

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年8月10日(10.08.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/134975 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 7/06 (2006.01) C12P 1/00 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01) C12P 7/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/000099
- (22) 国際出願日: 2017年1月5日(05.01.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-019048 2016年2月3日(03.02.2016) JP
- (71) 出願人: 新日鉄住金エンジニアリング株式会社
(NIPPON STEEL & SUMIKIN ENGINEERING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1418604 東京都品川区大崎一丁目5番1号 Tokyo (JP). トヨタ自動車株式会社
(TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町1番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 木内 崇文(KIUCHI Takafumi); 〒1418604 東京都品川区大崎一丁目5番1号 大崎センタービル 新日鉄住金エンジニアリング株式会社内 Tokyo (JP). 森田 健太郎(MORITA Kentaro); 〒1418604 東京都品川区大崎一丁目5番1号 大崎センタービル 新日鉄住金エンジニアリング株式会社内 Tokyo (JP). 古賀 吏(KOGA Tsukasa); 〒1418604 東京都品川区大崎一丁目5番1号 大崎センタービル 新日鉄住金エンジニアリング株式会社内 Tokyo (JP). 小川 健一(OGAWA Kenichi); 〒1418604 東京都品川区大崎一丁目5番1号 大崎センタービル 新日鉄住金エンジニアリング株式会社内 Tokyo (JP). 茗荷菜月(MYOGA Natsuki); 〒1418604 東京都品川区大崎一丁目5番1号 大崎センタービル 新日鉄

住金エンジニアリング株式会社内 Tokyo (JP). 保谷 典子(YASUTANI Noriko); 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 大西 徹(ONISHI Toru); 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP).

- (74) 代理人: 志賀 正武, 外(SHIGA Masatake et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ETHANOL

(54) 発明の名称: エタノールの製造方法

(57) Abstract: The method for producing ethanol according to the present invention comprises (A) a step for mixing a pretreated lignocellulosic biomass with an enzyme to saccharify the lignocellulosic biomass, and (B) a step for inoculating, with a yeast, and fermenting a saccharification liquid and saccharification residue obtained in step (A), wherein: the yeast is *Saccharomyces cerevisiae*; and the method comprises, before step (A), or after step (A) but before step (B), (M) a step for determining the concentration of yeast cells in step (B) so as to equal to a preset reference value depending on the concentration of furfural in a liquid containing the pretreated lignocellulosic biomass before step (A) or the saccharification liquid obtained in step (A), wherein the preset reference value is the concentration of yeast cells which is higher than or equal to the critical value of the concentration of yeast cells at which fermentation is not inhibited depending on the concentration of furfural, and the yeast is inoculated in step (B) such that the concentration of yeast cells determined in step (M) is attained.

(57) 要約: 本発明のエタノールの製造方法は、(A) 前処理済リグノセルロース系バイオマス及び酵素を混合し糖化する工程と、(B) 前記工程(A)で得られた糖化液及び糖化残渣に、酵母を植菌し発酵する工程と、を備え、前記酵母がサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces Cerevisiae*)であり、前記工程(A)の前又は工程(A)の後であって、工程(B)の前に、(M) 前記工程(A)前の前記前処理済リグノセルロース系バイオマスを含む液中、又は前記工程(A)で得られた糖化液中のフルフラールの濃度に応じて、予め設定された基準値となるように前記工程(B)における酵母の菌体濃度を決定する工程を備え、前記予め設定された基準値がフルフラールの濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値以上の酵母の菌体濃度であって、前記工程(B)において前記工程(M)で決定された前記菌体濃度となるように酵母を植菌する。

WO 2017/134975 A1

明 細 書

発明の名称：エタノールの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、エタノールの製造方法に関する。

本願は、2016年2月3日に、日本に出願された特願2016-019048号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 近年、地球温暖化対策や、廃棄物の有効活用の観点から、植物資源を原料とするバイオマスの利用が注目されている。一般に、バイオマスからエタノール等の化合物を製造するための原料としては、サトウキビ等の糖質やトウモロコシ等のデンプン質が多く用いられている。しかしながら、これらの原料はもともと食料又は飼料として用いられており、長期的に工業用利用資源として活用することは、食料又は飼料用途との競合を引き起こし、原料価格の高騰を招く危険性がある。

[0003] 従って、非食用バイオマスをエネルギー資源として活用する技術開発が進められている。非食用バイオマスとしては、地球上に最も多く存在するセルロースが挙げられるが、その大部分は芳香族ポリマーのリグニンやヘミセルロースとの複合体であるリグノセルロースとして存在する。

[0004] リグノセルロース系バイオマスから目的の化合物を製造する方法としては、水熱処理等の前処理を行う。このとき、必要に応じて、適宜酸又はアルカリを混合させてもよい。前処理工程では、リグノセルロースを構成するヘミセルロースやリグニンといったポリマーを分解し、後工程におけるセルロースの反応性を向上させる。しかしながら、酸強度や温度条件が強すぎると、セルロース及びヘミセルロースの分解で生成された単糖がさらに分解され、過分解物を生成してしまい、その後の発酵工程を阻害することが知られている。また、主にヘミセルロースが分解される際に副産物として、酢酸やギ酸等の有機酸が生成され、これらもその後の発酵工程を阻害することが知られ

ている。

[0005] 特許文献1には、木質系炭化物により処理することで発酵阻害物質を除去する方法が開示されている。また、特許文献2には、ポリスチレン系の樹脂に吸着又は保持させることで、発酵阻害物質を除去する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2005-270056号公報

特許文献2：特開2011-78327号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1では、発酵阻害物質を除去する為に木質系炭化物及び除去処理のための設備が必要となる。特許文献2では、発酵阻害物質を除去する為にポリスチレン系樹脂及び除去処理のための設備が必要となる。さらに、ポリスチレン系樹脂の脱着処理（再生処理）を行うための設備が必要となる。

[0008] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、発酵阻害物質の存在下での、安定的で効率的なリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0009] すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

（1）エタノールの製造方法であって、

（A）前処理済みリグノセルロース系バイオマス及び酵素を混合し、糖化する工程と、

（B）前記工程（A）で得られた糖化液及び糖化残渣に、酵母を植菌し、発酵する工程と、を備え、

前記酵母がサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces Cerevisiae*）であり、

前記工程（Ａ）の前、又は、工程（Ａ）の後であって、工程（Ｂ）の前に、

（Ｍ）前記工程（Ａ）前の前記前処理済リグノセルロース系バイオマスを含む液中、又は、前記工程（Ａ）で得られた糖化液中のフルフラールの濃度に応じて、予め設定された基準値となるように、前記工程（Ｂ）における酵母の菌体濃度を決定する工程を備え、

前記予め設定された基準値が、フルフラールの濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値以上の酵母の菌体濃度であって、

前記工程（Ｂ）において、前記工程（Ｍ）において決定された前記菌体濃度となるように酵母を植菌することを特徴とする製造方法。

（２）前記予め設定された基準値が、前記臨界値の１．０～３．０倍である（１）に記載のエタノールの製造方法。

（３）前記臨界値が酵母の菌体数を用いた濃度（ＣＦＵ（Ｃｏｌｏｎｙ ｆｏｒｍｉｎｇ ｕｎｉｔ）／ｍＬ）で表され、

前記フルフラールの濃度が X （ｇ／Ｌ）、前記臨界値が Y （ＣＦＵ／ｍＬ）であるとき、前記 X 及び前記 Y は下記数式〔１〕で表される関係である（１）又は（２）に記載のエタノールの製造方法。

[0010] [数1]

$$Y = a X + b \quad [1]$$

[0011] （数式〔１〕中、 a は、 1.0×10^7 以上 4.0×10^7 以下の数であり、 b は、 2.0×10^6 である。）

（４）前記臨界値が酵母の乾燥菌体重量を用いた濃度（ｇ／Ｌ）で表され、乾燥菌体１ｇあたりに含まれる酵母の菌体数が 1.5×10^{10} ＣＦＵであって、

前記フルフラールの濃度が X （ｇ／Ｌ）、前記臨界値が Y' （ｇ／Ｌ）であるとき、前記 X 及び前記 Y' は下記数式〔２〕で表される関係である（１）又は（２）に記載のエタノールの製造方法。

[0012] [数2]

$$Y' = c X + d \quad [2]$$

[0013] (数式[2]中、cは、0.5以上2.5以下の数であり、dは、0.13である。)

発明の効果

[0014] 本発明によれば、発酵阻害物質の存在下において、安定的且つ効率的にリグノセルロース系バイオマス由来化合物の収率を向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]酵母内でのフルフラールの無毒化の経路を示した概略図である。

[図2]本実施形態におけるリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造装置の概略構成を示す図である。

[図3A]実施例1における糖化工程及び発酵工程でのグルコース濃度の変化を示すグラフである。

[図3B]実施例1における糖化工程及び発酵工程でのキシロース濃度の変化を示すグラフである。

[図3C]実施例1における糖化工程及び発酵工程でのフルフラール濃度の変化を示すグラフである。

[図3D]実施例1における糖化工程及び発酵工程でのエタノール濃度の変化を示すグラフである。

[図4]実施例2における発酵工程での発酵収率とフルフラール濃度の関係を示すグラフである。

[図5A]実施例2における発酵阻害物質の濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値とフルフラール濃度の関係を示すグラフである。

[図5B]実施例2における酵母の菌体数に置き換えた発酵阻害物質の濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値とフルフラール濃度の関係を示すグラフである。

[図5C]実施例2における酵母の乾燥重量に置き換えた発酵阻害物質の濃度に

応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値とフルフラール濃度の関係を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] 本明細書において、リグノセルロース系バイオマスとしては、主に、セルロース、ヘミセルロース及びリグニンを含有するものであり、例えば針葉樹、広葉樹、建築廃材、林地残材、剪定廃材、稲藁、籾殻、麦藁、木材チップ、木材繊維、化学パルプ、古紙、合板等の農林産物資源、サトウキビバガス、サトウキビ茎葉、コーンストーバー等の農林産物廃棄物、農林産物加工品及び大型藻類、微細藻類等の植物組織である。これらのリグノセルロース系バイオマスは単独であってもよく、混合物であってもよい。

[0017] 本明細書において、ヘミセルロースは、キシロース等の5つの炭素を構成単位とする五炭糖とよばれるものやマンノース、アラビノース、ガラクトロン酸等の6つの炭素を構成単位とする六炭糖とよばれるもの、さらにグルコマンナンやグルクロノキシラン等のような複合多糖を有するので、加水分解を受けると、炭素5つからなる五炭糖の単糖やその単糖が複数個連結された五炭糖のオリゴ糖、炭素6つからなる六炭糖の単糖やその単糖が複数個連結された六炭糖のオリゴ糖、五炭糖の単糖と六炭糖の単糖が複数個連結されたオリゴ糖を生ずる。

セルロースは、6つの炭素を構成単位として有するので、加水分解を受けると、炭素6つからなる六炭糖の単糖やその単糖が複数個連結された六炭糖のオリゴ糖を生ずる。一般に、単糖及びオリゴ糖の少なくともいずれかの糖の構成比率や生成量は、前処理方法や原料として用いた農林産物資源、農林産物廃棄物、農林産物加工品、及び大型藻類、微細藻類等の植物組織の種類によって異なる。

[0018] 以下、図面を参照しながら、本発明の実施形態について詳細に説明する、なお、各図において、説明に関連しない部分は図示を省略する場合がある。

[0019] <リグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法>

本実施形態のリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造方法は、

(A) 前処理済リグノセルロース系バイオマス及び酵素を混合し、糖化する工程と、

(B) 前記工程 (A) で得られた糖化液及び糖化残渣に、酵母を植菌し、発酵する工程と、を備え、

前記工程 (A) の前、又は、工程 (A) の後であって、工程 (B) の前に、

(M) 前記工程 (A) 前の前記前処理済リグノセルロース系バイオマスを含む液中、又は、前記工程 (A) で得られた糖化液中の発酵阻害物質の濃度に応じて、予め設定された基準値となるように、前記工程 (B) における酵母の菌体濃度を決定する工程を備え、

前記予め設定された基準値が、発酵阻害物質の濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値以上の酵母の菌体濃度であって、

前記工程 (B) において、前記工程 (M) において決定された前記菌体濃度となるように酵母を植菌するものである。

[0020] 本実施形態の製造方法によれば、発酵阻害物質の存在下において、安定的且つ効率的にリグノセルロース系バイオマス由来化合物の収率を向上させることができる。

[0021] 《工程 (A) : 糖化工程》

本実施形態の製造方法において、まず、前処理済リグノセルロース系バイオマス及び酵素を混合し、糖化する。糖化温度は、45℃以上70℃以下が好ましく、45℃以上55℃以下がより好ましく、50℃が特に好ましい。また、糖化時間は12時間以上120時間以下が好ましく、24時間以上96時間以下がより好ましく、24時間以上72時間以下がさらに好ましい。

[0022] 本明細書において、酵素とは、リグノセルロース系バイオマスを単糖又はオリゴ糖単位に分解する酵素を意味し、リグノセルロース系バイオマスを単糖又はオリゴ糖にまで分解するものであればよく、セルラーゼ及びヘミセルラーゼの各活性を持つものであればよい。

セルラーゼは、セルロースをグルコース等の単糖又はオリゴ糖に分解する

ものであればよく、エンドグルカナーゼ（EG）、セロビオハイドロラーゼ（CBH）及び β -グルコシダーゼ（BGL）の各活性の少なくとも1つの活性を有するものを挙げることができ、これらの各活性を有する酵素混合物であることが、酵素活性の観点から好ましい。

同じくヘミセルラーゼは、ヘミセルロースをキシロース等の単糖又はオリゴ糖に分解するものであればよく、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、マンナーゼ、ペクチナーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、及びアラビノフラノシダーゼの各活性の少なくとも1つの活性を有するものを挙げることができ、これらの各活性を有する酵素混合物であることが、酵素活性の観点から好ましい。

これらセルラーゼ及びヘミセルラーゼの起源は限定されることはなく、糸状菌、担子菌、細菌類等のセルラーゼ及びヘミセルラーゼを用いることができる。

[0023] 本明細書において、前処理済リグノセルロース系バイオマスとは、糖化反応を効率的に行うために事前処理を行ったリグノセルロース系バイオマスを意味する。事前処理方法としては、例えば、蒸気のみでの蒸煮法、イオン液体を用いる方法、ミルを用いる粉砕法等が挙げられる。また、事前処理において、必要に応じて、適宜酸又はアルカリを混合させてもよい。酸としては、例えば、硫酸、塩酸、硝酸、リン酸等の中から選ばれ、これらを単独で又は組み合わせて用いてもよい。中でも工業利用には安価で手に入りやすい硫酸が特に好ましい。アルカリとしては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等が挙げられ、これらを単独で又は組み合わせて用いてもよい。事前処理に用いる反応容器には特に限定はないが、耐酸性若しくは耐アルカリ性を有する加熱圧力容器、又は耐酸性若しくは耐アルカリ性を有する容器をオートクレーブのような加熱圧力装置に入れて処理する形態が考えられる。

[0024] 前処理済リグノセルロース系バイオマス中には、セルロース、ヘミセルロース、単糖及びオリゴ糖の少なくともいずれかの糖以外にも、種々の副生成

物が含まれている。それら副生成物が後工程の糖化工程、発酵工程等に悪影響を及ぼさない物質であれば、最後の精製工程において除去すればよいので大きな問題とはならない。しかしながら、悪影響を及ぼす発酵阻害物質であれば、糖化工程又は発酵工程の前工程で、各工程に悪影響を及ぼさないようにする必要性が生じる。

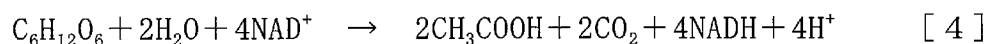
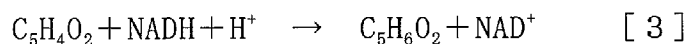
[0025] 本明細書において、発酵阻害物質とは、発酵工程で発酵反応を妨害する物質のことである。代表的な発酵阻害物質としては、糖の過分解物、リグニン又はリグニン由来の芳香族化合物、接着剤又は塗料由来の化合物が挙げられる。この中で、接着剤又は塗料等の人工的な薬品に由来する化合物は、それらの処理が施されていない自然由来のリグノセルロース系バイオマスを使用することにより、ある程度回避可能である。しかし、リグノセルロース系バイオマスを原料とする限り、糖の過分解物やリグニン由来の芳香族化合物の生成は回避することが困難である。

ここで、発酵阻害物質がリグニンのような不溶性固体であり、セルロース、ヘミセルロース、単糖及びオリゴ糖の少なくともいずれかの糖が可溶性である場合には、通常の固液分離によって除去することが可能な場合もある。しかしながら、発酵阻害物質も有用物も可溶性である場合には、通常の固液分離が適用できないため、後述の発酵阻害物質の濃度に応じた酵母の菌体濃度を決定し、植菌する方法が好ましく適用される。すなわち、本実施形態において、主に処理対象とする発酵阻害物質は、実質的にセルロース、ヘミセルロース、単糖及びオリゴ糖の少なくともいずれかの糖との混合溶液を形成しているものであり、通常の固液分離では分離できない、又は、分離し難い状態のものを指す。そのような発酵阻害物質としては、例えば、酢酸、ギ酸、レブリン酸、糖の過分解物であるフルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール（5-HMF）、リグニン由来の芳香族化合物であるバニリン、アセトバニリン、グアヤコール等が挙げられる。これら発酵阻害物質のうち、代表的な発酵阻害物質はフルフラール及び5-HMFである。

[0026] 上記のフルフラール又は5-HMFによる酵母の発酵阻害の機構について、

以下に説明する。フルフラール又は5-HMFは、酵母の解糖系やアルコール脱水素（ADH）を阻害することが知られている（Alemeida et al., J Chem. Technol. Biotechnol. 82:320-349 (2007), 参照）。さらに、図1は、酵母内でのフルフラールの無毒化の経路を示した概略図である。好気条件下では、酸素、水によりカルボン酸の一種である2-フロイック酸に変化し、さらにATPにより2-フロリル-CoAに変化することでTCA回路において活用される。一方、嫌気条件下でフルフラールを無毒化するためには、NADHが必要である（下記式[3]参照）。フルフラールはNADHによりフルフリルアルコールに還元され、さらにフルフリルアルコールを細胞外に排出されることが知られている（Nieces et al. Front. Bioeng. Biotechnol. 18, Feb (2015), 参照）。そのため、酵母はNADHを合成するために、グルコースから酢酸の合成が優先的になされ（下記式[4]参照）、グルコースからエタノールの合成が抑制される。

[0027] [化1]



[0028] 本発明者らは、上記の発酵阻害機構に着目し、発酵阻害物質の濃度に応じた酵母量を植菌することにより、本発明に至った。

[0029] 《工程（M）：決定工程》

続いて、前記工程（A）前の前記前処理済リグノセルロース系バイオマスを含む液中、又は、前記工程（A）で得られた糖化液中の発酵阻害物質の濃度を測定する。測定された発酵阻害物質の濃度に応じて、予め設定された基準値となるように、後述の工程（B）における酵母の菌体濃度を決定する。

発酵阻害物質の濃度の測定方法としては、例えば、糖化装置で糖化が開始される前、糖化中又は糖化後に、液を抜き取り、高速液体クロマトグラフ又

はニトロフェニルヒドラジン及びアルカリ溶液を用いた呈色反応（発酵阻害物質がフルフラールである場合）等により発酵阻害物質を測定する方法や、ライン上で事前処理の条件等により発酵阻害物質の濃度を算出する方法等が挙げられる。

[0030] 本実施形態の製造方法において、基準値は、次のようにして予め設定する。

まず、スモールスケールにて、事前処理条件の異なる前処理済リグノセルロース系バイオマスを調製する。事前処理条件については、上述したとおり、事前処理方法、温度、時間、使用する触媒の種類及び濃度等を変えたものを準備する。続いて、前処理済リグノセルロース系バイオマスそれぞれと酵素とを混合し、糖化を行う。続いて、得られた糖化液中の発酵阻害物質の濃度を測定する。発酵阻害物質の濃度に対して、後述の実施例 2 に示すように、酵母の植菌量を変えて糖化液に含まれる酵母の菌体濃度が変わるように添加し、目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を目的の発酵収率まで得られるか否かを評価する。

[0031] 目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を目的の発酵収率まで得られた場合、このときの酵母の菌体濃度は、発酵阻害物質の濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値と判断できる。予め設定された基準値は、上記の臨界値以上の酵母の菌体濃度とすればよく、例えば上記の臨界値の 1.0 倍～3.0 倍、好ましくは上記の臨界値の 1.0 倍～2.5 倍、さらに好ましくは上記の臨界値の 1.0 倍～1.5 倍を予め設定された基準値とする。

[0032] 本実施形態の製造方法において、より具体的な例として、発酵阻害物質がフルフラールである場合の、上記の臨界値とフルフラール濃度の関係について、以下に説明する。

[0033] [臨界値：酵母の菌体数を用いた濃度]

本実施形態の製造方法において、

上記の臨界値が酵母の菌体数を用いた濃度（CFU/mL）で表され、

フルフラールの濃度が X (g/L)、上記の臨界値が Y (CFU/mL)であるとき、 X 及び Y は下記数式〔1〕で表される関係である。

[0034] [数3]

$$Y = a X + b \quad [1]$$

[0035] (数式〔1〕中、 a は、 1.0×10^7 以上 4.0×10^7 以下の数であり、 b は、 2.0×10^6 である。)

[0036] 後述の実施例2のとおり、フルフラールの濃度 X 及び上記の臨界値 Y は、線形関係で表すことができる。

[0037] 数式〔1〕中、傾き a は、 1.0×10^7 以上 4.0×10^7 以下であることが好ましく、 1.5×10^7 以上 3.5×10^7 以下であることがより好ましく、 2.0×10^7 以上 3.0×10^7 以下であることがさらに好ましい。傾き a が上記範囲内であることにより、フルフラール存在下において、効率的に目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を目的の発酵収率で得ることができる。

[0038] 数式〔1〕中、切片 b は、 2.0×10^6 以上であればよい。上記の値は、糖化液中にフルフラールが含まれない場合に、目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を目的の発酵収率まで得るために、必要な酵母の菌体数の最低値である。

[0039] [臨界値：酵母の乾燥菌体重量を用いた濃度]

本実施形態の製造方法において、

上記の臨界値が酵母の乾燥菌体重量を用いた濃度 (g/L) で表され、

乾燥菌体 1 g 当たりに含まれる酵母の菌体数が $1.5 \times 10^{10} \text{CFU}$ であって、

フルフラールの濃度が X (g/L)、上記の臨界値が Y' (g/L) であるとき、 X 及び Y' は下記数式〔2〕で表される関係である。

[0040] [数4]

$$Y' = c X + d \quad [2]$$

[0041] (数式[2]中、cは、0.5以上2.5以下の数であり、dは、0.13である。)

[0042] 上記の臨界値は、酵母の乾燥菌体重量で表してもよい。酵母の乾燥菌体1gに含まれる酵母の菌体数は、酵母の種類により若干変動するが、通常、 $0.75 \times 10^{10} \sim 3.0 \times 10^{10}$ CFUであって、 1.5×10^{10} CFUであることが好ましい。

[0043] 数式[2]中、傾きcは、0.5以上2.5以下の数であることが好ましく、0.75以上2.25以下の数であることがより好ましく、1.0以上1.5以下の数であることがさらに好ましい。傾きcが上記範囲内であることにより、フルフラール存在下において、効率的に目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を目的の発酵収率で得ることができる。

[0044] 数式[2]中、切片dは、0.13以上であればよい。上記の値は、糖化液中にフルフラールが含まれない場合に、目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を目的の発酵収率まで得るために、必要な酵母の乾燥菌体重量の最低値である。

[0045] [臨界値：糖化液に対する使用する酵母を含む溶液の割合]

本実施形態の製造方法において、

上記の臨界値が糖化液に対する使用する酵母を含む溶液の割合で表され、

酵母を含む溶液中の酵母の菌体濃度が 2.0×10^8 CFU/mLであって、

フルフラールの濃度がX (g/L)、上記の臨界値がY' (g/L) であるとき、X及びY' は下記数式[5]で表される関係である。

[0046] [数5]

$$Y' = eX + f \quad [5]$$

[0047] (数式[5]中、eは、4.5以上20.0以下の数であり、fは、1.0である。)

[0048] 上記の臨界値は、糖化液に対する使用する酵母を含む溶液の割合で表して

もよい。酵母を含む溶液中の酵母の菌体濃度は、適宜調整してもかまわないが、通常、 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ であって、 $2 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ であることが好ましい。

[0049] 数式[5]中、傾き e は、4.5以上20.0以下の数であることが好ましく、5.0以上15.0以下の数であることがより好ましく、7.5以上10.0以下の数であることがさらに好ましい。傾き e が上記範囲内であることにより、フルフラール存在下において、目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を目的の発酵収率まで得ることができる。

[0050] 数式[5]中、切片 f は、1.0以上であればよい。上記の値は、糖化液中にフルフラールが含まれない場合に、目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を目的の発酵収率まで得るために、必要な糖化液に対する使用する酵母を含む溶液の割合の最低値である。

[0051] 《工程（B）：発酵工程》

続いて、上記の工程（A）で得られた糖化液及び糖化残渣に、酵母を植菌し、発酵する。このとき、上記の工程（M）において決定された前記菌体濃度となるように酵母を植菌する。発酵温度は、25℃以上50℃以下が好ましく、28℃以上35℃以下がより好ましく、32℃が特に好ましい。また、発酵時間は24時間以上120時間以下が好ましく、24時間以上96時間以下がより好ましく、24時間以上72時間以下がさらに好ましい。

[0052] 本実施形態の製造方法において、酵母としては、目的のリグノセルロース系バイオマス由来化合物を生成できるものであれば、特別な限定はない。植菌する酵母は、酵母を含む培養液をそのまま使用してもよく、又は、酵母を含む培養液を遠心分離により濃縮したもの、乾燥状態のもの等を適宜使用してよい。また、酵母の状態に合わせて、上記の臨界値と発酵阻害物質の関係から、植菌する量を算出すればよい。

[0053] 工程（B）後の工程については、発酵液の活用方法によって、適宜選択できる。例えば、エタノールを得ることを目的とした場合は、発酵液を精製する工程として蒸留工程を設けることができる。

[0054] 本実施形態において、リグノセルロース系バイオマス由来化合物とは、リグノセルロース系バイオマスを分解して得られた単糖及びオリゴ糖を、酵母が摂取することにより生成された化合物を意味する。例えば、エタノール、ブタノール、1, 3-プロパンジオール、1, 4-ブタンジオール、グリセロール等のアルコール、ピルビン酸、コハク酸、リンゴ酸、イタコン酸、クエン酸、乳酸等の有機酸、イノシン、グアノシン等のヌクレオシド、イノシン酸、グアニル酸等のヌクレオチド、カダベリン等のジアミン化合物等が挙げられる。発酵によって得られた化合物が乳酸等のモノマーである場合は、重合によりポリマーに変換することもある。

[0055] <リグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造装置>

図2は、本実施形態におけるリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造装置の概略構成を示す図である。本実施形態のリグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造装置10は、糖化装置1と発酵槽3との間に配管2が配設されている。

さらに、糖化装置1に、糖化液を一部抜き出すための配管4が配設されていてもよい。

また、発酵槽3には、配管6を介して酵母を供給するための酵母供給槽5が配設されていてもよい。

また、図2において、糖化装置1と発酵槽3が別々に配設された態様を例示しているが、同時に糖化反応及び発酵反応を行う1つの糖化発酵槽としてもよい。

[0056] 糖化装置1は、前処理済リグノセルロース系バイオマス及び酵素を混合し、糖化を行うための装置であり、特別な限定はない。例えば、攪拌型、通気攪拌型、気泡塔型、流動層型、充填層型等を挙げることができる。

配管4は、糖化装置1から糖化液を一部抜き出し、糖化液中の発酵阻害物質の濃度を測定するための配管であって、特別な限定はない。また、糖化前若しくは糖化発酵前の前処理済リグノセルロース系バイオマスを含む液中の発酵阻害物質の濃度を測定する場合、又は、事前処理の条件等から含まれる

発酵阻害物質の濃度が算出できる場合には、配管 4 を備えていなくてもよい。

[0057] 本実施形態の製造装置において、糖化前又は糖化発酵前の前処理済リグノセルロース系バイオマスを含む液中の発酵阻害物質の濃度を測定する場合において、糖化装置へ前処理済リグノセルロース系バイオマスを含む液を送液する配管に液を一部抜き出すための配管を備えていてもよい。これにより、発酵阻害物質の濃度を測定することができる。

[0058] 配管 2 は、糖化装置 1 において得られた糖化液及び糖化残渣を発酵槽 3 へ送役するための配管であって、特別な限定はない。

[0059] 発酵槽 3 は、糖化装置 1 で得られた糖化液及び糖化残渣に、酵母を植菌し、発酵するための槽であって、特別な限定はない。例えば、攪拌型、通気攪拌型、気泡塔型、流動層型、充填層型等を挙げることができる。

酵母供給槽 5 は、発酵槽 3 へ酵母を供給するための槽であって、特別な限定はない。また、乾燥状態の酵母を発酵槽 3 へ直接植菌する場合には、酵母供給槽 5 を備えていなくてもよい。

[0060] さらに、糖化装置 1 の前に、リグノセルロース系バイオマスを事前処理するための事前処理装置を有していてもよい。事前処理装置は、特に限定はなく、例えば、耐酸性若しくは耐アルカリ性を有する加熱圧力装置、又は耐酸性若しくは耐アルカリ性を有する容器をオートクレーブのような加熱圧力装置に入れて処理する形態等が挙げられる。

また、発酵槽 3 の後続く設備は、発酵液の用途に応じて、適宜選択することができる。

実施例

[0061] 以下、具体的実施例により、本発明についてより詳細に説明する。ただし、本発明は以下に示す実施例に何ら限定されるものではない。

[0062] [実施例 1]

(1) 糖化工程

酵素の基質として前処理済リグノセルロース系バイオマス 10 g-dry

を使用して、水と、pH調整剤としてNaOH 0.04～0.2 gとを加え、前処理済バイオマス濃度が10%質量%となるように希釈し、基質溶液を調製した（全量100 g）。基質溶液に*Trichoderma reesei*由来酵素を投入した。50℃で48時間振盪撹拌した。糖化工程開始直後、24時間後、48時間後にサンプルを1.0 gずつ採取し、高速液体クロマトグラフ（島津製作所製LC-20AD）を用いてフルフラール濃度及びエタノール濃度を測定した。また、糖化工程開始直後、24時間後、48時間後にサンプルを1.0 gずつ採取し、高速液体クロマトグラフィー（SHIMADZU社製、HPLC還元糖システム）及びAsahipak MH2p-504Eカラム（shodex社製）を用いて、グルコース濃度及びキシロース濃度を測定した。

[0063] (2) 発酵工程

(1) で得られた糖化液に、酵母（トヨタ自動車製「サッカロミセス・セルビシエ（*Saccharomyces Cerevisiae*）」）を糖化液に対して、1質量%、4.5質量%、10質量%、20質量%となるように添加し、32℃で48時間振盪撹拌した。なお、酵母は培養液の状態で添加した。培養液中に含まれる酵母の菌体数は 2×10^8 CFU/mLであった。発酵工程開始から24時間後、48時間後にサンプルを1.0 gずつ採取し、高速液体クロマトグラフ（島津製作所製LC-20AD）を用いてフルフラール濃度及びエタノール濃度を測定した。また、発酵工程開始から24時間後、48時間後にサンプルを1.0 gずつ採取し、高速液体クロマトグラフ（SHIMADZU社製、HPLC還元糖システム）及びAsahipak MH2p-504Eカラム（shodex社製）を用いて、グルコース濃度及びキシロース濃度を測定した。

[0064] (3) 結果

糖化工程及び発酵工程でのグルコース濃度（図3A参照）、キシロース濃度（図3B参照）、フルフラール濃度（図3C参照）、及びエタノール濃度（図3D参照）の変化を図3A～図3Dに示した。図3A～図3Dから、糖

化液に対する使用する酵母を含む溶液の割合が20%である場合では、フルフラール濃度が約1.3 g/Lであっても、安定的に発酵し、エタノールが得られることが明らかとなった。

[0065] [実施例2]

(1) 糖化液の調製

あらかじめ、含まれるフルフラール濃度を0 g/L、0.44 g/L、0.5 g/L、0.54 g/L、0.6 g/L、0.62 g/L、1.0 g/L、1.15 g/L、1.19 g/L、1.37 g/L、及び1.4 g/Lとなるように調製した糖化液を準備した。

[0066] (2) 発酵工程

(1) で得られた糖化液それぞれに、酵母（トヨタ自動車製「サッカロミセス・セルビシエ（*Saccharomyces Cerevisiae*）」）を糖化液に対して、1質量%、4.5質量%、10質量%、20質量%となるようにそれぞれ添加し、32℃で48時間振盪攪拌した。なお、酵母は培養液の状態で添加した。培養液中に含まれる酵母の菌体数は 2×10^8 CFU/mLであった。実施例1の(2)と同様の方法により、フルフラール濃度及びエタノール濃度を測定した。

[0067] (3) 結果

発酵工程での発酵収率とフルフラール濃度の関係を図4に示した。図4から、フルフラール濃度が0.54 g/Lである場合、発酵阻害物質の濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値は4.5%であり、フルフラール濃度が0.98 g/Lである場合、上記の臨界値は10%であり、フルフラール濃度が1.37 g/Lである場合、上記の臨界値は20%であった。

[0068] さらに、図5Aは、発酵阻害物質の濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値とフルフラール濃度の関係を示すグラフである。図5Bは、酵母の菌体数に置き換えた上記の臨界値とフルフラール濃度の関係を示すグラフである。図5Cは、酵母の乾燥重量に置き換えた上記の臨界値とフ

ルフラール濃度の関係を示すグラフである。また、グラフは、臨界値 0 %、4.5 %、10 % の 3 点を使用し、近似値としての線形関数のグラフを作成した。

[0069] 以上のことから、糖化液に対する使用する酵母を含む溶液の割合（質量 %）、酵母の菌体数（CFU/mL）、及び酵母の乾燥重量（g/L）のうちいずれを使用しても上記の臨界値を表すことができる。

また、実際の臨界値とフルフラール濃度との関係は曲線のグラフであることから、誤差を鑑みて、図 5 A～図 5 C のそれぞれの線形グラフの傾きが 0.5 倍～2 倍、好ましくは 0.75 倍～1.5 倍であれば、発酵阻害物質の濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値の範囲内であると考えられる。

産業上の利用可能性

[0070] 本発明によれば、発酵阻害物質の存在下において、安定的且つ効率的にリグノセルロース系バイオマス由来化合物の収率を向上させることができる。

符号の説明

[0071] 1…糖化装置、2, 4, 6…配管、3…発酵槽、5…酵母供給槽、10…リグノセルロース系バイオマス由来化合物の製造装置。

請求の範囲

[請求項1]

エタノールの製造方法であって、

(A) 前処理済リグノセルロース系バイオマス及び酵素を混合し、糖化する工程と、

(B) 前記工程 (A) で得られた糖化液及び糖化残渣に、酵母を植菌し、発酵する工程と、を備え、

前記酵母がサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces Cerevisiae*) であり、

前記工程 (A) の前、又は、工程 (A) の後であって、工程 (B) の前に、

(M) 前記工程 (A) 前の前記前処理済リグノセルロース系バイオマスを含む液中、又は、前記工程 (A) で得られた糖化液中のフルフラールの濃度に応じて、予め設定された基準値となるように、前記工程 (B) における酵母の菌体濃度を決定する工程を備え、

前記予め設定された基準値が、フルフラールの濃度に応じた発酵阻害を受けない酵母の菌体濃度の臨界値以上の酵母の菌体濃度であって、

前記工程 (B) において、前記工程 (M) において決定された前記菌体濃度となるように酵母を植菌することを特徴とする製造方法。

[請求項2]

前記予め設定された基準値が、前記臨界値の1.0～3.0倍である請求項1に記載のエタノールの製造方法。

[請求項3]

前記臨界値が酵母の菌体数を用いた濃度 (CFU (Colony forming unit) / mL) で表され、

前記フルフラールの濃度がX (g / L)、前記臨界値がY (CFU / mL) であるとき、前記X及び前記Yは下記数式 [1] で表される関係である請求項1又は2に記載のエタノールの製造方法。

[数1]

$$Y = a X + b \quad [1]$$

(数式[1]中、 a は、 1.0×10^7 以上 4.0×10^7 以下の数であり、 b は、 2.0×10^6 である。)

[請求項4] 前記臨界値が酵母の乾燥菌体重量を用いた濃度 (g/L) で表され、

乾燥菌体 1 g 当りに含まれる酵母の菌体数が 1.5×10^{10} CFU であって、

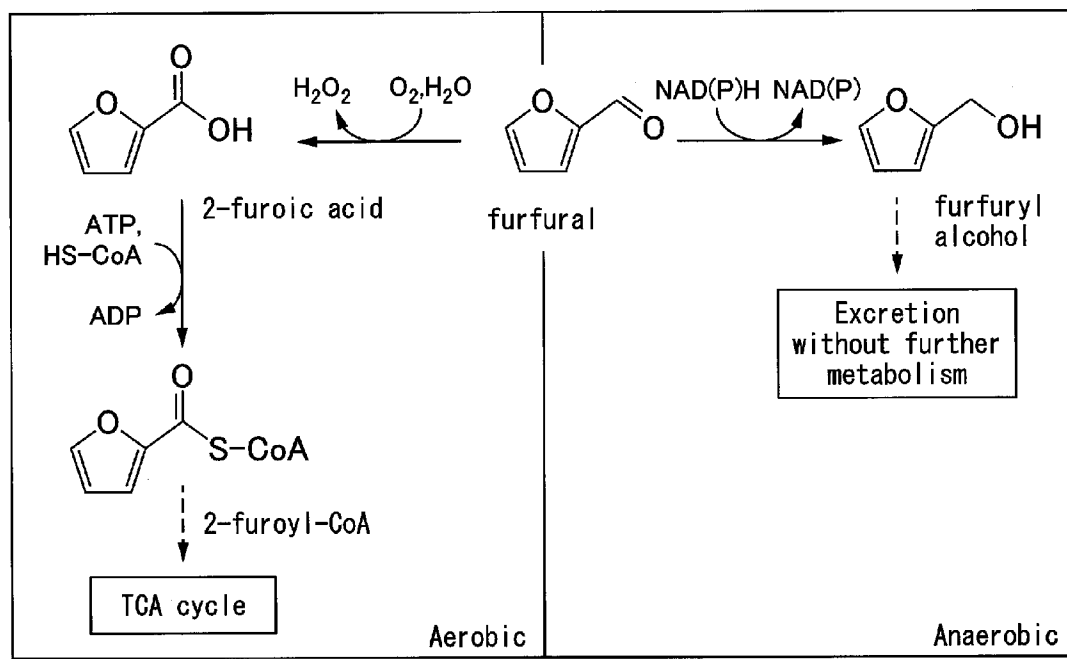
前記フルフラールの濃度が X (g/L)、前記臨界値が Y' (g/L) であるとき、前記 X 及び前記 Y' は下記数式 [2] で表される関係である請求項 1 又は 2 に記載のエタノールの製造方法。

[数2]

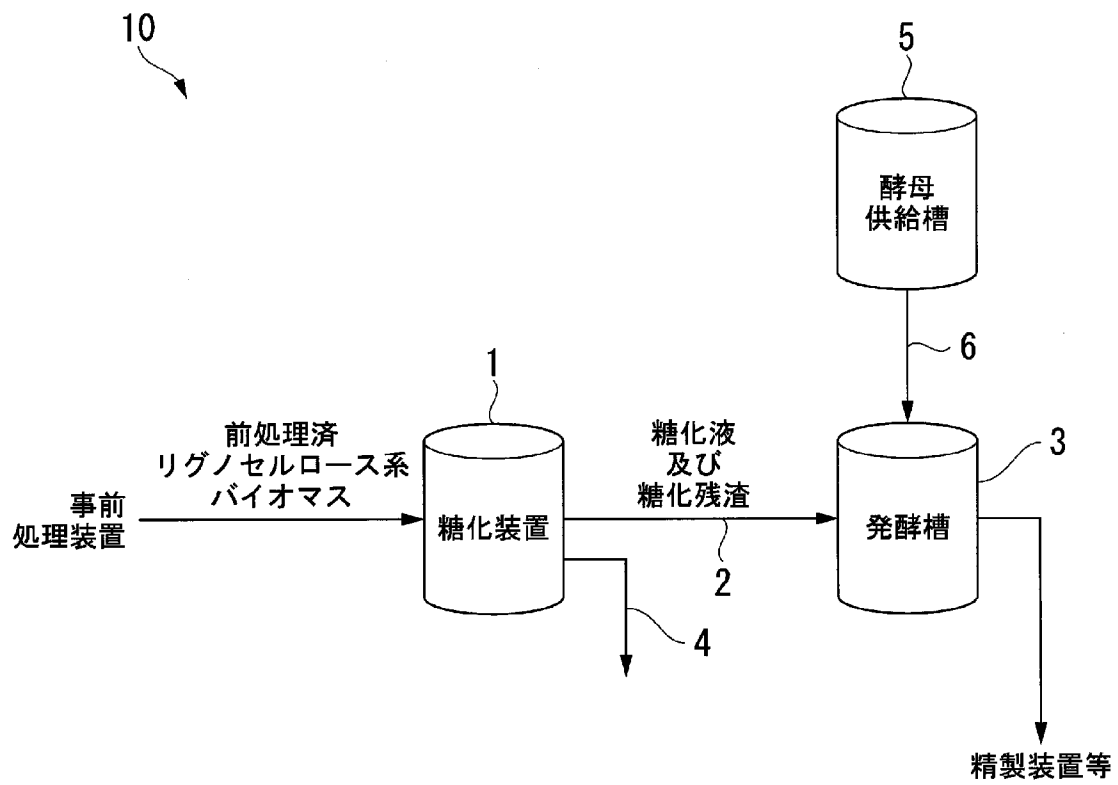
$$Y' = cX + d \quad [2]$$

(数式[2]中、 c は、 0.5 以上 2.5 以下の数であり、 d は、 0.13 である。)

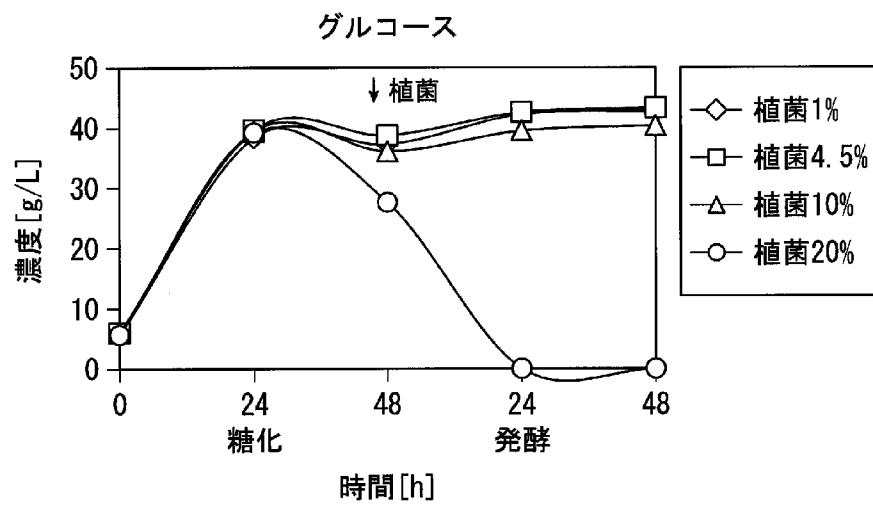
[図1]



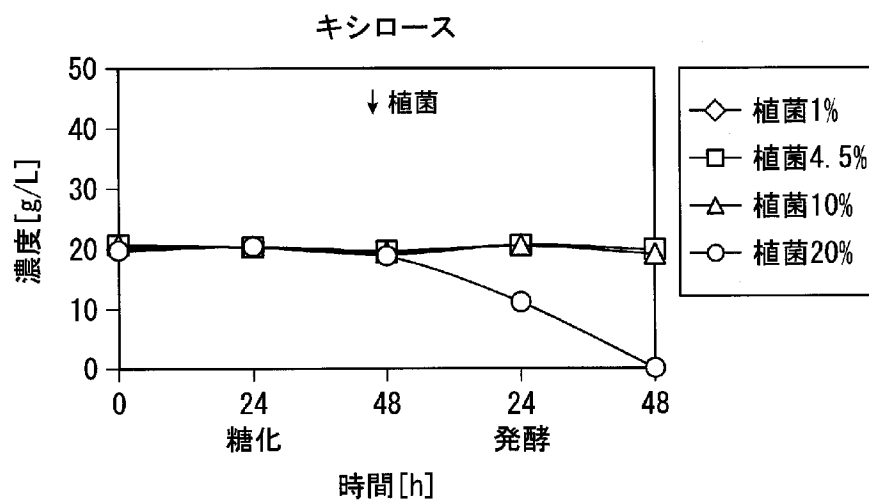
[図2]



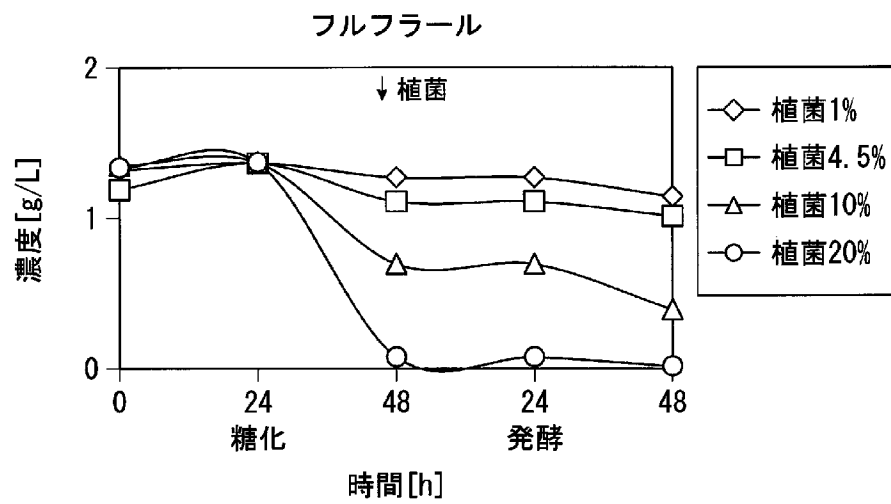
[図3A]



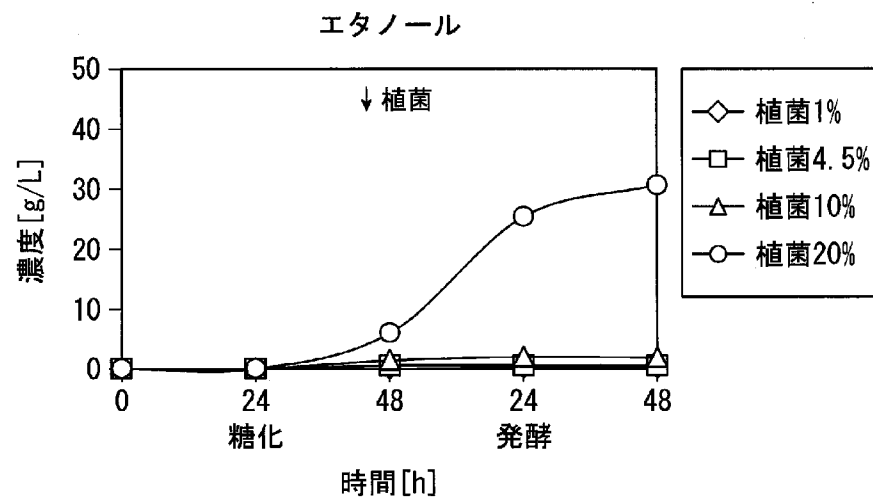
[図3B]



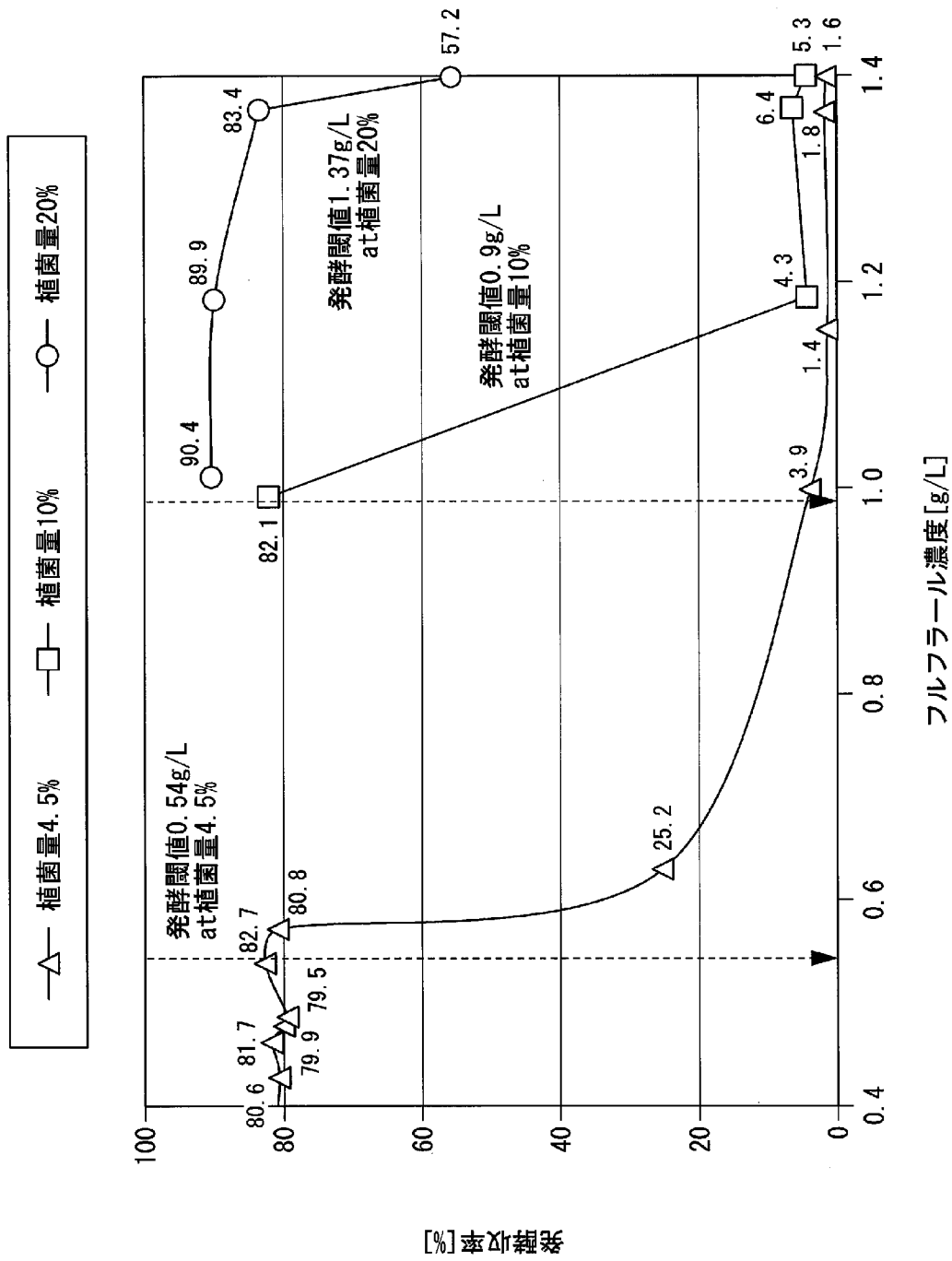
[図3C]



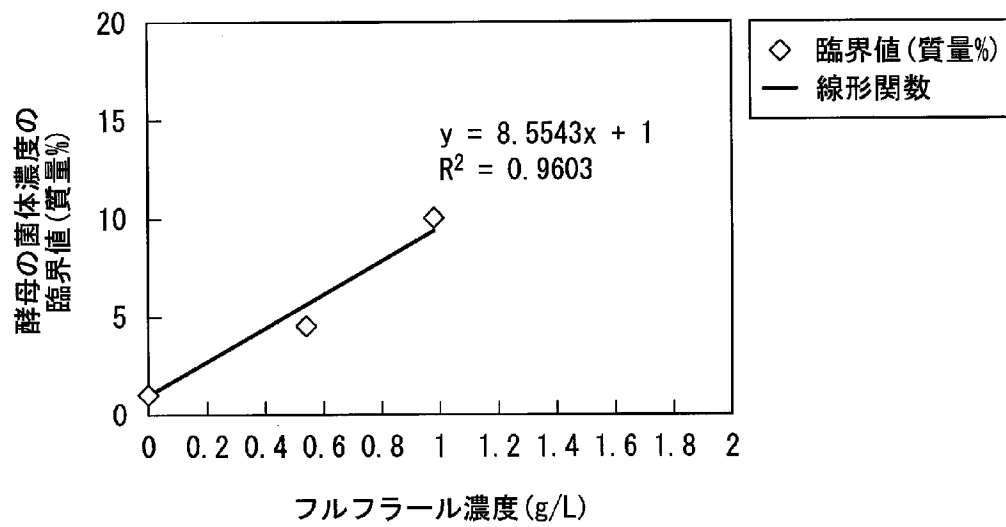
[図3D]



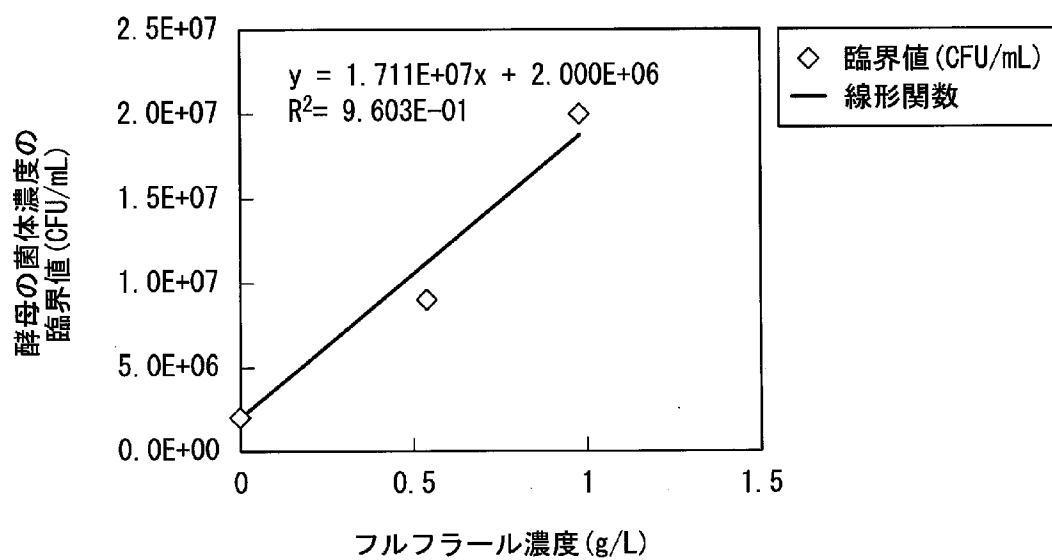
[図4]



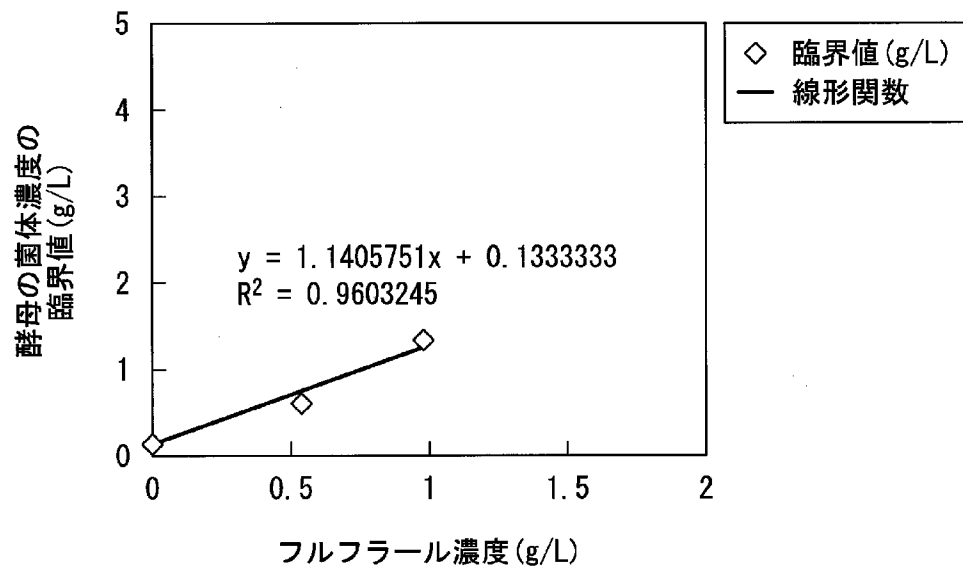
[図5A]



[図5B]



[図5C]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/000099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/06(2006.01)i, C12N1/16(2006.01)i, C12P1/00(2006.01)i, C12P7/10(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P7/06, C12N1/16, C12P1/00, C12P7/10

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-235729 A (Nippon Steel Engineering Co., Ltd.), 06 December 2012 (06.12.2012), (Family: none)	1-4
A	JP 2014-176351 A (Cosmo Oil Co., Ltd.), 25 September 2014 (25.09.2014), (Family: none)	1-4
A	JP 2015-107088 A (Akita-Ken), 11 June 2015 (11.06.2015), (Family: none)	1-4
A	JP 2011-167096 A (Kobe University), 01 September 2011 (01.09.2011), (Family: none)	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 March 2017 (27.03.17)

Date of mailing of the international search report
04 April 2017 (04.04.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/000099

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/110374 A1 (Toray Industries, Inc.), 11 September 2009 (11.09.2009), & US 2011/0008826 A1 & EP 2251427 A1	1-4
A	OLIVA JM. et al., Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of Kluyveromyces marxianus, Process Biochemistry, 2006, vol.41, p.1223-1228	1-4
A	TOFIGHI A. et al., Inhibitory Effect of High Concentrations of Furfural on Industrial Strain of Saccharomyces cerevisiae, Int. J. Environ. Res., 2010, vol.4, no.1, p.137-142	1-4
A	TAHERZADEH MJ. et al., Inhibition Effects of Furfural on Aerobic Batch Cultivation of Saccharomyces cerevisiae Growing on Ethanol and/or Acetic Acid, J. Biosci. Bioeng., 2000, vol.90, no.4, p.374-380	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/06(2006.01)i, C12N1/16(2006.01)i, C12P1/00(2006.01)i, C12P7/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/06, C12N1/16, C12P1/00, C12P7/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2012-235729 A (新日鉄エンジニアリング株式会社) 2012. 12. 06, (ファミリーなし)	1-4
A	JP 2014-176351 A (コスモ石油株式会社) 2014. 09. 25, (ファミリーなし)	1-4
A	JP 2015-107088 A (秋田県) 2015. 06. 11, (ファミリーなし)	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 03. 2017

国際調査報告の発送日

04. 04. 2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

福岡 信子

4 N

3539

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2011-167096 A (国立大学法人神戸大学) 2011. 09. 01, (ファミリーなし)	1-4
A	WO 2009/110374 A1 (東レ株式会社) 2009. 09. 11, & US 2011/0008826 A1 & EP 2251427 A1	1-4
A	OLIVA JM. et al., Effects of acetic acid, furfural and catechol combinationson ethanol fermentation of Kluyveromyces marxianus, Process Biochemistry, 2006, vol.41, p.1223-1228	1-4
A	TOFIGHI A. et al., Inhibitory Effect of High Concentrations of Furfural onIndustrial Strain of Saccharomyces cerevisiae, Int. J. Environ. Res., 2010, vol.4, no.1, p.137-142	1-4
A	TAHERZADEH MJ. et al., Inhibition Effects of Furfural on Aerobic Batch Cultivation of Saccharomyces cerevisiae Growing on Ethanol and/or Acetic Acid, J. Biosci. Bioeng., 2000, vol.90, no.4, p.374-380	1-4