

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5825690号
(P5825690)

(45) 発行日 平成27年12月2日 (2015. 12. 2)

(24) 登録日 平成27年10月23日 (2015. 10. 23)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	1/20	(2006. 01)	C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 P	7/56	(2006. 01)	C 1 2 P 7/56
C 1 2 P	7/16	(2006. 01)	C 1 2 P 7/16
C 1 2 P	13/04	(2006. 01)	C 1 2 P 13/04
A 2 3 L	1/03	(2006. 01)	A 2 3 L 1/03

請求項の数 11 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-241175 (P2013-241175)	(73) 特許権者	501174550
(22) 出願日	平成25年11月21日 (2013. 11. 21)		国立研究開発法人国際農林水産業研究センター
(65) 公開番号	特開2015-100283 (P2015-100283A)		茨城県つくば市大わし1-1
(43) 公開日	平成27年6月4日 (2015. 6. 4)	(74) 代理人	100106909
審査請求日	平成27年6月10日 (2015. 6. 10)		弁理士 棚井 澄雄
早期審査対象出願		(74) 代理人	100188558
			弁理士 飯田 雅人
		(74) 代理人	100153763
			弁理士 加藤 広之
		(74) 代理人	100148884
			弁理士 ▲廣▼保 直純
		(72) 発明者	小杉 昭彦
			茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政 法人国際農林水産業研究センター内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 樹液の調製方法、微生物の培養方法、有用物質の生産方法及び樹液成分の活用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オイルパーム幹及び/又は葉柄から得られる樹液を活性炭で濾過し、または当該樹液に活性炭を添加し、あるいは、当該樹液に凝集剤を添加し、凝集物を生成させ、当該樹液に含まれる微生物発酵阻害物質を、不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有することを特徴とする樹液の調製方法。

【請求項 2】

前記微生物発酵阻害物質がフェノール性物質又はフェノール性物質を含む物質である請求項1に記載の樹液の調製方法。

【請求項 3】

前記活性炭は、オイルパーム残渣から得られた繊維質を原料とし調製された活性炭である請求項1又は2に記載の樹液の調製方法。

【請求項 4】

請求項1から3のいずれか1項に記載の樹液の調製方法で調製された樹液を用いて、微生物を培養させることを特徴とする微生物の培養方法。

【請求項 5】

請求項1から3のいずれか1項に記載の樹液の調製方法で調製された樹液を用いて、微生物を培養して前記微生物により有用物質を生産させることを特徴とする有用物質の生産方法。

【請求項 6】

前記微生物は乳酸菌であり、前記有用物質は乳酸である請求項 5 に記載の有用物質の生産方法。

【請求項 7】

前記微生物は生分解性バイオポリマー生産菌であり、前記有用物質は生分解性バイオポリマーである請求項 5 に記載の有用物質の生産方法。

【請求項 8】

前記微生物はブタノール生産菌であり、前記有用物質はブタノールを主体とするアルコール類である請求項 5 に記載の有用物質の生産方法。

【請求項 9】

前記微生物はアミノ酸生産菌であり、前記有用物質は L - 又は D - アミノ酸を主体とするアミノ酸類である請求項 5 に記載の有用物質の生産方法。

10

【請求項 10】

請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の樹液の調製方法により不活化及び / 又は除去された発酵阻害物質を回収し、燃料、燃料補助成分、飲食料品素材、飲食料品補助剤、樹脂加工原料、樹脂加工材料、土壌改良素材又は肥料成分として利用することを特徴とする樹液成分の活用方法。

【請求項 11】

請求項 4 に記載の微生物の培養方法により培養された微生物を含む発酵阻害物質を回収し、燃料及び燃料補助成分、飲食料品素材及び補助剤、樹脂加工原料及び材料、土壌改良素材及び肥料成分として利用することを特徴とする樹液成分の活用方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、樹液の調製方法、微生物の培養方法、有用物質の生産方法及び樹液成分の活用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

パーム油は、世界で約 3,550 万トン / 年生産され、そのうちの約 87% をマレーシアとインドネシアの 2 カ国で半々を占める東南アジアの代表的な農産物である (2005 年実績、アメリカ農務省統計資料による)。パーム油は大豆油等と比較し安価であることから、マーガリンや揚げ物用の油など食用に利用されるほか石鹸や化粧品など工業用途にも多用されている。

30

【0003】

パーム油生産のために栽培されるオイルパーム (oil palm、学名: *Elaeis guineensis*、和名: アブラヤシ) は、生産性を維持するために、20~25 年の間隔で再植栽培が必要とされる。マレーシアの場合、1980 年からの本格的なプランテーションにより現在年間約 4 万ヘクタールの再植栽培が行われるため約 3000 万トンのパーム幹が伐採されている。近い将来には、これまでのプランテーション面積拡大の結果として、毎年約 20 万~25 万ヘクタールもの再植栽培が必要になると見込まれている。再植栽培による伐採オイルパームは、幹に薬物を注入して立ち枯れさせるか、伐採後プランテーション内で放置又は焼却処分しており、深刻な環境破壊につながる懸念され、環境負荷を掛けない活用法の開発が求められている。

40

【0004】

オイルパーム幹は他の木質系バイオマスと異なり、幹の大部分が維管束や維管束を取り巻く繊維質で構成されている。そのため、木材としての耐久性が不十分で、利用方法としては比較的強固な外皮を合板等の表面加工資材として利用する程度であり、その他の部分は未利用、廃棄されていることから、特に幹の内側部分の早急な有効活用法の開発が必要である。

【0005】

50

一方、近年、石油資源の枯渇や地球温暖化問題の軽減方策として燃料用エタノールなど石油代替エネルギーや乳酸などバイオプラスチック原料の製造技術の開発が活発に行われている。特に燃料用エタノールに関しては、自動車燃料であるガソリンの代替燃料として注目を集めており、その需要は非常に大きい。

しかしながら、現在、燃料用エタノールの多くはトウモロコシ澱粉やサトウキビ汁等の食用農産物から製造されており、将来の人口増に伴う食用農産物需要の増大などにより、食用途とエネルギー用途間での競合が生じることが予想されている。そのため農作物の未利用部分、即ち、農産廃棄物から燃料用エタノールなどへの変換技術の開発が切望されているが、未だ技術開発は困難を極めている状況である。伐採されるオイルパーム幹は、産出される量、持続的なオイルパーム産業の発展及び環境負荷低減の観点からも非常に有望なバイオマス資源である。

10

【0006】

このような背景から、特許文献1には、オイルパーム幹搾汁液における微生物発酵又は/及び搾汁後の残渣繊維を酵素で加水分解し、得られた加水分解物を共に微生物で発酵させる工程を含むエタノール及び乳酸の製造方法が記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特許第4065960号公報

【特許文献2】再公表WO2012/137636号公報

20

【特許文献3】特許第4665257号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Akihiko Kosugi, Ryohei Tanaka, Kengo Magara, Yoshinori Murata¹, Takamitsu Arai¹, Othman Sulaiman, Rokiah Hashim, Zubaidah Aimi Abdul Hamid, Mohd Khairul Azri Yahya, Mohd Nor Mohd Yusof, Wan Asma Ibrahim, Yutaka Mori, Ethanol and lactic acid production using sap squeezed from old oil palm trunks felled for replanting. Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume 110, Issue 3, September 2010, P322-325.

30

【非特許文献2】Mior Ahmad Khusairi Mohd Zahari, Mohd Rafein Zakaria, Hidayah Ariffin, Mohd Noriznan Mokhtar, Jailani Salihon, Yoshihito Shirai, Mohd Ali Hassan, Renewable sugars from oil palm frond juice as an alternative novel fermentation feedstock for value-added products. Bioresource Technology, Volume 110, April 2012, P566-571.

40

【非特許文献3】Faustino, Nuno Gil, Ceclia Baptista, Ana Paula Duarte, Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. Molecules 2010, 15(12), 9308-9322.

【非特許文献4】Julian Velez, Mark C. Thies. Solvated liquid-lignin fractions from a Kra

50

ft black liquor. Bioresource Technology, Vol 148, Nov 2013, P586v Te

【非特許文献5】Schmidt CG, Gonmalves LM, Prietto L, Hackbart HS, Furlong EB, Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. Food Chem. 2014, 146:371-377.

【非特許文献6】Sumangala Bhattacharya, Kathrine Bisgaard Christensen, Louise Cathrine Braun Olsen, Lars Porskj O Christensen, Kai Grevsen, Nils Joakim Fakim F, Karsten Kristiansen, Jette Feveile Young, and Niels Oksbjerg. Bioactive components from flowers of *Sambucus nigra* L. increase glucose uptake in primary porcine myotube cultures and reduce fat accumulation in *Caenorhabditis elegans*. J Agric Food Chem. 2013 Oct 24. DOI: 10.1021/jf402838a.

【非特許文献7】茶ポリフェノール含有有機肥料製造技術日食 1995/11/15 日付 07959 号 02面 A

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

天然優良培地として認知されているオイルパーム幹より得られた樹液は、酵母を利用したエタノール発酵ではエタノールの生産が可能である。

一方で、本発明者らは、オイルパーム幹より得られた樹液を原料とした培地で細菌類等の微生物を使用した発酵をするにあたり、生産不良や発酵機能低下が起こるといった課題に直面した。

【0010】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、オイルパーム幹より得られた樹液を原料とした微生物の培養に適した培地に好適に用いることができる樹液の調製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】

【0011】

本発明の第一の態様は、オイルパーム幹及び/又は葉柄から得られる樹液に含まれる微生物発酵阻害物質を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有することを特徴とする樹液の調製方法である。

本発明の第二の態様は、オイルパーム幹及び/又は葉柄から得られる樹液のpHを調整し、前記微生物発酵阻害物質を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有することを特徴とする樹液の調製方法である。

本発明の第三の態様は、オイルパーム幹及び/又は葉柄から得られる樹液を活性炭で濾過、または活性炭を添加することを特徴とする樹液の調製方法である。

本発明の第四の態様は、オイルパーム幹及び/又は葉柄から得られる樹液に凝集剤を添加し、前記微生物発酵阻害物質を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有する樹液の調製方法である。

本発明の第五の態様は、オイルパーム幹及び/又は葉柄から得られる樹液から高分子化合物を除去することを特徴とする樹液の調製方法である。

本発明の第六の態様は、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液を加熱し、前記微生物発酵阻害物質を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有することを特徴とする樹液の調製方法である。

本発明の第七の態様は、前記第一～第六の態様の調製方法で調製された樹液を用いて、微生物を培養することを特徴とする微生物の培養方法である。

本発明の第八の態様は、前記第一～第六の態様の調製方法で調製された樹液を用いて、微生物を培養して前記微生物により有用物質を生産させることを特徴とする有用物質の生産方法である。

本発明の第八の態様は、前記第一～第六の態様の調製方法により不活化及びノ又は除去された発酵阻害物質を回収し、肥料及びノ又は燃料として加工利用することを特徴とする樹液成分の活用方法である。

10

本発明の第九の態様は、前記第七の態様の微生物の培養方法により培養された微生物を含む発酵阻害物質を回収し、燃料及び燃料補助成分、飲食料品素材及び補助剤、樹脂加工原料及び材料、土壌改良素材及び肥料成分として利用することを特徴とする樹液成分の活用方法である。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、オイルパーム幹より得られた樹液を原料とした微生物の培養に適した培地に好適に用いることができる樹液の調製方法を提供することができる。

また本発明によれば、従来廃棄物としてしか扱われなかった伐採オイルパーム幹の樹皮以外の組成物を原材料とし、微生物培養に適した培地を提供できるばかりでなく、伐採オイルパーム幹に対する資源価値を高め、持続的なオイルパーム産業の確立と環境負荷の低減化が可能となる。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】弱アルカリpH9.0処理 - 樹液から得られた沈殿物を示す図。

【図2】活性炭処理樹液に利用した活性炭を示す図。

【図3】本発明による樹液利用及び樹液から得られた微生物発酵阻害物質利用のフローを示す図。

【発明を実施するための形態】

30

【0014】

樹液の調製方法

以下、本発明の樹液の調製方法を実施するための好ましい形態について説明する。

[第一実施形態]

本実施形態の樹液の調製方法は、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液に含まれる微生物発酵阻害物質を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有することを特徴とする樹液の調製方法である。

【0015】

なお、本明細書でいうオイルパーム幹とは、オイルパーム、サゴヤシ、ココヤシ又はニッパヤシ等の果実生産性が落ちたパーム幹又は20年以上経過したパーム幹、さらには伐採予定のパーム幹を原料とするほか、再植栽培や計画的な栽培のために伐採されるパーム幹又は病害虫により伐採を余儀なくされる樹齢の若いパーム幹でもよく、さらには合板用途等に使用され樹皮を剥かれたパーム幹のような、伐採後も樹液の採取可能なパーム幹であれば何れでも構わない。また本明細書でいう葉柄は上記、オイルパーム幹の果実又は果房及び幹中の樹液採取時に、鎌等で刈り取られる葉柄のことで有る。時にオイルパーム幹の伐採時に幹付着している部分でも利用可能である。

40

【0016】

オイルパーム幹及びノ又は葉柄から樹液などの組成物(以下、「樹液」と記載することがある。)を採取する手法として、物理的な圧搾、粉碎、乾燥、及び遠心分離、水蒸気を

50

伴う加熱、加水、有機溶媒による抽出法を使用することができる。一例を挙げれば、特許文献3に記載されている方法でも搾汁を行うことが可能である。また化学的な処理を施し、樹液を採取し易くしてもよい。特に、伐採オイルパーム幹を粉碎後、物理的に圧搾して樹液や繊維を得るのが好ましいが、採取可能であれば何れの方法を採用しても構わない。

【0017】

本実施形態において、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液に含まれる微生物発酵阻害物質を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有する。微生物発酵阻害物質は、微生物を培養することによって有用物質を生産させる発酵過程において、微生物の生育を阻害したり、物質生産効率を低下させたりする物質を意味する。微生物発酵阻害物質としては、例えば、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液に圧搾直後から含まれている発酵阻害物質や、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から樹液などの組成物を採取する過程において生じる発酵阻害物質が挙げられる。

10

【0018】

本実施形態においては、微生物発酵阻害物質としてフェノール性物質又は、フェノール性物質を含む物質(以下、「フェノール等」と記載することがある。)が挙げられる。本実施形態においては、フェノール等は、樹液中のフェノール性物質であれば特に限定されず、1価フェノール(クレゾール、サリチル酸、ピクリン酸、ナフトール等)、2価フェノール(カテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン等)、3価フェノール(ピロガロール、フロログルシノール等)、6価フェノール(ヘキサヒドロキシベンゼン等)が挙げられる。またフェノールとして代表的なベンゼン環以外にナフタレン環、アントラセン環のような芳香環化合物も含まれる。さらに芳香環に水酸基、カルボン酸基等が結合した化合物群のことを指す場合も挙げられる。例えば、パニリン酸、ヒドロキシ安息香酸やジメトキシ安息香酸のような安息香酸類、シリング酸、クマル酸、フェルラ酸等が挙げられる。

20

また、本実施形態においては、樹液中の総フェノール以外にも、有用物質の生産性を阻害すると思われる他の物質を除去してもよい。

【0019】

本実施形態において、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液に含まれる微生物発酵阻害物質を不活化、分離又は除去する方法としては、特に限定されないが、樹液のpHを調整し、沈殿物を生成させ、前記微生物発酵阻害物質を不活化、分離又は除去する方法、樹液を活性炭で濾過、または活性炭を添加する方法、樹液に凝集剤を添加し、凝集物を生成させ、前記微生物発酵阻害物質を不活化、分離又は除去する方法、樹液から高分子化合物を不活化、分離又は除去する方法、膜ろ過法、吸着剤を用いた方法等の処理方法、オートクレーブのような加熱滅菌による発酵阻害物質の不活化、分離又は除去する方法等の処理方法等が挙げられ、これらの方法を単独で用いてもよく、1種又は2種以上を組み合わせ併用させてもよい。

30

【0020】

本実施形態において、樹液中の微生物発酵阻害物質を不活化、分離又は除去するとは、例えば、微生物発酵阻害物質がフェノール等である場合には、Folin-Ciocalteu法等によって、樹液中の総フェノール量を測定した場合に、上記に記載したような処理方法を行う前後で樹液中の総フェノール濃度を低下させることをいう。

40

本実施形態において、樹液中の総フェノール濃度は上記に記載したような処理方法を行う前後で40~100質量%低下させることが好ましく、45~95質量%低下させることがより好ましい。

【0021】

[第二実施形態]

本実施形態の樹液の調製方法は、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液のpHを調整し、沈殿物を生成させ、前記微生物発酵阻害物質を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有する樹液の調製方法である。

50

採取後の樹液のpHは約5.0～6.5付近であるが、樹液のpHを調整することにより、凝集作用が起こり、樹液中の微生物発酵阻害物質を沈降分離して沈殿物を生成させることができる。

樹液中の微生物発酵阻害物質を沈殿させることにより、微生物発酵性阻害物質を不溶化させることができる。これにより、微生物発酵性阻害物質を分離し、又は反応性を大きく失わせることができると考えられる。つまり、該微生物発酵性阻害物質を隔離及び/又は不活性化することができると考えられる。

また、本実施形態においては、生じた沈殿物を除去することにより、樹液中の微生物発酵阻害物質を除去することができる。

沈殿物に含まれる物質としては上述したフェノール等が挙げられるが、これに限定されず、タンパク質、重金属類、金属イオン類、微粒子等や、フェノール性物質を介した複合体成分も考慮できる。一例として、本実施形態の樹液の調製方法により調製された樹液を用いて微生物を培養する場合の生育阻害物質又は有用物質を生産する場合の発酵阻害物質が挙げられる。

【0022】

本実施形態においては、不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有していればよく、沈殿物を生成させて、不活性化した工程の後に、沈殿物を除去することにより、微生物発酵性阻害物質を除去する工程を有することが好ましい。

【0023】

pHの調整方法としては、例えば酸性に調整する場合には、塩酸、酢酸、硫酸等を挙げることができる。これらを用い、pHを2.0～5.0に調整することにより沈殿物を生成させることができる。

【0024】

また、アルカリ性に調整する場合には、アルカリ溶液としては、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化バリウム、アンモニア水、水酸化銅、水酸化アルミニウム、水酸化鉄、水酸化アンモニウム、炭酸水素ナトリウム又はこれらの水溶液などを挙げるることができる。

本実施形態においては、上記に示したようなアルカリ溶液を樹液に添加することにより、樹液のpHを8.0～12.0、好ましくは9.0～11.0に調整することにより、凝集物を沈殿させることができる。

【0025】

樹液のpHを調整する際、適宜攪拌等の処理を行ってもよい。酸又はアルカリ溶液を樹液に添加する際、攪拌を行う場合は、冷暗所中で行うことが好ましい。

【0026】

沈殿物生成後、沈殿物を固液分離することにより、固体成分と液体成分を回収し、沈殿物を除去することができる。回収又は除去のための固液分離方法としては、具体的には、遠心分離器、フィルタープレス、スクリーンプレス、濾過器、ラバルセパレータ、沈殿槽等を用いる方法等が挙げられる。固液分離方法は、一種でも本発明を実施できるが、必要に応じて二種以上を併用したり、複数組み合わせたりしてもよい。

本実施形態においては、遠心分離により行うことが好ましい。

【0027】

pH調整により沈殿物を除去した後は、酸性溶液又はアルカリ性溶液を用いて、pH5.0～5.5の範囲に再度調整するとよい。利用する形態によってはpH調整しなくても構わない。

【0028】

[第三実施形態]

本実施形態の樹液の調製方法は、オイルパーム幹及び/又は葉柄から得られる樹液を活性炭で濾過、または前記樹液に活性炭を添加混合する調製方法である。

樹液を活性炭で濾過、または樹液に活性炭を添加混合すると、一例として活性炭にフェ

10

20

30

40

50

ノールが吸着する。

活性炭に吸着する物質としては、フェノール等に限定されず、一例として、本実施形態の樹液の調製方法により調製された樹液を用いて微生物を培養する場合の生育阻害物質又は有用物質を生産する場合の発酵阻害物質が挙げられる。

【0029】

本実施形態において用いる活性炭の種類としては、上述したフェノール等の生育阻害物質又は発酵阻害物質の総量を低下させることができる能力を有するものであれば特に限定されないが、オイルパーム残渣から得られた繊維質を原料とし調製された活性炭であることが好ましい。オイルパーム残渣から得られた繊維質とは、搾汁工程で得られる搾汁残渣繊維をはじめ、オイルパーム油の搾油工程において発生する残渣物（ヤシの実殻、空果房ともいう）から得られた繊維質をいう。

10

微生物発酵阻害物質の分離除去にオイルパーム搾汁残渣から得られた繊維質を原料とし調製された活性炭を用いることにより、従来廃棄物としてしか扱われなかったオイルパーム残渣を有効に活用することができる。オイルパーム残渣を常法により炭化させることにより、オイルパーム残渣から得られた繊維質を原料とし調製された活性炭を得ることができる。

【0030】

また、活性炭を用いて微生物発酵阻害物質を除去させる方法としては、市販の活性炭等を樹液に対し、乾燥重量で1～10質量%となるように添加し、1～5時間程度放置した後、フィルター等により活性炭を分離する方法が挙げられる。

20

【0031】

[第四実施形態]

本実施形態の樹液の調製方法は、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液に凝集剤を添加し、凝集物を生成させ、前記微生物発酵阻害物質を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有する調製方法である。

オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液に凝集剤を添加することにより、凝集作用が起こり、樹液中の微生物発酵阻害物質を沈降分離して沈殿物を生成させることができる。

樹液中の微生物発酵阻害物質を沈殿させることにより、微生物発酵性阻害物質を不溶化させることができる。これにより、微生物発酵性阻害物質を隔離し、又は反応性を大きく失わせることができると考えられる。つまり、該微生物発酵性阻害物質を隔離及びノ又は不活性化することができると考えられる。

30

また、本実施形態においては、生じた沈殿物を除去することにより、樹液中の微生物発酵阻害物質を除去することができる。

本実施形態に用いる凝集剤は特に限定されないが、無機凝集剤であることが好ましい。

無機凝集剤としては、例えばPAC（ポリ塩化アルミニウム）、硫酸バンド（硫酸アルミニウム）等のアルミニウム系凝集剤や塩化第二鉄等の鉄系凝集剤等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0032】

40

凝集沈殿後、そのまま微生物発酵へ利用しても構わない。またこれを固液分離することにより、固体成分と液体成分を回収し、沈殿物を除去することができる。固液分離方法としては、具体的には、遠心分離器、フィルタープレス、スクリュープレス、濾過器、ラバルセパレータ、沈殿槽等を用いる方法等が挙げられる。固液分離方法は、一種でも本発明を実施できるが、必要に応じて二種以上を併用したり、複数組み合わせたりしてもよい。

本実施形態においては、遠心分離により行うことが好ましい。

【0033】

本実施形態においては、不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有していればよく、沈殿物を生成させて、不活性化した工程の後に、沈殿物を除去することにより、微生物発酵性阻害物質を除去する工

50

程を有することが好ましい。

【 0 0 3 4 】

[第五実施形態]

本実施形態の樹液の調製方法は、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液から高分子化合物を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有する調製方法である。本実施形態において、高分子化合物を除去する方法としては、例えば限界濾過、透析膜等の使用等が挙げられる。また、高分子化合物がタンパク質類である場合には、後述する加熱により、不活性化させることができる。

【 0 0 3 5 】

本実施形態においては、不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有していればよく、上記に挙げた限界濾過、透析膜等の使用により、微生物発酵性阻害物質を除去する工程を有することが好ましい。

【 0 0 3 6 】

[第六実施形態]

本実施形態の樹液の調製方法は、オイルパーム幹及びノ又は葉柄から得られる樹液を加熱し、前記微生物発酵阻害物質を不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有する方法である。

加熱処理を行うことにより、発酵阻害物質を不活化することができる。

加熱により樹液中の主にフェノール性化合物又はフェノール性化合物と複合体を形成している高分子化合物が変性し沈殿凝集する。

加熱の方法は特に限定されないが、例えば100～140、好ましくは110～130で、5～30分間、好ましくは10～20分間、特に好ましくは5～10分間一気圧の条件で加熱するとよい。

加熱の際にはオートクレーブ等を用いることが好ましい。また、発酵阻害物質が不活化する条件であれば、適宜加熱温度や加熱時間を調整しても構わない。例えば、50～80の低温で長時間加熱することによっても効果がある。処理時間は短時間が好ましいが、場合によっては長時間処理でも構わない。

加熱処理に伴い、圧力が生じるが圧力上昇により滅菌効果も加わることから、処理においては全く問題が無い。これらの加熱処理により樹液中の発酵阻害物質が沈殿もしくは粒子として不活化すれば目的を達する。一方、加熱処理により樹液中の栄養成分、例えばビタミン類など熱に弱い成分があり、微生物の生育阻害が起こる場合がある。この場合は酵母エキスやポリペプトン、肉エキス、魚肉エキス、コーンステープリカー等ビタミンが豊富に含まれる栄養素を適量加えることで改善できる。

【 0 0 3 7 】

本実施形態においては、不活化する工程、分離する工程、及び除去する工程からなる群から選択された1種又は2種以上の工程を有していればよく、加熱により、不活性化する工程を有することが好ましい。

【 0 0 3 8 】

上述した第一～第六の実施形態の樹液の調製方法によれば、樹液に含まれるフェノール等の微生物発酵阻害物質の不活化又は分離除去させることにより、細菌を使った有用物質、例えばバイオプラスチックの原料である乳酸、ポリヒドロキシ酪酸(以下、「PHB」と記載することがある。)、ブタノール等のバイオ燃料の生産性を向上させることができる。

【 0 0 3 9 】

第一～第六の実施形態の樹液の調製方法により提供できる樹液は、微生物の培養に適した培地に好適に用いることができる。その理由は以下のように推察される。

パーム樹液は酵母を利用したエタノール発酵などには阻害がなく、理論収率でエタノール生産が可能である。それ故に発酵阻害がない天然優良培地として認識されている。葉柄からの樹液においても幹からの樹液と同様な成分が含まれていることが知られており、発

10

20

30

40

50

酵阻害が全く認められないことが非特許論文3にて示されている。

一方、本発明者らは、乳酸、PHBといった特に細菌類を利用した微生物発酵の場合、生育不良や発酵能低下が生じるという問題を見出した。この原因は樹液中のビタミン類など微量成分等の不足に起因した現象と考察されていた。

これに対して、本発明者らは、一例としてフェノール性物質が微生物の生育や発酵を阻害することを見出した。更に、上述したアルカリ凝集沈殿法や活性炭を用いたろ過方法により、樹液に含まれるフェノール等の生育阻害物質又は発酵阻害物質の総量を低下できることを見出した。また、本発明の樹液の調製方法は、樹液中の糖量を減少させることなく、フェノール等の微生物発酵阻害物質の総量を低下できる。従って、本発明の樹液の調製方法は、樹液中の発酵可能な遊離糖の損失を抑制しながら、微生物発酵阻害物質量を低下

10

させることができる。第一～第六の実施形態の樹液の調製方法は、細菌類の生育や発酵阻害の原因と考えられる物質を低下又は除去したものであるため、微生物の培養に適した培地に好適に用いることができる」と推察される。

【0040】

微生物の培養方法

本発明の微生物の培養方法は、上記の調製方法により調製されたいずれかの樹液を用いて、微生物を培養する微生物の培養方法である。

[培地]

本発明の培養方法において使用する培地は、上記の調製方法により調製されたいずれかの樹液を含み、微生物の増殖に用いられるものであれば、合成培地、半合成培地、天然培地などいずれの培地も使用することができる。好ましくは、炭素源、窒素源を含む培地である。炭素源としてはグルコース、フラクトース、マルトース、スクロースが好ましい。窒素源としてはアミノ酸、アンモニウム塩が好ましい。また、微生物の増殖速度が高くなる為、富栄養培地がより好ましい。富栄養培地としては、酵母抽出物（イーストエクストラクト）、トリプトン、ペプトン、ポリペプトンなどのタンパク質分解物、麦芽汁等の天然成分由来のものを含むものが好ましい。富栄養培地の具体例としては、YPD培地、YEL培地、LB培地等が挙げられる。また、培地は、上記栄養分その他、ビタミン類、核酸類、金属塩類等、リン、微量元素など、微生物の生育を促進するための物質を含んでもよい。さらに、炭素源が代謝されて生成したエタノール、酢酸等を炭素源として微生物

20

30

が消費する場合もある。本発明の微生物の培養方法におけるpHの範囲は、後述する微生物が生育可能である範囲内にある限り制限されないが、例えば4～7.5、好ましくは5～7.0に調整する。このpHの調整には、pH調整剤として通常使用されている塩酸、硫酸、酢酸、クエン酸などの酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アンモニアなどのアルカリ、又は、トリス塩酸塩、リン酸水素塩、リン酸水素カリウムなどの塩類の何れかを用いることができる。

【0041】

栄養補助成分の一例として、酵母エキスを添加する場合、樹液100重量%中に酵母エキス0.01～2重量%となる範囲に調製するとよい。この添加割合の範囲であれば微生物の発酵を促進することができる。

40

【0042】

[微生物]

次に、発酵の際に用いる微生物について説明する。

アルコール発酵の際に用いる微生物として、サッカロミセス属酵母、ピケア属酵母、クルイペロミセス属酵母、ザイモモナス属細菌、ザイモバクター属細菌、クロストリジウム属細菌などが挙げられる。クロストリジウム属細菌としては、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium beijerinckii*、*Clostridium saccharobutylicum*が挙げられる。

乳酸発酵の際に用いる微生物としては、バチルス属細菌、ラクトバチルス属細菌、スト

50

レプトコッカス属細菌、クルイベロミセス属酵母などが挙げられる。バチルス属細菌としては、*Bacillus coagulans*が挙げられる。

PHB発酵の際に用いられる微生物としては、コマモナス属細菌、ラストニア属細菌、バリオボラックス細菌、バチルス属細菌等が挙げられる。バチルス属細菌としては、*Bacillus megaterium*が挙げられる。

これらの微生物に限らず、本発明により得られる樹液で生育可能な微生物であればよい。例えば、遺伝子組み換えを行った酵母、大腸菌、乳酸菌、放線菌、カビ、キノコ等などの微生物や真菌類でもよく、これらの微生物を用いることでアルコール類や乳酸等の有用物質を効率的に生産させることができる。また、セルラーゼやアミラーゼなどの加水分解酵素を生産する微生物、例えば、カビ、バチルス属細菌又はクロストリジウム属細菌などを併用しても構わない。

10

【0043】

[培養]

本発明の培養方法において、微生物を培養する為の培養槽は特に制限はない。培養装置は、培養液の温度を一定に保ち、培養液を攪拌する機能を有していてもよい。最適な培養温度は、微生物の種類、培養目的等によって異なるため、培養温度は適宜決定することができるが、25 ~ 45 付近の培養温度が好ましく、この温度範囲で効果的に発酵を行なうことができる。しかし、微生物の種類に応じて、25 以下の低温域又は40 以上の高温域で培養、発酵させても構わない。その他の培養条件としては、用いる微生物に応じて、例えば上述したpHの範囲、あるいは嫌気条件又は好気的な条件下で微生物を培養

20

【0044】

本発明によれば、従来廃棄物としてしか扱われなかった伐採パーム幹を原材料とし、高収率、安価にアルコール類又は乳酸等の有用物質を製造できるばかりでなく、伐採パーム幹に対する資源価値を高め、持続的なパーム幹処理を含めたパーム関連産業の確立と環境負荷の低減化が可能となる。

【0045】

有用物質の生産方法

本発明の有用物質の生産方法は、上記の調製方法により調製されたいずれかの樹液を用いて、微生物を培養して前記微生物により有用物質を生産させる方法である。

30

本発明において、「有用物質」とは、微生物がグルコースなどの栄養源を発酵することにより得る生産物である。有用物質としては特に限定されないが、微生物がグルコースを利用して生産可能なものが挙げられ、例えば、エタノール、ブタノール等のC3~C5の低級アルコール；乳酸、PHB等のバイオプラスチックプラスチック原料等、バイオリファイナリー技術が対象とする材料が挙げられる。

【0046】

また、本発明において行われる発酵としては、特に限定されず、アルコール発酵、水素発酵、メタン発酵、乳酸やコハク酸やクエン酸など有機酸発酵、2,3-ブタンジオール発酵、アセトイン発酵、アセトン・ブタノール発酵、エリスリトール発酵、マンニトール発酵、グリセロール(グリセリン)発酵、L-ソルボース発酵、D-リボース発酵、3-ケト糖発酵、セルロース発酵、カードラン発酵、キサンタンガム発酵、プルラン発酵、デキストラン発酵、トレハロース発酵、グリコーゲン発酵、リボフラビン発酵、ピオチン発酵、ビタミンB6発酵、ビタミンB12発酵、D-パントテン酸発酵、ユビキノン発酵、メナキノン発酵、グルタミン酸やリシンなどのアミノ酸発酵、5'-イノシン酸発酵やグアノシン発酵やウリジン発酵などの核酸発酵、ペニシリン発酵やセファロsporin発酵やストレプトマイシン発酵やカナマイシン発酵などの二次代謝産物発酵、ステロイド発酵や多価不飽和脂肪酸発酵などの脂質発酵、またタカアミラーゼ、アルカリプロテアーゼ、セラチオペプチダーゼ、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プルラナーゼ、グルコースイソメラーゼ、グルコースオキシダーゼ、シクロデキストリン生成酵素、セルラーゼ、リパーゼなど酵素タンパク質発酵、インターフェロン α 、ヒト成長ホルモン、B型肝炎ウイ

40

50

ルス表面抗原、ヒトインスリン、キモシン、インターロイキン 6 (IL-6) やインターロイキン 2 (IL-2) など組換えタンパク質発酵、さらにはピロロキノン発酵、アスタキサンチン発酵、界面活性剤発酵、ケトアルカン発酵、サーファクチン発酵、 α -カロチン発酵等が挙げられる。

【0047】

本発明において使用することができる微生物としては、例えば、有用物質として乳酸を生産させる場合は、上述した乳酸菌が挙げられる。

有用物質としてバイオポリマーを生産させる場合は、上述したコマモナス属細菌、ラストニア属細菌、パリオボラックス細菌、パチルス属細菌等のバイオポリマー生産菌が挙げられる。

また、有用物質としてブタノールを主体とするアルコール類を生産させる場合には、上述したクロストリジウム属細菌等のブタノール生産菌が挙げられる。

【0048】

このような微生物を得るには、例えば、湧水、排水、土壌等又はその他の分離原を、必要に応じて水と共に、原油のごとき炭化水素含有物と混合して振とうし、水相中の強度が上昇した(微生物の増殖のため)培養物を選択し、その水相を希釈して寒天培養上で培養し、生じたコロニーを、原油等の炭化水素含有物を唯一の炭素源として含む培地中で培養し、微生物の増殖と共に膜状やフロック状スライス(バイオポリマー)を生成する菌株を選択すればよい。

【0049】

また、有用物質としてL又はD-アミノ酸を主体とするアミノ酸類を生産させる場合には、アミノ酸生産菌として、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、パチルス属又はエセリヒア属等に属する微生物が挙げられる。L-アミノ酸としては、L-グルタミン酸、L-リジン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-フェニルアラニン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-バリン、L-セリン、L-オルニチン、L-シトルリン、L-チロシン、L-トリプトファン及びL-ロイシン等が挙げられる。

また、D-アミノ酸としては、D-アラニン、D-システイン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸、D-フェニルアラニン、D-ヒスチジン、D-イソロイシン、D-リシン、D-ロイシン、D-メチオニン、D-アスパラギン、D-プロリン、D-グルタミン、D-アルギニン、D-セリン、D-トレオニン、D-バリン、D-トリプトファン、D-アスパラギン、及びD-チロシン等が挙げられる。

【0050】

また、本発明においては、上記の樹液の調整方法によって生じる、不活化及び/又は除去された発酵阻害物質、又は上記の微生物の培養方法により培養された微生物を含む発酵阻害物質を回収し、燃料、燃料補助成分、飲食料品素材、飲食料品補助剤、樹脂加工原料、樹脂加工材料、土壌改良素材又は肥料成分として加工利用してもよい。これによって、回収した発酵阻害物質を資源化し、活用することができる。一般に炭素が多く含まれるフェノール性物質は、燃料成分として非特許文献4, 5においてクラフトパルプ製造工程に発生する黒液に関し、含まれるフェノール性物質の燃料化に関する研究が行われている。

またこれらの天然植物由来のフェノール性化合物は、抗酸化活性を有することから動物や人間における有用なサプリメント素材になり得ることを非特許文献6, 7において開示している。また最近、これらのフェノール性化合物を肥料成分として含ませることにより土壌改善が行われることが非特許文献8において報告があった。またフェノール性化合物として有望な用途として特許文献9に開示されているように、樹脂原料素材としても加工利用できる。実際、全芳香族ポリエステルとして現在市販されているものは4-ヒドロキシ安息香酸が主成分とされており、実施例で示すが樹液を処理し、分離分画した沈殿物においても4-ヒドロキシ安息香酸が含まれていることが分析結果で明らかとなっている。しかし、そのフェノール性化合物が上記のような有用性を示すことは公知であるが、オイルパーム樹液中にこれらの有用なフェノール性化合物の存在や分離方法、及び/又は利活

10

20

30

40

50

用方法に関する情報は一切開示されておらず、本明細書の中ではじめて開示される情報である。

【実施例】

【0051】

以下、具体的実施例により、本発明についてより詳細に説明する。ただし、本発明は以下に示す実施例に何ら限定されるものではない。

【0052】

< 破砕工程 >

オイルパーム幹を伐採した後、直径約32～35cmになるようにディスク状にチェーンソーによりスライスした。スライスした位置は、パーム幹上部、中部、下部のそれぞれについて行った。そのスライスしたパーム幹の厚さは、6.8～7.0cmであった。スライスしたパーム幹を更に細かく破砕するために、スティック状に裁断し、パーム幹裁断物を生成した。

10

【0053】

(パーム幹裁断物の水分含有量の測定)

得られたパーム幹裁断物を3～5g秤量し、80℃で24時間加熱して乾燥させた。そして、この乾燥破砕物の重量を測定し、乾燥前の破砕物の重量からこの測定値を差し引いて、破砕物の水分含有量を算出した結果、約76質量%であった。樹液は以下のように調整した。

【0054】

20

(パーム幹裁断物からの樹液の採取)

パーム幹裁断物約70～90gを用いて油圧式プレス機に供し70～80kg/cm²の圧力により搾汁し、樹液を採取した。この操作により約50ml程度搾汁できた。得られた樹液を10,000回転/分の遠心機により、澱及び繊維等の固形残渣を分離した。これら遠心分離を行った樹液は-20℃に凍結保存した。

【0055】

[試験例1：樹液(無処理)を用いた乳酸、ポリヒドロキシ酪酸、ブタノール発酵試験]

特許文献1及び非特許文献1及び2からオイルパーム樹液は天然の微生物培地成分として極めて優れていることが明らかとなっている。酵母においては、含まれる糖含量に対して高い効率でエタノールや乳酸へ変換することが可能である。そこで、他微生物、特に細菌類においても同様に高い発酵効率で物質変換可能かどうかを確認するため、いくつかの微生物による物質生産を試験した。使用した微生物として、好熱性乳酸発酵菌であるバチルス・コアグランス(*Bacillus coagulans*)、バイオプラスチックとしてポリヒドロキシ酪酸(PHB)生産菌であるバチルス・メガトリウム(*Bacillus megaterium*)アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)11561株、バイオブタノール生産菌であるクロストリジウム・サッカロブチリカム(*Clostridium saccharobutylicum*)製品評価技術基盤機構(Biological Resource Center(NBRC))109358、及びグルタミン酸生産菌であるコリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)NBRC12168を用い、発酵試験を行った。

30

40

【0056】

バチルス・コアグランスは、乳酸菌接種用培地(ニッスイ)を用いて一晩前培養を行った。得られた樹液を用いて前培養物0.5容量%植菌した。樹液1リッターに対して栄養源として2g硫酸アンモニウム, 2gリン酸2水素カリウム, 2g塩化ナトリウム, 0.2g硫酸マグネシウム, 0.05g硫酸マンガン, 0.01g硫酸第二鉄, 10gイーストエキストラクトを添加した樹液を用いた。比較対象となる合成培地は、樹液を含まない前記培地にグルコースを約11.0重量%(v/w)になるように添加調製したものを使用した。培養液中に蓄積した乳酸濃度は、ポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)有機酸分析システム(島津製作所製、Prominence)を用いて測定した。

50

【0057】

ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 生産菌であるバチルス・メガトリウム ATCC 11561 株の培養は、蒸留水 1 リッターに 10 g バクトペプトン、10 g 塩化ナトリウム、5 g イーストエキストラクトを溶解し、pH 7.0 に調整した LB 培地を用いて 30 にて一晩振とうし、前培養を行った。この前培養物を用いて樹液 (無処理) に直接 0.5 容量% (v/v%) 接種を行った。比較対象となる合成培地は、前記培地にグルコースを約 11.0 重量% (v/w%) になるように添加調製したものを使用した。培養液中に生産されたポリヒドロキシ酪酸の測定は、前培養液を植菌後、約 24 時間ごとに培養液からサンプリングを行い、遠心分離 (10,000 回転、4、10 分間) 後、上清を分析サンプルとして用いた。培養液中に生産された乳酸の測定は、前培養液を植菌後、約 24 時間ごとに培養液から 1 ml サンプリングを行い、遠心分離 (10,000 回転、4、5 分間) 後、上清と沈殿を分離後、菌体を含む沈殿画分を分析サンプルとして用いた。その菌体を含む沈殿物は、凍結乾燥機 (EYELA 社製、FDU-2100) にて凍結乾燥を行った。前記沈殿物からのポリヒドロキシ酪酸の抽出は、培養液 1 ml から得られる沈殿物に対して濃硫酸 1 ml を加えて 90、30 分間加熱した。反応後、室温まで冷却し、水中で 0.014 N 硫酸水溶液を 4 ml 加えて攪拌し、遠心分離 (10,000 回転、4、10 分間) で上清と沈殿とを再度分離し、上清を測定サンプルとした。そのサンプル中のポリヒドロキシ酪酸濃度は、Aminex HPLC-87H (バイオラッドラボラトリー) カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (流速は 0.6 ml/min、55) により UV 210 nm の吸光度を測定することで定性、定量を行った。

10

20

【0058】

さらに、クロストリジウム・サッカロブチリカムは、嫌気性 BUT 培地により前培養を行った。その組成は蒸留水 1 リッターに対し 5 g イーストエキストラクト、10 g バクトペプトン、10 g 粉末ミートエキストラクト、20 g 可溶性デンプン、5 g 塩化ナトリウム、0.5 g L-システイン、5 g グルコース、3 g 酢酸ナトリウム、pH 7.0 に調整後、窒素ガスによりバブリングを行い脱気、窒素置換により BUT 培地を調製した。この BUT 培地を用いて 37 にて一晩静置培養を行い、前培養物とした。前記前培養物を用いて直接樹液に 0.5 容量% (v/v%) 接種を行った。比較対象となる合成培地は、前記 BUT 培地にグルコースを約 11.0 重量% (v/w%) になるように添加調製したものを使用した。培養液中に生産されたブタノールの測定は、前培養液を植菌後、約 24 時間ごとに培養液からサンプリングを行い、遠心分離 (10,000 回転、4、5 分間) により上清と沈殿 (菌体を含む) を分離し、上清を分析サンプルとして用いた。ガスクロマトグラフィー (島津製作所製、モデル BC-2014) を用いて測定した。内部標準物質として n-プロパノールを用いて定量を行った。

30

【0059】

また、コリネバクテリウム・グルタミクスは、まずアミノ酸発酵培地により培養を行った。その組成は蒸留水 1 リッターに対しグルコース 50 g、硫酸アンモニウム 30 g、KH₂PO₄ 1 g、MgSO₄・7H₂O 0.4 g、FeSO₄・7H₂O 0.01 g、MnSO₄・5H₂O 0.01 g、ビタミン B1 200 μg、ポリペプトン 0.48 g、ピオチン 300 μg、水酸化カリウムを用いて pH 8.0 に調整後、オートクレーブによる通常の滅菌処理を行い調製した。予め乾熱滅菌しておいた炭酸カルシウム 1 g を添加した後、30、速度 170 rpm で振とう培養を行った。シード培養物を用いて樹液及び前処理した樹液約 20 ml に 1 ml 接種を行い、前記同様に予め乾熱滅菌しておいた炭酸カルシウム 1 g を添加した後、30、速度 170 rpm で振とう培養を行った。培養開始 2.5 時間後に Tween 80 (Sigma 製) 4 g/l 添加し、17.5 時間目の菌体量 (620 nm の吸収を測定)、グルタミン酸蓄積量を測定した。比較対象となる生産培地は、前記シード発酵培地にグルコースを約 10.0 重量% (v/w%) になるように添加調製したものを使用した。生産したグルタミン酸濃度の測定は L-グルタミン酸測定キット II (ヤマサ醤油 (株) 製) を用いて測定を行った。

40

【0060】

50

[試験例 2：樹液（無処理）における発酵阻害物質の存在]

樹液（無処理）を用いた発酵試験の各生産量を表 1 に示す。対象として樹液を用いずに、前培養にて使用した前記合成培地に接種したものを比較試験とした。樹液（無処理）と前培養で使用した合成培地中の糖濃度が異なることから、グルコースを樹液の糖濃度 12.0 質量%になるように樹液（無処理）へ添加、溶解した物を使用した。その結果、樹液（無処理）を用いた場合、乳酸では約半分、ポリヒドロキシ酪酸の蓄積の指標となる菌体量はほぼ生育なし、またブタノール生産能もほとんど認められない結果となった。一方、栄養源の影響も考えられるため、前記各合成培地成分を樹液に溶解して、発酵試験を行ったが発酵生産量の改善及び菌体量の改善は認められなかった。これらの結果は明らかに樹液にこれらの発酵生産を阻害するような因子が含まれていることが確認出来た。

10

【0061】

【表 1】

合成培地と樹液（無処理）を用いた各発酵生産能の比較

発酵生産物	合成培地 (g/L)	樹液（無処理） (g/L)
乳酸	91.5	56.8
ポリヒドロキシ酪酸（PHB）	10.0	5.4
ブタノール	5.4	4.4
グルタミン酸	5.3	4.7

20

【0062】

樹液中の発酵阻害因子により前記の発酵生産能を阻害することが明らかとなった。酵母によるエタノール発酵においてはこのような現象は認められないことから、特に微生物においても細菌を用いた微生物発酵生産能に広く阻害能を持つことが推察された。従って、これらの阻害因子を取り除くための処理方法の検討を行った。

【0063】

[実施例 1：活性炭による樹液の処理]

すべての活性炭は前記樹液（無処理）に対し乾燥重量で 5 質量%になるように添加した。活性炭として市販されるチャコール活性化（Charcoal activated）粉末（ナカライ）を使用した。活性炭添加後、4 で約 5 時間放置した。ワットマンフィルターを用い、活性炭を含む樹液を濾過することにより活性炭と樹液を分離し、フィルターを通った樹液を活性炭処理済み樹液（活性炭処理 - 樹液）とした。またオイルパーム搾汁後の残渣である搾汁繊維を用いて、活性炭を調製した。室温乾燥した搾汁残渣 10 g を用いて直接マッフルにより 600 にて炭化させた。放冷後、前記と同様に活性炭として樹液に加え 4 で約 5 時間放置した。ワットマンフィルターを用い、搾汁繊維活性炭を含む樹液を濾過することにより樹液を分離し、繊維活性炭処理済み樹液（パーム繊維活性炭処理 - 樹液）とした。

30

【0064】

[実施例 2：pH 調整による樹液の処理]

樹液（無処理）の通常の pH は約 5.0 ~ 6.5 付近にある。その樹液の pH を酸性側 pH に調整する場合は、1 N ~ 4 N 塩酸を用い少量ずつ加えて行き、pH 2.0、pH 3.0、pH 4.0、pH 5.0 にそれぞれ調整した。またアルカリ側 pH へ調整する場合、1 N ~ 4 N 水酸化ナトリウム溶液を少量ずつ加えて行き pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0、pH 10.0、pH 11.0、pH 12.0、pH 13.0 へそれぞれ調整した。どちらの pH においても樹液 100 ml あたりに約 0.5 ml 以下の添加にて pH 調整を行った。調整後、4 にて 3 時間放置することで沈殿生成を促進させた。生成した沈殿物は遠心分離（10,000 回転、5 分間、4 ）することで沈殿物を取り除いた。得られた樹液は pH を pH 5.0 ~ 5.5 の範囲に前記塩酸又は水酸化ナトリウム溶液を用いて再度調整した。これらの樹液を pH 調整処理済み樹液とし、pH 2.0 - 4.0 の酸性 pH（酸性 pH 処理 - 樹液）、pH 5.0 - 7.0 の中性 pH（中性 pH 処

40

50

理 - 樹液)、pH 8.0 - 11.0 弱アルカリ pH (弱アルカリ pH 処理 - 樹液)、pH 12.0 - 13.0 の強アルカリ pH (強アルカリ pH 処理 - 樹液) と分け傾向を検討した。

【0065】

[実施例 3 : 凝集剤による樹液の処理]

樹液の凝集剤による影響を検討するために、無機凝集剤で処理を行った。無機凝集剤として硫酸アルミニウム及びポリ塩化アルミニウムを用いた。樹液(無処理)1リッターに対してそれぞれ、0.2重量%(w/v)を加え、1時間4 で放置することで沈殿を生成させた。その後、前記と同様に遠心分離を行い、沈殿を取り除いた。得られた樹液は凝集剤処理済み樹液として実験に使用した。

10

【0066】

[実施例 4 : 限外濾過による樹液の処理]

樹液中の高分子化合物による影響を確認するため、限外濾過膜を利用した樹液の処理を行った。限外濾過膜として遠心型限外濾過装置を用いて樹液を遠心濾過した。樹液(無処理)約30mlを用い、遠心型限外濾過膜装置(ミリポア アミコン 分子量10,000カット)により5,000回転、30分間の遠心により分子量10,000以下の化合物が含まれるとされる濾液を調製した。その濾液は限外濾過処理(低分子画分 - 樹液)として実験に使用した。

【0067】

[実施例 5 : 加熱処理による樹液の処理]

樹液中の発酵阻害物質の熱処理による影響を確認するため、オートクレーブによる熱処理を行った。樹液約50mlを用いてガラス製三角フラスコへ移し、トミー精工社製のオートクレーブにより120、10分間の条件において前処理を行った。調製した樹液はタンパク質等の不溶性沈殿物が生じたが、そのままの状態で使用した。

20

【0068】

[比較例 1 : 無処理の樹液]

無処理の樹液を比較例 1 とした。

【0069】

[樹液の総フェノール量の測定]

樹液中の総フェノール化合物の量を測定するために、樹液及び前記各処理を行った樹液(実施例 1 ~ 5、比較例 1)を用いてフォーリン・チオカルト(Folin-Ciocalteu)法により測定した。フェノール化合物のスタンダードとしてガリック酸を用い濃度測定のための検量線を作成した。単に搾汁を行ったパーム幹中の樹液の総フェノール量は、約850mg ~ 約1,040mg含まれており、その平均942mg ± 86mgの範囲で存在していることが分かった(比較例 1)。一方、前記処理を行った樹液中の総ポリフェノール含量を測定した結果、いずれの処理法でも総フェノールが低下することが明らかとなった(実施例 1 ~ 5)。その結果を表 2 に示す。

30

【0070】

【表 2】

樹液サンプルに含まれるフェノール性化合物量の比較

使用した樹液サンプル		総フェノール量 (mg/ml)
比較例 1	樹液 (無処理)	942 ± 86
実施例 1	活性炭処理-樹液	163 ± 48
	パーム繊維活性炭処理-樹液	580 ± 60
実施例 2	酸性 pH 処理-樹液 (pH 2.0 - 4.0)	754 ± 30
	中性 pH 処理-樹液 (pH 5.0 - 7.0)	768 ± 21
	弱アルカリ pH 処理-樹液 (pH 8.0 - 11.0)	699 ± 35
	強アルカリ pH 処理-樹液 (pH 12.0 - 13.0)	766 ± 31
実施例 3	凝集剤処理-樹液 (硫酸アルミニウム)	817 ± 37
	凝集剤処理-樹液 (ポリ塩化アルミニウム)	763 ± 25
実施例 4	限外濾過処理 (低分子画分-樹液)	683 ± 30
実施例 5	加熱処理 (120℃、10分間)	820 ± 18

10

【0071】

20

[各種前処理による樹液中の糖濃度の影響試験]

これらの処理により樹液中の糖含量へ影響を示すかどうかを確認するため、各処理後の樹液中の糖組成及び糖含量の測定を行った。各樹液に含まれる糖含量は各遊離糖の測定には、示差屈折検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。分析条件は CARBOSep CHO-682 カラム (東京化成工業) を使用し、移動相は超純粋水 (0.4 ml/分、80) を用いた。樹液中の微生物発酵可能な糖としてはグルコース、スクロース、フラクトースが主に存在することが知られている (特許第 4065960 号)。従ってこれらの遊離糖をそれぞれ測定し、その総量として示した。その結果を表 3 に示す。樹液 (無処理) においては 11.9 ± 9.6 重量% (グルコース、スクロース、フラクトースの総量) であった。一方、各処理によって調製した樹液中の遊離糖量を測定した結果、糖量の減少は認められず、特に活性炭などの吸着物質を用いたとしても樹液中の糖量や、各遊離糖の含量の比率に変化は認められなかった。従ってこれらの方法は樹液中の発酵可能な遊離糖の損失を抑制しながら、発酵阻害物質と推察されるフェノール性物質を取り除く方法として優れていることが明らかとなった。

30

【0072】

【表 3】

各樹液サンプル中の遊離糖濃度の比較

使用した樹液サンプル		遊離糖量 (w/v %)
比較例 1	樹液 (無処理)	11.9 ± 9.6
実施例 1	活性炭処理-樹液	10.1 ± 5.8
実施例 2	酸性 pH 処理-樹液 (pH 2.0 - 4.0)	11.0 ± 2.0
	中性 pH 処理-樹液 (pH 5.0 - 7.0)	11.2 ± 3.1
	弱アルカリ pH 処理-樹液 (pH 8.0 - 11.0)	11.1 ± 5.5
	強アルカリ pH 処理-樹液 (pH 12.0 - 13.0)	11.0 ± 3.3
実施例 3	凝集剤処理-樹液 (硫酸アルミニウム)	10.1 ± 2.2
	凝集剤処理-樹液 (ポリ塩化アルミニウム)	11.1 ± 6.2
実施例 4	限外濾過処理 (低分子画分-樹液)	10.7 ± 5.5
実施例 5	加熱処理 (120℃、10分間)	11.2 ± 2.4

10

【0073】

[実施例 6 : 前処理した樹液を用いた発酵試験]

20

前記、各種前処理した樹液 (実施例 1 ~ 5、比較例 1) を用いて、前記の培養法に従い好熱性乳酸発酵菌であるバチルス・コアグランス、バイオプラスチックポリヒドロキシ酪酸生産菌であるバチルス・メガトリウム、ATCC 11561 株、及びバイオブタノール生産菌であるクロストリジウム・サッカロプチリカム NBRC 109358 を用いて発酵試験を行った。その結果を表 3 に示した。結果から無処理の樹液に比較し、各処理を行った樹液による発酵生産効率は約 1.2 倍 ~ 2.6 倍まで向上することが明らかとなった。一方、特に pH 調整及び凝集剤を加えた沈殿物を除去しない処理液を用いても同様な結果が得られることから、凝集沈殿により発酵能に影響を及ぼす発酵阻害物質は不活化していることが考えられた。これらの結果からオイルパーム幹から樹液を前処理することで、樹液中の発酵阻害物質が効果的に除去され、微生物の成育や有用物質生産が促進され、発酵生産能力を向上させることが明らかとなった。下記表 4 中、括弧内は無処理の樹液を用いた際の生産量を 1.0 とした時の各前処理樹液を用いた生産量との相対値を示している。

30

【0074】

【表4】

オイルパーム幹からの搾汁液の前処理による発酵生産能への影響。

使用した樹液サンプル		発酵生産物 (g/L)		
		乳酸	PHB	ブタノール
比較例 1	樹液 (無処理)	56.8 (1.0)	5.4 (1.0)	4.4 (1.0)
実施例 1	活性炭処理-樹液	71.7 (1.3)	11.0 (2.0)	11.4 (2.6)
実施例 2	酸性pH処理-樹液 (pH 2.0-4.0)	80.8 (1.4)	12.1 (2.2)	9.5 (2.2)
	中性pH処理-樹液 (pH 5.0-7.0)	80.0 (1.4)	13.8 (2.6)	9.8 (2.2)
	弱アルカリpH処理-樹液 (pH 8.0-11.0)	91.5 (1.6)	18.8 (3.5)	11.5 (2.6)
	強アルカリpH処理-樹液 (pH 12.0-13.0)	60.0 (1.1)	11.3 (2.1)	9.3 (2.1)
実施例 3	凝集剤処理-樹液 (硫酸アルミニウム)	73.1 (1.3)	8.0 (1.5)	10.0 (2.2)
	凝集剤処理-樹液 (ポリ塩化アルミニウム)	73.9 (1.3)	6.3 (1.2)	10.0 (2.2)
実施例 4	限外濾過処理 (低分子画分-樹液)	70.1 (1.2)	8.0 (1.5)	10.0 (2.2)
実施例 5	加熱処理 (120℃、10分間)	64.7 (1.3)	6.3 (1.4)	9.5 (2.1)

10

20

【0075】

【実施例7】 オイルパーム幹搾汁液の前処理によるアミノ酸発酵生産への影響

アミノ酸発酵の中でもグルタミン酸は代表的なアミノ酸発酵生産として知られている。樹液中の発酵阻害物の影響を受けるかどうか確認するため、前記、樹液前処理として、活性炭処理、弱アルカリpH処理(pH 11.0)、凝集剤(ポリ塩化アルミニウム)で処理を行った樹液(実施例1~3、比較例1)を用いてグルタミン酸発酵試験を行った。その結果を表5に示す。結果、いずれも無処理樹液よりもグルタミン酸の生産能は向上することから、アミノ酸発酵においても樹液前処理の影響は確認出来た。

30

【0076】

【表5】

樹液処理方法		グルタミン酸生産性 (g/L)	相対値
比較例 1	樹液 (無処理)	4.7	1.0
実施例 1	活性炭処理-樹液	9.0	1.9
実施例 2	弱アルカリpH処理-樹液 (pH 8.0-11.0)	12.0	2.6
実施例 3	凝集剤処理-樹液 (ポリ塩化アルミニウム)	6.3	1.3

40

【0077】

一方、合成培地によるこれらの発酵生産能と、各前処理を行った樹液による発酵生産量を比較した結果、いずれも表1に示した市販合成培地よりも前処理済みの樹液の発酵能は明らかに高い。このことはオイルパーム幹を搾汁した樹液において、発酵阻害物質と想定されるフェノール性物質を沈殿により不活化すること、又は分画除去することで合成培地以上の発酵生産培地として利用できることが明らかとなった。

50

【 0 0 7 8 】

[実施例 9]

上記実施例 2 に記載された、弱アルカリ pH 処理 - 樹液により得られたフェノール性物質を含む発酵阻害物質の凝集沈殿物を遠心分離 (1 0 , 0 0 0 回転、4 、 1 0 分間) により回収した。また活性炭処理樹液に利用した活性炭をワットマンフィルターにより分離回収した。これらの沈殿物や活性炭は恒温機内で 7 0 °C にて一晩乾燥させた。その様相を図 1、図 2 にそれぞれ示す。上記表 2 に示すようにこれらの沈殿物又は活性炭はフェノール性化合物や繊維由来の微粒子を含んでいると考えられた。一般に炭素が多く含まれるフェノール性物質は、燃料成分 (非特許文献 4 , 5)、有用なサプリメント素材 (非特許文献 6 , 7)、肥料成分 (非特許文献 8 : 茶ポリフェノール含有有機肥料製造技術日食 1 9 9 5 / 1 1 / 1 5 日付 0 7 9 5 9 号 0 2 面 A、)、又は樹脂素材 (特許文献 9) に加工利用することが可能であることが知られている。

10

【 0 0 7 9 】

これらの沈殿物にフェノール性化合物等含まれているかを確認するため、樹液のアルカリ pH 処理した乾燥沈殿物 (図 1) を用い、有機酸やフェノール性化合物を測定した。有機酸の測定は、沈殿物を蒸留水にて溶解し、前記記載の H P L C 有機酸分析システムにより分析を行った。またこの沈殿物に含まれるフェノール性化合物の測定は乾燥沈殿物を 1 ~ 3 g 程度秤量し、アセトン (0 . 1 m L)、水 (1 0 m L)、2 m o l / L 塩酸 (0 . 1 m L) を入れ、軽く攪拌し溶解した。ジエチルエーテル (1 0 m L) を入れ 1 分間攪拌した後、常温にて遠心分離 (3 0 0 0 r p m、5 分間) を行った。ジエチルエーテル層を回収し、ジエチルエーテルを 1 m L 程度まで減圧濃縮した。この濃縮液をスクリーバイアル (1 . 5 m L) に移し入れ、6 0 °C に保温したアルミブロックヒーターで緩やかに乾燥し、アセトン (0 . 1 m L) を加え再溶解した。この再溶解液に N , O - ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (1 % トリメチルクロロシランを含む) (東京化成工業株式会社) (9 9 : 1) (0 . 1 m L) を加え軽く攪拌し、室温で 1 時間以上静置したものを試料溶液とした。この試料溶液をガスクロマトグラフ質量分析計 (G C / M S) により測定を行った。G C / M S は G C 6 8 9 0 (A g i l e n t T e c h n o r o g i e s) と A u t o s p e c U l t i m a (M i c r o m a s s) を用い、カラム D B - 5 M S、キャリアガスはヘリウム (2 m L / m i n) の昇温プログラム : 6 0 (1 m i n) 5 / m i n 3 2 0 (7 m i n) にて分析を行った。

20

30

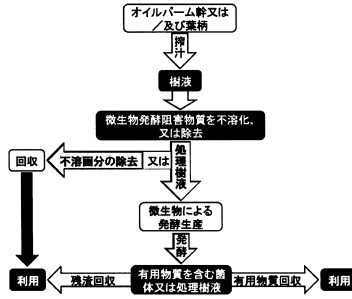
【 0 0 8 0 】

その結果、有機酸等においては、樹液 1 m l 中に約 4 9 μ g ~ 2 5 0 μ g の範囲でグリセロールやクエン酸、コハク酸、フマル酸等様々な微生物生育に促進効果を持つとされる有機酸類が認められた。一方、芳香環を有するとされるバニリン酸、シリンジック酸などパラヒドロキシ安息香酸やジメチル安息香酸といった物質は、樹液 1 m l 中に約 3 0 μ g ~ 2 6 0 μ g の範囲で含まれていることが明らかとなった。

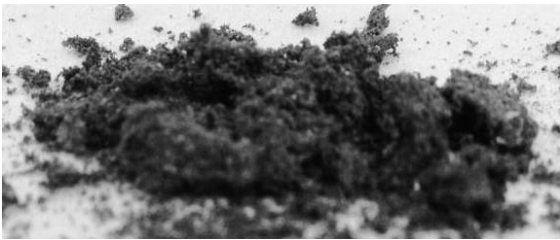
本明細書に示した凝集沈殿や活性炭処理により、通常樹液成分として可溶であったフェノール性物質を、糖質等、微生物生育に必要とされる有用成分を樹液中に残したまま、分離回収できる。図 1 及び図 2 に示した沈殿残渣は、非特許文献 4 ~ 8、特許文献 9 に開示される原料として利用加工することができる。本発明による樹液利用及び樹液から得られた微生物発酵阻害物質利用のフローを図 3 に示す。

40

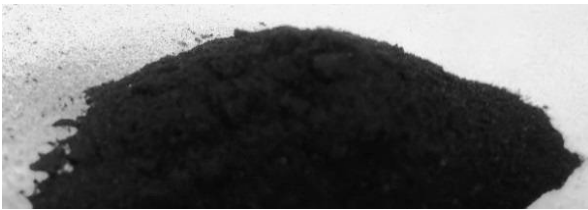
【 図 3 】



【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 5 F	11/00 (2006.01)	C 0 5 F	11/00
C 0 9 K	17/32 (2006.01)	C 0 9 K	17/32 H
C 1 0 L	1/02 (2006.01)	C 1 0 L	1/02

(72)発明者 荒井 隆益
茨城県つくば市大わし1番地1 独立行政法人国際農林水産業研究センター内

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第2008/090707(WO, A1)
小林昭彦, 他, 伐採オイルパーム幹の樹液を用いたエタノール発酵試験, 日本農芸化学会大会講演要旨集 2009年度(平成21年度)大会, 社団法人 日本農芸化学会, 2009年 3月 5日, p. 336, 3P1360B
KOSUGI, A., et al., Ethanol and lactic acid production using sap squeezed from old oil palm trunks felled for replanting, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010年 3月 25日, Vol. 110, No. 3, p. 322-325, p. 323参照
CHOOKLIN, S., et al., Potential use of Lactobacillus casei TISTR 1500 for the bioconversion from palmyra sap and oil palm, Electronic Journal of Biotechnology[online], 2011年 9月 15日, Vol. 14, No. 5, Material and Methods参照, URL, <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v14n5-11/1363>
KOMONKIAT, I., et al., Felled oil palm trunk as a renewable source for biobutanol production by Clostridium spp., Bioresource Technology, 2013年 7月 22日, Vol. 146, p. 200-207, p. 201参照

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 2 0
A 2 3 L 1 / 0 3
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d
C i N i i
D W P I (T h o m s o n I n n o v a t i o n)