

(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2014-506451

(P2014-506451A)

(43) 公表日 平成26年3月17日 (2014. 3. 17)

(51) Int. Cl.		F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 P	1/00	(2006.01)	C 1 2 P	1/00	A	4 B 0 6 4
C 1 2 P	19/14	(2006.01)	C 1 2 P	19/14	A	4 H 0 5 5
C 0 7 G	1/00	(2011.01)	C 0 7 G	1/00		
C 0 8 H	7/00	(2011.01)				

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2013-550526 (P2013-550526)	(71) 出願人	590003238
(86) (22) 出願日	平成24年1月17日 (2012. 1. 17)		バックマン・ラボラトリーズ・インターナショナル・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成25年7月9日 (2013. 7. 9)		BUCKMAN LABORATORIES INTERNATIONAL INCORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/021481		アメリカ合衆国テネシー州38108, メムフィス, ノース・マックリーン・ブルバード 1256
(87) 国際公開番号	W02012/102896	(74) 代理人	100088904
(87) 国際公開日	平成24年8月2日 (2012. 8. 2)		弁理士 庄司 隆
(31) 優先権主張番号	61/435, 492	(74) 代理人	100124453
(32) 優先日	平成23年1月24日 (2011. 1. 24)		弁理士 資延 由利子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リグニン及び他の生物学的生成物を草本植物から酵素によって単離するプロセス及びシステム

(57) 【要約】

リグニン及び他の生物学的生成物、例えば発酵性糖を草本植物材料から酵素によって単離する方法を説明する。該方法は、生成物の純度の増大、並びにプロセスエネルギー要件及び生成物の変性及び汚染の低減といった改善をもたらすことができる。該方法を実施するためのシステムも提供される。

【選択図】 図 1

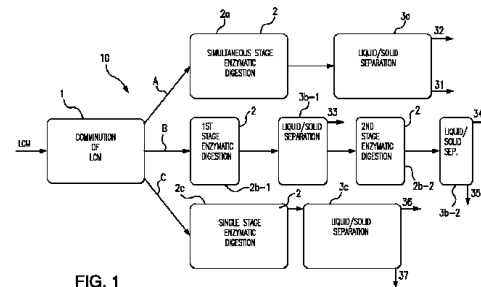


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リグノセルロース材料の構成要素を単離する方法であって、
 リグノセルロース材料を粉碎し、粉碎されたリグノセルロース材料を形成することと、
 リグニンを含む前記リグノセルロース材料の不溶性部分から少なくとも 1 つの C 6 糖及び／又は C 5 糖を遊離する酵素加水分解のために、該リグノセルロース材料からの任意の事前の非酵素的なリグニン分離をせずに、前記粉碎されたリグノセルロース材料、少なくとも 1 つの酵素ブレンド、及び水溶液を含む混合物を酵素消化することと、
 前記少なくとも 1 つの C 6 糖及び／又は C 5 糖を含有する前記水溶液の少なくとも一部分を、リグニンを含む前記不溶性部分から分離することと、
 を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記水溶液が酸性有機緩衝水溶液を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記水溶液中の前記少なくとも 1 つの C 6 糖及び／又は C 5 糖が、可溶化した C 6 糖及び／又は C 5 糖、若しくは懸濁した C 6 糖及び／又は C 5 糖粒子状物質、又はそれらの任意の組合せを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

酵素ブレンドを用いた前記水溶液中の前記粉碎されたリグノセルロース材料の酵素消化が、約 30℃～約 60℃の温度で少なくとも約 1 時間、混合物を攪拌することを含み、分離が、攪拌するのを止め、沈殿固体を含む不溶性部分から前記少なくとも 1 つの C 6 糖及び／又は C 5 糖を含有する前記水溶液の少なくとも一部分をデカントすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記リグノセルロース材料が、綿実殻、穀物殻、サトウキビバガス、トウモロコシ茎葉、トウモロコシ穂軸、麦藁、スイッチグラス、葉、茎、植物の外皮、軟材片、硬材片、おが屑、製紙工場のパルプ、古紙、再生紙、又はそれらの任意の組合せである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記リグノセルロース材料が綿実殻を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの酵素ブレンドが 1) 群～5) 群の内の少なくとも 2 群に由来する少なくとも 1 つの酵素を含む第 1 の酵素ブレンドを含む、請求項 1 に記載の方法：

- 1) エンドグルカナーゼ、カルボキシメチルセルラーゼ、
- 2) エキソグルカナーゼ、アビセラーゼ、
- 3) セロビアーゼ、 β -グルコシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、
- 4) エンド-1, 4- β -キシラナーゼ、エンド-(1, 4)- β -キシラノヒドロラーゼ、
- 5) β -1, 3-キシラナーゼ、1, 3- β -D-キシロシダーゼ、及びエキソ-1, 3- β -キシロシダーゼ。

40

【請求項 8】

第 1 の酵素ブレンドが、

- 1) 群及び／又は 2) 群に由来する少なくとも 1 つの酵素、
 - 3) 群の少なくとも 1 つの酵素、及び、
 - 4) 群及び／又は 5) 群の少なくとも 1 つの酵素、
- を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの酵素ブレンドが、1 a) 群～20 a) 群の内の少なくとも 2 群に由来する少なくとも 1 つの酵素を含む第 2 の酵素ブレンドを更に含む、請求項 1 に記載の方法：

50

- 1 a) エンドー 1, 3 (4) - β - グルカナーゼ、
- 2 a) ラミナリナーゼ (エンドー 1, 3 - β - グルカナーゼ)、
- 3 a) エキソー 1, 2 - 1, 6 - α - マンノシダーゼ、
- 4 a) β - D - キシロピラノシル - (1, 4) - β - D - キシロピラノース、
- 5 a) α - N - アラビノフラノシダーゼ、
- 6 a) フェルロイルエステラーゼ、
- 7 a) エンドー 1, 5 - α - アラビナナーゼ、
- 8 a) ペクチナーゼ、
- 9 a) ポリガラクトツロナーゼ、
- 10 a) ペクチンエステラーゼ、
- 11 a) アスパラギン酸プロテアーゼ、
- 12 a) メタロプロテアーゼ、
- 13 a) エンドー (1, 4) - マンナナーゼ、
- 14 a) フィターゼ、
- 15 a) α - グルクロニダーゼ及び β - グルクロニダーゼ、
- 16 a) ヘキセスロニダーゼ、
- 17 a) アルカリホスファターゼ及び酸ホスファターゼ、
- 18 a) α - ガラクトシダーゼ及び β - ガラクトシダーゼ、
- 19 a) β - マンノシダーゼ、
- 20 a) α - フコシダーゼ。

10

20

【請求項 10】

リグニンの収率が少なくとも約 90% である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

C6 糖及び／又は C5 糖の収率が少なくとも約 90% である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

リグノセルロース材料の構成要素を単離する方法であって、

- a) リグノセルロース材料を粉砕されたリグノセルロース材料へと粉砕することと、
 - b) リグニンを含む前記リグノセルロース材料の第 1 の不溶性部分から少なくとも 1 つの C6 糖及び／又は C5 糖を遊離する第 1 の酵素加水分解のために、該リグノセルロース材料の任意の事前の非酵素的なリグニン分離処理をせずに、前記粉砕されたリグノセルロース材料、第 1 の酵素ブレンド、及び第 1 の水溶液を含む第 1 の混合物を酵素消化することと、
 - c) 前記少なくとも 1 つの C6 糖及び／又は C5 糖を含有する前記第 1 の水溶液の少なくとも一部分を前記第 1 の不溶性部分から分離することと、
 - d) 前記第 1 の不溶性部分を粉砕された第 1 の不溶性部分へと粉砕することと、
 - e) リグニンを含む第 2 の不溶性部分から少なくとも 1 つの C6 糖及び／又は C5 糖を遊離する第 2 の酵素加水分解のために、前記粉砕された第 1 の不溶性部分、第 2 の酵素ブレンド、及び第 2 の水溶液を含む第 2 の混合物を酵素消化することと、
 - f) リグニンを含む前記第 2 の不溶性部分を前記少なくとも 1 つの C6 糖及び／又は C5 糖を含む前記第 2 の水溶液から分離することと、
- を含む、方法。

30

40

【請求項 13】

前記リグノセルロース材料の粉砕が該リグノセルロース材料を約 2 mm 未満のサイズまで摩砕することを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1 の不溶性部分の粉砕が該第 1 の不溶性部分を約 50 ミクロン未満のサイズまで摩砕又は破砕することを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

分離した後に、前記第 1 の不溶性部分を少なくとも 1 回洗浄し、洗浄した第 1 の不溶性部分を該第 1 の不溶性部分を粉砕する前に乾燥させることを更に含む、請求項 12 に記載

50

の方法。

【請求項 16】

前記第 1 の水溶液が酸性有機緩衝水溶液を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 1 の水溶液中の前記少なくとも 1 つの C6 糖及び／又は C5 糖が、可溶化した C6 糖及び／又は C5 糖、若しくは懸濁した C6 糖及び／又は C5 糖粒子状物質、又はそれらの任意の組合せを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 の酵素ブレンドを用いた前記第 1 の水溶液中の前記粉碎されたりグノセルロース材料の酵素消化が、約 30℃～約 60℃の温度で少なくとも約 1 時間、前記第 1 の混合物を攪拌することを含み、分離が、攪拌するのを止め、沈殿固体を含む前記第 1 の不溶性部分から前記少なくとも 1 つの C6 糖及び／又は C5 糖を含有する前記第 1 の水溶液の少なくとも一部分をデカントすることを含む、請求項 12 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記リグノセルロース材料が、綿実殻、穀物殻、サトウキビバガス、トウモロコシ茎葉、トウモロコシ穂軸、麦藁、スイッチグラス、葉、茎、植物の外皮、軟材片、硬材片、おが屑、製紙工場のパルプ、古紙、再生紙、又はそれらの任意の組合せである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 20】

前記リグノセルロース材料が綿実殻を含む、請求項 12 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記第 1 の酵素ブレンドが 1) 群～5) 群の内の少なくとも 2 群に由来する少なくとも 1 つの酵素を含む、請求項 12 に記載の方法：

- 1) エンドグルカナーゼ、カルボキシメチルセルラーゼ、
- 2) エキソグルカナーゼ、アビセラーゼ、
- 3) セロビアーゼ、 β -グルコシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、
- 4) エンド-1, 4- β -キシラナーゼ、エンド-(1, 4)- β -キシラノヒドロラーゼ、
- 5) β -1, 3-キシラナーゼ、1, 3- β -D-キシロシダーゼ、及びエキソ-1, 3- β -キシロシダーゼ。

30

【請求項 22】

前記第 2 の酵素ブレンドが、1a) 群～20a) 群の内の少なくとも 2 群に由来する少なくとも 1 つの酵素を含む、請求項 12 に記載の方法：

- 1a) エンド-1, 3-(4)- β -グルカナーゼ、
- 2a) ラミナリナーゼ(エンド-1, 3- β -グルカナーゼ)、
- 3a) エキソ-1, 2-1, 6- α -マンノシダーゼ、
- 4a) β -D-キシロピラノシル-(1, 4)- β -D-キシロピラノース、
- 5a) α -N-アラビノフラノシダーゼ、
- 6a) フェルロイルエステラーゼ、
- 7a) エンド-1, 5- α -アラビナナーゼ、
- 8a) ペクチナーゼ、
- 9a) ポリガラクトツロナーゼ、
- 10a) ペクチンエステラーゼ、
- 11a) アスパラギン酸プロテアーゼ、
- 12a) メタロプロテアーゼ、
- 13a) エンド-(1, 4)-マンナナーゼ、
- 14a) フィターゼ、
- 15a) α -グルクロニダーゼ及び β -グルクロニダーゼ、
- 16a) ヘキセヌロニダーゼ；
- 17a) アルカリホスファターゼ及び酸ホスファターゼ、

40

50

- 18 a) α -ガラクトシダーゼ及び β -ガラクトシダーゼ、
19 a) β -マンノシダーゼ、
20 a) α -フコシダーゼ。

【請求項 23】

リグニンの収率が少なくとも約90%である、請求項12に記載の方法。

【請求項 24】

前記少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖の収率が前記リグノセルロース材料に存在する元の量をベースとして少なくとも約50%である、請求項12に記載の方法。

【請求項 25】

前記少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖の生物学的発酵処理を更に含む、請求項12に記載の方法。 10

【請求項 26】

リグノセルロース材料の構成要素を単離するシステムであって、

リグノセルロース材料を粉砕するための少なくとも1つの粉砕機と、

内部アジテーターを備える容器を含む少なくとも1つの消化槽であって、該容器は前記リグノセルロース材料の任意の事前の非酵素的なリグニン分離処理をせずに、粉砕されたリグノセルロース材料、少なくとも1つの酵素ブレンド、及び水溶液の混合物を保持するのに使用可能であり、少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を、リグニンを含む該リグノセルロース材料の不溶性部分から遊離する酵素加水分解のために、攪拌しながら前記混合物を酵素消化するのに使用可能である、少なくとも1つの消化槽と、 20

前記少なくとも1つの糖を含有する前記水溶液の少なくとも一部分を、リグニンを含む前記不溶性部分から分離するためのセパレーターと、を含む、システム。

【請求項 27】

リグニンを含む前記不溶性部分を乾燥させるための乾燥機と、

第1の不溶性材料を粉砕するための粉砕機と、

内部アジテーターを備える容器を含む消化槽であって、該容器は粉砕された第1の不溶性材料、少なくとも1つの酵素、及び水溶液の混合物を保持するのに、また少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を、リグニンを含む前記リグノセルロース材料の不溶性部分から遊離する酵素加水分解のために、攪拌しながら前記混合物を接触させるのに使用可能 30

である、少なくとも1つの消化槽と、
前記少なくとも1つの糖を含有する前記水溶液の少なくとも一部分を、リグニンを含む前記不溶性部分から分離するためのセパレーターと、
を更に含む、請求項26に記載のシステム。

【請求項 28】

前記消化槽から遊離したC6糖及び／又はC5糖を受け取り、該C6糖及び／又はC5糖をエタノールへと発酵させるのに適した生物学的発酵処理システムを更に含む、請求項26に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明はリグニン及び他の生物学的生成物を草本植物から酵素によって単離すること、具体的にはリグニン及び糖をリグノセルロース材料から酵素によって単離するプロセス、並びにこれらのプロセスを実施するシステムに関する。

【0002】

本願は、2011年1月24日に出願された米国仮特許出願第61/435,492号の米国特許法第119条(e)項に基づく利益を主張するものであり、この出願の全体は引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【背景技術】

【0003】

50

生物学的生成物の生産のための豊富に存在し得るバイオマス源は草本植物のリグノセルロース繊維である。例えば植物繊維に見られる一部のセルロース多糖類をリグニンから分離し、発酵性糖へと分解することができる。これらの糖を発酵させ、例えばアルコール（例えばエタノール、ブタノール）、有機酸（例えば酢酸、クエン酸）、及び他の生成物（例えば他の炭水化物、タンパク質）を生産することができる。リグニンは例えば燃焼することでエネルギー源として、また様々な化学物質及び組成物のための原材料又は添加剤としての多様な用途に使用されている。しかしながら一般的に理解されるように、リグノセルロース材料の天然構造が、リグノセルロース材料の苛酷な及び／又はエネルギー集約的な手段を用いない分画化に対する耐性を非常に強いものにしている。

【0004】

リグノセルロース系バイオマスは例えば、約35wt%～50wt%のセルロース、約15wt%～35wt%のヘミセルロース、及び約5wt%～30wt%のリグニン、又はその起源に応じて他の割合で上記のものを含有し得る。セルロース、ヘミセルロース、及びリグニンは多くの場合、リグノセルロース系バイオマスの主要構成要素であり得るが、結合形態及び非結合形態の両方で存在する他の材料が様々な量で存在することもある。これらの微量の構成要素には、例えばタンパク質、ウロン酸、酢酸、灰分、スクロース等の遊離糖、土壌物質、及び異物が含まれ得る。セルロースは一般的にグルコースの重合体である。グルコース分子を β -1, 4-グリコシド結合によって連結することができる。ヘミセルロースは一般的に主にキシロース及びアラビノース等の五炭糖を含有する重合体であり、幾つかのグルコース及びマンノースが全体に分散されている場合がある。ヘミセルロースは、植物細胞壁においてセルロース及びリグニンと相互作用し、植物細胞壁を強固にする重合体を形成する傾向がある。リグニンは柔軟性を付加すると同時にセルロース-ヘミセルロースマトリックスの結合を助ける傾向がある。リグニン重合体の分子構造は通常、例えばランダムで無秩序である場合があり、主に多糖類によって相互接続された炭素環構造（例えばメトキシ基、ヒドロキシ基、及びプロピル基を有するベンゼン環）からなり得る。リグニン-ヘミセルロースマトリックスは通常セルロースを内包し、リグノセルロース材料を消化し難いものにしている。

【0005】

バイオマスにおいてリグニンをバイオポリマーから分離するためのリグノセルロース材料の処理は積極的に研究されている分野であり、多様な熱的前処理アプローチ、機械的前処理アプローチ、及び化学的前処理アプローチ（及びそれらの組合せ）が研究され報告されている。これまで、リグニンをリグノセルロース材料の他の成分から分離するために、例えば強い化学物質及び／又は強力な加熱処理を伴う苛酷な処理が使用されてきた。一部の従来のプロセスにおける草本植物のリグノセルロース繊維材料でのセルロース多糖類の、例えば保護リグニンからの分離は、高いエネルギーコストを必要とするか、又は変性生成物若しくは汚染生成物を生じるか、又はそれらの下流の処理に影響を与えるか、又は他の欠点を有していた。

【0006】

製紙工場で用いられているようなクラフトパルプ化プロセス又は亜硫酸パルプ化プロセスは、製紙の予備操作としてパルプを濃酸（例えば硫酸）、硫化ナトリウム、又は硫酸塩で前処理することによって、リグニンを軟材、硬材、又はその両方のセルロース繊維から取り出す。リグノセルロース材料を濃酸又は濃アルカリ／アルカリ性剤で処理することによって、硫黄で汚染されたリグニン材料であるリグノスルホネートが生成される場合がある。リグノセルロース材料の苛酷な酸処理は阻害物質の存在をもたらすこともあり、阻害物質によって生物学的生成物の下流の処理が複雑になり、これに伴う解毒工程により生産コストが増大し得る。リグニンを取り出し、セルロースを露出させるための別の従来技法には、例えばエネルギーコストの増大を伴い得る高圧蒸気の使用が含まれる。リグニン及び糖を綿実殻から遊離するための従来プロセスの実施には、例えば多大なエネルギーが要求される、材料の高温（例えば180℃超）及び蒸気圧による処理が含まれる。リグノセルロース材料に対する濃酸／アルカリと蒸気処理との併用も報告されているが、これは上

10

20

30

40

50

記の欠点を増幅させる場合がある。別の従来プロセスはリグノセルロース系バイオマス原料を電離するために照射装置を使用してきた。照射はリグニン構成要素及びそのリグニン誘導体の構造を変える可能性がある。他の従来技術は他の加水分解酵素の放出を高めるために組換えポリペプチドを使用してきた。組換えポリペプチドの使用はより高い材料コストを伴う場合があり、天然の作用物質は使用されない。従来の実施では、連続処理のためにバイオリアクターフィルムを用いた連続バイオリアクタープロセスも使用されてきた。バイオリアクターフィルムの使用には、構成要素の一貫しない収率を伴う処理時間の延長が必要となる場合がある。他の従来プロセスは、必要とされる放出作業を行うために生物の生きた嫌気性培養物を使用してきた。生きた嫌気性培養物の使用は処理の複雑さ及びコストを増大させる場合がある。

10

【0007】

本発明者らは、リグニン及び糖のようなリグノセルロース材料（例えば綿実殻）の或る特定の構成要素及び構成要素の誘導体は、抽出されたリグニン及び糖を分解せずに、廃棄副産物を少なくした上でより純粋な形態で単離することができれば、工業原材料としてより有用になるであろうことを認識している。本発明者らは更に、天然でより環境にやさしい再生可能な活性剤のみを使用してエネルギー要件を低くしてリグニン及び糖を綿実殻等の草本植物材料から単離する必要性を認識している。

【発明の概要】**【0008】**

本発明の特徴は、全酵素プロセスを用いてリグニン及び他の生物学的生成物を草本植物のリグノセルロース材料から単離する方法を提供することである。

20

【0009】

本発明の更なる特徴は、全酵素プロセスを用いてリグニン及び糖を綿実殻から単離する方法を提供することである。

【0010】

本発明の別の特徴は、高温処理、電離照射処理、強酸、強アルカリ性剤、キレート剤、組換えDNA、及び／又は生きた嫌気性微生物培養物を必要とせずに全酵素プロセスを用いてリグニン及び糖を綿実殻から単離する方法を提供することである。

【0011】

本発明の更なる特徴及び利点は、以下の明細書で一部説明され、本明細書から一部明らかとなるか、又は本発明の実施により認識することができる。本発明の目的及び他の利点は、本明細書及び添付の特許請求の範囲において具体的に指摘された要素及び組合せを用いて実現及び達成される。

30

【0012】

本明細書において具体化されるとともに広く記載される、これらの利点及び他の利点を達成するために、並びに本発明の目的に従って、本発明は一部、リグノセルロース材料の構成要素を単離する方法であって、リグノセルロース材料を、増大した表面積を有するより小さな粒径へと粉砕することを含む、方法に関する。次いで、粉砕されたリグノセルロース材料、少なくとも1つの酵素ブレンド、及び水溶液を含む混合物を、リグニンを含むリグノセルロース材料の不溶性部分から少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を遊離する酵素加水分解のために、リグノセルロース材料の事前の非酵素的なリグニン分離処理をせずに、酵素消化する。それから、少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を含有する水溶液の少なくとも一部分を生物学的生成物のいずれか又は両方の回収のためにリグニンを含む不溶性部分から分離する。

40

【0013】

本発明は更に、リグノセルロース材料の構成要素を単離する方法であって、リグノセルロース材料を、第1の増大した表面積を有するより小さな粒径へと粉砕することと、次いで、粉砕されたリグノセルロース材料、第1の酵素ブレンド、及び第1の水溶液を含む第1の混合物を、リグニンを含むリグノセルロース材料の第1の不溶性部分から少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を遊離する第1の酵素加水分解のために、リグノセルロー

50

ス材料の任意の事前の非酵素的なリグニン分離処理をせずに酵素消化することと、を含む、方法に関する。それから、少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を含有する第1の水溶液の少なくとも一部分を第1の不溶性部分から分離した後、分離した第1の不溶性部分を、第2の増大した表面積を有するより小さな粒径へと粉碎する。次いで、粉碎された第1の不溶性部分、第2の酵素ブレンド、及び第2の水溶液を含む第2の混合物を、リグニンを含む第2の不溶性部分から少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を遊離する第2の酵素加水分解のために酵素消化した後、リグニンを含む第2の不溶性部分を第2の水溶液から分離する。

【0014】

上記の包括的記載及び下記の詳細な記載はともに例示的なものであり、説明的なものにすぎず、特許請求される本発明の更なる説明を与えることのみを意図するものであることが理解されよう。

【0015】

本発明で使用される場合、「リグノセルロース材料」又は「リグノセルロース」は、マトリックス内にリグニン及びセルロース、任意に更にはヘミセルロースを含有する植物細胞壁材料を指す。これらの成分を含有するリグノセルロース材料は、草本材料、農業残留物、森林残留物、都市固形廃棄物、再生紙及び古紙（無漂白紙）、並びにパルプ製紙工場残留物（例えば無漂白パルプ製紙工場残留物）であり得るが、これらに限定されない。

【0016】

「リグニン」は、植物及び一部の藻類の二次細胞壁の不可欠な部分である複合バイオポリマーを指す。リグニンは細胞壁内においてセルロース、ヘミセルロース、及び存在する場合はペクチン構成要素の間の間隙を埋める。リグニンは例えばCAS番号9005-53-2によって特定することができる。

【0017】

「C6糖及び／又はC5糖」は、例えばヘキソース（「C6」）糖（例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、グロース、イドース、タロース、アルドヘキソース、アロース、アルトロース等のアルドヘキソース；及びプシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース等のケトヘキソース；又はそれ以外、単独で又はそれらの任意の組合せで）、及び／又はペントース（「C5」）糖（例えばキシロース、アラビノース、リボース、リキソース等のアルドペントース；リブロース、キシルロース等のケトペントース；及びそれ以外、単独で又はそれらの任意の組合せで）を含む単糖類を指す。ヘキソースは、化学式が $C_6H_{12}O_6$ である6つの炭素原子を有する単糖である。ヘキソースは、例えば官能基によって、1位にアルデヒド官能基を有するアルドヘキソースと、2位にケトン官能基を有するケトヘキソースと、に分類することができる。知られているとおり、六炭のアルドース糖はピラノース構造を含み得る環状ヘミアセタールを形成することができる。溶液中で、開鎖形態及び環状形態の六炭のアルドース糖は平衡状態にあり得るか、又は互いに他の相対比で存在し得る。添付の図面に含まれる図は、説明的なものにすぎず、必ずしもこれに限定されないが、D-グルコース及びD-マンノースの開鎖形態及び環状形態を示している（図4）。指定の図に示されるように、ヘキソースの炭素の番号はその開鎖形態に対して指定されている（同様の炭素付番方式がペントースに用いられている）。これに関して提示されている図に示された環状環における任意のひだ状（puckered：歪み）構造（例えば椅子型立体構造）は説明を簡略化するために示しておらず、これらの構造は当業者にとって理解されるものとする。ペントースは、化学式が $C_5H_{10}O_5$ である5つの炭素原子を有する単糖である。ペントースは、例えば1位にアルデヒド官能基を有するアルドペントースと、2位にケトン官能基を有するケトペントースとの2つの群に分類することができる。知られているとおり、五炭のアルドース糖はフラノース構造を含み得る環状ヘミアセタール形態を有することもできる。五炭のアルドース糖のヘミアセタール環状形態は自然発生的に開環及び閉環することがあり、変旋光が起こり得る。

【0018】

「グルカン」はグリコシド結合によって結合したD-グルコースモノマーの多糖を指す

。グルカンは、単独で又はそれらの任意の組合せで β -グルカン（例えばセルロース、カードラン、ラミナリン、クリソラミナリン、レンチナン、リケニン、プレウラン（pleuran）、ザイモサン）、 α -グルカン（例えばデキストラン、グリコーゲン、プルラン、デンプン）を指し得る。

【0019】

「酵素活性」は特に他に指示がなければ、酵素の加水分解活性を指す。

【0020】

「非酵素的なリグニン分離処理」は、リグノセルロース材料の加水分解を引き起こすか又は誘導することができる、高温／高圧プロセス、電離照射プロセス、強酸処理、強アルカリ性剤処理、キレート剤処理、組換えDNA処理、若しくは生きた嫌気性微生物培養物による処理、又は酵素ベースの加水分解プロセスではない任意の他の処理プロセスのいずれかを指し、リグニンをリグノセルロース材料のC6糖及び／又はC5糖から検出可能な量で分離するには十分苛酷なものである。

【0021】

本願に組み込むことによりその一部をなすものとする添付の図面は、本発明の態様を示すものであり、本明細書とともに本発明の原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の一例に従ってリグニン及び他の生物学的生成物をリグノセルロース材料から単離する方法のプロセスブロック図である。

【図2】本発明の一例に従ってリグニン及び糖を綿実殻として例示されるリグノセルロース材料から単離する方法のプロセスブロック図である。

【図3】本発明の一例に従ってリグニン及び糖をリグノセルロース材料から単離する方法のプロセスフロー図である。

【図4】D-グルコース及びD-マンノースの開鎖形態及び環状形態の非限定的な図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、回収可能な糖及び／又は他の生物学的生成物の同時遊離とともにリグニンを草本植物から酵素によって精製する方法を提供する。本方法は、生物学的生成物の品質を落とし得る及び／又はそうでなければ生産を複雑にし得る若しくは生産のコストを増大し得るリグノセルロース材料の任意の苛酷な非酵素的な前処理又は同時処理を必要としない、全酵素ベースのプロセスであり得る。本方法では、リグノセルロース原料を、原料粒子状物質の表面積を増大する及び／又はそうでなければ該材料をセルロース分子のその後の酵素加水分解処理により利用しやすくするために、原料粒子状物質の物理的サイズを物理的に低減することにより前処理することができる。本発明の方法において前処理された（サイズを変更した）リグノセルロース材料で続いて行われる酵素加水分解では、セルロース分子を分解して発酵性糖及び他のより小さな分子を遊離することができ、粉碎前処理をせずに可能なものよりも高度に精製された形態でそれらのそれぞれの回収のために、リグニンから分離する。例えば、本発明の方法において中間材料として生成される粉碎された（サイズを変更した）リグノセルロース材料におけるセルロース鎖を、C6糖分子及び／又はC5糖分子へとより容易に分解し、酵素のみを使用してリグニンから単離することができる。本方法に用いられる粉碎を、リグノセルロース原料の加水分解を引き起こさない又は誘導しない好ましい方法で行うことができ、材料のサイズを変更する以外は、元の成分（例えばリグニン、セルロース）は続く単離処理のために実質的に又は本質的に完全に無傷のままにする。本方法は粉碎された原料に対する酵素加水分解反応を提供し、ここで酵素ブレンドは1つ又は複数の消化段階に使用される。本方法で可能な全体的な戦略は、粉碎されたリグノセルロース原料に存在する多糖類（例えばセルロースポリマー、キシランポリマー、ヘキソースポリマー、及び／又はペントースポリマー）を可能な限り多く取り除き（消化し）、本質的に無傷の形態で単離されたリグニン、並びにC6糖及び／又は

C 5 糖、例えば発酵性 C 6 糖及び／又は C 5 糖を得ることである。さらに、リグノセルロース材料を、本発明の方法において比較的穏和な条件（例えば約 5 0 °C、約 5 の p H、及び略大気圧、又は他の穏和な条件）で酵素によって加水分解することができる。これによって、より苛酷な加水分解条件に伴い得る望ましくない副産物（例えば産物汚染物質及び反応阻害物質）の形成が低減した効率的なセルロース分解が可能となり得る。さらに、本明細書の実施例に記載の実験研究の結果により示されるように、リグノセルロース原料の苛酷な非酵素的な前処理（例えば強酸処理又は高温及び高圧でのより弱い酸による処理）を含まなくても、本発明の方法はリグノセルロース材料の大幅な酵素加水分解を達成し、高度に精製されたリグニン、発酵性糖、又はその両方を提供することができることが見出されている。

10

【0024】

草本植物は本発明の方法を用いて処理することができるリグノセルロース材料の供給源であり得る。リグノセルロース材料は例えば、リグニン（例えば乾燥固体ベースで少なくとも 1 w t %、又は少なくとも 3 w t %、又は少なくとも 5 w t %、又は少なくとも 1 0 w t %、又は少なくとも 1 5 w t %、又は少なくとも 2 5 w t % のリグニン）を含有する木質材料、草本材料、及び／又はこれらの材料に由来する廃棄産物であり得る。リグノセルロース材料は例えば、農業残留物及び農業廃棄物（例えば綿実殻、穀物殻、サトウキビバガス、トウモロコシ茎葉、トウモロコシ穂軸、麦藁、スイッチグラス、葉、茎、外皮等）、森林産物（例えば軟材、硬材等）、廃材（例えばおが屑、木片、樹皮等）、製紙工場のパルプ、並びに古紙若しくは再生紙（例えば無漂白紙、新聞印刷用紙）、並びに他のリグノセルロース材料のカテゴリー又はそれらの任意の組合せにグループ分けすることができる。リグノセルロース材料では、炭水化物ポリマー（例えばセルロース及びヘミセルロース）がリグニンに強く結合し、発酵性糖又はその前駆体がリグニンとヘミセルロースとで形成されるマトリックス内に閉じ込められている。本発明の方法は、所望の生物学的生成物を分解又は汚染することなく、またリグノセルロース材料の苛酷な非酵素的処理を要求することなく経済的な方法で、リグノセルロース材料からのリグニンの単離及び精製、並びに他の有用な生物学的生成物の生成に対するこの障害を乗り越えることを目的とし得る。

20

【0025】

本方法では、リグノセルロース材料を粒子状物質の形態で処理することができ、粒径は粒子を処理するのに使用される酵素との相互作用に利用可能な表面積に直接影響し得るため、重要であり得る。本発明の方法では、粒径の低減（すなわち粉碎）を、より純度の高い生成物を提供するために酵素加水分解処理の前に行う。理論に束縛されることを望むものではないが、酵素消化前の粉碎は、材料の全体の表面積を増大することによって酵素のリグノセルロース材料への接近可能性を増大することができる。これによって、酵素加水分解活性がリグノセルロース材料上の露出面でより容易に生じると考えられ、セルロースをリグニンからより容易に切り離すことができる。遊離したセルロースを更に酵素によって加水分解し、単純な単糖又は他の発酵性糖へと分解することができる。さらに、酵素加水分解を、例えば大気圧での穏和な加熱条件下での弱酸性の有機酸緩衝水溶液中の粉碎されたリグノセルロース粒子に対して実施することができ、これにより苛酷な化学物質又はエネルギー集約的な操作に対する必要性が低減又は回避される。

30

40

【0026】

一般的機構に関して、酵素ブレンドを本発明の方法においてリグノセルロース材料の一段階消化又は多段階消化で使うことができる。六炭（C 6）糖及び／又は五炭（C 5）糖は草本材料（例えば綿実殻（C S H））のバイオポリマーマトリックスから遊離される。リグニンは加水分解しない固体画分中に残存バイオポリマーとして残る。消化攪拌を止めた後、リグニンが互いに凝集し、析出物として溶液から容易に析出し、これを更に処理し、及び／又は最終生成物として回収することができる。本発明の方法の酵素加水分解のように化学処理によってスルホン化されていない天然の草本材料に対して加水分解を行う場合、得られる凝集したリグニンはスルホネートの形態の硫黄には汚染されない。遊離

50

したC6糖及び／又はC5糖（例えばグルコース、マンノース、キシロース、アラビノース等）は加水分解溶液中で可溶化又は懸濁し、消化混合物の液体画分からの回収、及び所望に応じて更なる潜在的用途に利用可能である。リグニンの除去後、除去された糖画分（単数又は複数）において回収されたC6糖及び／又はC5糖を、例えばバイオエタノール発酵産業において認識されるものを含む選ばれた適切な変換生物を導入することによって発酵法を用いてエタノール又は他の生化学系生成物へと直接変換することができる。リグニンは燃料源として、原材料若しくは添加剤として、及び／又は他の用途に使用することができる。

【0027】

図1を参照すると、本発明の方法10は例えば、リグノセルロース材料（LCM）を増大した表面積を有するより小さな粒径へと摩滅させる粉碎工程1を含み得る。リグノセルロース材料は、例えば約10mm未満、若しくは約7mm未満、若しくは約5mm未満、若しくは約3mm未満、若しくは約2mm未満、若しくは約1mm未満、若しくは約0.5mm未満の粒径、又は約0.001mm～約10mm、若しくは約0.01mm～約7mm、若しくは約0.1mm～約5mm、若しくは約1mm～約3mmのサイズ、又はこれらの範囲の値の任意の他の組合せへと粉碎することができる。粒径は、例えばメッシュ篩群によって又はマイクロメートル目盛を備える顕微鏡を使用して極微細粒子に対して決定することができる。示される粒径は絶対値又は平均値であり得る。粉碎された粒子の例えば少なくとも75%（体積基準）、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は100%が、示される範囲のいずれかの内にあるとすることができる。最適範囲は処理対象のリグノセルロース材料のタイプによって異なり得る。リグノセルロース材料のサイズはリグニン又はセルロース成分が損傷を受けるサイズまでは低減されないことが好ましい。理論に束縛されることを望むものではないが、リグノセルロース材料において標的成分又はそれらの前駆体の損傷が起こる閾値に達するまでは、サイズの低減の程度（表面積の増大の程度）が漸増するにつれて、続く酵素消化において粉碎されたリグノセルロース材料で達成可能な酵素加水分解活性の程度及び／又は酵素加水分解の速度は漸増し得ると考えられる。

【0028】

次いで図1に示されるように、粉碎されたリグノセルロース材料を酵素消化することができ、例えば3つの異なるプロセス経路A、B、又はCに従って、得られる生物学的生成物を分画化することができる。3つ全てのプロセス経路には、プロセス工程（複数の場合もあり）2として包括的に特定される酵素消化レジメンが含まれる。3つの異なるシナリオでは、消化は概して、少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を、リグニンを含むリグノセルロース材料の不溶性部分から遊離する酵素加水分解のために、リグノセルロース材料の任意の事前の非酵素的なリグニン分離処理をせずに、粉碎されたリグノセルロース材料、少なくとも1つの酵素ブレンド、及び水溶液を含む混合物を接触させることを含む。図1に示されるように、消化レジメン2を一段階又は多段階で行うことができる。

【0029】

プロセス経路Aの工程2aでは、指定の混合物を、セルロースに対するセルロース加水分解活性を有する少なくとも1つの酵素、任意でヘミセルロースに対して加水分解活性を有する少なくとも1つの酵素、及びグルカンに対する加水分解活性を有する少なくとも1つの他の酵素で同時に酵素消化する。次いで工程3aで、糖を含有する水溶液の少なくとも一部分を、リグニンを含む不溶性部分から分離し、リグニン含有生成物31と糖含有水性流32とを得る。各リグニン生成物流及び糖生成物流を別々に更に処理することができる。例えば、更なる取扱及び使用又は他の取扱の前にリグニン生成物を乾燥させることができる。糖生成物流は、例えばエタノール等の他の生成物を生産するために生物学的発酵施設において処理することができる。

【0030】

プロセス経路Bの工程2bでは、混合物を、複数の段階2b-1及び段階2b-2において連続的に酵素消化することができる。セルロースに対するセルロース加水分解活性を

有する少なくとも1つの酵素及び任意でヘミセルロースに対して加水分解活性を有する少なくとも1つの酵素を含む第1の酵素ブレンドを第1の消化2b-1で使用する事ができる。グルカンに対する加水分解活性を有する第2の酵素ブレンドを第2の消化2b-2で使用する事ができる。液固分離3b-1及び3b-2をそれぞれの消化段階2b-1及び2b-2の後で行い、糖含有水性流33及び水性残留糖／洗浄液34をそれぞれ取り出す。糖含有水性流33及び水性残留糖／洗浄液34も示されるように更に処理することができる。リグニン含有生成物35を第2の液固分離工程3b-2により生成する。リグニン含有生成物35も示されるように更に処理することができる。

【0031】

プロセス経路Cの工程2cでは、混合物を第1の消化においてセルロース分解活性を有する少なくとも1つの酵素及びヘミセルロース分解活性を有する少なくとも1つの酵素によって一段階で酵素消化する。液固分離3cを単一の消化段階2cの後に行い、水性糖及びグルカン含有流36を取り出し、リグニン含有生成物37を単離する。このプロセス流も示されるように更に処理することができる。このプロセス経路の水性流36に存在し得る加水分解されていないグルカンバイオポリマー、例えばペクチンは、二次消化が省略されていることから、発酵酵母による作用を受けない場合がある。

【0032】

工程2a、工程2b-1、又は工程2cでは、第1の酵素ブレンドは本明細書で適用される場合、より詳細に記載される酵素の組合せを含むことができる。処理対象のリグノセルロース材料のタイプによっては、ヘミセルロースの分解が残りのプロセスを単純なものにし、ヘミセルロース及びセルロース由来の糖の潜在的に複雑な下流の分離の必要可能性を排除することができる。したがって、第1の酵素ブレンドは、少なくとも一方がセルロースに対する加水分解活性を有し、少なくとも他方がヘミセルロースに対する加水分解活性を有する異なる酵素を組み合わせたものであり得る。さらに、これらの工程2a、工程2b-1、及び工程2cで使用される第1の酵素ブレンドは、例えばセロビアーゼ、若しくはβ-グルコシダーゼ若しくはα-グルコシダーゼ、又はそれらの組合せと組み合わせた、少なくとも1つのエンドグルカナーゼ若しくはエキソグルカナーゼ、又はその両方を含む酵素群を含み得る。いかなる理論にも束縛されることを望むものではないが、セロビアーゼ（又はβ-グルコシダーゼ若しくはα-グルコシダーゼ）の存在が例えばフィードバックを抑制することができると考えられる。フィードバックはエンドグルカナーゼ（又はエキソグルカナーゼ）が例えばリグノセルロースマトリックスからC2～C5モノマーを切断する傾向があり、C2～C5モノマーを酵素加水分解反応の進行を阻害し得るレベルまで高める現象を指す。セロビアーゼ、又はβ-グルコシダーゼ若しくはα-グルコシダーゼは例えばC2～C5モノマー（例えばC2～C5短鎖糖）を分解し、それによりエンドグルカナーゼ及び／又はエキソグルカナーゼに関連する酵素反応に対するフィードバックを抑制又は阻害することができる。この点において選択肢として、セロビアーゼを使用して、フィードバックを抑制することができる。相当量のC6糖及びC5糖（例えばリグノセルロース原料に存在する元の理論量をベースとして少なくとも50重量%、又は少なくとも60重量%、又は少なくとも70重量%、又は少なくとも80重量%、又は少なくとも90重量%、又は少なくとも95重量%、又は少なくとも99重量%）を、プロセス経路Bの第1の消化工程2b-1後にリグニンから遊離することができる。

【0033】

プロセス経路Aの工程2aでの第1の消化と効果的に組み合わせられた、プロセス経路Bの第2の消化段階2b-2は、リグニンの二次クリーニングを行う第2の酵素ブレンド、例えばグルカナーゼとペクチナーゼとの組合せ等、又はこの酵素ブレンドに関して本明細書に記載される他の酵素を使用することができる。この二次クリーニングはグルカン（例えばペクチン）の第2の鎖を破壊すること、及びそれらを遊離糖（例えばガラクトース、マンノース）としてリグニンから取り出すことを伴い得る。

【0034】

プロセス経路Aの同時消化の性能は、例えば達成される遊離したC5糖及びC6糖のリ

グニンの純度並びに遊離したC5糖及びC6糖の量に関して、プロセス経路Bの多段階消化の性能と同程度であり得るが、必ずしもそうである必要はない。例えば、プロセス経路A及びプロセス経路Bにより得られるリグニンの純度は例えば、互いに約±25%内、又は約±20%内、又は約±15%内、又は約±10%内、又は約±5%内、又は約±2%内にあり得る。プロセス経路A及びプロセス経路Bにより得られるリグニン及び／又はC6糖及びC5糖の収率は例えば同じ許容値のいずれかの内にあり得る。2つのプロセス経路A及びプロセス経路Bの結果の相違は、プロセスAの生成物流では、第2の酵素ブレンドによりリグノセルロースマトリックスから遊離された糖及び任意のより小さな分子と第1の酵素ブレンドの作用により遊離した糖及び他の生物学的生成物とが組み合わされており、一方でプロセス経路Bではこれらの生物学的生成物を各消化段階及び関連する液固分離工程の後にリグニン固体から取り除かれた別々の生成物流において回収することができることであり得る。プロセス経路Cでは、リグニンの第2の酵素ブレンドによる第2のクリーニングは含まれない。プロセス経路Cのリグニン生成物は依然として高純度のリグニン生成物を提供することができるが、同じ材料に適用する場合、プロセス経路A及びプロセス経路Bで達成可能なものに満たない傾向があり得る（処理対象の特定のリグノセルロース材料に応じる）。重要なこととしては、プロセス経路A、プロセス経路B、及びプロセス経路Cでは、使用する酵素はリグニンに対して酵素的に不活性であるのが好ましく、C6糖及びC5糖を遊離する際、リグニンが無傷のままであるのが好ましい。リグニンに対する酵素効果を有し得る酵素、例えばラッカーゼは使用しないのが好ましいが、断定的に排除するものではない。

【0035】

本方法を回分式に又は連続して行うことができる。いずれの戦略でも、一段階又は多段階であるかに関わらず本明細書で記載されるような酵素消化順序をリグノセルロース材料の構成要素の単離に用い、少なくとも最初の酵素消化段階の前に、リグノセルロース材料を増大した表面積を有するより小さな粒径へと粉砕する。好ましくは、元のリグノセルロース原料及び粉砕されたリグノセルロース材料のいずれも最初の又は単一の酵素消化段階が適用される前に、任意の非酵素的なリグニン分離処理には供しない。多段階を用いる場合、リグノセルロース材料は、連続する消化段階のそれぞれの前に段階的により小さなサイズへと粉砕し、表面積を増大させるのが好ましい。さらに、示されるように本発明の方法では、酵素の第1のブレンド及び第2のブレンドを一消化段階において同時に、又は別々の消化段階において別々に使用することができる。示されるように、第1の酵素ブレンドは好ましくは、例えば少なくともセルロースに対するセルロース加水分解活性を有する酵素、及び任意で少なくともヘミセルロースに対する加水分解活性を有する少なくとも1つの酵素、又はその両方を含み得る。第2の酵素ブレンドは好ましくは、例えば残留糖又は他の非リグニン材料を取り除くためのリグニンを含有する固体粒子の二次クリーニング又は例えば「清澄化（polishing）」をもたらす、少なくともグルカンポリマーに対する加水分解活性を有する酵素を含み得る。

【0036】

第1の酵素ブレンドは例えば、酵素の以下の1)群～5)群の内の2群以上から選択される少なくとも1つの酵素を含み得る：

1) エンドグルカナーゼ（1, 4-β-D-グルカノヒドロラーゼ）、カルボキシメチルセルラーゼ（CMCアーゼ）（これは例えばバイオポリマー鎖の本体に沿って攻撃を与えることができ、セルロース鎖のランダム切断を生じさせ、グルコース及びセロオリゴ糖を得ることができる）；

2) エキソグルカナーゼ（1, 4-β-D-グルカンセロビオヒドロラーゼ）、アビセララーゼ（C1）（これは一次構造としてセロビオースを有するセルラーゼの非還元端にエキソ（末端）攻撃を与えることができる）；

3) セロビアーゼ、β-グルコシダーゼ、α-グルコシダーゼ（これらは示されるように、エンドグルカナーゼ及び／又はエキソグルカナーゼに関連する酵素反応に対するフィードバックを抑制又は阻止することができ、セロビオースをグルコースへと加水分解する

ことができる) ;

4) エンドー 1, 4- β -キシラナーゼ、エンドー (1, 4)- β -キシラノヒドロラーゼ (ここでキシラナーゼは例えばヘミーセルロースを分解することができる) ;

5) β -1, 3-キシラナーゼ、1, 3- β -D-キシロシダーゼ、及びエキソ-1, 3- β -キシロシダーゼ。

【0037】

1) 群~5) 群の中の複数の群から選択される酵素の任意の組合せを第1の酵素ブレンドに使用することができる。これらの組合せは、1) 群~5) 群の内の少なくとも2群に由来する少なくとも1つの酵素、又は1) 群~5) 群の内の少なくとも3群に由来する少なくとも1つの酵素、又は1) 群~5) 群の内の少なくとも4群に由来する少なくとも1つの酵素、又は1) 群~5) 群の5群全てに由来する少なくとも1つの酵素を含み得る。示されるように、1つの好ましいブレンドは1) 群及び/又は2) 群の酵素と3) 群の酵素とのブレンドである。別の組合せは1) 群、2) 群、3) 群の酵素、並びに4) 群及び/又は5) 群の少なくとも1つの酵素、又はその両方であり得る。

【0038】

第2の酵素ブレンドは例えば、酵素の以下の1 a) 群~20 a) 群の2群以上に由来する少なくとも1つの酵素を含み得る:

1 a) エンドー 1, 3 (4)- β -グルカナーゼ、

2 a) ラミナリナーゼ (エンドー 1, 3- β -グルカナーゼ)、

3 a) エキソ-1, 2-1, 6- α -マンノシダーゼ、

4 a) β -D-キシロピラノシルー (1, 4)- β -D-キシロピラノース、

5 a) α -N-アラビノフラノシダーゼ、

6 a) フェルロイルエステラーゼ、

7 a) エンドー 1, 5- α -アラビナナーゼ、

8 a) ペクチナーゼ、

9 a) ポリガラクトツロナーゼ、

10 a) ペクチンエステラーゼ、

11 a) アスパラギン酸プロテアーゼ、

12 a) メタロプロテアーゼ、

13 a) エンドー (1, 4)-マンナナーゼ、

14 a) フィターゼ、

15 a) α -グルクロニダーゼ及び β -グルクロニダーゼ、

16 a) ヘキセヌロニダーゼ、

17 a) アルカリホスファターゼ及び酸ホスファターゼ、

18 a) α -ガラクトシダーゼ及び β -ガラクトシダーゼ、

19 a) β -マンノシダーゼ、

20 a) α -フコシダーゼ。

【0039】

1 a) ~20 a) のこれらの酵素群の任意の組合せを第2の酵素ブレンドに使用することができる。これらの組合せには、例えば1 a) 群~20 a) 群の内の少なくとも2群に由来する少なくとも1つの酵素、又は1 a) 群~20 a) 群の内の少なくとも3群に由来する少なくとも1つの酵素、又は1 a) 群~20 a) 群の内の少なくとも4群に由来する少なくとも1つの酵素、又は1 a) 群~20 a) 群の内の少なくとも5群に由来する少なくとも1つの酵素、及び同様に1 a) 群~20 a) 群のそれぞれに由来する少なくとも1つの酵素の組合せまでが含まれ得る。1つの方法では、例えば1 a) 群、2 a) 群、及び8 a) 群に由来する少なくとも1つの酵素が第2の酵素ブレンドに含まれる。別の方法では、1 a) 群~20 a) 群の大部分に由来する少なくとも1つの酵素が第2の酵素ブレンドに使用される。別の方法では、1 a) 群~20 a) 群の内の2群、又は3群、又は4群、又は5群、又は6群、又は7群、又は8群、又は9群、又は10群、又は11群、又は12群、又は13群、又は14群、又は15群、又は16群、又は17群、又は18群、

又は19群、又は20群全てに由来する少なくとも1つの酵素が第2の酵素ブレンドに使用される。

【0040】

添加される第1の酵素ブレンドの総量は例えば、固体重量ベースでリグノセルロース材料に対して約0.001重量%～約3重量%の総酵素、又は約0.01重量%～約1重量%の総酵素、又は約0.015重量%～約0.8重量%の総酵素、又は約0.05重量%～約0.6重量%の総酵素、又は約0.1重量%～約1重量%の総酵素、又は約0.2重量%～約0.8重量%の総酵素、又は約0.25重量%～約0.75重量%の総酵素、又は約0.4重量%～約0.6重量%の総酵素、又は約0.5重量%の総酵素であり得るが、他の量を用いてもよい。1)群～5)群のそれぞれに由来する使用酵素の割合は同じであっても又は異なってもよい。第1の酵素ブレンドの酵素の割合は例えば、10wt%～90wt%の1)群及び2)群の総酵素、10wt%～90wt%の3)群の総酵素、並びに0wt%～90wt%の4)群及び5)群の総酵素；又は10wt%～90wt%の1)群及び2)群の総酵素、10wt%～90wt%の3)群の総酵素、並びに10wt%～90wt%の4)群及び5)群の総酵素；又は20wt%～40wt%の1)群及び2)群の総酵素、20wt%～40wt%の3)群の総酵素、並びに20wt%～40wt%の4)群及び5)群の総酵素；又は他の割合であり得る。使用する第2の酵素ブレンドの総量は例えば、第1の酵素ブレンドに関して示されているものと同程度の量、又は他の有効量であり得る。第2の酵素ブレンドにおける酵素の割合は例えば、処理対象のリグノセルロース材料又はその固体画分誘導体の固体重量ベースで少なくとも0.5wt%、又は0.5%～50%、又は約2%～約10%の1a)群～20a)群の大部分、又はこれらの群の内の他の指定の数の群に由来する少なくとも1つの酵素であり得る。本明細書に示される任意の酵素の任意量は活性酵素に基づくものであり得る。

【0041】

酵素ブレンドを、溶液中で又は基材を使用して乾燥形態で導入することができる。各ブレンドの個々の酵素を（例えば共通の溶液中に）予混合することができるか、又は個別に若しくは他のより小さな包含される組合せで消化槽へと別々に導入し、*in situ*で酵素ブレンドを形成することができる。酵素を乾燥形態で消化槽に導入することもでき、ここでは酵素は例えばタルク、カオリン、デンドライト等の基材とともに使用される。乾燥酵素に対する基材は（例えば基材に起因する固体を回収するために）付加的な取扱い要件をもたらすことがあり、使用する場合、基材が消化を妨げていないかモニタリングする必要がある。

【0042】

図2を参照すると、本発明は、1つ又は複数の特定用途において、例えば発酵性糖の同時遊離を伴う、リグニンを綿実殻等の草本植物から酵素によって精製する方法200に関し得る。工程201では、綿実殻(CSH)を2mm未満のサイズまで摩砕する。工程202では、摩砕した綿実殻を第1の酵素消化に供する。工程203では、より重い固体を沈殿させ、沈殿固体から水相中の糖をデカントする。工程204では、沈殿固体を再懸濁し、洗浄し、更なる処理のために回収する。工程205では、析出物を乾燥させる。工程206では、乾燥した析出物を50µm未満のサイズまで摩砕する。工程207では、摩砕した析出物を第2の酵素消化に供する。工程208では、より重い固体を沈殿させ、沈殿固体から水相中の残留糖をデカントする。工程209では、沈殿固体を再懸濁し、洗浄し、更なる処理のために回収する。工程210では、析出物を乾燥させる。工程211では、幾らかの不純物を含むリグニンが回収される。このプロセスフローは、本願の教示を鑑みて容易に行うことが可能な適合又は変更を加えて、他のリグノセルロース材料にも適用することができる。

【0043】

図3を参照すると、本発明の方法30は例えば、リグノセルロース原料301、例えば綿実殻又は他のリグノセルロース材料を第1の粉碎機300に供給することを含み得る。該原料は、既に或る程度、細かく碎き、細断し、細かく刻み、及び／又は破碎された植物

繊維材料であり得る。リグノセルロース原料を第1の粉碎機300によって、より実現可能な方法で粒子の任意の他の事前調整（preconditioning）を要することなく、酵素加水分解を摩滅した粒子で行うことができる十分な増大した表面積を有するより小さな粒径へと摩滅することができる。これに関して与えられる粉碎された原料の粒径は例えば、リグノセルロース原料材料のタイプに応じて変わり得る。綿実殻に関する粉碎された粒径は例えば、約5mm未満、又は約3mm未満、又は約2mm未満、又は約1.5mm未満、又は約1mm未満、又は約1mm未満、又は0.5mm未満、又は約0.001mm～約5mm、又は約0.01mm～約3mm、又は約0.1mm～約2.5mm、又は約0.2mm～約2mm、又は約0.5mm～約1.5mm、又は他の値であり得る。綿実殻に関するこれらの粒径は絶対値又は平均値を示し得る。粉碎された粒子の例えば少なくとも75%（体積基準）、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は100%が、示される範囲のいずれかの内にあるとすることができる。これらの粒径を他のリグノセルロース材料にも適用することができる、又は続く酵素処理に好適な粉碎粒径を、本願の教示を用いて経験的に決定することができる。粉碎装置は例えば、乾式ミル（例えばハンマーミル、回転式ハンマーミル等）、湿式ミル、又は原料の粒径を低減するための他の既知の装置及び配置であり得る。粉碎された原料を任意で、例えばメッシュ篩スクリーン群を用いて篩分し、粒群（size fractions）を選択するか、又はそうでなければ粒子状物質を第1の酵素消化槽において更に処理する前に粒径分布を更に制御することができる。消化槽は混合物の構成要素全てを保持する容量が十分にあり、穏和な温度制御手段（例えば従来の容器加熱手段）を備えることができる任意の容器であり得る。消化槽は攪拌装置（従来の攪拌装置（例えばインペラ、マグネチックスターラー等）であり得る）を備えることができるのも好ましく、適用可能な吸入口及び排出口が消化槽に付いていてもよい。理解されるように、保持容器、攪拌装置、加熱手段等のより好適なタイプはプロセスの規模に応じて変わり得る。本方法を、例えば工業プラント、パイロットプラント、研究所、又は他の規模を含む任意の規模で実行することができる。

【0044】

粉碎されたリグノセルロース材料、第1の酵素ブレンド311、及び酸性水緩衝液302を含む第1の水溶液を含む混合物を第1の消化槽310において調製する。示されるように、第1の酵素ブレンドを、例えば少なくともセルロース、任意でヘミセルロース、又はその両方に対してセルロース分解活性を有するように選択することができる。示されるように、リグニン生成物の純度が望まれる場合、ラッカーゼ等のリグニンを変性し得る酵素はあまり好ましくない。酵素及び緩衝液を消化槽で導入するか、又は粉碎されたリグノセルロース原料と合わせた後、消化槽に導入することができる。第1の水溶液は例えば、クエン酸緩衝液等の酸性有機緩衝水溶液を含み得る。酸性緩衝溶液は例えば、約4.5～約6.9、又は約4.7～約5.5、又は約4.8～約5.2のpHを有し得る。酸緩衝溶液はリグノセルロース材料の酸加水分解を引き起こすか、又は酵素加水分解機構を損なうほど酸性ではない。原料、酵素、緩衝液、及び溶液の混合物を攪拌し、それにより消化中により均一な組合せが与えられるとともに維持される。混合物を、例えばC6糖及び／又はC5糖がリグニンを含むリグノセルロース材料の第1の不溶性部分から遊離するのに十分な期間、穏和な加熱下で攪拌することができる。混合物を例えば少なくとも約30℃の温度で少なくとも約1時間、消化することができる。消化温度は、例えば約60℃を超える必要はなく、実際により低い温度を用いることができる。また消化をリグノセルロース粒子で所望の酵素活性を達成するのに消化槽の内容物を加圧する必要なく、略大気圧で実施することができる。混合物を例えば、少なくとも約35℃、又は少なくとも約40℃、又は少なくとも約45℃、又は少なくとも約50℃、又は約30℃～約50℃の温度又は他の温度で、少なくとも約3時間、又は少なくとも約6時間、又は少なくとも約9時間、又は少なくとも約12時間、又は少なくとも約15時間、又は少なくとも約18時間、又は少なくとも約21時間、又は少なくとも約24時間、消化することができる。少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を含有する第1の水溶液312の一部を第1の不溶性部分か

らデカントする。C 6 糖及び／又は C 5 糖は、可溶化した C 6 糖及び／又は C 5 糖、懸濁した C 6 糖及び／又は C 5 糖粒子状物質の少なくとも 1 つ、又はその両方を含み得る。容器内で析出したリグニン含有材料を、酵素消化した混合物の水相をデカント又は吸い上げる (siphoning off) ことによって、C 6 糖及び／又は C 5 糖を含有する水相から分離することができる。濾過 (例えばスクリーン濾過)、遠心分離、及び固体を水相から分離する他の既知の手段を使用することができる。デカンテーション若しくは吸い上げ (siphoning)、又は沈殿固体相を相対的にそのままにしながら液相を取り出す他の分離方法は、消化混合物のリグニン含有固体画分を単離するのに好ましい分離方法である。遠心分離のような他の技法は、固体画分中の非リグニン不純物の増大を引き起こす可能性がある。デカントした糖を発酵処理システム 3 1 5 へと送ることができる。これらの糖を発酵するために用いることができる技法が既知であり、この技法は一般的に糖溶液の微生物発酵工程、およそ 9 5 % 純度のアルコールを生成する蒸留工程、及びエタノール濃度を 9 9 . 5 % 超にする分子篩による脱水工程を含み得る技法、又は他の既知の発酵方法である。糖からのエタノールの生成は、例えば米国特許第 2 , 8 0 2 , 7 7 4 号に記載されるようなサッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 及びフザリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*) 等の酵母によって達成することができる。他の有用な微生物は、例えば米国特許第 4 , 0 9 4 , 7 4 2 号に記載されるエタノール産生桿菌であり、これらの特許は全て引用することによりその全体が本明細書の一部をなすものとする。

【0045】

第 1 の消化槽内の不溶性部分を再懸濁し、少なくとも 1 回洗浄することができる。使用される最初の洗浄液は弱酸性であってもよく、続く任意の洗浄液は水単独であり得る。沈殿固体を消化が行われるのと同じ容器で洗浄することができる、又は代替的に別々の容器を、沈殿固体を洗浄するのに使用することができる。洗浄液 3 1 3 を任意の便利な固液分離技法 (例えばデカンテーション、吸い上げ、遠心分離、スクリーン濾過等) により取り除く又は除去することができる。洗浄析出物 3 1 4 を乾燥機 3 2 0 内で乾燥させることができる。乾燥した不溶性部分を粉砕機 3 3 0 で第 2 の増大した表面積を有するより小さな粒径へと粉砕することができる。この粉砕機は先のユニットのものと同一であっても又は異なってもよい。乾燥した粒子を粉砕機 3 3 0 で、続く消化において酵素作用に利用可能な更なる表面積をもたらすために、先の消化槽に与えられるものよりも更に小さな粒径へと粉砕することができる。綿実殻において第 2 の粉砕機ユニット 3 3 0 で生じる粉砕粒径は例えば、約 5 0 μm 未満、又は約 4 0 μm 未満、又は約 3 0 μm 未満、又は約 2 0 μm 未満、又は 1 0 μm 未満、又は約 1 μm ~ 約 5 0 μm 、又は約 5 μm ~ 約 4 0 μm 、又は約 7 . 5 μm ~ 約 3 0 μm 、又は他の値であり得る。これらの粒径は絶対値又は平均値を示し得る。粉砕された綿実殻粒子の例えば少なくとも 7 5 % (体積基準)、又は少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 %、又は少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % が、示される範囲のいずれかの内にあるとすることができる。これらの粒径を他のリグノセルロース材料にも適用することができる、又は続く酵素処理に好適な粉砕粒径を、本願の教示を用いて経験的に決定することができる。

【0046】

第 1 の消化槽で使用されるものと同様のものであり得る、粉砕された第 1 の不溶性部分、第 2 の酵素ブレンド 3 4 1、及び酸性水緩衝液 3 3 1 を含む第 2 の水溶液を含む第 2 の混合物を第 2 の消化槽 3 4 0 に供給する。第 2 の酵素ブレンドを溶液中で又は乾燥形態で導入することができる。示されるように、第 2 の酵素ブレンドを、例えば少なくともグルカンに対してセルロース加水分解活性を有するように選択することができる。第 2 の混合物を残留 C 6 糖及び／又は C 5 糖がリグニンを含む第 2 の不溶性部分から遊離するのに十分な期間、穏和な加熱下で攪拌することができる。例えば第 1 の消化槽 3 1 0 で示される温度条件及び圧力条件を第 2 の消化槽 3 4 0 に使用することができる。第 1 の消化槽と同様に、消化温度は、例えば約 6 0 $^{\circ}\text{C}$ を超える必要はなく、実際により低い温度及び大気圧を用いることができる。残留糖を含有する水相 3 4 2 を第 2 の消化槽からデカントし、任意で発酵処理システム 3 1 5 又は他の処理システムへと送ることができる。リグニンを含

む第2の不溶性部分を再懸濁し、洗浄することができる。残存する析出物344を乾燥機350に供給し、リグニン生成物351を回収することができる。二段階の粉碎／消化プロセスが説明されているが、一段階プロセスを使用しても、又は三段階プロセス若しくは四段階プロセス若しくは更により多段階のプロセスを使用してもよいことが理解される。

【0047】

図3で説明されるプロセス容器及び器具は全て、かかる目的において有益な取付具及び器具を使用するような、適用可能なあらゆる供給物の導入に適した吸入口及び示される材料の除去のための排出口が付いていてもよい。液体材料は重力排水するか、又はプロセス容器から容器へと圧送することができる。この配置を用いて処理することができるリグノセルロース材料は、必ずしも限定されておらず、本明細書で先に示された材料を含む。当業者であれば、他のリグノセルロース含有原料が存在し、これを本発明の方法を実施することによって分画化することができることが認識される。さらに図3には示されていないが、酵素の回収は糖水性流316、又は水性流345、又はそれらの複合流317で行うことができる。これらの水性流の酵素内容物は、例えば逆浸透、精密濾過、又は他の方法を使用する等といった好適な分離プロセスによって分離することができ、必要に応じ上記のシステムにおいて消化槽内で再使用するために再循環することができる。新たな酵素のみを本方法に使用することができる、又は再利用酵素のみを使用することができる、又は新たな酵素と再利用酵素との組合せを本方法において任意の割合で使用することができる。

10

【0048】

本発明の方法を実施することによって、リグノセルロース材料を少なくともリグニンとC6糖及び／又はC5糖（例えば発酵性糖）とに分画化することができる。他の材料が、示される本方法の生成物流の1つ又は複数に存在していてもよい。本発明の方法によって得られる生成物の収率は高いとされる。本明細書の目的上、「収率」は（酵素加水分解反応のために添加される水に占める）最初のリグノセルロース材料に存在する量をベースとする理論的最大値で除算した、回収された或る特定の生成物の質量である。リグニンの収率は、例えば少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約91%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約93%、又は少なくとも約94%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%、又はそれ以上であり得る。C6及びC5糖の収率は、例えば少なくとも約50%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも約98%、又は少なくとも約99%、又はそれ以上であり得る。

20

30

【0049】

得られるリグニンは、硫黄を含有しない、高品質、比較的高純度、低分子量のリグニンであり得る。本発明の方法のリグニン生成物は多くの可能な用途を有する。リグニンをエネルギー生産のために燃焼することができる。リグニンに関する幾つかの他の可能な用途としては、炭素繊維生産、アスファルト生産、及びバイオポリマーの構成要素としての用途が挙げられる。これらの使用としては例えば、石油採掘添加剤、コンクリート添加剤、染料分散剤、農薬、動物飼料、工業用結合剤、製紙業用の特殊ポリマー、貴金属回収助剤、木材防腐剤、無硫黄リグニン製品、自動車のブレーキ、木製パネル製品、バイオ分散剤（biodispersants）、ポリウレタンフォーム、エポキシ樹脂、プリント基板、乳化剤、金属イオン封鎖剤（sequestrants）、水処理配合物、壁材用の補強剤、接着剤、バニリン、キシリトールの原材料、及びパラクマリルアルコール、コニフェリルアルコール、シナピルアルコールの供給源としての使用が挙げられる。

40

【0050】

本プロセスのC6糖生成物及びC5糖生成物を、例えばエタノール、n-ブタノール、アセトン、有機酸、パン酵母、又は選ばれた発酵用微生物の細胞代謝の任意の他の生成物

50

へと発酵させることができる。糖から製造することができる他の市販製品としては、例えば動物用の飼料添加物、キシリトール甘味料、フルフラール、及び他の有用な製品が挙げられる。

【0051】

本発明の方法はリグノセルロース材料の構成要素を遊離するために濃酸又は濃アルカリを使用する幾つかの事前プロセスの実施を回避することができる。本方法の酵素処理はリグニン構成要素の放出のためのこれらの苛酷な化学処理によるものではなく、製紙に用いられている従来のパルプ処理に伴うリグノスルホネートの生成を排除することができる。本発明の酵素プロセスは、純粋なリグニン構成要素の価値を損なう可能性もある高压蒸気を使用する従来の熱化学プロセスよりもエネルギー消費量を大幅に少なくすることができる。さらに、本発明の方法で用いられる酵素処理は、EDTA等の一部のキレート剤の使用とは異なり下流の処理に影響を与えないか、又は少なくとも著しい影響は与えない。したがって、本発明の方法を用いることで、リグニンの最終精製工程を補助する後処理サブシステムの必要性が軽減又は完全に回避される。照射処理とは異なり、本発明の方法に用いられる酵素的アプローチは、リグニン構成要素を変性させず、無傷のまま徐々に放出し、また照射器具を必要としないことからコストが低減される。不純な取扱いの難しい材料が消化される。リグニン構成要素の任意の最終精製を容易にするのに組換えポリペプチドを必要とすることなく、天然酵素を構成要素の放出のために本発明の方法において使用することができる。生きた嫌気性微生物は、該微生物の非存在下において酵素溶液のみを使用するのであれば必ずしも必要ではない。遊離した天然のリグニン構成要素及びリグニン誘導体の変換を補助する穏和な酵素加水分解によってこれらの不純物が自然と除去されることから、取扱いが難しい場合がある不純物を低減するために強硬手段を原料溶液に対して用いる必要はない。さらに、本発明の方法はそれ自体が酵素の構成要素の再利用に有用であり、この再利用によって有益な別々の材料の回収コストを下げるのが可能になる。本方法は操作コスト及びコミュニティの観点から環境に優しくかつ地球にも優しいものであり得る。

【0052】

本発明は以下の態様／実施形態／特徴を任意の順序及び／又は任意の組合せで包含する：

1. 本発明は、リグノセルロース材料の構成要素を単離する方法であって、
リグノセルロース材料を粉砕し、粉砕されたリグノセルロース材料を形成することと、
リグニンを含むリグノセルロース材料の不溶性部分から少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を遊離する酵素加水分解のために、リグノセルロース材料からの任意の事前の非酵素的なリグニン分離をせずに、粉砕されたリグノセルロース材料、少なくとも1つの酵素ブレンド、及び水溶液を含む混合物を酵素消化することと、
少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を含有する水溶液の少なくとも一部分を、リグニンを含む不溶性部分から分離することと、
を含む、方法に関する。
2. 水溶液が酸性有機緩衝水溶液を含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。
3. 水溶液中の少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖が、可溶化したC6糖及び／又はC5糖、若しくは懸濁したC6糖及び／又はC5糖粒子状物質、又はそれらの任意の組合せを含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。
4. 酵素ブレンドを用いた水溶液中の粉砕されたリグノセルロース材料の酵素消化が、約30℃～約60℃の温度で少なくとも約1時間、混合物を攪拌することを含み、分離が、攪拌するのを止め、沈殿固体を含む不溶性部分から少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を含有する水溶液の少なくとも一部分をデカントすることを含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。
5. リグノセルロース材料が、綿実殻、穀物殻、サトウキビバガス、トウモロコシ茎葉、トウモロコシ穂軸、麦藁、スイッチグラス、葉、茎、植物の外皮、軟材片、硬材片、お

が屑、製紙工場のパルプ、古紙、再生紙、又はそれらの任意の組合せである、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

6. リグノセルロース材料が綿実殻を含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

7. 少なくとも1つの酵素ブレンドが1)群～5)群の内の少なくとも2群に由来する少なくとも1つの酵素を含む第1の酵素ブレンドを含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法：

- 1) エンドグルカナナーゼ、カルボキシメチルセルラーゼ、
- 2) エキソグルカナナーゼ、アビセラーゼ、
- 3) セロビアーゼ、 β -グルコシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、
- 4) エンド-1, 4- β -キシラナーゼ、エンド-(1, 4)- β -キシラノヒドロラーゼ、
- 5) β -1, 3-キシラナーゼ、1, 3- β -D-キシロシダーゼ、及びエキソ-1, 3- β -キシロシダーゼ。

8. 第1の酵素ブレンドが、

- 1) 群及び／又は2)群に由来する少なくとも1つの酵素、
- 3) 群の少なくとも1つの酵素、及び、
- 4) 群及び／又は5)群の少なくとも1つの酵素、

を含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

9. 少なくとも1つの酵素ブレンドが、1 a) 群～20 a) 群の内の少なくとも2群に由来する少なくとも1つの酵素を含む第2の酵素ブレンドを更に含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法：

- 1 a) エンド-1, 3 (4)- β -グルカナナーゼ、
- 2 a) ラミナリナーゼ (エンド-1, 3- β -グルカナナーゼ)、
- 3 a) エキソ-1, 2-1, 6- α -マンノシダーゼ、
- 4 a) β -D-キシロピラノシル-(1, 4)- β -D-キシロピラノース、
- 5 a) α -N-アラビノフラノシダーゼ、
- 6 a) フェルロイルエステラーゼ、
- 7 a) エンド-1, 5- α -アラビナナーゼ、
- 8 a) ペクチナーゼ、
- 9 a) ポリガラクトツロナーゼ、
- 10 a) ペクチンエステラーゼ、
- 11 a) アスパラギン酸プロテアーゼ、
- 12 a) メタロプロテアーゼ、
- 13 a) エンド-(1, 4)-マンナナーゼ、
- 14 a) フィターゼ、
- 15 a) α -グルクロニダーゼ及び β -グルクロニダーゼ、
- 16 a) ヘキセヌロニダーゼ、
- 17 a) アルカリホスファターゼ及び酸ホスファターゼ、
- 18 a) α -ガラクトシダーゼ及び β -ガラクトシダーゼ、
- 19 a) β -マンノシダーゼ、
- 20 a) α -フコシダーゼ。

10. リグニンの収率が少なくとも約90%である、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

11. C6糖及び／又はC5糖の収率が少なくとも約90%である、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

12. リグノセルロース材料の構成要素を単離する方法であって、

- a) リグノセルロース材料を粉碎されたリグノセルロース材料へと粉碎することと、
- b) リグニンを含むリグノセルロース材料の第1の不溶性部分から少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を遊離する第1の酵素加水分解のために、リグノセルロース材料の

10

20

30

40

50

任意の事前の非酵素的なリグニン分離処理をせずに、粉碎されたリグノセルロース材料、第1の酵素ブレンド、及び第1の水溶液を含む第1の混合物を酵素消化することと、

c) 少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を含有する第1の水溶液の少なくとも一部分を第1の不溶性部分から分離することと、

d) 第1の不溶性部分を粉碎された第1の不溶性部分へと粉碎することと、

e) リグニンを含む第2の不溶性部分から少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を遊離する第2の酵素加水分解のために、粉碎された第1の不溶性部分、第2の酵素ブレンド、及び第2の水溶液を含む第2の混合物を酵素消化することと、

f) リグニンを含む第2の不溶性部分を少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を含む第2の水溶液から分離することと、

を含む、方法。

13. リグノセルロース材料の粉碎がリグノセルロース材料を約2mm未満のサイズまで摩砕することを含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

14. 第1の不溶性部分の粉碎が第1の不溶性部分を約50ミクロン未満のサイズまで摩砕又は破砕することを含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

15. 分離した後に、第1の不溶性部分を少なくとも1回洗浄し、洗浄した第1の不溶性部分を第1の不溶性部分を粉碎する前に乾燥させることを更に含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

16. 第1の水溶液が酸性有機緩衝水溶液を含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

17. 第1の水溶液中の少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖が、可溶化したC6糖及び／又はC5糖、若しくは懸濁したC6糖及び／又はC5糖粒子状物質、又はそれらの任意の組合せを含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

18. 第1の酵素ブレンドを用いた第1の水溶液中の粉碎されたリグノセルロース材料の酵素消化が、約30℃～約60℃の温度で少なくとも約1時間、第1の混合物を攪拌することを含み、分離が、攪拌するのを止め、沈殿固体を含む第1の不溶性部分から少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を含有する第1の水溶液の少なくとも一部分をデカントすることを含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

19. リグノセルロース材料が、綿実殻、穀物殻、サトウキビバガス、トウモロコシ茎葉、トウモロコシ穂軸、麦藁、スイッチグラス、葉、茎、植物の外皮、軟材片、硬材片、おが屑、製紙工場のパルプ、古紙、再生紙、又はそれらの任意の組合せである、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

20. リグノセルロース材料が綿実殻を含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

21. 第1の酵素ブレンドが1)～5)の内の少なくとも2群に由来する少なくとも1つの酵素を含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法：

1) エンドグルカナーゼ、カルボキシメチルセルラーゼ、

2) エキシグルカナーゼ、アビセラーゼ、

3) セロビアーゼ、 β -グルコシダーゼ、 α -グルコシダーゼ、

4) エンド-1, 4- β -キシラナーゼ、エンド-(1, 4)- β -キシラノヒドロラーゼ、

5) β -1, 3-キシラナーゼ、1, 3- β -D-キシロシダーゼ、及びエキソ-1, 3- β -キシロシダーゼ。

22. 第2の酵素ブレンドが、1a)～20a)の内の少なくとも2群に由来する少なくとも1つの酵素を含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法：

1a) エンド-1, 3(4)- β -グルカナーゼ、

2a) ラミナリナーゼ(エンド-1, 3- β -グルカナーゼ)、

3a) エキソ-1, 2-1, 6- α -マンノシダーゼ、

4a) β -D-キシロピラノシル-(1, 4)- β -D-キシロピラノース、

5a) α -N-アラビノフラノシダーゼ、

10

20

30

40

50

- 6 a) フェルロイルエステラーゼ、
- 7 a) エンドー 1, 5- α -アラビナーゼ、
- 8 a) ペクチナーゼ、
- 9 a) ポリガラクトツロナーゼ、
- 10 a) ペクチンエステラーゼ、
- 11 a) アスパラギン酸プロテアーゼ、
- 12 a) メタロプロテアーゼ、
- 13 a) エンドー(1, 4)-マンナーゼ、
- 14 a) フィターゼ、
- 15 a) α -グルクロニダーゼ及び β -グルクロニダーゼ、
- 16 a) ヘキセヌロニダーゼ、
- 17 a) アルカリホスファターゼ及び酸ホスファターゼ、
- 18 a) α -ガラクトシダーゼ及び β -ガラクトシダーゼ、
- 19 a) β -マンノシダーゼ、
- 20 a) α -フコシダーゼ。

10

23. リグニンの収率が少なくとも約90%である、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

24. 少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖の収率がリグノセルロース材料に存在する元の量をベースとして少なくとも約50%である、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

20

25. 少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖の生物学的発酵処理を更に含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様の方法。

26. リグノセルロース材料の構成要素を単離するシステムであって、

リグノセルロース材料を粉砕するための少なくとも1つの粉砕機と、

内部アジテーターを備える容器を含む少なくとも1つの消化槽であって、容器はリグノセルロース材料の任意の事前の非酵素的なリグニン分離処理をせずに、粉砕されたリグノセルロース材料、少なくとも1つの酵素ブレンド、及び水溶液の混合物を保持するのに使用可能であり、少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を、リグニンを含むリグノセルロース材料の不溶性部分から遊離する酵素加水分解のために、攪拌しながら混合物を酵素消化するのに使用可能である、少なくとも1つの消化槽と、

30

少なくとも1つの糖を含有する水溶液の少なくとも一部分を、リグニンを含む不溶性部分から分離するためのセパレーターと、を含む、システム。

27. リグニンを含む不溶性部分を乾燥させるための乾燥機と、

第1の不溶性材料を粉砕するための粉砕機と、

内部アジテーターを備える容器を含む消化槽であって、容器は粉砕された第1の不溶性材料、少なくとも1つの酵素、及び水溶液の混合物を保持するのに、また少なくとも1つのC6糖及び／又はC5糖を、リグニンを含むリグノセルロース材料の不溶性部分から遊離する酵素加水分解のために、攪拌しながら混合物を接触させるのに使用可能である、少なくとも1つの消化槽と、

40

少なくとも1つの糖を含有する水溶液の少なくとも一部分を、リグニンを含む不溶性部分から分離するためのセパレーターと、を更に含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様のシステム。

28. 消化槽から遊離したC6糖及び／又はC5糖を受け取り、C6糖及び／又はC5糖をエタノールへと発酵させるのに適した生物学的発酵処理システムを更に含む、任意の上記又は下記の実施形態／特徴／態様のシステム。

【0053】

本発明は文及び／又は段落に記載される上記及び／又は下記のこれらの様々な特徴又は実施形態の任意の組合せを包含し得る。本明細書に開示される特徴の任意の組合せが本発明の一部であるとみなされ、組み合わせることができる特徴に関しては何ら限定を意図し

50

ない。

【0054】

以下の実施例は本発明を説明することを意図するものであり、限定するものではない。以下の実施例において、他に特に規定がなければ全ての部は重量比である。

【実施例】

【0055】

実施例 1

実験は、リグニン精製及び糖単離のためのリグノセルロース材料の供給源である粉碎された綿実殻に対する酵素の有効性を評価するために行った。

【0056】

実験手順

精製方法

綿実殻はBuckeye Technologies (Memphis, Tennessee) から入手した。綿実殻を 2 mm 未満のサイズまで乾式摩砕した。摩砕をハンマーミル摩砕又は同程度の摩砕により行った。摩砕殻のサイズはメッシュ篩によって決定した。およそ 220 g の摩砕された綿実殻を 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 中の 10 % 固形分溶液として作製した。綿実殻の 10 % 固形分溶液はおよそ 2200 ml の溶液中に 220 g の綿実殻を含有するものとした。

【0057】

50 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を以下のように調製した。クエン酸緩衝液ストック (pH 5.0) を、900 g の水に 210 g のクエン酸一水和物を混合し、次いで 100 ml の 50 % NaOH をかき混ぜながら徐々に添加することにより調製し、これによって 1 L のクエン酸緩衝液ストック (pH 5.0) を得た。50 mM (0.05 M) クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を、50 ml ~ 55 ml のクエン酸緩衝液ストック溶液 (pH 5.0) を 1 L の水で希釈することにより緩衝液ストックを使用して調製し、綿実殻固体のための緩衝溶液として使用される 50 mM クエン酸緩衝液を得た。pH メーターを使用して、クエン酸緩衝液の pH をモニタリングした。クエン酸緩衝液の pH は、必要に応じて 50 % NaOH 又は濃 HCl を滴加することによって 5.0 の pH が与えられ維持されるように、随時調整した。

【0058】

10 % 綿実殻溶液の温度をおよそ 50 °C に上昇させ、この温度で保持した。加熱した溶液に消化槽としての 4 L 容の発酵ビーカー内で 0.5 % の第 1 の酵素溶液を加えた (amended with)。第 1 の酵素溶液は、Novozymes North America (Franklinton, North Carolina) から入手した、エンドグルカナナーゼ、セロビオヒドロラーゼ及び β -グルコシダーゼを含む酵素調製物である CelliC (商標) CTEC 1 / 3 重量部、Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri) から入手したグルコシダーゼ 1 / 3 重量部、並びに Novozymes North America から入手した H-TEC キシラナーゼ 1 / 3 重量部からなる酵素の混合物を含有するものとした。得られる混合物を、マグネチックスターラーを使用しておよそ 200 rpm で 24 時間、攪拌した。24 時間後、攪拌を止め、固体を沈殿させた。沈殿固体上にある水相を消化槽からデカントした。デカントした水相は糖及び懸濁した微細糖粒子状物質を含有する。より大きく重い固体のみを沈殿析出物として消化槽内に保持した。沈殿固体を、水を添加することで消化槽内において再懸濁し、HCl を用いて pH 2.5 まで酸性化し、次いで攪拌して、弱酸洗浄工程を行った。固体を洗浄した後に攪拌を止め、固体を再度沈殿させた。洗浄液の水相を消化槽からデカントし、固体のみを残した。固体を水単独 (酸性化の必要なし) 中で再懸濁し、攪拌し、攪拌を止めた後、固体を再回収した。この洗浄手順を、水相が透明又はほぼ透明になるまで繰り返すことができる。次いで固体をおよそ 50 °C の温度の熱風炉内において一晚乾燥させた。乾燥した析出物 (固体) を 50 ミクロン未満のサイズまで摩砕した。乳鉢及び乳棒を使用して、固体を極微細粉末へと破碎した。マイクロメートル目盛を備える顕微鏡を使用して、破碎固体のサイズを測定した。固体の破碎期間は、指定の粒径が得られ、その後破碎を止めるまで、破碎固

10

20

30

40

50

体のサイズを確認するために断続的なものであった。この粉末は特に吸湿性ではない。摩砕粉末を再度 0.05 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) で上述のように 10% 固形分溶液となるように作製した。溶液を、マグネチックスターラーを用いておよそ 200 rpm で攪拌し、第 2 の酵素溶液を加えた。第 2 の酵素溶液は、Specialty Enzymes and Biotechnologies (Chino, California) から入手した CELLUSE 1/3 重量部及びペニシリン種酵素 (penicillinsp. ferment) 2/3 重量部を含む溶液中の酵素ブレンドであり、この溶液は示される第 2 の酵素ブレンドの酵素を全て又は本質的に全て含む現場で作製される調製物であった。得られる混合物をおよそ 45℃ の温度で 6 時間消化した。攪拌を止め、上述のように固体 (析出物) を沈殿させた。沈殿固体の上にある水相をデカン

10

20

30

40

50

【0059】

リグニンアッセイ：

臭化アセチルアッセイ溶液を使用して、綿実殻及び最終リグニン生成物におけるリグニンを同定し定量した。リグニンに対する臭化アセチルアッセイは、Iiyama, K., et al., "Determination of Lignin in Herbaceous Plants by an Improved Acetyl Bromide Procedure" (JSci Food Agric 1990)、及び Hatfield, R.D., et al., "Using the Acetyl Bromide Assay To Determine Lignin Concentrations in Herbaceous Plants: Some Cautionary Notes" (J Agric Food Chem 1999) の公開手順に従うものであった。アッセイ方法は概して以下の手順を含むものであった。

(1) 各試験管に、10 mg ~ 15 mg の乾燥破碎サンプルを加える。サンプルを粉末になるまで破碎し、最大でも 20 メッシュスクリーンを通過する (work) ようにする。また、サンプル重量は 2 mg ~ 40 mg の範囲にあれば、良好な結果を示すことができるが、少なくとも 10 mg を用いることでより正確な質量が確保され、15 mg 以下を用いることで完全な消化が確保される。1 本の試験管を常に手順ブランクとして使用し、少なくとも 2 本の試験管を「標準」として使用する。

(2) 各試験管に、10 ml の DI H₂O を加える。試験管を 65℃ (85 に設定した) のドライブロックに入れ、10 分ごとにかき混ぜながら 1 時間加熱する。

(3) サンプルを GF/A ガラス繊維フィルターに通し、以下の溶液をそれぞれこの順序で用いて 3 回洗い流す：水、エタノール、アセトン、ジエチルエーテル。洗い流すのにそれぞれ 2 ~ 3 分かけた。

(4) フィルターディスクを 20 ml 容のガラス製シンチレーションバイアル (蓋なし) に入れて、70℃ で一晩加熱する。

(5) 2.5 ml の酢酸中の 25% AcBr を各バイアルに加える。

(6) バイアルに蓋をして、それを 50℃ のオーブンに 2 時間入れ、時折回転させる。

(7) サンプルを冷蔵庫内で冷却する。10 ml の 2 N 水酸化ナトリウム及び 12 ml の酢酸が入ったメスフラスコを準備する。各サンプルをシンチレーションバイアルからメスフラスコへと移す。濾紙を酢酸でメスフラスコへと十分に洗い流し、酢酸を用いて容量を調節する (bring to volume)。

(8) サンプルを最後に 1 時間、好ましくは一晩沈殿させ、次いで 280 nm で測定した吸光度を用いてサンプルを測定する。

【0060】

アッセイ結果：

アッセイ結果は、220 g の綿実殻についてはおよそ 20% の純リグニン含量という分析結果であったことを示していた。最終リグニン生成物については約 95% の純リグニン含量という分析結果であった。

【0061】

実験研究の結果によって、膨大な量の糖が第1の酵素消化によって除去されたことが示されている。第2の消化後では、ほとんどのリグニンが幾らかの不純物を含んだままである。フラクションインベントリ (Fraction inventory) によって、元の220gの内のおよそ60gが第1の消化後に固体として残ったままであることが実証された。そのため、膨大な量の糖が初めに第1の消化において除去された。純化する第2の消化のみでリグニンの二次クリーニングが行われる。理論に束縛されることを望むものではないが、酵素処理前の固体の微細摩砕 (粉末化) は、表面を増大させ、固体の純化に用いられる第2の酵素消化 (濃カルボヒドラーゼ) の際の残留糖の除去を大いに助けると考えられる。したがって、プロトコル又はプロセスは好ましくは、酵素を利用可能な糖へと近付けさせる最大の表面積をもたらすことが可能な最小の粒径と連動するものであり得る。消化する混合物の総量をベースとして20%~30%の固体で一次消化を行うことが可能であり得る。またこれに続けて、第1の消化後の固体の量を或る期間回収し、次いで純化サイズ (例えば約50ミクロン未満) まで摩砕した後、第2の消化段階を実施することができる。

10

【0062】

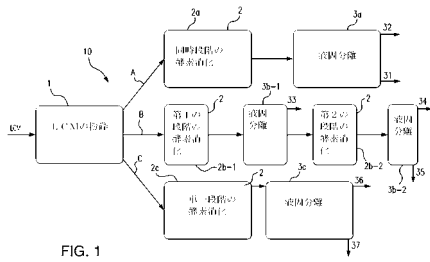
出願人らはこの開示における全ての引用文献の全内容を具体的に援用する。さらに、量、濃度又は他の値若しくはパラメータが範囲、好ましい範囲、又は好ましい上限値と好ましい下限値とのリストのいずれかとして与えられる場合、これは範囲が別々に開示されているかに関わらず、任意の範囲上限又は好ましい値と任意の範囲下限又は好ましい値との任意の対からなる全ての範囲を具体的に開示するものと理解される。数値の範囲が本明細書で言及されている場合、特に指定のない限り、範囲はその端点、並びに範囲内の全ての整数及び少数を含むことが意図される。本発明の範囲は、範囲を規定する場合に言及された特定の値に限定されることは意図されない。

20

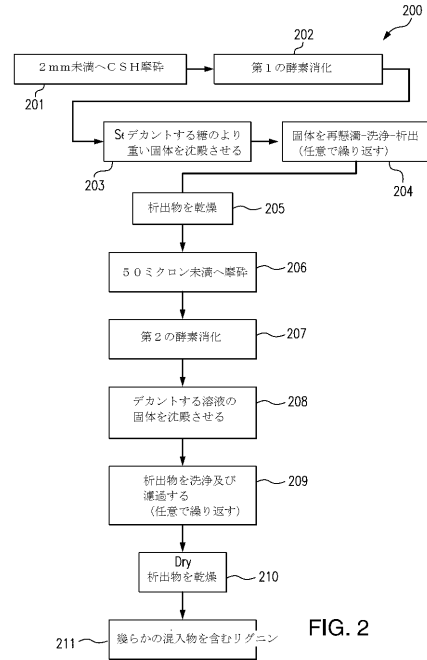
【0063】

本発明の他の実施形態は、本明細書の考察及び本明細書に開示される本発明の実施から当業者にとって明らかであろう。本明細書及び本実施例は単なる例示とみなされ、本発明の真の範囲及び趣旨は添付の特許請求の範囲及びその均等物により示されることが意図される。

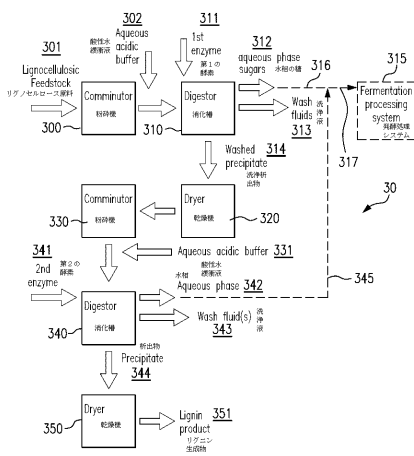
【図 1】



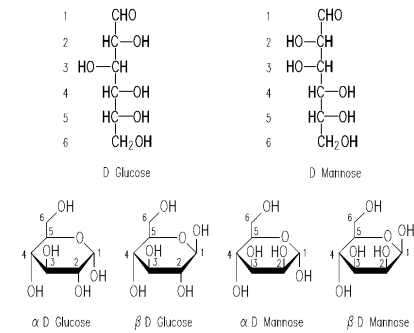
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/021481
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12P 1/00(2006.01)i, C07G 1/00(2011.01)i, C08B 1/00(2006.01)i, C12P 19/00(2006.01)i, C12P 7/10(2006.01)i</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) C12P 1/00; C12P 19/04; C12P 19/22; C12P 7/10; C12P 19/12; A61L 9/00; A61L 9/01; C12P 19/14		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: lignocellulosic material, enzyme, hydrolysis, lignin, sugar, etc.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0227161 A1 (LEVIE BENJAMIN E. et al.) 18 September 2008 See claims 1, 3-5; paragraph [0071]; fig. 7.	1-28
A	JP 2008-271962 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL & TECHNOLOGY) 13 November 2008 See claim 1; paragraphs [0027], [0048]-[0049].	1-28
A	US 2007-0218530 A1 (DUCK, NICHOLAS B. et al) 20 September 2007 See claim 1; paragraphs [0019], [0036]-[0058].	1-28
A	US 2006-0104939 A1 (ANTHONY COVINGTON et al.) 18 May 2006 See claims 1, 7.	1-28
☐ 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 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 AUGUST 2012 (27.08.2012)		Date of mailing of the international search report 29 AUGUST 2012 (29.08.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer BAE, YEO WOOL Telephone No. 82-42-481-5568 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/021481

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008-0227161 A1	18.09.2008	US 2008-227182 A1 WO 2008-115891 A2 WO 2008-115893 A1	18.09.2008 25.09.2008 25.09.2008
JP 2008-271962 A	13.11.2008	None	
US 2007-0218530 A1	20.09.2007	AU 2003-228765 A1 CA 2484118 A1 EP 1511848 A2 JP 2005-523720 A US 2004-0005674 A1 WO 03-083420 A2	17.11.2003 13.11.2003 09.03.2005 11.08.2005 08.01.2004 13.11.2003
US 2006-0104939 A1	18.05.2006	AU 2003-214413 A1 AU 2003-252973 A1 EP 1488012 A1 EP 1529104 A2 GB 0218001 D0 US 2004-0219652 A1 WO 03-080873 A1 WO 2004-013322 A2	08.10.2003 23.02.2004 22.12.2004 11.05.2005 11.09.2002 04.11.2004 02.10.2003 12.02.2004

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

(74)代理人 100152319

弁理士 曾我 亜紀

(72)発明者 ジャック, パーシー

アメリカ合衆国, テネシー州 38108-0305, メンフィス, 1256 ノース マックリー
ン ブールバード, シー/オー バックマン ラボラトリーズ インターナショナル, アイエヌ
シー.

(72)発明者 ジェンセ, バーナード

アメリカ合衆国, テネシー州 38108-0305, メンフィス, 1256 ノース マックリー
ン ブールバード, シー/オー バックマン ラボラトリーズ インターナショナル, アイエヌ
シー.

Fターム(参考) 4B064 AC16 AF02 CA21 CB01 DA16

4H055 AA02 AC50