

公表用

平成21年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「中鎖脂肪酸産生微生物の探索と抽出油脂の
食品及び燃料への利用」

研究開発成果等報告書

平成22年3月

委託者 関東経済産業局
委託先 株式会社つくば研究支援センター

目 次

第 1 章 研究開発の概要

- 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標
- 1-2 研究体制
(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)
- 1-3 成果概要
- 1-4 当該プロジェクト連絡窓口

第 2 章 研究開発の成果

- 2-1 微生物資源の有効利用に係る技術の開発
 - 2-1-1 油糧微生物発見のための高度探索技術開発
 - 2-1-2 中鎖脂肪酸産生海洋微生物のスクリーニング
- 2-2 発酵・精製工程等の効率化に係る技術の開発
 - 2-2-1 中鎖脂肪酸産生海洋微生物の培養特性の検討
 - 2-2-2 発酵槽に適合するマイクロバブル発生装置の検討
- 2-3 発酵生産物 MCT の食品分野における有効利用に関わる技術の開発
 - 2-3-1 海洋性油糧微生物が生産した MCT の脂肪酸構成の解析
- 2-4 発酵生産物 MCT のバイオ燃料への変換技術の開発
 - 2-4-1 THF (テトラヒドロフラン) を用いた均一相反応によるバイオケロシンの生産
 - 2-4-2 THF (テトラヒドロフラン) を用いた均一相反応によるバイオケロシン生産のための小型 BDF 装置の開発
 - 2-4-3 バイオケロシンの市場について

最終章 本年度成果とバイオケロシンの市場について

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

食料品製造業、化学工業における発酵では、多様化、高品質化、低コスト化、環境対応へのニーズが高く、これらを達成するために、微生物の多様化・改良ならびに発酵生産物の有効利用に係る技術の高度化を図ることが求められる。

発酵の利用は、発酵食品、アミノ酸の生産など食品、医薬工業原料など多岐にわたり、油脂の生産もその一つである。中鎖脂肪酸で構成される油脂（MCT：中鎖脂肪酸トリグリセリド）の製造には、主に炭素数 12, 14 を主体とするココナツ油およびパーム核油が用いられている。健康志向の高まりに伴って、消化吸収と代謝が一般の油脂（炭素数 16, 18）に比較して 4~10 倍と高く、速やかにエネルギーに変換されて中性脂肪の蓄積が低い MCT の利用が注目されるようになった。MCT の需要増大に対応するために原料の多様化と共に、炭素数が 8~10 とさらに短い高品質中鎖脂肪酸油脂の利用が望まれている。また、発酵によるバイオ燃料の原料生産も可能であり、特に引火点の低い灯油代換燃料の製造には MCT の利用が適している。家庭部門のエネルギー種別 CO₂ 排出量をみると、灯油の使用に伴う CO₂ 排出が約 40% も占めており、その削減は環境対策として重要である。しかし、バイオ燃料の製造コストの 7 割程度は原料費であり、その普及には安価な、大量の原料を安定に供給することが最も重要な課題である。これまでの陸上植物に依存した原料供給のみでは、植物の低い生産性、栽培地拡大の限界などによって、更なる MCT の需要の高まりに対応することは困難である。大量の MCT の生産に対応するためには、より油脂生産速度の高い藻類、微生物に注目すべきである。特に、将来の淡水資源利用における競合も考慮し、海水で生育し、炭素数 8~10 の MCT を蓄積する油糧微生物の新規探索が望まれる。

しかし、これまでに効率的な油糧微生物の 1 次スクリーニング法がないため、この分野の研究開発は極めて少ない。僅かに、炭素数 16~18 のトリグリセリドを蓄積する油糧酵母 *Lypomyces* がバイオディーゼル生産に検討されている程度である。中鎖脂肪酸トリグリセリドを産生する海洋性油糧微生物の探索は皆無と言って過言ではない。そこで、油脂を著量蓄積する微生物の比重は、他の微生物に比して低いという物理的特徴を利用した新規スクリーニング法を開発し、油糧微生物の単離効率を飛躍的に改善する。そして、単離した新規微生物を同定し、その培養特性を明らかにして油量微生物の大量培養法の準備を行う。大量培養法が確立された際には、発酵生産された MCT の構成脂肪酸を解析し、マウスもしくはラットを使った実験で、一般的な油脂と比べた時の体内におけるエネルギー代謝効率の違いを明らかにする。そして、エネルギー補助食品としての利用が可能かどうかについて検証する。また、近年バイオ燃料の利用先として注目されている航空機燃料への用途開発のほか、未だ開発されていない家庭用暖房に利用可能なバイオ灯油の新規開発も目指す。

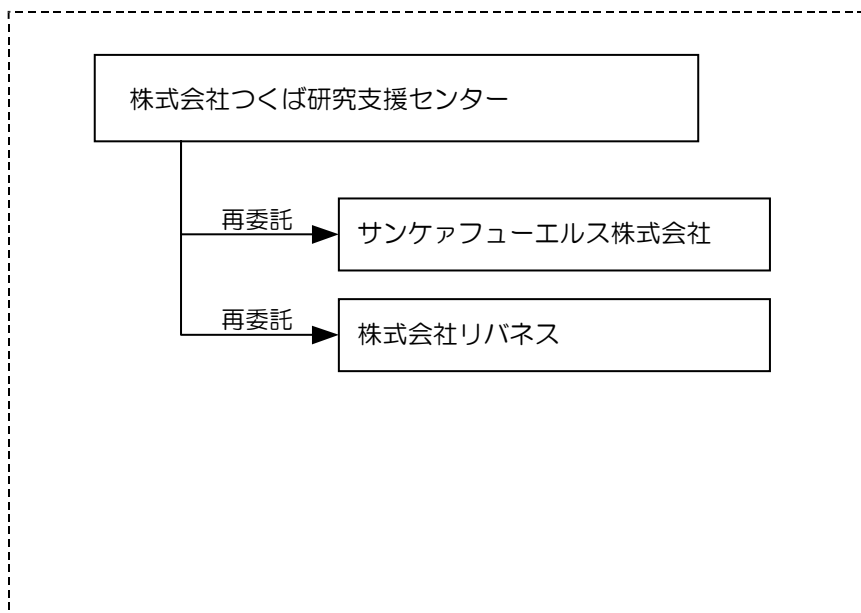
上記の発酵に係る技術において達成すべき高度化目標をまとめると、微生物資源の有効利用に資する技術、発酵・精製工程等の効率化に係る技術、発酵生産物の有効利用に係る技術が挙げられる。そこで、以下 4 つのサブテーマを設けて開発研究を実施する。

1. 微生物資源の有効利用に係るスクリーニング及び培養技術の開発
2. 発酵・精製工程等の効率化に係る技術の開発
3. 発酵生産物 MCT の食品製造分野における有効利用に係る技術の開発
4. 発酵生産物 MCT のバイオ燃料への変換技術の開発

1-2 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制

1) 研究組織 (全体)

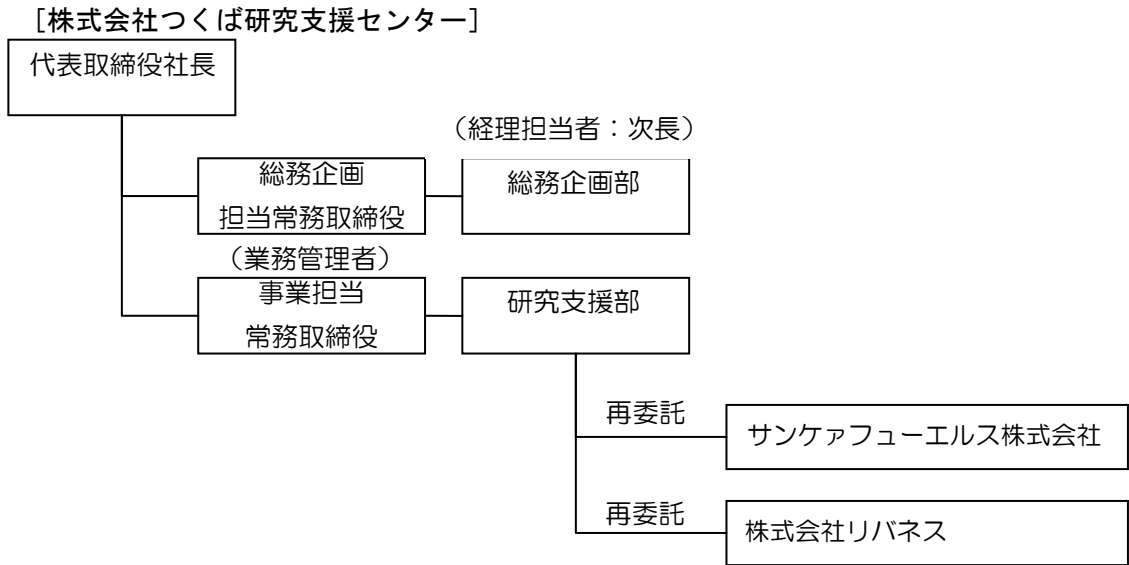


統括研究代表者 (PL)
サンケアフューエルズ株式会社
基盤技術開発担当取締役
松村 正利

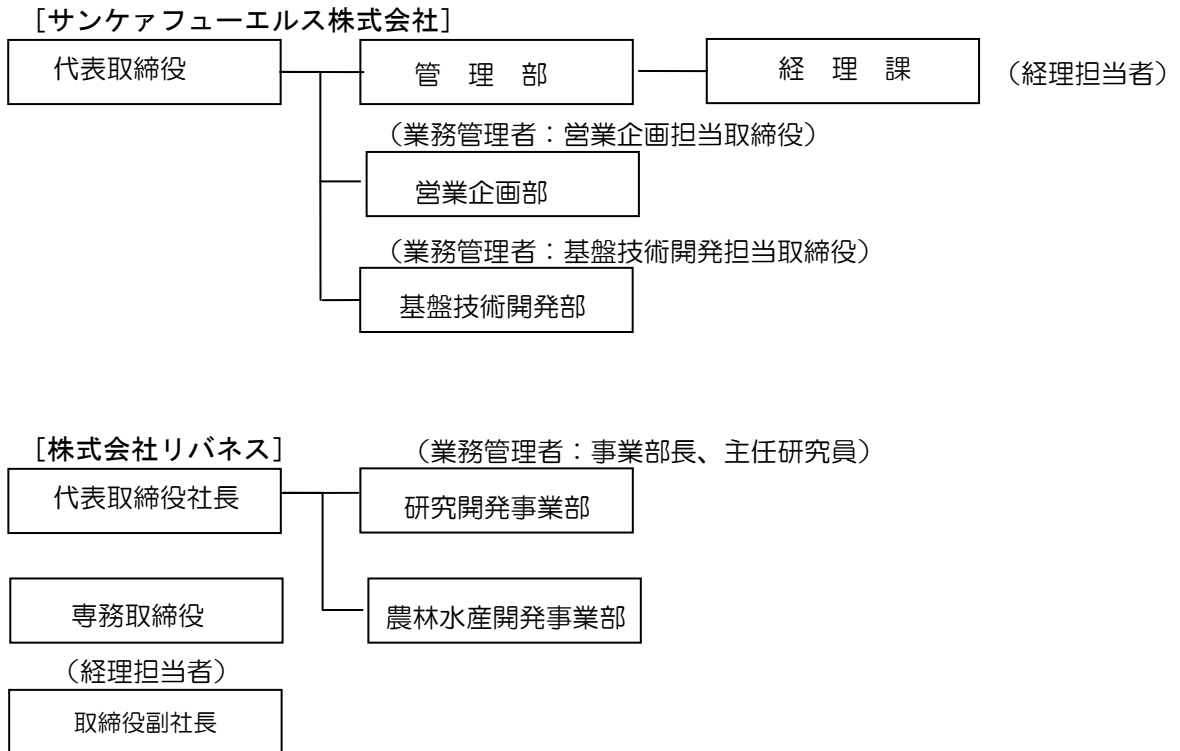
副統括研究代表者 (SL)
株式会社リバネス
専務取締役
高橋 修一郎

2) 管理体制

①事業管理者



② 再委託先



3) 研究者氏名

サンケアフューエルズ株式会社

氏名	所属・役職
松村 正利	基盤技術開発担当取締役
若林 恒平	営業企画担当取締役
Saman Wijesekara	基盤技術開発部主任研究員
坪田 宏	基盤技術開発部 生産技術開発担当主任研究員
石井 晴美	基盤技術開発部主任技術員
鈴田 哲也	基盤技術開発部研究員
清水 和哉	基盤技術開発部研究員
今瀬 将人	基盤技術開発部研究員

株式会社リバネス

氏名	所属・役職
丸 幸弘	代表取締役社長
高橋 修一郎	専務取締役
高橋 宏之	研究開発事業部主任研究員
塚田 周平	農林水産開発事業部長
坂本 真一郎	研究開発事業部長
王延旭	研究開発事業部専任研究員
松原 尚子	研究開発事業部研究員
西山 哲史	研究開発事業部研究員

4) 協力者

氏名	所属・役職	備考
小柳津 広志	東京大学植物昨日工学研究室 教授	アドバイザー
青柳 秀樹	筑波大学生命環境科学研究科 准教授	アドバイザー
野村 名可男	筑波大学生命環境科学研究科 講師	アドバイザー

1-3 成果概要

本年度は、下記に示す4つの研究開発課題にそれぞれ2~3のサブ課題を設け、開発を進めた。

- ① 微生物資源の有効利用に係る技術の開発
 - ①-1 油糧微生物発見のための高度探索技術開発
 - ①-2 中鎖脂肪酸産生海洋微生物のスクリーニング
- ② 発酵・精製工程等の効率化に関わる技術の開発
 - ②-1 中鎖脂肪酸産生海洋微生物の培養特性の検討
 - ②-2 発酵槽に適合するマイクロバブル発生装置の検討
- ③ 発酵生産物 MCT の食品分野における有効利用に関わる技術の開発
 - ③-1 海洋性油糧微生物が生産した MCT の脂肪酸構成の解析
- ④ 発酵生産物 MCT のバイオ燃料への変換技術の開発
 - ④-1 THF (テトラヒドロフラン) を用いた均一相反応によるバイオケロシンの生産
 - ④-2 THF (テトラヒドロフラン) を用いた均一相反応によるバイオケロシン生産のための小型 BDF 装置の開発

「油糧微生物発見のための高度探索技術開発」では、油脂を生産する油糧微生物の菌体密度は、非生産菌のそれよりも低いという物理的特徴を利用した分離方法を検討した。新規に考案したスクリーニング法の信頼性確認実験には、油脂生産菌として報告のある酵母3株、カビ2株、海洋性バクテリア4株をポジティブ・コントロールとして用いた。その結果、新規方法は酵母、カビ、細菌を問わず適用できる有効な油糧微生物の一次スクリーニング法であった。

二次スクリーニングには、各種の染色方法を適用し、寒天培地上のコロニーを染色して目視で油脂生産を確認する方法、蛍光顕微鏡下で確認する方法それぞれを確立した。中鎖脂肪酸生産の最終確認は、これらの培養菌体を溶剤抽出にかけガスクロ分析で行った。

上記油糧微生物の一次スクリーニング法、二次スクリーニング法を土壌、海水試料に適用し、土壌より C8, C10, C12 の脂肪酸を生産している菌株を分離し、また海水からは C12 を生産しているバクテリアを分離した。

「発酵・精製工程等の効率化に関わる技術の開発」に関する検討には、未だ実用できる中鎖脂肪酸産生微生物が特定されていない段階であるため、予備的に海水から単離され、C12 の中鎖脂肪酸産生微生物の脂肪酸生成に及ぼす培地と培養温度の影響を調べた。また、発酵形式については、将来大型の発酵槽を使う可能性が高いために、酸素供給装置についての調査には注力した。

「発酵生産物 MCT の食品分野における有効利用に関わる技術の開発」に関する検討では、単離した微生物の産生する菌体内油脂を抽出して、脂肪酸メチルエステルに変換して構成脂肪酸組成を調べた。その菌株の一つは C12 のみが検出され、大変特異的なものと考えられる。今後は、この菌株の培養規模を上げ、より詳細な検討を早急に実施することが必要である。また、ある菌株では、C8 から C18 まで幅広い脂肪酸を作っているものもあった。

「発酵生産物 MCT のバイオ燃料への変換技術の開発」では、THF の有効利用法の探索に努めた。バイオケロシンはバイオ燃料の中で最も安い燃料であり、製造コストを可能な限り抑制する必要がある。燃料製造に用いられるメチルエステル化反応では、原料の植物油とメタノールが相互に溶解し難いために、温度を上げると共に強い攪拌が必要であった。しかし、THF の添加によって、植物油とメタノールの相互溶解は促進され、室温、無攪拌でも十分反応することが明らかとなった。この均一相形成に THF 添加を必要とするのが C10 以上の植物油であり、C8 はメタノールに容易に溶解し、THF を必要としないことも明らかとなった。

また、燃料製造コスト削減には人手を掛けない製造方法の確立も極めて重要である。ここでは

遠隔操作可能な小型バイオ燃料製造装置を試作し、全自動で製造走査が行われ、品質の高い燃料を作ることに成功した。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

松村 正利 (サンケアフューエルズ株式会社)
TEL : 029-835-5677 FAX : 029-821-5568

高橋 修一郎 (株式会社リバネス)
TEL: 03-6277-8041 FAX: 03-6277-8042

第2章 研究開発の成果

2-1 微生物資源の有効利用に係る技術の開発

2-1-1 油糧微生物発見のための高度探索技術開発

菌体内に油脂を蓄積する油糧微生物の効率的な1次スクリーニング方法はこれまでなく、シャーレ培地状に現れたコロニーを単離・培養して油脂含有量を測定し、油脂蓄積能を調べていた。本課題で実施した新たな方法は、油脂を含有する微生物の比重が低いことに着目した新規な方法である。

・実験方法と実験材料

供試微生物を独立行政法人製品評価技術基盤機構・生物資源遺伝部門（NBRC）より購入した。購入した微生物を表1に示した。

各微生物の保存培養は、NBRCより指定されている各培地を用いて行なった。*Rhodococcus marinonascens*, *Labyrinthula* sp., *Vibrio alginolyticus* を除く微生物は油糧蓄積培地として報告があるA培地（glucose 30 g, Yeast extract 1.5 g, NH₄Cl 0.35 g, KH₂PO₄ 7.0 g, Na₂HPO₄·12H₂O 5.0 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, FeCl₃·6H₂O 0.08 g, ZnSO₄·7H₂O 0.01 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, MnSO₄·5H₂O 0.1 mg, CuSO₄·5H₂O 0.1 mg, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.1 mg 超純水 1.0 L メスアップ）を用いて培養し、実施した。*Acinetobacter* sp. は海洋性細菌であるためA培地を人工海水 750 ml と超純水 250 ml を混合した水で 1.0 L にメスアップした。

・実験結果と考察

新規分離方法を適用した場合、油脂生産微生物は菌の種類を問わず、一定の箇所を集積された。各微生物の集積箇所の位置はほぼ同様であった。ことから新規方法は一次スクリーニング法として有効であることを確認した。

表1 供試微生物

微生物名	NBRC 番号	培養温度	特記
<i>Mortierella alpina</i>	8568	28	糸状菌
<i>Umbelopsis isabellina</i>	7873	28	糸状菌
<i>Rhodotorulla minuta</i>	0387	28	酵母
<i>Lipomyces sterkeyi</i>	10381	28	酵母
<i>Rhodotorula toruloides</i>	8766	28	酵母
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10217	28	酵母, ネガティブコントロール
<i>Rhodococcus marinonascens</i>	14363	20	海洋底泥から単離, 細菌
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	100887	20	海洋水から単離, 細菌
<i>Acinetobacter</i> sp.	100985	28	海洋水から単離, 細菌
<i>Labyrinthula</i> sp.	33215	28	海洋性微生物
<i>Vibrio alginolyticus</i>	33215	28	海洋性細菌, <i>Labyrinthulaso.</i> の餌
<i>Sphingopyxis</i> sp. C-1	-	28	藍藻毒ミクロシスチン分解菌, 湖沼より単離

2) Triphenyltetrazolium chloride (TTC) による染色法の有効性確認

・実験方法と実験材料

供試細菌は表1に示した。寒天培地は、A培地とした。

TTC は、2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (微生物学用, メルク株式会社)を購入し、リン酸バッファー (pH7.0) に溶解させ終濃度 0.8%となるようにA培地に添加した。属によらず TTC により油糧微生物が赤く染まること及び油糧微生物のスクリーニングのために、ネガティブコントロールを作成し比較した。

赤く染まった、もしくは前述の密度勾配遠心後に他の油糧微生物とほぼ同様の位置にバンドを形成した *Acinetobacter* sp., *R. erythropolis* と *R. marinonascens* 及び油脂蓄積の報告がある *L. sterkeyi*, *R. minuta*, *R. toruloides*, *U. isabellina* の油脂含有量をガスクロマトグラフィー法により測定した。前処理は、各微生物の培養液を凍結乾燥機により乾燥させた後に、脂肪酸メチル化キット (ナカライ株式会社) 及びメチル化脂肪酸精製キット (ナカライ株式会社) を用いて、微生物細胞内の脂肪酸を抽出・精製した。

・実験結果と考察

ネガティブコントロールである *Saccharomyces cerevisiae* は赤く染色されず、*R. marinonascens* はコロニーを形成しなかった。これ以外の微生物は全て赤く染まった。このことから油糧微生物をスクリーニングする方法として TTC による染色は、強力な方法であると考えられる。*R. marinonascens* がコロニーを形成しなかった原因として、A培地が増殖に適さなかったこと及び *R. marinonascens* の増殖速度が低い細菌であることが考えられる。

まとめ

本課題では、考案した新規スクリーニング法が油糧微生物の単離技術として妥当であるか否かを検討した。新規一次スクリーニング法と TTC 染色の組み合わせによって油糧微生物を効率よく発見することが可能である。しかし、今後、サンプリングした海洋水から油糧微生物を選択的に集積培養することが可能となる共通培地の検討など改善する余地がいくつか存在する。

2-1-2 中鎖脂肪酸産生海洋微生物のスクリーニング

1. 研究概要

本研究では、中鎖脂肪酸を蓄積する微生物の特徴として、日本全国からの海水サンプルを採取した。そして、中鎖脂肪酸産生菌を効率よく単離するため、比重を利用したスクリーニング法や脂質染色によるスクリーニング法、薬剤を利用したスクリーニング法など、三つのスクリーニング方法を開発し、スクリーニングを行った。さらに、単離した微生物の培地成分、培養温度などの重要な培養特性を検討し、脂肪酸の組成を解析し、これらの油糧微生物の大量培養に有用な情報を得ることができた。

2. 材料と方法

2.1 材料

1) 海水サンプル

海洋微生物分離用の海水サンプルは、2009年10月から12月にかけて日本全国約85カ所から

集め、前述のスクリーニング法を適用した。(図1)。

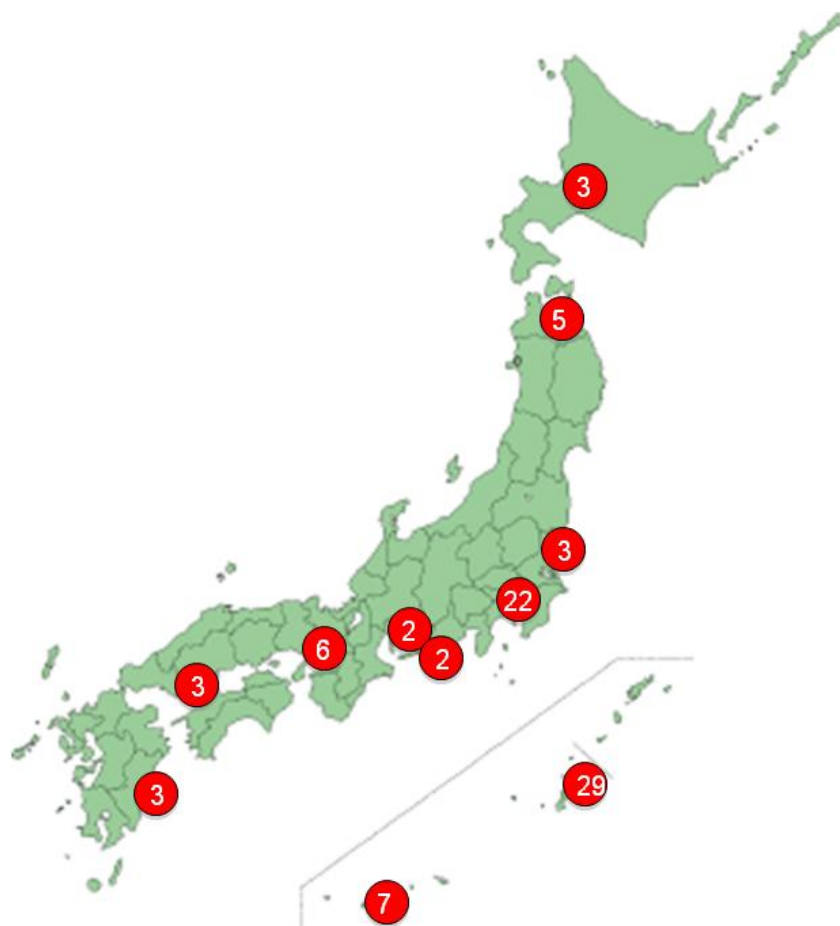


図1 サンプルング場所とサンプル数

2.1.1 海水（海泥）のサンプルング

海水の採取には、ロープで結んだ滅菌済みの50ml遠沈管を、海水中に投げ込み、表層の海水を採取した。その際、引き上げた遠沈管に、直ちに蓋をし、採取場所と番号を油性マーカーで記入したあと、保冷剤の入ったクーラーボックスに入れ、保存した。藻類を分離するための海水サンプルングは、目合い20 μ mの採水器付のプランクトンネット（離合社製）を使用して、海水を採取した。マングローブ泥の採取は、水底から深さ10~15cmの泥試料を採取した。

2.2 培地

海洋微生物の分離に市販の海洋微生物用培地として Marine Agar 2216 培地 (DIFCO, USA)、Marine Broth 2216 培地 (DIFCO, USA) を用いた。微生物によっては Marine agar 2216 培地や Marine Broth 2216 培地が適さないものもあるため、上述の培地の他に NBRC が糸状菌等の培地としてあげている no. 13 培地、沖縄特産の雪塩をベースにして新規に開発した培地も用いた。また、藻類の培養には、f/2 培地[1]と海産微細藻類用 IMK 培地を使用した。NBRC no. 13 培地、雪塩培地の組成は以下の通り。

NBRC no. 13 培地 (1L あたり) :	
ソイトン	1g
可溶性デンプン	10g

ダイゴ人工海水	36g
寒天	15g
培地の pH 8.2	

雪塩培地（1L あたり）：

雪塩	21g
酵母エキス	1g
寒天	15g
培地の pH8.0	

2. 3. まとめ

全国85か所から単離した約2000株の微生物を本研究で検討したスクリーニング法にかけ70株を分離した。これら微生物の GC-MS を行った際に脂肪酸のピークが確認され、我々が構築した手法が脂肪酸を蓄積する微生物のスクリーニング法として有効であることが分かった。また、藻類が脂肪酸を蓄積するという報告は多くあるが、細菌が脂肪酸を蓄積するという結果は今回の結果が初めてである可能性がある。細菌は藻類と比べて増殖速度が速いため、中鎖脂肪酸の抽出原料として有効な生物種になる可能性があり、今後さらにクリーニングを進め、有望種を単離してることが望まれる。

2-2 発酵・精製工程等の効率化に関わる技術の開発

2-2-1 中鎖脂肪酸産生海洋微生物の培養特性の検討

培養条件による脂肪酸組成の変化

NBRC 海洋微生物ライブラリーの脂肪酸組成解析の結果、ドデカン酸 C12:0 を含むことが分かった藻類 8 株を用いて、培地栄養成分、培養温度の改変によって脂肪酸組成が変化するかどうかについて検討した。その結果、培地栄養成分豊富な Marine Broth 培地を使った場合に、脂肪酸の含有率が高くなったことが分かった。特に NBRC 102714、NBRC 102697、NBRC 102719、NBRC 102737 の 4 株に対して、C12:0 と C16:0 の含有率はおよそ 3 倍近く増加したことが明らかになった (Table 1)。また、培養温度による脂肪酸組成の変化について検討したところ、顕著な変化は見られなかったが、菌株によって違う傾向が観察された (Table 2)。例えば、NBRC 102714、NBRC 102737 両株は、25°C で培養した場合は 15°C の時と比べ、脂肪酸含有率がやや増加している傾向が観察された。一方、NBRC 102719 株では、25°C で培養した場合に脂肪酸含有率が高くなる傾向が観察された。

Table 1. 培地栄養成分の改変による藻類脂肪酸含有率 (%) の変化

Scientific Name	NBRC No.	C10:0		C12:0		C14:0		C16:0	
		IMK	MB	IMK	MB	IMK	MB	IMK	MB
<i>Stichococcus</i> sp. (class: Trebouxiophyceae)	102697	—	—	1.42	7.67	2.23	3.27	1.02	9.01
<i>Chlorella saccharophila</i> (class: Trebouxiophyceae)	102700	—	—	2.34	0.75	—	—	1.08	1.83
<i>Nannochloropsis granulata</i> (class: Eustigmatophyceae)	102713	—	—	1.3	3.61	—	—	1.37	4.25
<i>Nannochloris</i> sp. (class: Trebouxiophyceae)	102714	—	—	1.66	4.28	1.31	2.08	3.45	10.15
<i>Nannochloropsis salina</i> (class: Eustigmatophyceae)	102719	—	—	0.52	5.48	—	—	0.36	5.57
<i>Chlorella</i> sp. (class: Trebouxiophyceae)	102737	—	—	1.1	5.35	—	—	1.38	6.82
<i>Nannochloropsis oceanica</i> (class: Eustigmatophyceae)	102738	—	—	1.18	2.80	—	—	2.01	5.90
<i>Chlamydomonas</i> sp. (class: Chlorophyceae)	102752	—	—	1.21	2.11	—	—	1.33	3.98

IMK= Daigo's IMK medium for marine microalgae.

MB= Marine Broth.

Table 2. 培養温度の改変による藻類脂肪酸含有率(%)の変化

Scientific Name	NBRC No.	C10:0		C12:0		C14:0		C16:0	
		15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
<i>Stichococcus</i> sp. (class: Trebouxiophyceae)	102697	—	—	2.41	1.94	3.58	3.52	2.05	2.24
<i>Chlorella saccharophila</i> (class: Trebouxiophyceae)	102700	—	—	1.60	1.32	—	—	1.82	1.85
<i>Nannochloropsis granulata</i> (class: Eustigmatophyceae)	102713	—	—	3.62	3.09	—	—	1.93	1.93
<i>Nannochloris</i> sp. (class: Trebouxiophyceae)	102714	—	—	3.57	2.99	1.56	1.87	14.89	10.86
<i>Nannochloropsis salina</i> (class: Eustigmatophyceae)	102719	—	—	1.68	0.72	—	—	1.65	1.55
<i>Chlorella</i> sp. (class: Trebouxiophyceae)	102737	—	—	2.33	2.06	—	—	14.15	10.15
<i>Nannochloropsis oceanica</i> (class: Eustigmatophyceae)	102738	—	—	2.96	2.41	—	—	3.09	7.73
<i>Chlamydomonas</i> sp. (class: Chlorophyceae)	102752	—	—	2.37	2.64	—	—	2.29	3.15

2-2-2 発酵槽に適合するマイクロバブル発生装置の検討

中鎖脂肪酸を産生する微生物が好気性菌であった場合、効率的に培養を進める為には酸素を効率よく活用する培養槽が望まれる。その培養槽に対してマイクロバブルの使用を検討した。

先ずリアクターの形状だが、培養法として下記の4つのタイプを検討した。

①静置培養

攪乱を与えない培養法。衝撃に対し脆弱な細胞を増やす場合や、特定の形状のコロニーを作らせる場合などに用いる。

②通気培養

バブリングを行う培養法。通気の目的は攪乱ではなく、気体を細胞に与える事にある。

③攪拌培養

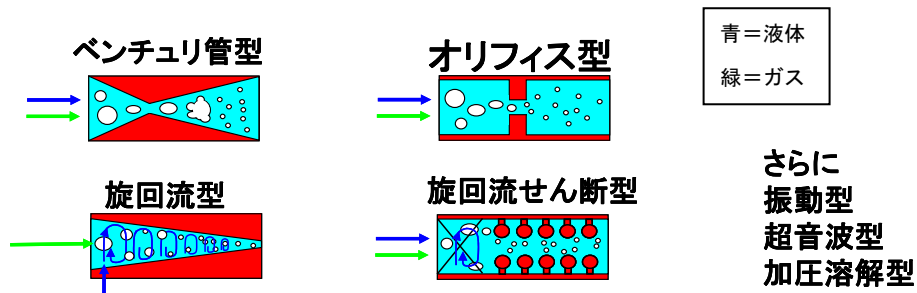
攪拌子（スターラー）やスクリーによって、細胞と培地とを混ぜ合わせる培養法。細胞が効率良く培地成分に接するので、増殖速度の向上が見込める。

④振盪培養

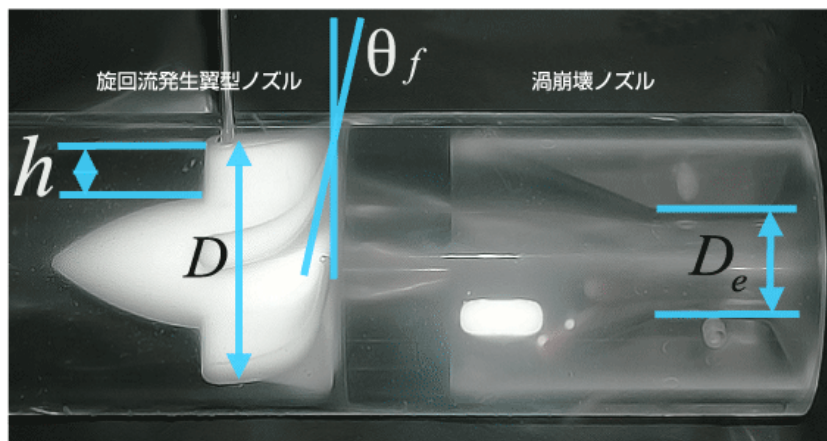
0.5-数 Hz 程度の頻度で培養容器を振り動かし、細胞と培地とを混ぜ合わせる培養法。攪拌培養と同様、増殖速度の向上が見込める。

培養方法として、旋回流を使用した場合に上記の②と④が同時に行える可能性が高い事が分かった。結果、今後のスケールアップの事も考え、円柱型もしくはチューブ型のリアクターを採用する事とした。

次にマイクロバブルだが、一般的に微細な気泡、特に直径50 μ 以下の気泡を指し、液中の溶存酸素量の増加が期待できるため、培養にも効果が有ると考えられる。発生装置には色々な種類が有り、一部を下記に示す。



発生機の検討の結果、ポンプの性能に応じて装置の設計が可能であること、水道水圧でも十分にマイクロバブルの発生が可能であること、給気が容易である事等から、下記の旋回流方式が有望となった。しかし、万が一今後の研究の進捗状況で、培養する菌が嫌気性菌であった場合、マイクロバブルの必要性が無くなる可能性があるため、今後他の開発状況に合わせながらリアクターの設計を開始する準備を進める事とした。



((株) エール・オーから)

2-3 発酵生産物 MCT の食品分野における有効利用に関わる技術の開発

2-3-1 海洋性油糧微生物が生産した MCT の脂肪酸構成の解析

GC-MS による脂肪酸成分の分析

NBRC 海洋微生物ライブラリー菌株の解析

NBRC が保有する海洋微生物ライブラリーからバクテリア 46 株、酵母 2 株、微細藻類 34 株、糸状菌 28 株、合計 110 株の脂肪酸組成解析を行った結果、酵母 1 株、藻類 9 株、糸状菌 1 株、バクテリア 1 株が脂肪酸を多く含むことが分かった。特に、中鎖脂肪酸としてドデカン酸 C12:0 が含まれていることが確認された (Table 1)。

Table 1. NBRC 海洋微生物ライブラリーの脂肪酸組成解析

NBRC番号	学名	種類	脂肪酸組成
678	<i>Lipomyces starkeyi</i>	酵母	C16:0
102752	<i>Chlamydomonas</i> sp. (class: Chlorophyceae)	藻類	C12:0, C16:0,
102700	<i>Chlorella saccharophila</i> (class: Trebouxiophyceae)	藻類	C12:0, C16:0, C16:1,
102737	<i>Chlorella</i> sp. (class: Trebouxiophyceae)	藻類	C12:0, C16:0, C16:1,
102705	<i>Chlorococcum dorsiventralle</i> (class: Chlorophyceae)	藻類	C12:0, C16:0, C16:1,
102714	<i>Nannochloris</i> sp. (class: Trebouxiophyceae)	藻類	C12:0, C14:0, C16:0, C16:1
102713	<i>Nannochloropsis granulata</i> (class: Eustigmatophyceae)	藻類	C12:0, C16:0,
102738	<i>Nannochloropsis oceanica</i> (class: Eustigmatophyceae)	藻類	C12:0, C16:0
102719	<i>Nannochloropsis salina</i> (class: Eustigmatophyceae)	藻類	C12:0, C16:0,
102697	<i>Stichococcus</i> sp. (class: Trebouxiophyceae)	藻類	C12:0, C14:0, C16:0, C16:1
32095	<i>Arenariomyces trifurcatus</i>	糸状菌	C14:?, C15:?
103148	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	細菌	C12:0, C14:0, C16:0, C16:1

海水サンプルから単離した菌株の脂肪酸組成

全国 85 か所から採取した海水サンプルを、Marine Agar 海洋微生物専用培地、NBRC no.13 培地、雪塩培地で一次スクリーニングを行い、約 2000 株の海洋微生物を単離した。また、新規スクリーニング法を用いてスクリーニングを行い、70 株を選別してきた。この 70 株と一次スクリーニングによって選別してきた株をランダムに選択し、脂肪酸組成を解析した結果、一次スクリーニング株 30 株からは脂肪酸のピークが観察されなかったのに対し、二次的なスクリーニングを行った館山 13-2 と沖縄-24 は C12:0 を含むことが分かった。さらに、沖縄 2 や沖縄 7、沖縄 9-1 など三つのサンプルは炭素数 12~16 までの脂肪酸を含むことが確認された。これらの物質の保持時間とマススペクトルを脂肪酸標準品と比較した結果、飽和脂肪酸ではなく、不飽和脂肪酸であることが推測された (Table 2)。このうち、館山 13-2 は遠心法によるスクリーニング、沖縄-2、沖縄-7、沖縄-8、沖縄-9-1、沖縄-24、沖縄-9-2 はオクタン酸を用いたスクリーニングによって単離してきたものであることから、今回構築したスクリーニング法の有効性が示唆された。

Table 2. 海水から単離した菌株の脂肪酸組成

サンプル名	種類	脂肪酸組成
館山13-2	細菌	C12:0
沖縄-2	細菌	C12~C16?
沖縄-7	細菌	C12~C16?
沖縄-8	細菌	C14~C15?
沖縄-9-1	細菌	C12~C16?
沖縄-24	細菌	C12:0, C16:0,
沖縄-9-2	糸状菌	C16:0

2-4 発酵生産物 MCT のバイオ燃料への変換技術の開発

2-4-1 THF (テトラヒドロフラン) を用いた均一相反応によるバイオケロシンの生産

1. はじめに

微生物の産生する中鎖脂肪酸油脂から、効率的にバイオケロシンを合成する方法として、THF を用いた均一相を利用する方法の開発を検討した。THF を用いて長鎖脂肪酸油脂からバイオディーゼルを合成する方法は、既知である¹⁾²⁾³⁾。この場合、アルカリ触媒を使用し、室温で効率よく反応することが知られている。しかし、中鎖脂肪酸油脂についての検討は、行われていない。

そこで、本研究では、中鎖脂肪酸油脂を原料に THF を用いて効率的にバイオケロシンを合成する方法の検討を行った。

2. 実験方法

2-1. 試料

本実験で使用した試薬は、購入したものを精製等の処理をせずに使用した。中鎖脂肪酸油脂として、炭素数 8 のトリグリセリドであるトリカプリリンを使用した。また、長鎖脂肪酸油脂として、主成分が炭素数 18 不飽和度 1 であるオレイン酸のトリグリセリドであるオレインリッチ (商品名) を使用した。また、長鎖脂肪酸として、主成分が炭素数 16 であるパルミチン酸とオレイン酸であるパームワックスを使用した。

トリカプリリン 和光純薬工業株式会社製

トリカプリン 東京化成工業株式会社

オレインリッチ 昭和産業株式会社製

パームワックス レインボーフェニックス株式会社製

2-2. 分析方法

2-2-1. モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、遊離グリセリンの分析

・ガスクロマトグラフィー: 島津製作所製 GC-2010

・カラム: ZB-5HT 15m×0.32 0.10 μm

・試料作成方法

①サンプル 100mg を 20ml のバイアル瓶に量り取った。

②内部標準液 (1, 2, 4-ブタントリオール) を 80 μl、内部標準液 (トリカプリン) を 100 μl、(N-Methyl-N-(trimethyl silyl)- trifluoroacetamide (MSTFA) を 100 μl 加えた。

③良く攪拌し、室温で 15 分間放置した。

④n-ヘプタンを 8ml を加えて振り混ぜた。

⑤1ml を GC 用サンプル瓶に入れ、セプタム、栓をする。

・試料の定量は、内部標準法により行った。

2-2-2. 酸価の分析

・サンプル約 5g を三角フラスコに量り取った。

・ジエチルエーテルとエタノール 1:1 混合溶液 25ml を加えよく攪拌した。指示薬として、フェノールフタレイン 0.1mol/l 水酸化カリウムエタノール溶液で滴定し、指示薬の薄い紅色を終点とした。(B(ml))

・酸価を計算した。

酸価 [mg KOH/g] = B [ml] × f × 5.611 / サンプル量 (g)

f : 0.1mol/l 水酸化カリウムエタノール溶液のファクター

2-2-3. 薄層クロマトグラム分析

- ・薄層クロマトグラム： Whatman Flexibl plates for TLC Silicagel
- ・展開溶媒： ヘキサン： ジエチルエーテル： 酢酸=80:20:1
- ・発色剤： Molybdo(IV) phosphoric acid n-hydrate 5% ethanol 溶液
- ・発色方法： 展開した薄層クロマトグラムをドライヤー室温で乾燥し、発色剤に含浸し、ドライヤーで加熱して発色した。

3. 実験結果

3-1. THF による均一相の生成

長鎖脂肪酸トリグリセリドとメタノール（以下、MeOH と略す。）とのエステル交換反応において、THF を添加して、均一相を形成することにより、反応速度は飛躍的に増大する。元来、長鎖脂肪酸トリグリセリドと MeOH は、相互溶解性が低く室温においては、二層をなす。そこで、THF の添加量によって、どのように均一相が形成されるのかを、オレインリッチと MeOH の様々な比率に対して検討した。実験は、オレインリッチと MeOH の所定の溶液に対して、THF を加え攪拌した後、静置し、一晚経過後に相分離の有無を判定した。判定は、目視で行った。

その結果を表 3-1-1. に示した。この結果より、オレインリッチ 20g に対して、MeOH は、0.7g 溶解することが判明した。しかし、長鎖脂肪酸トリグリセリドと MeOH の反応は、平衡反応である。そのため、MeOH は、長鎖脂肪酸トリグリセリドに対して、通常理論量の 2 倍、つまり 6mol 倍を添加することが必要である。この量の MeOH (4.2g、6mol 倍)を、添加した場合、完全混合に THF は、7.5g 必要であった。

表 3-1-1. オレインリッチと MeOH への THF 添加による均一相の生成

Orein rich (g)	MeOH (g)	mol ratio (MeOH/Orein rich)	完全混合に必要なTHF(g)
20	0.7	1	0.0
20	1.4	2	1.0
20	2.1	3	3.5
20	2.8	4	4.5
20	3.5	5	6.0
20	4.2	6	7.5

また、中鎖脂肪酸トリグリセリドと MeOH の相互溶解性については、知見が得られていない。そこで、カプリリンを用いて、相互溶解性について初めて検討を行った。その結果を、表 3-1-2. に示した。この場合、MeOH を徐々に追加していったが、重量比で 1 : 1 になるまで混合したが、均一相のままであった。

表 3-1-2. カプリリンと MeOH への THF
添加による均一相の生成

Capryline (g)	MeOH (g)	mol ratio (MeOH/Capryline)	完全混合に必要なTHF(g)
1	1	14.63	0.0

次に、通常、極性溶媒と非極性溶媒との混合反応において、反応は極性溶媒中で行われることが知られている。そこで、完全に均一相ができないまでも、THF を添加することによって、反応を加速する可能性があると考え、MeOH 相へのオレインリッチおよびトリカプリリンの溶解性について、THF の添加効果を検討した。また、カプリリンの MeOH 相への溶解は、表 3-1-2. に示されたように、1 : 1 混合であるので、その結果も合わせて、表 3-1-3. に示した。これより、THF を添加することにより、MeOH 相へのオレインリッチおよびトリカプリリンの溶解性が、飛躍的に上昇することがわかった。この結果より、オレインリッチと MeOH の反応への THF 添加の使用方法として、完全均一相を形成するまで添加せず、THF 量を抑える方法の可能性が示唆された。均一系でない場合、攪拌速度の影響を大きく受けるので、反応容器形状、反応速度、攪拌方法等の最適化を図ることにより、より経済的な方法を確立することが可能である。

表 3-1-3. MeOH と THF 混合溶液への
オレインリッチとカプリリンの溶解度

	MeOH	THF/MeOH=1 /10	THF/MeOH=1 /2
Olein rich (MeOH比%)	0.07	0.35	3.74
Tricaplin (MeOH比%)	7.4	15.7	>100
Tricaprylin (MeOH比%)	>100	-	-

3-2. アルカリ触媒における THF 添加効果

世界的に見て、脂肪酸油脂のエステル交換法によるバイオディーゼルの製造には、アルカリ触媒を用いることが通常である。また、価格面から水酸化ナトリウムをアルカリ触媒に用いられることが多い。そこで、水酸化ナトリウム触媒によるエステル交換反応における THF の添加効果を検討した。はじめに、長鎖脂肪酸油脂を用いて、条件検討を行った。次に、長鎖脂肪酸油脂に対して THF の添加が反応速度に与える影響を検討した。最後に、中鎖脂肪の THF の添加が反応速度に与える影響を検討した。

3-2-1. 長鎖脂肪からのバイオディーゼル合成

まず、様々な比率で、オレインリッチ、MeOH、NaOH、THF またはその他の溶媒、を混合した。また、攪拌時間、分離するまでの時間も様々に変化させて、最適条件の検討を行った。

次に、そこで得られた知見と、3-1. で得られた知見より、最適な条件による反応速度の解析を行った。

3-2-1-1. 長鎖脂肪からのバイオディーゼル合成

まず、様々な比率で、オレインリッチ、MeOH、NaOH、THF またはその他の溶媒、を混合した。また、攪拌時間、分離するまでの時間も様々に変化させて、最適条件の検討を行った。

①試験方法

50ml バイアル瓶に、所定量のオレインリッチ、MeOH、NaOH 等を仕込み、攪拌子により攪拌した。所定の時間攪拌した後、所定の時間静置した。反応物を分液ロートで分液し、水洗を 3 回行った。得られた液を加熱し、水分を除去して、重量測定ならびに、ガスクロマトグラフィーにて組成の分析を行った。

- ・ 反応容器： 50ml バイアル瓶 Φ40mm×75mm
- ・ 攪拌子： テフロン攪拌子 Φ7mm×20mm 900rpm
- ・ 仕込み：
オレインリッチ 20g
MeOH オレインリッチに対し 1 当量を 0.7g とした量

②試験結果

試験結果を表 3-2-1. に載せた。以下に試験結果から得られた知見を列挙した。

Run4, 23, 24 から、MeOH をオレインリッチに対して 10 以上入れても、良い結果は、得られなかった。

Run24, 27 から、THF 以外にも Hexane の添加でも同様な効果が期待できる。

Run25 より、1 時間の反応時間では、ASTM 基準をクリアーすることは、出来ない。

Run28-30 より、MeOH/triglyceride=3.3 では、ASTM 基準をクリアーすることは、出来ない。

Run31-36 より、NaOH 量は、 triglyceride の 0.05%では、触媒量が不足である。(0.5%が最適)

表 3-2-1. オレインリッチと MeOH のエステル交換反応条件検討

	MeOH/tri glyceride(mol比)	THF (g)	NaOH (g)	Mixing Time (min)	Seperation time	Yeild (%)	Monogly ceride (%)	Diglyceri de (%)	Triglycer ide (%)
Run4	29.9	15	0.1	90	Over night	83%	1.01	0.07	0.02
Run23	14.3	5	0.1	3	Over night	95%	0.77	0.05	0
Run24	10.0	4	0.1	1	Over night	97%	0.29	0.06	0
Run25	10.0	2	0.1	30	60min	92%	1.52	1.91	2.33
Run26	10.0	2(Ether)	0.1	30	40min	76%	1.91	3.62	6.01
Run27	9.7	2(Hexane)	0.1	30	3 Over night	91%	0.24	0.07	0.07
Run28	3.3	2	0.1	30	sep over night	96%	3.53	8.23	10.86
Run29	3.3	0	0.1	30	sep over night	95%	2.03	6.08	7.68
Run30	3.3	2(diesel)	0.1	30	60min	91%	2.5	6.06	7.41
Run31	3.3	0	0.01	150	Over night	89%	3.06	12.28	24.21
Run32	3.3	0	0	120	No reaction	0%	-	-	-
Run33	3.3	2.06	0.01	30	4 Over night	97%	7.19	14.55	18.25
Run34	3.3	0	0.01	120	4 Over night	97%	4.03	10.93	19.68
Run35	3.3	0.24(H ₂ O)	0.01	120	No reaction	0%	-	-	-
Run36	3.3	2.39	0	120	No reaction	0%	-	-	-
Run37	10.0	0	0.1	30	Over night	97%	0.45	0.41	0.5
Run38	4.7	0	0.1	30	Over night	96%	2.3	4.63	6.46
Run43	6.0	0	0.21	60	60min	93%	1.21	2.76	5.36
Run46	3.4	0	0.2	45	120min	45%	2.35	7.01	13.52

3-2-1-2. オレインリッチからのバイオディーゼル合成の反応速度検討

反応速度を求めるにあたり、先の結果と経済的な面から、MeOH 添加量をオイルの 6 当量とした。

二相系の反応においては、反応速度における攪拌の影響が大きく出ると予想され、普遍的なデータとはなりにくい。そこで、THF の添加量は、完全溶解をする必要量とし、THF の添加あり、なしで試験した。

①試験方法

50ml バイアル瓶に、所定量のオレインリッチ、MeOH、NaOH 等を仕込み、攪拌子により攪拌した。所定の時間毎に、0.5ml サンプルングし、アセトン：酢酸=100:1 溶液 1ml に添加し、反応を止めた。所定の方法にて、ガスクロマトグラフィーにて組成の分析を行った。

- ・ 反応容器： 50ml バイアル瓶 Φ40mm×75mm
- ・ 攪拌子： テフロン攪拌子 Φ7mm×20mm 900rpm
- ・ 仕込み：

オレインリッチ 20g

MeOH 4.2g(オレインリッチに対して 6mol)

THF 7.5g

NaOH 0.1g

- ・ 温度：室温 (20~25 度)

・サンプリング方法：10 μ l 酢酸含有アセトン 2ml に、採取した反応液 0.5ml を添加しクエンチした。反応液添加前後の重量より、反応液重量を計算した。

・サンプリング時間： 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30min

②試験結果

試験結果を図3-2-1、図3-2-2. にまとめた。THF を添加することにより、反応速度は、飛躍的に向上した。

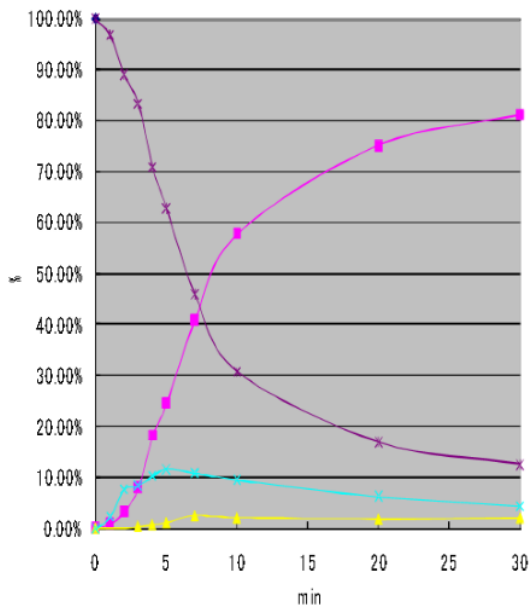


図3-2-1. オレインリッチ反応速度

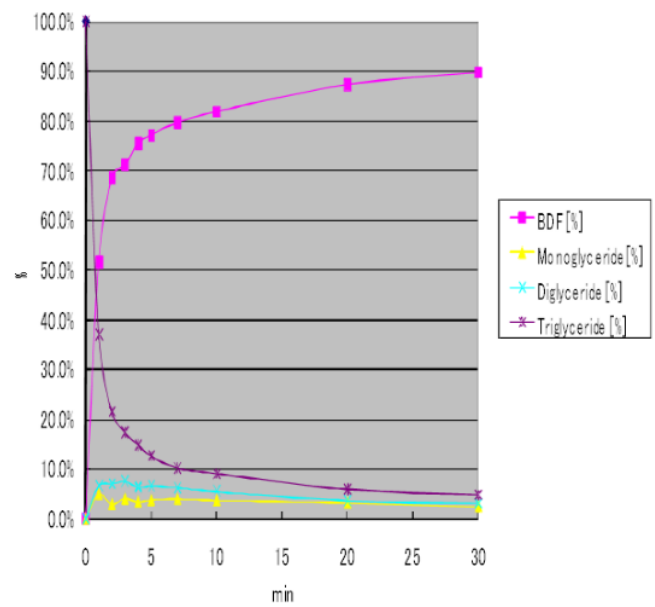


図3-2-2. オレインリッチ反応速度 (THF 添加)

3-2-2. 中鎖脂肪からのバイオケロシン合成

長鎖脂肪からのバイオディーゼル合成の方法を参考に、同様な方法で、試験を行い、長鎖と中鎖の反応性の違いを比較した。中鎖としては、トリカプリン (C10) とトリカプリリン (C8) を試験に用いた。

3-2-2-1. トリカプリンからのバイオケロシン合成の反応速度検討

①実験方法

実験方法は、3-2-1-2. の方法と同様にして行った。MeOH は、オイルとのモル比を基準に合わせた。

トリカプリン	20g
MeOH	6.9g(トリカプリンに対して 6mol)
THF	7.5g
NaOH	0.1g

②試験結果

試験結果を図3-2-3.、図3-2-4. にまとめた。THF を添加することにより、反応速度は、かなり向上した。

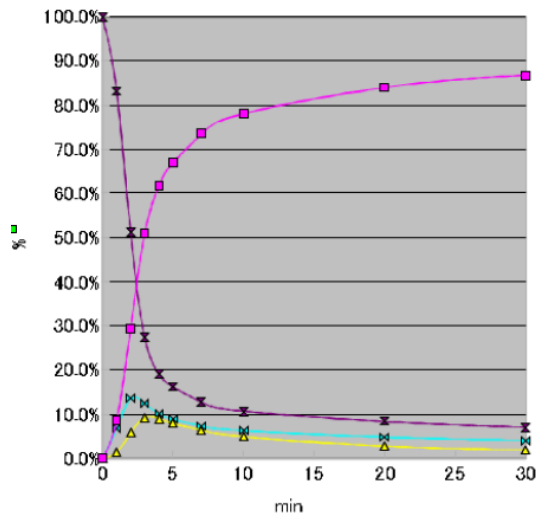


図 3-2-3. トリカプリリン反応速度

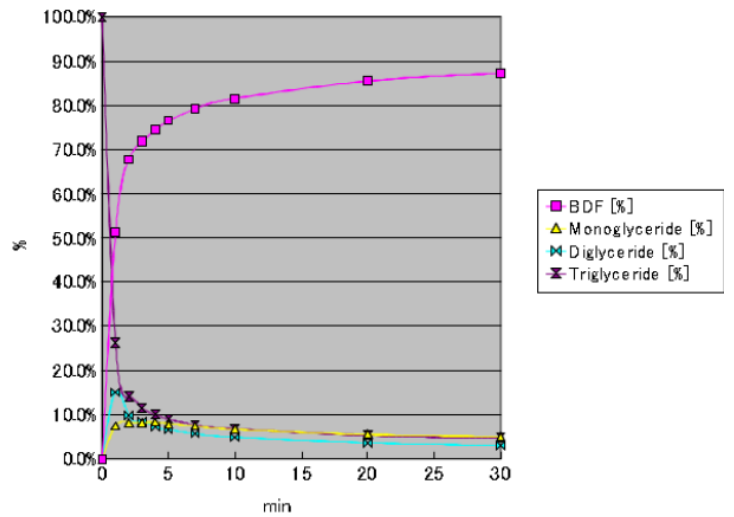


図 3-2-4. トリカプリリン反応速度
(THF 添加)

3-2-2-2. トリカプリリンからのバイオケロシン合成の反応速度検討

①実験方法

実験方法は、3-2-1-2. の方法と同様にして行った。MeOH は、オイルとのモル比を基準に合わせた。MeOH 量が 3-2-1-2. の 2 倍になったので、NaOH 量は、2 倍にした。

トリカプリリン	20g
MeOH	8.3g(トリカプリリンに対して 6mol)
THF	7.5g
NaOH	0.2g

②試験結果

試験結果を図 3-2-5、図 3-2-6. にまとめた。

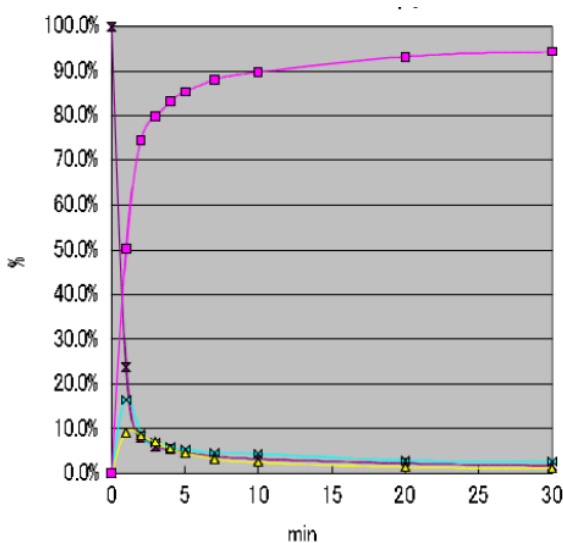


図 3-2-5. トリカプリリン反応速度

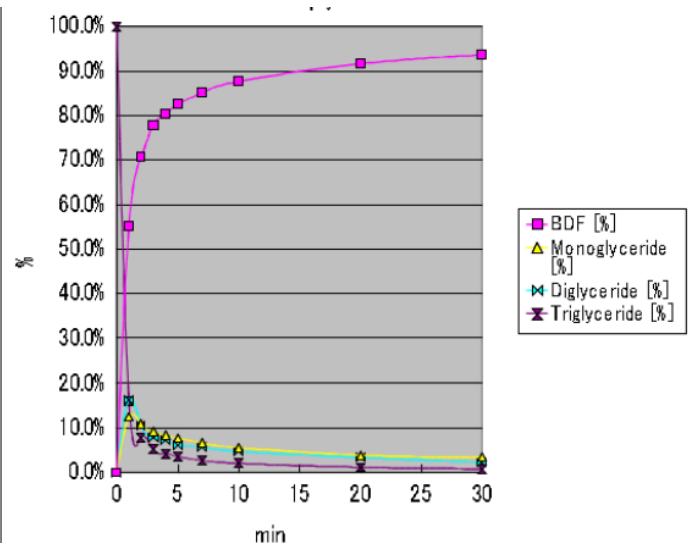


図 3-2-6. トリカプリリン反応速度
(THF 添加)

3-2-3. 長鎖脂肪からのバイオディーゼル合成の新方式

3-2-1-2. により、THF を混合することにより、飛躍的に反応速度が速くなることが、示唆された。しかし、これには、THF を多量に用いるために、溶媒の回収等のコストがかかることが予想される。そこで、THF 添加量を削減し、また、攪拌時間を極端に短縮して、その後静置する手法を検討した。一段で BDF の基準をクリアする点を見つけるために MeOH 仕込み量を増加し、長時間の測定を行った。今回は、中鎖脂肪であるトリカプリンを試験する予備試験として、オレインリッチを用いた。

3-2-3-1. 短時間攪拌静置法

①試験方法

MeOH 量を増加し、THF 量を減らした以外は、3-2-1-2. と同様な方法で試験を行った。

仕込み

オレインリッチ	20g
MeOH	7g(オレインリッチに対して 10mol)
THF	4g
NaOH	0.1g

②試験結果

試験結果を、図 3-2-7. に載せた。また、表 3-2-2. に 6 時間後と 21 時間後の組成を載せた。表 3-2-2. より、21 時間で平衡に達し、それ以降は、組成が変化しないことが判明した。また、平衡状態においてもグリセリンの含有量は高く、水洗なしで、ASTM 規格を満たすことは、出来なかった。図 3-2-7. は、グリセリンを除いたデータである。これより、6 時間以上経過しないと、ASTM の規格には、収まらないことが判明した。また、水洗工程を入れれば、グリセリンは、100%除去できることが知られているので、グリセリンを除いた表 3-2-2. より、6 時間と 21 時間の中間である 15 時間程度経過後には、ASTM 規格を満足する組成が出来ることが判明した。

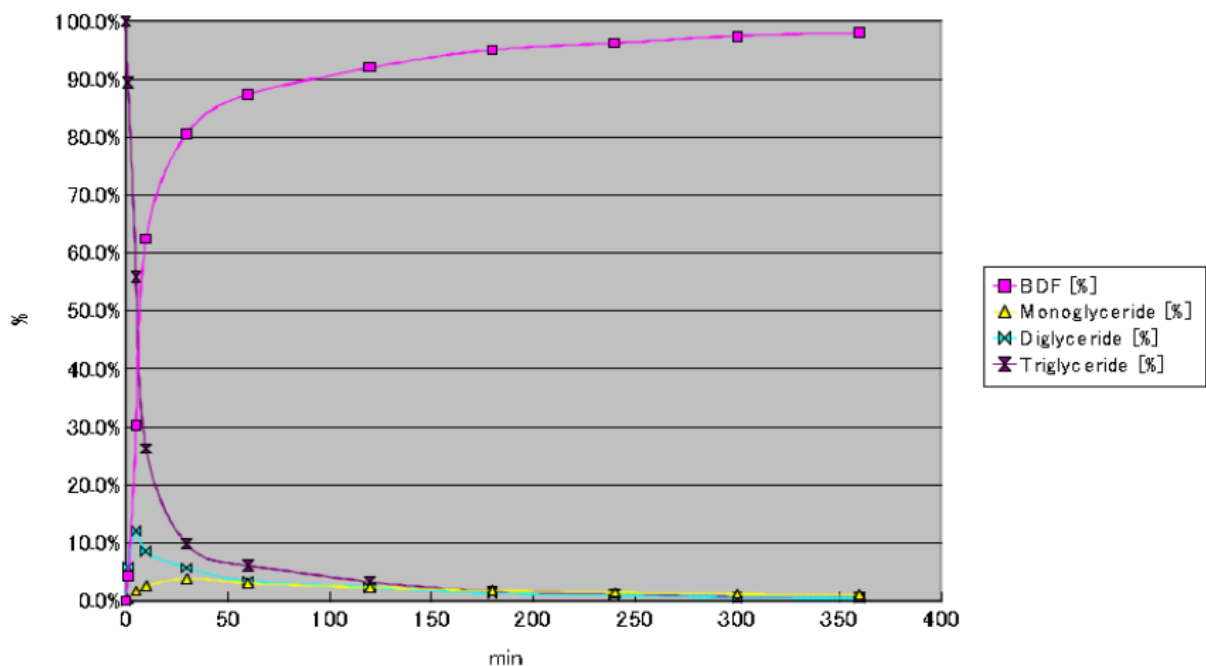


図 3-2-7. 2分攪拌後静置 オレインリッチから BDF THF 添加
除くグリセリン

表 3-2-2. 2分攪拌後静置 オレインリッチから BDF THF 添加 6, 21 時間後組成

時間(h)	BDF [%]	Glycerol [%]	Monoglyceride [%]	Diglyceride [%]	Triglyceride [%]	Total glycerin[%]
6	97.0%	1.1%	1.0%	0.4%	0.5%	1.41%
21	98.5%	0.8%	0.6%	0.1%	0.0%	0.77%
51	98.6%	0.7%	0.6%	0.1%	0.0%	0.78%
168	98.5%	0.8%	0.6%	0.1%	0.0%	0.76%
参考	ASTM規格	<0.02%	<0.8%	<0.2%	<0.2%	<0.25%

表 3-2-3. 2分攪拌後静置 オレインリッチから BDF THF 添加 6, 21 時間後組成
除くグリセリン

時間(min)	BDF [%]	Monoglyceride [%]	Diglyceride [%]	Triglyceride [%]	Total glycerin[%]
360	98.1%	1.0%	0.4%	0.5%	0.38%
1260	99.3%	0.56%	0.07%	0.03%	0.16%

3-2-3-2. 短時間攪拌静置法 THF 量の影響

THF の添加により、反応速度および、平衡状態にどのような影響が出るかを検討した。

①実験方法

THF 量を変化させた以外は、3-2-1-2. と同様な方法で試験を行った。サンプリングは、30 分後と、その後 40°C に加温し、22 時間後に行った。

30 秒毎に攪拌を止め、静置しても混合された状態になるまで、攪拌を行った。

仕込み

オレインリッチ	20g
MeOH	4.2g(オレインリッチに対して 6mol)
THF	7.5、4、2、1、0g
NaOH	0.1g

②試験結果

攪拌時間の試験結果を表 3-2-3. に載せた。溶液の組成の分析結果を、図 3-2-8.、図 3-2-9. に載せた。表 3-2-3. より、THF 添加量が多いほど、短時間の攪拌で十分な混合状態が得られたことがわかる。また、図 3-2-8. より、THF の添加量が多いほど、反応速度も速いことがわかった。途中 run2 と run3 で逆転しているのは、攪拌時間が 30 秒から、60 秒になったためと思われる。また、run4 と run5 で逆転しているのは、run5 においては、30 秒後に攪拌を終了したとき一応混合状態になったものの 4 分後に分離したため、4 分後から 30 秒攪拌したことにより、影響を受けたものと思われる。

最終的な平衡状態においては、BDF がいずれも 94~95.5 であり、大きな違いは見られなかった。ただし、その他の組成は違いが見られ、THF 量が多いほどトリグリセライドの割合が低かった。

表 3-2-4. THF 添加量と攪拌時間の検討
(オレインリッチからの BDF 合成)

	1	2	3	4	5
MeOH	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
THF	7.5	4	2	1	0
Mixing(sec)	30	30	60	60	60

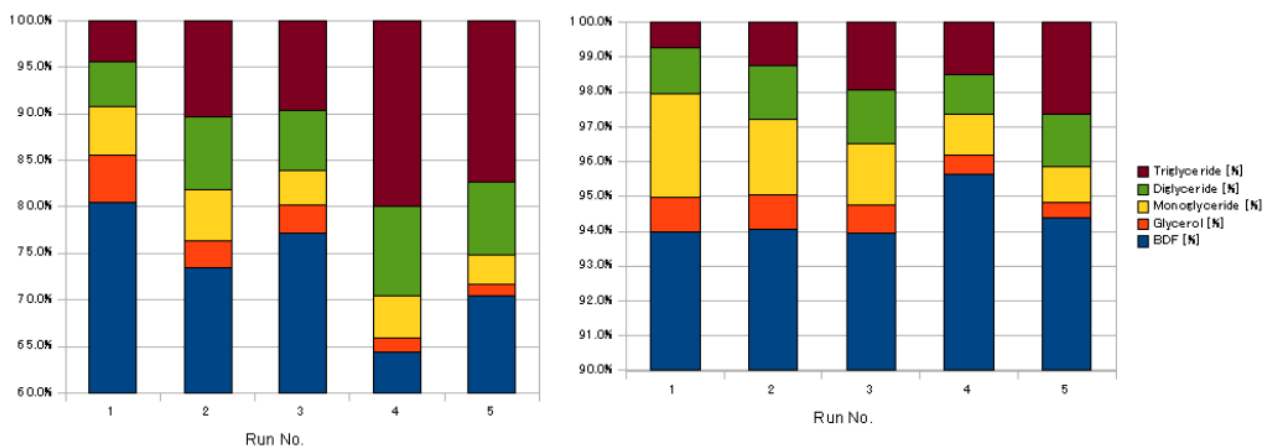


図 3-2-8. THF 添加量と攪拌時間の検討 30 分後組成
 図 3-2-9. THF 添加量と攪拌時間の検討 22 時間後組成

4. まとめ

3-2-1. および 3-2-2. の反応速度データを、初期速度として、50%反応率達成までの時間を用いて、解析を行った。その結果を表 4-1. に載せた。この結果より、THF を添加することにより、オレインリッチの場合は 8 倍、トリカプリンの場合は 4 倍反応速度を加速することができた。しかし、トリカプリリンの場合は、THF 添加により反応速度の変化は見られなかった。いずれの場合も、THF を添加した時の初期速度は 0.17~0.19g/min であり、ほぼ一定であった。また、THF 添加による MeOH 相へのオイルの溶解性のデータからも、反応性は、脂肪の炭素数に余り影響を受けずに、THF により均一相を生成するか否かにより大きな影響を受けるといえる。

トリカプリリンを用いた場合には、THF の添加は必要ないが、トリカプリリンの場合には、THF 添加による均一相生成の合成法は有用であり、今後も開発していく必要がある。

表 4-1. 長鎖および中鎖脂肪のエステル交換反応速度

	50%Time(s)	初期速度(g/min)
Olein rich	519	0.02
Olein rich +THF	58	0.17
Tricaprin	242	0.04
Tricaprin+THF	59	0.17
Tricapryln	60	0.17
Tricaprylin+THF	54	0.19

また、THF を少量添加して、静置する新しいバイオディーゼルの合成方法の検討では、反応時間が 15 時間と長いものの短時間の攪拌だけで、室温で反応を完結することができた。この方法を用いて、大幅な製造コスト削減の可能性が示唆された。

2-4-2 THF（テトラヒドロフラン）を用いた均一相反応によるバイオケロシン生産のための小型 BDF 装置の開発

1. 概要

本装置は、THF を用いたバイオケロシン生産のための小規模実験装置である。そのために、小型の BDF 製造装置を実験の都合によるレシピの変更に柔軟に対応できるように設計されている。

また、遠隔監視機能付きの自動運転が可能であり、実験者の負担を極力低減するようにした。

2. ハードウェア

3-1 主要緒元

小型機の主な仕様を以下に示す。

処理量	100l/バッチ
処理時間	約 5 時間/バッチ (BDF 製造時)
触媒	THF (苛性ソーダ+メタノール) (BDF 製造時)
操作	全自動 + VPN 接続による遠隔サポート
電源	3φ 200V 30A 以下
寸法 (H×W×D)	2500×900×900 (mm)

3-2 プロセス方式

装置の部品点数の少なさ、調整の容易なことから 1 槽式のバッチ方式としました。

3-3 容量

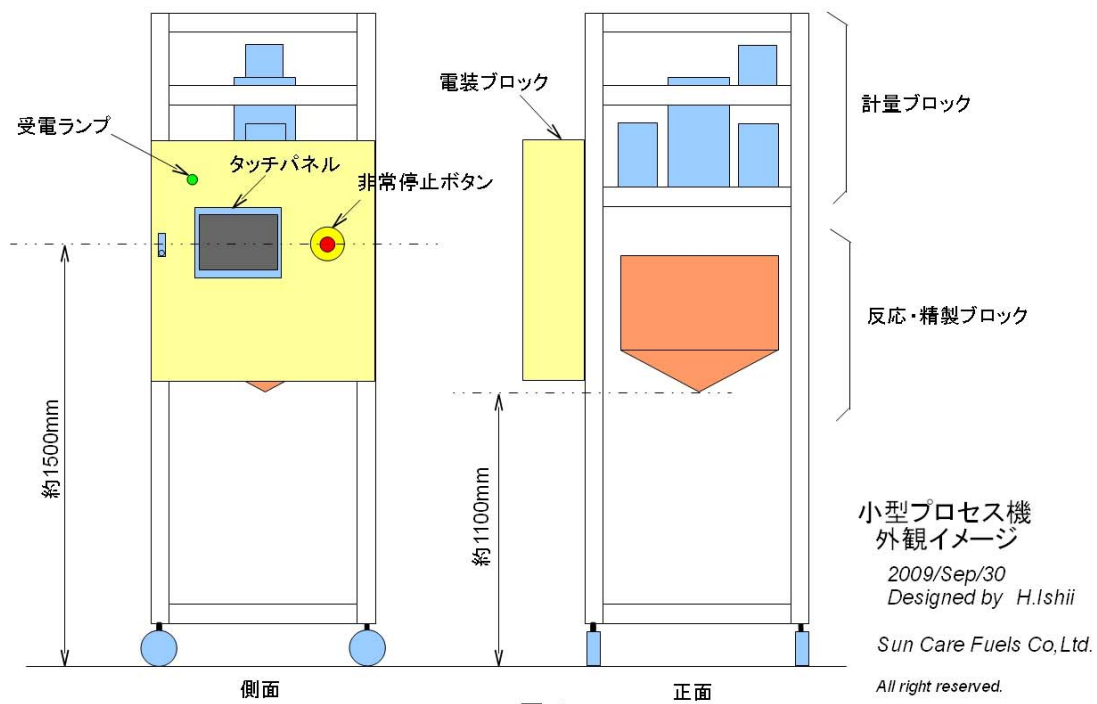
一回の処理量は、原料油 100L にした。ここに薬液を 20L+ α 混合することが可能。

3-4 動力

主電源は、3 相 200V30A とした。これは主にヒーターに供される電力である。流体が可燃物であることから、流体の移送制御は、可能な限りエアオペレーションバルブ等の圧空を動力源とするデバイスを用いている。

3-5 構造 (図-1 参照)

動力の項でも記述したが、可燃物を扱うために、できるだけ火花の出るようなデバイスを使いたくない。よって、流体のハンドリングには電動ポンプ等は使用せずに、圧空と重力を使用することにした。そのために高さが少々高くなっている。



3-6 計量ブロック (図-2 参照)

装置最上段には、原料油・薬液 1・薬液 2・温水それぞれの計量バケツがあり、ここで定量測定したのち、レシピに従って反応槽に自然流下によって投入される。

それぞれの計量タンクの 1 定量は以下の通り。

計量物	1 定量 (L)
原料油	50
薬液 1	14
薬液 2	0.2
温水	20

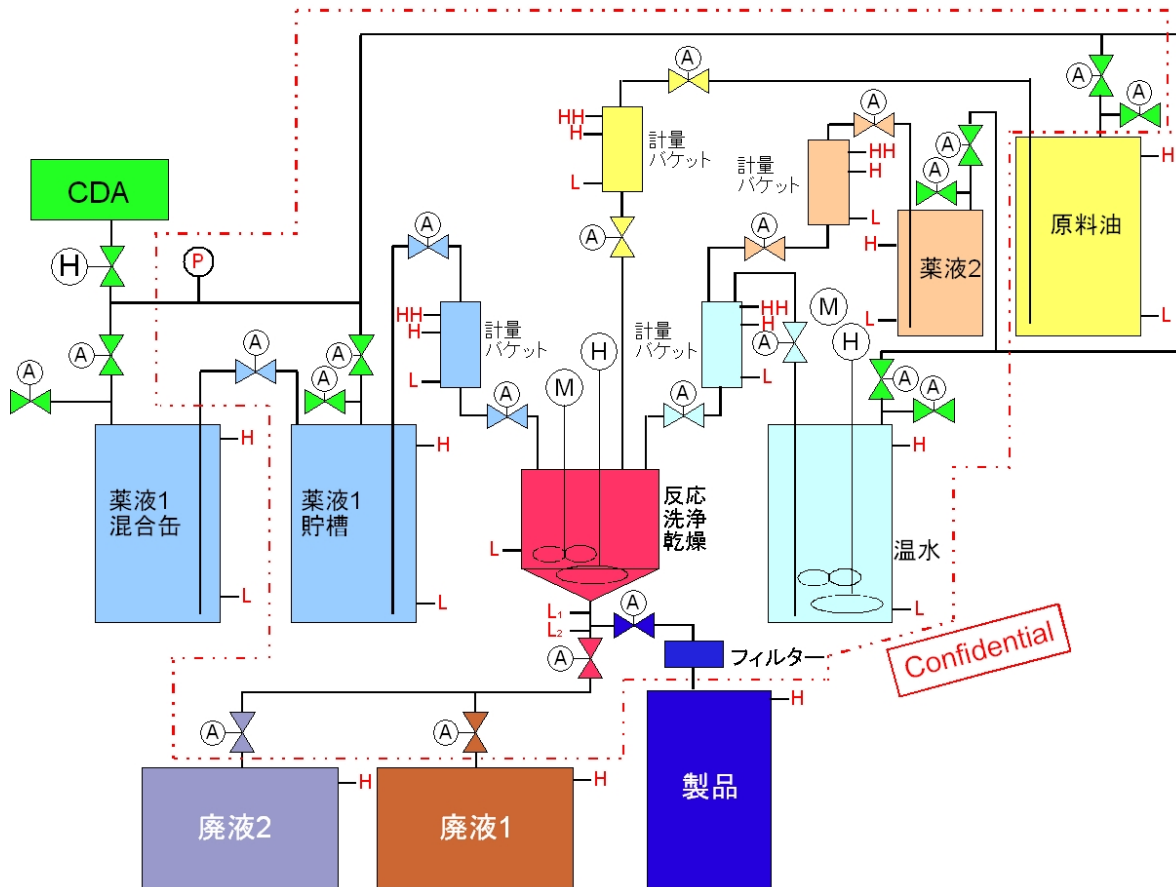


図-2 Sun Care Fuels Co.,Ltd. All right reserved.

3-7 反応・精製ブロック

計量ブロックの下部には反応槽が設置されている。設置槽の最適容量は120L となっている。

計量槽内には、攪拌機及びヒーターが設置されており、反応はもとより、洗浄、すすぎ、乾燥のすべての工程をこの槽一つで行う。

反応槽底部には、反応後のグリセリン排出や排水排出、完成品払い出しのためのポートが設けられており、ポートにはグリセリン廃液（廃液1）・洗浄水廃液（廃液2）・製品払い出しの専用バルブが取り付けられている。

これらの液の払い出しもすべて、自然流下で行われる。

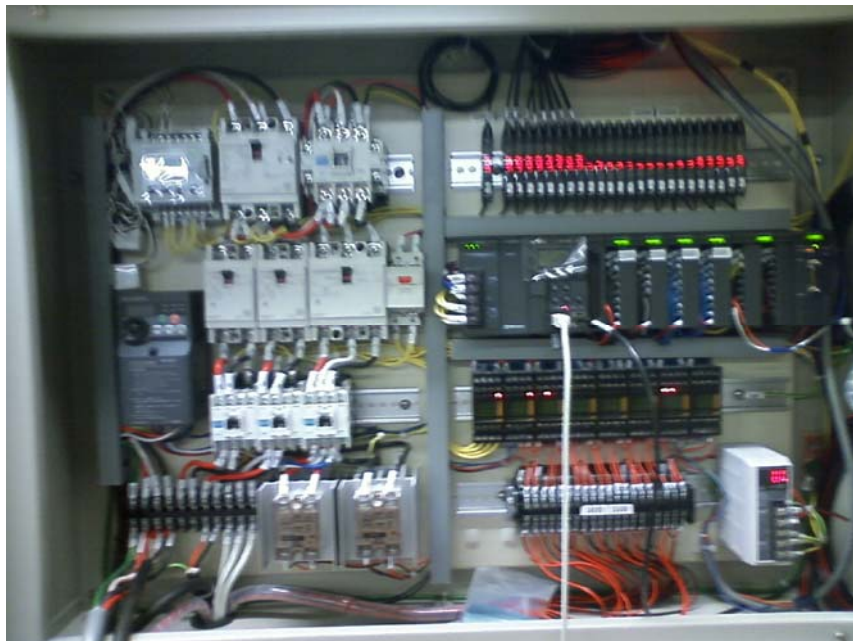
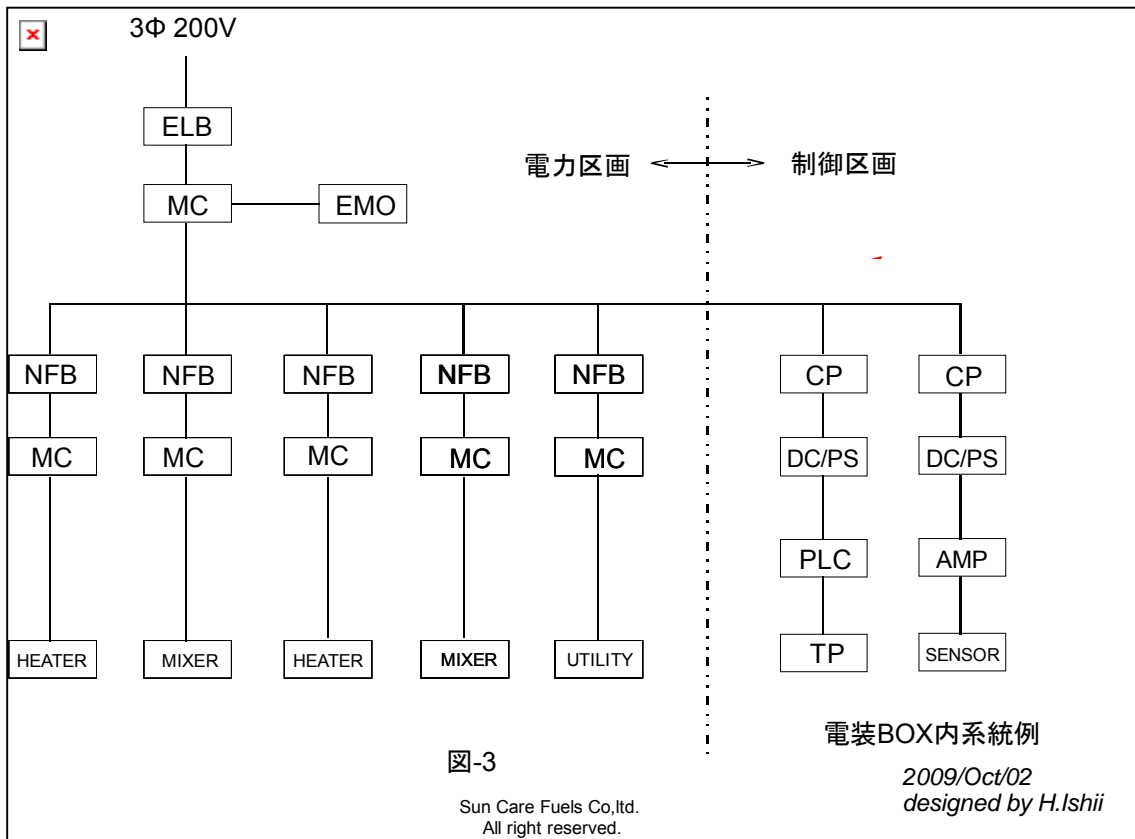
3-8 最下部

反応槽の下には、200L ドラム缶に自然流下で完成品を送り出すためのスペースが確保されている。この装置の背の高さの主要因である。

3-9 電装ブロック（図-3 参照）

筐体側面には、この装置の制御系及び電力系が納められた電装 Box が取り付けられている。この Box 内は、主幹ブレーカー及びヒーター・温水器・攪拌機・制御系電力の各系統別のブレーカー区画とセンサーアンプ・PLC・DC 電源・制御リレー等を含む制御ブロックに分かれている。

また、電装 Box 表面には、装置操作を行うためのタッチパネルと非常停止スイッチ、受電ランプが取り付けられている。操作は、すべてこのタッチパネルより行われる。



実際の電装 Box 内（左側が電力区画、右側が制御区画になっている）

3-10 センサー

液面センサーには、光学式のセンサーを用い、本質防爆構造を考慮した計測方式を用いている。

計量タンクに取り付けられた光電センサー
（赤く光っているのが光電センサー）



4. ソフトウェア

4-1 制御モード

制御モードは、全自動モード・半自動モード・メンテナンスモードが定義されている。

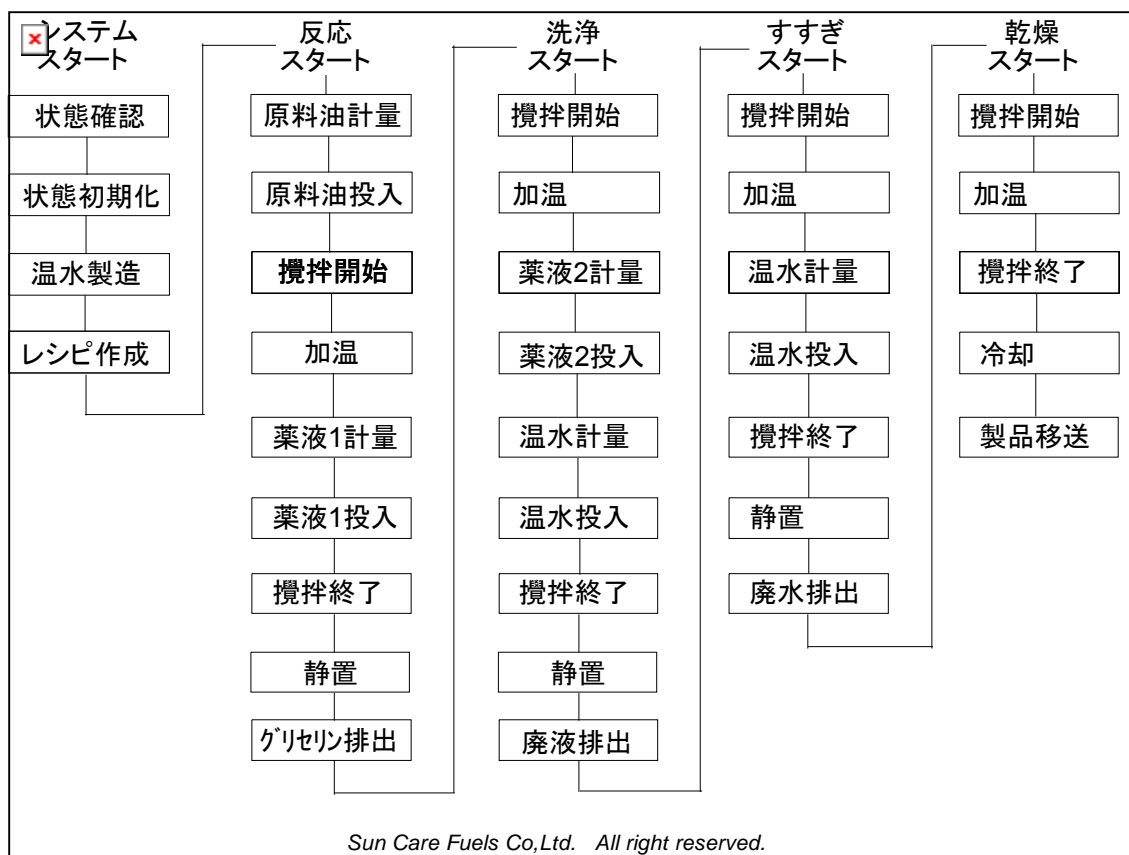
各モードで行える機能を以下に示す。

Full auto mode	レシピ実行routine
Semi auto mode	Alarm routine, Initial routine, 反応 routine, すすぎ routine, 洗浄 routine, 乾燥 routine, 温水 routine, 製品移送 routine, レシピEND routine,
Maintenance mode	各バルブ on/off、 温調器出力on/off, 攪拌機on/off, 各液面センサー監視,

4-2 全自動モード

タッチパネル上の全自動スタートスイッチを押すことにより、プロセスのすべてを自動で運転する。(エラー発生時には、エラーレベルに応じて、停止・続行・終了を自動的に選択する)

実行される手順を以下に示す。



4-3 半自動モード

プロセスの各段階（反応・洗浄 1・洗浄 2・乾燥）を個別に単独運転することができる。
 （エラー発生時には、全自動同様に停止・続行・終了を自動的に選択する）
 全自動モードの各単工程を実行し停止する。

4-4 メンテナンスモード

装置のバルブ類・ヒーター・攪拌機を個別に運転することができる。（インターロックは無効になっている）
 インターロック機能が無効になっているゆえ、このモードに入るためには、パスワードの入力を求められる。
 以下に各モードの操作画面を示す。



全自動モード画面



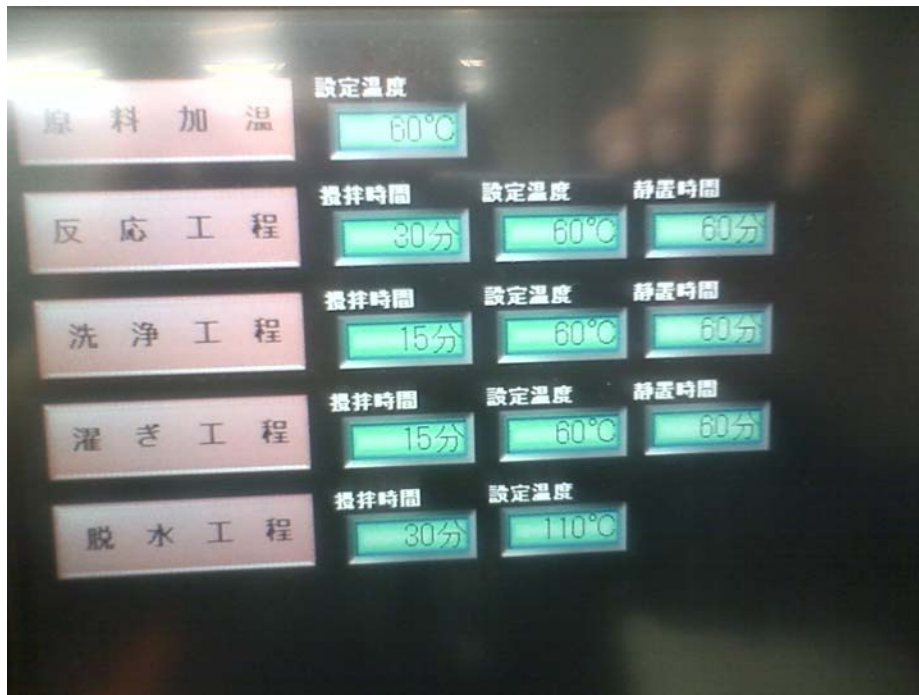
半自動モード画面



メンテナンス画面

4-5 レシピ設定

全自動モード及び半自動モードでの加温温度・攪拌時間・静置時間を設定できる。これにより、レシピの細かい変更を可能としている。



4-6 アラーム

アラームは、その重大性に応じて3段階に分かれている。アラームレベル及びアラーム種により適切なインターロック動作が定義されている。

以下に、アラーム種とレベルを示す。

メトキシド貯槽レベルL	警報
原料油貯槽レベルL	警報
メトキシド貯槽レベルLL	軽異常
薬液2貯槽レベルLL	軽異常
原料油貯槽レベルLL	軽異常
製品タンクH	軽異常
廃液1タンクH	軽異常
廃液2タンクH	軽異常
停電	軽異常
メトキシド計量タイムアウト	重故障
薬液2計量タイムアウト	重故障
原料油計量タイムアウト	重故障
温水計量タイムアウト	重故障
メトキシド吐出タイムアウト	重故障
薬液2吐出タイムアウト	重故障
原料油吐出タイムアウト	重故障
温水吐出タイムアウト	重故障
廃液1吐出タイムアウト	重故障
廃液2吐出タイムアウト	重故障
二次洗浄水吐出タイムアウト	重故障
加熱タイムアウト	重故障
反応槽温度HH	重故障
温水貯槽温度HH	重故障
反応槽ヒーター断線	重故障
反応槽攪拌機異常	重故障
非常停止スイッチ作動	重故障
PLC異常	重故障

・ 警報

アラーム要因ではあるが、実行中プロセスは続行する。但し、新規プロセスは警報要因が取り除かれない限りスタートしない。

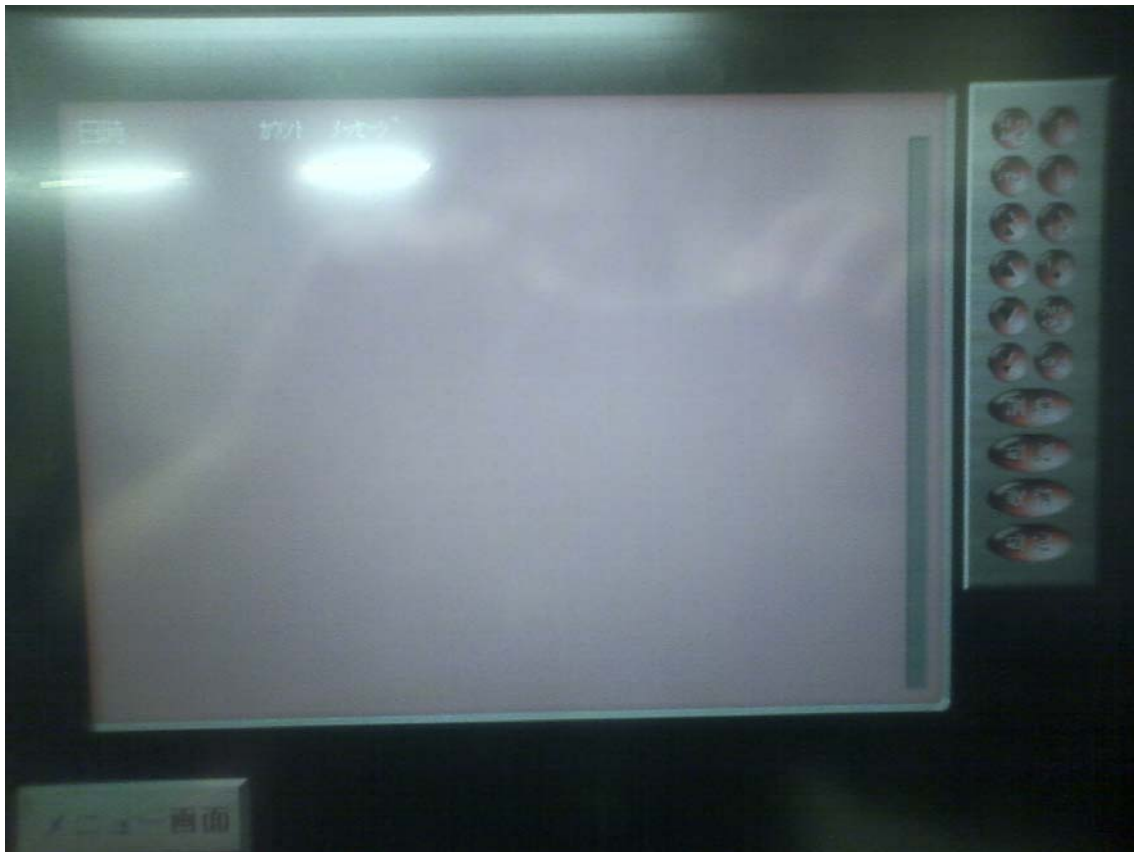
・ 軽異常

実行中のプロセスは一時停止するが、軽異常要因が取り除かれた後にプロセスを続行することができる。

・ 重故障

実行中のプロセスは中止される。重故障要因が取り除かれたのちでもプロセスを再開することは不可能。停止したプロセスの残液を手動で抜いた後、新たなプロセスを開始する必要がある。

アラーム画面を以下に示す。



5. 遠隔監視

5-1 LAN 接続

当社 LAN に接続することによって、当社内の PC から運転状況をリアルタイムでモニターすることができる。この機能は、PLC がデフォルトでもっている IP アドレスを当社 LAN のドメインに合わせることで実現した。

また、この機能により、アラーム発生時の携帯電話等へのメール通達機能を使用することができるようになっている。

実験 RUN では、あまり使用頻度は多くないと思われるが、当社サーバーの VPN 機能を使って、当社以外の場所から運転状況モニターも可能になっている。

社外からのモニターは一般インターネット回線を使用する関係上、十分なセキュリティーを確保するために VPN 機能は必須である。

6. 試運転

6-1 BDF 製造試験

装置の動作試験を行うに当たり、原料油としてひまわり油、触媒として苛性ソーダとメタノールを使用して、装置の全自動運転を行った。

その結果、プロセスは滞りなく進行し成功しました。

その様子を示します。

プロセス	量 (L)	温度 (°C)	時間 (min)	工程
原料油投入	100			予熱

予熱		60		
メトキシド投入	28			反応
攪拌		60	30	
静置			60	
廃液排出				
温水投入	20			洗浄
攪拌		60	15	
静置			60	
廃液排出				
温水投入	20			すすぎ
攪拌		60	15	
静置			60	
廃液排出				
攪拌		110	30	乾燥
終了				

※メトキシド濃度 メタノール 60L + NaOH 0.9Kg

この自動運転プロセスの開始から終了までに要した電力量は、約 6Kwh であった。要した時間は、約 7 時間でした。（油温が低いため粘性が高く移送スピードが上がらないことと予熱に時間がかかっているため。）



試験風景

手前の PC からプログラムの進行状況等を確認した。

廃液は青いポリバケツに受けた。

装置下部におかれている白い立方体が温水器。その右側が圧縮空気乾燥器です。

手前の白いポリタンクがメトキシド貯槽。その奥が原料油貯槽。

原料・薬液は圧縮空気によって装置まで圧送される。

7. 今後の課題

乾燥工程時、ドライエアを吹き込むと、かなりの量の蒸気（水分+油分）と臭気が噴出する。室内で運転するためには、排気ダクトを設置することを考えたい。

最終章 本年度成果とバイオケロシンの市場について

食料品製造業、化学工業における発酵では、多様化、高品質化、低コスト化、環境対応へのニーズが高く、これらを達成するために、微生物の多様化・改良ならびに発酵生産物の有効利用に係る技術の高度化を図ることが求められる。発酵の利用は、発酵食品、アミノ酸の生産など食品、医薬工業原料など多岐にわたり、油脂の生産もその一つである。

しかし、これまでに効率的な油糧微生物の1次スクリーニング法がないため、この分野の研究開発は極めて少ない。そこで、油脂を著量蓄積する微生物の比重は、他の微生物に比して低いという物理的特徴を利用した新規スクリーニング法を開発し、油糧微生物の単離効率を飛躍的に改善した。そして、単離した新規微生物を同定し、その培養特性を明らかにして油量微生物の大量培養法の準備を行った。大量培養法が確立された際には、発酵生産されたMCTの構成脂肪酸を解析し、マウスもしくはラットを使った実験で、一般的な油脂と比べた時の体内におけるエネルギー代謝効率の違いを明らかにする。そして、エネルギー補助食品としての利用が可能かどうかについて検証する。また、近年バイオ燃料の利用先として注目されている航空機燃料への用途開発のほか、未だ開発されていない家庭用暖房に利用可能なバイオ灯油の新規開発も目指す。そこで、生産されるバイオケロシン、またその生産可能なプラントの市場と事業化について検討を行った。

1) ターゲット市場

バイオケロシンの市場を考えた場合、バイオ航空機燃料とバイオ灯油の2つの市場が存在する可能性がある事が分かった。

・ 航空機燃料

2008年の石油連盟の販売実績統計では、国内で約5,249千KLの航空機燃料が販売されている。地域で見ると、1位：東京（1,517千KL）、2位：沖縄（586千KL）、3位北海道（550千KL）となっている。

・ 灯油

2008年の実績では、21,365千KLの灯油が販売されており、航空機燃料の約4倍の市場規模である。また地域別で見ると、1位：東京（3,223千KL）、2位：北海道（2,904千KL）、3位：神奈川県（953千KL）となっている。

都道府県別石油製品販売数量

(2008年04月～2009年03月) 年度

(単位: kl)

都道府県名	揮発油	ナフサ	ジェット 燃料油	灯油	軽油	重油				燃料油計
						A	B	C	計	
北海道	2,361,301	1,345,768	550,343	2,904,296	2,355,724	1,363,994	-	2,058,703	3,422,697	12,940,129
東北小計	4,367,291	2,995	238,290	3,012,464	3,028,519	1,739,810	-	2,238,421	3,978,231	14,627,790
茨城	1,707,568	2,370,162	70,687	499,652	1,011,302	664,103	-	3,674,763	4,338,866	9,998,237
栃木	1,147,617	-	3,338	365,358	666,409	335,265	-	27,849	363,114	2,545,836
群馬	1,193,235	-	2,760	393,176	622,134	356,704	-	8,635	365,339	2,576,644
埼玉	2,672,545	-	24,307	500,886	1,300,134	232,329	-	10,394	242,723	4,740,595
千葉	2,427,511	9,438,199	57,352	501,203	1,198,882	358,115	-	1,538,470	1,896,585	15,519,732
東京	6,927,028	1,338,969	1,517,873	3,223,940	3,945,239	2,210,837	-	2,005,601	4,216,438	21,169,487
神奈川	2,916,525	4,199,703	31,367	953,296	1,341,120	369,414	-	793,225	1,162,639	10,604,650
山梨	431,015	-	141	150,814	188,268	105,888	-	-	105,888	876,126
長野	1,121,903	-	2,077	675,836	581,094	291,957	-	200	292,157	2,673,067
新潟	1,257,693	576	26,496	645,355	835,912	329,771	-	271,416	601,187	3,367,219
静岡	1,722,729	-	33,551	409,380	1,043,736	664,182	11,646	518,790	1,194,618	4,404,014
関東小計	23,525,369	17,347,609	1,769,949	8,318,896	12,734,230	5,918,565	11,646	8,849,343	14,779,554	78,475,607
中部小計	7,644,275	2,943,644	438,411	2,072,560	4,110,883	2,220,837	-	1,713,910	3,934,747	21,144,520
近畿小計	8,372,817	391,683	481,064	1,985,420	4,094,049	1,692,374	-	1,423,328	3,115,702	18,440,735
中国小計	3,674,794	8,451,983	189,409	1,095,804	2,378,160	1,842,087	-	2,659,201	4,501,288	20,291,438
四国小計	1,745,711	2,288,101	115,987	502,132	1,277,722	776,115	-	882,573	1,658,688	7,588,341
九州小計	5,899,432	1,157,224	879,526	1,409,034	3,537,838	2,336,337	-	1,133,862	3,470,199	16,353,253
沖縄	623,976	-	586,563	64,904	254,523	276,550	-	416,854	693,404	2,223,370
合計	58,214,966	33,929,007	5,249,542	21,365,510	33,771,648	18,166,669	11,646	21,376,195	39,554,510	192,085,183

(石油連盟・2008年度統計)

上記の事から、事業化を想定した場合のターゲット市場は、まずは規模から灯油市場が有望とされ、また地域で言えば、東京を中心とした関東圏と北海道の2つに絞り込むことが出来ると考えられる。

2) 事業化に伴う障害

市場として大きい灯油を念頭にバイオ灯油で市場参入する際、障害となる項目について検討を行った。

・ 許認可関係

バイオ灯油の製造に関しては、消防法等の安全性に関する許認可が必要であるが、その他の届出は現在のところ必要がない。しかし石油由来の灯油とバイオ灯油をある一定の比率で混合して販売・使用する場合、その混合行為は石油精製品の製造行為に当たるので、許認可が必要となる。

・ 品質規格

バイオケロシンについて、バイオディーゼルの様なJIS規格は存在しない。よって既存の灯油規格を満たしていれば販売が可能と言える。特に混合して使用する場合、混合する事で灯油の品質規格にどのような影響を与えるのかを確認しておく必要がある。

バイオ灯油を通常の灯油と混合して使用する方法は、まだ新しいので安全性面での担保をどのように行うかが課題も出てくる。

3) 安全性

灯油・バイオ灯油の分野は、まだバイオディーゼルの様に法的に整理されていない分野であるので一見参入は容易に見えるが、その利用は私たちの生活に密着しており、安全性面では特に車両用燃料よりも厳しい見方をする必要があると考えられる。

・ 燃焼時の安全性

燃焼時の安全性については、実際に燃焼テストを行わなければならないと考えられる。使用状態を想定した幾つかのケースを設け、着火時、燃焼中、消火時における煙の出方、臭気、燃焼度合いをテストする必要がある。

- ・ 保存時の安全性

保存時における安全性は、主に製品の計時変化と機器および保存容器への影響確認である。特に燃焼機器の内部で長期保存されれば場合にどうなるのか？また太陽光による計時変化はどうなるのか？長期保存の場合の吸水性はどこまで進むのか等を検証する必要がある。

- ・ 人体への影響

バイオ燃料は一般的に毒性が無く人体に優しいとされているが、バイオ灯油の様に季節限定でまた家庭内、子供やお年寄りまで触れる可能性のある燃料は、人体の影響に対するMSDSの作成が必須である。LD50や皮膚刺激性等の確認テストは行っておく必要があると考えられる。

4) 事業化に向けて

バイオ灯油として事業化を検討する場合、混合する灯油の入手と混合する施設を確保する必要がある。その為各分野での協力企業が必要となってくる。

- 石油卸、販売（灯油）
- 化学製品製造（混合施設）
- 暖房機製造（製品テスト・品質確認）

これらの分野の企業の協力なしには、流通も含めて混合灯油の商品化は難しい。しかしこの調査を進める過程で幾つかの企業に接触をした結果、既に下記の分野の企業が興味を示しており、今後の事業化に向けた積極的な検討を行う上で非常に重要な存在となる。

- ◇ 北海道： 産業廃棄物処理企業（1社）
- ◇ 東京： 石油精製・販売企業（1社）
- ◇ 神奈川： 石油卸・販売企業（1社）

今後、上記の企業と提携の方向性を模索しながら、事業化の方向性を引き続き検討していくこととした。

