl₃ · 6 H₂O、2 g/L CuSO₄ · 5 H₂O、0.4 g/L MnCl₂ · 4 H₂O、10 g/L ZnCl₂を含む。

**マンデルスは、7 g/L (NH₄)₂SO₄、10 g/L KH₂PO₄、3 g/L CaCl₂、3 g/L MgSO₄ · 7 H₂Oを含む。

***バイオマスは他成分を混合し、メスアップした後に添加する。

[0062] 培養液の採取

培養開始より1日おきに500 μ Lずつ培養液を採取した。そして、15,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cの条件下で10分間遠心分離を行い、上清を得た。その上清を0.22 μ mのフィルターでろ過し、そのろ液を培養上清液とし、タンパク質濃度を測定した。酵素活性測定には培養5日目の培養上清液を使用した(表3)。

[0063] [表3]

	比較例1	実施例2
使用株	PC-3-7	PC-3-7 / Δ BXL1
β -キシロシダーゼ活性 (U/mg protein)	0.400	0.0018
β -グルコシダーゼ活性 (U/mg protein)	0.300	0.330
セロビオヒドロラーゼ活性 (U/mg protein)	0.158	0.159

[0064] 酸素利用速度の算出

培養開始24時間後に酸素供給を停止し、培養液の溶存酸素量の値(DO値)の経時変化を10秒ごとに測定し、プロットした。プロットした曲線の中で対数的に減少している3点以上のプロットの傾きを求め、その傾きから酸素利用速度を求めた(表4)。

[0065]

[表4]

	比較例1	実施例2	比較例2	比較例3	比較例4	比較例5
使用株	PC-3 -7	PC-3 -7 /△BXL1	PC-3 -7	PC-3 -7 /△BXL1	PC-3 -7	PC-3 -7 /△BXL1
誘導剤	セルロースと キシラン	セルロースと キシラン	キシラン	キシラン	セルロース	セルロース
酸素利用速度 (mM/L/hr)	6.88	2.48	3.11	9.20	3.89	2.84
酸素利用速度割合 (BXL1破壊株 /親株)	100	36	100	296	100	73

[0066] 実施例2 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

使用株を実施例1で作製したトリコデルマ・リーセイ PC-3-7/△BXL1株にする以外は比較例1と同様にして、酵素活性（表3）、酸素利用速度（表4）を求めた。また、その際の前培養液当たりの乾燥菌体量を測定した結果、11mg/mLであり、親株（PC-3-7株）と同じであった。活性測定の結果、親株（PC-3-7株）と比較してβ-キシロシダーゼ活性が100分の1以下に低下し、β-グルコシダーゼ活性が増加していることが判明した。さらに、酸素利用速度は比較例1の親株の結果と比較して実施例2のPC-3-7/△BXL1株では半分以下の36%に低下していることが判明した。なお、誘導剤として用いたバイオマスは、Arboce1（商品名）であり、セルロース含有量が約80重量%、キシラン含有量が約20重量%である。

[0067] 比較例2 PC-3-7株を用いたキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

[0068] 誘導剤として、beech wood xylan（シグマアルドリッチ社製）を使用すること以外は比較例1と同様にして、酸素供給速度を算出した（表4）。

[0069] 比較例3 PC-3-7/△BXL1株を用いたキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

誘導剤として、beech wood xylan（シグマアルドリッチ社製）を使用し、使用株をトリコデルマ・リーセイ PC-3-7/△BXL1株にする以外は比較例1と同様にして、酸素利用速度（表4）を求めた。その結果、キシランを誘導剤として使用した場合には、親株（PC-3-7株）の培養結果（比較例2）と比較すると、比較例3の酸素利用速度は、親株の296%に増加した。

[0070] 比較例4 PC-3-7を用いたセルロースを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

誘導剤として、微結晶セルロースであるCellulose microcrystalline（Merck社製）を使用すること以外は比較例1と同様にして、酸素利用速度を算出した（表4）。

[0071] 比較例5 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

誘導剤として、Cellulose microcrystalline（Merck社製）を使用し、使用株をトリコデルマ・リーセイ PC-3-7/△BXL1株にする以外は比較例1と同様にして、酸素利用速度（表4）を求めた。その結果、セルロースを誘導剤として使用した場合には、親株（PC-3-7株）の培養結果（比較例4）と比較すると、比較例5の酸素利用速度は、親株の73%に低下した。

[0072] 比較例1～5と実施例2の培養結果から、セルロースとキシランを誘導剤として使用した場合、親株ではセルロース単独、またはキシラン単独を誘導剤として添加した場合と比較して酸素利用速度が著しく増加してしまうことがわかった。さらに、BXL1遺伝子を破壊することで、セルロースとキシランを誘導剤として使用した場合には酸素利用速度が著しく低下することがわかった。また、セルロースとキシラン、セルロース単独を誘導剤として添加した際に得られた培養液のタンパク質濃度はほぼ同等であった。一方、キ

シラン単独を誘導剤として添加した際に得られた培養液のタンパク質濃度は非常に低く、セルロースとキシランを誘導剤として添加した際と比較して10分の1以下に低下しており、タンパク質の製造に不適であることがわかった。

[0073] 比較例6 PC-3-7を用いたセルローとキシランを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

本培養液100mLに対し、誘導剤として、微結晶セルロースであるCellulose microcrystalline (Merck社製)を8.5g、beech wood xylan (シグマアルドリッチ社製)を1.5g使用すること以外は比較例1と同様にして、酸素利用速度を算出した(表5)。その結果、キシラン含有量が15重量%の誘導剤を使用した場合には、キシラン単独(比較例2)、またはセルロース単独(比較例4)の誘導剤を使用した場合と比較して、酸素利用速度は大幅に増加していることがわかった。

[0074] 実施例3 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルローとキシランを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

本培養液100mLに対し、誘導剤として、微結晶セルロースであるCellulose microcrystalline (Merck社製)を8.5g、beech wood xylan (シグマアルドリッチ社製)を1.5g使用すること以外は比較例1と同様にして、酸素利用速度を算出した(表5)。その結果、キシラン含有量が15重量%の誘導剤を使用した場合には、親株(PC-3-7株)の培養結果(比較例6)と比較すると、実施例3の酸素利用速度は、親株の56%に低下した。

[0075]

[表5]

	比較例6	実施例3	比較例7	実施例4	比較例8	実施例5
使用株	PC-3 -7	PC-3 -7 /△BXL1	PC-3 -7	PC-3 -7 /△BXL1	PC-3 -7	PC-3 -7 /△BXL1
キシラン重量%	15	15	30	30	40	40
酸素利用速度 (mM/L/hr)	6.11	3.42	5.52	3.01	5.63	4.70
酸素利用速度割合 (BXL1破壊株 /親株)	100	56	100	55	100	83
タンパク質 濃度(g/L)	9.00	10.15	8.50	9.55	5.90	6.50

[0076] 比較例7 PC-3-7を用いたセルローとキシランを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

本培養液100mLに対し、誘導剤として、微結晶セルロースであるCellulose microcrystalline (Merck社製)を7g、beech wood xylan (シグマアルドリッチ社製)を3g使用すること以外は比較例1と同様にして、酸素利用速度を算出した(表5)。その結果、キシラン含有量が30重量%の誘導剤を使用した場合には、キシラン単独(比較例2)、またはセルロース単独(比較例4)の誘導剤を使用した場合と比較して、酸素利用速度は大幅に増加していることがわかった。

[0077] 実施例4 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルローとキシランを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

本培養液100mLに対し、誘導剤として、微結晶セルロースであるCellulose microcrystalline (Merck社製)を7g、beech wood xylan (シグマアルドリッチ社製)を3g使用すること以外は比較例1と同様にして、酸素利用速度を算出した(表5)。その結果、キシラン含有量が30重量%の誘導剤を使用した場合には

、親株（PC-3-7株）の培養結果（比較例7）と比較すると、実施例4の酸素利用速度は、親株の55%に低下した。

[0078] 比較例8 PC-3-7を用いたセルローとキシランを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

本培養液100mLに対し、誘導剤として、微結晶セルロースであるCellulose microcrystalline（Merck社製）を6g、beech wood xylan（シグマアルドリッチ社製）を4g使用すること以外は比較例1と同様にして、酸素利用速度を算出した（表6）。その結果、キシラン含有量が30重量%の誘導剤を使用した場合には、キシラン単独（比較例2）、またはセルロース単独（比較例4）の誘導剤を使用した場合と比較して、酸素利用速度は大幅に増加していることがわかった。

[0079] 実施例5 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルローとキシランを誘導剤として添加した培養評価（誘導剤8%添加）

本培養液100mLに対し、誘導剤として、微結晶セルロースであるCellulose microcrystalline（Merck社製）を6g、beech wood xylan（シグマアルドリッチ社製）を4g使用すること以外は比較例1と同様にして、酸素利用速度を算出した（表6）。その結果、キシラン含有量が40重量%の誘導剤を使用した場合には、親株（PC-3-7株）の培養結果（比較例8）と比較すると、実施例5の酸素利用速度は、親株の85%に低下した。

[0080] 比較例6～8と実施例3～5の培養結果から、セルロースとキシランを誘導剤として使用した場合、親株ではセルロース単独、またはキシラン単独を誘導剤として添加した場合と比較して酸素利用速度が著しく増加してしまうことがわかった。さらに、BXL1遺伝子を破壊することで、セルロースとキシランを含み、キシラン含有量が15～40重量%である誘導剤として使用した場合には、親株と比較して酸素利用速度が著しく低下することがわかった。

[0081] 比較例9 PC-3-7株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養評価（5Lジャー）（誘導剤8%添加）

200mL容のジャーで酸素利用速度が減少するという効果が確認されたため、より大きい5Lスケールで培養し、全培養期間でのDO値推移を測定することにした。前培養は比較例1と同様にして行った。本培養はトリコデルマ・リーセイ PC-3-7株の前培養液250mLをそれぞれ5L容ミニジャーに入れた表2に示した本培養液2.5Lへ接種させ、28℃、700rpm、1vvm、pH5の培養条件にて5日間培養を行った。中和は10%アンモニアと1N硫酸を使用した。誘導剤であるセルロースとキシランを含むバイオマスとして、Arboce1（登録商標）（J. Rettenmaier & Sohne）を使用した。培養開始時のバイオマスの添加量を測定した結果、8重量%（wt/wt）であった。培養開始後、溶存酸素飽和度の推移を培養終了後まで測定し（図1）、最低飽和度を算出した（表6）。また、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した（表6）。DO計は密閉型溶存酸素電極SDOC-12F-L260（エイブル株式会社）を使用した。また、培養槽の加圧は行わなかった。

[0082] [表6]

	比較例9	実施例6	比較例10	実施例7
使用株	PC-3-7	PC-3-7 /△BXL1	PC-3-7	PC-3-7 /△BXL1
誘導剤 (%)	8	8	2	2
最低飽和度 (%)	45	60	83	87
タンパク質濃度 (g/L)	9.30	10.42	3.30	3.34

[0083] 実施例6 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養評価（5Lジャー）（誘導剤8%添加）

使用株をトリコデルマ・リーセイ PC-3-7/△BXL1株にする以

外は比較例9と同様にして、全培養期間の溶存酸素飽和度推移を測定し（図2）、最低飽和度を算出し（表6）、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した（表6）。その際、前培養の菌体量は比較例9と同じであった。その結果、比較例9の親株（PC-3-7）の培養結果と比較して実施例6のBXL1遺伝子破壊株では酸素要求性が低下して、最低飽和度が顕著に増加した。また、タンパク質濃度に関しても比較例9よりも12%増加していた。

[0084] 比較例10 PC-3-7株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養評価（5Lジャー）（誘導剤2%添加）

本培養培地を表7の組成にすること以外は比較例9と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した（表6）。培養開始時のバイオマスの添加量を測定した結果、2重量%（wt/wt）であった。

[0085] [表7]

成分	1L当たり
バイオマス	20g
5×マンデルス**	200mL
コーンステーパーリカー	25g
微量元素*	1mL
Tween80	0.5mL
消泡剤（PE-M）	1mL

*微量元素溶液は、0.3g/L H_3BO_3 、1.3g/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 、5g/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、2g/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.4g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、10g/L $ZnCl_2$ を含む。

**マンデルスは、7g/L $(NH_4)_2SO_4$ 、10g/L KH_2PO_4 、3g/L $CaCl_2$ 、3g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を含む。

***バイオマスは他成分を混合し、メスアップした後に添加する。

[0086] 実施例7 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養評価（5Lジャー）（誘導剤2%添加）

使用株をトリコデルマ・リーセイ PC-3-7/△BXL1株にする以外は比較例10と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した(表6)。比較例10の結果と比較すると、誘導剤2%の場合においても最低飽和度が増加し、タンパク質濃度は親株よりも1%増加することが判明した。

[0087] 比較例11 PC-3-7株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマス誘導剤として添加した培養評価(5Lジャー)(誘導剤4%添加)

本培養培地に添加するバイオマスを培地1Lに対して46gに変更し、その他成分は表7の組成にし、比較例9と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した(表8)。培養開始時のバイオマスの添加量を測定した結果、4重量%(wt/wt)であった。

[0088] 実施例8 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマス誘導剤として添加した培養評価(5Lジャー)(誘導剤4%添加)

使用株をトリコデルマ・リーセイ PC-3-7/△BXL1株にする以外は比較例11と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した(表8)。さらに、活性を測定した(表10)。比較例11の結果と比較すると、誘導剤4%の場合においても最低飽和度が増加し、タンパク質濃度は親株よりも1%増加することが判明した。

[0089] 比較例12 PC-3-7株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマス誘導剤として添加した培養評価(5Lジャー)(誘導剤5%添加)

本培養培地に添加するバイオマスを培地1Lに対して58gに変更し、その他成分は表7の組成にし、比較例9と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した(表8)。培養開始時のバイオマスの添加量を測定した結果、5重量%(wt/wt)であった。

[0090] 実施例9 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマス誘導剤として添加した培養評価(5Lジャー)(誘導剤5%添加)

使用株をトリコデルマ・リーセイ PC-3-7/△BXL1株にする以外は比較例12と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した(表8)。さらに、活性を測定した(表10)。比較例12の結果と比較すると、誘導剤5%の場合においても最低飽和度が増加し、タンパク質濃度は親株よりも8%増加することが判明した。

[0091] 比較例13 PC-3-7株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマス誘導剤として添加した培養評価(5Lジャー)(誘導剤6%添加)

本培養培地に添加するバイオマスを培地1Lに対して70gに変更し、その他成分は表7の組成にし、比較例9と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した(表9)。培養開始時のバイオマスの添加量を測定した結果、6重量%(wt/wt)であった。

[0092] 実施例10 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマス誘導剤として添加した培養評価(5Lジャー)(誘導剤6%添加)

使用株をトリコデルマ・リーセイ PC-3-7/△BXL1株にする以外は比較例13と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した(表9)。さらに、活性を測定した(表10)。比較例13の結果と比較すると、誘導剤6%の場合においても最低飽和度が増加し、タンパク質濃度は親株よりも10%増加することが判明した。

[0093] 比較例14 PC-3-7株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマス誘導剤として添加した培養評価(5Lジャー)(誘導剤7%添加)

本培養培地に添加するバイオマスを培地1Lに対して83gに変更し、その他成分は表7の組成にし、比較例9と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した(表9)。培養開始時のバイオマスの添加量を測定した結果、7重量%(wt/wt)であった。

[0094] 実施例11 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマス誘導剤として添加した培養評価(5Lジャー)(誘導剤7%添加)

使用株をトリコデルマ・リーセイ PC-3-7/△BXL1株にする以外は比較例14と同様にして、最低飽和度を算出し、培養開始4日後のタンパク質濃度を測定した(表9)。さらに、活性を測定した(表10)。比較例14の結果と比較すると、誘導剤7%の場合においても最低飽和度が増加し、タンパク質濃度は親株よりも11%増加することが判明した。

[0095] 比較例9～14、実施例6～11の結果から、本発明のBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌をセルロースとキシランを含む誘導剤を添加して培養した際に、誘導剤の添加量を増加させるほど、親株よりも最低飽和度がより高くなることが判明した。さらに、誘導剤の添加量を5重量%以上にすると、親株よりもタンパク質濃度が顕著に増加し、よりタンパク質の製造に適することが判明した。

[0096] [表8]

	比較例11	実施例8	比較例12	実施例9
使用株	PC-3-7	PC-3-7 /△BXL1	PC-3-7	PC-3-7 /△BXL1
誘導剤 (%)	4	4	5	5
最低飽和度 (%)	80	85	70	77
タンパク質濃度 (g/L)	5.01	5.07	6.20	6.70

[0097] [表9]

	比較例13	実施例10	比較例14	実施例11
使用株	PC-3-7	PC-3-7 /△BXL1	PC-3-7	PC-3-7 /△BXL1
誘導剤 (%)	6	6	7	7
最低飽和度 (%)	60	70	52	64
タンパク質濃度 (g/L)	7.10	7.86	7.90	8.80

[0098]

[表10]

	実施例8	実施例9	実施例10	実施例11
誘導剤 (%)	4	5	6	7
β -キシロシダーゼ活性 (U/mg protein)	0.005	0.003	0.002	0.0019
β -グルコシダーゼ活性 (U/mg protein)	0.285	0.290	0.315	0.320
セロビオヒドロラーゼ活性 (U/mg protein)	0.162	0.163	0.167	0.168
p-ニトロフェニル- β -D-キシロピオシド分解活性 (U/mg protein)	4.20	4.40	5.01	5.20

[0099] 比較例15 PC-3-7株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（誘導剤8%添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

比較例9で得られた培養開始4日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。得られたろ過液は糖化反応に使用した。糖化反応に使用したバガスはアルカリ処理（前処理）を行ったバガスを使用した。糖化反応は以下のようにして行った。2 mLチューブの中にアルカリ処理をしたバガスを乾燥重量50 mg分入れ、バガスの固形分濃度が反応開始時に5重量%となるように純水を加えつつ、希塩酸を用いてpH 5.0に調整した。pHを調整した前処理物に8 mg/gバイオマスになるようにセルラーゼ組成物（タンパク質）を添加して、ヒートブロックローターを用いてpH 5.0、50°Cの反応条件で反応を開始した。反応中は適宜pH 5になるように調整を行った。8時間後に99度の湯浴に5分間浸けて反応を停止した。反応液は8,000×gの条件下で5分間遠心分離を行い、上清を得た。その上清を0.22 μ mのフィルターでろ過し、そのろ液を参考例5に従いキシロオリゴ糖とグルコースの分析に供した。キシロオリゴ糖の結果を表11に、グルコースの結果を表12に示す。

[0100] [表11]

	比較例 1 5	実施例 1 2
使用株	PC-3-7	PC-3-7 /△BXL1
キシロヘキソース (g/L)	0.00	0.00
キシロペントース (g/L)	0.00	0.00
キシロテトラオース (g/L)	0.77	0.90
キシロトリオース (g/L)	0.00	0.37
キシロピオース (g/L)	0.00	5.68
キシロース (g/L)	9.17	2.92
キシロオリゴ糖合計 (g/L)	0.77	6.95
キシロース/ (キシロース+キシ ロオリゴ糖) (%)	92.3	29.6

[0101] [表12]

	比較例 1 5	実施例 1 2
使用株	PC-3-7	PC-3-7 /△BXL1
グルコース (g/L)	9.19	10.3

[0102] 実施例 1 2 PC-3-7/△BXL1 株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（誘導剤 8% 添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

実施例 6 で得られた培養開始 4 日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。糖化反応は比較例 1 5 と同様にし

て行い、キシロオリゴ糖とグルコースの分析に供した（表 1 1、表 1 2）。その結果、親株（PC-3-7）と比較して BXL 1 破壊株ではキシロオリゴ糖の収量が顕著に増加していることが判明した。さらに、グルコースの収量も親株と比較して増加していることが判明した。

[0103] 比較例 1 6 PC-3-7 株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（キシラン含有率 15%、誘導剤 8% 添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

比較例 6 で得られた培養開始 4 日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。糖化反応は比較例 1 5 と同様に行い、グルコースの分析に供した（表 1 3）。

[0104] 実施例 1 3 PC-3-7 / Δ BXL 1 株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（キシラン含有率 15%、誘導剤 8% 添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

実施例 3 で得られた培養開始 4 日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。糖化反応は比較例 1 5 と同様に行い、グルコースの分析に供した（表 1 3）。

[0105] 比較例 1 7 PC-3-7 株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（キシラン含有率 30%、誘導剤 8% 添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

比較例 7 で得られた培養開始 4 日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。糖化反応は比較例 1 5 と同様に行い、グルコースの分析に供した（表 1 3）。

[0106] 実施例 1 4 PC-3-7 / Δ BXL 1 株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（キシラン含有率 30%、誘導剤 8% 添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

実施例 4 で得られた培養開始 4 日後の培養液を遠心分離した後、上清を限

外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。糖化反応は比較例 15 と同様にして行い、グルコースの分析に供した（表 13）。

[0107] 比較例 18 PC-3-7 株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（キシラン含有率 40%、誘導剤 8% 添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

比較例 8 で得られた培養開始 4 日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。糖化反応は比較例 15 と同様にして行い、グルコースの分析に供した（表 14）。

[0108] 実施例 15 PC-3-7/ΔBXL1 株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（キシラン含有率 40%、誘導剤 8% 添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

実施例 5 で得られた培養開始 4 日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。糖化反応は比較例 15 と同様にして行い、グルコースの分析に供した（表 14）。

[0109] 比較例 15～18、実施例 12～15 の結果から、本発明の BXL1 遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌をセルロースとキシランを含む誘導剤を添加して培養した際に得られたタンパク質をセルラーゼ組成物として使用し、セルロースとキシランを含むバイオマスに糖化反応させると、親株と比較してグルコースの収量が意外にも増加することが判明した。

[0110] [表13]

	比較例 16	実施例 13	比較例 17	実施例 14
使用株	PC-3-7	PC-3-7 /ΔBXL1	PC-3-7	PC-3-7 /ΔBXL1
キシラン含有率 (%)	15	15	30	30
グルコース (g/L)	9.00	9.30	9.10	10.00

[0111]

[表14]

	比較例 1 8	実施例 1 5
使用株	PC-3-7	PC-3-7 /△BXL1
キシラン含有率 (%)	40	40
グルコース (g/L)	8.40	8.80

[0112] 比較例 1 9 PC-3-7/△BXL1 株を用いたキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（誘導剤 8% 添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

比較例 3 で得られた培養開始 4 日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。培養開始 4 日後の培養液は遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。得られたろ過液は活性、タンパク質濃度を測定し（表 1 6）、糖化反応に使用した。糖化反応はセルラーゼ組成物（タンパク質）の添加量を 2 mg/g - バイオマスにすることと、反応時間を 24 時間にする以外は比較例 1 5 と同様に行い、キシロオリゴ糖の分析に供した（表 1 5）。

[0113]

[表15]

	比較例 19	比較例 20	実施例 16
誘導剤	キシラン	セルロース	セルロース とキシラン
キシロヘキソース (g/L)	0.00	0.00	0.00
キシロペントース (g/L)	0.24	0.22	0.25
キシロテトラオース (g/L)	1.05	1.09	1.07
キシロトリオース (g/L)	0.43	0.94	1.05
キシロピオース (g/L)	4.88	3.66	4.36
キシロース (g/L)	2.77	1.50	1.93
キシロオリゴ糖 (g/L)	6.60	5.91	6.73
キシロース/ (キシロース+キシ ロオリゴ糖) (%)	29.6	20.0	22.3

[0114] 比較例20 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（誘導剤8%添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

比較例5で得られた培養開始4日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。得られたろ過液は糖化反応に使用した。糖化反応は比較例19と同様にして行い、キシロオリゴ糖の分析に供した（表15）。

[0115] 実施例16 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（誘導剤8%添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

実施例2で得られた培養開始4日後の培養液を遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。得られたろ過液は活性、タンパク質濃度を測定し（表16）、その後糖化反応に使用した。糖化反応は比較例19と同様にして行い、キシロオリゴ糖の分析に供した（表15）。その結果、セルロースとキシランを誘導剤として添加した培養液が最もキシロオリゴ糖の収率が高くなった。二番目に収率が高かったのは、キシランを誘導剤とした場合であった。しかし、キシロース／（キシロース+キシロオリゴ糖）の割合がセルロースとキシランを誘導剤にした場合の方が低く、キシロオリゴ糖とキシロースの膜分離がより容易になることが判明した。さらにキシランを誘導剤として添加した培養では、セルロースとキシランを誘導剤とした場合の培養と比較して、タンパク質（セルラーゼ組成物）が10分の1程度しか生産されないため、糖化反応時により多くの培養液が必要になる。

[0116] 表10と表16の結果から、本発明のBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を培養する際に誘導剤の添加量を増加させると、得られるセルラーゼ組成物の β -キシロシダーゼ活性が低下し、さらに β -グルコシダーゼ活性、セロビオヒドロラーゼ活性が増加し、よりグルコースとキシロオリゴ糖の製造に適したセルラーゼ組成物になることが判明した。特に誘導剤の添加量を5重量%以上添加した際には2重量%添加した際と比較して、 β -キシロシダーゼ活性が2分の1以下に低下しているため、グルコースとキシロオリゴ糖製造により適している。また、特に誘導剤の添加量を6重量%以上添加した際には2重量%添加した際と比較して、 β -グルコシダーゼ活性が顕著に増加し、さらにグルコースとキシロオリゴ糖の製造に適する。

[0117]

[表16]

	実施例 16	実施例 17	比較例 19	比較例 21
誘導剤 (%)	8	2	8	2
誘導剤種類	セルロースとキシラン	セルロースとキシラン	キシラン	キシラン
β -キシロシダーゼ活性 (U/mg protein)	0.0018	0.006	0.009	0.018
β -グルコシダーゼ活性 (U/mg protein)	0.330	0.280	0.140	0.180
セロピオヒドロラーゼ活性 (U/mg protein)	0.170	0.160	0.066	0.071
p-ニトロフェニル- β -D-キシロピオシド分解活性 (U/mg protein)	5.50	4.01	1.10	1.67
タンパク質濃度 (g/L)	10.43	3.06	0.76	0.63

[0118] 比較例 21 PC-3-7/ Δ BXL1 株を用いたキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（誘導剤 2% 添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価

使用した株を PC-3-7/ Δ BXL1 株にし、本培養の組成を表 7 に示した組成にし、バイオマスに beech wood xylan（シグマアルドリッチ社製）を使用する以外は比較例 1 と同様の条件にて培養を行った。培養開始 4 日後の培養液は遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。得られたろ過液は活性、タンパク質濃度を測定し（表 16）、糖化反応に使用した。糖化反応は比較例 19 と同様に行い、キシロオリゴ糖とグルコースの分析に供した（表 17、表 18）。

[0119]

[表17]

	比較例 19	比較例 21	実施例 16	実施例 17
誘導剤	キシラン (8%)	キシラン (2%)	セルロースとキシラン (8%)	セルロースとキシラン (2%)
キシロヘキソース (g/L)	0.00	0.00	0.00	0.00
キシロペントース (g/L)	0.24	0.13	0.25	0.00
キシロテトラオース (g/L)	1.05	0.51	1.07	0.87
キシロトリオース (g/L)	0.43	0.36	1.05	0.49
キシロピオース (g/L)	4.88	4.40	4.36	4.54
キシロース (g/L)	2.77	2.92	1.93	1.93
キシロオリゴ糖 (g/L)	6.60	5.40	6.73	5.90
キシロース/ (キシロース+キシロオリゴ糖) (%)	29.6	35.1	22.3	24.6

[0120] [表18]

	比較例 19	比較例 21	実施例 16	実施例 17
誘導剤	キシラン (8%)	キシラン (2%)	セルロースとキシラン (8%)	セルロースとキシラン (2%)
グルコース (g/L)	3.13	3.59	6.45	5.05

[0121] 実施例17 PC-3-7/△BXL1株を用いたセルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤として添加した培養（誘導剤2%添加）から得られたセルラーゼ組成物を使用したバガスの糖化反応評価。

使用した株をPC-3-7/△BXL1株にし、本培養の組成を表7に示

した組成にする以外は比較例1と同様の条件にて培養を行った。培養開始4日後の培養液は遠心分離した後、上清を限外ろ過膜にてろ過し、菌体除去を行った。得られたろ過液は活性を測定した(表16)。その結果、誘導剤を8%添加した場合には、誘導剤を2%添加した場合と比較して β -キシロシダーゼの活性が低下し、 β -グルコシダーゼの活性、*p*-ニトロフェニル- β -D-キシロピオシドの分解活性が増加していた。その後、得られたろ過液は糖化反応に使用した。糖化反応は比較例19と同様にして行い、キシロオリゴ糖とグルコースの分析に供した(表17、表18)。その結果、誘導剤添加の割合が同じ場合には、キシランよりもセルロースとキシランを誘導剤としたほうが、キシロオリゴ糖収量、グルコース収量が増加していた。さらに、キシロース/(キシロース+キシロオリゴ糖)の割合がセルロースとキシランを誘導剤にした場合の方がキシランを誘導剤にした場合より低かった。また、セルロースとキシランを誘導剤とした場合には、誘導剤を2%よりも8%添加して培養して得られたセルラーゼ組成物を使用したほうが、キシロオリゴ糖、グルコースの収量が増加し、キシロース/(キシロース+キシロオリゴ糖)割合も低下していた。これらの結果から、セルロースとキシランを誘導剤として8%添加し培養して得られたセルラーゼ組成物が、最もキシロオリゴ糖とグルコースの生産に適していることがわかった。

産業上の利用可能性

- [0122] セルロースとキシランを誘導剤として添加した培養においても、BXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を使用することにより、溶存酸素飽和度が高い条件でタンパク質を製造することができ、スケールアップが容易になる。さらに、本発明で得られたタンパク質をセルラーゼ組成物として使用することでキシロオリゴ糖とグルコースを効率良く製造することができる。

請求の範囲

- [請求項1] セルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤としてBXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を培養することを含む、トリコデルマ属真菌によるタンパク質の製造方法。
- [請求項2] 前記誘導剤を5重量% (w t / w t) 以上培地に添加して培養する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記誘導剤に含まれるキシランの含有量が15～40重量%である請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記トリコデルマ属真菌がトリコデルマ・リーセイである、請求項1から3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] 前記トリコデルマ・リーセイがカーボン・カタボライト・リプレッションが解除されている株である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 前記タンパク質がセルラーゼ組成物である請求項1から5のいずれかに記載の方法。
- [請求項7] 前記セルラーゼ組成物の β -キシロシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.006U/mg protein以下、セロビオヒドロラーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-ラクトピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.1U/mg protein以上、 β -グルコシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.25U/mg protein以上である請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記 β -キシロシダーゼ比活性が0.002U/mg protein以下、前記 β -グルコシダーゼ比活性が0.3U/mg protein以上である請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 請求項6～8のいずれか1項に記載の方法により製造されたセルラ

ーゼ組成物でキシランとセルロースを含むバイオマスを加水分解する、キシロオリゴ糖の製造方法。

[請求項10] 請求項6～8のいずれか1項に記載の方法により製造されたセルラーゼ組成物でキシランとセルロースを含むバイオマスを加水分解する、キシロオリゴ糖とグルコースの製造方法。

[請求項11] セルロースとキシランを含むバイオマスを誘導剤としてトリコデルマ属真菌を培養する際の溶存酸素飽和度の減少を抑制する方法であって、前記トリコデルマ属真菌として、BXL1遺伝子が破壊されたトリコデルマ属真菌を用いる、溶存酸素飽和度の減少抑制方法。

[請求項12] 以下の(a)～(d)の特徴を有するセルラーゼ組成物。

(a) β -キシロシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.006U/mg protein以下

(b) セロビオヒドロラーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-ラクトピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.1U/mg protein以上

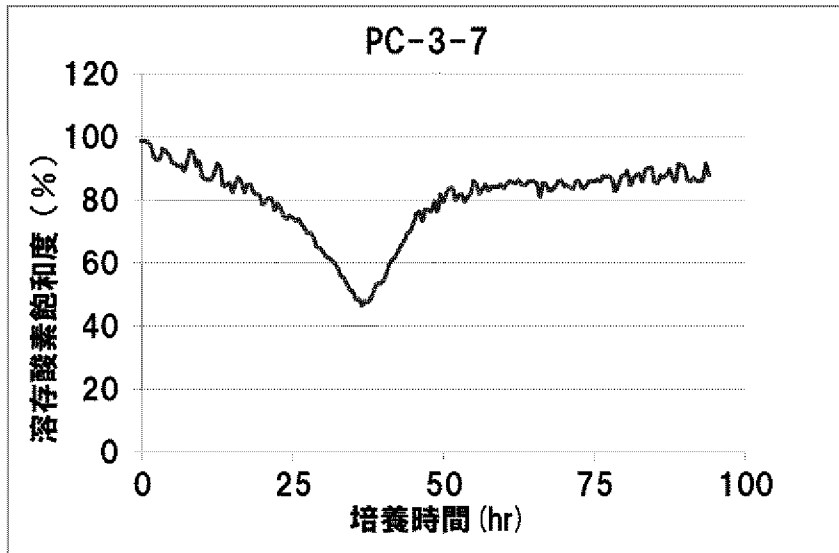
(c) β -グルコシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.25U/mg protein以上

(d) 該セルラーゼ組成物のタンパク質濃度が3g/L以上

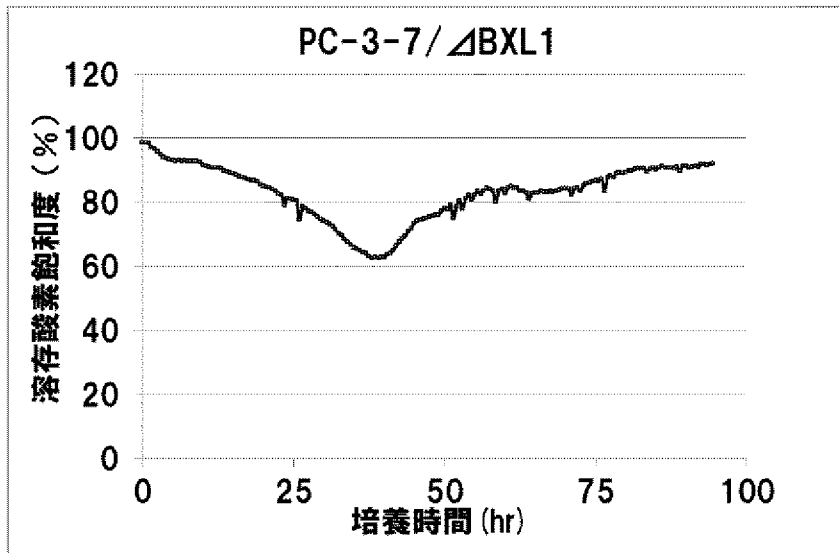
[請求項13] 前記タンパク質濃度が9g/L以上である、請求項12に記載のセルラーゼ組成物。

[請求項14] p-ニトロフェニル- β -D-キシロビオシドの分解活性が該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり5U/mg protein以上である、請求項12または13に記載のセルラーゼ組成物。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/013377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N9/42(2006.01)i, C12P19/14(2006.01)i, C13K1/02(2006.01)i, C13K13/00(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)

C12N15/09, C12N9/42, C12P19/14, C13K1/02, C13K13/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-515482 A (Danisco US Inc.), 09 May 2013 (09.05.2013), examples 4, 5 & US 2013/0143277 A1 & EP 2516663 A1 & WO 2011/079048 A2 examples 4, 5	1-14
A	XU J et al., A third xylanase from Trichoderma reesei PC-3-7, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, Vol.49, No.6, pp.718-724, p.718	1-14
A	WURLEITNER E et al., Transcriptional regulation of xyn2 in Hypocrea jecorina, Eukaryotic cell, Vol.2, No.1, 2003, pp.150-158, p.150	1-14

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

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 May 2017 (29.05.17)	Date of mailing of the international search report 06 June 2017 (06.06.17)
---	---

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/013377

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARGOLLES-CLARK E et al., Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from <i>Trichoderma reesei</i> by expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 1996, Vol.62, No.10, pp.3840-3846, Abstract	1-14
A	MAO LS et al., Study on production of xylo-oligosaccharides from xylan hydrolyzed by selectively purified endo-b-xyylanase, <i>Linchan Huaxue Yu Gongye</i> , 2006, Vol.26, No.1, pp.124-126, Abstract	1-14
A	HERRMANN MC et al., The β -d-xylosidase of <i>Trichoderma reesei</i> is a multifunctional β -d-xyylan xylohydrolase, <i>Biochemical Journal</i> , 1997, Vol.321, No.2, pp.375-381, Abstract	1-14
A	RASMUSSEN LE et al., Mode of action and properties of the beta-xylosidases from <i>Talaromyces emersonii</i> and <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Biotechnol. Bioeng.</i> , 2006, Vol.94, No.5, pp.869-876, Abstract	1-14
A	JP 11-507837 A (Danisco Ingredients A/S (Danisco A/S)), 13 July 1999 (13.07.1999), claims & US 6177261 B1 & EP 833922 A1 & WO 1997/000962 A1 claims	1-14
A	WO 2014/208493 A1 (Toray Industries, Inc.), 31 December 2014 (31.12.2014), paragraphs [0025], [0026] (Family: none)	1-14
A	WO 2015/099109 A1 (Toray Industries, Inc.), 02 July 2015 (02.07.2015), paragraph [0015] & US 2016/0326559 A1 & EP 3088530 A1 paragraph [0016]	1-14
A	JP 2009-171885 A (Nippon Paper Industries Co., Ltd.), 06 August 2009 (06.08.2009), paragraph [0025] (Family: none)	1-14
A	JIANG X et al., New isolate of <i>Trichoderma viride</i> strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production, <i>J. Biosci. Bioeng.</i> , 2011, Vol.111, No.2, pp.121-127, Abstract	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/013377

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAYN M et al., Separation and partial characterization of trichoderma reesei cellulase by fast chromatofocusing, Journal of Chromatography A, 1985, Vol.329, pp.379-387, Abstract	1-14
A	JP 2014-150745 A (Nagaoka University of Technology), 25 August 2014 (25.08.2014), paragraphs [0035], [0036] (Family: none)	1-14
A	JP 7-31467 A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 03 February 1995 (03.02.1995), claims (Family: none)	1-14
A	JP 2013-533751 A (Danisco US Inc.), 29 August 2013 (29.08.2013), claims & US 2013/0224864 A1 & EP 2609200 A1 & WO 2012/027580 A1 claims	1-14
P,A	WO 2016/068223 A1 (Toray Industries, Inc.), 06 May 2016 (06.05.2016), examples (Family: none)	1-14
P,A	WO 2016/100825 A1 (Danisco US Inc.), 23 June 2016 (23.06.2016), examples (Family: none)	1-14

Claim 12 of the present application involves any microorganism-origin cellulase compositions satisfying a requirement of "a composition of a cellulase having the following characteristics (a) to (d): (a) having a β -xylosidase specific activity, as an enzyme activity of degrading p-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, of not more than 0.006 U per mg of proteins in the cellulase composition; (b) having a cellobiohydrolase specific activity, as an enzyme activity of degrading p-nitrophenyl- β -D-lactopyranoside, of not less than 0.1 U per mg of proteins in the cellulase composition; (c) having a β -glucosidase specific activity, as an enzyme activity of degrading p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, of not less than 0.25 U per mg of proteins in the cellulase composition; and (d) the protein concentration of the cellulase composition being not less than 3 g/l". However, it is recognized that only "a composition of a cellulase originating from a fungi belonging to the genus *Trichoderma*" described in the description is exclusively disclosed under the provision of Article 5 of the PCT. Thus, claim 12 is not supported under the provision of Article 6 of the PCT.

Meanwhile, a meaningful search and examination can be made on "a composition of a cellulase originating from a fungi belonging to the genus *Trichoderma*, said composition having the following characteristics (a) to (d): (a) having a β -xylosidase specific activity, as an enzyme activity of degrading p-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, of not more than 0.006 U per mg of proteins in the cellulase composition; (b) having a cellobiohydrolase specific activity, as an enzyme activity of degrading p-nitrophenyl- β -D-lactopyranoside, of not less than 0.1 U per mg of proteins in the cellulase composition; (c) having a β -glucosidase specific activity, as an enzyme activity of degrading p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, of not less than 0.25 U per mg of proteins in the cellulase composition; and (d) the protein concentration of the cellulase composition being not less than 3 g/l". Thus, the above claim is not excluded from the scope of the search.

The search/examination has been carried out on said claims with limitation to the parts on which a meaningful search and examination can be made.

This is also applied to claims 13, 14.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N9/42(2006.01)i, C12P19/14(2006.01)i, C13K1/02(2006.01)i, C13K13/00(2006.01)i</p>															
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, C12N9/42, C12P19/14, C13K1/02, C13K13/00</p>															
<p>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</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2017年														
日本国実用新案登録公報	1996-2017年														
日本国登録実用新案公報	1994-2017年														
<p>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)</p> <p>JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq</p>															
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">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</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align:center;">A</td> <td>JP 2013-515482 A (ダニスコ・ユーエス・インク) 2013.05.09, 実施例 4, 5 & US 2013/0143277 A1 & EP 2516663 A1 & WO 2011/079048 A2, EXAMPLE4, EXAMPLE5</td> <td style="text-align:center;">1-14</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center;">A</td> <td>XU J et al., A third xylanase from Trichoderma reesei PC-3-7, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, Vol. 49, No. 6, pp. 718-724, p. 718</td> <td style="text-align:center;">1-14</td> </tr> </tbody> </table>				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	JP 2013-515482 A (ダニスコ・ユーエス・インク) 2013.05.09, 実施例 4, 5 & US 2013/0143277 A1 & EP 2516663 A1 & WO 2011/079048 A2, EXAMPLE4, EXAMPLE5	1-14	A	XU J et al., A third xylanase from Trichoderma reesei PC-3-7, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, Vol. 49, No. 6, pp. 718-724, p. 718	1-14			
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	JP 2013-515482 A (ダニスコ・ユーエス・インク) 2013.05.09, 実施例 4, 5 & US 2013/0143277 A1 & EP 2516663 A1 & WO 2011/079048 A2, EXAMPLE4, EXAMPLE5	1-14													
A	XU J et al., A third xylanase from Trichoderma reesei PC-3-7, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998, Vol. 49, No. 6, pp. 718-724, p. 718	1-14													
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>													
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>													
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align:center;">29.05.2017</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align:center;">06.06.2017</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align:center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td style="width:10%; text-align:center;">4N</td> <td style="width:10%; text-align:center;">3435</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align:center;">西村 亜希子</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="2">電話番号 03-3581-1101</td> <td colspan="2">内線 3488</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)		4N	3435	西村 亜希子				電話番号 03-3581-1101		内線 3488	
特許庁審査官 (権限のある職員)		4N	3435												
西村 亜希子															
電話番号 03-3581-1101		内線 3488													

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	WURLEITNER E et al., Transcriptional regulation of xyn2 in Hypocrea jecorina, Eukaryotic cell, Vol.2, No.1, 2003, pp.150-158, p.150	1-14
A	MARGOLLES-CLARK E et al., Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from Trichoderma reesei by expression in Saccharomyces cerevisiae, Appl. Environ. Microbiol., 1996, Vol.62, No.10, pp.3840-3846, Abstract	1-14
A	MAO LS et al., Study on production of xylo-oligosaccharides from xylan hydrolyzed by selectively purified endo-b-xylanase, Linchan Huaxue Yu Gongye, 2006, Vol.26, No.1, pp.124-126, Abstract	1-14
A	HERRMANN MC et al., The β -d-xylosidase of Trichoderma reesei is a multifunctional β -d-xylan xylohydrolase, Biochemical Journal, 1997, Vol.321, No.2, pp.375-381, Abstract	1-14
A	RASMUSSEN LE et al., Mode of action and properties of the beta-xylosidases from Talaromyces emersonii and Trichoderma reesei, Biotechnol. Bioeng., 2006, Vol.94, No.5, pp.869-876, Abstract	1-14
A	JP 11-507837 A (ダニスコ・イングレディエント・アー/エス (ダニスコ・アー/エス)) 1999.07.13, 特許請求の範囲 & US 6177261 B1 & EP 833922 A1 & WO 1997/000962 A1, Claims	1-14
A	WO 2014/208493 A1 (東レ株式会社) 2014.12.31, [0025],[0026] (ファミリーなし)	1-14
A	WO 2015/099109 A1 (東レ株式会社) 2015.07.02, [0015] & US 2016/0326559 A1 & EP 3088530 A1, [0016]	1-14
A	JP 2009-171885 A (日本製紙株式会社) 2009.08.06, [0025] (ファミリーなし)	1-14
A	JIANG X et al., New isolate of Trichoderma viride strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production, J. Biosci. Bioeng., 2011, Vol.111, No.2, pp.121-127, Abstract	1-14

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	HAYN M et al., Separation and partial characterization of trichoderma reesei cellulase by fast chromatofocusing, Journal of Chromatography A, 1985, Vol.329, pp.379-387, Abstract	1-14
A	JP 2014-150745 A (国立大学法人長岡技術科学大学) 2014.08.25, [0035], [0036] (ファミリーなし)	1-14
A	JP 7-31467 A (三井東圧化学株式会社) 1995.02.03, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-14
A	JP 2013-533751 A (ダニスコ・ユーエス・インク) 2013.08.29, 特許請求の範囲 & US 2013/0224864 A1 & EP 2609200 A1 & WO 2012/027580 A1, Claims	1-14
P, A	WO 2016/068223 A1 (東レ株式会社) 2016.05.06, 実施例 (ファミリーなし)	1-14
P, A	WO 2016/100825 A1 (DANISCO US INC) 2016.06.23, 実施例 (ファミリーなし)	1-14

本願の請求項12は「以下の(a)～(d)の特徴を有するセルラーゼ組成物。

(a) β -キシロシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.006U/mg protein以下

(b) セロビオヒドロラーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-ラクトピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.1U/mg protein以上

(c) β -グルコシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.25U/mg protein以上

(d) 該セルラーゼ組成物のタンパク質濃度が3g/L以上」というあらゆる微生物由来のセルラーゼ組成物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、明細書に記載された「トルコデルマ属真菌由来のセルラーゼ組成物」のみであり、PCT第6条の意味での裏付けを欠いている。

他方、「以下の(a)～(d)の特徴を有するトルコデルマ属真菌由来のセルラーゼ組成物。

(a) β -キシロシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.006U/mg protein以下

(b) セロビオヒドロラーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-ラクトピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.1U/mg protein以上

(c) β -グルコシダーゼ比活性がp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを分解する酵素活性として該セルラーゼ組成物のタンパク質1mg当たり0.25U/mg protein以上

(d) 該セルラーゼ組成物のタンパク質濃度が3g/L以上」については有意義な調査・審査を行うことができるため、上記請求項を除外対象とはしない。そして、前記有意義な調査・審査を行うことができる部分に限定して、当該請求項についての調査・審査を行った。このことは、請求項13、14についても同様である。