

令和元年度環境省委託業務

令和元年度

<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>

植物由来で生分解性を備えた高吸水性ポリマーの製造

実証事業委託業務

成果報告書

令和2年3月

**Green Earth Institute 株式会社**

## 要約

高吸水性ポリマー (SAP) は主に紙おむつや生理用品の吸水剤として用いられ、世界での生産量は 250 万トンを超える。現在高吸水性ポリマーにはポリアクリル酸が使用されているが、このポリアクリル酸は、石油由来のプロピレンから作られているため、二酸化炭素削減の観点から植物由来の原料への転換が求められている。

本事業では、Green Earth Institute (株)が、発酵法によりアスパラギン酸を製造し、DIC 株式会社がこのアスパラギン酸を使って高吸水性ポリマーであるポリアスパラギン酸を製造するという計画である。現在アスパラギン酸は石油由来のフマル酸から作られており、発酵法による工業生産が実現すれば世界初の植物由来のアスパラギン酸が誕生する。またポリアクリル酸は生分解されないが、ポリアスパラギン酸は生分解性を有しているため環境汚染への懸念が軽減される。

Green Earth Institute では、本事業開始時にはすでにコリネ菌を使ったアスパラギン酸発酵の技術をある程度確立させていた。本事業の主な目的は、実生産を可能にするように菌体のパフォーマンスを向上させることと、実生産に向けてスケールアップ実験を徐々に進めていくことにある。事業開始時の菌体のパフォーマンスは、対糖収率 5 割 (g/g)、反応時間 7 2 時間、終濃度 4 0 g/L、精製収率 8 割であったが、本事業の成果により、対糖収率 9 割 (g/g)、反応時間 4 8 時間、終濃度 5 0 g/L、精製収率 9 割に向上した。またスケールアップ実験も 1 0 L ジャースケールから 9 0 L 培養装置への実証に成功した。

DIC 株式会社では、本事業において Green Earth Institute が製造した発酵アスパラギン酸、あるいは石油由来の工業品アスパラギン酸を用いてポリアスパラギン酸を製造する技術開発に成功した。発酵アスパラギン酸は工業品と同程度の分子量 (6 ~ 8 万) であり、両者に大きな違いは見られなかった。吸水性テストでも紙おむつに使われているポリアクリル酸が自重の 300 (g/g) 倍の水を吸収するのに対して、本事業で作製したポリアスパラギン酸は両者とも自重の 200 (g/g) 倍程度の水を吸収することが確認された。

## Abstract

Superabsorbent Polymers (SAP) has been mainly used for hygiene applications such as disposable diapers, sanitary napkins. Global demand for SAP reached over 2.5 million tons. At present, polyacrylic acid and its derivatives have been mainly used as SAP, but they are produced from petroleum-derived isopropylene and need to be replaced by plant-based materials from the viewpoint of carbon dioxide reduction.

In this project, Green Earth Institute Co.ltd carries out the production of bio-based aspartic acid by fermentation and DIC corporation polymerizes it, producing alternative superabsorbent polymer, polyaspartic acid. Currently, aspartic acid is industrially produced from petroleum-derived fumaric acid and it would be the world-first green aspartate if the fermentation process become industrialized. Furthermore, polyaspartic acid is a biodegradable, environmental-friendly product whereas polyacrylic acid is non-biodegradable.

Green Earth Institute has developed fermentation process of aspartic acid using *Corynebacterium glutamicum*. The main purpose of the project is to improve the bacterial performance to the level, which enables industrial production, and to perform the scale-up experiments with the aim of commercial production. As the project achievement, the production performance with yield of 0.50 g/g, the concentration of 40 g/L, the reaction time of 72h and purification yield of 0.8 g/g at the beginning of the project has been improved to that with yield of 0.90 g/g, the concentration of 50 g/L, the reaction time of 48h and purification yield of 0.9 g/g. We also succeeded in a scale-up experiment from a 10L Jar to a 90L fermentor.

DIC corporation succeeded in developing polyaspartate production process, using either bio-based aspartate produced by Green Earth Institute or petroleum-derived industrial aspartate. Molecular weights of both products were 60,000~80,000 and there were no significant differences between them. Both products absorbed ~200 times as much water as their own weight, whereas polyacrylic acid extracted from disposable diapers absorbed ~300 times as much water as their own weight.

## 目次

1.	ポリアスパラギン酸製造に関する技術開発	1
1-1	アスパラギン酸発酵	2
	序論	
1-1-1	本事業前の菌体の性能	
1-1-2	菌体の改良	
1-1-3	培養条件の検討	
1-1-4	反応条件の検討	
1-1-5	10L 培養-5L 反応の実施例	
1-1-6	原材料費試算	
1-1-7	90L 培養槽でのスケールアップ <sup>°</sup>	
1-1-8	材料と方法	
1-1-9	参考文献	
1-2	アスパラギン酸の精製	61
	序論	
1-2-1	本事業前のアスパラギン酸精製プロセスについて	
1-2-2	アスパラギン酸濃度と精製收率	
1-2-3	熱溶解法の導入	
1-2-4	着色の問題	
1-2-5	材料と方法	
1-2-6	参考文献	
1-3	ポリアスパラギン酸の合成	79
	序論	
1-3-1	反応概要	
1-3-2	ポリスクシンイミドの合成検討	

1 - 3 - 3	架橋方法の検討
1 - 3 - 4	吸水性評価
1 - 3 - 5	まとめ
2.	モラセス（糖蜜）を使った発酵法の開発 ······ 103
序論	
2-1	グルコース培地との比較（培養）
2-2	グルコース培地との比較（反応）
2-3	グルコース培地との比較（精製）
2-4	培養条件検討
2-5	増殖によるアスパラギン酸生産能の低下
2-6	モラセスの濃度と生育速度
2-7	CSL の添加の影響
2-8	リン酸の添加の影響
2-9	モラセスでの反応
2-10	材料と方法
2-11	参考文献
3.	LCA の検証・評価 ······ 124
3-1	評価の目的
3-2	調査範囲
3-2-1	調査対象の製品システム
3-2-2	製品システムが持つ機能
3-2-3	機能単位及び基準フロー
3-2-4	システム境界
3-3	影響領域と影響評価手法
3-3-1	評価対象製品（バイオ SAP）
3-3-2	比較対象製品（石化 SAP）

### 3-4 前提条件

- 3-4-1 評価対象製品（バイオ SAP）
- 3-4-2 比較対象製品（石化 SAP）
- 3-4-3 共通

### 3-5 ライフサイクルインベントリ分析（LCI）

- 3-5-1 データ区分とデータ取得方法
- 3-5-2 シナリオ項目
- 3-5-3 評価対象製品（バイオ SAP）生産
- 3-5-4 比較対象製品（石化 SAP）生産
- 3-5-5 廃棄・リサイクル

### 3-6 ライフサイクル影響評価（LCIA）

- 3-6-1 ベースシナリオ
- 3-6-2 シナリオ分析
- 3-6-3 エネルギー起源・非エネルギー起源
- 3-6-4 CO<sub>2</sub>削減効果

### 3-7 ライフサイクル解釈

### 3-8 本評価の限界と今後の課題

# 1. ポリアスパラギン酸製造に関する技術開発

## 1-1 アスパラギン酸発酵

### 序論

アスパラギン酸は古くからその存在が知られた酸性アミノ酸であり、アミノ酸輸血などの医療品、食品添加物、また人工甘味料のアスパルテームの原料としてなど幅広く利用されており、現在では年間4～5万トン生産されている。特に近年では、ポリアクリル酸に代わる生分解性の樹脂であるポリアスパラギン酸の需要が増えており、アスパラギン酸全体の2割以上のシェアを占めている。

アスパラギン酸の工業生産は、石油から大量に安価に合成されるフマル酸を原料にして、これにアンモニアを加えて微生物が生産するアスパルターゼという酵素を作用させて合成される（図1-1-1）。現在では、強いアスパルターゼの活性をもつ大腸菌を $\kappa$ -カーナギンで固定化して連続酵素反応を行うことが一般的となっている。しかし、1973年に田辺製薬がこの手法を確立した後、この分野では大きな技術革新が起こっていないのが現状である。

一方、フマル酸より安価な炭素源であるブドウ糖からのアスパラギン酸発酵の技術は、ほとんど報告がない。科学論文の検索で最も良く使われるPubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)でaspartic acid, fermentation, glucoseをキーワードに検索すると55件の文献がヒットするが、このうちブドウ糖からのアスパラギン酸発酵の論文は一本も存在しない。Green Earth Instituteでは、コリネバクテリウムという微生物を用いて、植物由来のブドウ糖から直接アスパラギン酸を生産することに成功している。その意味では本プロセスによるアスパラギン酸発酵は画期的な手法と言える（図1-1-2）。

発酵法もユニークな静止菌体を使った発酵法を採用している（1）。このプロセスでは菌の増殖（培養）と物質生産（反応）の二段階のフェーズがあり、前者は好気条件で菌体を増やし、後者は嫌気条件で物質生産する（図1-1-2）。このことは、安価な糖源を使うという観点から見ても好ましい。不純物を含む安価な糖源は、発酵物の精製過程に影響するが、培養と反応プロセスが分かれていれば、培養で安価な糖源を使用しても反応・精製に対する影響は軽減される。

また嫌気条件での反応というプロセスも、アスパラギン酸という物質を生産する上で有利に働いている。好気条件では1モルのブドウ糖から1モルのアスパラギン酸しかできないが、嫌気条件では、理論的には1モルのブドウ糖から2モルのアスパラギン酸の製造が可能である。この意味において、本プロセスとアスパラギン酸というターゲットの相性は非常に良い（図1-1-3）。

さらに特筆すべき本プロセスの大きな特徴として、ブドウ糖からアスパラギン酸を生産するにあたって、コリネバクテリウムが二酸化炭素を同化することである（2）。これは本プロセスにおいて、ピルビン酸、あるいはフォスフオエノールピルビン酸からオキサロ酢酸を生合成する時に起こる現象であり、通常の好気培養では起こらない。好気培養では通常、ピルビン酸は酸化され二酸化炭素が放出されるが、本プロセスでは逆に二酸化炭素を取り込むことになる。植物以外で炭酸同化を行う反応は極めて限られており、その意味でもユニークなプロセスと言える（図1-1-3）。

また発酵プロセスは嫌気状態で行われるために、微生物は呼吸によって二酸化炭素を排出することもない。好気反応でアスパラギン酸を作るプロセスでは、アスパラギン酸1モルにつき3モルの二酸化炭素が排出されるが、このプロセスでは1モルの二酸化炭素が吸収されるため、合計で4モルの二酸化炭素削減につながっている。このことは二酸化炭素削減と言う観点からだけではなく、ブドウ糖から効率よくアスパラギン酸を生産するためにも重要なことになっている。

コリネバクテリウムはグルタミン酸発酵に使われる細菌であるが（3）、その他の発酵でも大腸菌と並んで発酵法によく使われる菌体である。大腸菌はグラムネガティブに分類される細菌であるのに対して、コリネバクテリウムはグラムポジティブという分厚い膜構造を持っている比較的頑丈な骨格を持った菌体である。本プロセスでは繰り返し反応と言う菌体の再利用を行うが、この分厚い膜構造が菌体の再利用に適している。大腸菌は膜が薄いため比較的溶菌しやすく複数の繰り返し反応はできないが、コリネバクテリウムは5回以上の繰り返し反応が可能であることが確認されている。本事業でも6回以上の繰り返し反応が可能であることを確認している。

Green Earth Instituteでは、静止菌体を使ったユニークな発酵法を用いて、これ適した細菌コリネバクテリウムを使い、この発酵法に適したアスパラギン

酸をターゲットとして菌体の開発を行った。本事業ではさらなる菌体開発と同時に、反応条件の最適化、商用化を見据えたスケールアップの実験を行った。

### 1-1-1 本事業前の菌体の性能

Green Earth Institute は、本事業が始まった時点ですでにアスパラギン酸を生産する菌体の開発に成功していた。培養は NA 培地 (7 g/L 硫酸アンモニウム、0.5g/L リン酸 1 水素カリウム、0.5g/L リン酸 2 水素カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム、2g/L 酵母エキス、6mg/L 硫酸鉄 7 水和物、4.2mg/L 硫酸亜鉛 1 水和物、0.2mg/L ビオチン、0.2mg/L チアミン) を使い、実験は 1L ジャーを使ったものである。

図 1-1-4、5、6 は、試算に用いたデータの反応の結果を示す。これは 2019 年 4 月の段階での最も良いデータをもとに、原材料費の試算をした (図 1-1-7)。この段階での菌体のパフォーマンスを数値化すると

収率 (ブドウ糖 g/g) : 0.513

濃度 (平均) : 46.7 g/L

反応時間 (平均) : 48h

精製収率 : 0.8

これは、この時点での最も良いデータであることを鑑みて、現状は

収率 (ブドウ糖 g/g) : 0.5

濃度 (平均) : 40 g/L

反応時間 (平均) : 72h

精製収率 : 0.8

程度であった。

### 1-1-2 菌体の改良

本事業が始まった時点では GES1158 という菌体がすでに出来ており (遺伝情報の詳細は非公開)、40 g/L 程度の濃度には到達する。しかし、この濃度より上げることは難しく反応時間を延ばしてもなかなか濃度が上がらなかった。この

現象は、細菌がアスパラギン酸に特化した排出機構を持っていないことに起因すると考えられる。アスパラギン酸はグルタミン酸と同じく、浸透圧を調節する MscS という膜タンパク質で排出されることが報告されている(4)。また MscS に A111V という変異が入った菌体はグルタミン酸の排出が促進されていると言う報告がある(5)。このことから GES1158 から *mscS* の遺伝子を一旦欠失させた株を作製し、これに *mscS* の変異体をコードしたプラスミドを導入して、その効果を評価した。

図 8 に示すように、*mscS* 遺伝子を破壊すると反応液に排出されるアスパラギン酸の量は著しく低下した。またこの株に *mscS* の遺伝子を導入した株はアスパラギン酸の生産を回復した。これに A111V の変異を導入した株では、若干アスパラギン酸の排出が促されているが、それ以上にグルタミン酸の排出が促進されていた。グルタミン酸は精製の過程で取り除くことが難しい副産物であり、またポリマー化への影響が懸念される副産物でもある。このため変異の導入は見送った。

アスパラギン酸に特異的な排出を促進するために、我々は AspT (*Tetragenococcus*) というアスパラギン酸を取り込む膜タンパク質に注目した(6)。このタンパク質は SucE というコハク酸を排出するタンパク質(7)と相同性がある(図 1-1-9)。コハク酸もアスパラギン酸もジカルボン酸に属する類似した分子であることを考えると、SucE では膜タンパクの内と外が反転して Importor から Exportor に変わった可能性が高いのではないかと考えた(図 1-1-10)。

そこで SucE と AspT のキメラタンパク質を発現させ、アスパラギン酸の排出が促進されるかどうかを検討した。相同性はタンパク質全長にわたって維持されているため、膜タンパク質の向きを決定する因子は N 末端の配列にあると考えた。そこで SucE タンパク質の N 末端に AspT をつないだキメラタンパク質をコードする遺伝子をプラスミドにクローニングさせて、*mscS* 遺伝子破壊株に形質転換した。図 1-1-11 に示すように *mscS* 遺伝子破壊株では、著しく反応液中のアスパラギン酸濃度が低下する。これに SucE をコードするプラスミドを導入した株では、僅かではあるがアスパラギン酸の濃度が上昇した。さらに SucE タンパク質の N 末端に AspT をつないだキメラタンパク質をコードするプラスミドではさらにアスパラギン酸の濃度が上昇した。しかしこの値は *mscS* を導入した場合に比べると半分以下であり、効果は限定的だったと言える。

実生産に使う菌体は、プラスミドを保有した菌体よりゲノムに遺伝子を組み込んだプラスミドフリーの菌体が望ましい。主な理由は、プラスミドを維持させるために培地に入れる抗生物質が要らないため、原材料費が安く抑えられることと、特にヨーロッパの市場で抗生物質の入った菌体での物質生産が敬遠される傾向があるためである。この理由から SucE タンパク質の N 末端に AspT をつないだキメラタンパク質をコードする遺伝子を GES1158 ゲノムに組み込んだ GES1349 を作製した。GES1158 と GES1349 を比べると僅かではあるが GES1349 の方が反応液中のアスパラギン酸濃度が高かった（図 1-1-1 2）。しかし、劇的にアスパラギン酸の排出が促進されていると言う印象はなく、効果はプラスミド株同様限定的といわざるを得ない。GES1158 は外来遺伝子の導入を含まないいわゆるセルフクローニング株であり、カルタヘナ法に基づけば遺伝子組み換え菌には当たらない。GES1349 は僅かながらパフォーマンスの向上は認められるが、*aspT* が外来遺伝子であるため組み替え体に当たる。実生産にどちらの菌体がより適しているかは今の段階では判断できず、アスパラギン酸生産株の有力な候補として、GES1158 と GES1349 の二つを取っておくことにした。

### 1-1-3 培養条件の検討

この事業が始まった早い段階でモラセスでの培養の検討が行われ、グルコース培地と性能が変わらない菌体が調整できることがわかっていた（2章参照）。培地の価格はグルコース培地の 1 / 5 程度と圧倒的に安く（図 1-1-1 3）、なるべく多くの菌体を安く調整して、反応は速く繰り返し回数も多くという方向でプロジェクトを進行させている。よって本事業ではそのほとんどがモラセスによる培養を行っており、詳細な培養条件の検討は第二章の「モラセス（糖蜜）を使った発酵法の開発」で述べる。

### 1-1-4 反応条件の検討

反応条件の検討は、本事業でリースさせて頂いている Bio. Jr. 8 MicroBio (ABLE) を使って行った（図 1-1-1 4）。全容量は 250ml と少量であるが、通気、攪拌、温度、pH 等が簡単に行え、ジャーファーメンターとしての機能を備えている。8 サンプルと言う比較的多くの検体を同時に取り扱えるので、条件検討

に適した機械といえる。ただ、容量に対して電極の占める体積が多く攪拌スピードが高い培養ではバッフル効果が出てしまうため、本事業では攪拌スピードが低めの反応条件の検討を使った。

10L ジャーで培養した菌体 500～1000ml を遠心して、これを以下に示す反応液に懸濁して反応を行った。現在の環境では培養から反応に持ち込む際に無菌的な操作が難しいため、クロラムフェニコールを反応液に加えている。菌体はこの薬剤には耐性を持っていないが、反応中に菌体は増殖せず、静菌性的な抗生物質は反応を妨げないため反応に影響はない。反応時間は基本的に 24 時間で行っている。通気はすべての条件に置いて 20ml/min で行った。

#### 反応液組成

##### 菌体

ミリ Q 水	7.5 ml
2M 炭酸アンモニウム	1.0 ml
50% グルコース	1.5 ml
クロラムフェニコール	2.5 μl

#### A. 温度による条件検討

コリネバクテリウム・グルタミカムの培養における至適温度は 33°C とされているが、反応では菌体は増殖せず、また動いている代謝系等も限られているため、至適温度や pH は変わってくると考えられる。反応における至適温度を調べるため、27°C から 37°C までを段階的に 7 点とて反応を行った。図 1-1-15 はアスパラギン酸の収率を示した。収率は温度が低いほど高く 27°C の時が最も良いと言う結果になった。しかし反応速度は低温では遅く（図 1-1-16）、何を最も重視する必要があるかによって、至適温度も変わってくると言う結果になった。

#### B. pH の検討

それぞれの酵素には至適 pH が存在し酵素の種類によって異なる。例えば本プロセスに取って重要な酵素である、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼやピルビン酸カルボキシラーゼの至適 pH は 8.0 前後の生物種が多い（コリネバクテリウムの情報はない）。pH は 7.5 から 8.25 での検討を行った。反応

は30°Cで行った。図1-1-17で示すように、収率で判断するとpH7.75-8.0付近が最も良いと言う結果になった。

### C. 揚拌速度の検討

嫌気発酵プロセスにおいて液中にどの程度の空気（酸素）を送り込むかと言うことは、収率や反応速度に大きな影響を与える。嫌気反応においては、基本的には酸素がなくても反応は進むはずである。しかし、全く酸素を入れないと、酸化によってNADHがNAD<sup>+</sup>に変換されないため、細胞内にNADHが蓄積してしまい、結果的に解糖系（GAP還元酵素など）の反応が進まず反応速度が急激に落ちてしまう。本検討では、通気は一定(20ml/min)にして、揚拌速度(200rpm-500rpm)で液中の酸化還元状態をコントロールした。温度は30°C、pHは8.0で反応を行った。

図1-1-18に示すように、揚拌スピードを上げると、反応速度はグルコースの消費から見ても、アスパラギン酸の生産から見ても上がっている。しかし収率の観点から見ると300rpmが最も良く（図1-1-19）、この場合も何を重視するかによって至適揚拌速度は変わってくる。また液中の酸化還元状態は、実際は通気と揚拌のコンビネーションによって変わり（液量や菌体密度も影響）、これらをすべて合わせてパラメーターとしてORP（酸化還元電位）の値が参考値としては最も重要である（図1-1-20）。現在の目安としてもORPは-400~-300として反応条件を設定している。細かな設定は反応速度を重視するか、収率を重視するかによって変わってくる。

### D. 初期炭酸アンモニウムの添加量の検討

本プロセスでは二酸化炭素（炭酸イオン）を同化する反応とアンモニアを同化する反応が存在する。これらの反応をスムーズに進めるためには反応液中にある程度の炭酸イオンやアンモニウムイオンが存在していないといけない。ただしあまり高すぎると浸透圧が増すためアスパラギン酸の排出が妨げられる。反応液に存在するイオンの数を減らすためには、炭酸アンモニウム、あるいは炭酸水素アンモニウムを入れるのが適当であるが、これまでの検討で炭酸アンモニウムの方が適していることがわかっている。

図1-1-21に示すように、初期炭酸アンモニウム（2M）の量は、液量（菌体量は除く）の1/10の10mlが、反応速度、収率ともに最大にすることがわか

った。

#### E. pH 調整液の検討

アミノ酸の生産には、基本的にアンモニアが pH 調整液として用いられる。これは、グルコースが炭素源となる一方で窒素源は別に供給する必要があり、また他方発酵が進むと有機酸などの酸が生産されるため pH は下がる傾向にあり pH を一定に保つためにはアルカリの液を加える必要がある。この二つの目的を同時に満たすためにアンモニア液を pH 調整液として使用する。

アスパラギン酸の反応のプロセスでは、炭素源としてグルコース、窒素源としてアンモニウムイオンの他に、炭酸イオンを供給する必要がある。pH 調整も加えた三つの目的を同時に満たすために、炭酸アンモニウム溶液を pH 調整液として使用しているが、炭酸イオンの最適な供給量が、pH 調整とリンクしていると言うのは考えにくい。炭酸イオンを最適な量を供給するために、pH 調整液を 2M 炭酸アンモニウム溶液と 2.5N アンモニア溶液の混合液を調整し、最適な混合比を検討した。

図 1-1-2 に示すように 2M の炭酸アンモニウムを 80% で 2.5N アンモニア溶液と混合するのが、収率、生産速度の両面から見て最適と言う結果になった。

#### F. 5L Jar での反応条件

精製を含めたラボスケールでの実験は、10L Jar での培養、5L Jar での反応という計画であり、8 連ジャーでの結果を 5L に還元していかなければならない。温度や pH、初期炭酸アンモニウムの割合、pH 調整液の組成等は、8 連ジャーの結果をそのまま反映することができる。温度 30°C、pH 8.0、初期炭酸アンモニウムは 2M 溶液を 1/10 量、pH 調整液の組成は 80% の 2M 炭酸アンモニウム、20% の 2.5N アンモニア溶液は 8 連ジャーでも 5L ジャーでも共通した条件で行っている。一方、通気と攪拌速度の組み合わせは、それぞれの Jar のスケールや液量に合わせた調整が必要である。

液量を 2L (菌体を除く)、通気を 250ml/min として、一回目の反応を 300rpm で、同じ細胞を繰り返した 2 回目の反応を 250rpm で反応したクロマトグラフを図 1-1-2 3 で示した。攪拌速度を 300rpm とした場合、グルタミン酸が大量に生産される結果となっている。これは 300rpm では液中の酸化還元状態が、酸化的に偏りすぎた結果であり、300rpm は攪拌速度が速すぎると言うことを示して

いる（図1-1-24）。

現在の反応系では、反応液に炭酸アンモニウムを加えているため pH8.7程度から反応がスタートする。反応が進むと pH は下がり、pH8.0まで下がった所で pH 調整液のフィードが始まる。基本的に反応は収率を重視して 30°C、250rpm という条件で行っているが、pH が 8.7 から 8.0 まで下がるのに時間がかかりすぎて、この間だけは収率より反応速度が速い 37°C、350rpm という反応条件を採用している。図1-1-25に現在採用している 5L Jar での反応系をまとめた。ただし菌体密度が濃い場合や、フィードが入って液量が増えた場合は、攪拌速度を 300rpm 程度まで上げることがある。この場合も ORP が -300 を上回らないようにしている。

### 1-1-5 10L 培養-5L 反応の実施例

5Lでの反応条件がほぼ整った所で、10Lで培養した菌体を 5L で反応した結果の中から、比較的良好な結果が得られた実施例を紹介しておく。

培養は 5% モラセス培地を用いて 10L ジャー 3 本（液量計 15L）を使い、菌体を調整した。培養条件は、温度は 33°C、pH8.0、攪拌速度 600rpm、通気 0.5vvm である。

図1-1-26～28は6回繰り返しを行った結果である。赤字は各回のモル収率であるが、これを重量収率に直すと、全体でも 0.945 とかなり高い数字が出ている。これは二酸化炭素を同化することで重量が増えることに起因する。また炭酸アンモニウムから見たモル収率は 0.897 であり、こちらもかなり高い数字が出ている。アスパラギン酸発酵ではかなり効率的に炭酸イオンを吸収できていると言うことになる。

### 1-1-6 原材料費試算

1-1-5 で示した実施例をもとに、原材料費のコスト試算を行った。図1-1-29～30で示すように、繰り返し回数を増やせば、相対的に培養でかかったコストが下がるが（緑）、3回目以降反応の収率自身は少しずつ下がっていくので反応のコストは上がっていく（青字）。精製のコストは繰り返しの回数によらない（赤字）。繰り返しの回数ごとに原料費の試算をしてみると繰り返し 6 回ま

では僅かだが下がる傾向（図1-1-3 0）があるが7回目まで入れるとコストが逆に高くなってしまう。

図1-1-3 1は本事業が始まる前と今回の原材料費の試算を比較したものである。モラセスを使ったことと収率や繰り返し回数の増加によって、原材料費の合計は半分程度に下げることに成功している。

### 1-1-7 90L 培養槽でのスケールアップ

#### A. 90L 培養装置で調整した細胞の評価

プロセス改良の余地はまだ多分にあるが、10L 培養-5L 反応の系はほぼ安定的に動くようになってきたので、90L 培養装置を使った実験に取りかかった。90L 培養装置で培養・反応を行うとすると、とくに培養槽の大きさの問題から今まで確立した反応条件が適応できなくなる。これは反応では培養液を濃縮して行うため、90L 培養装置での液量が多くとも 20L 程度にならざるを得ない。培養槽に対して液量が少ないと反応液の酸化還元状態がかなり変わってくる。

第一段階として 90L 培養装置で菌体を培養して、すでに反応条件が確立している 5L ジャーで菌体の性能を評価することにした。培地組成、培養条件は以下の通りである。後述するが粉末 CSL (ソルリス) の添加が培養を促進する効果があるので（第二章参照）、この実験ではソルリスを加えている。

#### 培地組成

モラセス	5.5L
ソルリス (粉末 CSL)	20g
消泡剤	78ml
水	
計	55L

#### 培養条件

温度	35°C
pH	8.0
攪拌速度	270rpm
通気	15L/min

圧力 0.03Mpa

図1-1-3 2は90L培養装置での培養の結果を示す。OD<sub>610</sub>は40程度でとどまったが、10LジャーではOD60～70まで菌体密度は伸びるので、培養条件はさらなる検討を要する。この菌体を20Lほど用いて5Lジャーでの反応に持ち込んだその結果を図1-1-3 3～3 5で示した。

反応は繰り返し6回まで行い、平均の収率はグラム換算で1.01となり、投入したグルコース以上のアスパラギン酸が出来ることがわかった。終濃度は原液換算（フィードなどで増えて薄まつた液量を差し引いて計算）で75.7g/L、生産速度は3.33g/L/hとなった（図1-1-3 6）。また繰り返し反応別に結果を見ていくと、終濃度、生産性ともに3回～4回目の反応にピークがあり、その後低下していく傾向が見て取れる（図1-1-3 7～3 9）。これは1～2回目の反応ではアスパラギン酸の排出に問題があり、その後膜構造の変化に伴ってアスパラギン酸の排出が促された結果ではないかと推測される。また収率は二回目がピークであるが、これは一回目の排出に問題があることでグルタミン酸にフラックスが流れており（図1-1-4 0）、解糖系からTCAに落とし込む活性は一回目の方が高くなっている。回数が増すごとにアラニンやピルビン酸といった解糖系から派生する副生物の割合が増えていき、少しずつTCAにフラックスが流れなくなっていることが見て取れる（図1-1-4 1）。

## B. 90L培養装置での培養-90L培養装置での反応

90L培養装置での培養-反応の実験に先駆けて、10Lジャーの培養-反応の系の確立をおこなった。10Lジャーに7Lの液量で培地を仕込み培養を行い、液量（菌体除く）3Lで反応を行った。通気は0.05vvm、搅拌は250rpm→220rpm、温度とpHは5Lと同じ37°C→30°C、pH8.0で行えばうまく反応が進むことを確認した。またモラセス培地にCSLではなくリン酸カリウムを入れた方が反応も速く進むことがこの検討で明らかになっており（第二章参照）、今回はリン酸添加に変更した。さらに前回の培養ではOD<sub>610</sub>=40程度で頭打ちになっており、この原因として通気・搅拌が充分ではなかったことが考えられたためこの点も改めた。これらの点を修正して90Lの培養は以下の条件で行った。

## 培地組成

モラセス	5.5L
KH2P04	7g
消泡剤	50ml
水	
計	55L

#### 培養条件

温度	35°C
pH	8.0
搅拌速度	350rpm
通気	21L/min
圧力	0.03Mpa

図1-1-4 2は90L 培養装置での培養の結果を示す。 $OD_{610}=51$ まで伸びたが、10L ジャーでは  $OD_{610}=60$  を越えているので更なる検討が必要だ。

90L 培養装置での繰り返し反応は、多くの人員を必要とし、休日にもかかってしまうこともあり長期の繰り返し反応の実行は現状では難しい。今回、繰り返しは二回とした。

図1-1-4 3は一回目の反応結果である。前回に比べて菌体はかなり薄くなっているが ( $OD_{610}=84$ )、反応速度は落ちておらず、収率も7割弱と言う結果であった。二回目もほぼ同じスピードで収率は7割を超えた(図1-1-4 4)。

### 1-1-8 材料と方法

#### A 菌体改良

出発材料として GES1058 株を用い、遺伝子破壊の手法により所定のタンパク質の機能を不活性化し、かつ所定の遺伝子を導入した組換えコリネ型細菌を作出した。以下に、その手順を示す。

##### (1) *mscS* 遺伝子欠損株の作製

まず、PCR法により、プラスミド pNIC-Bsa4 (Source BioScience 社) を鋳型として、*sacB* 遺伝子断片を増幅させた。

5' -GGGAAGCTTGACGCCACATACCTGCC-3'  
5' -ATTGGATCCGTATCCACCTTAC-3'

増幅したDNA断片とプラスミドpHSG299（タカラバイオ株式会社）とを、*Bam*HI及び*Hind*IIIで制限酵素処理した後、DNA Ligation Kit Ver.2（タカラバイオ株式会社）を用いてライゲーションし、プラスミドpGE015を得た。

さらにpMW119（タカラバイオ株式会社）を鋳型として以下のプライマーを用いて低コピーの*ori*の部位を増幅した。

5' -GAACCGTAAAAAGGCGACAGTAAGACGGTAAGCC-3'  
5' -GC GGCGCGTAGAAAGTAACGGTAAACAGTTGTC-3'

これをpGE015を鋳型にして以下のプライマーを使って*ori*の部分を含まない遺伝子断片を増幅し、上記の低コピーの*ori*を含む遺伝子断片とInFusion Cloning Kit（タカラバイオ株式会社）を使って結合させ pGE248を得た。

5' -TTTCTACGCGGCCGCGAGGTCTGCCTCGTGAAGAA-3'  
5' -GCCTTTTACGGTTCGCTATGACCATGATTACGCC-3'

さらに、PCR反応により、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株のゲノムDNAを鋳型として、*mscS*遺伝子コード領域上流の約1000bpの領域と、該遺伝子コード領域下流の約1000bpの領域とをそれぞれ以下のプライマーを使って増幅させた。

5' -GACGGCCAGTGAATTGCGCCCTGCTCGTGGCGCAC-3' (A)  
5' -CGACTGCACACCAAGGCCAATGGCAGCTGA-3'  
5' -TACCGAGCTCGAATTGGTCACCGCAGTTGAGGTGG-3' (B)  
5' -CTTGGTGTGCAGTCGTTCTAATAACTGGTCGCGTG-3'

これをpGE248のEcoRIサイトにInfusion Cloningを行いpGE944を得た。なお、上記の手順において、各PCR反応には、サーマルサイクラーT100TM(Bio-Rad社)を利用し、PCR酵素試薬としてはPrimeStar MAX（タカラバイ

才株式会社)を利用した。以下に説明する手順におけるP C R反応についても、特に断わりの無い限り同様である。

プラスミド pGE944において、*mscS* 遺伝子上流域断片と該遺伝子の下流域断片とは、タンデムに連結されてマルチクローニングサイトに挿入された形態となっているものの、*mscS* 遺伝子のコード領域は欠損している。加えて、pGE944 は、大腸菌では複製可能であるが、コリネ型細菌の菌体内では複製不可能なプラスミドである。

プラスミド pGE944 を、電気パルス法 (2500 V, 25  $\mu$  F, 200  $\Omega$ ) により、GES1158 へ導入した。電気パルス法後の試料は、カナマイシン 25  $\mu$  g/ml を含むA寒天培地 (培地 1 L 中の組成 : 尿素 : 2 g, (NH4)2SO4 : 7 g, KH2PO4 : 0.5 g, K2HP04 : 0.5 g, MgSO4 · 7H2O : 0.5 g, FeSO4 · 7H2O : 6m g, MnSO4 · nH2O : 4.2m g, D-ビオチン : 200  $\mu$  g, 塩酸チアミン : 200  $\mu$  g, 酵母エキス : 2 g, カザミノ酸 : 7 g, グルコース : 20 g, 寒天 : 16 g を蒸留水に 1000m l 溶解 (pH6.6)) に塗布し、常法により培養した。

ここで、pGE944 は、薬剤耐性マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を有していることから、上記のとおりカナマイシンを含むA寒天培地上で増殖した生育株は、pGE944 が染色体上の野生型 *mscS* 遺伝子と 1 点相同組換えを起こして、該プラスミドごとゲノムDNAに組み込まれた株である。

このようにして取得した生育株を、10%スクロースを添加したLB寒天培地 (培地 1 L 中の組成 : バクトペプトン : 10 g、酵母エキス : 5 g、塩化ナトリウム : 10 g、寒天 : 16 g) に塗布し、常法により培養した。ここで、pGE944 に由来の *sacB* 遺伝子が保持された形質転換体は、スクロースを添加した培地上では、毒性物質が產生されることから生存することができない。一方、再度の相同組換えにより *sacB* 遺伝子を含むプラスミド由来の領域が抜け落ちた形質転換体については、スクロースが添加された培地上でも生存できることから、プラスミド由来の領域が抜け落ち、かつ *mscS* 遺伝子が欠損した形質転換体が生育株として得られる。なお、再度の相同組換えの際に、完全な pGE944 の形態でプラスミド全領域が抜け落ちるものは、*mscS* 遺伝子をインタクトに保持する GES1158 株の形質に戻る。

上記のとおり LB 寒天培地上で生育株として取得された菌体コロニーの中から、上記の(A)及び(B)のプライマーペアを用いたコロニー P C R 法により *mscS* 遺伝子欠損株をスクリーニングした。

上記のプライマー(A)及び(B)は、*mscS* 遺伝子上流約 1000 b p の領域の 5' 端と、該遺伝子下流約 1000 b p の領域の 3' 端にそれぞれ設計したプライマーであることから、*mscS* 遺伝子を欠損した菌株であれば、約 2 k b のDNA断片が得られるはずである。この事を指標として、上記コロニーPCRで得られたプロダクトについてアガロース電気泳動法を行い、*mscS* 遺伝子の欠損が確認されたコロニー菌体を *mscS* 遺伝子欠損株 (GES1308) として取得した。

## (2) *sucE-aspT* 遺伝子ゲノム挿入株の作製

PCR反応により、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 株のゲノム DNA を鋳型として、*pckA* 遺伝子コード領域上流の約 1000 b p の領域と、該遺伝子コード領域下流の約 1000 b p の領域とをそれぞれ以下のプライマーを使って増幅させた。

5' -GACGGCCAGTGAATTCTGCGACGACTGGAAAACCA-3'  
5' -GCTAGCTACTTCTCCAGATTTGTGT-3'  
5' -GGAGAAGTAGCTAGCAGTTCACGCTTAAGAACTGC-3'  
5' -TACCGAGCTCGAATTGGCTGGACCCTAGAATTGG-3'

これを pGE248 の EcoRI サイトに Infusion Cloning を行い pGE1261 を得た。

PCR反応により、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 株のゲノム DNA を鋳型として、*sucE* 遺伝子のプロモーター部位及び N 末端コード領域を以下のプライマーを用いて増幅した。

5' -CATGTGCATGGATCCCGACAGGCTGAACGCAAGG-3'  
5' -GATTGGCCGATCAATAGCGCTAGACCTACAAACA-3'

また PCR 反応により、*Tetragenococcus* (NBRC12172) のゲノム DNA を鋳型として、*aspT* 遺伝子のコード領域を以下のプライマーを用いて増幅した

5' -TTGATCGGCCAAATCGCGT-3'  
5' -GACGGTACCGGATCGCATATCGTCCTCTCAGTTG-3'

上記の二つの遺伝子断片を pGE004 の BamHI サイトに InFusion クローニングし

て pGE1270 を得た。このプラスミドを鋳型にして以下のプライマーで *sucE-aspt* の領域を増幅し、pGE1261 の *NheI* サイトに InFusion クローニングして pGE1354 を得た。

5' -TGGAGAAGTAGCTAGGCTCCCTCACCGCCTGAAG-3'  
5' -AGCGTGAACTGCTAGTTAGAGGCATCTCGGCGATC-3'

pGE1354 を上記の欠失株と同様の手法を用いて GES1158 株のゲノムに挿入して、遺伝子断片が組み変わった株も同様の手法で取得し、確認も同様の手法でおこなった。*sucE-aspt* 遺伝子が組み替えられた株を GES1349 とした。

## B 菌体の培養

試験管・フラスコ培養では、基本的には NA 培地（7 g/L 硫酸アンモニウム、0.5g/L リン酸 1 水素カリウム、0.5g/L リン酸 2 水素カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム、2g/L 酵母エキス、6mg/L 硫酸鉄 7 水和物、4.2mg/L 硫酸亜鉛 1 水和物、0.2mg/L ビオチン、0.2mg/L チアミン）を使い、振とう器は BioShaker BR-43FL (TAITEC) を用いた。温度は 33 °C、200rpm で一晩培養した。

8 連ジャー (250ml) は Bio Jr. 8 BJR-25NAIS-8M (ABLE) を使用し、5L ジャーと 10L ジャーは、それぞれ BMS-05NP4, BMS-10NP4 (ABLE) を用いた。90L 培養装置は BMP-90K03 (ABLE) を用いた。

## C HPLC によるアミノ酸分析・有機酸分析

アミノ酸分析は、Prominence アミノ酸分析システム（島津製作所）を用いた。有機酸分析は、島津製作所の有機酸分析装置に TSKgel OApak (TOSOH) のカラムをつないで使用した。アミノ酸分析は 1000 倍希釈、有機酸分析は 100 倍希釈で分析した。

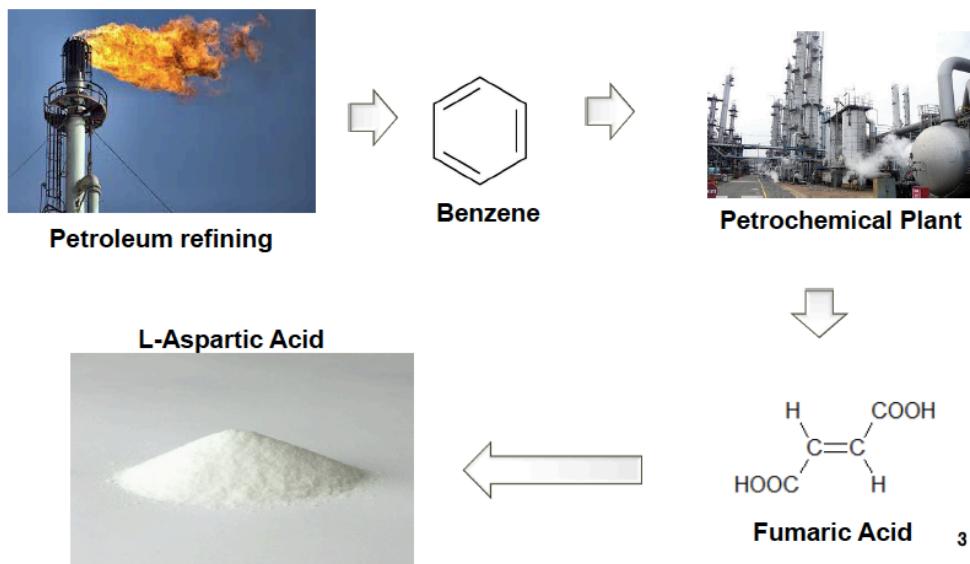
## 1-1-9 参考文献

- (1) Inui M1, Kawaguchi H, Murakami S, Vertès AA, Yukawa H. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. J Mol Microbiol

Biotechnol. 2004;8(4):243-54.

- (2) Kameshita I, Tokushige M, Katsuki H. Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Essential arginyl residues for catalytic and regulatory functions. J Biochem. 1978 Oct;84(4):795-803.
- (3) Kimura E1. Metabolic engineering of glutamate production. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2003;79:37-57.
- (4) Nakamura J1, Hirano S, Ito H, Wachi M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. Appl Environ Microbiol. 2007 Jul;73(14):4491-8.
- (5) Yamashita C1, Hashimoto K, Kumagai K, Maeda T, Takada A, Yabe I, Kawasaki H, Wachi M. L-Glutamate secretion by the N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel. Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(5):1008-13.
- (6) Abe K1, Ohnishi F, Yagi K, Nakajima T, Higuchi T, Sano M, Machida M, Sarker RI, Maloney PC. Plasmid-encoded asp operon confers a proton motive metabolic cycle catalyzed by an aspartate-alanine exchange reaction. J Bacteriol. 2002 Jun;184(11):2906-13.
- (7) Zhu N1, Xia H, Yang J, Zhao X, Chen T. Improved succinate production in *Corynebacterium glutamicum* by engineering glyoxylate pathway and succinate export system. Biotechnol Lett. 2014 Mar;36(3):553-60.  
doi: 10.1007/s10529-013-1376-2.

## 現在のアスパラギン酸製造法



## Green Earthによるアスパラギン酸製造法

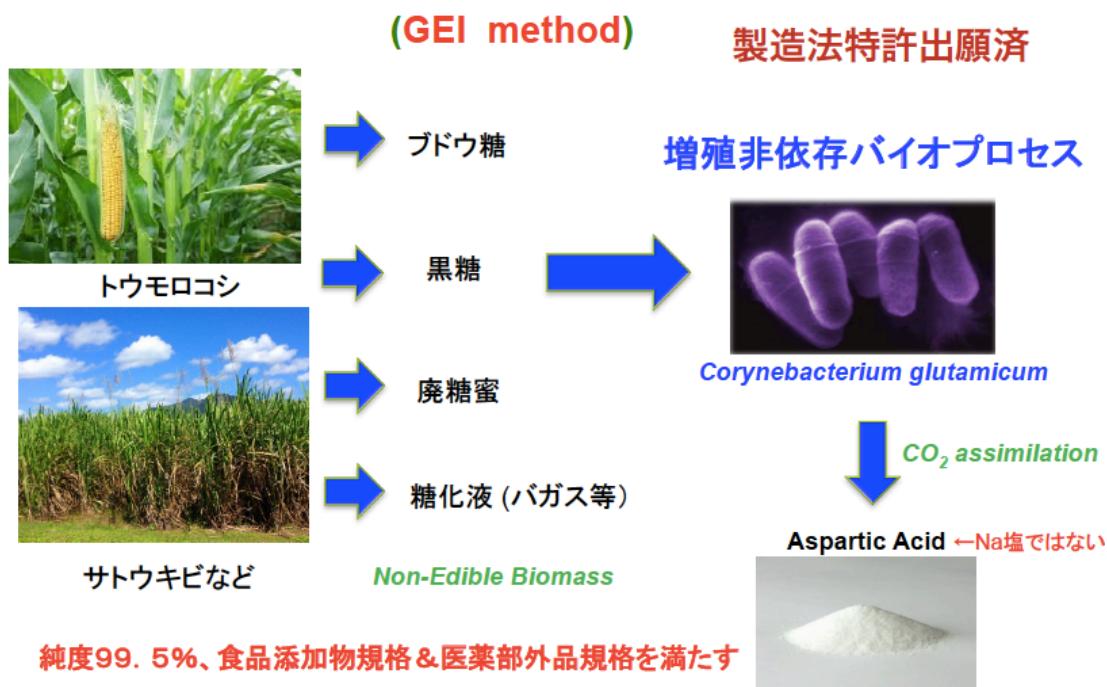


図1-1-1

# 静止菌体を使った発酵法による アスパラギン酸製造

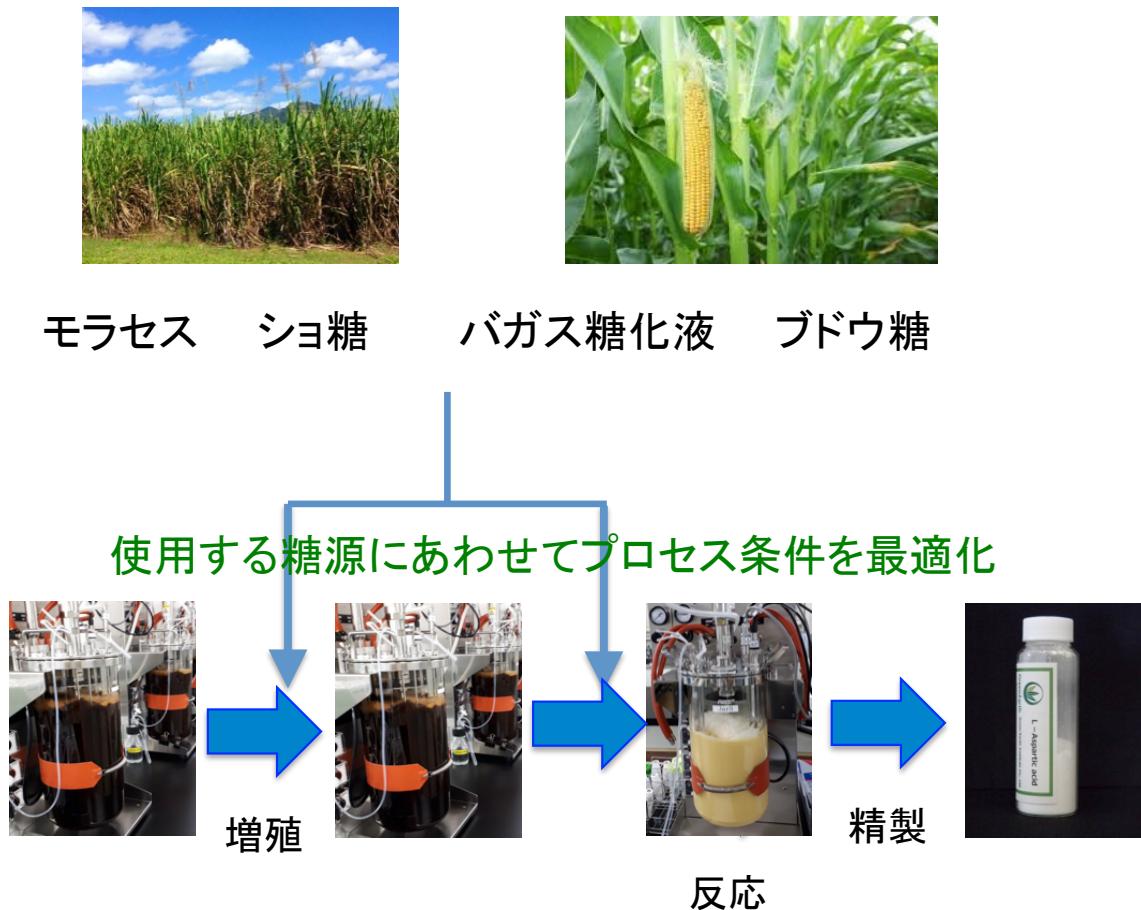


図1-1-2

## 本プロセスにおけるCO<sub>2</sub>固定

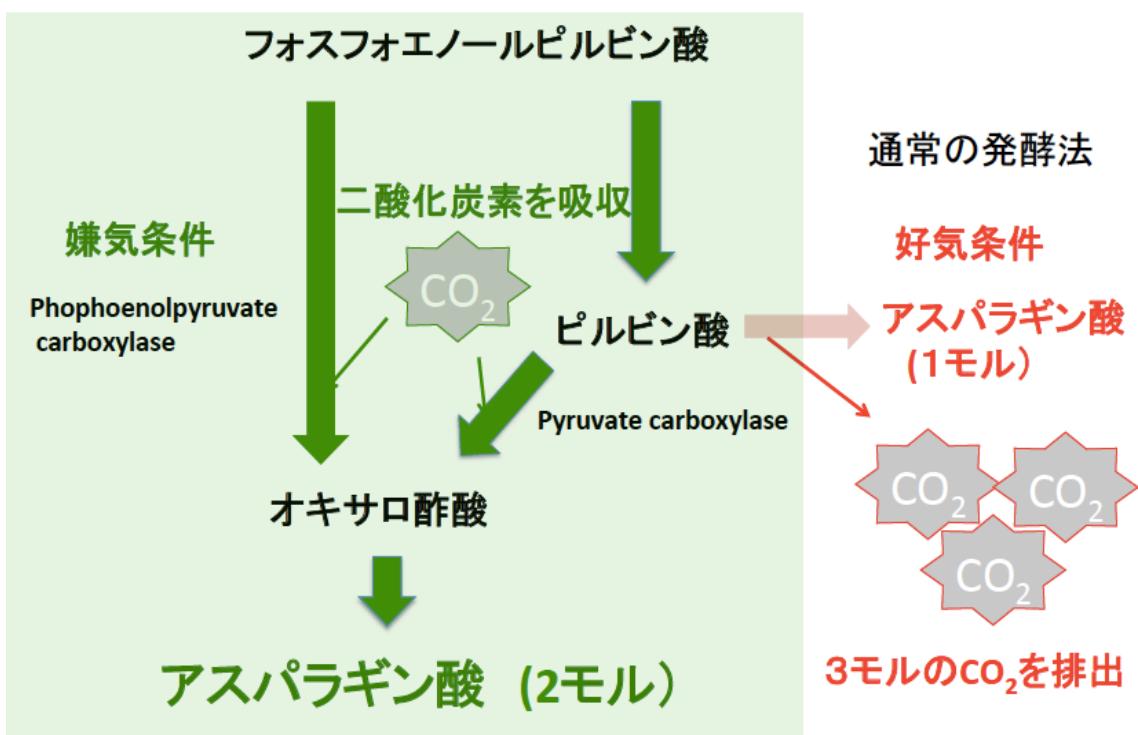


図1-1-3

## グルコース培地で培養した菌体での反応

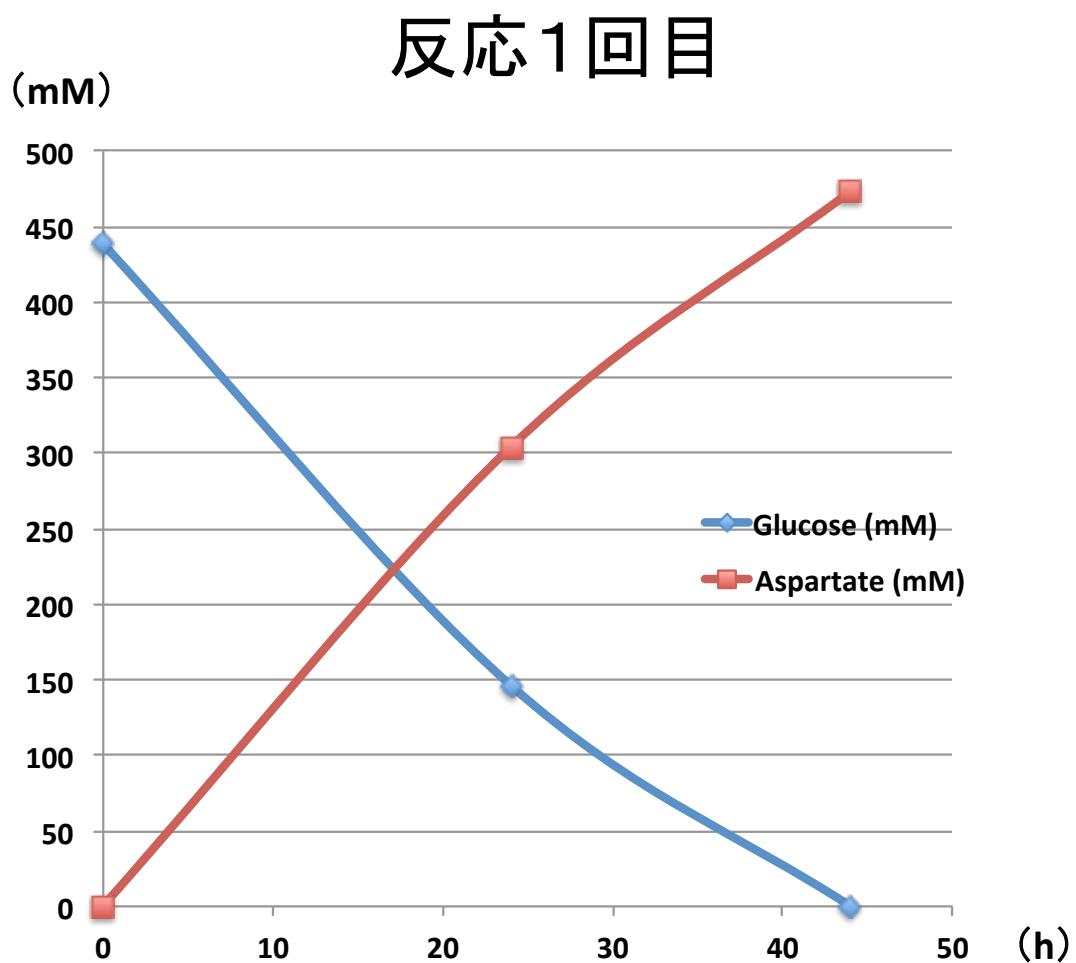


図 1-1-4

## グルコース培地で培養した菌体での反応

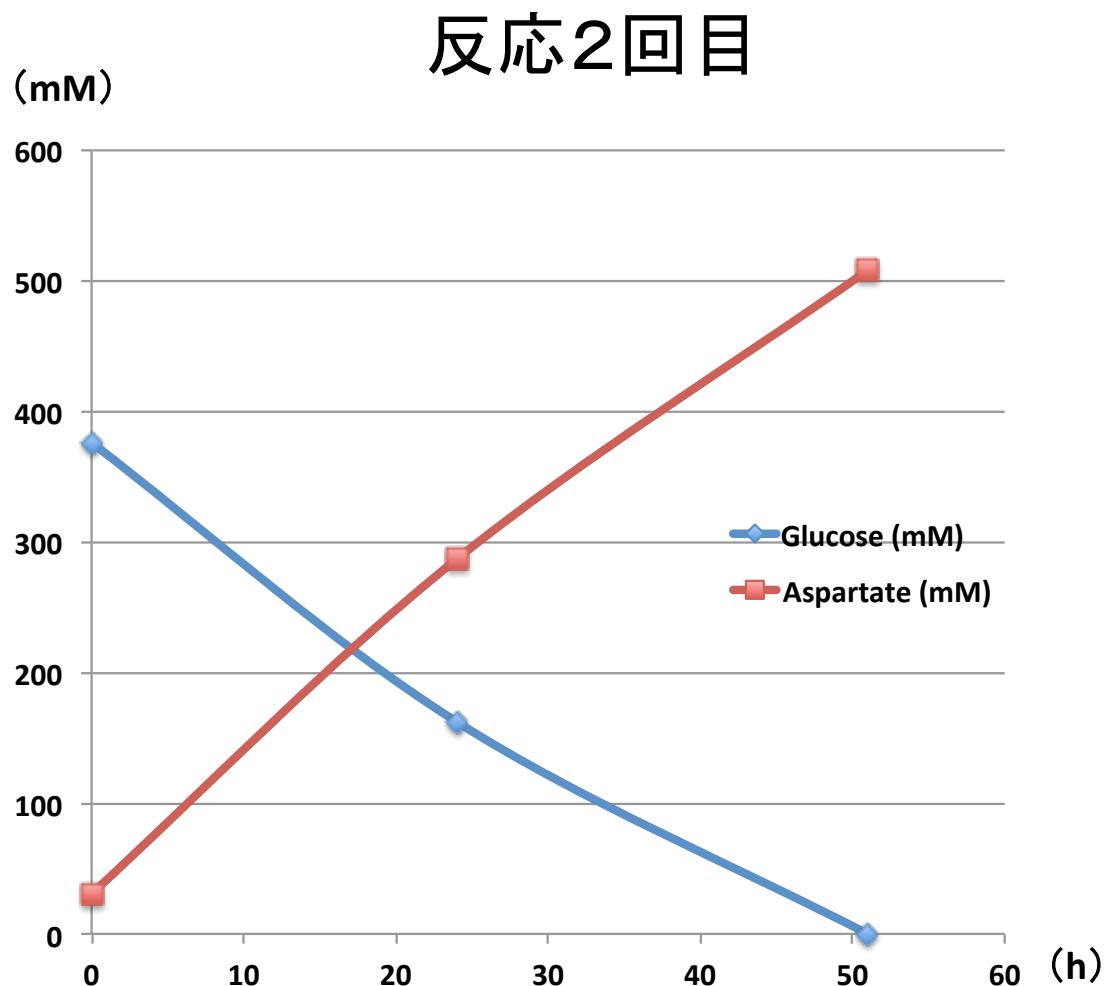


図1-1-5

## グルコース培地で培養した菌体での反応

### 反応3回目

(mM)

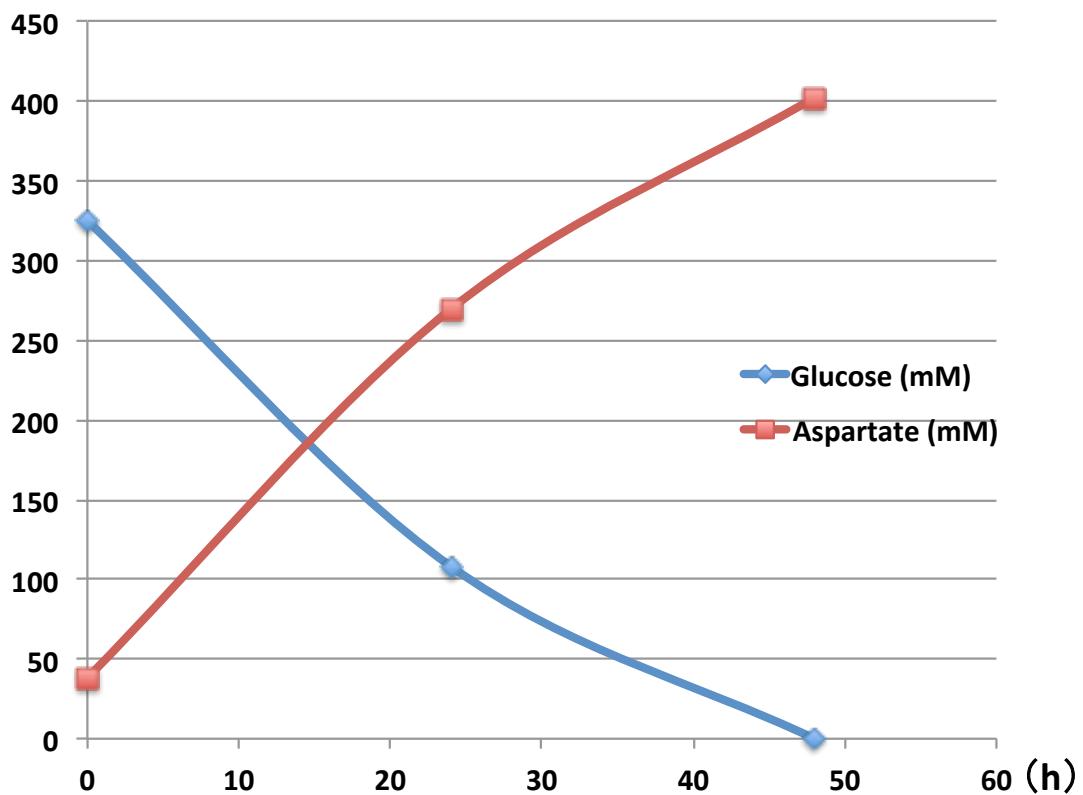


図 1-1-6

# 2019年4月での原材料費の試算

	単価 (JPY/kg)	1L jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
(NH4)2SO4	30	10.5	0.204	6.2
Yeast Extract	500	1.5	0.029	14.6
K2HPO4	150	0.75	0.015	2.2
KH2PO4	100	0.75	0.015	1.5
MgSO4·7H2O	25	0.75	0.015	0.4
Thiamine	77,500	0.0003	0	0.5
Biotin	232,500	0.0003	0	1.4
FeSO4·7H2O	20	0.009	0	0
MnSO4·H2O	1,300	0.0063	0	0.2
15N NH3(培養)	20	43.07	0.836	16.7
Antifoam	200	600ul	0.004	0.9
Glucose	40	111.1	2.157	86.3
(NH4)2CO3	20	46.51	0.903	18.1
15 NH3 (中和)	20	76.67ml	0.572	11.4
H2SO4 (36N)	20	97 ml	0.724	14.5
NaCl	5	50	0.373	1.9
活性炭	125	25	0.186	23.3
				199.8

図1-1-7

## MscSによるアスパラギン酸の排出

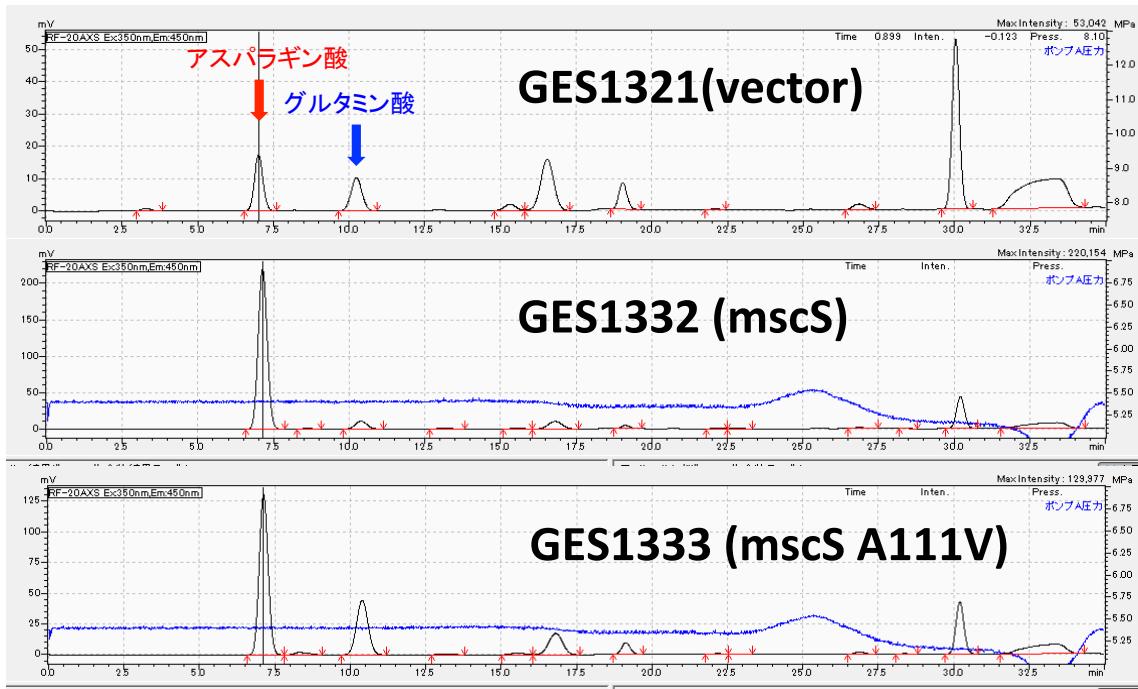
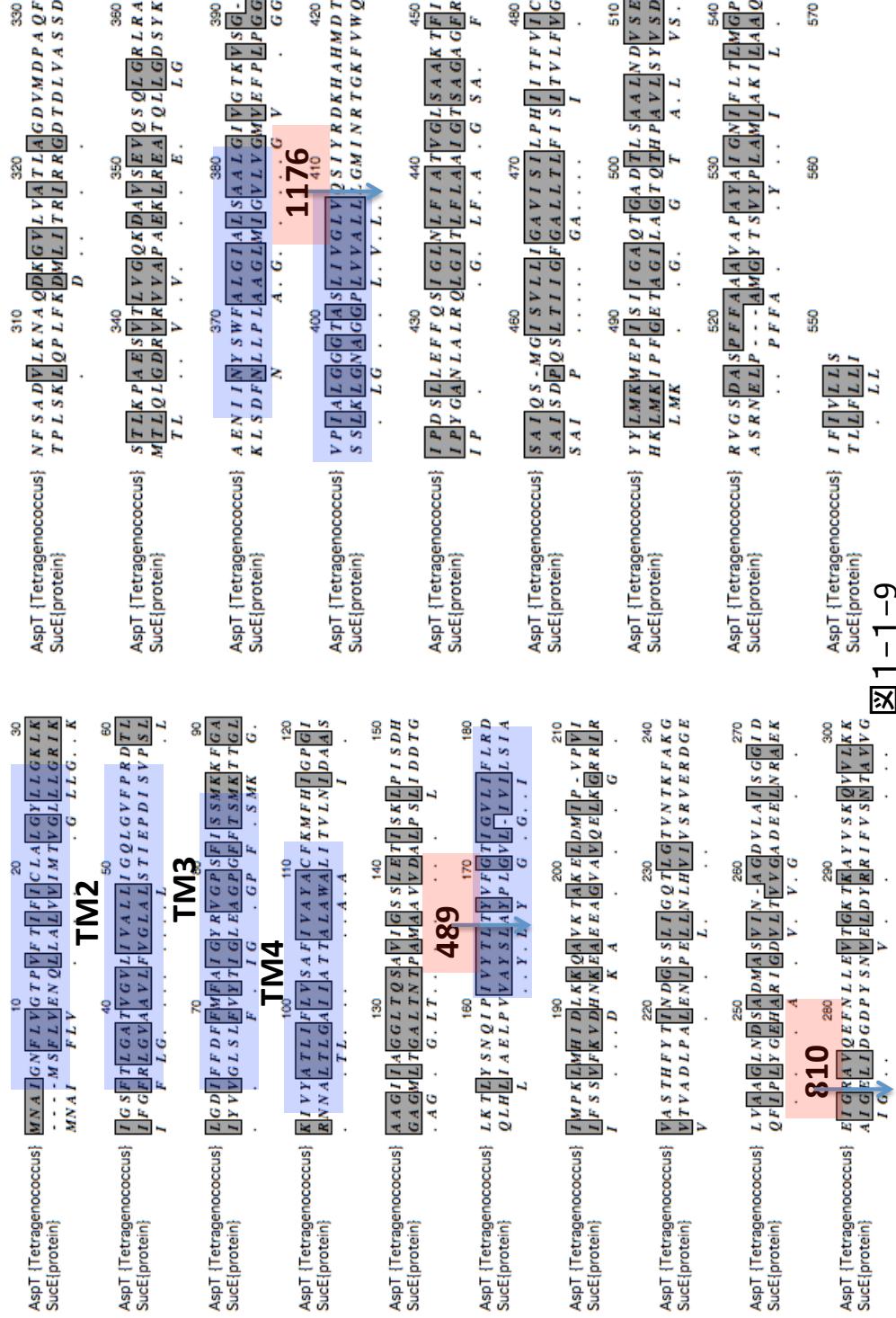


図1-1-8

## SucEとAspTの相同性



## SucEによるコハク酸の排出(予想図)

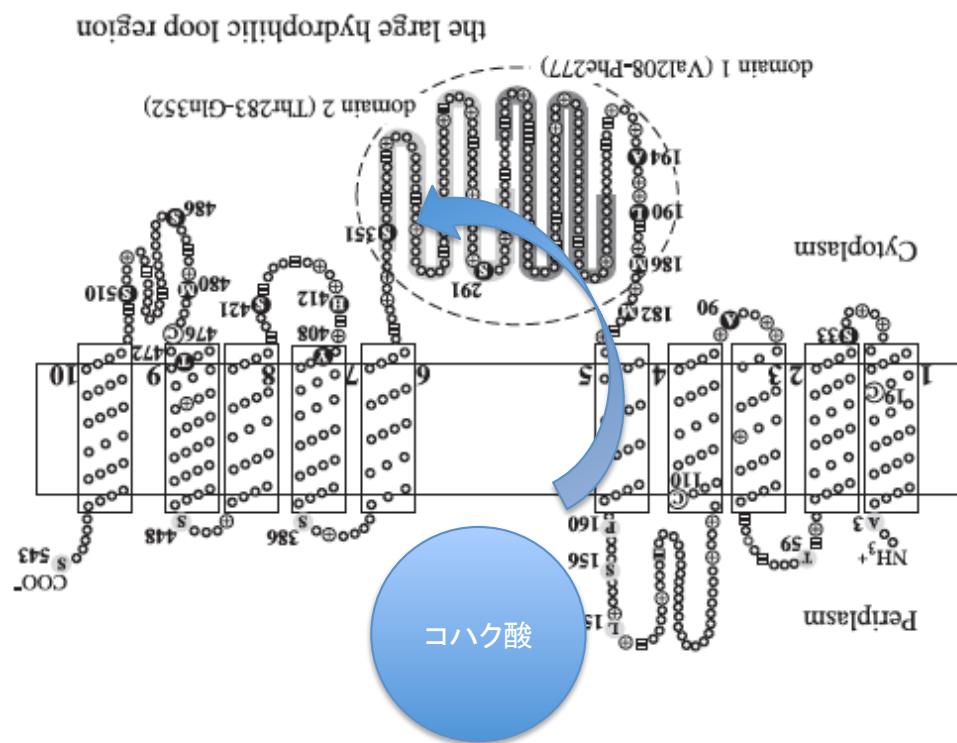


図1-1-10

# SucE-AspT融合タンパク質によるアスパラギン酸の排出

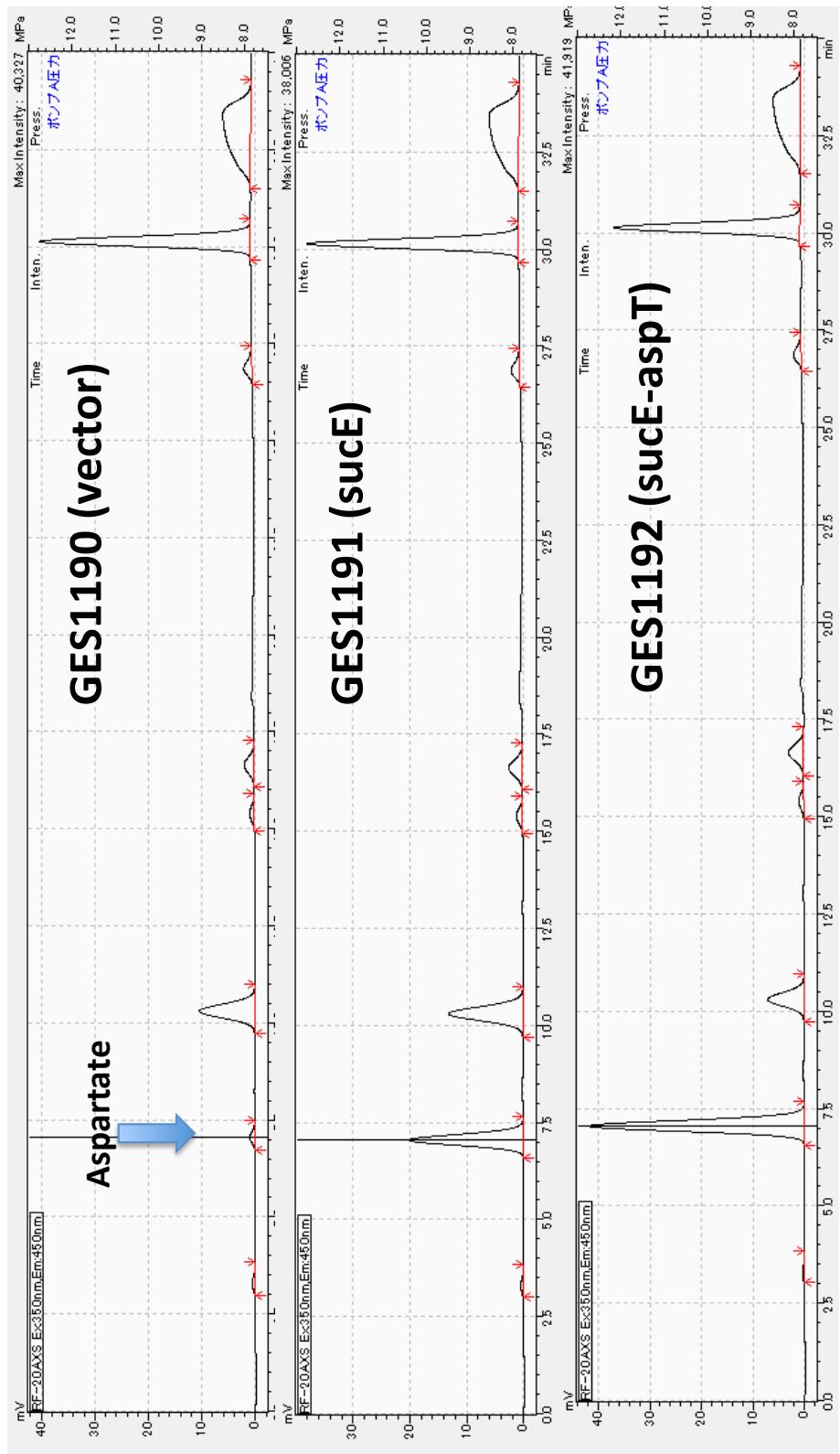


図1-1-11

# aspT遺伝子ゲノム挿入株

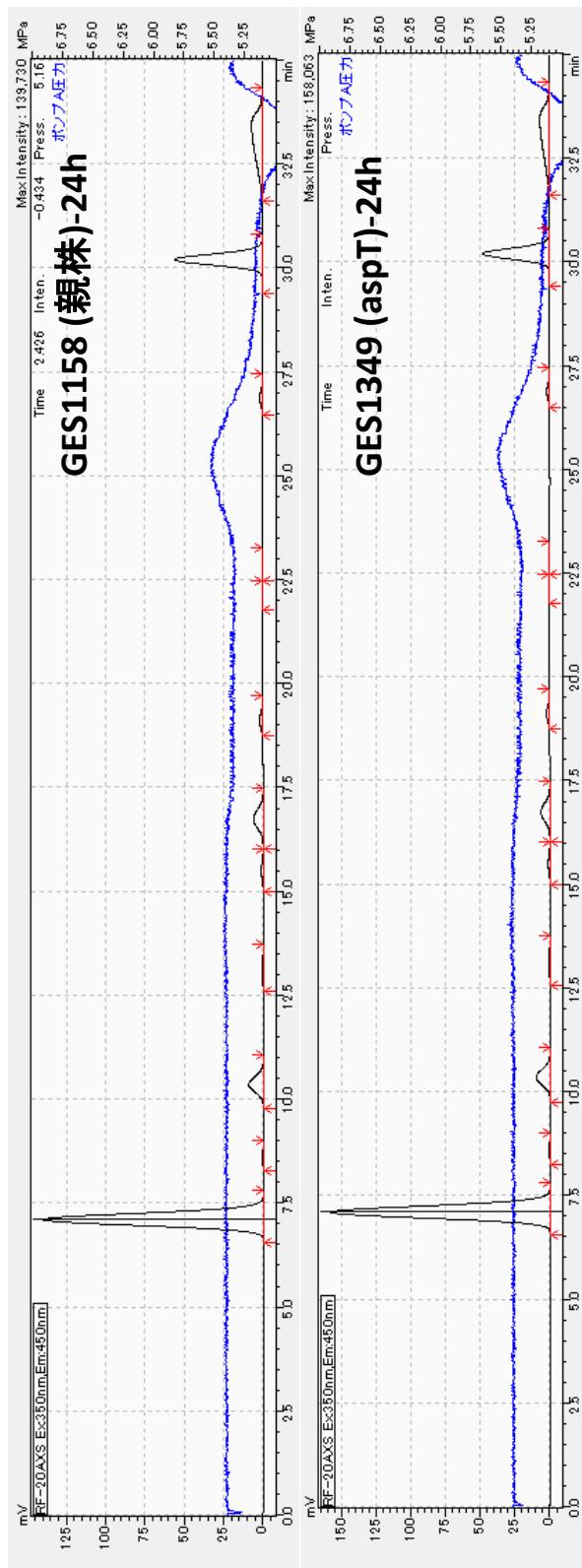


図1-1-12

# 培地代の比較

## Glucose培地

グルコース	25g
硫酸アンモニウム	7g
Yeast Extract	2g
リン酸カリウム	1g
ビタミン・ミネラル	

0.242円/L

## 廃糖蜜培地

モラセス	50g
------	-----

0.050円/L

図1-1-13

## 8連ジャー Bio Jr.8 MicroBio



図1-1-14

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (温度1)

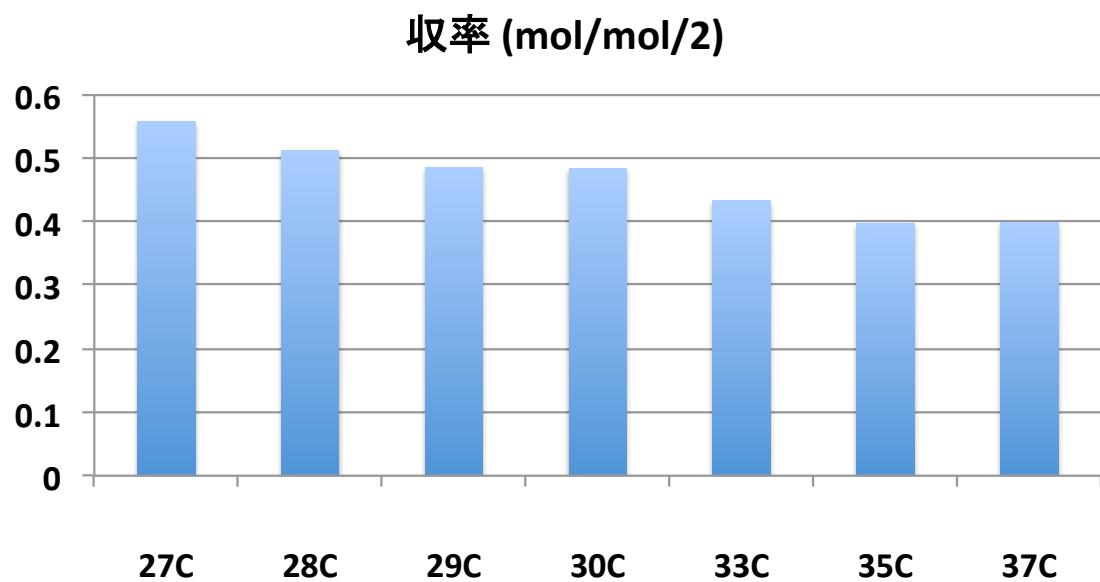


図1-1-15

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (温度2)

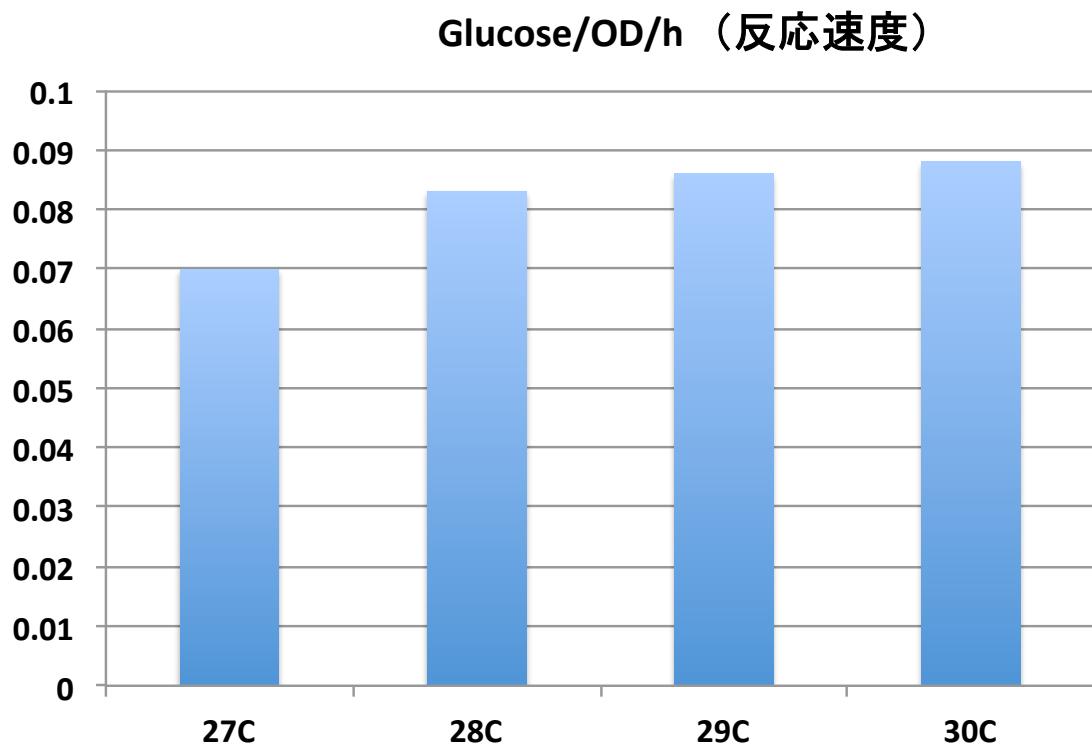


図1-1-16

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (pH)

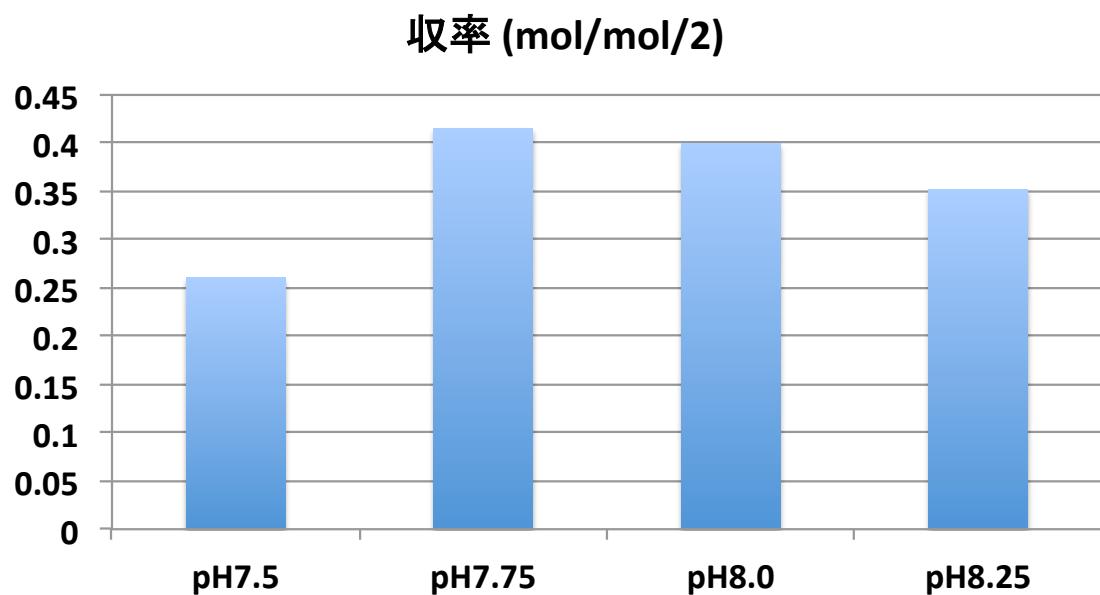


図1-1-17

# 8連ジャーによる反応条件の検討 (攪拌速度1)

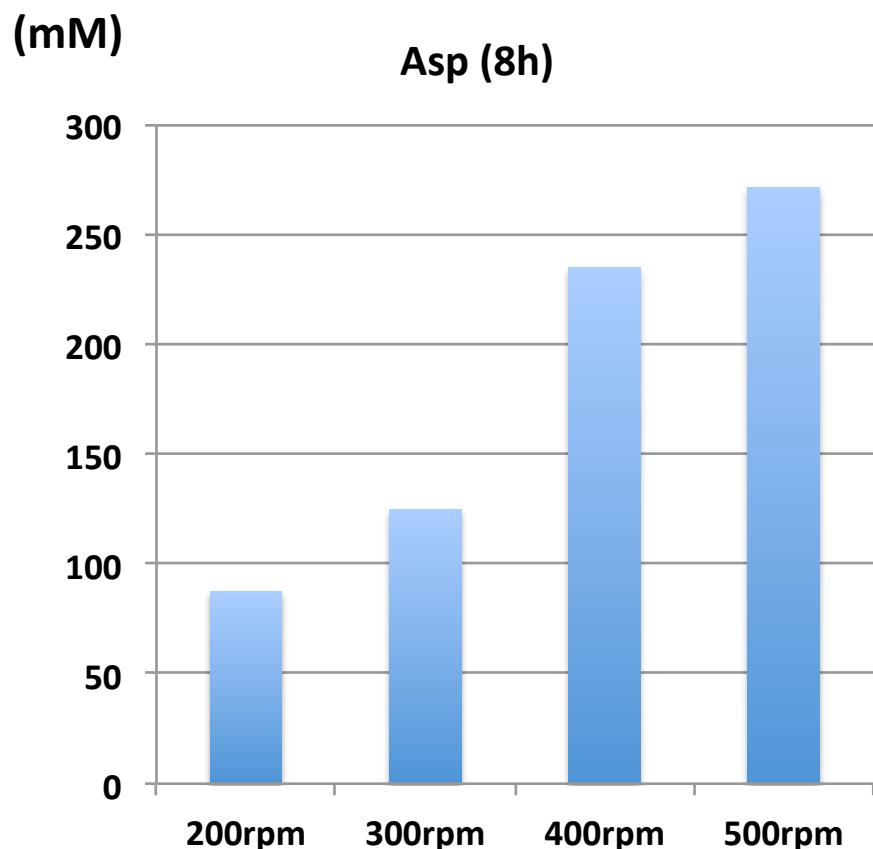


図1-1-18

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (攪拌速度2)

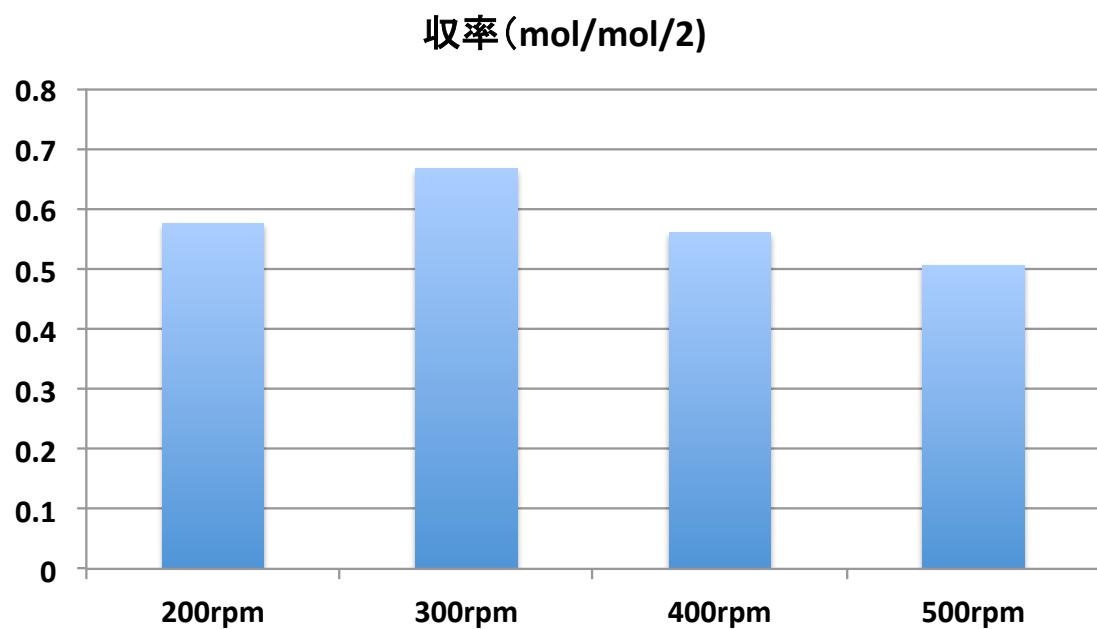


図1-1-19

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (攪拌速度3)

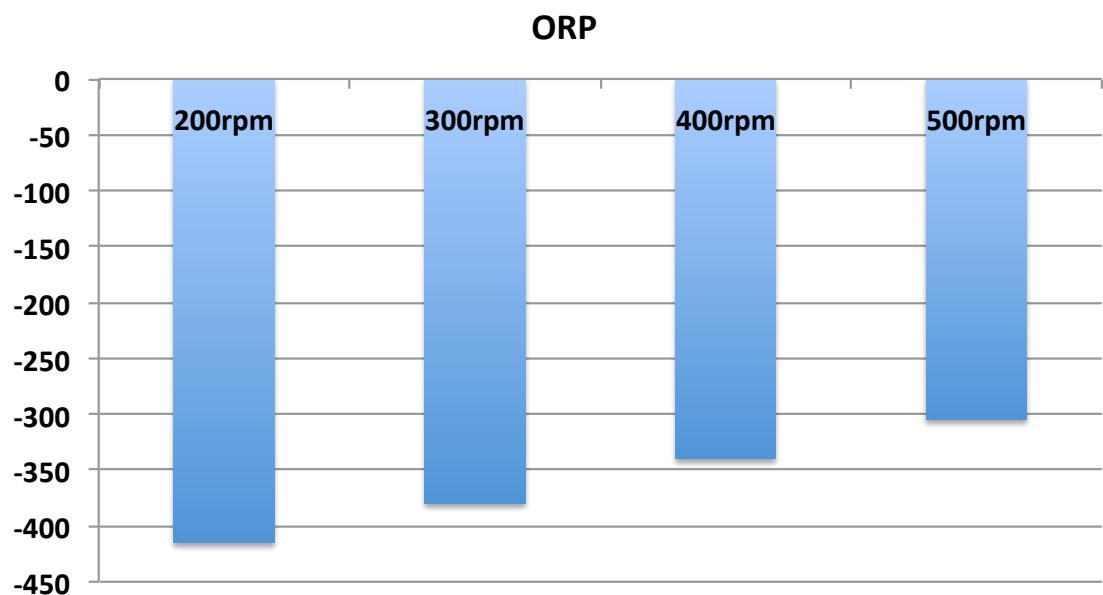


図1-1-20

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (炭酸アンモニウム)

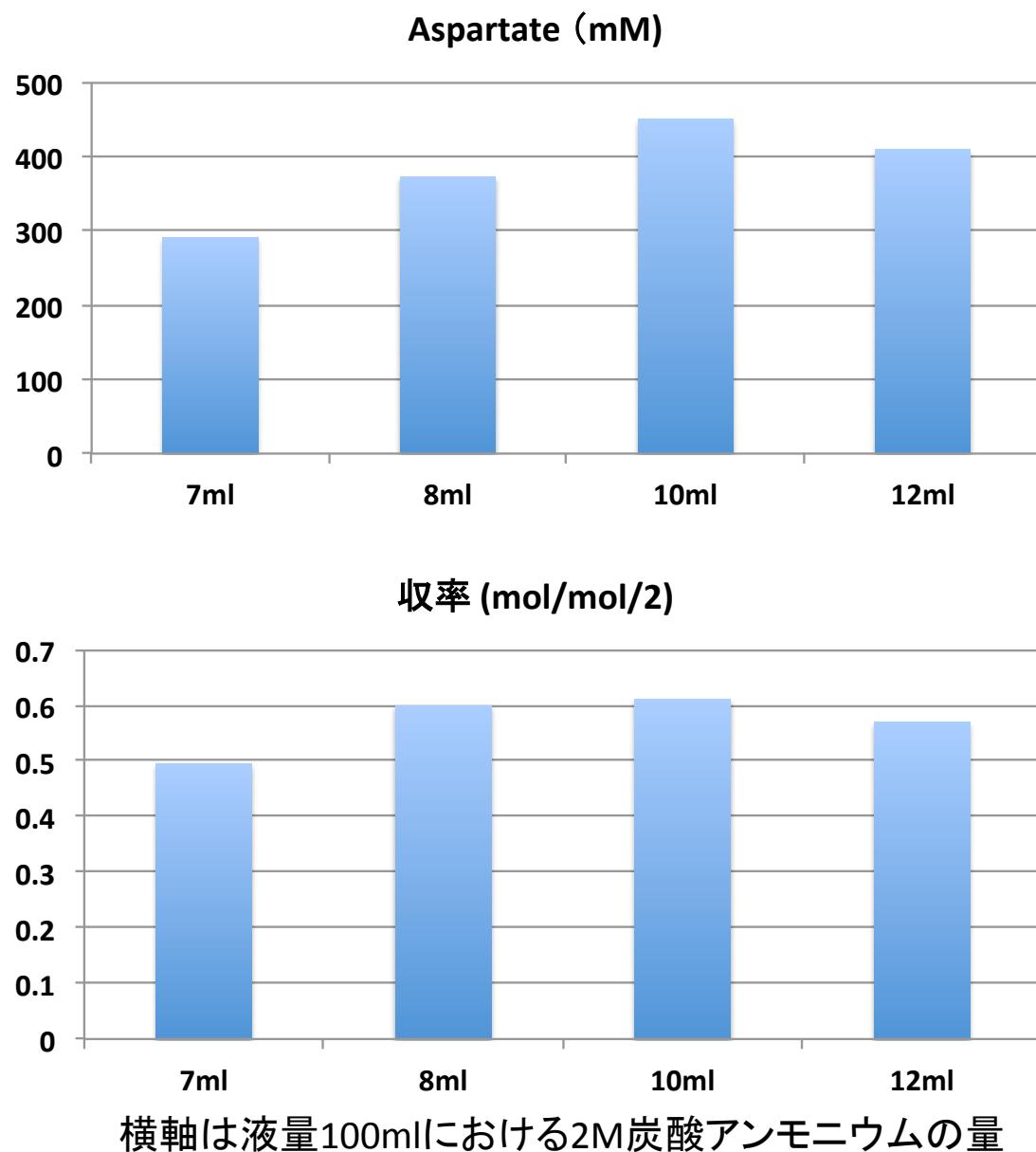


図1-1-21

## 8連ジャーによる反応条件の検討 (pH調整液)

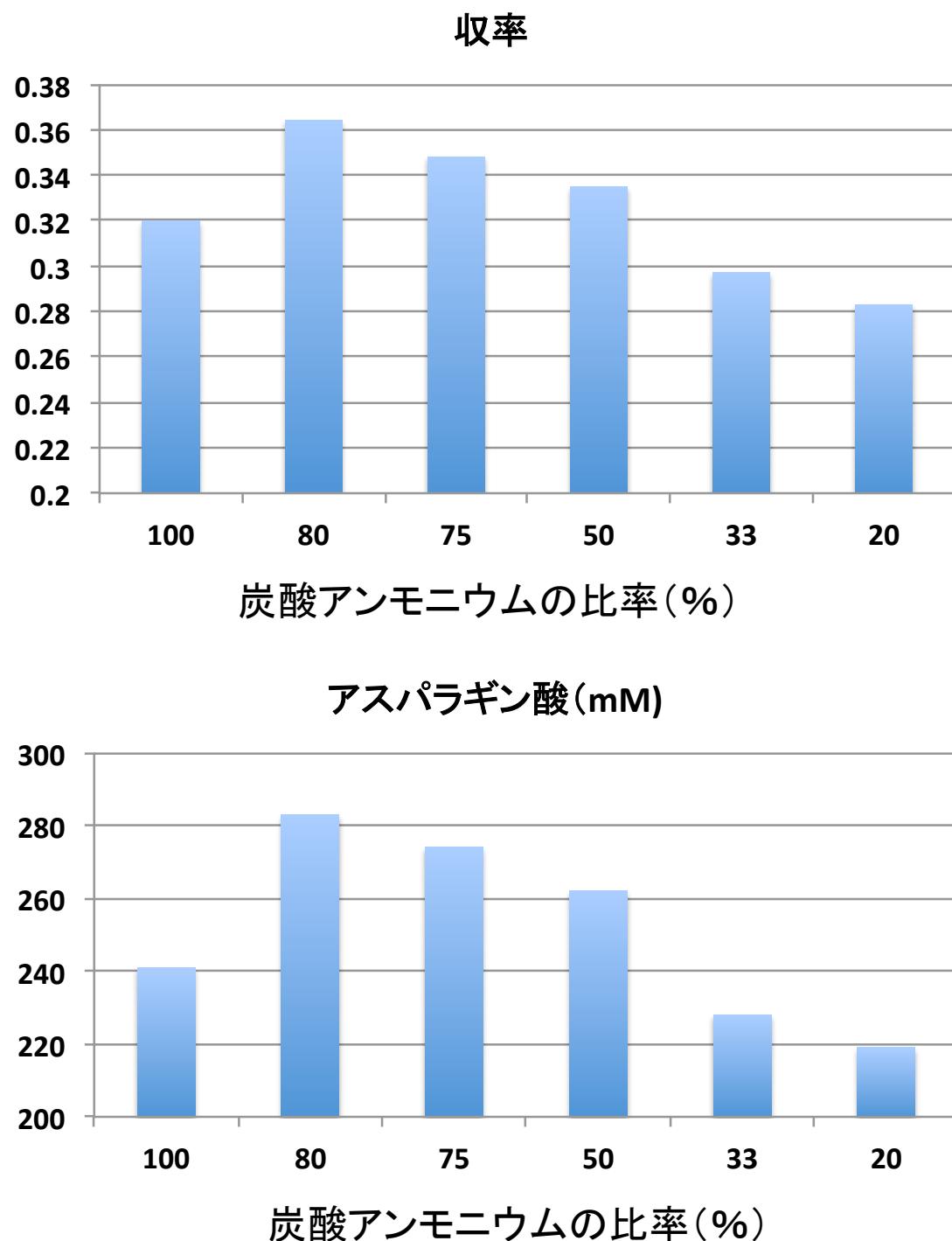


図1-1-22

# 5Lジャーでの攪拌速度の調節

グルタミン酸



アスパラギン酸



mV  
RF-20AXS E<350nm Em<450nm

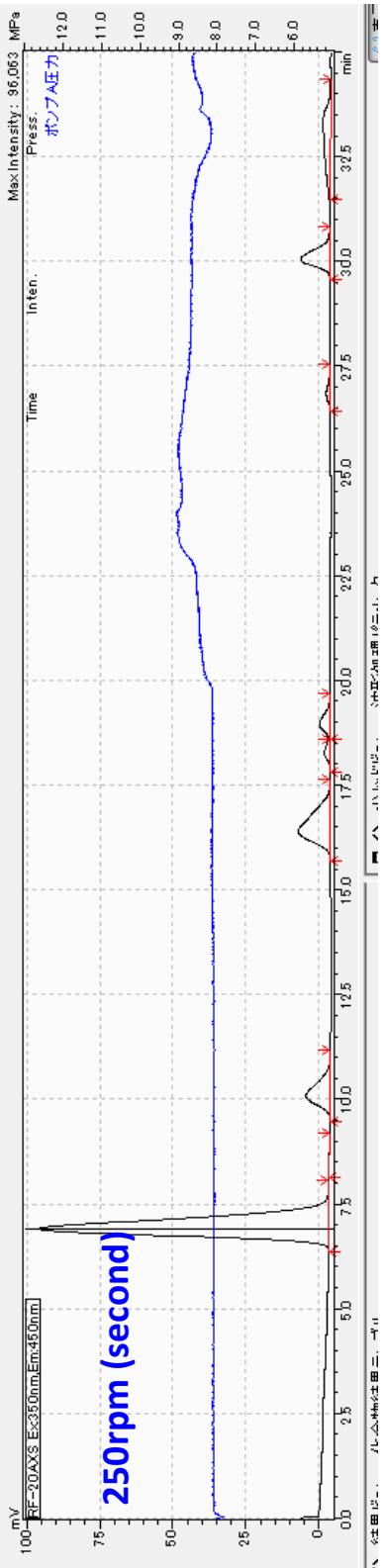
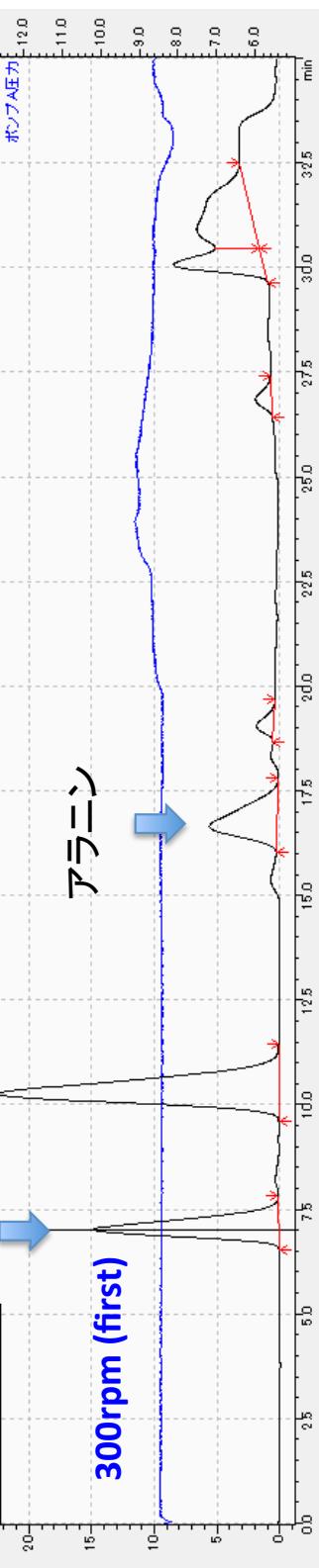


図1-1-23

## 代謝経路におけるアスパラギン酸と副生物

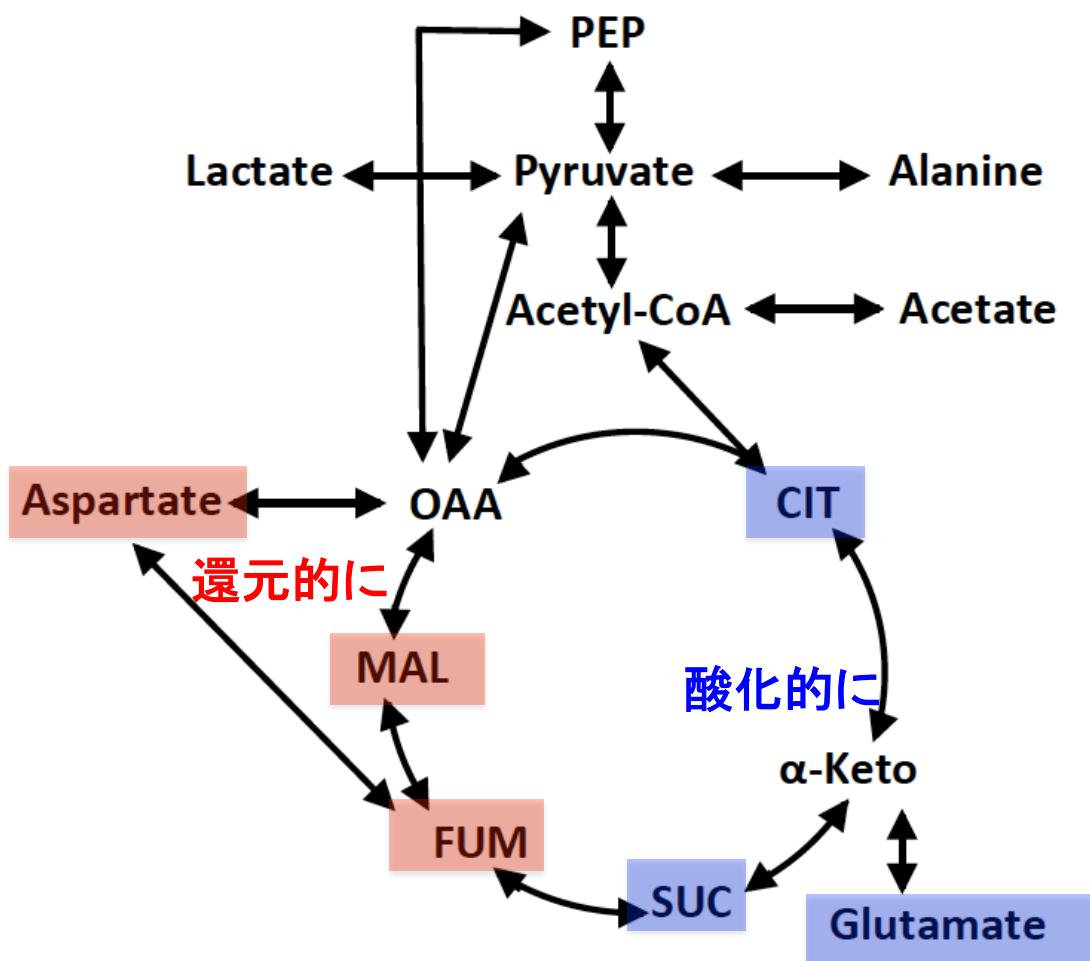


図1-1-24

# 現在の反応系

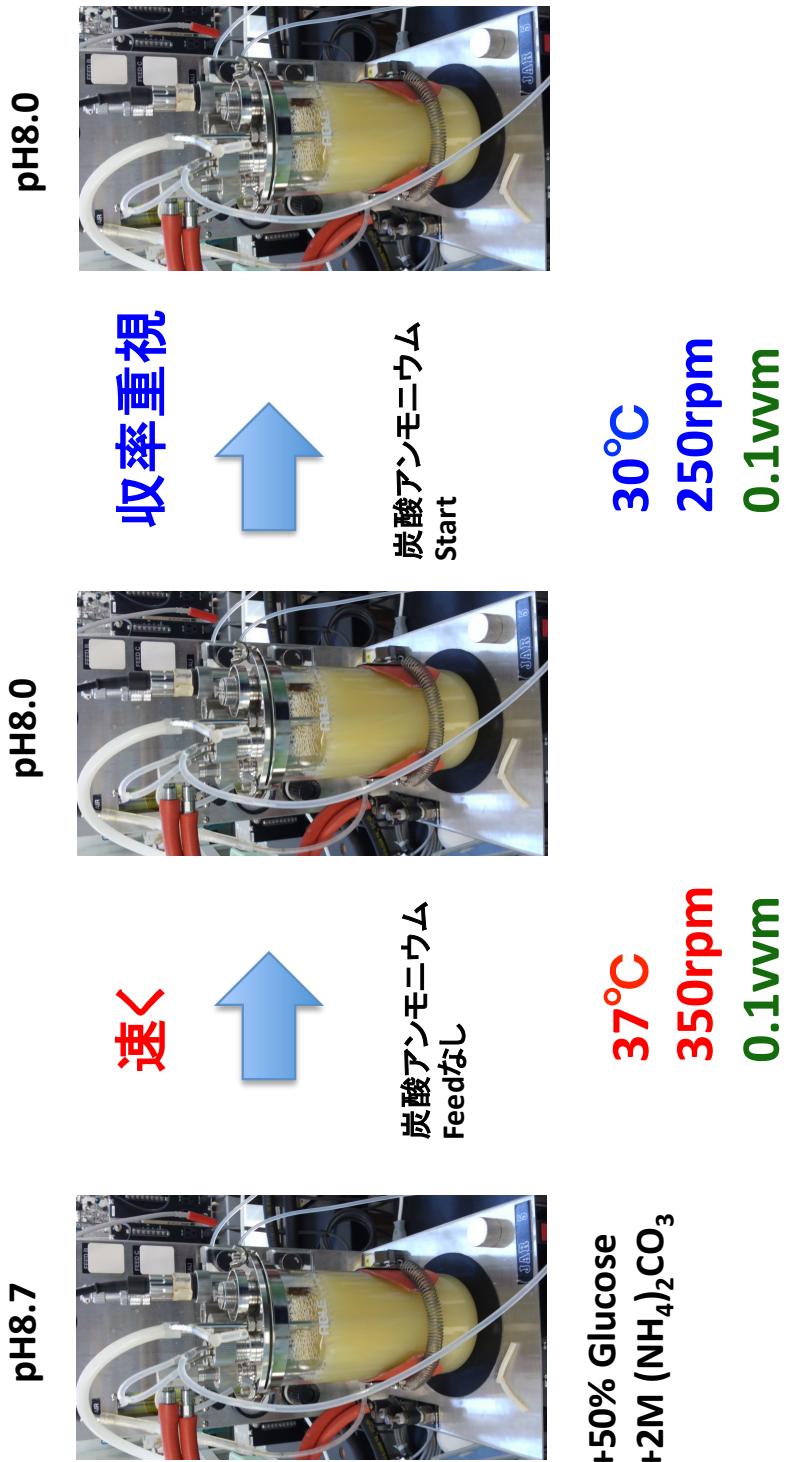
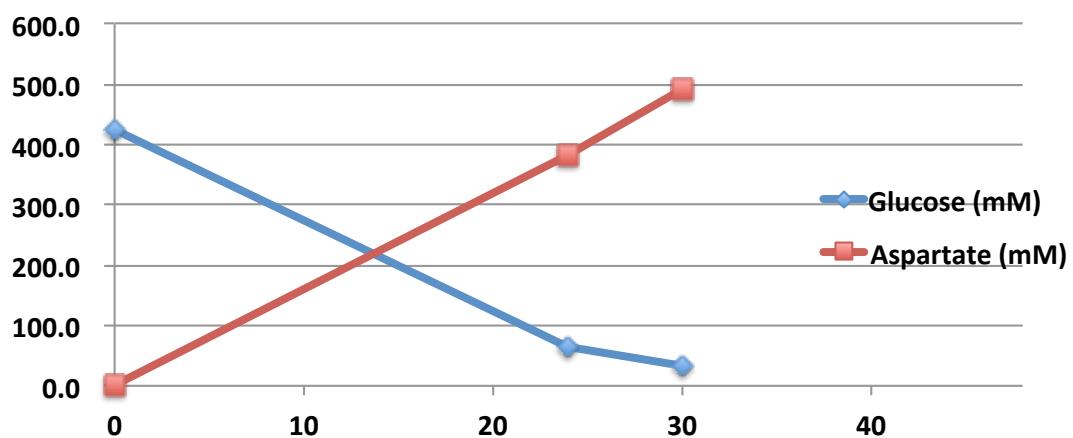


図1-1-25

## 5Lジャーでの反応実施例(1)

1回目

0.559



2回目

0.590

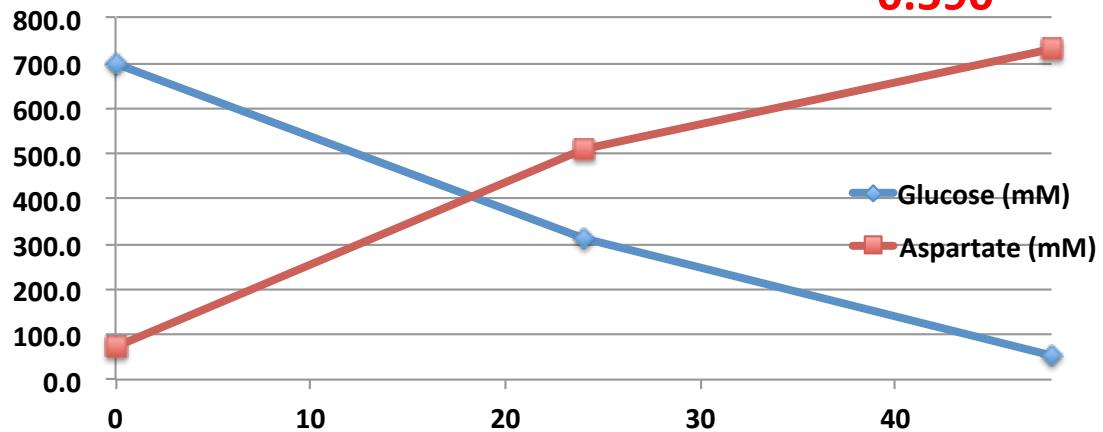
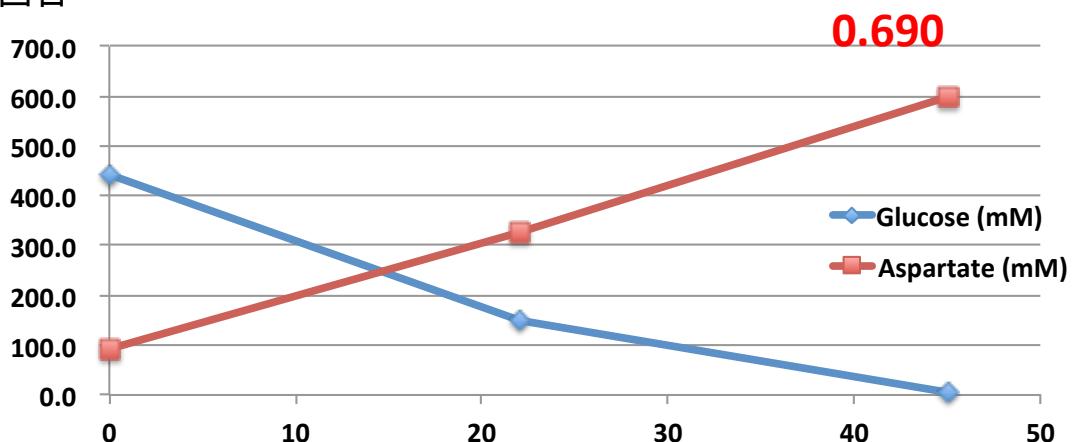


図1-1-26

## 5Lジャーでの反応実施例(2)

3回目



4回目

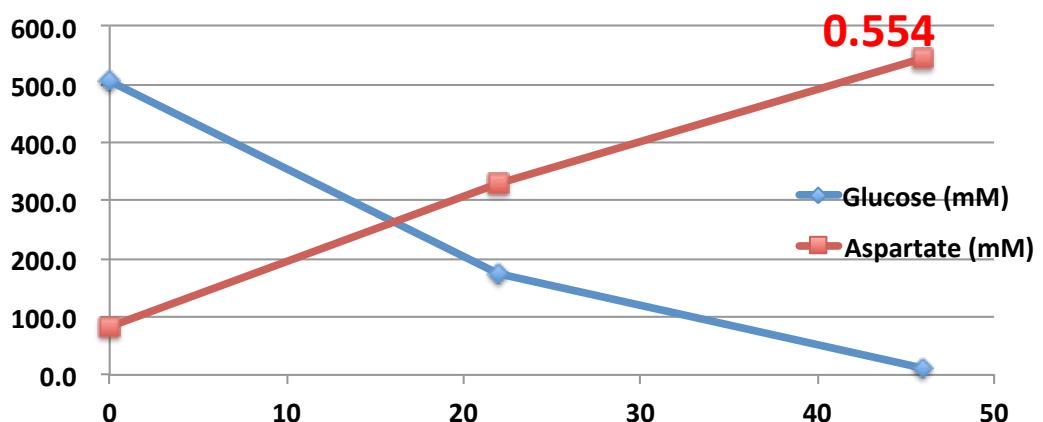


図1-1-27

## 5Lジャーでの反応実施例(3)

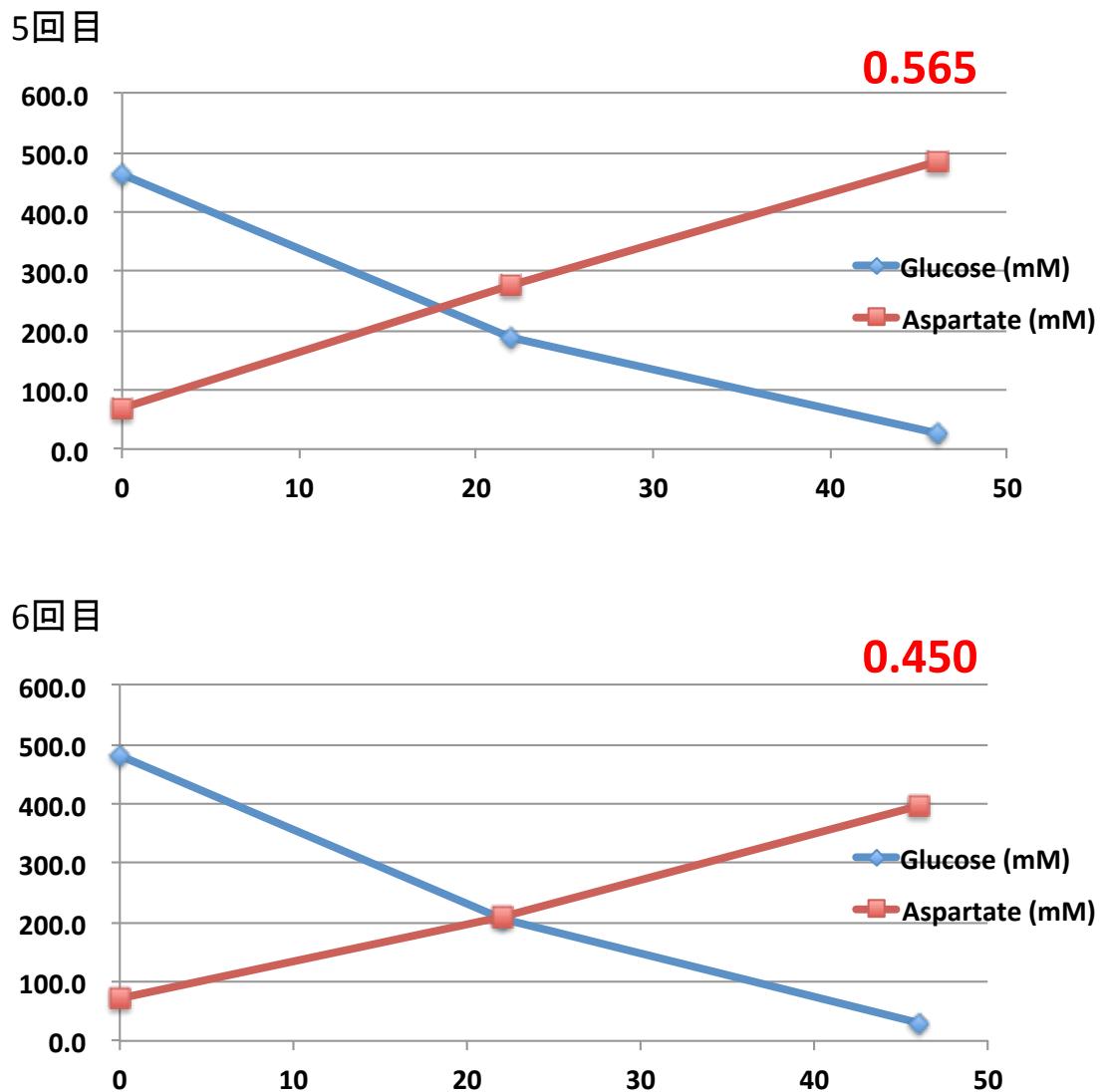


図1-1-28

# 実施例での原材料費試算(1)

	単価 (JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
Molasses	10	750	7.28	72.8
15N NH3 (培養)	20	210	2.04	40.8
Glucose	40	138	1.34	53.6
(NH4)2CO3	20	64	0.62	12.4
15N NH3(反応)	20	27.8	0.27	5.4
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8
活性炭	125	5	0.02	2.5
				194.3

	単価 (JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
Molasses	10	750	2.70	27.0
15N NH3 (培養)	20	210	0.76	15.1
Glucose	40	338.8	1.22	48.8
(NH4)2CO3	20	166.4	1.62	32.3
15N NH3(反応)	20	72.2	0.26	5.2
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8
活性炭	125	5	0.02	2.5
				137.6

	単価 (JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
Molasses	10	750	1.69	16.9
15N NH3 (培養)	20	210	0.47	9.5
Glucose	40	495.3	1.12	44.6
(NH4)2CO3	20	275.2	0.62	12.4
15N NH3(反応)	20	119.4	0.27	5.4
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8
活性炭	125	5	0.02	2.5
				98.0

図1-1-29

## 実施例での原材料費試算(2)

	単価(JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位(kg/kg)	Cost/1kg	Asp
Molasses	10	750	1.26	12.6	
15N NH3 (培養)	20	210	0.35	7.1	
Glucose	40	672.2	1.13	45.3	
(NH4)2CO3	20	371.2	0.62	12.5	
15N NH3(反応)	20	161.1	0.27	5.4	
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8	
活性炭	125	5	0.02	2.5	
				92.2	

	単価(JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位(kg/kg)	Cost/1kg	Asp
Molasses	10	750	1.03	10.3	
15N NH3 (培養)	20	210	0.29	5.8	
Glucose	40	827.1	1.14	45.5	
(NH4)2CO3	20	448.0	0.62	12.3	
15N NH3(反応)	20	194.4	0.27	5.3	
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8	
活性炭	125	5	0.02	2.5	
				88.6	

	単価(JPY/kg)	10L jar scale (g)	原単位(kg/kg)	Cost/1kg	Asp
Molasses	10	750	0.89	8.9	
15N NH3 (培養)	20	210	0.25	5.0	
Glucose	40	985.7	1.17	47.0	
(NH4)2CO3	20	522.2	0.62	12.4	
15N NH3(反応)	20	226.7	0.27	5.4	
H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8	
活性炭	125	5	0.02	2.5	
				88.1	

図1-1-30

# 原材料費試算の比較

## コスト試算(原料費のみ)

2019年4月					現在				
	単価 (JPY/kg)	1L_jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp		単価 (JPY/kg)	10L_jar scale (g)	原単位 (kg/kg)	Cost/1kg Asp
(NH4)2SO4	30	10.5	0.204	6.2	Molasses	10	750	0.89	8.9
Yeast Extract	500	1.5	0.029	14.6	15N NH3(培養)	20	210	0.25	5.0
K2HPO4	150	0.75	0.015	2.2	Antifoam	200	15	0.02	3.6
KH2PO4	100	0.75	0.015	1.5	Glucose	40	985.7	1.17	47.0
MgSO4·7H2O	25	0.75	0.015	0.4	(NH4)2CO3 15N NH3(反応)	20	522.2	0.62	12.4
Thiamine	77,500	0.0003	0	0.5		20	226.7	0.27	5.4
Biotin	232,500	0.0003	0	1.4	K2HPO4	150	5	0.006	0.9
FeSO4·7H2O	20	0.009	0	0	KH2PO4	100	5	0.006	0.6
MnSO4·H2O	1,300	0.0063	0	0.2	MgSO4·7H2O	25	5	0.006	0.1
15N NH3(培養)	20	43.07	0.836	16.7	H2SO4 (36N)	20	84	0.34	6.8
Antifoam	200	600ul	0.004	0.9	活性炭	125	5	0.02	2.5
Glucose	40	111.1	2.157	86.3					93.3
(NH4)2CO3 15N NH3(中和)	20	46.51	0.903	18.1					
	20	76.67ml	0.572	11.4					
H2SO4 (36N)	20	97 ml	0.724	14.5					
NaCl	5	50	0.373	1.9					
活性炭	125	25	0.186	23.3					
			199.8						

12

図1-1-31

## 90L培養装置での培養(1)

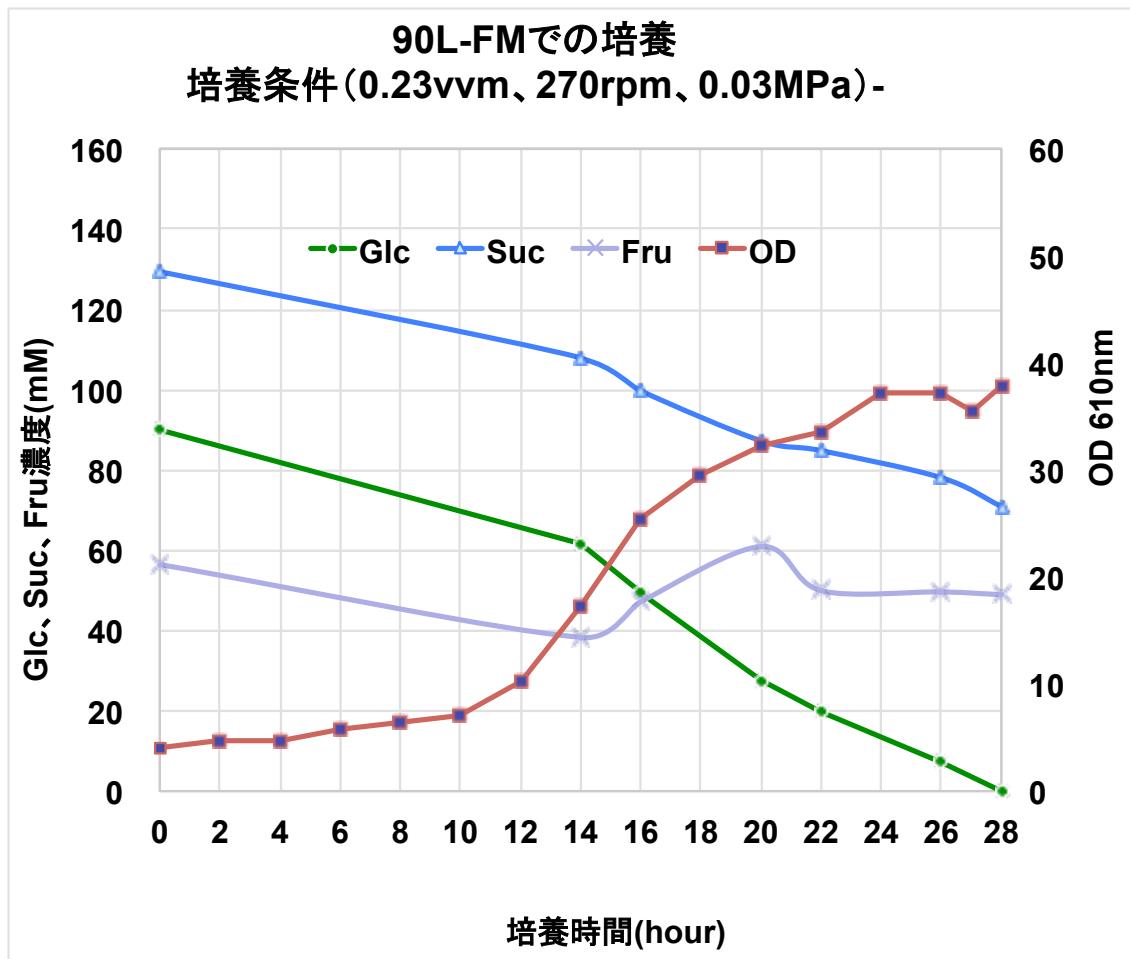
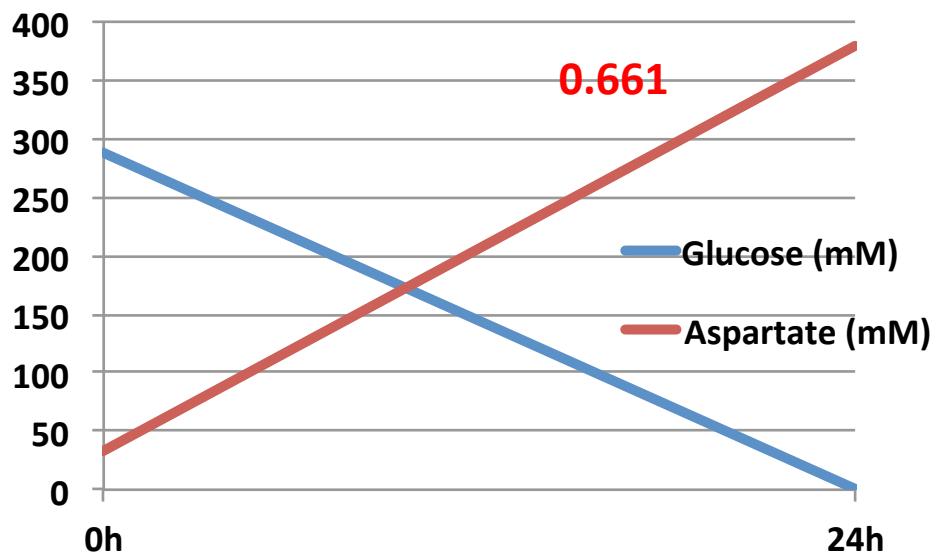


図1-1-32

# 90L(培養)-5L(反応)系(1)

反応一回目



反応二回目

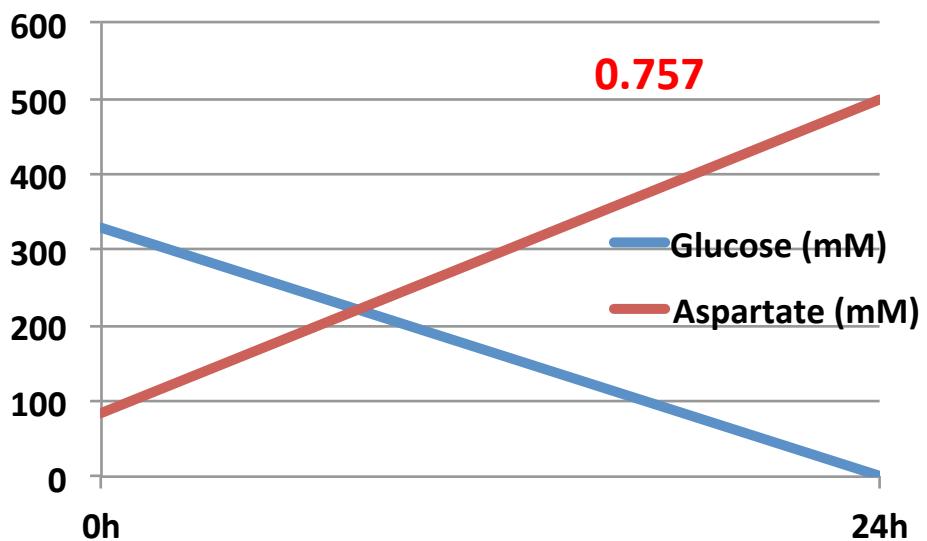
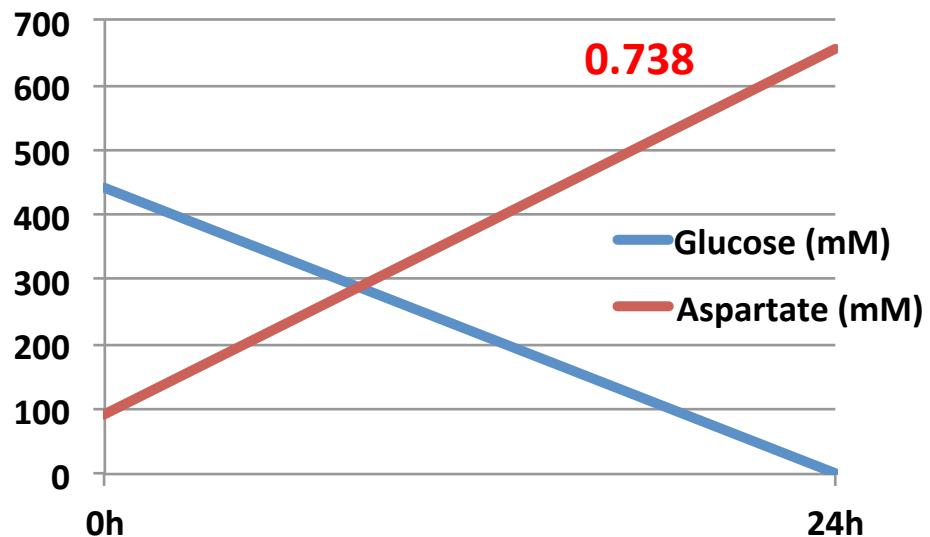


図1-1-33

## 90L(培養)-5L(反応)系(2)

### 反応三回目



### 反応四回目

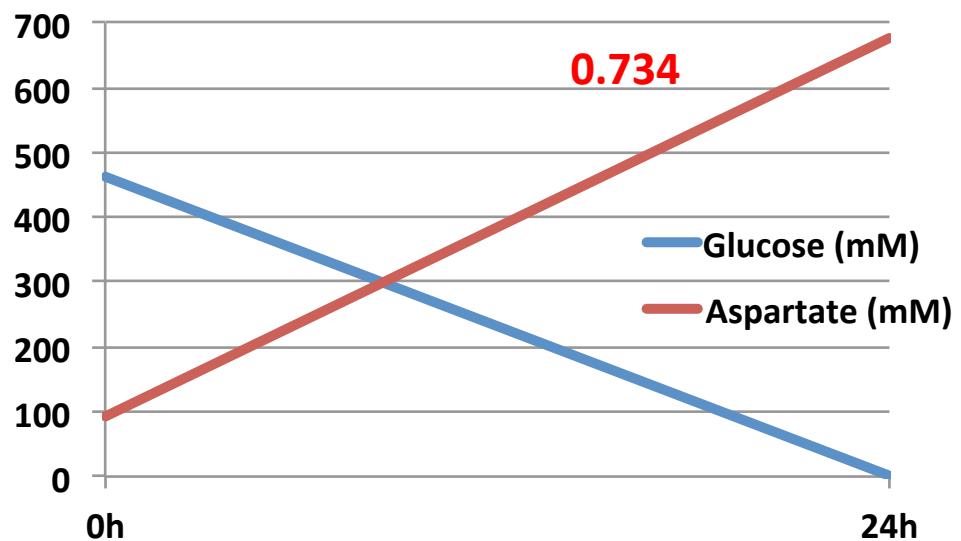
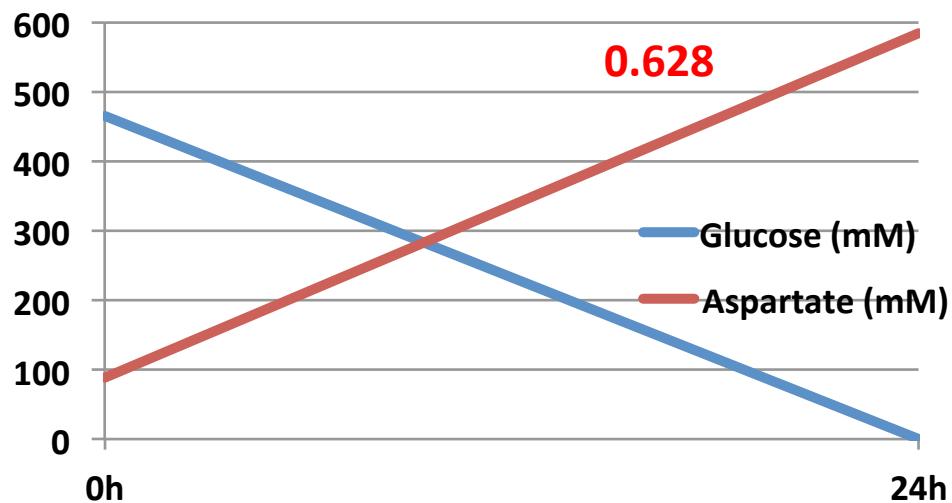


図1-1-34

## 90L(培養)-5L(反応)系(3)

反応五回目



反応六回目

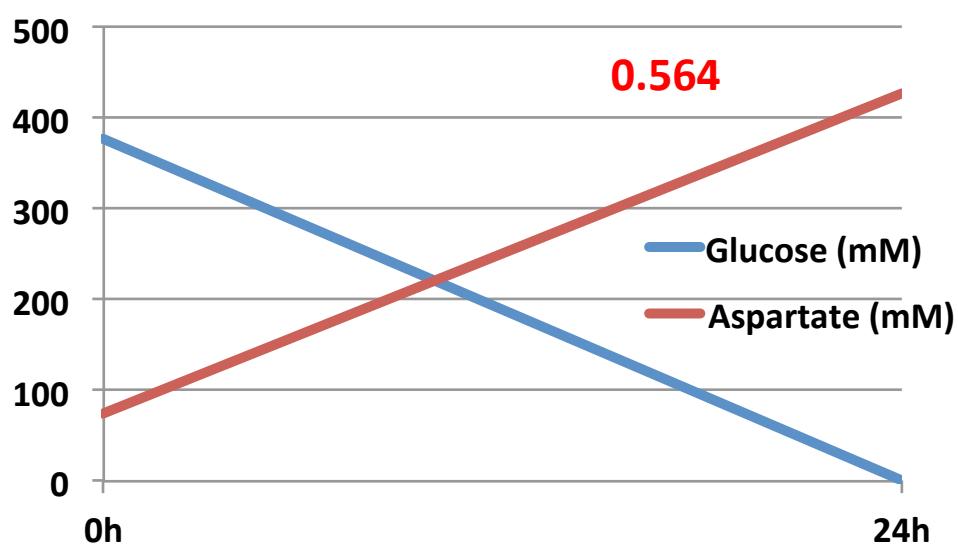


図1-1-35

## 90L(培養)-5L(反応)系(4) 6回平均

対糖収率 (g/g): 1.01

濃度(原液換算): 75.7 g/L  
(実濃度 53.5g/L)

反応時間: 22.6時間

生産速度: 3.33g/L/h

図1-1-36

## 90L(培養)-5L(反応)系(5) 反応毎-収率

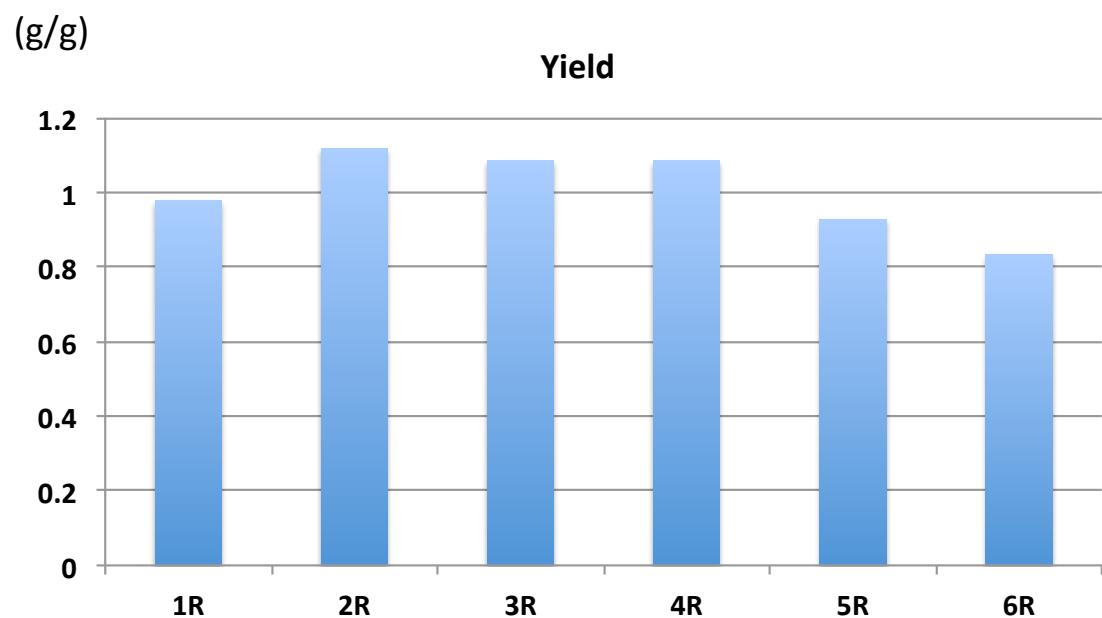


図1-1-37

## 90L(培養)-5L(反応)系(6) 反応毎-終濃度

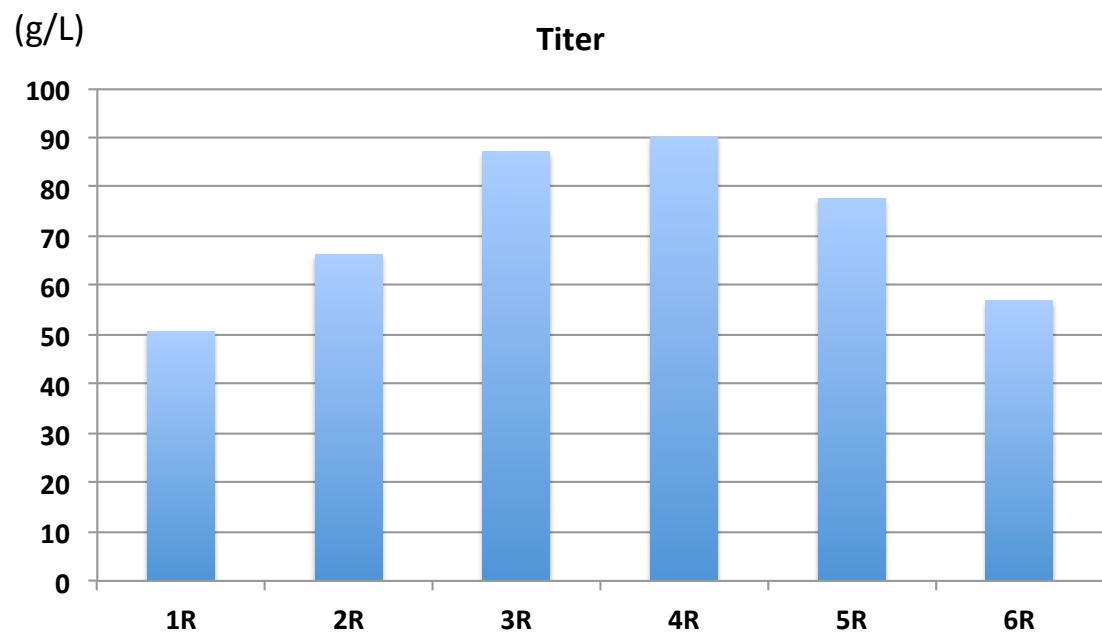


図1-1-38

## 90L(培養)-5L(反応)系(7) 反応毎-反応速度

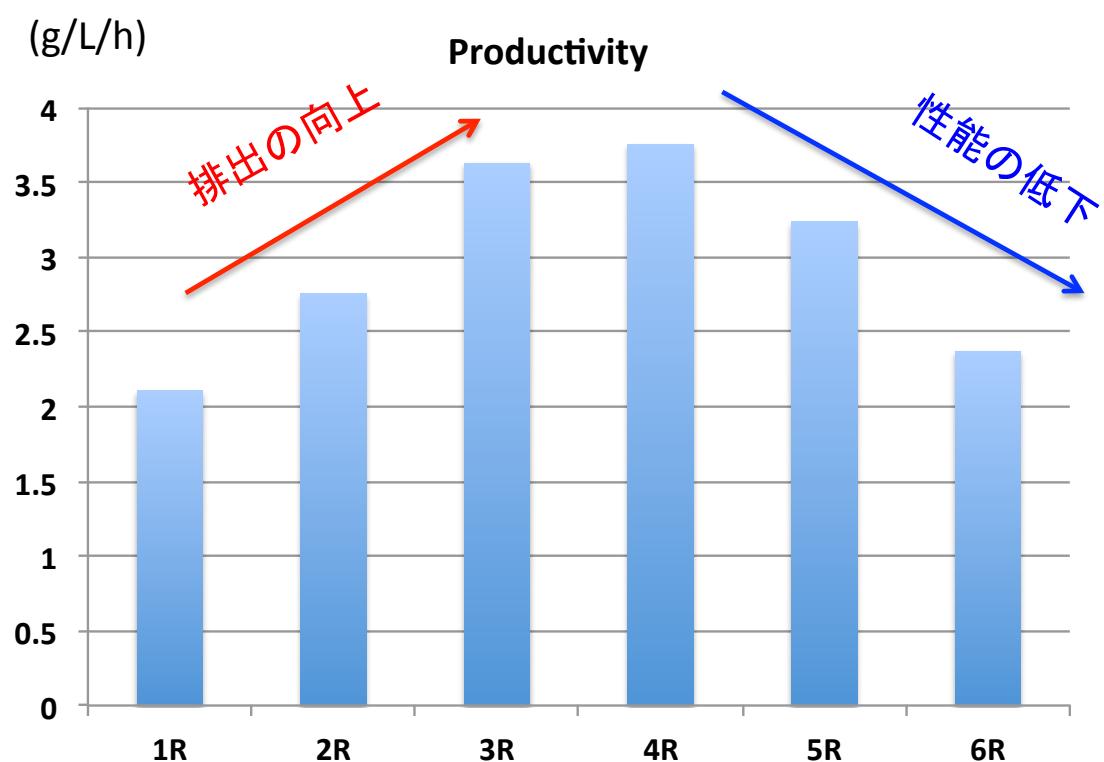


図1-1-39

## 90L(培養)-5L(反応)系(8) 反応毎-副生物

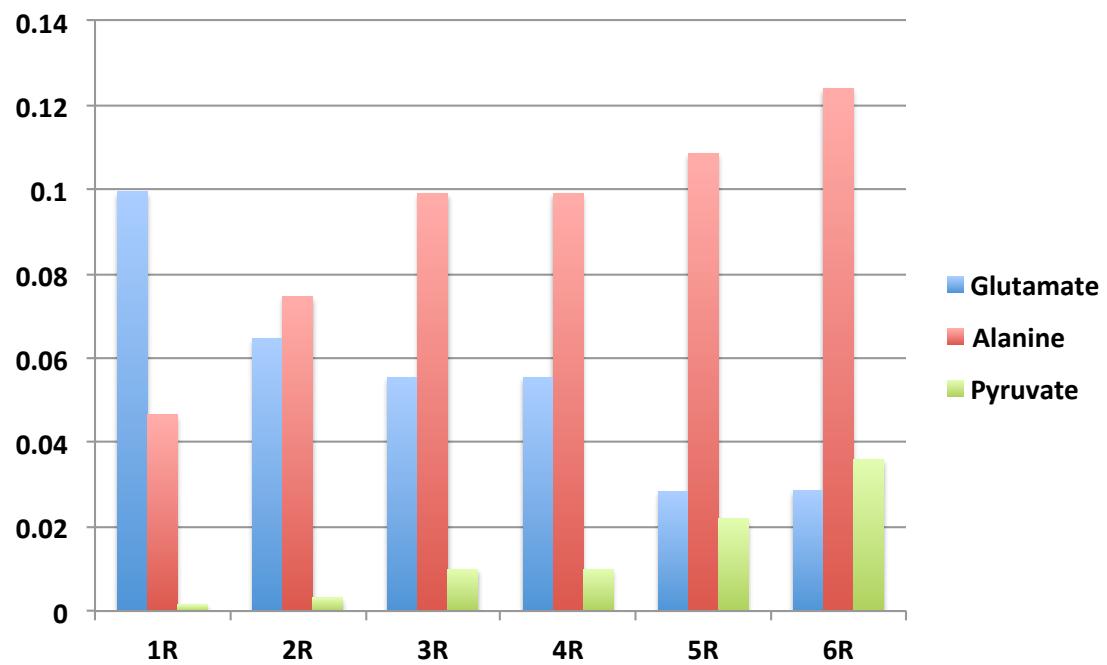


図1-1-40

## 90L(培養)-5L(反応)系(9) 反応毎-フラックス

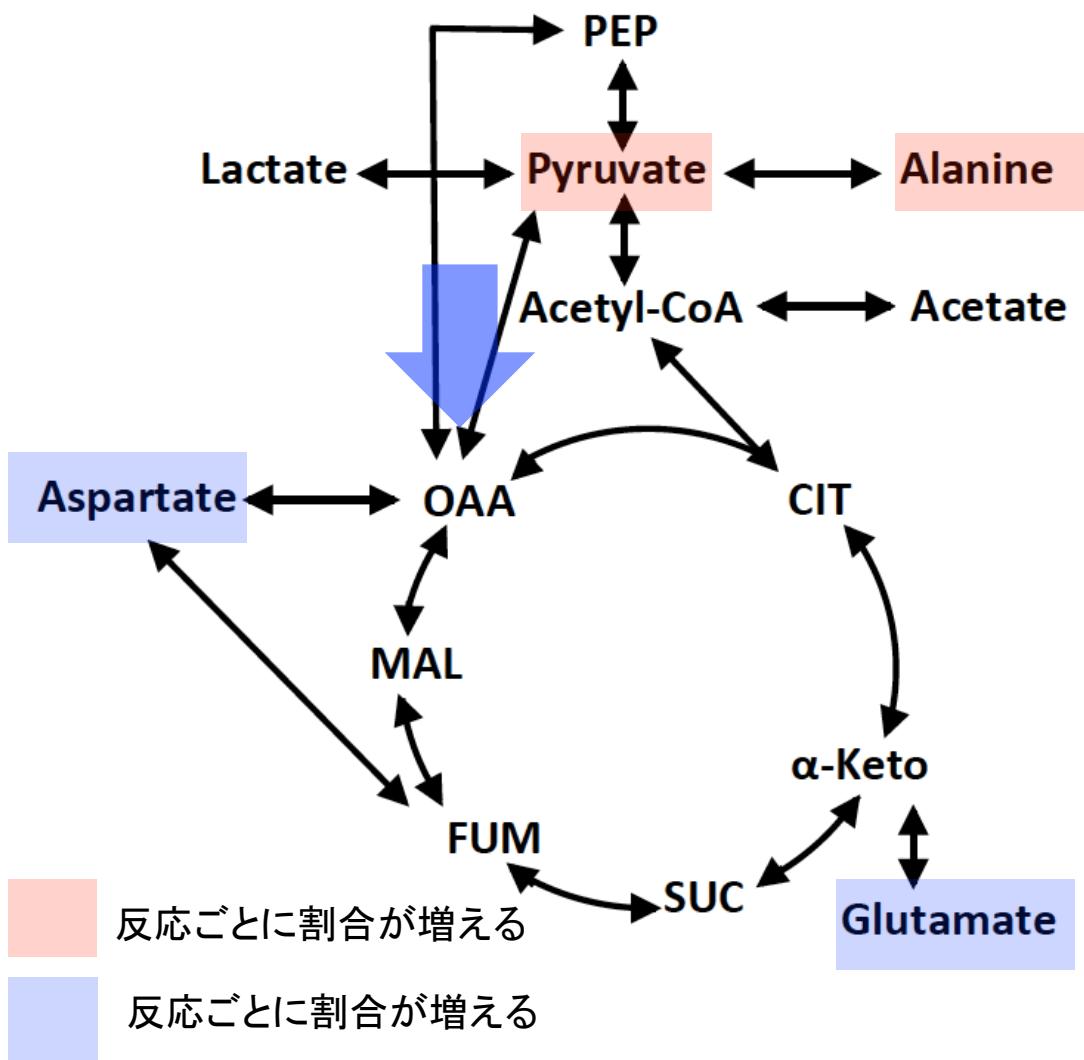


図1-1-41

## 90L培養装置での培養(2)

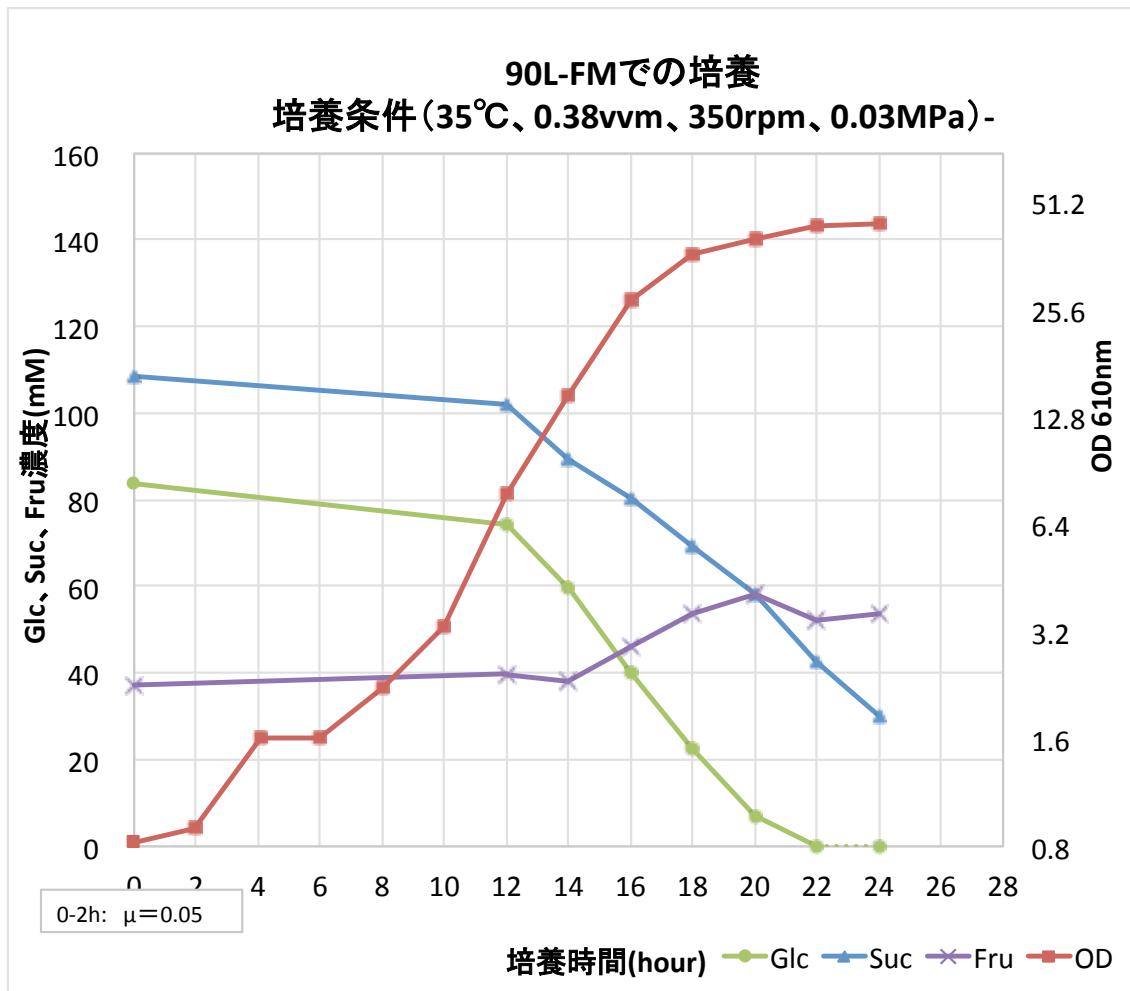


図1-1-42

## 90L(培養)-90L(反応)系(1)

反応一回目

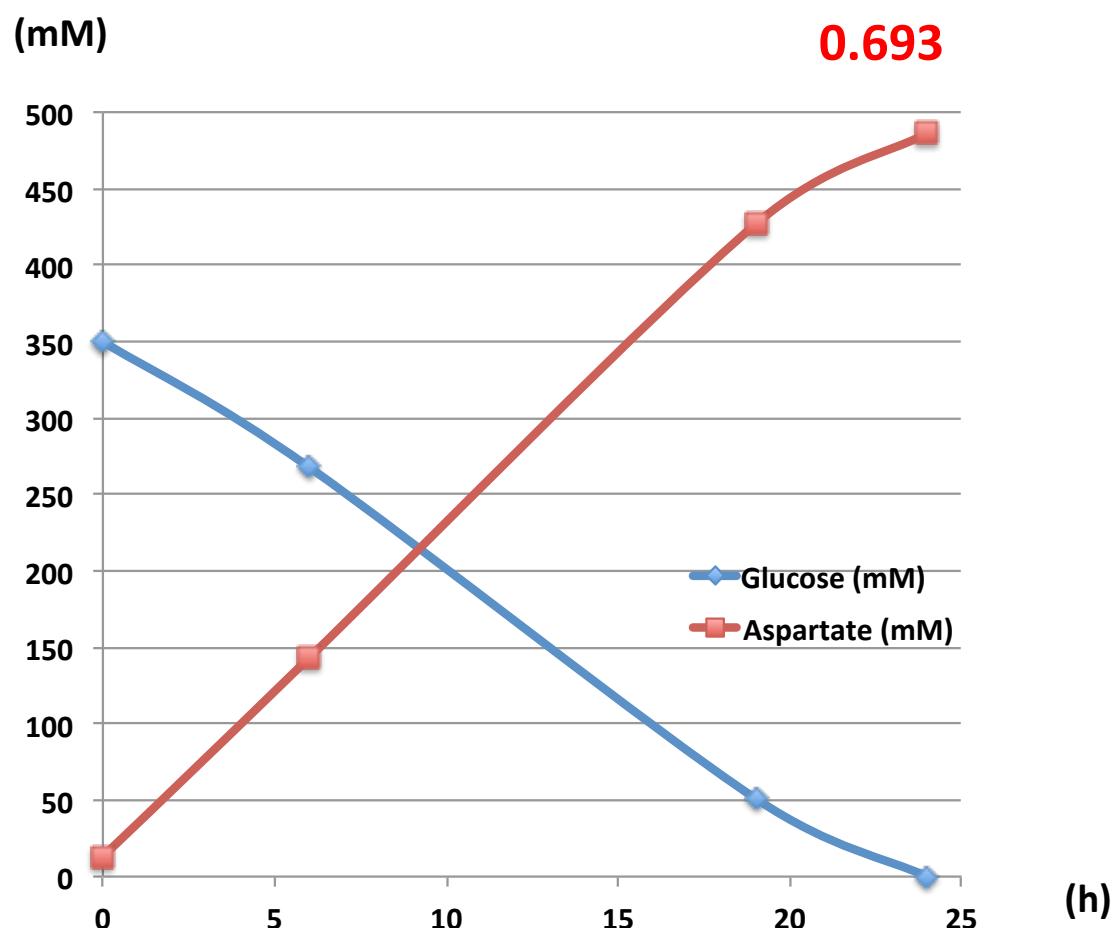


図1-1-43

## 90L(培養)-90L(反応)系(2)

反応二回目

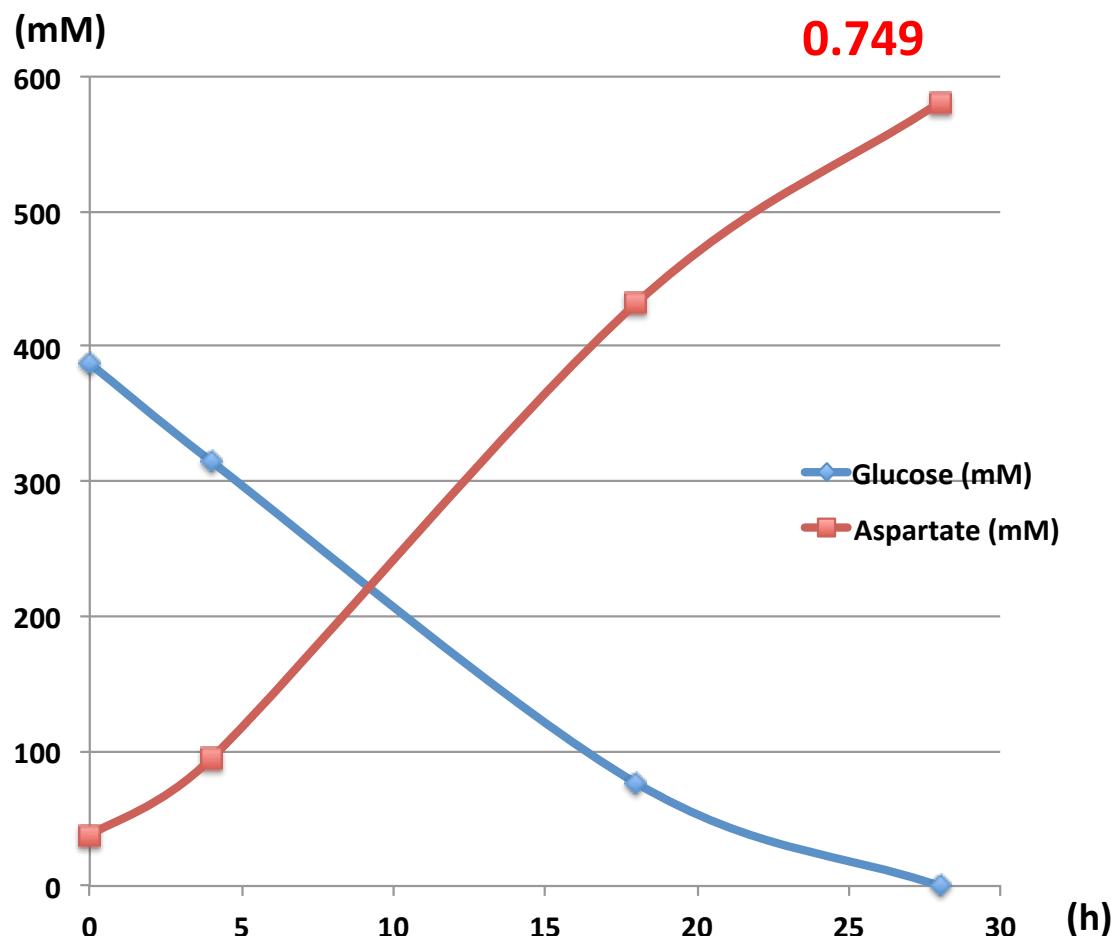


図1-1-44

## 1-2 アスパラギン酸の精製

### 序論

アスパラギン酸は、グルタミン酸と同じく酸性アミノ酸であり、その化学的性質もよく似ている。この二つのアミノ酸の特徴として、水に対する溶解度が非常に低いと言う性質がある。溶解度は、アスパラギン酸が20°Cで0.42(g/100g)、グルタミン酸が25°Cで0.84(g/100g)であり難容性であることがわかる。他方、イオンの状態であるアスパラギン酸ナトリウムの溶解度は、25°Cで67(g/100g)であり、グルタミン酸ナトリウムが60(g/100g)であり、非常によく水に溶ける。アスパラギン酸、グルタミン酸の等電点はどちらも酸性側に偏っており、アスパラギン酸がpH2.8、グルタミン酸がpH3.2である。

この性質を利用した有力な晶析法として等電点晶析がある(1)。すなわち、中性溶液ではアスパラギン酸もグルタミン酸もイオンとして存在するため、溶解度が高く高濃度の溶液を調整することができる。これに強酸を添加することで等電点までpHを下げるとき溶解度が極端に下がるため、グルタミン酸、あるいはアスパラギン酸がフリーの状態で析出する。実際、発酵法が確立しているグルタミン酸ナトリウム(MSG)は、最初の晶析は等電点晶析でグルタミン酸の形で一度結晶化して、その後中和して水をとばしてグルタミン酸ナトリウムを結晶化させる(図1-2-1)。

発酵液には、培地成分の他にも発酵過程で生産される様々な副生物が存在する。特に細菌の培養にモラセスなどの着色が目立つ培養液を使う場合、如何にして着色成分を取り除くかと言う問題は決して小さな問題ではない。グルタミン酸ナトリウムを精製するのに、一度グルタミン酸として等電点晶析する技術は、着色や副生物を取り除く非常に効果的な方法である。

本事業では、最終的な精製産物はアスパラギン酸ナトリウムではなく、アスパラギン酸であるため、グルタミン酸ナトリウムと全く同じ精製プロセスを採用することは出来ない。また本事業では、精製されたアスパラギン酸はポリアスパラギン酸を製造する原料となるため、ポリマー化が可能な純度が必要であり、しかも高吸水性を出すためには、かなりの長さのポリアスパラギン酸の製

造が可能でなければならない。ポリマー化の反応を妨げる副生物の混入は出来る限り抑えていかなければならない。つまり安価な方法で高品質のアスパラギン酸を精製することが本事業の課題ということになる。

### 1-2-1 本事業前のアスパラギン酸精製プロセスについて

本事業が始まる前は、食品添加物規格を満たすアスパラギン酸の精製（純度98%以上）を目標にして精製プロセスの確立を目指していた。本事業が始まる前はグルコース培地で培養をしていたが、それでも一回の等電点晶析では、食品添加物規格を満たすことは難しく、二回の等電点晶析を行っていた。本事業が始まる前の精製のプロセスは以下のようになる。

反応液濃縮 → 等電点晶析 (I) → 洗浄 → 中和 → 活性炭処理  
→ 沔過 → 等電点晶析 (II) → 洗浄 → 乾燥

このように、等電点晶析を二度行い、しかもかなり念入りな洗浄を行えば、食品添加物規格を満たすアスパラギン酸の精製は可能であり、本事業が始まる前から、食品環境検査協会（財団法人）による食品添加物規格には合格していた。しかし、洗浄液などの再利用を行っても精製収率は8割に届かないと言う状態であった。図1-2-2は本事業が始まる前の地点でのマテリアルバランスと精製収率を示した。

### 1-2-2 アスパラギン酸濃度と精製収率

アスパラギン酸の溶解度は0.42であるので、これをもとに1Mのアスパラギン酸溶液を1Lで等電点晶析すると原理的には4.2gのアスパラギン酸しか上澄みには残らない。溶液には133gのアスパラギン酸が存在するので、一回目の精製で $(133 - 4.2) / 133 = 0.968$ という高い収率が期待できる。しかし実際にはこのような高い回収率は実現できていない。溶解度から換算される上澄みのアスパラギン酸濃度は31.6mM程度であるが、実際の反応液を等電点晶析した上澄みのアスパラギン酸濃度は濃縮の度合いによって50mM～300mMと幅があるがいずれにしろ溶解度を大幅に上回る。これは反応液にはたくさんの塩やその他の電解

質が存在し、アスパラギン酸がイオンの状態で存在するのを可能にしているからだと考えられる（塩溶）。

基本的にアスパラギン酸の濃度が高ければ高いほど精製収率は良くなるはずであるが、これには二つの問題がある。ひとつは濃縮すればそれだけ反応液中の塩濃度も高くなり、前述した塩溶の効果も増大し上澄みにかなり高濃度のアスパラギン酸が残ってしまう。もう一つはあまり高濃度で等電点晶析をすると、すべての溶液が結晶に取り込まれた状態になり、実質精製が困難になってしまふことである。後者の問題は、Green Earth で取得したシードを使用することでかなり状況は改善し、2M 程度の反応液であれば、水層と結晶の層を分離できるようになった。

前者の問題を実験で確かめるために、様々な反応液の濃度を調整し、その上澄みのアスパラギン酸濃度と精製収率の関係を調べた。上澄みのアスパラギン酸濃度は 1.5mM 程度の濃縮までは増加していくが、それ以上の濃縮では横ばいの状態であった（図 1-2-3）。精製収率は、濃縮度を増すほどに増加の傾向があり、反応液の濃度が 1.8M で精製収率 9 割に達する（図 1-2-4）。

精製収率 9 割は、本事業の目標値であるが、反応液の濃縮によって早い時期に目標を達成した。ただし、反応終了後の反応液の実質の濃度（原液換算しない）は 400mM 程度であり、濃縮にかかる光熱費を考えればもう少し高くしたい。また反応終了時の pH を抑えることで、アンモニアの添加量や等電点晶析に必要とされる硫酸の量を抑えることができ、塩溶の効果も低減できないかと考えている。

### 1-2-3 热溶解法の導入

一回の等電点晶析では、純度 98 % 以上という目標を達成することは難しいため、本事業が始まる前は二度の等電点晶析を行っていた。仮に一回の晶析で 98 % に到達したとしても、結晶化の前に活性炭処理が必要となるため、大量の活性炭が必要となりコストに響くことになる。またポリマー化という大目標があり、晶析の回数を減らしてアスパラギン酸の品質を落とすことは許されない。

しかし二回の等電点晶析を行うと言うことには、いくつかの問題点がある。中和にアンモニア、さらに晶析のための濃硫酸が必要となり原材料費が増える

のでコストに響く。さらに中和、晶析の後は大量の硫酸アンモニウムが生成されるため、先述の塩溶の効果で上澄みに残るアスパラギン酸が多くなる。また二回目の晶析には大量の塩を除くためにかなり念入りな洗浄が必要となる。

アスパラギン酸の純度を落とさずに、二回目の等電点晶析に変わることとして熱溶解で再結晶する方法を考えた。図1-2-5はアスパラギン酸の溶解度曲線を示している。100°Cでは、1Lの水に対して69gのアスパラギン酸が溶けるのに対して(519mM)、0°Cでは2gのアスパラギン酸しか溶けない(15mM)。この溶解度の差を利用すれば、一度中和しなくとも再結晶させることが可能である。

等電点晶析で得られた粗結晶を60g/L程度になるように水を入れて100°Cに加熱する。アスパラギン酸が溶けた所で水溶液が透明になるまで活性炭を入れる。活性炭を濾過しそのまま水溶液を4°Cまで冷却する(図1-2-6下)。この方法で得られたアスパラギン酸の結晶(図1-2-7 No.101~110)は、二度の等電点晶析で得られる結晶(図1-2-7 No.41~50)より品質もよく、また中和のためのアンモニアも二度目の等電点晶析の硫酸も要らないため原材料費が安くなる。

#### 1-2-4 着色の問題

本事業の開始とほぼ同時に、Green Earth Instituteで生産・精製したアスパラギン酸(Green Earthアスパラギン酸)を使ってDIC株式会社がポリアスパラギン酸の開発を開始している。当初は等電点晶析を二回行ったサンプルを提供していたが、ポリ化はほぼ工業品と同じレベルで進むと言う報告を受けていた。しかし工業品アスパラギン酸は、ポリ化しても着色がないのに対して、Green Earthアスパラギン酸は褐色の着色が目立つという話だった。(詳しい話は1-3のポリ化の章をご参照)。何度かこちらで出来る限りきれいにしたサンプルを提供したが、着色の問題はなかなか解決しなかった。その後熱溶解の手法が確立して、よりきれいなサンプルが調整できるようになったが、それでも着色の問題は解決しなかった。

アスパラギン酸の状態で目立った着色がなくともポリ化する工程で着色が目立つののは、ポリ化の工程において高温(160~200°C)で反応するためである(4)。この点を考慮してGreen Earth Instituteでも簡易な着色テストが行えないか

と考えた。単純にアスパラギン酸の粉末にリン酸を混ぜてスラリー状態にして160°Cで静置すると、2時間程度で褐色に着色した。この着色はポリ化の時の着色と同じ原因に起因すると考え、着色のアッセイ方法として採用した（リン酸スラリー法）。

図1-2-8は、No.74のサンプルをリン酸スラリーアッセイにかけた結果である。160°Cで二時間静置しただけで、サンプルは濃い褐色になった（左端）。着色の原因物質を特定すると言う方法は、現時点では難しいので、どのような精製方法が着色物質を取り除くのに効果的なのかを検討した。まずNo.74を水洗いしただけのサンプルでも着色はかなり軽減した（左から二番目）。水溶性の着色物質が原因と考え、さらに大量の水で再結晶させる熱溶解法を行った結果、うっすら褐色に染まる程度になった（右から二番目）。この薄い着色は水洗いでなかなか取ることができず、難容性の着色成分が残っていると考え、活性炭を処理してみたところ、目に見える着色はなくなった（右端）。

のことから、主な着色成分は少なくとも二種類存在し、親水性の着色成分と難容性の着色成分があると考えた。よって精製方法の改善点としては、1) 水洗いを増やすことと、2) 活性炭の量を増やすことの二点である。具体的なプロセス改良としては1)は熱溶解法で大量の薄いアスパラギン酸溶液を粗結晶の洗いにすべて使うこと、2)は活性炭の量を2倍にすることをおこなった。上記の改善されたプロセスで精製したNo.79とこれまでの方法で最も着色の少なかったNo.53と工業品アスパラギン酸を使ってアッセイを行った。これら三つのサンプルは二時間程度では着色は見られないので160°C、20時間でアッセイを行った。図1-2-9のようにNo.53は長時間の高熱にさらすと褐色に変化するが、工業品とNo.79は薄い着色のみ観察され、両者には目立った差は認められなかった。

## 1-2-5 材料と方法

### A 本事業が始まる前の精製方法

反応液を500mMを目安に加熱（70°C）して濃縮する。濃縮した反応液に濃硫酸を加えてpH2.8まで下げる。アスパラギン酸がある程度析出し始めたことを確認して、4°Cで一晩静置する。析出した粗結晶を遠心機（4000rpm, 5min）で分離して、着色が取れるまでミリQ水での洗浄・遠心を繰り返す。粗結晶は

2Nのアンモニアで中和して粗結晶が完全に溶けた所で、着色が取れるまで活性炭を加えて室温でスターラーで攪拌する。活性炭をろ紙で除去した後に、もう一度濃硫酸を加えて等電点晶析を行う。硫酸アンモニウムがなくなるまで（水酸化バリウムでテスト）水洗いして55°Cで乾燥させる。

#### B 熱溶解による再結晶法

4LのミリQ水を沸騰させ、そこに240gの粗結晶を入れて完全に溶解させる。5g（ポリ化用は10g）のカルボラフィン（活性炭）を入れて5分程度よく攪拌する。活性炭は濾紙で除いてアスパラギン酸溶液はそのまま室温で冷却する。温度が室温まで下がったら4°Cで一晩静置する。

#### C 着色テスト（リン酸スラリー法）

精製したアスパラギン酸1gをガラスシャーレにとって、1mlのリン酸を加えてスラリー状態になるまでよくまぜる。160°Cのインキュベーターにサンプルを静置し、2時間後、あるいは20時間後に着色の度合いを黙視で確認した。

### 1-2-6 参考文献

- (1) 川喜田 哲哉 グルタミン酸ナトリウムの工業晶析 /日本海水学会誌 56巻 (2002) 5号 p. 362-365
- (2) 平松 茂実 L-グルタミン酸の $\alpha$ - $\beta$ 結晶転移に対する新規影響物質の検索 日本農芸化学会誌 51巻 (1977) 1号 p. 27-37
- (3) 山本辰美, 川崎博幸, 水野光国, 森英利 L-アスパラギン酸の冷却晶析に及ぼす超音波照射の影響 - 粉体工学会誌, 2014 124-130
- (4) 富田 雅之, 中藤 肇 ポリアスパラギン酸-構造と生分解性- 2001年 50巻 6号 p. 393

# グルタミン酸の精製法

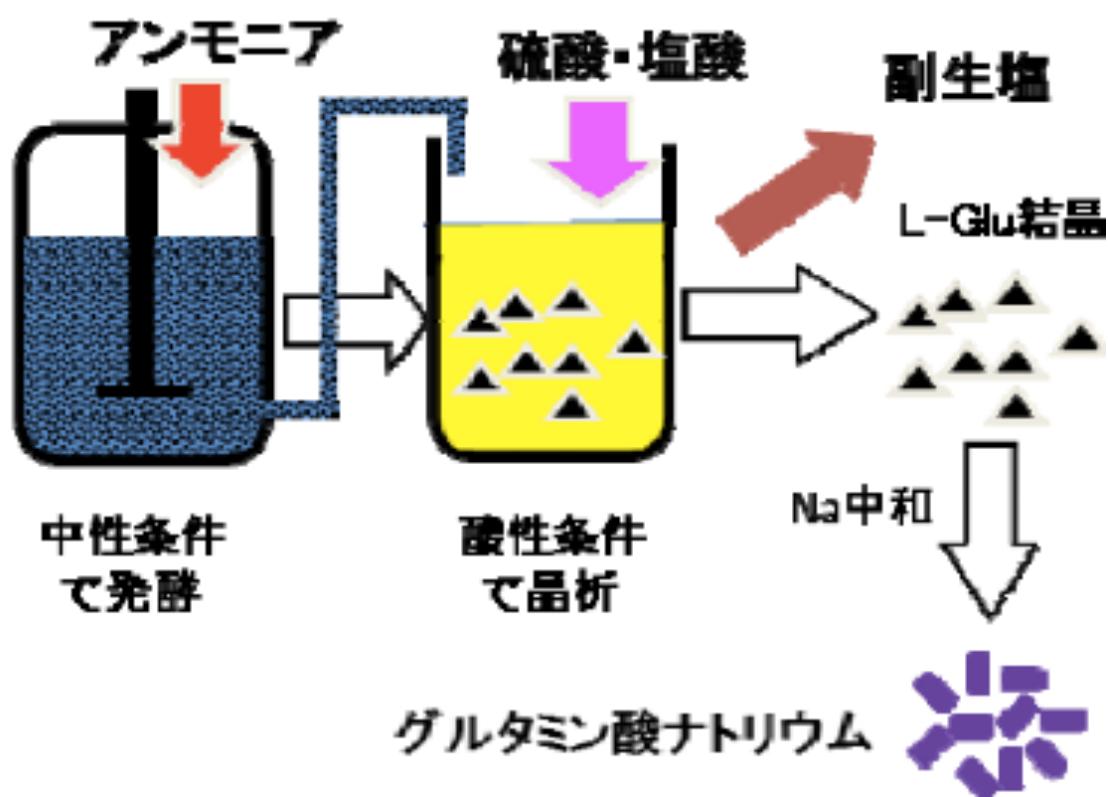


図1-2-1

## 事業開始前のアスパラギン酸の精製法

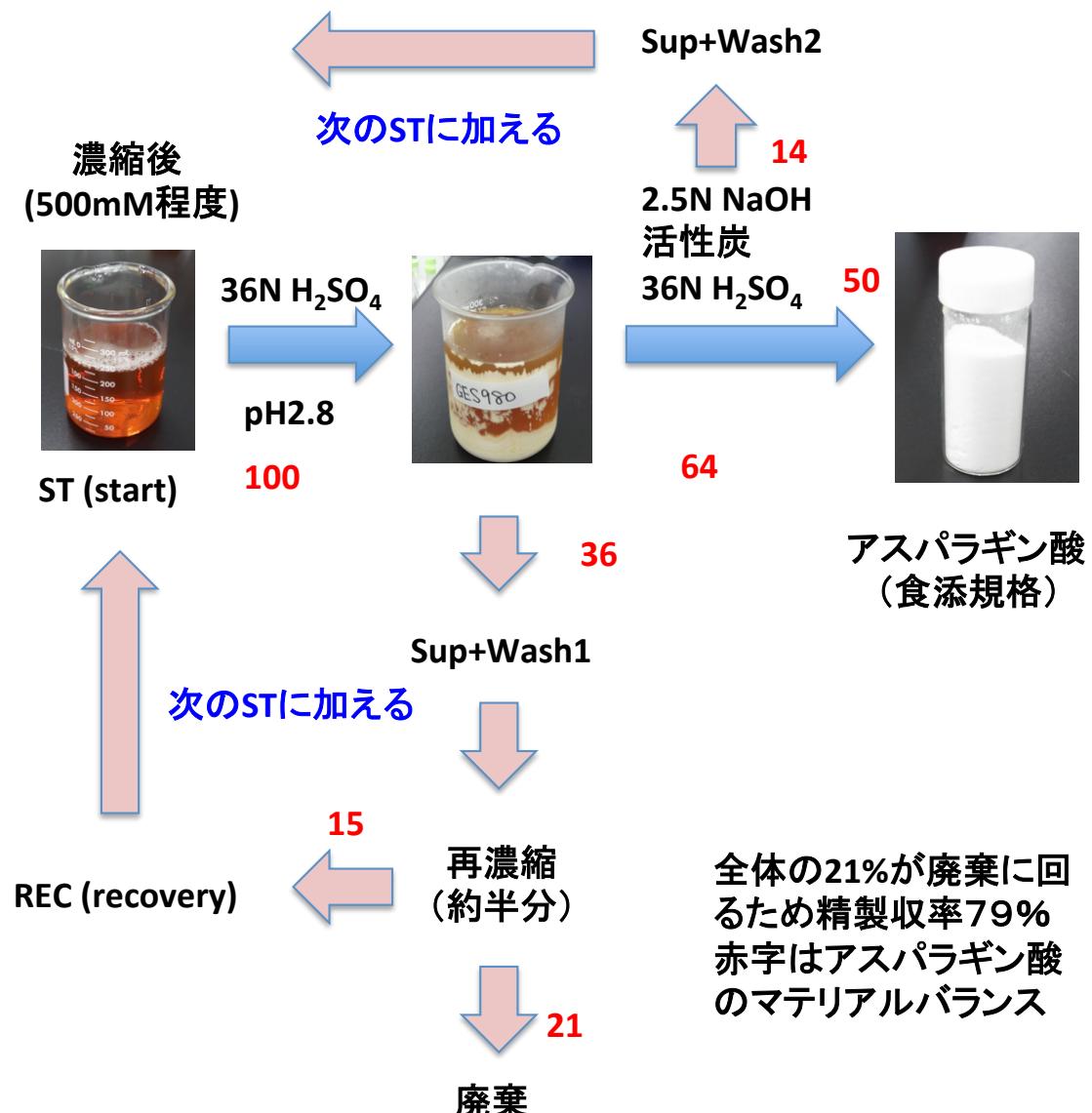


図1-2-2

## 反応液の濃縮度と上澄みのアスパラギン酸

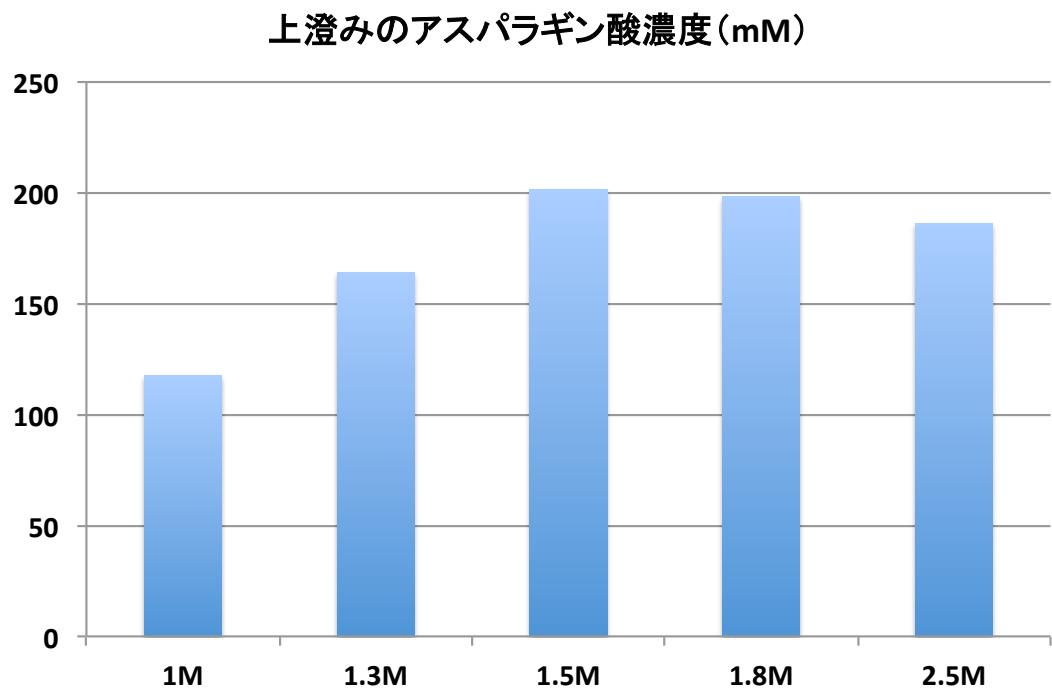


図1-2-3

## 反応液の濃縮度と精製收率

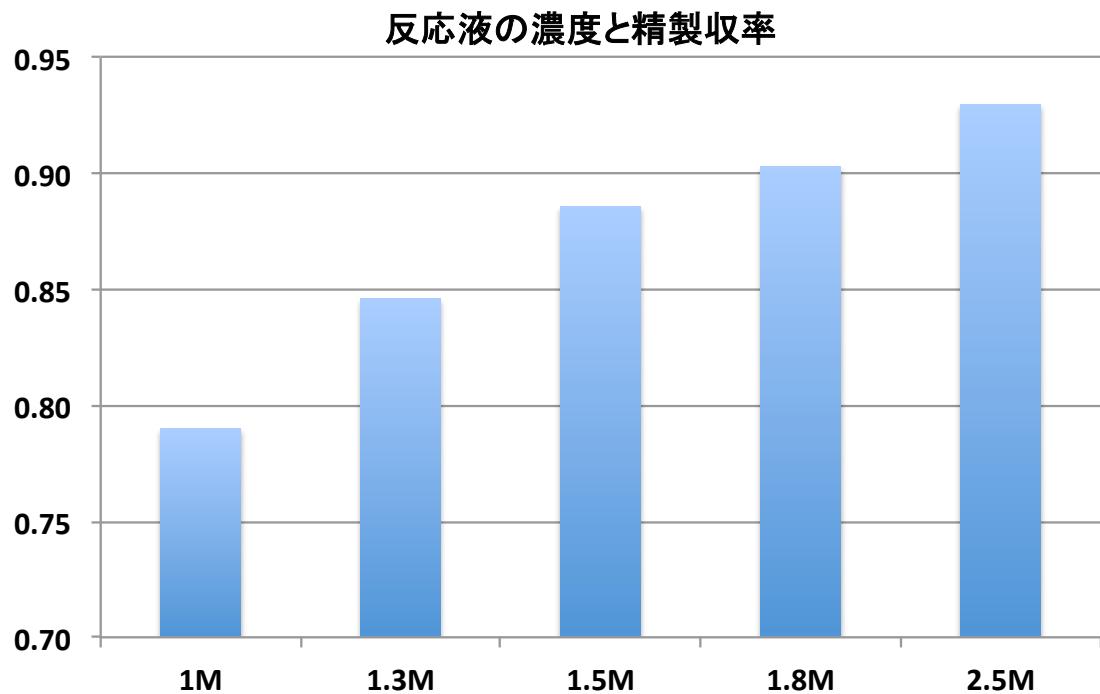


図1-2-4

## 温度とアスパラギン酸の溶解度

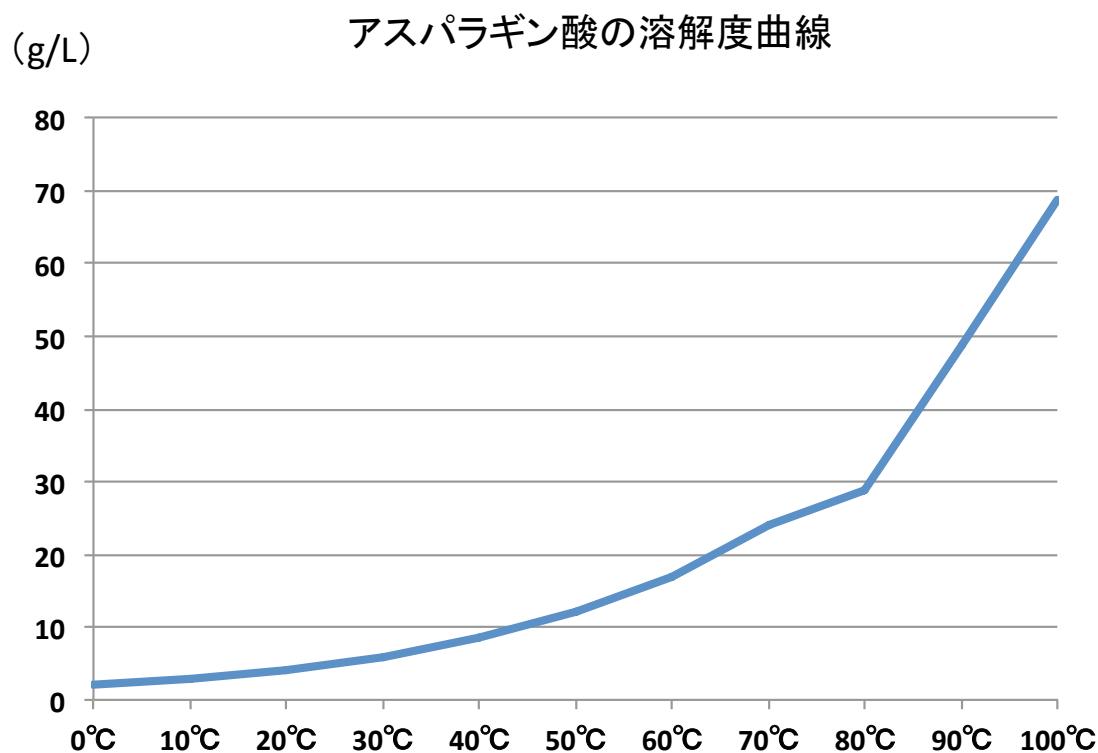


図1-2-5

## これまでの精製法と熱融解法の比較(1)

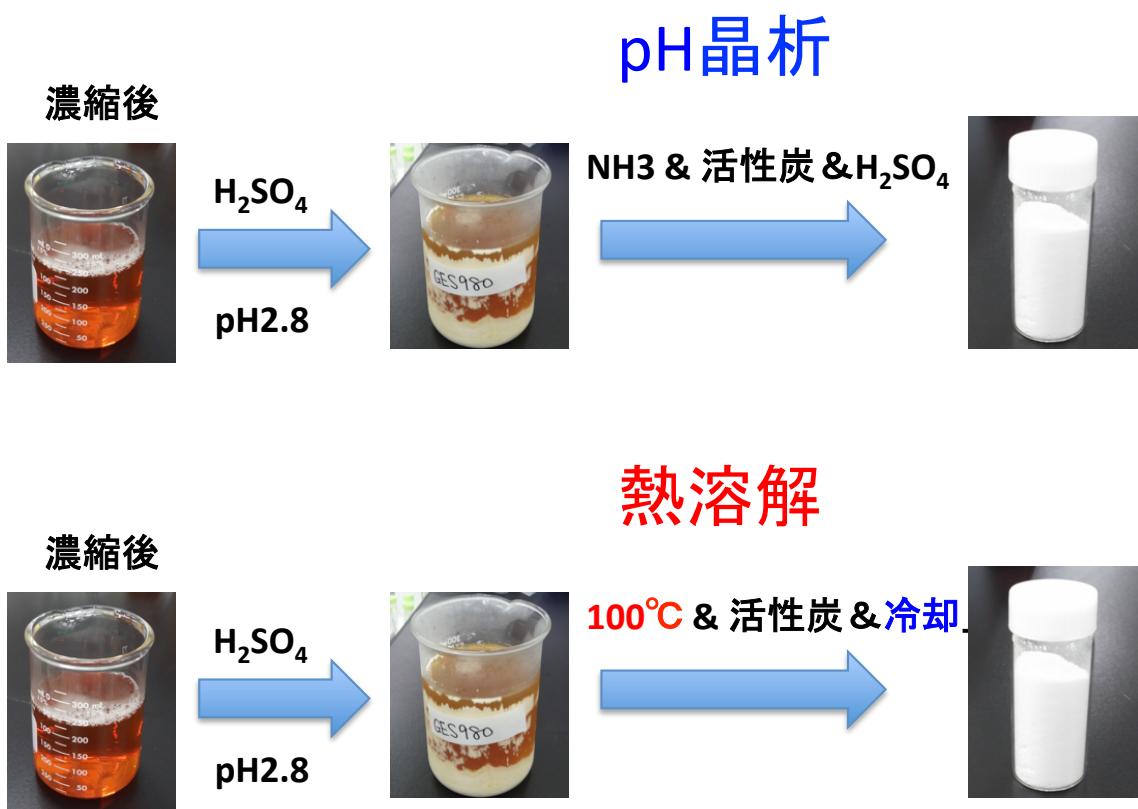


図1-2-6

## これまでの精製法と熱融解法の比較(2)

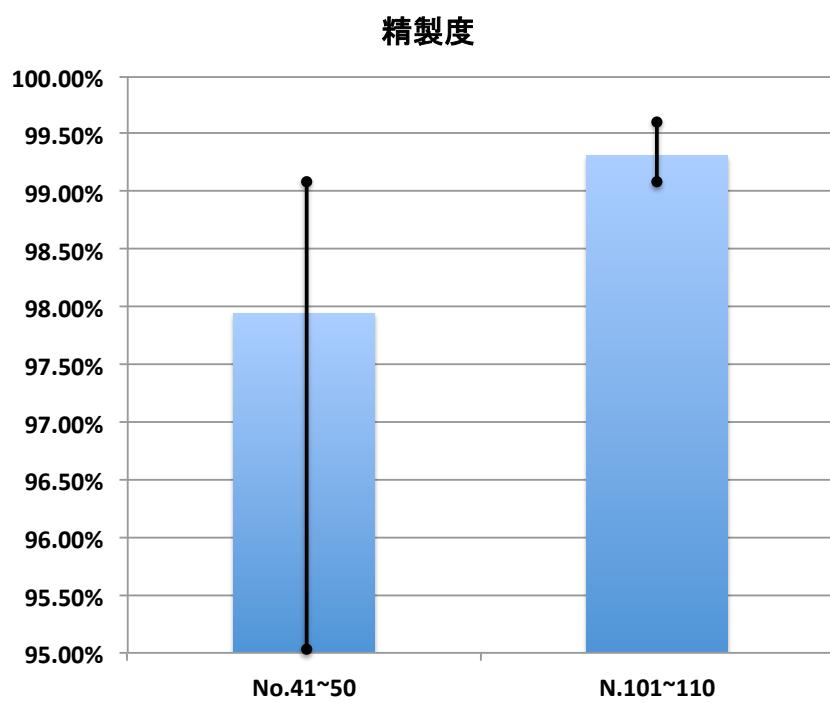
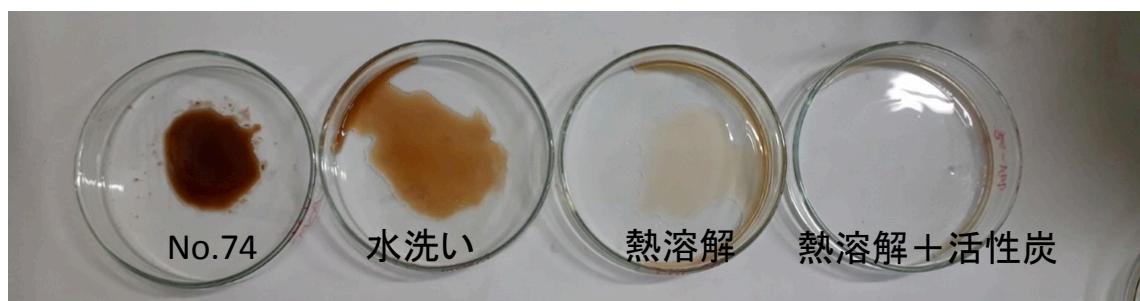


図1-2-7

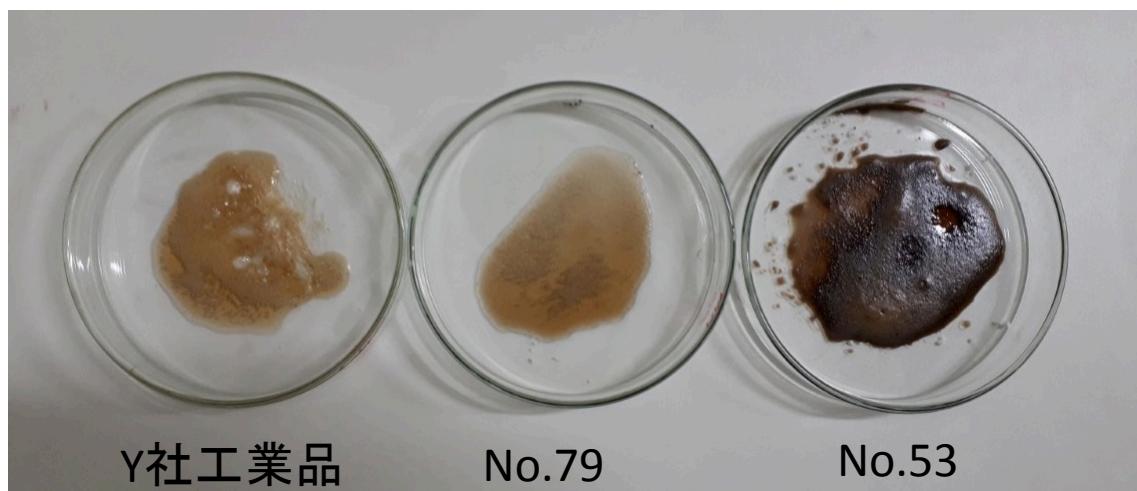
## リン酸スラリー法による着色テスト(1)



リン酸でスラリー状にして160°C 2h

図1-2-8

## リン酸スラリー法による着色テスト(2)



リン酸でスラリー状にして160°C 20h

図1-2-9

## 1-3 ポリアスパラギン酸の合成

### 序論

ポリアスパラギン酸は、分子内にカルボキシル基を有するポリアミノ酸であり、高吸水性用途の使用が期待されている。高吸水性用途のポリマーとして、現在はポリアクリル酸ナトリウムが主流であり、低コストで優れた吸水特性を持つことが広く知られている。一方で、ポリアクリル酸ナトリウムは生分解性を有しておらず、廃棄時また使用後の処理には焼却が必要であるが、大量の水を含んでおり処理効率が非常に悪い。また、石油由来のプロピレンから作られているため、二酸化炭素削減の観点から植物由来の原料への転換が求められている。

ポリアスパラギン酸は生分解性ポリマーとして知られており、植物由来であればポリアクリル酸の代替となりうる理想的な素材である。しかし、ポリアクリル酸は優れた吸水特性を有し、低コストの素材であるため、他の素材に置き換えるにはハードルが高い。そのため、ポリアスパラギン酸製造の課題としては、ポリアクリル酸に近い品質をいかに低成本で製造するプロセスを見出す事である。

高吸水性ポリマー (SAP) は自重の数百～数千倍程度の水を吸水して膨潤し、多少の圧力をかけてもゲル状のまま水を保持する性質を持つポリマーである。ポリアスパラギン酸そのものは前述の通り分子中にカルボキシル基を有する水溶性ポリマーであるため、高吸水性用途のポリマーとして利用するためには、ポリアスパラギン酸の一部を架橋し、水に不溶な状態をつくりだす必要がある。そのため、主鎖であるポリアスパラギン酸の構造や分子量、架橋状態の制御が吸水性能に及ぼす影響が大きいことが知られている。そこで、本年度は低成本、高品質のポリアスパラギン酸の製法を検討するにあたり、分子量が決まる重合方法の基礎検討、及び吸水性能に影響を及ぼす架橋方法の基礎検討を中心に取り組みを開始した。

### 1-3-1 反応概要

ポリアスパラギン酸の工業的な合成は、石油由来のマレイン酸やフマル酸を出発原料とする方法とアスパラギン酸を出発原料とする方法が知られている。アスパラギン酸を出発原料として、ポリアスパラギン酸を得るためには、酸触媒を用いてアスパラギン酸を重縮合し、中間物質であるポリスクシンイミド(PSI)を経由する方法が一般的に知られている(図1-3-1)。ポリスクシンイミドを得た後に、吸水性ゲルとするため架橋及び加水分解を行い、ポリアスパラギン酸とする方法である。その後、脱水・乾燥、粉碎を経て紙おむつ用途の高吸水性ポリマーとして製造するプロセスが想定される。

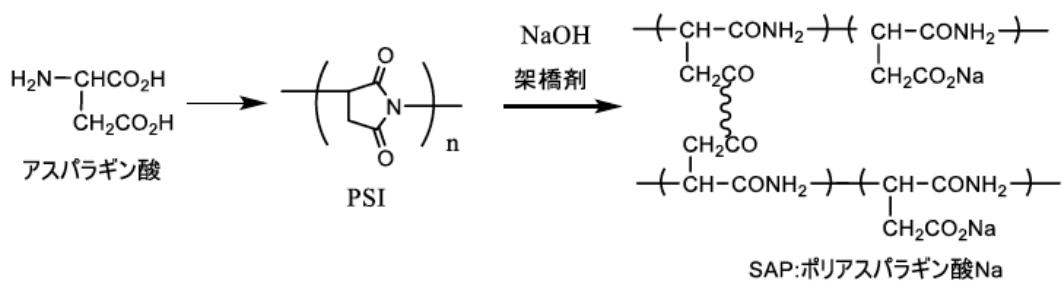


図1-3-1 ポリアスパラギン酸の製造スキーム

アスパラギン酸からポリアスパラギン酸を合成する製法に関しては1990年代に盛んに開発が進められている。製造技術の課題としてはポリマーの高分子量化及びポリマーの架橋反応が挙げられ、それらの課題をクリアしつつコスト低減を可能とする製造プロセス開発が最大の課題である。

本事業を進めるにあたり、本年度はまずポリマーの高分子量化及び架橋法の検討を行い、ポリアスパラギン酸の吸水性ポリマーとしての可能性を探るために、ポリアクryル酸との比較を実施し、現時点での材料としての基本的な性能を把握することとした。

## 1－3－2 ポリスクシンイミドの合成検討

高吸水性ポリマーとしての吸水性を向上させ、吸水ゲルの強度を保つためにはポリマーの高分子量化は大きな課題である。高分子量化したポリアスパラギン酸を得るためには、中間物質であるポリスクシンイミドを合成段階で高分子量化する必要がある。そのため、ポリスクシンイミドの重合方法及び重合条件の検討が極めて重要であるといえる。

アスパラギン酸からポリスクシンイミドを得るための重合方法としては、アスパラギン酸を有機溶媒中でスラリー状態にし、酸触媒を添加し脱水縮合により重合する①溶液重合法と、アスパラギン酸に酸触媒を直接添加し加熱状態下で脱水縮合を行う②固相重合法の2つの重合法が広く検討されている。そこで、この2つの重合法をベースにポリスクシンイミドの重合方法及び重合条件の検討を行った。尚、反応条件の検討には、石油由来のアスパラギン酸を使用した。

また、③バイオベースのアスパラギン酸の重合への影響を石油由来のアスパラギン酸を同条件で重合し、その結果を比較することで行った。

重合条件の評価は、得られたポリスクシンイミドの分子量を測定することを行った。また、得られた重合体の高吸水性樹脂向けの物性に及ぼす影響に関しては1－3－4で評価した。

### ① 溶液重合

アスパラギン酸は一般的な有機溶剤にはほとんど不溶であるため、溶媒中で反応を行う場合、重合初期から重合終了時まで系内がスラリー状態で反応が進む。そのため重合溶媒選定は重合度に影響が及ぶため、高分子量化の重要なファクターであると考えられる。今回 溶液重合に用いた溶媒は、ポリスクシンイミドの高分子量化の観点から、文献や特許情報をもとに溶媒A／溶媒Bの混合溶媒を選定した。また、反応触媒も同様な考えのもと、文献や特許情報をもとに8.5%リン酸を選定した。

以下に重合装置及び重合条件の概要を示す。

#### <実験装置>

- ・ 1L 四ツ口セパラブルフラスコ

- ・ 搅拌機
- ・ 温度計
- ・ Dean-Stark trap
- ・ 還流冷却管
- ・ オイルバス

#### <重合条件>

- ・ 反応温度：150～170℃
- ・ 反応圧力：常圧
- ・ 反応溶媒：溶媒A／溶媒Bの混合溶媒
- ・ 反応触媒：85%リン酸

#### <合成手順>

アスパラギン酸、溶媒及び反応触媒を所定量計量してフラスコに投入し、攪拌状態を調整しながら内部を均一なスラリー状態にした。その後、オイルバスで攪拌しながら所定温度まで昇温を行った。昇温に伴い生じた縮合水と反応溶媒は Dean-Stark trap により分離し、水分を系外へ抜き取ることで重縮合反応を進めた。その後、所定の温度まで内温が上昇したら温度を一定に保ち、昇温時と同様の操作で脱水を継続した。その後、所定時間の反応が終了した後、内容物を冷却し、濾過を行うことでポリスクシンイミドを回収した。回収したサンプル中は溶媒や触媒が残存していると考えられるため、メタノールやイオン交換水を用い、洗净液のPHが中性になるまで洗净し、真空乾燥を行うことで洗净されたポリスクシンイミドを得た。

#### <分子量測定>

ポリスクシンイミドの重量平均分子量 ( $M_w$ ) は、ポリスチレンを標準サンプルとして GPC(ゲルペーミエーションクロマトグラフィー)により測定した。

装置 : Shimadzu GPC

検出器 : Shimadzu RI

カラム : TSKgel H タイプカラム(東ソー)

溶媒 : 0.1M-LiBr DMF 溶液

濃度 : 1wt%

注入量 : 50  $\mu$ L

流速 : 0.8mL/min

#### A. 触媒量の検討

石油由来のアスパラギン酸を用いて、触媒量が分子量へ与える影響を検討した。重合条件を統一し、触媒のモノマーに対する比率を変えて分子量への影響を確認した（表1）。

表1 溶液重合における触媒量の分子量への影響

	条件1	条件2	条件3	条件4
触媒比(mol%)	無添加	少	中	多
温度(°C)	150–170	150–170	150–170	150–170
圧力	常圧	常圧	常圧	常圧
時間(h)	3.0	5.0	5.0	0.4
PSI 分子量 M <sub>w</sub>	ND	49,000	46,000	8,000
備考	反応進まず	—	—	固着継続不可

表1に示された結果から、無触媒では170°C以下の重合温度では重縮合反応が進まず、反応には一定量の触媒が必要である事が明確になった。一方で、触媒量が多い場合は反応の進行に伴い、フラスコ内部の粒子同士が固着する現象が確認された。スラリー粒子が固着した場合、本検討の実験装置では、粒子解碎が行えず、攪拌機による攪拌が不可能となつたため、実験は中断した。この事から、反応面及び装置面の観点を考えると適正な触媒量が存在することが示唆される。

一方で、条件2や条件3の範囲内の触媒量であれば、スラリー状態で攪拌を継続可能であったため、これに近い触媒量であれば特に問題なく、スラリー状態での重合が可能であると推察される。同様に、この条件内の触媒量であれば、生成されるポリスクシンイミドの分子量に大きな差異が生じないことも確認さ

れた。

## B. 反応温度／溶媒組成の検討

触媒量の検討と同様に石油由来のアスパラギン酸を用いて、重合条件を統一し、反応温度を変えて分子量への影響を確認した。溶液重合は系外への水の除去を溶媒の蒸発を利用する事で、脱水を促進させている。従って、反応温度を変えるためには溶媒の沸点を調整する必要がある。今回、溶媒の沸点調整には、溶媒種の変更を行った。そのため、溶媒組成の変更は反応温度の変更が伴っており、本検討結果は溶媒及び温度の複合的な影響が含まれている結果である（表2）。

表2 溶液重合における反応温度／溶媒の分子量への影響

	条件1	条件2	条件3
反応溶媒	溶媒A/溶媒B 混合溶媒	溶媒C/溶媒B 混合溶媒	溶媒D 单一溶媒
温度(℃)	150-170	140	165-195
圧力	常圧	常圧	常圧
時間(h)	5.0	5.0	4.0
PSI分子量Mw	53,000	60,000	8,600
備考(外観)	スラリー状	スラリー状	スラリー状

表2に示された結果から、反応溶媒が分子量に及ぼす影響が大きいことが確認された。特に条件1，2での分子量がそれほど大きな差がみられなかつたことを考慮すると、反応溶媒として溶媒Bが含まれる系で高分子量のポリスクシンイミドが得られやすい事が示唆される結果となった。重縮合の観点からは、高温の方が脱水は促進され、重合が進むと予想していたが、この系では溶媒種による影響が大きく、温度の影響は小さい結果となった。

## ② 固相重合

ここで言う固相重合は、アスパラギン酸モノマーに触媒を添加した状態で、重縮合を進める反応である。溶液重合に比べ、溶媒を使用しないため低コストでの製造方法につながる可能性がある。一方で、アスパラギン酸に触媒を加えたスラリー状態から反応がスタートし、重縮合終了後は固体物になり、系の状態変化を伴うため、ハンドリングが難しいことも予想される。

固相重合検討では溶液重合と同様に、ポリスクシンイミドの高分子量化の観点から検討を行い、文献や特許情報をもとに触媒は8.5%リン酸を選定した。

以下に重合装置及び重合条件の概要を示す。

### <実験装置>

- ・真空乾燥機
- ・真空ポンプ
- ・冷却トラップ
- ・フッ素樹脂コーティング容器
- ・乳鉢

### <重合条件>

- ・反応温度：180°C
- ・反応圧力：10 torr
- ・反応触媒：8.5%リン酸

### <合成手順>

モノマーである粉末のアスパラギン酸に溶液の触媒を添加し、モノマーに触媒がなじむように乳鉢で良く混合させた。乳鉢で混合後はスラリー状の混合物が得られ、その混合物をフッ素樹脂でコーティングされた金属製の容器に薄く広がるように投入した。

次にあらかじめ所定の温度まで温度を上げておいた真空乾燥機の中に、スラリーが入った容器ごと入れ、所定の圧力まで真空引きを行い、重合反応を行った。所定時間まで重合を行った後に、容器を真空乾燥機から取り出し、重合を終了させた。反応前の状態はスラリー状であるが、取り出し時は脱水及び重合

の影響で、ポーラス状の板状固体が得られる。

重合が終了した後は、得られた板状固体を破碎し、乳鉢で粉末状になるまで粉碎した。その後、触媒を取り除くため洗浄水が中性になるまでイオン交換水で洗浄を行った。洗浄後の重合物は真空乾燥を行い、触媒が除去されたポリスクシンイミドを得た。

#### A. 触媒量の検討

石油由来のアスパラギン酸を用いて、触媒量が分子量へ与える影響を検討した。溶液重合と同様に重合条件をほぼ統一し、触媒のモノマーに対する比率を変えて分子量への影響を確認した（表3）。

表3 固相重合の触媒量と分子量の関係

	条件1	条件2	条件3	条件4
触媒量(mol%)	少	中①	中②	多
温度(°C)	180	180	180	180
圧力(torr)	10	10	10	10
時間(h)	5.0	4.0	5.0	5.0
分子量 Mw	23,000	52,000	78,000	57,000

表3に示された結果から、溶液重合と同様に添加する触媒量とポリスクシンイミドの分子量には最適値が存在することが示唆される。条件1のように、触媒量が少ない場合は重合が進まず、低分子量のポリスクシンイミドしか得られなかった。一方で、条件4のようにアスパラギン酸モノマーに対し、触媒量を多量に添加した場合は、条件2と分子量はそれほど変わらない結果となった。一方で、条件3では他の条件より大きいMw8万近いポリスクシンイミドが得られることが確認された。そのため、高分子量化させる観点では条件2－条件4の間の触媒量に最適値(極大値)が存在することが示唆される。

## B. 反応温度の検討

溶液重合と同様に、反応温度が分子量へ及ぼす影響を確認した。反応温度の変更は、真空乾燥機の温度設定のみで行い、その他の重合条件は統一させて重合を実施した（表4）。

表4 固相重合の反応温度と分子量の関係

	条件1	条件2	条件3
温度(°C)	180	190	200
圧力(torr)	10	10	10
時間(h)	4	4	4
分子量 M <sub>w</sub>	70,000	78,000	74,000

条件1から条件2への温度の変更で、ポリスクシンイミドは若干高分子量化する傾向が見られたが、条件2から条件3の変更では分子量の優位な差は確認できなかった。このことから、今回検討の反応条件であれば、190°C以上の温度でポリスクシンイミドの高分子量化につながる可能性がある結果が得られた。

## ③ 発酵法によるアスパラギン酸の影響確認

これまでの重合検討では石油由来のアスパラギン酸をモノマーとして検討を進めてきた。しかし、本事業の最終目標は発酵法により得られたアスパラギン酸を使ったポリアスパラギン酸の製造法の確立である。そのため、石油由来のアスパラギン酸と発酵法により得られたアスパラギン酸の重合に及ぼす影響を今回の反応条件で比較し、発酵法モノマーの課題抽出を行った。

## A. 到達分子量への影響

石油、発酵法由来のそれぞれのアスパラギン酸で、前述した溶液重合法及び固相重合法でポリスクシンイミドを合成し、到達分子量への影響を確認した。

溶液重合及び固相重合で合成したポリスクシンイミドの到達分子量の結果を

表5に示す。

表5 発酵法によるアスパラギン酸の影響確認

	条件1	条件2	条件3	条件4
モノマー	石油系	発酵法	石油系	発酵法
重合法	溶液	溶液	固相	固相
温度(°C)	150-170	150-170	180	180
圧力(torr)	常圧	常圧	10	10
時間(h)	5	5	3	3
到達分子量Mw	5.8万	5.5万	7.3万	7.5万

表5の重合結果より、溶液重合及び固相重合とともに石油由来及び発酵法由來のポリスクシンイミドの到達分子量に大きな差異は見られなかった。このことから現在の発酵法により得られているアスパラギン酸は、ポリスクシンイミドの現在の重合法では、石油由来のアスパラギン酸と大きな違いはないと推察される。一方で、石油由来、発酵法由來のアスパラギン酸は含有成分が異なっている。この事から重合法の変更や到達分子量の違いにより、差が明確化する可能性もあるため、その都度影響を確認していく必要はあると考えている。

## B. その他影響

発酵法によるアスパラギン酸を使った重合検討を開始した直後は、ポリスクシンイミドの重合中にポリマーが時間経過とともに褐色に着色していく課題が確認された。図1-3-2に溶液重合におけるポリスクシンイミドの着色過程を示す。石油由来のモノマーでは、反応5 hr 時点では淡黄色のポリスクシンイミドであるのに対し、発酵法のモノマーを使った場合、褐色に着色していた。紙おむつ用途では、白色の素材のニーズが高く、石油品並みまでの着色度合いへ改善が必要であった。

	石油由来	開発当初	精製改善後
溶液重合	<p>反応時間</p> <p>1hr 2hr 3hr 5hr 7hr</p>	<p>反応時間</p> <p>1hr 2hr 3hr 5hr</p>	<p>反応時間</p> <p>1hr 2hr 3hr 5hr 7hr</p>

図 1-3-2 溶液重合によるポリスクシンイミドの着色度合い

本事業検討当初のアスパラギン酸の精製度が不十分であると推察し、精製法を改善したアスパラギン酸を使って同様に合成を実施した。その結果、図 1-3-2 の右側に示すように、開発当初に比べ着色が改善されていることがわかる。石油品の結果と比較しても着色度合いは、ほぼ変わらない結果であった。このことから、アスパラギン酸の精製度を上げれば着色の課題は解決できることが確認できた。

また、石油由来、発酵法由来のポリマーの吸水性に及ぼす影響の比較については 1-3-4 で実施した。

### 1-3-3 架橋方法の検討

ポリアスパラギン酸は水溶性のポリマーであるため、高吸水性ポリマーとして使用するためには、架橋を行う事で水に不溶な状態をつくりだし、吸水後に膨潤してもゲル状態を保ち、水を保持する必要がある。架橋密度を高くすることで、吸水後のゲルの形態を保持しやすくなるが、架橋を行う事でポリマー中のカルボキシル基量（親水基量）が減少するため、吸水性能が低下する。

下図（図 1-3-3）のフローリーの吸水理論（高分子電解質）により、吸水力はイオンの浸透圧とポリマーの水との親和力に比例し、ポリマーの架橋密度に反比例するといわれている。すなわち、架橋状態が吸水性に影響を及ぼすため、架橋方法及び架橋条件の影響の把握が必要である。また、この理論より吸水力を大きくする対策として、イオン濃度差により浸透圧を大きくする、ポリマー

の水との親和性を高める、架橋密度を低くすることが考えられる。

### 吸水力Q

$$Q^{5/3} = \left\{ \left[ 1/2 \times i/Vu \times 1/S^{1/2} \right]^2 + (1/2 - X_1)/V_1 \right\} / (v/V_0)$$

$i/Vu$  : ポリマーに固定された電荷密度

$S$  : 外部溶液中のイオン濃度

$(1/2 - X_1)/V_1$  : ポリマーと水の親和力

$v/V_0$  : ポリマーの架橋密度



$$\text{吸水力} = \frac{\text{イオンの浸透圧} + \text{ポリマーと水の親和力}}{\text{架橋密度}}$$

図 1-3-3 フローリーの吸水理論

一般的にポリアスパラギン酸の架橋方法として、①ポリスクシンイミドにポリアミン等を反応させ架橋したポリスクシンイミドを合成した後に、加水分解して架橋型ポリアスパラギン酸を得る方法[アミン架橋]と②ポリスクシンイミドを加水分解し、ポリアスパラギン酸にした後にカルボン酸を利用し、ジエポキシなどで架橋し、架橋型ポリアスパラギン酸を得る方法[エポキシ架橋]が知られている。今回は文献情報をもとに両架橋方法を検討し、吸水性能への影響を評価した。

#### ① アミン架橋

アミン架橋では、まずポリスクシンイミドを溶媒に溶解させた後、架橋剤である多官能アミンを反応させ、ポリスクシンイミドの架橋体を得る。その後、加水分解することで、ゲル状の架橋型ポリアスパラギン酸が得る方法である。

アミン架橋反応の概略を下図（図1-3-4）に示す。

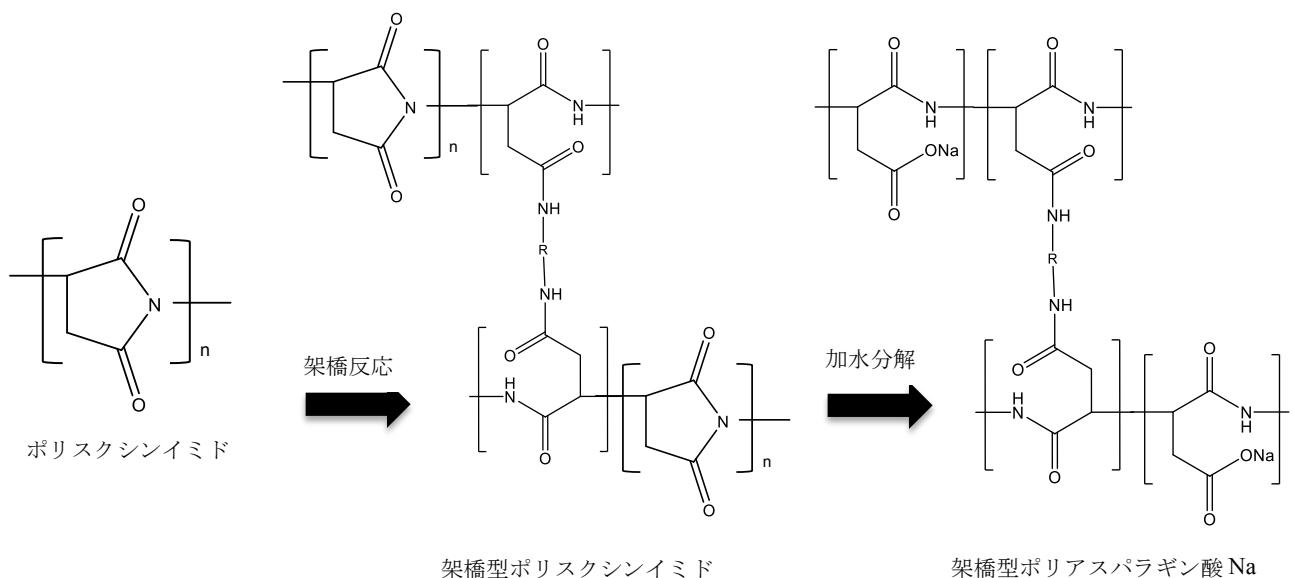


図1-3-4 ポリスクシンイミドのアミン架橋反応概略

#### <アミン架橋手順>

重合により得られたポリスクシンイミドをN,N-ジメチルホルムアミド（DMF）に溶解させ、ポリスクシンイミド溶液にする。その後、架橋剤（ジアミンなど）を添加し、架橋させることで架橋したポリスクシンイミド溶液を得る。次にメタノールを貧溶媒として、メタノール中にポリスクシンイミド溶液を添加し析出させ、濾過することで粉末状のポリスクシンイミドを得る。得られた粉末を水酸化ナトリウム溶液に添加し、加水分解することでゲル状の架橋したポリアスパラギン酸ナトリウムが得られる。その後、得られたゲルを乾燥及び粉碎／分級することで、吸水性のある架橋型ポリアスパラギン酸ナトリウムの粉末を得る。今回テストを行った架橋条件を下記に示す。

#### <架橋条件>

- ・架橋温度：室温／60°C

- ・架橋時間：約 5 分～
- ・架橋剤：ジアミン架橋剤A、ジアミン架橋剤B

架橋の評価は1-3-4に示す吸水性評価で比較した。吸水性評価方法は1-3-4に示すため、ここではアミン架橋の検討内容と架橋条件及び吸水性の評価結果を示す。

#### A. 架橋剤の検討

架橋剤種が吸水性に及ぼす影響を検討した。架橋剤の種類により、ポリマーと水の親和力が変わると予想されるため、架橋剤選定の上でも吸水性への影響を確認する必要がある。架橋剤はジアミン系のジアミン架橋剤Aと、ジアミン架橋剤Bの二種類を用いて検討した。架橋条件及び吸水性の評価結果を表6に示す。尚、比較のため一般的な吸水用途のポリアクリル酸の吸水性評価も実施した。

表6 ジアミン架橋剤の違いによる吸水性比較

	条件1	条件2	比較
PSI 分子量 Mw	5.5万	5.5万	ポリアクリル酸
架橋剤	架橋剤A	架橋剤B	
架橋温度	室温	室温	
吸水性評価結果			
吸水量(純水)g/g	19	82	304
吸水量(生食)g/g	N.D	26	52
保水量(生食)g/g	N.D	15	32

(\*) 生食:0.9%生理食塩水

架橋剤としてジアミン架橋剤Aを使用した場合は、検討した架橋条件ではうまく架橋できず、吸水性を有するポリマーが得られなかった。一方で、ジアミン架橋剤Bを使用した場合は、純水及び生理食塩水ともに吸水し、保水性も確

認された。しかし、比較対象のポリアクリル酸の1／3～1／2程度の吸水性しか発現しなかった。

## B. 架橋剂量の検討

アミン架橋の架橋剂量が吸水性に及ぼす影響を検討した。架橋剤増加により架橋密度が増加するため、吸水量が低下する事が想定される。一方で、架橋剤を減少させた場合、吸水後のポリマーがゲルを保持できず、水に溶解することも想定される。そのため、架橋剂量と吸水性への関係把握は重要である。

検討には架橋剤としてジアミン架橋剤を用い、架橋剂量を表7に示す通りに設定し、吸水量への影響を確認した（表7）。

表7 ジアミン架橋剂量による吸水性能への影響

	条件1	条件2	条件3	比較
PSI分子量Mw	7.7万	7.7万	7.7万	ポリアクリル酸
架橋剂量	少	中	多	
架橋温度	60°C	60°C	60°C	
吸水性評価結果				
吸水量(純水)g/g	114	35	17	304

当初の想定予想通り架橋剂量を増やした場合、架橋密度の増加やカルボキシル基量の低減により吸水量が低下していると予想される。一方で、吸水量はポリアクリル酸には全く及んでいない。

架橋剤や架橋量の検討から考えると、アミン架橋に関しては現状の架橋法／条件ではポリアクリル酸の吸水性に到達することは難しいと考えられ、架橋方法、架橋条件の見直しが必要であることが示唆される。

## ② エポキシ架橋

エポキシ架橋では、まずポリスクシンイミドを加水分解してポリアスパラギ

ン酸ナトリウムにした後、一部カルボン酸塩をカルボン酸に変化させ、その後多官能エポキシを反応させ架橋体を得る。ポリアスパラギン酸Naは水溶性ポリマーのため、架橋剤であるエポキシは水溶性且つポリアスパラギン酸との相溶性に富むものが好ましい。本検討では、架橋剤であるエポキシはジグリシジル系架橋剤C、ジグリシジル系架橋剤Dを用いた。エポキシ架橋反応の概略を図1-3-5に示す。

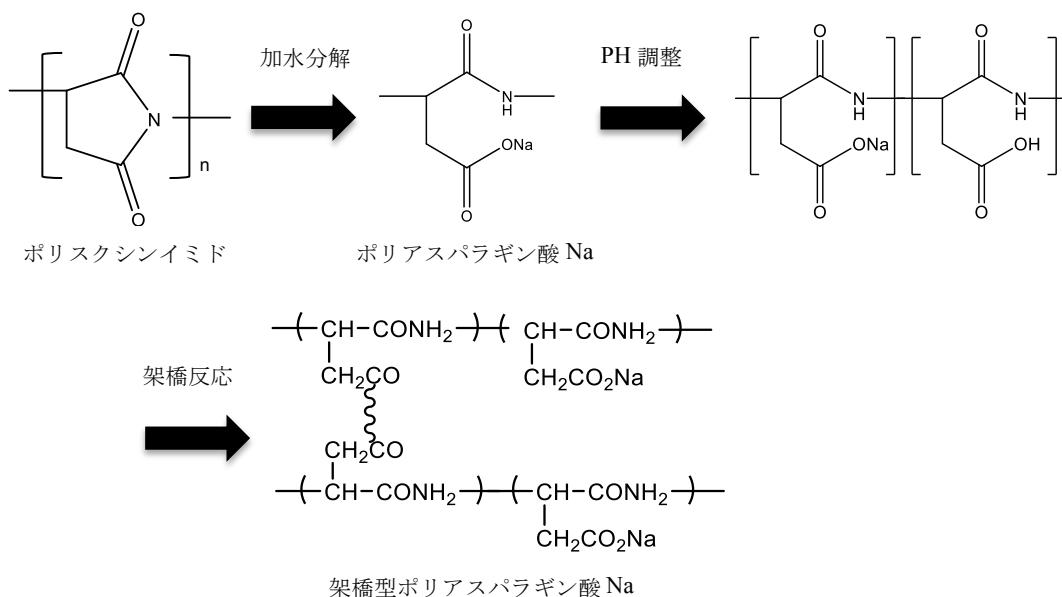


図1-3-5 ポリスクシンイミドのエポキシ架橋反応概略

#### <エポキシ架橋手順>

重合により得られたポリスクシンイミドを水に分散させ、ポリスクシンイミド水分散体を得る。その後、水酸化ナトリウム水溶液をポリスクシンイミド分散体に徐々に滴下し、加水分解を行う。加水分解完了後は水溶性のポリアスパラギン酸ナトリウムが生成するため、固体物のない水溶液が得られる。その後、塩酸を滴下し、PHを調整することでポリアスパラギン酸ナトリウムのカルボキシル基の一部をナトリウム型から酸型に変換する。その後、架橋剤（水溶性ジエポキシ）を加え、反応させることで、ゲル状の架橋したポリアスパラギン酸ナトリウムを得る。得られたゲルを乾燥及び粉碎／分級することで、吸水性

のある架橋型ポリアスパラギン酸ナトリウムの粉末を得る。

#### <架橋条件>

- ・架橋温度：60°C
- ・架橋時間：約60min
- ・架橋剤：ジグリシジル系架橋剤C  
ジグリシジル系架橋剤D

架橋の評価は1-3-4に示す吸水性評価方法で比較した。ここではエポキシ架橋の検討内容と架橋条件及び吸水性の評価結果を示す。

#### A. 架橋剤の検討

架橋剤種が吸水性に及ぼす影響を検討した。アミン架橋と同様に架橋剤の種類により、ポリマーと水の親和力が変わると予想されるため、架橋剤選定の上でも吸水性への影響を確認する必要がある。架橋剤にはジグリシジル系架橋剤Cと架橋剤Dを用いた。架橋条件及び吸水性の評価結果を表8に示す。

表8 エポキシ架橋剤の違いによる吸水性比較

	条件1	条件2	比較
PSI分子量Mw	5.5万	5.5万	ポリアクリル酸
架橋剤	架橋剤C	架橋剤D	
吸水性評価結果			
吸水量(純水)g/g	196	192	304
吸水量(生食)g/g	42	32	52
保水量(生食)g/g	19	20	32

架橋剤として架橋剤Cと架橋剤Dを比較したが、吸水性にそれほど大きな違いは見られなかった。吸水量や保水量はポリアクリル酸に対し約6割の性能を示した。

## B. 架橋剂量の検討

架橋剂量が吸水性に及ぼす影響を検討した。架橋剤を固定し、添加量を変えた条件で比較を行った。吸水量の評価結果を表9に示す。

表9 エポキシ架橋剂量による吸水性能への影響

	条件1	条件2	条件3	比較
PSI 分子量 Mw	5.1万	5.1万	5.1万	ポリアクリル酸
架橋剂量	少	中	多	
吸水性評価結果	ゲル化せず			
吸水量(純水)g/g	-	161	131	304
吸水量(生食)g/g	-	41	37	52
保水量(生食)g/g	-	21	16	32

架橋剂量を変えた結果から、架橋量を増やした場合は吸水性能が低下していくことが確認できた。一方で、架橋剂量を減らしていった場合は、ポリマーが水溶性のままでゲル化せず、吸水性樹脂として機能しないことも確認できた。この事から、架橋剂量を減らして吸水量を上げ、且つゲルの状態を保持できる最適な架橋剂量を見極める必要がある。この結果は分子量Mw5.1万の結果であり、分子量が変わると最適値も変わる可能性が高く、ポリスクシンイミドの分子量に応じた架橋剂量の調整が必要であると推察される。

## 1-3-4 吸水性評価

紙おむつ用途に用いる場合、高吸水性樹脂の吸水量や保水量は重要な評価指標となる。そこで、得られた架橋型ポリアスパラギン酸ナトリウムは、下記の方法で物性の評価を実施した。

<吸水量評価>

吸水量の評価は、ティーバック法により行った。架橋反応で得られた吸水性樹脂を不織布製のティーバックに入れ、25°Cに保たれた大量のイオン交換水中にティーバックごと浸漬し、吸水及び膨潤させた。その後1時間で、ティーバックを引き上げ、そのまま吊り下げて水切りを行った。水切りが終了した後に吸水した全体の重量を測定した。

同様の操作をティーバックのみで行い、それをブランクとして、全体重量からブランクの重量と吸水性樹脂の重量を減じた値を吸水性樹脂の重量で除した値を吸水量 (g-water/g) と定義した。

また、紙おむつ用途では尿に対しての吸水性が重要であるため、尿の代替として生理食塩水 (0.9 wt%NaCl) を用いた吸水量も評価した。イオン交換水の代わりに生理食塩水を用いた以外は上記と同じ手順で測定した。

#### <保水量の評価>

保水量の評価も、吸水量の評価と類似した手順で行った。吸水量の評価のティーバックを引き上げ、そのまま吊り下げて水切りを行うまでは同じ手順で実施した。その後、遠心脱水を行い、脱水後の全体の重量を測定した。同様の操作をティーバックのみで行い、それをブランクとして、全体重量からブランクの重量と吸水性樹脂の重量を減じた値を吸水性樹脂の重量で除した値を保水量 (g-water/g) と定義した。

保水量の評価は生理食塩水でのみ測定した。

#### A. 重合法の影響

1-3-2で溶液重合及び固相重合の2つの方式でポリスクシンイミドの重合方法を検討した。そこで、重合方法の違いによる吸水性能への影響を把握するため、2つの重合製法で作製した分子量の近いポリスクシンイミドから架橋型ポリアスパラギン酸ナトリウムを作成し、吸水性能を比較した。

尚、架橋反応は1-3-3に記載したエポキシ架橋の手順で、架橋剤を添加する事で実施した。

吸水性の評価結果を表10に示す。

表 10 重合法と吸水量の関係

PSI 由来	条件 1	条件 2	条件 3	比較
モノマー由来	石油系	石油系	石油系	ポリアクリル酸
重合方法	溶液	溶液	固相	N. D
PSI 分子量 Mw	5.2 万	5.5 万	5.1 万	N. D
吸水評価				
吸水量(純水)g/g	211	196	161	304
吸水量(生食)g/g	34	42	41	52
保水量(生食)g/g	18	19	24	32

条件 1, 2 の溶液重合品では同じ重合方法でポリスクシンイミドの分子量も近いことから、吸水性能はほぼ近いものが得られた。ターゲット材料であるポリアクリル酸の吸水物性と比べると、6~7割の性能に到達していることを確認した。条件 3 の固相重合品は、純水の吸水量が溶液重合品に比べ、若干劣るものの生理食塩水での吸水性能は、溶液重合品とほぼ変わらないことを確認した。このことから、紙おむつ用途ではポリスクシンイミドの重合方法として、溶液重合、固相重合で吸水性能にはそれほど差がみられなかった。

#### B. ポリスクシンイミドの分子量の影響

ポリアスパラギン酸の分子量と吸水性能の関係を把握するため、中間体であるポリスクシンイミドの分子量の異なるものを、架橋型ポリアスパラギン酸ナトリウムにし、吸水性能を比較した。

尚、架橋反応は 1-3-3 に記載したエポキシ架橋の手順で、架橋を実施した。

ポリスクシンイミドの分子量並びに吸水性の評価結果を表 1-1 に示す。

表11 PSI 分子量と吸水量の関係

PSI 由来	条件1	条件2	条件3	ポリアクリル酸
モノマー由来	石油系	石油系	石油系	
PSI 分子量 Mw	2.3万	5.1万	7.8万	
吸水評価	ゲル未形成			
吸水量(純水)g/g	測定不可	161	272	304
吸水量(生食)g/g	測定不可	41	45	52
保水量(生食)g/g	測定不可	24	21	32

表11の結果で、ポリスクシンイミドの分子量が小さい条件1においては、実施した架橋反応では、ポリマーが水溶液に溶解したままでゲル状にならず、吸水性の評価が行えなかった。このことから、ポリスクシンイミドの分子量 Mw が 2 万前後の場合、現在の架橋条件下では吸水性樹脂として必要な水に不溶な状態を作ることが難しい事が分かった。架橋剂量の増加により、ゲル状の状態にすることは可能であると推察される。しかし、前述までの検討で架橋剂量を増やすと吸水性が低下することが容易に推察できる。

一方で、ポリスクシンイミドの分子量 Mw が大きくなるについて、吸水量が増加していくことも確認できた。分子量 Mw 7.8 万のポリスクシンイミドから合成された架橋型ポリアスパラギン酸ナトリウムでは、吸水用途のポリアクリル酸ナトリウムに対し、約 8 割の吸水性を示すことが確認できた。このことから、吸水性を向上させる手段の一つとして、ポリスクシンイミドの分子量 Mw を更に上げる方法が有効であることが分かった。

### C. 発酵法によるアスパラギン酸の影響確認

石油由来のアスパラギン酸とバイオ由来の発酵法によるアスパラギン酸により生成された架橋型ポリアスパラギン酸ナトリウムの吸水性能を比較するため、異なる重合法でそれぞれポリスクシンイミドを合成し、架橋型ポリスパラギン酸ナトリウムでの吸水性能を比較した。ポリスクシンイミド合成にあたり、触媒量や反応時間は同一条件で実施した。

尚、ポリスクシンイミド重合後の架橋反応は 1-3-3 に記載したエポキシ

架橋の手順で、架橋を実施した。

吸水性の評価結果を表1-2に示す。

表1-2 モノマー由来と吸水量の関係

PSI由来	条件1	条件2	条件3	条件4	比較
モノマー由来	石油系	発酵法	石油系	発酵法	ポリアクリル酸
重合方法	溶液	溶液	固相	固相	
分子量Mw	5.5万	5.2万	7.4万	7.0万	
吸水評価					
吸水量(純水)g/g	196	211	191	152	304
吸水量(生食)g/g	42	34	31	39	52
保水量(生食)g/g	19	18	26	22	32

上記の結果から、まず溶液重合でつくられた架橋型ポリスパラギン酸ナトリウムは生理食塩水での吸水性に若干の差異が見られるものの、保水量や純水での吸水量はほぼ同等であった。固相重合も同様で、発酵法のモノマーによる目立った吸水性の低下は見られなかった。

石油系及び発酵法にそれぞれにより得られたアスパラギン酸を使って合成された架橋型ポリアスパラギン酸ナトリウムは、吸水性の面からは大差は確認されなかった。前述の通り重合条件を統一させた場合、ポリスクシンイミドの到達分子量もほぼ同等のものが得られており、吸水用途のポリマーの吸水面の観点からは、発酵法のモノマーは石油由来のモノマーと変わらないと考えられる。

### 1-3-5 まとめ

紙おむつ用途に向けた高吸水性材料としてのポリアスパラギン酸の製造方法の基礎検討を行った。本年度は、吸水性能への影響が大きいと推察されるアスパラギン酸からポリスクシンイミドの重合工程とポリアスパラギン酸を水に不溶化させる架橋工程の検討を中心に実施した。

アスパラギン酸からポリアスパラギン酸を得る重合方法として、溶液法と固相法の2つの重縮合方法を検討した。どちらの方法でも触媒量や反応温度などの重縮合条件を最適化することで、ポリスクシンイミドの分子量アップにつながった。結果的に今回の検討条件では分子量Mwが6～8万まで到達することを確認した。

ポリアスパラギン酸の架橋方法として、ジアミンによるアミン架橋とジエポキシによるエポキシ架橋の2つの架橋方法を検討した。アミン架橋では分子量Mw5.5万のポリスクシンイミドを使用した今回の架橋条件下では、吸水性ポリマーとして吸水性能は出るもの、ポリアクリル酸SAPの25～50%程度の吸水性能しか示さなかった。一方で、エポキシ架橋の検討では、架橋剂量が少ない場合は水溶性が強く吸水性ポリマーとして機能しない事、架橋剂量を増やしていく場合は吸水性能が低下していく事が確認された。この事から架橋剂量の設定が吸水性を左右することが明確になった。エポキシ架橋では分子量Mw5.5万のポリスクシンイミドを使用した今回の架橋条件下では、ポリアクリル酸SAPの60%程度の吸水性能を示した。

ポリスクシンイミドを高分子量化させることで、ポリアスパラギン酸SAPの吸水性能も向上していくことが確認された。そこで、本年度の検討で得られたMw7.8万のポリスクシンイミドを使用して、エポキシ架橋により吸水性ポリマーを合成した。合成したポリマーを紙おむつに使用されているポリアクリル酸SAPと吸水性能の比較を行った結果、ポリアクリル酸SAPが純水で自重の300倍を吸水するのに対し、本事業で作製したポリアスパラギン酸SAPは自重の200倍以上の純水が吸収できることが確認できた。また、生理食塩水を使用した吸水量及び保水量の比較でも、ポリアクリル酸SAPの7～8割程度の性能を示すことが確認できた。

今後、吸水性能をポリアクリル酸SAPに近づけるためには、重合条件の検討によるポリスクシンイミドの高分子量化、さらなる架橋条件の最適化が必要である。また、本事業で作製したポリアスパラギン酸SAPは、ポリアクリル酸SAPに比べ吸水ゲル強度が弱く、ゲルブロッキングを起こしやすい事が分かっているため、紙おむつ用途に向けた他の物性評価も今後の課題である。

本事業のベースとなる発酵アスパラギン酸を使い吸水性ポリマーを作製し、石油系アスパラギン酸ベースの吸水性ポリマーと比較を実施した。結果、前述した重合工程や架橋工程を行った場合、吸水性能には大きな差は確認できなか

った。現時点での製法では、発酵アスパラギン酸も石油系アスパラギン酸と性能面で変わらない吸水性ポリマーが得られることが分かった。今後、吸水性能を上げるため、製法改良を行う余地があるため、発酵アスパラギン酸の影響を継続して確認していく必要がある。

## 2. モラセス（糖蜜）を使った発酵の開発

## 序論

静止菌体を使った発酵には様々な利点は存在する。反応を増殖と切り離すことで、反応は菌体の増殖とは無関係に目的物質を生産するためだけに糖源を利用できる。これは遺伝子改変等を考える上でも有利であり、通常の発酵法では作れない物質の生産が可能になる。例えばL-alanineは、ペプチドグリカンに使われる生育に必須なD-alanineを合成するため（1）、通常の発酵法ではどうしてもDL-alanineという二つの物質が混ざった形で生産される。しかし静止菌体を使った発酵法では、予め $\alpha lr$ というD-alanineを合成する遺伝を破壊しておき、増殖にはD-alanine（あるいはDL-alanine）を培地に加えて増殖させる。反応では菌体は増殖する必要がないため、D-alanineを反応に加える必要はない。D-alanineを加えずに発酵させれば、D-alanineは全く合成されずにL-alanineが単独で精製される。その他にも、増殖とは違った代謝系を反応で動かしたり、増殖させる必要がないので繰り返し反応が可能であったりと、この反応系のみで可能なことはいくつか存在する。

しかし、通常の発酵法にはないマイナスの面もいくつか存在する。その一つが培養の過程では、基本的に細胞を増やすためだけに糖源が使われ、物質生産には活かされないことがある。よって培養にかけるコストを如何に削減するかと言うことが、実用化に向けた鍵になる。その一つの解決策がモラセス（廃糖蜜）を使った培養法の導入がある。モラセスはサトウキビから砂糖を精製する過程で出てくる砂糖としては使えない成分であるが、砂糖（ショ糖）の他に、グルコースやフルクトースの糖源、アミノ酸や有機酸、ミネラル、ビタミンなど細菌の培養に必要な成分はほぼすべて備えている（2）。価格も製糖工場の近くであれば安価に手に入れることができる。実際グルタミン酸の生産にはこのモラセスを使っているケースが多く（3）、安価な物質生産に適していることはすでに証明されていると言っても良い。

モラセスは非常に安価な糖源であり、その他の栄養素も豊富なため、培養にモラセスを使うメリットは大きい。しかし雑多な不純物が多く含まれており難容性の固形成分も存在する。また着色がひどく精製に与える負荷も大きい。このようなモラセスの抱える問題点は、培養のフェーズと反応のフェーズが分かれている静止菌体を使った発酵法ではかなり緩和される。すなわち培養後の培地成分は、基本的に反応液で置き換えられるため、モラセスの着色や不純物が

反応液に持ち込まれる割合は少ない。

このようなモラセスの持つプラスの側面とマイナス面を補う静止菌体発酵法を組み合わせ、その利点を最大限に活かそうと言うことで、今回の提案に至った。

## 2-1 グルコース培地との比較（培養）

これまでの実験では培養の糖源にはグルコースを使っており通常の試験管培養などはA培地という培地を使っている。

A 培地

4% グルコース

2g/L 酵母エキス

7g/L カザミノ酸

7 g/L 硫酸アンモニウム

0.5g/L リン酸1水素カリウム

0.5g/L リン酸2水素カリウム

0.5g/L 硫酸マグネシウム

6mg/L 硫酸鉄7水和物、

4.2mg/L 硫酸亜鉛1水和物、

0.2mg/L ビオチン、

0.2mg/L チアミン

しかし、酵母エキスやカザミノ酸は比較的高価である。これでは実地での培養を考えた時にコストがかかり過ぎるため、ジャー培養などにはカザミノ酸を入れないNA培地という栄養源を抑えた培地を使っていた。

NA 培地

2.5% グルコース

2g/L 酵母エキス

7g/L 硫酸アンモニウム

0.5g/L リン酸1水素カリウム

0.5g/L リン酸2水素カリウム  
0.5g/L 硫酸マグネシウム  
6mg/L 硫酸鉄7水和物、  
4.2mg/L 硫酸亜鉛1水和物、  
0.2mg/L ビオチン、  
0.2mg/L チアミン

このNA培地(Glucose)のグルコースをモラセス(50%糖液換算)で置き換えた培地(糖液+YE)、モラセスと酵母エキスをモラセスで置き換えた(糖液-YE)、モラセスと水のみの培地(糖液only)を用意して菌体の培養を行った。培養は10L Jarを用いて液量は5L、培養条件は以下の通り。

#### 培養条件

温度	33°C
pH	7.5
攪拌速度	600rpm
通気	5L/min

図2-1に示すように、どの培地を用いてもOD610の伸びはほぼ同じであり、菌体の量と言う観点から見るとモラセスのみの培地で充分であることがわかった。ここでモラセスのコストを10円/kgとしてグルコース培地と比較すると、グルコース培地の約1/5の費用しかからないことがわかる(図1-1-13)。実際現地でモラセスを調達すればコストはさらに安くなる可能性もある。

#### 2-2 グルコース培地との比較(反応)

菌体を増やす目的ではモラセスはグルコース培地に遜色ないことがわかった。モラセス培地が本事業に使えるかどうかを判断するためには、モラセス培地で増やした菌体がきちんとアスパラギン酸をつくることを確認しなければならない。図2-2はグルコース培地で培養した菌とモラセス培地で培養した菌を反応に持ち込んだ結果の比較である。菌体の性能は若干モラセス培地で培養した菌体の方がよいと言う結果が得られた。ただし後述するが、モラセス培地で調整

した菌体は、モラセスの濃度によってはかなり不安定であり、場合によっては性能の劣化が見られることがある。図2-2では通常通り反応が進んだ実施例と考えられる。この問題に対する検討は後述する。

### 2-3 グルコース培地との比較（精製）

静止菌体を使った発酵プロセスにおいては反応で培地を入れ替えるため、モラセスが精製に及ぼす影響は少ない。しかしそれでも一回目の反応液は褐色に着色しており、影響が全くないとは言えない。図1-2-10のNo.41～50, 101～110はともにモラセスで培養した菌体で精製したアスパラギン酸の精製度を示しているが、現在の精製法を用いれば、モラセスを使った反応液でも99%以上の純度に仕上げることができ、かつポリマー化の際にも着色は見られない。モラセスを使うことによる精製への影響は特に大きな問題ではないと言える。

### 2-4 培養条件検討

以上の結果からグルコース培地での培養を選択する理由は乏しく、システムをモラセス培地に切り替えることにした。8連ジャーは攪拌速度の遅い反応の条件検討には適しているが、培養の条件検討には必ずしも適していない。その大きな理由は小さなベッセルにpHセンサーやORPセンサーが入っているため、攪拌した時にバッフルのような役割を果たして泡立ちがひどくなる。

現在のアスパラギン酸生産では、10Lジャーでの培養-5Lジャーでの反応という形態が主なものであることから、培養の条件検討も10Lジャーで行うこととした。培地成分等は以下の通りである。培養時間は24時間とした。

#### 培地組成

モラセス	350mL
消泡剤	10ml
水	
計	7L

図2-3に示すように、温度、pH、攪拌速度、通気をそれぞれ3種類に振って

OD<sub>610</sub> の伸びが最もよいものを選んだ。その結果、温度は 35°C、pH は 8.0、攪拌速度は現条件では差は顕著ではないが、微差ながら 600rpm が最も高い OD<sub>610</sub> を示した。通気はほぼ一定だったため、今後の設定も低めに設定して 0.5vvm とした。

## 2-5 増殖によるアスパラギン酸生産能の低下

条件検討では 24 時間程度培養した OD<sub>610</sub> を示したが、5%モラセスで培養した場合 24 時間の地点では、培地にはかなりのスクロースやフルクトースが残っている（図 2-4）。培養時間を延ばせば、OD<sub>610</sub> は上がるのだが、菌体の性能が落ちると言う現象が確認されていた。図 2-5 は同じ培養液からそれぞれ OD<sub>610</sub>=30, OD<sub>610</sub>=37, OD<sub>610</sub>=41 の時に培養液を 750ml 抜き取り、8 連ジャーで反応試験をした結果である。生産性も収率も OD<sub>610</sub>=30 の時が最もよく、細胞数が少ないにもかかわらず、もっともよい性能を示していることになる。つまり増殖を引き延ばすことにより、菌体のアスパラギン酸生産能力は劣化していくと言うことを示している。

これはモラセスに含まれる糖源の量に対して、生育に必要な他の成分が足りていないのではないかと考え、ビタミンの添加による生育とアスパラギン酸生産能の回復を調べた。図 2-6 ではグルコース培地で必ず添加するチアミンとビオチンの影響を調べたが、菌体の増殖には劇的な変化は見られなかった。二つのビタミンを同時に加えたときのみ菌体性能にプラスの効果が確認された。

## 2-6 モラセスの濃度と生育速度

モラセスの成分が糖源の割合に対して、生育に必要な成分 X が足りないと仮定すると、その成分を特定するよりも、単純にモラセスの供給量を増やしてその成分を供給する方が簡単であると考えた。モラセスはこの時点では 5%で固定していたが、この濃度を 10%まで段階的に増やしてみた。

図 2-7 に示すように、モラセスの濃度の増加は細胞の増殖速度を速めて、10%モラセス培地では 24 時間で OD<sub>610</sub>=52.8 まで達した。菌体の性能も落ちておらず（図 2-8）、菌体密度を上げて性能を維持させるためにはモラセスの濃度を上げる必要があることがわかった。

## 2-7 CSL の添加の影響

モラセスの濃度を上げることで、一先ず菌体の性能劣化の問題は解決したが、モラセス培地でその糖源を有効に利用するためには、先ほどの生育に必要な成分 X をモラセスとは別の形で供給することが望ましい。

窒素源、特にアミノ酸の供給が必要ではないかと言う仮説がすぐに浮かんだが、酵母エキスやカザミノ酸は価格が高く、実生産に使うのは難しい。そこで比較的安価に手に入るコーンスティーピリカー(CSL)でその効果を試すことにした。CSL とはトウモロコシからでんぷんを精製する際に出てくる可溶性分で、アミノ酸、ビタミン、ミネラルを多く含んでいる(4)。この実験では、この CSL を粉末にしたソルリス（オリエンタル酵母）を使用した。

図 2-9 に示すように、ソルリスの添加は増殖を高める効果があり、24 時間での  $OD_{610}$  は 68 に達した。菌体の性能も維持されていることも確認している。

## 2-8 リン酸の添加の影響

グルコース培地ではアミノ酸成分を除けば、主に 0.5g/L リン酸 1 水素カリウム、0.5g/L リン酸 2 水素カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウムが加えられている。モラセスの成分は、産地によって異なるが、Wikipedia

(<https://en.wikipedia.org/wiki/Molasses>) によると、100g のモラセスに対して、リンは 31mg、カリウムは 1464mg、マグネシウムは 242mg である。このうち桁が違って低いものはリンであり、このすべてがリン酸に由来すると考えても、1L のモラセス培地 (10%) に含まれるリン酸の重量は 95mg となる。一方、グルコース培地に含まれるリン酸を計算すると 622mg となり、モラセス培地の 6 倍以上のリン酸が含まれていることになる。

リン酸の添加の影響を調べるために、10%モラセス培地と 1g/L でリン酸 2 水素カリウムを添加した培地で菌体を培養した。図 2-10 に示したように、24 時間培養した時点で、10%モラセス培地が  $OD_{610}=50.0$ 、リン酸を添加した培地が  $OD_{610}=58.8$  であった。またこの菌体に反応に持ち込んだ結果を図 2-11 で示した。リン酸を添加した培地で調整した菌体は、リン酸を入れない培地より反応スピードが速く、この現象は再現性良く確認された。この結果から、リン

酸の添加は、培養・反応とともにプラスの効果が認められた。

## 2-9 モラセスでの反応

コスト削減の観点から言うと、培養だけではなく反応もモラセスで行なうことが望ましい。しかし、モラセスには多くの不純物が存在するため、通常通り反応が進むのかは不透明である。通常グルコースで反応させる所をモラセスで置き換えて反応させた結果を図2-1-2で示した。反応スピードは遅く、200mMを越えるのに72時間かかっている。またここから精製も行ったが、濃縮を行うことが困難なため、精製収率は5割を割る結果になった。条件検討によっては反応・精製収率の改善は見込まれるが、この時点ではグルコースでの反応に注力して90Lのスケールアップに備えた方が賢明と判断してモラセスでの反応の検討は一旦打ち切りとした。

## 2-10 材料と方法

### A 10Lジャーによる培養

モラセスは糖蜜液（日本ガーリック株式会社、20kg）を使用した。原液は粘性が高いため50%モラセス溶液のストックをつくり、これを計量してジャー培養に用いた。消泡剤はCB-442（日油株式会社）を用いた。固体 CSL はソルリス 095E（オリエンタル酵母株式会社）を使用した。ジャー培養は、BMS-10NP4(ABLE)を使用した。

### B 糖分析

モラセス培地の糖分析は、島津高速液体クロマトグラフ（Prominence）糖分析システム（Shimadzu）を用いた。カラムはAminex HPX-87P (BIO-RAD)を使用した。サンプルは純水で50倍に希釈し、HPLC用フィルターバイアル(Thomson)を通して調整した。

## 2-11 参考文献

- (1) Azam MA1, Jayaram U1. Inhibitors of alanine racemase enzyme: a review. J Enzyme Inhib Med Chem. 2016 Aug;31(4):517-26.

- (2) 河本 正彦、前田 直彦、藤井 聰 砂糖の精製に関する研究 (XX) : 原料糖並びに精製糖工場廃糖蜜の二三の不純物に就て 兵庫農科大學研究報告. 農芸化学編, 3(2) :101-108
- (3) 安枝寿 アミノ酸発酵研究の最前線 : 生産プロセスの高効率化に向けて 生物工学会誌 : seibutsu-kogaku kaishi 86(11), 525-527,
- (4) 滝昭夫コーンスターク製造工業における副産物「コーンスティーピリカ一」の高度利用に関する研究 三重大学農学部学術報告 75 53-57

## モラセスを使った培養

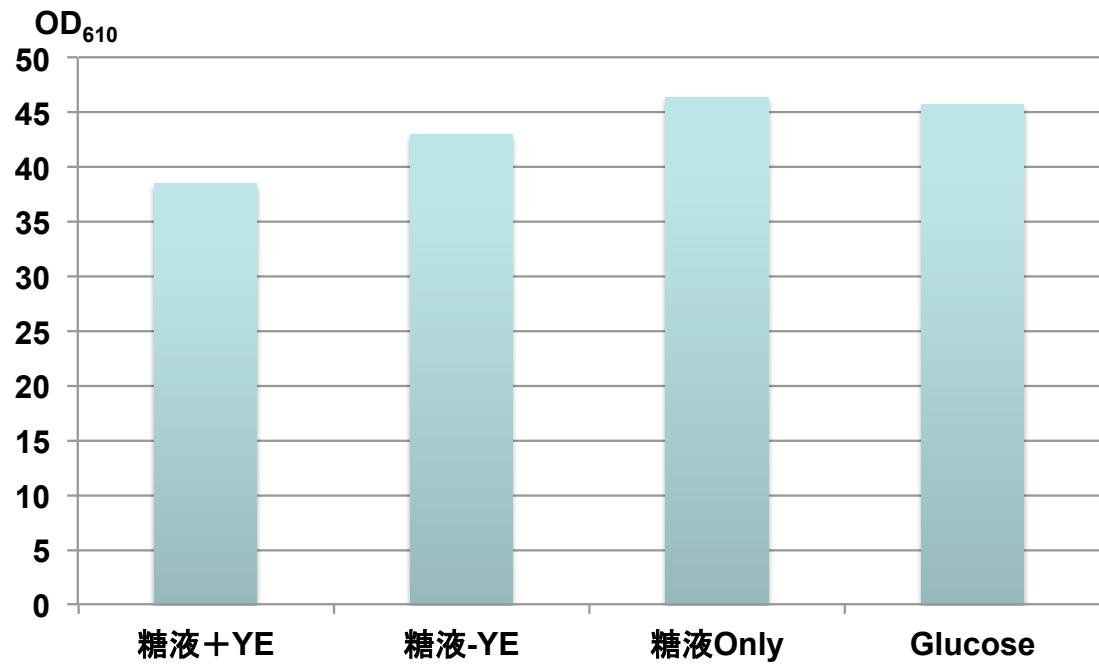


図2-1

## モラセスを使った菌体の反応

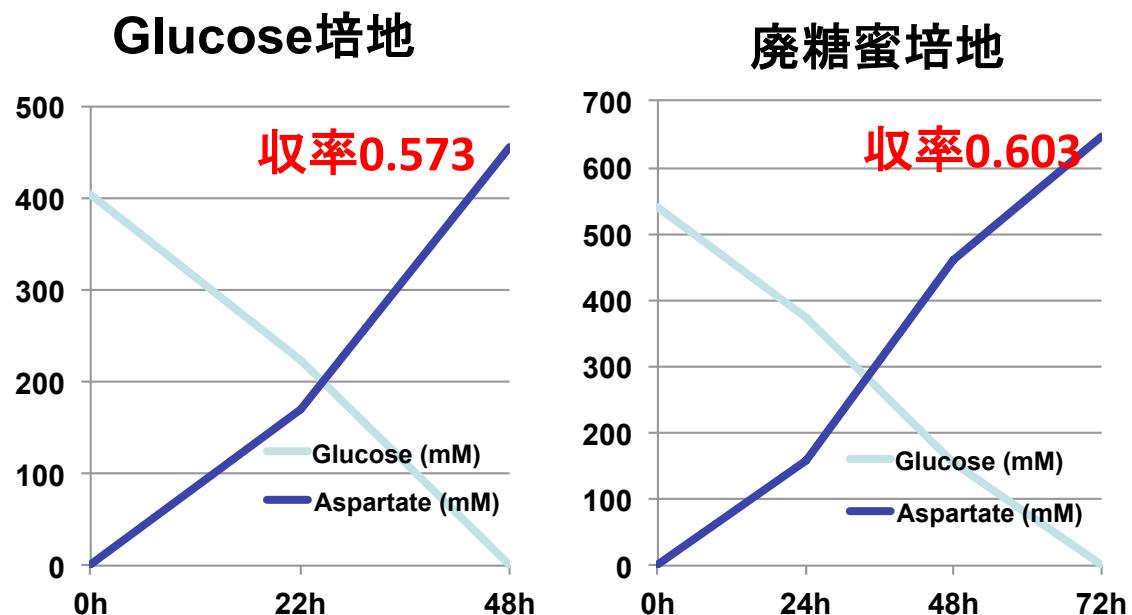


図2-2

## モラセス培地での条件検討

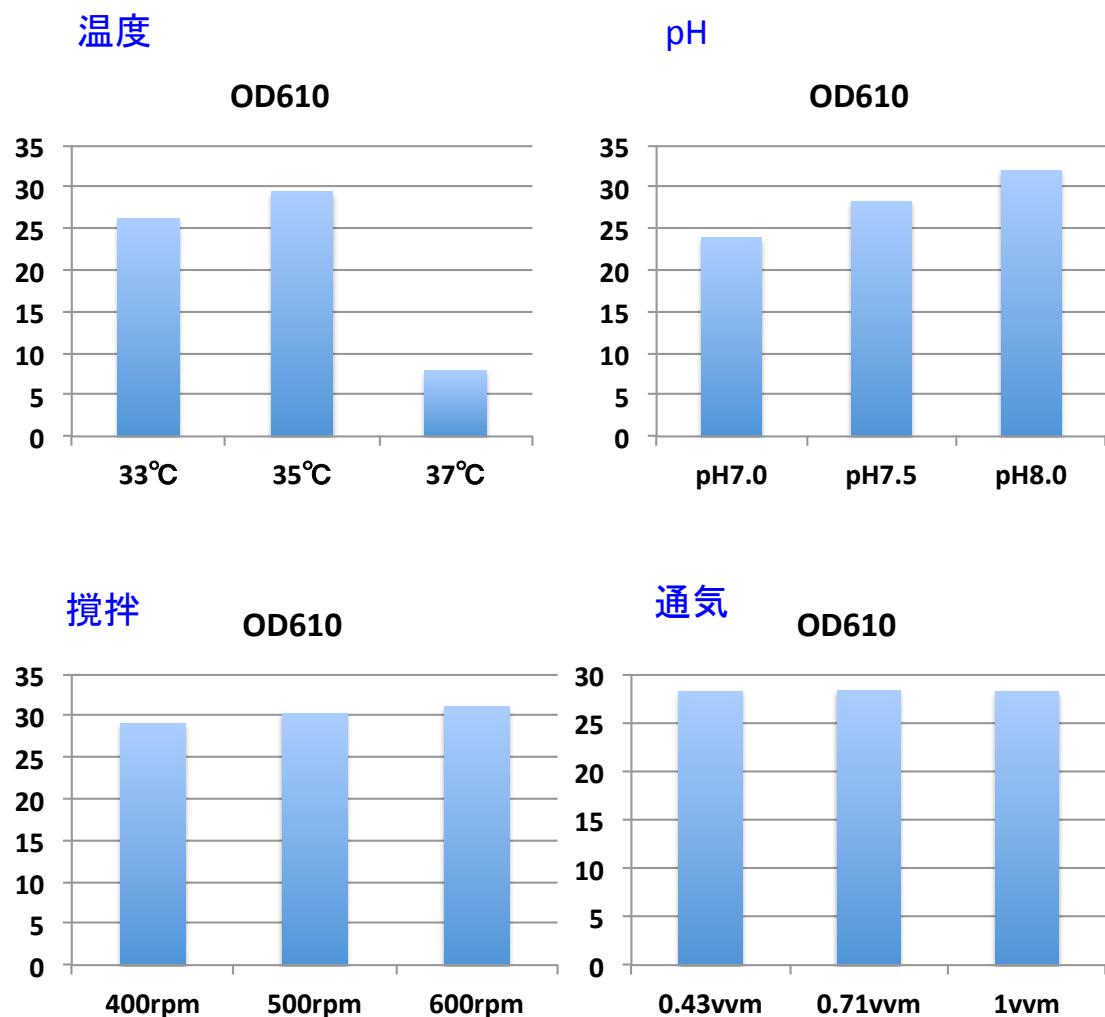


図2-3

## モラセス培地での生育曲線と糖消費

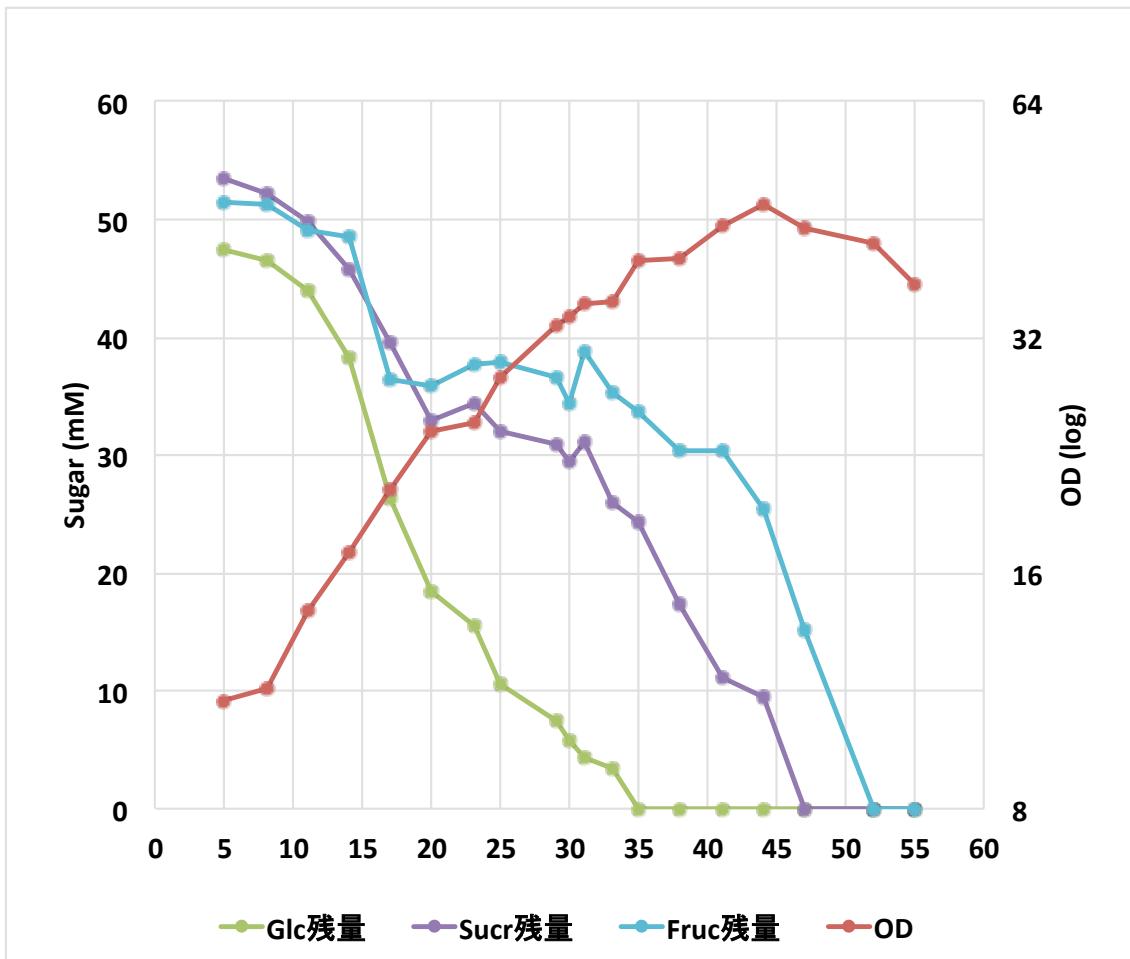


図2-4

## 増殖フェーズによる菌体の性能

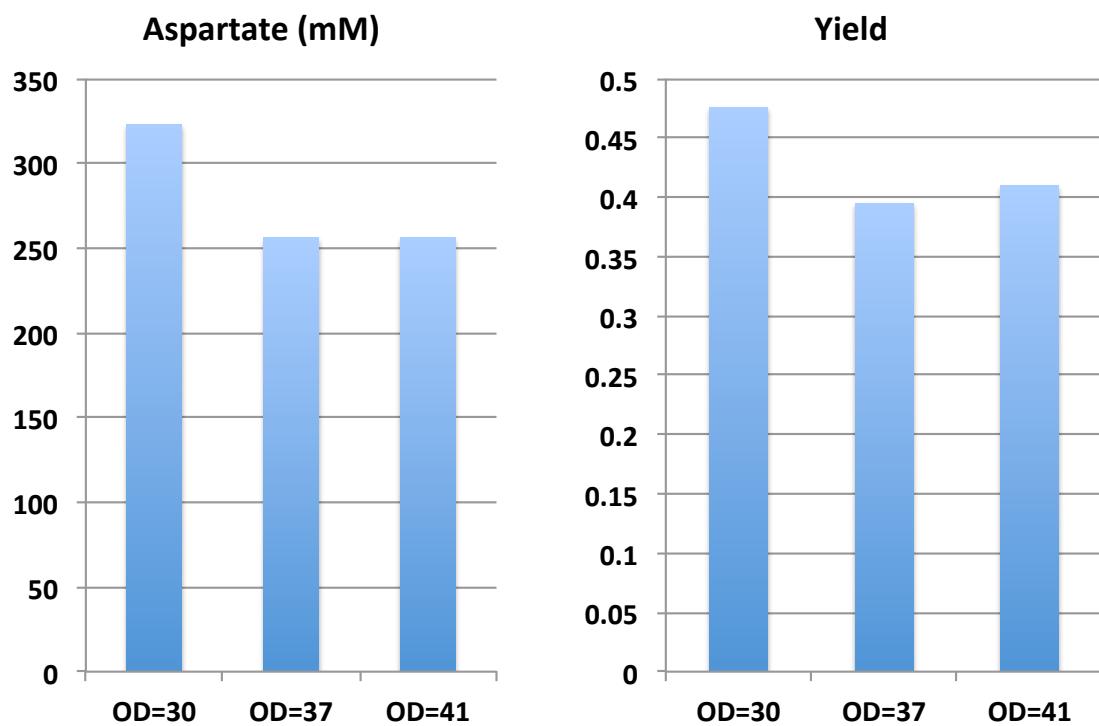


図2-5

## ビタミン添加の影響

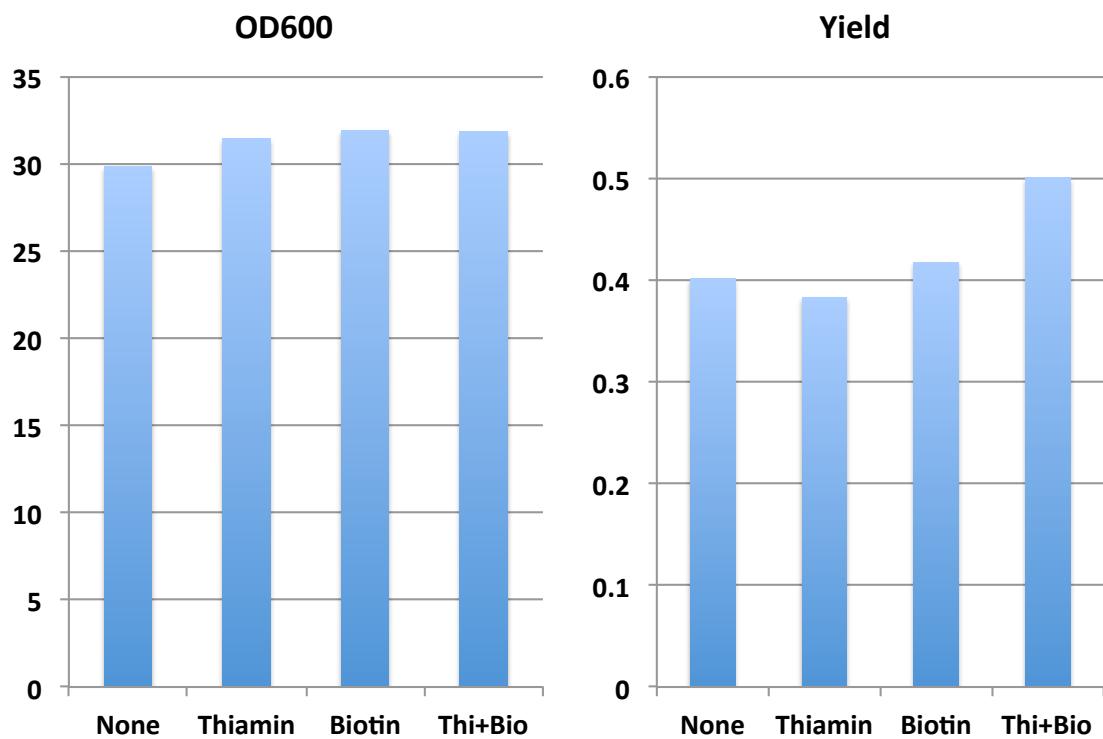


図2-6

## モラセスの濃度と増殖速度

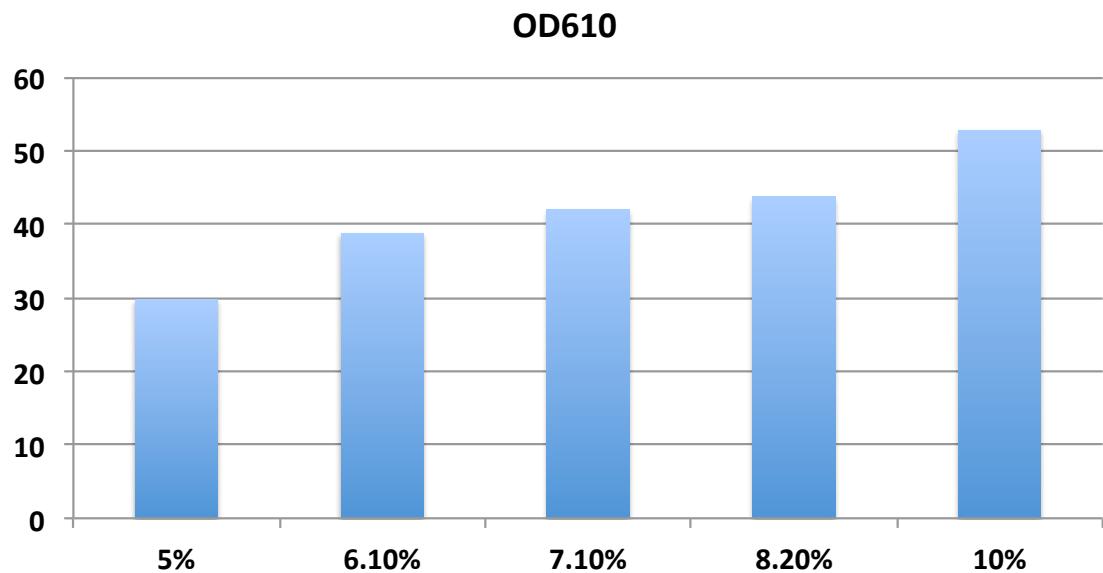


図2-7

## モラセスの濃度と菌体の性能

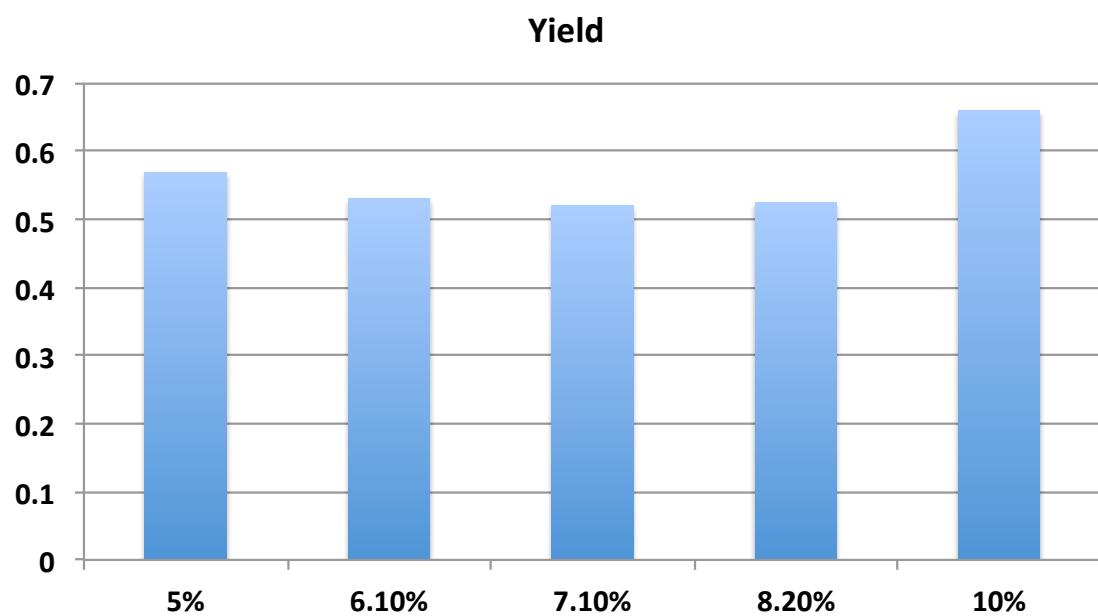


図2-8

## CSL添加の影響

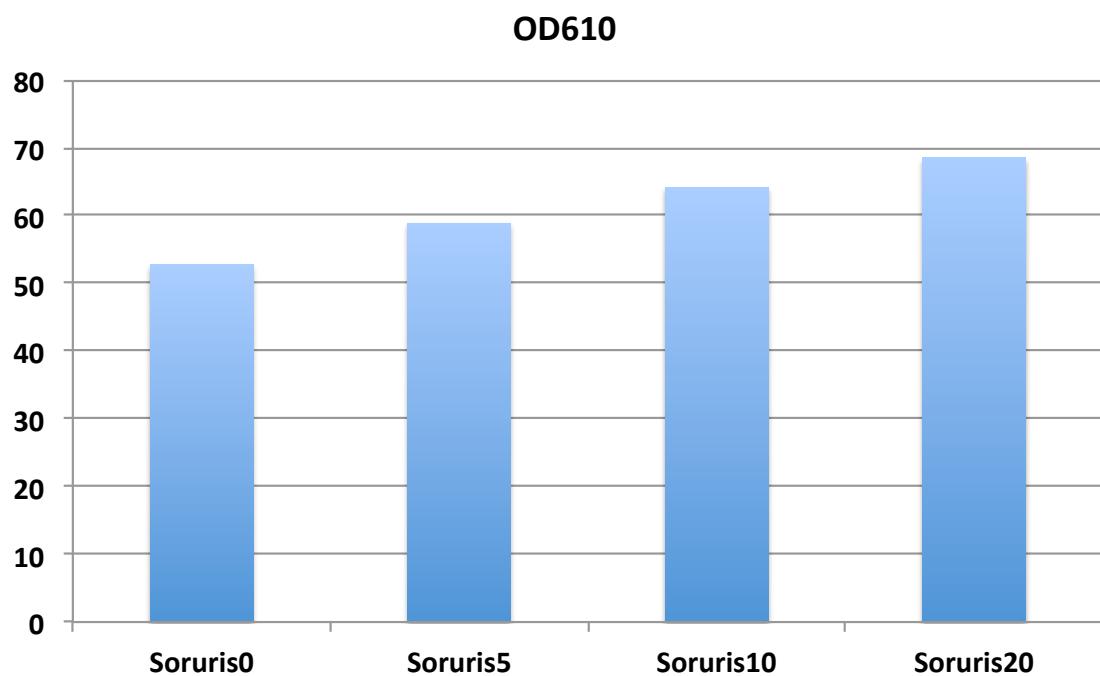


図2-9

## リン酸添加の影響

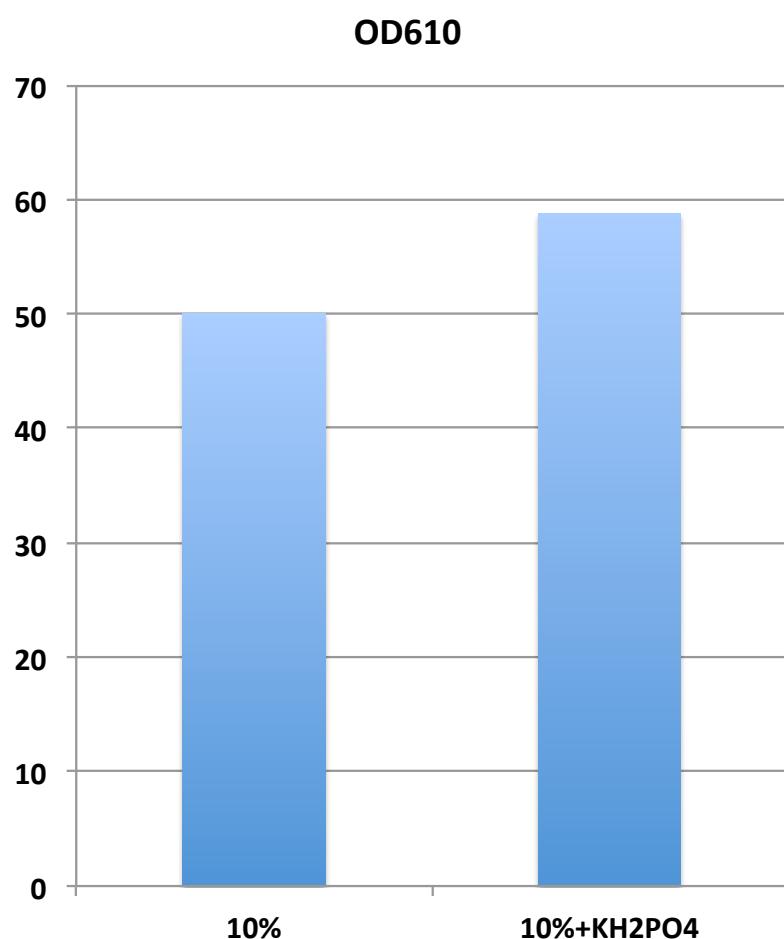


図2-10

## リン酸添加と反応速度

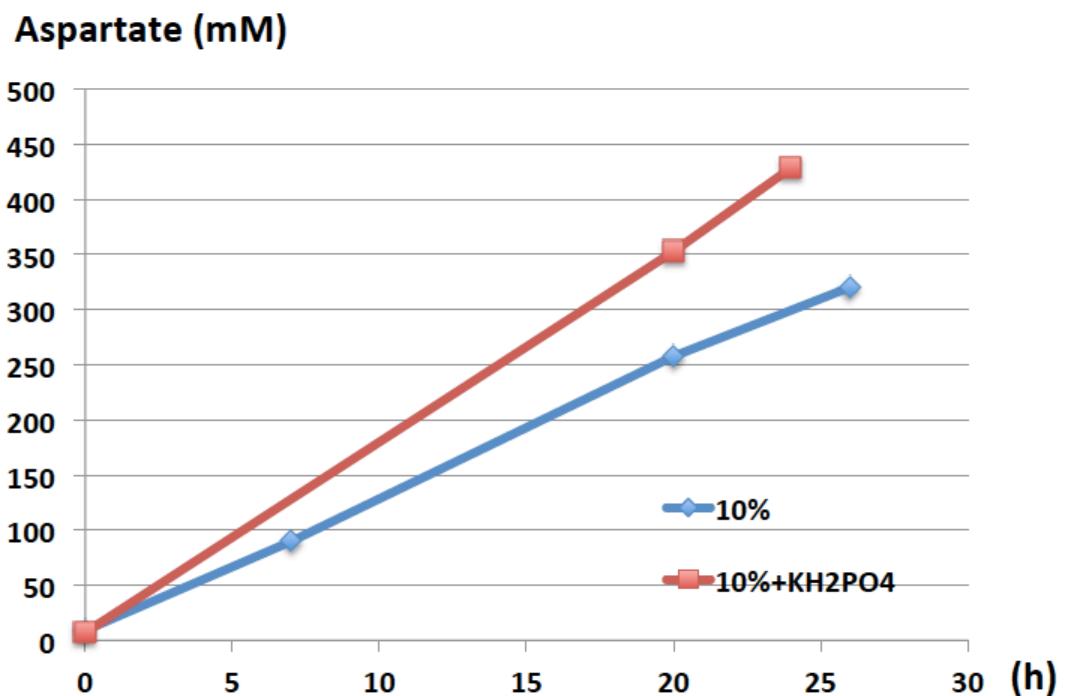


図2-11

## 反応におけるモラセスの利用

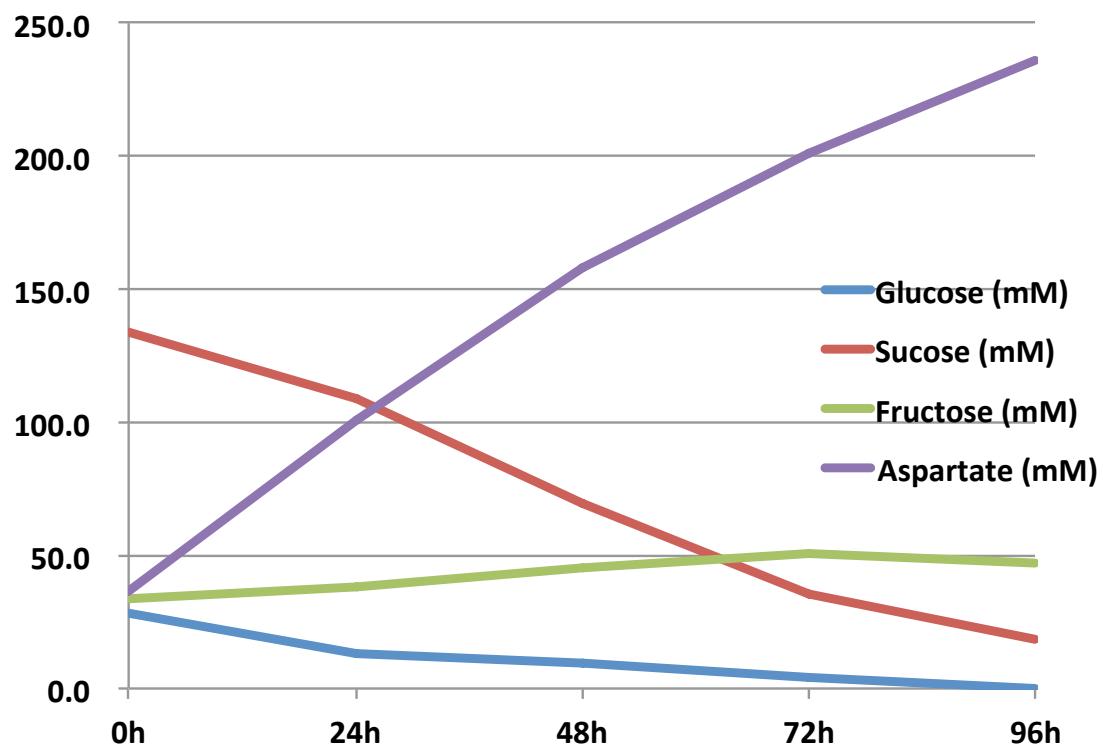


図2-12

### 3. LCA の検証・評価

### 3-1 評価の目的

- 開発予定であるバイオマス由来のポリアスパラギン酸 Na 系高吸水性樹脂（Super Absorbent Polymer : SAP）の環境負荷と、従来の石油由来のポリアクリル酸系 SAP との環境負荷の比較を行い、代替効果を検証する。
- 早期に製品システムの環境負荷の排出ポイントの全体像や問題点を把握し、環境効率の改善に役立てる。

### 3-2 調査範囲

#### 3-2-1 調査対象の製品システム

本評価で対象とする製品システムを下記に示す。

表 1 製品システム

項目	評価対象製品	比較対象製品
製品名	バイオ SAP	石化 SAP
仕様	紙おむつ用途	
構成要素	ポリアスパラギン酸 Na	ポリアクリル酸 Na

評価対象製品は、バイオマス由来のポリアスパラギン酸 Na 系 SAP（以下バイオ SAP）とし、比較対象製品（ベースライン）は、石油由来のポリアクリル酸系 Na 系 SAP（以下石化 SAP）とする。ただし、どちらの SAP も用途は紙おむつに限定する。また、調査範囲は、原材料の調達、土地利用、資本財の製造、製品の製造、輸送および廃棄物処理とする。なお、紙おむつの製造から使用段階に関しては、評価対象製品と比較対象製品で同等の機能を発現すると仮定し、同一の工程と想定されるため、調査対象外とする。

#### 3-2-2 製品システムが持つ機能

紙おむつ利用時に発現する吸水機能。

### **3-2-3 機能単位及び基準フロー**

機能単位は、石化 SAP 1kg が発現する吸水機能とした。バイオ SAP と石化 SAP ではその品質が同等と考えられる（そのような品質を目指し事業において開発を実施）ことから、石化 SAP も、バイオ SAP も基準フローは SAP 1kg である。ただし、石化 SAP と異なりバイオ SAP には生分解性があり、廃棄プロセスにおいて有効にリサイクルでき、土壤改良材等として再利用できた場合には機能の差が発生する場合もありうる。今回の算定では日本の紙おむつの処理の現状を踏まえて廃棄プロセスは焼却処理を想定しており考慮していない。

### **3-2-4 システム境界**

#### **ライフサイクルフロー図**

前出「製品システム」を満たすシステム境界を決定した。バイオ SAP（図中：評価対象製品）と石化 SAP（図中：ベースライン）のライフサイクルフロー図を以下に示す。それぞれのライフサイクルの詳細については、次項以降で説明する。

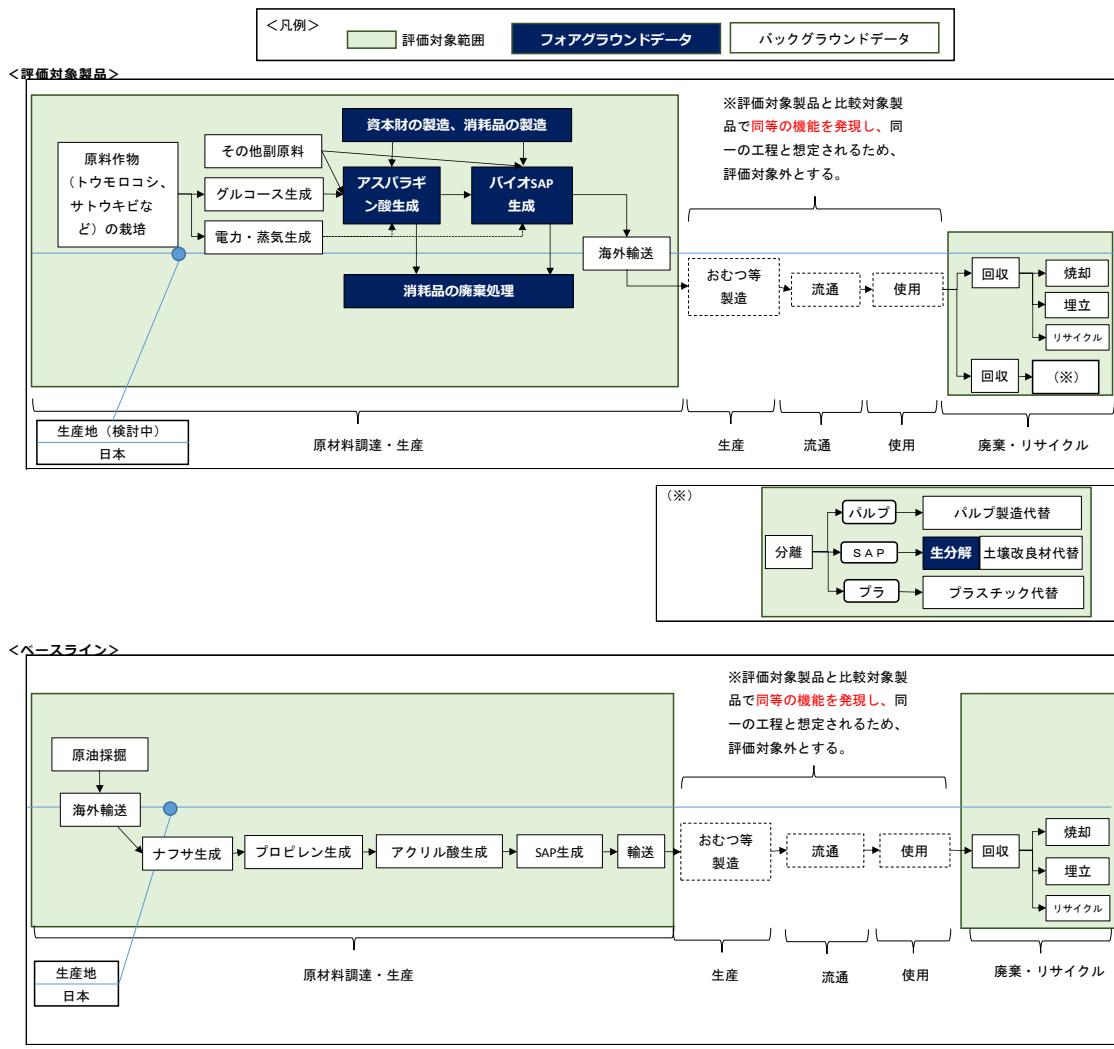


図 3-1 バイオ SAP と石化 SAP のライフサイクルフロー図

### 石化 SAP の生産

ベースラインとなる石化 SAP は、アクリル酸をポリマー化したポリアクリル酸 Na で構成されている。アクリル酸は、化石燃料を原材料としており、ナフサ、プロピレンといった物質を経て生産される。石化 SAP は、日本国内でも多く生産されており、紙おむつ用途に限らないが、日本国内生産かつ日本国内需要分で年間 20 万トンほどの量となっている [吸水性樹脂工業会, 2019]。

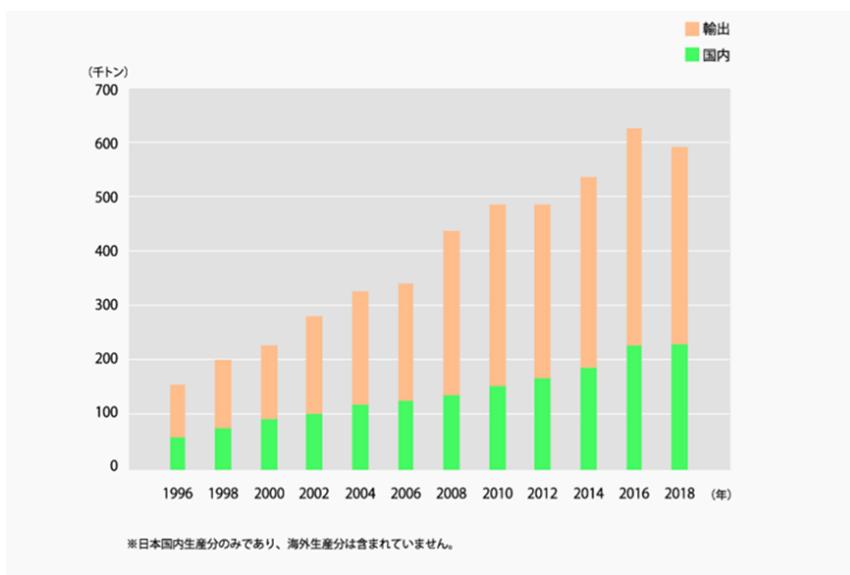


図 3-2 SAP の国内生産量の推移とその供給先 [吸水性樹脂工業会, 2019]

SAP の国内メーカー大手である日本触媒は、アクリル酸生産能力で世界第 3 位、SAP 生産能力で世界第 1 位 [日本触媒, 2015] であるが、その生産工程は以下のとおりである。

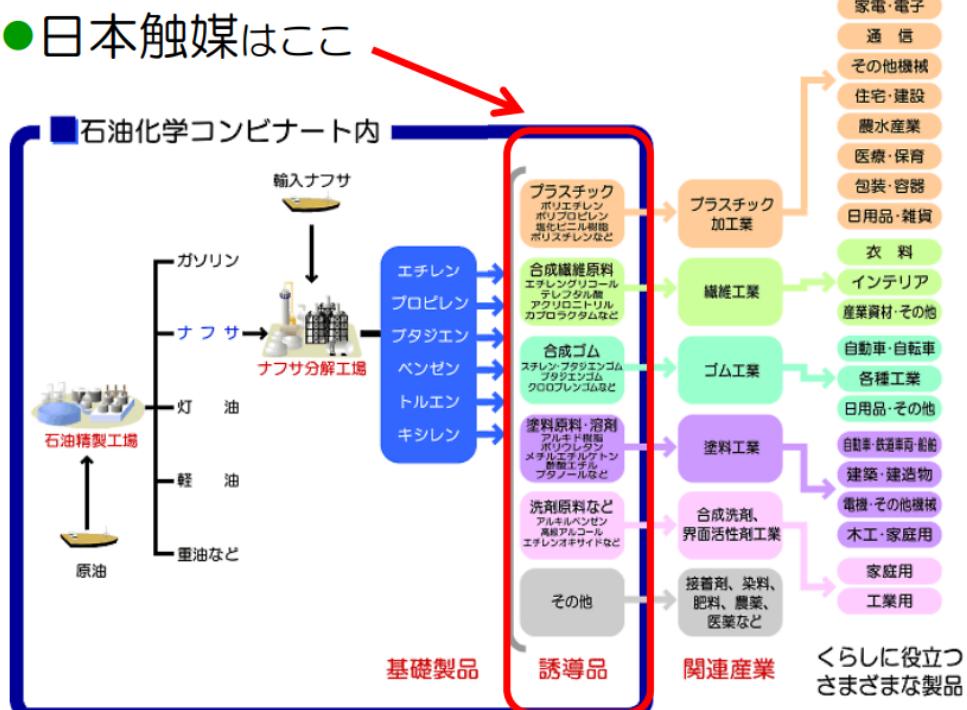


図 3-3 日本触媒の生産工程全体像 [日本触媒, 2015]

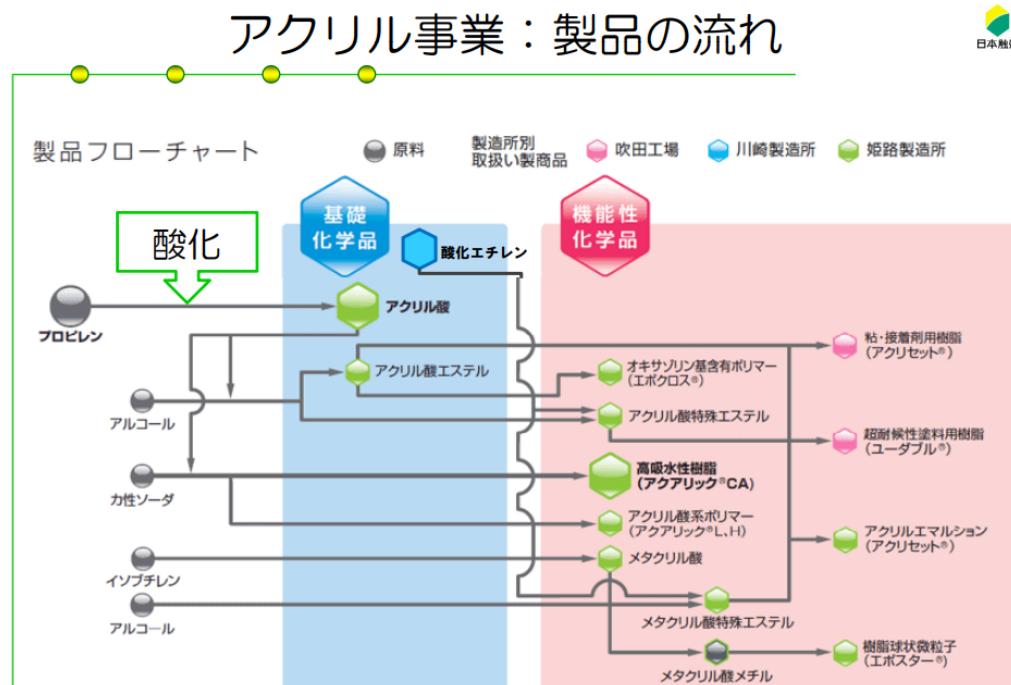


図 3-4 日本触媒の SAP 生産工程 [日本触媒, 2012]

上記資料をみると、アクリル酸は SAP と同じく国内で生産されており、その原料であるナフサもしくは原油は海外から輸入していることが確認できる。そこで、本評価でのライフサイクルフロー図の構築に当たっては、海外から輸入した原油を用いて、国内でナフサ、プロピレン、アクリル酸、SAP を生産しているものとした。

### バイオ SAP の生産

バイオ SAP は、石化 SAP と異なりポリアスパラギン酸 Na で構成される。ポリアスパラギン酸 Na は、アスパラギン酸を主原料としたポリマーである。また、アスパラギン酸は、グルコース等の糖類を原料に生産される。本評価では、上記のポリアスパラギン酸生産とアスパラギン酸生産、ならびにそれらの生産に伴う資本財と廃棄物処理についてフォアグラウンドデータを用いた。LCA の観点におけるバイオ SAP と石化 SAP の大きな違いは、バイオ SAP の主原料が化石燃料ではなく、バイオマス由来の作物なことである。

### SAP の利用・廃棄

続いて、SAP の主な用途である紙おむつの生産、利用、廃棄状況について調

査した。

紙おむつは、主にパルプ、プラスチック、SAPで構成される。統計によると、2018年における紙おむつの生産量は、乳幼児用が48万トン、大人用が39万トンである [経済産業省, 2019]。乳幼児用は主に一般家庭で利用され、大人用は主に介護施設で利用される。下図のように、使用に伴い紙おむつの重量はおよそ4倍になるとされている。

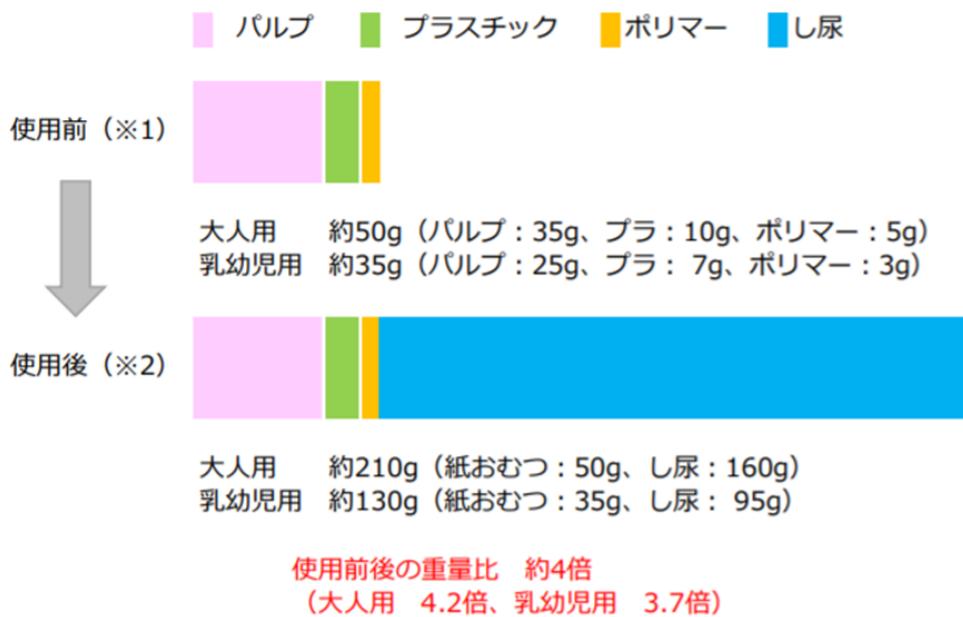


図 3-1 使用前後の紙おむつの組成 [国土交通省, 2018]

利用された紙おむつは、前者のほとんどは家庭系一般廃棄物として、後者のほとんどは事業系一般廃棄物として収集・焼却処理される場合が多い [国土交通省, 2018]。たとえば、北海道の調査では、道内の「紙おむつ」および「生ごみ」の処理方法について、市町村区単位で80%が焼却、17%が埋立、3%がその他という回答だった [循環資源活用部会, 2016]。

使用済み紙おむつの分別回収・リサイクルは、いまだ自治体レベルの規模でありほとんど行われていない [国土交通省, 2018]。しかし、伊坪らの研究事例のように、SAPを含めたおむつのリサイクルプロセスに関する研究も進められており、将来時点での評価であれば検証する価値があるプロセスになりつつある [伊坪 徳宏, 2019]。

### **3-3 影響領域と影響評価手法**

- ・本調査の影響領域は、気候変動とした。
- ・本調査では、影響評価手法として IPCC 2013 Global Warming Potential 100 years (単位 : kg CO<sub>2</sub> eq) を使用した。
- ・インベントリデータの整理・計算、環境影響の算定にあたっては、LCA 支援ソフト「SimaPro 9.0.0.29 英語版」を使用した。「SimaPro 9.0.0.29 英語版」には、本調査で使用した「IPCC 2013 Global Warming Potential 100 years」が標準で実装されており、また、二次データとして使用した LCI データベース「IDEA V2.2」もオプションデータベースとして搭載できることから、本 LCA の実施にあたっては、適切なソフトウェアであると判断した。

#### **3-3-1 評価対象製品（バイオ SAP）**

本 LCA では、対象製品の使用段階を除いたライフサイクルの環境影響を評価するため、原材料の調達から製品の生産プロセス、そして製品廃棄のプロセスに係るデータを収集する。製品の生産プロセスについては、原則一次データを収集する。サプライチェーン上の外部事業者による原料の製造については、二次データを収集する。バイオ SAP は生産までが海外で行われることが想定される。そのため、原材料や生産に必要な二次データはその土地のものが望ましい。

#### **3-3-2 比較対象製品（石化 SAP）**

バイオ SAP と同様に原材料の調達から製品の生産プロセス、そして製品廃棄のプロセスに係るデータを収集する。ただし、一次データは収集しない。バイオ SAP と異なり、石化 SAP はライフサイクルの途中から日本で生産が行われる。日本で生産されるプロセスについては、日本の二次データを用いることが望ましい。

### **3-4 前提条件**

#### **3-4-1 評価対象製品（バイオ SAP）**

- ・ アスパラギン酸製造プロセス、ポリアスパラギン酸 Na の生産プロセスのフォアグラウンドデータは、現時点では実験等から推計されたデータセットである。
- ・ アスパラギン酸製造の原料となるグルコースの原料作物は、トウモロコシをベースシナリオとして設定した。
- ・ 原料作物の生産プロセスについては、実際に事業を開始し生産する土地のものであることが望ましいが、現時点で生産地は未定であることから、日本のデータもしくは海外の一般的な生産地のデータを用いた。
- ・ グルコースの原料、生産プロセスの効率化については、開発状況を考慮して、複数のシナリオを設定して算定を行った。
- ・ 輸送距離については、可能な限り一次データを収集する方針であるが、生産地が決定していないことから、現段階では未計上である。
- ・ 原料作物の生産に伴う土地利用変化に関しては、生産地が決まっていないことから、現段階では未計上である。

### 3-4-2 比較対象製品（石化 SAP）

- ・ 石化 SAP のバックグラウンドデータは IDEA になかったため、石化 SAP 生産のユニットプロセスを別途文献から収集したデータで作成した。

### 3-4-3 共通

- ・ 紙おむつの生産段階、使用段階、廃棄段階までは、評価対象製品と比較対象製品は同一の工程をとり同一の機能を発現するとした。
- ・ 廃棄処理方法に関しては、100% 焼却処理をベースシナリオとしたが、今後は、別の廃棄シナリオについても算定を行う予定である。

## 3-5 ライフサイクルインベントリ分析（LCI）

### 3-5-1 データ区分とデータ取得方法

#### 一次データ

アスパラギン酸、バイオ SAP の生産データは、事業実施元より提供された製造データを用いた。一次データの取得範囲を以下に示す。

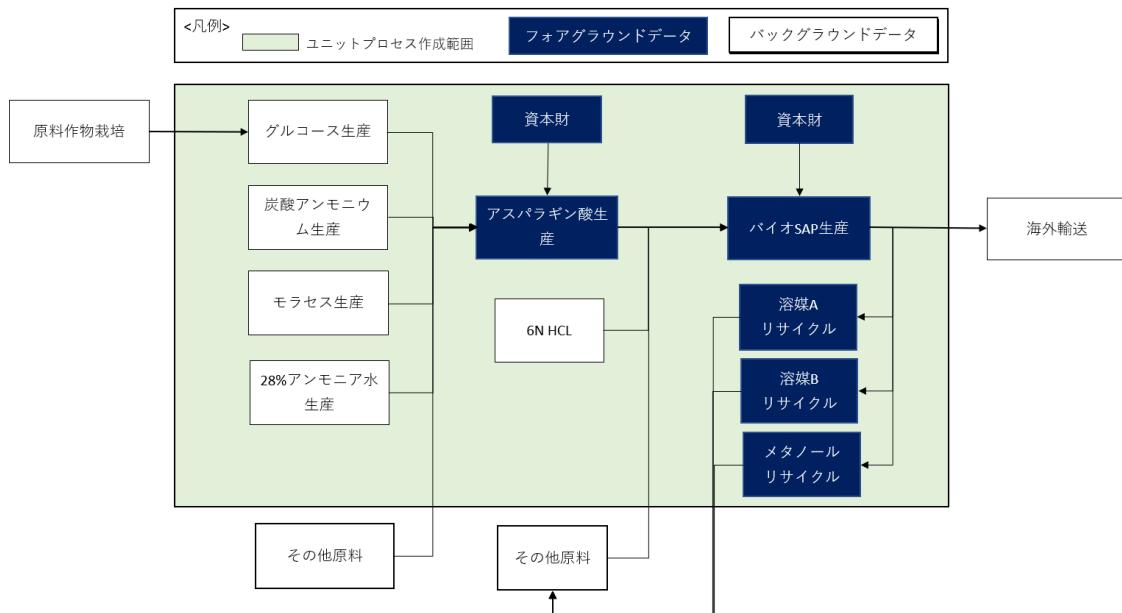


図 3-6 バイオ SAP 生産のライフサイクルフロー図

#### 二次データ

本 LCA では、サプライチェーン上の部品調達先や、製品販売先等の取引先からの一次データ収集はおこなわなかったため、それらのプロセスについては二次データを用いた。二次データは、原則として SimaPro 9.0.0.29 に実装される IDEA V2.2 に含まれるユニットプロセスデータを使用した。ただし、IDEA のユニットプロセスに適当なものがない場合は、別途ユニットプロセスを作成し、IDEA の二次データに上流連鎖させた。

### 3-5-2 シナリオ項目

#### 評価対象製品の削減施策

評価対象製品について、今後導入可能性のある削減施策について、以下の表に示す項目のインベントリを調査した。

**表 2 削減施策項目の分類と内容**

対象製品	ライフサイクル段階	プロセス	削減施策項目
バイオ SAP	原料調達	グルコース生産	コーンストーバー由来グルコースの利用
	生産	バイオ SAP 生産	生産プロセスの効率
		アスパラギン酸生産	バイオマス残渣由来の蒸気の投入
		炭酸アンモニウム	炭酸アンモニウムの代わりに、アンモニア + 化石燃料燃焼由来 CO <sub>2</sub> の有効利用

### 3-5-3 評価対象製品（バイオ SAP）生産

評価対象製品の生産のインベントリを調査した。表中の「データ」列の値が「※」である項目は、IDEA V2.2 に適当なユニットプロセスがなかった。それらの項目は、別途ユニットプロセスを作成した。

#### バイオ SAP 生産

バイオ SAP 生産のユニットプロセスのインベントリは以下の通りである。

**表 3 バイオ SAP 生産インベントリ表**

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	バイオ SAP	1	kg	
入力	主原料	アスパラギン酸	0.905	kg	一次データ
	副原料	溶媒 A	非公表	kg	
		溶媒 B	非公表	kg	
		85%リン酸	非公表	kg	
		NaOH	非公表	kg	
		架橋剤	非公表	kg	
		メタノール	1.539	kg	
		水	2.079	kg	
		6N HCL(濃度 20%)	0.108	kg	※

エネルギー	電力	0.2	kWh	
	蒸気	3.69	kg	
	都市ガス	0.103	m3	
処理	廃溶媒 A リサイクル	非公表	kg	一次データ
	廃溶媒 B リサイクル	非公表	kg	一次データ
	廃メタノールリサイクル	1.539	kg	一次データ
	排水処理	2.432	kg	
資本財	化学プラント	4.00E-10	p	一次データ

また、現段階で可能とされる高効率なアスパラギン酸生産のユニットプロセスのインベントリは以下のとおりである。

表 4 バイオ SAP 生産インベントリ表（高効率）

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	バイオ SAP	1	kg	
入力	主原料	アスパラギン酸	0.905	kg	※
	副原料	溶媒 A	非公表	kg	
		溶媒 B	非公表	kg	
		85%リン酸	非公表	kg	
		NaOH	非公表	kg	
		架橋剤	非公表	kg	
		メタノール	1.539	kg	
	エネルギー	水	2.079	kg	
		6N HCL(濃度 20%)	0.108	kg	※
		電力	0.2	kWh	
	処理	蒸気	3.69	kg	
		都市ガス	0.062	m3	
		廃溶媒 A リサイクル	非公表	kg	※
	資本財	廃溶媒 B リサイクル	非公表	kg	※
		廃メタノールリサイクル	1.539	kg	※
		排水処理	2.432	kg	
		化学プラント	4.00E-10	p	一次データ

## アスパラギン酸生産

アスパラギン酸生産のユニットプロセスのインベントリは以下の通りである。なお、アスパラギン酸生産においてアスパラギン酸以外の出力物の処理プロセスも、すでにこのプロセスの中に存在する。

表 5 アスパラギン酸生産インベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	アスパラギン酸	1	kg	
	大気への排出	活性炭燃焼時の直接排出 CO2	0.1833	kg	
入力	主原料	グルコース	1.5	kg	※
	副原料	炭酸アンモニウム	1	kg	※
		モラセス	1	kg	※
		28%アンモニア水	1.5	L	※
		活性炭	0.05	kg	
		36N 濃硫酸	0.9205	kg	
		洗浄用水道水	53	L	
	エネルギー	純水	30	L	
		電力	0.352	kWh	
	処理	蒸気	0.00239	kg	
		下水処理	80	L	
		廃液処理 (アンモニア水)	0.15	kg	
		廃液処理 (モラセス)	0.01	kg	
		産廃処理 (コネリ菌)	1	kg	
	資本財	産廃処理 (活性炭)	0.05	kg	
		化学プラント	4.00E-10	p	一次データ

また、現段階で可能とされる高効率なアスパラギン酸生産のインベントリは以下のとおりである。

表 6 アスパラギン酸生産インベントリ表（高効率）

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	アスパラギン酸	1	kg	
	大気への排出	活性炭燃焼時の直接排出 CO2	0.0733	kg	
入力	主原料	グルコース	1.17	kg	※
	副原料	炭酸アンモニウム	0.62	kg	※
		モラセス	0.89	kg	※
		28%アンモニア水	0.52	L	※
		活性炭	0.02	kg	
		36N 濃硫酸	0.34	kg	
	エネルギー	洗浄用水道水	40	L	
		純水	25	L	
	処理	電力	0.32	kWh	
		蒸気	0.00122	kg	
	資本財	下水処理	65	L	
		廃液処理（アンモニア水）	0.1	kg	
		廃液処理（モラセス）	0.01	kg	
		産廃処理（コネリ菌）	0.89	kg	
		産廃処理（活性炭）	0.02	kg	
	化学プラント		4.00E-10	p	一次データ

### 6N HCL 生産

濃度 6N の HCL は、濃度 12N の HCL を同体積の水で希釀したものとした。  
塩酸の密度としては、1.18 g/cm<sup>3</sup> を用いた。

表 7 6N HCL 生産インベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	6N HCL	2.28	kg	
入力	主原料	HCL 35%	1.18	kg	
		水	1	kg	

## 溶媒 A リサイクル

溶媒 A のリサイクルのユニットプロセスのインベントリは以下の通りである。下記のインベントリ表は、廃溶媒 A をリサイクルすると、溶媒 A が回収できることを表す。ただし、溶媒 A の蒸留残差は焼却されるものとし、直接排出される CO<sub>2</sub> 量は、完全燃焼を想定し、溶媒 A の燃焼化学反応式より計算した。

表 8 溶媒 A リサイクルインベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	回避製品	溶媒 A	非公表	kg	
	処理	蒸留残渣焼却処理	非公表	kg	
	大気への排出	蒸留残渣焼却処理直接排出 CO <sub>2</sub>	0.9735	kg	
入力	処理	廃溶媒 A	非公表	kg	

表 9 溶媒 A CO<sub>2</sub> 排出係数の計算

項目	算定式	量	単位
溶媒 A 分子量	非公表	非公表	
二酸化炭素分子量	CO <sub>2</sub>	44	
溶媒 A 完全燃焼時二酸化炭素分子数	溶媒 A 分子の炭素数	非公表	
CO <sub>2</sub> 排出係数	非公表	非公開	kg CO <sub>2</sub> eq/ kg

また、高効率のバイオ SAP 生産時における、高効率の廃溶媒 A リサイクルのインベントリ表は以下の通りである。

表 10 溶媒 A リサイクルインベントリ表（高効率）

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	回避製品	溶媒 A	非公表	kg	
	処理	蒸留残渣焼却処理	非公表	kg	
	大気への排出	蒸留残渣焼却処理直接排出 CO2	0.686	kg	
入力	処理	廃溶媒 A	非公表	kg	

### 溶媒 B リサイクル

溶媒 B のリサイクルのユニットプロセスのインベントリは以下の通りである。下記のインベントリ表は、廃溶媒 B をリサイクルすると、溶媒 B が回収できることを表す。ただし、溶媒 B の蒸留残差は焼却されるものとし、直接排出される CO2 量は、完全燃焼を想定し、溶媒 B の燃焼化学反応式より計算した。

表 11 溶媒 B リサイクルインベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	回避製品	溶媒 B	非公表	kg	
	処理	蒸留残渣焼却処理	非公表	kg	
	大気への排出	蒸留残渣焼却処理直接排出 CO2	0.1848	kg	
入力	処理	廃溶媒 B	非公表	kg	

表 12 溶媒 B CO2 排出係数の計算

項目	算定式	量	単位
溶媒 B 分子量	非公表	非公表	
二酸化炭素分子量	CO2	44	
溶媒 B 完全燃焼時二酸化炭素分子数	溶媒 B 分子の炭素数	非公表	
CO2 排出係数	非公表	非公開	kg CO2 eq/ kg

また、高効率のバイオ SAP 生産時における、高効率の廃溶媒 B リサイクルのインベントリ表は以下の通りである。

表 13 溶媒 B リサイクルインベントリ表（高効率）

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	回避製品	溶媒 B	非公表	kg	
	処理	蒸留残渣焼却処理	非公表	kg	
	大気への排出	蒸留残渣焼却処理直接排出 CO2	0.0396	kg	
入力	処理	廃溶媒 B	非公表	kg	

### メタノールリサイクル

メタノールのリサイクルのユニットプロセスのインベントリは以下の通りである。下記のインベントリ表は、1.3kg の廃メタノールをリサイクルすると、1kg のメタノールが回収できることを表す。ただし、メタノールの蒸留残差は焼却されるものとし、直接排出される CO2 量は、完全燃焼を想定し、メタノールの燃焼化学反応式より計算した。

表 14 メタノールリサイクルインベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	二次データ
出力	回避製品	メタノール	1	kg	
	処理	蒸留残渣焼却処理	0.39	kg	
	大気への排出	蒸留残渣焼却処理直接排出 CO2	0.536	kg	
入力	処理	廃メタノール	1.39	kg	
	エネルギー	蒸気	0.826	kg	

表 15 メタノール CO<sub>2</sub> 排出係数の計算

項目	算定式	量	単位
メタノール分子量	CH <sub>3</sub> OH	32	
二酸化炭素分子量	CO <sub>2</sub>	44	
メタノール完全燃焼時二酸化炭素分子数	メタノール分子の炭素数	1	
CO <sub>2</sub> 排出係数	(44 × 1) ÷ 32	1.375	kg CO <sub>2</sub> eq / kg メタノール

また、高効率のバイオ SAP 生産時における、高効率の廃メタノールリサイクルのインベントリ表は以下の通りである。

表 16 メタノールリサイクルインベントリ表（高効率）

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	回避製品	メタノール	1	kg	
	処理	蒸留残渣焼却処理	0.18	kg	
	大気への排出	蒸留残渣焼却処理直接排出 CO <sub>2</sub>	0.2475	kg	
入力	処理	廃メタノール	1.18	kg	
	エネルギー	蒸気	0.81	kg	

### グルコース生産

IDEA には、日本におけるグルコース生産のユニットプロセスは存在するが、海外における高効率なグルコース生産のユニットプロセスは存在しない。海外におけるグルコース生産の GHG 排出量を調査したところ、文献 [Ioannis Tsiropoulos, 2013] の値(0.7~1.2 kg CO<sub>2</sub> eq / kg) のように IDEA のデータの値(1.46 kg CO<sub>2</sub> eq / kg) よりも低い値となっていた。本調査では、具体的な生産場所は決まっておらず、グルコースの具体的な生産方法も決まっていないが、GHG 排出量が 1kg CO<sub>2</sub> eq / kg であると仮定し、その値になるよう日本の IDEA のグルコースの二次データを調整して用いた。

表 17 グルコース生産インベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	グルコース	1	kg	
入力	主原料	グルコース（日本）	0.68	kg	

また、シナリオ分析のためのコーンストーバー由来のグルコースのインベントリを文献より入手した。コーンストーバー由来の場合、グルコースのほかに電力も生産される。発電電力により回避される GHG 排出量は、電力の二次データから計算され、その値はグルコースの GHG 排出量から控除される。

表 18 グルコース生産インベントリ表（コーンストーバー由来） [Felix A. et al., 2019]

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	グルコース	1	kg	
	エネルギー	Electricity	5	MJ	
入力	主原料	Corn stover	1.5	kg	※
	副原料	H2SO4	0.03	kg	
		NH3	0.02	kg	
		Cellulae protein	0.02	kg	
		Yeast	0.01	kg	
	エネルギー	Natural gas	2.1	MJ	
		Electricity	0.22	MJ	

corn stover については、IDEA に二次データがなかったため、別途ユニットプロセスを作成した。corn stover は、corn grain との間で配分が必要である。corn stover の GHG 排出量や配分について調査をしたところ、GHG 排出量 0.03~0.09 kg CO2 eq/kg とする論文 [Seungdo Kim, 2009] や、0.2~1.8kg CO2 eq/kg とする論文 [Thea Whitman, 2011] を確認できた。また、後者の論文において、corn grain との合計に対する corn stover の配分（質量配分・価値配分）は、0.05~0.43 であった。本評価では、これらのデータかつ IDEA における corn の環境負荷 0.52kg CO2 eq/kg corn も考慮して、corn stover の配分を 0.25 とし以下の表を corn stover 生産のインベントリとした。なお、この時、corn stover の環境負荷は 0.13kg CO2 eq/kg

であり、おおむね論文と一致する。

表 19 コーンストーバー生産のインベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	Corn stover	1	kg	
		Corn grain	1	kg	
入力	主原料	Corn	2	kg	

表 20 コーンストーバーの配分設定

項目	配分
Corn stover	0.25
Corn grain	0.75

### 炭酸アンモニウム生産

炭酸アンモニウムは IDEA にユニットプロセスが存在しなかった。そこで、炭酸アンモニウムのインベントリデータを別途 LCI データベース Ecoinvent2.0 の「Ammonium carbonate {RER}| production」より入手し、それぞれの項目に IDEA のプロセスを上流連鎖させた。ただし資本財については、後述する CO<sub>2</sub>・アンモニア直接投入シナリオと条件をそろえるために二次データには紐づけず基本フローとした。炭酸アンモニウム生産のインベントリはライセンスの関係上本報告書に表記しない。

また、シナリオ分析のために、アスパラギン酸の生産において、炭酸アンモニアの代わりに他の燃料燃焼から取得した二酸化炭素とアンモニアを直接投入することを想定したユニットプロセスのインベントリを作成した。これらの項目と数値は、前述の炭酸アンモニウム生産のインベントリから CO<sub>2</sub> とアンモニアのみを抽出したため、マスバランスはとれていない。また、CO<sub>2</sub> に関しては、化石燃料燃焼由来の排ガスなどを利用することを想定した。

### モラセス生産

モラセスもグルコースと同様に IDEA にそのユニットプロセスは存在したが、徳島産のモラセスだったため、新たに論文 [Patel, 2014] からインベントリを作成した。

表 21 モラセス生産インベントリ表 [Patel, 2014]

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	Molasses	50.3	kg	
		Sugar	91.4	kg	
		Bagasse	6	kg	
		Electricity	54.2	kWh	
入力	主原料	Sugarcane	1000	kg	
	原料	Sulphur dioxide	1.5	kg	
		Limestone	1.9	kg	
		Sodium hydroxide	0.5	kg	
		Superphosphate	0.1	kg	
		Soda	0.03	kg	
		Organic chemicals	0.01	kg	
		Lubrication oil	0.6	kg	
		Phosphoric acid	0.01	kg	
	輸送	Water	30	kg	
		Transport, sugarcane	12	tkm	
		Transport, inputs	0.6	tkm	

モラセスの生産には共製品があるため、論文の値を利用し以下のように配分した。

表 22 モラセスの配分 [Patel, 2014]

製品	量	単位	単位当たり価格	配分
Molasses	50.3	kg	0.087	0.075
Sugar	91.4	kg	0.546	0.851
Bagasse	6	kg	0.043	0.004
Electricity	54.2	kWh	0.076	0.070

### アンモニア水生産

アンモニア水は IDEA のユニットプロセスになかったため、アンモニアから生

産することを考え、濃度を水で調整するようインベントリ表を作成した。ただし、アンモニア水の密度としては、0.9g/cm<sup>3</sup> [KISHIDA, 2019]を用いた。

表 23 アンモニア水生産インベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	28%アンモニア水	1	kg	
入力	主原料	アンモニア	0.252	kg	
	副原料	水	0.648	L	

### 資本財（化学プラント）

現時点では資本財について正確な一次データは把握できていないが、生産設備は Ecoinvent における「Chemical factory, organics {RER}| construction」と大きな違いはないと想定し、Ecoinvent のインベントリに IDEA のユニットプロセスを上流連鎖させた。IDEA の二次データが紐づかなかった項目は、さらにその項目の Ecoinvent のインベントリ (RoW) を参考に、IDEA の二次データに上流連鎖させた。化学プラント製造のインベントリはライセンスの関係上本報告書に表記しない。

#### 3-5-4 比較対象製品（石化 SAP）生産

比較対象製品であるポリアクリル酸ナトリウム系 SAP は、IDEA のユニットプロセスになかったため、論文 [SANDERSON, 2003] より生産のインベントリを別途作成し、そのインベントリに IDEA のユニットプロセスを上流連鎖させた。表中の「データ」列の値が「※」である項目は、IDEA V2.2 に適当なユニットプロセスがなかった。それらの項目は、別途生産のインベントリを作成した。

### 石化 SAP 生産

石化 SAP 生産のインベントリ表は以下のとおりである。ただし、論文のデータには、使用した水の排水処理が含まれていないと考えられるため、1,753 kg の排水処理を別途追加した。また、アクリル酸から SAP 製造に伴う資本財も別途追加した。

表 24 石化 SAP 生産インベントリ表 [SANDERSON, 2003]

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	Sodium poly-acrylate	1	kg	
入力	主原料	Acrylic acid	0.782	kg	
	副原料	NaOH	0.468	kg	
		initiator [(NH4)2S2O8]	0.005	kg	※
		water	1.753	L	
	エネルギー	Electricity	7.830	MJ	
	処理	排水処理	1.753	kg	
	資本財	化学プラント	4.00E-10	p	※

### 過硫酸アンモニウム生産

IDEA に二次データがなかった過硫酸アンモニウム (initiator [(NH4)2S2O8]) のインベントリを論文から別途取得した。

表 25 過硫酸アンモニウム生産インベントリ表 [JAKOB, 2000]

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	製品	(NH4)2S2O8	1	kg	
入力	主原料	(NH4)2SO4	0.429	kg	
		H2SO4	0.578	kg	
	エネルギー	Electricity	2	kWh	

### 3-5-5 廃棄・リサイクル

廃棄・リサイクル処理としては、焼却処理を基本シナリオとした。本評価では、廃棄段階における CO2 直接排出において、バイオ由来の CO2 は計上しないこととした（カーボンニュートラル）。石化 SAP の焼却時 CO2 直接排出量は、完全燃焼を想定し、SAP の燃焼化学反応式より計算した。おむつの重量が使用後約 4 倍になるというデータから、1 kg のバイオ SAP 処理に必要な廃棄・リサイクル処理の重量は 4kg としてユニットプロセスのインベントリを作成した。焼却処理のユニットプロセスのインベントリは以下のとおりである。

表 26 バイオ SAP 焼却処理インベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	大気への排出	焼却時直接排出 CO2	0	kg	
入力	処理	廃バイオ SAP	1	kg	
	処理	焼却の処理場由来	4	kg	

表 27 石化 SAP 焼却処理インベントリ表

入出力	分類	項目	値	単位	データ
出力	大気への排出	焼却時直接排出 CO2	1.36	kg	
入力	処理	廃石化 SAP	1	kg	
	処理	焼却の処理場由来	4	kg	

石化 SAP の焼却時の CO2 直接排出量は、石化 SAP の化学式より計算した。  
ただし、重合数が十分に大きいと考えて計算を行った。

表 28 石化 SAP CO2 排出係数の計算

項目	算定式	量	単位
石化 SAP 分子量	C7H5O6Na3	227	
二酸化炭素分子量	CO2	44	
石化 SAP 完全燃焼時二酸化炭素分子数	石化 SAP 分子の炭素数	7	
CO2 排出係数	(44 × 7) ÷ 227	1.36	kg CO2 eq / kg SAP

## 3-6 ライフサイクル影響評価 (LCIA)

### 3-6-1 ベースシナリオ

基本となるシナリオにおいて、ライフサイクルの段階別の GHG 排出量の内訳を以下に示す。また、バイオ SAP の主原料はアスパラギン酸であり、そのアスパラギン酸製造の内訳についても示した。

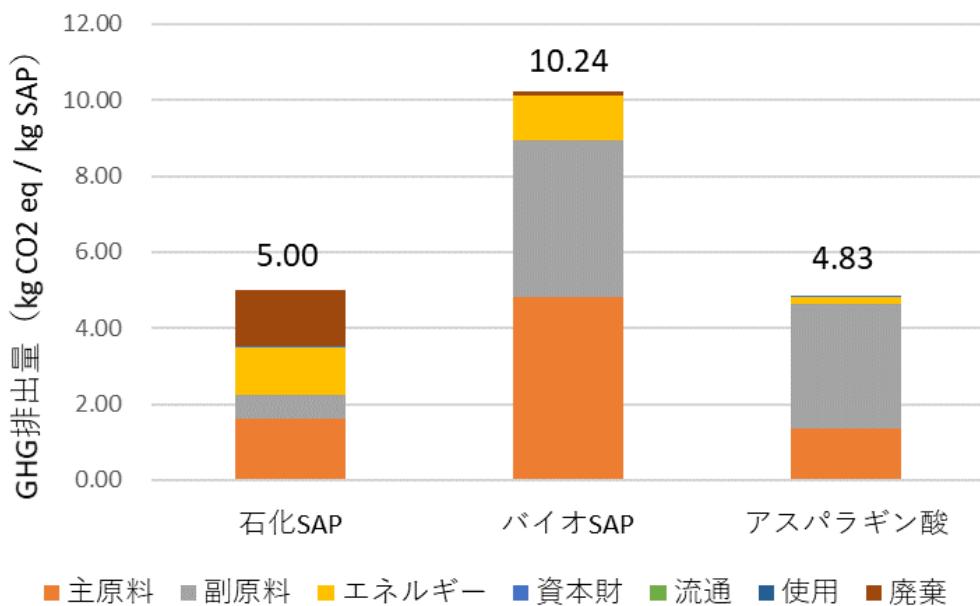


図 3-7 石化 SAP とバイオ SAP の GHG 排出量

石化SAP とバイオSAP のライフサイクル GHG 排出量は、それぞれ 5.00 kg CO<sub>2</sub> eq / kg SAP 、 10.24 kg CO<sub>2</sub> eq / kg SAP となった。バイオ SAP は、廃棄段階の GHG 排出量が石化 SAP に比べて少ない一方で、製造時の GHG 排出量は大きくなっている。ライフサイクルで合計した GHG 排出量はバイオ SAP のほうが倍以上大きいことが分かった。

### 3-6-2 シナリオ分析

ベースシナリオは、バイオ SAP 事業開始前レベルの実験段階における影響評価結果である。今後のプロセスの効率化や原材料の選定を見据え、複数の削減施策を適用した場合のシナリオ分析を行った。前述の削減施策項目に対して、

以下の表に示すようにシナリオを 4 つ設定した。各シナリオでは、同じ行に○がついた削減施策項目が実施されることを想定した。たとえば、シナリオ番号 2 は、削減施策項目 A と B の両方を適用した場合のシナリオであることを示している。

表 29 バイオ SAP で設定した削減施策シナリオ番号

削減施策 シナリオ番号	削減施策			
	A	B	C	D
	アスパラギン酸 生産・ポリアス パラギン酸生産 の高効率化	炭酸アンモニウムをアンモニア +CO <sub>2</sub> で代替	バイオマス残渣 由来の蒸気投入	コーンストーバー由来のグルコース
1	○			
2	○	○		
3	○	○	○	
4	○	○	○	○

なお、シナリオ項目 ABD に用いるインベントリデータは前述のとおりである。シナリオ項目 C に関しては、アスパラギン酸とバイオ SAP 生産のインベントリにおける「蒸気」の影響を 0 と考えたものである。以上のシナリオ項目のインベントリから、シナリオ番号 1~4 の影響評価を行った結果を以下に示す。

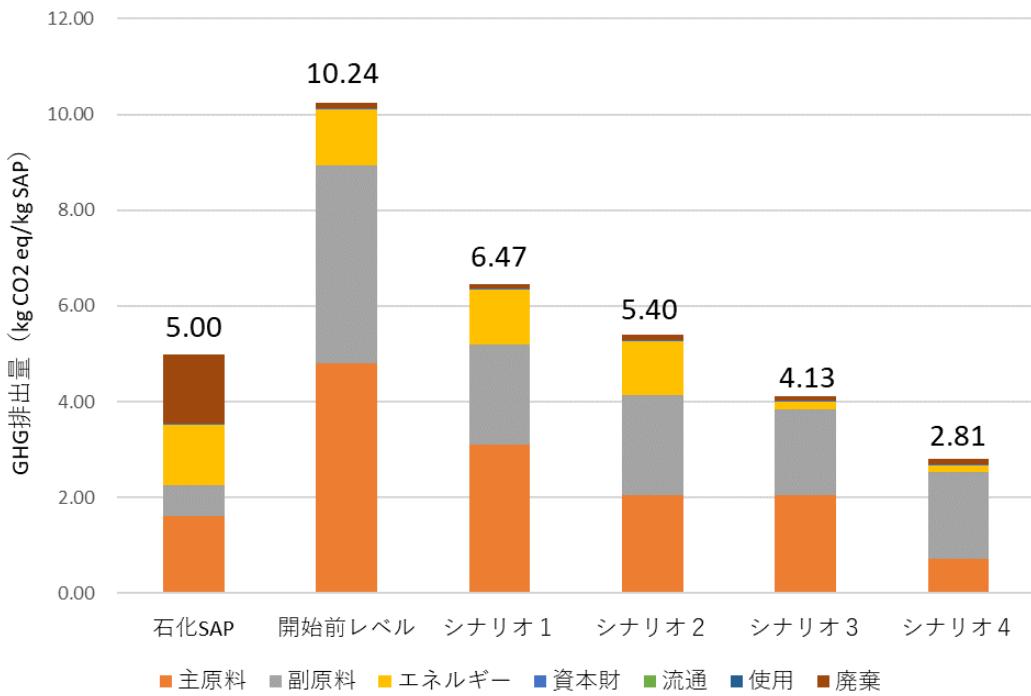


図 3-8 削減施策シナリオ番号ごとの GHG 排出量

バイオ SAP の GHG 排出量は、各施策を適応するごとに値が低下することがわかった。また、シナリオ 2 で石化 SAP と 10%以内の差まで低下し、シナリオ 3 と 4 では、石化 SAP よりも GHG 排出量は少ない結果となった。具体的には、シナリオ 3 で対石化 SAP -18% であり、シナリオ 4 では対石化 SAP -44%となつた。

続いて、シナリオ 4 について、バイオ SAP の主原料であるアスパラギン酸製造時の GHG 排出量を以下に示す。

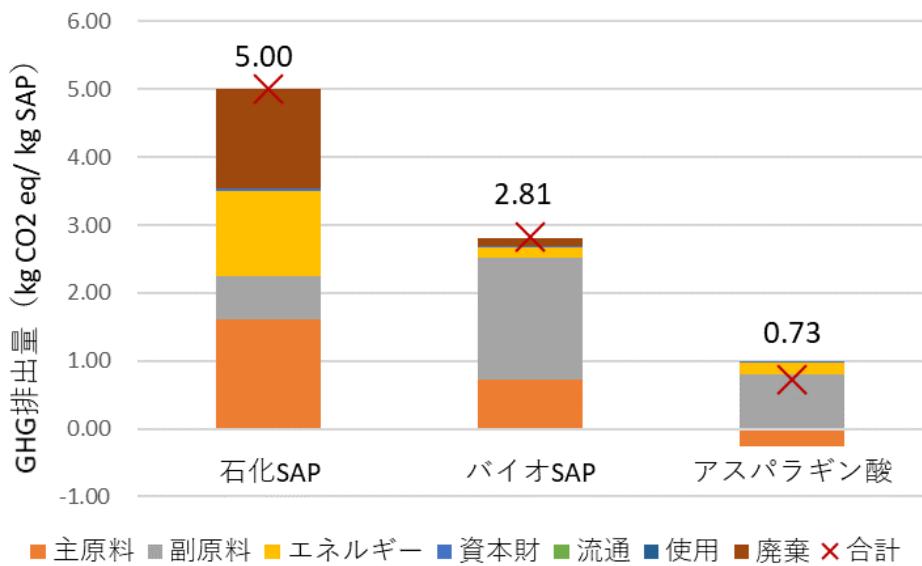


図 3-9 シナリオ番号 4 におけるアスパラギン酸の GHG 排出量の内訳

シナリオ 4においては、バイオ SAP の主原料であるアスパラギン酸の負荷は 0.73 kg CO<sub>2</sub> eq / kg SAP であるが、その内訳としては副原料が大きいことがわかる。アスパラギン酸の主原料であるグルコースについては値がマイナスになっているが、これは、コーンストーバー由来のグルコース生産の際に電力も複製品として発生し、その控除によるものである。

### 3-6-3 エネルギー起源・非エネルギー起源

CO<sub>2</sub> 排出量をエネルギー起源のものと非エネルギー起源のものに分類した。IDEA の基本フロー Emissions, carbon dioxide (fossil), air, unspecified について、エネルギー起源のプロセスから発生するものをエネルギー起源の CO<sub>2</sub> 排出量とした。エネルギー起源のプロセスとは、IDEA のプロセス名に energy とついているプロセスと、その他エネルギー起源と考えられた C4 distillate, naphtha cracking {JP} 等一部のプロセスとした。

分類した結果を以下に示す。

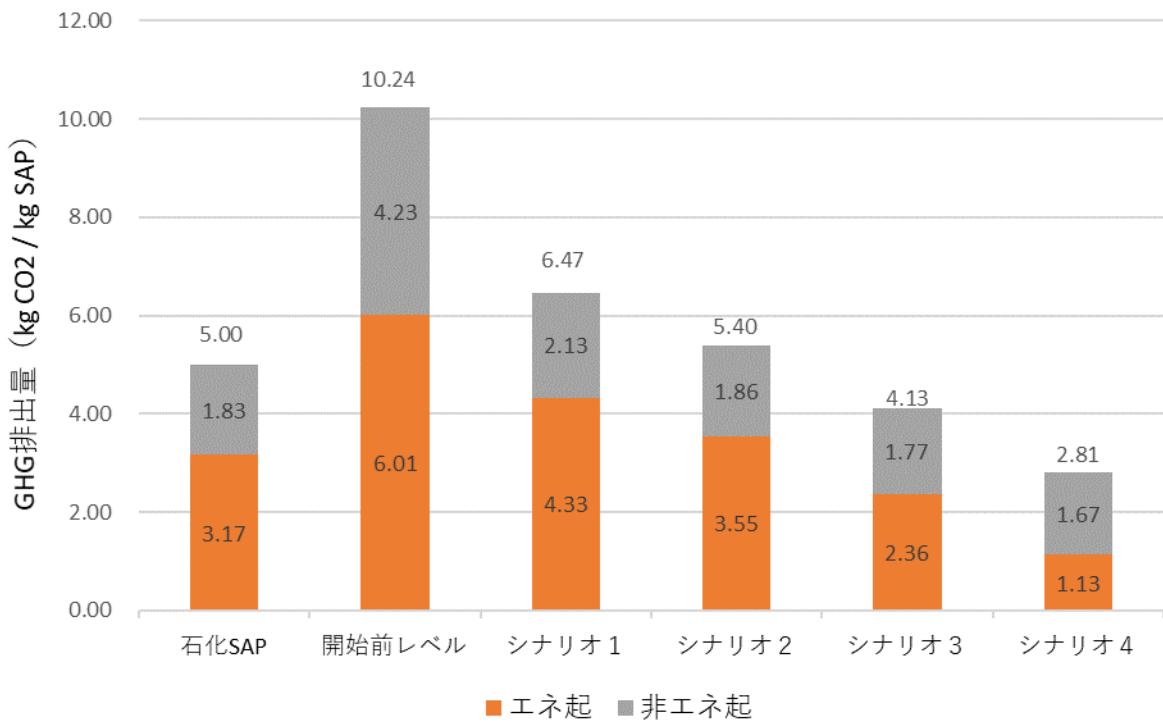


図 3-10 CO<sub>2</sub> 排出量のエネルギー起源、非エネルギー起源の分類結果

石化 SAP は、全体のうちエネルギー起源の CO<sub>2</sub> 排出量が多く、バイオ SAP も事業開始前レベルでは同じである。バイオ SAP は、シナリオ 3 以降で大幅なエネルギー起源 CO<sub>2</sub> 排出量の低下が確認できた。SAP 単位量あたりの CO<sub>2</sub> 排出量の差は、石化 SAP とシナリオ 4 で 2.19kg CO<sub>2</sub>/kg であるが、そのうちの 2.14kg CO<sub>2</sub>/kg がエネルギー起源の差である。

### 3-6-4 CO<sub>2</sub>削減効果

石油 SAP の影響評価結果と前述のシナリオ 4 におけるバイオ SAP の影響評価結果から、CO<sub>2</sub> 削減効果を算出した。CO<sub>2</sub> 削減効果に用いる前提条件を以下に示す。なお、影響評価結果と CO<sub>2</sub> 削減効果については、エネルギー起源と非エネルギー起源に分類してある。

表 30 CO<sub>2</sub> 削減効果総量算出の前提条件

項目	前提条件
削減施策シナリオ	シナリオ番号 4
実証事業終了時点の年間生産量	設定しない
2030 年時点の年間生産量	20 万トン

表 31 CO<sub>2</sub> 削減効果

製品	時期	段階	エネルギー起源	非エネルギー起源	合計
品 材 料 製 品 評 価	普及段階 2030 年時 点 (t-CO <sub>2</sub> / 年)	原材料調達・生産	(5,908)	151,572	145,665
		生産	215,679	178,440	394,120
		流通	0	0	0
		使用	0	0	0
		廃棄・リサイクル	17,217	4,857	22,075
		合計	226,989	334,870	561,859
ハイ テク ノロ ジ ー ス ペ シ ー ル	普及段階 2030 年時 点 (t-CO <sub>2</sub> / 年)	原材料調達・生産	253,673	67,866	321,539
		生産	363,442	21,258	384,700
		流通	0	0	0
		使用	0	0	0
		廃棄・リサイクル	17,217	276,223	293,440
		合計	634,333	365,347	999,680
削 減 量	普及段階 2030 年時 点 (t-CO <sub>2</sub> / 年)	原材料調達・生産	259,581	(83,706)	175,875
		生産	147,763	(157,183)	(9,420)
		流通	0	0	0
		使用	0	0	0
		廃棄・リサイクル	0	271,366	271,366
		合計	407,344	30,477	437,820

評価対象製品をベースライン製品に置き換えた場合のライフサイクルにおける削減量は、年間 43.8 万 t CO<sub>2</sub> という結果となった。そのほとんどは、エネルギー起源の削減量であり、エネルギー起源の削減幅は年間 40.7 万 t CO<sub>2</sub> である。エネルギー起源の削減幅が大きい理由としては、バイオ残渣を活用することによる蒸気の代替、またコーンストーバーからグルコースを生産する際の複製品である電気による控除分の効果が大きい。

### 3-7 ライフサイクル解釈

- バイオ SAP の生産は、バイオ由来の原料にてグルコースを生産しているが、それ以外の副原料である炭酸アンモニウムやメタノール等はバイオ由来ではないため、その廃棄処理の燃焼時に CO<sub>2</sub> を排出しており、大きなホットスポットになっている。これらの副原料の使用量を低減するリサイクル処理の効率化が求められる。
- 現在のバイオ SAP 生産プロセスは、使用しているエネルギー量も石炭 SAP に比べて大きいことから、石炭 SAP のほうがバイオ SAP よりも GHG 排出量は高かった。よって今後バイオ SAP 生産における各プロセスの効率化、より環境負荷の低い原材料やエネルギー源の選定などの各種削減施策の導入は必須であり、その全てを導入した場合には、石炭 SAP に対して -44% の削減効果があることが確認できた。
- 

### 3-8 本評価の限界と今後の課題

本評価では、未評価の部分以外にも多くの仮定やシナリオが想定されている。今後の検証に向けて現段階での評価の限界と今後の課題をまとめた。

表 32 本評価の限界と今後の課題

製品名	ライフサイクル段階	項目	限界・課題
バイオ SAP	原材料調達	全体	二次データを使用して算定するため、必ずしも実際の負荷を反映した算定結果となっていない可能性がある。
		土地利用	現段階では、土地利用変化の負荷は評価できていない。バイオ SAP の具体的な生産場所と原料作物が確定し次第、現在の算定モデルに追加する必要がある。
		輸送	現段階では、輸送についての負荷は評価できていない。バイオ SAP の具体的な生産場所と原料が確定し次第、現在の算定モデルに追加する必

		要がある。
	グルコース	二次データの環境負荷はデータにより 50%ほどの幅がある。そのため、どの二次データを選択するかで結果に大きな違いが出る。今後生産地として選ばれた製造場所において調達したグルコースの環境負荷が、今回の環境負荷の通りになるかはまだわからない。今後、実際の生産実態にあったデータを取得する必要がある。
	グルコース	コーンストーバー由来のグルコースのインベントリデータはプラントシュミレーターから得られた推計値である。今後、コスト等も含めて、導入の実現性を検証し、調達実態に即したデータの取得・作成を行う必要がある。
	グルコース	大量のバイオ SAP の生産を行った際には、今までコーンストーバーを原料としたプロセスが他の生産プロセスで代替される可能性があることから、その地域において発生しうる Consequential な影響についても調査が必要である。
	モラセス	現段階では、モラセスは二次データを用いている。今後具体的な生産場所において調達したモラセスの構成物、環境負荷が今回の環境負荷と近接したものになるかは不明である。今後は、より実際の生産実態にあったデータを取得する必要がある。
	モラセス	モラセスの配分について、価値基準での配分をおこなっているが、大量生産時においては、そのモラセスを使用することが、どのように他の糖原料の増産に影響を与えるかなど、Consequential に発生しうる影響についても考慮が必要である。
	炭酸アンモ	炭酸アンモニウムの投入を、アンモニア + 燃料

		ニウム	燃焼由来 CO <sub>2</sub> の吹き込みで代替する技術は開発途上であり、今後の生産実態にあったデータを取得する必要がある。
生産	全体		バイオ由來の蒸気を投入できるかは今後のプロト設計に依存しており、実現できた場合においても、その負荷はゼロにはならない可能性がある。
			現時点では、実験室段階データを元にした推計値を用いており、大規模生産を実施した場合の効率は異なってくる可能性がある。今後はより実際の生産実態にあったデータを取得する必要がある。
	アスパラギン酸生産		洗浄・廃棄処理などで仮定が多く残っている。より実際の生産実態にあったデータを取得する必要がある。
石化 SAP	生産	全体	石化 SAP の影響評価を実施している既存の研究は複数あり、現状ベースラインとしている石化 SPA の影響評価とは異なる可能性がある。入手可能な限り多くの情報を参考し、妥当な値に更新していくことが必要である。
共通	使用	機能	本算定では、バイオ SAP は石化 SAP と、重量あたりで同等の機能を持つ前提で算定を行っているが、今後バイオ SAP の品質特性を踏まえた調整が必要となる可能性がある。
	廃棄	リサイクル・機能	土壤改良資材等、生分解する機能を発現する用途へリサイクルするシステムの境界拡張は行っていない。今後のバイオ SAP を選択的に回収・リサイクルすることの実現性も含めて、廃棄・リサイクルのシナリオ追加についての踏み込んだ検討が必要である。