

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年10月6日(06.10.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/210733 A1

- (51) 国際特許分類:
CI2P 7/22 (2006.01) *C07G 1/00* (2011.01) 41110 ウドンタニ、クムパワピー、ポントン、ロード、11、73/6ムー Thani (TH).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/015547 (74) 代理人: 中村 行孝, 外(NAKAMURA Yukitaka et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1丁目6番6号 日本生命丸の内ビル 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2022年3月29日(29.03.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-058651 2021年3月30日(30.03.2021) JP
- (71) 出願人: 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP). セルロースック、バイオマス、テクノロジー、カンパニー、リミテッド (CELLULOSIC BIOMASS TECHNOLOGY CO., LTD.) [TH/TH]; 10500 バンコク、バーンラック、シーロム、ノース、サトーン、ロード、20、プッパジットビルディング、6フロア Bangkok (TH).
- (72) 発明者: 旭 裕佳 (ASAHI Yuka); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 南野 淳 (MINAMINO Atsushi); 41110 ウドンタニ、クムパワピー、ポントン、ロード、11、73/6ムー Thani (TH). 伊藤 傑 (ITOU Satoru);
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYPHENOL-CONTAINING COMPOSITION

(54) 発明の名称: ポリフェノール含有組成物の製造方法

(57) Abstract: The present invention provides a technical means for efficiently producing a polyphenol-containing composition from grass-based biomass. More specifically, the present invention provides a method for producing a polyphenol-containing composition from grass-based biomass, the method including: (1) a step in which an extraction liquid is obtained by bringing grass-based biomass into contact with an alkaline aqueous solution; (2) a step in which the pH of the extraction liquid obtained in step (1) is adjusted to a pH of 3.2-4.5, and the extraction liquid is reacted with an enzyme having cellobiohydrolase activity and xylanase activity to obtain an enzyme-reacted solution; and (3) a step in which a clarified liquid containing a polyphenol-containing composition is obtained by performing solid-liquid separation of the enzyme-reacted solution obtained in step (2).

(57) 要約: 本発明は、草本系バイオマスからポリフェノール含有組成物を効率的に製造する技術的手段を提供する。より具体的には、本発明は、草本系バイオマス由来のポリフェノール含有組成物の製造方法であって、(1) 草本系バイオマスをアルカリ性水溶液に接触させて抽出液を得る工程、(2) 工程(1)で得られた抽出液をpH3.2以上4.5以下に調整し、セロビオハイドラーゼ活性およびキシラナーゼ活性を含む酵素と反応させ酵素反応液を得る工程、および(3) 工程(2)で得られた酵素反応液を固液分離してポリフェノール含有組成物を含む清澄液を得る工程、を含むポリフェノール含有組成物の製造方法を提供する。

WO 2022/210733 A1

SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：ポリフェノール含有組成物の製造方法

関連出願の参照

[0001] 本特許出願は、2021年3月30日に出願された日本国特許出願2021-58651号に基づく優先権の主張を伴うものであり、かかる先の特許出願における全開示内容は、引用することにより本明細書の一部とされる。

技術分野

[0002] 本発明は、草本系バイオマスからのポリフェノール含有組成物の製造方法に関する。

背景技術

[0003] 近年、地球温暖化や石油資源の枯渇といった問題やカーボンニュートラルの観点から、バイオマスの活用が注目されている。その中の一つとして、食糧と競合しないセルロース含有バイオマスからポリフェノール組成物を得る方法がある。

[0004] セルロース含有バイオマスは、主に多糖であるセルロース、ヘミセルロース、芳香族ポリマーであるリグニンで構成されており、セルロース含有バイオマス中のリグニンやリグニンと多糖との接続部が分解されることによってポリフェノールを含有する分解液を得ることができる。

[0005] 例えば、特許文献1には、セルロース含有バイオマスにアルカリ性水性媒体を通液させて効率的にヒドロキシ桂皮酸を得る方法が記載されており、特許文献2には、植物のアルカリ抽出液から酸不溶性のリグニンを回収する方法が記載されている。また、特許文献3には、さとうきびの絞り粕であるバガスをアルカリ溶液で処理した抽出液を酸性に調整して濾過し、その濾液を芳香族系合成吸着剤で吸着させることで効率的にポリフェノール組成物を製造する方法が記載されている。

[0006] 従来、こうしたセルロース含有バイオマスのアルカリ処理は、セルロース含有バイオマスから糖液を得やすくするために、前処理として行われ、アル

カリ処理後の液分は廃棄されてきたが、上述のようにポリフェノールが含有するため、有効利用が望まれている。

[0007] 上述のような従来技術によって得られるポリフェノールを含む分解液は、消臭剤（特許文献4）、食品用変色防止剤（特許文献5）、水産生物成長促進剤（特許文献6）などとして利用が知られている。また、代表的なポリフェノールとしては、クマル酸、フェルラ酸が含有していることが知られている。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：WO2017/170549号
特許文献2：WO2012/120184号
特許文献3：WO2019/230803号
特許文献4：特開2020-93080号公報
特許文献5：WO2018/079640号
特許文献6：WO2018/079641号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 上述のように、草本系バイオマスからポリフェノール含有組成物を効率的に製造する従前の方法として草本系バイオマスをアルカリ溶液で処理した前処理液を酸性に調整して固液分離する方法があるが、固液分離性が悪いことや、ミセル化様の現象が起き、固液分離できなくなる場合があることが本発明者らの検討から明らかとなった。また、上記固液分離後の液の精製や濃縮などに適用される分離膜分離膜処理においても、濾過性が悪い場合があることが本発明者らの検討から明らかとなった。

[0010] したがって、本発明は、草本系バイオマスからポリフェノール含有組成物を効率的に製造する新たな技術的手段を提供することを一つの目的としている。

[0011] 本発明者は鋭意検討した結果、草本系バイオマスをアルカリ処理した抽出液をpH調整して特定の酵素と反応させることで、草本系バイオマスからポリフェノール含有組成物を効率的に製造しうることを見出し、本発明を完成させるに至った。

課題を解決するための手段

[0012] すなわち、本発明の一実施形態よれば、以下の[1]から[13]が提供される。

[1] 草本系バイオマス由来のポリフェノール含有組成物の製造方法であって、

(1) 草本系バイオマスをアルカリ性水溶液に接触させて抽出液を得る工程、

(2) 工程(1)で得られた抽出液をpH3.2以上4.5以下に調整し、セロビオハイドラーゼ活性およびキシラーゼ活性を含む酵素と反応させ酵素反応液を得る工程、および

(3) 工程(2)で得られた酵素反応液を固液分離してポリフェノール含有組成物を含む清澄液を得る工程、
を含むポリフェノール含有組成物の製造方法。

[2] 上記工程(1)で得られた抽出液をpH3.5以上4.0未満に調整する、[1]に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[3] 工程(1)で使用されるアルカリ性水溶液が、60℃以上である、[1]または[2]に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[4] さらに上記工程(3)で得られた清澄液を精密濾過膜、限外濾過膜、ナノ濾過膜および逆浸透膜からなる群から選択される1種以上の分離膜に通じて濾過し、ポリフェノール含有組成物を含む透過液および/または非透過液を得る工程(4)を含む、[1]～[3]のいずれかに記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[5] 上記分離膜が精密濾過膜であり、ポリフェノール含有組成物を含む透過液を得る、[4]に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[6] 上記工程(4)にて上記清澄液を精密濾過膜に通じて濾過して得た透過液を限外濾過膜、ナノ濾過膜および逆浸透膜からなる群から選択される1種以上の分離膜に通じて濾過し、ポリフェノール含有組成物を含む非透過液を回収する、[4]または[5]に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[7] 上記工程(4)にて上記清澄液または精密濾過膜に通じて濾過して得た透過液をナノ濾過膜に通じて濾過し、ポリフェノール含有組成物を含む透過液を得る、[4]～[6]のいずれかに記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[8] 上記ナノ濾過膜の分画分子量が300～1000である、[7]に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[9] 上記工程(2)での上記酵素の反応時間が10分～2時間である、[1]～[8]のいずれかに記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[10] 上記草本系バイオマスがバガスである、[1]～[9]のいずれかに記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[11] 上記酵素がトリコデルマ属微生物由来である、[1]～[10]のいずれかに記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

[12] クマル酸およびキシロースを含み、クマル酸に対するキシロースの含有率が1～200%(w/w)である、ポリフェノール含有組成物。

[13] 上記クマル酸に対するキシロースの含有率が2～50%(w/w)である、[12]に記載のポリフェノール含有組成物。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、草本系バイオマスからポリフェノール含有組成物を効率的に製造することができる。また、本発明によれば、草本系バイオマスからポリフェノール含有組成物を製造するに際して、ミセル化様の現象を防ぐとともに、固液分離の効率を向上させることができる。また、本発明によれば、上記固液分離後の分離膜処理においても生成物の濾過性を改善することができる。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の一実施形態によれば、草本系バイオマス由来のポリフェノール含有組成物の製造方法は、

(1) 草本系バイオマスをアルカリ性水溶液に接触させて抽出液を得る工程、

(2) 工程(1)で得られた抽出液をpH3.2以上4.5以下に調整し、セロビオハイドラーゼ活性およびキシラナーゼ活性を含む酵素と反応させ酵素反応液を得る工程、および

(3) 工程(2)で得られた酵素反応液を固液分離してポリフェノール含有組成物を含む清澄液を得る工程、

を含むことを特徴としている。

[0015] 以下、本発明を実施するための形態について説明する。

<工程(1)>

本発明の一実施形態によれば、上述の通り、工程(1)において、草本系バイオマスをアルカリ性水溶液に接触させて抽出液を得る。

[0016] 本発明の一実施形態によれば、草本バイオマスの例としては、サトウキビの絞り粕であるバガス、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサス、コーンストーバー、コーン外皮、小麦外皮、大豆外皮、稲わら、麦わら、油椰子空果房などが挙げられるがこれに限定されない。ポリフェノール製造の観点から、リグニン含有率が5%以上の草本系バイオマスを使用することが好ましく、具体的には、バガス、ネピアグラス、エリアンサス、コーンストーバー、稲わらが好ましく、バガスがより好ましい。なお、リグニン含有率は、酸加水分解の残渣から灰分を引いたものであるクラークソンリグニンを測定することで求めることができる。

[0017] 本発明の一実施形態によれば、草本系バイオマスの形状は特に限定されないが、粉碎処理されていることが好ましい。粉碎手段は特に限定されず、ボールミル、振動ミル、カッターミル、ハンマーミル、ウィレーミル、ジェットミルなど各種材料の粗粉碎に慣用されている機械を用いて行うことができ

る。この機械的な粉碎は乾式および湿式のいずれでもよいが、好ましくは乾式粉碎である。

[0018] 本発明の一実施形態によれば、草本系バイオマスの含水率は特に限定されないが、好ましい範囲は、例えば、3%程度以上、3%程度以上75%程度以下、5%程度以上、5%程度以上70%程度以下、5%程度以上65%程度以下、5%程度以上55%程度以下である。

[0019] 本発明の一実施形態によれば、ポリフェノールとは、クマル酸やフェルラ酸といったヒドロキシ桂皮酸、リグニン分解物の1種以上を含んでもよく、例えば、フォーリンチオカルト法によって測定することができる。フォーリンチオカルト法は、元来、チロシン、トリプトファン等の芳香族アミノ酸やこれらを有するたんぱく質の分析を目的に開発された方法である。フェノール性水酸基がアルカリ性でリタングステン酸、モリブデン酸を還元して生ずる青色を700~770nmで比色定量する方法である。没食子酸、カテキン等特定の基準物質で同様の操作を行い、その化合物換算で定量値を示すことができ、本発明ではカテキン換算での値を用いる。

[0020] 本発明の一実施形態によれば、アルカリ性水溶液は、アンモニア、アンモニア水、アルカリ金属水酸化物、アルカリ金属酸化物、アルカリ土類金属酸化物、アルカリ金属炭酸塩、アルカリ土類金属炭酸塩、水酸化四級アンモニウム等から選択される少なくとも1つを含むアルカリ性水溶液が挙げられるが、好ましくは水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウムから選択される少なくとも一つの水酸化物を含む水性媒体であり、より好ましくは水酸化ナトリウム水溶液または水酸化カリウム水溶液である。

[0021] アルカリ性水溶液のアルカリ濃度は、特に限定されないが、0.05重量%以上10重量%以下、好ましくは、0.05重量%以上5重量%以下、0.1重量%以上5重量%以下、さらに好ましくは、0.1重量%以上3重量%以下、0.1重量%以上2重量%以下である。

[0022] また、アルカリ性水溶液のpHの下限値は、アルカリ性である限り特に限定されないが、pH7以上、好ましくはpH8以上、より好ましくはpH9

以上、さらに好ましくはpH10以上である。pHの上限値は、pH14未満であれば、特に限定はされないが、アルカリの使用量を少なくする観点で、pH12以下で設定することができる。また、好ましいpHの範囲は、例えば、7以上13.5以下、8以上13.5以下、より好ましいpHの範囲は9以上13.5以下、さらに好ましいpHの範囲は10以上12以下の範囲である。

[0023] 本発明の一実施形態によれば、アルカリ性水溶液と草本系バイオマスを接触させる際の温度は60℃以上である。また、アルカリ処理物を100℃より高く保持するためには、アルカリ処理物に常圧を超える圧力を加える必要があり高圧設備が必要となるため、生産コストの面から好ましくは60～100℃、より好ましくは80～100℃、さらに好ましくは60℃以上100℃未満、80℃以上100℃未満である。

[0024] また、本発明の一実施形態によれば、アルカリ性水溶液と、草本系バイオマス（乾燥重量）との重量割合は、特に限定されないが、好ましい範囲は、例えば、100：1～2：1、90：1～3：1、50：1～5：1、30：1～5：1、25：1～7：1、25：1～7：1、25：1～5：1、20：1～5：1である。

[0025] 草本系バイオマスとアルカリ性水溶液との接触方法は特に限定されないが、例えばアルカリ性水溶液を草本系バイオマスに噴霧したり、浸漬させたり、通液させたりして接触させる方法が挙げられ、その際にアルカリ性水溶液と草本系バイオマスが十分接触するように、攪拌したり、容器を回転させたりしてもよい。

[0026] アルカリ性水溶液と草本系バイオマスの接触時間は、特に限定されないが、好ましくは、20分程度以上72時間程度以下、20分程度以上48時間程度以下、20分程度以上24時間程度以下、30分程度以上48時間程度以下、30分程度以上24時間程度以下、30分程度以上12時間程度以下、30分程度以上6時間程度以下または30分程度以上3時間程度以下ある。

[0027] 草本系バイオマスとアルカリ性水溶液を固液分離することによって抽出液を得ることができる。固液分離装置としては、スクリーンプレス、遠心分離機などが挙げられる。微粒子除去のためにストレイナーなどを使用しても良い。また、アルカリ性水溶液との接触時に草本系バイオマスにアルカリ性水溶液の通液させた場合は、通液後の液を抽出液としてそのまま使用しても良いが、固液分離装置によって草本系バイオマスの反応物を絞ることが抽出液の回収の観点から好ましい

[0028] <工程（２）>

本発明の一実施形態によれば、工程（２）において、工程（１）で得られた抽出液をpH 3.2以上4.5以下に調整し、セロビオハイドラーゼ活性およびキシラナーゼ活性を含む酵素と反応させて酵素反応液を得る。

[0029] 本発明の一実施形態によれば、上記抽出液を得る工程で得られた抽出液に酸性物質を加えてpHを上述のような酸性の範囲に調整する。

[0030] 酸性物質としては、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、乳酸、酢酸、ギ酸、クエン酸などが挙げられるが、これに限定されないが、好ましくは、塩酸、硫酸、硝酸、より好ましくは塩酸である。

[0031] 酸性物質によるpH調整方法は特に限定されないが、pHを確認しながら適当な濃度の酸性物質を適宜添加し、混合する方法が挙げられる。pH調整中にアルカリ抽出液を連続的に投入してpH調整後の液を連続的に抜き出す連続式でも良いし、バッチ式でも良い。

[0032] pH調整時の温度は特に限定されないが、20℃以上100℃以下、好ましくは、20℃以上60℃以下、より好ましくは30℃以上60℃以下である。

[0033] pHの調整範囲としては、通常3.2以上4.5以下、好ましくはpH 3.3以上4.5以下であるが、より好ましくはpH 3.3以上4.0未満、より好ましくはpH 3.5以上4.0以下、より一層好ましくはpH 3.5以上4.0未満の範囲である。

[0034] セロビオハイドラーゼ活性を含む酵素とは、グルコースが β -1, 4結合

したセルロース鎖を末端から分解してセロビオースを産生するエキソ型酵素である。セロビオヒドラーゼの活性は、4-ニトロフェニル- β -D-ラクトピラノシドを分解する酵素活性として測定することができる。1分間に1 μ molの4-ニトロフェノールを生成する酵素量を1 Uと定義する。酵素活性は、後述の参考例2に記載の手順に準じた方法で測定する。本発明では、セロビオヒドラーゼ活性が5 U/g以上である酵素を、セロビオヒドラーゼ活性を含む酵素として定義し、本発明で使用する酵素のセロビオヒドラーゼ活性値は、好ましくは5~1000 U/g、より好ましくは5~500 U/g、さらに好ましくは10~500 U/g、特に好ましくは20~300 U/gである。

[0035] キシラナーゼ活性を含む酵素とは、キシロースが β -1, 4結合したキシランをランダムに分解するエンド型酵素である。キシラナーゼの活性は、試薬として市販されているキシラン（例えば、Birchwood xylan）を基質として、反応後の反応液に含まれる還元糖量を測定することで求めてもよいが、Megazyme社の“キシラナーゼ分析キット（XylX6法）”を用いることが好ましい。“キシラナーゼ分析キット（XylX6法）”では、XylX6試薬が測定対象中のキシラナーゼと補助試薬である β -キシロシダーゼとの組み合わせにより分解されて、4-ニトロフェノールを生成することでキシラナーゼの活性を測定することができる。1分間に1 μ molの4-ニトロフェノールを生成する酵素量を1 Uと定義する。酵素活性は、後述の参考例3に記載の手順に準じた方法で測定する。本発明では、キシラナーゼ活性が400 U/g以上である酵素を、キシラナーゼ活性を含む酵素として定義し、本発明の一実施形態によれば、キシラナーゼ活性値は、好ましくは400~50000 U/g、より好ましくは500~50000 U/g、さらに好ましくは1000~50000 U/g、特に好ましくは3000~45000 U/gである。

[0036] 本発明の一実施形態によれば、上記酵素は、微生物により産生され、例えば単一の微生物が産生するものであっても、複数の微生物が産生するもので

あっても良い。セロビオハイドラーゼおよびキシラナーゼを産生する微生物としては、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、セルロモナス属 (*Cellulomonas*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)、フミコラ属 (*Humicola*)、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、イルペックス属 (*Irpex*)、ムコール属 (*Mucor*)、タラロマイセス属 (*Talaromyces*)、などの微生物を挙げることができるが、トリコデルマ属であることが好ましい。

[0037] トリコデルマ属微生物は特に限定されないが、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) が好ましく、具体的にはトリコデルマ・リーセイQM9414 (*Trichoderma reesei* QM9414)、トリコデルマ・リーセイQM9123 (*Trichoderma reesei* QM9123)、トリコデルマ・リーセイRutC-30 (*Trichoderma reesei* Rut C-30)、トリコデルマ・リーセイPC3-7 (*Trichoderma reesei* PC3-7)、トリコデルマ・リーセイCL-847 (*Trichoderma reesei* CL-847)、トリコデルマ・リーセイMCG77 (*Trichoderma reesei* MCG77)、トリコデルマ・リーセイMCG80 (*Trichoderma reesei* MCG80)、トリコデルマ・ビリデQM9123 (*Trichoderma viride* 9123) を例示することができる。また、上述のトリコデルマ属に由来する微生物であって、これらを変異剤あるいは紫外線照射などで変異処理を施し、セルラーゼ生産性が向上した変異株であってもよい。

[0038] 本発明の一実施形態によれば、上記酵素は、上記活性を満たしていれば、精製されたものを添加しても良く、培養液を粗酵素として加えても良く、市販のセルラーゼ剤やキシラナーゼ剤を使用しても良く、セロビオハイドラーゼおよびキシラナーゼ以外の酵素を含んでも良い。例えば、 β -グルコシダ

ーゼ、 β -キシロシダーゼ、エンドグルカナーゼ、マンナーゼなどを含んでも良い。

[0039] 市販のセルラーゼ剤、キシラナーゼ剤としては、例えばノボザイム社の“セリック・シーテック”（登録商標）、“セリック・シーテック2”（登録商標）や、ダニスコ・ジャパン社の“アクセルレース”（登録商標）1000、“アクセルレース”（登録商標）1500、“アクセルレース”（登録商標）デュエットや、シグマ・アルドリッチ社の“セルラーゼ from *Trichoderma reesei* ATCC 26921”、“セルラーゼ from *Trichoderma viride*”、および“Cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*”、エイチビィアイ社の“セルロシンTP25”、“セルロシンHC100”が挙げられるが、これに限定されない。

[0040] 上記酵素の添加量については、添加する酵素によって適宜変更しても良く、特に限定されないが、粗酵素や酵素剤として、pHを調整した抽出液100重量部に対して0.001重量部から50重量部、好ましくは0.005重量部から20重量部、さらに好ましくは0.005重量部から5重量部である。

[0041] 上記抽出液を上記所定範囲のpHに調整し、上記酵素と反応させ酵素反応液を得るとは、上記抽出液が所定範囲のpHに調整された状態で上記酵素が液中に存在する酵素反応液とすることであり、pH調整中に上記酵素を添加しても良いが、所定範囲のpHに調整後に添加することが好ましい。上記酵素の添加は連続式でも良いし、バッチ式でも良い。

[0042] 本発明の一実施形態によれば、上記酵素を反応させる時間とは、上記所定範囲のpHの状態上記酵素が存在し、固液分離処理を行って清澄液を得るまでの時間のことであり、連続式で行う場合は、上記所定範囲のpHで上記酵素が存在し、固液分離処理を行って清澄液を得るまでの滞留時間のことであり、上述の所定範囲のpHで上記酵素を反応させる時間は特に限定されないが、好ましくは5分以上8時間以下、より好ましくは5分以上6時間以下

、さらに好ましくは5分以上4時間以下、よりさらに好ましくは10分以上4時間以下、特に好ましくは10分以上2時間以下である。

[0043] 上記酵素を反応させる温度は、使用する酵素に応じて適宜変更して良く、特に限定されないが、好ましくは15～100℃、より好ましくは30～60℃、さらに好ましくは35～55℃である。

[0044] <工程(3)>

本発明の一実施形態によれば、工程(3)において、工程(2)で得られた酵素反応液を固液分離してポリフェノール含有組成物を含む清澄液を得る。

[0045] 上述の酵素反応液の固液分離処理では、固液分離処理の方法は特に限定されず、濾過、遠心分離、沈降分離といった方法を用いることができ、その組み合わせであっても良い。固液分離装置としては、沈降分離装置、デカンター型遠心沈降機、分離板型遠心沈降機、スクリーンプレス、フィルタープレス、ベルトプレス、ベルトスクリーンなどを使用することができ、その組み合わせであっても良い。好ましくは、フィルタープレス、デカンター型遠心沈降機、分離板型遠心沈降機である。

[0046] 固液分離方法によっては、濾過助剤を使用しても良い。濾過助剤としては、珪藻土、パーライト、セルロース、活性炭などが挙げられ、これに限定されないが、珪藻土であることが好ましい。濾過助剤は、抽出液を得る工程から酵素反応液の固液分離処理を行い清澄液を得るまでに添加されれば良く、添加のタイミングは特に限定されない。濾過助剤の量は、特に限定されないが、酵素反応液100重量部に対して0.05重量部から10重量部、好ましくは0.1重量部から5重量部である。

[0047] <工程(4)>

また、本発明の一実施形態によれば、上記工程(3)で得られた清澄液を、精密濾過膜、限外濾過膜、ナノ濾過膜および逆浸透膜からなる群から選択される1種以上の分離膜に通じて濾過し、ポリフェノール含有組成物を含む透過液および／または非透過液を得る。

- [0048] また、本発明の好ましい実施形態によれば、工程（４）にて上記清澄液を精密濾過膜に通じて濾過して得た透過液を、限外濾過膜、ナノ濾過膜および逆浸透膜からなる群から選択される１種以上の分離膜に通じて濾過し、ポリフェノール含有組成物を含む非透過液を回収する。
- [0049] また、本発明のより好ましい実施形態によれば、工程（４）にて上記清澄液または精密濾過膜に通じて濾過して得た透過液を、ナノ濾過膜に通じて濾過し、ポリフェノール含有組成物を含む透過液を得る。
- [0050] 以下、清澄液を精密濾過膜、限外濾過膜およびナノ濾過膜からなる群から選択される１種以上の分離膜に通じて濾過してポリフェノール含有組成物を回収する工程について説明する。
- [0051] 精密濾過膜とは、平均細孔径が $0.01\ \mu\text{m}$ ～ $5\ \text{mm}$ である膜のことであり、マイクロフィルトレーションやMF膜などと略称されるものである。膜表面に固形分を濃縮し膜内部の目詰まりを防ぐためには、平均細孔径が $0.45\ \mu\text{m}$ 以下であることが好ましく、より好ましくは $0.22\ \mu\text{m}$ 以下である。
- [0052] 上記精密濾過膜の材質としては、特に限定されないが、例えば、セルロース類、芳香族ポリアミド、ポリビニルアルコール、ポリスルホン、ポリフッ化ビニルデン、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、セラミックス、金属などを用いることができる。
- [0053] 上記精密濾過膜の形態としては、中空糸型、チューブラー型、平膜型、スパイラル型などが挙げられるがこれらに限定されない。また、濾過方式としては、全量濾過でも良く、クロスフロー濾過でも良く、定圧濾過でも定流量濾過でも良い。精密濾過膜の目詰まりが起こった場合は、膜の透過側から非透過側に洗浄液を通液する逆洗浄や、気体を膜の非透過側に供給して膜面に形成されたケーキを剥離させる空気洗浄を行っても良い。逆洗浄の洗浄液としては、精密濾過膜の濾液、水、薬液が挙げられる。
- [0054] 限外濾過膜とは、分画分子量が $1,000$ より大きく $200,000$ 以下

となる膜のことであり、ウルトラフィルトレーション、UF膜などと略称されるものである。ここで、限外濾過膜は、孔径が小さすぎて膜表面の細孔径を電子顕微鏡等で計測することが困難であり、平均細孔径の代わりに分画分子量という値を孔径の大きさの指標とすることになっている。分画分子量とは、日本膜学会編 膜学実験シリーズ 第111巻 人工膜編 編集委員/木村尚史・中尾真一・大矢晴彦・仲川勤（1993 共立出版）P92に、『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。』とあるように、限外濾過膜の膜性能を表す指標として当業者には周知のものである。

- [0055] 上記限外濾過膜の材質としては、特に限定されないが、例えば、セルロース類、芳香族ポリアミド、ポリビニルアルコール、ポリスルホン、ポリフッ化ビニルデン、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、セラミックス、金属などを用いることができる。
- [0056] 上記限外濾過膜の材質としては、特に限定されないが、例えば、セルロース類、芳香族ポリアミド、ポリビニルアルコール、ポリスルホン、ポリフッ化ビニルデン、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、セラミックス、金属などを用いることができる。
- [0057] 上記限外濾過膜の形態としては、中空糸型、チューブラー型、平膜型、スパイラル型などが挙げられるがこれらに限定されない。また、濾過方式としては、全量濾過でも良く、クロスフロー濾過でも良く、定圧濾過でも定流量濾過でも良い。
- [0058] ナノ濾過膜とは、ナノフィルター（ナノフィルトレーション膜、NF膜）とも呼ばれるものであり、「一価のイオンは透過し、二価のイオンを阻止する膜」と一般に定義される膜である。数ナノメートル程度の微小空隙を有していると考えられる膜で、主として、水中の微小粒子や分子、イオン、塩類

等を阻止するために用いられる。

[0059] 上記ナノ濾過膜の素材には、酢酸セルロース系ポリマー、ポリアミド、ポリエステル、ポリイミド、ビニルポリマーなどの高分子素材を使用することができ、複数の膜素材を含む膜であってもよい

[0060] 上記ナノ濾過膜の形態としては、中空糸型、チューブラー型、平膜型、スパイラル型などが挙げられるがこれらに限定されない。また、濾過方式としては、全量濾過でも良く、クロスフロー濾過でも良く、定圧濾過でも定流量濾過でも良い。

[0061] 上記ナノ濾過膜の分画分子量は、通常100～1000のものを指すが、150～1000が好ましく、300～1000であることがさらに好ましい。分画分子量が300以上1000以下のナノ濾過膜で濾過することで、ポリフェノール成分中の着色物質を非透過側に濃縮し、着色を低減させたポリフェノール成分を透過側に得ることができる。

[0062] 清澄液を、精密濾過膜、限外濾過膜およびナノ濾過膜からなる群から選択される1種以上の分離膜に通じて濾過する場合、分離膜の透過液または非透過液としてポリフェノール含有組成物を回収することができる、分離膜の透過液としてポリフェノール含有組成物を回収することが好ましい。また、清澄液を限外濾過膜またはナノ濾過膜に通じて濾過する前に精密濾過膜で濾過することで限外濾過膜またはナノ濾過膜の目詰まりを防止することができる。また、異なる孔径の限外濾過膜および／またはナノ濾過膜を組み合わせることによって清澄液中に含まれる成分を分画および／または精製しても良い。

[0063] 以下、清澄液を逆浸透膜に通じて濾過してポリフェノール含有組成物を回収する工程について説明する。

[0064] 逆浸透膜とは、RO膜とも呼ばれるものであり、「1価のイオンを含めて脱塩機能を有する膜」と一般に定義される膜である。数オングストロームから数ナノメートル程度の超微小空隙を有していると考えられる膜で、主として海水淡水化や超純水製造などイオン成分除去に用いられる。また分画分子

量としては100未満のものを指す。

[0065] 本発明の一実施形態によれば、逆浸透膜の素材には、酢酸セルロース系ポリマー、ポリアミド、ポリエステル、ポリイミド、ビニルポリマーなどの高分子素材を使用することができ、複数の膜素材を含む膜であってもよい。

[0066] 上記逆浸透膜の形態としては、中空糸型、チューブラー型、平膜型、スパイラル型などが挙げられるがこれらに限定されない。また、濾過方式としては、全量濾過でも良く、クロスフロー濾過でも良く、定圧濾過でも定流量濾過でも良い。

[0067] 上記清澄液は、逆浸透膜で濾過することによってポリフェノール成分を非透過側に濃縮することができる。また、逆浸透膜の種類や運転条件によっては、ポリフェノール成分以外の不純物を透過側に除去し、ポリフェノール成分を濃縮しながら精製することが可能である。すなわち、上記清澄液を逆浸透膜に通じて濾過する場合、ポリフェノール含有組成物は分離膜の非透過液として回収される。

[0068] 上記清澄液を、精密濾過膜、限外濾過膜およびナノ濾過膜からなる群から選択される1種以上の分離膜に通じて濾過し、その透過液を逆浸透膜に通じて濾過して非透過液としてポリフェノール含有組成物を回収してもよい。精密濾過膜および／または限外濾過膜に通じて濾過して得られた透過液を逆浸透膜に通じて濾過することで、逆浸透膜での目詰まりを防止しながら、逆浸透膜の非透過側にポリフェノール成分を濃縮することができるが、少なくとも精密濾過膜で濾過した透過液を逆浸透膜で濾過して逆浸透膜の非透過側にポリフェノール成分を濃縮することが好ましい。また、ナノ濾過膜の透過液を逆浸透膜に通じて濾過することで濾過することで、ポリフェノール成分の分画や精製しても良い。

[0069] <ポリフェノール含有組成物>

本発明の一実施形態によれば、上述のような製造方法により草本系バイオマス由来のポリフェノール含有組成物を得ることができる。

本発明の一実施形態によれば、草本系バイオマス由来のポリフェノール含

有組成物は、ポリフェノール成分として少なくともクマル酸を含み、さらにポリフェノール以外の成分としてキシロースを含むことを特徴とする。これら成分の組成比率は特に限定されないが、クマル酸に対するキシロースの含有率（%（w/w））は、好ましくは1～200%（w/w）、より好ましくは2～100%（w/w）、さらに好ましくは2～50%（w/w）である場合は経時的な着色が進みづらいという効果が得られる。着色の度合いは550nmの吸光度で評価することができ、吸光度が小さいほど着色の度合いは低い。

[0070] ポリフェノール含有組成物の形態は液状であっても粉末状であっても良いが、クマル酸に対するキシロースの含有率が2～50%（w/w）のポリフェノール含有組成物を粉末状とする場合、手で触れたときのべたつきがないという効果が得られる上で好ましい。粉末状にする方法は特に限定されないが、噴霧乾燥法が好ましい。

実施例

[0071] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに実施例に限定されない。なお、特段の記載のない限り、本願明細書に記載の測定方法および単位は日本工業規格（JIS）の規定に従う。

[0072] （参考例1）タンパク質濃度の測定

水溶液中のタンパク質の濃度は、ブラッドフォード法による測定キット（Quick Start Bradford Protein Assay、Bio-Rad社製）を使用して測定した。

[0073] （参考例2）セロピオハイドラーゼ活性の測定

50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）に、1mMとなるように4-トロフェニル-β-D-ラクトピラノシド（Sigma-Aldrich社製）を溶解したものを基質溶液とした。90μLの基質溶液に適宜希釈した酵素液10μLを添加して、30℃で静置反応させた。60分後に炭酸ナトリウム溶液10μLを添加し、反応停止および遊離した4-ニトロフェノールを発色させ、405nmで吸光度を測定した。ブランクは、炭酸ナトリ

ウム溶液添加後に酵素液を添加する以外は同様の方法で反応させたものを用いた。酵素1単位(1U)は、上記反応条件下において1分間に1 μmol の4-ニトロフェノールを生成する量と定義し、タンパク質量1gあたりの活性は以下の式で算出する。

[0074] 酵素液あたりのセロビオヒドラーゼの活性 $[\text{U}/\text{mL}] = (4\text{-ニトロフェノール} [\mu\text{mol}/\text{mL}] \times \text{反応液量} [\mu\text{L}]) / (\text{反応時間} [\text{min}] \times \text{酵素液量} [\mu\text{L}]) \times \text{希釈倍率} (\text{倍})$

[0075] 酵素のタンパク質量1gあたりのセロビオヒドラーゼ活性 $[\text{U}/\text{g}] = (\text{酵素液あたりの活性} [\text{U}/\text{mL}] / \text{酵素液のタンパク濃度} [\text{g}/\text{L}]) \times 1000$

[0076] (参考例3) キシラナーゼ活性の測定

MegaZyme社“キシラナーゼ分析キット(Xy1X6法)”を使用して測定した。1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)2.5 μL 、キットに従って調製したXy1X6反応溶液25 μL 、ミリQ水12.5 μL を混合し、適宜希釈した酵素液10 μL を添加して、30 $^{\circ}\text{C}$ で静置反応させた。10分後に炭酸ナトリウム溶液100 μL を添加し、反応停止および遊離した4-ニトロフェノールを発色させ、405nmで吸光度を測定した。ブランクは、炭酸ナトリウム溶液添加後に酵素液を添加する以外は同様の方法で反応させたものを用いた。酵素1単位(1U)は、上記反応条件下において1分間に1 μmol の4-ニトロフェノールを生成する量と定義し、タンパク質量1gあたりの活性は以下の式で算出する。

[0077] 酵素液あたりのキシラナーゼの活性 $[\text{U}/\text{mL}] = (4\text{-ニトロフェノール} [\mu\text{mol}/\text{mL}] \times \text{反応液量} [\mu\text{L}]) / (\text{反応時間} [\text{min}] \times \text{酵素液量} [\mu\text{L}]) \times \text{希釈倍率} (\text{倍})$

酵素のタンパク質量1gあたりのキシラナーゼ活性 $[\text{U}/\text{g}] = (\text{酵素液あたりの活性} [\text{U}/\text{mL}] / \text{酵素液のタンパク濃度} [\text{g}/\text{L}]) \times 1000$

[0078] (参考例4) 芳香族化合物の測定

クマル酸、フェルラ酸等の芳香族化合物濃度の測定は以下の条件で実施し

た。

機器：日立高速液体クロマトグラムLaChrom Elite

カラム：Synergi 2.5 μ Hydro-RP100A 100 \times
3.00mm (Phenomenex)

移動相：0.1%リン酸：アセトニトリル＝93：7から5：95までグラ
ジェント

検出器：Diode Array

流速：0.6mL/min

温度：40 $^{\circ}$ C

[0079] (参考例5) 糖濃度の測定

キシロース濃度は、下記に示すHPLC条件で、標品との比較により定量
した。

カラム：AQUITY UPLC BEH Amide (Waters製)

移動相A：80%アセトニトリル+0.1%TFA

移動相B：30%アセトニトリル+0.1%TFA

流速：0.12mL/min

[0080] 10分間で移動相Bの割合が0から40%に達するように徐々に上昇させ、
10.01分で再び移動相Aのみとし、20分まで分析を行った。

検出方法：ELSD (蒸発光散乱検出器)

温度：55 $^{\circ}$ C

[0081] (参考例6) バガスのアルカリ抽出液の調製

サトウキビの絞り粕であるバガスを0.45 (wt/wt) %水酸化ナト
リウム水溶液に乾燥重量で5wt%添加・混合し、90 $^{\circ}$ C、3時間反応させ
、固形分と液分を分離して、液分として、アルカリ抽出液を得た。

[0082] (参考例7) 濁度の測定

糖化液を遠心分離した上清の濁度はHACH社製室内用高度濁度計 (21
00N) を用いて測定した。

[0083] (比較例1~4、実施例1および2) 沈降による固液分離性

参考例6に従って調製したバガスのアルカリ抽出液を35% (w/w) 塩酸を用いて、pH3.5に調整した。そこに、酵素1 (セロビオヒドラーゼ活性あり、キシラナーゼ活性なし) : “Pectinase from *Aspergillus aculeatus*” (液状、Sigma-Aldrich社製)、酵素2 (セロビオヒドラーゼ活性なし、キシラナーゼ活性なし) : “Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*” (液状、Sigma-Aldrich社製)、酵素3 (セロビオヒドラーゼ活性あり、キシラナーゼ活性なし) : “セルロシンGM5” (粉末状、エイチビィアイ社製)、酵素4 (セロビオヒドラーゼ活性あり、キシラナーゼ活性あり) : “セルロシンTP25” (粉末状、エイチビィアイ社製)、酵素5 (セロビオヒドラーゼ活性あり、キシラナーゼ活性あり) : “アクセルレースデュエット” (液状、ダニスコ・ジャパン製)、をそれぞれ添加した。添加量はpH3.5に調整した抽出液30gに対して酵素は0.03gを添加した。

[0084] 添加後は、攪拌しながら50℃で1時間反応させた。その後、15分静置し、沈降後の上清を分取し、参考例7に従って濁度を測定した。また、酵素添加なしでも同様の操作を行い、濁質が沈殿しなかった場合は、15mLを分取し濁度を測定した。

それぞれの酵素のセロビオヒドラーゼ活性およびキシラナーゼ活性は、参考例2, 3に従って測定した。

[0085] 結果を表1に示す。比較例1~4では、pH調整によって生じた濁質が沈降せず、白濁したミセル化様の状態となり、濁度が1000以上となり計測ができなかった。一方で、実施例1, 2では上清の濁度は比較例1~4に比べて顕著に低く、静置での沈降による固液分離性が向上した。

[0086]

[表1]

	添加酵素	由来	セロビオ ハイドラーゼ 活性 (U/g)	キシラナーゼ 活性 (U/g)	上清濁度 (NTU)
比較例1	なし				>1000
比較例2	酵素1	アスペルギルス属	160	320	>1000
比較例3	酵素2	アスペルギルス属	検出限界以下	検出限界以下	>1000
比較例4	酵素3	アスペルギルス属	30	140	>1000
実施例1	酵素4	トリコデルマ属	50	40000	210
実施例2	酵素5	トリコデルマ属	94	10000	240

[0087] (比較例5および6、実施例3～6) pHの違いによる固液分離性
バガスのアルカリ抽出液をpH3.0、3.3、3.8、4.0、4.5、5.0としたこと以外は実施例1と同様にして酵素を添加して、15分静置し、沈降後の上清を分取し、参考例7に従って濁度を測定した。

[0088] 結果を表2に示す。表2に示したように、pH3.3から4.5にて上清の濁度が低くなり、静置での沈降による固液分離性が向上した。

[0089] [表2]

	pH	上清濁度
比較例5	3.0	580
実施例3	3.3	310
実施例2	3.5	240
実施例4	3.8	235
実施例5	4.0	245
実施例6	4.5	350
比較例6	5.0	620

[0090] (比較例7、実施例7および8) フィルタープレスによる固液分離

参考例6に従って調製したバガスのアルカリ抽出液に珪藻土を、アルカリ抽出液100重量部に対して1重量部加え、35% (w/w) 塩酸を用いて、pH3.5とpH4.5にそれぞれ調整した。pH調整後の抽出液3Lに対して酵素5 (セロビオハイドラーゼ活性あり、キシラナーゼ活性あり) :

“アクセルレースデュエット”（液状、ダニスコ・ジャパン製）を3 mL添加し、50℃で30分攪拌しながら反応させた。反応後、フィルタープレスによる固液分離を行った。フィルタープレスは荻田産業株式会社製の小型濾過装置MO-4を使用した。また、pH 3.5に調整したアルカリ処理液に酵素を添加しない以外は同様の方法で酵素添加なしの条件でもフィルタープレスによる固液分離を行った。5分間処理を行った結果を表3に示した。

[0091] 表3に示したように、実施例7、8では、比較例7に比べて5分後の濾液量が多く、フィルタープレスによる固液分離性が向上した。また、実施例8よりも実施例7でより濾液量が多く、フィルタープレスでの固液分離性が向上した。

[0092] [表3]

	pH	添加酵素	5分後の濾液量(L)
比較例7	3.5	なし	0.5
実施例7	3.5	あり	2.8
実施例8	4.5	あり	1.5

[0093] （比較例8～10、実施例9）精密濾過膜による濾過処理

参考例6に従って調製したバガスのアルカリ抽出液を35%（w/w）塩酸を用いて、pH 3.5とpH 5.0にそれぞれ調整した。pH調整後の抽出液30 mLに対して酵素5（セロピオハイドラーゼ活性あり、キシラーゼ活性あり）：“アクセルレースデュエット”（液状、ダニスコ・ジャパン製）を30 μL添加し、50℃で30分攪拌しながら反応させた。

[0094] 反応後、1500Gで10分間遠心分離し、その上清2 mLをUltrafree-CL（MILLIPORE社製）を用いて500Gにて1分間遠心分離処理することで精密濾過し、透過液量を測定した。酵素を添加しない以外は同様の方法で酵素添加なしの条件でも精密濾過を行った。結果を表4に示した。

[0095] 表4に示したように、pH 3.5に調整した抽出液に酵素を添加した実施例9では、精密濾過膜での濾過性が酵素を添加しない場合に比べて顕著に向

上した。一方で、pH 5.0で酵素を添加した場合は、精密濾過膜での濾過性はほとんど変化がなかった。

[0096] [表4]

	pH	酵素添加	精密濾過の濾液量 (mL)
実施例9	3.5	あり	1.5
比較例8	5	あり	0.5
比較例9	3.5	なし	0.3
比較例10	5	なし	0.2

[0097] (比較例11～15、実施例10～14) 限外濾過膜、ナノ濾過膜、逆浸透膜での全循環濾過処理

参考例6に従って調製したバガスのアルカリ抽出液を35% (w/w) 塩酸を用いて、pH 3.5に調整した。pH調整後の抽出液10Lに対して酵素5 (セロビオハイドラーゼ活性あり、キシラーゼ活性あり) : “アクセルレースデュエット” (液状、ダニスコ・ジャパン製) を10mL添加し、50℃で30分攪拌しながら反応させた。反応後、静置し上清を得た。上清は精密濾過膜である“SPV0.2” (Synder社製、孔径0.2μm) を用いて膜面線速度20cm/secにて濾過した。

[0098] 精密濾過膜の透過液は、それぞれ、限外濾過膜：“SPE50” (Synder社製、分画分子量50,000Da)、ナノ濾過膜1：“SPE1” (Synder社製、分画分子量1,000Da)、ナノ濾過膜2：“NFG” (Synder社製、分画分子量600～800Da)、ナノ濾過膜3：“NFW” (Synder社製、分画分子量300～500Da)、逆浸透膜：“BW60-1812-75” (Filmtec社製モジュールより取得、塩阻止率99%) で濾過処理を行った。すべての種類の分離膜にて膜面線速度20cm/sec、濾過束度0.5m/Dにて濾液を供給槽に返送する全循環濾過を行い、濾過開始時の操作圧力と濾過開始後30分後の操作圧力を測定した。

[0099] また、酵素を添加しない以外は同様の方法で酵素添加なしの条件でも、精密濾過膜で濾過し、同様の種類の膜で精密濾過膜の透過液を濾過した。

[0100] それぞれの結果を表5に示した。表5に示したように、酵素を添加したものでは、酵素添加しないものに比較して濾過開始時の操作圧力、30分後の操作圧力ともに、低い値であり、限外濾過膜、ナノ濾過膜、逆浸透膜での濾過において酵素の添加によって濾過性が向上した。また、表には示していないが精密濾過膜においても、酵素添加したものでは、酵素添加しないものの10倍程度の濾過速度であった。

[0101] [表5]

	酵素添加	膜種	分画分子量 (Da)	開始時操作圧 (Mpa)	30分後操作圧 (Mpa)
実施例10	あり	限外濾過膜	50000	0.15	0.16
実施例11		ナノ濾過膜1	1000	0.5	0.6
実施例12		ナノ濾過膜2	600-800	1	1.1
実施例13		ナノ濾過膜3	300-500	1.5	1.6
実施例14		逆浸透膜		2	2.2
比較例11	なし	限外濾過膜	50000	0.3	0.5
比較例12		ナノ濾過膜1	1000	2	3
比較例13		ナノ濾過膜2	600-800	4	6
比較例14		ナノ濾過膜3	300-500	6	不能
比較例15		逆浸透膜		不能	不能

[0102] (比較例16~19、実施例15~18) 精密濾過膜、ナノ濾過膜、逆浸透膜による濾過処理

参考例6に従って調製したバガスのアルカリ抽出液を35% (w/w) 塩酸を用いて、pH3.5とpH5.0にそれぞれ調整した。pH調整後の抽出液10Lに対して酵素5 (セロピオヒドラーゼ活性あり、キシラナーゼ活性あり) : “アクセルレースデュエット” (液状、ダニスコ・ジャパン製) を10mL添加し、50℃で30分攪拌しながら反応させた。反応後、静置し上清を得た。上清は精密濾過膜である“SPV0.2” (Synder社製、孔径0.2μm) を用いて膜面線速度20cm/secにて濾過した。

- [0103] 精密濾過膜の透過液は、それぞれ、ナノ濾過膜 2：“NFG”（Syndeer社製、分画分子量600～800Da）、ナノ濾過膜 3：“NFW”（Syndeer社製、分画分子量300～500Da）、逆浸透膜：“BW60-1812-75”（Filmtec社製モジュールより取得、塩阻止率99%）で濾過処理を行った。すべての種類の分離膜で、膜面線速度20cm/sec、濾過束度0.2m/Dにて定流量濾過を行い、操作圧力は6MPaを上限として、6MPaに達した場合は6MPaでの定圧濾過に切り替え、濃縮した。また、酵素を添加しない以外は同様の方法で酵素添加なしの条件でも、精密濾過膜で濾過し、同様の種類の膜で精密濾過膜の透過液を濾過した。
- [0104] 精密濾過膜の透過液、ナノ濾過膜 2, 3の透過液、逆浸透膜の非透過液は目視での着色の有無の評価と、それを数値化するため、分光光度計による測定を行った。測定は、調製直後と調製から冷蔵保管7日後に行った。当該液の吸光度の測定は分光光度計UV-1280（島津製作所製）を用いて、本色度測定差異に特徴的なピークであった550nmの波長を指標とする吸光度測定を行った。
- [0105] また、精密濾過膜の透過液、ナノ濾過膜 2, 3の透過液、逆浸透膜の非透過液は噴霧乾燥法に供して粉体化した。得られた粉体についてべたつき度合いを評価するため、粉体を1時間室内で実験机上に放置したのち、指で粉を押して手に付着するかどうかを指標として粉体のべたつきの評価を行った。
- [0106] さらに、精密濾過膜の透過液、ナノ濾過膜 2, 3の透過液、逆浸透膜の非透過液は参考例4、参考例5の方法でクマル酸とキシロースの濃度を測定し、クマル酸に対するキシロース含有率（%（w/w））を以下の式に従って測定した。
- [0107] $\text{クマル酸に対するキシロース含有率（\%）} = \text{キシロース濃度（w/v）} / \text{クマル酸濃度（w/v）} \times 100$
- [0108] 結果を表6に示した。表6のように、分画分子量が1000よりも小さいナノ濾過膜で濾過することによってナノ濾過膜の透過液は目視して着色が確

認できず、分光光度計による吸収量も大きくなり、脱色することができた。
また、酵素添加したものでは、酵素を添加しないものに比べて調製後からの分光光度計による吸収量の変化が小さかった。

また、乾燥した粉体については、酵素添加して得られたものでは接触時のべたつきがなかった。

[表6]

	酵素添加	濾過1	濾過2	クマル酸に対する キシロース含有率 (w/w%)	目視での着色 の有無	吸光度(Abs)		乾燥粉体 のべたつき
						調製後	7日後	
実施例15	あり	精密濾過膜	なし	50	あり	0.100	0.108	なし
実施例16		精密濾過膜	ナノ濾過膜2	15	なし	0.000	0.003	なし
実施例17		精密濾過膜	ナノ濾過膜3	2	なし	0.000	0.002	なし
実施例18		精密濾過膜	逆浸透膜	45	あり	0.000	0.001	なし
比較例16	なし	精密濾過膜	なし	0	あり	0.100	0.130	あり
比較例17		精密濾過膜	ナノ濾過膜2	0	なし	0.001	0.010	あり
比較例18		精密濾過膜	ナノ濾過膜3	0	なし	0.000	0.008	あり
比較例19		精密濾過膜	逆浸透膜	0	あり	0.000	0.004	あり

請求の範囲

- [請求項1] 草本系バイオマス由来のポリフェノール含有組成物の製造方法であって、
- (1) 草本系バイオマスをアルカリ性水溶液に接触させて抽出液を得る工程、
 - (2) 工程(1)で得られた抽出液をpH3.2以上4.5以下に調整し、セロビオハイドラーゼ活性およびキシラナーゼ活性を含む酵素と反応させ酵素反応液を得る工程、
 - (3) 工程(2)で得られた酵素反応液を固液分離してポリフェノール含有組成物を含む清澄液を得る工程、
- を含むポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項2] 前記工程(1)で得られた抽出液をpH3.5以上4.0未満に調整する、請求項1に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項3] 工程(1)で使用されるアルカリ性水溶液が、60℃以上である、請求項1または2に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項4] さらに前記工程(3)で得られた清澄液を、精密濾過膜、限外濾過膜、ナノ濾過膜および逆浸透膜からなる群から選択される1種以上の分離膜に通じて濾過し、ポリフェノール含有組成物を含む透過液および/または非透過液を得る工程(4)を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項5] 前記分離膜が精密濾過膜であり、ポリフェノール含有組成物を含む透過液を得る、請求項4に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項6] 前記工程(4)にて前記清澄液を精密濾過膜に通じて濾過して得た透過液を、限外濾過膜、ナノ濾過膜および逆浸透膜からなる群から選択される1種以上の分離膜に通じて濾過し、ポリフェノール含有組成物を含む非透過液を回収する、請求項4または5に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。

- [請求項7] 前記工程（４）にて前記清澄液または精密濾過膜に通じて濾過して得た透過液を、ナノ濾過膜に通じて濾過し、ポリフェノール含有組成物を含む透過液を得る、請求項４～６のいずれか一項に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項8] 前記ナノ濾過膜の分画分子量が３００～１０００である、請求項７に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項9] 前記工程（２）での前記酵素の反応時間が１０分～２時間である、請求項１～８のいずれか一項に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項10] 前記草本系バイオマスがバガスである、請求項１～９のいずれか一項に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項11] 前記酵素がトリコデルマ属微生物由来である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のポリフェノール含有組成物の製造方法。
- [請求項12] クマル酸およびキシロースを含み、クマル酸に対するキシロースの含有率が１～２００％（w/w）である、ポリフェノール含有組成物。
- [請求項13] 前記クマル酸に対するキシロースの含有率が２～５０％（w/w）である、請求項１２に記載のポリフェノール含有組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/015547

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12P 7/22</i> (2006.01)i; <i>C07G 1/00</i> (2011.01)i FI: C12P7/22; C07G1/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P7/22; C07G1/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/154955 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 14 September 2017 (2017-09-14) paragraph [0016]	12-13
A	JP 2013-220067 A (NATIONAL AGRICULTURE & FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 28 October 2013 (2013-10-28) entire text	1-11
A	ZHAO, Rui et al. Integration of a phenolic-acid recovery step in the CaCCO process for efficient fermentable-sugar recovery from rice straw. Bioresource Technology. 2013, 148, pp. 422-427 entire text	1-11
A	JP 2016-520093 A (RHODIA OPERATIONS) 11 July 2016 (2016-07-11) entire text	1-11
A	WO 2006/013530 A1 (THE UNIVERSITY OF STELLENBOSCH) 09 February 2006 (2006-02-09) entire text	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 June 2022		Date of mailing of the international search report 14 June 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/015547

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2017-530701 A (XYLECO, INC.) 19 October 2017 (2017-10-19) paragraphs [0102], [0175]	1-11
A	SELIG, Michael J. et al. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. Bioresource Technology. 2008, 99, pp. 4997-5005 entire text	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/015547

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2017/154955	A1	14 September 2017	US 2019/0100776 A1 paragraph [0014]	
				EP 3428270 A1	
				CA 3017099 A1	
				CN 108713058 A	
JP	2013-220067	A	28 October 2013	(Family: none)	
JP	2016-520093	A	11 July 2016	US 2016/0145183 A1 entire text	
				WO 2014/187784 A1	
				FR 3005952 A1	
				CN 105246868 A	
WO	2006/013530	A1	09 February 2006	US 2009/0004331 A1 entire text	
JP	2017-530701	A	19 October 2017	US 2016/0081381 A1 paragraphs [0078], [0135]	
				WO 2016/043956 A1	
				KR 10-2017-0055997 A	
				CN 107074898 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 7/22(2006.01)i; C07G 1/00(2011.01)i FI: C12P7/22; C07G1/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12P7/22; C07G1/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2017/154955 A1 (東レ株式会社) 14.09.2017 (2017-09-14) [0016]	12-13
A	JP 2013-220067 A (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) 28.10.2013 (2013-10-28) 全文	1-11
A	ZHAO, Rui et al., Integration of a phenolic-acid recovery step in the CaCCO process for efficient fermentable-sugar recovery from rice straw, Bioresource Technology, 2013, 148, p. 422-427 全文	1-11
A	JP 2016-520093 A (ローディア オペレーションズ) 11.07.2016 (2016-07-11) 全文	1-11
A	WO 2006/013530 A1 (THE UNIVERSITY OF STELLENBOSCH) 09.02.2006 (2006-02-09) 全文	1-11
A	JP 2017-530701 A (ザイレコ, インコーポレイテッド) 19.10.2017 (2017-10-19) [0102], [0175]	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引 用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性 又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献 との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな いと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 01.06.2022	国際調査報告の発送日 14.06.2022	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 山内 達人 4N 3348 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/015547

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2017/154955	A1	14.09.2017	US	2019/0100776	A1	
					[0014]		
				EP	3428270	A1	
				CA	3017099	A1	
				CN	108713058	A	
JP	2013-220067	A	28.10.2013	(ファミリーなし)			
JP	2016-520093	A	11.07.2016	US	2016/0145183	A1	
				全文			
				WO	2014/187784	A1	
				FR	3005952	A1	
				CN	105246868	A	
WO	2006/013530	A1	09.02.2006	US	2009/0004331	A1	
				全文			
JP	2017-530701	A	19.10.2017	US	2016/0081381	A1	
					[0078] , [0135]		
				WO	2016/043956	A1	
				KR	10-2017-0055997	A	
				CN	107074898	A	