

令和5年度脱炭素型循環経済システム構築促進事業のうち、
プラスチック等資源循環システム構築実証事業
(うち、廃棄物等バイオマスを用いた省CO₂型ジェット燃料又は
ジェット燃料原料製造・社会実装化実証事業)
(木質バイオマス由来のバイオジェット燃料生産実証事業)

成果報告書

令和6年2月

Green Earth Institute 株式会社

要約

地球温暖化問題が深刻化する中で、二酸化炭素（CO₂）削減を進めるために、国内外でSAF（Sustainable Aviation Fuel：持続可能な航空燃料）の導入目標の設定や義務化が進んでいる。しかしながら、SAFのコストが下がらず、普及が進んでいないのが現実である。さらに、日本国内では、原料を海外から輸入するケースが多く、その輸送に係るCO₂排出をカウントすると、結果としてCO₂削減効果は小さく、本来のSAFの導入目的を達成できない状況にある。また、安定的なSAFの確保のためには、国産原料を有効活用していくことが重要である。

従って、本事業では、国内で流通する古紙及び木材チップを原料とし、ASTM D7566 Annex2 及び Annex5 に適合するバイオジェット燃料を一貫して製造するプロセスを開発し、社会実装可能なコスト（300 円/L 以下）かつ CO₂ 排出量の 80%以上削減（化石燃料由来のジェット燃料比）を実現する SAF の社会実装を目指した。

本プロジェクトでは、仕様書内容に沿って以下業務について、本年度目標を達成すべく試みを実施した。

（1）古紙及び木材チップの前処理プロセスに関する技術開発

令和4年度事業に引き続き、原料の種類による糖化効率の違いを発酵工程と併せて10L培養槽を用いた系でスケールアップ試験を実施した。糖化効率、エタノール収率の良い2種のクラフト蒸解パルプを用いて、300L培養槽を用いたスケールアップによる糖化処理を達成した。

（2）糖化酵素の効率的利用に関する技術開発

木質パルプ原料の糖化処理に使用した酵素を回収して再利用するために、数種類の膜を用いて、糖液を溶出させつつ酵素を回収する試みを実施した。0.1 μmポアサイズのMF膜と、10,000 MWカットオフのUF膜の二段階の分離により酵素回収できることが分かった。最終的に300L培養槽で糖化を行い、MF膜とUF膜の組み合わせで酵素を回収し、5回に相当する糖化工程に酵素を再利用することを達成した。

（3）糖液からのエタノール生産プロセスに関する技術開発

木質由来の原料に含まれるC5糖（キシロース）を効率良く資化できる菌体をセルフクローニングによりキシロース資化性能を強化した。10L培養槽で培養条件を最適化し、最終的に300L培養槽を用いて同時糖化発酵を行い、0.46 g/g sugarのエタノール収率を達成した。

（4）エタノールからのSAF製造プロセスに関する技術開発

木質由来原料と開発した菌体を用いて、同時糖化発酵により製造したエタノールについて成分調査を行った結果、SAF 製造プロセスで要求される品質基準を満たしていた。効率的な触媒条件により、炭化水素油を得ることに成功し、ASTM D7566 Annex5 の規格に準じたニートを製造可能なことを確認した。

(5) 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発

既存ライブラリーの中で不飽和脂肪酸含量が少ない mh0186 株を選び、糖質の時間当たりの追加添加量は、0.42 g/hr/L-初発培地に設定し 5 L 培養槽での培養を実施した。対糖脂肪酸含量収率は 25%に達しなかったものの、弊社らの既往研究により、酸素量供給量増加と DO の維持により解決可能と考えている。この株は Annex2 準拠の SAF 製造時での水素要求量が低く抑えられ GHG 排出量が低減されることを確認した。

(6) ラビリンチュラ大量高密度培養法の確立

高密度培養法確立の一環として「流加培養」技術を 5 L 系で確立した。2022 年度の実績では 102g のグルコースから油脂 23.49g (対糖収率 23%) の再試により mh1915 株では古紙由来糖質 1kg から 270g の油脂回収に成功したことにより、対糖収率として 25%は達成している。

2023 年度は、得られた流加培養技術を基に mh0186 株は、5 kL の培養槽での高密度培養を実現した。対糖脂肪酸含量収率として 7%程度であった。脂肪酸蓄積までの時間が不足していたことが脂肪酸回収量の低下を招いたと考えられる。菌体回収量を上げるために培養時間を延長することと延長時に窒素添加を抑制することで解決可能と考えている。

(7) ASTM D7566 Annex2 に適合した SAF の製造

大量高密度培養により得られた脂肪酸を用いて HiBD 法での Annex2 に準拠する SAF の試験製造を行った。結果として菌体由来の不純物の混入が確認されたため、ヘキサン抽出により SAF 製造を行ったところ廃食用油由来 SAF と同様の品質を示すジェット燃料留分の製造に成功した。また、ラビリンチュラ由来 SAF の水素要求量はパーム油由来より約 1.2 倍高かった。水素添加量が 20%増ではあるがラボ機での機械精度が悪いことによる誤差が大きく、パーム油の水素要求量と大きな差はないと考える。また、今後、不飽和脂肪酸含量が少なくなる培養方法の検討及び新規株の探索により、ラビリンチュラ由来の脂肪酸でも水素添加量は既存の油脂と大きな差はないと考えている。

(8) LCA の検証・評価

ラボスケールでのデータをもとに商業サイズプラントを想定し LCA 計算を実施した。その結果木質由来原料を用いたエタノール生産からの SAF 製

造における CO2 削減率は、63%であった。また、木質由来原料を用いた油脂生産からの SAF 製造における CO2 削減率は、57%であった。

(9) ASTM D7566 適合性の確認

(5)～(7)で製造されたニートについて ASTM D7566 の規格適合性を確認した。ラビリンチュラ由来のニート SAF は海事検定協会での分析により、密度やその他科学的適性についてはおおむね規格値に合致していたが、唯一「窒素」のみ規格値を大きく超えていた。窒素分は原料由来である可能性が高いと考えているが、こちらは現在含有量が多い芳香族同様に水素圧を上げる、あるいは触媒に対する原料油供給量を下げるなど現状よりも水素化反応の進行により有利な条件で運転することで改善される可能性が高いと考える。

Summary

As the problem of global warming becomes more serious, targets for the introduction of SAF (Sustainable Aviation Fuel) are being set and mandated in Japan and abroad in order to reduce carbon dioxide (CO₂) emissions. However, the reality is that the cost of SAF has not come down, and its use has not spread. Furthermore, in Japan, raw materials are often imported from overseas, and if CO₂ emissions related to their transportation are counted, the resulting CO₂ reduction effect is small and the original purpose of introducing SAF cannot be achieved. In addition, it is important to make effective use of domestically produced raw materials in order to secure a stable supply of SAF. Therefore, this project aims to develop an integrated process to produce bio-jet fuel from recycled paper and wood chips that complies with ASTM D7566 Annex 2 and Annex 5, and to develop a SAF with a cost that can be implemented in society (less than 300 yen/L) and a reduction of more than 80% of CO₂ emissions (compared to fossil fuel-derived jet fuel).

The project attempted to achieve this year's targets for the following tasks in accordance with the contents of the specifications.

(1) Technological development of pre-treatment processes for used paper and wood chips.

Difference in saccharification efficiency between different types of pulp materials were tested in a test system using 10L jar fermenter in conjunction with the fermentation process. Scale-up was conducted using two types of kraft pulp with good saccharification efficiency and ethanol yield, using a 300L fermenter.

(2) Technological development on efficient use of saccharification enzymes.

In order to recover and reuse the enzyme used in the saccharification of wood pulp material, an attempt was made to recover the enzyme while eluting the sugar solution using several types of membranes. It was found that the enzyme could be recovered by a two-step separation using an MF membrane with a 0.1- μ m pore size and a UF membrane with a 10,000 MW cutoff. Finally, saccharification was performed in a 300L culture tank, and the enzyme was recovered using a combination of MF and UF membranes, allowing the enzyme to be reused for the saccharification process, which was equivalent to five times.

(3) Technological development of ethanol production processes from sugar solutions.

The xylose assimilation performance was enhanced by self-cloning of a yeast that can efficiently assimilate C5 sugar (xylose) contained in wood-derived materials. Culture conditions were optimized in 10L jar fermenters, and finally simultaneous saccharification and fermentation was conducted using a 300L fermenter, achieving an ethanol yield of 0.46 g/g sugar.

(4) Technological development of the SAF production process from ethanol.

Compositional investigations of ethanol produced by simultaneous saccharification and fermentation using wood-derived feedstock and modified yeast showed that the ethanol met the quality standards required by the SAF production process. Efficient catalytic conditions were used to obtain hydrocarbon oil, and it was confirmed that neat can be produced according to ASTM D7566 Annex 5 standards.

(5) Development of technology for the production of fatty acids with low unsaturated fatty acid content.

Among the existing bacterial libraries, we selected strain mh0186, which has low unsaturated fatty acid content, and cultured it in a 5 L culture tank with an additional hourly carbohydrate addition rate of 0.42 g/hr/L - the initial medium. Although the yield of sugar-to-sugar fatty acid content did not reach 25%, we believe that this problem can be solved by increasing oxygen supply and maintaining DO, based on our previous research. It was confirmed that the mh0816 strain suppresses hydrogen demand during Annex 2 compliant SAF production and reduces GHG emissions.

(6) Establishment of a Large-scale high-density culture method for *Labyrinthula*.

As part of the establishment of a high-density culture method, the "fed-batch culture" technique was established in a 5 L system. In FY2022, 23.49 g of oil and fat (23% sugar yield) was obtained from 102 g of glucose, and through this retest, the mh1915 strain succeeded in recovering 270 g of oil and fat from 1 kg of recycle paper-derived sugars, achieving a 25% sugar yield. In FY2023, the mh0186 strain was cultured at high density in a 5 kL culture tank based on the fed-batch culture technique. The yield of the content of fatty acids in the sugar content was about 7%. Insufficient time for fatty acid accumulation may have contributed to the lower fatty acid recovery. We believe that the problem can be solved by extending the incubation time and

suppressing nitrogen addition at the time of extension in order to increase the recovery of the bacteria.

(7) Production of SAF conforming to ASTM D7566 Annex 2.

Using fatty acids obtained by mass and high-density culture, production of SAF compliant with Annex 2 of the HiBD method was conducted. As a result, since impurities from the bacterial were confirmed, SAF production was performed by hexane extraction, and jet fuel fractions with the same quality as SAF derived from waste cooking oil were successfully produced. The hydrogen requirement of SAF derived from *labirintula* was about 1.2 times higher than that from palm oil. Although the amount of hydrogen added was 20% higher, the error was largely due to poor mechanical precision in the laboratory machine, and we do not believe that there is a significant difference from the hydrogen requirement of palm oil. In addition, we believe that the amount of hydrogenation will not differ significantly from that of existing oils and fats even for fatty acids derived from *Labyrinthula* by examining culture methods that reduce unsaturated fatty acid content and by searching for new strains in the future.

(8) LCA verification and evaluation

LCA calculations were conducted for a commercial-scale plant based on laboratory-scale data. As a result, the CO₂ reduction rate for SAF production from ethanol production using wood-derived feedstock was 63%. The CO₂ reduction rate for SAF production from oil production using wood-derived feedstock was 57%.

(9) ASTM D7566 conformance check

The neat SAF produced in (5) through (7) was checked for conformance to ASTM D7566. The analysis of Neat SAF derived from *Lavirintula* by the Japan Marine Accreditation Association showed that the density and other scientific suitability generally met the specified values, but only "nitrogen" exceeded the specified values by a large margin. We believe that the nitrogen content is most likely derived from the feedstock, but it is highly likely to be improved by operating under conditions more favorable to the progress of the hydrogenation reaction than the current conditions, such as increasing the hydrogen pressure or reducing the feedstock oil supply to the catalyst, as well as aromatics, which currently contain a large amount of nitrogen.

目次

第1章 木質バイオマスから効率的なアルコール生産と、そのアルコール由来のジェット燃料製造開発（担当：Green Earth Institute 株式会社）

背景と目的	11
1-（1）古紙及び木材チップの前処理プロセスに関する技術開発	14
1-（1）-1 10L 発酵槽を用いた同時糖化発酵のスケールアップ	14
1-（1）-1-1 原材料パルプについて	14
1-（1）-1-2 10L 発酵槽を用いた糖化発酵培養	16
1-（1）まとめ	20
1-（2）糖化酵素の効率的利用に関する技術開発	21
1-（2）-1 酵素分離膜の選定	22
1-（2）-2 300L スケールでの酵素回収再利用試験	23
1-（2）まとめ	26
1-（3）糖液からのエタノール生産プロセスに関する技術開発	27
1-（3）-1 キシロース資化酵母の育種	27
1-（3）-1-1 試験管を用いた継代培養による育種	27
1-（3）-1-2 連続培養による育種および連続培養装置の検討	29
1-（3）-1-2-1 pH センサーによる連続培養の制御1	29
1-（3）-1-2-2 pH センサーによる連続培養の制御2	30
1-（3）-1-2-3 培地定速フィードでの連続培養	31
1-（3）-1-3 育種により得られた菌株の性能評価	34
1-（3）-1-3-1 高グルコース濃度培地における評価	34
1-（3）-1-3-2 エタノール含有培地における増殖評価	36
1-（3）-1-3-3 キシロース培地における評価	38
1-（3）-1-3-4 育種株のエタノール耐性の評価	39
1-（3）-1-3-5 育種株の高温耐性の評価	40
1-（3）-2 組換えによるキシロース資化遺伝子強化株の作製	41
1-（3）-2-1 染色体上の遺伝子導入部位の比較	42
1-（3）-2-2 キシロース資化遺伝子の強化	47
1-（3）-2-3 同時糖化発酵によるセルフクロニング株の評価	48
1-（3）-2-4 10L 発酵槽を用いた各種パルプにおける同時糖化発酵性能の評	

価	49	
1 - (3) - 2 - 5	300 L 発酵槽によるスケールアップ検討	52
1 - (3) - 2 - 6	広葉樹クラフト漂白パルプを用いた 300 L スケール同時糖化発酵	52
1 - (3) - 2 - 7	針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 300 L スケール同時糖化発酵	55
1 - (3) - 3	同時糖化発酵条件の最適化	58
1 - (3) - 3 - 1	針葉樹クラフト漂白パルプを用いた高温同時糖化発酵	58
1 - (3) - 3 - 2	広葉樹クラフト漂白パルプを用いた高温同時糖化発酵	60
1 - (3) - 3 - 3	10 L スケールにおける高温同時糖化発酵	61
1 - (3) - 3 - 4	パルプ単糖組成の再分析	63
1 - (3) - 3 - 5	針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 300 L スケール高温同時糖化発酵	63
1 - (3)	まとめ	66
1 - (4)	エタノールからの SAF 製造プロセスに関する技術開発	66
1 - (4) - 1	SAF について	67
1 - (4) - 1 - 1	Annex5 詳細	70
1 - (4) - 2	ATJ 製造用エタノールへの要求品質	72
1 - (4) - 3	ATJ 向けエタノールの蒸留精製について	72
1 - (4) - 4	ETJ 技術の調査	74
1 - (4) - 5	SAF 製造実験計画	75
1 - (4) - 6	SAF 製造実験結果	75
1 - (4) - 6 - 1	エタノール脱水反応試験	75
1 - (4) - 6 - 2	第 1 オリゴマー化触媒の調製	77
1 - (4) - 6 - 3	第 1 のオリゴマー化試験	78
1 - (4) - 6 - 4	第 2 のオリゴマー化試験	82
1 - (4) - 6 - 5	水素化試験	84
1 - (4)	まとめ	86

第 2 章 廃棄物（古紙系、食品残渣系）由来糖質を活用しての脂肪酸及びバイオジェット燃料開発（担当：株式会社 Biomaterial in Tokyo）

背景と目的	87
-------	----

2 - (1)	不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発	90
2 - (1) - 1	菌株の選抜と培養	90
2 - (1) - 2	油脂回収	95
2 - (1) - 3	ラビリントチュラの油脂組成分析	96
2 - (2)	ラビリントチュラ大量高密度培養法の確立	98
2 - (3)	ASTM D7566 Annex2 に適合した SAF の製造	106
2 - (3) - 1	HiBD 法を用いた SAF 製造	106
2 - (3) - 1 - 1	ラビリントチュラの接触分解油化	106
2 - (3) - 1 - 2	ラビリントチュラ接触分解油の水素化	109
2 - (3) - 2	ラビリントチュラのヘキサン抽出油からの SAF 製造	117
2 - (3) - 2 - 1	ラビリントチュラ培養物の乾燥及びヘキサン抽出	118
2 - (3) - 2 - 2	ヘキサン抽出油の水素化脱酸素及び水素化異性化	120
2 - (4)	まとめ	131
第 3 章	LCA の検証・評価	133
3 - (1)	GEI_ETJ プロセス	133
3 - (1) - 1	評価対象範囲	133
3 - (1) - 2	LCA 計算データ	134
3 - (2)	BITS_HEFA プロセス	138
3 - (2) - 1	評価対象範囲	138
3 - (2) - 2	LCA 計算データ	140
3 - (3)	プロセス比較	145
第 4 章	ASTM D7566 適合性の確認	147
4 - (1)	D7566 適合性の確認	147
4 - (2)	まとめ	149
参考		150

第1章 木質バイオマスから効率的なアルコール生産と、そのアルコール由来のジェット燃料製造開発

背景と目的

日本国内において森林面積は、国土の約3分の2に及んでおり、巨大なバイオマス資源として森林資源を活用することが望ましい。しかしながら、林業従事者数の伸び悩み、急峻な地形が故の生産効率の悪さ、林道整備の遅れ、木材価格の低迷など様々な要因から造林・造材が進まないという状況が根本にあり、森林面積の40%を占める人工林の高齢化が起こり、二酸化炭素の吸収量が減少傾向で推移している¹⁾。一方で国内の製紙会社は、企業によっては100年以上前から各地に製紙工場を構え、工場周辺の森林資源を活用しながら、紙の生産を続けており、国内での森林資源供給のネットワークを確立済みである。この30年を振り返ると製紙業界では、国産材から、安価な海外植林木へのシフトが1980年代後半から始まり、2000年には輸入材比率が70%を超えた。2000年には、2,000万トン（乾燥重量）の木材チップを原料として使用していたが、2000年以降のペーパーレス化により紙需要は低迷し、2020年には、1,300万トンの使用まで落ち込んでいる²⁾。印刷用紙の使用が激減したことが主な原因であるが、製紙工場側では、一部製紙マシンの停止による減産調整や工場閉鎖に至る例もある。

木質資源をベースにしたバイオエタノール生産は、国内でも国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)などいくつかの実証事業で検討されてきた。木質資源をより効率よく糖化させることが、エタノール生産を上げるための一つのカギとなる。樹木植物の茎部には木質細胞が蓄積される。広葉樹では長さ0.5~1.2mm程度の木部繊維細胞が形成され、針葉樹では、長さ1~2mmの仮道管が形成され、いずれも針状の長い細胞であり、二次細胞壁が肥厚し重量のほとんどを占める。木質資源（二次細胞壁）の構成要素として、約50%がセルロース、約25%がヘミセルロース、約25%をリグニンが占める。この割合や、各要素の化学組成は針葉樹、広葉樹あるいは樹種によって様々なバリエーションが見られる。広葉樹ヘミセルロースの特徴として、80%以上がグルクロノキシランで構成されるが、針葉樹ヘミセルロースは、60%以上をグルコマンナンで構成される。セルロース、ヘミセルロースを単糖まで効率よく加水分解（糖化）させ、その単糖を余すことなく発酵によりエタノール生産できることが理想と考える。未処理の木材を粉碎した原料から、セルラーゼなどの酵素によって糖化させる場合、細胞壁に存在するリグニンがセルロースマイクロフィブリル外側にヘミセルロースとともに形成されるネットワークに入り込むように架橋結合しているため、セルラーゼなどの酵素がセルロースあるいはヘミセルロースまで辿り着けず分解を阻害する。そのため、前処理としてリグニンを除く、あるいはセルロース部分を露出させる工程が必要となる。本事業では、木質原料の前処理として、製紙工場で最初のステップとして脱リグニンを

行うアルカリ蒸解工程に着目した。国内で生産される化学パルプのほとんどは、クラフトパルプ法による生産で、苛性ソーダと硫化ソーダを用いてアルカリ蒸解により脱リグニン反応を促す。この脱リグニン工程により、セルロース及びヘミセルロースの純度が95%以上に高められ、糖化原料として最高の材料となると考えている。また、アルカリ蒸解によって溶出されるリグニンは、濃縮燃焼により、工場内の電力、蒸気として熱回収が行われ、GHG 排出量を大幅に下げることができる。この様に、製紙工場には、脱リグニンのアルカリ蒸解工程の設備をはじめとして、リグニンをエネルギーとして回収するシステム、排水設備など、木質資源のバイオリファイナリーに必要なインフラの大部分がすでに完備されており、設備投資額を抑えることが可能である。米国 NREL (National Renewable Energy Laboratory) の報告では、コーンストーバーを原料にしたバイオエタノール生産に係る設備投資費用の中で、原料のハンドリング設備、原料前処理設備、排水処理設備、ボイラーを含むユーティリティー周辺の設備費用が全体の70%を占めるとしている。製紙工場の既存インフラを活用した場合、上記の設備投資が抑えられることになる³⁾。

昨今の紙需要の低迷から製紙工場における紙以外の新たなビジネスチャンスを模索する手段の一つとして、木質資源を出発としてバイオリファイナリー技術により、糖化・発酵からエタノールやその他化学物質の製造を目指せると考える。

Green Earth Institute が担当する、木質資源由来のエタノールの高効率化生産システムの開発と、そのエタノールを用いたジェット燃料製造の特徴としては、製紙工場で製造することを前提として、アルカリ蒸解したクラフトパルプを洗浄後、エネルギーを用いて乾燥することなく糖化工程に移行できるように、未乾燥パルプを原料にすることを想定した。パルプには、用途によって広葉樹パルプ、針葉樹パルプが製造されており、また、さらに酸素漂白、オゾン漂白、化学漂白などの漂白工程を加えたパルプもある。加えて、回収した古紙からインクを脱墨し、バージンパルプをミックスさせた古紙パルプもあり、いくつかの種類のパルプについて、糖化評価を行い、バイオリファイナリーの経済性に優れたパルプを見出すこととした。糖化を行う際にセルロース、ヘミセルロースを分解する複数の酵素が必要となるが、酵素が高価であるため最終的なエタノール生産コストが高くなることが知られている。そこで、糖化反応が終了した酵素を回収し、リサイクル利用することで、酵素コストの大幅な削減を目指すこととした。さらに糖化した単糖について、セルロース由来の C6 糖グルコースは広葉樹、針葉樹由来ともに共通し 80%程度を占めるが、特に広葉樹に多いヘミセルロースのキシラン由来の C5 糖キシロース、針葉樹ヘミセルロースの主要 C6 糖のマンノースについては、各々特徴的な単糖構成となっている。酵母を用いた発酵によりすべての単糖をエタノールへ資化することが望ましいが、多くの野生酵母は、グルコースをエタノールへ変換する機能を有しているものが多いが、キシロースを取り込み資化することを持ったものが少ない。すべ

での糖質をエタノールへ変換できるようにするため、グルコースだけでなくキシロース資化を有する菌株の選抜及び育種による改良、遺伝子組み換えによる改良によりエタノールへの高い収率を目指す。

木質原料由来のバイオエタノール生産において糖化・発酵プロセスは様々な方式が試みられてきた。糖化と発酵を別々に実施する手法として逐次糖化発酵と半並行複発酵があり、逐次糖化発酵は、最初に木質資源の糖化を行い別の反応槽に糖化液を送液し、酵母を加えて発酵させる。半並行複発酵は、木質原料を糖化しその後、同じ反応槽に酵母を加えて発酵させる手法である。この様に糖化と発酵を別々にすることで、セルラーゼ酵素を用いた糖化時の温度を至適温度の 50℃で反応することができ、素早く糖化することが可能となる。一方で、並行複発酵（同時糖化発酵）プロセスは、糖化と発酵を同じ反応槽で進行させることができるため設備コストが下げられるメリットがあるが、酵母の至適温度 30℃までしか温度を上昇させることが出来ず、糖化が十分に進むかという懸念点もあった。平成 27 年度～平成 29 年度に実施された NEDO 事業において、上記 3 つのプロセスが比較され、並行複発酵プロセスが時間当たりのエタノール生産効率が最も良い事を見出している 4)。

本事業においても、並行複発酵プロセスを主眼に、酵素による糖化反応とそれにより生成するグルコース、キシロース、マンノースを原料に発酵させエタノール生産できる系を目指すことにした。

また、酵素コストがエタノール生産に占めるコストへの割合が高く、酵素の再利用について同時糖化発酵のプロセスで実施できるか検証することとした。

- 1) 林野庁 令和 3 年度 森林・林業白書
- 2) 日本製紙連合会 ホームページより
<https://www.jpa.gr.jp/states/pulpwood/index.html>
- 3) 「Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol」-Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover-. Technical Report NREL/TP-5100-47764 May 2011 P62
- 4) セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業/最適組合せの検討及び事業性評価/木本バイオマスを原料とする日本の持続可能性基準に適合するセルロース系エタノールの一貫生産技術開発及び事業性評価 平成 27 年度～平成 29 年度 成果報告書 <https://www.nedo.go.jp/content/100927215.pdf>
(国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 新エネルギー部)

1 - (1) 古紙及び木材チップの前処理プロセスに関する技術開発

本事業では、木質原料の前処理方法として、クラフトパルプ製造の際のクラフト蒸解プロセスによって脱リグニンされ、セルロースあるいはヘミセルロース純度を高めたパルプを原料にする事が、糖化・発酵効率が良いのではと考えた。大王製紙株式会社の協力を得て、針葉樹木質資源、広葉樹木質資源を原料としてクラフト蒸解処理したクラフトパルプ及び、古紙を脱墨・漂白処理した古紙パルプを入手し、原料、前処理工程などの違いによる、糖化・発酵によるエタノール生産のための素材の成分分析、市販酵素を用いた糖化評価を実施した。また1L発酵槽を用いて、同時糖化発酵を行い、酵素と酵母の再利用により、5回分のパルプの糖化発酵を行えることを示した。また酵母の改良により、これらのパルプの糖質成分を有効に利用でき、より効率が高いと考えられる同時糖化発酵に有効な、高温耐性、C5糖発酵能力の高い株の開発を行っている。今年度はこれらの知見を元に、実用化に向けて10Lから300L発酵槽へのスケールアップ試験を行った。

1 - (1) - 1 10L発酵槽を用いた同時糖化発酵のスケールアップ

1 - (1) - 1 - 1 原材料パルプについて

昨年度事業と同様に協力を得た大王製紙株式会社より、4種のパルプ原料の提供を受け（写真1）、10L発酵槽により、同時糖化発酵によるエタノール生産のスケールアップ試験を実施した。

- ①広葉樹クラフト漂白パルプ
- ②針葉樹クラフト漂白パルプ
- ③針葉樹クラフト漂白前パルプ
- ④脱墨古紙パルプ

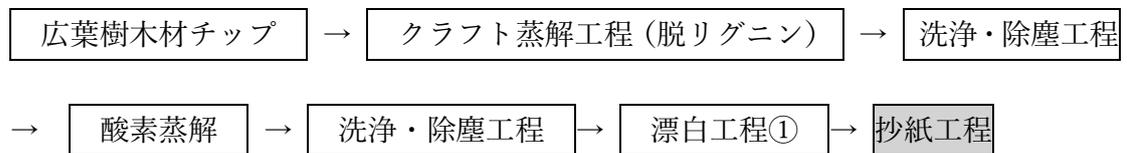


写真1 試験供試材料パルプ入手時

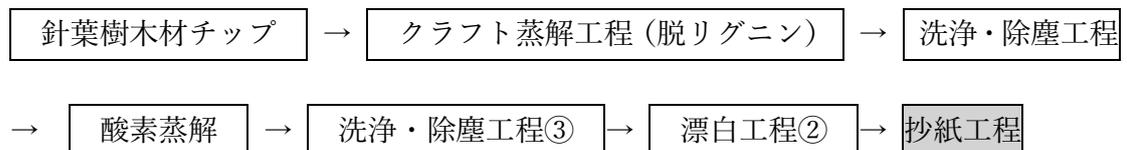
各パルプの製造方法概略は以下となる。

今回の4つの試料は、抄紙乾燥工程前のパルプを取り出した。

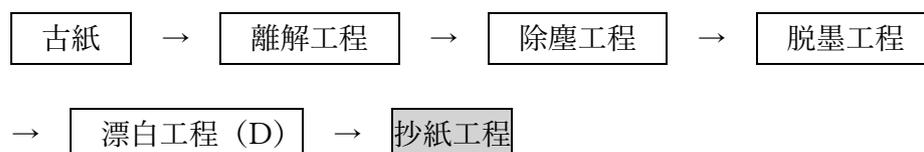
①広葉樹クラフト漂白パルプの製造工程概略。



②針葉樹クラフト漂白パルプ、③針葉樹クラフト漂白前パルプの製造工程概略



④脱墨古紙パルプ製造工程概要



入手したパルプ中の糖組成は硫酸加水分解によって求めたが、しばしば糖含量の総量が100%を超える結果となり分析精度に課題が残っている。ここでは、昨年度の報告書に記載の以下の糖含量推定値（表1-1）をもとに糖化発酵の収率計算に用いた。

表1-1 100gドライパルプから加水分解により得られる推定糖量

	Glucose (g)	Xylose (g)	Mannose (g)	総量 (g)
広葉樹クラフト漂白パルプ	86.8	22.0	0	108.8
針葉樹クラフト漂白パルプ	84.9	16.3	8.1	109.2
針葉樹クラフト漂白前パルプ	84.2	16.2	8.0	108.4
脱墨古紙パルプ	80.5	19.9	0	100.4

1- (1) - 1-2 10L発酵槽を用いた糖化発酵培養

(方法)

製紙会社から入手したパルプサンプルは、各種実験の使用前に脱水を行った。パルプの脱水は、ナイロンメッシュ（255メッシュ）の袋にパルプを入れ、Hismart社製HS-S60Aの脱水機を使用し、3,000rpmで5分間脱水処理した。

また、脱水サンプルの保管は、パルプを手でほぐしてから121℃40分間、オートクレーブ処理し1wt%相当を小分けし冷蔵保管した。パルプ入手時と脱水後の含水率は、島津製作所社製MOC63uを用いて150℃で測定した。いずれのサンプルについても、62～65%含水率まで脱水できた。

4種類のパルプは、都度水分含量が異なるため、一部を採って105℃で一夜乾燥し、水分含量を求め、発酵試験に使用するパルプの固形分濃度が所定の濃度となるように、水分を考慮してパルプを添加した。これらのパルプの構成糖の分析はTAPPI法（二段階硫酸加水分解法）に従って行った。

糖化酵素は市販のセルラーゼ酵素Cを用い、パルプ重量に対して所定の添加率(特に断りがない限り通常15%)となるように酵素を加えた。

酵母については、令和4年度に開発したキシロース資化酵母#30株のエタノール耐性を順化により育種した#30育種株を用い、2%グルコース、1%酵母エキス、2%ポリ

ペプトンを含む培地で 30°C 一夜振盪培養により前培養を行った。

10L 発酵槽は、張り込み液 5L、パルプ濃度 10%(w/v)、酵素添加率対パルプ 15%(w/w)、1%(w/v) CSL、0.5%(w/v) 硫酸アンモニウム、pH5 の培地に酵母前培養液を OD が 0.2 となるように添加して、培養温度通常 35°C、通気量通常 0.1 vvm、攪拌速度通常初期 100 rpm 必要に応じて攪拌速度を高める条件で培養した。

なお、パルプは、24 時間で 5%(w/v) 量を攪拌の様子を見ながら 1 時間おきに少量ずつ分けて投入した。

培養中、一定時間おきに培養液をサンプリングし、遠心分離後上清を 0.22 μ m のフィルターでろ過し、ろ液中の単糖類、エタノール濃度を測定した。

エタノールの濃度は GC で定法により行った。単糖類の分析は HPLC を用いて、以下の条件で行った。

HPLC 条件：

カラム：Aminex HPX-87P(300 mm x 7.8 mm, BIO-RAD 製)、

検出器：RID-10A

温度：85°C

流速：0.6 ml/min

移動相：ミリ Q 水

培養後の残渣量は、遠心分離により上清と沈殿を分離後、沈殿を懸濁し、ガラス繊維濾紙 GF75 で吸引ろ過し、濾紙上に残った SS 成分を一夜乾燥後、重量を測定した。

(結果と考察)

① 広葉樹クラフト漂白パルプ

広葉樹クラフト漂白パルプを基質に、#30 育種株を 10 L 培養槽へスケールアップして、0.1 vvm の通気量で糖化発酵を行った。図 1-1 に単糖類、エタノールの消費を示した。

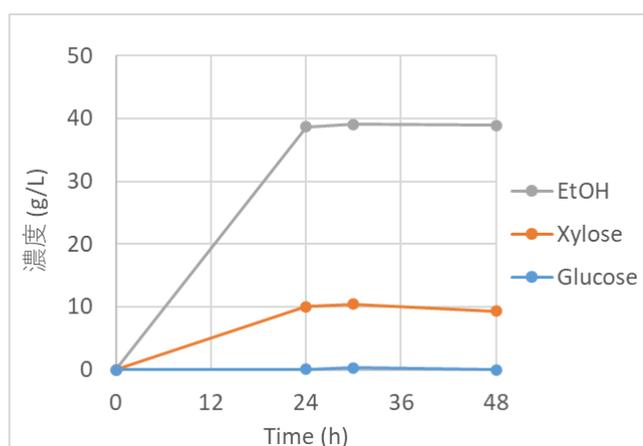


図1-1 #30 育種株による広葉樹クラフト漂白パルプの同時糖化発酵の経時変化

パルプの酵素糖化によって徐々にグルコース、キシロースなどの単糖が生じるが、酵母が糖を資化して発酵が進むため、迅速に消費されるグルコースは検出されなかった。またキシロースは48時間後に9.33 g/L 残存しており、約12.06 g/L が消費されていた。生成したエタノールは38.9 g/L であり、投入したパルプ濃度10%(w/v)から得られると推定される糖あたりの収率を表1-1から計算すると35.8%(g/sugar g)であった。

② 針葉樹クラフト漂白パルプ

#30 育種株による針葉樹クラフト漂白パルプを原料とした糖化発酵試験を実施した。結果を図1-2に示した。

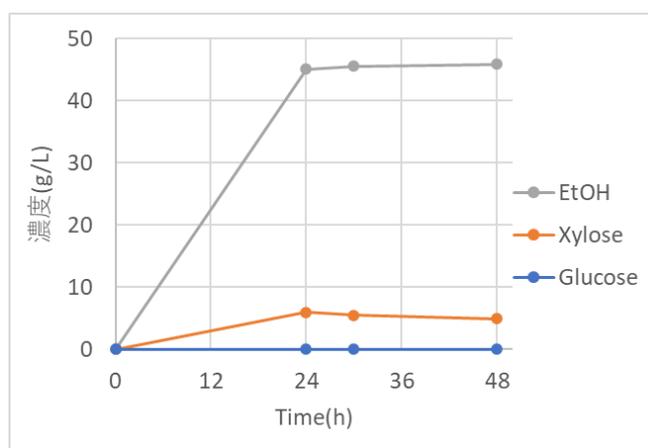


図1-2 #30 育種株による針葉樹クラフト漂白パルプの同時糖化発酵

針葉樹の場合、糖化によってグルコース、キシロース以外にマンノース、アラビノースが生じるが、酵母が資化するためグルコース、マンノースは24時間以降の発酵液中には含まれていなかった。キシロースの残存量が4.95 g/L で、エタノールの収量は45.9 g/L であった。パルプあたりの収率は42.0%(g/sugar g)であった。

③ 針葉樹クラフト漂白前パルプ

原料コストを下げる為に、漂白工程を経ない漂白前のパルプを使用することを検討した。#30 株を使用して同時糖化発酵を行った結果を図 1-3 に示した。

針葉樹クラフト漂白パルプと同様の傾向が観察された。酵母が資化するグルコース、マンノースは 24 時間以降の発酵液中には検出されなかった。キシロースは 24 時間後にはまだ 13 g/L 残っていたが、48 時間後には全て資化された。しかしながらキシロースの消費に伴うエタノールの増加は見られなかった。エタノールの収量は 24 時間でほぼ頭打ちとなり 42.3 g/L であり、パルプあたりの収率は 39.0%(g/sugar g)であった。針葉樹クラフト漂白パルプの結果と比較するとエタノール濃度、糖からの収率ともに低かった。

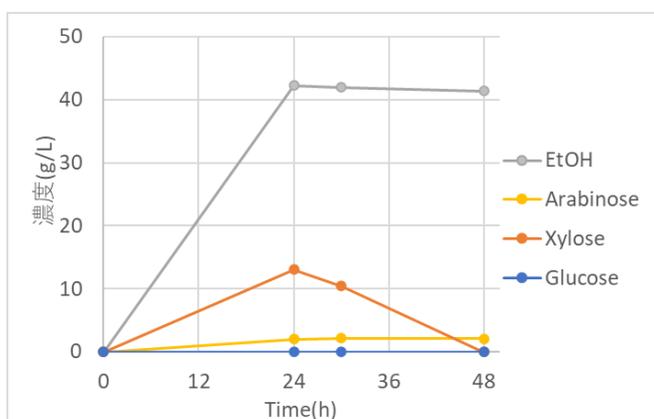


図 1-3 #30 育種株による針葉樹クラフト漂白前パルプの同時糖化発酵試験

④ 脱墨古紙パルプ

脱墨古紙パルプはバージンパルプに比べて安価であり、また繊維が細く、また短いため糖化の速度が速いことが期待される。しかし構成糖は主にグルコースとキシロースであり、その含量はバージンパルプに比べて少ない。原料コストとしては低くなることが期待できるため、脱墨古紙パルプについても評価した。#30 株を使用して同時糖化発酵を行った結果を図 1-4 に示した。

100 g のパルプから生産されたエタノールは 27.4 g/L であり、バージンパルプに比べて 3 割ほど少なかった。24 時間でグルコースは検出されず、酵母で資化されたと考えられた。一方キシロースへの糖化が 24 時間以降も続いており、糖化しにくい原料であると考えられた。キシロースは 48 時間後にはまだ 1.1 g/L 残っていた。エタノールの収量は 48 時間で 27.4 g/L であり、24 時間目からほぼ変化がなかった。パルプあたりの収率も 27.3%(g/sugar g)と低かった。

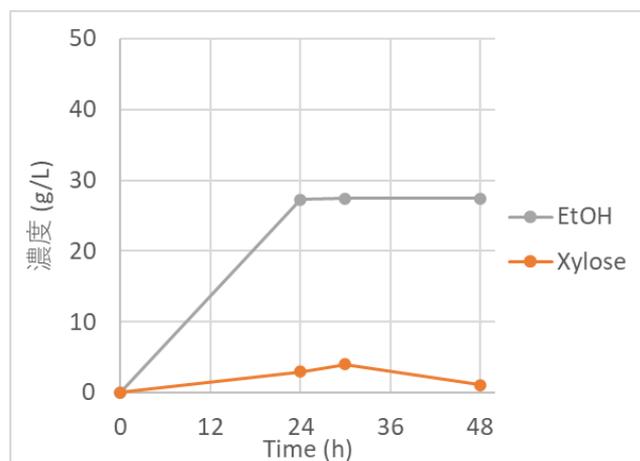


図1-4 #30育種株による脱墨古紙パルプの同時糖化発酵

1- (1) まとめ

広葉樹、針葉樹の各種パルプを原料とするエタノール同時糖化発酵を10 L 発酵槽にスケールアップし、評価した。菌株は継代培養の繰り返しによりエタノール耐性を高めた#30 育種株を用いて、各種パルプの同時糖化発酵を行い、エタノール生産性の比較を行った。評価したパルプの中では針葉樹クラフト漂白パルプが最もエタノールの生産量が多く、次いで針葉樹クラフト漂白前パルプ、広葉樹クラフト漂白パルプ、脱墨古紙パルプの順であった。針葉樹クラフト漂白前パルプは糖含量が漂白パルプに比べて低いため、酵素、酵母を繰り返し利用する連続生産プロセスでは残渣の蓄積が懸念される。

なお、別途開発した酵母でも同時糖化発酵によるパルプの比較試験を行っており、詳細は1- (3) に記述する。また、300 L 発酵槽における糖化試験は1- (2) において広葉樹クラフト漂白パルプについて行った他、1- (3) - 2- 5において広葉樹クラフト漂白パルプと針葉樹クラフト漂白パルプについて同時糖化発酵もかねて複数種類のパルプでの300 L 発酵槽における糖化試験を行った。

パルプ濃度10%(w/v)に対して、酵素を15%(w/w)添加する条件では令和4年度の報告書に記載したように24時間で糖化は90%以上まで進んでいる。実際に24時間以降には培地中にキシロース以外の糖は殆ど検出されず、単糖となった後直ちに酵母により資化、発酵されていたと考えられる。殆どのケースでエタノール生産量が24時間でほぼ最大に近くなっていて、24時間以降は残存するキシロースの資化、発酵によりわずかにエタノールが生産されているにすぎない。連続プロセスでは48時間まで待たずに新たな基質を加えることで時間あたりの生産性を高めることも検討の余地があると考えられる。

1 - (2) 糖化酵素の効率的利用に関する技術開発

木質資源を原料として発酵によるエタノール生産を行う場合、木質資源中に含まれるセルロースやヘミセルロースなどの糖鎖ポリマーを効率よく単糖まで加水分解し、酵母による発酵を行う必要がある。セルロースやヘミセルロースの単糖への分解には、いわゆるセルラーゼと呼ばれる酵素群を用いた分解工程が必要となる。セルロースを分解するためには、セルロース鎖の内部にランダムに作用するエンドグルカナーゼ、セルロース鎖末端に順次作用し二糖のセロビオースを与えるセロビオヒドラーゼなどの酵素が必要となる¹⁾。一方でヘミセルロースの場合、広葉樹の主なヘミセルロースであるグルクロノキシランを分解できる複数の酵素が必要になる。キシラン主鎖をランダムに加水分解するキシラナーゼやグルクロノキシランの側鎖の分解を担う α -グルクロニダーゼなどの酵素が必要である²⁾。市販酵素には、これら酵素群が含まれるが、高価であることから使用量を大幅に削減する、あるいは糖化発酵を行う工場でのオンサイト生産による自製酵素の使用を検討する必要がある。

本項では、糖化反応に用いる酵素について、複数回の再利用技術の確立を目指し、より低コストな糖化プロセスの確立を試みた。

R4年度の100mlフラスコ系、および1L発酵槽を用いた試験では、同時糖化発酵によりバッチ式で糖化発酵を行い、限外濾過膜により酵素を回収して5回目の酵素再利用においても問題なく糖化することが結果として得られている。本年度においては、商用生産ベースで酵素再利用が検討できるように、300Lスケールで糖化した際の糖液と酵素回収が出来るシステムの構築を目指し、膜の選定を行った後に300Lスケールによる糖化酵素再利用を試みた。

1) 吉田誠 (2009) 木材保存、35(6),250-259

2) 前原智子、金子哲 (2012) 応用糖質科学、第2巻、第3号、165-168

1 - (2) - 1 酵素分離膜の選定

糖化反応後の糖化液を反応液中から分離しつつ、酵素を回収して再利用するため、適切な膜の選抜試験を実施した。

(方法)

検討に用いた膜は 0.1 μm ポアサイズの MF 膜、50,000MW、20,000MW、3,000MW カットオフの UF 膜の 3 種を用いた。ろ過試験には、90L 培養槽に、50L の張り込み液量で広葉樹クラフトパルプ 10wt% (ドライ換算)、酵素量 15wt% (対パルプ重量)、35°C、pH5.0 で #30 育種株を用いて 48 時間同時糖化発酵培養を行った後の培養液を用いた。この時の培養残渣 SS の濃度は 1.5wt% であった。

(結果と考察)

最初ろ液量が最も多いと想定される 0.1 μm ポアサイズの MF 膜から実施し線速度を変更しながら flux を比較した (表 2-1)。結果として、線速度が 3m/s の時に flux が 100 L/m²/hr 以上を示した。

次に、3,000、20,000 および 50,000MW カットオフの UF 膜を用いて培養残渣を循環したところ、3 m/s で各々 10.0 以下、41.6、73.2 L/m²/hr となった。溶け残りのパルプ残渣が残る溶液のろ過には不十分と考え、連続的な循環と酵素の再利用には、0.1 μm ポアサイズの MF 膜で一旦ろ過してから、酵素を回収できる UF 膜で二段目のろ過を行う事が酵素回収のために適当だと考えた。但し、20,000MW カットオフ以上の膜では、酵素も同様に溶出されること、3,000MW カットオフではろ過時間が必要になるため、10,000 MW カットオフの UF 膜を用いることで酵素を回収する連続ろ過システムを以後の試験に用いることとした。

表 2 - 1 0.1 μm ポアサイズ MF 膜の培養液の濾過速度

	線速度 (m/s)	Flux (L/m ² /hr)
0.1 μm ポアサイズ	1	49.8
	2	101.0
	3	135.2

1 - (2) - 2 300 L スケールでの酵素回収再利用試験

酵素コスト削減のため、酵素の回収、再利用を 300 L 培養槽スケールで検討した。

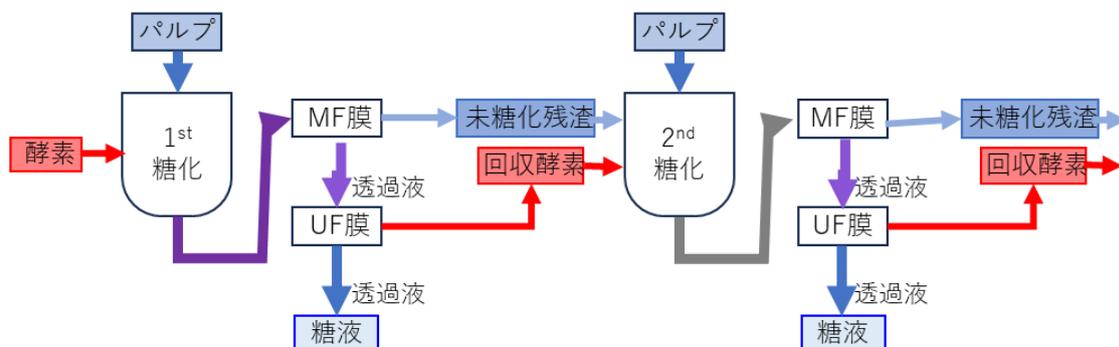


図 2-1 酵素繰り返し回収再利用の試験のイメージ

(方法)

300 L 発酵槽に張り込み液量 100 L、パルプ濃度は 10%、市販のセルラーゼ酵素 C をパルプの重量に対して 30% 加えた。pH は 10N NaOH と濃硫酸で pH5.0 となるように制御した。温度は 50°C で、パルプは広葉樹クラフト漂白パルプを使用した。

50°C に温度調節した pH 5 の反応液に酵素液を 1.5 kg 添加し、当初は 3% のパルプを加えて、50 rpm で攪拌した。およそ 1 時間おきに反応槽のパルプが溶解し、攪拌されていることを確認しながら、1 kg のパルプを加えた。攪拌が弱いときには回転数を最大 250 rpm まで高めて、糖化を促進した。7 時間で全てのパルプを加え終えて、糖化開始から 48 時間経過後に、一部サンプリングし、SS 量、糖濃度を測定した。

48 時間後に MF 膜(0.1 μm)を通して、未分解のパルプを糖化槽に戻し、ろ液はさらに UF 膜モジュール (旭化成 SLP-3053、10,000MW カットオフ、有効膜面積 4.5m²、モジュール寸法 1129 x 89 φ mm) を通して酵素を回収し、糖化槽に戻した。回収した未分解残渣及び回収糖液は糖化槽に戻し、UF 膜を通過した液量となるように、水をパルプの水分含量を考慮して加え、再度、新たなパルプを終濃度 10% となるように徐々に加えた。この膜処理、酵素回収作業を 4 回繰り返し、5 回分のパルプを糖化できることを確認する。

(結果と考察)

図2-2 に、5回繰り返し行った際の、各回の糖化終了時の単糖濃度を示した。

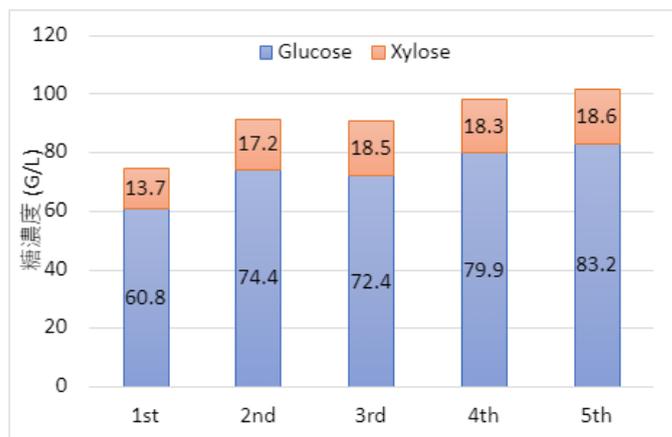


図2-2 各回の糖化終了時の単糖濃度

図2-2 に示したように、各回の糖化終了時の単糖濃度は5回糖化を行っても減少しておらず、5回繰り返し行うことができた。

1回目の酵素糖化によって48時間に生じた単糖類は74.5 g/Lであり、スモールスケールの実験に比べて低かったが、一つの原因として、設備上の問題で攪拌速度を高めることができなかつたため、パルプの分散が不十分であったことが考えられる。実生産設備では攪拌動力についても考慮が必要であると考えられた。

1回目の糖化液は次いでMF膜、分画分子量10000のUF膜に順次通して、糖化された分子量10,000以下の糖を取りだした。この時のMF膜透過液、膜を透過しなかつた糖は、糖化槽に回収され、次のパルプ原料の糖化と併せて糖化されるため、2回目は糖濃度が高まっている。(図2-3)

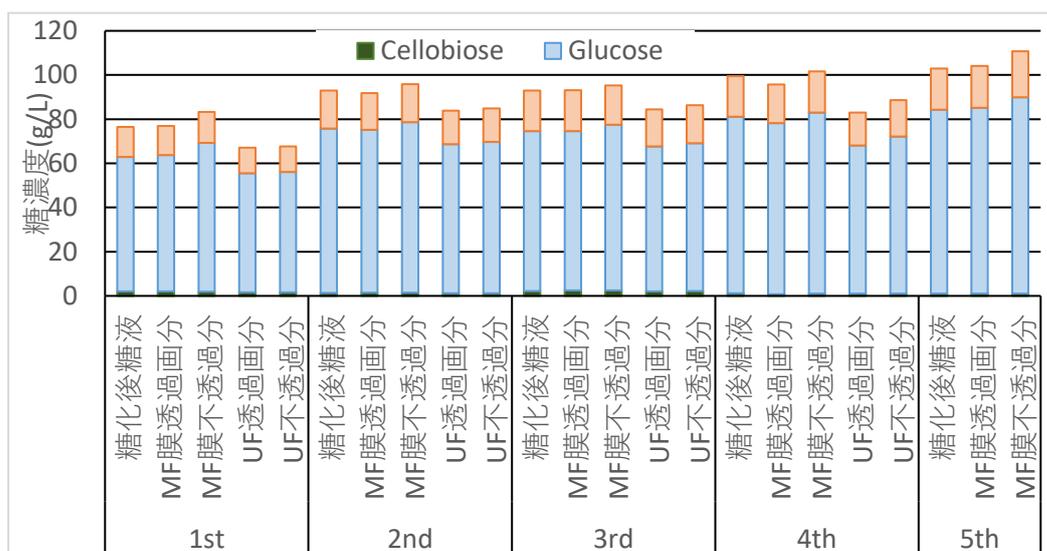


図2-3 各回の糖化後、MF膜、UF膜処理中の単糖濃度

1回目の糖化後のSSは図2-3に示すように16.6 g/Lであり、単糖と残渣を合わせた91.1 g/Lの残り8.9 g/Lは可溶性のオリゴ糖と考えられ、この一部はUF膜を透過して系外に排出されると考えられる。

これらの膜処理を行う間、分子量10,000以下の糖濃度はいずれの溶液も同じ濃度のはずであるが、UF膜不透過の画分の糖濃度が若干高まっているのは、サンプリングから分析までの間に分解された単糖が含まれるためと考えられる。

糖化槽の各回の糖化終了時のSS濃度は、1回目16.6 g/Lであったが、2回目17.5 g/L、3回目47.6 g/Lと回を追うごとに未糖化パルプが蓄積した。(図2-4)そこで糖化の時間を48時間より伸ばして糖化を進めたが、SSの増加傾向は変わらなかった。MF膜で回収される未糖化パルプの量も呼応して増加している。5回目にはSS濃度が89 g/Lと10%に近づき、この装置では攪拌が不十分となったため5回で打ちきりとした。最終的な糖化処理後の原料パルプの様子は、写真2の顕微鏡写真に示すように、100~200 μ m長さの繊維の状態が多くが残されていた。

逐次発酵システムにより木質由来原料を用いた糖化発酵運転コストのうち、酵素コストが大きいことはよく知られている。本事業では同時糖化発酵システムを想定し5回以上酵素を再利用し糖化できる再利用系を構築することで、生産エタノール当たりの酵素コストを下げるための検討を行った。

300L培養槽では、同時糖化発酵試験が出来る環境を準備できなかったことから、糖化処理のみで膜システムを構築することで検証したが、5回の酵素再利用による糖化処理をMF膜、UF膜の連続ろ過により酵素を回収し達成することが出来た。ただし、糖化が進む過程で、グルコース濃度が上がることで酵素活性が阻害されやすく4回目、5回目には残渣量が10%に達して攪拌が困難になった。今回、バッチ式で糖化処理と膜による糖液の溶出と酵素の回収を行ったが、連続的に循環して酵素処理を行う事が、酵素再利用効率を上げるために望ましいと考える。

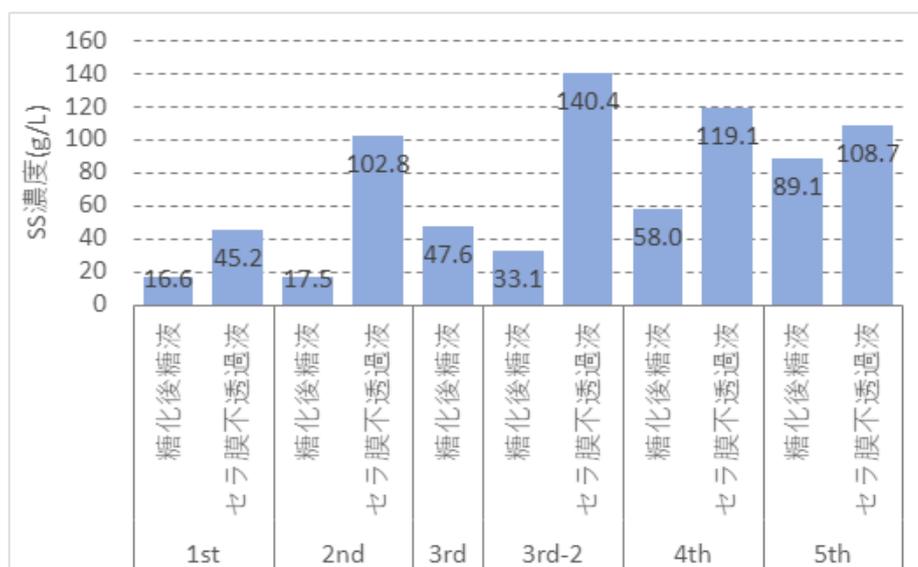


図 2 - 4 各回糖化後と MF 膜不透過面分の SS 濃度



写真 2 糖化处理 5 回後の処理液中のパルプ残渣

(まとめ)

以上のように 300L 培養槽を用いて木質由来クラフトパルプの糖化を 5 回繰り返し、酵素の再利用ができることが確認できた。実生産では糖化と酵母による発酵を同時に行うため、単糖が酵母で消費されて糖濃度が低くなり、SS の蓄積は減ると考えられるため、5 回以上の繰り返しは可能と考える。

1 - (3) 糖液からのエタノール生産プロセスに関する技術開発

パルプを糖化した糖液には単糖として C6 糖であるグルコースだけでなく、C5 糖であるキシロースも含まれるため、C5 糖であるキシロースを効率的に利用できる菌株の開発を継続して行った。

1 - (3) - 1 キシロース資化酵母の育種

令和4年度の報告にて#30株のエタノール存在下での複数回の継代により6.8%(w/v)エタノール含有プレート上において、37°Cでも増殖することができる育種系統が複数得られた。得られた育種系統の中でエタノールを含む液体培地中での増殖が特に優れていた複数系統から、令和4年度の報告で用いた#30-A-1株(令和4年度報告書では#30育種株と表記)の系統よりもエタノールを含む液体培地中での増殖が優れていた#30-F-1株を親株として更なるエタノール耐性の獲得を目指した育種を実施した(図3-1)。

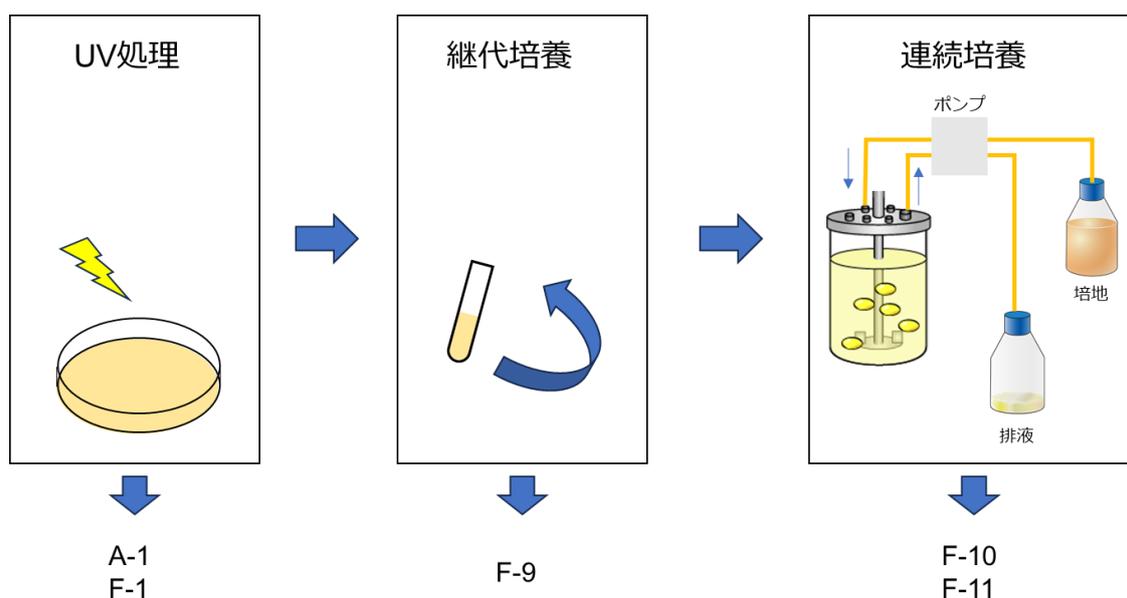


図3-1 育種方法

1 - (3) - 1 - 1 試験管を用いた継代培養による育種

#30-F-1株を親株として試験管培養を行い、一定程度増殖した後に定期的に植え継ぐことでエタノール含有培地に順化させた。

(方法)

5%(v/v)エタノール含有 YPX 培地(10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、20 g キシロース、50 mL エタノール、pH 6.4 / 1 L)で試験管培養を行い、培養温度 35°Cで継代を繰り返した。OD₆₁₀を定期的に測定し、1.0を上回った際に新しい培地に5から100倍希

積となるように継代した。累積培養時間 910 時間目、継代回数 20 回目以降は培地のエタノール濃度を段階的に増加させ、継代回数 23 回目はエタノール含量 6%(v/v)となるように設定した。

(結果と考察)

継代回数 3 回目の開始点から 19 回目の最終点までの累積培養時間 910 時間の OD の推移をグラフに示す (図 3-2)。グラフ中の点は継代前と継代後の OD 値を示している。OD が 1 を上回った時点で OD1 以下になるように希釈して継代しているが、継代後の OD は一定ではなく、一部継代後に 1 を超えてしまった点もあった。培養開始当初はエタノール含有培地における増殖は遅かったが、継代数を重ねるごとに増殖が速くなりエタノール存在下でも増殖できるようになった。910 時間目以降は培地中のエタノール濃度を段階的に増加させ、最終的には継代数 23 回目、累積培養時間 1078 時間の時点で 6%(v/v)エタノール含有培地でも増殖可能となった (図 3-3)。継代数 23 回目の最終点の菌体を回収し、# 30-F-9 株とした。

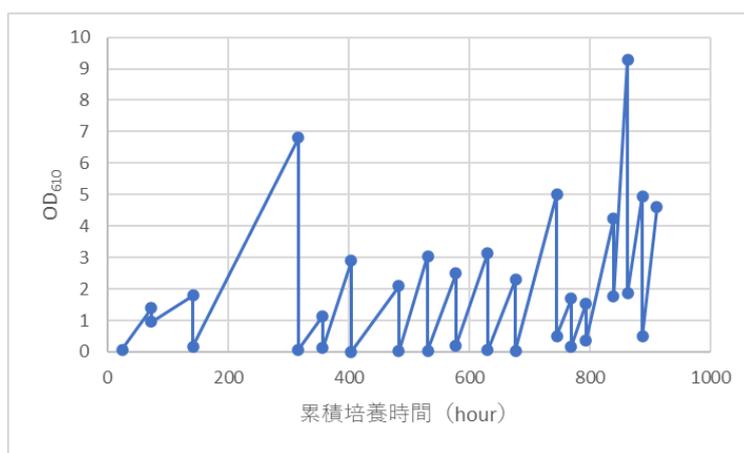


図 3-2 継代回数 3 回目から 19 回目までの OD の推移

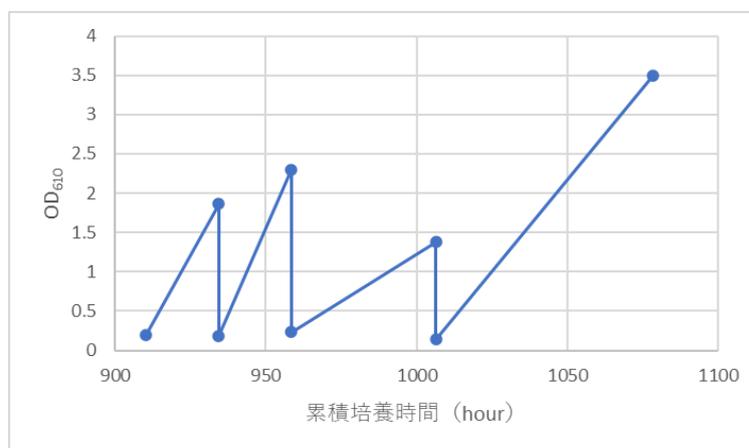


図 3-3 継代数 20 回目から 23 回目までの OD の推移

1 - (3) - 1 - 2 連続培養による育種および連続培養装置の検討

試験管を用いた継代培養では定期的な継代操作が必要であり、また、菌体増殖にあわせた継代のタイミングを設定する事が難しい。一方、連続培養では菌体増殖にあわせた培地の自動添加が可能である為、より効率的な育種が可能となる。そのための装置および培養条件について検討を行った。

1 - (3) - 1 - 2 - 1 pH センサーによる連続培養の制御 1

当初はタービットスタットシステムを利用した育種の実施を想定していたが、装置の部品供給不足により入手困難となった為、既存のケモスタット培養装置を利用した。しかし、既存設備では菌体の増殖を直接測定するセンサーを有していなかった為、菌体増殖に伴い低下する pH を指標としたフィード添加の制御による連続培養を試みた。連続培養によるエタノール耐性の獲得を目標とし、開始時の張込み培地とフィード培地のエタノール濃度をそれぞれ 3%(v/v)、5%(v/v)とし、フィード培地の添加に伴いエタノール濃度が上昇する設定と、培地の添加に伴い菌体がエタノール耐性を獲得することを目指した。

(方法)

YM プレート (3g 酵母エキス、5g ペプトン、3g 麦芽エキス、10g グルコース、20g 寒天、pH 5.5 / 1L) で培養した菌体をかきとり、試験管に分注した YPD 培地 (10g 酵母エキス、20g ペプトン、20g グルコース / 1L) に植菌し 30°C, 150 rpm で一晩培養し前培養菌液とした。

250mL 容培養装置に 3%(v/v)エタノール含有 YPX 培地 (10g 酵母エキス、20g ペプトン、40g キシロース、30 mL エタノール、pH 6.4 / 1L) を 100 mL 張込み、前培養菌液を 1 mL 植菌し、30°C, 300 rpm で本培養を開始した。pH センサーにより培養液の pH を測定し、pH 5.4 以下でフィード用ポンプが作動し培地が添加されるように設定した。フィード培地には 5%(v/v)エタノール含有 YPX 培地 (10g 酵母エキス、20g ペプトン、40g キシロース、50 mL エタノール、pH 6.4 / 1L) を使用した。また培養槽内部の液量を一定に保つためフィード培地添加による増加分はオーバーフローさせ、培養槽の外部に排出する形にした。

(結果と考察)

菌体の増殖速度が比較的高い 55 時間目から 90 時間目では pH センサーによるフィード制御で菌体量が OD = 約 2.5 で定常状態にすることができた。100 時間目以降は培地中のエタノールの蓄積に伴い、菌体増殖速度が低下し、pH 低下速度の減少によりポンプの作動時間が低下した。これは、フィード培地によるエタノール濃度の上昇が、菌体が獲得したエタノール耐性を上回った為と考えられる。(図 3 - 4) またオーバー

フローによる液量調整では流路への菌体付着および培養時の発泡による排出不良が生じる為、定期的なメンテナンスを要した。

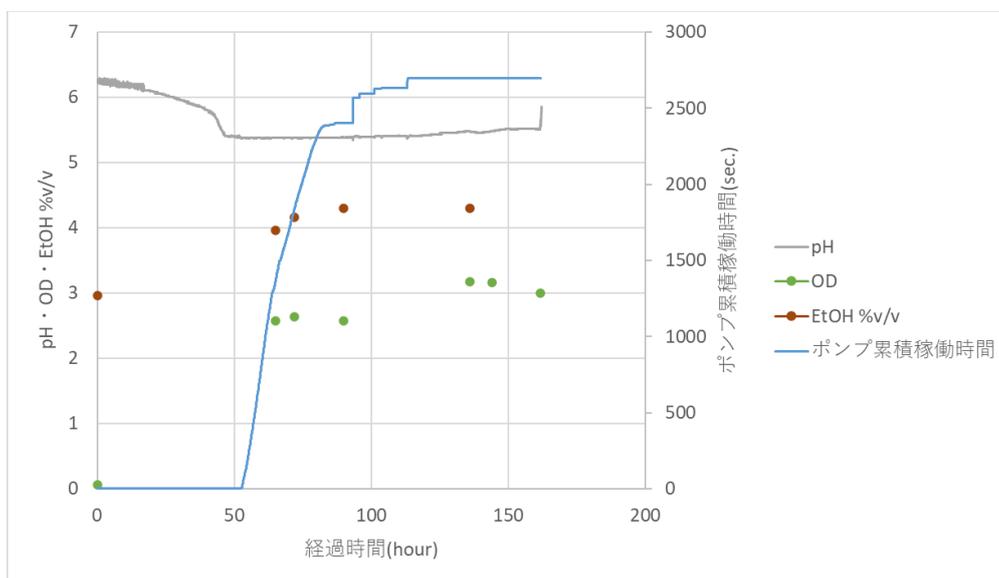


図3-4 pHセンサーによる連続培養の制御①

1 - (3) - 1 - 2 - 2 pHセンサーによる連続培養の制御2

5%(v/v)エタノール含有のフィード培地では、エタノールの蓄積が速すぎて菌体の増殖速度が大幅に低下した為、開始時の張込み培地とフィード培地中のエタノール濃度を同一にした。菌体のエタノール耐性の獲得はODの上昇および培地添加量の増加を指標として評価することができる。また、オーバーフローによる液量調整では排出不良が確認された為、ポンプを利用した排出を実施した。

(方法)

YMプレート(3g酵母エキス、5gペプトン、3g麦芽エキス、10gグルコース、20g寒天、pH 5.5 / 1 L)で培養した菌体をかきとり、試験管に分注したYPD培地(10g酵母エキス、20gペプトン、20gグルコース / 1 L)に植菌し30°C、150rpmで一晩培養し前培養菌液とした。

250mL容培養装置に3%(v/v)エタノール含有YPX培地(10g酵母エキス、20gペプトン、40gキシロース、30mLエタノール、pH 6.4 / 1 L)を100mL張込み、前培養菌液を1mL植菌し、30°C、300rpmで本培養を開始した。pHセンサーにより培養液のpHを測定し、培養液pHが設定値以下でフィード用ポンプが作動して培地が添加される設定とした。pHの設定値は120時間目まではpH 5.4、120時間目以降はpH 5.5とした。フィード培地には3%(v/v)エタノール含有YPX培地(10g酵母エキス、20gペプトン、40gキシロース、50mLエタノール、pH 6.4 / 1 L)を使用した。また培養槽内部の液量を一定に保つために、100mLの液面の高さに排出ラインのパイプ先端を触れさせた状態で排出用ポンプを接続して連続的に作動させ、フィード添加による増

加分を培養槽の外部に排出する形にした。菌体のエタノール耐性の獲得は OD の上昇および培地添加量の増加を指標として評価した。

(結果と考察)

オーバーフローによる排出と比較すると、pH の低下が緩やかになり、フィード培地の添加が少なく、OD が高い値で推移していた。pH 低下が緩和した原因としては、排出用ポンプの連続的な運転により培養槽内部が陰圧となることで、培養液中の溶存二酸化炭素が気相に移動しやすくなった為と考察される。また、フィード培地の流入量が少なく、培地の希釈率が菌体増殖速度を下回っていることが想定された為、120 時間目以降は pH の設定値を pH 5.5 に引き上げた。(図 3-5) 設定値を pH 5.5 に変更後は OD の増加及び培地添加量の増加が確認されなかったことから、菌体のエタノール耐性は大幅には上昇していないと考察された。また、培地の流入と菌体増殖が同調した 150 時間目以降はフィード用ポンプの作動時間が直線的であることから、培地添加速度を制御せず一定流量でのフィードであっても連続培養が可能であることが示唆された。

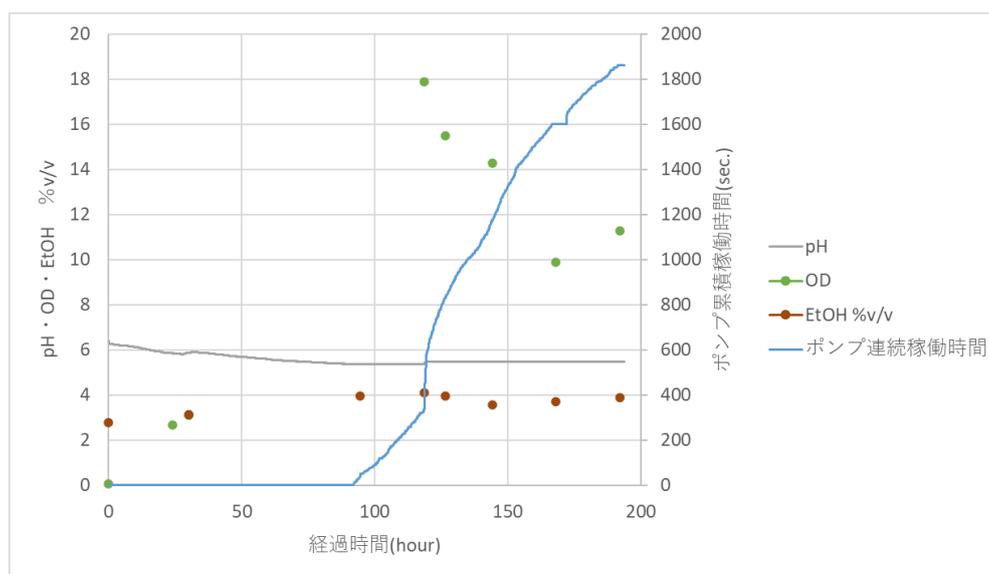


図 3-5 pH センサーによる連続培養の制御②

1 - (3) - 1 - 2 - 3 培地定速フィードでの連続培養

定速フィードでの連続培養が可能であることが示唆された為、2 ラインを同調させて運転可能なポンプを用いて、フィード量および排出量を同調させた連続培養を試みた。ここまでの試験から、フィード培地の添加速度は概ね 1 mL/hour から 5 mL/hour 程度の低速での添加が適していると判断し、低速での連続的な運転を実施した。

(方法)

YM プレート (3g 酵母エキス、5g ペプトン、3g 麦芽エキス、10g グルコース、20

g 寒天、pH 5.5 / 1 L) で培養した菌体をかきとり、試験管に分注した YPD 培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、20 g グルコース / 1 L) に植菌し 35°C, 150 rpm で一晩培養し前培養菌液とした。

250mL 容培養槽に 5.5%(v/v)エタノール含有 YPX 培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、40 g キシロース、30 mL エタノール、pH 6.4 / 1 L) 又は 6.0%(v/v)エタノール含有 YPX 培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、40 g キシロース、60 mL エタノール、pH 6.4 / 1 L) を 100 mL 張込み、前培養菌液を 1 mL 植菌し、35°C又は 36°C、300 rpm で本培養を開始した。本培養開始後 OD=1.4 より高い値となった時点でフィードラインと排出ラインが同調できるポンプを作動させて連続培養を開始した。フィード培地は張込み培地と同じ組成を使用した。菌体のエタノール耐性の獲得は OD の上昇を指標として評価した。また、培地に含まれる糖をキシロースに限定することにより、キシロース資化能力の増強も同時に試みた。

(結果と考察)

初めに#30-F-9 株を用いて、培養温度 35°C、5.5%(v/v)エタノール含有 YPX 培地で連続培養を実施した。(図 3-6) 19 時間目の時点で OD が目標値を大幅に超えていたため、19 時間目から 67 時間目までは約 3.5 mL/hour の流速で作動させた。しかし、今度は OD が減少していった為、67 時間目以降は約 1 mL/hour の流速での運転に切り替えた。67 時間目から 400 時間目までは OD = 1.5 前後で推移している為、フィードによる培地の希釈と菌体の増殖速度が釣り合っていると考えられたが、400 時間目以降は OD が徐々に上昇しており、菌体のエタノール耐性獲得により増殖速度が培地の希釈を上回ったと考察できる。581 時間目の菌体を回収し、# 30-F-10 株とした。

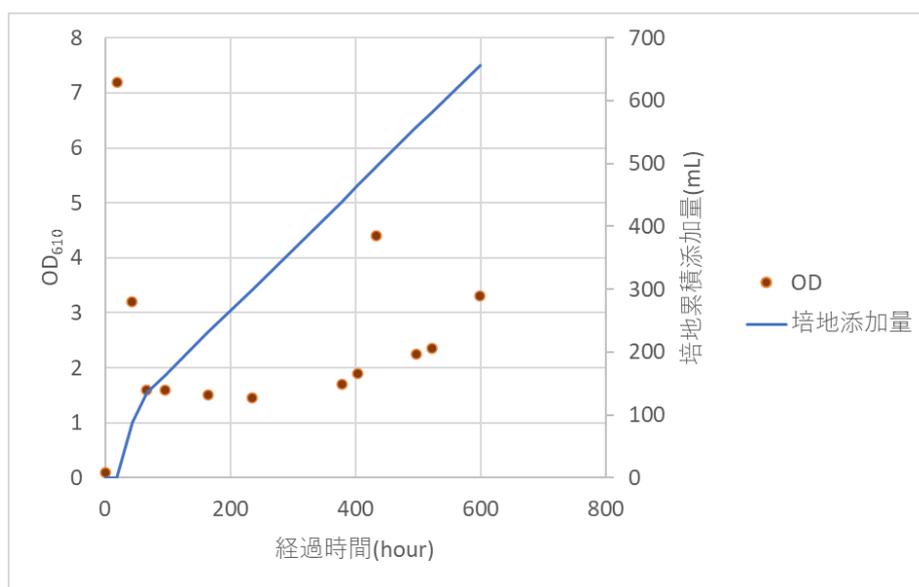


図 3-6 培地定速フィードでの連続培養 1

培養温度 35°C、5.5%(v/v)エタノール含有 YPX 培地での菌体のエタノール耐性が獲得できた為、#30-F-10 株を用いて温度耐性の獲得とエタノール耐性の更なる上昇を目指した。そのために、培養温度 36°C、6.0%(v/v)エタノール含有 YPX 培地による連続培養を行った(図3-7)。50 時間目からポンプを作動させ、OD=2.0 以上となった 168 時間目と 312 時間目でそれぞれポンプの流速を段階的に上昇させた。ポンプの流速を上昇させても OD は 50 時間目とほぼ同じ値となっている為、エタノール耐性および温度耐性の獲得が示唆される結果となった。336 時間目の菌体を回収し、#30-F-11 株とした。

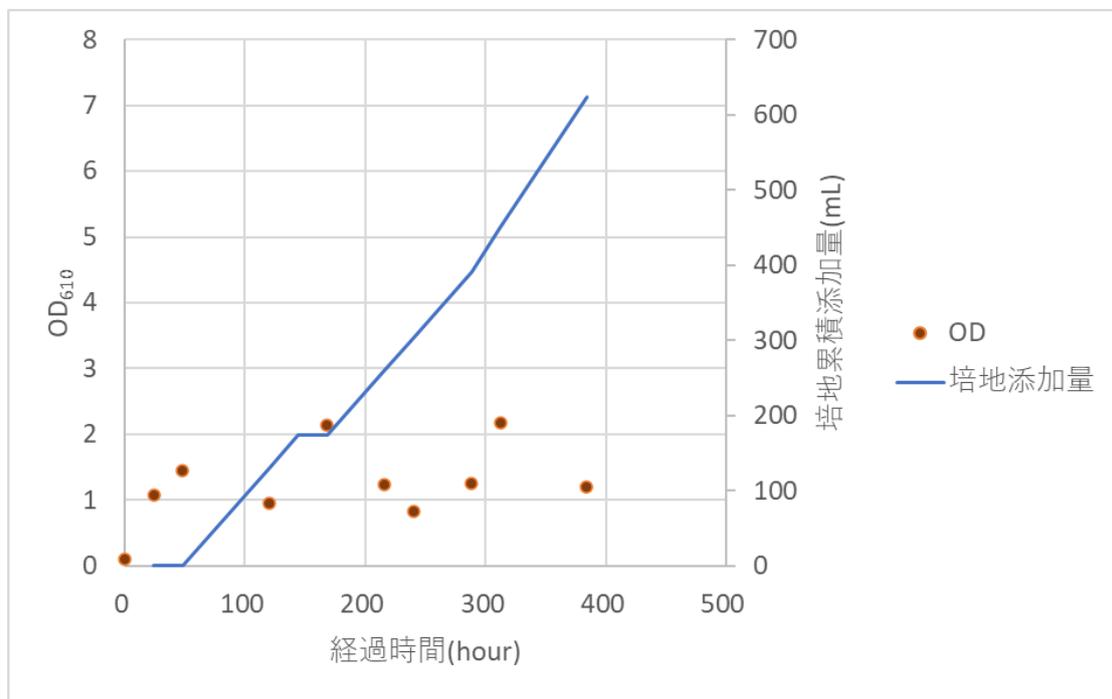


図3-7 培地定速フィードでの連続培養2

1 - (3) - 1 - 3 育種により得られた菌株の性能評価

スクリーニングで得られた#30株をもとに、育種により#30-A-1株、#30-F-1株、#30-F-9株、#30-F-10株、#30-F-11株が得られた。得られた育種株5株と#30株(#30-WT)を比較し性能評価を行った。

1 - (3) - 1 - 3 - 1 高グルコース濃度培地における評価

高濃度でグルコースを含む培地による培養で菌体が生産するエタノール蓄積によりエタノール濃度が耐性の限界に到達すると生育が停滞することが想定される為、グルコース濃度14%(w/v)培地での評価を試みた。

(方法)

YPDプレート(10g酵母エキス、20gペプトン、20gグルコース、20g寒天/1L)で培養した菌体をかきとり、試験管に10mL分注したYPD液体培地(10g酵母エキス、20gペプトン、20gグルコース/1L)に植菌した。35°C, 150rpmの設定で培養を行い、エタノール濃度、グルコース濃度、ODで評価した。

(結果と考察)

#30-WT株においてグルコース濃度14%(w/v)での培養では、24時間目以降のグルコースの消費が停止する現象が観察された。一方、育種株では24時間目以降もグルコース消費は停止せず、#30-F-10株を除く育種株では48時間目でほぼグルコースが枯渇していた。また、#30-F-10株も#30-WT株と比較すると残存しているグルコースの濃度が低い結果となった(図3-8)。さらに、#30-F-10株を除く育種株では48時間目の培地中のエタノールの濃度が#30-WT株と比較して高い値となっており、より高濃度のエタノールが生産できることが分かった。これらの結果より、育種株はエタノール耐性が増強され、より高濃度のエタノール存在下でも糖からエタノールを生産できるようになった(図3-9)。一方で、育種株では生育が停止する前にグルコースが枯渇してしまったため、本試験ではエタノール耐性を正確に評価することができなかった。また、ODによる評価により#30-F-10株および#30-F-11株ではエタノール存在下で#30-WT株より菌体量が多くなることが示唆される結果となった(図3-10)。

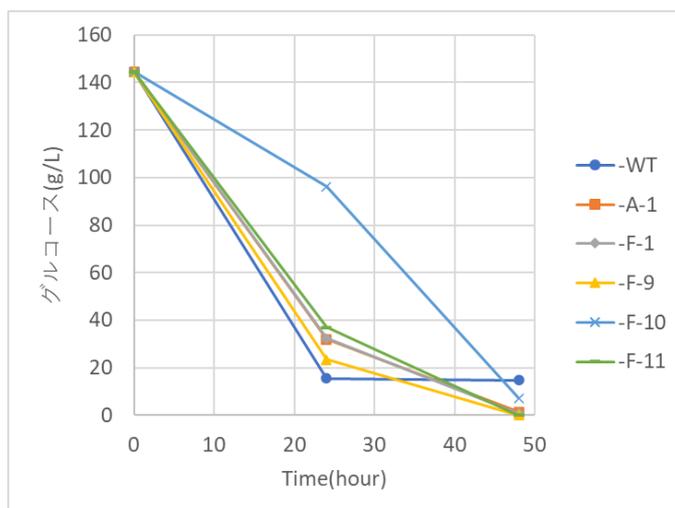


図3-8 高グルコース濃度培地での培養中のグルコース濃度の推移

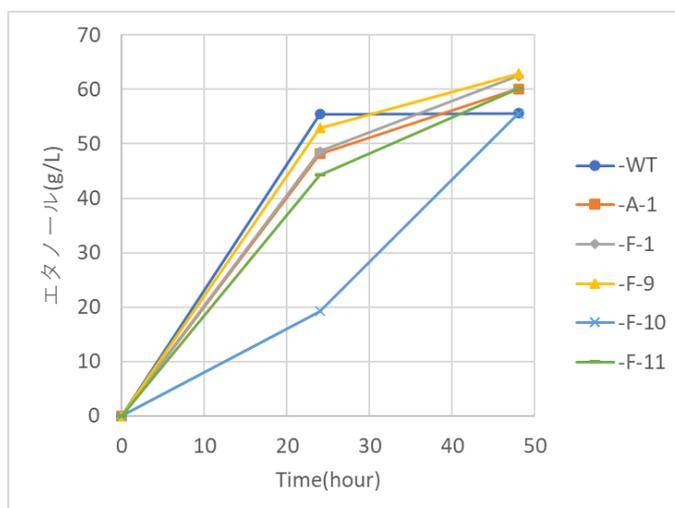


図3-9 高グルコース濃度培地での培養中のエタノール濃度の推移

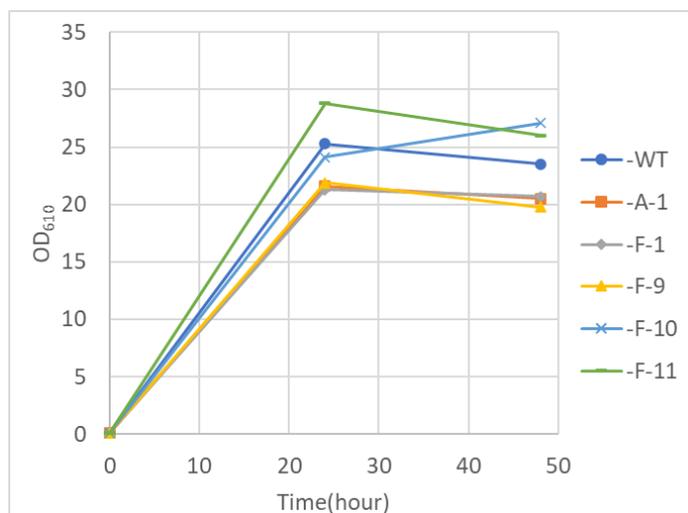


図3-10 高グルコース濃度培地での培養中のODの推移

1 - (3) - 1 - 3 - 2 エタノール含有培地における増殖評価

高グルコース濃度培地での評価では、育種株それぞれのエタノール耐性評価が難しい結果となった為、更に培地にエタノール 2%(v/v)を添加した状態で培養を開始し、エタノール耐性の上限と培養初期の低濃度エタノールによる影響の評価を行った。

(方法)

YPD プレート (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、20 g グルコース、20 g 寒天/1 L) で培養した菌体をかきとり、試験管に 10 mL 分注した YPD 液体培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、20 g グルコース、20 mL エタノール/1 L) に植菌した。35°C, 150 rpm の設定で培養を行い、エタノール濃度、グルコース濃度、OD で評価した。

(結果と考察)

#30-WT 株、#30-A-1 株では 24 時間目以降グルコース消費の停滞が確認されたが、#30-F-1 株、#30-F-9 株、#30-F-11 株では 24 時間目以降も継続的にグルコース消費が確認された。一方で#30-F-10 株はグルコース消費が著しく遅かった (図 3 - 1 1)。

培養液中のエタノール濃度は#30-WT 株、#30-A-1 株では 48 時間目の時点で 65 g/L 程度となっているが、#30-F-1 株、#30-F-9 株、#30-F-11 株では 65 g/L 以上の濃度となっていたことから、高いエタノール耐性を獲得し、より高濃度のエタノールを生産できることが示唆された。一方で、#30-F-10 株はエタノールをほとんど生産しない結果となった (図 3 - 1 2)。

OD に着目すると、#30-A-1 株、#30-F-1 株、#30-F-9 株では#30-WT 株よりも少し低い値となったが、#30-F-10 株、#30-F-11 株では#30-WT 株よりも高い値となった。特に#30-F-10 株はグルコースの消費が遅く、エタノールの蓄積が少ないにも関わらず、OD の値は#30-WT 株の 2 倍近い値となっていた。これらの結果より、#30-F-10 株はグルコースからエタノールを生産しない為、エタノール含有培地中で高い増殖能力を得る形質を獲得した株が選抜された可能性があるが、こちらの形質は#30-F-11 の時点では淘汰され再び高いエタノール生産能を有しながらエタノール耐性を持つ株として選抜されたと考察できる (図 3 - 1 3)。

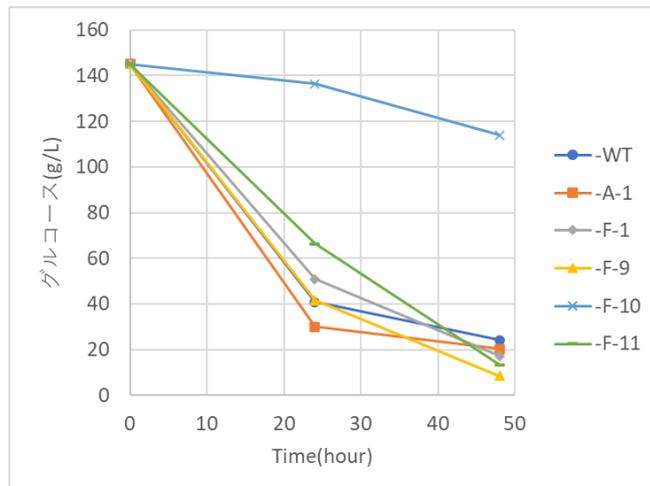


図 3 - 1 1 エタノール含有培地における培養中のグルコース濃度の推移

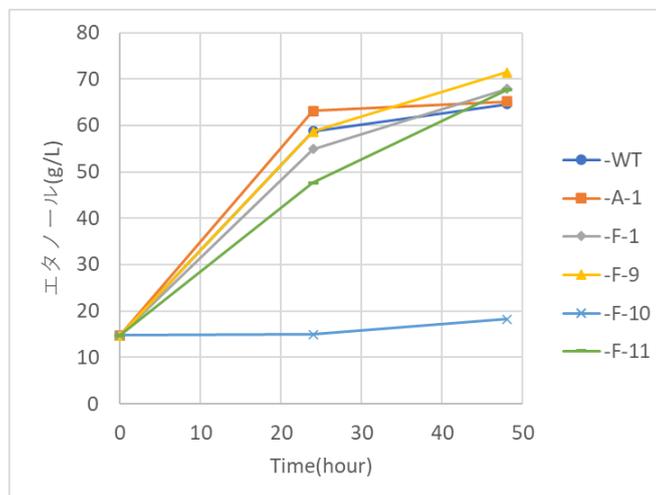


図 3 - 1 2 エタノール含有培地における培養中のエタノール濃度の推移

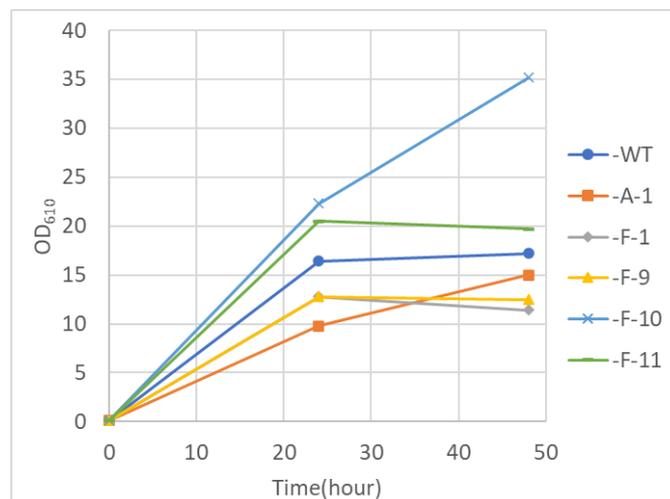


図 3 - 1 3 エタノール含有培地における培養中の OD の推移

1 - (3) - 1 - 3 - 3 キシロース培地における評価

連続培養による育種ではキシロース資化能の増強も目標とし、糖としてキシロースのみを含む培地で連続培養を実施した。よって、キシロース資化能が強化されたかどうかの評価を実施した。

(方法)

YPD プレート (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、20 g グルコース、20 g 寒天/1 L) で培養した菌体をかきとり、試験管に 10 mL 分注した YPX 液体培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、40 g キシロース/1 L) に植菌した。35°C, 150 rpm の設定で培養を行い、エタノール濃度、キシロース濃度、OD で評価した。

(結果と考察)

キシロース消費速度は#30-WT 株が最も高い結果となったが、48 時間目では#30-F-10 株を除いたすべての株で完全消費しており、消費速度に大きな差はなかった (図 3-14)。また、#30-F-1 以外はほとんどエタノールを生産しておらず、#30-F-1 株も収率は低い値となった (図 3-15)。OD は育種株で#30-WT 株と比較し高い値となるものが多い結果となった (図 3-16)。これらの結果は、育種の際にキシロースからの増殖を選択圧として選抜したことにより、キシロースをエタノール生産ではなく菌体増殖に利用する株が選択された可能性があることを示唆している。

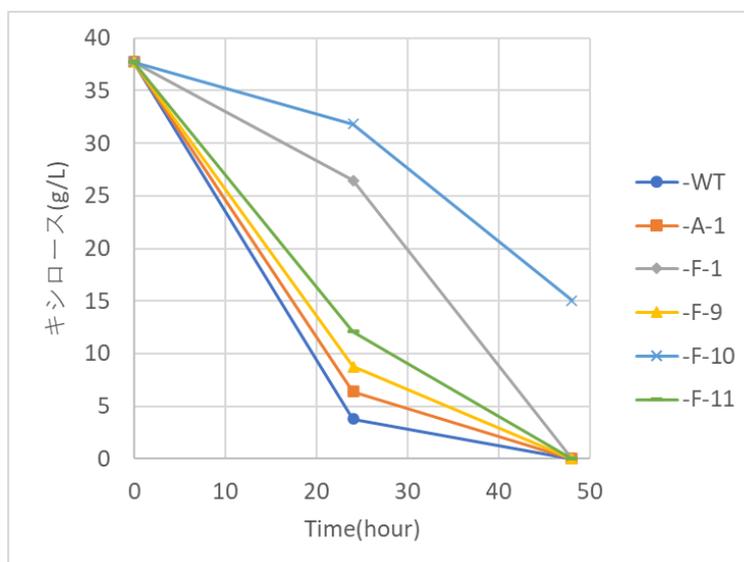


図 3-14 キシロース培地での培養中のキシロース濃度の推移

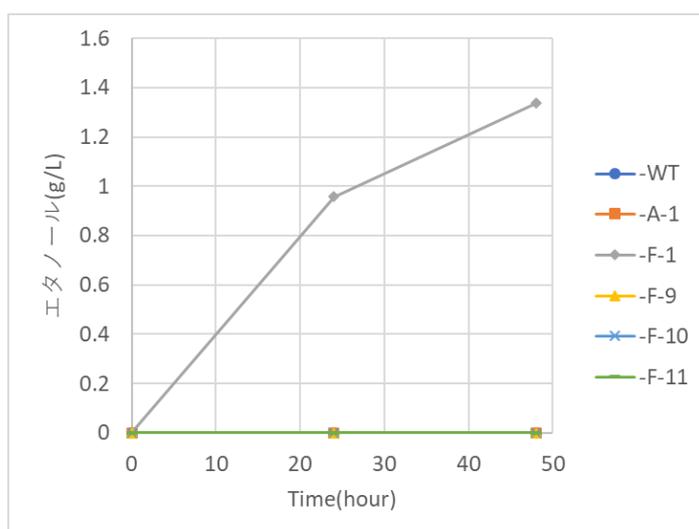


図3-15 キシロース培地での培養中のエタノール濃度の推移

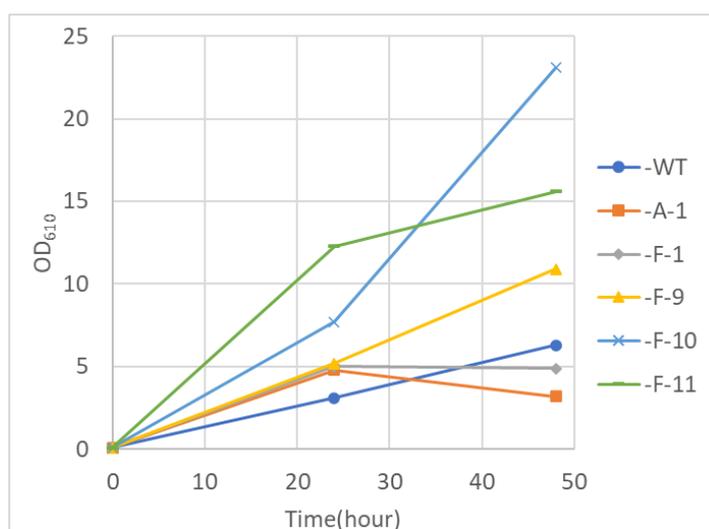


図3-16 キシロース培地での培養中のODの推移

1-(3)-1-3-4 育種株のエタノール耐性の評価

これまでの育種株の評価により育種株はエタノール耐性の上昇が示唆される結果となったが、それぞれの株で菌体増殖速度やエタノール生産濃度に差が見られた為、より定量的な方法によるエタノール耐性の評価を試みた。

(方法)

YPD プレート (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、20 g グルコース、20 g 寒天/1 L) で培養した菌体をかきとり、試験管に 10 mL 分注した YPD 液体培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、40 g グルコース、エタノール 45 mL~60 mL/1 L) に植菌した。30°C、120 rpm の設定で培養を行い、培養 24 時間目の OD₆₁₀ を測定し最もエタノール

濃度の低い 4.5%(v/v)との相対値で評価した。

(結果と考察)

#30-WT 株では 6%(v/v)エタノール含有培地ではほぼ増殖できず、エタノール濃度 5.5%(v/v)が増殖可能限界であったが、育種の世代が進むごとに 6%(v/v)エタノールでの OD の相対的値が高い値となり、増殖可能限界濃度の上昇が確認できた(図 3-17)。

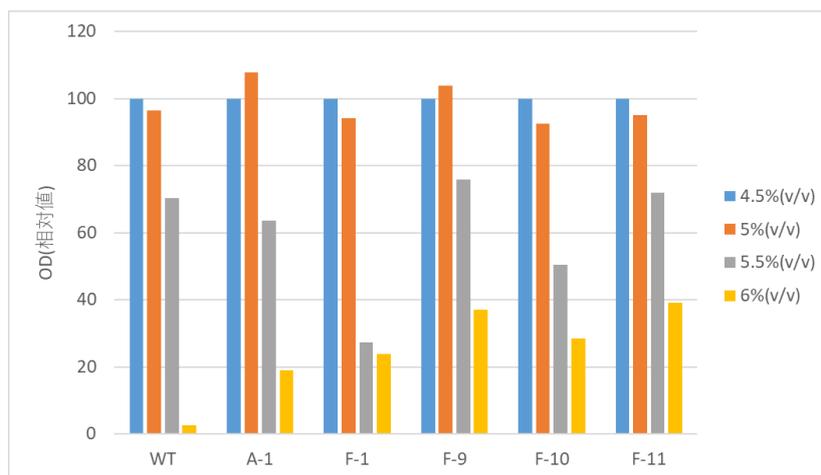


図 3-17 #30 育種株 エタノール含有培地での増殖評価

1-(3)-1-3-5 育種株の高温耐性の評価

連続培養による育種では並行して高温耐性獲得も考慮し、通常酵母の培養温度よりも高い温度で実施した。育種株による高温耐性の獲得確認の為、高温条件下で培養し評価を実施した。

(方法)

YPD プレート (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、20 g グルコース、20 g 寒天/1 L) で培養した菌体をかきとり、試験管に 10 mL 分注した YPD 液体培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、40 g グルコース/1 L) に植菌した。30°C、35°C、37°C、39°C、42°C の温度条件で 150 rpm の設定で培養を行い、培養 24 時間目の OD₆₁₀ を測定し最も低い温度である 30°C との相対値で評価した。

(結果と考察)

#30 株は野生型の段階で高温での増殖が可能であり、育種による高温耐性の強化は確認されなかった(図 3-18)。一方で、菌体開発での目標である 35°C から 39°C の温度でも十分な増殖速度で増殖は可能であることが示された。

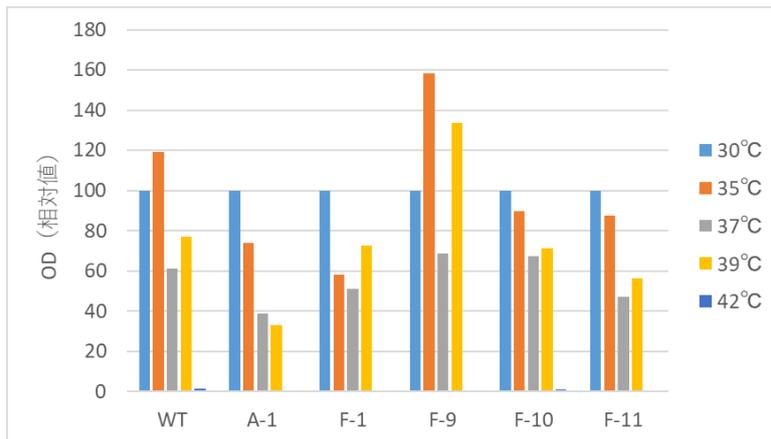


図3-18 #30 育種株 高温条件下での増殖評価

1-(3)-2 組換えによるキシロース資化遺伝子強化株の作製

酵母にキシロース資化能を付与するには、XR (xylose reductase), XDH (xylitol dehydrogenase), XK (xylulose kinase)の3つの遺伝子を強化する必要がある(図3-19)。そこで、令和4年度の報告にて選抜された *Saccharomyces cerevisiae* #50 株についてこれらの遺伝子を強化し、C6糖とC5糖を両方利用できる酵母を作製した。

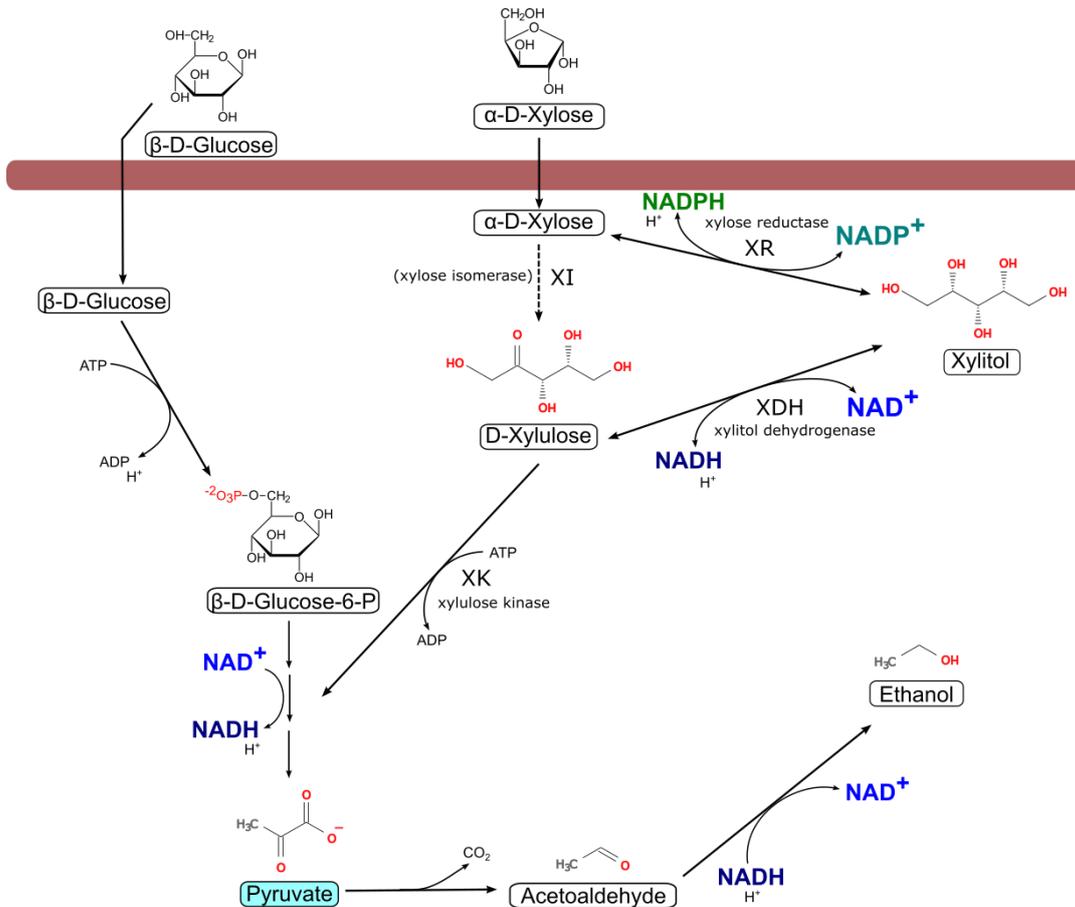


図3-19 酵母のキシロース資化経路概略

1 - (3) - 2 - 1 染色体上の遺伝子導入部位の比較

遺伝子組換えによって染色体上に遺伝子を導入する際、染色体上の部位によって導入した遺伝子の発現量が異なる可能性が考えられる。そこで、*URA3*, *ADH2* の 2 カ所の挿入部位について、キシロース資化遺伝子群の発現量を比較した。

(方法)

XR-XDH-XK を連結した配列の上流および下流に *URA3*, *ADH2* の相同配列を連結し、下記に示すプライマーを用いて PCR により増幅した。

URA3 部位への挿入

5'-TCGCTATTATTCAAGCTTTGGCAC-3'
5'-GGCGTGAGCGTCAAGGTC-3'

ADH2 部位への挿入

5'-GTGAAGCTATCTTCCAGCAAAG-3'
5'-ATTTTCTCCCTCACTGCATCC-3'

得られた約 9 kbp の断片を酵母に形質転換し、キシロースのみを炭素源としたプレート上で培養した。プレート上に出現したコロニーを下記プライマーにより PCR で増幅し、目的の遺伝子が挿入されていることを確認した。

URA3 部位への挿入確認

5'- GCTGGAAGATAATAACGATCTGCG-3'
5'- GGTTGTTCCGTTTGGACTTGTCG-3'

ADH2 部位への挿入確認

5'-GAACACCGGGCATCTCCAAC-3'
5'- TCCCATCTACGGAACCCTGATC-3'

得られた菌株を用いて、試験管に分注した YPDX 培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、40 g グルコース、10 g キシロース / 1 L) に植菌し 30°C で 48 時間培養した。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清を HPLC により分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム：Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5 mM H₂SO₄

温度：55°C

検出：RID

(結果と考察)

URA3 部位、*ADH2* 部位にキシロース資化遺伝子をヘテロに導入した株を作製し、それぞれ S924 株、S929 株と命名した。これらの株のキシロース資化能を野生株と比較した。

30°Cにおいて、野生株では微量しかキシロースを消費できないのに対して、S924 株、S929 株ではキシロース資化能が増加した(図3-20, 3-21, 3-22)。特に S924 株では 10 g/L のキシロースを 48 時間以内に全て消費することができた。このことから、キシロース資化遺伝子の挿入部位としては *ADH2* 部位より *URA3* 部位の方が適していることが分かった。

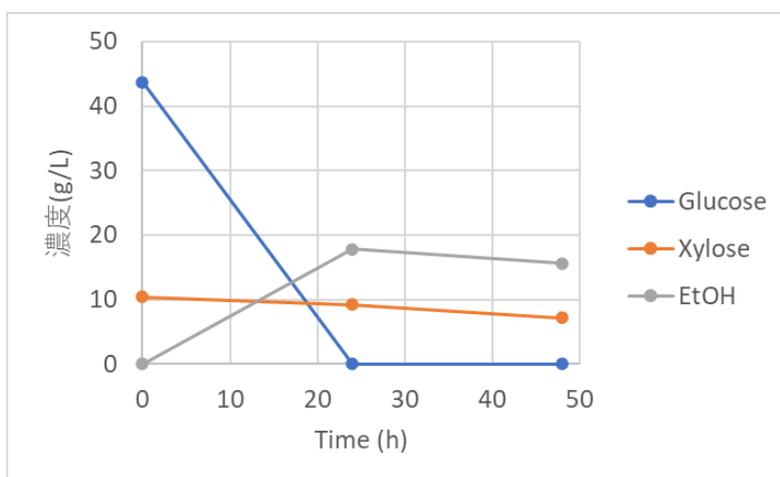


図3-20 #50株の30°Cにおける発酵試験

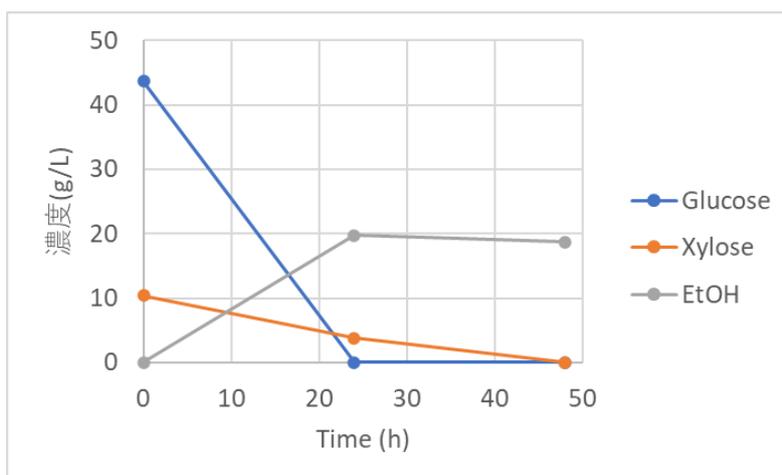


図3-21 S924株の30°Cにおける発酵試験

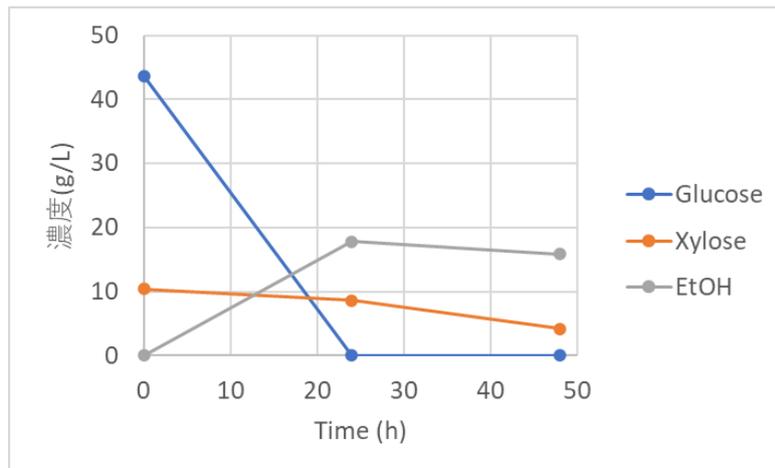


図3-2-2 S929株の30°Cにおける発酵試験

次に、糖化酵素の至適温度を考慮して、より高温での発酵性能を35°Cで比較した(図3-2-3, 3-2-4, 3-2-5)。35°Cにおいても、*URA3*部位へキシロース資化遺伝子を挿入したS924株の方が優れたキシロース資化能を持つことが確認できた。一方で、35°Cに温度を上げると、全ての株において、後半にエタノールの減少が観察された。

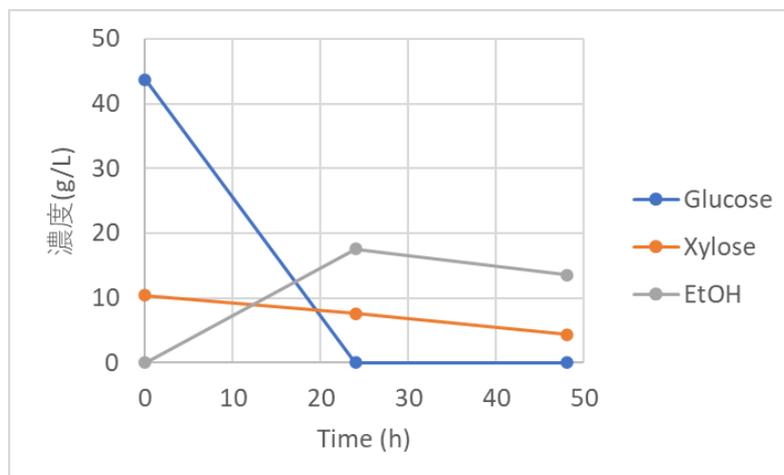


図3-2-3 #50株の35°Cにおける発酵試験

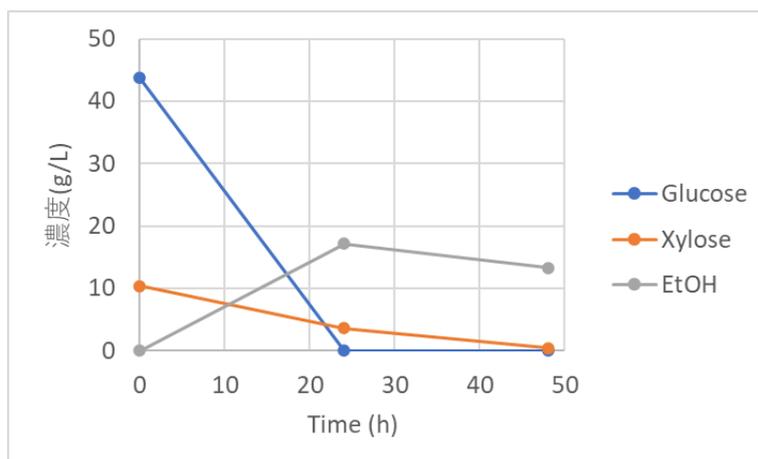


図 3 - 2 4 S924 株の 35°Cにおける発酵試験

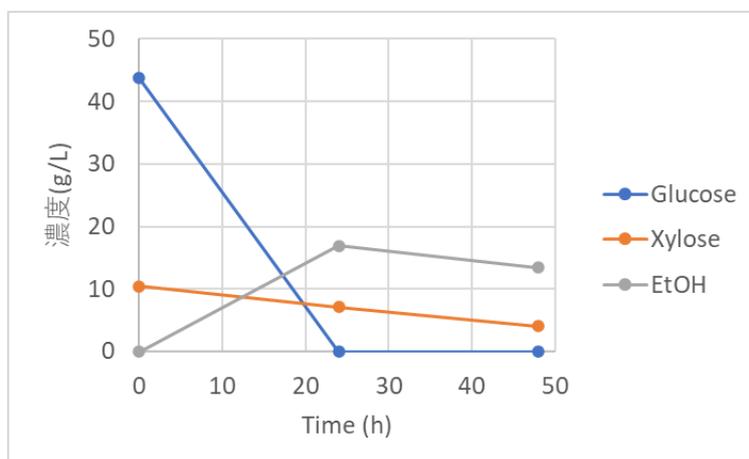


図 3 - 2 5 S929 株の 35°Cにおける発酵試験

35°Cにおけるエタノール減少の原因を明らかにするため、キシロース代謝の中間体であるキシリトールの定量分析を行った(図3-26, 3-27, 3-28)。その結果、全ての株において30°Cと比べて35°Cでキシリトールが顕著に蓄積していることが分かった。中でもS924株の35°Cにおけるキシリトール蓄積量が顕著に多かったが、これはキシロースの消費量も他の株より多かったためだと思われる。

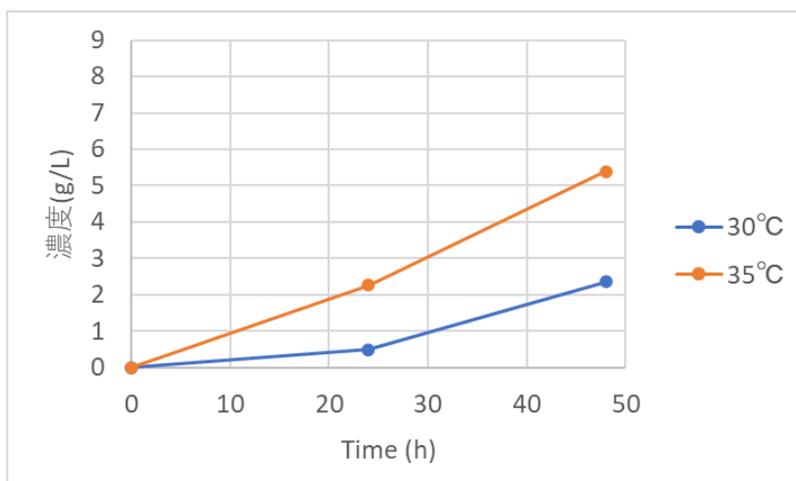


図3-26 #50株の各温度におけるキシリトール蓄積量

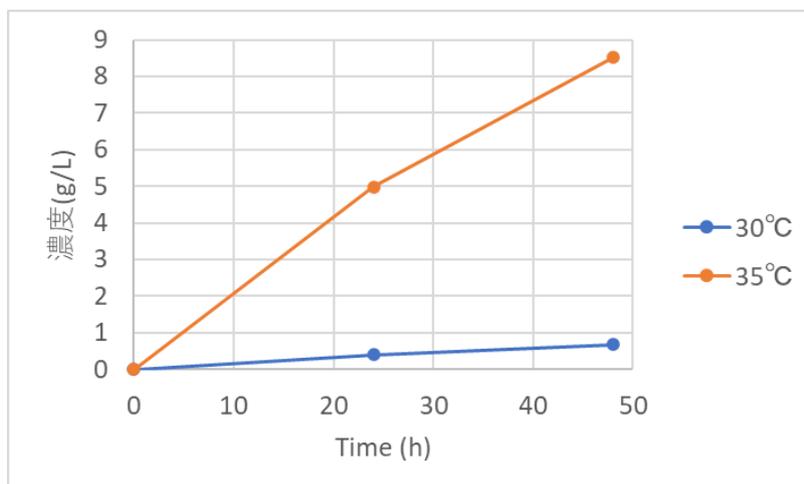


図3-27 S924株の各温度におけるキシリトール蓄積量

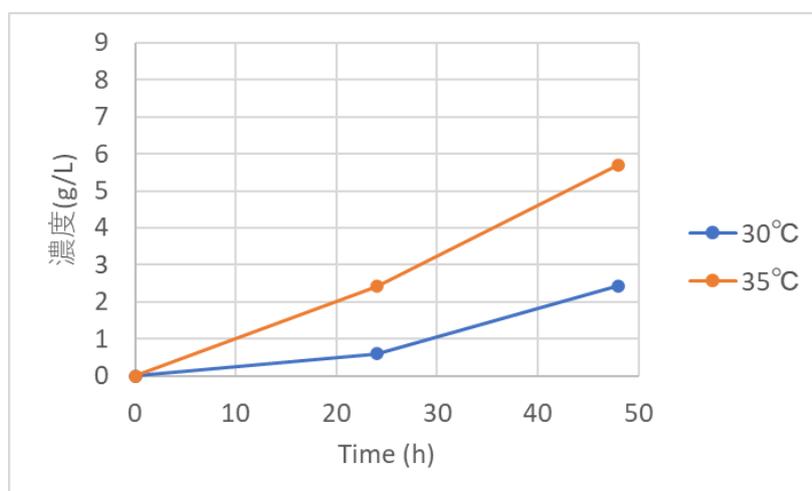


図3-28 S929株の各温度におけるキシリトール蓄積量

1 - (3) - 2 - 2 キシロース資化遺伝子の強化

1 - (3) - 2 - 1 で作製した S924 株は、30°Cでは高いキシロース資化能を示したが、35°Cではキシリトールが蓄積してしまうことが分かった。そこで、キシリトールを代謝する酵素である XDH の活性を上げるため、染色体上の *XDH* のプロモーターを酵母において強力なプロモーターであることが知られている PGK1 プロモーターに置換した株を作製し、S937 株と命名した。

この株を使用して、以下のように発酵試験を行い、キシロース資化能を評価した。

(方法)

YPD プレートで培養した菌体をかきとり、試験管に分注した YPDX 培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、40 g グルコース、10 g キシロース / 1 L) に植菌し 35°Cで 48 時間培養した。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清を HPLC により分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム：Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5 mM H₂SO₄

温度：55°C

検出：RID

(結果と考察)

XDH を強化した S937 株においては、S924 株とは異なり 35°Cでもエタノールが後半大きく減少することはなく、キシリトールの蓄積も抑えられた (図 3 - 2 9, 3 - 3 0)。よって、キシリトールの蓄積に対して XDH 活性の強化は有効な施策だったと言える。

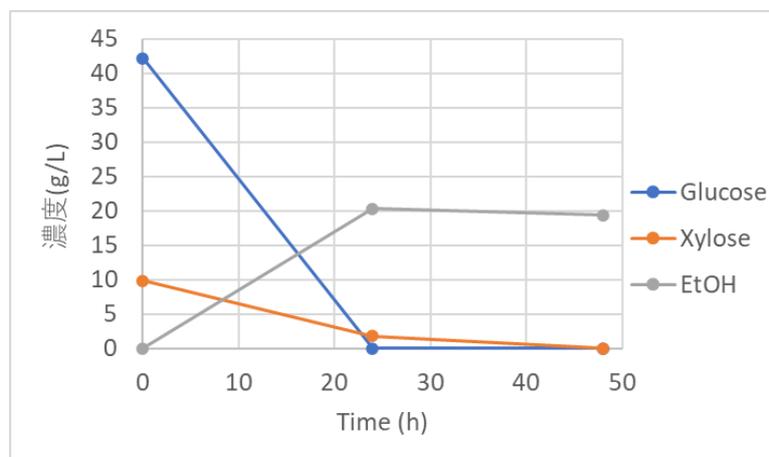


図 3 - 2 9 S937 株の発酵試験

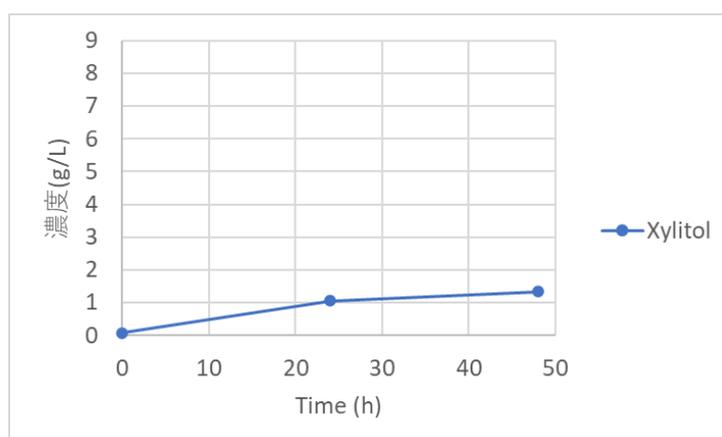


図3-30 S937株のキシリトール蓄積量

1-(3)-2-3 同時糖化発酵によるセルフクロニング株の評価

キシロース資化能力の高いセルフクロニング株が得られたことから、スクリーニングと育種により作成した#30-A-1株とどちらがよりパルプからの同時糖化発酵に適しているかを1L発酵槽を用いて比較した。

(方法)

1L発酵槽に1%(w/v) CSL、0.5%(w/v)硫酸アンモニウムを加えて500mLとし、糖化酵素、酵母を加えて35°C、250rpmで攪拌した。パルプは複数回に分けて添加し、最終的に10%(w/v)パルプ(広葉樹クラフト漂白パルプ)となるようにした。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清をHPLCにより分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム：Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5mM H₂SO₄

温度：55°C

検出：RID

(結果と考察)

#30-A-1株を用いた広葉樹クラフト漂白パルプの同時糖化発酵の結果、エタノール収量は37.8g/Lであったが(図3-31)、S937株を用いた場合には38.1g/Lに改善した(図3-32)。また、#30-A-1株ではキシロースの資化が遅く、大部分が残ってしまったが、S937株ではパルプの糖化により発生するキシロースを48時間でほぼ全て消費することができた。これらのことから、パルプの同時糖化発酵において使用する酵母は、S937株の方が優れていると言える。よって、以降の試験においてはS937株を用いた。

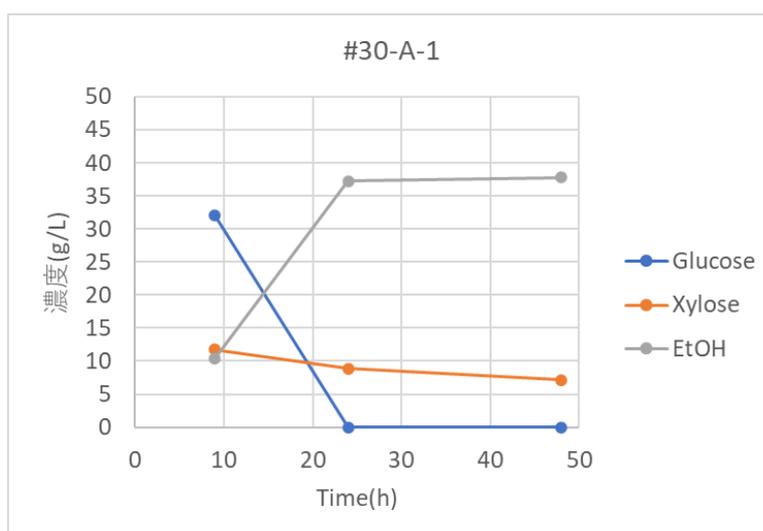


図 3-3-1 広葉樹クラフト漂白パルプを用いた#30-A-1 株による同時糖化発酵

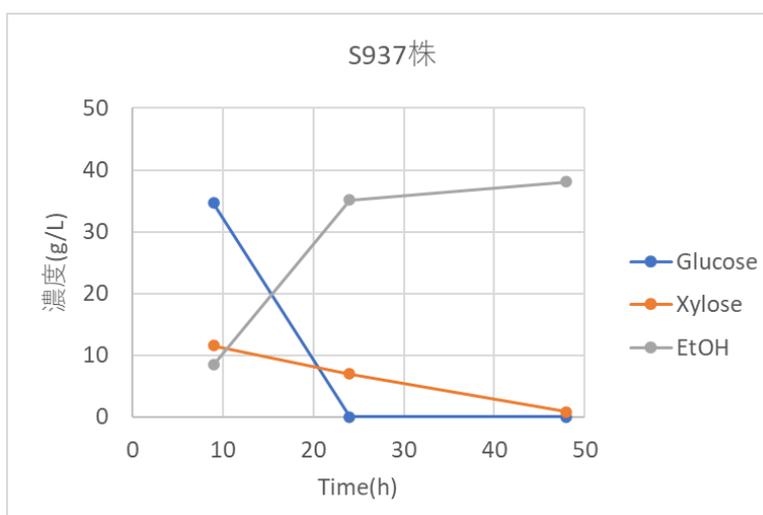


図 3-3-2 広葉樹クラフト漂白パルプを用いた S937 株による同時糖化発酵

1-(3)-2-4 10L 発酵槽を用いた各種パルプにおける同時糖化発酵性能の評価

1-(1)-1-2の内容と同様の方法で S937 株を用いて各種パルプについて評価した。

①広葉樹クラフト漂白パルプ

S937 株はキシロースの資化性が高く、48 時間でキシロースの残存量は 1.3 g/L と低く抑えられていた (図 3-3 3)。またエタノールの生産量もキシロースの減少に呼応して増加しており、キシロースからエタノールが生産されていることが示唆された。41.2 g/L のエタノールが得られ、パルプあたりの収率は 37.9%(g/sugar g)であった。

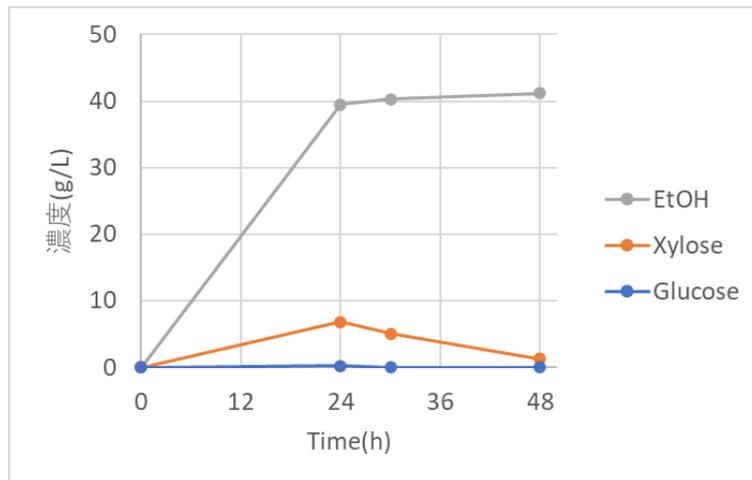


図 3 - 3 3 広葉樹クラフト漂白パルプを用いた S937 株の同時糖化発酵

②針葉樹クラフト漂白パルプ

S937 株はキシロースの資化効率がよく、48 時間後の残存量は 0.23 g/L であった (図 3 - 3 4)。酵母が資化するグルコース、マンノースは 24 時間以降の発酵液中には含まれていなかった。エタノールの収量は 24 時間以降も増加しており最終的に 46.2 g/L であった。パルプあたりのエタノール収率は 42.3%(g/sugar g)であった。また残存するキシロースは、もともとパルプ中の含量も少ないこともあって、広葉樹クラフト漂白パルプ使用時よりも低く抑えられていた。

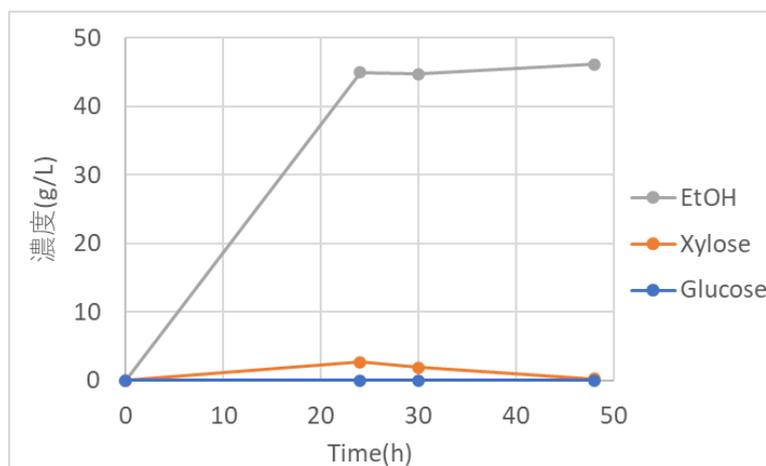


図 3 - 3 4 S937 株による針葉樹クラフト漂白パルプの同時糖化発酵

③針葉樹クラフト漂白前パルプ

針葉樹クラフト漂白前パルプを原料とした同時糖化発酵によるエタノールの生産を検討した結果、針葉樹クラフト漂白パルプと同様の結果が得られた (図 3 - 3 5)。

酵母が資化するグルコース、マンノースは24時間以降の発酵液中には検出されなかった。キシロースは24時間後にはまだ5.7 g/L残っていたが、48時間後には全て資化された。しかし、24時間以降のキシロースの消費に伴うエタノールの増加は観察されなかった。また、アラビノースが検出されたことも他の結果とは異なっていた。エタノールの収量は24時間でほぼ頭打ちとなり44.4 g/Lであった。パルプあたりのエタノール収率は41.0%(g/sugar g)であった。針葉樹クラフト漂白パルプの結果と比較するとエタノール濃度、糖からの収率ともにやや低い結果となった。

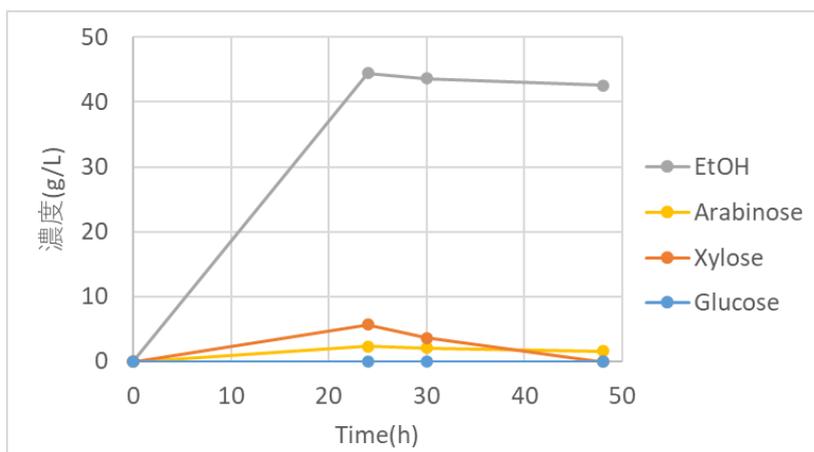


図3-35 S937株による針葉樹クラフト漂白前パルプの同時糖化発酵

④脱墨古紙パルプ

同様に、脱墨古紙パルプの同時糖化発酵を検討した(図3-36)。キシロースは24時間以降減少しており、48時間で0.27 g/Lまで減少したが、消費しきれなかった。エタノールの収量は24時間以降も若干増え続け、48時間で31.3 g/Lとなった。パルプあたりのエタノール収率は31.2%(g/sugar g)であり、バージンパルプの収率に比べると収率が低かった。

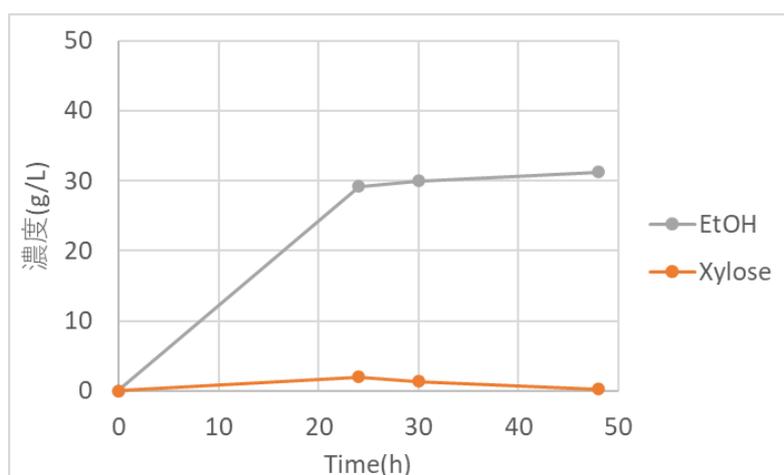


図 3 - 3 6 S937 株による脱墨古紙パルプの同時糖化発酵

評価したパルプの中では針葉樹クラフト漂白パルプが最もエタノールの生産量が多く、次いで針葉樹クラフト漂白前パルプ、広葉樹クラフト漂白パルプ、脱墨古紙パルプの順であり、#30 株を用いた 1 - (1) - 1 - 2 の結果と同じ結果となった。

1 - (3) - 2 - 5 300 L 発酵槽によるスケールアップ検討

これまでの結果より、4 種類のパルプ（広葉樹クラフト漂白パルプ、針葉樹クラフト漂白パルプ、針葉樹クラフト漂白前パルプ、脱墨古紙パルプ）を用いて同時糖化発酵が可能な事を確認できた。そこで、エタノール生産量が良好だった 2 種類のパルプとして広葉樹クラフト漂白パルプと針葉樹クラフト漂白パルプを選定し、300 L 発酵槽へのスケールアップを試みた。

1 - (3) - 2 - 6 広葉樹クラフト漂白パルプを用いた 300 L スケール同時糖化発酵

(方法)

300 L 発酵槽は、攪拌装置、ジャケット温調が可能な装置を使用し、100 L の張り込み液量で同時糖化発酵を行った。300 L 発酵槽に 1%(w/v) CSL、0.5%(w/v)硫酸アンモニウム、0.01%(v/v)消泡剤を加えて、パルプの固形物濃度に対して 15%(w/v)の糖化酵素、1%(v/v)の前培養した酵母を加えて 35°C、100 rpm で同時糖化発酵を行った。パルプは複数回に分けて添加し、最終的に 10%(w/v)パルプとなるようにした。通気は 0.1 vvm で行い、pH は 5.0 になるよう NaOH で調整した。培養液の一部をサンプリングし、粘度測定及び生菌数確認の為プレーティングを行った。培養液の粘度は B 型粘度計（東機産業社製、TV-100BL 型）を使用して測定した。またサンプルの一部を 1.5mL チューブに取り遠心分離により上清と沈殿を分離した後、糖濃度、エタノール濃度、残渣量の測定を 1 - (1) - 1 に記載の方法で行った。

排気中の CO₂ 及び O₂ 濃度は排ガス分析計（ABLE 社製、DEX-1562 型）で測定した。

パルプ投入から 48 時間培養後、300 L 発酵槽内の培養液を回収し、セラミックフィルターを用いて菌体及び残渣の除去を行った。ろ過条件は、0.1 μm のセラミックフィルターを使用し、循環線速 3 m/sec、出口圧力 0.1 MPa、温度制御無しで実施した。ろ過中の濃縮液は、30 分おきにサンプリングを行い、粘度測定を行った。ろ過終了後は、濃縮液の粘度及び残渣量を測定した。また残渣量から、濃縮液の濃縮倍率を求めた。

（結果と考察）

あらかじめ、最終張り込み液量が 100 L となるように、培地成分、酵素、酵母前培養液を加え、初発パルプ濃度 3% を加えて、同時糖化発酵を開始した。

培養開始時は攪拌数を 50 rpm としたが、溶け残ったパルプが影響し混合状態が悪かったため、4% 目の追加以降は攪拌数を 100 rpm に変更した。パルプ濃度 8% では、溶け残りのパルプが目立ってきたため、攪拌数を 160 rpm まで上げた。

同時糖化発酵中の酵母は酵素糖化によりグルコースが供給されるとそれに応じて増殖し、12 時間でほぼ 2×10^8 CFU/mL まで増殖した後ほぼその菌濃度を維持した。（図 3-37）

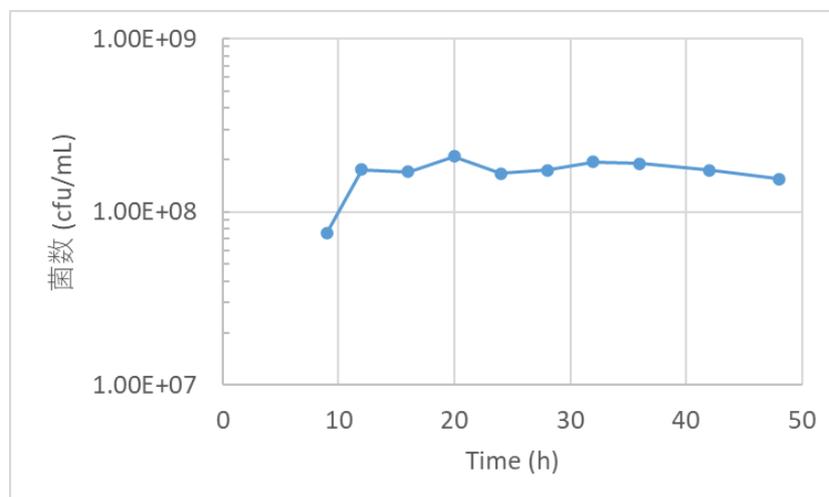


図 3-37 同時糖化発酵中の生菌数の推移

広葉樹クラフト漂白パルプには、単糖としてはほぼグルコースとキシロースから構成されており、C6 糖であるグルコースは速やかに消費された（図 3-38）。C5 糖であるキシロースはグルコースが枯渇した後にゆっくりと消費され、28 時間時点でエタノールの収量が最大の 39.5 g/L となった。その後、糖がほぼ枯渇した状態で発酵を続けたことによりエタノール濃度が多少低下したが、酵母が消費したのか通気を続け

ていたことにより揮発したのかは分からない。パルプあたりの最大エタノール収率は36.3%(g/sugar g)であった。

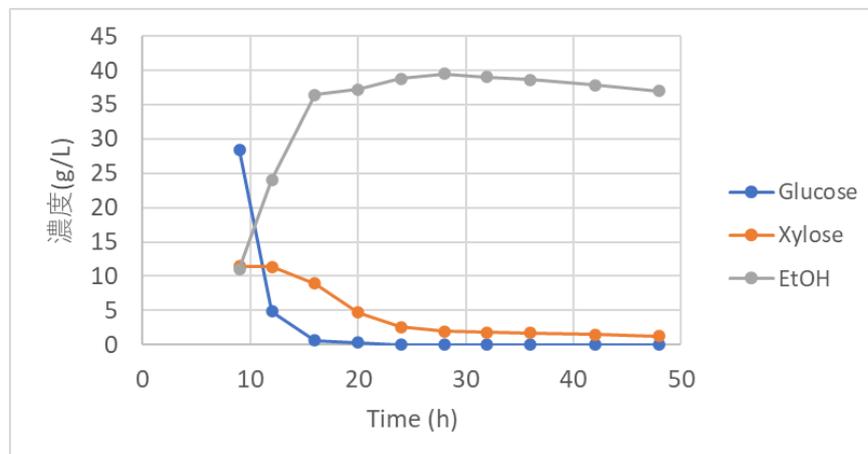


図3-38 広葉樹クラフト漂白パルプを用いた300Lスケールにおける同時糖化発酵

同時糖化発酵開始6時間目以降は、酵母の増殖と発酵が進むことにより徐々にpHの低下が起きたため、パルプ濃度10%投入後(同時糖化発酵開始7時間目)に10N NaOHを加えてpH 5.3程度に調製した(図3-39)。その後pH制御を行った結果、48時間までの10N NaOHの使用量は0.83kgとなった。また、温度は増殖が盛んになっていると考えられる6時間から12時間にかけて発酵熱による温度上昇が観察された。エタノール発酵時に発生する二酸化炭素ガスを、排ガス計を用いて測定したところ、二酸化炭素の濃度は5時間後から徐々に高まり12時間後に最大23%となった。

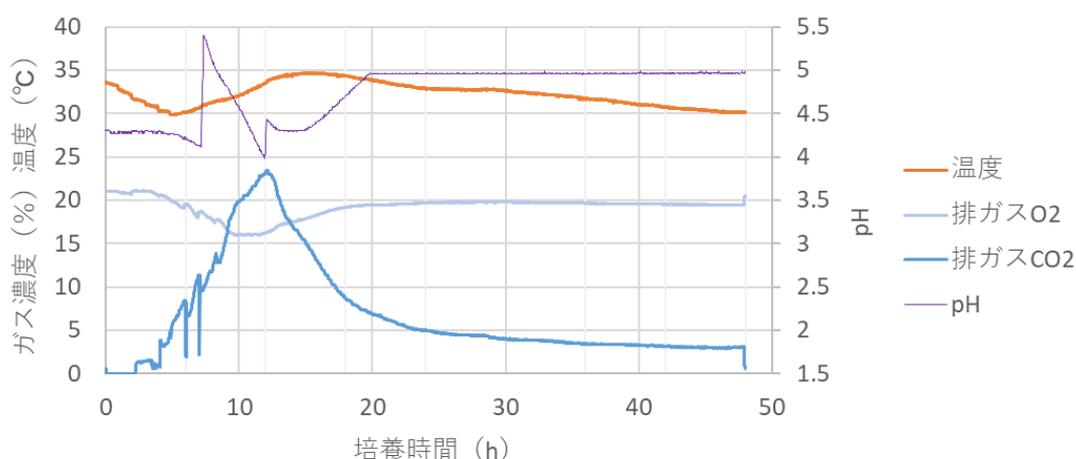


図3-39 300L発酵槽による同時糖化発酵中の温度、pHおよび排ガス中のO₂、CO₂濃度の変化

培養終了後に実生産での残渣の利用方法を検討するため、想定する $0.1\mu\text{m}$ のセラミックフィルターモジュールを用いて、残渣を分離した。培養液約 90 kg を 6.29 kg まで濃縮できた。SS の濃度はろ過前で 16 g/L で濃縮した後は 208 g/L であった。SS の濃度から計算した濃縮率は 12.7 倍であった (図 3-40)。

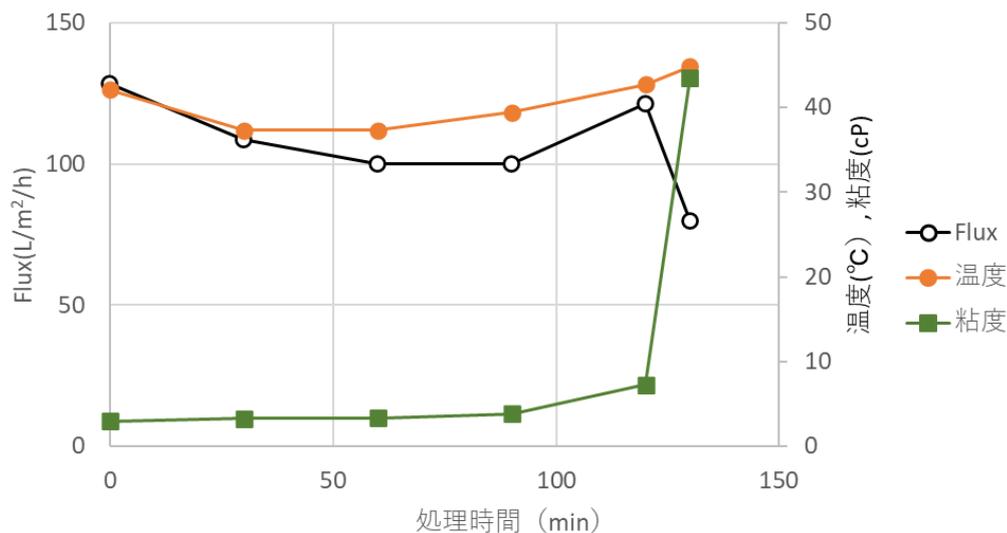


図 3-40 セラミックフィルターによる発酵液の濃縮

1-(3)-2-7 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 300 L スケール同時糖化発酵

(方法)

針葉樹クラフト漂白パルプを原料に前節と同様に試験を実施した。初発のパルプ濃度 2%分を培養槽に入れ攪拌を行い、30 分後に 1%のパルプを追加した。以降 1 時間毎にパルプ濃度 1%ずつ追加した。針葉樹由来のパルプは繊維長が長く粘度が高くなりやすいため、培養開始時は攪拌数を 150 rpm で行ったが、1%のパルプを追加毎に混合状態を確認し、攪拌性が悪い場合攪拌数を上げ 7%追加後には 200 rpm に変更した。全てのパルプを培養槽に加えて 1 時間攪拌後の 11 時間後に 100 rpm にした。パルプが十分溶解した 12 時間目からサンプリングし、1-(1)-2-2-1 と同様に、単糖、エタノール、生菌数、粘度の測定を行った。

(結果と考察)

発酵中の生菌数をコロニー形成法により観察したところ、酵母が増殖しきった後は 1×10^8 CFU/mL より高い生菌数を維持していた (図 3-41)。

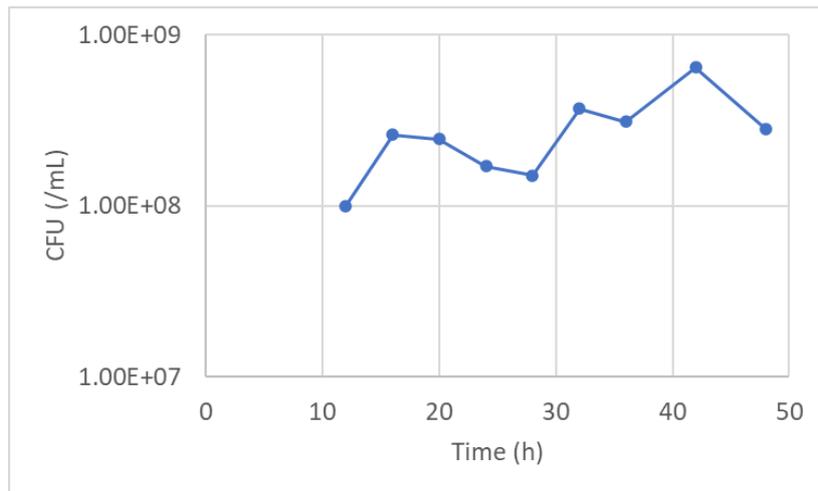


図3-4-1 同時糖化発酵中の生菌数の推移

針葉樹クラフト漂白パルプ中に含まれる C6 糖であるグルコースとマンノースは 16 時間でほぼ消費され、C5 糖であるキシロースも徐々に消費して 48 時間後にはほぼ消費しつくした(図3-4-2)。エタノール収量は 28 時間で最大である 38.4 g/L となり、それ以降は低下して 48 時間で 34.7 g/L となった。パルプあたりのエタノール収率は 35.2%(g/sugar g)であり、10 L 発酵槽の結果に比べて低い結果となった。

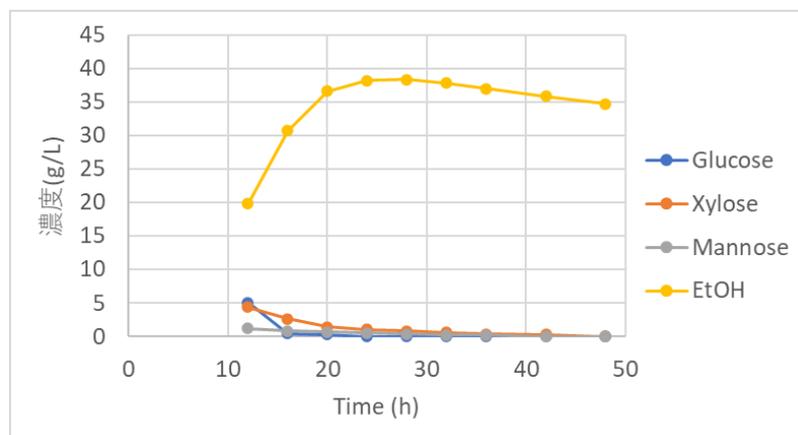


図3-4-2 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 300 L スケールにおける同時糖化発酵

同時糖化発酵開始 6 時間目以降は、酵母の増殖と発酵が進むことにより徐々に pH の低下が起きたため、パルプ濃度 8% 投入後(開始 5 時間目)に 10N NaOH を加えて pH4.95 に調製した(図3-4-3)。その後 pH 制御を行った結果、48 時間までの 10N NaOH の使用量は 0.87 kg となった。また、温度は増殖が盛んになっていると考えられる 6 時間から 12 時間にかけて発酵熱による温度上昇が観察された。

エタノール発酵時に発生する二酸化炭素ガスを、排ガス計を用いて測定したところ、二酸化炭素の濃度は5時間後から徐々に高まり、10時間後に最大23%となった(図3-43)。

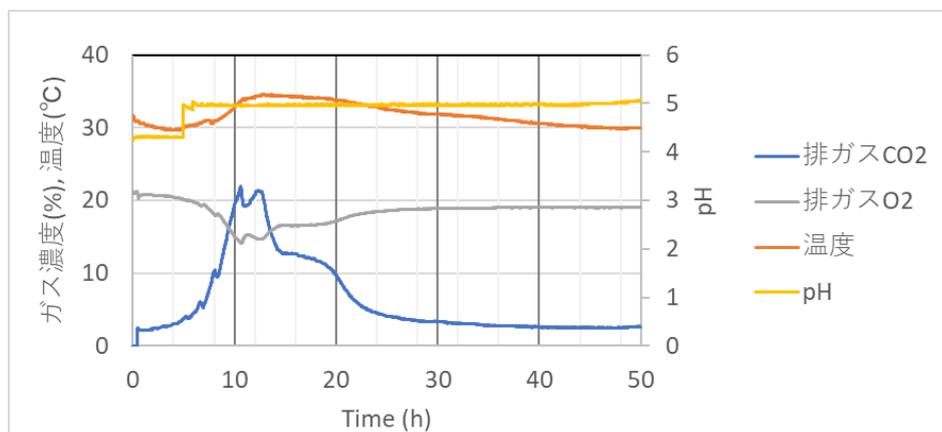


図3-43 300 L 発酵槽による同時糖化発酵中の温度、pH および排ガス中のO₂、CO₂ 濃度の変化

10%の針葉樹クラフトパルプの糖化による粘度の低下は、24時間で8.9 cP、その後さらに減り続けて42時間目で2 cPとなった(図3-44)。

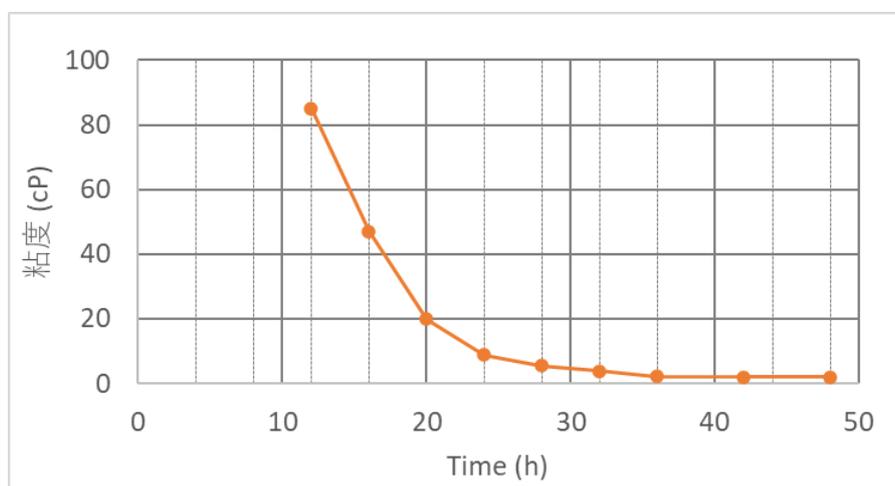


図3-44 300 L 発酵槽による針葉樹クラフト漂白パルプ同時糖化発酵中の粘度の経時変化

培養終了後に実生産での残渣の利用方法を検討するため、想定する0.1 μmのセラミックフィルターモジュールを用いて、残渣を分離した。培養液約96 kgの培養液を10.6 kgまで濃縮した結果、SS濃度は2.3 g/Lから18.1 g/Lまで7.8倍濃縮できた(表3-1)。

表3-1 セラミックフィルターによる同時糖化発酵液からの残渣回収

	液量(kg)	SS 濃度(g/L)
ろ過前	96	2.3
ろ過後	10.6	18.1

1-(3)-3 同時糖化発酵条件の最適化

1-(3)-3-1 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた高温同時糖化発酵

ここまでの結果では、300 L スケールでの同時糖化発酵を行うことはできたもののエタノール収率には課題があることが分かった。そこで、より高いエタノール収量が見込まれる針葉樹クラフト漂白パルプを中心に同時糖化発酵条件の最適化を行った。

(方法)

1 L 発酵槽に 1 % (w/v) CSL、0.5 % (w/v) 硫酸アンモニウムを加えて 500 mL とし、糖化酵素、酵母を加えて 35, 37, 39, 41°C、250 rpm, 0.02 vvm で攪拌した。パルプは複数回に分けて添加し、最終的に 10 % (w/v) パルプ(針葉樹クラフト漂白パルプ)となるようにした。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清を HPLC により分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム：Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5 mM H₂SO₄

温度：55°C

検出：RID

本分析条件ではキシロースとマンノースを区別できないため、グラフ上ではキシロースとマンノースを合わせたおよその糖濃度として表示した。

(結果と考察)

開発した酵母は比較的高い耐熱性を持っていたため、より高温条件で同時糖化発酵を行うことによる効率的な糖化の発酵への影響を検討した。また、針葉樹クラフト漂白パルプ中のキシロース含量は比較的小さいため、通気量を 0.02 vvm に抑えた。

開発したキシロース資化酵母 S937 株は 37°C までの高温でも発酵能を維持することができる。一方、糖化酵素の至適温度は 50°C 付近なので、より高い温度で同時糖化発酵を行うことで糖化速度を高め、糖の供給量を多くできる可能性がある。よって、針葉樹クラフト漂白パルプを用いて 35-41°C で同時糖化発酵の効率を比較した。

各温度での同時糖化発酵の結果を比較したところ、35°C と 37°C ではほぼ同じエタノ

ール収量となり、39°Cでエタノール収量が増加し、41°Cでは逆に低下した（図3-45, 3-46, 3-47, 3-48）。9時間目のグルコース濃度を見ると温度が高いほど高濃度となっており、糖化酵素が高温でより活性が高いことを示す結果となった。また、キシロースの消費速度は温度が高いほど低くなる傾向にあり、41°Cまで高温にすると著しく阻害されるが、39°Cであれば0.02 vvmであっても48時間でほぼキシロースを消費できていた。これらの結果より、高温にすることで糖化速度が上がり、エタノールの収量も高くなる傾向があるが、酵母の発酵活性との兼ね合いで39-41°Cの間に限界があると予想された。

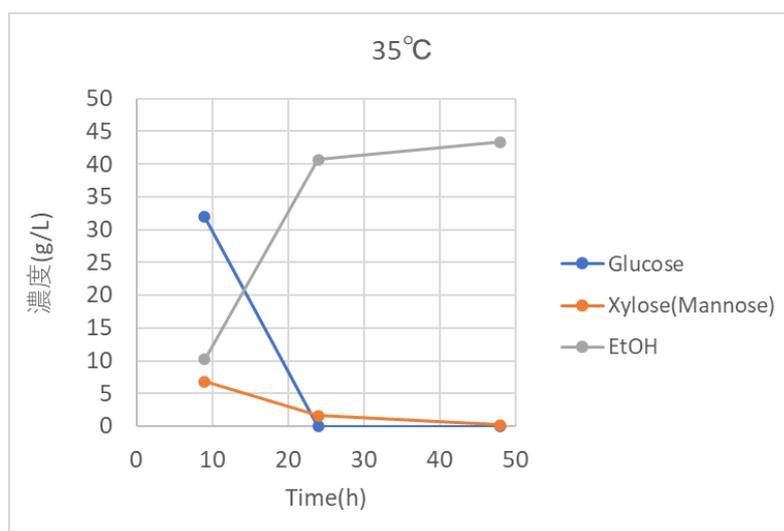


図3-45 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた35°Cでの同時糖化発酵

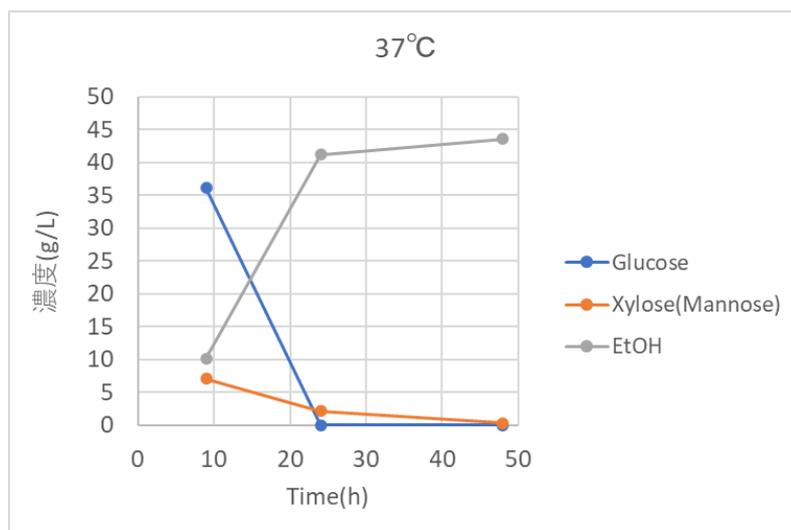


図3-46 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた37°Cでの同時糖化発酵

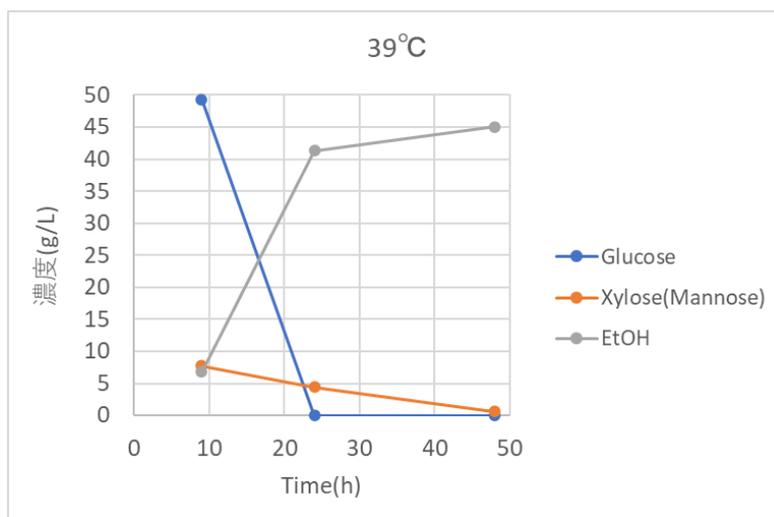


図3-47 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 39°Cでの同時糖化発酵

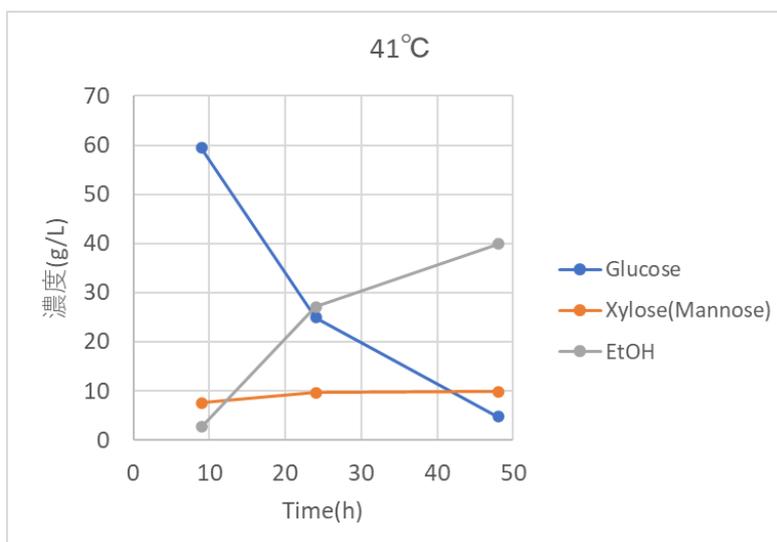


図3-48 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 41°Cでの同時糖化発酵

1-(3)-3-2 広葉樹クラフト漂白パルプを用いた高温同時糖化発酵

針葉樹クラフト漂白パルプを用いた試験により高温での効果が確認できたことから、広葉樹クラフト漂白パルプについても同様の試験を行った。

(結果と考察)

広葉樹クラフト漂白パルプを用いて、1-(3)-3-1と同様に 39°Cでの同時糖化発酵試験を行った(図3-49)。針葉樹クラフト漂白パルプと同様に、温度による糖化促進が観察されて9時間目で高いグルコース濃度を示した。また、キシロース消費速度の低下も観察されたが、48時間後には大部分のキシロースを消費することができた。結果として 39.6 g/L のエタノール収量となり、同様の試験を 35°C, 0.1 vvm で行っ

た図3-32と比べて高い収量となったが、針葉樹クラフト漂白パルプを用いた方がエタノール収量は高かった。

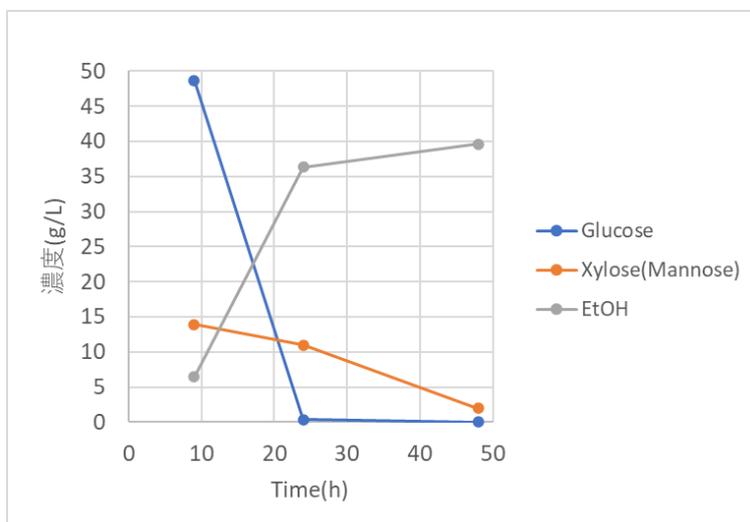


図3-49 広葉樹クラフト漂白パルプを用いた 39°Cでの同時糖化発酵

1-(3)-3-3 10 Lスケールにおける高温同時糖化発酵

前節で得られた高温、微好気条件の影響を 10 L スケールで確認するために、10 L 発酵槽を用いて 1-(1)-1-2 と同様の方法で広葉樹クラフト漂白パルプ、針葉樹クラフト漂白パルプについて試験を行った。ただし、菌株は S937、温度は 38°C、通気量は 0.02 vvm とした。

(結果と考察)

① 広葉樹クラフト漂白パルプ

キシロースは 2.5g/L と多少残存したが、エタノールの収量は 44.5g/L まで増加した。パルプあたりのエタノール収率は 40.9%(g/sugar g) となり、同様の試験を 35°C, 0.1 vvm で行った図3-33 と比べるとエタノール収量、収率ともに増加した (図3-50)。

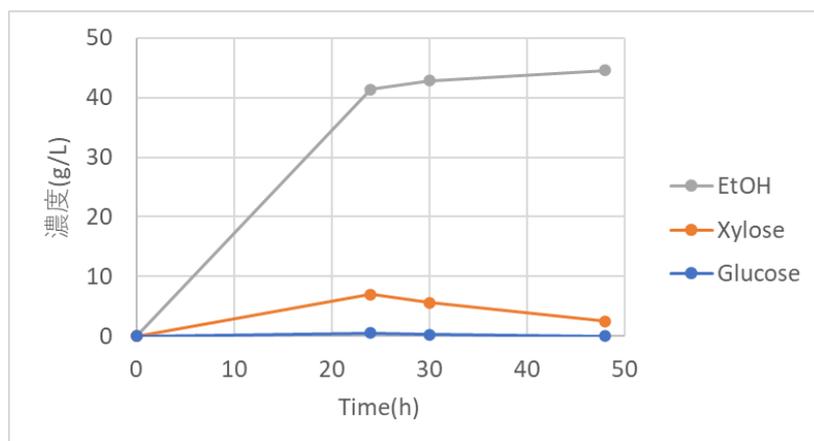


図3-50 広葉樹クラフト漂白パルプを用いた 38°Cでの同時糖化発酵

② 針葉樹クラフト漂白パルプ

針葉樹クラフト漂白パルプでも同様に試験を行ったところ、キシロース濃度は低く抑えられて 48 時間後でも残存量は 0.4g/L となり、エタノールの収量が 47.4g/L まで増加した。パルプあたりのエタノール収率は 43.4%(g/sugar g) となり、同様の試験を 35°C, 0.1 vvm で行った図3-34 と比べるとエタノール収量、収率ともに増加した(図3-51)。

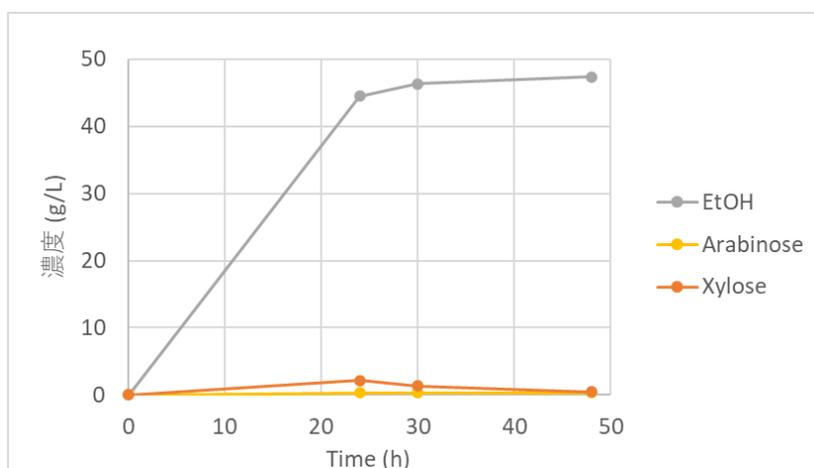


図3-51 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 38°Cでの同時糖化発酵

結果として、高温、微好気条件による糖化促進、エタノール収量増加の効果は 10 L スケールでも確認することができ、特に針葉樹クラフト漂白パルプを用いたときに良好な結果が得られた。よって次に、針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 300 L スケールの同時糖化発酵試験を、高温、微好気条件で再度行った。

1 - (3) - 3 - 4 パルプ単糖組成の再分析

スケールアップした同時糖化発酵での性能を正確に評価するために、使用するパルプの構成糖（キシロース、マンノース、グルコース、ガラクトース、アラビノース）の定量を行った。

(方法)

粉碎したパルプ試料に 72%硫酸を加えて、30°Cで 1 時間膨潤させた。これに純水を加えて混合し、120°Cで 1 時間処理した。加水分解した試料をガラスフィルターでろ過し、ろ液を用いて HPLC により単糖を定量した。

(結果)

針葉樹クラフト漂白パルプについて、それぞれ 2 回ずつ分析を行った。乾燥パルプあたり構成単糖含有量の分析結果を表 3 - 2 に示す。

表 3 - 2. 針葉樹クラフト漂白パルプの構成単糖含有量

	1 回目(%)	2 回目(%)	平均(%)
キシロース	6.83	6.62	6.73
アラビノース	0.54	0.51	0.53
マンノース	6.07	5.93	6.00
グルコース	87.1	85.3	86.2
ガラクトース	0.42	0.41	0.42

1 - (3) - 3 - 5 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 300 L スケール高温同時糖化発酵

(方法)

300 L 発酵槽に 1%(w/v) CSL、0.5%(w/v)硫酸アンモニウム、0.01%(v/v)消泡剤を加えて、パルプの固形物濃度に対して 15%(w/v)の糖化酵素、1%(v/v)の前培養した酵母を加えて 38°C, 100 rpm で同時糖化発酵を行った。パルプは複数回に分けて添加し、最終的に 10%(w/v)パルプ(針葉樹クラフト漂白パルプ)となるようにした。使用したパルプのロットは、表 3 - 2 で分析したものと同一ロットを用いた。通気は 0.02 vvm で行い、pH は 5.0 になるよう NaOH で調整した。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清を HPLC により分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム：Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5 mM H₂SO₄

温度：55°C

検出：RID

本分析条件ではキシロースとマンノースを区別できないため、マンノース含量の定量は別途以下の分析により行った。

カラム：Aminex HPX-87P (Bio-Rad)

溶離液：超純水

温度：80°C

検出：RID

(結果と考察)

針葉樹クラフト漂白パルプ中に含まれる C6 糖であるグルコースとマンノースについては、糖化酵素による糖化後速やかに消費された (図 3-5 2)。C5 糖であるキシロースの消費はやや遅いものの、C6 糖の消費後問題なく消費することができた。エタノールの収量としては 32 時間頃に 45.6 g/L で頭打ちとなっていたことから、この時点で既にほぼ全てのパルプを糖化、発酵し終えていたと考えられる。48 時間時点でもエタノール含量に変化はなく、パルプあたりのエタノール収率は 45.7%(g/sugar g)となった。

発酵中の生菌数をコロニー形成法により観察したところ、酵母が増殖しきった後は 1×10^8 CFU/mL 前後の生菌数を維持していた (図 3-5 3)。

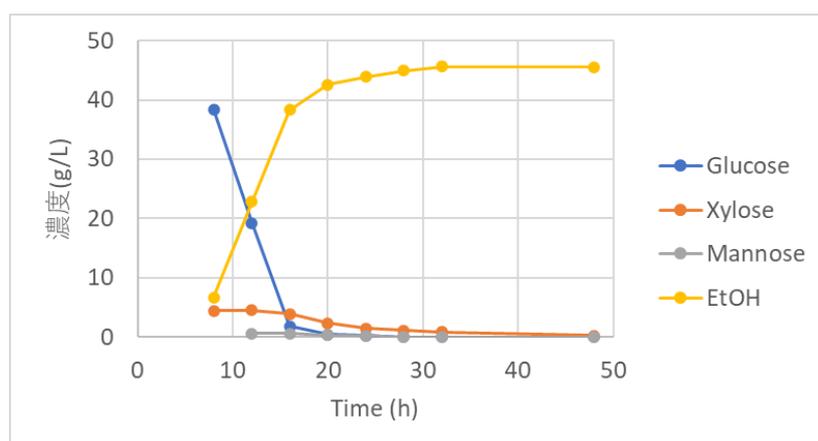


図 3-5 2. 針葉樹クラフト漂白パルプを用いた 300 L スケールにおける同時糖化発酵

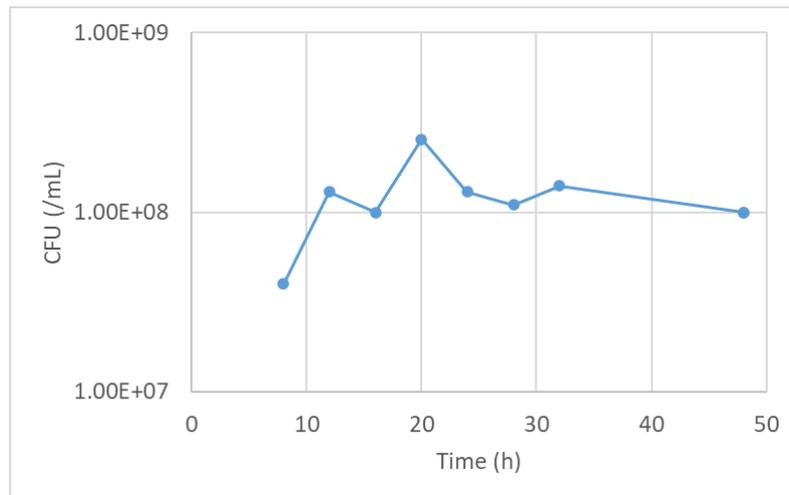


図 3 - 5 3 . 同時糖化発酵中の生菌数の推移

1 - (3) まとめ

S. cerevisiae を宿主としたセルフクローニングによるキシロース資化酵母である S937 株を開発した。この酵母を用いて 4 種類のパルプで同時糖化発酵を比較試験したところ、スケールに関わらず針葉樹クラフト漂白パルプが最もよいエタノール生産性を示した。また、同時糖化発酵の条件を検討し、38°C, 0.02 vvm とすることでエタノール収量が増加した。最終的に、300 L スケールにおける針葉樹クラフト漂白パルプを用いた同時糖化発酵を実施し、目標としていた対糖収率 0.45 g/sugar g を上回る 0.46 g/sugar g を達成した。

1 - (4) エタノールからの SAF 製造プロセスに関する技術開発

本研究開発におけるエタノールからの SAF 製造方法は、ASTM D7566 Annex5 ALCOHOL-TO-JET SYNTHETIC PARAFFINIC KEROSENE (ATJ-SPK)として記載されている。これを効率的に製造するために必要なエタノール品質（濃度、不純物の限量など）を明らかにすることが重要である。このため、木質バイオマスから製造したエタノールを用いた脱水反応によるエチレン製造が可能であることを確認するとともに、試薬エチレンからの ATJ 製造を試みた。

1 - (4) - 1 SAF について

SAF とは Sustainable Aviation Fuel（持続可能な航空燃料）の略号である。

パリ協定の各国削減目標の対象とならない国際航空では、ICAO（国際民間航空機関／International Civil Aviation Organization）が、温室効果ガス削減目標を設定している。ICAO では、技術、運用改善、代替燃料（SAF）での排出量削減に加え、どうしても削減できない炭素は、炭素クレジットを活用することによる、2020 年水準からの温室効果ガス排出量の増加防止を目標としており、この枠組みを定めるのが CORSIA である。CORSIA とは Carbon Offsetting and Reduction Scheme for International Aviation の略号であり、「国際航空のための炭素オフセットと削減のための枠組み」を意味しており、2023 年 5 月の段階では、日本を含む 193 ヶ国が CORSIA に参加している。

一方、航空機に商用使用するための合成燃料は、国際規格として ASTM International によって承認される仕組みとなっており、ASTM D7566 "Standard Specification for Aviation Turbine Fuel Containing Synthesized Hydrocarbons"において、要件が定義されている。この規格では、純バイオジェット燃料および石油由来ジェット燃料との混合バイオジェット燃料に関する要件が、原料や製造方法ごとに定義されている。

SAF の商業使用にあたっては、石油由来ジェット燃料との混合の上で使用することが義務付けられているが、混合燃料の基本的な在り方としては純バイオジェット燃料（ニートバイオジェット燃料）製造後に、厳密な設備管理の上で石油由来ジェット燃料と混合されることが求められている。

○ASTM D7566、D1655

2023 年 11 月には、ASTM D7566 においては、2013 年 11 月に Annex8 が追加され、合計 8 種類が承認されている。

また、ASTM D1655 においても、D7566 を補完する形で 3 種類の変換プロセスが承認されている。表 4 - 1 にその概要を示す。

Annex 8 "ALCOHOL-TO-JET SYNTHETIC PARAFFINIC KEROSENE WITH AROMATICS (ATJ-SKA)"は、Swedish Biofuels 社が申請していたもので 2023 年 10 月 1 日に承認され、11 月に改訂版 D7566^{-23b}として発行された。

変換技術としては、C2~C5 混合アルコールから ATJ 法で製造した非芳香族炭化水素と、別系列で混合アルコールから製造した芳香族炭化水素を混合した燃料で、アルコールは単独または 2~3 種の混合でも良いこととなっている。芳香族分の比率は 8~20vol% (8.4~21.1wt%) と規定されている。なお、密度規格は 775~840kg/m³ となっている。現規格では混合上限が 50% と規定されているが、芳香族を含んでいることから、Swedish Biofuels 社は 100%SAF 認証に向けて引き続き取り組むとしている。

表 4 - 1 ASTM International が承認した転換プロセス

ASTM reference	Conversion process	Abbreviation	Possible Feedstocks	Maximum Blend Ratio
ASTM D7566 Annex 1	Fischer-Tropsch hydroprocessed synthesized paraffinic kerosene	FT	Coal, natural gas, biomass	50%
ASTM D7566 Annex 2	Synthesized paraffinic kerosene from hydroprocessed esters and fatty acids	HEFA	Bio-oils, animal fat, recycled oils	50%
ASTM D7566 Annex 3	Synthesized iso-paraffins from hydroprocessed fermented sugars	SIP	Biomass used for sugar production	10%
ASTM D7566 Annex 4	Synthesized kerosene with aromatics derived by alkylation of light aromatics from non-petroleum sources	FT-SKA	Coal, natural gas, biomass	50%
ASTM D7566 Annex 5	Alcohol to jet synthetic paraffinic kerosene	ATJ-SPK	Biomass from ethanol, isobutanol or isobutene	50%
ASTM D7566 Annex 6	Catalytic hydrothermolysis jet fuel	CHJ	Triglycerides such as soybean oil, jatropha oil, camelina oil, carinata oil, and tung oil	50%
ASTM D7566 Annex 7	Synthesized paraffinic kerosene from hydrocarbon - hydroprocessed esters and fatty acids	HC-HEFA-SPK	Algae	10%
ASTM D7566 Annex 8	ATJ derivative starting with the mixed alcohols	ATJ-SKA	C2-C5 alcohols from biogas, and from CO ₂ and hydrogen.	50%
ASTM D1655 Annex A1.2.2.1	co-hydroprocessing of esters and fatty acids in a conventional petroleum refinery	co-processed HEFA	Fats, oils, and greases (FOG) co-processed with petroleum	5%
ASTM D1655 Annex A1.2.2.2	co-hydroprocessing of Fischer-Tropsch hydrocarbons in a conventional petroleum refinery	co-processed FT	Fischer-Tropsch hydrocarbons co-processed with petroleum	5%
ASTM D1655 Annex A1.2.2.3	co-hydroprocessing of biomass	co-processed biomass	hydrocarbons derived from hydroprocessed mono-, di-, and triglycerides, free fatty acids, and fatty acid esters	24%

出典：ICAO GFAAF ホームページの Conversion processes

<https://www.icao.int/environmental-protection/GFAAF/Pages/Conversion-processes.aspx> より抜粋

ASTM D7566 では 8 種類のプロセスが承認されているが、非従来型供給源からのすべての燃料がまだ含まれていないため、暫定的な解決策として、非従来型供給源から特定のプロセスで製造される燃料性能の適合性についてプロフェッショナルの検討により ASTM D1655 で個別に認めることとなっている。

なお、ASTM D1655^{-23a} (2023 年 10 月 1 日承認、10 月発酵) の Annex A1 には次の 3 種類の変換プロセスが承認されている。表-1.4.1 の下部から 3 列参照

A1.2.2.1

モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、遊離脂肪酸、および脂肪酸エステルを既存の製油所の精製処理設備で共水素化処理する方法で、共処理する際の上記の非

従来型供給源の混合は5%に制限されている。

A1.2.2.2

鉄またはコバルト触媒を使用したフィッシャー・トロプシュ法（FT法）による合成ガスから誘導された炭化水素を既存の製油所の精製設備で共水素化処理する方法で、共処理する際のFT油（Wax）の混合は5%に制限されている。

A1.2.2.3

水素化処理されたモノ-、ジ-、およびトリグリセリド、遊離脂肪酸、および脂肪酸エステルから誘導された炭化水素を既存の製油所の精製設備で共水素化処理する方法で、共処理する際の際の非従来型供給源の混合は24%に制限されている。

なお、以下の7つの変換プロセスがASTM D7566 認証のための評価が行われている。

表4-2 ASTM Internationalにて評価中の転換プロセス

Conversion process under evaluation	Abbreviation	Lead developers
synthesized aromatic kerosene	SAK	Virent
Integrated hydrolysis and hydroconversion	H2	Shell
Alcohol-to-Jet (ATJ) derivative utilizing biochemical production of isobutene	-	Global Bioenergies
Single Reactor HEFA (Drop-in Liquid Sustainable Aviation and Automotive Fuel)	DLSAAF	Indian CSIR-IP
Pyrolysis of non-recyclable plastics	ReOil	OMV
Co-processing of pyrolysis oil from used tires		
Methanol to jet		ExxonMobil

出典：ICAO GFAAF ホームページの Conversion processes

<https://www.icao.int/environmental-protection/GFAAF/Pages/Conversion-processes.aspx> より抜粋。

なお、従来から認められていた7種類の製造方法の概要を示す。

Annex1 Fischer Tropsch

Annex1 (FT: Fischer-Tropsch) は都市ごみや廃木材などをガス化して得られる合成ガス (CO と H₂) をフィッシャー・トロプシュ合成でパラフィン燃料に転換する技術であり、天然ガスを液化する GTL (Gas to Liquid) で実績がある。

Annex2

Annex2 (HEFA: Hydroprocessed Esters and Fatty Acids) は廃食油や植物油などの脂肪酸エステルの水素化により燃料を製造する技術で、Neste や World Energy などが実際に SAF の航空会社への供給を行っている。

Annex3

Annex3 (SIP: Sugars to Synthetic Isoparaffins) は、サトウキビなどの糖を発酵して得られるファルネセンの水素化によるファルネセンベースのバイオジェット燃料製造技術である。サトウキビなどを原料にしたバイオ製品を製造する Amyris が Total (現

Total Energies)と共同で本技術を開発し、Annex3 の認証を取得した。しかし、Amyris は現在より付加価値の高い化粧品等の分野に注力しており、本技術による SAF の製造は行っていない。

Annex4

Annex4 (FT/A: Fischer-Tropsch with Aromatics) は、Annex1 の FT 合成油に非石油系の芳香族を添加する技術である。

南アフリカがアパルトヘイト政策で、他国からの原油輸入を禁止されていた時代に、Sasol や Rentech が天然ガスや石炭から GTL や CTL (Coal to Liqui) でガソリンや軽油を製造する技術を確立していた。その Sasol や Rentech がニートでのバイオジェット燃料として使うことも視野に入れて認証を取得したが、現時点で実際の製造に向けた動きはない。

Annex5

Annex5 (ATJ: Alcohol to Jet) は、2016 年 4 月に米国の Gevo がイソブタノールの脱水、オリゴメリゼーション (低重合) によりバイオジェット燃料を製造する技術として認証を取得した。その後、2018 年 6 月にはアルコールとしてエタノールが使えることになったため、Lanza Tech などのエタノールを原料とした ATJ の開発が積極的に進められるようになった。

Annex6

Annex6 (CHJ: Catalytic Hydrothermolysis Jet) は、ARA (Applied Research Associates) が開発した動植物油などの脂肪酸エステルの水熱反応により SAF を製造する技術で、2019 年 12 月に新たに ASTM D7566 の認証を取得した。ARA と Chevron Lummus Global LLC (CLG) は、この技術を使用して製造した燃料を ReadiJet™と呼んでいる。ReadiJet™は、芳香族、シクロパラフィン、イソパラフィン、およびノルマルパラフィンを含み、従来のジェット燃料にみられる全ての炭化水素分布とほぼ同じ組成となっている。

Annex7

Annex7 (HC-HEFA: Hydroprocessed Hydrocarbons, Esters and Fatty Acids) は、Annex2 (HEFA) の水素化プロセスの原料を、動植物油などの脂肪酸エステルから炭化水素も含めた形に拡張したものである。実質的には IHI のボツリオコッカスからの藻油が対象で、藻油が酸素を含まない炭化水素であり Annex2 の名称にあてはまらないため、2020 年の 5 月に新規 Annex として認証された。なお、IHI の Annex7 は通常とは異なる Fast

Track の手続きを経て認証を得たため、従来のジェット燃料へ混合の上限は 10%となっている。

1 - (4) - 1 - 1 Annex5 詳細

Ethanol to Jet は D7566 の Annex5 に該当しているが、Annex5 には以下の記載があり、「アルコールの脱水、オリゴマー化、水素化、分留」という工程を経て、ジェット燃料油基油として相応しい品質規格を満足することが求められている。

A5.4 Materials and Manufacture

A5.4.1 ATJ-SPK synthetic blending components shall be comprised of hydroprocessed synthesized paraffinic kerosene wholly derived from ethanol²¹ or isobutanol²² (see Note A5.1) processed through **dehydration, oligomerization, hydrogenation, and fractionation.**²³

NOTE A5.1—It is the ultimate objective of this committee to permit use of all C2 to C5 alcohols for production of ATJ-SPK once sufficient test data is available for these other alcohols.

²¹ Supporting data have been filed at ASTM International Headquarters and may be obtained by requesting Research Report RR:D02-1884.

Contact ASTM Customer Service at service@astm.org.

²² Supporting data have been filed at ASTM International Headquarters and may be obtained by requesting Research Report RR:D02-1828.

Contact ASTM Customer Service at service@astm.org.

²³ Supporting data have been filed at ASTM International Headquarters and may be obtained by requesting Research Report RR:D02-1828.

Contact ASTM Customer Service at service@astm.org.

要求品質は TABLE A5.1 Detailed Batch Requirements; Alcohol-to-Jet (ATJ-SPK)と、TABLE A5.2 Other Detailed Requirements; Alcohol-to-Jet (ATJ-SPK)に、試験法とともに記載されている。(表 4 - 3 参照)

表 4 - 3 ATJ-SPK 要求品質



TABLE A5.1 Detailed Batch Requirements; Alcohol-to-Jet (ATJ-SPK)^A

Property	ATJ-SPK	Test Method ^B
COMPOSITION		
Acidity, total KOH, mg/g	Max	0.015
VOLATILITY		
Distillation—both of the following requirements shall be met:		
1. Physical Distillation		
Distillation temperature, °C		
10 % recovered, temperature (T10)		
50 % recovered, temperature (T50)		
90 % recovered, temperature (T90)		
Final boiling point, temperature		
T90-T10, °C		
Distillation residue, percent		
Distillation loss, percent		
2. Simulated Distillation		
Distillation temperature, °C:		
10 % recovered, temperature (T10)		
20 % recovered, temperature (T20)		
50 % recovered, temperature (T50)		
80 % recovered, temperature (T80)		
90 % recovered, temperature (T90)		
Final boiling point, temperature		
Flash point, °C		
Density at 15 °C, kg/m ³		
Freezing point, °C		
Thermal Stability (2.5 h at control temperature)		
Temperature, °C		
Filter pressure drop, mm Hg		
Tube rating: One of the following requirements		
(1) Annex A1 VTR, VTR Color Code		
(2) Annex A2 ITR or Annex A3 ETR, nm avg		
ADDITIVES		
Antioxidants, mg/L ^I		

組成
酸度
揮発性
物理的蒸留性状
GC法による蒸留性状（シミュレーション法）
引火点
密度
析出点
熱安定性
酸化防止剤添加量

^A For compliance of test results against the requirements of Table A5.1, the test methods indicated in this table are referred to in A5.6.2.

^B The test methods indicated in this table are referred to in A5.6.2.

^C D86 or IP 123 distillation of jet fuel is run at 6.5 mm Hg.

^D A higher or lower minimum flash point specification shall not be known as SPK or as kerosene, but shall be known as ATJ-SPK.

^E Relative to Test Method D56, results obtained can be up to 0.5 °C lower (a research report is available).

^F At point of manufacture. Control temperature of 100 °C is required.

^G D3241/IP 323 Thermal Stability is a critical aviation compliance. The integrity of D3241/IP 323 testing to the heater tubes supplied by the original equipment manufacturer and can be at Fallbrook Drive, Houston, TX 77064) were used in 1020 Airpark Dr., Sugar Grove, IL, 60554-9585) not be construed as an endorsement or certification.

^H Tube deposit ratings shall be measured by D2887 measurement, the test shall be a failure and the A2 ITR or Annex A3 ETR deposit thickness measurement shall be considered the Annex A3 ETR method if available.

^I Antioxidant shall be added to the bulk product prior to blending. This shall be done as soon as practicable after blending. Tank blenders are considered acceptable methods.

^J Do not convert D2887 measured temperature to °C.

^K The D2887 test is intended to provide data for the purpose of this standard.



TABLE A5.2 Other Detailed Requirements; Alcohol-to-Jet (ATJ-SPK)^A

Property	ATJ-SPK	Test Method ^B
Hydrocarbon Composition		
Cycloparaffins, mass %	Max	
Aromatics, mass %	Max	
Paraffins, mass %	Max	
Carbon and Hydrogen, mass %	Min	
Non-hydrocarbon Composition		
Nitrogen, mg/kg		
Water, mg/kg		
Sulfur, mg/kg		
Metals		
(Al, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Pd, Pt, Sn, Sr, Ti, V, Zn), mg/kg		
Halogens, mg/kg		

炭化水素組成
シクロパラフィン、芳香族、パラフィン
炭素 + 水素の重量%
炭化水素以外の組成
窒素分、水、硫黄分
金属分、ハロゲン

^A For compliance of test results against the requirements of Table A5.2, the test methods indicated in this table are referred to in A5.6.2.

^B The test methods indicated in this table are referred to in A5.6.2.

^C Maximum cycloparaffin composition is based on current experience with jet fuel.

前回の報告時は、D7566-21 であったが、昨年 D7566-23b に改訂された。しかし、Annex5 (ATJ-SPK) の記載内容に変更は無かった。

1 - (4) - 2 ATJ 製造用エタノールへの要求品質

D7566 Annex5 の規格を満足させるために様々なライセンサーがプロセスを開発しており、そのプロセスに使用するエタノール品質についても、それぞれ独自の規格を持っている。主なライセンサーとして、LanzaTech 社、Axens 社、UOP 社、Petron 社、Biogy 社などがある。

その中から一部、エタノール要求品質項目と規格を入手した。

要求品質項目には、通常のエタノールに含まれるメタノール、アルデヒドなどの軽沸成分、n-プロパノール、イソブタノール、アミルアルコールなどの項目があった。更に、ATJ 製造プロセスの触媒毒となるような成分を規制している例もあり、それらの要求品質を満足させるには工夫が必要である。

実際に、本研究の過程で製造したエタノールも当初は規格に合致しなかったが、発酵酵母の改良と発行条件の変更、蒸留・精製方法などの改善により規格に合致するエタノールを製造することに成功した。

1 - (4) - 3 ATJ 向けエタノールの蒸留精製について

木質バイオマスからのエタノール発酵液中には、様々な副産物、培地成分、酵母、酵素などが含まれており、酵母、酵素のような固形物は粗留塔下部から排出されるが、副産物である軽沸分（メタノールやアルデヒドなど）は塔頂から、エタノールよりも重質なフーゼル油などは蒸留塔の中間段から除去する必要がある。

イメージ図を図4-1に示す。

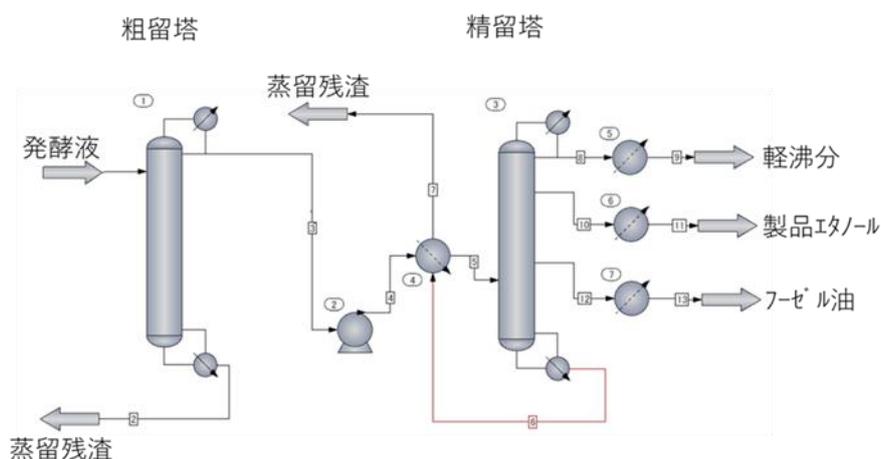


図4-1 エタノール発酵液の蒸留精製イメージ図

培養液の組成の確認

蒸留塔の設計・運転方法を確立するには発酵液中のエタノール濃度、軽沸分濃度、フーゼル油（エタノールよりも重質なアルコール類等）などの成分の濃度を知る必要がある。

これらの成分は、酵母の種類、発酵の条件などにより異なることが考えられるため、発酵液中の成分について GC-MS で分析を行い、以下の組成を標準として蒸留塔の設計に着手している。

表 4 - 4 培養液の組成例（蒸留塔設計条件）

成分名	標準	Max
アセトアルデヒド	30	130
メタノール	20	50
酢酸エチル	2	4
1-プロパノール	30	100
2-メチル-1-プロパノール	30	90
酢酸	500	1000
3-メチル-1-ブタノール（2-メチル-1-ブタノール）※	60	120

※ 3-メチル-1-ブタノールと 2-メチル-1-ブタノールはピークが重なり分離不能のため、それぞれのピークを合わせ 3-メチル-1-ブタノールとして定量した。

なお、今回得られた発酵液中の酢酸の含有量が大きいが、蒸留塔での分離除去は可能であり、問題とはならない。

1 - (4) - 4 ETJ 技術の調査

アルコールの脱水によるオレフィンの製造、低分子オレフィンのオリゴマー化、オレフィンの水素化、分留技術は何れも石油化学で確立された技術であるが、エタノールから SAF を製造するための公開された文献は少ない。そこで、先に述べた PNNL の特許を検討の参考にすることとした。

PNNL は国際特許を申請していたが、我が国においても 2020 年 12 月 7 日に成立し、特許第 6805136 号「エチレン供給原料の炭化水素燃料への変換のためのシステム及び方法」として登録された。

特許の内容は多岐に渡っているが、SAF 製造としてはエチレンを原料に 2 段階反応でオリゴマー化するというところに特徴がある。(図 4 - 2 参照)

また、エチレン含有供給原料はエタノール由来という請求項も記載されており、エタノールの脱水によりエチレンを製造することが示唆されている。

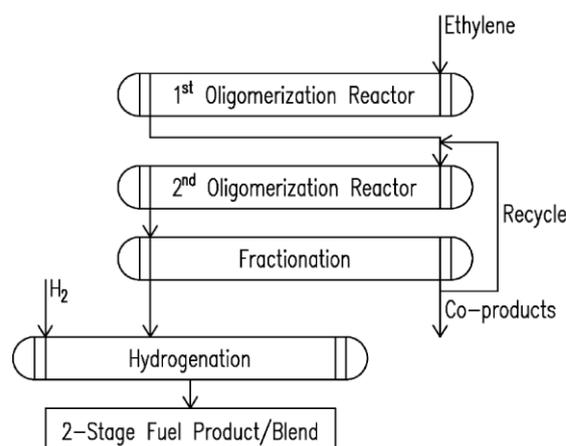


図 4 - 2 ETJ プロセス概要図

第 1 のオリゴマー化反応で、エチレン (C2) は C4,C6,C8 に変換され、それらを原料に第 2 のオリゴマー化反応により C8,C10,C12,C14,C16 など SAF に相当する成分に変換、未反応物質はリサイクルすることにより SAF の収率を向上させる仕組みとなっている。

実施例によると、第 1 のオリゴマー化反応による成分は、触媒や反応条件により異なるが、C4 : 64~73%、C6 : 21~29%、C8 : 3~6%、C10 は最大 2%含まれることがある。事業化にあたっては触媒と運転条件を調整することにより適正な組成とすることが必要と考えられる。

第 2 のオリゴマー化反応の実施例では、C4~C20+までの成分が検出されている。

温度 250°C、圧力 300psig の条件下での各種触媒を用いた場合の生成組成物を示す。

この図より SAF の主要成分 (C9~C16) は Zeolyst 触媒で最も多く得られていることが分かる。反応に大きく寄与するのは、触媒と運転条件 (温度、圧力、WHSV など) であることから、これらを十分に検討する必要がある。この特許の実施例では 250°C 付近が最適との結果が得られている。

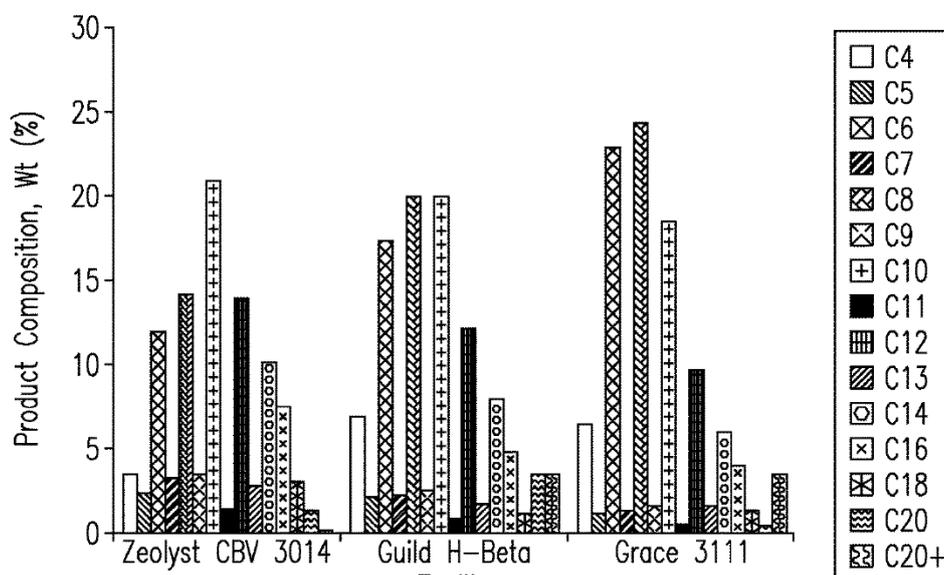


図4-3 250°C反応生成物の炭化水素分布（触媒比較）

1-(4)-5 SAF 製造実験計画

当初は、「数L~100LのASTM D7566 Annex5の規格を満たしたニートを得ること」を目標としていたが、予定していた外注先での実施が困難となったため、「効率的な条件により、ASTM D7566 Annex5の規格に準じたニートを得ること」を目標に変更した。この間、国内外の様々な企業・研究機関に対して協力を打診し、最終的にKRIに外注することとした。

外注内容は次の通りである。

- (1) 木質系バイオマスから得られたエタノールを用いた脱水反応によるエチレンの製造
- (2) エチレンからの2段階オリゴマー化によるSAF成分（オレフィン）の製造
- (3) SAF成分の水素化によるパラフィンへの変換とサンプルの確保

1-(4)-6 SAF 製造実験結果

1-(4)-6-1 エタノール脱水反応試験

GEIより提供した木質バイオエタノールを原料に市販アルミナ触媒を用いてエタノールの脱水反応試験を実施した。

試験条件は次の通りである。

【試験条件】

原料：GEIが提供したエタノール

木質パルプを原料に300L培養槽を用いた同時糖化発酵で得た発酵液をMF膜

処理した後、蒸留精製会社（アルコール製造事業者）に委託蒸留精製して製造したものであり、窒素分は 1ppm 以下であった。

触 媒：活性アルミナ（KRI にて使用実績のある γ -Al₂O₃）

充填量：10ml

LHSV：1.0h⁻¹(EtOH=10ml/h)

反応温度：400°C、450°C、500°C

反応圧力：0MPaG（常圧）、0.8MPaG

試験装置概略図を図 4 - 4 に示す。

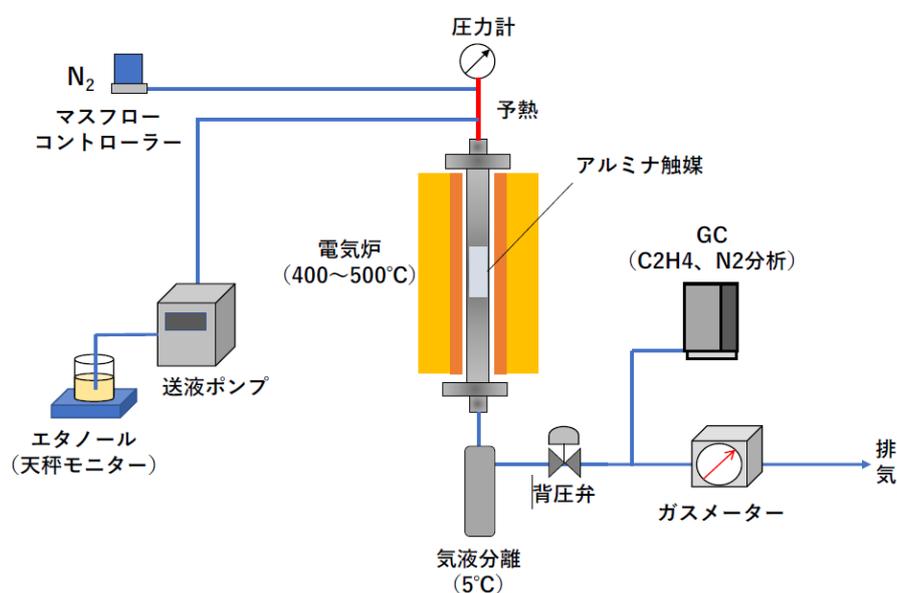


図 4 - 4 脱水装置概要

実験は以下の手順で実施した。

N₂ パージ中で昇温し、反応温度到達後に原料を送液ポンプにより供給した。SUS 製の反応容器にアルミナ触媒を充填し、電気炉により加熱した。試験温度は反応管内に挿入した熱電対で触媒温度を計測し、調整した。系内圧力は背圧弁により調整し、圧力計でモニターした。気液分離は 5°C 程度とし、分離後のガス濃度を GC で分析した。また、出口ガスラインに乾式ガスマーターを接続し、流量を計測した。

【試験結果】

表 4 - 5 に結果を示す。常圧条件では 450°C 付近で変換率が高かった。

表 4-5 エタノールの脱水反応（常圧）結果

試験温度	触媒温度 [°C]			EtOH送液量 [g/min]	EtOH送液量 [ml/h]	出口ガス流量 [NL/min]	ガス濃度 [vol%]		C2H4変換率 [%]
	上部	中部	下部				H2	C2H4	
400°C	403.3	397.5	396.8	0.136	10.3	0.054	6.9	87.5	70.9
450°C	453.5	443.6	450.0	0.136	10.3	0.062	8.2	86.8	81.2
500°C	502.0	492.2	502.9	0.137	10.4	0.063	12.6	82.0	78.2

EtOH 送液量・・・設定値=10ml/h (0.167ml/min)

EtOH 比重=0.8 にて計算

C2H4 転化率=出口 C2H4[mol/min]/入口 EtOH [mol/min]×100

エタノールの脱水は吸熱反応であることから、反応温度の上昇により収率が向上すると推定していたが、最適点がありそうなのが判明した。実生産に生かしていく必要がある。

1-(4)-6-2 第1オリゴマー化触媒の調製

特許の実施例3に基づき触媒調製を実施した。実施例では、W.R.Grace & Co(以下 Grace 社)の Si-Al 粉末が使用されている。Grace 社から該当するサンプルを入手し、特許の実施例に従い触媒調製を行った。調製後の触媒について、Ni 担持量を ICP 分析により定量確認した。

【担体試料】

Grace 社より Silica-Aluminas DAVICAT 3111、3125 並びに FCC-MS13 を入手した。

【触媒調整】

下記特許記載の手順に従い、触媒調製を実施し、Ni 担持量を確認した。

【手順抜粋】

20.0g の DAVICAT 3111 を、脱イオン水中に溶解した 13.22 g の無水 NiCl₂ を含有する約 200mL の溶液と混合する。混合物を激しく攪拌し、非地番フラスコ内で加熱還流する。冷却後、フラスコの内容物を、脱イオン水を用いて、0.6 μm ディスクを有する Millipore (登録商標) フィルタ内で洗浄し、スラリー化し、約 150mL の高温の脱イオン水を用いて 12 回濾過し、次いで、60°C で一晩乾燥させる。乾燥後、材料をペレット化し、粉碎し、-35/+100 メッシュフィルタを通じてふるいにかけ、収集した。

【試験用触媒の調製】

オリゴマー化試験用に、上記手順の 5 倍量×2 回で触媒を調整し、以下の手順で分析を行った。

調製した触媒については、ICP 発光分析により Ni 元素の含有量 (wt%) を分析し、触媒における金属 (Ni) 担持量を確認した。

分析方法：ICP 分析

分析成分：Ni

分析点数：3 検体（小スケール調製 1 検体と試験用触媒の調製 2 検体）

【触媒調整結果】

表 4 - 6 に触媒調整後の Ni 担持量を示す。図 4 - 5 に調整触媒拡大図を示す。

特許と同様の Ni 担持が出来ていることが確認出来たので、担体 DVICAT3111 を用いた Ni 担持触媒を反応試験に供した。

表 4 - 6 Ni 担持結果

担体名	DAVICAT 3111	DAVICAT 3125	FCC MS-13
担持前後比較 左:担体 右:調製触媒			
Ni担持量	3.4wt%		



図 4 - 5 調整触媒拡大図

1 - (4) - 6 - 3 第 1 のオリゴマー化試験

エチレンガス (C₂H₄、ボンベガス) を用いてオリゴマー化試験を実施した。

試験条件は次の通りである。

使用触媒：Ni/3111 15 mL

前処理：N₂ 300 Nml / min 流通下にて 300°C × 4 h

試験温度：85°C ~ 350°C の範囲で調節

試験圧力：0.8 MPaG

試験流量：C₂H₄ 550 Nml / min

N₂ 113 Nml / min

合計 668 Nml/min

試験装置の概略図を図4-6に示す。

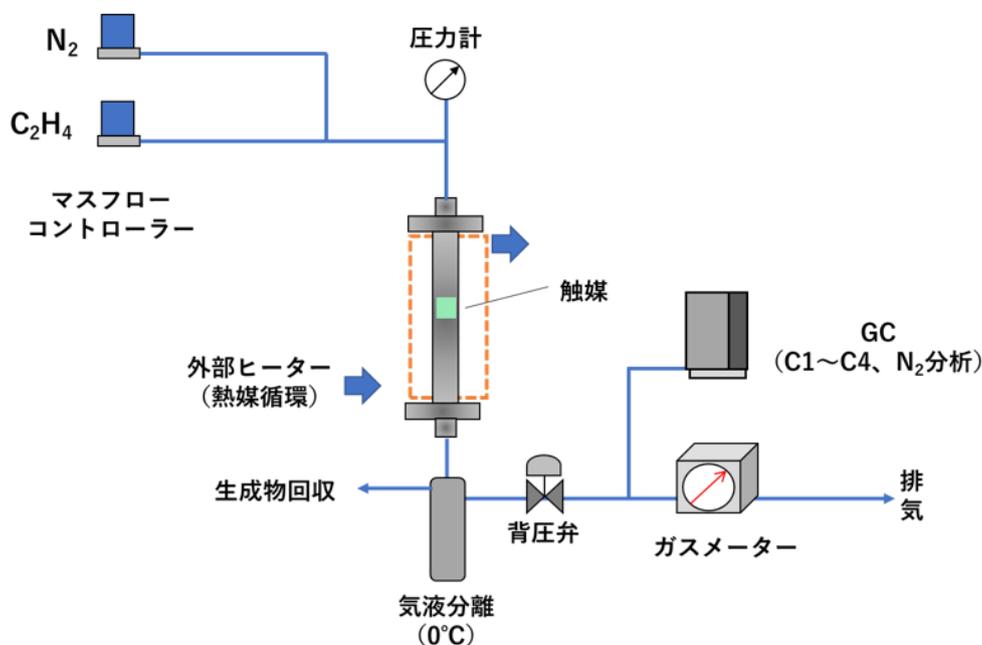


図4-6 第1のオリゴマー化試験装置概要

試験用ガスは、ボンベガスより供給し、流量はマスフローにより流量調整した。SUS製の反応容器に触媒を充填し、外部ヒーターにより温度調整した。試験温度は反応管内に挿入した熱電対で触媒温度を計測し、調整した。系内圧力は背圧弁により調整し、圧力計でモニターした。気液分離は10°C程度とし、分離後のガス濃度をGCで分析し、エチレン反応率を算出した。また、出口ガスラインに乾式ガスマーターを接続し、流量を計測した。試験終了時に、気液分離でトラップされた液体生成物を回収した。

試験結果

Run1

触媒温度 85°Cにてエチレンを流通開始した直後から触媒温度が上昇した。その後、触媒温度は徐々に低下し、それに伴い反応率が低下する傾向が確認されたため、反応率が低下しないよう、熱媒の温度設定を上昇させながら試験を実施した。

試験開始から3h経過すると触媒の温度変動が緩やかになった。

3.5h経過後、生成物を回収したところ、やや黄色がかった液体が得られた。その後は反応率 50%以上(出口ガス流量が半分以下)となるように熱媒温度を緩やかに上昇させて

試験した。図4-7にRun1の各部温度結果を示す。

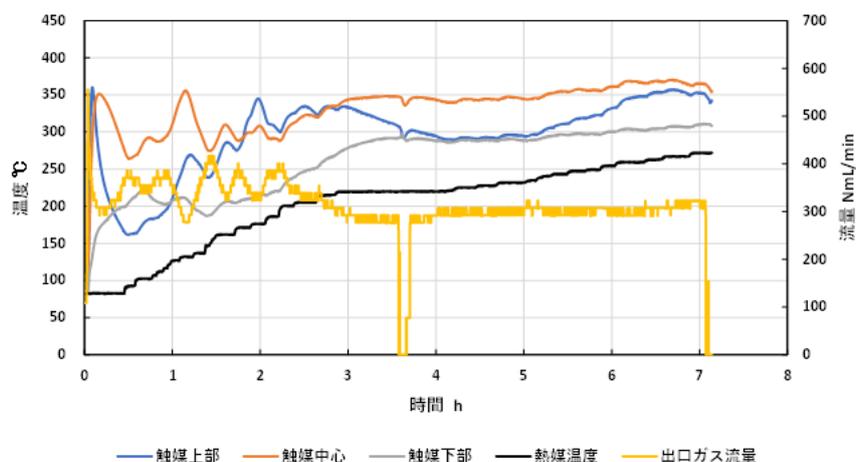


図4-7 Run 1 各部温度推移

Run2

触媒の耐久性について確認するため触媒を詰め替えずに実施した。

触媒温度 85°C、0.8 MPaG にてエチレンの流通を開始したが、Run1 のように温度が上昇することはなかった。熱媒温度を設定上限の 300°Cまで上昇させたが、転化率、触媒温度は緩やかに下がり続ける結果となった。

3.5h 経過後、生成物を回収した。Run1 と同様なやや黄色がかった液体が得られたが、回収量は Run1 の半分程度であった。

図4-8にRun2の各部温度結果を示す。

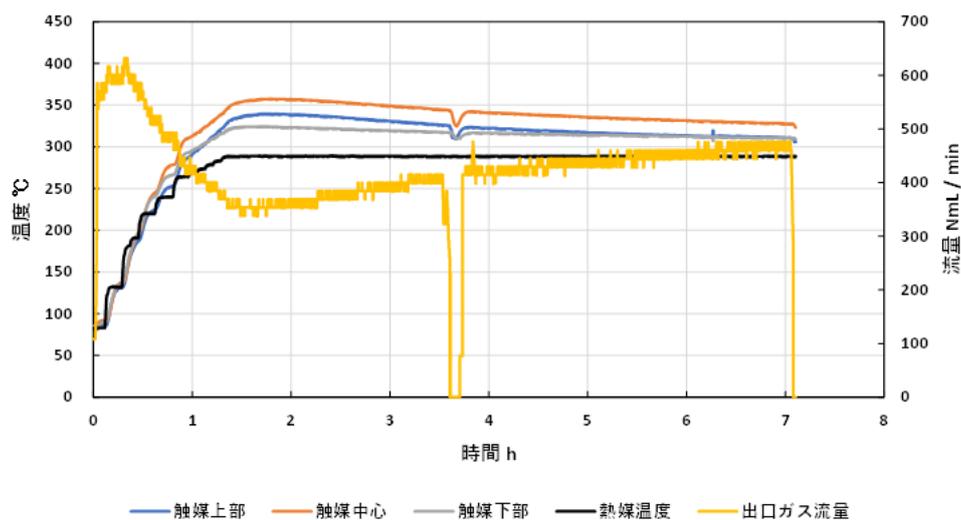


図4-8 Run 2 各部温度推移

Run3

触媒を入れ替えて試験を実施した。

Run1 と同様に、触媒温度 85°Cにてエチレンを流通開始した直後から触媒温度が上昇した。試験開始から2時間経過すると触媒の温度変動が緩やかになった。

3.5h 経過後、生成物を回収した。やや黄色がかった液体が得られた。その後は反応率50%以上(出口ガス流量が半分以下)となるように熱媒温度を緩やかに上昇させて試験した。

図4-9にRun3の各部温度結果を示す。

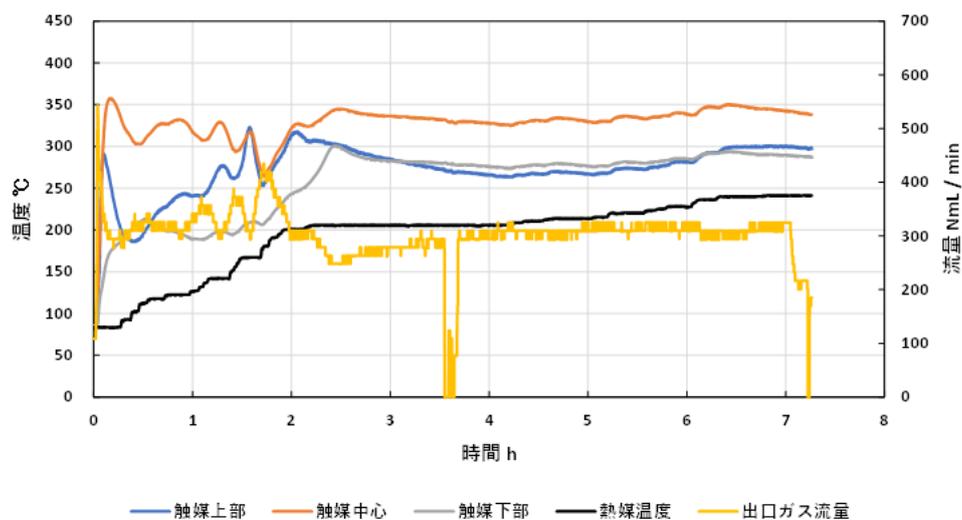


図4-9 Run3各部温度推移

オリゴマー化は発熱反応なので、エチレン導入直後より触媒層の温度上昇がみられるのは妥当であるが、Run2では触媒でのオリゴマー化反応が進まなかったため、触媒層の温度が低下を始める結果となった。これは、Run1で触媒が失活したことが原因と思われる。実生産に当たっては更に適切な触媒や運転条件の適正化が必要と考えられる。一連の実験結果を表4-7に示す。

表 4-7 第一のオリゴマー化反応結果

	炭素数	組成比率 [%]			
		Run 1	Run 2	Run 3	特許
組成比率	C2	0.82	0.67	0.55	
	C3	0.36	0.07	0.14	
	C4	64.49	62.85	64.33	72
	C5	3.36	1.84	2.26	
	C6	22.65	27.78	25.72	24
	C7	1.16	-	0	
	C8	7.16	6.79	7	4
回収量	g	116.58	50.35	113.34	—
収率	%	40.4%	17.4%	39.3%	—

1 - (4) - 6 - 4 第 2 のオリゴマー化試験

第 1 のオリゴマー化試験で回収した液体生成物を原料として第 2 のオリゴマー化試験をした。

試験条件は次の通りである。

【試験条件】

使用触媒：Grace 3111 9mL

前処理：Air 中にて 400°C × 2 h

試験温度：225°C (275°C、325°C)

試験圧力：0.8 MPaG

試験流量：第 1 オリゴマー化試験生成物
0.2ml/min (液体)

表 4-8 供試燃料組成

	炭素数	比率(%)
組成比率	C2	0.7
	C3	0.2
	C4	63.9
	C5	2.5
	C6	25.4
	C7	0.2
	C8	7.0

試験装置概略図を図 4-10 に示す。

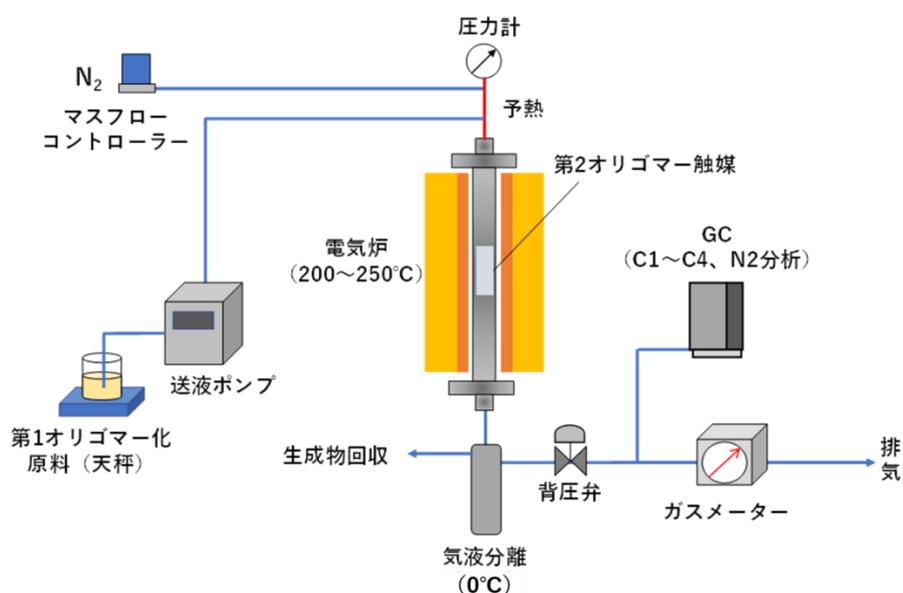


図4-10 第2のオリゴマー化試験装置概要

第1のオリゴマー化試験で得られた液体生成物を送液ポンプで供給した。

SUS製の反応容器に触媒を充填し、電気炉により加熱した。

試験温度は反応管内に挿入した熱電対で触媒温度を計測し、調整した。系内圧力は背圧弁により調整し、圧力計でモニターした。気液分離は10°C程度とし、分離後のガス濃度をGCで分析した。また、出口ガスラインに乾式ガスマーターを接続し、流量を計測した。

試験終了時に、気液分離でトラップされた液体生成物を回収した。

分析項目を下記に示す。

【ガス分析】

分析装置：GC-TCD

分析対象：N₂、CH₄、C₂H₄、C₂H₆、C₃H₆、C₃H₈、n-C₄H₁₀、i-C₄H₁₀

分析回数：1回/30min

【生成液分析】

分析装置：GC-FID

分析対象：C₄~C₁₈ ※炭素数毎に定量した。

結果を表4-8に示す。

表 4-8 第2のオリゴマー化試験結果

RUN No		Run1	Run2	Run3
触媒温度	°C	225	275	325
送液流量	ml/min	0.2	0.2	0.2
運転時間	hour	5	4	3
供給量	g	40.44	34.06	25.39
回収量	g	24.51	24.49	22.78
収率	%	60.6 [*]	71.9	89.7
C3	wt%	0.18	0.17	0.15
C4	wt%	47.68	41.14	36.96
C5	wt%	6.34	5.91	5.85
C6	wt%	24.44	26.26	26.73
C7	wt%	1.7	1.9	1.45
C8	wt%	13.97	17.24	20.09
C10	wt%	4.26	5.62	6.8
C12	wt%	1.43	1.75	1.98

* Run1 のトラップ温度は 10°C、Run2,3 のトラップ温度は 0°C

反応温度の上昇とともに収率、SAF 成分 (C10、C12) の割合が増加したが、C14 以上の成分は見られなかった。オリゴマー化反応は容積が縮小する反応なので、圧力が高いほどオリゴマー化反応が進む。KRI の設備では圧力上昇が出来なかったため、これ以上の収率向上には圧力を上昇させた実験が必要である。

第1オリゴマー化と第2のオリゴマー化の反応液の写真を図4-11に示す。

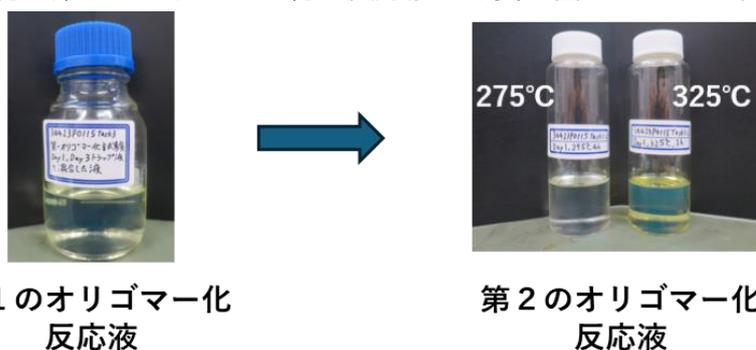


図 4-11 オリゴマー化反応液

第2のオリゴマー化は反応温度が高い 325°C で蛍光色を示した。

1-(4)-6-5 水素化試験

第2のオリゴマー化試験で得られた生成物(オレフィン)を原料として水素化試験

(オレフィン⇒パラフィン) を実施した。

試験条件は次の通りである。

【試験条件】

使用触媒：水添触媒（国内触媒メーカー）15mL

前処理：なし

試験温度：200℃（160℃から徐々に昇温）

試験圧力：0.8 MPaG

試験流量：第2オリゴマー化試験生成物

0.25ml/min (LHSV=1.0h⁻¹)

第2のオリゴマー化試験と同じ装置を用いて実験を実施した。

試験途中 3.25 時間めに 1 回サンプリングした。経過時間毎の収量、収率を表 4 - 9 に示す。

表 4 - 9 水素化試験結果

経過時間 [h]	供給量 [g]	トラップ回収液量 [g]	収率 [%]
0~3.25	35.85	25.44	71
3.25~5.5	26.63	22.35	83.9
0~5.5	62.48	47.79	76.5

得られたサンプルは原料についていた蛍光色が消失し無色透明となった。

図 4 - 12 に水素化処理反応液の写真を示す。

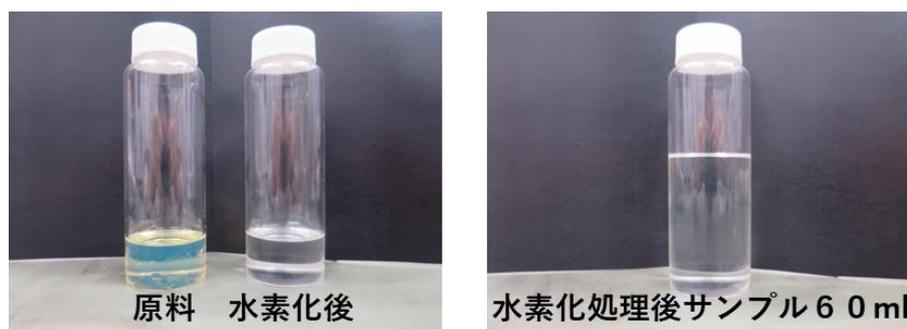


図 4 - 1 2 水素化処理反応液

水素化処理前後のヨウ素価を測定した結果、水素化前の 277 に対して水素化後は 0.2 に低減した。これは二重結合をもつオレフィンがパラフィンに転換したことを示しており、水素化により得られたサンプルは、ほぼ全量が飽和炭化水素であることが確認出来たので、蒸留により SAF 成分を回収することが可能と判断した。

1 - (4) (まとめ)

SAF 製造プロセスのライセンサーが持つ原料エタノールの要求品質を確認した。木質由来原料と開発した菌体を用いて、同時糖化発酵により製造したエタノールについて成分調査を行った結果、SAF 製造プロセスで要求される品質基準を満たしていた。試薬エチレンからの SAF 製造では、効率的な触媒条件により、炭化水素油を得ることに成功し、ASTM D7566 Annex5 の規格に準じたニートを製造可能なことを確認した。

第2章 廃棄物（古紙系、食品残渣系）由来糖質を活用しての脂肪酸及びバイオジェット燃料開発

（担当：株式会社 Biomaterial in Tokyo）

（背景と目的）

油脂からの SAF 製造は技術分類として Annex2 に分類される、油脂の水素化分解技術により C2-C20 の炭素鎖の炭化水素鎖を作ることによって「ケロシン」様の液体燃料を製造可能である。現在、産業廃油などから SAF が作られているが廃油については収集運搬量が限定的である。日本において余剰廃油は数万 KL/年程度であり余剰廃油を原料とした場合、SAF 製造設備の大型化には限界がある。設備の大型化の為には原料供給が重要である。残念ながら製造設備の大型化がなされないため今のところ Annex2 での SAF 製造は製品コストの低減には限界があると考えられる。

光合成をおこなう微生物による原料油脂製造技術はいまだに完成された技術が無く技術開発の道は遠い。一方で、光合成をおこなわず「糖」を原料として油脂を生産する微生物は複数存在している。弊社は既往研究成果として NEDO 支援による「戦略次世代研究（2014年-17年）」において油糧微生物であるラビリンチュラを用いた「糖質」からの間接的な SAF 生産を検討し、パルプ由来糖液を利用してラビリンチュラを培養→油脂生産を行ってきた実績がある。ラビリンチュラは従属培養が可能のため独立栄養型の微細藻類に比べて事業化の目途が立てやすく培養タンクの規模にもよるが年間で数十 kL の SAF 生産が可能である。培養規模と得られる SAF 量の関係性を表 5-1 に示す。

表 5-1 培養規模と得られる SAF 量の関係性 1)

培養槽規模	1 m ³	5 m ³	500 m ³
仕込み液量	800 L	4 kL	400 kL
菌体生産量*	10 g/L/day		
油脂含有率**	50%		
稼働日数	300日間		
菌体回収・粗油抽出効率***	95%		
菌体生産量	2.28 ton/y	11.4 ton/y	1140 ton/y
粗油生産量	1.14 ton/y	5.7 ton/y	570 ton/y
粗油からの HEFA-SPK 製造効率***	0.5 L/kg-oil		
HEFA-SPK 製造量	570 L/y	2.85 kL/y	285 kL/y

*最低実績値、**実績値、***仮定値

ラビリントチュラ類は従属栄養性の真核微生物で、極域や深海を含む世界中の海域に生息が確認されており、その現存量は沿岸海域で 108cenS/L 程度のオーダーであることが報告されている。中でも亜熱帯から熱帯にわたるマングローブ域にはラビリントチュラが豊富に分布することが知られており、これまで数多くの株が分離されている。特にヤブレッツボカビ科にはこれまで応用面での検討例が多い *Auranriochytrium*、*Schizochytrium* などの 11 属が含まれることが最近の分子系統解析によって示されている。いずれの属のラビリントチュラも DHA や EPA、ドコサペンタエン酸 (DPA)、アラキドン酸 GRD などの多価不飽和脂肪酸(PUFAN) を細胞内に蓄積し、その高い増殖性や脂質蓄積性からオメガ 3 脂肪酸やカロテノイドをはじめとする脂質素材生産やバイオ燃料生産などの産業利用が各方面で検討されている²⁾。

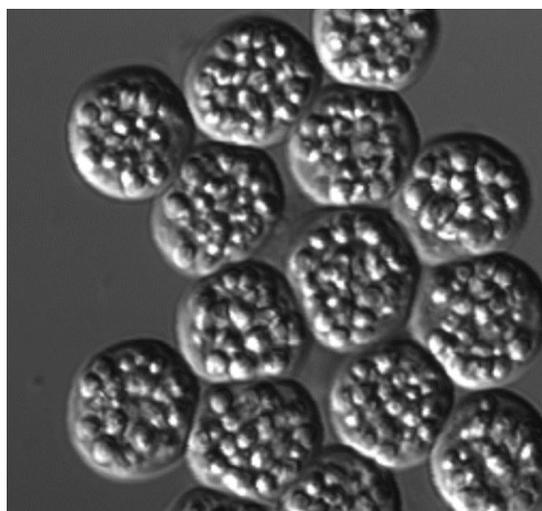


図 5-1 ラビリントチュラ類の顕微鏡写真

糖質を原料とした場合、大量の油脂が培養により獲得が可能で設備の大型化が可能であると想定されている。大量培養が可能となればコストの低下や効率的な油脂製造においての二酸化炭素排出量の抑制が可能であり、これこそが油脂生産微生物による油脂の大量生産が期待されている所以である。一方で油脂の SAF 化には水素を必要とする。現在、水素は化石燃料をもとに製造した「電気」をエネルギー源として製造された「電解水素」が主流であり、この電解水素を使った SAF 製造は二酸化炭素の排出抑制効果が薄い。このため油脂製造において水素要求性が少ない不飽和脂肪酸含量が少なく飽和脂肪酸を多く含む油脂製造が重要である。よって今回の技術開発においては 2-(1) 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発、2-(2) ラビリントチュラ大量高密度培養法の確立、2-(3) ASTM D7566 Annex2 に適合した SAF の製造を技術開発項目とする。

- 1) NEDO バイオマスエネルギー技術研究開発/戦略的次世代バイオマスエネルギー利用技術開発事業(次世代技術開発)/油糧微生物ラビリンチュラを利用したジェット燃料・船舶燃料生産の研究開発 平成25年度～平成26年度成果報告書
- 2) 株式会社情報機構 カーボンニュートラル燃料最新動向～水素・アンモニア・e-fuel・バイオ燃料～ 2022年

(各実験項目と概要)

(2-(1) 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発)

既存ライブラリーの中で不飽和脂肪酸含量が少ない mh0186 株は、5 kL ジャーでの培養を実施することができた。また、乾燥菌体から 27.8%の油脂回収に成功し、最適に近い流加培養法を確立できた。mh1915 株では対糖収率は 25%を超えているが mh0816 株では 7%程度にとどまっている。水素添加率は既存の廃棄油脂原料に比べて 20%程度高くなった。これは機械精度の問題もあり 20%程度は誤差であると考えている。よって廃棄油脂とラビリンチュラによって培養された脂肪酸は水素添加量の差は大きな違いはないことから GHG 削減も可能であることが分かった。このことから培養された菌体由来の脂肪酸で十分 SAF 製造が可能であると考えられる。

(2-(2) ラビリンチュラ大量高密度培養法の確立)

高密度培養法確立の一環として「流加培養」技術を 5 L 系で確立した。また、得られた流加培養技術を基に mh0186 株は、5 kL の培養槽での高密度培養を実現した。対糖脂肪酸含量収率としては 7%程度であった。対糖脂肪酸含量だけを見ると mh1915 株の方が mh0816 株より良いと考えられる。

(2-(3) ASTM D7566 Annex2 に適合した SAF の製造)

2-(2) より得られた脂肪酸を原料として、HiBD 法でのラビリンチュラの分解油化及びヘキサン抽出法での Annex2 に準拠する SAF の試験製造を実施した。HiBD 法ではジェット燃料留分に相当する炭化水素油は得られたが、菌体由来の不純物過多による影響で Annex2 準拠の SAF は製造できなかった。2023 年度は菌体の直接分解を避け不純物の影響をなくすためにヘキサン抽出を行い、抽出油から SAF 製造を実施したところ、廃食用油由来 SAF と同等品質の SAF が得られた。

2 - (1) 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発

2 - (1) - 1 菌株の選抜と培養

Aurantiochytrium limacinum mh0186 株は高い増殖性と著量の DHA を細胞内に蓄積することを特徴とする分離株である。形態的特徴と 18S rRNA 遺伝子の塩基配列から、*A. limacinum* と同定されている。グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、スクロースなど広い糖資化性を示すが、グリセロール、デンプンは資化しない。また、15%グルコースのような高い糖濃度でも増殖が可能で、グルコースの流加培養で 180 g/L 以上の高いバイオマス収量を得ることができる。さらに、培養温度については 15~35° C の広い温度帯で良好な増殖を示し、10° C でも増殖が認められる。*A. limacinum* mh0186 株の総脂肪酸のガスクロマトグラムをみると、培養条件にかかわらず細胞の主要な脂肪酸はパルミチン酸、n-6 DPA、DHA であり、EPA や ARA、モノエン酸~トリエン酸はほとんど含まれない。培養温度が低いほど総脂肪酸中の DHA の割合が高くなる傾向にあり、10° C で培養した細胞では、総脂肪酸中に占める DHA の割合は 70% に達する。培養条件によっては C15:0 や C17:0 といった奇数鎖飽和脂肪酸が総脂肪酸中に数%~10 数%含有される。脂質中に 2 重結合を含まないため SAF 製造に有利であると判断し、mh0186 株を使って 5 L-jar を用いて培養を実施し最終的 5kL 発酵槽での培養に挑戦した。

【培養方法】

プレート馴化→種母培養(フラスコ)→本培養(5 L-Jar)のフローにて培養を実施した。

<プレート馴化>

-80° Cにて凍結保存していた *Aurantiochytrium* sp. の mh0186 株を解凍し、LB 寒天プレートにて馴化させた。

<種母培養>

馴化した mh0186 株を GY 改変培地に植菌し、フラスコ培養した。

培地：	GY 改変培地
培地組成	無水グルコース 3 g
	酵母エキス 1 g
	人工海水 50 mL
	水道水 50 mL
	アンピシリン(20mg/mL) 100 μL (滅菌後別添加)

培地量： 100 mL/培養容器
 培養容器： 500 mL 容バツフル付き三角フラスコ W/シリコ栓 (Cタイプ)
 滅菌条件： 121°C、20分
 添加試薬： 人工海水
 NaCl 30.0 g
 KCl 0.7 g
 MgCl₂ · 6H₂O 10.8 g
 MgSO₄ · 7H₂O 5.4 g
 CaCl₂ · 2H₂O 1.0 g
 水道水 1L
 →添加量：50 mL/培養容器 (三角フラスコ)
 ・アンピシリン溶液
 20 mg/mL (フィルター滅菌)
 ⇒添加量：100m μ L (終濃度 20 μ g/mL)
 接種量： 10 μ L ディスポループでひとかき
 培養器： 恒温振とう培養器/高杉製作所
 振とう数： 125 rpm
 培養温度： 28°C
 培養時間： 72 hr

<本培養>

培地： GY 培地
 培地組成

グルコース	60 g
酵母エキス	20 g
人工海水	1000 mL
水道水	1000 mL
消泡剤 (PE-M)	0.8 mL
<u>→NaOH で pH7.0 に調整</u>	
Vitamin Mix	2 g (滅菌後に別添加)
Mineral Mix	4 g (滅菌後に別添加)
アンピシリン (20 mg/mL)	2 mL (滅菌後に別添加)

培地量： 約 2 L
 培養容器： 5L-Jar \times 1 基/高杉製作所
 滅菌条件： 121°C、20分

添加試薬：

・人工海水

NaCl 30.0 g

KCl 0.7 g

MgCl₂ · 6H₂O 10.8 g

MgSO₄ · 7H₂O 5.4 g

CaCl₂ · 2H₂O 1.0 g

水道水 1 L

→添加量：1000 mL／培養容器（5L-Jar）

・Vitamin Mix

Vitamin B₁ 200.0 mg

Vitamin B₂ 1.0 mg

Vitamin B₁₂ 1.0 mg

純水 100 mL

→0.2 μm フィルターにて濾過滅菌後、バイアルに分注

※光で分解するためできるだけ光に当てないようにする

・Mineral Mix

EDTA di-sodium 30 g

FeCl₃ · 6H₂O 1.45 g

H₃BO₃ 34.2 g

MnCl₂ · 4H₂O 4.3 g

ZnSO₄ · 7H₂O 1.335 g

CoCl₂ · 6H₂O 0.13 g

NiSO₄ · 6H₂O 0.26 g

CuSO₄ · 5H₂O 0.01 g

Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.025 g

純水 1L

→DW 中に上から順に溶かし、5N NaOH で pH7 に調整

→オートクレーブ滅菌（121°C、20 分）

→冷蔵保存

・アンピシリン溶液

20 mg/mL（フィルター滅菌）

⇒添加量：2 mL（終濃度 20 μg/mL）

接種量： 100 mL（種母培養分すべて）

培養温度： 28.0°C

冷却水温度： 10°C

pH 制御： 7.0±0.1 (アルカリ：1N NaOH)

DO 制御： 下限値 50% (3.88 mg/L)

攪拌制御： 初発 400 rpm 上限 600 rpm

DO 下限値を下回った後に変動 (DO 50–60%)

通気量： 2L/min→5 L/min (流加開始後)

圧力： 0 kPa

流加液： 50%グルコース溶液

無水グルコース 120 g

水道水 120 g

→秤量・溶解後、オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

→アンピシリン溶液 (20 mg/mL) 240 μL 添加

流加開始： 初発グルコース消費後

流加速度： 0.04 g/L/min ⇒ 機器入力値：5 g/L

消泡剤溶液： PE-M 人工海水混合液

PE-M 20 mL

人工海水 100 mL

水道水 100 mL

→121°C、20 分オートクレーブ滅菌

培養時間： 3 日

サンプリング： 約 20 mL/Day0, 1, 2, 3

ブロスアウト： 5 L 容ユニオンコンテナ

菌体回収：遠心分離 (4°C、6,000 rpm, 60 min) →上清除去→蒸留水を加えて懸濁

→遠心分離 (4°C、6,000 rpm, 60 min) →上清除去→凍結

(分析) 濁度： OD660nm

グルコース濃度(g/L)： バイオセンサ BF-7 (王子製計測機械)

(結果と考察)

本培養のトレンドデータ、グルコース濃度及び細胞濁度の推移は図 5-2、図 5-3 の通りである。本培養開始 24 時間で初期グルコース量が 0 g/L になったため、50%グルコース溶液の流加を開始した。本培養開始 72 時間 (流加開始 48 時間) でグルコースの消費量が落ちて培養液中に残存し始め、濁度はピークを迎えた。また、培養開始 87 時間ほどで pH は下がり始めた。グルコースの蓄積が培養開始 72 時間で認められた。酸素量が足りないことが考えられたため、188 時間で通気量を 2L/min から 5L/min に

上げた。しかし、グルコース蓄積量は増加し続け、200時間で培養を終了した。グルコースの蓄積する原因として、酸素不足が考えられた。しかしながら攪拌翼の回転数は上限の600rpmにて培養しているためこれ以上の回転上昇は不可能である。攪拌翼の形状の変更は必要であるかもしれない。

また、検鏡を行ったところ、コンタミネーションは確認されず、グルコースの添加方法が適切であり、抗生物質の添加が効果を示したと考えられる。油脂が生成されていることも示された。また、後述する SAF 製造の実験によりこの株は Annex2 準抛の SAF 製造時での水素要求量が低く抑えられ GHG 排出量が低減されることを確認した。

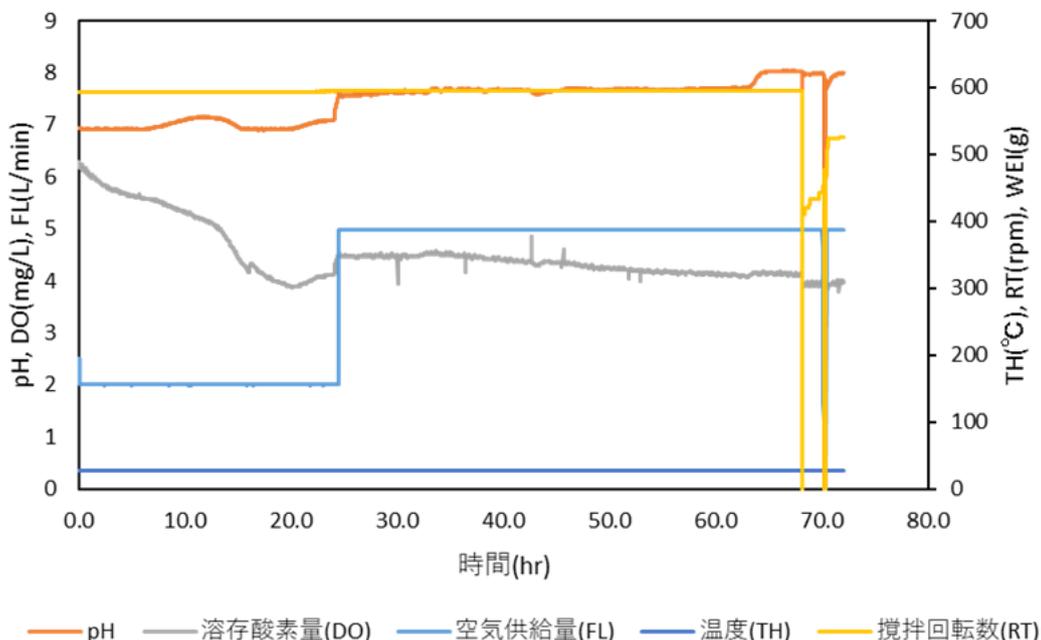


図5-2 本培養時のトレンドデータ

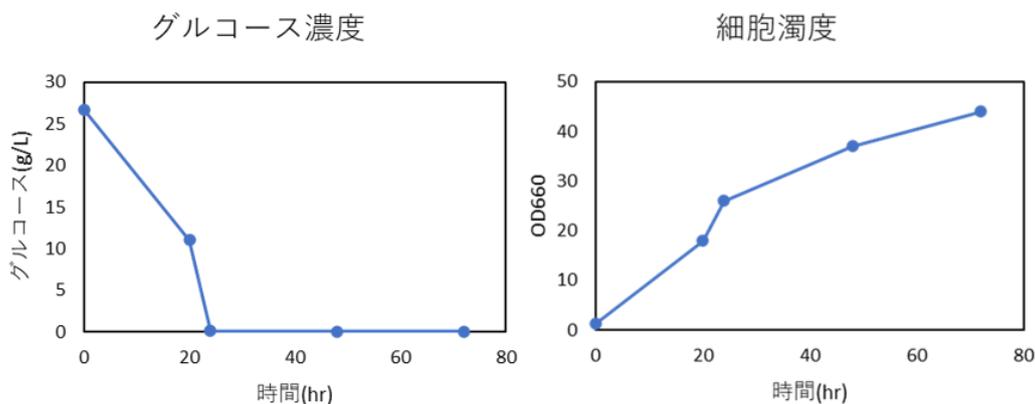


図5-3 グルコース濃度及び細胞濁度の推移

2 - (1) - 2 油脂回収

5 L-Jar 培養で得られた菌体からの油脂回収方法の検討を行った。

(方法)

1. 乾燥菌体を 2 mL 容マイクロチューブに約 0.1 g を量りとった。
2. ジルコニアビーズ 0.6 mm を約 0.3 g、5.0 mm を 1 粒入れた。
3. CHCl₃/MeOH (2/1) 溶液を約 1.5 mL 添加し、蓋をしっかりと閉めた。
4. レシプロシェーカー (RMS-12R-2/高杉製作所) にテープで装着し、細胞を振とう破碎した (230 rpm, 26°C, 12hr~o/n)。
5. 全量を 15 mL の遠沈管に移す。CHCl₃/MeOH (2/1) 溶液で共洗いした (液量 10 mL)。
6. 遠心分離した (10,000 rpm, 5 min)。
7. 上清をパスツールピペットでナスフラスコへ移した。
8. 11~13 を計 5 回繰り返した。
9. ロータリーエバポレーターで乾固させた (40°C)。
10. 真空乾燥機で溶媒を留去した (2 min)。
11. CHCl₃ 約 5 mL でナスフラスコの壁面を洗浄し、予め精密天秤にて風袋重量を測定した別のナスフラスコに溶解液を移した。これを計 5 回繰り返した。
12. ロータリーエバポレーターで乾固させた (40°C)。
13. 真空乾燥機で溶媒を留去した (2 min)。
14. 精密天秤で重量を測定し、総脂質重量を算出した。

(結果と考察)

凍結乾燥した菌体から CHCl₃/MeOH (2/1) の溶媒を用いることで、油脂の回収を実施した。今回、培養時に投入したグルコース (初発+流加) は 100 g/L、油脂回収に用いた乾燥菌体は 37.8 g/L、乾燥菌体から得られた油脂は 10.5 g/L であった。したがって、油脂の対菌体収率は 27.8% であり、対糖脂肪酸含量収率は 10% に近い収率を得ることができた。最適条件に近い流加培養法を確立できたと考えるが対糖脂肪酸含量収率は 25% とはならなかった。この要因は酸素量不足によるものと考えられ、対応策として攪拌翼の改善による DO 維持、もしくは直接的な酸素供給などが考えられる。今回の培養では、初発糖質が枯渇後、糖質の時間当たりの追加添加量は、初発培地 1 L に対して 0.42 g/hr であった。対糖脂肪酸含量収率は 25% に達しなかったものの、弊社らの既往研究により、糖質の追加添加量は 0.42 g/hr/L-初発培地にて、酸素量供給量増加と DO の維持を行うことにより、解決可能と考えている。

2 - (1) - 3 ラビリント菌の油脂組成分析

5 L-Jar の培養で得られたラビリント菌体の脂質組成の分析を GC-MS にて行った。

(方法)

1. ブロスを 50mL 容遠沈管に約 40 mL 計り取った。
2. 遠心分離 (5,000G、10 分、4°C) し、できるだけ沈殿を捨てないように上清を除いた。
3. 0.9%生理食塩水 40 mL を加え、ボルテックスした。
4. 遠心分離 (5,000G、10 分、4°C) し、上清を除いた。これを計 2 回行った。
5. 沈殿を凍結し、(o/n)、真空乾燥させた (3days)。
6. 乾燥菌体を 2 mL 容マイクロチューブに約 0.1 g 計り取った。
7. ジルコニアビーズ 0.6 mm を約 0.3 g、5.0 mm を 1 粒入れた。
8. CHCl₃/MeOH (2/1) 溶液を約 1.5 mL 添加し、蓋をしっかりと閉めた。
9. レシプロシェーカー (RMS-12R-2/高杉製作所) にテープで装着し、細胞を振とう破碎した (230 rpm, 26°C, 12hr~o/n)。
10. 全量を 15 mL の遠沈管に移した。CHCl₃/MeOH (2/1) 溶液で共洗いした (液量 10 mL)。
11. 遠心分離した (10,000 rpm=9,100 G, 5 min)。
12. 上清をパスツールピペットでナスフラスコへ移した。
13. 11~13 を計 5 回繰り返した。
14. ロータリーエバポレーターで乾固させた (40°C)。
15. 真空乾燥機で溶媒を留去した (2 min)。
16. CHCl₃ 約 5 mL でナスフラスコの壁面を洗浄し、別のナスフラスコに溶解液を移した。これを計 5 回繰り返した。
17. ロータリーエバポレーターで乾固させた (40°C)。
18. 真空乾燥機で溶媒を留去した (2 min)。

(結果と考察)

2 - (1) - 1 の項目で得られたラビリント菌体から脂肪酸を抽出し、GC-MS を行った。この結果、C12~C26 の脂肪酸が検出された (図 5-4)。両サンプルとも同様の脂肪酸組成を示し、ほとんどが飽和脂肪酸であった。また、不飽和脂肪酸量が少なかったことから、SAF 製造における水素化分解工程の負荷を減少させることが可能であり、mh0186 株は SAF 製造に適した菌体であることが示唆された。

サンプル 1

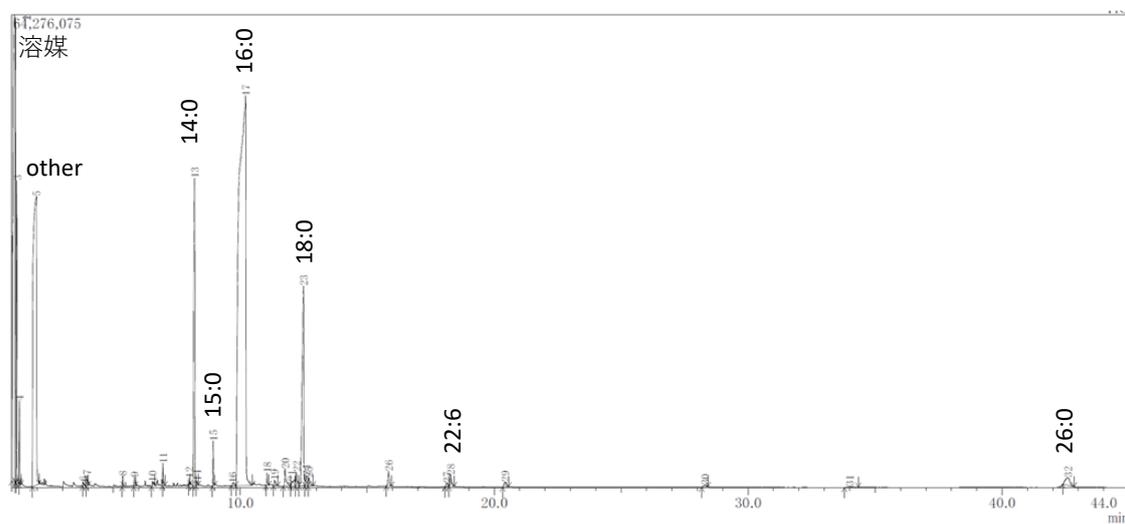


図 5-4 GC-MS の結果

※図中の数字は、脂肪酸の種類（炭素数：不飽和結合数）を示している

2 - (2) ラビリンチュラ大量高密度培養法の確立

5L 培養槽での検討結果をもとに、ユーグリード社の 5kL の培養槽にて、ラビリンチュラ (mh0186) の大量高密度培養を行った。

【培養方法】

フラスコ培養→5L-Jar 培養→90L-タンク培養→5kL タンク培養のフローにより、大量高密度培養を行った。本培養試験で用いた 5kL 培養タンクを図 6-1 に示す。



図 6 - 1 本培養試験で用いたユーグリード社の 5kL 培養タンク

<5L-Jar 培養>

mh1915 株を 100mL フラスコ培養 (o/n) 後、5L-Jar へ植菌して培養した。2 日後に 3% グルコースをフィードした。

培地： GY 培地 (2.5 L)
 培地組成 グルコース 75 g
 酵母エキス 25 g
 人工海水 1250 mL
 水道水 1250 mL
 消泡剤 (PE-M) 1 mL
→NaOH で pH7.0 に調整
 Vitamin Mix 2.5 mL (滅菌後に別添加)
 Mineral Mix 5 mL (滅菌後に別添加)

培地量： 約 2.5 L
 培養容器： 5L-Jar × 1 基
 滅菌条件： 121°C、20 分

添加試薬： ・人工海水
 NaCl 45.0 g
 KCl 1.05 g
 MgCl₂ · 6H₂O 16.2 g
 MgSO₄ · 7H₂O 8.1 g
 CaCl₂ · 2H₂O 1.5 g
 水道水 1.5 L
 →添加量：1250 mL／培養容器 (5L-Jar)

・ Vitamin Mix
 Vitamin B₁ 200.0 mg
 Vitamin B₂ 1.0 mg
 Vitamin B₁₂ 1.0 mg
 純水 100 mL
 →0.2 μm フィルターにて濾過滅菌後、バイアルに分注

・ Mineral Mix
 EDTA di-sodium 30 g
 FeCl₃ · 6H₂O 1.45 g
 H₃BO₃ 34.2 g
 MnCl₂ · 4H₂O 4.3 g

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.335 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.13 g
NiSO ₄ · 6H ₂ O	0.26 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025 g
純水	1L

→DW 中に上から順に溶かし、5N NaOH で pH7 に調整

→オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

→冷蔵保存

接種量：	フラスコ培養分すべて
培養温度：	28.0°C
pH 制御：	7.0 ± 0.1 (アルカリ：1N NaOH)
攪拌制御：	250 rpm
通気量：	3 L/min
圧力：	0 kPa

流加液： 50%グルコース溶液
無水グルコース 90 g

Extract Yeast Dried 10 g

DW 100 mL

流加時期： 培養開始からおよそ 2 日後

<90L-Jar 培養>

培地：	GY 培地 (60 L)
培地組成	グルコース 1.8 kg
酵母エキス	0.6 kg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 kg
水道水	60 L
	Vitamin Mix 0.06 L (滅菌後に別添加)
	Mineral Mix 0.12 L (滅菌後に別添加)

培地量： 約 60 L

培養容器： 90L-Jar × 1 基 / 高杉製作所

• Vitamin Mix

Vitamin B ₁	0.12 g
Vitamin B ₂	0.0006 g
Vitamin B ₁₂	0.0006 g
DW	0.06 L

• Mineral Mix

EDTA di-sodium	30 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1.45 g
H ₃ BO ₃	34.2 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	4.3 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.335 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.13 g
NiSO ₄ · 6H ₂ O	0.26 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025 g
純水	1L

→DW 中に上から順に溶かし、5N NaOH で pH7 に調整

→オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

接種量： 5 L 培養分すべて
培養温度： 28.0°C
pH 制御： 7.0±0.1 (アルカリ：1N NaOH)

流加液： 50%グルコース溶液 (1 回分)
無水グルコース 1.8 kg
Extract Yeast Dried 0.2 kg
DW 2 L

フィード時期： 初発グルコースの減りを見て 2 回

<5 kL-Jar 培養>

培地： GY 培地 (3000 L)
培地組成 グルコース 90 kg

酵母エキス	30 kg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15 kg
水道水	3000 L
Vitamin Mix	3 L (滅菌後に別添加)
Mineral Mix	6 L (滅菌後に別添加)

培地量： 約 3000 L
 培養容器： 5 kL-Jar × 1 基 / 高杉製作所

• Vitamin Mix

Vitamin B ₁	6 g
Vitamin B ₂	0.03 g
Vitamin B ₁₂	0.03 g
DW	3 L

• Mineral Mix

EDTA di-sodium	180 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	8.7 g
H ₃ BO ₃	205.2 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	25.8 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.04 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.078g
NiSO ₄ · 6H ₂ O	0.156 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.06 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.15 g
DW	6 L

→DW 中に上から順に溶かし、5N NaOH で pH7 に調整

→オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

接種量： 90 L 培養分 57L すべて
 培養温度： 28.0°C
 pH 制御： 7.0 ± 0.1 (アルカリ：1N NaOH)

流加液： 50%グルコース溶液 (1 回分)
 無水グルコース 90 kg

Extract Yeast Dried	10 kg
DW	100 L

フィード時期： 初発グルコースがなくなったタイミング

(分析)

濁度： OD660nm

グルコース濃度(g/L)： CIIテストワコー

(結果と考察)

最終的な培養液は 322 kg となり、遠心分離機で水分含量 80% のラビリンチュラ菌体 500 kg (絶乾燥菌体：約 120 kg) を回収した。本培養試験時の酸素濃度は、1.0 mg/L を維持しており、前回の mh1915 株培養時の 4.5mg/L とは異なる。よって酸素不足であった可能性が示唆されている。この mh0186 株は酸素要求性が mh1915 株よりも高いと推察される。機械的な問題により Air 流量は 1200L/min が上限であるが、この流量は少ない。培地量が最終的に 3,000L を超えているので Air 量は 3,000L/min は必要であったと推測されている。

5 L ジャーから 5kL 発酵槽まで 1000 倍の培養規模拡大を実施したが、高密度培養自体には問題が無く、5kL ジャーから 100~1000 倍の培養規模拡大についても十分可能と推察された。5kL 発酵槽での最終的な細胞数は 44×10^6 /ml であり、この細胞数濃度に達するまでの培養時間は 112 時間であった。

回収した培養液は斎藤遠心機製の連続遠心機 (ADS-8000CS) にて遠心力 1.5G にて遠心分離を行い、500 kg (約 500 L) の濃縮培養液を得た。このうち約 120 kg (約 120L) を環境エネルギー株式会社に送付。乾燥後へキサン抽出を行い SAF 製造のサンプルとして供した。

環境エネルギー社でのマテリアルバランスを測定したところ対糖脂肪酸含量収率は目標値 25% であるところが 7% 程度であった。この課題は 5L-Jar での培養時から露見していたが、5 kL 発酵槽でも同じような結果になっている。一方令和 4 年度培養に使った mh1915 株は対糖脂肪酸含量収率は 25-27% を達成している。ラビリンチュラの株が変われば対糖脂肪酸含量収率は 25% 程度を達成できる見込みである。一方で mh0186 株は油脂の組成は不飽和度が低い脂肪酸がほとんどで、SAF 製造には適しているが培養法に若干の難しさがあることが分かった。

対応法は酸素濃度を上げて培養する方法とタンパク質生産を抑制し脂質生産へエネルギーを振り分けるように培養中期より「窒素」を与えない培養法を試す必要がある。

今後の検討課題としたい。図6-2~4に5kL発酵槽での培養時の各種パラメータをまとめた。

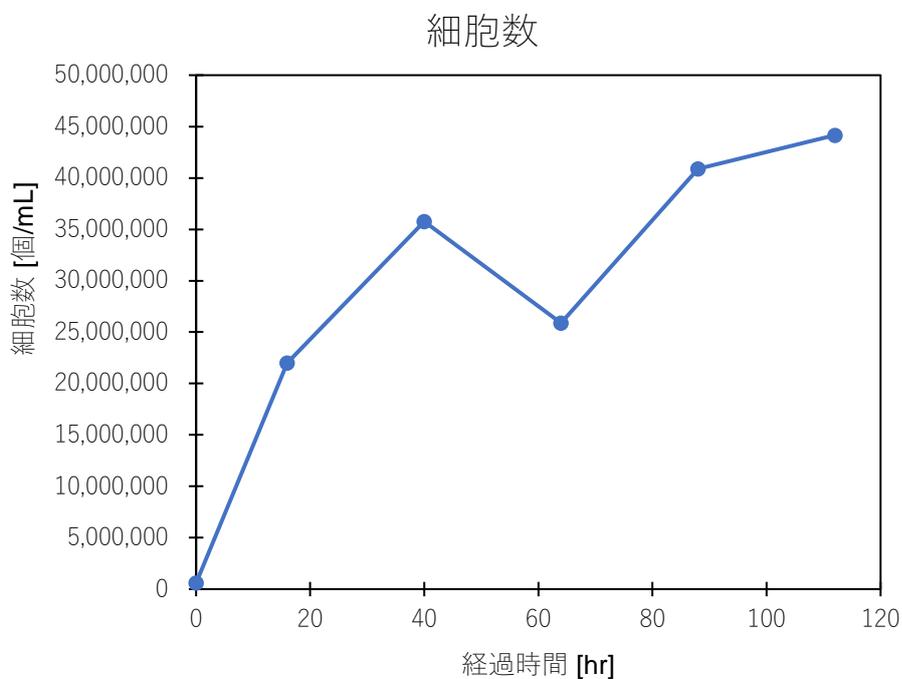


図6-2 5kL発酵槽培養時の細胞数推移

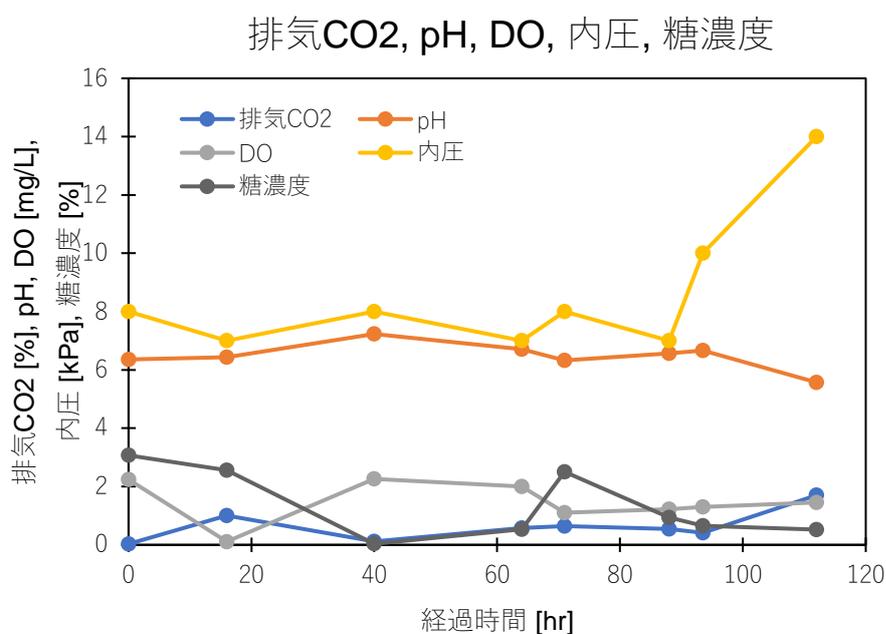


図6-3 5kL発酵槽培養時の排気CO2濃度・pH・DO・内圧・糖濃度の推移

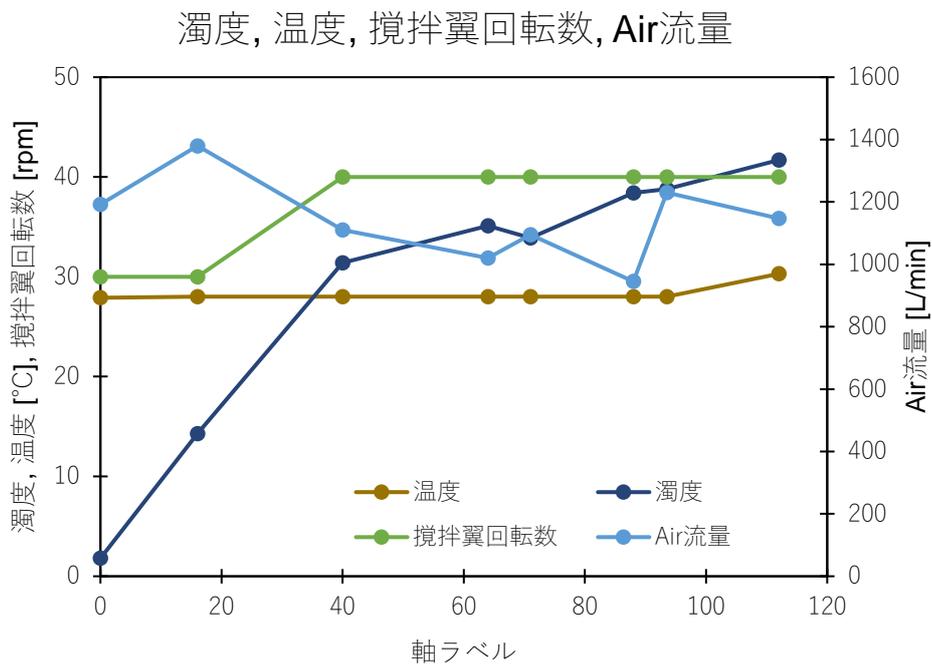


図 6-4 5kL 発酵槽培養時の濁度・温度・攪拌翼回転数・Air 流量の推移

2 - (3) ASTM D7566 Annex2 に適合した SAF の製造

2 - (3) - 1 HiBD 法を用いた SAF 製造

HiBD (High quality-Bio Diesel: ハイビーディー) 法により、ラビリンチュラを油化することにより SAF 製造を試みた。HiBD 法とは、副原料を用いることなく一連の接触分解化技術により、廃食油や油脂含有バイオマスあるいは脂肪酸から脱炭酸反応により「高品質な炭化水素系バイオ燃料」の混合物を得ることが可能な技術である。本項目では、HiBD 法を用いたラビリンチュラ油化による SAF 製造を行った。

2 - (3) - 1 - 1 ラビリンチュラの接触分解油化

(方法)

真空乾燥によりラビリンチュラ培養物の脱水を行った。その後、図 7 - 1 に示す装置を用いて HiBD 法 (固体塩基触媒) によりラビリンチュラ乾燥品の接触分解油化を実施した。

<生成油搾油条件>

反応器：	触媒 (140g)
検体投入方式：	バッチ方式
検体量：	140 g/1 バッチ
窯温度：	~450°C
延長管：	なし
チラー：	10°C

(結果と考察)

真空乾燥によりサンプル①43.4 kg から乾燥品①6.3 kg、サンプル②106.8 kg から乾燥品②3.7 kg を得た (図 7 - 2)。HiBD 用の固体触媒と乾燥ラビリンチュラを混合し、分解油化を起こった (図 7 - 3)。乾燥ラビリンチュラから炭化水素油の生成を確認した (図 7 - 4)。300~350°C 及び 350~450°C で蒸発した留分を粗油として回収し、培養物①の乾燥品①6.25 kg から、生成油量 2,379 g (2,832 mL) を得た (含油率: 約 38%)。培養②の乾燥品②3.70 kg から、生成油量 886.1 g (1,023 mL) を得た (含油率: 約 23.9%)。GC-FID 分析の結果から灯油~ディーゼル分が多い留分であった (図 7 - 5, 6)。このことから、ラビリンチュラの油脂含有率は約 25-40%であると推定された。

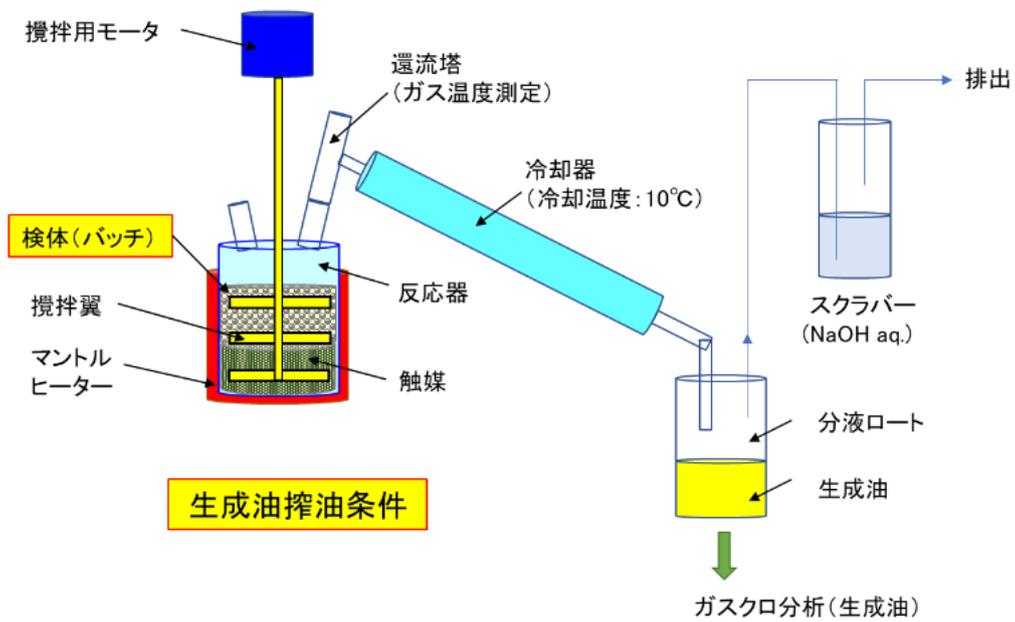


図 7-1 ラビリントラ油化装置の概略図

	培養物①	培養物②
原料		
原料投入時		
乾燥終了時		

図 7-2 ラビリントラ培養物及び乾燥後の様子



触媒: 140 g



触媒: 140 g
乾燥ラビリンチュラ: 140 g

図 7 - 3 HBD に用いた触媒及びラビリンチュラ乾燥品



水分
($\sim 200^{\circ}\text{C}$)



生成油
($300\text{-}350^{\circ}\text{C}$)



生成油
($350\text{-}450^{\circ}\text{C}$)



培養物①の生成油



培養物②の生成油

図 7 - 4 ラビリンチュラ分解油化により得られた生成油

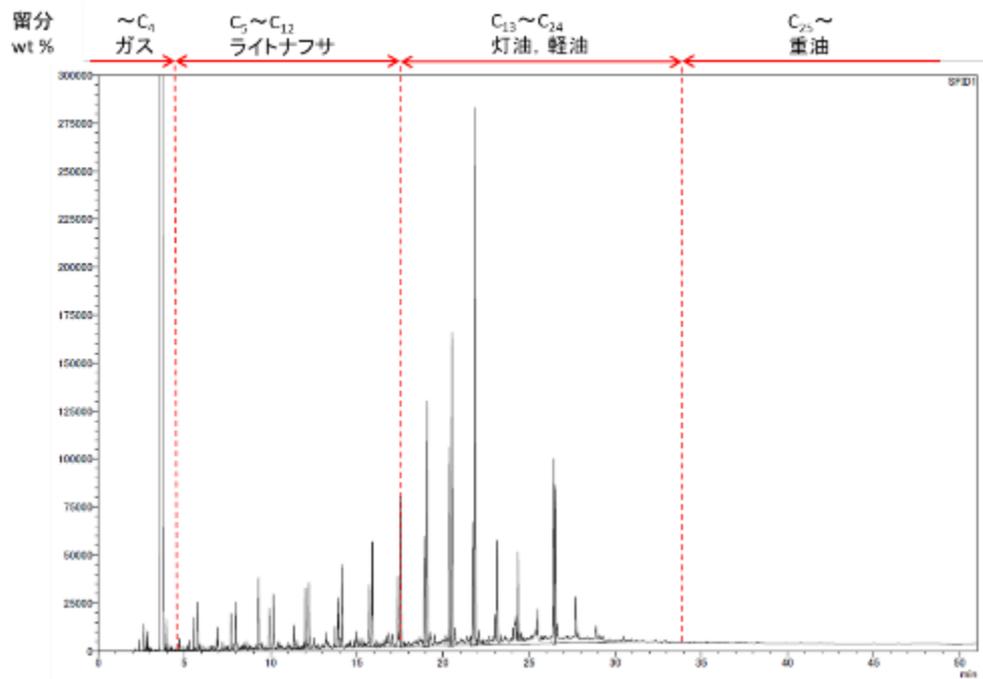


図 7 - 5 培養物①の GC-FID クロマトグラム

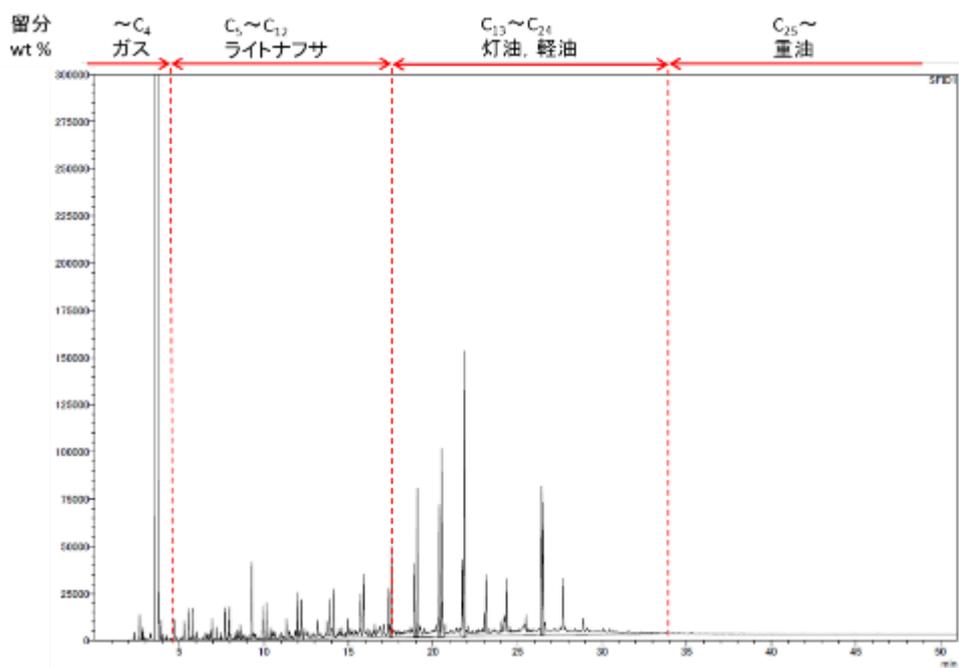


図 7 - 6 培養物②の GC-FID クロマトグラム

2 - (3) - 1 - 2 ラビリントラ接触分解油の水素化

(方法)

常圧・減圧蒸留により、ナフサ、ジェット、ディーゼル、高沸点分への分留した（重質カット蒸留）。その後、水素化異性化触媒 A あるいは水素化異性化触媒 B を用いてジェット、ディーゼル留分に対する水素化を行った。水素化したサンプルを常圧・減圧蒸留により、ナフサ、ジェット、ディーゼルへの分留を実施した（製品蒸留）。製品蒸留により得られたジェット留分が ASTM D7566 Annex2 規格に準拠しているか海事検定協会に分析を依頼した。本項目の流れを図 7-7 に示す。

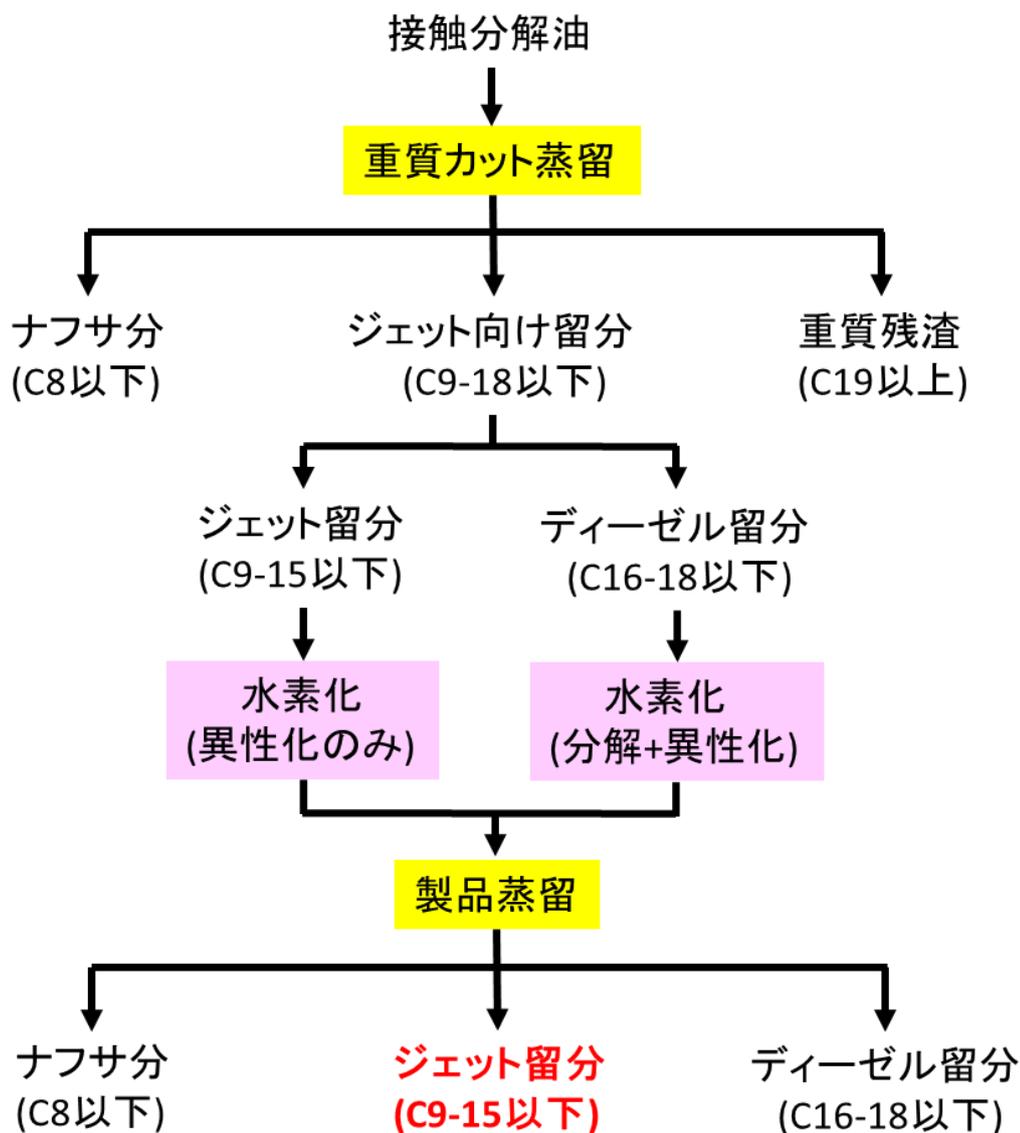


図 7-7 ラビリントラ接触分解油の水素化フロー

(結果と考察)

重質カット蒸留を3バッチ行い、C18以降の重質分をカットすることができた。ジェット燃料留分に該当するC9~18の留分を57.1~65.7wt%の収率にて得た(図7-8)。

バイオジェット向け水素化異性化触媒(水素化触媒A)及びその反応条件を用いて水素化を行い、水素化異性化生成物を得た(図7-9)。GCMS分析の結果、オレフィンや芳香族の水素化が数%残留し、i-パラフィンもほとんど生成しなかった(図7-10、表7-1)。したがって、水素化が進行していないことがわかった。水素圧を上げての反応も行ったが、その効果は小さかった。

また、GCMS解析の結果より、粗油中には、環状化合物が多く含まれるだけでなく、多種多様な含酸素及び含窒素化合物が含まれることが明らかとなった。接触分解油は強烈な臭いを発しており、その要因と考えられる。

ディーゼル留分については、水素化触媒Bも用いて、廃プラスチック分解油の水素化条件での水素化を行った。その結果、強烈なアンモニア臭が発生し、反応後の油のにおいが軽減され、水素化が進行したと考えられる。GCMS解析においても、複数の含酸素分・含窒素分のピークの消失が確認されたほか、オレフィン分のピークも消失していることが確認されたが、i-パラフィンの生成はあまり進行しなかった(図7-11、表7-2)。したがって、C16-18成分をC9-15程度まで選択的に分解可能な条件を見出すには至らなかった。

製品蒸留の結果、74.2wt%の収率でジェット留分を得ることができた(図7-12)。海事検定協会による分析の結果、酸度、密度、凝固点、芳香族、窒素、硫黄、ガム分などにおいてスペックアウトしており、ASTM D7566 Annex2の規格には準拠していなかった(表7-3,4)。これらのことから、ラビリントラ由来のバイオ燃料製造時は、ラビリントラを直接油化する方法ではなく、芳香族低減と品質向上の観点から抽出工程を経由し、その粗油に適した触媒を使用した水素化が望ましいと考えられる。

<蒸留1バッチ目>



<蒸留2バッチ目>



<蒸留3バッチ目>



図7-8 重質カット蒸留の結果



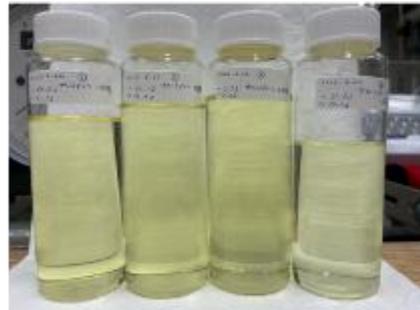
水素化前
(C9-15)

水素化後(反応温度220-250°C)



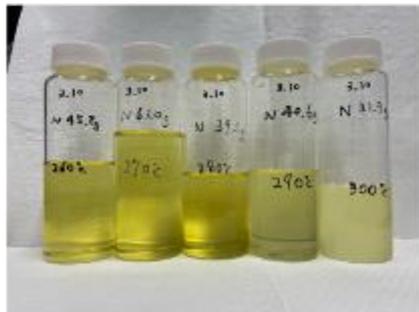
Cat.: 水素化触媒A
Temp.: 220-300°C
Press.: 2.0MPa
LHSV: 0.4h⁻¹
H₂/oil: 2200

水素化後(280°C-2回目)

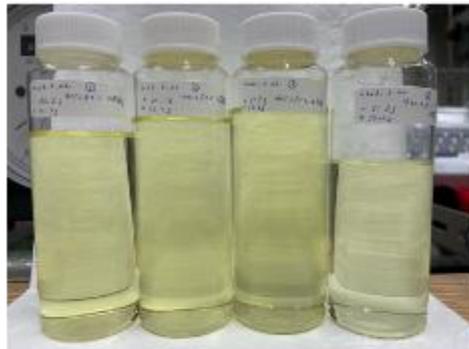


* 220-300°Cでの精製油を混合し
再度280°Cで水素化

水素化後(反応温度260-300°C)



水素化後(280°C, 2.0MPa-2回目)



Cat.: 水素化触媒A
Press.: 2.0, 2.6MPa
LHSV: 0.4h⁻¹
H₂/oil: 2200



水素化前
(C9-15)

水素化後(280°C, 2.6MPa-4回目)

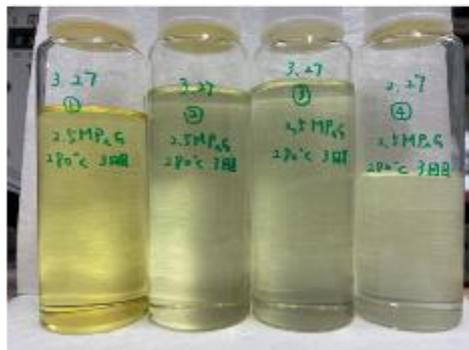


図7-9 水素化異性化生成物

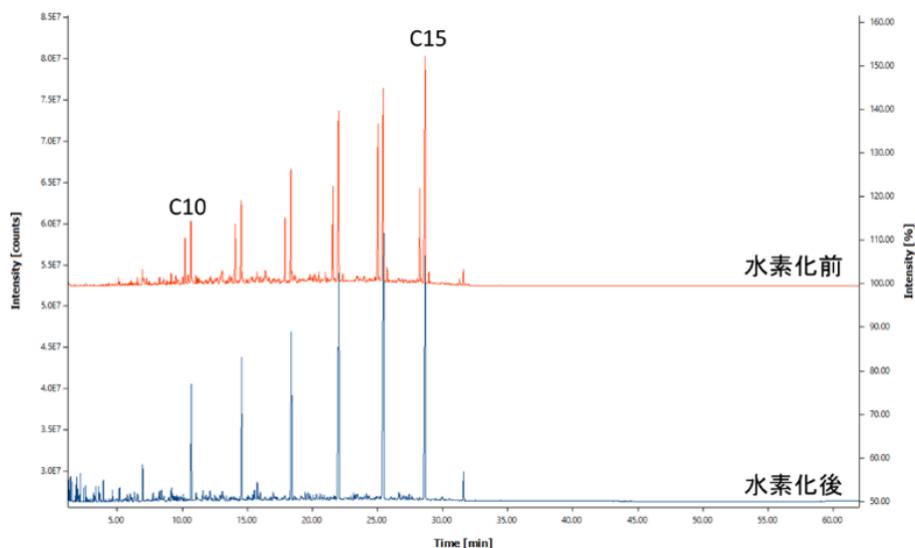


図7-10 ジェット留分の水素化前後のGCMSクロマトグラム

表7-1 ジェット留分のGCMS分析結果

構造	水素化前		水素化後		差	
	面積	割合(%)	面積	割合(%)		
n-パラフィン	4,572,323,030	46.4	7,336,675,155	70.6	+24.2	++
i-パラフィン	27,187,771	0.3	763,709,778	7.3	+7.1	+
オレフィン	2,619,519,749	26.6	258,580,757	2.5	-24.1	--
シクロパラフィン	39,124,375	0.4	805,122,556	7.7	+7.4	+
シクロオレフィン	67,537,998	0.7	42,590,692	0.4	-0.3	-
芳香族	1,080,126,167	11.0	1,057,682,268	10.2	-0.8	-
シクロケトン	141,082,621	1.4	0	0.0	-1.4	-
アルコール	37,746,443	0.4	0	0.0	-0.4	-
アルデヒド	26,459,728	0.3	0	0.0	-0.3	-
脂肪酸	0	0.0	0	0.0	0.0	
ケトン	43,358,204	0.4	0	0.0	-0.4	-
エステル	2,704,164	0.0	650,616	0.0	0.0	
含酸素	144,812,441	1.5	19,220,939	0.2	-1.3	-
不明(特定不可)	120,905,839	1.2	74,359,150	0.7	-0.5	-
Ethe	0	0.0	0	0.0	0.0	
フェノール	297,222,889	3.0	0	0.0	-3.0	-
含ホウ素	0	0.0	0	0.0	0.0	
含ケイ素	29,366,799	0.3	0	0.0	-0.3	-
含硫黄	0	0.0	0	0.0	0.0	
含酸素窒	109,876,351	1.1	2,069,825	0.0	-1.1	-
含窒素	498,105,147	5.1	32,071,087	0.3	-4.7	-
合計	9,857,459,716	100.0	10,392,732,823	100.0		

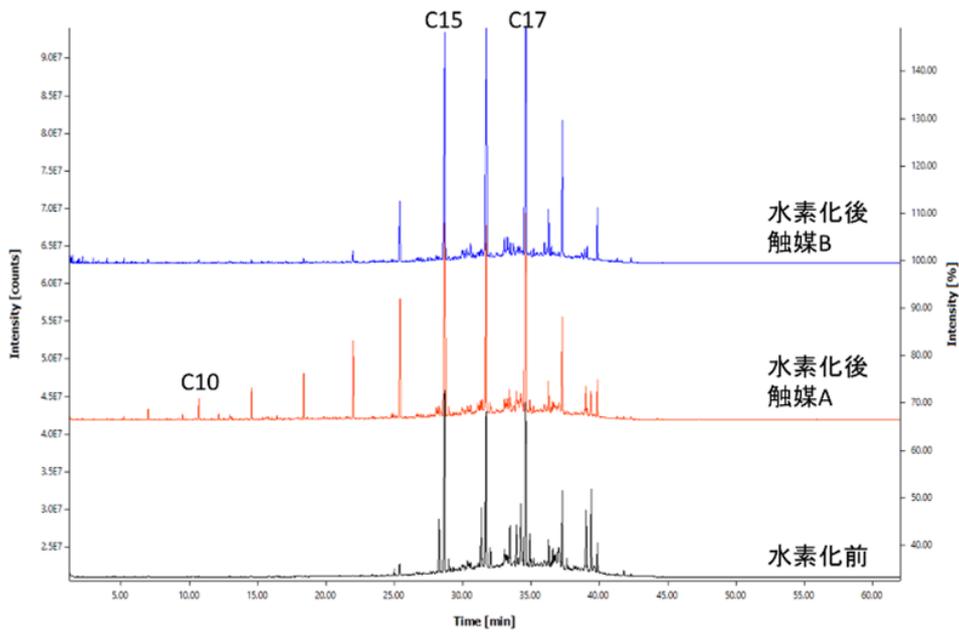


図7-11 ディーゼル留分の水素化前後の GCMS クロマトグラム

表7-2 ディーゼル留分の GCMS 分析結果

構造	水素化前		水素化後 触媒A		水素化後 触媒B	
	面積	割合(%)	面積	割合(%)	面積	割合(%)
n-パラフィン	4,198,818,655	49.0	6,486,259,296	64.9	6,798,166,542	69.1
i-パラフィン	145,872,283	1.7	374,480,441	3.7	836,659,763	8.5
オレフィン	1,711,752,876	20.0	979,194,921	9.8	323,650,592	3.3
シクロパラフィン	4,351,229	0.1	215,459,782	2.2	366,638,345	3.7
シクロオレフィン	4,166,628	0.0	46,402,055	0.5	34,059,664	0.3
芳香族	531,613,242	6.2	777,153,846	7.8	972,197,651	9.9
シクロケトン	23,245,329	0.3	4,050,291	0.0	23,937,533	0.2
アルコール	57,128,761	0.7	2,543,180	0.0	19,786,463	0.2
アルデヒド	0	0.0	1,297,684	0.0	0	0.0
脂肪酸	0	0.0	0	0.0	0	0.0
ケトン	740,413,431	8.6	291,459,972	2.9	0	0.0
エステル	18,827,098	0.2	9,130,159	0.1	0	0.0
含酸素	192,089,122	2.2	42,052,313	0.4	20,731,028	0.2
不明(特定不可)	206,166,713	2.4	197,003,404	2.0	159,464,814	1.6
Ethe	0	0.0	0	0.0	11,931,987	0.1
フェノール	25,354,994	0.3	192,679,889	1.9	58,787,089	0.6
含ホウ素	0	0.0	0	0.0	0	0.0
含ケイ素	0	0.0	0	0.0	0	0.0
含硫黄	0	0.0	2,246,880	0.0	0	0.0
含酸素窒	18,334,157	0.2	21,683,936	0.2	46,814,423	0.5
含窒素	645,972,507	7.5	351,560,572	3.5	174,049,442	1.8
含硫窒	34,111,431	0.4	3,709,207	0.0	0	0.0
含酸硫	16,551,967	0.2	0	0.0	0	0.0
合計	8,574,770,423	100	9,998,367,828	100	9,846,875,336	100

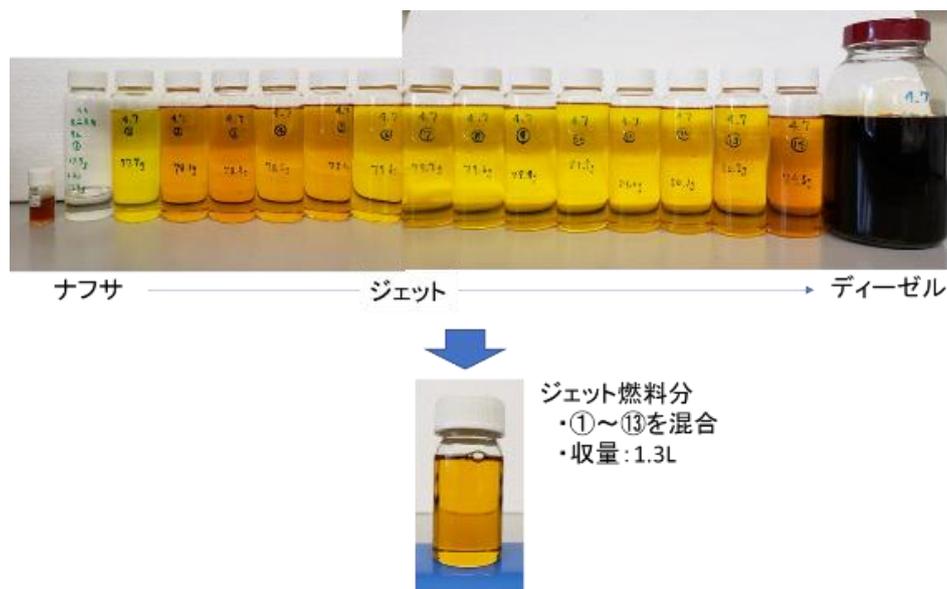


図7-12 製品蒸留の結果

表7-3 海事検定分析結果-1 (赤字: はスペックアウトした項目)

試験項目	単位	規格値	本サンプル	廃食用油由来 バイオジェット	試験方法
Acidity total	mgKOH/g	Max 0.015	0.324	0.000	ASTM D3242
Phycal Distillation					ASTM D86
10% recoverd temp.	°C	Max 205	196.8	164.2	
50% recoverd temp.	°C	Report	230.4	188.4	
90% recoverd temp.	°C	Report	255.7	223.0	
Final foiling temp.	°C	Max 300	237.5	245.2	
T90 - T10	°C	Min 22	58.9	58.8	
Residue	vol%	Max 1.5	1.0	1.0	
Loss	vol%	Max 1.5	0.3	0.1	
Simulated Distillation					ASTM D2887
10% recoverd temp.	°C	Report	174.9	143.7	
20% recoverd temp.	°C	Report	196.7	159.0	
50% recoverd temp.	°C	Report	238.4	189.6	
80% recoverd temp.	°C	Report	269.8	221.2	
90% recoverd temp.	°C	Report	274.3	235.8	
Final foiling temp.	°C	Report	357.9	273.9	
Flash point	°C	Min 38	62.0	42.5	ASTM D56
Density at 15°C	kg/m3	730 to 772	804.3	754.5	ASTM D4052
Freezing point	°C	Max -40	-14.5	<-65.0	ASTM D2386
Existent gum	mg/100ml	Max 7	179	7	ASTM D381
FAME	mg/kg	Max <5	Less than 4.5	Less than 4.5	IP 585
Thermal Stability					ASTM D3241
Test temp.	°C	Min 325	N.A.	325	
Filer Pressure Drop	mmHg	Max 25	N.A.	0.1	
Tube Rating	-	Less than 3, no peacock or Abnormal colour deposits	N.A.	<1	
Antioxidant	mg/L	Min 17, Max 24	N.A.	20.2	GC-MS

表 7-4 海事検定分析結果-2 (赤字はスペックアウトした項目)

試験項目	単位	規格値	本サンプル	廃食用油由来 バイオジェット	試験方法
Hydrocarbon composition*					ASTM D2425
Cycloparaffins	mass%	Max 15	14.7	12.8	
Paraffins	mass%	Report	72.5	87.2	
Aromatics	Mass%	Max 0.5	12.8	0.0	
Carbon and Hydrogen	mass%	Min 99.5	99.1		ASTM D5291
Non-hydrocarbon composition					
Nitrogen	mg/kg	Max 2	7037	1.1	ASTM D4629
Water	mg/kg	Max 75	531	28	ASTM D6304
Sulfur	mg/kg	Max 15	120	Less than 1.0	ASTM D5453
Metals					ASTM D7111
Aluminium (Al)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Calcium (Ca)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Cobalt (Co)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Chromium (Cr)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Copper (Cu)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Iron (Fe)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Potassium (K)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Magnesium (Mg)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Manganese (Mn)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Molybdenum (Mo)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Sodium (Na)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Nickel (Ni)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Phosphorus (S)	mg/kg	Max 0.1	0.3	Less than 0.1	
Lead (Pb)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Palladium (Pd)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Platinum (Pt)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Tin (Sn)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Strontium (Sr)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Titanium (Ti)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Vanadium (V)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Zinc (Zn)	mg/kg	Max 0.1	Less than 0.1	Less than 0.1	
Halogens	mg/kg	Max1	N.A.	Less than 1	ASTM D7359

2 - (3) - 2 ラビリンチュラのヘキサン抽出油からの SAF 製造

HiBD 法によるラビリンチュラ油化では、ジェット留分相当の炭化水素油は得られたものの、以下の点で ASTM D7566 Annex2 を満たすことができなかった

- ・環状化合物(芳香族含む)が多く、密度が高い。
- ・窒素、酸素、硫黄分などの含有量が多く。ガム分も多い。
- ・析出点が高い。

HiBD 法では、ラビリンチュラそのものを分解したことにより、製品に不純物が多く混入したと考えられる。本項目では、ラビリンチュラ培養物を真空・凍結乾燥後にヘキサン抽出・濃縮を行って得られたサンプルを水素化することで炭化水素へ変換することを

検討した。これにより、藻の直接的・熱的な分解を避けることで、窒素・硫黄の混入の回避、熱的な反応による環状化合物生成の抑制、脂肪酸やエステル脱酸素の促進を図り、ASTM D7566 Annex2 の達成を目指して検討を行った。本項目の実験フロー概略図を図7-13に示す。

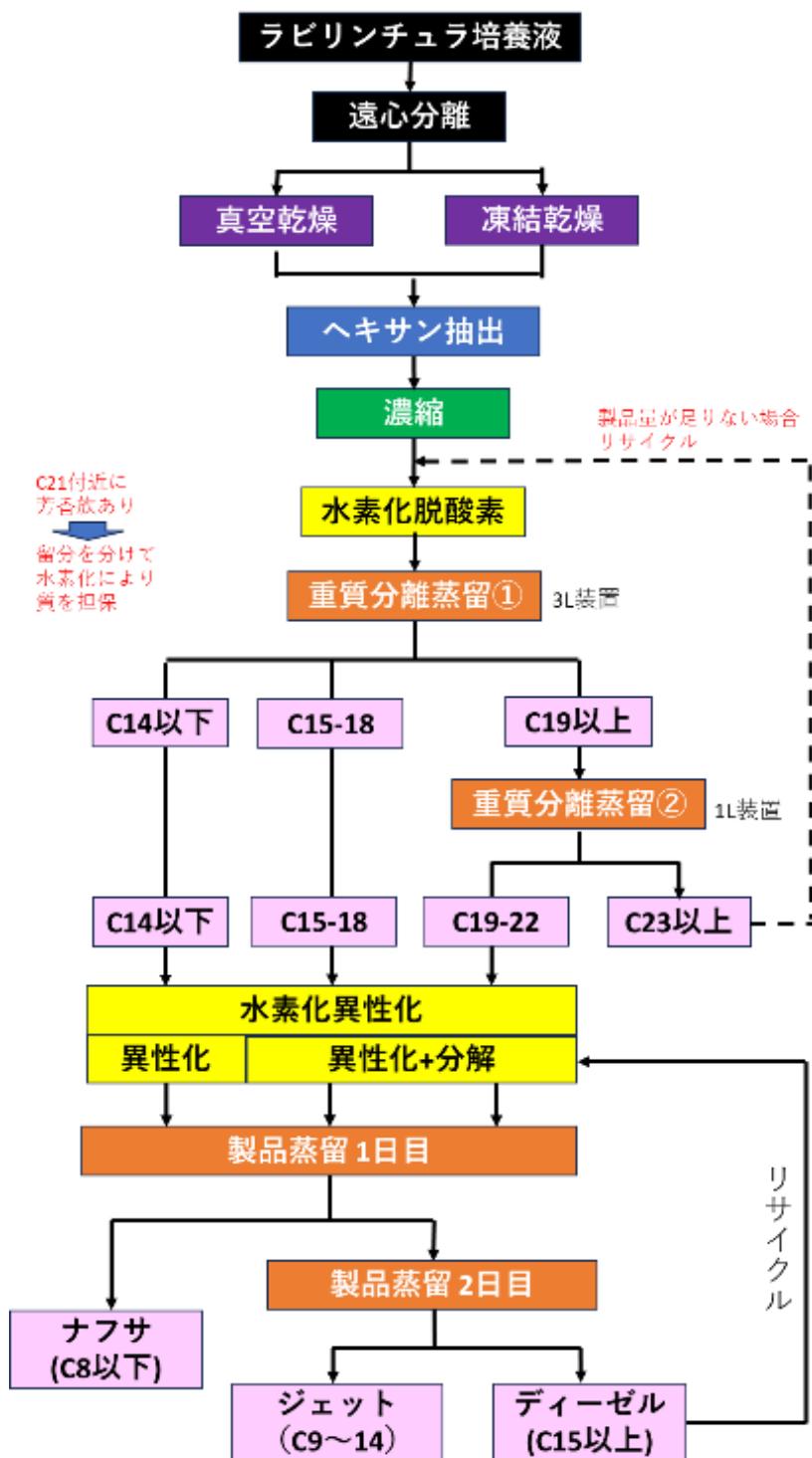


図7-13 実験フロー概略図

2 - (3) - 2 - 1 ラビリントチュラ培養物の乾燥及びヘキサン抽出

(方法)

ラビリントチュラ培養物を真空乾燥あるいは凍結乾燥した。その後、図7-14に示す装置を用いてヘキサン抽出及び濃縮を行った。手順としては次の通りである。ラビリントチュラ乾燥品に対して約10倍量のヘキサンを加え、40°Cに昇温し4~5時間攪拌した。吸引ろ過し、ラビリントチュラ残渣と抽出液を分離した。ヘキサン抽出液をエバポレーターにより濃縮した。

(結果と考察)

ラビリントチュラ乾燥品(図7-15)のヘキサン抽出及び濃縮後、ヘキサン抽出油を約30wt%の収率にて油脂を回収した(図7-16)。

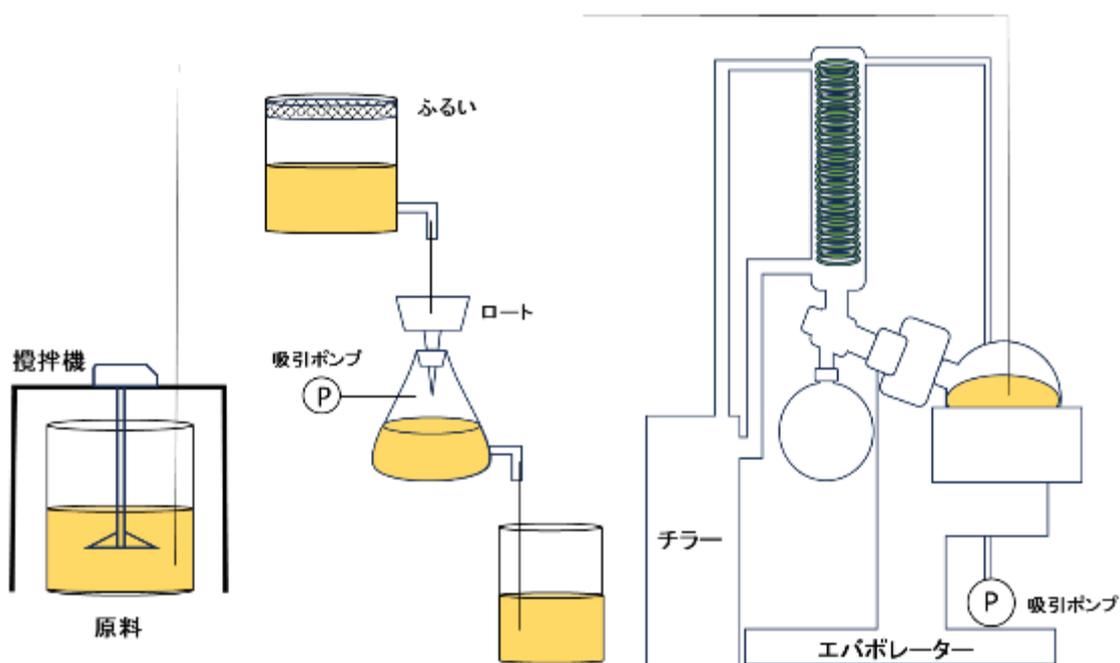


図7-14 ヘキサン抽出及び濃縮装置



真空乾燥品



凍結乾燥品

図7-15 ラビリントチュラ乾燥品



濃縮物(水素化脱酸素原料)

図7-16 ヘキサン抽出液の濃縮物

2 - (3) - 2 - 2 ヘキサン抽出油の水素化脱酸素及び水素化異性化

(方法)

水素化脱酸素触媒を用いて圧力 0.9 MPa、温度 350~380°C、サンプル投入速度 4~6 mL/min、 $H_2/oil=1500$ の条件にて水素化脱炭素を行った。装置フローを図 7-17 に示す。その後、重質カット蒸留を行い、C18 以下と C19~22 の留分に分けた。水素化異性化を、圧力 2 MPa、温度 210~230°C、LHSV 0.4 h⁻¹、 $H_2/oil=2200$ の条件にて行った後、製品蒸留を行った。水素化異性化装置フローを図 7-18 に示す。

(結果と考察)

水素化脱酸素処理後、79.1~96.3wt%の収率にて分解油を得た(図 7-19)。重質カット蒸留により、C18 以下の留分を 24.8~36.4wt%の収率(図 7-20)、C19~22 の留分を 22.8~42.1wt%の収率(図 7-21)で得た。これらの水素化異性化処理し、製品蒸留を行ったところ、C9~14 の留分の収率は 17.6~26.8wt%であった(図 7-22)。GCMS 分析の結果、C15 以上の成分の混入が多かったため(図 7-23)、ジェット留出分の再蒸留を行った。収率 53.5wt%にてジェット留出分①~⑧が得られた(図 7-24)。留分⑤以降では、ディーゼル分の混入が多かったことから(図 7-25)、ジェット留分①~④をジェット燃料製品とした。製品の蒸留性状分析を行ったところ、廃食用油由来のジェット燃料に近い性状であった(図 7-26)。したがって、Annex2 規格を満たす可能性が高い。HiBD 法由来ジェット留分と GCMS を比較すると、本製品は軽質分が増加した一方、重質分も減少していた(図 7-27、表 7-5)。また、クロマトグラムが複雑であり、異性化の進行が予想された。廃食用油由来ジェット燃料と比較したところ、本製品は軽質分がやや少なかった(図 7-28)。また、ピーク位置が廃食用油由来品と重なっていたことから、

イソ体が多く、環状化合物は少ないと考えられる。

水素要求量については、水素化脱酸素工程では実測データ(図 7-29)をもとにしたが、水素化異性化工程においては実測が困難であったため、原料油の GCMS での分析組成から単純なモデル化し、理論的に要求される水素量を算出した。この結果、水素要求量は、水素化脱酸素工程において、ラビリンチュラ由来 SAF は 383 L/L、パーム油由来 SAF は 333 L/L、水素化異性化工程において、ラビリンチュラ由来は 19.0 L/L、パーム油由来は 4.4 L/L であった。したがって、ラビリンチュラ由来の方がパーム油由来よりも合計で約 1.2 倍多かった。

ラビリンチュラ由来油脂の方が、不飽和度の高い脂肪酸やステロールが多く含まれているためと考えられる。不飽和脂肪酸含量がさらに少なくなる培養法の検討や新規株の探索を行うことにより、解決可能と考えている。

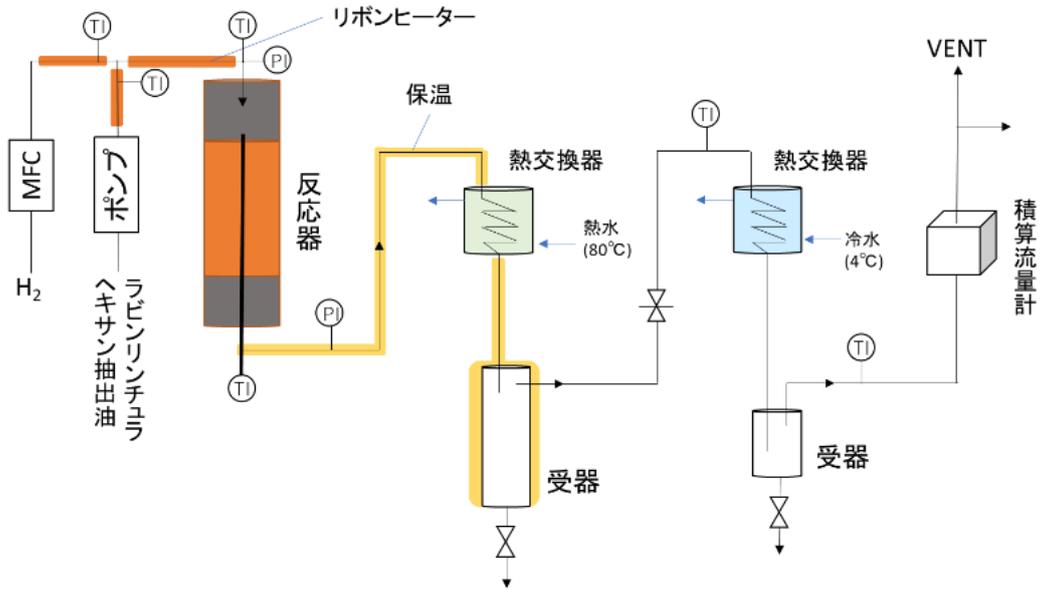


図 7 - 1 7 水素化脱酸素装置フロー図

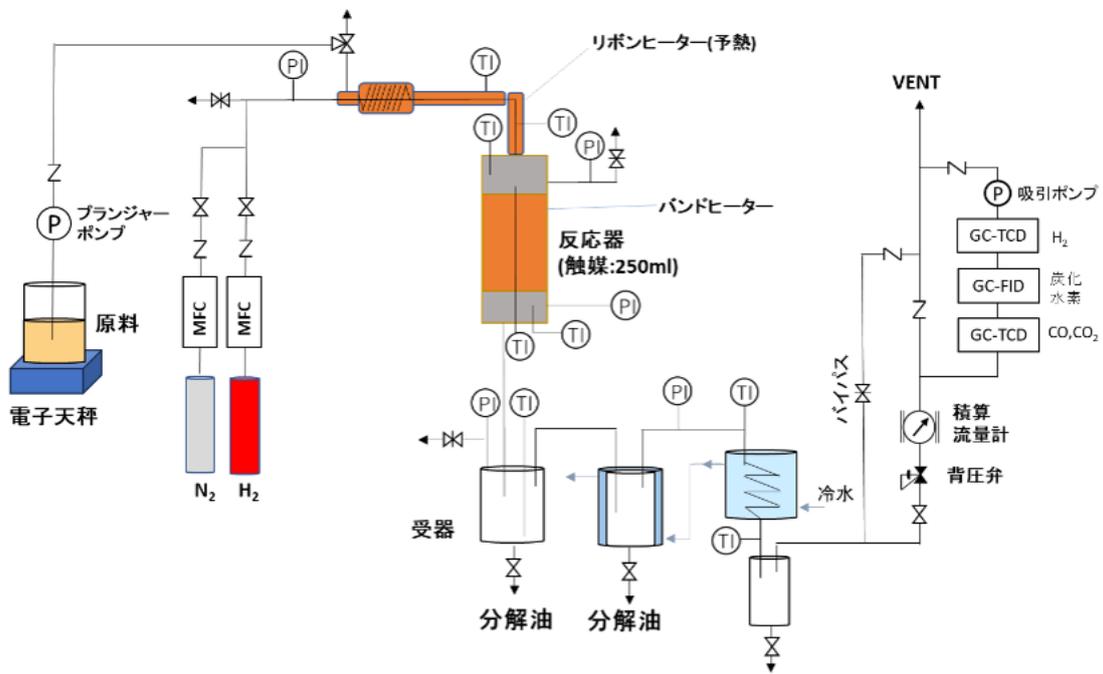


図 7 - 1 8 水素化異性化装置フロー図



基本条件



360-380°C, 4.5ml/min



360-380°C, 6ml/min



360-380°C, 4ml/min



360-380°C, 4.5ml/min

图 7 - 1 9 水素化脱酸素生成物

<蒸留1バッチ目>



<蒸留2バッチ目>

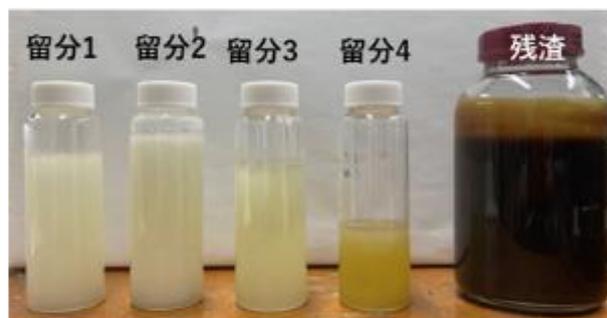


<蒸留3バッチ目>



図7-20 重質カット蒸留により得られた C18 以下の留分

<蒸留1バッチ目>



<蒸留2バッチ目>



<蒸留3バッチ目>

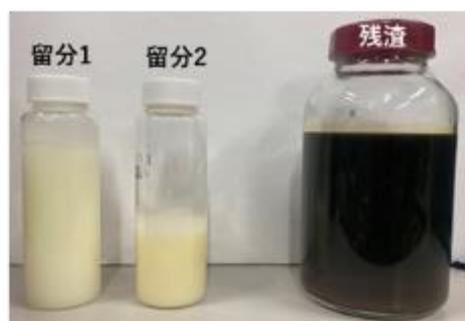


図7-21 重質カット蒸留により得られたC19以上の留分

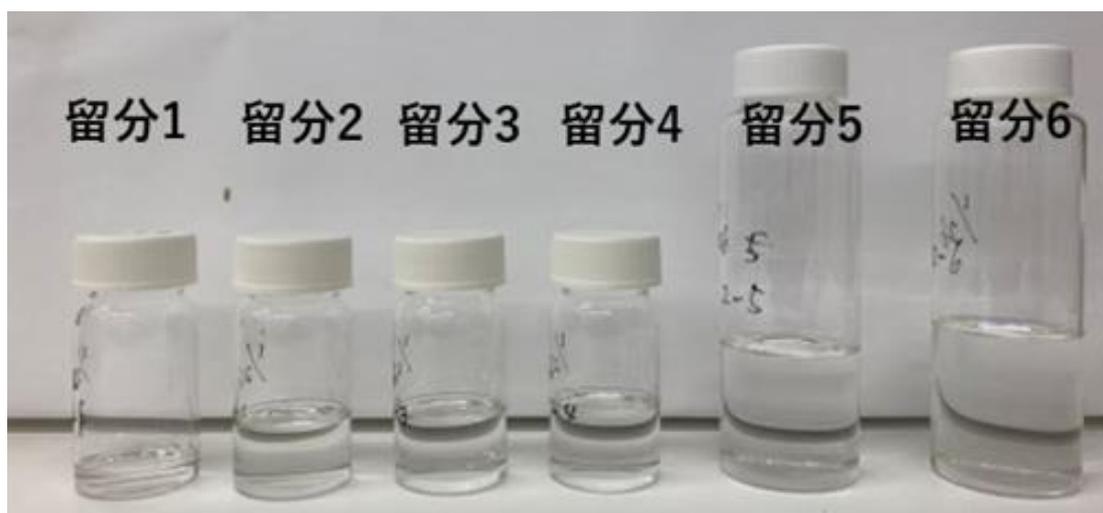


図7-22 製品蒸留の結果

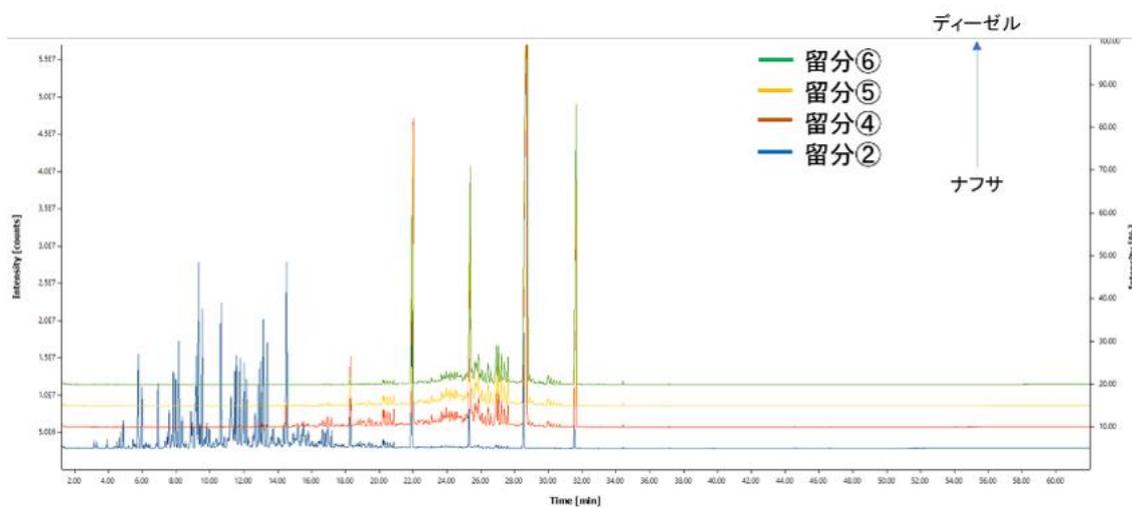


図7-23 製品蒸留サンプルの GCMS クロマトグラム



ナフサ → ジェット → ディーゼル



ジェット燃料分
 ・①～④を混合
 ・収量: 120ml

図 7 - 2 4 製品再蒸留の結果

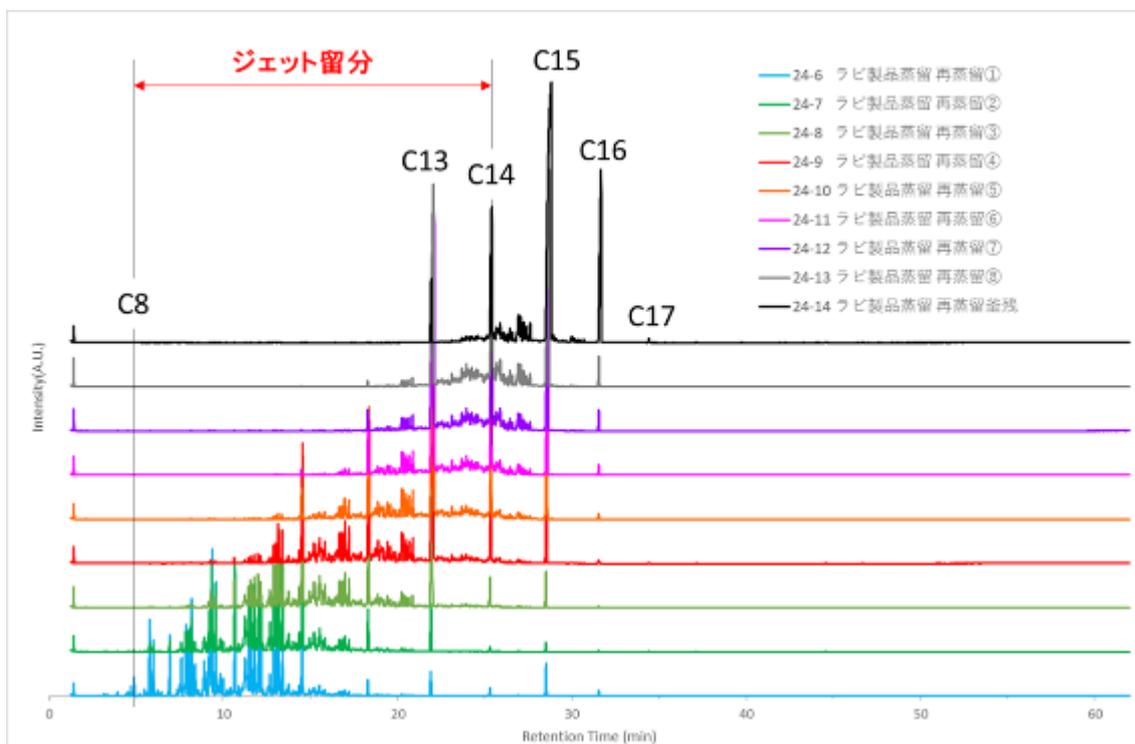


図 7 - 2 5 再蒸留サンプルの GCMS クロマトグラム

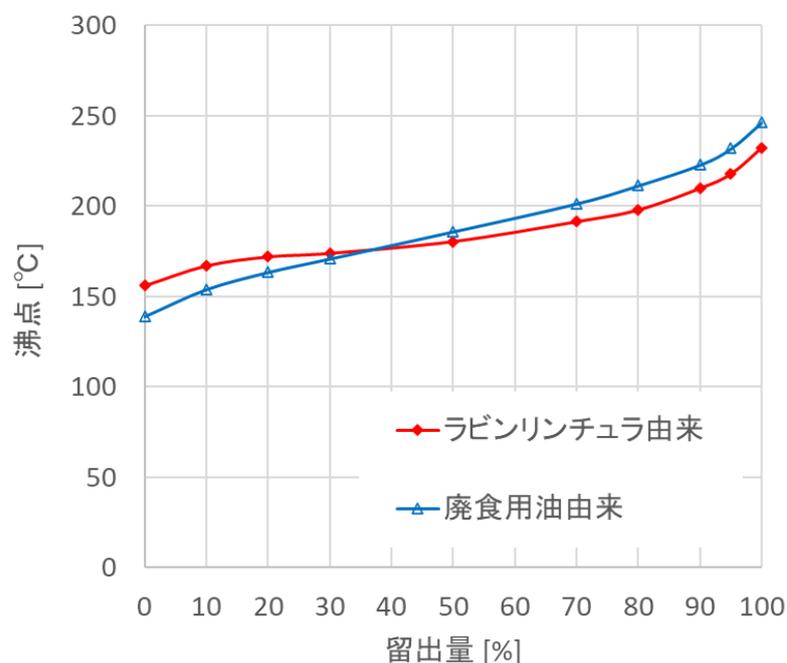


図7-26 ラビンリンチュラ由来と廃食用油由来のジェット燃料留分の蒸留性状比較

表7-5 ジェット留分のGCMS分析の結果

	ラビンリンチュラ由来		廃食用油由来	
	本製品	HiBD法	製品1	製品2
n-パラフィン	28.1	70.6	15.8	13.2
i-パラフィン	62.3	7.3	83.3	82.6
オレフィン	0.5	2.5	0.1	0.0
シクロパラフィン	7.2	7.7	0.7	3.2
シクロオレフィン	0.2	0.4	0.0	0.0
芳香族	0.2	10.2	0.0	0.0
エステル	0.0	0.0	0.0	0.0
含酸素	0.0	0.2	0.0	0.0
不明(特定不可)	1.4	0.7	0.1	1.0
含硫黄	0.0	0.0	0.0	0.0
含窒素	0.0	0.0	0.0	0.0
含窒素	0.0	0.3	0.0	0.0

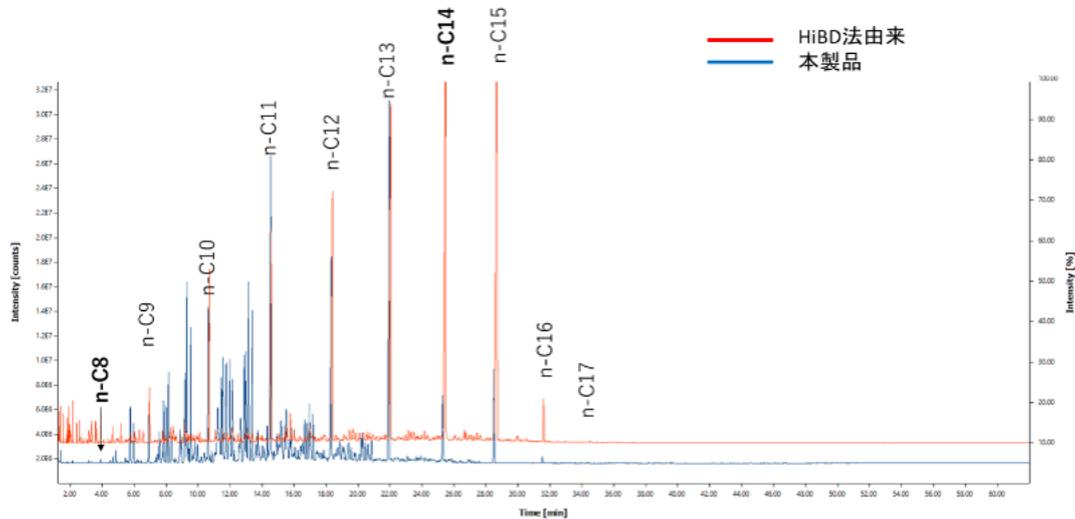


図 7 - 2 7 HiBD 法由来品と本製品との GCMS クロマトグラムの比較

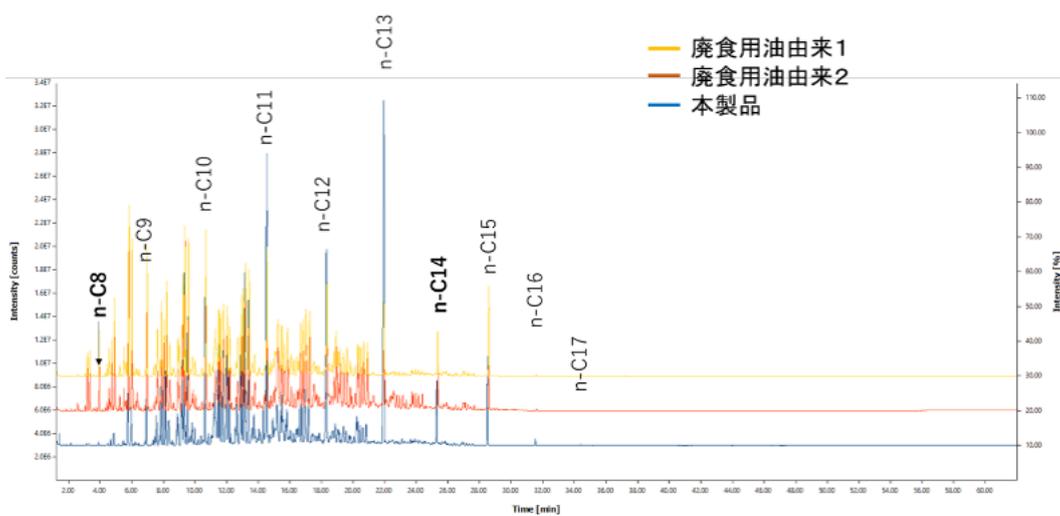


図 7 - 2 8 廃食用油由来品と本製品との GCMS クロマトグラムの比較

ラビリンチュラ抽出油

時間		原料油		ガス				H ₂					
反応時間 [min]	測定間隔 [min/回]	換算 投入量[g]	input [g/回]	H ₂ 投入量 [L/min]	換算出口 ガス量[L]	出口ガス量 [L/回]	出口ガス中 H ₂ 濃度[%]	H ₂ 投入量 [L/回]	出口H ₂ 量 [L/回]	H ₂ 消費量 [L]	消費量 [L/g]	消費量 [L/kg]	消費量 [L/L]
0	0	0	0.0	6.8	349	0		0.0		0.0	0.00	0.0	0.0
60	60	60	120.4	6.8	717	368	98.4	406.8	362.3	44.5	0.37	369.9	329.4
93	33	153	81.4	6.8	909	192	98.1	223.7	188.3	35.4	0.44	435.2	387.5
126	33	279	114.2	6.8	1097	188	95.9	223.7	180.4	43.4	0.38	379.7	338.1
160	34	439	112.8	6.8	1291	194	95.0	230.5	184.4	46.1	0.41	409.0	364.2
193	33	632	97.0	6.8	1483	192	97.2	223.7	186.6	37.2	0.38	383.1	341.1
226	33	858	113.8	6.8	1672	189	97.7	223.7	184.6	39.2	0.34	344.1	306.4
259	33	1117	117.7	6.8	1855	183	95.4	223.7	174.7	49.1	0.42	416.9	371.3
293	34	1410	108.0	6.8	2046	191	94.2	230.5	179.9	50.6	0.47	468.7	417.2
326	33	1736	103.0	6.8	2229	183	94.3	223.7	172.6	51.1	0.50	496.1	441.8
359	33	2095	77.6	6.8	2417	188	94.4	223.7	177.4	46.3	0.60	597.1	531.7

Average 382.9 L/L

パーム油

時間		原料油		ガス				H ₂					
反応時間 [h]	測定間隔 [h/回]	換算 投入量[g]	input [g/回]	H ₂ 投入量 [L/min]	換算出口 ガス量[L]	出口ガス量 [L/回]	出口ガス中 H ₂ 濃度[%]	H ₂ 投入量 [L/回]	出口H ₂ 量 [L/回]	H ₂ 増減量 [L]	消費量 [L/g]	消費量 [L/kg]	消費量 [L/L]
60	0		0.0	6.8	2320	0	93.631	0.0	0	0.0	0.00	0.0	0.0
61	1		166.1	6.8	2693	373	93.353	406.8	348.2	58.6	0.35	352.8	322.7
62	1		174.4	6.8	3054	361	93.59	406.8	337.9	68.9	0.40	395.3	361.7
63	1		190.0	6.8	3421	367	93.894	406.8	344.6	62.2	0.33	327.4	299.6
64	1		184.2	6.8	3777	356	93.616	406.8	333.3	73.5	0.40	399.2	365.2
65	1		185.3	6.8	4143	366	93.799	406.8	343.3	63.5	0.34	342.7	313.5
66	1		183.7	6.8	4507	364	93.749	406.8	341.2	65.6	0.36	356.9	326.5
67	1		187.7	6.8	4868	361	94.017	406.8	339.4	67.4	0.36	359.1	328.5
68	1		179.5	6.8	5207	339	93.945	406.8	318.5	88.3	0.49	492.1	450.2
69	1		199.7	6.8	5590	383	93.759	406.8	359.1	47.7	0.24	238.9	218.5
70	1		187.9	6.8	5947	357	93.892	406.8	335.2	71.6	0.38	381.1	348.7
71	1		167.5	6.8	6318	371	93.479	406.8	346.8	60.0	0.36	358.2	327.7
72	1		194.4	6.8	6690	372	93.69	406.8	348.5	58.3	0.30	299.8	274.3
73	1		196	6.8	7059	369	93.265	406.8	344.1	62.7	0.32	319.7	292.5
74	1		197.1	6.8	7437	378	93.487	406.8	353.4	53.4	0.27	271.0	248.0
75	1		168.4	6.8	7810	373	93.401	406.8	348.4	58.4	0.35	346.9	317.4
76	1		197.7	6.8	8185	375	93.245	406.8	349.7	57.1	0.29	289.0	264.4
77	1		198.2	6.8	8564	379	93.142	406.8	353.0	53.8	0.27	271.4	248.3
78	1		193.7	6.8	8936	372	93.136	406.8	346.5	60.3	0.31	311.5	285.0
79	1		191.6	6.8	9313	377	93.487	406.8	352.4	54.4	0.28	283.7	259.5
80	1		194.9	6.8	9685	372	93.246	406.8	346.9	59.9	0.31	307.5	281.3

Average 333.5 L/L

図7-29 水素化脱酸素工程で消費した水素量の結果

2 - (4) まとめ

既存ライブラリーの中で不飽和脂肪酸含量が少なく SAF 製造に有利であると考えられる mh0186 株を選択し、5 L ジャーでの培養法を確立した。乾燥菌体から 27.8%の油脂回収に成功した。回収した油脂の GCMS 分析を行ったところ、ほとんど飽和脂肪酸であった。したがって、SAF 製造における水素化分解工程の負荷を減少させることが可能であり、mh0186 株は SAF 製造に適した菌体であることが示唆された。5 L ジャーで確立した流加培養技術を基に、mh0186 株を 5 kL 培養槽での高密度培養を行った。

5 kL 培養で得られた回収菌体より得られた脂肪酸を原料として、HiBD 法を用いた直接分解油及びヘキサン抽出油からの SAF の試験製造を実施した。HiBD 法を用いた場合、ジェット燃料留分相当の炭化水素油は得られたが、タンパク質が存在する条件下での HiBD 法ではタンパク質の分解に由来する不純物が多く混入したため、Annex2 規格を満たすことができなかった。よって培養菌体を直接 HiBD 法で処理しニート SAF を得る方法は適切ではないと判断した。不純物の影響をなくすために、ヘキサン抽出により得られた油脂から SAF の試験製造を実施した。その結果、Annex2 規格にほぼ準拠した廃食用油由来と同等品質のジェット燃料留分が得られた。Annex2 規格に外れている「窒素」については、水素化の方法を改善することで対応が可能であり大きな問題ではないと考えている。

収率改善の方法としてヘキサン抽出を行ったが、実用化する上では高価な溶媒を大量に用いることでコストは大きくなり、CO₂ 排出量の増大も避けられない。HiBD 法も菌体に含まれるタンパク質が品質に悪影響を与えるため適切ではないと判断している。一方で弊社は既往研究成果として NEDO 支援による「戦略的次世代研究 (2014 年-17 年)」において廃油を用いての油脂抽出を検討している。廃油からの油脂方法を確立することでコスト及び CO₂ 排出量の面は解決可能と考えている。製造設備の大型化についてはまず HiBD 法での直接水素化熱分解法はタンパク質由来の不純物の影響で難しいと判断している。次に本事業で実施したヘキサン抽出法での油脂抽出後のニート SAF 製造は技術的には平易である、ヘキサン抽出法は日本では食品用の油脂製造に利用できるため多くの抽出実績がある。大型設備は米ぬかから「コメ油」を製造するときにも採用されており年間で 1000 トン規模のコメ油の製造実績もある。しかしながらヘキサン抽出法は上記のごとく 1000 トン規模での抽出実績が上限である。これはヘキサンの回収にコストとエネルギーが必要なためである。SAF 事業は年間で数万 KL の製造を指向しておりヘキサン抽出法での大型設備については数万 KL レベルの大型化は難しいと思われる。廃油を用いてラビリンチュラ油脂を抽出すると、その抽出廃油とラビリンチュラ油脂と一緒に SAF 化が可能であり数万 KL 程度の設備設置が可能である。ヘキサン抽出ではヘキサンとラビリンチュラ油脂を分離する必要があり工程の機械設備が無駄に大きくなると同時にコストアップが避けられないが、廃油

による油脂抽出は廃油とラビリンチュラ油脂がそのまま SAF 化できる点はエネルギーコスト的にメリットが大きい。廃油を使ってラビリンチュラから油脂を抽出するにはラビリンチュラ培養液からラビリンチュラ菌体のみを分離することが必要であり連続遠心機やセラミックフィルターを使った培養液 500 トン規模での処理が必要である。また廃油とラビリンチュラ菌体自体を混合するタンクも大型化し同じく 500 トン規模での抽出槽の設置が重要である。すでに海外では 1000 トン/日規模でのラビリンチュラ油脂を精製し粉末ミルク用の油脂を製造する工程が確立しており、ラビリンチュラ培養液を処理する工程は確立しているため大型化は比較的容易である。もちろん今後はなるべく小さな混合タンクでの効率的抽出設備の設計が重要であることはいまでもない。ラビリンチュラ油脂の中には窒素を含むステロールなど SAF 製造に不要な成分も抽出されてくるが、大量の廃油で菌体を希釈しながら抽出することで、不純物であるステロールなどが希釈されて後段の触媒反応が効率化できるため、大型設備で廃油抽出する意義は大きい。加えて稼働中の廃油由来の Annex2 を実施している大型設備の横に隣接して廃油抽出設備を設置することも考えられており、大型化への道筋は容易である、当面はこの廃油抽出処理での設備規模の大型化が有望である。

大型化・実用化に向けて、弊社らが実施中の N E D O 事業「バイオジェット燃料生産技術開発事業/実証を通じたサプライチェーンモデルの構築/パルプからの国産 S A F の一貫生産およびサプライチェーン構築実証事業」にて丸住製紙工場内にパルプから第二世代バイオエタノール及び SAF を生産する予定であり、このプラントにラビリンチュラ培養設備、油脂抽出を併設することを考えている。このプラントで得られるパルプ糖液をラビリンチュラ培養に使用する。11 ton/日のパルプが糖化可能であり、糖化率 80%と想定すると、8.8 ton の糖が得られる。パルプ糖液を用いてラビリンチュラを培養し、対糖脂肪酸含量収率 25%で得られるとすると、2.2 ton の脂肪酸が得られることとなる。対糖脂肪酸含量収率改善のためにラビリンチュラ培養法の検討、及び廃油からの油脂抽出技術の確立が必要である。

第3章 LCAの検証・評価

(担当：Green Earth Institute 株式会社)

本章における LCA の計算・評価は、Agro Ludens 社へ外注委託した。

本章では、木材チップをパルプ化し、その糖からエタノールを経由してジェット燃料を製造するプロセス (GEI_ETJ プロセス) と、ラビリンチュラ油脂を経由してジェット燃料を製造するプロセス (BITS_HEFA プロセス) の LCA を検証・評価する。

評価対象製品は副生炭化水素を含む木質バイオマス由来のジェット燃料 (以下、バイオジェット燃料組成物と略記) とし、ベースラインは化石燃料由来のジェット燃料とする。

まず、それぞれのプロセスについて、評価対象範囲を設定し、前項までの実証データをもとに想定規模のシステムをシミュレーションすることでフォアグラウンドデータを整理する。次に、各種データ源から整理したバックグラウンドデータとフォアグラウンドデータを乗じることで、それぞれのプロセスの CO₂ 排出量を算出する。そして、生産されるバイオジェット燃料組成物のベースライン排出量からプロセス排出量を差し引くことで、CO₂ 削減量を算出する。

3 - (1) GEI_ETJ プロセス

3 - (1) - 1 評価対象範囲

図 8 - 1 に評価対象製品とベースラインの評価対象範囲を示す。評価対象製品の評価対象範囲は、原料収集、輸送① (パルプ化プラントへの原料輸送)、パルプ化・エタノール化、輸送② (ジェット燃料化プラントへのエタノール輸送)、ジェット燃料化が含まれる。ベースラインの対象範囲は、原油採掘から国内製油所で石油精製までである。評価対象製品とベースライン商品で製品流通は同一の工程と想定されるため、評価対象外とする。

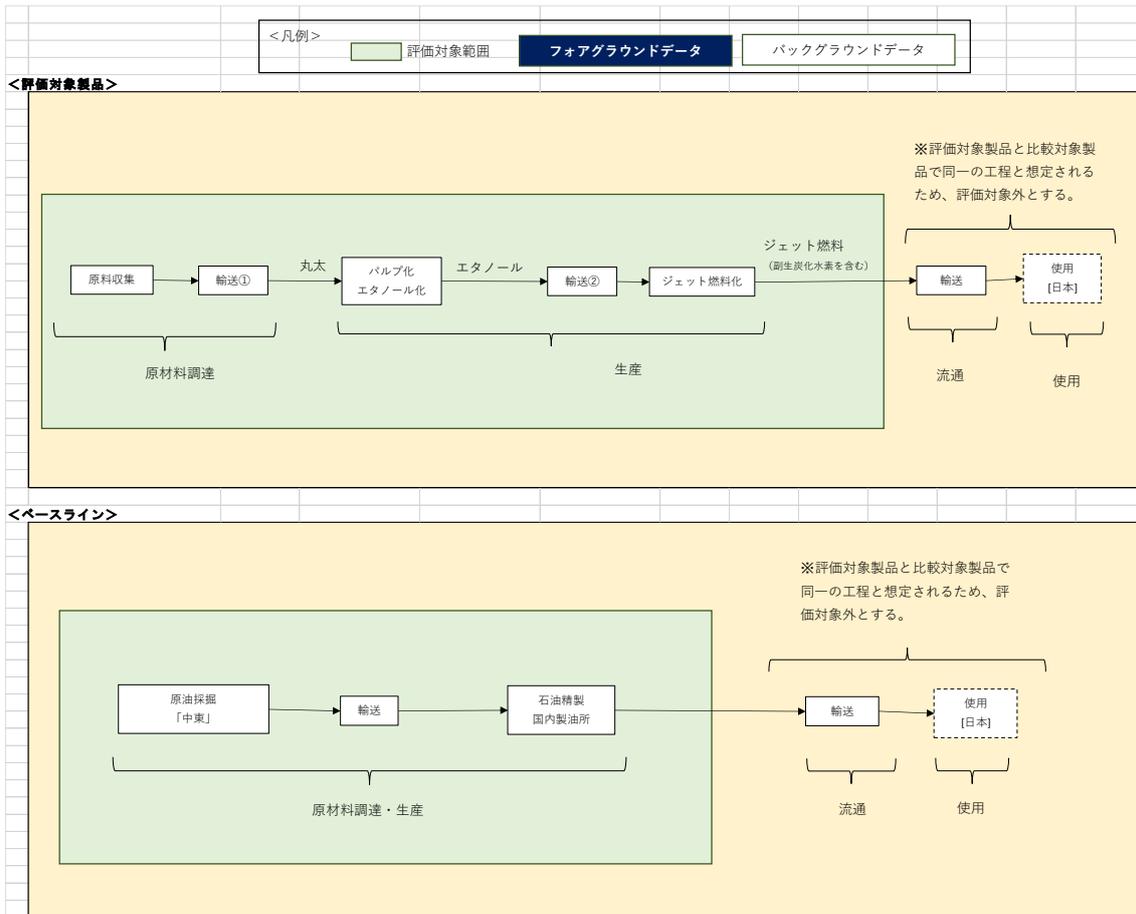


図 8 - 1 GEI_ETJ プロセスの評価対象範囲

3 - (1) - 2 LCA 計算データ

- 原料収集：林地で丸太を伐倒・搬出するプロセス
 既往文献 1)より、丸太を伐採・搬出工程で排出される CO₂ 排出原単位を 14.3kg-CO₂/t-原木 (=丸太 9.01kgCO₂m³÷0.63t/m³、1m³=0.63t、原木含水率 50%と仮定)とした。必要となる原料重量と CO₂ 排出原単位を乗じることで、原料収集における CO₂ 排出量を計算した 1)。
- 輸送①：丸太を製紙工場に輸送するプロセス
 既往文献 2)より、丸太のトラック輸送する際の軽油消費原単位を 0.036L/t・km、輸送距離を往復輸送距離 100 kmとした。輸送する原料重量、軽油消費原単位、往復輸送距離を乗じたものに、軽油の CO₂ 排出原単位を乗じることで、輸送①における CO₂ 排出量を計算した 2)。
- パルプ・エタノール生産：

図8-2にパルプ・エタノール生産プロセスを示す。まず原料の木材チップは回収薬液が混合されたパルプ洗浄脱水液で蒸解される。蒸解物は固液分離によって、パルプと黒液に分離される。回収された黒液は、多重効用缶によって濃縮され黒液ボイラーで熱電回収される。回収された電気及び熱エネルギーはプロセスエネルギーに充当される。生産されたパルプは同時糖化発酵（SSF）（反応温度 35℃）され、セラミックフィルターによる膜分離によってエタノール溶液と残渣スラリーに分離される。残渣スラリーには未分解基質とセルラーゼ酵素が含まれており、循環利用される。エタノール溶液は減圧蒸留され、酵素が含まれるボトム液はSSF槽へリサイクルされる。精留の後、92.5wt%のエタノールが製造される。表8-1に実証データに基づく反応条・変換効率データを示す。これらの設定値でパルプ・エタノール生産プロセスの物質・エネルギー収支を整理し、CO₂ 排出原単位を乗じることで、CO₂ 排出量を計算した。パルプ・エタノール生産で投入されるエネルギーは黒液から回収されるエネルギーで賄うことが可能で、CO₂ 排出量は酵素、CSL、NaOHなどの非エネルギー起源の化学品から計算される。

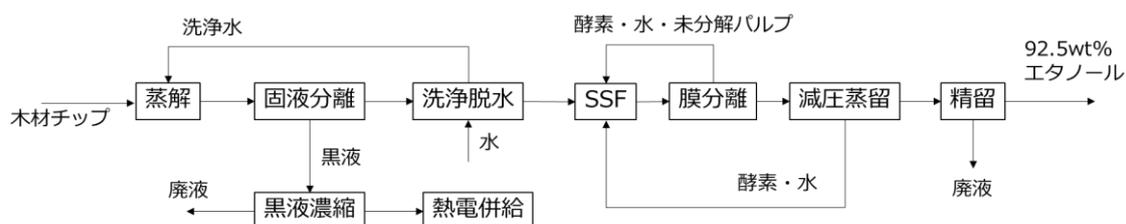


図8-2 パルプ・エタノール生産プロセス

表8-1 パルプ・エタノール生産プロセスの反応条件・変換効率データ

工程	反応条件・変換効率
蒸解	170℃、液比3、パルプ収率55% NaOH添加量195kg/BDT、Na ₂ CO ₃ 添加量29kg/BDT
リグニン回収・洗浄脱水	パルプ固形分率30%、パルプ回収率99%、圧搾圧力0.5MPa
黒液濃縮	三重効用缶、濃縮黒液含水率30%
熱電回収装置	ボイラー効率90%、発電効率20%
SSF	固形分率10w/v%、48時間、攪拌動力0.4kW/m ³ 糖化発酵効率82%、
膜分離	セラミックフィルター、透過圧力0.3MPa
粗留	減圧蒸留、50℃、エタノール濃度30wt%、エタノール回収率95%
精留	常圧、還流比3、エタノール濃度92.5wt%、エタノール回収率99%

- 輸送②：製品エタノールがATJプラントに海上輸送されるプロセス
既往文献より、石油製品タンカーによるCO₂ 排出原単位を9.2g-CO₂/t*km、往復輸送距離を1000kmとした。CO₂ 排出原単位に、輸送するエタノール重量、往復輸送距離を乗じることで、輸送②におけるCO₂ 排出量を計算した3)。

- ジェット燃料化：製品エタノールがジェット燃料化されるプロセス
 図8-3に Byogy 社の ETJ 製造プロセスを示す。エタノールの SAF 化プロセスはエタノールの脱水によるエチレン化、エチレンのオリゴマー化、水素化分解から構成される。

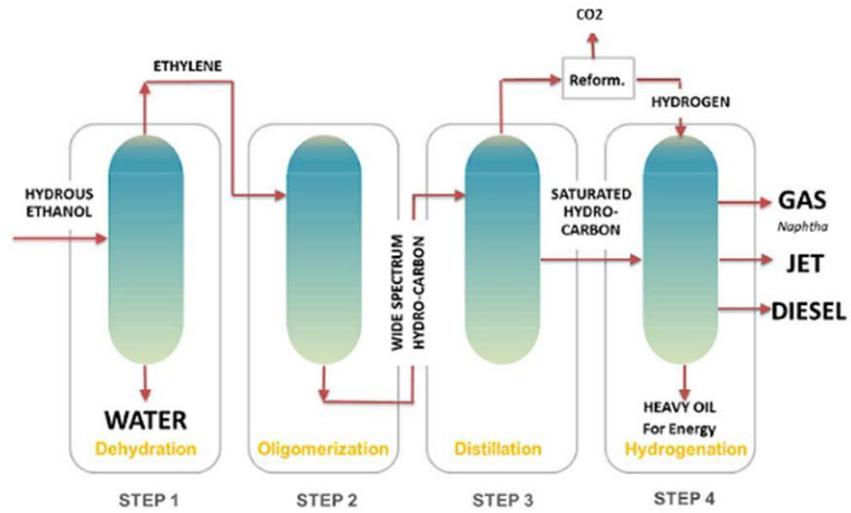


図8-3 Byogy 社の ETJ 製造プロセス4)

エタノールをジェット燃料に変換するプロセスにおいてフォアグラデータは、CORSlA 適格燃料 (CEF: CORSlA Eligible Fuel) として登録されている Forest residues, Standalone の値を引用した (表 8 - 2)。Hydrogen、Natural gas、Electricity のフォアグラウンドデータに CO2 排出原単位を乗じることで、ジェット燃料生産における CO2 排出量を計算した。

表 8 - 2 エタノールのジェット燃料化のフォアグラウンドデータ 5)

Table 71: Lifecycle inventory cellulosic ethanol ATJ pathway (agreed set of input between JRC and ANL).

Ethanol production		Agricultural residues		Forest residues		Miscanthus		Switchgrass	
Inputs	Units	Standalone	Integrated	Standalone	Integrated	Standalone	Integrated	Standalone	Integrated
Biomass feedstock	dry kg	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Natural gas	MJ	-	-	.042	.042	-	-	-	-
Diesel	MJ	0.0024	0.0024	.0044	.0044	0.0024	0.0024	0.0024	0.0024
Cellulase	g	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33
Yeast	g	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Sulfuric acid	g	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30
Ammonia	g	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
NaOH	g	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46
CaO	g	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
Corn steep liquor	g	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63
DAP	g	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Urea	g	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26
Outputs									
Ethanol	MJ	1	1	1	1	1	1	1	1
Electricity before use for ATJ conversion	MJ	0.11	0.088	0.11	0.088	0.11	0.088	0.11	0.088

Ethanol-to-jet		Agricultural residues		Forest residues		Miscanthus		Switchgrass	
Inputs	Units	Standalone	Integrated	Standalone	Integrated	Standalone	Integrated	Standalone	Integrated
Ethanol	MJ	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
Hydrogen	MJ	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Natural gas	MJ	0.18	0	0.18	0	0.18	0	0.18	0
Electricity	MJ	0.02	0	0.02	0	0.02	0	0.02	0
Total Energy Input	MJ	1.32	1.12	1.32	1.12	1.32	1.12	1.32	1.12
Outputs									
Jet fuel and other energy products	MJ	1	1	1	1	1	1	1	1
Jet energy share in total energy output (%)		75%	75%	75%	75%	75%	75%	75%	75%
Energy efficiency (%)		76%	92%	76%	92%	76%	92%	76%	92%

(結果)

ジェット燃料組成物年産 10 万 kL 規模の GEI_ETJ プロセスの CO₂ 削減量を表 8-3 に示す。ジェット燃料組成物排出原単位：2.61kg-CO₂ (カーボンフットプリント制度試行事業 CO₂ 換算量共通原単位データベース ver.4.0 (国内データ)) とジェット燃料組成物生産量 10 万 kL を乗じることで、ベースライン排出量は 261,000t-CO₂ となる。

評価対象製品を製造するためのプロセス排出量は、原材料調達・生産で 20,978t-CO₂、生産 (パルプ・エタノール生産、輸送②、ジェット燃料化) でエネルギー起源 51,034t-CO₂、非エネルギー起源 26,390t-CO₂ となった。

ベースライン排出量からプロセス排出量を差し引いた CO₂ 削減量は 162,598t-CO₂ となり、CO₂ 削減率 (CO₂ 削減量/ベースライン排出量) は 62.2% と算出された。

表 8-3 GEI_ETJ プロセス (ジェット燃料組成物年産 10 万 kL 規模) の CO₂ 削減量

(単位 t-CO ₂ /年)	①評価対象製品						②ベースライン						③削減量 (②-①)							
	原材料 調達・ 生産	生産	流通	使用	廃棄・ リサイ クル	合計	原材料 調達・ 生産	生産	流通	使用	廃棄・ リサイ クル	合計	原材料 調達・ 生産	生産	流通	使用	廃棄・ リサイ クル	合計		
エネルギー 起源	20,978	51,034				71,012	261,000						261,000						188,988	
非エネルギー 起源		26,390				26,390	0						0							-26,390
合計	20,978	77,424				98,402	261,000						261,000							162,598

3 - (2) BITS_HEFA プロセス

3 - (2) - 1 評価対象範囲

図8-4に評価対象製品とベースラインの評価対象範囲を示す。評価対象製品の評価対象範囲は、原料収集、輸送①（パルプ化プラントへの原料輸送）、パルプ・油脂生産、輸送②（ジェット燃料化プラントへの油脂輸送）、ジェット燃料化が含まれる。ベースラインの対象範囲は、原油採掘から国内製油所で石油精製までである。評価対象製品とベースライン商品で製品流通は同一の工程と想定されるため、評価対象外とする。

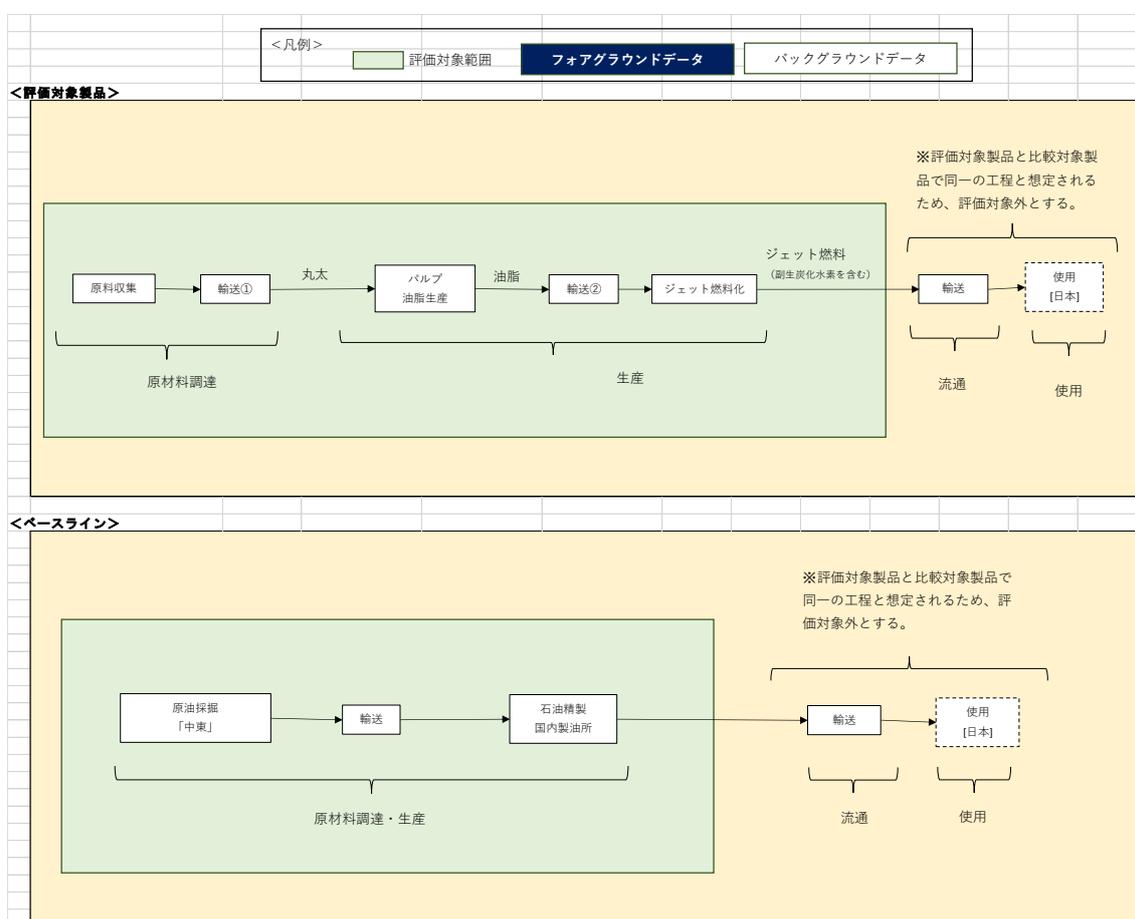


図8-4 BITS_HEFA プロセスの評価対象範囲

3 - (2) - 2 LCA 計算データ

- 原料収集：林地で丸太を伐倒・搬出するプロセス

既往文献¹⁾より、丸太を伐採・搬出工程で排出される CO₂ 排出原単位を 14.3kg-CO₂/t-原木 (=丸太 9.01kgCO₂m³÷0.63t/m³、1m³=0.63t、原木含水率 50%と仮定) とした。必要となる原料重量と CO₂ 排出原単位を乗じることで、原料収集における CO₂ 排出量を計算した¹⁾。

- 輸送①：丸太を製紙工場に輸送するプロセス

既往文献²⁾より、丸太のトラック輸送する際の軽油消費原単位を 0.036L/t・km、輸送距離を往復輸送距離 100 km とした。輸送する原料重量、軽油消費原単位、往復輸送距離を乗じたものに、軽油の CO₂ 排出原単位を乗じることで、輸送①における CO₂ 排出量を計算した²⁾。

- パルプ・油脂生産

図 8-5 にパルプ・油脂生産プロセスを示す。まず原料の木材チップは蒸解されて、パルプと黒液に分離される。回収された黒液は濃縮され黒液ボイラーで熱電回収される。回収された電気及び熱エネルギーはプロセスエネルギーに充当される。ここまでのプロセスは GEI_ETJ プロセスと同様である。生産されたパルプは酵素糖化 (反応温度 50°C) され、パルプ糖液は残渣スラリーと濃縮糖液に分離される。糖化残渣と酵素液を含むスラリー液は循環利用される。濃縮糖液はラビリンチュラの流加培養さに用いられ、油脂生産される。ラビリンチュラの培養後、菌体はデカンターによって菌体ペーストが回収される。回収された菌体ペーストはロータリードライヤー (排熱回収あり) で乾燥処理され、油脂を溶媒抽出する。表 8-4 に実証データに基づく反応条・変換効率データを示す。これらの設定値でパルプ・油脂生産プロセスの物質・エネルギー収支を整理し、CO₂ 排出原単位を乗じることで、CO₂ 排出量を計算した。

パルプ・油脂生産で投入されるエネルギーは黒液から回収されるエネルギーで賄うことが可能で、CO₂ 排出量は酵素、CSL、溶媒ロスなどの非エネルギー起源の化学品から計算される。

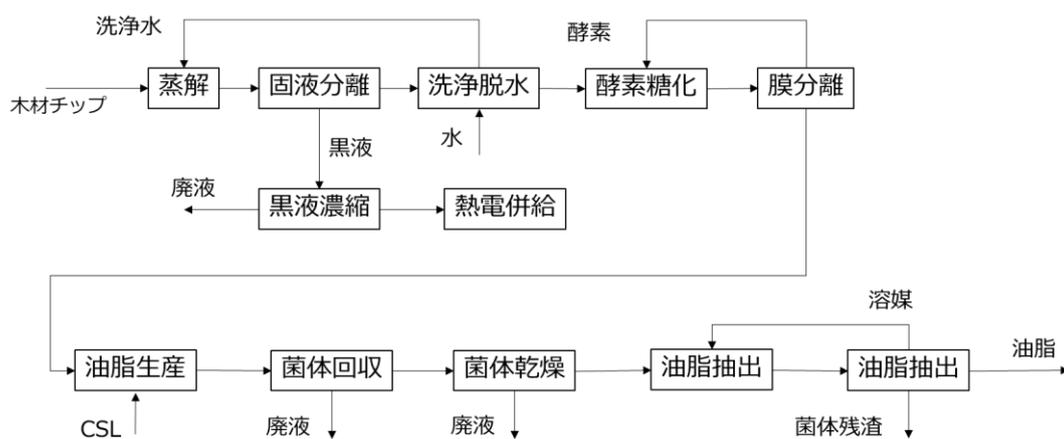


図 8 - 5 パルプ・油脂生産プロセス

表 8 - 4 パルプ・油脂生産プロセスの反応条件・変換効率データ

工程	反応条件・変換効率
蒸解	170℃、液比3、パルプ収率55% NaOH添加量195kg/BDT、Na2CO3添加量29kg/BDT
リグニン回収・洗浄脱水	パルプ固形分率30%、パルプ回収率100%、圧搾圧力0.5MPa
黒液濃縮	三重効用缶、濃縮黒液含水率30%
熱電回収装置	ボイラー効率90%、発電効率20%
酵素糖化	固形分率15w/v%、48時間、攪拌動力0.4kW/m ³ C5C6糖化率95%、
膜分離	セラミックフィルター、透過圧力0.3MPa、濃縮糖濃度25w/v%
油脂生産	C5C6消費率100%、C5C6菌体変換効率54%、油脂含有率45% CSL添加率 (CSL/糖) 0.133、通気攪拌動力0.5kW/m ³ 、培養期間6日
菌体回収	デカンター遠心分離動力1.3kWh/m ³ 、菌体固形分率20w%
菌体乾燥	ロータリードライヤー排熱回収、菌体固形分率95w%
溶媒抽出	溶媒比 (溶媒重量/菌体重量) 5、油脂抽出効率95%

- 輸送②：製品油脂がジェット燃料化プラントに海上輸送されるプロセス
既往文献³⁾より、石油製品タンカーによる CO₂ 排出原単位を 9.2g-CO₂/t*km、往復輸送距離を 1000 kmとした。CO₂ 排出原単位に、輸送するエタノール重量、往復輸送距離を乗じることで、輸送②における CO₂ 排出量を計算した³⁾。

- ジェット燃料化

図8-6に ANNEX 2 対応の HEFA (Hydroprocessed Esters and Fatty Acids) 生産プロセスを示す。油脂を水素化処理および脱酸素化することでジェット燃料を生産する。

油脂をジェット燃料に変換するプロセスにおいてフォアグラデータは、CORSA 適格燃料 (CEF: CORSA Eligible Fuel) として登録されている HEFA 変換データの値を引用した (表8-5)。上記フォアグラウンドデータと CO₂ 排出原単位を乗じることで、ジェット燃料生産における CO₂ 排出量を計算した。

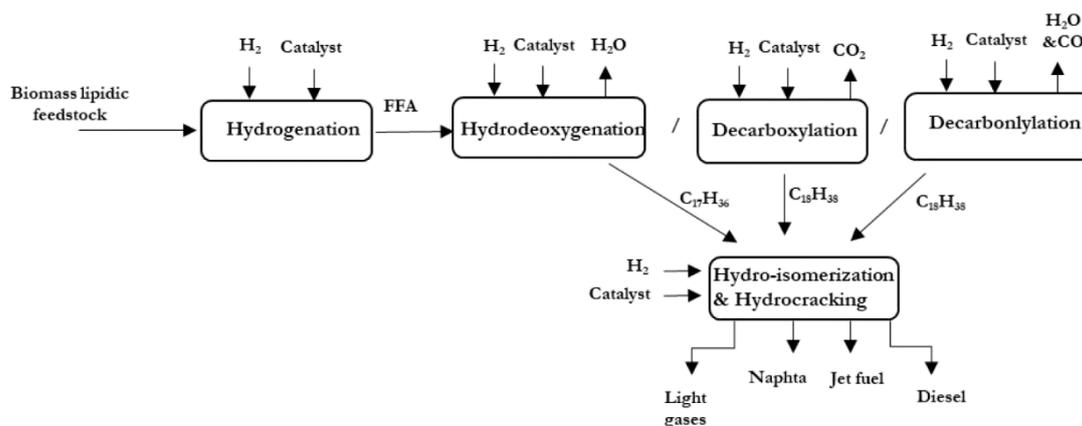


図8-6 HEFA 製造プロセス 5)

表 8 - 5 油脂のジェット燃料化のフォアグラウンドデータ 5)

Table 62: Lifecycle inventory for palm oil HEFA pathway (without agricultural inputs)

Feedstock		Palm Oil	
Data provider		JRC	ANL
Feedstock transportation			
Input	Diesel (MJ/tkm)	2.2378	2.7959
Plant oil extraction			
Input	FFB (MJ/MJ _{oil})	1.8079	1.1172
	Grid electricity (MJ/MJ _{oil})	0.000066	0.0042
	Diesel (MJ/MJ _{oil})	0.00375	0.0243
Output	CH ₄ emissions (g/MJ _{oil})	0.831(open pond) 0.125(close pond)	0.736 (open pond) 0.110(close pond)
	N ₂ O emission (g/MJ _{oil})	0.00084	-
	Heat (MJ/MJ _{oil})	0.0177	0.0181
	Crude vegetable oil (MJ)	1	1
Oil transport			
Input	Diesel (MJ/tkm)	0.8111	1.0175
	Heavy fuel oil (MJ/tkm)	2.2717	1.9571
Feedstock to fuel conversion			
Input	NG (MJ/MJ _{BTL})	0.08576	0.081627
	Vegetable oil (MJ/MJ _{BTL})	1.02385	1.183235
	H ₃ PO ₄ (kg/MJ _{BTL})	1.68778E-05	-
	NaOH (kg/MJ _{BTL})	2.70028E-05	-
	N ₂ (kg/MJ _{BTL})	4.91944E-06	-
	Electricity (MJ/MJ _{BTL})	0.00686	0.004624
	GH ₂ (MJ/MJ _{BTL})	0.017	0.091586
Output	BTL-like fuel (MJ)	1	1
	Steam (MJ/MJ _{BTL})	0.004712	0.1148

(結果と考察)

ジェット燃料組成物年産 1 万 kL 規模の GEI_ETJ プロセスの CO₂ 削減量を表 8-6 に示す。ジェット燃料組成物排出原単位：2.61kg-CO₂ とジェット燃料組成物生産量 1 万 kL を乗じることで、ベースライン排出量は 26,100t-CO₂ となる。

評価対象製品を製造するためのプロセス排出量は、原材料調達・生産で 2,725t-CO₂、生産（パルプ・油脂生産、輸送②、ジェット燃料化）でエネルギー起源 2,383t-CO₂、非エネルギー起源 7,030t-CO₂ となった。

ベースライン排出量からプロセス排出量を差し引いた CO₂ 削減量は 13,962t-CO₂ となり、CO₂ 削減率（CO₂ 削減量／ベースライン排出量）は 53.4% と算出された。

表 8-6 BITS_HEFA プロセス（ジェット燃料組成物年産 1 万 kL 規模）の CO₂ 削減量

(単位 t-CO ₂ / 年)	①評価対象製品						②ベースライン						③削減量 (②-①)						
	原材料 調達・ 生産	生産	流通	使用	廃棄・ リサイ クル	合計	原材料 調達・ 生産	生産	流通	使用	廃棄・ リサイ クル	合計	原材料 調達・ 生産	生産	流通	使用	廃棄・ リサイ クル	合計	
エネルギー起源	2,725	2,383				5,108	26,100						26,100						20,992
非エネルギー起源		7,030				7,030	0						0						-7,030
合計	2,725	9,413				12,138	26,100						26,100						13,962

3- (3) プロセス比較

図*に木材チップ10万トン（絶乾基準）から GEI_ETJ プロセスと BITS_HEFA プロセスで SAF 製造した場合の CO₂ 削減量を図8-7に示す。

GEI_ETJ プロセスと BITS_HEFA プロセスのバイオジェット燃料組成物生産量はそれぞれ 1.88 万 KL と 1.45 万 KL で、ベースライン排出量は GEI プロセスの方が大きい。両プロセスのパルプ・バイオ燃料生産に係るエネルギーは、黒液回収エネルギーで自給可能である。両プロセスのプロセス排出量は同程度であり、GEI_ETJ プロセスと BITS_HEFA プロセスの CO₂ 削減率（CO₂ 削減量／ベースライン排出量）は、それぞれ 62.2% と 53.4% であった。

GEI_ETJ プロセスではジェット燃料化におけるエネルギー起源の CO₂ 排出量の占める割合が大きい。本検討では、パルプ・エタノール生産とジェット燃料化は別の場所で行う Standalone 型を前提としている。しかしながら、このプロセスでは黒液回収エネルギーを有効に活用することが困難である。バイオジェット燃料生産量が大型化した場合、パルプ・エタノール生産とジェット燃料化を同一敷地内で実施する Integrate 型を採用することができれば、CO₂ 削減量を大幅に向上させることが可能である。

BITS_HEFA プロセスでは油脂生産における非エネルギー起源の CO₂ 排出量の占める割合が大きい。これは油糧微生物のラビリンチュラ菌体を培養するために必要となる CSL（菌体培養のための窒素源）が支配的である。今後、ラビリンチュラ油脂だけでなく、菌体にふくまれるタンパク質を評価対象商品に組み込むことで、CO₂ 削減量を大幅に増加させることが可能である。

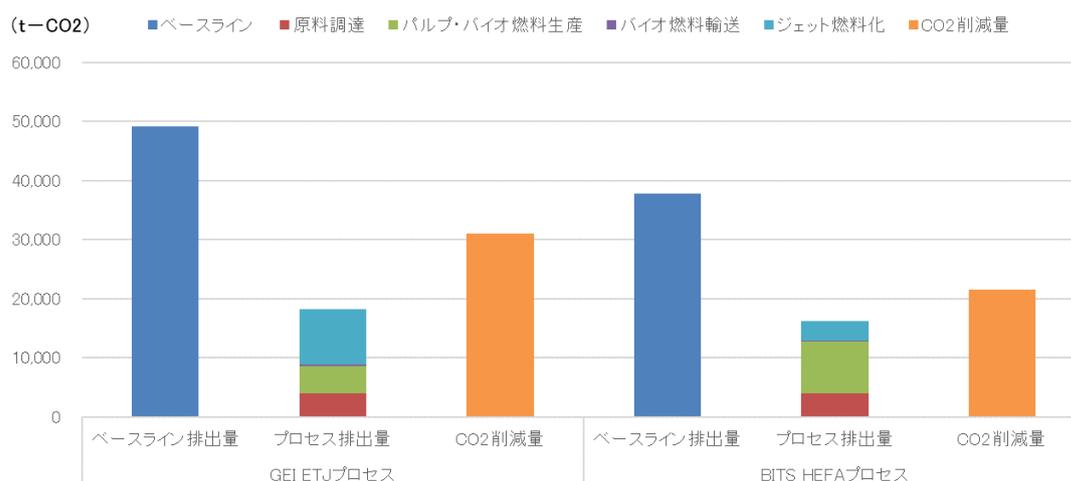


図8-7 両プロセスの CO₂ 削減量

引用

- 1) 中畑ら「林業作業における CO2 排出量算定と収支分析」2001、森林利用学会誌
- 2) 経済産業省、国土交通省「ロジスティック分野における CO2 排出量算定方法 共同ガイドライン Ver3.1 改良トンキロ法による原単位」平成 28 年 7 月
- 3) 国土交通政策研究所「物流から生じる CO2 排出量のディスクロージャーに関する手引き」平成 23 年 5 月
- 4) Byogy 社 HP, <https://byogy.com/technology/>
- 5) CORSIA SUPPORTING DOCUMENT, CORSIA Eligible Fuels – Life Cycle Assessment Methodology, 2022
- 6) カーボンフットプリント制度試行事業 CO2 換算量共通原単位データベース ver.4.0 (国内データ)

4章 ASTM D7566 適合性の確認

4- (1) D7566 適合性の確認

ATJ-SPK については研究途中で分析に必要なサンプル量の確保が困難と判断されたため、この試験は断念し計画変更した。仕様書(5)～(7)で製造される HEFA-SPK については3Lの試料を用いて NKKK にて ANNEX 2 の規格への適合性を確認する計画であったが、事業期間中に製造出来たサンプルが十分でなかったため、優先度を決めて分析を行った。

具体的には、ラビリンチュラ接触分解油の水素化のサンプル(以下、接触分解油と略す。)不合格となった品質項目(表7-3, 7-4参照)を勘案し、次の優先順位とした。

- ・密度：接触分解油で殆どのサンプルが不合格となったため、最優先で分析した。

なお、密度は分子構造と深い関連があり、パラフィン、オレフィン < ナフテン < 芳香族の順で密度が大きくなる。

- ・組成：シクロパラフィン、芳香族、パラフィンの構成比率を分析した。
- ・窒素分：接触分解油で不合格だったため分析した
- ・硫黄分：接触分解油で不合格だったため分析した。
- ・蒸留：ジェット燃料の基本特性であり、接触分解油で不合格となった引火点や析出点とも深い関わりを持つことから、ガスクロ法による分析を実施した。
- ・金属分：微量で規格を外れる可能性があるため、優先的に分析した。

(接触分解油ではPが不合格だった)

- ・ハロゲン：微量で規格を外れる可能性があるため、優先的に分析した。

(別プロジェクトでハロゲンが混入した経験を有していたため)

結果を表9-1に示す。

規格値のある分析項目27項目中、合格24項目、不合格3項目であった。

課題であった密度は合格したが、芳香族、シクロパラフィン含有率が僅かに不合格、硫黄分は合格、窒素分は規格値を大きく外れるという結果となった。

芳香族、シクロパラフィンについてはヘキサン抽出法により大きな改善が見られており、あと僅かな水素化処理の改善で規格達成可能と考えられる。窒素分は原料由来である可能性が高いと思われるが、これも水素圧を上げる、あるいは触媒に対する原料油供給量を下げるなど、より水素化反応が進む条件とすることにより、規格達成可能と考えている。

表 9 - 1 HEFA-SPK 分析結果

	Result	Specification	Test Method	Remarks
Density at 15°C, kg/m³	763.6	730 to 772	D4052	合格
Simulated Distillation			D2887	
Distillation temperature, °C:				
10 % recovered, temperature (T10)	165.7	report	D2887	
50 % recovered, temperature (T50)	197	report	D2887	
90 % recovered, temperature (T90)	238	report	D2887	
Final boiling point, temperature	271.8	report	D2887	
Non-hydrocarbon Composition				
Nitrogen, mg/kg	29	2Max	D4629	不合格
Sulfur, mg/kg	9.6	15Max	D4629	合格
Hydrocarbon Composition				
Cycloparaffins, mass percent	16.6	15Max	D2425	不合格
Aromatics, mass percent	0.6	0.5Max	D2425	不合格
Paraffins, mass percent	82.8	Report	D2425	
Metals				
Al, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Ca, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Co, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Cr, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Cu, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Fe, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
K, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Mg, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Mn, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Mo, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Na, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Ni, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
P, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Pb, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Pd, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Pt, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Sn, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Sr, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Ti, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
V, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Zn, mg/kg	Less than 0.1	0.1Max	D7111	合格
Halogens, mg/kg	Less than 1	1Max	D7359	合格

4- (2) まとめ

(5)～(7)で製造されたニートについて ASTM D7566 の規格適合性を確認した。ヘキサン抽出により得られた油脂から製造したニート SAF について日本海事検定協会
で分析した結果、密度やその他の項目についてはおおむね規格値に合致していたが、唯一「窒素」のみ規格値を大きく超えていた。

窒素分は原料由来である可能性が高いと考えているが、水素圧を上げる、あるいは触媒に対する原料油供給量を下げるなど、より水素化反応しやすい条件で運転することで改善される可能性が高いと考える。

参考

(事業成果)

- ・特許出願：出願日 2023 年 10 月 9 日、出願番号：特願 2023-174873、発明の名称：
「標的物質を製造する方法及び装置」、出願人：G r e e n E a r t h I n s t i t u
t e 株式会社