

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

(うち、廃棄物等バイオマスを用いた省CO<sub>2</sub>型ジェット燃料又は  
ジェット燃料原料製造・社会実装化実証事業)  
(木質バイオマス由来のバイオジェット燃料生産実証事業)

成果報告書

令和5年3月

Green Earth Institute 株式会社

## 要約

地球温暖化問題が深刻化する中で、二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）削減を進めるために、国内外でSAF（Sustainable Aviation Fuel：持続可能な航空燃料）の導入目標の設定や義務化が進んでいる。しかしながら、SAFのコストが下がらず、普及が進んでいないのが現実である。さらに、日本国内では、原料を海外から輸入するケースが多く、その輸送に係るCO<sub>2</sub>排出をカウントすると、結果としてCO<sub>2</sub>削減効果は小さく、本来のSAFの導入目的を達成できない状況にある。また、安定的なSAFの確保のためには、国産原料を有効活用していくことが重要である。

従って、本事業では、古紙及び木材チップを原料とし、ASTM D7566 Annex2 及び Annex5 に適合するバイオジェット燃料を一貫して製造するプロセスを開発し、社会実装可能なコスト（300 円/L 以下）かつ CO<sub>2</sub> 排出量の 80%以上削減（化石燃料由来のジェット燃料比）を実現する SAF の社会実装を目指した。

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

- (1) 古紙及び木材チップの前処理プロセスに関する技術開発  
製紙工場で得られた 4 種のパルプ材料について、250ml フラスコおよび 1L ジャーを使った糖化実験を行い、広葉樹クラフト漂白パルプの糖化効率が最も良いことを見出した。
- (2) 糖化酵素の効率的利用に関する技術開発  
250ml フラスコおよび 1L ジャーを使った糖化実験において、酵素を 5 回利用することを試み、達成した。
- (3) 糖液からのエタノール生産プロセスに関する技術開発  
1L ジャーを使ったエタノール生産実験において、育種改良した酵母を用いて対糖収率が、0.41g/sugar g に達成することができた。
- (4) エタノールからの SAF 製造プロセスに関する技術開発  
効率的な触媒条件により、炭化水素油を 20ml 生産することができた。
- (5) 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発  
既存ライブラリーの中で不飽和脂肪酸含量が少ない株を 2 株選択し、そのうち mh1916 株は、5 kL ジャーでの培養を実施することができた。ま

た、乾燥菌体から 73.7%の油脂回収に成功し、最適に近い流加培養法を確立できた。

(6) ラビリンチュラ大量高密度培養法の確立

高密度培養法確立の一環として「流加培養」技術を 5 L 系で確立した。また、得られた流加培養技術を基に mh1916 株は、5 kL の培養槽での高密度培養を実現した。これにより最適培養時の酵素濃度に関して 4~5.5 mg/L であることが得られた。

(7) ASTM D7566 Annex2 に適合した SAF の製造

(5), (6) より得られた脂肪酸を原料として、HiBD 法での Annex2 に準拠する SAF の試験製造を実施し、2.8 L 製造することに成功し ASTM D7566 Annex2 適合性評価を依頼した。

(8) LCA の検証・評価

ラボスケールでのデータを基に LCA を実施し、異なる原料・製造方法の比較検証・評価を行った。

## Summary

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

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

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

Saccharification experiments were conducted on four types of pulp material obtained from paper mills using 250 ml flasks and 1L jar fermenters, and it was found that the saccharification efficiency of bleached hardwood kraft pulp was the highest.

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

In a saccharification experiment using 250 ml flasks and 1 L jar fermenters, the enzyme was successfully recycled five times.

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

In an ethanol production experiment using a 1L jar fermenters, a yield of 0.41 g/sugar g of sugar was achieved using an improved yeast.

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

Hydrocarbon oil could be produced under efficient catalytic conditions.

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

Two strains with low unsaturated fatty acid content were selected from our library. Of these, strain mh1916 was successfully cultured in a 5 kL jar and recovered 73.7% of fatty acids from dried bacteria, thus establishing a near-optimal flow-incubation method.

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

As part of the establishment of a high-density culture method, a 'Fed-batch culture' technique was established in a 5 L system.

Based on the flow-added culture technique, high-density culture of strain mh1916 was achieved in a 5 kL culture tank. As a result, an enzyme concentration of 4-5.5 mg/L was obtained for the optimum culture.

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

Using the fatty acids obtained from (5) and (6) as raw materials, test production of SAF compliant with Annex 2 using the HiBD method was carried out and 2.8 L of SAF was successfully produced.

## 目次

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

(担当：Green Earth Institute 株式会社)

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 背景と目的                                 | 9  |
| 1 - (1) 古紙及び木材チップの前処理プロセスに関する技術開発     | 12 |
| 1 - (1) - 1 木質原料の処理方法の検討              | 12 |
| 1 - (1) - 2 前処理した木質原料の成分分析            | 15 |
| 1 - (1) - 2 - 1 サンプルの脱水処理と保管          | 15 |
| 1 - (1) - 2 - 2 パルプ試料中の灰分測定           | 16 |
| 1 - (1) - 2 - 3 パルプ試料中の単糖組成           | 17 |
| 1 - (1) - 3 市販酵素を用いた糖化評価              | 19 |
| 1 - (1) - 3 - 1 250ml フラスコを用いた糖化評価    | 19 |
| 1 - (1) - 3 - 2 1L ジャーファーマンターを用いた糖化評価 | 25 |
| 1 - (1) まとめ                           | 27 |
| 1 - (2) 糖化酵素の効率的利用に関する技術開発            | 29 |
| 1 - (2) - 1 糖化酵素の選定                   | 29 |
| 1 - (2) - 2 前処理木質原料に対する酵素評価           | 30 |
| 1 - (2) - 3 酵素のリサイクル利用の検証             | 33 |
| 1 - (2) - 3 - 1 100ml 培養系での酵素リサイクル    | 34 |
| 1 - (2) - 3 - 2 1L ジャーを用いた酵素リサイクル     | 36 |
| 1 - (2) まとめ                           | 38 |
| 1 - (3) 糖液からのエタノール生産プロセスに関する技術開発      | 39 |
| 1 - (3) - 1 キシロース資化酵母のスクリーニング         | 39 |
| 1 - (3) - 1 - 1 キシロース資化性の高い酵母のスクリーニング | 39 |
| 1 - (3) - 1 - 2 キシロース資化酵素活性           | 44 |
| 1 - (3) - 2 耐熱性の評価                    | 47 |
| 1 - (3) - 3 エタノール耐性の評価                | 49 |

|                 |                             |    |
|-----------------|-----------------------------|----|
| 1 - (3) - 4     | キシロース資化酵母の育種                | 51 |
| 1 - (3) - 5     | 組換えによるキシロース資化遺伝子の強化         | 52 |
| 1 - (3) - 5 - 1 | 耐熱性                         | 52 |
| 1 - (3) - 5 - 2 | ストレス耐性                      | 53 |
| 1 - (3) - 6     | 選別株による同時糖化発酵                | 55 |
| 1 - (3) - 6 - 1 | フラスコによる同時糖化発酵               | 55 |
| 1 - (3) - 6 - 2 | 1L ジャーファーマンターによる同時糖化発酵      | 58 |
| 1 - (3) - 7     | まとめ                         | 61 |
| 1 - (4)         | エタノールからの SAF 製造プロセスに関する技術開発 | 62 |
| 1 - (4) - 1     | SAF の状況調査                   | 62 |
| 1 - (4) - 1 - 1 | Annex5 詳細                   | 66 |
| 1 - (4) - 1 - 2 | エタノール to ジェットの経緯            | 70 |
| 1 - (4) - 1 - 3 | ETJ 事業化の動き                  | 72 |
| 1 - (4) - 2     | ETJ 技術の調査                   | 73 |
| 1 - (4) - 3     | SAF 製造実験計画                  | 75 |
| 1 - (4) - 4     | 実験結果とまとめ                    | 75 |

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

（担当：株式会社 Biomaterial in Tokyo）

|             |                        |     |
|-------------|------------------------|-----|
| 背景と目的       | 77                     |     |
| 2 - (1)     | 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発 | 83  |
| 2 - (1) - 1 | 流加培養方法の検討              | 83  |
| 2 - (1) - 2 | 流加培地の検討                | 91  |
| 2 - (1) - 3 | 浮上菌体抑制の検討              | 95  |
| 2 - (1) - 4 | 油脂回収方法の検討              | 103 |
| 2 - (1) - 5 | ラビリントラの油脂組成分析          | 105 |

|             |                                 |     |
|-------------|---------------------------------|-----|
| 2 - (2)     | ラビリントラ大量高密度培養法の確立               | 108 |
| 2 - (3)     | ASTM D7566 Annex2 に適合した SAF の製造 | 115 |
| 2 - (4)     | まとめ                             | 130 |
| 第 3 章       | LCA の検証・評価                      | 133 |
| 3 - (1) - 1 | 各プロセスの技術開発構成                    | 133 |
| 3 - (1) - 2 | GEI_ETJ プロセスフロー                 | 134 |
| 3 - (1) - 3 | BITS_HEFA プロセスフロー               | 138 |
| 3 - (1) - 4 | LCA の検証・評価まとめ                   | 142 |

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

### 背景と目的

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

木質資源をベースにしたバイオエタノール生産は、国内でも国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）などいくつかの実証事業で検討されてきた。木質資源をより効率よく糖化させることが、エタノール生産を上げるための一つのカギとなる。樹木植物の茎部には木質細胞が蓄積される。広葉樹では長さ0.5~1.2mm程度の木部繊維細胞が形成され、針葉樹では、長さ1~2mmの仮道管が形成され、いずれも針状の長い細胞であり、二次細胞壁が肥厚し重量のほとんどを占める。木質資源（二次細胞壁）の構成要素として、約50%がセルロース、約25%がヘミセルロース、約25%をリグニンが占める。この割合や、各要素の化学組成は針葉樹、広葉樹あるいは樹種によって様々なバリエーションが見られる。広葉樹ヘミセルロースの特徴として、80%以上がグルクロノキシランで構成されるが、針葉樹ヘミセルロースは、60%以上をグルコマンナンで構成される。セルロース、ヘミセルロースを単糖まで効率よく加水分解（糖化）させ、その単糖を余すことなく発酵によりエタノール生産できることが理想と考える。未処理の木材を粉碎した原料から、セルラーゼなどの酵素によっ

て糖化させる場合、細胞壁に存在するリグニンがセルロースマイクロフィブリル外側にヘミセルロースとともに形成されるネットワークに入り込むように架橋結合しているため、セルラーゼなどの酵素がセルロースあるいはヘミセルロースまで辿り着けず分解を阻害する。そのため、前処理としてリグニンを除く、あるいはセルロース部分を露出させる工程が必要となる。本事業では、木質原料の前処理として、製紙工場で最初のステップとして脱リグニンを行うアルカリ蒸解工程に着目した。国内で生産される化学パルプのほとんどは、クラフトパルプ法による生産で、苛性ソーダと硫化ソーダを用いてアルカリ蒸解により脱リグニン反応を促す。この脱リグニン工程により、セルロース及びヘミセルロースの純度が95%以上に高められ、糖化原料として最高の材料となると考えている。また、アルカリ蒸解によって溶出されるリグニンは、濃縮燃焼により、工場内の電力、蒸気として熱回収が行われ、GHG 排出量を大幅に下げることができる。この様に、製紙工場には、脱リグニンのアルカリ蒸解工程の設備をはじめとして、リグニンをエネルギーとして回収するシステム、排水設備など、木質資源のバイオリファイナリーに必要なインフラの大部分がすでに完備されており、設備投資額を抑えることが可能である。

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

Green Earth Institute が担当する、木質資源由来のエタノールの高効率化生産システムの開発と、そのエタノールを用いたジェット燃料製造の特徴としては、製紙工場で製造することを前提として、アルカリ蒸解したパルプを洗浄後、エネルギーを用いて乾燥することなく糖化工程に移行できるように、未乾燥パルプを原料にすることを考えた。パルプには、用途によって広葉樹パルプ、針葉樹パルプが製造されており、また、さらに酸素漂白、オゾン漂白、化学漂白などの漂白工程を加えたパルプもある。加えて、回収した古紙からインクを脱墨し、バージンパルプをミックスさせた古紙パルプもあり、いくつかの種類のパルプについて、糖化評価を行い、バイオリファイナリーの経済性に優れたパルプを見出すこととした。糖化を行う際にセルロース、ヘミセルロースを分解する複数の酵素が必要となるが、酵素が高価であるため最終的なエタノール生産コストが高くなることが知られている。そこで、糖化反応が終了した酵素を回収し、リサイク

ル利用することで、コストの 80%削減を目指すこととした。さらに糖化した単糖について、セルロース由来の C6 糖グルコースは広葉樹、針葉樹由来ともに共通であるが、広葉樹へミセルロースのキシラン由来の C5 糖キシロース、針葉樹へミセルロースの主要 C6 糖のマンノースについては、各々特徴的な単糖構成となっている。酵母を用いた発酵によりすべての単糖をエタノールへ資化することが望ましいが、多くの野生酵母は、グルコースをエタノールへ変換する機能を有しているものが多いが、キシロース、マンノースまで取り込み資化することを持ったものが少ない。すべての糖質をエタノールへ変換できるようにするため、グルコースだけでなくキシロース資化を有する菌株の選抜及び育種による改良、遺伝子組み換えによる改良によりエタノールへの高い収率を目指す。

1) 林野庁 令和 3 年度 森林・林業白書

2) 日本製紙連合会 ホームページより

<https://www.jpa.gr.jp/states/pulpwood/index.html>

## 1 - (1) 古紙及び木材チップの前処理プロセスに関する技術開発

本事業では、木質原料の前処理方法として、クラフトパルプ製造の際のクラフト蒸解プロセスによって脱リグニンされ、セルロースあるいはヘミセルロース純度を高めたパルプを原料にする事が、糖化・発酵効率が良いのではと考えた。製紙会社 A 社の協力を得て、針葉樹木質資源、広葉樹木質資源、古紙を原料としてクラフト蒸解処理したクラフトパルプを入手し、原料、前処理工程などの違いによる、糖化・発酵によるエタノール生産のための素材の成分分析、市販酵素を用いた糖化評価を実施した。

### 1 - (1) - 1 木質原料の処理方法の検討

製紙会社 A 社の協力により、以下の4種の未乾燥パルプを入手した(写真1)。未乾燥パルプを本試験に用いた理由として、パルプ抄上げ後の乾燥を省略することで、乾燥に消費されるエネルギーの削減を狙った。

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

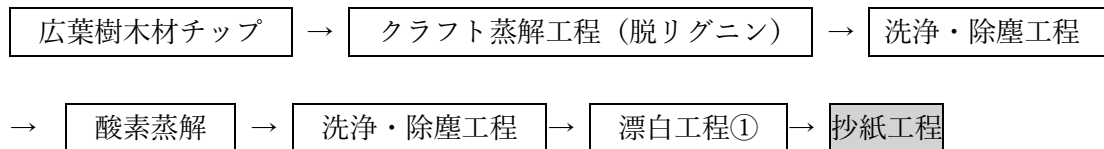


写真1 試験供試材料パルプ入手時

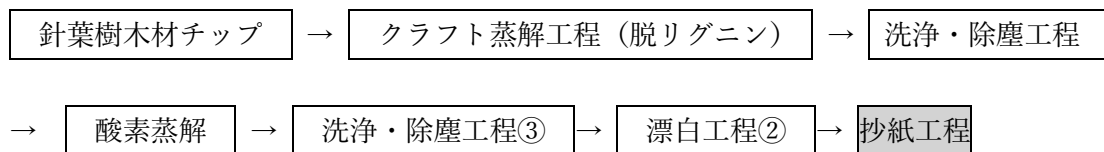
各パルプの製造方法概略は以下となる。

今回の4つの試料は、抄紙乾燥工程前のパルプを取り出した。

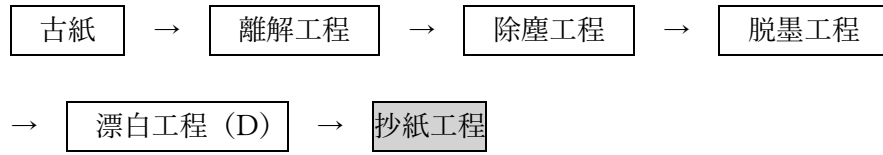
①広葉樹クラフト漂白パルプの製造工程概略。



②針葉樹クラフト漂白パルプ、③針葉樹クラフト漂白前パルプの製造工程概略



④脱墨古紙パルプ製造工程概要



1 - (1) - 2 前処理した木質原料の成分分析

1 - (1) - 2 - 1 サンプルの脱水処理と保管

(方法)

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

また、脱水サンプルの保管は、パルプを手でほぐしてから121°C 30分間、オートクレーブ処理し冷蔵保管した。パルプ入手時と脱水後の含水率は、島津製作所社製 MOC63u を用いて150°Cで測定した(表1-1)。いずれのサンプルについても、62~65%含水率まで脱水できた。

表1-1 パルプサンプルの含水率

| サンプル種類          |     | 含水率 (%) |
|-----------------|-----|---------|
| ① 広葉樹クラフト漂白パルプ  | 入手時 | 86.5    |
|                 | 脱水後 | 63.8    |
| ② 針葉樹クラフト漂白パルプ  | 入手時 | 83.4    |
|                 | 脱水後 | 65.3    |
| ③ 針葉樹クラフト漂白前パルプ | 入手時 | 79.0    |
|                 | 脱水後 | 64.5    |
| ④ 脱墨古紙パルプ       | 入手時 | 78.7    |
|                 | 脱水後 | 62.3    |

### 1 - (1) - 2 - 2 パルプ試料中の灰分測定

(1) - 2 - 1 で調製した脱水パルプ 4 種について、灰分を測定した。

(方法)

各パルプサンプルを 600°C 12 時間処理し、燃焼残渣を無機灰分として定量した。

(結果と考察)

結果を表 1 - 2 に示す。広葉樹クラフト漂白パルプ、針葉樹クラフト漂白および漂白前パルプの灰分は、いずれも 1% 前後含まれ、針葉樹クラフト漂白前パルプは、1.5 (w/w%) の灰分が存在していた。脱墨古紙パルプについては、8.7 (w/w)% と顕著に灰分の存在が確認され、洋紙の紙化工程で添加される填料(クレール(白土)、タルク(滑石)、炭酸カルシウムなど) やサイズ剤(ロジンサイズ、ワックスサイズなど) が含まれていると考える。

表 1 - 2 パルプサンプルの無機灰分率

| サンプル種類         | 無機灰分率 (w/w%) |
|----------------|--------------|
| ①広葉樹クラフト漂白パルプ  | 1.12         |
| ②針葉樹クラフト漂白パルプ  | 0.69         |
| ③針葉樹クラフト漂白前パルプ | 1.48         |
| ④脱墨古紙パルプ       | 8.71         |

### 1 - (1) - 2 - 3 パルプ試料中の単糖組成

乾燥処理を施していないパルプ4種類について、単糖組成について分析した。

#### (方法)

液体窒素下で粉碎した試料を乾燥させ、72%硫酸を加え1時間室温で反応、3%硫酸濃度になるまで加水し、121°C 1hr で加水分解した。中和希釈した試料溶液をHPLCに供し分析した。

HPLC 条件：

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

検出器：RID-10A

温度：85°C

流速：0.6 ml/min

移動相：ミリ Q 水

#### (結果と考察)

結果として、広葉樹由来のクラフト漂白パルプ中には、キシロースが 20.2% 存在し、マンノースの存在は認められなかった(表1-3)。一方で、針葉樹クラフトパルプは、漂白、漂白前において同じ単糖組成を示した。脱墨古紙パルプは、広葉樹クラフト漂白パルプと同様の単糖組成を示した。いずれのパルプサンプルにおいても、酵母による発酵に利用できるグルコースが試料中の単糖組成の77~80%であることが明らかとなった。よりエタノール収率を向上させるには、残り15~20%を占めるキシロース、マンノースなどのヘミセルロース由来の単糖について酵母による資化が必要となる。

表1-3 各パルプの単糖組成

| サンプル種類         | 単糖組成 (%) |       |       |
|----------------|----------|-------|-------|
|                | グルコース    | キシロース | マンノース |
| ①広葉樹クラフト漂白パルプ  | 79.8%    | 20.2% | 0.0%  |
| ②針葉樹クラフト漂白パルプ  | 77.7%    | 14.9% | 7.4%  |
| ③針葉樹クラフト漂白前パルプ | 77.7%    | 14.9% | 7.4%  |
| ④脱墨古紙パルプ       | 80.2%    | 19.8% | 0.0%  |

無機灰分率データと単糖組成データより、パルプ単位量当たりの単糖量を推定した。①広葉樹クラフト漂白パルプは、最もグルコース含量が高く、エタノール収率が高くなると推測する。②③の針葉樹クラフトパルプにおいては、加水分解後の理論単糖量が多くなるが、構成ヘミセルローズに含まれる単糖組成として、マンノース、キシロースの両方が存在し、これら単糖を資化できる菌株の利用がエタノール収率を上げるために必要になると考える。④脱墨古紙パルプは、構成単糖は、①広葉樹クラフトパルプと類似しており、キシロース資化ができる酵母の利用によりエタノール生産ができると考えるが、絶対量として糖組成が低いと推定されるため、培養後の残渣量が増加することが推測できる。

表 1 - 4 100gドライパルプ中の推定糖量

| サンプル種類         | セルローズ・<br>ヘミセルローズ<br>(g) | 加水分解後の<br>理論単糖量<br>(x 1.1 g) | 単糖量 (g) |      |     |
|----------------|--------------------------|------------------------------|---------|------|-----|
|                |                          |                              | Glc     | Xyl  | Man |
| ①広葉樹クラフト漂白パルプ  | 98.88                    | 108.8                        | 86.8    | 22.0 | 0.0 |
| ②針葉樹クラフト漂白パルプ  | 99.31                    | 109.2                        | 84.9    | 16.3 | 8.1 |
| ③針葉樹クラフト漂白前パルプ | 98.52                    | 108.4                        | 84.2    | 16.2 | 8.0 |
| ④脱墨古紙パルプ       | 91.29                    | 100.4                        | 80.5    | 19.9 | 0.0 |

### 1 - (1) - 3 市販酵素を用いた糖化評価

#### 1 - (1) - 3 - 1 250ml フラスコを用いた糖化評価

酵母などの菌体によるグルコースなどの単糖の発酵によってエタノールを生産するためには、木質原料の二次細胞壁に含まれるセルロース、あるいはヘミセルロースを単糖レベルまで加水分解させる必要がある。本試験では、市販のセルラーゼ酵素 C を用いた糖化試験を行い、パルプ濃度、酵素濃度を変え、糖化評価を行った。

#### (方法)

250 ml 容の三角フラスコに 100 ml 処理系にて、パルプ濃度 5%、10% の 2 種類、酵素濃度を 10%、15%、20% (絶乾重量に対する%)、また pH5.0 の酢酸 buffer 下で、攪拌速度を 120 rpm、35°C にて 24 時間処理しグルコース、キシロース、マンノース、その他単糖類を合わせた総単糖量の測定を HPLC で行い、各種パルプのセルラーゼによる糖化効率を評価した。

#### HPLC 条件：

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

検出器：RID-10A

温度：85°C

流速：0.6 ml/min

移動相：ミリ Q 水

#### (結果と考察)

パルプ 5% における酵素添加量 10%、15%、20% の時の糖化結果を図 1-1 に示した。いずれの酵素濃度でも、①広葉樹クラフト漂白パルプの糖化が最も早かった。

②、③の針葉樹クラフト漂白・未漂白パルプは、ほぼ同じ糖化挙動を示したが、若干、②漂白パルプの糖化が早かった。おそらく③未漂白パルプ中に含まれるリグニンが、酵素反応を阻害している可能性がある。また、針葉樹クラフトパルプは、①広葉樹クラフトパルプより糖化が遅くなる理由については、攪拌性の悪さが大きいと考えられる。広葉樹木部繊維長の長さは、1mm 前後であるが、針葉樹仮道管の長さは、2~3mm と長く、絡まりやすいことが原因と考えられる。ス

ケールアップ時にも、この攪拌性の悪さは影響すると考えられ、針葉樹由来のパルプ使用時の攪拌の工夫が必要と考えられる。

糖組成分析より、広葉樹クラフト漂白パルプ、針葉樹クラフト漂白および漂白前パルプでは、セルロース、ヘミセルロースが乾物重量当たり 98%以上を占め、単糖に加水分解する際に、各単糖へ H<sub>2</sub>O 一分子が付加されるため、重量として 1.1 倍増加する (表 1 - 4 参照)。今回の試験系では 100ml 反応液中にパルプ 5% (5g) が存在していることから、全糖量が 98.5~99.3%の①②③のクラフトパルプでは、理論上 5.42~5.46 g (5g x 98.5~99.3% x 1.1)の単糖が存在することになる。また、古紙パルプの場合、約 91.3%のセルロース、ヘミセルロースが存在することから、理論上 5 g (5g x 91.3 x 1.1)の単糖が存在する。図 1 の結果では、①②③のクラフトパルプでは、24 時間で 55g/L 前後の全糖量が得られており、ほぼ 100%の糖化が完了していることが分かる。一方で、④古紙パルプの場合、30g/L 程度の全糖量しか得られておらず、24 時間で約 60%程度の糖化率に留まっている。

今回の試験では、同時糖化発酵を前提目標として、酵母の生育上限温度 (目標) の 35°C と、セルラーゼの至適温度を下回る条件での実施であったため、反応性は低く出たと考えられるが、それでも①広葉樹クラフト漂白パルプは、5%パルプ濃度、15%酵素濃度化において、8 時間目で完全糖化が完了していることが分かった。

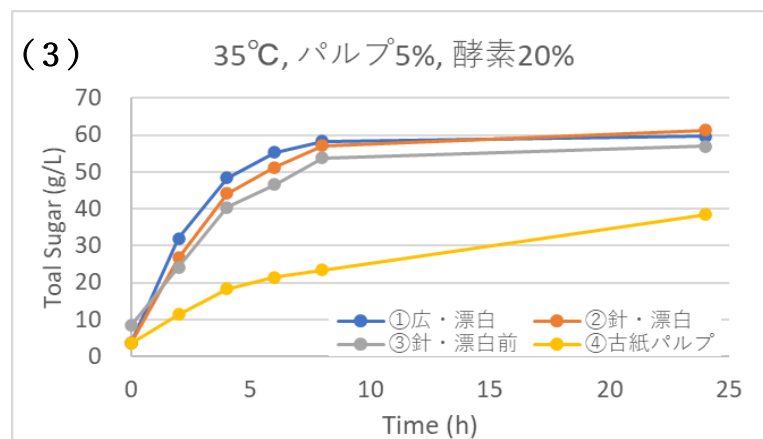
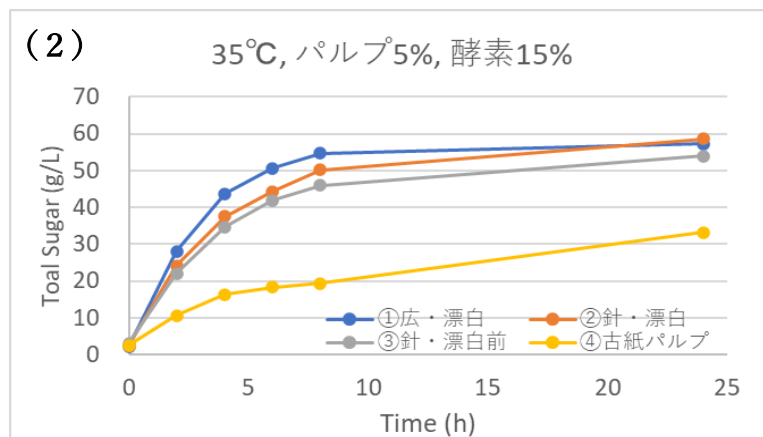
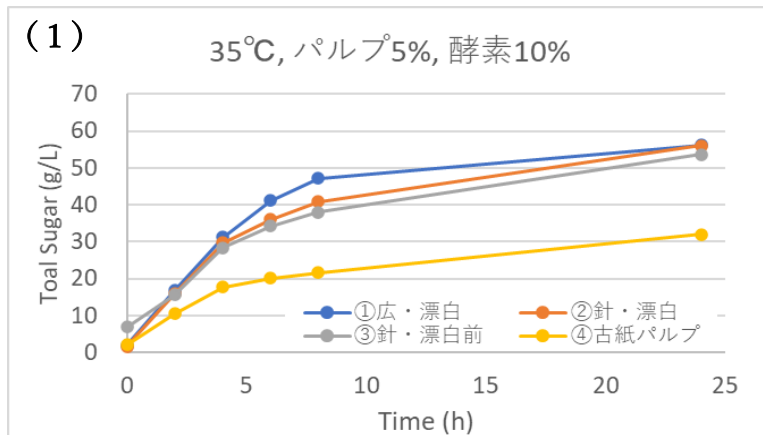


図1-1 パルプ5%における酵素処理での糖化評価  
 (1) 酵素濃度は、対パルプ絶乾重量に対して10%添加  
 (2) 酵素濃度は、対パルプ絶乾重量に対して15%添加  
 (3) 酵素濃度は、対パルプ絶乾重量に対して20%添加

パルプ 10%における酵素添加量 10%、15%、20%の時の糖化結果を図 1-2 (1)、(2)、(3) に示した。パルプ濃度 10%でも①広葉樹クラフト漂白パルプが最も効率が良いが、10%パルプを用いた全ての実験系で攪拌性が低下し酵素反応が効率よく行われていないことが分かった。写真 1-2 で明らかなように、①広葉樹クラフト漂白パルプ、②③針葉樹クラフト漂白・未漂白パルプでは、吸水性が高く試験開始時に攪拌性がほぼないことが分かった。この結果より、パルプの添加は、攪拌性を保ちつつ逐次的なパルプ添加を行い、糖化を進めることが必要であることが分かった。効率の良い時間当たりのパルプ添加量を求める必要があり、次年度のスケールアップ培養では、パルプ原料を添加するタイミング、量などの培養条件について検討したい。

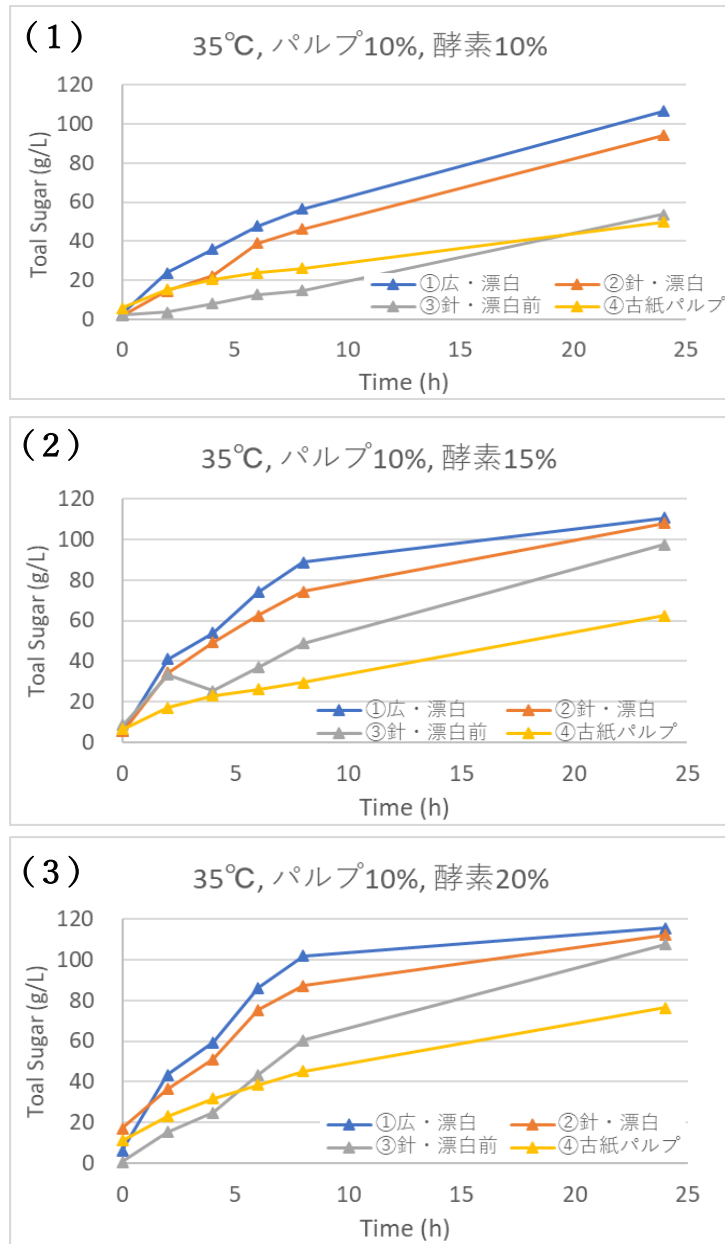


図1-2 各パルプ10%における酵素処理での糖化評価  
 (1) 酵素濃度は、対パルプ絶乾重量に対して10%添加  
 (2) 酵素濃度は、対パルプ絶乾重量に対して15%添加  
 (3) 酵素濃度は、対パルプ絶乾重量に対して20%添加



①広葉樹クラフト漂白パルプ      ②広葉樹クラフト漂白パルプ



③広葉樹クラフト漂白前パルプ      ④脱墨古紙パルプ

写真 1 - 2 酵素糖化処理前のパルプ性状。各パルプ 10%、  
酵素 10% (対パルプ絶乾重量)



①広葉樹クラフト漂白パルプ      ②広葉樹クラフト漂白パルプ



③広葉樹クラフト漂白前パルプ      ④脱墨古紙パルプ

写真 1 - 3 酵素糖化処理 24 時間後のパルプ性状。各パルプ 10%、  
酵素 10% (対パルプ絶乾重量)。処理温度 35°C、120 rpm。

### 1 - (1) - 3 - 2 1L ジャーファーマンターを用いた糖化評価

1 - (1) - 3 - 1 での試験をスケールアップし、1L ジャーファーマンターを用いた糖化試験を試みた。100ml 反応系では、5%パルプ濃度に対して、酵素濃度が 15%、20%において糖化速度に差が見られなかった。そのため 15%酵素濃度で得られた糖化速度が、ジャーファーマンターを用いたスケールアップにおいても同様な結果が得られるか検証することにした。

#### (方法)

1L 容のジャーファーマンターを用いて 500 ml 反応系にて試験を行った。パルプ濃度 5% (培養初期パルプ濃度は 2%、1 時間毎に 1%に相当する量を 3 回に分けて添加した)、市販酵素 C、酵素濃度 15% (パルプ絶乾重量に対する%)、50mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 下で、攪拌速度を 75 rpm (初期)、35°Cにて 24 時間処理し、HPLC で単糖生成の分析を行い、各種パルプのセルラーゼによる糖化効率を評価した。

#### HPLC 条件：

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

検出器：RID-10A

温度：85°C

流速：0.6 ml/min

移動相：ミリ Q 水

#### (結果と考察)

1L ジャーファーマンターは、槽内に邪魔板があり、パルプが回転中に邪魔板に引っかかり、全ての原料を攪拌することを妨げた。古紙パルプは、pH 上昇が早く、硫酸を用いた pH 調整 (pH4.5-5.5) を行う事で、フラスコ試験の時より糖化改善が見られた。広葉樹クラフト漂白パルプは、グルコース、キシロースともに他のパルプと比較して、早い時間帯に糖化が完了した (図 1 - 2)。今回用いた 1L ジャーファーマンターは、マグネット式の回転子のため攪拌性が弱くパルプの様に粘度が高い原料の培養には向いていない。次回は、モーター駆動式の攪拌羽を持った 5L あるいは 10L ジャーファーマンターを用いたスケールアップ検討を行う。

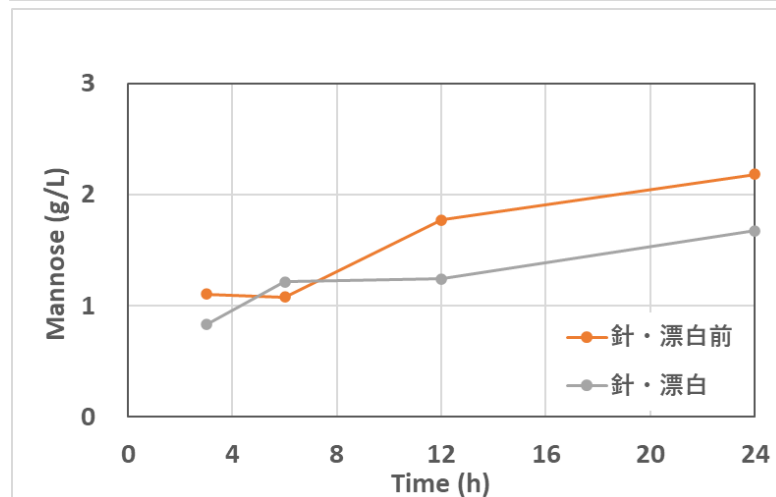
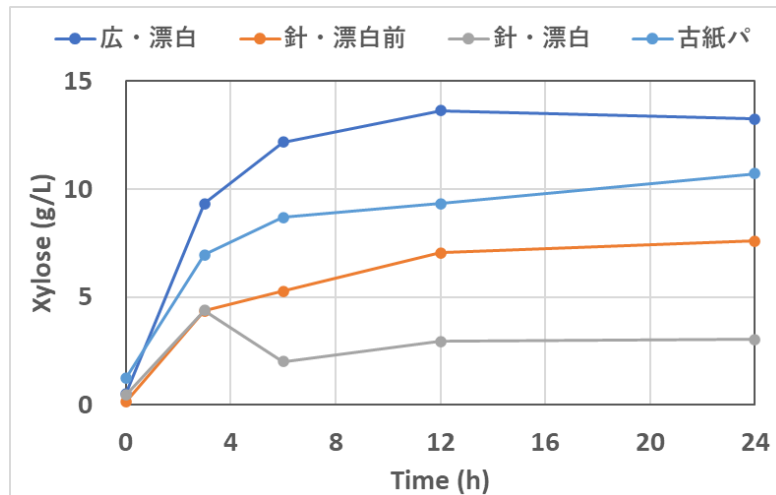
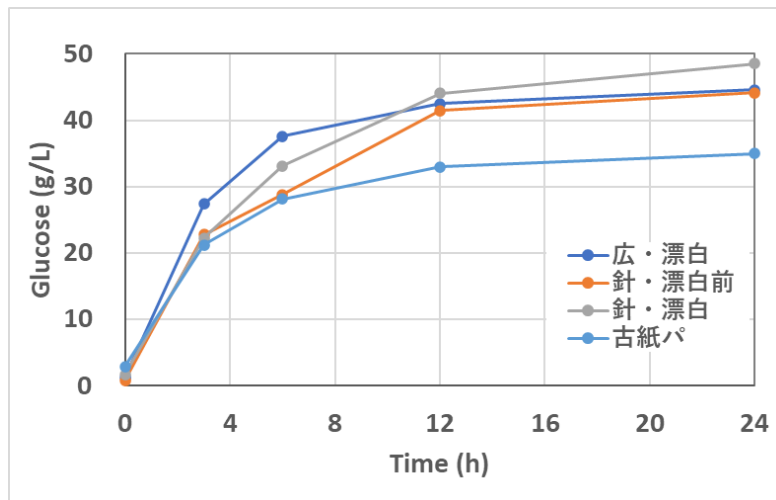


図1-2 各パルプ5%、1L ジャーにおける酵素 C15% 処理での糖化評価  
 広・漂白：広葉樹クラフト漂白パルプ、針・漂白前：針葉樹クラフト未漂白パルプ、針・漂白：針葉樹クラフト漂白パルプ、古紙パ：脱墨古紙パルプ

## 1 - (1) まとめ

製紙会社 A 社の協力を得て、3 種類のクラフトパルプと古紙パルプを試験材料として用いた。今回の 3 種のクラフトパルプ、①広葉樹クラフト漂白パルプ、②針葉樹クラフト漂白パルプ、③針葉樹クラフト漂白前パルプ製造では、脱リグニン工程のためのクラフト蒸解工程を経ており、ここでリグニンは黒液として回収される。回収後は、濃縮されボイラーで燃料として使用され、通常であればパルプや製紙工程の乾燥のための蒸気や、マシンを稼働させるためのエネルギーとして活用される。本事業で目指す、糖化・発酵工程で使用される滅菌用あるいは蒸留に用いる熱源として黒液燃焼由来の蒸気が活用することができる。これら 3 種のクラフトパルプは、洗浄・除塵工程を経て酸素蒸解、続けて洗浄・除塵工程を経る。③針葉樹クラフト漂白前パルプはこの工程の後、回収される。①、②の漂白パルプは洗浄・除塵の後、漂白されたものである。④脱墨古紙パルプは、回収された古紙を離解し溶かした後で、印刷インクなどの脱墨工程後、漂白されたものである。

3つのクラフトパルプ①②③は、いずれも 98.5%以上の糖が含まれており、完全糖化できれば無駄のない発酵用素材と言える。針葉樹由来の 2 種のパルプは、特に攪拌性が悪く、糖化の際のパルプ添加速度に工夫が必要であることが今回の試験で明らかとなった。特に③の針葉樹クラフト未漂白パルプは、リグニンが若干含まれていると考えられ、②漂白パルプに比べて、パルプ濃度 5%、10%においても糖加速度が遅いことが分かり、クラフトパルプ工程の漂白工程が糖化効率を上げるために必要であることが分かった。それに対して、①広葉樹由来のクラフトパルプは、攪拌性が良く、糖化反応時の単位時間当たり添加量の増加が期待され、エタノールの高効率生産が望める。

各々のパルプの単糖組成として、広葉樹クラフトパルプでは、キシロースが 20.2%、針葉樹クラフトパルプでは、14.9%といずれの木質由来パルプにも含まれており、針葉樹クラフトパルプには、マンノースも含まれている。これら、ヘミセルロースを如何に資化し、エタノールへと変換できるかが収率を上げるカギとなると考えられる。

資源再利用の観点で、古紙パルプに期待するところはあるが、炭酸カルシウムやロジンなど紙由来の成分が約 8.7%含まれ、素材に含有する糖量が他のパルプに比べて低い事、pH が上昇しやすく、総合的に糖化に時間を要すること

から、100%古紙パルプの利用ではなく、部分的に活用する方法を検討する事が望ましいと考える。

木質由来資源由来のパルプを用いた高効率なエタノール生産性を目指す検討に当たり、以降の試験に①広葉樹クラフト漂白パルプを用いて、評価を行う事とした。

## 1 - (2) 糖化酵素の効率的利用に関する技術開発

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

本項では、糖化反応に用いる酵素について、複数回の再利用技術の確立を目指し、より低コストな糖化プロセスの確立を試みた。それに対して、国内酵素生産会社 B の協力により、酵素の提供を受け、オンサイト生産における生産コストなど試算に向けた準備を行った。

1)吉田誠 (2009) 木材保存、35(6),250-259

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

### 1 - (2) - 1 糖化酵素の選定

(1) - 1 で入手した針葉樹、広葉樹由来のクラフト蒸解パルプは、セルロース、ヘミセルロースがパルプ重量当たり 98%以上存在しており、これらを糖化するために2種のセルラーゼを検討した。一つは、市販酵素 C、そして酵素製造会社 B 社の協力によりオンサイト生産可能なセルラーゼ酵素の提供を得ることができた。この2種類の酵素について木質由来のパルプに対する糖化評価を行った。また、試験に用いるパルプ種類は、前項 1 - (1) で糖化評価を行い、最も糖化効率が良かった広葉樹クラフト漂白パルプを用いて検討した。

## 1 - (2) - 2 前処理木質原料に対する酵素評価

広葉樹クラフト漂白パルプを用いて、市販セルラーゼ酵素 C と国内酵素製造会社 B 社のセルラーゼ酵素を用いて、糖化試験を行った。

### (方法)

250ml 三角フラスコに、処理溶液系 100ml にて原料パルプ濃度は、5%を使用した。酵素濃度は、パルプ絶乾重量に対して 10%、20%、30%、50%を添加。国内酵素製造会社 B 社においては、70%および 100%濃度の酵素も検討した。

温度条件は 35°C、振盪回転数は 120rpm、48hr 処理を行い経時的に一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清を HPLC により分析し各単糖濃度を測定した。

### HPLC 条件：

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

検出器：RID-10A

温度：85°C

流速：0.6 ml/min

移動相：ミリ Q 水

### (結果と考察)

酵素濃度 10~50%での糖化反応結果を図 2 - 1 に示した。

①広葉樹クラフト漂白パルプの場合、表 1 - 3 に示した様に、79.8%のグルコース組成であったため、5g パルプの場合、理論的には  $4.34\text{g}(5\text{g} \times 98.9\% \times 1.1 \times 79.8\%)$  のグルコースが 100%糖化時に生成する。L 当たりに換算すると 43.4 g/L となる。一方でキシロースについては、20.2%存在するため、5g パルプ添加時は、理論的に  $1.1\text{g}(5\text{g} \times 98.9\% \times 1.1 \times 20.2\%)$  生成する。リットル当たりに換算すると、11.0 g/L となる。

酵素 C については、いずれの酵素濃度においても 24 時間目でグルコース、キシロースとも理論通りの糖量が生成しており完全糖化していると考えられる。若干 HPLC でのキシロース分析量が、理論値と比較して少なめに出ており、今後は改善したい。

B社酵素では、50%酵素濃度でグルコースについては48時間目によく完全糖化していると考えられるが、キシロースの生成が酵素Cと比較し9割程度で止まっていることが分かった。

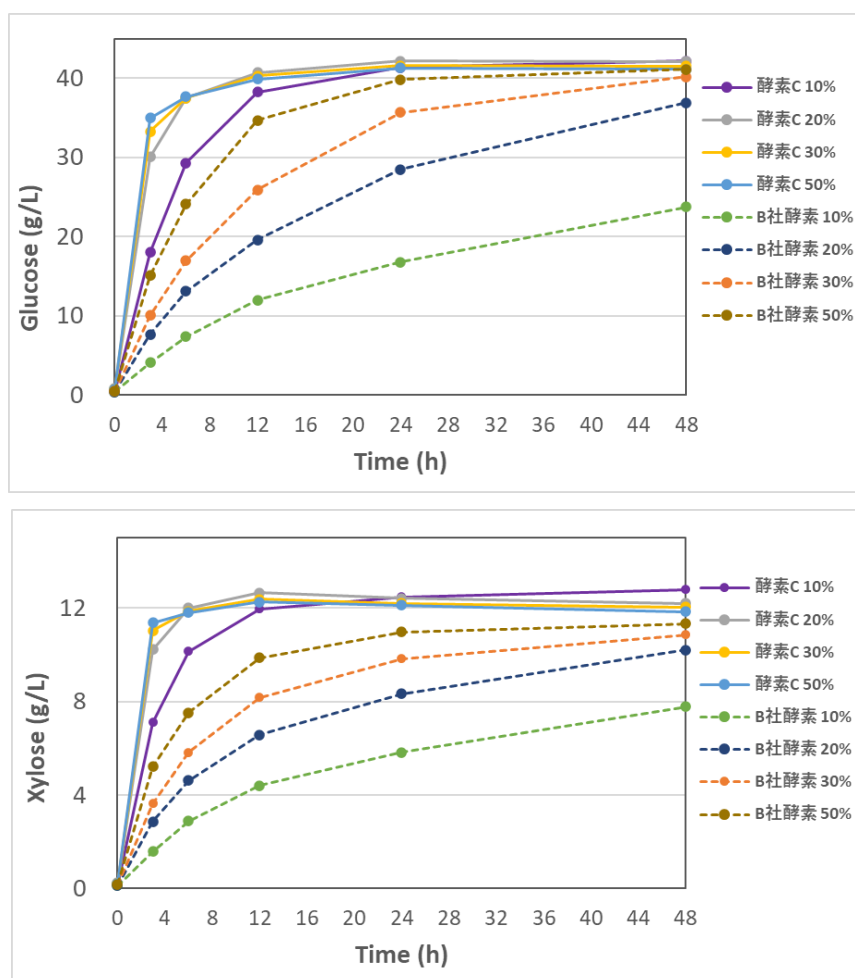


図2-1 5%広葉樹クラフト漂白パルプにおける2種の酵素を用いた糖化評価。酵素濃度は、10、20、30、50%（対パルプ重量）

50%酵素濃度までは、B社酵素活性が市販酵素Cと同じレベルではないと考え、対パルプ重量の70%、100%の酵素量で、酵素Cの10%、15%濃度と比較することとした。結果を図2-2に示した。グルコースでは、B社酵素100%と市販酵素Cの15%濃度、B社酵素70%と市販酵素Cの10%濃度でのグルコース生成量挙動が重なる結果となった。しかしながらキシロースの生成に関しては、B社酵素は、市販酵素Cに対し48時間で100%糖化していないことが示唆された。

広葉樹ヘミセルロースキシランに対する活性は、市販酵素Cの方が若干強いと考えられる。

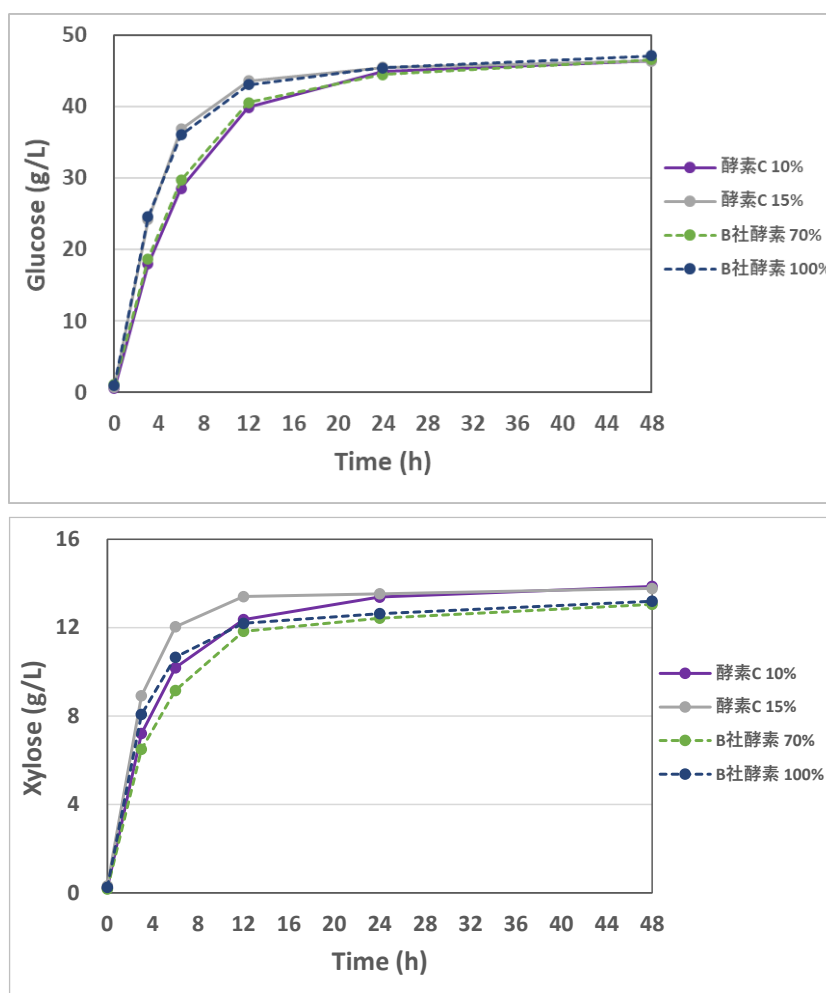


図2-2 5%広葉樹クラフト漂白パルプにおける2種の酵素を用いた糖化評価。酵素濃度は、酵素Cが10%および15%、B社酵素は、70%、100% (対パルプ重量)

### 1 - (2) - 3 酵素のリサイクル利用の検証

木質原料由来のバイオエタノール生産において糖化・発酵プロセスは様々な方式が試みられてきた。糖化と発酵を別々に実施する手法として逐次糖化発酵と半並行複発酵があり、逐次糖化発酵は、最初に木質資源の糖化を行い別の反応槽に糖化液を送液し、酵母を加えて発酵させる。半並行複発酵は、木質原料を糖化しその後、同じ反応槽に酵母を加えて発酵させる手法である。この様に糖化と発酵を別々にすることで、セルラーゼ酵素を用いた糖化時の温度を至適温度の50℃で反応することができ、素早く糖化することが可能となる。一方で、並行複発酵(同時糖化発酵)プロセスは、糖化と発酵を同じ反応槽で進行させることができるため設備コストが下げられるメリットがあるが、酵母の至適温度30℃までしか温度を上昇させることが出来ず、糖化が十分に進むかという懸念点もあった。平成27年度～平成29年度に実施されたNEDO事業において、上記3つのプロセスが比較され、並行複発酵プロセスが時間当たりのエタノール生産効率が最も良い事を見出している<sup>1)</sup>。

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

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

1) セルロース系エタノール生産システム総合開発実証事業/最適組合せの検討及び事業性評価/木本バイオマスを原料とする日本の持続可能性基準に適合するセルロース系エタノールの一貫生産技術開発及び事業性評価 平成27年度～平成29年度成果報告書

### 1 - (2) - 3 - 1 100ml 培養系での酵素リサイクル

小スケールとしてフラスコを用いた実験系で、①広葉樹クラフト漂白パルプを用いて同時糖化発酵を行い、5回繰り返し、酵素と酵母を再利用ができるか検証した。

#### (方法)

250ml 三角フラスコに、100ml の培養系にて原料パルプ (広葉樹クラフト漂白パルプ) 濃度は、10%を使用した。酵素は、市販酵素 C をパルプ絶乾重量に対して 15%を添加。120rpm (INNOVA44)、35°C、培養組成は 1% CSL (ソルリス)、0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、50mM クエン酸バッファー。酵母は開発中の#30 株を使用した。

酵素と酵母のリサイクルは、40 時間培養後、50ml ファルコンチューブ 2 本に取り分け、6,000 x g で 10 分間遠心分離 (20°C TOMY MX-307)、次に遠心分離した上清を限外濾過膜 (ザルトリウス、ビバフロー50) で濾過濃縮した。ろ過画分は回収し、濃縮画分は 10~15ml になる様に濃縮した。フラスコに戻し、パルプ、CSL、硫安、クエン酸バッファーを加えて再培養した。この操作を 5 回繰り返した。各回の 40 時間培養液についてサンプリングし、遠心分離した上清について、単糖分析およびエタノール濃度を分析した。

#### HPLC 条件：

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

検出器：RID-10A

温度：85°C

流速：0.6 ml/min

移動相：ミリ Q 水

#### (結果と考察)

各培養 40 時間後の単糖濃度を図 2 - 3 に示した。グルコースは、検出されなかった。キシロースは、初回 13 g/L からその後も 15 g/L 前後の濃度を 5 回目まで維持した。用いた開発中の酵母#30 は、現段階でキシロース資化ができないため、キシロースが残存する。限外ろ過濃縮前に遠心分離した沈殿部に含まれたキシロースが次の培養に持ち出されるため、若干のキシロース量増加が発生す

ると推測する。

同様に培養 40 時間後のエタノール濃度を測定した結果を図 2 - 4 に示した。エタノール濃度は、初回 34g/L であったが、キシロース同様、遠心分離で沈殿した画分の持ち出し分が増加し、2 回目培養以降は 41g/L 程度を維持した。このことから、5 回目までにおいて酵素の糖化反応は、初回と変わらず活性が維持し、酵母の働きによりエタノールも同じレベルで生産を続けられることが明らかとなった。

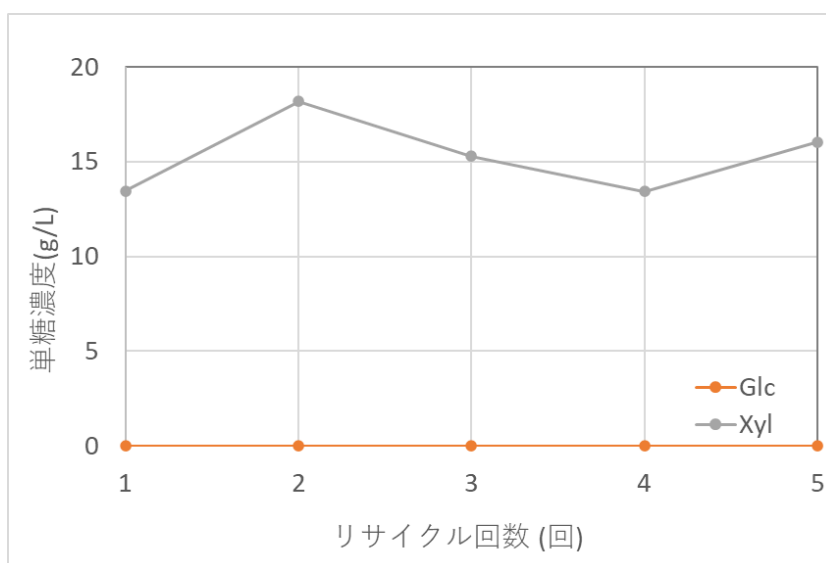


図 2 - 3 広葉樹クラフト漂白パルプ糖化における酵素リサイクル評価  
各 40 時間糖化発酵後の残留単糖濃度 (グルコース : Glc、キシロース : Xyl)

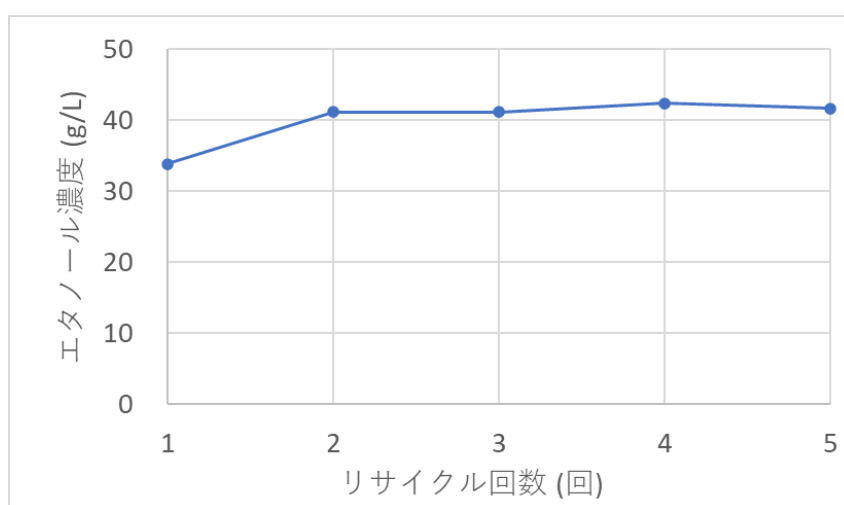


図 2 - 4 広葉樹クラフト漂白パルプ糖化における酵素リサイクル評価

### 1 - (2) - 3 - 2 1L ジャーを用いた酵素再利用

100ml フラスコ培養系において同時糖化発酵を行い、酵素と酵母について回収し、5回の再利用に成功した。次に1L ジャーファーマンターを用いた500ml 培養系へスケールアップを試みた。

#### (方法)

1L ジャーファーマンターに500ml 培養系で実施した。原料パルプ(広葉樹クラフト漂白パルプ)濃度は、5%を使用した。酵素は、市販酵素Cをパルプ絶乾重量に対して15%を添加。200 rpm、35°C、培養組成は1% CSL(ソルリス)、0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、50mM クエン酸バッファー。酵母は開発中の#30株を使用した。

酵素と酵母のリサイクルは、40時間培養後、6,000 x g で10分間遠心分離(20°C TOMY MX-307)、次に遠心分離した上清を限外濾過膜(ザルトリウス、ビバフロー200)で濾過濃縮した。ろ過画分は回収し、濃縮画分は100 ml になる様に濃縮した。フラスコに戻し、パルプ、CSL、硫酸、クエン酸バッファーを加えて再培養した。この操作を5回繰り返した。各回の40時間培養液についてサンプリングし、遠心分離した上清について、単糖分析およびエタノール濃度を分析した。

#### HPLC 条件：

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

検出器：RID-10A

温度：85°C

流速：0.6 ml/min

移動相：ミリ Q 水

#### (結果と考察)

培養1回目の初期から、1L ジャー内部にある邪魔板が、パルプの攪拌を妨げ40時間後の培養液はフラスコ培養と比較し液状化が劣るよう見られた。そこで、培養槽内の粘度を下げるために、パルプ投入のタイミングを変更し試みた。培養初期に2%パルプを準備し糖化発酵を進め、その後2時間毎に1%分のパルプ添加を行い、総パルプ量を5%になるようにした。各培養40時間後の単糖濃

度を図 2 - 5 に示した。グルコースは、検出されなかった。キシロースは、初回 5.6 g/L、二回目以降 2.4 g/L 前後の濃度を 5 回目まで維持した。100ml 培養系と同様、用いた開発中の酵母#30 は、現段階でキシロース資化ができないため、キシロースが残存する。濃縮前に遠心分離した沈殿部に含まれたキシロースが次の培養に持ち出されるため、若干のキシロース量増加が発生すると推測する。

また、培養 40 時間後のエタノール濃度を測定した結果を図 2 - 6 に示した。エタノール濃度は、5 回に渡って 20 g/L 前後を維持した。

このことから、5 回以上の酵素再利用は可能であることが分かった。

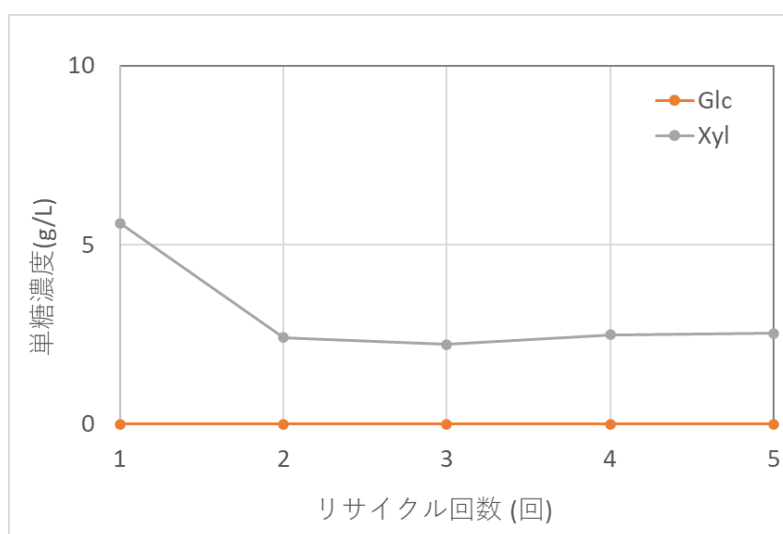


図 2 - 5 広葉樹クラフト漂白パルプ糖化における酵素リサイクル評価  
各 40 時間糖化発酵後の残留単糖濃度 (グルコース : Glc、キシロース : Xyl)

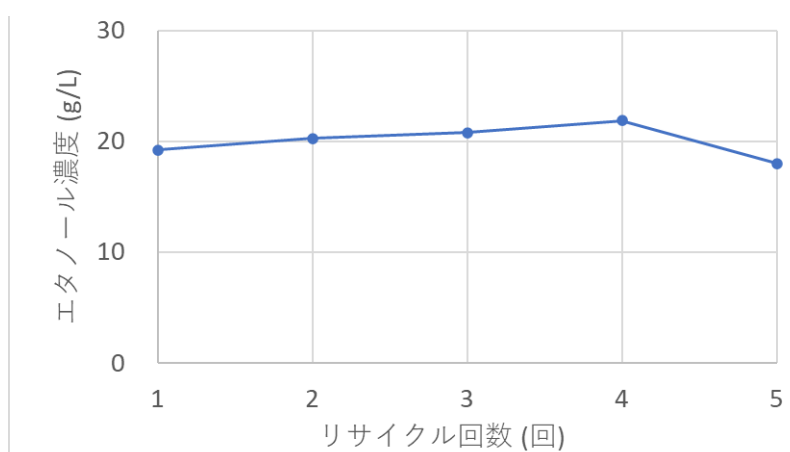


図 2 - 6 広葉樹クラフト漂白パルプ糖化における酵素リサイクル評価  
各 40 時間糖化発酵後のエタノール濃度

## 1 - (2) まとめ

本項では、従来より指摘されていた木質資源由来のエタノール生産における酵素コストの低減を狙い、オンサイト生産および購入酵素であっても何度も再利用することによりコスト削減ができる可能性を模索し検討しようと試みた。酵素製造会社 B の協力によりオンサイト生産可能な酵素提供を受けパルプに対する糖化能力を検証した。市販酵素 C との比較では、セルロースに対する活性は同様の効率を得られることが明らかとなった。今回使用したパルプは、広葉樹クラフト漂白パルプのため、ヘミセルロースとしてはキシランが存在すると考えられるが、ヘミセルロースのキシランに対する活性は市販酵素 C の糖化反応が早いことが分かった。これより、オンサイト生産可能な酵素の糖化発酵に関わる最適な酵素濃度条件は、パルプ重量に対して等量の酵素が必要であることが分かった。

酵素の再利用については、市販酵素 C を用いた検討を行ったがフラスコでの 100ml 培養系では、同時糖化発酵による酵素と酵母の再利用を 5 回実施することができた。また、1L ジャーを用いた 500ml 培養系では、ジャーファーマンターの邪魔板により攪拌が上手くいかず、実験 1 回目では糖化効率が上がらず失敗したが、パルプ添加を 4 回に分けて実施した結果、5 回目の酵素再利用においても問題なく糖化することができた。培養における攪拌性が、パルプサンプルにおいて重要であることが分かり、次回更なるスケールアップにおいては、攪拌とパルプ添加方法について検討したい。

同時糖化発酵でのバイオエタノール生産方式とする前提で、酵母至適温度上限 35°C での糖化を見ると、5%パルプ、酵素 10%の条件でかろうじて 24 時間でほぼ完全糖化しており、パルプ濃度が 10%では、同酵素濃度で 24 時間以内での完全糖化はやや困難であるという結果であった (図 1 - 1、1 - 2)。バッチ方式では、同時糖化発酵の場合、酵素濃度を極力減らしたとしてもパルプ添加重量に対し 10%の酵素が必要となる。これに対して初期酵素添加量が 15%と高くなるが、5 回酵素を再利用し、5 %パルプ添加の場合、酵素添加量はバッチ方式の 30%酵素使用量で済む事になるため、酵素再利用回数を延ばすことが、木質原料由来のバイオエタノール生産のコストダウンに寄与できることが明らかであり、5 回以上の酵素再利用によるさらなるコストダウンを目指したい。酵素の再利用回数によるコストダウンと、酵素のオンサイト生産に関わる設備投資費用、ランニングコスト、LCA の観点からの比較を次年度は実施したいと考える。

## 1 - (3) 糖液からのエタノール生産プロセスに関する技術開発

本実証事業では木質バイオマス由来のパルプを原料とすることを想定しているため、パルプを糖化した糖液には単糖として C6 糖であるグルコースだけでなく、C5 糖であるキシロースも含まれる。よって、キシロースを利用できないと全体のエタノール収率が下がるだけでなく、連続プロセスにおいてはコンタミネーションの原因にもなり得る。また、酵素による糖化と酵母によるエタノール発酵を同時に行う同時糖化発酵においては、糖化酵素の至適温度が酵母の生育温度と比較して高いため、使用する酵母の耐熱性ができるだけ高いことが望ましい。さらに、連続プロセスにおいては、酵母は常に一定濃度のエタノール濃度にさらされるため、一定以上のエタノール耐性も必要である。

これらのことから、以下では、上記3つの指標であるキシロース資化性、耐熱性、エタノール耐性に着目して酵母の選抜を行った。

### 1 - (3) - 1 キシロース資化酵母のスクリーニング

#### 1 - (3) - 1 - 1 キシロース資化性の高い酵母のスクリーニング

通常、発酵産業で用いられるような醸造酵母はキシロースを資化することができない。よって、キシロースを資化できることが知られている種を中心に、様々な酵母株を用いてキシロース資化酵母のスクリーニングを行った。

#### (方法)

YM プレート (3 g 酵母エキス、5 g ペプトン、3 g 麦芽エキス、10 g グルコース、20 g 寒天、pH 5.5 / 1 L) で 28°C、24 時間以上培養した菌体をかきとり、試験管に分注した YPDX 培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、40 g グルコース、10 g キシロース / 1 L) に植菌し、28°C、120 rpm で 48 時間培養した。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清を HPLC により分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム : Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

温度：45°C

検出：RID

(結果と考察)

全91株の酵母のスクリーニングにおける定量結果を図3-1から図3-6に示した。1つの棒グラフが1種類の菌株の測定値をそれぞれ示している。増殖速度やエタノール生産性、副生物の生産量や種類などは株によって様々であり、今回スクリーニングした酵母が多様な集団からなることを示唆している。

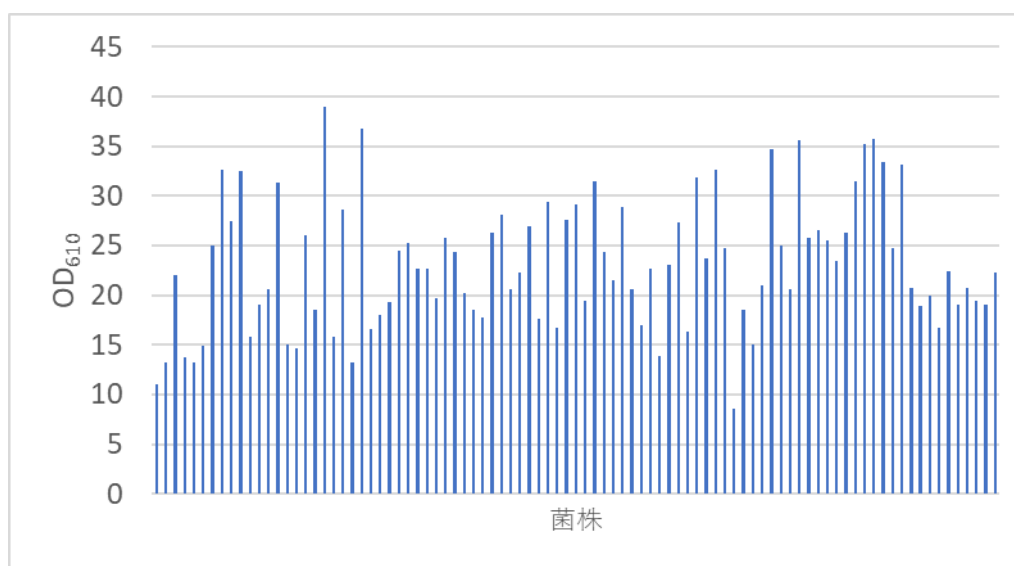


図3-1. OD<sub>610</sub>を指標とした菌体収量の比較

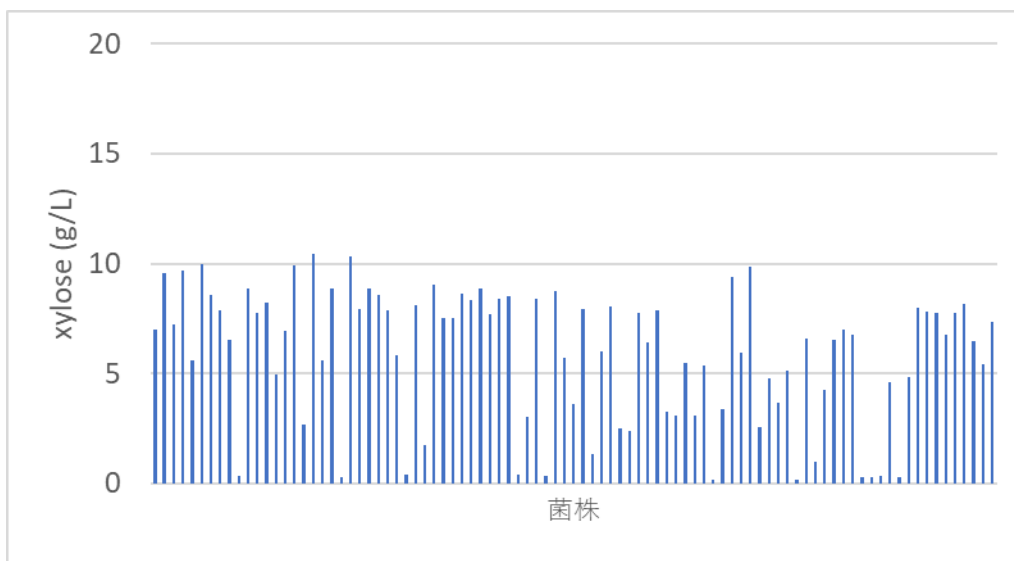


図3-2. キシロース濃度の比較

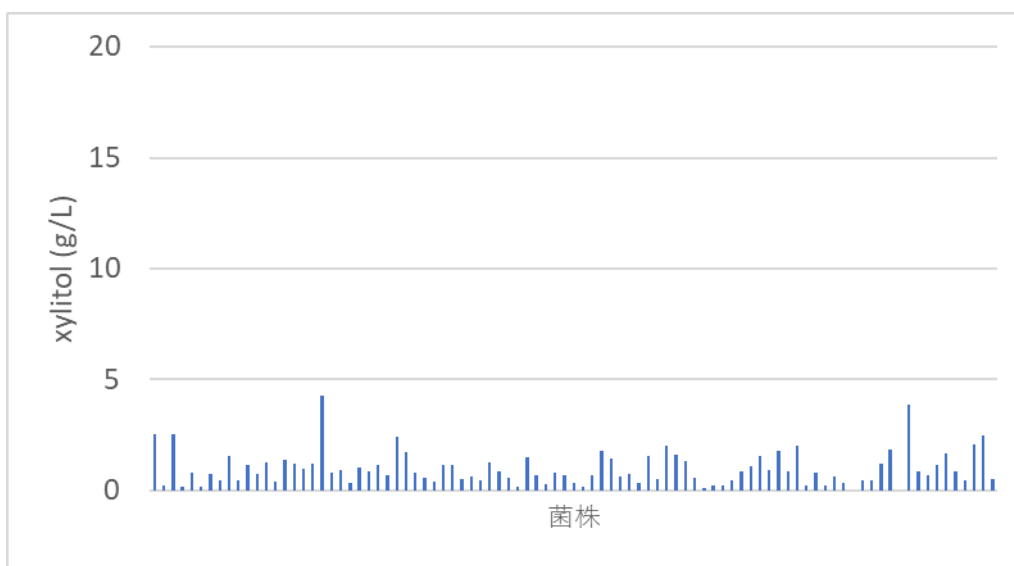


図3-3. キシリトール濃度の比較

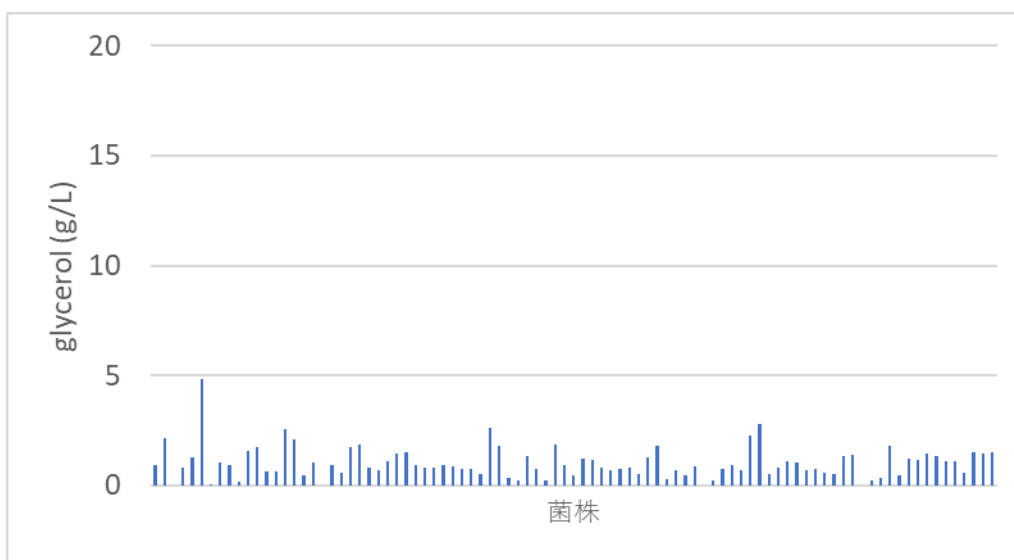


図3-4. グリセロール濃度の比較



図3-5. 酢酸濃度の比較

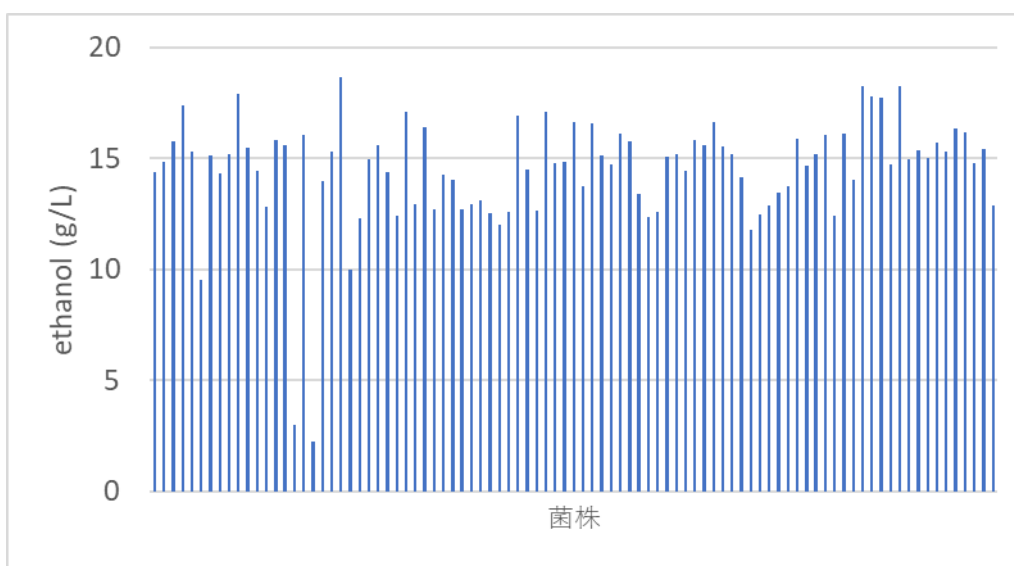


図3-6. エタノール濃度の比較

これらの指標の中から、消費したキシロース量を元にしたキシロース資化率と、消費した糖に対するエタノール収率（糖からの理論値に対する収率）の関係を図3-7に図示した。酵母の持つ高いエタノール生産性により、エタノール収率は概ね60-80%の範囲に収まったが、キシロース資化率は菌株によって千差万別であった。キシロース資化率が低く、エタノール収率も著しく低い株も存在したが、キシロース資化率が高くてもエタノール収率は落ちない傾向にあった。中でも、キシロースを80%以上資化できる酵母が14株見出され、これらの株のエタノール収率は全て60%以上であった。

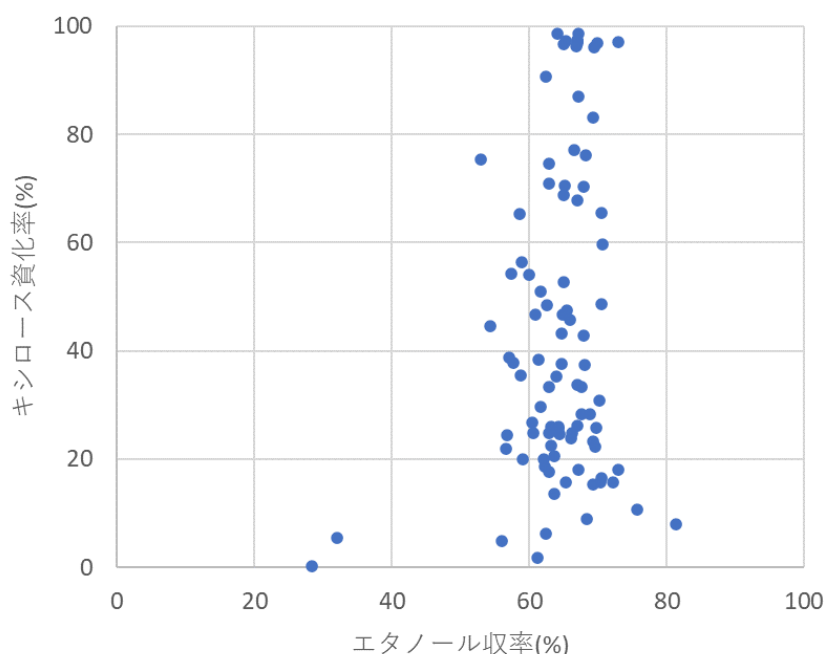


図3-7. エタノール収率とキシロース資化率の関係

### 1-(3)-1-2 キシロース資化酵素活性

キシロースを資化するためには、キシロースを細胞内に取り込んだ後、キシロースレダクターゼにより還元してキシリトールに変換し、キシリトールデヒドロゲナーゼによりキシロースに酸化する必要がある(図3-8)。このとき、多くの酵母のキシロースレダクターゼは補酵素としてNADPHを利用する一方、

キシリトールデヒドロゲナーゼは NAD を補酵素として利用するため、補酵素の再生が上手くいかずにキシロース資化が滞ることが知られている。一方、キシロースレダクターゼが NADPH の代わりに NADH を利用できると補酵素のバランスが合って効率的にキシロースを資化できるが、野生株でそのような性質を持つ酵母はほとんど知られていない。

そこで、今回得られた酵母のうち、キシロース資化性の高いものを中心にキシロースレダクターゼの補酵素特異性を調べた。

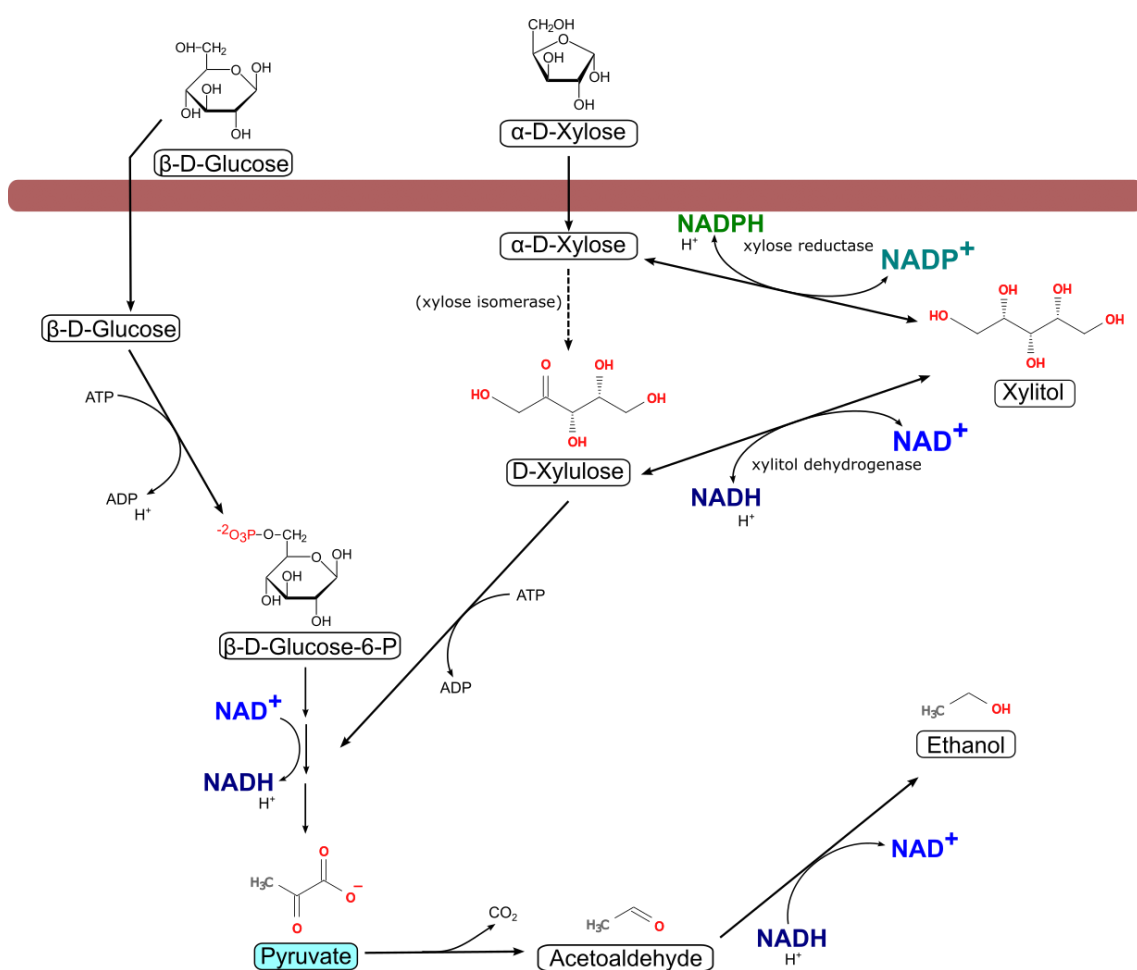


図 3 - 8. 酵母のキシロース資化経路概略

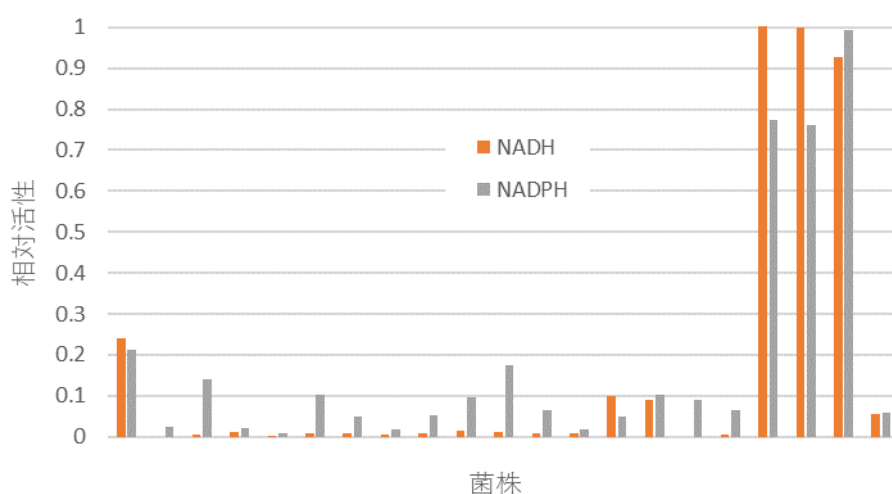
### (方法)

培養した酵母を集菌し、ガラスビーズを用いて破碎した細胞破碎液を調製した。調製した細胞破碎液を用い、50 mM MES (pH 6.0), 0.6 mM NAD(P)H, 20 mM キシロースを含有した反応液中で反応させ、NAD(P)H の 340 nm の吸光度の減少をモニターすることで酵素活性値に変換した。

### (結果と考察)

キシロースを資化する酵母においても、多くは NADPH 依存キシロースレダクターゼ活性を示した (図 3-9)。一方で、いくつかの酵母では、NADH 依存キシロースレダクターゼ活性も持ち、NADPH と NADH をどちらも同程度の効率で利用できるものが存在した。今回スクリーニングした中には、期待したような NADH 依存キシロースレダクターゼ活性のみを持つ酵母は存在しなかったが、NADPH 依存キシロースレダクターゼ活性のみでも条件によっては十分にキシロースを資化できることが分かった。

Lee らによると、*Candida parapsilosis* KFCC-10960 株が NADH 依存キシロースレダクターゼ活性を持っていたという報告がある (*Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69:6179-6188)。今回のスクリーニング対象にも *C. parapsilosis* は含まれていたが、同様の性質を持つものは見出されなかったため、たとえ同じ種であったとしてもその性質は株によって大きく異なるものと思われる。



### 1 - (3) - 2 耐熱性の評価

木質バイオマスの糖化酵素の至適温度は 50°C前後であることが多いが、酵母の生育至適温度は通常 30°C前後である。よって、バイオマスを糖化しつつ酵母でエタノール発酵を行うためには、できる限り高い温度で生育できることが望ましい。そこで、スクリーニングに用いた酵母の一部において、35°Cあるいは37°Cにおいて増殖可能かどうかを検証した（図3-10, 図3-11）。

その結果、35°Cで増殖可能な酵母は多数見出されたが、28°Cでは増殖可能であっても、35°Cだとほとんど増殖しない酵母も少なからず存在した（図3-10）。また、37°Cだと増殖可能な酵母はさらに限られ、わずか2°Cの差であっても増殖に大きな影響がある例が多数観察された（図3-11）。合計すると、キシロースの資化性とは別に、少なくとも 35°C以上で OD<sub>610</sub>=10 以上まで生育できる酵母が 45 株見つかった。

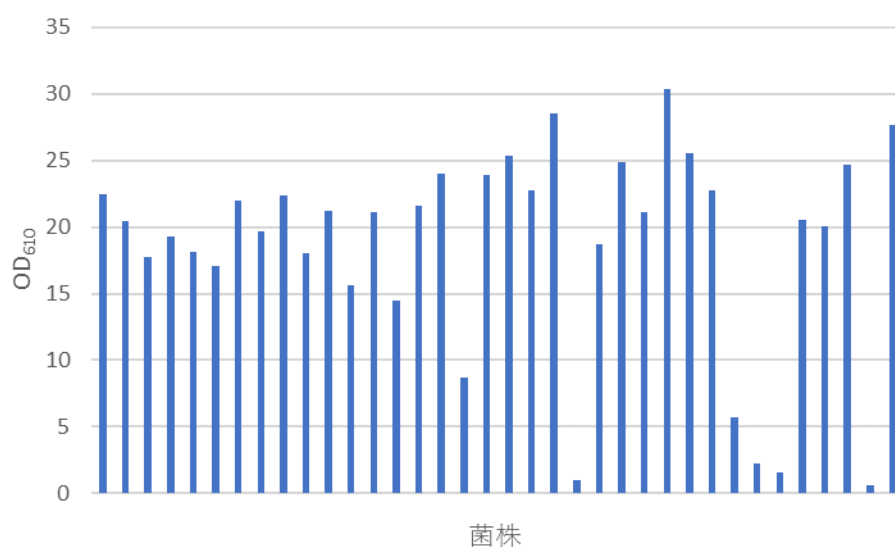


図3-10. 35°Cにおける生育

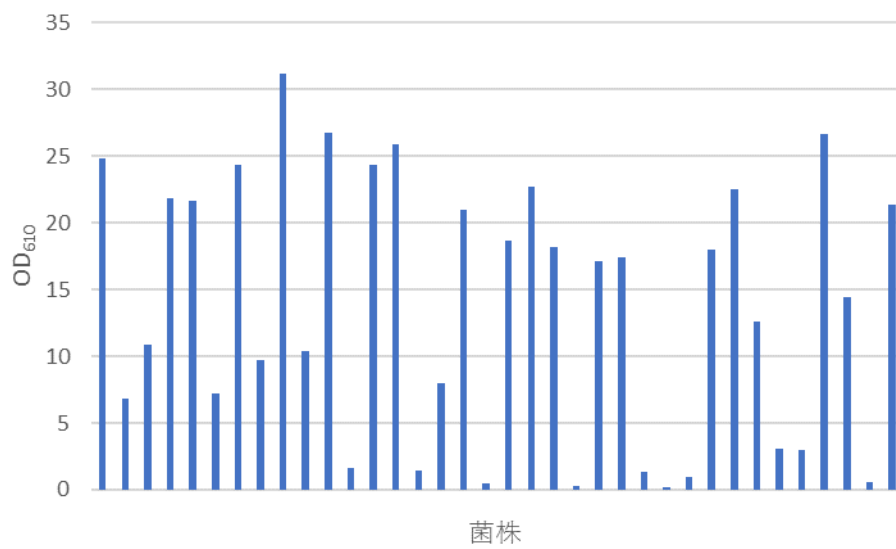


図3 - 1 1. 37°Cにおける生育

### 1 - (3) - 3 エタノール耐性の評価

連続同時糖化発酵プロセスにおいては、プロセスが定常状態に達した後、ある一定のエタノール濃度に常にさらされることとなり、その状態で長期間発酵を持続する必要がある。*Saccharomyces cerevisiae* などの醸造酵母は高いエタノール耐性を持つことが知られているが、その他の野生型酵母は必ずしもエタノール耐性が高いとは限らない。そのため、スクリーニングに用いた酵母の中から生産性が高いものを中心にエタノール耐性を比較した。本検証においては、高基質濃度下においてどの程度の濃度までエタノールを生産できるかどうかを調べることで、エタノール耐性を比較した。

#### (方法)

YM プレートで培養した酵母をかきとり、試験管に分注した YPD 培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、140 g グルコース / 1L) に植菌し、28°C、120 rpm で 41-48 時間培養した。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清を HPLC により分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム：Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

温度：45°C

検出：RID

#### (結果と考察)

菌株によって糖消費速度には大きな違いが見られたが、ほとんどの酵母は高濃度のグルコースを迅速に消費した。消費したグルコースはエタノールへと変換され、多数の酵母において高濃度のエタノールを生産できることが示された (図 3-12)。ただし、増殖初期においてエタノールが存在すると増殖が顕著に阻害される酵母も観察されており、エタノール耐性を調べるためには、さらなる検証が必要であると思われた。合計すると、40 g/L 以上のエタノールを生産できる株が 34 株見つかった。

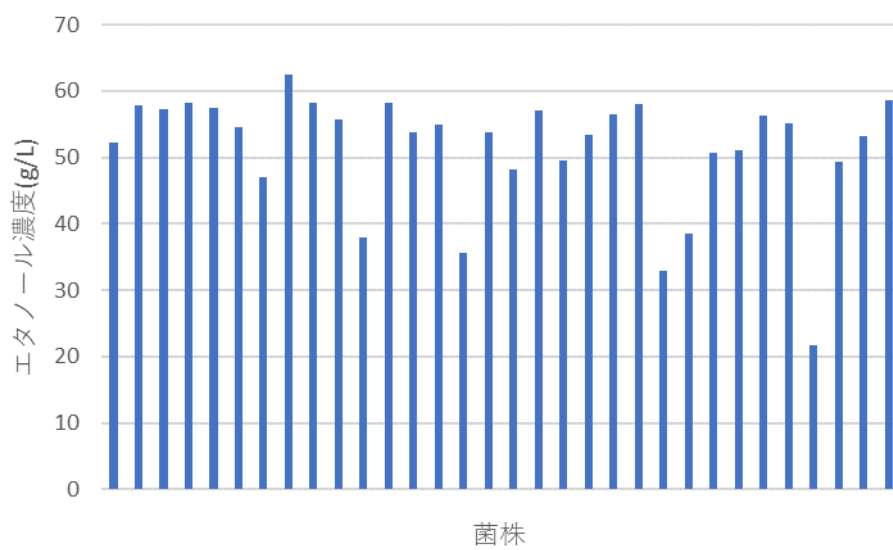


図3-12. エタノール生産性の比較

#### 1 - (3) - 4 キシロース資化酵母の育種

3-1で得られたキシロース資化酵母は必ずしも耐熱性、エタノール耐性は高くなく、改良が必要である。微生物の耐熱性やアルコール耐性については、あるレベルまでは育種により耐性を上げられたという報告が複数あるため、本開発においても育種による耐性付与を試みた。

##### (方法)

エタノールを添加した液体培地で酵母を培養し、継代を繰り返した。また、寒天プレート上に塗布した菌体に紫外線を照射することで突然変異の促進を試みた。

##### (結果と考察)

スクリーニングで得られた#30株は、5 wt%程度のエタノールまで生産可能であるが、培養初期から5 wt%のエタノール存在下で培養すると増殖が非常に遅くなった。一方、複数回継代した菌体に紫外線を照射し、より高濃度のエタノールを含むプレート上で培養したところ、糖源としてキシロースのみを含み、6.8 wt%エタノール含有プレート上において、37°Cでも増殖することができた(図3-13)。他のキシロース資化株においても同様に育種による耐性付与を試みている。

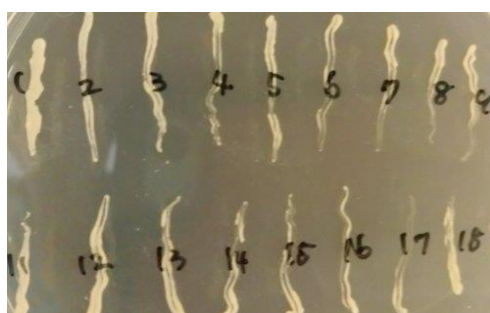


図3-13. 育種株のエタノール含有プレート上での生育

## 1 - (3) - 5 組換えによるキシロース資化遺伝子の強化

### 1 - (3) - 5 - 1 耐熱性

キシロース資化酵母のスクリーニングの結果、野生株でキシロースを資化できる酵母は多数存在することが明らかとなったが、実用化に向けては耐熱性やエタノール耐性に課題があることが分かった。そこで、耐熱性とエタノール耐性を合わせ持つ酵母を宿主として、組換えによりキシロース資化遺伝子を強化するアプローチが有効であると考えられる。そこで、どの株が宿主として適しているかを検証するため、温度によるエタノール生産への影響を調べた。

#### (方法)

YM プレートで培養した酵母をかきとり、試験管に分注した YPD 培地 (10 g 酵母エキス、20 g ペプトン、140 g グルコース / 1 L) に植菌し、28°Cあるいは37°C、120 rpm で 41-48 時間培養した。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清を HPLC により分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム：Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

温度：45°C

検出：RID

#### (結果と考察)

組換え系が確立していることや知見の豊富さに加え、高いエタノール耐性を持つことが知られていることから、*Saccharomyces* 属を宿主とすることを想定し、エタノール生産性を 28°Cと 37°Cで比較した (図 3 - 1 4)。その結果、同じ *Saccharomyces* 属でも耐熱性やエタノール生産性は大きく異なり、特に耐熱性については 37°Cにするとほとんど生育しなくなる酵母も複数存在した。37°Cでも生産性を維持できる酵母も複数見出されたが、28°Cと比べると生産性はやや落ちる傾向にあった。その中でも、#50 株 (図 3 - 1 4、赤丸) は 37°Cにおける生産性が 28°Cとほぼ変わらなかった。

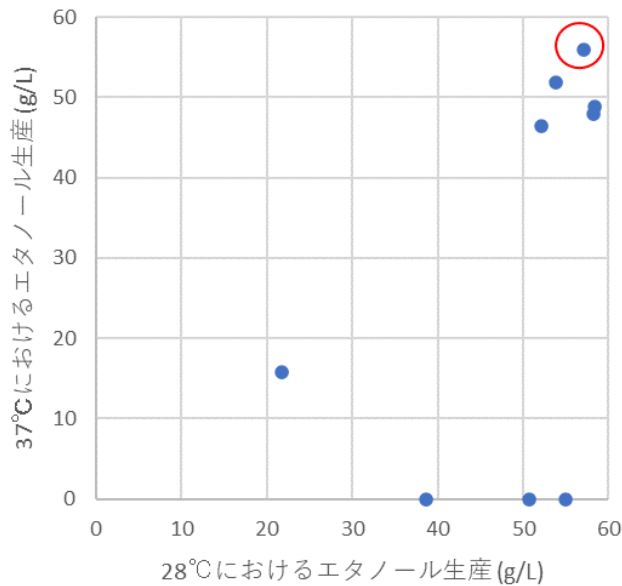


図3-14. 温度によるエタノール生産性の違い

### 1-(3)-5-2 ストレス耐性

実用酵母においては、使用する糖液に発酵阻害物質が含まれていることもあり、各種ストレスに対する耐性が高いことが望ましい。そこで次に、スポットテストによりエタノール耐性、耐塩性、耐酸性を比較した。

#### (方法)

培養した酵母を OD=1 になるように希釈し、10 倍ずつ希釈した希釈系列を作成した。これら菌体懸濁液を、各種プレート培地に 2 uL ずつスポットし、28°C で菌体が増殖するまで培養した。

#### (結果と考察)

スポットテストにより各種ストレス耐性を比較したところ、同じ *Saccharomyces* 属酵母でもストレスの種類に対する耐性は異なり、特定の種類のストレスのみに耐性のある酵母も存在した (図3-15、図3-16)。その中で、#50 株は 10 wt%エタノール含有培地上でも生育することができ、高い耐塩性も持っていた。また、耐酸性は一部酵母よりは劣るものの、pH 2 でも増殖す

ることができた。これらの結果から、#50 株を組換えの宿主とし、現在キシロース資化遺伝子の強化を行っている。

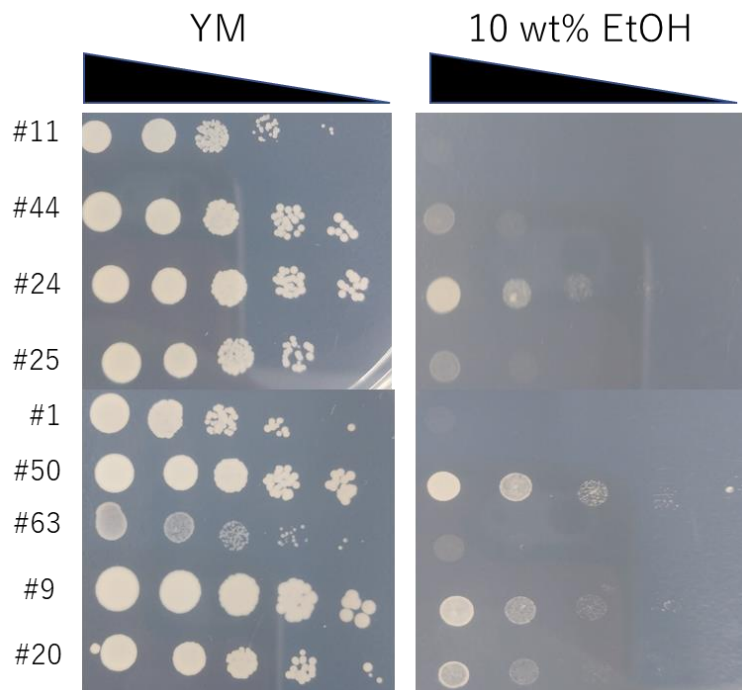


図3-15. スポットテストによるエタノール耐性の比較

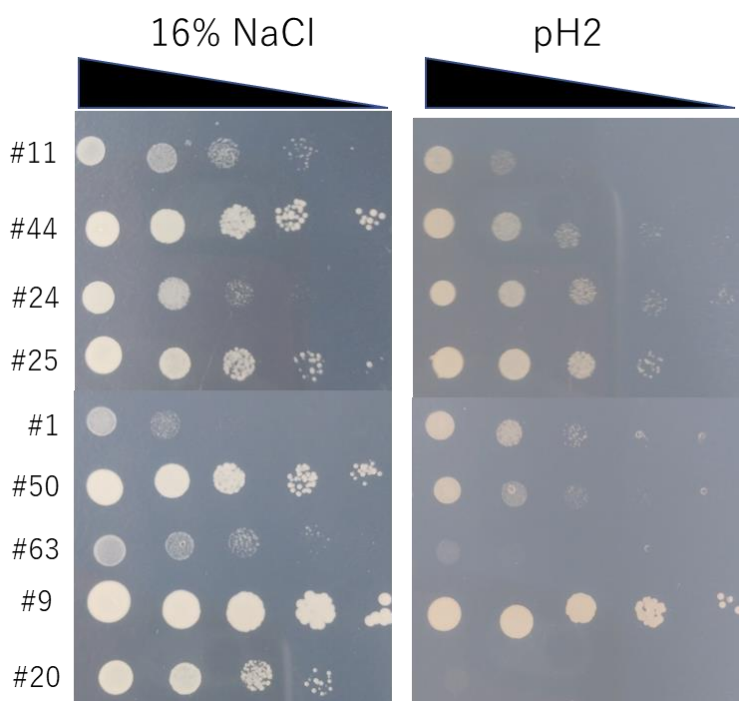


図3-16. スポットテストによる耐塩性、耐酸性の比較

### 1 - (3) - 6 選別株による同時糖化発酵

#### 1 - (3) - 6 - 1 フラスコによる同時糖化発酵

選抜されたキシロース資化酵母を用いて、パルプを原料として糖化とエタノール発酵を同時に行った際の性能を評価した。

#### (方法)

10 wt%パルプ(LBKP)、1 wt% CSL、0.5 wt%硫酸アンモニウム、50 mM クエン酸バッファー(pH 5.0)、糖化酵素をフラスコに加えて 100 mL とし、酵母を加えて 30°C、120 rpm で攪拌した。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清を HPLC により分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム：Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

温度：55°C

検出：RID

収率の計算は、酵母を添加していないコントロールを用意し、パルプ糖化によって生じる単糖の定量値を用いて、エタノールの対糖収率を算出した。

#### (結果と考察)

スクリーニングの際にはキシロース資化に優れた株を選択したにも関わらず、同時糖化発酵ではキシロース資化が停滞する株が多かった(図 3-17~図 3-20)。その理由として、スクリーニング条件と同時糖化発酵条件の培地組成の違いに起因する可能性や、糖化速度と発酵速度が合っていないことにより高糖濃度になってしまい、何らかの障害がかかった可能性も考えられた。一方、#30 株は同時糖化発酵でも優れた発酵速度を示し、キシロースも大部分を資化することができた。対糖収率を計算すると、#30 株と#61 株は同等な収率を示した(表 3-1)。ただし、発酵速度は#30 株の方が速かった。

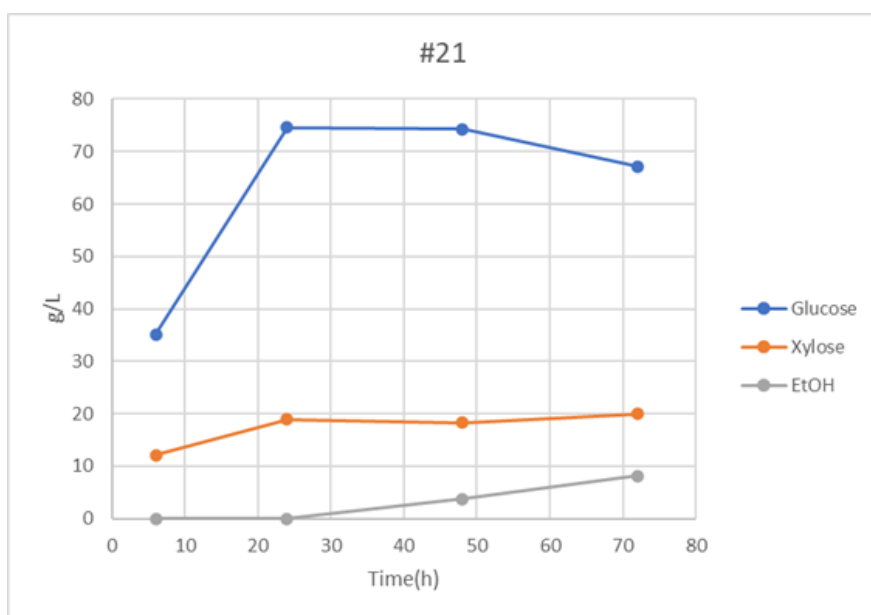


図3-17. キシロース資化株のフラスコスケール同時糖化発酵 (#21)

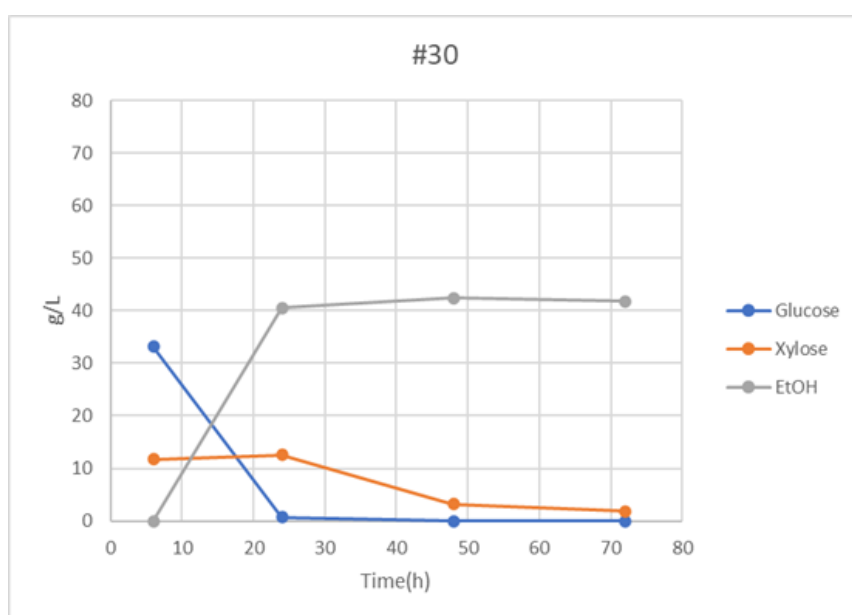


図3-18. キシロース資化株のフラスコスケール同時糖化発酵 (#30)

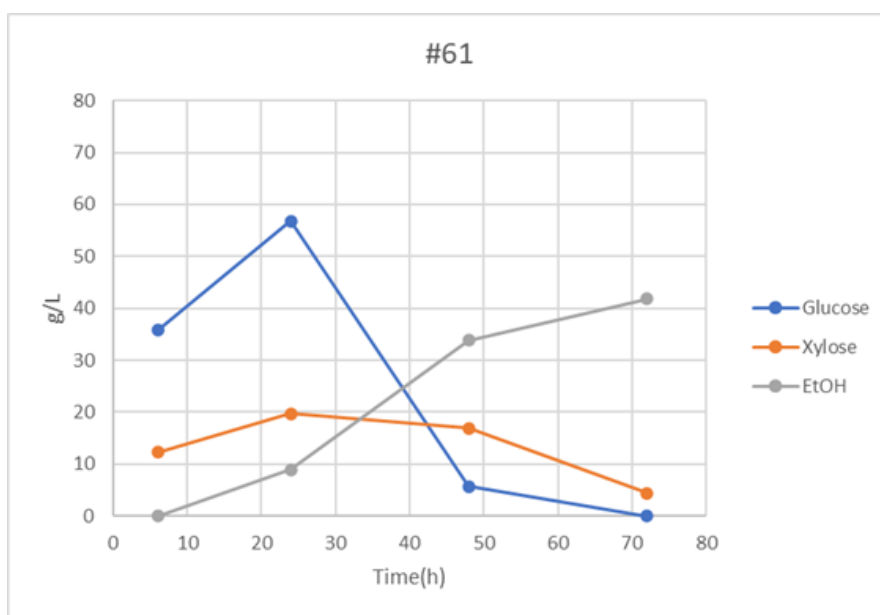


図3-19. キシロース資化株のフラスコスケール同時糖化発酵 (#61)

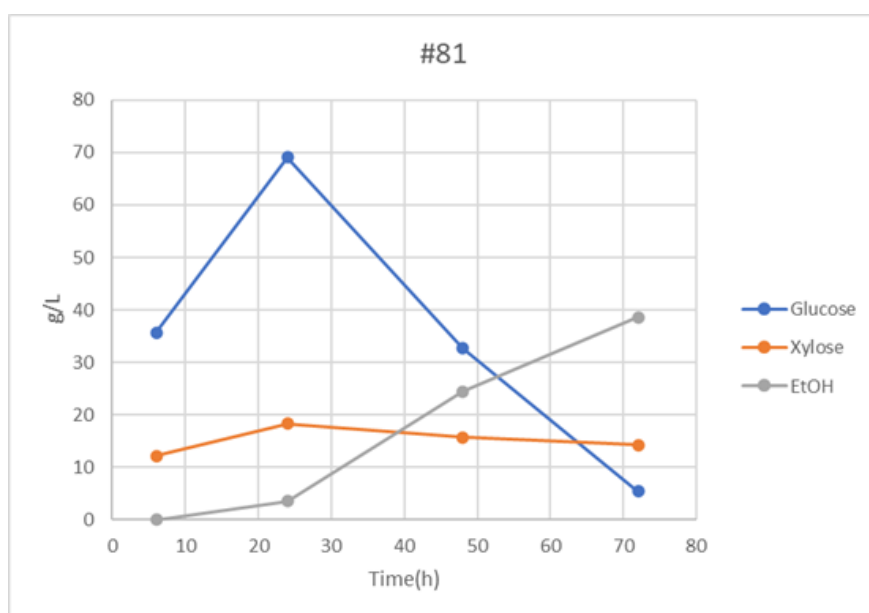


図3-20. キシロース資化株のフラスコスケール同時糖化発酵 (#81)

表3-1. フラスコスケール同時糖化発酵の対糖収率

|           | #21   | #30  | #61  | #81  | #30 育種 |
|-----------|-------|------|------|------|--------|
| g/g sugar | 0.075 | 0.39 | 0.39 | 0.35 | 0.41   |

さらに、3-4で作製した#30株の育種株についても、同様に試験した(図3-21)。育種株についても#30株と同様に高い生産性を示し、#30株よりも高い収率となった(表3-1)。

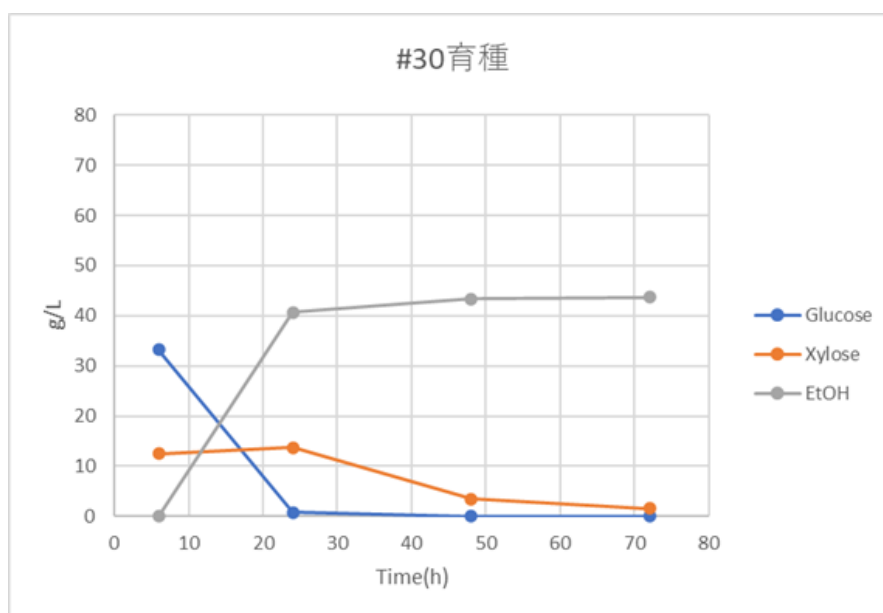


図3-21. 育種株のフラスコスケール同時糖化発酵

### 1-(3)-6-2 1L ジャーフェーマンターによる同時糖化発酵

フラスコスケールでの同時糖化発酵で良好な性能を示す株が見つかったため、次に、1Lジャーを用いた同時糖化発酵試験を行い、課題を抽出した。

#### (方法)

1 wt% CSL、0.5 wt%硫酸アンモニウム、50 mM クエン酸バッファー(pH 5.0)を加えて500 mLとし、糖化酵素、酵母を加えて30°C、250 rpmで攪拌した。パルプは複数回に分けて添加し、最終的に10 wt%パルプ(LBKP)となるようにした。培養液の一部をサンプリングし、遠心分離により上清と沈殿を分離した後、上清をHPLCにより分析した。分析条件は以下のとおり。

カラム：Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

溶離液：5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

温度：55°C

検出：RID

収率の計算は、パルプ重量あたりのセルロース、ヘミセルロース含量から理論的な単糖量を計算し、エタノールの対糖収率を算出した。

#### (結果と考察)

フラスコスケールの同時糖化発酵で最も性能のよかった#30 育種株を用いて評価を行った。グルコースはほぼ完全に消費したが、今回の条件ではキシロースの消費が遅く、72 時間以内にキシロースを完全に消費することができなかった(図 3-21)。最終的なエタノール濃度もフラスコスケールよりやや低い値となり、パルプ単糖あたり収率は 0.38 g/g だった。

1L ジャーファーマンターでパルプを糖化する場合、攪拌羽根を傷めないように少しずつパルプを投下する必要がある。そのため培養 10 時間頃まで糖濃度が上昇し、フラスコスケールと比べると到達した糖濃度もやや高い値になっていた。酵母にもカタボライト抑制という現象が知られており、グルコースが存在するとグルコースがなくなるまで他の糖を消費しなくなることがある。これにより、グルコースが高濃度になることでキシロース資化に阻害がかかった可能性がある。また、キシロースレダクターゼの一般的な補酵素特異性を考えると、キシロース資化のためには NADPH を再生する必要がある(図 3-8)、この酸化還元力のアンバランスを解消するためには酸素が一般に必要な。今回の条件では酸素、つまり通気が不足していた可能性が高い。よって、今後ジャーファーマンターを用いた同時糖化発酵を進めるにあたって、パルプの投入速度や、適切な通気量などを検討する必要がある。また、糖化酵素の至適温度に近くなるように、より高温での発酵試験や、連続プロセスにして長時間エタノールにさらされたときに性能を維持できるかどうかを検討していく必要がある。合わせて、不足する性能があれば育種や組換えなどにより改善していく必要がある。

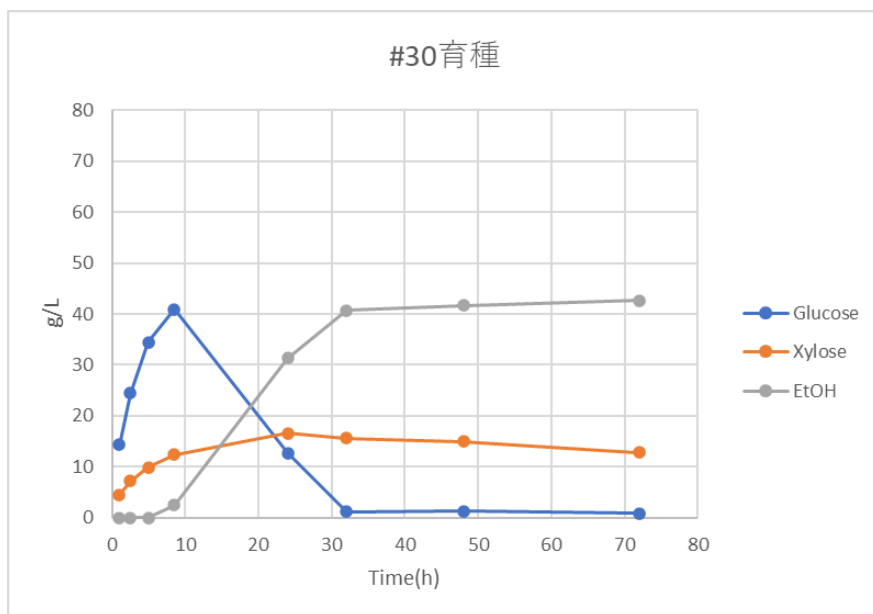


図3-22. 1Lジャーを用いた同時糖化発酵

### 1 - (3) - 7 まとめ

パルプ糖化液からのエタノール発酵に適した酵母のスクリーニングのため、キシロース資化、耐熱性、エタノール耐性の3つの指標で評価し、全91株の酵母から14株のキシロース資化株、46株の耐熱性を持った酵母、34株のエタノール耐性のある酵母を見出した(図3-23)。全ての指標を満たす酵母は4株存在したが、複合的な条件となると単独指標での性能を発揮できない傾向にあったため、育種により複合的な性能向上を目指している。キシロース資化能を持つ株#30は、エタノール耐性が5wt%から、エタノール存在下での継代培養と紫外線照射による変異を与え、6.8wt%エタノール耐性を持つ株へ育種開発することができた。

また、耐熱性、エタノール耐性が高い酵母を宿主として、組換えによりキシロース資化能を強化する試みも進めており、両面からのアプローチで想定するプロセスに適した酵母の開発を行っていく。

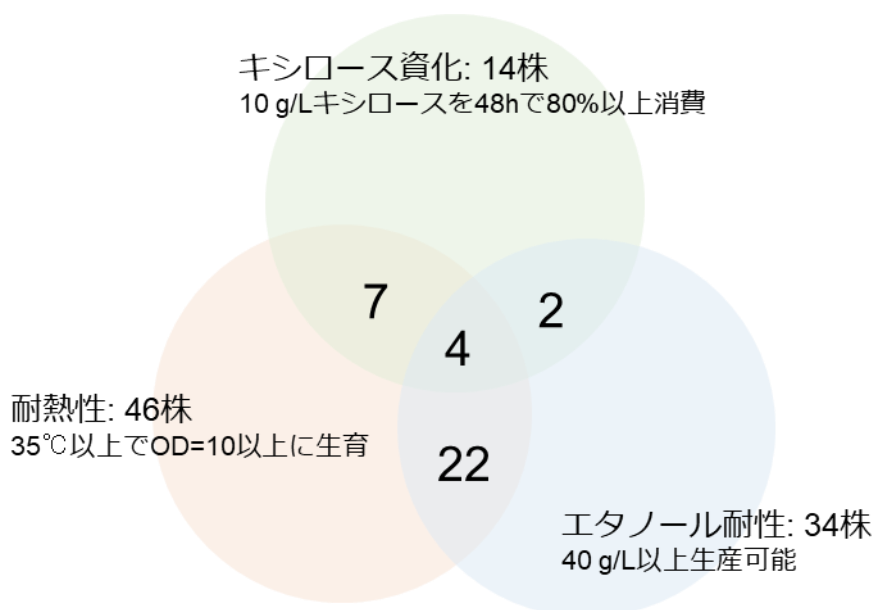


図3-23. 酵母のスクリーニング結果

1 - (4) エタノールからの SAF 製造プロセスに関する技術開発

1 - (4) - 1 SAF の状況調査

SAF とは Sustainable Aviation Fuel (持続可能な航空燃料) の略号で、既存のジェット燃料よりも、地球温暖化ガスの排出が少ないことが求められている。航空機に商用使用するための合成燃料は、国際規格として ASTM D7566 において要件が定義されている。この規格では、純バイオジェット燃料および石油由来ジェット燃料との混合バイオジェット燃料に関する要件が、原料や製造方法ごとに定義、認証されている。

2023 年 2 月現在、D7566 で承認されているのは次表 4 - 1 の 7 種類である。

表 4 - 1 ASTM D7566 の要件定義

Standard Specification for Aviation Turbine Fuel Containing Synthesized Hydrocarbons

| Annex   | Pathway  | Blend Level | Year of Certification | Note                               |
|---------|--|-------------|-----------------------|------------------------------------|
| Annex 1 | Fischer-Tropsch Synthetic Paraffinic Kerosene (FT-SPK)                         | 50% Max     | 2009                  |                                    |
| Annex 2 | Hydroprocessed Esters and Fatty Acids Synthetic Paraffinic Kerosene (HEFA-SPK) | 50% Max     | 2011                  |                                    |
| Annex 3 | Hydroprocessed Fermented Sugars to Synthetic Isoparaffins (HFS-SIP)            | 10% Max     | 2014                  |                                    |
| Annex 4 | Fischer-Tropsch Synthetic Paraffinic Kerosene with Aromatics (FT-SPK/A)        | 10% Max     | 2015                  |                                    |
| Annex 5 | Alcohol to Jet Synthetic Paraffinic Kerosene (ATJ-SPK)                         | 30% Max     | 2016                  | iso-Butanol only                   |
| Annex 5 | Alcohol to Jet Synthetic Paraffinic Kerosene (ATJ-SPK)                         | 50% Max     | 2018                  | Ethanol added, Blend Level 30%→50% |
| Annex 6 | Catalytic Hydrothermolysis Synthesized Kerosene (CH-SK, or CHJ)                | 50% Max     | 2020                  |                                    |
| Annex 7 | Hydroprocessed Hydrocarbon, esters and fatty acids                             | 10% Max     | 2020                  |                                    |

既存の石油由来ジェット燃料は、炭素数 9~15 の炭化水素を主成分として構成されており、石油を分留することによって得られる。SAF 製造の基本的な流れは、非石油由来の各種原料（バイオマスや廃食油、動植物油脂、都市ゴミなど）を、種々化学反応を用いることで石油由来ジェット燃料に近い炭化水素に改質・抽出し、ジェット燃料化する。

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

以下にそれぞれの製造方法の概要を示す。

### **Annex1 Fischer Tropsch**

Annex1 (FT : Fischer-Tropsch) は都市ごみや廃木材などをガス化して得られる合成ガス (CO と H<sub>2</sub>) をフィッシャー・トロプシュ合成でパラフィン燃料に転換する技術であり、天然ガスを液化する GTL (Gas to Liquid) で実績がある。Annex1 を利用した製造では、Fulcrum や Red Rock が航空会社との間で将来的な燃料供給契約を結んでいる。Fulcrum は 2021 年 7 月に Sierra BioFuels Plant で製造を開始した。年間 17 万 5,000 トンの都市ごみを約 11,100 万ガロン (4.2 万 kL) の合成原油に転換し、SAF、再生可能ディーゼル、再生可能ガソリンなどを生産している。

Fulcrum は、原料である都市ごみの調達は、Waste Management および Waste Connections との間の長期契約により確保している。Fulcrum が長期契約した都市ごみの総量は、米国で 1 年間に埋め立てられるごみの約 4% に相当するものとされる。Annex1 は、再生可能電力などで製造された水素と空気中や工場排煙などから回収された CO<sub>2</sub> を原料として製造できるため、原料がバイオ由来でないものでも含まれる。2021 年 10 月 4 日、ドイツ北部のニーダーザクセン州で、世界初となる風力発電による電力を用いて水を電気分解し、これにより製造された水素と CO<sub>2</sub> を合成してジェット燃料を製造する、合成ジェット燃料の量産プラントの開所式が行われた。このプラントは、環境保護団体であるアトモスフェア (atmosfair) が運営しており、製造された SAF は、近隣の製油所にタンクローリーで輸送され、従来のジェット燃料と混合された後、ルフトハンザ・グループに供給されている。将来、SAF の需要が高まることが予測されるため、バイオ由来の SAF では、原料の確保に限界があると考えられており、このような再生可能エネルギーを利用した SAF の製造方法が期待される。

### **Annex2**

Annex2 (HEFA: Hydroprocessed Esters and Fatty Acids) は廃食油や植物油などの脂肪酸エステルの水素化により燃料を製造する技術で、Neste や World Energy などが実際に SAF の航空会社への供給を行っている。Neste や World Energy の他にも、米国の Diamond Green Diesel、米国の REG、イタリアの Eni などがプラントを所有しているが、いずれも自動車や船舶に用いられる

HEFA ディーゼル燃料の製造を主要としており、SAFの製造量は少ない。自動車や船舶のディーゼル燃料の需要と航空機のSAF需要見合いで、今後、SAFの割合が高まると予測されている。加えて、米国のSG Prestonなど、HEFA製造プロセスは成熟した技術であることから、あえて研究開発を経ずに商用化を目指し、航空会社と長期供給契約（Offtake Agreement）を結ぶ後発ベンチャー企業も出現している。

### **Annex3**

Annex3（SIP: Sugars to Synthetic Isoparaffins）は、サトウキビなどの糖を発酵して得られるファルネセンの水素化によるファルネセンベースのバイオジェット燃料製造技術である。サトウキビなどを原料にしたバイオ製品を製造するAmyrisがTotal（現 Total Energies）と共同で本技術を開発し、Annex3の認証を取得した。しかし、Amyrisは現在より付加価値の高い化粧品等の分野に注力しており、本技術によるSAFの製造は行っていない。

### **Annex4**

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

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

### **Annex5**

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

現在、ドイツでは再生可能エネルギーで製造したメタノールからATJの製造を検討しており、Annex5に含めるか、新たなAnnexとして申請するかを検討して

いるようである。

### **Annex6**

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

### **Annex7**

Annex7 (HC-HEFA: Hydroprocessed Hydrocarbons, Esters and Fatty Acids) は、Annex2 (HEFA) の水素化プロセスの原料を、動植物油などの脂肪酸エステルから炭化水素も含めた形に拡張したものである。実質的には IHI のボツリオコッカスからの藻油が対象で、藻油が酸素を含まない炭化水素であり Annex2 の名称にあてはまらないため、2020年の5月に新規 Annex として認証された。なお、IHI の Annex7 は通常とは異なる Fast Track の手続きを経て認証を得たため、従来のジェット燃料へ混合の上限は10%となっている。

## 1 - (4) - 1 - 1 Annex5 詳細

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

### A5.4 Materials and Manufacture

A5.4.1 ATJ-SPK synthetic blending components shall be comprised of hydroprocessed synthesized paraffinic kerosene wholly derived from ethanol<sup>21</sup> or isobutanol<sup>22</sup> (see Note A5.1) processed through **dehydration, oligomerization, hydrogenation, and fractionation.**<sup>23</sup>

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

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

Contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org).

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

Contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org).

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

Contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org).

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



当初は米国 GEVO 社が申請して承認されたイソブタノールのみが原料として D7566 Annex5 (ATJ) に認められていた。この状況下において筆者らは古着を原料に糖化酵素で糖化した糖化液を用いてイソブタノールを製造し、イソブタノールの脱水・オリゴマー化・蒸留により D7566 Annex5 に適合したニート SAF を製造し、既存のジェット燃料と混合して、商用フライトに成功した経験を有している (図 4-1)。

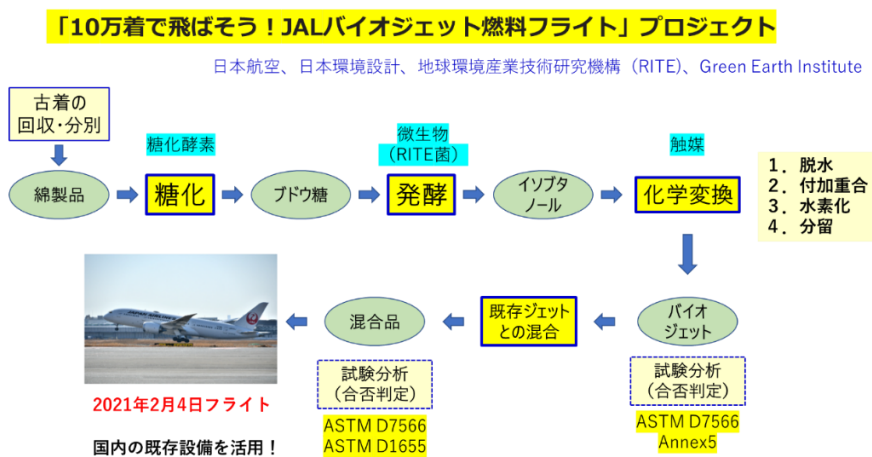


図 4-1 古着を原料とした SAF 製造プロジェクト

表 4-3 古着を原料とした SAF 製造プロジェクト ニート ATJ 分析結果

ASTM D7566 TABLE.A5.1 Detailed Batch Requirements;Alcohol-to-Jet(ATJ-SPK)

| 試験項目                                | 試験結果      | 規格値   | 試験方法       |
|-------------------------------------|-----------|---|------------|
| Acidity total, mgKOH/g              | 0.000     | Max 0.015   | ASTM D3242 |
| Physical Distillation               |           |   | ASTM D86   |
| 10% recovered temperature, °C       | 173.2     | Max 205   |            |
| 50% recovered temperature, °C       | 186.5     | report  |            |
| 90% recovered temperature, °C       | 216.4     | report  |            |
| Final boiling temperature, °C       | 253.7     | Max 300   |            |
| T90-T10, °C                         | 43.2      | Min 21  |            |
| Residue, vol%                       | 1.0       | Max 1.5   |            |
| Loss, vol%                          | 0.1       | Max 1.5   |            |
| Flash point, °C                     | 46.0      | Min 40  | ASTM D56   |
| Density at 15°C, kg/cm <sup>3</sup> | 765.3     | 730 to 770  | ASTM D4052 |
| Freezing point, °C                  | Below -65 | Max -40   | ASTM D2386 |
| Thermal Stability                   |           |   | ASTM D3241 |
| Test temperature, °C                | 325       | Min 325   |            |
| Filter Pressure Drop, mmHg          | 0.1       | Max 25  |            |
| Tube Rating                         | <1        | Less than 3, no 'Peacock' or 'Abnormal' colour deposits |            |
| Antioxydants, mg/L                  | 18.9      | 17 to 24  | GC-MS      |

1 - (4) - 1 - 2 エタノール to ジェットの経緯

PNNL (Pacific Northwest National Laboratory) は Lanza Tech 社とともに ASTM D7566 Annex A5 の原料としてエタノールを追加するように申請していたが、2008年4月に認証された。同時に ATJ の混合上限も 30%から 50%に緩和された。

認証の仕組みは、ASTMD4054 に規定されており、エタノールの追加についても、この仕組みに則って実施された。



図4-2 SAFに係る ASTM 規格

D4054 は、(1) 試験プログラム、(2) 航空機メーカー・航空機エンジンメーカー (OEM) による部内検査、(3) 規格の設定・変更 という3段階の仕組みが規定されている。

ASTM Fuel Approval Process- ASTM D4054

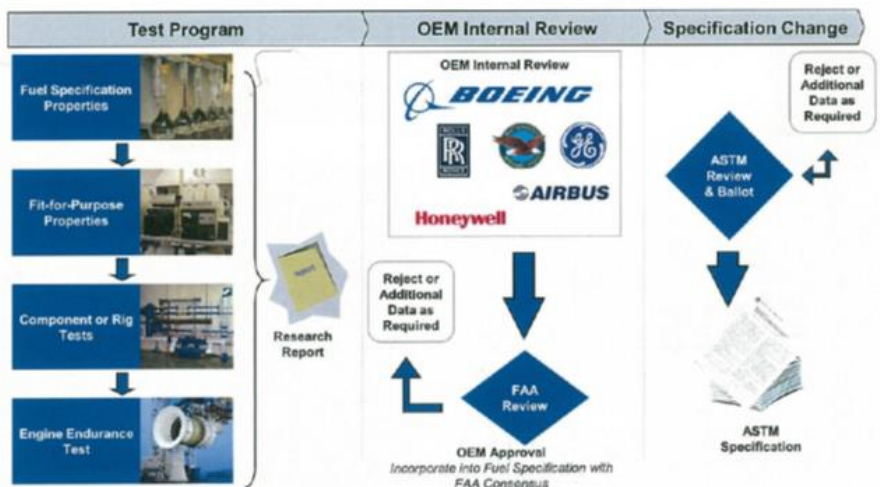


図4-3 ASTM 燃料認証プロセス

(1) の試験プログラムは、

①燃料規格特性の試験、②目的適合特性の試験、③成分検査、④エンジン耐久性検査から成り立っており、この全てに合格して(2)に進む。

申請者は、上記の試験のために、約95万リットルの試験用燃料を用意する必要がある。

PNNL(Pacific Northwest National Laboratory)は、エタノールをATJ-SPKに変換する独自の触媒プロセスを開発していたが、LanzaTechと協力して触媒をスケールアップし、LanzaTechはプロセス全体をスケールアップしてテスト用のエタノール由来ATJ-SPKを生産した。LanzaTechは、ATJ-SPK製品の広範な分析とテストのデータを調査レポートにまとめ、連邦航空局と航空機およびエンジンのOEMがレビューできるようにした。レビューは、ATJ-SPKがASTM D4054、新しい航空タービン燃料と燃料添加剤の認定と承認のための標準プラクティスで必要とされるすべての目的適合特性を満たしていることを検証した。このレビューに続いて、ASTM D7566 Annex A5の原料としてのエタノールの追加を承認するため、ASTMメンバーシップに投票が提出され、2018年の4月1日に可決された。2回目の投票も通過し、ATJ-SPKのブレンド比率が30%から50%への増加が決定した。

### 1 - (4) - 1 - 3 ETJ 事業化の動き

LanzaTech は、エタノールからジェット燃料を製造する第一世代の PNNL 技術のスケールアップを完了させ、Lanza Jet™ Alcohol-to-Jet の商業化に向けてランザジェット社を設立、ジョージア州ソパートンにおいて世界初のエタノールベースのアルコールからジェットへの持続可能な航空燃料 (SAF) 生産プラントを建設中で、2023 年の稼働が見込まれている。このプラントは、廃棄物ベースの原料を含む、さまざまな持続可能で低炭素強度のエタノールを使用して、エタノールから年間 1,000 万ガロンの SAF および再生可能ディーゼルを生産する計画で、米国における現在の SAF 生産量の約 2 倍に相当する量の生産が見込まれている。

国内では、出光興産が Axxens 社の ATJ 技術を導入し、GI 基金も活用して 2026 年度には国産初の商用レベルの ATJ 生産に乗り出す計画である。コスモ石油は三井物産とともに、ランザジェット社 Alcohol to Jet (ATJ) 技術を活用した国産 SAF 製造の共同検討を開始している。

## 1 - (4) - 2 ETJ 技術の調査

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

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

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

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

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

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

第 2 のオリゴマー化反応の実施例では、C4~C20+までの成分が検出されている。温度 250°C、圧力 300psig の条件下での各種触媒を用いた場合の生成組成物を示す。

この図より SAF の主要成分 (C9~C16) は Zeolyst 触媒で最も多く得られていることが分かる。反応に大きく寄与するのは、触媒と運転条件 (温度、圧力、

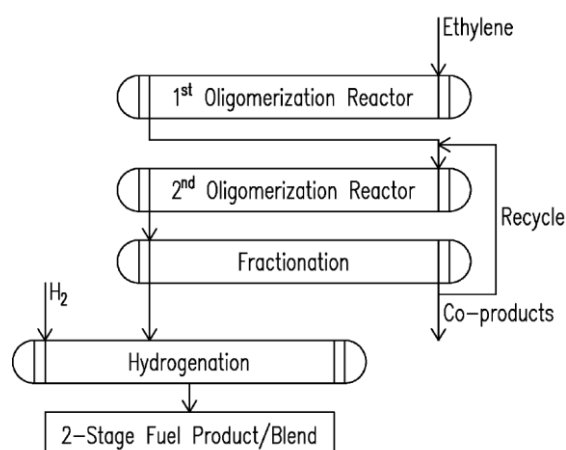


図 4 - 4 ETJ SAF 製造プロセス

WHSV など) であることから、これらを十分に検討する必要がある。この特許の実施例では 250°C 付近が最適との結果が得られている。

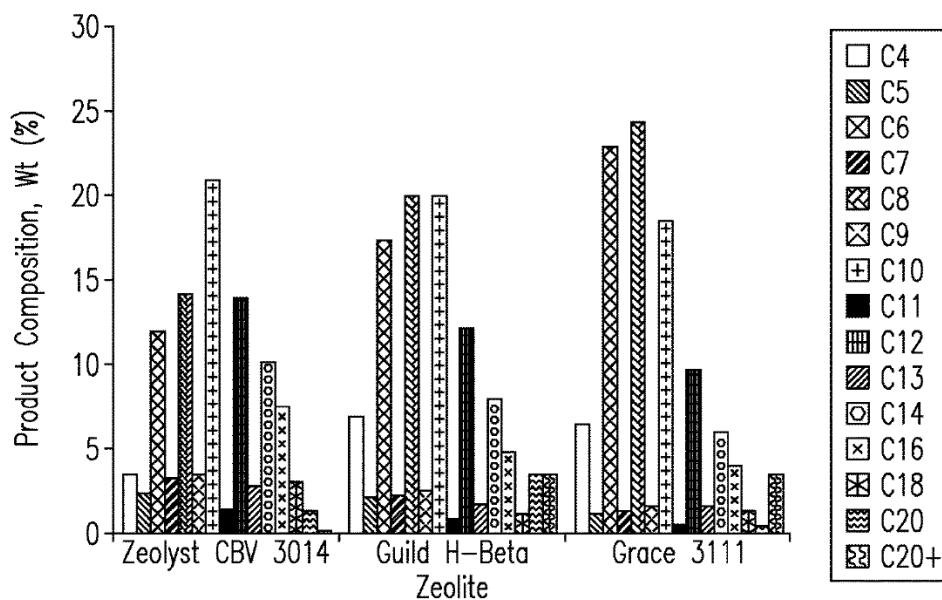


図 4 - 5 250°C 反応生成物の炭化水素分布 (触媒比較)

### 1 - (4) - 3 SAF 製造実験計画

脱水技術については、数多くの文献があること、SAF 製造試験を委託している株式会社 Biomaterial in Tokyo (以下 BITS と略す) がエタノールの脱水装置を有していることから、同社に託すこととした。

流通式の反応試験装置も BITS が保有していることから、どのような試験を実施するかについて同社と打ち合わせを行い、本年度の目標である「製紙工場で得られるパルプから数十～数百 mL の炭化水素油を得ること」を達成することとした。

具体的には、BITS が保有している触媒を用い、比較的温和な条件でエチレンを反応させることにより、炭化水素油を得ることとし、得られた炭化水素油をガスクロマトグラフィーで分析することにより、SAF 成分が得られていることを確認することとした。

### 1 - (4) - 4 実験結果とまとめ

BITS では木質系バイオマスを原料に製造したエタノールの脱水を同社の川崎工場にて実施し、得られたエチレンをボンベに詰め、同社の筑紫野研究所に移送した。

筑紫野研究所では、反応装置に触媒を充填し、ボンベからエチレンと窒素を送り込み所定の温度で反応させた結果、BTX (ベンゼン、トルエン、キシレン)、エチルベンゼン、スチレンといった芳香族環状化合物が多く生成したが、直鎖状炭化水素などの成分も存在している可能性があった (図 4 - 6)。本年度試験として 20ml の炭化水素油を得ることが出来た (図 4 - 7)。次年度は、SAF に適した直鎖状炭化水素の収量を増やすため、2 段階反応も含め触媒と運転条件の最適化を検討する計画である。

主な運転条件を以下に示す。

触媒：BITS 自製触媒 充填量 50 ml

通塔量：エチレン 1.5 L/分、 窒素 3.0 L/分

反応温度： 550 °C

反応圧力： 0.25 MPa

炭化水素油の収量 20 ml

ガスクロマトグラフィーの分析条件を以下に示す。

カラム：SH-Polarwax（島津製作所）

キャリアガス：窒素

キャリアガス流量：6 mL/min

カラム温度：40°C，1分保持→15°C/minで190°Cまで昇温→190°C，5分間保持

分析時間：16分

検出：FID 炭化水素組成

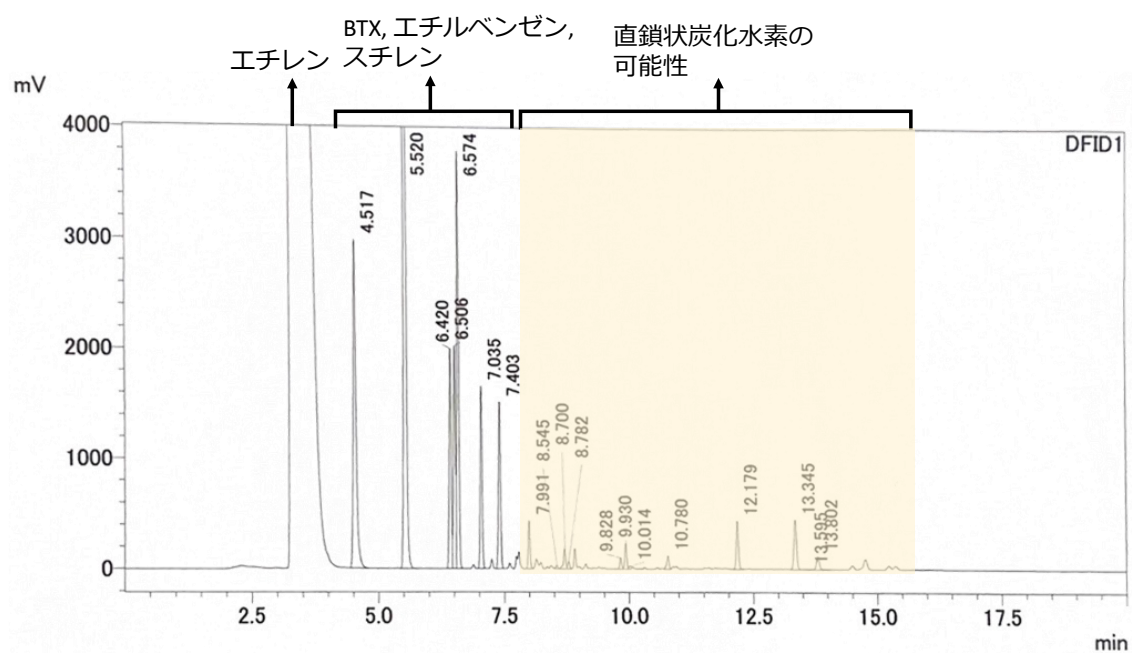


図4-6 ガスクロマトグラム



図4-7 得られた炭化水素油

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

（担当：株式会社 Biomaterial in Tokyo）

（背景と目的）

地球温暖化問題が深刻化する中で、CO<sub>2</sub>削減を進めるために、国内外で SAF（Sustainable Aviation Fuel：持続可能な航空燃料）の導入目標の設定や義務化が進んでいる。しかしながら、SAF のコストが下がらず、普及が進んでいないのが現実である。さらに、日本国内では、原料を海外から輸入するケースが多く、その輸送に係る CO<sub>2</sub> 排出をカウントすると、結果として CO<sub>2</sub> 削減効果は小さく、本来の SAF の導入目的を達成できない状況にある。また、安定的な SAF の確保のためには、国産原料を有効活用していくことが重要である。

従って、本事業では、古紙及び木材チップを原料とし、ASTM D7566 Annex2 及び Annex5 に適合するバイオジェット燃料を一貫して製造するプロセスを開発し、社会実装可能なコスト（300 円/L 以下）かつ CO<sub>2</sub> 排出量の 80%以上削減（化石燃料由来のジェット燃料比）を実現する SAF の社会実装を目指すものとする。

油脂からの SAF 製造は技術分類として Annex2 に分類される、油脂の水素化分解技術により C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> の炭素鎖の炭化水素鎖を作ることで「ケロシン」様の液体燃料を製造可能である。現在、産業廃油などから SAF が作られているが廃油については収集運搬量が限定的である。日本において剰廃油は数万 KL/年程度であり余剰廃油を原料とした場合、SAF 製造設備の大型化には限界がある。設備の大型化の為には原料供給が重要である。残念ながら製造設備の大型化がなされないため今のところ Annex2 での SAF 製造は製品コストの低減には限界があると考えられる。

光合成をおこなう微生物による原料油脂製造技術はいまだに完成された技術が無く技術開発の道は遠い。一方で、光合成をおこなわず「糖」を原料として油脂を生産する微生物は複数存在している。弊社は既往研究成果として NEDO 支援による「戦略次世代研究（2014 年-17 年）」において油糧微生物であるラビリンチュラを用いた「糖質」からの間接的な SAF 生産を検討し、パルプ由来糖液を

利用してラビリンチュラを培養→油脂生産を行ってきた実績がある。

ラビリンチュラ類は従属栄養性の真核微生物で、極域や深海を含む世界中の海域に生息が確認されており、その現存量は沿岸海域で 108cenS/L 程度のオーダーであることが報告されている。中でも亜熱帯から熱帯にわたるマングローブ域にはラビリンチュラが豊富に分布することが知られており、これまで数多くの株が分離されている。特にヤブレツボカビ科にはこれまで応用面での検討例が多い *Auranriochytrium*、*Schizochytrium* などの 11 属が含まれることが最近の分子系統解析によって示されている。いずれの属のラビリンチュラも DHA や EPA、ドコサペンタエン酸 (DPA)、アラキドン酸 GRD などの多価不飽和脂肪酸 (PUFAN) を細胞内に蓄積し、その高い増殖性や脂質蓄積性からオメガ 3 脂肪酸やカロテノイドをはじめとする脂質素材生産やバイオ燃料生産などの産業利用が各方面で検討されている<sup>1)</sup>。

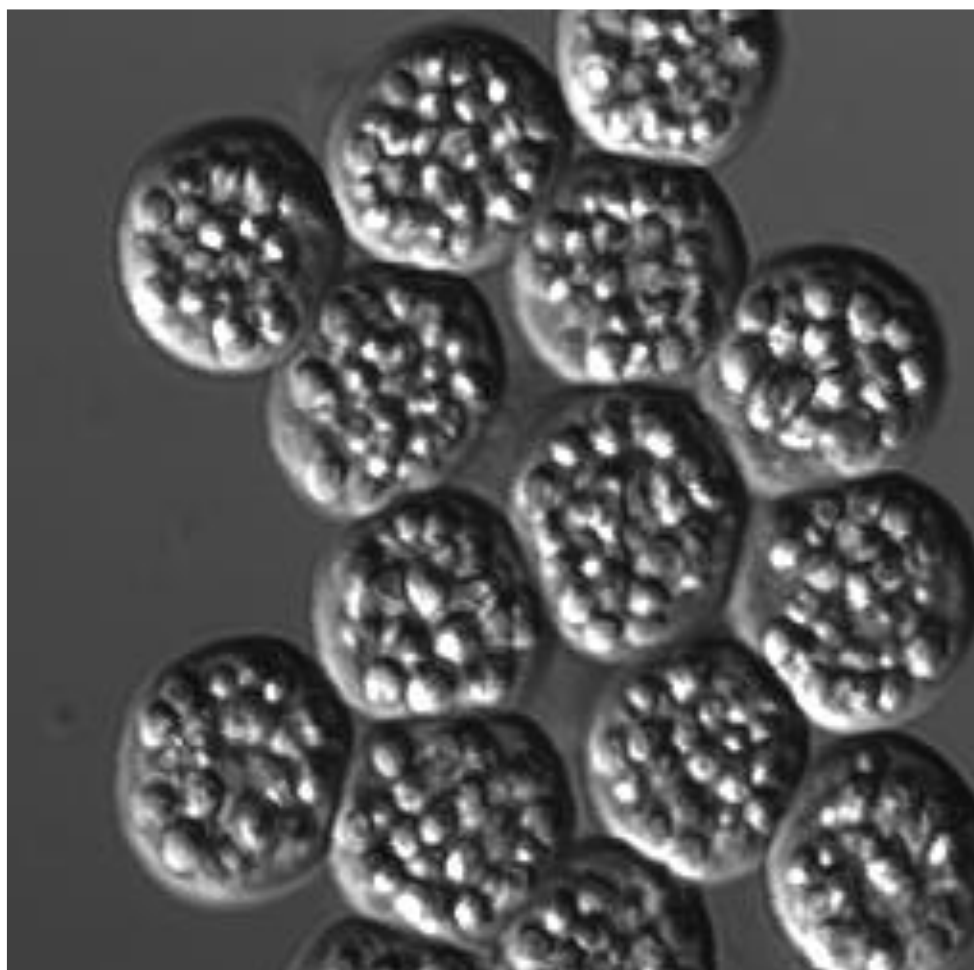


図 5-1 ラビリンチュラ類の顕微鏡写真

糖質を原料とした場合、大量の油脂が培養により獲得が可能で設備の大型化が可能であると想定されている。大量培養が可能となればコストの低下や効率的な油脂製造における二酸化炭素排出量の抑制が可能であり、これこそが油脂生産微生物による油脂の大量生産が期待されている所以である。一方で油脂の SAF 化には水素を必要とする。現在、水素は化石燃料をもとに製造した「電気」をエネルギー源として製造された「電解水素」が主流であり、この電解水素を使った SAF 製造は二酸化炭素の排出抑制効果が薄い。このため油脂製造において水素要求性が少ない不飽和脂肪酸含量が少なく飽和脂肪酸を多く含む油脂製造が重要である。よって今回の技術開発においては 2 - (1) 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発、2 - (2) ラビリンチュラ大量高密度培養法の確立、2 - (3) ASTM D7566 Annex2 に適合した SAF の製造を技術開発項目とする。

(実験スケジュール)

|               | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 12月 | 1月 | 2月 | 3月 |
|---------------|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|
| Run001 (プレ実験) | ↑  |    |     |     |     |    |    |    |
| Run002        |    | ↑  |     |     |     |    |    |    |
| ストック作製        |    | ↑  |     |     |     |    |    |    |
| Run003        |    |    | ↑   |     |     |    |    |    |
| ストック作製        |    |    | ↑   |     |     |    |    |    |
| Run004        |    |    |     | ↑   |     |    |    |    |
| Run005        |    |    |     | ↑   |     |    |    |    |
| ストック作製        |    |    |     | ↑   |     |    |    |    |
| Run006        |    |    |     |     | ↑   |    |    |    |
| 菌体回収、乾燥       |    |    |     |     |     | ↑  |    |    |
| 5kL培養Run001   |    |    |     |     |     |    | ↑  |    |
| 総脂質量測定001     |    |    |     |     |     |    |    | ↑  |
| 総脂質量測定002     |    |    |     |     |     |    |    | ↑  |
| 5kL培養Run002   |    |    |     |     |     |    | ↑  |    |
| 総脂質量測定003     |    |    |     |     |     |    |    | ↑  |
| mh0806培養      |    |    |     |     |     |    |    | ↑  |
| 脂質分析          |    |    |     |     |     |    |    | ↑  |
| SAF製造試験       |    |    |     |     |     |    |    | ↑  |

### (結果概略)

本事業開始のプレ実験 (Run001) として既存の培養方法で培養したところ、グルコース添加時にコンタミしたと考えられ、また、培養期間が長く浮上菌体が発生した。このことから、コンタミを防いでグルコースを添加する方法 (流加: 速度やタイミングの検討) と、浮上菌体を発生させず、かつ高密度で培養する方法の検討を行うこととした。また、5L-Jar での実験データを基に、5kL-Jar での大量高密度培養を試みた。合わせて、大量培養した菌体から SAF の製造試験を行った。不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術については複数回の流加培養にて流加タイミングの選定を行い、高密度培養における糖添加のタイミング確定することで大量培養技術に必要なパラメータの獲得を成した。

### (各試験項目と概要)

#### (2 - (1) 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発)

既存ライブラリーの中で不飽和脂肪酸含量が少ない株を 1 株選定した。mh1915 株を 5L-Jar で培養し、古紙由来のグルコース 102 g/L (初発+流加) から乾燥菌体 31.88 g/L を回収。さらに乾燥菌体から 73.7% (23.49g/L) の油脂回収に成功した。グルコースを用いた流化培養条件は確立できたが、2022 年度ではコロナ影響による人員不足から古紙由来糖質 3 トンからの培養は未実施であり、次年度、グルコース培養時のデータをもとに、検討を進める予定である。

#### (2 - (2) ラビリンチュラ大量高密度培養法の確立)

高密度培養法確立の一環として 5L-Jar での流加培養を実施した。得られた流加培養技術を基に 5kL-Jar での高密度培養を実施した。3,500L の高密度培養を実施し、そのうち 120 L のブロス環境エネルギー (株) に送付し SAF を製造した。最適培養に近い条件での培養を実施できたと考えており、その時の酸素濃度は 4~5.5 mg/L であった。

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

2 - (1)、2 - (2) より得られた脂肪酸を原料として、HiBD 法での Annex2 に準拠する SAF の試験製造を実施し、2.8L 製造することに成功した。

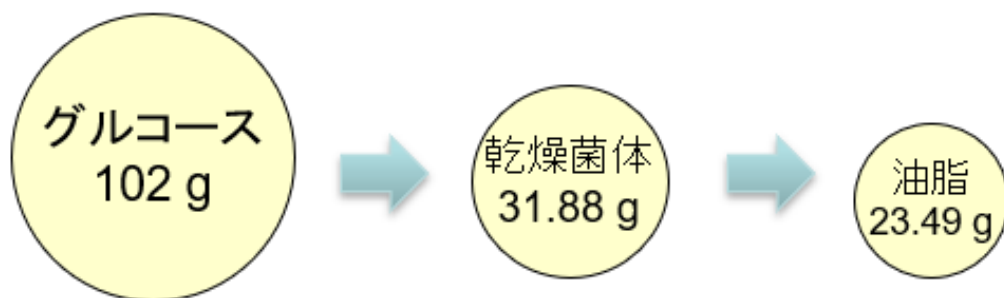
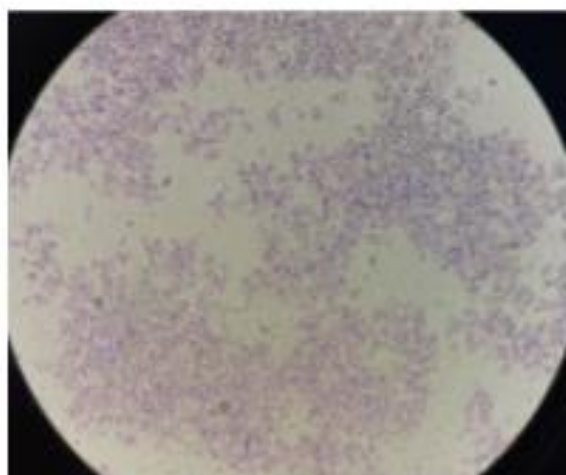


図5-2 油脂収量のイメージ



高密度培養



使用した5ton  
発酵槽

図5-3 高密度培養菌体の顕微鏡写真、本事業で使用した5t発酵槽

1) 株式会社情報機構、カーボンニュートラル燃料最新動向～水素・アンモニア・e-fuel・バイオ燃料～、2022年

## 2 - (1) 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発

本事業開始のプレ実験として既存の培養方法で培養したところ、グルコース添加時にコンタミしたと考えられ、また、培養期間が長く浮上菌体が発生した。このことから、コンタミを防いでグルコースを添加する方法（流加：速度やタイミングの検討）と、浮上菌体を発生させず、かつ高密度で培養する方法の検討を行うこととした。

### 2 - (1) - 1 流加培養方法の検討

これまでの既存の培養方法では、流加培養時に添加するグルコースを粉末として植菌口から添加していたが、コンタミが確認された。したがって、本項目ではグルコースの添加方法の検討及び抗生物質使用の検討を行った。

#### 【培養方法】

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

#### <プレート馴化>

-80℃にて凍結保存していた *Aurantiochytrium* sp. の mh1915 株を解凍し、LB 寒天プレートにて馴化させた。

#### <種母培養>

馴化した mh1915 株を GY 改変培地に植菌し、フラスコ培養した。

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

培地量： 100 mL/培養容器

培養容器： 500 mL 容バツフル付き三角フラスコ W/シリコ栓(Cタイプ)

滅菌条件： 121°C、20分

添加試薬： 人工海水

NaCl 30.0 g

KCl 0.7 g

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10.8 g

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 5.4 g

CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.0 g

水道水 1L

→添加量：50 mL／培養容器（三角フラスコ）

・アンピシリン溶液

20 mg/mL（フィルター滅菌）

⇒添加量：100m $\mu$ L（終濃度 20 $\mu$ g/mL）

接種量： 10 $\mu$ L ディスポーループでひとかき

培養器： 恒温振とう培養器／高杉製作所

振とう数： 125 rpm

培養温度： 28°C

培養時間： 72 hr

<本培養>

培地： GY 培地

培地組成 グルコース 60 g

酵母エキス 20 g

人工海水 1000 mL

水道水 1000 mL

消泡剤（PE-M） 0.8 mL

→NaOH で pH7.0 に調整

Vitamin Mix 2 g（滅菌後に別添加）

Mineral Mix 4 g（滅菌後に別添加）

アンピシリン（20 mg/mL）2 mL（滅菌後に別添加）

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

添加試薬： ・人工海水

NaCl 30.0 g

KCl 0.7 g

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10.8 g

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 5.4 g

CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.0 g

水道水 1 L

→添加量：1000 mL／培養容器（5L-Jar）

・ Vitamin Mix

Vitamin B<sub>1</sub> 200.0 mg

Vitamin B<sub>2</sub> 1.0 mg

Vitamin B<sub>12</sub> 1.0 mg

純水 100 mL

→0.2 μm フィルターにて濾過滅菌後、バイアルに分注

※光で分解するためできるだけ光に当てないようにする

・ Mineral Mix

EDTA di-sodium 30 g

FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.45 g

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 34.2 g

MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 4.3 g

ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.335 g

CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.13 g

NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.26 g

CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.01 g

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.025 g

純水 1L

→DW 中に上から順に溶かし、5N NaOH で pH7 に調整

→オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

→冷蔵保存

・アンピシリン溶液

20 mg/mL (フィルター滅菌)

⇒添加量：2 mL (終濃度 20  $\mu$ g/mL)

接種量： 100 mL (種母培養分すべて)

培養温度： 28.0°C

冷却水温度： 10°C

pH 制御： 7.0 $\pm$ 0.1 (アルカリ：1N NaOH)

DO 制御： 下限値 50% (3.88 mg/L)

攪拌制御： 初発 400 rpm 上限 600 rpm

DO 下限値下回り後に変動 (DO 50–60%)

通気量： 2L/min→5 L/min (流加開始後)

圧力： 0 kPa

流加液： 50%グルコース溶液

無水グルコース 120 g

水道水 120 g

→秤量・溶解後、オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

→アンピシリン溶液 (20 mg/mL) 240  $\mu$ L 添加

流加開始： 初発グルコース消費後

流加速度： 0.04 g/L/min ⇒ 機器入力値：5 g/L

消泡剤溶液： PE-M 人工海水混合液

PE-M 20 mL

人工海水 100 mL

水道水 100 mL

→121°C、20分オートクレーブ滅菌

培養時間： 3日

サンプリング： 約20 mL/Day0, 1, 2, 3

ブロスアウト： 5L容ユニオンコンテナ

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

（分析）

濁度： OD660nm

グルコース濃度(g/L)：バイオセンサ BF-7（王子製計測機械）

（結果と考察）

本培養のトレンドデータ、グルコース濃度及び細胞濁度の推移は図5-7、図5-4と図5-5の通りである。本培養開始24時間で初期グルコース量が0 g/Lになったため、50%グルコース溶液の流加を開始した。本培養開始72時間（流加開始48時間）でグルコースの消費量が落ちて培養液中に残存し始め、濁度はピークを迎えた。また、培養開始87時間ほどでpHは下がり始めた。グルコースの蓄積が培養開始72時間で認められた。酸素量が足りないことが考えられたため、188時間で通気量を2L/minから5L/minに上げた。しかし、グルコース蓄積量は増加し続け、216時間で培養を終了した。グルコースの蓄積する原因として、培地中の窒素源が枯渇してしまい、十分に菌体量が増加しなかったことが挙げられる。したがって、流加糖液に窒素源を追加する必要があると考えられた。

また、検鏡を行ったところ、コンタミネーションは確認されず、グルコースの添加方法が適切であり、抗生物質の添加が効果を示したと考えられる。さらに、油滴のようなものも確認でき、油脂が生成されていることが示された。

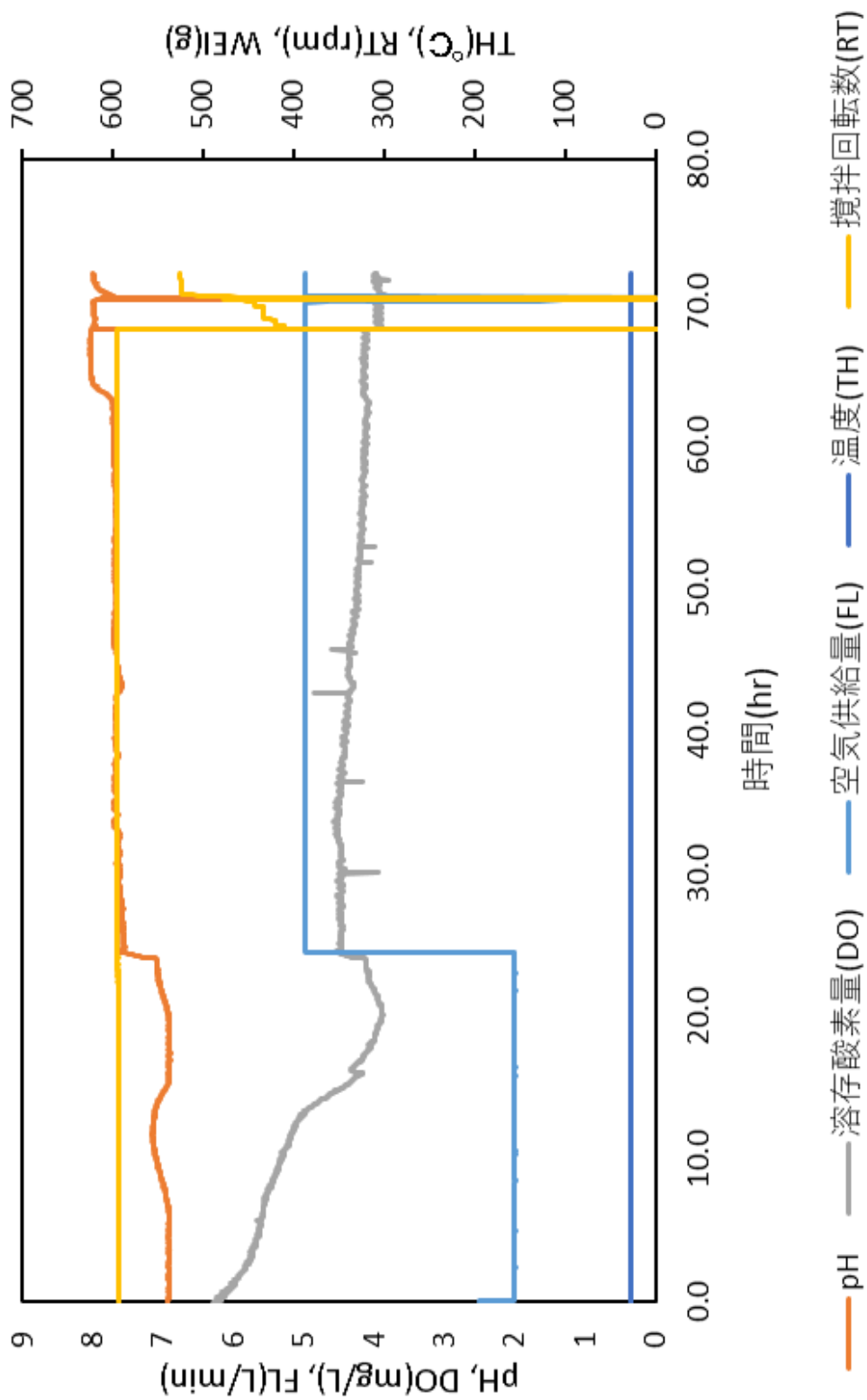
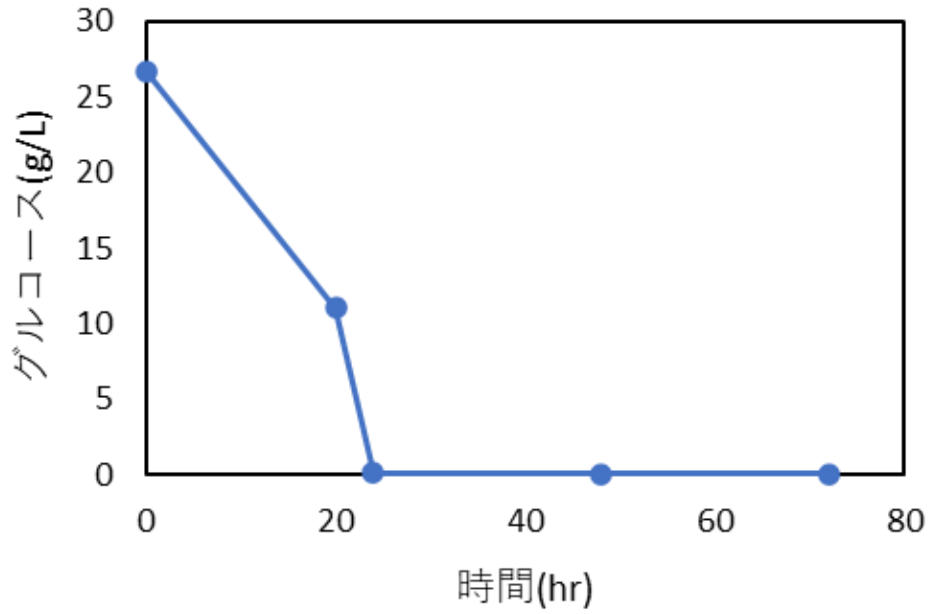


図5-4 本培養時のトレンドデータ

## グルコース濃度



## 細胞濁度

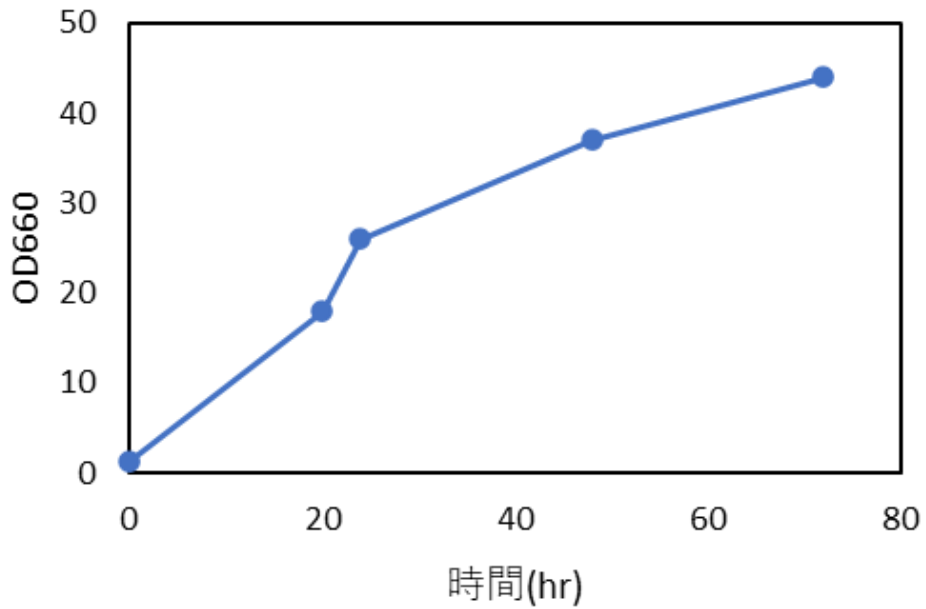


図 5- 5 グルコース濃度及び細胞濁度の推移



図 5- 6 培養液の顕微鏡写真

## 2- (1) -2 流加培地の検討

2- (1) -1 の検討において、培地中の窒素源が足りないことから、菌体量が十分に増加せず、グルコースが蓄積した可能性が考えられた。そこで、本培養時のグルコース枯渇後、グルコース溶液の流加とともに酵母エキスを添加することで、グルコースの蓄積が解消し、菌体量の増加が望めるか確かめた。

### (方法)

2- (1) -1 に示した培養方法に追加して、本培養開始後 72 時間で酵母エキス溶液の流加を実施した。酵母エキス溶液の組成は下記に示したとおりである。コントロールとして、酵母エキスを流加しない系も用意した。

#### ・ 12.5%酵母エキス溶液 (1 基分)

Bacto Yeast Extract 15.6 g

水道水 109.4 g

→オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

### (結果と考察)

本培養のトレンドデータ、グルコース濃度及び細胞濁度の推移は図 5- 7 と図 5- 8 の通りである。本培養開始後 72 時間で酵母エキス溶液の流加を開始したところ、細胞濁度が急激に上昇し、細胞増殖が促進されていた。菌体を遠心分離にて回収したところ、酵母エキス添加系では 151.8g/L、コントロールでは 97.9g/L の菌体 (ウェット) が回収された。酵母エキス添加により、菌体収量が大幅な向上が確認できた。

また、酵母エキス添加系では、培養終了時に浮上菌体が確認された。油脂の合成が促進されたためであると考えられる。浮上菌体は、遠心分離での回収が困難であることから、浮上菌体の出現を抑える必要がある。培養終了のタイミングをさらに早めることが有効である可能性が考えられる。

# 酵母エキス添加

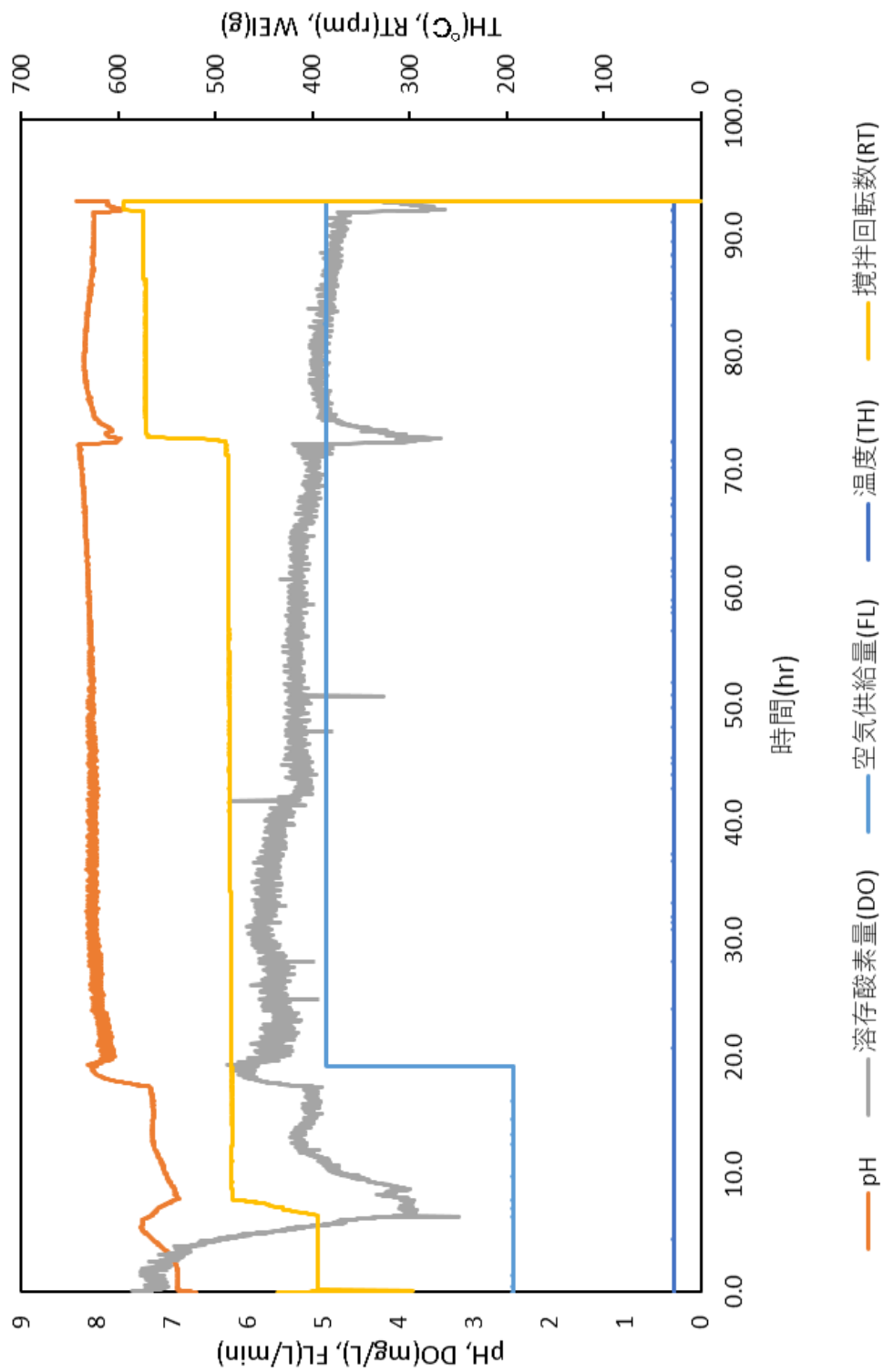


図5-7 酵母エキス添加系の培養トレンドデータ

# コントロール

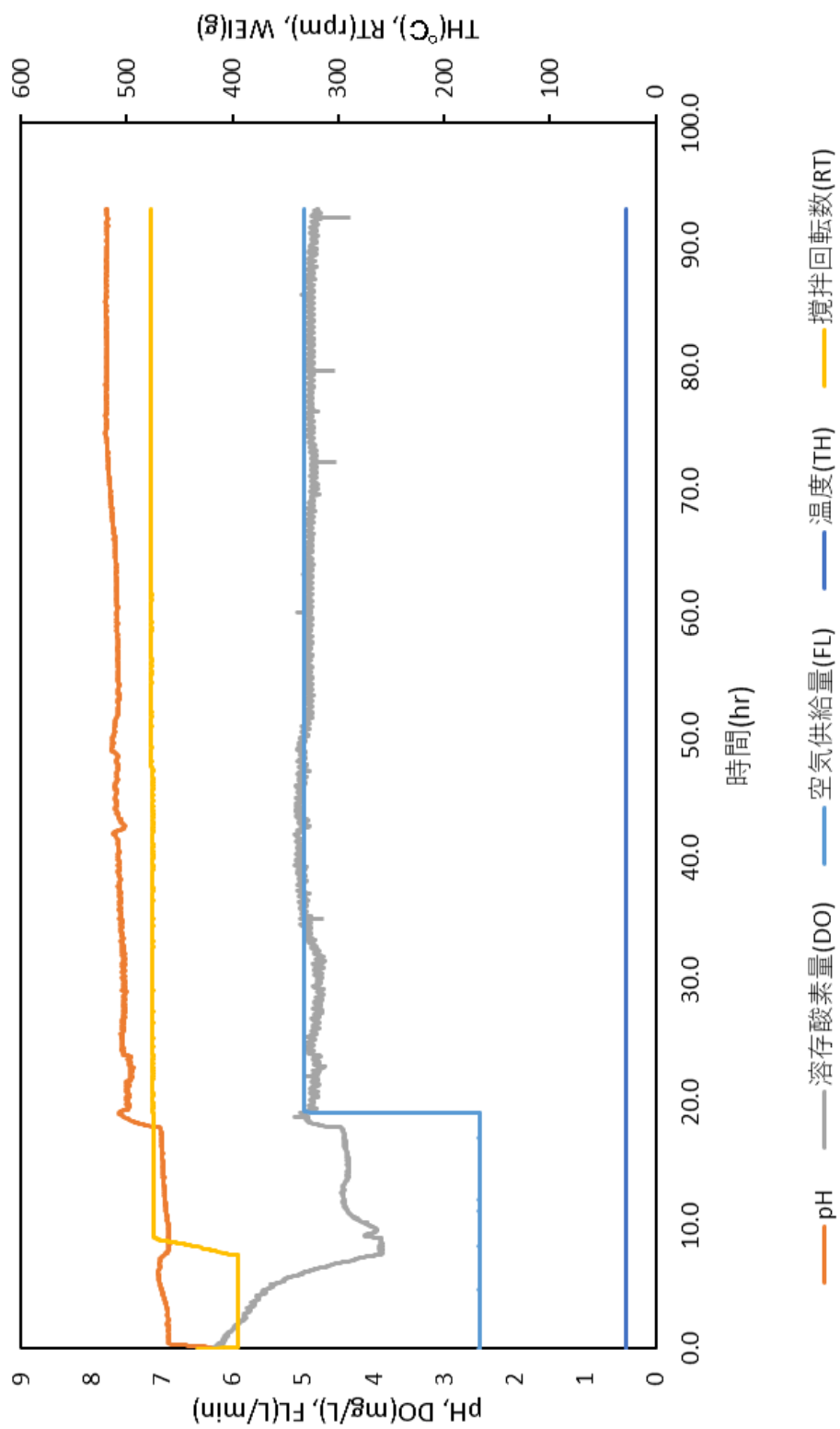


図5-8 コントロールの培養トレンドデータ

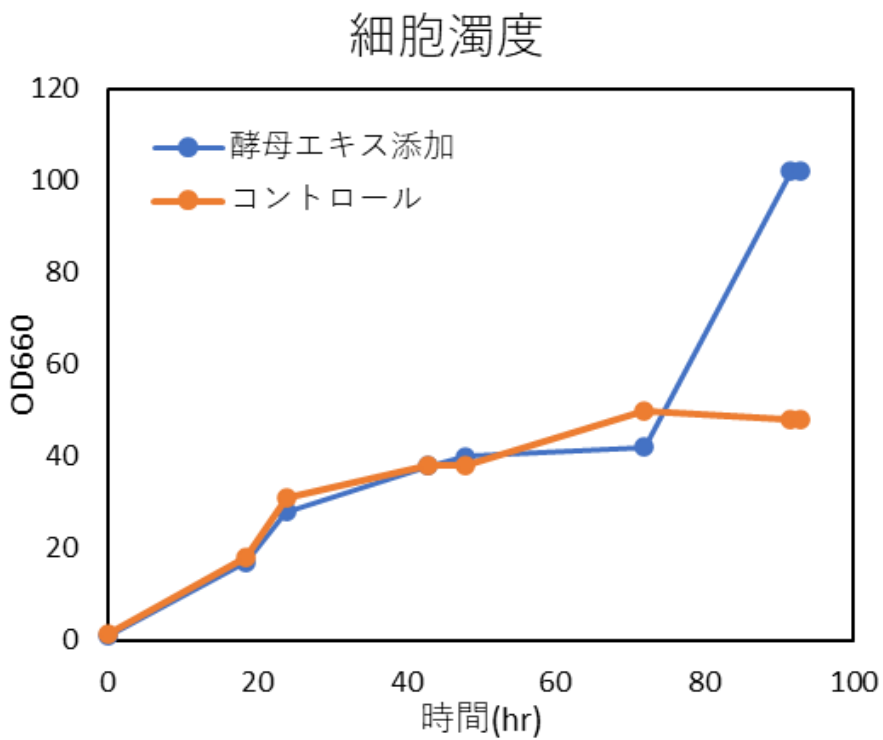
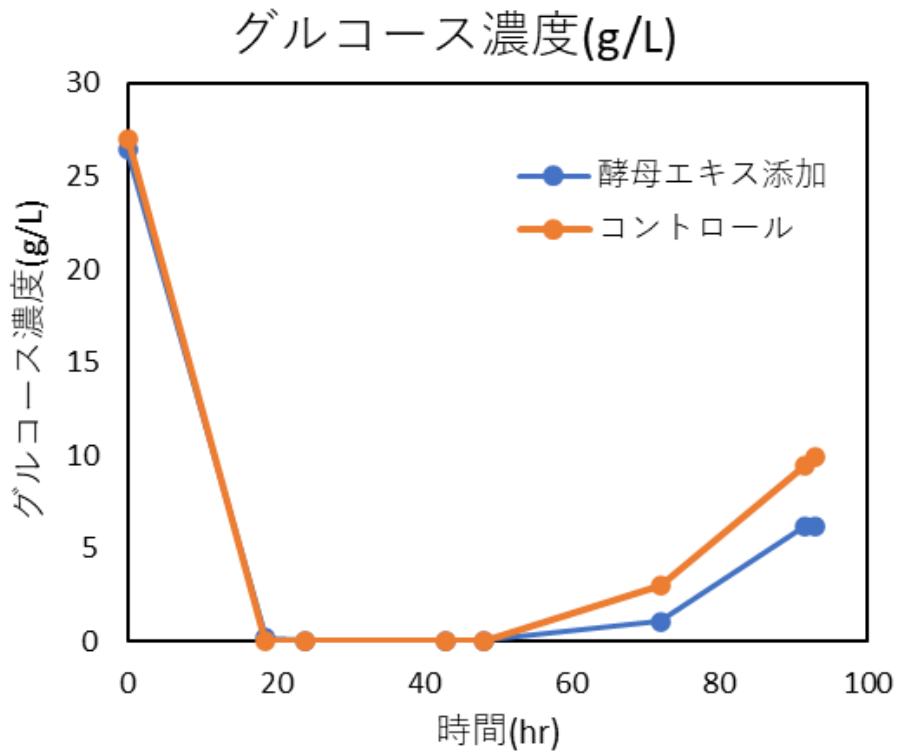


図 5-9 グルコース濃度及び細胞濁度の推移

## 2 - (1) - 3 浮上菌体抑制の検討

回収が困難な浮上菌体の生成量を減らすためには、培養終了のタイミングが検討する必要があること考えた。また、培養後期になるとグルコース蓄積が見られているため、糖質源が無駄となっており、対糖収率の低下につながってしまいます。本項目では、グルコースの蓄積がなく、かつ浮上菌体の生成が抑えられる培養終了のタイミングを検討した。

### (方法)

2 - (1) - 2 と同様の培養を実施し、グルコースの蓄積が見られたタイミングで培養を終了し、菌体回収を行った。

### (結果と考察)

本培養のトレンドデータ、グルコース濃度及び細胞濁度の推移は図 5- 10 と図 5- 11 の通りである。培養開始 48 時間で少量のグルコース蓄積が確認され、1 時間後に微増していたため、培養開始 49 時間で培養を終了し、菌体回収を行った。細胞濁度は培養終了時点で最も高かった。浮上菌体については、2 - (1) - 2 の項目において 93 時間培養した際よりも、少なかった。菌体を遠心分離にて回収して重量を測定したところ、135.99 g であった。2 - (1) - 2 の項目にて、得られた菌体量は 155.43 g であったことと比較すると、半分の培養時間で、同等の菌体収量が得られていることになる。これらのことから、培養時間を短くしたことで、菌体内への余剰な脂肪酸蓄積を抑えることができたために浮上菌体の生成量を抑えられたと考えられる。また、グルコースの蓄積がないタイミングで培養を終了したことから、培地原料の無駄を防ぐことができた。本培養条件で得られたラビリンチュラ菌体の脂肪酸組成を分析することとした。

当社は、平成 29~30 年度に NEDO 事業「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」において、リグノセルロース系バイオマス原料を用いたラビリンチュラ培養を実施している。古紙由来糖質は、リグノセルロース系バイオマスから生産されているため、平成 29~0 年度 NEDO 事業のデータ及び、本事業にて得られた知見をもとに古紙由来糖質を原料としたラビリンチュラによる油脂生産の検討を進めていきたい。(参考資料)として下記ページに、参考データを記載しておく。

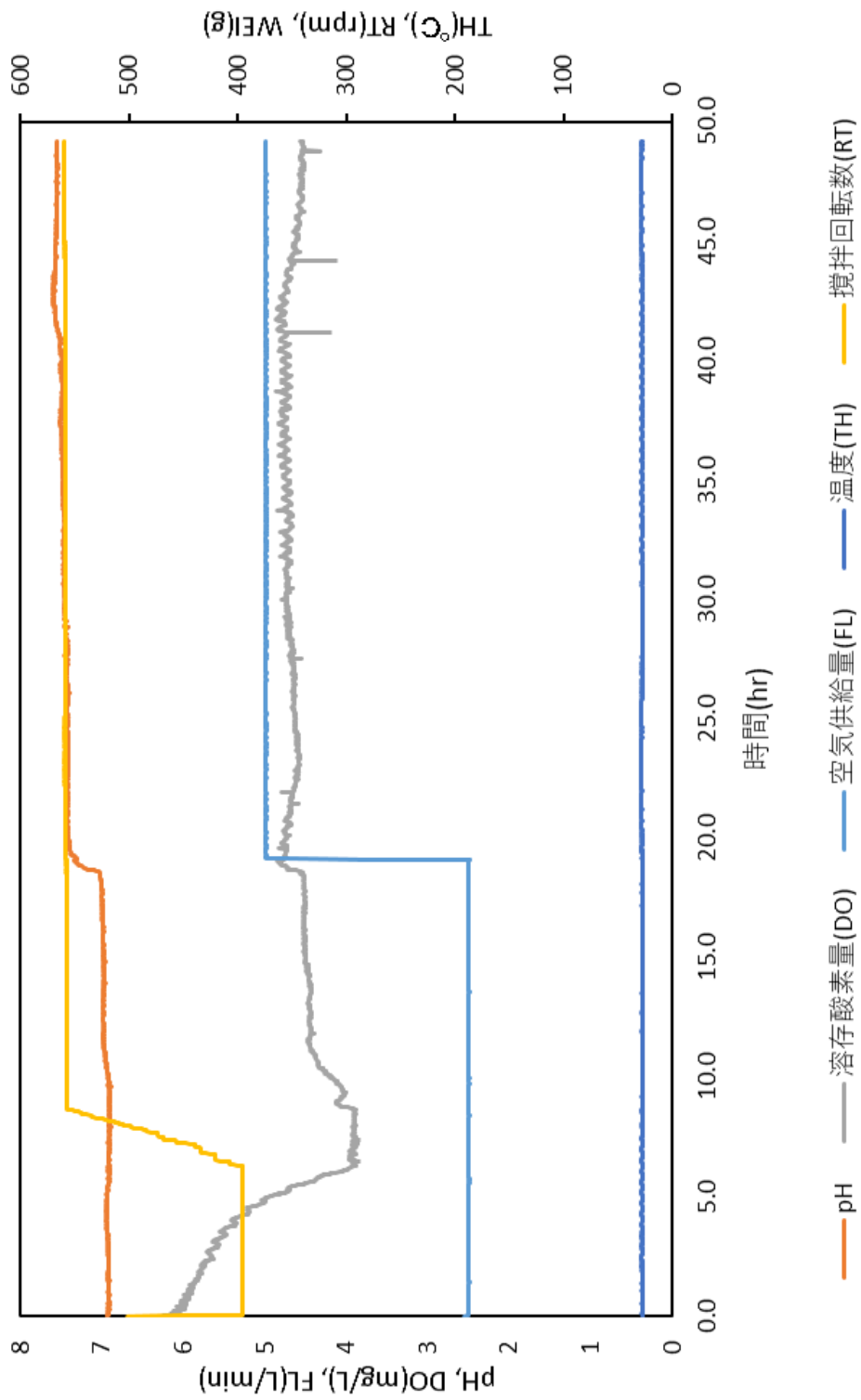


図5-10 本培養のトレンドデータ

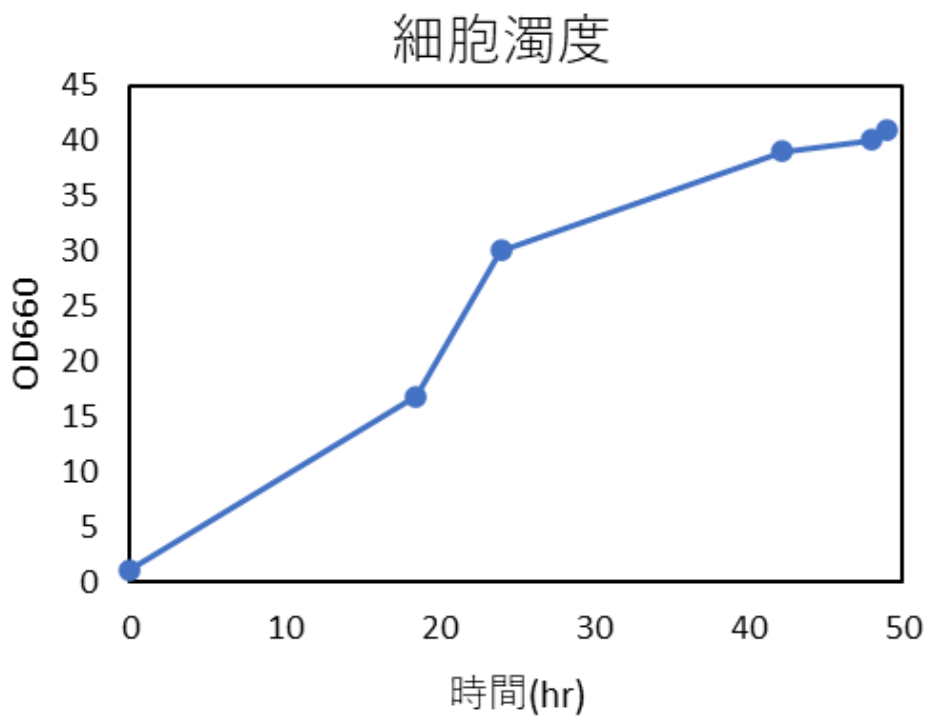
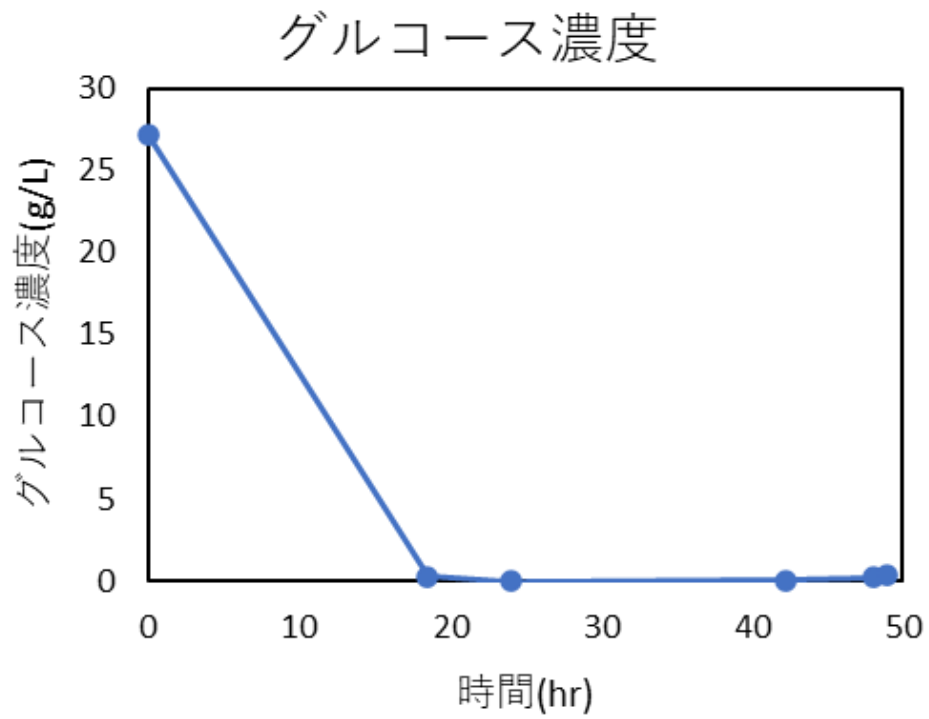


図 5- 11 グルコース濃度及び細胞濁度の推移

(参考資料) 2)

### リグノセルロース系バイオマス糖化液の利用検討

炭素源であるグルコースをリグノセルロース系バイオマス糖化液に代替可能か検討した。

下記①～④を炭素源として計4試験区において培養検討を行った。

- ① コントロール：グルコース
- ② 木質系バイオマス：広葉樹パルプ (Leaf Bleached Kraft Pulp; LBKP)
- ③ 木質系バイオマス：廃菌床 (Spent Mushroom Substrate; SMS)
- ④ 食品廃棄物：コーヒー粕 (Coffee Ground; CG)

炭素源には各糖化液を用い、糖濃度が3%となるように培地への添加量を調節した。また、消泡剤として0.1% (w/v) の Antifoam PE-M (和光純薬工業株式会社) を添加した。培地の分量は、2L-ジャーファーメンターに対し1200mlとした。各液体培地の組成を表5-1に示した。

表5-1 リグノセルロース系バイオマス糖化液培地の組成

|                                       | Glucose | LBKP  | SMS   | CG    |
|---------------------------------------|---------|-------|-------|-------|
| Saccharified solution                 | -       | 300ml | 350ml | 90ml  |
| Glucose                               | 30g     | -     | -     | -     |
| Extract yeast dried                   | -       | 1.6g  | 1.9g  | 0.5g  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 2.7g    | 2.7g  | 2.7g  | 2.7g  |
| SS                                    | 1000ml  | 700ml | 650ml | 910ml |
| pH                                    | 7.0     |       |       |       |

培地中の炭素源が枯渇するまで、培養温度を28°C、攪拌速度を400rpm、通気量を1.0vvmに設定し、通気培養を行った。DCWと残糖量の経時的変化を24時間ごとに測定することで、各糖化液を炭素源として利用可能か検討した。また、培養終了時の菌体を用いて総脂質 (Total Lipid; TL) 分析と脂肪酸分析を行い、各糖化液を炭素源とした場合の脂質蓄積性を検討した。

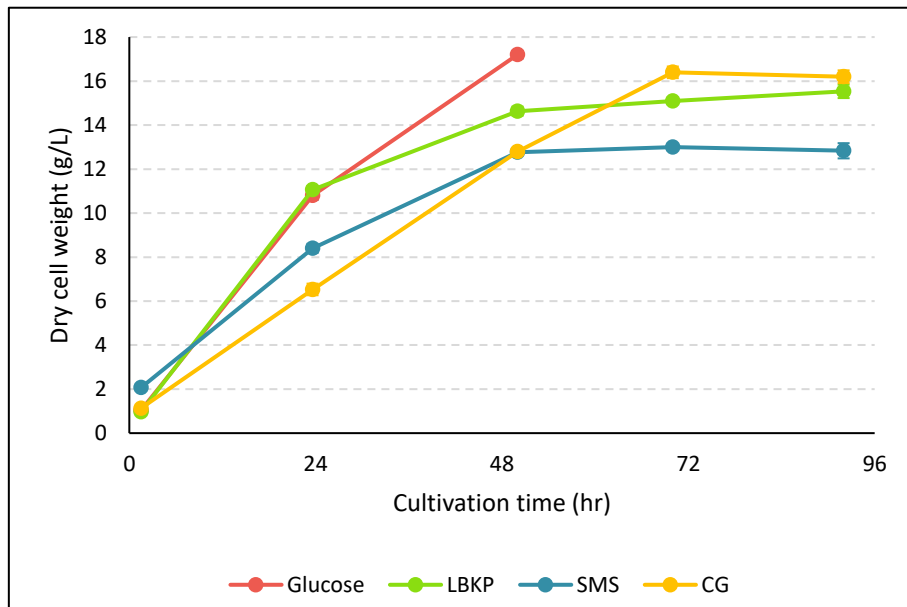


図 5- 12 糖化液別培養における DCW の経時的変化

糖化液別培養における DCW の経時的変化（図 5- 12）より、コントロール区と比較するとどの糖化液も増殖速度は遅いが、炭素源として利用可能であることが明らかとなった。

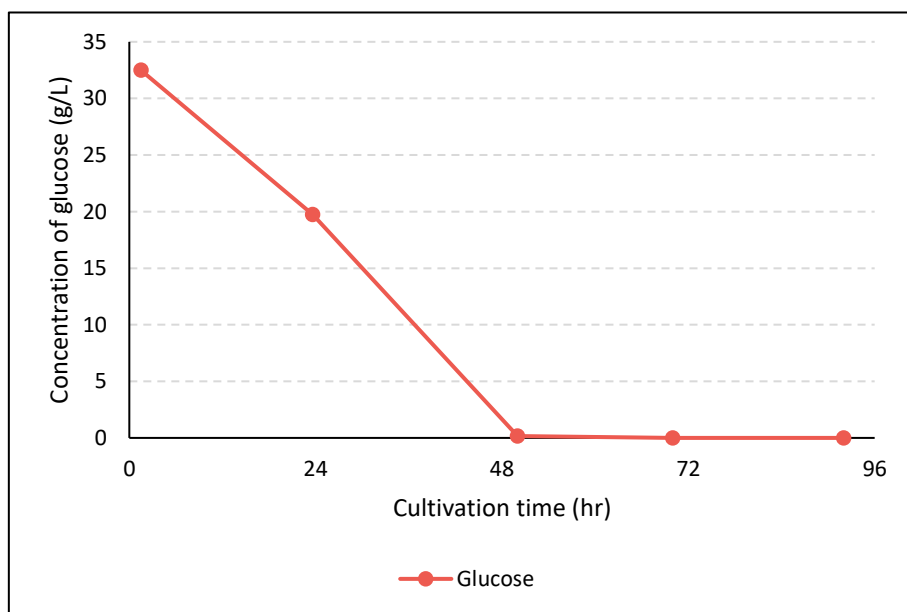


図 5- 13 コントロール区における残糖量の経時的変化

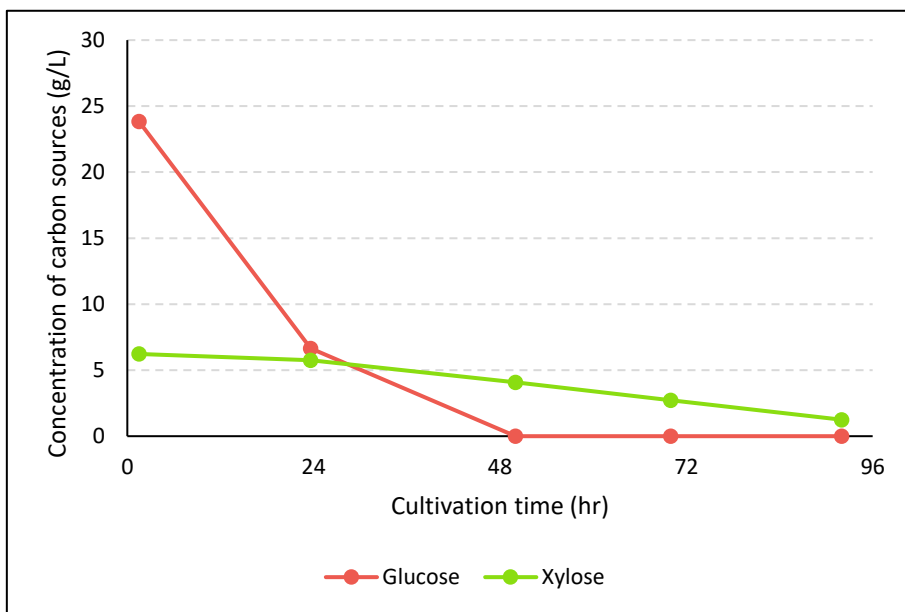


図 5- 14 LBKP 試験区における残糖量の経時的変化

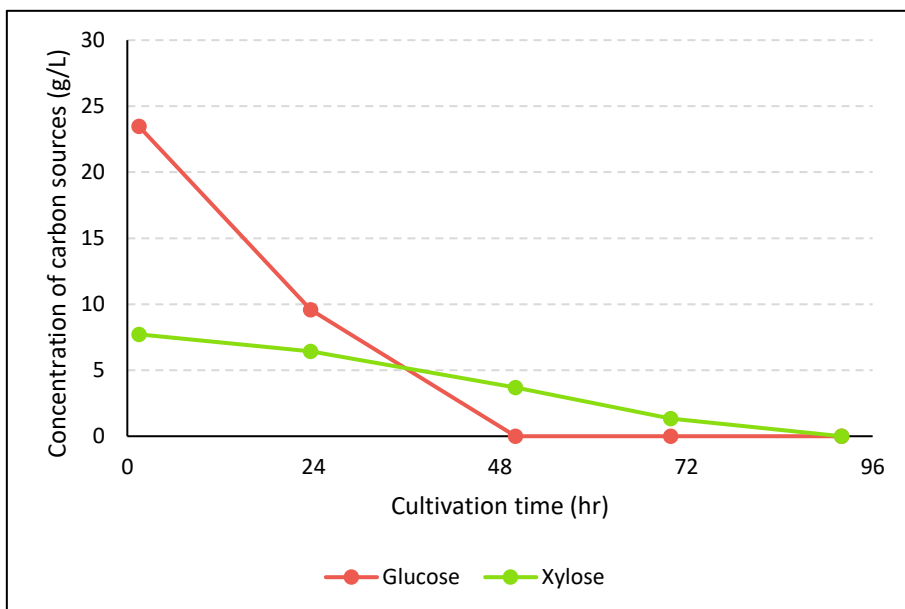


図 5- 15 SMS 試験区における残糖量の経時的変化

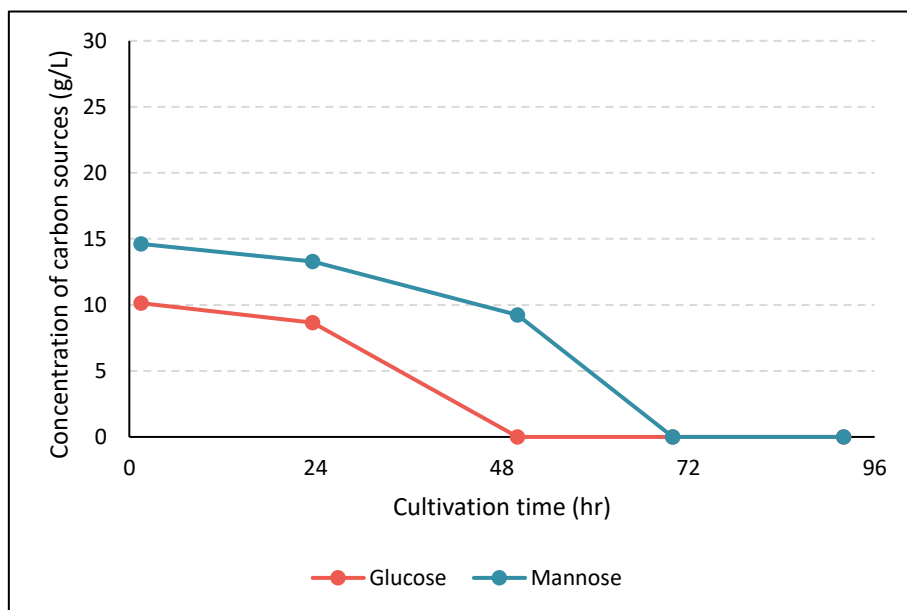


図5-16 CG試験区における残糖量の経時的変化

残糖量の経時的変化（図5-13～16）より、グルコースとキシロースを含むLBKP、SMS試験区では、先にグルコースが消費され、その後キシロースが緩やかに消費される傾向が見られた。CG試験区ではグルコースとマンノースが同時に消費された。

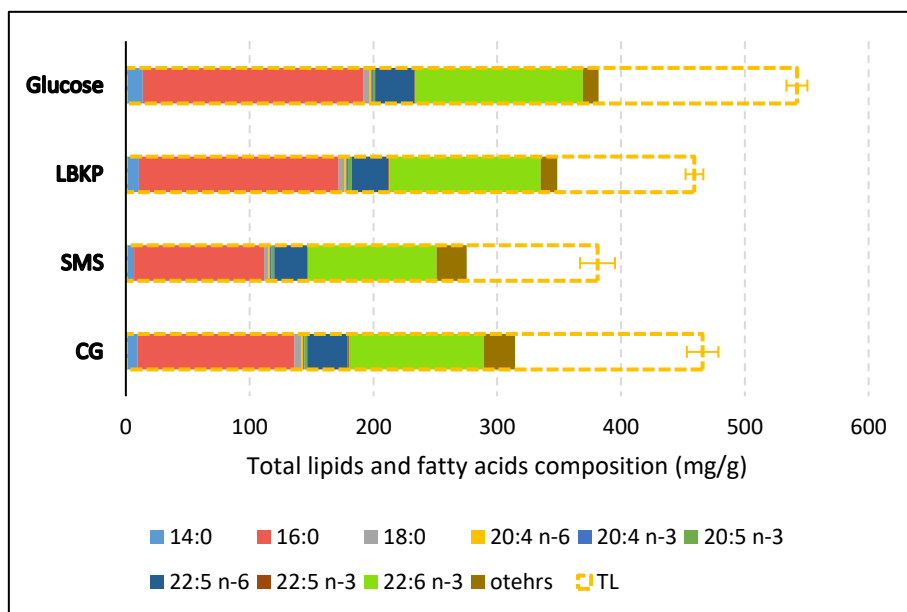


図5-17 培養終了時の総脂質および脂肪酸含量（mg/g）

培養終了時の総脂質および脂肪酸含量（図 5- 17）より、どの糖化液を炭素源とした場合でも脂質の蓄積が見られた。

2) 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/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～平成 30 年度成果報告書より抜粋

## 2 - (1) - 4 油脂回収方法の検討

5 L-Jar 培養で得られた菌体からの油脂回収方法の検討を行った。

### (方法)

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

### (結果と考察)

凍結乾燥した菌体から CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2/1) の溶媒を用いることで、油脂の回収に成功した。回収率は、乾燥菌体重量に対して、73.7%であった。今回、培養時に投入したグルコース (初発+流加) は 102 g/L、油脂回収に用いた乾燥菌体は 31.88 g/L、乾燥菌体から得られた油脂は 23.49 g/L であった。したがって、油脂の対糖収率は 23% であり、25% に近い収率を得ることができた。最適条件に近い流加培養法を確立できたと考える。

表 5 - 2 油脂抽出の結果

|    | 菌体量(g) | ナスフラスコ(g) | ナスフラスコ+脂質重量(g) | 脂質重量(g) | %        |
|----|--------|-----------|----------------|---------|----------|
| 1  | 0.1    | 86.445    | 86.519         | 0.074   | 74       |
| 2  | 0.109  | 75.999    | 76.08          | 0.081   | 74.31193 |
| 3  | 0.106  | 77.949    | 78.026         | 0.077   | 72.64151 |
| 平均 |        |           |                |         | 73.65115 |

## 2 - (1) - 5 ラビリントウモロコシの油脂組成分析

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

### (方法)

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

(結果と考察)

2 - (1) - 2 (サンプル1) 及び 2 - (1) - 3 (サンプル2) の項目で得られたラビリンチュラ菌体から脂肪酸を抽出し、GC-MS を行った。この結果、C12~C26 の脂肪酸が検出された。両サンプルとも同様の脂肪酸組成を示し、ほとんどが飽和脂肪酸であり、不飽和脂肪酸はごく微量であった(図5-a、5-b)。サンプル1 とサンプル2 では、培養時間に違いがあり、サンプル1 は 90 時間、サンプル2 は 50 時間である。このことから、培養時間による脂肪酸組成への影響はほとんどないと考えられた。また、不飽和脂肪酸量が少なかったことから、SAF 製造における水素化分解工程の負荷を減少させることが可能であり、mh1915 株は SAF 製造に適した菌体であることが示唆された。

今後、古紙由来糖質を用いて培養した際も、今回得られた結果と同様の脂肪酸組成になるか確認する必要がある。

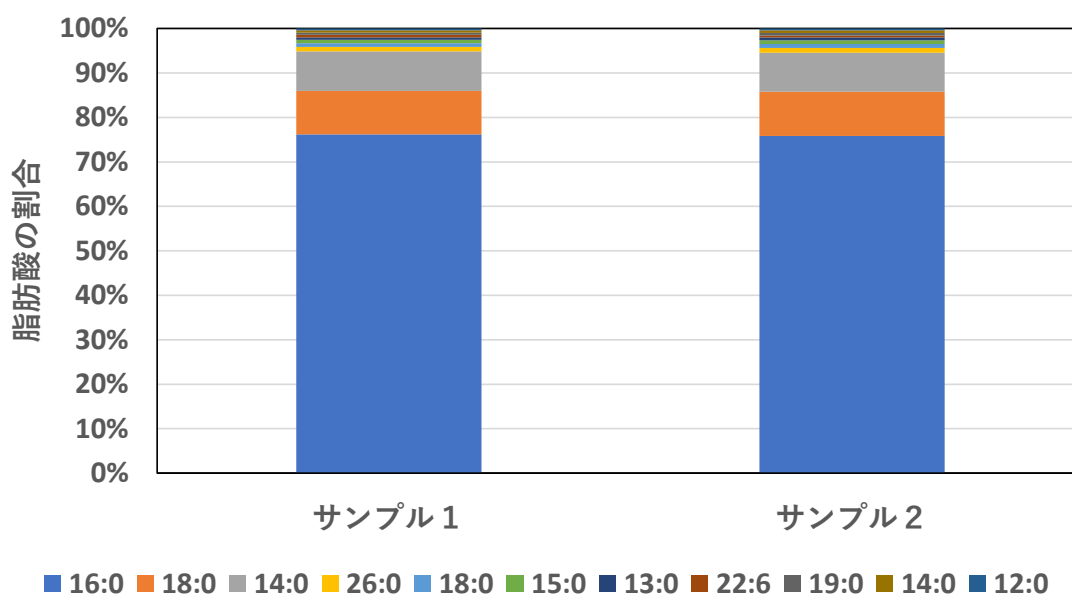
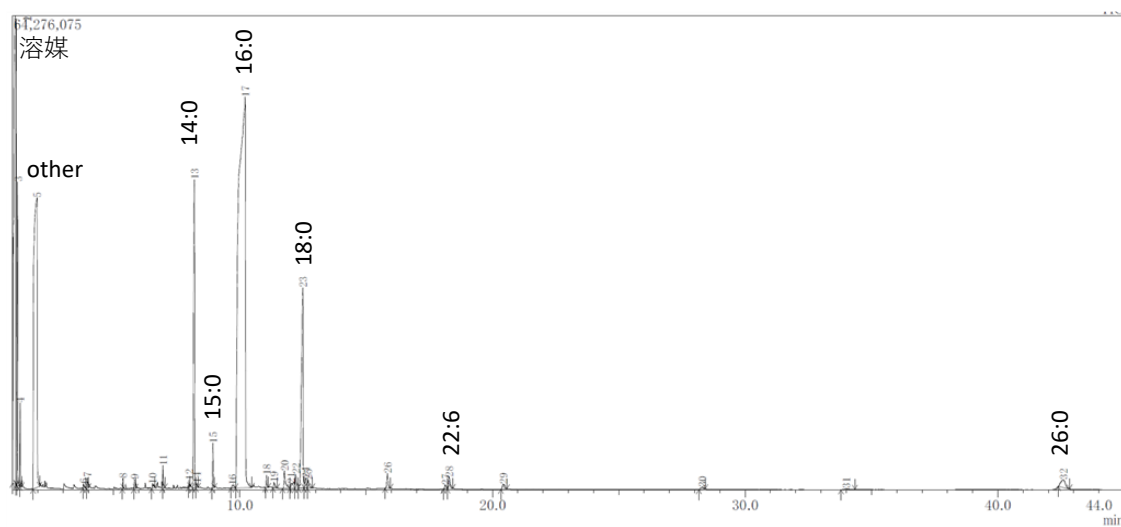


図5-a ラビリンチュラ菌体の脂肪酸組成

\* 凡例の 16:0 は、炭素数 16 : 不飽和結合数 0 を示している

サンプル 1



サンプル 2

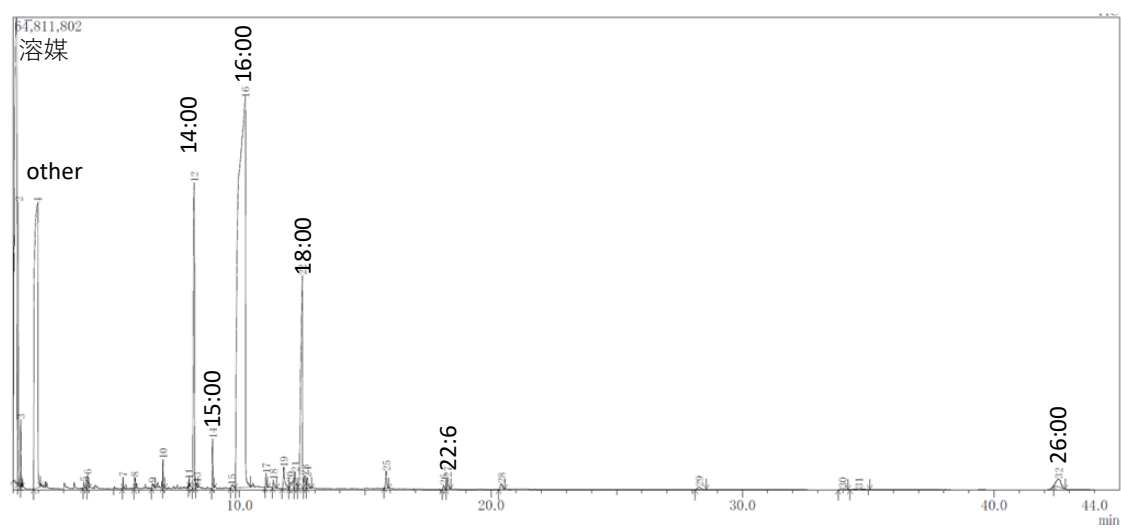


図5 -b GC-MS の結果

※図中の数字は、脂肪酸の種類（炭素数：不飽和結合数）を示している

## 2 - (2) ラビリンチュラ大量高密度培養法の確立

5L 培養槽での検討結果をもとに、ユーグリード社の 5 トンの培養槽にて、ラビリンチュラ (mh1915) の大量高密度培養を行った。

(培養方法)

フラスコ培養→5 L-Jar 培養→90 L-タンク培養→5 t タンク培養のフローにより、大量高密度培養を行った。



図 5- 18 本培養試験で用いたユーグリード社の 5kL-Jar

<5L-Jar 培養>

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

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

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

添加試薬： ・人工海水  
NaCl 45.0 g  
KCl 1.05 g  
MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 16.2 g  
MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 8.1 g  
CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.5 g  
水道水 1.5 L  
→添加量：1250 mL / 培養容器 (5L-Jar)

・ Vitamin Mix  
Vitamin B<sub>1</sub> 200.0 mg  
Vitamin B<sub>2</sub> 1.0 mg  
Vitamin B<sub>12</sub> 1.0 mg  
純水 100 mL  
→0.2 μm フィルターにて濾過滅菌後、バイアルに分注

・ Mineral Mix  
EDTA di-sodium 30 g

|  |         |
|--|---------|
| FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 1.45 g  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 34.2 g  |
| MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O                | 4.3 g   |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 1.335 g |
| CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 0.13 g  |
| NiSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O                | 0.26 g  |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                | 0.01 g  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.025 g |
| 純水   | 1L      |

→DW 中に上から順に溶かし、5N NaOH で pH7 に調整

→オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

→冷蔵保存

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

流加液： 50%グルコース溶液  
 無水グルコース 90 g  
 Extract Yeast Dried 10 g  
 DW 100 mL

流加時期： 培養開始からおよそ 2 日後

<90L-Jar 培養>

培地： GY 培地 (60 L)  
 培地組成 グルコース 1.8 kg  
 酵母エキス 0.6 kg  
 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.3 kg

水道水 60 L  
Vitamin Mix 0.06 L (滅菌後に別添加)  
Mineral Mix 0.12 L (滅菌後に別添加)

培地量： 約 60 L  
培養容器： 90L-Jar × 1 基 / 高杉製作所

• Vitamin Mix

Vitamin B<sub>1</sub> 0.12 g  
Vitamin B<sub>2</sub> 0.0006 g  
Vitamin B<sub>12</sub> 0.0006 g  
DW 0.06 L

• Mineral Mix

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

→DW 中に上から順に溶かし、5N NaOH で pH7 に調整

→オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

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

流加液： 50%グルコース溶液 (1 回分)

無水グルコース 1.8 kg  
Extract Yeast Dried 0.2 kg  
DW 2 L

フィード時期： 初発グルコースの減りを見て2回

<5 t-Jar 培養>

培地： GY 培地 (3000 L)  
培地組成 グルコース 90 kg  
酵母エキス 30 kg  
MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 15 kg  
水道水 3000 L  
Vitamin Mix 3 L (滅菌後に別添加)  
Mineral Mix 6 L (滅菌後に別添加)

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

• Vitamin Mix

Vitamin B<sub>1</sub> 6 g  
Vitamin B<sub>2</sub> 0.03 g  
Vitamin B<sub>12</sub> 0.03 g  
DW 3 L

• Mineral Mix

EDTA di-sodium 180 g  
FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 8.7 g  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 205.2 g  
MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 25.8 g  
ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 8.04 g  
CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.078g  
NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.156 g

|  |        |
|--|--------|
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                | 0.06 g |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.15 g |
| DW   | 6 L    |

→DW 中に上から順に溶かし、5N NaOH で pH7 に調整  
→オートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)

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

流加液： 50%グルコース溶液 (1 回分)  
無水グルコース 90 kg  
Extract Yeast Dried 10 kg  
DW 100 L

フィード時期： 初発グルコースがなくなったタイミング

(分析)

濁度： OD660nm

グルコース濃度(g/L)：CII テストワコー

(結果と考察)

最終的な培養液は 350 kg となり、遠心分離機で水分含量 80% のラビリンチュラ菌体 120 kg (絶乾燥菌体：24 kg) を回収した。本培養試験時の酸素濃度は、4~5.5 mg/L を維持しており、5 L-Jar での検討時の酸素濃度と同様であった。したがって、5 kL 発酵槽においても、最適培養時に近い状態での酸素濃度のデータが取得できたと考える。

5 L ジャーから 5kL 発酵槽まで 1000 倍の培養規模拡大を実施したが、高密度培養自体には問題が無く、5kL ジャーから 100~1000 倍の培養規模拡大についても十分可能と推察された。ラビリンチュラの大量培養実績については USA の Solazyme 社が 200m<sup>3</sup> 以上の培養槽で実施した実績があり、本培養試験で得られ

た酸素濃度データを使うことで 100~300m<sup>3</sup> ほどの培養液での培養は可能と推察している。

本試験では、グルコースを原料とした培養にとどまっており、古紙由来糖質を原料とした培養は現状未実施である。今回得られた酸素濃度のデータをもとに検討を進めていく予定である。

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

2 - (2) より得られたラビリンチュラを原料として、環境エネルギー社にて HiBD 法での Annex2 に準拠する SAF の試験製造を実施した。生成した搾油を使っての SAF 製造試験 (Annex2 準拠) を行い、得られたケロシン画分を「海事検定協会」に提出し分析を行った。

ここで、ラビリンチュラを燃料へと改質する技術について紹介する。

### (改質技術の紹介)

ラビリンチュラによるバイオ燃料生産については、脂質蓄積性から脂肪酸メチルエステルを成分とするバイオディーゼル燃料 (BDF) 生産が挙げられる。バイオディーゼルとは、植物由来の油脂を原料として得られる改質されたディーゼル燃料のことで、リニューアブル輸送燃料であり、世界的な開発競争の渦中にある。バイオディーゼルへの改質技術としては、FAME (Fatty Acid Methyl Esters : 脂肪酸メチルエステル) 法と BHD (Bio Hydrofined Diesel : 水素化熱分解) 法の 2 つが広く知られている。

FAME 法は油脂にメタノールを添加し、アルカリ触媒を用いたエステル交換により脂肪酸メチルエステルを得る技術である。合成は低温常圧で実施できる利点がある一方、ラビリンチュラ由来脂質の様な脂肪酸を多く含む原料の改質には不向きで、且つコモンレール式等の近代的なディーゼルエンジンには不適であることが明らかとなっている。

BHD 法は油脂に高圧下で水素を添加して水素化分解し、炭化水素であるパラフィンを生成する技術である。生成油はパラフィンの為、FAME 燃料の様に生成油がノズルに詰まるといったトラブルの心配は無いものの、油化反応にて高圧下で多量の水素を使用するため設備や副原料コストが高くなり、また 2 次的な改質も必要であるといった欠点を有している。

一方、HiBD (High quality-Bio Diesel : ハイビーディー) 法とは、副原料を用いることなく一連の接触分解化技術により、廃食油や油脂含有バイオマスあるいは脂肪酸から脱炭酸反応により「高品質な炭化水素系バイオ燃料」の混合物を得ることが可能な技術である (表 5 - 3)。

表 5 - 3 油脂改質技術の比較表

|      | FAME                 | BHD                  | HiBD             |
|------|----------------------|----------------------|------------------|
| プロセス | メチルエステル化法            | 水素化熱分解法              | 接触分解法            |
| 原料   | 油脂                   | 油脂                   | 油脂・脂肪酸           |
| 副原料  | メタノール                | 水素                   | —                |
| 触媒   | アルカリ触媒               | Ni-Mo触媒他             | セラミック系<br>炭素系触媒他 |
| 反応条件 | 50~60°C<br>常圧        | 260~300°C<br>60~80気圧 | 400~430°C<br>常圧  |
| 生成物  | 脂肪酸メチルエステル<br>(FAME) | 直鎖炭化水素<br>(パラフィン)    | 混合炭化水素           |
| 副生成物 | グリセリン<br>(触媒含有)      | 水<br>炭酸ガス<br>プロペン    | 炭酸ガス<br>炭化水素ガス   |
| 流動性  | -10~15°C             | -10~20°C             | -15~-7.5°C       |

HiBD 法により得られた生成油は約 30%の分岐炭化水素を含有するため、流動点が低く寒冷地でも使用可能である。また脱炭酸反応なので、遊離の酸がほとんど含まれず酸化安定度が高いという特長もある。石油系炭化水素油（灯油・軽油等）に類似した性質を有し、軽油等に混合することなく 100%使用も可能で、コモンレール式の最新型ディーゼルエンジンにも対応でき、またジェットエンジンなどタービン燃料としても優れた特性を示す為、広く実用化が見込まれている改質技術である。本項目においては、HiBD 法を採用し SAF の製造試験を実施した。HiBD のプロセスを図 5- 19 に示した。

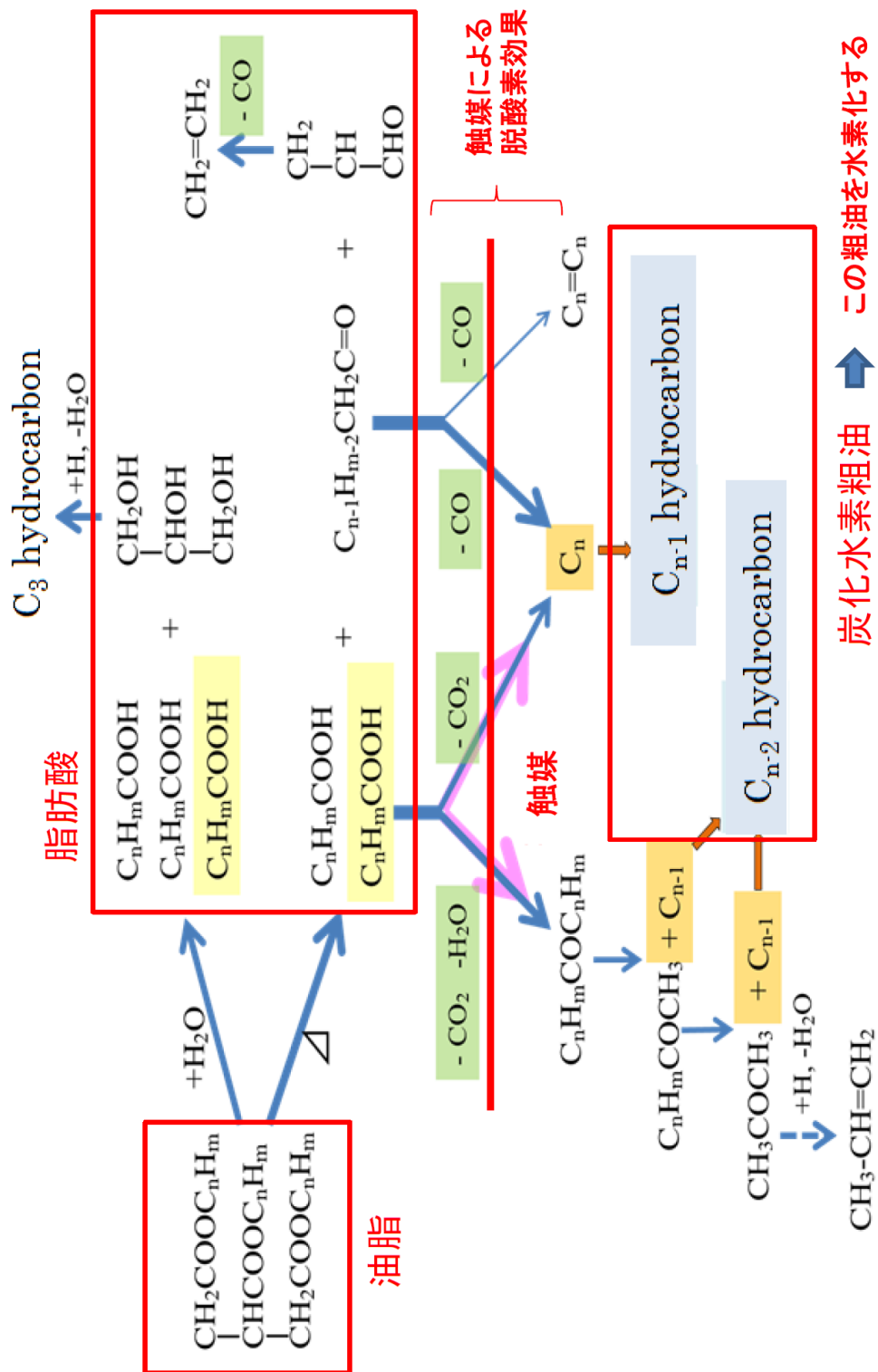


図5-19 HiBD プロセス (触媒による脱炭素プロセス)

(方法)

HiBD 乾燥ラビリンチュラを図5-10に示したような油化装置にて、炭化水素油製造試験を行った。

<生成油搾油条件>

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

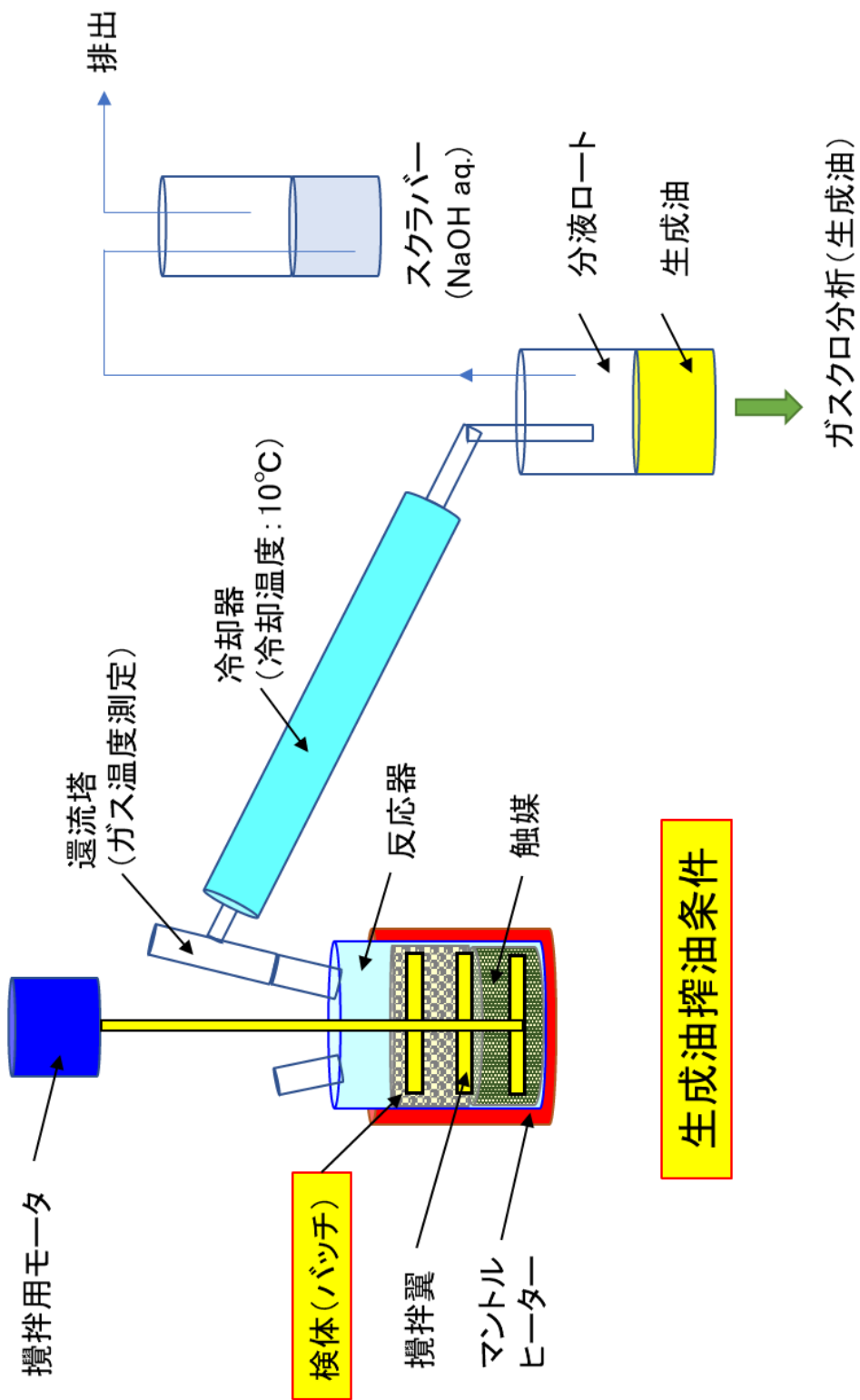
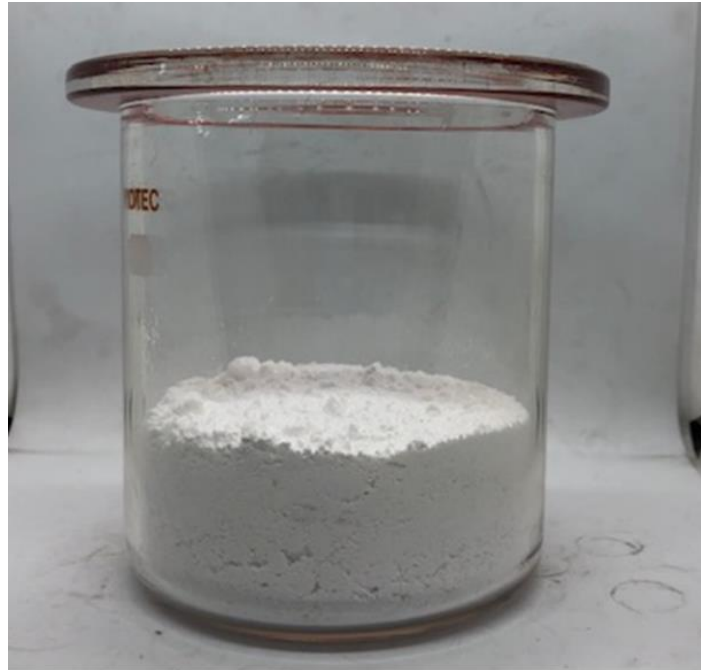


図 5-20 ラビリントラ油化装置の概略図



触媒: 140 g



触媒 : 140 g  
乾燥ラビリントシユラ : 140 g

図 5- 21 HiBD に用いた触媒及び乾燥ラビリントシユラ

(結果と考察)

乾燥ラビリンチュラ (6.25 kg) から炭化水素油の生成を確認した (図5-13)。300~350°C及び 350~450°Cで蒸発した留分を粗油として回収し、回収量は 2,379 g (2,832 mL)であった (図5-13)。これにより、ラビリンチュラの油脂含有率は約 4 割であると推定された。GC-FID 分析を行ったところ、ライトナフサ相当部分及び灯油~ディーゼル分が多い留分であった (図5-14)。したがって、ジェット燃料に適する留分が多いことがわかった。



油(350-450°C)

油(300-350°C)

水分(~200°C)

採油

図 5- 22 乾燥ラビリンチュラから生成された炭化水素油

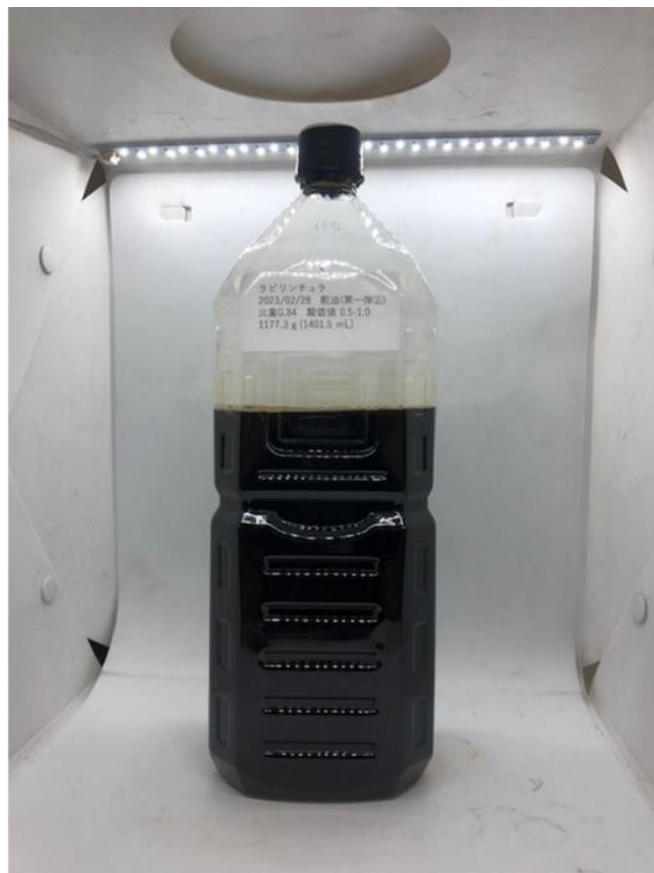


図 5- 23 回収された炭化水素油全量

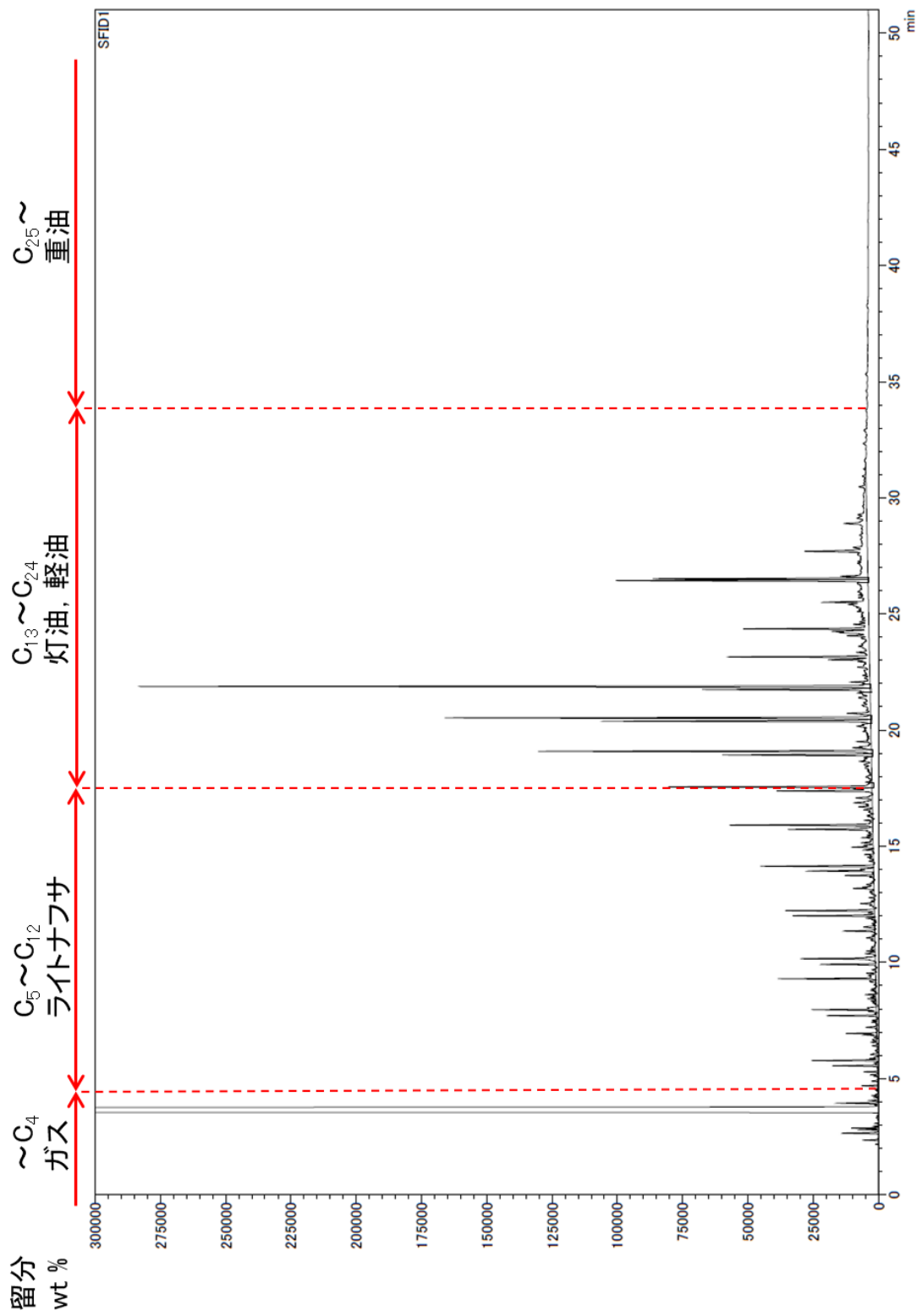


図 5-24 炭化水素油の GC-FID 分析結果

表5 - 4 油化実験のマテリアルバランス No.1~20

| 実験<br>No. | 検体量<br>[g] | 触媒量<br>[g] | 油収率<br>[%] | 水分率<br>[%] | 残渣率<br>[%] | オフガス<br>量 [%] | 採油量<br>[g] | 採油量<br>[mL] |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|---------------|------------|-------------|
| 1         | 140        | 140        | 34.6       | 19.6       | 21.9       | 23.9          | 48.4       | 57.8        |
| 2         | 210        | 210        | 39.4       | 16.6       | 22.0       | 22.0          | 82.7       | 98.7        |
| 3         | 140        | 140        | 38.9       | 16.5       | 20.1       | 24.5          | 54.5       | 64.9        |
| 4         | 140        | 140        | 39.6       | 17.1       | 21.8       | 21.5          | 55.5       | 66.1        |
| 5         | 140        | 140        | 38.4       | 20.4       | 27.1       | 14.1          | 53.7       | 63.9        |
| 6         | 280        | 280        | 37.8       | 17.7       | 20.8       | 23.7          | 105.9      | 126.1       |
| 7         | 140        | 140        | 40.9       | 17.7       | 25.8       | 15.6          | 57.3       | 68.2        |
| 8         | 140        | 140        | 33.4       | 17.3       | 29.0       | 20.3          | 46.8       | 55.5        |
| 9         | 140        | 140        | 38.2       | 15.5       | 22.5       | 23.8          | 53.6       | 63.8        |
| 10        | 140        | 140        | 38.2       | 18.4       | 22.1       | 21.3          | 53.5       | 63.7        |
| 11        | 140        | 140        | 38.8       | 19.9       | 23.8       | 17.5          | 54.3       | 64.6        |
| 12        | 280        | 280        | 38.6       | 18.3       | 21.1       | 22.0          | 108.1      | 128.7       |
| 13        | 140        | 140        | 36.4       | 18.4       | 23.4       | 21.8          | 51.0       | 60.7        |
| 14        | 140        | 140        | 32.6       | 16.4       | 28.1       | 22.9          | 45.7       | 54.4        |
| 15        | 140        | 140        | 35.8       | 17.8       | 28.4       | 18.0          | 50.1       | 59.6        |
| 16        | 280        | 280        | 39.4       | 17.7       | 20.5       | 22.4          | 110.2      | 131.2       |
| 17        | 140        | 140        | 38.7       | 17.1       | 24.7       | 19.5          | 54.2       | 64.5        |
| 18        | 140        | 140        | 36.6       | 17.9       | 24.2       | 21.3          | 51.2       | 61.0        |
| 19        | 140        | 140        | 36.9       | 17.1       | 21.6       | 24.4          | 51.6       | 61.4        |
| 20        | 140        | 140        | 36.0       | 17.3       | 21.9       | 24.8          | 50.4       | 60.0        |

表5 - 5 油化実験のマテリアルバランス No.21~40

| 実験<br>No. | 検体量<br>[g] | 触媒量<br>[g] | 油収率<br>[%] | 水分率<br>[%] | 残渣率<br>[%] | オフガス<br>量 [%] | 採油量<br>[g] | 採油量<br>[mL] |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|---------------|------------|-------------|
| 21        | 140        | 140        | 37.9       | 18.9       | 23.5       | 19.7          | 53.1       | 63.2        |
| 22        | 140        | 140        | 36.9       | 22.1       | 25.6       | 15.4          | 51.7       | 61.5        |
| 23        | 280        | 280        | 41.5       | 16.1       | 20.3       | 22.1          | 116.1      | 138.2       |
| 24        | 140        | 140        | 34.1       | 18.4       | 23.6       | 23.9          | 73.5       | 87.5        |
| 25        | 140        | 140        | 41.7       | 16.4       | 23.2       | 18.7          | 81.4       | 96.9        |
| 26        | 140        | 140        | 36.4       | 17.1       | 21.5       | 25.0          | 51.0       | 60.7        |
| 27        | 140        | 140        | 39.7       | 18.1       | 21.1       | 21.1          | 55.6       | 66.2        |
| 28        | 140        | 140        | 35.6       | 19.1       | 24.6       | 20.7          | 49.9       | 59.4        |
| 29        | 140        | 140        | 36.9       | 18.0       | 19.4       | 25.7          | 51.6       | 61.4        |
| 30        | 280        | 280        | 41.4       | 16.5       | 21.6       | 20.5          | 115.9      | 138.0       |
| 31        | 140        | 140        | 31.2       | 17.6       | 27.4       | 23.8          | 48.9       | 58.2        |
| 32        | 140        | 140        | 35.1       | 16.4       | 21.3       | 27.2          | 49.1       | 58.5        |
| 33        | 140        | 140        | 39.1       | 18.1       | 22.1       | 20.7          | 54.7       | 65.1        |
| 34        | 140        | 140        | 38.9       | 19.1       | 22.5       | 19.5          | 54.5       | 64.9        |
| 35        | 140        | 140        | 40.0       | 17.6       | 20.6       | 21.8          | 56.1       | 66.8        |
| 36        | 140        | 140        | 38.8       | 18.1       | 20.7       | 22.4          | 54.3       | 64.6        |
| 37        | 140        | 140        | 40.1       | 18.1       | 19.0       | 22.8          | 56.2       | 66.9        |
| 38        | 140        | 140        | 36.6       | 18.3       | 24.4       | 20.7          | 51.3       | 61.1        |
| 39        | 140        | 140        | 38.6       | 20.9       | 20.0       | 20.5          | 53.2       | 63.3        |
| 40        | 140        | 140        | 38.7       | 18.8       | 22.3       | 20.2          | 58.1       | 69.2        |

ジェット燃料留分の分析に関する  
結果記載用ページ（概要版 1 ページ）

ジェット燃料留分の分析結果記載用ページ（詳細 3 ページ）





(まとめ)

2022年度に実施した内容より、油糧微生物ラビリンチュラから脂肪酸を含む油脂を培養により得ることができた。培養条件の検討により、対糖収率が25%に近い条件を見出すことができた。しかし、現状は古紙由来糖質を原料とした培養は未実施であり、グルコースでの培養にとどまっている。

ここで、グルコースでの培養データをもとに、古紙由来糖質（針葉樹パルプを主成分とする古紙パルプ）3,000 kg（3トン）を原料とした場合の脂肪酸収率を試算した（図5-25）。古紙由来糖質を原料としたときの脂肪酸生産の流れは以下の通りである。古紙由来糖質を糖化し、得られた糖化液を用いてラビリンチュラを培養し、脂肪酸を生産するという流れである。筆者らは糖化酵素による古紙パルプの糖化率は90%に到達可能であることを見出しているため、得られる糖の量は $3,000\text{ kg} \times 90\% = 2,700\text{ kg}$ となる。針葉樹パルプの場合、糖の組成はグルコース（Glc）85%、マンノース（Man）15%であるため、Glc量は $2,700\text{ kg} \times 85\% = 2,295\text{ kg}$ 、Man量は $2,700\text{ kg} \times 15\% = 405\text{ kg}$ となる。バイオマス糖化液を用いたラビリンチュラの培養は、（参考資料）のデータからも問題ないことはわかっている。2022年度実施内容より対糖収率が23%であることを踏まえると、Glcのみを資化するラビリンチュラ菌株①を用いて培養した場合、得られる脂肪酸量は $2,295\text{ kg} \times 23\% = 527.9\text{ kg}$ 、GlcとManを資化するラビリンチュラ菌株②を用いて培養した場合、得られる脂肪酸量は $2,700\text{ kg} \times 23\% = 621\text{ kg}$ となる。したがって、古紙由来糖質を原料とした場合、対原料収率20%程度の脂肪酸を得られると予想される。

2023年度は古紙由来糖質原料を用いた培養を実施し、今回の試算を上回るような収率で脂肪酸を得られる条件の検討を進める。2022年度実施内容より流加液に窒素源を添加したことにより菌体量の増加が見られたことから、培地中の炭素源及び窒素源の詳細組成の検討などを行い適用することで脂肪酸対糖収率25%以上の収率が得られると考える。古紙由来糖質原料から得られた脂肪酸を用いてAnnex2準拠のSAF製造を行う必要がある。



図5-25 古紙由来糖質を原料とした場合の脂肪酸収率のシミュレーション

以下は分析値からの考察とまとめのページ



### 第3章 LCA の検証・評価

(担当：Green earth institute)

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

#### 3 - (1) - 1 各プロセスの技術開発構成

本年度は、木材チップをパルプ化し、その糖からエタノールを経由してジェット燃料を製造するプロセス (GEI\_ETJ プロセス) と、ラビリンチュラ油脂を経由してジェット燃料を製造するプロセス (BITS\_HEFA プロセス) を検討した。両プロセスの技術開発成果に基づき、プロセスフローを構築し、主要な工程の物質・エネルギー収支を整理した。そして、そのバイオジェット燃料 1 MJ あたりの CO<sub>2</sub> 削減効果を算出し、次年度開発方針を検討した。

GEI\_ETJ プロセス：主に下記の技術開発成果から構成される。

- 古紙及び木材チップの前処理プロセスに関する技術開発
- 糖化酵素の効率的利用に関する技術開発
- 糖液からのエタノール生産プロセスに関する技術開発
- エタノールからの SAF 製造プロセスに関する技術開発

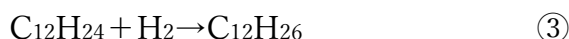
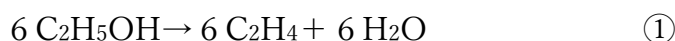
BITS\_HEFA プロセス：主に下記の技術開発成果から構成される。

- 不飽和脂肪酸含量が少ない脂肪酸製造技術の開発
- ラビリンチュラ大量高密度培養法の確立
- ASTM D7566 Annex2 に適合した SAF の製造

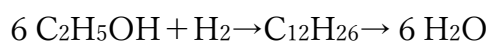
### 3 - (1) - 2 GEI\_ETJ プロセスフロー

図6-1にGEI\_ETJプロセスフローを示す。まず原料の木材チップは回収薬液が混合されたパルプ洗浄脱水液で蒸解される。蒸解物は固液分離によって、パルプと黒液に分離される。回収された黒液は、多重効用缶によって濃縮され黒液ボイラーで熱電回収される。回収された電気及び熱エネルギーはプロセスエネルギーに充当される。生産されたパルプは同時糖化発酵(SSF)(反応温度35°C)され、セラミックフィルターによる膜分離によってエタノール溶液と残渣スラリーに分離される。残渣スラリーには未分解基質とセルラーゼ酵素が含まれており、循環利用される。エタノール溶液は粗留/精留を経て、ANNEX5対応のETJ化技術によってジェット燃料に変換される。

各種技術開発成果から整理したプロセス諸元データを表1に示す。図6-2にByogy社のETJ製造プロセスを示す。エタノールのSAF化プロセスはエタノールの脱水によるエチレン化、エチレンのオリゴマー化、水素化分解から構成される。エタノールをジェット燃料に変換するプロセスにおいて実験データが不十分であることから、本年度はCORISIA 適格燃料(CEF: CORISIA Eligible Fuel)として登録されているATJ変換データの値を引用した。1MJのジェット燃料各画分を製造するために、エタノール1.06MJ、天然ガス0.18MJ、電力0.02MJが投入される。また、エタノールのSAF化に関しては以下の量論式から生産量を推定した。



式①～③より



これらの諸元データをもとにGEI\_ETJプロセスの物質・エネルギー収支を算出した。この物質・エネルギー収支のデータをフォアグラウンドデータとし、当該変換プロセスのバイオジェット燃料1MJを機能単位とするGHG削減率を検討する。

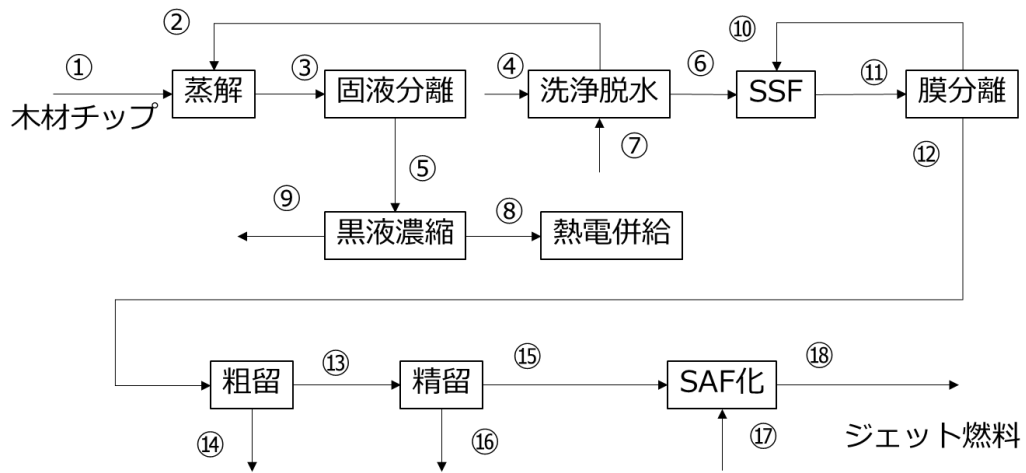


図 6-1 GEI\_ETJ プロセスフロー

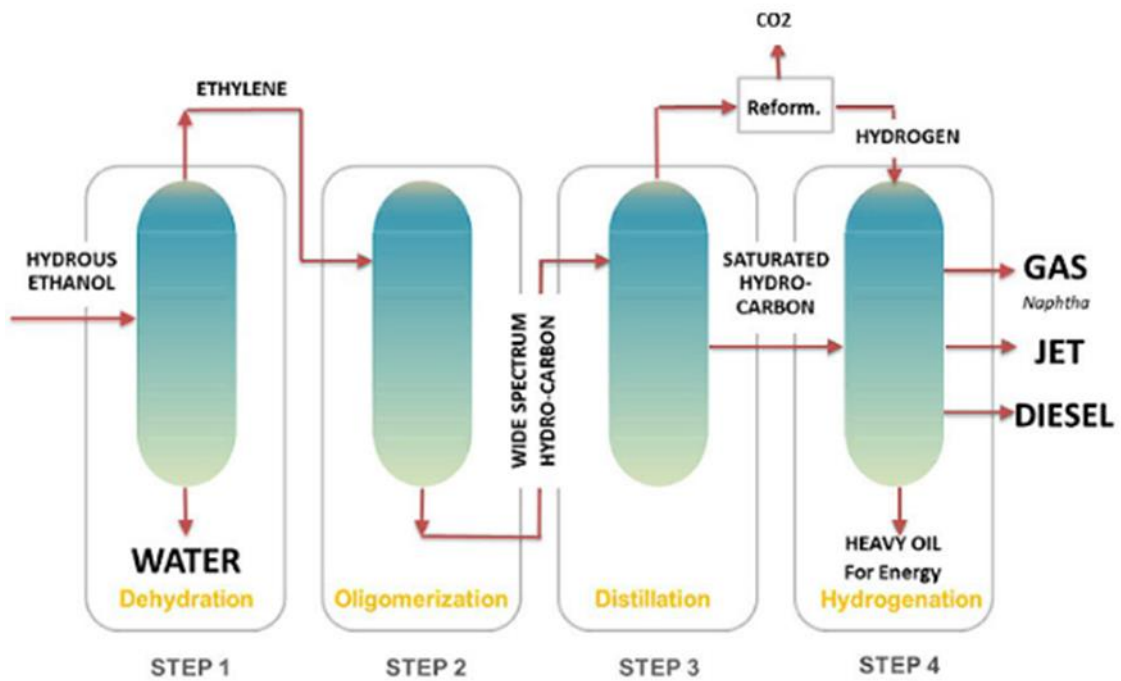


図 6-2 Byogy 社の ETJ 製造プロセス

(<https://byogy.com/technology/>)

表 6-1 GEI\_ETJ プロセスデータ

| 工程          | 反応条件・変換効率   |
|-------------|---|
| 蒸解          | 170℃、液比3、パルプ収率55%<br>NaOH添加量195kg/BDT、Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 添加量29kg/BDT |
| リグニン回収・洗浄脱水 | パルプ固形分率30%、パルプ回収率100%、圧搾圧力0.5MPa  |
| 黒液濃縮        | 三重効用缶、濃縮黒液含水率30%  |
| 熱電回収装置      | ボイラー効率90%、発電効率20%   |
| SSF         | 固形分率10w/v%、48時間、攪拌動力0.2kW/m <sup>3</sup><br>C5C6糖化率99%、C5C6糖化85%、                 |
| 膜分離         | セラミックフィルター、透過圧力0.3MPa   |
| 粗留          | 常圧、濃縮比1.5、エタノール回収率95%   |
| 精留          | 常圧、還流比3、エタノール回収率99%   |
| SAF化        | ジェット燃料 1 MJあたり投入熱：0.18MJ、投入電力：0.02MJ  |

表 6-2 エネルギー計算に用いた原単位

| 項目       | 値     | 単位      |
|----------|-------|---------|
| ユーカリ発熱量  | 18.7  | MJ/kg   |
| 黒液発熱量    | 15.9  | MJ/kg   |
| 木材比熱     | 1.25  | kJ/kg・K |
| エタノール発熱量 | 21.2  | MJ/L    |
| エタノール比熱  | 2.4   | kJ/kg・K |
| エタノール潜熱  | 0.838 | MJ/kg   |
| 水比熱      | 4.2   | kJ/kg・K |
| 水潜熱      | 2.2   | MJ/kg   |
| LUKPの組成  |       |         |
| セルロース    | 0.79  |         |
| ヘミセルロース  | 0.17  | kJ/kg・K |
| リグニン     | 0.01  | MJ/kg   |
| 灰分       | 0.02  | MJ/kg   |

表6-3 エタノールの SAF 化の投入エネルギー

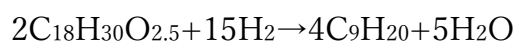
Table 71: Lifecycle inventory cellulosic ethanol ATJ pathway (agreed set of input between JRC and ANL).

| Ethanol production                          |           | Agricultural residues |             | Forest residues |             | Miscanthus  |             | Switchgrass |             |
|---|-----------|-----------------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Inputs                                      | Units     | Standalone            | Integrated  | Standalone      | Integrated  | Standalone  | Integrated  | Standalone  | Integrated  |
| Biomass feedstock                           | dry kg    | 0.13                  | 0.13        | 0.13            | 0.13        | 0.13        | 0.13        | 0.13        | 0.13        |
| Natural gas                                 | MJ        | -                     | -           | .042            | .042        | -           | -           | -           | -           |
| Diesel                                      | MJ        | 0.0024                | 0.0024      | .0044           | .0044       | 0.0024      | 0.0024      | 0.0024      | 0.0024      |
| Cellulase                                   | g         | 1.33                  | 1.33        | 1.33            | 1.33        | 1.33        | 1.33        | 1.33        | 1.33        |
| Yeast                                       | g         | 0.33                  | 0.33        | 0.33            | 0.33        | 0.33        | 0.33        | 0.33        | 0.33        |
| Sulfuric acid                               | g         | 4.30                  | 4.30        | 4.30            | 4.30        | 4.30        | 4.30        | 4.30        | 4.30        |
| Ammonia                                     | g         | 0.52                  | 0.52        | 0.52            | 0.52        | 0.52        | 0.52        | 0.52        | 0.52        |
| NaOH  | g         | 1.46                  | 1.46        | 1.46            | 1.46        | 1.46        | 1.46        | 1.46        | 1.46        |
| CaO   | g         | 0.95                  | 0.95        | 0.95            | 0.95        | 0.95        | 0.95        | 0.95        | 0.95        |
| Corn steep liquor                           | g         | 1.63                  | 1.63        | 1.63            | 1.63        | 1.63        | 1.63        | 1.63        | 1.63        |
| DAP   | g         | 0.17                  | 0.17        | 0.17            | 0.17        | 0.17        | 0.17        | 0.17        | 0.17        |
| Urea  | g         | 0.26                  | 0.26        | 0.26            | 0.26        | 0.26        | 0.26        | 0.26        | 0.26        |
| <b>Outputs</b>                              |           |                       |             |                 |             |             |             |             |             |
| Ethanol                                     | MJ        | 1                     | 1           | 1               | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Electricity before use for ATJ conversion   | MJ        | 0.11                  | 0.088       | 0.11            | 0.088       | 0.11        | 0.088       | 0.11        | 0.088       |
| Ethanol-to-jet                              |           | Agricultural residues |             | Forest residues |             | Miscanthus  |             | Switchgrass |             |
| Inputs                                      | Units     | Standalone            | Integrated  | Standalone      | Integrated  | Standalone  | Integrated  | Standalone  | Integrated  |
| Ethanol                                     | MJ        | 1.06                  | 1.06        | 1.06            | 1.06        | 1.06        | 1.06        | 1.06        | 1.06        |
| Hydrogen                                    | MJ        | 0.06                  | 0.06        | 0.06            | 0.06        | 0.06        | 0.06        | 0.06        | 0.06        |
| Natural gas                                 | MJ        | 0.18                  | 0           | 0.18            | 0           | 0.18        | 0           | 0.18        | 0           |
| Electricity                                 | MJ        | 0.02                  | 0           | 0.02            | 0           | 0.02        | 0           | 0.02        | 0           |
| <b>Total Energy Input</b>                   | <b>MJ</b> | <b>1.32</b>           | <b>1.12</b> | <b>1.32</b>     | <b>1.12</b> | <b>1.32</b> | <b>1.12</b> | <b>1.32</b> | <b>1.12</b> |
| <b>Outputs</b>                              |           |                       |             |                 |             |             |             |             |             |
| Jet fuel and other energy products          | MJ        | 1                     | 1           | 1               | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Jet energy share in total energy output (%) |           | 75%                   | 75%         | 75%             | 75%         | 75%         | 75%         | 75%         | 75%         |
| <b>Energy efficiency (%)</b>                |           | <b>76%</b>            | <b>92%</b>  | <b>76%</b>      | <b>92%</b>  | <b>76%</b>  | <b>92%</b>  | <b>76%</b>  | <b>92%</b>  |

### 3 - (1) - 3 BITS\_HEFA プロセスフロー

図 6-3 に BITS\_HEFA プロセスフローを示す。まず原料の木材チップは蒸解されて、パルプと黒液に分離される。回収された黒液は濃縮され黒液ボイラーで熱電回収される。回収された電気及び熱エネルギーはプロセスエネルギーに充当される。ここまでのプロセスは GEI\_ETJ プロセスと同様である。生産されたパルプは酵素糖化（反応温度 50°C）され、パルプ糖液は残渣スラリーと濃縮糖液に分離される。糖化残渣と酵素液を含むスラリー液は循環利用される。濃縮糖液はラビリンチュラの流加培養に用いられ、油脂生産される。ラビリンチュラの培養後、菌体はデカンターによって菌体ペーストが回収される。回収された菌体ペーストはスプレー乾燥処理され、HiBD 法によって油脂抽出とともに炭化水素化する。HiBD (High quality Bio-Diesel: ハイビーディー) 法は、副原料を用いることなく比較的簡単なプロセスにより、接触分解反応によって油脂あるいは脂肪酸から炭化水素の混合物を得る技術である。その後、ANNEX 2 対応の HEFA 化技術によってジェット燃料に変換される。

各種技術開発成果から整理したプロセス諸元データを表 3-4 に示す。表 3-5 に一般的な脂質の水素化処理による SAF 製造プロセスを示す。ラビリンチュラ油脂をジェット燃料に変換するプロセスにおいて実験データが不十分であることから、本年度は CORSIA 適格燃料 (CEF: CORSIA Eligible Fuel) として登録されている HEFA 変換データの値を引用した。1 MJ のジェット燃料画分を製造するために、脂質 1.02386MJ、天然ガス 0.08576MJ、電力 0.00686MJ が投入される。また、ラビリンチュラ油脂からのジェット生産は以下の量論式から生産量を推定し、ラビリンチュラ油脂およびジェット燃料の発熱量はデュロンの式より計算した。



これらの諸元データをもとに BITS\_HEFA プロセスの物質・エネルギー収支を算出した。この物質・エネルギー収支のデータをフォアグラウンドデータとし、当該変換プロセスのバイオジェット燃料 1 MJ を機能単位とする GHG 削減率を検討する。

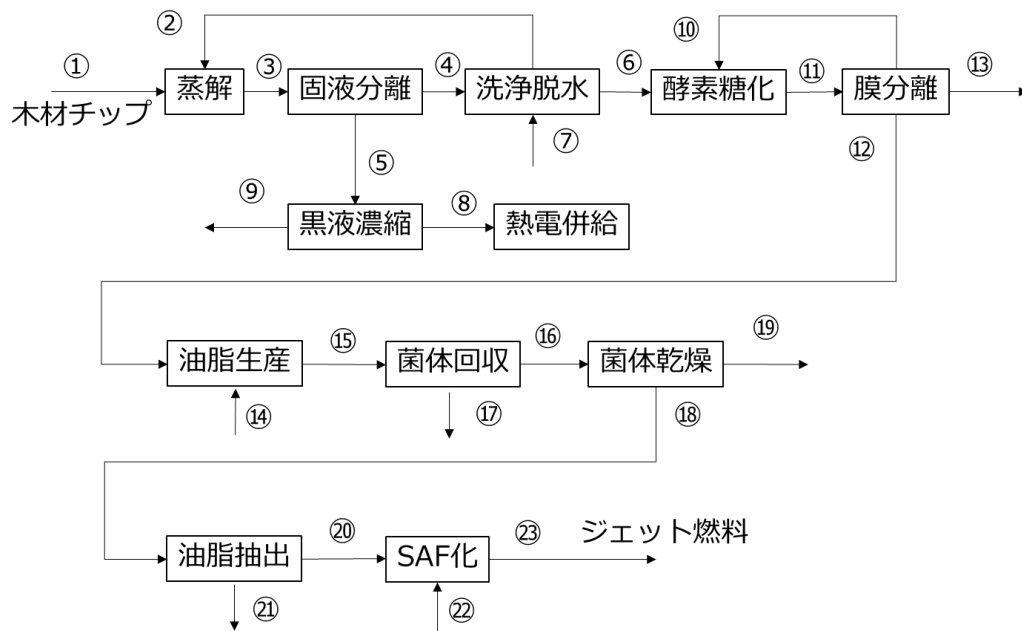


図 6-3 BITS\_HEFA プロセスフロー

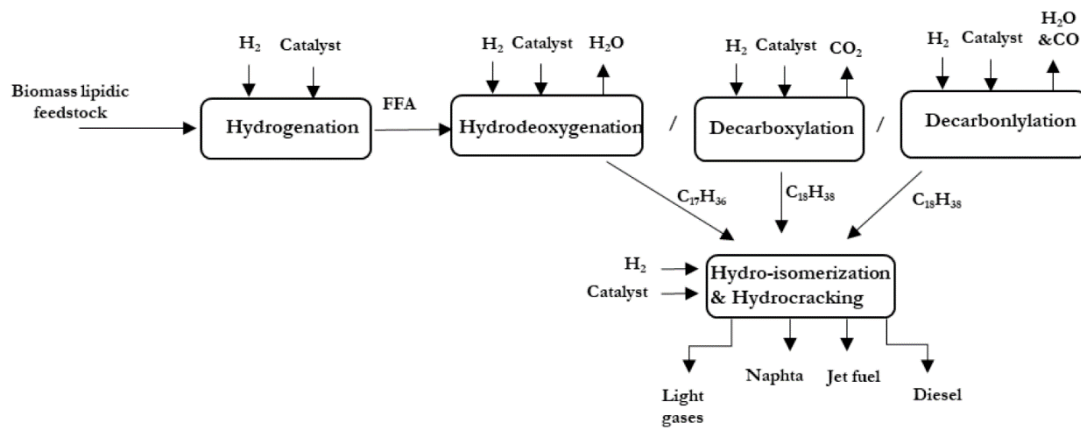


図 6-4 一般的な HEFA 製造プロセス

(CORISIA SUPPORTING DOCUMENT CORISIA Eligible Fuels – Life Cycle Assessment Methodology より引用)

表 6-4 BITS\_HEFA プロセスデータ

| 工程          | 反応条件・変換効率   |
|-------------|---|
| 蒸解          | 170℃、液比3、パルプ収率55%   |
|             | NaOH添加量195kg/BDT、Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 添加量29kg/BDT              |
| リグニン回収・洗浄脱水 | パルプ固形分率30%、パルプ回収率100%、圧搾圧力0.5MPa  |
| 黒液濃縮        | 三重効用缶、濃縮黒液含水率30%  |
| 熱電回収装置      | ボイラー効率90%、発電効率20%   |
| 酵素糖化        | 固形分率15w/v%、48時間、攪拌動力0.2kW/m <sup>3</sup><br>C5C6糖化率95%                    |
| 膜分離         | セラミックフィルター、透過圧力0.3MPa、濃縮糖濃度25w/v%   |
| 油脂生産        | C5C6資化率100%、C5C6菌体変換効率54%、菌体濃度10w/v%<br>培養期間6日、通気攪拌動力0.5kW/m <sup>3</sup> |
| 菌体回収        | デカンタ遠心分離機1.3kW/m <sup>3</sup> 、菌体固形分率20w/w%                               |
| 菌体乾燥        | スプレー乾燥機の排ガス熱回収、菌体固形分率95w/w%   |
| 油脂抽出        | HiBD法により油脂抽出、常圧400℃、顕熱回収  |
| SAF化        | ジェット燃料 1 MJあたり投入熱 : 0.017MJ、投入電力 : 0.00686MJ                              |

表 6-5 ラビリンチュラ油脂の SAF 化の投入エネルギー

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

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

### 3 - (1) - 4 LCA の検証・評価まとめ

物質・エネルギー収支の算出結果より、木材チップ1トン（絶乾）から製造される GEI\_ETJ プロセスと BITS\_HEFA プロセスのジェット燃料はそれぞれ 184L、135L であり、木材チップからのジェット燃料収率はエタノール経由のプロセスの方が大きい。

図 6-5 と 6-6 に GEI\_ETJ プロセスと BITS\_HEFA プロセスのバイオジェット燃料 1MJ を生産するための投入エネルギー及びプロセスから回収されるエネルギーを示す。両プロセスともに投入エネルギーよりもプロセスで回収されるエネルギーが大きくなる可能性が示唆された。GHG 削減率は以下の式で定義される。

GHG 削減率 = (代替される化石燃料由来ジェット燃料の GHG 排出量 - プロセスで排出される GHG 排出量) / 代替される化石由来ジェット燃料の GHG 排出量

プロセスエネルギーを自給できる場合、削減率は 100% になる。しかしながら、本検討で取り上げたプロセスは主要なものだけであり、詳細な工程を設計した場合、投入エネルギーをプロセス回収エネルギーだけで賄えない可能性も考えられる。以下、両プロセスの省エネルギー化のために有効と考えられる技術開発について考察する。また、詳細な数値等は翌年度の結果を踏まえて精緻化する。

#### GEI\_ETJ プロセス

エタノールを経由する本プロセスにおいて、粗留プロセスの投入熱エネルギーが占める割合は大きい。現在は SSF（同時糖化発酵）時の基質濃度が 10w/v% と設定されているが、より高基質濃度 15w/v% での反応条件を確立することで、粗留工程での投入エネルギーは 20% 程度削減される。今回の試算では常圧での蒸留と仮定しており、沸点までの顕熱エネルギーの占める割合が大きいことから、減圧蒸留によって投入エネルギーを約半減できる可能性がある。50°C 以下の減圧蒸留により、膜分離で回収できなかった酵素の失活を防ぎながら、回収する技術も重要と考えられる。次に投入エネルギーの占める割合が大きいのは SAF 化プロセスである。表 6-6 ETJ 製造技術ライセンスを示す。本検討では、CORISA 適格燃料で示されている投入エネルギーデータを引用したが、今後、表 6-6 に示す ETJ 製造技術ライセンスの技術情報を収集

するとともに、ETJ 製造プロセスの反応条件・収率を把握し、計算に反映させる必要がある。

### BITS\_HEFA プロセス

ラビリンチュラ油脂を経由する本プロセスにおいて、菌体乾燥プロセスの投入熱エネルギーが占める割合が大きい。デカンター遠心分離機で菌体回収した固形分率が 20w/w%と設定されているが、凝集剤などを利用することで、より固形分率を向上させることができれば、当該エネルギーを削減することが可能である。蒸解、黒液濃縮に要する熱エネルギーは大きいですが、既に確立されているプロセスであることから省エネルギー化を進めることは困難である。糖化プロセスでは反応温度を 50°Cと設定しているが、低温排熱をプロセス内で有効利用できる省エネルギー化を図ることが可能である。また、油脂生産時の通気攪拌に要する電気エネルギーは、気泡塔型培養装置などの培養条件の最適化や糖化と並行して油脂生産するプロセス共用などが省エネルギー化に有効であると考えられる。ラビリンチュラ油脂の SAF 化の投入エネルギーは大きな割合を占めないことが示唆されたが、CORISA 適格燃料で示されている投入エネルギーデータを引用していることから、今後、詳細なデータを実験を通じて把握し、計算に反映させる必要がある。

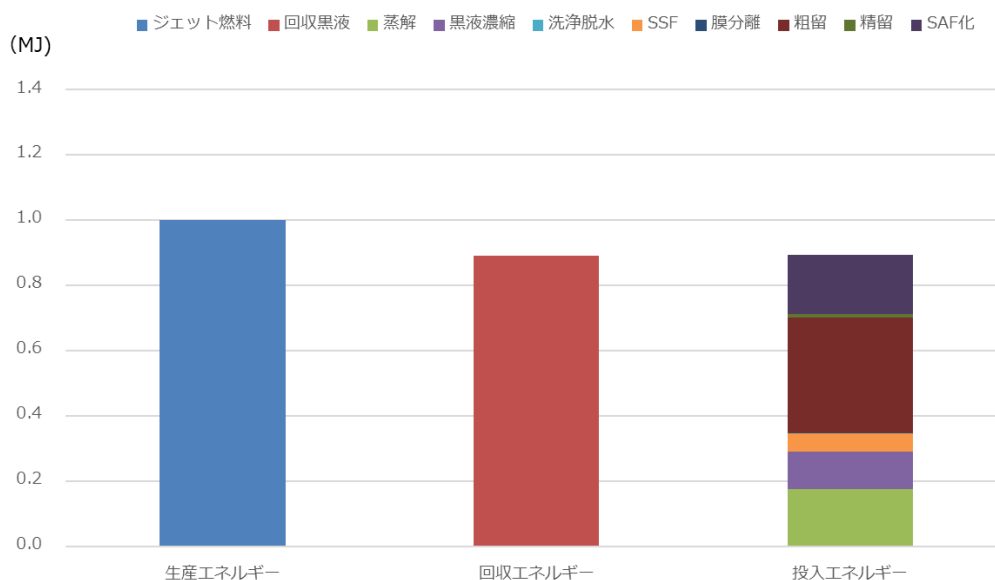


図 6-5 GEI\_ETJ プロセスのエネルギー収支

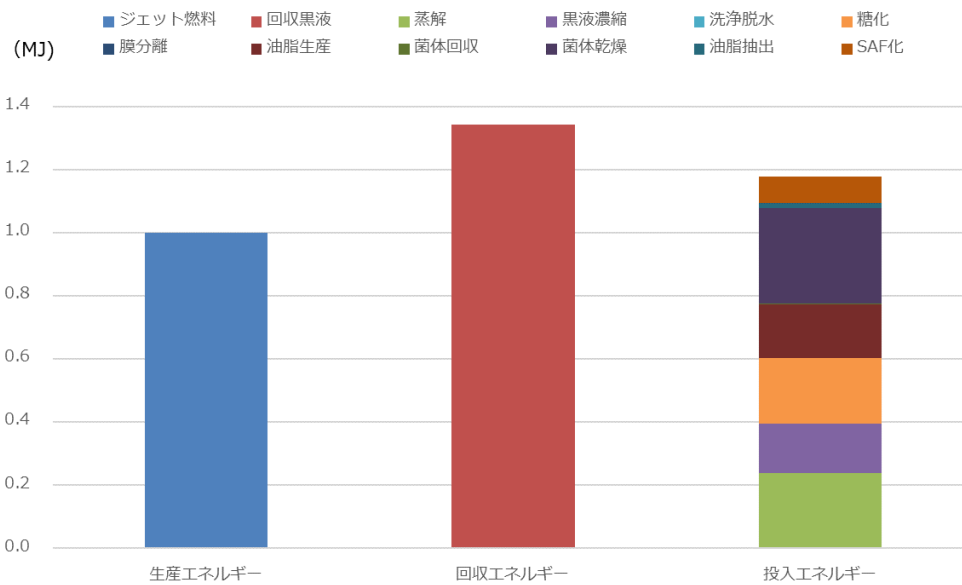









図 6-6 BITS\_HEFA プロセスのエネルギー収支

表 6-6 ETJ 技術ライセンサー

| Company   | Founded/Headquarters              | Oligomerization | BTX |
|---|-----------------------------------|-----------------|-----|
|  Swedish BioFuels  | 2000<br>Stockholm, Sweden         | 2-Step          | Yes |
|  BYOGY   | 2006<br>California, United States | 2-Step          | Yes |
|  LanzaTech   | 2005<br>Illinois, United States   | 2-Step          | No  |
|  Axens  | 2001<br>Rueil-Malmaison, France   | ?               | ?   |
|  Vertimass <sup>™</sup><br><small>Translational Fungus for Fuels</small>                   | 2012<br>California, United States | 1-Step          | Yes |
|  Honeywell<br>UOP  | 1914<br>Illinois, United States   | ?               | ?   |