

令和4年度環境省委託業務

令和4年度脱炭素社会を支えるプラスチック等資源循環システム構築実証事業
(非食用の多糖類を利用したバイオプラスチック製造の実証事業) 委託業務

成果報告書

令和5年3月

株式会社ラビリントラ

要約

1. 実証事業の目的

資源が豊富で、かつ安定的に供給可能なセルロースなどの非食用の植物資源を由来とする多糖類は、酵素分解により従属栄養微生物の炭素源として利用できる。このカーボンニュートラルな原料から、バイオ燃料や高付加価値な化合物を生産する技術開発が、社会実装可能なレベルにまで進んでいる。

本実証事業では、結晶化度が高く、かつ強固な分子構造をもつセルロースパーティクルをバイオプラスチックの分子骨格とし、加えて、安価な植物性バイオマス糖化液を炭素源として得られる油糧微生物ラビリンチュラ由来の脂肪酸を副成分として利用することで、生物成分率100%（触媒、溶媒は除く）のバイオプラスチック合成技術の確立を目指した。

本年度においては、抄紙工程後の廃棄物であるパルプ粕を分子骨格として用い、試薬脂肪酸を付加してなるバイオプラスチックを合成し、物性評価（熱物性、機械物性）、ならびにLCA（Life Cycle Assessment）の検証・評価を行った。

2. 実証事業の内容

- (1) ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発
 - i) 総脂質生産性の向上に関する培養検討
 - ii) ラビリンチュラの大規模培養へ向けた培養検討
 - iii) 製造実機を想定したラビリンチュラの大規模培養
- (2) ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討
 - i) 脂肪酸抽出方法の検討
 - ii) 脂肪酸抽出のスケールアップへ向けた検討
- (3) パルプ粕由来バイオプラスチックの合成と成形特性評価
 - i) 合成：パルミチン酸変性パルプ
 - ii) 合成：ドコサヘキサエン酸変性パルプ
- (4) LCAの検証・評価
- (5) 「非食用の多糖類を利用したバイオプラスチック製造の実証事業」の現地視察会及び検討会の開催

3. 実証事業の成果

- (1) ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発

バイオプラスチック合成用の副原料としてラビリンチュラ由来脂肪酸を供給するため、ベンチスケールテストからパイロットスケールへの段階を経て、ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発を遂行した。

スケールの異なる設備に対して、同等の酸素供給条件を導くのに有効な kLa -rpm 相関データを活用し、5 L, 30 L, 1 kL 培養タンクを経てスケールアップ培養を行った。また、用いた培養設備は同じ機能を有していなかったため、1 kL 培養タンクで実施可能な培養方法を考え、30 L-Jar にてその手法の可否について検討を行った。バッチ（回分）フィード法による培地の流加は、脂質の産生に対して問題無いことを明らかとした。また、pH調整剤による pH の制御、消泡剤の追添加が不要であることを示した。大規模培養の実施を前に、培地殺菌条件に関する知見も見出した。

これらの要素を含めて 1 kL 培養タンクによる大規模培養を行い、想定通りに 1 kL 培養タンクでの大規模培養を遂行できた。本培養方法の妥当性が示された。

投入されたグルコース量 45.0 kg (理論値) から求められる総脂質収率は 25.1%、総脂肪酸収率は 20.6%であった。定量分析により、乾燥菌体中の 66.9 w/w%が脂肪酸であることが示され、1 kL 培養 1 バッチ (理論ブロス液量：639.4 L) で得られる菌体中に含まれる総脂肪酸重量は 9,257 g と理論的に導かれた。脂肪酸の組成は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸が 50.7%と最も多く、ドコサヘキサエン酸 (DHA) が 35.7%と続く結果となった。

単位バッチあたりで更に多くの菌体と脂肪酸を得るには、特に培養基材、培地組成の改善が必要である。また、原価低減のために、安価な糖液や窒素源への転換が望まれる。

(2) ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討

これまでに検討された過去の脂肪酸抽出方法も交えて、ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討を行った。

結果、抽出溶媒としてヘキサンを用いた場合には、ほとんど脂質を回収できず、Folch 法でのクロロホルム (+メタノール) を用いた手法が顕著に有効であることが示された。

これを受けて、Folch 法のスケールアップへ向けた検討を行った。検討の結果、エマルション層は確認されるものの、菌体スラリー容量の 7 倍当量の添加で比較的良好な分離が認められた。分離剤の添加によりエマルション層を削減できる余地はあり、製造実機での脂肪酸の抽出において、クロロホルムを用いた脂質抽出法を適用できる可能性があるものと考察した。

(3) パルプ粕由来バイオプラスチックの合成と成形特性評価

抄紙工程後のパルプ粕を分子骨格として用い、理論上は生物成分率 100%のプラスチック合成品を得ることを最初の目的とした。脂肪酸の中でも安価で大量に入手可能なパルミチン酸 (C16:0) を用い、水酸基置換度が飽和であるパルミチン酸変性パルプ (パルミトイル化パルプ) の合成を行った。次いで、ドコサヘキサエン酸 (C22:6n-3) を用いたドコサヘキサエン酸変性パルプの調製を行った。

結果、パルミチン酸を用いた場合 (水酸基置換度：2.5, 3.0)、DHA を用いた場合 (水酸基置換度：2.6) の双方で、プラスチック合成品を得ることができた。理論上は生物成分率 100%のプラスチックを合成可能であることが示唆された。

DHA 変性パルプ (水酸基置換度：2.6) について、簡易的に熱可塑性の有無を評価したところ、200°Cで軟化する前に焦げて炭化した。DHA は熱や酸素に弱いことから、DHA のみをエステル化することで成形可能な熱可塑性を付与することは難しいと考えられた。また、熱安定性の観点からも DHA をプラスチック材料に適用することは難しい可能性が高いものと考えられた。

得られた化合物に対して適宜熱物性、機械物性を評価した。水酸基置換度 2.5 のパルミチン酸変性パルプについて、熱物性に関して DSC での明確な数値は得られなかったものの、ホットプレート上での加熱にて 175~200°C程度で軟化が確認され、熱可塑性自体は有していることが示された。なお、引張試験では、150°C、100 kN で熱プレスすることで、試験片を問題なく作製することができた。パルミチン酸変性パルプ (水酸基置換度：2.5) の引張強さは 7.04 MPa、引張弾性率 (JIS 規格) は 287.0 MPa

であった。

(4) LCA の検証・評価

パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸から製造したバイオプラスチックについての環境負荷と、従来の石油由来のプラスチックの環境負荷の比較を行い、代替した場合の CO₂ 削減効果を評価した。CO₂ 排出量の評価は、LCA 手法を適用した。本実証事業においては、後に製造プロセスの改善に反映させることを想定し、CO₂ 排出の全体像、および CO₂ 排出のボトルネックであるホットスポットを把握することを目的とした。

ライフサイクル解釈を通じて、一次データにおけるエネルギー使用量が顕著に大きいという結果となった。熱源としての電気ボイラー、電気ヒーターを用いており、これらの電力値が非常に大きいことが主な要因である。この値をフォアグラウンドデータの全工程で反映させており、全体として GHG 排出量を押し上げる結果となった。

GHG 排出のホットスポットとして、「パルプ由来セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの合成」工程が指摘された。熱源に関する先の理由に加え、合成方法はプラスチックを合成する上では複雑で高コストなフローである。合成方法の改善の必要性が示唆された。

CO₂ 削減の対応策と CO₂ 削減シナリオについて考察した。電力は、全て製紙工場内の再生可能エネルギーを使用する想定とし、原単位をゼロとする。パルプからのグルコース収率、培養での脂肪酸収率、バイオプラスチック合成収率の向上により、バージンパルプをスタートとしてバイオプラスチックを得るまでの収率が 16 倍へ改善となる。さらに、実験室レベルの合成方法からの製法改良をはかり、副原料の利用効率を上げて、それらの使用量を 10%にまで削減する。加えて、溶媒留去で生じた溶媒は 100%リサイクルとする。これらを踏まえた検討の結果、評価対象製品の GHG 排出量の総計は、3.41 kg-CO₂eq/kg となり、比較対象製品と比べて、37%の CO₂ 削減を想定できる結果となった。

SUMMARY

1. Purpose of this project

Polysaccharides, derived from non-edible biomass resource such as cellulose through enzyme decomposition, which are rich in resources and stable, can be used as carbon sources for cultivation of heterotrophic microorganisms. The development of biofuel and high-value-added compounds from this carbon neutral raw material has progressed to a level that can be implemented in society.

In this project, we aimed to establish bioplastic synthesis technology with 100% biological content, excluding catalysts and solvents, using cellulose particles with high crystallinity and strong structure as molecular skeleton for bioplastic and fatty acids derived from the *Labyrinthula* microorganism using biomass sugar from cellulose as a carbon source.

In 2022, we have synthesized bioplastics from pulp lees and reagent fatty acids, and evaluated thermophysical and mechanical properties, then verified and evaluated LCA (Life Cycle Assessment).

2. Details of this project

- (1) Technological development for scale up of *Labyrinthula* cultivation
 - i) Cultivation studies for improving total lipid productivity
 - ii) Cultivation studies for large-scale cultivation of *Labyrinthula*
 - iii) Large-scale cultivation of *Labyrinthula* for assuming actual production
- (2) Investigation of scale up method for extraction of fatty acid from *Labyrinthula*
 - i) Experiment studies for fatty acid extraction method
 - ii) Experiment studies for scale up of fatty acid extraction
- (3) Synthesis of bioplastics derived from pulp lees and evaluation of molding characteristics
 - i) Synthesis: Esterification of cellulose with palmitic acid
 - ii) Synthesis: Esterification of cellulose with docosahexaenoic acid (DHA)
- (4) Verification and evaluation of LCA
- (5) Holding of on-site inspection meetings and review meetings for
"Demonstration project for manufacturing bioplastics using non-edible polysaccharides"

3. Results of this projects

- (1) Technological development for scale up of *Labyrinthula* cultivation

We have developed technology for scale up of *Labyrinthula* cultivation through stages from bench scale testing to pilot scale so as to supply *Labyrinthula*-derived fatty acids as a secondary raw material for bioplastic synthesis.

Utilizing the kLa -rpm correlation data, which is effective in deriving equivalent oxygen supply conditions for facilities with different scales, we performed scale up cultivations in 5 L-Jar fermentor, 30 L-Jar fermentor, and 1 kL culture tank. In addition, since those culture equipments did not have the same functions, we considered the culture methods that can be performed in the 1 kL culture tank, and examined the feasibility of the methods with a 30 L-Jar fermentor. It was clarified that the feeding of the medium by the batch feeding method had no problem in the production of lipids. In addition, it was shown that pH control with pH

adjuster and addition of antifoaming agent during cultivation were unnecessary. We also found knowledge about sterilization conditions for medium, that can be used for large-scale cultivation.

Based on these obtained results, we were able to carry out a large-scale cultivation in the 1 kL tank successfully as expected. The validity of this culture method was demonstrated.

It was determined that the total lipid yield and the total fatty acid content were 25.1% and 20.6% respectively, from the input glucose amount of 45.0 kg. Quantitative analysis showed that 66.9 w/w% of the dried cells were fatty acids, and the total fatty acid weight in the cells obtained from one batch of 1 kL cultivation was 9,257 g. In terms of fatty acid composition, palmitic acid, a saturated fatty acid, was the most abundant at 50.7%, followed by DHA at 35.7%.

It is particularly necessary to improve the culture substrate and medium composition so as to obtain more cells and fatty acids per batch. Also, it is desirable to switch to inexpensive sugar solutions and nitrogen sources for reducing costs.

(2) Investigation of scale up method for extraction of fatty acid from *Labyrinthula*

We investigated a scale up method including the past ways that have been studied for extraction of fatty acid from *Labyrinthula*.

It was indicated that the Folch method using chloroform as extraction solvent was remarkably effective. On the other hand, when hexane was used as extraction solvent, almost no lipid could be recovered.

In response to this result, we investigated the scale up of the Folch method. As a result of the examination, although an emulsion layer was confirmed, relatively good separation was observed with the addition of 7-times the volume of the fungal cell slurry. It is possible that the emulsion layer can be reduced by adding a separating agent. It was considered that the lipid extraction method using chloroform could be applied to the extraction of fatty acids in the actual production equipment.

(3) Synthesis of bioplastics derived from pulp lees and evaluation of molding properties

The first objective was to obtain a synthetic plastic product with a theoretically 100% biological content, using pulp lees after the papermaking process as the molecular skeleton. Palmitic acid (C16:0), which is inexpensive and widely available among fatty acids, was used to synthesize esterified cellulose with a saturated degree of hydroxyl group replacement. Next, esterified cellulose with docosahexaenoic acid was prepared using DHA (C22:6n-3).

As a result, synthetic plastic products could be obtained with both palmitic acid and DHA. It was suggested that it is theoretically possible to synthesize plastic with 100% biological content.

The thermoplasticity of DHA-esterified pulp was evaluated, it scorched and carbonized before softening at 200 degrees C. Since DHA is unstable to heat and oxygen, it was considered difficult to impart moldable thermoplasticity by esterifying DHA alone. Also, it was highly likely that it would be difficult to apply DHA to plastic materials from the viewpoint of thermal stability.

Thermophysical properties and mechanical properties were appropriately evaluated for the obtained compounds. We could not obtain a clear numerical value by DSC regarding

thermophysical properties for the palmitic acid esterified pulp with a degree of substitution of 2.5. However, when heated on a hot plate, softening was confirmed at about 175 to 200 degrees C, indicating that it possesses thermoplasticity. In the tensile test, we could fabricate test pieces without any problems by hot pressing at 150 degrees C and 100 kN. The tensile strength was 7.04 MPa and the tensile elastic modulus was 287.0 MPa.

(4) Verification and evaluation of LCA

We compared the environmental impact of bioplastics produced from cellulose particles and *Labyrinthula*-derived fatty acids, and conventional petroleum-derived plastics, then evaluated the carbon dioxide (CO₂) reduction effect of the replacement. The LCA method was applied to the evaluation of CO₂ emissions. The purpose of this project was to understand the overall picture of CO₂ emissions and the hot spots that are the bottlenecks of CO₂ emissions, with a view to improving the manufacturing process later.

Through the LCA, the results showed that energy consumption in primary data is significantly higher. The main reason is that electric boilers and heaters are used as heat sources, and their electric consumptions are very high. This value is reflected in all processes of the foreground data, resulting in an overall increase in greenhouse gas (GHG) emissions.

The bioplastic synthesis process was pointed out as a hotspot for GHG emissions. In addition to the above reasons regarding the heat source, the synthesis methods are complex and costly flows for synthesizing plastics. It was suggested that the synthesis method needs to be improved.

We considered countermeasures for CO₂ reduction and reduction scenarios. It is assumed that all electricity will use renewable energy within the paper plant, and the basic unit will be zero. Improvements in glucose yield from pulp, fatty acid yield in culture, and bioplastic synthesis yield will result in a 16-fold improvement in the yield from virgin pulp to bioplastic. We will improve the production method from the laboratory-level synthesis method, increase the efficiency of the use of auxiliary materials, and reduce their usage to 10%. In addition, 100% of the solvent generated by solvent evaporation is recycled. As a result of examination based on these points, the total GHG emission amount of the evaluated products was 3.41 kg-CO₂eq/kg, which is a result that can be expected to reduce CO₂ by 37% compared to the comparative product.

目次

1. 実証事業の概要.....	10
1.1. 目的	10
1.2. 検討内容	11
1.3. 実施体制	15
1.4. スケジュール	15
2. ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発.....	16
2.1. 概要	16
2.2. 総脂質生産性の向上に関する培養検討.....	20
2.2.1. 流加培養における菌体増殖と総脂質生産性の評価	20
2.3. ラビリンチュラの大規模培養へ向けた培養検討	34
2.3.1. kLa-rpm 相関	35
2.3.2. 非一圧培養器を想定した培地殺菌条件の検討	41
2.3.3. 菌体増殖におけるバッチ（回分）フィード法の妥当性検討	51
2.3.4. 通気攪拌培養における pH 制御の必要性評価	54
2.3.5. 通気攪拌培養における消泡剤制御の必要性評価	55
2.4. 製造実機を想定したラビリンチュラの大規模培養	56
2.4.1. 1 kL 培養タンクによるラビリンチュラ培養.....	56
2.4.2. 脂肪酸の定量、脂肪酸の組成	70
2.5. 本章のまとめ	71
3. ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討.....	72
3.1. 概要	72
3.2. 脂肪酸抽出方法の検討	73
3.3. 脂肪酸抽出のスケールアップへ向けた検討	75
3.4. 本章のまとめ	76
4. パルプ粕由来バイオプラスチックの合成と成形特性評価.....	78
4.1. 概要	78
4.2. 廃パルプ、セルロースパーティクル、パルプ粕について	79
4.3. 脂肪酸について	81
4.4. 合成：パルミチン酸変性パルプ	81
4.4.1. パルプ粕の精製	83
4.4.2. パルミチン酸変性パルプの合成（塩化パルミトイルを用いたエステル化）	85
4.4.2.1. 水準 1（パルミチン酸仕込み当量 3.0, 置換度 3.0）	85
4.4.2.2. 水準 2（パルミチン酸仕込み当量 1.5, 置換度 2.5）	90
4.4.2.3. 水準 3（パルミチン酸仕込み当量 1.0, 置換度 2.5）	92
4.4.2.4. 水準 4（パルミチン酸仕込み当量 2.0, 置換度 2.5）	94
4.4.2.5. 水準 4（パルミチン酸仕込み当量 2.0, 置換度 2.5）スケールアップ合成	96
4.5. 合成：ドコサヘキサエン酸変性パルプ.....	106

4.5.1.	DHA 変性パルプの合成 (DHA-Cl を用いたエステル化)	108
4.5.1.1.	DHA-Cl の合成	108
4.5.1.2.	水準 1 (DHA 仕込み当量 2.0)	112
4.5.1.3.	水準 2 (DHA 仕込み当量 4.0)	113
4.6.	本章のまとめ	118
5.	LCA の検証・評価	121
5.1.	概要	121
5.2.	LCA の概念・手法	121
5.3.	セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの LCA	125
5.3.1.	評価の目的	125
5.3.2.	調査範囲	125
5.3.2.1.	調査対象の製品システム	125
5.3.2.2.	製品システムが持つ機能	126
5.3.2.3.	機能単位及び基準フロー	126
5.3.2.4.	システム境界	127
5.3.3.	影響領域と影響評価手法	128
5.3.4.	必要とされるデータ	128
5.3.5.	前提条件	128
5.3.5.1.	評価対象製品の前提条件	129
5.3.5.2.	比較対象製品の前提条件	130
5.3.5.3.	共通	130
5.3.6.	ライフサイクルインベントリ分析	130
5.3.6.1.	データ区分とデータ収集方法	130
5.3.6.1.1.	一次データ	130
5.3.6.1.2.	二次データ	133
5.3.6.1.3.	評価対象製品	133
5.3.6.1.4.	比較対象製品	141
5.3.7.	ライフサイクル影響評価	142
5.3.7.1.	評価対象 vs. 比較対象	142
5.3.7.2.	CO ₂ 削減効果	144
5.3.8.	ライフサイクル解釈	144
5.3.9.	課題・対応策、CO ₂ 削減シナリオ	145
5.3.9.1.	課題・対応策	145
5.3.9.2.	CO ₂ 削減シナリオ	146
5.4.	本章のまとめ	148
6.	本実証事業のまとめ	149
7.	参考文献	152

1. 実証事業の概要

1.1. 目的

資源が豊富で、かつ安定的に供給可能なセルロースなどの非食用の植物資源を由来とする多糖類は、酵素分解により従属栄養微生物の炭素源として利用できる。このカーボンニュートラルな原料から、バイオ燃料や高付加価値な化合物を生産する技術開発が、社会実装可能なレベルにまで進んでいる。

これまでの先行研究開発において、「セルロース系エタノール生産システム総合実証事業：最適組合せの検討及び事業性評価／パルプを用いた水蒸気爆砕法によるバイオエタノール生産に関する技術開発及び事業性評価／平成27年度～31年度」等^[1.1, 1.2]により、非食用多糖類を糖化する要素技術を開発している（図1-1）。また、「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～26年度」^[1.3]、「ベンチャー企業等による新エネルギー技術革新支援事業（バイオマス）：油糧微生物ラビリンチュラによるバイオ燃料製造への地域バイオマス資源の有用性検証／平成29年度～30年度」^[1.4]において、ラビリンチュラを培養する要素技術（図1-1）、さらには「戦略的創造研究推進事業（ALCA）：非食用の多糖類を利用したバイオプラスチックの研究開発／平成23年度～27年度」^[1.5]を通して、非食用の多糖類（ β -1,3-グルカン：パラミロン）を骨格としたバイオプラスチックを合成する要素技術を開発している。

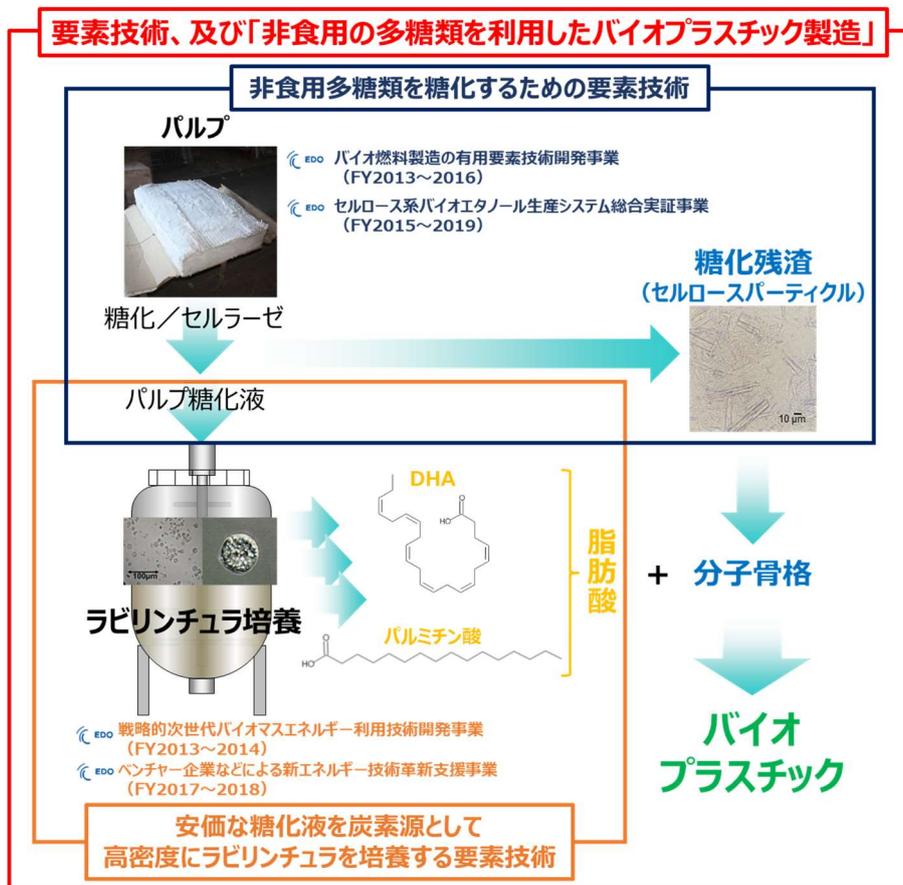


図 1-1 要素技術、及び「非食用の多糖類を利用したバイオプラスチック製造」

本実証事業では、結晶化度が高く、かつ強固な分子構造をもつセルロースパーティクルをバイオプラスチックの分子骨格とし、加えて、安価な植物性バイオマス糖化液を炭素源として得られる油糧微生物ラビリンチュラ由来の脂肪酸を副成分として利用することで、生物成分率100%（触媒、溶媒除く）のバイオプラスチック合成技術の確立を目指した。

本年度においては、抄紙工程後の廃棄物であるパルプ粕を分子骨格として用い、試薬脂肪酸を付加してなるバイオプラスチックを合成し、物性評価（熱物性、機械物性）、ならびにLCAの検証・評価を行った。

なお本事業は、脱炭素社会構築に資する資源循環システム構築の加速化を図るため、環境省が推進する「化石資源由来プラスチックを代替する省CO₂型バイオプラスチック等（再生可能資源）への転換及び社会実装化実証事業」を受けて、「令和4年度脱炭素社会を支えるプラスチック等資源循環システム構築実証事業（非食用の多糖類を利用したバイオプラスチック製造の実証事業）」において実施した。

1.2. 検討内容

（1）ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発

副資材となるラビリンチュラ由来脂肪酸を得るためのラビリンチュラ培養スケールアップ最適化に向けて、酸素移動容量係数を基に1kL培養タンクまでの培養を実施する。また、培養で得られたラビリンチュラ培養菌体中の脂肪酸含量を確認するために、ガスクロマトグラフィーにて脂肪酸の定量と組成確認を行う。

（2）ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討

副資材となるラビリンチュラ由来脂肪酸の生産のため、脂肪酸抽出方法について、過去の抽出実績も踏まえて最適なスケールアップ手法を検討する。

（3）パルプ粕由来バイオプラスチックの合成と成形特性評価

試薬の脂肪酸とパルプ粕を用いたプラスチックを合成する。また、その熱物性比較のため水酸基置換度の異なるプラスチックを用意し、熱物性として示差走査熱量計（DSC）で融点、GPCで分子量、NMRにて水酸基置換度を評価する。機械物性評価として、引張強度試験を実施する。

（4）LCAの検証・評価

パルプ糖化後の残渣であるセルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸から製造したバイオプラスチックについて、LCAによる比較検証・評価を行う。

（5）「非食用の多糖類を利用したバイオプラスチック製造の実証事業」の現地視察会及び検討会の開催

業務の円滑な実施のため、業務実施期間内において、評価審査委員1名程度、環境省担当官1名程度、「令和4年度地球温暖化対策に係る技術実証事業管理・検討等事業委託業務」の受託者（以下「事務局という。」）2名程度による現地視察会を1回程度開催する。尚、現地視察会の日程については、事務局と調整を行う。現地視察会においては、実証事業の現場を案内し、実証に使用する施設や設備機器等の説明を行う。また、現地視察会に併せて検討会を設置し、本業務の進捗報告を行う。事務局の

決定により現地視察会及び検討会はオンラインで行う場合もある。

評価審査委員、事務局の旅費等については、事務局で支払いを行うため、事業者で支払う必要はない。

(6) 評価審査委員会の出席

業務実施期間内において開催する評価審査委員会（都内、2回程度）に出席し、業務の進捗状況についてプレゼン形式で報告を行う。プレゼン資料のデータについては、事務局の指示に従って事前に送付する。

(7) 報告書の作成

業務の内容についての最終的な取りまとめを行い、業務報告書を作成し、提出する。

(8) 実証事業の目標設定

本実証事業の目標は、別表のとおりとし、別添の工程表に従って業務を実施する。

(9) 関係者間の連携

本業務の遂行にあたっては、別途業務委託している事務局が実施する以下の事項について、協力・連携する。

- ・現状把握
- ・実施計画等に関する達成状況の調査
- ・LCA 評価（CO₂削減効果の検証・評価等）
- ・共通的な事業課題の抽出・整理
- ・広報資料の作成
- ・展示会への出展 ※東京都区内 1 イベント程度
- ・そのほか、環境省担当官が協力・連携を要請する業務

別表 本技術開発[実証研究]の目標

	項目	採択時の技術の状況	本年度の目標	最終目標
0	全体目標	各要素技術（ラビリンチュラを高密度培養する技術、非食用多糖類を分子骨格として脂肪酸を付加してバイオプラスチックを合成する技術）はあるものの、社会実装を想定したスケールでのバイオプラスチック原料製造と成形特性の評価、並びに分解性度を評価した実績がない。	生物成分率100%の廃パルプ（パルプ粕）由来バイオプラスチック製品の原料の製造に向け、予備実証として以下の4点を実施する。 1) 事業スケールでのラビリンチュラ培養 2) ラビリンチュラ由来脂肪酸の抽出方法の検討 3) パルプ粕および試薬脂肪酸によるバイオプラスチックの合成およびその熱・機械物性評価 4) スケールアップを想定したLCAの検証・評価	セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来の脂肪酸を合成した生物成分率100%のパルプ粕由来バイオプラスチック製品の原料を製造する。製造したプラスチック製品の原料の特性を踏まえて、目標とするバイオプラスチック製品を示す。プラスチック製品の原料を製造する際のプロセスについて LCA を評価し、CO2 削減効果を検証する。
1	ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発	非可食バイオマス由来の糖化液を用いたラビリンチュラの培養は 5L ジャーでの実績のみ。また、1 kL タンクのサイズを超えた培養実績はない。	糖質としてグルコースを用い、菌株ライブラリー、C/N比、流加条件を考慮し、1 kL タンクまでの培養を実施する。また、培養で得られたラビリンチュラ培養菌体中の脂肪酸含量を確認するために、ガスクロマトグラフィーにて脂肪酸の定量と組成確認を行う。	パルプ由来糖化液を用い、1 kL タンクでの培養を実施する。
2	ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討	脂肪酸抽出に関し、ラボレベルでの知見しかなく、社会実装を考慮した製造実機での脂肪酸抽出の見識がない。	脂肪酸抽出方法について、過去の抽出実績を踏まえて最適なスケールアップ方法を検討する。	R4 で検討した最も効率のよい抽出方法を用いて、1 kL タンク培養で得られた菌体から脂肪酸を回収する。

別表 本技術開発[実証研究]の目標

	項目	採択時の技術の状況	本年度の目標	最終目標
3	パルプ粕由来バイオプラスチックの合成と特性評価	非食用多糖類を分子骨格とし、脂肪酸を付加してバイオプラスチックを合成する要素技術はあるものの、生物成分率100%のバイオプラスチック製造実績はない（現在は50～70%）。また、生物成分率100%のバイオプラスチック素材の成形特性に関する知見も分かっていない。	パルプ粕と試薬脂肪酸を用い、合成プラスチックの熱物性比較のため水酸基置換度のことなるプラスチックを用意し、熱物性として示差走査熱量計（DSC）で融点、GPCで分子量、NMRにて水酸基置換度を評価する。 また、機械物性評価として上記と合わせて引張強度試験を実施する。	ラビリンチュラ由来脂肪酸を用い、生物成分率100%のバイオプラスチック製品の原料を製造できる。 ターゲットとするポリ乳酸と合成バイオプラスチックの物性を比較し、合成プラスチックの特性から最適なバイオプラスチック製品を検討し、製品化に必要な分析項目を抽出するとともに、製造した原料の特性を踏まえて、目標とするバイオプラスチック製品を示す。 目標とするバイオプラスチック製品に準じた評価項目（熱物性、機械物性）に準じた物性評価を実施する。
4	LCAの検証・評価	社会実装を想定したスケールでのバイオプラスチック原料製造時のCO2排出量の試算ができていない。	ベースラインは化石由来のプラスチック製造として、本事業で合成するバイオプラスチックの製造工程についてLCAを実施し、CO2削減効果の検証を行う。	バイオプラスチック合成工程も加味してLCAを実施し、異なる原料・製造方法との比較検証を行う。

1.3. 実施体制

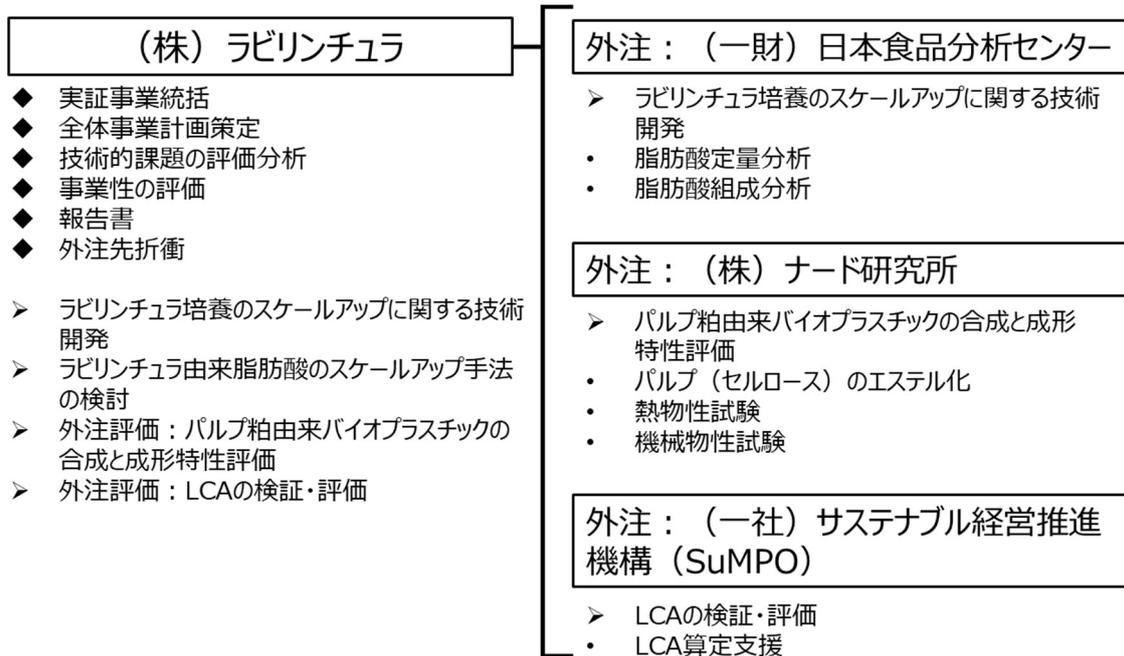


図 1-2 実施体制

1.4. スケジュール

工 程 表																			
委託業務実施上の区分	実施期間	9	月	1	0	月	1	1	月	1	2	月	1	2	月	3	月	摘	要
ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発											予備検討培養			1kl発酵槽による培養					
ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討														抽出方法の検討					
パルプ粕由来バイオプラスチックの合成と成形特性評価				合成準備										・ 試薬脂肪酸を用いた合成試験(水酸基置換度の検討) ・ 物性検討 熱物性: 水酸基置換度、融点、分子量 機械物性: 引張強度					
LCAの検証・評価													セルロースパーテイクルとラビリンチュラ由来脂肪酸から製造したバイオプラスチックについて評価						
現地視察会及び検討会の開催											→ 12/9								
評価審査委員会の出席														→ 2/9					
報告書の作成																			
関係者間の連携																			
報告書の提出																			

※本工程表に変更が生じた場合には、新旧工程を表示する。

新工程 —————
 旧工程

図 1-3 スケジュール

2. ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発

2.1. 概要

微生物を用いた物質生産を事業化する上で、「微生物による脂肪酸の産生」という現象の意義を考える必要がある。脂肪酸は天然物質で、植物や魚類から製造可能である。実際、現在市場に流通している脂肪酸は、これらを由来とするものが殆どである。種子や回収した組織を圧搾し、精製すれば目的とする脂質や脂肪酸が得られる。つまり、脂肪酸は既知物質であるということである。

これを微生物由来の脂肪酸に代替するには、微生物培養にしかない特徴を活かす必要がある。魚類などに含まれる脂肪酸は食物連鎖にて蓄積されたものも含まれ、そもそも天然化合物であるため、生化学反応（一連の酵素反応）により生合成されたものである。ラビリンチュラ由来の脂肪酸も生合成反応で産生されるため、この点では植物や魚類由来の脂肪酸と合成の考え方は同じである。植物や魚類から脂肪酸を得る場合、脂肪酸を含有する原料を確保する必要がある。植物であれば栽培して種子等の原料を収穫し、魚類であれば漁で魚を得るといった具合である。前者であれば、天候などの環境要因に収穫量が左右されることが考えられ、さらには広大な土地の確保が必要である。端境期があるため、年中栽培が可能というわけではない。後者であれば、気候変動の影響により、漁獲量を確保できる年もあればそうでないときもある。従って、双方とも安定供給という意味では不安要素を抱えている。

一般に、微生物培養による有価物の産生は、微生物の有する特異な酵素群によって簡素な栄養源から難化学合成品へ変換可能であること、製造側が望むタイミングで機器を運転して製造可能であること、自然界の天然物と異なり天候に左右されずに製造可能であること、化学合成とは異なり穏やかな反応条件で酵素反応を遂行できる点において、非常に魅力的な製造方法であるということによって説明できる。また、生体触媒ゆえに位置選択性、立体選択性、基質選択性は精巧で、加えて複数の触媒反応を細胞内で遂行し、目的物をワンポットで合成できるのも大きな特徴である。

ラビリンチュラが産生する高度不飽和脂肪酸も、原料（微生物、炭素源、窒素源、無機物、ビタミン、水、酸素他）を培養タンクに入れて混ぜておけば、微生物の有する触媒反応により、投じた原料を脂肪酸に変換できる点に特徴がある。微生物と設備を上手く制御すれば、望むタイミング、同じ場所にて通年で生産が可能である。

その長所を活かすために考慮すべき点は、その品質、生産性（生産力価）、コスト、環境負荷である。産生物は既知であり、例えば抗がん剤として用いられる抗生物質のように特段に高付加価値があるものではない。従って、いかに安価な原材料から、加えて低環境負荷で効率的に生産できるかが事業化への焦点である。つまり、効率よく微生物を培養できる場所が開発のスタートとなる。菌体量や脂肪酸の産生力価に関する目標値の設定も考慮すべき必要な要素ではある。

微生物培養による物質生産において、微生物を増殖させて培養菌体を得ることは最初に考えるべき重要な目的である。本実証で用いる微生物 *Aurantiochytrium* sp. においても例外ではない。細胞の一つ一つは、脂肪酸を製造する機能を備えており、小さな「脂肪酸製造工場」といえる。機能を有する細胞を増やせば脂肪酸製造工場が増え、長時間において製造工場を稼働させれば産生される脂肪酸量は増加する。また、細胞（工場）の運転条件を最適化すれば脂肪酸量が増え、細胞を活性化すれば脂肪酸量が増加する。単位時間あたり、決まった容積でより高濃度の脂肪酸を得ることができれば脂肪酸製造における製造原価を下げることに繋がる。このようなステップを

積み重ねていけば脂肪酸生産の効率化が期待できるため、本技術開発は重要な検討項目である。

微生物による物質生産の事業化に向けては、通常、研究室にて行う振とう培養やジャーファーメンターで得れた試験結果をもとに、パイロット、続いて製造実機へと順次規模を拡大する必要がある。これがスケールアップである。この過程の目的は、研究規模の装置で得られた結果を、最終的には実生産規模の設備でも得るための手法や技術を確立することである。通常、2段階の中間的な培養試験を行うことが多い。

第1段階：「ベンチ (bench) スケールテスト」といわれ、このテストは研究室内で行われることが多いが、その規模によっては工場内に設置する場合もある。

第2段階：「パイロット (pilot) スケールテスト」といわれ、ベンチスケールテストで確認された性能に対して、規模を上げることによって生産収率や処理収率にどのような影響が出てくるかを確認する。培養槽の規模と共に培地の供給量や電気、水などのユーティリティ供給量もかなり多くなるため、これらの供給が容易な工場内に設置されることが多い。

大型培養槽へのスケールアップの考え方は、小型培養槽と同じ培地を用い、溶存酸素濃度、溶存二酸化炭素濃度、pH、温度などの細胞外部の状態変数を小型培養槽と同じ履歴を辿りながら一定かつ均一に保つならば、細胞数密度や生産物濃度も小型培養槽と同じ培養履歴を辿るであろうということになる。しかしながら、好気性微生物用培養槽の完全なスケールアップは不可能に近い。これは、たとえ幾何学的に相似の培養槽を設計したとしても、同じ混合性、同じ物質移動性を示す操作条件を実現できないためである。単位容積あたりの所要動力、攪拌翼の線速度（先端速度：せん断の程度に関係）、混合の程度など、培養特性に影響を及ぼすと考えられるいずれの因子を基準にしても、因子の値は相似にならない。

従って、スケールアップに際しては、どの因子を基準にとるかは実施者の視点に応じて決める必要がある。好気性微生物で用いる培養槽をスケールアップするときの代表的な指標には次のものがある。

- 酸素移動濃度 (kLa)
- 単位液量当たりの消費電力
- 通気攪拌培養槽における攪拌レイノルズ数
- 混合時間
- 攪拌翼先端速度
- 溶存酸素濃度 (DO : Dissolved Oxygen)

好気培養においては、最も律速段階になりやすい酸素移動速度 (kLa) を基準としてスケールアップすることが多い。これは、スケールが異なっても酸素移動速度を等しくしておけば、等しい培養生産が期待できるとする考え方である。従って、本実証事業では、酸素移動速度に着眼してスケールアップテストを行った。次に示す、1) 総脂質生産性の向上に関する培養検討、2) ラビリンチュラの大規模培養へ向けた培養検討、3) 製造実機を想定したラビリンチュラの大規模培養、の3段階の実証項目を設けた。

1) 総脂質生産性の向上に関する培養検討：総脂質生産性の向上を目的として、回分培養を対象に、培地の流加が菌体増殖および総脂質の産生に及ぼす影響を評価し

た。

2) ラビリントラの大規模培養へ向けた培養検討：1) で得られた評価結果をもとに、3) 製造実機を想定したラビリントラの大規模培養へ適用させるデータの取得を目的として、培養槽（ジャーファーメンター）の攪拌回転数（rpm）と kLa 相関データの取得を行った。 kLa -rpm 相関データは、培養開始時の初期攪拌回転数を定めるために必要なパラメータである。排気法による静的測定法での kLa 測定とそれを元に導いた kLa -rpm 相関データは、培養細胞存在下の kLa とは乖離があるものの、培養タンクのスケールアップの際の攪拌回転数を定めるためには、有効な方法である。

また、次の理由により、3) の実証で用いる培養タンクを想定した事前検討を行う必要があった。当たり前ではあるが、好気培養において問題なく培養を完遂するには、培地の殺菌が不可欠である。実験室だと小型圧力容器であるオートクレーブにてフラスコやミニジャーを容易に殺菌（あるいは滅菌）できるため、殺菌不良が問題になることはほとんどない。しかしながら、オートクレーブに頼らない設備における培地殺菌では、そのための技術やノウハウ（殺菌の順番、蒸気シール等）が存在しており、これを怠ると、第一種圧力容器、非一圧容器の如何に関わらず雑菌汚染が顕著に現れることになる。このことは意外と知られず、現場の設備に精通していない研究者においては、蔑ろにされることが多い。

本実証事業で用いる 1 kL 培養タンクは、非一圧容器である。内圧の加圧が不可能であるため、 100°C 以上の温度に上げることが不可能である。つまり、通常の実験室でのオートクレーブや第一種圧力容器で実施可能な温度である $115\sim 135^{\circ}\text{C}$ といった条件下で培地を滅菌することができない。ただし、微生物培養で用いられる培養槽は、本実証で使用する培養タンクがそうであるように、必ずしも一圧容器である必要はない。一圧容器はその頑健な性能から、非一圧容器よりも高価なため、大きな設備投資費用を要する。また、微生物培養にはメタン発酵やアセトン・ブタノール発酵のように絶対嫌気性菌を用いるケースもあり、このような場合では通気が不要なため、強度に培地を殺菌せずとも培養が可能である。一方で、そうでない好気性や通性嫌気性の微生物を用いる場合でも、殺菌温度を積算するなどの工夫により培養が可能である。要は非一圧容器を用いる場合でも、正しく殺菌方法や操作を理解し、工程影響、特に品質影響なく最終的に目的とする培養を遂行できれば良い。

ラビリントラは好気性の微生物である。従って、培地の殺菌において何らかの不備（殺菌熱量の不足、殺菌順番の間違い、蒸気シール不備等）があると、培養の後半では同じく好気性微生物による雑菌汚染が顕著となり、試験品質や製品品質の低下につながる。場合によっては、培養液は廃棄となり、それは要したコストを廃棄することに同値となる。また、通常は容量が大きい（数～数十トン）、容易に廃棄もできず、設備や工程の渋滞を引き起こす。ほとんどの場合で悪臭を発生させ、近隣へ迷惑をかけることになる。以上の理由から、雑菌汚染は最も避けたい項目である。

本実証においても、事前の条件検討を行い、殺菌条件を確立することが望ましい。しかしながら、設備や培地固有の殺菌条件を見出すには、多くの時間と労力を要する。なぜなら、培地に与えられる熱負荷量に応じて仕上がる培地品質も変わり、培地品質は目的物の産生力価（本実証では菌体量と脂肪酸力価が対象）へ影響を及ぼすためである。従って、培地殺菌条件の検討については、雑菌汚染と目的物の力価を合わせて評価する必要があり、一大テーマとなるため、できることならば

省力化をしたい。本事業では 30L-Jar を用い、経験的に導いた条件にて培地を殺菌して培養へ及ぼす影響を評価し、得られた結果を 1 kL 培養へ活用することを目的とした。

1 kL 培養（本培養）では、培養中の培地フィードを想定している。1) の実証項目にて、培地をフィードした方が多くの培養菌体を得ることができたことが理由である。培地フィードを行うには、流加培地を殺菌可能な設備、及び望む速度で流加可能な設備の付帯が必要である。しかしながら、1 kL 培養タンクにはそのような付帯設備は存在しない。一方で、シード培養用の培養槽（小型圧力容器）が付帯されており、この容器にて流加培地の殺菌と本培養タンクへのバッチ（回分）フィードが可能である。1 kL 培養タンクでの本培養では、培地をバッチフィードにて流加する方法を採用することとし、事前の 30 L-Jar 培養試験にて流加培地のバッチフィードが培養へ与える影響を検討した。

通常、培養では、グルコースの消費による pH の低下や、アンモニア態窒素（NH₄-N）の産生による pH の上昇が起きるため、培養槽で培養を行う場合は、pH 調整剤を自動制御にて添加させる場合が多い。本ラビリンチュラの培養においても、実証項目 1) にてその様子は確認されている。本実証で用いる 1 kL 培養タンクには、pH 変動に伴う pH 調整剤の添加機能が付帯されているものの、設備環境を複雑にするため可能であれば添加を実施せずに培養できる方が望ましい。また、一般的には調整剤として、アンモニア水（10～28%）や液体苛性ソーダ、有機酸が用いられる。アンモニア水は濃度によっては劇物に分類され、かつ刺激臭を伴い、液体苛性ソーダも強アルカリ性のため、このような添加剤は不要であれば使用は避けたいところである。1 kL 培養タンクは、共用の研究棟の室内に設置されているため、アンモニアによる異臭リスクを避けるために pH 調整剤として使用しないことを想定し、30 L-Jar による事前試験にて、pH 調整剤を使用しないことによる培養への影響を検討した。

pH 調整剤と同様に、培養中に消泡剤を自動制御で添加させることがある。ポリエーテル系、アルコール系、シリコン系などがある。添加の理由は、通気攪拌培養を行う場合は発泡を伴うことがあるため、これを抑制させるためである。発泡の要因はタンパク質や窒素源である。この発泡は非常に厄介で、ひどい発泡の場合は培養物（培養菌体）を培養槽の排気ラインから流出させる要因となる。排気フィルターを目詰まりさせて、培養タンクの内圧の上昇を引き起こす。非一圧容器の場合ならば、なおさら深刻である。用いる消泡剤は何でも良いわけではなく、消泡効果が認められる消泡剤が見つからない場合は、培養による物質生産の開発を断念させる要因ともなりかねない。しかしながら、本 1 kL 培養タンクには消泡剤を自動添加するための機能と付帯設備が存在しない。1 kL 培養タンクでの本培養は、消泡剤を追添加しないことを想定し、30 L-Jar による事前試験にて、消泡剤を追添加しないことによる培養への影響を検討した。

3) 製造実機を想定したラビリンチュラの大規模培養：実証項目 2) で得られた評価結果を反映させて、実製造規模の培養タンクでのラビリンチュラの培養、並びに脂肪酸の産生（本実証事業では産生力価の予測定量）を目的として、1 kL 培養タンクによるラビリンチュラの通気攪拌培養を行った。

2.2. 総脂質生産性の向上に関する培養検討

2.2.1. 流加培養における菌体増殖と総脂質生産性の評価

脂質あるいは脂肪酸を効率的に産生させるには、菌体の増殖、基質グルコースの消費、脂質等の生産性を定量的、速度論的に扱う必要がある。事業化を想定して脂肪酸を生産する際には、生産計画を立てるための定量的な予測が必要なためである。

回分（バッチ）培養は、初発培地で栄養条件が制限される閉鎖系の培養法である。培地の追加を伴わず、実験室でよく実施される三角フラスコでの培養も回分培養の一つである。培養方法がシンプルであり、設備投資が少なく、通気攪拌培養による物質生産でも適用されたケースはある。培養において、最初に存在した基質（栄養分）を菌体が消費し、これをもとに菌体が増殖し、生産物を産生する。それに伴って、基質の濃度は減少していき、その濃度を制御することはできない。通常の培地では、得られる菌体の濃度は 10 g-cell（乾燥菌体）/L を超えることは少なく、生産物の高濃度化も期待できない。菌体濃度を高めるには、初発基質濃度を高めれば良いが、高濃度化に伴う浸透圧の上昇は、菌の生育と物質の生産性に負の影響を与える。

微生物の増殖と基質濃度の関係を示す数式として Monod（モノー）^[2.1]の経験式があり、菌体の比増殖速度は基質濃度に左右される。この数式については後述する。一方、物質の比生産速度は比増殖速度（基質濃度）に依存することが多く、一般に基質濃度の制御ができない回分培養においては生産性を高く保つことができない。

流加培養は、培養中に基質溶液を供給することにより、消費分を補うことができる。しっかりと計算して適度な流速で基質を供給すれば、基質濃度を任意の値に制御することができ、高い菌体濃度と生産物濃度を達成することができる。そのため、商用スケールで培養生産を行う場合、流加培養がもっとも一般的に用いられる。

一方、培養槽の容量には限りがあるため、流加培養では培養液量が増え過ぎると培養を終了せざるを得ない。その問題を解決するには、流加量を想定して最初の培地仕込み量を少なくし、供給する基質の濃度を高くする必要がある。

また、連続フィードを行う場合は、無菌的に培地を流加するための配管やポンプも必要となる。これを実験室レベルで実施できたとしても、スケールアップの実証で用いる設備にその機能が備わっており、加えて流加速度のスペックに対応していないと、ベンチスケールテストを行う意味がない。

流加培養は、基質の濃度を制御できることが大きな特徴であるが、これによって以下のようなメリットが得られる。

(1) 高密度培養

高濃度の菌体を得るために培養初期から高濃度の制限基質（例えばグルコース）を投入すると、浸透圧が著しく高まり菌体の増殖は阻害される。そこで、基質濃度が常に微生物の増殖に適当な濃度に保たれるよう、微生物が消費した分だけ基質を供給すれば、単位容積当たりの菌体濃度を高めた培養を実現できる。

(2) 基質阻害の回避

低濃度でも増殖阻害を起こす原料を基質とする場合、流加培養によって阻害の程

度を弱めて培養することができる。

(3) 基質による抑制の解除

グルコースが十分に存在する場合、グルコース以外の糖を取り込み、或いは分解する酵素の発現は抑制される。流加培養でグルコース濃度を低く保てば、グルコースを炭素源としながらグルコースによる抑制を回避することができる。

(4) 副生成物の抑制

十分な酸素が存在するにもかかわらず、グルコース濃度が高くなると副産物を生成し、菌体収率が低下するケースがある。流加培養によってこれを回避することができる。

以上の理由から、流加培養は商用スケールにおいても汎用される効率の良い培養方法である。本試験では、回分培養を対象にして、流加培養における菌体増殖と総脂質生産性を評価した。

培養条件

<種母 (シード) 培養>

菌株：*Aurantiochytrium* sp. mh1915

培地：GY31 培地

組成：	D-(+)-Glucose (無水)	15 g (500 mL 分)
	乾燥酵母エキス (ナカライ)	5 g
	NaCl	7.5 g
	KCl	0.18 g
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	2.70 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.35 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.25 g
	水道水	<u>500 mL</u>
	・ Vitamin mix	100 μL/100 mL (滅菌後に別添加)
	・ Element solution	200 μL/100 mL (滅菌後に別添加)
	・ アンピシリン Na (20 mg/mL)	200 μL/100 mL (滅菌後に別添加)

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 min

添加試薬：Vitamin mix

組成：	Vitamin B1	2 g (1 L 分)
	Vitamin B2	0.01 g
	Vitamin B12	0.01 g
	水道水	<u>1 L</u>
	溶解後、フィルター滅菌 (0.2 μm)	

添加試薬：Element solution

組成：	EDTA-2Na	30.0 g (1L 分)
	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	1.34 g
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	130 mg
	NiSO ₄ · 6H ₂ O	260 mg
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	10 mg
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25 mg
	<u>水道水</u>	<u>1 L</u>

NaOH で pH7 に調整後、滅菌 (121°C、20 min)

接種量： WCB：200 μL ※本試験では 200 μL を植菌

培養器： 恒温振とう培養器 (株高杉製作所)

振とう数： 120 rpm (旋回式、振幅 70 mm)

培養温度： 28.0°C

培養時間： 41.5 hr (12/5 21:00~12/7 14:30)

<本培養>

培地：GY31 培地

組成：	D-(+)-Glucose (無水)	75 g (2.5 L 分)
	乾燥酵母エキス (ナカライ)	25 g
	NaCl	37.5 g
	KCl	0.875 g
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	13.5 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	6.75 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.25 g
	消泡剤 PE-M	1 mL
	<u>水道水</u>	<u>2.5 L</u>

・ Vitamin mix 2.5 mL (滅菌後に別添加)

・ Element solution 5 mL (滅菌後に別添加)

・ アンピシリン Na (20 mg/mL) 5 mL (滅菌後に別添加)

培地量： 2.5 L

培養容器： 5 L-Jar ファーマンター (株高杉製作所)

殺菌条件： 121°C、20 min

接種量： 前培養液：100 mL (4.0%)

培養温度： 28.0°C

冷却水温度： 10°C

pH 制御： 7.0 (10% アンモニア水)

DO 制御： 下限値：30% (2.33 mg/L)
初発溶存酸素値下回り後、攪拌回転数出力調整による制御

攪拌制御： 初発：400 rpm

通気量： 1.0 vvm (2.5 L/min)

圧力： 0 kPa

流加培地：GY91

組成： D-(+)-Glucose（無水） 360 g
 乾燥酵母エキス（ナカライ） 40 g
 水道水 400 g
 溶解後、滅菌（121℃、20 min）

流加速度： 2.4 g/h/L-初発培地（6.0 g/h）

流加開始： 初発グルコース消費後（Day1）

培養時間： 123.4 hr（5 days）

サンプリング：約 20 mL/Day0, 1, 2, 3, 4, B.O

ブロスアウト：5 L 容ユニオンコンテナ

ブロス重量：電子天秤にて測定（流加無し：2.205 kg, 流加有り：2.720 kg）

保管： 冷蔵

<分析>

- (1) 濁度：OD660nm
- (2) グルコース濃度（g/L）：バイオセンサーBF-7（王子計測機器株）
- (3) 総脂質含量（w/w%）
- (4) 総脂質重量（g/L-ブロス）

表 2-1 回分培養のデータ

hr	OD660	ln(OD660)	V	流加	X	S	P	VP	VX	lnVX μ	ΔX	Σ ΔX
	計算値	-	L	kg	乾燥菌体重量 g/L	Glucose g/L	総脂質重量 g/L					
0.0	1.2	0.18	2.50	0.00	0.343	27.3	-	-	0.9	-0.2	0	0
17.5	21	3.04	2.50	0.00	5.995	0.1	-	-	15.0	2.7	14.1	14.1
50.0	22	3.09	2.50	0.00	6.280	0.1	-	-	15.7	2.8	0.7	14.8
68.0	21	3.04	2.50	0.00	5.995	0.1	-	-	15.0	2.7	-0.7	14.1
96.0	21	3.04	2.50	0.00	5.995	0.1	-	-	15.0	2.7	0.0	14.1
120.0	22	3.09	2.50	0.00	6.280	0.1	1.4	3.5	15.7	2.8	0.7	14.8

hr	VS	流加S	ΔS	Σ ΔS	P/hr	P/hr/VX	X/hr
	g	g	g	g	g-P/hr	g-P/hr/VX	g-X/hr
0.0	68.25	0	0	0	-	-	0
17.5	0.25	0	68.00	68.00	-	-	0.34
50.0	0.25	0	0	68.00	-	-	0.13
68.0	0.25	0	0	68.00	-	-	0.09
96.0	0.25	0	0	68.00	-	-	0.06
120.0	0.25	0	0	68.00	0.03	0.00187	0.05

表 2-2 流加培養のデータ

hr	OD660	ln(OD660)	V 液量	流加	X 乾燥菌体重量	S Glucose	P 総脂質量	VP	VX	lnVX μ	ΔX	$\Sigma \Delta X$
	計算値	-	L	kg	g/L	g/L	g/L	g	g	-	g	g
0.0	1.2	0.18	2.50	0	0.432	27.6	-	-	1.1	0.1	0	0
17.5	21	3.04	2.50	0	7.567	0.1	-	-	18.9	2.9	17.8	17.8
50.0	35	3.56	2.67	0.195	12.611	0.1	-	-	33.6	3.5	14.7	32.5
68.0	39	3.66	2.76	0.108	14.052	0.1	-	-	38.7	3.7	5.1	37.7
96.0	41	3.71	2.90	0.168	14.773	0.1	-	-	42.8	3.8	4.1	41.7
120.0	42	3.74	3.02	0.144	15.133	0.1	10.7	32.4	45.7	3.8	2.9	44.6

hr	VS	流加S	ΔS	$\Sigma \Delta S$	P/hr	P/hr/VX	X/hr
	g	g	g	g	g-P/hr	g-P/hr/VX	g-X/hr
0.0	69.00	0	0	0	-	-	0
17.5	0.25	0	68.75	68.75	-	-	0.43
50.0	0.27	87.75	87.73	156.48	-	-	0.25
68.0	0.28	48.60	48.59	205.07	-	-	0.21
96.0	0.29	75.60	75.59	280.66	-	-	0.15
120.0	0.30	64.80	64.79	345.45	0.27	0.00591	0.13

- OD660 : 濁度 (実測値)
 Ln(OD660) : 濁度の自然対数
 V : 培養液量[L]
 流加 : 流加量[L]
 X : 乾燥菌体の濃度[g-cell/L]
 S : 基質グルコースの濃度[g-glucose/L] (実測値)
 P : 総脂質の濃度[g/L] (実測値)
 VP : 総脂質量[g]
 VX : 乾燥菌体量[g]
 lnVX μ : 乾燥菌体量の自然対数
 ΔX : サンプル間における乾燥菌体の増加量[g]
 $\Sigma \Delta X$: 増加した乾燥菌体の積算量[g]
 VS : 基質グルコースの残存量[g]
 流加 S : 流加投入された基質グルコース量[g]
 ΔS : サンプル間における基質グルコースの消費量[g]
 $\Sigma \Delta S$: 消費された基質グルコースの積算量[g]
 P/hr : 単位時間あたりの総脂質量[g-総脂質/hr]
 P/hr/VX : 単位時間、菌体量あたりの総脂質量[g-総脂質/hr]
 X/hr : 単位時間あたりの乾燥菌体量[g-乾燥菌体/hr]

回分培養

好気培養において溶存酸素 DO は重要な基質であり、濃度を適切な範囲に制御することは非常に重要である。培養中の DO 濃度 C [mg/L] の変化は次式で表される。

$$\text{数式： } dC/dt = kLa(C^* - C) - Q_{O_2}X$$

- kL : 液境膜物質移動係数 [m/hr]
- a : 単位容積あたりの気液接触面積 [m^{-1}]
- C^* : 飽和溶存酸素濃度 [mg/L]
- Q_{O_2} : 酸素比消費速度 [mg/g-cell/hr]
- X : 菌体濃度 [g-cell/L]
- t : 培養時間 [hr]

一般に、菌体濃度 X の増加に伴い基質のグルコースが枯渇すると、酸素比消費速度 Q_{O_2} は急激に低下するため、 $Q_{O_2}X$ が小さくなり DO 濃度は急激に上昇する。DO ジャンプと呼ばれる現象により、基質が枯渇するタイミングを知ることができる。基質の枯渇は、代謝産物の転換となるケースが多く、また本試験においては培地フィード（流加開始）のタイミングとなるので、DO トレンドを注視し、ジャンプのタイミングを知ることが、培養条件の構築と改善を行っていく上で重要な要素の一つである。

回分培養では、培養 10.5 時間に DO ジャンプが確認された（図 2-1）。同時期に pH の上昇が確認されており、この時点で基質グルコースが枯渇している。

また、培養 18 時間で顕著な pH の上昇が確認され、培養 36 時間にかけて DO の緩やかな上下動が確認された。この間は、微生物の代謝産物や培地に含まれているアミノ酸を基質に用いることができる期間であるため、DO の変動が確認されている。培養 36 時間以降は緩やかに pH が上昇しており、アンモニア態窒素の生成が推測される。本現象が認められて以降は、一般的には十分な菌体量の増加は見込めない（図 2-3 左）。

流加培養

明確な DO ジャンプは不明であるが、培養 11.1 時間で pH の低下が止まっているので、この時点で基質グルコースが枯渇している（図 2-2）。この直前が最も $Q_{O_2}X$ が大きい。一般的にはこの時点での DO 濃度が 50%飽和であることが理想的である。温度 28°C のときの飽和溶存酸素濃度は 7.75 mg/L であるから、50%だと 3.88 mg/L となる。DO ジャンプ時点での DO 値は 2.49 mg/L であり、3.88 mg/L を下回っている。本試験条件において、初発の攪拌回転数（5L-Jar の場合）は 400 rpm と設定しており、一般論からすると、この回転数よりもやや大きくするか（つまり攪拌回転数の下限値を大きくする）、通気量を増加する方が望ましいといえる。

培養 19.4 時間に培地の連続フィードを開始した。同時期にグルコースの消費による DO 値の低下、有機酸の生成による pH の低下が認められた。8.09 まで上昇していた pH は緩やかに下降し、培養 71 時間頃を境に上昇に転じた。pH 上昇の理由は、培地の窒素化合物が炭素源として利用され、アンモニア態窒素が生じたためと考えられる。

このように、pH 上昇が確認される状況下では、回分培養時と同様に以降の十分な

菌体量の増加は見込めない。本試験区では、培地の連続フィードを行っているものの、菌体増殖のための単位時間当たりのグルコース流加量が不足しているためと考えられる。また、培養 20.5 時間で DO の上昇が認められていることも考慮すると、単位時間当たりの培地流加量を増加させる余地があるといえる（本試験での流加速度：2.4 g/h/L-初発培地）。当然ではあるが、消費されたグルコースに対して得られる乾燥菌体重量の割合は、十分な速度で継続されることが好ましい。しかしながら、本試験では培養の推移に伴い、先の推測と同じく菌体収率の低下が認められた（図 2-4）。傾きはプロット間における乾燥菌体収率[g-cell（乾燥菌体）/g-glucose]を表している。本試験の範囲内において、最大収率は 0.2594 g-cell/g-Glucose、最小は 0.0446 g-cell/g-glucose であった。

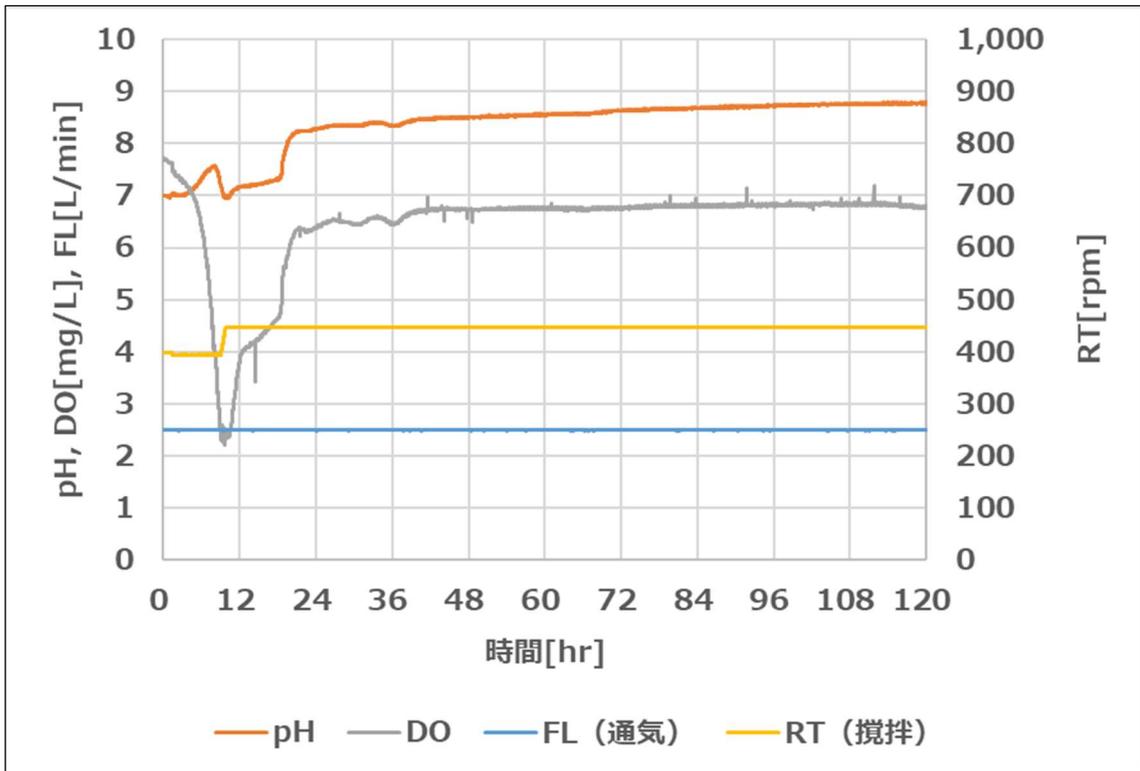


図 2-1 経時変化 (pH, DO, 通気, 攪拌) / 5 L-Jar_回分培養

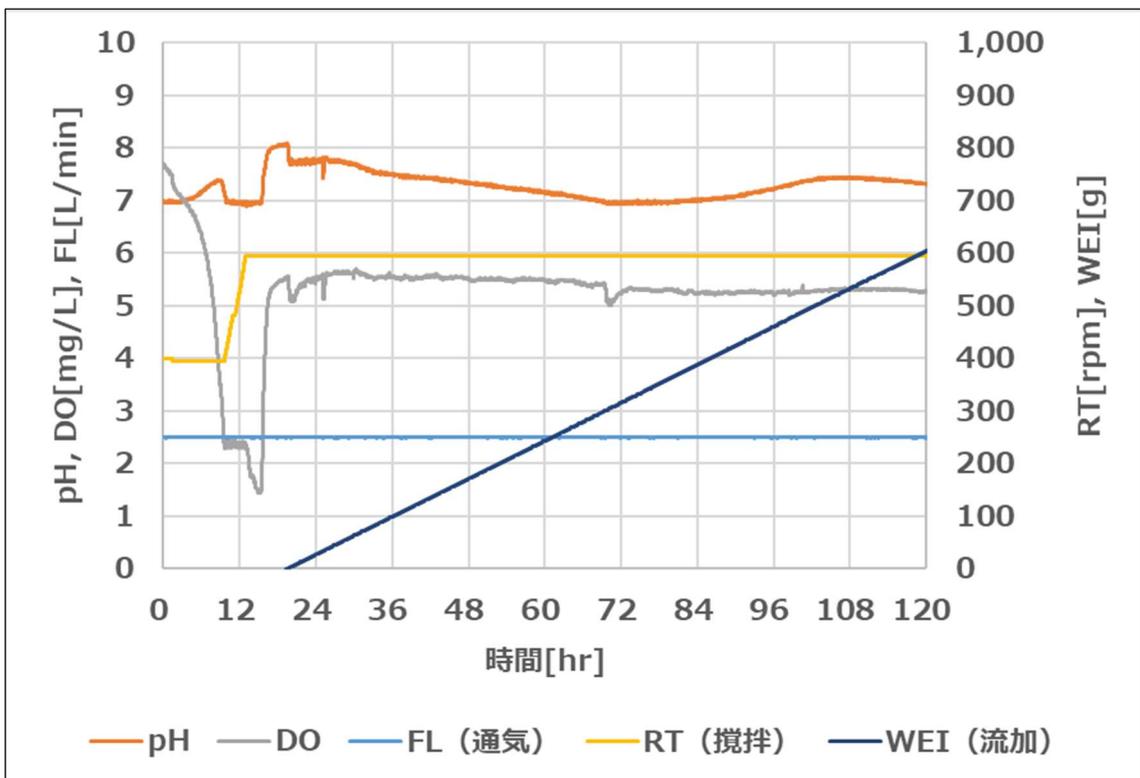


図 2-2 経時変化 (pH, DO, 通気, 攪拌, 流加) / 5 L-Jar_流加培養

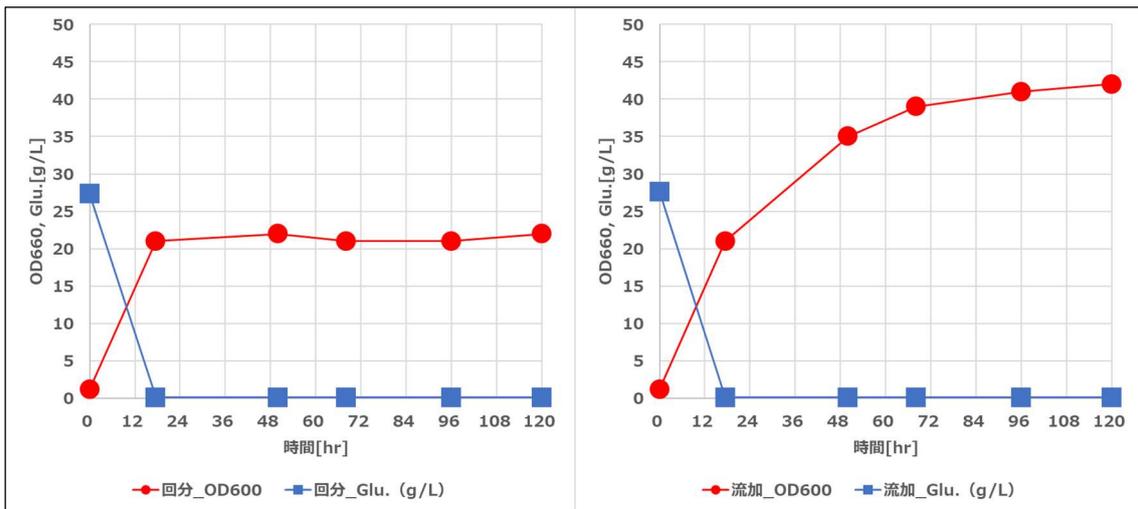


図 2-3 経時変化 (濁度, グルコース) / 5 L-Jar_流加有無

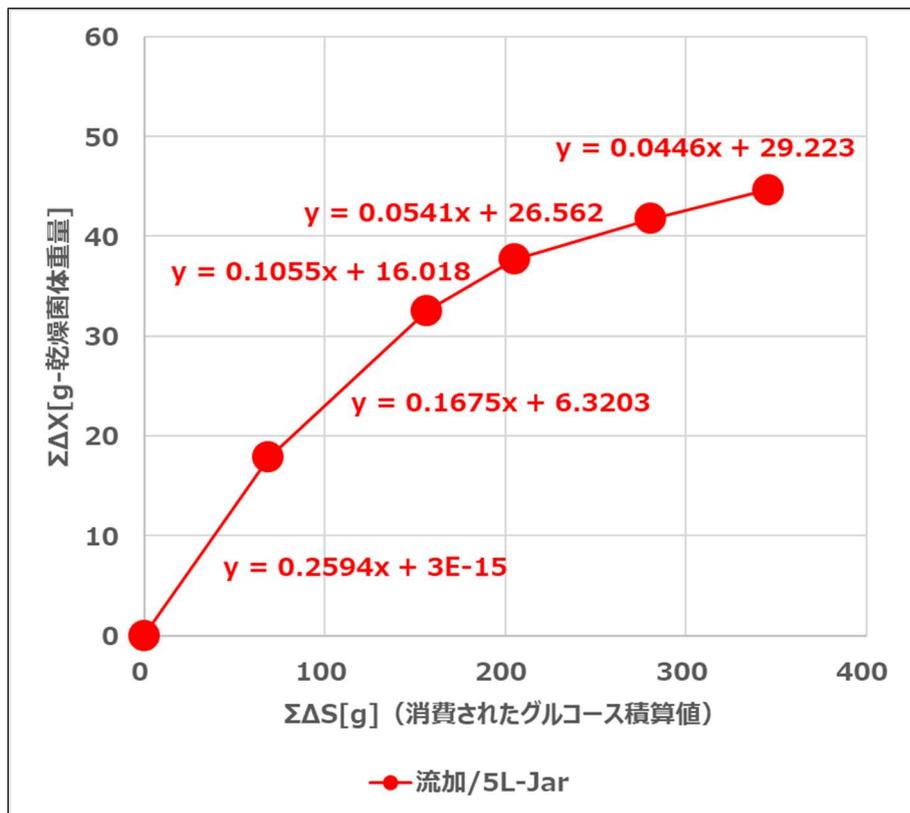


図 2-4 グルコース消費量と乾燥菌体重量の相関 / 5L-Jar_流加培養

回分培養・流加培養における生産物の比較：菌体

回分培養ではグルコース枯渇後の菌体増殖は認められていない。一方で、流加培養では、流加量や流加速度に改善の余地が認められたものの、回分培養に比べて菌体量が顕著に増加することが示された（図 2-3 右）。培養終了後まで菌体は徐々に増殖しており、培地流加の必要性に加え、当然に改善の余地はあるものの、本流加培地の基本組成の妥当性も示された。

回分培養では、最初に存在した基質（グルコース）を菌体が消費し、これを元に菌体が増殖して目的物を産生する。これに伴って基質濃度の減少は進行し、濃度を制御することは不可能である。多くの微生物培養では、得られる菌体の濃度は 10 g-cell（乾燥菌体）/L を超えることはほとんどない。例えば、細胞増殖が良好な酵母について実験室で標準的に用いられる YPD 培地（グルコース濃度：20 g/L）で培養すると、菌体収率は 0.2 g-cell/g-glucose 程度なので、菌体濃度は 4 g-cell/L である。本試験での *Aurantiochytrium* sp. における回分培養では、グルコース濃度 30 g/L（理論値）に対して得られた菌体濃度は 6.280 g-cell/L であり、実際のところ 10 g-cell に届いていない（表 2-1）。

一方、流加培養では、投入されたグルコース量 345.45 g（理論値）に対して、得られた菌体濃度は 15.133 g-cell/L で、回分培養のそれを上回った。投入したグルコース量からすると物足りない菌体濃度ではある。本要因については後述する。

次に、菌体の比増殖速度 μ に基づいた解析結果を示す。微生物の増殖を示す数式として Monod の経験式があり、比増殖速度 μ は制限基質濃度 S の関数として表すことができるため、基質濃度が増殖に及ぼす影響を定量化できる。

$$\text{数式： } \mu = \mu_m S / (K_s + S)$$

- μ ：比増殖速度
- μ_m ：最大比増殖速度
- K_s ：最大比増殖速度の 1/2 の比増殖速度を与える基質濃度（＝ミカエリス定数）
- S ：制限基質濃度

一般的に、消費量が多い炭素源や、水に溶けにくい酸素が制限基質となる場合が多い。グルコースは菌株 *Aurantiochytrium* sp. の培養下で最初に消費し尽くされてしまう基質のため、本試験の制限基質の一つである。本数式からは、 S が大きければ増殖は制限されずに最大代速度で増殖するが、逆に S が小さくなると残存基質の濃度に増殖が左右されることが読み取れる。従って、菌体濃度を高めるには基質濃度 S を高めれば良いが、高濃度の基質添加は浸透圧を高め、生育にも目的物質産生にも負の影響を及ぼす可能性があるため、比増殖速度との相関を元に評価することは非常に意義がある。

表 2-1、表 2-2 の $VX[g]$ は菌体量で、その自然対数 $\ln VX$ の経時変化を図 2-5 に示す。グラフの傾きは比増殖速度 μ を表し、0.1636 の傾きが培養 17.5 時間以降で 0.0081 と顕著に小さくなっていることから、増殖速度の低下が明らかである。

増殖速度の低下の要因としては、制限基質である酸素濃度とグルコース濃度の低下が考えられる。殆どの好気性微生物は酸素に対する親和性が非常に高いが、通常は 1 mg-O₂/L 以上の酸素濃度であれば、酸素の欠乏が増殖を律速することはない。本試験における酸素濃度は、流加開始以降で 5 mg/L 以上を維持しており十分量と考え

られるため、この場合の制限基質ではない。従って、グルコースが制限基質であり、流加培養においても基質グルコースの不足が認められた。菌体生産性の向上に向けて培養条件を改善するには、まずは基質の高濃度化をはかるべきと考えられる。

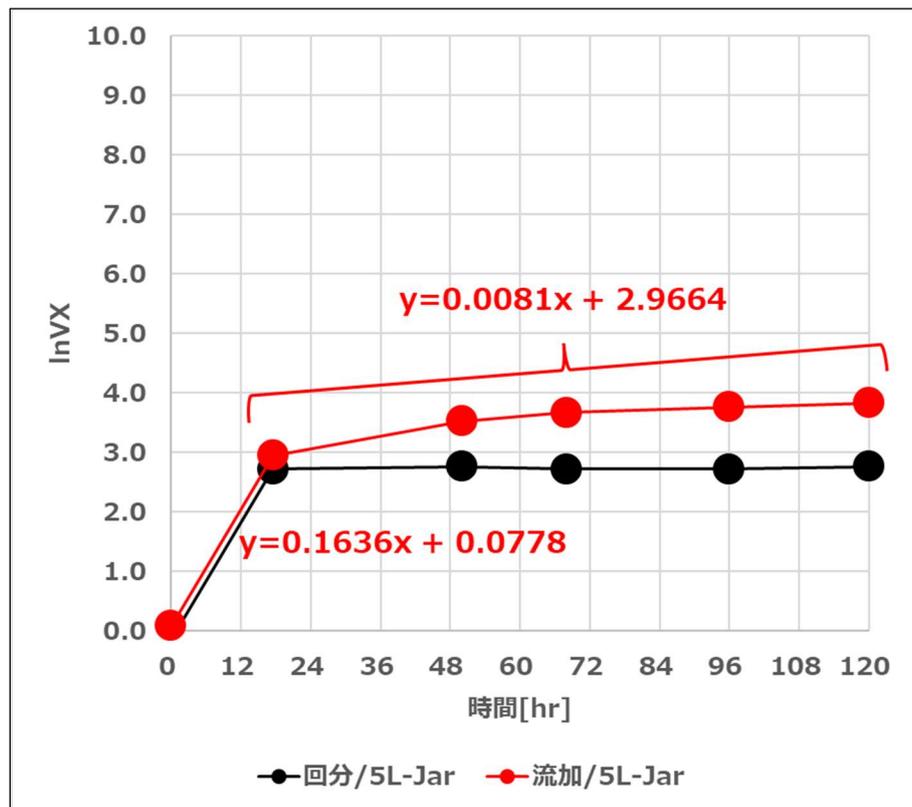


図 2-5 比増殖速度/5L-Jar_流加有無

回分培養・流加培養における生産物の比較：脂質

本試験における生産物の本質は、菌体ではなく脂肪酸である。従って、本来は目的物質である脂肪酸を評価すべきである。当然ではあるが、脂肪酸濃度[g-product/L]の測定は、生産性の高さを表す分かり易い指標となる。しかしながら、本試験ではその簡便性から、以下の考えに基づいて、菌体量をベースとした脂質生産性の評価を行っている。

回分培養における菌体濃度 X [g-cell/L]の変化速度は、 $dX/dt=\mu X$ の微分方程式で表すことができる。菌体量 VX [g-cell]の変化速度は、 dVX/dt [g-cell/hr]となる。

流加培養における菌体量の変化速度は、物質量的変化量「流入速度-流出速度+生成速度-消費速度」の式で表すことができるが、流入する培地に菌体は含まれておらず流加培養では流出はないので、菌体の流入速度と流出速度の項はゼロとすることができる。また、培養期間中の菌体分解がないものと想定すれば、この項も無視できる。従って、培養槽内の菌体量 VX の変化速度は菌体の生成速度と同値になり、 $dVX/dt=\mu VX$ で表すことができる。

生産物濃度 P [g-product/L]の変化速度は、 $dP/dt=\rho X$ の微分方程式で表すことができる。生産物量についても菌体量の理屈と同様に、流入、流出はない。加えて、分解もないと仮定すれば、生産物濃度 P を生産物量 VP に置き換えて、 $dVP/dt=\rho VX$ の式が得られる。分母を払い、 $dVP=\rho VXdt$ となる。この式より、生産物の量 VP を増加させるためには、菌体量 VX を増加させ、生産期間 t を伸ばし、比生産速度 ρ を高く保てば良いことが分かる。この比生産速度 ρ は、一般的に比増殖速度 μ 、または基質濃度に依存する。そのため、本試験では菌体量を生産物定量の指標と捉え、培養終了後の菌体のみについて、総脂質含量[w-総脂質/w-乾燥菌体%]と総脂質重量[g-総脂質/L]の分析を行った。

凍結乾燥菌体を調製し、クロロホルムとメタノール (2:1) を用いた Folch 法により総脂質を抽出した。なお、本方法では細胞のリン脂質を含むすべての脂質を抽出することを想定している。

流加培養において、乾燥菌体あたりの総脂質含量は 69.1 w/w%となった (図 2-6)。一方で、回分培養では 22.1 w/w%と低調であった。双方の比較により、総脂質の蓄積には、培地の流加が有効であることが示された。

本実証試験では、菌体量を生産物定量の指標としていることは、先に述べた通りである。この場合、単位菌体重量は総脂質の重量比を相対的に表していることになるので、理屈的には総脂質含量[w/w%]は試験区に関わらず類似した数値になる。しかしながら、回分、流加の両試験区における総脂質含量は大きく異なる結果となった。このことは、菌体量では脂肪酸を含む脂質量を正確に評価できないことを示している。また、培養条件によって、単位菌体重量当たりの脂質量が異なることも示唆された。

乾燥菌体あたりの総脂質含量値をもとに、総脂質重量[g/L]を算出した。その結果、回分培養では 1.4 g/L であったのに対し、流加培養では 10.7 g/L と相対的に高い産生値となった。高い総脂質量を得るには培地の流加が必要であることは明確である。投入したグルコース量に対する培養菌体濃度が低調であることは先に記したとおりであるが、当然のごとく総脂肪酸重量にも同様の様子が反映されている。投入されたグルコース量 345.45 g (理論値)、培養終了時の液量 3.02 L から求められる脂質収率 ($VP/\Sigma\Delta S \times 100$) は、9.35%であった (脂肪酸に限定した場合の収率の目標値：20~25%)。

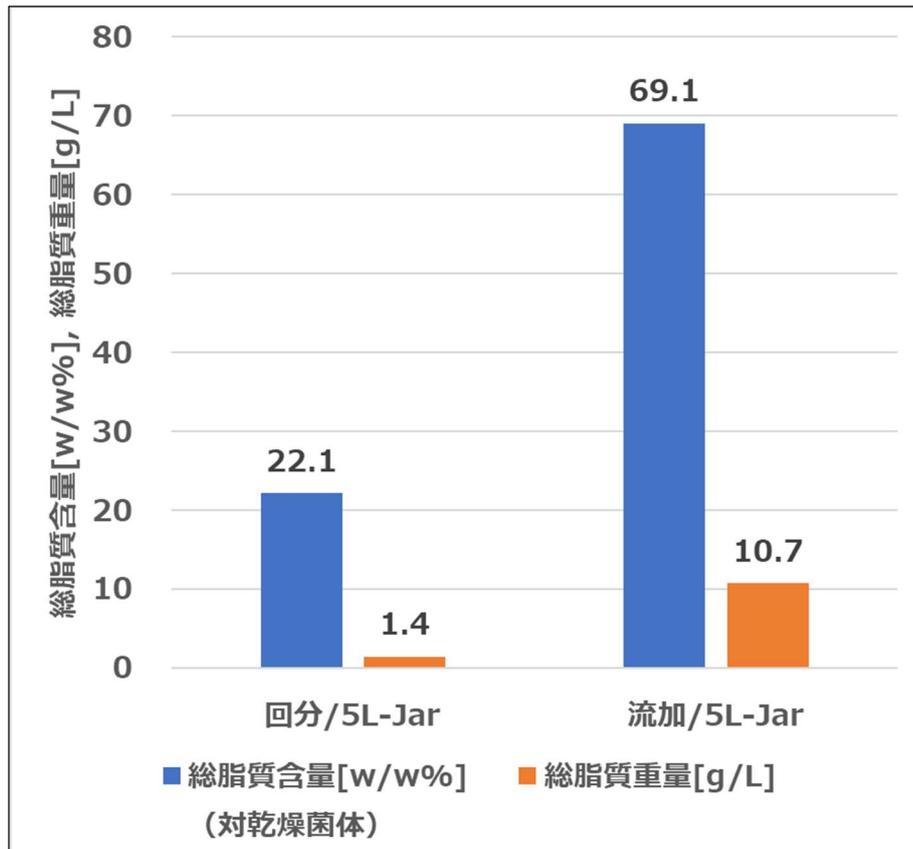


図 2-6 総脂質含量、総脂質重量の比較／5 L-Jar_流加：無 vs. 有

培養開始時の初発グルコース濃度に着目すると、回分培養で 27.3 g/L（実測値, 表 2-1）、流加培養で 27.6 g/L（実測値, 表 2-2）であった。グルコース濃度 30 g/L を想定したにも関わらず、実測値とは一致していない。これは、メイラード反応で還元糖が減少したためである。その様子は褐変として培地の見た目に現れる（図 2-7）。メイラード反応によって、微生物が使用できるグルコース量が減少するため、菌体収量に影響を及ぼす。更に、反応生成物であるフルフラールはアルデヒド類のため増殖速度を低下させる要因となる。還元糖やアミノ酸の濃度が高くなるほど、より高い温度で長時間殺菌するほど褐変は強くなる。流加培地は本培養培地よりもグルコースと酵母エキスの濃度が高い。対糖脂質収率が期待値を下回ったのは、メイラード反応によって微生物が使用できるグルコース量が減少したことが大きな要因と考えられる。培養の経過に伴い褐変が強くなっているのはその理由に由る。グルコースを別滅菌、或いは培地殺菌条件を穏やかにするなどの改善が必要である。最後に顕微鏡観察の様子を示す（図 2-8）。

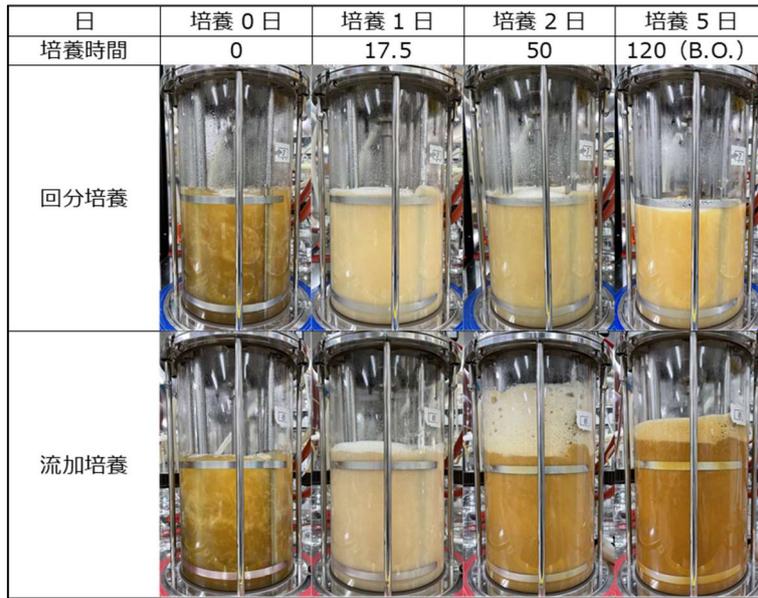


図 2-7 培養の様子

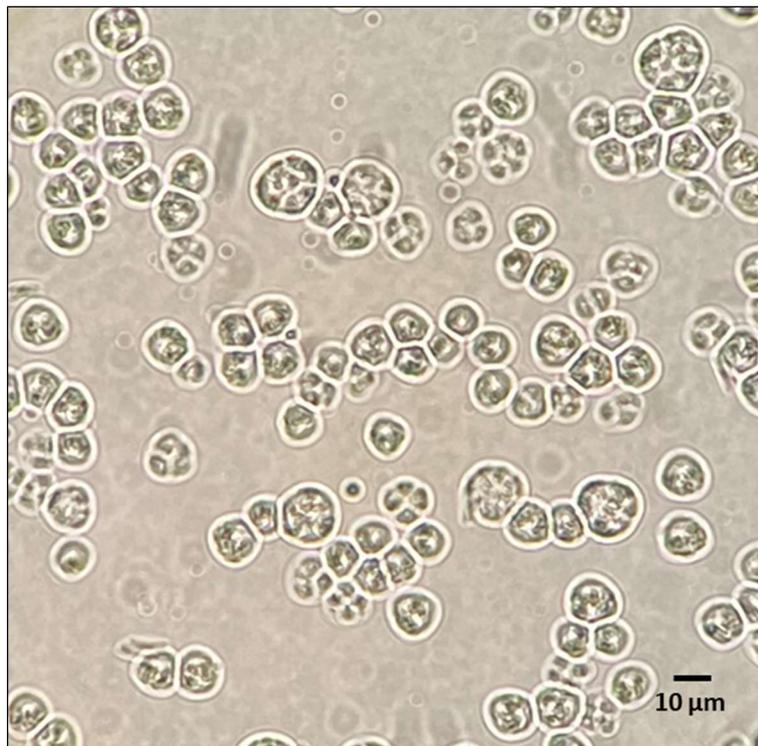


図 2-8 *Aurantiochytrium* sp. mh1915 株の画像 / 5L-Jar_流加培養

2.3. ラビリントラの大規模培養へ向けた培養検討

前項 2.2.では 5L-Jar を用いたが、本項では 30L-Jar、次項では 1 kL 培養タンクを使用する。培養槽のスケールアップに必要なデータの取得を目的として、まずは培養槽の攪拌回転数 (rpm) と kLa 相関データの取得を行った (図 2-9)。kLa-rpm 相関データは、培養開始時の初期攪拌回転数を決めるための重要なパラメータである。

また、次項 2.4.製造実機を想定したラビリントラの大規模培養で用いる 1 kL 培養タンクの使用を想定し、以下の検討項目を列挙した。これらの項目を確認すべく、30 L-Jar 培養にて事前検討を行った。

- (1) 1 kL 培養タンクでは、培地の加圧滅菌が不可能である。従って、加圧滅菌条件に頼らない条件にて培地を殺菌し、培養へ及ぼす影響を検討した。
- (2) 1 kL 培養タンクでの培養は、流加培地を連続フィードではないバッチ (回分) フィードを採用することとし、流加培地のバッチフィードが培養へ与える影響を検討した。
- (3) 1 kL 培養タンクでの培養は、pH 調整剤を使用しないことを想定した。pH 調整剤を使用しないことによる培養への影響を検討した。
- (4) 1 kL 培養タンクには、消泡剤を自動添加するための機能と付帯設備が存在しない。1 kL 培養タンクでの培養は、消泡剤を追添加しないことを想定し、消泡剤を追添加しないことによる培養への影響を検討した。

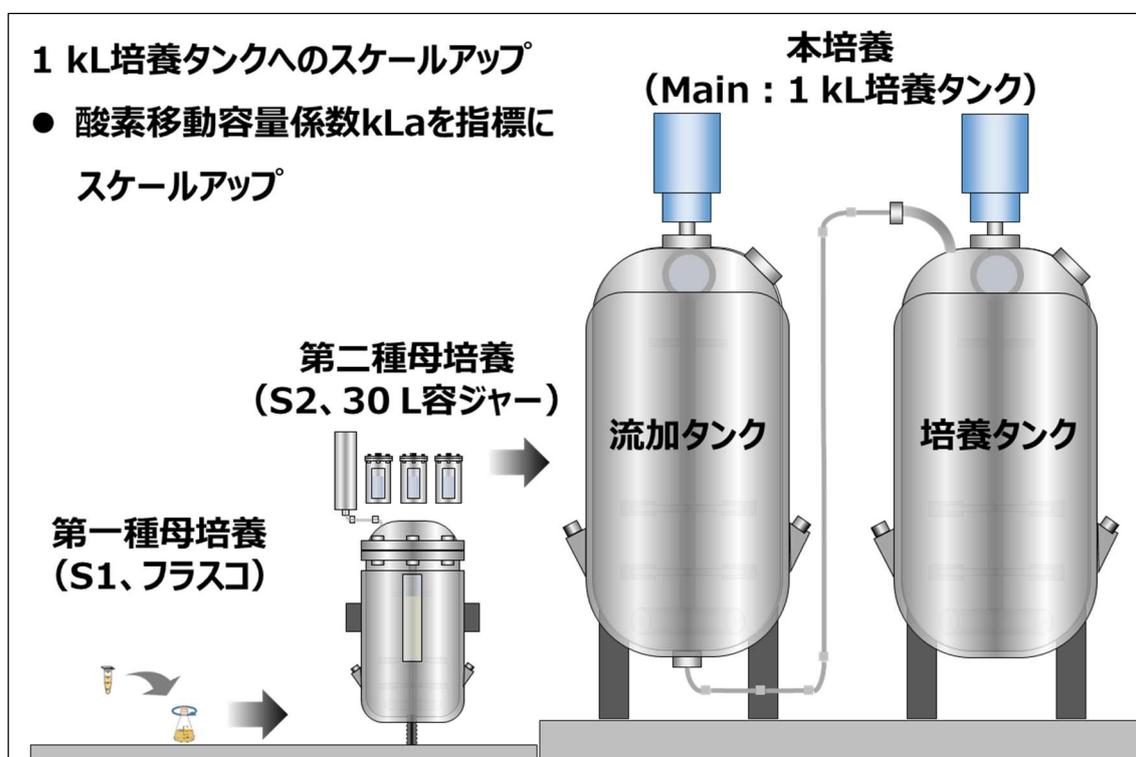


図 2-9 培養のスケールアップ化、1 kL タンク培養における設備のイメージ

2.3.1. kLa-rpm 相関

培養あるいは培養槽をスケールアップするときに、一定とすべき代表的な指標の候補は先に記した(2.1.概要)。中でも、好気培養においては、最も律速段階になりやすい酸素移動速度を基準としてスケールアップすることが多い。これは、スケールが異なっても酸素移動速度を等しくしておけば、等しい培養生産が期待できるとする考え方である。多くの培養プロセスが、その培養槽の酸素供給能で生産性が律速されているのが実情であり、それゆえ培養槽という微生物培養系の酸素供給に影響を与える要因を検討することは、極めて重要である。

多くの生物にとって、酸素は生命活動を営むために必須である。本実証事業で取り扱う微生物ラビリンチュラもその例外ではなく、振とうによる攪拌や通気により増殖が可能である。酸素は培地成分として最初の培地に加えられるものではないが、栄養素の一つとして重要であり、酸素がいかに供給されるかは生育速度や物質生産をコントロールする上で特に重要である。

酸素供給に関わる培地の問題として、一般的に糖濃度、粘性、消泡が挙げられる。糖が高濃度で存在して代謝速度が速い場合、酸素要求量が高くなり、酸素の供給が間に合わずに酸素律速培養となってしまう。殆どの好気性微生物は酸素に対する親和性が非常に高いが、通常は1 mg-O₂/L以上の酸素濃度であれば、酸素の欠乏が増殖を律速することはない。従って、糖を含む培地のフィード速度は留意する必要がある。

液体培地で好気性微生物を培養するとき、効率的な培養を実現するためには十分かつ適正な酸素供給が行われる必要がある。それは、酸素を利用した酸素呼吸は、もっとも効率良くATP(アデノシン3リン酸)を生成できるシステムのためである。生物はATPを獲得するための巧妙なシステムを有している。酸素呼吸によるATPの生成は細胞のミトコンドリアで行われており、酸素は最終的な電子の受け手として非常に重要な役割を担っている。

適切な酸素供給がなされ、1分子のグルコースが好氣的に完全酸化された場合の反応式は次の反応式で表される($C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6H_2O + 6CO_2$)。つまり、180 gのグルコースを酸化するには192 gの酸素が必要である。グルコースは水に易溶な物質で、水1 L(25°C)に対して約900 gも溶解するが、酸素は難溶性のガスのため溶解度は極めて低く、大気圧で通常の培地(28°C)に溶ける酸素量は7.75 mg-O₂/Lである。十分な増殖が認められている培養系では数分で消費されてしまう酸素量のため、培地への酸素供給は連続的かつ適正に行う必要がある。

kLaは、好気性培養槽における酸素溶解能の指標となり、酸素移動容量係数と呼ばれ、酸素供給能力を高めるにはkLaを大きくすればよい。

ラビリンチュラ培養のスケールアップへ繋げるデータの取得を目的として、培養槽(ジャーファーマンター)の攪拌回転数(rpm)とkLa相関データの取得を行った^[2.2]。kLa-rpm相関データは、容量の異なる培養槽において、相関する攪拌回転数を導くために活用できる。排気法による静的測定法でのkLa測定と、それを元に導いたkLa-rpm相関データは、培養細胞存在下のkLaとは乖離があるが、培養槽のkLaの測定は、通気攪拌効果を定量的に把握し、酸素供給条件を正しく設定するために不可欠である。

<方法>

1. DO計を校正し、培養槽へ装着した。
2. 培養槽に一定量の水を投入し、温度を培養条件に合わせた（28℃）。
3. 設定した条件に安定したことを確認し、塩化コバルトを 0.5 mg/L、亜硫酸ナトリウムを 100 mg/L の濃度になるよう投入した。
4. 緩やかに攪拌し、溶存酸素濃度がゼロになり、数値が安定したことを確認した。
5. 攪拌条件、および通気条件を予め設定値に合わせておき、運転を開始した（on）。
6. 5秒ごとに溶存酸素濃度を記録した。

kLa の算出

$$\ln(C^*-C)/(C-C_0)=-kLa \times t$$

C：溶存酸素濃度

C₀：0時間の飽和酸素濃度

C*：飽和酸素濃度

kLa-rpm 関連データ取得の対象設備

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| • 5 L-Jar（榊高杉製作所製） | kLa-rpm 関連：図 2-10, 2-11 |
| • 30 L-Jar（榊高杉製作所製） | kLa-rpm 関連：図 2-12, 2-13 |
| • 1 kL 培養タンク（榊高杉製作所製） | kLa-rpm 関連：図 2-14, 2-15 |

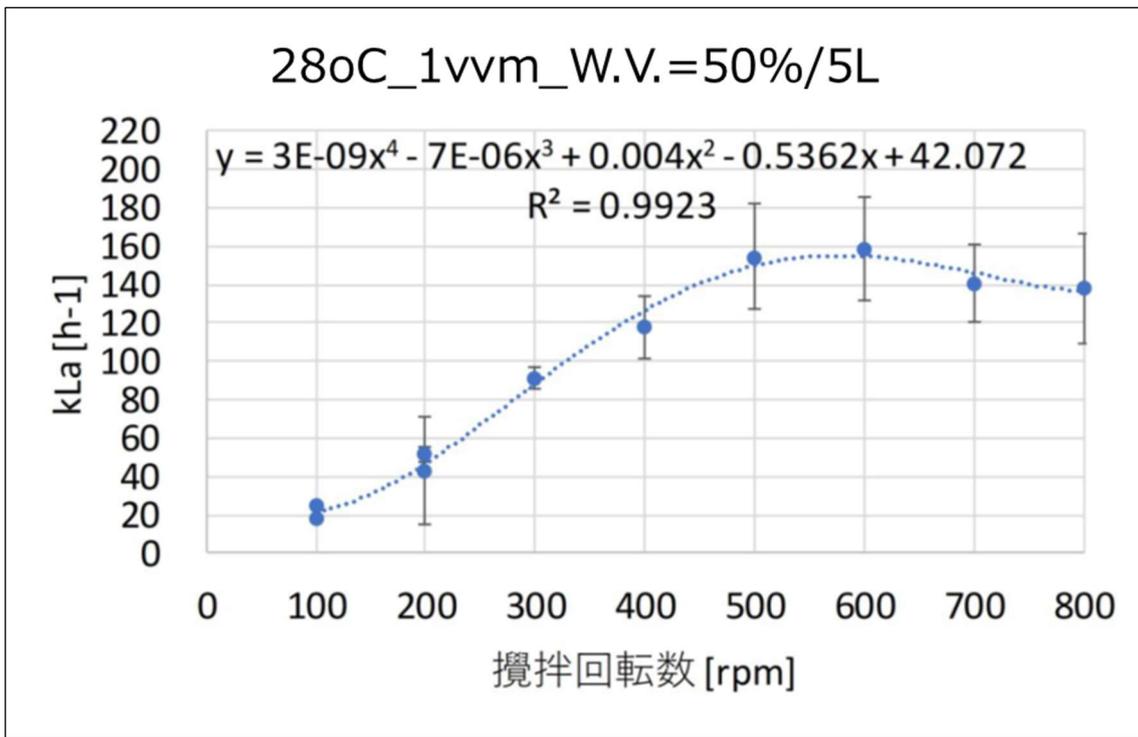


図 2-10 kLa-rpm 相関_W.V.=50% (2.5 L) /5 L

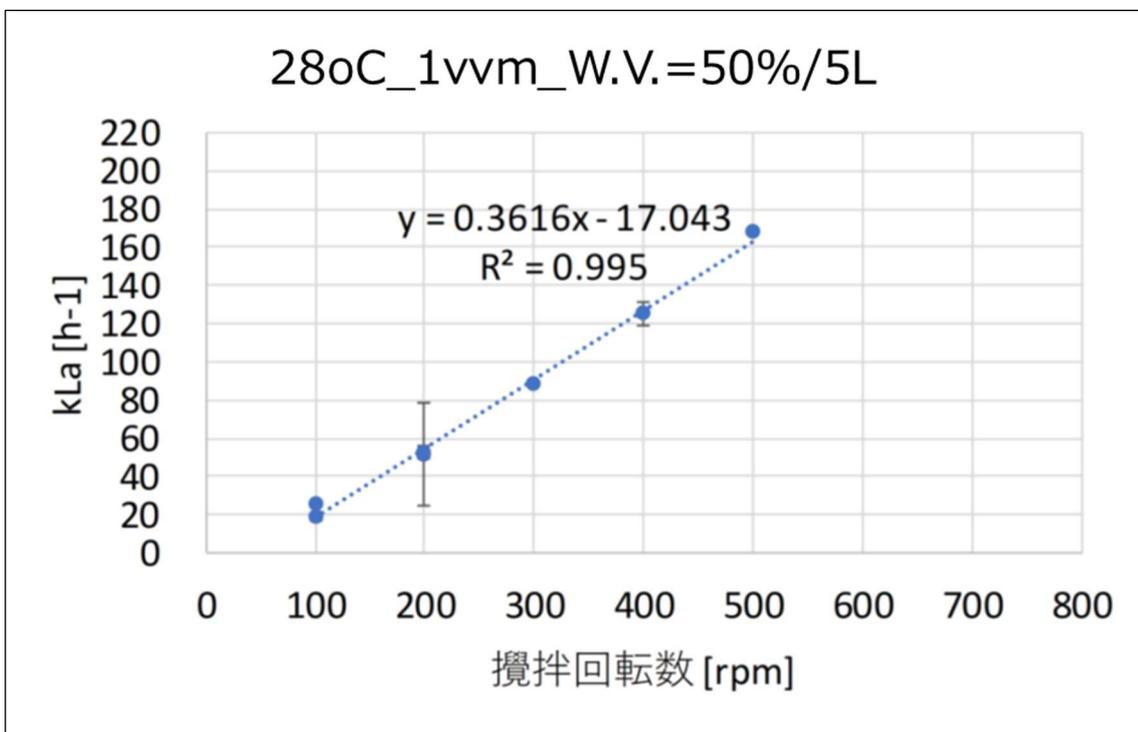


図 2-11 kLa-rpm 相関 (グラフ抜粋) _W.V.=50% (2.5 L) /5 L

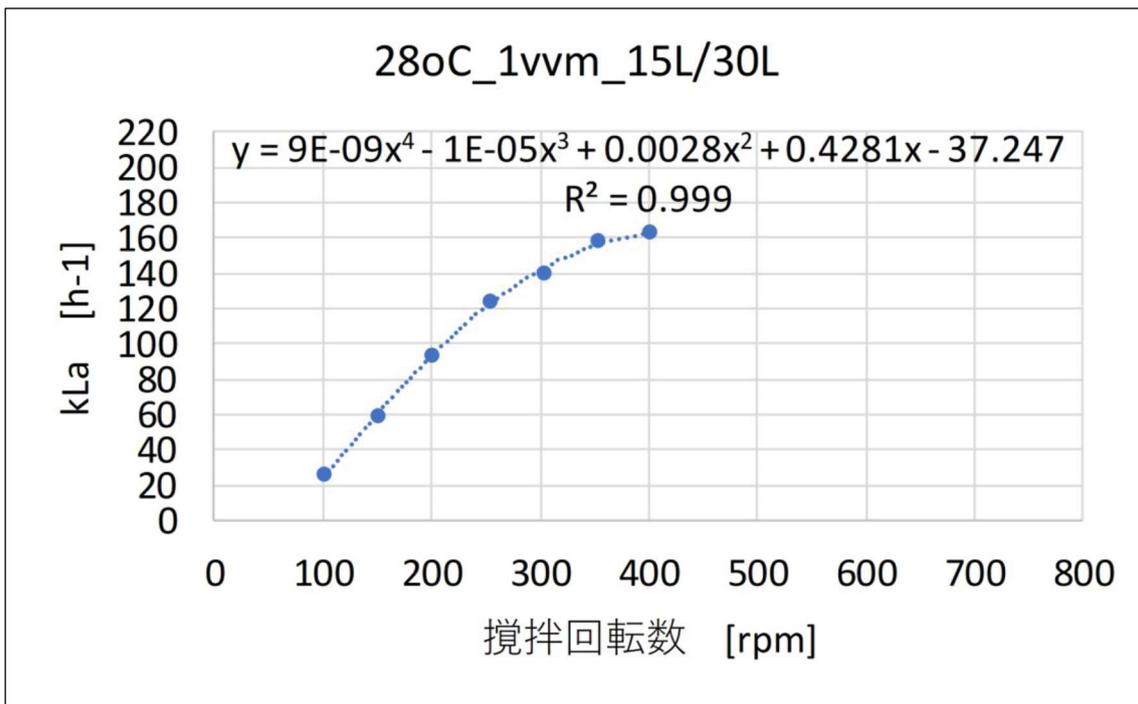


図 2-12 kLa-rpm 相関_15 L/30 L

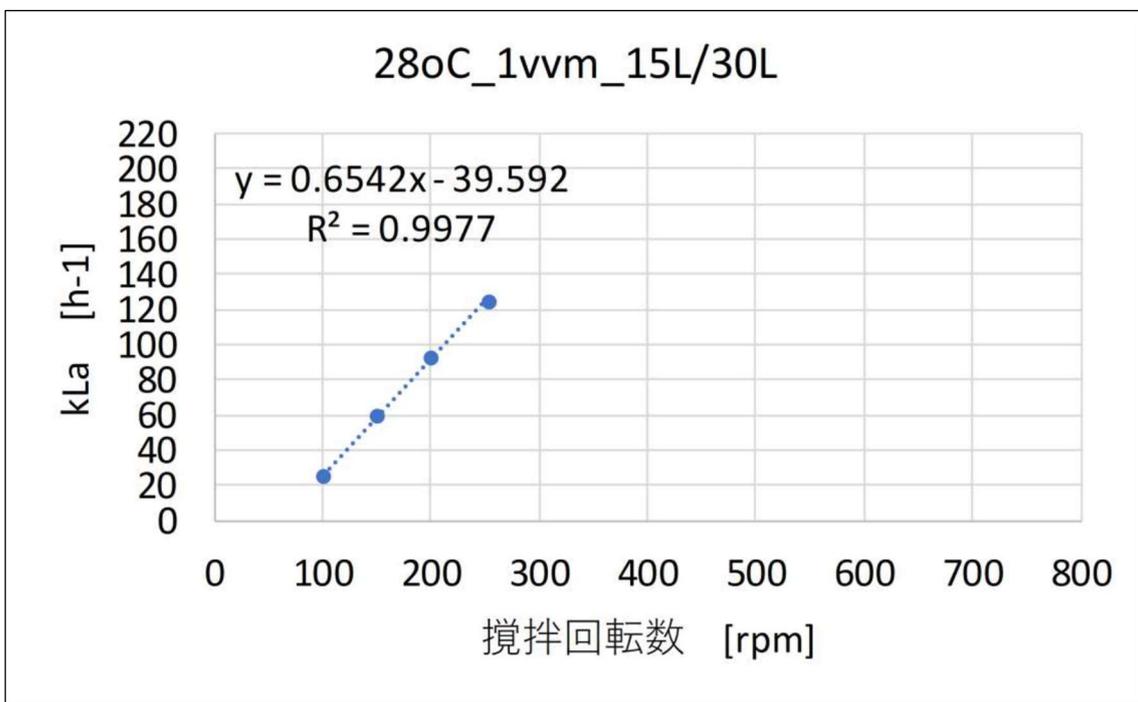


図 2-13 kLa-rpm 相関 (グラフ抜粋) _15 L/30 L

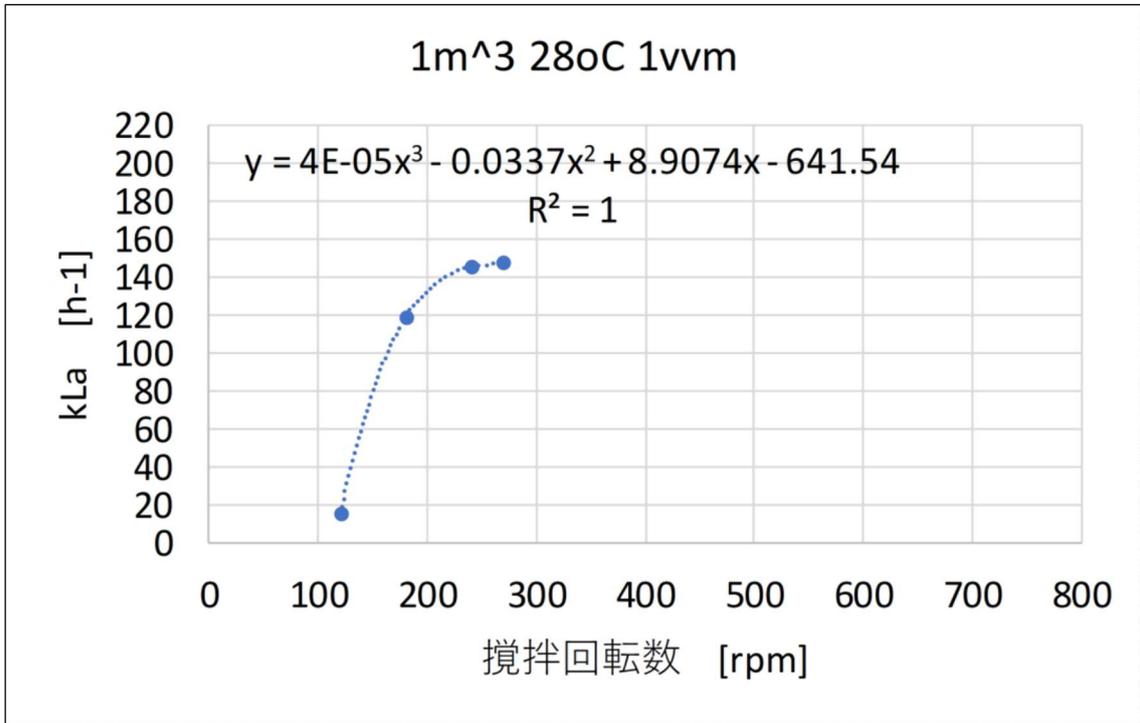


図 2-14 kLa-rpm 相関_500 L/1,000 L

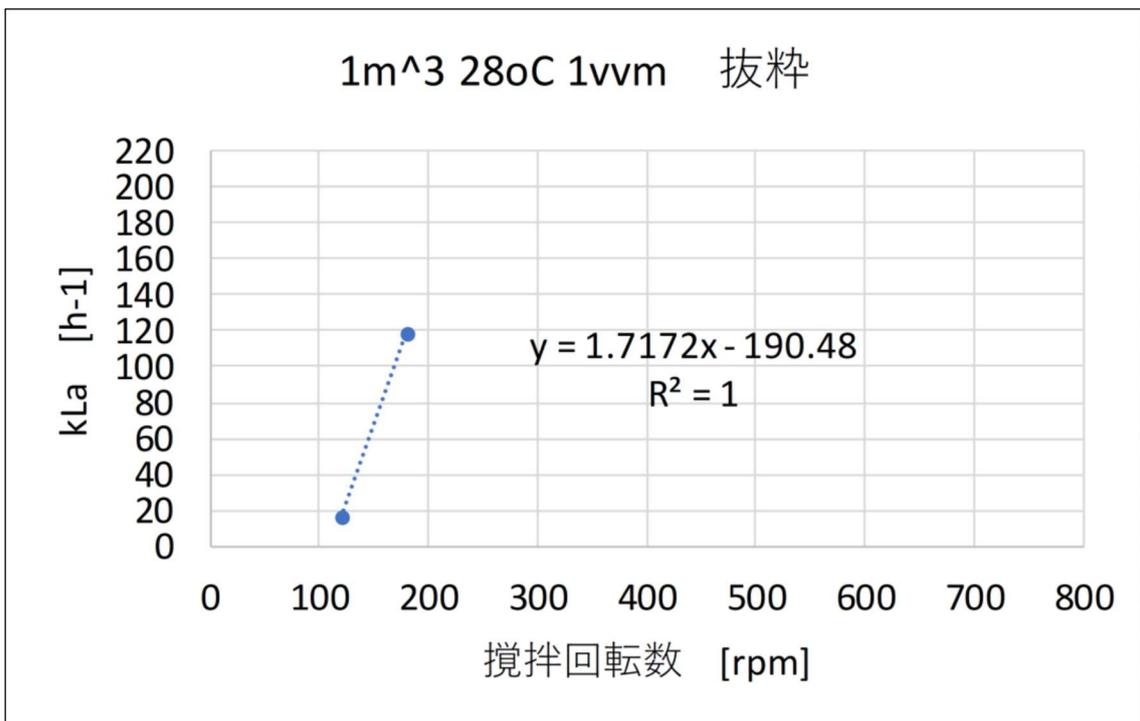


図 2-15 kLa-rpm 相関 (グラフ抜粋) _500 L/1,000 L

kLa-rpm 相関データのまとめを示す（図 2-16）。例えば、5 L-Jar での 400 rpm は、30 L-Jar では 260 rpm、1 kL 培養タンクでは、190 rpm に相当することがこのグラフで分かる。ただし、装着する攪拌翼の位置、形状でも kLa 値は変わるので、設備洗浄後は、攪拌翼（羽根）を一定の位置に装着する等条件を定め、かつ記録として残すといった注意が必要である。

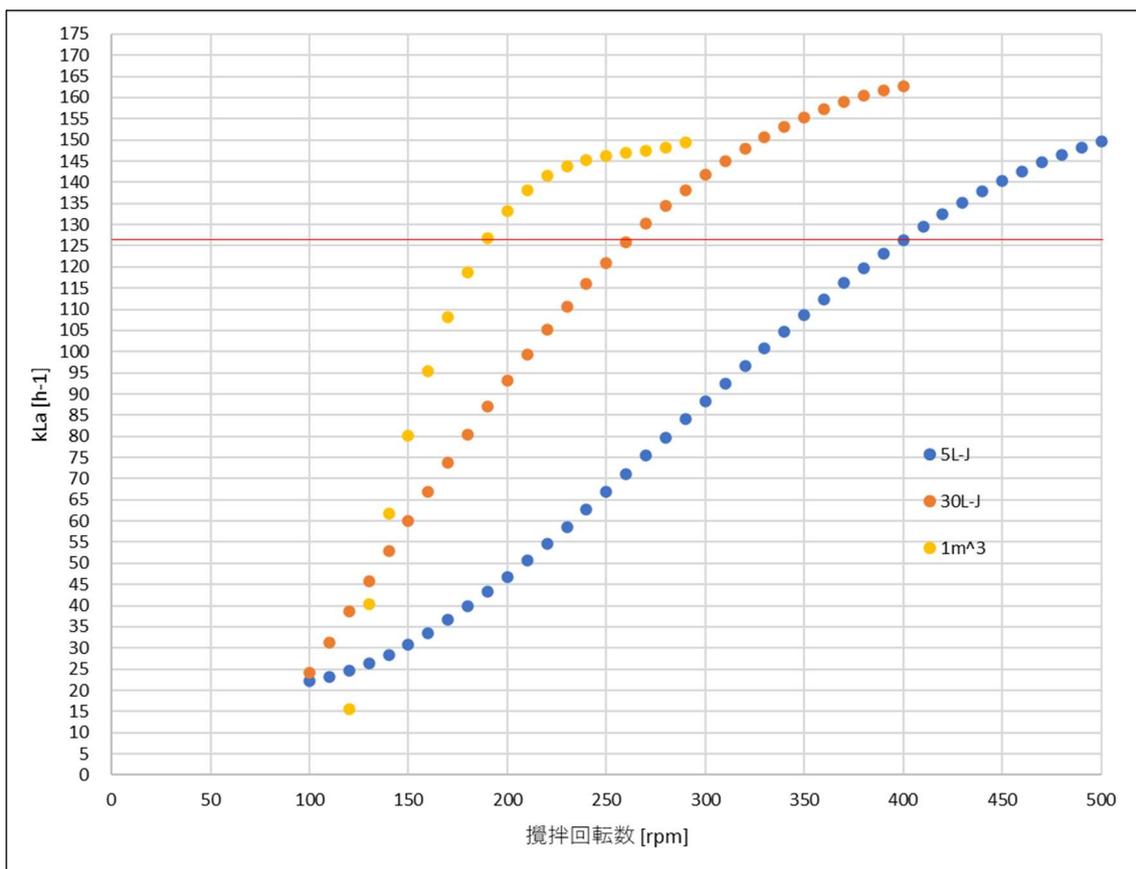


図 2-16 kLa-rpm 相関データのまとめ

2.3.2. 非一圧培養器を想定した培地殺菌条件の検討

本実証事業で使用する 1 kL 培養タンクは非一圧容器のため、加圧による加温殺菌が不可能である。つまり、実験室でのオートクレーブ装置や第一種圧力容器で実施可能な温度 115～135℃を適用できない。つまり、100℃以下で殺菌を行う必要があり、殺菌不良のリスクがある。培地の殺菌不良は、好気性微生物の雑菌汚染を引き起こす。培地の殺菌不良に起因する問題点を以下に示す。

- (1) 培地は本命菌のみならず殺菌されなかった雑菌の生育にも消費され、原料を浪費する。結果的に目的物の生産性の低下を招く。
- (2) 雑菌の顕著な増加は悪臭を招き、周囲へ迷惑をかける。
- (3) 菌体を製品とする場合は、雑菌が製品に混入する（異物混入）。
- (4) 後工程である脂肪酸抽出に外乱を与える。場合によっては脂質の組成が変わるので、プラスチックの合成工程へも影響を与え、再現性も得られない。

ラビリンチュラは好気性の微生物である。従って、培地の殺菌において何らかの不備（殺菌熱量の不足、殺菌順番の間違い、蒸気シール不備等）があると、培養の後半では雑菌汚染が顕著となり、製品品質や試験品質を低下させてしまう。ほとんどの場合で悪臭を引き起こし、廃棄ともなれば原材料費も無駄になる。雑菌汚染は最も避けたい問題の一つである。

従って、1 kL 培養タンクでの大規模培養を行う前に、1 kL 培養タンクで実施可能な殺菌条件で培地を殺菌し、培養への影響を評価する必要がある。例えば、小規模の培養タンクで培地殺菌を行い、培養の可否、あるいは問題点や改善点を抽出しておく必要がある。

一方で、100℃未満での穏やかな殺菌条件は、デメリットのみではない。相対的に単位時間あたりのメイラード反応を抑制できるので、高温高圧下による培地滅菌と比べて微生物が利用できるグルコース量が増える。従って、菌体増殖と物質生産性にも好影響が期待できる。

本試験では、培地（本培養培地、流加培地）を 80℃、40 分の条件で殺菌し、得られたデータから殺菌条件についての考察を行った。

培養条件

<種母（シード）培養>

菌株：*Aurantiochytrium* sp. mh1915

培地：GY31 培地

組成：	D-(+)-Glucose（無水）	15 g（500 mL 分）
	乾燥酵母エキス（ナカライ）	5 g
	NaCl	7.5 g
	KCl	0.18 g
	MgCl ₂ ・6H ₂ O	2.70 g
	MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.35 g
	CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.25 g
	水道水	<u>500 mL</u>

- Vitamin mix 100 μ L/100 mL (滅菌後に別添加)
- Element solution 200 μ L/100 mL (滅菌後に別添加)
- カナマイシン硫酸塩 (50 mg/mL) 100 μ L/100 mL
(滅菌後に別添加) ※本試験ではカナマイシン硫酸塩を使用

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 min

添加試薬：Vitamin mix

組成： Vitamin B1 2 g (1 L 分)
Vitamin B2 0.01 g
Vitamin B12 0.01 g
水道水 1 L
溶解後、フィルター滅菌 (0.2 μ m)

添加試薬：Element solution

組成： EDTA-2Na 30.0 g (1L 分)
FeCl₃ · 6H₂O 1.45 g
H₃BO₃ 34.2 g
MnCl₂ · 4H₂O 4.3 g
ZnSO₄ · 7H₂O 1.34 g
CoCl₂ · 6H₂O 130 mg
NiSO₄ · 6H₂O 260 mg
CuSO₄ · 5H₂O 10 mg
Na₂MoO₄ · 2H₂O 25 mg
水道水 1 L
NaOH で pH7 に調整後、滅菌 (121°C、20 min)

接種量： WCB：200 μ L ※本試験では200 μ L を植菌

培養器： 恒温振とう培養器 (株高杉製作所)

振とう数： 120 rpm (旋回式、振幅 70 mm)

培養温度： 28.0°C

培養時間： 25.0 hr (12/21 16:00~12/22 17:00)

<本培養>

培地：GY31 培地

組成：	D-(+)-Glucose (無水)	450 g (15 L 分)
	乾燥酵母エキス (ナカライ)	150 g
	NaCl	225 g
	KCl	5.25 g
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	81 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	40.5 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7.5 g
	消泡剤 PE-M	6 mL
	水道水	15 L
	・ Vitamin mix	15 mL (殺菌後に別添加)
	・ Element solution	30 mL (殺菌後に別添加)
	・ アンピシリン Na (50 mg/mL)	15 mL (殺菌後に別添加)

培地量： 15 L (殺菌後の液量：19 L)

培養容器： 30 L-Jar ファーマンター (榎高杉製作所) (図 2-17)

殺菌条件： 80°C、40 min

接種量： 前培養液：200 mL (1.3%)

培養温度： 28.0°C

冷却水温度：水道水を使用

pH 制御： なし

DO 制御： 初発下限値：30% (2.33 mg/L)

初発溶存酸素値下回り後、攪拌回転数出力調整による制御

攪拌制御： 初発：270 rpm (5L-Jar：400 rpm 相当)

上限：320 rpm

(1 kL タンク：270 rpm 相当、5L-Jar：490 rpm 相当)

通気量： 1.0 vvm (15 L/min)

圧力： 0 kPa

流加培地：GY91

組成：	含水結晶ぶどう糖 (サナス)	825 g
	乾燥酵母エキス (ナカライ)	83.3 g
	水道水	758.3 g
	消泡剤 PE-M	2 mL

溶解後、殺菌 (80°C、40 min)

※50°Cで完全溶解を確認し、オートクレーブにて殺菌

流加： バッチフィード (上記 GY91×3 回)

流加開始： 初発グルコース消費後 (Day1 より)

培養時間： 90 hr (4 days)

サンプリング：約 50 mL/Day0, 1, 2, 3, B.O

ブロスアウト：10 L 容ユニオンコンテナ×2 袋

ブロス重量：電子天秤にて測定 (20.937 kg)

保管： 冷蔵

<分析>

- (1) 濁度：OD660nm
- (2) グルコース濃度 (g/L)：バイオセンサーBF-7 (王子計測機器株)
- (3) 総脂質含量 (w/w%)
- (4) 総脂質重量 (g/L-ブロス)



図 2-17 本実証試験で使用した 30 L-Jar

表 2-3 30 L-Jar 培養のデータ

hr	OD660	ln(OD660)	V 液量	流加	X 乾燥菌体重量	S Glucose	P 総脂質量	VP	VX	lnVX μ	ΔX	Σ ΔX
	計算値	-	L	L	g/L	g/L	g/L	g	g	-	g	g
0	1	0.00	19.4	0.0	0.2	22.5			4.6	1.52	0	0.0
26	22	3.09	20.6	1.2	5.2	0.0	-	-	106.8	4.67	102.2	102.2
43	35	3.56	21.8	1.2	8.3	8.7	-	-	179.7	5.19	72.9	175.1
76	47	3.85	22.9	1.2	11.1	4.1	-	-	254.3	5.54	74.7	249.8
89	84	4.43	22.9	0.0	19.8	23.8	-	-	454.6	6.12	200.2	450.0
90	106	4.66	22.9	0.0	25.0	22.4	25.0	573.6	573.6	6.35	119.1	569.0

hr	VS	流加S	ΔS	Σ ΔS	P/hr	P/hr/VX	X/hr
	g	g	g	g	g-P/hr	g-P/hr/VX	g-X/hr
0	436.5	0.0	0.0	0	-	-	-1.00
26	0.0	0.0	436.5	437	-	-	0.00
43	189.3	758.3	569.0	1,005	-	-	0.19
76	94.1	758.3	853.6	1,859	-	-	0.15
89	546.0	758.3	306.4	2,165	-	-	0.22
90	513.9	0.0	32.1	2,198	6.4	0.01111	0.28

- OD660 : 濁度 (実測値)
 Ln(OD660) : 濁度の自然対数
 V : 培養液量[L]
 流加 : 流加量[L]
 X : 乾燥菌体の濃度[g-cell/L]
 S : 基質グルコースの濃度[g-glucose/L] (実測値)
 P : 総脂質の濃度[g/L] (実測値)
 VP : 総脂質量[g]
 VX : 乾燥菌体量[g]
 lnVXμ : 乾燥菌体量の自然対数
 ΔX : サンプル間における乾燥菌体の増加量[g]
 ΣΔX : 増加した乾燥菌体の積算量[g]
 VS : 基質グルコースの残存量[g]
 流加 S : 流加投入された基質グルコース量[g]
 ΔS : サンプル間における基質グルコースの消費量[g]
 ΣΔS : 消費された基質グルコースの積算量[g]
 P/hr : 単位時間あたりの総脂質量[g-総脂質/hr]
 P/hr/VX : 単位時間、菌体量あたりの総脂質量[g-総脂質/hr]
 X/hr : 単位時間あたりの乾燥菌体量[g-乾燥菌体/hr]

培養トレンドの解析

培養 10.2 時間に DO ジャンプが確認された (図 2-18)。同時期に pH の上昇が確認されており、この時点で基質グルコースが枯渇している。このときの DO 値は 2.22 mg/L であった。なお、先の試験 2.2 で述べたように、この時点での DO 濃度は 50% 飽和であることが理想的である。飽和溶存酸素濃度 7.75 mg/L の 50% である 3.88 mg/L を下回っており、攪拌回転数の上限をさらに上げるか、または通気量を増加する方が望ましいといえる。

培養 26, 43, 76 時間に培地のバッチフィードを行った。同時期にグルコースの消費

による DO 値の低下、有機酸の生成による pH の低下が認められた。また、参考までに O₂ と CO₂ の排ガスデータを測定している（図 2-19）。

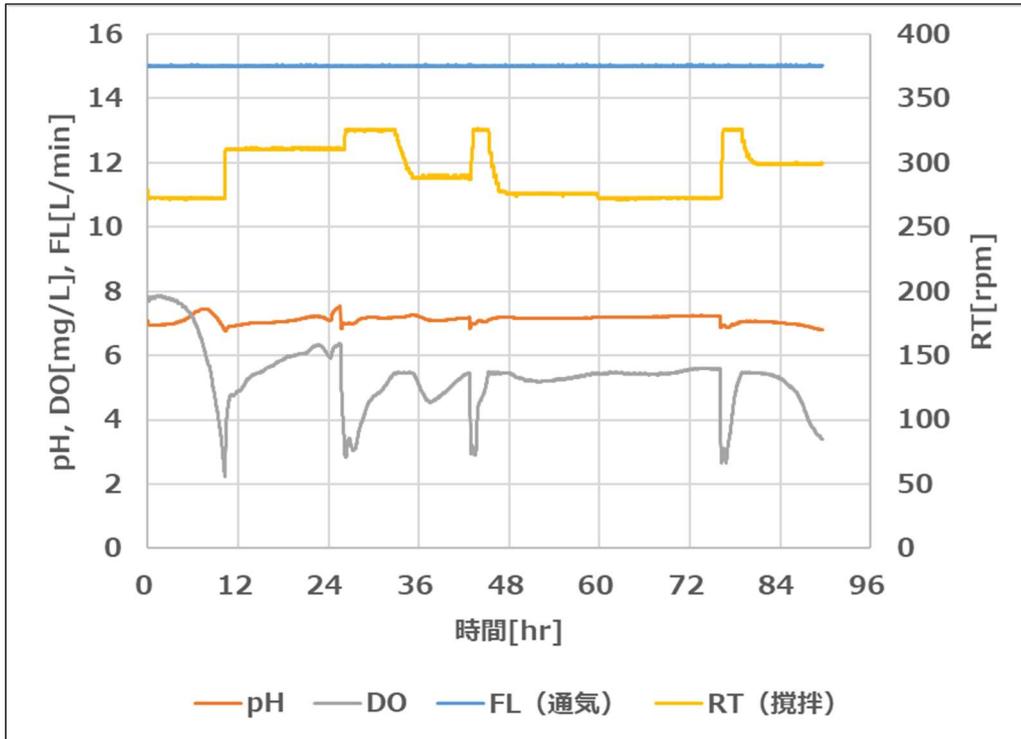


図 2-18 経時変化 (pH, DO, 通気, 攪拌) / 30 L-Jar_バッチフィード培養

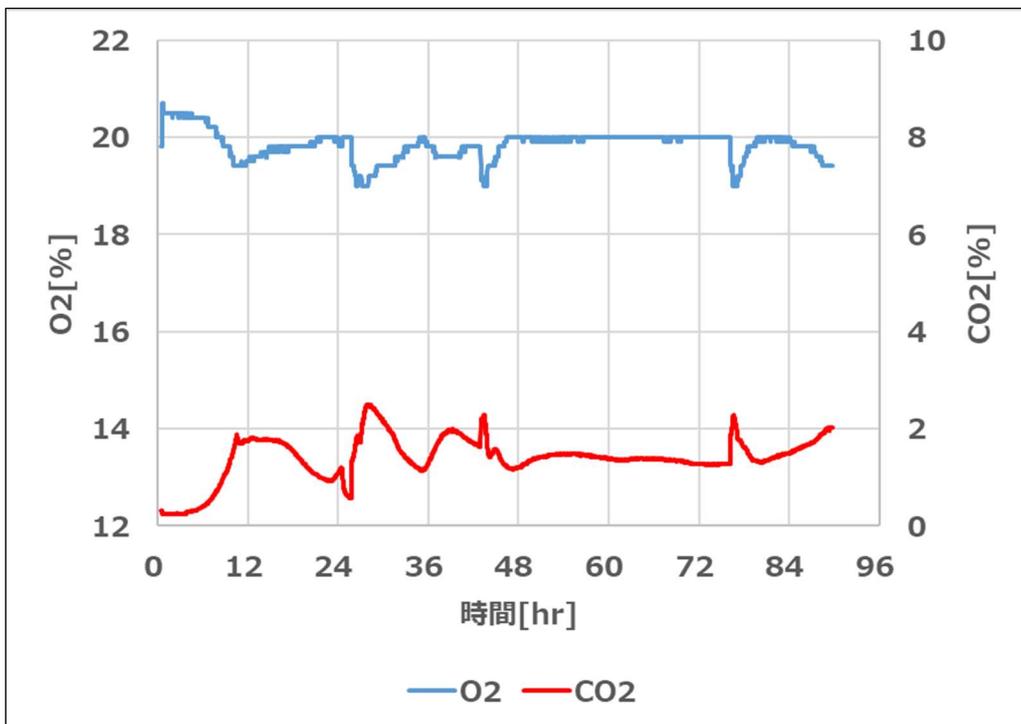


図 2-19 経時変化 (O₂, CO₂) / 30 L-Jar_バッチフィード培養

バッチフィードにおける生産性評価：菌体

濁度とグルコースの経時変化を図 2-20 に、消費されたグルコースと乾燥菌体重量の相関を図 2-21 に示す。

当然ではあるが、消費されたグルコースに対して得られる乾燥菌体重量の割合は、十分な速度で継続されることが好ましい。しかしながら、本試験では培養の推移に伴い、菌体収率の低下が認められた（図 2-21）。傾きはプロット間における乾燥菌体収率[g-cell（乾燥菌体）/g-glucose]を表している。本試験の範囲内において、最大収率は 0.2342 g-cell/g-Glucose、最小は 0.0875 g-cell/g-glucose であった。

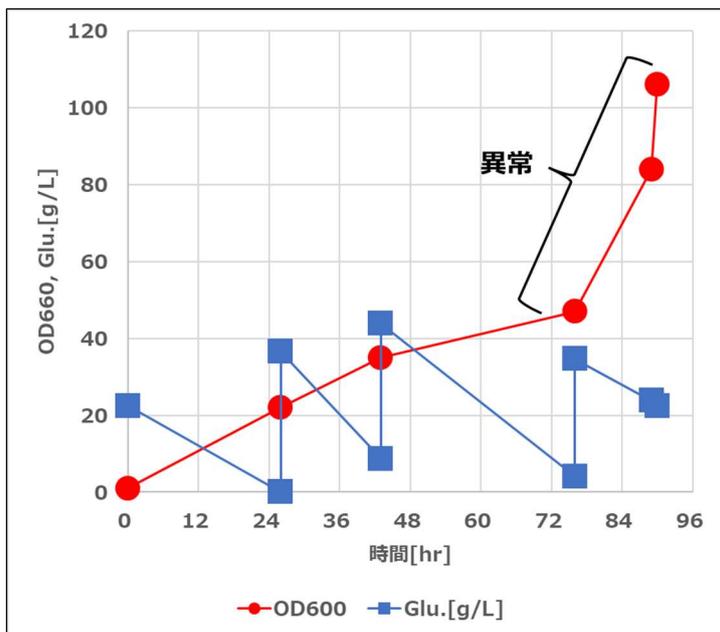


図 2-20 経時変化（濁度, グルコース）／30L-Jar_バッチフィード培養

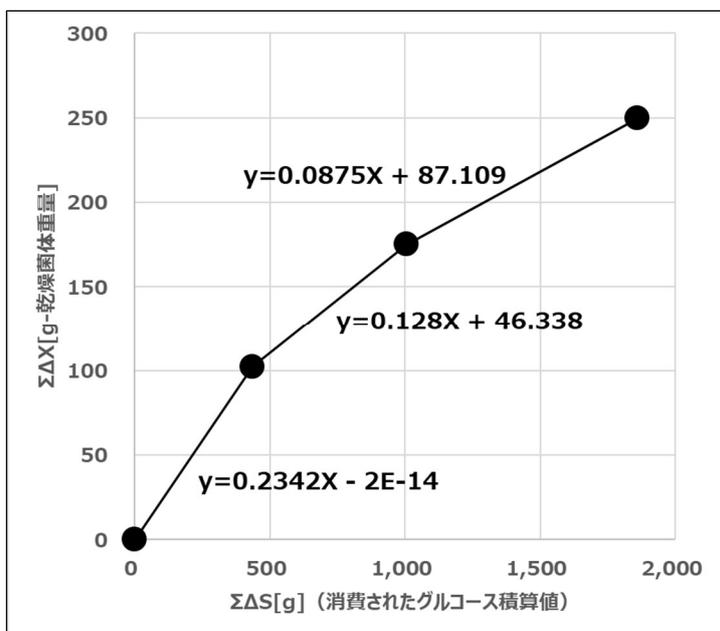


図 2-21 グルコース消費量と乾燥菌体重量の相関／30L-Jar_バッチフィード培養

先に記した表 2-3 の $VX[g]$ は菌体量で、その自然対数 $\ln VX$ の経時変化を図 2-22 に示す。グラフの傾きは比増殖速度 μ を表し、0.1212 の傾きが培養 26 時間以降で 0.0164 と顕著に小さくなっていることから、増殖速度の低下が明らかである。

増殖速度の低下の要因としては、制限基質である酸素濃度とグルコース濃度の低下が考えられる。殆どの好気性微生物は酸素に対する親和性が非常に高いが、通常は $1 \text{ mg-O}_2/\text{L}$ 以上の酸素濃度であれば、酸素の欠乏が増殖を律速することはない。本試験における酸素濃度は、流加開始以降で 5 mg/L 以上を維持しており十分量と考えられるため、この場合の制限基質ではないと考える。従って、グルコースが制限基質であり、流加培養においても基質グルコースの不足が認められた。菌体生産性の向上に向けて培養条件を改善するには、まずは基質の高濃度化をはかるべきと考えられる。

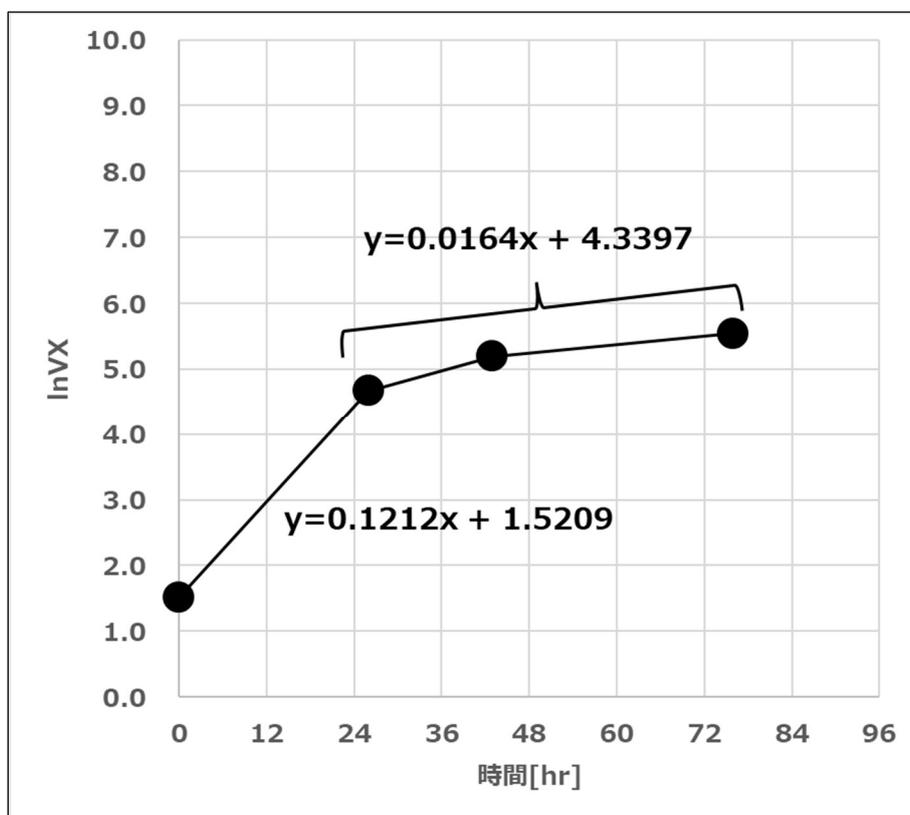


図 2-22 比増殖速度/30L-Jar_バッチフィード培養

バッチフィードにおける生産性評価：脂質

培養終了後の菌体のみについて、総脂質含量[w-総脂質/w-乾燥菌体%]と総脂質重量[g-総脂質/L]の定量を行った。

凍結乾燥菌体を調製し、クロロホルムとメタノール（2:1）を用いた Folch 法により総脂質を抽出した。なお、本方法では細胞のリン脂質を含むすべての脂質を抽出することを想定している。

乾燥菌体あたりの総脂質含量は、76.47 w/w%であった（図 2-23）。

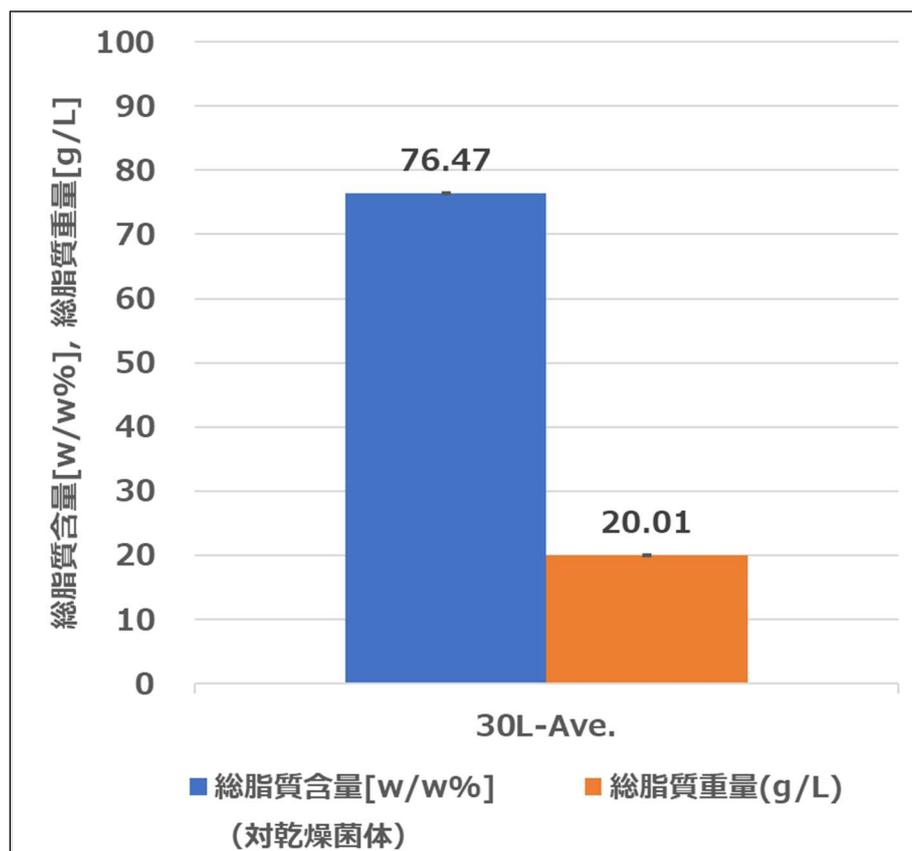


図 2-23 総脂質含量、総脂質重量／30 L-Jar_バッチフィード培養

乾燥菌体あたりの総脂質含量値をもとに、総脂質重量[g/L]を算出した。その結果、総脂質重量は 20.01 g/L であった（図 2-23）。先の 5 L-Jar による流加培養では 10.7 g/L であったため、相対的に高い産生値となった。投入されたグルコース量 2,198 g（理論値）、培養終了時の液量 22.9 L から求められる総脂質収率（ $VP/\Sigma\Delta S \times 100$ ）は、26.10%であった（脂肪酸に限定した場合の収率の目標値：20~25%）。5 L-Jar による流加培養での総脂質収率は 9.35%であったことから、培地のバッチ（回分）フィード法においても、脂質の生産性に関して問題は無いことが示唆された。培地の殺菌強度を下げたことによるメイラード反応の抑制は、脂質生産性に良好な影響を与えた要因の一つと推測する。

培地殺菌条件の評価

本試験では、培養後期に雑菌汚染が認められた（図 2-24）。本培養培地、流加培地の双方を 80°C、40 分の条件で殺菌しており、この殺菌条件の不完全性が示唆された。大規模培養（1 kL 培養タンク）の以前に示唆されたことには意義がある。1 kL 培養タンクでの培地殺菌では、これより殺菌強度の強い、80~100°C、60 分の条件を目標として殺菌することとした。培養の様子を図 2-25 に示す。

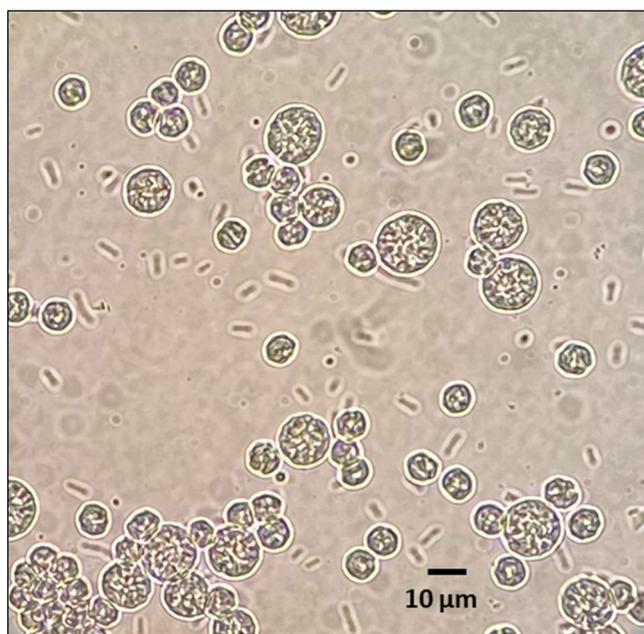


図 2-24 *Aurantiochytrium* sp. mh1915 株の画像 / 30L-Jar_ バッチフィード培養
(雑菌汚染により、桿菌が確認される)

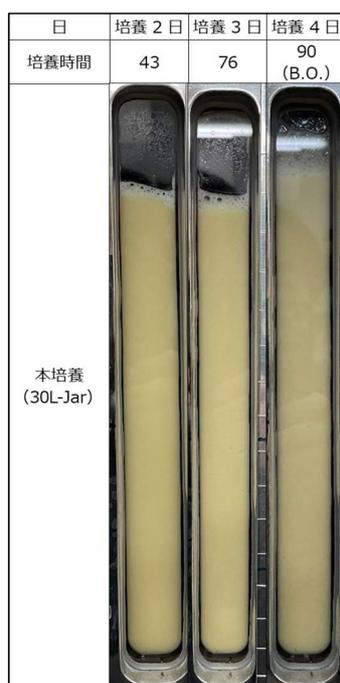


図 2-25 培養の様子 / 30L-Jar_ バッチフィード培養

2.3.3. 菌体増殖におけるバッチ（回分）フィード法の妥当性検討

実証試験 2.2.にて、回分培養よりも流加培養の方が菌体の生産性が良いことが示された。従って、この結果を反映させて、次項 2.4.の 1 kL 培養では、何らかの方法で培地流加を意図した培養を行いたい。しかしながら、培養途中における培地の流加を行うためには、当然ではあるが流加培地の殺菌設備とポンプ等の流加設備が必要となる。

本実証事業で想定している 1 kL 培養タンクには、流加を目的とした付帯設備は存在しない。ブロスアウト時に用いる 2 kL キルタンク（通称ブロスアウトタンク）が既設され、本設備はジャケット加温が可能ではあるものの、強度のある殺菌は不可能であり、加えて密閉性が悪い。そのため、培地フィード開始後の雑菌汚染リスクを高めるといふ、設備上の問題がある。

一方で、1 kL 培養タンクには、シード（S2）培養用の培養槽（小型圧力容器）が付帯されており、この容器による流加培地の殺菌と本培養タンクへのバッチ（回分）フィードが可能である。1 kL 培養タンクでの本培養では、流加培地のバッチフィード法を採用することとし、30 L-Jar による事前試験にて、本手法の可否を検討した。

表 2-4 グルコースの推移

hr	Glu.[g/L]			備考
	実測値	希釈率	計算値	
0.0	2.25	10	22.5	液量：20 L（殺菌時でのドレン増加、+5 L）
26.0	0	10	0.0	
26.0	3.65	10	36.5	1st.フィード後
43.0	0.87	10	8.7	
43.0	4.38	10	43.8	2nd.フィード後
76.0	0.41	10	4.1	
76.0	3.47	10	34.7	3rd.フィード後
89.0	2.38	10	23.8	雑菌確認（桿菌：運動性なし）
90.0	2.24	10	22.4	B.O.

グルコースの推移を、表 2-4、図 2-20 に示す。可否の判断は、バッチフィードしたグルコースが残存しないこと、ならびに回分培養に比べて菌体生産性が向上できることが指標となる。

フィード培地は先に記した方法にて調製し、3 回のバッチフィードを実施した（培養：26, 43, 76 時間）。培養 26 時間では初発のグルコースが既に枯渇している状況でのフィードとなった。一方で、培養 43 時間後の 2 回目のフィード直前では、グルコースが残存していた（8.7 g-Glucose/L）。バッチフィードしたグルコースの 23.8%が残存したことになる。同じく、培養 76 時間後の 3 回目のフィード直前においても、グルコースの残存が確認された（4.1 g/L）。同じく 9.4%の残存率となる。バッチフ

ィード1回目の後のグルコース残存率は気にはなるが、全培養を通じて顕著に残存する傾向は認められないので（図 2-20）、本グルコース濃度のバッチ投入に特段に問題は無いものと考察した。

バッチ（回分）フィードが脂質生産性へ及ぼす影響を評価することが本質ではあるが、本実証試験では菌体生産性を指標とした。先の試験 2.2.（5 L-Jar_流加培養）と比較した結果を以下に示す（図 2-26）。

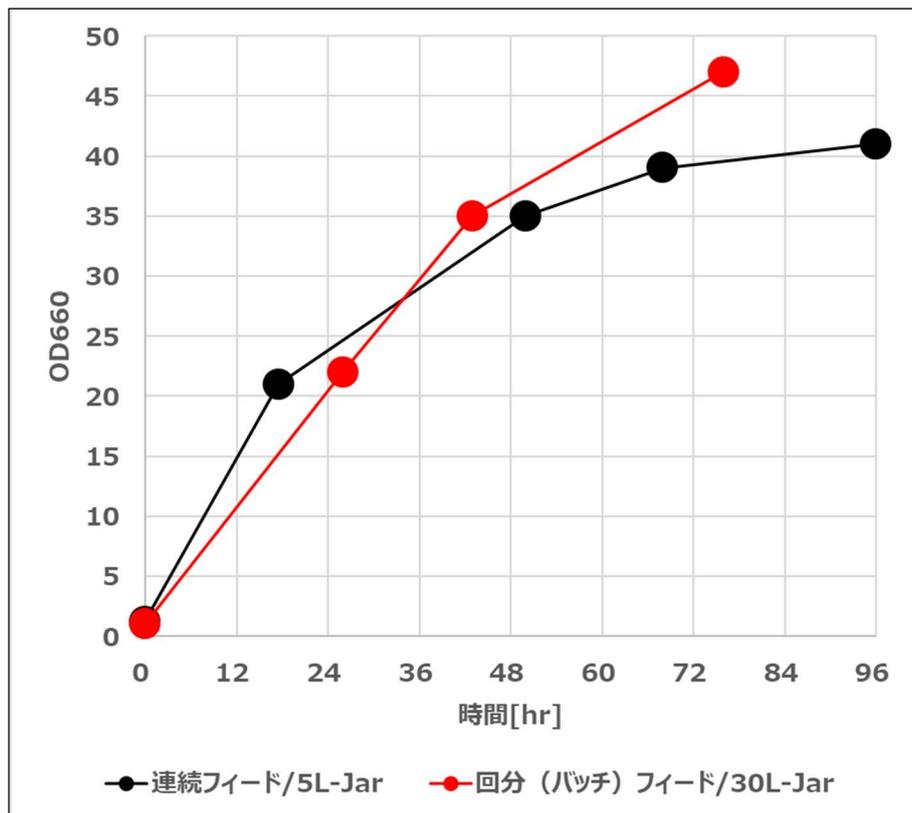


図 2-26 濁度の比較（連続フィード/5 L-Jar vs. バッチフィード/30 L-Jar）

30 L-Jar_バッチフィードでは、培養 76 時間以降で雑菌汚染が確認されたため、以降の濁度測定は意味を持たない。雑菌汚染が培養へ影響を及ぼす培養時間を明確に示すのは難しいが、DO 経時変化（図 2-18）、排ガスデータ（図 2-19）より、76 時間以前であれば雑菌汚染による顕著な影響は認められないため、76 時間までのデータを採用することとした。結果、連続フィード/5L-Jar と同等の菌体増殖が認められた（図 2-26）。培地流加の方法、培養器の容量は異なるが、培養をほぼ再現できたことを意味する。30 L-Jar を用いて培地を殺菌する場合は、直接蒸気吹込みを行うため、蒸気ドレンにより初発の培地液量が増加する。本試験においても液量の増加を加味した培地殺菌を行ったが、初発 15 L の想定に対して 20 L の液量となった。これはグルコースを含めた培地全体の希釈をもたらす。実際、本試験における初発グルコース濃度は 22.5 g/L であった（対象の 5 L-Jar では 27.5 g/L）。また、グルコースの希釈は菌体濃度へも影響を与える。それにもかかわらず、比較した両試験の濁度は

同等の数値を示した。30 L-Jar の方が菌体生産性が良好であったことを意味する。比増殖速度は、乾燥菌体重量と液量をもとに導かれるので、異なる試験区間で評価できる指標である。比増殖速度を比較した結果を図 2-27 に示す。傾きは比増殖速度を示す。培養 24 時間以降で 30 L-Jar の増殖速度は 5 L-Jar のそれを上回っている。菌体生産性に良好な影響を与えた要因の一つは、培地の殺菌強度を下げたことによるメイラード反応の抑制が関与しているものと推測する。

以上より、本条件での培地のバッチ（回分）フィードにおいても連続フィードと同様に培養が可能であることが示された。次項 2.4. の 1 kL 培養タンクでの培養にて、本方法を採用することとした。

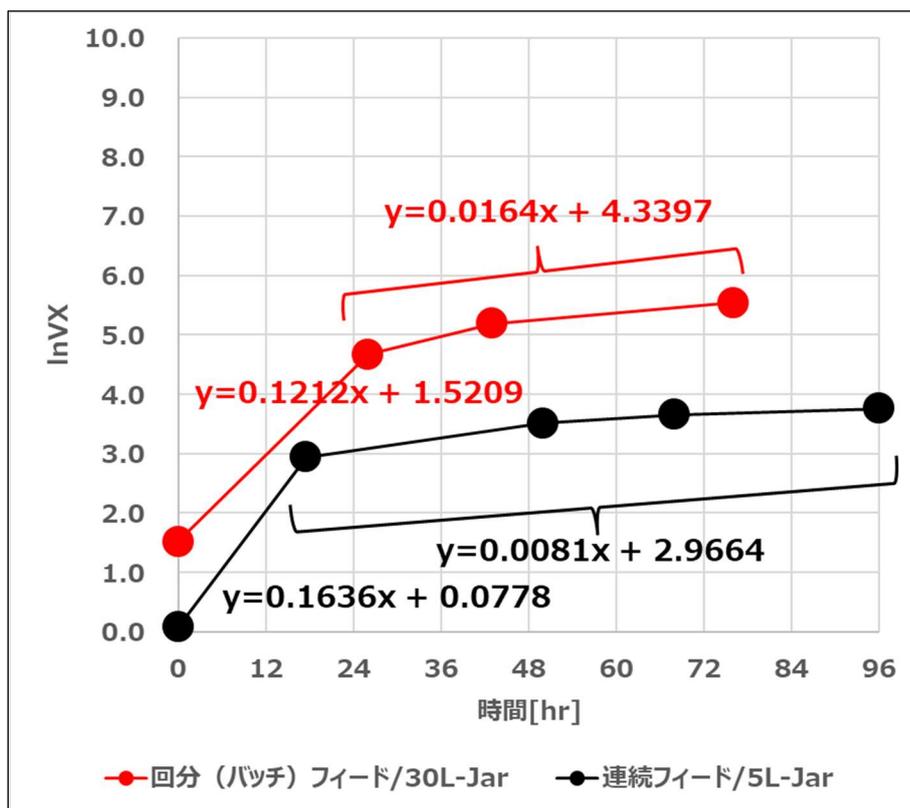


図 2-27 比増殖速度の比較 (連続フィード/5 L-Jar vs. バッチフィード/30 L-Jar)

2.3.4. 通気攪拌培養における pH 制御の必要性評価

通常、培養では、グルコースの消費による pH の低下や、アンモニア態窒素 (NH₄-N) の産生による pH の上昇が起きるため、培養槽で培養を行う場合は、設定値に合わせて pH 調整剤を自動制御にて添加させる場合が多い。実証項目 2.4 の大規模培養でもグルコースがバッチフィードされるため、有機酸の生成に伴い pH の低下が想定される。実際、実証項目 2.2.にてその様子は確認されている。

好気性微生物の糖質への反応性は速く、培養トレンドに即座に反映される (図 2-18, 2-19)。2.2.の試験では、培地流加速度が小さかったこともあるが、基質グルコースと酸素が十分量で代謝速度が速い場合は、pH の急激な低下により、菌の生育と脂肪酸の産生を低下させる要因となる可能性がある。

pH 制御剤は酸性とアルカリ性に分かれる。本試験のようなグルコースを多量に用いる場合では、この代謝産物である有機酸が酸の役割を果たすため、pH を制御する上での酸性溶液は必要なく、その代わりにアルカリ溶液の追添加を考慮する必要があり、一般的にはアンモニア水や液体苛性ソーダが用いられる。アンモニアに使用においては、アンモニア態窒素としての利用できるメリットがあるので、目的物質の生産性向上にも寄与できる場合がある。

ラビリンチュラの培養において、現状の培地組成で培養した際に、pH 調整剤が本当に必要かを考察した。ラビリンチュラにおける pH と菌の増殖については、pH4.0～8.0 の範囲において *Aurantiochytrium* sp. の増殖に問題ないことが確認されている (平成 25 年度～平成 26 年度成果報告書, 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) ^[1,3]。また、2.2.にて、回分培養では pH が 8.76 までの上昇が認められたものの、流加培養においてはグルコースが枯渇していた時間を除いて pH7～8 の間をほぼ維持できていた。有機酸の生成による極端な pH の低下も認められていない。グルコースが酸としての役割を果たして pH を適度に下げていたことに起因する。

1 kL 培養タンクには pH 変動に伴う pH 調整剤の添加機能が付帯されているものの、設備環境や動線を複雑にする。複雑な設備装着や槽外からの送液は、雑菌汚染のリスクを高める要因となる。通常は前述のとおり、アンモニア水 (10～28%) や液体苛性ソーダ、有機酸が用いられる。原料は安価であり、実製造を考慮してもコストを主に圧迫する要因とはならないが、アンモニア水は濃度によっては劇物に分類され、かつ激しい臭気を伴う。液体苛性ソーダも強アルカリ性のため、このような添加剤は不要であれば使用は避けたいところである。つまり、pH 制御を行うことなく培養できる方が望ましい。

1 kL 培養タンクでの本培養は、このような pH 調整剤を使用しないことを想定し、30 L-Jar による事前試験にて、pH 調整剤を使用しないことによる培養への影響を検討した。

その結果、pH 制御剤を用いることなく、pH6.89～7.46 の範囲内で培養を遂行できた (図 2-18)。従って、次項 2.4.の 1 kL 培養タンクでの培養では、pH 制御を実施しない本方法を採用することとした。

なお、本質は脂肪酸産生であり、pH 制御を実施しないことによる脂肪酸産生への影響を評価する必要がある。

2.3.5. 通気攪拌培養における消泡剤制御の必要性評価

通気攪拌培養では、ほとんどの場合で培養中に発泡が確認されるため、培養中に消泡剤を自動制御にて添加させることがある。消泡剤としては、ポリエーテル系、アルコール系、シリコン系などがあり、発泡を抑制させる非常に有効な培地原料の一つである。

発泡の要因はタンパク質や窒素源である。この発泡は非常に厄介で、発泡を極小化することは重要である。ひどい発泡の場合はサイフォン現象を誘発し、培養物（培養菌体）の一部、場合によっては殆どを培養槽の排気ラインから流出させる要因となる。加えて、排気フィルターを目詰まりさせて、培養タンクの内圧の上昇に繋がる。非一圧容器の場合なら、なおさら深刻である。また、エアフィルターに付着したブロスの泡沫により、コンタミネーションの原因となる。消泡効果が認められる消泡剤が見つからない場合は、培養による物質生産の開発を断念させる要因ともなる。このように、発泡は多くの培養プロセスで考慮すべき要素の一つである。

自動制御では、通常は泡の上昇による通電をセンサーが感知して消泡剤が添加される。しかしながら、1 kL 培養タンクには消泡剤の自動添加システムが存在しない。従って、添加する場合はバッチ投入となるが、発泡の有無やタイミングが経験的に不明なため、培養の多くの時間において発泡の状況を注視する必要があり、現実的に不可能である。バッチ投入するにしても適度な添加量が不明で、過少だと発泡に起因する上記問題を除去できない。過剰添加だと、培養の目的である脂肪酸産生へ影響を及ぼす可能性がある。

その一方で、消泡剤の添加にはデメリットが存在する。界面活性剤であり、多くは酸素移動速度を 50%も低下させる。このことは、好気性微生物の菌の増殖を抑制し、その結果、目的物質の産生を低下させる。酸素が反応律速であれば、比生産速度を低下させる。従って、可能な限り使用を避ける、あるいは使用量を減らすのが理想である。

30～50 L-Jar 以下の小スケール培養における発泡は、それほど大きな問題とはならない。同容積程度の容器を用意しておけば、仮に培養液が漏出しても培養液の回収が可能のためである。一方、この培養液の漏出自体は問題ではあるが、大規模培養槽ではない小スケール培養基にて、事前に様子を観察することは可能である。

1 kL 培養タンクでの本培養は、消泡剤を追添加しないことを想定し、30 L-Jar による事前試験にて、消泡剤を追添加しないことによる培養への影響を評価した。

その結果、消泡剤を追添加することなく、培養を遂行できた。培養時の様子を図 2-25 に示す。従って、次項 2.4. の 1 kL 培養タンクでの培養では、消泡剤を追添加しない本方法を採用することとした。

なお、本質は脂肪酸産生であり、消泡剤の有無が脂肪酸産生に与える影響を評価する必要がある。

2.4. 製造実機を想定したラビリンチュラの大規模培養

2.4.1. 1 kL 培養タンクによるラビリンチュラ培養

バイオプラスチック合成に用いるためのラビリンチュラ由来脂肪酸を確保するためには、ダウンストリームの抽出工程の製法確立も必要ではあるが、そのためには抽出工程へ供給するための培養菌体を十分量に製造する必要がある。まずは、上流の大規模培養を問題なく実施できることを確認し、大規模培養用の技術を整備するのが第一の目標となる。加えて、本質はラビリンチュラ培養による脂肪酸の製造であるため、事業化を行う上で目標とされる脂肪酸の生産力価と原価を評価する必要がある。

本実証では、最も律速段階になりやすい酸素移動速度を基準としてスケールアップを考えた。これは、スケールが異なっても酸素移動速度を等しくしておけば、等しい培養生産が期待できるとする考え方に基づく。

2.3.1.では本実証で使用する培養器において、 kLa -rpm 相関データの取得を行った。この攪拌回転数のデータを反映させて、2.3.2.、2.3.3.、2.3.4.、2.3.5.では 30 L-Jar を用い、1 kL 培養タンクでの大規模培養を行うためのデータの取得を行った。

1 kL 培養タンクは非一圧容器であることを受けて、2.3.2.では 80°C、40 分の殺菌条件での培養の可否を検討した。その結果、培養後期で雑菌汚染が確認され、本条件では培地の殺菌不良となることが示された。本結果を受けて、問題が無いという根拠はないものの、80~100°C、60 分の条件にて本培養培地の殺菌を行うこととした。

1 kL 培養タンクには、培地の連続フィードが可能な設備が付帯されていないため、バッチ（回分）フィードが培養へ与える影響を検討した。その結果、本培地組成のバッチ（回分）フィードにおいても、連続フィードと同様に培養が可能であることが示された。この結果を受けて、1 kL 培養タンクでの培養では、バッチ（回分）フィードを採用することとした。

2.3.4.にて、pH 制御剤を用いることなく、pH6.89~7.46 の範囲内で問題なく培養を遂行できた。この結果を受けて、1 kL 培養タンクでの培養では、pH 制御を実施せずに培養を行うこととした。

2.3.5.にて、消泡剤を用いることなく、培養を遂行できた。この結果を受けて、1 kL 培養タンクでの培養では、消泡剤を追添加せずに培養を行うこととした。

また、フィード培地については、加熱殺菌中のメイラード反応を避けるために、含水結晶ぶどう糖（還元糖）と酵母エキスは別滅菌添加とした。

これらの要素を含めて 1 kL 培養タンクによる大規模培養を行い、培養方法の妥当性を評価した。また、サンプリングしたサンプルに対して脂肪酸定量と脂肪酸組成の分析を行い、1 kL 培養で得られる脂肪酸の定量を行った。本実証で用いた 30 L-Jar (S2)、1 kL 培養タンク、付帯設備を以下に示す（図 2-28, 2-29）。

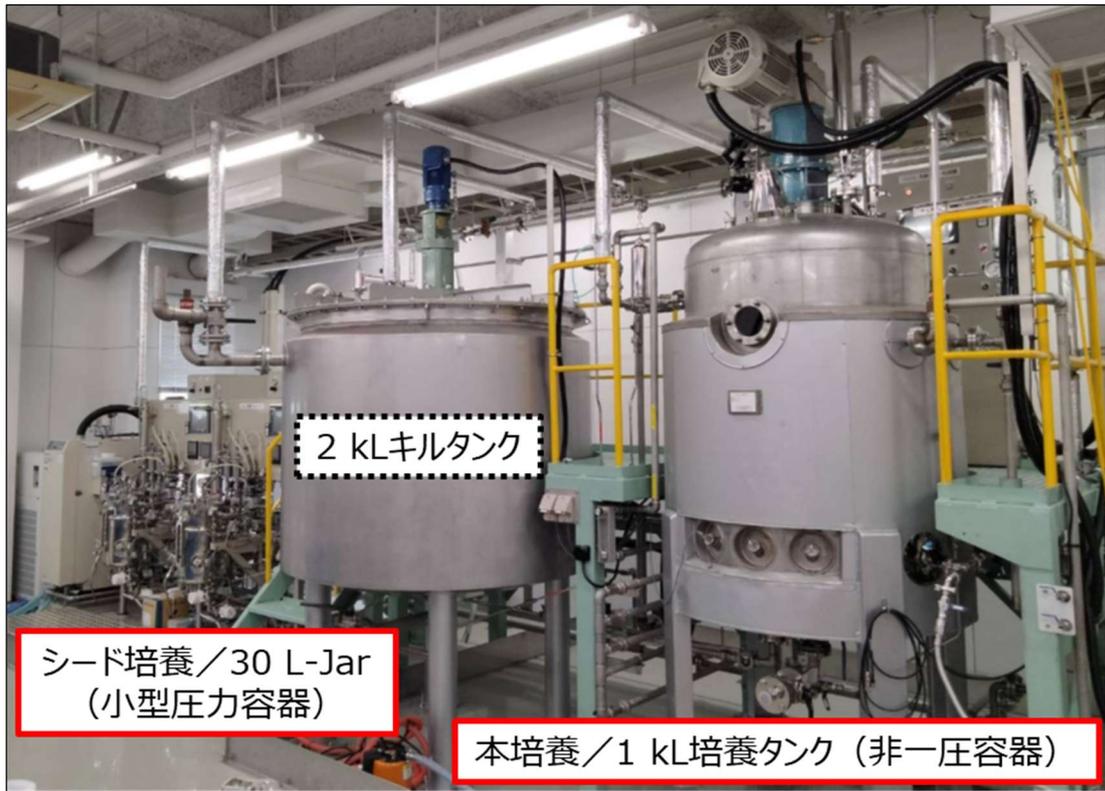


図 2-28 本実証で用いた 30 L-Jar および 1 kL 培養タンク



図 2-29 本実証で用いた 30 L-Jar と付帯設備

培養条件

< 第一種母培養 (S1) >

菌株 : *Aurantiochytrium* sp. mh1915

培地 : GY31 培地

組成 : 含水結晶ぶどう糖 (サナス) 16.5 g (500 mL 分)
乾燥酵母エキス (ナカライ) 5 g
NaCl 7.5 g
KCl 0.18 g
MgCl₂ · 6H₂O 2.70 g
MgSO₄ · 7H₂O 1.35 g
CaCl₂ · 2H₂O 0.25 g
水道水 500 mL
・ Vitamin mix 100 μL/100 mL (滅菌後に別添加)
・ Element solution 200 μL/100 mL (滅菌後に別添加)
・ アンピシリン Na (50 mg/mL) 100 μL/100 mL
(滅菌後に別添加)

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 min

添加試薬 : Vitamin mix

組成 : Vitamin B1 2 g (1 L 分)
Vitamin B2 0.01 g
Vitamin B12 0.01 g
水道水 1 L
溶解後、フィルター滅菌 (0.2 μm)

添加試薬 : Element solution

組成 : EDTA-2Na 30.0 g (1L 分)
FeCl₃ · 6H₂O 1.45 g
H₃BO₃ 34.2 g
MnCl₂ · 4H₂O 4.3 g
ZnSO₄ · 7H₂O 1.34 g
CoCl₂ · 6H₂O 130 mg
NiSO₄ · 6H₂O 260 mg
CuSO₄ · 5H₂O 10 mg
Na₂MoO₄ · 2H₂O 25 mg
水道水 1 L
NaOH で pH7 に調整後、滅菌 (121°C、20 min)

接種量 : WCB : 200 μL ※本試験では 200 μL を植菌

培養器 : 恒温振とう培養器 (タイテック株)

振とう数 : 120 rpm (旋回式、振幅 50 mm)

培養温度 : 28.0°C

培養時間 : 25.0 hr (1/10 10:30~1/11 11:30)

S1 情報 : OD660 : 18.8, グルコース : 15.8 g/L

<第二種母培養 (S2) >

培地：GY31 培地

組成：	含水結晶ぶどう糖 (サナス)	495 g (15 L 分)
	乾燥酵母エキス (ナカライ)	150 g
	NaCl	225 g
	KCl	5.25 g
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	81 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	40.5 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7.5 g
	消泡剤 PE-M	6 mL
	水道水	15 L
	・ Vitamin mix	15 mL (滅菌後に別添加)
	・ Element solution	30 mL (滅菌後に別添加)
	・ アンピシリン Na (50 mg/mL)	15 mL (滅菌後に別添加)

培地量： 15 L (殺菌後の液量：17 L)

培養容器： 30 L-Jar ファーマンター (榎高杉製作所)

殺菌条件： 121°C、20 min

接種量： S1：200 mL (1.3%)

培養温度： 28.0°C

冷却水温度：水道水を使用

pH 制御： なし

DO 制御： 下限値：40% (3.10 mg/L)

撹拌制御： 初発：270 rpm (5L-Jar：400 rpm 相当)

通気量： 1.0 vvm (15 L/min)

圧力： 0 kPa

培養時間： 28 hr

サンプリング：約 50 mL/Day0, 1

S1 情報： 0 hr (OD660：1.0, グルコース：25.8 g/L)

28 hr (OD660：17.2, グルコース：0.1 g/L)

<本培養>

培地：GY31 培地

組成：	含水結晶ぶどう糖 (サナス)	16,500 g (500 L 分)
	乾燥酵母エキス (ナカライ)	5,000 g 微生物培養用
	NaCl	7,500 g
	KCl	175 g
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	2,700 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,350 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	250 g
	消泡剤 PE-M	200 mL
	水道水	500 L
	・ Vitamin mix	0.5 L (殺菌後、S2 と共に圧送)
	・ Element solution	1.0 L (殺菌後、S2 と共に圧送)

培地量： 500 L
 培養容器： 1 kL 培養タンク（非一圧容器, ㈱高杉製作所）
 殺菌条件： $\geq 80^{\circ}\text{C}$ 、60 min
 接種量： S2：15 L（3.0%）
 培養温度： 28.0°C
 冷却水温度： 10°C
 pH制御： なし
 消泡剤制御：なし
 DO制御： なし
 攪拌制御： 初発：210 rpm（5L-Jar：440 rpm 相当、30L-Jar：290 rpm 相当）
 14 hr：270 rpm（5L-Jar：490 rpm 相当、30L-Jar：320 rpm 相当）
 通気量： 0.5 vvm（250 L/min）
 圧力： 0 kPa
 流加培地：GY101
 組成： 含水結晶ぶどう糖（サナス）16.5 kg
 乾燥酵母エキス（ナカライ）1.5 g
 水道水 58~64 L
 消泡剤 PE-M 8 mL
 ぶどう糖と酵母エキスは別々で滅菌（ 121°C 、20 min）
 ※30L-Jar より圧送
 流加： バッチフィード（上記 GY101×2 回）
 流加開始： 初発グルコース消費後（Day1 より）
 培養時間： 90 hr（4 days）
 サンプルング：約 200 mL/Day0, 1, 2, 3, 4, B.O
 ブロスアウト：20 L 容ユニオンコンテナ×10 袋（残りは廃棄）
 ブロス液量：639.4 L（理論値）

<分析>

- (1) 濁度：OD660nm
- (2) グルコース濃度（g/L）：バイオセンサーBF-7（王子計測機器㈱）
- (3) 総脂質含量（w/w%）
- (4) 総脂質重量（g/L-ブロス）
- (5) 脂肪酸定量
- (6) 脂肪酸組成

培地殺菌のトレンドを図 2-30 に示す。ハンドバルブを適宜開閉して直接吹込み蒸気量を調整し、80°C以上、60 分間の維持を目標に培地を殺菌した。赤い破線は 80°C のラインを示す。なお、培地殺菌時の攪拌回転数は、原料溶解時と同じく 100 rpm とした。想定よりも温度が上昇し、計器上は 100°C前後を示す時間帯もあったが、80°C 以上、70 分間の殺菌結果となった。

今回の実証試験ではデータを抽出してはいないが、培地の褐変度（吸光度）を数値として記録しておく方が良い。メイラード反応の進行の目安となるため、菌体の増殖と脂肪酸の生産性との相関を回顧する上で重要な指標となる。

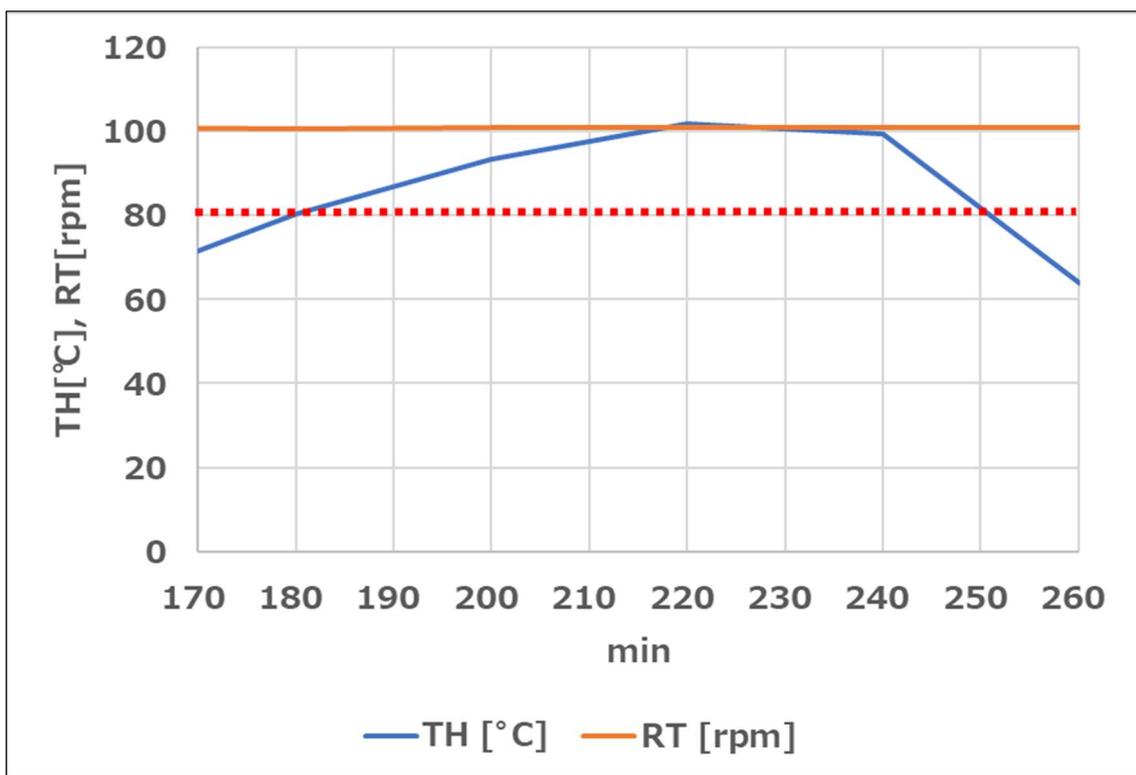


図 2-30 培地殺菌のトレンド／1 kL 培養タンク

1 kL 培養タンクにおける培養データを表 2-5 にまとめる。

表 2-5 1 kL タンク培養のデータ

hr	OD660	ln(OD660)	V 液量	流加	X 乾燥菌体重量	S Glucose	P 総脂質重量	VP	VX	lnVX μ	ΔX	$\Sigma \Delta X$
	計算値	-	L	kg(L)	g/L	g/L	g/L	g	g	-	g	g
0	0.6	-0.51	517.4	0	0.4	26.4	-	-	204	5.32	0	0
19	21.0	3.04	517.4	0	13.8	2.5	-	-	7,125	8.87	6,921	6,921
42	31.0	3.43	581.4	64	20.3	0.0	-	-	11,819	9.38	4,694	11,615
65	33.0	3.50	639.4	58	21.6	0.1	-	-	13,837	9.54	2,018	13,633
90	33.0	3.50	639.4	0	21.6	0.1	17.7	11,319	13,837	9.54	0	13,633

hr	VS	流加S	ΔS	$\Sigma \Delta S$	P/hr	P/hr/VX	X/hr
	g	g	g	g	g-P/hr	g-P/hr/VX	g-X/hr
0	13,659	0	0	0	-	-	0.00
19	1,294	0	12,366	12,366	-	-	0.72
42	0	15,000	16,294	28,659	-	-	0.48
65	64	15,000	14,936	43,595	-	-	0.33
90	64	0	0	43,595	125.8	0.00909	0.24

- OD660 : 濁度 (実測値)
 Ln(OD660) : 濁度の自然対数
 V : 培養液量[L]
 流加 : 流加量[L]
 X : 乾燥菌体の濃度[g-cell/L]
 S : 基質グルコースの濃度[g-glucose/L] (実測値)
 P : 総脂質の濃度[g/L] (実測値)
 VP : 総脂質量[g]
 VX : 乾燥菌体量[g]
 lnVX μ : 乾燥菌体量の自然対数
 ΔX : サンプル間における乾燥菌体の増加量[g]
 $\Sigma \Delta X$: 増加した乾燥菌体の積算量[g]
 VS : 基質グルコースの残存量[g]
 流加 S : 流加投入された基質グルコース量[g]
 ΔS : サンプル間における基質グルコースの消費量[g]
 $\Sigma \Delta S$: 消費された基質グルコースの積算量[g]
 P/hr : 単位時間あたりの総脂質量[g-総脂質/hr]
 P/hr/VX : 単位時間、菌体量あたりの総脂質量[g-総脂質/hr]
 X/hr : 単位時間あたりの乾燥菌体量[g-乾燥菌体/hr]

培地殺菌前、培養終了後の様子を図 2-31 に示す。顕微鏡観察の様子を図 2-32 に示す。



(左：培地殺菌前、右：培養終了後)

図 2-31 培地・培養の様子／1 kL 培養タンク_バッチフィード培養

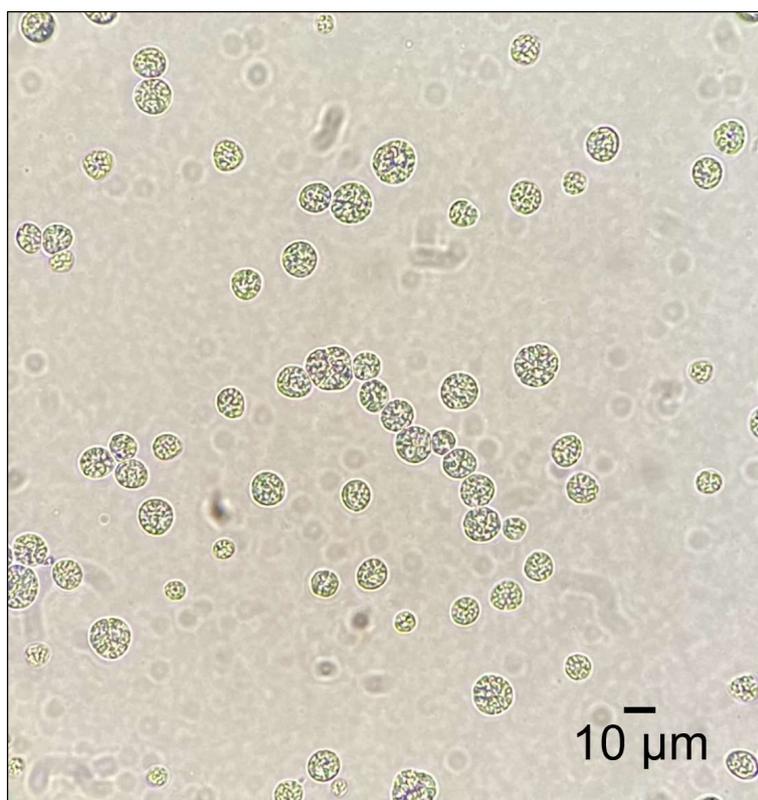


図 2-32 *Aurantiochytrium* sp. mh1915 株の画像／1 kL 培養タンク_バッチフィード培養
(顕微鏡観察の範囲では、雑菌汚染は確認されない)

培養トレンドの解析

培養 9.0 時間に DO ジャンプが明確に確認された (図 2-33)。DO 値に影響を及ぼす要素として、温度、通気量、攪拌回転数、圧力があるが、いずれも固定値であり、その条件下において同時期に pH の上昇が確認されているので、基質グルコースの枯渇のタイミングと考えるのが妥当である。しかしながら、その後の培養 19 時間において 2.5 g/L の残存グルコースが確認された (表 2-5, 図 2-34)。先の試験 2.3.2. の排ガスデータより (CO₂トレンド)、本挙動のタイミングで基質グルコースが枯渇していることを明らかとしており、DO および pH の挙動も一致していることから、培養 9.0 時間で基質グルコースが枯渇している。この矛盾は、サンプリングラインへのブロスの残存が考えられる。サンプリング前にはサンプリングラインに残存したブロスのブローを行っているため、採取サンプルの不均一性とは考えづらいが、十分なブロスブロー (500 mL 前後) 行うなどの改善が必要である。

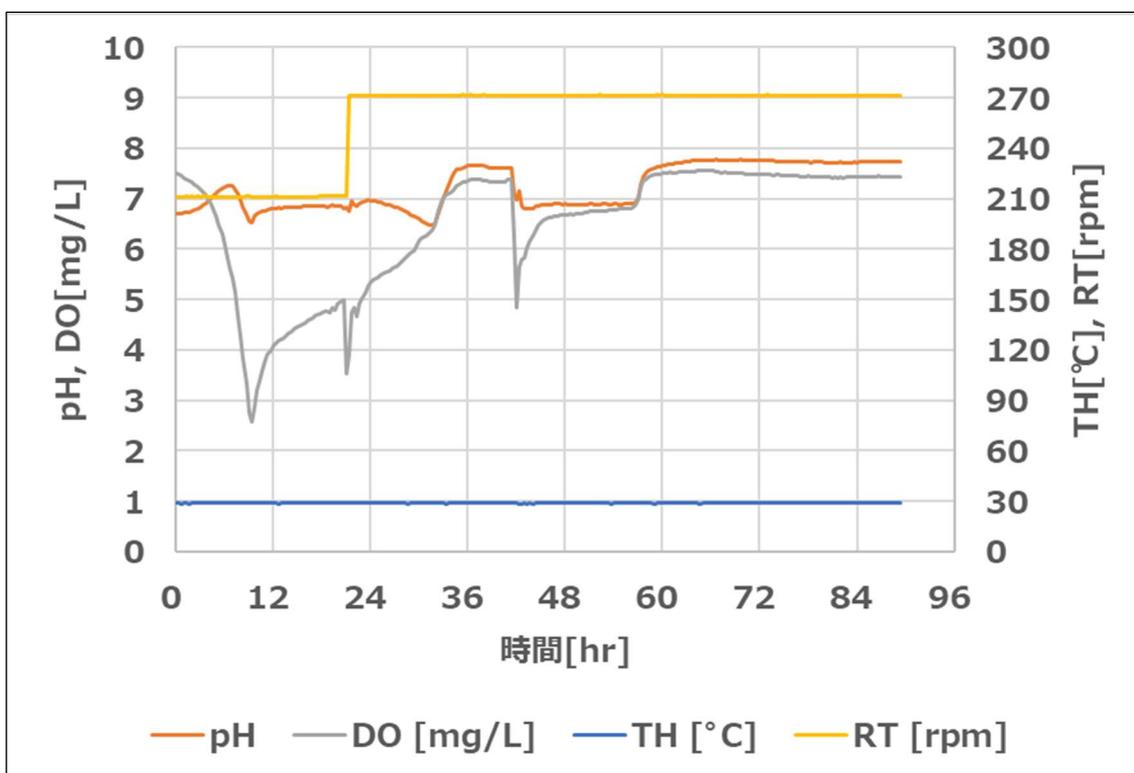


図 2-33 経時変化 (pH, DO, 温度, 攪拌) / 1 kL 培養タンク_バッチフィード培養

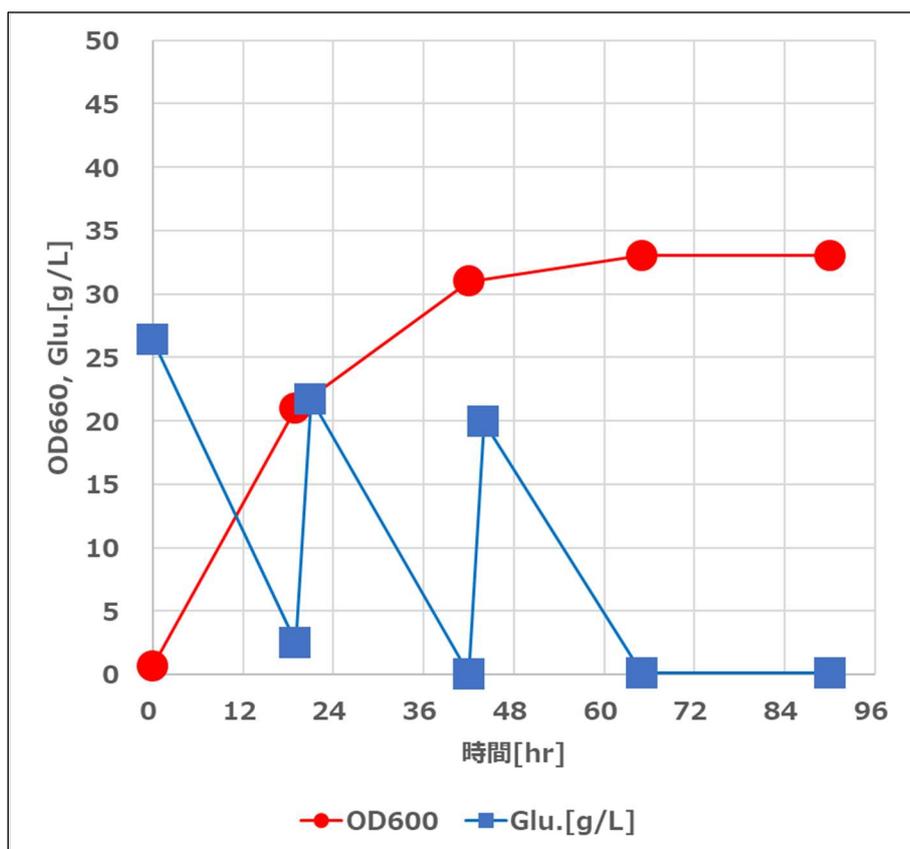


図 2-34 経時変化（濁度, グルコース） / 1 kL 培養タンク_バッチフィード培養

培地流加の観点でみると、基質グルコースが補填されたのは培養 20 時間前後となり、約 11 時間近くにかけて基質グルコースが枯渇した状態が継続されたことになる。グルコースの枯渇後、ただちに溶存酸素が飽和レベルにまで戻らないのは、培養中に産生された物質や培地に含まれているアミノ酸を基質にして酸素を消費しているためと考えられる。この間、pH は緩やかに上昇し、このような pH 上昇が確認される状況下では、回分培養時と同様に以降の十分な菌体量の増加は見込めない。培養 9.0 時間での基質グルコースの枯渇では、時間サイクル上で培養を制御しにくいので、枯渇のタイミングを先に延ばしたいところである。例えば培養 16~18 時間後の枯渇が理想である。本培養への植菌量を減らす、初発の基質グルコース濃度を高くする、酸素供給量を抑える（攪拌回転数低下、通気量低下）等の対応で増殖を遅らせて、基質グルコースが枯渇するタイミングで流加を開始するのが望ましい。

流加 1 バッチ目を培養 19 時間から 21 時間にかけて実施した（投入順は、グルコース#1、グルコース#2、酵母エキス）。グルコースは、フィード 1 バッチで投入する量を 30L-Jar では一度で溶解できないため、二分して滅菌し、1 kL 培養タンクへ圧送した。なお、フィード 1 バッチにおける投入量は、培養開始時のグルコース濃度へ戻すことを想定して、本培養培地と同じ仕込み量とした。グルコースの圧送後、酵母エキスも同様に 30L-Jar で滅菌し、1 kL 培養タンクへ圧送した。グルコースの投入時はほとんど DO 値が低下せずに僅かな変動しか示さなかったのに対し、窒素源である酵母エキスを投入した際に急激な DO 値の低下が認められた (4.99→3.53 mg/L)。な

お、フィード 1 バッチにおける投入量は、グルコース投入重量の 1/10 量とした。すべての流加培地の投入後、グルコースが残存しているにも関わらず、翌日の二回目の流加時である培養 41.0 時間まで DO 値は上昇を続けた。飽和溶存酸素濃度の 50% 値である 3.88 mg/L を満たしており、その間の酸素供給量は十分と考えられ、むしろ過剰である可能性もある。既に培養 19.0 時間以降において、比増殖速度は急激に低下しており（図 2-36, 後述）、その一方で、流加 11 時間後の培養 31.0 時間では pH ジャンプが確認されてグルコースの枯渇を示していることから（図 2-33）、基質グルコースは菌の増殖以外、例えば脂肪酸の産生に主に用いられた可能性が考えられる。詳細の把握のためには、各プロット間における総脂質の比生産速度の確認が必要である。一方で、菌体を増加させるためには、投入する窒素源の増量が必要と推測された。初発の窒素源濃度を高くする、流加時の窒素源投入量を増加することで、単位時間、単位容積あたりの菌体収量を増加できるものとする。

なお、流加 1 バッチ目の後においても約 10 時間近くにかけて基質グルコースが枯渇した状態が継続されたことになる。流加 1 バッチ当たりの基質グルコースの投入量を増加する、酸素供給量を抑える（攪拌回転数低下、通気量低下）等の対応で、基質グルコースが枯渇している時間を短くすることが望ましい。

流加 2 バッチ目を培養 42 時間から 44 時間にかけて実施した（投入順は、酵母エキス、グルコース#1、グルコース#2）。投入量、投入方法は流加 1 バッチ目と同様とした。窒素源である酵母エキスを投入した際に急激な DO 値の低下が認められた（7.37→4.85 mg/L）。一方で、グルコースの投入時はほとんど DO 値の低下は確認されていない。すべての流加培地の投入後、グルコースが残存しているにも関わらず、DO 値は上昇を続けた。飽和溶存酸素濃度の 50% 値である 3.88 mg/L を満たしており、その間の酸素供給量は十分と考えられる。培養 56.3 時間に pH ジャンプが確認されており、この時点でグルコースが枯渇している。流加 1 バッチから 2 バッチ目にかけても更に比増殖速度は更に低下していることから（図 2-36, 後述）、基質グルコースは菌の増殖以外に主に用いられた可能性が考えられる。詳細の把握のためには、プロット間における総脂質の比生産速度の確認が必要である。

なお、pH ジャンプは、流加 2 バッチ目を投入後の 13 時間後に確認されている。本実証では終濃度 3.0 w/v% を想定してグルコースを投入しているが、本濃度のグルコースは初発培地から各流加にかけて 9.0~13.0 時間で消費されたことになる。基質グルコースが枯渇した時間帯を継続することは、菌にとっても作業者にとっても生産性がない。加えて、12 時間前後でのグルコースの枯渇は、前述の通り時間のサイクル上で培養を制御しづらい。初発の基質グルコース濃度を高くする、流加 1 バッチ当たりの基質グルコースの投入量を増加する、酸素供給量を抑える（攪拌回転数低下、通気量低下）等の対応で、基質グルコースが枯渇している時間を短くすることが望ましい。また、目的物の比生産速度を今後調査する必要があるが、投入した基質グルコースが枯渇するタイミングで培養を終了できるのが、種々原価コストや CO₂ 排出量を低減する上で望ましい。

生産性評価：菌体

投入されたグルコース量 45.0 kg（理論値）に対して、得られた乾燥菌体濃度は 21.6 g-cell/L であった。グルコース消費量あたりで得られる乾燥菌体量を図 2-35 に示す。傾きはプロット間における乾燥菌体収率[g-cell（乾燥菌体）/g-glucose]を表している。本試験の範囲内において、最大収率は 0.5597 g-cell/g-Glucose、最小は 0.1351 g-cell/g-glucose であった。

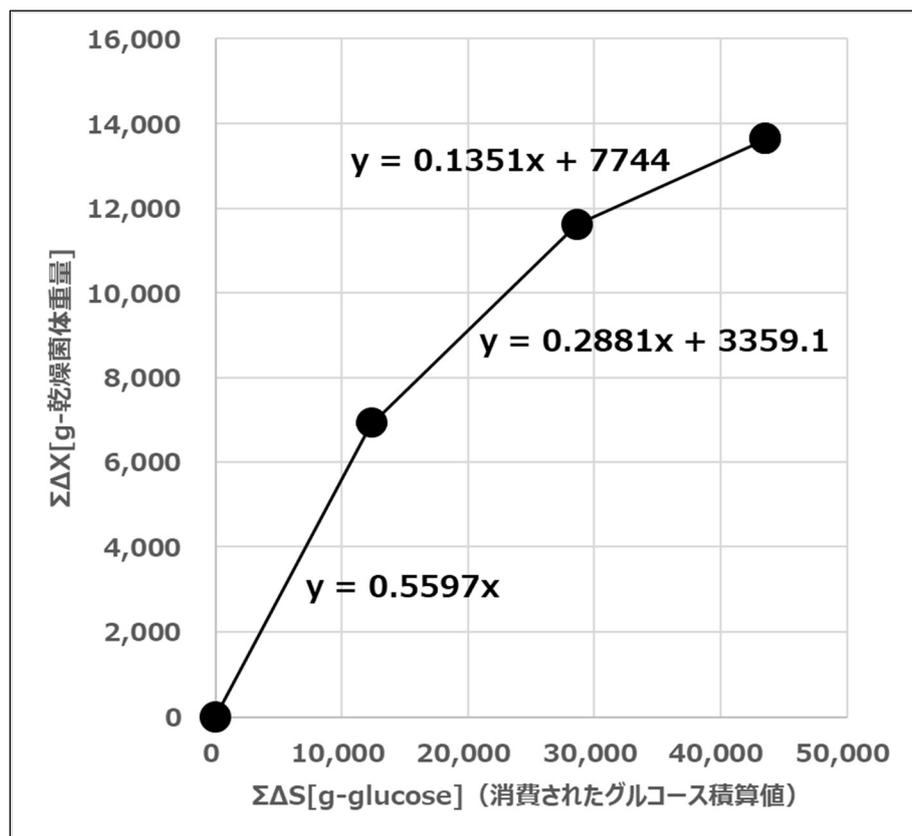


図 2-35 グルコース消費量と乾燥菌体重量の相関／1 kL 培養タンク_バッチフィード培養

表 2-5 の $VX[g]$ は菌体量で、その自然対数 $\ln VX$ の経時変化を図 2-36 に示す。グラフの傾きは比増殖速度 μ を表し、0.1871 の傾きが培養 19.0 時間以降で 0.009 と顕著に小さくなっていることから、増殖速度の低下が明らかである。

増殖速度の低下の要因としては、一般には制限基質である酸素濃度とグルコース濃度の低下が考えられるが、本試験区における先の考察の通り、窒素源の関与が指摘された。通常は多くのケースで $1 \text{ mg-O}_2/\text{L}$ 以上の酸素濃度であれば、酸素の欠乏が増殖を律速することではなく、常時この値以上を維持できているので (図 2-33)、菌体増殖に対する制限基質ではない。

基質グルコースが菌体増殖に及ぼす影響も先の考察の通りである。流加後においてグルコースが菌体の増殖に積極的に消費されている様子はない。グルコースが何に消費されているかについては、まずは総脂質の生産性との相関を調査する必要がある。

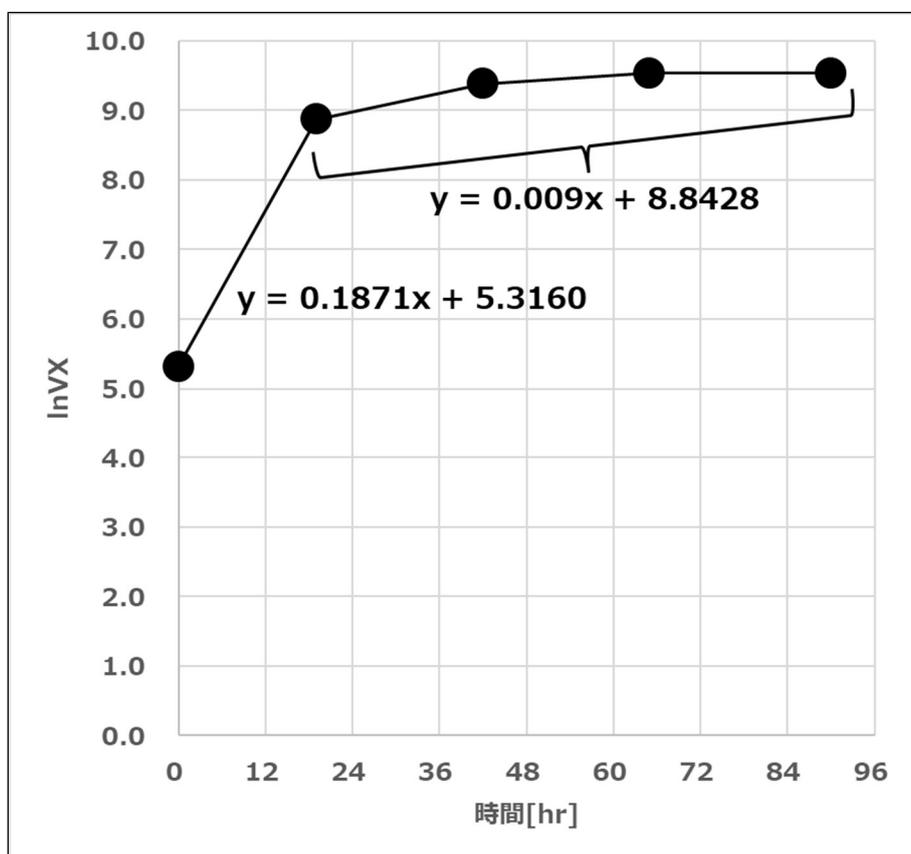


図 2-36 比増殖速度 / 1 kL 培養タンク_バッチフィード培養

生産性評価：脂質

本試験における生産物の本質は、菌体ではなく脂肪酸である。脂肪酸濃度[g-product/L]の測定は、生産性の高さを表す分かり易い指標となる。しかしながら、本試験ではその簡便性から、先の考えに基づいて(2.2.1.)、菌体量をベースとした脂質生産性の評価を行った。

凍結乾燥菌体を調製し、クロロホルムとメタノール(2:1)を用いたFolch法により総脂質を抽出した。なお、本方法では細胞のリン脂質を含むすべての脂質を抽出することを想定している。

乾燥菌体あたりの総脂質含量は79.8 w/w%となった(図2-37)。

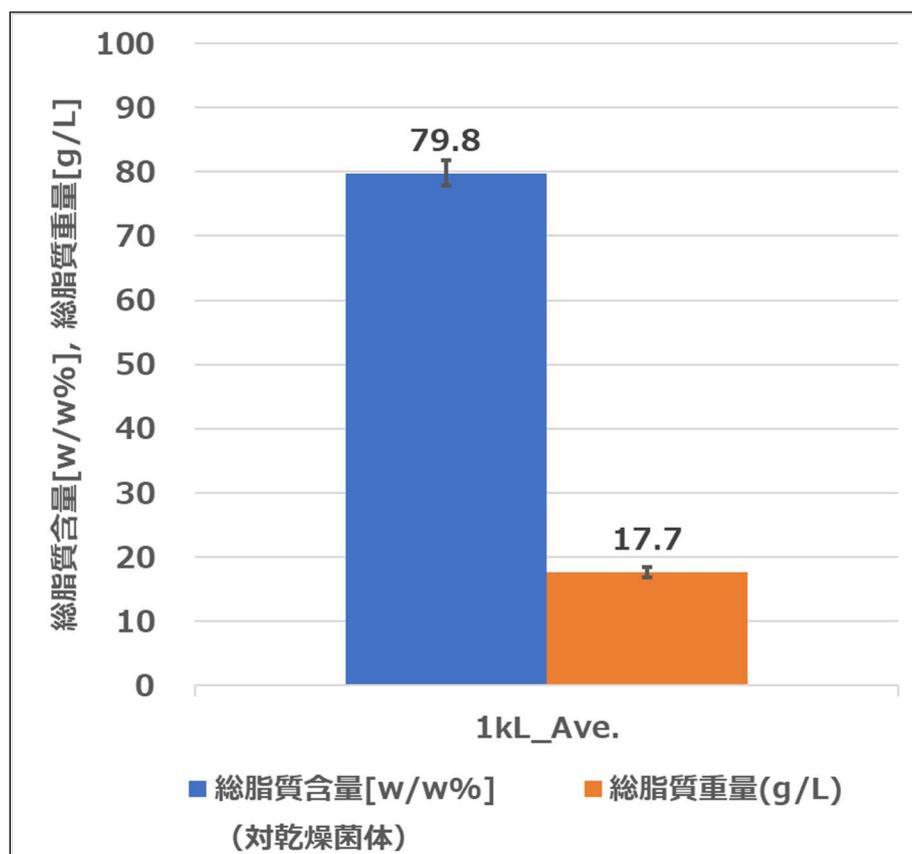


図2-37 総脂質含量、総脂質重量/1kL培養タンク_バッチフィード培養

乾燥菌体あたりの総脂質含量値をもとに、総脂質重量[g/L]を算出した。その結果、総脂質重量は17.7 g/Lとなった(図2-37)。培養終了時の液量639.4 Lから求められる総脂質重量は11.319 kgとなる。投入されたグルコース量45.0 kg(理論値)から求められる総脂質収率は、25.1%であった(脂肪酸に限定した場合の収率の目標値:20~25%)。

2.4.2. 脂肪酸の定量、脂肪酸の組成

遠心分離後のラビリンチュラ培養菌体を精製水で洗浄し、凍結乾燥菌体を得た。これを用いて、ガスクロマトグラフィーにて脂肪酸の定量を行った（図 2-38）。100 g の乾燥菌体中に含まれる総脂肪酸重量は 66.9 g で、飽和脂肪酸は 37.1 g、多価不飽和脂肪酸は 29.8 g となった。最も一般的な脂肪酸であるオレイン酸（C18:1）をはじめとする一価不飽和脂肪酸は検出されていない。

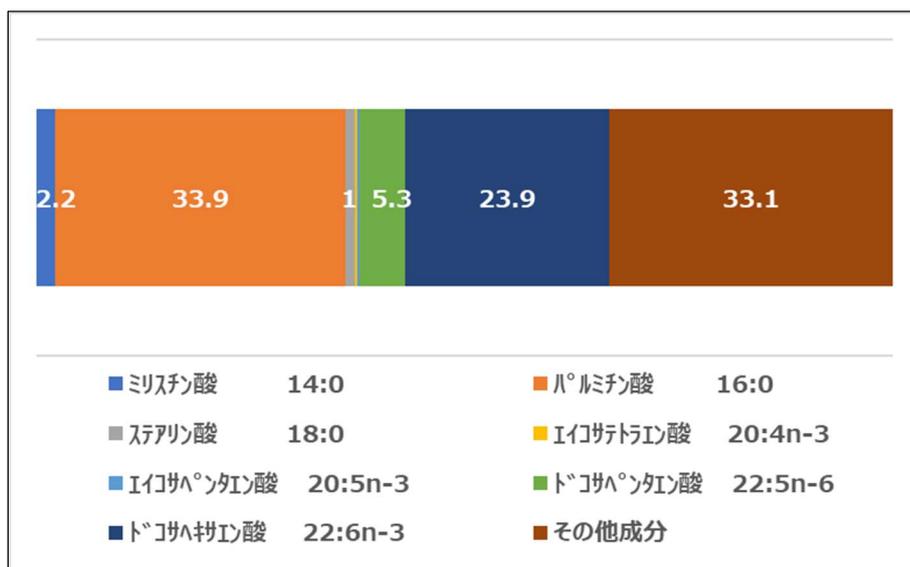


図 2-38 脂肪酸の定量 (g/100 g-乾燥菌体)

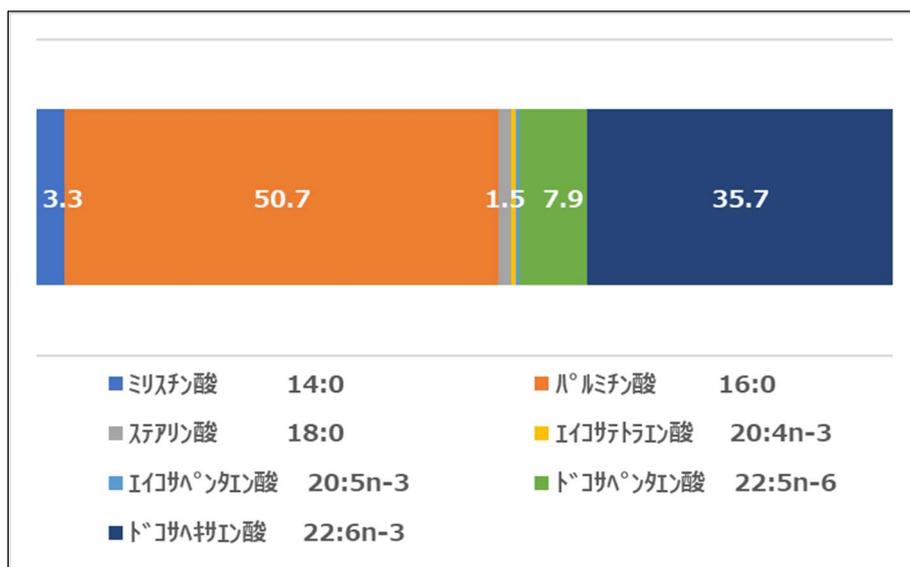


図 2-39 脂肪酸組成比 (w/w%)

一般に、回収した培養細胞の 2/3 は水分で、残りの 1/3 が固形分である。さらに、その固形分（乾燥菌体）の 1/2 がタンパク質という法則がある。乾燥菌体の 66.9 w/w%が脂肪酸であるため、残りの 33.1 w/w%が全てタンパク質であったとしても、この法則には従わない。本微生物がいかに多くの脂肪酸を細胞内に蓄える特徴を有しているかを改めて知る結果となった。

培養液あたりの乾燥菌体重量 X (21.6 g/L) と液量 V (639.4 L) から、総乾燥菌体重量 VX は 13,837 g である。この内の 66.9 w/w%が脂肪酸であることから、培養 1 バッチで得られる菌体中に含まれる総脂肪酸重量は 9,257 g と理論的に導かれた。投入されたグルコース量 45.0 kg (理論値) から求められる総脂肪酸収率は 20.6%であった。

全脂肪酸中の組成比は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸が 50.7%と最も多く、次いでドコサヘキサエン酸 (DHA) が 35.7%、ドコサペンタエン酸 (DPA) が 7.9%、ミリスチン酸と続く結果となった (図 2-39)。

2.5. 本章のまとめ

バイオプラスチック合成用の副原料としてラビリンチュラ由来脂肪酸を供給するため、ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発を遂行した。ベンチスケールテストからパイロットスケールへの段階を踏んでおり、開発の結果は、2.4. の製造実機を想定したラビリンチュラの大規模培養に集約できる。

スケールの異なる設備に対して、同等の酸素供給条件を導くのに有効な kLa -rpm 相関データを活用し、5 L, 30 L, 1 kL 培養タンクを経てスケールアップ培養を行った。

また、用いた培養設備は同じ機能を有していなかったため、1 kL 培養タンクで実施可能な培養方法を考え、30 L-Jar にてその手法の可否について検討を行った。その結果、バッチ (回分) フィード法による培地の流加は、脂質の産生に対して問題無いことを明らかとした。また、pH 調整剤による pH の制御、消泡剤の追添加が不要であることを示した。大規模培養の実施を前に、培地殺菌条件に関する知見も見出した。

これらの要素を含めて 1 kL 培養タンクによる大規模培養を行い、本培養方法の妥当性を評価した。菌体の生産性に改善の余地が示唆されたものの、試験の範囲では雑菌汚染は確認されず、想定通りに 1 kL 培養タンクでの大規模培養を遂行できた。また、脂肪酸の定量と組成分析を行い、1 kL 培養 1 バッチで得られる脂肪酸の定量を行った。

投入されたグルコース量 45.0 kg (理論値) から求められる総脂質収率は 25.1%、総脂肪酸収率は 20.6%であった。グルコースの 50%は菌体の生育と呼吸で消費されるため、得られた総脂質収率と総脂肪酸含有率は、概ね良好な結果と言える。また、定量分析により、乾燥菌体中の 66.9 w/w%が脂肪酸であることが示され、1 kL 培養 1 バッチ (理論ブロス液量: 639.4 L) で得られる菌体中に含まれる総脂肪酸重量は 9,257 g と理論的に導かれた。脂肪酸の組成は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸が 50.7%と最も多く、ドコサヘキサエン酸 (DHA) が 35.7%と続く結果となった。

なお、単位バッチあたりで更に多くの菌体と脂肪酸を得るには、特に培養基材、培地組成の改善が必要である。また、原価低減のために、安価な糖液や窒素源への転換が望まれる。

3. ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討

3.1. 概要

ラビリンチュラが産生する脂肪酸は細胞内に蓄えられる。2.ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発では、グルコース濃度やコスト上の課題はあるものの、1 kL 培養タンクでの大規模培養を想定する範囲内で遂行できた。次は、培養菌体から脂肪酸を回収する必要がある。

ラビリンチュラ由来の総脂質を抽出する既存の方法として、Folch 法^[3,1]もしくは Bligh-Dyer 法などの溶媒抽出法がある。一般的に、細胞組織などから総脂質を抽出する方法として知られる方法で、いずれもクロロホルムを用いることを特徴とする。ラビリンチュラの培養菌体においても、これらの方法にて総脂質の抽出は可能である。実際、本実証の 2.における総脂質含量[w/w%]、総脂質重量[g/L]の測定では、Folch 法を採用して脂質の定量分析を行っている（2.4.2.の外注分析を除く）。

理論的には、この方法をスケールアップできれば、脂肪酸を含む総脂質の抽出・回収は可能と考えられるが、実際はそうもいかない。それは、次の理由に由る。

① 水分の除去が必要、加えて菌体回収における手法が未定

微生物培養による物質の生産において、水分と菌体を分けることは必然の工程である。本菌株のように目的物が細胞内に存在する場合や、抗生物質生産菌のように菌体外へ産生する場合がある。どちらのケースにおいても菌体の分離工程は必要である。従って、ラビリンチュラ由来脂肪酸の製造に関しても、どのような方法で菌体を回収するかを検討試験を事前に行い、実製造へ落とし込む必要がある。

ラビリンチュラ由来脂肪酸の製造における水分除去の意義は、ワーキングボリュームのダウンである。脂肪酸は細胞内に蓄えられるため、必要なのは菌体の方である。培養液のほとんどは水であるため、これが非常に邪魔になる。多くは、連続遠心分離機やセラミック膜ろ過器が用いられ、菌体は含水率の高いスラリー状まで濃縮される。ラビリンチュラにおいても何れかの機器が適するものと予想する。また、これらの機器にて菌体を回収したとしても、そのうちの 2/3~4/5 は、未だ水分である。

バイオプラスチック合成用の原料として、脂肪酸をバルクで製造することを想定しているため、その培養設備の規模は 100 t にも及ぶ。培養液の容量は 50 kL 以上にもなり、乾燥菌体重量 X を先の実証結果の 21.6 g/L とすると、乾燥菌体の総重量はわずか 1.082 t である。培養液中の僅か 2.16 w/v% であり、ほとんどが不要であることが分かる。菌体回収は必須要件であるにもかかわらず、回収方法が未定であることは問題である。培養にて好都合に脂肪酸が産生された場合は、細胞の比重が軽くなることが予想され、セパレーターによる分離の可否に関しても、現時点では情報がない。クロスフローろ過を用いるにしても、適切な膜口径の知見がない。このように、製造実機を想定した菌体回収の知見が不足している。

② 第一種有機溶媒であるクロロホルムを使用

Folch 法に準じると、回収した菌体スラリーを脂質抽出槽で攪拌しながら、比重の大きいクロロホルム（メタノール混合液）を投入し、抽出する方法が想定される。クロロホルムはハロゲン系の第一種有機溶剤であるため、できるだけ多量の使

用は避けたいところである。溶媒の使用量を減らすためにも、①で述べた水分除去によるブrossのボリュームダウンは必須条件である。

上記の①②は、必ずしも製造実機にて不可能な方法ではなく、本実証に適用できる根拠がないことが問題である。本実証事業のみならず、多くの開発案件において、目的物質の回収は重要な工程にもかかわらず、回収検討はアップストリームの培養に比べるとあまり注力されることがない。本ラビリンチュラについても、実験室レベルで脂質定量を目的として満足な結果を与える方法はあるが、脂肪酸抽出における知見が極めて少なく、実験室の技術の域を逸していない。

これまでに、脂肪酸抽出における有機溶媒の使用は望ましくないとされてきた。溶媒は燃料に比べて高価であることが理由である。しかしながら、実際には、有機溶媒は蒸留により継続的にリサイクルが可能である。蒸留に要する熱源も、工場においては再生可能なバイオマスエネルギーにて回収可能である。また、有機溶媒使用の可否は、最終的に製造する原料の付加価値に依存するため、本時点で不適とみなすのは正しい判断とはいえない。有機溶剤のため、作業環境の整備に配慮する必要があるものの、Folch 法に類似した脂肪酸抽出法の適用を想定し、関連する手法について検討することは意義があると考えられる。

本実証では、これまでに検討された過去の脂肪酸抽出方法も交えて、ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討を行った。

3.2. 脂肪酸抽出方法の検討

ヘキサンは、植物原料からの油脂の抽出において、一般的に汎用されている有機溶媒である。第二種有機溶媒に分類され、可燃性ではあるものの、クロロホルムの使用に比べれば扱い易い溶媒である。本実証では、抽出溶媒としてヘキサンをを用いる可能性を考慮し、Folch 法との脂質抽出率の比較を行った。

<Folch 法>

1. ブross 50 g を 50 mL 遠沈管に計り取る。
2. 遠心分離し、できるだけ沈殿を捨てないように上清を除く。
3. 0.9%生理食塩水 40 mL で 2 回洗浄する。
4. 蒸留水 25 mL に懸濁する。
5. クロロホルム/メタノール (2/1) 10 mL を添加し、5 min 振とう抽出する。
6. 遠心分離する (10,000 rpm=9,100 G, 5 min)。
7. 下層を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移す。5~7 を計 5 回繰り返す。
8. ロータリーエバポレーターで乾固させる (40°C)。
9. 凍結乾燥機で溶媒を留去する (≥5 min)。
10. 精密天秤で重量を測定し、総脂質重量を算出する。

<浸透圧破碎抽出法>

1. ブロス 50 g を 50 mL 遠沈管に計り取る。
2. 遠心分離し、できるだけ沈殿を捨てないよう上清を除く。
3. 0.9%生理食塩水 40 mL で 2 回洗浄する。
4. 蒸留水 25 mL に懸濁し、1 hr 振とうする (100 rpm, 26°C)。
5. ヘキサン 10 mL を添加し、5 min 振とう抽出する。
6. 遠心分離する (10,000 rpm=9,100 G, 5 min)。
7. 上層を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移す。5~7 を計 5 回繰り返す。
8. ロータリーエバポレーターで乾固させる (40°C)。
9. 凍結乾燥機で溶媒を留去する (≥5 min)。
10. 精密天秤で重量を測定し、総脂質重量を算出する。

<浸透圧-SDS 破碎抽出法>

1. ブロス 50 g を 50 mL 遠沈管に計り取る。
2. 遠心分離し、できるだけ沈殿を捨てないよう上清を除く。
3. 0.9%生理食塩水 40 mL で 2 回洗浄する。
4. 0.1% SDS 溶液 25 mL に懸濁し、1 hr 振とうする (100 rpm, 26°C)。
5. ヘキサン 10 mL を添加し、5 min 振とう抽出する。
6. 遠心分離する (10,000 rpm=9,100 G, 5 min)。
7. 上層を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移す。5~7 を計 5 回繰り返す。
8. ロータリーエバポレーターで乾固させる (40°C)。
9. 凍結乾燥機で溶媒を留去する (≥5 min)。
10. 精密天秤で重量を測定し、総脂質重量を算出する。

先に述べたように、脂肪酸を抽出する上で水分が余分であるとはいっても、実製造において凍結乾燥などの乾燥工程を経ることは事実上ない。従って、本実証では遠心分離後の含水菌体を検体とした総脂質抽出を行い、抽出物の重量を測定した。事前の検討にて Folch 法ではほぼ総脂質を回収できることを確認している (未掲載)、本手法を 100%とした場合の相対評価を行った。

その結果、抽出溶媒としてヘキサンを用いた場合では、ほとんど脂質を回収できないという結果が示された (図 3-1)。過去に、浸透圧による破碎を組み合わせた脂質抽出が検討されているが、これに準じた方法、ならびに界面活性剤を補填した何れの方法においても、脂質抽出の効果は認められなかった。脂肪酸が脂肪酸塩となって水溶性が増し、ヘキサンへの溶解性を下げている可能性があるため、試薬の脂肪酸塩を用いたヘキサンへの溶解性検討を行う必要がある。

本実証では、Folch 法でのクロロホルム (+メタノール) を用いた手法が、総脂質の抽出において顕著に有効であるという結果となった。クロロホルムは比重が大きいため、脂肪酸を含有する抽出相は下層となる。一方で、上層からの回収する場合も考慮し、クロロホルムに頼らない抽出溶媒のスクリーニングを行った。意外にも抽出の可能性を示唆する溶媒は少なかったものの、トルエンとアセトンの組み合わせにおいて、抽出の効果が認められた (データ未掲載)。

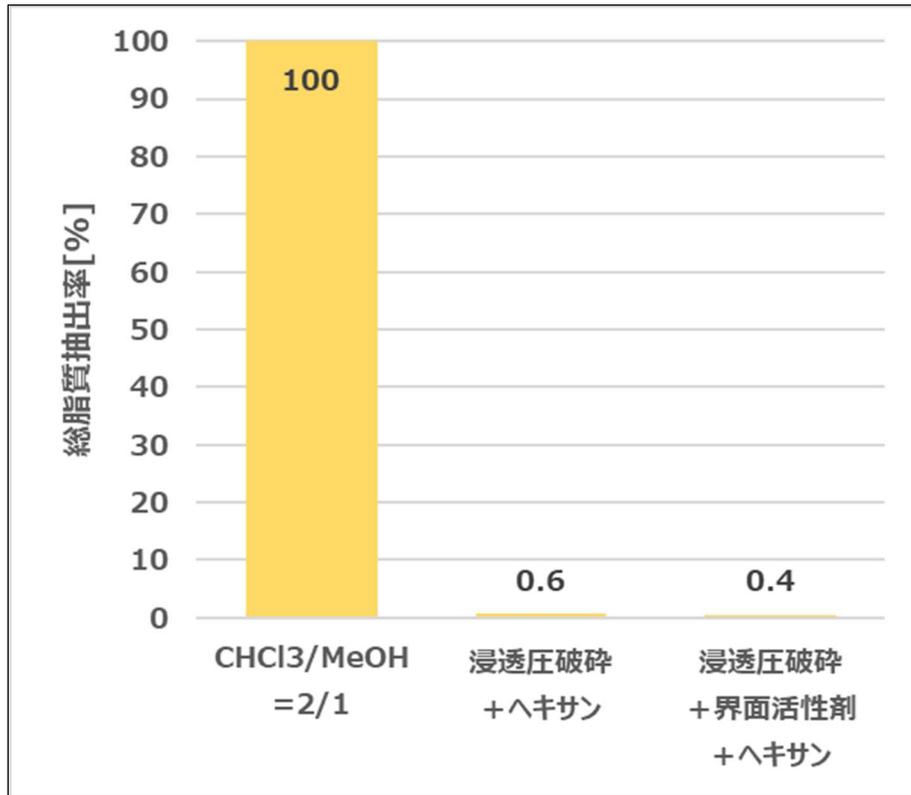


図 3-1 総脂質抽出率の相対比較

3.3. 脂肪酸抽出のスケールアップへ向けた検討

ラビリンチュラの培養終了後は、連続遠心分離機、あるいはセラミック膜ろ過などによって脂肪酸を含有した菌体を濃縮させることが想定される。含水率は 70%以上である。実験室であれば、これを更に脱水させて凍結乾燥を経てほとんどの水分を除去し、Folch 法による脂質抽出が容易に可能である。しかしながら、実製造においては、凍結乾燥工程やスプレードライ法による乾燥を経るのは、エネルギー的にもコスト的にも現実的な工程ではない。従って、濃縮した菌体スラリーから乾燥工程を経ることなく脂質を抽出・回収するのが妥当な手順である。

抽出溶媒であるクロロホルムとメタノールは、再生可能エネルギーによる熱源にて継続的にリサイクル可能であるが、投入する溶媒量は少ない方が望ましい。また、溶媒量が多いと、設備規模も大きくする必要がある。少ない原料、エネルギーで抽出できる方が望ましい。

本実証では、Folch 法を製造実機へ適用させることをイメージし、抽出に必要な溶媒量の検討を行った。

菌体スラリーの容量に対して1~7倍当量のクロロホルム/メタノール(2/1)を添加し、5分間の振とうを行い、静置後の様子を観察した。その結果、エマルション層は確認されるものの、菌体スラリー容量の7倍当量の添加で、比較的良好な分離が認められた(図3-2)。

エマルション層には、溶媒により破碎された菌体残渣と水層を中心として、有機層も含まれている。攪拌抽出時における分離剤の添加によりエマルション層を削減できる可能性はある。今後の検討要素の一つである。

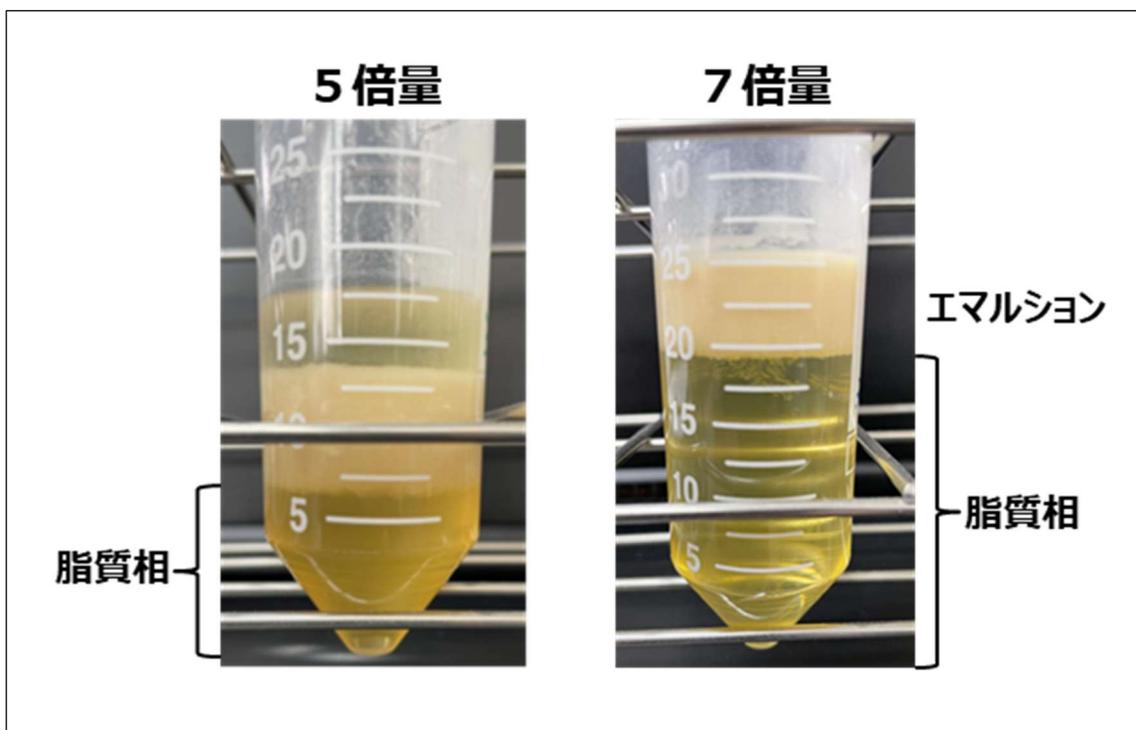


図 3-2 抽出溶媒量の検討

3.4. 本章のまとめ

本実証では、これまでに検討された過去の脂肪酸抽出方法も交えて、ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討を行った。

ラビリンチュラ由来の総脂質を抽出する既存の方法として、実験室レベルで用いられる Folch 法がある。クロロホルムとメタノールの両極性の溶媒で脂質を回収することを特徴とする。しかしながら、製造実機に適用できる実験データが存在しない。有機溶剤のため作業環境の整備に配慮する必要はあるものの、Folch 法に類似した脂肪酸抽出法の適用を想定した関連する手法の検討は意義があると考えた。

ヘキサンは、可燃性ではあるものの、クロロホルムの使用に比べれば扱い易い溶媒である。本実証では、抽出溶媒としてヘキサンを用いる可能性を考慮し、Folch 法との脂質抽出率の比較を行った。その結果、抽出溶媒としてヘキサンを用いた場合では、ほとんど脂質を回収できず、Folch 法でのクロロホルム(+メタノール)を

用いた手法が脂質抽出に顕著に有効であることが示された。

これを受けて、Folch 法のスケールアップへ向けた検討を行った。抽出に際し、投入する溶媒量は、設備上、エネルギー上で少ない方が望ましい。検討の結果、エマルション層は確認されるものの、菌体スラリー容量の7倍当量の添加で比較的良好な分離が認められた。エマルション層が確認されたものの、分離剤の添加によりこれを削減できる余地はあり、製造実機での脂肪酸の抽出において、クロロホルムを用いた脂質抽出法を適用できる可能性があるものと考察した。

4. パルプ粕由来バイオプラスチックの合成と成形特性評価

4.1. 概要

バイオマス資源であるパルプ粕に脂肪酸エステル化（図 4-1）を施した、エステル化パルプ粕の合成を行った結果を報告する（図 4-2）。

Aurantiochytrium sp. mh1915 株が産生する主要な脂肪酸は、パルミチン酸（50.7%）とドコサヘキサエン酸（DHA : docosahexaenoic acid, 35.7%）である（2.4.2.参照）。まずは、理論上は生物成分率 100%のバイオプラスチック合成品を得ることを目的として、脂肪酸の中でも安価で大量に入手可能なパルミチン酸（C16:0）を用い、水酸基置換度が飽和であるパルミトイル化パルプの合成を試み、得られた化合物に対して熱物性を評価した。次いで、水酸基置換度の相違がバイオプラスチックの熱物性に及ぼす影響を調べるために、異なる水酸基置換度の合成品の調製を行った。併せて機械物性についても評価した。不飽和脂肪酸を副資材とした合成品の調製と物性評価を目的として、ドコサヘキサエン酸（DHA）を用いたバイオプラスチックの調製を試みた。

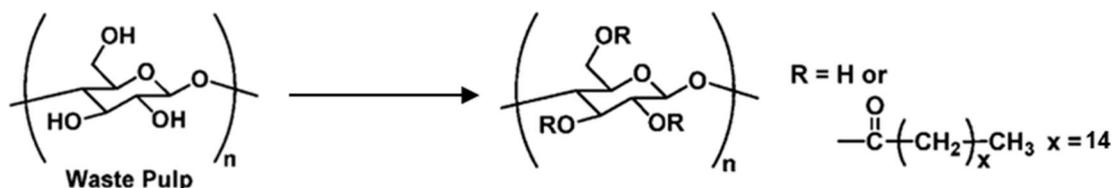


図 4-1 パルプ粕への脂肪酸の付加（例：パルミチン酸）

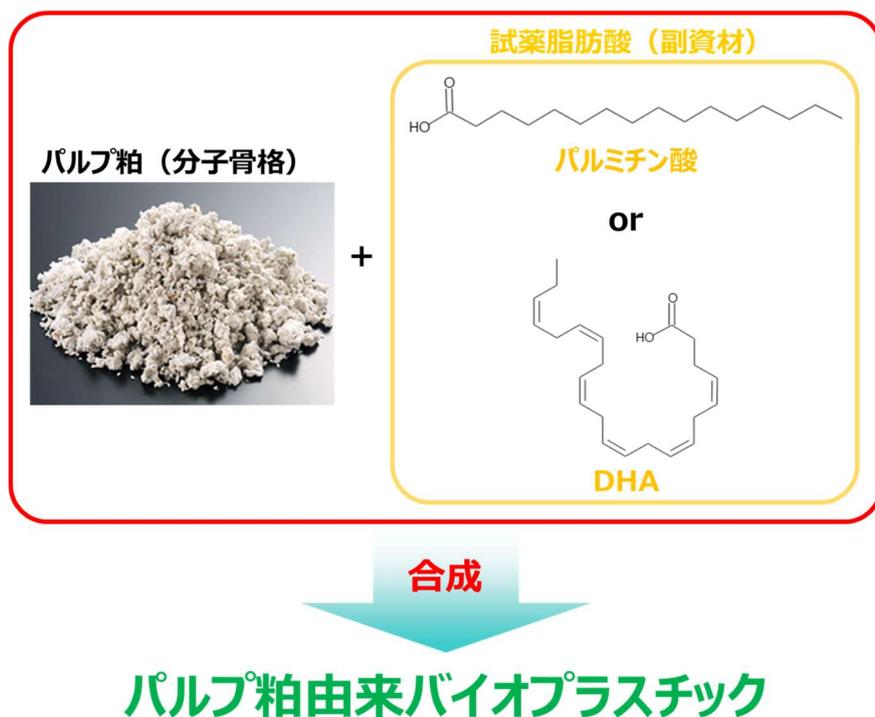


図 4-2 本実証事業におけるバイオプラスチックの合成

4.2. 廃パルプ、セルロースパーティクル、パルプ粕について

公式には廃パルプという文言は存在しない。製紙過程の産物である廃棄されるパルプ由来の粕、品質規格外で廃棄されるバージンパルプ、品質が悪く廃棄される古紙パルプなど、パルプを由来とする廃棄物を総じて、広く「廃パルプ」と呼称している。本実証事業では、パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクルを分子骨格として用いることを本質とするが、これも廃パルプの一つとしている。

2G バイオエタノール製造では、主要な炭素源としてパルプ等の利用を想定するものの、現在はそのサプライチェーンが構築段階にあるため、セルラーゼによるパルプの糖化が、製紙工場で継続的に実施されているわけではなく、セルロースパーティクルの決まった供給元も存在しない。従って、セルロースパーティクルを入手するには自製する以外の方法が存在しない。我々のグループでは、パルプ糖化液を調製する要素技術を有しており、副産物であるセルロースパーティクルの調製は可能ではあるが、そもそも残渣の利用を目的としていないため、在庫を有していない。バイオプラスチック合成用の副資材として用いるためには、新たに調製する、又はこれに代わる廃パルプの用意が必要であった。

パルプのセルラーゼ糖化後の副産物であるセルロースパーティクルは、数 μm ～数百 μm の短繊維状のセルロースである（図 4-3）。これに類似したものとして「パルプ粕」がある（図 4-4）。製紙過程の抄子工程で生じるセルロースであり、凝集剤を加えて塊状として回収される。通常は、焼却あるいは埋め立て処分されるため、安価（マテリアルコストフリー）に利用することができる。また、パルプ粕を含めセルロースは地球上で最も多い天然高分子であるため、バイオマス資源としての供給能力が高く、さらに生分解性有機物であることから、環境に配慮した材料の合成において、格好の合成原料である。

本事業では、このパルプ粕（日本製紙クレシア株式会社より分譲）をバイオプラスチックの分子骨格として使用した。

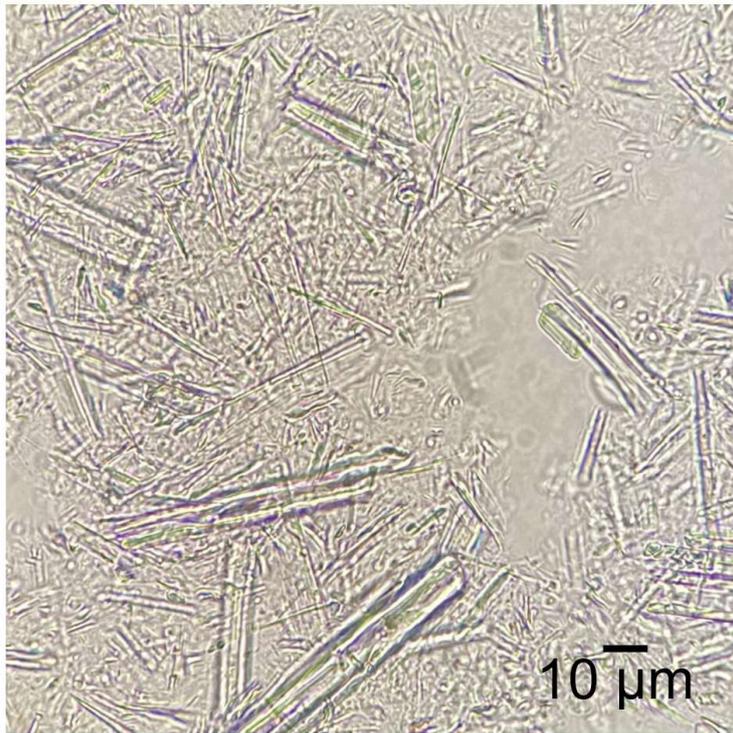


図 4-3 セルロースパーティクル

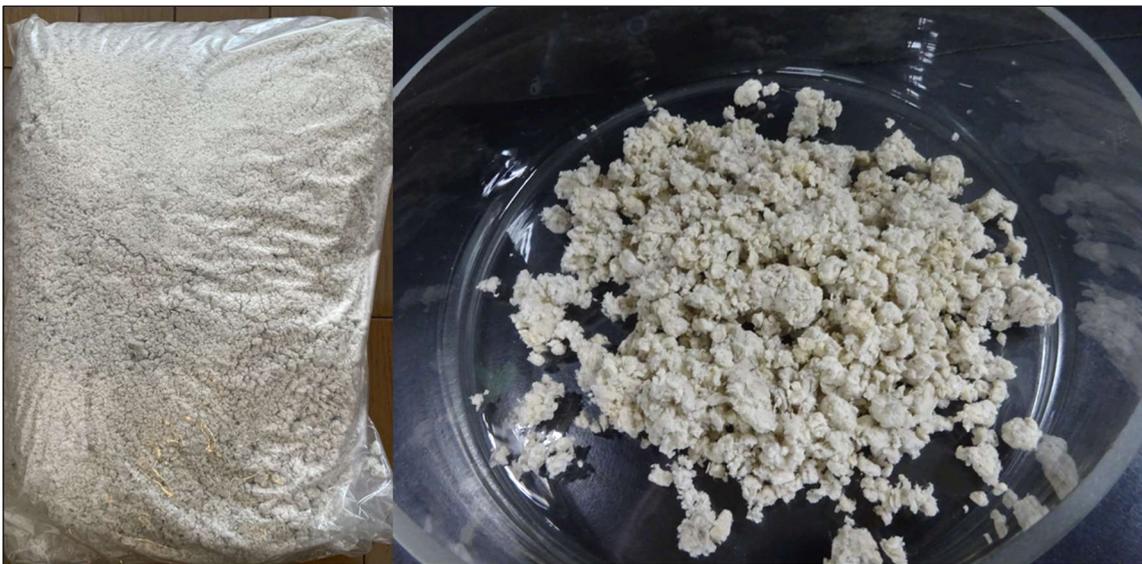


図 4-4 本実証事業で用いた初発原料であるパルプ粕

4.3. 脂肪酸について

我々のグループは、1 kL 培養タンクにてラビリンチュラを培養する要素技術を有しており、ラビリンチュラの高密度培養方法の検討は進んでいる一方で、培養菌体から製造規模の設備を用いて事業性を以て脂肪酸を回収する技術については、現時点において途上であり確立されていない。総脂質の定量を目的に実施する、小スケールの抽出方法（Folch 法）のみである。従って、セルロースパーティクルと同様に、直ちに使用可能なラビリンチュラ由来の脂肪酸を保有していないため、バイオプラスチック合成用の副資材として用いるためには、ラボスケールの機器を用いて地道に脂肪酸抽出を繰り返す、またはこれに代わる脂肪酸の使用が必然であった。

本実証事業では、後者を採用し、ラビリンチュラ由来脂肪酸ではない試薬脂肪酸をバイオプラスチックの副資材として使用した。

4.4. 合成：パルミチン酸変性パルプ

まず、パルプ粕の精製をイオン交換水と塩酸水を用いて行った^[4.1]。結果、精製パルプ粕 119 g を得た（収率 24%）。

次に、得られたパルプ粕、パルミチン酸を酸クロライド化した化合物である塩化パルミトイルを用いてエステル化検討を行った（表 4-1）。まずは、水準 1 にて水酸基置換度 3.0 を狙い合成を行ったところ、目的とする置換度 3.0 のサンプルが得られた。

次に、水準 2~4 で置換度を下げるために塩化パルミトイルの当量を下げて合成検討を行ったが、置換度は 2.5 に収束した。今回行っている合成法では、反応後のパルプに対してクロロホルムに可能な部分を回収している。今回の結果から、クロロホルムに可溶化するためには置換度が平均値で 2.5 以上必要となっており、置換度が低くクロロホルムへの溶解度の低い部分については回収できていないと推察される。その結果、塩化パルミトイルの当量を減らした場合でも得られるサンプルの置換度は下がらず、収率のみが低下したと考えられる。この結果を考慮し、水準 4 の条件にてスケールアップ合成を実施し、水酸基置換度 2.5 のサンプル 74.3 g を得た。

合成品が得られた一方で、置換度 2.5 のサンプルでは、示差走査熱量測定（DSC : Differential Scanning Calorimetry）にて明確なガラス転移温度や融点は観察されなかった。これは変性反応が不均一状態で進行しているため、セルロース中の置換度にばらつきが生じてしまうために、DSC にて明確なピークが観察されなかったものと推察される（置換度 3.0 であれば水酸基がパルミチン酸飽和に置換されているため、基本的にばらつきがなくピークが出やすい）。そこで、得られたサンプルを簡易的にホットプレート上で加熱を行うと、175~200°C 程度で軟化することは確認できたことから、熱可塑性自体は有していると考えられた。

最後に、水酸基置換度 2.5 のスケールアップ合成品について引張試験を実施した。その結果、150°C、100 kN で熱プレスすることで試験片を作製することができた。このことから熱可塑性を有していることが示された。引張試験結果については後述する。

表 4-1 パルミチン酸変性パルプの水準・結果一覧

項目	水準 1	水準 2	水準 3	水準 4	水準 4 スケールアップ ^o	
Lot	221202MO	221220MO	221225MO	230111MO	230116MO	
パルプ仕込み量	10.0g	10.0g	5.00g	5.00g	22.00g	
塩化 ^o セルトール 仕込み当量 (vs グルコースユニット)	3.0 当量	1.5 当量	1.0 当量	2.0 当量	2.0 当量	
収量	46.2g	26.3g	5.3g	16.3g	74.3g	
収率	85%	82%	43%	83%	86%	
置換度	3.0	2.5	2.5	2.5	2.5	
融点	69.4℃	未測定	未測定	未検出	未検出	
分子量	Mn	41,816	未測定	未測定	未測定	32,950
	Mw/Mn	3.6	未測定	未測定	未測定	3.3

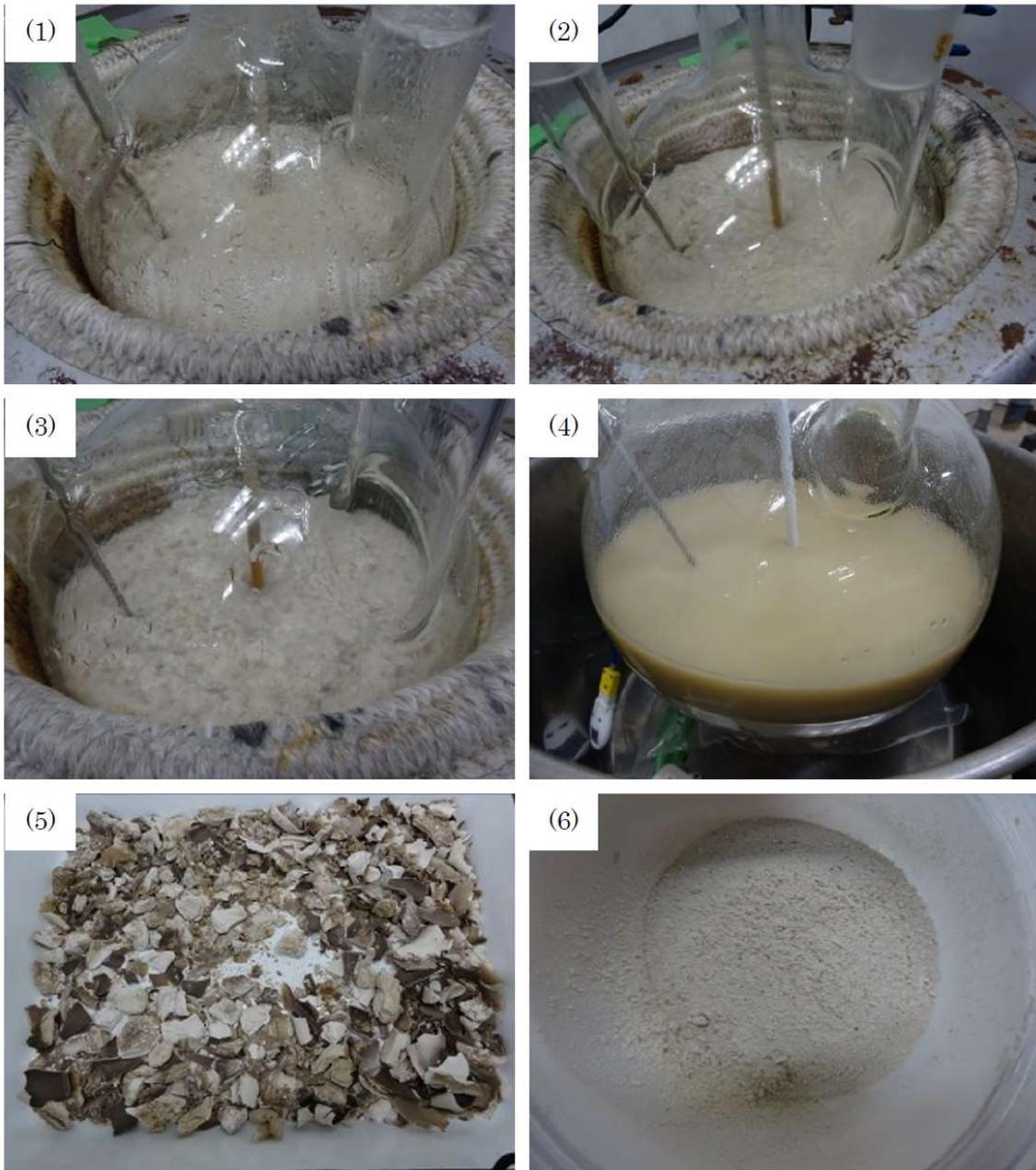
各合成品のその他情報

- 精製済みパルプ粕 Lot : 221105MO NET : 59 g
- パルミチン酸変性パルプ (置換度 : 3.0) Lot : 221202MO NET : 20 g、25 g
- パルミチン酸変性パルプ (置換度 : 2.5) Lot : 221220MO NET : 25 g
- パルミチン酸変性パルプ (置換度 : 2.5) Lot : 221225MO NET : 5 g
- パルミチン酸変性パルプ (置換度 : 2.5) Lot : 230111MO NET : 15 g
- パルミチン酸変性パルプ (置換度 : 2.5) Lot : 230116MO NET : 67 g

4.4.1. パルプ粕の精製

<実験 (図4-5) >

1. 5 L の 4 つ口のフラスコにイオン交換水 (2.5 L) とパルプ粕 (500.00 g) を投入し、攪拌翼をセットした。
2. マントルヒーターで還流する温度 (内温約 100°C) まで昇温し、2 時間還流させた。
3. 内温が 60°C程度になるまで氷冷した。
4. 吸引ろ過で固体を回収した。
5. 1 から 4 の操作を計 3 回行った。
6. 10 L の 4 つ口フラスコに (5) で回収した固体と 2 M の塩酸水溶液 (5 L) を投入し、攪拌翼をセットした。
7. マントルヒーターで還流する温度 (内温約 100°C) まで昇温し、2 時間還流させた。
8. 吸引ろ過と遠心分離で固体を回収した (以下)。
9. 1 L の遠心管に反応液を 4 等分し、15,000 rpm で 5 分間の条件で遠心分離を行った。
10. 上澄みを取り除き、5 L のプラスチック製容器に回収した固体と水道水 (3 L) を投入し、10 分間攪拌した。
11. 1 L の遠心管に反応液を 4 等分し、15,000 rpm で 5 分間の条件で遠心分離を行った。
12. 上澄みを取り除き、5 L のプラスチック製容器に回収した固体と水道水 (3 L) を投入し、10 分間攪拌した。
13. 11 から 12 の操作を計 5 回行った。なお、5 回目の上澄み液の pH は 6 程度となった。
14. 回収した固体を 60°Cで 48 時間の減圧乾燥を行った。
15. 乾燥後の固体をミキサーで粉碎し、粉末状パルプ粕 (118.91 g) を得た。



- (1) 凝集剤の除去操作：1st.2時間還流後
- (2) 凝集剤の除去操作：2nd.2時間還流後
- (3) 凝集剤の除去操作：3rd.2時間還流後
- (4) 塩酸処理 2時間還流後
- (5) 減圧乾燥 48 時間後
- (6) ミキサーで粉碎後

図4-5 パルプ粕の精製

4.4.2. パルミチン酸変性パルプの合成（塩化パルミトイルを用いたエステル化）

4.4.2.1. 水準 1（パルミチン酸仕込み当量 3.0, 置換度 3.0）

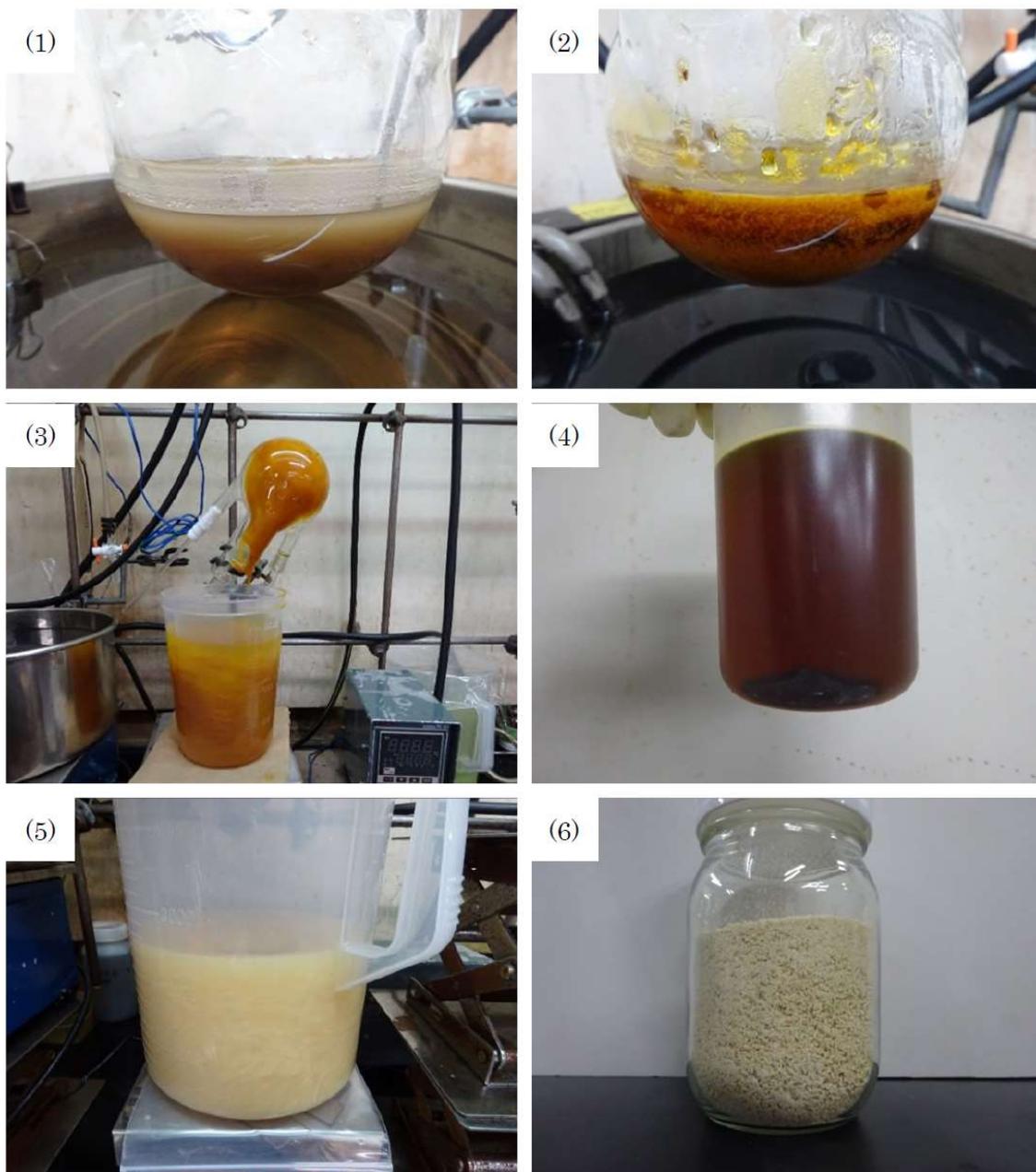
<実験（表 4-2, 図 4-6）>

1. 500 mL の 4 つフラスコに、精製パルプ、ピリジンを仕込み、スターラーチップ、Ar ライン、ディーンスターク管、温度計をセット
2. Ar を 300mL/min でフローしながら、内温を 100°C に昇温し、24 時間加熱を行った。（脱水のためにディーンスターク管に留去したピリジン（約 17 mL）は廃棄した。
3. 内温を 0°C に冷却後、塩化パルミトイルを滴下した（塩化パルミトイルが低温化で凝固したため、以降は室温で滴下した）。
4. その後、内温を徐々に昇温し、内温 113°C で 21 時間反応を行った。
5. 反応終了後、室温まで冷却した。
6. 反応液をメタノール（2 L）に滴下し、再沈殿を行った。
7. 滴下完了後、30 分間攪拌した後、吸引ろ過にて固体を回収した。
8. 固体を再度メタノール（1 L）中で 30 分間攪拌した。
9. 30 分間攪拌したのち、吸引ろ過にて固体を回収し、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
10. 乾燥した固体をクロロホルム（300 mL）に溶解した後、遠心分離（20,000 G×10 分間）を行った。
11. 上澄みをメタノール（2L）に滴下し、再沈殿を行った。
12. 吸引ろ過にて固体を回収したのち、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
13. 乾燥した固体をクロロホルム（300 mL）に溶解した。
14. 溶解した溶液をメタノール（2 L）に滴下し、再沈殿を行った。
15. 吸引ろ過にて固体を回収後、メタノール（500 mL）で掛け洗いをを行った。
16. 回収した固体を 50°C で 48 時間減圧乾燥を行い、最終サンプルとした（収量：46.2 g、収率：85%）。

表 4-2 合成処方（水準 1）

試薬	MW	eq	mmol	g	mL
精製パルプ	162	1.0	62 ^{*1}	10.00	-
ピリジン	79	-	-	-	212
塩化パルミトイル	275	3.0	185	50.90	-

※1. グルコースユニットのモル数



- (1) ピリジンで 24 時間加熱後 (2) 塩化パルミトイル添加し 21 時間反応後
 (3) 反応液の再沈殿の様子 (4) クロロホルム溶液遠心分離後
 (5) 再沈殿 (3 回目) の様子 (6) 最終サンプル

図 4-6 仕込み当量 3.0 の様子

<分析：置換度／¹H-NMR（重クロロホルム、400 MHz）>

合成したサンプルを NMR で測定したところ、セルロース由来のピーク（1～6）とパルミチン酸由来のピーク（a～d）が観察され、目的のエステル化が進行していることを確認した。また、置換度は 3.0^{※1} となった（図 4-7）。

※1：NMR 結果から、計算上は置換度が 3.1 となったが、理論上の最大である 3.0 を採用した。

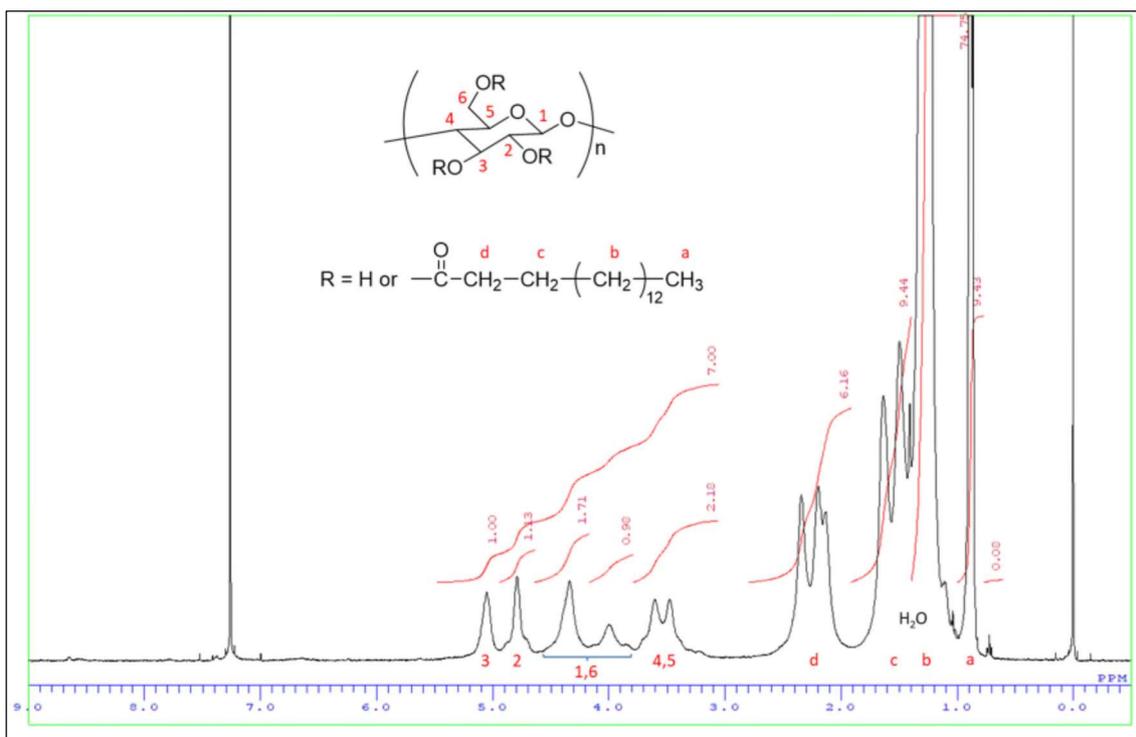


図 4-7 ¹H-NMR チャート（水準 1）

<分析：熱物性（融点、結晶化温度）／DSC>

合成したサンプルを DSC で測定したところ、融点は 69.4℃、結晶化温度は 60.3℃であった（図 4-8）。

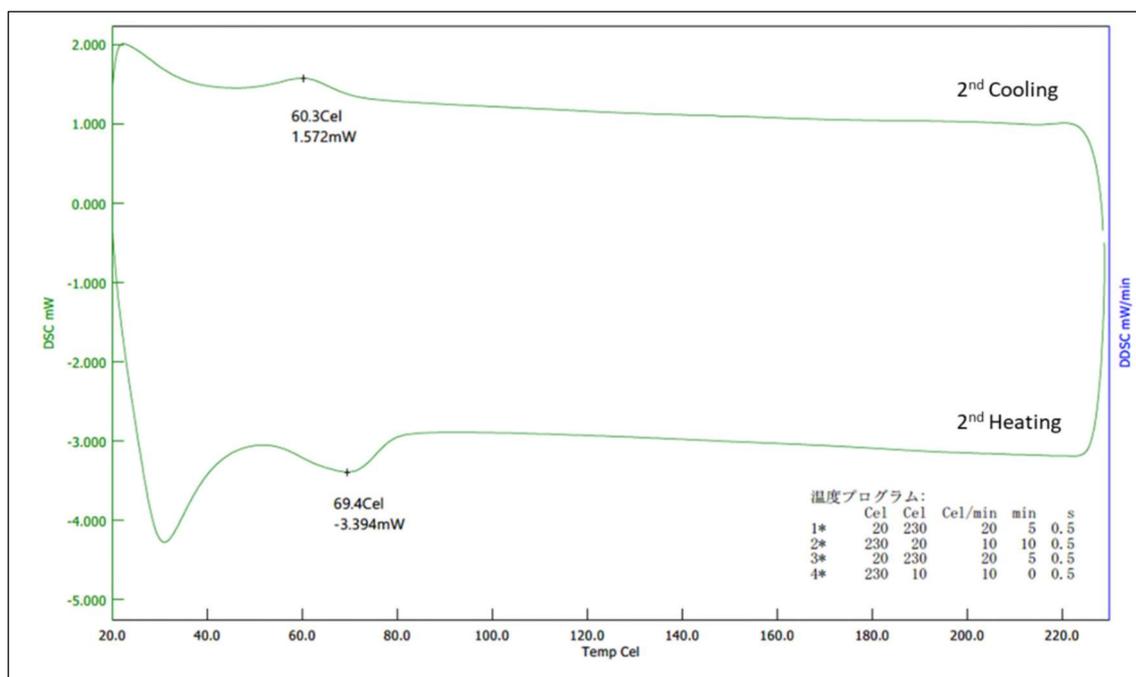


図 4-8 DSC チャート (水準 1)

<分析：分子量／ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC*）>

*GPC：Gel Permeation Chromatography

◆ 測定条件

カラム： Shodex KF-805L×2 本

溶媒： THF

スタンダード： ポリスチレン

検出器： RI

合成したサンプルを GPC にて分子量を測定したところ、Mn が 4.2 万となった（図 4-9）。

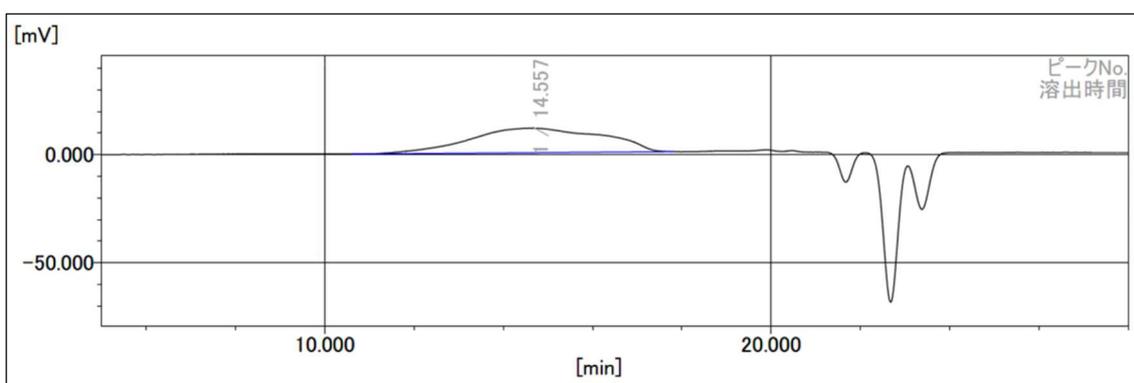


図4-9 GPCチャート（水準1）

$$M_n = 41,816$$

$$M_w = 150,269$$

$$M_w/M_n = 3.6$$

4.4.2.2. 水準 2 (パルミチン酸仕込み当量 1.5, 置換度 2.5)

<実験 (表 4-3) >

1. 500 mL の 4 つ口のフラスコに、精製パルプ、ピリジンを仕込み、スターラーチップ、Ar ライン、ディーンスターク管、温度計をセットした。
2. Ar を 300 mL/min でフローしながら、内温を 100°C に昇温し、24 時間加熱を行った (脱水のためにディーンスターク管に留去したピリジン (約 15 mL) は廃棄した)。
3. 内温を室温まで冷却後、塩化パルミトイルを滴下した。
4. その後、内温を徐々に昇温し、内温 113°C で 21 時間反応を行った。
5. 反応終了後、室温まで冷却した。
6. 反応液をメタノール (1.2 L) に滴下し、再沈殿を行った。
7. 滴下完了後、30 分間攪拌した後、吸引ろ過にて固体を回収した。
8. 固体を再度メタノール (0.6 L) 中で 30 分間攪拌した。
9. 30 分間攪拌したのち、吸引ろ過にて固体を回収し、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
10. 乾燥した固体をクロロホルム (176 mL) に溶解した後、遠心分離 (20,000 G×10 分間) を行った。
11. 上部に少量のゲル状の不溶物が見られたが、ゲルを除去せず、ゲルと上澄みをメタノール (1.2 L) に滴下し、再沈殿を行った。
12. 吸引ろ過にて固体を回収したのち、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
13. 乾燥した固体をクロロホルム (176 mL) に溶解した。
14. 溶解した溶液をメタノール (1.2 L) に滴下し、再沈殿を行った。
15. 吸引ろ過にて固体を回収後、メタノール (300 mL) で掛け洗いをを行った。
16. 回収した固体を 50°C で 48 時間減圧乾燥を行い、最終サンプルとした (収量 : 26.3 g、収率 : 82%)。

表 4-3 合成処方 (水準 2)

試薬	MW	eq	mmol	g	mL
精製パルプ	162	1.0	62 ^{*1}	10.00	-
ピリジン	79	-	-	-	212
塩化パルミトイル	275	3.0	93	25.45	-

※1. グルコースユニットのモル数

<分析：置換度／¹H-NMR（重クロロホルム、400 MHz）>

合成したサンプルを NMR で測定したところ、セルロース由来のピーク（1～6）とパルミチン酸由来のピーク（a～d）が観察され、目的のエステル化が進行していることを確認した（図 4-10）。また、置換度は 2.5 となった。

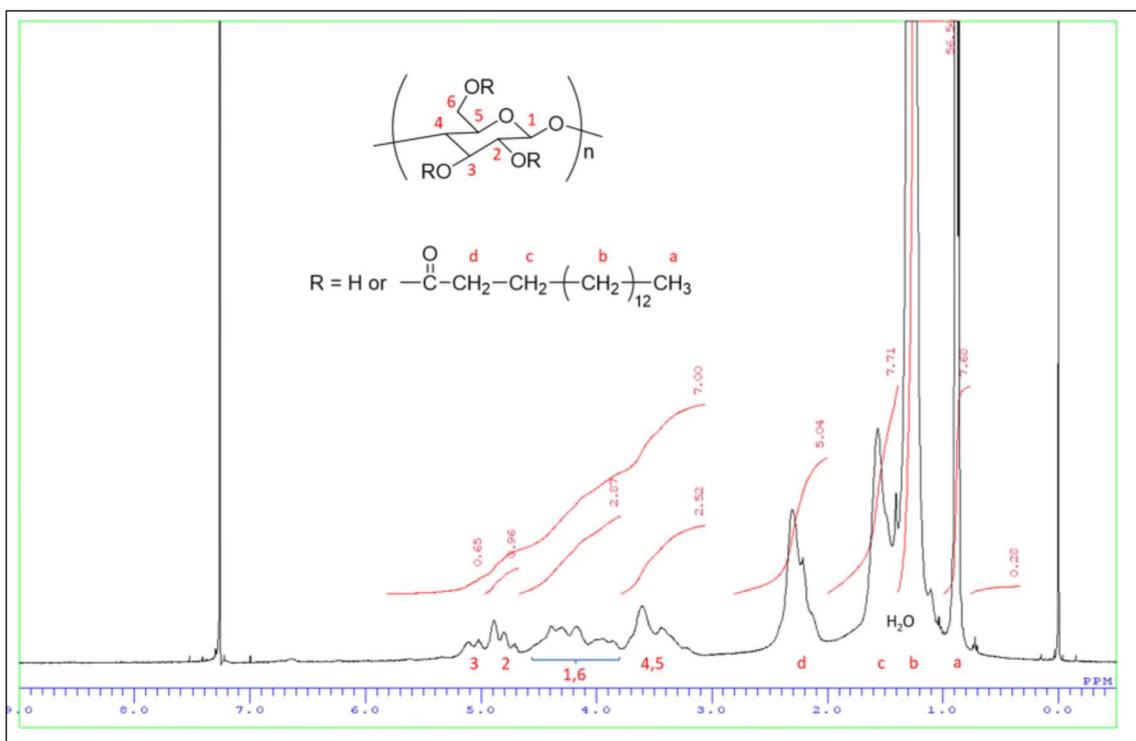


図 4-10 ¹H-NMR チャート（水準 2）

4.4.2.3. 水準3 (パルミチン酸仕込み当量 1.0, 置換度 2.5)

<実験 (表 4-4) >

1. 300 mL の4つ口のフラスコに、精製パルプ、ピリジンを仕込み、スターラーチップ、Ar ライン、ディーンスターク管、温度計をセットした。
2. Ar を 300 mL/min でフローしながら、内温を 100°C に昇温し、24 時間加熱を行った。(脱水のためにディーンスターク管に留去したピリジン (約 8 mL) は廃棄した)。
3. 内温を室温まで冷却後、塩化パルミトイルを滴下した。
4. その後、内温を徐々に昇温し、内温 113°C で 21 時間反応を行った。
5. 反応終了後、室温まで冷却した。
6. 反応液をメタノール (0.6 L) に滴下し、再沈殿を行った。
7. 滴下完了後、15 分間攪拌した後、吸引ろ過にて固体を回収した。
8. 固体を再度メタノール (0.3 L) 中で 15 分間攪拌した。
9. 15 分間攪拌したのち、吸引ろ過にて固体を回収し、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
10. 乾燥した固体をクロロホルム (100 mL) に溶解した後、遠心分離 (20,000 G×10 分間) を行った。
11. 上部にゲル状の不溶物が見られたため、ゲルを除去した後、上澄みをメタノール (0.6 L) に滴下し、再沈殿を行った。
※このゲル部分は、置換度が低くてクロロホルムに溶解しきれない部分と推察された。
12. 吸引ろ過にて固体を回収したのち、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
13. 乾燥した固体をクロロホルム (100 mL) に溶解した。
14. 溶解した溶液をメタノール (0.6 L) に滴下し、再沈殿を行った。
15. 吸引ろ過にて固体を回収後、メタノール (150 mL) で掛け洗いをを行った。
16. 回収した固体を 50°C で 24 時間減圧乾燥を行い、最終サンプルとした (収量 : 5.3 g、収率 : 43%)。

表 4-4 合成処方 (水準 3)

試薬	MW	eq	mmol	g	mL
精製パルプ	162	1.0	31*1	5.00	-
ピリジン	79	-	-	-	106
塩化パルミトイル	275	1.0	31	8.48	-

※1. グルコースユニットのモル数

<分析：置換度／¹H-NMR（重クロロホルム、400 MHz）>

合成したサンプルを NMR で測定したところ、セルロース由来のピーク（1～6）とパルミチン酸由来のピーク（a～d）が観察され、目的のエステル化が進行していることを確認した（図 4-11）。また、置換度は 2.5 となった。

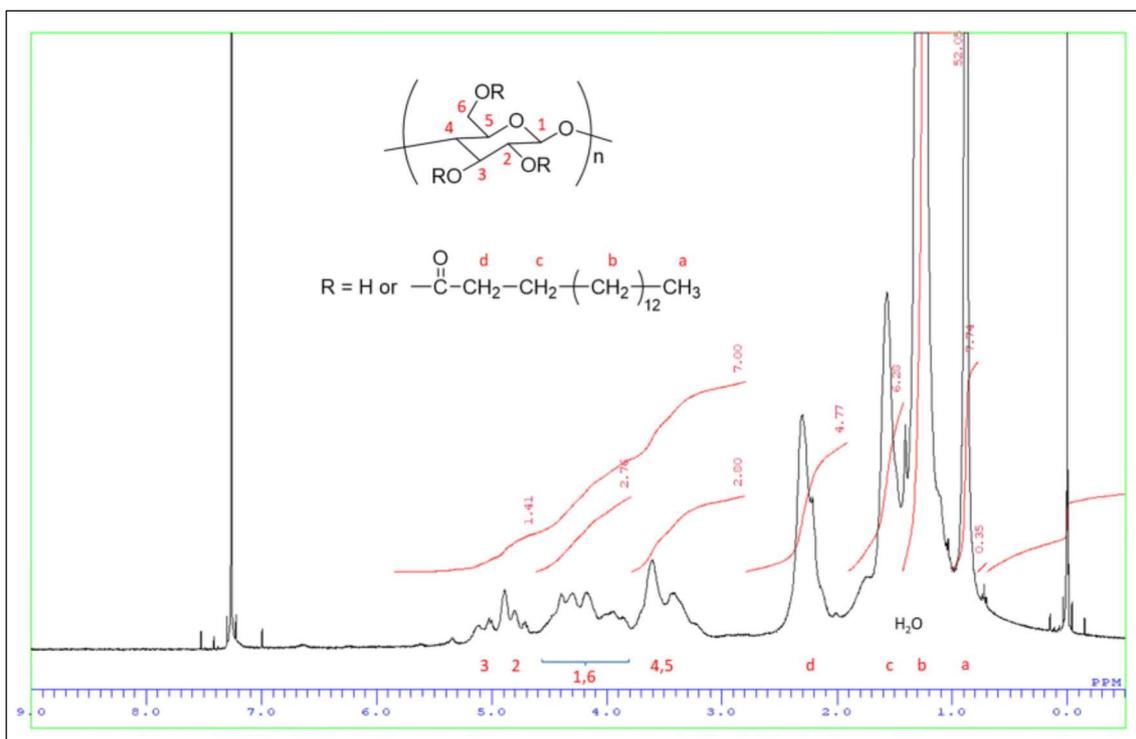


図 4-11 ¹H-NMR チャート（水準 3）

4.4.2.4. 水準4 (パルミチン酸仕込み当量 2.0, 置換度 2.5)

<実験 (表 4-5) >

1. 300 mL の4つ口のフラスコに、精製パルプ、ピリジンを仕込み、スターラーチップ、Ar ライン、ディーンスターク管、温度計をセットした。
2. Ar を 300 mL/min でフローしながら、内温を 100°C に昇温し、24 時間加熱を行った (脱水のためにディーンスターク管に留去したピリジン (約 11 mL) は廃棄した)。
3. 内温を室温まで冷却後、塩化パルミトイルを滴下した。
4. その後、内温を徐々に昇温し、内温 113°C で 21 時間反応を行った。
5. 反応終了後、室温まで冷却した。
6. 反応液をメタノール (0.75 L) に滴下し、再沈殿を行った。
7. 滴下完了後、15 分間攪拌した後、吸引ろ過にて固体を回収した。
8. 固体を再度メタノール (0.75 L) 中で 15 分間攪拌した。
9. 15 分間攪拌したのち、吸引ろ過にて固体を回収し、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
10. 乾燥した固体をクロロホルム (110 mL) に溶解した後、遠心分離 (20,000 G×10 分間) を行った。
11. 上澄みをメタノール (0.75 L) に滴下し、再沈殿を行った。
12. 吸引ろ過にて固体を回収したのち、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
13. 乾燥した固体をクロロホルム (110 mL) に溶解した。
14. 溶解した溶液をメタノール (0.75 L) に滴下し、再沈殿を行った。
15. 吸引ろ過にて固体を回収後、メタノール (150 mL) で掛け洗いをを行った。
16. 回収した固体を 50°C で 24 時間減圧乾燥を行い、最終サンプルとした (収量 : 16.3 g、収率 : 83%)。

表 4-5 合成処方 (水準 4)

試薬	MW	eq	mmol	g	mL
精製パルプ	162	1.0	31 ^{*1}	5.00	-
ピリジン	79	-	-	-	106
塩化パルミトイル	275	2.0	62	16.97	-

※1. グルコースユニットのモル数

<分析：置換度／¹H-NMR（重クロロホルム、400 MHz）>

合成したサンプルを NMR で測定したところ、セルロース由来のピーク（1～6）とパルミチン酸由来のピーク（a～d）が観察され、目的のエステル化が進行していることを確認した（図 4-12）。また、置換度は 2.5 となった。

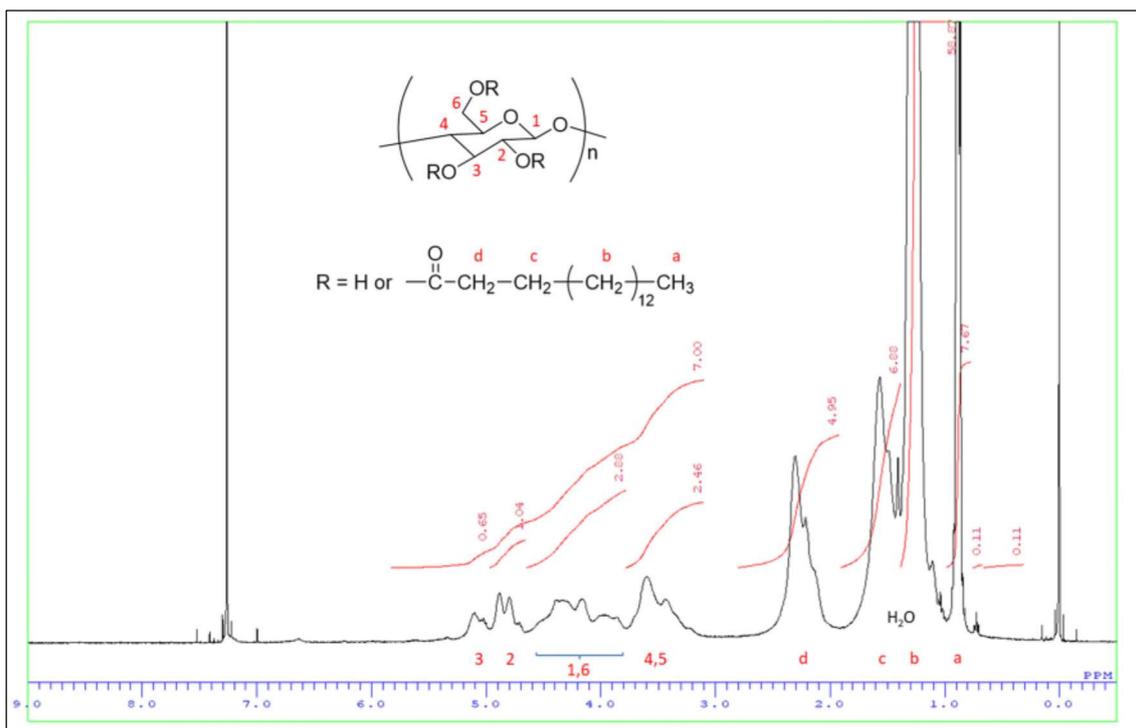


図 4-12 ¹H-NMR チャート（水準 4）

4.4.2.5. 水準4（パルミチン酸仕込み当量 2.0, 置換度 2.5）スケールアップ合成

<実験（表 4-6）>

1. 1Lの4つ口のフラスコに、精製パルプ、ピリジンを仕込み、スターラーチップ、Arライン、ディーンスターク管、温度計をセットした。
2. Arを300 mL/minでフローしながら、内温を100°Cに昇温し、24時間加熱を行った（脱水のためにディーンスターク管に留去したピリジン（約8 mL）は廃棄した）。
3. 内温を室温まで冷却後、塩化パルミトイルを滴下した。
4. その後、内温を徐々に昇温し、内温113°Cで21時間反応を行った。
5. 反応終了後、室温まで冷却した。
6. 反応液をメタノール（3.2 L）に滴下し、再沈殿を行った。
7. 滴下完了後、15分間攪拌した後、吸引ろ過にて固体を回収した。
8. 固体を再度メタノール（3.2 L）中で15分間攪拌した。
9. 15分間攪拌したのち、吸引ろ過にて固体を回収し、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
10. 乾燥した固体をクロロホルム（480 mL）に溶解した後、遠心分離（20,000 G×10分間）を行った。
11. 上澄みをメタノール（3.2 L）に滴下し、再沈殿を行った。
12. 吸引ろ過にて固体を回収したのち、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
13. 乾燥した固体をクロロホルム（480 mL）に溶解した。
14. 溶解した溶液をメタノール（3.2 L）に滴下し、再沈殿を行った。
15. 吸引ろ過にて固体を回収後、メタノール（1 L）で掛け洗いをを行った。
16. 回収した固体を50°Cで24時間減圧乾燥を行い、最終サンプルとした（収量：74.3 g、収率：86%）。

表 4-6 合成処方（水準4スケールアップ合成）

試薬	MW	eq	mmol	g	mL
精製パルプ	162	1.0	136 ^{※1}	22.00	-
ピリジン	79	-	-	-	466
塩化パルミトイル	275	2.0	272	74.66	-

※1. グルコースユニットのモル数

<分析：置換度／¹H-NMR（重クロロホルム、400 MHz）>

合成したサンプルを NMR で測定したところ、セルロース由来のピーク（1～6）とパルミチン酸由来のピーク（a～d）が観察され、目的のエステル化が進行していることを確認した（図 4-13）。また、置換度は 2.5 となった。

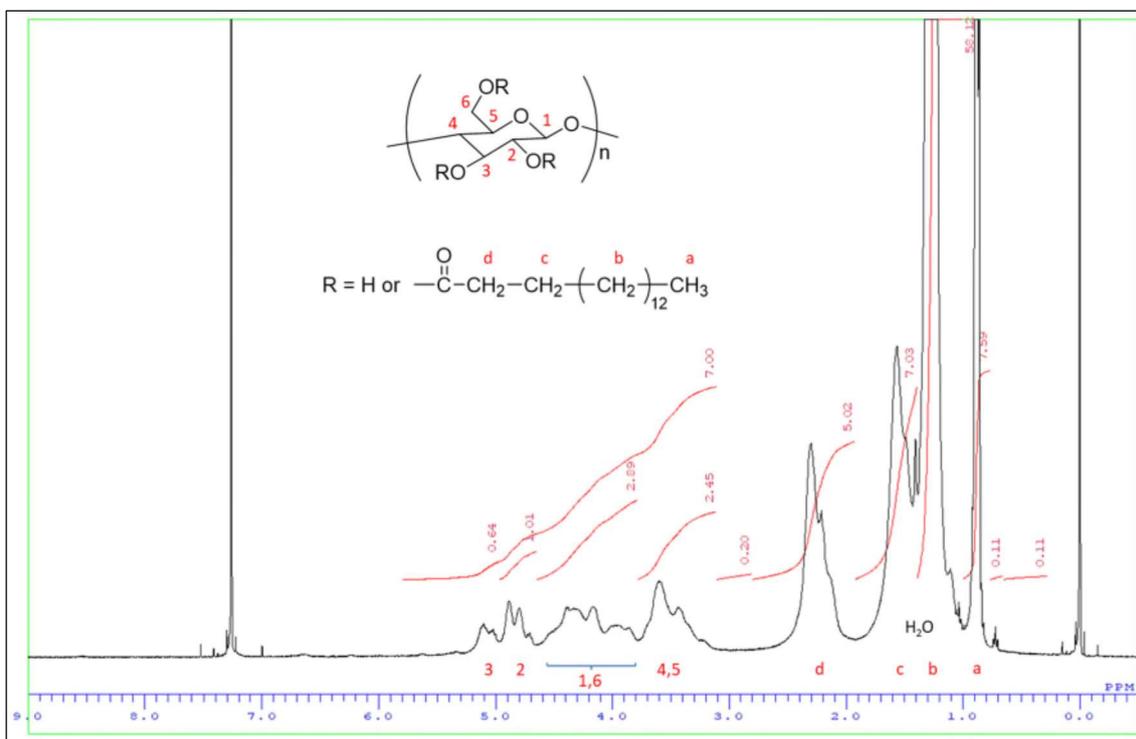


図 4-13 ¹H-NMR チャート（水準 4 スケールアップ合成）

<分析：熱物性（融点、結晶化温度）／DSC>

合成したサンプルを DSC で測定したところ、明確なガラス転移温度や融点は観察されなかった（図 4-14）。

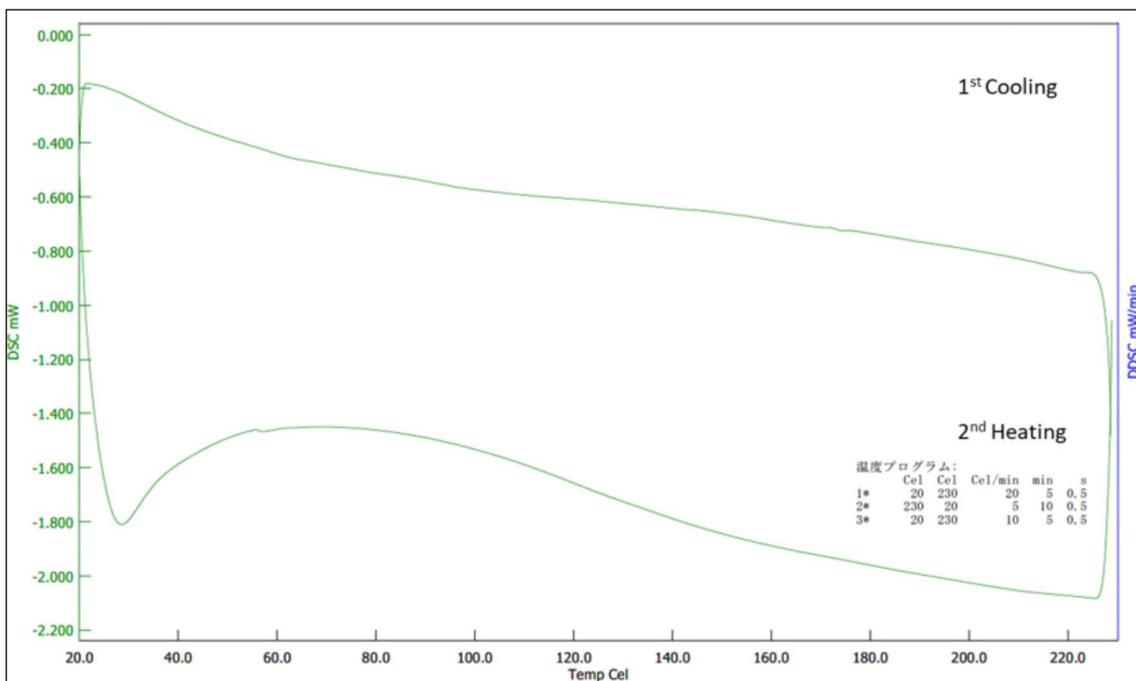


図 4-14 DSC チャート（水準 4 スケールアップ合成）

<分析：分子量／ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）>

◆ 測定条件

- カラム : Shodex KF-805L×2 本
- 溶媒 : THF
- スタンダード : ポリスチレン
- 検出器 : RI

合成したサンプルを GPC にて分子量を測定したところ、水準 1 対比分子量が小さい結果となった（図 4-15）。

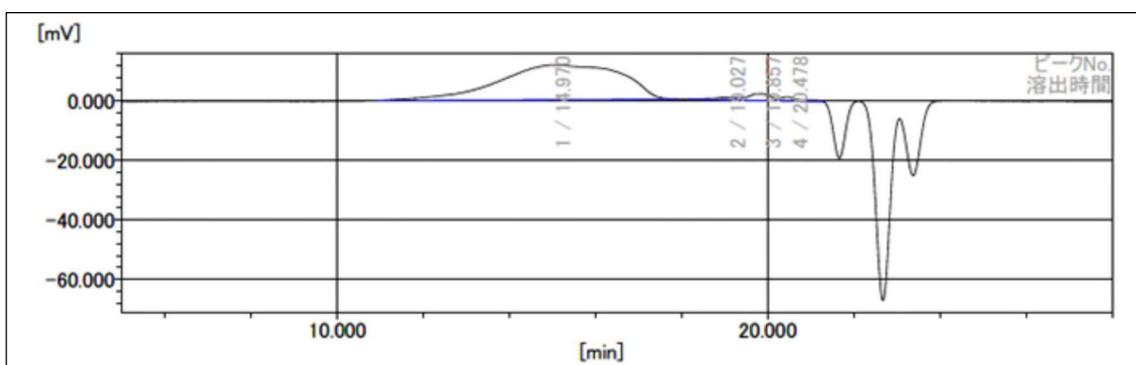


図 4-15 GPC チャート（水準 4 スケールアップ合成）

$M_n = 32,950$
 $M_n = 110,184$
 $M_w/M_n = 3.3$

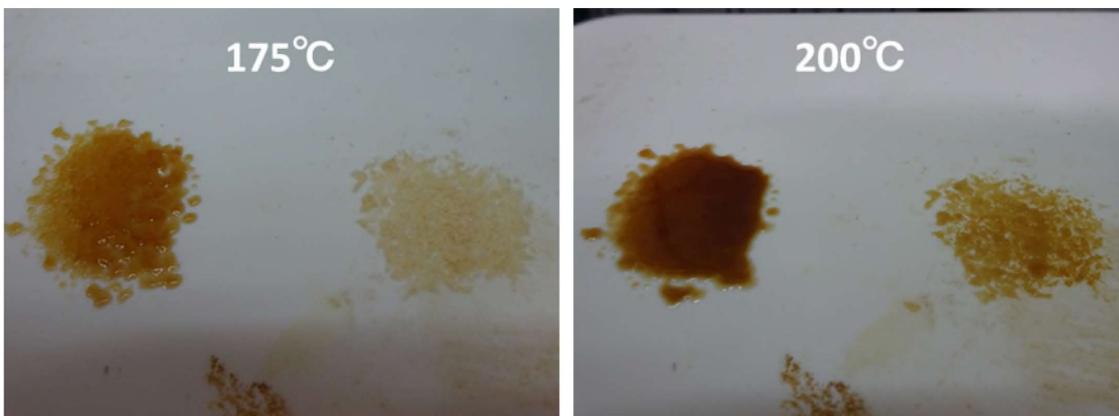
<分析：熱可塑性簡易評価>

サンプルをホットプレート上で加熱し、簡易的に熱可塑性の確認を行った（図 4-16）。結果、置換度 2.5 のサンプルにおいて、175～200℃程度で軟化することが確認された。従って、熱可塑性自体は有していると考えられる。



(左) 置換度 3.0：一部軟化
(右) 置換度 2.5：変化なし

(左) 置換度 3.0：全体軟化
(右) 置換度 2.5：変化なし



(左) 置換度 3.0：全体溶融
(右) 置換度 2.5：一部軟化

(左) 置換度 3.0：全体溶融し一体化
(右) 置換度 2.5：全体軟化

図 4-16 熱可塑性簡易評価の様子

<分析：引張試験>

水準4（パルミチン酸仕込み当量2.0,置換度2.5）スケールアップ合成品について、引張試験を実施した（株式会社 DJK）。結果、150°C、100 kN で熱プレスすることで試験片を作製することができたことから、熱可塑性を有していることが示された（図 4-17, 4-18）。



図 4-17 熱プレス後サンプル

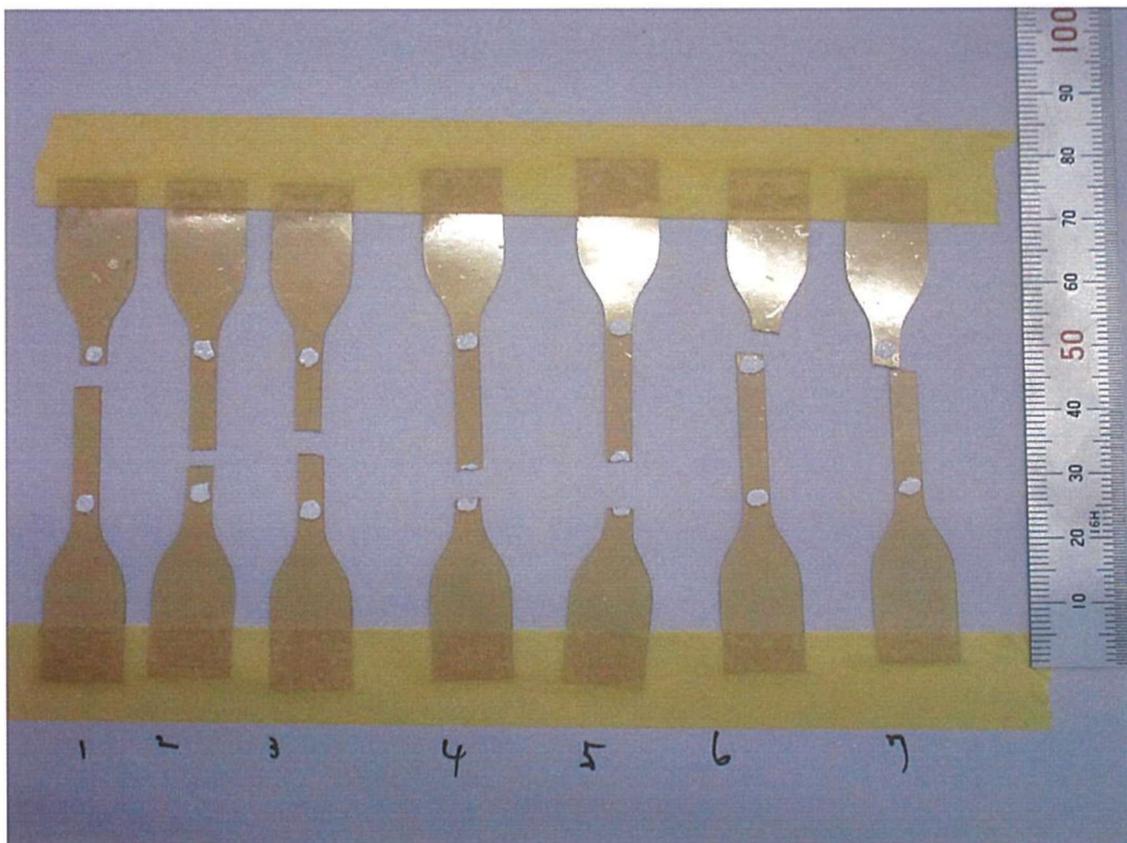


図 4-18 引張試験後サンプル

<分析：引張試験>

◆ 目的

熱プレスと打ち抜き加工による試験片作製および引張試験の実施

◆ 試料

パルミチン酸変性パルプ（水酸基置換度：2.5）：1種類

◆ 試験項目および条件

熱プレス成形

- 試作条件 : 表 4-7
- 成形形状 : □100 mm～150 mm×t0.25～0.35 mm
※スペーサーは使用せず、厚みは成り行き
- 数量 : 1枚
- 事前乾燥 : 真空乾燥 50°C×16 h 以上
- 使用装置 : 20 t 手動油圧加熱プレス ICM-4552-4
(株井元製作所製)

表 4-7 熱プレス条件表

試料名	加熱プレス				冷却プレス	
	設定温度 [°C]	予熱時間 [sec]	加圧		加圧	
			時間 [sec]	圧力 [kN]	時間 [sec]	圧力 [kN]
パルミチン酸 変性パルプ	150	30	30	100	30	100

引張試験

- 試験方法 : JIS K 716-2 準拠
- 測定項目 : 強さ、ひずみ、弾性率
- 試験片形状 : 5A 形（小形ダンベル試験片）
※3.1 熱プレス成形品を打ち抜き加工実施
- 測定条件 : 試験速度；0.5 mm/min→2.5 mm/min
(ひずみ 0.3%時切り替え)
チャック間距離；50 mm
標点間距離；20 mm
測定数；n = 5
- 状態調節 : (23±1) °C, (50±5) %RH 50 h 以上
- 試験温度 : (23±2) °C, (50±10) %RH
- 測定装置 : 万能材料試験機 5982 型（インストロン社製）
高性能 AVE2 ビデオ伸び計（インストロン社製）

◆ 結果

引張試験の結果を以下に記載する（表 4-8, 4-9, 図 4-19）。プレス成形は材料に流動性がほとんどなかったため、複数回材料の追加とプレスを行った。パルミチン酸変性パルプ（水酸基置換度：2.5）の引張強さは 7.04 MPa、引張弾性率（JIS 規格）は 287.0 MPa であった。

表 4-8 引張試験結果まとめ

材料名	引張強さ [MPa]	弾性率 [MPa]
パルミチン酸変性パルプ	7.04	287.0

・弾性率はひずみ 0.05～0.25%の解析値を記載

表 4-9 引張試験_データ

	厚さ [mm]	幅 [mm]	最大荷重 [N]	引張強さ [MPa]	強さ時ひずみ(ビデオ) [%]
2	0.365	4.05	10.63	7.189	6.12
3	0.361	4.05	10.20	6.974	10.1
4	0.358	4.05	9.863	6.802	11.2
5	0.342	4.05	9.567	6.907	9.62
6	0.337	4.05	9.968	7.303	8.29
平均値	0.353	4.05	10.04	7.035	9.07

	強さ時呼びひずみ(変位) [%]	弾性率(ひずみ0.05-0.25%) [MPa]	弾性率(接線法) [MPa]
2	4.20	312.3	326.9
3	6.04	281.1	282.4
4	7.09	269.5	267.2
5	6.22	280.7	283.9
6	6.08	291.3	292.4
平均値	5.93	287.0	290.5

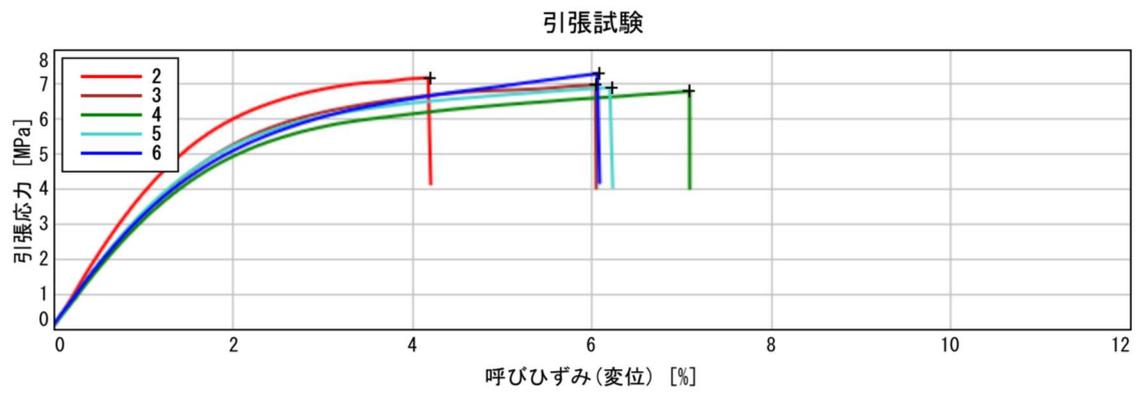
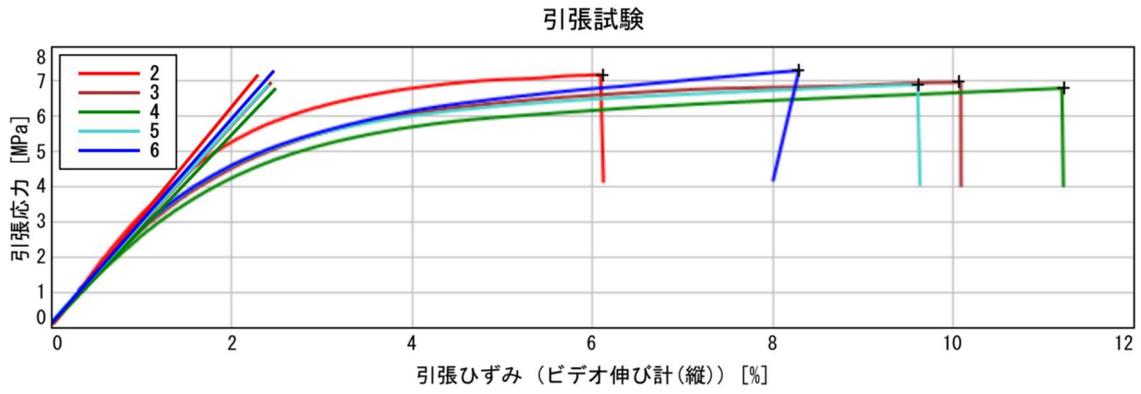


図 4-19 引張試験_ダイアグラム

パルミチン酸変性パルプ（水酸基置換度：2.5）とポリエチレン（LDPE）の物性比較を行った（表 4-10）。ポリエチレンは、構造上でエチレンが重合したプラスチックで、低密度ポリエチレン（LDPE）と、高密度ポリエチレン（HDPE）、超高分子ポリエチレン（UHPE, スーパーエンプラの一種）等の種類があり、熱可塑性プラスチックに分類される。安価で大量生産されており、また化学的に安定しているため、その耐水性や耐薬品性を活かして、ビニール袋をはじめ、多くの用途に使用されている。

引張強さは LDPE に劣る結果となった。特に、強さ時（呼び）ひずみは LDPE のそれよりも顕著に劣り、伸び率が小さい結果となった。一方で、引張弾性率は、LDPE と同等以上の値が示された。また、融点（簡易試験による）は、LDPE よりも顕著に高く、パルミチン酸変性パルプ（水酸基置換度：2.5）は熱的性質において強い特徴を有することが示唆された。このような特徴から、例えば、耐熱性を補うための原料として用いることで、石油由来プラスチックの使用量を削減するという出口の可能性も考えられる。

参考として、ポリ乳酸（PLA）との物性比較も行った。PLA 樹脂は、植物由来樹脂であり、生分解性を有することから環境にやさしい素材として広く認識されているものの、耐熱性が悪く、成型加工しにくいという欠点がある。

引張強さに加え、引張弾性率が顕著に PLA よりも劣る結果となった。その一方で、強さ時（呼び）ひずみはパルミチン酸変性パルプの方がやや大きく、また融点についても PLA よりも高く、先の考察と同じく、熱物性において強い特徴を有する可能性が示唆された。

表 4-10 物性比較

項目	単位	パルミチン酸 変性パルプ (置換度：2.5)	ポリエチレン* LDPE	PLA** (射出成形用)	備考
引張強さ	MPa	7.0	8~31	60.0	=引張強度、降伏応力
引張弾性率	MPa	287.0	180~280	3500.0	JIS, ひずみ：0.05-0.25%
	MPa	290.5			ASTM, 接線法
強さ時ひずみ（ビデオ）	%	9.1	90~600	6.0	=破壊ひずみ、伸び、伸び計使用 クロスヘッド変位で計算
強さ時呼びひずみ（変位）	%	5.9			
ガラス転移温度	°C	-	-125	52~60	
融点	°C	175~200	98~115	145~175	

引用

*https://www.sanplatec.co.jp/uploads/files/chemical-resistance/pla_busseiyou.pdf

<https://www.toishi.info/sozai/plastic/pe.html#two>

**<https://www.toishi.info/sozai/plastic/pla.html>

4.5. 合成：ドコサヘキサエン酸変性パルプ

まず、ドコサヘキサエン酸（DHA：docosahexaenoic acid）を用いて、ジクロロメタン中で N,N-ジメチルホルムアミド（DMF：N,N-dimethylformamide）と塩化オキサリルを作用させることで、ドコサヘキサエン酸クロライド（DHA-Cl）を合成した。なお、DHA は反応時間の経過とともに、茶色く変色した（後述）。

次に、合成した DHA-Cl を用いて、精製後のパルプ粕とのエステル化検討を行った（表 4-11）。まず DHA-Cl を 2 当量で反応を行ったところ、DHA エステル化パルプ（置換度 2.6）が得られたが、収率は非常に低かった。パルミチン酸系と同様にクロロホルムに不溶のゲルが観察されたことから、置換度の低い部分が溶解せずに収率低下に繋がったと推定した。また、数回のゲル除去操作にも関わらず、精製後のサンプルにはクロロホルムに難溶な成分が残存していた。

次いで、収率の向上を狙って DHA-Cl を 4 当量に増加し反応を行ったところ、予想に反して収率は大きく低下した。一方で、クロロホルムに難溶なゲル成分が多く得られた。なお、溶解したサンプル部分においてもセルロース部位のピークはほとんど確認できなかった。

以上のように、DHA-Cl の合成は問題なく実施でき、パルプとも反応していると考えられるが、クロロホルムに不溶となる成分が大量に生成し、パルミチン酸系とは異なる傾向が観察された。この原因については明確にはわからないものの、DHA の構造に含まれる、アリル基の繰り返し部分の反応性が高いことから、エステル化中にアリル基部分で副反応が生じ、架橋構造が形成することで、不溶部分が大量に生じている可能性が考えられた。

以上の結果から、DHA-Cl を大量に含んだ系にてエステル化パルプを効率的に合成することは難しいと考えられた。

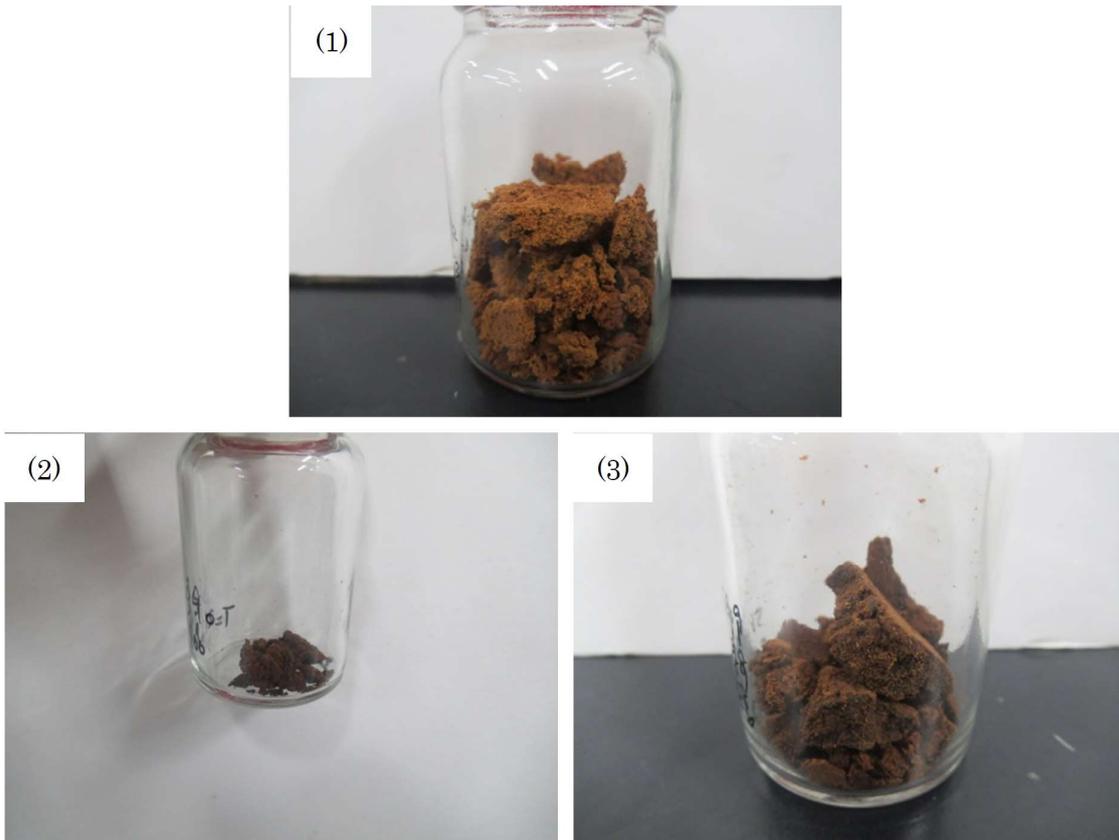
また、得られたサンプルを用いて、ホットプレート上で簡易的に熱可塑性の有無を評価した。水準 1 のサンプルでは、200°C で軟化する前に焦げて炭化し、水準 2 の難溶ゲル成分は、300°C でも融解することはなく黒く変色してきたことから、成形可能な温度域での熱可塑性は無いと考えられる。なお、DHA は熱や酸素に弱いことから、水準 1 のサンプルのように低温での焦げの原因になったものと推定された。

これらの結果から、DHA のみをエステル化することで成形可能な熱可塑性を付与することは難しいと考えられた。また、熱安定性の観点からも DHA をプラスチック材料に適用することは難しい可能性が高いと考えられた。

表 4-11 パルプ粕と DHA を用いた検討水準・結果一覧

項目	水準 1	水準 2
Lot	230309KM3	230309KM4 230309KM5
パルプ粕仕込み量	5.0 g	2.5 g
DHA-Cl 仕込み当量 (vs グルコースユニット)	2.0 当量	4.0 当量
収量	5.07 g (主に溶解成分であるが、 一部難溶ゲル成分あり※1)	195 mg (溶解成分) 6.21 g (難溶ゲル成分)
収率	21%	1% (溶解成分) 36% (難溶ゲル成分)
置換度	2.6	未算出

※1. 不溶部分の重量・収率は未確認



(1) 水準 1
(2) 水準 2 溶解成分 (3) 水準 2 難溶ゲル成分

図 4-20 DHA 変性パルプ残渣

各合成品のその他情報

- DHA 変性パルプ (水準 1) Lot : 230309KM3 NET : 4 g
- DHA 変性パルプ (水準 2 溶解成分) Lot : 230309KM4 NET : 190 mg
- DHA 変性パルプ (水準 2 難溶ゲル成分) Lot : 230309KM5 NET : 6 g

4.5.1. DHA 変性パルプの合成 (DHA-Cl を用いたエステル化)

4.5.1.1. DHA-Cl の合成

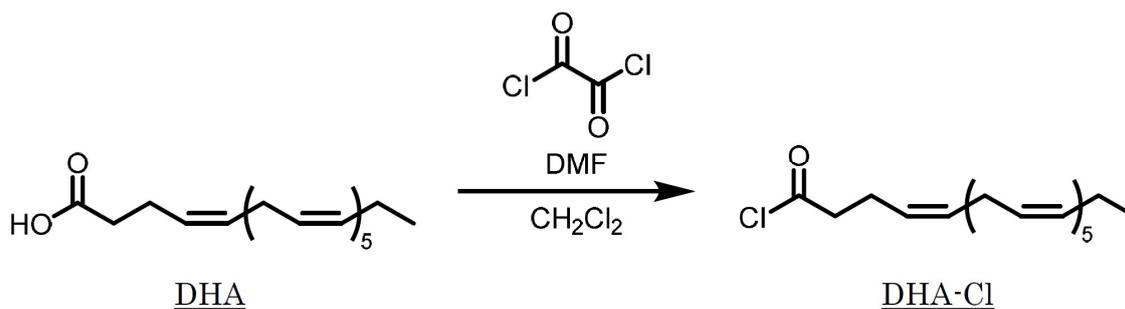
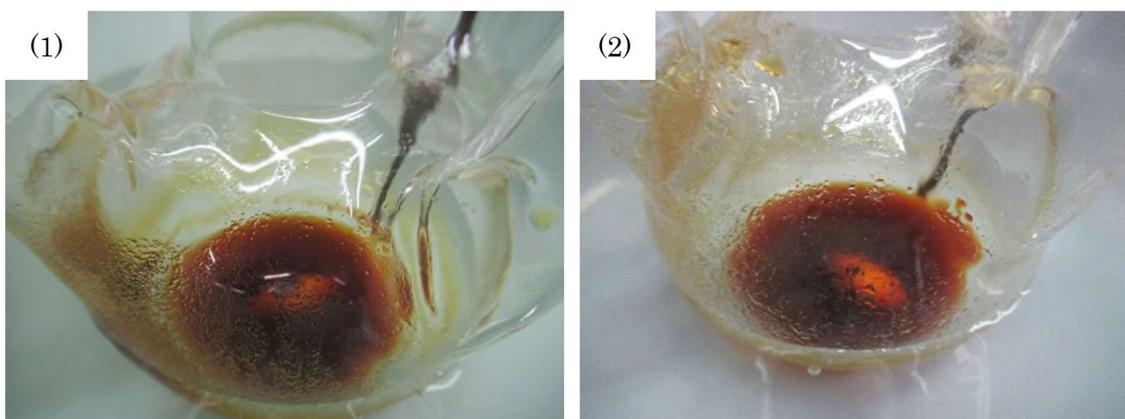


図 4-21 DHA-Cl の合成

<実験 (図 4-21, 4-22) >

※合成は、2 当量仕込み用と 4 当量仕込み用の計 2 回行った。

1. 300 mL の 4 つ口フラスコに、DHA (24.0 g)、ジクロロメタン (120 mL)、DMF (0.2 mL) を仕込み、スターラーチップ、Ar ライン、温度計をセットした。
2. 反応容器を氷浴に浸漬させ、内温 3°C まで冷却した。
3. 氷浴に浸漬させたまま、塩化オキサリル (28.7 g) をゆっくりと滴下した。
4. 滴下終了後に氷浴を外し、室温で 2 時間攪拌した。
5. ¹H-NMR によりほぼ定量的な DHA-Cl の生成が確認されたため、低沸成分を減圧留去した。
6. 減圧留去後、褐色液体を得た。



- (1) 減圧蒸留で得られた褐色液体 (2.0 当量仕込みに使用)
- (2) 減圧留去で得られた褐色液体 (4.0 当量仕込みに使用)

図 4-22 DHA-Cl の合成の様子

<分析： $^1\text{H-NMR}$ （重クロロホルム、400 MHz）>

A) 合成1回目（DHA仕込み当量2.0に使用）

少量のDHA-Clをメタノールで処理し、測定を行った（図4-23）。DHAメチルエステルが確認されたため、DHA-Clは定量的に生成したと判断した。

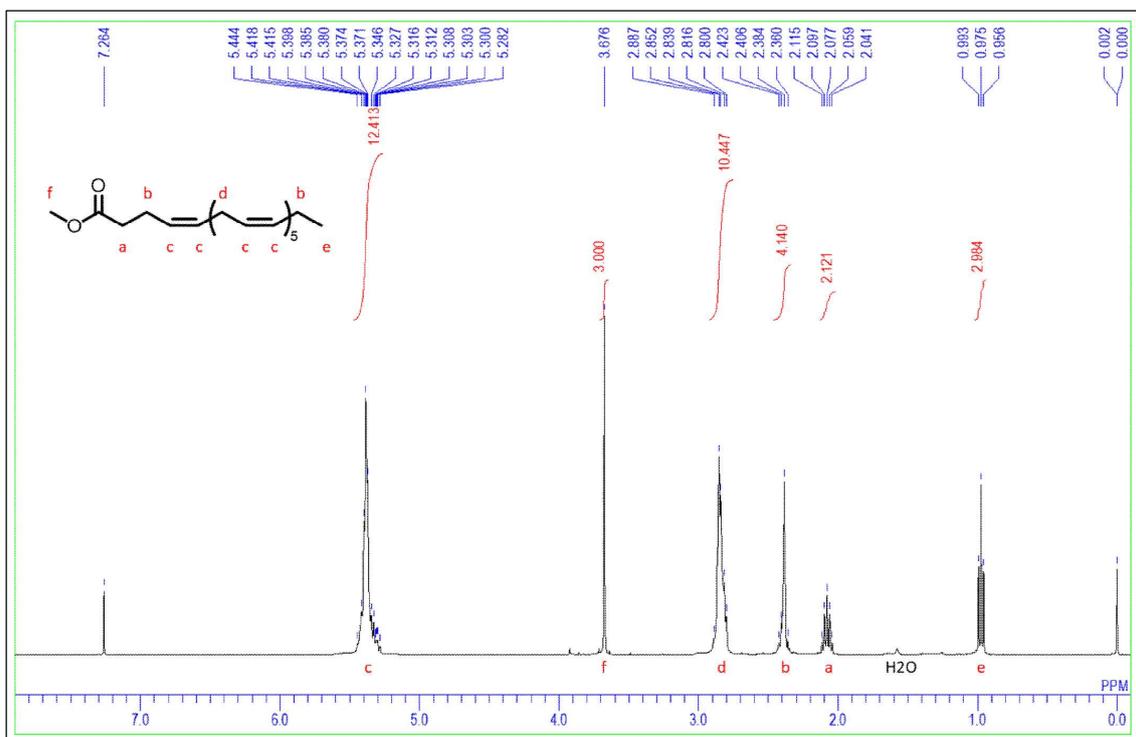


図4-23 $^1\text{H-NMR}$ チャート（合成1回目）

B) 合成 2 回目 (DHA 仕込み当量 4.0 に使用)

少量の DHA-Cl をメタノールで処理し、測定を行った (図 4-24)。DHA メチルエステルが確認されたため、DHA-Cl は定量的に生成したと判断した。また、3.92 ppm 付近に由来不明のピークが確認された。

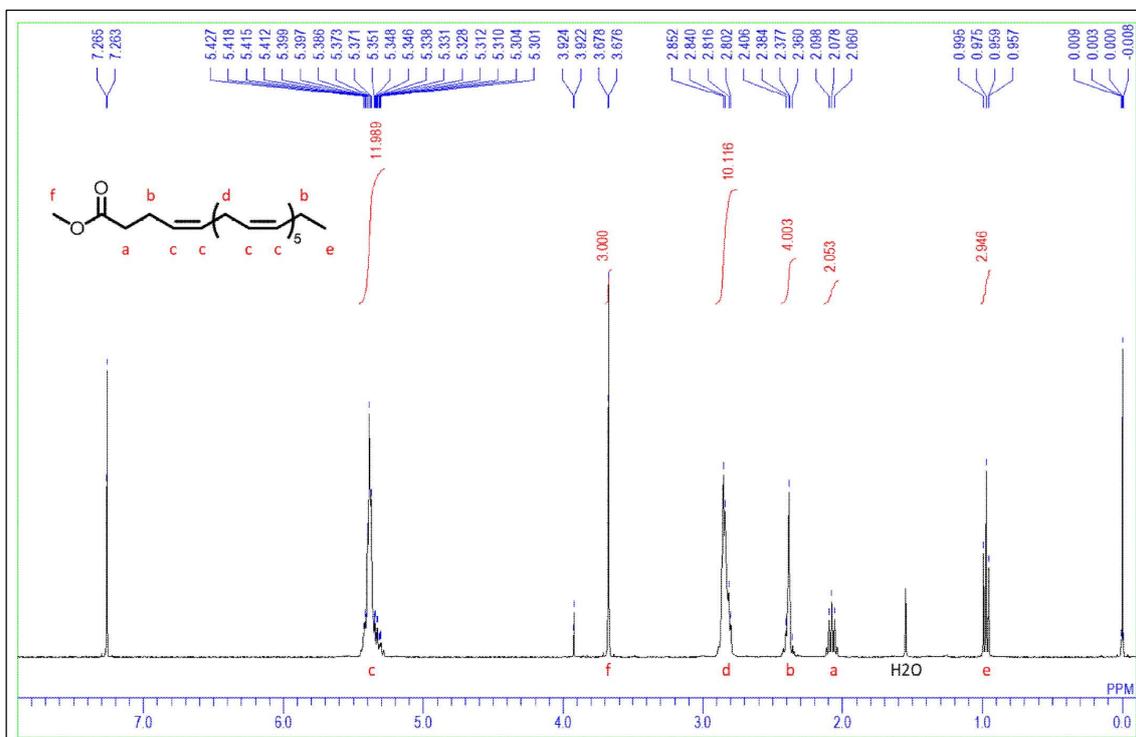


図 4-24 ¹H-NMR チャート (合成 2 回目)

C) 反応前後の比較

DHA とメタノール処理した DHA-Cl の比較から、合成した DHA-Cl の長鎖部位は変性していないことが確認された (図 4-25)。

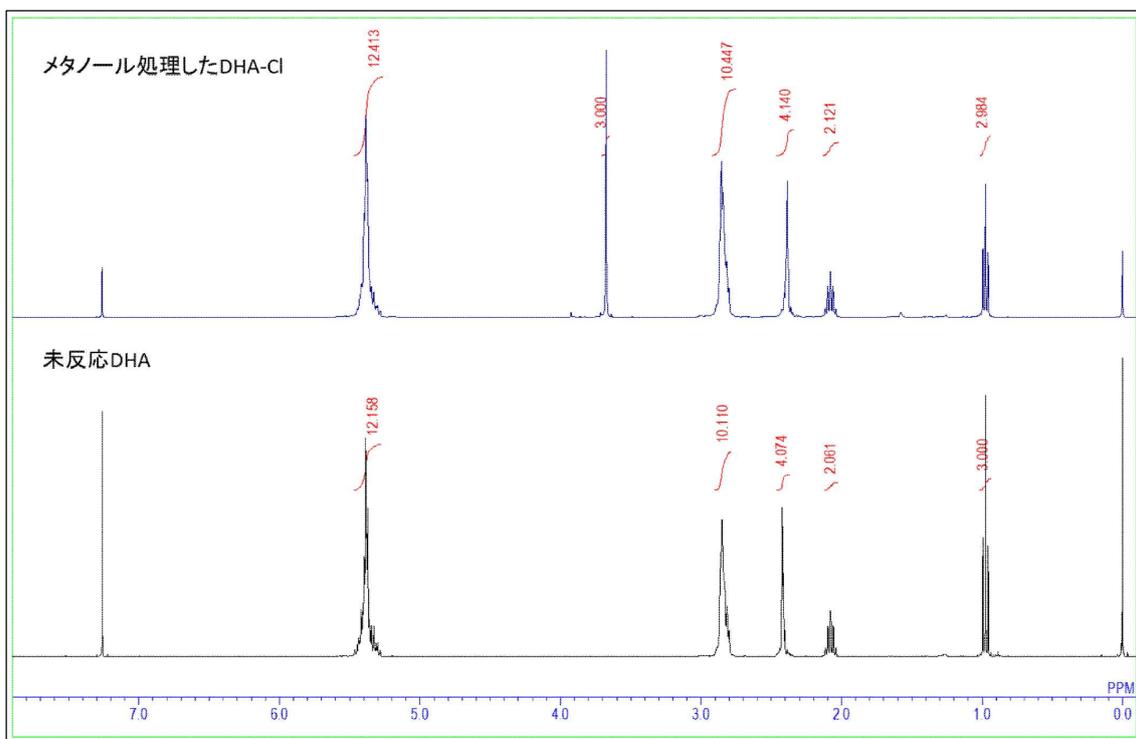


図 4-25 ¹H-NMR チャート (反応前後の比較)

4.5.1.2. 水準 1 (DHA 仕込み当量 2.0)

<実験 (表 4-12) >

1. 300 mL の 4 つ口のフラスコに、パルプ粕、ピリジンを仕込み、スターラーチップ、Ar ライン、ディーンスターク管、温度計をセットした。
2. Ar を 100 mL/min でフローしながら、内温を 100°C に昇温し、24 時間加熱を行った (脱水のためにディーンスターク管に留去したピリジン (約 14 mL) は廃棄した)。
3. 内温を室温まで冷却後、DHA-Cl を滴下した。
4. その後、内温を徐々に昇温し、内温 110°C で 21 時間反応を行った。
5. 反応終了後、室温まで冷却した。
6. 反応液をメタノール (0.75 L) に滴下し、再沈殿を行った。
7. 滴下完了後、5 分間攪拌した後、吸引ろ過にて固体を回収した。
8. 固体を再度メタノール (0.75 L) 中で 5 分間攪拌した。
9. 吸引ろ過にて固体を回収し、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
10. 乾燥した固体をクロロホルム (190 mL) に溶解した後、遠心分離 (20,000 G×10 分間) を行った。
11. 上部にゲル状の不溶物が見られたため、ゲルを除去した後、上澄みをメタノール (0.75 L) に滴下し、再沈殿を行った。
12. 吸引ろ過にて固体を回収したのち、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
13. 乾燥した固体をクロロホルム (150 mL) に溶解させた。
14. ろ過によりゲルを除去した後、溶液をメタノール (0.75 L) に滴下し、再沈殿を行った。
15. 吸引ろ過にて固体を回収した。
16. 回収した固体を 50°C で 24 時間減圧乾燥を行い、最終サンプルとした (収量 : 5.07 g、収率 : 21%)

表 4-12 合成処方 (水準 1)

試薬	MW	eq	mmol	g	mL
パルプ粕	162	1.0	31 ^{*1}	5.00	-
ピリジン	79	-	-	-	106
DHA-Cl	347	2.0	62	21.51	-

※1. グルコースユニットのモル数

4.5.1.3. 水準 2 (DHA 仕込み当量 4.0)

<実験 (表 4-13) >

1. 300 mL の 4 つ口フラスコに、パルプ粕、ピリジンを仕込み、スターラーチップ、Ar ライン、ディーンスターク管、温度計をセットした。
2. Ar を 100 mL/min でフローしながら、内温を 100°C に昇温し、24 時間加熱を行った (脱水のためにディーンスターク管に留去したピリジン (約 4 mL) は廃棄した)。
3. 内温を室温まで冷却後、DHA-Cl を滴下した。
4. その後、内温を徐々に昇温し、内温 110°C で 21 時間反応を行った。
5. 反応終了後、室温まで冷却した。
6. 反応液をクロロホルム (100 mL) に分散させた後、メタノール (375 mL) に滴下し、再沈殿を行った。
7. 滴下完了後、10 分間攪拌した後、吸引ろ過にて固体を回収した。
8. 固体を再度メタノール (375 mL) 中で 5 分間攪拌した。
9. 吸引ろ過にて固体を回収し、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
10. 乾燥した固体をクロロホルム (110 mL) に溶解した後、遠心分離 (20,000 G×10 分間) を行った。
11. 上部にゲル状の不溶物が見られたため、ゲルを除去した後、上澄みをメタノール (375 mL) に滴下し、再沈殿を行った。
12. 吸引ろ過にて固体を回収したのち、エバポレーターを用いて乾燥を行った。
13. 遠心分離後に除去したゲルをメタノール (150 mL) に分散させ、30 分間攪拌した。
14. 吸引ろ過により固体を回収した。
15. 回収した 2 種の固体を 50°C で 24 時間減圧乾燥を行い、最終サンプルとした (溶解成分 : 収量 195 mg、収率 1%、難溶ゲル成分 : 収量 6.21 g、収率 36%)。

表 4-13 合成処方 (水準 2)

試薬	MW	eq	mmol	g	mL
パルプ粕	162	1.0	15.5 ^{※1}	2.50	-
ピリジン	79	-	-	-	53
DHA-Cl	347	4.0	62	21.51	-

※1. グルコースユニットのモル数

<分析：¹H-NMR（重クロロホルム、400 MHz）>

A) 水準 1（2.0 当量仕込み）

合成したサンプルを NMR で測定したところ、セルロース由来のピーク（1～6）と DHA 由来のピーク（a～d）が観察され、目的のエステル化が進行していることを確認した（図 4-26）。また、置換度は 2.6 となった。

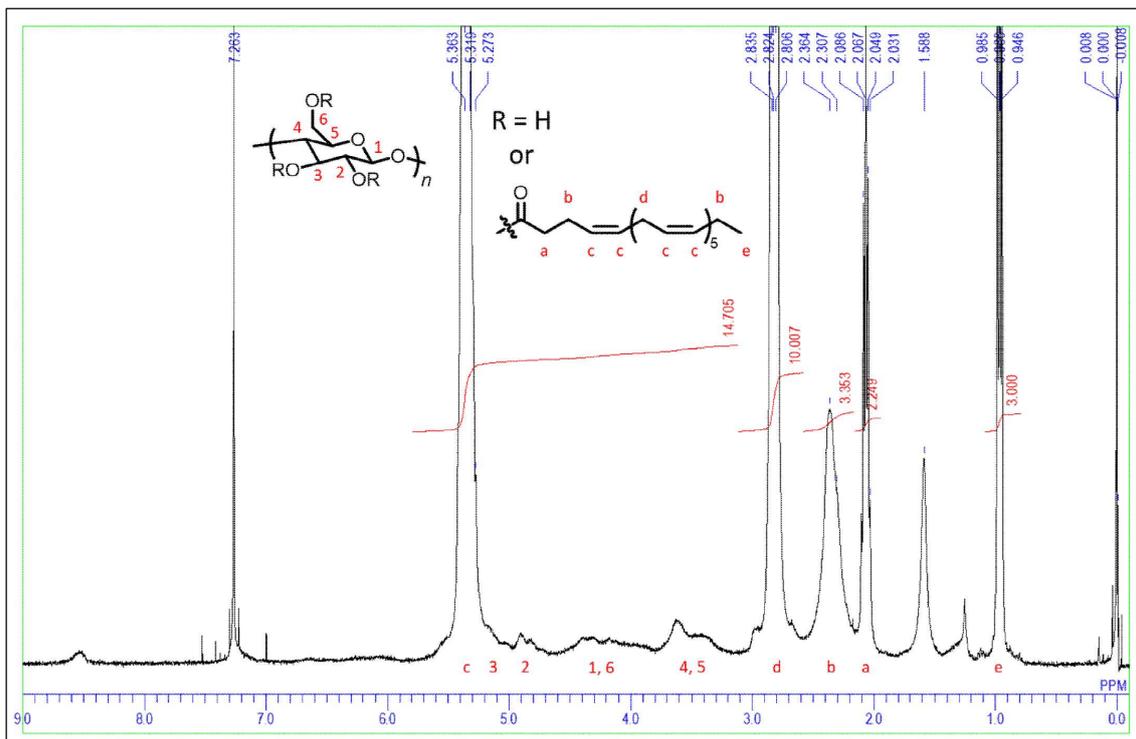


図 4-26 ¹H-NMR チャート（水準 1）

B) 水準 2 (4.0 当量仕込み、溶解成分)

合成したサンプルを NMR で測定したところ、DHA 由来のブロードなピークが確認された (図 4-27)。また、3.4 ppm に由来不明のピークが確認された。セルロース由来のピークは確認できなかった。

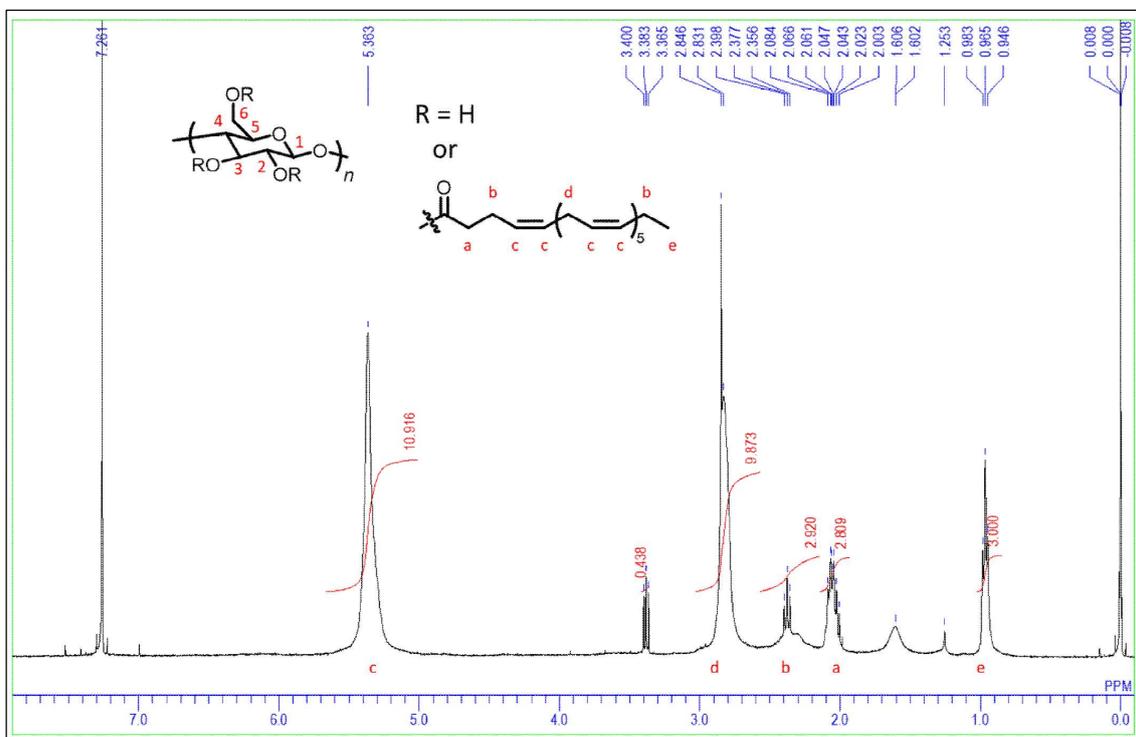


図 4-27 $^1\text{H-NMR}$ チャート (水準 2、溶解成分)

C) 水準 2 (4.0 当量仕込み、難溶ゲル成分)

合成したサンプルを NMR で測定したところ、DHA 由来のブロードなピークが確認された (図 4-28)。また、3.4 ppm に由来不明のピークが確認された。セルロース由来のピークは確認できなかった。

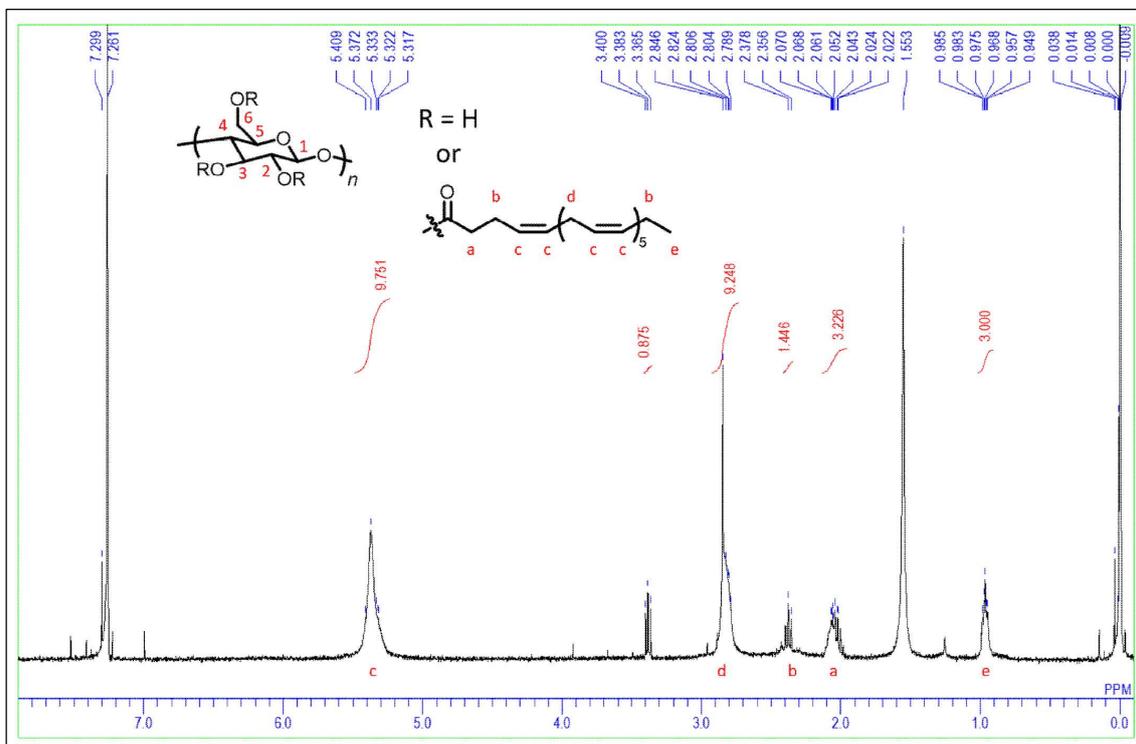


図 4-28 $^1\text{H-NMR}$ チャート (水準 2、難溶ゲル成分)

<分析：熱可塑性簡易評価>

得られたサンプルを用いて、ホットプレート上で簡易的に熱可塑性の有無を評価したところ、水準 1 (2.0 当量仕込み) のサンプルでは、200°Cで軟化する前に焦げて炭化し、水準 2 (4.0 当量仕込み) の難溶ゲル成分は 300°Cでも融解することはなく黒く変色してきたことから、成形可能な温度域での熱可塑性は無いと考えられる (図 4-29)。なお、DHA は熱や酸素に弱いことから、水準 1 のサンプルのように低温での焦げの原因になったと推定される。

これらの結果から、DHA のみをエステル化することで成形可能な熱可塑性を付与することは難しいと考えられる。また、熱安定性の観点からも DHA をプラスチック材料に適用することは難しい可能性が高いと考えられる。

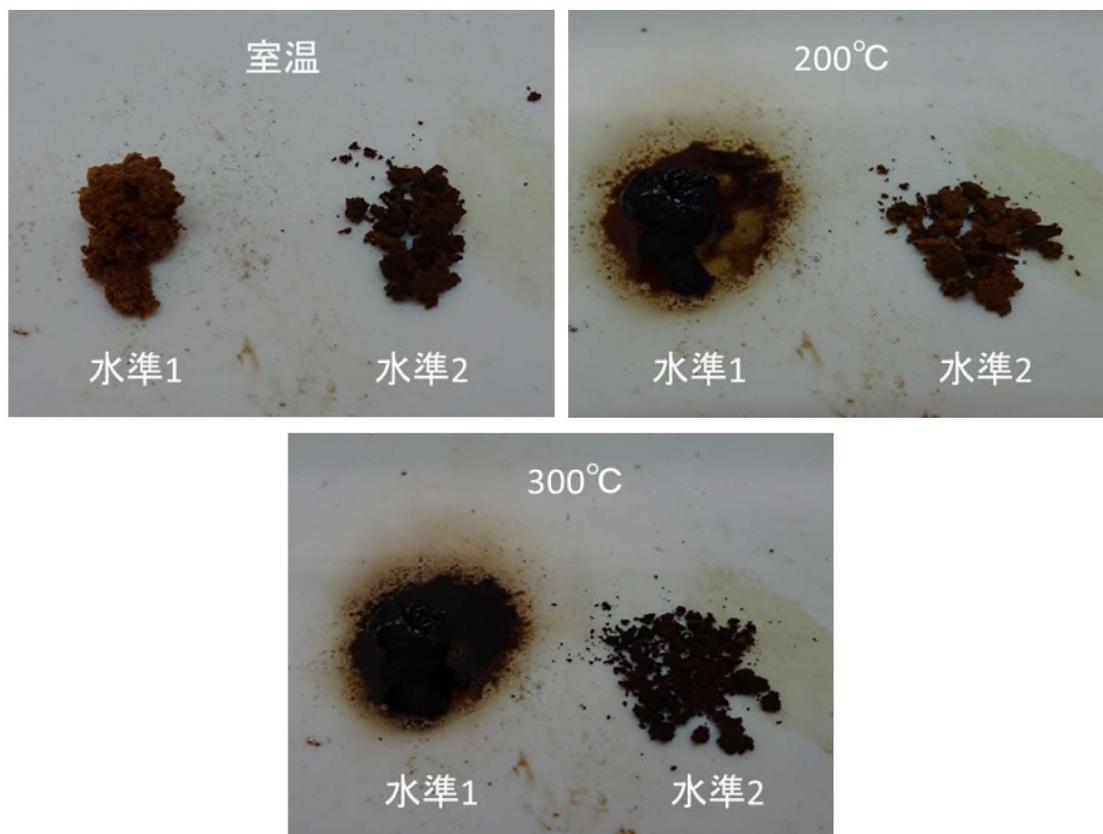


図 4-29 ホットプレート上での加熱試験

4.6. 本章のまとめ

本実証事業では、バイオプラスチックの原料として、1) 分子骨格：パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクル、2) 副資材：ラビリンチュラ由来の脂肪酸、を用いることを本質とするが、抄紙工程後のパルプ粕を分子骨格として用い、試薬脂肪酸を付加したプラスチックの合成と成形特性評価を行った。

まずは、理論上は生物成分率 100%のプラスチック合成品を得ることを目的として、脂肪酸の中でも安価で大量に入手可能なパルミチン酸 (C16:0) を用い、水酸基置換度が飽和であるパルミチン酸変性パルプ (パルミトイル化パルプ) の合成を行った。次いで、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を用いたドコサヘキサエン酸変性パルプの調製を行った。得られた化合物に対して適宜熱物性、機械物性を評価した。

結果、パルミチン酸を用いた場合 (水酸基置換度：2.5, 3.0)、DHA を用いた場合 (水酸基置換度：2.6) の双方で、プラスチック合成品を得ることができた。副資材として用いたパルミチン酸 (塩化物は塩化パルミトイル) は試薬ではあるものの、天然物として存在するため、理論上は生物成分率 100%のプラスチック合成品を得ることができたといえる。

当然ではあるが、パルミチン酸によるプラスチックの水酸基置換度は合成方法に依存することも指摘された。今回行っている合成法では、反応後のパルプに対してクロロホルムに可能な部分のみを回収しており、クロロホルムに可溶化するためには置換度が平均値で 2.5 以上必要となっており (今回の結果より)、置換度が低く溶解度の低い部分についてはおそらく回収できていない。塩化パルミトイルの当量を減らした場合でも得られるサンプルの置換度は下がらず、収率のみが低下したのは、その理由に由る。

一方で、不飽和脂肪酸の一つで、構造がシス型のため直鎖ではない DHA (塩化物は DHA-Cl) を用いた場合では、DHA 変性パルプ (水酸基置換度：2.6) が得られ、パルプとも反応していると考えられたが、その収率は非常に低かった。パルミチン酸系と同様にクロロホルムに不溶のゲルが観察されたことから、置換度の低い部分が溶解せずに収率低下に繋がったためである。また、数回のゲル除去操作にも関わらず、精製後のサンプルにはクロロホルムに難溶な成分が残存していた。投入する DHA-Cl 量を増加させた場合でも、予想に反して収率は大きく低下し、クロロホルムに難溶なゲル成分が多く得られた。なお、溶解したサンプル部分においてもセルロース部位のピークはほとんど確認できなかった。この原因については明確にはわからないものの、DHA の構造に含まれる、アシル基の繰り返し部分の反応性が高いことから、エステル化中にアシル基部分で副反応が生じ、架橋構造が形成することで、不溶部分が大量に生じている可能性が考えられた。

同じく DHA 変性パルプ合成に関して、溶解したサンプルについてホットプレート上で簡易的に熱可塑性の有無を評価した。水準 1 のサンプル (水酸基置換度：2.6) では、200°C で軟化する前に焦げて炭化し、水準 2 の難溶ゲル成分は 300°C でも融解することはなく黒く変色してきたことから、成形可能な温度域での熱可塑性は無いと考えられた。なお、DHA は熱や酸素に弱いことから、水準 1 のサンプルのように低温での焦げの原因になったものと推定された。

これらの結果から、DHA のみをエステル化することで成形可能な熱可塑性を付与することは難しいと考えられた。また、熱安定性の観点からも DHA をプラスチック材料に適用することは難しい可能性が高いものと考えられた。

パルミチン酸変性パルプに関して、水酸基置換度 2.5 では、示差走査熱量測定 (DSC) にて明確なガラス転移温度や融点は観察されなかった。これは変性反応が不均一状態で進行しているため、セルロース中の置換度にばらつきが生じてしまうために、DSC にて明確なピークが観察されなかったものと考えられた (置換度 3.0 であれば水酸基がパルミチン酸飽和に置換されているため、基本的にばらつきがなくピークが出やすい)。同じく置換度 2.5 のパルミチン酸変性パルプについて、熱物性に関して DSC での明確な数値は得られなかったものの、ホットプレート上での加熱にて 175 ~ 200°C 程度で軟化が確認され、熱可塑性自体は有していることが示された。なお、引張試験では、150°C、100 kN で熱プレスすることで、試験片を問題なく作製することができた。パルミチン酸変性パルプ (水酸基置換度 : 2.5) の引張強さは 7.04 MPa、引張弾性率 (JIS 規格) は 287.0 MPa であった。

本実証事業では、必ず脂肪酸変性パルプを得ることを第一の大きな目標としていた。それは、理論的に生物成分率 100% のバイオプラスチックを合成できることを証明するためである。用いた手法は実験室レベルの合成技術であり、多くの熱、原材料 (特に有機溶媒)、工程を要した。これらのことは、5 章で述べる LCA の検証・評価にて顕著にマイナスに反映されている。

脂肪酸変性パルプを合成できることを明らかとしたものの、低環境負荷、低コストのためには、製法の改善が必須である。

例えば、本事業では、抄紙工程後のパルプ粕を使用したが、そもそもは廃棄されるもので、凝集剤も含有した粗雑なものであるため、バイオプラスチック合成に用いるために前処理を行った (酸処理、水洗)。パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクルを用いることが本質ではあるが、これを用いるにしても酵素セルラーゼが付着しているため、洗浄によりタンパク質を除去するなどの前処理 (アルカリによるタンパク変性、水洗) が必要であることが予想される。このように、主原料についても何らかの前処理工程が必要で、コストと LCA に加算されることが容易に推測される。製法改善に加え、品質の安定化も必要である。

エステル化については、今回のような酸クロライドを用いるか、あるいは酸無水物を用いる方法がある。必ず合成品を得ることを意図していたため、反応性が良い酸クロライドを用いた。高付加価値な化成品や医薬品の製造には良いが、高コストであるため、アウトプットされる合成物の用途も考慮して製法を選ぶ必要がある。単純に脂肪酸を 100% 用いるのではなく、酢酸無水物もエステル化原料として用いれば、コスト的に安価にできる可能性があるため、原料の見直しもメリットはありそうである。

高コスト化、高環境負荷の一番のボトルネックは、プラスチック合成後の精製工程である。①原材料の見直し、②製品用途 (付加価値の向上) の要素と共に、③精製工程の改善が必要と考える。

なお、原材料の見直しに関連するが、ラビリントラ由来脂肪酸は DHA に限らず不飽和脂肪酸を多く含む特徴を有している。不飽和脂肪酸は総脂肪酸中の約 45% で、このうち DHA (C22:6n-3) が 35.7%、DPA (C22:5n-6, ドコサペンタエン酸) が 7.7% を占める。本実証事業では、不飽和結合を有する脂肪酸をエステル化原料として用いることは困難であることが示唆された。今回の試験では、純度 99.55% の DHA を用いており (図 4-30)、脂肪酸変性パルプの合成品を得るには非常にハードルが高かったものと考えられる。ラビリントラ由来脂肪酸のような混合脂肪酸を用いる場合には、不飽和脂肪酸の比率は今回ほど高くはないが、できるだけ不飽和度が低い脂肪酸、あるいは不飽和脂肪酸の比率を下げる方が良いものと推測される。得られた脂肪

酸を水素化によって不飽和部位を無くす、不飽和脂肪酸の産生率が低いラビリンチュウ株を用いるなどの検討が必要と考えられる。



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Chemical Name: cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid
Batch Number: ASP22-725545-1

Chemical Structure:

CAS Registry No.: 6217-54-5

Product ID: AG0036XV

Mfg. Date: 2022-07-08

Long-term Storage: -20 °C

Formula: C22H32O2

Molecular Weight: 328.4900

Quantity: 10g

Analysis Data:

Test:	Result:
Appearance	Colorless And Transparent Liquid
HNMR	Conforms
Purity (By HPLC)	99.55%

Conclusion: The above product meets the specifications of Angene.

図 4-30 DHA の試験成績書

5. LCA の検証・評価

5.1. 概要

パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸から製造したバイオプラスチックについての環境負荷と、従来の石油由来のプラスチックの環境負荷の比較を行い、代替した場合の CO₂ 削減効果に関する評価結果を報告する。なお、本実証事業においてはバイオプラスチック開発の初期段階であるため、CO₂ 排出の全体像、および CO₂ 排出のボトルネックであるホットスポットを把握することを目的とした。得られた検証結果は、後に製造プロセスの改善に反映させることを想定している。

CO₂ 排出量の評価は、ライフサイクルアセスメント (LCA : Life Cycle Assessment) 手法を適用した。本事業の GHG (Green House Gas) 排出量削減効果の評価する手法として適用した LCA について紹介した後、本実証事業の具体的な LCA の算定結果を報告する。

5.2. LCA の概念・手法

製品およびサービスの使用時は当然として、関係する資源の採掘から、素材や部品の製造、組立、廃棄に至る製品の一生 (ライフサイクル) を考えることを「ライフサイクル思考 (LCT : Life Cycle Thinking)」という。さらに、環境から採取した資源の量、環境へ排出した物質の量を定量的に計算する方法をライフサイクルアセスメント (LCA) という。各工程では、資源およびエネルギーが消費されるとともに物質が排出され、環境へ影響を及ぼすことになる。LCA は、資源の採掘から廃棄まで、対象とする製品・サービスに係わる物質/技術の連鎖を一貫して捉え、資源消費量や環境への排出物質を定量し、環境負荷を可視化するための手法である。

この数年で、地球温暖化の要因である CO₂ 削減や、SDGs (Sustainable Development Goals) という言葉を頻繁に耳にするようになった。それに伴い、環境に良いと発信される商品やサービスが増えている。しかしながら、その長所を唱える反面で、見えていない部分が多いケースもある。電気自動車は走行時に CO₂ を排出しないが、製造時には CO₂ を排出するといった事例などである。ガソリン自動車に対し、都合良く走行時における CO₂ の排出量だけで比較するのは、何とも不公平ではある。加えて、どれくらい良いのかも不明である。LCA では一部を切る取るのではなく、ゆりかごから墓場までの全体を評価に含めることができ、前述のような問題点がなくなる。

自動車を例にとると、原材料生産、輸送、素材製造、組み立て、使用・修理、解体、焼却・埋め立て、リサイクルといった段階を評価に含むことになる。このように、製品やサービスの素材・原材料の調達から、製造、流通、消費、廃棄に至るプロセス全体を数値化し、定量的に評価するのが LCA の特徴である。

LCA は、CO₂ を可視化するためだけを目的としない。生物多様性や水資源、労働時間も見ることができるので、SDGs の目標 13_気候変動だけではなく、目標 1, 3, 7, 12, 14, 15 など多くの Goals に関係している。その意味でも LCA による評価は重要なツールといえる。

LCA は、国際標準化機構 (ISO : International Organization for Standardization) が、国際規格化を行ってきており、一般的には ISO 14040 (Environmental management-

Life cycle assessment-Requirements and guidelines)、ISO 14044 (Environmental management-Life cycle assessment-Principles and framework) の2つの規格が挙げられる。1979年に北米で設立された環境毒物化学学会 (SETAC: Society of Environmental Toxicology and Chemistry) の欧州支部が1989年に設立され、その中でLCAワーキンググループが活動を始めた。その中で、地域のLCA、データ、ライフサイクルコスト情報、および社会的LCAを取り入れたライフサイクル思考の概念が生まれ、世界各国でLCAが採用され、それに基づいてその国に必要なデータが開発されていった経緯がある。LCAは特定の時点における評価ではあるが、SDGsに通じる概念である継続的改善、および持続可能な原材料の管理と消費を通じて地球にやさしい世界経済を目指すという考え方は、LCAから生まれたものである。LCA情報を公的に開発および共有することで、それらの情報をすべての関係者が利用できるスケールメリットがあり、LCAは再現可能ですべての条件を満たしており、ISO 14040に準拠していることがわかれば、利用者はその結果を信頼することができる。また、製品やサービスのライフサイクルの観点でみると、マネジメント活動の方法が国際規格になっていれば、より効率的なサプライチェーンマネジメントの推進が実現可能となる。LCA標準化の意義、及びこれをISO 14040に準拠して実施することの重要性は以上の様に説明でき、その結果を公表する場合には、必ずISOのルールを知識として有する必要がある。

LCAでは、はじめに何のために製品を評価するのか目的を決める。そして、その目的に応じて以降の評価の方法が決まる。目的を決める作業がLCAにおいてもっとも重要なプロセスである。何事にもいえるが、目的に応じて調査フローや結果の解釈、最終的なアウトプットの形が変わってくるためである。

LCAは(1)目的及び調査範囲の設定、(2)インベントリ分析、(3)影響評価、(4)解釈の4つの段階で構成される。

(1) 目的及び調査範囲の設定

LCA研究の目的と調査範囲を明確に設定し、意図する用途に整合するものとする。まずは、どんな製品を対象とし、何の目的で、誰を報告対象者として、LCAを実施するのか明確にする。対象とする製品の機能、そして何を基準(機能単位)にしてLCAを実施するのか明確にする。次に、製品のライフサイクルに関連するどのプロセスまでを検討するのか決定する。これを、システム境界の設定という。続いて、環境負荷をどこまで検討するかを決定する。検討する環境負荷が多くなればなるほど、後のインベントリ分析でのデータ収集が膨大となり、実施に要する時間が多くなることに留意する必要がある。

ISO 14040 (2006) ^[5.1]、及びISO 14044 (2006) ^[5.2]では、LCAの目的として、下記について明確に記載することとなっている。

- 1) 意図する用途(社内での製品開発に使用、環境報告書に記載して一般に公開、など)
- 2) 実施する理由(新製品のCO₂削減、製品の環境負荷を一般に知らせる、など)
- 3) 結果を伝える相手(社内の製品開発チーム、一般消費者、など)
- 4) 「一般に開示することを意図する比較主張」を行うかどうか

(2) インベントリ分析

目的と調査範囲において決定した事項に応じて、製品のライフサイクルにおいて投入される資源および環境へ排出される物質の定量を行う。製品のライフサイクルにおいて関連するプロセスを調査し、各プロセスにおける原料およびエネルギーの消費量と環境への物質の排出量に関するデータを収集する。それら収集したデータに基づき、製品のライフサイクルにおいて投入される資源および環境へ排出される物質量を算出する。使用するデータは収集方法により、下記の2種類のデータからなる。

- ① 一次データ：LCA 実施者が自らの責任のもとで収集・測定可能な素材やエネルギー使用量、製品生産量などのデータであり、調査対象の製品やサービスに直接的に関与するデータ
- ② 二次データ：LCA 実施者が直接かかわることができない素材やエネルギーの生産などのデータであり、調査対象の製品やサービスに間接的に関与するデータ

一次データは、LCA 実施者が、製造サイトからデータを直接測定もしくはヒアリングにより収集する。次に、使用されている素材やエネルギーによりどれだけの環境負荷が誘発されるかについて、二次データを収集する必要がある。これらのデータについては、LCA 実施者が各種素材やエネルギーの製造工程を資源の採掘に至るまで遡り、各工程において投入される原料とエネルギーおよび排出される環境負荷に関して収集する必要があるが、膨大な時間を要するため現実的ではない。これらのデータに関しては、公開、市販されているLCA ソフトウェアや、インベントリデータベースを利用するのが一般的になっている。日本国内では、産業技術総合研究所が開発しているIDEA (Inventory Database for Environmental Analysis) や、国立環境研究所が開発している産業連関表による環境負荷原単位データブック 3EID (Embodied Energy and Emission Intensity Data for Japan Using Input-Output Tables) などが知られている。

IDEA は、国内製品およびサービスを日本標準産業分類および工業統計調査用商品分類に基づいて分類している。各単位プロセスでの入力と出力を積み上げることでインベントリデータを作成する「積み上げ法」に基づいたインベントリデータベースである。格納されている単位プロセスデータセット数の合計は約 4,000 個であり、高い網羅性を特長としている。汎用的な素材を用いて製造される製品のLCAを実施するには威力を発揮するが、バイオ由来の革新素材や特殊な素材に関しては解像度が十分であるとは言い難く、データの無い素材に関して汎用素材のデータを代替すれば、環境負荷を過小評価することになりかねない点に留意する必要がある。また、ほとんどの製品に関して環境負荷の原単位は kg や m³ などの物理的な単位を基準に与えられているが、ガラス製品などは「円」単位など経済的な単位にて与えられているものもある。

3EIDの環境負荷原単位は、産業連関表を用いて各産業部門の環境負荷排出量を解析したものであり、日本国内の生産活動の種類によって区分された約 400 の部門で構成される各部門の単位生産活動（百万円相当の生産）に伴い直接・間接的に発生する環境負荷量を示したものである。産業連関表は、経済構造の把握、生産波及効果の計算などに利用されるものである。3EID では、各部門で単位価格当たりの CO₂ 排出原単位がわかるので、それに単位重量当たりの生産者価格をかければ重量単位当たりの CO₂ 排出原単位がわかる。生産者購入価格もまとめられているので原単位を容易に求めることができる。一方で、産業連関表を用いた環境負荷排出量の解析では、我が国の産業（製品）を約 400 の部門に分類しているため分類（粒度）が粗いことが問題であると指摘されている。同分類の製品では、環境負荷が単純に製品価格に比例し高価

な製品ほど環境負荷が大きい結果となる。高価な製品は、生産されるまでの工程が多くエネルギー消費量などが多いゆえ、環境負荷も大きくなるとの考え方であると捉えることができる。

いずれにせよ、初めは粗いながらもインベントリ分析を実施し、得られた結果をもとに、どのプロセス（製品）が環境負荷排出に関して最も効いているのか特定する。そして、それに直接係るデータを「フォアグラウンドデータ」と呼ぶ。特定されたプロセス（製品）に関して、順次正確なデータを収集し再度インベントリ分析を実施することによって、信頼性の高い結果を得ていくのが定石となっている。

(3) 影響評価

多岐にわたるインベントリ分析の結果を、環境影響を評価することで少数の理解しやすい情報として表現することが影響評価の役割である。一般に、この過程はインベントリデータを特定の環境影響と関連付け、それらの影響を理解することである。分類化ではインベントリ分析の結果、定量化された排出物質をその物質が影響を引き起こすインパクトカテゴリに振り分ける。特性化では排出物質が指定されたインパクトカテゴリに対して果たす割合を相対的に評価し、インパクトカテゴリ内での役割を数値化して総計する。すなわち、インパクトカテゴリ内での影響の定量化を行う。

(4) 解釈

LCA の能力が最も求められるのが、ライフサイクル解釈である。設定された目的と調査範囲に沿って、インベントリ分析と影響評価が実施されているかどうか評価すると共に、得られた結果をまとめ、報告する。評価する事項としては、データが漏れなく収集されているかどうか完全性の点検や、インベントリ分析や影響評価に用いた手法が一貫しているかどうか整合性の点検などがある。また、どのような種類のデータを用いてLCAが実施されているのか、データ品質評価を行う。その他、得られた結果がどれだけのばらつきを持っているのか、感度分析、不確実性分析を行い検討する。これらは、LCA 調査結果の信頼性を確立するための作業と位置付けられる。続いて、得られた結果を分かりやすく表現するために情報の体系化を行う。そして、LCA の実施により得られた結論を導き、報告書の作成を行う。

なお、LCA 調査結果の信頼性を高める手順のひとつとしてクリティカルレビューがある。クリティカルレビューの実施は原則として必須ではない。ただし、異なる競合製品をLCAにより比較評価し環境優位性等を主張する結果を公開する場合には、関係者からなるクリティカルレビューを行い、第三者から評価してもらうことが求められている。

LCA により導き出される結果は、限られた範囲に調査範囲を絞り、様々な前提の基に算出されたものにならざるを得ない。そのような LCA の限界を認識しながらも、LCA の実施手法に透明性を与え、得られる結果に客観性を高めようとするのが、国際規格のねらいと解釈することができる。

5.3. セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックのLCA

5.3.1. 評価の目的

本LCAは、パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクル（結晶性セルロース）を分子骨格とし、これにラビリンチュラ由来脂肪酸を付加して得られる熱可塑性バイオプラスチックについて、従来の石化由来のプラスチックより変更した場合の温室効果ガス（GHG）排出量の削減効果を定量的に求め、さらに、CO₂排出量に関してエネルギー起源と非エネルギー起源に分けて分析評価する。なお、本実証事業においてはバイオプラスチック開発の初期段階であるため、CO₂排出の全体像、およびCO₂排出のボトルネックであるホットスポットを把握することを目的とした。

- 1) 意図する用途：社内での製品開発に使用、本委託業務成果報告書「令和4年度脱炭素社会を支えるプラスチック等資源循環システム構築実証事業（非食用の多糖類を利用したバイオプラスチック製造の実証事業）」に記載
- 2) 実施する理由：製造するバイオプラスチック原料によるCO₂削減
- 3) 結果を伝える相手：社内、および委託先

5.3.2. 調査範囲

5.3.2.1. 調査対象の製品システム

LCAで対象とする製品のライフサイクルを構成するすべてのプロセスの集合体を「製品システム」という。

製品システムには、原料の採掘プロセス、製品製造プロセス、輸送プロセスなどに加えて、電力などのユーティリティとして必要となるプロセスなどが含まれる。これらは、LCAでデータを収集する最小単位である「単位プロセス」で構成される。投入される資源やエネルギー（インプット）と生産される製品や排出物（アウトプット）のデータをすべて収集する必要がある。

本実証事業で製造する製品あるいは原料は、パルプ製紙工場内で完結させることを想定している。パルプ製紙工場では、紙の製造を目的としてバージンパルプが製造される。同工場内に設置された糖化槽にて、糖化酵素であるセルラーゼを用いてこのパルプを糖化する。パルプのおよそ9割は糖化され、グルコースを主とするパルプ由来の糖化液が得られる。残りの1割は糖化されにくい結晶性のセルロース残渣であり、これを脱水して回収すれば、セルロースパーティクルが得られる。

次に、パルプ由来糖化液は同工場内に設置された培養棟へ配管移送され、油糧微生物ラビリンチュラを高密度培養するための炭素源として供給される。培養後、水分を除去しながら培養菌体は濃縮されてスラリーとなり、同工場内に設置された抽出棟へ移送される。抽出棟での脂肪酸抽出工程を経て、パルミチン酸やドコサヘキサエン酸を主に含有する粗脂肪酸が得られる。

得られたセルロースパーティクルと粗脂肪酸を素材原料として用い、同工場内に設置された合成棟にてバイオプラスチックの原料が合成され、その粉体が製品となる。製品であるバイオプラスチック粉体は、この工場から販売拠点にトラックで運ばれる。

販売先に運ばれたバイオプラスチック原料は、販売先の工場にて成型加工、ある

いは別の性質を有する（バイオ）プラスチック原料と混練されて、目的の製品へ成型加工されて形を持った製品となる。

バイオプラスチックを含む新たな製品は、流通を経て消費者や次の販売者へ購入されて利用される。現時点で用途が不明な本製品は、役目を終えると適宜分別して回収される。焼却、埋立、リサイクルのいずれかの方法にて処分あるいは利活用され、その役目を終える。

5.3.2.2. 製品システムが持つ機能

通常、製品システムは特定機能（便益）を持っており、その機能を明確にする必要がある。しかしながら、セルロースパーティクルと粗脂肪酸から合成されるバイオプラスチックの熱物性と機械物性が未知数であるため、製品システムを通じて、特に用途に関してどのような特定機能を有しているかを明示することが現時点で困難である。

一方で、パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクルは、有効活用するにしても本来は堆肥としての用途しかない。しかしながら、自然界で造成された天然物であり、副資材である粗脂肪酸も天然物であることから、これらを掛け合わせたバイオプラスチックは自然界で微生物の働きにより H₂O と CO₂ へ生分解されることを期待するものではある（ただし、生分解性の検証は本実証事業の対象範囲外）。

このような、バイオプラスチック合成に用いる原料の由来を考慮すると、頑健な機能を有するプラスチック原料ができるとは想像しがたく、耐熱性や強度が要求されるエンジニアリングプラスチックというより、容易に汎用される用途への利用が考えやすい。例えば、プラスチックが有する疎水性を活かした「水から保護する」という機能からの紙容器等へのコーティング剤としての活用、あるいは熱可塑性を有し、かつ加工しやすいといった特徴を活かした「模型の加工原料」といった機能の活用が、想像される用途の一つといえる。

5.3.2.3. 機能単位及び基準フロー

前述の通り、本事業で開発するバイオプラスチック原料は、その用途が明確に決まっているわけではない。従って、バイオプラスチック原料を製造することを目的に定め、評価対象の機能と機能単位については、日本におけるプラスチック 1 kg と設定した。また、パルプ由来のプラスチックが発現する機能と、従来の石化由来プラスチックの機能は同等とした。

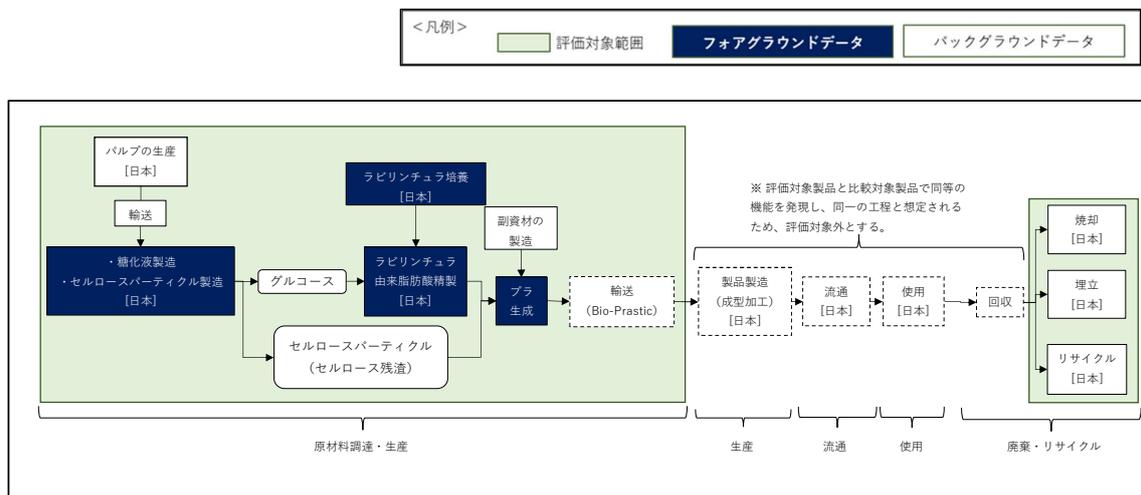
5.3.2.4. システム境界

本実証事業では、パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクル（結晶性セルロース）を分子骨格とし、これにラビリンチュラ由来脂肪酸を付加して熱可塑性バイオプラスチックを製造する。セルローパーティクルは、パルプ由来の糖液を得ることを目的として生じる副産物であり、それ以上の糖化が見込めないため堆肥あるいは廃棄される想定のところを本事業では副資材として利活用する。評価対象範囲として、原料となるパルプの生産も含めることとし、評価対象製品と比較対象製品（ベースライン）のシステム境界を作成した（図 5-1）。

5.3.2.4.1. ライフサイクルフロー図

<機能単位：日本におけるプラスチック 1 kg>

<評価対象製品：セルロースパーティクル由来プラスチック>



<比較対象製品（ベースライン）>

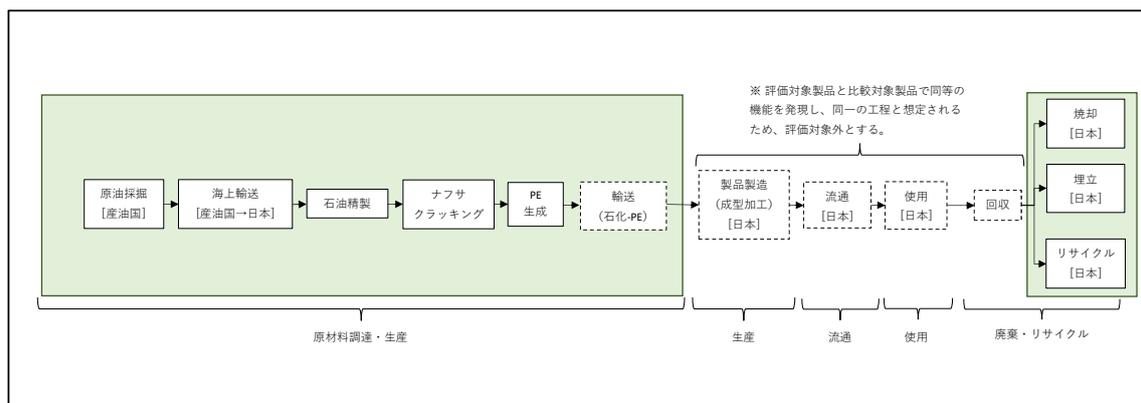


図 5-1 本実証事業のシステム境界

5.3.3. 影響領域と影響評価手法

環境影響領域は、多領域に及ぶ。例えば、欧州委員会（EC）の環境総務によって推奨された環境領域は、気候変動、オゾン層破壊、生態毒性（淡水域）、人間毒性（ガンへの影響）、人間毒性（ガン以外の影響）、PM/呼吸器疾患、電離放射線（人間健康への影響）、光化学オキシダント生成、酸性化、富栄養化（陸生）、富栄養化（水生）、資源枯渇（水）、資源枯渇（鉱物、化石）、土地改変の14項目である。日本では、特に気候変動が対象とされるケースが多い。

本実証事業における影響領域は、気候変動とした。また、影響評価手法として IPCC 2013 Global Warming Potential 100 years（単位：kg-CO₂eq）を使用した。

5.3.4. 必要とされるデータ

まずは、評価の対象となるバイオプラスチック原料の生産におけるプロセスフローを捉える必要がある。5.3.2.にて、「調査範囲」を定めた。

ISO 14040 では、単位プロセスのデータすべてを収集することが基本になっている。しかし、すべてのデータを実施者が収集することは困難なので、実際には評価対象製品に直接関係するフォアグラウンドデータ（一次データ）を実測し、間接的に関与するバックグラウンドデータ（二次データ）にはバックグラウンドデータ用に整備されたデータベースや、文献などを引用して作成することが多い。

フォアグラウンドデータを収集するためには、それぞれの単位プロセスの内容について十分な知識が必要である。そのため、そのプロセスに精通した者がデータを収集するのが一般的である。

バックグラウンドデータは、目的に合致したデータを、バックグラウンド用に整備されたデータベースや、既往文献のデータから選定し、精査して作成する。なお、公表されている情報源からデータを収集した場合は、その情報源を明記しておく。

5.3.5. 前提条件

データベースに記載の数値を利用するにあたり、暗黙的に設定されている以下の前提条件は認識しておくべき要素である。

例えば、LCA を評価する際、電力 1 kWh の利用に伴う CO₂ 排出量には決まりがある。この数値は、1年間の燃料消費量などから算出した年間総 CO₂ 排出量を年間総発電量で除することで算定されている。しかしながら、例えば日本では電力需要が多い夏冬と、比較的少ない春秋で分かるように季節によって、或いは昼間と夜間といった時間帯によっても CO₂ 排出量が異なることが容易に想像つく。しかしながら、実際には、同じ数値を用いて算出することが殆どである。つまり、「季節や時間帯に関わらず環境負荷は同じ」という前提条件がある。

電力の供給方法に着目すると、離島では電力系統が独立している所が数多くみられる。そのため、本土の電力の平均値とは大きく異なることが予想される。しかしながら、離島に特化した電力データはないため、実際には入手可能なデータベースの値を用いて計算することが一般的である。つまり、「データが作成された地理的範囲の中で、環境負荷は一律に同じ」という前提条件がある。

データベースでは、素材・エネルギー等の環境負荷は単位あたりで整理されており、それらを通称「原単位」と呼んでいる。素材・エネルギー等の使用量に応じて環境負荷を計算するのが一般的である。しかし、工場を大きくできれば効率良く製品を製造できることが予想できる。熱源であるボイラーについても、例えば燃料を石炭から天然ガスに代替することで工場の CO2 排出量を削減できる。ところが、使用以前の前処理に着目すると、日本ではパイプラインによる天然ガス供給は不可能であるため、わざわざ液化して輸送しているのが実情である。従って、このためのエネルギーを余分に消費しているため、世界全体でみた場合には CO2 排出量は増加している可能性も否定できない。実務者が用いるデータベースでは、そのような複雑な世の中の因果関係は一般的に考慮されていない。つまり、「生産量の多少に関わらず、単位あたりの環境負荷は同じ（比例で変化する）」という前提条件がある。

また、同じ名前、同規格の天然ガスや石炭にしても、埋蔵場所は陸や海といった違いや採掘方法も異なるはずである。それゆえ、おそらく環境負荷にもばらつきがあると思われるが、「同じ名前、同じ体積であれば環境負荷は同じ」という前提条件がある。

LCA の評価では、以上のような前提条件を踏まえたうえで、広く年間の平均値が用いられている。これは、細かなデータを十分な根拠をもって作成できないというデータ作成者側の都合と、エネルギーや資材使用量を時間別、地域別、技術別に把握することが難しいというデータ利用者側の両方の都合があることに由る。そして何より、本実証事業にも通じることであるが、例えば CO2 排出のホットスポットを特定したい、あるいは環境配慮設計の効果を把握したい、という一般的な LCA の目的においては、このような細かな違いは通常意味がなく、逆にこれらの前提条件を揃えた方が自社の評価対象製品を表現し易いといえる。能動的な事業活動の過程で、環境負荷を発生させたという責任を世の中で平等に背負うという暗黙の前提条件ともいえる。

また、それなりに確からしい評価ができるのが LCA の長所であるため、結論に大差がないのであれば、必要以上に労力を注ぎ込むことはその長所を無くしてしまうので望ましくない。しかし、それはあくまでこれら暗黙の前提条件が目的に対して望ましい場合、もしくは無視できる場合にのみ言えることであり、これら前提条件のもとで計算するのが LCA の作法である。本実証事業では、以上を念頭に置き、データベースの限界を認識したうえで LCA の検証・評価に臨んでいる。

5.3.5.1. 評価対象製品の前提条件

生産プロセスのフォアグラウンドデータは、現時点では実験等から推計されたデータセットである。また、原材料の調達段階から製品の廃棄段階までにおいて、すべて日本国内と想定した。

また、本実証で必要な熱源に関しては、電気を由来とする電気ボイラー、および電気ヒーターを供給源としており、使用温度の差異に起因する電力容量の相違は考慮しない前提条件としている。

5.3.5.2. 比較対象製品の前提条件

比較対象製品をポリエチレン（PE）とし、この生産工場については、評価対象製品と同様に日本とした。

5.3.5.3. 共通

プラスチックの機能は、評価対象製品と比較対象製品と同等とし、生産段階、使用段階、廃棄段階は同じ工程をとるものと仮定した。廃棄処理段階としては、焼却、埋立、リサイクルが考えられるが、生分解性としての性能やリサイクル性については現時点では不明なため、100%焼却処理とした。

5.3.6. ライフサイクルインベントリ分析

評価対象製品について、原材料・エネルギー（入力）や生産または排出される製品・排出物（出力）のデータを収集し、環境負荷項目に関する入出力の明細一覧を作成することが一般的とされる。

本項では、評価対象製品に直接関係する「フォアグラウンドデータ（一次データ）」を実測した結果を報告する。また、間接的に関与する「バックグラウンドデータ（二次データ）」の収集方法についても説明する。

5.3.6.1. データ区分とデータ収集方法

5.3.6.1.1. 一次データ

前述したライフサイクルフロー図で、「フォアグラウンドデータ」となっている生産プロセスについて、一次データを収集した。一次データに関与する①～④の単位プロセスとデータ収集方法は次の通りである。

① パルプ由来糖化液の製造・パルプ由来セルロースパーティクルの製造

本単位プロセスは、株式会社 Biomaterial in Tokyo の保有設備にて実施可能である。実際、2 kL キルタンクを用い、主原料である含水の広葉樹漂白クラフトパルプ（LBKP：Laubholz Bleached Kraft Pulp／三菱製紙株式会社製、バージン）を絶対乾燥重量で 100 kg を仕込み、主生成物としてパルプ由来糖化液（グルコース溶液）を得た。入力である原料は、パルプの他に副原料として、酵素、水、液体苛性ソーダを考慮した。得られた糖化液の総液量、比重を測定し、グルコース濃度（バイオセンサー調べ）からグルコース含量を測定した。得られた糖液の情報を示す（表 5-1）。グルコース濃度は、実測で 6.42 w/v% で、グルコース重量は 38.8 kg と導かれた。なお、定性・定量分析は実施していないが、糖化液にはグルコース以外に、単糖としてキシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、二糖としてセロビオースなども理論的に含まれる。

表 5-1 パルプ由来糖化液の基本情報

項目	単位	備考
製造日	2023/1/12	
品名	パルプ由来糖化液	LBKPバージンパルプ
総重量	624.6 kg	
総液量	604.0 L	比重換算
比重	1.0341	
グルコース濃度	64.2 g/L	バイオセンサー分析 (2023/1/27)
グルコース含量	38.8 kg	
pH	3.74	

副生成物は、糖化後の残渣であるセルロースパーティクルである。絶対乾燥重量 100 kg のパルプから得られるセルロースパーティクルの重量は、推測で 10.0 kg (乾燥重量) とした。

出力に含まれる廃棄物は、廃水 (推測値)、資材、リサイクル等の廃棄物を考慮した。

その他、パルプの糖化は 50°C 前後の温度で行う酵素反応である。従って、熱源を要する。いかなる製品の製造工場においていえることであるが、地熱などの再生可能エネルギーに頼らない限り、熱源は重油などの燃料ボイラーを用いることが殆どである。

糖化液製造・セルロースパーティクル製造で使用した本設備は、実製造を模倣できる規模ではあると考えるが、その熱源を電力で蒸気を製造する電気ボイラーに依存している。燃料に依存しないためバーナー加熱用のスペースがなく、コンパクトになり省スペースである。燃料ボイラーと異なり、排ガスがないため、排気熱のロスがない。また、燃焼を伴わないので、音が小さく、周辺環境への騒音リスクが小さい。燃料タンクやガス用の配管工事、排気ダクト、煙突が不要といったメリットがある。

その一方で、電気の多くは燃料から発電されており、その電気を熱源へ変換するよりは燃料そのものを燃焼させて熱源を得る方がはるかに効率的で安価である。

本実証のような開発段階で用いる設備は、実証の可否や実プラントへ反映させるためのデータ取得を目的とするものであり、生産性の効率化や CO2 排出量の削減を意図するものではない。従って、先に記したメリットの元で電気ボイラーを用いる方が好都合ではあるものの、LCA の検証・評価においてはベースラインと比較して非常に不利であることを予めここで述べておく。

② パルプ由来糖化液を用いたラビリンチュラの培養

本単位プロセスは、①と同じく株式会社 Biomaterial in Tokyo の保有設備にて実施可能である。実際、1 kL 培養タンクを用い、本実証においては試薬グルコース (正確には、トウモロコシ由来の精製された「含水結晶ぶどう糖」/株式会社サナス製) を仕込み、主生成物であるラビリンチュラ培養液を得た。培養液の実重量測定は困難であるため、培養槽内に設置された液量ガイドバーをもとに導いた。実際の培養で投入したグルコース重量は 1 バッチあたりで 45.0 kg ではあるが、本インベントリ分析においては、①の 1 バッチで製造された糖化液全量 (38.8 kg-グルコース) を使用したものと

仮定して出力へ換算し、ラビリンチュラ培養液の重量を 650.0 kg とした。入力項目である原料は、糖化液の他に、酵母エキス、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム六水和物、硫酸マグネシウム七水和物、塩化カルシウム二水和物、塩化カリウム、消泡剤 PE-M を考慮した。

出力に含まれる廃棄物は、廃水（推測値）、資材、リサイクル等の廃棄物を考慮した。

その他、本単位プロセスには、シード培地殺菌工程、シード培養工程、培地殺菌工程、本培養工程が含まれ、熱源を要する。①と同様に、殺菌工程用の蒸気は電気ボイラーで製造されるため、消費電気容量が大きい。また、特に問題となるのが培養工程である。微生物培養により化成品等を製造する一般の工場では、温水の調製には燃料ボイラーで加温された 40°C 程度の温水タンクを用いるのが常法である。この温水を循環しながら培養タンクのジャケット内に緩やかに通水し、適宜水道水のバルブを開閉させて目的の培養温度へ制御する仕組みである。一方で、本実証事業で用いた培養タンクでは、培養中では熱源として電気ボイラー由来の蒸気を使うことはないものの、温水を電気ヒーターで調製する仕組みとなっているため、消費電気容量が大きいことに加え、培養の期間は数日間にも及ぶ。従って、本事業の培養工程においても、LCA の検証・評価においてはベースラインと比較して非常に不利である。

③ ラビリンチュラ由来脂肪酸の製造

本単位プロセスに関し、製造実機での実績はない。確立した抽出手法は無く、製造フローは、現時点におけるラボ検討で得られた最も効率的と考えられる手法を採用している。「ラビリンチュラ培養液からの菌体濃縮 → 濃縮菌体からの脂肪酸の溶媒抽出 → 溶媒留去による粗脂肪酸の回収」の工程である。

入力の主原料であるラビリンチュラ培養液の重量は、②で得られた 650.0 kg とした。この他に副原料として、クロロホルム（蒸留にてリサイクル可能）、メタノール（蒸留にてリサイクル可能）を考慮し、ラボ試験では用いてはいないものの、これまでの実務経験を踏まえ、使用する前提として、水層と有機層を分離するための補助剤も追加考慮した。

ラボ検討での総脂質抽出率をもとに、得られた総脂質重量を 8.0 kg と導いた。その他の出力に含まれる廃棄物は、廃水（推測値）、資材、廃棄物（溶媒で破碎された菌体粕、リサイクル可能な抽出溶媒で、いずれも推測値）を考慮した。

その他、本単位プロセスには、濃縮缶による抽出溶媒の留去工程が含まれ、40°C 程度の熱源を要する。①、②に整合させて、脂肪酸の製造工程でも加温用の蒸気を電気ボイラーで製造する前提条件とした。従って、本工程においても、LCA の検証・評価においてはベースラインと比較して非常に不利である。

④ パルプ由来セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの合成

パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を原料としたバイオプラスチック原料の製造を想定している。③のラビリンチュラ由来脂肪酸の製造と同様に、本単位プロセスに関して製造実機での実績はない。過去の要素技術を参照し、ラボ試験にて抄紙工程後のパルプ粕と試薬パルミチン酸（塩化パルミトイル）を原料に用い、プラスチック原料を製造できることを実証している。ラビリンチュラ由来脂肪酸は、約 50% をパルミチン酸が占め、DHA

や DPA を含む粗脂肪酸ではあるものの、本脂肪酸混合物を用いても同様の製造フローにてバイオプラスチック原料を合成できるものと想定した。工程の詳細を 4.4.2. で説明している。

入力の主原料の一つであるラビリンチュラ由来脂肪酸は、③で得られる 8.0 kg (38.8 kg-グルコースを用い、1 kL 培養タンクで得られる脂肪酸全量) とした。もう一つの主原料であるセルロースパーティクルは、脂肪酸でエステル化された場合の水酸基置換度を 2.5 と想定し、必要重量を割り出した。この他に、副原料として、ピリジン (合成反応溶媒)、塩化オキサリル (脂肪酸へのハロゲン化剤)、メタノール (合成したバイオプラスチックの沈殿化および洗浄)、クロロホルム (バイオプラスチックの再溶解) を考慮した。

ラボ試験でのマスバランスデータをもとに、得られたバイオプラスチック原料を 9.0 kg と導いた。その他の出力に含まれる廃棄物は、廃水 (原則水は不使用)、資材、廃棄物 (合成反応で用いた有機溶媒の総量、いずれも推測値) を考慮した。

その他、本単位プロセスでは、1) パルプ前処理 (洗浄を含む精製)、2) バイオプラスチック合成反応、3) 合成物の沈殿化、4) 合成物の再溶解、5) 合成物の再沈殿化、6) 合成物の洗浄、7) 合成物の乾燥の単位工程を含む。1, 2, 7 では熱源を要する。①, ②, ③に整合させて、バイオプラスチック原料の製造工程でも加温用の蒸気を電気ボイラーで製造する前提条件とした。従って、本工程においても、LCA の検証・評価においてはベースラインと比較して非常に不利である。

5.3.6.1.2. 二次データ

本 LCA では、サプライチェーン上の部品調達先や、製品販売先等の取引先からの一次データ収集はおこなわなかったため、それらのプロセスについては二次データを用いた。二次データは、原則として IDEA V3.1 に含まれるユニットプロセスデータを使用した。

5.3.6.1.3. 評価対象製品

インベントリ、並びに対応させた IDEA 製品名を併記した。なお、IDEA 製品名が空白の箇所については、別途インベントリ収集を実施したプロセスである。

ラビリンチュラ由来脂肪酸とセルロースパーティクルの生産重量、下流におけるそれらの使用量を考慮すると、副原料であるセルロースパーティクルが余る計算となる。つまり、製造される 10.0 kg のセルロースパーティクルのうち、3.14 kg のみを使用する計算である。そのため、本プロセスにおいて、セルロースパーティクルの配分はゼロと考えた。

また、製品の廃棄段階については、リサイクルの可否が現時点では不明のため焼却工程とし、構成成分の 100%がバイオマス由来のためゼロと考えた。実際の廃棄段階では、製品燃焼時の GHG 排出以外の廃棄処理自体の負荷についても存在するが、比較対象製品と合わせてゼロとした。

<① パルプ由来糖化液の製造・パルプ由来セルロースパーティクルの製造>

入手したデータを示す（表 5-2）。併せて、電力算出に関するデータも示す（表 5-3）。パルプ糖化に用いる酵素の負荷はゼロとした。

表 5-2 フォアグラウンドデータ

入出力	分類	項目	値	単位	IDEA 製品名
出力	製品	グルコース	624.6	kg	
	複製品	セルロース パーティクル	10	kg	
入力	主原料	パルプ	100.00	kg	パルプ, 4 桁
	副原料	酵素	10.00	kg	-
		水	0.80	m3	工業用水道
		苛性ソーダ	15.00	kg	苛性ソーダ（液体 97%換算・固形有 姿）
	ユーティリティ	電力	193.00	kWh	電力, 一般電気事業 者 10 社平均, 2015 年度
	処理	排水処理	290.00	L	下水道処理サー ビス
	輸送	酵素	5.00	tkm	トラック輸送サー ビス, 20 トン車, 積 載率_平均
		苛性ソーダ	7.50	tkm	トラック輸送サー ビス, 20 トン車, 積 載率_平均
		パルプ	50	tkm	トラック輸送サー ビス, 20 トン車, 積 載率_平均

表 5-3 電力算出

主要設備 (工程)	詳細	kW	h	kWh	備考
2 t キルタンク (糖化)	モーター	1.5	12.0	18.00	
	電気ボイラー	125.0	0.5	62.50	
セラミック膜ろ過 (糖液回収)	ポンプ	7.5	15.0	112.50	
計		134.0	27.50	193.00	

<② パルプ由来糖化液を用いたラビリンチュラの培養>

入手したデータを示す（表 5-4）。併せて、電力算出に関するデータも示す（表 5-5）。酵母エキス調達の負荷はゼロとした。

表 5-4 フォアグラウンドデータ

入出力	分類	項目	値	単位	IDEA 製品名
出力	製品	ラビリンチュラ 培養液	650	kg	
入力	主原料	パルプ由来 糖化液	624.60	kg	
	副原料	酵母エキス	5.00	kg	-
		NaCl	7.50	kg	塩化ナトリウム, ポリフェニレンサルファ イド副生
		MgCl ₂ ・6H ₂ O	2.70	kg	塩化マグネシ ウム,6水塩
		MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.35	kg	他に分類され ない無機化学 工業製品
		CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.25	kg	塩化カルシウ ム,2水塩
		KCl	0.18	kg	塩化カリウム
		消泡剤 PE-M	0.20	L	その他の界面 活性剤
	ユーティリティ	電力	2,263.85	kWh	電力, 一般電気 事業者 10 社平 均, 2015 年度
	輸送	酵母エキス	2.50	tkm	トラック輸送 サービス, 20ト ン車, 積載率_ 平均
		NaCl	3.75	tkm	トラック輸送 サービス, 20ト ン車, 積載率_ 平均
MgCl ₂ ・6H ₂ O		1.35	tkm	トラック輸送 サービス, 20ト ン車, 積載率_ 平均	

表 5-4 (続き) フォアグラウンドデータ

入出力	分類	項目	値	単位	IDEA 製品名
入力	輸送	CaCl ₂ ・2H ₂ O	0.13	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均
		KCl	0.09	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均
		消泡剤 PE-M	0.10	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均

表 5-5 電力算出

主要設備 (工程)	詳細	kW	h	kWh	備考
30 L (シード培養)	モーター	0.75	15.0	11.25	
	ヒーター	1.00	15.0	15.00	
	コンプレッサー	2.20	15.0	33.00	
	電気ボイラー	125.00	0.5	62.50	
1 kL 培養タンク (本培養)	ポンプ	3.70	92.0	340.40	
	ヒーター	10.00	90.0	900.00	
	コンプレッサー	2.20	92.0	202.40	
	電気ボイラー	125.00	1.5	187.50	
30 L (培地フィード, 2回分)	モーター	0.75	4.0	3.00	
	コンプレッサー	2.20	4.0	8.80	
	電気ボイラー	125.00	4.0	500.00	
計		397.80	333.00	2263.85	

<③ ラビリンチュラ由来脂肪酸の製造>

入手したデータを示す（表 5-6）。併せて、電力算出に関するデータも示す（表 5-7）。

表 5-6 フォアグラウンドデータ

入出力	分類	項目	値	単位	IDEA 製品名
出力	製品	脂肪酸	8	kg	
入力	主原料	ラビリンチュラ 培養液	650.00	kg	
	副原料	クロロホルム	357.60	kg	トリクロロフル オロメタン
		メタノール	95.52	kg	メタノール
		分離剤	5.00	L	潤滑油 (グリース を含む)
	ユーティリティ	電力	760.75	kWh	電力, 一般電気事 業者 10 社平均, 2015 年度
	処理	洗浄水	0.80	m ³	工業用水道
		排水処理 (プロセス)	0.64	m ³	下水道処理サー ビス
		排水処理 (洗浄水)	0.80	m ³	下水道処理サー ビス
		菌体	40.00	kg	産廃処理サー ビス, 動植物性残渣
		クロロホルム	357.60	kg	産廃処理サー ビス, 廃油
		メタノール	95.52	kg	産廃処理サー ビス, 廃油
		分離剤	4.45	kg	産廃処理サー ビス, 廃油
	輸送	クロロホルム	178.80	tkm	トラック輸送サ ービス, 20 トン車, 積載率_平均
		メタノール	47.76	tkm	トラック輸送サ ービス, 20 トン車, 積載率_平均
分離剤		2.23	tkm	トラック輸送サ ービス, 20 トン車, 積載率_平均	

表 5-7 電力算出

主要設備 (工程)	詳細	kW	h	kWh	備考
セラミック膜ろ過 (菌体濃縮)	モーター	7.5	15.0	112.50	
抽出槽 (脂肪酸抽出)	モーター	1.5	0.5	0.75	
濃縮缶 (溶媒留去)	モーター	1.5	5.0	7.50	
	真空ポンプ	1.5	5.0	7.50	
	冷水チラー	1.5	5.0	7.50	
	ボイラー	125.0	5.0	625.00	電気ボイラーで計算
計		138.5	35.5	760.8	

※ 上記すべての設備において、類似設備より算出

＜④ パルプ由来セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの合成＞

入手したデータを示す（表 5-8）。併せて、電力算出に関するデータも示す（表 5-9）。有機溶媒の廃棄段階については廃油として計上し、非エネルギー起源の CO2 と考えた。

表 5-8 フォアグラウンドデータ

入出力	分類	項目	値	単位	IDEA 製品名
出力	製品	バイオプラスチック	9	kg	
入力	主原料	脂肪酸	8.00	kg	
	副原料	セルロースパーティクル	3.14	kg	
		ピリジン	39.31	kg	ピリジン
		塩化オキサリル	0.20	kg	しゅう酸, アジピン酸副生
		メタノール(沈殿化)	299.93	kg	メタノール
		クロロホルム	82.34	kg	トリクロロフルオロメタン
		メタノール(再沈殿化)	299.93	kg	メタノール
		メタノール(洗浄)	74.98	kg	メタノール
	ユーティリティ	電力	11,770.50	kWh	電力, 一般電気事業者 10社平均, 2015年度
	処理	メタノール	674.85	kg	産廃処理サービス, 廃油
		ピリジン	39.31	kg	産廃処理サービス, 廃油
		クロロホルム	82.34	kg	産廃処理サービス, 廃油
	輸送	ピリジン	19.65	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均
塩化オキサリル		0.10	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均	

表 5-8 (続き) フォアグラウンドデータ

入出力	分類	項目	値	単位	IDEA 製品名
入力	輸送	メタノール	149.97	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均
		クロロホルム	41.17	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均
		メタノール	149.97	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均
		メタノール	37.49	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均
	製品輸送	バイオプラスチック輸送	4.50	tkm	トラック輸送サービス, 20トン車, 積載率_平均

表 5-9 電力算出

主要設備 (工程)	詳細	kW	h	kWh	備考
反応缶 (パルプ前処理)	モーター	1.5	24.0	36.00	
	ボイラー	125.0	24.0	3000.00	電気ボイラーで計算
反応缶 (合成反応)	モーター	1.5	21.0	31.50	
	ボイラー	125.0	21.0	2625.00	電気ボイラーで計算
反応缶 (沈殿化)	モーター	1.5	1.0	1.50	
反応缶 (再溶解)	モーター	1.5	1.0	1.50	
反応缶 (再沈殿化)	モーター	1.5	1.0	1.50	
反応缶 (洗浄)	モーター	1.5	1.0	1.50	
乾燥	真空ポンプ	1.5	48.0	72.00	
	ボイラー	125.0	48.0	6000.00	電気ボイラーで計算
計		385.5	190.0	11770.50	

5.3.6.1.4. 比較対象製品

インベントリ、並びに対応させた IDEA 製品名を併記した（表 5-10）。なお、IDEA 製品名が空白の箇所については、別途インベントリ収集を実施したプロセスである。

廃棄段階については、焼却を考慮し、化学式（ $C_2H_4 + 3O_2 \rightarrow 2CO_2 + 2H_2O$ ）より、1 kg のポリエチレン（28 g- C_2H_4/mol ）より 3.38 kg の CO_2 （44 g- CO_2/mol ）が排出されるものとみなした。廃棄処理自体の負荷については、バイオプラスチックと同様に計上しないものとした。

表 5-10 フォアグラウンドデータ

入出力	分類	項目	値	単位	IDEA 製品名
出力	製品	石油由来 PE	1	kg	
入力		ポリエチレン	1	kg	ポリエチレン
	製品輸送	プラスチック輸送	0.50	tkm	トラック輸送サービス, 20 トン車, 積載率_平均

5.3.7. ライフサイクル影響評価

5.3.7.1. 評価対象 vs. 比較対象

評価対象製品と比較対象製品 1 kg あたりの GHG 排出量の比較結果を示す（図 5-2）。

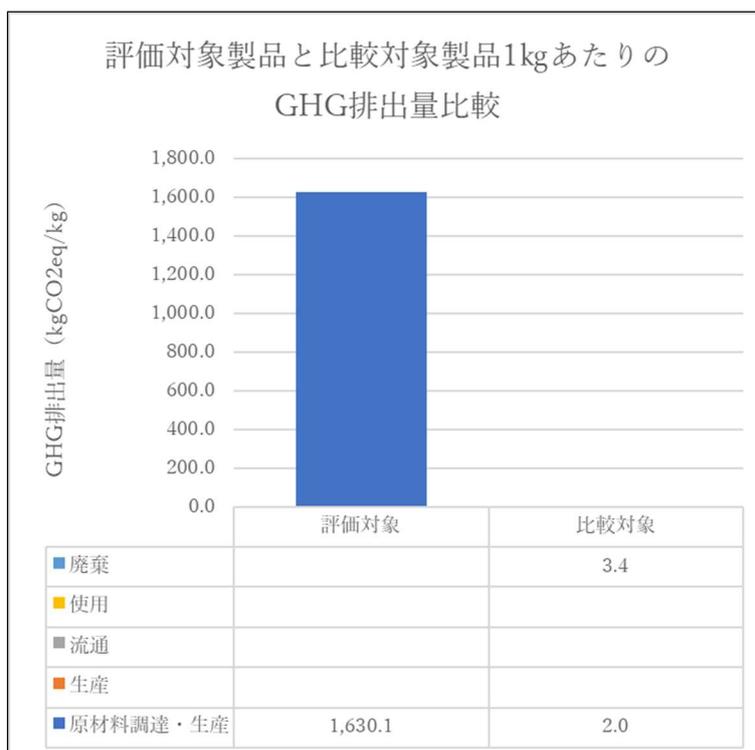


図 5-2 評価対象製品と比較対象製品 1 kg あたりの GHG 排出量比較

図 5-2 より、評価対象製品の GHG 排出量に与える影響が、現時点においては非常に大きいことが判明した。

続いて、評価対象製品 1 kg における GHG 排出量の内訳を示す（図 5-3）。

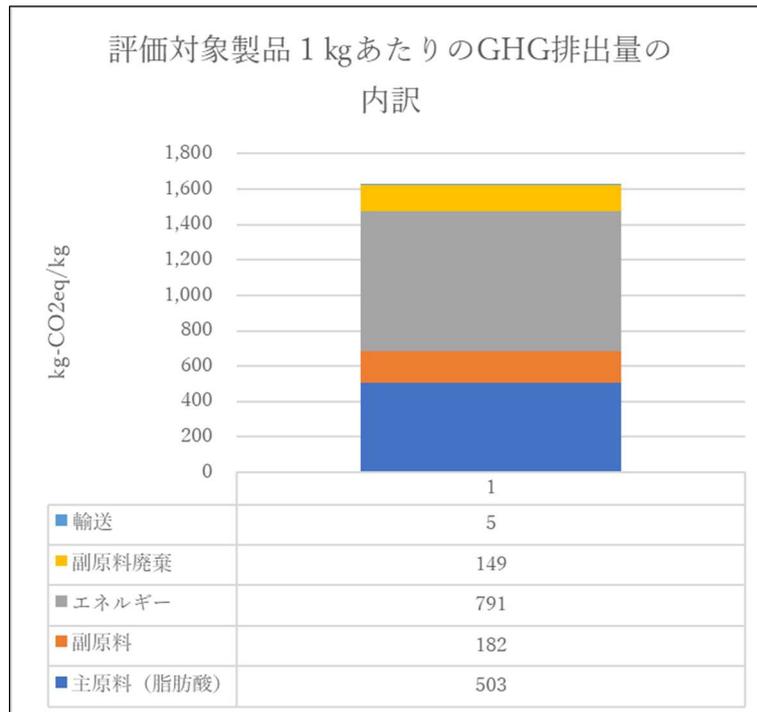


図 5-3 評価対象製品 1 kg あたりの GHG 排出量内訳

図 5-3 より、GHG 排出量はエネルギーが最も多く、次いで主原料（脂肪酸）、副原料、副原料廃棄の順となった。

先の評価結果は、算定した CO₂ 排出量はすべてエネルギー起源 CO₂ と非エネルギー起源 CO₂ を合算した値になる。次に、CO₂ 排出量を、エネルギー起源 CO₂ と非エネルギー起源 CO₂ に分けて評価した（表 5-11, 5-12）。

バイオ由来プラスチックの原材料調達・生産段階について、副原料の廃棄による CO₂ は非エネルギー起源 CO₂ と考え、それ以外はすべてエネルギー起源 CO₂ とした。石油由来プラスチックの原材料調達・生産段階に排出される CO₂ は全てエネルギー起源 CO₂ と考えた。

表 5-11 エネルギー起源 CO₂、非エネルギー起源 CO₂
セルロースパーティクル由来バイオプラスチック（1 kg あたり）

	エネルギー起源 kg-CO ₂ eq	非エネルギー起源 kg-CO ₂ eq	合計 kg-CO ₂ eq
原材料調達・生産	1395.9	234.2	1630.1
生産	-	-	-
流通	-	-	-
使用	-	-	-
廃棄	0	0	0
合計	1395.9	234.2	1630.1

表 5-12 エネルギー起源 CO₂、非エネルギー起源 CO₂
石油由来プラスチック (1 kg あたり)

	エネルギー起源 kg-CO ₂ eq	非エネルギー起源 kg-CO ₂ eq	合計 kg-CO ₂ eq
原材料調達・生産	2.05	0	2.05
生産	-	-	-
流通	-	-	-
使用	-	-	-
廃棄	0	3.38	3.38
合計	2.05	3.38	5.43

表 5-11 より、評価対象製品については、エネルギー起源 CO₂ に関連する GHG 排出量が、現時点においては非常に多いことが判明した。

石油由来 CO₂ と算定結果を比較した場合においても、エネルギー起源 CO₂、非エネルギー起源 CO₂ 共に GHG 排出量は顕著に高い結果となった (表 5-11, 5-12)。

5.3.7.2. CO₂ 削減効果

本実証事業におけるバイオプラスチック原料の製造では、CO₂ 排出量が大きく、製造方法に課題を残す結果となった。CO₂ 削減シナリオは後述する (5.3.9.2.)。

5.3.8. ライフサイクル解釈

評価対象製品について、比較対象製品に対して GHG 排出量が顕著に大きくなる結果となった。GHG 排出量が大きくなったのは、一次データの全工程 (①パルプ由来糖化液の製造・パルプ由来セルロースパーティクルの製造、②パルプ由来糖化液を用いたラビリンチュラの培養、③ラビリンチュラ由来脂肪酸の製造、④パルプ由来セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの合成) において、エネルギー使用量が大きくなったことが要因である。これは全排出量の 50%以上を占める結果となった。ちなみに、これら一次データは実験室ベースに基づいて抽出しており、設備に関していえば、一般に製造実機よりもエネルギー効率は悪い。

例えば、本実証では熱源として電気ボイラー (大規模工場では重油ボイラー)、培養タンクの温水は電気ヒーターを使用しているため (大規模工場では蒸気で加温された循環温水)、顕著に電力を押し上げている。培養は終夜運転で稼働時間も 100 時間前後と長いため、大きな電力を長時間浪費する設定となっている。このことが GHG 排出量の結果に顕著に負の要素として反映されている。これらのエネルギー源を大規模工場での平均値に置き換えれば、より実製造を反映する GHG 排出量が見えてくると考える。

全工程の中でも、特に GHG 排出量が高いスポットは、④パルプ由来セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの合成であった。他の工程と同様に、電気ボイラーの電力値を用いている。パルプ前処理、合成反応、乾燥では、熱源を要する。終夜運転にも及ぶため、顕著に GHG 排出量を押し

上げる結果となった。これらについても、大規模工場での平均値に置き換えれば、より実製造を反映する GHG 排出量となることが予想できる。なお、本合成方法はプラスチックを合成する上では複雑で高コストなフローであるため、熱源を変えたとしても比較対象製品と比較して、高い GHG 排出量になるのではと推測する。従って、合成方法の改善も必要と考える。

また、副資材であるメタノールの使用、ならびに廃棄についても、現在は非常に大きい環境負荷を占めている。メタノール、クロロホルムといった有機溶媒は蒸留によって回収し再利用が通常可能である。熱源も大規模工場での蒸気で調製される温水を使えば、エネルギー使用量を下げることが可能である。このように、副資材の使用量を削減し、溶媒をリサイクルするプロセスを追加するといった改善策が考えられる。

一方で、廃棄のプロセスにおいては、バイオ由来プラスチックは比較対象製品に対して 3 kg-CO₂eq/kg ほど低いという結果となった。

全体における CO₂ 排出の削減、エネルギー起源 CO₂ の削減のためには、エネルギー効率の最適化が求められる。

5.3.9. 課題・対応策、CO₂ 削減シナリオ

5.3.9.1. 課題・対応策

ライフサイクル解釈を通じて、一次データにおけるエネルギー使用量が顕著に大きいという結果となった。熱源としての電気ボイラー、電気ヒーターを用いており、これらの電力値が非常に大きいことが要因の一つである。この値をフォアグラウンドデータの全工程で反映させており、全体として GHG 排出量を押し上げる結果となった。

中でも、GHG 排出のホットスポットとして、「パルプ由来セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの合成」工程が指摘された。熱源に関する先の理由に加え、合成方法はプラスチックを合成する上では複雑で高コストなフローである。合成方法の改善が必要である。フォアグラウンドデータごとの課題と改善策を示す。

パルプ由来糖化液の製造・パルプ由来セルロースパーティクルの製造

バイオプラスチック製造工場は、製紙工場内に敷設する。パルプの消費量は年々減少しており、原料バージンパルプを用意する。検討を経て、古紙パルプも原料として使用する。パルプの酵素糖化は 50°C 程度で行うため、熱源が必要である。この熱源には、場内で発生する黒液の燃焼から得られた蒸気を用いる。木材などから紙の原料であるパルプを製造するときには、有機性廃液である黒液が発生する。黒液はパルプ工場に設置された専用の回収ボイラーで燃料として使用される。黒液を回収ボイラーで燃焼させるということは、エネルギーを得ると同時にパルプ製造に必要な薬品を再生するためのプロセスの一つでもある。つまり、パルプ製造プラントでは黒液の燃料としての利用が必要不可欠であり、すべてのパルプ製造工場では黒液の燃焼利用が行われている。広葉樹の場合、パルプ 1 t あたり固形分重量で 1.5 t、針葉樹の場合 2.0 t の黒液が副生物として発生する。得られたエネルギーは、主にパルプや紙の製造プロセスでバイオマスエネルギーとして使用され、糖化反応でもこれを利用する。黒液の燃焼で排出される CO₂ はもともと大気中に存在していたものなので、カーボンニュートラルであり、CO₂ を排出しないものとして計算される。糖

化反応では攪拌動力が必要であるが、この電力も黒液の燃焼により発電された電力を用いる。

パルプ糖化後は、糖化液とセルロース残渣を分けるために、セラミック膜によるろ過を行う。スラリーとして回収されたセルロース残渣は脱水され、これらの工程にも工場内で製造された電力を用いる。

パルプ由来糖化液を用いたラビリンチュラの培養

製紙工場内に設置された培養タンクに、製造されたパルプ糖化液を配管移送する。窒素源は酵母エキスから代替する原料を用いる。培地殺菌に必要な熱源は、先の項と同じく工場内で製造された蒸気を使用する。培養には温水の循環が必要であるが、この温水も蒸気で調製する。培養、その他ユーティリティに必要な電力は、黒液燃焼由来の電力を用いる。

ラビリンチュラ由来脂肪酸の製造

培養液は連続遠心分離機、あるいはセラミック膜ろ過を経て、菌体スラリーとなる。これを攪拌しながらクロロホルムを含む有機溶媒を投入し、有機層と水層に静置分離させる。有機層を回収し、溶媒留去を経て、脂肪酸を含む総脂質を得る。蒸留に必要な熱源、すべての工程に必要な電力は、先と同様に工場内で製造・調達する。蒸留で回収された溶媒は、次ロットの製造にてリサイクル使用する。

パルプ由来セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの合成

セルロース残渣は水洗等の前処理を行い、その後はフィルタープレス等により可能な限り水分を除去する。この残渣と総脂質を用い、プラスチック合成を行う。合成、乾燥に必要な熱源、すべての工程に必要な電力は、工場内で製造・調達する。蒸留で回収された溶媒は、次ロットの製造にてリサイクル使用する。

5.3.9.2. CO2削減シナリオ

前述の課題・対応策の内容を反映させて、CO2削減シナリオについて考察した。電力は、全て製紙工場内の再生可能エネルギーを使用する想定とし、原単位をゼロとする。また、本実証事業では、バージンパルプからのグルコースの収率が38.8w/w%と低い(表 5-1)。糖化時間を短くしたことが要因の一つで、糖化可能なセルロースが相当量残存しているため、糖化条件を考慮してグルコースの収率を本実証の2倍へ改善する。培養工程では、菌体の比増殖速度に改善の余地があることが示唆されている(2章)。現段階での乾燥菌体重量は約20 g/Lであり、高密度培養による菌体収率と生産物収率向上の検討を行い、単位バッチあたりの脂肪酸収量を4倍へ改善する。合成工程では、クロロホルムに溶解する区分を回収としており、廃棄される画分が存在するため、製法改善により廃棄部分を削減し、バイオプラスチックの合成収率を2倍へ改善する。この結果、バージンパルプをスタートとしてバイオプラスチックを得るまでの収率が16倍へ改善となる。さらに、実験室レベルの合成方法からの製法改良をはかり、副原料の利用効率を上げて、それらの使用量を10%にまで削減する。加えて、溶媒留去で生じた溶媒は100%リサイクルとする。以上のシナリオをもとに算出した評価対象製品のGHG排出量の内訳を図 5-4 に示す。評価対

象製品の GHG 排出量の総計は、3.41 kg-CO₂eq/kg となり、比較対象製品と比べて、37%の CO₂ 削減を想定できる結果となった（図 5-5）。

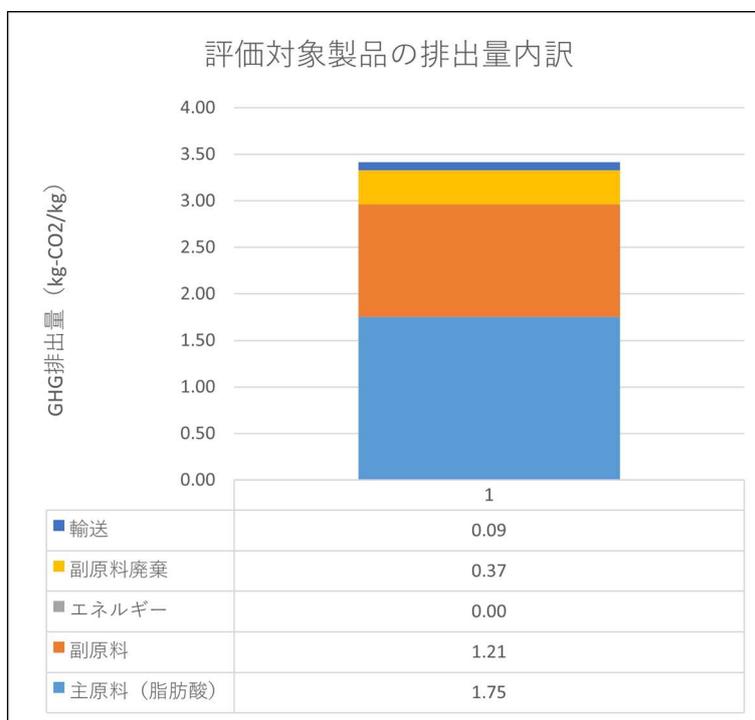


図 5-4 CO₂ 削減シナリオにおける評価対象製品 1 kg あたりの GHG 排出量内訳

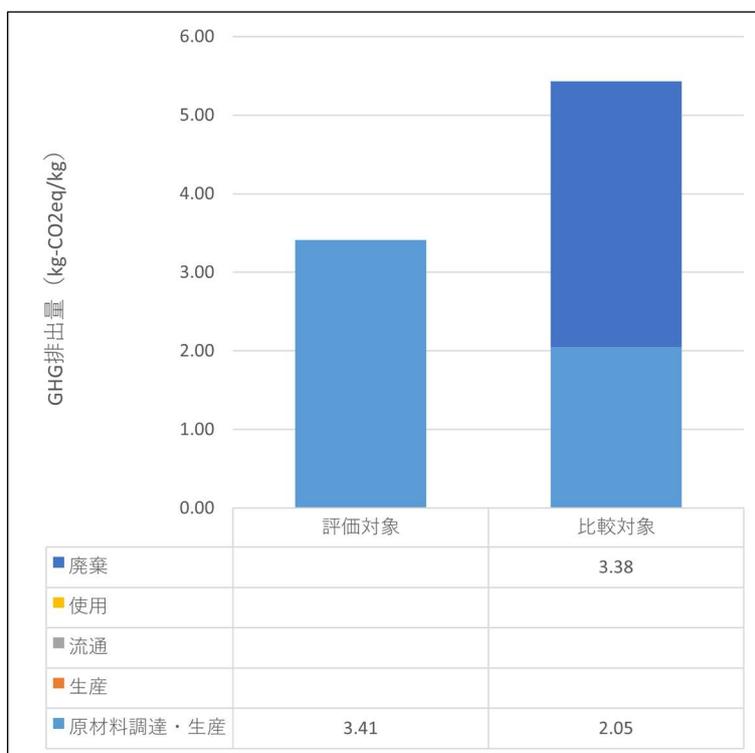


図 5-5 CO₂ 削減シナリオにおける評価対象製品と比較対象製品 1 kg あたりの GHG 排出量比較

5.4. 本章のまとめ

パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸から製造したバイオプラスチックについての環境負荷と、従来の石油由来のプラスチックの環境負荷の比較を行い、代替した場合の CO₂ 削減効果を評価した。CO₂ 排出量の評価は、LCA 手法を適用した。本事業においてはバイオプラスチック開発の初期段階であるため、得られた検証結果は、後に製造プロセスの改善に反映させることを想定し、CO₂ 排出の全体像、および CO₂ 排出のボトルネックであるホットスポットを把握することを目的とした。

ライフサイクル解釈を通じて、一次データにおけるエネルギー使用量が顕著に大きいという結果となった。熱源としての電気ボイラー、電気ヒーターを用いており、これらの電力値が非常に大きいことが主な要因である。この値をフォアグラウンドデータの全工程で反映させており、全体として GHG 排出量を押し上げる結果となった。

GHG 排出のホットスポットとして、「パルプ由来セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの合成」工程が指摘された。熱源に関する先の理由に加え、合成方法はプラスチックを合成する上では複雑で高コストなフローである。合成方法の改善の必要性が示唆された。

最後に、CO₂ 削減の対応策と CO₂ 削減シナリオについて考察した。電力は、全て製紙工場内の再生可能エネルギーを使用する想定とし、原単位をゼロとする。パルプからのグルコース収率、培養での脂肪酸収率、バイオプラスチック合成収率の向上により、バージンパルプをスタートとしてバイオプラスチックを得るまでの収率が 16 倍へ改善となる。さらに、実験室レベルの合成方法からの製法改良をはかり、副原料の利用効率を上げて、それらの使用量を 10%にまで削減する。加えて、溶媒留去で生じた溶媒は 100%リサイクルとする。これらを踏まえた検討の結果、評価対象製品の GHG 排出量の総計は、3.41 kg-CO₂eq/kg となり、比較対象製品と比べて、37%の CO₂ 削減を想定できる結果となった。

6. 本実証事業のまとめ

本実証事業の成果は、次のようにまとめられる。

(1) ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発

バイオプラスチック合成用の副原料としてラビリンチュラ由来脂肪酸を供給するため、ベンチスケールテストからパイロットスケールへの段階を経て、ラビリンチュラ培養のスケールアップに関する技術開発を遂行した。

スケールの異なる設備に対して、同等の酸素供給条件を導くのに有効な kLa -rpm 相関データを活用し、5 L, 30 L, 1 kL 培養タンクを経てスケールアップ培養を行った。また、用いた培養設備は同じ機能を有していなかったため、1 kL 培養タンクで実施可能な培養方法を考え、30 L-Jar にてその手法の可否について検討を行った。バッチ（回分）フィード法による培地の流加は、脂質の産生に対して問題無いことを明らかとした。また、pH 調整剤による pH の制御、消泡剤の追添加が不要であることを示した。大規模培養の実施を前に、培地殺菌条件に関する知見も見出した。

これらの要素を含めて 1 kL 培養タンクによる大規模培養を行い、想定通りに 1 kL 培養タンクでの大規模培養を遂行できた。本培養方法の妥当性が示された。

投入されたグルコース量 45.0 kg（理論値）から求められる総脂質収率は 25.1%、総脂肪酸収率は 20.6% であった。定量分析により、乾燥菌体中の 66.9 w/w% が脂肪酸であることが示され、1 kL 培養 1 バッチ（理論ブロス液量：639.4 L）で得られる菌体中に含まれる総脂肪酸重量は 9,257 g と理論的に導かれた。脂肪酸の組成は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸が 50.7% と最も多く、ドコサヘキサエン酸（DHA）が 35.7% と続く結果となった。

単位バッチあたりで更に多くの菌体と脂肪酸を得るには、特に培養基材、培地組成の改善が必要である。また、原価低減のために、安価な糖液や窒素源への転換が望まれる。

(2) ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討

これまでに検討された過去の脂肪酸抽出方法も交えて、ラビリンチュラ由来脂肪酸抽出のスケールアップ手法の検討を行った。

結果、抽出溶媒としてヘキサンを用いた場合には、ほとんど脂質を回収できず、Folch 法でのクロロホルム（+メタノール）を用いた手法が顕著に有効であることが示された。

これを受けて、Folch 法のスケールアップへ向けた検討を行った。検討の結果、エマルション層は確認されるものの、菌体スラリー容量の 7 倍当量の添加で比較的良好な分離が認められた。分離剤の添加によりエマルション層を削減できる余地はあり、製造実機での脂肪酸の抽出において、クロロホルムを用いた脂質抽出法を適用できる可能性があるものと考察した。

(3) パルプ粕由来バイオプラスチックの合成と成形特性評価

抄紙工程後のパルプ粕を分子骨格として用い、理論上は生物成分率 100% のプラスチック合成品を得ることを最初の目的とした。脂肪酸の中でも安価で大量に入手可能なパルミチン酸（C16:0）を用い、水酸基置換度が飽和であるパルミチン酸変性パルプ（パルミトイル化パルプ）の合成を行った。次いで、ドコサヘキサエン酸（DHA）

を用いたドコサヘキサエン酸変性パルプの調製を行った。結果、パルミチン酸を用いた場合（水酸基置換度：2.5, 3.0）、DHAを用いた場合（水酸基置換度：2.6）の双方で、プラスチック合成品を得ることができた。理論上は生物成分率 100%のプラスチックを合成可能であることが示唆された。

構造がシス型のため直鎖ではない DHA（塩化物は DHA-Cl）を用いた場合では、DHA 変性パルプ（水酸基置換度：2.6）が得られ、パルプとも反応していると考えられたが、その収率は非常に低かった。NMR 分析では、セルロース部位のピークはほとんど確認できなかった。これは、DHA の構造に含まれるアリル基の繰り返し部分の反応性が高いことから、エステル化中にアリル基部分で副反応が生じ、架橋構造が形成されたものと考えられた。簡易的に熱可塑性の有無を評価したところ、200°Cで軟化する前に焦げて炭化した。DHA は熱や酸素に弱いことから、DHA のみをエステル化することで成形可能な熱可塑性を付与することは難しいと考えられた。また、熱安定性の観点からも DHA をプラスチック材料に適用することは難しい可能性が高いものと考えられた。

得られた化合物に対して適宜熱物性、機械物性を評価した。水酸基置換度 2.5 のパルミチン酸変性パルプについて、熱物性に関して DSC での明確な数値は得られなかったものの、ホットプレート上での加熱にて 175~200°C程度で軟化が確認され、熱可塑性自体は有していることが示された。なお、引張試験では、150°C、100 kN で熱プレスすることで、試験片を問題なく作製することができた。パルミチン酸変性パルプ（水酸基置換度：2.5）の引張強さは 7.04 MPa、引張弾性率（JIS 規格）は 287.0 MPa であった。

（4）LCA の検証・評価

パルプ糖化後の結晶性の残渣であるセルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸から製造したバイオプラスチックについての環境負荷と、従来の石油由来のプラスチックの環境負荷の比較を行い、代替した場合の CO₂ 削減効果を評価した。CO₂ 排出量の評価は、LCA 手法を適用した。本実証事業においては、後に製造プロセスの改善に反映させることを想定し、CO₂ 排出の全体像、および CO₂ 排出のボトルネックであるホットスポットを把握することを目的とした。

ライフサイクル解釈を通じて、一次データにおけるエネルギー使用量が顕著に大きいという結果となった。熱源としての電気ボイラー、電気ヒーターを用いており、これらの電力値が非常に大きいことが主な要因である。この値をフォアグラウンドデータの全工程で反映させており、全体として GHG 排出量を押し上げる結果となった。

GHG 排出のホットスポットとして、「パルプ由来セルロースパーティクルとラビリンチュラ由来脂肪酸を用いたバイオプラスチックの合成」工程が指摘された。熱源に関する先の理由に加え、合成方法はプラスチックを合成する上では複雑で高コストなフローである。合成方法の改善の必要性が示唆された。

CO₂ 削減の対応策と CO₂ 削減シナリオについて考察した。電力は、全て製紙工場内の再生可能エネルギーを使用する想定とし、原単位をゼロとする。パルプからのグルコース収率、培養での脂肪酸収率、バイオプラスチック合成収率の向上により、バージンパルプをスタートとしてバイオプラスチックを得るまでの収率が 16 倍へ改善となる。さらに、実験室レベルの合成方法からの製法改良をはかり、副原料の利用効率を上げて、それらの使用量を 10%にまで削減する。加えて、溶媒留去で

生じた溶媒は 100%リサイクルとする。これらを踏まえた検討の結果、評価対象製品の GHG 排出量の総計は、3.41 kg-CO₂eq/kg となり、比較対象製品と比べて、37%の CO₂ 削減を想定できる結果となった。

(5) 「非食用の多糖類を利用したバイオプラスチック製造の実証事業」の現地視察会及び検討会の開催

- 日時 12月9日(金) 13:00~16:30
- 場所 株式会社 Biomaterial in Tokyo 本社
福岡県大野城市川久保 1-3-22 1F
株式会社 Biomaterial in Tokyo クリエイション・コア福岡
福岡県筑紫野市上古賀 3-2-16
- 視察会メンバー (計5名)
- 実証事業メンバー (計1名)
株式会社ラビリンチュラ 代表取締役 廣末慎嗣

7. 参考文献

- [1.1] 平成 25 年度～28 年度成果報告書, バイオマスエネルギー技術研究開発/バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業: 可溶性糖質源培養による木質系バイオマス由来パルプ分解用酵素生産の研究開発
- [1.2] 平成 27 年度～31 年度成果報告書, セルロース系エタノール生産システム総合実証事業: 最適組合せの検討及び事業性評価/パルプを用いた水蒸気爆砕法によるバイオエタノール生産に関する技術開発及び事業性評価
- [1.3] 平成 25 年度～26 年度成果報告書, 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
- [1.4] 平成 29 年度～30 年度成果報告書, ベンチャー企業等による新エネルギー技術革新支援事業(バイオマス): 油糧微生物ラビリンチュラによるバイオ燃料製造への地域バイオマス資源の有用性検証
- [1.5] 平成 23 年度～27 年度成果報告書, 戦略的創造研究推進事業(ALCA): 非食用の多糖類を利用したバイオプラスチックの研究開発
- [2.1] 石崎文彬, 「発酵工学の基礎」, 学会出版センター
- [2.2] 中村豊, 総括酸素移動容量係数の測定と酸素移動速度, 環境技術, **11**, 37(1982)
- [3.1] J. Folch et al., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497(1957).
- [4.1] 波多野慎吾, 高分子論文集, **59**, 511(2002)
- [5.1] 日本語訳 JIS Q 14040 (2010), 環境マネジメント ライフサイクルアセスメント-原則及び枠組み, (一財) 日本規格協会 (2010), <http://kikakurui.com/q/Q14040-2010-01.html>
- [5.2] 日本語訳 JIS Q 14044 (2010), 環境マネジメント ライフサイクルアセスメント-要求事項及び指針, (一財) 日本規格協会 (2010), <http://kikakurui.com/q/Q14044-2010-01.html>