



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105473729 B

(45)授权公告日 2019.05.14

(21)申请号 201480046133.0

(22)申请日 2014.08.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105473729 A

(43)申请公布日 2016.04.06

(30)优先权数据

2013-172186 2013.08.22 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.02.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/071911 2014.08.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/025927 JA 2015.02.26

(73)专利权人 东丽株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 山田千晶 栗原宏征 山田胜成

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 曾祯 段承恩

(51)Int.Cl.

C12P 19/02(2006.01)

C12P 7/06(2006.01)

C12P 7/56(2006.01)

审查员 王康

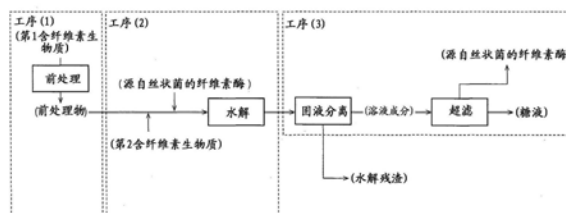
权利要求书1页 说明书14页 附图1页

## (54)发明名称

糖液的制造方法

## (57)摘要

本发明涉及糖液的制造方法,包括以下的工序(1)~(3),工序(1):对第1含纤维素生物质进行前处理,工序(2):添加第2含纤维素生物质,通过源自丝状菌的纤维素酶进行水解,所述第2含纤维素生物质的量相对于工序(1)的第1含纤维素生物质的前处理物的固体成分重量为1~50%的范围,工序(3):将工序(2)的水解物固液分离为溶液成分和水解残渣,使溶液成分通过超滤膜进行过滤,作为非透过液回收源自丝状菌的纤维素酶,作为透过液回收糖液。



1. 一种糖液的制造方法,包括以下的工序(1)~(3),  
工序(1):准备第1含纤维素生物质的前处理物,  
工序(2):添加第2含纤维素生物质或其前处理物,通过源自丝状菌的纤维素酶进行水解,所述第2含纤维素生物质或其前处理物的量相对于工序(1)的第1含纤维素生物质的前处理物的固体成分重量为1~50%的范围,  
工序(3):将工序(2)的水解物固液分离为溶液成分和水解残渣,使溶液成分通过超滤膜进行过滤,作为非透过液回收源自丝状菌的纤维素酶,作为透过液回收糖液,  
所述第2含纤维素生物质是谷物外皮,  
所述第1含纤维素生物质与所述第2含纤维素生物质植物种类或植物部位不同。
2. 根据权利要求1所述的糖液的制造方法,工序(2)的第2含纤维素生物质的前处理物是将第2含纤维素生物质进行水热处理和/或酸处理而得的前处理物。
3. 根据权利要求1或2所述的糖液的制造方法,工序(1)的第1含纤维素生物质是草本系生物质或木质系生物质。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的糖液的制造方法,工序(1)的第1含纤维素生物质是选自玉米秸秆、玉米穗轴、稻秸、麦秸和蔗渣中的1种以上的生物质。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的糖液的制造方法,工序(1)的第1含纤维素生物质的前处理物是通过选自酸处理、碱处理、水热处理、亚临界水处理、微粉碎处理和蒸煮处理中的1种以上的方法进行前处理而得的。
6. 一种化学品的制造方法,包括以下工序:通过权利要求1~5中任一项所述的糖液的制造方法制造糖液的工序,以及将以上工序中得到的糖液作为发酵原料来培养微生物的工序。

## 糖液的制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及由纤维素制造糖液的方法。

### 背景技术

[0002] 近年来,使用纤维素酶的生物质的水解方法由于能量使用量以及环境负荷少且糖收量多,所以被广泛研究。然而,使用纤维素酶的糖液的制造方法的缺点是由于纤维素酶的价格高,因而糖液制造成本增大。为了解决这样的技术课题,提出了将水解中使用的纤维素酶回收再利用的方法,但是由于纤维素酶强烈地吸附于水解含纤维素生物质时产生的水解残渣中,所以酶的再利用性低成为问题。

[0003] 作为使吸附于水解残渣的纤维素酶脱附,提高纤维素酶的回收率的方法,公开了用pH值8左右的氢氧化钠水溶液洗涤水解残渣的方法(非专利文献1)、使水解残渣与非离子性表面活性剂接触的方法(专利文献1)等。另一方面,作为减少纤维素酶对水解残渣的吸附的方法,已知在含纤维素生物质的水解时,添加水溶性盐类而将电导率调节为5~25mS/cm的方法(专利文献2)、添加相对于含纤维素生物质的固体物重量为1~10重量%的碳酸钙粒子的方法(专利文献3)等。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特开昭63-87994号公报

[0007] 专利文献2:日本特许第4947223号公报

[0008] 专利文献3:日本特开2012-100617号公报

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:D.E.Otter等,“Elution of *Trichoderma reesei* Cellulase from Cellulose by pH Adjustment with Sodium Hydroxide”*Biotechnology Letters* (1984) Vol.6, No.6, 369-374

### 发明内容

[0011] 如上所述,虽然进行了各种通过回收在含纤维素生物质的水解中使用的纤维素酶、进行再利用,从而削减纤维素酶的使用量的尝试,但是由于纤维素酶强烈吸附于水解残渣,因而其回收率低,并没有解决问题。

[0012] 因此,本发明的目的在于,提供提高以往的方法中纤维素酶使用量的削减效果的糖液的制造方法。

[0013] 本发明者们这次进行了深入研究,结果发现,在利用源自丝状菌的纤维素酶水解第1含纤维素生物质的前处理物时,添加相对于所述前处理物的固体成分重量为1~50%范围的量的第2含纤维素生物质或其前处理物,结果能够显著高效地回收源自丝状菌的纤维素酶的酶成分,从而完成了本发明。

[0014] 即,本发明包含以下[1]~[8]的构成。

- [0015] [1]一种糖液的制造方法,包括以下的工序(1)~(3),
- [0016] 工序(1):准备第1含纤维素生物质的前处理物,
- [0017] 工序(2):添加第2含纤维素物质或其前处理物,通过源自丝状菌的纤维素酶进行水解,所述第2含纤维素物质或其前处理物的量相对于工序(1)的第1含纤维素生物质的前处理物的固体成分重量为1~50%的范围,
- [0018] 工序(3):将工序(2)的水解物固液分离为溶液成分和水解残渣,使溶液成分通过超滤膜进行过滤,作为非透过液回收源自丝状菌的纤维素酶,作为透过液回收糖液。
- [0019] [2]根据[1]所述的糖液的制造方法,工序(2)的第2含纤维素生物质的前处理物是将第2含纤维素物质进行水热处理和/或酸处理而得的前处理物。
- [0020] [3]根据[1]或[2]所述的糖液的制造方法,工序(2)的第2含纤维素物质是谷物外皮。
- [0021] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的糖液的制造方法,工序(2)的第2含纤维素物质是选自玉米外皮、大豆外皮和小麦外皮中的1种以上的生物物质。
- [0022] [5]根据[1]~[4]中任一项所述的糖液的制造方法,工序(1)的第1含纤维素生物物质是草本系生物物质或木质系生物物质。
- [0023] [6]根据[1]~[5]中任一项所述的糖液的制造方法,工序(1)的第1含纤维素生物物质是选自玉米秸秆、玉米穗轴、稻秸、麦秸和蔗渣中的1种以上的生物物质。
- [0024] [7]根据[1]~[6]中任一项所述的糖液的制造方法,工序(1)的第1含纤维素生物物质的前处理物是通过选自酸处理、碱处理、水热处理、亚临界水处理、微粉碎处理和蒸煮处理中的1种以上的方法进行前处理而得的。
- [0025] [8]一种化学品的制造方法,包括以下工序:通过[1]~[7]中任一项所述的糖液的制造方法制造糖液的工序,以及将以上工序中得到的糖液作为发酵原料来培养微生物的工序。
- [0026] 根据本发明,能够抑制源自丝状菌的纤维素酶对含纤维素生物质的水解残渣的吸附,特别是能够高效地回收和/或再利用在水解反应中发挥重要作用的纤维二糖水解酶、内切葡聚糖酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶等酶群。其结果是,与以往技术相比,能够削减纤维素酶的使用量,将糖液制造成本控制在低水平。

## 附图说明

- [0027] 图1是表示实施本发明的糖液的制造方法的一个方式的概略图。
- [0028] 发明的具体说明
- [0029] 以下,按照工序一一对本发明进行说明。
- [0030] 工序(1):准备第1含纤维素生物质的前处理物的工序
- [0031] 本发明的第1含纤维素生物物质是指包含纤维素成分的生物资源。对第1含纤维素生物物质无特别限制,作为具体例子,可举出蔗渣、柳枝稷、象草、蔗茅、玉米秸秆、玉米穗轴、甜菜浆、稻秸、麦秸等草本系生物物质,树木、废建材等木质系生物物质,或者藻类、海草等源自水生环境的生物物质,作为优选的具体例子,可举出草本系生物物质或木质系生物物质,作为更优选的具体例子,可举出草本系生物物质,作为进一步优选的具体例子,可举出选自玉米秸秆、玉米穗轴、稻秸、麦秸和蔗渣中的1种或2种以上。

[0032] 由于在含纤维素生物质中,除了纤维素和半纤维素(以下,作为纤维素与半纤维素的总称为“纤维素”。)以外,还含有作为芳香族高分子的木质素等,因此,通过进行前处理能够提高利用纤维素酶的水解效率。作为前处理的方法,可举出利用硫酸、乙酸等的酸处理、利用苛性钠、氨等的碱处理、水热处理、亚临界水处理、微粉碎处理、蒸煮处理,但是在本发明中有效的是氨处理、水热处理、乙酸处理或稀硫酸处理,优选这些前处理方法。在本发明中,将进行了前处理的生物质称为生物质前处理物。根据本发明的一个方式,优选在工序(1)的准备中对第1含纤维素生物质进行前处理。然而,本发明工序(1)的准备中,可以预先购入进行了如上所述的前处理的生物质前处理物来使用,本发明中也包含这样的方式。

[0033] 在含纤维素生物质的前处理物中,除了源自含纤维素生物质的固体物以外,还包含含有木糖的溶液成分,该木糖是含纤维素生物质中所包含的半纤维素的一部分水解而生成的。本发明中的前处理物,是指包含固体物与溶液成分两者的状态、或者通过固液分离和/或固体物的洗涤除去包含木糖的溶液成分的状态两者。

[0034] 工序(2):添加第2含纤维素生物质或其前处理物,通过源自丝状菌的纤维素酶进行水解的工序,所述第2含纤维素生物质或其前处理物的量相对于工序(1)的第1含纤维素生物质的前处理物的固体成分重量为1~50%的范围

[0035] 本发明的特征在于,在水解第1含纤维素生物质前处理物时,添加第2含纤维素生物质或其前处理物。第2含纤维素生物质是指与第1含纤维素生物质同样地包含纤维素成分的生物资源,但是其特征在于,与第1含纤维素生物质植物种类或植物部位不同。

[0036] 作为第2含纤维素生物质的优选的具体例子,可举出谷物外皮。谷物是指包含禾本科作物、豆科作物或者其他植物的种子果实在内的以淀粉质为主体的种子果实,具体而言,可以示例出玉米、稻、麦、大豆、荞麦、苋属植物、昆诺阿藜(quinoa)等。这些谷物都是相当于种子果实的部分,而谷物外皮是指种子果实最外侧的表皮部分。例如,对于玉米、小麦、大豆、稻,在食品加工的过程中,有时除去谷物外皮的部分。玉米在淀粉制造中、小麦在小麦粉制造中、大豆在大豆油制造中、稻来在作为食用部分的精米的制造过程中等会除去谷物外皮的部分。由于这样的谷物外皮包含纤维素,因而可以说是在前述谷物加工过程中产生的含纤维素生物质。作为本发明的第2含纤维素生物质最优选的是玉米外皮、大豆外皮、小麦外皮。

[0037] 虽然第2含纤维素生物质直接使用也能发挥充分的效果,但是优选进行了水热处理和/或酸处理的前处理物。通过对第2含纤维素生物质进行前处理,能够在提高利用源自丝状菌的纤维素酶分解第2含纤维素生物质的分解效率的同时,增大工序(3)中源自丝状菌的纤维素酶的回收量。

[0038] 以相对于工序(1)中第1含纤维素生物质的前处理物的固体成分重量为1~50%的范围的量添加第2含纤维素生物质。这里所说的固体成分重量,是指使第1含纤维素生物质的前处理物和/或第2含纤维素生物质或其前处理物在105℃下干燥后的重量,通过使用加热干燥·质量测定方式的水分计来测定含水率,能够逆运算出第1含纤维素生物质的前处理物和/或第2含纤维素生物质或其前处理物的固体成分浓度。例如,在第1含纤维素生物质的前处理物的含水率为70%、第2含纤维素生物质或其前处理物的含水率为10%的情况下,其固体成分浓度分别是30%、90%。第1含纤维素生物质的前处理物的湿重150g相当于固体成分45g,第2含纤维素生物质或其前处理物的添加量为固体成分0.45~22.5g,即相当于湿

重0.5~25g。

[0039] 在本发明中,使用源自丝状菌的纤维素酶来水解第1含纤维素生物质的前处理物和第2含纤维素生物质或其前处理物。作为丝状菌,可举出木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、梭菌属(*Clostridium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、腐质霉属(*Humicola*)、枝顶孢霉属(*Acremonium*)、耙齿菌属(*Irpex*)、毛霉属(*Mucor*)、篮状菌属(*Talaromyces*)等的微生物。此外,也可以是源自利用诱变剂或紫外线照射等对这些微生物进行了突变处理从而纤维素酶生产性提高了的突变株的纤维素酶。

[0040] 由于丝状菌中木霉属在培养液中大量地生产在纤维素的水解中比活性高的酶成分,因此可以在本发明中优选使用。作为源自木霉属的纤维素酶的具体例子,可举出源自里氏木霉QM9414(*Trichoderma reesei* QM9414)、里氏木霉QM9123(*Trichoderma reesei* QM9123)、里氏木霉RutC-30(*Trichoderma reesei* RutC-30)、里氏木霉PC3-7(*Trichoderma reesei* PC3-7)、里氏木霉CL-847(*Trichoderma reesei* CL-847)、里氏木霉MCG77(*Trichoderma reesei* MCG77)、里氏木霉MCG80(*Trichoderma reesei* MCG80)、绿色木霉QM9123(*Trichoderma viride* QM9123)的纤维素酶,其中更优选源自里氏木霉的纤维素酶。

[0041] 源自丝状菌的纤维素酶是具有将纤维素和/或半纤维素水解并生成葡萄糖、木糖等单糖的活性的酶组合物,作为酶成分,优选包含选自纤维二糖水解酶、内切葡聚糖酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、木聚糖酶和 $\beta$ -木糖苷酶中的1种以上。例如,作为源自里氏木霉的纤维素酶的酶成分,可示例纤维二糖水解酶I、纤维二糖水解酶II、内切葡聚糖酶I、内切葡聚糖酶III、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶等,由于这样通过多种酶成分的协同效果或互补效果能够有效地进行纤维素和/或半纤维素的水解,因此在本发明中优选使用。

[0042] 纤维二糖水解酶是通过纤维素链的水解而释放纤维二糖的酶的总称,作为EC编号:EC3.2.1.91,记载了归属于纤维二糖水解酶的酶群。纤维二糖水解酶I从纤维素链的还原末端侧开始水解反应,纤维二糖水解酶II从非还原末端侧开始水解反应。

[0043] 内切葡聚糖酶是以从纤维素链的中央部分开始水解为特征的酶的总称,作为EC编号:EC3.2.1.4,记载了归属于内切葡聚糖酶的酶群。

[0044] 所谓 $\beta$ -葡萄糖苷酶,是以作用于纤维寡糖或纤维二糖为特征的酶的总称,作为EC编号:EC3.2.1.21,记载了归属于 $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶群。

[0045] 所谓木聚糖酶,是以作用于半纤维素或特别作用于木聚糖为特征的酶的总称,作为EC编号:EC3.2.1.8,记载了归属于木聚糖酶的酶群。

[0046] 所谓 $\beta$ -木糖苷酶,是以作用于木寡糖为特征的酶的总称,作为EC编号:EC3.2.1.37,记载了归属于木糖苷酶的酶群。

[0047] 这样的纤维素酶成分通过凝胶过滤、离子交换、二维电泳等公知手法进行分离,对分离出的成分进行氨基酸序列分析(N末端分析、C末端分析、质量分析),通过与数据库比较可以进行鉴定。

[0048] 此外,源自丝状菌的纤维素酶的酶活性可以以结晶纤维素、羧甲基纤维素(CMC)、纤维二糖、木聚糖、甘露聚糖等多糖作为底物,根据其水解活性进行评价。显示结晶纤维素分解活性的主要的酶是具有从纤维素末端部分水解的特征的纤维二糖水解酶。显示纤维二糖分解活性的主要的酶是 $\beta$ -葡萄糖苷酶。与CMC分解活性相关的主要的酶是纤维二糖水解酶、内切葡聚糖酶。显示木聚糖分解活性的主要的酶是木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶。这里“主要的”的

意思是来自已知与分解最相关的表达方式,意思是其以外的酶成分也与其分解相关。

[0049] 由于丝状菌在培养液中产生纤维素酶,因此可以将其培养液作为粗酶物直接使用,也可以将以公知的方法将酶群纯化并制剂化而得的制品作为源自丝状菌的纤维素酶混合物使用。在使用将源自丝状菌的纤维素酶纯化并制剂化而得的制品的情况下,也可以将添加了蛋白酶抑制剂、分散剂、溶解促进剂、稳定剂等酶以外的物质的制剂作为纤维素酶制剂使用。另外,在本发明中优选使用其中的粗酶物。粗酶物源自在为了使丝状菌产生纤维素酶而调制的培养基中将该微生物培养任意时间而得的培养上清。对使用的培养基成分不特别限定,但是为了促进纤维素酶的产生,一般可以使用添加了纤维素的培养基。而且,作为粗酶物,优选直接使用培养液,或使用仅除去了木霉菌体的培养上清。

[0050] 对粗酶物中的各酶成分的重量比不特别限定,例如,源自里氏木霉的培养液中含有50~95重量%的纤维二糖水解酶,其余成分包含内切葡聚糖酶、 $\beta$ -葡糖苷酶等。此外,木霉属的微生物在培养液中产生强的纤维素酶成分,另一方面由于 $\beta$ -葡糖苷酶大多保持在细胞内或细胞表层,因而培养液中的 $\beta$ -葡糖苷酶活性低。因此可以在粗酶物中进一步添加异种或同种的 $\beta$ -葡糖苷酶。作为异种的 $\beta$ -葡糖苷酶,可以优选使用源自曲霉属的 $\beta$ -葡糖苷酶。作为源自曲霉属的 $\beta$ -葡糖苷酶,可以示例出由ノボザイム社市售的Novozyme188等。此外,还可以培养以向木霉属的微生物导入基因使其在其培养液中产生 $\beta$ -葡糖苷酶的方式进行基因重组而得的木霉属的微生物,从而使用 $\beta$ -葡糖苷酶活性提高了的培养液。

[0051] 对第1含纤维素生物质的前处理物和第2含纤维素生物质或其前处理物的固体成分浓度不特别限定,但是优选1~30重量%的范围。如果考虑生成的糖浓度和操作性,则设定为该固体物浓度是有利的。

[0052] 对于水解反应的温度,只要依照源自丝状菌的纤维素酶的优选的反应条件就不特别限定,优选为30~75℃的范围,特别是在使用源自木霉属的纤维素酶的情况下,进一步优选40~60℃的范围。

[0053] 对于水解反应的pH值也是同样,只要依照源自丝状菌的纤维素酶的优选的反应条件就不特别限定,优选pH值为3.0~7.0的范围,进一步优选pH值为4.0~6.0的范围。在使用源自木霉属的纤维素酶作为源自丝状菌的纤维素酶的情况下,其反应最适pH值为5.0。进而,由于在水解的过程中pH值发生变化,因此优选一边向反应液中添加缓冲液或者使用酸、碱来保持一定pH值,一边进行。

[0054] 水解反应的时间优选为2小时~200小时的范围。将水解反应的时间设定为该范围在生成充分的糖和防止回收纤维素酶失活方面是有利的。

[0055] 工序(3):将工序(2)的水解物固液分离为溶液成分和水解残渣,使溶液成分通过超滤膜进行过滤,作为非透过液回收源自丝状菌的纤维素酶,作为透过液回收糖液的工序

[0056] 将由工序(2)获得的水解物固液分离而获得的溶液成分中包含源自丝状菌的纤维素酶成分和糖成分,它们可以通过使用超滤膜的过滤来分离。

[0057] 超滤膜是指截留分子量为500~200,000的膜,简称为Ultra filtration膜、UF膜等。此外,超滤膜孔径过小,难以用电子显微镜等对膜表面的细孔径进行计测,因此用截留分子量的值来代替平均细孔径作为孔径大小的指标。所谓截留分子量,像在日本膜学会编膜学実験シリーズ(膜学实验系列)第III卷人工膜编集委员/木村尚史・中尾真一・大矢晴彦・仲川勤(1993年,共立出版)的第92中的记载:“溶質の分子量を横軸に、阻止率を縦

軸にとってデータをプロットしたものを分画分子量曲線とよんでいる。そして阻止率が90%となる分子量を膜の分画分子量とよんでいる。(以溶質の分子量作为横轴、以截留率作为纵轴,将数据作图而得的曲线叫做截留分子量曲线。而且将截留率为90%的分子量叫做膜的截留分子量)。”那样,其作为表示超滤膜的膜性能的指标是本领域技术人员周知的。

[0058] 在使用超滤膜进行的源自丝状菌的纤维素酶与糖成分的分离中,其截留分子量只要能够使作为糖液主成分的单糖的葡萄糖(分子量180)、木糖(分子量150)透过且能够截留源自丝状菌的纤维素酶就不特别限定,但是优选截留分子量为500~100,000,从保证源自丝状菌的纤维素酶成分的收率、且将对酶反应显示抑制作用的夹杂物质与源自丝状菌的纤维素酶成分分离的观点出发,更优选为截留分子量5,000~50,000的范围,进一步优选为截留分子量10,000~30,000的范围。

[0059] 作为超滤膜的材料,可以使用聚醚砜(PES)、聚砜(PS)、聚丙烯腈(PAN)、聚1,1-二氟乙烯(PVDF)、再生纤维素、纤维素、纤维素酯、磺化聚砜、磺化聚醚砜、聚烯烃、聚乙烯醇、聚甲基丙烯酸甲酯、聚四氟乙烯等,但是由于再生纤维素、纤维素、纤维素酯受到源自丝状菌的纤维素酶的分解,因此优选使用以PES、PVDF等合成高分子作为材料的超滤膜。

[0060] 作为超滤膜的过滤方式,有死端过滤、错流过滤,但从抑制膜污染的观点出发,优选错流过滤。此外,作为使用的超滤膜的膜形态,可以使用平膜型、螺旋型、管状型、中空丝型等适宜的形态。具体而言,可举出DESAL社のG-5型、G-10型、G-20型、G-50型、PW型、HWSUF型,KOCH社のHFM-180、HFM-183、HFM-251、HFM-300、HFK-131、HFK-328、MPT-U20、MPS-U20P、MPS-U20S,Synder社のSPE1、SPE3、SPE5、SPE10、SPE30、SPV5、SPV50、SOW30,旭化成株式会社制的マイクロザ(注册商标)UF系列の相当于截留分子量3,000~10,000の膜,日东电工株式会社制的NTR7410、NTR7450等。

[0061] 作为利用超滤膜的过滤的非透过液而被回收的源自丝状菌的纤维素酶,可以在工序(2)的水解工序中进行再利用。在本发明中,通过对回收纤维素酶进行再利用,从而源自丝状菌的纤维素酶的使用量减少,从而能够削减糖液制造成本。另外,在使用回收纤维素酶进行含纤维素生物质的水解的情况下,可以向回收纤维素酶中新添加未使用的源自丝状菌的纤维素酶。如果新添加的源自丝状菌的纤维素酶的量增加,则在成本方面变得不利,因此,为了获得充分的糖收量,优选添加必要的最低限度的未使用纤维素酶。

[0062] 作为利用超滤膜的过滤的透过液而被回收的糖液是以作为单糖的葡萄糖和木糖为主成分的糖液,可以直接作为后述发酵工序中的发酵原料使用,但是为了提高发酵工序的效率,也可以进行进一步提高糖浓度的浓缩处理。作为糖液的浓缩处理,可以示例出蒸发浓缩、减压浓缩、膜浓缩等,但是通过能量使用量少且能够分离糖液中所包含的发酵抑制物质的W02010/067785号中记载的、通过纳滤膜和/或反渗透膜进行过滤的方法,能够获得糖成分浓缩了的浓缩糖液。

[0063] 通过培养具有将由本发明获得的糖液作为发酵原料来生产化学品的能力的微生物,能够制造各种化学品。这里所谓的作为发酵原料而使微生物生长繁育,意思是将糖液中所包含的糖成分或氮源作为微生物的营养素进行利用,从而进行微生物的增殖、生长繁育维持。这样的化学品是以糖液中的糖成分作为碳源,在其代谢过程中在生物体内外作为化学品而蓄积产生的。作为化学品的具体例,可举出乙醇、1,3-丙二醇、1,4-丁二醇、甘油等醇,乙酸、乳酸、丙酮酸、琥珀酸、苹果酸、衣康酸、柠檬酸等有机酸,肌苷、鸟苷等核苷,肌苷



酸、鸟苷酸等核苷酸，尸胺等胺化合物。进而，本发明的源自纤维素的糖液还能够应用于酶、抗生素、重组蛋白质等的生产中。

## 实施例

[0064] 以下，通过实施例更具体地说明本发明。但是，本发明不受这些实施例限定。

[0065] (参考例1) 蛋白质浓度的测定

[0066] 蛋白质浓度的测定使用市售的蛋白质浓度测定试剂(Quick Start Bradford Protein Assay, Bio-Rad制)。在回到室温的蛋白质浓度测定试剂250 $\mu$ L中添加5 $\mu$ L稀释的纤维素酶溶液，在室温下静置5分钟之后，用酶标仪(POWERSCAN HT、大日本住友制药株式会社制)测定其在595nm的吸光度。将牛血清白蛋白水溶液作为标准液，参照标准曲线算出纤维素酶溶液的蛋白质浓度。

[0067] (参考例2) 糖浓度的测定

[0068] 糖液中所包含的葡萄糖和木糖浓度在下述所示的HPLC条件下，通过与标准品的比较进行定量。

[0069] 柱:Luna NH<sub>2</sub> (Phenomenex社制)

[0070] 流动相:Milli-Q:乙腈=25:75(流速0.6mL/分钟)

[0071] 检测方法:RI(差示折射率)

[0072] 温度:30℃。

[0073] (参考例3) 源自丝状菌的纤维素酶的活性测定方法

[0074] 纤维素酶活性，即作为与纤维素的分解相关的酶群的活性，通过以下所示的方法测定评价(1) 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃乳糖苷(pNP-Lac)和(2) 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(pNP-Glc)的分解活性；作为与作为半纤维素主成分的木聚糖的分解相关的酶群的活性，通过以下所示的方法测定评价(3) 4-硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃木糖苷(pNP-Xyl)的分解活性。另外，将上述(1)～(3)的底物合并称为pNP-糖。

[0075] 向分别以1.1mM的浓度包含各底物的55mM乙酸缓冲液(pH5.0)0.9mL中添加酶液0.1mL，在30℃下使其反应(底物的终浓度1mM，缓冲液的终浓度50mM)。在底物为pNP-Lac的情况下，反应时间为60分钟；在底物为pNP-Glc的情况下，反应时间为10分钟；在底物为pNP-Xyl的情况下，反应时间为30分钟，在按照各自的时间正确地使其反应之后，添加0.1mL的2M碳酸钠水溶液使反应停止，测定在405nm的吸光度(ODtest)。作为空白，对于向底物溶液中依次添加2M碳酸钠水溶液、酶液而得的样品同样地测定在405nm的吸光度(ODblank)。将在上述反应体系中1分钟生成1 $\mu$ mol的4-硝基苯酚的酶量定义为1U，根据下述式算出活性值(U/mL)。另外，上述反应体系中的4-硝基苯酚的毫摩尔分子吸光系数是17.2L/mmol/cm。

[0076] pNP-Lac分解活性(U/mL) = { (ODtest-ODblank)  $\times$  1.1 (mL)  $\times$  酶稀释倍率 } / { 17.2  $\times$  60 (分钟)  $\times$  0.1 (mL) }

[0077] pNP-Glc分解活性(U/mL) = { (ODtest-ODblank)  $\times$  1.1 (mL)  $\times$  酶稀释倍率 } / { 17.2  $\times$  10 (分钟)  $\times$  0.1 (mL) }

[0078] pNP-Xyl分解活性(U/mL) = { (ODtest-ODblank)  $\times$  1.1 (mL)  $\times$  酶稀释倍率 } / { 17.2  $\times$  60 (分钟)  $\times$  0.1 (mL) }。

[0079] (比较例1) 仅使用第1含纤维素生物质的情况

[0080] (工序1:第1含纤维素生物质的前处理)

[0081] (前处理1) 第1含纤维素生物质的氨处理

[0082] 将第1含纤维素生物质(玉米穗轴或稻秸)投进小型反应器(耐压硝子工业制、TVS-N230ml)中,用液氮进行冷却。向该反应器中充入氨气,使试样完全浸渍在液氨中。关闭反应器的盖,在室温下放置15分钟左右。接着,在150℃的油浴中处理1小时。处理后,将反应器从油浴中取出,在通风橱中直接泄掉氨气,然后再用真空泵将反应器内部抽真空到10Pa并使其干燥。将玉米穗轴的前处理物作为前处理物1、将稻秸的前处理物作为前处理物2用于以下的实施例。

[0083] (前处理2) 第1含纤维素生物质的水热处理

[0084] 将第1含纤维素生物质(玉米穗轴)浸渍在水中,一边搅拌一边在180℃下进行20分钟高压釜处理(日东高压株式会社制)。此时的压力是10MPa。处理后,通过离心分离(3,000G)而固液分离为溶液成分和固体物,将该固体物作为前处理物3用于以下的实施例。

[0085] (前处理3) 第1含纤维素生物质的稀硫酸处理

[0086] 使第1含纤维素生物质(玉米秸秆、麦秸或蔗渣)混悬在硫酸2%水溶液中,调制固体成分浓度30%的浆液。在150℃下对该浆液进行30分钟高压釜处理(日东高压株式会社制)。处理后,通过离心分离(3,000g)而固液分离为溶液成分和固体物,将通过玉米秸秆的前处理获得的固体物作为前处理物4、将通过麦秸的前处理获得的固体物作为前处理物5、将通过蔗渣的前处理获得的固体物作为前处理物6用于以下的实施例。

[0087] (工序2:利用源自丝状菌的纤维素酶的水解)

[0088] 作为源自丝状菌的纤维素酶,使用了市售的纤维素酶酶液(“アクセルレースデュエット”、ジェネンコア制)。按照参考例1测定了纤维素酶酶液的蛋白质浓度,结果其浓度是40g/L。

[0089] 分别称量由工序1调制的前处理物1至前处理物6各1.0g(固体成分重量),在50mL离心管中混悬于7.0mL的水中,调制出浆液。使用稀硫酸或氨水将浆液的pH值调节为4.7~5.3的范围内,然后添加纤维素酶酶液0.2mL和水,使总重量为10g,使固体成分浓度为10%。在50℃下使用混合旋转器(日伸理化株式会社制SN-06BN)进行24小时旋转混合,从而获得水解物。

[0090] (工序3:源自丝状菌的纤维素酶和糖液的回收)

[0091] 将工序2的水解物利用离心分离(8,000G、10分钟)进行固液分离,获得溶液成分8g和水解残渣2g。通过将水解残渣用8mL的水进行再混悬,再次进行离心分离(8,000G、10分钟),从而回收水解残渣中残存的溶液成分。将回收的溶液成分合并,通过孔径0.2μm的精密过滤膜(25mm GD/X注射器过滤器材质:PVDF、GEヘルスケア・ジャパン制)除去微粒,然后使用截留分子量10,000的超滤膜(VIVASPIN20材质:PES、Sartorius stedim biotech制)进行过滤。将非透过侧作为回收纤维素酶液进行回收,将透过液作为糖液进行回收。对于糖液,按照参考例2测定糖浓度。对于回收纤维素酶液,按照参考例3进行酶活性测定。

[0092] 将糖浓度汇总于表1中,将回收纤维素酶液的酶活性相对于加入的纤维素酶酶液的酶活性的比例作为残存率汇总于表2中。

[0093] 表1

[0094]

	糖浓度 (g/L)	
	葡萄糖	木糖
前处理物1	3 3	2 9
前处理物2	3 5	1 6
前处理物3	5 1	1 2
前处理物4	5 2	8
前处理物5	3 8	1 2
前处理物6	3 2	2 2

[0095] 表2

[0096]

	pNP-糖分解活性残存率 (%)		
	pNP-L a c	pNP-G l c	pNP-X y l
前处理物1	2 2	7 4	3 1
前处理物2	1 8	1 3	9
前处理物3	1 5	9	1 1
前处理物4	1 6	3	5
前处理物5	1 9	2 7	1 3
前处理物6	1 7	3 5	0

[0097] (实施例1) 第2含纤维素生物质的使用

[0098] 使用前处理物1或前处理物3作为第1含纤维素生物质,作为比较例1的工序2中的第2含纤维素生物质,以相对于第1含纤维素生物质的固体成分重量为10%的量添加了玉米外皮、大豆外皮、小麦外皮(麸)3种中的任一种。其结果调制了第1含纤维素生物质的固体成分浓度为10%、第2含纤维素生物质的固体成分浓度为1%的浆液。其他与比较例1同样地进行糖液的制造,获得糖液和回收纤维素酶液。对于糖液,按照参考例2来测定糖浓度;对于回收纤维素酶液,按照参考例3来进行活性测定。

[0099] (实施例2) 第2含纤维素生物质的前处理物的使用

[0100] 作为第2含纤维素生物质,使用了玉米外皮、大豆外皮、小麦外皮(麸)3种的水热处理物或酸处理物。

[0101] 水热处理物是将固体成分浓度为30%的第2含纤维素生物质的浆液在150℃下进行30分钟高压釜处理(日东高压株式会社制)而获得的。

[0102] 酸处理物是将硫酸为0.5%、固体成分浓度为30%的第2含纤维素生物质的浆液在150℃下进行30分钟高压釜处理(日东高压株式会社制)而获得的。

[0103] 除了在比较例1的工序2中添加相对于第1含纤维素生物质的固体物重量为10%的量的第2含纤维素生物质的前处理物以外,与比较例1同样地进行糖液的制造。其中,在使用前处理物1或前处理物3作为第1含纤维素生物质的情况下,使用第2含纤维素生物质(玉米外皮、大豆外皮、小麦外皮)中的任一种的水热处理物或酸处理物;在使用前处理物2、前处理物4、前处理物5或前处理物6作为第1含纤维素生物质的情况下,仅使用作为第2含纤维素生物质的玉米外皮的酸处理物。对于所得的糖液和回收纤维素酶液,糖液按照参考例2来测

定糖浓度,回收纤维素酶液按照参考例3进行活性测定。

[0104] 将实施例1和实施例2的糖浓度汇总于表3、表4和表5中,将酶活性的残存率汇总于表6、表7和表8中。其结果是通过使用第2含纤维素生物质,糖收量和回收纤维素酶液相对于初始加入酶的活性残存率提高了。

[0105] 表3

含纤维素生物质				糖浓度(g/L)	
第1	第2			葡萄糖	木糖
前处理物1	比较例1	无		3 3	2 9
	实施例1	未处理	玉米外皮	3 8	3 2
			大豆外皮	3 4	3 0
			小麦外皮	3 6	3 3
	实施例2	水热处理	玉米外皮	4 1	3 5
			大豆外皮	3 8	3 1
			小麦外皮	3 9	3 5
		酸处理	玉米外皮	4 3	3 6
			大豆外皮	4 4	3 2
			小麦外皮	4 2	3 6

[0107] 表4

含纤维素生物质				糖浓度(g/L)	
第1	第2			葡萄糖	木糖
前处理物3	比较例1	无		5 1	1 2
	实施例1	未处理	玉米外皮	5 6	1 3
			大豆外皮	5 3	1 3
			小麦外皮	5 4	1 4
	实施例2	水热处理	玉米外皮	5 9	1 5
			大豆外皮	5 7	1 3
			小麦外皮	5 6	1 4
		酸处理	玉米外皮	6 2	1 8
			大豆外皮	6 2	1 5
			小麦外皮	5 8	1 7

[0109] 表5

[0110]

含纤维素生物质				糖浓度(g/L)	
第1	第2			葡萄糖	木糖
前处理物2	比较例1	无		3 5	1 6
	实施例2	酸处理	玉米外皮	4 3	1 9
前处理物4	比较例1	无		5 2	8
	实施例2	酸处理	玉米外皮	5 9	1 0
前处理物5	比较例1	无		3 8	1 2
	实施例2	酸处理	玉米外皮	4 5	1 4
前处理物6	比较例1	无		3 2	2 2
	实施例2	酸处理	玉米外皮	3 9	2 5

[0111] 表6

[0112]

含纤维素生物质				pNP-糖分解活性残存率(%)		
第1	第2			pNP-Lac	pNP-Glc	pNP-Xyl
前处理物1	比较例1	无		2 2	7 4	3 1
	实施例1	未处理	玉米外皮	3 6	8 5	3 2
			大豆外皮	3 8	8 6	3 9
			小麦外皮	3 2	8 3	3 3
	实施例2	水热处理	玉米外皮	5 3	8 7	3 8
			大豆外皮	4 9	9 1	5 1
			小麦外皮	3 7	8 8	3 8
		酸处理	玉米外皮	6 1	9 4	4 3
			大豆外皮	5 5	9 8	6 7
			小麦外皮	4 3	8 9	4 5

[0113] 表7

[0114]

含纤维素生物质			pNP-糖分解活性残存率(%)		
第1	第2		pNP- L a c	pNP- G l c	pNP- X y l
前处理物3	比较例1	无	1 5	9	1 1
	实施例1	未处理	玉米外皮	1 8	1 2
			大豆外皮	1 7	1 2
			小麦外皮	1 6	1 3
	实施例2	水热处理	玉米外皮	2 7	2 5
			大豆外皮	1 7	2 3
			小麦外皮	1 8	1 9
	酸处理		玉米外皮	4 2	3 8
			大豆外皮	2 8	3 7
			小麦外皮	3 1	2 5

[0115] 表8

[0116]

含纤维素生物质			pNP-糖分解活性残存率(%)		
第1	第2		pNP- L a c	pNP- G l c	pNP- X y l
前处理物2	比较例1	无	1 8	1 3	9
	实施例2	酸处理	玉米外皮	2 9	3 8
前处理物4	比较例1	无	1 6	3	5
	实施例2	酸处理	玉米外皮	2 3	1 8
前处理物5	比较例1	无	1 9	2 7	1 3
	实施例2	酸处理	玉米外皮	2 8	5 5
前处理物6	比较例1	无	1 7	3 5	0
	实施例2	酸处理	玉米外皮	3 4	6 5

[0117] (实施例3) 第2含纤维素生物质的添加量的影响

[0118] 使用玉米外皮的酸处理物作为比较例1的工序2中的第2含纤维素生物质, 相对于第1含纤维素生物质的前处理物3 (水热处理玉米穗轴) 的固体成分重量添加了1~50%的量。其他与比较例1同样地进行糖液的制造, 获得糖液和回收纤维素酶液。糖液按照参考例2

来测定糖浓度；回收纤维素酶液按照参考例3来进行活性测定。将糖浓度汇总于表9中，将酶活性的残存率汇总于表10中。

[0119] 结果是第2含纤维素生物质的添加量越多，糖收量越大。回收纤维素酶液相对于初始加入酶的活性残存率在添加相对于第1含纤维素生物质前处理物的固体成分重量为10%以上的第2含纤维素生物质的情况下最大。

[0120] 表9

[0121]

含纤维素生物质			糖浓度(g/L)	
第1	第2		葡萄糖	木糖
前处理物3	无(比较例1)		5 1	1 2
	玉米外皮	1 %	5 3	1 3
		5 %	5 9	1 5
		1 0 %(实施例2)	6 2	1 8
		2 0 %	6 7	2 0
		3 0 %	6 9	2 1
		5 0 %	7 2	2 2

[0122] 表10

[0123]

含纤维素生物质			pNP-糖分解活性残存率(%)		
第1	第2		pNP-Lac	pNP-Glc	pNP-Xyl
前处理物3	无(比较例1)		15	9	11
	玉米外皮	1%	27	22	18
		5%	35	31	24
		10%(实施例2)	42	38	27
		20%	42	39	28
		30%	43	41	27
		50%	42	40	28

[0124] (实施例4)以源自含纤维素生物质的糖液作为发酵原料的乳酸发酵生产

[0125] 使用前处理物3(水热处理玉米穗轴)作为第1含纤维素生物质前处理物，使用由比较例1制造的糖液(糖液1)和在实施例2中使用进行了酸处理的玉米外皮作为第2含纤维素生物质制造的糖液(糖液2)作为发酵原料，将乳酸乳球菌JCM7638株在37℃的温度下进行24小时静置培养。用以下条件分析培养液中包含的L-乳酸浓度。

[0126] 柱:Shim-Pack SPR-H(株式会社岛津制作所制)

[0127] 流动相A:5mM 对甲苯磺酸(流速0.8mL/min)

[0128] 流动相B:5mM 对甲苯磺酸、20mM Bis-Tris、0.1mM EDTA • 2Na(流速0.8mL/min)

[0129] 检测方法:电导率

[0130] 温度:45℃。

[0131] 上述分析的结果如表11所示，确认了在任一糖液作为发酵原料的乳酸发酵中都能

够生产L-乳酸,但是通过本发明制造的糖液在乳酸发酵的收率方面形成优异的结果。

[0132] 表11

[0133]

	糖液1	糖液2
L-乳酸浓度 (g/L)	10	16

[0134] 本发明中的糖液的制造方法能够用于从包含纤维素的生物质制造成为发酵原料的糖液。此外,由本发明制造的糖液能够作为各种化学品的发酵原料使用。



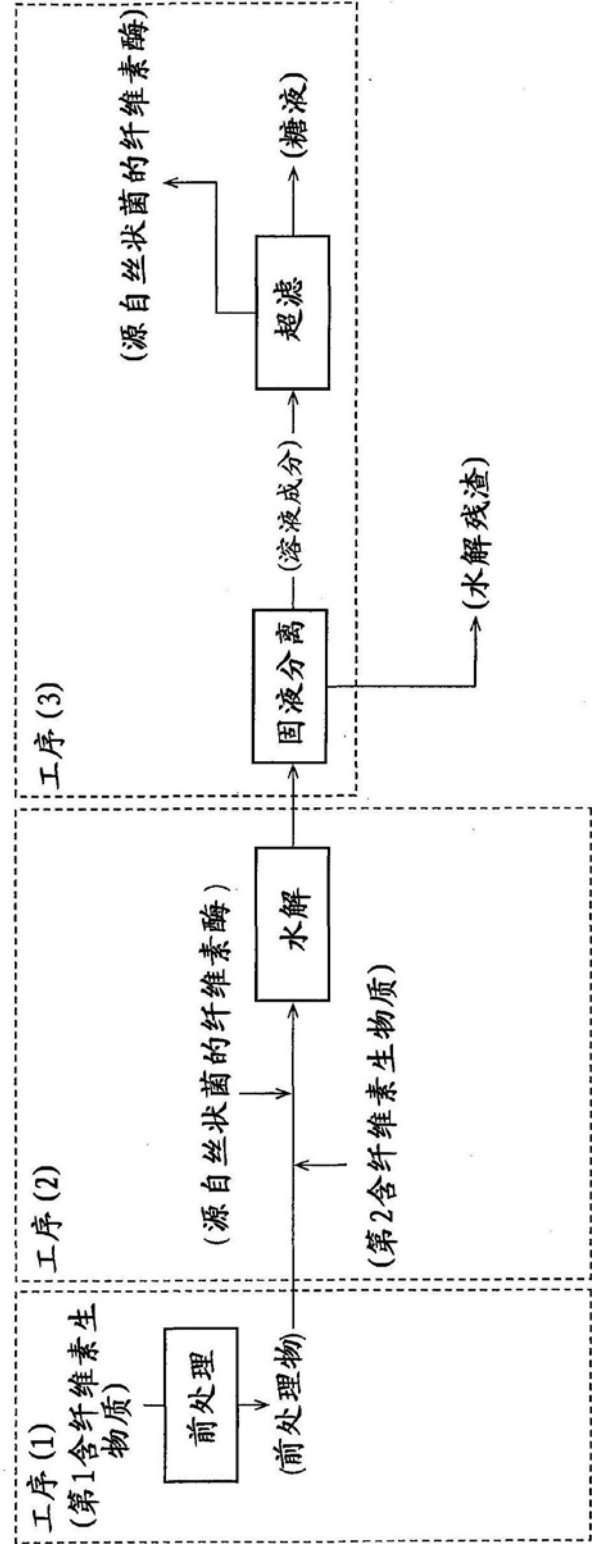


图1