

(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
2014年12月31日(31.12.2014)



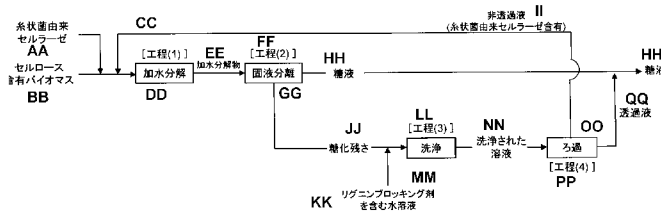
(10) 国際公開番号
WO 2014/208493 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 19/14 (2006.01) C13K 1/02 (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/066534
- (22) 国際出願日: 2014年6月23日(23.06.2014)
- (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 2013-132757 2013年6月25日(25.06.2013) JP
- (71) 出願人: 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)
[JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 栗原 宏征(KURIHARA Hiroyuki); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 千晶(YAMADA Chiaki); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 勝成(YAMADA Katsushige); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 勝沼 宏仁, 外(KATSUNUMA Hirohito et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1丁目6番6号 日本生命丸の内ビル 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING SUGAR SOLUTION

(54) 発明の名称: 糖液の製造方法



- AA Filamentous fungus-originated cellulase
- BB Cellulose-containing biomass
- CC Step (1)
- DD Hydrolysis
- EE Hydrolysate
- FF Step (2)
- GG Solid/liquid separation
- HH Sugar solution
- II Unpenetrated solution (containing filamentous fungus-originated cellulase)
- JJ Glycosylation residue
- KK Aqueous solution containing lignin blocking agent
- LL Step (3)
- MM Washing
- NN Wash solution
- OO Filtration
- PP Step (4)
- QQ Penetrated solution

(57) Abstract: A method for producing a sugar solution according to the present invention is a method for producing the sugar solution from a cellulose-containing biomass, and comprises: (1) a step of hydrolyzing the cellulose-containing biomass with a filamentous fungus-originated cellulase to produce a hydrolysate; (2) a step of subjecting the hydrolysate to solid/liquid separation to produce a sugar solution and a glycosylation residue; (3) a step of washing the glycosylation residue with an aqueous solution containing a lignin blocking agent to produce a wash solution containing the filamentous fungus-originated cellulase contained in the glycosylation residue; and (4) a step of filtrating the wash solution to collect an unpenetrated solution containing the filamentous fungus-originated cellulase.

(57) 要約: 本発明による糖液の製造方法は、セルロース含有バイオマスから糖液を製造する方法であって、工程(1): 前記セルロース含有バイオマスを糸状菌由来セルラーゼにより加水分解して、加水分解物を得る工程、工程(2): 前記加水分解物を、糖液と糖化残さと共に固液分離する工程、工程(3): 前記糖化残さをリグニンブロッキング剤を含む水溶液で洗浄して、前記糖化残さに含まれる前記糸状菌由来セルラーゼを含む洗浄された溶液を得る工程、および工程(4): 前記洗浄された溶液をろ過し、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液を回収する工程、を含む。



WO 2014/208493 A1



(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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：糖液の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、セルロース含有バイオマスから糖液を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 糖を原料とした化学品の発酵生産プロセスは、種々の工業原料の生産に利用されている。この発酵原料となる糖として、再生可能な非食用資源、すなわちセルロース含有バイオマスから効率的に糖液を製造するプロセス、または得られた糖液を発酵原料として効率的に工業原料に変換するプロセスの構築が検討されている。

[0003] セルロース含有バイオマスから糖液を製造する方法として、濃硫酸を使用してセルロースおよびヘミセルロースを酸で加水分解して糖液を製造する方法（特許文献1、2）、セルロース含有バイオマスを希硫酸で加水分解した後、さらにセルラーゼなどの糖化酵素を用いて糖化处理することにより糖液を製造する方法が開示されている（非特許文献1）。また、酸を使用しない方法として、250～500℃程度の亜臨界水を使用してセルロース含有バイオマスを加水分解して糖液を製造する方法（特許文献3）、セルロース含有バイオマスを亜臨界水で処理した後、さらに糖化酵素で糖化处理することにより糖液を製造する方法（特許文献4）、セルロース含有バイオマスを240～280℃の加圧熱水で加水分解した後、さらに糖化酵素を用いて糖化处理することにより糖液を製造する方法（特許文献5）が開示されている。これらの中でも、近年、特にエネルギー使用量および環境負荷が少なく、かつ糖収量が多い糖化酵素を使用したバイオマスの加水分解方法が広く検討されている。しかしながら、このような糖化酵素を使用して糖液を製造する方法は、酵素の費用が高いため、糖液を製造するための費用が高くなる。

[0004] そのため、前述の技術課題を解決する方法として、加水分解に使用した糖化酵素を回収して再利用する方法が提案されている。例えば、スピンフィル

ターで連続して固液分離を行い、得られた糖液を限外ろ過膜に通じてろ過し、酵素を回収する方法（特許文献6）、酵素糖化の段階において、セルロースを酵素で糖化した糖化液中に残存する固形分に界面活性剤を投入することで、固形分に対する酵素吸着を抑制し回収効率を向上させる方法（特許文献7）、酵素糖化後の糖化残さを通電処理することで酵素成分を回収する方法（特許文献8）、酵素糖化後の糖化残さを再度新しいバイオマスに投入することで酵素を回収して再利用する方法（特許文献9）などが開示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特表平11-506934号公報
- 特許文献2：特開2005-229821号公報
- 特許文献3：特開2003-212888号公報
- 特許文献4：特開2001-95597号公報
- 特許文献5：特許3041380号公報
- 特許文献6：特開2006-87319号公報
- 特許文献7：特開昭63-87994号公報
- 特許文献8：特開2008-206484号公報
- 特許文献9：特開昭55-144885号公報

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：A. Adenら、“Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover” NREL Technical Report (2002)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 上述の通り、糖化酵素を使用したセルロース含有バイオマスを加水分解する方法が開発されているが、糖化酵素の使用量を削減するという観点から、

セルロース含有バイオマスから糖液を製造する当たり、糖化酵素をより有効に利用しつつ糖液を製造する方法が求められている。

[0008] そこで、本発明は、かかる状況を鑑み、糖化酵素の使用量をさらに低減しつつ糖液を製造することができる糖液の製造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

[0009] 上述した課題を解決するため、本発明者らは、糖液の製造方法について鋭意検討を行った。その結果、糖化残さに吸着した糖化酵素である糸状菌由来セルラーゼを、リグニンブロッキング剤を含む水溶液に溶出させ、糸状菌由来セルラーゼが溶出した水溶液をろ過して、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液を回収して再利用することで、糸状菌由来セルラーゼの使用量をさらに低減しつつ糖液を製造することができることを見出した。本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものである。

[0010] 本発明は以下の [1] ~ [10] の構成を有する。

[1] セルロース含有バイオマスから糖液を製造する方法であって、
工程（1）：前記セルロース含有バイオマスを糸状菌由来セルラーゼにより加水分解して、加水分解物を得る工程、
工程（2）：前記加水分解物を、糖液と糖化残さとに固液分離する工程、
工程（3）：前記糖化残さをリグニンブロッキング剤を含む水溶液で洗浄して、前記糖化残さに含まれる前記糸状菌由来セルラーゼを含む洗浄された溶液を得る工程、および
工程（4）：前記洗浄された溶液を含む溶液をろ過し、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液を回収する工程、
を含む、糖液の製造方法。

[2] 前記リグニンブロッキング剤が、コーンステープリカー、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、カゼイン、牛血清由来アルブミン、スキムミルク、エタノール発酵蒸留残さ、ゼイン、魚加工廃棄物、肉加工廃棄物、ホエータンパク質、穀物加工廃棄物、糖加工廃棄物、食物、藻類タンパク質、大

豆タンパク質、細菌タンパク質、および菌タンパク質からなる群から選択される1以上である、[1]に記載の糖液の製造方法。

[3] 工程(4)において、前記洗浄された溶液のろ過が、限外ろ過膜である、[1]または[2]に記載の糖液の製造方法。

[4] 工程(4)において、工程(2)において得られた糖液と、工程(3)において得られた前記洗浄された溶液とを混合する工程を含み、前記糖液および前記洗浄された溶液とを含む混合溶液をろ過して、前記糖液を含む透過液を回収する、[1]～[3]のいずれか一つに記載の糖液の製造方法。

[5] 工程(3)において、前記リグニンブロッキング剤を含む水溶液の温度が、40～60℃である、[1]～[4]のいずれか一つに記載の糖液の製造方法。

[6] 前記リグニンブロッキング剤を含む水溶液が、無機塩を含む、[1]～[5]のいずれか一つに記載の糖液の製造方法。

[7] 前記糸状菌由来セルラーゼが、トリコデルマ属微生物由来である、[1]～[6]のいずれか一つに記載の糖液の製造方法。

[8] 前記非透過液が、工程(1)の前記糸状菌由来セルラーゼに混合される、[1]～[7]のいずれか一つに記載の糖液の製造方法。

[9] 工程(2)において、前記加水分解物の固液分離がプレスろ過により行われる、[1]～[8]のいずれか一つに記載の糖液の製造方法。

[10] [1]～[9]のいずれか一つに記載の糖液の製造方法により糖液を製造する工程と、

前記糖液を発酵原料として化学品を生産する能力を有する微生物を培養する工程と、

を含む、化学品の製造方法。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、糖化残さに吸着した糸状菌由来セルラーゼを、リグニンブロッキング剤を含む水溶液に溶出させ、糸状菌由来セルラーゼが溶出した

水溶液をろ過することで、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液を得ることができる。得られた糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液を回収して再利用することにより、糸状菌由来セルラーゼの使用量をさらに低減しつつ糖液を製造することができる。これにより、糖液の製造コストを大幅に削減することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明による糖液の製造方法を示す図である。

[図2]本発明による糖液の製造方法の他の一例を示す図である。

[図3]本発明による糖液の製造方法を用いた糖液製造装置の一例を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。なお、本発明を実施するための形態は、以下に限定されるものではない。

[0014] <糖液の製造方法>

本発明による糖液の製造方法を図1に示す。本発明による糖液の製造方法について、以下、各工程ごとに説明する。

[0015] [工程(1)]

工程(1)では、セルロース含有バイオマスに、糖化酵素である糸状菌由来セルラーゼを添加して、セルロース含有バイオマスを糸状菌由来セルラーゼにより加水分解する。これにより、加水分解物が得られる。加水分解は、セルロースを低分子量化し、単糖またはオリゴ糖を生成することを目的とするが、セルロース含有バイオマスの加水分解では、キシラン、マンナン、アラビナンなどのヘミセルロース成分も同時に加水分解される。

[0016] セルロース含有バイオマスとは、セルロース成分を含む生物資源のことをいう。具体的には、バガス、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサス、コーンストーバー、ビートパルプ、綿実殻、パーム殻房、稲わら、麦わら、竹、笹などの草本系バイオマス、または、シラカバ、ブナなどの樹木、廃建材などの木質系バイオマス、さらに藻類、海草など水生環境由来のバイオ

マスを挙げることができる。なお、セルロース含有バイオマスには、糖から構成されるセルロースおよびヘミセルロース（以下、セルロースとヘミセルロースの総称として「セルロース」という。）の他に、芳香族高分子であるリグニンなどを含有している。

[0017] 糖化酵素による加水分解の反応条件としては、糖化酵素の好ましい反応条件に準じて行えばよく、本発明においては、糸状菌由来セルラーゼを使用するため、反応温度は、15～100℃の範囲が好ましく、40～60℃がより好ましく、50℃前後が更に好ましい。

[0018] 加水分解の反応時間は、2時間～200時間の範囲であることが好ましい。2時間以上であれば、十分な糖が生成される。また、200時間以下であれば、酵素活性の低下を抑制し、回収した糖化酵素を再利用することができる。

[0019] 加水分解反応のpHは、糸状菌由来セルラーゼの至適pHにおいて糸状菌由来セルラーゼによる加水分解の効果が最も高くなるため、セルラーゼ処理時のpHは、糸状菌由来セルラーゼの至適pHとすることが好ましい。本発明においては、糸状菌由来セルラーゼを使用するため、pHは、3～9の範囲が好ましく、4～5.5がより好ましく、5前後がさらに好ましい。また、糸状菌由来セルラーゼとしてトリコデルマ属由来セルラーゼを使用する場合、その反応最適pHは5.0である。

[0020] セルロース含有バイオマスおよび糸状菌由来セルラーゼを含む反応溶液のpHの調整は、後述する、工程（2）において、加水分解物を固液分離する直前、または加水分解物を固液分離すると同時に行ってもよい。pHの調整は加水分解物の固液分離を行う前に行い、固液分離を開始するまで一定時間静置することにより、さらに効果を高めることができる。例えば、加水分解物のpH調整後、1時間静置した後、固液分離を行う方法などがある。

[0021] さらに、加水分解の過程でpHの変化が起きるため、pH調整には、酸またはアルカリを使用して一定のpHとなるように調整することが好ましい。また、pH調整は、適宜、加水分解物に緩衝液を使用してもよい。pH調整

に用いる、酸またはアルカリは、特に限定されるものではない。酸としては、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸などが挙げられ、好ましくは、本発明において得られる糖液の発酵時の阻害が起こりにくいという観点から、硫酸、硝酸、リン酸が用いられ、より好ましくは、経済性の観点から、硫酸が用いられる。アルカリとしては、好ましくは、経済性の観点から、アンモニア、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウムとそれらを含む水溶液が用いられ、より好ましくは、後述の行程（４）において膜分離する際に膜ファウリングが生じることを抑制する観点から、１価イオンである、アンモニア、水酸化ナトリウムが用いられ、さらに好ましくは、発酵時の阻害が起こり難いという観点から、アンモニアが用いられる。

[0022] セルロース含有バイオマスと糖化酵素との接触を促進させると共に、加水分解物の糖濃度を均一にするため、セルロース含有バイオマスと糖化酵素とを攪拌しながら混合することが好ましい。

[0023] セルロースの固形分濃度は、好ましくは１～２５重量％、より好ましくは５～２０重量％の範囲となるようにする。

[0024] 糖化酵素として用いられる糸状菌由来セルラーゼとしては、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、セルロモナス属 (*Cellulomonas*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)、フミコラ属 (*Humicola*)、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、イルペックス属 (*Irpex*)、ムコール属 (*Mucor*)、タラロマイセス属 (*Talaromyces*)、ファネロカエーテ (*Phanerochaete*) 属、白色腐朽菌、褐色腐朽菌などの微生物に由来するセルラーゼを挙げることができる。また、これらの微生物に変異剤あるいは紫外線照射などで変異処理を施してセルラーゼ生産性が向上した変異株由来のセルラーゼであってもよい。こうした糸状菌由来セルラーゼの中でも、セルロースの加水分解において比活性の高い酵素成分を培養液中に大量に生産するトリコデルマ属由来セルラーゼを使用することが好ましい。

[0025] トリコデルマ属由来セルラーゼとは、トリコデルマ属微生物由来のセルラーゼを主成分とする酵素組成物である。トリコデルマ属微生物は特に限定されないが、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) が好ましく、具体的にはトリコデルマ・リーセイQM9414 (*Trichoderma reesei* QM9414)、トリコデルマ・リーセイQM9123 (*Trichoderma reesei* QM9123)、トリコデルマ・リーセイRutC-30 (*Trichoderma reesei* Rut C-30)、トリコデルマ・リーセイPC3-7 (*Trichoderma reesei* PC3-7)、トリコデルマ・リーセイCL-847 (*Trichoderma reesei* CL-847)、トリコデルマ・リーセイMCG77 (*Trichoderma reesei* MCG77)、トリコデルマ・リーセイMCG80 (*Trichoderma reesei* MCG80)、トリコデルマ・ビリデQM9123 (*Trichoderma viride* 9123) を例示することができる。

[0026] 糸状菌由来セルラーゼは、セルロースを加水分解する複数の酵素を含んでおり、セルロースおよび／またはヘミセルロースを加水分解して糖化する活性を有する酵素組成物である。セルロースを加水分解する酵素としては、セロビオヒドラーゼ、エンドグルカナーゼ、エキソグルカナーゼ、 β グルコシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼなどが挙げられる。糸状菌由来セルラーゼは、こうした複数の酵素を含んでいるため、セルロース分解において複数の酵素の協奏効果または補完効果により効率的にセルロースおよび／またはヘミセルロースの加水分解を行うことができる。

[0027] 特に、本発明で使用する糸状菌由来セルラーゼは、セロビオヒドラーゼおよびキシラナーゼを含むことが好ましい。本発明においては、高濃度の無機塩を、セルロース含有バイオマスの加水分解時にセルロース含有バイオマスおよび糸状菌由来セルラーゼに添加することにより、セルロース含有バイオマスの加水分解前である、バイオマス前処理物に対するセロビオヒドラーゼおよびキシラナーゼの吸着を低減させ、高い酵素回収率が得られるため

である。

[0028] セロビオハイドラーゼとは、セルロースを末端部分から加水分解を開始し、セロビオースを放出するセルラーゼの総称であり、EC番号：EC 3. 2. 1. 91として、セロビオハイドラーゼに帰属される酵素群が記載されている。セルロース分解活性は、セルロースを基質として酵素を作用させた際に遊離してくるグルコース量より測定することができ、具体的な方法は、「Pure & Appl. Chem.、Vol. 59、No. 2、257-268ページ」の“FILTER PAPER ASSAY FOR SACCHARIFYING CELLULASE”に記載の方法を使用できる。

[0029] エンドグルカナーゼとは、セルロース分子鎖の中央部分から加水分解する活性を有するセルラーゼの総称であり、EC番号：EC 3. 2. 1. 4、EC 3. 2. 1. 6、EC 3. 2. 1. 39、EC 3. 2. 1. 73としてエンドグルカナーゼに帰属される酵素群が記載されている。セルロース分解活性は、カルボキシメチルセルロース（CMC）を基質として酵素を作用させた際に遊離してくる還元糖の量より測定することができ、具体的な方法は、例えば、「Pure & Appl. Chem.、Vol. 59、No. 2、257-268ページ」の“CARBOXYL CELLULASE ASSAY FOR ENDO- β -1, 4-GLUCANASE”に記載の方法を使用できる。

[0030] エキソグルカナーゼとは、セルロース分子鎖の末端から加水分解するセルラーゼの総称であり、EC番号：EC 3. 2. 1. 74、EC 3. 2. 1. 58としてエキソグルカナーゼに帰属される酵素群が記載されている。

[0031] β グルコシダーゼとは、セロオリゴ糖またはセロビオースを加水分解するセルラーゼの総称であり、EC番号：EC 3. 2. 1. 21として β グルコシダーゼに帰属される酵素群が記載されている。セロビオース分解活性（以下、「BGL活性」ともいう）は、セロビオースを基質として酵素を作用させた際に遊離してくるグルコースの量より測定することができ、例えば、「

Pure & Appl. Chem., Vol. 59, No. 2, 257-268ページ」に記載の“Cellulobiose assay”の方法に従って測定することができる。

[0032] キシラナーゼとは、ヘミセルロースまたは特にキシランに作用することを特徴とするセルラーゼの総称であり、EC番号：EC 3. 2. 1. 8としてキシラナーゼに帰属される酵素群が記載されている。

[0033] キシロシダーゼとは、キシロオリゴ糖に作用することを特徴とするセルラーゼの総称であり、EC番号：EC 3. 2. 1. 37としてキシロシダーゼに帰属される酵素群が記載されている。

[0034] こうした糸状菌由来セルラーゼに含まれる酵素は、ゲルろ過、イオン交換、二次元電気泳動などの公知手法により分離し、分離した成分のアミノ酸配列（N末端分析、C末端分析、質量分析）を行い、データベースとの比較により同定することができる。

[0035] また、糸状菌由来セルラーゼの酵素活性は、アビセル分解活性、キシラン分解活性、カルボキシメチルセルロース（CMC）分解活性、セロビオース分解活性、マンナン分解活性などの多糖の加水分解活性によって評価することができる。アビセル分解活性を示す主たる酵素は、セルロース末端部分から加水分解する特徴を有するセロビオヒドラーゼあるいはエキソグルカナーゼである。キシラン分解活性を示す主たる酵素はキシラナーゼ、 β -キシロシダーゼである。CMC分解活性に関与する主たる酵素は、セロビオヒドラーゼ、エキソグルカナーゼ、エンドグルカナーゼである。セロビオース分解活性を示す主たる酵素は、 β -グルコシダーゼである。ここで、“主たる”という意味は、最も分解に関与することが知られていることからの表現であり、これ以外の酵素成分もその分解に関与していることを意味している。

[0036] 糸状菌は、培養液中にセルラーゼを産生するため、その培養液を粗酵素剤としてそのまま使用してもよいし、公知の方法で酵素群を精製し、製剤化したものを糸状菌由来セルラーゼ混合物として使用してもよい。糸状菌由来セ

ルラーゼを精製し、製剤化したものとして使用する場合、プロテアーゼ阻害剤、分散剤、溶解促進剤、安定化剤など、酵素以外の物質を添加したものをセルラーゼ製剤として使用してもよい。

[0037] 本発明においては、糸状菌由来セルラーゼとしては、粗酵素物が好ましく使用される。粗酵素物は、トリコデルマ属の微生物がセルラーゼを産生するよう調整した培地中で、任意の期間、該微生物を培養した培養上清に由来する。使用する培地成分は特に限定されないが、セルラーゼの産生を促進するために、セルロースを添加した培地が一般的に使用できる。そして、粗酵素物として、培養液をそのまま、またはトリコデルマ菌体を除去したのみの培養上清が好ましく使用される。

[0038] 粗酵素物中の各酵素成分の重量比は特に限定されるものではないが、例えば、トリコデルマ・リーセイ由来の培養液には、50～95重量%のセロビオハイドラーゼが含まれており、残りの成分にエンドグルカナーゼ、 β グルコシダーゼなどが含まれている。また、トリコデルマ属の微生物は、強力なセルラーゼ成分を培養液中に生産する一方で、 β グルコシダーゼに関しては、細胞内または細胞表層に保持しているため培養液中の β グルコシダーゼ活性は低い。そのため、粗酵素物に、さらに異種または同種の β グルコシダーゼを添加してもよい。異種の β グルコシダーゼとしては、アスペルギルス属由来の β グルコシダーゼが好ましく使用できる。アスペルギルス属由来の β グルコシダーゼとして、ノボザイム社より市販されているNovozyme 188などを例示することができる。粗酵素物に異種または同種の β グルコシダーゼを添加する方法としては、トリコデルマ属の微生物に遺伝子を導入し、その培養液中に産生されるよう遺伝子組換えされたトリコデルマ属の微生物を培養し、その培養液を単離する方法でもよい。

[0039] (前処理)

セルロース含有バイオマスは、上記のように、セルロースの他に、リグニンなどを含有している。そのため、セルロース含有バイオマスを前処理しておくことが好ましい。これにより、糸状菌由来セルラーゼによるセルロース

含有バイオマスの加水分解効率を向上させることができる。セルロース含有バイオマスの前処理方法としては、酸処理、硫酸処理、希硫酸処理、酢酸処理、アルカリ処理、苛性ソーダ処理、アンモニア処理、水熱処理、亜臨界水処理、微粉碎処理、蒸煮処理などが挙げられる。本発明においては、後述の工程（3）で種々の酵素を効率よく回収するという観点から、アンモニア処理、水熱処理または希硫酸処理を行うことが好ましい。

[0040] アンモニア処理は、特開2008-161125号公報や特開2008-535664号公報などに記載の方法に準拠して行うことができる。例えば、使用するアンモニア濃度はバイオマスに対して0.1～15重量%の範囲で添加し、4～200℃、好ましくは90～150℃で処理する。添加するアンモニアは、液体または気体のどちらでもよい。添加する形態は、純粋なアンモニアでもアンモニア水溶液の形態でもよい。処理回数は、特に限定されず、前記処理を1回以上行えばよい。特に、前記処理を2回以上行う場合、1回目と2回目以降の処理を異なる条件で行ってもよい。アンモニア処理によって得られた処理物は、さらに酵素による加水分解反応を行うため、アンモニアの中和またはアンモニアの除去を行う必要がある。中和は、加水分解物より固形分を固液分離により除去したアンモニアに対し行ってもよいし、固形分を含んだままの状態で行ってもよい。中和に使用する酸試薬は、特に限定されない。アンモニアの除去は、アンモニア処理物を減圧状態に保つことでアンモニアを気体状態に揮発させて除去することができる。また、除去したアンモニアは、回収して再利用してもよい。

[0041] 水熱処理の場合、セルロース含有バイオマスが、0.1～50重量%となるよう水を添加後、100～400℃の温度で、1秒～60分処理する。このような温度条件で処理することにより、セルロースの加水分解が生じる。処理回数は、特に限定されず、該処理を1回以上行えばよい。特に、該処理を2回以上行う場合、1回目と2回目以降の処理を異なる条件で実施してもよい。

[0042] 希硫酸処理の場合、硫酸の濃度は0.1～15重量%であることが好まし

く、0.5～5重量%であることがより好ましい。反応温度は、100～300℃の範囲で設定することができ、120～250℃で設定することが好ましい。反応時間は、1秒～60分の範囲で設定することができる。処理回数は、特に限定されず前記処理を1回以上行えばよい。特に、上記処理を2回以上行う場合、1回目と2回目以降の処理を異なる条件で行ってもよい。希硫酸処理によって得られた加水分解物は、酸を含んでおり、さらにセルラーゼによる加水分解反応を行うため、または発酵原料として使用するために、中和を行う必要がある。

[0043] [工程(2)]

工程(2)では、工程(1)で得られた加水分解物を、糖液と糖化残さに固液分離する。

[0044] 工程(2)で加水分解物を固液分離する方法は、特に限定されず、従来より公知の一般の固液分離の方法を使用することができる。固液分離の方法として、例えば、スクリュードカンタなどの遠心分離、フィルタープレスなどの膜分離、ベルトフィルター、自然沈降による分離、またはメッシュスクリーン、不織布、および濾紙などによるろ過などが挙げられる。加水分解物の固液分離方法は、膜分離を用いることが好ましい。膜分離の中でも、加水分解物の固液分離方法は、粒子状の固形物である糖化残さを効率よく除去でき、かつ除去した糖化残さを圧搾することで、より多くの糖液を回収することができるという観点から、加水分解物の固液分離をプレスろ過により行うフィルタープレスを用いることが最も好ましい。加水分解物を固液分離する方法は、単独で用いてもよいし、複数を組み合わせて用いてもよい。

[0045] [工程(3)]

工程(3)では、糖化残さをリグニンブロッキング剤を含む水溶液で洗浄して、糖化残さに吸着などして含まれる糸状菌由来セルラーゼをリグニンブロッキング剤を含む水溶液に溶出させる。これにより、糖化残さに含まれる糸状菌由来セルラーゼを含む洗浄された溶液が得られる。

[0046] リグニンブロッキング剤とは、セルロース含有バイオマスに含まれるリグ

ニン成分に対し親和性を有しており、疎水性相互作用、水素結合、イオン結合などにより吸着可能な成分のことである。前記成分として、具体的には、ペプチド、タンパク質、多糖などの親水性の高分子化合物などが挙げられる。また、リグニンブロッキング剤は、これら高分子化合物を単独で含むものよりも、それ以外の成分、例えば、糖、アミノ酸、塩類、脂肪なども含まれていることが、糖化残さに吸着した糸状菌由来セルラーゼの溶出効果を高めるという観点で好ましい。

[0047] 前記高分子化合物とそれ以外の成分を含む好ましいリグニンブロッキング剤の具体例としては、コーンステープリカー（CSL）、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、カゼイン、スキムミルク、牛血清由来アルブミン（BSA）、エタノール発酵蒸留残さ（DDGS）、ゼイン、魚加工廃棄物、肉加工廃棄物、ホエータンパク質（乳清タンパク質）、糖加工廃棄物、穀物加工廃棄物、食物、藻類タンパク質、大豆タンパク質、細菌タンパク質、菌タンパク質などが挙げられる。これらは、1種類単独で使用してもよいし複数種類混合して使用してもよい。これらの中でも、コーンステープリカーおよび／またはエタノール発酵蒸留残さが、より好ましい。また、上記の例示したリグニンブロッキング剤は、単位あたりの値段が安いという利点を有する。

[0048] リグニンブロッキング剤は、水溶液中に1g/L以上の濃度で含まれることが、糖化残さに吸着した糸状菌由来セルラーゼの溶出効果を高めるという観点から、好ましく、1~10g/Lであることがより好ましい。なお、水溶液に含まれるリグニンブロッキング剤は、すべて水に溶解した状態である必要はなく、一部は不溶化した状態であってもよい。

[0049] リグニンブロッキング剤を含む水溶液は、さらに無機塩を含むことが好ましい。これにより、リグニンブロッキング剤のみでは溶出させられない酵素成分、具体的には、キシロシダーゼなどのヘミセルラーゼ成分を溶出させることができる。

[0050] 無機塩としては、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化マグネシウム、

硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、硫酸アンモニウムなどが挙げられる。これらの中でも、硫酸アンモニウムが好ましい。リグニンブロッキング剤を含む水溶液中に含まれる無機塩の濃度は、1～25 g/Lであることが好ましい。

[0051] 糖化残さの洗浄は、糖化残さをリグニンブロッキング剤を含む水溶液に分散させて攪拌混合する方法でもよいし、糖化残さに対して、リグニンブロッキング剤を含む水溶液を通液させる方法であってもよい。糖化残さに吸着した糸状菌由来セルラーゼの溶出効果を高めるという観点から、糖化残さに対して、リグニンブロッキング剤を含む水溶液を通液させる方法が好ましい。

[0052] リグニンブロッキング剤を含む水溶液で糖化残さを洗浄する際の、リグニンブロッキング剤を含む水溶液の温度は、40～60℃であることが好ましい。洗浄時の温度が40℃以上であると、糖化残さの洗浄効果が高まり、糸状菌由来セルラーゼの溶出量が増大する。洗浄時の温度が60℃以下の場合には、糸状菌由来セルラーゼの失活が進むことを抑制できるため、洗浄された溶液中の糸状菌由来セルラーゼの各活性が減少することを抑制することができる。

[0053] [工程（4）]

工程（4）では、洗浄された溶液をろ過して、糖液を含む透過液と、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液とに分離する。これにより、透過液が回収されると共に、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液が回収される。透過液は、糖液を含んでいるため、工程（2）で得られた糖液に混合されることで、糖液として利用できる。

[0054] 洗浄された溶液のろ過は、単糖であるグルコース（分子量180）やキシロース（分子量150）が透過可能であって、糸状菌由来セルラーゼの透過を阻止できる方法が用いられる。

[0055] 本発明においては、洗浄された溶液のろ過には、限外ろ過膜（UF膜）が用いられることが好ましい。限外ろ過膜は、洗浄された溶液中に含まれる糸状菌由来セルラーゼなどの高分子の透過を阻止しつつ糖を透過させることが

できる。糖化残さを洗浄して得られた洗浄された溶液には、糖化残さに吸着していた糸状菌由来セルラーゼが溶出している。洗浄された溶液を限外ろ過膜でろ過することで、洗浄された溶液中に含まれる糸状菌由来セルラーゼを限外ろ過膜の非透過液として、洗浄された溶液から分離して、回収することができる。また、洗浄された溶液は、逐次的または連続して限外ろ過膜に通じてろ過するようにしてもよい。

[0056] 限外ろ過膜は、グルコースやキシロースなどの単糖が透過でき、かつ糸状菌由来セルラーゼの透過を阻止できる分画分子量を有するものを用いることが好ましい。本発明においては、限外ろ過膜の分画分子量は、好ましくは500～100,000である。この範囲内の分画分子量を有する限外ろ過膜を用いれば、糸状菌由来セルラーゼが透過することを阻止しつつ単糖を糖液として透過させることができる。また、限外ろ過膜の分画分子量は、酵素反応に阻害的作用を示す夾雑物質を酵素と分離するという観点から、より好ましくは10,000～50,000である。

[0057] ここで、限外ろ過膜は、孔径が小さすぎて膜表面の細孔径を電子顕微鏡などで計測することが困難であり、平均細孔径の代わりに分画分子量という値を孔径の大きさの指標とすることになっている。分画分子量とは、日本膜学会編 膜学実験シリーズ 第111巻 人工膜編 編集委員／木村尚史・中尾真一・大矢晴彦・仲川勤（1993 共立出版） P92に、『溶質の分子量を横軸に、阻止率を縦軸にとってデータをプロットしたものを分画分子量曲線とよんでいる。そして阻止率が90%となる分子量を膜の分画分子量とよんでいる。』とあるように、限外ろ過膜の膜性能を表す指標として当業者には周知のものである。

[0058] 使用する限外ろ過膜の素材としては、ポリエーテルスルホン（PES）、ポリスルホン（PS）、ポリアクリロニトリル（PAN）、ポリフッ化ビニルデン（PVDF）、再生セルロース、セルロース、セルロースエステル、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、塩素化ポリエチレン、ポリプロピレン、スルホン化ポリスルホン、スルホン化ポリエーテルスルホン、ポリオレ

フィン、ポリビニルアルコール、ポリメチルメタクリレート、ポリ4フッ化エチレンなどの有機材料、あるいはステンレスなどの金属、またはセラミックなど無機材料などが挙げられる。使用する限外ろ過膜の材質としては、再生セルロース、セルロース、セルロースエステルはセルラーゼによる分解を受けるため、PES、PVDFなどを使用することが好ましい。

[0059] 限外ろ過膜の形態は、チューブラー型、スパイラル型、平膜型、中空糸型などが好ましく使用できる。具体的には、DESAL社のG-5タイプ、G-10タイプ、G-20タイプ、G-50タイプ、PWタイプ、HWSUFタイプ、KOCH社のHFM-180、HFM-183、HFM-251、HFM-300、HFK-131、HFK-328、MPT-U20、MPS-U20P、MPS-U20S、Synder社のSPE1、SPE3、SPE5、SPE10、SPE30、SPV5、SPV50、SOW30、旭化成株式会社製のマイクロザ（登録商標）UFシリーズの分画分子量3,000から10,000に相当するもの、日東電工株式会社製のNTR7410、NTR7450などが挙げられる。

[0060] 限外ろ過膜のろ過方式は、クロスフローろ過方式、デッドエンドろ過方式などが挙げられるが、膜ファウリング、フラックスの抑制などを図る観点から、クロスフローろ過方式が好ましい。

[0061] ろ過方法としては、圧ろ過、真空ろ過、遠心ろ過などが好ましく使用できる。また、ろ過操作として、定圧ろ過、定流量ろ過、非定圧非定流量ろ過などが挙げられる。ろ過操作は、上記限外ろ過膜を2回以上使用する多段ろ過でもよい。

[0062] 工程（4）で回収された非透過液は、糸状菌由来セルラーゼを含んでいるため、回収された非透過液を、工程（1）で使用される糸状菌由来セルラーゼに混合することで、工程（1）の糸状菌由来セルラーゼとして使用することができる。これにより、工程（1）で新たに使用する糸状菌由来セルラーゼの量を低減することができるため、糸状菌由来セルラーゼの費用の低減を図ることができる。

[0063] このように、本発明の糖液の製造方法によれば、糖化残さに吸着した糸状菌由来セルラーゼをリグニンブロッキング剤を含む水溶液に溶出させ、糸状菌由来セルラーゼが溶出した水溶液をろ過することにより、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液を得ることができる。得られた非透過液中の糸状菌由来セルラーゼを回収して再利用することで、糖化酵素の使用量をさらに低減しつつ糖液を製造することができる。これにより、糖液の製造コストを大幅に削減することができる。

[0064] (他の形態)

本発明においては、工程（４）で洗浄された液をろ過して、得られた非透過液を回収する場合について説明したが、これに限定されるものではない。例えば、工程（２）で得られた糖液も洗浄された溶液とは別にろ過して、糖液に含まれる糸状菌由来セルラーゼを糖液から分離し、透過液を糖液として回収し、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液を回収するようにしてもよい。これにより、糖液に含まれる糸状菌由来セルラーゼも有効に再利用することができる。

[0065] また、工程（２）で得られた糖液と工程（３）で得られた洗浄された溶液とを混合した後、この混合溶液をろ過し、混合溶液に含まれる糸状菌由来のセルラーゼを分離するようにしてもよい。これにより、糖液を含む透過液を回収することができると共に、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液を回収することができる。混合溶液をろ過する形態の一例を図２に示す。図２に示すように、糖液と洗浄された溶液とを混合して混合溶液とする。その後、工程（４）において、混合溶液を限外ろ過膜でろ過して、糸状菌由来のセルラーゼを含む非透過液と、糖液を含む透過液とに分離する。これにより、糖液を含む透過液が回収されると共に、糸状菌由来のセルラーゼを含む非透過液が回収される。透過液は、そのまま糖液として使用してもよいし、糖液以外の成分を分離して得られた糖液のみを使用してもよい。回収された非透過液は、工程（１）で添加される糸状菌由来セルラーゼに混合して、工程（１）において再利用することができる。工程（２）で得られた糖化残さには、糸

状菌由来セルラーゼの多くが吸着しているが、工程（２）で得られた糖液にも、工程（１）でセルロース含有バイオマスの加水分解に使用された糸状菌由来セルラーゼ成分が含まれている。そのため、工程（４）において、工程（２）で得られた糖液に含まれる糸状菌由来セルラーゼも洗浄された溶液に含まれる糸状菌由来セルラーゼとまとめて回収することができるため、糸状菌由来セルラーゼの回収量を更に高めることができる。これにより、糖化酵素の使用量をさらに低減しつつ糖液を製造することが可能となる。また、工程（２）で得られた糖液を洗浄された溶液とは別にろ過する場合に比べ、混合溶液をろ過する場合の方が、製造装置の簡略化を図りつつ糸状菌由来セルラーゼを効率良く回収することができる。

[0066] また、混合溶液は、工程（２）で得られた糖液を、ろ過する前に一時保持しておき、工程（３）で得られた洗浄された溶液と混合して調製しておくことが好ましい。一般的に、タンパク質は、限外ろ過膜の表面に吸着する傾向がある他、配管、タンクなどにも吸着しうる。工程（２）で得られる糖液に含まれる主なタンパク質成分は、糸状菌由来セルラーゼ成分であるため、限外ろ過膜、配管、タンク内にタンパク質成分が吸着してしまうと、回収される糸状菌由来セルラーゼ量が減少することになる。そこで、工程（２）の糖液と工程（３）で得られた洗浄された溶液とを予め混合しておき、この混合溶液を、限外ろ過膜などのろ過膜でろ過することにより、糖液中の糸状菌由来セルラーゼ成分が、特に限外ろ過膜、配管、タンク内などに吸着することを抑制することができる。これにより、糸状菌由来セルラーゼの回収量を更に高めることができる。

[0067] <糖液製造装置>

本発明による糖液の製造方法を用いた糖液製造装置について説明する。なお、糖液製造装置の形態は、以下に限定されるものではない。図３は、本発明による糖液の製造方法を用いた糖液製造装置の一例を示す図である。なお、図３は、上記の図２に記載の本発明による糖液の製造方法を用いた装置である。図３に示すように、本発明による糖液の製造方法を用いた糖液製造装

置 1 0 は、加水分解反応槽 1 1、固液分離装置 1 2、洗浄水槽 1 3、ろ液回収タンク 1 4、限外ろ過膜装置 1 5、および糖化酵素回収ライン L 1 1 を有する。

[0068] 加水分解反応槽 1 1 は、加水分解を行う攪拌タンク 2 1、セルロース含有バイオマス 2 2 を攪拌混合する攪拌装置 2 3、および攪拌タンク 2 1 を保温する保温設備 2 4 を備える。攪拌タンク 2 1 は、上部に、セルロース含有バイオマス 2 2 が供給される供給口 2 5 と、糸状菌由来セルラーゼ 2 6 が供給される供給口 2 7 とを備える。セルロース含有バイオマス 2 2 および糸状菌由来セルラーゼ 2 6 が攪拌タンク 2 1 内に供給されると、攪拌タンク 2 1 において、セルロース含有バイオマス 2 2 は、糸状菌由来セルラーゼ 2 6 により加水分解され、加水分解物 2 8 が得られる（工程（1））。

[0069] 攪拌タンク 2 1 で得られた加水分解物 2 8 は、調節弁 V 1 1 を開くことで、攪拌タンク 2 1 から抜き出され、ポンプ P 1 により圧送されて、供給口 3 1 から固液分離装置 1 2 に供給される。

[0070] 固液分離装置 1 2 は、プレスろ過装置 3 2 と、コンプレッサー 3 3 とを備える。加水分解物 2 8 は、コンプレッサー 3 3 によりプレスろ過装置 3 2 において圧搾されることで、糖液と糖化残さ（固形物）とに固液分離される（工程（2））。糖液は、プレスろ過装置 3 2 から糖液供給ライン L 2 1 に排出され、ろ過室内には糖化残さが保持される。

[0071] 糖液供給ライン L 2 1 は、その途中に、洗浄水槽 1 3 と連結した分岐ライン L 2 2 が連結されている。糖液供給ライン L 2 1 に調節弁 V 2 1 が設けられ、分岐ライン L 2 2 に調節弁 V 2 2 が設けられている。調節弁 V 2 1 を開き、かつ調節弁 V 2 2 を閉じることで、プレスろ過装置 3 2 から排出された糖液は、糖液供給ライン L 2 1 を通って、ろ液回収タンク 1 4 に供給され、ろ液回収タンク 1 4 内に保持される。また、調節弁 V 2 1 を閉じ、かつ調節弁 V 2 2 を開くことで、プレスろ過装置 3 2 から排出された糖液は、分岐ライン L 2 2 を通って、洗浄水槽 1 3 に供給され、洗浄水槽 1 3 内に保持される。

- [0072] リグニンブロッキング剤を含む水溶液 3 4 は、洗浄水槽 1 3 から洗浄液供給ライン L 2 3 を通って、通水口 3 5 よりプレスろ過装置 3 2 に供給される。プレスろ過装置 3 2 で生じた糖化残さは、リグニンブロッキング剤を含む水溶液 3 4 で洗浄され、糖化残さに付着している糸状菌由来セルラーゼがリグニンブロッキング剤を含む水溶液 3 4 に溶出して、糸状菌由来セルラーゼを含む洗浄された溶液が得られる（工程（3））。なお、リグニンブロッキング剤を含む水溶液 3 4 は、調節弁 V 2 3 の開度を調整することで洗浄水槽 1 3 から抜き出され、ポンプ P 2 で圧送されて、洗浄水槽 1 3 からプレスろ過装置 3 2 に供給される。
- [0073] また、洗浄水槽 1 3 は、その周囲に保温設備 3 6 を備えている。これにより、洗浄水槽 1 3 内のリグニンブロッキング剤を含む水溶液 3 4 は、所定温度に保温される。洗浄水槽 1 3 は、循環ライン L 1 1 および洗浄液供給ライン L 2 4 と連結されている。リグニンブロッキング剤を含む水溶液 3 4 は、洗浄液供給ライン L 2 4 を介して洗浄水槽 1 3 に供給される。リグニンブロッキング剤を含む水溶液 3 4 の供給量は、調節弁 V 2 4 の開度を調整することで調整される。
- [0074] プレスろ過装置 3 2 で得られた洗浄液は、糖液供給ライン L 2 1 を通って、ろ液回収タンク 1 4 に供給され、ろ液回収タンク 1 4 内で糖液と混合される。また、プレスろ過装置 3 2 で得られた洗浄液は、分岐ライン L 2 2 を通って洗浄水槽 1 3 に循環させるようにしてもよい。この時、調節弁 V 2 1、V 2 5 の開度が調整され、調節弁 V 2 1 は閉じて調節弁 V 2 5 は開くようにする。
- [0075] ろ液回収タンク 1 4 は、糖液、洗浄液、またはこれらが混合された混合溶液 4 1 を貯留するためのタンクである。ろ液回収タンク 1 4 には、ろ液回収タンク 1 4 内の溶液を限外ろ過膜装置 1 5 に供給する糖液供給ライン L 3 1 と、ろ液回収タンク 1 4 内の溶液を攪拌タンク 2 1 に供給される糸状菌由来セルラーゼ 2 6 に混合する糖化酵素回収ライン L 1 1 とが連結されている。
- [0076] 混合溶液 4 1 は、糖液供給ライン L 3 1 を通って、限外ろ過膜装置 1 5 に

供給される。糖液供給ラインL 3 1には、調節弁V 3 1が設けられており、混合溶液4 1の限外ろ過膜装置1 5への供給量は、調節弁V 3 1の開度を調整することにより調整される。混合溶液4 1は、ポンプP 3で圧送されて、限外ろ過膜装置1 5に供給される。

[0077] 限外ろ過膜装置1 5は、混合溶液4 1をろ過して、透過液4 2と非透過液4 3とに分離する。限外ろ過膜装置1 5内の限外ろ過膜を透過した透過液4 2は、糖液を回収される。限外ろ過膜を透過しない非透過液4 3は、ろ液回収タンク1 4内の混合溶液4 1が排出された後、ろ液回収タンク1 4に供給される。

[0078] ろ液回収タンク1 4に回収された非透過液4 3は、糖化酵素回収ラインL 1 1を通して、攪拌タンク2 1に供給される糸状菌由来セルラーゼと混合されて、攪拌タンク2 1に供給される。糖化酵素回収ラインL 1 1には、調節弁V 3 2が設けられており、非透過液の供給量は、調節弁V 3 2の開度を調整することで調整される。ろ液回収タンク1 4に回収された非透過液4 3は、糸状菌由来セルラーゼを含んでいるため、攪拌タンク2 1で糸状菌由来セルラーゼとして再利用することができる。

[0079] 本発明による糖液の製造方法を用いた糖液製造装置は、糖化残さに付着した糸状菌由来セルラーゼを回収して再利用することで、糸状菌由来セルラーゼの使用量をさらに低減しつつ糖液を製造することができる。これにより、糖液の製造コストの大幅な削減を図ることができる。

[0080] <糖液の用途>

本発明により得られた糖液は、食品原料、医薬品原料、化学品などの発酵原料などのさまざまな用途に使用することができる。本発明により得られた糖液は、発酵原料として使用し、化学品を生産する能力を有する微生物を生育させることで、各種化学品を製造することができる。なお、微生物を生育させるとは、糖液に含まれる糖成分またはアミノ源を微生物の栄養素として利用し、微生物の増殖、生育維持を行うことをいう。化学品の具体例としては、アルコール、有機酸、アミノ酸、核酸など発酵工業において大量生産さ

れている物質を挙げるができる。こうした化学品は、糖液中の糖成分を炭素源として、その代謝の過程において生体内外に化学品として蓄積生産する。微生物によって生産可能な化学品として、例えば、エタノール、プロパノール、ブタノール、1, 3-プロパンジオール、1, 4-ブタンジオール、グリセロールなどのアルコール、酢酸、乳酸、ピルビン酸、コハク酸、リンゴ酸、イタコン酸、クエン酸などの有機酸、イノシン、グアノシンなどのヌクレオシド、イノシン酸、グアニル酸などのヌクレオチド、カダベリンなどのアミン化合物を挙げるができる。さらに、本発明の糖液の製造方法により得られる糖液は、酵素、抗生物質、組換えタンパク質などの生産に適用することも可能である。こうした化学品の製造に使用する微生物としては、目的の化学品を効率的に生産可能な微生物であればよく、大腸菌、酵母、糸状菌、担子菌などの微生物を使用することができる。

実施例

[0081] 以下、本発明の糖液の製造方法に関し、さらに詳細に説明するために実施例を挙げて具体的に説明する。ただし、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0082] (参考例1) 糸状菌由来セルラーゼ(培養液)の調製

糸状菌由来セルラーゼ(培養液)は、次の方法で調製した。

[0083] (前培養)

コーンスティップリカー5% (w/vol)、グルコース2% (w/vol)、酒石酸アンモニウム0.37% (w/vol)、硫酸アンモニウム0.14 (w/vol)、リン酸二水素カリウム0.2% (w/vol)、塩化カルシウム二水和物0.03% (w/vol)、硫酸マグネシウム七水和物0.03% (w/vol)、塩化亜鉛0.02% (w/vol)、塩化鉄(III)六水和物0.01% (w/vol)、硫酸銅(II)五水和物0.004% (w/vol)、塩化マンガン四水和物0.0008% (w/vol)、ホウ酸0.0006% (w/vol)、および七モリブデン酸六アンモニウム四水和物0.0026% (w/vol)となるように蒸留水に添加し、

上記各成分を含む蒸留水100mLを500mLバツフル付き三角フラスコに張り込み、121℃の温度で15分間オートクレーブ滅菌した。放冷後、これとは別に、それぞれ121℃の温度で15分間オートクレーブ滅菌したPE-MとTween80とを、上記の500mLバツフル付き三角フラスコにそれぞれ0.01% (w/vol) 添加した。この前培養培地に、トリコデルマ・リーセイATCC66589を 1×10^5 個/mLになるように植菌し、振とう装置 (TAITEC社製 BIO-SHAKER BR-40LF) を用いて、28℃の温度で72時間、180rpmで振とう培養し、前培養とした。

[0084] (本培養)

コーンスティップリカー5% (w/vol)、グルコース2% (w/vol)、セルロース (アピセル) 10% (w/vol)、酒石酸アンモニウム0.37% (w/vol)、硫酸アンモニウム0.14% (w/vol)、リン酸二水素カリウム0.2% (w/vol)、塩化カルシウム二水和物0.03% (w/vol)、硫酸マグネシウム七水和物0.03% (w/vol)、塩化亜鉛0.02% (w/vol)、塩化鉄(III)六水和物0.01% (w/vol)、硫酸銅(II)五水和物0.004% (w/vol)、塩化マンガン四水和物0.0008% (w/vol)、ホウ酸0.0006% (w/vol)、および七モリブデン酸六アンモニウム四水和物0.0026% (w/vol) となるように蒸留水に添加し、上記各成分を含む蒸留水2.5Lを5L容攪拌ジャー (DPC-2A、ABLE社製) 容器に張り込み、121℃の温度で15分間オートクレーブ滅菌した。放冷後、これとは別に、それぞれ121℃で15分間オートクレーブ滅菌したPE-MとTween80とを、それぞれ0.1%添加し、予め前記の方法で液体培地で前培養したトリコデルマ・リーセイATCC66589を250mL接種した。その後、振とう装置 (TAITEC社製 BIO-SHAKER BR-40LF) を用いて、28℃で87時間、300rpm、通気量1vvmの条件で振とう培養を行った。その後、遠心分離した後、上清を膜ろ過 (ス

テリカップーGV、材質：PVDF、ミリポア社製)した。得られた培養液を糸状菌由来セルラーゼとして、以下の実施例に使用した。

[0085] 以下の実施例および比較例において、糖濃度、糸状菌由来セルラーゼの活性は、以下のようにして測定した。

[0086] (参考例2) 糖濃度の測定

糖液に含まれるグルコースおよびキシロースの各濃度は、下記に示す高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography: HPLC) 条件で、標品との比較により定量した。

(HPLC条件)

カラム: Luna NH₂ (Phenomenex社製)

移動相: ミリQ: アセトニトリル = 25 : 75

流速: 0.6 mL / 分

反応液: なし

検出方法: RI (示差屈折率)

温度: 30°C。

[0087] (参考例3) 糸状菌由来セルラーゼの活性の測定

糸状菌由来セルラーゼの酵素活性は、(1) アビセル分解活性および(2) キシラン分解活性の2種の分解活性に分けて、次の手順で活性を測定評価した。

[0088] (1) アビセル分解活性

回収した酵素液(100 μL)に対し、アビセル(メルク社製)を1 g/Lと酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)を100 mMとなるように添加し、50°Cの温度で24時間反応させた。反応液は1 mLチューブで調整し、前記の条件で回転混和しながら反応を行った。反応後、チューブを遠心分離し、その上清成分のグルコース濃度を測定した。グルコース濃度は、参考例2に記載の方法に準じて測定した。アビセル分解活性は、生成したグルコース濃度(g/L)をそのまま活性値とした。

[0089] (2) キシラン分解活性

酵素液に対し、キシラン (Birch wood xylan、和光純薬工業株式会社製) 10 g/Lと酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を 100 mMとなるように添加し、50°Cで4時間反応させた。反応液は1 mLチューブで調整し、前記の条件で回転混和しながら反応を行った。反応後、チューブを遠心分離し、その上清成分のキシロース濃度を測定した。キシロース濃度は、参考例2に記載の方法に準じて測定した。キシロース分解活性は、生成したキシロース濃度 (g/L) をそのまま活性値とした。

[0090] <実施例1：セルロース含有バイオマスの加水分解（工程（1））>

[セルロース含有バイオマスの前処理]

(セルロース含有バイオマスのアンモニア処理（前処理1）)

セルロース含有バイオマスとして稲藁を使用した。稲藁を小型反応器（耐圧硝子工業製、TVS-N2 30 ml）に投入し、液体窒素で冷却した。この反応器にアンモニアガスを流入し、試料を完全に液体アンモニアに浸漬させた。リアクターの蓋を閉め、室温で15分ほど放置した。次いで、150°Cのオイルバス中にて1時間処理した。処理後、反応器をオイルバスから取り出し、ドラフト中で直ちにアンモニアガスをリーク後、さらに真空ポンプで反応器内を10 Paまで真空引きし乾燥させた。これを前処理物1として、以下の実施例に使用した。

[0091] (セルロース含有バイオマスの水熱処理（前処理2）)

セルロース含有バイオマスとして稲藁を使用した。稲藁を水に浸し、攪拌しながら180°Cで20分間オートクレーブ処理（日東高圧株式会社製）した。その際の圧力は10 MPaであった。処理後は溶液成分（以下、水熱処理液という。）と処理バイオマス成分に遠心分離（3000 G）を用いて固液分離した。この処理バイオマス成分を前処理物2として、以下の実施例に使用した。

[0092] [セルロース含有バイオマスの糸状菌由来セルラーゼによる加水分解]

前述の前処理物1および前処理物2をそれぞれ糸状菌由来セルラーゼで加

水分解を行った。それぞれの前処理物（0.5 g）に蒸留水を加えた後、参考例2で調製した糸状菌由来セルラーゼ0.5 mLを添加した。その後、それぞれの前処理物（0.5 g）に、総重量が10 gとなるように、さらに蒸留水を添加した。さらに、それぞれの本組成物のpHが4.5～5.3の範囲となるように、希釈硫酸または希釈苛性ソーダを添加して調整した。それぞれの本組成物を枝付き反応容器（東京理化器械株式会社製、φ30、NS14/23）に移した。その後、この枝付き反応容器を恒温槽（MG-2200、東京理化社製）に入れて、小型攪拌機（CPS-1000、東京理化社製）を用いて、50℃で24時間、前記本組成物を保温および攪拌しながら加水分解を行った。前処理物1から得られた加水分解物を「加水分解物1」、前処理物2から得られた加水分解物を「加水分解物2」として、以下工程（2）以降の実施例に使用した。

[0093] <実施例2：加水分解物の固液分離（工程（2））>

実施例1において得られた加水分解物1および加水分解物2をそれぞれ遠心分離（3000G、10分）して固液分離し、糖液（6g）と糖化残さ（4g）とに分離した。加水分解物1から得られた糖液および糖化残さを、「糖液1」および「糖化残さ1」とし、加水分解物2から得られた糖液および糖化残さを、「糖液2」および「糖化残さ2」として、工程（3）以降の実施例に使用した。また、得られた糖液1および糖液2の糖濃度（グルコースおよびキシロース濃度）は、参考例1に記載の方法で測定した。得られた糖液1および糖液2の糖濃度（グルコースおよびキシロース濃度）の測定結果を、表1に示す。

[0094] [表1]

（表1）糖液の糖濃度

	糖液1	糖液2
グルコース濃度（g/L）	1.8	2.4
キシロース濃度（g/L）	1.1	6

[0095] <実施例3：糖化残さの洗浄（工程（3））、および得られた洗浄された溶

液のろ過（工程（４））＞

実施例２で得られた各糖化残さに対し、リグニンブロッキング剤を含む水溶液で洗浄操作を室温で行った。リグニンブロッキング剤としては、BSA（牛血清由来アルブミン、シグマアルドリッチ社製）、カゼイン（シグマアルドリッチ社製）、DDGS（トウモロコシ蒸留残さ、BP-50、Wilbur-Ellis製）、CSL（コーンステープリカー、王子コーンスターチ株式会社製）、スキムミルク（和光純薬工業株式会社製）、ペプトン（BBLペプトン、ベクトン・ディッキンソン製）を使用した。リグニンブロッキング剤を滅菌水に最終濃度5g/Lとなるように添加し、洗浄された溶液を調製した。これら洗浄された溶液を「糖化残さ1」および「糖化残さ2」に対し、6g（6mL）添加し混合した。混合後、30分、室温で放置した後、遠心分離（3000G、10分）して固液分離し、糖化残さ1および糖化残さ2の各洗浄された溶液6gを各遠心上清として回収した。回収した上清成分は、マイレクスHVフィルターユニット（33mm、PVDF製、細孔径0.45μm）を使用して精密濾過を行った。得られたろ液は、分画分子量10000の限外ろ過膜（Sartorius stedim biotech社製 VIVASPIN 20 材質：PES）でろ過し、膜画分が1mLになるまで4500Gで遠心した。さらに蒸留水6mLを膜画分に添加し、再度膜画分が1mLになるまで4500Gで遠心した。その後、膜画分から酵素を回収した。回収酵素の各活性は、参考例3に準じて測定した。また、従来技術との比較のため、比較例1として蒸留水のみ（リグニンブロッキング剤を含まない）で糖化残さを洗浄した際のそれぞれの回収酵素成分の活性を基準1として、相対値として回収酵素成分の活性を表2および表3に示す。

[0096]

[表2]

(表2) 回収酵素成分のアビセル分解活性

リグニンブロッキング剤	糖化残さ1	糖化残さ2
比較例1 (蒸留水)	1	1
BSA	2.4	3.7
カゼイン	2.8	3.6
DDGS	2.1	2.8
CSL	4.3	4.5
スキムミルク	3.5	4.1
ペプトン	3.5	4.2

[0097] [表3]

(表3) 回収酵素成分のキシラン分解活性

リグニンブロッキング剤	糖化残さ1	糖化残さ2
比較例1 (蒸留水)	1	1
BSA	1.2	1.4
カゼイン	1.6	1.4
DDGS	1.3	1.5
CSL	2.6	2.8
スキムミルク	1.4	1.5
ペプトン	1.6	1.6

[0098] 表2および表3から明らかなように、リグニンブロッキング剤を含む水溶液による洗浄で糸状菌由来セルラーゼの回収が高まり、回収酵素成分中のアビセル分解活性が特に高まることが判明した。

[0099] <実施例4：工程(2)の糖液と洗浄された溶液との混合溶液のろ過(工程(4))>

実施例2の糖液1(6g)と実施例3の洗浄された溶液(6g)(糖化残さ1をCSLで洗浄した洗浄された溶液)とを混合して、限外ろ過膜に通じてろ過を行った。マイレクスHVフィルターユニット(33mm、PVDF製、細孔径0.45 μ m)を使用して精密ろ過を行った。得られたろ液を、分画分子量10000の限外ろ過膜(Sartorius stedim biotech社製 VIVASPIN 20 材質:PES)でろ過し、膜画分が1mLになるまで4500Gで遠心した。さらに蒸留水6mLを膜

画分に添加し、再度膜画分が1 mLになるまで4500 Gで遠心した。この後、膜画分から酵素を回収した。回収酵素の各活性は、参考例3に準じて測定した。また、回収酵素活性の比較のため、工程(2)の糖液と比較例1の糖化残さの洗浄された溶液とを混合した後、限外ろ過膜に通じてろ過して、非透過液として糸状菌由来セルラーゼを回収する工程(比較例2)で得られた回収酵素活性を基準(1)として、相対値として表4に示した。

[0100] [表4]

(表4) 回収酵素の各酵素活性の比較

	実施例3	実施例4	比較例2
アビセル分解活性	4.3	5.2	1
キシラン分解活性	2.6	3.4	1

[0101] 表4から明らかなように、比較例2に対して、実施例4では各回収酵素活性が高まることが判明した。また、実施例4では比較例2との相対的な各回収酵素活性の差が、実施例3に対して大きくなっていることが判明した。

[0102] <実施例5：リグニンブロッキング剤を含む水溶液での糖化残さの洗浄時の温度の影響>

リグニンブロッキング剤を含む水溶液を用いて糖化残さを洗浄する場合において、洗浄時の温度による糖化残さの洗浄への影響を検討した。40℃、50℃、60℃の各温度に設定した湯浴に対し、糖化残さ1に洗浄された溶液を添加したものを浸し、30分放置した。その後、実施例3と同様の操作で回収酵素を得て、各酵素活性を測定した。

[0103] [表5]

(表5) アビセル分解活性

	BSA	CSL
室温(実施例3)	2.4	4.3
40℃	4.4	6.3
50℃	5.2	6.8
60℃	4.9	6.5

[0104]

[表6]

(表6) キシラン分解活性

	B S A	C S L
室温 (実施例3)	1. 2	2. 6
4 0 °C	1. 4	2. 9
5 0 °C	1. 6	3. 2
6 0 °C	1. 2	2. 1

[0105] 表5および表6に示すように、40～60℃の温度範囲で糖化残さ1を洗浄して回収された洗浄された溶液の酵素活性が室温に比べて増大することが判明した。

[0106] <実施例6：リグニンブロッキング剤と硫酸アンモニウムを含む水溶液による糖化残さの洗浄>

リグニンブロッキング剤を含む水溶液による糖化残さの洗浄において、さらに、無機塩として硫酸アンモニウムを添加する場合の洗浄効果を検討した。リグニンブロッキング剤として、BSA（牛血清由来アルブミン、シグマアルドリッチ社製）、CSL（コーンステープリカー、王子コーンスターチ株式会社製）を使用した。前記リグニンブロッキング剤を滅菌水に最終濃度5g/Lとなるように添加し、本実施例ではさらに硫酸アンモニウムを1g/L、5g/L、10g/Lとなるように添加して、洗浄された溶液を調製した。これら洗浄された溶液を「糖化残さ1」に対し、6g（6mL）添加して混合した。混合後、30分、室温で放置した後、遠心分離（3000G、10分）して固液分離し、糖化残さ1の洗浄された溶液6gを各遠心上清として回収した。回収した上清成分は、実施例3と同じ手順で各酵素活性を測定した。結果を表7および表8に示す。

[0107] [表7]

(表7) アビセル分解活性

	B S A	C S L
0 g / L (実施例3)	2. 4	4. 3
1 g / L	2. 6	5. 4
5 g / L	3. 2	5. 8
1 0 g / L	4. 2	5. 6

[0108] [表8]

(表8) キシラン分解活性

	BSA	CSL
0 g/L (実施例3)	1. 2	2. 6
1 g/L	2. 3	3. 6
5 g/L	6. 7	8. 9
10 g/L	12. 2	19

[0109] 表7および表8から明らかなように、硫酸アンモニウムをさらに洗浄された溶液に添加することによって、酵素活性が増大することが判明した。特にこの効果は、キシラン分解活性に対して大きいことが判明した。

[0110] <実施例7：乳酸の生産>

実施例2の糖液1および糖液2を発酵原料として使用して、ラクトコッカス・ラクティスJCM7638株を24時間、37℃の温度で静置培養した。培養液に含まれるL-乳酸濃度を以下の条件で分析した。結果を表9に示す。

カラム：Shim-Pack SPR-H (株式会社島津製作所製)

移動相：5 mM p-トルエンスルホン酸 (流速0.8 mL/min)

反応液：5 mM p-トルエンスルホン酸、20 mM ビストリス、0.1 mM EDTA・2Na (流速0.8 mL/min)

検出方法：電気伝導度

温度：45℃

[0111] [表9]

(表9)

	糖液1	糖液2
L-乳酸濃度 (g/L)	10	16

[0112] 表9に示す通り、糖液1および糖液2を発酵原料として使用することで、L-乳酸を生産することが可能であることが確認された。

符号の説明

[0113] 10 糖液製造装置

- 1 1 加水分解反応槽
- 1 2 固液分離装置
- 1 3 洗浄水槽
- 1 4 ろ液回収タンク
- 1 5 限外ろ過膜装置
- 2 1 攪拌タンク
- 2 2 セルロース含有バイオマス
- 2 3 攪拌装置
- 2 4、3 6 保温設備
- 2 5、3 1 供給口
- 2 6 糸状菌由来セルラーゼ
- 2 8 加水分解物
- 3 2 プレスろ過装置
- 3 3 コンプレッサー
- 3 4 リグニンブロッキング剤を含む水溶液
- 3 5 通水口
- 4 1 混合溶液
- 4 2 糖液（透過液）
- 4 3 非透過液
- L 1 1 糖化酵素回収ライン

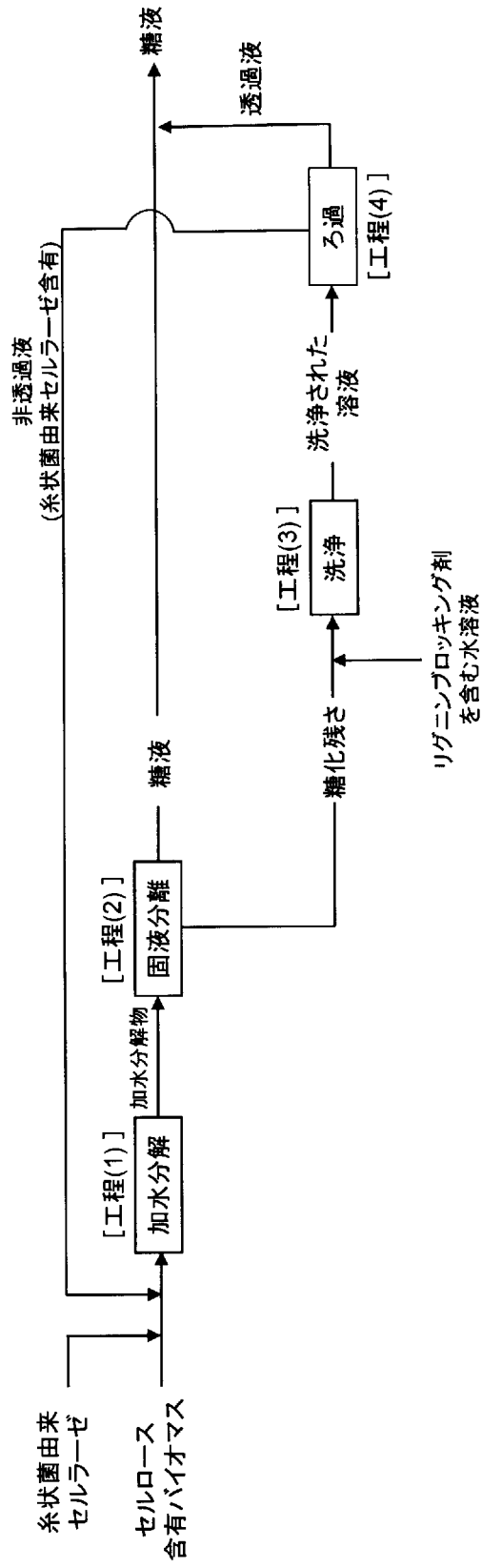
請求の範囲

- [請求項1] セルロース含有バイオマスから糖液を製造する方法であって、
工程（１）：前記セルロース含有バイオマスを糸状菌由来セルラーゼにより加水分解して、加水分解物を得る工程、
工程（２）：前記加水分解物を、糖液と糖化残さとに固液分離する工程、
工程（３）：前記糖化残さをリグニンブロッキング剤を含む水溶液で洗浄して、前記糖化残さに含まれる前記糸状菌由来セルラーゼを含む洗浄された溶液を得る工程、および
工程（４）：前記洗浄された溶液を含む溶液をろ過し、糸状菌由来セルラーゼを含む非透過液を回収する工程、
を含む、糖液の製造方法。
- [請求項2] 前記リグニンブロッキング剤が、コーンステープリカー、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、カゼイン、スキムミルク、牛血清由来アルブミン、エタノール発酵蒸留残さ、ゼイン、魚加工廃棄物、肉加工廃棄物、ホエータンパク質、穀物加工廃棄物、糖加工廃棄物、食物、藻類タンパク質、大豆タンパク質、細菌タンパク質、および菌タンパク質からなる群から選択される１以上である、請求項１に記載の糖液の製造方法。
- [請求項3] 工程（４）において、前記洗浄された溶液のろ過が、限外ろ過膜である、請求項１または２に記載の糖液の製造方法。
- [請求項4] 工程（２）において得られた糖液と、工程（３）において得られた前記洗浄された溶液とを混合する工程を含み、
工程（４）において、前記糖液および前記洗浄された溶液とを含む混合溶液をろ過して、前記糖液を含む透過液を回収する、請求項１～３のいずれか一項に記載の糖液の製造方法。
- [請求項5] 工程（３）において、前記リグニンブロッキング剤を含む水溶液の温度が、４０～６０℃である、請求項１～４のいずれか一項に記載の

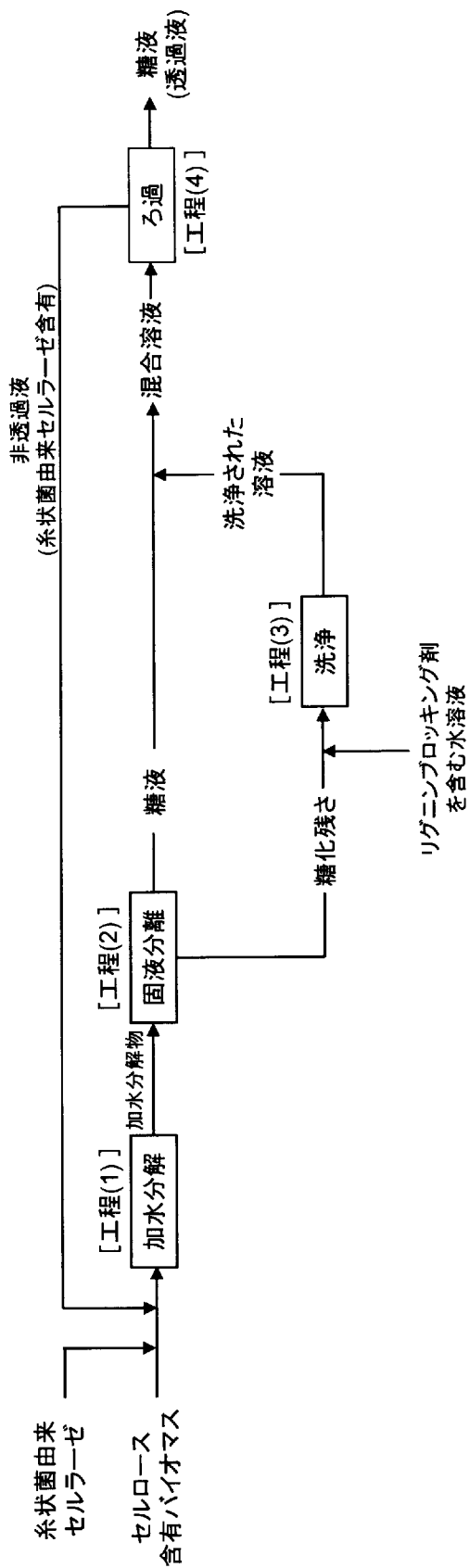
糖液の製造方法。

- [請求項6] 前記リグニンブロッキング剤を含む水溶液が、無機塩を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の糖液の製造方法。
- [請求項7] 前記糸状菌由来セルラーゼが、トリコデルマ属微生物由来である、請求項1～6のいずれか一項に記載の糖液の製造方法。
- [請求項8] 前記非透過液が、工程（1）の前記糸状菌由来セルラーゼに混合される、請求項1～7のいずれか一項に記載の糖液の製造方法。
- [請求項9] 工程（2）において、前記加水分解物の固液分離がプレスろ過により行われる、請求項1～8のいずれか一項に記載の糖液の製造方法。
- [請求項10] 請求項1～9のいずれか一項に記載の糖液の製造方法により糖液を製造する工程と、
前記糖液を発酵原料として化学品を生産する能力を有する微生物を培養する工程と、
を含む、化学品の製造方法。

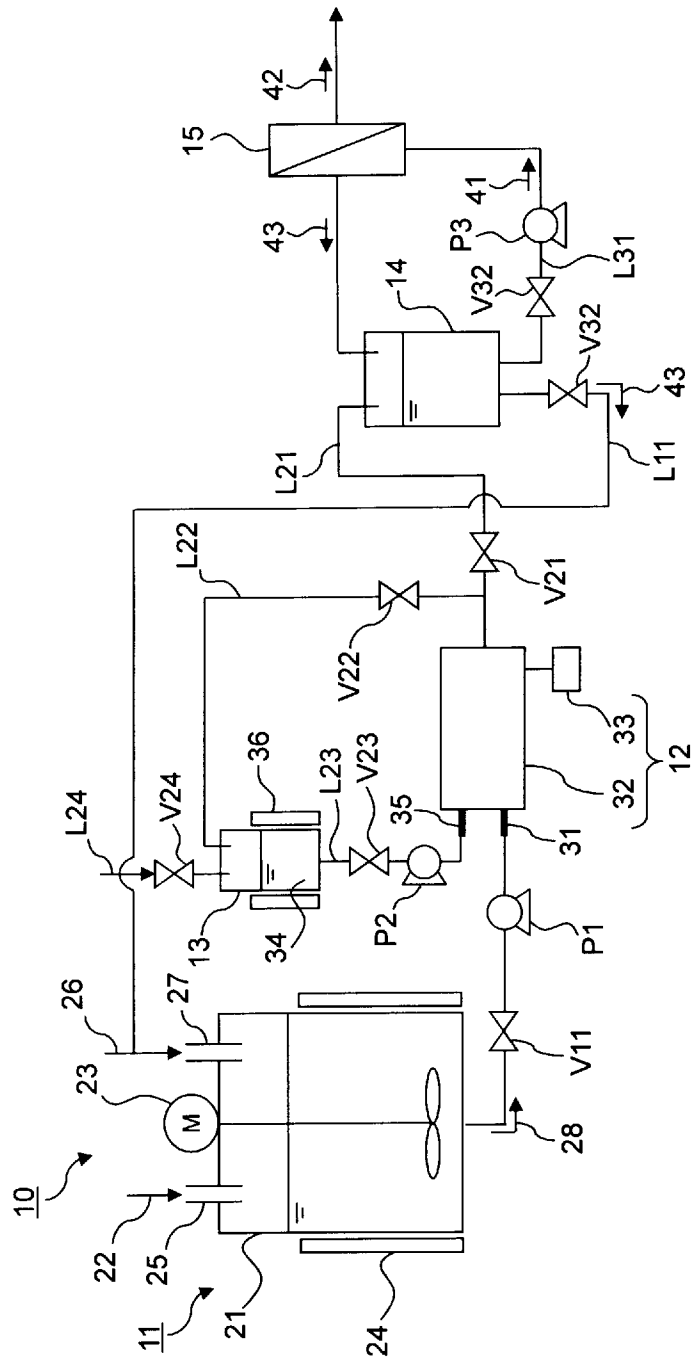
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/066534

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P19/14(2006.01)i, C12P19/00(2006.01)i, C13K1/02(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)
C12P19/14, C12P19/00, C13K1/02

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), JSTPLUS (JDreamIII), JST7580 (JDreamIII), JSTChina (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 59-173079 A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), 29 September 1984 (29.09.1984), entire text & US 4713334 A1	1-5, 7, 8, 10 1-10
Y	JP 61-162180 A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), 22 July 1986 (22.07.1986), entire text & US 4746611 A1	1-10
Y	WO 2012/118171 A1 (Toray Industries, Inc.), 07 September 2012 (07.09.2012), entire text & US 2013/0344543 A1 & EP 2682472 A1 & JP 5246379 B	1-10

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

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

Date of the actual completion of the international search 09 September, 2014 (09.09.14)	Date of mailing of the international search report 16 September, 2014 (16.09.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/066534

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/115039 A1 (Toray Industries, Inc.), 22 September 2011 (22.09.2011), paragraphs [0036], [0037], [0049] & US 2013/0059345 A1 & EP 2548965 A1	6, 9
Y	WO 2012/133495 A1 (Toray Industries, Inc.), 04 October 2012 (04.10.2012), claims; paragraphs [0008], [0048] & US 2014/0017736 A1	6, 9
P, Y	WO 2014/007189 A1 (Toray Industries, Inc.), 09 January 2014 (09.01.2014), entire text (Family: none)	1-10
P, Y	WO 2013/172446 A1 (Toray Industries, Inc.), 21 November 2013 (21.11.2013), entire text (Family: none)	1-10
P, Y	JP 2014-064563 A (Toray Industries, Inc.), 17 April 2014 (17.04.2014), entire text (Family: none)	1-10
P, Y	JP 2014-042511 A (Oji Holdings Corp.), 13 March 2014 (13.03.2014), entire text (Family: none)	1-10
E, Y	WO 2014/129489 A1 (Toray Industries, Inc.), 28 August 2014 (28.08.2014), entire text (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12P19/14(2006.01)i, C12P19/00(2006.01)i, C13K1/02(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. C12P19/14, C12P19/00, C13K1/02

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 1971-2014年
 日本国実用新案登録公報 1996-2014年
 日本国登録実用新案公報 1994-2014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）
 CAplus(STN), JSTPlus(JDreamIII), JST7580(JDreamIII), JSTChina(JDreamIII)

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	JP 59-173079 A（工業技術院長）1984.09.29, 全文 & US 4713334 A1	1-5, 7, 8, 10 1-10
Y	JP 61-162180 A（工業技術院長）1986.07.22, 全文 & US 4746611 A1	1-10
Y	WO 2012/118171 A1（東レ株式会社）2012.09.07, 全文 & US 2013/0344543 A1 & EP 2682472 A1 & JP 5246379 B	1-10

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 09.09.2014	国際調査報告の発送日 16.09.2014
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） 馬場 亮人 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B 4 0 4 3

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
Y	WO 2011/115039 A1 (東レ株式会社) 2011.09.22, [0036]、[0037]、[0049] & US 2013/0059345 A1 & EP 2548965 A1	6, 9
Y	WO 2012/133495 A1 (東レ株式会社) 2012.10.04, 請求の範囲、[0008]、[0048] & US 2014/0017736 A1	6, 9
P, Y	WO 2014/007189 A1 (東レ株式会社) 2014.01.09, 全文 (ファミリーなし)	1-10
P, Y	WO 2013/172446 A1 (東レ株式会社) 2013.11.21, 全文 (ファミリーなし)	1-10
P, Y	JP 2014-064563 A (東レ株式会社) 2014.04.17, 全文 (ファミリーなし)	1-10
P, Y	JP 2014-042511 A (王子ホールディングス株式会社) 2014.03.13, 全文 (ファミリーなし)	1-10
E, Y	WO 2014/129489 A1 (東レ株式会社) 2014.08.28, 全文 (ファミリーなし)	1-10