

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-528400

(P2013-528400A)

(43) 公表日 平成25年7月11日 (2013.7.11)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/16 (2006.01) C 1 2 P 7/16 Z N A 4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁)

(21) 出願番号	特願2013-515550 (P2013-515550)	(71) 出願人	310011310 ビュータマックス・アドバンスド・バイオ フューエルズ・エルエルシー アメリカ合衆国デラウェア州19880. ウィルミントン. パウダーミルロード20 0. イクスペリメンタルステーション ビ ー268/アール226
(86) (22) 出願日	平成23年6月17日 (2011.6.17)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月30日 (2013.1.30)	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/040899	(72) 発明者	ブライアン・マイケル・ローシュ アメリカ合衆国デラウェア州19709. ミドルタウン. ベッツィーロールズドライ ブ103
(87) 国際公開番号	W02011/160030		
(87) 国際公開日	平成23年12月22日 (2011.12.22)		
(31) 優先権主張番号	13/160,766		
(32) 優先日	平成23年6月15日 (2011.6.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/440,034		
(32) 優先日	平成23年2月7日 (2011.2.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/379,546		
(32) 優先日	平成22年9月2日 (2010.9.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブタノールの生成における抽出発酵の前に非溶解固体を除去するための方法およびシステム

(57) 【要約】

原位置生成物抽出を用いてブタノールなどの発酵生成物アルコールを効率的に生成する方法およびシステムが提供される。所与の原料を液化して、原料を生成した後で、かつ、例えば遠心分離による発酵の前に、非溶解固体を分離することによって、効率性が得られる。非溶解固体の除去により、原位置生成抽出の際に存在する非溶解固体を有することに関連する問題が回避され、それによって、アルコール生成の効率性が高められる。

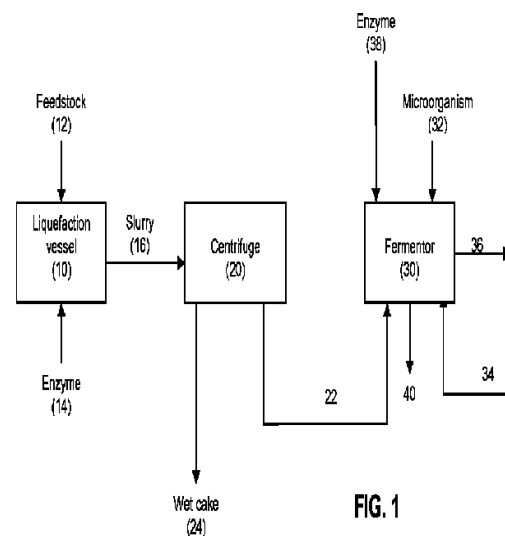


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発酵性炭素源、非溶解固体、および水を含むバイオマス原料スラリーを提供する工程と；

前記非溶解固体の少なくとも一部を前記スラリーから分離する工程であって、それによって、（i）発酵性炭素源を含む水溶液および（ii）固体を含むウェットケーキ副産物が生成される工程と；

発酵槽中の組み換え微生物を含む発酵プロセスに前記水溶液を加え、それによって、発酵生成物が生成される工程とを含む方法であって；

前記バイオマスの処理生産性が改良される方法。

10

【請求項 2】

前記改良されたバイオマスの処理生産性が、非溶解固体の存在下で生成される発酵生成物と比べて向上した発酵生成物および副産物回収性を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記改良されたバイオマスの処理生産性が、向上したプロセス流再利用性、向上した発酵装置体積効率、および向上したバイオマス原料負荷供給のうちの 1 つまたはそれ以上を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記発酵プロセスを抽出剤と接触させる工程をさらに含み、前記抽出剤が、非溶解固体を含む発酵プロセスと比べて向上した抽出効率を有する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

向上した抽出効率が、前記抽出剤の安定化した分配係数、前記発酵プロセスからの前記抽出剤の向上した相分離、向上した液液物質移動係数、向上した抽出剤の回収および再利用性、ならびに回収および再利用のために保存される抽出剤のうちの 1 つまたはそれ以上を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抽出剤が有機抽出剤である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抽出剤が、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルコール、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸のエステル、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルデヒド、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アミド、およびそれらの混合物からなる群から選択される 1 種またはそれ以上の不混和性有機抽出剤を含む、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記抽出剤が、トウモロコシ油に由来する $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記非溶解固体が、デカンターボウル遠心分離、トリカンター遠心分離、ディスクスタック遠心分離、ろ過遠心分離、デカンター遠心分離、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるいを用いたろ過、ふるい分け分離、格子、多孔質格子、浮遊法、ハイドロクロン、フィルタープレス、スクリュープレス、重力沈降器、ボルテックス分離器、またはそれらの組合せによって、原料スラリーから分離される、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

原料を液化して、バイオマス原料スラリーを生成する工程をさらに含み；前記原料が、トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、トウモロコシ、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、干し草、稲わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

50

前記原料がトウモロコシである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記原料が、分画されるかまたは分画されない、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記原料が、湿式粉碎または乾式粉碎される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

液化の際の反応温度を上昇させる工程をさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記原料スラリーが、前記原料に由来する油を含み、前記油が、前記スラリーから分離される、請求項 10 に記載の方法。

10

【請求項 16】

前記ウェットケーキが原料油を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記ウェットケーキが、前記ウェットケーキ中に存在するオリゴ糖を回収するために水で洗浄される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記回収されたオリゴ糖が、前記発酵槽に加えられる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ウェットケーキが、向上した副産物を得るためにさらに処理される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 20】

前記副産物が、動物飼料製品を形成するためにさらに処理される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記ウェットケーキが、前記ウェットケーキ中に存在する油を回収するために溶媒で洗浄される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記溶媒が、ヘキサン、ブタノール、イソブタノール、イソヘキサン、エタノール、および石油蒸留物から選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記発酵生成物が、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、およびそれらの異性体からなる群から選択される生成物アルコールである、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 24】

前記組み換え微生物が、改変されたブタノール生合成経路を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記発酵プロセスおよび生成物および場合により CO_2 を少なくとも部分的に蒸発させる工程をさらに含む、ここで、蒸気流が生成され、前記蒸気流から前記生成物を回収する、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 26】

前記蒸気流を吸収液相と接触させる工程をさらに含む、ここで、前記蒸気流の少なくとも一部が、前記吸収液相中に吸収され；

前記吸収液相中への前記蒸気流の吸収の開始の温度が、前記吸収液相がない場合の前記蒸気流の凝縮の開始の温度より高い、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記蒸発および接触工程が、真空条件下で行われる、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記非溶解固体の大部分を前記スラリーから分離する前記工程により、非溶解固体を含む発酵プロセスと比べて前記発酵プロセスのより高い蒸気圧が得られる、請求項 25 に記載の

50

方法。

【請求項 29】

前記より高い蒸気圧により、より効率的な蒸発生成物回収が得られる、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記より効率的な蒸発生成物回収が、より少ない資源投入、より少ない蒸発、吸収、圧縮、および冷蔵設備、向上した物質移動速度、蒸発のためのより少ないエネルギー、およびより低い吸収剤流量のうちの 1 つまたはそれ以上を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

ブタノールを生成するための方法であって：

10

原料を提供する工程と；

前記原料を液化して、オリゴ糖、油、および非溶解固体を含む原料スラリーを生成する工程と；

非溶解固体を前記原料スラリーから分離して、(i) オリゴ糖を含む水溶液、(ii) 非溶解固体を含むウェットケーキ、および (iii) 油相を生成する工程と；

前記水溶液を、発酵装置中の発酵プロセスと接触させる工程と；

前記発酵装置中の前記オリゴ糖を発酵させて、ブタノールを生成する工程と；

前記ブタノールが生成されるにつれて、前記発酵プロセスからの前記ブタノールの原位置除去を行う工程とを含み、

前記原料スラリーからの前記非溶解固体の除去により、前記ブタノール生成の効率が高められる方法。

20

【請求項 32】

前記原料がトウモロコシであり、前記油がトウモロコシ油である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記非溶解固体が、胚芽、繊維、およびグルテンを含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記原料を乾式粉碎する工程をさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記トウモロコシが分画されない、請求項 32 に記載の方法。

30

【請求項 36】

前記非溶解固体が、デカンターボウル遠心分離、トリカンター遠心分離、ディスクスタック遠心分離、ろ過遠心分離、デカンター遠心分離、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるいを用いたろ過、ふるい分け分離、格子、多孔質格子、浮遊法、ハイドロクロン、フィルタープレス、スクリュープレス、重力沈降器、ボルテックス分離器、またはそれらの組合せによって分離される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 37】

非溶解固体を前記原料スラリーから分離する前記工程が、前記原料スラリーを遠心分離する工程を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 38】

40

前記原料スラリーを遠心分離する工程が、前記原料を、前記水溶液を含む第 1 の液相と、前記ウェットケーキを含む固相と、前記油を含む第 2 の液相とに分離する、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記ウェットケーキが、前記ウェットケーキ中に存在するオリゴ糖を回収するために水で洗浄される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記原位置除去が液液抽出を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 41】

前記液液抽出のための抽出剤が有機抽出剤である、請求項 40 に記載の方法。

50

【請求項 4 2】

前記水溶液中の前記オリゴ糖の糖化が、前記発酵装置中の前記オリゴ糖の発酵と同時に
行われる、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

液化の際の反応温度を上昇させる工程をさらに含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記発酵装置中の前記オリゴ糖を発酵させる前に、前記オリゴ糖を糖化する工程をさら
に含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

非溶解固体を前記原料スラリーから除去する前記工程が、前記原料スラリーを遠心分離
する工程を含む、請求項 4 4 に記載の方法。

10

【請求項 4 6】

前記原料スラリーを遠心分離する工程が、前記糖を糖化する前に行われる、請求項 4 5
に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記発酵プロセスが、ブタノール生合成経路を含む組み換え微生物を含む、請求項 3 1 に
記載の方法。

【請求項 4 8】

前記ブタノールがイソブタノールである、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 9】

非溶解固体を前記原料スラリーから除去する前記工程が、前記発酵プロセスから前記抽出
剤への前記ブタノールの液液物質移動係数を高めることによって、前記ブタノール生成の
効率を高め；抽出剤により前記ブタノールの抽出効率を高めることによって、前記ブタノ
ール生成の効率を高め；前記発酵プロセスと抽出剤との間の相分離の速度を上げることによ
って、前記ブタノール生成の効率を高め；抽出剤の回収および再利用を増加させることによ
って、前記ブタノール生成の効率を高め；または抽出剤の流量を減少させることによっ
て、前記ブタノール生成の効率を高める、請求項 3 1 に記載の方法。

20

【請求項 5 0】

原料を液化して、原料スラリーを生成するように構成される液化槽であって：

前記原料を受け入れるための入口；および

30

糖および非溶解固体を含む原料スラリーを排出するための出口

を含む液化槽と；

前記非溶解固体を前記原料スラリーから除去して、（i）前記糖を含む水溶液および（
i i）前記非溶解固体の部分を含むウェットケーキを生成するように構成される遠心分離
機であって：

前記原料スラリーを受け入れるための入口；

前記水溶液を排出するための第 1 の出口；および

前記ウェットケーキを排出するための第 2 の出口

を含む遠心分離機と；

前記水溶液を発酵させて、ブタノールを生成するように構成される発酵装置であって：

40

前記水溶液を受け入れるための第 1 の入口；

抽出剤を受け入れるための第 2 の入口；

ブタノールに富んだ前記抽出剤を排出するための第 1 の出口；および

発酵プロセスを排出するための第 2 の出口

を含む発酵装置と

を含む、ブタノールを生成するためのシステム。

【請求項 5 1】

前記遠心分離機が、前記非溶解固体を前記原料スラリーから除去しながら、生成される
油を排出するための第 3 の出口をさらに含む、請求項 5 0 に記載のシステム。

【請求項 5 2】

50

前記原料スラリー中の前記糖を糖化するように構成される糖化槽であって：

前記原料スラリーを受け入れるための入口；および

前記原料スラリーを排出するための出口を含む糖化槽をさらに含む、請求項 5 0 に記載のシステム。

【請求項 5 3】

前記水溶液中の前記糖を糖化するように構成される糖化槽であって：

前記水溶液を受け入れるための入口；および

前記水溶液を排出するための出口を含む糖化槽をさらに含む、請求項 5 2 に記載のシステム。

【請求項 5 4】

10

前記原料を磨砕するように構成される乾式粉碎機であって：

前記原料を受け入れるための入口；および

磨砕された原料を排出するための出口を含む乾式粉碎機をさらに含む、請求項 5 0 に記載のシステム。

【請求項 5 5】

2 0 ～ 3 5 質量 % の粗タンパク質、

1 ～ 2 0 質量 % の粗脂肪、

0 ～ 5 質量 % のトリグリセリド、

4 ～ 1 0 質量 % の脂肪酸、および

2 ～ 6 質量 % の脂肪酸イソブチルエステル

20

を含む組成物。

【請求項 5 6】

2 5 ～ 3 1 質量 % の粗タンパク質、

6 ～ 1 0 質量 % の粗脂肪、

4 ～ 8 質量 % のトリグリセリド、

0 ～ 2 質量 % の脂肪酸、および

1 ～ 3 質量 % の脂肪酸イソブチルエステル

を含む組成物。

【請求項 5 7】

2 0 ～ 3 5 質量 % の粗タンパク質、

1 ～ 2 0 質量 % の粗脂肪、

0 ～ 5 質量 % のトリグリセリド、

4 ～ 1 0 質量 % の脂肪酸、および

2 ～ 6 質量 % の脂肪酸イソブチルエステル

30

を含む組成物。

【請求項 5 8】

2 6 ～ 3 4 質量 % の粗タンパク質、

1 5 ～ 2 5 質量 % の粗脂肪、

1 2 ～ 2 0 質量 % のトリグリセリド、

1 ～ 2 質量 % の脂肪酸、

2 ～ 4 質量 % の脂肪酸イソブチルエステル、

1 ～ 2 質量 % のリジン、

1 1 ～ 2 3 質量 % の N D F、および

5 ～ 1 1 質量 % の A D F

40

を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 1 0 年 6 月 1 8 日に提出された米国仮特許出願第 6 1 / 3 5 6 , 2 9 0 号；2 0 1 0 年 7 月 2 8 日に提出された米国仮特許出願第 6 1 / 3 6 8 , 4 5 1 号；2 0

50

10年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,436号、2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,444号；2010年7月28日に出願された米国仮特許出願第61/368,429号；2010年9月2日に出願された米国仮特許出願第61/379,546号；および2011年2月7日に出願された米国仮特許出願第61/440,034号；2011年6月15日に出願された米国特許出願第13/160,766号の利益を主張するものであり；これらの内容全体が全て、参照により本明細書に援用される。

【0002】

本出願に関連する配列表は、E F S - W e bを介して電子書式で提出され、全体が参照により本明細書に援用される。

【0003】

本発明は、ブタノールなどの発酵アルコールの生成において発酵装置原料流から非溶解固体を除去するための方法およびシステムに関する。

【背景技術】

【0004】

ブタノールは、燃料添加剤として、プラスチック産業における原料化学物質として、ならびに食品および香料産業における食品グレードの抽出剤としての使用を含む様々な用途を有する重要な産業用化学物質である。したがって、ブタノール、ならびに効率的でかつ環境に優しい生成方法に対する高い需要がある。

【0005】

微生物による発酵を用いたブタノールの生成は、1つのこのような環境に優しい生成方法である。高収率でブタノールを生成するいくつかの微生物は、低いブタノール毒性閾値も有するため、ブタノールは、生成されるにつれて発酵装置から除去される必要がある。原位置生成物除去（I S P R）を用いて、ブタノールが生成されるにつれて発酵装置からブタノールを除去し、それによって、微生物が高収率でブタノールを生成することが可能になり得る。当該技術分野で説明されているI S P Rのための1つの方法は、液液抽出（特許文献1）である。技術的および経済的に実行可能であるために、液液抽出は、効率的な物質移動のための抽出剤と発酵ブロスとの接触；発酵ブロスからの抽出剤の相分離（発酵中および発酵後）；および／または溶媒の効率的な回収および再利用および長期間の運転にわたる抽出剤の劣化および／または汚染が最小限であることを必要とする。

【0006】

発酵装置に入る水流が、原料からの非溶解固体を含有するとき、非溶解固体は、資本コストおよび運転コストを増加させることによって、液液抽出が技術的および経済的に実行可能であるための上述した要件の妨げとなる。特に、抽出発酵中の非溶解固体の存在は、発酵装置の内部の物質移動係数を低下させ、発酵装置中の相分離を妨げることがあり、抽出剤中の非溶解固体からの油（例えば、トウモロコシ油）の蓄積を生じ、時間の経過とともに抽出効率の低下を招くことがあり、可溶物含有乾燥穀類蒸留粕（D D G S）として最終的に除去される固体に溶媒が捕捉されるため、溶媒の損失を増加することがあり、発酵ブロスからの抽出剤液滴の離脱を遅くすることがあり、および／または発酵装置体積効率を低下させることがある。したがって、抽出発酵によるブタノールなどの生成物アルコールを生成するためのより効率的な方法およびシステムを開発することが引き続き必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許出願公開第2009/0305370号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、上記の必要性を満たし、発酵装置に供給される非溶解固体の量を減少させる

10

20

30

40

50

ことによって、ブタノールなどの生成物アルコールを生成するための方法およびシステムを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、ブタノールなどの発酵アルコールの生成において発酵装置原料流から非溶解固体を除去するための方法およびシステムに関する。

【0010】

本発明は、発酵性炭素源、非溶解固体、および水を含むバイオマス原料スラリーを提供する工程と；非溶解固体の少なくとも一部を前記スラリーから分離する工程であって、それによって、（i）発酵性炭素源を含む水溶液および（ii）固体を含むウェットケーキ副産物が生成される工程と；発酵槽中の組み換え微生物を含む発酵ブロスに水溶液を加え、それによって、発酵生成物が生成される工程とを含む方法であって；バイオマスの処理生産性が改良される方法に関する。ある実施形態において、改良されたバイオマスの処理生産性は、非溶解固体の存在下で生成される発酵生成物と比べて向上した発酵生成物および副産物回収性（recoverability）を含む。ある実施形態において、改良されたバイオマスの処理生産性は、向上したプロセス流再利用性、向上した発酵装置体積効率、および向上したバイオマス原料負荷供給のうちの1つ以上を含む。ある実施形態において、本方法は、発酵ブロスを抽出剤と接触させる工程をさらに含み、抽出剤は、非溶解固体を含む発酵ブロスと比べて向上した抽出効率を有する。ある実施形態において、向上した抽出効率は、抽出剤の安定化した分配係数、発酵ブロスからの抽出剤の向上した相分離、向上した液液物質移動係数、向上した抽出剤の回収および再利用性、ならびに回収および再利用のために保存される抽出剤のうちの1つ以上を含む。ある実施形態において、抽出剤は有機抽出剤である。ある実施形態において、抽出剤は、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルコール、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸のエステル、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルデヒド、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アミド、およびそれらの混合物からなる群から選択される1種以上の不混和性有機抽出剤を含む。ある実施形態において、抽出剤は、トウモロコシ油に由来する $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸を含む。ある実施形態において、非溶解固体は、デカンターボウル遠心分離、トリカンター（tricanter）遠心分離、ディスクスタック遠心分離、ろ過遠心分離、デカンター遠心分離、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるいを用いたろ過、ふるい分け分離、格子（grating）、多孔質格子、浮遊法（floatation）、ハイドロクロン、フィルタープレス、スクリーンプレス、重力沈降器、ボルテックス分離器（vortex separator）、またはそれらの組合せによって、原料スラリーから分離される。ある実施形態において、本方法は、原料を液化して、バイオマス原料スラリーを生成する工程をさらに含み；原料は、トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、トウモロコシ、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、干し草、稲わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物から選択される。ある実施形態において、原料はトウモロコシである。ある実施形態において、原料は、分画されるかまたは分画されない。ある実施形態において、原料は、湿式粉碎または乾式粉碎される。ある実施形態において、本方法は、液化の際の反応温度を上昇させる工程をさらに含み。ある実施形態において、原料スラリーは、上記の原料に由来する油を含み、前記油は、スラリーから分離される。ある実施形態において、ウェットケーキは原料油を含む。ある実施形態において、ウェットケーキは、ウェットケーキ中に存在するオリゴ糖を回収するために水で洗浄される。ある実施形態において、回収されたオリゴ糖は、発酵槽に加えられる。ある実施形態において、ウェットケーキは、向上した副産物を得るためにさらに処理される。ある実施形態において、副産物は、動物飼料製品を形成するためにさらに処理される。ある実施形態において、ウェットケーキは、ウェットケーキ中に存在する油を回収するために溶媒で洗浄される

10

20

30

40

50

。ある実施形態において、溶媒は、ヘキサン、ブタノール、イソブタノール、イソヘキサン、エタノール、および石油蒸留物から選択される。ある実施形態において、発酵生成物は、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、およびそれらの異性体からなる群から選択される生成物アルコールである。ある実施形態において、組み換え微生物は、改変された (engineered) ブタノール生合成経路を含む。ある実施形態において、本方法は、発酵プロセスおよび生成物および任意に CO_2 を少なくとも部分的に蒸発させる工程をさらに含み、ここで、蒸気流が生成され、蒸気流から生成物を回収する。ある実施形態において、本方法は、蒸気流を吸収液相と接触させる工程をさらに含み、ここで、蒸気流の少なくとも一部が、吸収液相中に吸収され；吸収液相中への蒸気流の吸収の開始の温度は、吸収液相がない場合の蒸気流の凝縮の開始の温度より高い。ある実施形態において、蒸発および接触工程は、真空条件下で行われる。ある実施形態において、非溶解固体の大部分を前記スラリーから分離する工程により、非溶解固体を含む発酵プロセスと比べて発酵プロセスのより高い蒸気圧が得られる。ある実施形態において、より高い蒸気圧により、より効率的な蒸発生成物回収が得られる。ある実施形態において、より効率的な蒸発生成物回収は、より少ない資本投資、より少ない蒸発、吸収、圧縮、および冷蔵設備、向上した物質移動速度、蒸発のためのより少ないエネルギー、およびより低い吸収剤流量のうちの1つ以上を含む。

【0011】

本発明は、ブタノールを生成するための方法にも関し、本方法は、原料を提供する工程と；原料を液化して、オリゴ糖、油、および非溶解固体を含む原料スラリーを生成する工程と；非溶解固体を原料スラリーから分離して、(i) オリゴ糖を含む水溶液、(ii) 非溶解固体を含むウェットケーキ、および (iii) 油相を生成する工程と；水溶液を、発酵装置中の発酵プロセスと接触させる工程と；発酵装置中のオリゴ糖を発酵させて、ブタノールを生成する工程と；ブタノールが生成されるにつれて、発酵プロセスからのブタノールの原位置除去を行う工程とを含み、原料スラリーからの非溶解固体の除去により、ブタノール生成の効率が高められる。ある実施形態において、原料はトウモロコシであり、油はトウモロコシ油である。ある実施形態において、非溶解固体は、胚芽、繊維、およびグルテンを含む。ある実施形態において、本方法は、原料を乾式粉碎する工程をさらに含む。ある実施形態において、トウモロコシは分画されない。ある実施形態において、非溶解固体は、デカンターボウル遠心分離、トリカンター遠心分離、ディスクスタック遠心分離、ろ過遠心分離、デカンター遠心分離、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるいを用いたろ過、ふるい分け分離、格子、多孔質格子、浮遊法、ハイドロクロン、フィルタープレス、スクリュープレス、重力沈降器、ボルテックス分離器、またはそれらの組合せによって分離される。ある実施形態において、非溶解固体を原料スラリーから分離する工程は、原料スラリーを遠心分離する工程を含む。ある実施形態において、原料スラリーを遠心分離する工程は、原料を、水溶液を含む第1の液相と、ウェットケーキを含む固相と、油を含む第2の液相とに分離する。ある実施形態において、ウェットケーキは、ウェットケーキ中に存在するオリゴ糖を回収するために水で洗浄される。ある実施形態において、原位置除去は液液抽出を含む。ある実施形態において、液液抽出のための抽出剤が有機抽出剤である。ある実施形態において、水溶液中のオリゴ糖の糖化が、発酵装置中のオリゴ糖の発酵と同時にされる。ある実施形態において、本方法は、液化の際の反応温度を上昇させる工程をさらに含む。ある実施形態において、本方法は、発酵装置中のオリゴ糖を発酵させる前に、オリゴ糖を糖化する工程をさらに含む。ある実施形態において、非溶解固体を原料スラリーから除去する工程は、原料スラリーを遠心分離する工程を含む。ある実施形態において、原料スラリーを遠心分離する工程は、糖を糖化する前に行われる。ある実施形態において、発酵プロセスは、ブタノール生合成経路を含む組み換え微生物を含む。ある実施形態において、ブタノールはイソブタノールである。ある実施形態において、非溶解固体を原料スラリーから除去する工程は、発酵プロセスから抽出剤へのブタノールの液液物質移動係数を高めることによって、ブタノール生成の効率を高め；抽出剤によりブタノールの抽出効率を高めることによって、ブタノール生成の効率を高め；発酵

ブロスと抽出剤との間の相分離の速度を上げることによって、ブタノール生成の効率を高め；抽出剤の回収および再利用を増加させることによって、ブタノール生成の効率を高め；または抽出剤の流量を減少させることによって、ブタノール生成の効率を高める。本発明は、原料を液化して、原料スラリーを生成するように構成される液化槽であって：原料を受け入れるための入口；および糖および非溶解固体を含む原料スラリーを排出するための出口を含む液化槽と；非溶解固体を原料スラリーから除去して、（i）糖を含む水溶液および（i i）非溶解固体の部分を含むウェットケーキを生成するように構成される遠心分離機であって：原料スラリーを受け入れるための入口；水溶液を排出するための第1の出口；およびウェットケーキを排出するための第2の出口を含む遠心分離機と；水溶液を発酵させて、ブタノールを生成するように構成される発酵装置であって：水溶液を受け入れるための第1の入口；抽出剤を受け入れるための第2の入口；ブタノールに富んだ抽出剤を排出するための第1の出口；および発酵ブロスを排出するための第2の出口を含む発酵装置とを含む、ブタノールを生成するためのシステムにも関する。ある実施形態において、遠心分離機は、非溶解固体を原料スラリーから除去しながら、生成される油を排出するための第3の出口をさらに含む。ある実施形態において、本装置は、原料スラリー中の糖を糖化するように構成される糖化槽であって：原料スラリーを受け入れるための入口；および原料スラリーを排出するための出口を含む糖化槽をさらに含む。ある実施形態において、本装置は、水溶液中の糖を糖化するように構成される糖化槽であって：水溶液を受け入れるための入口；および水溶液を排出するための出口を含む糖化槽をさらに含む。ある実施形態において、本装置は、原料を磨砕するように構成される乾式粉碎機であって：原料を受け入れるための入口；および磨砕された原料を排出するための出口を含む乾式粉碎機をさらに含む。

10

20

【0012】

本発明は、20～35重量%の粗タンパク質、1～20重量%の粗脂肪、0～5重量%のトリグリセリド、4～10重量%の脂肪酸、および2～6重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含む組成物にも関する。本発明は、25～31重量%の粗タンパク質、6～10重量%の粗脂肪、4～8重量%のトリグリセリド、0～2重量%の脂肪酸、および1～3重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含む組成物にも関する。本発明は、20～35重量%の粗タンパク質、1～20重量%の粗脂肪、0～5重量%のトリグリセリド、4～10重量%の脂肪酸、および2～6重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含む組成物にも関する。本発明は、26～34重量%の粗タンパク質、15～25重量%の粗脂肪、12～20重量%のトリグリセリド、1～2重量%の脂肪酸、2～4重量%の脂肪酸イソブチルエステル、1～2重量%のリジン、11～23重量%のNDF、および5～11重量%のADFを含む組成物にも関する。

30

【0013】

ある実施形態において、（a）前記バイオマスおよび水から発酵性炭素および非溶解固体を含む原料スラリーを提供する工程と；（b）非溶解固体の大部分を前記スラリーから分離し、それによって、（i）発酵性炭素を含む水溶液および（i i）固体を含むウェットケーキ副産物が生成される工程と；（c）発酵槽中の組み換え微生物を含む発酵ブロスに水溶液を加え、それによって、発酵生成物が生成される工程とを含む方法であって；バイオマスの処理生産性が改良される方法。ある実施形態において、改良されたバイオマスの処理生産性は、非溶解固体の存在下で生成される発酵生成物と比べて向上した発酵生成物および副産物回収性を含む。ある実施形態において、改良されたバイオマスの処理生産性は、向上したプロセス流再利用性、向上した発酵装置体積効率および向上したトウモロコシ負荷供給のうちの1つ以上を含む。ある実施形態において、向上したプロセス流再利用性は、発酵性組み換え微生物の再利用、水の再利用、およびエネルギー効率のうちの1つ以上を含む。

40

【0014】

ある実施形態において、本方法は、（d）（c）の発酵ブロスを抽出剤と接触させる工程も含み得、抽出剤は、非溶解固体を含む発酵ブロスと比べて向上した抽出効率を有する

50

。ある実施形態において、向上した抽出効率は、安定化した分配係数、向上した相分離、向上した物質移動係数、および向上したプロセス流再利用性のうちの1つ以上を含む。ある実施形態において、向上した抽出効率は、抽出剤の安定化した分配係数、発酵プロセスからの抽出剤の向上した相分離、向上した液液物質移動係数、ならびに向上した抽出剤の回収および再利用性のうちの1つ以上を含む。ある実施形態において、向上した抽出効率は、再利用のために保存される抽出剤を含む。

【0015】

ある実施形態において、水溶液は、約20 c p s未満の粘度を有する。ある実施形態において、水溶液は、約20 g/L未満のモノマーグルコースを含有する。

【0016】

ある実施形態において、向上した生成物回収性は、生成物に対する向上した組み換え微生物耐性を提供する。ある実施形態において、向上した耐性は、非溶解固体を含む阻害剤の除去または向上した液液物質移動係数のうちの1つ以上によって提供される。ある実施形態において、向上した抽出剤効率は、向上した組み換え微生物耐性を提供する。ある実施形態において、向上した組み換え微生物耐性は、阻害剤、副生成物、および代謝産物の抽出によって提供される。

【0017】

ある実施形態において、原料スラリーは、上記の原料に由来する油を含み、前記油は、工程(b)のスラリーから分離される。ある実施形態において、ウェットケーキは、ウェットケーキの乾燥固形分の約20%未満の量で原料油を含む。

【0018】

ある実施形態において、工程(b)で原料スラリーから分離される非溶解固体の大部分は、非溶解固体の少なくとも約75重量%である。ある実施形態において、工程(b)で原料スラリーから分離される非溶解固体の大部分は、非溶解固体の少なくとも約90重量%である。ある実施形態において、工程(b)で原料スラリーから分離される非溶解固体の大部分は、非溶解固体の少なくとも約95重量%である。ある実施形態において、工程(b)は、原料スラリーを遠心分離する工程を含む。ある実施形態において、原料スラリーを遠心分離する工程は、原料を、水溶液を含む第1の液相とウェットケーキを含む固相とに分離する。ある実施形態において、ウェットケーキは、ウェットケーキ中に存在する糖または糖源を回収するために水で洗浄される。ある実施形態において、水溶液を含む液相は、2回以上遠心分離される。

【0019】

ある実施形態において、抽出剤は有機抽出剤である。ある実施形態において、抽出剤は、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルコール、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸のエステル、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルデヒド、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アミド、およびそれらの混合物からなる群から選択される1種以上の不混和性有機抽出剤を含む。

【0020】

ある実施形態において、発酵性組み換え微生物は、細菌または酵母細胞である。

【0021】

ある実施形態において、生成物は、ブタノールおよびその異性体からなる群から選択される生成物アルコールである。

【0022】

ある実施形態において、本方法は、(d)発酵プロセスおよび(c)の生成物および任意に CO_2 を少なくとも部分的に蒸発させる工程も含み、ここで、蒸気流が生成され、蒸気流から生成物を回収する。ある実施形態において、本方法は、蒸気流を吸収液相と接触させる工程も含み、ここで、蒸気流の少なくとも一部が、吸収液相中に吸収され、吸収液相中への蒸気流の吸収の開始の温度は、吸収液相がない場合の蒸気流の凝縮の開始の温度より高い。ある実施形態において、蒸発および接触工程は、真空条件下で行われる。ある実施形態において、非溶解固体の大部分を前記スラリーから分離する工程により、非溶解固体を含む発酵プロセスと比べて発酵プロセスのより高い蒸気圧が得られる。ある実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、より高い蒸気圧により、より効率的な蒸発生成物回収が得られる。ある実施形態において、より効率的な蒸発生成物回収は、より少ない資本投資、より少ない蒸発、吸収、圧縮、および冷蔵設備、向上した物質移動速度、蒸発のためのより少ないエネルギー、およびより低い吸収剤流量のうちの1つ以上を含む。

【0023】

ある実施形態において、非溶解固体の大部分を分離する工程は、非溶解固体に対するでんぶんの損失が最小限に抑えられるように行われる。ある実施形態において、でんぶんの損失は、温度制御、酵素濃度、pH、磨砕トウモロコシの粒度、および液化の際の反応時間；遠心分離運転条件；およびウェットケーキ洗浄条件を含む1つ以上の最適化作業を行うことによって最小限に抑えられる。

10

【0024】

ある実施形態において、ウェットケーキは、向上した副産物を得るためにさらに処理される。ある実施形態において、副産物は、DDGSにさらに処理される。ある実施形態において、DDGSは、非溶解固体の存在下で生成されるDDGSと比べて少ない原料油を含む向上した生成物プロファイルを有する。ある実施形態において、DDGSは、DDGSが、発酵ブロス、組み換え微生物、発酵生成物、および抽出剤との最小限の汚染接触で生成されるように向上した生成物プロファイルを有する。ある実施形態において、上記の方法によって生成されるDDGSは、有機動物飼料のための食品表示要件を満たす。

【0025】

ある実施形態において、発酵ブロスは、発酵生成物部分およびトウモロコシ油部分を、重量基準で少なくとも約4：1の比率で含み、前記ブロスは、非溶解固体を実質的に含まない。ある実施形態において、トウモロコシ油部分は、少なくとも約15重量%の遊離脂肪酸を含有する。ある実施形態において、発酵ブロスは、約15重量%以下の非溶解固体を含有する。ある実施形態において、発酵ブロスは、約10重量%以下の非溶解固体を含有する。ある実施形態において、発酵ブロスは、約5重量%以下の非溶解固体を含有する。

20

【0026】

ある実施形態において、遠心分離生成物プロファイルは、非溶解固体の層と、トウモロコシ油層と、発酵性糖を含む上清層とを含み、非溶解固体層中の非溶解固体に対する上清層中の発酵性糖の重量基準による比率は、約2：1～約5：1の範囲であり；トウモロコシ油層中のトウモロコシ油に対する上清層中の発酵性糖の重量基準による比率は、約10：1～約50：1の範囲であり；トウモロコシ油層中のトウモロコシ油に対する非溶解固体層中の非溶解固体の重量基準による比率は、約2：1～約25：1の範囲である。

30

【0027】

ある実施形態において、ブタノールを生成するための方法は、(a) トウモロコシ原料を提供する工程と；(b) トウモロコシ原料を液化して、糖、トウモロコシ油、および非溶解固体を含む原料スラリーを生成する工程と；(c) 非溶解固体を原料スラリーから除去して、(i) 糖を含む水溶液、(ii) 非溶解固体を含むウェットケーキ、および(iii) フリートウモロコシ油(free corn oil)相を生成する工程と；(d) 水溶液を、発酵装置中のブロスと接触させる工程と；(e) 発酵装置中の糖を発酵させて、ブタノールを生成する工程と；(f) ブタノールが生成されるにつれて、ブロスからのブタノールの原位置除去を行う工程とを含み、原料スラリーからの非溶解固体の除去により、ブタノール生成の効率が高められる。ある実施形態において、非溶解固体は、胚芽、繊維、およびグルテンを含む。ある実施形態において、本方法は、トウモロコシ原料を乾式粉碎する工程も含む。ある実施形態において、トウモロコシは分画されない。

40

【0028】

ある実施形態において、工程(c)は、原料スラリーを遠心分離する工程を含む。ある実施形態において、原料スラリーを遠心分離する工程は、原料スラリーを、水溶液を含む第1の液相と、ウェットケーキを含む固相と、フリートウモロコシ油を含む第2の液相とに分離する。ある実施形態において、ウェットケーキは、ウェットケーキ中に存在する糖

50

を回収するために水で洗浄される。ある実施形態において、水溶液を含む液相は、2回以上遠心分離される。ある実施形態において、非溶解固体の少なくとも約75重量%が、工程(c)で原料スラリーから除去される。ある実施形態において、非溶解固体の少なくとも約90重量%が、工程(c)で原料スラリーから除去される。ある実施形態において、非溶解固体の少なくとも約95重量%が、工程(c)で原料スラリーから除去される。

【0029】

ある実施形態において、原位置除去は液液抽出を含む。ある実施形態において、液液抽出のための抽出剤が有機抽出剤である。ある実施形態において、有機抽出剤はオレイルアルコールを含む。

【0030】

ある実施形態において、ブ罗斯は微生物を含む。ある実施形態において、微生物は、細菌または酵母細胞である。

【0031】

ある実施形態において、ブ罗斯の一部が、発酵装置を出て、本方法は、ブ罗斯の一部に存在する酵母をブ罗斯から分離する工程と、分離された酵母を発酵装置に戻す工程とをさらに含む。ある実施形態において、ブ罗斯の一部は、原料スラリー中に存在する約25重量%以下の非溶解固体を含む。ある実施形態において、ブ罗斯の一部は、原料スラリー中に存在する約10重量%以下の非溶解固体を含む。ある実施形態において、ブ罗斯の一部は、原料スラリー中に存在する約5重量%以下の非溶解固体を含む。

【0032】

ある実施形態において、水溶液中の糖の糖化は、発酵装置中の糖の発酵と同時に行われる。ある実施形態において、本方法は、発酵装置中の糖の発酵の前に、糖を糖化する工程も含む。ある実施形態において、工程(c)は、原料スラリーを遠心分離する工程を含む。ある実施形態において、原料スラリーを遠心分離する工程は、糖を糖化する前に行われる。ある実施形態において、原料スラリーを遠心分離する工程は、糖を糖化する工程の後に行われる。

【0033】

ある実施形態において、ブタノールはイソブタノールである。ある実施形態において、工程(c)は、ブ罗斯から抽出剤へのブタノールの液液物質移動係数を高めることによって、ブタノール生成の効率を高める。ある実施形態において、工程(c)は、抽出剤によりブタノールの抽出効率を高めることによって、ブタノール生成の効率を高める。ある実施形態において、工程(c)は、ブ罗斯と抽出剤との間の相分離の速度を上げることによって、ブタノール生成の効率を高める。ある実施形態において、工程(c)は、抽出剤の回収および再利用を増加させることによって、ブタノール生成の効率を高める。ある実施形態において、工程(c)は、抽出剤の流量を減少させることによって、ブタノール生成の効率を高める。

【0034】

ある実施形態において、工程(c)は、抽出剤の安定化した分配係数、向上した発酵装置体積頻度(v o l u m e f r e q u e n c y)、向上したトウモロコシ負荷供給、向上した発酵性組み換え微生物再利用、向上した水の再利用、向上したエネルギー効率、ブタノールに対する向上した組み換え微生物耐性、より低い水相力価(a q u e o u s p h a s e t i t e r)、およびDDGSの向上した値のうちの1つ以上を含む。

【0035】

ある実施形態において、ブタノールを生成するためのシステムは、(a)原料を液化して、原料スラリーを生成するように構成される液化槽であって、原料を受け入れるための入口、糖および非溶解固体を含む原料スラリーを排出するための出口を含む液化槽と；(b)非溶解固体を原料スラリーから除去して、(i)糖を含む水溶液および(ii)非溶解固体の部分を含むウェットケーキを生成するように構成される遠心分離機であって、原料スラリーを受け入れるための入口、水溶液を排出するための第1の出口、およびウェットケーキを排出するための第2の出口を含む遠心分離機と；(c)発酵装置中の水溶液を

発酵させて、ブタノールを生成するための発酵装置であって、水溶液を受け入れるための第1の入口、抽出剤を受け入れるための第2の入口、およびブタノールに富んだ抽出剤を排出するための第1の出口および発酵プロセスを排出するための第2の出口を含む発酵装置とを含む。ある実施形態において、遠心分離機は、非溶解固体を原料スラリーから除去しながら、生成される油を排出するための第3の出口をさらに含む。ある実施形態において、本システムは、原料スラリー中の糖を糖化するように構成される糖化槽であって、原料スラリーを受け入れるための入口および原料スラリーを排出するための出口を含む糖化槽も含む。ある実施形態において、本システムは、水溶液中の糖を糖化するように構成される糖化槽であって、水溶液を受け入れるための入口および水溶液を排出するための出口を含む糖化槽も含む。ある実施形態において、本システムは、原料を磨砕するように構成される乾式粉碎機であって、原料を受け入れるための入口および磨砕された原料を排出するための出口を含む乾式粉碎機も含む。

10

【0036】

ある実施形態において、非溶解固体を含む、遠心分離機においてトウモロコシマッシュスラリーから形成されるウェットケーキは、トウモロコシマッシュスラリー中に存在する少なくとも約75重量%の非溶解固体を含む。ある実施形態において、ウェットケーキは、トウモロコシマッシュスラリー中に存在する少なくとも約90重量%の非溶解固体を含む。ある実施形態において、ウェットケーキは、トウモロコシマッシュスラリー中に存在する少なくとも約95重量%の非溶解固体を含む。

【0037】

ある実施形態において、非溶解固体を含む、遠心分離機においてトウモロコシマッシュスラリーから形成される水溶液は、トウモロコシマッシュスラリー中に存在する約25重量%以下の非溶解固体を含む。ある実施形態において、水溶液は、トウモロコシマッシュスラリー中に存在する約10重量%以下の非溶解固体を含む。ある実施形態において、水溶液は、トウモロコシマッシュスラリー中に存在する約5重量%以下の非溶解固体を含む。

20

【0038】

本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を成す添付の図面は、本発明を例示し、さらに、本明細書とともに、本発明の原理を説明し、関連技術分野の当業者が本発明を行い、使用できるようにする働きを果たす。

30

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】液化の後かつ発酵の前に、非溶解固体が遠心分離機において除去される、本発明の例示的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図2】原料が粉碎される、本発明の例示的な代替的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図3】遠心分離機が油流を排出する、本発明の別の例示的な代替的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図4】糖化槽が、遠心分離機と発酵装置との間に配置される、本発明の別の例示的な代替的な方法およびシステムを概略的に示す。

40

【図5】糖化槽が、液化槽と遠心分離機との間に配置される、本発明の別の例示的な代替的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図6】非溶解固体を除去するために、2つの遠心分離機が連続して用いられる、本発明の別の例示的な代替的な方法およびシステムを概略的に示す。

【図7】液化されたトウモロコシでんぷん（すなわち、オリゴ糖）の水溶液から、2.03 mmの内径を有するノズルを用いてオレイルアルコールを分配するときに気泡塔を通過して上方に流れるオレイルアルコール液滴の分散体への $i-BuOH$ の移動についての全体積物質移動係数、 $k_L a$ に対する非溶解トウモロコシマッシュ固体の存在の影響を示す。

【図8】液化されたトウモロコシでんぷん（すなわち、オリゴ糖）の水溶液から、0.76 mmの内径を有するノズルを用いてオレイルアルコールを分配するときに気泡塔を通過

50

て上方に流れるオレイルアルコール液滴の分散体への $i-BuOH$ の移動についての全体積物質移動係数、 $k_L a$ に対する非溶解トウモロコシマッシュ固体の存在の影響を示す。

【図 9】（重力）沈降時間に応じた、発酵試料管における液液界面の位置を示す。実行時間：5.3 時間、29.3 時間、53.3 時間、および 70.3 時間の実行時間について示される相分離データ。固体がマッシュ原料から除去され、OA が溶媒であった場合の抽出－発酵からの試料データ（2010Y035）。

【図 10】（重力）沈降時間に応じた、最終的な発酵プロセスの液液界面の位置を示す。固体がマッシュ原料から除去され、OA が溶媒であった場合の抽出－発酵からのデータ（2010Y035）。

【図 11】バッチ 1 およびバッチ 2 についての、時間に応じたスラリーの水相中のグルコースの濃度を示す。

【図 12】バッチ 3 およびバッチ 4 についての、時間に応じたスラリーの水相中のグルコースの濃度を示す。

【図 13】でんぶんの転化に対する、酵素充填および＋／－高温段階が液化中のある時点で適用されたか否かの影響を示す。

【発明を実施するための形態】

【0040】

特に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾が生じた場合、定義を含めて本出願が優先するものとする。また、文脈上異なる解釈を要する場合を除き、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。本明細書に記載される全ての刊行物、特許、および他の参照文献は、あらゆる目的のために、全体が参照により本明細書に援用される。

【0041】

本発明をさらに定義するために、以下の用語および定義が、本明細書において提供される。

【0042】

本明細書において使用される際の「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (has)」、「有する (having)」、「含有する (contains)」、または「含有する (containing)」という用語、またはそれらの任意の他の活用形は、記載される整数または整数の群を包含するが、任意の他の整数または整数の群を除外しないことを意味することが理解されよう。例えば、要素の列挙を含む組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置は、必ずしもそれらの要素のみに限定されるわけではなく、明示的に列挙されていないかあるいはこのような組成物、混合物、プロセス、方法、物品、または装置に固有の他の要素を含み得る。さらに、相反する明示的な記載がない限り、「または」は、排他的な「または」ではなく包括的な「または」を指す。例えば、条件 A または B は、以下のうちの 1 つによって満たされる：A が真であり（または存在する）かつ B が偽である（または存在しない）、A が偽であり（または存在しない）かつ B が真である（または存在する）、A および B の両方とも真である（または存在する）。

【0043】

また、本発明の要素または構成要素の前にある不定冠詞「a」および「an」は、事例の数、すなわち、要素または構成要素の出現の数に関して限定されないことが意図される。したがって、「a」または「an」は、1 つまたは少なくとも 1 つを含むものと読まれるべきであり、要素または構成要素の単数語形は、数値が単数であることを明白に意味しない限り、複数も含む。

【0044】

本明細書において使用される際の「発明」または「本発明」の用語は、非限定的な用語であり、特定の発明の任意の 1 つの実施形態を指すことは意図されず、本出願に記載され

10

20

30

40

50

る考えられる全ての実施形態を包含する。

【0045】

本明細書において使用される際の、用いられる本発明の成分または反応剤の量を修飾する「約」という用語は、例えば、現実の世界で濃縮物または溶液を作製するのに使用される典型的な測定および液体処理手順によって；これらの手順における不注意による誤りによって；組成物を作製するかまたは方法を行うのに用いられる成分の製造、供給源、または純度の差などによって起こり得る数量の変動を指す。「約」という用語は、特定の初期混合物から得られる組成物のための平衡条件が異なるために異なる量も包含する。「約」という用語によって修飾されているか否かにかかわらず、特許請求の範囲は、量に対する均等物を含む。一実施形態において、「約」という用語は、報告される数値の10%以内、あるいは報告される数値の5%以内を意味する。

10

【0046】

本明細書において使用される際の「バイオマス」は、トウモロコシ、サトウキビ、小麦、セルロース系またはリグノセルロース系材料ならびにセルロース、ヘミセルロース、リグニン、でんぷん、オリゴ糖、二糖類および／または単糖類、およびそれらの混合物を含む材料などの天然資源に由来する任意の糖類およびでんぷんを含む発酵性糖を提供する加水分解性多糖類を含有する天然産物を指す。バイオマスは、タンパク質および／または脂質などのさらなる成分も含み得る。バイオマスは、1つの供給源に由来してもよく、またはバイオマスは、2つ以上の供給源に由来する混合物を含み得る。例えば、バイオマスは、トウモロコシの穂軸とトウモロコシの茎葉との混合物、または草と葉との混合物を含み得る。バイオマスとしては、以下に限定はされないが、バイオエネルギー作物、農業残渣、都市固形廃棄物、産業固形廃棄物、製紙からの汚泥、庭ごみ、木くずおよび林業廃棄物が挙げられる。バイオマスの例としては、以下に限定はされないが、トウモロコシの穀粒、トウモロコシの穂軸、トウモロコシの皮、トウモロコシの茎葉などの作物残渣、草、小麦、ライ麦、小麦のわら、大麦、大麦のわら、牧草、稲わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビの絞りかす、ソルガム、サトウキビ、大豆、穀類の粉碎から得られる成分、樹木、枝、根、葉、木質チップ、おがくず、灌木および低木、野菜、果物、花、動物の糞尿、およびそれらの混合物が挙げられる。例えば、マッシュ、絞り汁、糖蜜、または加水分解物が、粉碎、処理、および／または液化などによる発酵のためのバイオマスを処理するための当該技術分野において公知の任意の処理によって、バイオマスから形成され得、発酵性糖を含み、水を含み得る。例えば、セルロース系および／またはリグノセルロース系バイオマスは、当業者に公知の任意の方法によって発酵性糖を含有する加水分解物を得るように処理され得る。低アンモニア前処理が、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2007/0031918A1号明細書に開示されている。セルロース系および／またはリグノセルロース系バイオマスの酵素的糖化は、通常、セルロースおよびヘミセルロースを分解して、グルコース、キシロース、およびアラビノースを含む糖類を含有する加水分解物を生成するために酵素群 (consortium) を利用する。(セルロース系および／またはリグノセルロース系バイオマスに適した糖化酵素は、Lynd, et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:506-577, 2002) に概説されている。

20

30

40

【0047】

本明細書において使用される際の可溶物含有乾燥穀類蒸留粕 (DDGS) は、原料またはバイオマスの発酵 (例えば、生成物アルコールを生成する穀類または穀類混合物の発酵) からの副産物または副生成物を指す。ある実施形態において、DDGSは、生成物アルコール (例えば、ブタノール、イソブタノールなど) を作製する方法から生成される動物飼料も指す。

【0048】

本明細書において使用される際の「発酵性炭素源」または「発酵性炭素基質」は、微生物によって代謝されることが可能な炭素源を意味する。好適な発酵性炭素源としては、以下に限定はされないが、グルコースまたはフルクトースなどの単糖類；ラクトースまたは

50

スクロースなどの二糖類；オリゴ糖；でんぷんまたはセルロースなどの多糖類；1つの炭素基質；およびそれらの混合物が挙げられる。

【0049】

本明細書において使用される際の「発酵性糖」は、発酵アルコールを生成するための、本明細書に開示される微生物によって代謝されることが可能な1種以上の糖類を指す。

【0050】

本明細書において使用される際の「原料」は、発酵プロセスにおける原料であって、非溶解固体を含むかまたは含まずに発酵性炭素源を含有し、該当する場合、発酵性炭素源がでんぷんから遊離されたかあるいは液化、糖化、または他のプロセスなどによるさらなる処理によって複合糖類を分解することから得られる前または後に発酵性炭素源を含有する原料を意味する。原料は、バイオマスを含むかまたはバイオマスに由来する。好適な原料としては、以下に限定はされないが、ライ麦、小麦、トウモロコシ、トウモロコシマッシュ、サトウキビ、サトウキビマッシュ、大麦、セルロース系材料、リグノセルロース系材料、またはそれらの混合物が挙げられる。「原料油」に言及される場合、この用語が、所与の原料から生成される油を包含することが理解されよう。

10

【0051】

本明細書において使用される際の「発酵プロセス」は、水と、糖類（発酵性炭素源）と、溶解固体と、任意にアルコールを生成する微生物と、生成物アルコールと、存在する微生物による、アルコール、水、および二酸化炭素（ CO_2 ）への糖類の反応によって生成物アルコールが作製される発酵槽中に保持される材料の全ての他の成分との混合物を意味する。場合により、本明細書において使用される際の「発酵培地」および「発酵された混合物」という用語は、「発酵プロセス」と同義に使用することができる。

20

【0052】

本明細書において使用される際の「発酵槽」は、発酵反応が行われ、それによって、ブタノールなどの生成物アルコールが糖類から作製される槽を意味する。「発酵装置」という用語は、「発酵槽」と同義に使用することができる。

【0053】

本明細書において使用される際の「糖化槽」は、糖化（すなわち、オリゴ糖の単糖類への分解）が行われる槽を意味する。発酵および糖化が同時に行われる場合、糖化槽および発酵槽は、同じ槽であってもよい。

30

【0054】

本明細書において使用される際の「糖化酵素」は、多糖類および／またはオリゴ糖、例えば、グリコーゲン、またはでんぷんの $\alpha-1$ ，4-グルコシド結合を加水分解することが可能な1種以上の酵素を意味する。糖化酵素は、セルロース系またはリグノセルロース系材料を加水分解することが可能な酵素も含み得る。

【0055】

本明細書において使用される際の「液化槽」は、液化が行われる槽を意味する。液化は、オリゴ糖が原料から遊離されるプロセスである。原料がトウモロコシである実施形態において、オリゴ糖は、液化中にトウモロコシでんぷん含有物から遊離される。

【0056】

本明細書において使用される際の「糖」は、オリゴ糖、二糖類、単糖類、および／またはそれらの混合物を指す。「糖」という用語は、でんぷん、デキストラン、グリコーゲン、セルロース、ペントサン、ならびに糖類を含む炭水化物も含む。

40

【0057】

本明細書において使用される際の「非溶解固体」は、液相に溶解されない原料の非発酵性部分、例えば、胚芽、繊維、およびグルテンを意味する。例えば、原料の非発酵性部分は、原料の固体として残る部分を含み、発酵プロセスから液体を吸収し得る。

【0058】

本明細書において使用される際の「抽出剤」は、任意のブタノール異性体を抽出するのに使用される有機溶媒を意味する。

50

【0059】

本明細書において使用される際の「原位置生成物除去（ISPR）」は、生成物が生成される際に、生物学的プロセスにおける生成物濃度を制御するために、発酵などの生物学的プロセスから特定の発酵生成物を選択的に除去することを意味する。

【0060】

本明細書において使用される際の「生成物アルコール」は、発酵性炭素基質の供給源としてバイオマスを用いる発酵プロセスにおいて微生物によって生成され得る任意のアルコールを指す。生成物アルコールとしては、以下に限定はされないが、 $C_1 \sim C_8$ のアルキルアルコールが挙げられる。ある実施形態において、生成物アルコールは $C_2 \sim C_8$ のアルキルアルコールである。他の実施形態において、生成物アルコールは $C_2 \sim C_5$ のアルキルアルコールである。 $C_1 \sim C_8$ のアルキルアルコールとしては、以下に限定はされないが、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、およびペンタノールが挙げられることが理解されよう。同様に、 $C_2 \sim C_8$ のアルキルアルコールとしては、以下に限定はされないが、エタノール、プロパノール、ブタノール、およびペンタノールが挙げられる。「アルコール」はまた、生成物アルコールに関連して本明細書において使用される。

10

【0061】

本明細書において使用される際の「ブタノール」は、特に、ブタノール異性体 1-ブタノール（1-BuOH）、2-ブタノール（2-BuOH）、第3級-ブタノール（tert-BuOH）、および／またはイソブタノール（i-BuOH、i-BuOH、または I-BuOH）を、個々にまたはそれらの混合物として指す。

20

【0062】

本明細書において使用される際の「プロパノール」は、プロパノール異性体イソプロパノールまたは 1-プロパノールを指す。

【0063】

本明細書において使用される際の「ペンタノール」は、ペンタノール異性体 1-ペンタノール、3-メチル-1-ブタノール、2-メチル-1-ブタノール、2, 2-ジメチル-1-プロパノール、3-ペンタノール、2-ペンタノール、3-メチル-2-ブタノール、または 2-メチル-2-ブタノールを指す。

【0064】

本明細書において使用される際の「水相力価」という用語は、発酵プロセス中の特定のアルコール（例えば、ブタノール）の濃度を指す。

30

【0065】

本明細書において使用される際の「有効力価」という用語は、発酵によって生成される特定のアルコール（例えば、ブタノール）または発酵培地のリットル当たりの、アルコールエステル化によって生成されるアルコールエステルのアルコール同等物の総量を指す。

【0066】

「水不混和性」または「不溶性」という用語は、1つの液相を形成するように、発酵プロセスなどの水溶液と混合することができない抽出剤または溶媒などの化学成分を指す。

【0067】

本明細書において使用される際の「水相」という用語は、発酵プロセスを水不混和性有機抽出剤と接触させることによって得られる二相混合物の水相を指す。発酵抽出を含む本明細書に記載されるプロセスの一実施形態において、「発酵プロセス」という用語は、この場合、二相性発酵抽出における水相を特に指す。

40

【0068】

本明細書において使用される際の「有機相」という用語は、発酵プロセスを水不混和性有機抽出剤と接触させることによって得られる二相混合物の非水相を指す。

【0069】

本発明は、バイオマスの処理生産性および費用対効果を高めつつ、発酵によって生成物アルコールなどの発酵生成物を生成するためのシステムおよび方法を提供する。ある実施

50

形態において、生成物アルコールはブタノールである。原料は、液化されて、原料スラリーを生成することができ、ここで、原料スラリーは、可溶性糖および非溶解固体を含む。原料スラリーが、発酵装置に直接供給される場合、非溶解固体は、発酵装置からの、ブタノールなどの生成物アルコールの効率的な除去および回収を妨げ得る。特に、液液抽出が、発酵プロセスからブタノールを抽出するのに用いられる場合、非溶解粒子の存在は、抽出剤と発酵プロセスとの接触を妨げることによって、抽出剤へのブタノールの物質移動速度を低下させること；発酵装置中でエマルジョンを生成し、それによって、抽出剤および発酵プロセスの良好な相分離を妨げること；抽出剤およびブタノールの少なくとも一部が、可溶物含有乾燥穀類蒸留粕（DDGS）として最終的に除去される固体に「捕捉される」ため、抽出剤を回収し、再利用する効率を低下させること；発酵装置中の体積を占める固体があるため、また、発酵プロセスからの抽出剤の離脱がより遅いため、発酵装置体積効率がより低いこと；およびトウモロコシ油による汚染によって抽出剤の寿命が短縮されることを含むがこれらに限定されないシステムの非効率を招き得る。これらの影響は全て、資本コストおよび運転コストを増加させる。さらに、DDGSに「捕捉される」抽出剤は、DDGS値および動物飼料として販売するための必要条件から外れ得る。したがって、これらの問題を回避し、および／または最小限に抑えるために、非溶解粒子（または固体）の少なくとも一部が、原料スラリー中に存在する糖を発酵装置に加える前に原料スラリーから除去される。ブタノール生成の抽出活性および効率が、非溶解粒子が除去されていない水溶液を含有する発酵プロセスにおいて行われる抽出と比べて、非溶解粒子が除去された水溶液を含有する発酵プロセスにおいて抽出が行われる場合に高められる。

10

20

【0070】

本発明のシステムおよび方法が、図面を参照して説明される。ある実施形態において、例えば、図1に示されるように、システムは、原料を液化して、原料スラリーを生成するように構成される液化槽10を含む。

【0071】

特に、原料12は、液化槽10の入口に導入され得る。原料12は、でんぷんなどの発酵性炭素源を含有する、ライ麦、小麦、サトウキビ、またはトウモロコシを含むがこれらに限定されない当業界で公知の任意の好適なバイオマス材料であり得る。

【0072】

原料12を液化するプロセスは、原料12中のでんぷんを加水分解して水溶性糖にすることを含み、従来のプロセスである。酸プロセス、酸-酵素プロセス、または酵素プロセスを含むがこれらに限定されない、当業界で通常用いられる、任意の公知の液化プロセス、ならびに対応する液化槽が使用され得る。このようなプロセスは、単独でまたは組み合わせて使用され得る。ある実施形態において、酵素プロセスを用いることができ、適切な酵素14、例えば、 α -アミラーゼが、液化槽10の入口に導入される。水も液化槽10に導入され得る。

30

【0073】

原料12を液化するプロセスは、原料またはバイオマスに由来する糖（例えば、発酵性炭素）および非溶解固体を含む原料スラリー16を生成する。非溶解固体は、原料12の非発酵性部分である。ある実施形態において、原料12は、乾式粉碎された、分画されていないトウモロコシの実などのトウモロコシであり得、非溶解粒子は、胚芽、繊維、およびグルテンを含み得る。原料スラリー16は、液化槽10の出口から排出され得る。ある実施形態において、原料12は、トウモロコシまたはトウモロコシの実であり、原料スラリー16は、トウモロコシマッシュスラリーである。

40

【0074】

非溶解固体を原料スラリー16から除去するように構成される遠心分離機20は、原料スラリー16を受け入れるための入口を有する。遠心分離機20は、原料スラリー16を攪拌し、または回転させて、液相または水溶液22および固相またはウェットケーキ24を生成する。

【0075】

50

水溶液 22 は、例えば、オリゴ糖の形態の糖、および水を含み得る。水溶液は、少なくとも約 10 重量%のオリゴ糖、少なくとも約 20 重量%のオリゴ糖、または少なくとも約 30 重量%のオリゴ糖を含み得る。水溶液 22 は、遠心分離機 20 の上部の近くに位置する出口から排出され得る。水溶液は、約 20 センチポアズ未満の粘度を有し得る。水溶液は、約 20 g/L 未満のモノマーグルコース、より好ましくは約 10 g/L 未満、または約 5 g/L 未満のモノマーグルコースを含み得る。モノマーグルコースの量を決定するための好適な方法は、当該技術分野において周知である。当該技術分野において公知のこのような好適な方法は、HPLC を含む。

【0076】

ウェットケーキ 24 は、非溶解固体を含み得る。ウェットケーキ 24 は、遠心分離機 20 の底部の近くに位置する出口から排出され得る。ウェットケーキ 24 は、糖および水の一部も含み得る。水溶液 22 が遠心分離機 20 から排出されてから、ウェットケーキ 24 は、遠心分離機 20 においてさらなる水で洗浄され得る。あるいは、ウェットケーキ 24 は、別個の遠心分離機においてさらなる水で洗浄され得る。ウェットケーキ 24 の洗浄により、ウェットケーキ中に存在する糖または糖源（例えば、オリゴ糖）を回収し、回収された糖および水は、液化槽 10 に再利用され得る。洗浄後、ウェットケーキ 24 は、任意の好適な公知の方法によって、乾燥されて、可溶物含有乾燥穀類蒸留粕（DDGS）が形成され得る。遠心分離機 20 において形成されるウェットケーキ 24 からの DDGS の形成にはいくつかの利点がある。非溶解固体が発酵装置に送られないため、抽出剤および／またはブタノールが DDGS に捕捉されず、DDGS が発酵装置の条件に供されず、DDGS が、発酵装置中に存在する微生物と接触しない。全てのこれらの影響が、例えば動物飼料としての DDGS の後の処理および販売に利点を与える。

【0077】

遠心分離機 20 は、例えば、デカンターボウル遠心分離機、トリカンター遠心分離機、ディスクスタック遠心分離機、ろ過遠心分離機、またはデカンター遠心分離機を含む、当業界で用いられる任意の従来の遠心分離機であり得る。ある実施形態において、原料スラリー 16 からの非溶解固体の除去は、ろ過、真空ろ過、ベルトフィルター、加圧ろ過、ふるいを用いたろ過、ふるい分け分離、火格子（grate）または格子、多孔質格子、浮遊法、ハイドロクロン、フィルタープレス、スクリュープレス、重力沈降器、ボルテックス分離器、または液体から固体を分離するのに使用され得る任意の方法によって行うことができる。一実施形態において、非溶解固体が、トウモロコシマッシュから除去されて、2 種の生成物流、例えば、トウモロコシマッシュと比較してより低い濃度の固体を含有するオリゴ糖の水溶液およびトウモロコシマッシュと比較してより高い濃度の固体を含有するウェットケーキが形成され得る。さらに、トリカンター遠心分離機が、トウモロコシマッシュからの固体の除去に用いられる場合、トウモロコシ油を含有する第 3 の流れが生成され得る。したがって、いくつかの生成物流が、様々な分離技術またはそれらの組合せを用いて生成され得る。

【0078】

ある実施形態において、ウェットケーキ 24 は、遠心分離機 20 において、原料スラリー 16、例えば、トウモロコシマッシュスラリーから形成される組成物であり、ここで、ウェットケーキ 24 は、原料スラリー中に存在する少なくとも約 50 重量%の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 55 重量%の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 60 重量%の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 65 重量%の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 70 重量%の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 75 重量%の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 80 重量%の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 85 重量%の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 90 重量%の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する少なくとも約 95 重量%の非溶解粒子、または原料スラリー中に存在する約 99 重量%の非溶解粒子を含む。

【0079】

ある実施形態において、遠心分離機 20 において、原料スラリー 16、例えば、トウモロコシマッシュスラリーから形成される水溶液 22 は、原料スラリー中に存在する約 50 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 45 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 40 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 35 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 30 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 25 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 20 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 15 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 10 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 5 重量%以下の非溶解粒子、または原料スラリー中に存在する約 1 重量%の非溶解粒子を含む。

10

【0080】

水溶液 22 を発酵させて、ブタノールを生成するように構成される発酵装置 30 は、水溶液 22 を受け入れるための入口を有する。発酵装置 30 は、発酵ブロスを含み得る。細菌、シアノバクテリア、糸状菌、および酵母からなる群から選択される微生物 32 が、発酵ブロスに含まれるべく発酵装置 30 に導入される。ある実施形態において、微生物 32 は、大腸菌 (*E. coli*) などの細菌であり得る。ある実施形態において、微生物 32 は、*S. セレヴィシエ* (*S. cerevisiae*) であり得る。微生物 32 は、水溶液 22 中の糖を消費し、ブタノールを生成する。微生物による発酵を用いたブタノールの生成、ならびに高収率のブタノールを生成する微生物は公知であり、例えば、米国特許出願公開第 2009/0305370 号明細書に開示されており、その開示内容の全体が、本明細書に援用される。ある実施形態において、微生物 32 は、発酵性組み換え微生物であり得る。

20

【0081】

ある実施形態において、微生物 32 は、生合成経路を含むように改変される。ある実施形態において、生合成経路は、ブタノール生合成経路である。ある実施形態において、生合成経路は、ピルビン酸塩を発酵生成物に転化する。ある実施形態において、生合成経路は、生合成経路の基質-生成物転化を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の異種のポリヌクレオチドを含む。ある実施形態において、生合成経路の各基質-生成物転化は、異種のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドによって触媒される。

30

【0082】

ブタノールが微生物によって生成されるにつれて、原位置生成物除去 (ISPR) を用いて、例えば、液液抽出によって、発酵装置 30 からブタノールを除去することができる。液液抽出は、以下に簡単に記載され、開示内容の全体が、本明細書に援用される米国特許出願公開第 2009/0305370 号明細書に記載される方法にしたがって行われ得る。

【0083】

発酵装置 30 は、抽出剤 34 を受け入れるための入口を有する。抽出剤 34 は、飽和、単不飽和、多価不飽和 (およびそれらの混合物) $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルコール、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪酸のエステル、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アルデヒド、 $C_{12} \sim C_{22}$ の脂肪アミド、およびそれらの混合物からなる群から選択される有機抽出剤であり得る。抽出剤はまた、飽和、単不飽和、多価不飽和 (およびそれらの混合物) $C_4 \sim C_{22}$ の脂肪アルコール、 $C_4 \sim C_{28}$ の脂肪酸、 $C_4 \sim C_{28}$ の脂肪酸のエステル、 $C_4 \sim C_{22}$ の脂肪アルデヒド、およびそれらの混合物からなる群から選択される有機抽出剤であり得る。抽出剤 34 は、オレイルアルコール、ベヘニルアルコール、セチルアルコール、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、ステアリルアルコール、1-ウンデカノール、オレイン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸メチル、オレイン酸メチル、ウンデカナール、ラウリンアルデヒド、20-メチルウンデカナール、およびそれらの混合物などの有機抽出剤であり得る。抽出剤 34 は、発酵ブロスと接触し、発酵ブロス中に存在するブタノールが、抽出剤 34 に移される。ブタノ

40

50

ールに富んだ抽出剤の流れ 36 が、発酵装置 30 の出口を通して排出される。その後、ブタノールは、従来の技術を用いて、流れ 36 中の抽出剤から分離される。原料流が、発酵装置 30 に加えられ得る。発酵装置 30 は、当該技術分野において公知の任意の好適な発酵装置であり得る。

【0084】

ある実施形態において、発酵装置 30 の内部で同時に糖化および発酵が行われ得る。酸プロセス、酸-酵素プロセス、または酵素プロセスを含むがこれらに限定されない、当業界で通常用いられる、任意の公知の糖化プロセスが使用され得る。ある実施形態において、グルコアミラーゼなどの酵素 38 が、水溶液 22 中に存在するオリゴ糖の形態の糖類を分解して単糖類にするために、発酵装置 30 の入口に導入され得る。

10

【0085】

ある実施形態において、発酵ブロス 40 が、発酵装置 30 の出口から排出され得る。排出される発酵ブロス 40 は、酵母などの微生物 32 を含み得る。微生物 32 は、例えば、遠心分離機（図示せず）において、発酵ブロス 40 から容易に分離され得る。その後、微生物 32 は、発酵装置 30 に再利用することができ、発酵装置 30 は、時間の経過とともにブタノールの生成速度を上げ、それによって、ブタノール生成の効率を高めることができる。

【0086】

発酵ブロス 40 の一部が発酵装置 30 を出るとき、発酵ブロス 40 は、原料スラリー中に存在する約 50 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 45 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 40 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 35 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 30 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 25 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 20 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 15 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 10 重量%以下の非溶解粒子、原料スラリー中に存在する約 5 重量%以下の非溶解粒子、または原料スラリー中に存在する約 1 重量%以下の非溶解粒子を含む。

20

【0087】

ある実施形態において、例えば、図 2 に示されるように、本発明のシステムおよび方法は、原料 52 を乾式粉碎するように構成される粉碎機 50 を含み得る。原料 52 は、図 1 の原料 12 と同じであり得、入口を通して粉碎機 50 に入り得る。粉碎機 50 は、原料 52 を粉碎または磨砕し得る。ある実施形態において、原料 52 は、分画されなくてもよい。ある実施形態において、原料 52 は、分画されていないトウモロコシの実であり得る。粉碎機 50 は、任意の好適な公知の粉碎機、例えば、ハンマーミルであり得る。乾式粉碎された原料 54 は、出口を通して粉碎機 50 から排出され、液化槽 10 に入る。図 2 の残りの部分は図 1 と同一であるため、再度説明しない。他の実施形態において、原料は、分画されないか、および／または乾式粉碎される代わりに、当業界で公知のように分画および／または湿式粉碎され得る。

30

【0088】

湿式粉碎は、各副産物から別々に価値を得るために、バイオマス（例えば、トウモロコシ）をその主要な構成要素（胚芽、種皮繊維、でんぷん、およびグルテン）に分離する多工程プロセスである。このプロセスにより、精製されたでんぷん流が得られるが；このプロセスはコストがかかり、バイオマスを、発酵アルコール生成に不要なその非でんぷん構成要素に分離することを含む。分画により、磨砕された全粒トウモロコシ中に存在する脂質の大部分を含有する繊維および胚芽が除去され、より高いでんぷん（胚乳）含量を有する分画されたトウモロコシが得られる。乾式分画は、繊維から胚芽を分離しないため、湿式粉碎よりコストが低い。しかしながら、分画は、繊維または胚芽の全体を除去せず、固体を完全に除去しない。さらに、分画の際にでんぷんをいくらか損失する。トウモロコシの湿式粉碎は、乾式分画よりさらにコストが高いが、乾式分画は、分画されていないトウモロコシの乾式磨砕よりコストが高い。

40

50

【0089】

ある実施形態において、例えば、図3に示されるように、本発明のシステムおよび方法は、遠心分離機20の出口からの油26の排出を含み得る。図3は、油流26が遠心分離機20を出ることを除いて図1と同一であるため、再度詳細に説明しない。

【0090】

原料スラリー16は、第1の液相または発酵性糖を含有する水溶液22と、固相または非溶解固体を含有するウェットケーキ24と、遠心分離機20を出ることができる油26を含有する第2の液相とに分離される。ある実施形態において、原料12はトウモロコシであり、油26は、フリートウモロコシ油である。本明細書において使用される際のフリートウモロコシ油という用語は、トウモロコシの胚芽を含まないトウモロコシ油を意味する。例えば、トリカンター遠心分離機といった任意の好適な従来の遠心分離機を用いて、水溶液22、ウェットケーキ24、および油26を排出することができる。ある実施形態において、原料がトウモロコシである場合、トウモロコシ油などの原料12からの油の一部が、ウェットケーキ24中に残る。このような場合、ウェットケーキ24は、ウェットケーキ24の乾燥固形分の約20重量%未満の量のトウモロコシ油を含む。

【0091】

ある実施形態において、原料12（例えば、トウモロコシ）およびトウモロコシ油26が、遠心分離機20から除去されるとき、発酵装置30中の発酵ブ罗斯は、減少された量のトウモロコシ油を含む。例えば、非溶解固体を実質的に含まない発酵ブ罗斯は、生成物アルコール部分（例えば、ブタノール）および油部分（例えば、トウモロコシ油）を、重量基準で少なくとも約4：1の比率で含み得る。トウモロコシ油は、少なくとも15重量%の遊離脂肪酸、例えば、16.7重量%の遊離脂肪酸を含有し得る。ある実施形態において、発酵ブ罗斯は、約25重量%以下の非溶解固体を有し、発酵ブ罗斯は、約15重量%以下の非溶解固体を有し、発酵ブ罗斯は、約10重量%以下の非溶解固体を有し、発酵ブ罗斯は、約5重量%以下の非溶解固体を有し、発酵ブ罗斯は、約1重量%以下の非溶解固体を有し、または発酵ブ罗斯は、約0.5重量%以下の非溶解固体を有する。

【0092】

ある実施形態において、遠心分離機20は、非溶解固体の層、油（例えば、トウモロコシ油）の層、および発酵性糖を含む上清層を含む生成物プロファイルを生成する。重量基準における非溶解固体層中の非溶解固体に対する上清層中の発酵性糖の比率は、約2：1～約5：1の範囲であり得；重量基準におけるトウモロコシ油層中のトウモロコシ油に対する上清層中の発酵性糖の比率は、約10：1～約50：1の範囲であり得；および／または重量基準におけるトウモロコシ油層中のトウモロコシ油に対する非溶解固体層中の非溶解固体の比率は、約2：1～約25：1の範囲であり得る。

【0093】

ある実施形態において、図2のシステムおよび方法は、図3のシステムおよび方法に関連して上述した遠心分離機20からの油流の排出を含むように変更され得る。

【0094】

油26が、別々に排出されない場合、ウェットケーキ24とともに除去され得る。ウェットケーキ24が、遠心分離機20を介して除去されるとき、ある実施形態において、原料がトウモロコシである場合、トウモロコシ油などの原料12からの油の一部が、ウェットケーキ24中に残る。水溶液22が遠心分離機20から排出されてから、ウェットケーキ24は、遠心分離機においてさらなる水で洗浄され得る。ウェットケーキ24の洗浄により、ウェットケーキ中に存在する糖（例えば、オリゴ糖）を回収し、回収された糖および水は、液化槽10に再利用され得る。洗浄後、ウェットケーキ24は、任意の好適な公知の方法によって、可溶物と組み合わせられ、次に、乾燥されて、可溶物含有乾燥穀類蒸留粕（DDGS）が形成され得る。遠心分離機20において形成されるウェットケーキ24からのDDGSの形成にはいくつかの利点がある。非溶解固体が発酵槽に送られないため、DDGSは、抽出剤および／またはブタノールなどの生成物アルコールを捕捉せず、DDGSは、発酵槽の条件に供されず、発酵槽中に存在する微生物と接触しない。全てのこ

これらの利点が、例えば、動物飼料としてのDDGSの処理および販売をより容易にする。ある実施形態において、油26は、ウェットケーキ24から別々に排出されず、油26は、ウェットケーキ24の一部として含まれ、最終的にDDGS中に存在する。このような場合、油は、DDGSから分離され、同じかまたは異なるアルコール発酵プロセスにおいてその後の使用のためにISPR抽出剤に転化され得る。

【0095】

油26は、例えば、溶媒抽出プロセスを含む任意の好適な公知の方法を用いてDDGSから分離され得る。本発明の一実施形態において、DDGSは、抽出槽に充填され、ヘキサンなどの溶媒で洗浄されて、油26が除去される。用いられ得る他の溶媒としては、例えば、イソブタノール、イソヘキサン、エタノール、石油エーテルなどの石油蒸留物、またはそれらの混合物が挙げられる。油26の抽出の後、DDGSは、一切の残留溶媒を除去するように処理され得る。例えば、DDGSは、当該技術分野において公知の任意の方法を用いて、一切の残留溶媒を蒸発させるように加熱され得る。溶媒を除去した後、DDGSは、一切の残留水を除去するように乾式処理に供され得る。処理されたDDGSは、家禽、家畜、およびペットなどの動物用の補足飼料として使用され得る。

10

【0096】

DDGSからの抽出の後、得られる油26および溶媒混合物は、溶媒から油26を分離するために収集され得る。一実施形態において、油26／溶媒混合物は、蒸発によって処理されてもよく、それによって、溶媒は蒸発され、収集され、再利用され得る。回収された油は、同じかまたは異なるアルコール発酵プロセスにおいてその後の使用のためにISPR抽出剤に転化され得る。

20

【0097】

発酵装置中に存在する油が脂肪酸およびグリセリンに分解し得るため、原料の油成分の除去はブタノール生成にとって有利である。グリセリンは、水中に蓄積し、システム全体にわたって再利用のために利用可能な水の量を減少させ得る。したがって、原料の油成分の除去は、システムを通して再利用され得る水の量を増加させることによって、生成物アルコール生成の効率を高める。

【0098】

ある実施形態において、例えば、図4および5に示されるように、糖化は、遠心分離機20と発酵装置30と間（図4）または液化槽10と遠心分離機20との間（図5）に位置する別個の糖化槽60において行われ得る。図4および5は、別個の糖化槽60を含むことおよび発酵装置30が酵素38を受け入れないことを除いて、図1と同一である。

30

【0099】

上述したように、酸プロセス、酸-酵素プロセス、または酵素プロセスを含むがこれらに限定されない、当業界で通常用いられる任意の公知の糖化プロセスが使用され得る。糖化槽60が、任意の好適な公知の糖化槽であり得る。ある実施形態において、グルコアミラーゼなどの酵素38が、オリゴ糖の形態の糖類を単糖類に分解するために、糖化槽60の入口に導入され得る。例えば、図4において、遠心分離機20から排出され、入口を通して糖化槽60に受け入れられる、水流22中に存在するオリゴ糖が、単糖類に分解される。したがって、単糖類を含有する水溶液62が、出口を通して糖化槽60から排出され、発酵装置30に受け入れられる。あるいは、図5に示されるように、液化槽10から排出され、入口を通して糖化槽60に受け入れられる、原料スラリー16中に存在するオリゴ糖が、単糖類に分解される。したがって、単糖類を含有する原料スラリー64が、出口を通して糖化槽60から排出され、遠心分離機20に受け入れられる。

40

【0100】

ある実施形態において、図2および3のシステムおよび方法は、図4および5のシステムおよび方法に関連して上述したように別個の糖化槽60を含むように変更され得る。

【0101】

ある実施形態において、例えば、図6に示されるように、本発明のシステムおよび方法は、一連の2つ以上の遠心分離機を含み得る。図6は、第2の遠心分離機20'が追加さ

50

れたことを除いて図 1 と同一であるため、再度詳細に説明しない。

【0102】

遠心分離機 20 から排出される水溶液 22 は、遠心分離機 20' の入口に受け入れられ得る。遠心分離機 20' は遠心分離機 20 と同一であり得、同じように運転され得る。遠心分離機 20' は、遠心分離機 20 において水溶液 22 から分離されない非溶解固体を除去して、(i) 水流 22 と比較して減少された量の非溶解固体を含有する以外は水流 22 と同様の水流 22' および (ii) ウェットケーキ 24 と同様のウェットケーキ 24' を生成し得る。次に、水流 22' は、発酵装置 30 に導入され得る。ある実施形態において、遠心分離機 20' の後に 1 つ以上のさらなる遠心分離機が存在し得る。

【0103】

ある実施形態において、図 2～6 のシステムおよび方法は、図 6 のシステムおよび方法に関連して上述したように非溶解固体を除去するためのさらなる遠心分離機を含むように変更され得る。

【0104】

ある実施形態において、発酵プロス 40 は、発酵装置 30 の出口から排出され得る。発酵プロス 40 とともに発酵装置 30 を出る非溶解固体がないかまたは最小限であることには、いくつかのさらなる利点がある。例えば、ビール塔 (beer column) または蒸留塔などの、例えば、下流の処理におけるユニットおよび作業の必要性をなくし、それによって、生成物アルコール生成の効率を高めることができる。また、発酵装置を出る最終的なプロス中の非溶解固体がより少ないことの結果として、全蒸留廃液 (whole stillage) の遠心分離機の一部または全てを省略することができる。

【0105】

図 1～6 に開示されるプロセスおよびシステムは、非溶解固体を原料スラリー 16 から除去する工程を含み、結果として、バイオマスの処理生産性および費用対効果を向上する。向上した生産性は、発酵の前に非溶解固体を除去しないプロセスおよびシステムと比べて、ブタノール生成の向上した効率および／または向上した抽出活性を有することを含み得る。

【0106】

上述したように、非溶解固体は、DDGS または脂肪酸エステルなどの他の副生成物を生成するようにさらに処理され得る。例えば、脂肪酸エステルは、炭水化物の、生成物アルコール (例えば、ブタノール) への収率を高めるために回収され得る。これは、溶媒を用いて、例えば、いくつかの副生成物流を組み合わせて混合し、組み合わせて混合する工程の生成物を乾燥させることによって形成される副生成物から脂肪酸エステルを抽出することによって行われ得る。DDGS からトウモロコシ油トリグリセリドを回収するためのこのような溶媒系の抽出システムは、米国特許出願公開第 2010/0092603 号明細書に記載されており、その教示内容が、参照により本明細書に援用される。

【0107】

脂肪酸エステルの溶媒抽出の一実施形態において、固体が、全蒸留廃液から分離され得る (「分離された固体」) が、これは、その流れが、組み合わされない副生成物流中の脂肪酸エステルの最も多い割合を含有し得るためである。次に、これらの分離された固体は、抽出器に供給され、溶媒で洗浄され得る。一実施形態において、分離された固体の全ての側が溶媒で確実に洗浄されるように、分離された固体は、少なくとも 1 回、回転される。洗浄後、ミセラとして知られている、脂質と溶媒との得られる混合物が、溶媒からの抽出される脂質の分離のために収集される。例えば、脂質と溶媒との得られる混合物は、さらなる処理のために分離器に堆積され得る。抽出プロセスの際、溶媒が分離された固体を洗浄するにつれて、溶媒は、脂質を溶液に入れるだけでなく、固体微粒子も収集する。これらの「微粒子」は、一般に、ミセラ中の望ましくない不純物であり、一実施形態において、ミセラは、ミセラから微粒子を分離するかまたは洗い落とす (scrub) 装置によって、抽出器または分離器から排出され得る。

【0108】

ミセラ中に含まれる脂質および溶媒を分離するために、ミセラは、蒸留工程に供され得る。この工程において、ミセラは、例えば、蒸発器によって処理することができ、蒸発器は、溶媒を蒸発させるのに十分に高いが、抽出される脂質に悪影響を与えるかまたは蒸発させるほど十分高くはない温度にミセラを加熱する。溶媒が蒸発するにつれて、溶媒は、例えば、凝縮器に収集され、将来の使用のために再利用され得る。ミセラからの溶媒の分離により、粗脂質の蓄積が得られ、これは、水、脂肪酸エステル（例えば、脂肪酸イソブチルエステル）、脂肪酸、およびトリグリセリドを分離するようにさらに処理され得る。

【0109】

脂質の抽出の後、固体は、抽出器の外に送られ、残留溶媒を除去するストリップングプロセスに供され得る。残留溶媒の回収は、プロセス経済性にとって重要である。一実施形態において、湿潤固体は、溶媒が脱溶媒器（desolventizer）に送られる際に湿潤固体から一時的に蒸発する溶媒を貯蔵し、収集するための気密（vapor tight）環境に送られ得る。固体が脱溶媒器に入る際、固体は加熱されて、残留溶媒が蒸発され、除去され得る。固体を加熱するために、脱溶媒器は、固体を1つ以上のトレイに分配するための機構を含んでいてもよく、固体は、加熱された空気または蒸気との直接接触などによって、直接加熱されるか、あるいは食事を運ぶトレイを加熱することなどによって間接的に加熱され得る。1つのトレイから別のトレイへの固体の移動を容易にするために、固体を運ぶトレイは、固体を1つのトレイから次のトレイへと送らせる開口部を含み得る。脱溶媒器から、固体は、任意に、混合器に送られてもよく、ここで、固体は、乾燥器に送られる前に、他の副生成物と混合される。この例では、固体は、脱溶媒器に供給され、ここで、固体は、蒸気によって接触される。一実施形態において、脱溶媒器中の蒸気および固体の流れは、逆行していてもよい。次に、固体は、脱溶媒器を出て、乾燥器または任意に混合器に供給されてもよく、ここで、様々な副生成物が混合され得る。脱溶媒器を出る蒸気は凝縮され、任意にミセラと混合され、次にデカンターに供給され得る。デカンターを出る水富化相は、蒸留塔に供給されてもよく、ここで、ヘキサンが、水富化流から除去される。一実施形態において、ヘキサン減損水富化流は、蒸留塔の塔底を出て、発酵プロセスに戻って再利用されてもよく、例えば、それは、磨砕されたトウモロコシ固体をスラリー化するために使用され得る。別の実施形態において、塔頂および塔底生成物は、発酵プロセスに再利用され得る。例えば、脂質富化塔底物は、加水分解装置の原料に加えられる。塔頂物は、例えば、凝縮され、デカンターに供給され得る。このデカンターを出るヘキサン富化流は、抽出器への溶媒原料の一部として任意に使用され得る。このデカンターを出る水富化相は、ヘキサンを水から取り除く塔に供給され得る。当業者が理解することができるように、本発明の方法は、ブタノールなどの生成物アルコールの生成のための発酵プロセスを最適化するために様々な方法で変更され得る。

【0110】

さらなる実施形態において、副生成物（または副産物）が、発酵プロセスに使用されるマッシュから得られる。例えば、トウモロコシ油は、マッシュから分離され得、このトウモロコシ油は、トリグリセリド、遊離脂肪酸、ジグリセリド、モノグリセリド、およびリン脂質（例えば、実施例20を参照）を含有し得る。トウモロコシ油は、様々な率で、他の副生成物（または副産物）に任意に加えられてもよく、したがって、例えば、得られる副生成物中のトリグリセリドの量を変化させる能力を生み出す。このように、得られる副生成物の脂肪含量は、例えば、高脂肪製品と比較して乳牛の必要性によく適合するであろうより低脂肪で高タンパク質の動物飼料が得られるように制御され得る。

【0111】

一実施形態において、マッシュから分離された粗トウモロコシ油は、消費者用途向けの食用油へとさらに処理されてもよく、またはその高いトリグリセリド含量により代謝エネルギーの優れた供給源となり得るため、動物飼料の成分としても使用され得る。別の実施形態において、この粗トウモロコシ油は、バイオディーゼルまたは再生可能ディーゼルの原料としても使用され得る。

【0112】

一実施形態において、抽出剤副生成物は、動物飼料副生成物の成分として、全てまたは部分的に使用されてもよく、またはバイオディーゼルまたは再生可能ディーゼルの原料として使用され得る。

【0113】

さらなる実施形態において、固体は、マッシュから分離されてもよく、トリグリセリドおよび遊離脂肪酸を含み得る。これらの固体（または流れ）は、動物飼料として使用されてもよく、遠心分離からの排出としてまたは乾燥後のいずれかで回収される。固体（またはウェットケーキ）は、利用可能なリジンおよびバイパスまたは第一胃非分解性タンパク質の含量が高いため、反すう動物（例えば、乳牛）の飼料として特に適し得る。例えば、これらの固体は、高タンパク質、低脂肪の飼料に特に有用であり得る。別の実施形態において、これらの固体は、基剤として使用されてもよく、すなわち、シロップなどの他の副生成物が、動物飼料として使用され得る生成物を形成するためにこの固体に加えられてもよい。別の実施形態において、様々な量の他の副生成物が、得られる生成物の特性が特定の動物種の必要性を満たすように調整するために固体に加えられてもよい。

【0114】

実施例21に記載される全蒸留廃液から分離される固体の組成物は、例えば、粗タンパク質、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。一実施形態において、この組成物（または副生成物）は、動物飼料として湿潤または乾燥した状態で使用されてもよく、その場合、例えば、高タンパク質（例えば、高リジン）、低脂肪、および高い繊維含量が所望される。別の実施形態において、より高脂肪、低繊維の動物飼料が所望される場合、例えば、別の副生成物流から、脂肪がこの組成物に加えられてもよい。一実施形態において、このより高脂肪、低繊維の動物飼料は、ブタまたは家禽に使用され得る。さらなる実施形態において、凝縮蒸留可溶物（Condensed Distillers Soluble）（CDS）（例えば、実施例21を参照）の非水性組成物は、例えば、タンパク質、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルならびに塩および炭水化物などの他の溶解および懸濁固体を含み得る。このCDS組成物は、例えば、動物飼料として湿潤または乾燥した状態で使用されてもよく、その場合、高タンパク質、低脂肪、高無機塩の飼料成分が所望される。一実施形態において、この組成物は、乳牛の飼料の成分として使用されてもよい。

【0115】

別の実施形態において、発酵プロセスからの油が、蒸発によって回収され得る。この非水性組成物は、脂肪酸イソブチルエステルおよび脂肪酸（例えば、実施例20を参照）を含んでいてもよく、この組成物（または流れ）は、イソブタノールおよび脂肪酸を回収するために加水分解装置に供給され得る。さらなる実施形態において、この流れは、バイオディーゼル生成の原料として使用され得る。

【0116】

発酵プロセスによるアルコール（例えば、ブタノール）の生成によって生成される様々な流れは、いくつかの副産物を生成するために多くの方法で組み合わせられ得る。例えば、マッシュからの粗トウモロコシを用いて、抽出剤として用いられる脂肪酸を生成し、脂質が、他の目的のために蒸発器によって抽出される場合、残りの流れが、組み合わせられ、粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルを含む副産物組成物を生成するように処理され得る。一実施形態において、この組成物は、少なくとも約20～35重量%の粗タンパク質、少なくとも約1～20重量%の粗脂肪、少なくとも約0～5重量%のトリグリセリド、少なくとも約4～10重量%の脂肪酸、および少なくとも約2～6重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。特定の一実施形態において、副産物組成物は、約25重量%の粗タンパク質、約10重量%の粗脂肪、約0.5重量%のトリグリセリド、約6重量%の脂肪酸、および約4重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。

【0117】

別の実施形態において、脂質は、蒸発器によって抽出され、脂肪酸は、他の目的のため

に使用され、マッシュからの粗トウモロコシの約50重量%および残りの流れが、組み合わせられ、処理され、得られる副産物組成物は、タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。一実施形態において、この組成物は、少なくとも約25~31重量%の粗タンパク質、少なくとも約6~10重量%の粗脂肪、少なくとも約4~8重量%のトリグリセリド、少なくとも約0~2重量%の脂肪酸、および少なくとも約1~3重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。特定の一実施形態において、副産物組成物は、約28重量%の粗タンパク質、約8重量%の粗脂肪、約6重量%のトリグリセリド、約0.7重量%の脂肪酸、および約1重量%の脂肪酸イソブチルエステルを含み得る。

【0118】

別の実施形態において、全蒸留廃液から分離される固体およびマッシュから抽出されるトウモロコシ油の50重量%が、組み合わせられ、得られる副産物組成物は、粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、脂肪酸イソブチルエステル、リジン、中性デタージェント繊維（NDF）、および酸性デタージェント繊維（ADF）を含み得る。一実施形態において、この組成物は、少なくとも約26~34重量%の粗タンパク質、少なくとも約15~25重量%の粗脂肪、少なくとも約12~20重量%のトリグリセリド、少なくとも約1~2重量%の脂肪酸、少なくとも約2~4重量%の脂肪酸イソブチルエステル、少なくとも約1~2重量%のリジン、少なくとも約11~23重量%のNDF、および少なくとも約5~11重量%のADFを含み得る。特定の一実施形態において、副産物組成物は、約29重量%の粗タンパク質、約21重量%の粗脂肪、約16重量%のトリグリセリド、約1重量%の脂肪酸、約3重量%の脂肪酸イソブチルエステル、約1重量%のリジン、約17重量%のNDF、および約8重量%のADFを含み得る。この副産物組成物の高脂肪、高トリグリセリド、および高リジン含量およびより低い繊維含量は、ブタおよび家禽の飼料として望ましいことがある。

【0119】

上述したように、発酵プロセスによるアルコール（例えば、ブタノール）の生成によって生成される様々な流れは、粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルを含む副産物組成物を生成するために多くの方法で組み合わせられ得る。例えば、少なくとも約6%の粗脂肪および少なくとも約28%の粗タンパク質を含む組成物が、乳畜の動物飼料製品として用いられ得る。少なくとも約6%の粗脂肪および少なくとも約26%の粗タンパク質を含む組成物が、フィードロット牛の動物飼料製品として用いられ得る一方、少なくとも約1%の粗脂肪および少なくとも約27%の粗タンパク質を含む組成物が、越冬牛の動物飼料製品として用いられ得る。少なくとも約13%の粗脂肪および少なくとも約27%の粗タンパク質を含む組成物が、家禽の動物飼料製品として用いられ得る。少なくとも約18%の粗脂肪および少なくとも約22%の粗タンパク質を含む組成物が、単胃動物の動物飼料製品として用いられ得る。したがって、様々な流れは、特定の動物種向けに飼料製品をカスタマイズするように組み合わせられ得る。

【0120】

上述したように、発酵プロセスによるアルコール（例えば、ブタノール）の生成によって生成される様々な流れは、粗タンパク質、粗脂肪、トリグリセリド、脂肪酸、および脂肪酸イソブチルエステルを含む副産物組成物を生成するために多くの方法で組み合わせられ得る。例えば、少なくとも約6%の粗脂肪および少なくとも約28%の粗タンパク質を含む組成物が、乳畜の動物飼料製品として用いられ得る。少なくとも約6%の粗脂肪および少なくとも約26%の粗タンパク質を含む組成物が、フィードロット牛の動物飼料製品として用いられ得る一方、少なくとも約1%の粗脂肪および少なくとも約27%の粗タンパク質を含む組成物が、越冬牛の動物飼料製品として用いられ得る。少なくとも約13%の粗脂肪および少なくとも約27%の粗タンパク質を含む組成物が、家禽の動物飼料製品として用いられ得る。少なくとも約18%の粗脂肪および少なくとも約22%の粗タンパク質を含む組成物が、単胃動物の動物飼料製品として用いられ得る。したがって、様々な流れは、特定の動物種向けに飼料製品をカスタマイズするように組み合わせられ得る。

【0121】

一実施形態において、発酵プロセスによるアルコール（例えば、ブタノール）の生成によって生成される1つ以上の流れが、バイオディーゼルなどの燃料源として使用され得る。少なくとも約90%のCOFAを含む組成物を生成するために多くの方法で組み合わせられ得る。

【0122】

本発明の方法の一実施形態の例として、粉碎された穀類（例えば、ハンマーミルによって処理されたトウモロコシ）および1種以上の酵素が組み合わせられて、スラリー化された穀類が生成される。このスラリー化された穀類は、調理され、液化され、フラッシュ蒸気でフラッシュされて、調理されたマッシュが得られる。次に、調理されたマッシュはろ過されて、懸濁固体が除去され、ウェットケーキおよびろ液が生成される。ろ過は、遠心分離、ふるい分け、または真空ろ過などのいくつかの方法によって行うことができ、このろ過工程は、少なくとも約80%～少なくとも約99%の懸濁固体をマッシュから除去し得る。

10

【0123】

ウェットケーキは、水を用いて再スラリー化され、再ろ過されて、さらなるでんぷんが除去され、洗浄されたろ過ケーキが生成される。再スラリー化プロセスは、何回か、例えば、1～5回繰り返され得る。ウェットケーキを再スラリー化するのに使用される水は、発酵プロセス中に生成される再利用水であってもよい。再スラリー化／再ろ過プロセスによって生成されるろ液は、最初の混合工程に戻されて、粉碎された穀類とともにスラリーが形成され得る。ろ液は、混合工程の前に加熱または冷却され得る。

20

【0124】

洗浄されたろ過ケーキは、生成プロセスの際にいくつかの段階でビールを用いて再スラリー化され得る。例えば、洗浄されたろ過ケーキは、発酵装置の後、プレフラッシュ塔（pre flash column）の前、または蒸留器の穀類乾燥器への供給点において、ビールを用いて再スラリー化され得る。洗浄されたろ過ケーキは、他の副生成物と別々に乾燥されてもよく、またはDDGSの生成のためのウェットケーキとして直接使用されてもよい。

【0125】

最初の混合工程の結果として生成されるろ液は、本明細書に記載されるようにさらに処理され得る。例えば、ろ液は、蒸気またはプロセス間熱交換（process to process heat exchange）を用いて加熱され得る。糖化酵素が、ろ液に加えられてもよく、ろ液の溶解されたでんぷんは、部分的にまたは完全に糖化され得る。糖化されたろ液は、プロセス間交換、冷却水による交換、または冷水による交換などのいくつかの手段によって冷却され得る。

30

【0126】

次に、冷却されたろ液は、発酵装置ならびにアルコール生成に適した微生物、例えば、ブタノールを生成することが可能な組み換え酵母に加えられ得る。さらに、アンモニアおよび再利用流も、発酵装置に加えられ得る。このプロセスは、少なくとも1つの発酵装置、少なくとも2つの発酵装置、少なくとも3つの発酵装置、または少なくとも4つの発酵装置を含み得る。大気放出（例えば、ブタノール大気放出）を減少させ、生成物の収率を高めるために、発酵中に生成される二酸化炭素がスクラバーに排気され得る。

40

【0127】

溶媒が、再利用ループを介して発酵装置に加えられてもよく、または発酵装置に直接加えられてもよい。溶媒は、アルコール（例えば、ブタノール）を溶解させるかまたはそれと反応することができ、かつ水への限られた溶解性を有し得る1種以上の有機化合物であり得る。溶媒は、1つの液相としてまたは2つの液相材料として連続して発酵装置から取り出されてもよく、または溶媒は、1つまたは2つの液相材料としてバッチ式に引き抜かれ得る。

【0128】

50

ビールが脱気され得る。ビールは、例えば、高温マッシュによるプロセス間交換またはプレフラッシュ塔の塔頂物によるプロセス間交換によって、脱気の前に加熱され得る。蒸気が、凝縮器、次に、スクラバーに排気されてもよい。脱気されたビールは、例えば、蒸留領域中の他の流れによるプロセス間熱交換によってさらに加熱され得る。

【0129】

予め加熱されたビールおよび溶媒は、従来の乾式磨砕燃料エタノールプラントのビール塔から改造され得るプレフラッシュ塔に入り得る。この塔は、大気圧より低い圧力で運転され、一連の蒸発器からまたはマッシュ調理工程から取り出された水蒸気によって駆動され得る。プレフラッシュ塔の塔頂物は、冷却水と、プレフラッシュ塔原料による熱交換を含むプロセス間熱交換とのいくつかの組み合わせによる熱交換によって凝縮され得る。液体凝縮物は、アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）に送られ得る。

10

【0130】

プレフラッシュ塔の塔底物は、溶媒デカンターに進められ得る。プレフラッシュ塔の塔底物は、遊離アルコール（例えば、ブタノール）を実質的に取り除かれ得る。デカンターは、スティルウェル（still well）、遠心分離機、またはハイドロクロンであり得る。水が、このデカンター中の溶媒相から実質的に分離され、水相が生成される。懸濁され、溶解された固体を含む水相は、遠心分離されて、ウェットケーキおよび希薄な蒸留廃液（thin stillage）が生成され得る。ウェットケーキは、他の流れと組み合わせられ、乾燥されて、DDGSが形成され得、それは、DDGSを生成する他の流れと別個に、乾燥され、販売され得るか、またはそれはウェットケーキとして販売され得る。水相は、上記のろ過ケーキを再スラリー化するために部分的に使用される逆流（back set）を提供するために分割され得る。分割は、希薄な蒸留廃液も提供し、これは、さらなる処理のために蒸発器に注入され得る。

20

【0131】

溶媒デカンター中で生成される有機相は、アルコール（例えば、ブタノール）のエステルであり得る。溶媒は、加水分解されて、反応性溶媒が再生され、さらなるアルコール（例えば、ブタノール）が回収され得る。あるいは、有機相は、ろ過され、製品として販売され得る。加水分解は、熱によって推進され、均一触媒によるか、または不均一触媒により得る。このプロセスへの熱注入は、加熱炉、高温油、電気的熱注入、または高圧蒸気であり得る。加水分解を推進するために加えられる水は、再利用された水流、新鮮な水、または蒸気に由来し得る。

30

【0132】

冷却され、加水分解された溶媒は、大気圧より低い圧力の溶媒塔に注入されてもよく、ここで、溶媒は、蒸気によってアルコール（例えば、ブタノール）を実質的に取り除かれ得る。この蒸気は、蒸発器からの水蒸気であってもよく、マッシュプロセスのフラッシュ工程からの蒸気であってもよく、またはボイラーからの蒸気であってもよい（例えば、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2009/0171129号明細書を参照）。従来の乾式磨砕エタノールプラントからの整流塔が、溶媒塔として適し得る。整流塔は、溶媒塔として働くように改造され得る。溶媒塔の塔底物は、例えば、冷却水またはプロセス間熱交換によって冷却され得る。冷却された塔底物は、残留水を除去するためにデカントされてもよく、この水は、このプロセスを含む他の工程に再利用されてもよく、またはマッシュ工程に再利用されてもよい。

40

【0133】

溶媒塔の塔頂物は、冷却水による交換によってまたはプロセス間熱交換によって冷却されてもよく、凝縮物が、プレフラッシュ塔の塔頂物と共用され得る排気されたアルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）に送られ得る。スクラバー塔底物および脱気工程からの凝縮物を含む、他の混合される水およびアルコール（例えば、ブタノール）流が、このデカンターに加えられてもよい。二酸化炭素を含む排気が、水スクラバーに送られてもよい。このデカンターの水層はまた、溶媒塔に供給されてもよく、また

50

は小型の専用の蒸留塔中でアルコール（例えば、ブタノール）を取り除かれ得る。水層は、プレフラッシュ塔の塔頂物、溶媒塔の塔頂物、または溶媒塔の塔底物によるプロセス間交換によって予め加熱され得る。この専用の塔は、従来の乾式磨砕燃料エタノールプロセスのサイドストリッパーから改造され得る。

【0134】

アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）の有機層は、アルコール（例えば、ブタノール）塔に注入され得る。この塔は、過圧（super-atmospheric）塔であってもよく、リボイラー内の蒸気凝縮によって駆動され得る。塔を運転するためのエネルギー需要を減少させるために、塔への原料がプロセス間熱交換によって加熱され得る。このプロセス間熱交換器は、プレフラッシュ塔の分縮器、溶媒塔の分縮器、加水分解装置の生成物、蒸発器からの水蒸気、またはブタノール塔の塔底物を含み得る。アルコール（例えば、ブタノール）塔の蒸気の凝縮物は、冷却されてもよく、アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）に戻されてもよい。アルコール（例えば、ブタノール）塔の塔底物は、アルコール（例えば、ブタノール）塔原料による交換を含むプロセス間熱交換によって冷却されてもよく、冷却水によってさらに冷却され、ろ過され、生成物アルコール（例えば、ブタノール）として販売され得る。

10

【0135】

上述されるプレフラッシュ塔の塔底物から生成される希薄な蒸留廃液は、多重効用蒸発器に送られ得る。この蒸発器は、2つ、3つ、またはそれ以上の段階を有し得る。蒸発器は、燃料エタノールプラントの従来の設計と同様の2つの効用部による4つの本体の構成を有してもよく、3つの効用部による3つの本体を有してもよく、または他の構成を有してもよい。希薄な蒸留廃液は、複数の効用部のいずれかに入り得る。第1の効用部本体の少なくとも1つが、過圧アルコール（例えば、ブタノール）塔からの蒸気によって加熱され得る。蒸気は、最も圧力の低い効用部から取り出されて、水蒸気の形態の熱が、大気圧より低い圧力のプレフラッシュ塔および溶媒塔に与えられ得る。蒸発器からのシロップが、蒸留器の穀類乾燥器に加えられてもよい。

20

【0136】

発酵装置、脱気装置（degasser）、アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）および他の供給源からの二酸化炭素放出は、水スクラバーに送られ得る。このスクラバーの上部に供給される水は、新鮮な補給水であってもよく、または再利用水であってもよい。再利用水は、揮発性有機化合物を除去するために処理（例えば、生物学的に消化）され、急冷され得る。スクラバーの塔底物は、アルコール／水デカンター（例えば、ブタノール／水デカンター）、溶媒塔に送られてもよく、または他の再利用水とともに使用されて、上記のウェットケーキが再スラリー化されてもよい。蒸発器からの凝縮物は、嫌気性の生物学的消化または他のプロセスによって処理されて、ろ過ケーキを再スラリー化するために再利用する前に水が精製され得る。

30

【0137】

トウモロコシが、粉碎された穀類の供給源として使用される場合、トウモロコシ油は、いくつかの点のいずれかにおいてプロセス流から分離され得る。例えば、遠心分離機が、調理されたマッシュのろ過の後にトウモロコシ油流を生成するように運転されてもよく、またはプレフラッシュ塔水相遠心分離機が、トウモロコシ油流を生成するように運転されてもよい。中間の濃縮シロップまたは最終的なシロップが遠心分離されて、トウモロコシ油流が生成され得る。

40

【0138】

本発明の方法の一実施形態の別の例において、発酵装置から排出される材料は、遠心分離機、沈降機、ハイドロサイクロンなど、およびそれらの組合せなどの装置を含む分離システムにおいて処理されて、直接またはいくらかの再調整の後に次の発酵バッチにおける再度の使用のために再利用され得る濃縮された形態の生酵母が回収され得る。この分離システムは、発酵から生成される脂肪酸エステル（例えばイソブチル脂肪酸エステル）およびアルコール（例えば、ブタノール）を含む有機流ならびにわずかな微量レベルの不混和

50

性有機物を含む水流も生成し得る。この水流は、液化されたマッシュから分離され、洗浄された低でんぷん固体を再パルプ化し、注入するために、アルコール（例えば、ブタノール）含有物を取り除く前または後に使用され得る。これには、本来であれば、液化領域から穀類乾燥およびシロップ混合領域へとこれらの固体を移動するための長いベルトで駆動される搬送システムであり得るものを回避するという利点がある。さらに、アルコール（例えば、ブタノール）が取り除かれた後に得られるこの全蒸留廃液は、既存のまたは新規な分離装置を用いて、希薄な蒸留廃液とウェットケーキ画分とに分離される必要があり、この希薄な蒸留廃液は、発酵性マッシュの新しいバッチを調製するために調理水と組み合わせるために戻る逆流を部分的に形成することになる。この実施形態の別の利点は、液化されたマッシュから分離される固体の水分中に保持された任意の残留溶解でんぷんの一部が捕捉され、この逆流を通して回収され得ることである。あるいは、固体流に含まれる酵母は、生育不能とみなされ、水流に再分配され得、この組み合わせられた流れは、発酵から残っているあらゆるアルコール（例えば、ブタノール）含有物を蒸留によって取り除かれる。生育不能の有機物は、繁殖（propagation）プロセスにおける栄養として使用するためにさらに分離され得る。

【0139】

別の実施形態において、多相材料が、プレフラッシュ塔の塔底を出て、上述したように分離システムにおいて処理され得る。濃縮された固体は、水流に再分配され得、この組み合わせられた流れは、液化されたマッシュから分離され、洗浄された低でんぷん固体を再パルプ化し、注入するのに使用され得る。

【0140】

上記のプロセスならびに本明細書に記載される他のプロセスは、Aspenモデル化などの計算機モデル化を用いて実証され得る（例えば、米国特許第7,666,282号明細書を参照）。例えば、市販のモデル化ソフトウェアAspen Plus（登録商標）（Aspen Technology, Inc., Burlington, MA）は、統合されたブタノール発酵、精製、および水管理プロセスのためのAspenモデルを作り出すために、American Institute of Chemical Engineers, Inc.（New York, NY）から入手可能なDIPPR（Design Institute for Physical Property Research）などの物理的特性データベースとともに使用され得る。このプロセスモデル化は、多くの基礎工学的計算、例えば、物質収支およびエネルギー収支、気／液平衡、および反応速度計算を行うことができる。Aspenモデルを生成するために、情報入力には、例えば、実験データ、含水量および原料の組成、マッシュの調理およびフラッシュのための温度、糖化条件（例えば、酵素原料、でんぷん転化率、温度、圧力）、発酵条件（例えば、微生物原料、グルコース転化率、温度、圧力）、脱気条件、溶媒塔、プレフラッシュ塔、凝縮器、蒸発器、遠心分離機などを含み得る。

【0141】

上記の方法およびシステムは、非溶解固体の除去の結果として、生成物アルコール生成における向上した抽出活性および／または効率をもたらし得る。例えば、非溶解固体の存在のない抽出発酵は、発酵プロセスから抽出剤への生成物アルコールのより高い物質移動速度、発酵装置の内部または外部の発酵からの抽出剤のより良好な相分離、およびより高い抽出剤液滴上昇速度の結果としての抽出剤のより低い保持（hold up）をもたらし得る。また、例えば、発酵の際に発酵プロセス中に保持される抽出剤液滴は、発酵プロセスからより速く、より完全に離脱し、それによって、発酵プロセス中の遊離抽出剤が少なくなり、プロセス中に喪失される抽出剤の量を減少させることができる。さらに、例えば、微生物は再利用することができ、例えば、ビール塔および／または全蒸留廃液遠心分離機の一部または全てなどの、下流の処理におけるさらなる設備を省略することができる。さらに、例えば、抽出剤がDDGS中で喪失される可能性がなくなる。また、例えば、微生物を再利用する能力は、生成物アルコール生成の全体速度を上げ、全カサ要件を低下させ、および／または水性カサ要件を低下させ、それによって、より健康な微生物およびより高い

生成速度をもたらしることができる。さらに、例えば、資本コストを削減するために発酵装置における攪拌器を省略し；保持される抽出剤が最小限に抑えられ、非溶解固体が存在しないために体積がより効率的に使用されるため、発酵装置の生産性を向上し；および／または未建設のプラントにおいて連続発酵またはより小型の発酵装置を使用することが可能であり得る。

【0142】

向上した抽出効率の例としては、例えば、安定化した分配係数、向上した（例えば、より速いまたはより完全な）相分離、向上した液液物質移動係数、より低い力価での運転、向上したプロセス流再利用性、向上した発酵体積効率、向上した原料（例えば、トウモロコシ）負荷供給、微生物（例えば、組み換え微生物）の向上したブタノール力価耐性、水の再利用、エネルギーの減少、抽出剤の増加した再利用、および／または微生物の再利用が挙げられる。

10

【0143】

例えば、発酵装置中で固体が占める体積が減少される。したがって、発酵に利用可能な発酵装置の有効体積が増加され得る。ある実施形態において、発酵に利用可能な発酵装置の体積は、少なくとも約10%だけ増加される。

【0144】

例えば、分配係数の安定化があり得る。発酵装置中のトウモロコシ油が、発酵の前に原料スラリーから固体を除去することによって減少され得るため、抽出剤は、より少ないトウモロコシ油に曝される。トウモロコシ油は、抽出剤と組み合わせられて、十分な量で存在する場合に分配係数を低下させ得る。したがって、発酵装置に導入されるトウモロコシ油の減少により、発酵装置における抽出剤相の分配係数がより安定する。ある実施形態において、分配係数は、10回の発酵サイクルにわたって約10%未満だけ減少される。

20

【0145】

例えば、発酵プロセスから抽出剤への生成物アルコールのより高い物質移動速度（例えば、より高い物質移動係数の形態における）があり、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られるため、抽出剤によるブタノールの抽出効率の向上があり得る。ある実施形態において、物質移動係数は、少なくとも2倍増加される（実施例4および5を参照）。

【0146】

さらに、発酵プロセスと抽出剤との間の相分離の向上があり得、これは、放出物の形成の可能性を減少させ、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られる。例えば、相分離は、より速く行うことができ、またはより完全であり得る。ある実施形態において、感知できる相分離が24時間予め観察されなかった場合に相分離が行われ得る。ある実施形態において、相分離は、固体が除去されなかった場合の相分離と比較して、少なくとも約2倍速く、少なくとも約5倍速く、または少なくとも約10倍速く行われる（実施例6および7を参照）。

30

【0147】

さらに、抽出剤の回収および再利用の増加があり得る。抽出剤は、DDGSとして最終的に除去され得る固体中に「捕捉」されず、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られる（実施例8および9を参照）。また、トウモロコシ油による抽出剤の希釈が少なくなり、抽出剤の劣化が少なくなり得る（実施例10を参照）。

40

【0148】

また、抽出剤の流量が減少され得るため、運転コストが低下し、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られる。

【0149】

さらにまた、抽出剤の保持が、抽出剤液滴がより高い速度で上昇する結果として減少され、それによって、生成物アルコール生成の向上した効率が得られる。発酵装置中の非溶解固体の量の減少は、生成物アルコール生成の向上した効率ももたらす。

【0150】

50

さらに、非溶解固体を懸濁させる必要がもはやないため、攪拌器を、発酵装置から除去することができ、それによって、資本コストおよびエネルギーを減少させ、生成物アルコール生成の効率を高める。

【0151】

ある実施形態において、発酵ブロス40が、発酵装置30の出口から排出され得る。発酵ブロス40とともに発酵装置30を出る非溶解固体がないかまたは最小限であることには、いくつかのさらなる利点がある。例えば、ビール塔または蒸留塔などの、例えば、下流の処理におけるユニットおよび作業の必要性をなくし、それによって、生成物アルコール生成の効率を高めることができる。さらに、非溶解固体が、発酵装置30を出る発酵ブロス40中に存在しないため、「捕捉される」抽出剤とともに形成されるDDGSがない。また、発酵装置を出る最終的なブロス中の非溶解固体がより少ないことの結果として、全蒸留廃液の遠心分離機の一部または全てを省略することができる。

【0152】

上述したように、本発明の方法は、ブタノールなどの生成物アルコールの向上した生産性（例えば、バッチまたは連続）をもたらし得るいくつかの利点を提供する。例えば、物質移動の改善は、より低い水性力価における運転を可能にし、微生物が「より健康」になる。より良好な相分離は、向上した発酵装置体積効率ならびにビール塔、蒸留塔などを通るより少ない反応器含有物の処理の可能性につながり得る。さらに、固体を介した溶媒損失がより少なく、細胞の再利用の可能性がある。本発明の方法は、DDGSの高い品質も提供し得る。

【0153】

さらに、本明細書に記載される方法は、発酵前の油（例えば、トウモロコシ油）の除去を提供し、これにより、発酵への油の制御された添加が可能になり得る。さらに、発酵前の油の除去は、DDGS中に存在する油の量にいくらかの柔軟性をもたせ得る。すなわち、油は、様々な量でDDGSに加えられてもよく、特定の動物種の栄養必要量に応じて様々な脂肪含量を有するDDGSが生成される。

【0154】

組み換え微生物およびブタノール生合成経路

理論によって制約されるのを望むものではないが、本明細書に記載される方法は、任意のアルコール生成微生物、特に、それらの耐性レベルを超える力価でアルコールを生成する組み換え微生物に関連して有用であると考えられる。

【0155】

アルコール生成微生物は、当該技術分野において公知である。例えば、メタン資化性細菌（例えば、メチロサイナス・トリコスポリウム（*Methylosinus trichosporium*））によるメタンの発酵酸化により、メタノールが生成され、メタノール（ C_1 アルキルアルコール）を、カルボン酸およびメタノールとともにカルボン酸をエステル化することが可能な触媒と接触させることにより、カルボン酸のメタノールエステルが形成される。酵母菌株CEN. PK113-7D（CBS 8340、the Centraal Bureau voor Schimmelcultuur; van Dijken, et al., *Enzyme Microb. Technol.* 26:706-714, 2000）により、エタノールが生成され得、エタノールを、カルボン酸およびエタノールとともにカルボン酸をエステル化することが可能な触媒と接触させることにより、エチルエステルが形成される（例えば、実施例36を参照）。

【0156】

アルコールを生成する組み換え微生物も、当該技術分野において公知である（例えば、Ohta, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 57:893-900, 1991; Underwood, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1071-1081, 2002; Shen and Liao, *Metab. Eng.* 10:312-320, 2008; Hahnai, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7814-7818, 2007）。

007；米国特許第5,514,583号明細書；米国特許第5,712,133号明細書；PCT出願公開番号国際公開第1995/028476号パンフレット；Feldmann, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 354-361, 1992；Zhang, et al., Science 267: 240-243, 1995；米国特許出願公開第2007/0031918A1号明細書；米国特許第7,223,575号明細書；米国特許第7,741,119号明細書；米国特許第7,851,188号明細書；米国特許出願公開第2009/0203099A1号明細書；米国特許出願公開第2009/0246846A1号明細書；およびPCT出願公開番号国際公開第2010/075241号パンフレット、これらは全て参照により本明細書に援用される）。

10

【0157】

ブタノールを生成することが可能な好適な組み換え微生物は、当該技術分野において公知であり、ブタノールを生成することが可能な特定の好適な微生物が本明細書に記載される。生合成経路を介してブタノールを生成する組み換え微生物としては、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ザイモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、エルウイニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルスロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロマイセス属 (*Schizosaccharomyces*)、クルイベロマイセス属 (*Kluyveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、ピヒア属 (*Pichia*)、カンジダ属 (*Candida*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサタケンキア属 (*Issatchenkia*)、またはサッカロマイセス属 (*Saccharomyces*) のメンバーが挙げられる。一実施形態において、組み換え微生物は、大腸菌 (*Escherichia coli*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、クルイベロマイセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、クルイベロマイセス・マルシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*) およびサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からなる群から選択され得る。一実施形態において、組み換え微生物は酵母である。一実施形態において、組み換え微生物は、サッカロマイセス属 (*Saccharomyces*)、ジゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces*)、シゾサッカロマイセス属 (*Schizosaccharomyces*)、デッケラ属 (*Dekkera*)、トルロプシス属 (*Torulopsis*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、およびカンジダ属 (*Candida*) のいくつかの種から選択されるクラブトリ陽性酵母である。クラブトリ陽性酵母種としては、以下に限定はされないが、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、シゾサッカロマイセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、サッカロマイセス・バイアヌス (*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・ミカタエ (*Saccharomyces mikatae*)、サッカロマイセス・パラドキシス (*Saccharomyces paradoxus*)、ジゴサッカロマイセス・ルーキシ (*Zygosaccharomyces rouxii*)、およびカンジダ・グラブラタ (*Candida glabrata*) が挙げられる。

20

30

40

【0158】

50

ある実施形態において、宿主細胞は、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である。*S. セレビシエ* (*S. cerevisiae*) 酵母が、当該技術分野において公知であり、米国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) (Rockville, MD)、Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre、LeSaffre、Gert Strand AB、Ferm Solutions、North American Bioproducts、Martrex、および Lallemand を含むがこれらに限定されない様々な供給元から入手可能である。*S. セレビシエ* (*S. cerevisiae*) としては、以下に限定はされないが、BY4741、CEN. PK 113-7D、Ethanol Red (登録商標) 酵母、Ferm Pro (商標) 酵母、Bio-Ferm (登録商標) XR 酵母、Gert Strand Prestige Batch Turbo アルコール酵母、Gert Strand Pot Distillers 酵母、Gert Strand Distillers Turbo 酵母、FerMax (商標) Green 酵母、FerMax (商標) Gold 酵母、Thermosacc (登録商標) 酵母、BG-1、PE-2、CAT-1、CBS7959、CBS7960、および CBS7961 が挙げられる。

【0159】

微生物による発酵を用いたブタノールの生成、ならびにブタノールを生成する微生物は、例えば、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第 2009/030537 0 号明細書に開示されている。ある実施形態において、微生物は、ブタノール生合成経路を含む。ある実施形態において、経路の基質→生成物転化を触媒する少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つのポリペプチドが、微生物中の異種のポリヌクレオチドによってコードされる。ある実施形態において、経路の基質→生成物転化を触媒する全てのポリペプチドが、微生物中の異種のポリヌクレオチドによってコードされる。ある実施形態において、微生物は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性の減少または消失を含む。ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を実質的に含まない微生物が、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第 2009/0305363 号明細書に記載されている。GPD2 などの NAD 依存性グリセロール→3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素を実質的に含まない微生物も、この文献に記載されている。

【0160】

ブタノールの生成に適した生合成経路は、当該技術分野において公知であり、特定の好適な経路が本明細書に記載される。ある実施形態において、ブタノール生合成経路は、宿主細胞に対して異種の少なくとも 1 つの遺伝子を含む。ある実施形態において、ブタノール生合成経路は、宿主細胞に対して異種の 2 つ以上の遺伝子を含む。ある実施形態において、ブタノール生合成経路は、生合成経路のあらゆる工程に対応するポリペプチドをコードする異種遺伝子を含む。

【0161】

指定の基質→生成物転化を触媒する能力を有する特定の好適なタンパク質が本明細書に記載され、他の好適なタンパク質が、当該技術分野において提供される。例えば、参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第 2008/0261230 号明細書、同第 2009/0163376 号明細書、および同第 2010/0197519 号明細書は、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼを記載しており；参照により援用される米国特許出願公開第 2010/0081154 号明細書は、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼを記載しており；アルコールデヒドロゲナーゼが、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第 2009/0269823 号明細書に記載されている。

【0162】

多くのレベルの配列同一性が、他の種からポリペプチドを同定するのに有用であり、このようなポリペプチドが、同じかまたは同様の機能または活性を有し、本明細書に記載される組み換え微生物に使用するのに適していることが、当業者によってよく理解される。

パーセント同一性の有用な例としては、以下に限定はされないが、75%、80%、85%、90%、または95%が挙げられ、あるいは75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%などの、75%～100%の任意の整数パーセンテージが、本発明を説明する際に有用であり得る。

【0163】

好適な株としては、本明細書に引用され、参照により本明細書に援用される特定の出願ならびに2010年9月7日に出版された米国仮特許出願第61/380,563号明細書に記載されるものが挙げられる。実施例に使用されるものを含む特定の好適な株の構造が、本明細書に提供される。

10

【0164】

サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 株BP1083 (「NGCI-070」; PNY1504) の作成

株BP1064は、CEN. PK 113-7D (CBS 8340; Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, Netherlands) から得られ、以下の遺伝子の欠失を含む: URA3、HIS3、PDC1、PDC5、PDC6、およびGPD2。BP1064を、プラスミドpYZ090 (配列番号1、米国仮特許出願第61/246,844号明細書に記載される) およびpLH468 (配列番号2) で形質転換して、株NGCI-070 (BP1083、PNY1504) を生成した。

20

【0165】

標的遺伝子および形質転換体の選択のためのG418耐性マーカーまたはURA3遺伝子のいずれかの上流および下流の相同領域を含むPCR断片による相同的組み換えによって、全コード配列を完全に除去した欠失を作り出した。loxP部位が側面にあるG418耐性マーカーを、Creリコンビナーゼを用いて除去した。URA3遺伝子を相同的組み換えによって除去して、無瘢痕 (scarless) 欠失を作り出し、またはloxP部位が側面にある場合、Creリコンビナーゼを用いて除去した。

【0166】

無瘢痕欠失の手順を、Akada, et al., (Yeast 23:399-405, 2006) から適応させた。一般に、各無瘢痕欠失のためのPCRカセットを、PCRを重複させることによって、4つの断片、A-B-U-Cを組み合わせてることによって作製した。PCRカセットは、プロモーター (URA3遺伝子の上流の250bp) およびターミネーター (URA3遺伝子の下流の150bp) とともに、天然CEN. PK 113-7D URA3遺伝子からなる、選択可能な/対抗選択可能な (counter-selectable) マーカー、URA3 (断片U) を含有していた。それぞれ長さ500bpの断片AおよびCは、標的遺伝子のすぐ上流の500bp (断片A) および標的遺伝子の3'500bp (断片C) に対応していた。断片AおよびCを、相同的組み換えによる、染色体へのカセットの組み込みに使用した。断片Bに対応する配列の直接の繰り返しは、染色体へのカセットの組み込みの際に生成された際、断片B (長さ500bp) は、標的遺伝子のすぐ下流の500bpに対応し、それを、相同的組み換えによる、染色体からのURA3マーカーおよび断片Cの切除に使用した。PCR産物ABUCカセットを用いて、URA3マーカーを、相同的組み換えによって、まず染色体に組み込み、次に染色体から切除した。最初の組み込みにより、3'500bpを除いて、遺伝子を欠失させた。切除の際、遺伝子の3'500bp領域も欠失させた。この方法を用いた遺伝子の組み込みでは、組み込まれる遺伝子が、断片AとBとの間のPCRカセットに含まれていた。

30

40

【0167】

URA3の欠失

内因性URA3コード領域を欠失させるために、ura3::loxP-kanMX-

50

loxPカセットを、pLA54 鋳型DNA（配列番号3）からPCRで増幅した。pLA54は、K. ラクチス（K. lactis）TEF1プロモーターおよびkanMXマーカ含有し、Creリコンビナーゼによる組み換えおよびマーカの除去を可能にするloxP部位が側面にある。Phusion（登録商標）DNAポリメラーゼ（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA）ならびにプライマーBK505およびBK506（配列番号4および5）を用いて、PCRを行った。loxP-kanMX-loxPマーカの組み込みが、URA3コード領域の置換をもたらすように、各プライマーのURA3部分を、URA3プロモーターの上流の5'領域およびコード領域の下流の3'領域から得た。標準的な遺伝子組み換え技術（Method in Yeast Genetics, 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 201-202）を用いて、PCR産物をCEN. PK 113-7Dへと形質転換し、30℃でG418（100 μg/mL）を含有するYPDにおいて形質転換体を選択した。プライマーLA468およびLA492（配列番号6および7）ならびに指定されるCEN. PK 113-7D Δura3::kanMXを用いたPCRによって、形質転換体をスクリーニングして、正確な組み込みを確認した。

【0168】

HIS3の欠失

無痕HIS3欠失のためのPCRカセットの4つの断片を、Phusion（登録商標）High Fidelity PCR Master Mix（New England Biolabs Inc., Ipswich, MA）およびGentra（登録商標）Puregene（登録商標）Yeast/Bact、キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて調製された、鋳型としてのCEN. PK 113-7DゲノムDNAを用いて増幅した。HIS3断片Aを、HIS3断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP452（配列番号14）およびプライマーoBP453（配列番号15）を用いて増幅した。HIS3断片Bを、HIS3断片Aの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP454（配列番号16）、およびHIS3断片Uの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP455（配列番号17）を用いて増幅した。HIS3断片Uを、HIS3断片Bの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP456（配列番号18）、およびHIS3断片Cの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP457（配列番号19）を用いて増幅した。HIS3断片Cを、HIS3断片Uの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP458（配列番号20）、およびプライマーoBP459（配列番号21）を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて精製した。HIS3断片AおよびHIS3断片Bを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP452（配列番号14）およびoBP455（配列番号17）を用いて増幅することによって、HIS3断片ABを生成した。HIS3断片UおよびHIS3断片Cを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP456（配列番号18）およびoBP459（配列番号21）を用いて増幅することによって、HIS3断片UCを生成した。得られたPCR産物を、アガロースゲル、続いてGel Extractionキット（Qiagen, Valencia, CA）において精製した。HIS3断片ABおよびHIS3断片UCを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP452（配列番号14）およびoBP459（配列番号21）を用いて増幅することによって、HIS3 ABUCカセットを生成した。PCR産物を、PCR Purificationキット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて精製した。

【0169】

CEN. PK 113-7D Δura3::kanMXのコンピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II（商標）キッ

10

20

30

40

50

ト (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) を用いて HIS3 ABUC PCR カセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養 (plate) した。Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマー oBP460 (配列番号22) および oBP461 (配列番号23) によるPCRによって、his3ノックアウトを有する形質転換体をスクリーニングした。正確な形質転換体を、株 CEN. PK 113-7D Δura3::kanMX Δhis3::URA3 として選択した。

【0170】

Δura3 部位からの KanMX マーカー除去および Δhis3 部位からの URA3 マーカー除去

Frozen-EZ Yeast Transformation II (商標) キット (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) を用いて、pRS423::PGAL1-cre (配列番号66、米国仮特許出願第61/290,639号明細書に記載される) で CEN. PK 113-7D Δura3::kanMX Δhis3::URA3 を形質転換し、30℃で2%のグルコースが補充されたヒスチジンおよびウラシル欠損合成完全培地において平板培養することによって、KanMX マーカーを除去した。形質転換体を、30℃で約6時間にわたって1%のガラクトースが補充されたYP中で増殖させて、CreリコンビナーゼおよびKanMXマーカー切除を誘発し、回収のために30℃でYPD (2%のグルコース) プレートに平板培養した。分離株を、YPD中で一晩増殖させ、30℃で5-フルオローオロチン酸 (5-FOA, 0.1%) を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3 マーカーを喪失した分離株を選択した。5-FOA 耐性分離株を、pRS423::PGAL1-cre プラスミドを除去するために、YPDにおいて増殖させ、平板培養した。YPD+G418 プレート、ウラシル欠損合成完全培地のプレート、およびヒスチジン欠損合成完全培地のプレートにおける増殖をアッセイすることによって、KanMX マーカー、URA3 マーカー、および pRS423::PGAL1-cre プラスミドの損失について分離株を調べた。G418 に対して感受性であり、かつウラシルおよびヒスチジンに対して栄養要求性であった正確な分離株を、株 CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 として選択し、BP857 として表した。Gentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、Δura3 についてはプライマー oBP450 (配列番号24) および oBP451 (配列番号25)、および Δhis3 についてはプライマー oBP460 (配列番号22) および oBP461 (配列番号23) によるPCRおよび配列決定によって、欠失およびマーカー除去を確認した。

【0171】

PDC6 の欠失

無瘢痕 PDC6 欠失のためのPCRカセットの4つの断片を、Phusion (登録商標) High Fidelity PCR Master Mix (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA) およびGentra (登録商標) Puregene (登録商標) Yeast/Bact. キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製された、鋳型としての CEN. PK 113-7D ゲノムDNAを用いて増幅した。PDC6断片Aを、PDC6断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP440 (配列番号26) およびプライマー oBP441 (配列番号27) を用いて増幅した。PDC6断片Bを、PDC6断片Aの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP442 (配列番号28)、およびPDC6断片Uの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP443 (配列番号29) を用いて増幅した。PDC6断片Uを、PDC6断片Bの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマー oBP444 (配列

番号30)、およびPDC6断片Cの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP445(配列番号31)を用いて増幅した。PDC6断片Cを、PDC6断片U3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP446(配列番号32)、およびプライマーoBP447(配列番号33)を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて精製した。PDC6断片AおよびPDC6断片Bを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP440(配列番号26)およびoBP443(配列番号29)を用いて増幅することによって、PDC6断片ABを生成した。PDC6断片UおよびPDC6断片Cを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP444(配列番号30)およびoBP447(配列番号33)を用いて増幅することによって、PDC6断片UCを生成した。得られたPCR産物を、アガロースゲル、続いてGel Extractionキット(Qiagen, Valencia, CA)において精製した。PDC6断片ABおよびPDC6断片UCを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP440(配列番号26)およびoBP447(配列番号33)を用いて増幅することによって、PDC6 ABUCカセットを生成した。PCR産物を、PCR Purificationキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて精製した。

10

【0172】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3のコンピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II(商標)キット(Zymo Research Corporation, Irvine, CA)を用いてPDC6 ABUC PCRカセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養した。pdc6ノックアウトを有する形質転換体を、Gentra(登録商標)Puregene(登録商標)Yeast/Bact.キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP448(配列番号34)およびBP449(配列番号35)によるPCRによってスクリーニングした。正確な形質転換体を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6::URA3として選択した。

20

【0173】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6::URA3を、YPD中で一晚増殖させ、30℃で5-フルオロオロチン酸(0.1%)を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3マーカーを喪失した分離株を選択した。Gentra(登録商標)Puregene(登録商標)Yeast/Bact.キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP448(配列番号34)およびoBP449(配列番号35)によるPCRおよび配列決定によって、欠失およびマーカー除去を確認した。PDC6、oBP554(配列番号36)およびoBP555(配列番号37)のコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性PCR結果によって、分離株からのPDC6遺伝子がないことを実証した。正確な分離株を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6として選択し、BP891として表した。

30

40

【0174】

PDC1欠失ilvDSm組み込み

PDC1遺伝子を欠失させ、ミュータンス連鎖球菌(*Streptococcus mutans*) ATCC No. 700610に由来するilvDコード領域で置換した。A断片、続いて、PDC1欠失-ilvDSm組み込みのためのPCRカセットのミュータンス連鎖球菌(*Streptococcus mutans*)に由来するilvDコード領域を、Phusion(登録商標)High Fidelity PCR Master Mix(New England BioLabs Inc., Ipswich, MA)およびGentra(登録商標)Puregene(登録商標)Yeast/Ba

50

ct. kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製された、鋳型としての NYLA83 ゲノム DNA を用いて増幅した。NYLA83 は、米国特許出願公開第 2009/0305363 号明細書（全体が参照により本明細書に援用される）に記載される PDC1 欠失-ilvDSm 組み込みを有する株（全体が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第 20110124060 号明細書に記載される作成）である。PDC1 断片 A-ilvDSm（配列番号 69）を、PDC1 断片 B の 5' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP513（配列番号 38）およびプライマー oBP515（配列番号 39）を用いて増殖した。PDC1 欠失-ilvDSm 組み込みのための PCR カセットの B、U、および C 断片を、Phusion（登録商標）High Fidelity PCR Master Mix（New England BioLabs Inc., Ipswich, MA）および Gentra（登録商標）Puregene（登録商標）Yeast/Bact. キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて調製された、鋳型としての CEN. PK 113-7D ゲノム DNA を用いて増幅した。PDC1 断片 B を、PDC1 断片 A-ilvDSm の 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP516（配列番号 40）、および PDC1 断片 U の 5' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP517（配列番号 41）を用いて増幅した。PDC1 断片 U を、PDC1 断片 B の 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP518（配列番号 42）、および PDC1 断片 C の 5' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP519（配列番号 43）を用いて増幅した。PDC1 断片 C を、PDC1 断片 U の 3' 末端に対して相同性を有する 5' テールを含むプライマー oBP520（配列番号 44）、およびプライマー oBP521（配列番号 45）を用いて増幅した。PCR 産物を、PCR Purification キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて精製した。PDC1 断片 A-ilvDSm および PDC1 断片 B を混合することによって PCR を重複させ、プライマー oBP513（配列番号 38）および oBP517（配列番号 41）を用いて増幅することによって、PDC1 断片 A-ilvDSm-B を生成した。PDC1 断片 U および PDC1 断片 C を混合することによって PCR を重複させ、プライマー oBP518（配列番号 42）および oBP521（配列番号 45）を用いて増幅することによって、PDC1 断片 UC を生成した。得られた PCR 産物を、アガロースゲル、続いて、Gel Extraction キット（Qiagen, Valencia, CA）において精製した。PDC1 断片 A-ilvDSm-B および PDC1 断片 UC を混合することによって PCR を重複させ、プライマー oBP513（配列番号 38）および oBP521（配列番号 45）を用いて増幅することによって、PDC1 A-ilvDSm-BUC カセット（配列番号 70）を生成した。PCR 産物を、PCR Purification キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて精製した。

【0175】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 のコンピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II（商標）キット（Zymo Research Corporation, Irvine, CA）を用いて PDC1 A-ilvDSm-BUC PCR カセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で2%のグルコースが補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養した。pdc1 ノックアウト ilvDSm 組み込みを有する形質転換体を、Gentra（登録商標）Puregene（登録商標）Yeast/Bact. キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて調製されたゲノム DNA を用いて、プライマー oBP511（配列番号 46）および oBP512（配列番号 47）による PCR によってスクリーニングした。PDC1、oBP550（配列番号 48）および oBP551（配列番号 49）のコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性 PCR 結果によって、分離株からの PDC1 遺伝子がないことを実証した。正確な形質転換体を、株 CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δp

10

20

30

40

50

d c 6 Δ p d c 1 : : i l v D S m - U R A 3として選択した。

【0176】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm-URA3を、YPD中で一晚増殖させ、30℃で5-フルオロオロチン酸(0.1%)を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3マーカーを喪失した分離株を選択した。PDC1の欠失、ilvDSmの組み込み、およびマーカー除去を、Gentra(登録商標)Puregene(登録商標)Yeast/Bact.キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP511(配列番号46)およびoBP512(配列番号47)によるPCRおよび配列決定によって確認した。正確な分離株を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSmとして選択し、BP907として表した。

10

【0177】

PDC5欠失sadB組み込み

PDC5遺伝子を欠失させ、アクロモバクター・キシロソキシダンス(Achromobacter xylosoxidans)に由来するsadBコード領域で置換した。PDC5欠失-sadB組み込みのためのPCRカセットのセグメントを、まずプラスミドpUC19-URA3MCSにクローニングした。

【0178】

pUC19-URA3MCSは、pUC19をベースとしており、多重クローニング部位(MCS)に位置するサッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)に由来するURA3遺伝子の配列を含む。pUC19は、pMB1レプリコンおよび大腸菌(Escherichia coli)における複製および選択のためのβ-ラクタマーゼをコードする遺伝子を含む。URA3のためのコード配列に加えて、この遺伝子の上流および下流の配列が、酵母におけるURA3遺伝子の発現のために含まれていた。ベクターを、クローニングプロセスに使用することができ、酵母組み込みベクターとして使用することができる。

20

【0179】

サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) CEN. PK 113-7DゲノムDNAに由来するURA3コード領域の上流の250bpおよび下流の150bpとともにURA3コード領域を含むDNAを、Phusion(登録商標)High Fidelity PCR Master Mix(New England BioLabs Inc., Ipswich, MA)を用いて、BamHI、AscI、PmeI、およびFseI制限部位を含有するプライマーoBP438(配列番号12)、およびXbaI、PacI、およびNotI制限部位を含有するoBP439(配列番号13)を用いて増幅した。ゲノムDNAを、Gentra(登録商標)Puregene(登録商標)Yeast/Bact.キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて調製した。PCR産物およびpUC19(配列番号71)を、BamHIおよびXbaIによる消化の後、T4 DNAリガーゼを用いてライゲートして、ベクターpUC19-URA3MCSを生成した。プライマーoBP264(配列番号10)およびoBP265(配列番号11)によるPCRおよび配列決定によって、ベクターを確認した。

30

40

【0180】

sadBおよびPDC5断片Bのコード配列を、pUC19-URA3MCSにクローニングして、PDC5 A-sadB-BUC PCRカセットのsadB-BU部分を生成した。AscI制限部位を含有するプライマーoBP530(配列番号50)、およびPDC5断片Bの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP531(配列番号51)とともに、鋳型としてpLH468-sadB(配列番号67)を用いて、sadBのコード配列を増幅した。PDC5断片Bを、sadBの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP532(配列番号52)、およ

50

びPme I制限部位を含有するプライマーoBP533（配列番号53）を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて精製した。sadBおよびPDC5断片B PCR産物を混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP530（配列番号50）およびoBP533（配列番号53）を用いて増幅することによって、sadB-PDC5断片Bを生成した。得られたPCR産物を、Asc IおよびPme Iによって消化させ、適切な酵素による消化の後、T4 DNAリガーゼを用いてpUC19-URA3 MCSの対応する部位にライゲートした。得られたプラスミドを、PDC5断片Cの5'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP536（配列番号54）およびoBP546（配列番号55）を用いて、sadB-断片B-断片Uの増幅のための鋳型として使用した。PDC5断片Cを、PDC5 sadB-断片B-断片Uの3'末端に対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP547（配列番号56）、およびプライマーoBP539（配列番号57）を用いて増幅した。PCR産物を、PCR Purificationキット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて精製した。PDC5 sadB-断片B-断片UおよびPDC5断片Cを混合することによってPCRを重複させ、プライマーoBP536（配列番号54）およびoBP539（配列番号57）を用いて増幅することによって、PDC5 sadB-断片B-断片U-断片Cを生成した。得られたPCR産物を、アガロースゲル、続いて、Gel Extractionキット（Qiagen, Valencia, CA）において精製した。天然のPDC5コード配列のすぐ上流の50ヌクレオチドに対して相同性を有する5'テールを含むプライマーoBP542（配列番号58）、およびoBP539（配列番号57）を用いてPDC5 sadB-断片B-断片U-断片Cを増幅することによって、PDC5 A-sadB-BUCカセット（配列番号72）を生成した。PCR産物を、PCR Purificationキット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて精製した。

【0181】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSmのコンピテント細胞を作製し、Frozen-EZ Yeast Transformation II（商標）キット（Zymo Research Corporation, Irvine, CA）を用いてPDC5 A-sadB-BUC PCRカセットで形質転換した。形質転換混合物を、30℃で1%のエタノール（グルコースではない）が補充されたウラシル欠損合成完全培地において平板培養した。pdc5ノックアウトsadB組み込みを有する形質転換体を、Gentra（登録商標）Puregene（登録商標）Yeast/Bact. キット（Qiagen, Valencia, CA）によって調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP540（配列番号59）およびoBP541（配列番号60）によるPCRによってスクリーニングした。PDC5、oBP552（配列番号61）およびoBP553（配列番号62）のコード配列に特異的なプライマーを用いた陰性PCR結果によって、分離株からのPDC5遺伝子がないことを実証した。正確な形質転換体を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB-URA3として選択した。

【0182】

CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB-URA3を、YPE（1%のエタノール）中で一晩増殖させ、エタノール（グルコースではない）が補充され、かつ30℃で5-フルオロオロチン酸（0.1%）を含有する合成完全培地において平板培養して、URA3マーカーを喪失した分離株を選択した。PDC5の欠失、sadBの組み込み、およびマーカー除去を、Gentra（登録商標）Puregene（登録商標）Yeast/Bact. キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて調製されたゲノムDNAを用いて、プライマーoBP540（配列番号59）およびoBP541

(配列番号60)によるPCRによって確認した。正確な分離株を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadBとして選択し、BP913として表した。

【0183】

GPD2の欠失

内因性GPD2コード領域を欠失させるために、gpd2::loxP-URA3-loxPカセット(配列番号73)を、鋳型DNAとしてloxP-URA3-loxP(配列番号68)を用いて、PCRで増幅した。loxP-URA3-loxPは、loxPリコンビナーゼ部位が側面にある(ATCC No. 77107)に由来するURA3マーカ含有する。Phusion(登録商標)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs Inc., Ipswich, MA)ならびにプライマーLA512およびLA513(配列番号8および9)を用いて、PCRを行った。loxP-URA3-loxPマーカの組み込みが、GPD2コード領域の置換をもたらすように、各プライマーのGPD2部分を、GPD2コード領域の上流の5'領域およびコード領域の下流の3'領域から得た。PCR産物をBP913に形質転換し、形質転換体を、1%のエタノール(グルコースではない)が補充されたウラシル欠損合成完全培地において選択した。プライマーoBP582およびAA270(配列番号63および64)を用いたPCRによって、形質転換体をスクリーニングして、正確な組み込みを確認した。

【0184】

pRS423::PGAL1-cre(配列番号66)を用いた形質転換、および30℃で1%のエタノールが補充されたヒスチジン欠損合成完全培地における平板培養によって、URA3マーカを再利用した。形質転換体を、1%のエタノールが補充され、かつ5-フルオロオロチン酸(0.1%)を含有する合成完全培地においてストリークし(streak)、30℃で培養して、URA3マーカを喪失した分離株を選択した。5-FOA耐性分離株を、pRS423::PGAL1-creプラスミドの除去のためにYPE(1%のエタノール)中で増殖させた。欠失およびマーカ除去を、プライマーoBP582(配列番号63)およびoBP591(配列番号65)によるPCRによって確認した。正確な分離株を、株CEN. PK 113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB Δgpd2::loxPとして選択し、PNY1503(BP1064)として表した。

【0185】

BP1064を、プラスミドpYZ090(配列番号1)およびpLH468(配列番号2)で形質転換して、株NGCI-070(BP1083; PNY1504)を生成した。

【0186】

さらに、本発明の様々な実施形態を上記説明してきたが、それらは例として示されたに過ぎず、限定するものではないことを理解されたい。本発明の趣旨および範囲から逸脱せずに本発明の形態および細部の様々な変更を行うことができることが、関連技術の当業者に明らかであろう。したがって、本発明の広さおよび範囲は、上述した例示的实施形態のいずれによって限定されるものでもなく、以下の特許請求の範囲およびそれらの均等物のみにしたがって規定されるものである。

【0187】

本明細書に記載される全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明が関する技術分野の当業者の技能のレベルを示し、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が参照により援用されることが具体的にかつ個々に示されているのと同程度に、参照により本明細書に援用される。

【実施例】

【0188】

以下の非限定的な実施例は、本発明をさらに例示する。以下の実施例が原料としてトウモロコシを含む一方、本発明から逸脱せずに、他のバイオマス源が原料に使用され得るこ

10

20

30

40

50

とを理解されたい。

【0189】

本明細書において使用される際、使用される略語の意味は以下のとおりであった：「g」はグラムを意味し、「kg」はキログラムを意味し、「L」はリットルを意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「μL」はマイクロリットルを意味し、「mL/L」はミリリットル／リットルを意味し、「mL/分」はミリリットル／分を意味し、「DI」は脱イオン化されていることを意味し、「uM」はマイクロメートルを意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「w/v」は重量／体積を意味し、「OD」は光学密度を意味し、「OD₆₀₀」は600nmの波長における光学密度を意味し、「dcw」は乾燥菌体重量を意味し、「rpm」は毎分回転数を意味し、「℃」は摂氏温度を意味し、「℃/分」は摂氏温度／分を意味し、「slpm」は標準リットル／分を意味し、「ppm」は百万分率を意味し、「pdc」はピルビン酸デカルボキシラーゼ酵素を意味し、後ろに酵素番号が付く。

10

【0190】

実施例 1

トウモロコシマッシュの調製

約100kgの液化されたトウモロコシマッシュを、30Lのガラスの被覆された樹脂ケトルを用いて、3つの等しいバッチで調製した。ケトルは、機械的攪拌、温度制御、およびpH制御を備えていた。全ての3つのバッチに使用されるプロトコルは以下のとおりであった：(a) 磨砕トウモロコシを水道水と混合し（乾燥量基準で30重量%のトウモロコシ）、(b) スラリーを、攪拌しながら55℃まで加熱し、(c) スラリーのpHを、NaOHまたはH₂SO₄のいずれかをを用いて5.8に調整し、(d) α-アミラーゼ（乾燥トウモロコシ基準で0.02重量%）を加え、(e) スラリーを85℃まで加熱し、(f) pHを5.8に調整し、(g) スラリーを、pHを5.8に保ちながら85℃で2時間保持し、(h) スラリーを25℃に冷却した。

20

【0191】

使用されるトウモロコシは、Pioneer製の全粒イエローコーン（3335）であった。トウモロコシを、1mmのふるいを用いて、ハンマーミルで磨砕した。磨砕トウモロコシの水分含量は12重量%であり、磨砕トウモロコシのでんぷん含量は、乾燥トウモロコシ基準で71.4重量%であった。α-アミラーゼ酵素は、Novozymes（Franklinton, NC）から入手可能なLiquozyme（登録商標）SCDSであった。全ての3つのバッチを合わせて使用される成分の総量は：33.9kgの磨砕トウモロコシ（12%の水分）、65.4kgの水道水、および0.006kgのLiquozyme（登録商標）SCDSであった。合計で0.297kgのNaOH（17重量%）を、pHを制御するために加えた。H₂SO₄は不要であった。3つの30Lのバッチから回収された、液化されたトウモロコシマッシュの総量は99.4kgであった。

30

【0192】

実施例 2

固体除去

6つの1Lのボトルを含む大容量（large floor）遠心分離機における遠心分離によって、実施例1で生成されたマッシュから固体を除去した。73.4kgのマッシュを、25℃で20分間、8000rpmで遠心分離したところ、44.4kgの遠心分離液および26.9kgのウェットケーキが得られた。遠心分離液が1重量%未満の懸濁固体を含有し、ウェットケーキが約18重量%の懸濁固体を含有していたことが分かった。これは、元の液化されたマッシュが、約7重量%の懸濁固体を含有していたことを示唆している。これは、でんぷんの大部分が液化されたと仮定した場合、トウモロコシ充填量および使用されるトウモロコシのでんぷん含量と一致する。でんぷんの全てが液化された場合、遠心分離機から直接回収される44.4kgの遠心分離液は、約23重量%の溶解されたオリゴ糖（液化でんぷん）を含有していたであろう。約0.6kgのi-BuO

40

50

Hを35.4kgの遠心分離液に加えて、それを保存した。1.6重量%のi-BuOHを含有する得られた36.0kgの遠心分離液を、原液として使用した。

【0193】

実施例3

物質移動の速度に対する非溶解固体の影響

SSFバッチ用の液相の平均的な組成を模倣するために、SSF（同時糖化発酵）発酵のほぼ中間段階（すなわち、オリゴ糖の約50%の転化率）の、トウモロコシマッシュから得られる発酵ブロスの組成をシミュレートする水相からのi-BuOHの物質移動の速度に対する非溶解固体の影響を測定するために以下の実験を行った。実施例2からの遠心分離液は、SSFの開始時の液相の組成を模倣している。したがって、その一部を、質量基準で等量のH₂Oで希釈して、約50%の転化率におけるSSFを模倣する遠心分離液を生成した。さらなるi-BuOHを加えて、希釈された遠心分離液中のi-BuOHの最終濃度を3.0重量%（約30g/L）にした。

【0194】

希釈された遠心分離液を以下のように調製した：1.6重量%のi-BuOHを含有する実施例2からの18kgの遠心分離液原液を、18kgの水道水と混合し、0.82kgのi-BuOHを加えた。希釈された遠心分離液の得られた36.8kgの溶液は、約11重量%のオリゴ糖および約30g/Lのi-BuOHからなっていた。この溶液は、オリゴ糖の約50%の転化率におけるトウモロコシマッシュ発酵（SSF）の液相および30g/Lのi-BuOHの水性力価を模倣している。

【0195】

実施例4

物質移動に対する非溶解固体の除去の影響

非溶解固体の大部分が除去された後、液化されたトウモロコシマッシュから得られるブロスにおける物質移動性能を模倣する水相として、実施例3において得られた溶液を用いて、物質移動試験を行った。物質移動試験の目的は、液化されたトウモロコシマッシュから得られる、シミュレートされるブロスから、シミュレートされるブロスを通して上昇する溶媒（抽出剤）液滴の分散体へのi-BuOHの移動の全体積物質移動係数（ $k_L a$ ）に対する非溶解固体の影響を測定することであった。運転パラメータの主な設計との $k_L a$ の相関は、物質移動運転の規模を拡大するのに使用され得る。規模を拡大するのに有用な、より小さい規模のデータからの $k_L a$ の相関を生成するためにできる限り一定に保持されるべきパラメータの例は、液滴サイズを決定する相および設計パラメータの両方の物理的特性（例えば、ノズル直径、ノズルを通して分散される相の速度）である。

【0196】

6インチの直径、7フィートの高さのガラスの被覆されたカラムを用いて、懸濁されたマッシュ固体を含むかまたは含まない、（液化されたトウモロコシマッシュから得られる）オリゴ糖の水溶液から、シミュレートされるブロスを通して上昇するオレイルアルコール（OA）液滴の分散体へのi-BuOHの移動の $k_L a$ を測定した。i-BuOHを水相に加えたところ、約30g/Lの、i-BuOHの初期濃度が得られた。約11重量%のオリゴ糖および約30g/Lのi-BuOHを含有する所定の量の水相（通常、約35kg）を、カラムに投入し、ジャケットを通して温かいH₂Oを流すことによってカラムを30℃まで加熱した。試験中、カラムに出入りする水相の流れは存在しなかった。

【0197】

新鮮なオレイルアルコール（Cognis製の80/85%グレード）を、1つのノズルを通してカラムの塔底に散布して、水相を通して上方に流れる抽出剤液滴の分散体を生成した。水相の上部に達した後、抽出剤液滴により別個の有機相が形成され、これはその後、カラムの上部から溢れ、受け器に収集された。通常、1つの試験につき3～5ガロンのOAが、カラムを通して流れた。

【0198】

水相の試料を、試験全体を通して数回カラムから引き抜き、溢流から収集された全「富

10

20

30

40

50

化」OAの複合試料を試験の最後に引き抜いた。全ての試料を、HP-6890 GCを用いてi-BuOHについて分析した。水相中のi-BuOHの濃度プロファイル（すなわち、時間に対するi-BuOH濃度）を用いて、所与の運転条件における $k_L a$ を計算した。試験中に収集される全「富化」OAの最終的な複合試料を用いて、i-BuOHの物質収支を調べた。

【0199】

ノズルサイズおよびノズル速度（供給ノズルを通るOAの平均速度）を様々に変化させて、 $k_L a$ に対するそれらの影響を観察した。マッシュ固体が除去されたオリゴ糖の水溶液（液化されたトウモロコシマッシュから得られる希釈された遠心分離液）を用いて、一連の試験を行った。SSFの途中で液化されたトウモロコシマッシュ（非溶解固体を含む）をシミュレートするためにマッシュ固体を戻し加えた後、オリゴ糖の同じ水溶液を用いて、同様の一連の試験を行った。ある運転条件（例えば、より高いOA流量）下で、カラムの上部において不十分な相分離が得られ、試験中に収集される全「富化」OAの典型的な複合試料を得るのが困難になることが留意される。ある運転条件下で、水相の試料がかなりの量の有機相を含有していたことも留意される。特殊な試料処理および調製技術を用いて、試料が引き抜かれたときにカラム中の水相のできる限り典型的な水相の試料を得た。

10

【0200】

i-BuOHの濃度が所与の時点でカラムの長さに沿ってそれほど変化しなかったため、カラム中の水相があらゆる実用的な目的のために「よく混合された」ことが分かった。溶媒液滴相もよく混合されたと仮定すると、カラム中の水相から溶媒相へのi-BuOHの全物質移動を、以下の式によって概算することができる：

20

【数1】

$$r_B = k_L a \left(C_{B, \text{フロス}} - \frac{C_{B, \text{溶媒}}}{K_B} \right) \quad (1)$$

式中、

r_B = 水相の単位体積当たりの単位時間当たりの水相から溶媒相へと移動されるi-BuOHの全質量（i-BuOHのグラム／水相のリットル／時またはg／L／時）である。

30

$k_L a$ = 水相から溶媒相へのi-BuOHの物質移動を表す全体積物質移動係数（毎時）である。

$C_{B, \text{フロス}}$ = シミュレートされるフロス（水）相中のi-BuOHの平均濃度（i-BuOHのグラム／水相のリットルまたはg／L）である。

$C_{B, \text{溶媒}}$ = 試験全体にわたる溶媒相中のi-BuOHの平均濃度（i-BuOHのグラム／溶媒相のリットルまたはg／L）である。

K_B = 溶媒と水相との間のi-BuOHの平均平衡分配係数（（i-BuOHのグラム／溶媒相のリットル）／（i-BuOHのグラム／水相のリットル））である。

40

【0201】

パラメータ r_B 、 $C_{B, \text{フロス}}$ 、および $C_{B, \text{溶媒}}$ を、水相および溶媒相の試料から得られる濃度データから各試験について計算した。液化されたトウモロコシマッシュからの水性遠心分離液、OA、およびi-BuOHを混合し、2つの液相が平衡状態になるまで系を激しく混合することによって、パラメータ K_B を独立して測定した。i-BuOHの濃度を両方の相において測定して、 K_B を決定した。 r_B 、 $C_{B, \text{フロス}}$ 、 $C_{B, \text{溶媒}}$ 、および K_B を所与の試験について決定した後、式（1）の配列を変更することによって $k_L a$ を計算することができた：

【数 2】

$$k_L a = \frac{r_B}{\left(C_{B, \text{ブロス}} - \frac{C_{B, \text{溶媒}}}{K_B} \right)} \quad (2)$$

【0202】

水相として希釈された遠心分離液（固体を除去したもの）を用いて5フィート／秒～21フィート／秒の範囲のノズル速度で2つの異なるサイズのノズルを用いて、物質移動試験を行った。0.76mmの内径（ID）を有するノズルを用いて3つの試験を行い、2.03mmの内径を有するノズルを用いて3つの試験を行った。溶媒としてOAを用いて上記の6インチの直径のカラム中で30℃で全ての試験を行った。OAと、固体を除去することによって液化されたトウモロコシマッシュから得られた希釈された遠心分離液との間のi-BuOHの平衡分配係数は、約5であった。希釈された遠心分離液（固体を除去したもの）を用いた物質移動試験の結果を表1に示す。

【0203】

【表 1】

表 1

	41	42	43	44	45	46
物質移動試験条件：						
水相 水相の体積 (L)：	36.0	35.0	34.3	32.0	28.0	28.6
溶媒供給速度 (g/分)：	33.2	79.5	145.3	237.7	507.7	875
表面液体速度 (Us)(フィート/時)	0.42	1.01	1.84	3.02	6.45	11.11
ノズル内径 (mm)：	0.76	0.76	0.76	2.03	2.03	2.03
ノズル速度 (フィート/秒)	4.7	11.3	20.6	4.7	10.1	17.4
物質移動結果：						
水相中の初期の [i-B](g/L)：	28.2	27.0	29.1	31.3	38.7	30.1
水相中の最終的な [i-B](g/L)：	25.7	14.8	14.7	24.8	11.5	5.4
収集された富化 OA(kg)：	4.05	7.47	6.03	7.37	12.82	14.0
収集されたOA中の [i-B](重量%)：	2.22	5.72	8.17	2.83	5.93	5.04
試験時間 (分)：	122	94	41.5	31.0	25.3	16.0
全 i-BuOH の物質移動速度 (g/L/時)	1.23	7.81	20.76	12.62	64.52	92.52
kLa(毎時)	0.05	0.70	2.58	0.54	4.29	10.06
(kLa/Us)	0.12	0.69	1.40	0.18	0.67	0.91

【0204】

実施例 5

物質移動に対する非溶解固体の影響

SSFの途中の段階の（非溶解固体を含有する）液化されたトウモロコシマッシュからの発酵ブロスをシミュレートする水相を、実施例2からのウェットケーキ（液化されたトウモロコシマッシュから固体を除去することによって最初に得られた）の一部を、希釈された遠心分離液（実施例4において上述した物質移動試験に使用した）に加えることによって合成した。ウェットケーキ中に保持される液相を希釈するためにいくらかの水も加えた。この液体は濃縮された遠心分離液と同じ組成を有するためである。17.8kgの希釈された上清、13.0kgのウェットケーキ（約18重量%の非溶解マッシュ固体を含有する）、5.0kgのH₂O、および0.83kgのi-BuOHと一緒に混合したところ、約6.3重量%の非溶解固体と、約13重量%の液化でんぷんおよび約2.4重量%のi-BuOH（残りはH₂O）からなる液相とを含有する36.6kgのスラリーが

得られた。このスラリーは、約 30 % のトウモロコシ充填量における $i\text{-BuOH}$ への、トウモロコシのSSFの途中の段階の発酵ブロスの組成を模倣している。こうしたタイプのブロスに見られる非溶解固体およびオリゴ糖のレベルが、それぞれ約 6 ~ 8 重量%および 10 ~ 12 重量%であるためである。

【0205】

水相として希釈された遠心分離液および非溶解マッシュ固体のスラリーを用いて、5 フィート/秒 ~ 22 フィート/秒の範囲のノズル速度で2つの異なるサイズのノズルを用いて、物質移動試験を行った。3つの試験を、0.76 mmの内径を有するノズルを用いて行い、3つの試験を、2.03 mmの内径を有するノズルを用いて行った。溶媒としてOAを用いて上記の6インチの直径のカラム中で30℃で全ての試験を行った。希釈された遠心分離液および非溶解マッシュ固体のスラリーを用いた物質移動試験の結果を表2に示す。

【0206】

【表2】

表2

	52	53	54	49	50	51
物質移動試験条件:						
水相	6.3重量%の 固体を含む、 液化された マッシュからの 希釈された 遠心分離液	6.3重量%の 固体を含む、 液化された マッシュからの 希釈された 遠心分離液	6.3重量%の 固体を含む、 液化された マッシュからの 希釈された 遠心分離液	6.3重量%の 固体を含む、 液化された マッシュからの 希釈された 遠心分離液	6.3重量%の 固体を含む、 液化された マッシュからの 希釈された 遠心分離液	6.3重量%の 固体を含む、 液化された マッシュからの 希釈された 遠心分離液
水相の体積 (L):	35.5	35.5	32.5	31.5	30	31.6
溶媒供給速度 (g/分):	40	64	157	249	549	853
表面液体速度 (Us) (フィート/時)	0.51	0.81	1.99	3.16	6.97	10.83
ノズル内径 (mm):	0.76	0.76	0.76	2.03	2.03	2.03
ノズル速度 (フィート/秒)	5.7	9.1	22.3	4.9	10.9	17.0
物質移動結果:						
水相中の初期の $[i\text{-B}](\text{g/L})$:	28.1	26.0	26.2	27.6	26.3	36.8
水相中の最終的な $[i\text{-B}](\text{g/L})$:	26.3	23.8	14.0	24.6	13.8	16.1
収集された富化 OA(kg):	6.02	5.75	10.23	15.05	16.58	13.22
収集された OA 中の $[i\text{-B}](\text{重量}\%)$:	1.05	1.35	3.86	0.68	2.30	5.00
試験時間 (分):	150	90	65	60	30	15.5
全 $i\text{-BuOH}$ の物質移動速度 (g/L/時)	0.71	1.46	11.2	3.0	25.0	80.0
$k_L a$ (毎時)	0.03	0.06	0.83	0.12	1.55	4.45
($k_L a/U_s$)	0.06	0.07	0.42	0.04	0.22	0.41

【0207】

図7は、液化トウモロコシでんぷん（すなわち、オリゴ糖）の水溶液から、気泡塔を通して上方に流れるオレイルアルコール液滴の分散体への $i\text{-BuOH}$ の移動の全体積物質移動係数、 $k_L a$ に対する非溶解トウモロコシマッシュ固体の存在の影響を示す。OAを、内径 2.03 mm のノズルを通してカラムに供給した。固体が除去されていない系の $k_L a$ に対する固体が除去された系の $k_L a$ の比率が、2.03 mm のノズルのノズル速度に応じて2 ~ 5であることが発見された。

【0208】

図8は、液化トウモロコシでんぷん（すなわち、オリゴ糖）の水溶液から、気泡塔を通して上方に流れるオレイルアルコール液滴の分散体への $i\text{-BuOH}$ の移動の全体積物質移動係数、 $k_L a$ に対する非溶解トウモロコシマッシュ固体の存在の影響を示す。OAを、内径 0.76 mm のノズルを通してカラムに供給した。固体が除去されていない系の $k_L a$ に対する固体が除去された系の $k_L a$ の比率が、0.76 mm のノズルのノズル速度に応じて2 ~ 4であることが発見された。

【0209】

実施例 6

水相と溶媒相との間の相分離に対する非溶解固体の除去の影響

この実施例は、非溶解固体が除去されていない液化されたトウモロコシマッシュから得られるオリゴ糖の水溶液および同じ溶媒と比較した、非溶解固体が除去された液化されたトウモロコシマッシュから得られるオリゴ糖の水溶液と溶媒相との間の向上した相分離を示す。両方の系が *i*-BuOH を含有していた。水相からの溶媒相の十分な分離は、液液抽出が原位置生成物除去 (ISPR) を実施するための実行可能な分離方法であるために重要である。

【0210】

約 900 g の液化されたトウモロコシマッシュを、1 L のガラスの被覆された樹脂ケトル中で調製した。ケトルは、機械的攪拌、温度制御、および pH 制御を備えていた。以下のプロトコルを使用した：磨砕トウモロコシを水道水と混合し（乾燥量基準で 26 重量%のトウモロコシ）、スラリーを、攪拌しながら 55 °C まで加熱し、NaOH または H₂SO₄ のいずれかをを用いて pH を 5.8 に調整し、 α -アミラーゼ（乾燥トウモロコシ基準で 0.02 重量%）を加え、85 °C まで加熱し続け、pH を 5.8 に調整し、pH を 5.8 に保ちながら 85 °C で 2 時間保持し、25 °C に冷却した。使用されるトウモロコシは、Pioneer 製の全粒イエローコーン (3335) であった。トウモロコシを、1 mm のふるいを用いて、ハンマーミルで磨砕した。磨砕トウモロコシの水分含量は 12 重量%であり、磨砕トウモロコシのでんぷん含量は、乾燥トウモロコシ基準で 71.4 重量%であった。 α -アミラーゼ酵素は、Novozymes (Franklinton, NC) 製の Liquozyme (登録商標) SCDS であった。使用される成分の総量は：265.9 g の磨砕トウモロコシ (12% の水分)、634.3 g の水道水、および 0.056 g の Liquozyme (登録商標) SCDS であった。回収された、液化されたトウモロコシマッシュの総量は 883.5 g であった。

【0211】

液化されたトウモロコシマッシュの一部を、非溶解固体を除去せずにそのまま用いて、固体を含む、相分離試験用の水相を調製した。液化されたトウモロコシマッシュの一部を遠心分離して、非溶解固体の大部分を除去し、それを用いて、固体を含まない、相分離試験用の水相を調製した。

【0212】

固体を、大容量遠心分離機における遠心分離によってマッシュから除去した。583.5 g のマッシュを、35 °C で 20 分間、5000 rpm で遠心分離したところ、394.4 g の遠心分離液および 189.0 g のウェットケーキが得られた。遠心分離液が約 0.5 重量%の懸濁固体を含有し、ウェットケーキが約 20 重量%の懸濁固体を含有していたことが分かった。これは、元の液化されたマッシュが、約 7 重量%の懸濁固体を含有していたことを示唆している。これは、でんぷんの大部分が液化されたと仮定した場合、トウモロコシ充填量および使用されるトウモロコシのでんぷん含量と一致する。でんぷんの全てが液化された場合、遠心分離機から直接回収された遠心分離液は、固体を含まない場合、約 20 重量%の溶解されたオリゴ糖（液化でんぷん）を含有していたであろう。

【0213】

相分離試験の目的は、液化されたトウモロコシマッシュから得られるブросをシミュレートする溶媒相と水相との間の相分離の程度に対する非溶解固体の影響を測定することであった。全ての試験において、水性液相は、約 20 重量%のオリゴ糖を含有し、有機相は、オレイルアルコール (OA) を含有していた。さらに、*i*-BuOH を全ての試験に加えたところ、相が平衡状態になったときに水相中約 25 g/L が得られた。2 つの振とう試験を行った。第 1 の試験の水相（固体を含むもの）を、60.0 g の液化されたトウモロコシマッシュを 3.5 g の *i*-BuOH と混合することによって調製した。第 2 の試験の水相（固体を除去したもの）を、固体を除去することによって液化されたトウモロコシマッシュから得られた 60.0 g の遠心分離液を、3.5 g の *i*-BuOH と混合することによって調製した。15.0 g のオレイルアルコール (Cognis 製の 80/85% グレード) を、振とう試験ボトルのそれぞれに加えた。OA は、両方のボトル中の水相の

上部に別個の液相を形成し、相の質量比、すなわち水相／溶媒相が約 1／4 になった。両方のボトルを 2 分間激しく振とうして、水相と有機相とを密着させ、i-BuOH が二相間で平衡に達するようにした。ボトルを 1 時間静置 (set) しておいた。写真を様々な時間 (0 分、15 分、30 分、および 60 分) で撮影して、液化されたトウモロコシマッシュから得られる水相、OA を含有する溶媒相、および i-BuOH を含有する系における相分離に対する非溶解固体の影響を観察した。時間ゼロ (0) は、振とう期間が完了した 2 分直後の時間に対応する。

【0214】

固体 (液化されたトウモロコシマッシュに由来する) を含む系および固体を除去した系 (液化されたトウモロコシマッシュからの液体遠心分離液) についての、時間に応じた有機 (溶媒) 相と水相との間の分離の程度は、任意の時点で両方の系においてほぼ同じであるようであった。固体を含む場合、有機相は、わずかに暗色で濁っており、界面が少し曖昧であった (界面の周りの「ラグ (rag)」層がより厚い)。しかしながら、溶媒が連続して操作される抽出発酵では、有機相の上部の組成は、次の工程が蒸留である抽出発酵の下流のプロセスに参与する。

【0215】

微生物は、蒸留塔において熱的に不活性化されるため、有機相の上部における微生物の量を最小限に抑えることが有利であり得る。微生物は、蒸留塔を詰まらせ、リボイラーを汚染し、カラムの基部に位置する溶媒／水デカンターにおける不十分な相分離の原因となり得、または上述した問題の任意の組合せであり得るため、有機相の上部における非溶解溶媒の量を最小限に抑えることが有利であり得る。有機相の上部における相の水の量を最小限に抑えることが有利であり得る。相の水は、別個の水相として存在する水である。さらなる量の水相は、蒸留塔における負荷およびエネルギー要件を増大させる。10 ミリリットルの試料を、「固体を含む」および「固体を除去した」ボトルからの有機層の上部から除去し、両方の試料を遠心分離して、60 分間の沈降時間の後、「固体を含む」および「固体を除去した」ボトルにおける有機相の組成を明らかにし、比較した。結果は、両方の振とう試験の最後の時点での「有機相」が、いくらかの望ましくない相を含有していた (両方の有機相が濁っている) ことを示す。しかしながら、結果は、固体が除去された、遠心分離液を含む相分離試験からの上層が、非溶解固体を実質的に含有していなかったことも示す。一方、非溶解固体は、マッシュを含む試験の有機相の上部から引き抜かれた 10 mL の試料の底部においてははっきりと見られる。有機層の上部から引き抜かれた試料の 3 % がマッシュ固体を洗浄することが推定された。抽出発酵プロセスの発酵装置を出る富化溶媒相が、3 % の非溶解固体を含有していた場合、以下の問題の 1 つ以上が起こり得る：かなりの量の微生物の損失、溶媒塔リボイラーの汚染、溶媒塔の閉塞。結果は、遠心分離液を含む相分離試験からの上層がより少ない相の水を含有していたことも示す。表 3 は、60 分間の沈降時間の後の両方の振とう試験ボトルにおける上側「有機」層にわたって分散された相の相対量の推定値を示す。

【0216】

【表 3】

表 3: 60 分後の振とう試験からの有機(上)層の近似組成

	「固体を含む」振とう試験 からの上層	「固体を除去した」振とう試験 からの上層
有機(溶媒)相:	82%	87%
水性(水)相:	15%	13%
非溶解固体:	3%	0%

【0217】

この実施例は、液化されたトウモロコシマッシュから非溶解固体の大部分を除去すると

、マッシュから得られる液体、水相がオレイルアルコールなどの溶媒と接触された後、向上した相分離が得られることを示す。この実施例は、マッシュの液体部分を有機溶媒と接触させる前に固体がまず除去される場合、相分離後に得られる上側相が大幅に少ない非溶解固体を含有することを示す。これは、抽出発酵のための相分離の上側（「有機」）層におけるマッシュの非溶解固体含量を最小限に抑えることの利点を示す。

【0218】

実施例7

水相と溶媒相との間の相分離に対する非溶解固体の除去の影響

実施例6と同様に、この実施例は、非溶解固体が除去されていない液化されたトウモロコシマッシュから得られるオリゴ糖の水溶液および同じ溶媒と比較して、非溶解固体が除去された液化されたトウモロコシマッシュから得られるオリゴ糖の水溶液と、溶媒相との間の向上した相分離を示す。両方の系が $i-BuOH$ を含有していた。水相からの溶媒相の十分な分離は、液液抽出が原位置生成物除去（ISPR）を実施するための実行可能な分離方法であるために重要である。

【0219】

実施例6のために調製される同じ混合物をこの実施例に使用した。唯一の相違は、この実施例に記載される相分離振とう試験を繰り返す前に、実施例6に記載される試料調製の完了後に試料を数日間静置しておいたことであった。「固体を含む」と表示される試料は、液化されたトウモロコシマッシュ、 $i-BuOH$ 、およびオレイルアルコールからなっていた。「固体を除去した」と表示される試料は、液化されたトウモロコシマッシュから非溶解固体の大部分を除去することによって生成された遠心分離液、 $i-BuOH$ 、およびオレイルアルコールからなっていた。液化されたマッシュは、約7重量%の懸濁固体を含有し、マッシュから生成される遠心分離液は、約0.5重量%の懸濁固体を含有していた。磨碎トウモロコシ中のでんぷんの全てが液化された場合、液化されたマッシュ中の液相およびマッシュから生成される遠心分離液は、固体を含まない場合、約20重量%の溶解されたオリゴ糖（液化でんぷん）を含有していた。両方の試料は、相の質量比、すなわち溶媒相／水相が約1／4である量でオレイルアルコールを含有していた。さらに、 $i-BuOH$ を全ての試験に加えたところ、相が平衡状態になったときに水相中約25 g／L が得られた。

【0220】

相分離試験の目的は、抽出発酵全体にわたって系の特性の潜在的变化を模倣するために、多相混合物を室温で数日間エージングさせた後に、溶媒相（OAを含有する）と、液化されたトウモロコシマッシュから得られる水相（固体を含むものおよび含まないもの）との間の相分離の程度に対する非溶解固体の影響を測定することであった。2つの振とう試験を行った。両方のボトルを2分間激しく振とうして、水相と有機相とを密着させた。ボトルを1時間静置しておいた。写真を様々な時間（0分、2分、5分、10分、20分、および60分）で撮影して、数日間エージングしたこれらの系における相分離に対する非溶解固体の影響を観察した。時間ゼロ（0）は、ボトルをベンチに置いた直後の時間に対応する。

【0221】

固体が2分後に除去された試料において相分離が起こり始めた。有機相が二相混合物の全体積の約25%を占めていたことに基づいて、固体がわずか5～10分後に除去された場合、ほぼ完全な相分離が試料において起こったと考えられる。有機相が全体積の約20%を占めていた場合、それが相の初期の比率に対応するため、完全な分離が示され得ることが予測され得る。1時間後でさえ、固体が除去されなかった試料では明らかな相分離は起こっていなかった。

【0222】

両方の試料の上側相の組成も比較した。上側相の組成は、次の工程が蒸留である抽出発酵の下流のプロセスのための意味を有する。微生物は蒸留塔において熱的に不活性化されるため、有機相の上部における微生物の量を最小限に抑えることが有利である。固体は、

蒸留塔を詰まらせ、リボイラーを汚染し、カラムの基部に位置する溶媒／水デカンターにおける不十分な相分離の原因となり得、または上述した問題の任意の組合せであり得るため、有機相の上部において最小限に抑えるべき別の構成要素は、非溶解固体の量である。さらに、有機相の上部において最小限に抑えるべき別の構成要素は、別個の水相として存在する水である相の水の量であり、その理由は、このさらなる量の水相は、その後の蒸留塔における負荷およびエネルギー要件を増大させるためである。

【0223】

10ミリリットルの試料を、「固体を含む」および「固体を除去した」ボトルからの有機層の上部から除去し、両方の試料を遠心分離して、60分間の沈降時間の後、「固体を含む」および「固体を除去した」ボトルにおける有機相の組成を明らかにし、比較した。

「固体を含む」試料の上部から引き抜かれた試料の組成は、60分以内に当該試料において相分離が実質的に全く起こらなかったことを確認している。特に、「固体を含む」振とう試験ボトルの上部から引き抜かれた試料中の全水相（水性液体＋懸濁固体）に対する溶媒相の比率は、約1／4w／wであり、これは、試験の前に試料を調製するのに使用されるのと同じ比率である。また、「固体を含む」振とう試験ボトルの上部から引き抜かれた試料中の非溶解固体の量は、液化されたトウモロコシマッシュにおいて見られる量とほぼ同じであり、これは、60分以内にこの振とう試験ボトルにおいて固体が実質的に全く沈降しなかったことを示す。一方、固体を除去した遠心分離液（「固体を除去した」）を含む相分離試験からの上層は、非溶解固体を実質的に含有していなかった。結果は、遠心分離液を含む相分離試験からの上層が相の水を含有していたことも示す。これは、試料ボトルにおける水相に対する溶媒相の比率が約1／1w／wであることによって示され、これは、固体を除去した場合の試験において有機相が溶媒（OA）で富化されたことを示す。表4は、60分間の沈降時間の後の両方の振とう試験ボトルにおける上側「有機」層にわたって分散された相の相対量の推定値を示す。

【0224】

【表4】

表4: 60分後の振とう試験からの有機(上)層の近似組成

	「固体を含む」振とう試験 からの上層	「固体を除去した」振とう試験 からの上層
有機(溶媒)相:	19%	50%
水性(水)相:	47%	50%
非溶解固体:	34%	0%

【0225】

この実施例は、i-BuOHを含有する液化されたトウモロコシマッシュから非溶解固体を除去し、それを溶媒相と接触させ、それを数日間静置させ、相を再度混合すると、非溶解固体を液化されたマッシュから除去しなかった試料と比較して、向上した相分離が得られることを示す。実際に、この実施例は、非溶解固体を除去しなかった試料において、60分後でさえ相分離が実質的に全く起こらないことを示す。この実施例は、マッシュの液体部分を有機溶媒と接触させる前に固体がまず除去される場合、相分離後に得られる上側相が大幅に少ない非溶解固体を含有することを示す。抽出発酵のための相分離の上側（「有機」）層において最小限に抑えられるべき最も重要な種の2つが、微生物のレベルおよびマッシュからの非溶解固体のレベルであるため、これは重要である。前の実施例は、液化されたトウモロコシマッシュから固体を除去すると、水相を溶媒相と接触させた直後に向上した相分離が得られることを示した。これにより、抽出発酵が、発酵のより早い時点で実行可能になり得る。この実施例は、液化されたトウモロコシマッシュから固体を除去すると、溶媒相と接触させた水相（固体を除去したオリゴ糖溶液）を含有するエージングした試料において向上した相分離が得られることも示す。また、これにより、抽出発酵が発酵のより遅い時点で実行可能になり得る。

【0226】

実施例 8

I S P R抽出溶媒の損失に対する非溶解固体の除去の影響ーディスクスタック遠心分離機
この実施例は、半連続的なディスクスタック遠心分離機を用いて、発酵前にトウモロコシマッシュから非溶解固体を除去することによって、抽出発酵プロセスによって生成されるDDGSを介した溶媒の損失を減少させる可能性を示す。

【0227】

約216kgの液化されたトウモロコシマッシュを、被覆されたステンレス鋼反応器中で調製した。反応器は、機械的攪拌、温度制御、およびpH制御を備えていた。使用されるプロトコルは以下のとおりであった：磨砕トウモロコシを水道水と混合し（乾燥量基準で25重量%のトウモロコシ）、スラリーを、400rpmで攪拌しながら55℃まで加熱し、NaOHまたはH₂SO₄のいずれかを用いてpHを5.8に調整し、 α -アミラーゼ（乾燥トウモロコシ基準で0.02重量%）を加え、85℃まで加熱し続け、pHを5.8に調整し、pHを5.8に保ちながら85℃で30分間保持し、生蒸気噴射を用いて121℃まで加熱し、ジェットクッカーをシミュレートするために121℃で30分間保持し、85℃に冷却し、pHを5.8に調整し、 α -アミラーゼ（乾燥トウモロコシ基準で0.02重量%）の第2の投入を加え、pHを5.8に保ちながら85℃で60分間保持して、液化を完了させた。次に、マッシュを60℃に冷却し、遠心分離機の供給タンクに移した。

【0228】

使用されるトウモロコシは、Pioneer製の全粒イエローコーン（3335）であった。トウモロコシを、1mmのふるいを用いて、ハンマーミルで磨砕した。磨砕トウモロコシの水分含量は12重量%であり、磨砕トウモロコシのでんぷん含量は、乾燥トウモロコシ基準で71.4重量%であった。 α -アミラーゼ酵素は、Novozymes（Franklinton, NC）製のLiquozyme（登録商標）SCDSであった。使用される成分の量は：61.8kgの磨砕トウモロコシ（12%の水分）、147.3kgの水道水、第1の α -アミラーゼ投入のための1kgの水中の0.0109kgのLiquozyme（登録商標）SCDSの溶液、第2の α -アミラーゼ投入（調理段階後）のための1kgの水中の0.0109kgのLiquozyme（登録商標）SCDSの別の溶液であった。約5kgのH₂Oを、調理段階中に蒸気凝縮液を介してバッチに加えた。合計で0.25kgのNaOH（12.5重量%）および0.12kgのH₂SO₄（12.5重量%）を、pHを制御するために実験全体にわたって加えた。回収される液化されたトウモロコシマッシュの総量は216kgであった。

【0229】

最終的な液化されたトウモロコシマッシュスラリーの組成は、約7重量%の非溶解固体および93重量%の液体であると推定された。液相は、約19重量%（190g/L）の液化でんぷん（可溶性オリゴ糖）を含有していた。マッシュのレオロジーは、スラリーをその成分に分離する能力に関して重要である。マッシュ中の液相は、30℃で約5.5cPの粘度を有するニュートン流体であることが分かった。マッシュスラリーは、せん断速度に応じて、85℃で約10~70cPの体積粘度を有するずり薄化（shear-thinning）流体であることが分かった。

【0230】

209kg（190L）の液化されたマッシュを、Alfa Lavalディスクスタック分離ボウル（split-bowl）遠心分離機を用いて遠心分離した。遠心分離機を、連続した供給、連続した遠心分離液排出、およびウェットケーキのバッチ排出を含むセミバッチモードで運転した。液化されたトウモロコシマッシュを、1L/分の速度で連続して供給し、浄化された遠心分離液を連続して除去し、ウェットケーキを4分ごとに定期的に排出した。ディスクスタックからの固体の適切な排出間隔を決定するために、ディスクスタックに供給されるマッシュの試料を、高速の実験用遠心分離機で遠心分離した。マッシュ（48.5g）を、室温で約10分間、11,000rpm（約21,000

g ' s) で回転させた。浄化された遠心分離液 (36.1 g) および 12.4 g のペレット (ウェットケーキ) を回収した。浄化された遠心分離液は、約 0.3 重量% の非溶解固体を含有し、ペレット (ウェットケーキ) は、約 27 重量% の非溶解固体を含有していたことが分かった。このデータに基づいて、4 分間の排出間隔を、ディスクスタック遠心分離機の運転のために選択した。

【0231】

ディスクスタック遠心分離機を、1 L / 分の液化されたトウモロコシマッシュ供給速度および約 60 °C で、9000 rpm (6100 g ' s) で運転した。マッシュ (209 kg) を、155 kg の浄化された遠心分離液と、55 kg のウェットケーキとに分離した。半連続ディスクスタックによって得られる、(遠心分離液の量) / (供給されるマッシュの量) として定義されるスプリット (split) は、バッチ式遠心分離機において得られるスプリットと同様であった。6100 g ' s、1 L / 分の供給速度、および 4 分間の排出間隔で運転されるディスクスタックセミバッチ式遠心分離機のスプリットは、(155 kg / 209 kg) = 74 % であり、21,000 g ' s で 10 分間運転される実験用のバッチ式遠心分離機のスプリットは、(36.1 g / 48.5 g) = 74 % であった。

10

【0232】

ディスクスタック遠心分離から回収される浄化された遠心分離液の 45 mL の試料を、実験用遠心分離機において 21,000 g ' s で 10 分間回転させて、遠心分離液中の懸濁固体のレベルを推定した。約 0.15 ~ 0.3 g の非溶解固体を、45 mL の遠心分離液から回収した。これは、遠心分離液中の 0.3 ~ 0.7 重量% の非溶解固体に相当し、これは、遠心分離機に供給されるマッシュからの非溶解固体の約 10 倍の減少である。発酵前にトウモロコシマッシュから懸濁固体を除去するために、抽出発酵の際に存在する非溶解固体のレベルが、いくつかの固 / 液分離デバイスまたはデバイスの組合せを用いて、1 桁減少される場合、DDGS を介した ISPR 抽出溶媒損失が、約 1 桁減少され得ると仮定することが妥当である。DDGS を介した溶媒損失を最小限に抑えることは、抽出発酵プロセスの経済性および DDGS 品質の重要な要因である。

20

【0233】

実施例 9

ISPR 抽出溶媒の損失に対する非溶解固体の除去の影響 - ボトル回転試験

30

この実施例は、遠心分離機を用いて、発酵前にトウモロコシマッシュから非溶解固体を除去することによって、抽出発酵プロセスによって生成される DDGS を介した溶媒の損失を減少させる可能性を示す。

【0234】

実験室規模のボトル回転試験を、液化されたトウモロコシマッシュを用いて行った。試験は、商業的なエタノール (EtOH) プラント中の全蒸留廃液から非溶解固体を除去するのに使用される典型的なデカンター遠心分離機の運転条件をシミュレートするものである。商業的な EtOH プラントにおけるデカンター遠心分離機は、通常、約 3000 g ' s の相対遠心力 (RCF) および約 30 秒間の全蒸留廃液滞留時間で運転される。これらの遠心分離機は、通常、約 5 % ~ 6 % の懸濁固体 (ビール塔の後) を含有する全蒸留廃液中の懸濁固体の約 90 % を除去し、約 0.5 % の懸濁固体を含有する希薄な蒸留廃液が得られる。

40

【0235】

液化されたトウモロコシマッシュを、実施例 6 に記載されるプロトコルにしたがって作製した。約 10 mL のマッシュを遠心分離機管に入れた。試料を、合計 1 分間、約 3000 g ' s の RCF (4400 rpm のローター速度) で遠心分離した。試料を、遠心分離機の加速および減速により、3000 g ' s で約 30 ~ 40 秒間および 3000 g ' s 未満の速度で合計 20 ~ 30 秒間経過させた。試料温度は約 60 °C であった。

【0236】

約 7 重量% の懸濁固体を含有する 10 mL のマッシュを、約 6.25 mL の浄化された

50

遠心分離液と、3.75 mLのウェットケーキ（遠心分離機管の底部におけるペレット）とに分離した。ボトル回転試験によって得られる、（遠心分離液の量）／（投入される元のマッシュの量）として定義されるスプリットは、約62%であった。浄化された遠心分離液は、約0.5重量%の懸濁固体を含有し、これは、元のマッシュ中の懸濁固体のレベルと比較して懸濁固体中では10倍を超える減少であることが分かった。浄化されたペレットは、約18重量%の懸濁固体を含有していたことも分かった。

【0237】

表5は、商業的なEtOHプロセスにおいて全蒸留廃液を希薄な蒸留廃液に転化するデカンター遠心分離機の運転の典型的な条件でのボトル回転試験の懸濁（非溶解）固体の物質収支をまとめたものである。表5に示される全ての値は概算値である。

【0238】

【表5】

表5

	体積(mL)	懸濁固体(重量%)
液化トウモロコシマッシュの投入量:	10	7%
浄化された遠心分離液:	6.25	0.5%
ウェットケーキ(ペレット):	3.75	18%
性能のまとめ		
スプリット:	62%	
遠心分離液の透明度:	0.5重量%の懸濁固体	
ケーキ(ペレット)乾燥度:	18重量%の懸濁固体	
懸濁固体の除去率%:	液化されたマッシュからの95%の除去率	

【0239】

遠心分離液は、約190 g/Lの溶解されたオリゴ糖（液化でんぷん）を含有していたことも分かった。これは、使用されるトウモロコシ充填量（乾燥トウモロコシ基準で約26重量%）および液化されたマッシュ（乾燥トウモロコシ基準で約71.4重量%のでんぷん）を生成するのに使用されるトウモロコシにおけるでんぷん含量に基づいて、磨碎トウモロコシ中のでんぷんの大部分が液化プロセスにおいて液化された（すなわち、可溶性オリゴ糖に加水分解された）という仮定と一致する。26%の乾燥トウモロコシ充填量における磨碎トウモロコシ中のでんぷんの大部分を加水分解すると、ボトル回転試験に使用される遠心分離機に投入される液化されたトウモロコシマッシュ中の約7重量%の懸濁（非溶解）固体が得られる。

【0240】

浄化された遠心分離液が、わずか約0.5重量%の非溶解固体を含有していたことは、ボトル回転試験に使用される条件が、投入されるマッシュからの非溶解固体の10倍を超える減少をもたらしたことを示す。この同じ固体除去性能が発酵前に連続デカンター遠心分離機によって得られる場合、DDGS中のISPR抽出溶媒損失が、約1桁減少され得ると仮定することが妥当である。DDGSを介した溶媒損失を最小限に抑えることは、抽出発酵プロセスの経済性およびDDGS品質の重要な要因である。

【0241】

実施例10

非溶解固体を除去することによるトウモロコシ油の除去

この実施例は、発酵前に非溶解固体を除去することによって、トウモロコシマッシュからトウモロコシ油を除去および回収する可能性を示す。抽出溶媒の有効性は、トウモロコシ油が、非溶解固体の除去によって除去される場合に向上され得る。さらに、非溶解固体の除去によるトウモロコシ油の除去により、溶媒分配係数の減少を最小限に抑えることが

でき、向上した抽出発酵プロセスが得られる可能性もある。

【0242】

約1000gの液化されたトウモロコシマッシュを、1Lのガラスの被覆された樹脂ケトル中で調製した。ケトルは、機械的攪拌、温度制御、およびpH制御を備えていた。以下のプロトコルを使用した：磨砕トウモロコシを水道水と混合し（乾燥量基準で26重量%のトウモロコシ）、スラリーを、攪拌しながら55℃まで加熱し、NaOHまたはH₂SO₄のいずれかを用いてpHを5.8に調整し、 α -アミラーゼ（乾燥トウモロコシ基準で0.02重量%）を加え、85℃まで加熱し続け、pHを5.8に調整し、pHを5.8に保ちながら85℃で2時間保持し、25℃に冷却した。使用されるトウモロコシは、Pioneer製の全粒イエローコーン（3335）であった。トウモロコシを、1mmのふるいを用いて、ハンマーミルで磨砕した。磨砕トウモロコシの水分含量は約11.7重量%であり、磨砕トウモロコシのでんぷん含量は、乾燥トウモロコシ基準で約71.4重量%であった。 α -アミラーゼ酵素は、Novozymes（Franklinston, NC）製のLiquozyme（登録商標）SCDSであった。使用される成分の総量は：294.5gの磨砕トウモロコシ（11.7%の水分）、705.5gの水道水、および0.059gのLiquozyme（登録商標）SCDSであった。酵素を希釈するために水（4.3g）を加え、pHを制御するために合計2.3gの20%のNaOH溶液を加えた。約952gのマッシュを回収した。

【0243】

液化されたトウモロコシマッシュを、40℃で30分間、5000rpm（7260g's）で遠心分離して、オリゴ糖の水溶液から非溶解固体を除去した。遠心分離によって固体を除去すると、水相の上部の別個の有機液体層としてフリートウモロコシ油も除去される。約1.5gのトウモロコシ油を、水相の上部に浮遊する有機層から回収した。液化されたマッシュを生成するのに使用される磨砕トウモロコシは、乾燥トウモロコシ基準で約3.5重量%のトウモロコシ油を含有していたことが、ヘキサン抽出によって分かった。これは、磨砕トウモロコシを含む、液化プロセスに供給される約9gのトウモロコシ油に相当する。

【0244】

トウモロコシ油を液化されたマッシュから回収した後、オリゴ糖の水溶液をデカントして、ウェットケーキから取り除いた。約617gの液化でんぷん溶液を回収したところ、約334gのウェットケーキが残った。ウェットケーキは、液化されたマッシュ中にあった非溶解固体の大部分を含有していた。液化でんぷん溶液は、約0.2重量%の非溶解固体を含有していた。ウェットケーキは、約21重量%の非溶解固体を含有していた。ウェットケーキを1000gの水道水で洗浄して、ケーキ中に残っているオリゴ糖を除去した。ケーキを水と混合して、スラリーを形成することによって、これを行った。次に、洗浄された固体を回収するために、元のマッシュを遠心分離するのに使用されるのと同じ条件下でスラリーを遠心分離した。洗浄スラリーを遠心分離することによって洗浄された固体を除去すると、液化されたマッシュから生成される元のウェットケーキとともに残っているはずのいくらかのさらなるフリートウモロコシ油も除去された。このさらなるトウモロコシ油は、遠心分離された洗浄混合物の水相の上部における別個の薄い有機液体層として観察された。約1gのさらなるトウモロコシ油を洗浄プロセスから回収した。

【0245】

湿潤固体を、毎回1000gの水道水を用いてさらに2回洗浄して、液化でんぷんの実質的に全てを除去した。目視可能なさらなるトウモロコシ油は、マッシュ固体の2回目および3回目の水洗浄から除去されなかった。最終的な洗浄固体を、真空オーブン中で一晚、80℃および約20水銀柱インチの真空下で乾燥させた。乾燥固体中に残っている（おそらく胚芽中に残っている）トウモロコシ油の量を、ヘキサン抽出によって測定した。比較的乾燥した固体（約2重量%の水分）の3.60gの試料が、0.22gのトウモロコシ油を含有していたことが測定された。この結果は、乾燥固体のg当たり0.0624gのトウモロコシ油に相当する。これは、湿潤固体中に残留オリゴ糖がないことを意味する

洗浄された固体の場合であった。液化されたトウモロコシマッシュを遠心分離して、フリートウモロコシ油の層およびオリゴ糖の水溶液をウェットケーキから分離した後、約 2.1 重量%の非溶解固体を含有する約 334 g のウェットケーキが残っていたことが分かった。これは、約 70.1 g の非溶解固体を含むウェットケーキに相当する。乾燥固体の g 当たり 0.0624 g のトウモロコシ油において、ウェットケーキ中の固体は、約 4.4 g のトウモロコシ油を含有するはずである。

【0246】

要約すると、液化されたマッシュを遠心分離することによって、約 1.5 g のフリートウモロコシ油を回収した。マッシュから生成される元のウェットケーキを洗浄するために生成された第 1 の（水）洗浄スラリーを遠心分離することによって、さらなる 1 g のフリートウモロコシ油を回収した。最終的に、洗浄された固体が、約 4.4 g のトウモロコシ油を依然として含有していたことが分かった。液化に投入されたトウモロコシが、約 9 g のトウモロコシ油を含有していたことも分かった。したがって、合計 6.9 g のトウモロコシ油を以下のプロセス工程から回収した：液化、液化されたマッシュからの固体の除去、マッシュからの固体の洗浄、および最終的な洗浄された固体。その結果、液化に供給されるトウモロコシ中の全トウモロコシ油の約 76% を、本明細書に記載される液化および固体除去プロセス中に回収した。

【0247】

実施例 11

糖源としてマッシュおよび遠心分離液を用いた抽出発酵

この実施例は、糖源としてトウモロコシマッシュおよびトウモロコシマッシュ遠心分離液を用いて行われる抽出発酵を説明する。発酵前にトウモロコシマッシュから非溶解固体を除去することによって、トウモロコシマッシュ遠心分離液を生成した。4 つの抽出発酵を、並行して行い、2 つは、液化されたトウモロコシマッシュを糖源（固体を除去したもの）として用い、2 つは、非溶解固体の大部分を液化されたトウモロコシマッシュから除去することによって得られる液化されたマッシュ遠心分離液（オリゴ糖の水溶液）を用いた。オレイルアルコール（OA）を発酵の 2 つ（1 つは固体を含み、1 つは固体を除去したもの）に加えて、生成物が形成されるにつれて生成物（i-BuOH）をブロスから抽出した。トウモロコシ油脂肪酸（COFA）の混合物を、発酵の他の 2 つ（1 つは固体を含み、1 つは固体を除去したもの）に加えて、生成物が形成されるにつれて生成物をブロスから抽出した。トウモロコシ油を加水分解することによって COFA を作製した。これらの発酵の目的は、溶媒とブロスとの間の相分離に対する固体の除去の影響を試験すること（実施例 11 を参照）および固体を除去したまたは除去しなかった発酵ブロスから回収される非溶解固体に捕捉される残留溶媒の量を測定すること（実施例 12 を参照）であった。

【0248】

液化されたトウモロコシマッシュの調製

約 31 kg の液化されたトウモロコシマッシュを、30 L の被覆されたガラス樹脂ケトル中で調製した。反応器は、機械的攪拌、温度制御、および pH 制御を備えていた。使用されるプロトコルは以下のとおりであった：磨砕トウモロコシを水道水と混合し（乾燥量基準で 40 重量%のトウモロコシ）、スラリーを、250 rpm で攪拌しながら 55℃ まで加熱し、NaOH または H_2SO_4 のいずれかをを用いて pH を 5.8 に調整し、 α -アミラーゼの希薄水溶液（乾燥トウモロコシ基準で 0.16 重量%）を加え、55℃ で 60 分間保持し、95℃ まで加熱し、pH を 5.8 に調整し、pH を 5.8 に保ちながら 95℃ で 120 分間保持して、液化を完了させた。汚染を防止するために、マッシュを滅菌した遠心分離機ボトルに移した。

【0249】

使用されるトウモロコシは、Pioneer 製の全粒イエローコーンであった。トウモロコシを、1 mm のふるいを用いて、パイロット規模のハンマーミルで磨砕した。磨砕トウモロコシの水分含量は約 12 重量%であり、磨砕トウモロコシのでんぷん含量は、乾燥

トウモロコシ基準で約 71.4 重量%であった。使用される α -アミラーゼ酵素は、Spezyme (登録商標) Fred-L (Genencor (登録商標), Palo Alto, CA) であった。使用される成分の量は：14.1 kg の磨砕トウモロコシ (12% の水分)、16.9 kg の水道水、2.0 kg の水中の 19.5 g の Spezyme (登録商標) Fred-L からなる α -アミラーゼの溶液であった。 α -アミラーゼを滅菌ろ過した。pH を制御するために、合計 0.21 kg の NaOH (17 重量%) を実験全体にわたって加えた。

【0250】

液化されたトウモロコシマッシュは、全てのでんぷんが液化中に加水分解されたと仮定して、使用されるトウモロコシ充填量、トウモロコシのでんぷん含量を基準にして、約 28 重量% (約 280 g/L) の液化でんぷんを含有していたことが推定された。マッシュを、発酵に必要とされるより高濃度のオリゴ糖を用いて調製して、栄養、接種材料、グルコアミラーゼ、および基剤を初期の発酵プロセスに加えるときに希釈を可能にした。栄養、接種材料、グルコアミラーゼ、および基剤の添加によって希釈した後、マッシュ (固体を除去していないもの) 中の予測される全初期可溶性糖は約 250 g/L であった。

【0251】

約 13.9 kg の液化されたマッシュを、6 つの 1 L のボトルを含むボトル遠心分離機を用いて遠心分離した。遠心分離機を、室温で 20 分間、5000 rpm (7260 RCF) で運転した。マッシュを、約 5.5 kg の浄化された遠心分離液と、約 8.4 kg のウェットケーキ (遠心分離機ボトルの底部におけるペレット) とに分離した。(遠心分離液の量) / (供給されるマッシュの量) として定義されるスプリットは、約 (5.5 kg / 13.9 kg) = 40% であった。

【0252】

後述される 2010Y034 および 2010Y036 発酵に投入されるマッシュから固体を除去しなかった。発酵 2010Y033 および 2010Y035 (後述もされている) に投入される遠心分離液を、上記のプロトコルにしたがって懸濁固体の大部分をマッシュから (遠心分離によって) 除去することによって生成した。

【0253】

発酵の一般的な方法

シードフラスコ増殖 (Seed Flask Growth)

pdc1 が欠損した、pdc5 が欠損した、および pdc6 が欠損した、炭水化物源からイソブタノールを生成するように改変されたサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 株を、凍結された培地からのシードフラスコ中で 0.55~1.1 g/L dcw (OD₆₀₀ 1.3~2.6-Thermo Helios α Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) まで増殖させた。培地を、300 rpm で回転する培養器中、26°C で増殖させた。凍結した培地を -80°C で予め貯蔵した。第 1 のシードフラスコ培地の組成は以下のとおりであった：

3.0 g/L のデキストロース

3.0 g/L の無水エタノール

3.7 g/L の Formedium (商標) Synthetic Complete Amino Acid (Kaiser) Drop-Out: HIS なし、URA なし (参照番号 DSC K162CK)

アミノ酸を含まない 6.7 g/L の Difco Yeast Nitrogen Base (番号 291920)。

【0254】

第 1 のシードフラスコ培地からの 12 ミリリットルを、2 L のフラスコに移し、300 rpm で回転する培養器中、30°C で増殖させた。第 2 のシードフラスコは、220 mL の以下の培地を有する：

30.0 g/L のデキストロース

5. 0 g/Lの無水エタノール

3. 7 g/LのForMedium (商標) Synthetic Complete Amino Acid (Kaiser) Drop-Out: HISなし、URAなし (参照番号DSCCK162CK)

アミノ酸を含まない6. 7 g/LのDifco Yeast Nitrogen Base (番号291920)

pH 5. 5~6. 0に滴定された0. 2 MのMES緩衝液。

【0255】

培地を、0. 55~1. 1 g/L dcw (OD₆₀₀ 1. 3~2. 6) で増殖させた。200 g/Lのペプトンおよび100 g/Lの酵母抽出物を含有するさらなる30 mLの溶液を、この細胞濃縮物に加えた。次に、さらなる300 mLの0. 2 μMのろ過滅菌されたCognis、90~95%のオレイルアルコールをフラスコに加えた。4 g/L dcw超 (OD₆₀₀ > 10) まで培地を増殖させ続けてから、採取し、発酵に加えた。

【0256】

発酵調製

初期の発酵装置調製

ガラスの被覆された2 Lの発酵装置 (Sartorius AG, Goettingen, Germany) に、固体を含むかまたは固体を含まない液化されたマッシュ (遠心分離液) を投入した。pHプローブ (Hamilton Easyferm Plus K8、部品番号: 238627、Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland) を、Sartorius DCU-3 Control Tower Calibrationメニューによって校正した。pH=7でゼロ校正を行った。pH=4でスパン校正を行った。次に、プローブを、ステンレス鋼のヘッドプレートを通して発酵装置に入れた。溶解された酸素プローブ (pO₂ プローブ) も、ヘッドプレートを通して発酵装置に入れた。栄養、シード培地、抽出溶媒、および基剤を送達するのに使用される管をヘッドプレートに取り付け、端部に箔を被せた (foil)。発酵装置全体をSteris (Steris Corporation, Mentor, Ohio) オートクレーブに入れ、液体サイクル中で30分間滅菌した。

【0257】

発酵装置をオートクレーブから取り出し、ロードセル上に設置した。ジャケット水供給および戻り管路を、それぞれ家庭用水および排水管 (house water and clean drain) に連結した。流入水および流出水の配管を冷却する凝縮器を、7℃で運転される6 Lの再循環温度浴に連結した。発酵装置からのガスを移送する通気管路を、Thermo質量分析計 (Prima dB, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) に連結された移送管路に連結した。スパージャ管路をガス供給管路に連結した。栄養、抽出溶媒、シード培地、および基剤を加えるための管を、ポンプを通して配管し (plumb)、しっかりと固定した。オートクレーブ材料、0. 9% w/vのNaClを、液化されたマッシュを加える前に排出した。

【0258】

液化後のリパーゼ処理

液化サイクルが完了した後 (液化)、発酵装置温度を30℃の代わりに55℃に設定した。必要に応じて酸または塩基のボラス添加を行うことによって、pHをpH=5. 8に手作業で制御した。リパーゼ酵素原液を、最終的なリパーゼ濃度が10 ppmになるように発酵装置に加えた。発酵装置を、55℃、300 rpm、および0. 3 slpmのN₂ 重層 (overlay) で6時間超にわたって保持した。リパーゼ処理が完了した後、発酵装置温度を30℃に設定した。

【0259】

接種の前の栄養添加

接種の直前に7.0 mL/L (接種後の体積)のエタノール(200プルーフ、無水)を加えた。接種の直前に20 mg/Lの最終濃度になるようにチアミンを加えた。接種の直前に100 mg/Lのニコチン酸を加えた。

【0260】

発酵装置の接種

N₂を発酵装置に加えながら、発酵装置pO₂プローブをゼロに校正した。発酵装置pO₂プローブを、300 rpmにおける滅菌空気スパーズを用いてそのスパンに校正した。第2のシードフラスコが4 g/L dcw超になった後、発酵装置に接種した。振とうフラスコを培養器/振とう器から5分間取り出して、オレイルアルコール相と水相との相分離を可能にした。55 mLの水相を滅菌した接種ボトルに移した。接種材料を、蠕動ポンプを通して発酵装置に注入した。

10

【0261】

接種後のオレイルアルコールまたはトウモロコシ油脂肪酸の添加

接種の直後に1 L/L (接種後の体積)のオレイルアルコールまたはトウモロコシ油脂肪酸を加えた。

【0262】

発酵装置の運転条件

発酵装置を、増殖および生成段階全体について30℃で運転した。pHを、酸を全く加えずに5.7~5.9のpHから5.2の制御設定点まで低下させた。増殖および生成段階の残りでは、水酸化アンモニウムを用いて、pHをpH=5.2に制御した。増殖および生成段階の残りでは、無菌の空気を、スパージャを介して、0.3 slpmで発酵装置に加えた。DCU-3 Control Box PID制御ループによって、攪拌制御のみを用いて、攪拌器を最小で300 rpmに設定し、最大で2000 rpmに設定して、pO₂を、3.0%に制御されるように設定した。α-アミラーゼ(グルコアミラーゼ)を加えることによって、液化トウモロコシマッシュの同時糖化発酵によってグルコースを供給した。でんぷんが糖化に利用できる限り、グルコースを過剰(1~50 g/L)に保った。

20

【0263】

分析

ガスの分析

30

処理空気を、Thermo Prima (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts)質量分析計で分析した。これは、滅菌してから各発酵装置に加えたのと同じ処理空気であった。各発酵装置のオフガスを、同じ質量分析計で分析した。このThermo Prima dBは、毎週月曜の午前6:00に校正チェックを実行する機能を有する。校正チェックを、質量分析器に関連するGas Works v1.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts)ソフトウェアによってスケジューリングした。校正されるガスは以下のとおりであった:

【0264】

【表6】

40

ガス	校正濃度モル%	校正頻度
窒素	78%	週1回
酸素	21%	週1回
イソブタノール	0.2%	年1回
アルゴン	1%	週1回
二酸化炭素	0.03%	週1回

【0265】

二酸化炭素を、他の公知のボトル入りのガスを用いて、校正サイクル中5%および15

50

%でチェックした。酸素を、他の公知のボトル入りのガスを用いて15%でチェックした。各発酵装置のオフガスの分析に基づいて、ストリッピングされたイソブタノール、消費された酸素、およびオフガスに吸入された二酸化炭素の量を、質量分析計のモル分率分析および発酵装置に入るガス流量（質量流制御装置）を用いて測定した。1時間当たりのガス速度を計算し、次に、発酵の間のその速度を積分した。

【0266】

バイオマスの測定

0.08%のTrypan Blue溶液を、1×PBSによる、NaCl（VWR BDH 8721-0）中の0.4%のTrypan Blueの1:5の希釈液から調製した。1.0mLの試料を、発酵装置から引き抜き、1.5mLのEppendorf遠心分離機管に入れ、Eppendorf, 5415において、14,000rpmで5分間遠心分離した。遠心分離の後、上部の溶媒層を、20~200μLのBioHitピペット先端を有するm200 Variable Channel BioHitピペットを用いて除去した。溶媒と水層との間の層を除去しないように注意した。溶媒層を除去してから、試料を、2700rpmに設定されたVortex-Genie（登録商標）を用いて再懸濁した。

【0267】

細胞を血球計計数のための理想的な濃度にするために、一連の希釈が必要とされた。ODが10であった場合、理想的な量（20~30）の細胞が平方当たり係数されるようにし得る0.5のODを得るために、1:20の希釈を行い得る。トウモロコシの固体による、希釈の不正確性を低下させるために、カットされた100~1000μLのBioHitピペット先端を用いた複数回の希釈が必要とされた。先端が詰まるのを防いで開口を広げるために、約1cmを先端からカットした。1:20の最終的な希釈の場合、発酵試料および0.9%のNaCl溶液の初期の1:1の希釈を行った。次に、前の溶液および0.9%のNaCl溶液の1:1の希釈、次に、最終的に、前の溶液およびTrypan Blue溶液による1:5の希釈。試料を各希釈の間にボルテックスし、カットされた先端を0.9%のNaClおよびTrypan Blue溶液に入れてすすいだ。

【0268】

カバースリップを、Hausser Scientific Bright-Line 1492、血球計の上部に注意深く入れた。2~20μLのBioHitピペット先端を有するm200 Variable Channel BioHitピペットを用いて、10μLを、最終的なTrypan Blue希釈液から抜き取り、血球計に注入した。血球計を40倍の倍率のZeiss Axioskop 40顕微鏡に設置した。中央の4分の1（center quadrant）を25個の方形に分割し、両方のチャンバーにおける4隅および中央の方形（center square）を計数し、記録した。両方のチャンバーを計数した後、平均値を取り、希釈係数（20）を乗算し、次に血球計における中央の4分の1における方形の数の25を乗算し、次に計数された4分の1の体積である0.0001mLで除算した。この計算の合計は、mL当たりの細胞の数である。

【0269】

水相中の発酵生成物のLC分析

試料を処理の準備ができるまで冷蔵した。試料を、1時間冷蔵から取り出して、室温にした。約300μLの試料を、100~1000μLのBioHitピペット先端を有するm1000 Variable Channel BioHitピペットを用いて、0.2μmの遠心分離機フィルター（Nanosep MFの改造されたナイロン遠心分離機フィルター）に移し、次にEppendorf 5415Cを用いて、14,000rpmで5分間遠心分離した。約200μLのろ過された試料を、ポリマーフィート（frit）とともに250μLのガラス容器挿入部（insert）を備えた1.8オートサンプラー容器に移した。PTFE隔壁を備えたねじ蓋を用いて容器に蓋をしてから、2700rpmに設定されたVortex-Genie（登録商標）を用いて試料をボルテックスした。

【0270】

次に、試料を、バイナリアイソクラティックポンプ、真空脱気装置、加熱されたカラム区画、サンプラー冷却システム、UV DAD検出器およびRI検出器を備えたAgilent 1200シリーズLCで実験した。使用されたカラムは、Bio-Rad Cation Hリフィル、30X4.6ガードカラムを備えたAminex HPLC-87H, 300 X 7.8であった。カラム温度は、0.01Nの硫酸の移動相を用いて、0.6mL/分の流量で40分間、40℃であった。結果を表6に示す。

【0271】

【表7】

表6: 水相中の発酵生成物の保持時間

10μLの注入に標準化した HPLC 302/310	FW	RID 保持時間 (分)	標準の範囲 (g/L)	UV 保持時間 (分)
クエン酸	192.12	8.025	0.3~17	7.616
グルコース	180.16	8.83	0.5~71	
ピルビン酸(Na)	110.04	9.388	0.1~5.2	8.5
A-Kiv(Na)	138.1	9.91	0.07~5.0	8.55
2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸 (Na)	156.1	10.972	0.2~8.8	10.529
コハク酸	118.09	11.561	0.3~16	11.216
乳酸(Li)	96.01	12.343	0.3~17	11.948
グリセロール	92.09	12.974	0.8~39	
ギ酸	46.03	13.686	0.2~13	13.232
酢酸塩(Na)	82.03	14.914	0.5~16	14.563
メソ-ブタンジオール	90.12	17.583	0.1~19	
(+/-)-2,3-ブタンジオール	90.12	18.4	0.2~19	
イソ酪酸	88.11	19.685	0.1~8.0	19.277
エタノール	46.07	21.401	0.5~34	
イソブチルアルデヒド	72.11	27.64	0.01~0.11	
イソブタノール	74.12	32.276	0.2~15	
3-OH-2-ブタノン(アセトイン)	88.11		0.1~11	17.151

【0272】

溶媒相中の発酵生成物のGC分析

試料を処理の準備ができるまで冷蔵した。試料を、1時間冷蔵から取り出して、室温にした。約150μLの試料を、100~1000μLのBioHitピペット先端を有するm1000 Variable Channel BioHitピペットを用いて、ポリマーフィートとともに250μLのガラス容器挿入部を備えた1.8オートサンプラー容器に移した。PTFE隔壁を備えたねじ蓋を用いて容器に蓋をした。

【0273】

次に、試料を、7683B注入器およびG2614Aオートサンプラーを備えたAgilent 7890A GCで実験した。カラムは、HP-Innowaxカラム(30m×0.32mmの内径、0.25μmのフィルム)であった。キャリアガスは、一定の上部圧力を用いて45℃で測定される1.5mL/分の流量でヘリウムであり；注入器スプリットは、225℃で1:50であり；オープン温度は、1.5分間45℃、10℃/分で0分間、45℃~160℃、次に29分間の実行時間について、35℃/分で14分間、230℃であった。炎イオン化検出を、40mL/分のヘリウムメイクアップガスを用いて260℃で使用した。結果を表7に示す。

【0274】

【表 8】

表 7: 溶媒相中の発酵生成物の保持時間

10μL の注入に標準化した GC 302/310	FW	溶媒保持時間 (分)	標準の範囲 (g/L)
イソブチルアルデヒド	72.11	2.75	0.7~10.4
エタノール	46.07	3.62	0.5~34
イソブタノール	74.12	5.53	0.2~16
3-OH-2-ブタノン(アセトイン)	88.11	8.29	0.1~11
(+/-)-2,3-ブタンジオール	90.12	10.94	0.1~19
イソ酪酸	88.11	11.907	0.1~7.9
メソ-ブタンジオール	90.12	11.26	0.1~6.5
グリセロール	92.09	16.99	0.8~9

【0275】

脂肪酸ブチルエステルについて分析される試料を、7683B 注入器および G2614 A オートサンプラーを備えた Agilent 6890 GC で実験した。カラムは、HP-DB-FFAP カラム (15メートル×0.53mm の内径 (Megabore)、1-ミクロンのフィルム厚さのカラム (30m×0.32mm の内径、0.25μm のフィルム) であった。キャリアガスは、一定の上部圧力を用いて 45℃ で測定される 3.7 mL/分の流量でヘリウムであり; 注入器スプリットは、225℃ で 1:50 であり; オープン温度は、2.0 分間 100℃、10℃/分で 100℃~250℃、次に、26 分間の実行時間について、9 分間 250℃ であった。炎イオン化検出を、40 mL/分のヘリウムメイクアップガスを用いて 300℃ で使用した。以下の GC 標準 (Nu-Chek Prep; Elysian, MN) を用いて、脂肪酸イソブチルエステル生成物: パルミチン酸イソブチル、ステアリン酸イソブチル、オレイン酸イソブチル、リノール酸イソブチル、リノレン酸イソブチル、アラキドン酸イソブチルの属性を確認した。

【0276】

実施例 11A

実験識別子 2010Y033 は以下のものを含んでいた: シードフラスコ増殖方法、固体を除外したトウモロコシマッシュを用いた初期の発酵装置の調製方法、液化後のリパーゼ処理、接種方法の前の栄養添加、発酵装置の接種方法、発酵装置の運転条件方法、および分析方法の全て。トウモロコシ油脂肪酸を、接種後 0.1~1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェン (butanologen) は、CEN. PK113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB Δgpd2::loxP/pYZ090+pLH468 (NGCI-070) であった。

【0277】

実施例 11B

実験識別子 2010Y034 は以下のものを含んでいた: シードフラスコ増殖方法、固体を含むトウモロコシマッシュを用いた初期の発酵装置の調製方法、液化後のリパーゼ処理、接種方法の前の栄養添加、発酵装置の接種方法、発酵装置の運転条件方法、および分析方法の全て。トウモロコシ油脂肪酸を、接種後 0.1~1.0 時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは、CEN. PK113-7D Δura3::loxP Δhis3 Δpdc6 Δpdc1::ilvDSm Δpdc5::sadB Δgpd2::loxP/pYZ090+pLH468 (NGCI-070) であった。

【0278】

実施例 11C

実験識別子 2010Y035 は以下のものを含んでいた: シードフラスコ増殖方法、固

体を除外したトウモロコシマッシュを用いた初期の発酵装置の調製方法、接種方法の前の栄養添加、発酵装置の接種方法、発酵装置の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後0.1～1.0時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは、CEN. PK113-7D $\Delta ura3::loxP$ $\Delta his3$ $\Delta pdc6$ $\Delta pdc1::ilvDSm$ $\Delta pdc5::sadB$ $\Delta gpd2::loxP/pYZ090+pLH468$ (NGCI-070)であった。

【0279】

実施例11D

実験識別子2010Y036は以下のものを含んでいた：シードフラスコ増殖方法、固体を含むトウモロコシマッシュを用いた初期の発酵装置の調製方法、接種方法の前の栄養添加、発酵装置の接種方法、発酵装置の運転条件方法、および分析方法の全て。オレイルアルコールを、接種後0.1～1.0時間、単一のバッチに加えた。ブタノロジェンは、CEN. PK113-7D $\Delta ura3::loxP$ $\Delta his3$ $\Delta pdc6$ $\Delta pdc1::ilvDSm$ $\Delta pdc5::sadB$ $\Delta gpd2::loxP/pYZ090+pLH468$ (NGCI-070)であった。

【0280】

実施例11A～11Dの結果を表8に示す。

【0281】

【表9】

表8: 実施例11A～11Dの発酵条件および結果

実施例 番号	実験 識別番号 (ID)	活性 リパーゼ	液化後の 非溶解固体 の除去	抽出溶媒	投入される グルコース 当量 (g/kg)	EORに おいて 消費される グルコース (g/kg)	有効な イソブタ ノール (g/L)
11A	2010Y033	あり	あり	トウモロコシ 油脂肪酸	257	257	30.9
11B	2010Y034	あり	なし	トウモロコシ 油脂肪酸	239	239	17.3
11C	2010Y035	なし	あり	オレイル アルコール	263	72	15.7
11D	2010Y036	なし	なし	オレイル アルコール	241	101	20

【0282】

実施例12

発酵装置体積効率の向上に対する発酵装置原料からの非溶解固体の除去の影響

この実施例は、発酵装置体積効率に対する、発酵前のマッシュからの非溶解固体の除去の影響を示す。トウモロコシマッシュ中の非溶解固体は、トウモロコシ充填量およびでんぷん含量に応じて、マッシュ体積の少なくとも5%を占める。発酵前の固体の除去により、少なくとも5%多くの糖を発酵装置に投入することができ、したがってバッチの生産性を高める。

【0283】

実施例10で生成された液化されたトウモロコシマッシュは、全てのでんぷんが液化中に可溶性オリゴ糖に加水分解されたと仮定して、使用されるトウモロコシ充填量（乾燥トウモロコシ基準で40%）、トウモロコシのでんぷん含量（乾燥トウモロコシ基準で71.4%）を基準にして、約28重量%（280g/L）の液化でんぷんを含有していたこ

とが推定された。マッシュを、実施例 1 1 に記載されるように発酵に必要とされるより高濃度のオリゴ糖を用いて調製して、栄養、接種材料、グルコアミラーゼ、および基剤を初期の発酵プロセスに加えるときに希釈を可能にした。これらの成分を加えた後、マッシュを約 10 % だけ希釈した。したがって、発酵 2010Y034 および 2010Y036 の開始時におけるマッシュ（固体を含む）中の液化でんぶんの予測される濃度は約 250 g/L であった。2010Y034 および 2010Y036 発酵に投入される実際のグルコース当量は、それぞれ 239 g/kg および 241 g/kg であった（表 8 を参照）。比較して、2010Y033 および 2010Y035 発酵に投入されるグルコース当量は、それぞれ 257 g/kg および 263 g/kg であった。これらの発酵の原料は、遠心分離液（固体の大部分を除去したマッシュ）であったことに留意されたい。約 1.2 L の糖源（マッシュまたは遠心分離液）を、各発酵に投入した。したがって、このデータに基づいて、マッシュ（2010Y034 および 2010Y036）と比較して約 8.3 % 多くの糖を、遠心分離液（2010Y033 および 2010Y035）を使用する発酵装置に投入した。これらの結果は、発酵前のトウモロコシマッシュからの非溶解固体の除去により、単位体積当たり投入される糖がかなり増加し得ることを示す。これは、固体が存在する場合、それが貴重な発酵装置体積を占めることを示唆している。固体が原料から除去される場合、非溶解固体が存在しないために、より多くの糖が、発酵装置に加えられ得る（「適する」）。この実施例は、発酵装置体積効率が、発酵前にマッシュから非溶解固体を除去することによって、かなり向上され得ることを示す。

【0284】

実施例 13

抽出溶媒とプロセスとの間の相分離に対する非溶解固体の除去の影響－抽出発酵

この実施例は、発酵前にトウモロコシマッシュから非溶解固体を除去することによる、抽出発酵プロセスの際およびその後の溶媒相とプロセス相との間の向上した分離を示す。2 つの抽出発酵を、並行して行い、1 つは、液化されたトウモロコシマッシュを糖源（固体を除去したもの）として用い、1 つは、非溶解固体の大部分を液化されたトウモロコシマッシュから除去することによって生成された遠心分離液（オリゴ糖の水溶液）を用いた。オレイルアルコール（OA）を両方の発酵に加えて、生成物が形成されるにつれて生成物（i-BuOH）をプロセスから抽出した。固体が原料（トウモロコシマッシュを使用した）から除去されなかった場合の、この実施例において言及される発酵プロセスは、実施例 10 に記載される 2010Y036 であった。固体が原料（トウモロコシマッシュから生成される遠心分離液を使用した）から除去された場合の、この実施例において言及される発酵プロセスは、実施例 10 に記載される 2010Y035 であった。オレイルアルコールが、両方の発酵に使用される抽出溶媒であった。最終的な発酵プロセスについてだけではなく発酵全体にわたって、相分離の速度および程度を測定し、比較した。抽出発酵プロセス中の十分な相分離は、微生物の最小限の損失および最小限の溶媒損失ならびに下流の処理のより低い資本コストおよび運転コストにつながり得る。

【0285】

発酵中の溶媒相とプロセス相との間の相分離

約 10 mL の試料を、5.3 時間、29.3 時間、53.3 時間、および 70.3 時間の時点で各発酵装置から引き抜き、試料から固体を除去した場合の発酵（2010Y035）および固体を除去しなかった場合の発酵（2010Y036）からの試料について相分離を比較した。試料を約 2 時間静置させ、液液界面の位置を追跡することによって、全ての実行時間からの全ての試料について、相分離を観察し、比較した。固体を除去しなかった場合の発酵から引き抜かれた試料のいずれについても相分離が実質的に全く観察されなかった。発酵前に液化されたトウモロコシマッシュから固体を除去した場合の発酵からの全ての試料について相分離が観察された。全ての発酵時間について固体を除去した場合の実験から試料を引き抜いた約 10～15 分以内に分離が起こり始め、2 時間の期間にわたって向上し続けた。約 7 分間の沈降時間の後、遠心分離液発酵（固体を除去したもの）から、5.3 時間の発酵実行時間の時点で引き抜かれた試料において相分離が起こり始め

た。約 17 分間の沈降時間の後、遠心分離液発酵（固体を除去したもの）から 53.3 時間の時点で引き抜かれた試料において相分離が起こり始めた。

【0286】

図 9 は、（重力）沈降時間に応じた発酵試料管中の液液界面の位置のプロットである。データは、遠心分離液が糖源として供給された（固体がトウモロコシマッシュから除去されたもの）場合の抽出発酵から引き抜かれた試料についてのものであり、OA は、ISPR 抽出溶媒（実施例 10 の実験 2010Y035）であった。このプロットにおける相分離データは、5.3 時間、29.3 時間、53.3 時間、および 70.3 時間の実行時間の時点で発酵 2010Y035 から引き抜かれた試料についてのものである。界面位置が、試料管中の全ブロス高さにおけるパーセンテージとして報告される。例えば、5.3 時間の実行時間の時点で 2010Y035 発酵（遠心分離液/OA）から引き抜かれた試料の界面位置は、120 分間の沈降時間の後、試料管の底部（分離なし）から 3.5 mL に増加した。その特定の試料管中には約 10 mL の全ブロスが存在していた。したがって、その試料の界面位置は、図 9 において 35% として報告された。同様に、53.3 時間の実行時間の時点で 2010Y035 発酵（遠心分離液/OA）から引き抜かれた試料の界面位置は、125 分間の沈降時間の後、試料管の底部（分離なし）から約 3.9 mL に増加した。その特定の試料管中には約 10 mL の全ブロスが存在していた。したがって、その試料の界面位置は、図 9 において 39% として報告された。

【0287】

発酵を完了した後の溶媒相とブロス相との間の相分離

70 時間の実行時間の後、発酵を停止し、OA 抽出発酵からの 2 つのブロスを、別個の 2 L のガラス製メスシリンダーに移した。溶媒相とブロス相との分離を観察し、比較した。発酵前に固体を除去しなかった場合のブロス（実験 2010Y036）については、約 3 時間後に相分離がほとんど観察されなかった。発酵前に液化されたトウモロコシマッシュから固体を除去した場合のブロス（実験 2010Y035）については、相分離が観察された。約 15 分間の沈降時間の後に分離が起こり始め、3 時間の期間にわたって向上し続けた。15 分後、液液界面が、二相混合物の全高さの約 10% のレベルで確立された。これは、水相がまず分散体から分割され、混合物の底部において蓄積され始めたことを示す。時間が経過するにつれて、より多くの水相が混合物の底部に蓄積され、界面の位置を上昇させた。約 3 時間の沈降時間の後、界面は、二相混合物の全高さの約 40% のレベルに増加した。これは、最初に発酵に投入した遠心分離液および OA の量に基づいて、固体を除去した場合の最終的な二相のブロスについて、ほぼ完全な相分離が、約 3 時間の（重力）沈降時間の後に起こったことを示す。ほぼ等しい体積の初期の遠心分離液および溶媒を、両方の発酵に投入した。約 1.2 L の液化されたトウモロコシマッシュおよび約 1.1 L の OA を、発酵 2010Y036 に投入した。マッシュの同じバッチから生成された約 1.2 L の遠心分離液、および約 1.1 L の OA を、発酵 2010Y035 に投入した。水相中の約 100 g/kg の初期の糖が消費されたことおよび生成される i -BuOH の約 75% が溶媒相中にあったことを把握した後、完全な分離が起こった場合、最終的な水相および有機相の相対体積が約 1:1 であろうことが予測され得る。図 10 は、固体を除去した場合の抽出発酵（2010Y035）からの最終的な二相のブロスについての（重力）沈降時間に応じた液液界面位置のプロットである。界面位置は、最終的なブロスの相分離を観察するために使用される 2 L のメスシリンダー中の全ブロス高さにおけるパーセンテージとして報告される。2010Y035 発酵からの最終的なブロスの界面位置は、175 分間の沈降時間の後、メスシリンダーの底部（分離なし）から二相混合物の全高さの約 40% のレベルに増加した。したがって、最終的なブロス中の二相のほぼ完全な分離が、3 時間の沈降時間の後に起こった。約 50% の界面位置が、完全な分離に相当し得る。

【0288】

10 mL の試料を、固体を除去した場合の発酵からの最終的なブロス（約 3 時間沈降させた）の有機相の上部から引き抜いた。試料を、高速の実験用遠心分離機において回転さ

せて、ブrossを3時間沈降させた後に有機相中に存在する水相の量を測定した。結果は、最終的なブrossの上層の約90%が溶媒相であったことを示した。比較的少量の非溶解固体を含む、最終的なブrossの上層の約10%が水相であった。いくらかの固体が水相の底部（水相より濃い）に位置し、また、少量の固体が液液界面に蓄積されていた。

【0289】

10 mLの試料を、固体を除去した場合の発酵からの最終的なブross（約3時間沈降させた）の底相からも引き抜いた。試料を、高速の実験用遠心分離機において回転させて、ブrossを3時間沈降させた後に水相中に存在する有機相の量を測定した。ブrossを3時間沈降させた後、固体を除去した発酵からの最終的なブrossの底（水）相中に有機相が実質的に存在しなかったことが分かった。これらの結果は、固体を除去した場合の発酵からの最終的なブrossについては、ほぼ完全な相分離が起こったことを確認する。固体を除去しなかった場合の発酵からの最終的なブrossについては、相分離がほとんど見られなかった。このデータは、抽出発酵前の液化されたトウモロコシマッシュからの固体の除去により、発酵中および発酵後の相分離のかなりの向上が可能になり得、下流の処理への微生物、非溶解固体、および水の損失が減少され得ることを示唆する。

【0290】

10 mLの試料を、ブrossを約3時間静置させた後に固体を除去しなかった発酵からの最終的なブrossの上部から引き抜いた。試料を、高速の実験用遠心分離機において回転させて、最終的なブrossの上部における溶媒相および水相の相対量を測定した。このブrossは、液化されたトウモロコシマッシュ固体からの全ての固体を含有していた。試料の約半分が水相であり、約半分が有機相であった。水相は、固体を除去した場合のブrossからの上層の試料と比較して、かなり多くの非溶解固体（液化されたマッシュに由来する）を含有していた。この試料中の水相および溶媒相の量はほぼ同じであり、これは、（3時間の沈降時間の後でさえ）固体を除去しなかった場合の最終的なブrossにおいて相分離が実質的に起こらなかったことを示す。このデータは、固体が、抽出発酵前に液化されたトウモロコシマッシュから除去されない場合、発酵中および発酵後に相分離がほとんどないし全く起こらない可能性が高いことを示唆する。これは、下流の処理への微生物、非溶解固体、および水のかかなりの損失をもたらし得る。

【0291】

実施例14

ISPR抽出溶媒の損失に対する非溶解固体の除去の影響－抽出発酵

この実施例は、発酵前にトウモロコシマッシュから非溶解固体を除去することによって、抽出発酵プロセスの最終段階から出るDDGSについての溶媒損失を減少させる可能性を示す。実施例10は、並行して行われる2つの抽出発酵を説明し、1つは、糖源として液化されたトウモロコシマッシュ（2010Y036－固体を除去しないもの）を用い、1つは、非溶解固体の大部分を液化されたトウモロコシマッシュから除去することによって得られる液化されたマッシュ遠心分離液（2010Y035－オリゴ糖の水溶液）を用いた。オレイルアルコール（OA）を両方の発酵に加えて、生成物が形成されるにつれて生成物イソブタノール（i-BuOH）をブrossから抽出した。最終的な発酵ブrossから回収される非溶解固体に捕捉される残留溶媒の量を測定し、比較した。

【0292】

実施例10に記載される発酵2010Y035および2010Y036が完了した後、ブrossを採取し、実施例11に記載される相分離試験を行うのに使用した。次に、非溶解固体（発酵前に除去されなかったトウモロコシマッシュからの微粒子）を、各ブrossから回収し、全抽出可能油について分析した。固体の各ロットから回収される油を、OAおよびトウモロコシ油について分析した。両方のブrossについて以下のプロトコルにしたがった：

- ・ブrossを遠心分離して、有機相と、水相と、固相とに分離した。

- ・有機相および水相を、固体からデカントして、遠心分離機ボトルの底部にウェットケーキを残した。

10

20

30

40

50

・ウェットケーキを水で十分に洗浄して、残留オリゴ糖、グルコース、塩、酵素などの、ケーキ中に保持される溶解固体の実質的に全てを除去した。

・洗浄されたウェットケーキを、一晩、真空オーブン（80℃で家庭用の真空）中で乾燥させて、ケーキ中の水の実質的に全てを除去した。

・乾燥固体の一部を、S o x h l e t 抽出器中でヘキサンと十分に接触させて、固体から油を除去した。

・固体から回収される油をGCによって分析して、固体から回収される油中に存在するOAおよびトウモロコシ油の相対量を測定した。

・両方の発酵プロセスから回収される固体についての粒度分布（PSD）を測定した。

【0293】

両方の発酵プロセスからの非溶解固体の回収およびヘキサン抽出についてのデータを表8に示す。データは、（固体の単位質量当たり）ほぼ同じ量の油が、両方の発酵において固体によって吸収されたことを示す。

【0294】

【表10】

表8

発酵識別番号(ID):	2010Y036	2010Y035
発酵前に液化されたマッシュから除去される固体	なし (マッシュ)	あり (遠心分離液)
有機相、水相を除去し、ウェットケーキを水で洗浄した後に回収される洗浄されたウェットケーキ(g):	290.6 g	15.6 g
洗浄されたウェットケーキ中の乾燥固形分(重量%):	23.6%	25.8%
洗浄されたウェットケーキから回収される乾燥固体(g):	68.1 g	4.02 g
Soxhletに投入される乾燥固体(g):	20.11 g	3.91 g
水分分析による、Soxhletに投入される固体の乾燥分(重量%):	97.9%	98.1%
Soxhletヘキサン抽出から回収される全油(g):	2.30 g	0.25 g
固体の油含量(乾燥固体基準)(乾燥固体のg当たりの油のg):	0.12 gの油/g 乾燥固体	0.07 gの油/g 乾燥固体
OAである固体から抽出される油の画分(概算値)(重量%):	76%	74%

【0295】

実施例15

ウェットケーキを水で洗浄することによる、液化されたトウモロコシマッシュからの固体の除去から生成されるウェットケーキからの可溶性でんぶんの回収—2段階プロセス

この実施例は、ケーキを水で2回洗浄することによる、ウェットケーキからの可溶性でんぶんの回収を示し、ここで、ケーキは、液化されたマッシュを遠心分離することによって生成された。液化されたトウモロコシマッシュを、連続デカンター遠心分離機に供給して、遠心分離液流（C-1）およびウェットケーキ（WC-1）を生成した。遠心分離液は、比較的固体を含まない、可溶性でんぶんの水溶液であり、原料マッシュと比較して、ウェットケーキを固体に濃縮した。ウェットケーキの一部を、高温水と混合して、スラリー（S-1）を形成した。スラリーをデカンター遠心分離機に再び注入して、洗浄水遠心分離液（C-2）および洗浄されたウェットケーキ（WC-2）を生成した。C-2は、比較的固体を含まない、可溶性でんぶんの希薄水溶液であった。C-2中の可溶性でんぶ

んの濃度は、マッシュの分離から生成される遠心分離液中の可溶性でんぶんの濃度より低かった。WC-2中に保持される液相は、マッシュの分離から生成されるウェットケーキ中の液体より、でんぶんが希薄であった。洗浄されたウェットケーキ（WC-2）を、高温水と混合して、スラリー（S-2）を形成した。投入されるウェットケーキ中の可溶性でんぶんの量に対する投入される水の比率は、両方の洗浄工程において同じであった。第2の洗浄スラリーを、デカンター遠心分離機に再び注入して、2回洗浄した、第2の洗浄水遠心分離液（C-3）およびウェットケーキ（WC-3）を生成した。C-3は、比較的固体を含まない、可溶性でんぶんの希薄水溶液であった。C-3中の可溶性でんぶんの濃度は、第1の洗浄段階（C-2）において生成される遠心分離液中の可溶性でんぶんの濃度より低く、したがって、WC-3（第2の洗浄されたウェットケーキ）中に保持される液相は、WC-2（第1の洗浄されたウェットケーキ）中のでんぶんより希薄であった。2つの洗浄遠心分離液（C-2およびC-3）中の全可溶性でんぶんは、回収され、液化に再利用され得るでんぶんである。最終的な洗浄されたウェットケーキ中に保持される液体中の可溶性でんぶんは、マッシュの元の分離において生成されるウェットケーキ中よりはるかに少ない。

10

【0296】

液化されたトウモロコシマッシュの生成

約1000ガロンの液化されたトウモロコシマッシュを、ハンマーミル、スラリー混合器、スラリートンク、および液化タンクからなる連続乾式磨砕液化システムにおいて生成した。磨砕トウモロコシ、水、および α -アミラーゼを連続して供給した。反応器は、アンモニアまたは硫酸のいずれかを用いて、機械的攪拌、温度制御、およびpH制御を備えていた。反応条件は以下のとおりであった：

20

- ・ハンマーミルのふりサイズ：7／64インチ
- ・スラリー混合器への供給速度
 - －磨砕トウモロコシ：560質量ポンド／時（14.1重量%の水分）
 - －処理水：16.6質量ポンド／分（200F）
 - － α -アミラーゼ：61g／時（Genecor：Spezyme（登録商標）A）
- ・スラリートンク条件：
 - －温度：185°F（85°C）
 - －pH：5.8
 - －滞留時間：0.5時間
 - －乾燥トウモロコシ充填量：31重量%
 - －酵素充填量：0.028重量%（乾燥トウモロコシ基準）
- ・液化タンク条件：
 - －温度：185°F（85°C）
 - －pH：5.8
 - －滞留時間：約3時間
 - －さらなる酵素添加なし。

30

【0297】

液化されたトウモロコシマッシュの生成速度は約3ガロン／分（gpm）であった。磨砕トウモロコシのでんぶん含量は、乾燥トウモロコシ基準で約70重量%であった。液化されたマッシュの全固形分（TS）は約31重量%であり、全懸濁固体（TSS）は約7重量%であった。液相は、HPLCによって測定した際に約23～24重量%の液化でんぶん（可溶性オリゴ糖）を含有していた。

40

【0298】

液化されたマッシュを、連続デカンター遠心分離機において以下の条件で遠心分離した：

- ・ボウル速度：5000rpm（約3600g's）
- ・差速：15rpm
- ・せきの直径：185mm（せき板を取り外した場合）

50

・供給速度：5～20ガロン／分で変動。

【0299】

約850ガロンの遠心分離液および約1400質量ポンドのウェットケーキを、マッシュを遠心分離することによって生成した。ウェットケーキ中の全固形分は、水分収支によって測定したところ、約46.3%（懸濁固体＋溶解固体）であった。液相が約23重量%の可溶性でんぷんを含有していたことが分かり、ウェットケーキ中の全懸濁固体が約28重量%であったことが推定された。ウェットケーキが、遠心分離機運転の前に液化されたマッシュ中に存在する約12%の可溶性でんぷんを含有していたことが推定された。

【0300】

固体を水で洗浄することによるウェットケーキからの可溶性でんぷんの回収－1回目の洗浄

10

液化されたマッシュの分離から回収される約707質量ポンドのウェットケーキを、300ガロンのステンレス鋼容器中で、165ガロンの高温（91℃）の水と混合した。得られたスラリーを、約30分間混合した。スラリーをデカンター遠心分離機に連続して供給して、洗浄された固体をスラリーから除去した。洗浄スラリーを分離するのに使用される遠心分離機は、上記の液化されたマッシュから固体を除去するのに使用されるのと同じものであり、スラリーを供給する前に、それを新鮮な水ですすいだ。遠心分離機を以下の条件で運転して、洗浄スラリーから固体を除去した：

- ・ボウル速度：5000rpm（約3600g's）
- ・差速：5rpm
- ・せきの直径：185mm（せき板を取り外した場合）
- ・供給速度：5ガロン／分。

20

【0301】

約600質量ポンドの洗浄されたウェットケーキを遠心分離機によって生成したが、材料の損失のためにわずか400質量ポンドが回収されたに過ぎなかった。ウェットケーキ中の全固形分は、水分収支によって測定したところ、約36.7%（懸濁固体＋溶解固体）であった。スラリーの液相中および洗浄水遠心分離液（スラリーから得られる）中の全可溶性でんぷん（グルコース、DP2、DP3、およびDP4+の合計）をHPLCによって測定したところ、それぞれ約6.7重量%および6.9重量%であった。DP2は、2つのグルコース単位（グルコース二量体）を含有するデキストロースポリマーを指す。DP3は、3つのグルコース単位（グルコース三量体）を含有するデキストロースポリマーを指す。DP4+は、4つ以上のグルコース単位（グルコース四量体およびより高次の多量体）を含有するデキストロースポリマーを指す。これにより、よく混合された希釈洗浄段階が行われたことを確認した。したがって、洗浄されたウェットケーキ中に保持される液相中の可溶性でんぷんの濃度は、この希釈洗浄について約6.8重量%（物質収支によって）であったはずである。全固形分および溶解されたオリゴ糖のデータに基づいて、洗浄されたウェットケーキ中の全懸濁固体は約32重量%であったことが推定された。遠心分離機によって生成されるケーキの全ての600質量ポンドを洗浄することができた場合、洗浄されたウェットケーキは、元の液化されたマッシュ中に存在する約2.6%の可溶性でんぷんを含有していたことが推定された。これは、洗浄前のマッシュウェットケーキと比較して、洗浄されたウェットケーキ中の可溶性でんぷんの約78%の減少を表す。液化されたマッシュの分離から生成されるウェットケーキを洗浄しなかった場合、マッシュ中の全でんぷんの約12%が、可溶性（液化）でんぷんとして喪失されるであろう。マッシュの分離から生成されるウェットケーキを、この実施例に示される条件で水で洗浄する場合、マッシュからの全でんぷんの2.6%が、可溶性（液化）でんぷんとして喪失されるであろう。

30

40

【0302】

液化されたマッシュウェットケーキの第1の再スラリー洗浄から回収される約400質量ポンドの洗浄されたウェットケーキを、300ガロンのステンレス鋼容器中で110ガロンの高温（90℃）水と混合した。得られたスラリーを約30分間混合した。スラリー

50

をデカンター遠心分離機に連続して供給して、洗浄された固体をスラリーから除去した。第2の洗浄スラリーを分離するのに使用される遠心分離機は、上記の第1の洗浄に使用されるのと同じであり、第2の洗浄スラリーを供給する前に、それを新鮮な水ですすいだ。遠心分離機を以下の条件で運転して、洗浄スラリーから固体を除去した：

- ・ボウル速度：5000rpm（約3600g's）
- ・差速：5rpm
- ・せきの直径：185mm（せき板を取り外した場合）
- ・供給速度：4ガロン／分。

【0303】

約322質量ポンドの洗浄されたウェットケーキを、遠心分離機によって生成した。第2の洗浄からのウェットケーキ中の全固形分は、水分収支によって測定したところ、約37.4%（懸濁固体＋溶解固体）であった。スラリーの液相中および洗浄水遠心分離液（スラリーから得られる）中の全可溶性でんぷん（グルコース、DP2、DP3、およびDP4+の合計）をHPLCによって測定したところ、それぞれ約1.6重量%および1.6重量%であった。これにより、よく混合された希釈洗浄段階が第2の洗浄において行われたことを確認した。したがって、洗浄されたウェットケーキ中に保持される液相中の可溶性でんぷんの濃度は、この希釈洗浄について約1.6重量%（物質収支によって）であったはずである。全固形分および溶解されたオリゴ糖のデータに基づいて、洗浄されたウェットケーキ中の全懸濁固体は約36重量%であったことが推定された。第1の洗浄段階において生成されるケーキの全ての600質量ポンドを洗浄することができた場合、洗浄されたウェットケーキは、元の液化されたマッシュ中に存在する約0.5%の可溶性でんぷんを含有していたことが推定された。これは、約96%の洗浄の前のマッシュウェットケーキと比較して、2回洗浄されたウェットケーキ中の可溶性でんぷんの全減少を表す。液化されたマッシュの分離から生成されるウェットケーキを除去しなかった場合、マッシュ中の全でんぷんの約12%が可溶性（液化）でんぷんとして喪失されるであろう。マッシュの分離から生成されるウェットケーキを、この実施例に示される条件で水で2回洗浄する場合、マッシュからの全でんぷんの0.5%が、可溶性（液化）でんぷんとして喪失されるであろう。

【0304】

実施例16

トウモロコシ固体中のでんぷんの、可溶性（液化）でんぷんへの転化率に対する液化中の高温段階の影響

この実施例は、反応の途中のある時点における高温（または「調理」）段階による液化の操作が、トウモロコシ固体中のでんぷんの、可溶性（液化）でんぷんへのより高い転化率につながり得ることを示す。この実施例に示される「調理」段階は、液化が開始した後のある時点で液化温度を上昇させる工程と、より高温である期間保持する工程と、次に、温度を再び元の値まで低下させて、液化を完了させる工程とを含む。

【0305】

A. 液化後に固体中に残っている非加水分解でんぷんを測定する手順

液化されたトウモロコシマッシュを、実施例1（中間の高温段階はない）のプロトコルにしたがって1回の実行で調製した。液化されたトウモロコシマッシュを、中間の高温段階を追加した以外は第1の実行と同じ条件における別の実行で調製した。両方の実行からのマッシュを、以下の工程にしたがって後処理（work up）した。それを遠心分離して、液化でんぷんの水溶液を非溶解固体から分離した。液化でんぷんの水溶液をデkantして取り除いて、ウェットケーキを回収した。ウェットケーキは、マッシュからの非溶解固体の大部分を含有していたが、固体は、液化でんぷん溶液でまだ湿っていた。ウェットケーキを水で十分に洗浄し、得られたスラリーを遠心分離して、水層を非溶解固体から分離した。ケーキを、十分な水で、合計5回洗浄して、液化から回収される元のウェットケーキ中に保持された可溶性でんぷんのほぼ全てを除去した。その結果、最終的な洗浄されたウェットケーキ中に保持される液相は、可溶性でんぷんを実質的に含有しない水から

なっていた。

【0306】

最終的な洗浄されたウェットケーキを、水中で再スラリー化し、非常に過剰な α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの両方を加えた。温度およびpHを制御しながら、スラリーを少なくとも24時間混合して、 α -アミラーゼが、非溶解固体中に残っている実質的に全ての非加水分解でんぷんを可溶性オリゴ糖に転化するのを可能にした。その後、残留でんぷん（対象とする条件における液化中に加水分解されなかった）から生成される可溶性オリゴ糖を、存在するグルコアミラーゼによってグルコースに転化した。グルコース濃度を、HPLCによって時間とともに追跡して、残留でんぷんから生成される全てのオリゴ糖がグルコースに転化されたことおよびグルコース濃度がもはや時間とともに増加しないことを確認した。

10

【0307】

B. 液化されたトウモロコシマッシュの生成

2つのバッチの液化されたトウモロコシマッシュを、Liquozyme（登録商標）SCDS（Novozymes（Franklinton, NC）製の α -アミラーゼ）を用いて、85℃で（それぞれ約1L）調製した。両方のバッチを、85℃で2時間余り運転した。ただし、「調理」期間を、第2のバッチ（「バッチ2」）の途中で追加した。バッチ2の温度分布は、85℃で約30分間、温度を85℃から101℃まで上昇させ、101℃で約30分間保持し、85℃に冷却し、さらに120分間液化を続けた。両方のバッチに使用される磨砕トウモロコシは、実施例1と同じであった。26重量%（乾燥トウモロコシ基準）のトウモロコシ充填量を両方のバッチに使用した。両方の実行に使用される酵素の総量は、0.08重量%（乾燥トウモロコシ基準）に相当していた。両方の液化実行中、pHを5.8に制御した。液化を、ガラスの被覆された樹脂ケトル中で行った。ケトルは、機械的攪拌、温度制御、およびpH制御を備えていた。

20

【0308】

以下のプロトコルにしたがって、バッチ1の液化されたトウモロコシマッシュを調製した：

- ・ α -アミラーゼを水道水で希釈した（20.802gの水中の0.418gの酵素）

。

- ・704.5gの水道をケトルに投入した。

30

- ・攪拌器のスイッチを入れた。

- ・磨砕トウモロコシ（198g）の第1の投入を行った。

- ・攪拌しながら55℃まで加熱した。

- ・ H_2SO_4 またはNaOHを用いて、pHを5.8に調整した。

- ・ α -アミラーゼ溶液（7.111g）の第1の投入を行った。

- ・85℃まで加熱した

- ・85℃で30分間保持した。

- ・ α -アミラーゼ溶液（3.501g）の第2の投入を行った。

- ・磨砕トウモロコシ（97.5g）の第2の投入を行った。

- ・85℃でさらに100分間、運転し続けた。

40

- ・液化が完了した後、60℃に冷却した。

- ・反応器の中身を空け（dump）、998.5gの液化されたマッシュを回収した。

【0309】

以下のプロトコルにしたがって、バッチ2の液化トウモロコシマッシュを調製した：

- ・ α -アミラーゼを水道水で希釈した（16.642gの水中の0.3366gの酵素）。

- ・562.6gの水道をケトルに投入した。

- ・攪拌器のスイッチを入れた。

- ・磨砕トウモロコシ（237.5g）を投入した。

- ・攪拌しながら55℃まで加熱した。

50

- ・希薄 H_2SO_4 または NaOH を用いて、 pH を 5.8 に調整した。
- ・ α -アミラーゼ溶液 (4.25 g) の第 1 の投入を行った。
- ・85℃まで加熱した。
- ・85℃で30分間保持した。
- ・101℃まで加熱した。
- ・101℃で30分間保持した。
- ・マッシュの温度を再び85℃に低下させた。
- ・希薄 H_2SO_4 または NaOH を用いて、 pH を 5.8 に調整した。
- ・ α -アミラーゼ溶液 (4.2439 g) の第 2 の投入を行った。
- ・85℃でさらに120分間、運転し続けた。
- ・液化が完了した後、60℃に冷却した。

10

【0310】

C. 液化されたマッシュからの非溶解固体の除去および可溶性でんぷんを除去するための水によるウェットケーキの洗浄

バッチを室温で20分間、5000 rpmで大容量遠心分離機において遠心分離することによって、液化されたマッシュの両方のバッチから固体の大部分を除去した。バッチ1からの500 gのマッシュの遠心分離により、334.1 gの遠心分離液および165.9 gのウェットケーキが得られた。バッチ2からの872 gのマッシュの遠心分離により、654.7 gの遠心分離液および217 gのウェットケーキが得られた。液化されたマッシュの各バッチから回収されるウェットケーキを、水道水で5回洗浄して、ケーキ中に保持される可溶性でんぷんの実質的に全てを除去した。容器間でケーキが移るのを防ぐために、元のマッシュを遠心分離するのに使用されるのと同じボトルにおいて洗浄を行った。各洗浄段階では、ケーキを水と混合し、得られた洗浄スラリーを室温で(5000 rpmで20分間)遠心分離した。マッシュの両方のバッチから回収されるウェットケーキにおいて行われる全ての5回の洗浄段階についてこれを行った。約165 gの水を、バッチ1からのウェットケーキの5回の洗浄のそれぞれに使用し、これは、バッチ1からのウェットケーキを洗浄するのに使用される合計828.7 gの水になった。約500 gの水を、バッチ2からのウェットケーキの5回の洗浄のそれぞれに使用し、これは、バッチ2からのウェットケーキを洗浄するのに使用される合計2500 gの水になった。バッチ1からのウェットケーキの全ての5回の水洗浄から回収される全洗浄遠心分離液は893.1 gであった。バッチ2からのウェットケーキの全ての5回の水洗浄から回収される全洗浄遠心分離液は2566.3 gであった。バッチ1から回収される最終的な洗浄されたウェットケーキは101.5 gであり、バッチ2から回収される最終的な洗浄されたウェットケーキは151.0 gであった。各バッチから得られる最終的な洗浄されたウェットケーキは、可溶性でんぷんを実質的に含有しておらず；したがって、各ケーキ中に保持される液体は主に水であった。ウェットケーキの全固形分(TS)を、水分収支を用いて測定した。バッチ1からのウェットケーキの全固形分は21.63重量%であり、バッチ2からのウェットケーキのTSは23.66重量%であった。

20

30

【0311】

D. 液化後に非溶解固体中に残っている非加水分解でんぷんのレベルを測定するための、洗浄されたウェットケーキの液化／糖化

両方の洗浄されたウェットケーキ中に存在する固体中に残っている非加水分解でんぷんのレベルを、水中のケーキを再スラリー化し、過剰の α -アミラーゼおよび過剰のグルコアミラーゼを加えることによって測定した。 α -アミラーゼは、固体中の残留非加水分解でんぷんを、スラリーの水相に溶解する可溶性オリゴ糖に転化する。その後、グルコアミラーゼが、 α -アミラーゼによって生成される可溶性オリゴ糖をグルコースに転化する。反応を55℃(グルコアミラーゼの推奨される最高温度)で少なくとも24時間実行して、固体中の残留でんぷんの全てが可溶性オリゴ糖に転化され、全ての可溶性オリゴ糖がグルコースに転化されるのを確実にした。液化中に加水分解されなかったでんぷんである、固体中の残留非加水分解でんぷんは、この手順によって生成されるグルコースの量から計

40

50

算することができる。

【0312】

以下のプロトコルに使用される α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ酵素は、それぞれ *Liquozyme*（登録商標）SC DSおよび *Spirizyme*（登録商標）Fuel（Novozymes, Franklinton, NC）であった。洗浄されたウェットケーキを処理するのに使用される容器は、機械的攪拌、温度制御、およびpH制御を備えた250mLの被覆されたガラス樹脂ケトルであった。使用される *Liquozyme*（登録商標）の量は、「乾燥トウモロコシ基準」における0.08重量%の酵素充填量に相当していた。使用される *Spirizyme*（登録商標）の量は、「乾燥トウモロコシ基準」における0.2重量%の酵素充填量に相当していた。この基準は、全てのでんぷんが可溶性オリゴ糖に加水分解されると仮定して、洗浄されたケーキ中に保持される非溶解固体の量を得るのに必要とされる磨砕トウモロコシの量として定義される。洗浄されたケーキ中に保持される非溶解固体はほとんど、トウモロコシのでんぷんでない非発酵性の部分であると考えられる。これらの酵素充填量は、26%のトウモロコシ充填量で完全な液化および糖化を得るのに必要とされるより少なくとも4倍多い。酵素を非常に過剰に用いて、固体中の残留でんぷんの完全な加水分解およびグルコースへのオリゴ糖の完全な転化を確実にした。

10

【0313】

以下のプロトコルにしたがって、バッチ1のマッシュからの洗浄されたウェットケーキ中に存在する固体中の非加水分解でんぷんのレベルを測定した：

20

- ・ α -アミラーゼを水道水で希釈した（10.3607gの水中の0.1297gの酵素）。
- ・グルコアミラーゼを水道水で希釈した（15.6054gの水中の0.3212gの酵素）。
- ・132gの水道水をケトルに投入した。
- ・攪拌器のスイッチを入れた。
- ・液化バッチ1から生成される68gの洗浄されたウェットケーキ（TS=21.63重量%）を投入した。
- ・攪拌しながら55℃まで加熱した。
- ・希薄 H_2SO_4 またはNaOHを用いて、pHを5.5に調整した。
- ・ α -アミラーゼ溶液（3.4992g）を投入した。
- ・グルコアミラーゼ溶液（5.319g）を投入した。
- ・pHを5.5に制御しながら55℃で24時間運転し、グルコース用のスラリーを定期的に採取した。

30

【0314】

以下のプロトコルにしたがって、バッチ2からの洗浄されたウェットケーキ中に存在する固体中の非加水分解でんぷんのレベルを測定した。

- ・ α -アミラーゼを水道水で希釈した（11.709gの水中の0.2384gの酵素）。
- ・グルコアミラーゼを水道水で希釈した（17.5538gの水中の0.3509gの酵素）。
- ・154.3gの水道水をケトルに投入した。
- ・攪拌器のスイッチを入れた。
- ・液化バッチ1から生成される70.7gの洗浄されたウェットケーキ（TS=23.66重量%）を投入した。
- ・攪拌しながら55℃まで加熱した。
- ・希薄 H_2SO_4 またはNaOHを用いて、pHを5.5に調整した。
- ・ α -アミラーゼ溶液（2.393g）を投入した。
- ・グルコアミラーゼ溶液（5.9701g）を投入した。
- ・pHを5.5に制御しながら55℃で24時間運転し、グルコース用のスラリーを定

40

50

期的に採取した。

【0315】

洗浄されたウェットケーキの液化／糖化の結果の比較

上述したように、バッチ1および2からの洗浄されたウェットケーキを、水中で再スラリー化し、固体中に残っている一切のでんぷんを加水分解し、それをグルコースに転化するために、非常に過剰な α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの両方をスラリーに加えた。図11は、時間に応じたスラリーの水相中のグルコースの濃度を示す。

【0316】

グルコース濃度は、時間とともに増加し、両方の反応について約24時間の時点で最大値で安定した。24時間～48時間のグルコースのわずかな減少は、微生物汚染によるものであり得；したがって、各系において達するグルコースの最大レベルを用いて、洗浄されたウェットケーキの固体中にある残留非加水分解でんぷんのレベルを計算した。（ α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの存在下で）バッチ1の液化から得られる洗浄されたウェットケーキを反応させることによって達するグルコースの最大レベルは4.48 g/Lであった。比較して、（ α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの存在下で）バッチ2の液化から得られる洗浄されたウェットケーキを反応させることによって達するグルコースの最大レベルは2.39 g/Lであった。

【0317】

液化されたマッシュ中の非溶解固体中にある残留非加水分解でんぷん（液化中に加水分解されなかった）のレベルを、マッシュの対応するバッチから得られる洗浄されたウェットケーキから得られるグルコースのデータに基づいて計算した。

・液化バッチ1：固体中の残留非加水分解でんぷんは、液化に供給されるトウモロコシ中の全でんぷんの2.1%に相当する。これは、トウモロコシ中のでんぷんの2.1%が、バッチ1の液化条件で加水分解されなかったことを示唆する。液化バッチ1中、中間の高温（「調理」）段階を行わなかった。

・液化バッチ2：固体中の残留非加水分解でんぷんは、液化に供給されるトウモロコシ中の全でんぷんの1.1%に相当する。これは、トウモロコシ中のでんぷんの1.1%が、バッチ2の液化条件で加水分解されなかったことを示唆する。液化バッチ2中、高温（「調理」）段階を行った。

【0318】

この実施例は、液化中のある時点における高温「調理」段階の追加が、より高いでんぷん転化率をもたらすことを示す。これにより、液化されたトウモロコシマッシュ中の非溶解固体中に残っている残留非加水分解でんぷんが少なくなり、非溶解固体が液化の前にマッシュから除去される場合のプロセスにおけるでんぷんの損失が少なくなる。

【0319】

実施例17

トウモロコシ固体中のでんぷんの、可溶性（液化）でんぷんへの転化率に対する液化中の高温段階の影響

液化されたトウモロコシマッシュの2つのバッチ（バッチ3およびバッチ4）を、Liquozyme（登録商標）SCDS（Novozymes（Franklinton, NC）製の α -アミラーゼ）を用いて85℃で調製した。両方のバッチを、85℃で2時間余り運転した。ただし、「調理」期間を、バッチ4の途中で追加した。バッチ4の温度分布は、85℃で約30分間、温度を85℃から121℃まで上昇させ、121℃で約30分間保持し、85℃に冷却し、さらに90分間液化を続けた。両方のバッチに使用される磨砕トウモロコシは、実施例1と同じであった。26重量%（乾燥トウモロコシ基準）のトウモロコシ充填量を両方のバッチに使用した。両方の実行に使用される酵素の総量は、0.04重量%（乾燥トウモロコシ基準）に相当していた。両方の液化実行中、pHを5.8に制御した。バッチ3の液化を、1Lのガラスの被覆された樹脂ケトル中で行い、バッチ4の液化を、200Lのステンレス鋼発酵装置中で行った。両方の反応器は、機械的攪拌、温度制御、およびpH制御を備えていた。

【0320】

この実施例の実験条件は、以下の相違点を除き、実施例14について記載される実験条件と同様であった：

【0321】

バッチ3の液化されたトウモロコシマッシュの生成では：0.211 gの α -アミラーゼを、10.403 gの水道水で希釈した。 α -アミラーゼ溶液の第1の投入は3.556 gであった。 α -アミラーゼ溶液の第2の投入は1.755 gであり、反応を、85℃でさらに90分間実行し続けた。

【0322】

バッチ4の液化されたトウモロコシマッシュの生成では：22 gの α -アミラーゼを、2 kgの水道水で希釈し、147.9 kgの水道水を発酵装置に投入し、61.8 kgの磨砕トウモロコシを投入した。 α -アミラーゼ溶液の第1の投入は1.0 kgであり、反応物を85℃まで加熱し、85℃で30分間保持し、次に、反応物を121℃まで加熱し、121℃で30分間保持した。 α -アミラーゼ溶液の第2の投入は1 kgであり、反応を、85℃でさらに90分間実行し続けた。

【0323】

液化されたマッシュからの非溶解固体の除去および可溶性でんぷんを除去するための水によるウェットケーキの洗浄

バッチを室温で15分間、5000 rpmで大容量遠心分離機において遠心分離することによって、液化されたマッシュの両方のバッチから固体の大部分を除去した。バッチ3からの500.1 gのマッシュの遠心分離により、337.2 gの遠心分離液および162.9 gのウェットケーキが得られた。バッチ4からの509.7 gのマッシュの遠心分離により、346.3 gの遠心分離液および163.4 gのウェットケーキが得られた。液化されたマッシュの各バッチから回収されるウェットケーキを、水道水で5回洗浄して、ケーキ中に保持される可溶性でんぷんの実質的に全てを除去した。容器間でケーキが移るのを防ぐために、元のマッシュを遠心分離するのに使用されるのと同じボトルにおいて洗浄を行った。各洗浄段階では、ケーキを水と混合し、得られた洗浄スラリーを室温で（5000 rpmで15分間）遠心分離した。マッシュの両方のバッチから回収されるウェットケーキにおいて行われる全ての5回の洗浄段階についてこれを行った。約164 gの水を、バッチ3からのウェットケーキの5回の洗浄のそれぞれに使用し、これは、バッチ3からのウェットケーキを洗浄するのに使用される合計819.8 gの水になった。約400 gの水を、バッチ4からのウェットケーキの5回の洗浄のそれぞれに使用し、これは、バッチ4からのウェットケーキを洗浄するのに使用される合計2000 gの水になった。バッチ3からのウェットケーキの全ての5回の水洗浄から回収される全洗浄遠心分離液は879.5 gであった。バッチ4からのウェットケーキの全ての5回の水洗浄から回収される全洗浄遠心分離液は2048.8 gであった。バッチ3から回収される最終的な洗浄されたウェットケーキは103.2 gであり、バッチ4から回収される最終的な洗浄されたウェットケーキは114.6 gであった。各バッチから得られる最終的な洗浄されたウェットケーキは、可溶性でんぷんを実質的に含有しておらず；したがって、各ケーキ中に保持される液体は主に水であった。ウェットケーキの全固形分（TS）を、水分収支を用いて測定した。バッチ3からのウェットケーキの全固形分は21.88重量%であり、バッチ4からのウェットケーキのTSは18.1重量%であった。

【0324】

この実施例の実験条件は、以下の相違点を除き、実施例14について記載される実験条件と同様であった：

【0325】

バッチ3についての、液化の後に非溶解固体中に残っている非加水分解でんぷんのレベルの測定するための洗浄されたウェットケーキの液化／糖化では：バッチ3の液化から生成される68 gの洗浄されたウェットケーキを投入した（TS=21.88重量%）。3.4984 gの α -アミラーゼ溶液および5.3042 gのグルコアミラーゼを投入した

。pHを5.5に制御しながら55℃で47時間反応を実行し、グルコース用のスラリーを定期的に採取した。

【0326】

バッチ4についての、液化の後に非溶解固体中に残っている非加水分解でんぶんのレベルの測定するための洗浄されたウェットケーキの液化／糖化では：0.1663gのα-アミラーゼを、13.8139gの水道水で希釈し、0.213gのグルコアミラーゼを、20.8002gの水道水で希釈した。117.8gの水道水をケトルに投入した。バッチ4の液化から生成される82.24gの洗浄されたウェットケーキを投入した（TS＝18.1重量％）。3.4952gのα-アミラーゼ溶液および10.510gのグルコアミラーゼを投入した。pHを5.5に制御しながら55℃で50時間反応を実行し、グルコース用のスラリーを定期的に採取した。

10

【0327】

洗浄されたウェットケーキの液化／糖化の結果の比較

上述したように、バッチ3および4からの洗浄されたウェットケーキを、水中で再スラリー化し、固体中に残っている一切のでんぶんを加水分解し、それをグルコースに転化するために、非常に過剰なα-アミラーゼおよびグルコアミラーゼの両方をスラリーに加えた。図12は、時間に応じたスラリーの水相中のグルコースの濃度を示す。

【0328】

グルコース濃度は、時間とともに増加し、バッチ3からの洗浄されたウェットケーキについて約26時間の時点で最大値で安定した。バッチ4の洗浄されたウェットケーキでは、グルコース濃度は、24時間～47時間でわずかに増加し続けた。バッチ4のウェットケーキについて47時間の時点で測定したグルコース濃度が、最大値にほぼ等しいことが仮定される。（α-アミラーゼおよびグルコアミラーゼの存在下で）バッチ3の液化から得られる洗浄されたウェットケーキを反応させることによって達するグルコースの最大レベルは8.33g/Lであった。比較して、（α-アミラーゼおよびグルコアミラーゼの存在下で）バッチ4の液化から得られる洗浄されたウェットケーキを反応させることによって達するグルコースの最大レベルは4.92g/Lであった。

20

【0329】

液化されたマッシュ中の非溶解固体中にある残留非加水分解でんぶん（液化中に加水分解されなかった）のレベルを、（過剰のα-アミラーゼおよびグルコアミラーゼの存在下で）マッシュの対応するバッチから得られる洗浄されたウェットケーキを「加水分解」することによって得られるグルコースのデータに基づいて計算した。

30

・液化バッチ3：固体中の残留非加水分解でんぶんは、液化に供給されるトウモロコシ中の全でんぶんの3.8％に相当する。これは、トウモロコシ中のでんぶんの3.8％が、バッチ3の液化条件で加水分解されなかったことを示唆する。液化バッチ3中、中間の高温（「調理」）段階を行わなかった。

・液化バッチ4：固体中の残留非加水分解でんぶんは、液化に供給されるトウモロコシ中の全でんぶんの2.2％に相当する。これは、トウモロコシ中のでんぶんの2.2％が、バッチ4の液化条件で加水分解されなかったことを示唆する。液化バッチ4中、高温（「調理」）段階を行った。

40

【0330】

この実施例は、液化中のある時点における高温「調理」段階の追加が、より高いでんぶん転化率をもたらし得ることを示す。これにより、液化されたトウモロコシマッシュ中の非溶解固体中に残っている残留非加水分解でんぶんが少なくなり、非溶解固体が液化の前にマッシュから除去される場合のプロセスにおけるでんぶんの損失が少なくなる。

【0331】

実施例16および17の概要および比較

液化条件は、トウモロコシ固体中のでんぶんの、可溶性（液化）でんぶんへの転化率に影響を与え得る。磨砕トウモロコシ中のでんぶんの、可溶性でんぶんへの転化率に影響し得る考えられる液化条件は、温度、酵素（α-アミラーゼ）充填量、および＋／－高温（

50

「調理」) 段階が液化中のある時点で行われるか否かである。実施例 16 および 17 は、液化中のある時点における高温 (「調理」) 段階の実施により、トウモロコシ固体中のでんぶんの、可溶性 (液化) でんぶんへのより高い転化率が得られることを示した。実施例 16 および 17 に記載される液化中の高温段階は、液化が開始した後のある時点で液化温度を上昇させる工程と、ある期間、より高い温度に保持する工程と、次に、温度を再び元の値まで低下させて、液化を完了させる工程とを含んでいた。

【0332】

実施例 16 において比較される液化反応を、実施例 17 において比較される反応と異なる酵素充填量で実行した。これらの実施例は、でんぶん転化率に対する 2 つの主な液化条件: (1) 酵素充填量、および (2) + / - 高温段階が液化中のある時点で適用されるか否かの影響を示す。

【0333】

実施例 16 および 17 に記載される液化されたトウモロコシマッシュの 4 つのバッチを調製するのに使用される条件を、以下および表 9 にまとめる。

【0334】

全てのバッチに共通の条件:

- ・液化温度 - 85 °C
- ・液化温度における合計時間 - 約 2 時間
- ・トウモロコシを磨碎するのに使用されるふるいサイズ - 1 mm
- ・pH - 5.8
- ・乾燥トウモロコシ充填量 - 26 %
- ・ α -アミラーゼ - L i q u o z y m e (登録商標) S C D S (Novozymes, Franklinton, NC)。

【0335】

【表 11】

表 9

	バッチ1	バッチ2	バッチ3	バッチ4
実施例に記載される条件:	16	16	17	17
実施される高温段階	なし	あり	なし	あり
高温段階の温度(°C):	NA	101°C	NA	121°C
全酵素充填量(重量%) (乾燥トウモロコシ基準):	0.08%	0.08%	0.04%	0.04%
液化の後の非溶解固体中の残留非加水分解でんぶん(トウモロコシ原料中の全でんぶんのパーセンテージとして):	2.1%	1.1%	3.8%	2.3%

【0336】

バッチ 2 および 4 の温度分布 (全ての値は概算値である) は: 85 °C で 30 分間、30 分間の高温段階、85 °C で 90 分間であった。最初の 85 °C の期間の前に半分の酵素を加え、最後の 85 °C の期間にわたる高温段階の後に半分を加えた。

【0337】

図 13 は、でんぶん転化率に対する、酵素充填量および + / - 高温段階が液化中のある時点で適用されたか否かの影響を示す。固体中の残留非加水分解でんぶんのレベルは、対象とする液化条件で加水分解されなかったでんぶんである。図 13 は、固体中の非加水分解でんぶんのレベルが、液化中のある時点における高温 (「調理」) 段階の適用によって

ほぼ半分だけ減少されたことを示す。これは、2つの異なる酵素充填量で示された。図13のデータは、高温段階が液化中に適用されたか否かにかかわらず、酵素充填量を2倍にすると、固体中に残っている非加水分解でんぶんのレベルがほぼ半分になったことも示す。これらの実施例は、より高い酵素（ α -アミラーゼ）充填量による液化の実行および／または反応中のある時点における高温（「調理」）段階の追加が、液化されたトウモロコシマッシュ中に存在する非溶解固体中の残留非加水分解でんぶんをかなり減少させ得、非溶解固体が液化の前にマッシュから除去される場合のプロセスにおけるでんぶんの損失を減少させ得ることを示す。液化の後の固体中の一切の残留でんぶんには、固体が発酵の前に除去される場合のプロセスにおいて発酵中に加水分解する機会がない。

【0338】

実施例18

85℃での酵素消化の後のでんぶんおよび不溶物のふるい分け分離

実施例1に記載される方法ごとに調製されるマッシュ（301グラム）を、調整が必要な場合にNaOH溶液の液滴を用いてpH5.8に保ち、業者指定の用量の約0.064グラムのLiquozyme（登録商標） α -アミラーゼ酵素（Novozyme, Franklinton, NC）で処理し、85℃で5時間保持した。生成物を冷蔵した。

【0339】

冷蔵された生成物を約50℃に温め、48gを、100メッシュスクリーンを含むフィルターアセンブリに注ぎ、-15水銀柱インチ（in Hg）~-20水銀柱インチで家庭用真空源に接続した。ふるい皿は、44cm²の露出されたふるい表面積を有し、このふるい皿を、Nalgene（登録商標）（Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY）によって提供されるプラスチックフィルターハウジング中に密閉した。スラリーをろ過したところ、ふるい上にウェットケーキが形成され、受け器ボトル中に40.4gの黄色の濁ったろ液が形成された。ウェットケーキを所定の位置で水ですぐに洗浄してから、中断した一方、真空源は、最終的な洗浄されたケーキを通して遊離水分を引き続けた。フィルターの下側からの滴りが停止したとき、ろ過を停止した。さらなる28.5gの洗浄ろ液を3段階にわたって収集し、ここで、最終段階のろ液が、最も少ない色および濁りを示した。7.6gの最終的なウェットケーキ質量を、室温で24時間にわたって2.1gになるまで空気乾燥させた。2.1gは、加熱ランプを用いて乾燥させた後に7.73%の水を含有することが分かった。この実験の真空ろ過により、合計25%の乾燥固体を含有するウェットケーキが生成された。

【0340】

ろ液の試料を、室温でオレイルアルコールと組み合わせて、激しく混合し、沈降させた。界面を約15分間回復させたが、濁ったラグ層が残った。

【0341】

1gの99.99%超（微量金属基準）のヨウ素、2gのReagent Plus（登録商標）グレード（99%超）のヨウ化カリウム（両方ともSigma-Aldrich（St. Louis, MO）製）、および1滴の量の17gの家庭用脱イオン水からなるルゴール液（でんぶん指示薬）を、ろ液の試料、水中で再スラリー化された、乾燥されたケーキ固体および水の対照試料に加えた。ろ液が濃い青色または紫色に変化し、固体スラリーが非常に濃い青色に変化し、水の色が薄い琥珀色になった。琥珀色より濃い色は、12単位長より長いオリゴ糖の存在を示す。

【0342】

この実験は、大部分の懸濁固体が、100メッシュスクリーンにおいて、中程度の速度で、上述したように調製されるでんぶん溶液から分離され得ること、およびでんぶんがろ過ケーキ固体とともに残ることを示した。これは、加水分解されたでんぶんの一部が残るケーキの不完全な洗浄を示す。

【0343】

この実験を、直径63mmの100メッシュスクリーン上で156グラムのマッシュを用いて繰り返した。最高温度は102℃であり、酵素はSpezyme（登録商標）であ

り、スラリーを、85℃超で、3時間保持した。ふるい分け速度を測定し、決定したところ、ふるい面積の平方フィート当たり毎分0.004ガロン以下であった。

【0344】

実施例19

115℃での酵素消化の後のでんぷんおよび不溶物のふるい分け分離

家庭用脱イオン水(200g)を、空のParr Model 4635の1リットルの圧力容器(Moline, IL)に投入し、85℃の温度まで加熱した。水を、磁気攪拌子を用いて攪拌した。実施例1に記載されるように調製される乾式磨砕トウモロコシ(90g)をスプーンで加えた。アンモニア水溶液の原液を用いて、pHを5.2から約6.0に上げた。約0.064グラムのLiquozyme(登録商標)溶液を、小型の校正されたピペットで加えた。圧力容器の蓋を閉め、家庭用窒素を用いて容器を50psigに加圧した。攪拌された混合物を6分以内に110℃まで加熱し、106~116℃で合計20分間保持した。加熱を抑え、圧力を軽減し、容器を開放した。さらなる0.064gのLiquozyme(登録商標)を加え、温度をさらに142分間、63~75℃で保持した。

【0345】

少量のスラリーを、Parr容器から取り、100、140、および170メッシュスクリーンのスタックを通して重力によりふるい分け(gravity screen)した。100メッシュスクリーン上のみに固体が留まった。

【0346】

スラリーの一部、約40%を、直径75ミリメートルの100および200メッシュ皿の2重ふるいアセンブリの上部に、高温のまま移した。いくらかの重力ろ過を行った。-15~-20水銀柱インチの真空を、ろ液受け器に引き、一定のろ過を設定した。ろ液は黄色で濁っていたが、分散は安定していた。ケーキの表面を5分以内の間、露出させた。ケーキを、脱イオン水の噴霧で2~3分間洗浄し、ろ液の濁りが一定になるまで(合計5回の噴霧)、受け器を変えて繰り返した。ふるいを調べたところ、全ての固体が100メッシュスクリーン上にあり、200メッシュ上に固体がなかったという結論となった。ウェットケーキは厚さ5mmであった。ウェットケーキの質量を測定したところ、18.9gであり、ろ液の合計質量は192gであった。

【0347】

スラリーの残りの質量を、65℃で所定の位置で100メッシュスクリーンを備えたフィルターアセンブリに移し、5~10分間にわたってろ過した。ケーキを脱イオン水の噴霧で3~4分間洗浄し、ろ液の濁りが一定になるまで(合計8回の噴霧)、受け器を変えて繰り返した。フィルターの下側から落ちる液滴が観察されなくなるまで真空をかけ続けた。ウェットケーキは、厚さ8mmで、直径75mmであり、質量が36.6gであった。ろ液の重量の合計は261gであった。

【0348】

3つの容器を、上記の方法ごとにでんぷんについて試験した。1つの容器は水を含み、他の2つの容器は、脱イオン水中でスラリー化されたウェットケーキの試料を含んでいた。全ての容器の色が黄色の琥珀色に変化した。これは、ろ過ケーキを洗浄してでんぷんのオリゴ糖を取り除いたことを意味するものと解釈される。これらの固体を、長期の液化およびその後の糖化を用いて正確に分析して、グルコース基準で、ウェットケーキが、元のトウモロコシ中にある全でんぷんの0.2%以下を含んでいたことを確認した。

【0349】

ろ液の試料を、容器中でオレイルアルコールと組み合わせて、激しく混合し、沈降させた。透明の油層が迅速に得られ、界面にはほとんどラゲ層がなく、明確に画定されていた。この実施例は、トウモロコシマッシュが約110℃で20分間の調理という熱水条件まで加熱され、ろ過および洗浄される前に85℃で2時間超さらに液化されるプロセスにおいて、全ろ液が、穀類に供給される実質的に全てのでんぷんを含んでいたことを示した。さらに、ろ液に含まれるオレイルアルコールと不純物との間の干渉がそれほど観察され

ない。

【0350】

この実験を、直径75mmの80メッシュスクリーンにおいて247グラムのマッシュを用いて繰り返した。最高調理温度は115℃であり、酵素はLiquozyme（登録商標）であり、スラリーを85℃以上で3時間保持した。ふるい分け速度を測定し、決定したところ、ふるい面積の平方フィート当たり毎分0.1ガロン超であった。

【0351】

実施例20

脂質の分析

エステル交換によって、様々な脂肪酸含有化合物種を、脂肪酸メチルエステル（「FAME」）に転化することによって、脂質の分析を行った。グリセリドおよびリン脂質を、メタノール中のナトリウムメトキシドを用いてエステル交換した。グリセリド、リン脂質、および遊離脂肪酸を、メタノール中の塩化アセチルを用いてエステル交換した。得られたFAMEを、トルエン／ヘキサン（2：3）中での希釈の後、30-m×0.25mm（内径）OMEGAWAX（商標）（Supelco, SigmaAldrich, St. Louis, MO）カラムを備えたAgilent 7890 GCを用いたガスクロマトグラフィーによって分析した。オープン温度を、5℃/分で160℃から200℃まで、次に10℃/分で200℃から250℃（10分間保持した）まで上昇させた。GC分析によって記録されたFAMEピークを、公知のメチルエステル（ME）の保持時間と比較したときの、それらの保持時間によって特定し、FAMEピーク面積を、公知の量の内部標準（C15：0のトリグリセリド、試料によるエステル交換手順によって取られた）の面積と比較することによって定量化した。したがって、概算量（mg）の任意の脂肪酸FAME（「mg FAME」）を、下式にしたがって計算する：（所定の脂肪酸についてのFAMEピークの面積／15：0のFAMEピークの面積）*（内部標準C15：0のFAMEのmg）。次に、FAMEの結果を、1.052の適切な分子量換算係数で除算することによって、対応する脂肪酸のmgに補正することができる。全ての内部標準および参照標準は、Nu-Chek Prep, Inc. から入手される。

【0352】

メタノール中のナトリウムメトキシドを用いてエステル交換された試料から得られる脂肪酸の結果を、1.045の分子量換算係数を乗算することによって、対応するトリグリセリドレベルに換算する。トリグリセリドは、一般に、この実施例について調べられた試料中のグリセリドの約80～90%を占め、残りはジグリセリドである。モノグリセリドおよびリン脂質含量は一般にごくわずかである。メタノール中の塩化アセチルを用いてエステル交換された試料について得られる全脂肪酸の結果を、ナトリウムメトキシド手順を用いて同じ試料について決定された脂肪酸を減算することによって、グリセリド含量について補正する。結果は、試料の遊離脂肪酸含量である。

【0353】

グリセリド含量（モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、およびリン脂質）の分布を、薄層クロマトグラフィーを用いて決定した。6：1のクロロホルム／メタノールに溶解される油の溶液を、シリカゲルで予め被覆されたガラスプレートの底部の近くに垂らした。次に、そのスポット（spot）を、70：30：1のヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸溶媒系を用いて、クロマトグラフにかける。次に、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、およびリン脂質に対応する分離されたスポットを、ヨウ素蒸気でプレートを染色することによって検出する。次に、スポットをプレートから落とし、メタノール手順で塩化アセチルを用いてエステル交換し、ガスクロマトグラフィーによって分析する。全てのスポットの合計ピーク面積に対する各スポットの合計ピーク面積の比率が、様々なグリセリドの分布である。

【0354】

実施例21

この実施例は、蒸留廃液からの固体の除去ならびに脂肪酸、エステル、およびトリグリ

セリドを固体から回収するための脱溶媒器による抽出を示した。発酵中、固体を全蒸留廃液から分離し、脱溶媒器に供給し、脱溶媒器において固体を1.1トン/時の蒸気と接触させる。全蒸留廃液のウェットケーキ（抽出器原料）、溶媒、抽出器のミセラ、および抽出器の排出固体の流量は、表10に示されるとおりである。表の値の単位は、ショートトン/時である。

【0355】

【表12】

表10

	全蒸留廃液 からの固体	溶媒	ミセラ	抽出器の 排出固体
脂肪酸	0.099	0	0.0982	0.001
非溶解固体	17.857	0	0.0009	17.856
脂肪酸ブチルエステル	2.866	0	2.837	0.0287
ヘキサン	0	11.02	10.467	0.555
トリグリセリド	0.992	0	0.982	0.0099
水	29.762	0	29.464	0.297

10

【0356】

脱溶媒器を出る固体を、乾燥器に供給する。脱溶媒器を出る蒸気は、0.55トン/時のヘキサンおよび1.102トン/時の水を含有する。この流れを凝縮し、デカンターに供給する。デカンターを出る水富化相は、約360ppmのヘキサンを含有する。この流れを蒸留塔に供給し、蒸留塔において、ヘキサンを水富化流から除去する。蒸留塔の上部を出るヘキサン富化流を凝縮し、デカンターに供給する。デカンターを出る有機物富化流を蒸留塔に供給する。蒸気（11.02トン/時）を、蒸留塔の塔底に供給する。この塔の塔頂および塔底生成物の組成を表11に示す。表の値の単位は、トン/時である。

20

【0357】

【表13】

表11

	塔底物	塔頂物
脂肪酸	0.0981	0
脂肪酸ブチルエステル	2.8232	0
ヘキサン	0.0011	11.12
トリグリセリド	0.9812	0
水	0	11.02

30

【0358】

実施例22

この実施例は、マッシュからの副生成物の回収を示す。トリカンター遠心分離機（Flo-tweg Z23-4ボウル直径、230mm、長さ対直径の比率4：1）をこれらの条件で使用したことを除いて、実施例10に記載される条件下でトウモロコシ油をマッシュから分離する：

40

- ・ボウル速度：5000rpm
- ・差速：10rpm
- ・供給速度：3ガロン/分
- ・相分離機ディスク：138mm
- ・羽根車の設定：144mm。

50

【0359】

分離されたトウモロコシ油は、実施例18に記載される方法および薄層クロマトグラフィーによって測定した際に、81%のトリグリセリド、6%の遊離脂肪酸、4%のジグリセリド、および合計5%のリン脂質およびモノグリセリドを有していた。

【0360】

上記の条件下でマッシュから分離された固体は、乾燥時の重量損失によって測定した際に58%の水分含量を有し、実施例18に記載される方法によって測定した際に1.2%のトリグリセリドおよび0.27%の遊離脂肪酸を有していた。

【0361】

表14中の全蒸留廃液から分離された固体、蒸発器段階の間に抽出された油、副生成物抽出剤および凝縮蒸留可溶物(CDS)の組成を、表12に示される全蒸留廃液の組成を前提とし、表13(トリカンター遠心分離機における分離)を前提として計算した。表11の値を、Aspen Plus(登録商標)モデル(Aspen Technology, Inc., Burlington, MA)から得た。このモデルは、トウモロコシ油がマッシュから抽出されていないことを前提としている。細胞、溶解固体、および懸濁固体の乾燥量基準でのタンパク質含量が、それぞれ約50%、22%、および35.5%であることが推定される。副生成物抽出剤の組成は、乾燥量基準で70.7%の脂肪酸および29.3%の脂肪酸イソブチルエステルであることが推定される。

【0362】

【表14】

表12

成分	質量%
水	57.386%
細胞	0.502%
脂肪酸	6.737%
脂肪酸のイソブチルエステル	30.817%
トリグリセリド	0.035%
懸濁固体	0.416%
溶解固体	4.107%

【0363】

【表15】

表13

	加水分解装置 の原料	希薄な 蒸留廃液	固体
有機物	99.175%	0.75%	0.08%
水および溶解固体	1%	96%	3%
懸濁固体および細胞	1%	2%	97%

【0364】

【表 1 6】

表 14

流れ	C.タンパク質	トリグリセリド	FFA	FABE
全蒸留廃液のウェットケーキ	40%	微量	0.5%	2.2%
蒸発器における油	0%	0.08%	16.1%	73.8%
CDS	22%	微量%	0.37%	1.71%

【 0 3 6 5 】

10

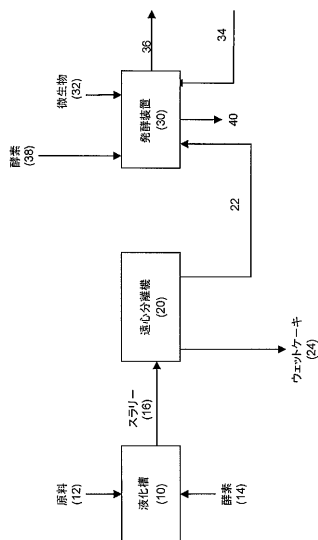
本発明の様々な実施形態を上記説明してきたが、それらは例として示されたに過ぎず、限定するものではないことを理解されたい。本発明の趣旨および範囲から逸脱せずに本発明の形態および細部の様々な変更を行うことができることが、関連技術の当業者には明らかであろう。したがって、本発明の広さおよび範囲は、上述した例示的实施形態のいずれによって限定されるものでもなく、以下の特許請求の範囲およびそれらの均等物のみにしたがって規定されるものである。

【 0 3 6 6 】

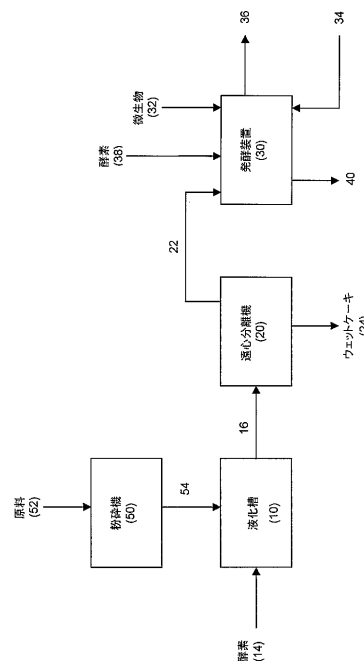
本明細書に記載される全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明に関する技術分野の当業者の技能のレベルを示し、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が参照により援用されることが具体的にかつ個々に示されているのと同程度に、参照により本明細書に援用される。

20

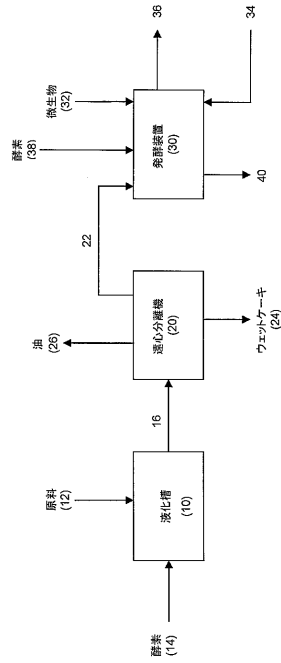
【 図 1 】



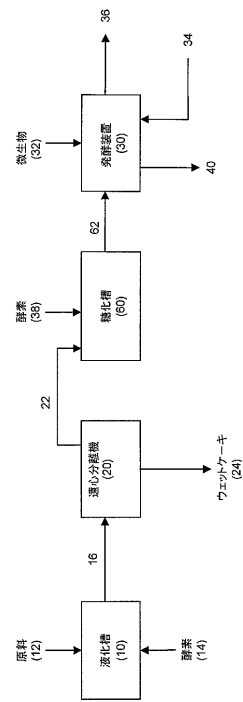
【 図 2 】



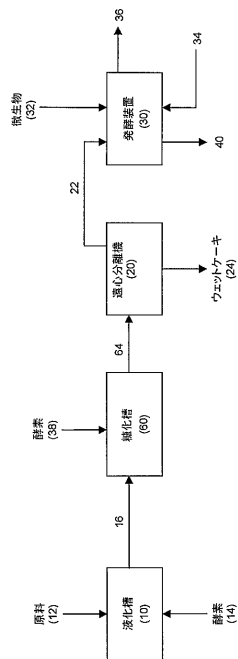
【図 3】



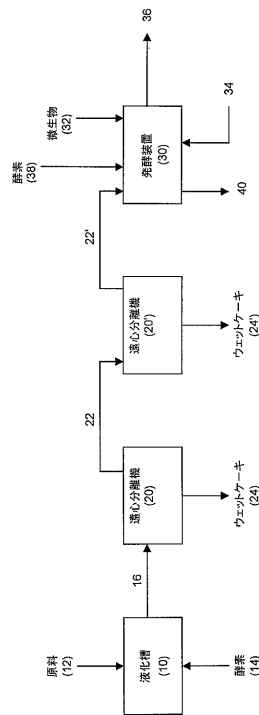
【図 4】



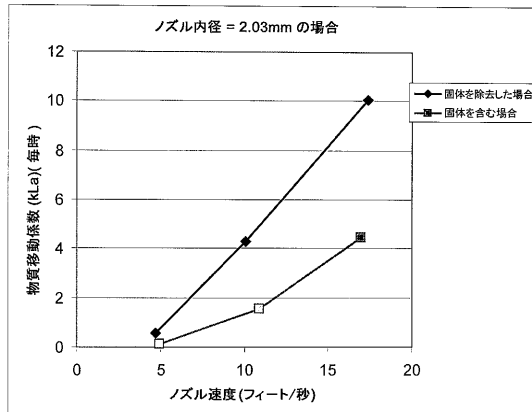
【図 5】



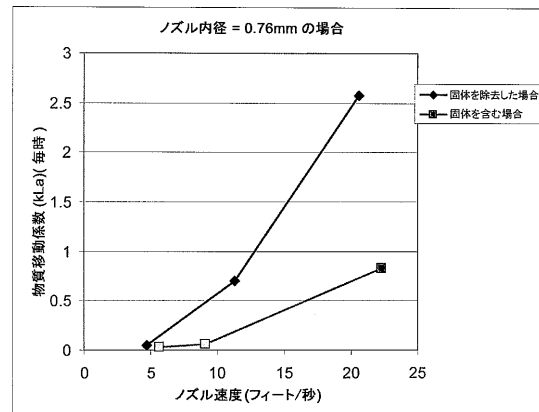
【図 6】



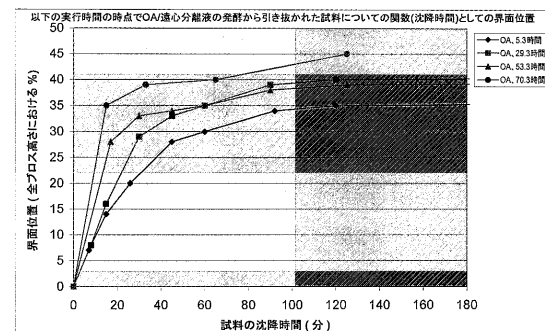
【図 7】



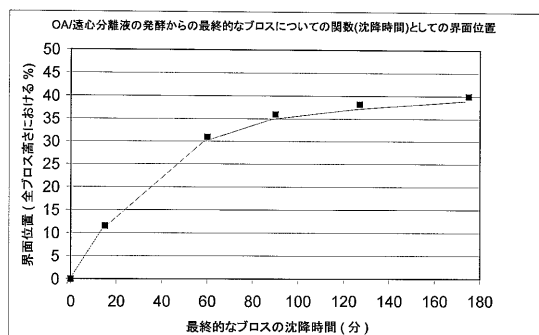
【図 8】



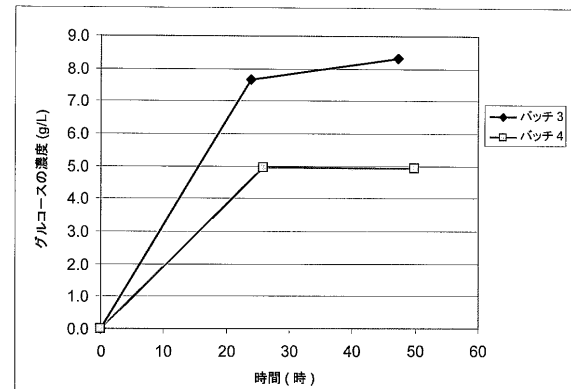
【図 9】



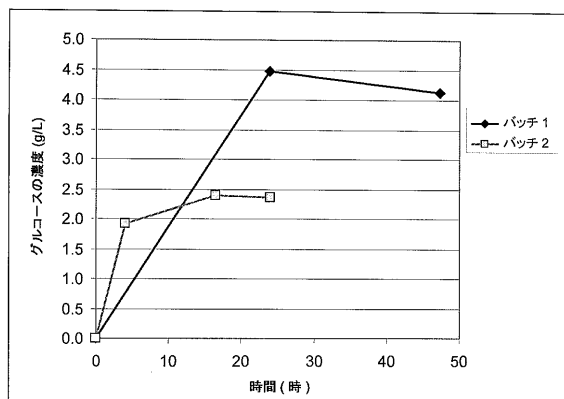
【図 10】



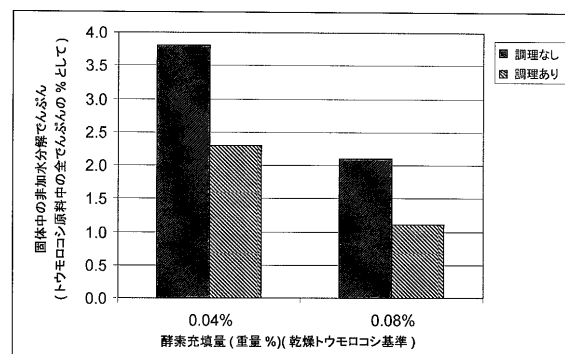
【図 12】



【図 11】



【図 13】



【配列表】

2013528400000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/040899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P7/16 C07C29/86 B01D21/26 C12M1/00 ADD.		
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) C12P C07C B01D C12M		
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 practical, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/026706 A1 (IOGEN ENERGY CORP [CA]; EDWARDS JASON B [CA]; MCMILLAN LISA [CA]; MUNK) 5 March 2009 (2009-03-05) paragraph [0052]	1-3, 9-39, 42-54 4-8,40, 41
Y	-----	
Y	WO 2009/149270 A2 (DU PONT [US]; GRADY MICHAEL CHARLES [US]; JAHIC MEHMEDALIJA [US]; PATN) 10 December 2009 (2009-12-10) the whole document	4-8,40, 41
X	DE 10 2006 040567 A1 (BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH [DE]) 6 March 2008 (2008-03-06) the whole document	1-3, 9-18,23, 24, 31-39, 42-45, 47-49
	----- -/-	
☒ 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 October 2011		28/12/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schneider, Patrick

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/040899

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-54

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/040899

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 491 522 A (ISHIDA MASAHIKO [JP] ET AL) 1 January 1985 (1985-01-01) the whole document -----	1-3, 9-18,23, 24, 31-39, 42-45, 47-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/040899

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009026706 A1	05-03-2009	AU 2008291588 A1 CA 2697073 A1 CN 101821398 A EP 2193205 A1 JP 2010536389 A US 2009061490 A1 WO 2009026706 A1	05-03-2009 05-03-2009 01-09-2010 09-06-2010 02-12-2010 05-03-2009 05-03-2009
WO 2009149270 A2	10-12-2009	AU 2009256148 A1 CA 2723877 A1 CN 102177243 A EP 2283141 A2 JP 2011522543 A KR 20110015045 A US 2009305370 A1 US 2011294179 A1 WO 2009149270 A2	10-12-2009 10-12-2009 07-09-2011 16-02-2011 04-08-2011 14-02-2011 10-12-2009 01-12-2011 10-12-2009
DE 102006040567 A1	06-03-2008	AR 062602 A1 DE 102006040567 A1 EP 2059603 A1 RU 2009111200 A WO 2008025522 A1	19-11-2008 06-03-2008 20-05-2009 10-10-2010 06-03-2008
US 4491522 A	01-01-1985	JP 1604687 C JP 2037239 B JP 59092094 A US 4491522 A	13-05-1991 23-08-1990 28-05-1984 01-01-1985

International Application No. PCT/US2011/040899

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-54

A method comprising separating solid and aqueous phase from biomass feedstock slurry wherein the aqueous phase is used for fermentation to produce alcohols like butanol and a fermentation system comprising a centrifuge to perform said method

2-5. claims: 55-58

Each compositions as defined in claims 55 to 58

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/368,429
(32)優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/368,444
(32)優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/368,436
(32)優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/368,451
(32)優先日 平成22年7月28日(2010.7.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/356,290
(32)優先日 平成22年6月18日(2010.6.18)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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

- (72)発明者 キース・エイチ・バーリユー
アメリカ合衆国デラウェア州19709. ミドルタウン. バーナムレーン502
(72)発明者 ジョン・ダブリュー・ハラム
アメリカ合衆国デラウェア州19701. ペア. フォックステールサークル109
(72)発明者 デーヴィッド・ジェイ・ロウ
アメリカ合衆国デラウェア州19808. ウィルミントン. アセンションドライブ3
(72)発明者 ジョーセフ・ジェイ・ザハー
アメリカ合衆国デラウェア州19711. ニューアーク. ヘイリーズトレイル3
Fターム(参考) 4B064 AC02 AC03 AC04 CA06 CA19 CA21 DA16