

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6501822号
(P6501822)

(45) 発行日 平成31年4月17日 (2019. 4. 17)

(24) 登録日 平成31年3月29日 (2019. 3. 29)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 7/16 (2006. 01)

C 1 2 P 7/16

C 1 2 P 7/64 (2006. 01)

C 1 2 P 7/64

C 1 2 N 1/20 (2006. 01)

C 1 2 N 1/20

D

C 1 2 N 1/22 (2006. 01)

C 1 2 N 1/20

F

C 1 2 N 1/00 (2006. 01)

C 1 2 N 1/22

請求項の数 18 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-101673 (P2017-101673)

(22) 出願日 平成29年5月23日 (2017. 5. 23)

(62) 分割の表示 特願2014-548924 (P2014-548924)
の分割

原出願日 平成24年12月20日 (2012. 12. 20)

(65) 公開番号 特開2017-192388 (P2017-192388A)

(43) 公開日 平成29年10月26日 (2017. 10. 26)

審査請求日 平成29年6月14日 (2017. 6. 14)

(31) 優先権主張番号 61/579, 552

(32) 優先日 平成23年12月22日 (2011. 12. 22)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 61/579, 559

(32) 優先日 平成23年12月22日 (2011. 12. 22)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 512175199

ザイレコ、インコーポレイテッド

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 O
1880、ウェイク フィールド、360
オーデュボン ロード

(74) 代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74) 代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74) 代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72) 発明者 メドフ、マーシャル

アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 O
1801、ウォーバン、ユニット エル、
271 セーラム ストリート

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオマス処理

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

溶媒を製造する方法であって、

(a) 糖を含む溶液を産生するためにセルロース系またはリグノセルロース系バイオマスを糖化することと、

(b) 前記糖溶液を処理し、糖溶液中に存在する他の糖に対するフルクトースの濃度を増大させることによってフルクトース濃度を増大させることと、

(c) 前記増大したフルクトースの糖溶液を微生物と接触させることと、

を含み、

前記微生物が糖の1つまたはそれ以上を溶媒へと添加し得るのに効果的な条件を維持する一方で、糖の1つまたはそれ以上の代謝により微生物が脂質を産生できるようにし、前記脂質が溶媒の毒性作用から微生物を保護し、

前記微生物がクロストリジウム (Clostridium) 種の菌株を含む、

方法。

【請求項 2】

前記糖の少なくとも一部分が異性化されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記糖化されたセルロース系またはリグノセルロース系バイオマスがキシロースイソメラーゼと接触される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

前記セルロース系またはリグノセルロース系バイオマス进行处理してその糖化に対する抵抗性を減少させるための処理方法に供される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記処理方法が、電子、超音波処理、酸化、熱分解、水蒸気爆砕、化学処理、機械的処理、凍結粉碎およびその組合せによる衝撃からなる群より選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記処理方法が電子による衝撃である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記セルロース系またはリグノセルロース系バイオマスが、紙、紙製品、紙くず、製紙パルプ、着色紙、塗工紙、コート紙、充填紙、雑誌、印刷物、プリンタ用紙、ポリコート紙、カード用紙、厚紙、板紙、ワタ、木材、削片板、林業廃棄物、おがくず、アスペン材、木片、草木、スイッチグラス、ススキ、コードグラス、クサヨシ、穀物残渣、米穀、オートムギ殻、コムギもみ殻、オオムギ殻、農業廃棄物、貯蔵牧草、カノーラわら、コムギわら、オオムギわら、オートムギわら、米わら、黄麻、大麻、亜麻、竹、サイザル麻、マニラ麻、トウモロコシ穂軸、トウモロコシ茎葉、ダイズ茎葉、トウモロコシ繊維、アルファルファ、乾草、ヤシ毛、糖加工残渣、バガス、テンサイパルプ、リュウゼツランバガス、藻、海藻、堆厩肥、下水、アラカチャ、ソバ、バナナ、オオムギ、キャッサバ、クズ、アンデスカタバミ、サゴ、モロコシ、ジャガイモ、サツマイモ、タロイモ、ヤマノイモ、マメ、ソラマメ、レンズマメ、エンドウマメ、産業廃棄物およびそのいずれかの組合せからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記微生物がクロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニカム (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記微生物がクロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニカム (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) 株 ATCC 27021 である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記微生物がクロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニカム (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) 株 ATCC 27022 である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記溶媒が有機溶媒を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記溶媒がアルコールを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記アルコールがイソブタノールまたは n - ブタノールを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

糖を含む前記糖化されたセルロース系またはリグノセルロース系バイオマスがフルクトースを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記脂質がトリグリセリドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記脂質が解糖経路を介して生成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記トリグリセリドが D - グリセルアルデヒド経路を介し、グリセロール 3 - リン酸のエステル化によって産生される、請求項 15 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

微生物のための飼料ベースの栄養素パッケージを供給することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

(関連出願の相互参照)

本願は 2011 年 12 月 22 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 579 , 559 号の利益を主張するものである。上記出願の開示全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

10

【0002】

本発明はバイオマスを有用な生成物に変換する方法に関する。具体的には、本発明はフルクトースなどの糖からブタノールなどの生成物を製造することに関する。

【背景技術】**【0003】**

石油に対する需要の増加に伴い、バイオ燃料および生化学物質を製造するための再生可能な供給原料に対しても関心が集まっている。このような製造工程にリグノセルロース系バイオマスをその供給原料として用いることが 1970 代から研究されている。リグノセルロース系バイオマスは豊富に存在し、再生可能であり、国内で産出され、かつ食品産業での利用と競合しないため、魅力的なものである。

20

【0004】

今日では、農業残渣、木材バイオマス、都市廃棄物、油糧種子 / 油粕および海藻のようないくつかの例を含め、多数の有望なリグノセルロース系供給原料が利用可能である。現時点では、このような原料は動物飼料やバイオコンポスト原料として使用されるか、熱電併給施設で燃やされるか、埋め立てられる。

【0005】

リグノセルロース系バイオマスは、植物細胞壁が硬くて密集した構造をもつことから、分解されにくい。この構造にはヘミセルロース基質に埋め込まれた結晶セルロース繊維が含まれており、リグニンがこれを取り囲んでいる。この密集した基質は、酵素をはじめとする化学的、生化学的、生物学的プロセスの作用を受けにくくなっている。セルロース系バイオマス原料（例えば、実質的リグニンがすべて除去されたバイオマス原料）の方が酵素をはじめとする変換プロセスを受けやすいが、それでも、天然に存在するセルロース系原料を加水分解酵素と接触させたときの収率が低い（理論的収率に比べて）場合が多い。リグノセルロース系バイオマスはこれよりさらに酵素の攻撃を受けにくい。さらに、各タイプのリグノセルロース系バイオマスにはそれ独自のセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの組成がある。

30

【0006】

リグノセルロース系バイオマスから構造型炭水化物を抽出する方法が多数試みられてきたが、これらの方法は費用がかかりすぎるか、収率が低すぎるか、得られた生成物に望ましくない化学物質が残るか、糖を分解するだけであるかのいずれかである。

40

【0007】

再生可能なバイオマス源に由来する単糖類が石油をはじめとする化石原料の代わりになる、これらを補う、あるいはこれに代わることによって、化学産業および燃料産業の基盤となる可能性も考えられる。しかし、このような単糖類を大量にかつ許容範囲にある純度および価格で利用できるようにする技術を開発する必要がある。

【発明の概要】**【0008】**

バイオマスの糖化の効率を増大させる方法が本明細書に提供される。具体的には、酵素反応ネガティブフィードバック阻害を回避することによって効率性を得ることができる。

【0009】

50

一態様では、本発明は生成物を製造する方法を特徴とし、この方法は、バイオマスの糖化によってフルクトースを製造することと、糖化したバイオマスを異性化剤と接触させることと、フルクトースを微生物および/または酵素で生成物に変換することとを含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、バイオマスはセルロース系またはリグノセルロース系原料を含む。セルロース系またはリグノセルロース系バイオマスバイオマスを、例えば、電子による衝撃、超音波処理、酸化、熱分解、水蒸気爆砕、化学処理、機械的処理、凍結粉碎およびその組合せからなる群より選択される処理方法を用いて処理し、その糖化に対する抵抗性を減少させる。

【0011】

異性化剤は、例えば、イソメラーゼ、例えばキシロースイソメラーゼであり得る。

【0012】

いくつかの実施形態では、セルロース系またはリグノセルロース系バイオマスバイオマスは、紙、紙製品、紙くず、製紙パルプ、着色紙、塗工紙、コーテッド紙、充填紙、雑誌、印刷物、プリンタ用紙、ポリコート紙、カード用紙、厚紙、板紙、ワタ、木材、削片板、林業廃棄物、おがくず、アスペン材、木片、草木、スイッチグラス、ススキ、コードグラス、クサヨシ、穀物残渣、米穀、オートムギ殻、コムギもみ殻、オオムギ殻、農業廃棄物、貯蔵牧草、カノーラわら、コムギわら、オオムギわら、オートムギわら、米わら、黄麻、大麻、亜麻、竹、サイザル麻、マニラ麻、トウモロコシ穂軸、トウモロコシ茎葉、ダイズ茎葉、トウモロコシ繊維、アルファルファ、乾草、ヤシ毛、糖加工残渣、バガス、テンサイパルプ、リュウゼツランバガス、藻、海藻、堆厩肥、下水、アラカチャ、ソバ、バナナ、オオムギ、キャッサバ、クズ、アンデスカタバミ、サゴ、モロコシ、ジャガイモ、サツマイモ、タロイモ、ヤマノイモ、マメ、ソラマメ、レンズマメ、エンドウマメ、産業廃棄物およびそのいずれかの組合せからなる群より選択される。

【0013】

いくつかの場合には、微生物はクロストリジウム (*Clostridium*) 種の株を含み、例えば、微生物は *C. サッカロペルブチルアセトニカム* (*C. saccharoperbutylacetonicum*)、例えば、*C. サッカロペルブチルアセトニカム* (*C. saccharoperbutylacetonicum*) の ATCC 27021 株または *C. サッカロペルブチルアセトニカム* (*C. saccharoperbutylacetonicum*) の ATCC 27022 株であり得る。

【0014】

生成物は溶媒、例えば、イソブタノールまたは *n*-ブタノールなどのアルコールを含み得る。

【0015】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、セルロース系またはリグノセルロース系原料に由来するフルクトースなどの糖からブタノールなどの生成物を製造するのが一般に好ましいが、他の入手源由来のフルクトースを使用してもよい。

【0016】

本発明は「発明の概要」に開示される実施形態に限定されるものではなく、請求項によって定められる本発明の趣旨と範囲を逸脱しない修正を包含することが意図されることを理解するべきである。

【0017】

上記の内容は、本発明の実施形態の例を、同じ参照文字が同じ部分を異なる視点から表す添付図面に図示し、さらに具体的に説明することにより明らかになる。図面は拡大を必要とするものではなく、本発明の実施形態を図示することに重点を置いたものである。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】 酵素によるセルロースからグルコースへの加水分解を示す図である。セルロース基質 (A) がエンドセルラーゼ (i) によってセルロース (B) に変換され、これがエキ

10

20

30

40

50

ソセルラーゼ (i i) によってセロピオース (C) に変換され、これがセロピアーゼ (ベータ - グルコシダーゼ) (i i i) によってグルコース (D) に変換される。

【図 2】バイオマス供給原料から 1 つ以上の生成物への変換を示す流れ図である。供給原料を物理的に前処理し (例えば、大きさを減少させるため) (2 0 0)、任意選択で処理してその抵抗性を減少させ (2 1 0)、糖化して糖溶液を生成し (2 2 0)、この溶液を製造プラントに輸送し (2 3 0) (例えば、パイプライン、鉄道車両によって) (または輸送中に糖化を実施する場合、供給原料、酵素および水を輸送する)、糖化した供給原料をバイオプロセス処理して所望の生成物 (例えば、アルコール) を生成し (2 4 0)、この生成物を例えば蒸留によってさらに処理し、最終生成物を生成する (2 5 0)。リグニン含有量を測定すること (2 0 1) または処理パラメータを設定または調節すること (2 0 5) によって、抵抗性の処理を改変してもよい。供給原料を培地および酵素と混合することによって (2 2 1)、供給原料の糖化 (2 2 0) を改変してもよい。

10

【図 3】グルコースおよびフルクトースの代謝の準備段階を示す図である。

【図 4】フルクトースが代謝されるときにトリグリセリドが生成する代謝経路を示す図である。

【図 5】ブタノール生成微生物の代謝経路を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 9 】

本発明は、バイオマス原料 (例えば、バイオマス原料またはバイオマス由来原料) を処理し、のちに生成物の製造に用いることができるフルクトースなどの糖を得る方法に関する。例えば、糖、例えばフルクトースを発酵させて、アルコール、例えばブタノール、例えばイソブタノールまたは n - ブタノールなどの溶媒を生成することができる。このほか酪酸を生成することができる。本発明者らは、いくつかの場合には、フルクトース溶液の方がグルコース溶液よりも速く高い収率でアルコールに発酵し得ることを発見した。

20

【 0 0 2 0 】

いかなる特定の理論にも束縛されるものではないが、溶媒 (例えば、ブタノール) などの生成物には溶媒生成生物に対して毒性があり、フルクトースなどの一部の糖を代謝することにより保護基質 (例えば、トリグリセリド) が生成し、グルコース代謝の程度または速度が増大すると考えられている。溶媒の作用としては、細胞膜と相互作用して膜流動性を崩壊させるという説が提唱されている。ブタノールなどの溶媒にはほかにも、膜に対するカオトロピック効果があると考えられている。カオトロピック物質は、非共有結合力によって媒介される分子内相互作用の安定化を阻害する。上に挙げた作用により、溶媒が栄養素の能動輸送、膜結合酵素の活性およびグルコース取込みを阻害し得る。ほかにも溶媒により、膜 pH 勾配が部分的にまたは完全に消失したり、細胞内の pH および ATP 濃度が低下したりすることがある。溶媒の増加にตอบสนองして、細胞が脂質組成を調節して流動性を維持しようとすることがある (Christopher A. Tomas, J. Bacteriol. 186: 2006 - 2018 (2004))。フルクトース代謝がトリグリセリドなどの脂質の増加を促進し得る。

30

【 0 0 2 1 】

いかなる特定の理論にも束縛されるわけではないが、溶媒生成に対するフルクトースなどの糖の有用性は、解糖の調節と関連があり得ると考えられている。調節の目的は、生物体の増殖および健康状態を調節することである。自然界にはフルクトースなどの一部の糖がグルコースほど豊富に存在しないことから、解糖を抑制する調節機序も発達していないと考えられている。このことにより、生物体によるこのようなフルクトースなどの糖の摂取および代謝が高くなる可能性がある。

40

【 0 0 2 2 】

例えば、図 1 に示されるように、糖化の過程では、最初にセルロース基質 (A) がランダムな位置でエンドグルカナーゼ (i) によって加水分解され、オリゴマー中間体 (例えば、セルロース) (B) が生成する。次いで、この中間体がセロピオヒドロラーゼなどのエキソ分解性のグルカナーゼ (i i) の基質となり、セルロースポリマーの末端からセロ

50

ピオースが生成する。セロピオースは水溶性の 1, 4 結合したグルコース二量体である。最後にセロピアーゼ (i i i) がセロピオース (C) を分解しグルコース (D) が生じる。したがって、セルロースの結晶部分を攻撃し、エキソセルラーゼがセロピオースを生成する効果を増大させるにはエンドグルカナーゼが特に効果的であり、それにはセロピオースがグルコースを生成する特異性が必要である。したがって、セルロース基質の性質および構造に応じて、異なる 3 種類の酵素の量およびタイプを修正することが必要であり得ることは明らかである。

【 0 0 2 3 】

アルコール、例えばブタノールを製造する工程を図 2 に示す。アルコールを製造する工程には、例えば、任意選択で供給原料を機械的に処理し、例えばその大きさを減少させること (2 0 0)、この処理の前および/または後に、任意選択で供給原料を別の物理的処理方法で処理し、その抵抗性を減少させること (2 1 0)、次いで、酵素複合体を用いて供給原料を糖化し、糖溶液を生成すること (2 2 0) が含まれ得る。ほかに、この方法には任意選択で、例えばパイプライン、鉄道車両、トラックまたは荷船によって、溶液 (または供給原料、酵素および水 (輸送中に糖化を実施する場合)) を製造プラントまで輸送すること (2 3 0) が含まれ得る。いくつかの場合には、糖化した供給原料をさらにバイオプロセス処理して (例えば、発酵させて)、所望の生成物、例えばアルコールを生成する (2 4 0)。いくつかの実施形態では、得られたこの生成物を例えば蒸留によってさらに処理し、最終生成物を生成する (2 5 0)。供給原料の抵抗性を減少させる方法の 1 つが、供給原料の電子衝撃によるものである。必要に応じて、2010 年 8 月 12 日に公開された Medoff および Masterman による米国特許出願公開第 2010/0203495 (A1) 号 (開示全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているように、工程の様々な段階で供給原料のリグニン含有量を測定する段階 (2 0 1) およびこの測定に基づいてパラメータを設定または調節する段階 (2 0 5) を実施してもよい。また、供給原料を培地および酵素と混合することによって (2 2 1)、供給原料の糖化 (2 2 0) を改変してもよい。

【 0 0 2 4 】

これより、上で図 2 を参照しながら論じた方法の諸段階についてさらに詳細に論じ、次いで、この工程で使用する原料について論じる。

【 0 0 2 5 】

フルクトースから有用な生成物への発酵

糖化または糖化とそれに続く異性化によって生成されたフルクトースを発酵させて、アルコール、例えば、ブタノールまたは酪酸を生成することができる。

【 0 0 2 6 】

図 3 は、フルクトースおよびグルコースの解糖の準備段階を示している。発酵には多相性の解糖反応が含まれ、その準備段階でグリセルアルデヒド 3 - リン酸が生成する。図 3 に示し、のちに詳細に論じるように、グリセルアルデヒド 3 - リン酸がフルクトースから生成する方がグルコースから生成するよりも反応の数が少なく、これがフルクトース発酵にみられる効率の方がグルコース発酵よりも高いことの一因となっている。

【 0 0 2 7 】

図 3 のグルコース経路を参照すると、ヘキソキナーゼと ATP の作用によりグルコースがグルコース 6 - リン酸に変換される。次いで、ホスホヘキソイソメラーゼによりグルコース 6 - リン酸がフルクトース 6 - リン酸に異性化された後、さらにホホフルクトキナーゼ (p h o p h o f r u c t o k i n a s e) と ATP の作用によりフルクトース 1, 6 - リン酸に変換される。この時点で、二リン酸化された糖がフルクトース二リン酸アルドラーゼによりジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒド 3 - リン酸に分解される。ジヒドロキシアセトンリン酸はトリオースリン酸イソメラーゼの作用によりグリセルアルデヒド 3 - リン酸に異性化される。

【 0 0 2 8 】

再び図 3 を参照すると、フルクトースの解糖には数種類の経路がある。ヘキソキナーゼ

10

20

30

40

50

はグルコースと強く反応するが、フルクトースに対する親和性は低い。したがって、フルクトースはヘキソキナーゼとATPによりグルコース6-リン酸にリン酸化されるが、この経路による解糖への関与はきわめて低いと予想される。これよりも可能性の高い経路では、フルクトキナーゼとATPの作用によるフルクトースのリン酸化から始まってフルクトース1-リン酸が生じる。次いで、フルクトース1-リン酸アルドラーゼによりフルクトース1-リン酸がジヒドロキシアセトンリン酸とD-グリセルアルデヒドに分解される。グルコース経路と同じように、トリオースリン酸イソメラーゼによりジヒドロキシアセトンリン酸がグリセルアルデヒド3-リン酸に異性化される。D-グリセルアルデヒドはトリオースキナーゼとATPによりグリセルアルデヒド3-リン酸に変換される。

【0029】

10

発酵に使用する微生物はブタノール、例えば、イソブタノールまたはn-ブタノールが生成するよう選択するのが好ましい。適切な微生物としては、のちの原料の節で論じる微生物が挙げられる。多くのブタノール生成生物が絶対嫌気性菌である。

【0030】

図4に示すように、フルクトースにより解糖の副生成物としてトリグリセリド(triglyceride)の生成が進むことがある。図4のトリグリセリド生成の最終段階では、グリセロール3-リン酸と脂肪酸との間でエステル化が起こる。脂肪酸はグリセルアルデヒド3-リン酸から生成されるものであり、その生成については上に記載したが、複数の中間体はここに掲載していない。グリセロール3-リン酸の生成が図4に示されているが、これはグリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼがジヒドロキシアセトンリン酸に作用することによって起こり得るものである。またこの生成は、グリセロールデヒドロゲナーゼがD-グリセルアルデヒドに作用してグリセロールが生成することによっても起こり得るものであり、グリセロールは次いでグリセロキナーゼとATPによりリン酸化され、グリセロール3-リン酸になる。グリセロール3-リン酸の生成は、グルコースからジヒドロキシアセトンリン酸中間体を経ることが可能であるが、D-グリセロールアルデヒドを経るまた別の経路が存在し、これはフルクトースを経てのみ利用可能な経路であり、この中間体がさらに多く生成し得るものである。グリセロール3-リン酸のエステル化により生成したトリグリセリドは、ブタノールの毒性作用からブタノール生成生物を保護することによって、ブタノール生成を補助し得る。

20

【0031】

30

図5は、ブタノール生成生物、クロストリジウム・アセトブチリシウム(*Clostridium acetobutylicum*)の発酵経路を示す。典型的な発酵では、細胞は誘導期の後に指数増殖期に入る。この増殖相では、最初に酪酸および酢酸が細胞増殖に必要なATPとともに生成する。この相は酸発酵とも呼ばれる。定常期付近および定常期になると、培養物の代謝が主要な溶媒生成物としてアセトン、ブタノールおよびエタノールを生成する方向へ移行する。この段階は溶媒生成相としても知られている。溶媒生成相の期間およびその後、細胞は栄養型になり、死滅し、かつ/または孢子を形成する。図5では、反応が太い矢印で表され、R1~R19の記号が付されている。酸生成反応はR9およびR18(それぞれPTA-AKおよびPTB-BKによって触媒される)であり、それぞれ酢酸および酪酸を生じる。この2つの酸はR7およびR17(R9およびR18と逆の経路)を経て再同化されるか、R8およびR15(CoATによって触媒される)を経てアセチルCoAおよびブチリルCoAに直接変換される。溶媒生成反応はR11、R16およびR19(それぞれAAD、AAD CおよびBDHによって触媒される)であり、それぞれエタノール、酢酸およびブタノールを生じる。R14はBHB D、CROおよびBCDによって触媒される反応からなるひとまとまりの反応である(<http://www.biomedcentral.com/1752-0509/5/S1/S12> "An improved kinetic model for the acetone-butanol-ethanol pathways of *Clostridium acetobutylicum* and model-based perturbation analysis")。

40

50

【 0 0 3 2 】

発酵の最適 pH は pH 4 ~ 7 前後である。典型的な発酵時間は 2 0 ~ 4 0 の範囲の温度で約 2 4 ~ 1 6 8 時間であるが、好熱性微生物はこれよりも高い温度を好む。嫌気性生物では、無酸素下で、例えば、 N_2 、 Ar 、 He 、 CO_2 またはその混合物などの不活性ガスで覆って発酵を実施するのが好ましい。さらに、発酵の一部の時間または発酵時間全体を通して、タンクに不活性ガスを流し混合物にパージし続けてもよい。

【 0 0 3 3 】

発酵中に噴流混合をはじめとする攪拌を用いてもよく、いくつかの場合には、糖化と発酵を同じタンク内で実施する。いくつかの実施形態では、機械的混合を一切行わずに発酵を実施する。

10

【 0 0 3 4 】

糖化および / または発酵中に栄養素、例えば、米国特許出願第 6 1 / 3 6 5 , 4 9 3 号および米国特許第 6 , 3 5 8 , 7 1 7 号 (開示全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている飼料ベースの栄養素パッケージを添加してもよい。

【 0 0 3 5 】

米国特許出願第 1 2 / 3 7 4 , 5 4 9 号および国際公開第 2 0 0 8 / 0 1 1 5 9 8 号に記載されているように、移動式の発酵槽を用いてもよい。同様に、糖化設備が移動式のものであってもよい。さらに、輸送中に糖化および / または発酵の一部または全部を実施してもよい。

【 0 0 3 6 】

20

好適な発酵剤

発酵に使用する微生物 (1 種または複数種) は天然の微生物および / または組換え微生物であり得る。例えば、微生物は細菌、例えば、セルロース分解細菌、真菌、例えば酵母、植物または原生生物、例えば藻、原生動物または真菌様原生生物、例えば粘菌であり得る。生物体に適合性があれば、生物体の混合物を用いてもよい。

【 0 0 3 7 】

適切な発酵微生物は、フルクトース、好ましくはこれに加えて他の糖、例えばグルコース、キシロース、アラビノース、マンノース、ガラクトース、オリゴ糖または多糖などをアルコール、例えばブタノールまたはブタノール誘導体に変換する能力を有するものである。

30

【 0 0 3 8 】

微生物の例としては、特に限定されないが、次に挙げるクロストリジウム (*Clostridium*) 菌株が挙げられる :

【表 1】

クロストリジウム (*Clostridium*) 菌株の例

C. サッカロペルブチルアセトニカム (<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>)	ATCC 27021	10
C. サッカロペルブチルアセトニカム (<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>)	ATCC 27022	
C. サッカロブチリカム (<i>C. saccharobutylicum</i>)	ATCC BAA-117	
C. プニセウム (<i>C. puniceum</i>)	ATCC 43978	
C. ベイジェリンキイ (<i>C. beijerinckii</i>)	ATCC 6014	
C. アセトブチリカム (<i>C. acetobutylicum</i>)	NRRL B-527	20
C. アセトブチリカム (<i>C. acetobutylicum</i>)	NRRL B-591	
C. ベイジェリンキイ (<i>C. beijerinckii</i>)	NRRL B593	
C. アセトブチリカム (<i>C. acetobutylicum</i>)	NRRL B-596	
C. ベイジェリンキイ (<i>C. beijerinckii</i>)	ATCC 11914	
C. アセトブチリカム (<i>C. acetobutylicum</i>)	DSM 1732	30
C. ベイジェリンキイ (<i>C. beijerinckii</i>)	NRRL B-592	
C. アセトブチリカム (<i>C. acetobutylicum</i>)	ATCC 3625	
C. サッカロブチリカム (<i>C. saccharobutylicum</i>)	NRRL B-643	
C. アセトブチリカム (<i>C. acetobutylicum</i>)	NRRL B595	
C. ロゼウム (<i>C. roseum</i>)	NRRL 17797	40
C. アセトブチリカム (<i>C. acetobutylicum</i>)	ATCC 4259	
C. アウランティブチリカム (<i>C. aurantibutyricum</i>)	DSM 793	
C. ベイジェリンキイ (<i>C. beijerinckii</i>)	ATCC 309058	
C. ファルシネウム (<i>C. felsineum</i>)	ATCC 17788	
C. サッカロブチリカム (<i>C. saccharobutylicum</i>)	NRRL B-643	

【0039】

キシロースイソメラーゼ

キシロースイソメラーゼ (ES5.3.1.5) は D - キシロースと D - キシルロースの間を行き来する化学反応を触媒する酵素である。この酵素はほかにも、分類上グルコースイソメラーゼおよび D - キシロースアルドース - ケトースイソメラーゼとしても知られており、イソメラーゼ、具体的にはアルドースとケトースを相互に変換する分子内酸化還

元酵素のファミリーに属する。よく用いられる他の名称としては、D - キシロースイソメラーゼ、D - キシロースケトイソメラーゼおよびD - キシロースケトール - イソメラーゼが挙げられる。この酵素は、ペントースとグルクロン酸の相互転換およびフルクトースとマンノースの代謝に関与する。同酵素は工業的には、高フルクトースコーンシロップ製造の際にグルコースをフルクトースに変換するのに用いられる。同酵素は「グルコースイソメラーゼ」と呼ばれることもある。本明細書では「キシロースイソメラーゼ」と「グルコースイソメラーゼ」を互換的に使用する。in vitroでは、グルコースイソメラーゼはグルコースとフルクトースの相互転換を触媒する。in vivoでは、グルコースイソメラーゼはキシロースとキシルロースの相互転換を触媒する。

【0040】

数種類の酵素がキシロースイソメラーゼであると考えられている。1種類目はシュードモナス・ハイドロフィラ (*Pseudomonas hydrophila*) によって産生されるものである。この酵素はグルコースに対する親和性がキシロースの160分の1であるが、グルコースの存在下でフルクトースの量を増大させるのに有用である。2種類目の酵素はエシェリキア・インテルメディア (*Escherichia intermedia*) にみられるものである。この酵素はホホグルコース (phosphoglucose) イソメラーゼ (EC 5.3.1.9) であり、ヒ酸の存在下でのみ非リン酸化糖を異性化することができる。グルコースイソメラーゼ (EC 5.3.1.6) はバチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) AIから単離することができる酵素で、NAD結合型であり、グルコースに特異的である。ほぼ同じ活性を有する別のグルコースイソメラーゼがパラコロバクテリウム・アエロジェナイデス (*Paracolibacterium aerogenoides*) から単離されている。ヘテロ乳酸菌によって産生されるグルコースイソメラーゼは誘導物質としてキシロースが必要とし、高温に比較的不安定である。キシロースイソメラーゼ (EC 5.3.1.5) はNAD⁺やATPなどの高価な補因子を必要とせず、熱に比較的安定であることから、商業的応用に最も有用なものである。

【0041】

グルコースイソメラーゼは通常、細胞間で産生されるが、グルコースイソメラーゼの細胞外分泌に関する報告が知られている。使用されるこの酵素は、特に限定されないが、次に挙げる多種の細菌から単離することができる：アクチノミセス・オリボシネレウス (*Actinomyces olivocinereus*)、アクチノミセス・ファエオクロモゲネス (*Actinomyces phaeochromogenes*)、アクチノプラネス・ミズーリエンシス (*Actinoplanes missouriensis*)、アエロバクター・アエロゲネス (*Aerobacter aerogenes*)、アエロバクター・クロアカエ (*Aerobacter cloacae*)、アエロバクター・レバニカム (*Aerobacter levanicum*)、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 種、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・メガバクテリウム (*Bacillus megabacterium*)、バチルス・コアグランス (*Bacillus coagulans*)、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 種、ブレビバクテリウム・インセルタム (*Brevibacterium incertum*)、ブレビバクテリウム・ペントソアミノアシディカム (*Brevibacterium pentosoaminoacidicum*)、チャイニア (*Chainia*) 種、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 種、コルトバクテリウム・ヘルボラム (*Cortobacterium helvolum*)、エシェリキア・フロインディ (*Escherichia freundii*)、エシェリキア・インテルメディア (*Escherichia intermedia*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、フラボバクテリウム・アルボレセンス (*Flavobacterium arborescens*)、フラボバクテリウム・デボランス (*Flavobacterium devorans*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus bre*

10

20

30

40

50

vis)、ラクトバチルス・ブフネリ(Lactobacillus buchneri)、ラクトバチルス・ファーマンティ(Lactobacillus fermenti)、ラクトバチルス・マンニトポエウス(Lactobacillus mannito poeus)、ラクトバチルス・ゴヤニイ(Lactobacillus gayoni i)、ラクトバチルス・プランタルム(Lactobacillus plantaru m)、ラクトバチルス・リコペルシシ(Lactobacillus lycopers ici)、ラクトバチルス・ペントーサス(Lactobacillus pentos us)、リューコノストック・メセンテロイデス(Leuconostoc mesen teroides)、ミクロビスポラ・ロゼア(Microbispora rosea)、ミクロエロボスポリア・フラベア(Microellobosporia flav ea)、ミクロモノスポラ・ケルラ(Micromonospora coerulea)、マイコバクテリウム(Mycobacterium)種、ノカルジア・アステロイデス(Nocardia asteroides)、ノカルジア・コラリア(Nocardia corallia)、ノカルジア・ダソンビレイ(Nocardia dasson villei)、パラコロバクテリウム・アエロジェナイデス(Paracolobac terium aerogenoides)、シュードノカルジア(Pseudonoc ardia)種、シュードモナス・ハイドロフィラ(Pseudomonas hyd rophila)、サルシナ(Sarcina)種、スタフィロコッカス・ビビラ(St aphylococcus bibila)、スタフィロコッカス・フラボビレンス(St aphylococcus flavovirens)、スタフィロコッカス・エキナ 20 タス(Staphylococcus echinatus)、ストレプトコッカス・ア クロモゲネス(Streptococcus achromogenes)、ストレプト コッカス・ファエオクロモゲネス(Streptococcus phaeochrom ogenes)、ストレプトコッカス・フラクリエ(Streptococcus fr acliae)、ストレプトコッカス・ロゼオクロモゲネス(Streptococcu s roseochromogenes)、ストレプトコッカス・オリバセウス(Str eptococcus olivaceus)、ストレプトコッカス・カリフォルニコス (Streptococcus californicos)、ストレプトコッカス・ベ ヌセウス(Streptococcus venuceus)、ストレプトコッカス・バ 30 ージニアル(Streptococcus virginial)、ストレプトミセス・ オリボクロモゲネス(Streptomyces olivochromogenes)、 ストレプトコッカス・ベネザエリエ(Streptococcus venezael ie)、ストレプトコッカス・ウェドモレンシス(Streptococcus wed morensis)、ストレプトコッカス・グリセオーラス(Streptococcu s griseolus)、ストレプトコッカス・グラウセセンス(Streptoco ccus glaucescens)、ストレプトコッカス・ビキニエンシス(Str eptococcus bikiniensis)、ストレプトコッカス・ルビギノーサス (Streptococcus rubiginosus)、ストレプトコッカス・アキ ナ 40 タス(Streptococcus achinatus)、ストレプトコッカス・ シンナモンシス(Streptococcus cinnamomensis)、スト レプトコッカス・フラディアエ(Streptococcus fradiae)、スト レプトコッカス・アルバス(Streptococcus albus)、ストレプトコ ッカス・グリセウス(Streptococcus griseus)、ストレプトコッ カス・ヒベンス(Streptococcus hivers)、ストレプトコッカス・ マテンシス(Streptococcus matensis)、ストレプトコッカス・ ムリナス(Streptococcus murinus)、ストレプトコッカス・ニベ 50 ンス(Streptococcus nivers)、ストレプトコッカス・プラテンシ ス(Streptococcus platensis)、ストレプトスポランギウム・ アルバム(Streptosporangium album)、ストレプトスポランギ ウム・オウルガレ(Streptosporangium oulgare)、サーモバ

リスボラ (Thermopolyspora) 種、サーマス (Thermus) 種、キサントモナス (Xanthomonas) 種およびザイモノナス・モビリス (Zymomonas mobilis)。

【0042】

グルコースイソメラーゼは、グルコースをフルクトースに変換するのに溶液中で遊離の状態で使用しても、支持体に固定化して使用してもよい。全細胞または細胞を含まない酵素を固定化することができる。支持構造物は任意の不溶性材料であってよい。支持構造物は陽イオン性、陰イオン性または中性の材料、例えば、ジエチルアミノエチルセルロース、金属酸化物、金属塩化物、金属炭酸塩およびポリスチレンであり得る。固定化は任意の適切な方法で行うことができる。例えば、水などの溶媒中で支持体と全細胞または酵素とを接触させた後、溶媒を除去することによって、固定化を行うことができる。溶媒は任意の適切な方法、例えばろ過、蒸発または噴霧乾燥によって除去することができる。別の例として、全細胞または酵素を支持体ごと噴霧乾燥させるのが効果的な場合がある。

10

【0043】

またグルコースイソメラーゼは、工程中、この酵素を産生する生細胞内に存在していてもよい。例えば、グルコースイソメラーゼ産生細菌を工程中、エタノール発酵細菌と共培養してもよい。あるいは、グルコースイソメラーゼ産生細菌を最初に基質と接触させた後、エタノール産生基質とともに植菌してもよい。

【0044】

またグルコースイソメラーゼは、また別の有用な糖の変換を行う能力も有する細胞内に存在していても、このような細胞から分泌されてもよい。例えば、グルコースイソメラーゼ産生のための遺伝子を含むか発現するようグルコース発酵種に遺伝子改変を施してもよい。

20

【0045】

溶媒の分離

発酵後、得られた液体を任意の有用な方法を用いて精製することができる。例えば、いくつかの有用な方法には蒸留、吸着、液体-液体抽出、パーストラクション、逆浸透、浸透気化およびガストリップングがある（例えば、J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (2009) 36: 1127-1138を参照されたい）。

【0046】

30

バイオマス原料

本明細書で使用される「バイオマス原料」という用語は、リグノセルロース系原料、セルロース系原料、デンプン系原料および微生物系原料を包含する。

【0047】

リグノセルロース系原料としては、特に限定されないが、木材、削片板、林業廃棄物（例えば、おがくず、アスペン材、木片）、草木（例えば、スイッチグラス、ススキ、コードグラス、クサヨシ）、穀物残渣（例えば、米穀、オートムギ殻、コムギもみ殻、オオムギ殻）、農業廃棄物（例えば、貯蔵牧草、カノーラわら、コムギわら、オオムギわら、オートムギわら、米わら、黄麻、大麻、亜麻、竹、サイザル麻、マニラ麻、トウモロコシ穂軸、トウモロコシ茎葉、ダイズ茎葉、トウモロコシ繊維、アルファルファ、乾草、ヤシ毛）、糖加工残渣（例えば、バガス、テンサイパルプ、リュウゼツランバガス）、藻、海藻、堆厩肥、下水およびそのいずれかの組合せが挙げられる。

40

【0048】

いくつかの場合には、リグノセルロース系原料はトウモロコシ穂軸を含む。粉碎または衝撃粉碎したトウモロコシ穂軸を比較的均一な厚さの層になるように広げて照射してもよく、照射後、さらに処理を進めるために培地中に分散させるのが容易になる。回収および収集を容易にするため、いくつかの場合には、トウモロコシ稈、トウモロコシ穀粒を含め、さらにいくつかの場合には植物体の根系も含めたトウモロコシ植物体全体を用いる。

【0049】

トウモロコシ穂軸またはトウモロコシ穂軸含有量の多いセルロース系もしくはリグノセ

50

ルコース系原料の発酵では、追加の栄養素（窒素源、例えば尿素またはアンモニア以外のもの）が不要である点が有利である。

【 0 0 5 0 】

またトウモロコシ穂軸は、粉碎前後でも運搬および分散が容易であり、乾草および草木などの他のセルコース系またはリグノセルコース系原料よりも空気中に爆発性の混合物を生成しにくい。

【 0 0 5 1 】

セルコース系原料としては、例えば、紙、紙製品、紙くず、製紙パルプ、着色紙、塗工紙、コーテッド紙、充填紙、雑誌、印刷物（例えば、本、カタログ、マニュアル、ラベル、カレンダー、グリーティングカード、パンフレット、案内書、新聞紙）、プリンタ用紙、ポリコート紙、カード用紙、厚紙、板紙、セルコース含有量の高いワタなどの原料およびそのいずれかの組合せが挙げられる。例えば、米国特許出願第 1 3 / 3 9 6 , 3 6 5 号（Medoff により 2 0 1 2 年 2 月 1 4 日に出願された「Magazine Feeds tocks」；開示全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている紙製品がある。

【 0 0 5 2 】

セルコース系原料としてはこのほか、脱リグニンされたリグノセルコース系原料を挙げることができる。

【 0 0 5 3 】

デンプン原料としては、デンプン自体、例えばコーンスターチ、コムギデンプン、バレイショデンプンまたは米デンプン、デンプンの誘導体または食品もしくは作物などのデンプンを含む原料が挙げられる。例えば、デンプン原料はアラカチャ、ソバ、バナナ、オオムギ、キャッサバ、クズ、アンデスカタバミ、サゴ、モロコシ、通常の家庭用バレイショ、サツマイモ、タロイモ、ヤマノイモまたはソラマメ、レンズマメもしくはエンドウマメなどの 1 種類以上のマメであり得る。任意の 2 種類以上のデンプン原料を配合したのもデンプン原料となる。このほかデンプン系原料、セルコース系原料および/またはリグノセルコース系原料の混合物を使用してもよい。例えば、バイオマスは例えば、コムギ植物体、ワタ植物体、トウモロコシ植物体、米植物体または木の全植物体、植物体の一部分または植物体の様々な部分であり得る。デンプン原料を本明細書に記載の方法のいずれかによって処理してもよい。

【 0 0 5 4 】

微生物原料としては、特に限定されないが、炭水化物源（例えば、セルコース）を含むかこれを供給する能力のある任意の天然または遺伝子改変微生物または生物、例えば、原生生物、例えば動物性原生生物（例えば、鞭毛虫、アメーバ様原生動物、繊毛虫および孢子虫などの原生動物）および植物性原生生物（例えば、アルベオラータ、クロララクニオン藻、クリプト藻、ユーグレナ藻、灰色藻、ハプト藻、紅藻、黄色植物および緑色植物などの藻類）が挙げられる。その他の例としては、海藻、プランクトン（例えば、マクロプランクトン、メソプランクトン、ミクロプランクトン、ナノプランクトン、ピコプランクトンおよびフェムトプランクトン）、植物プランクトン、細菌（例えば、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌および好極限性細菌）、酵母および/またはその混合物が挙げられる。いくつかの場合には、微生物バイオマスを天然源、例えば、海、湖、水域、例えば海水もしくは淡水または陸上から入手してもよい。上記のものに代えてまたは加えて、微生物バイオマスを培養系、例えば、大規模な乾式および湿式の培養系および発酵系から入手してもよい。

【 0 0 5 5 】

バイオマス原料としてはこのほか、屑肉およびこれと同類の原料入手源を挙げることができる。

【 0 0 5 6 】

他の実施形態では、セルコース系、デンプン系およびリグノセルコース系供給原料などのバイオマス原料を、野生型種に対して改変したトランスジェニック微生物および植物か

10

20

30

40

50

ら入手してもよい。このような改変は、例えば、植物で所望の形質が得られるまで選択と交配の段階を繰り返すことによるものであってよい。さらに、植物は、野生型種に対して遺伝物質を除去、改変、発現停止および/または追加したものであってよい。例えば、組換えDNA法(この場合、遺伝子改変には、親種由来の特定の遺伝子を導入または改変することが含まれる)によって、あるいは例えば、異なる種の植物および/または細菌から特定の1つまたは複数の遺伝子を植物に導入するトランスジェニック育種を用いることによって、遺伝子改変植物を作製してもよい。遺伝的変異を作出する別の方法には、内因性遺伝子から新たな対立遺伝子を人工的に作出する突然変異育種によるものがある。人工遺伝子は、植物体または種子を例えば、化学的突然変異誘発物質(例えば、アルキル化剤、エポキシド、アルカロイド、過酸化物、ホルムアルデヒドを用いる)、照射(例えば、X線、ガンマ線、中性子、ベータ粒子、アルファ粒子、プロトン、重陽子、UV照射)および温度ショックをはじめとする外部ストレスで処理することならびにそれに続く選択技術を含めた様々な方法によって作出することができる。改変遺伝子を得る他の方法には、エラープローンPCRおよびDNAシャフリングを実施し、次いで所望の植物体または種子に所望の改変DNAを挿入するものがある。種子または植物体に所望の遺伝的変異を導入する方法としては、例えば、細菌担体、遺伝子銃、リン酸カルシウム沈殿法、エレクトロポレーション、遺伝子スプライシング、遺伝子サイレンシング、リボフェクション法、マイクロインジェクション法およびウイルス担体の使用が挙げられる。また別の遺伝子改変材料については、2012年2月14日に開示された米国特許出願第13/396,369号(開示全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【0057】

本明細書に記載する方法はいずれも、本明細書に記載の任意のバイオマス原料の混合物で実施することができる。

【0058】

バイオマス原料の調製 機械的処理

バイオマスは、例えば含水率が約35%未満(例えば、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満または約1%未満)の乾燥形態であってよい。またバイオマスは湿潤状態で、例えば、固体が少なくとも約10重量%(例えば、少なくとも約20重量%、少なくとも約30重量%、少なくとも約40重量%、少なくとも約50重量%、少なくとも約60重量%、少なくとも約70重量%)の湿潤固体、スラリーまたは懸濁液として供給してもよい。

【0059】

本明細書に開示される工程では、かさ密度の低い原料、例えば、物理的に前処理してかさ密度を約0.75 g/cm³未満、例えば、約0.7、0.65、0.60、0.50、0.35、0.25、0.20、0.15、0.10、0.05未満かそれ以下、例えば約0.025 g/cm³未満にしたセルロース系またはリグノセルロース系供給原料を使用し得る。かさ密度はASTM D1895Bを用いて決定される。簡潔に述べると、この方法では既知の体積のメスシリンダーに試料を充填し、試料の重量を量る。グラムで表した試料の重量を立方センチメートルで表した既知のシリンダーの体積で除することにより、かさ密度を計算する。必要に応じて、例えば、Medoffに対する米国特許第7,971,809号(開示全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている方法により、かさ密度の低い原料の密度を高めてもよい。

【0060】

いくつかの場合には、前処理工程はバイオマス原料の篩分けを含む。篩分けは所望の開口径、例えば、約6.35 mm(1/4インチ、0.25インチ)未満(例えば、約3.18 mm(1/8インチ、0.125インチ)未満、約1.59 mm(1/16インチ、0.0625インチ)、約0.79 mm(1/32インチ、0.03125インチ)、例えば、約0.51 mm(1/50インチ、0.02000インチ)未満、約0.40 mm(1/64インチ、0.015625インチ)未満、約0.23 mm(0.009インチ)未満、約0.20 mm(1/128インチ、0.0078125インチ)未満、約0.

18 mm (0.007 インチ) 未満、約 0.13 mm (0.005 インチ) 未満または約 0.10 mm (1/256 インチ、0.00390625 インチ) 未満) の開口径のメッシュまたは有孔板に通すものであり得る。ある形態では、所望のバイオマスが孔または篩を通して下に落ち、孔または篩より大きいバイオマスは照射を受けない。この大きい原料は、例えば粉碎によって再処理しても、単に工程から取り除いてもよい。別の形態では、孔より大きい原料が照射を受け、小さい原料は篩工程によって取り除かれるか再利用される。この種の形態では、コンベア自体 (例えば、コンベアの一部) に孔が開いていても、コンベア自体がメッシュ製であってもよい。例えば、1 つの特定の実施形態では、バイオマス原料が湿潤状態であってよく、照射前に孔またはメッシュによってバイオマスから水分が抜ける。

10

【0061】

原料の篩分けはほかにも、例えば、不要な原料を取り除く技師またはメカノイド (例えば、色、反射率などのセンサーを備えたロボット) による手動的方法によるものであってもよい。このほか篩分けは、磁気による篩分けによるものであってもよく、この方法では、原料が輸送されてくる付近に磁石を配置し、磁性をもつ原料を磁石によって取り除く。

【0062】

任意選択の前処理は原料の過熱を含み得る。例えば、コンベアの一部が加熱ゾーンを通るようにしてよい。加熱ゾーンは、例えば、IR 放射、マイクロ波、燃焼 (例えば、ガス、石炭、油、バイオマス)、抵抗加熱および / または誘導コイルによって作り出すことができる。熱は少なくとも 1 つの側面から加えても 2 つ以上の側面から加えてもよく、連続的に加えても断続的に加えてもよく、原料の一部に加えても原料全体に加えてもよい。例えば、輸送トラフの一部を加熱ジャケットの使用によって加熱することができる。加熱は例えば、原料の乾燥を目的とするものであってもよい。原料を乾燥させる場合、加熱の有無とは関係なく、輸送されるバイオマスの上方および / または中にガス (例えば、空気、酸素、窒素、He、CO₂、アルゴン) を流すことによって感熱を促進することができる。

20

【0063】

任意選択で、前処理は原料の冷却を含み得る。原料の冷却については、Medoff に対する米国特許第 7,900,857 号 (開示全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。例えば、冷却は、輸送トラフの底部に冷却液、例えば水 (例えば、グリセロールを含んだもの) または窒素 (例えば、液体窒素) を送ることによるものであってもよい。あるいは、バイオマス原料の上方または輸送システムの下方に冷却ガス、例えば冷却窒素を吹きかけてもよい。

30

【0064】

別の任意選択の前処理方法は、バイオマスに原料を添加することを含み得る。例えば、バイオマスを輸送する際に原料をバイオマスに降り注ぐこと、撒くことおよび / または注ぐことによって、追加の原料を添加することができる。添加することができる原料としては、例えば、米国特許出願公開第 2010/0105119 (A1) 号 (2009 年 10 月 26 日出願) および米国特許出願公開第 2010/0159569 (A1) 号 (2009 年 12 月 16 日出願) (いずれも開示全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている金属、セラミックおよび / またはイオンが挙げられる。添加することができる任意選択の原料としては、酸および塩基が挙げられる。添加することができるその他の原料にはオキシダント (例えば、過酸化物、塩素酸)、ポリマー、重合性単量体 (例えば、不飽和結合を含むもの)、水、触媒、酵素および / または生物体がある。原料は例えば、純粋な形態で、溶媒 (例えば、水または有機溶媒) に溶かした溶液として、および / または溶液として添加することができる。いくつかの場合には、溶媒は揮発性物質であり、例えば、既に述べたように加熱および / またはガス吹付けによって蒸発させることが可能である。添加した原料がバイオマス上に均一な被膜を形成することもある。異なる成分 (例えば、バイオマスと追加の原料) の均一な混合物になることもある。添加した原料は、照射の効率を増大させることによって、照射を減衰することによって、あるいは照射の

40

50

作用を変える（例えば、電子ビームからX線または熱に変える）ことによって、のちの照射段階を調節し得る。この方法は照射に一切影響を及ぼさないが、さらに下流の処理に有用であり得る。添加した原料は、例えば、塵埃量を減らすことによって、原料の輸送に役立ち得る。

【0065】

バイオマスをベルトコンベア、空気コンベア、スクリーコンベア、ホッパー、パイプ、手動またはその組合せによってコンベアまで運ぶことができる。例えば、上に挙げたいずれかの方法によって、バイオマスをコンベア上に落下させ、注ぎ、かつ／または置くことができる。いくつかの実施形態では、低酸素雰囲気を維持し、かつ／または粉塵および微粉を抑えるために封入した原料を分配するシステムを用いて、原料をコンベアまで運ぶ。バイオマスの微粉および粉塵が舞い上がったり、空気中に浮遊すると、爆発の危険性が生じたり、電子銃の窓箔が破損する（原料の処理にこのような装置を用いる場合）可能性があるため望ましくない。

【0066】

原料を約0.0312～5インチ（約0.79248mm～約127mm）（例えば、約0.0625～2.000インチ（約1.5875mm～約50.8mm）、約0.125～1インチ（約3.175mm～約25.4mm）、約0.125～0.5インチ（約3.175mm～約12.7mm）、約0.3～0.9インチ（約7.62mm～約22.86mm）、約0.2～0.5インチ（約5.08mm～約12.7mm）約0.25～1.0インチ（約6.35mm～約25.4mm）、約0.25～0.5インチ（約6.35mm～約12.7mm）、0.100±0.025インチ（約2.54mm±約0.635mm）、0.150±0.025インチ（約3.81mm±約0.635mm）、0.200±0.025インチ（約5.08mm±約0.635mm）、0.250±0.025インチ（約6.35mm±約0.635mm）、0.300±0.025インチ（約7.62mm±約0.635mm）、0.350±0.025インチ（約8.89mm±約0.635mm）、0.400±0.025インチ（約10.16mm±約0.635mm）、0.450±0.025インチ（約11.43mm±約0.635mm）、0.500±0.025インチ（約12.7mm±約0.635mm）、0.550±0.025インチ（約13.97mm±約0.635mm）、0.600±0.025インチ（約15.24mm±約0.635mm）、0.700±0.025インチ（約17.78mm±約0.635mm）、0.750±0.025インチ（約19.05mm±約0.635mm）、0.800±0.025インチ（約20.32mm±約0.635mm）、0.850±0.025インチ（約21.59mm±約0.635mm）、0.900±0.025インチ（約22.86mm±約0.635mm）、0.900±0.025インチ（約22.86mm±約0.635mm））の均一な厚さになるようにそろえることができる。

【0067】

一般に、原料をできるだけ速く電子ビームの中を輸送して処理量を最大限にするのが好ましい。例えば、原料を少なくとも1フィート（約0.3m）/分、例えば、少なくとも2フィート（約0.6m）/分、少なくとも3フィート（約0.9m）/分、少なくとも4フィート（約1.2m）/分、少なくとも5フィート（約1.5m）/分、少なくとも10フィート（約3.0m）/分、少なくとも15フィート（約4.6m）/分、20、25、30、35、40、45、50フィート（約6.1m、約7.6m、約9.1m、約11m、約12m、約14m、約15m）/分の速度で輸送し得る。輸送速度はビーム電流と関係があり、例えば、バイオマスの厚さ1/4インチ、100mAでは、コンベアが約20ft/minで動いて有効な照射線量になり、50mAではコンベアが約10ft/minで動いてほぼ同じ照射線量になる。

【0068】

バイオマス原料が照射ゾーンの中を輸送された後、任意選択で後処理を実施してもよい。任意選択の後処理は、例えば、照射前処理に関して記載されている工程であり得る。例

10

20

30

40

50

えば、バイオマスを篩分けする、加熱する、冷却するおよび／または添加剤と組み合わせることができる。照射後に限られるものとして、ラジカルの消滅、例えば、液体または気体（例えば、酸素、亜酸化窒素、アンモニア、液体）の添加、圧力の利用、熱および／またはラジカルスカルベンジャーの添加によってラジカルの消滅が生じ得る。例えば、バイオマスを封入されたコンベアから搬出して気体（例えば、酸素）に曝露し、そこで反応を停止させてカボキシル化（c a b o x y l a t e d）基を形成させることができる。一実施形態では、照射時にバイオマスを反応性の気体または液体に曝露する。照射したバイオマスの反応停止については、M e d o f f に対する米国特許第 8 , 0 8 3 , 9 0 6 号（開示全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【 0 0 6 9 】

必要に応じて、照射に加え機械的処理を 1 種類以上用いてバイオマス原料の抵抗性をさらに減少させてもよい。このような工程は照射前、照射時および／または照射後に適用することができる。

【 0 0 7 0 】

いくつかの場合には、機械的処理は受け取った供給原料の初期調製、例えば、サイズリダクション、例えば切断、破碎、剪断、微粉碎または細切などによる原料の粉碎を含み得る。例えば、いくつかの場合には、ばらばらの供給原料（例えば、再生紙、デンプン原料またはスイッチグラス）を剪断または細断によって調製する。機械的処理により、バイオマス原料のかさ密度が減少し、バイオマス原料の表面積が増大し、かつ／またはバイオマス原料の 1 つ以上の寸法が減少し得る。

【 0 0 7 1 】

上記のものに代えてまたは加えて、供給原料を最初に 1 種類以上の他の物理的処理方法、例えば、化学処理、照射、超音波処理、酸化、熱分解または水蒸気爆砕によって物理的に処理した後、機械的に処理してもよい。1 種類以上の他の処理、例えば照射または熱分解によって処理した原料には脆くなる傾向があり、したがって、機械的処理によって原料の構造を変化させるのが容易になり得るため、このシーケンスは有利なものとなり得る。例えば、本明細書に記載されるように、コンベアを用いて供給原料を電離放射線の中を輸送した後、機械的に処理することができる。化学処理により、リグニンの一部または全部が除去（例えば、化学パルプ化）され、また原料が部分的にまたは完全に加水分解され得る。また、この方法を予め加水分解した原料に用いてもよい。また、この方法を予め加水分解していない原料に用いてもよい。この方法を加水分解した原料と加水分解していない原料との混合物、例えば、加水分解していない原料を約 5 0 % 以上、加水分解していない原料を約 6 0 % 以上、加水分解していない原料を約 7 0 % 以上、加水分解していない原料を約 8 0 % 以上または加水分解していない原料を 9 0 % 以上含む混合物に用いてもよい。

【 0 0 7 2 】

破碎を工程の最初および／または後の段階に実施することができるが、これに加えて、機械的処理もバイオマス原料を「分断し」、「圧力を加え」、壊しまたは砕いて、物理的処理の際に原料のセルロースが鎖の切断および／または結晶構造の崩壊を受けやすくするのに有利であり得る。

【 0 0 7 3 】

バイオマス原料を機械的に処理する方法としては、例えば、ミリングまたは破碎が挙げられる。ミリングは、例えばミル、ボールミル、コロイドミル、コニカルまたはコーンミル、ディスクミル、エッジミル、W i l e y ミル、グリストミルまたはその他のミルを用いて実施することができる。破碎は、例えば、切断／衝撃タイプのグラインダを用いて実施することができる。グラインダの一部の例としては、石材グラインダ、ピングラインダ、コーヒングラインダおよびバークラインダが挙げられる。破碎またはミリングは、例えば、ピンミルの場合と同様に、往復運動するピンをはじめとする要素によって行われ得る。その他の機械的処理方法としては、機械的に引き裂くこと、引きちぎること、剪断することまたは細切すること、繊維に圧力を加える他の方法および空気摩擦によるミリングが挙げられる。適切な機械的処理としてはさらに、前の処理段階によって始まった原料の内

10

20

30

40

50

部構造の崩壊を継続させる他の任意の技術が挙げられる。

【 0 0 7 4 】

具体的な特徴、例えば、具体的な最大サイズ、具体的な長さや幅または具体的な表面積比などを有する流れができるように、機械的な原料調製システムを構成することができる。物理的調製により、反応速度が増大し、コンベアでの原料の移動が向上し、原料の照射プロファイルが向上し、原料の照射均一性が向上し、あるいは原料を分断して処理および/または溶液中の試薬などの試薬の作用を受けやすくするのに必要な処理時間が削減され得る。

【 0 0 7 5 】

供給原料のかさ密度を調節する（例えば、増大させる）ことができる。いくつかの状況では、かさ密度の低い原料を例えば、原料の密度を高めることによって調製し（例えば、密度を高めることにより、別の場所への輸送を容易にし、そのコストを削減することができる）、のちにその原料をかさ密度の低い状態に戻す（例えば、輸送後）のが望ましい場合がある。原料を例えば、約 0.2 g / cc 未満から約 0.9 g / cc 超（例えば、約 0.3 g / cc 未満から約 0.5 g / cc 超、約 0.3 g / cc 未満から約 0.9 g / cc 超、約 0.5 g / cc 未満から約 0.9 g / cc 超、約 0.3 g / cc 未満から約 0.8 g / cc 超、約 0.2 g / cc 未満から約 0.5 g / cc 超）に密度を高めることができる。例えば、Medoff に対する米国特許第 7,932,065 号および国際公開第 2008/073186 号（2007 年 10 月 26 日に出版され、英語で公開され、米国を指定；開示全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている方法および設備によって、原料の密度を高めることができる。密度を高めた原料を本明細書に記載のいずれかの方法によって処理しても、本明細書に記載のいずれかの方法によって処理した任意の原料の密度を後で高めてもよい。

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、処理する原料は、繊維源を剪断することによって得られた繊維を含む繊維性原料の形態である。例えば、回転ナイフ式切断機で剪断を実施することができる。

【 0 0 7 7 】

例えば、繊維源、例えば抵抗性のある、あるいは抵抗性のレベルを低下させた繊維源を、例えば回転刃式裁断機で剪断し、第一の繊維性原料を得ることができる。この繊維性原料を第一の篩、例えば平均開口径が 1.59 mm 以下（1/16 インチ、0.0625 インチ）の篩にかけて第二の繊維性原料を得る。必要に応じて、剪断前に細断機で繊維源を切断してもよい。例えば、繊維源として紙を用いる場合、最初に紙をシュレッダ、例えば、Munson 社（Utica, N.Y.）製のシュレッダのような異方向回転スクリュ式のシュレッダで、例えば幅 1/4 ~ 1/2 インチ（約 6.35 mm ~ 約 12.7 mm）の細片に切断することができる。細断の別の方法として、ギロチン断裁機を用いて所望の大きさに切断することによって紙の大きさを小さくしてもよい。例えば、ギロチン断裁機を用いて、紙を例えば、幅 10 インチ（約 25 cm）、長さ 12 インチ（約 30 cm）の紙片に切断することができる。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、繊維源を剪断することと、得られた第一の繊維性原料を第一の篩にかけることを同時に実施する。また、剪断と篩にかけることをバッチ型の工程で実施してもよい。

【 0 0 7 9 】

例えば、回転刃式裁断機を用いて、繊維源を剪断すると同時に第一の繊維性原料を篩にかけることができる。回転刃式裁断機には、繊維源を剪断することにより調製された剪断済みの繊維源を投入することができるホッパーが備わっている。細断済みの繊維源。

【 0 0 8 0 】

いくつかの実施形態では、糖化および/または発酵の前に供給原料を物理的に処理する。物理的処理は、機械的処理、化学処理、照射、超音波処理、酸化、熱分解または水蒸気

10

20

30

40

50

爆砕などの本明細書に記載の処理のいずれか１種類以上を含み得る。ここに挙げた技術を２種類、３種類、４種類または全種類（任意の順序で）組み合わせて、処理方法を用いることができる。２種類以上の処理方法を用いる場合、その方法を同時に適用しても異なる時間に適用してもよい。また、バイオマス供給原料の分子構造を変化させる他の方法を単独で、または本明細書に開示される工程と組み合わせて用いてもよい。

【００８１】

用い得る機械的処理および機械的に処理したバイオマス原料の特徴については、２０１１年１０月１８日に出願された米国特許出願公開第２０１２／０１００５７７（Ａ１）（開示全体が参照により本明細書に組み込まれる）にさらに詳細に記載されている。

【００８２】

バイオマス原料の処理 粒子衝撃

エネルギー粒子衝撃による処理を１種類以上用いて多種多様な入手源由来の未処理供給原料を処理し、供給原料から有用な物質を抽出して、さらなる処理段階および／またはシーケンスへの投入物として機能する部分的に分解された有機原料を得ることができる。粒子衝撃により、供給原料の分子量および／または結晶化度を減らすことができる。いくつかの実施形態では、物質内に蓄積しその原子軌道から電子を放出するエネルギーを用いて原料を処理することができる。衝撃は重荷電粒子（アルファ粒子またはプロトンなど）、電子（例えば、ベータ崩壊または電子ビーム加速器で生じるもの）または電磁放射線（例えば、ガンマ線、Ｘ線または紫外線）によって生じ得る。あるいは、放射性物質により生じた放射線を用いて供給原料を処理してもよい。上に挙げた処理を任意に組み合わせて、任意の順序で、または同時に用いてよい。また別の方法では、電磁放射線（例えば、電子ビームエミッタを用いて生じるもの）を用いて供給原料を処理してもよい。

【００８３】

各形態のエネルギーが特定の相互作用を介してバイオマスをイオン化する。重荷電粒子は主として、クーロン散乱を介して物質をイオン化し、さらにこの相互作用によって、物質をさらにイオン化し得るエネルギー電子が生じる。アルファ粒子はヘリウム原子の核と同一のものであり、ピスマス、ポロニウム、アスタチン、ラドン、フランシウム、ラジウム、数種類のアクチニド、例えばアクチニウム、トリウム、ウラン、ネプツニウム、キュリウム、カリホルニウム、アメリシウムおよびブルトニウムなどの同位体のような様々な放射性核種のアルファ崩壊によって生じる。

【００８４】

粒子を用いる場合、それは中性（非荷電）、正荷電、負荷電のいずれであってもよい。荷電粒子である場合、その粒子は単一の正電荷もしくは負電荷を帯びていても、複数の電荷、例えば１つ、２つ、３つまたは４つ以上の電荷を帯びていてもよい。鎖の切断が望まれる場合、一部には酸性の性質であるという理由から、正荷電粒子が望ましい場合がある。粒子を用いる場合、粒子は静止電子以上の質量、例えば、静止電子の５００倍、１０００倍、１５００倍または２０００倍以上の質量を有し得る。例えば、粒子は約１原子単位～約１５０原子単位、例えば、約１原子単位～約５０原子単位または約１～約２５、例えば１、２、３、４、５、１０、１２または１５原子単位の質量を有し得る。粒子を加速するのに使用する加速器は静電ＤＣ型、動電ＤＣ型、ＲＦリニア型、磁気誘導リニア型または連続波型のものであり得る。例えば、サイクロトロン型の加速器は、Rhodotron（商標）システムなどがIBA社（Ion Beam Accelerators, Louvain-la-Neuve, Belgium）から入手可能であり、ＤＣ型加速器は、Dynamitron（商標）などがRDI社（現IBA Industrial社）から入手可能である。イオンおよびイオン加速器については、Introductory Nuclear Physics, Kenneth S. Krane, John Wiley & Sons, Inc. (1988), Krsto Prelec, FIZIKA B 6 (1997) 4, 177-206; Chu, William T., "Overview of Light-Ion Beam Therapy", Columbus-Ohio, ICRU-IAEA Meeting, 18-20 Mar. 2006

10

20

30

40

50

; Iwata, Y.ら, "Alternating - Phase - Focused IH - DTL for Heavy - Ion Medical Accelerators", Proceedings of EPAC 2006, Edinburgh, Scotland; および Leitner, C.M.ら, "Status of the Superconducting ECR Ion Source Venus", Proceedings of EPAC 2000, Vienna, Austriaで論じられている。

【0085】

照射量は所望の効果および具体的な供給原料によって決まる。例えば、照射量が多いと供給原料成分内の化学結合が切断され、照射量が少ないと供給原料成分内の化学結合（例えば、架橋）が増加し得る。

10

【0086】

鎖の切断が望ましい、および/またはポリマー鎖の官能化が望ましいいくつかの場合には、電子よりも重い粒子、例えばプロトン、ヘリウム核、アルゴンイオン、ケイ素イオン、ネオンイオン、炭素イオン、リンイオン、酸素イオンまたは窒素イオンを用いることができる。開環する鎖切断が望まれる場合、開環する鎖切断を増強するために正荷電のルイス酸特性を利用することができる。例えば、酸素含有官能基が望まれる場合、酸素存在下での処理または酸素イオンでの処理を実施することができる。例えば、窒素含有官能基が望まれる場合、窒素存在下での処理または窒素での処理を実施することができる。

【0087】

20

その他の形態のエネルギー

電子は、クーロン散乱および電子速度の変化によって生じる制動放射を介して相互作用する。電子はヨウ素、セシウム、テクネチウムおよびイリジウムなどの同位体のようなベータ崩壊する放射性核種によって生じ得る。あるいは、熱電子放出を介する電子源として電子銃を用いることができる。

【0088】

電磁放射線は3つの過程、すなわち光電吸収、コンプトン散乱および対生成を介して相互作用する。優勢な相互作用は入射放射線のエネルギーおよび物質の原子番号によって決まる。セルロース系原料の放射線吸収に寄与する相互作用の総和は質量吸収係数で表すことができる。

30

【0089】

電磁放射線は波長によってガンマ線、X線、紫外線、赤外線、マイクロ波および電波にさらに分類される。

【0090】

例えば、ガンマ線を用いて原料を処理することができる。ガンマ線には、試料中の様々な物質への透過深度がきわめて大きいという利点がある。ガンマ線源としては、コバルト、カルシウム、テクネチウム、クロム、ガリウム、インジウム、ヨウ素、鉄、クリプトン、サマリウム、セレン、ナトリウム、タリウムおよびキセノンの同位体などの放射性核種が挙げられる。

【0091】

40

X線源としては、電子ビームとタングステンもしくはモリブデンまたは合金などの金属標的との衝突またはLyncean社が商用に製造している光源などの小型光源が挙げられる。

【0092】

紫外線源としては、ジュウテリウムまたはカドミウムランプが挙げられる。

【0093】

赤外線源としては、サファイア、亜鉛またはセレン化物ウィンドウのセラミックランプが挙げられる。

【0094】

マイクロ波源としては、クライストロン、Slevin型RF源または水素、酸素もし

50

くは窒素ガスを用いる原子ビーム源が挙げられる。

【0095】

本明細書に開示される方法には、電界イオン化源、静電イオン分離器、電界イオン化発生装置、熱電子放出源、マイクロ波放電イオン源、再循環型または静止型加速器、動的リニア型加速器、バンデグラフ加速器および折り返し型タンデム加速器を含めた他の様々な装置を用いることができる。このような装置は、例えば米国特許第7,931,784(B2)号(開示全体が参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている。

【0096】

バイオマス原料の処理 電子衝撃

供給原料を電子衝撃で処理しその構造を変化させることにより、抵抗性を減少させることができる。このような処置により、例えば、供給原料の平均分子量が減少し、供給原料の結晶構造が変化し、かつ/または供給原料の表面積および/または多孔率が増大し得る。

10

【0097】

一般的には電子ビームによる電子衝撃が好ましく、それは、電子ビームによる電子衝撃がきわめてハイスループットであること、および「自己遮蔽」され安全で効率的な工程を可能にする比較的低電圧/高出力の電子ビーム装置を使用することにより、高価なコンクリートボルトシールドを必要としないことが理由である。「自己遮蔽」装置にはシールド(例えば、金属板シールド)が備わっており、コンクリートボルトの建設が不要であるため、設備投資が大幅に削減され、また多くの場合、費用のかかる改造を施さずに既存の製造施設を用いることができる。電子ビーム加速器は、例えば、IBA社(Ion Beam Applications、Louvain-la-Neuve、Belgium)、Titan社(San Diego、California、USA)およびNHV社(Nippon High Voltage、Japan)から入手可能である。

20

【0098】

電子衝撃は、公称エネルギーが10 MeV未満、例えば、7 MeV未満、5 MeV未満または2 MeV未満、例えば、約0.5~1.5 MeV、約0.8~1.8 MeV、約0.7~1 MeVまたは約1~3 MeVの電子ビーム装置を用いて行うことができる。いくつかの実施形態では、公称エネルギーは約500~800 keVである。

【0099】

電子ビームは総ビーム出力(全加速ヘッドのビーム出力の合計、あるいは複数の加速器を用いる場合は全加速器と全ヘッドの合計)が比較的高いもの、例えば、少なくとも25 kW、例えば、少なくとも30、40、50、60、65、70、80、100、125または150 kWの者であり得る。いくつかの場合には、出力が500 kW、750 kWまたは1000 kW以上もの高さであり得る。いくつかの場合には、電子ビームのビーム出力は1200 kW以上である。

30

【0100】

この高い総ビーム出力は通常、複数の加速ヘッドを用いることにより達成される。例えば、電子ビームは加速ヘッドを2つ、4つまたはそれ以上備え得る。各ヘッドのビーム出力が低い複数のヘッドを使用することにより、原料の過剰な温度上昇が抑えられ原料の燃焼が防止されることに加えて、原料の層の厚さ全体にわたる照射量の均一性が増大する。

40

【0101】

いくつかの実施形態では、電子衝撃時に原料を冷却するのが好ましい。例えば、スクリュ押出機をはじめとする運搬設備によって原料を運搬する間に冷却することができる。

【0102】

抵抗性を減少させる工程に必要なエネルギーを削減するため、原料をできる限り迅速に処理するのが好ましい。一般に、毎秒約0.25 Mrad超、例えば、毎秒約0.5、0.75、1、1.5、2、5、7、10、12、15 Mradまたは毎秒約20 Mrad超、例えば、毎秒約0.25~2 Mradの線量率で処理を実施するのが好ましい。一般に線量率を高くすると、原料の熱分解を避けるため、線速度を速くする必要がある。一実

50

施形態では、厚さ約 20 mm の試料（例えば、かさ密度 0.5 g/cm^3 の破碎トウモロコシ穂軸原料）に対して、加速器を 3 MeV、ビーム電流 50 mAmp、線速度を 24 フィート（約 7.3 m）/分に設定する。

【0103】

いくつかの実施形態では、原料に少なくとも 0.5 Mrad、例えば、少なくとも 5、10、20、30 Mrad または少なくとも 40 Mrad の総線量が照射されるまで電子衝撃を実施する。いくつかの実施形態では、原料に約 0.5 Mrad ~ 約 150 Mrad、約 1 Mrad ~ 約 100 Mrad、約 2 Mrad ~ 約 75 Mrad、10 Mrad ~ 約 50 Mrad、例えば、約 5 Mrad ~ 約 50 Mrad、約 20 Mrad ~ 約 40 Mrad、約 10 Mrad ~ 約 35 Mrad または約 25 Mrad ~ 約 30 Mrad の線量が照射されるまで処理を実施する。いくつかの実施形態では、25 ~ 35 Mrad の総線量が好ましく、理想的には、例えば、各回に約 1 秒間照射し 5 Mrad / 回で数秒間にわたって照射する。照射量が 7 ~ 8 Mrad / 回を超えると、原料の熱分解が起こる場合がある。

10

【0104】

上述のように複数のヘッドを用いて、原料を複数回、例えば、10 ~ 20 Mrad / 回、例えば 12 ~ 18 Mrad / 回で数秒間の冷却時間を置いて 2 回、または 7 ~ 12 Mrad / 回、例えば 9 ~ 11 Mrad / 回を 3 回処理することができる。上に述べた通り、原料を高線量で 1 回処理するのではなく、比較的低線量で数回処理すると、原料の過熱を防止しやすいことに加えて、原料の厚さ全体にわたる線量の均一性が増大する。いくつかの実施形態では、次の回を実施する前に、各回の間または後に原料を攪拌するか別の方法でかき混ぜてから、均一な層にならし、処理の均一性をさらに増大させる。

20

【0105】

いくつかの実施形態では、例えば、光速の 75 パーセント超、例えば光速の 85、90、95 または 99 パーセント超の速度まで電子を加速する。

【0106】

いくつかの実施形態では、入手時から乾燥しているか、例えば加熱および / または減圧を用いて乾燥させたリグノセルロース系原料に本明細書に記載の任意の処理を実施する。例えば、いくつかの実施形態では、セルロース系および / またはリグノセルロース系原料は、25、相対湿度 50 パーセントで測定した残存水分量が約 5 重量パーセント未満である。

30

【0107】

電子衝撃は、セルロース系および / またはリグノセルロース系原料を空気、酸素含有量の多い空気もしくは酸素自体に曝露しながら、または窒素、アルゴンもしくはヘリウムなどの不活性ガスで覆って加えることができる。最大限の酸化が望まれる場合、空気または酸素などの酸化環境を用い、反応性ガス、例えば、オゾンおよび / または窒素酸化物の形成が最大限になるようビーム源からの距離を最適化する。

【0108】

いくつかの実施形態では、2 種類以上の電子源、例えば 2 種類以上のイオン源などを使用する。例えば、試料を任意の順序で、電子ビーム、次いで波長が約 100 nm ~ 約 280 nm のガンマ線および UV 光で処理することができる。いくつかの実施形態では、電子ビーム、ガンマ線およびエネルギー UV 光などの 3 種類の電離放射線源で試料を処理する。処理ゾーンを通るようバイオマスを運搬し、そこで電子で衝撃を加えることができる。敷き詰めたバイオマス原料は一般に、既に述べたように、処理時に比較的均一な厚さであることが好ましい。

40

【0109】

処理を繰り返し、バイオマスの抵抗性をさらに徹底的に減少させ、かつ / またはバイオマスをさらに変化させるのが有利な場合がある。具体的には、原料の抵抗性に応じて、最初の回（例えば、2 回目、3 回目、4 回目またはそれ以降）の後に処理パラメータを調節することができる。いくつかの実施形態では、バイオマスが上記各種工程の中を複数回運

50

搬される循環システムを備えたコンベアを用いることができる。他のいくつかの実施形態では、複数の処理装置（例えば、電子ビーム発生装置）を用いてバイオマスを複数回（例えば、2回、3回、4回またはそれ以上）処理する。また別の実施形態では、単一の電子ビーム発生装置をバイオマスの処理に使用することができる複数のビーム（例えば、2つ、3つ、4つまたはそれ以上）の発生源にしてもよい。

【0110】

分子/超分子構造を変化させる効果および/またはバイオマスの抵抗性を減少させる効果は使用する電子エネルギーおよび照射する線量によって左右されるのに対して、曝露時間は出力および線量によって決まる。

【0111】

いくつかの実施形態では、原料に少なくとも約0.05 Mrad、例えば、少なくとも約0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175または200 Mradの線量が照射されるまで処理（任意の電子源または電子源の組合せを用いるもの）を実施する。いくつかの実施形態では、0.1~100 Mrad、1~200、5~200、10~200、5~150、5~100、5~50、5~40、10~50、10~75、15~50、20~35 Mradの線量が照射されるまで処理を実施する。

【0112】

いくつかの実施形態では、5.0~1500.0 キロラド/時、例えば、10.0~750.0 キロラド/時または50.0~350.0 キロラド/時の線量率で処理を実施する。他の実施形態では、10~10000 キロラド/時、100~1000 キロラド/時または500~1000 キロラド/時の線量率で処理を実施する。

【0113】

電子源

電子は、クーロン散乱および電子速度の変化によって生じる制動放射を介して相互作用する。電子はヨウ素、セシウム、テクネチウムおよびイリジウムなどの同位体のようなベータ崩壊する放射性核種によって生じ得る。あるいは、熱電子放出を介する電子源として電子銃を用いることができる。あるいは、熱電子放出を介する電子源として電子銃を使用し、加速電位により加速することができる。電子銃とは電子を発生させ、高い電位によりこれを加速し（例えば、約50万ボルト超、約100万ボルト超、約200万ボルト超、約500万ボルト超、約600万ボルト超、約700万ボルト超、約800万ボルト超、約900万または1000万ボルト超）、次いで電子をx-y平面で磁氣的に走査するものであり、電子は最初に管を通してz方向に加速され、箔窓から取り出される。電子ビームの走査は、走査ビームの中を通して運搬される原料、例えばバイオマスを照射する際に照射表面を増大させるのに有用である。このほか電子ビームの走査により、熱負荷が窓に均一に分布し、電子ビームによる局部加熱に起因する箔窓破裂が減少する。窓箔が破裂すると、それに続いて必要となる修理と電子銃の再始動による長い中断時間の原因となる。

【0114】

本明細書に開示される方法には、電界イオン化源、静電イオン分離器、電界イオン化発生装置、熱電子放出源、マイクロ波放電イオン源、再循環型または静止型加速器、動的リニア型加速器、バンデグラフ加速器および折り返し型タンデム加速器を含めた他の様々な照射装置を用いることができる。このような装置は、例えば、Medoffに対する米国特許第7,931,784号（開示全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【0115】

電子ビームを放射線源として用いることができる。電子ビームには線量率が高く（例えば、毎秒1、5または10 Mrad）、ハイスループットで、封じ込め設備および閉じ込め設備が比較的小さいという利点がある。電子ビームはほかにも、電気効率がよく（例えば、80%）、他の照射方法よりも使用エネルギーを少なくすることが可能であることか

10

20

30

40

50

ら、使用エネルギー量が少ない分だけ稼働コストおよび温室効果ガス放出量の削減につながる可能性がある。電子ビームは、例えば、静電起電機、カスケード起電機、変圧起電機、スキャニングシステムを備えた低エネルギー加速器、リニアカソードを備えた低エネルギー加速器、線形加速器、パルス加速器によって発生させることができる。

【0116】

電子はほかにも、例えば鎖切断機序によって、バイオマス原料の分子構造の変化を比較的効率的に変化させることができる。さらに、エネルギーが0.5～10 MeVの電子は、本明細書に記載のバイオマス原料のような低密度の原料、例えば、かさ密度が0.5 g/cm³未満、深さが0.3～10 cmの原料を透過することができる。電離放射線源としての電子は、山積みにした、積み重ねたまたは敷き詰めた厚さが比較的薄い、例えば、約0.5インチ(約1.3 cm)未満、例えば約0.4インチ(約1.0 cm)、0.3インチ(約0.76 cm)、0.25インチ(約0.64 cm)未満または約0.1インチ(約0.25 cm)未満の原料に有用であり得る。いくつかの実施形態では、電子ビームの電子1個のエネルギーは約0.3 MeV～約2.0 MeV(100万電子ボルト)、例えば、約0.5 MeV～約1.5 MeVまたは約0.7 MeV～約1.25 MeVである。原料を照射する方法については、2011年10月18日に出願された米国特許出願公開第2012/0100577(A1)号(開示全体が参照により本明細書に組み込まれる)で論じられている。

【0117】

電子ビーム照射装置はIon Beam Applications社(Louvain-la-Neuve, Belgium)、Titan社(San Diego, California, USA)およびNHV社(Nippon High Voltage, Japan)から購入することができる。典型的な電子エネルギーは0.5 MeV、1 MeV、2 MeV、4.5 MeV、7.5 MeVまたは10 MeVであり得る。典型的な電子ビーム照射装置の出力は1 KW、5 KW、10 KW、20 KW、50 KW、60 KW、70 KW、80 KW、90 KW、100 KW、125 KW、150 KW、175 KW、200 KW、250 KW、300 KW、350 KW、400 KW、450 KW、500 KW、600 KW、700 KW、800 KW、900 KWまたは1000 KWであり得る。

【0118】

電子ビーム照射装置の出力仕様を考慮する際のトレードオフとしては、稼働コスト、資本コスト、減価償却および装置の設置面積が挙げられる。電子ビーム照射の曝露量レベルを考慮する際のトレードオフは、エネルギーコストならびに環境、安全および衛生面(ESH)の問題であろう。通常、特に工程で発生するX線からの生成には、発生装置を、例えば鉛またはコンクリート製のボルトに格納する。電子エネルギーを考慮する際のトレードオフとしてはエネルギーコストが挙げられる。

【0119】

電子ビーム照射装置は固定ビームまたは走査ビームのいずれかを生成させることができる。走査ビームは走査スイープの長さが長く走査速度が速いと、事実上、広い固定されたビーム幅の代わりとなるため有利であり得る。さらに、使用できるスイープ幅が0.5 m、1 m、2 mまたはそれ以上のものが入手可能である。走査ビームは走査幅が比較的広く、局部加熱および窓の破損が起こる可能性が低いいため、本明細書に記載のほとんどの実施形態に好適である。

【0120】

バイオマス原料の処理 超音波処理、熱分解、酸化、水蒸気爆砕

必要に応じて、他の処理に加えて、またはその代わりに1つ以上の超音波処理、熱分解、酸化または水蒸気爆砕工程を用いて、バイオマス原料の抵抗性をさらに減少させることができる。このような工程は、1つまたは複数の別の処理の前、最中および/または前に適用することができる。このような工程については、Medoffに対する米国特許第7,932,065号(開示全体が参照により本明細書に組み込まれる)に詳細に記載されている。

【 0 1 2 1 】

処理済みバイオマス原料の使用

出発バイオマス原料（例えば、植物バイオマス、動物バイオマス、紙および都市廃棄物バイオマス）を供給原料として使用し、本明細書に記載の方法を用いて、有機酸、有機酸塩、無水物、有機酸エステルおよび燃料、例えば、内燃機関の燃料または燃料電池の供給原料などの有用な中間体および生成物を製造することができる。入手は容易であるが処理が困難な場合が多いセルロース系および／またはリグノセルロース系原料、例えば、都市廃棄物ストリームおよび新聞紙、クラフト紙、段ボール紙またはその組合せを含むストリームなどの古紙ストリームを供給原料として使用することができるシステムおよび工程をここに記載する。

10

【 0 1 2 2 】

供給原料を容易に処理が可能な形態に変換するために、糖化剤、例えば酵素または酸、糖化と呼ばれる過程によって、供給原料中のグルカン含有またはキシラン含有セルロースを糖などの低分子量炭水化物に加水分解することができる。次いで、低分子量炭水化物を例えば、単細胞タンパク質工場、酵素製造プラントまたは燃料プラント、例えばエタノール製造施設などの既存の製造プラントで使用するすることができる。

【 0 1 2 3 】

供給原料を酵素を用いて、例えば、溶液、例えば水溶液中で原料と酵素を一緒にすることによって加水分解することができる。

【 0 1 2 4 】

あるいは、バイオマスのセルロースおよび／またはリグニン部分などのバイオマスを分解するか、様々なセルロース分解酵素（セルラーゼ）、リグニナーゼまたは様々な小分子のバイオマス分解代謝産物を含有もしくは生成する生物体によって、酵素を供給してもよい。このような酵素は、相乗的に作用してバイオマスの結晶セルロースまたはリグニン部分を分解する酵素の複合体であり得る。セルロース分解酵素の例としては、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼおよびセロビアーゼ（ベータ - グルコシダーゼ）が挙げられる。

20

【 0 1 2 5 】

糖化の過程では、最初にセルロース基質がランダムな位置でエンドグルカナーゼによって加水分解され、オリゴマー中間体が生成する。次いで、この中間体がセロビオヒドロラーゼなどのエキソ分解性のグルカナーゼの基質となり、セルロースポリマーの末端からセロビオースが生成する。セロビオースは水溶性の 1, 4 結合したグルコース二量体である。最後にセロビアーゼがセロビオースを分解しグルコースが生じる。この過程の効率（例えば、加水分解に要する時間および／または加水分解の完全度）は、セルロース系原料の抵抗性によって左右される。

30

【 0 1 2 6 】

中間体および生成物

本明細書に記載の工程はブタノール、例えば、イソブタノールまたは n - ブタノールおよび誘導体を生成するのに用いるのが好ましい。しかし、この工程を他の生成物、副産物および中間体、例えば、2011年10月18日に出願され、2012年4月26日に公開された米国特許出願公開第2012/0100577号（A1）（開示全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている生成物の製造に用いてもよい。

40

【 0 1 2 7 】

本明細書に記載の工程を用いて、バイオマス原料をエネルギー、燃料、食料および原料などの1つ以上の生成物に変換することができる。生成物の具体例としては、特に限定されないが、水素、糖（例えば、グルコース、キシロース、アラビノース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、二糖、オリゴ糖および多糖）、アルコール（例えば、エタノール、n - プロパノール、イソブタノール、sec - ブタノール、tert - ブタノールまたはn - ブタノールなどの一価アルコールまたは二価アルコール）、水和または含水アルコール（例えば、10%、20%、30%超または40%超の水を含有するもの）、バ

50

イオディーゼル、有機酸、炭化水素（例えば、メタン、エタン、プロパン、イソブテン、ペンタン、*n*-ヘキサン、バイオディーゼル、バイオガソリンおよびその混合物）、副産物（例えば、セルロース分解タンパク質（酵素）または単細胞タンパクなどのタンパク質）および任意の組合せまたは相対濃度で、また任意選択で任意の添加剤（例えば、添加剤）と組み合わせて、これらのうちのいずれかを組み合わせたものが挙げられる。その他の例としては、カルボン酸、カルボン酸塩、カルボン酸とカルボン酸塩の組合せおよびカルボン酸エステル（例えば、メチル、エチルおよび*n*-プロピルエステル）、ケトン（例えば、アセトン）、アルデヒド（例えば、アセトアルデヒド）、アルファおよびベータ不飽和酸（例えば、アクリル酸）ならびにオレフィン（例えば、エチレン）が挙げられる。その他のアルコールおよびアルコール誘導体としては、プロパノール、プロピレングリコール、1,4-ブタンジオール、1,3-プロパンジオール、糖アルコールおよびポリオール（例えば、グリコール、グリセロール、エリスリトール、トレイトール、アラビトール、キシリトール、リビトール、マンニトール、ソルビトール、ガラクトール、イジトール、イノシトール、ボレミトール、イソマルト、マルチトール、ラクチトール、マルトリトール、マルトテトライトールおよびポリグリシトールなどのポリオール）ならびに上記アルコールのいずれかのメチルまたはエチルエステルが挙げられる。その他の生成物としては、アクリル酸メチル、メチルメタクリル酸、乳酸、クエン酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、コハク酸、吉草酸、カプロン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、シュウ酸、マロン酸、グルタル酸、オレイン酸、リノール酸、グリコール酸、ガンマ-ヒドロキシ酪酸ならびにその混合物、上記酸のいずれかの塩、いずれかの酸とそれぞれの塩の混合物が挙げられる。

10

20

【0128】

上記生成物同士の組合せおよび/または上記生成物と本明細書に記載の工程もしくは他の方法で製造され得る他の生成物との組合せと一緒に包装し製品として販売してもよい。製品は組み合わせたもの、例えば、混合、配合もしくは一緒に溶解させたものであっても、単に一緒に包装または販売されるものであってもよい。

【0129】

本明細書に記載の生成物または生成物の組合せはいずれも、製品として販売する前、例えば、精製もしくは単離後または包装後、衛生化または滅菌し、生成物（1つまたは複数）中に存在し得る潜在的に望ましくない夾雑物を失活させてもよい。このような衛生管理は、電子衝撃を用いて、約20 Mrad未満、例えば、約0.1~15 Mrad、約0.5~7 Mradまたは約1~3 Mradの線量で行うことができる。

30

【0130】

本明細書に記載工程によって、プラントの他の部分で使用する（熱電併給）、または自由市場で販売する蒸気および電気を発生させるのに有用な様々な副生成物ストリームが生成され得る。例えば、副生成物ストリームを燃焼させて発生した蒸気を蒸留工程に用いることができる。また別の例として、副生成物を燃焼させて発生した電気をを用いて、前処理に使用する電子ビーム発生装置に動力を供給することができる。

【0131】

蒸気または電気を発生させるために使用する副生成物は、工程全体を通して多数の入手源から得られる。例えば、廃水の嫌気性消化により、メタンが多く廃棄物バイオマス（スラッジ）の量が少ないバイオガスを生成することができる。また別の例として、糖化後および/または蒸留後の固形物（例えば、前処理および主要工程で残った未変換のリグニン、セルロースおよびヘミセルロース）を使用する、例えば、燃料として燃焼させることができる。

40

【0132】

得られたエタノールまたは*n*-ブタノールなどの生成物の多くが、乗用車、トラック、トラクター、船舶または鉄道に動力を供給する燃料として、例えば、内燃燃料または燃料電池の供給原料として用いることが可能である。また、得られた生成物の多くが、例えばジェットエンジンを搭載した飛行機またはヘリコプターなどの航空機の動力供給に用いる

50

ことが可能である。さらに、本明細書に記載の生成物を従来の蒸気発生プラントまたは燃料電池プラントでの電力生成に用いることができる。

【0133】

食品および医薬品を含めた他の中間体および生成物については、2010年5月20日に公開されたMedoffに対する米国特許出願公開第2010/0124583号(A1)(開示全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【0134】

糖化

抵抗性が減少した供給原料からフルクトース溶液を得るために、一般的には原料とセルラーゼ酵素を液体媒体、例えば水溶液中で一緒にすることによって、処理済みバイオマス原料を糖化した後、異性化し、任意選択で精製してもよい。いくつかの場合には、2012年4月26日に公開されたMedoffおよびMastermanによる米国特許出願公開第2012/0100577号(A1)(内容全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているように、糖化の前に原料を熱湯でゆでるか、熱湯に浸けるか、熱湯で加熱する。

【0135】

糖化工程は、一部もしくは全部を製造プラント内のタンク(例えば、容積が少なくとも4000、40,000または500,000Lのタンク)で実施してよく、かつ/または一部もしくは全部を、例えば鉄道車両、タンカートラックまたは超大型タンカーもしくは船倉中で、輸送中に実施してよい。完全な糖化に必要な時間は、工程条件ならびに使用する原料および酵素によって左右される。糖化を製造プラントで制御された条件下で実施する場合、セルロースは約12~96時間で実質的に完全に糖、例えばグルコースに変換され得る。糖化の一部または全部を輸送に実施する場合、糖化に要する時間はこれより長くなり得る。

【0136】

糖化する際に、2010年5月18日に出願、国際公開第2010/135380号として英語で公開され、米国特許第を指定した国際出願PCT/US2010/035331号(開示全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように、噴流混合を用いてタンクの内容物を混合するのが一般に好ましい。

【0137】

界面活性剤の添加によって糖化の速度が増大し得る。界面活性剤の例としては、Tween(登録商標)20またはTween(登録商標)80ポリエチレングリコール界面活性剤などの非イオン性界面活性剤、イオン性界面活性剤または両性界面活性剤が挙げられる。

【0138】

糖化により得られる糖溶液の濃度は比較的高い、例えば、40重量%超または50、60、70、80、90もしくは95重量%超であるのが一般に好ましい。水分を、例えば蒸発によって除去し、糖濃度の濃度を増大させてもよい。これにより輸送量が少なくなり、溶液中での微生物増殖も抑えられる。

【0139】

例えば糖化溶液の異性化後のフルクトース溶液の濃度は、約1~40%であり得る。例えば、約5~40%、約10~40%、約15~40%、約5~10%、約10%~30%および約30%~40%であり得る。

【0140】

他のフルクトース入手源を用いてもよい。例えば、糖蜜からフルクトースを得ることができる。様々な種類の糖蜜のいくつかの例には、サトウキビ糖蜜、柑橘類糖蜜、デンプン糖蜜、廃糖蜜および/またはテンサイ糖蜜がある。糖蜜中のグルコースは、グルコース/フルクトースの合計の約30%~70%の範囲内(例えば、40%~60%、例えば、45%~55%)であり得、例えば、高フルクトースコーンシロップではフルクトースが55%、グルコースが45%である。このほか、果物の抽出物を高フルクトース生成物の入

10

20

30

40

50

手源とすることができ、例えば、リュウゼツラン抽出物にはフルクトースが90%、グルコースが10%含まれ得る。グルコース溶液の異性化によりグルコース溶液の濃度を増大させることが可能であり、これもまた別のフルクトース入手源となる。本明細書で論じたようにイソメラーゼによって異性化を行ってもよい。フルクトースのまた別の入手源には、例えば酵素（例えば、スカラーゼ（*sucrase*））を用いる、酸を用いるおよび/または塩基を用いるスクロースの加水分解がある。

【0141】

あるいは、比較的低濃度の糖溶液を使用してもよく、この場合、抗菌添加剤、例えば広域抗生物質を低濃度、例えば50~150ppmで加えるのが望ましいことがある。その他の適切な抗生物質としては、アンホテリシンB、アンピシリン、クロラムフェニコール、シプロフロキサシン、ゲンタマイシン、ヒグロマイシンB、カナマイシン、ネオマイシン、ペニシリン、ピューロマイシン、ストレプトマイシンが挙げられる。抗生物質は輸送および保管時の微生物増殖を抑制し、しかるべき濃度、例えば15~1000重量ppm、例えば25~500ppmまたは50~150ppmで 사용할 ことができる。糖濃度が比較的高い場合でも、必要に応じて抗生物質を加えることができる。あるいは、保存特性のある他の抗菌添加剤を使用してもよい。抗菌添加剤（1つまたは複数）は食品用であるのが好ましい。

10

【0142】

酵素とともにバイオマス原料に添加される水分量を抑えることによって、比較的高濃度の溶液を得ることができる。濃度は、例えば、糖化が生じる程度を制御することによって制御することができる。例えば、溶液に加えるバイオマス原料を増量することによって、濃度を増大させることができる。溶液中に生成する糖を保持するために、界面活性剤、例えば上記界面活性剤のうちの1つを加えることができる。ほかに、溶液の温度を高くすることによって溶解度を増大させることができる。例えば、溶液を40~50、60~80 またはそれ以上の温度に維持し得る。

20

【0143】

タンクの内容物にグルコースイソメラーゼを加えることによって、タンク内の糖により糖化が阻害されずに高濃度のフルクトースを得ることができる。グルコースイソメラーゼは任意の量で加えることができる。例えば、濃度は約500U/gセルロース未満（100U/gセルロース以下、50U/gセルロース以下、10U/gセルロース以下、5U/gセルロース以下）であり得る。濃度は少なくとも約0.1U/gセルロース（少なくとも約0.5U/gセルロース、少なくとも約1U/gセルロース、少なくとも約2U/gセルロース、少なくとも約3U/gセルロース）である。

30

【0144】

グルコースイソメラーゼの添加により、生成する糖の量が少なくとも5%（少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%）増加する。

【0145】

このほか、酵素とともに供給原料に加えられる水分量を抑えることによって溶液中の糖の濃度を増大させることができ、かつ/または糖化時に溶液に加える供給原料を増量することによって濃度を増大させることができる。溶液中に生成する糖を保持するために、界面活性剤、例えば上記界面活性剤のうちの1つを加えることができる。ほかに、溶液の温度を高くすることによって溶解度を増大させることができる。例えば、溶液を40~50、60~80 またはそれ以上の温度に維持し得る。

40

【0146】

糖化剤

適切なセルロース分解酵素としては、バチルス（*Bacillus*）属、コプリナス（*Coprinus*）属、ミセリオフトラ（*Myceliophthora*）属、セファロスポリウム（*Cephalosporium*）属、シタリジウム（*Scytalidium*）属、ペニシリウム（*Penicillium*）属、アスペルギルス（*Aspergillus*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属、ヒューミコラ（*Humi*

50

cola) 属、フサリウム (*Fusarium*) 属、チエラビア (*Thielavia*) 属、アクレモニウム (*Acremonium*) 属、クリソスポリウム (*Chrysosporium*) 属およびトリコデルマ (*Trichoderma*) 属の種由来のセルラーゼ、特にアスペルギルス (*Aspergillus*) 種 (例えば、欧州特許第 0 4 5 8 1 6 2 号を参照されたい)、ヒューミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) (シタリジウム・サーモフィラム (*Scytalidium thermophilum*) として再分類された; 例えば、米国特許第 4, 4 3 5, 3 0 7 号を参照されたい)、ネナガヒトヨタケ (*Coprinus cinereus*)、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、ミセリオフトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、トンビマイタケ (*Meripilus giganteus*)、チエラビア・テレストリス (*Thielavia terrestris*)、アクレモニウム (*Acremonium*) 種 (特に限定されないが、*A. persicinum*)、*A. acremonium*、*A. brachyphenium*、*A.ジクロモスポラム* (*A. dichromosporum*)、*A. オブクラバタム* (*A. obclavatum*)、*A. ピンケルトニエ* (*A. pinkertoniae*)、*A. ロセオグリセウム* (*A. roseogriseum*)、*A. インコロラタム* (*A. incoloratum*) および *A. フラタム* (*A. furatum*) を含む) の種から選択される菌株によって産生されるセルロース分解酵素が挙げられる。好ましい菌株としては、ヒューミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) DSM 1 8 0 0、フサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) DSM 2 6 7 2、ミセリオフトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) CBS 1 1 7 . 6 5、セファロスポリウム (*Cephalosporium*) 種 RYM - 2 0 2、アクレモニウム (*Acremonium*) 種 CBS 4 7 8 . 9 4、アクレモニウム (*Acremonium*) 種 CBS 2 6 5 . 9 5、アクレモニウム・アクレモニウム (*Acremonium persicinum*) CBS 1 6 9 . 6 5、アクレモニウム・アクレモニウム (*Acremonium acremonium*) AHU 9 5 1 9、セファロスポリウム (*Cephalosporium*) 種 CBS 5 3 5 . 7 1、アクレモニウム・ブラキペニウム (*Acremonium brachyphenium*) CBS 8 6 6 . 7 3、アクレモニウム・ジクロモスポラム (*Acremonium dichromosporum*) CBS 6 8 3 . 7 3、アクレモニウム・オブクラバタム (*Acremonium obclavatum*) CBS 3 1 1 . 7 4、アクレモニウム・ピンケルトニエ (*Acremonium pinkertoniae*) CBS 1 5 7 . 7 0、アクレモニウム・ロセオグリセウム (*Acremonium roseogriseum*) CBS 1 3 4 . 5 6、アクレモニウム・インコロラタム (*Acremonium incoloratum*) CBS 1 4 6 . 6 2 およびアクレモニウム・フラタム (*Acremonium furatum*) CBS 2 9 9 . 7 0 H が挙げられる。このほか、クリソスポリウム (*Chrysosporium*)、好ましくはクリソスポリウム・ラックノウェンス (*Chrysosporium lucknowense*) の菌株からセルロース分解酵素を得てもよい。使用できるほかの菌株としては、特に限定されないが、トリコデルマ (*Trichoderma*) (特に *T. viride*、*T. リーセイ* (*T. reesei*) および *T. コニンギイ* (*T. koningii*))、好アルカリ性バチルス (*Bacillus*) (例えば、米国特許第 3, 8 4 4, 8 9 0 号および欧州特許第 0 4 5 8 1 6 2 号を参照されたい) およびストレプトミセス (*Streptomyces*) (例えば、欧州特許第 0 4 5 8 1 6 2 号を参照されたい) が挙げられる。

【0147】

バイオマス原料を糖化して糖を生成するのに使用できる微生物の多くはほかにも、その糖を発酵し有用な生成物に変換するのに使用することができる。

【0148】

糖

10

20

30

40

50

本明細書に記載の工程で、例えば糖化後、糖（例えば、グルコースおよびキシロース）を単離することができる。例えば、沈殿、結晶化、クロマトグラフィー（例えば、擬似移動層式クロマトグラフィー、高圧クロマトグラフィー）、遠心分離、抽出、当該技術分野で公知の他の任意の単離方法およびその組合せによって糖を単離することができる。

【0149】

水素化およびその他の化学変換

本明細書に記載の工程には水素化が含まれ得る。例えば、グルコースおよびキシロースをそれぞれソルビトールおよびキシリトールに水素化することができる。水素化は、高圧下（例えば、 $10 \sim 12000 \text{ psi}$ （約 $69 \text{ kPa} \sim 8.3 \times 10^4 \text{ kPa}$ ））、触媒（例えば、Pt / ガンマ- Al_2O_3 、Ru / C、ラネーニッケルをはじめとする当業者に公知の触媒）を H_2 と組み合わせて用いることによって行うことができる。本明細書に記載の工程で得られた生成物の他の種類の化学変換、例えば、有機糖由来の生成物（例えば、フルフラールおよびフルフラール由来の生成物）の生成を用いてもよい。糖由来生成物の化学変換については、2012年7月3日に出願された米国特許仮出願第61/667,481号（開示全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0150】

発酵

クロストリジウム（*Clostridium*）種を用いて糖を（例えば、フルクトース）をブタノールに変換するのが好ましい。発酵の最適pHはpH約4～7である。例えば、酵母の最適pHはpH約4～5であり、ザイモナス（*Zymomonas*）の最適pHはpH約5～6である。典型的な発酵時間は、20～40（例えば、26～40）の範囲の温度で約24～168時間（例えば、24～96時間）であるが、好熱性微生物はこれよりも高い温度を好む。

【0151】

いくつかの実施形態では、例えば、嫌気性生物を使用する場合、発酵の少なくとも一部は無酸素下で、例えば、 N_2 、Ar、He、 CO_2 またはその混合物などの不活性ガスで覆って発酵を実施するのが好ましい。さらに、発酵の一部の時間または発酵時間全体を通して、タンクに不活性ガスを流し混合物にパージし続けてもよい。いくつかの場合には、発酵時の二酸化炭素発生によって嫌気性条件が得られ、追加の不活性ガスを必要としない。

【0152】

いくつかの実施形態では、低分子量の糖が完全に生成物（例えば、エタノール）に変換される前に発酵工程の全部または一部を中断し得る。中間発酵生成物には糖および炭水化物が高濃度で含まれる。当該技術分野で公知の任意の手段によって、この糖および炭水化物を単離することができる。この中間発酵生成物をヒトまたは動物が摂取する食物の調製食糧の調製に用いることができる。上記のものに代えてまたは加えて、中間発酵生成物をステンレス製の実験室用ミルで微細な粒子径になるまで粉碎し、粉末状の物質を作製してもよい。

【0153】

発酵中に噴流混合を用いてもよく、いくつかの場合には、糖化と発酵を同じタンク内で実施する。

【0154】

糖化および／または発酵中に微生物のための栄養素、例えば、2011年7月15日に提出された米国特許出願公開第2012/0052536号（開示全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている飼料ベースの栄養素パッケージを添加してもよい。

【0155】

「発酵」には、2012年12月22日に提出された米国特許仮出願第61/579,559号および2012年12月22日に提出された米国特許仮出願第61/579,576号（ともにその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている方

10

20

30

40

50

法および生成物が含まれる。

【0156】

国際出願 PCT/US 2007/074028 号 (2007 年 7 月 20 日に出願され、国際公開第 2008/011598 号として英語で公開され、米国を指定) (その内容全体が本明細書に組み込まれる) に記載されているように、移動式の発酵槽を用いてもよい。同様に、糖化設備が移動式のものであってもよい。さらに、輸送中に糖化および/または発酵の一部または全部を実施してもよい。

【0157】

その他の発酵剤

クロストリジウム (*Clostridium*) が好ましいが、他の微生物を用いてもよい。例えば、糖 (1 つまたは複数) を他のアルコール (1 つまたは複数) に発酵または変換するのに酵母およびザイモナス (*Zymomonas*) 菌を用いてもよい。その他の微生物を以下で論じる。これらは天然の微生物および/または組換え微生物であり得る。例えば、微生物は細菌 (特に限定されないが、例えばセルロース分解細菌が挙げられる)、真菌 (特に限定されないが、例えば酵母が挙げられる)、植物、原生生物、例えば、原生動物もしくは真菌様原生生物 (特に限定されないが、例えば粘菌が挙げられる) または藻であり得る。生物体に適合性があれば、生物体の混合物を用いてもよい。

【0158】

適切な発酵微生物は、グルコース、フルクトース、キシロース、アラビノース、マンノース、ガラクトース、オリゴ糖または多糖などの炭水化物を発酵生成物に変換する能力を有するものである。発酵微生物としては、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 種 (特に限定されないが、*S. cerevisiae*) (パン酵母)、*S. distaticus*、*S. uvarum* が挙げられる) 属、クリベロミセス (*Kluyveromyces*) 属 (特に限定されないが、*K. marxianus*)、*K. fragilis* が挙げられる)、カンジダ (*Candida*) 属 (特に限定されないが、*C. pseudotropicalis*) および *C. brassicae* が挙げられる)、ピキア・スティピティス (*Pichia stipitis*) (カンジダ・シェハタエ (*Candida shehatae*) の近縁種)、クラビスポラ (*Clavispora*) 属 (特に限定されないが、*C. lusitaniae*) および *C. opuntiae* が挙げられる)、パキソレン (*Pachysolen*) 属 (特に限定されないが、*P. tannophilus*) が挙げられる)、ブレタノミセス (*Brettanomyces*) 属 (特に限定されないが、例えば、*B. clausenii*) (*Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E. (編) 所載の *Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212*) の菌株が挙げられる。その他の適切な微生物としては、例えば、ザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*)、クロストリジウム (*Clostridium*) 種 (特に限定されないが、*C. thermocellum*) (*Philippidis, 1996, 上記*)、*C. saccharobutylacetonicum*、*C. saccharobutyllicum*、*C. puniceum*、*C. beijerinckii* および *C. acetobutyllicum* が挙げられる)、モニリエラ・ポリニス (*Moniliella pollinis*)、モニリエラ・メガチリエンシス (*Moniliella megachiliensis*)、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 種、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、アウレオバシジウム (*Aureobasidium*) 種、トリコスポロノイデス

10

20

30

40

50

(*Trichosporonoides*) 種、トリゴノプシス・バリアビリス(*Trigonopsis variabilis*)、トリコスポロン(*Trichosporon*) 種、モニリエラアセトアブタンス(*Moniliella acetobutans*) 種、チフラ・バリアビリス(*Typhula variabilis*)、カンジダ・マグノリエ(*Candida magnoliae*)、クロボキン(*Ustilaginomycetes*) 種、シュードザイマ・ツクバエンシス(*Pseudozyma tsukubaensis*)、ザイゴサッカロミセス(*Zygosaccharomyces*) 属、デバリオミセス(*Debaryomyces*) 属、ハンセヌラ(*Hansenula*) 属およびピキア(*Pichia*) 属の酵母種ならびにデマチオイド(*dematioid*) のトルラ(*Torula*) 属の真菌が挙げられる。

10

【0159】

例えば、クロストリジウム(*Clostridium*) 種を用いてエタノール、ブタノール、酪酸、酢酸およびアセトンを生成することができる。*Lactobacillus* 種を用いて乳酸を生成することができる。

【0160】

このような微生物菌株の多くが、購入するか、寄託機関、数例挙げるとATCC(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA), NRRL(Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois, USA) またはDSMZ(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) などを通して、公的に入手可能なものである。

20

【0161】

市販されている酵母としては、例えば、Red Star(登録商標)/Lesaffre Ethanol Red(Red Star/Lesaffre社(米国)から入手可能)、FALI(登録商標)(Burns Philip Food社(米国)の一部門、Fleischmann's Yeastから入手可能)、SUPERSTART(登録商標)(Alltech社(現Lallemant社)から入手可能)、GERTSTRAND(登録商標)(Gert STRAND AB社(スウェーデン)から入手可能)およびFERMOL(登録商標)(DSM Specialties社から入手可能)が挙げられる。

30

【0162】

バイオマス原料の糖化および糖生成に使用できる微生物の多くが、このような糖を有用な生成物に発酵および変換することにも使用することができる。

【0163】

蒸留

発酵後、得られた液体を、例えば「ピアカラム」を用いて蒸留し、エタノールをはじめとするアルコールと水および固形残留物の大部分とを分離することができる。ピアカラムから出る蒸気は、例えば、35重量%のエタノールであり得、精留カラムへ送られ得る。気相分子篩を用いて、ほぼ共沸性(92.5%)のエタノールと精留カラムの水の混合物を純粋な(99.5%)エタノールに精製することができる。ピアカラムの残液は三重効用蒸発缶の第一効用缶へ送られ得る。精留カラムの還流冷却器により、この効用缶に熱を加えることができる。第一効用缶の後、遠心分離を用いて固体を分離し、回転乾燥機で乾燥させることができる。遠心分離の排出液の一部(25%)は発酵に再利用し、残りは蒸発缶の第二および第三効用缶へ送られ得る。蒸発缶の濃縮物のほとんどは、きわめて清浄な濃縮物として工程に戻すことができ、ごく一部のものは、低沸点化合物の蓄積の防ぐため分離して廃水処理に回す。

40

【0164】

本明細書の実施例以外でも、また別途明記されていなくても、本明細書の以下の部分および添付の特許請求の範囲に記載されている原料の量、元素含有量、反応の時間および温

50

度、量の比その他の数値範囲、量、値および百分率はすべて、値、量または範囲に「約」という用語が明記されていなくても、「約」という語が記載されているものと解釈される。したがって、別途明示されない限り、以下の明細書および添付の「特許請求の範囲」に記載されている数値パラメータは、本発明によって得ようとする所望の特性に応じて異なり得る近似値である。少なくとも、特許請求の範囲への均等論の適用を制限することを試みるわけではないが、各数値パラメータは少なくとも、報告される有効数字の数を考慮し、通常の丸め法を適用することにより解釈されるべきである。

【0165】

本発明の広い範囲を表す数値範囲およびパラメータは近似値であるが、具体例に記載されている数値は、可能な限り正確に報告されている。しかし、いずれの数値にも本来的に、その基となる個々の試験測定値にみられる標準偏差から必然的に生じる誤差が含まれている。さらに、本明細書に数値範囲が記載されている場合、その範囲に記載される範囲の両端値が含まれる（すなわち、両端値が用いられる場合がある）。本明細書で重量百分率を用いる場合、報告される数値は総重量に相対的な値である。

10

【0166】

ほかにも、本明細書に記載される数値範囲はそこに包含されるすべての部分範囲を含むことが意図されることを理解するべきである。例えば、範囲「1～10」は、記載されている最小値1と記載されている最大値10を含めたその間にあって、最小値が1以上かつ最小値が10以下であるすべての部分範囲を含むことが意図される。本明細書で使用される「1つの」（「one」、「a」または「an」）という用語は、特に明示されない限り、「少なくとも1つ」または「1つ以上」を包含することが意図される。

20

実施例

【0167】

実施例1．グルコース、キシロースおよびフルクトースでのブタノール生成

米国特許第6,358,717号に記載されているP2ベースの培地を以下の試験に用いた。培地は別々に調製した以下の溶液から構成されていた（別途明記されない限り、蒸留水100mL当たりのグラム数で表す）：糖（種類および量については下を参照されたい）、蒸留水790mL（溶液I）、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 CH_3COONH_4 2.2g（溶液II）、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0g、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.1g、 $NaCl$ 0.1g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ （溶液III）0.1gおよびp-アミノ安息香酸100mg、チアミン100mg、ビオチン1mg（溶液IV）。溶液IおよびIIをろ過滅菌してから混合し、糖緩衝液を作製した。液剤IIIおよびIVをろ過滅菌した。糖緩衝液に液剤IIIおよびIVの一部（10mLおよび1mL）をそれぞれ無菌状態で加えた。P2培地の最終pHは6.6であった。

30

【0168】

使用した糖の量は次の通りであった：培地GXP2にグルコース43gとキシロース24g；培地F P2にフルクトース43g；培地F G P2にフルクトース43gとグルコース43g。

【0169】

溶液をアルゴンで45分間曝気した後、嫌気性チャンバに入れた。予め加圧滅菌した20mL血清バイアル21本に溶液（10mL）を量り入れた。密閉可能なセプタムでバイアルを密閉した後、嫌気性ボックスから取り出した。ATCCが提供するペレットからATCC推奨プロトコルに従って調製したグリセロール水溶液ストックから1体積%のクロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニカム（*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*）（ATCC27021）をバイアルに植菌した。バイアルを30℃で48時間または96時間培養した。ブタノール生成についてGCを用いてヘッドスペースを分析した。結果（g/Lで表す）を下の表に示す。

40

【0170】

【表 2】

3 種類の異なる炭素源でのブタノール生成の結果。

試料 I D	時点	培地	n-ブタノール
1	48 時間	GXP2	3.2
2	48 時間	GXP2	2.9
3	48 時間	GXP2	2.0
4	48 時間	FP2	11.5
5	48 時間	FP2	11.0
6	48 時間	FP2	11.7
7	48 時間	FGP2	3.1
8	48 時間	FGP2	3.0
9	48 時間	FGP2	3.5
10	96 時間	GXP2	2.6
11	96 時間	GXP2	2.9
12	96 時間	GXP2	3.0
対照-13	96 時間	GXP2	0.0
14	96 時間	FP2	11.1
15	96 時間	FP2	12.0
16	96 時間	FP2	11.4
対照-17	96 時間	FP2	0.0
18	96 時間	FGP2	2.3
19	96 時間	FGP2	2.7
20	96 時間	FGP2	3.4
対照-21	96 時間	FGP2	0.0

10

20

30

【0171】

実施例 2 . フルクトースおよびグルコース/キシロースでのブタノール生成

グルコース/キシロース混合物またはフルクトースのみ (32 g/L) を含有する P2 培地 10 ml をクロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニカム (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) ATCC 株 27021 または 27022 のうち的一方とともに 30 でインキュベートした。実施例 1 と同じく、下の表に記載する結果は、グルコースまたはキシロースではなくフルクトースでクロストリジウム (*Clostridium*) を培養したときの方がブタノール生成量が多いことを示すものである。

40

【0172】

【表 3】

フルクトースまたはグルコース／キシロースを炭素源としたクロストリジウム（*Clostridium*）のバイアル培養。

菌株	基質	ブタノール生成量（g／L）	時点（時間）
ATCC 27021	フルクトース	11.7	48
ATCC 27021	グルコース／キシロース	2.3	48
ATCC 27022	フルクトース	11.6	96
ATCC 27022	グルコース／キシロース	4.0	96

10

【0173】

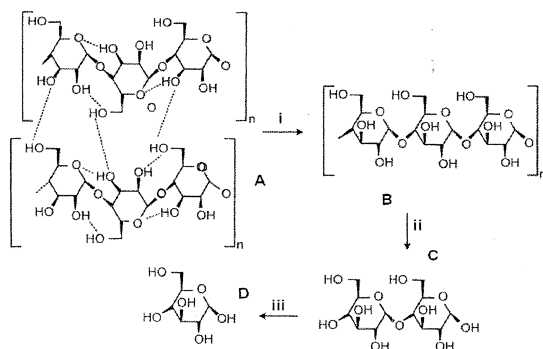
全体または一部分が参照により本明細書組み込まれることが記されている特許、刊行物をはじめとする開示資料はいずれも、組み込まれる資料が本開示に記載されている既存の定義、記述をはじめとする開示内容と矛盾しない範囲でのみ組み込まれる。したがって、必要な範囲内で、本明細書に明記されている開示は、参照により本明細書に組み込まれた矛盾するあらゆる資料に優先する。参照により本明細書組み込まれることが記されているが、本明細書に記載されている既存の定義、記述をはじめとする開示内容と矛盾する資料またはその一部分はいずれも、その組み込まれる資料と既存の開示内容との間に矛盾が生じない範囲でのみ組み込まれる。

20

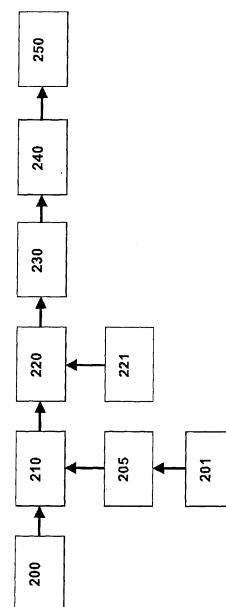
【0174】

ここまで、本発明を特にその好ましい実施形態について示し説明してきたが、添付の「特許請求の範囲」に包含される本発明の範囲から逸脱することなく、その形態および詳細に様々な変更を加え得ることが当業者には理解されよう。

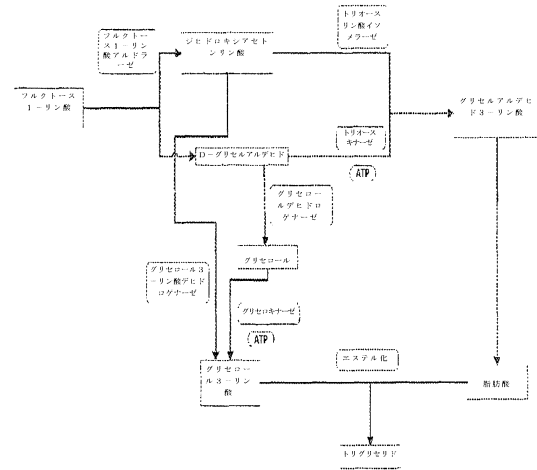
【図 1】



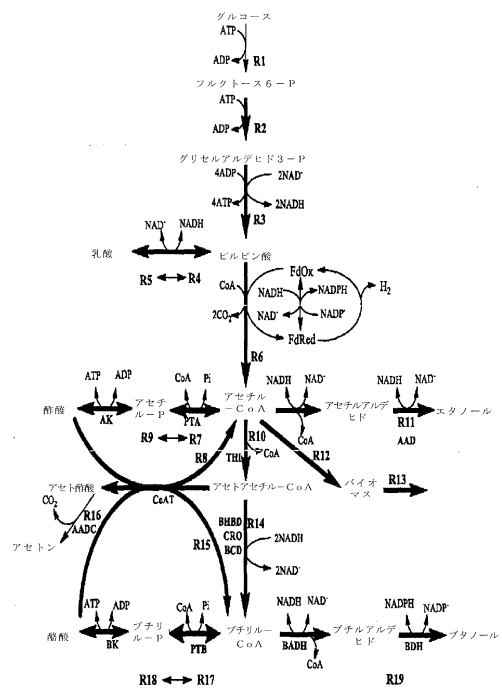
【図 2】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
B 0 9 B	3/00	(2006.01)	C 1 2 N 1/00 S
C 1 2 P	19/02	(2006.01)	B 0 9 B 3/00 Z A B A
C 1 2 N	9/90	(2006.01)	C 1 2 P 19/02
C 1 2 R	1/145	(2006.01)	C 1 2 N 9/90
			C 1 2 R 1:145

(72)発明者 マスターマン, トーマス
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 8 0 1, ウォーバン, ユニット エル, 2 7 1 セー
 ラム ストリート

(72)発明者 フィン, マイケル
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 8 0 1, ウォーバン, ユニット エル, 2 7 1 セー
 ラム ストリート

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 1 3 8 8 7 2 (U S , A 1)
 特表 2 0 1 0 - 5 0 8 3 9 0 (J P , A)
 国際公開第 2 0 0 9 / 0 6 2 6 0 1 (W O , A 1)
 Bioresource Technology, 2 0 1 1 年 8 月, Vol.102, p.9985-9990
 Gene, 1 9 9 1 年, Vol.104, p.25-31

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C A / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 P u b M e d