(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2013-162777
(P2013-162777A)
(43)公開日　平成25年8月22日(2013.8.22)

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
C13K	1/02	(2006.01)	C13K	1/02	4B064
C12P	7/06	(2006.01)	C12P	7/06	

審査請求 未請求　請求項の数 6　ＯＬ　（全 22 頁）

(21)出願番号　特願2012-28962(P2012-28962)
(22)出願日　平成24年2月13日(2012.2.13)

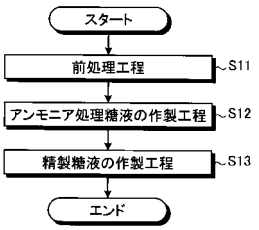
（出願人による申告）国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成２３年度　独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業」に関する委託研究、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願）

(71)出願人　000004444
ＪＸ日鉱日石エネルギー株式会社
東京都千代田区大手町二丁目６番３号
(71)出願人　591108178
秋田県
秋田県秋田市山王４丁目１番１号
(71)出願人　000003159
東レ株式会社
東京都中央区日本橋室町２丁目１番１号
(74)代理人　100089118
弁理士　酒井　宏明
(74)代理人　100113398
弁理士　寺崎　直

最終頁に続く

(54)【発明の名称】糖液の製造方法、糖液及びエタノールの製造方法

(57)【要約】
【課題】アンモニアを含む処理剤で処理したセルロース系バイオマスから製造した糖液の発酵効率を向上させることができる糖液の製造方法、糖液及びエタノールの製造方法を提供する。
【解決手段】本発明の糖液の製造方法は、セルロース系バイオマスをアンモニアを含む処理剤で処理し、アンモニア処理物を得る前処理工程（ステップＳ１１）と、アンモニア処理物を酵素糖化し、アンモニア処理糖液を得るアンモニア処理糖液の作製工程（ステップＳ１２）と、アンモニア処理糖液に含まれるクマルアミドおよび／またはフェルラアミドを精製除去し、クマルアミドおよび／またはフェルラアミドの濃度が１０～１１００ｐｐｍの精製糖液を得る精製糖液の作製工程（ステップＳ１３）と、を含むことを特徴とする。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
セルロース系バイオマスをアンモニアを含む処理剤で処理し、アンモニア処理物を得る前処理工程と、
前記アンモニア処理物を酵素糖化し、アンモニア処理糖液を得るアンモニア処理糖液の作製工程と、
前記アンモニア処理糖液に含まれるクマルアミドおよび／またはフェルラアミドを精製除去し、クマルアミドおよび／またはフェルラアミドの濃度が１０～１１００ｐｐｍの精製糖液を得る精製糖液の作製工程と、
を含むことを特徴とする糖液の製造方法。
【請求項２】
前記セルロース系バイオマスが、草本系バイオマスを含むことを特徴とする請求項１に記載の糖液の製造方法。
【請求項３】
前記アンモニア処理糖液の精製処理にナノ濾過膜を用いることを特徴とする請求項１または２に記載の糖液の製造方法。
【請求項４】
前記アンモニア処理物を酵素糖化する際、前記アンモニア処理物の固形物の濃度が１～１０質量％の範囲内の溶液を用いて前記アンモニア処理物を酵素糖化することを特徴とする請求項１から３の何れか１項に記載の糖液の製造方法。
【請求項５】
請求項１から４の何れか１項に記載の糖液の製造方法を用いて得られることを特徴とする糖液。
【請求項６】
請求項５に記載の糖液を発酵原料として用いてエタノールを製造することを特徴とするエタノールの製造方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、セルロース系バイオマスから糖液を製造する糖液の製造方法、糖液及びエタノールの製造方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
糖を原料とした化学品の発酵生産プロセスは、種々の工業原料生産に利用されている。現在、発酵原料となる糖としては、例えば、さとうきび、澱粉、テンサイなどの食用原料に由来するものが工業的に使用されている。しかしながら、今後は世界人口の増加により食用原料が不足し、価格が高騰することが懸念され、再生可能な非食用資源、すなわちセルロース系バイオマスから効率的に糖液を製造するプロセスの構築が課題となっている。
【０００３】
セルロース系バイオマスは、主に芳香族系重合物のリグニンと、単糖の重合物であるセルロースやヘミセルロースを含む。セルロース系バイオマスを原料とした糖液の製造方法として、例えば、濃硫酸などを用いて直接原料であるセルロース系バイオマスを加水分解する方法や、セルロース系バイオマスに予め蒸煮処理、微粉砕処理、希硫酸処理などの前処理を施してセルロースやヘミセルロースをリグニンから脱離した後、セルラーゼ等の糖化酵素により加水分解を行う前処理－酵素糖化法等がある。
【０００４】
これらの方法により得られるセルロース系バイオマス由来の糖液では、その製造の過程でヒドロキシメチルフルフラール（ＨＭＦ）、フルフラール、バニリンなどの発酵阻害物質が生成し、得られた糖液を発酵してアルコール等を生産する際に糖液の発酵を阻害するという課題があった。また、糖液製造の処理条件によっては得られる糖液の糖濃度が薄い

場合があり、この場合は発酵工程に供する前に数倍～１０倍程度に糖濃度を濃縮する必要があった。そこで、セルロース系バイオマスを原料として糖液を製造する際、糖液に含まれる発酵阻害物質を取り除くと同時に、糖の濃度を高めることができる方法として、ナノろ過膜を用いた糖液の処理方法が開示されている（例えば、特許文献１、２参照）。

【０００５】

また、前処理－酵素糖化法は、一般に、直接原料を加水分解する方法と比べて環境負荷が小さいという利点を有する一方、糖の収率は低い。そこで、環境負荷が小さく、かつ高い糖収率が得られる前処理方法として、アンモニアを含む処理剤を用いた前処理方法が提案されている（例えば、特許文献３参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】国際公開第２００９／１１０３７４号パンフレット

【特許文献２】国際公開第２０１０／０６７７８５号パンフレット

【特許文献３】特開２００８－１６１１２５号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

前述のとおり、一般に、蒸煮処理等の前処理を施したセルロース系バイオマスから得られる糖液では、糖液を製造する過程でヒドロキシメチルフルフラール（ＨＭＦ）、フルフラール、バニリンなどの発酵阻害物質が生成し、得られた糖液を発酵してアルコール等を生産する際に糖液の発酵を阻害する。

【０００８】

一方、特許文献３に記載のアンモニアを含む処理剤による前処理法を用いて、上記前処理－酵素糖化法により得られた糖液は、上記のような既知の発酵阻害物質はほとんど検出されていないにも関わらず、セルロース系バイオマスを用いて得られた糖液と同様、糖液の発酵が阻害されていることが見出された。

【０００９】

すなわち、本発明は、セルロース系バイオマスから得られた糖液を用いてエタノール等の製造効率の向上を図るにあたり、高い糖収率が得られるアンモニアを含む処理剤で前処理したセルロース系バイオマスを用いて得られる糖液を発酵する際の糖液の発酵効率を向上させることができる糖液の製造方法、糖液及びエタノールの製造方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

上述した課題を解決し、目的を達成するために、本発明者らは糖液の製造方法、糖液及びエタノールの製造方法について鋭意研究をした。その結果、アンモニアで前処理したセルロース系バイオマスを酵素で加水分解して得られる加水分解物（アンモニア処理糖液）は特有の発酵阻害物質としてクマルアミドおよびフェルラアミドを含んでいることを発見した。この得られた知見に基づいて、アンモニア処理糖液に含まれるクマルアミドおよび／またはフェルラアミドを精製除去し、クマルアミドおよび／またはフェルラアミドを所定範囲の濃度とすることにより、アンモニア処理糖液の発酵効率を向上させることができることを見出した。本発明は、係る知見に基づいて完成されたものである。

【００１１】

すなわち、本発明は以下の（１）～（６）の構成を有する。

（１）　セルロース系バイオマスをアンモニアを含む処理剤で処理し、アンモニア処理物を得る前処理工程と、

前記アンモニア処理物を酵素糖化し、アンモニア処理糖液を得るアンモニア処理糖液の作製工程と、

前記アンモニア処理糖液に含まれるクマルアミドおよび／またはフェルラアミドを精製

除去し、クマルアミドおよび／またはフェルラアミドの濃度が１０～１１００ｐｐｍの精製糖液を得る精製糖液の作製工程と、
を含むことを特徴とする糖液の製造方法。
（２）　前記セルロース系バイオマスが、草本系バイオマスを含むことを特徴とする上記（１）に記載の糖液の製造方法。
（３）　前記アンモニア処理糖液の精製処理にナノ濾過膜を用いることを特徴とする上記（１）又は（２）に記載の糖液の製造方法。
（４）　前記アンモニア処理物を酵素糖化する際、前記アンモニア処理物の固形物の濃度が１～１０質量％の範囲内の溶液を用いて前記アンモニア処理物を酵素糖化することを特徴とする上記（１）から（３）の何れか１つに記載の糖液の製造方法。
（５）　上記（１）から（４）の何れか１つに記載の糖液の製造方法を用いて得られることを特徴とする糖液。
（６）　上記（５）に記載の糖液を発酵原料として用いてエタノールを製造することを特徴とするエタノールの製造方法。
【発明の効果】
【００１２】
本発明によれば、アンモニアを含む処理剤で前処理したセルロース系バイオマスを用いて得られる糖液を発酵する際の糖液の発酵効率を向上させることができる。
【図面の簡単な説明】
【００１３】
【図１】図１は、本発明の実施形態に係る糖液の製造方法の一例を示すフローチャートである。
【図２】図２は、アンモニア処理糖液中の芳香族化合物をＨＰＬＣにて分析した結果を示す図である。
【図３】図３は、アンモニア処理糖液のピーク１のＵＶ吸収スペクトルを示す図である。
【図４】図４は、アンモニア処理糖液のピーク２のＵＶ吸収スペクトルを示す図である。
【図５】図５は、クマルアミド標品のＵＶ吸収スペクトルを示す図である。
【図６】図６は、フェルラアミド標品のＵＶ吸収スペクトルを示す図である。
【図７】図７は、ＮＦ濃縮液とＲＯ濃縮液との発酵時間とエタノール濃度との関係を示す図である。
【図８】図８は、ＮＦ濃縮液とＲＯ濃縮液との発酵時間とキシロース濃度との関係を示す図である。
【図９】図９は、ＮＦ濃縮液とＲＯ濃縮液との発酵時間とエタノール濃度との関係を示す図である。
【図１０】図１０は、ＮＦ濃縮液とＲＯ濃縮液との発酵時間とキシロース濃度との関係を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
以下、本発明の実施の形態（以下、実施形態という）を図面を参照しつつ詳細に説明する。なお、下記の発明を実施するための実施形態により本発明が限定されるものではない。また、下記実施形態における構成要素には、当業者が容易に想定できるもの、実質的に同一のもの、いわゆる均等の範囲のものが含まれる。さらに、下記実施形態で開示した構成要素は適宜組み合わせてもよいし、適宜選択して用いてもよい。
【００１５】
本発明の実施形態に係る糖液の製造方法について、図面を参照して説明する。図１は、本実施形態に係る糖液の製造方法の一例を示すフローチャートである。図１に示すように、本実施形態に係る糖液の製造方法は、以下の工程を含む。
（Ａ）　セルロース系バイオマスをアンモニアを含む処理剤で処理し、アンモニア処理物を得る前処理工程（ステップＳ１１）
（Ｂ）　アンモニア処理物を酵素糖化し、アンモニア処理糖液を得るアンモニア処理糖

液の作製工程（ステップＳ１２）
（Ｃ） アンモニア処理糖液に含まれるクマルアミドおよび／またはフェルラアミドを精製除去し、クマルアミドおよび／またはフェルラアミドの濃度が１０～１１００ｐｐｍの濃度範囲の精製糖液を得る精製糖液の作製工程（ステップＳ１３）
【００１６】
本明細書において、セルロース系バイオマスとは、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（トウモロコシの茎）、稲わら、麦わらなどの草本系バイオマス、また樹木、廃建材などの木質系バイオマスなどのことである。前記セルロース系バイオマスは、セルロースあるいはヘミセルロースなどの多糖を含有しており、こうした多糖を加水分解することにより糖液を製造することが可能である。
【００１７】
一般に、セルロース系バイオマスの加水分解のことを、糖化と呼ぶ。また、本実施形態ではセルロース系バイオマスを糖化することにより得られた糖液をセルロース由来糖液と呼ぶ。セルロース由来糖液は、グルコース、キシロース、マンノース、アラビノースなどの単糖、セロビオース、セロオリゴ糖、キシロオリゴ糖などの水溶性多糖を含んでおり、こうした糖類は微生物の発酵原料（炭素源）として使用することができ、微生物によりエタノール、乳酸、アミノ酸など様々な化学品に変換することが可能である。
【００１８】
＜前処理工程：ステップＳ１１＞
セルロース系バイオマスをアンモニアを含む処理剤で処理し、アンモニア処理物を得る（前処理工程：ステップＳ１１）。セルロース系バイオマスの前処理方法としては、一般的に、例えば、蒸煮処理、微粉砕処理、爆砕処理、硫酸などの酸性溶液による酸処理、水酸化ナトリウムなどアルカリ溶液によるアルカリ処理、アンモニア（NH_3）による処理、酵素処理、アミノ基（NH_2）を含む化合物による処理などが挙げられる。これらの前処理方法の中でも、本実施形態においては、アンモニアを含む処理剤を用いてセルロース系バイオマスを前処理する。アンモニアは入手及び取り扱いが容易であり、アンモニアを含む処理剤を用いた前処理方法は他の前処理方法に比べてセルロース系バイオマスを効率良く糖化できる。セルロース系バイオマスを糖化する前に予めアンモニアを含む処理剤を用いて前処理することで、セルロース系バイオマスの糖化の効率を向上させることができる。
【００１９】
アンモニアを含む処理剤としては、アンモニア以外に、アミノ基を含む化合物、その他の化合物を複数組み合わせて使用してもよい。アミノ基を含む化合物としては、例えば、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、ブチルアミン、ヒドラジン、エチレンジアミン、プロパンジアミン、ブタンジアミンなどが挙げられる。その他の化合物としては、例えば、二酸化炭素、窒素、エチレン、メタン、エタン、プロパン、エタン、ブタン、ペンタン、ヘキサン、トルエン、ベンゼン、フェノール、ジオキサン、キシレン、アセトン、クロロホルム、四塩化炭素、エタノール、メタノール、プロパノール、ブタノールなどが挙げられる。
【００２０】
本実施形態においては、アンモニアを含む処理剤は、液体、気体、気液混合相のいずれであってもよい。液体、気体、気液混合相のいずれの状態のアンモニアを用いた場合でも酵素糖化効率に優れたセルロース系バイオマスを得ることができる。また、アンモニアを含む処理剤は、超臨界アンモニア流体又は亜臨界アンモニア流体でもよい。超臨界アンモニア流体を用いて処理する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、セルロース系バイオマスとアンモニアとを、オートクレーブ等の反応器内に導入し、反応器内を加熱加圧して、アンモニアを超臨界状態にすることにより行うことができる。超臨界アンモニア流体はセルロース系バイオマス内部への浸透性が高いため、短時間で効率的に酵素糖化に適したセルロース系バイオマスを得ることができる。
【００２１】

本実施形態においては、収穫したセルロース系バイオマスはそのまま使用してもよいが、セルロース系バイオマスを前処理する前に予め裁断、粉砕等して、平均粒子径が所定の大きさ以下のセルロース系バイオマスの粒子としてから前処理してもよい。セルロース系バイオマスの粒子径を予め小さくしておくことで、取り扱いが容易であると共に、アンモニアを含む処理剤による処理の効率の向上を図ることができる。

【００２２】

セルロース系バイオマスの粒子の粒子径としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、５ｍｍ径以下が好ましく、１ｍｍ径以下がより好ましく、０．１ｍｍ径以下が更に好ましい。セルロース系バイオマスの粒子の粒子径が、５ｍｍ径を超えると、セルロース系バイオマスの糖化処理が不十分となることがある。セルロース系バイオマスの粒子の粒子径が上記範囲内の場合には、セルロース系バイオマスの糖化処理に要する時間を短縮できると共に、アンモニアの使用量を少なくできる。

【００２３】

本実施形態においては、収穫したセルロース系バイオマスをそのまま使用してアンモニアを含む処理剤を用いて前処理してもよいが、これに限定されるものではなく、セルロース系バイオマスを前処理する際に用いるアンモニアの回収を図る観点から、セルロース系バイオマスは乾燥してからアンモニアを含む処理剤を添加して前処理するようにしてもよい。

【００２４】

本実施形態においては、セルロース系バイオマスの前処理方法として、アンモニアを含む処理剤で処理する方法を用いているが、上述の他のセルロース系バイオマスの前処理方法を併用してもよい。

【００２５】

＜アンモニア処理糖液の作製工程：ステップＳ１２＞

前処理工程（ステップＳ１１）により得られたアンモニア処理物に酵素を添加して酵素処理により糖化し、アンモニア処理糖液（加水分解物）を得る（アンモニア処理糖液の作製工程：ステップＳ１２）。本実施形態においては、アンモニアを含む処理剤で処理を施したセルロース系バイオマスを糖化することにより得られた糖液を、アンモニア処理糖液という。

【００２６】

セルロース系バイオマスに由来して生じる糖液（セルロース由来糖液）は、前処理や糖化の方法によって量あるいは成分に差があるが、発酵阻害物質を含んでいる。発酵阻害とは、セルロース由来糖液を発酵原料として化学品を製造する際に、試薬単糖を発酵原料として使用する場合と比較して、微生物の増殖速度や、化学品の生産量、蓄積量、あるいは生産速度などが低下する現象のことである。こうした発酵工程で発酵阻害の現象を引き起こし、発酵反応を妨害する原因物質のことを発酵阻害物質という。発酵阻害物質としては、具体的には、例えば、酢酸、蟻酸、レブリン酸、糖の過分解物であるフルフラール、ヒドロキシメチルフルフラール（ＨＭＦ）、リグニン由来の芳香族化合物であるバニリン、アセトバニリン、グアヤコールなどが挙げられる。

【００２７】

アンモニア処理糖液は、発酵阻害物質として、クマルアミドおよびフェルラアミドを含んでいる。クマルアミドおよびフェルラアミドは、アンモニア処理以外の処理により得られたセルロース由来糖液には含まれていないがアンモニア処理糖液には含まれていることから、アンモニア処理糖液に含まれる特有の発酵阻害物質であるといえる。クマルアミド、フェルラアミドは、各々クマル酸又はフェルラ酸とアンモニアとの縮合により生じるアミド化合物である。クマル酸又はフェルラ酸は、セルロース系バイオマス中に含まれている。よって、アンモニア処理糖液中のクマルアミド、フェルラアミドは、前処理工程（ステップＳ１１）においてセルロース系バイオマスにアンモニアを含む処理剤を添加した際に、セルロース系バイオマス中のクマル酸、フェルラ酸がアンモニア処理によりアンモニア分子と縮合反応することにより生じたものといえる。

【００２８】
クマルアミド、フェルラアミドは、草本系、木本系のどちらのセルロース系バイオマスを原料として使用した場合も、アンモニア処理糖液中に含まれるが、草本系バイオマスを原料とした場合の方がより多く含まれる。そのため、アンモニア処理糖液を、精製処理せずにそのまま発酵原料として使用する際、草本系バイオマスを原料とした場合では、木本系バイオマスを原料とした場合と比較して発酵効率が低くなってしまう。しかし、本発明によれば、アンモニア処理糖液を精製処理することにより、草本系、木本系のどちらのバイオマスを原料とした場合でも同等の発酵効率が得られる。なお、アンモニア処理糖液中のクマルアミド、フェルラアミドが、木本系バイオマスを原料として使用した場合よりも草本系バイオマスを原料として使用した場合の方が多い理由は、元々バイオマス中に含まれているクマル酸、フェルラ酸の量が、草本系バイオマスの方が多いためであるといえる。

【００２９】
アンモニア処理物を酵素糖化する際のアンモニア処理物の固形物の濃度は１質量％以上１０質量％以下の範囲内の溶液を用いてアンモニア処理物を酵素糖化することが好ましい。アンモニア処理物の固形物の濃度は、より好ましくは５質量％以上１０質量％未満である。アンモニア処理物の固形物の濃度が１０質量％以下の場合には、アンモニア処理物を後述するアンモニア処理糖液の作製工程（ステップＳ１２）でアンモニア処理物に酵素を添加して酵素糖化すると、糖化反応が阻害されず、得られるアンモニア処理糖液中の発酵阻害物質の濃度が高くなるのを抑制できる。また、アンモニア処理物の固形物の濃度が１質量％以上の場合には、発酵生産の原料として使用するために必要な濃度に濃縮する際のエネルギー及び処理時間が抑えられ、費用を低減でき、経済的に有利である。

【００３０】
アンモニア処理物の固形物を含む溶媒成分としては、アンモニア処理物の固形物を分散させることができるものであればよく、水などが用いられる。

【００３１】
前記アンモニア処理物の酵素糖化に使用する酵素としては、セルロース分解活性を有する酵素（セルラーゼ）であれば特に限定されないが、結晶性セルロースの分解活性を有するエキソ型セルラーゼ、あるいはエンド型セルラーゼを含んでなるセルラーゼが好ましく使用される。こうしたセルラーゼとしては、糸状菌が産生するセルラーゼが好ましく、糸状菌の中でもトリコデルマ属細菌が産生するセルラーゼがより好ましく、トリコデルマ属細菌の中でもトリコデルマ・リーセイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ）が産生するセルラーゼがさらに好ましい。

【００３２】
前記酵素糖化はｐＨ３～７の付近で行うことが好ましく、ｐＨ５付近で行うことがより好ましい。また、前記酵素糖化の反応温度は４０～７０℃であることが好ましく、５０℃付近であることがより好ましい。

【００３３】
前記酵素糖化によって得られるアンモニア処理糖液は、そのまま後段のステップに供してもよく、また、遠心分離法や膜分離法などによる固液分離によって固形物を除去した後に後段のステップに供してもよい。

【００３４】
＜精製糖液の作製工程：ステップＳ１３＞
アンモニア処理糖液の作製工程（ステップＳ１２）により得られたアンモニア処理糖液に含まれるクマルアミドおよび／またはフェルラアミドを精製除去し、所定濃度の精製糖液を得る（精製糖液の作製工程：ステップＳ１３）。

【００３５】
精製糖液中のクマルアミドおよび／またはフェルラアミド濃度は、１０～１１００ｐｐｍの濃度範囲であり、より好ましくは１０～８００ｐｐｍであり、更に好ましく１０～４５０ｐｐｍである。精製糖液中のクマルアミドおよび／またはフェルラアミドの濃度が１

１００ｐｐｍ以下の場合には、発酵効率が著しく改善する。また、精製糖液の濃度が１０ｐｐｍ以上の場合には、アンモニア処理糖液の精製に要するエネルギーやコストの増大を抑制することができる。すなわち、精製糖液の発酵効率はクマルアミドおよび／またはフェルラアミドの濃度が低くなればなるほどより改善されるが、精製糖液の濃度を１０ｐｐｍ未満としても、アンモニア処理糖液の精製に要するエネルギーやコストが膨大になるばかりであり、精製糖液の発酵効率はそれ以上改善しないため、経済的に不利であり、好ましくない。

【００３６】

アンモニア処理糖液の精製処理方法は、特に限定されないが、例えば、蒸留、抽出、晶析、再結晶、カラムクロマトグラフィー、膜分離などが挙げられる。これらのアンモニア処理糖液の精製処理方法は単独で用いてもよいし、複数を組み合わせて用いてもよい。上記アンモニア処理糖液の精製処理方法の中でも、膜処理を用いることが好ましく、特にナノ濾過膜を用いることが好ましい。ナノ濾過膜は、アンモニア処理糖液中の糖の透過を阻止すると共に、クマルアミドおよび／またはフェルラアミドを透過させることができる。よって、アンモニア処理糖液の精製にナノ濾過膜を用いることによって、糖濃縮とフェルラアミド、クマルアミドの除去を同時に行うことが可能となる。

【００３７】

ナノ濾過膜とは、「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分離膜であり、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。ナノ濾過膜は、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あり、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。

【００３８】

ナノ濾過膜を形成する材料としては、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るが、前記１種類の素材で構成される膜に限定されず、複数の膜素材を含む膜であってもよい。また、ナノ濾過膜の膜構造は、膜の少なくとも片面に緻密層を持ち、緻密層から膜内部あるいはもう片方の面に向けて徐々に大きな孔径の微細孔を有する非対称膜や、非対称膜の緻密層の上に別の素材で形成された非常に薄い機能層を有する複合膜のどちらでもよい。複合膜としては、例えば、ポリスルホンを膜素材とする支持膜にポリアミドの機能層からなるナノフィルターを構成させた複合膜を用いることができる。このような複合膜としては、例えば、特開昭６２－２０１６０６号公報に記載されている。

【００３９】

これらの中でも高耐圧性と高透水性、高溶質除去性能を兼ね備え、優れたポテンシャルを有する、ポリアミドを機能層とした複合膜が好ましい。操作圧力に対する耐久性と、高い透水性、阻止性能を維持できるためには、ポリアミドを機能層とし、それを多孔質膜や不織布からなる支持体で保持する構造のものが適している。また、ポリアミド半透膜としては、多官能アミンと多官能酸ハロゲン化物との重縮合反応により得られる架橋ポリアミドの機能層を支持体に有してなる複合半透膜が適している。

【００４０】

ポリアミドを機能層とするナノ濾過膜において、ポリアミドを構成する単量体の好ましいカルボン酸成分としては、例えば、トリメシン酸、ベンゾフェノンテトラカルボン酸、トリメリット酸、ピロメット酸、イソフタル酸、テレフタル酸、ナフタレンジカルボン酸、ジフェニルカルボン酸、ピリジンカルボン酸などの芳香族カルボン酸が挙げられるが、製膜溶媒に対する溶解性を考慮すると、トリメシン酸、イソフタル酸、テレフタル酸、およびこれらの混合物がより好ましい。

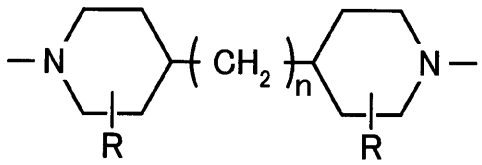
【００４１】

前記ポリアミドを構成する単量体の好ましいアミン成分としては、ｍ－フェニレンジアミン、ｐ－フェニレンジアミン、ベンジジン、メチレンビスジアニリン、４，４’－ジアミノビフェニルエーテル、ジアニシジン、３，３‘，４－トリアミノビフェニルエーテル、３，３’，４，４‘－テトラアミノビフェニルエーテル、３，３’－ジオキシベンジジ

ン、１，８－ナフタレンジアミン、ｍ（ｐ）－モノメチルフェニレンジアミン、３，３’－モノメチルアミノ－４，４’－ジアミノビフェニルエーテル、４，Ｎ，Ｎ‘－（4-アミノベンゾイル）－ｐ（ｍ）－フェニレンジアミン－２，２’－ビス（４－アミノフェニルベンゾイミダゾール）、２，２’－ビス（４－アミノフェニルベンゾオキサゾール）、２，２‘－ビス（４－アミノフェニルベンゾチアゾール)等の芳香環を有する一級ジアミン、ピペラジン、ピペリジンまたはこれらの誘導体等の二級ジアミンが挙げられ、中でもピペラジンまたはピペリジンを単量体として含む架橋ポリアミドを機能層とするナノ濾過膜は耐圧性、耐久性の他に、耐熱性、耐薬品性を有していることから好ましく用いられる。より好ましくは前記架橋ピペラジンポリアミドまたは架橋ピペリジンポリアミドを主成分とし、かつ、下記化学式１で示される構成成分を含有するポリアミドであり、さらに好ましくは架橋ピペラジンポリアミドを主成分とし、かつ、下記化学式１で示される構成成分を含有するポリアミドである。また、下記化学式１中、ｎ＝３のものが好ましく用いられる。架橋ピペラジンポリアミドを主成分とし、かつ下記化学式１で示される構成成分を含有するポリアミドを機能層とするナノ濾過膜としては、例えば、特開昭６２－２０１６０６号公報に記載のものが挙げられ、具体例として、架橋ピペラジンポリアミドを主成分とし、かつ、下記化学式１中、ｎ＝３のものを構成成分として含有するポリアミドを機能層とする、東レ株式会社製の架橋ピペラジンポリアミド系ナノ濾過膜のＵＴＣ６０が挙げられる。

【００４２】

【化１】



（ｎは１以上の整数である。）

【００４３】

ナノ濾過膜は一般にスパイラル型の膜モジュールとして使用されるが、本実施形態で用いるナノ濾過膜も、スパイラル型の膜モジュールとして好ましく使用される。好ましいナノ濾過膜モジュールの具体例としては、例えば、酢酸セルロース系のナノ濾過膜であるＧＥ　Ｏｓｍｏｎｉｃｓ社製ナノ濾過膜のＧＥｓｅｐａ、ポリアミドを機能層とするアルファラバル社製ナノ濾過膜のＮＦ９９またはＮＦ９９ＨＦ、架橋ピペラジンポリアミドを機能層とするフィルムテック社製ナノ濾過膜のＮＦ－４５、ＮＦ－９０、ＮＦ－２００、ＮＦ－２７０またはＮＦ－４００、あるいは架橋ピペラジンポリアミドを主成分とし、かつ前記化学式１で示される構成成分を含有するポリアミドを機能層とする、東レ株式会社製のＵＴＣ６０を含む同社製ナノ濾過膜モジュールＳＵ－２１０、ＳＵ－２２０、ＳＵ－６００またはＳＵ－６１０が挙げられ、より好ましくはポリアミドを機能層とするアルファラバル社製ナノ濾過膜のＮＦ９９またはＮＦ９９ＨＦ、架橋ピペラジンポリアミドを機能層とするフィルムテック社製ナノ濾過膜のＮＦ－４５、ＮＦ－９０、ＮＦ－２００またはＮＦ－４００、あるいは架橋ピペラジンポリアミドを主成分とし、かつ前記化学式１で示される構成成分を含有するポリアミドを機能層とする、東レ株式会社製のＵＴＣ６０を含む同社製ナノ濾過膜モジュールＳＵ－２１０、ＳＵ－２２０、ＳＵ－６００またはＳＵ－６１０であり、さらに好ましくは架橋ピペラジンポリアミドを主成分とし、かつ前記化学式１で示される構成成分を含有するポリアミドを機能層とする、東レ株式会社製のＵＴＣ６０を含む同社製ナノ濾過膜モジュールＳＵ－２１０、ＳＵ－２２０、ＳＵ－６００またはＳＵ－６１０である。

【００４４】

ナノ濾過膜に供するアンモニア処理糖液のｐＨは特に限定されないが、ｐＨ１～５であることが好ましい。ｐＨが１未満であると長期間使用した際に膜が変性してフラックス、透過率といった膜性能が著しく低下し、ｐＨが５より大きいと、発酵阻害物質の除去率が

著しく低下する場合があるためである。アンモニア処理糖液のｐＨを上記範囲内に調整してナノ濾過膜で濾過することで、発酵阻害物質の除去効率を向上させることができる。また、アンモニア処理糖液のｐＨが上記範囲内の場合には、ナノ濾過膜のファウリングを抑制する効果があるため、ナノ濾過膜を長期間安定して使用することができる。

【００４５】

アンモニア処理糖液のｐＨ調整に使用する酸もしくはアルカリは特に限定されるものではない。酸としては、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸などが挙げられ、好ましくは発酵時の阻害が起こりにくい観点から硫酸、硝酸、リン酸、より好ましくは経済性の観点から硫酸である。アルカリとしては、好ましくは経済性の観点からアンモニア、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウムとそれらを含む水溶液、より好ましくは膜ファウリングの観点から１価イオンであるアンモニア、水酸化ナトリウム、さらに好ましくは発酵時の阻害が起こりにくい観点からアンモニアである。

【００４６】

アンモニア処理糖液のｐＨ調整を行う段階は、ナノ濾過膜を通過させる前であればよい。またセルロース系バイオマスの加水分解に酵素を利用する場合は、加水分解反応時にｐＨを５以下に調整しておいてもよい。また、濾液に含まれる酵素を再利用するプロセスの場合にはｐＨを４以下まで低下させると酵素の失活が起こりやすいため、濾液に含まれる酵素を除去した後の濾液をｐＨ調整することが好ましい。

【００４７】

ナノ濾過膜を通過させるアンモニア処理糖液の温度は特に限定されないが、使用するナノ濾過膜の濾過時の発酵阻害物質の除去能を高める観点から適宜設定することができる。具体的には、ナノ濾過膜で濾過する場合、アンモニア処理糖液の温度が４０℃～８０℃であれば、ナノ濾過膜の発酵阻害物質の除去性能が高まるため、好ましい。ナノ濾過膜で濾過する場合のアンモニア処理糖液の温度が４０℃以上の場合には、アンモニア処理糖液に含まれる発酵阻害物質の除去性能が大きくなるが、アンモニア処理糖液の温度が８０℃より高いとナノ濾過膜が変性してしまうため、膜特性が失われることがある。そのため、アンモニア処理糖液の温度を上記範囲内とすることで、ナノ濾過膜の発酵阻害物質の除去性能を向上させることができる。

【００４８】

また、ナノ濾過の方法としては、具体的には、例えば、国際公開第２０１０／０６７７８５号に記載されている方法に準じて行うことができる。

【００４９】

ナノ濾過膜を用いてアンモニア処理糖液をろ過する場合には、アンモニア処理糖液に加水を行うことより、更に効率よく発酵阻害物質を除去することができる。また、加水する水の量によって、ナノ濾過後の精製糖液に含まれる発酵阻害物質の含有量を調節することができる。具体的には、加水の量が多ければ多いほど、ナノ濾過後の精製糖液に含まれる発酵阻害物質の含有量は少なくなる。

【００５０】

このように、アンモニア処理糖液に含まれるクマルアミドおよび／またはフェルラアミドを精製除去することで、所定濃度の精製糖液が得られる。

【００５１】

以上のように、本実施形態に係る糖液の製造方法によれば、セルロース系バイオマスをアンモニアを含む処理剤で処理したアンモニア処理物を酵素糖化して得られるアンモニア処理糖液に含まれるクマルアミドおよび／またはフェルラアミドを精製除去し、所定濃度の精製糖液を得ることができる。アンモニア処理糖液に発酵阻害物質として含まれる特有のクマルアミドおよび／またはフェルラアミドを該糖液を発酵する前に予め低減しておくことにより、発酵効率を向上させることができる。

【００５２】

得られた精製糖液を発酵原料として用いて発酵を行うことでエタノールを製造することができる。本実施形態に係る糖液の製造方法を用いて得られる精製糖液からエタノールを

製造する方法は特に限定されるものではない。エタノールを製造する方法としては、例えば、特開２００９－２９６９８３号公報に記載されている二段階発酵方法が挙げられる。二段階発酵方法は、酵母や細菌により、一次発酵工程においてグルコースやマンノースなどの６炭糖をエタノールに変換し、続いて二次発酵工程においてキシロースなどの５炭糖をエタノールに変換する。一次発酵工程で使用する菌は、公知のものを使用できるが、その中でも、サッカロマイセス・セレビシエなどの酵母が好ましい。酵母は、エタノール耐性が高く、５％以上の濃度のエタノールを生産することができるためである。二次発酵工程で使用する菌は、ピキア・スティピティスなどの５炭糖資化性酵母を使用することができ、その中でも発酵阻害耐性能付与株が好ましい。

【００５３】

本実施形態に係る糖液の製造方法を用いて得られた精製糖液は、セルロース系バイオマスをアンモニアを含む処理剤で処理したアンモニア処理糖液に発酵阻害物質として含まれる特有のクマルアミドおよび／またはフェルラアミドが除去されているため、発酵原料として用いる場合に発酵が阻害されることはない。よって、本実施形態に係る糖液の製造方法を用いて得られた精製糖液を発酵原料として用いることで、エタノールの製造の効率化を図ることが可能となる。

【実施例】

【００５４】

本発明の内容を実施例及び比較例を用いて以下に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【００５５】

＜実施例１：精製糖液の作製・分析＞

［Ａ．アンモニア処理糖液の作製］

（１．セルロース系バイオマスの粉砕処理）

セルロース系バイオマスとしてエリアンサスを用いた。前記エリアンサスを４ｍｍの目開きを有するスクリーンで粒度を制御しながらカッターミルを用いて粉砕した。レーザー回折法で測定した平均粒子径（ｄ５０）は約９７５μｍであった。粉砕後のエリアンサスを、温度４０℃、５ｋＰａの減圧下にて一昼夜乾燥した。乾燥後のエリアンサスの含水率は乾燥後のエリアンサスの質量を基準として０．５質量％程度であった。

【００５６】

（２．セルロース系バイオマスのアンモニア処理）

得られた粉砕・乾燥後のセルロースをセルロースチップとしてアンモニア処理を行った。内容積が約５Ｌの攪拌装置を備えたステンレス・スチール製オートクレーブに、前記セルロースチップを２００ｇ充填した。次に、オートクレーブ内への加圧窒素ガスの導入／脱圧を繰り返して、オートクレーブ内の空気を除去し、窒素ガスへと置換した。その後このオートクレーブを１２０℃まで昇温した。昇温後、オートクレーブ内を脱圧し、更に減圧にして窒素ガスを排気した。一方、別途の圧力容器に加圧アンモニアを導入し、１２０℃よりやや高い温度までこのアンモニアを昇温した。その後、前記オートクレーブと前記圧力容器とを連結する配管に設置したバルブを開くことにより、前記オートクレーブに、温度１２０℃において圧力１．２ＭＰａとなるようにアンモニアを導入した。この温度、圧力条件にて２．５時間、攪拌下にセルロースチップをアンモニアにより処理した。その後、脱圧してアンモニアを排出し、更に窒素ガスをオートクレーブに流通させてセルロースチップ粒子中に残留したアンモニアを除去し、前処理バイオマスを得た。これをアンモニア処理セルロース（アンモニア処理物）として用いた。

【００５７】

（３．アンモニア処理セルロースの加水分解）

アンモニア処理セルロース０．４ｋｇに水７．６ｋｇを添加し、アンモニア処理セルロース濃度を５％とした。これに少量の濃硫酸または水酸化ナトリウム水溶液を加えてｐＨを５に調整した後、トリコデルマ・リーセイ由来のセルラーゼ製剤（アクセルレース・デュエット、Ｇｅｎｅｎｃｏｒ社製）を、アンモニア処理セルロース乾燥質量に対し、酵素

タンパク質質量で１００分の１の量を添加し、５０℃で２４時間糖化反応を行った。この糖化反応により得られたものを加水分解物として用いた。

【００５８】

（４．加水分解物の固液分離）

得られた加水分解物を、遠心分離に供し、溶液成分と、未分解セルロースおよびリグニンとを分離した。前記溶液成分を、更に細孔径０．４５μｍの精密濾過膜（ステリカップ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）に供することにより、ミクロンオーダーの不溶性粒子を除去した。以上の方法により得られた溶液成分を、アンモニア処理糖液として用いた。

【００５９】

［Ｂ．精製糖液の作製］

（５．ナノ濾過膜による糖濃縮）

得られたアンモニア処理糖液を、ナノ濾過膜（ＵＴＣ－６０、東レ社製）を用いて、常温にて操作圧力４ＭＰａで濾過を行った。濾過して得られた透過液を精製糖液として用いた。なお、膜分離装置は平膜ユニット（ＳＥＰＡ　ＣＦ－ＩＩ、ＧＥ　Ｏｓｍｏｎｉｃｓ社製、有効膜面積１４０ｃｍ^2）を使用した。

【００６０】

［Ｃ．アンモニア処理糖液の分析］

上記「４．加水分解物の固液分離」で得られたアンモニア処理糖液に含まれる糖類、有機酸、芳香族化合物を分析した。アンモニア処理糖液の糖類、有機酸、芳香族化合物の各分析条件を以下に示す。

（ＨＰＬＣ分析条件）

１．糖類分析条件

アンモニア処理糖液中のグルコース、キシロース濃度は、下記に示す高速液体クロマトグラフィー(High performance liquid chromatography：ＨＰＬＣ)条件で、標品との比較により定量した。

機器：ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　システム（Ｗａｔｅｒｓ社製）

カラム：ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ　Ａｍｉｄｅ　１．７μｍ　２．１×１００ｍｍ　Ｃｏｌｕｍｎ（Ｗａｔｅｒｓ社製）

移動相：Ａ液；８０％アセトニトリル＋０．２％ＴＥＡ、Ｂ液；３０％アセトニトリル＋０．２％ＴＥＡ

流速：０．３ｍＬ／ｍｉｎ

温度：５５℃

２．有機酸分析条件

アンモニア処理糖液中の酢酸の濃度は、下記に示すＨＰＬＣ条件で、標品との比較により定量した。

機器：日立高速液体クロマトグラフ　Ｌａｃｈｒｏｍ　ｅｌｉｔｅ（Ｈｉｔａｃｈｉ社製）

カラム：ＧＬ－Ｃ６１０Ｈ－Ｓ　（Ｈｉｔａｃｈｉ社製）

移動相：３ｍＭ過塩素酸

反応液：ブロモチモールブルー溶液

検出方法：ＵＶ－ＶＩＳ検出器

流速　移動相：０．５ｍＬ／ｍｉｎ　　反応液：０．６ｍＬ／ｍｉｎ

温度：６０℃

３．芳香族化合物分析条件

アンモニア処理糖液中のクマル酸、クマルアミド、フェルラアミドの濃度は、下記に示すＨＰＬＣ条件で、標品との比較により定量した。また、同時に各検出ピークのＵＶ吸収スペクトル（測定波長：２００ｎｍ～４００ｎｍ）を得た。

機器：日立高速液体クロマトグラフ　Ｌａｃｈｒｏｍ　ｅｌｉｔｅ（Ｈｉｔａｃｈｉ社製）

カラム：Ｓｙｎｅｒｇｉ　２．５μｍ　Ｈｙｄｒｏ‐ＲＰ　１００Ａ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎ

ｅｘ社製）
検出方法：Ｄｉｏｄｅ　Ａｒｒａｙ　検出器
流速：０．６　ｍＬ／ｍｉｎ
温度：４０℃
【００６１】
得られたアンモニア処理糖液の糖類を、上記「１．糖類分析条件」に記載のＨＰＬＣ条件にて分析した結果、主要な糖類成分として、グルコース、キシロースが含まれることが確認された。また、アンモニア処理糖液の有機酸を上記「２．有機酸分析条件」に記載のＨＰＬＣ条件にて分析した結果、主要な有機酸成分として、酢酸が含まれることが分かった。また、アンモニア処理糖液中の芳香族化合物を上記「３．芳香族化合物分析条件」に記載のＨＰＬＣ条件にて分析した結果を図２に示す。図２に示すように、アンモニア処理糖液からは主要なピークが３つ検出（ピーク１、ピーク２、ピーク３参照）された。
【００６２】
これらのうち、ピーク３は、クマル酸標品のＨＰＬＣ溶出時間と一致したためクマル酸であることが判明した。また、残り２つの化合物（ピーク１、ピーク２）の溶出時間は、セルロース系バイオマス由来糖液に含まれる芳香族化合物として知られているＨＭＦ、フルフラール、バニリン、アセトバニロン、フェルラ酸、コニフェリルアルデヒド、グアヤコールのいずれの標品とも一致しなかった。そこで、ＨＰＬＣによりこれら２種のピーク（ピーク１、ピーク２）を分取し、ＬＣ／ＭＳ（ＬＣＭＳ‐ＩＴ‐ＴＯＦおよびＬＣ２０Ａ、Ｓｈｉｍａｄｚｕ社製）にて分子量を分析した。
【００６３】
その結果、分子量はそれぞれ１６３．０６３、１９３．０７４であることが判明した。クマル酸、フェルラ酸が、アンモニア分子と縮合反応するとクマルアミド、フェルラアミドが生成することが予想される。クマルアミド、フェルラアミドの構造式から算出される分子量は、各々１６３．１７２、１９３．１９８であり、上記ＬＣ／ＭＳで得られた分子量と一致することから、アンモニア処理セルロース糖液に含まれる残りの２種のピーク（ピーク１およびピーク２）は、クマルアミド、フェルラアミドであることが推定された。
【００６４】
そこで、クマルアミドおよびフェルラアミド標品に関して、委託合成（委託先：ＶＳＮ社　合成研究所）し、合成した標品のＨＰＬＣ溶出時間を測定した。その結果、アンモニア処理糖液中のピーク１と標品混合液中のクマルアミド標品の溶出時間（３．７４分）およびアンモニア処理糖液中のピーク２と標品混合液中のフェルラアミド標品の溶出時間（５．２５分）が完全に一致した（図２参照）。
【００６５】
ＨＰＬＣを行った際に得られた、アンモニア処理糖液のピーク１およびピーク２と、クマルアミド標品およびフェルラアミド標品との各々のＵＶ吸収スペクトルを図３～図６に示す。また、測定波長は２００ｎｍ～４００ｎｍとした。図３、５に示すように、アンモニア処理糖液のピーク１とクマルアミド標品とのＵＶ吸収スペクトルは一致した。また、図４、６に示すように、アンモニア処理糖液のピーク２とフェルラアミド標品とのＵＶ吸収スペクトルは一致した。
【００６６】
以上の分析の結果より、アンモニア処理セルロースの加水分解物であるアンモニア処理糖液に含まれるピーク１およびピーク２は、クマルアミド、フェルラアミドであり、アンモニア処理糖液には、これらの化合物が多く含まれていることが判明した。
【００６７】
［Ｄ．精製糖液の分析］
濾過前の原液（アンモニア処理糖液）、濾過後の濃縮糖液および透過液（精製糖液）中の各成分濃度を表１に示す。なお、成分の分析には上記「Ｃ．アンモニア処理糖液の分析」に記載のＨＰＬＣ分析条件に従って分析を行った。
【００６８】

【表１】

(表1)

	グルコース (g/L)	キシロース (g/L)	酢酸 (g/L)	クマル酸 (g/L)	クマルアミド (g/L)	フェルラアミド (g/L)
原液	17.0	11.0	0.157	0.037	0.491	0.189
濃縮糖液	99.6	53.9	0.151	0.079	0.622	0.454
透過液	1.16	1.4	0.169	0.030	0.317	0.064

【００６９】

表１から明らかなように、アンモニア処理糖液をナノ濾過膜に通じて濾過することにより、濃縮糖液では糖成分、すなわちグルコース、キシロースがそれぞれ５．９倍、４．９倍に濃縮されており、一方で糖以外の成分（酢酸、クマル酸、クマルアミド、フェルラアミド）は１～２．４倍程度にしか濃縮されておらず、アンモニア処理糖液をナノ濾過膜に通じて濾過することにより、原液中の糖成分の多くは非透過側へ、糖以外の成分の多くは透過側へと、それぞれ効率よく分離できた。

【００７０】

＜比較例１：アンモニア処理糖液を逆浸透膜で糖濃縮した場合の検討＞

分離膜に逆浸透膜（ＵＴＣ－８０、東レ社製）を使用し、操作圧を５ＭＰａとすること以外、実施例１の「５．ナノ濾過膜による糖濃縮」と同様の方法で濾過を行った。濾過前の原液（アンモニア処理糖液）、濾過後の濃縮糖液および透過液（精製糖液）中の各成分濃度を表２に示す。なお、成分の分析には、上記と同様、ＨＰＬＣを用いて行った。

【００７１】

【表２】

(表2)

	グルコース (g/L)	キシロース (g/L)	酢酸 (g/L)	クマル酸 (g/L)	クマルアミド (g/L)	フェルラアミド (g/L)
原液	17.0	11.0	0.157	0.037	0.491	0.189
濃縮糖液	102.9	59.5	0.743	0.160	2.050	2.053
透過液	0.2	0.1	0	0	0	0

【００７２】

表２から明らかなようにグルコース、キシロースの単糖成分およびその他の成分は、ほとんど透過液には含まれていなかった。よって、分離膜として逆浸透膜を用いた場合、アンモニア処理糖液中に含まれる糖成分とクマルアミドおよびフェルラアミドとを分離できないことが確認できた。

【００７３】

＜実施例２：クマルアミド、クマル酸、フェルラアミドを含むモデル溶液を使用した増殖試験＞

下記「Ａ．モデル糖液を使用したピキア・スティピティスの増殖試験」の本培養において、培地中に、クマルアミド、クマル酸、フェルラアミドのうちいずれかひとつを添加物として２ｐｐｍ～２００ｐｐｍの濃度で添加した培地についてそれぞれ増殖試験を行った。また、ポジティブコントロールとして、添加物を含まないＹＰＤＸ培地についても同様に試験を行った。

（Ａ．モデル糖液を使用したピキア・スティピティスの増殖試験）

ピキア・スティピティスＮＢＲＣ１６８７株を、下記表３に記載のＹＰＤＸ培地に２％の寒天を加えて作製したＹＰＤＸ寒天培地にて、２５℃で静置培養した（前々培養）。寒天培地上に形成されたコロニーのひとつを、滅菌した白金耳を用いて、ＹＰＤＸ培地１０ｍＬに播種し、２５℃、１２０ｓｐｍにて容積が２０ｍＬの試験管内で４８時間振盪培養

した（前培養）。前培養後の培地１ｍＬを、ＹＰＤＸ培地９ｍＬに添加し、２０ｍＬ容の試験管内で、２５℃、６０ｓｐｍにて更に培養を続けた（本培養）。培養開始後０、２４、４８時間にそれぞれサンプリングを行い、単糖濃度や吸光度（ＯＤ６６０）を測定することにより、菌体の増殖を観察した。

【００７４】

【表３】

(表3)

YPDX培地

組成物	組成物濃度(g/L)
グルコース	10
キシロース	10
ポリペプトン	20
酵母エキス	10

【００７５】

本実施例において、サンプリングの際に、培地中のグルコース、キシロースの濃度を分析した結果を表４に示す。

【００７６】

【表４】

(表4)

グルコース	PC	クマルアミド(ppm)			クマル酸(ppm)			フェルラアミド(ppm)		
	0	2	20	200	2	20	200	2	20	200
0h	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
24h	2.4	2.3	4.82	5.9	2.6	2.6	3.6	2.3	6.6	6.7
48h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
キシロース	PC	クマルアミド(ppm)			クマル酸(ppm)			フェルラアミド(ppm)		
	0	2	20	200	2	20	200	2	20	200
0h	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
24h	2.4	2.3	9.7	9.5	2.6	8.7	9.2	2.3	9.3	9.7
48h	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0	5.2

【００７７】

表４から明らかなように、添加物の濃度が２０ｐｐｍ以上の場合、いずれの添加物においてもキシロース消費がポジティブコントロールに対して遅くなっており、増殖阻害が起きていることが分かった。一方、添加物の濃度が２ｐｐｍでは、いずれの添加物においても増殖阻害は全く見られなかった。また、クマル酸よりも、クマルアミドおよびフェルラアミドの方が増殖阻害性は強く、その傾向はグルコースの消費速度に対して特に顕著であることが判明した。すなわち、ピキア・スティピティスの培養において、クマルアミドおよびフェルラアミドが発酵阻害物質であることが判明した。

【００７８】

＜実施例３．ナノ濾過膜による濃縮糖液の増殖試験＞

実施例１の「５．ナノ濾過膜による糖濃縮」に記載の方法により、アンモニア処理糖液のナノ濾過膜による濃縮糖液（以下、ＮＦ濃縮液１とする。）を調整した。更に、ＮＦ濃縮液１に、等体積の水を添加して混合した後、ナノ濾過膜による濾過を、実施例１の「５

．ナノ濾過膜による糖濃縮」に記載の条件にて再度行い、ＮＦ濃縮液２を得た。更に、ＮＦ濃縮液２に、ＮＦ濃縮液２と同じ体積の水を添加した後、ナノ濾過膜による濾過を、実施例１の「５．ナノ濾過膜による糖濃縮」に記載の条件に従って再度行い、ＮＦ濃縮液３を得た。ＮＦ濃縮液１～３および比較例１に記載の方法により得られた逆浸透膜による濃縮糖液（以下、ＲＯ濃縮液）の各成分濃度を表５に示す。

【００７９】

また、それぞれの糖液を使用して、下記「Ｂ．アンモニア処理糖液の濃縮液を使用したピキア・スティピティスの増殖試験」に記載の方法により増殖試験を行った。試験結果を表５に示す。増殖試験の結果は、培養開始４８時間後の吸光度（ＯＤ６６０）が、ポジティブコントロールに対して５０％～１００％の場合を＋＋、１０％～５０％の場合を＋、１０％未満の場合を－として表記した。なお、ポジティブコントロールの吸光度（ＯＤ６６０）は４８時間後で約１５であった。

（Ｂ．アンモニア処理糖液の濃縮液を使用したピキア・スティピティスの増殖試験）

アンモニア処理糖液の濃縮液について増殖試験を行う場合は、アンモニア処理糖液の濃縮液に、ポリペプトン、酵母エキスをそれぞれ上記表３に記載のＹＰＤＸ培地と同じ濃度となるように添加したものを本培養の培地として使用する以外は、上記「Ａ．モデル糖液を使用したピキア・スティピティスの増殖試験」と同様の方法で培養を行った。また、ポジティブコントロールは「Ａ．モデル糖液を使用したピキア・スティピティスの増殖試験」と同様の方法で培養を行った。

【００８０】

【表５】

(表5)

	グルコース (g/L)	キシロース (g/L)	クマル酸 (g/L)	クマルアミド(a) (g/L)	フェルラアミド(b) (g/L)	(a)+(b) (ppm)	微生物生育
NF 濃縮液1	99.6	53.9	0.079	0.622	0.454	1076	+
NF 濃縮液2	98.3	51.5	0.053	0.436	0.345	781	+
NF 濃縮液3	97.7	50.2	0.032	0.213	0.217	430	++
RO濃縮液 (比較例)	102.9	59.5	0.160	2.050	0.809	2859	－

【００８１】

表５から明らかなように、ＮＦ濃縮液に水を添加し、ナノ濾過を繰り返すたびに、クマル酸、クマルアミド、フェルラアミドの濃度が低下していた。一方、逆浸透膜を用いて濾過した場合では、これらの物質は顕著に濃縮されていた。また、増殖試験の結果より、糖液中のクマルアミド、フェルラアミド濃度の合計が１１００ｐｐｍ以下であれば、増殖が可能であるといえる。よって、本結果より、クマルアミド、フェルラアミドを除去するためには逆浸透膜ではなくナノ濾過膜で処理する必要があることが確認された。また、本結果および実施例２より、ナノ濾過では、クマルアミド、フェルラアミドの濃度の合計が１１００ｐｐｍ以下の濃度範囲となるように精製処理を行うことによって効率的な微生物の増殖が可能になることが判明した。

【００８２】

＜実施例４．アンモニア処理糖液を使用したエタノール生産試験＞

下記「Ｃ．アンモニア処理糖液を使用したピキア・スティピティスのエタノール生産試験」に従い、アンモニア処理糖液のナノ濾過膜による濃縮糖化液（ＮＦ濃縮液）と比較例１に記載の方法により得られた逆浸透膜による濃縮糖化液（ＲＯ濃縮液）とを使用してエ

タノール生産を行い、それぞれにおける発酵特性の比較を行った。

【００８３】

（Ｃ．アンモニア処理糖液を使用したピキア・スティピティスのエタノール生産試験）

アンモニア処理糖液からのエタノール生産試験は、特開２００９－２９６９８３号公報の明細書に記載された二段階発酵方法に準じて行った。まず一次発酵として、アンモニア処理糖液濃縮液でサッカロマイセス・セレビシエを培養し、グルコースをエタノールに変換したところ、ＮＦ濃縮液、ＲＯ濃縮液のいずれを使用した場合も発酵阻害を受けなかったことが確認された。

【００８４】

次に二次発酵として、ロータリーエバポレーターによりエタノール濃度を１０ｇ／Ｌに調整した一次発酵液でピキア・スティピティスを培養し、一次発酵液に含まれるキシロースをエタノールに変換した。二次発酵における、ＮＦ濃縮液由来一次発酵液とＲＯ濃縮液由来一次発酵液での発酵時間とエタノール濃度との関係を図７に示し、ＮＦ濃縮液由来一次発酵液とＲＯ濃縮液由来一次発酵液での発酵時間とキシロース濃度との関係を図８に示す。その結果、図７、８に示すように、ピキア・スティピティスによる二次発酵ではＲＯ濃縮液由来一次発酵液でのエタノール生産が大きく阻害され、ＮＦ濃縮液由来一次発酵液でのエタノール生産と比較してキシロースの消費速度、エタノール生成速度とエタノール最終生成濃度が減少した。そのため、ナノ濾過膜による濃縮よりも逆浸透膜による濃縮がアルコール発酵阻害物質をより顕著に濃縮することが明らかとなった。

【００８５】

＜実施例５：膜濾過後の透過液によるエタノール生産阻害の検証＞

ＮＦ濃縮液およびＲＯ濃縮液を生成する際に得られる濾液（透過液）を用いたエタノール生産を行った。ＮＦ濃縮液およびＲＯ濃縮液に由来する透過液をそれぞれＮＦ透過液およびＲＯ透過液とした。各透過液はロータリーエバポレーターを用いて３倍に濃縮した。濃縮した透過液に酵母エキス、ポリペプトン、キシロースを終濃度がそれぞれ０．５％、１．０％、７．０％になるように添加した。これらの調製された液体培地にピキア・スティピティスを添加し、エタノール生産を行った。対照として水に上記と同様の組成になるように酵母エキス、ポリペプトン、キシロースを加えたものを用いて同様の検証を行った。

【００８６】

ＮＦ濃縮液とＲＯ濃縮液との発酵時間とエタノール濃度との関係を図９に示し、ＮＦ濃縮液とＲＯ濃縮液との発酵時間とキシロース濃度との関係を図１０に示す。図９、１０に示すように、ＲＯ透過液を含む培地では対照と同様のキシロース消費とエタノール生成を行った。しかしながら、ＮＦ透過液を含む培地ではキシロース消費速度が対照の約７５％に、エタノール生成速度が約６０％に減少した。よって、この結果から、アンモニア処理糖液のナノ濾過膜による濃縮処理によりエタノール生産阻害物質が膜を透過し、濾液に蓄積することが明らかとなった。従って、ナノ濾過膜による濃縮処理によりエタノール生産阻害物質の除去を行うことができることが示された。

【００８７】

＜実施例６：糖化時のアンモニア処理セルロース濃度＞

実施例１の「２．セルロース系バイオマスのアンモニア処理」に記載のアンモニア処理セルロース０．４ｋｇに、下記表６に記載の仕込時加水量に従って水を添加し、アンモニア処理セルロース濃度を５、１０、１５、２０％にそれぞれ調整した。これに少量の濃硫酸を加えてｐＨを５に調整した後、セルラーゼ製剤（アクセルレース・デュエット、Ｇｅｎｅｎｃｏｒ社製）を、アンモニア処理セルロース乾燥質量に対し、酵素タンパク質質量で１００分の１の量を添加し、５０℃で２４時間酵素糖化反応を行った。得られた加水分解物を遠心分離に供し、溶液成分と、未分解セルロースあるいはリグニンとを分離した。前記溶液成分を、更に細孔径０．４５μｍの精密濾過膜（ステリカップ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）に供することにより、ミクロンオーダーの不溶性粒子を除去した。以上の方法により得られた溶液成分を、実施例１の「５．ナノ濾過膜による糖濃縮」に従ってナノ濾

過膜処理し、ＮＦ濃縮液を得た。なお濃縮倍率は、濃縮液中のグルコース濃度がおよそ１０％となるように調整した。それぞれの濃縮液中の各成分濃度を表７に示す。

【００８８】

【表６】

(表6)

酵素糖化時アンモニア処理セルロース濃度（質量%）	仕込み時加水量（kg）
5	7.6
10	3.6
15	2.6
20	1.6

【００８９】

【表７】

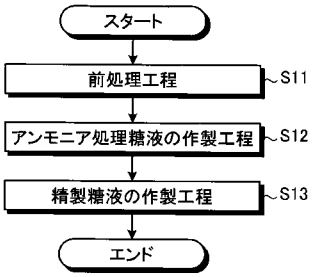
(表7)

酵素糖化時アンモニア処理セルロース濃度（質量%）	NF濃縮液中濃度（g/L）				
	グルコース	キシロース	クマルアミド（a）	フェルラアミド（b）	(a)+(b)（ppm）
5	99.6	53.9	0.62	0.45	1070
10	101.2	53.4	0.61	0.47	1080
15	100.4	52.2	0.72	0.53	1250
20	102.3	52.8	0.80	0.59	1390

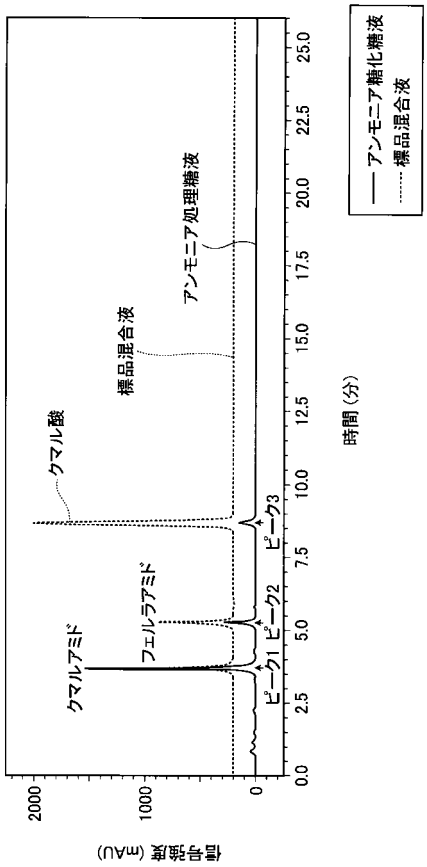
【００９０】

表７から明らかなように、ＮＦ濃縮液中のクマルアミド、フェルラアミドの濃度の合計量は、酵素糖化時のアンモニア処理セルロース濃度が５％および１０％の場合では共に１１００ｐｐｍ以下であるが、酵素糖化時のアンモニア処理セルロース濃度が１５％、２０％ではＮＦ濃縮液中のクマルアミド、フェルラアミドの濃度の合計量は顕著に高くなっており、それぞれ１２５０ｐｐｍ、１３９０ｐｐｍであった。よって、本結果ならびに実施例５より、糖液中のクマルアミド、フェルラアミドの濃度の合計量が１１００ｐｐｍ以下の場合には、微生物は生育可能であり、効率的な微生物によるエタノールの生産は可能であるため、酵素糖化時のアンモニア処理セルロース濃度は１０％以下とすることが好ましいことが判明した。

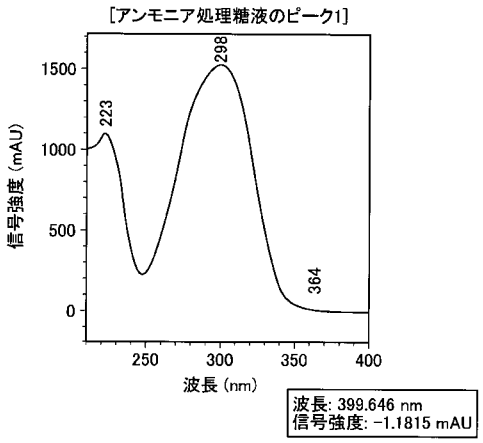
【図１】


スタート
前処理工程
S11
アンモニア処理糖液の作製工程
S12
精製糖液の作製工程
S13
エンド

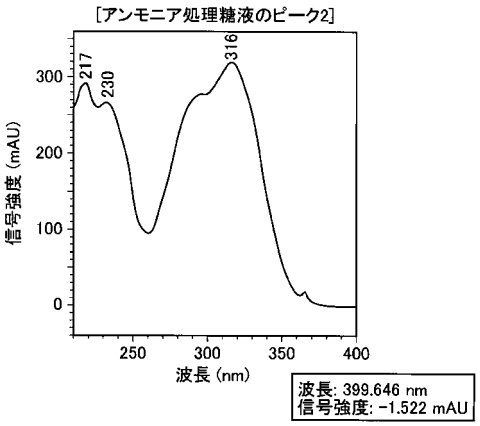
【図２】


アンモニア糖化糖液
標品混合液
時間（分）
信号強度（mAU）
クマル酸
標品混合液
アンモニア処理糖液
クマルアミド
フェルラアミド
ピーク1
ピーク2
ピーク3

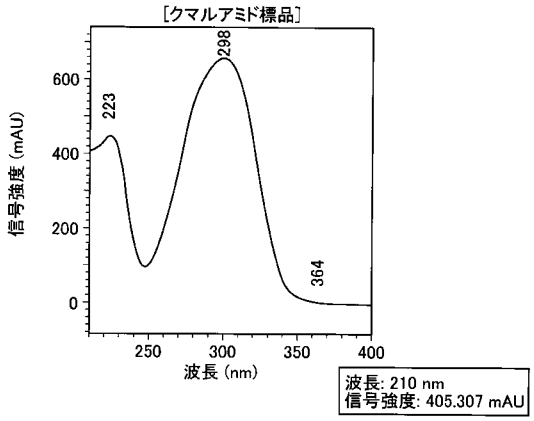
【図３】


[アンモニア処理糖液のピーク1]
信号強度（mAU）
波長（nm）
223
298
364
波長: 399.646 nm
信号強度: −1.1815 mAU

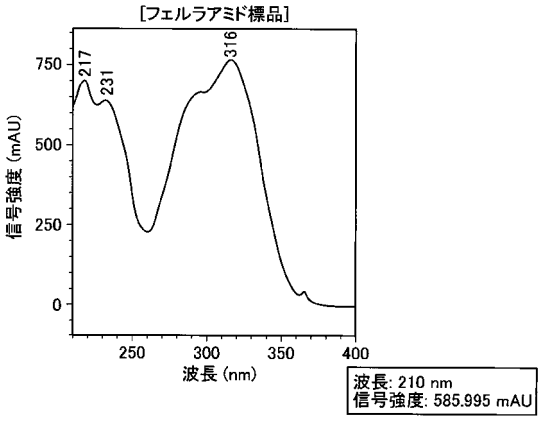
【図４】


[アンモニア処理糖液のピーク2]
信号強度（mAU）
波長（nm）
217
230
316
波長: 399.646 nm
信号強度: −1.522 mAU

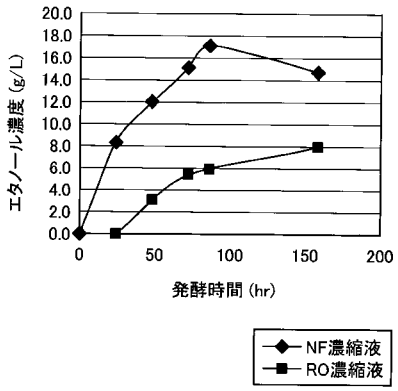
【図５】


[クマルアミド標品]
信号強度 (mAU)
600
400
200
0
223
298
364
250
300
350
400
波長 (nm)
波長: 210 nm
信号強度: 405.307 mAU

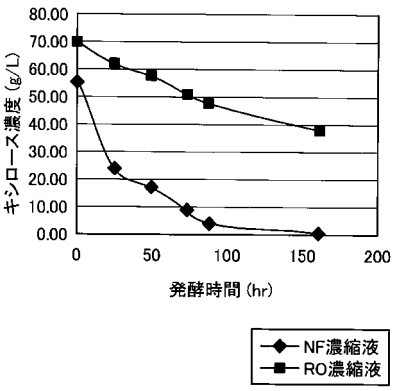
【図６】


[フェルラアミド標品]
信号強度 (mAU)
750
500
250
0
217
231
316
250
300
350
400
波長 (nm)
波長: 210 nm
信号強度: 585.995 mAU

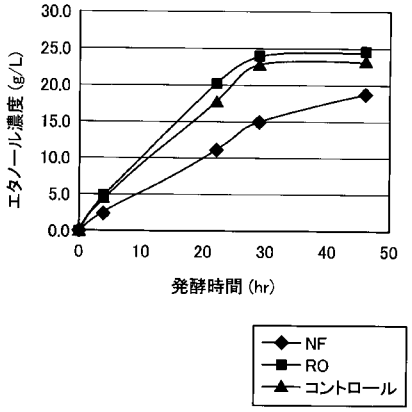
【図７】


エタノール濃度 (g/L)
20.0
18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
0
50
100
150
200
発酵時間 (hr)
NF濃縮液
RO濃縮液

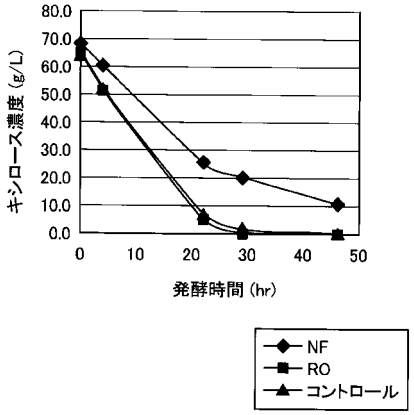
【図８】


キシロース濃度 (g/L)
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0
50
100
150
200
発酵時間 (hr)
NF濃縮液
RO濃縮液

【図９】


30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
エタノール濃度 (g/L)
0
10
20
30
40
50
発酵時間 (hr)
NF
RO
コントロール

【図１０】


80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
キシロース濃度 (g/L)
0
10
20
30
40
50
発酵時間 (hr)
NF
RO
コントロール

フロントページの続き

(72)発明者　丹羽　雅裕
東京都千代田区大手町二丁目６番３号　ＪＸ日鉱日石エネルギー株式会社内
(72)発明者　進藤　昌
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄４－２６　秋田県総合食品研究センター内
(72)発明者　西田　孝伸
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄４－２６　秋田県総合食品研究センター内
(72)発明者　岸本　淳平
神奈川県鎌倉市手広６丁目１０番１号　東レ株式会社基礎研究センター内
(72)発明者　南野　淳
神奈川県鎌倉市手広６丁目１０番１号　東レ株式会社基礎研究センター内
(72)発明者　栗原　宏征
神奈川県鎌倉市手広６丁目１０番１号　東レ株式会社基礎研究センター内
(72)発明者　山田　勝成
神奈川県鎌倉市手広６丁目１０番１号　東レ株式会社基礎研究センター内

Ｆターム(参考) 4B064 AC03　CA06　DA16