

(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2015-529456

(P2015-529456A)

(43) 公表日 平成27年10月8日 (2015. 10. 8)

|                                 |                             |             |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                   | F I                         | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 P</b> 19/02 (2006. 01) | <b>C 1 2 P</b> 19/02 Z A B  | 4 B 0 6 4   |
| <b>C 1 3 K</b> 13/00 (2006. 01) | <b>C 1 3 K</b> 13/00 1 0 1  | 4 D 0 0 4   |
| <b>C 1 3 K</b> 1/02 (2006. 01)  | <b>C 1 3 K</b> 1/02         |             |
| <b>B 0 9 B</b> 3/00 (2006. 01)  | <b>B 0 9 B</b> 3/00 3 0 4 Z |             |
| <b>C 1 2 P</b> 7/06 (2006. 01)  | <b>C 1 2 P</b> 7/06         |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁)

|               |                              |          |                     |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2015-524644 (P2015-524644) | (71) 出願人 | 512046958           |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年8月1日 (2013. 8. 1)       |          | インビコン エー／エス         |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成27年3月24日 (2015. 3. 24)     |          | デンマーク王国 フレデリシア スキャベ |
| (86) 国際出願番号   | PCT/DK2013/050256            |          | ック クラフトヴェルクズベイ 5 3  |
| (87) 国際公開番号   | W02014/019589                | (74) 代理人 | 100091096           |
| (87) 国際公開日    | 平成26年2月6日 (2014. 2. 6)       |          | 弁理士 平木 祐輔           |
| (31) 優先権主張番号  | PA201270461                  | (74) 代理人 | 100118773           |
| (32) 優先日      | 平成24年8月1日 (2012. 8. 1)       |          | 弁理士 藤田 節            |
| (33) 優先権主張国   | デンマーク (DK)                   | (74) 代理人 | 100122389           |
| (31) 優先権主張番号  | 61/678, 130                  |          | 弁理士 新井 栄一           |
| (32) 優先日      | 平成24年8月1日 (2012. 8. 1)       | (74) 代理人 | 100111741           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 田中 夏夫           |
|               |                              | (74) 代理人 | 100169971           |
|               |                              |          | 弁理士 菊田 尚子           |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1 段階自己加水分解及び C 5 バイパスを用いた酵素加水分解及び後加水分解を利用してリグノセルロース系バイオマスを処理する方法

## (57) 【要約】

本発明は、概して、リグノセルロース系バイオマスを発酵性糖に処理する方法、及び熱水前処理に依存する方法に関する。1段階加圧熱水前処理において非常に低い過酷度まで前処理し、続いて酵素加水分解を行って固体状態で維持されるキシロースを放出することにより、2段階前処理を使用して達成されるキシロースモノマー収率と同等のキシロースモノマー収率が、ソフトリグノース系バイオマス原料から達成され得る。いくつかの実施形態において、前処理されたバイオマスは、固体画分及び液体画分に分離され、固体画分は酵素加水分解に供され、分離された液体画分は、その後、加水分解された固体画分と混合される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

リグノセルロース系バイオマスを処理する方法であって、  
ソフトリグノセルロース系バイオマス原料を準備するステップと、  
前処理されたバイオマスが10%以上のキシラン価を有することを特徴とするような非常に低い過酷度まで、原料を、1段階加圧熱水前処理において、3.5から9.0の範囲内のpHで前処理するステップと、

前処理されたバイオマスを、固体画分及び液体画分に分離するステップと、  
エンドグルカナーゼ活性、エキソグルカナーゼ活性、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性、エンドキシラナーゼ活性、キシロシダーゼ活性、及びアセチルキシランエステラーゼ活性を含む酵素混合物により触媒される酵素加水分解を利用して、補助水分を添加して又は添加せずに固体画分を加水分解するステップと、

その後、分離した液体画分及び加水分解した固体画分を混合するステップであって、液体画分中のキシロオリゴマーが、加水分解した固体画分中に残留する酵素活性の作用により、キシロースモノマーに分解されるステップとを含む方法。

## 【請求項 2】

原料が、麦わら、トウモロコシ茎葉、サトウキビバガス、スイートソルガムバガス、又は空果房である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

原料が、加圧前処理の前に洗浄及び/又は浸出される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 4】

原料が、加圧前処理の前に、前処理の後続のステップから得られる酢酸含有液体中に浸漬される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 5】

原料が、少なくとも35%の乾燥物質含量で加圧前処理を受ける、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 6】

加圧前処理が、10バール以下の圧力で行われる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 7】

原料が、液体遠心分離システムを使用して、加圧前処理反応器から除去される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 8】

原料が、スルース型システムを使用して、加圧前処理反応器から除去される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 9】

バイオマスが12%以上のキシラン価を有することを特徴とするような過酷度まで原料を前処理する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 10】

固体画分が、40%以上の乾燥物質含量を有する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 11】

後加水分解後のキシロースモノマー収率が、理論的最大収率の少なくとも60%である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 12】

加水分解後のグルコースモノマー収率が、理論的最大収率の少なくとも60%である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 13】

酵素加水分解が、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物を使用して行われる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 14】

酵素加水分解が、少なくとも96時間行われる、請求項1に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

酵素加水分解が、15%から23%の間の乾燥物質含量で行われる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 16】

酵素加水分解が、20%以上の乾燥物質含量で行われる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 17】

酵素加水分解が、エキソセルラーゼ活性(EC3.2.1.91)、エンドセルラーゼ活性(EC3.2.1.4)、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性(EC3.2.1.21)、 $\beta$ -1,4-エンドキシラナーゼ活性(EC3.2.1.8)、及びアセチルキシランエステラーゼ活性(EC3.1.1.72)を含む酵素混合物を使用して行われ、酵素混合物は、1FPUのセルラーゼ活性が、少なくとも30CMC Uのエンドグルカナーゼ活性と、及び少なくとも28pNPG Uの $\beta$ -グルコシダーゼ活性と、及び少なくとも50ABX Uのエンドキシラナーゼ活性とに関連する酵素活性の相対的比率を有することをさらに特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

## 【請求項 18】

酵素混合物が、 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼ活性(EC3.2.1.72)、 $\beta$ -1,4-キシロシダーゼ活性(EC3.2.1.37)、並びに $\alpha$ -1,3-アラビノフラノシダーゼ活性及び/又は $\alpha$ -1,5-アラビノフラノシダーゼ活性(EC3.2.1.23)をさらに含む、請求項17に記載の方法。

## 【請求項 19】

液体画分の後加水分解後に回収された、合わせられたC5/C6加水分解物が、1種以上の改変酵母株を使用してエタノールに直接発酵されることをさらに特徴とする、請求項1に記載の方法。

20

## 【請求項 20】

固体画分が、溶解固体の50%超が除去された不溶性固体を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 21】

液体画分中に存在するキシロオリゴマーの少なくとも85%が、後加水分解中にキシロースモノマーに加水分解される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 22】

グルコースへの少なくとも50%のセルロース変換率が達成された後に、液体画分が、加水分解された固体画分に添加される、請求項1に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、概して、リグノセルロース系バイオマスを発酵性糖に処理する方法、特に熱水前処理に依存する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

石油及び他の化石燃料への歴史的な依存は、温室効果ガスの大気中レベルの劇的な憂慮すべき増加に関係している。温室効果ガス蓄積を軽減するために、多くの国々で、公式の政策指示により支持された国際的な取り組みがなされている。これらの軽減への取り組みの中心的な1つの焦点は、燃料及び他の化学製品の駆体の源としての石油を置き換えるために、再生可能植物バイオマスを利用するためのプロセス及び技術を開発することである。地球上の植物由来バイオマスの年間増加量は、乾燥重量で毎年約 $1 \times 10^{11}$ メートルトンであると推定されている。Lieth及びWhittaker(1975)を参照されたい。したがって、バイオマス利用は、持続可能な経済の発展における最終的な目標である。

40

## 【0003】

サトウキビ、根菜及び穀類作物等の糖及びデンプン系植物材料から生成される燃料エタノールは、すでに幅広く使用されており、現在世界的生産量は、毎年730億リットルを超える。エタノールは、かねてから化石燃料の許容される代替物と考えられており、燃料ブレンドへの添加剤として、又はさらに個人車用の燃料として直接、容易に使用することができる。しかしながら、これらの「第1世代」バイオエタノール技術により生成されるエ

50

タノールの使用は、実際には、温室効果ガス排出の劇的な低減を実現していない。正味の削減量は、最終エタノール生産量に対する全化石燃料投入量を全て考慮した場合、石油と比較してわずか約13%である。Farrellら(2006)を参照されたい。さらに、「第1世代」バイオエタノール市場に対し、経済的及び道徳的な面の両方から異議が唱えられている。これは実際に、人間の食物としての作物の需要を、個人車のための需要と直接競合させるものである。また、実際に、燃料エタノールの需要は、貧しい穀物輸入国にとって問題となることが判明している穀物価格の上昇に関連している。

#### 【0004】

リグノセルロース系バイオマス、例えば作物廃棄物(茎、穂軸、核、柄、殻、皮等)、草、わら、木片、古紙等から、バイオエタノール及び他の生成物が生成され得る、食用作物を消費しないバイオマス変換システム、いわゆる「第2世代」バイオ精製の開発に大きな関心が寄せられている。「第2世代」技術において、主にセルロースから得られる発酵性6炭素(C6)糖、及びヘミセルロースから得られる発酵性5炭素(C5)糖が、酵素加水分解により、又はいくつかの場合には、純粋な化学的加水分解により、バイオマス多糖類ポリマー鎖から遊離する。「第2世代」バイオ精製においてバイオマス変換から得られる発酵性糖は、燃料エタノール、若しくは代替としてブタノール等の他の燃料、又は、バイオプラスチックの合成における使用のための乳酸モノマー、又は、他の多くの生成物を生成するために使用され得る。

10

#### 【0005】

C5及びC6糖の両方の全収率は、リグノセルロース系バイオマス処理の商業化における中心的考慮点である。エタノール生成、及びラクテート又は他の化学物質の生成の場合、C5及びC6糖プロセスストリームの両方を1つの糖溶液に組み合わせることが有利となり得る。エタノール生成においてC5及びC6糖の両方を効率的に消費し得る改変された発酵生物が、現在利用可能である。例えば、Madhavanら(2012)、Dumonら(2012)、Huら(2011)、Kuhadら(2011)、Ghoshら(2011)、Kurianら(2010)、Jojimaら(2010)、Sanchezら(2010)、Bettigaら(2009)、Matsushikaら(2009)を参照されたい。

20

#### 【0006】

その物理的構造の制限のため、リグノセルロース系バイオマスは、いくつかの前処理プロセスなしには、酵素加水分解により発酵性糖に効果的に変換することができない。様々な異なる前処理スキームが報告されており、それぞれ、異なる利点及び欠点を提供する。再検討のために、Agborら(2011)、Girioら(2010)、Alviraら(2010)、Taherzadeh及びKarimi(2008)を参照されたい。環境的及び「再生可能性」の観点から、熱水前処理が特に魅力的である。これらは、約160~230の温度の加圧蒸気/液体の熱水を利用して、セルロースストランドと複雑に関連した疎水性リグニンを穏やかに溶解し、C5糖に富むヘミセルロースの主成分を可溶化し、生産的酵素結合への接近性を改善するようにセルロースストランドを破壊する。熱水前処理は、既存の石炭及びバイオマス燃焼発電プラントと都合よく統合して、タービン蒸気及び「余剰」発電容量を効率的に利用することができる。

30

#### 【0007】

熱水プロセスの場合、競合する目的の間で前処理を最適化しなければならないことが、当該技術分野において周知であり、広く議論されている。一方、前処理は、理想的には、モノマー性ヘミセルロース由来糖の最終的収率を最大化するために、ヘミセルロース糖含量を維持するべきである。さらに、それと同時に、前処理は、モノマー性セルロース由来糖の妥当な収率を最小限の酵素消費で得ることができるよう、セルロース鎖を酵素加水分解に十分に暴露し、その感受性を事前に調整するべきである。酵素消費もまた、現在定義されているような「世界市場経済」に関連する「経済的採算性」の境で揺れているバイオマス処理の商業化における、中心的考慮点である。近年における劇的な改善にもかかわらず、市販の酵素調製物の高いコストが、バイオマス変換における最も高い運営コストの1つとなっている。

40

#### 【0008】

熱水前処理温度及び反応器滞留時間が増加すると、フルフラール及び縮合反応の生成物

50

を含む他の物質への化学的転換に起因して、ヘミセルロースから得られるC5糖のより高い生成量が、回復不可能なほど失われる。モノマー性6炭素グルコースへの効率的な酵素加水分解のためにセルロース繊維を適切に調整するためには、さらに高い温度及び滞留時間が必要である。

#### 【0009】

先行技術において、熱水前処理のしばしば使用されるパラメータの「過酷度」は、典型的には対数値として言及される「 $R_0$ 」である。 $R_0$ は、式 $R_0 = t \cdot \exp[(T-100)/14.75]$ (式中、 $t$ は、分単位の滞留時間であり、 $T$ は、摂氏温度での反応温度である)に従う、前処理温度及び反応器滞留時間の複合的尺度である。我々は、非常に低いレベルの「過酷度」であっても古典的 $\log R_0$ との逆直線関係を提供する前処理過酷度の代替的尺度、「キシラン価」を考案した。前処理状態の純粋に経験的な記述である $R_0$ とは異なり、キシラン価は、機能的に重要な物理的パラメータである。キシラン価は、バイオマス原料が供されている $R_0$ 過酷度とは無関係に、異なるバイオマス原料のC5回収率に関する比較を可能にする、前処理度の尺度を提供する。

10

#### 【0010】

熱水前処理過酷度が「キシラン価」又は「 $R_0$ 」に関して表現されるかどうかに関わらず、所与のバイオマス原料に対する前処理条件の最適化には、本来、ヘミセルロースからの高いモノマー性C5糖収率(低過酷度)の要求と、セルロースからの高いモノマー性C6糖収率(高過酷度)の要求との間にある程度の妥協点が必要である。

20

#### 【0011】

熱水前処理中に可溶化されるヘミセルロース由来C5糖は、典型的には、セルラーゼ酵素触媒を大きく阻害する大量のキシロオリゴマーを含む。Shiら(2011)、Quing及びWyman(2011)、Quingら(2010)を参照されたい。可溶化されたリグニンから得られる酢酸及びフェノール系化合物等の、前処理の他の可溶性副生成物もまた、セルラーゼ酵素触媒を阻害することが知られている。Kothari及びLee(2011)、Ximenesら(2010)を参照されたい。効果的なレベルの酵素阻害物質の存在は、所与の加水分解度を達成するために必要な酵素消費を増加させる。したがって、商業規模バイオマス変換の「経済的採算性」には、前処理から得られる可溶性化合物によるセルラーゼ阻害の最小限化が有利である。

#### 【0012】

ヘミセルロース及びセルロースの両方からの糖収率を最大化するための、並びにセルラーゼ触媒のキシロオリゴマー阻害を最小限化するための、様々な異なる熱水前処理戦略が報告されている。いくつかの場合において、ヘミセルロース分解(酸、 $\text{pH} < 3.5$ )又はリグニン可溶化(塩基、 $\text{pH} > 9.0$ )を触媒するために、外因性の酸又は塩基が添加される。他の場合において、熱水前処理は、リグノセルロース自体から得られる非常に弱い酢酸( $\text{pH} 3.5 \sim 9.0$ )のみを使用して行われる。これらの弱 $\text{pH}$ 条件下での熱水前処理は、ヘミセルロースエステル自体から遊離した酢酸がヘミセルロース加水分解をさらに触媒するため、「自己加水分解」プロセスと呼ばれている。

30

#### 【0013】

酸触媒の存在下ではより低い温度で同等のヘミセルロース可溶化が生じ得るため、「希酸」又は「酸浸漬」処理として知られる酸触媒熱水前処理は、典型的には高収率のC5糖を提供する。希酸前処理に続く酵素加水分解後の全C5糖収率は、典型的には、所与のバイオマス原料から理論的に遊離し得るものの約75%以上である。例えば、Baboukaniuら(2012)、Wonら(2012)、Luら(2009)、Jeongら(2010)、Leeら(2008)、Sassnerら(2008)、Thomsenら(2006)、Chungら(2005)を参照されたい。

40

#### 【0014】

対照的に、酸触媒の非存在下ではより高い温度での前処理が必要であるため、自己加水分解熱水前処理は、典型的にはそれよりはるかに低い収率のC5糖を提供する。商業的に非現実的な低い乾燥物質含量で行われる自己加水分解前処理を除いて、自己加水分解処理は、典型的には理論的回収率の40%未満のC5糖収率を提供する。例えば、Diazら(2010)、Dogarisら(2009)を参照されたい。商業的に非現実的な反応時間及び極めて高い酵素用量が使

50

用された場合において、自己加水分解からの53%もの高いC5収率が報告されている。しかしながら、これらの非常に高いC5収率でさえも、希酸前処理を使用して日常的に得られるレベルをはるかに下回っている。例えば、Leeら(2009)、Ohgrenら(2007)を参照されたい。

#### 【0015】

自己加水分解により得られるより低いC5収率の結果、商業的バイオマス変換システムにおける熱水前処理に関するほとんどの報告は、希酸プロセスに焦点を置いている。いわゆる「2段階」希酸前処理の使用により、約85%のヘミセルロース由来C5糖収率が達成されている。2段階前処理においては、より低い初期温度を使用してヘミセルロースが可溶化され、その後でC5に富む液体画分が分離される。第2の段階において、より高い温度を使用してセルロース鎖が調整される。例えば、Mesaら(2011)、Kimら(2011)、Chenら(2010)、Jinら(2010)、Monavariら(2009)、Soderstromら(2005)、Soderstromら(2004)、Soderstromら(2003)、Kimら(2001)、Leeら(1997)、Paptheofanousら(1995)を参照されたい。米国国立再生可能エネルギー研究所(US National Renewable Energy Laboratory、NREL)により報告された1つの精密な「2段階」希酸前処理は、原料としてトウモロコシ茎葉を使用して、約90%のC5収率を達成したと主張している。Humbirdら(2011)を参照されたい。

10

#### 【0016】

キシロオリゴマーのキシロースモノマーへの加水分解が、添加される酸により触媒されるため、希酸システムにおいては、セルラーゼ触媒のキシロオリゴマー阻害が回避される。キシロオリゴマーの酸触媒加水分解はまた、残留固体が酵素加水分解を受けるプロセス

20

#### 【0017】

自己加水分解は、それにより提供されるC5収率がより低いにもかかわらず、依然として商業規模での希酸前処理に勝る競走上の利点を提供する。

#### 【0018】

自己加水分解プロセスの利点のうち最も注目すべきは、加水分解していない残留リグニンが、希酸プロセスから回収されたリグニンと比較して、非常に高い市場価値を有することである。第1に、希酸前処理において典型的に使用される硫酸は、残留硫黄含量をもたらす。これにより、得られるリグニンは、別様には「環境に優しい」石炭代替物として自己加水分解から得られる硫黄不含リグニン燃料ペレットを消費する傾向にある商業的発電所にとって、魅力がなくなる。第2に、硫酸触媒熱水前処理中に生じるリグニンのスルホン化により、リグニンは比較的親水性となり、それにより機械的な保水能力が増加する。この親水性は、商業的使用のためのリグニンの乾燥のコストを増加させると共に、リグニンの水分を吸収する傾向を考慮すると、屋外保存に好適でないものとする。希酸前処理による、リグノセルロース系バイオマス変換のためのNRELのプロセスのいわゆる「技術経済モデル」は、リグニンを販売可能な商品としてではなく、プロセス蒸気用の燃料の内部源として説明するのみである。Humbirdら(2011)を参照されたい。対照的に、自己加水分解に依存するプロセススキームの「経済的採算性」は、清浄な乾燥リグニンペレットの堅調な販売からの大きな寄与を含む。これは、典型的なソフトリグノセルロース系バイオマス原料が、乾燥物質含量の10%から40%の間の高い割合のリグニンを含むという点で、特に重要である。したがって、自己加水分解システムからのプロセス糖収率が、希酸システムと比べて減少し得るとしても、全体的な「採算性」は同等のままであるか、又はさらにそれより高くなり得る。

30

40

#### 【0019】

自己加水分解プロセスはまた、希酸の他の周知の欠点を回避する。「環境に優しい」処理が好まれる哲学的方向性から逸脱する硫酸の必要性は、プロセス材料としての酸の相当な運営コストを導入し、精密な廃水处理システム、及び高価な耐食性機器が必要になる。

#### 【0020】

自己加水分解はまた、控え目な処理シナリオに有利に拡張可能である。NRELにより説明される希酸プロセスは、非常に複雑及び精密であり、より小規模で構築するのは現実的に

50

不可能であり、1時間当たり約100トンのバイオマス原料の巨大規模でのみ可能である。そのような規模は、超集約的バイオマス処理シナリオにおいてのみ適切である。Humbirdら(2011)を参照されたい。トウモロコシ茎葉の超集約型バイオマス処理は、化学的に増強された過剰生産において栽培される遺伝子組み換えトウモロコシが豊富な米国においては、十分適切となり得る。しかしながら、そのようなシステムは、世界の他の国ではより関連性が低い。そのようなシステムは、控え目なバイオマス処理シナリオ、例えば、遺伝子組み換え及び化学的増強を用いても、典型的にはトウモロコシよりもはるかに少ないヘクター当たりのバイオマスを生成する、サトウキビ若しくはヤシ油若しくはソルガム畑でのオンサイト処理、又は麦わらの地域的处理には不適切である。

#### 【0021】

自己加水分解システムは、希酸とは対照的に、法的に「環境に優しく」、容易に拡張可能であり、精密な廃水処理システムの必要性による重荷がない。したがって、糖収率の点だけでは希酸システムより明らかに有利ではない可能性があるとしても、改善された自己加水分解システムを提供することが有利である。

#### 【0022】

自己加水分解による低いC5モノマー収率の問題により、一般に、リグノセルロース系バイオマス処理技術の商業的提供者は、他の手法を追求することを余儀なくされた。改善されたC5収率を提供するように設計された、いくつかの「2段階」前処理システムが、自己加水分解前処理と共に報告されている。WO2010/113129、US2010/0279361、WO2009/108773、US2009/0308383、US8,057,639、US20130029406を参照されたい。これらの「2段階」前処理スキームにおいて、いくつかのC5に富む液体画分は、より低温での前処理の後に固体/液体分離により除去され、その後、より高温での固体画分の前処理が続く。これらの公開特許出願のほとんどは、実際の実験結果を報告していない。WO2010/113129におけるその2段階自己加水分解前処理の説明において、Chemtex Italiaは、麦わらを使用した全部で26の実験例を、52%の平均C5糖回収率と共に報告している。これらのC5回収率値は、エタノール及び他の有用な生成物への発酵において実際に消費される基質である、C5回収率自体とモノマー糖収率とを区別していない。

#### 【0023】

リグノセルロース系バイオマスを処理するためのスキームに第2の前処理段階を導入すると、追加的な複雑性及びコストがもたらされる。したがって、単純な1段階自己加水分解システムを使用して、2段階前処理の利点を実質的に達成することが有利である。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0024】

我々は、1段階自己加水分解前処理が非常に低い過酷度まで行われる場合、妥当なグルコース収率を達成しながらも、理論的収率の60%以上という予想外に高い最終C5モノマー収率を、酵素加水分解後に達成できることを発見した。バイオマス原料がキシラン価10%以上まで前処理される場合、大量の元のキシラン含量が、固体画分中に残留する。予想に反して、この非常に高い残留キシラン含量は、非常に低いパーセンテージのグルコースへのセルロース変換のみを犠牲にしながら、高い回収率でキシロースモノマーに酵素加水分解され得る。

#### 【0025】

これらの非常に低い過酷度のレベルにおいて、セルラーゼ活性又は発酵生物に影響する可溶性副生成物の生成は低く維持され、前処理された材料は、典型的にはいかなる洗浄又は他の解毒ステップも必要とせずに、直接、酵素加水分解及びその後の発酵に使用され得る。

#### 【0026】

キシロオリゴマーによる、又は液体画分中の他の可溶性生成物によるセルラーゼ触媒の阻害は、プロセス中容易に回避され得る。前処理後の固体/液体分離ステップは、液体画分及び固体画分を生成する。C5に富む液体画分は、酵素加水分解中、「バイパス」におい

10

20

30

40

50

て固体画分から別個に維持される。固体画分の酵素加水分解の後、液体画分が加水分解物に添加され、残りの活性キシラナーゼ酵素による後加水分解を受ける。液体画分中のキシロオリゴマーは、セルラーゼ活性がもはや必要ではなくなった後にのみ、このようにしてキシロースモノマーに加水分解される。セルロース及びヘミセルロースの両方から得られたC5及びC6モノマー糖の両方を含む、最終的な合わせられた加水分解物及び後加水分解物は、改変酵母により直接エタノールに発酵され得る。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】自己加水分解前処理に供されたソフトリグノセルロース系バイオマス原料の、前処理過酷度係数の関数としてのキシラン価を示す図である。

10

【図2】自己加水分解前処理に供されたソフトリグノセルロース系バイオマス原料の、キシラン価の関数としての可溶性及び不溶性形態でのC5回収率を示す図である。

【図3】自己加水分解前処理に供されたソフトリグノセルロース系バイオマス原料の、キシラン価の関数としての全C5回収率を示す図である。

【図4】自己加水分解前処理に供されたソフトリグノセルロース系バイオマス原料の、キシラン価の関数としての酢酸、フルフラール及び5-HMFの生成を示す図である。

【図5】非常に低い過酷度の自己加水分解前処理に供されたソフトリグノセルロース系バイオマス原料の、セルロース変換率に対する溶解固体の除去の効果を示す図である。

【図6】非常に低い過酷度の自己加水分解前処理に供されたソフトリグノセルロース系バイオマス原料からの液体画分の、HPLC特性決定を示す図である。

20

【図7】固体画分が酵素加水分解に供され、続いて、後加水分解のために液体画分が導入された場合の、時間の関数としてのC5糖回収率を示す図である。

【図8】非常に低い過酷度の自己加水分解により前処理され、酵素加水分解され、解毒して発酵阻害物質を除去せずに、合わせられた液体及び固体画分として使用された麦わらを使用した、改変酵母株によるエタノール発酵の発酵プロファイルを示す図である。

【図9】一実施形態のプロセススキームを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

いくつかの実施形態において、本発明は、リグノセルロース系バイオマスを処理する方法であって、

30

ソフトリグノセルロース系バイオマス原料を準備するステップと、

前処理されたバイオマスが10%以上のキシラン価を有することを特徴とするような非常に低い過酷度まで、原料を、1段階加圧熱水前処理において、3.5から9.0の範囲内のpHで前処理するステップと、

前処理されたバイオマスを、固体画分及び液体画分に分離するステップと、

エンドグルカナーゼ活性、エキソグルカナーゼ活性、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性、エンドキシラナーゼ活性、キシロシダーゼ活性、及びアセチルキシランエステラーゼ活性を含む酵素混合物により触媒される酵素加水分解を利用して、補助水分を添加して又は添加せずに固体画分を加水分解するステップと、

その後、分離した液体画分及び加水分解した固体画分を混合するステップであって、液体画分中のキシロオリゴマーが、加水分解した固体画分中に残留する酵素活性の作用により、キシロースモノマーに分解されるステップとを含む方法を提供する。

40

【0029】

本明細書において使用される場合、以下の用語は、以下の意味を有する。

「約」は、本明細書において量的数値又は範囲に関して使用される場合、相対的に見て、言及される数又は範囲の+/-10%を指す。

【0030】

「自己加水分解」は、前処理中にヘミセルロース加水分解により遊離した酢酸が、ヘミセルロース加水分解をさらに触媒する前処理プロセスを指し、3.5から9.0の間のpHで行わ

50

れるリグノセルロース系バイオマスの任意の熱水前処理に該当する。

【0031】

「リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物」は、前処理されたリグノセルロース系バイオマスの酵素加水分解を提供するのに十分であり、またエンドセルラーゼ(エンドグルカナーゼ)、エキソセルラーゼ(エキソグルカナーゼ)、エンドキシラナーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、キシロシダーゼ及び $\beta$ -グルコシダーゼ活性を含む、酵素活性の市販の混合物を指す。「リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された」という用語は、酵素混合物が、前処理されたリグノセルロース系バイオマスの発酵性糖への加水分解における加水分解収率を改善する、及び/又は酵素消費を低減するという特定の目的のために選択及び/又は改変された、製品開発プロセスを指す。

10

【0032】

乾燥物質レベル「において」前処理を行うということは、加圧熱水前処理の開始時の原料の乾燥物質含量を指す。前処理は、バイオマスの水分のpHが、加圧熱水前処理の開始時のpHであるpH「において」行われる。

【0033】

DMとしても示される「乾燥物質」は、可溶性及び不溶性両方の全固体を指し、事実上「非水分量」を意味する。乾燥物質含量は、105 で一定重量が達成されるまで乾燥させることにより測定される。

【0034】

「繊維構造」は、前処理後の繊維断片の平均サイズが750umを超える限り維持される。

20

【0035】

「熱水前処理」は、高温液体、気化蒸気、又は高温液体若しくは蒸気若しくはその両方を含む加圧蒸気としての水を使用して、酸又は他の化学物質を添加して又は添加せずに、120 以上の温度でバイオマスを「加熱処理」することを指す。

【0036】

「1段階加圧熱水前処理」は、バイオマスを単一の通過で加熱するように構成される単一反応器内で、バイオマスが加圧熱水前処理を受ける前処理を指し、加圧熱水前処理に供された原料から液体画分を除去するための固体/液体分離ステップの後、それ以上加圧熱水前処理は適用されない。

【0037】

「固体/液体分離」は、圧縮による力、遠心力又は他の力の印加により固体から液体が分離される、能動的機械プロセスを指す。

30

【0038】

「ソフトリグノセルロース系バイオマス」は、セルロース、ヘミセルロース及びリグニンを含む木以外の植物バイオマスを指す。

【0039】

「固体画分」及び「液体画分」は、固体/液体分離における前処理されたバイオマスの分別を指す。分離された液体は、集合的に「液体画分」と呼ばれる。相当量の不溶性固体含量を含む残留画分は、「固体画分」と呼ばれる。「固体画分」は、乾燥物質含量を有し、典型的には、相当量の残留「液体画分」も含む。

40

【0040】

「理論的収率」は、ポリマーセルロースから、又はポリマーヘミセルロース構造から得られたモル当量の純粋なモノマー糖を指し、構成モノマー糖はまた、エステル化又は別様に置換されてもよい。理論的収率のパーセンテージとしての「C5モノマー収率」は、以下のように決定される。前処理の前に、バイオマス原料は、Sluiterら(2008)の強酸加水分解法を用い、ガラクトース及びマンノースがキシロースと共溶出するHPLCカラム及び溶出システムを使用して、炭水化物について分析される。そのようなシステムの例は、Phenomex製REZEX(商標)Monosaccharide H+カラム及びBiorad製AMINEX HPX 87C(商標)を含む。強酸加水分解中、エステル及び酸に不安定な置換が除去される。別段に指定される場合を除き、前処理されていないバイオマスにおいて決定される「キシロース」+アラビノース

50

の総量は、100%理論的C5モノマー回収率とみなされ、これは集合的に「C5モノマー回収率」と呼ぶことができる。モノマー糖の決定は、精製外部標準を用いた標準曲線に基づき、HPLC特性決定を使用してなされる。実際のC5モノマー回収率は、C5モノマーの直接測定用の試料のHPLC特性決定により決定され、これは次いで、理論的収率のパーセントとして表現される。

#### 【0041】

「キシラン価」は、以下のように決定される前処理されたバイオマスの特性決定を指す。前処理されたバイオマスは、固体/液体分離に供され、約30%の全固体の固体画分、及び液体画分が提供される。次いで、この固体画分は、1:3の全固体(DM)対水の重量比で70の水と混合することにより、部分的に洗浄される。このようにして洗浄された固体画分は、次いで約30%の全固体まで圧縮される。このようにして洗浄された固体画分のキシラン含量は、参照により全体が本明細書に明示的に組み込まれるA. Sluiterら、「Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass」、US National Renewable Energy Laboratory (NREL) Laboratory Analytical Procedure (LAP)(発行日2008年4月25日、Technical Report NREL/TP-510-42618(2008年4月改訂)に記載)の方法を使用して決定される。ガラクトース及びマンノースがキシロースと共溶出するHPLCカラム及び溶出システムが使用される。そのようなシステムの例は、Phenomenex製REZEX(商標)Monosaccharide H+カラム及びBiorad製AMINEX HPX 87C(商標)を含む。説明されるようなこのキシラン含量の測定は、これらの条件下において固体画分から洗浄されていない残留液体画分からの可溶性物質のある程度の寄与を含む。したがって、「キシラン価」は、不溶性固体中の残留キシラン含量、並びに「液体画分」中の可溶性キシロース及びキシロオリゴマー含量の「加重した組合せ」の測定値を提供する。

#### 【0042】

少なくとも、麦わら、トウモロコシ茎葉、トウモロコシ穂軸、空果房、稲わら、オート麦わら、大麦わら、菜種わら、ライ麦わら、ソルガム、スイートソルガム、大豆茎葉、スイッチグラス、ギョウギシバ及びその他の草、バガス、ビートパルプ、トウモロコシ繊維、又はそれらの任意の組合せ等のバイオマスを含む、任意の好適なソフトリグノセルロース系バイオマスが使用され得る。リグノセルロース系バイオマスは、紙、新聞紙、ダンボール、又は他の都市若しくはオフィス廃棄物等の他のリグノセルロース系材料を含んでもよい。リグノセルロース系バイオマスは、異なる原料に由来する材料の混合物として使用されてもよく、生の、部分的に乾燥した、若しくは完全に乾燥したもの、又はそれらの任意の組合せであってもよい。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、少なくとも約10kg、又は少なくとも100kg、又は少なくとも500kgのバイオマス原料を使用して実行される。

#### 【0043】

リグノセルロース系バイオマスは、緩く組織化されたヘミセルロースのマトリックス内にインターカレートされ、疎水性リグニンに富む環境内に封入された結晶セルロース繊維を含む。セルロース自体は、D-グルコースの長い直鎖ポリマーを含むが、ヘミセルロースは、全ての5炭素アルドペントース(C5糖)、並びにグルコース及びマンノースを含むいくつかの6炭素(C6)糖のモノマーを含む、短い分岐鎖炭水化物の不均質混合物である。リグニンは、極めて不均質なポリマーであり、任意の特定の主構造を持たず、疎水性フェニルプロパノイドモノマーを含む。

#### 【0044】

好適なリグノセルロース系バイオマスは、典型的には、前処理前の乾燥質量の20%から50%の間の量のセルロース、前処理前の乾燥質量の10%から40%の間の量のリグニン、及び15%から40%の間の量のヘミセルロースを含む。

#### 【0045】

いくつかの実施形態において、バイオマス原料は、熱水前処理の前に、粒子サイズ低減及び/又は他の機械的処理、例えば粉碎、ミリング、寸断、切断、又は他のプロセスに供されてもよい。いくつかの実施形態において、バイオマス原料は、加圧前処理の前に、Kn

udsenら(1998)において説明されるように、有益な塩を洗浄及び/又は進出されてもよい。いくつかの実施形態において、原料は、加圧前処理の前に、99 までの温度で浸漬されてもよい。

【0046】

いくつかの実施形態において、原料は、熱水前処理の前に、まず水溶液中に浸漬される。いくつかの実施形態において、参照により全体が本明細書に組み込まれるUS8,123,864に記載のように、前処理において、後のステップから得られる酢酸含有液体中に原料を浸漬させることが有利となり得る。参照により全体が本明細書に組み込まれるUS12/935,587に記載のように、可能な限り高い乾燥物質含量で処理を行うことが有利である。高い乾燥物質で前処理を行うことは、不必要な水の加熱に対するプロセスエネルギーの支出を回避する。しかしながら、酵素加水分解からの最適な最終糖収率を達成するために、ある程度の水分は必要である。典型的には、その本来の保水能力で、又はその付近でバイオマス原料を前処理することが有利である。これは、所与の原料が、過剰の水の中での浸漬に続く、通常の商業的スクリュープレスの機械的限界までの圧縮の後に到達する水分のレベル、典型的には30%から45%DMの間である。いくつかの実施形態において、熱水前処理は、少なくとも35%のDM含量で行われる。熱水前処理中は、ある程度の水分が加熱中に追加されるため、DM含量が減少し得ることが、当業者に容易に理解されるだろう。いくつかの実施形態において、原料は、少なくとも20%、又は少なくとも25%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は40%以下、又は35%以下、又は30%以下のDM含量で前処理される。

【0047】

いくつかの実施形態において、水溶液での浸漬/湿潤は、前処理前のpHを、典型的に自己加水分解に有利である3.5から9.0の間の範囲に調整するのに役立ち得る。可溶化されたヘミセルロースから酢酸が遊離するため、pHは、前処理の間、典型的にはより酸性のレベルに変化し得ることが、容易に理解されるだろう。

【0048】

いくつかの実施形態において、熱水前処理は、湿潤酸化前処理に必要とされるような補助酸素なしに、又は、オルガノソルブ前処理に必要とされるような有機溶媒の添加なしに、又は、マイクロ波前処理に必要とされるようなマイクロ波加熱の使用なしに行われる。いくつかの実施形態において、熱水前処理は、140 以上、又は150 以上、又は160 以上、又は160 から200 の間、又は170 から190 の間、又は180 以下、又は170 以下の温度で行われる。

【0049】

いくつかの実施形態において、ある程度のC5含量は、加圧前処理の前に浸漬ステップにより除去され得る。いくつかの実施形態において、単一反応器は、バイオマスを単一の標的溫度に加熱するように構成され得る。代替として、単一反応器は、バイオマスが単一の通過中2つ以上の温度領域に暴露されるように、反応器内の温度勾配に影響するように構成され得る。いくつかの実施形態において、前処理の過程に、加圧反応器内からある程度の可溶化されたバイオマス成分を部分的に除去することが有利となり得る。

【0050】

好適な熱水前処理反応器は、典型的には、紙パルプ産業から知られているほとんどのパルプ化反応器を含む。いくつかの実施形態において、熱水前処理は、10パール以下、又は12パール以下、又は4パール以上、又は8パール以上、又は8パールから18パールの間、又は18パールから20パールの間まで加圧された反応器内で蒸気により施される。いくつかの実施形態において、前処理反応器は、原料の連続流入のために構成される。

【0051】

いくつかの実施形態において、圧力下で、ある程度の期間又は「滞留時間」の間、湿潤バイオマスが反応器を通して移送される。滞留時間は、有利には、より高いバイオマス処理量を促進するために、短時間に維持される。しかしながら、得られる前処理過酷度は、温度及び滞留時間の両方によって決定される。熱水前処理中の温度は、有利にはより低く維持されるが、これは、本発明の方法が非常に低い前処理過酷度を得ることを追及するた

めだけではなく、より低い温度がより低い蒸気圧を使用して達成され得るためである。前処理温度が180 以下のレベルとなり得る限り、したがって飽和蒸気圧が10バール以下に維持される限り、より低い腐食傾向を経験することとなり、はるかに低いグレードの圧力金具及び鋼組成を使用することができ、これにより工場資本コストが低減される。いくつかの実施形態において、反応器は、バイオマスを、160 から200 の間、又は170 から190 の間の単一の標的溫度に加熱するように構成される。いくつかの実施形態において、滞留時間は、60分未満、又は30分未満、又は20分未満、又は15分未満、又は14分未満、又は13分未満、又は12分未満、又は10分未満、又は8分未満、又は5分未満である。

#### 【0052】

バイオマス原料は、様々な手段により、大気圧から加圧反応器内に投入され得る。いくつかの実施形態において、参照により全体が本明細書に組み込まれるUS13/062,522に記載のシステム等のスルース(sluiice)型「パーティクルポンプ」システムを使用して、バイオマス原料が投入され得る。いくつかの実施形態において、いわゆる「スクリュープラゲ」供給機器を使用して前処理反応器に投入することが有利となり得る。

10

#### 【0053】

前処理されたバイオマスは、様々な手段により加圧反応器から排出され得る。いくつかの実施形態において、前処理されたバイオマスは、材料の繊維構造を維持するような様式で排出される。前処理されたバイオマスの繊維構造を維持することは、これによって、前処理された材料の固体画分が、通常のスクリュープレス機器を使用して、固体/液体分離中に比較的高い乾燥物質レベルまで圧縮され、それによりメンブレンフィルタプレスシステムの追加的費用及び複雑性が回避され得るため、有利である。

20

#### 【0054】

繊維構造は、非爆発の様式で加圧反応器から原料を除去することにより維持され得る。いくつかの実施形態において、非爆発的除去は、参照により全体が本明細書に組み込まれるUS13/043,486に記載のもの等のスルース型システムを使用して達成されてもよく、それにより繊維構造が維持され得る。いくつかの実施形態において、非爆発的除去は、参照により全体が本明細書に組み込まれるUS12/996,392に記載のもの等の液体遠心分離機除去システムを使用して達成されてもよく、それにより繊維構造が維持され得る。

#### 【0055】

いくつかの実施形態において、前処理されたバイオマスは、前処理された材料の爆発的な放出を含む「蒸気爆発」を利用して、加圧前処理反応器から除去され得る。蒸気爆発した前処理されたバイオマスは、その繊維構造を維持しておらず、したがって、その繊維構造を維持する前処理されたバイオマスによる通常のスクリュープレスシステムを使用して達成され得るものに匹敵する乾燥物質含量を達成するために、より精密な固体/液体分離システムを必要とする。

30

#### 【0056】

バイオマス原料は、前処理されたバイオマスが、10%以上のキシラン価を有することを特徴とするような非常に低い過酷度まで前処理される。いくつかの実施形態において、バイオマスは、11%以上、又は12%以上、又は13%以上、又は14%以上、又は15%以上、又は16%以上、又は17%以上のキシラン価まで前処理される。「キシラン価」というパラメータは、不溶性固体中に残っている残留キシラン含量、並びに液体画分中の可溶性キシロース及びキシロオリゴマーの濃度の両方を加重した組合せを反映する複合的測定値を指す。より低いRo過酷度では、キシラン価はより高い。したがって、最も高いキシラン価は、最も低い前処理過酷度を指す。キシラン価は、不溶性固体中の残留キシラン含量が10%以上である非常に低い過酷度であっても、従来の過酷度の尺度logR<sub>0</sub>との逆直線関係を提供する。

40

#### 【0057】

等しいキシラン価を有する異なる前処理されたバイオマス原料は、等しいC5モノマー回収率を示すことから、キシラン価は、前処理過酷度の尺度として特に有用である。対照的に、従来のRo過酷度は、単に前処理条件の経験的説明であり、これは異なるバイオマス原料の間の比較の合理的根拠を提供しない。例えば、過酷度logR<sub>0</sub>=3.75までの1段階自己加

50

水分解は、6～7%の間のキシラン価を有する前処理されたサトウキビバガス及びトウモロコシ茎葉を提供し、一方、典型的な麦わら系統では、前処理された原料の得られるキシラン価は、約10%である。

#### 【0058】

バイオマス原料が非常に低い過酷度まで前処理され、前処理された原料のキシラン価が10%以上であることが有利である。この非常に低い過酷度のレベルは、前処理中に可溶化される、又は回復不可能なほど失われる前処理前の原料の全ヘミセルロース含量が最小限化されるプロセスに対応する。10%以上のキシラン価において、麦わら、サトウキビバガス、スイートソルガムバガス、トウモロコシ茎葉、及び空果房(油ヤシ由来)の典型的な系統では、原料の元のC5含量の少なくとも60%が、1段階自己加水分解前処理後に回収され得、固体画分中のキシラン、並びに液体画分中の可溶性キシロース及びキシロオリゴマーの両方がそれを構成する。

10

#### 【0059】

我々は、予想外にも、1段階自己加水分解により非常に低い過酷度まで前処理された原料の酵素加水分解後に、理論値の少なくとも55%、又は少なくとも60%、又は少なくとも65%という高い最終C5モノマー収率が、認識され得るほどのC6モノマー収率の損失なしに得ることができることを発見した。非常に低い過酷度レベルにおいては、大量の原料のヘミセルロース含量が前処理後の固体画分中に残留し、これは後に、酵素加水分解を利用して、高い回収率でC5モノマーに加水分解され得る。

20

#### 【0060】

「キシロース回収率」に関する報告は、多くの場合、本明細書で報告されるキシロース回収率と比較できない観点から表現されている。例えば、Ohgrenら(2007)及びLeeら(2009)は、高いキシロース回収率を報告している。しかしながら、これらの値は、前処理されたバイオマスからのキシロース回収率のみを示しており、前処理前の原料の元のヘミセルロース含量のパーセンテージとして表現されていない。又は、例えば、WO2010/113129は、前処理前の原料のヘミセルロース含量のパーセンテージとしてのヘミセルロース回収率に言及しているが、全ヘミセルロース回収率よりも常に低いモノマー収率を示していない。

#### 【0061】

非常に低い過酷度のレベルまでの1段階自己加水分解により前処理されたバイオマスの別の驚くべき特徴は、発酵生物の阻害物質として機能する前処理副生成物の濃度が、非常に低いレベルに維持されるということである。その結果、典型的には、本発明の方法により得られる加水分解されたバイオマスは、いかなる洗浄又は他の解毒ステップを必要とすることもなく、直接発酵に使用することが可能である。

30

#### 【0062】

当該技術分野において周知のように、自己加水分解熱水前処理は、典型的には、「発酵阻害物質」として作用し、発酵生物の増殖及び/又は代謝を阻害する様々な可溶性副生成物を生成する。リグノセルロース系原料の特性、及び前処理の過酷度に依存して、異なる発酵阻害物質が異なる量で生成される。Klinkeら(2004)を参照されたい。自己加水分解前処理中、典型的には、(1)フラン、主に単糖又はオリゴ糖からの分解生成物である2-フルフラール及び5-HMF(5ヒドロキシメチルフルフラール)、(2)リグニン構造の分解生成物であるモノマーフェノール、及び(3)小分子有機酸、主に、ヘミセルロース及びリグニン中のアセチル基に由来する酢酸の、少なくとも3つのカテゴリーの発酵阻害物質が形成される。異なる阻害物質の混合物が、酵母株を使用して(例えばPalmquistら(1999)を参照されたい)、またエタノール性大腸菌(*Escherichia coli*)を使用して(例えばZaldivarら(1999)を参照されたい)、バイオエタノール発酵において相乗的に作用することが示されている。いくつかの実施形態において、揮発性阻害物質、中でも特にフルフラールのレベルを低減するために、当該技術分野において周知の方法を使用して、前処理されたバイオマスをフラッシュ蒸発に供することが有利となり得る。我々の経験では、10%以上のキシラン価まで前処理された麦わら、スイートソルガムバガス、サトウキビバガス、トウモロコシ茎

40

50

葉、及び空果房等のバイオマス原料の典型的な系統による自己加水分解を使用すると、酢酸及びフルフラールレベルのみが、発酵生物を阻害する可能性がある。バイオマス原料が、DM35%以上で、10%以上のキシラン価まで前処理される場合、及び、その後固体画分が、DMを調整するための水を添加するが洗浄ステップなしで25%以下のDMで酵素加水分解される場合、加水分解物中のフルフラールレベルは、典型的には、3g/kg未満に、また酢酸レベルは9g/kg未満に維持できる。これらのレベルは、典型的には、特殊な系統を使用した酵母発酵に許容され得る。酵素加水分解中、ある程度の追加の酢酸が、固体画分中のヘミセルロースの分解から放出される。いくつかの実施形態において、電気透析又は当該技術分野において知られた他の方法を使用して、液体画分及び/又は加水分解された固体画分からある程度の酢酸含量を除去することが有利となり得る。

10

#### 【0063】

反応器滞留時間及び温度の様々な異なる組合せにより、1段階自己加水分解を利用して10%以上のキシラン価まで異なる原料が前処理され得る。当業者は、慣例的な実験を通して、所与の原料を用い、所与の反応器を使用し、また所与のバイオマス反応器投入及び反応器排出システムを用いた、適用すべき適切な前処理ルーチンを容易に決定するだろう。スルースシステム又はスクリュープラグ供給機器により投入され、「パーティクルポンプ」スルースシステム又は液体遠心分離システムにより排出される連続反応器を使用して原料が前処理される場合、10%以上のキシラン価の非常に低い過酷度は、麦わら又は空果房の典型的な系統を使用して、180 °Cの温度及び24分の反応器滞留時間により達成され得る。トウモロコシ茎葉、サトウキビバガス、及びスイートソルガムバガスの典型的な系統では、10%以上のキシラン価の非常に低い過酷度は、典型的には、180 °Cの温度及び12分の反応器滞留時間を使用して、又は、175 °Cの温度及び17分の反応器滞留時間を使用して達成され得る。滞留時間及び温度は、同等レベルのR<sub>90</sub>過酷度を達成するように調整され得ることが、当業者に容易に理解されるだろう。

20

#### 【0064】

前処理後、前処理されたバイオマスは、固体/液体分離ステップにより、固体画分及び液体画分に分離される。「固体画分」及び「液体画分」は、さらに細分化され、処理されてもよいことが、容易に理解されるだろう。いくつかの実施形態において、バイオマスは、固体/液体分離と同時に前処理反応器から除去され得る。いくつかの実施形態において、前処理されたバイオマスは、反応器から排出された後、典型的には単純で低コストのスクリュープレスシステムを使用して固体/液体分離ステップに供され、固体画分及び液体画分を生成する。セルラーゼ酵素活性は、中でも特にキシロオリゴマー含量に起因するが、恐らくはまたフェノール含量及び/又はまだ同定されていない他の化合物にも起因して、液体画分により阻害される。したがって、実行可能な最高レベルの固体画分中の乾燥物質含量を達成すること、又は、代替として、固体画分から実行可能な最大量の溶解固体を除去することが有利である。いくつかの実施形態において、固体/液体分離は、少なくとも40%、又は少なくとも45%、又は少なくとも50%、又は少なくとも55%のDM含量を有する固体画分を達成する。繊維構造が維持されるような様式でバイオマス原料が前処理された場合、通常のスクリュープレスシステムを使用した固体/液体分離は、典型的には、固体画分において50%もの高いDMレベルを達成し得る。いくつかの実施形態において、例えばメンブレンフィルタプレスシステムを使用して、より効果的な固体/液体分離を達成するために、より高い工場資本経費を負担することが有利となり得る。いくつかの実施形態において、溶解固体は、連続的な洗浄及びプレスにより、又は紙パルプ技術分野において知られた置換洗浄技術により、固体画分から除去され得る。いくつかの実施形態において、直接固体/液体分離により、又は洗浄及び固体/液体分離のいくつかの組合せにより、固体画分の溶解固体含量は、少なくとも50%、又は少なくとも55%、又は少なくとも60%、又は少なくとも65%、又は少なくとも70%、又は少なくとも75%低減される。

30

40

#### 【0065】

10%以上のキシラン価まで前処理された原料の酵素加水分解は、典型的には、特定の洗浄又は解毒ステップを必要とすることなく、商業的に妥当な酵素消費で行うことができ、

50

固体画分は、少なくとも40%のDMまで圧縮され、又は、固体画分の溶解固体含量は、少なくとも50%低減される。

【0066】

固体/液体分離から得られた液体画分は、固体画分の酵素加水分解の間、固体画分から別個に維持される。我々は、この一時的分離を「C5バイパス」と呼ぶ。1段階自己加水分解により10%以上のキシラン価まで前処理された、麦わら、サトウキビバガス、スイートソルガムバガス、トウモロコシ茎葉、及び空果房の典型的系統等のソフトリグノセルロース系バイオマス原料から得られた液体画分は、典型的には、少量のC6モノマー成分(1×)、いくつかの他の糖を含む主要グルコース、より多量の可溶性C6オリゴマー成分(約2×~7×)、より多量のC5モノマー成分(約4×~8×)、いくつかのアラビノース及び他の糖を含む主要キシロース、並びにはるかに多量の可溶性キシロオリゴマー成分(約18×~30×)を含む。可溶性キシロオリゴマーは、典型的には、いくつかのより長鎖のオリゴマーと共に、主にキシロヘキソース、キシロペントース、キシロテトラオース、キシロトリオース及びキシロピオースを含む。

10

【0067】

固体画分は、酵素活性の混合を利用して酵素加水分解を受ける。当業者に容易に理解されるように、本発明の方法を実行するのに好適な酵素混合物の組成は、比較的広い範囲内で変動し得る。好適な酵素調製物は、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物を含む。最適化の間の酵素混合物の選択及び改変は、遺伝子組み換え技術、例えばZhangら(2006)により説明されるもの、又は当該技術分野において知られた他の方法等を含み得る。リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物は、典型的には、製造者及び/又は供給者により適宜特定される。これらは、典型的には、一般用途の、又は動物飼料、食品、繊維用洗浄剤の生産、若しくは製紙産業における使用に最適化された市販のセルラーゼ調製物とは異なる。いくつかの実施形態において、GENENCOR(商標)により提供され、また遺伝子改変されたトリコデルマリゼイ(*Trichoderma reesei*)の発酵から単離されたエキソグルカナーゼ、エンドグルカナーゼ、エンドキシラナーゼ、キシロシダーゼ、アセチルキシランエステラーゼ及びβ-グルコシダーゼを含む、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物、例えば、ACCELLERASE TRIO(商標)の商標で販売されている市販のセルラーゼ調製物等が使用される。いくつかの実施形態において、NOVOZYMES(商標)により提供され、またエキソグルカナーゼ、エンドグルカナーゼ、エンドキシラナーゼ、キシロシダーゼ、アセチルキシランエステラーゼ及びβ-グルコシダーゼを含む、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物、例えば、CELLIC CTEC2(商標)又はCELLIC CTEC3(商標)の商標で販売されている市販のセルラーゼ調製物等が使用される。

20

30

【0068】

リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された3つの市販のセルラーゼ調製物において表示されている酵素活性を、詳細に分析した。これらの3つの調製物、GENENCOR(商標)製ACCELLERASE TRIO(商標)並びにNOVOZYMES(商標)製CELLIC CTEC2(商標)及びCELLIC CTEC3(商標)はそれぞれ、製造者が提案する範囲内の酵素用量レベルにおいて本発明の方法に従い調製された、合わせられたC5/C6麦わら加水分解物を提供する上で効果的であることが示されており、C5モノマー収率は、少なくとも60%であり、セルロースC6変換収率は、少なくとも60%であった。これらの市販のセルラーゼ調製物のそれぞれにおいて、12の異なる酵素活性のレベルを特性決定し、タンパク質のグラム当たりで表現した。実験の詳細は、実施例8に記載される。結果を表1に示す。

40

【0069】

【表 1】

表1.リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物における、選択された活性の測定

|                          | CTEC 3                                                       | 活性<br>ACTrio                                                 | CTEC2                                                          | 基質             | 単位の定義<br>(形成)                                |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------|
| CBH I                    | 454±2.5 U/g                                                  | 171±0.4 U/g                                                  | 381±21 U/g                                                     | MeUmb-3-セロビオシド | 1 $\mu$ モルMeUmd当量/分                          |
| CBH II*                  | 測定不能                                                         | 測定不能                                                         | 測定不能                                                           |                |                                              |
| エンド-1,4- $\beta$ -グルカナーゼ | 466±31 U/g                                                   | 149±21 U/g                                                   | 173±15 U/g                                                     | Avicel PH-101  | 1 $\mu$ モルグルコース当量/分                          |
| $\beta$ -グルコシダーゼ         | 3350±75 U/g                                                  | 891±60 U/g                                                   | 2447±70 U/g                                                    | セロビオース         | 2 $\mu$ モルグルコース/分<br>(1 $\mu$ モルセロビオース/分の変換) |
| エンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼ | 278±10 U/g                                                   | 799±55 U/g                                                   | 306±41 U/g                                                     | WEAX(中間粘度)     | 1 $\mu$ モルグルコース当量/分                          |
| $\beta$ -キシロシダーゼ         | 279±7.0 U/g                                                  | 431±22 U/g                                                   | 87±0.2 U/g                                                     | WEAX(中間粘度)     | 1 $\mu$ モルキシロース/分                            |
| $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ   | 20±1.0 U/g                                                   | 9.4±0.4 U/g                                                  | 12±0.1 U/g                                                     | WEAX(中間粘度)     | 1 $\mu$ モルアラビノース/分                           |
| ラッカーゼ                    | 活性なし                                                         | 活性なし                                                         | 活性なし                                                           | シリンガルダジン       | -                                            |
| アミログルコシダーゼ(AMG)          | 18±3.6 U/g                                                   | 29±0.1 U/g                                                   | 18±1.5 U/g                                                     | コーンスターチ(可溶性)   | 1 $\mu$ モルグルコース/分                            |
| o-アミラーゼ                  | 2.7±0.1 U/g                                                  | 3.4±0.5 U/g                                                  | 4.7±1.4 U/g                                                    | コーンスターチ(可溶性)   | 1 $\mu$ モルグルコース当量/分                          |
| アセチルキシランエステラーゼ           | 3.8 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> ±9 $\cdot$ 10 <sup>-5</sup> U/g | 3.1 $\cdot$ 10 <sup>-4</sup> ±1 $\cdot$ 10 <sup>-4</sup> U/g | 4.2 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> ±4.2 $\cdot$ 10 <sup>-4</sup> U/g | pNP-アセテート      | 1 $\mu$ モルpNP当量/分                            |
| フェルラ酸エステラーゼ              | 活性なし                                                         | 活性なし                                                         | 活性なし                                                           | メチルフェルレート      | -                                            |

いくつかの実施形態において、エンドグルカナーゼ、エキソグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、エンドキシラナーゼ、キシロシダーゼ及び/又はアセチルキシランエステラーゼ活性のいずれかの間で、表1に記載の市販の調製物により示されるものと同様の相対的比率を有する酵素調製物が使用され得る。

【0071】

代替として、リグノセルロース系バイオマスを加水分解するのに効果的な酵素混合物は、当該技術分野において周知の方法により、好気性及び嫌気性細菌、白色腐朽菌、軟腐朽菌、並びに嫌気性真菌を含む様々な微生物から得ることができる。例えば、Singhanianら(2010)を参照されたい。セルラーゼを産生する生物は、典型的には、リグノセルロース系基質の加水分解に好適となるような適切な割合の異なる酵素の混合物を分泌する。リグノセルロース系バイオマスの変換に有用なセルラーゼ調製物の好ましい源は、トリコデルマ(Trichoderma)、ペニシリウム(Penicillium)、フザリウム(Fusarium)、フミコーラ(Humicola)、アスペルギルス(Aspergillus)及びファネロケーテ(Phanerochaete)の種等の菌類を含む。

10

【0072】

特に、1つの菌種であるトリコデルマリゼイが広く研究されている。野生型トリコデルマリゼイは、セルラーゼ鎖の還元及び非還元末端に対するそれぞれの特異性を有する2種のエキソセルラーゼ(セロピオヒドロラーゼ)、異なるセルロース認識部位を有する少なくとも5種の異なるエンドセルラーゼ、2種の $\beta$ -グルコシダーゼ、並びに様々なエンドキシラナーゼ及びエキソキシロシダーゼを含む、酵素の混合物を分泌する。Rouvinen, J.ら(1990)、Divne, C.ら(1994)、Martinez, D.ら(2008)を参照されたい。市販のセルラーゼ調製物は、典型的には、アルファ-アラビノフラノシダーゼ及びアセチルキシランエステラーゼ活性も含む。例えば、Vinzant, T.ら(2001)を参照されたい。

20

【0073】

野生型生物により自然に分泌される混合物中に存在する割合とは異なる相対的比率の酵素活性の最適化された混合物は、以前に、より高い糖収率をもたらすことが示されている。Rosgaardら(2007)を参照されたい。実際に、16もの多くの異なる酵素タンパク質を含む酵素ブレンドの最適化は、有利にも、所与の前処理を受ける所与のバイオマス原料に対して別個に決定されることが示唆されている。Billard, H.ら(2012)、Banerjee, G.ら(2010)を参照されたい。しかしながら、商業的実用性として、商業的酵素供給者は、典型的には、大量生産において規模の経済性を得ることができるために、実行可能な最小数の異なる酵素ブレンドを生成することを追求する。

30

【0074】

いくつかの実施形態において、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物を、1種以上の追加的又は補助的酵素活性で補完することが有利となり得る。いくつかの実施形態において、単に市販の調製物中に存在する1種以上の成分酵素の相対的比率を増加させることが有利となり得る。いくつかの実施形態において、特殊な追加的活性を導入することが有利となり得る。例えば、所与のバイオマス原料を使用して本発明の方法を実行する際、1種以上の補助的酵素活性の使用により有利に加水分解され得る特定の加水分解していない炭水化物結合が特定されてもよい。そのような加水分解していない結合は、当該技術分野において周知の方法を使用して、可溶性の加水分解物中、又は不溶性の加水分解されていない残渣中で、オリゴマー炭水化物の特性決定により特定されてもよい。また、加水分解していない結合は、Nguema-Onaら(2012)により説明されているように、特定の炭水化物結合に対するモノクローナル抗体を使用して、総合的なマイクロアレイポリマープロファイリングにより特定されてもよい。いくつかの実施形態において、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物を、追加的なエンドキシラナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、マンナーゼ、グルクロニダーゼ、キシランエステラーゼ、アミラーゼ、キシロシダーゼ、グルクロニルエステラーゼ、又はアラビノフラノシダーゼの1種以上を使用して補完することが有利となり得る。

40

【0075】

50

代替として、いくつかの実施形態において、Humbirdら(2011)により説明されるように、リグノセルロース系バイオマス処理施設においてオンサイトで酵素を生成することが有利となり得る。いくつかの実施形態において、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物は、特定のバイオマス原料に適切な特定の酵素活性で特別に補完して、又は補完せずに、オンサイトで生成され得る。

#### 【0076】

いくつかの実施形態において、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物が使用されるか否かに関わらず、また酵素がバイオマス処理工場でオンサイトで生成されるか否かに関わらず、本発明の利点は、以下を含む酵素混合物を使用して、10%以上のキシラン価という非常に低い過酷度までの自己加水分解前処理を受けるソフトリグノセルロース系バイオマス原料を使用して得ることができる：(1)セルロース鎖の還元及び非還元末端に対する特異性を有する少なくとも2種の酵素を任意選択で含む、エキソセルラーゼ(セロビオヒドロラーゼ)活性(EC3.2.1.91)、(2)エンドセルラーゼ活性(EC3.2.1.4)、(3)β-グルコシダーゼ活性(EC3.2.1.21)、(4)β-1,4-エンドキシラナーゼ活性(EC3.2.1.8)、(5)アセチルキシランエステラーゼ活性(EC3.1.1.72)、並びに任意選択で(6)β-1,3-キシロシダーゼ活性(EC3.2.1.72)、並びに任意選択で(7)β-1,4-キシロシダーゼ活性(EC3.2.1.37)、並びに任意選択で(8)α-1,3-及び/又はα-1,5-アラビノフラノシダーゼ活性(EC3.2.1.23)。いくつかの実施形態において、酵素混合物は、以下のような酵素活性の相対的比率を有することをさらに特徴とする：1FPUのセルラーゼ活性は、少なくとも30CMC Uのエンドグルカナーゼ活性と、及び少なくとも28pNPG Uのβ-グルコシダーゼ活性と、及び少なくとも50ABX Uのエンドキシラナーゼ活性とに関連する。CMC Uは、カルボキシメチルセルロース単位を指し、1CMC Uの活性は、50 及びpH4.8の特定のアッセイ条件下で、1分で1μmolの還元糖(グルコース当量として表現される)を遊離させること、pNPG Uは、pNPG単位を指し、1pNPG Uの活性は、50 及びpH4.8で、パラ-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドから1分当たり1μmolのニトロフェノールを遊離させること、並びに、ABX Uは、カバノキシラナーゼ単位を指し、1ABX Uの活性は、50 及びpH5.3で、1分で1μmolのキシロース還元糖当量を遊離させることが、当業者には容易に理解されるだろう。さらに、FPUは、異なるセルラーゼ酵素の任意の混合物を含む全セルラーゼ活性の尺度を提供する「濾紙分解活性(filter paper units)」を指すが、当業者に容易に理解されるだろう。本明細書において使用される場合、FPUは、参照により全体が本明細書に明示的に組み込まれるAdney, B.及びBaker, J., Laboratory Analytical Procedure #006、「Measurement of cellulase activity」、1996年8月12日、USA National Renewable Energy Laboratory (NREL)の方法により決定されるような濾紙分解活性を指す。

#### 【0077】

いくつかの実施形態において、酵素混合物は、マンノシダーゼ(EC3.2.1.25)、α-D-ガラクトシダーゼ(EC3.2.1.22)、α-L-アラビノフラノシダーゼ(EC3.2.1.55)、α-D-グルクロニダーゼ(EC3.2.1.139)、シンナモイルエステラーゼ(EC3.1.1.-)、又はフェルロイルエステラーゼ(EC3.1.1.73)の任意の1つ以上をさらに含んでもよい。

#### 【0078】

当業者は、慣例的な実験を通して、適用すべき所与の酵素調製物の適切な用量レベル、及び酵素加水分解の適切な期間を容易に決定するだろう。一般に、酵素のコストを最小限化するために、より低い酵素用量レベルを維持することが有利である。いくつかの実施形態において、高い酵素用量を使用することが有利となり得る。本発明の方法を実行する上で、当業者は、地域のバイオマスコスト、生成物ストリームの市場価格、全工場資本コスト、及び償却スキームを含む関連要因、並びにその他の要因を考慮して、酵素用量の経済的最適化を決定することができる。リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物が使用される実施形態において、製造者により提供される一般的用量範囲を使用して、最適化すべき大まかな範囲を決定することができる。いくつかの実施形態において、加水分解期間は、少なくとも48時間、又は少なくとも64時間、又は少なくとも72時間、又は少なくとも96時間、又は24時間から150時間の間の時間である。

## 【0079】

当該技術分野において周知であるように、セルラーゼ触媒は、加水分解が、低い乾燥物質含量で行われる場合、より効率的である。より高い固体濃度は、セルラーゼ触媒を効果的に阻害するが、この周知の効果の正確な原因は完全には理解されていない。例えば、Kristensenら(2009)を参照されたい。

## 【0080】

いくつかの実施形態において、酵素消費を増加させる結果となることもあるにもかかわらず、20%を超える非常に高いDMで加水分解を行うことが有利となり得る。一般に、水の消費及び廃水処理の必要性の両方を最小限化するために、実行可能な最も高い乾燥物質レベルで加水分解を行うことが有利である。さらに、発酵システムにおいて、実行可能な最も高い糖濃度を使用することが有利である。加水分解がより高い乾燥物質レベルで行われる場合、より高い糖濃度がもたらされる。当業者は、慣例的な実験を通して、所与のバイオマス原料及び酵素調製物に対して、所与のプロセス目標を達成するために適切な酵素加水分解を行うためのDMレベルを容易に決定するだろう。いくつかの実施形態において、固体画分の酵素加水分解は、15%DM以上、又は16%DM以上、又は17%DM以上、又は18%DM以上、又は19%DM以上、又は20%DM以上、又は21%DM以上、又は22%DM以上、又は23%DM以上、又は25%DM以上、又は30%DM以上、又は35%DM以上で行われてもよい。

## 【0081】

いくつかの実施形態において、固体画分は、40%DM以上で固体/液体分離から回収されるが、酵素加水分解がより低いDMレベルで行われ得るように、追加的な水分が添加される。水分は、添加剤、例えば任意の分子量のポリエチレングリコール(PEG)若しくは界面活性剤、塩、アンモニア、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、若しくは水酸化ナトリウム等のpH調整用化学物質、抗菌若しくは抗真菌剤、又は他の材料と共に、又はそれを含めずに、真水、凝縮水、又は他のプロセス溶液の形態で添加されてもよいことが容易に理解されるだろう。

## 【0082】

固体画分が所望の程度の変換率まで酵素加水分解された後、C5パイパス中に維持されている液体画分は、後加水分解のために加水分解物混合物と混合される。いくつかの実施形態において、回収された液体画分は全て1度に添加されてもよく、一方他の実施形態において、液体画分のいくつかの成分が除去されてもよく、及び/又は、液体画分は徐々に添加されてもよい。いくつかの実施形態において、固体画分は、液体画分との混合の前に、少なくとも50%、又は少なくとも55%、又は少なくとも60%のセルロース変換率まで加水分解され、すなわち、少なくとも特定の理論的収率のグルコースモノマーが得られる。液体画分中に存在するキシロオリゴマーの実質的部分が、典型的には、加水分解物混合物中で活性を維持するキシラナーゼ及び他の酵素の作用により、キシロースモノマーに加水分解され得る。いくつかの実施形態において、後加水分解は、少なくとも6時間、又は15時間から50時間の間の期間、又は少なくとも24時間行われる。いくつかの実施形態において、液体画分中に存在する少なくとも60質量%、又は少なくとも65質量%、又は少なくとも70質量%、又は少なくとも75質量%、又は少なくとも80質量%、又は少なくとも85質量%、又は少なくとも90質量%のキシロオリゴマーが、後加水分解中、加水分解物混合物中で活性を維持するキシラナーゼ及び他の酵素の作用により、キシロースモノマーに加水分解される。いくつかの実施形態において、液体画分は、化学添加剤のさらなる添加なしに直接加水分解物と混合される。いくつかの実施形態において、酢酸、フルフラール又はフェノール等の液体画分のいくつかの成分は、加水分解物との混合前に液体画分から除去されてもよい。

## 【0083】

いくつかの実施形態において、固体画分の酵素加水分解及び/又は液体画分の後加水分解は、同時糖化発酵(SSF)プロセスとして行われてもよい。当該技術分野において周知であるように、SSFが酵素加水分解に最適な温度と同じ温度で行われ得る場合、酵素加水分解の過程で導入された発酵生物が、グルコース及びキシロースモノマーを消費し、それに

より酵素触媒反応の生成物阻害を低減するため、酵素消費は最小限化され得る。いくつかの実施形態において、後加水分解は、発酵生物の添加なしに、少なくとも60%のセルロース変換率まで繊維画分が加水分解された後にのみ行われる。

#### 【0084】

麦わら、サトウキビバガス、スイートソルガムバガス、トウモロコシ茎葉、又は空果房の典型的系統等のバイオマス原料が、1段階自己加水分解により、10%以上のキシラン価まで、35%以上のDMで前処理され、少なくとも40%のDMを有する、又は溶解固体が少なくとも50%除去された、前処理されたバイオマスの固体画分が得られ、固体画分が、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物を使用して、15%から27%の間のDMで酵素加水分解に供され、酵素加水分解が少なくとも48時間行われ、少なくとも50%のグルコース変換率が達成された後に、液体画分が固体画分加水分解物に添加され、また、添加された液体画分が、少なくとも6時間の期間、後加水分解を受ける場合、典型的には、理論的最大キシロース収率の60%以上のC5モノマー収率に対応する、合わせられたC5/C6加水分解物中のC5モノマー濃度を達成することが可能である。

#### 【0085】

いくつかの実施形態において、合わせられたC5/C6加水分解物は、1種以上の改変酵母株を使用して、直接エタノールに発酵され得る。

#### 【0086】

図9は、一実施形態のプロセススキームを示す。示されるように、ソフトリグノセルロース系バイオマスが、DM35%以上まで浸漬、洗浄、又は湿潤される。バイオマスは、1段階自己加水分解において、加圧蒸気を使用して3.5から9.0の範囲内のpHで、10%以上のキシラン価を特徴とする過酷度まで前処理される。前処理されたバイオマスは、固体/液体分離に供され、液体画分及び40%以上のDM含量を有する固体画分を生成する。固体画分は、適切なDM含量に調整され、次いで15%以上のDM含量で60%以上のセルロース変換率まで酵素加水分解を受ける。分離された液体画分は、その後、加水分解された固体画分と混合されて後加水分解に供され、それにより、液体画分中に存在するキシロオリゴマーの実質的な量が、キシロースモノマーに加水分解される。説明されたような加水分解及び後加水分解の終了後、C5モノマー収率は、典型的には少なくとも60%であり、一方セルロース変換率は、同様に少なくとも60%である。

#### 【実施例】

#### 【0087】

##### 実施例1

前処理過酷度の尺度としての固体画分の「キシラン価」の特性決定

#### 【0088】

麦わら(WS)、トウモロコシ茎葉(CS)、スイートサトウキビバガス(SCB)及び空果房(EFB)を、0~10g酢酸/kg乾燥物質バイオマス(pH>4.0)で浸漬してから、35~50%乾燥物質で前処理した。約60kg DM/hのバイオマスを、170~200 の温度で、12~18分の滞留時間で前処理した。バイオマスは、スルースシステムを使用して反応器内に投入され、前処理された材料は、スルースシステムを使用して排出された。加圧前処理反応器内の圧力は、使用された温度での飽和蒸気の圧力に対応した。前処理されたバイオマスを、スクリュープレスを使用した固体/液体分離に供し、液体画分、及び約30%の乾燥物質を有する固体画分を生成した。固体画分を、約3kg水/kg乾燥バイオマスで洗浄し、再び約30%乾燥物質まで圧縮した。前処理反応器及びプロセスに関する詳細は、Petersenら(2009)においてさらに説明されている。

#### 【0089】

原材料を、Sluiterら(2005)及びSluiterら(2008)に記載の方法に従い、Phenomenex製Rezex Monosaccharide H+カラムを備えたDionex Ultimate 3000 HPLCシステムを使用して、炭水化物について分析した。3時間の連続前処理後、液体画分及び固体画分の試料を採取し、試料が安定な状態の前処理から得られることを確認とするため、試料を3時間にわたり3回採取した。固体画分を、Sluiterら(2008)に記載の方法に従い、Rezex Monosacchari

de H+ Monosaccharideカラムを備えたDionex製Ultimate 3000 HPLCシステムを用いて、炭水化物について分析した。液体画分を、Sluiterら(2006)に記載の方法に従い、Rezex Monossacharide H+ Monosaccharideカラムを備えたDionex製Ultimate 3000 HPLCシステムを用いて、炭水化物及び分解生成物について分析した。固体画分中の分解生成物を、1:4の比で5mM硫酸を含む水中に固体画分を懸濁させることにより分析し、その後、Sluiterら(2006)に記載の方法に従い、Rezex Monossacharide H+カラムを備えたDionex製Ultimate 3000 HPLCシステムを用いて分析した。乾燥物質含量及び懸濁固体の量を、Weissら(2009)に記載の方法に従い分析した。物質収支は、Petersenら(2009)に記載のように設定し、セルロース及びヘミセルロース回収率を決定した。バイオマス乾燥物質のkg当たりの、前処理中に5-HMF又はフルフラールに分解した糖の量、及びヘミセルロースから放出されたアセテートの量も同様に定量したが、フラッシングによるフルフラールの損失は考慮されていない。

10

#### 【0090】

前処理プロセスの過酷度は、一般に、Overendら(1987)により初めて考案された過酷度係数(severity factor)により説明される。過酷度係数は、典型的には、 $\log(R_0)=t \cdot \exp((T-T_{ref})/14.75)$ (式中、 $R_0$ は、過酷度係数であり、 $t$ は、分単位での滞留時間であり、 $T$ は、温度であり、 $T_{ref}$ は、参照温度、典型的には100 である)のような対数値として表現される。過酷度係数は、Belkecemiら(1991)、Jacobsen及びWyman(2000)又はLloydら(2003)により説明されるように、ヘミセルロース可溶化の反応速度論に基づく。したがって、前処理の過酷度は、前処理後に固体画分中に残っている残留ヘミセルロース含量に関連する。

20

#### 【0091】

説明されたように調製及び洗浄された固体画分を、Sluiterら(2008)により説明される方法に従い、Phenomenex製Rezex Monossacharide H+カラムを備えたDionex Ultimate 3000 HPLCシステムを用いて、C5含量について分析した。上述のように生成及び洗浄された固体画分中のキシラン含量は、熱水自己加水分解により前処理した場合の、例えば麦わら、トウモロコシ茎葉又はEFB等のソフトリグノセルロース系バイオマスについての過酷度係数に直線的に依存する。上述のように調製及び洗浄された固体画分中のキシラン含量としての過酷度の定義は、前処理設定の間で振り替え可能である。キシラン価は、洗浄された固体画分中の測定されたキシラン含量であり、これは可溶性物質からのある程度の寄与を含む。前処理過酷度 $\log(R_0)$ に対するキシラン価の依存性は、図1において、麦わら、トウモロコシ茎葉、サトウキビバガス及びヤシ油処理からの空果房に関して示されている。

30

#### 【0092】

示されるように、1段階自己加水分解により前処理された試験バイオマス原料のそれぞれにおいて、キシラン価と前処理過酷度との間に明確な逆直線関係が存在する。

#### 【0093】

##### 実施例2

前処理過酷度の関数としてのC5回収率

#### 【0094】

実施例1に記載のように、バイオマス原料を前処理し、試料を特性決定した。図2は、麦わらが自己加水分解により前処理された実験における、キシラン価の関数としてのC5回収率(キシロース+アラビノース)を示す。C5回収率は、非水溶性固体(WIS)、水溶性固体(WSS)及び全回収率として示されている。示されるように、非水溶性及び水溶性固体の両方としてのC5回収率は、キシラン価が増加すると共に増加する。キシラン価が10%を超えて増加すると、水溶性固体としてのC5回収率は減少するが、非水溶性固体としてのC5回収率は増加し続ける。

40

#### 【0095】

試験された麦わらの典型的な系統は、前処理前に、乾燥物質を基準として約27%のヘミセルロースを含有していた。図3は、自己加水分解により前処理された麦わら、トウモロコシ茎葉、サトウキビバガス及びEFBの、キシラン価の関数としての前処理後の全C5回収

50

率を示す。試験されたトウモロコシ茎葉、スイートサトウキビバガス及びEFBの典型的な系統は、前処理前に乾燥物質を基準としてそれぞれ約25%、19%及び23%のC5含量を含有していた。示されるように、全ての原料において、前処理後の全C5回収率は、キシラン価により定義されるような前処理過酷度に依存する。示されるように、前処理後に回収されたC5含量の90%を完全にC5モノマーに加水分解できる場合、酵素加水分解後に60%の最終C5モノマー収率が予想され得、前処理過酷度は10%以上のキシラン価をもたらすことを特徴とする。

【0096】

#### 実施例3

前処理過酷度の関数としての酵素及び酵母増殖を阻害する分解生成物の生成

10

【0097】

実施例1に記載のように、バイオマス原料を前処理し、試料を特性決定した。図4は、麦わらが1段階自己加水分解により前処理された実験における、キシラン価の関数としての、酢酸放出並びにフルフラール及び5-ヒドロキシ-メチル-フルフラール(5-HMF)の生成の依存性を示す。示されるように、発酵酵母を阻害することが周知であり、いくつかの場合においてはセルラーゼ酵素も阻害するこれらの分解生成物の生成は、10%未満のキシラン価において指数関数的増加を示す。10%以上のキシラン価において、フルフラール及び酢酸のレベルは、前処理されたバイオマスの発酵を、解毒ステップを必要とすることなく可能にする範囲内に収まる。酢酸については、レベルは、10%以上のキシラン価まで前処理されたバイオマスの酵素加水分解の間さらに増加するが、通常、C5及びC6糖の両方を消費するように改変された酵母が十分耐えられるレベルまでである。

20

【0098】

#### 実施例4

固体画分のDM%の関数としての、固体画分中に残留する材料によるセルラーゼ酵素の阻害

【0099】

原理的にWO2006/056838において説明及び使用されている6チャンバ反応器として機能する、6チャンバ自由落下反応器内で実験を行った。6チャンバ加水分解反応器は、20%DMを超える固体濃度での液化及び加水分解による実験を行うために設計した。反応器は、それぞれ幅24cm及び高さ50cmの6つの別個のチャンバに分割された、水平に設置されたドラムからなる。各チャンバ内の3つのパドルを備えた水平回転軸が、混合/攪拌に使用される。1.1kWモータが駆動部として使用され、回転速度は、2.5rpmから16.5rpmの範囲内で調整可能である。回転方向は、時計方向と反時計方向との間で1分おきに变化するようにプログラムされる。外側の水充填加熱ジャケットが、80℃までの温度の制御を可能にする。

30

【0100】

この実験には、1段階自己加水分解により前処理された麦わらを使用した。バイオマスを35%超のDMまで湿潤させ、10.5%のキシラン価まで、蒸気により4.0超のpHで前処理した。前処理は、Skaerbaek、DenmarkのInbiconパイロットプラントにおいて行われた。バイオマスは、スルースシステムを使用して前処理反応器内に投入され、前処理されたバイオマスは、スルースシステムを使用して反応器から除去された。いくつかの場合において、前処理されたバイオマスを、スクリュープレスを使用した固体/液体分離に供し、液体画分及び固体画分を生成した。固体画分は、約30%のDM含量を有し、最初のセルロース及びリグニンの大部分、ヘミセルロースの一部、並びに全部で約25%の溶解固体を含有していた。

40

【0101】

6チャンバ反応器のチャンバに、全ての溶解及び非溶解固体を含む全ての前処理されたバイオマス、又は、全溶解固体の約25%を含む圧縮固体画分を充填した。乾燥物質含量は、19%DMに調整した。次いで、前処理されたバイオマスを、0.08mlのNovozymes製CTec2(商標)/gグルカン、又は0.2~0.3mlのDupont、Genencor製Accellerase TR10(商標)/gグルカンを使用して、50℃及びpH5.0から5.3で加水分解させた。リグノセルロース系バイオマス変換に最適化されたこれらの市販のセルラーゼ調製物のこれらの用量レベルは、十分製造

50

者により提案される範囲内であった。酵素加水分解実験は、6rpmの混合速度で96時間行った。

#### 【0102】

図5は、酵素加水分解前に除去された%溶解固体の関数としての、これらの条件下での酵素加水分解後のセルロース変換率を示す。示されるように、これらの酵素用量レベルにおける75%の溶解固体の除去は、絶対的にセルロース変換率を10~20%改善する。したがって、酵素加水分解前に少なくとも40%のDM含量まで固体画分を圧縮すること、又は別様に溶解固体含量を少なくとも50%低減することが、改善された酵素性能が提供されるため、有利である。

#### 【0103】

##### 実施例5

10%超のキシラン価まで前処理されたバイオマスから得られた液体画分の糖含量及び加水分解

#### 【0104】

麦わら、トウモロコシ茎葉、及びサトウキビバガスを、キシラン価11.5%(WS)、12.3%(SCB)及び15.5%(CS)まで前処理し、固体/液体分離に供して、実施例5に記載のように液体画分及び固体画分を生成した。液体画分を、Sluiter、Hamesら、2005に記載の方法に従い、Rezex Monosaccharideカラムを備えたDionex Ultimate 3000 HPLCシステムを使用して、炭水化物及び分解生成物について分析した。表2は、オリゴマー及びグルコースモノマー/グルカン、キシロース/キシラン及びアラビノース/アラビナンのカテゴリーに細分化された、DM含量のパーセントとして表現される液体画分の糖含量を示す。示されるように、ある程度のグルコース含量がモノマー及びオリゴマー形態の両方で存在するが、糖含量の大部分はオリゴマーキシランである。自己加水分解を利用して得られる液体画分中のキシランオリゴマーの優位性は、希酸前処理を使用して得られる液体画分と極めて対照的である。希酸熱水前処理により前処理されたバイオマスにおいては、液体画分は、典型的に、酸触媒の作用によりモノマー構成成分に加水分解される。

#### 【0105】

##### 【表2】

表2.10%超のキシラン価まで前処理されたバイオマス中の液体画分の糖含量

|     | オリゴマー<br>グルカン | モノマーグ<br>ルコース | オリゴマー<br>キシラン | モノマーキ<br>シロース | オリゴマー<br>アラビナン | モノマーア<br>ラビノース | その他<br>のDM |
|-----|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|------------|
| WS  | 5.5%          | 2.1%          | 40.4%         | 8.6%          | 1.1%           | 4.8%           | 37%        |
| SCB | 8.2%          | 3.1%          | 39.1%         | 8.7%          | 0.7%           | 3.1%           | 37%        |
| SC  | 6.2%          | 1.9%          | 37.0%         | 5.3%          | 2.8%           | 3.9%           | 43%        |

#### 【0106】

前処理された麦わらからの液体画分を、モジュール型Dionex ICS-5000クロマトグラフィシステムを使用し、Thermo Scientific Dionex CarboPacTM PA200カラムを用いてさらにHPLCにより特性決定した。NaOH/NaOAc勾配条件を使用して検体を分離し、金電極を用いて統合パルスアンペロメトリック検出(IPAD)により測定した。図6は、液体画分の溶出プロファイルを示す下のトレースに対して、キシロピオース( $X_2$ )、キシロトリオース( $X_3$ )、キシロテトラオース( $X_4$ )、キシロペンタオース( $X_5$ )、及びキシロヘキサオース( $X_6$ )標準の溶出プロファイルを上トレースとして重ね合わせたHPLCクロマトグラムを示す。示されるように、自己加水分解されたバイオマスの液体画分は、少量のキシロースモノマー、並びに比較的多量のキシロピオース( $X_2$ )、キシロトリオース( $X_3$ )、キシロテトラオース( $X_4$ )、キシロペンタオース( $X_5$ )、及びキシロヘキサオース( $X_6$ )をその他の材料と共に含む混合物を含有する。

#### 【0107】

##### 実施例6

10%超のキシラン価まで前処理され、40%超のDMまで圧縮されたバイオマスから得られた固

体画分の酵素加水分解及び繊維加水分解後の液体画分の添加、その後の後加水分解

【0108】

実施例4に記載のように、6チャンバ自由落下反応器内で実験を行った。

【0109】

実験には、1段階自己加水分解により、11.5%から15.6%の範囲のキシラン価まで前処理された麦わら、トウモロコシ茎葉、又はサトウキビバガスを使用した。バイオマスを切断して35%超のDMまで湿潤させ、170～190 の蒸気で12分間前処理した。前処理は、Skaerbaek、DenmarkのInbiconパイロットプラントにおいて行われた。前処理されたバイオマスを、スクリュープレスを使用した固体/液体分離に供し、40%超のDMを有する固体画分を生成した。

10

【0110】

6チャンバ反応器のチャンバに、約10kgの圧縮後の前処理されたバイオマスを充填し、水の添加により19～22%DMに調整した。前処理されたバイオマスを、GENENCOR-DuPONT製ACCELLERASE TRIO(商標)を使用して、50 及びpH5.0～5.3で加水分解した。混合速度は6rpmであった。加水分解実験を96時間行い、その後、前処理後の固体画分から圧縮除去された液体画分を添加し、50 及びpH5.0～5.3で48時間、後加水分解を行った。

【0111】

HPLC試料を毎日採取し、Rezex Monosaccharideカラムを備えたDionex Ultimate 3000 HPLCシステムを使用して、外部標準を使用した定量化により、セルロース及びヘミセルロースの変換を追跡し、グルコース、キシロース及びアラビノースについて分析した。

20

【0112】

図7は、キシラン価12.3%まで前処理され、グルカンのg当たり0.3mlのAccellerase Trio(商標)(Genencor)を使用して加水分解されたサトウキビバガスを使用し、固体画分の96時間の加水分解後に液体画分を追加した、ヘミセルロースの変換率の加水分解データを示す。示されているのは、典型的な加水分解プロファイルである。C5モノマー回収率は、加水分解反応において存在する材料からの理論的収率のパーセントとして表現される。固体画分中のヘミセルロースのほとんどは、固体画分の加水分解における最初の24時間以内にモノマー糖に変換されている。96時間後の液体画分の追加は、理論的潜在収率を増加させ、これは、液体画分が添加された直後に観察されるC5変換率の降下を説明している。最初の24時間以内に、液体画分からのC5のほとんどは、モノマーに変換される。液体画分が添加される直前のC5変換率と、加水分解の終了点でのC5変換率を比較すると、これらの条件下でサトウキビバガスを使用した場合、液体画分中のC5変換率を90%と計算することができる。

30

【0113】

表3は、異なる状況下で前処理され、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物、Accellerase Trio(商標)(Genencor)の異なる用量レベルを使用して加水分解された、異なるバイオマスに対する加水分解データを示す。使用された全ての酵素用量レベルは、製造者により提案される範囲内であった。示されるように、1段階自己加水分解及びC5バイパスを用いた酵素加水分解及び後加水分解を利用し、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物の製造者の推奨する用量を用いて、60%以上のC5モノマー収率を達成しながらも、60%以上のセルロース変換率を達成することができる。

40

【0114】

【表 3】

表3.非常に低い過酷度の1段階自己加水分解をC5バイパス及び後加水分解と共に利用した加水分解収率

|                                 | WS    | SCB   | SCB   | CS    | CS    | EFB   |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 浸漬後の乾燥物質[wt%]                   | 40%   | 39%   | 39%   | 40%   | 40%   | 39%   |
| 滞留時間[分]                         | 12.0  | 12.0  | 12.0  | 12.0  | 12.0  | 12.0  |
| 温度[°C]                          | 183.0 | 182.7 | 182.7 | 174.5 | 174.5 | 185.2 |
| 前処理過酷度[logRo]                   | 3.52  | 3.51  | 3.51  | 3.27  | 3.27  | 3.58  |
| 前処理からのC5回収率[%]                  | 74%   | 87%   | 87%   | 88%   | 88%   | 84%   |
| キシラン価                           | 11.5% | 12.3% | 12.3% | 15.6% | 15.6% | 15.5% |
| 酵素用量[mL Ac. TRIO/gグルカン]         | 0.2   | 0.3   | 0.3   | 0.3   | 0.2   | 0.4   |
| 繊維加水分解における%TS                   | 22%   | 22%   | 22%   | 19%   | 22%   | 22%   |
| 加水分解(96時間)後のセルロース変換率            | 78%   | 64%   | 66%   | 68%   | 58%   | 69%   |
| 加水分解(96時間)後のヘミセルロース変換率(C5回収率)   | 80%   | 73%   | 73%   | 61%   | 61%   | 75%   |
| 第2の加水分解における%TS                  | 18%   | 17%   | 17%   | 16%   | 18%   | 18    |
| 後加水分解(144時間)後のセルロース変換率          | 78%   | 65%   | 67%   | 67%   | 61%   | 72%   |
| 後加水分解(144時間)後のヘミセルロース変換率(C5回収率) | 90%   | 79%   | 78%   | 71%   | 68%   | 83%   |
| 全セルロース変換率                       | 78%   | 65%   | 67%   | 67%   | 61%   | 72%   |
| 全C5モノマー収率                       | 67%   | 69%   | 68%   | 63%   | 60%   | 70%   |

10

20

## 【0115】

## 実施例7

改変酵母による、合わせられた加水分解物中のC5及びC6糖のエタノールへの共発酵

## 【0116】

10%超のキシラン価までの1段階自己加水分解前処理により調製されたソフトリグノセルロース系バイオマス(この場合麦わら)から生成された加水分解物の使用に関する一例として、図8は、C5及びC6糖の両方を変換することができるGMO酵母(TERRANOL(商標)製V1株)による発酵の前に、解毒又は任意の他のプロセスステップを行わずに実行された発酵についてのデータを示す。加水分解物は、発酵前にKOHペレットでpH5.5に調整され、3g/Lの尿素が加えられた。発酵は、バッチ発酵として行われた。反応器内の最初の細胞濃度は、0.75 g dw/Lであった。発酵は、10%NH<sub>3</sub>の自動添加を利用して、pH5.5に制御された。温度は30℃に維持され、攪拌速度は300rpmであった。示されるように、酢酸、フルフラール、及び典型的により高レベルの前処理過酷度で阻害性であることが明らかな他の化合物の存在下にもかかわらず、グルコース及びキシロースが容易に消費され、エタノールが容易に生成された。

30

## 【0117】

## 実施例8

市販のセルラーゼ調製物中の活性レベルの実験的測定

## 【0118】

GENENCOR(商標)製ACCELLERASE TRIO(商標)、並びにNOVOZYMES(商標)製CELLIC CTEC2(商標)及びCELLIC CTEC3(商標)の市販の調製物を、試験された試料調製物中でタンパク質濃度がほぼ同等であるように希釈した。同体積の希釈酵素調製物を添加し、2回又は3回分析測定を行った。

## 【0119】

CBHI(エキソセルラーゼ)活性の分析は、50mM NaOAC緩衝液中で、pH5、25℃で25分間行った。モデル基質である4-メチルウンベリフェリル-β-D-セロピオシドからの4-メチルウン

50

ベリフェロン放出(吸収:347nm)の持続的速度を追うことで活性を3回測定した。活性単位は、1 $\mu$ モルMeUmb当量/分であった。タンパク質濃度は、CTEC3、ACTrio、及びCTEC2分析においてそれぞれ0.16、0.14、0.17mg/mlであった。基質濃度は、0.5mg/mlであった。

【0120】

エンド-1,4- $\beta$ -グルカナーゼ活性の分析は、50mM NaOAC緩衝液中で、pH5、50℃で60分間行った。モデル基質であるAvicel PH-101からの還元末端の生成に関連する吸収の変化を追うことで活性を3回測定した。活性単位は、1 $\mu$ モルグルコース当量/分であった。タンパク質濃度は、CTEC3、ACTrio、及びCTEC2分析においてそれぞれ0.80、0.67、0.79mg/mlであった。基質濃度は、80mg/mlであった。

【0121】

$\beta$ -グルコシダーゼ活性の分析は、50mM NaOAC緩衝液中で、pH5、50℃で20分間行った。モデル基質であるセロピオースからのグルコースの放出に関連する吸収の変化を追うことで活性を3回測定した。活性単位は、2 $\mu$ モルグルコース/分であった。タンパク質濃度は、CTEC3、ACTrio、及びCTEC2分析においてそれぞれ0.1、0.12、0.12mg/mlであった。基質濃度は、1.7mg/mlであった。

【0122】

エンド-1,4- $\beta$ -キシラナーゼ活性の分析は、50mM NaOAC緩衝液中で、pH5、50℃で60分間行った。モデル基質である水抽出可能なアラビノキシランからの還元末端の生成に関連する吸収の変化を追うことで活性を3回測定した。活性単位は、1 $\mu$ モルグルコース当量/分であった。タンパク質濃度は、CTEC3、ACTrio、及びCTEC2分析においてそれぞれ1.12、0.97、1.12mg/mlであった。基質濃度は、10mg/mlであった。

【0123】

$\beta$ -キシロシダーゼ活性の分析は、50mM NaOAC緩衝液中で、pH5、50℃で60分間行った。モデル基質である水抽出可能なアラビノキシランの加水分解に関連するキシロースの放出を追うことで活性を2回測定した。活性単位は、1 $\mu$ モルキシロース/分であった。タンパク質濃度は、CTEC3、ACTrio、及びCTEC2分析においてそれぞれ1.12、0.97、1.12mg/mlであった。基質濃度は、10mg/mlであった。

【0124】

$\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ活性の分析は、50mM NaOAC緩衝液中で、pH5、50℃で60分間行った。モデル基質である水抽出可能なアラビノキシランの加水分解に関連するアラビノアーゼの放出を追うことで活性を3回測定した。活性単位は、1 $\mu$ モルアラビノース/分であった。タンパク質濃度は、CTEC3、ACTrio、及びCTEC2分析においてそれぞれ1.12、0.97、1.12mg/mlであった。基質濃度は、10mg/mlであった。

【0125】

アミログルコシダーゼ(AMG)活性の分析は、50mM NaOAC緩衝液中で、pH5、50℃で80分間行った。モデル基質である可溶性コーンスターチからのグルコース放出に関連する吸収の変化を追うことで活性を3回測定した。活性単位は、1 $\mu$ モルグルコース/分であった。タンパク質濃度は、CTEC3、ACTrio、及びCTEC2分析においてそれぞれ1.12、0.97、1.12mg/mlであった。基質濃度は、10mg/mlであった。

【0126】

$\alpha$ -アミラーゼ活性の分析は、50mM NaOAC緩衝液中で、pH5、50℃で60分間行った。モデル基質である可溶性コーンスターチからの還元末端の生成に関連する吸収の変化を追うことで活性を3回測定した。活性単位は、1 $\mu$ モルグルコース当量/分であった。タンパク質濃度は、CTEC3、ACTrio、及びCTEC2分析においてそれぞれ1.12、0.97、1.12mg/mlであった。基質濃度は、10mg/mlであった。

【0127】

アセチルキシランエステラーゼ活性の分析は、100mMスクシネート緩衝液中で、pH5、25℃で25分間行った。モデル基質である4-4-ニトロフェニルアセテートからの4-ニトロフェニル放出(吸収:410nm)の持続的速度を追うことで活性を3回測定した。活性単位は、1 $\mu$ モルpNP当量/分であった。タンパク質濃度は、CTEC3、ACTrio、及びCTEC2分析においてそれ

10

20

30

40

50

ぞれ0.48、0.42、0.51mg/mlであった。基質濃度は、10mg/mlであった。

【 0 1 2 8 】

活性測定の結果を、表1に示す。

【 0 1 2 9 】

実施形態及び実施例は、単なる説明であり、特許請求の範囲を限定することを意図しない。本明細書において引用される参考文献はそれぞれ、参照により全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

【 0 1 3 0 】

参考文献

- Agbor, V., et al. "Biomass pretreatment: Fundamentals toward application", *Biotechnology Advances* (2011) 29:675 10
- Alvira, P., et al. "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review", *Bioresource Technology* (2010) 101:4851
- Baboukani, B., et al. "Optimisation of dilute-acid pretreatment conditions for enhancement sugar recovery and enzymatic hydrolysis of wheat straw", *Biosystems Engineering* (2012) 166
- Banerjee, G., Car, S., Scott-Craig, J., Borrusch, M., and Walton, D., "Rapid optimisation of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations," *Biotechnology for Biofuels* (2010), 3:22. 20
- Belkacemi, K., Abatzoglou, N., Overend, R.P., Chornet, E., "Phenomenological Kinetics of Complex Systems: Mechanistic Considerations in the Solubilization of Hemicelluloses following Aqueous/Steam Treatments." *Ind. Eng. Chem. res.*, (1991) 30, 2416-2425.
- Bettiga, M., et al. "Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway", *Microbial Cell Factories* (2009) 8:40
- Billard, H., Faraj, A., Ferreira, N., Menir, S., and Heiss-Blanquet, S., "Optimisation of a synthetic mixture composed of major *Trichoderma reesei* enzymes for the hydrolysis of steam-exploded wheat straw," *Biotechnology for Biofuels* (2012), 5:9. 30
- Chen, Y., et al. "Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol", *Bioresource Technology* (2010) 101:6994
- Chung, Y., et al. "Enzymatic Saccharification and Fermentation of Xylose-Optimized Dilute Acid-Treated Lignocellulosics", *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2005) 121-124:947
- Diaz, M., et al. "Hydrothermal pretreatment of rapeseed straw", *Bioresource Technology* (2010) 101:2428
- Divne, C., et al., "The 3-dimensional crystal-structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*," *Science* (1994), 265:524. 40
- Dogaris, I., et al. "Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production", *Bioresource Technology* (2009) 100:6543
- Dumon, C., et al. "Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining", *Process Biochemistry* (2012) 47:346
- Farrell, E et al., "Ethanol can contribute to energy and environmental goals," *Science* (2006), 311:506.
- Ghosh, A., et al. "Genome-Scale Consequences of Cofactor Balancing in Engineered Pentose Utilization Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*", *PLoS ONE* (2011) 50

6:11

Girio, F., et al., "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review," *Bioresource Technology* (2010), 101:4775

Hu, C., et al. "Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*", *Biotechnology and Biofuels* (2011) 4:25

Humbird, D., et al. "Process Design and Economic for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover" Technical Report NREL/TP-5100-47764 May 2011

Humbird, D., et al., "Economic Impact of Total Solids Loading on Enzymatic Hydrolysis of Dilute Acid Pretreated Corn Stover," *Biotechnology Progress* (2010) 26:1245 10

Jacobsen, S., et al. "Xylose Monomer and Oligomer Yields for Uncatalyzed Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Hemicellulose at Varying Solids Concentration", In *d. Eng. Chem. Res.* (2002) 41:1454

Jacobsen, S.E., Wyman, C.E., Cellulose and Hemicellulose Hydrolysis Models for Application to Current and Novel Pretreatment Processes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2000), 84-86, 81-96.

Jeong, T., et al. "Optimizing Dilute-Acid Pretreatment of Rapeseed Straw for Extraction of Hemicellulose", *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 161:22

Jin, M., et al. "Two-step SSCF to convert AFEX-treated switchgrass to ethanol using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST)", *Bioresource Technology* (2010) 101:8171 20

Jojima, T., et al. "Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook", *Applied Microbiology and Biotechnology* (2010) 85:471

Kim, J., et al. "Two-stage pretreatment of rice straw using aqueous ammonia and dilute acid", *Bioresource Technology* (2011) 102:8992

Kim, K. et al. "Continuous Countercurrent Extraction of Hemicellulose from Pretreated Wood Residues", *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2001) 91-93:253 30

Klinke, H., et al., "Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pretreatment of biomass," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2004) 66:10.

Knudsen, N., et al., "Possibilities and evaluation of straw pretreatment," 10th European biomass conference in Wurzburg in 1998, *Biomass for Energy and Industry*, p. 224-228.

Kothari, U., and Lee, Y., "Inhibition effects of dilute acid pre-hydrolysate of corn stover on enzymatic hydrolysis of solka floc," *Applied. Biochem. Biotechnol.* (2011) 165:1391

Kristensen, J., Felby, C., and Jorgensen, H., "Determining yields in high solids enzymatic hydrolysis of biomass," *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2009), 156:557 40

Kuhad, R., et al. "Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects", *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2011) 15:4950

Kurian, J., et al. "BIOCONVERSION OF HEMICELLULOSE HYDROLYSATE OF SWEET SORGHUM BAGASSE TO ETHANOL BY USING *PICHTIA STIPITIS* NCIM 3497 AND *DEBARYOMYCES HANSENII* SP.", *Bioresources* (2010) 5:2404

Larsen, J., et al. "The IBUS Process - Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality", *Chem. Eng. Technol.* (2008) 5:765

Lee, J., et al. "Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for inc 50

reased enzyme hydrolysis", *Bioresource Technology* (2009) 100:6434

Lee, J., et al. "Recent developments of key technologies on cellulosic ethanol production", *Journal of Scientific & Industrial Research* (2008) 67:865

Lee, J. et al. "Review article Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol", *Journal of Biotechnology* (1997) 56:1

Leith, H and Whittaker, R, *Primary productivity of the biosphere*. Springer, Berlin. 1975. P. 205-206.

Lloyd, T., and Wyman, C. "Application of a Depolymerization Model for Predicting Thermochemical Hydrolysis of Hemicellulose." *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2003), 105-108, 53-67.

Lu, X., et al. "Optimization of H2SO4-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content", *Bioresource Technology* (2009) 100:3048

Madhavan, A., et al. "Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*", *Critical Reviews in Biotechnology* (2012) 32:22

Martinez, D., et al., "Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei*," *Nature Biotechnology* (2008), 26:553.

Matsushika, A., et al. "Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives", *Applied Microbiology and Biotechnology* (2009) 84:37

Mesa, L. et al. "Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse", *Chemical Engineering Journal* (2011) 175:185

Monavari, S., et al. "The influence of solid/liquid separation techniques on the sugar yield in two-step dilute acid hydrolysis of softwood followed by enzymatic hydrolysis", *Biotechnology for Biofuels* (2009) 2:6

Nguema-Ona, E., Moore, J., Fagerstrom, A., Fangel, J., Willats, W., Hugo, A., and Vivier, M., "Profiling the main cell wall polysaccharides of tobacco leaves using high-throughput and fractionation techniques", *Carbohydrate Polymers* (2012), 88:939

Ohgren, K., et al. "Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover", *Bioresource Technology* (2007) 98:2503

Overend, R.P., Chornet, E., "Fractionation of lignocellulosics by steam aqueous pretreatments" *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A* (1987), 321, 523-536.

Palmquist E, H Grage, NQ Meinander and B Hahn-Hagerdal "Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and phydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts." *Biotechnol. Bioeng.* (1999) 63: 46-55

Paptheofanous, M., et al. "TWO-STAGE ACID-CATALYZED FRACTIONATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS IN AQUEOUS ETHANOL SYSTEMS AT LOW TEMPERATURES", *Bioresource Technology* (1995) 54:305

Petersen, M., et al. "Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals", *Biomass and Bioenergy* (2009) 33:834

Quing, Q., Yang, B., Wyman, C., "Xylo-oligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes," *Bioresource Technology* (2010) 101:9624

Quing, Q., and Wyman, E., "Hydrolysis of different chain length xylo-oligomers by cellulase and hemicellulase enzymes," *Bioresource Technology* (2011) 102:13

Rosgaard, L., et al., "Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates," *Biotechnol. Prog.* (2007), 23:1270

Rouvinen, J., et al., "3-dimensional structure of cellobiohydrolase -II from *Trichoderma reesei*," *Science* (1990), 249:380

Saha, B., et al. "Hemicellulose bioconversion", *Microbiol Biotechnol* (2003) 30:279

Sanchez, R., et al. "Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering", *Biotechnology for Biofuels* (2010) 3:13

Shen, F., et al. "Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates", *Bioresource Technology* (2011) 102:8945

Singhania, R., et al., "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases," *Enzyme and Microbial Technology* (2010), 46:541

Sluiter, A., et al., "Determination of Extractives in Biomass," US National Renewable Energy Laboratory (NREL), Laboratory Analytical Procedure (LAP) with issue date July 17, 2005, NREL/TP-510-42619, revised January 2008

Sluiter, A., et al., "Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples," US National Renewable Energy Laboratory (NREL), Laboratory Analytical Procedure (LAP) with issue date December 8, 2006, NREL/TP-510-42623, revised January 2008

Sluiter, A., et al., "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass," US National Renewable Energy Laboratory (NREL), Laboratory Analytical Procedure (LAP) with issue date April 25, 2008, NREL/TP-510-42618, revised April 2008

Soderstrom, J., et al. "Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production", *Biomass and Bioenergy* (2003) 24:475

Soderstrom, J., et al. "Effect of Washing on Yield in One- and Two-Step Steam Pretreatment of Softwood for Production of Ethanol", *Biotechnol. Prog.* (2004) 20:744

Soderstrom, J., et al. "Separate versus Simultaneous Saccharification and Fermentation of Two-Step Steam Pretreated Softwood for Ethanol Production", *Journal of Wood Chemistry and Technology* (2005) 25:187

Taherzadeh, M., et al. "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review" *International Journal Molecular Science* (2008) 9:1621

Thomsen, M., et al. "Preliminary Results on Optimization of Pilot Scale Pretreatment of Wheat Straw Used in Coproduction of Bioethanol and Electricity", *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2006) 129-132:448

Vinzant, T., et al., "Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation," *Applied Biochem. and Biotechnol.* (2001), 91-93:99

Weiss, N.D., et al., "A simplified Method for the Measurement of Insoluble Solids in Pretreated Biomass Slurries." *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2009), 975-987:162(4)

Won, K., et al. "Fractionation of barley straw with dilute sulfuric acid for improving hemicellulose recovery", *Korean Journal Chemical Engineering* (2012) 29:614

Ximenes, E., et al., "Inhibition of cellulases by phenols," *Enzyme and Micro*

bial. Technol. (2010) 46:170

Zaldivar J, A Martinez and LO Ingram "Effects of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic Escherichia 25 co//." Biotechnol. Bioeng. (1999) 65. 24-33

Zhang, P., et al., "Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies," Biotechnology Advances (2006), 24:452

【 図 1 】

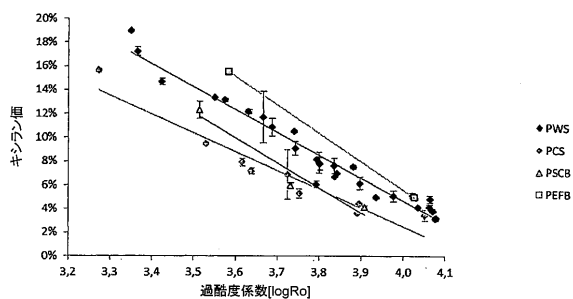


図1 前処理された麦わら(PWS)、トウモロコシ茎葉(PCS)、サトウキビバガス(SCB)及び油やしからの空果房(PEFB)の、過酷度係数の関数としてのキシラン値

【 図 2 】

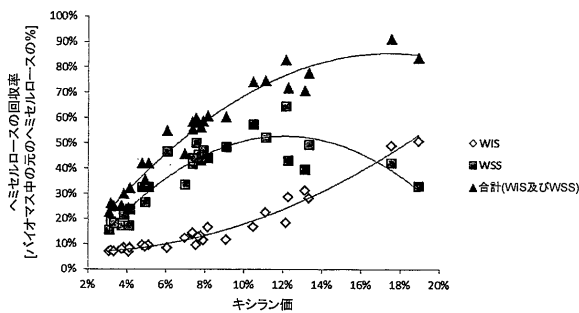


図2 キシラン値の関数としての、非水溶性固体(WIS)及び水溶性固体(WSS)として表現される、前処理後の麦わらからの元のヘミセルロース糖の回収率

【 図 3 】

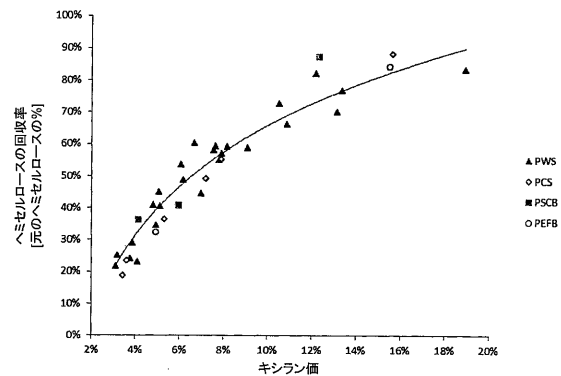


図3 麦わら(PWS)、トウモロコシ茎葉(PCS)、サトウキビバガス(PSCB)及び空果房(PEFB)の、キシラン値の関数としての、前処理後の元のヘミセルロース糖の回収率

【 図 4 】

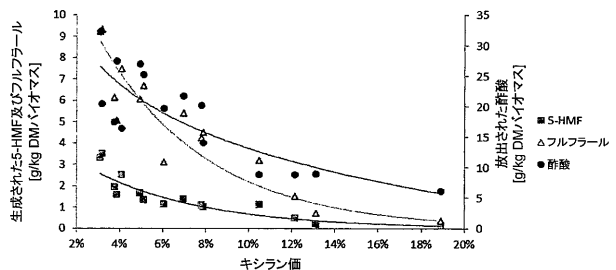


図4 キシラン値の関数としての、自己加水分解前処理中の酢酸の放出及び生成、並びにフラン類の5-HMF及びフルフラールの生成

【図 5】

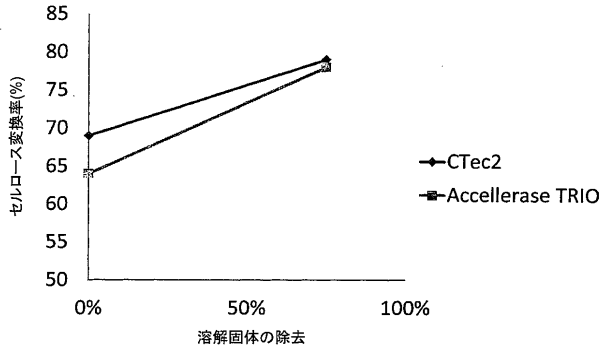


図5 溶解固体の除去の関数としてのセルロース変換率

【図 6】

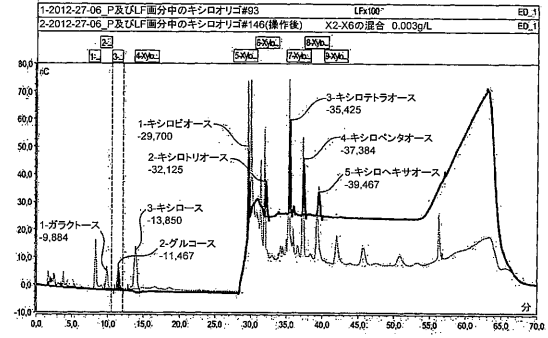


図6 キシラン価11.5%まで自己加水分解により前処理された麦わらからの液体画分のHPLC特性決定

【図 7】

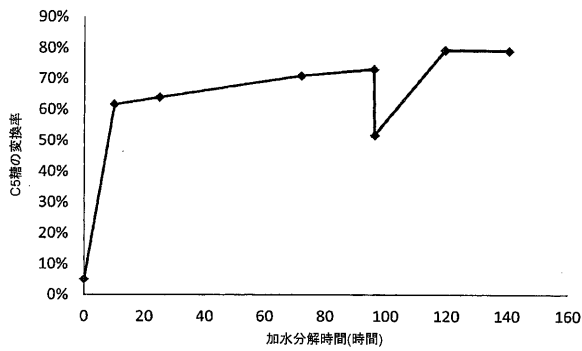


図7 %理論的収率として表現される、固体画分の加水分解中、及び96時間での液体画分の添加後の、C5糖のモノマーへの変換率を示す加水分解プロファイル

【図 8】

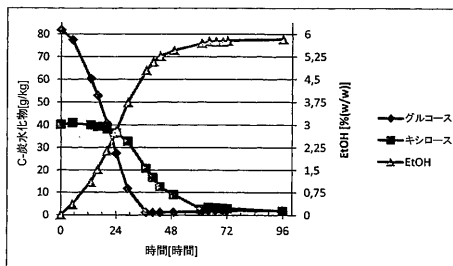


図8 蒸気前処理された麦わら(キシラン価&gt;10%)を事前にNovozymes製Celic Ctec2(商標)により加水分解し、解毒して発酵阻害物質を除去せずに、合わせられた液体及び固体画分として使用した、Terranol製酵母株V1(商標)による発酵

【図 9】

プロセススキーム-1段階蒸気前処理、C5バイパス加水分解及び後加水分解

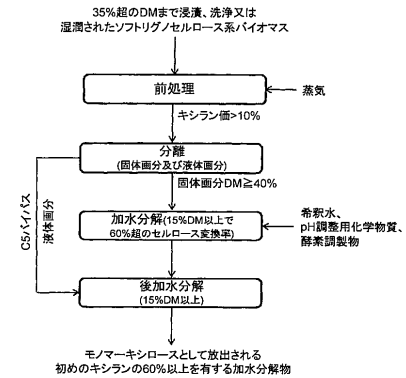


図9 一実施形態のプロセススキーム

## 【手続補正書】

【提出日】平成26年11月4日(2014.11.4)

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リグノセルロース系バイオマスを処理する方法であって、  
ソフトリグノセルロース系バイオマス原料を準備するステップと、  
前処理されたバイオマスが10%以上のキシラン価を有することを特徴とするように、  
原料を、1段階加圧熱水前処理において、3.5から9.0の範囲内のpHで、少なくとも35%の乾燥物質含量で、160 から200 の間の温度で、60分未満の滞留時間で前処理するステップと、

前処理されたバイオマスを、固体画分及び液体画分に分離するステップと、  
エンドグルカナーゼ活性、エキソグルカナーゼ活性、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性、エンドキシラナーゼ活性、キシロシダーゼ活性、及びアセチルキシランエステラーゼ活性を含む酵素混合物により触媒される酵素加水分解を利用して、補助水分を添加して又は添加せずに、15%以上の乾燥物質含量で、24時間から150時間の間の時間で、固体画分を加水分解するステップと、

その後、少なくとも50%のグルコース変換率が達成された後に、分離した液体画分及び加水分解した固体画分を混合し、後加水分解を少なくとも6時間行うステップであって、液体画分中のキシロオリゴマーが、加水分解した固体画分中に残留する酵素活性の作用により、キシロースモノマーに分解されるステップと  
を含む方法。

【請求項 2】

1段階加圧熱水前処理が、前処理中にヘミセルロース加水分解により遊離した酢酸がヘミセルロース加水分解をさらに触媒する、1段階加圧自己加水分解前処理として行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前処理ステップ中に原料に硫酸が添加されない、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

原料が、麦わら、トウモロコシ茎葉、サトウキビバガス、スイートソルガムバガス、又は空果房である、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

原料が、加圧前処理の前に洗浄及び/又は浸出される、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

原料が、加圧前処理の前に、前処理の後続のステップから得られる酢酸含有液体中に浸漬される、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

原料の繊維構造が前処理中に維持される、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

加圧前処理が、10パール以下の圧力で行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

原料が、液体遠心分離システムを使用して、加圧前処理反応器から除去される、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

原料が、スルース型システムを使用して、加圧前処理反応器から除去される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 1 1】

バイオマスが12%以上のキシラン価を有することを特徴とするような過酷度まで原料を前処理する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

固体画分が、40%以上の乾燥物質含量を有する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

後加水分解後のキシロースモノマー収率が、理論的最大収率の少なくとも60%である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

加水分解後のグルコースモノマー収率が、理論的最大収率の少なくとも60%である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

酵素加水分解が、製造者が提案する範囲内の酵素用量レベルで使用される、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物を使用して行われる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

酵素加水分解が、少なくとも96時間行われる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

酵素加水分解が、15%から23%の間の乾燥物質含量で行われる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 1 8】

酵素加水分解が、20%以上の乾燥物質含量で行われる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 1 9】

酵素加水分解が、エキソセルラーゼ活性(EC3.2.1.91)、エンドセルラーゼ活性(EC3.2.1.4)、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性(EC3.2.1.21)、 $\beta$ -1,4-エンドキシラナーゼ活性(EC3.2.1.8)、及びアセチルキシランエステラーゼ活性(EC3.1.1.72)を含む酵素混合物を使用して行われ、酵素混合物は、1FPUのセルラーゼ活性ごとに、少なくとも30CMC Uのエンドグルカナーゼ活性があり、及び少なくとも28pNPG Uの $\beta$ -グルコシダーゼ活性があり、及び少なくとも50ABX Uのエンドキシラナーゼ活性がある、酵素活性の相対的比率を有することをさらに特徴とする、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 2 0】

酵素混合物が、 $\beta$ -1,3-キシロシダーゼ活性(EC3.2.1.72)、 $\beta$ -1,4-キシロシダーゼ活性(EC3.2.1.37)、並びに $\alpha$ -1,3-アラビノフラノシダーゼ活性及び/又は $\alpha$ -1,5-アラビノフラノシダーゼ活性(EC3.2.1.23)をさらに含む、請求項19に記載の方法。

## 【請求項 2 1】

液体画分の後加水分解後に回収された、合わせられたC5/C6加水分解物が、1種以上の改変酵母株を使用してエタノールに直接発酵されることをさらに特徴とする、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

固体画分が、溶解固体の50%超が除去された不溶性固体を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

液体画分中に存在するキシロオリゴマーの少なくとも85%が、後加水分解中にキシロースモノマーに加水分解される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物が、1種以上の追加的酵素活性で補完されている、請求項15に記載の方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【 0 0 4 1 】

「キシラン価」は、以下のように決定される前処理されたバイオマスの特性決定を指す。前処理されたバイオマスは、固体/液体分離に供され、約30%の全固体の固体画分、及び液体画分が提供される。次いで、この固体画分は、1:3の全固体(DM)対水の重量比で70の水と混合することにより、部分的に洗浄される。このようにして洗浄された固体画分は、次いで約30%の全固体まで圧縮される。このようにして洗浄された固体画分のキシラン含量は、A. Sluiterら、「Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass」、US National Renewable Energy Laboratory (NREL) Laboratory Analytical Procedure (LAP)(発行日2008年4月25日、Technical Report NREL/TP-510-42618(2008年4月改訂)に記載)の方法を使用して決定される。ガラクトース及びマンノースがキシロースと共溶出するHPLCカラム及び溶出システムが使用される。そのようなシステムの例は、Phenomenex製REZEX(商標)Monosacharide H+カラム及びBiorad製AMINEX HPX 87C(商標)を含む。説明されるようなこのキシラン含量の測定は、これらの条件下において固体画分から洗浄されていない残留液体画分からの可溶性物質のある程度の寄与を含む。したがって、「キシラン価」は、不溶性固体中の残留キシラン含量、並びに「液体画分」中の可溶性キシロース及びキシロオリゴマー含量の「加重した組合せ」の測定値を提供する。

## 【 手続補正 3 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 4 6

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

## 【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態において、原料は、熱水前処理の前に、まず水溶液中に浸漬される。いくつかの実施形態において、US8,123,864に記載のように、前処理において、後のステップから得られる酢酸含有液体中に原料を浸漬させることが有利となり得る。US12/935,587に記載のように、可能な限り高い乾燥物質含量で処理を行うことが有利である。高い乾燥物質で前処理を行うことは、不必要な水の加熱に対するプロセスエネルギーの支出を回避する。しかしながら、酵素加水分解からの最適な最終糖収率を達成するために、ある程度の水分は必要である。典型的には、その本来の保水能力で、又はその付近でバイオマス原料を前処理することが有利である。これは、所与の原料が、過剰の水の中での浸漬に続く、通常の商業的スクリュープレスの機械的限界までの圧縮の後に到達する水分のレベル、典型的には30%から45%DMの間である。いくつかの実施形態において、熱水前処理は、少なくとも35%のDM含量で行われる。熱水前処理中は、ある程度の水分が加熱中に追加されるため、DM含量が減少し得ることが、当業者に容易に理解されるだろう。いくつかの実施形態において、原料は、少なくとも20%、又は少なくとも25%、又は少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は40%以下、又は35%以下、又は30%以下のDM含量で前処理される。

## 【 手続補正 4 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 5 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

## 【 0 0 5 2 】

バイオマス原料は、様々な手段により、大気圧から加圧反応器内に投入され得る。いくつかの実施形態において、US13/062,522に記載のシステム等のスルース(slucose)型「パーティクルポンプ」システムを使用して、バイオマス原料が投入され得る。いくつかの実施形態において、いわゆる「スクリュープラグ」供給機器を使用して前処理反応器に投入することが有利となり得る。

## 【 手続補正 5 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 5 4

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0054】

繊維構造は、非爆発的様式で加圧反応器から原料を除去することにより維持され得る。いくつかの実施形態において、非爆発的除去は、US13/043,486に記載のもの等のスルース型システムを使用して達成されてもよく、それにより繊維構造が維持され得る。いくつかの実施形態において、非爆発的除去は、US12/996,392に記載のもの等の液体遠心分離機除去システムを使用して達成されてもよく、それにより繊維構造が維持され得る。

## 【手続補正6】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0076

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0076】

いくつかの実施形態において、リグノセルロース系バイオマス変換に最適化された市販のセルラーゼ調製物が使用されるか否かに関わらず、また酵素がバイオマス処理工場でオンサイトで生成されるか否かに関わらず、本発明の利点は、以下を含む酵素混合物を使用して、10%以上のキシラン価という非常に低い過酷度までの自己加水分解前処理を受けるソフトリグノセルロース系バイオマス原料を使用して得ることができる：(1)セルロース鎖の還元及び非還元末端に対する特異性を有する少なくとも2種の酵素を任意選択で含む、エキソセルラーゼ(セロビオヒドロラーゼ)活性(EC3.2.1.91)、(2)エンドセルラーゼ活性(EC3.2.1.4)、(3)β-グルコシダーゼ活性(EC3.2.1.21)、(4)β-1,4-エンドキシラナーゼ活性(EC3.2.1.8)、(5)アセチルキシランエステラーゼ活性(EC3.1.1.72)、並びに任意選択で(6)β-1,3-キシロシダーゼ活性(EC3.2.1.72)、並びに任意選択で(7)β-1,4-キシロシダーゼ活性(EC3.2.1.37)、並びに任意選択で(8)α-1,3-及び/又はα-1,5-アラビノフラノシダーゼ活性(EC3.2.1.23)。いくつかの実施形態において、酵素混合物は、以下のような酵素活性の相対的比率を有することをさらに特徴とする：1FPUのセルラーゼ活性は、少なくとも30CMC Uのエンドグルカナーゼ活性と、及び少なくとも28pNPG Uのβ-グルコシダーゼ活性と、及び少なくとも50ABX Uのエンドキシラナーゼ活性とに関連する。CMC Uは、カルボキシメチルセルロース単位を指し、1CMC Uの活性は、50 及びpH4.8の特定のアッセイ条件下で、1分で1μmolの還元糖(グルコース当量として表現される)を遊離させること、pNPG Uは、pNPG単位を指し、1pNPG Uの活性は、50 及びpH4.8で、パラ-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドから1分当たり1μmolのニトロフェノールを遊離させること、並びに、ABX Uは、カバノキシラナーゼ単位を指し、1ABX Uの活性は、50 及びpH5.3で、1分で1μmolのキシロース還元糖当量を遊離させることが、当業者には容易に理解されるだろう。さらに、FPUは、異なるセルラーゼ酵素の任意の混合物を含む全セルラーゼ活性の尺度を提供する「濾紙分解活性(filter paper units)」を指すが、当業者に容易に理解されるだろう。本明細書において使用される場合、FPUは、Adney, B.及びBaker, J., Laboratory Analytical Procedure #006, 「Measurement of cellulase activity」、1996年8月12日、USA National Renewable Energy Laboratory (NREL)の方法により決定されるような濾紙分解活性を指す。

## 【手続補正7】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0129

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0129】

実施形態及び実施例は、単なる説明であり、特許請求の範囲を限定することを意図しない。

## 【国際調査報告】

| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | International application No<br><b>PCT/DK2013/050256</b>                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. C12P7/10      D21C1/04      D21C3/04<br>ADD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                             |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                             |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br><b>C12P D21C</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                             |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                             |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br><b>EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                             |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                             |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No.                                                                                       |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | KABEL ET AL: "Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw",<br>BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB,<br>vol. 98, no. 10,<br>11 February 2007 (2007-02-11), pages<br>2034-2042, XP005884979,<br>ISSN: 0960-8524, DOI:<br>10.1016/J.BIORTECH.2006.08.006<br>the whole document<br><div style="text-align: center; margin-top: 10px;">-----<br/>-/--</div> | 1-22                                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                             |
| * Special categories of cited documents :                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                             |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                             |
| Date of the actual completion of the international search<br><br><div style="text-align: center;">23 October 2013</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Date of mailing of the international search report<br><br><div style="text-align: center;">04/11/2013</div> |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Authorized officer<br><br><div style="text-align: center;">Schneider, Patrick</div>                         |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DK2013/050256

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                       |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
| X                                                    | <p>RODOLFO VEGAS ET AL: "Hydrothermal processing of rice husks: effects of severity on product distribution", JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY &amp; BIOTECHNOLOGY, vol. 83, no. 7, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 965-972, XP055084758, ISSN: 0268-2575, DOI: 10.1002/jctb.1896 the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                            | 1-22                  |
| X                                                    | <p>PETERSEN M O ET AL: "Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals", BIOMASS AND BIOENERGY, PERGAMON, AMSTERDAM, NL, vol. 33, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 834-840, XP026033714, ISSN: 0961-9534, DOI: 10.1016/J.BIOMBIOE.2009.01.004 [retrieved on 2009-01-30] the whole document</p> <p>-----</p> | 1-22                  |
| A                                                    | <p>WO 2011/125056 A1 (INBICON AS [DK]; LARSEN JAN [DK]; JEPPESEN MARTIN DAN [DK]) 13 October 2011 (2011-10-13) pages 12,27,28</p> <p>-----</p>                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1-22                  |
| A                                                    | <p>DOGARIS I ET AL: "Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 100, no. 24, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 6543-6549, XP026520507, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2009.07.046 [retrieved on 2009-08-18] the whole document</p> <p>-----</p>                                  | 1-22                  |
| A                                                    | <p>DIAZ M J ET AL: "Hydrothermal pre-treatment of rapeseed straw", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 101, no. 7, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 2428-2435, XP026822537, ISSN: 0960-8524 [retrieved on 2009-11-25] the whole document</p> <p>-----</p>                                                                                                                                            | 1-22                  |
| A,P                                                  | <p>WO 2013/050806 A1 (INBICON AS [DK]; LARSEN JAN [DK]; JEPPESEN MARTIN DAN [DK]) 11 April 2013 (2013-04-11) pages 19,20,33</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>                                                                                                                                                                                                                           | 1-22                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                                                   |
|---------------------------------------------------|
| International application No<br>PCT/DK2013/050256 |
|---------------------------------------------------|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                   |                       |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                | Relevant to claim No. |
| E                                                    | WO 2013/120492 A1 (INBICON AS [DK])<br>22 August 2013 (2013-08-22)<br>the whole document<br>----- | 1-22                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/DK2013/050256

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2011125056 A1                          | 13-10-2011          | NONE                       |                     |
| WO 2013050806 A1                          | 11-04-2013          | NONE                       |                     |
| WO 2013120492 A1                          | 22-08-2013          | NONE                       |                     |

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100176197

弁理士 平松 千春

(72)発明者 ラーセン, ヤン

デンマーク国 ディーケー - 5 6 9 0 トマーラップ, ウシュタブロ 2 8

(72)発明者 ニールセン ポウルセン, ニールス

デンマーク国 ディーケー - 6 5 0 0 フォイェンス, コルスナプヴァイ 1 1

(72)発明者 イェッペセン, マルティン ダン

デンマーク国 ディーケー - 5 2 0 0 オーデンセ ブイ, イェルストルプヴァイ 4 0

(72)発明者 モーゲンセン, キット ケレブイエルク

デンマーク国 ディーケー - 7 0 0 0 フレゼリシア, クラボレヴァイ 4

F ターム(参考) 4B064 AC03 AF02 CA06 CA21 CB07 CC30 DA16

4D004 AA02 AA12 AB10 AC05 BA03 BA07 CA04 CA13 CA20 CA39

CA40 CB50 CC20 DA03 DA06 DA07 DA11 DA20