

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5633839号  
(P5633839)

(45) 発行日 平成26年12月3日(2014.12.3)

(24) 登録日 平成26年10月24日(2014.10.24)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 19/14	(2006.01)	C 1 2 P 19/14	A
C 1 2 P 7/10	(2006.01)	C 1 2 P 7/10	
C 1 3 K 1/02	(2006.01)	C 1 3 K 1/02	

請求項の数 14 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2009-220787 (P2009-220787)	(73) 特許権者	501203344
(22) 出願日	平成21年9月25日(2009.9.25)		独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(65) 公開番号	特開2011-4730 (P2011-4730A)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(43) 公開日	平成23年1月13日(2011.1.13)	(74) 代理人	100086221
審査請求日	平成24年8月8日(2012.8.8)		弁理士 矢野 裕也
(31) 優先権主張番号	特願2009-123792 (P2009-123792)	(72) 発明者	徳安 健
(32) 優先日	平成21年5月22日(2009.5.22)		茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	朴 正一
	(出願人による申告)平成20年度、農林水産省、「稲わら等の作物の未利用部分や資源作物、木質バイオマスを効率的にエタノール等に変換する技術の開発」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		茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リグノセルロース系バイオマスの変換方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リグノセルロース系バイオマス原料である植物体の地上部を粉砕した後、当該原料、水酸化カルシウムおよび水を含むスラリーを調製してアルカリ処理を行い、その後二酸化炭素を通気すること及び加圧することによって、中和しpHを5~7に低下させること、かつ、当該方法が固液分離も洗浄も含まないこと、を特徴とする、酵素糖化反応の基質として用いるスラリーの製造方法。

【請求項2】

植物体の地上部からなるリグノセルロース系バイオマス原料を裁断又は粉砕した後、水酸化カルシウムと、水とを混合し、アルカリを浸透させることによりスラリーを調製してアルカリ処理を行い、その後二酸化炭素を通気すること及び加圧することによって、中和しpHを5~7に低下させること、かつ、当該方法が固液分離も洗浄も含まないこと、を特徴とする、酵素糖化反応の基質として用いるスラリーの製造方法。

【請求項3】

前記アルカリ処理が、80~180 で10分~3時間行うものである、請求項1又は2に記載のスラリーの製造方法。

【請求項4】

前記アルカリ処理が、0 ~ 50 で3日以上行うものである、請求項1又は2に記載のスラリーの製造方法。

【請求項5】

前記中和前もしくは中和後に、スラリーの固形分を磨砕する工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のスラリーの製造方法。

【請求項 6】

前記植物体の地上部が、稲、麦、トウモロコシ、サトウキビ、ソルガム、エリアンサス、牧草、単子葉類の雑草のうちの 1 以上からのものである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のスラリーの製造方法。

【請求項 7】

前記植物体の地上部が、非可食部分である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のスラリーの製造方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の製造方法によりスラリーを製造し、当該スラリーに、デンプン、-(1 3), (1 4)-グルカン、セルロース、キシラン、および、これらの部分分解物、のうちの少なくとも 1 種類以上を糖化する酵素を添加した後、二酸化炭素を通気及び/又は加圧しながら pH の上昇が起こらないように酵素糖化反応を行うことを特徴とする、酵素糖化法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の酵素糖化法により糖化物を含むスラリーを製造し、当該糖化物を含むスラリーに、エタノール発酵微生物を添加した後、二酸化炭素を通気及び/又は加圧しながら pH の上昇が起こらないようにエタノール発酵を行うことを特徴とする、エタノール製造法。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の酵素糖化反応において、前記糖化酵素に加えてさらにエタノール発酵微生物を添加し、酵素糖化反応とエタノール発酵とを並行複発酵で行うことを特徴とする、エタノール製造法。

【請求項 11】

前記エタノール発酵微生物が酵母である、請求項 9 又は 10 に記載のエタノール製造法。

【請求項 12】

請求項 8 に記載の酵素糖化反応を行って糖化物を得て、当該糖化物を回収し、残存物を膜濾過または遠心分離することによって固液分離して固形分を得て、得られた固形分を燃焼することによって、灰分を回収することを特徴とする、カルシウム塩を含む無機物の回収法。

【請求項 13】

請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載のエタノール発酵を行って、エタノールと残存物を得て、当該エタノールを回収し、残存物を膜濾過または遠心分離することによって固液分離して固形分を得て、得られた固形分を燃焼することによって、灰分を回収することを特徴とする、カルシウム塩を含む無機物の回収法。

【請求項 14】

前記カルシウム塩を含む無機物が、リン酸塩を含むものである、請求項 12 又は 13 に記載のカルシウム塩を含む無機物の回収法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リグノセルロース系バイオマス原料を酵素糖化する際の前処理技術に関し、詳しくは、リグノセルロース系バイオマス原料である植物体地上部を粉砕した後、当該原料、水酸化カルシウムおよび水を含むスラリーを調製してアルカリ処理を行い、その後二酸化炭素を通気すること及び/又は加圧することによって、中和し調製することを特徴とする、酵素糖化反応の基質として用いるスラリーの製造方法に関する。

さらに本発明は、前記製造方法より得られるスラリーを基質とした酵素糖化法、前記酵素糖化法によって得られる糖質を基質としたエタノール製造法に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

バイオ燃料への世界的ニーズの高まりに対応して、糖質系バイオマス由来のバイオエタノール製造技術開発競争が世界的規模で繰り広げられている。特に、食料資源と競合しないリグノセルロース系バイオマスの利用技術開発が、欧米のみならず我が国においても最も重要なブレイクスルーとなりうると期待されている。リグノセルロース系バイオマスの糖化技術開発は、200年の歴史を有しているが、現在、再び活発化している。特に、酸糖化を中心に展開した糖化技術に代わり、現在は、セルラーゼを中心とした酵素糖化技術が高い期待を集めている。

## 【0003】

また、リグノセルロース系バイオマス原料中の糖質は複雑な構造をとる細胞壁中に埋め込まれており、酵素糖化に先立ち、苛酷な条件による前処理によって糖質を分離する必要がある。バイオマス原料を糖化する際の前処理技術として、これまでに、希硫酸爆砕処理、水熱処理、苛性ソーダ処理、アンモニア水処理、水酸化カルシウム処理などが検討されている。

## 【0004】

特に、水酸化カルシウム（酸化カルシウムは、水存在下で水酸化カルシウムとなることから、前処理試薬として事実上、同じ物質と見なされる。）は、水酸化ナトリウムやアンモニア水と比較しても安価な試薬であり、有害性も低いと認識されていることから、本試薬を用いたリグノセルロース系バイオマス原料に対する前処理の可能性が検討されてきた。

水酸化カルシウムは、水溶液中での電離度は高いが、その溶解度が低いことから、木質系バイオマスに対する単独使用での前処理効果はさほど大きくない（非特許文献1参照）。なお、木質系バイオマスに対して水酸化カルシウム処理を行う際には、酸化剤の使用が有効であることが明らかとなっている。

その一方で、木化度の低い草本系バイオマスに対する水酸化カルシウム前処理の有効性については、複数の論文で報告されている（非特許文献2～4参照）。

## 【0005】

一般に、酵素糖化の前処理として行う希アルカリ処理では、ヘミセルロースのアセチル基やフェルロイル基などのエステルやリグニン分子内のエステルが加水分解されることにより、酵素糖化性が向上するとともに、リグニンやシリカの一部が可溶化すると考えられている。その際に、ヘミセルロースの一部も遊離・可溶化するが、セルロースやヘミセルロースの大部分は固形分としてバイオマス中に残存し、後段の酵素糖化を効率的に行うことが可能となる。

しかしながら、このような希アルカリ処理工程は、弱酸性条件下で働くセルラーゼ等の酵素による糖化工程に先立ち、酸・アルカリ等の試薬や水溶性成分を細胞壁由来の固形分と分離するための固液分離工程や、洗浄・中和工程が必要となる。水熱処理でも、過分解物や遊離リグニン等を除去するための洗浄を行うことが望ましい。

また、水酸化カルシウム前処理工程では、バイオマス原料の破碎・粉碎物、水酸化カルシウムと水を主成分とする混合物を、室温または加熱状態で反応することにより、希アルカリ処理効果を発現させる。しかしながら、アルカリ中の陽イオン（ $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ など）は、前処理反応時にバイオマス（主にヘミセルロースのカルボキシル基とリグニンのフェノール基）と強く結合し、簡単な水洗浄では完全に除去できない。また、バイオマスから外れた陽イオンはアルカリ性を示すため、洗浄時には大量の水を必要とする（非特許文献5参照）。

このアルカリ前処理物の中和方法としては、水洗浄中和方法（非特許文献6参照）、塩酸中和後水洗浄法（非特許文献4参照）、酢酸中和後水洗浄法（非特許文献7参照）、クエン酸中和後水洗浄法（非特許文献8参照）及び上記の中和法を組み合わせる法（非特許文献2参照）などが検討されている。

## 【0006】

しかしながら、ここで挙げられている中和方法では、固液分離工程や洗浄工程において

10

20

30

40

50

、細胞壁由来固形分や可溶性糖質の流亡が起こり、糖質の回収率が低下する原因となる。

また、これらのうち特に一般的な方法として、塩酸、硫酸、水洗浄について、以下の具体的な欠点が挙げられる。

(1) 塩酸：中和後に水溶性の塩化カルシウムが生じる。中和操作は簡単だが、塩化カルシウムの再利用は困難であり、酸のコストと洗浄工程の整備・運転コストがかかる。また、糖化工程に先立ちイオン濃度を低下させるため、固液分離操作、洗浄操作が必要となり、その際に大量の水を使用し、廃液排出と共に繊維性固形分や遊離糖質の流亡が起こる。中和過程で生じる塩化カルシウムとアルカリ前処理によって生じる可溶化されたリグニンと低分子化されたキシランは廃液処理を困難にする。その他、中和・洗浄後も糖化酵素反応を行うためには反応槽の更なるpH調節が必要であるため、試薬コストの増加および洗浄工程時の微生物による汚染の危険性が存在する。

10

(2) 硫酸：中和後に不溶性の石膏が沈殿する。生成する石膏は、溶解性が極めて低く、酵素反応や微生物発酵時の塩阻害の原因となりにくい。中和操作は簡単だが、試薬は再利用困難であり石膏処理コストや硫酸のコストや洗浄工程の整備・運転コストがかかる。また、糖化時の固形分濃度を減じるため、粉末状の石膏と繊維性固形分の分離操作が必要となり、その際に大量の水使用が必要で廃液排出と共に繊維性固形分や遊離糖質の流亡が起こる。中和過程で生じる石膏は処理バイオマスの粒子サイズが細かい場合は石膏と前処理後バイオマスの分離が困難であり、塩酸中和時と同様にアルカリ前処理によって生じる可溶化されたリグニンと低分子化されたキシランは廃液処理が困難である。その他、中和・洗浄後も糖化酵素反応を行うためには反応槽の更なるpH調節が必要であるため、試薬コストの増加と洗浄工程時の微生物による汚染の危険性が存在する。

20

(3) 水洗浄：水酸化カルシウムと繊維性固形分との相互作用等によりpH低下が鈍くなるため、洗浄工程は極めて非効率的なものとなり、大量の廃水が生じる。洗浄時に繊維性固形分や遊離糖質の流亡が起こる。アルカリ前処理によって生じる低分子化されたキシランと共に可溶性されたリグニンとシリカは水洗浄工程では再沈澱が行われず、廃液中に塩酸または硫酸中和に比べて多く排出され、廃液処理をさらに困難にする。その他、中和・洗浄後も糖化酵素反応を行うためには反応槽の更なるpH調節が必要であるため、試薬コストが増加と洗浄工程時の微生物による汚染の危険性が存在する。

#### 【0007】

このように、従来で挙げられている中和方法では、固液分離工程や洗浄工程が必要であり、特に、ショ糖やでん粉などの易分解性糖質を含む稲わらを原料として糖化を行う際には、セルロースの糖化性を向上するような化学的前処理を行った後に固液分離や洗浄・中和を行うことにより、ショ糖やでん粉の流亡が起こることが懸念される。

30

さらに、固液分離工程では、遠心分離機やスクリーン型分離装置等を用いることとなり、分離装置導入・稼働によるコスト増が問題となる。洗浄・中和工程では、連続洗浄装置を導入する必要が生じるほか、大量の水を使用することとなり、廃液処理コストが増大する。

そこで、前処理後の固液分離工程および洗浄・中和工程を改良し、細胞壁由来固形分や遊離糖質の流亡を防ぎ、効率的に糖化を行うための技術(原料コスト、試薬コスト、設備・運転コストを大幅に節約できる技術)の開発が求められていた。

40

#### 【先行技術文献】

##### 【非特許文献】

#### 【0008】

【非特許文献1】 Vincent S. Chang, Murlidhar Nagwani, Chul-Ho Kim, and Mark T. Holtzapple, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, 94, 1

【非特許文献2】 Vincent S. Chang, Barry Burr, and Mark T. Holtzapple, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, 63-65, 3

【非特許文献3】 Vincent S. Chang, Murlidhar Nagwani, and Mark T. Holtzapple, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1998, 74, 135

【非特許文献4】 Sarita C. Rabelo, Rubens M. Filho, and Aline C. Costa, Applied B

50

iochemistry and Biotechnology, 2008, 153(1-3), 139

【非特許文献5】パルプの洗浄・精選・漂白、紙パルプ技術協会、2000

【非特許文献6】Sarita C. Rabelo, Rubens Maciel Filho, and Aline C. Costa, Applied Biochemistry and Biotechnology 2008, 148, 45

【非特許文献7】William E. Karr, Mark T. Holtzapple, Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59(4), 419

【非特許文献8】William E. Karr, Mark T. Holtzapple, Biomass and Bioenergy, 2000, 18, 189

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

本発明は、上記課題を解決し、リグノセルロース系バイオマス原料（易分解性糖質を含むリグノセルロース系バイオマス原料を含む）を酵素糖化する前処理として、固液分離や洗浄工程による糖質（特に、遊離糖質、でん粉、キシラン等）の流出を伴わず、且つ、効率よく糖化を行うための前処理技術の開発を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記従来課題を解決するべく鋭意努力した結果、リグノセルロース系バイオマス原料を酵素糖化する前処理として、アルカリ処理に水酸化カルシウムを用いる際に、中和に用いる酸として二酸化炭素に注目した。そして、二酸化炭素を用いて中和を行う場合、中和によって生成する炭酸カルシウムは、溶解性が極めて低く、反応系内に残存しても酵素反応や微生物発酵時の塩阻害の原因となりにくく、また、中和コストも最も低い上に中和操作は比較的簡単であり、さらに、炭酸カルシウムは熱分解により酸化カルシウムに再生できることを見出した。

20

【0011】

そこで、本発明者らは、リグノセルロース系バイオマス原料を粉碎し、水酸化カルシウムによるアルカリ処理を行った後、二酸化炭素を通気すること及び/又は加圧して中和したスラリーを調製することによって、'固液分離や洗浄を伴うことなく'直接酵素糖化反応やエタノール発酵を行うことができることを見出し、本発明の完成に至った。

【0012】

30

即ち、請求項1に係る本発明は、リグノセルロース系バイオマス原料である植物体の地上部を粉碎した後、当該原料、水酸化カルシウムおよび水を含むスラリーを調製してアルカリ処理を行い、その後二酸化炭素を通気すること及び加圧することによって、中和しpHを5~7に低下させること、かつ、当該方法が固液分離も洗浄も含まないこと、を特徴とする、酵素糖化反応の基質として用いるスラリーの製造方法に関するものである。

請求項2に係る本発明は、植物体の地上部からなるリグノセルロース系バイオマス原料を裁断又は粉碎した後、水酸化カルシウムと、水とを混合し、アルカリを浸透させることによりスラリーを調製してアルカリ処理を行い、その後二酸化炭素を通気すること及び加圧することによって、中和しpHを5~7に低下させること、かつ、当該方法が固液分離も洗浄も含まないこと、を特徴とする、酵素糖化反応の基質として用いるスラリーの製造方法に関するものである。

40

請求項3に係る本発明は、前記アルカリ処理が、80~180で10分~3時間行うものである、請求項1又は2に記載のスラリーの製造方法に関するものである。

請求項4に係る本発明は、前記アルカリ処理が、0~50で3日以上行うものである、請求項1又は2に記載のスラリーの製造方法に関するものである。

請求項5に係る本発明は、前記中和前もしくは中和後に、スラリーの固形分を磨砕する

50

工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のスラリーの製造方法に関するものである。

請求項 6 に係る本発明は、前記植物体の地上部が、稲、麦、トウモロコシ、サトウキビ、ソルガム、エリアンサス、牧草、単子葉類の雑草のうちの 1 以上からのものである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のスラリーの製造方法に関するものである。

請求項 7 に係る本発明は、前記植物体の地上部が、非可食部分である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のスラリーの製造方法に関するものである。

請求項 8 に係る本発明は、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の製造方法によりスラリーを製造し、当該スラリーに、デンプン、 $\alpha$ -(1-3)、(1-4)-グルカン、セルロース、キシラン、および、これらの部分分解物、のうちの少なくとも 1 種類以上を糖化する酵素を添加した後、二酸化炭素を通気及び/又は加圧しながら pH の上昇が起こらないように酵素糖化反応を行うことを特徴とする、酵素糖化法に関するものである。

10

請求項 9 に係る本発明は、請求項 8 に記載の酵素糖化法により糖化物を含むスラリーを製造し、当該糖化物を含むスラリーに、エタノール発酵微生物を添加した後、二酸化炭素を通気及び/又は加圧しながら pH の上昇が起こらないようにエタノール発酵を行うことを特徴とする、エタノール製造法に関するものである。

20

請求項 10 に係る本発明は、請求項 8 に記載の酵素糖化反応において、前記糖化酵素に加えてさらにエタノール発酵微生物を添加し、酵素糖化反応とエタノール発酵とを並行複発酵を行うことを特徴とする、エタノール製造法に関するものである。

請求項 11 に係る本発明は、前記エタノール発酵微生物が酵母である、請求項 9 又は 10 に記載のエタノール製造法に関するものである。

請求項 12 に係る本発明は、請求項 8 に記載の酵素糖化反応を行って糖化物を得て、当該糖化物を回収し、残存物を膜濾過または遠心分離することによって固液分離して固形分を得て、得られた固形分を燃焼することによって、灰分を回収することを特徴とする、カルシウム塩を含む無機物の回収法に関するものである。

30

請求項 13 に係る本発明は、請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載のエタノール発酵を行って、エタノールと残存物を得て、当該エタノールを回収し、残存物を膜濾過または遠心分離することによって固液分離して固形分を得て、得られた固形分を燃焼することによって、灰分を回収することを特徴とする、カルシウム塩を含む無機物の回収法に関するものである。

請求項 14 に係る本発明は、前記カルシウム塩を含む無機物が、リン酸塩を含むものである、請求項 12 又は 13 に記載のカルシウム塩を含む無機物の回収法に関するものである。

40

#### 【発明の効果】

#### 【0013】

本発明により、反応容器内の細胞壁由来固形分や遊離性糖質を容器外に出すことなく、酵素糖化・発酵に適した pH を安定的に維持することができ、'固液分離や洗浄工程を行わずに'直接糖化反応やエタノール発酵を行うことが可能となる。即ち、同一反応槽内で、前処理・糖化・エタノール発酵という一連工程を同時に行うことが可能となる。

従って、本発明により、リグノセルロース系バイオマス原料(特に易分解性糖質を含有するリグノセルロース系バイオマス原料)を酵素糖化する前処理として、固液分離や洗浄

50

工程による糖質（特に遊離糖質）の流出を伴わず、且つ、効率よく糖化を行うための前処理技術、を提供することが可能となる。

【0014】

また、本発明によれば、リグノセルロース系バイオマス原料のうち、繊維質（セルロース、ヘミセルロース）のみのバイオマス原料だけでなく、澱粉や砂糖等の易分解性糖質を含む稲わら、サトウキビなどの茎葉部や植物体地上部全体を原料とし、水酸化カルシウム処理および糖化反応を行うことが可能となり、易分解性糖質およびセルロース・ヘミセルロースの両方から効率的に糖質を回収し、エタノール発酵工程に供することができる。

即ち、本発明によって、リグノセルロース系バイオマス原料から、‘バイオエタノール’を効率良く製造することが可能となる。

10

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】試験例1において、各pHにおけるグルカン糖化率およびキシランの糖化率を示した図である。

【図2】試験例2において、水酸化カルシウム懸濁液を二酸化炭素で中和した時のpH変化を示した図である。

【図3】実施例1において、水酸化カルシウム処理後の稲わらスラリーを、二酸化炭素で中和した時のpH変化を示した図である。

【図4】実施例2におけるバイアル瓶の模式図を示した図である。

【図5】実施例11における並行複発酵時のエタノール変換率の経時変化を示した図である。

20

【図6】実施例11における発酵槽中の遊離グルコースおよびキシロース量の経時変化を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、リグノセルロース系バイオマス原料を酵素糖化する際の前処理技術に関し、詳しくは、リグノセルロース系バイオマス原料である植物体地上部を粉碎した後、当該原料、水酸化カルシウムおよび水を含むスラリーを調製してアルカリ処理を行い、その後二酸化炭素を通気すること及び/又は加圧することによって、中和し調製することを特徴とする、酵素糖化反応の基質として用いるスラリーの製造方法に関する。

30

【0017】

〔バイオマス原料〕

本発明で対象となる「リグノセルロース系バイオマス原料」としては、植物体の地上部を用いることができる。

これらは、大きく木質系原料と草本系原料に分けられる。また、これらの他に、海藻、水草などがリグノセルロース系原料に準じるものとして本発明の対象原料となる。

木質系原料としては、針葉樹、広葉樹、裸子植物等の幹、枝、葉、実などを挙げることができる。しかし、一般に、木質系バイオマス原料と比較して、草本系バイオマス原料の方が木化の程度が低く、前処理条件を穏和に設定できるため、本発明のバイオマス原料としては、草本を用いることが好ましい。

40

草本系バイオマス原料としては、稲、麦、トウモロコシ、サトウキビ、ソルガム、エリアンサス、牧草、単子葉類の雑草の地上部全体を用いることができる。

【0018】

また、本発明のリグノセルロース系バイオマス原料としては、食物生産との競合を避けるために、非可食部分を用いることが望ましい。

具体的には、コーンエタノール製造時に圃場に蓄積するトウモロコシ茎葉（コーンストーパー）、サトウキビ搾汁後に得られるバガス、主要穀物生産時に副生される稲わら、麦わら、もみ殻、そしていわゆる資源作物としてのスイートソルガムやエリアンサス、牧草類、稲の植物体地上部全体など、が挙げられる。

これらリグノセルロース系バイオマス原料は、易分解性糖質を含有するものを含むもの

50

である。これらのうち、特に稲わらやサトウキビバガスでは、澱粉やショ糖（シュークロース）などの易分解性糖質を回収しつつ、セルロースやヘミセルロースの糖化性を向上するような前処理技術の開発が求められているところであり、本発明はこの問題を解決するものである。

#### 【0019】

本発明においては、前記バイオマス原料を粉砕して用いる。

本発明におけるバイオマス原料の最適な粉砕度については、原料の形状、含水率、粉砕特性等に応じて異なる。

例えば、稲わらを試料としてスラリーを調製した場合、アルカリ処理の効果は、脱穀後の長いものや数センチメートル程度に裁断されたものでも見出されるが、数ミリメートルから数百マイクロメートル程度の平均粒径またはそれ以下まで粉砕された試料では、薬液の浸透性や基質の表面積が向上し、前処理後の糖化効率が上昇する。

粉砕時の熱による原料の損耗や基質の被覆が起こらない限り、細かく粉砕する程反応効率は向上すると考えられるが、原料に応じて、糖化効率、粉砕コストとハンドリング性を考慮した最適化を行う必要がある。例えば、アルカリ処理によってバイオマスが軟化するとともに機械的強度が減少し、後段の粉砕処理のエネルギー効率が高まることが期待できる。

本発明では、中和後に、塩と前処理したバイオマス原料との分離（固液分離や洗浄）を行う必要がないことから、数百マイクロメートル以下の小さい粒径の試料を用いてもロスがなく、ハンドリング性も低下しにくい。このことは、本発明の大きい利点である。また、石臼などで磨り潰すグラインダー等を用いて、粉砕原料を磨砕しながらアルカリ液を浸透させる方法により、アルカリ処理の効率の向上が期待される。

#### 【0020】

##### 〔アルカリ処理〕

本発明では、前記バイオマス原料を粉砕した後、当該原料、水酸化カルシウムおよび水を含むスラリーを調製してアルカリ処理を行う。

アルカリ処理を行う際には、まずバイオマスに対して水を加えて、その後に水酸化カルシウムまたはその水懸濁物を混合する方法や、逆に、水酸化カルシウムの粉末を加えた後に水や水蒸気を加える方法、水酸化カルシウムの添加を数段階に分けて行う方法、バイオマス中の水分を利用して、水酸化カルシウムのみを添加して混合する方法など、様々な反応混合物の調整方法が存在する。また、原料への水や試薬の浸透性を向上するため、界面活性剤を添加する方法や、減圧下において気泡を除く方法、加圧下において気泡を縮小させて液の浸透を促す方法、などが考えられる。

当該アルカリ処理により、ヘミセルロースのアセチル基やフェルロイル基などのエステルやリグニン分子内のエステルが加水分解されることにより、酵素糖化性が向上するとともに、リグニンやシリカの一部が可溶化すると考えられている。その際に、ヘミセルロースの一部も遊離・可溶化するが、セルロースやヘミセルロースの大部分は固形分としてバイオマス中に残存し、後段の酵素糖化の基質となる。

#### 【0021】

本発明においては、アルカリ処理を「水酸化カルシウム（もしくは酸化カルシウム）」を用いて行うものである。水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化マグネシウム、アンモニア水等の他のアルカリを用いて行うことは、バイオマス粉末スラリーのpHを低下させる効果の点や、二酸化炭素を用いた中和を行った際に酵素反応や発酵を阻害する要因になる塩の沈殿が生じにくい点や、試薬の回収や、試薬コストの点で適さない。

なお、当該処理に用いる水酸化カルシウムの添加比としては、前記バイオマス原料の乾重量に対して2～80%の添加が可能で、望ましくは10～40%の添加で行うことができる。

その際、前処理反応系の水分含量は、前記バイオマス原料に対して1～40倍への調整が可能で、望ましくは3～20倍の調整を行うことができる。また、原料が有する水分を利用し、前記水分含量とすることも可能である。さらに、前記バイオマス原料の粉砕度を

10

20

30

40

50



上げることにより、水の添加量を減らすことも可能である。

【0022】

水酸化カルシウム処理の処理温度としては、80 以上の高温条件で行う場合と、外気温や室温程度の条件で行う場合を挙げることができる。

【0023】

・高温条件

高温条件で水酸化カルシウム処理を行う場合、80 以上、望ましくは100 程度またはそれ以上の温度で数時間処理することが有効である。なお、180 を越えると、熱処理コストが増大し、糖の回収率が下がる現象が見出されることから、本発明では、80 ~ 180 、さらに望ましくは80 ~ 160 の条件とする。

処理時間は、熱伝達に必要な10分程度の時間以上が求められ、10分~3時間程度、好ましくは、30分~2時間程度の範囲で行うことが望ましい。また、水蒸気を用いてスラリーを調製する場合、加水処理と加熱処理を同時に行うことができる。

【0024】

・外気温や室温条件

外気温や室温条件で水酸化カルシウム処理を行う場合、具体的には0 ~ 50 、望ましくは室温程度である10~40 で、3時間以上、望ましくは3日以上、さらに望ましくは6日以上、保存することが有効である。また、冬季には外気温が氷点下になることもあり、本発明では、そのような条件での外気温での保存を行う場合も含む。

なお、外気温や室温でのアルカリ処理の場合、アルカリ条件下での前処理効果と共に、保存効果も期待しているものであることから、3時間程度~数百日以上保存を行うことにより、収穫物の長期間貯蔵・利用が可能となる。特に、含水率が高い稲わら、サトウキビ粉砕物等の原料を乾燥することなく貯蔵できることから、乾燥コストの低減や乾燥によるバイオマス原料の特性変化の抑制などに繋がる技術として重要となる。これまでに、稲わら等の原料を乾燥させずに保存する方法としては、乳酸菌の接種、アンモニア接種、尿素接種などが知られているが、乳酸発酵時には、一部の糖質が消費されることや乳酸がエタノール発酵を阻害すること、そして乳酸菌によるエタノール発酵酵母の汚染などが問題となる。また、アンモニアは比較的高価であり、臭気や毒性により作業効率が低下する欠点を有する。尿素は、サイレージ作製上の実用性が期待されているが、エタノール発酵基質として用途を限定した場合には有害物質の生成が懸念されている。このような観点から、水酸化カルシウムにおける非乾燥保存法は極めて有効性や実用性が高く、本発明の技術において一層有効性を発揮するものとなる。特に、稲わら、サトウキビ粉砕物等の原料中に含まれる、でん粉やショ糖は、アルカリ中でほぼ安定的に存在することから、微生物汚染や植物代謝による変質を避けつつ、これらを維持することが可能となる。さらに、前処理としての効果が高いことから、高温での前処理と比較して、前処理時における加熱コストを大幅に減じることが可能となる。

【0025】

また、リグニンの分解を促し、適宜、 $\beta$ -脱離による糖収率の低下を防ぐため、アントラキノンや分子状酸素等の酸化剤を添加することが有効である。また、アルカリ処理後のスラリーの固形分を二酸化炭素中和の前に磨砕することで、後段の酵素反応を促進させることが可能である。

【0026】

〔二酸化炭素による中和〕

本発明においては、前記水酸化カルシウム処理（アルカリ処理）後の溶液に、二酸化炭素を通気すること及び/又は加圧することによって、中和しpHを低下させる。

中和後のpHは5~7、好ましくは糖化酵素多くが高い活性を有する6.5以下の弱酸性に調整することが望ましい。具体的にはpH5~6.5に調整することが望ましい。

二酸化炭素による中和の具体的な方法は、アルカリ処理後の溶液中に二酸化炭素を直接通気（例えば、バブリング、炭酸水の添加、上部からの吹きつけ等）する方法、密閉容器を用いて二酸化炭素で加圧する（陽圧にする）方法、を挙げることができる。また、さら

10

20

30

40

50

に攪拌、振盪、低温・高圧処理などを行うことにより、二酸化炭素の溶解をより効率的にすることもできる。また、これらの方法を組み合わせて行うこともできる。

なお、本発明では、非密閉容器を用いて、下方置換等の方法により反応系外に出る二酸化炭素を回収することもできるが、密閉容器を用いることが経済的に望ましい。

二酸化炭素で加圧にすることによって、緩やかなpH上昇が抑えられ、pHを前記所定の範囲で一定とすることができる。また、圧力計スイッチ等を利用することで、陽圧容器中の二酸化炭素の消費が進むと容器内の圧力が徐々に低下した際に、新たな二酸化炭素を自動的に導入することもできる。

#### 【0027】

本発明で使用する二酸化炭素ガスの給源は、市販炭酸ガスのほか、ボイラー燃焼後のガス、発酵時のガス等が考えられる。一般的には、ガスの精製を行う必要性は高くないと考えられる。

また、リグノセルロース系バイオマス原料からのエタノール製造工程では、リグニン等の糖化・発酵残渣の燃焼工程やエタノール発酵工程が含まれることから、変換工場内での入手が可能となる。また、ショ糖やでん粉などからの大規模なバイオエタノール製造工場やボイラー燃焼工程を伴う工場が隣接する場合、炭酸ガスの供給はより効率的に行われるものと期待される。水酸化カルシウム-二酸化炭素による中和系は、いわゆるオーバーライミング効果により、遊離リグニン等の物質の沈殿を促し、廃液処理コストを低減することができる。

なお、さらには、後記した工程であるエタノール発酵の際に、反応溶液中から二酸化炭素が発生するが、この反応溶液外に放出された二酸化炭素を貯蔵して利用することもできる。

#### 【0028】

二酸化炭素を用いて、アルカリ処理後のスラリーを中和し、pHを前記所定の範囲に維持した後は、当該スラリーに対して酵素を‘直接’入れて、糖化反応を行うことが可能である。従って、本発明では、前処理後に、固液分離や洗浄などの糖質（特に易分解性糖質）が流出する工程を完全に省くことができる。

また、当該二酸化炭素中和後のスラリーは、糖化酵素の活性に適したpH値を有し、また、カルシウムも塩として沈殿する。炭酸カルシウムの殆どは固形物となり、溶質としては殆ど存在していないことから、酵素活性に対する塩の影響は極めて少ないと考えられる。

さらに、中和後に生じた炭酸カルシウム結晶の多くは、前処理バイオマスと接触して存在していることから、前処理物を糖化前に湿式粉碎処理に供することにより、炭酸カルシウム結晶が研磨剤としての役割を果たすことが期待される。酵素糖化反応に先立ち、または、酵素添加後から酵素糖化時において、二酸化炭素中和後のスラリーの固形分を磨砕することにより、糖化効率が上昇させることができる。

本発明では、未反応の水酸化カルシウムが微量存在している場合でも、炭酸ガス雰囲気下で迅速に中和することにより、酵素安定性に対する影響を最低限に抑えることが可能となる。

#### 【0029】

##### 〔酵素糖化反応〕

本発明で原料として用いるリグノセルロース系バイオマス原料（特に草本系バイオマス原料）中には、主要な多糖としては、澱粉、 $\alpha$ -D-グルカン、 $\beta$ -D-グルカン、セルロース、キシランが挙げられる。本発明では、これらの多糖あるいはその部分分解物の少なくとも1種類を糖化する活性をもつ酵素（さらには、糖化を促進する活性を有する酵素）を添加するものである。

なお、好ましくは、これらの多糖あるいはその部分分解物の全てを糖化できるように、複数種類の酵素を組み合わせて添加することが望ましい。

当該糖化酵素としては、セルラーゼ製剤、ヘミセルラーゼ製剤、 $\alpha$ -D-グルコシダーゼ製剤を用いることができるが、具体的には、 $\alpha$ -D-グルコシダーゼ、 $\beta$ -D-グルコシダーゼ、グルコアミ

10

20

30

40

50

ラーゼ、プルラーゼ、イソアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、リケナーゼ、セロビオハイドロラーゼ、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、セロビオースデヒドロゲナーゼ、キシラーゼ、 $\beta$ -L-アラビノフラノシダーゼ、 $\beta$ -D-キシロシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、フェルロイルエステラーゼ、 $\alpha$ -マンナーゼ、 $\beta$ -D-マンノシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、キシログルカナーゼ、ガラクタナーゼ、アラビナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ等が挙げられる。

#### 【0030】

前記糖化酵素であるセルラーゼ、ヘミセルラーゼ等の細胞壁成分加水分解酵素の多くは、pH 4.5 ~ 5.5 付近で高い活性を有しているが、その多くは pH 6.5 付近でも高い活性が維持される。

10

本発明では、糖化反応の際に、二酸化炭素を必要に応じて用いることで、pHの上昇が起こらないようにして（pHを維持した条件下で）糖化反応を行うものである。

なお、pH 6.5 付近で活性が低下する糖化酵素については、安定性が高い場合には、通常の用量または用量を増して適用することが可能となる。

また、安定性が低い酵素の場合には、用量を調節することにより、失活するまでの間に十分な触媒活性を期待しながら酵素活性を最適化することが可能となる。

また、先述したとおり、バイオマス糖化用酵素製剤の多くは、pH 6.5 付近での使用が可能であるが、pH 6.5 付近で活性の「特に高い活性を有する糖化用酵素」を自然界からスクリーニングしたり、タンパク質構造を改変して触媒特性や安定性を改良した変異酵素等を用いたりして、これらを糖化工程で用いることも可能である。例えば、pH 6.5 付近で高い活性を示す  $\alpha$ -グルコシダーゼとして、Humicola 属糸状菌、特に Humicola insolens 由来の酵素を用いることができる。

20

#### 【0031】

糖化反応は、前記糖化酵素の活性に合わせた温度で行うことができるが、前記アルカリ処理で加熱した場合、前処理物（アルカリ処理後の二酸化炭素中和スラリー）の品温低下に合わせて耐熱性の高い酵素を順次加えていくことで、糖化工程を効率化することができる。

例えば、澱粉糊化が起こりやすい 70 ~ 110 程度の温度に低下した時に、耐熱性アミラーゼを加えて糖化反応を行うことにより、でん粉の液化が効率化する。

30

また、市販酵素製剤中のセルラーゼ製剤やヘミセルラーゼ製剤の多くは、50 前後で安定に作用することから、前処理物の品温が 50 程度に低下した際に酵素を添加することが望ましい。

なお、酵素（機能性タンパク質も含む）のほかに、界面活性剤のように酵素糖化反応を促進する因子を加えて糖化を行うこともできる。

#### 【0032】

当該酵素糖化反応後に得られる糖化物としては、グルコース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、ラムノース、フラクトース、グルクロン酸、ガラクトロン酸などを挙げることができる。特に、主なエタノール発酵の基質として、グルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトースを挙げることができる。

40

#### 【0033】

##### 〔エタノール発酵〕

本発明では、前記酵素糖化反応後に得られる糖化物を含むスラリーに、エタノール発酵微生物を添加した後、二酸化炭素を必要に応じて用いることで、pHの上昇が起こらないようにして（pHを維持した条件下で）エタノール発酵を行う。

なお、当該エタノール発酵は、前記酵素糖化反応によって得られる糖化物だけでなく、バイオマス原料に含まれる糖質（内在性のグルコース、フラクトース、シュークロース、など）そのものをも基質とするものである。

本発明における前記のスラリーは、前記酵素反応と同様に、通常のエタノール発酵においても阻害を殆ど起こさないため、当該スラリーに対してエタノール発酵微生物を「直接

50

入れて、エタノール発酵を行うことが可能である。従って、本発明では、発酵を行う前の固液分離や洗浄などの糖質が流出する工程を完全に省くことができる。すなわち、効率良く「バイオエタノール」を製造することが可能である。

また、当該スラリーは、エタノール発酵に適したpH値を有し、また、カルシウムも塩として沈殿する。炭酸カルシウムの殆どは固形物となり、溶質としては殆ど存在していないことから、エタノール発酵に対する塩の影響は極めて少ないと考えられる。

#### 【0034】

また本発明によれば、酵素糖化反応前の二酸化炭素中和後のスラリーに対して、前記糖化酵素と共に、さらにエタノール発酵微生物を添加することで、酵素糖化反応とエタノール発酵とを「並行複発酵」で行うことも可能である。

糖化と発酵を同時に行う並行複発酵を行うことにより、発酵生成物であるエタノールを得るまでの時間や設備コストを低く抑えることが可能である。さらに、並行複発酵工程を高度化したConsolidated Bioprocessにおいても、本発明における中和スラリーを基質とすることができる。

さらに、エタノール発酵時に副産物として生産される有機酸による発酵槽のpHの低下は、エタノール発酵阻害または菌の生育阻害を起こす原因になるが、当該発明におけるエタノール発酵では、二酸化炭素による中和過程で生じた炭酸カルシウムにより発酵中発生される有機酸が自然に中和されるため、発酵槽のpH制御のための更なる試薬コスト削減が可能である。

#### 【0035】

本発明に用いるエタノール発酵微生物としては、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia stipitis*、*Candida shehatae*、*Kluyveromyces marxianus*などの酵母、；エタノール発酵性担子菌類や子嚢菌類、；*Zymomonas mobilis*などの細菌、；のような発酵性微生物を用いることができる。

なお、発酵時には、発生する二酸化炭素やpH維持のために吹き込む二酸化炭素等により、反応液中のpHは6.5付近またはそれ以下となる。pH6.5付近は、酵母、細菌、糸状菌の多くが生育可能なpH範囲内にあり、種々の遺伝子組換え発酵菌、例えば、*Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Corynebacterium*属菌等を用いることが可能である。

また、複数の微生物（例えば、グルコースやシュークロースに対する発酵性を有する微生物と、キシロースに対する発酵性を有する微生物）を、同時にもしくは1種類ずつ経時的に添加して発酵させることで、バイオマス原料からのエタノール変換率を向上させることができる。

なお、当該技術は、エタノール発酵以外においても、発酵菌の種類や培養条件を変更することにより、種々のバイオリファイナリー工程において適用することも可能である。

#### 【0036】

##### 〔無機物回収〕

本発明では、前記酵素糖化反応を行った後やエタノール発酵を行った後、目的物質回収後の残存物を、膜濾過または遠心分離することによって固液分離を行い、得られた固形分（炭酸カルシウム、リグニン、発酵菌等を含む固形分）を燃焼することにより、カルシウム塩を含む無機物（灰分）を回収することが可能となる。また、同時にリグニン由来の熱を回収することも可能である。

一度の固形分燃焼工程で、リグニンの燃焼とカルシウム塩を含む無機物の回収が可能となることも本発明のメリットである。

#### 【0037】

回収されたカルシウム塩を含む無機物（灰分）は、酸化カルシウムとして利用可能であり、本発明における水酸化カルシウム前処理工程において再利用できる。

また、この灰分は、原料由来の無機成分、例えば、稲わらから得られるシリカ分が含まれており、稲栽培用の資材として用いる場合等にはシリカを含有している点が肥料としての付加価値となる。

バイオマス変換工程における無機栄養分の回収および再利用は極めて重要である。バイオマス原料や発酵微生物等の生体成分等に由来する、または酵素製剤等の試薬に含まれているリン分を回収し、植物栄養源として再利用するための技術開発が求められているところである。本発明では、リン酸とカルシウムイオンが結合し、種々の難溶性塩類を形成する現象に注目し、カルシウムを含む蒸留残渣を燃焼することにより、灰分としてリン酸分を回収する方法を発明した。

#### 【0038】

このように、燃焼後の灰分には、付加価値をもつカルシウムやその他の無機金属が含まれ、原料や変換工程に対応した特徴を有する無機塩素材を与えることが期待される。燃焼温度の違いにより、灰分の成分は変化する。特に、炭酸カルシウムは、820 以上、特に1000 ~ 1100 程度で効率的に酸化カルシウムに変化する。副産物として、炭酸カルシウムを残し、アルカリ分を調整することが重要な場合、温度条件を変化させて成分変化を制御することができる。そして得られた灰分は、肥料や土壌改質剤等の農業関連資材の他に、舗装資材、金属回収資材、オーバーライミング等における水酸化カルシウム給源等の資材等として用いることができる。

#### 【実施例】

#### 【0039】

以下、本発明を実施例等によって詳しく説明するが、本発明の範囲はこれらにより何ら限定されるものではない。

#### 【0040】

<調製例1> リグノセルロース系バイオマス原料の調製

以下の実験例、実施例で原料として用いたリグノセルロース系バイオマス原料として、稲わら（品種名：コシヒカリ、リーフスター）、麦わら（品種名：シルキースノウ）、サトウキビバガス（国内製糖工場より入手）、ソルガムバガス（品種名：SIL-05）及びサトウキビ（品種名：Nif8）を用いた。

各バイオマス原料は、65 で乾燥させ水分含量5%以下の状態で、粒子サイズ1mm以下に粉碎した粉末として調製した。

#### 【0041】

<測定例1>

#### (1) 各種糖質含量と糖化率

#### A. グルコース含量およびキシロース含量の測定

100mgの前記リグノセルロース系バイオマス粉末（稲わら、サトウキビ、麦わら、ソルガム、サトウキビバガス）またはアルカリ処理後のこれら粉末を量り取り、これを2段階硫酸処理（7.2%硫酸、1mL、30 で1時間処理後、水で8倍希釈し、100、2時間処理）を行った。そして、一部をサンプリングして10%NaOH水溶液で中和した。

その後、グルコースC-IIテストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて乾重当たりのグルコース含量を測定した。また、D-キシロースキット（メガザイム社）を用いて乾重当たりのキシロース含量を測定した。

#### 【0042】

#### B. グルカン含量およびキシラン含量の計算

アルカリ処理前と後のバイオマス粉末において、グルカン含量とキシラン含量を以下の式1、2で計算した。

〔式1〕

$$\text{グルカン含量(\%)} = 100 \times (\text{グルコース量} \times 0.90) / \text{バイオマス原料の乾重量}$$

〔式2〕

$$\text{キシラン含量(\%)} = 100 \times (\text{キシロース量} \times 0.88) / \text{バイオマス原料の乾重量}$$

#### 【0043】

#### C. 糖化反応後のグルカン糖化率とキシラン糖化率の計算

各糖化反応後のグルカン糖化率とキシラン糖化率は以下の式3、4で計算した。

10

20

30

40

50

〔式3〕

グルカン糖化率(%) =  $100 \times (\text{酵素糖化グルコース量} \times 0.90) / \text{バイオマス原料のグルカン含量}$

〔式4〕

キシラン糖化率(%) =  $100 \times (\text{酵素糖化キシロース量} \times 0.88) / \text{バイオマス原料のキシラン含量}$

【0044】

D. 糖化反応後のグルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率の計算

アルカリ処理後にサンプル中和、洗浄工程が必要な場合は、洗浄によるサンプルの流失（おもに、易分解性糖質と低分子化されたグルカン及びキシラン）が起こるため、グルカン糖化率とキシラン糖化率の計算後、さらにグルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率の計算を行った。

すなわち、アルカリ処理後のバイオマス粉末の乾重回収率を、式5で計算した。

2段階硫酸処理と糖化反応を行い、前処理後稲わらのグルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率を式6、7で計算した。

また、アルカリ処理後のサンプル中和時、洗浄工程を必要としない場合は、式3と4で求められたグルカン糖化率とキシラン糖化率をそれぞれグルカンとキシラン糖化回収率とした。

〔式5〕

乾重回収率(%) =  $100 \times \text{アルカリ処理後バイオマスの乾重量} / \text{バイオマス原料の乾重量}$

〔式6〕

グルカン糖化回収率(%) =  $100 \times \text{グルカン糖化率} \times \text{乾重回収率} / (100 \times \text{アルカリ処理後バイオマスのグルカン含量} / \text{バイオマス原料のグルカン含量})$

〔式7〕

キシラン糖化回収率(%) =  $100 \times \text{キシラン糖化率} \times \text{乾重回収率} / (100 \times \text{アルカリ処理後バイオマスのキシラン含量} / \text{バイオマス原料のキシラン含量})$

【0045】

(2) 各バイオマス原料の易分解性糖質含量の計算

A. バイオマス乾重あたりの澱粉含量の計算

バイオマスの乾重あたりの澱粉含量の計算はTotal starch kit（メガザイム社）で行った。

すなわち、バイオマス粉末を10mg量り取り、1.5mL容のプラスチックチューブに入れたものを2本用意した。そのうち1本は水(0.02% NaN<sub>3</sub>)を0.5mL加え、10分間激しく攪拌した。攪拌後、サンプルを速やかに4℃に冷却し、遠心分離(15,000g、3分)して上清一部分をサンプリングした。これを水で希釈した後、グルコースC-IIテストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて遊離グルコース量を測定し、乾重あたりの遊離グルコース値を計算し、「G値」とした。

他1本は熱安定性のα-アミラーゼ(50mM MOPS緩衝液、0.02% NaN<sub>3</sub>、5mM CaCl<sub>2</sub>、pH 7.0)酵素液を300μL(30U)添加し、100℃のヒートブロック(CTU-N、Taitec社)中で10分間処理した(2分ごとに激しく攪拌)。その後、サンプルを50℃に冷却し、酢酸ナトリウム緩衝液400μL(200mM、0.02% NaN<sub>3</sub>、pH 4.5)とアミログルコシダーゼ酵素液10μL(2U)を添加して50℃サーモブロック回転機(SN-48BN、日伸理化社)で、回転させながら糖化反応を30分間行った。反応後、サンプルは速やかに4℃に冷却し、遠心分離(15,000g、3分)して上清一部分をサンプリングした。これを水で希釈した後に、グルコースC-IIテストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いてグルコース量を測定して乾重あたりの酵素反応後のグルコース値を計算し、「StaG値」とした。

10

20

30

40

50

乾重あたりの澱粉含量は S t a G 値から G 値を差し引き、澱粉量に換算して計算した。

【 0 0 4 6 】

B . バイオマス乾重あたりの  $\alpha$ -(1 → 3), (1 → 4)-グルカン含量の計算

バイオマスの乾重あたりの  $\alpha$ -(1 → 3), (1 → 4)-グルカン含量の計算は、Mixed-linkage Beta-glucan kit (メガザイム社)で行った。

すなわち、バイオマス粉末を 1 0 mg 量り取り、1 . 5 m L 容のプラスチックチューブに入れたものを 2 本用意した。そのうち 1 本は水 ( 0 . 0 2 % N a N <sub>3</sub> ) を 0 . 5 m L 加え、1 0 分間激しく攪拌した。攪拌後、サンプルを速やかに 4 ℃ に冷却し、遠心分離 ( 1 5 , 0 0 0 g 、 3 分 ) して上清一部分をサンプリングした。これを水で希釈した後、グルコース C - II テストワコー ( 和光純薬工業株式会社 ) を用いて遊離グルコース量を測定し、乾重あたりの遊離グルコース値を計算し、「 G 値」とした。

他 1 本は酢酸ナトリウム 緩衝液 ( 2 0 m M 、 p H 5 . 0 ) を 4 8 0 μ L 添加して 1 0 0 ℃ のヒートブロック中で 1 0 分間処理した ( 2 分ごとに激しく攪拌 ) 。その後、サンプルを 4 ℃ に冷却し、リケナーゼ 2 0 μ L ( 1 U ) を添加して 4 0 ℃ のサーモブロック回転機 ( S N - 4 8 B N 、 日伸理化社 ) で、回転させながら糖化反応を 6 0 分間行った。反応後、サンプルは速やかに 4 ℃ に冷却し、遠心分離 ( 1 5 , 0 0 0 g 、 3 分 ) して上清 1 0 0 μ L をサンプリングした。これにベータグルコシダーゼ ( 0 . 2 3 U , 2 0 m M , p H 7 . 0 リン酸緩衝液 ) 酵素液 1 0 0 μ L を添加して 4 0 ℃ のサーモブロック回転機で、回転させながら糖化反応を 3 0 分間行った。反応後、サンプルは速やかに 4 ℃ に冷却し、遠心分離 ( 1 5 , 0 0 0 g 、 3 分 ) して上清一部分をサンプリングした。これを水で希釈した後、グルコース C - II テストワコー ( 和光純薬工業株式会社 ) を用いてグルコース量を測定して乾重あたりの酵素反応後のグルコース値を計算し、「 B e t a G 値」とした。

乾重あたりの  $\alpha$ -(1 → 3), (1 → 4)-グルカン含量は、 B e t a G 値から G 値を差し引き、 $\alpha$ -(1 → 3), (1 → 4)-グルカン量に換算して計算した。

【 0 0 4 7 】

C . 稲わら乾重あたりのシュークロース含量の計算

稲わら乾重あたりのシュークロース含量の計算は Sucrose, D-fructose and D-glucose kit (メガザイム社)で行った。

すなわち、稲わらを 2 0 m g 量り取り、1 . 5 m L 容のプラスチックチューブに入れ、水 ( 0 . 0 2 % N a N <sub>3</sub> ) を 1 m L 加え、1 0 分間激しく攪拌した。攪拌後、サンプルを速やかに 4 ℃ に冷却し、遠心分離 ( 1 5 , 0 0 0 g 、 3 分 ) して上清 1 0 μ L をサンプリングして、9 6 プレートの 2 ヶ所のウェルに入れた。そのうち 1 ウェルはグルコース C - II テストワコー ( 和光純薬工業株式会社 ) を用いて遊離グルコース量を測定し、乾重あたりの遊離グルコース値を計算し、「 G 値」とした。

他 1 ウェルはインペルターゼ酵素液 ( クエン酸緩衝液、 p H 4 . 6 ) を 2 0 μ L ( 4 U ) 添加して 3 0 ℃ で 1 0 分間酵素反応後、一部分をサンプリングして、水で希釈した後に、グルコース C - II テストワコー ( 和光純薬工業株式会社 ) を用いてグルコース量を測定し、乾重あたりの遊離グルコース値を計算し、「 S u c G 値」とした。

乾重あたりのシュークロース含量は S u c G 値から G 値を差し引き、シュークロース量に換算して計算した。

【 0 0 4 8 】

D . 稲わら乾重あたりのフラクトース含量の計算

稲わら乾重あたりのフラクトース含量の計算は Sucrose, D-fructose and D-glucose kit (メガザイム社)を用いて行った。

すなわち、稲わらを 2 0 m g 量り取り、1 . 5 m L 容のプラスチックチューブに入れ、水 ( 0 . 0 2 % N a N <sub>3</sub> ) を 1 m L 加えて 1 0 分間激しく攪拌した。攪拌後、サンプルを速やかに 4 ℃ に冷却し、遠心分離 ( 1 5 , 0 0 0 g 、 3 分 ) して上清 1 0 μ L をサンプリングして、9 6 プレートのウェルに入れた。このウェルに水 2 0 0 μ L と I m i d a z o l 緩衝液 ( 2 M 、 p H 7 . 6 ) 1 0 μ L 及び N A D P <sup>+</sup> · A T P ( 1 2 . 5 m g / m L · 3 6 . 7 m g / m L ) 水溶液 1 0 μ L を添加して 3 0 ℃ で 3 分間反応した。

その後、340 nmでの吸光度を測定して「A1値」とした。A1値測定後、ヘキソキナーゼ(0.85 U)とGlucose-6-phosphate Dehydrogenase(0.42 U)の混合酵素液を10 µL入れて30 で10分間反応を行い、340 nmでの吸光度を測定して「A2値」とした(2分間隔で吸光度を測定して吸光度安定を確認し、次の反応を行った)。A2値測定後、Phosphoglucose Isomerase 10 µL(2 U)を添加して30 で10分間反応を行い、340 nmでの吸光度を測定して「A3値」とした。

A3値からA2値を引いた値と各濃度のフラクトース検量線を作成し、乾重あたりのフラクトース含量を計算した。

#### 【0049】

##### <試験例1> 酵素製剤の至適糖化pH範囲

まず、糖化反応に用いる稲わら粉末(品種名:コシヒカリ)に対して、アンモニア処理(アルカリ処理)を行った。

すなわち、5%(v/v)アンモニア水溶液(1 L)に稲わら粉末(50 g)を入れ、25 で7日間の静置反応後、超純水で洗浄し遠心回収(10,000 g、10分)する操作を、上清のpHが7になるまで繰り返した。

超純水による中和後の前処理後稲わらは60 、3日間乾燥させた。糖化反応には1.5 mL容のプラスチックチューブにアンモニア処理後の稲わら粉末(50 mg)とそれぞれpHの異なる50 mM緩衝液(1 mL、0.02%  $\text{NaN}_3$ )を入れ加えた。

そして、酵素製剤の糖化反応の至適pH範囲を調べるため、各pH条件下での緩衝液はグリシン緩衝液(pH 2.0、2.5、3.0、3.5及び4.0)、酢酸緩衝液(pH 4.0、4.5、5.0、5.5及び6.0)とリン酸緩衝液(pH 6.0、6.5、7.0、7.5及び8.0)を用いた。

酵素製剤としては、それぞれの緩衝液にセルラーゼ製剤(12 µL、Celluclast 1.5L、ノボザイムズ・ジャパン社)、ヘミセルラーゼ製剤(6 µL、Ultraflo L、ノボザイムズ・ジャパン社)及びβ-グルコシダーゼ製剤(4 µL、Novozyme 188、シグマ社)を添加した。

反応条件は50 サーマブロック回転機(SN-48BN、日伸理化社)中で、回転させながら24時間糖化反応を行った。反応後は一部分をサンプリングして、水で希釈後、グルコース量とキシロース量を測定して、上記測定例1に記載の方法に従ってグルカン糖化率とキシラン糖化率を計算した。結果を図1に示す。

#### 【0050】

その結果、アンモニア処理後の稲わらにおける総グルカン含量と総キシラン含量は、それぞれ39.8と17.6%を示した(未処理稲わら原料では、それぞれ31.5と14.5%であった)。

また、グルカンとキシランの糖化率は図1に示した。一般的に加水分解酵素は、至適pHが酸性側にシフトしている。しかしながら、本実験で用いた酵素製剤と使用量の酵素反応条件においては、グルカンの至適糖化pH範囲は、3.0から6.5までであった、pH3.0より低い若しくはpH6.5より高くなると急速に糖化率が減少した。一方、キシランの至適糖化pHは3.0から7.0であり、グルカンの至適糖化pHに比べて、pH7の中性付近での活性も維持されていた。

本結果から、適切な酵素製剤を利用することで、アルカリ処理を行ったバイオマスの中和反応はキシラン糖化を主目的とする場合はpH7.0以下、グルカンも主目的にする場合はpH6.5付近までで十分と考えられる。

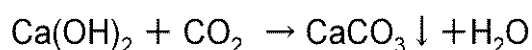
#### 【0051】

##### <試験例2> 水酸化カルシウム( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )懸濁液の二酸化炭素による中和

水酸化カルシウムは以下の反応式によって二酸化炭素で中和され、炭酸カルシウムになり沈澱する。

#### 【0052】

##### 【化1】



10

20

30

40

50



## 【0053】

そこで、二酸化炭素による水酸化カルシウムの中和効率を調べるため、100 mLの水酸化カルシウム懸濁液(1%(w/v)、13.5 mmol)を攪拌(100 rpm)しながら、二酸化炭素ガスを1分間20 mL(0.9 mmol/min)の流速で通気し、pH変化をpHメーターを用いて経時的に測定した。さらに、二酸化炭素による中和が完了し、pH 6.3に安定した30分時点で二酸化炭素通気を止め、攪拌のみでpH変化をモニタリングした。その結果を図2に示した。

その結果、18 mmolの二酸化炭素通気で中和されpH 7になり、理論値13.5 mmolにほぼ近い通気量で中和が可能であった。また、27 mmol通気することでpH 6.4まで下げることが可能であった。二酸化炭素の通気を止めるとpHの上昇(pH 7まで)が見られた。

10

## 【0054】

<実施例1> 稲わらの水酸化カルシウム処理後、開放系での二酸化炭素による中和

開放系で水酸化カルシウムを用いてアルカリ処理を行った稲わら懸濁液の二酸化炭素による中和効率を調べた。

まず、200 mL容のガラスビーカーに100 mLの水酸化カルシウム懸濁液(1%(w/v)、13.5 mmol、稲わら乾重に対して10%に相当)と稲わら粉末(品種名:コシヒカリ、10 g)を添加し、室温でスラリーが均一になるように攪拌した。そして、高温高圧滅菌機(KS-323、Tomy社)を用いて120、1時間の水酸化カルシウム処理(アルカリ処理)を行い、室温で冷却した。

20

その後、二酸化炭素ガスを1分間20 mL(0.9 mmol/min)の流速で通気し、pH変化をpHメーターを用いて経時的に測定した。さらに、二酸化炭素ガスによる中和が完了し、pH 6.76に安定した32分時点で二酸化炭素通気を止め、攪拌のみでpH変化をモニタリングした。その結果を図3に示した。

## 【0055】

図が示すように、水酸化カルシウム処理後の稲わら懸濁液は、14.3 mmolの二酸化炭素通気量で中和されてpH 7になった。これは、バイオマス原料を加えずに水酸化カルシウム懸濁液のみを中和した場合(試験例2:pH 7となる二酸化炭素添加量は18 mmol)に比べて、中和に必要な二酸化炭素の量が少なかった。

本現象は、アルカリ金属陽イオン( $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ など)が稲わらの酸性基(主にヘミセルロースのカルボキシル基( $-\text{COOH}$ )とリグニンのフェノール基)と結合し、水溶液中で存在量が減少することから起因していると考えられる。

30

また、23.1 mmol通気することでpH 6.76まで下げて安定させることが可能であり、二酸化炭素の通気を止めるとpH上昇(pH 7.22まで)が確認された。

## 【0056】

<実施例2> 稲わらの水酸化カルシウム処理後、密閉系での二酸化炭素による中和

密閉系で水酸化カルシウムを用いてアルカリ処理を行った稲わら懸濁液の二酸化炭素による中和能を調べた。

まず、10 mL容バイアル瓶(No. 3、マルエム社)に4 mLの各濃度の水酸化カルシウム懸濁液(0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0%(w/v)、稲わら乾重に対してそれぞれ、0、2、10、20、40、80%(w/w)に相当)にそれぞれ稲わら粉末(品種名:コシヒカリ、200 mg)を添加してプチルゴム栓とアルミニウムキャップを閉め、スラリーが均一になるように攪拌した。そして、高温高圧滅菌機を用いて120、1時間の水酸化カルシウム処理(アルカリ処理)を行い、室温で冷却した。

40

なお、各水酸化カルシウム処理後のpH測定は、1 mL シリンジ(SS-01T、テルモ社)と針(NN-2138R、0.80×38 mm、テルモ社)でバイアル瓶内の水酸化カルシウム処理液を50 μLサンプリングして行った。

その後、密閉系での中和は、まず、図4に示したように2本の針(NN-2138R、NN-2070C、テルモ社)を用いてバイアル瓶内の気層を、滅菌フィルター(0.45 μm)を通した二酸化炭素ガス(500 mL/min、0.15 MPa)で20秒間置換し後、アウトレ

50

ット側の針 (NN-2138R) を取り除き、インレット側の針 (NN-2070C) は液中まで入れてバイアル瓶内の二酸化炭素圧力が 0.15 MPa で 20 分間加圧する方法で行った。

二酸化炭素中和後の各中和反応液の pH 測定は、1 mL シリンジ (SS-01T) と針 (NN-2138R) でバイアル瓶内の中和反応液を 50  $\mu$ L サンプルングし、速やかに pH メーターを用いて行った。本工程は無菌的にクリーンベンチ内で行った。その結果を表 1 に示す。

【 0 0 5 7 】

【表 1】

水酸化カルシウム濃度 (% (w/w)) <sup>1</sup>	水酸化カルシウム 処理後の pH	二酸化炭素 中和後の pH
0	6.1	5.1
2	6.8	5.4
10	8.9	6.3
20	10.3	6.4
40	12.2	6.2
80	12.2	6.5

アルカリ処理条件：水酸化カルシウム、120°C、1時間

<sup>1</sup> % (w/w) = 100 × 水酸化カルシウム g / バイオマス g

10

【 0 0 5 8 】

表が示すように、水酸化カルシウム処理 (アルカリ処理) 後の pH は、水酸化カルシウム濃度の増加に従い上昇したが、二酸化炭素中和後の pH はいずれの場合も pH 6.5 以下を示した。なお、これは、開放系で中和を行った場合 (実施例 1 : 中和後 pH 6.76) に比べて低い値を示した。これは、気層の二酸化炭素分圧による反応液中の炭酸イオン濃度の増加によるものと考えられる。

試験例 1 の酵素製剤の至適 pH 範囲を考慮すると、水酸化カルシウム処理後に二酸化炭素を用いて中和する際に、密閉系において行うことで、グルカン糖化反応とキシラン糖化反応に好適な pH に調整しやすくなることが示された。

【 0 0 5 9 】

< 実施例 3 > 稲わらの水酸化カルシウム処理後、発酵槽での二酸化炭素による中和

発酵槽で水酸化カルシウムを用いてアルカリ処理を行った稲わら懸濁液について、二酸化炭素による中和能を調べた。

まず、1 L ガラス瓶に 450 mL の水酸化カルシウム懸濁液 (4%、稲わら乾重に対して 36% に相当) に稲わら粉末 (50 g) を添加し、スラリーが均一になるように攪拌した。高温高压滅菌機を用いて 120、1 時間の水酸化カルシウム処理 (アルカリ処理) を行い、室温で冷却した。

その後、1 L 発酵槽 (Bioneer-C 型、丸菱バイオエンジニアリング社、予め 121、10 分間高温加圧滅菌済) に、水酸化カルシウム処理後稲わら懸濁液を入れた。その際、1 L ガラス瓶の洗浄は 50 mL の滅菌水を用いて 2 回洗い、洗浄液は全て 1 L 発酵槽に入れた。本工程は無菌的にクリーンベンチ内で行った。その後、この懸濁液を攪拌 (400 rpm)、二酸化炭素を通気 (100 mL/min) しながら、発酵槽内の pH 変化をモニタリングした。

【 0 0 6 0 】

その結果、二酸化炭素通気 40 分後は、発酵槽内の pH が 6.1 まで落ちて、以降は pH 6.1 で安定に維持された。

試験例 1 の酵素製剤の至適 pH 範囲を考慮すると、実施例 2 の密閉系での中和例と共に、発酵槽においても、グルカン糖化反応とキシラン糖化反応に好適な pH に調整しやすくなることが示された。

【 0 0 6 1 】

< 試験例 3 > 稲わらの水酸化カルシウム処理、塩酸中和・水洗浄後の酵素糖化

20

30

40

50

## (1) 水酸化カルシウム処理、塩酸中和、水洗浄

水酸化カルシウム処理を行った稲わらの塩酸による中和・水洗浄を行った。

まず、30 mLのガラス瓶に、10 mLの各濃度の水酸化カルシウム懸濁液(0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0% (w/v)、稲わら乾重に対してそれぞれ、0、2、10、20、40、80% (w/w)に相当)と稲わら粉末(品種名:コシヒカリ、500 mg)をそれぞれ入れてスラリーが均一になるようによく攪拌した。高温高圧滅菌機を用いて120℃、1時間の水酸化カルシウム処理(アルカリ処理)を行い、室温で冷却した。

その後、塩酸(1 M)で中和を行い、さらにpHを1まで下げることで、余剰の水酸化カルシウムを塩化カルシウム化した。次いで、15 mLのプラスチックチューブに移して超純水で水洗浄し遠心回収(16,000g、10分)する工程を、上清のpHが4.5以上になるまで繰り返して行った。

そして、得られた中和・水洗浄後に回収した固形物(ペレット)を、75℃で1日間乾燥して乾燥重量を計った。

## 【0062】

## (2) 糖化反応

1.5 mLのプラスチックチューブに、前記工程を経て得た固形物(水酸化カルシウム処理後に塩酸中和し洗浄した稲わらのペレット)50 mgを量り取り、50 mMのクエン酸緩衝液(1 mL、pH 4.8、0.02%  $\text{NaN}_3$ )と、酵素製剤としてセルラーゼ製剤(12  $\mu\text{L}$ 、Celluclast 1.5 L、ノボザイムズ・ジャパン社)、ヘミセルラーゼ製剤(6  $\mu\text{L}$ 、Ultraflo L、ノボザイムズ・ジャパン社)及び $\alpha$ -グルコシダーゼ製剤(20  $\mu\text{L}$ 、Novozyme 188、シグマ社)を添加した。

酵素反応条件は50℃サーモブロック回転機(SN-48BN、日伸理化社)中で、回転させながら24時間糖化反応を行った。反応後は一部分をサンプリングして、水で希釈した後に、グルコース量とキシロース量を、測定例1に記載の方法に従って測定した。

また、稲わら原料と水酸化カルシウム処理後の稲わらについて2段階硫酸処理を行い、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率を測定例1に記載の方法に従い計算した。

その結果を表2に示した。

## 【0063】

## 【表2】

水酸化カルシウム濃度 (% (w/w)) <sup>1</sup>	乾重回収率 (%)	グルカン含量 (%)	グルカン糖化 回収率(%)	キシラン含量 (%)	キシラン糖化 回収率(%)
0	85.6	35.8	29.2	15.7	14.0
2	86.1	37.2	35.8	14.7	20.5
10	80.6	38.4	59.1	14.8	44.4
20	75.2	41.8	73.5	15.3	49.7
40	74.8	41.0	71.3	15.0	48.4
80	73.3	42.3	77.8	15.0	49.0

アルカリ処理条件: 水酸化カルシウム、120℃、1時間

<sup>1</sup> % (w/w) = 100 × 水酸化カルシウムg / バイオマスg

## 【0064】

表の結果が示すように、水酸化カルシウム処理の際に、水酸化カルシウムの濃度が増加すると共に、乾重回収率は85.6%から73.3%へ減少した。しかし、グルカン含量は35.8% (未処理の稲わら原料では31.5%)から42.3%へ、グルカン回収率は29.2%から77.8%へ、それぞれ増加する傾向を示した。

一方、グルカン含量に比べてキシラン含量は比較的一定の値(約15%)を示しており乾重回収率が減少することを考慮すると、水酸化カルシウム処理時に低分子化されたキシランが洗浄工程で流失されると考えられた。また、キシラン回収率も増加はするものの、グルカン回収率に比べて低い値(14.0%から49.0%へ)を示した。

## 【 0 0 6 5 】

<実施例 4> 稲わらの水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和後の酵素糖化

実施例 2 で調製した、各水酸化カルシウム処理後に二酸化炭素による密閉系での中和工程を行った稲わらのスラリーについて、糖化反応を行った。

すなわち、実施例 2 で調製した前記スラリーに、酵素製剤としてセルラーゼ製剤 ( 4 8  $\mu$  L、Celluclast 1.5 L、ノボザイムズ・ジャパン社)、ヘミセルラーゼ製剤 ( 2 4  $\mu$  L、Ultraflo L、ノボザイムズ・ジャパン社) 及び  $\alpha$ -グルコシダーゼ製剤 ( 8 0  $\mu$  L、Novozyme 188、シグマ社) と超純水 ( 8 4 8  $\mu$  L ) を滅菌フィルター ( 0 . 4 5  $\mu$  m ) でろ過して、1 m L シリンジ ( SS-01T、テルモ社) と針 ( NN-2138R、0.80 x 38 mm、テルモ社) で中和後のバイアル瓶 ( 実施例 2 参照) に注入した。本工程は無菌的にクリーンベンチ

10

内で行った。反応条件は 5 0 恒温槽内で回転機 ( RKVSD、ATR社) を用いて、バイアル瓶を回転させながら 2 4 時間酵素糖化反応を行った。

糖化反応後は一部分をサンプリングして、水で希釈後に、グルコース量とキシロース量を測定例 1 に記載の方法に従い測定した。また、未処理の稲わら原料について 2 段階硫酸処理を行った。そして、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率を測定例 1 に記載の方法に従い計算した。その結果を表 3 に示した。

## 【 0 0 6 6 】

【表 3】

水酸化カルシウム濃度 (% (w/w)) <sup>1</sup>	グルカン糖化回収率 (%)	キシラン糖化回収率 (%)
0	34.5	20.1
2	44.0	33.4
10	69.1	57.4
20	74.2	64.3
40	72.8	64.4
80	77.0	65.8

20

アルカリ処理条件：水酸化カルシウム、120℃、1時間

<sup>1</sup> % (w/w) = 100 × 水酸化カルシウム g / バイオマス g

30

## 【 0 0 6 7 】

表が示すように、水酸化カルシウムの濃度が増加すると共に、グルカン糖化回収率 ( 3 4 . 5 % から 7 7 . 0 % へ) は増加する傾向を示した。また、試験例 3 の塩酸中和法のグルカン糖化回収率と比較すると、0, 2, 10, 20, 40, 80 % 水酸化カルシウム濃度でより高いグルカン糖化回収率を示し、80 % の水酸化カルシウム濃度でも塩酸中和法とほぼ同一の糖化回収率を得ることが可能であった。

一方、キシラン糖化回収率も、水酸化カルシウムの濃度が増加すると共に、キシラン糖化回収率 ( 2 0 . 1 % から 6 5 . 8 % へ) が増加する傾向を示した。また、実施例 3 の塩酸中和法と比較すると、いずれの水酸化カルシウム濃度においても、塩酸中和法よりもさら

40

## 【 0 0 6 8 】

<実施例 5> 異なるアルカリを用いたアルカリ処理、二酸化炭素中和後の酵素糖化

各種アルカリ溶液で稲わらをアルカリ処理した場合における二酸化炭素中和後の酵素糖化反応を検討した。

まず、2 7 0 m M ( 稲わら乾重に対して水酸化カルシウム濃度 8 0 % に相当) の各アルカリ ( 水酸化カルシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及び水酸化マグネシウム) 溶液 ( 4 m L ) にそれぞれ稲わら粉末 ( 品種名：コシヒカリ、2 0 0 m g ) を添加した。そして、これらのアルカリ溶液を用いたこと、及び、アルカリ処理の条件を ( 1 2 0 、 2 時間) で行ったことを除いては実施例 2 に記載の方法と同様にしてアルカリ処理を行い

50

、二酸化炭素中和とpH測定を行った。そして、実施例4に記載の方法と同様に酵素糖化反応を行った。

糖化反応後は、一部分をサンプリングして、水で希釈した後に、グルコース量とキシロース量を測定例1に記載の方法に従い測定した。また、未処理の稲わら原料について2段階硫酸処理を行った。そして、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率を、測定例1に記載の方法に従い計算した。

二酸化炭素による中和後pH、グルカン糖化回収率およびキシラン糖化回収率を、表4に示した。

【0069】

【表4】

各アルカリ	二酸化炭素中和後のpH	グルカン糖化回収率(%)	キシラン糖化回収率(%)
水酸化カルシウム	6.1	75.8	68.1
水酸化カリウム	7.0	61.7	61.3
水酸化ナトリウム	7.0	51.8	47.0
水酸化マグネシウム	6.4	25.1	19.4

アルカリ処理条件：80%水酸化カルシウム(w/w)相当、120℃、2時間

【0070】

二酸化炭素中和後のpHは、いずれのアルカリ処理系においてもpH7以下を示したが、水酸化カルシウムを用いた系が一番低い値(pH6.1)を示した。

また、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率の結果から、水酸化カリウムや水酸化ナトリウムを用いたアルカリ処理系でも、二酸化炭素中和後の糖化反応は可能であることが示唆されたが、水酸化カルシウムを用いた系で一番高い値(75.8%、68.1%)になることが示された。

なお、本実施例では、アルカリ処理(水酸化カルシウム処理)を2時間行っているが、実施例4で1時間の80%水酸化カルシウム処理を行った場合(グルカン糖化回収率77.0%、キシラン糖化回収率65.8%)と比べると、処理時間による大きな回収率上昇効果は得られなかった。

【0071】

<実施例6> 異なるバイオマスの水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和後の酵素糖化バイオマス粉末各種を用いて水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和後の酵素糖化反応を行った。

まず、4mLの1%水酸化カルシウム懸濁液(各バイオマス乾重に対して20%に相当)と各バイオマス〔稲わら(品種名：コシヒカリ)、サトウキビバガス(国産製糖工場より入手)、麦わら(品種名：シルキースノウ)、ソルガムバガス(品種名：SIL-05)〕粉末(200mg)を添加し、金属製のポータブルリアクター(TYS-1型、耐圧硝子工業)で160のオイルバスで2時間水酸化カルシウム処理(アルカリ処理)を行い、室温で冷却した。

その後、処理物全量を10mL容バイアル瓶に入れ、実施例2に記載の方法と同様にして、二酸化炭素中和を行い、実施例4に記載の方法と同様にして、酵素糖化反応を行った。

糖化反応後は、一部分をサンプリングして、水で希釈後、グルコース量とキシロース量を測定例1に記載の方法に従い測定した。また、未処理の稲わら原料について2段階硫酸処理を行い、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率を測定例1に記載の方法に従い計算した。その結果を表5に示した。

【0072】

10

20

30

40

【表 5】

各バイオマス原料	グルカン含量 (%)	キシラン含量 (%)	グルカン糖化 回収率(%)	キシラン糖化 回収率(%)
稲わら	31.5	14.5	73.5	83.2
サトウキビバガス	36.8	21.9	71.7	85.2
麦わら	28.2	13.4	67.1	82.8
ソルガムバガス	32.4	17.7	72.9	87.7

アルカリ処理条件：20%水酸化カルシウム(w/w)、160°C、2時間

10

## 【0073】

表が示すように、バイオマス原料の種類によって、グルカン含量とキシラン含量の値はそれぞれ異なり、サトウキビバガスがもっとも高い値(36.8%、21.9%)を示した。グルカン糖化回収率は全てのバイオマスで約70%示した。

なお、本実施例では、水酸化カルシウム処理を160で2時間で行っているが、稲わらについて、実施例4で120で1時間の1%水酸化カルシウム(稲わら乾重に対して20%に相当)処理を行った場合(グルカン糖化回収率74.2%、キシラン糖化回収率64.3%)と比べると、グルコース糖化回収率については、温度の上昇による大きな回収率上昇効果は得られなかったものの、キシラン糖化回収率は83.2%を示し、回収率が約20%上昇した。

20

また、実施例5で示されたように、処理時間(1時間と2時間の差)が回収率に大きな影響を与えないことを鑑みると、'処理温度'は、高いキシラン回収率を要する工程において重要なファクターであると考えられた。

## 【0074】

<実施例7> 易分解性糖質を含む稲わらの水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和後の酵素糖化

## (1) 稲わら中の易分解性糖質含量、グルカン含量、キシラン含量

稲わらには、セルロースとヘミセルロース以外にも、多くの易分解性糖質(グルコース、シュクロース、フラクトース、澱粉、 $\beta$ -(1-3)、(1-4)-グルカン)が含まれている。このような易分解性糖質含量は、稲わらの品種、収穫時期及び保存方法によって異なる。稲わら中の易分解性糖質含量、グルカン含量、キシラン含量を測定例1, 2に記載の方法に従って測定した。結果を表6に示した。

30

## 【0075】

【表 6】

稲わら (品種名)	グルコース 含量(%)	フラクトース 含量(%)	シュクロー ス含量(%)	澱粉含量 (%)	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)-グルカン 含量(%)	グルカン 含量(%)	キシラン 含量(%)
コシヒカリ	0.0	0.0	0.0	2.2	0.3	31.5	14.5
リーフスター	0.8	0.9	3.5	20.8	1.5	46.2	9.2

40

## 【0076】

表が示すように、リーフスターのような品種には、特に澱粉含量が多く、シュクロースも多く含まれていた。

## 【0077】

## (2) 易分解性糖質を含む稲わらの水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和後の酵素糖化

本易分解性糖質は、従来のアルカリ処理方法では洗浄工程で流失が起こる。しかしながら、水酸化カルシウム前処理、二酸化炭素中和後の糖化では、洗浄工程を全く使わないことから流失は起こらない。

そこで、このような易分解性糖質を含む稲わらを用いて、水酸化カルシウム前処理、二

50

酸化炭素中和後の酵素糖化反応を行った。また、比較データとして水酸化カルシウム処理後、塩酸中和・水洗浄後の酵素糖化を行った。

【0078】

まず、4 mLの1%水酸化カルシウム懸濁液（稲わら乾重に対して20%に相当）に、稲わら（200 mg）を添加したバイアル瓶を2本用意した。

1本は、実施例2に記載の方法と同様にして水酸化カルシウム処理（120℃、1時間）と二酸化炭素中和を行い、実施例4に記載の方法と同様にして酵素糖化反応を行った。

他の1本は、実施例2に従って水酸化カルシウム処理（120℃、1時間）を行い、試験例3に記載の方法と同様にして塩酸中和・水洗浄を行った後、酵素糖化反応を行うことで比較対照とした。

糖化反応後は一部分をサンプリングして、水で希釈後、グルコース量とキシロース量を測定例1に記載の方法に従い測定した。また、未処理の稲わら原料について2段階硫酸処理を行い、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率を測定例1に記載の方法に従い計算した。

その結果を表7に示した。

【0079】

【表7】

稲わら (品種名)	二酸化炭素中和後の糖化		塩酸中和・水洗浄後の糖化	
	グルカン糖化 回収率(%)	キシラン糖化 回収率(%)	グルカン糖化 回収率(%)	キシラン糖化 回収率(%)
コシヒカリ	74.2	64.3	73.5	49.7
リーフスター	83.6	61.7	58.2	51.3

アルカリ処理条件：20%水酸化カルシウム(w/w)、120℃、1時間

【0080】

表が示すように、易分解性糖質を多く含むリーフスターの場合、塩酸中和・水洗浄後の糖化反応に比べて、二酸化炭素中和後の糖化反応の工程で行った方が、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率が共に高い値を示した。

この結果から、二酸化炭素中和後の糖化は、易分解性糖質を含む稲わらの糖化反応の前処理工程として適していることが示された。

なお、酵素製剤として澱粉分解酵素を添加していないにもかかわらず、リーフスターの澱粉が分解されたのは、 $\alpha$ -グルコシダーゼ製剤（Novozyme 188、シグマ社）として添加した酵素製剤に強い澱粉分解酵素活性が存在するためと考えられる。

【0081】

(3) 水酸化カルシウム前処理後、塩酸中和・水洗浄時に流失されるシュークロースと澱粉量の測定

また、水酸化カルシウム前処理後、塩酸中和・水洗浄時に流失されるシュークロースと澱粉量を測定した。

まず、水酸化カルシウム処理後、塩酸で中和を行った上清を遠心分離（16,000 g、10分）により回収し、上清4 mL中のシュークロース量と澱粉量を測定して、未処理の稲わら原料の乾重あたりに対する含量（%）を計算した。その結果を表8に示した。なお、流失した各易分解性糖質含量は、アルカリ処理前の稲わら乾重あたりに対する値を示す。

【0082】

10

20

30

40

【表 8】

稲わら (品種名)	シュークロース 含量(%)	澱粉含量 (%)
コシヒカリ	0.0	0.7
リーフスター	3.3	4.8

## 【0083】

その結果、リーフスターの水酸化カルシウム前処理を行った上清には、3.3%のシュークロースと4.8%の澱粉が存在していた。このシュークロース量は水酸化カルシウム処理前のリーフスターの全シュークロース含量に匹敵するものであった。すなわち、洗浄工程を繰り返すことで、シュークロースは完全に流失されることが示された。

また、澱粉も全澱粉の約20%が流失されており、熱処理で糊化される澱粉の性質を考慮すると洗浄工程を繰り返すことでより多くの澱粉が流失されることが予測された。

これらのことから、水酸化カルシウム処理後に洗浄を行うことなく、二酸化炭素中和後に糖化する方法が、糖化反応前に行う前処理法として適していると考えられた。

なお、リーフスターでは、120℃、1時間の過酷な水酸化カルシウム処理後でも3.3%のシュークロースが存在していた。

## 【0084】

<実施例 8> サトウキビの水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和後の酵素糖化

4 mLの1%水酸化カルシウム懸濁液(サトウキビ乾重に対して20%に相当)に、収穫後、60℃で乾燥し、粉碎したサトウキビ粉末(品種名:Nif8、200 mg)を添加したバイアル瓶を2本用意した。

1本は実施例2に記載の方法と同様にして、水酸化カルシウム処理(120℃、1時間)と二酸化炭素中和を行い、実施例4に記載の方法と同様にして、酵素糖化反応を行った。

他の1本は実施例2に記載の方法と同様にして、水酸化カルシウム処理(120℃、1時間)を行い、その後、試験例3に記載の方法と同様にして、塩酸中和・水洗浄を行い、酵素糖化反応を行い、比較対照とした。

糖化反応後は、一部分をサンプリングして、水で希釈後、グルコース量、キシロース量及びフラクトースを測定例1に記載の方法に従い測定した。

また、シュークロース含量について、'未処理のサトウキビ原料'と、'水酸化カルシウム処理を行わずに水洗浄を行ってシュークロースを除去して乾燥させたサトウキビ'を用いて2段階硫酸処理を行い、測定例1に記載の方法に従いシュークロース含量を測定した。

また、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率を測定例1に記載の方法に従い計算した。ただし、式1のグルコース量は2段階硫酸処理で得られるグルコース量にシュークロース含量をグルコースに換算して加えて計算した。式3の酵素糖化グルコース量も酵素糖化反応で生じるフラクトースをグルコースと同量と換算して加えて計算した。

その結果を表9に示した。

## 【0085】

【表 9】

サトウキビ (品種名)	二酸化炭素中和後の糖化		塩酸中和・水洗浄後の糖化	
	グルカン糖化 回収率(%)	キシラン糖化 回収率(%)	グルカン糖化 回収率(%)	キシラン糖化 回収率(%)
Nif8	84.8	51.7	27.5	56.5

アルカリ処理条件: 20%水酸化カルシウム(w/w)、120℃、1時間

## 【0086】

10

20

30

40

50



表が示すように、シュークロース（乾重当たり15.6%）を含むサトウキビの水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和後の糖化によるグルカン糖化回収率は84.8%であった。これは、塩酸中和・水洗浄後に糖化する方法に比べて、3倍以上の糖化回収率であった。

本結果は、水酸化カルシウム処理によって稲わらに含まれるシュークロースが分解されないことが示された実施例7の結果と一致しており、サトウキビのようにシュークロースを多く含むバイオマスに対しても、水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和後に糖化することが有効であることが示された。

#### 【0087】

<実施例9> 稲わらの水酸化カルシウム保存、二酸化炭素中和後の酵素糖化

稲わらに対して水酸化カルシウムと水を添加して30℃で保存し、適宜、追加的に加熱処理を行い、稲わら保存処理懸濁液の二酸化炭素中和後の酵素糖化能を調べた。

すなわち、10mL容バイアル瓶に稲わら200mg、水酸化カルシウム40mgおよび水4mLを加えて、実施例2に従い閉栓・攪拌して調製したスラリーに対して、熱処理を行う前に、30℃で3日又は6日間の静置保存処理を行った。その後、3日又は6日間保存処理を行ったスラリー入りのバイアル瓶を30℃、60℃、90℃、120℃、150℃でそれぞれ1時間熱処理を行い、室温で冷却することで水酸化カルシウム処理を行い、実施例2に記載の方法と同様にして二酸化炭素中和とpH測定を行った。そして、実施例4に記載の方法と同様にして酵素糖化反応を行った。

糖化反応後は、一部分をサンプリングして、水で希釈後に、グルコース量とキシロース量を測定例1に記載の方法に従い測定した。また、未処理の稲わら原料について2段階硫酸処理を行った。そして、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率を測定例1に記載の方法に従い計算した。その結果を表10に示した。

#### 【0088】

##### 【表10】

熱処理(1時間) 温度(℃)	3日間保存処理		6日間保存処理	
	グルカン糖化 回収率(%)	キシラン糖化 回収率(%)	グルカン糖化 回収率(%)	キシラン糖化 回収率(%)
30	66.4	66.2	76.0	65.2
60	72.2	64.4	75.9	63.3
90	75.0	66.4	75.0	64.1
120	71.7	64.0	71.1	63.0
150	64.0	62.6	70.8	63.5

アルカリ処理条件: 20%水酸化カルシウム(水酸化カルシウムw/稲わらw)相当

#### 【0089】

表が示すように、水酸化カルシウム中で長期保存を行うことによって、実施例4の高温高圧処理による水酸化カルシウム処理の結果とほぼ同じ程度の回収率が得られることが示された。

また、長期保存後においては、熱処理の有無によって回収率に大きな差が生じないことが示された。

#### 【0090】

<実施例10> 二酸化炭素中和前と中和後のスラリーの磨砕が糖化効率に及ぼす影響

二酸化炭素中和前と中和後のスラリーに対して、磨砕を行い、糖化に及ぼす影響を調べた。

まず、3本の50mL容バイアル瓶（マルエム社）にそれぞれ稲わら粉末（品種名：コシヒカリ、4g）と水酸化カルシウム（800mg）と水（40mL）を添加してブチルゴム栓とアルミニウムキャップを閉め、スラリーが均一になるように攪拌した（20%水酸化カルシウム(w/w、水酸化カルシウムg/稲わらg)相当）。1本は水酸化カルシウム処

理サンプルとして高温高圧滅菌機を用いて120℃、1時間の水酸化カルシウム処理を行い、室温で冷却した。他の2本は、水酸化カルシウム中において30℃で3日又は6日間の静置保存による水酸化カルシウム処理を行った。

【0091】

その後、‘高温高圧処理(120℃、1時間)後のスラリー’と、‘3日間の水酸化カルシウム保存処理後のスラリー’は、グラインダーミル(マイクロ・パウダー、ウエスト社)を用いて5回の磨砕処理を行い、稲わら粉末が200mg、水が4mLになるように調整して10mL容バイアル瓶に添加した。その後、このバイアル瓶に対して、実施例2に記載の方法と同様にして二酸化炭素中和とpH測定を行った。そして、実施例4に記載の方法と同様にして酵素糖化反応を行った。

10

また、‘6日間の水酸化カルシウム保存処理後のスラリー’は、実施例2に記載の方法と同様にして二酸化炭素中和とpH測定を行った後、グラインダーミルで5回磨砕し、稲わら粉末が200mg、水が4mLになるように調整して10mL容バイアル瓶に添加した。そして、抗生物質であるハイグロマイシンB(H772-1G、シグマ社、2.5mg)を添加したことを除いては、実施例4に記載の方法と同様にして酵素糖化反応を行った。

糖化反応後は、一部分をサンプリングして、水で希釈後に、グルコース量とキシロース量を測定例1に記載の方法に従い測定した。また、未処理の稲わら原料について2段階硫酸処理を行った。そして、グルカン糖化回収率とキシラン糖化回収率を測定例1に記載の方法に従い計算した。その結果を表11に示した。

【0092】

20

【表11】

水酸化カルシウム処理	水酸化カルシウム処理後の工程	グルカン糖化回収率(%)	キシラン糖化回収率(%)
高温高圧処理	磨砕→中和→糖化	83.7	70.4
3日間保存処理	磨砕→中和→糖化	85.3	73.1
6日間保存処理	中和→磨砕→糖化	86.3	72.6

20%水酸化カルシウム(w/w、水酸化カルシウムg/稲わらg)相当

【0093】

30

表が示すように、各磨砕サンプルは、同一濃度の水酸化カルシウムの反応条件で磨砕を行わなかったサンプル(実施例4)と比較すると、いずれの場合においてもグルカン・キシラン糖化回収率が向上することが示された。具体的には、グルカン糖化回収率は最大10%向上することが示され、キシラン糖化回収率は最大8%向上することが示された。

【0094】

<実施例11> 稲わらの水酸化カルシウム処理、二酸化炭素中和後の並行複発酵

稲わらの水酸化カルシウム処理を行い、1L発酵槽を用いて二酸化炭素中和を行ったスラリーを基質とするエタノール並行複発酵(酵素糖化とエタノール発酵を同時に行う発酵法)を行った。

なお、本実施例では、セルラーゼ製剤、ヘミセルラーゼ製剤、及びβ-グルコシダーゼ製剤を用いた酵素系において、エタノール発酵微生物としてはグルカンを目的とする*Saccharomyces cerevisiae* NBRC0224とキシランを目的とする*Pichia stipitis* NBRC10063を用いて、並行複発酵を行った。

40

【0095】

まず、実施例3に記載の方法と同様にして、稲わら粉末の水酸化カルシウム処理(4%、120℃、1時間)後、二酸化炭素による中和を行った1L発酵槽(Bioneer-C型、丸菱バイオエンジニアリング社)を準備した。

そこに、セルラーゼ製剤(12mL、Celluclast 1.5 L、ノボザイムズ・ジャパン社)、ヘミセルラーゼ製剤(6mL、Ultraflo L、ノボザイムズ・ジャパン社)及びβ-グルコシダーゼ製剤(16mL、Novozyme 188、シグマ社)と超純水(66mL)を滅菌フィ

50

ルター (0.45 μm) でろ過して無菌的に添加した。

その後、50 mL の *S. cerevisiae* の懸濁液 [YPD 培地、30、16 時間の前培養を行い、遠心 (5000 g、10 分) して菌体を回収し、滅菌生理食塩水で 2 回洗浄・遠心して並行複発酵時の初発は O.D.<sub>600nm</sub> が 2 になるように調整したもの] を、無菌的に発酵槽に接種した。

接種後は二酸化炭素通気を止め、200 rpm で回転させながら 30 で並行複発酵 (糖化反応とグルカン由来のエタノール発酵) を行った。

また、接種後は発酵槽の一部を無菌的にサンプリングして発酵槽内のグルコース、キシロース、エタノール濃度を測定した。エタノールの定量は、サンプル液をフィルター濾過 (0.45 μm) し、HPLC (LC-20AD、SIL-20AC、CTO-20AC、RID-10A、島津社) と Am  
inexR HPX-87H カラム (300 mm × 7.8 mm、Bio-Rad 社) を用いて行った。 10

#### 【0096】

グルカン由来のエタノール生産がプラトーになった時点 (培養 24 時間目) で、50 mL の *P. stipitis* の懸濁液 [YPX 培地、30、16 時間の前培養を行い、遠心 (5000 g、10 分) して菌体を回収し、滅菌生理食塩水で 2 回洗浄・遠心して並行複発酵時の初発は O.D.<sub>600nm</sub> が 2 になるように調整したもの] を、無菌的に発酵槽に接種した。

接種後は空気を通気 (5 mL/min)、回転 (200 rpm) させながら 30 で並行複発酵 (糖化反応とキシラン由来のエタノール発酵) を行った。

また、接種後は発酵槽の一部を無菌的にサンプリングして発酵槽内のグルコース、キシロース及びエタノール濃度を測定した。 20

並行複発酵開始から、22 時間目までの *S. cerevisiae* によるグルカンのエタノール変換率、22 時間以降の *P. stipitis* によるキシランのエタノール変換率、及び全エタノールの変換率を、2 段階硫酸処理法と以下の式 8、9 及び 10 によってそれぞれ計算した。その結果を図 5 に示した。なお、発酵槽内の遊離グルコース量とキシロース量の経時変化も図 6 に示した。

#### 【0097】

〔式 8〕

グルカンのエタノール変換率 (%) =  
100 × (*S. cerevisiae* のエタノール生産量) / (0.511 × 未処理稲わら原料のグルカン量 / 0.9)  
) 30

〔式 9〕

キシランのエタノール変換率 (%) =  
100 × (*P. stipitis* のエタノール量) / (0.511 × 未処理稲わら原料のキシラン量 / 0.88)

〔式 10〕

全エタノール変換率 (%) =  
100 × (発酵槽のエタノール量) / {0.511 × (未処理稲わら原料のグルカン量 / 0.9 + 未処理稲わら原料のキシラン量 / 0.88)}

#### 【0098】

その結果、培養 16 時間以降はグルカン由来のエタノール生産が緩やかになり、22 時間までは *S. cerevisiae* によるグルカンのエタノール変換率 (%) は 73% であった。また、培養槽中のグルコースは、*S. cerevisiae* の培養後すぐに降検出されなくなった。 40

なお、実施例 4 に示されるように、本実施例と同様の条件の水酸化カルシウム処理 (4%、120、1 時間) 後に糖化反応を行ったグルカン糖化率は、77% であった。このことを考慮すると、二酸化炭素による中和工程で生じる炭酸カルシウムは並行複発酵時、酵素反応及び酵母の生育には影響を与えないことが示唆された。

一方、キシロースは *P. stipitis* 接種前 (並行複発酵開始後 22 時間) までは発酵槽内の濃度が増加し続けていたが、*P. stipitis* 接種後、減少しはじめて並行複発酵開始後 67 時間目以降は検出されなかった。*P. stipitis* を接種してから並行複発酵開始後 55 時間目までのエタノール生産を、キシラン由来エタノールとすると、キシランのエタノール変換率は 44.8% であった。 50

そして、並行複発酵開始から並行複発酵開始後55時間目までの‘全アルコール変換率’は66%であった。

【0099】

<実施例12> 発酵残渣からの水酸化カルシウム回収

実施例11において、並行複発酵後の発酵残渣（稲わら）を遠心（80,000g、20分）によって回収した。回収後、65℃で2日間乾燥させ乾燥重量を測定した。

その乾燥発酵残渣1gを量り取り、るつぼに入れ、1000℃のマッフル炉（FB-1314M、Barnsteadthermolyne社）で1時間処理を行った。一時間後、るつぼを室温で冷却して水酸化カルシウム由来の酸化カルシウム（CaO）と稲わら由来の灰の量を測定した。測定後は、燃焼産物を100mLの超純水に入れて攪拌し、pHを測定しながら、5M塩酸と0.1M塩酸を用いてpH7までの中和適定を行った。すなわち、燃焼産物中の酸化カルシウムが水と反応して水酸化カルシウムとなり、その中和に必要な塩酸を定量して水酸化カルシウム量に換算し、水酸化カルシウムの回収率を求めた。

10

【0100】

その結果、発酵残渣の乾燥重量は42.8gであった。1000℃燃焼後（乾燥残渣1g）、49%の重量減少がおり、乾燥重量の51%が酸化カルシウムと稲わらの灰であると考えられた。さらに、この燃焼産物の中和反応に必要な塩酸量は7.7mmolであることから3.85mmol（0.285g）の水酸化カルシウムが本工程で回収された計算となる。アルカリ処理に用いた水酸化カルシウム（20g）からは、61.1%（12.2g）の水酸化カルシウムの回収が可能であることが示された。

20

【0101】

<実施例13> 発酵残渣からのリン酸の回収

実施例12において回収された燃焼産物を、改良モリブデンブルー法を用いてリン酸（ $\text{PO}_4^{3-}$ ）の定量を行った。燃焼物50mgに対して、1M/L硫酸溶液1.2mlを加えて5分間超音波処理を行い、さらに5分間ボルテックスしてリン酸を抽出した。混合溶液の遠心分離後上清をサンプルとして用いた。標準溶液にはリン酸二水素カリウムの0、10、25、50ppm溶液を調製し使用した。

サンプルまたは標準溶液と発色試薬を混合後、880nmの吸光度を測定することによりリン酸（ $\text{PO}_4^{3-}$ ）の濃度を算出した。

【0102】

30

その結果、発酵残渣の乾燥重量は42.8gの燃焼産物から、1.6g（燃焼産物中の7.2%相当）のリン酸（ $\text{PO}_4^{3-}$ ）の回収可能であることが示された。

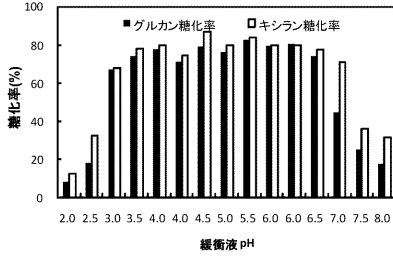
【産業上の利用可能性】

【0103】

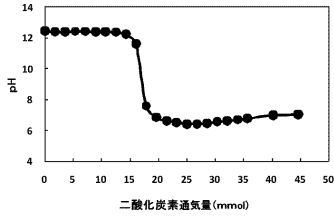
本発明は、リグノセルロース系バイオマス原料（易分解性糖質を含有するリグノセルロース系バイオマス原料を含む）の効率的な糖化技術の開発に関するものであり、バイオエタノール製造技術の開発、バイオリファイナリー技術の開発に繋がることが期待される。

特に、我が国で喫緊の課題となっている、国産バイオエタノール生産技術開発に新機軸を提供するものとして、極めて重要性が高い。

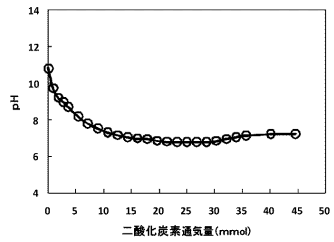
【 図 1 】



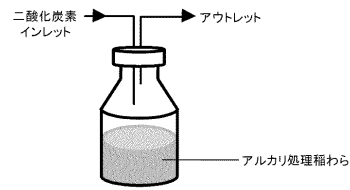
【 図 2 】



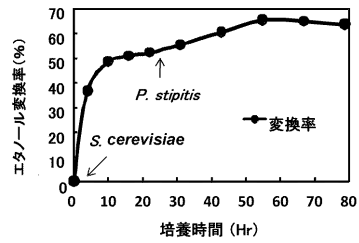
【 図 3 】



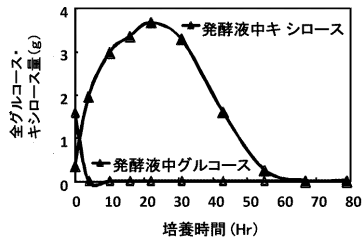
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## フロントページの続き

(72)発明者 城間 力  
茨城県つくば市観音台2 - 1 - 12 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合  
研究所内

(72)発明者 ムハマド イムラン アルハック  
茨城県つくば市観音台2 - 1 - 12 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研  
究所内

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 特開2009-089662(JP,A)  
特開2006-088136(JP,A)  
特表平11-506934(JP,A)  
特表2007-532587(JP,A)  
特表2008-506370(JP,A)  
日本農芸化学会大会講演要旨集, 2009.03, Vol.2009, p.338  
日本農芸化学会大会講演要旨集, 2009.03, Vol.2009, p.335  
水環境学会誌, 2004, Vol.27, No.3, p.181-187  
Bioresour. Technol., 2006, Vol.97, p.583-591

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 19/00 - 19/64

C12P 7/00 - 7/66

C13K 1/00 - 1/10

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

WPIDS/WPIX(STN)