

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/122538

発行日 平成29年3月30日 (2017. 3. 30)

(43) 国際公開日 平成27年8月20日 (2015. 8. 20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/04 (2006.01)	C 1 2 P 7/04	4 B 0 2 9
C 1 2 P 7/10 (2006.01)	C 1 2 P 7/10	4 B 0 6 4
C 1 2 P 7/16 (2006.01)	C 1 2 P 7/16	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 H	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

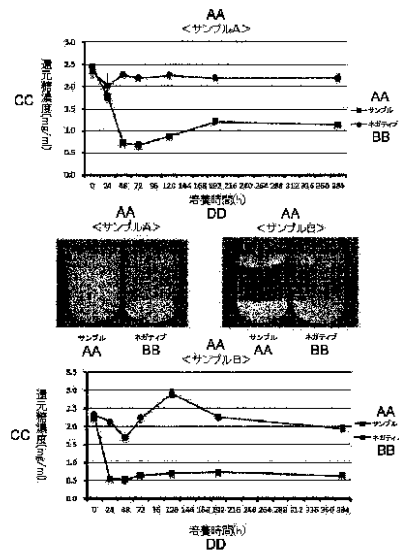
出願番号 特願2015-562894 (P2015-562894)	(71) 出願人 304026696 国立大学法人三重大学 三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/054324	(74) 代理人 100114362 弁理士 萩野 幹治
(22) 国際出願日 平成27年2月17日 (2015. 2. 17)	(72) 発明者 田丸 浩 三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 国立大学 法人三重大学内
(31) 優先権主張番号 特願2014-27308 (P2014-27308)	Fターム(参考) 4B029 AA02 BB06 CC01 DA05 DB01 DD00 DF01
(32) 優先日 平成26年2月17日 (2014. 2. 17)	4B064 AC02 AC03 AC04 CA05 CB12 CC06 CC22 DA16
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルコール製造方法

(57) 【要約】

セルロース含有原料から効率的にアルコールを製造するための、新規な方法を提供することを課題とする。セルロース含有原料を基質として、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を同一容器内で培養してアルコールを製造する。



AA Sample  
BB Negative  
CC Reducing sugar concentration  
DD Culturing duration (hours)

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

セルロース含有原料を基質として、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を同一容器内で培養すること、を特徴とするアルコール製造方法。

## 【請求項 2】

ヘミセルロースを含まない基質の場合はセルロソーム生産菌とアルコール発酵菌とを同時に投入し、セルロース及びヘミセルロースを含有する基質の場合はセルロソーム生産菌を投入した後にアルコール発酵菌を投入すること、を特徴とする請求項 1 に記載のアルコール製造方法。

## 【請求項 3】

前記セルロース含有原料はセルロースとヘミセルロースを含有し、セルロースとヘミセルロースの含有比に応じて、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌の投入時期を決定すること、を特徴とする請求項 1 に記載のアルコール製造方法。

## 【請求項 4】

前記セルロソーム生産菌によるセルロース又はヘミセルロースの分解と前記アルコール発酵菌によるアルコール発酵が並行する期間を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

## 【請求項 5】

前記セルロソーム生産菌がクロストリジウムセルロポランスであり、前記アルコール発酵菌がクロストリジウムアセトブチリカム又はクロストリジウムベイジェリンキーである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

## 【請求項 6】

培養温度が 25 ~ 40 である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

## 【請求項 7】

前記培養中において、生成したアルコールが連続的又は間欠的に回収される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

## 【請求項 8】

前記セルロース含有原料が、柑橘類由来原料、イネ科由来原料及びマメ科由来原料からなる群より選択される 1 以上の原料である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

## 【請求項 9】

前記柑橘類由来原料が柑橘類搾汁粕であり、  
前記イネ科由来原料が糠であり、  
前記マメ科由来原料が豆粕である、請求項 8 に記載のアルコール製造方法。

## 【請求項 10】

前記アルコールが、エタノール、ブタノール又はイソプロパノール、或いはこれらの二つ以上の組合せである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

## 【請求項 11】

前記セルロース含有原料が、セルロースに加え、アルコール発酵菌が資化できる糖も含むバイオマスから該糖を回収した後の残渣であり、

前記培養とは別に、前記バイオマスから回収した糖を基質としてアルコール発酵菌を培養し、該培養で得られたアルコールを、前記培養で得られたアルコールとともに回収する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の製造方法。

## 【請求項 12】

セルロースに加え、アルコール発酵菌が資化できる糖も含むバイオマスを原料としたアルコールの製造に使用される製造システムであって、

前記バイオマスから回収した糖を基質としてアルコール発酵菌を培養するための第 1 培養槽と、

糖を回収した後の残渣を基質としてセルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を培養する

10

20

30

40

50

ための第2培養槽と、

前記第1培養槽及び前記第2培養槽から回収したアルコールを收容するためのアルコール貯留槽と、を備える製造システム。

【請求項13】

前記第1培養槽の温度を調節するための第1温度調節手段と、前記第2培養槽の温度を調節するための第2温度調節手段を更に備える、請求項12に記載の製造システム。

【請求項14】

前記第1培養槽と前記アルコール貯留槽の間、及び前記第2培養槽と前記アルコール貯留槽の間に、ガストリップング用冷却設備が備えられる、請求項12又は13に記載の製造システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はセルロース含有原料からアルコールを製造する方法に関する。さらに詳しくは、セルロソーム生産菌及びアルコール発酵菌を利用したアルコール製造方法及びそれに使用するシステムに関する。本出願は、2014年2月17日に出願された日本国特許出願第2014-027308号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

【背景技術】

【0002】

近年、稲わら、バカス、植物残渣等のバイオマスからエタノール、ブタノール等のアルコールを製造する様々な技術が開発されている。バイオマスからクロストリジウム属の微生物によりアルコールを製造する技術として、例えば特許文献1では、クロストリジウムフィットフェルメンタスやクロストリジウムセルロポランス等のクロストリジウム株を第1の微生物として、リグノセルロース系バイオマスを発酵させ、さらにサッカロミセス・セレピシエ等の第2の微生物によりヘキソースまたはペントースサッカリドの発酵をさせることで、エタノール等の発酵最終生成物を得る方法が開示されている。また、特許文献2では、サトウキビ、テンサイ、カエデ等の植物物質を再生可能な出発物質の一つとして挙げており、これをクロストリジウムアセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) またはこれらの変異体の存在下で発酵させることにより、ブタノールを含む混合物を製造させ、これからtert-ブチルヒドロペルオキシドを製造し、単離する技術が開示されている。さらに柑橘類由来原料をバイオマスとする技術として、特許文献3では、柑橘類の果実、絞り粕等に由来する多糖類をクロストリジウム属等の微生物によりエタノール、ブタノール等のコモディケミカルに変換する方法が開示されている。また、特許文献4では、柑橘類の廃棄物等のリグノセルロース性の原料を *Aspergillus*、*Clostridium* 等の属に属している微生物で分解し、エタノール等のリグノセルロース性の原料の分解物を含む組成物を得ることが開示されている。

【0003】

特許文献5にもセルロース分解菌とアルコール発酵菌を利用したアルコールの製造方法が提案されているが、高温での反応が必要であり、製造に伴う消費エネルギー及び製造コストの面で改善が望まれる。また、セルロース分解菌がセロビオースまでしか分解できず、アルコール発酵菌の炭素源であるグルコースを得るため、遺伝子組換えによってセルロース分解菌にグリコシダーゼ(セロビオース分解酵素)を発現させている。一方、特許文献6に開示されたアルコール等の製造方法ではセルロースの分解及びアルコール発酵を順次行っており、効率的な製造方法とはいえない。

【0004】

既報の技術により、様々なバイオマスからアルコール(エタノール、ブタノールなど)を製造可能な状況にある。しかしながら、効率化及び製造コストの低減に対する要望は依然として高く、一層効率的なアルコールの製造方法の提供が望まれる。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

## 【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表2012-523852号公報

【特許文献2】特表2012-504117号公報

【特許文献3】特表2010-539988号公報

【特許文献4】特表2012-520682号公報

【特許文献5】国際公開第2013/070949A1号パンフレット

【特許文献6】米国特許出願公開第2014/0329285号明細書

## 【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】日本農芸化学会2012年度大会、要旨集、講演番号4SY01-4

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、セルロース含有原料から効率的にアルコールを製造するための、新規な方法を提供することを課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記課題の解決を目的として鋭意検討した結果、セルロース含有原料を基質として、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を同一容器内で培養すること（換言すれば、並行複発酵）によれば、セルロース含有原料から効率的にアルコールの製造が可能になることを見出した。また、セルロース含有原料を有効に活用できる製造システムの構築にも成功した。以下の発明は、主としてこれらの成果に基づく。なお、本発明の一態様で使用されるセルロソーム生産菌とアルコール発酵菌の有用性について過去に報告したが（例えば非特許文献1）、本発明での各菌の利用形態は特徴的であり、これまでの報告と一線を画する。

[1]セルロース含有原料を基質として、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を同一容器内で培養すること、を特徴とするアルコール製造方法。

[2]ヘミセルロースを含まない基質の場合はセルロソーム生産菌とアルコール発酵菌とを同時に投入し、セルロース及びヘミセルロースを含有する基質の場合はセルロソーム生産菌を投入した後にアルコール発酵菌を投入すること、を特徴とする[1]に記載のアルコール製造方法。

[3]前記セルロース含有原料はセルロースとヘミセルロースを含有し、セルロースとヘミセルロースの含有比に応じて、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌の投入時期を決定すること、を特徴とする[1]に記載のアルコール製造方法。

[4]前記セルロソーム生産菌によるセルロース又はヘミセルロースの分解と前記アルコール発酵菌によるアルコール発酵が並行する期間を有する、[1]～[3]のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

[5]前記セルロソーム生産菌がクロストリジウムセルロポランスであり、前記アルコール発酵菌がクロストリジウムアセトブチリカム又はクロストリジウムベイジェリンキーである、[1]～[4]のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

[6]培養温度が25～40である、[1]～[5]のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

[7]前記培養中において、生成したアルコールが連続的又は間欠的に回収される、[1]～[6]のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

[8]前記セルロース含有原料が、柑橘類由来原料、イネ科由来原料及びマメ科由来原料からなる群より選択される1以上の原料である、[1]～[7]のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

[9]前記柑橘類由来原料が柑橘類搾汁粕であり、前記イネ科由来原料が糠であり、

10

20

30

40

50

前記マメ科由来原料が豆粕である、[ 8 ]に記載のアルコール製造方法。

[ 1 0 ]前記アルコールが、エタノール、ブタノール又はイソプロパノール、或いはこれらの二つ以上の組合せである、[ 1 ]～[ 9 ]のいずれか一項に記載のアルコール製造方法。

[ 1 1 ]前記セルロース含有原料が、セルロースに加え、アルコール発酵菌が資化できる糖も含むバイオマスから該糖を回収した後の残渣であり、

前記培養とは別に、前記バイオマスから回収した糖を基質としてアルコール発酵菌を培養し、該培養で得られたアルコールを、前記培養で得られたアルコールとともに回収する、[ 1 ]～[ 1 0 ]のいずれか一項に記載の製造方法。

[ 1 2 ]セルロースに加え、アルコール発酵菌が資化できる糖も含むバイオマスを原料としたアルコールの製造に使用される製造システムであって、

前記バイオマスから回収した糖を基質としてアルコール発酵菌を培養するための第1培養槽と、

糖を回収した後の残渣を基質としてセルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を培養するための第2培養槽と、

前記第1培養槽及び前記第2培養槽から回収したアルコールを収容するためのアルコール貯留槽と、を備える製造システム。

[ 1 3 ]前記第1培養槽の温度を調節するための第1温度調節手段と、前記第2培養槽の温度を調節するための第2温度調節手段を更に備える、[ 1 2 ]に記載の製造システム。

[ 1 4 ]前記第1培養槽と前記アルコール貯留槽の間、及び前記第2培養槽と前記アルコール貯留槽の間に、ガストリップング用冷却設備が備えられる、[ 1 2 ]又は[ 1 3 ]に記載の製造システム。

#### 【 0 0 0 9 】

本願は以下の発明も開示する。

( 1 )柑橘類由来原料をクロストリジウムセルロポランス (*Clostridium cellulovorans*) により糖化するとともに、酵母および/またはクロストリジウムアセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) により発酵させることでアルコールを製造する方法。

( 2 )柑橘類由来原料を基質濃度 5 . 0 % [ w / v ] 未満として用いる ( 1 ) に記載の方法。

( 3 )柑橘類由来原料が柑橘類の果皮または搾汁粕である ( 1 ) または ( 2 ) に記載の方法。

( 4 )アルコールがエタノールおよび/またはブタノールである ( 1 ) ～ ( 3 ) のいずれかに記載の方法。

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 1 0 】

【 図 1 】サンプル A またはサンプル B を用いて基質濃度 0 . 5 % [ w / v ] に調製した培養液におけるクロストリジウムセルロポランスの培養試験の結果を示した図である ( 実施例 1 ) 。

【 図 2 】サンプル A またはサンプル B を用いて基質濃度 2 . 5 % [ w / v ] に調製した培養液におけるクロストリジウムセルロポランスの培養試験の結果を示した図である ( 実施例 1 ) 。

【 図 3 】サンプル A またはサンプル B を用いて基質濃度 5 . 0 % [ w / v ] に調製した培養液におけるクロストリジウムセルロポランスの培養試験の結果を示した図である ( 実施例 1 ) 。

【 図 4 】クロストリジウムセルロポランスの培養液 ( 糖化液 ) 中の還元糖量を示した図である ( 実施例 2 ) 。

【 図 5 】酵母の培養液 ( 発酵液 ) 中のエタノール濃度 ( 酵素法により測定 ) およびエタノール濃度 ( GC により測定 ) を示した図である ( 実施例 2 ) 。

【図6】クロストリジウムアセトブチリカムの培養液（発酵液）中のブタノール濃度（GCにより測定）を示した図である（実施例3）。

【図7】クロストリジウムセルロポランス（*C. cellulovorans*）とクロストリジウムベイジェリンキー（*C. beijerinckii*）の共培養による、あずき粕からのn-ブタノール生産を示した図である（実施例4）。

【図8】クロストリジウムセルロポランス（*C. cellulovorans*）とクロストリジウムベイジェリンキー（*C. beijerinckii*）の共培養による、みかん搾汁粕からのn-ブタノール生産を示した図である（実施例5）。

【図9】クロストリジウムセルロポランス（*C. cellulovorans*）とクロストリジウムベイジェリンキー（*C. beijerinckii*）の共培養による、脱脂米糠からのn-ブタノール生産を示した図である（実施例6）。

【図10】クロストリジウムセルロポランス（*C. cellulovorans*）による可溶糖抽出済みのみかん搾汁残渣（乾燥重量あたり1% [w/v]）の分解を示した図である。

【図11】還元糖濃度のモニタリングに基づくアルコール発酵菌の植菌および生産したアルコール濃度を示した図である（実施例7、みかん搾汁残渣）。

【図12】還元糖濃度のモニタリングに基づくアルコール発酵菌の植菌および生産したアルコール濃度を示した図である（実施例8、シュレッダー古紙）。

【図13】セルロースに加え、アルコール発酵菌が資化できる糖も含むバイオマスを用いた製造システムの一例を示した図である（実施例9）。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明はアルコール製造方法に関する。本発明の製造方法の特徴の一つは、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を同一容器内で培養する点である。換言すれば、本発明の製造方法では、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を並行複発酵することにより、アルコールを製造する。このような特徴を備える本発明の製造方法では、製造過程の少なくとも一部において、セルロソーム生産菌によるセルロースの分解とアルコール発酵菌によるアルコール発酵が同時に進行することになる。本発明の製造方法の特徴のもう一つは、セルロースとヘミセルロースの含有比に応じて、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌の投入時期を決定する点である。すなわち、セルロースとヘミセルロースとを含む基質の場合は、好ましくは、セルロソーム生産菌を植菌してセルロースの分解を開始させた後にアルコール発酵菌を植菌してアルコール発酵を進行させる。これにより、発酵効率が向上する。アルコール発酵菌を植菌するタイミングは、使用する基質、使用する菌株、その他の条件等によって変動し得るが、還元糖濃度を、サンプリング・クロマトグラフィー等を用いてモニタリングすること、紫外・可視・赤外等の領域における糖の吸収帯を用いて計測しモニタリングすること、等によって決定することが好ましい。一方で、実質的にヘミセルロースを含まない基質の場合は、好ましくは、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を同時に植菌してアルコール発酵を進行させることにより発酵効率が向上する。

【0012】

本発明ではセルロース含有原料を培養の基質とする。セルロース含有原料とは、セルロース及び/又はヘミセルロースを含有する材料であり、木本植物、草本植物、それらの加工品等が該当する。典型的には、セルロース系バイオマス又はリグノセルロース系バイオマスをセルロース含有原料として用いる。セルロース含有原料の具体例は、柑橘類（例えばバレンシアオレンジ、ネーブルオレンジ、ブラッドオレンジ等のオレンジ類、グレープフルーツ、オレンジロ等のグレープフルーツ類、ユズ、カボス等の香酸柑橘類、ナツミカン、ハッサク等の雑柑類、イヨカン、タンカン等のタンゴール類、セミノール、サマーフレッシュ等のタンゼロール類、ブンタン、バンペイユ等の文旦類、マンダリンオレンジ、温州ミカン、キシウミカン等のミカン類等、ミカン属（カンキツ属）の属する柑橘類）、イネ科植物（例えば米、小麦、大麦、エン麦、ライ麦、はと麦、サトウキビ、トウモロコシ、スイッチグラス、ネピアグラス）、マメ科植物（例えば大豆、あずき、エンドウ、そら豆）、木材、樹皮、間伐材、建築廃材、古紙、バガスである。好ましくは、柑橘類由

来原料、イネ科由来原料、又はマメ科植物由来原料をセルロース含有原料として用いる。  
2種類以上のセルロース含有原料を併用してもよい。

【0013】

柑橘類由来原料は、柑橘類の実まるごとや、果肉、果汁、種子、果皮等に分けられたものであっても良い。これらを絞ったジュースや絞った後の搾汁粕等の残渣であっても良く、これらが2つ以上混ざったものであっても良い。果皮は最表面層の外果皮、最内層の内果皮、これらの中間に位置する中果皮に分けることができ、分けたものそれぞれを「柑橘類由来原料」としても、これらを2つ以上含むものを「柑橘類由来原料」としてもよい。さらに、これらを有機溶媒等で抽出し、柑橘類に含まれる発酵阻害物質である、例えばリモネン等の脂溶性物質を除去したものであっても良い。有機溶媒等による抽出は、従来知られているいずれの方法で行っても良い。

10

【0014】

イネ科由来原料の具体例として米糠、麦糠、ふすま糠などの糠、稲わら、麦わら、を挙げることができる。同様にマメ科植物由来原料の具体例として、大豆粕、あずき粕、おから等の豆粕を挙げることができる。

【0015】

セルロソーム生産菌とは、セルラーゼ複合体であるセルロソームを生産する菌であり、高いセルロース分解能力を発揮する。セルロソームの生産能を示す限り特に限定されないが、好ましくは、クロストリジウム属細菌 (*Clostridium cellulovorans*、*Clostridium thermocellum*、*Clostridium josui*、*Clostridium cellulolyticum*) を用いる。中でも、中温性嫌気性セルロース分解細菌であるクロストリジウムセルロポランス (*Clostridium cellulovorans*) を用いることが特に好ましい。セルロソーム生産菌は、従来知られている株や新たに単離した株、これらをフリーズストック等したものであってもよい。なお、クロストリジウムセルロポランスは例えばATCC (American Type Culture Collection) 等の保存機関から容易に入手することができる。

20

【0016】

アルコール発酵菌とは、セルロース含有原料の分解によって生じた糖を資化し、アルコールを生成する菌である。本発明では各種アルコール発酵菌を利用可能である。アルコール発酵菌を例示すると、酵母、アスペルギルス属菌、トリコデルマ属菌、クロストリジウム属細菌である。好ましくは、酵母又はクロストリジウム属細菌を採用する。更に好ましくはクロストリジウム属細菌を用いる。クロストリジウム属細菌は、5炭糖に加え、大腸菌(野生株)や酵母(野生株)が通常は利用できない6炭糖をも資化することができる。従って、クロストリジウム属細菌を用いれば、セルロースの分解によって生じた糖の利用効率が高まり、ひいてはアルコール生産効率が向上する。クロストリジウム属細菌の具体例はクロストリジウムアセトブチリカム、クロストリジウムベイジェリンキーである。アルコール発酵菌は、従来知られている株や新たに単離した株、これらをフリーズストック等したものであってもよい。なお、クロストリジウムアセトブチリカム及びクロストリジウムベイジェリンキーは例えばATCC (American Type Culture Collection) 等の保存機関から容易に入手することができる。

30

40

【0017】

嫌気性のセルロソーム生産菌と、同じく嫌気性のアルコール発酵菌を併用して本発明の製造方法を構成するとよい。当該態様によれば、嫌気性条件下で一連の製造工程を実施することができる。操作の簡便化、設備の簡略化などが図られる。例えば、セルロソーム生産菌としてクロストリジウムセルロポランスを、アルコール発酵菌としてクロストリジウムアセトブチリカム又はクロストリジウムベイジェリンキーを用いれば当該態様を実現できる。後述の実施例に示す通り、クロストリジウムセルロポランスと、クロストリジウムアセトブチリカム又はクロストリジウムベイジェリンキーの組合せは、いずれの菌株も野生株であるにもかかわらず、効率的なアルコールの製造を可能にする。野生株を用いて実用

50

的なアルコール製造方法を実現できることは、遺伝子組換えを必要とせず、安全性はもとより、製造コストの点でも有利である。また、当該組合せは、セルロース分解菌の分解能が高い一方で、アルコール発酵菌の発酵能も非常に高く、極めてバランスがよい。特に柑橘類由来原料に対して最適な組合せであり、顕著な効果をもたらす。

#### 【0018】

培養に際しては、使用するセルロソーム生産菌及びアルコール発酵菌の培養に適した培養条件を採用する。嫌気性のセルロソーム生産菌を用いるのであれば、嫌気性培地を用意し、これに基質及びセルロソーム生産菌を添加し、培養を開始すればよい。基質とセルロソーム生産菌の添加順序は特に限定されないが、反応開始点をコントロールするため等の理由から、通常は、基質と培地の混合物を用意しておき、これへセルロソーム生産菌を植 10  
菌する。アルコール発酵菌は上記の通り、セルロソーム生産菌と同時又はセルロソーム生産菌を植菌後、所定時間経過した時点で植菌すればよい。培養温度は例えば25 ~ 40、好ましくは30 ~ 38、更に好ましくは約37とする。クロストリジウムセルロポランスは比較的低温(中温)においても高いセルロース分解活性を示す。その一方で、40を超える温度条件下ではその生育及び活性が大幅に低下する。クロストリジウムセルロポランスをセルロソーム生産菌として用いた場合には、上記温度範囲(25 ~ 40)の培養によって、効率的なセルロースの分解が達成されるとともに、必要エネルギー及び製造コストの低減が可能となる。

#### 【0019】

培養の途中で基質を追加してもよい。また、菌体(セルロソーム生産菌及び/又はアルコール発酵菌)を追加することにしてもよい。基質/菌体の追加により、十分な基質/菌体 20  
が存在する状態が維持され、生産効率の維持ないし向上が図られる。

#### 【0020】

基質として柑橘類由来原料を採用した場合には、柑橘類由来原料を基質濃度5.0% [w/v]未満として用い、クロストリジウムセルロポランス(*Clostridium cellulovorans*)により糖化させることが好ましい。基質濃度5.0% [w/v]未満であればよく、特に2.5% [w/v]以下であることが好ましく、0.5% [w/v]以下であっても良い。ここで、「基質濃度」とは、各柑橘類由来原料に含まれる固形分の割合(重量%)のことをいう。この固形分の割合(重量%)は、サンプルの重量を100%(重量%)とした場合に、これから下記実施例にて示した方法によって算出さ 30  
れるサンプルの含水率(重量%)を引くことによって求めることができる。

#### 【0021】

本発明の製造方法では同一容器内でセルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を培養する。この条件を満たす限り、使用する容器は特に限定されない。即ち、従来知られているいずれの培養容器を用いて実施することができる。例えば、クロストリジウムセルロポランスによる糖化と酵母の発酵によるアルコールの製造を組み合わせる場合は、酵母によるエタノールの変換率が高くなるように基質濃度を調製してジャーファーマンター等の一つの培養容器内で培養を行うこともできる。ジャーファーマンターを用いることにより、生産されたエタノールを除去・回収しながら連続的に発酵を行うことが可能である。クロストリジウムセルロポランスによる糖化とクロストリジウムアセトブチリカム又はクロストリジウムベージェリンキーの発酵によるアルコールの製造を組み合わせる場合も同様に、ジャーファーマンターを使用して生産されたブタノールを除去・回収しながら連続的にブタノール発酵を行う「Gas Stripping法」を行うことにより、クロストリジウムアセトブチリカムが有するブタノール生産のポテンシャルを最大級に高めることが可能である。また、細胞毒性のあるブタノールの濃度を低減することで、菌体の活性を高い状態に維持することが可能となる。生産物(エタノールやブタノールなど)の回収は連続的又は間欠的に行うことができる。 40

#### 【0022】

本発明の製造方法により製造されるアルコールは従来知られているいずれのアルコールであっても良く、例えばエタノール、ブタノール、イソプロパノール等のアルコールが挙 50



げられる。

【0023】

本発明の一態様では、セルロース含有原料として、セルロースに加え、アルコール発酵菌が資化できる糖も含むバイオマスを用いる。この場合には、当該バイオマスから糖を回収した後の残渣（セルロースを含有する）を、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌の培養に用いる基質とする。その一方で、回収した糖を基質としてアルコール発酵菌を培養し、その結果得られたアルコールを、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌の共培養によって得られたアルコールとともに回収する。この態様の製造方法によれば、アルコールに変換可能な物質（即ち、セルロース/ヘミセルロースと糖）を無駄なく利用することができる。ここでのバイオマスに該当するものとして、例えば、柑橘類の搾汁粕、糠（米糠、小麦糠、ふすま糠など）、粕（大豆粕、あずき粕、おからなど）を用いることができる。回収した糖を基質とした培養に使用するアルコール発酵菌は、セルロソーム生産菌との共培養に使用するアルコール発酵菌と同一の又は異なる菌種である。前者の場合、使用する菌種の数が少なくなり、製造方法が簡素化する。後者の場合には、菌種の選択の自由度が高くなることから、各培養に最適な菌種を選ぶことによる、生産効率の更なる向上が図られる。

10

【0024】

上記態様の実施には、例えば、以下の製造システム、即ち、バイオマスから回収した糖を基質としてアルコール発酵菌を培養するための第1培養槽と、糖を回収した後の残渣を基質としてセルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を培養するための第2培養槽と、第1培養槽及び第2培養槽から回収したアルコールを収容するためのアルコール貯留槽と、を備える製造システム（図13を参照）を利用することができる。適した培養温度を維持するために、第1培養槽に温度調節手段（例えばヒーター）を設けるとよい（第1温度調節手段）。第2培養槽についても同様である（第2温度調節手段）。この態様においても、培養の途中で連続的又は間欠的に生産物（アルコール）を回収することが好ましく、例えば、第1培養槽とアルコール貯留槽の間、及び第2培養槽とアルコール貯留槽の間に、ガストリップング用冷却設備が備えられる。

20

【0025】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

30

【実施例】

【0026】

A．クロストリジウムセルロポランスと酵母又はクロストリジウムアセトブチリカムによるアルコールの製造

< サンプルの調製 >

温州ミカン（以下、実施例において単にミカンと示す）の果皮または搾汁粕を試料とした。これらの糖化にあたり、各サンプルの基質濃度を調製するために、以下の方法により試料の含水率を算出した。

【0027】

< サンプルの含水率の算出 >

40

50ml容ビーカーを105℃に加熱した乾熱滅菌器に入れて十分に乾燥させた後、デシケーター内で常温に戻し、ビーカーの重量を測定した。このビーカーにサンプルを加えて重量を測定した後、ビーカーの重量を引いたものをサンプル湿潤重量とした。その後、サンプルを加えたビーカーを乾熱滅菌器へ入れて十分に乾燥させ、これをデシケーター内で常温に戻し、重量を測定した。この重量からビーカーの重量を引いたものをサンプル乾燥重量とした。測定したサンプル湿潤重量およびサンプル乾燥重量より、サンプルの含水率（重量%）を次の式により算出した。また、算出された各サンプルの含水率から基質濃度（固形分（重量%））を求めた。得られた含水率および固形分の割合を表1に示した。これらのサンプルの含水率は平均して81%であった。

【0028】

50

## 【式】

サンプルの含水率（重量％）＝（サンプル湿潤重量－サンプル乾燥重量）／サンプル湿潤重量×100

【0029】

【表1】

サンプル		含水率（重量％）	固形分（重量％）
A	ミカン果皮	84.9	15.1
B	ミカン搾汁粕	83.8	16.2

10

【0030】

## 【実施例1】

上記において調製した各サンプルを炭素源として、クロストリジウムセルロポランスによる培養試験を行い、各サンプルを添加した培養液の経時変化を基質濃度及び培養期間ごとに調べた。

## &lt;方法&gt;

100ml容バイアル瓶に、上記において調製したサンプルを用い、基質濃度がそれぞれ0.5% [w/v]、2.5% [w/v]、5.0% [w/v]となるように含ませた嫌気性培地50mlを加え、これにクロストリジウムセルロポランス（フリーズストックより24時間プレ培養を行ったもの）を100μl植菌した。37のインキュベーター内で、静置培養で行い、培養開始から0時間、24時間、48時間、72時間、120時間、144時間、192時間及び384時間経過後の培養液をサンプリングした。サンプリングした各培養液について遠心沈殿で不溶性物を除いた後、DNS法により還元糖濃度を測定した。また、比較としてクロストリジウムセルロポランスを植菌していないサンプルについても同様に37のインキュベーター内に静置し、ここからサンプリングした未植菌の溶液について還元糖濃度を測定した。

20

【0031】

## &lt;結果&gt;

各クロストリジウムセルロポランスの培養液および未植菌の溶液における培養開始からの経過時間ごとの還元糖濃度（mg/ml）と基質の経時的な変化を図1（基質濃度0.5% [w/v]）、図2（基質濃度2.5% [w/v]）、図3（基質濃度5.0% [w/v]）にそれぞれ示した（図1～図3、サンプル：クロストリジウムセルロポランス植菌区、ネガティブ：未植菌）。この還元糖濃度（mg/ml）はグルコース換算によるものである。また、各サンプルにおいて、培養384時間目におけるクロストリジウムセルロポランス植菌区と未植菌区のバイアル瓶の写真を示した。その結果、図1に示されるように、基質濃度0.5% [w/v]に調製した培養液では、サンプルAまたはBのいずれを添加した場合でも、不溶性の固形分がほぼ完全に可溶化したことが観察された。還元糖濃度はサンプルBでは培養開始から24時間目で最も低くなり、サンプルAでは48時間目以降で最も低くなったが、その後わずかに上昇した。これは、クロストリジウムセルロポランスが植菌された直後から分解と増殖を繰り返した後、酵素による分解によって遊離した還元糖量が菌体の資化量を上回ったためと考えられた。さらに、クロストリジウムセルロポランスが分泌したセルロソームを含む酵素が各サンプルの分解に対して最適化されたと考えられたため、還元糖濃度が最も低くなった24時間目または48時間目にて基質を追加（連続糖化）することにより、還元糖濃度の上昇が見込めることが予測できた。

30

40

【0032】

また、図2に示されるように、基質濃度2.5% [w/v]に調整した培養液では、還元糖濃度と菌体の増殖がほぼ釣り合った状態であった。このことから、連続糖化を行う場合、培養液における最適な基質濃度は2.5% [w/v]未満であると考えられた。さらに、図3に示されるように、基質濃度5.0% [w/v]に調整した培養液では、ミカン

50

果皮（サンプルA）を炭素源とした場合、黙視によるサンプルの変化がほとんど見られなかった。また、ミカン搾汁粕サンプル（サンプルB）を炭素源とする植菌区においては、コロイド状になった不溶性分子の凝集が見られたものの、分解が進んでいる様子は観察されず、還元糖濃度の変化も確認できなかった。従って、これらの結果より、クロストリジウムセルロポランスによる糖化においては、基質濃度 5.0% [w/v] 未満のものを使用することが好ましいことが示唆された。

【0033】

[実施例2]

エタノールの生産

クロストリジウムセルロポランスにより糖化された培養液（以下、糖化液と示す場合がある）から酵母によるエタノールの生産を試みた。 10

< 試料の調製 >

1. 糖化液

実施例1と同様の方法により、各サンプルを用い、基質濃度が 2.5% [w/v] となるように含ませた嫌気性培地によってクロストリジウムセルロポランスを1ヶ月培養した培養液（糖化液）を得た。

【0034】

2. 酵母用発酵培地

次の組成からなる酵母用発酵培地を調製した。上記1.で得た糖化液を carbon source (s)（炭素源）として用い、DNS法により測定した還元糖量を基にしてグルコース換算で 0.5% [w/v] となるように加えた。培地は調製後に二酸化炭素を吹き込み、微好気状態にして使用した。以下、この酵母用発酵培地を酵母用発酵培地（ポジティブ）と示す。 20

【0035】

また、比較として各サンプルを用い、基質濃度が 2.5% [w/v] となるように含ませた嫌気性培地にクロストリジウムセルロポランスを植菌せず、そのまま1ヶ月インキュベートしたものを carbon source (s)（炭素源）として用い、DNS法により測定した還元糖量を基にしてグルコース換算で 0.5% [w/v] となるように加えて微好気状態にしたものを使用した。以下、この培地を酵母用発酵培地（ネガティブ）と示す。さらに比較として、グルコースを carbon source (s)（炭素源）として用い、0.5% [w/v] となるように加えて同様に微好気状態にしたものを使用した。以下、この培地を酵母用発酵培地（グルコース）と示す。 30

【0036】

[酵母用発酵培地組成]

0.67% yeast nitrogen base without amino acids

0.5% carbon source (s)

2.0% casamino acids

buffered with 50mM MES buffer (pH 7.0)

【0037】

図4に基質濃度 2.5% [w/v] でクロストリジウムセルロポランスを1ヶ月培養した培養液（糖化液）中の還元糖量およびクロストリジウムセルロポランスを植菌せず、そのまま1ヶ月インキュベートしたものの還元糖量を示した（図4、サンプル：クロストリジウムセルロポランス植菌区、ネガティブ：未植菌区）。図4に示される各記号はそれぞれ、クロストリジウムセルロポランスの培養において使用した培養液ごとに次のものを示す。 40

A：サンプルAを柑橘類由来原料とするクロストリジウムセルロポランスの培養液使用

B：サンプルBを柑橘類由来原料とするクロストリジウムセルロポランスの培養液使用

【0038】

その結果、図4に示されるように、柑橘類由来原料としてミカン果皮（サンプルA）を加えた培養液にクロストリジウムセルロポランスを植菌した場合に、培養液中の還元糖量 50

が最も高かった。また、ミカン搾汁粕（サンプルB）は未植菌区の還元糖量が植菌区を上回ったことが確認された。クロストリジウムセルロポランスを植菌していないものにおいても、多少の還元糖の存在が確認できたが、これは柑橘類由来原料そのものに含まれる還元糖であると考えられる。

#### 【0039】

##### <エタノールの生産>

YPD培地で酵母野生株を48時間培養し（OD600 = 1.9）、4、3、000 × gで10分間遠心分離して集菌した後、10倍に濃縮した酵母菌液を上記にて調製した酵母用発酵培地（ポジティブ）に全体の1/10量植菌した。30℃で60時間静置培養を行い、培養終了後に遠心分離して回収した上清を濾過し、生産されたエタノールの濃度をガスクロマトグラフィー（GC）（株）島津社製）および酵素法による2通りの方法で測定した。また、比較として酵母用発酵培地（ネガティブ）または酵母用発酵培地（グルコース）にそれぞれ酵母を植菌して静置培養を行い、上清を回収して、同様に生産されたエタノールの濃度を測定した。なお、酵素法は以下の原理を用いた。すなわち、alcohol dehydrogenase（ADH）およびNAD<sup>+</sup>存在下において、発酵液中に含まれるアルコールをアルデヒドに酸化することでNADHを生成する。ここにphenazinemethosulfate（PMS）を加えると、NADHによって還元され、還元型PMSが生じ、それを発色試薬NTBによって酸化することで青紫色に発色することを利用した。

10

#### 【0040】

20

##### <結果>

図5に酵母を加えて静置培養したことにより得られた培養液（発酵液）中のエタノール濃度（酵素法により測定したもの、及びGCにより測定したもの）を示した。さらに、GCによる測定により得られた発酵液中のエタノール濃度と発酵率（エタノール変換率）を表2に示した。図5および表2に示される各記号はそれぞれ、酵母の培養において使用した酵母発酵用培地ごとに次のものを示す。

AN：サンプルAを柑橘類由来原料とする酵母用発酵培地（ネガティブ）使用

A：サンプルAを柑橘類由来原料とする酵母用発酵培地（ポジティブ）使用

BN：サンプルBを柑橘類由来原料とする酵母用発酵培地（ネガティブ）使用

B：サンプルBを柑橘類由来原料とする酵母用発酵培地（ポジティブ）使用

P：グルコースを炭素源とする酵母用発酵培地（グルコース）使用

30

#### 【0041】

図5に示されるように、酵母用発酵培地の炭素源として、ミカン果皮（サンプルA）またはミカン搾汁粕（サンプルB）を柑橘類由来原料としたクロストリジウムセルロポランス植菌区の糖化液を用いた場合はいずれもエタノールが生産できることが確認できた。特にミカン搾汁粕（サンプルB）を柑橘類由来原料としたクロストリジウムセルロポランス植菌区の糖化液を用いた場合にエタノール濃度が高くなったことから、ミカン搾汁粕（サンプルB）を柑橘類由来原料として直接糖化・発酵した場合に、高い濃度で効率的にエタノールを生産できることが示された。

40

#### 【0042】

図4に示されるように、クロストリジウムセルロポランスの糖化による還元糖の蓄積はミカン果皮（サンプルA）を用いた場合に最も高かったが、酵母によって十分に発酵されなかったのは、クロストリジウムセルロポランスによるバイオマス糖化の生成物として特徴的に見られるセロピオース（酵母資化不可能糖）などの蓄積があったためと考えられた。そこで、このようなセロピオース（酵母資化不可能糖）も発酵可能な微生物により、直接糖化発酵（CBP（Consolidated Bioprocessing））を行うことでエタノールおよびブタノールの収量を高めることが期待される。なお、表2にGCによる測定により得られた発酵液中のエタノール濃度と発酵率（エタノール変換率）を示した。

#### 【0043】

50

【表 2】

サンプル	AN	A	BN	B	P
エタノール濃度 (v/v%)	0.186	0.150	0.194	0.283	0.240
発酵率 (%)	37.2	30.0	38.8	56.6	48.0

## 【0044】

## [ 実施例 3 ]

## アルコールの生産

10

クロストリジウムセルロポランスにより糖化された糖化液からクロストリジウムアセトブチリカムによるアルコール（エタノール・ブタノール）の生産を試みた。

## &lt; 試料の調製 &gt;

クロストリジウムアセトブチリカム発酵用チオグリコレート培地（pH 5.0）

次の組成からなるクロストリジウムアセトブチリカム発酵用チオグリコレート培地（pH 5.0）を調製した。実施例 2、< 試料の調製 > 1. 糖化液と同様に調製した糖化液を carbon source (s)（炭素源）として用い、DNS 法により測定した還元糖量を基にしてグルコース換算で 0.5% [w/v] となるように加えた。培地は調製後に嫌気チャンパー内に移して 12 時間以上放置して嫌気状態にして使用した。以下、このクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地をクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地（ポジティブ）と示す。

20

## 【0045】

また、比較として各サンプルを用い、基質濃度が 2.5% [w/v] となるように含ませた嫌気性培地にクロストリジウムセルロポランスを植菌せず、そのまま 1 ヶ月インキュベートしたものを carbon source (s)（炭素源）として用い、DNS 法により測定した還元糖量を基にしてグルコース換算で 0.5% [w/v] となるように加えて嫌気状態にしたものを使用した。以下、この培地をクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地（ネガティブ）と示す。さらに比較として、グルコースを carbon source (s)（炭素源）として用い、0.5% [w/v] となるように加えて同様に微好気状態にしたものを使用した。以下、この培地をクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地（グルコース）と示す。

30

## 【0046】

## [ クロストリジウムアセトブチリカム発酵用チオグリコレート培地組成 ]

- 1.5% Polypeptone
- 0.5% Yeast extract
- 0.5% Carbon source
- 0.25% NaCl
- 0.05% L-cysteine
- 0.05% Sodium thioglycolate
- 0.0001% Resazurin

40

## 【0047】

## &lt; アルコールの生産 &gt;

チオグリコレート培地でクロストリジウムアセトブチリカムを 24 時間培養し、4、3、000 × g で 10 分間遠心分離して集菌した後、10 倍に濃縮したクロストリジウムアセトブチリカム懸濁液を上記にて調製したクロストリジウムアセトブチリカム発酵用チオグリコレート培地（以下、単に発酵培地と示す場合がある）に全体の 1/10 量を植菌した。37 で 60 時間、嫌気チャンパー内で静置培養を行い、培養終了後に遠心分離して回収した上清を濾過し、生産されたアルコール（ブタノール、エタノール）の濃度をガスクロマトグラフィー（GC）（株）島津社製）により測定した。また、比較としてクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地（ネガティブ）またはクロストリジウムアセト

50

ブチリカム発酵用培地（グルコース）にそれぞれ酵母を植菌して静置培養を行い、上清を回収して、同様に生産されたエタノールの濃度を測定した。

【 0 0 4 8 】

< 結果 >

得られたアルコールのうち、図 6 および表 3 にクロストリジウムアセトブチリカムを加えて嫌気チャンバー内で静置培養したことにより得られた培養液（発酵液）中のブタノール濃度と発酵率（ブタノール変換率）を示した。図 6 および表 3 に示される各記号はそれぞれ次のものを示す。

A N：サンプル A を柑橘類由来原料とするクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地（ネガティブ）使用

10

A：サンプル A を柑橘類由来原料とするクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地（ポジティブ）使用

B N：サンプル B を柑橘類由来原料とするクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地（ネガティブ）使用

B：サンプル B を柑橘類由来原料とするクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地（ポジティブ）使用

P：グルコースを炭素源とするクロストリジウムアセトブチリカム発酵用培地（グルコース）使用

【 0 0 4 9 】

【 表 3 】

20

サンプル	AN	A	BN	B	P
ブタノール濃度 (w/v%)	0.235	0.231	0.275	0.275	0.418
発酵率 (%)	4.7	4.6	5.5	5.5	8.4

【 0 0 5 0 】

図 6 および表 3 に示されるように、酵母によって生産されるエタノールとは異なり、クロストリジウムアセトブチリカムによって生産されるブタノールは、培地に使用するサンプルの種類や糖化方法の違いによって大きな差が見られなかった。これは、クロストリジウムアセトブチリカムが酵母に比べて多種多様な糖源をアルコール変換できる能力を有するためと考えられた。

30

【 0 0 5 1 】

B．クロストリジウムセルロポランスとクロストリジウムベイジェリンキーによるアルコールの製造

[ 実施例 4 ] あずき粕からのアルコールの製造

あずき粕（三重県松阪市産、含水率 80%）からアルコールの製造を試みた。まず、あずき粕 0.25 g を 10 ml のクロストリジウムセルロポランス嫌気性培地に懸濁し 10 ml 容キャップ付き試験管に投入した。続いて、クロストリジウムベイジェリンキー（フリーズストックより 24 時間プレ培養を行ったもの）を 200  $\mu$ l（菌数：OD 600 nm = 約 1.4）植菌した後、37 のインキュベーター内に移し、48 時間、静置培養した。培養終了後、サンプリングし（一次発酵サンプル）、生産されたアルコールの組成及び量を測定した。

40

【 0 0 5 2 】

一方、同様の培地を別の 10 ml キャップ付き試験管に投入した。クロストリジウムセルロポランス（フリーズストックより 24 時間プレ培養を行ったもの）を 100  $\mu$ l（菌数：OD 600 nm = 約 0.6）植菌した後、37 のインキュベーター内に移し、1 週間、静置培養した。この時点でサンプリングした後（糖化サンプル）、クロストリジウムベイジェリンキー（フリーズストックより 24 時間プレ培養を行ったもの）を 200  $\mu$ l（菌数：OD 600 nm = 約 1.4）植菌し、同条件下で 48 時間、培養を継続した

50

。培養終了後、サンプリングし（二次発酵サンプル）、生産されたアルコールの組成及び量を測定した。また、糖化サンプル中の還元糖量を測定した。

【0053】

測定結果を図7に示す。図7中の左欄は、上から順に、原料名、原産地、含水量、原料に含まれる糖質（湿重量1kgあたりに含まれている可溶糖・不溶糖の量）、及び糖化時の様子である。図7中の右欄は、上から順に、原料から溶出した可溶糖の濃度と原料1kg（湿重量）あたりの溶出量、原料から溶出した可溶糖を発酵（一次発酵）して得られた各生産物質の濃度と原料1kg（湿重量）あたりの生産量、原料中の不溶糖を糖化して得られた糖濃度と原料1kg（湿重量）あたりの糖化糖量、原料中の不溶糖を糖化して得られた糖を発酵（二次発酵）して得られた生産物質の濃度と原料1kg（湿重量）あたりの生産量である。

10

【0054】

クロストリジウムセルロポランスによる糖化の結果、原料1kgあたり65.44gの還元糖（グルコース換算）が得られた。クロストリジウムベイジェリンキーとの並行複発酵により、原料1kgあたり10.592gのエタノール、12.960gのn-ブタノールを発酵生産することに成功した。クロストリジウムベイジェリンキーの直接接種（一次発酵）による発酵生産も確認できたが、その生産量は共培養（並行複発酵）の場合よりもやや少なかった。なお、クロストリジウムセルロポランスの植菌直後から菌体の増殖とガスの発生が見られ、培養開始から168時間（1週間）後には、固形物の大幅な減少（分解）が確認された（図7中の左欄、下段）。

20

【0055】

[実施例5] みかん搾汁粕からのアルコールの製造

みかん搾汁粕（三重県御浜町産、含水率84%）からアルコールの製造を試みた。まず、みかん搾汁粕113.4gを100mlの水に懸濁し、ろ過処理によって可溶性画分と不溶性画分を分離した。可溶性画分（全量）を用いてチオグリコレート培地を作製し、50ml容バイアル瓶に投入した。続いて、クロストリジウムベイジェリンキー（フリーズストックより24時間プレ培養を行ったもの）を1000 $\mu$ l（菌数：OD 600 nm = 約1.4）植菌した後、37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター内に移し、48時間、静置培養した。培養終了後、サンプリングし（一次発酵サンプル）、生産されたアルコールの組成及び量を測定した。

30

【0056】

一方、不溶性画分（0.3125g）をクロストリジウムセルロポランス培地とともに別の50ml容バイアル瓶に投入した。クロストリジウムセルロポランス（フリーズストックより24時間プレ培養を行ったもの）を500 $\mu$ l（菌数：OD 600 nm = 約0.6）植菌した後、37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター内に移し、384時間、静置培養した。この時点でサンプリングした後（糖化サンプル）、クロストリジウムベイジェリンキー（フリーズストックより24時間プレ培養を行ったもの）を1000 $\mu$ l（菌数：OD 600 nm = 約1.4）植菌し、同条件下で48時間、培養を継続した。培養終了後、サンプリングし（二次発酵サンプル）、生産されたアルコールの組成及び量を測定した。また、糖化サンプル中の還元糖量を測定した。

40

【0057】

測定結果を図8に示す。図8中の左欄は、上から順に、原料名、原産地、含水量、原料に含まれる糖質（湿重量1kgあたりに含まれている可溶糖・不溶糖の量）、及び糖化時の様子である。図8中の右欄は、上から順に、原料から溶出した可溶糖の濃度と原料1kg（湿重量）あたりの溶出量、原料から溶出した可溶糖を発酵（一次発酵）して得られた各生産物質の濃度と原料1kg（湿重量）あたりの生産量、原料中の不溶糖を糖化して得られた糖濃度と原料1kg（湿重量）あたりの糖化糖量、原料中の不溶糖を糖化して得られた糖を発酵（二次発酵）して得られた生産物質の濃度と原料1kg（湿重量）あたりの生産量である。

【0058】

50

アルコール発酵可能な可溶糖が予め多く含まれており、洗浄溶出液からの一次発酵によって各種アルコールの生産が可能であった。また、洗浄後の残渣にはセルロースが含まれており、クロストリジウムセルロポランスで糖化可能であることから、二次発酵においても各種アルコールの生産が可能であった。なお、基質濃度 0.5%、糖化時間 384 時間で固形分がほぼ全て消失した（図 8 中の左欄、下段）。

#### 【0059】

##### [ 実施例 6 ] 脱脂米糠からのアルコールの製造

脱脂米糠（ベトナム、含水率 12.42%）からアルコールの製造を試みた。まず、脱脂米糠 0.057 g を 10 ml のクロストリジウムセルロポランス嫌気性培地に懸濁し 10 ml 容キャップ付き試験管に投入した。続いて、クロストリジウムベイジェリンキー（フリーズストックより 24 時間プレ培養を行ったもの）を 200  $\mu$ l（菌数：OD 600 nm = 約 1.4）植菌した後、37 のインキュベーター内に移し、48 時間、静置培養した。培養終了後、サンプリングし（一次発酵サンプル）、生産されたアルコールの組成及び量を測定した。

10

#### 【0060】

一方、同様の培地を別の 10 ml 容キャップ付き試験管に投入した。クロストリジウムセルロポランス（フリーズストックより 24 時間プレ培養を行ったもの）を 100  $\mu$ l（菌数：OD 600 nm = 約 0.6）植菌した後、37 のインキュベーター内に移し、1 週間、静置培養した。この時点でサンプリングした後（糖化サンプル）、クロストリジウムベイジェリンキー（フリーズストックより 24 時間プレ培養を行ったもの）を 200  $\mu$ l（菌数：OD 600 nm = 約 1.4）植菌し、同条件下で 48 時間、培養を続けた。培養終了後、サンプリングし（二次発酵サンプル）、生産されたアルコールの組成及び量を測定した。また、糖化サンプル中の還元糖量を測定した。

20

#### 【0061】

測定結果を図 9 に示す。図 9 中の左欄は、上から順に、原料名、原産地、含水量、原料に含まれる糖質（湿重量 1 kg あたりに含まれている可溶糖・不溶糖の量）、及び糖化時の様子である。図 9 中の右欄は、上から順に、原料から溶出した可溶糖の濃度と原料 1 kg（湿重量）あたりの溶出量、原料から溶出した可溶糖を発酵（一次発酵）して得られた各生産物質の濃度と原料 1 kg（湿重量）あたりの生産量、原料中の不溶糖を糖化して得られた糖濃度と原料 1 kg（湿重量）あたりの糖化糖量、原料中の不溶糖を糖化して得られた糖を発酵（二次発酵）して得られた生産物質の濃度と原料 1 kg（湿重量）あたりの生産量である。

30

#### 【0062】

クロストリジウムセルロポランスによる糖化後、クロストリジウムベイジェリンキー接種による共培養で発酵液 1 L あたり 0.0643 g のエタノール、0.0860 g の n-ブタノールを発酵生産することに成功した。また、クロストリジウムベイジェリンキーの直接接種（一次発酵）によっても発酵生産が可能であったが、その生産量は共培養（並行複発酵）の場合にやや劣った。なお、糖化時には全体的な米糠の減少が見られ、菌体の活動を示す発酵ガスの発生も見られたことから、原料の一部を糖化利用可能と考えられた（図 9 中の左欄、下段）。

40

#### 【0063】

##### [ 実施例 7 ] 還元糖濃度のモニタリングに基づくアルコール発酵（みかん搾汁残渣）

クロストリジウムセルロポランス（*C. cellulovorans*）による可溶糖抽出済みのみかん搾汁残渣（乾燥重量あたり 1% [w/v]）の分解を図 10 に示す。縦軸は培養液中の還元糖濃度（g/L）であり、横軸は培養時間である。

#### 【0064】

クロストリジウムセルロポランス（*C. cellulovorans*）およびクロストリジウムベイジェリンキー（*C. beijerinckii*）の共培養による可溶糖抽出済みのみかん搾汁残渣からのアルコール生産の結果を図 11 に示す。培地中の基質としてセルロースおよびヘミセルロースがそれぞれ 0.73 g/L、0.23 g/L 含まれている

50



。

n : 未植菌区、

b : クロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) のみ、

c + b 0 : クロストリジウムセルロポランス (*C. cellulovorans*) 植菌 0 時間後にクロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) 植菌、

c + b 48 : クロストリジウムセルロポランス (*C. cellulovorans*) 植菌 48 時間後にクロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) 植菌、

c + b 96 : クロストリジウムセルロポランス (*C. cellulovorans*) 植菌 96 時間後にクロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) 植菌

10

c + b 192 : クロストリジウムセルロポランス (*C. cellulovorans*) 植菌 192 時間後にクロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) 植菌、

であり、植菌時間は図 11 の分解時間における 1 回目の減少 (48 時間目)、1 回目のピーク (96 時間目)、2 回目のピーク (192 時間目) にそれぞれ対応している。3 本ずつのバーは左からエタノール濃度、ブタノール濃度、トータルのアルコール濃度 (g/L) を示している。図 11 より、セルロースとヘミセルロースを含む基質の場合は、セルロソーム生産菌を植菌してセルロースの分解を開始させた後にアルコール発酵菌を植菌してアルコール発酵を進行させることによって、発酵効率が向上することがわかった。さらに、図 10 のように、還元糖濃度を、サンプリング・クロマトグラフィー等や、紫外・可視・赤外等の領域における糖の吸収帯を用いた計測等によってモニタリングし、アルコール発酵菌の植菌の最適なタイミングを決定することによって、発酵効率がより向上することがわかった。

20

#### 【0065】

[ 実施例 8 ] 還元糖濃度のモニタリングに基づくアルコール発酵 (シュレッダー古紙)

クロストリジウムセルロポランス (*C. cellulovorans*) およびクロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) の共培養によるシュレッダー古紙からのアルコール生産の結果を図 12 に示す。培地中の基質として実質的にセルロースのみが含まれている。

30

n : 未植菌区、

b : クロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) のみ、

c + b 0 : クロストリジウムセルロポランス (*C. cellulovorans*) 植菌 0 時間後にクロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) 植菌、

c + b 120 : クロストリジウムセルロポランス (*C. cellulovorans*) 植菌 120 時間後にクロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) 植菌、

c + b 216 : クロストリジウムセルロポランス (*C. cellulovorans*) 植菌 216 時間後にクロストリジウムベイジェリンキー (*C. beijerinckii*) 植菌、

40

であり、3 本ずつのバーは左からエタノール濃度、ブタノール濃度、トータルのアルコール濃度 (g/L) を示している。図 12 より、実質的にセルロースのみ含む基質の場合は、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を同時に植菌してアルコール発酵を進行させることによって、発酵効率が向上することがわかった。

#### 【0066】

さらに、つぎの通り、サンプリング・クロマトグラフィー等や、紫外・可視・赤外等の領域における糖の吸収帯を用いた計測等によってヘミセルロースの有無を検出または判別する工程を最初に設けることにより、基質に最適な培養を行うことができ、発酵効率がより向上する。すなわち、基質におけるヘミセルロースの有無を検出または判別した結果、ヘミセルロースが含まれる基質の場合は、セルロソーム生産菌のみを植菌して培養を開始

50

、還元糖濃度をモニタリングすることで、アルコール発酵菌の植菌の最適なタイミングを決定し、発酵菌の植菌を行う。ヘミセルロースが実質的に含まれない、実質的にセルロースのみが含まれる基質の場合は、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を同時に植菌して培養を開始する。

【0067】

[実施例9] アルコール製造システム

上記実施例1から8の態様としての製造システムについて、一例を図13に示す。この製造システムは、バイオマスから回収した糖を基質としてアルコール発酵菌を培養するための第1培養槽（一次発酵槽）と、糖を回収した後の残渣を基質としてセルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を培養するための第2培養槽（共培養槽）とを備えている。この第2培養槽で、セルロソーム生産菌によるセルロース又はヘミセルロースの分解とアルコール発酵菌によるアルコール発酵が並行する期間を実現している。第1培養槽及び第2培養槽には、それぞれガスストリッピング（Gas Stripping）用冷却設備を介してアルコール貯留槽が連結されており、第1培養槽及び第2培養槽それぞれから回収したアルコールをアルコール貯留槽で収容できる。また、培養温度を維持するために、第1培養槽及び/又は第2培養槽には、ヒーター等の温度調節手段を設けることもできる。また内容物を攪拌するために、第1培養槽及び/又は第2培養槽には、攪拌機等の攪拌手段を設けることもできる。さらに、培養の途中で連続的又は間欠的に生産物（アルコール）を回収するために、第1培養槽とアルコール貯留槽の間、及び第2培養槽とアルコール貯留槽の間に、ガスストリッピング用冷却設備を備えてもよい。

10

20

【0068】

前記したように、本発明の製造方法の特徴の一つは、セルロースとヘミセルロースの含有比に応じて、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌の投入時期を決定する点である。セルロソーム生産菌を植菌してセルロースの分解を開始させた後にアルコール発酵菌を植菌してアルコール発酵を進行させることにより発酵効率が向上する。そのため、アルコール発酵菌を植菌するタイミングは、使用する基質、使用する菌株、その他の条件等によって変動し得る。経験値によって投入時期を決定しても良いが、還元糖濃度をモニタリングし、その結果に基づき投入時期を決定することが好ましい。サンプリング・クロマトグラフィ、紫外・可視・赤外等の領域における糖の吸収帯を用いて計測する還元糖濃度測定手段を備えることで、タイミング決定を効率的に決定できる。

30

【0069】

また、設置面積を削減するため、第1培養槽及び第2培養槽を1つの培養槽とすることも可能である。例えば、バイオマスから回収した糖を基質としてアルコール発酵菌を培養するための第1培養期間（一次発酵期間）と、糖を回収した後の残渣を基質としてセルロソーム生産菌とアルコール発酵菌を培養するための第2培養期間（共培養期間）として1つの培養槽を時系列で使い分けることで当該態様を実現することができる。この場合、第1培養期間と第2培養期間の間に、洗浄期間及び/又は一時培養休止期間を設けることができる。この場合は培養、発酵、回収に時間がかかるが、第一培養槽から第二培養槽へ残渣を移動する必要がなく、回収効率が下がる可能性はあるものの、作業効率は向上できる。

40

【0070】

さらに、発酵速度調整用に嫌気性の雰囲気調整するように制御された吸排気口や、セルロソーム生産菌とアルコール発酵菌の密度を制御するための菌种植菌口を設けること、それらを、時間、温度、還元糖濃度測定手段の出力、アルコール等の回収量をパラメータとして、プログラムによってコンピュータなどを用いて自動制御することも可能である。

【産業上の利用可能性】

【0071】

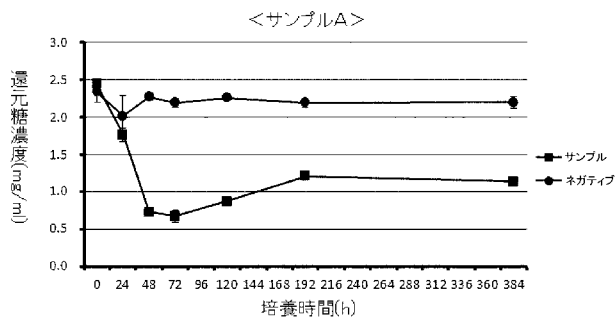
本発明により、セルロース含有原料（例えば柑橘類由来原料、イネ科由来原料及びマメ科由来原料）から効率的にエタノールやブタノール等のアルコールを製造することが可能となる。柑橘類由来原料を用いる場合には、基質濃度を最適な範囲内に調整することによ

50

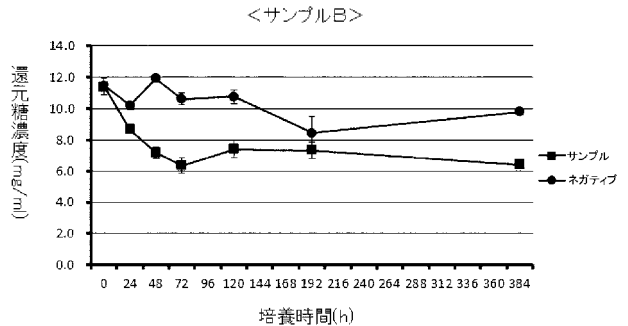
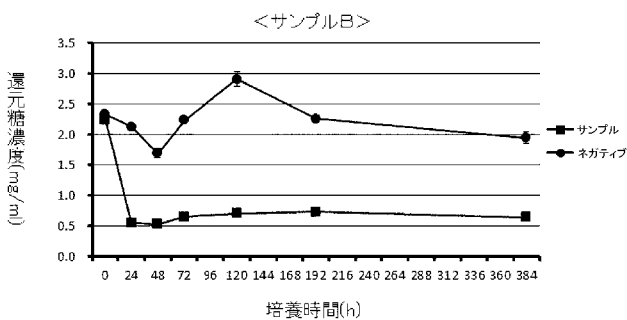
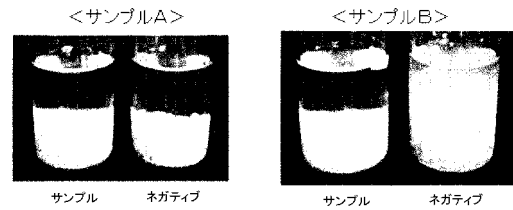
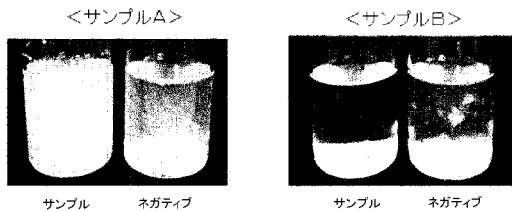
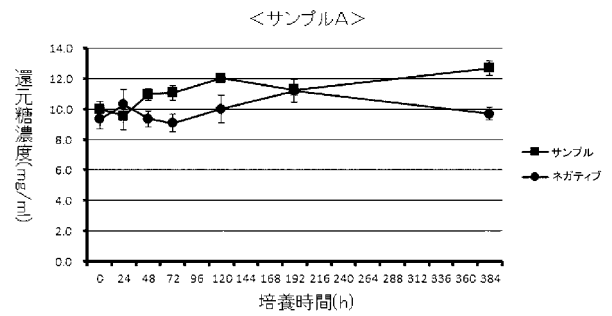
り、柑橘類の大量な残渣から有用なアルコールを安価かつ大量に得ることも可能となる。  
【0072】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

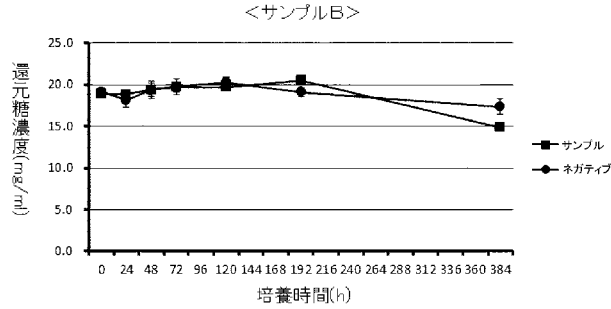
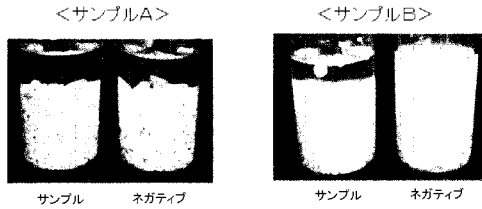
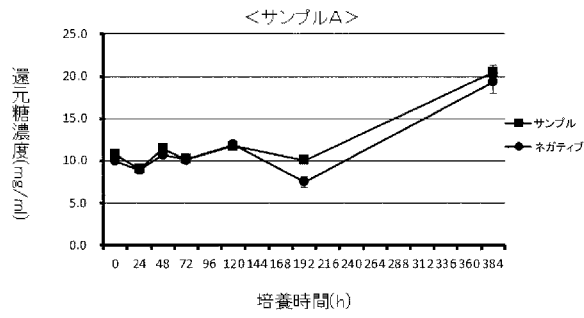
【図1】



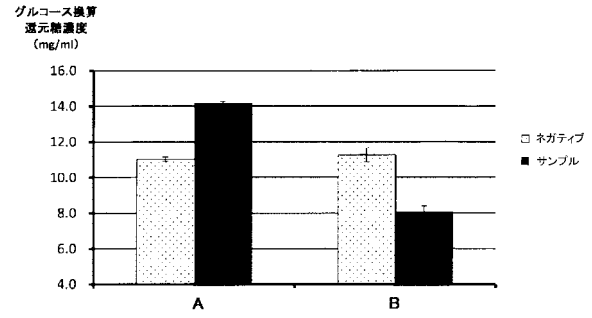
【図2】



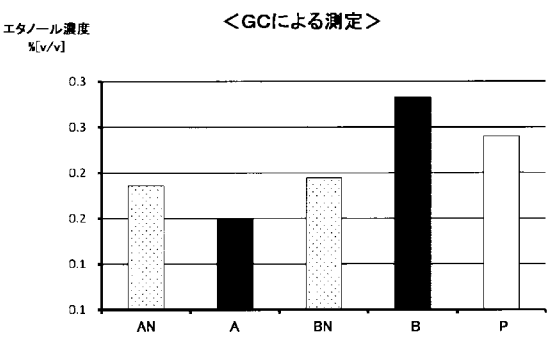
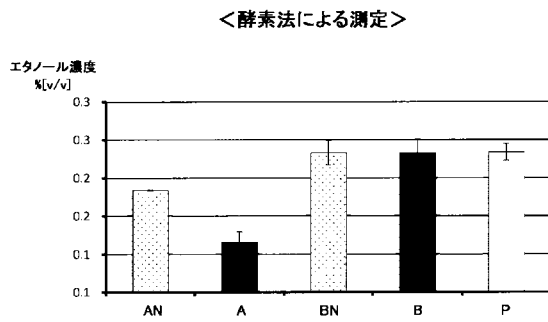
【 図 3 】



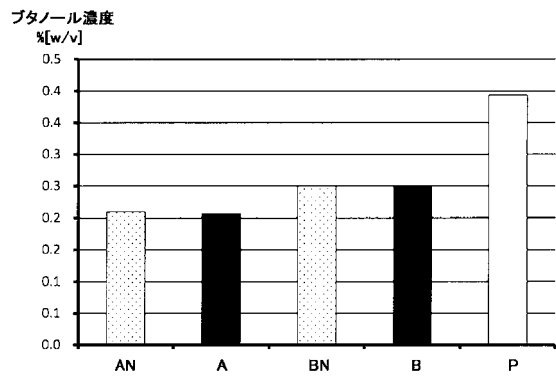
【 図 4 】



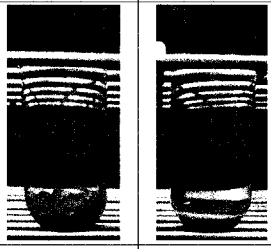
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

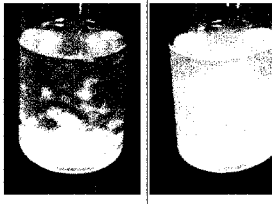
原料	あずき粕	
原産地	三重県松阪市	
含水率	80%	
原料に含まれる糖質		
糖の種類	原料1kgあたりの糖量(g/kg)	
可溶性糖	未測定	
不溶性糖	未測定	
糖化時の様子(写真)		
未糖菌	糖菌	
		
培養時間		

洗浄時の可溶性糖溶出*		
溶出濃度	0.25 g/L 未満	
溶出量	2.40 g/kg 未満	
一次発酵時の生産物質**		
化合物名	発酵液1Lあたりの生産濃度(g/L)	原料1kgあたりの生産量(g/kg)
Ethanol	0.0822	9.952
Acetone		
2-Propanol		
n-Butanol	0.0770	12.320
糖化時の還元糖生産*		
還元糖濃度	0.409 g/L	
還元糖量	65.44 g/kg	
二次発酵時の生産物質**		
化合物名	発酵液1Lあたりの生産濃度(g/L)	原料1kgあたりの生産量(g/kg)
Ethanol	0.0862	10.992
Acetone		
2-Propanol		
n-Butanol	0.0810	12.960

\*DNS法による(グルコース換算)  
\*\*ガスクロマトグラフィーによる

【 図 8 】

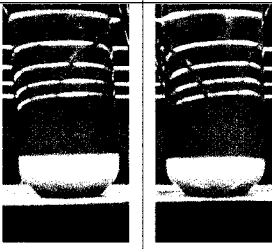
原料	みかん搾汁粕	
原産地	三重県御浜町	
含水率	84%	
原料に含まれる糖質		
糖の種類	原料1kgあたりの糖量(g/kg)	
可溶性糖	87.9	
不溶性糖	15.2	
糖化時の様子(写真)		
未糖菌	糖菌	
		
糖化時間		
384時間		

洗浄時の可溶性糖溶出*		
溶出濃度	42 g/L	
溶出量	73 g/kg	
一次発酵時の生産物質**		
化合物名	発酵液1Lあたりの生産濃度(g/L)	原料1kgあたりの生産量(g/kg)
Ethanol	0.154	0.270
Acetone	0.077	0.135
2-Propanol	0.846	1.484
n-Butanol	3.991	7.002
糖化時の還元糖生産*		
還元糖濃度	4.25 g/L	
還元糖生産量	37.5 g/kg	
二次発酵時の生産物質**		
化合物名	発酵液1Lあたりの生産濃度(g/L)	原料1kgあたりの生産量(g/kg)
Ethanol	0.283	1.814
Acetone		
2-Propanol		
n-Butanol	0.250	1.503

\*DNS法による(グルコース換算)  
\*\*ガスクロマトグラフィーによる

【 図 9 】

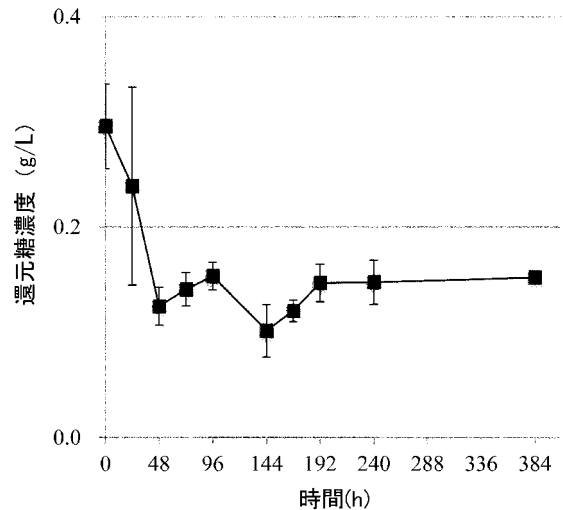
原料	脱脂米ぬか	
原産地	ベトナム	
含水率	12.42%	
原料に含まれる糖質		
糖の種類	原料1kgあたりの糖量(g/kg)	
可溶性糖	未測定	
不溶性糖	未測定	
糖化時の様子(写真)		
未糖菌	糖菌	
		
培養時間		

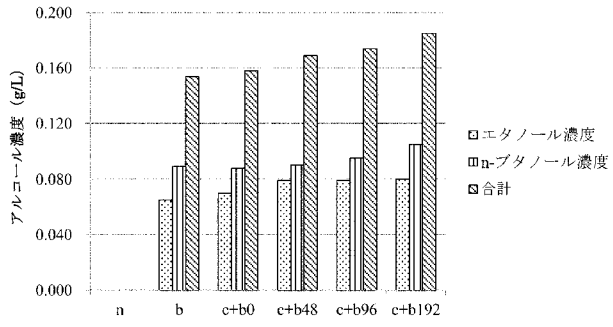
洗浄時の可溶性糖溶出*		
溶出濃度	0.25 g/L 未満	
溶出量	2.40 g/kg 未満	
一次発酵時の生産物質**		
化合物名	発酵液1Lあたりの生産濃度(g/L)	原料1kgあたりの生産量(g/kg)
Ethanol	0.0643	5.631
Acetone		
2-Propanol		
n-Butanol	0.0799	6.998
糖化時の還元糖生産*		
還元糖濃度	0.25 g/L 未満	
還元糖量	2.40 g/kg 未満	
二次発酵時の生産物質**		
化合物名	発酵液1Lあたりの生産濃度(g/L)	原料1kgあたりの生産量(g/kg)
Ethanol	0.0643	5.631
Acetone		
2-Propanol		
n-Butanol	0.0860	7.532

\*DNS法による(グルコース換算)  
\*\*ガスクロマトグラフィーによる

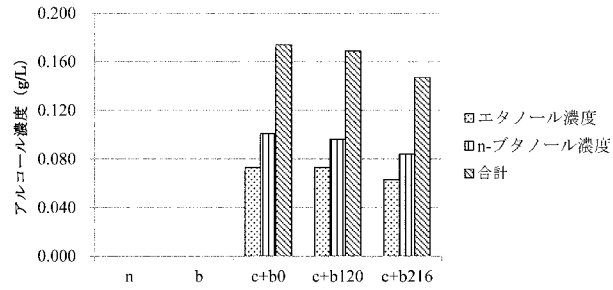
【 図 10 】



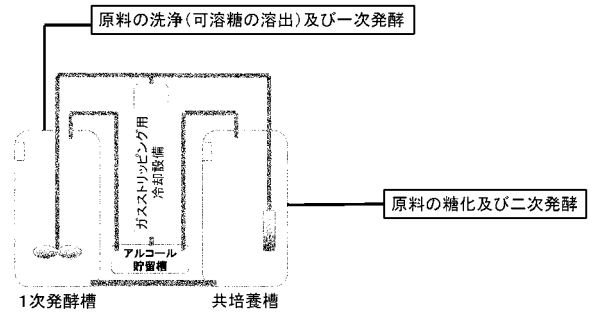
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/054324
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12P7/04(2006.01)i, C12P7/10(2006.01)i, C12P7/12(2006.01)i, C12P7/16(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P7/04, C12P7/10, C12P7/12, C12P7/16 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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), WPIDS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Yujiro KAWADE et al., "Chuonkin <i>C.cellulovorans</i> Oyobi <i>C.aceetobutylicum</i> no Kyobaiyo ni yoru Cellulose kara no Butanol Hakko", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2013 Nendo Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2013 (05.03.2013), vol.2013, 3C11P20, entire text	1,4-7,10/ 1-14
X/Y	Hiroshi TAMARU, "Cellulosome Kenkyu no Kiso to Oyo: <i>Clostridium cellulovorans</i> ", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2012 Nendo Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2012 (05.03.2012), vol.2012, 4SY01-4, main text, lines 18 to 26	1,4-7,10/ 1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 15 May 2015 (15.05.15)		Date of mailing of the international search report 26 May 2015 (26.05.15)
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/JP2015/054324

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X/P,Y	WEN, Z. et al., Artificial symbiosis for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation from alkali extracted deshelled corn cobs by co-culture of <i>Clostridium beijerinckii</i> and <i>Clostridium cellulovorans.</i> , Microb. Cell Fact., 2014.07.15, Vol.13 No.1(92), pages 1-11, summary, page 3, left column, line 1 to page 4, right column, line 2, page 4, right column, line 4 to page 5, left column, line 20, fig. 2, 3A	2,4-6,8,10/ 2-14
Y	HAN, S.O. et al., Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in <i>Clostridium cellulovorans.</i> , J. Bacteriol., 2003, Vol.185 No.20, pages 6067-6075, summary, page 6069, line 10 to page 6072, left column, line 12, page 6072, right column, line 24 to page 6074, left column, line 8, fig. 3 to 8	2-14
Y	JP 2010-094093 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 30 April 2010 (30.04.2010), claims; paragraph [0016] (Family: none)	8-14
Y	JP 2010-200647 A (Saga-Ken), 16 September 2010 (16.09.2010), claims; examples (Family: none)	8-14
Y	WO 2008/078418 A1 (Saihatu KO), 03 July 2008 (03.07.2008), claims; paragraph [0027] & JP 2010-57363 A	8-14
Y	JP 2010-246435 A (Nippon Steel Engineering Co., Ltd. et al.), 04 November 2010 (04.11.2010), paragraphs [0011] to [0012] (Family: none)	11-14
Y	Shinji OKAMOTO, "Mikan Sakuju Zansa o Genryo to shita Bioethanol Koritsuteki Seizo Gijutsu Kaihatsu Kenkyu", Chikyu Ondanka Taisaku Gijutsu Kaihatsu To Jigyo Heisei 22 Nendo Shuryo Kadai no Jigo Hyoka [online], Ministry of the Environment, 22 April 2011 (22.04.2011), [retrieval date 13 May 2015 (13.05.2015)], Internet <URL:http://www.env.go.jp/earth/ondanka/cpttv_funds/hyouka/hyouka_h22/jigo_h22/4-3.pdf>	11-14



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/054324

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X/P, A	Kosuke YAMAMOTO et al., " <i>Clostridium</i> -zoku Chuonkin o Mochiita Miriyo Kankitsurui kara no n-butanol Seisan", Dai 66 Kai Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 05 August 2014 (05.08.2014), vol.66, page 73, 1P-220, entire text	1, 4-10/2, 3, 11-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 4 3 2 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P7/04(2006.01)i, C12P7/10(2006.01)i, C12P7/12(2006.01)i, C12P7/16(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. C12P7/04, C12P7/10, C12P7/12, C12P7/16											
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 <table border="0"> <tr> <td>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>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015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	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015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) CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), WPIDS(STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X /Y	川出 雄二郎 他, 中温菌 <i>C. cellulovorans</i> および <i>C. acetobutylicum</i> の共培養によるセルロースからのブタノール発酵, 日本農芸化学会 2013 年度大会講演要旨集, 2013.03.05, Vol.2013, 3C11P20, 全文	1, 4-7, 10 /1-14									
X /Y	田丸 浩, セルロソーム研究の基礎と応用: <i>Clostridium cellulovorans</i> , 日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集, 2012.03.05, Vol.2012, 4SY01-4, 本文 18 行-26 行	1, 4-7, 10 /1-14									
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人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 15.05.2015		国際調査報告の発送日 26.05.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 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		特許庁審査官 (権限のある職員) 鶴 剛史	4 B 4 6 7 0								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 4 3 2 4
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
P, X /P, Y	WEN, Z. et al., Artificial symbiosis for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation from alkali extracted deshelled corn cobs by co-culture of <i>Clostridium beijerinckii</i> and <i>Clostridium cellulovorans.</i> , Microb. Cell Fact., 2014.07.15, Vol.13 No.1(92), pages 1-11, 要旨、3頁左欄1行-4頁右欄2行、4頁右欄4行-5頁左欄20行、図2、図3A	2, 4-6, 8, 10 /2-14
Y	HAN, S.O. et al., Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in <i>Clostridium cellulovorans.</i> , J. Bacteriol., 2003, Vol.185 No.20, pages 6067-6075, 要旨、6069頁10行-6072頁左欄12行、6072頁右欄24行-6074頁左欄8行、図3-8	2-14
Y	JP 2010-094093 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2010.04.30, 特許請求の範囲、[0016] (ファミリーなし)	8-14
Y	JP 2010-200647 A (佐賀県) 2010.09.16, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	8-14
Y	WO 2008/078418 A1 (洪 再発) 2008.07.03, 請求の範囲、[0027] & JP 2010-57363 A	8-14
Y	JP 2010-246435 A (新日鉄エンジニアリング株式会社 他) 2010.11.04, [0011]-[0012] (ファミリーなし)	11-14
Y	岡本 信二, みかん搾汁残さを原料としたバイオエタノール効率的製造技術開発研究, 地球温暖化対策技術開発等事業 平成22年度終了課題の事後評価 [online], 環境省, 2011.04.22, [検索日 2015.05.13], インターネット <URL:http://www.env.go.jp/earth/ondanka/cpttv_funds/hyouka/hyouka_h22/jigo_h22/4-3.pdf>	11-14
P, X /P, A	山本 康介 他, <i>Clostridium</i> 属中温菌を用いた未利用柑橘類からのn-ブタノール生産, 第66回日本生物工学会大会講演要旨集, 2014.08.05, Vol.66, page 73 1P-220, 全文	1, 4-10 /2, 3, 11-14

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。