(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
2013 年 5 月 10 日(10.05.2013)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2013/065541 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/16 (2006.01) *C12P 7/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/077428

(22) 国際出願日: 2012 年 10 月 24 日(24.10.2012)

(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 2011-240158 2011 年 11 月 1 日(01.11.2011) JP

(71) 出願人: コスモ石油株式会社(COSMO OIL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1058528 東京都港区芝浦一丁目１番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 長崎　宏(NAGASAKI, Hiroshi); 〒3400193 埼玉県幸手市権現堂１１３４－２　コスモ石油株式会社中央研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町１丁目３番８号　沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示（規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii)）

WO 2013/065541 A1

(54) **Title**: NOVEL YEAST AND METHOD FOR PRODUCING ETHANOL USING SAME

(54) 発明の名称 : 新規酵母及びこれを用いたエタノールの生産方法

(57) **Abstract**: Provided are: novel yeast capable of producing ethanol with high efficiency within a short time from glucose and xylose in the co-presence of glucose and xylose; and a method for producing ethanol using the yeast. Yeast that is designated *Candida intermedia* 4-6-4T2 and is deposited under the accession number of FERM BP-11509.

(57) 要約:　グルコース及びキシロースとの共存下で、グルコース及びキシロースから短時間で効率良くエタノールを生産する能力を有する新規酵母及びこれを用いたエタノールの生産方法の提供。　カンジダ・インターメディア（Candida intermedia）４－６－４Ｔ２と命名され、ＦＥＲＭ　ＢＰ－１１５０９として寄託された酵母。

明　細　書

発明の名称 ： 新規酵母及びこれを用いたエタノールの生産方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規酵母及びこれを用いたエタノールの生産方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、地球温暖化対策として世界的に大規模なバイオエタノール生産が行われている。バイオエタノールの原料はトウモロコシやサトウキビ等の可食性のバイオマスが多くを占めており、斯様な可食性のバイオマスにおいては、バイオエタノール原料としての使用と、食糧としての使用との競合が問題となる。

斯かる問題を回避するために、食糧として使用されない木材や非可食性の草本等のセルロース系バイオマス（特に、農業残渣、林業残渣等から得られるもの）からエタノールを生産する技術の開発が求められている。

斯かる技術においては、セルロース系バイオマスに含まれるセルロースや、ヘミセルロース、これらの一部分解物である多糖類を加水分解し、六炭糖であるグルコース、マンノース及びガラクトースや五炭糖であるキシロースを主成分とする糖化液を得、この糖化液中の糖を微生物で発酵させることでエタノールが得られる。

[0003] グルコース及びマンノースから効率よくエタノールを生産可能な酵母として、サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）が知られているものの、キシロースやガラクトースから効率的にエタノールを生産できる微生物はわずかな種類しか存在しない。

例えば、グルコースだけでなくキシロースからもエタノールを生産可能な微生物の数少ない例として、ピキア・スティピティス（Pichia stipitis）、カンジダ・シハタエ（Candida shehatae）及びパチソレン・タノフィルス（Pachysolen tannophilus）や（非特許文献１）、カンジダ・インターメディア（Candida intermedia）が知られている（非特許文献２）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Yablochkova, EN., Bolotnikova, OI., Mikhailova, NP., Nemova, NN. And Ginak, AI. Applied Biochemistry and Microbiology, Vol.39, 302-306 (2003)

非特許文献2：Y. Morikawa,et al., Biotechnology and Bioengineering, Vol:XXVII, 509-513 (1984)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、非特許文献１に記載の酵母は、セルロース系バイオマス由来の原料液に含まれるグルコース及びキシロースの両方の存在下でエタノール発酵を行うと、グルコースによるカタボライトリプレッション（異化代謝産物抑制）によりグルコースがほぼ完全に消費されるまでキシロースはほとんど消費されないため発酵に時間を要し、エタノール生産性が低下するという問題があった。

また、非特許文献２に記載の酵母は、本発明者が検討したところ、製造条件によってはグルコースによるカタボライトリプレッションが生じにくく、グルコース及びキシロースの両方の存在下でエタノール発酵を行ってもその両方からエタノール発酵をすることが可能な場合もあるものの、キシロースの消費効率が悪く、キシロースからエタノールを生産する能力が十分でないという問題がある。

[0006] したがって、本発明の課題は、グルコース及びキシロースとの共存下で、グルコース及びキシロースから短時間で効率良くエタノールを生産する能力を有する新規酵母及びこれを用いたエタノールの生産方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] そこで、本発明者は、鋭意研究した結果、特定の酵母がグルコース及びキ

シロースとの共存下で、グルコース及びキシロースから短時間で効率良くエタノールを生産する能力を有することを見出し、本発明を完成した。

[0008] すなわち、本発明は、カンジダ・インターメディア（Candida intermedia）４－６－４Ｔ２と命名され、ＦＥＲＭ　ＢＰ－１１５０９として寄託された酵母を提供するものである。

[0009] また、本発明は、グルコース及びキシロースから選ばれる１種以上の単糖を含有する原料液体を、上記酵母を用いて発酵させる工程を含むことを特徴とするエタノールの生産方法を提供するものである。

発明の効果

[0010] 本発明の酵母は、グルコース及びキシロースとの共存下で、グルコース及びキシロースから短時間で効率良くエタノールを生産する能力を有する。また、斯かる酵母を用いれば、グルコースやキシロースを含有するセルロース系バイオマス由来の原料を用いた場合であっても短時間で効率良くエタノールを生産できる。

したがって、本発明のエタノールの生産方法によれば、セルロース系バイオマス由来の原料を用いて短時間で効率よくエタノールを生産することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]グルコース及びキシロースを親株で発酵させたときの各成分の経時変化を示す図である。

[図2]グルコース及びキシロースを４－６－４Ｔ２株で発酵させたときの各成分の経時変化を示す図である。

[図3]キシロースを親株で発酵させたときの各成分の経時変化を示す図である。

[図4]キシロースを４－６－４Ｔ２株で発酵させたときの各成分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] ＜酵母＞

本発明の酵母は、カンジダ・インターメディア（Candida intermedia）４－６－４Ｔ２と命名され、ＦＥＲＭ　ＢＰ－１１５０９として独立行政法人製品評価技術基盤機構　特許生物寄託センター（ＩＰＯＤ）（住所：日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６　〒305-8566）に平成２４年９月２０日に寄託された酵母である。斯かる酵母は、カンジタ・インターメディア（Candida intermedia）「ＮＢＲＣ１０６０１」を親株として、常法に従い自然変異させ、親株よりもエタノール生産能が高い株を選抜することにより取得したものである。なお、上記「ＮＢＲＣ１０６０１」は独立行政法人　製品評価技術基盤機構　特許生物寄託センター（ＩＰＯＤ）から入手可能な酵母である。

そして、本発明の酵母は、グルコース及びキシロースとの共存下で、グルコース及びキシロースから短時間で効率良くエタノールを生産する能力を有する。

ここで、グルコース及びキシロースとの共存下とは、少なくともグルコースとキシロースを含む原料液体（発酵液）中に本発明の酵母が共存することを意味する。従来の酵母は、前述のようにキシロースの消費効率が十分でないもの、或いはグルコース又はキシロースのうちいずれか一方からのエタノール生産能を有するものの、グルコース及びキシロースの両方が存在する場合は、カタボライトリプレッションによりグルコースが完全に消費されるまでキシロースがほとんど消費されないものであったが、本発明の酵母は、グルコース及びキシロースの両方が存在する場合であっても、その両方から短時間で効率よくエタノールを生産する能力を有する。

また、本発明の酵母は、グルコース及びキシロースを含有する原料液体から短時間で効率良くエタノールを生産するが、このとき副生成物としてのキシリトールがほとんど生成されない。また、本発明の酵母は、このような糖からのエタノールの生産能力以外については親株と同等の性質を有する。

[0013]　＜エタノール生産方法＞

本発明のエタノールの生産方法は、グルコース及びキシロースから選ばれ

る１種以上の単糖を含有する原料液体を、上記酵母を用いて発酵させる工程（以下、発酵工程ともいう）を含むことを特徴とする。斯かる生産方法によれば、短時間で効率良くエタノールを生産できる。

[0014] 酵母の使用量は特に限定されないが、上記単糖１質量部に対し、通常０．０１～１００質量部程度であり、好ましくは０．１～１０質量部である。

[0015] また、上記原料液体（例えば、糖化液）としては、グルコースとキシロースとを含むものが好ましい。また、これら単糖にくわえてマンノース、ガラクトース等の他の単糖（六炭糖）を含んでいてもよい。本発明の生産方法はカタボライトリプレッションの影響を受けにくいため、斯かる方法によれば、グルコースとともに上記のような単糖（キシロースや、マンノース、ガラクトース）を含んでいたとしても、効率よくエタノールを生産することができる。

[0016] また、上記原料液体がグルコース及びキシロースを含む場合、グルコースとキシロースの含有比率としては、グルコース１質量部に対し、キシロースが０．１～５質量部が好ましく、０．５～３質量部がより好ましい。本発明の酵母を用いれば、グルコースとキシロースの含有比率が上記のような範囲であっても、グルコースと同時にキシロースからもエタノールを生産できる。また、原料液体中のグルコース含有量及びキシロース含有量は、それぞれ１～１００ｇ／Ｌが好ましく、５～５０ｇ／Ｌがより好ましい。本発明の酵母を用いれば、グルコースやキシロースの含有量が斯様な範囲であってもエタノールを生産できる。また、原料液体に含まれる糖に対するグルコースの含有割合は特に限定されないが、原料液体に含まれる糖全量中、５～９９質量％が好ましく、１０～７０質量％がより好ましい。

[0017] また、上記原料液体に含まれる単糖の合計含有量としては１～１００ｇ／Ｌが好ましい。

[0018] また、エタノール生産に用いる原料液体は、動物由来のもの、植物由来のもの、工業廃棄物由来のもの等のいずれであってもよいが、植物由来のものが好ましく、バイオエタノール原料としての使用と食糧としての使用との競

合を避ける観点から、セルロース系バイオマスの加水分解物がより好ましい。ここで、セルロース系バイオマスとは、セルロースとヘミセルロースを含むバイオマスをいう。斯かるバイオマス中のセルロースが加水分解されることでグルコースが得られ、一方、ヘミセルロースが加水分解されることでグルコース、キシロース、マンノース、ガラクトースが得られる。

斯かるセルロース系バイオマスとしては、エタノール生産における経済的優位性の観点から、農業残渣（稲わら、麦わら等）、林業残渣（材木等）等から得られるものが好ましい。

[0019] また、上記原料液体のｐＨ（３０℃）は、好ましくは３．５～６．５であり、より好ましくは４～６であり、更に好ましくは４．５～５．５であり、特に好ましくは４．５～５である。本発明の酵母によれば、斯様な低ｐＨ領域であってもエタノール生産が可能であり、酢酸等を含有する糖化液（バイオマス系セルロースの酸加水分解物）を用いた場合でもエタノールを生産できる。

なお、酸を用いてセルロース系バイオマスを加水分解することによって得られる低ｐＨの糖化液には、微生物によるエタノール生産を阻害する酢酸等の阻害物質が含まれることが報告されており（Nigam JN. Journal of Applied Microbiology, Vol.90,208-215 (2001)）、特に、キシロースからエタノール生産可能な微生物は、ｐＨ５以下という低ｐＨ領域ではエタノール発酵が阻害されることが報告されている（Palmqvist E., Hahn-Hagardal B. Bioresource Technology Vol.74,25-33 (2000)）。

また、上記生産方法は、好ましくは２０～３５℃、より好ましくは２５～３０℃で行われる。

[0020] また、上記生産方法においては、上記酵母を生育条件におき生育させつつエタノールを生産してもよく、また、休止菌体状態、すなわち窒素源を酵母の生育には不十分な程度に制限しかつエタノールの原料となる炭素源が豊富な条件下におき、酵母の生育を止めた状態でエタノールを生産することもできる。このうち、酢酸や亜硫酸等のエタノール生産阻害物の影響を受けにく

いという点から、休止菌体の状態でエタノールを生産することが好ましい。休止菌体で生産を行う場合、酵母の濃度は５～１００ｇ／Ｌで行うことが好ましい。また、休止菌体でエタノールを生産する場合には、窒素源や酵母エキスなどを含有させなくてもよいが、リン酸緩衝液や水酸化ナトリウム等で前記のｐＨに調整することが好ましい。なお、エタノールの回収は、蒸留等の通常の手段で行えばよい。

[0021] また、上記生産方法においては、菌体量の観点から、上記発酵工程に先立って前培養を行うことが好ましい。斯かる前培養に用いる培地としては、グルコースと、マンノース、ガラクトース及びキシロースから選ばれる１種以上の糖を含有する培地が好ましい。斯様な培地として、前記セルロース系バイオマス加水分解物を含有するものを用いてもよい。

また、上記糖の濃度としては、合計で１～１００ｇ／Ｌが好ましく、１０～５０ｇ／Ｌがより好ましい。なお、マンノース、ガラクトース及びキシロースから選ばれる１種以上とグルコースとの含有量の比率は特に限定されない。

また、上記前培養において、セルロース系バイオマス加水分解物を炭素源として用いる場合、斯かる加水分解物の使用量は、通常、培地容量の２０容量％以下であるが、好ましくは１０容量％以下である。なお、培地に含まれる他の成分は特に限定されるものではないが、生育に適したアミノ酸、尿素、ポリペプトン、アミノ酸不含ニトロゲンベース等の窒素源；酵母エキス等が挙げられる。前培養の温度は、好ましくは１０℃～３７℃であり、より好ましくは２５℃～３０℃である。一方、ｐＨは、好ましくは４～７、より好ましくは４．５～６．５である。また、前培養は好気条件で行うことが好ましい。

実施例

[0022] 以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0023] 実施例１

以下の手順に従い、独立行政法人　製品評価技術基盤機構　特許生物寄託センター（ＩＰＯＤ）に保存されている酵母カンジタ・インターメディア（Candida intermedia）「ＮＢＲＣ１０６０１」を親株として、馴養及び自然変異により４－６－４Ｔ２株を取得した。

[0024] まず、グルコース及びキシロースをそれぞれ１質量％含有する酢酸水溶液のｐＨを水酸化マグネシウムにて５．０に調整し、この溶液２０％と液体培地（酵母エキス：１％、アミノ酸不含酵母ニトロゲンベース：２％）８０％を混合した。この混合溶液１０ｍＬにキシロースを１％添加し、酵母カンジタ・インターメディア（Candida intermedia）「ＮＢＲＣ１０６０１」を１白金耳植菌し、３０℃で３日間培養し培養液を得た。

次いで、上記と同様にしてｐＨを５．０に調整したグルコース及びキシロースをそれぞれ１質量％含有する酢酸水溶液と液体培地を５０％ずつ混合し、この混合液１０ｍＬに上記３日間培養した培養液を１００μＬ添加し、更に７日間培養した。更に、上記と同様にしてｐＨを５．０に調整したグルコース及びキシロースをそれぞれ１質量％含有する酢酸水溶液８０％と培地２０％を混合し、この混合液１０ｍＬに上記７日間培養した培養液を１００μＬ加え３０日間更に培養し、馴養株液とした。

上記馴養株液を１０００倍希釈し、ＹＮＢ寒天培地（グルコース：５％、酵母エキス：１％、アミノ酸不含酵母ニトロゲンベース：２％、寒天：２％）の培地に塗布し、２５℃で４日間培養した後、コロニーを形成した株を取得した。

[0025] 上記取得した株をＹＮＢ寒天培地（トレハロース：２％、酵母エキス：１％、アミノ酸不含酵母ニトロゲンベース：２％、寒天：２％）の培地に塗布し、２５℃で３日間培養した後、コロニーが形成されたのを確認し、４℃で保管した。４℃において拡大したコロニーを選抜し、リン酸緩衝液（キシロース：２．５％、KH_2PO_4：０．１Ｍ、ｐＨ＝５．０、ＭｇＳＯ４・７H_2O：０．００６Ｍ）でエタノール生産試験を実施し、親株よりもエタノール生産能の高い株を選抜した。

[0026] このようにして目的とする酵母を選抜し、これをカンジダ・インターメディア（Candida intermedia）４－６－４Ｔ２株と命名した。本菌株は、独立行政法人　製品評価技術基盤機構　特許生物寄託センター（ＩＰＯＤ）に寄託されており、その受託番号はＦＥＲＭ　ＢＰ－１１５０９である。

[0027] 実施例２

親株（ＮＢＲＣ１０６０１株）及び４－６－４Ｔ２株をＹＮＢ培地（グルコース：０．５％、キシロース：２％、酵母エキス：１％、アミノ酸不含酵母ニトロゲンベース：２％）にそれぞれ植菌し、３０℃、１２０ｒｐｍで振とう培養を行った（２４～４８時間、OD_{660}＝１８～２５）。培養液１ｍＬ中の乾燥菌体重量は経験的に得られた以下の関係式（１）にて算出した（式（１）によれば、例えばOD_{660}＝２０のとき乾燥菌体重量は０．００６２ｇに相当すると算出できる）。

[0028] 乾燥菌体重量（ｇ／ｍＬ）＝０．０００３２×OD_{660}－０．０００１７・・・（１）

[0029] 菌体量が乾燥重量で２％となるように必要量の培養液をそれぞれ遠心分離（３０００ｒｐｍ、２分）で回収し、リン酸緩衝液（KH_2PO_4／K_2HPO_4：０．０１Ｍ、ｐＨ＝５．０）に下記表１～４に示す糖（エタノール原料）を混合した発酵用液をそれぞれの菌体に添加して発酵させエタノール生産量の経時変化を確認した。結果を表１～４及び図１～４に示す。なお、表及び図中のＧはグルコースをＸはキシロースをそれぞれ示す。

[0030] [表1]

発酵（h）	EtOH((%)v/v)	Xylitol((%)w/v)	G((%)w/v)	X((%)w/v)
0	0	0	2.5	2.5
2	1.43	0.04	0	1.71
4	1.43	0.12	0	1.42
12	1.52	0.38	0	0.96
24	1.52	0.41	0	0.81

使用菌体:NBRC10601、糖:G(2.5%)+X(2.5%)

[0031] [表2]

発酵 (h)	EtOH((%)v/v)	Xylitol((%)w/v)	G((%)w/v)	X((%)w/v)
0	0	0	2.5	2.5
2	1.04	0.09	0.44	2.00
4	1.60	0.16	0	1.48
12	1.96	0.20	0	0.15
24	2.14	0.22	0	0

使用菌体:4−6−4T2、糖:G(2．5%)+X(2．5%)

[0032] [表3]

発酵 (h)	EtOH((%)v/v)	Xylitol((%)w/v)	X((%)w/v)
0	0	0	5
2	0.25	0.25	3.35
4	0.28	0.38	2.95
12	0.57	0.44	2.13
24	0.80	0.77	1.69

使用菌体:NBRC10601、糖:X(5%)

[0033] [表4]

発酵 (h)	EtOH((%)v/v)	Xylitol((%)w/v)	X((%)w/v)
0	0	0	5
2	0.43	0.06	3.25
4	0.81	0.06	2.16
12	1.42	0.13	0.81
24	1.75	0.15	0.23

使用菌体:4−6−4T2、糖:X(5%)

[0034] 表１及び図１に示すように、親株（２%）を用いて、グルコース及びキシロース（それぞれ２．５%）を炭素源としてエタノールを生産させた場合は、発酵初期ではグルコースとキシロースの双方は消費されエタノールが生産されているが、グルコースを消費しきったところでエタノール生産は停止し

、キシロースの消費もほとんど停止状態となっている。このことから、親株は、グルコースによるカタボライトリプレッションの影響をうけにくいものの、キシロースからのエタノール生産能が低いことがわかる。

これに対し、表２及び図２に示すように、４－６－４Ｔ２株（２％）を用いて、グルコースとキシロース（それぞれ２．５％）を炭素源としてエタノールを生産させた場合は、親株と同様に発酵初期でグルコースとキシロースの双方が消費されエタノールが生産されているだけでなく、グルコース消費後もキシロースの消費がほとんど変わらない速度で進行しており、グルコースだけでなくキシロースも充分に消費され、それに伴いエタノール生産量も増加している。このことから、４－６－４Ｔ２株は、グルコースによるカタボライトリプレッションの影響を受けにくい性質を親株から受け継ぎつつ、キシロースからのエタノール生産能が親株と比較して格段に向上したものであることがわかる。

[0035] また、表３及び図３に示すように、親株（２％）を用いて、キシロース（５％）を炭素源としてエタノールを生産させた場合は、発酵２４時間でも３０％以上のキシロースが残存した。

これに対し、表４及び図４に示すように、４－６－４Ｔ２株（２％）を用いて、キシロース（５％）を炭素源としてエタノールを生産させた場合は、発酵時間２４時間で９０％以上のキシロースが消費され、親株と比較して約１．４倍のエタノールが生産されていた。

[0036] ４－６－４Ｔ２株と親株でキシロースからのエタノール生産能力に差がある理由は必ずしも明らかではないが、キシロースからエタノールが生産される際の中間代謝物であるキシリトールが蓄積することでキシロースからのエタノール生産が抑制・阻害されるものと上記図１～４から推測される。

すなわち、上記親株を用いた発酵の経時変化を追った図１及び３と４－６－４Ｔ２株を用いた発酵の経時変化を追った図２及び４との比較から、いずれも親株ではキシリトールの生産量が多く、このキシリトールの増加に伴うようにしてキシロース消費が低下し、エタノール生産が停止する傾向がある

と考えられる。

[0037] このように本発明の酵母を用いることでエタノールを効率良く生産できるのは、グルコースによるカタボライトリプレッションの影響が少ないことと共に、キシリトールの生産が抑制されているためキシリトールによるエタノール生産性が阻害されにくいことも影響していると推察される。

[0038] 実施例３

表５に示す糖を含む発酵用液（リン酸緩衝液：０．０１Ｍ、ｐＨ５．０）に同表に示す酵母をそれぞれ２％乾燥重量相当添加し、１２時間後のエタノール生産量（％（ｖ／ｖ））を測定した。結果を表５に示す。

[0039]

［表5］

%(v/v)	4-6-4T-2	C. intermedia NBRC 10601	S. cerevisiae NBRC 0216	P. tannophilus ATCC32691	C. shehatae ATCC22984	P. stipits ATCC58785
Xylose(2.5%)	1.2	1.1	0.0	0.9	1.0	1.1
Xylose(2.5%)+ Glucose(2.5%)	2.3	1.9	1.2	2.0	2.0	2.2
Xylose(2.5%)+ Glucose(1.2%)+ Mannose(1.2%)	2.6	2.4	1.2	2.0	2.0	2.2
Xylose(2.5%)+ Glucose(1.2%)+ Galactose(1.2%)	2.6	2.5	1.2	1.5	2.0	2.2
Xylose(2.3%)+ Glucose(0.9%)+ Mannose(0.6%)+ Galactose(0.6%)	2.4	2.1	1.2	1.5	2.0	2.2

［0040］ 表５から、いずれの糖を用いた場合においても、４－６－４Ｔ２株は親株

や公知酵母と比較して高いエタノール生産能を示すことがわかる。

請求の範囲

［請求項1］ カンジダ・インターメディア（Candida intermedia）４－６－４Ｔ２と命名され、ＦＥＲＭ　ＢＰ－１１５０９として寄託された酵母。

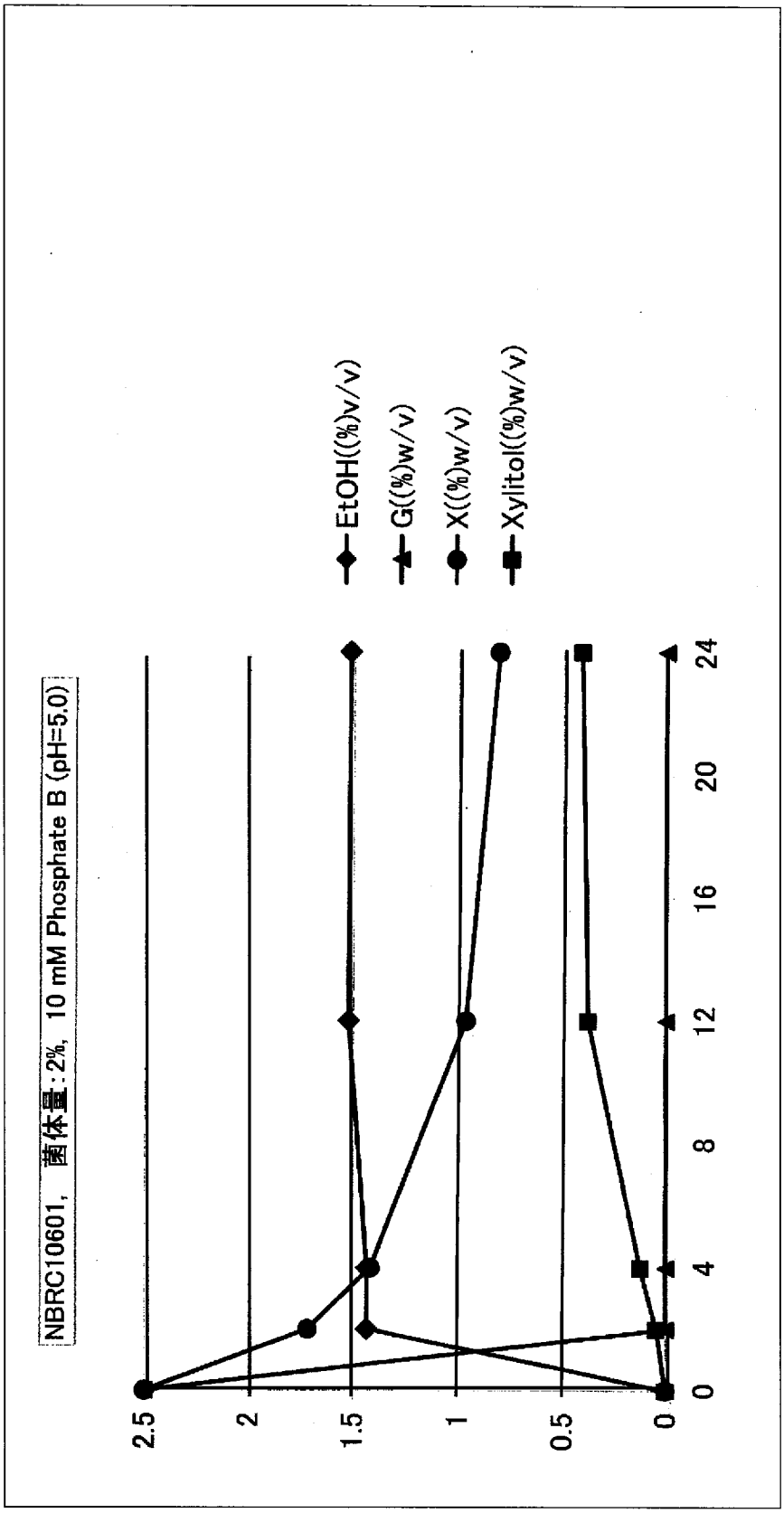
［請求項2］ グルコース及びキシロースから選ばれる１種以上の単糖を含有する原料液体を、請求項１に記載の酵母を用いて発酵させる工程を含むことを特徴とするエタノールの生産方法。

［請求項3］ 原料液体として、グルコースとキシロースとを含有するものを用いる請求項２に記載の生産方法。

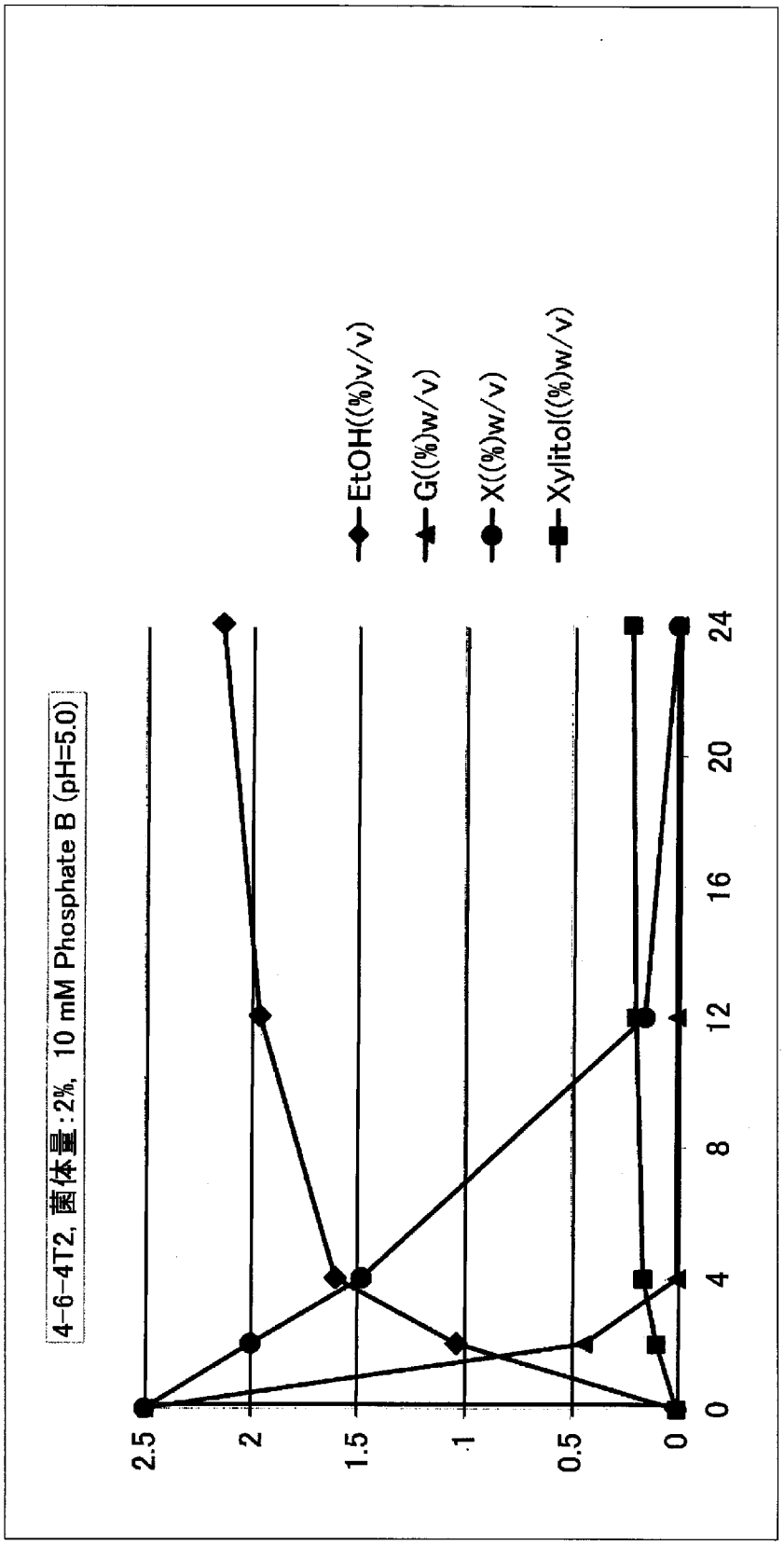
［請求項4］ 原料液体のｐＨが３．５～６．５である請求項２又は３に記載の生産方法。

［請求項5］ 原料液体として、セルロース系バイオマスの加水分解物を用いる請求項２～４のいずれか１項に記載の生産方法。

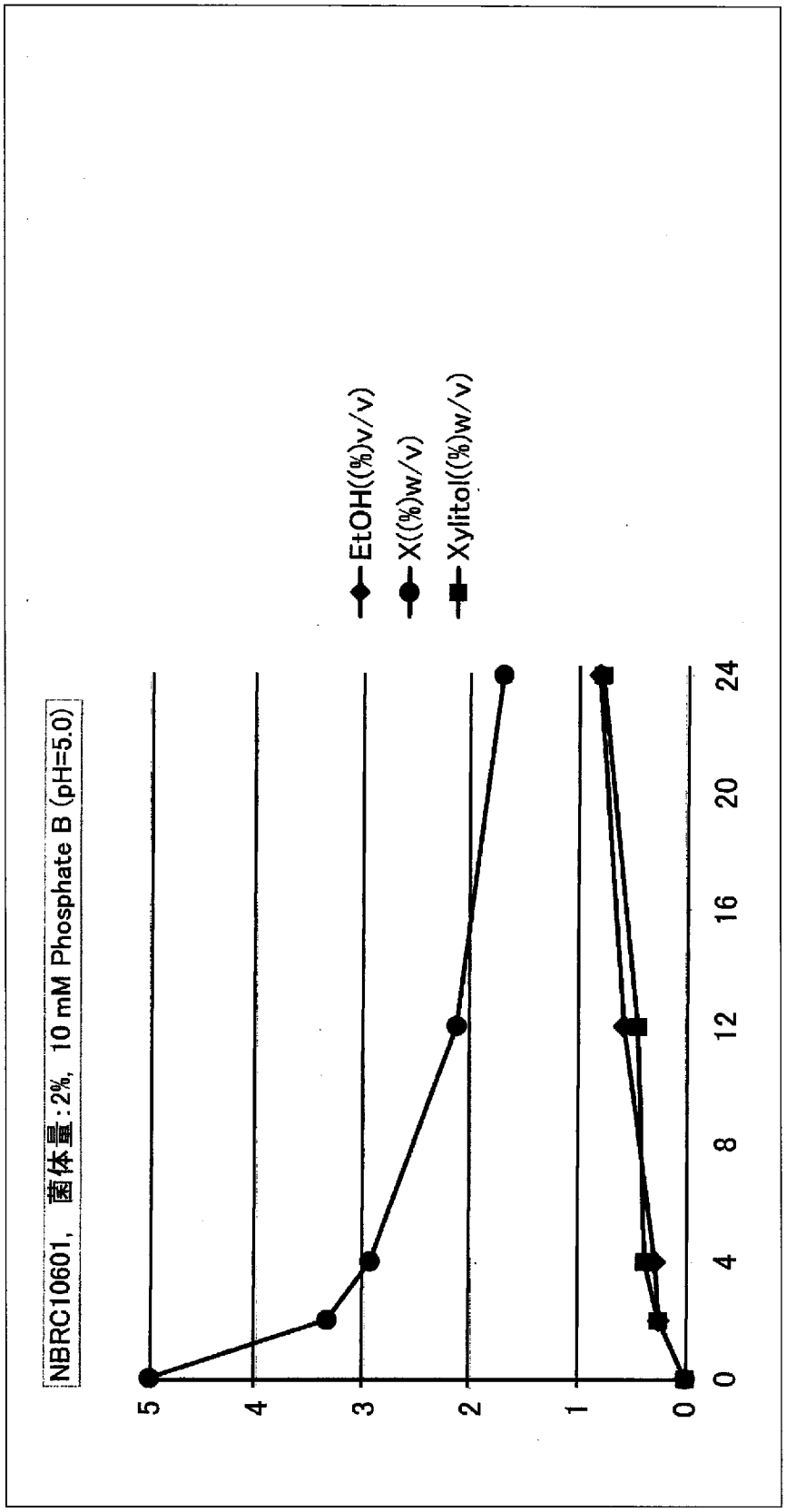
[図1]


NBRC10601, 菌体量: 2%, 10 mM Phosphate B (pH=5.0)
EtOH((%)v/v)
G((%)w/v)
X((%)w/v)
Xylitol((%)w/v)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
4
8
12
16
20
24

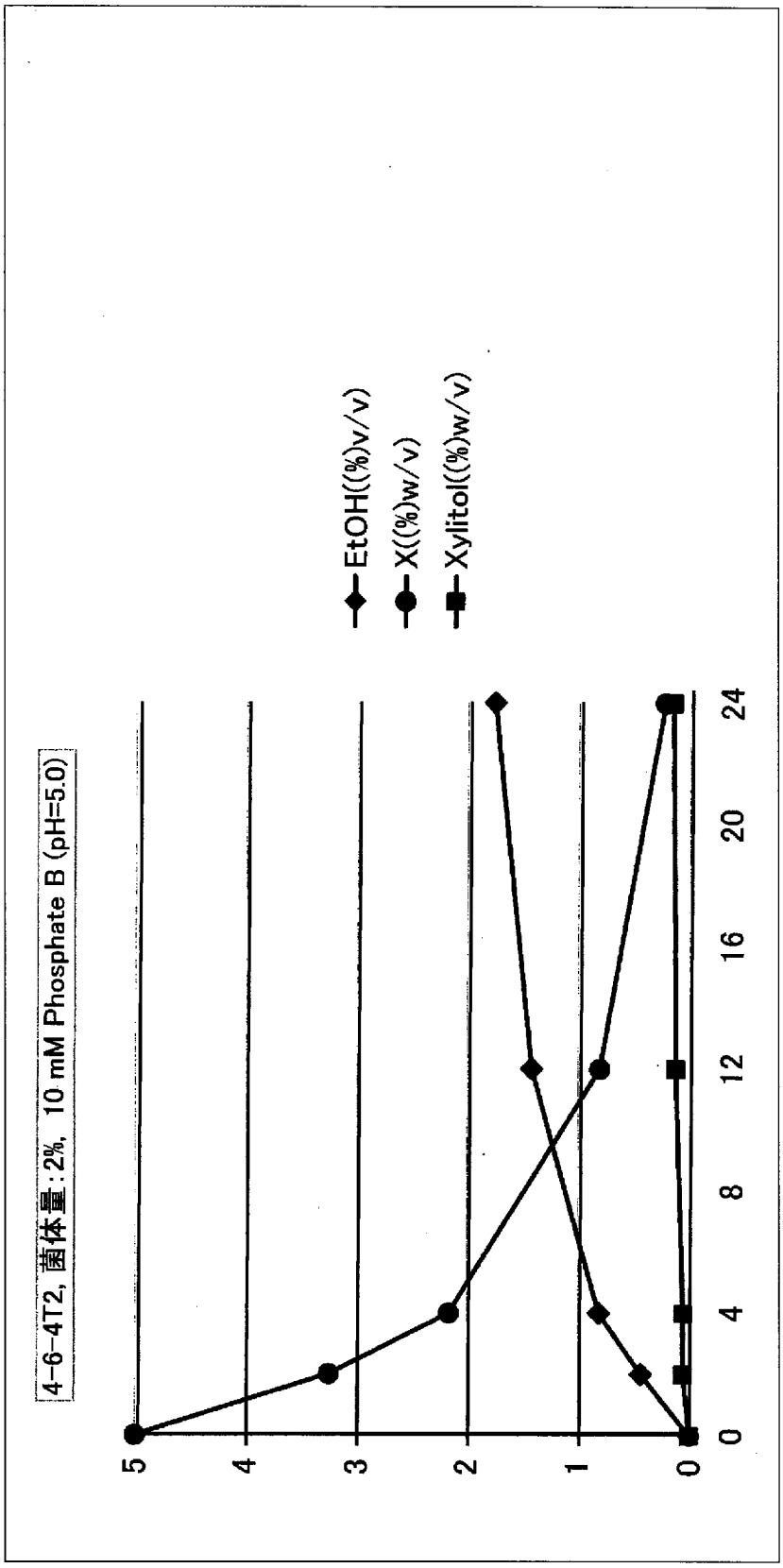
[図2]


4-6-4T2, 菌体量:2%, 10 mM Phosphate B (pH=5.0)
EtOH((%)v/v)
G((%)w/v)
X((%)w/v)
Xylitol((%)w/v)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
4
8
12
16
20
24

[図3]


NBRC10601, 菌体量:2%, 10 mM Phosphate B (pH=5.0)
EtOH((%)v/v)
X((%)w/v)
Xylitol((%)w/v)
0
1
2
3
4
5
0
4
8
12
16
20
24

[図4]


4-6-4T2, 菌体量:2%, 10 mM Phosphate B (pH=5.0)
EtOH((%)v/v)
X((%)w/v)
Xylitol((%)w/v)
0
1
2
3
4
5
0
4
8
12
16
20
24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/077428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1/16(2006.01)i, *C12P7/08*(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N1/16, C12P7/08

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), Science Direct, Wiley InterScience, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORIKAWA,Y. et al, Ethanol productions from D-xylose and cellobiose by Kluyveromyces cellobiovorus, Biotechnology and bioengineering, 1985, Vol.27, No.4, p.509-13	1-5
X	JP 58-028289 A (Shinnenryoyu Kaihatsu Gijutsu Kenkyu Kumiai), 19 February 1983 (19.02.1983), entire text & GB 2104915 A & AU 8287027 A & US 4472501 A & CA 1203186 A	1-5
X	GARDONYI,M. et al, High capacity xylose transport in Candida intermedia PYCC 4715, FEMS yeast research, 2003, Vol.3, No.1, p.45-52	1-5

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 January, 2013 (15.01.13)	22 January, 2013 (22.01.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/077428

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NIDETZKY,B. et al, Multiple Forms of Xylose Reductase in Candida intermedia: Comparison of Their Functional Properties Using Quantitative Structure-Activity Relationships, Steady-State Kinetic Analysis, and pH Studies , J Agric Food Chem, 2003, Vol.51, No.27, p.7930-7935	1-5
X	RAJESHAM,S., Ethanol production from D-xylose by Candida intermedia MTCC-1404: Parameter optimization using Taguchi's overall evaluation criteria technique, Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 2005, Vol.7, No.4, p.679-684	1-5
X	VENKATESWAR,R.L., Isolation and screening of yeast for ethanol and xylitol production from D-xylose, Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 2006, Vol.8, No.4, p.785-789	1-5

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０７７４２８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/16(2006.01)i, C12P7/08(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/16, C12P7/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３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/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), Science Direct, Wiley InterScience, CiNii

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	MORIKAWA,Y. et al, Ethanol productions from D-xylose and cellobiose by Kluyveromyces cellobiovorus, Biotechnology and bioengineering, 1985, Vol.27, No.4, p.509-13	1-5
X	JP 58-028289 A (新燃料油開発技術研究組合) 1983.02.19,全文 & GB 2104915 A & AU 8287027 A & US 4472501 A & CA 1203186 A	1-5

☑　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 １５．０１．２０１３	国際調査報告の発送日 ２２．０１．２０１３
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３０３８ 山本　匡子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	GARDONYI,M. et al, High capacity xylose transport in Candida intermedia PYCC 4715, FEMS yeast research, 2003, Vol.3, No.1, p.45-52	1-5
X	NIDETZKY,B. et al, Multiple Forms of Xylose Reductase in Candida intermedia: Comparison of Their Functional Properties Using Quantitative Structure-Activity Relationships, Steady-State Kinetic Analysis, and pH Studies , J Agric Food Chem, 2003, Vol.51, No.27, p.7930-7935	1-5
X	RAJESHAM,S., Ethanol production from D-xylose by Candida intermedia MTCC-1404: Parameter optimization using Taguchi's overall evaluation criteria technique, Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 2005, Vol.7, No.4, p.679-684	1-5
X	VENKATESWAR,R.L., Isolation and screening of yeast for ethanol and xylitol production from D-xylose, Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 2006, Vol.8, No.4, p.785-789	1-5