

## (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  
2009年8月27日(27.08.2009)

PCT



(10) 国際公開番号

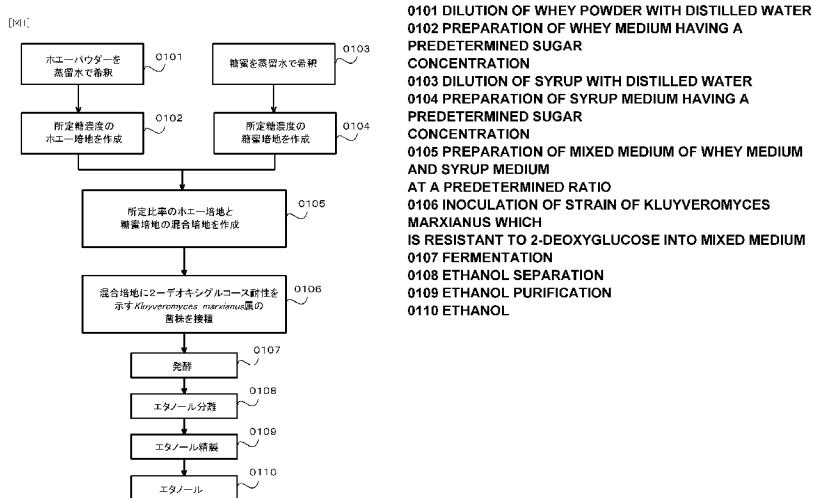
WO 2009/104454 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12P 7/06* (2006.01)      *C12R 1/645* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/051106
- (22) 国際出願日: 2009年1月23日(23.01.2009)
- (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 2008-040697 2008年2月21日(21.02.2008) JP  
特願 2008-239928 2008年9月18日(18.09.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 帯広畜産大学(OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稻田町西2線11番地 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小田 有二 (ODA, Yuji) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稻田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 工藤 一郎(KUDO, Ichiro); 〒1000006 東京都千代田区有楽町1丁目7番1号有楽町電気ビル南館 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, JP, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

## (54) Title: METHOD FOR PRODUCING ETHANOL

## (54) 発明の名称: エタノール製造方法



(57) Abstract: A lactose amount in cheese whey is 1 to 5% (w/v), which is low, and when cheese whey is fermented as such, an ethanol concentration results in only 0.5 to 2.5% (w/v), and production efficiency is low. It is possible to increase a sugar concentration in a medium using whey powder, however, fossil energy is consumed in a production step of the whey powder, therefore, the cost tends to be high. By utilizing a yeast strain of *Kluyveromyces marxianus* which is resistant to 2-deoxyglucose, ethanol is promptly and efficiently produced from a raw material containing lactose and a sugar other than lactose as a sugar source.

(57) 要約: 【課題】チーズホエー中のラクトース量は1~5%(w/v)と低く、このままの状態で発酵させるとエタノール濃度が0.5~2.5%(w/v)にしかならないため、生産効率が悪い。ホエーパウダーを使用して培地の糖濃度を高めることも可能だが、該ホエーパウダーの生産工程において化石エネルギーを消費するのでコスト高になりやすい。【解決方法】2-デオキシグルコース耐性を示す*Kluyveromyces marxianus*に属する酵母菌株を利用し、糖源としてラクトースとそれ以外の糖が混合された原料から迅速かつ効率的にエタノールを生産する。



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)）

## 明細書

### エタノール製造方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、ラクトースとそれ以外の糖が混合された原料から効率的にエタノールを製造する方法に関するものである。

#### 背景技術

[0002] 地球温暖化の防止に向けた取り組みとして、世界各国で植物に由来するバイオ燃料の導入が急速に進んでいる。わが国でもエタノール混合ガソリンの本格的な普及のために、農作物を原料とした燃料用エタノールの商業規模による生産が計画されている。原料中の糖質をエタノールへと変換するには、一般的に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が使用されている。この酵母は、テンサイやサトウキビに含まれるスクロースを自らグルコースとフルクトースに分解して発酵する。トウモロコシ、米、小麦、バレイショなどに含まれるデンプン質を原料とする場合には、アミラーゼなどによって酵母が容易に発酵可能なグルコースにまで加水分解しなければならない。

[0003] 植物以外でエタノール製造の原料として豊富に存在する資源にチーズホエーがある。チーズホエーとは、生乳を凝固させてチーズを製造する際に副生する液体のことである。主成分はグルコースとガラクトースそれぞれ一分子から成る二糖のラクトース、ホエータンパク質、無機塩類およびビタミンなどである。チーズホエーは原料乳の約90%に相当する量が発生し、廃液として処理するには大きな環境負荷がかかるため、全量をホエーパウダーと呼ばれる乾燥品にしたり、あるいはろ過、濃縮、乾燥などの処理によってタンパク質およびラクトースを分別・回収して食品素材や飼料としても利用されている(M. I. Gonzalez-Siso, The biotechnological utilization of cheese whey: a review, *Bioresource Technology*, 57, 1-11, 1996)。しかし、チーズの生産が盛んな地域では大量に発生するため、その処分に苦慮することが少なくない。

[0004] 通常の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はラクトースを発酵できないため、チーズホエーからエタノールを製造するには、上記で述べたニュージーランドを含めて *Kluyveromyces marxianus* などのラクトース発酵性酵母を使用することが多い(非特許文献1)。

組み換えDNA技術によってラクトース発酵性遺伝子を導入した*Saccharomyces cerevisiae*を使用する方法や(非特許文献2)、チーズホエー中のラクトースを酵素製剤によってグルコースとガラクトースに分解した後、*Saccharomyces cerevisiae*で発酵させる方法も報告されている(非特許文献3)。

[0005] 最近の関連特許は次の通りである。Kluyveromyces marxianusによるエタノール製造に関しては、高温発酵性酵母によるエタノールの製造法がある(特許文献1)、栄養酒の製造方法(特許公開昭63-7774)。チーズホエーの利用に関しては、チーズホエードリンクヨーグルトの製造方法(特許公開2002-165557)およびチーズホエー飲料の製造法(特許公開平9-131162)、チーズ加工廃棄物の処理方法(特許公表平10-513437)、クリヴェロマイセス・マルキシアヌスによる4-trans, 8-trans-sphingadienineを主要なスフィンゴイド塩基として持つセレブロシドの製造法(特許公開2006-55071)などがある。2-デオキシグルコース耐性酵母に関しては、アルコール発酵力の高い酵母菌株がある(特許文献2)。異化代謝産物非抑制性の基質限定性酵母菌株(特許公表平9-511406)、ガンマーデカラクトン及びガンマードデカラクトンを含有する液体組成物の製造方法(特許出願平9-295387)、イノシトールの製造方法およびグルコース代謝拮抗物質耐性株の取得法(特許公開平8-38188)、シュワンニオミセス・カステリ変異株および該株からの培養濾液(特許公開平6-189735)などがある。

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0006] しかし、チーズホエー中のラクトース量は1～5%(w/v)と低く、このままの状態で発酵させるとエタノール濃度が0.5～2.5%(w/v)にしかならないため、生産効率が悪い。ホエーパウダーを使用して培地の糖濃度を高めることも可能だが、該ホエーパウダーの生産工程において化石エネルギーを消費するのでコスト高になりやすい。もっとも簡便な解決方法は、糖蜜をチーズホエーで希釀した混合原料として使用する方法である。しかしここで問題となるは、グルコースやスクロースの存在下におけるラクトース代謝系酵素の発現抑制、いわゆるカタボライトプレッシャンが起こることである(K. J. Vestrupen et al., Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast, Trends in Biotechnology, 22, 531-537, 2004)。グルコースやスクロースが消費された後、徐

々にラクトース代謝系酵素の発現し始めるため、所定の時間内に発酵が完了しないのである。同様の現象は、組み換えDNA技術によってラクトース発酵性遺伝子を導入した*Saccharomyces cerevisiae*でも起こりうる。

[0007] そこで、該カタボライトリプレッショング解除された菌株として、2-デオキシグルコースを含むガラクトースを主要糖源とする最小培地において生育可能な*Saccharomyces cerevisiae*の2-デオキシグルコース耐性株の中からグルコースとガラクトースの両方を迅速かつ完全に発酵する菌株が見出されている(非特許文献4)。グルコースの構造アナログである2-デオキシグルコースはグルコースと同様にカタボライトリプレッショングを引き起こすが代謝されないためにガラクトースの利用を阻害する。2-デオキシグルコース耐性株の中には、カタボライトリプレッショングの影響を受けない菌株が出現したと考えられる。*Kluyveromyces marxianus*においては、これまでに2-デオキシグルコース耐性を付与することにより、イヌリナーゼ高生産性株が取得されている(J. Bourgi et al., Isolation of a *Kluyveromyces fragilis* derepressed mutant hyperproducer of inulinase for ethanol production from Jerusalem Artichoke, *J. Ferment. Technol.*, 64, 2 39–243, 1986)。

[0008] *Kluyveromyces marxianus*には、チーズホエー(非特許文献5)およびサトウキビ搾汁(非特許文献6)からのエタノール生産性に優れた菌株がそれぞれ別々に見出されている。しかし、*Kluyveromyces marxianus*によって乳由来のラクトースとそれ以外の糖が混合された原料から効率的にエタノールを製造する従来技術はないのが現状である。また、高温耐性発酵菌として分離された*Kluyveromyces marxianus* IMB3は、ラクトースおよびスクロースからのエタノールを生成するが、糖蜜培地におけるエタノール生産性はあまり高くない(D. Singh et al., Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: part II—use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 823–834, 1998)。

非特許文献1:S. Ozmihci and F. Kargi, Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations, *Bioresource Technology*, 98, 2978–2984, 2007

非特許文献2:L. Domingues et al., Alcohol production from cheese whey permeate

using genetically modified flocculent yeast cells, Biotechnology and Bioengineering, 72, 507–514, 2001

非特許文献3:C. P. Champagne and J. Goulet, Growth of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in lactose-hydrolyzed cheese-whey ultrafiltrate, Canadian Institute of Food Science and Technology journal, 21, 545–548, 1988

非特許文献4:(R. B. Biley et al., *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to catabolite repression; use in cheese whey hydrolysate fermentation, Applied and Environmental Microbiology, 44, 631–639, 1982)

非特許文献5:P. Vienne and R. V. Stockar, Alcohol from whey permeate: strain selection, temperature, and medium optimization, Biotechnology and Bioengineering Symposium, 13, 421–435, 1983; J. Szczodrak et al., Selection of yeast strain and fermentation conditions for high-yield ethanol production from lactose and concentrated whey, Acta Biotechnologica, 17, 51–61, 1997; S. Ozmihi and F. Kargi, Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution, Letters in Applied Microbiology, 44, 602–606, 2007

非特許文献6:S. Limotong et al., Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*, Bioresource Technology, 98, 3367–3374, 2007

特許文献1:公開昭63-42690

特許文献2:公開昭63-240775

### 課題を解決するための手段

[0009] 上記の目的を達成するためには、まず原料中のラクトースを迅速に発酵すると同時に、スクロースも迅速に発酵する酵母菌株が必要である。通常のエタノール製造用に使用する酵母*Saccharomyces cerevisiae*はラクトース発酵性がないため、*Saccharomyces cerevisiae*に統いて比較的エタノール生産性の高い酵母*Kluyveromyces marxianus*が候補となる。ただし、*Kluyveromyces marxianus*に分類される菌株は一般にスクロースを発酵するものの、ラクトースを発酵しない菌株もある。また、糖からのエタノール生産性には菌株間の差異が大きい。そこで、最初にラクトースとスクロースをそれぞれ

主要な糖源として含む培地において、エタノール生産性の高い菌株を選抜する必要がある。このようにして選抜した菌株はラクトースとスクロース以外にグルコースからのエタノール生産性も十分に高いが、カタボライトリプレッションを受けるためにラクトースとスクロースまたはグルコースの共存下ではラクトースを発酵しない。そこで、この選抜株に2-デオキシグルコース耐性を付与することにより、カタボライトリプレッションが起こらない優良株へと改良することができる。本発明者はこのような方法で鋭意研究した結果、2-デオキシグルコース耐性を示す*Kluyveromyces marxianus*に属する酵母菌株が、糖源としてラクトースとそれ以外の糖が混合された原料から迅速かつ効率的にエタノールを生産することを発見し、本発明を完成させた。

- [0010] (1) 本発明は、2-デオキシグルコース耐性を示す、*Kluyveromyces marxianus*に属する酵母菌株を利用して、スクロース、ガラクトース、フルクトース、グルコース、ラフィノースからなる群のうち一または二以上の組み合わせである糖と、さらにラクトースとを混合した糖源をエタノール発酵させることでエタノールを得る、エタノールの製造方法を提供する。
- [0011] (2) また、本発明は2-デオキシグルコース耐性を示す、*Kluyveromyces marxianus*に属する酵母菌株を利用して、チーズホエー、乳のいずれか一以上、及び、テンサイ搾汁、サトウキビ搾汁、テンサイ糖蜜、サトウキビ糖蜜のいずれか一以上に含まれるラクトース、及び、スクロース、ガラクトース、フルクトース、グルコース、ラフィノースからなる群のうち一または二以上の組み合わせである糖を混合した糖源とからエタノール発酵させることでエタノールを得る、エタノールの製造方法を提供する。
- [0012] (3) また、本発明は2-デオキシグルコース耐性を示す、*Kluyveromyces marxianus*に属する酵母菌株は、受託番号NITE BP-465及び／又はNBRC0541であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載のエタノールの製造方法を提供する。
- [0013] (4) また、本発明は2-デオキシグルコース耐性を示す、*Kluyveromyces marxianus*に属する酵母菌株は、受託番号NITE BP-465であって、エタノール発酵は前記混合した糖源を15%から20%含む培地にて行うことを特徴とする上記(1)から(3)のいずれか一に記載のエタノール製造方法を提供する。

## 発明の効果

[0014] 本発明のエタノールの製造方法により、ラクトースとそれ以外の糖が混合された原 料から効率的にエタノールを製造することが可能となる。これによって、国産バイオ燃 料供給を確立する上で多大な寄与が期待できる。同時に、農業廃棄物の有効利用 が可能である。

### 発明を実施するための最良の形態

[0015] 以下、本件発明の実施の形態について、添付図面を用いて説明する。なお、本件発 明は、これら実施形態に何ら限定されるべきものではなく、その要旨を逸脱しない範 囲において、種々なる態様で実施し得る。なお、実施形態1は請求項1及び3などに 関する。実施形態2は請求項2及び3などに関する。

#### <<実施形態1>>

##### <実施形態1:概要>

[0016] 本実施形態は、糖源をエタノール発酵することによりエタノールを製造する方法で あって、エタノール発酵用微生物として、2-デオキシグルコース耐性を示すKluyveromyces marxianus に属する酵母菌株を利用し、糖源としてラクトースを含む混合糖源 を用いることを特徴とするエタノール製造方法について説明する。

[0017] 図1は、本発明に係るエタノール製造方法を示す概念図である。エタノール生産培 地として、ホエー培地及び糖蜜培地をそれぞれ生成する。ホエー培地は、ホエーパ ウダーを蒸留水で希釈し(S0101)、所定の糖濃度に調整し生成する(S0102)。糖 蜜培地は、糖蜜を蒸留水で希釈し(S0103)、所定の糖濃度に調整し生成する(S01 04)。生成したホエー培地と糖蜜培地とを所定の比率で混合し、混合培地を生成す る(S0105)。該混合培地に、2-デオキシグルコース耐性を示すKluyveromyces marxianus 属の酵母菌株を接種し(S0106)、エタノール発酵し(S0107)、発酵液から エタノールを分離し(S0108)、蒸留などによりエタノールを精製し(S0109)、エタノ ールを得る(S0110)。

##### <実施形態1:構成>

[0018] 「2-デオキシグルコース耐性を示すKluyveromyces marxianus に属する酵母菌株 」とは、カタボライトプレッショングルコースを解除されたKluyveromyces marxianus に属する酵 母菌株のことをいう。最終濃度0.1%の2-デオキシグルコースを含むガラクトースを主

要糖源とする最少培地において生育可能なものであれば特に限定しない。好ましくは、後述するKluyveromyces marxianus 受託番号NITE BP-465である。また、酵母菌株、Kluyveromyces marxianus NBRC-0541である。NBRC-0541は、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門(NBRC)の寄託機関より分譲により得ることができる。

[0019] 「糖源」とは、ラクトースを含む混合糖源をいう。ラクトース以外の糖は、スクロース、ガラクトース、フルクトース、グルコース、ラフィノースをいう。混合糖源は、ラクトースと、ラクトース以外の糖のうち、一又は二以上の組み合わせから構成される。ラクトース原料としては、主に哺乳類の乳汁を利用する。スクロース、ガラクトース、フルクトース、グルコース、ラフィノースの原料としては、米、麦類、ジャガイモ、サツマイモ、とうもろこし、キヤッサバ、チコリー、キクイモ、小豆等の作物及び、これらの調理・加工残渣に含まれる発酵性糖、多糖の加水分解物などである。

[0020] エタノール発酵は、通常の発酵反応により行う。培地中の糖濃度は20%(w/v)以下が好ましく、特に好ましくは15%(w/v)以下である。なかでも、2-デオキシグルコース耐性を示すKluyveromyces marxianus に属する酵母菌株がNITE BP-465である場合、後述する実施例7及び図5より、糖濃度は15から20% (w/v)が特に好ましい。ラクトースとそれ以外の糖の比率は限定しない。なお、発酵条件は使用する原料、培地中の糖濃度、糖組成などを勘案して決定すればよい。

#### 〈実施形態1:効果〉

[0021] Kluyveromyces marxianus に属する酵母菌株を利用することにより、ラクトースの発酵が可能となる。更に、2-デオキシグルコース耐性を示すKluyveromyces marxianus に属する酵母菌株を利用することにより、ラクトースの他にグルコースなどを含む混合糖源の発酵を、カタボライトリプレッションの影響を受けることなく、短時間で可能とする。

#### 〈実施形態2>>

#### 〈実施形態2:概要〉

[0022] 本実施形態は、2-デオキシグルコース耐性を示すKluyveromyces marxianus に属する酵母菌株を利用して、糖源をエタノール発酵することによりエタノールを製造する

方法であつて、ラクトース原料として、チーズホエー、乳、グルコース等の原料としてテンサイ、サトウキビの搾汁や糖蜜を利用する特徴とするエタノール製造方法について説明する。

#### 〈実施形態2:構成〉

- [0023] チーズホエー(乳清)とは、生乳を凝固させてチーズを製造する際に副生する液体のこととし、主成分はラクトース、ホエータンパク質、無機塩類およびビタミンなどで構成される。ここでは、ホエータンパク質や塩等をあらかじめ除去したものも含む。
- [0024] 乳とは、牛に限らず哺乳類の乳汁であればよく、生乳などに限定されない。乳房炎に罹病した哺乳類の乳や、腐敗乳、賞味期限切れの加工乳も含む。
- [0025] 搾汁とは、破碎、圧搾、遠心分離又は水若しくは湯水等を用いて抽出することにより得られた液汁のことをいう。
- [0026] 糖蜜とは、粘着性のある黒褐色の液体であり、サトウキビの搾汁から粗糖を製造し、又は粗糖を生成する際、また、テンサイからテンサイ糖を生産する際の副産物である。ショ糖搾汁からショ糖をその晶出が生じなくなるまで十分に回収した後の廃糖蜜の他、該晶出が未だ可能であるほどのショ糖を含有する糖蜜も含む。

#### 〈実施形態2:効果〉

- [0027] チーズホエーだけでは糖濃度が低くエタノール生産効率が悪いが、糖蜜や搾汁を混合した混合糖源を利用することにより、生産効率の向上を可能とする。また、農業廃棄物をバイオマス資源として利用可能であり、更に低コスト化を実現できる。

#### 〈実施形態3:概要〉

- [0028] 本実施形態は、2-デオキシグルコース耐性を示す*Kluyveromyces marxianus*に属する酵母菌株として、受託番号NITE BP-465及び/又はNBRC0541を利用する特徴とするエタノール製造方法について説明する。
- [0029] なお、受託番号NITE BP-465の菌株は、2007年12月6日付けで独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(NPMD)(千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に受託番号NITE P-465として原寄託され、2008年12月12日付けでブタペスト条約の規定下で受託番号NITE BP-465として国際寄託に移管されてい

る。

〈実施形態3:構成〉

- [0030] 本実施形態で利用する上記菌株のうちNITE BP-465は次の性質を有する。
- [0031] (1)形態学的性質
- [0032] YM寒天培地で25°C、3日間培養したときの細胞は球形または橢円形で、大きさは2~5 μm × 3~7 μmで、多極出芽する。コロニーは淡褐色で、光沢がある。McClary 培地において1~4個の子のう胞子を形成し、形状は球形である。
- [0033] (2)生理的性質  
温度20~40°Cで生育し、最適温度は30~38°Cである。
- [0034] (3)糖の発酵性

グルコース	+	ラクトース	+
ガラクトース	+	ラフィノース	+
スクロース	+	トレハロース	-
マルトース	-	イヌリン	+

- [0035] (4)炭素源の資化性

グルコース	+	D-アラビノース	-
ガラクトース	+	D-リボース	+
L-ソルボース	-	L-ラムノース	-
スクロース	+	エリスリトール	-
マルトース	-	アドニトール	+
セロビオース	+	ズルシトール	-
トレハロース	-	D-マンニトール	+
ラクトース	+	D-ソルビトール	+
メリビオース	-	α-メチルグルコシド	-
ラフィノース	+	サリシン	+
メレジトース	-	グルコン酸	-
イヌリン	+	乳酸	+
可溶性デンプン	-	コハク酸	+
D-キシロース	+	クエン酸	+
L-アラビノース	+	イノシトール	+

- [0036] (5)その他の資化性および生育の特徴

硝酸カリウム	—	ゼラチンの液化	—
カダベリン	—	アルブチンの分解	—
L・リジン	+	尿素の分解	—
エチルアミン塩酸塩	+	有機酸生成	—
50%グルコース	—	シクロヘキシミド耐性 100mg/l	+

[0037] NBRC-0541は、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門(NB RC)の寄託機関より分譲により得ることができる。

#### 〈実施形態3:効果〉

[0038] 後述する、実施例4の図3及び表3より、本実施形態の菌株は、ラクトースとスクロースを主成分とする混合糖源においても、高いエタノール変換率を示す。よって、チーズホエーの処理とエタノールの生産をより高効率かつ低コストで実現することが可能である。

#### 実施例 1

[0039] 独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門(NBRC)保存の微生物菌株のうち、*Kluyveromyces marxianus* 15株およびその無性世代に相当する*Candida kefyr* 11株の中からラクトース発酵性を有する*Kluyveromyces marxianus* 5株および*Candida kefyr* 9株について、ラクトース、スクロースおよびこれらの混合したときのエタノール生産性を調べた。また、2-デオキシグルコース(2-DOG)による最少阻害濃度についても調べた。対照株としては*Saccharomyces cerevisiae* NEYを使用した。

[0040] 酵母の菌体を一白金耳かきとり、それぞれ1.8cm試験管中のYPD液体培地(酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース2%)3.0mlに接種して、30°C、24時間、150rpmで振盪培養した。この培養液1.5mlを無菌的に採取して遠心分離後、沈殿した菌体を50ml三角フラスコ中のエタノール生産培地(糖15%、NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%)15mlに懸濁し、30°C、90rpmで振盪培養した。なお、エタノール生産培地用の三角フラスコの口に取り付けたシリコセン(信越ポリマー社製)の上はサランラップで完全に覆い、針で三箇所ピンホールを開けることにより空気の流入を制限した。

[0041] ラクトースを糖源とするエタノール生産培地(ホエー培地)を調製する際には、糖濃度78.4%(w/w)のホエーパウダーを蒸留水に糖濃度15%(w/v)になるように溶解して121

°C、20分間加熱後、発生する不溶性のタンパク質はガーゼで除去、遠心分離した上清を使用した。スクロースを糖源とするエタノール生産培地(糖蜜培地)は、糖濃度54.3%(w/w)のテンサイ糖蜜を希釀して使用した。ラクトースとスクロースを糖源とするエタノール生産培地(ホエー・糖蜜混合培地)は糖濃度15%の両培地を等量混合した。培養液中のエタノール量は、遠心分離後の上清を蒸留水で20倍希釀して測定した。分析に使用した機種は高速液体クロマトグラフLaChrom Elite(日立)でRI検出器を装着、カラムはSUGAR KS-801(Shodex)、カラム温度は50°C、溶媒は蒸留水で、流速は毎分1.0mlである。

- [0042] 2-DOG最少阻害濃度は、酵母の菌体を各種濃度の2-DOGを含む寒天培地(2-DOG 0.0025～2.0%，ガラクトース 2.0%，Yeast Nitrogen Base without Amino Acids 0.67%，寒天 2.0%)に塗布し、30°C、10日間培養後の生育から決定した。
- [0043] *Kluyveromyces marxianus* 5株および*Candida kefyr* 9株を糖濃度15%のエタノール生産培地でそれぞれ48時間培養したとき生成するエタノール量を表1に示した。培地に含まれる15%(w/v)のラクトース及び／又はスクロースがすべてエタノールへと変換されるとすると、その生成量は理論的に80.7(mg/ml)となる。生成エタノール量は3～75(mg/ml)と菌株間に大きな差異が認められたが、糖蜜培地において対照菌株の*Saccharomyces cerevisiae* NEYと同程度の菌株もあった。ホエー培地および糖蜜培地のいずれにおいても生成エタノール濃度が高かった菌株は、*Kluyveromyces marxianus* N BRC 1735およびNBRC 1963の2株であった。2-DOGに耐性で最少生育阻害濃度が高い菌株は、ホエー・糖蜜混合培地においてエタノールを良好に生成する傾向が見られたが、必ずしもそうではなかった。NBRC0541は2-DOG耐性が強く、ホエー培地、糖蜜培地およびホエー・糖蜜混合培地において生成エタノール量が高かったが、ホエー培地または糖蜜培地における生成エタノール量はNBRC 1735およびNBRC1963に及ばなかった。

[表1]

種名	菌株番号	エタノール量(mg/ml)			2-DOG 最少生育 阻害濃度 (%)
		ホエー 培地	糖蜜 培地	ホエー・ 糖蜜混合 培地	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 0288	30.1	70.5	33.7	0.25
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 0541	68.2	71.4	62.2	1.00
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 0617	54.1	47.0	62.0	0.50
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 1735	75.1	72.0	48.4	0.25
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 1963	73.2	70.4	34.1	0.10
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0008	66.9	53.9	64.1	0.01
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0432	68.9	65.7	52.1	0.01
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0586	59.4	8.2	40.1	>2.00
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0616	5.6	28.0	28.3	0.01
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0882	53.7	71.3	39.9	0.25
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0883	48.3	59.9	49.0	0.05
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0942	41.2	18.3	46.2	0.05
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 1065	66.6	72.0	41.1	0.10
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 10287	20.4	4.8	29.8	0.025
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NEY	0	67.1	26.4	0.05

## 実施例 2

[0044] *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1735およびNBRC 1963の2株について、酵母の菌体を一白金耳かきとり、それぞれ100ml三角フラスコ中のYPD液体培地(酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース2%)25mlに接種して、30°C、24時間、150rpmで振盪培養した。この培養液10mlを無菌的に採取して遠心分離後、沈殿した菌体を200ml三角フラスコ中のエタノール生産培地(糖20%、NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%)100mlに懸濁し、30°C、90rpmで実施例1と同様に振盪培養した。24, 48, 72, 96, 120時間後に培養液1.0mlを無菌的に抜き取り、遠心分離後の上清を蒸留水で20倍希釈してエタノール量を測定した。図2はホエー培地および糖蜜培地における生成エタノール量を追跡した結果である。

[0045] ホエー培地および糖蜜培地のいずれにおいても2菌株は同様にエタノールを生成したが、*Kluyveromyces marxianus* NBRC 1963はNBRC1735よりもエタノール生成の立ち上がりがわずかに早かったことから、この菌株から2-デオキシグルコース耐性株を取得することにした。

## 実施例 3

[0046] *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1963を200ml三角フラスコ中のYP8D液体培地(酵

母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース8%)60mlに接種して、30°C、14時間、150rpmで振盪培養した。菌体は遠心分離で回収し、滅菌水で2回洗浄後、滅菌水に懸濁して容量を6.0mlにした。この約 $3 \times 10^8$ 個の菌体を含む懸濁液0.1mlをシャーレ(直径8cm)中の2-DOG寒天培地(2-DOG 0.1%, ガラクトース 2.0%, Yeast Nitrogen Base without Amino Acids 0.67%, 寒天 2.0%)18枚に塗布した。これらの寒天培地を30°C、10日間培養後、出現した8個のコロニーを拾い、2-DOG耐性株KD-12～KD-19として保存し、実施例1と同様の実験を行った。対照株としては、*Kluyveromyces marxianus* N BRC 1963を使用した。

[0047] 表2にエタノール生成量を示す。2-DOG耐性株の中にはホエー培地および糖蜜培地でのエタノール生成が親株のNBRC 1963よりも劣るものがあった。ホエー・糖蜜混合培地において、NBRC 1963ではラクトースの発酵がスクロースによって阻害されるために生成エタノール量は34.8(mg/ml)に過ぎない。一方、2-デオキシグルコース耐性株KD-12～KD19の中にはNBRC 1963を上回るものがあり、そのうちKD-15(NITE BP-465)は15%ラクトースまたは15%スクロースからの生成エタノール量に匹敵する水準であった。KD-15(NITE BP-465)の2-DOG最少生育阻害濃度は0.5%でその他の2-DOG耐性株ほど高くなかった。

[表2]

種名	菌株番号	エタノール量(mg/ml)			2-DOG 最少生育 阻害濃度 (%)
		ホエー 培地	糖蜜 培地	ホエー・ 糖蜜混合 培地	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-12	72.7	57.3	40.7	>2.00
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-13	72.0	27.3	42.7	2.00
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-14	42.1	31.4	37.1	2.00
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-15	74.3	70.2	69.7	0.50
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-16	70.7	32.3	50.5	2.00
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-17	56.4	68.3	44.9	>2.00
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-18	71.7	1.7	36.9	>2.00
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-19	54.9	3.5	40.4	1.00
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1963	73.7	71.1	34.8	0.10

#### 実施例 4

[0048] *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1963に由来する2-DOG耐性株KD-15(NITE BP-465)および*Kluyveromyces marxianus* NBRC 0541を実施例2のようにYPD培地で培養

し、2種類のホエー・糖蜜混合培地(ラクトース3%+スクロース12%、ラクトース7.5%+スクロース7.5%)、ホエー培地および糖蜜培地で培養し、12時間毎にエタノール量を測定した。対照株としては、*Kluyveromyces marxianus* NBRC 1963を使用した。

[0049] NBRC 1963はホエー・糖蜜混合培地においてラクトース濃度に伴ってエタノール量が低下した。KD-15(NITE BP-465)によって生成されたエタノール量は、4種類の培地において培養72時間で65(mg/ml)以上のほぼ一定水準に達した(図3)。NBRC 0541はこれよりも劣っていたが、NBRC 1963よりは良好であった。

[0050] 培地に含まれる15%(w/v)のラクトース及び／又はスクロースがすべてエタノールへと変換されるとすると、その生成量は理論的に80.7(mg/ml)となる。図3において最高値に達したエタノール量から変換率を算出すると表3のようになり、KD-15(NITE BP-465)の変換率はいずれの培地においても80%以上であった。

[表3]

糖源	エタノール変換率(%)			
	KD-15	NBRC 0541	NBRC	1963
ラクトース 15%	90.7	87.2	91.4	
ラクトース7.5% + スクロース7.5%	85.8	84.6	52.0	
ラクトース 3% + スクロース 12%	83.8	73.6	63.7	
スクロース 15%	85.0	79.4	81.3	

## 実施例 5

[0051] 前記実施例1および3で使用した菌株について、糖濃度20%のエタノール生産培地(ホエー培地、糖蜜培地および両培地を等量混合したホエー・糖蜜混合培地)でそれぞれ96時間培養したとき生成するエタノール量を表4に示した。

[0052] 酵母の菌体を一白金耳かきとり、それぞれ50ml三角フラスコ中のYPD液体培地(酵母エキス1%、ポリペプトン2%、グルコース2%)10mlに接種して、30°C、24時間、150rpmで振盪培養した。この培養液2.5mlを無菌的に採取して遠心分離後、沈殿した菌体を50ml三角フラスコ中のエタノール生産培地(糖20%、NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%)25mlに懸濁し、実施例1と同様の方法で培養した。

[0053] ホエー培地、糖蜜培地およびホエー・糖蜜混合培地において生成エタノール量が高かった菌株は本発明の2-DOG耐性株KD-15(NITE BP-465)だけであった。

[表4]

種名	菌株番号	エタノール量(mg/ml)		
		ホエー 培地	糖蜜 培地	ホエー・糖蜜 混合培地
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 0288	62.1	85.3	40.5
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 0541	78.1	77.1	48.4
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 0617	73.6	50.8	60.3
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 1735	89.9	81.4	41.7
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC 1963	90.7	81.1	39.7
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0008	80.7	48.5	43.4
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0432	64.9	73.2	46.2
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0586	76.7	77.2	49.6
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0616	13.8	34.3	41.5
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0882	65.1	59.5	43.6
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0883	72.0	61.4	43.9
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0942	46.2	20.3	43.3
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 1065	84.3	79.6	48.0
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 10287	18.0	19.2	41.0
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-12	85.2	70.6	46.9
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-13	86.7	70.1	70.7
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-14	45.9	38.0	24.5
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-15	88.9	84.4	77.4
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-16	82.7	61.4	78.2
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-17	68.1	67.9	50.3
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-18	78.4	59.1	73.1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KD-19	71.2	65.7	53.2

## 実施例 6

- [0054] *Kluyveromyces marxianus* の2-DOG耐性株KD-15(NITE BP-465)およびNBRC 1963を実施例4のようにYPD培地で培養し、糖濃度20%のエタノール生産培地としてホエー培地、糖蜜培地および2種類のホエー・糖蜜混合培地(ラクトース20%、ラクトース10%+スクロース10%、ラクトース5%+スクロース15%、スクロース20%)で培養し、1日毎にエタノール量を測定した。
- [0055] NBRC 1963はホエー・糖蜜混合培地においてラクトース濃度に伴ってエタノール量が低下した。KD-15(NITE BP-465)によって生成されたエタノール量は、4種類の培地において培養96時間で70(mg/ml)以上のはほぼ一定水準に達した(図4)。
- [0056] 培地に含まれる20%(w/v)のラクトースまたはスクロースがすべてエタノールへと変換されるとすると、その生成量は理論的に108(mg/ml)となる。図4において最高値に達したエタノール量から変換率を算出すると表5のようになり、KD-15(NITE BP-465)の

変換率はいずれの培地においても70%以上であった。

[表5]

糖源	エタノール変換率(%)		
	KD-15	NBRC	1963
ラクトース 20%	86.2	87.0	
ラクトース10% + スクロース10%	70.2	36.4	
ラクトース 5% + スクロース 15%	71.4	58.2	
スクロース 20%	73.6	70.6	

## 実施例 7

[0057] *Kluyveromyces marxianus* の2-DOG耐性株KD-15(NITE BP-465)を実施例4のようにYPD培地で培養し、エタノール生産培地としてホエー培地(ラクトース5～30%)、糖蜜培地(スクロース5～30%)およびホエー・糖蜜混合培地(ラクトース+スクロース[等量]5～30%)で培養し、6日目のエタノール量を測定した。その結果を図5に示す。いずれのエタノール生産培地においてもエタノール量は糖濃度とともに上昇したが、糖濃度20%以上になると低下した。さらにエタノール変換率を算出すると、糖濃度15～20%が最高となった。

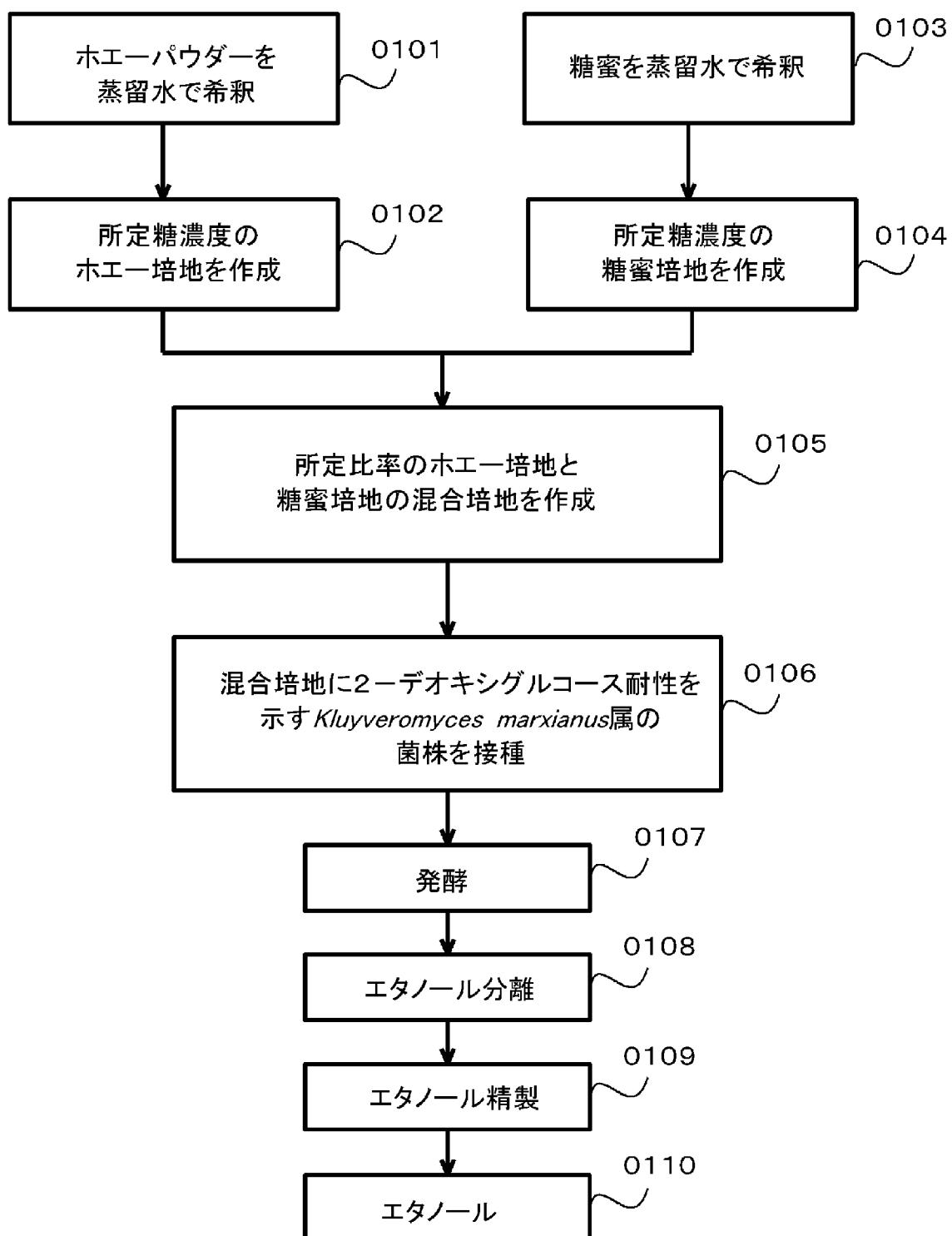
### 図面の簡単な説明

- [0058] [図1]本発明に係るエタノール製造方法の概念図  
 [図2]ホエー培地、糖蜜培地それぞれにおけるエタノール生成量を示すグラフ  
 [図3]糖濃度15% (w/v) 混合培地におけるエタノール生成量を示すグラフ  
 [図4]糖濃度20% (w/v) 混合培地におけるエタノール生成量を示すグラフ  
 [図5]糖濃度5%～30% (w/v) 混合培地における2-DOG耐性株KD-15(受託番号NITE BP-465)によるエタノール生成量及びエタノール変換率を示すグラフ

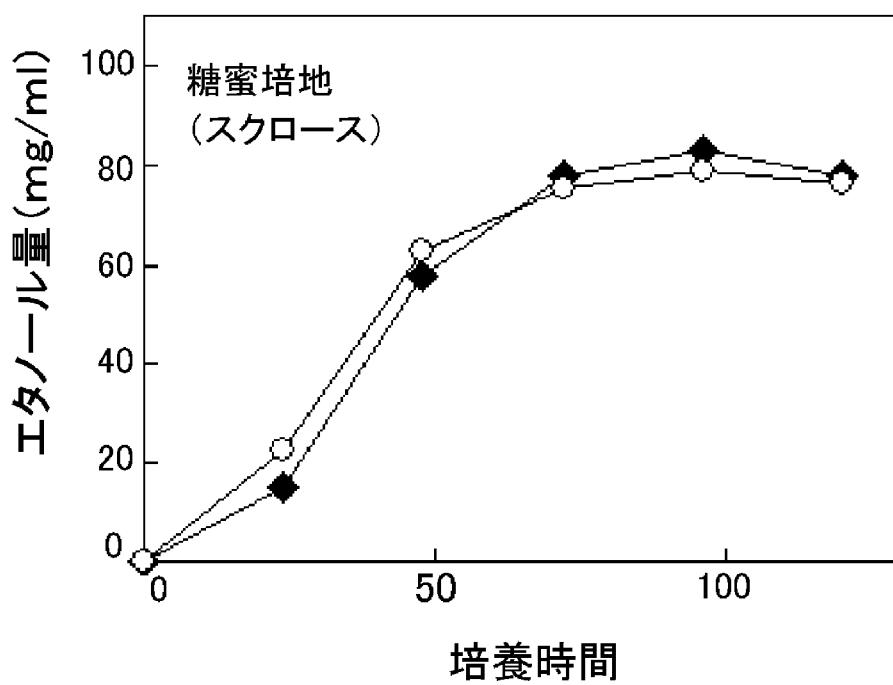
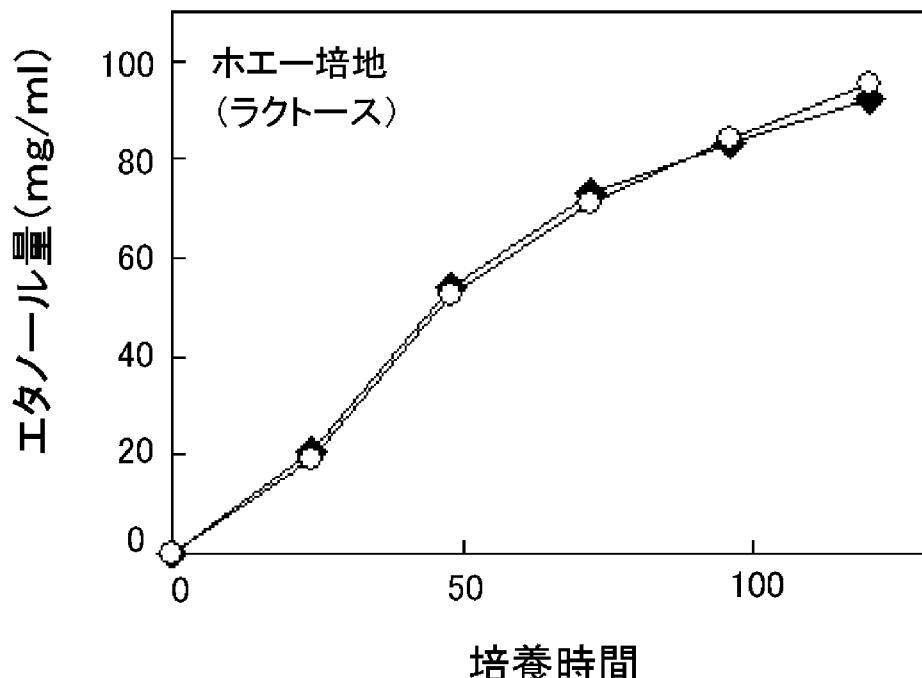
## 請求の範囲

- [1] 2-デオキシグルコース耐性を示す、*Kluyveromyces marxianus* に属する酵母菌株を利用して、スクロース、ガラクトース、フルクトース、グルコース、ラフィノースからなる群のうち一または二以上の組み合わせである糖と、さらにラクトースとを混合した糖源をエタノール発酵させることでエタノールを得る、エタノールの製造方法。
- [2] 2-デオキシグルコース耐性を示す、*Kluyveromyces marxianus* に属する酵母菌株を利用して、チーズホエー、乳のいずれか一以上、及び、テンサイ搾汁、サトウキビ搾汁、テンサイ糖蜜、サトウキビ糖蜜のいずれか一以上に含まれるラクトース、及び、スクロース、ガラクトース、フルクトース、グルコース、ラフィノースからなる群のうち一または二以上の組み合わせである糖を混合した糖源とからエタノール発酵させることでエタノールを得る、エタノールの製造方法。
- [3] 2-デオキシグルコース耐性を示す、*Kluyveromyces marxianus* に属する酵母菌株は、受託番号NITE BP-465及び／又は受託番号NBRC0541である請求項1または2に記載のエタノールの製造方法。
- [4] 2-デオキシグルコース耐性を示す、*Kluyveromyces marxianus* に属する酵母菌株は、受託番号NITE BP-465であって、エタノール発酵は前記混合した糖源を15%から20%含む培地にて行う請求項1から3のいずれか一に記載のエタノール製造方法。  
。

[図1]

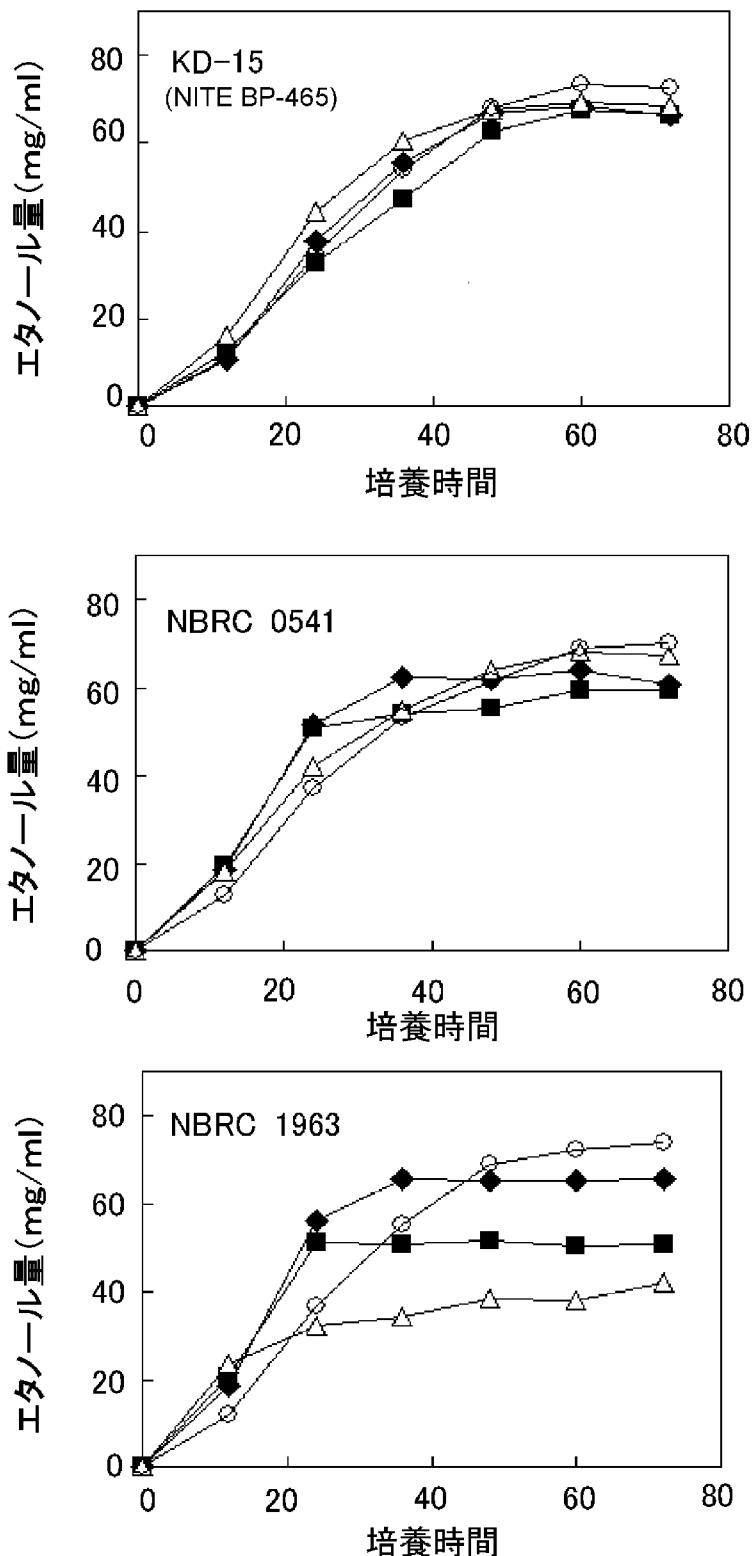


[図2]



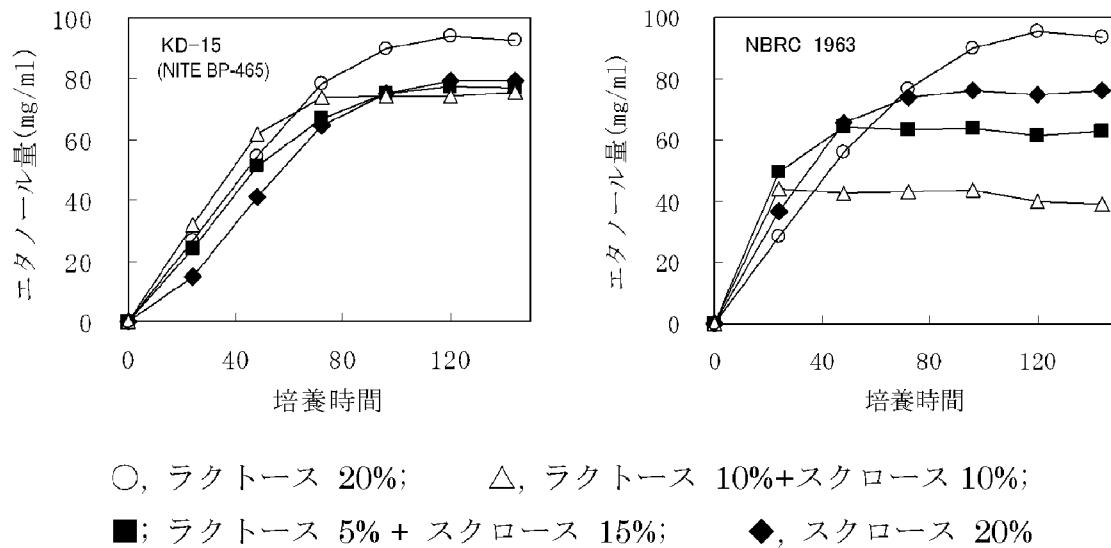
◆ ; *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1735;  
○, *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1963

[図3]

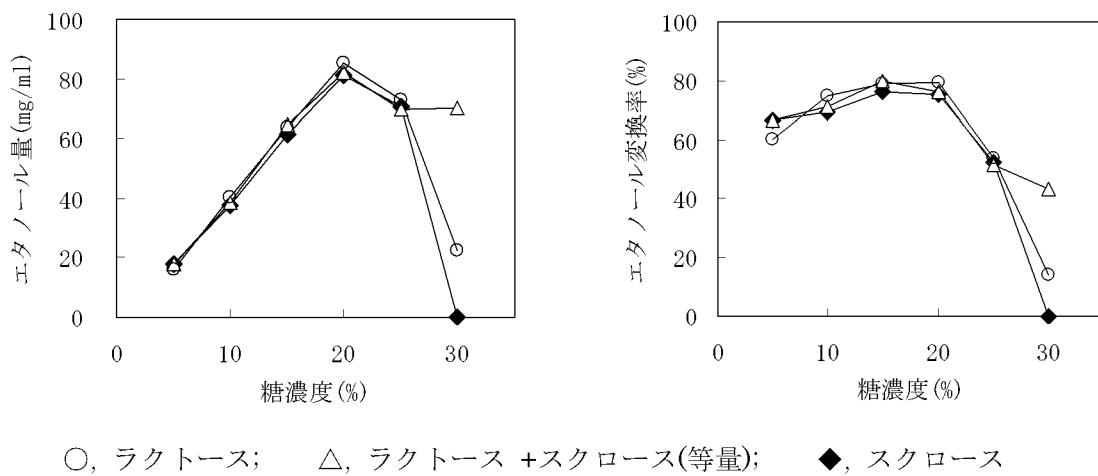


○, ラクトース 15%; △, ラクトース 7.5%+スクロース 7.5%;  
 ■; ラクトース 3%+スクロース 12%; ◆, スクロース 15%

[図4]



[図5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/051106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
*C12P7/06 (2006.01) i, C12R1/645 (2006.01) n*

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
*C12P7/06, C12R1/645*

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kenji NAKAMURA et al., "Kluyveromyces marxianus ni yoru Sugar Beet Tomitsu Oyobi Cheese Whey kara Ethanol no Seisan", Hokkaido Branch of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry · Hokkaido Branch of Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition · Kitanippon Branch of The Society for Biotechnology, Japan · Hokkaido Branch of The Japanese Society of Applied Glycoscience · Hokkaido Nogei Kagaku Kyokai Godo Gakujutsu Koenkai Koen Yoshi, 2007, Dai 2 kai, page 22	1-4
Y	WANG Chen-Jen, et al., Effect of Multiple Substrates in Ethanol Fermentations from Cheese Whey., J. Ferment. Technol., 1987, Vol.65, No.3, p.249-253	1-4

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  
*06 February, 2009 (06.02.09)*

Date of mailing of the international search report  
*17 February, 2009 (17.02.09)*

Name and mailing address of the ISA/  
*Japanese Patent Office*

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/051106

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BAILEY B. Richard, et al., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mutants Resistant to Catabolite Repression: Use in Cheese Whey Hydrolysate Fermentation., <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 1982, Vol.44, No.3, p.631-639	1-4
P, X	Kenji NAKAMURA et al., "Furekkusu Kobo Kluyveromyces marxianus KD-15 ni yoru Sugar Beet Tomitsu · Cheese Whey Kongo Genryo kara no Bio Ethanol Seisan", Hokkaido Branch of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry · Hokkaido Branch of Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition · Kitanippon Branch of The Society for Biotechnology, Japan · Hokkaido Branch of The Japanese Society of Applied Glycoscience, · Hokkaido Nogei Kagaku Kyokai Godo Gakujutsu Koenkai Koen Yoshi 2008 Nov, Vol.2008, Dai 2 Kai, page 22	1-4
A	BOURGI J., et al., Isolation of a Kluyveromyces fragilis Derepressed Mutant Hyperproducer of Inulinase for Ethanol Production from Jerusalem Artichoke., <i>J. Ferment. Technol.</i> , 1986, Vol.64, No.3, p.239-243	1-4
A	LIMTONG Savitree, et al., Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated Kluyveromyces marxianus., <i>Bioresource Technology</i> , 2007, Vol.98, p.3367-3374	1-4
A	OZMIHCI S. et al., Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution., <i>Letters in Applied Microbiology</i> , 2007, Vol.44, p.602-606	1-4
A	JP 59-154979 A (Suntory Ltd.), 04 September, 1984 (04.09.84), (Family: none)	1-4

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12P7/06 (2006.01)i, C12R1/645 (2006.01)n

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12P7/06, C12R1/645

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

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）

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

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	仲村憲治他, Kluyveromyces marxianus によるテンサイ糖蜜およびチーズホエーからエタノールの生産, 日本農芸化学会北海道支部・日本土壤肥料学会北海道支部・日本生物工学会北日本支部・日本応用糖質科学会北海道支部・北海道農芸化学協会合同学術講演会講演要旨, 2007, Vol. 2007, 第2回, p. 22	1-4
Y	WANG Chen-Jen, et al., Effect of Multiple Substrates in Ethanol Fermentations from Cheese Whey., J. Ferment. Technol., 1987, Vol. 65, No. 3, p. 249-253	1-4

 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」国際出願目前で、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 06.02.2009	国際調査報告の発送日 17.02.2009
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	特許序審査官（権限のある職員） 長谷川 茜 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 4045

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
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	
Y	BAILEY B. Richard, et al., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mutants Resistant to Catabolite Repression: Use in Cheese Whey Hydrolysate Fermentation., <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 1982, Vol. 44, No. 3, p. 631-639	1 - 4
P, X	仲村憲治他, フレックス酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> KD-15 によるテンサイ糖蜜・チーズホエー混合原料からのバイオエタノール生産, 日本農芸化学会北海道支部・日本土壤肥料学会北海道支部・日本生物工学会北日本支部・日本応用糖質科学会北海道支部・北海道農芸化学協会合同学術講演会講演要旨, 2008Nov, Vol. 2008, 第2回, p. 22	1 - 4
A	BOURGI J., et al., Isolation of a <i>Kluyveromyces fragilis</i> Derepressed Mutant Hyperproducer of Inulinase for Ethanol Production from Jerusalem Artichoke., <i>J. Ferment. Technol.</i> , 1986, Vol. 64, No. 3, p. 239-243	1 - 4
A	LIMTONG Savitree, et al., Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated <i>Kluyveromyces marxianus</i> ., <i>Bioresource Technology</i> , 2007, Vol. 98, p. 3367-3374	1 - 4
A	OZMIHCI S. et al., Comparison of yeast strains for batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution., <i>Letters in Applied Microbiology</i> , 2007, Vol. 44, p. 602-606	1 - 4
A	JP 59-154979 A (サントリー株式会社) 1984.09.04 (ファミリーなし)	1 - 4