

平成２５年度戦略的基盤技術高度化支援事業
「未利用バイオマスからのＤ-乳酸の高効率生産技術の開発と樹脂製造への展開」

研究開発成果等報告書

平成２６年３月

委託者 近畿経済産業局

委託先 特定非営利活動法人

近畿バイオインダストリー振興会議

目 次

第 1 章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制 (研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	3
1-3 成果概要	5
1-4 当該研究開発の連絡窓口	6
第 2 章 本論	7
2-1 アミラーゼ活性強化株の育種	7
2-2 未利用バイオマスからの効率的 D-乳酸発酵プロセスの開発	9
2-3 発酵液からのオリゴマー化最適条件の検索	20
2-4 固相重合によるポリ乳酸の合成	22
2-5 分岐状ポリ D-乳酸の合成	22
2-6 D-乳酸オリゴマーおよび分岐状ポリ D-乳酸製造 (スケールアップ、評価試験)	25
第 3 章 全体総括	34

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

1-1-1 研究開発の背景

(1) 背景概要

本研究開発「未利用バイオマスからの D-乳酸の高効率生産技術の開発と樹脂製造への展開」は、中小企業のものづくり基盤技術の高度化に関する法律に基づく特定研究開発等の計画として平成23年6月に認定を受けた研究計画（認定番号 近畿1106046）に基づいており、特定ものづくり基盤技術の種類（十九）発酵技術に係る技術と（十四）高機能化学合成に係る技術に該当する技術開発である。乳酸プラスチックの分野においては、川下製造業者から環境対応、高付加価値化、低コスト化への要請が高まっている。

- ① 環境対応：地球環境問題が深刻化すると共に、川下製造業者等からは環境対応への要請が年々高まってきている。特にプラスチック材料に関しては、化石資源の枯渇や地球温暖化の防止の観点からカーボンニュートラルである植物由来という新しい付加価値へのニーズが高い。特に自動車業界では、燃費向上のための軽量化対策としてプラスチック使用量を増やしている（自動車1台当りの材料構成比 8.2%、約 110kg）うえに、自動車リサイクル法で定められたリサイクル率を 2015 年以降には現行の 80%から 95%へ引き上げることから、自動車用プラスチック材料の環境対応が急務であり、植物由来樹脂への期待は大きい。
- ② 高付加価値化：国内におけるプラスチック生産量は 1995 年以降、年産 1400 万トンで殆ど成長していない。一方、日本を除くアジア諸国での生産は成長著しく、2004 年で約 6500 万トンに上り、北米を上回るトップシェア（29.0%）である。また、自動車、家電などの生産拠点の海外移転に伴う海外からの部品調達の増加のため、国内生産量が増加する見込みはない。しかし、情報家電においてエンブラに絞った需要予測では 2010 年において 2006 年比で 39% の成長が見込まれている。国内プラスチック産業は高付加価値化の要請対応に商機がある。
- ③ 低コスト化： バイオマスプラスチックの一つであるポリ乳酸は現在、ネイチャーワークス社がほぼ世界市場を独占しており、樹脂価格は 200～300 円/kg である。これは汎用プラスチックの価格より高く（150～250 円/kg）、そのことが市場拡大につながらない一因とされる。また、一般的に用いられているポリ乳酸は L-乳酸であり、L-ポリ乳酸（PLLA）単独では汎用性プラスチックと比較して耐熱性、耐衝撃性に劣る。光学異性体であるポリ D-乳酸(PDLA)を混在すると、それらが対となって結晶格子に充填されたステレオコンプレックス結晶が生成することが知られている。ポリ乳酸単独結晶の融点は 180℃であるが、ステレオコンプレックスの融点は 230℃まで上昇するため、耐熱性に優れたバイオマスプラスチックとしての実用化が期待される。現在、D-乳酸は市場にはほとんど出回っておらず、非常に高価である。試薬としてリチウム D-乳酸塩が 55,700 円/g（シグマアルドリッチ）で市販され、武蔵野化学は D-ラクチド(D-乳酸の 2 量体)を 8000～9000 円/kg で販売している。しかし、ポリ D-乳酸を製造、販売している企業は存在しない。そこで、本研究開発ではバイオマスプラスチックの市場拡大を担うべく未利用バイオマスからの安価な D-乳酸発酵ならびにポリ D-乳酸および分岐状ポリ D-乳酸の製造技術を構築し、その実用化を目指す。

1-1-2 研究目的及び目標

(1) 研究目的

本研究開発は、上述のような川下製造業者からの要請に対して、安価な D-乳酸の発酵、発酵液からの直接オリゴマー重合および分岐状ポリ D-乳酸を開発し、ステレオコンプレックス乳酸の原料や植物由来樹脂（ポリ乳酸）の耐熱性、生産性を向上する添加剤を開発し、乳酸プラスチックの使用範囲を拡大することで、地球温暖化の防止と国内プラスチック産業の伸張に貢献することを目的としている。

(2) 「高度化指針」において定める高度化目標

本研究開発は、高度化指針において定めるところの以下を高度化目標としている。

環境対応に関する事項

ア. 未利用バイオマス等の高度利用に係る技術

イ. 発酵・精製工程等の効率化・高精度化に係る技術

(3) 高度化目標の概要

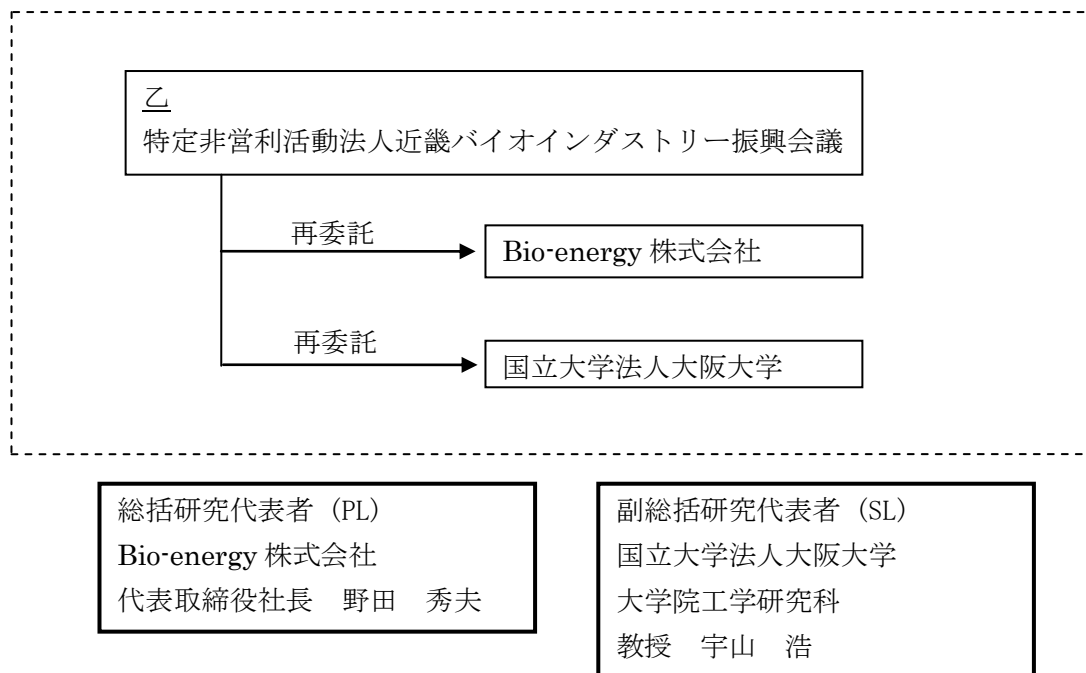
地球環境問題が深刻化すると共に、川下製造業者等からは環境対応への要請が年々高まってきている。特にプラスチック材料に関しては、化石資源の枯渇や地球温暖化の防止の観点からバイオマス由来あるいは植物由来という新しい付加価値へのニーズが高い。石油資源を原料とした従来のプラスチックは、廃棄時の焼却により二酸化炭素などの地球温暖化ガスを増加させるが、植物資源を原料とする植物由来樹脂は、廃棄時に二酸化炭素を排出しても、植物が成長する過程で二酸化炭素を吸収するカーボンニュートラルであるため、地球温暖化ガスの増加を抑制する。植物由来樹脂のなかでもポリ乳酸（PLA）は既に量産されており、力学物性等も既存の樹脂に近い性質を示すために石油系樹脂の一部に取って代わるとして期待されている。また、一般的に用いられているポリ乳酸は L-乳酸であり、L-ポリ乳酸（PLLA）単独では汎用性プラスチックと比較して耐熱性、耐衝撃性に劣る。光学異性体であるポリ D-乳酸(PDLA)を混在すると、それらが対となって結晶格子に充填されたステレオコンプレックス結晶が生成することが知られている。ポリ乳酸単独結晶の融点は 180℃であるが、ステレオコンプレックスの融点は 230℃まで上昇するため、耐熱性の高い生分解性及び生体内吸収性高分子材料としての実用化が期待される。しかし、D-乳酸は市場には殆ど出回っておらず、また非常に高価である。そこで、本研究開発では未利用バイオマスからの安価な D-乳酸発酵ならびにポリ D-乳酸製造を行う。

1－2 研究体制

(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)

1－2－1 研究組織及び管理体制

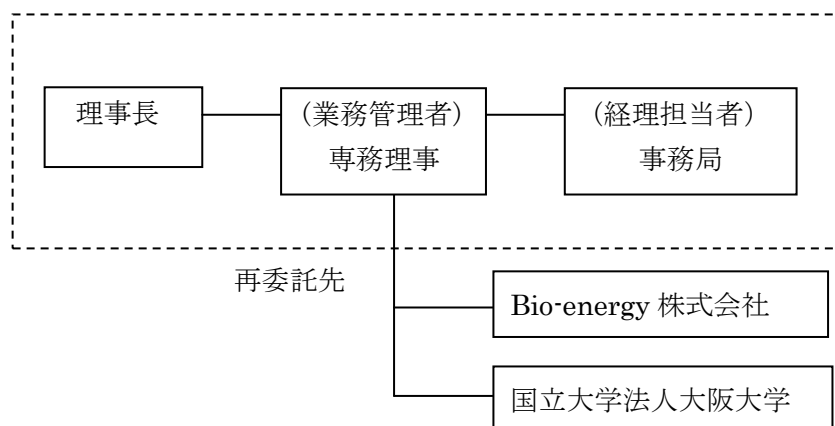
(1) 研究組織 (全体)



(2) 管理体制

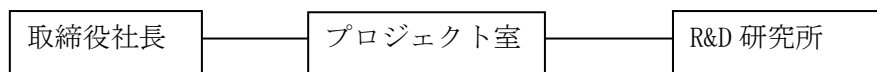
①事業管理機関

[特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議]

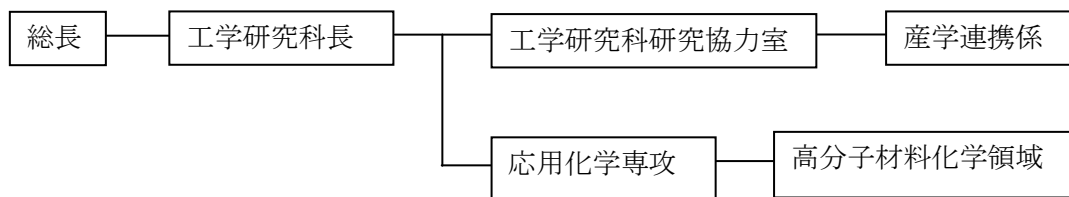


②（再委託先）

Bio-energy 株式会社



国立大学法人大阪大学



1-2-2 研究者氏名

Bio-energy 株式会社

氏 名	所属・役職
濱 真司	R&D研究所 主任研究員
吉田 あゆみ	R&D研究所 研究員
木原 真希	R&D研究所 研究員
竹中 沙耶香	R&D研究所 研究員
水野 志乃	R&D研究所 研究員
小野寺 かおる	R&D研究所 研究員

国立大学法人 大阪大学

氏 名	所属・役職
宇山 浩	大学院工学研究科 教授
辻本 敬	大学院工学研究科 助教

1-2-3 協力者（アドバイザー）

氏 名	所属・役職
寺田 貴彦	バイオベース株式会社 代表取締役社長
三好 孝則	帝人株式会社 融合研究所 第一研究室テーマリーダー
松本 圭司	株式会社カネカ GP事業開発プロジェクト 将来技術グループリーダー

1-3 成果概要

本研究開発の成果は以下の通りである。

①アミラーゼ活性強化株の育種

Streptococcus bovis 148 に由来する α -amylase (SBA) を導入するためのプラスミドを用いて *Lactobacillus plantarum* のアミラーゼ分泌活性を強化した。SBA のみを糖化酵素として用いた場合、生デンプンを発酵基質とした 48 h 段階での乳酸生産速度は 1.63 g/L/h に達した。

②未利用バイオマスからの効率的 D-乳酸発酵プロセスの開発

工業原料米に応用できる安価な D-乳酸発酵プロセスとして、乳酸菌の生育に要する栄養素を全く添加せず、残存グルコース濃度の低い乳酸発酵液を得られる方法を見出した（特願 2013-229812）。さらに、全容量 30 L までの発酵装置を用いて pH を制御する乳酸発酵プロセスを最適化し、発酵収率 90%で D-乳酸光学純度 99.5~99.8%に達する D-乳酸生産技術を確立した。D-乳酸モノマーのトータル製造コストを試算したところ、年産 10,000 トン規模での固定費、変動費、廃棄物処理費を含めた D-乳酸製造コストが 225 円/kg と見積もられた。

③発酵液からのオリゴマー化最適条件の検索

試薬乳酸を用いるモデル重合系において触媒の種類、触媒量、温度など反応条件の探索を行い、硫酸とイオン液体の触媒としての有用性を見出した。モデル発酵液として酵母エキスをを用いた乳酸発酵液からのオリゴマー化最適条件を検討したところ、重合物の着色と収率が酵母エキス濃度に依存することから、発酵液含有成分による重合への強い阻害作用を示唆する知見を得た。

④固相重合によるポリ乳酸の合成

高分子量ポリ D-乳酸は乳酸オリゴマーの固相重合により製造することが可能であり、既報の固相重合技術を取り入れることにより、実用レベルの高分子量ポリ D-乳酸を製造できる目途を立てた。ポリ乳酸の光学純度が一定より高ければこの技術は適用可能であり、乳酸発酵に関する研究でモノマーの光学純度について目標が達成されたことから、これらの技術を活用することで、乳酸オリゴマーの高分子量化が可能であると考えられた。

⑤分岐状ポリ D-乳酸の合成

ヒマシ油に含まれる水酸基を開始点として利用し、乳酸及びラクチドの重合で分岐状ポリ乳酸を合成したところ、スズ系触媒を用いることで定量的に反応でき、モノマーとヒマシ油の混合比で分子量を制御できた。また、D-乳酸を分岐鎖とする分岐状ポリ乳酸を合成し、L 体ポリ乳酸への添加効果を検討することで、分岐状ポリ D-乳酸がポリ乳酸の結晶核剤として作用することを示した。分岐状ポリ乳酸の末端水酸基の修飾による機能化では、トリメリット酸修飾ポリマーを 5%添加した場合にポリ乳酸の変形の抑制が見られ、耐熱性が向上することを明らかにした。

⑥D-乳酸オリゴマーおよび分岐状ポリ D-乳酸製造（スケールアップ、評価試験）

D-乳酸発酵液（実液）から精製した D-乳酸モノマーの品質を評価し、該 D-乳酸モノマー及び粗精製発酵液の溶融・溶液重合で D-乳酸オリゴマーを合成・回収した。発酵液から精製した D-乳酸モノマーが濃度 90%以上、光学純度 99.7%の高純度品であることを示し、粗精製発酵液の溶融重合では、段階的に減圧しながら重合温度を徐々に 120℃まで上昇させることで、分子量 1,800~4,500 の D-乳酸オリゴマーが得られることを明らかにした。

1－4 当該研究開発の連絡窓口

(事業管理者)

特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議

理事・事務局長 魚谷信夫

〒550-0004

大阪府大阪市西区靱本町1丁目7番8号

ビーイングビル7階

TEL：06-6459-6795 FAX：06-6447-7011

(総括研究代表者（P L）)

Bio-energy 株式会社

代表取締役社長 野田秀夫

〒660-0053

兵庫県尼崎市南七松町2丁目9番7号

TEL：06-6418-0810 FAX：06-6419-8915

第2章 本論

2-1 アミラーゼ活性強化株の育種 (Bio-energy 株式会社)

Streptococcus bovis 148 に由来する α -amylase (SBA) は、生デンプンの分解能力が高く、*Lactobacillus plantarum* など他の乳酸菌を宿主とした場合でも活性発現が可能な有用性の高いアミラーゼである。本研究では、SBA を導入するためのプラスミド pCUS-SBA を用いて *L. plantarum* *ldhL1::SBA* の分泌アミラーゼ活性を 0.1 U/ml まで増加できることを確認した (表 2-1-1)。

表 2-1-1 SBA 分泌型プラスミドを導入した D-乳酸生産菌のアミラーゼ活性

実験手順		
1. SYP培地に菌液を2回植え継ぐ SYP培地 (starch 1%, yeast extract 0.5%, pepton 0.5%) にEmを終濃度5 μ g/mlとなるように添加した液体培地に菌株を植菌後、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養		
2. 菌液1-2 ml を13,000 rpm, 1min 遠心し、上清を回収		
3. 基質溶液100 μ l, 酵素溶液100 μ lをエッペンに入れて、37 $^{\circ}$ Cで5分プレヒート		
4. 測定試料を20 μ l 加え、反応開始		
5. 37 $^{\circ}$ Cで3時間の反応を行い、反応停止液を400 μ l 加え、よく混ぜる		
6. 620 μ l のD.W.を添加して(2倍希釈)、1 mlセルにてOD ₄₀₀ の条件で吸光度を測定		

菌株	測定値(吸光度)	α -アミラーゼ活性 [U / ml]
<i>ldhL1::SBA</i>	0.077	0.0276
<i>ldhL1::SBA</i> / pCUS-SBA No.5	0.323	0.1156
<i>ldhL1::SBA</i> / pCUS-SBA No.24	0.277	0.0992
<i>ldhL1::SBA</i> / pCUS-SBA No.25	0.279	0.0999

2L ジャーファメンターで仕込み濃度 10%の生デンプンを発酵させた結果を図 2-1-1 に示す。発酵培地には MRS 培地 (糖を含まない) を用いて、pH を 5.5 (NaOH による中和)、温度を 37 $^{\circ}$ Cで制御し、試薬のアミラーゼなどを全く添加せず発酵させた。図 2-1-1 の結果から、pCUS-SBA を導入してアミラーゼ活性を強化した乳酸菌は、対照株 (*ldhL1::SBA*) よりも発酵速度が増加することがわかった。

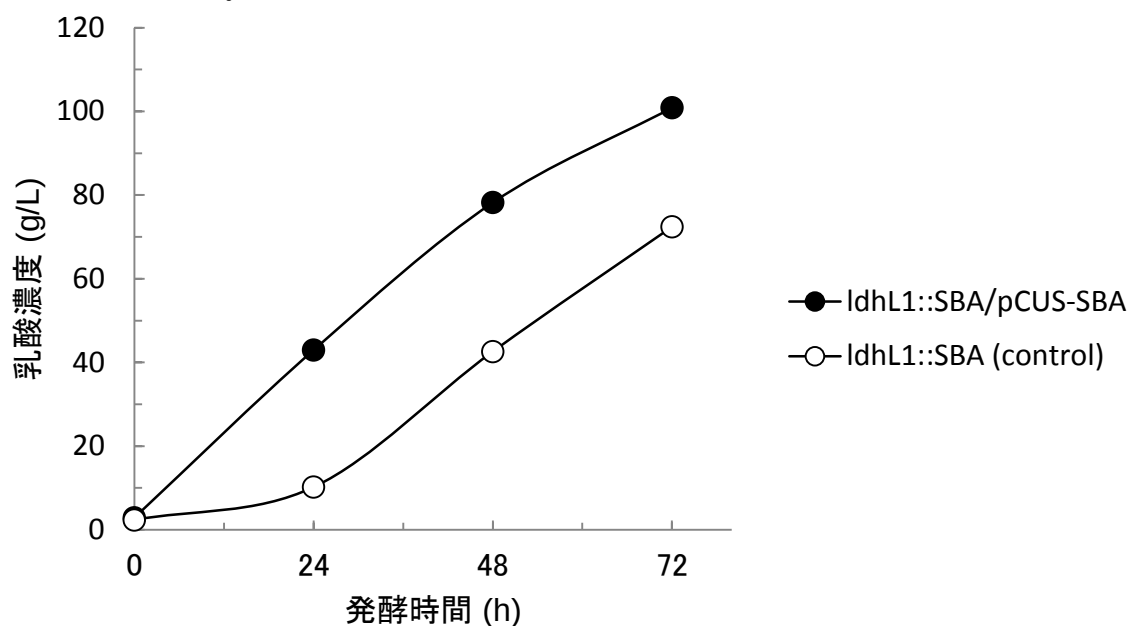


図 2-1-1 SBA 分泌型プラスミドを導入した D-乳酸生産菌による生デンプンの乳酸発酵

乳酸発酵は 72 h でほぼ終了しており、乳酸濃度が直線的に増加している 48 h 段階での発酵液 1 L あたりの乳酸生産速度は 1.63 g/h であるため、アミラーゼ等の酵素を別途添加することなく、目標の乳酸生産速度 1.5 g/L/h を達成することができた。

次に、菌体が生産するアミラーゼがバイオマスの乳酸発酵に及ぼす影響を確認するため、玄米を用いた乳酸発酵を行った。図 2-1-2 に *L. plantarum* の Δ ldhL1 株と ldhL1::SBA 株を用いた発酵条件と結果を示す。

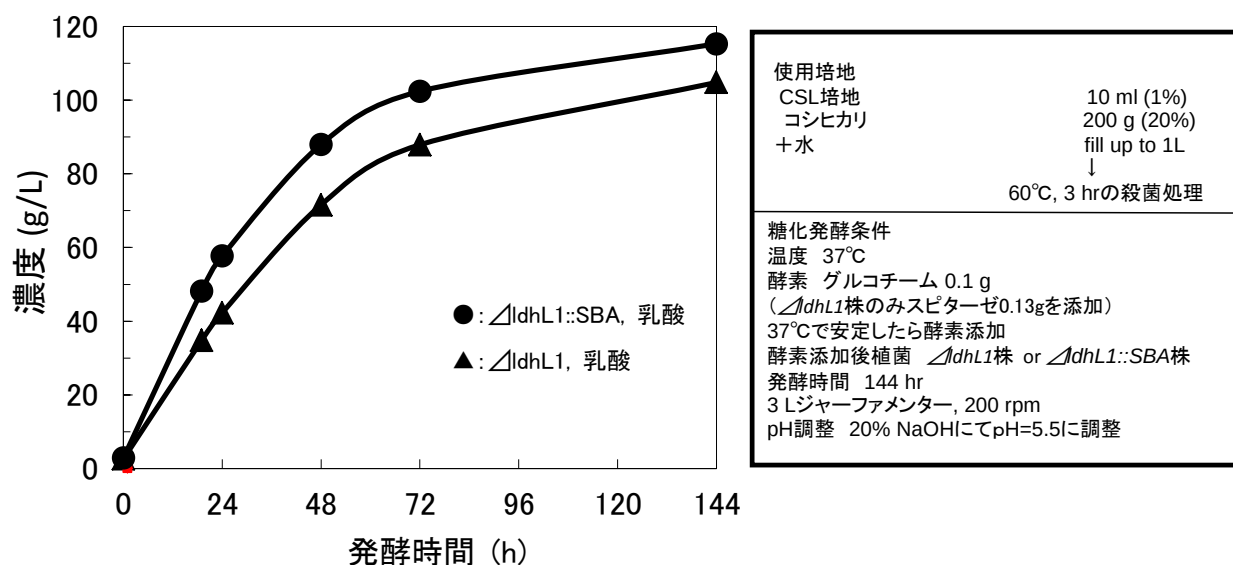


図 2-1-2 アミラーゼ分泌 D-乳酸生産菌を用いた玄米の乳酸発酵

Δ ldhL1 株を用いた場合、市販酵素剤としてスピターゼ (α -アミラーゼ) とグルコチーム (グルコアミラーゼ) の両方を添加しており、72 h で乳酸濃度 87.9g/L に達したが、残糖の蓄積が顕著であった。一方、ldhL1::SBA 株を用いた場合、スピターゼを添加していないにも関わらず ldhL1 株よりも高い発酵速度を示し、残糖濃度も低く抑えることができた。したがって、市販酵素剤の α -アミラーゼを添加せずとも、菌体が分泌生産した SBA を利用することによってバイオマスからの乳酸発酵を達成できることがわかった。

その他の研究として、SBA の触媒作用領域に *L. amylovorus* 由来 α -amylase のデンプン結合領域を融合させたキメラ酵素 (SL-1) を分泌する染色体組み込み型プラスミドを作製し、*L. plantarum* の染色体へ組み込んだ。しかしながら、SL-1 はタンパク質重量あたりの活性が SBA より 1.5-2 倍高いことを確認できたものの、高分子量となる SL-1 の分泌生産量そのものが低く、D-乳酸生産菌として良好な発酵成績を得られなかった。また、*L. plantarum* で発現可能な酵素として *Clostridium thermoamylolyticus* 由来のグルコアミラーゼ遺伝子があり、この遺伝子配列を乳酸菌に最適化することで *L. plantarum* のグルコアミラーゼ活性の強化を試みたが、顕著な活性増加はみられなかった。

アミラーゼは食品加工用として工業的に広く利用されている酵素であり、基質であるデンプンが比較的容易に糖化できる原料であることを考慮すると、最終的な発酵システムの決定には発酵菌のアミラーゼ活性以外にも重要な要素が存在すると予想される。したがって、本項で開発した SBA 分泌型 D-乳酸生産菌 (*L. plantarum* ldhL1::SBA 株) を用いたうえで、次項の開発サブテーマでは酵素剤のコスト、乳酸収量、総発酵時間などを勘案しながら、安価な D-乳酸生産が可能となる条件を探索していくことにした。

2-2 未利用バイオマスからの効率的D-乳酸発酵プロセスの開発 (Bio-energy 株式会社)

・玄米からの D-乳酸発酵プロセスの開発

バイオマスである米からの D-乳酸発酵プロセス開発にあたって、開発当初の技術段階で原材料コストに影響を及ぼす因子を明らかにするため、単価変動と使用量変動に対する原材料コストの感度分析を行った (図 2-2-1)。

【前提条件】

原材料の内訳	原料	栄養源1	栄養源2	酵素1	酵素2	中和剤
品名	米	バーレックス	無機塩	スピターゼ	グルコナーム	NaOH(工業用)
単価(円/kg)	30	600		26350	9750	100
培養液あたりの使用量(g)	150	60		0.1	0.075	40

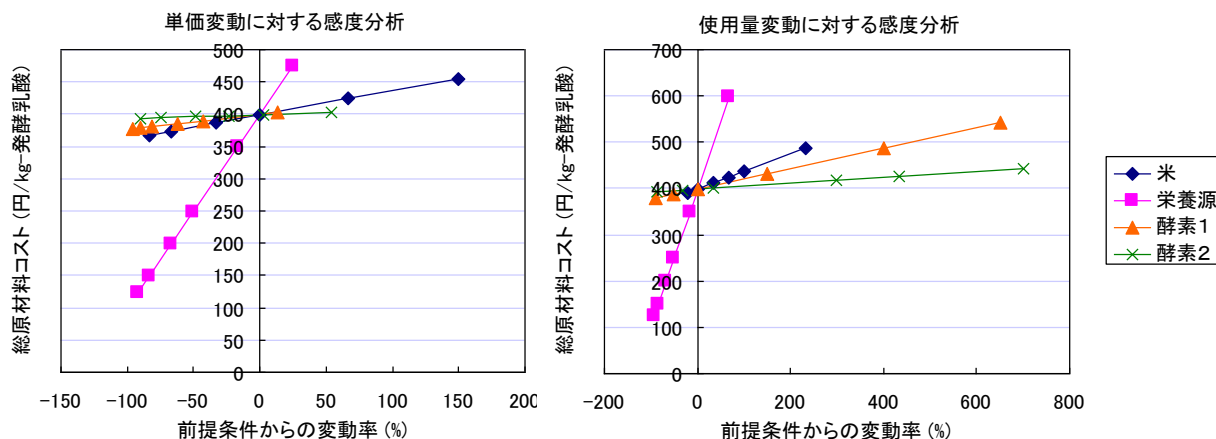


図 2-2-1 米の乳酸発酵における原材料コストの感度分析

原料となる炭素源、栄養源、酵素のうち単価・使用量変動に対して最も感度が高いのは栄養源であり、酵素の影響は比較的小さい。これは、米に含まれるデンプンを分解するのに要する酵素量が比較的小さいことに起因する。栄養源に比べるとバイオマスの影響も比較的小さく、原料の使用量を増加して乳酸収量を向上させる方がコスト低減に繋がると考えられた。

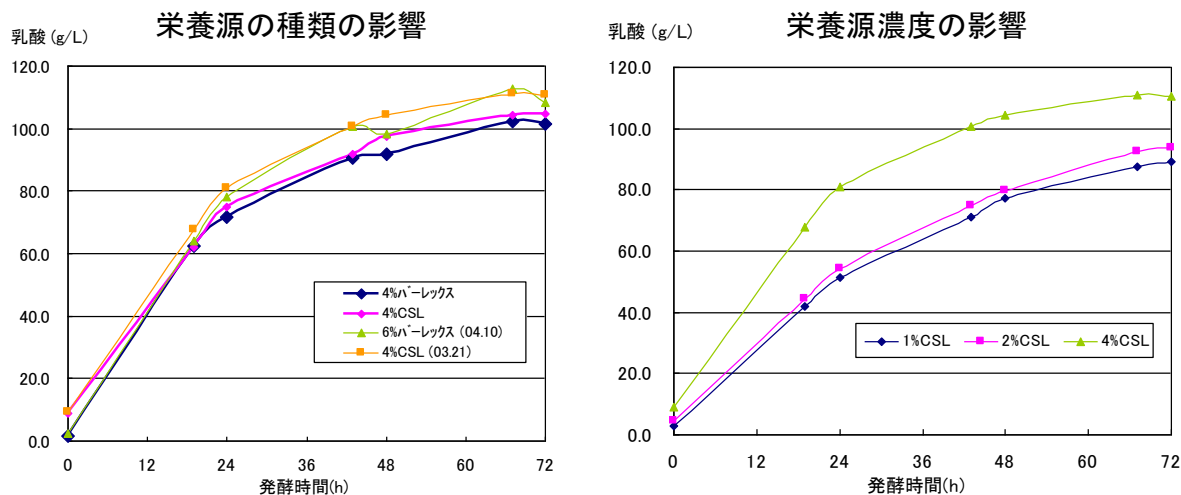


図 2-2-2 玄米の乳酸発酵における栄養源の種類と濃度の影響

そこで栄養源の種類と濃度が玄米の乳酸発酵に及ぼす影響を確認したところ、安価なコーンスティープリカー (CSL) でもバーレックス培地と同等の発酵成績を得られることがわかった (図 2-2-2 左)。また、CSL 濃度は乳酸発酵速度に影響を及ぼすが、低い CSL 濃度でも培養時間を延長すれば十分な乳酸収量を得られた (図 2-2-2 右)。これらの結果から、低い CSL 濃度の発酵において仕込み米濃度を増やすことで乳酸濃度も増加し、培養時間によっては高い対糖収率を得られるものと考えられた。仕込み米濃度を増加させる場合には、米に含まれる栄養素が培地中の栄養分を補うことも期待される。

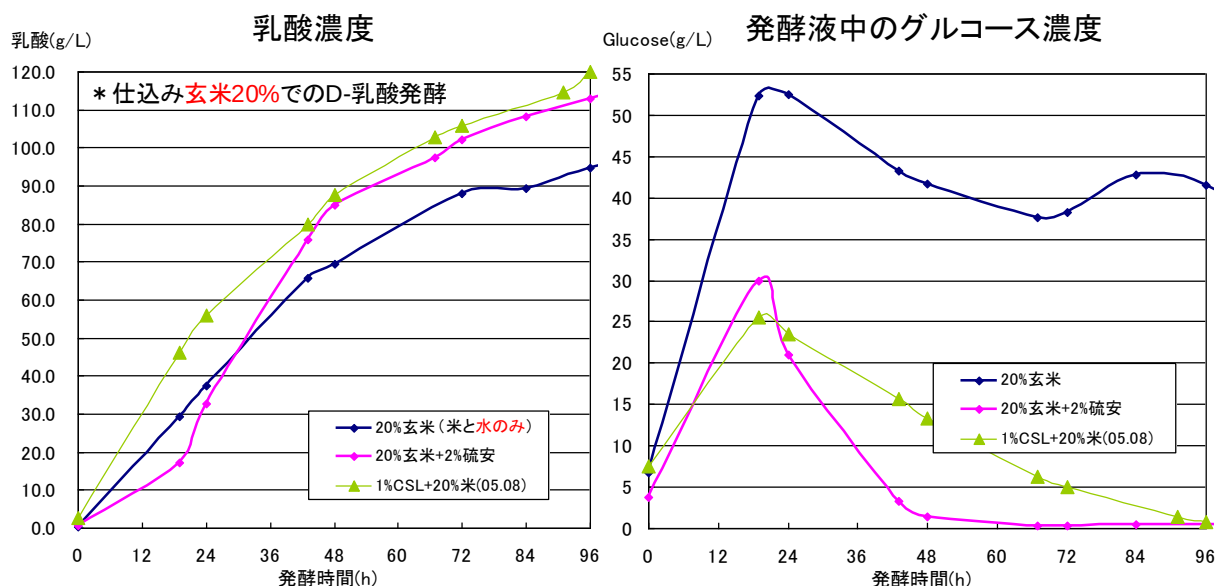


図 2-2-3 玄米 20%仕込み濃度での乳酸発酵

図 2-2-3 には、玄米の仕込み濃度を 20%に増加させて乳酸発酵を行った結果を示す（酵素剤は玄米の重量あたり同力価となるよう添加した）。発酵液に対して 1%の CSL を添加した場合でも、発酵 96 h での対糖収率は 90%に到達した。また CSL のような有機態窒素を添加せずとも、水と玄米のみを用いた乳酸発酵は可能であることもわかった。玄米に含まれる栄養素が菌体の生育に良い影響を及ぼしたものと考えられるが、CSL 添加時と比べて収率低下と残糖増加が懸念される。水と玄米に硫酸アンモニウム（硫安）を添加した場合に乳酸濃度の増加と残糖の低減がみられるが、これは発酵初期の pH 制御法に相違があったためであり、硫安の特別な発酵促進効果を意味するものではない。詳細は後述する。

安価な栄養源である CSL を少量使用し、バイオマスである米の仕込み濃度を上げることで、D-乳酸光学純度 98%以上で発酵収率は 90%以上を維持し、現段階の発酵に要する原材料コストは約 118 円/kg D-乳酸と見積もられた。一方で、実際の D-乳酸の生産規模を想定した上でトータルコストを試算し、発酵プロセスの詳細条件を最適化していく必要性が生じた。

・pH 制御法による D-乳酸発酵プロセスの改良

乳酸発酵において発酵液の pH 制御は極めて重要な要素である。一般的には、菌体の増殖・発酵性能を維持するため、図 2-2-4 の①のように発酵初期から pH を一定制御する。しかしながら、D-乳酸発酵プロセスの改良方法を鋭意検討した結果、pH 制御に関して興味深い現象を確認した。ここでは、図 2-2-4 の②に示すように発酵開始 17 h まで pH を全く制御せず、pH が 4 以下に減少する 17 h 以降に初めて pH を中和により一定制御することとした。

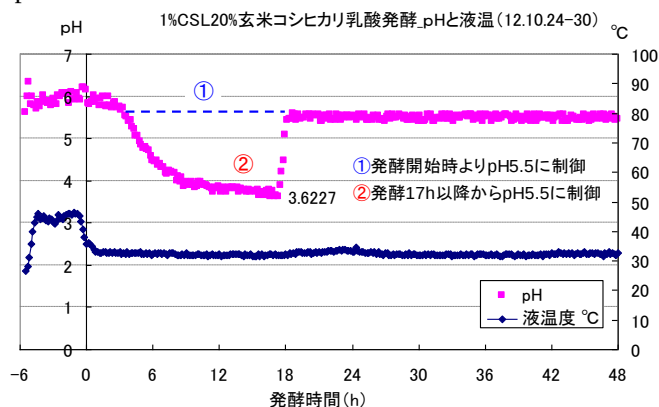


図 2-2-4 乳酸発酵における pH の経時変化

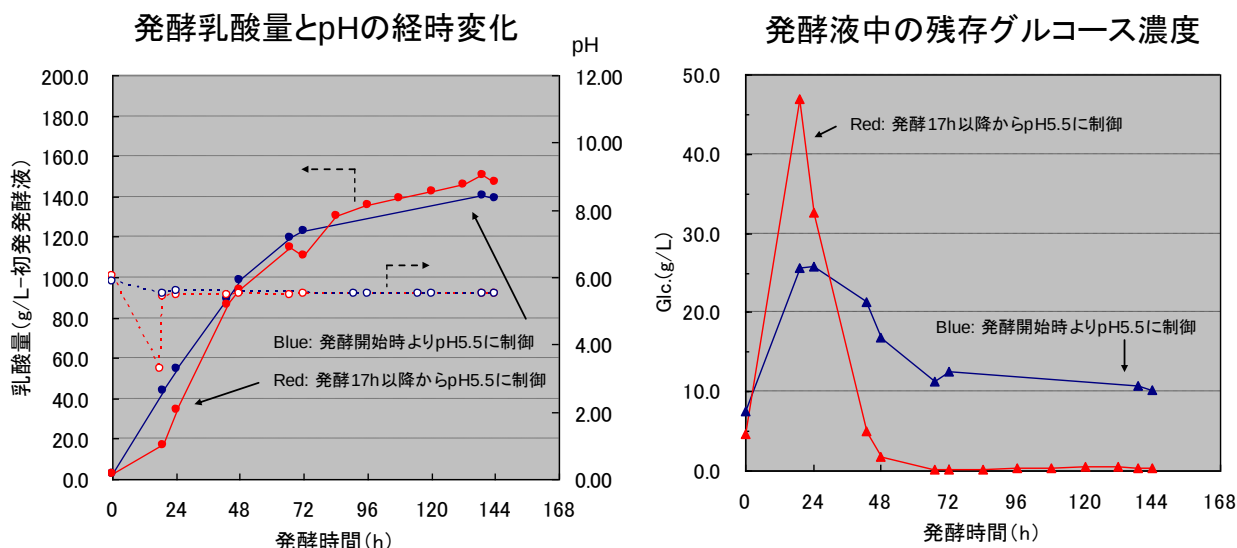


図 2-2-5 玄米の乳酸発酵（1%CSL）における乳酸収量と残存グルコースの経時変化

図 2-2-5 に示すように、玄米の乳酸発酵（1%CSL を含む）で発酵 17 h 以降から pH を 5.5 に制御した場合、菌体の増殖が抑えられるために初期の乳酸収量は低いに関わらず、発酵後期では初期から pH 制御をした場合と比べて高い乳酸収量に到達した。さらに興味深いことに、発酵液中に残存するグルコースの濃度に顕著な違いがみられた。通常、本条件のような低い CSL 濃度では菌体の糖消費が遅く発酵後期でもグルコースが残存する傾向にある。しかしながら、pH を発酵途中から制御した場合には、pH 制御を開始するまでは著量のグルコースが残存するものの、以降の糖消費速度が大きく、72 h 以降には 1.0 g/L 以下のグルコース濃度を維持した。グルコース濃度が低いに関わらず乳酸収量が増加しているのは、並行複発酵により酵素分解で生じたグルコースを菌体が速やかに乳酸へ変換しているためである。

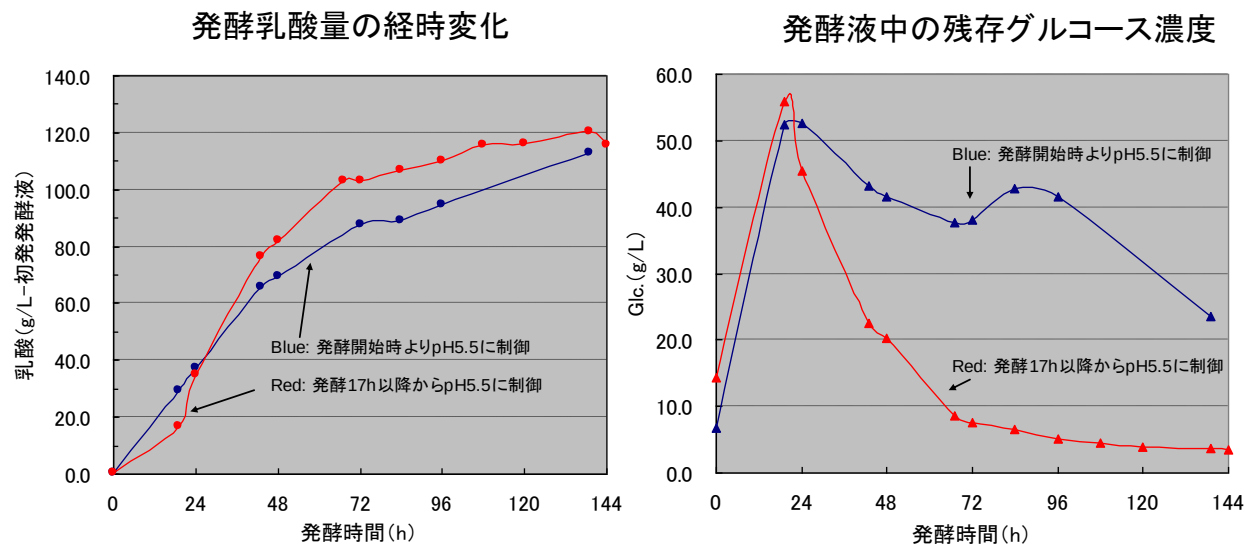


図 2-2-6 玄米の乳酸発酵（栄養素の添加なし）における乳酸収量と残存グルコースの経時変化

上記について、栄養素を添加しない水と玄米のみの発酵系でも同様の現象が生じるかを確認した結果を図 2-2-6 に示す。発酵初期から pH を制御した場合、CSL など栄養素を添加していないためグルコースの残存が著しいが、発酵 17 h 以降の pH 制御によってグルコースの残存を顕著に抑えられることがわかった。以上の結果から、発酵途中から pH 制御を開始する方が、乳酸収量の増加、残存グルコース抑制などに対して有利であることが示唆された。

水と玄米のみの発酵系において、発酵 17 h 以降の pH 制御値をさらに検討したところ、pH を 6.0 に維持した場合に 1.0 g/L 以下の極めて低い残存グルコース濃度を得ることができた。これにより、純度の高い乳酸発酵液をその後の重合工程に使用できる可能性が開かれた。

・ pH 制御法が D-乳酸発酵と糖消費速度に及ぼす影響

前頁において、乳酸発酵の pH 制御を発酵 17 h 以降から開始することで、乳酸生産量が増加すると共に残存糖の少ない乳酸発酵液が得られることを見出した。pH 制御開始時期が乳酸発酵に及ぼす影響を詳細に調べるため、玄米からの乳酸発酵において異なる時点（発酵開始から 0～15 h）で pH 制御を開始した発酵液 pH の経時変化を図 2-2-7 に示す。発酵開始 0 h（すなわち発酵開始時）で pH 制御を行った場合（対照）、発酵中の pH は 5.5 に維持されていた。一方、発酵開始から 5、8 および 15 h で中和による pH 制御を行った場合、発酵液の pH がそれぞれ 4.2、3.8、3.6 まで低下した後、中和開始以降は pH が 5.5 に維持されていた。

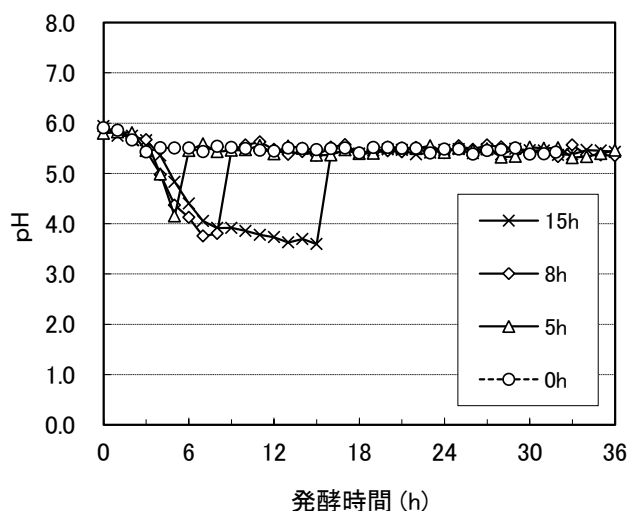


図 2-2-7 発酵液 pH の経時変化

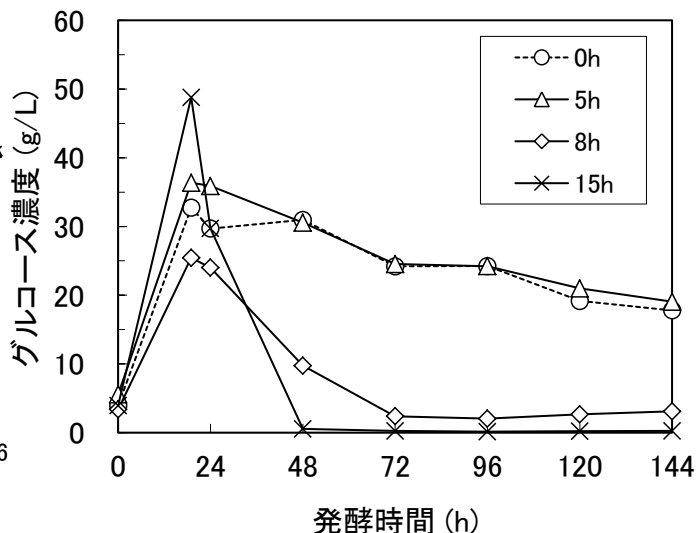


図 2-2-8 乳酸発酵液の残存グルコース濃度

発酵 144 h 後の乳酸濃度は、発酵途中（5～15 h）から pH 制御を開始した場合に 123.6～130 g/L と対照（114.9 g/L）よりも高い値を示した。図 2-2-8 には、異なる時点で pH 制御を開始した発酵液中のグルコース濃度の経時変化を示す。図から明らかなように、いずれも発酵初期に酵素糖化で生じたグルコースが高い濃度で存在した。発酵開始 0 h で pH 制御を行った場合（対照）および発酵開始 5 h に pH 制御を開始した場合には、グルコースの消費速度が小さく、発酵後期になっても高濃度のグルコースが残存した。発酵開始 8 および 15 h で pH 制御を開始した場合、発酵初期に生じたグルコースは pH 制御開始以降に速やかに消費され、発酵 72 h 以降には極めて低い残存グルコース濃度となった。

これらのことから、発酵により生じた乳酸によって発酵液の pH を減少させ、その後、中和を開始して乳酸発酵に適する pH（例えば 5.5～6.0）に設定することで、菌体の糖消費速度が向上し、乳酸収量も増加するものと考えられた。pH 制御を 5 h 後に開始した場合に残糖濃度が高くなった原因としては、発酵開始 5 h での菌体密度が低く、中和開始以降から増殖した菌体の性質が発酵結果に影響したものと思われる。

続いて、菌体の糖消費速度が有意に向上する pH 値の上限および該 pH で菌体を浸漬する所要時間を調べた。まず中和を伴う乳酸発酵（pH を 5.5 に制御）を行い、発酵開始（菌体添加）17 h 後に 6N 塩酸を添加して強制的に pH を 4.8 まで減少させた。攪拌を継続しながら、この pH 値に発酵液を一定時間（30 分から 3 時間）維持した（すなわち該 pH の発酵液に菌体を浸漬した）。その後、中和を再開して発酵液の pH を 5.5 に調整しながら 144 h まで発酵を継続した。この場合の生成乳酸およびグルコースの濃度の経時変化を図 2-2-9 に示す。いずれも発酵 144 h 後の残存グルコース濃度が低く、高い乳酸濃度を得ることができた。このように、発酵液の pH を低下

させる方法としては、発酵途中に pH 制御を停止するか、または酸を添加するなどして強制的に pH を低下させる方法のいずれを用いてもよいことがわかった。

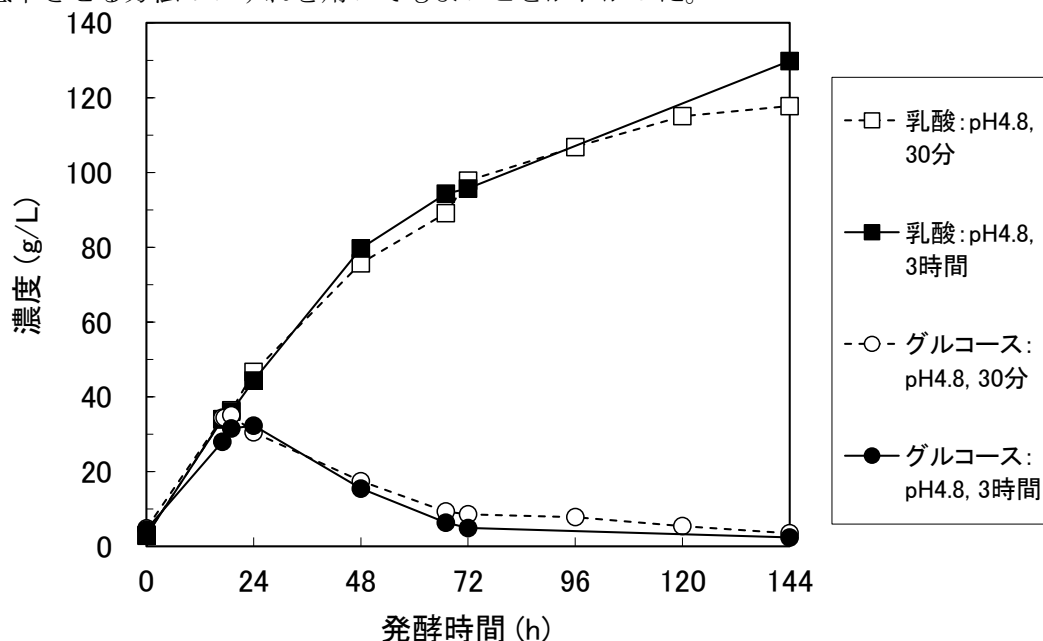


図 2-2-9 発酵途中に pH を短時間低下させた場合の乳酸発酵結果

pH の低下が菌体の糖消費速度に及ぼす影響を調べるため、中和しない場合および中和した場合で培養を 18 h 行い、糖濃度を再調整した後に発酵を開始してからの液培養中の生成乳酸およびグルコースの濃度の経時変化を図 2-2-10 に示す。培養時に中和を行わず pH を低下させた方がグルコースの消費速度が著しく速いことがわかった。

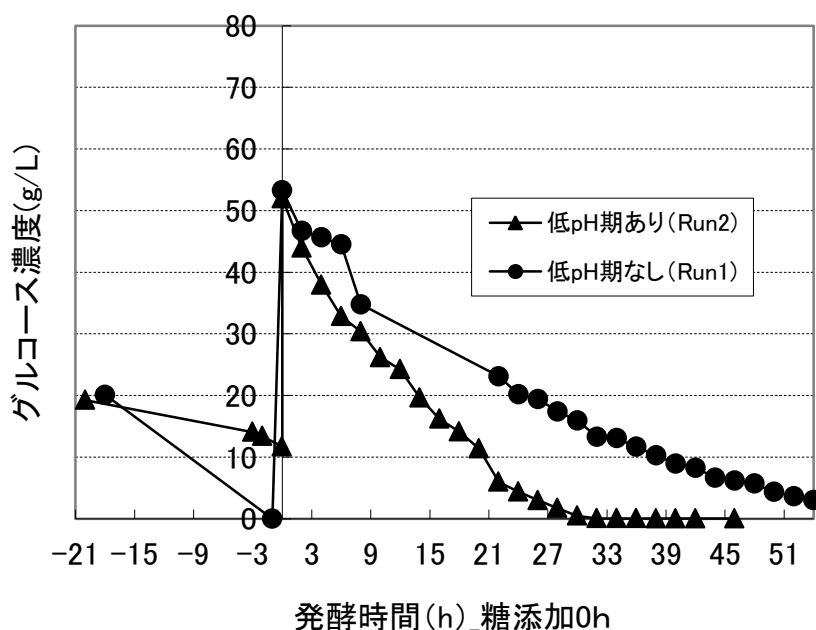


図 2-2-10 グルコース消費速度の比較

発酵液の pH を特別に制御して菌体の糖消費速度を改善し、乳酸収量と残存糖濃度の両方を改善できる上記のプロセスについては、平成 25 年度中に特許出願を行った（特願 2013-229812）。この方法によると、乳酸発酵過程において発酵液の pH を制御するという簡便なプロセスで、乳酸を効率的に生産することができる。さらに、発酵液中に残存する糖を減らすことができるので、乳酸精製工程が容易になり、また、精製乳酸を得る場合においても収率の向上が期待できる。

・D-乳酸光学純度の評価

発酵プロセスの検討で得られた様々なロットの発酵液に含まれる D-乳酸の光学純度を測定した。仕込み濃度 20%の玄米と 1%CSL を含む発酵液の結果を表 2-2-1 に示す。モル比率ではおよそ 98%、光学純度にして 95.4～97.3%の D-乳酸であることがわかった。

表 2-2-1 1%CSL と 20%玄米からの乳酸発酵液の D-乳酸光学純度

サンプル	乳酸 (光学性)	HPLC			
		測定値 (mM)	換算 (g/L)	比率	e.e.
1%CSL20%玄米0h～pH5.5 96h(120512)	L-	26	2.3	2.0%	
	D-	1267	114.1	98.0%	96.0%
1%CSL20%玄米0h～pH5.5 96h(120512) 80°Cx15min処理	L-	26	2.3	2.1%	
	D-	1210	109.0	97.9%	95.8%
1%CSL20%玄米アキタコマチ(130514回収) 17h-pH5.5 144h	L-	19	1.7	1.6%	
	D-	1182	106.5	98.4%	96.8%
1%CSL20%玄米コシヒカリ130409(130514回収) 17h-pH5.5 144h	L-	20	1.8	1.7%	
	D-	1179	106.2	98.3%	96.7%
1%CSL+20%玄米5h-pH5.5 144h(130311)	L-	18	1.6	1.6%	
	D-	1106	99.6	98.4%	96.8%
1%CSL+20%玄米8h-pH5.5 144h(130304)	L-	20	1.8	1.6%	
	D-	1232	111.0	98.4%	96.9%
1%CSL+20%玄米15h-pH5.5 144h(130220)	L-	20	1.8	1.7%	
	D-	1207	108.7	98.3%	96.7%
1%CSL+20%玄米0h-pH5.5 144h(120926)	L-	16	1.4	1.3%	
	D-	1177	106.0	98.7%	97.3%
1%CSL20%コシヒカリ 18h-pH5.5 (120827) 144h	L-	21	1.9	1.7%	
	D-	1239	111.6	98.3%	96.6%
1%CSL20%アキタコマチpH4.8x3h 144hx500	L-	23	2.1	1.7%	
	D-	1315	118.4	98.3%	96.6%
1%CSL20%アキタコマチpH4.5x3h 144hx500	L-	23	2.1	1.8%	
	D-	1270	114.4	98.2%	96.4%
1%CSL20%アキタコマチ(13.07.09) 168hx500	L-	25	2.3	1.8%	
	D-	1339	120.6	98.2%	96.3%
1%CSL20%アキタコマチ(13.07.11) 144hx500	L-	25	2.3	1.8%	
	D-	1370	123.4	98.2%	96.4%
5-3 1%CSL20%玄米アキタコマチ 17h-pH5.5(130716回収)80°Cx30分上清x500	L-	31	2.7	2.3%	
	D-	1317	118.6	97.7%	95.5%
5-7 1%CSL20%玄米アキタコマチ 17h-pH5.5(130716回収)0.45μ mろ液x500	L-	32	2.9	2.3%	
	D-	1373	123.7	97.7%	95.4%
7-2 1%CSL20%玄米アキタコマチ 17h-pH5.5(130514回収)80°Cx30分上清x500	L-	23	2.0	1.7%	
	D-	1285	115.7	98.3%	96.6%
7-6 1%CSL20%玄米アキタコマチ 17h-pH5.5(130514回収)0.45μ mろ液x500	L-	24	2.1	1.7%	
	D-	1379	124.2	98.3%	96.6%

続いて CSL を含まない発酵液の結果を表 2-2-2 に示す。

表 2-2-2 水と 20%玄米からの乳酸発酵液の D-乳酸光学純度

サンプル	乳酸 (光学性)	HPLC			
		測定値 (mM)	換算 (g/L)	比率	e.e.
水+20%玄米17h～pH6.0 144h(120806)0.45μ m透過 4°C保管	L-	0	0.0	0.0%	
	D-	1220	109.9	100.0%	100.0%
水+20%玄米17h～pH6.0 144h(120806)0.45μ m透過 4°C保管 80°Cx15min処理	L-	13	1.2	1.1%	
	D-	1193	107.5	98.9%	97.8%
水20%玄米アキタコマチ(130522回収) 17h-pH5.5 144h	L-	5	0.4	0.4%	
	D-	1161	104.6	99.6%	99.2%
水20%玄米コシヒカリ130409(130522回収) 17h-pH5.5 144h	L-	5	0.5	0.4%	
	D-	1165	104.9	99.6%	99.1%
水20%アキタコマチ 15h-pH6.0 (130522)エハホ80°Cx30分処理 前	L-	6	0.5	0.5%	
	D-	1137	102.4	99.5%	99.0%
水20%アキタコマチ 15h-pH6.0 (130522)エハホ80°Cx30分処理 後	L-	6	0.5	0.5%	
	D-	1146	103.2	99.5%	99.0%
6-0 水20%玄米アキタコマチ 15h-pH6.0(130522回収)90°Cx5分上清x500	L-	9	0.8	0.7%	
	D-	1145	103.1	99.3%	98.5%
6-4 水20%玄米アキタコマチ 15h-pH6.0(130522回収)0.45μ mろ液x500	L-	9	0.8	0.7%	
	D-	1203	108.4	99.3%	98.5%

発酵プロセスの検討により、低い CSL 濃度あるいは CSL 添加無しでも高収量の D-乳酸を得られるようになったが、予想通り CSL 添加無しの方が高い光学純度を得られることがわかった。この光学純度については、発酵液の保存期間中に大きな変化が生じないことを確認した（図 2-2-11）。CSL を含む場合のみ、37℃の保管で光学純度のわずかな低下がみられた。菌体が活動することにより若干のラセミ化が生じたのではないかと推察される。

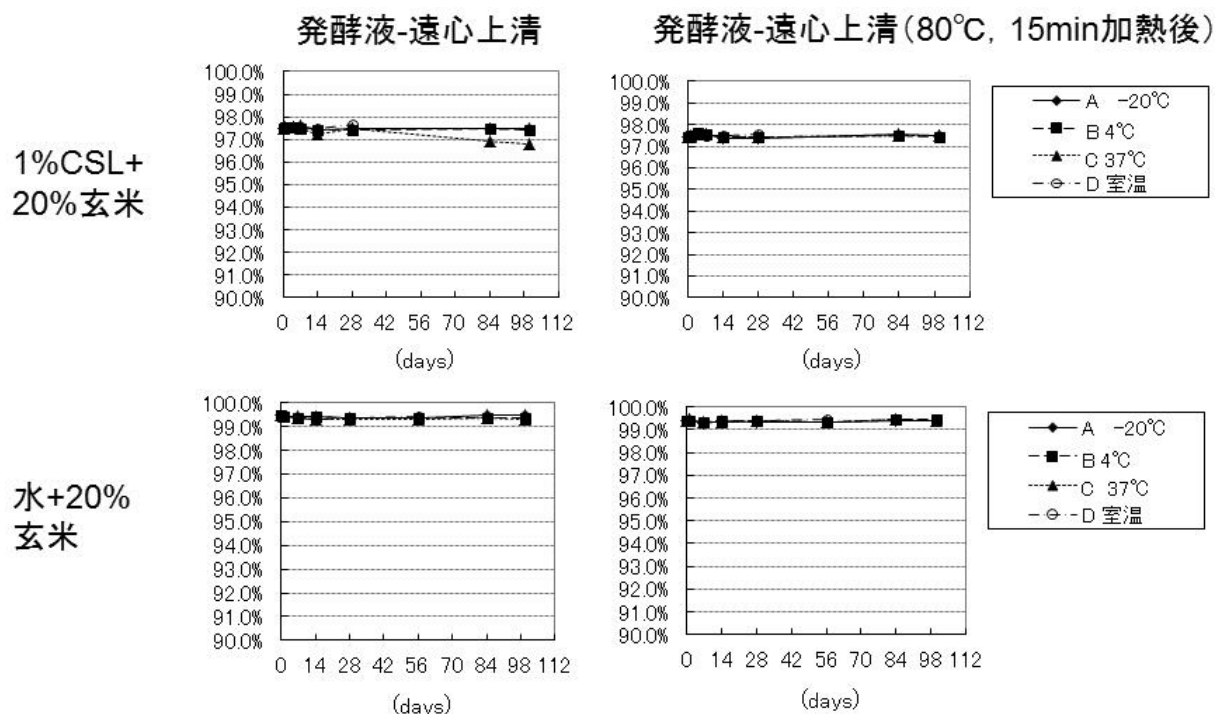


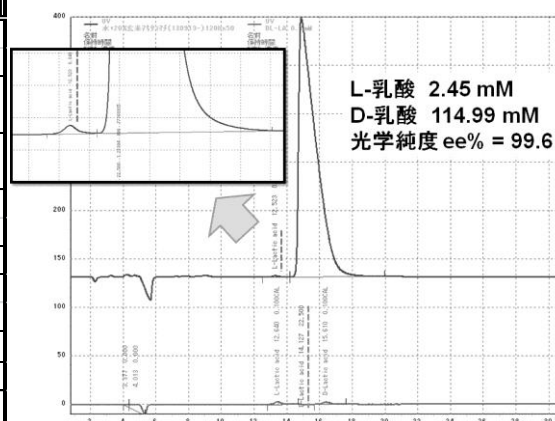
図 2-2-11 乳酸発酵液の保存中における D-乳酸光学純度の変化

CSL に含まれる L-乳酸は、D-乳酸発酵液の不純物となり得る。本研究では菌体の前培養に CSL を使用しており、表 2-2-2 の結果から前培養液に含まれる L-乳酸が発酵液中 D-乳酸の光学純度低下につながることを懸念されたため、前培養で得た種菌を洗浄してから水と玄米のみで乳酸発酵を行った。表 2-2-3 に示すように、玄米のみを原料（および栄養素）として発酵を行うことで、D-乳酸の光学純度は 99.5～99.8%に達し、当初の目標値を完全に満たすことができた。

表 2-2-3 水と 20%玄米からの乳酸発酵液（種菌洗浄済み）の D-乳酸光学純度

*参考図：光学分割された D, L-乳酸の HPLC クロマトグラム

ロット	発酵時間 [h]	光学純度		
		D-LA[g/L]	L-LA[g/L]	D-LA[%ee]
#1	120	103.5	0.2	99.6%
	144	103.2	0.3	99.5%
#2	144	106.8	0.3	99.5%
	144	108.7	0.2	99.7%
#4	96	98.7	0.1	99.8%
	144	105.3	0.2	99.7%
#5	96	111.5	0.2	99.6%
	144	116.8	0.3	99.5%
#7	96	112.6	0.3	99.5%
#8	96	102.7	0.3	99.5%
#9	96	116.0	0.20	99.7%
#10	96	94.3	0.09	99.8%
#11	96	120.30	0.16	99.7%



・D-乳酸発酵のスケールアップおよび発酵時間の短縮

ジャーファーマンター（1～2 L）で確立

した条件を基に、全容量 30 L の発酵装置を用いて D-乳酸発酵のスケールアップを検討した。図 2-2-12 に示すように、玄米のみを含む発酵液を 60℃で殺菌し、酵素と乳酸菌を加えて発酵開始後 15 h から pH を 6.0 に制御しながら発酵を行った。D-乳酸の光学純度を高めるため、バイオマスである玄米以外の栄養素を全く添加せずに発酵させた。

発酵液量	10L	
培地	水, pH 6.0	(CSLなし)
基質	20%破碎玄米	(アキコマ2Kg)
殺菌処理	60℃x3h	
発酵温度	37℃	
攪拌速度	150rpm	
pH	pH6.0(15h～)	
中和剤	50%NaOH水	
添加剤	酵素グルコサーム#2000 1.0g スピタゼ CP-40FG 1.3g	
菌株	<i>L.plantarum</i> ΔldhL::amyA	
接種量	初期培養液量に対して5%	



図 2-2-12 全容量 30 L 発酵槽における乳酸発酵条件

発酵液の乳酸濃度、グルコース濃度、各種パラメータの経時変化を図 2-2-13 に示す。

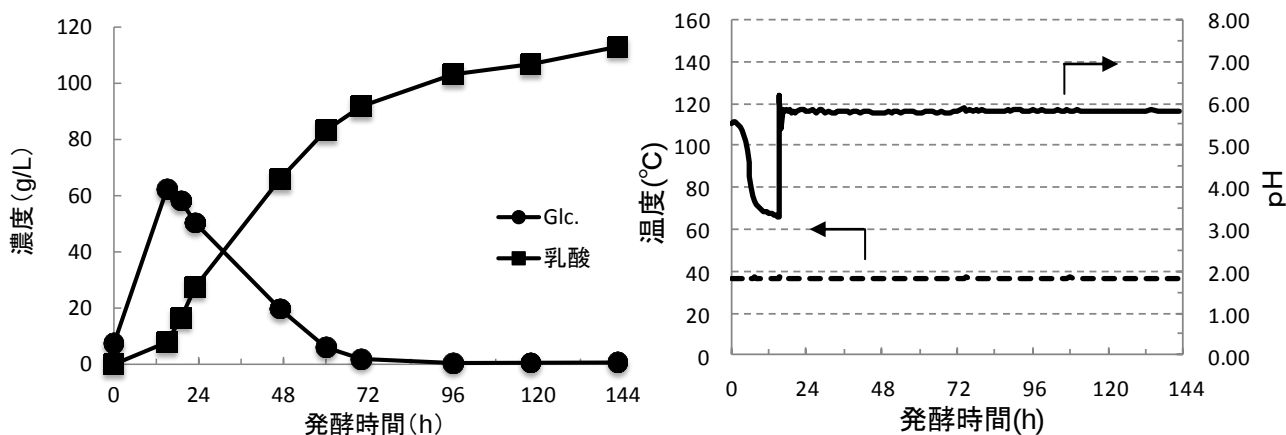


図 2-2-13 全容量 30 L 発酵槽における乳酸発酵の結果

(左図：発酵液の乳酸およびグルコース濃度、右図：発酵液の温度と pH)

pH を発酵途中から制御する方式を採用することで、30 L 発酵装置においても高い乳酸濃度と極めて低い残存グルコース濃度を得られることがわかった。発酵装置における乳酸およびグルコース濃度をジャーファーマンター（1, 2 L）における値と比較すると、いずれも同様の経時変化を示し、発酵スケールによらず高い再現性を示すことが確認できた（図 2-2-14）。また、発酵装置で得られた乳酸発酵液の D-乳酸光学純度は 99.7%であり、高純度の発酵液であることから、その後の重合実験用サンプルとして供試した。

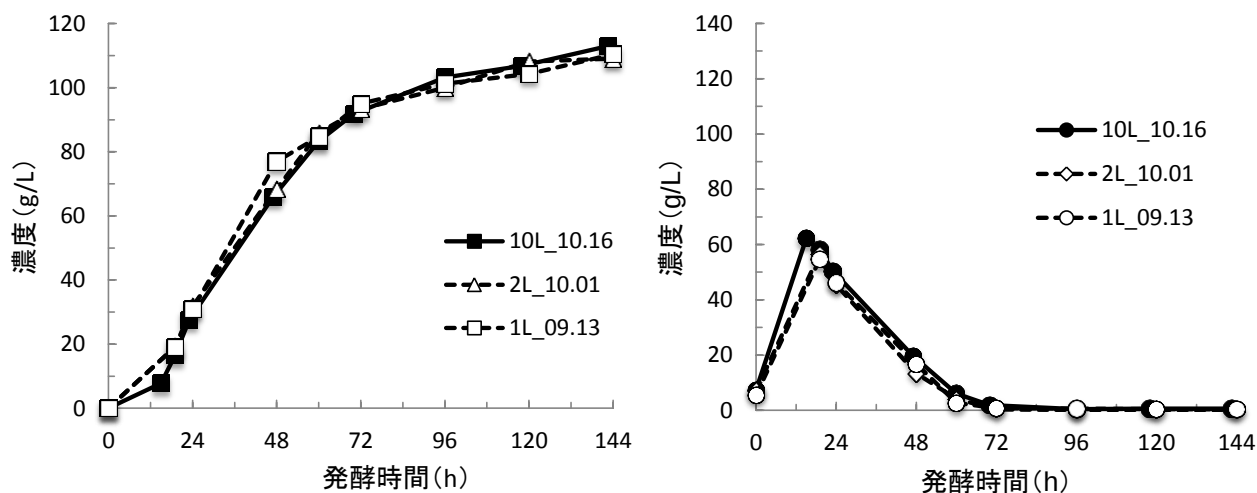


図 2-2-14 発酵スケールの比較 (左図：乳酸濃度、右図：グルコース濃度)

乳酸発酵工程における原材料コストの感度分析の結果から、酵素（ α -アミラーゼとグルコアミラーゼ）の添加量は少量であり、工業的には比較的安価に購入可能な酵素であるため、乳酸発酵コストに占める酵素コストは原料バイオマスや栄養素などのコストと比べて小さいことが予測されていた。また、酵素添加量が少なく発酵速度や乳酸収量が低い場合、酵素コストよりもむしろ発酵設備のイニシャルコストや運転コスト（ユーティリティ費用など）の方が全体の乳酸製造コストに及ぼす影響が大きい。さらに、D-乳酸のラセミ化のリスクを極力軽減するためにも、長い発酵時間は望ましくない。これらの事情を考慮し、玄米 1 kg あたり α -アミラーゼ 0.65 g（発酵液 1 L あたりの酵素力価 10.1 U 相当）とグルコアミラーゼ 0.5 g（発酵液 1 L あたりの酵素力価 75.3 U 相当）の添加量を基準条件（酵素 1 倍量）とし、この酵素添加量を 3～10 倍まで増加させて乳酸発酵時間の短縮を試みた。

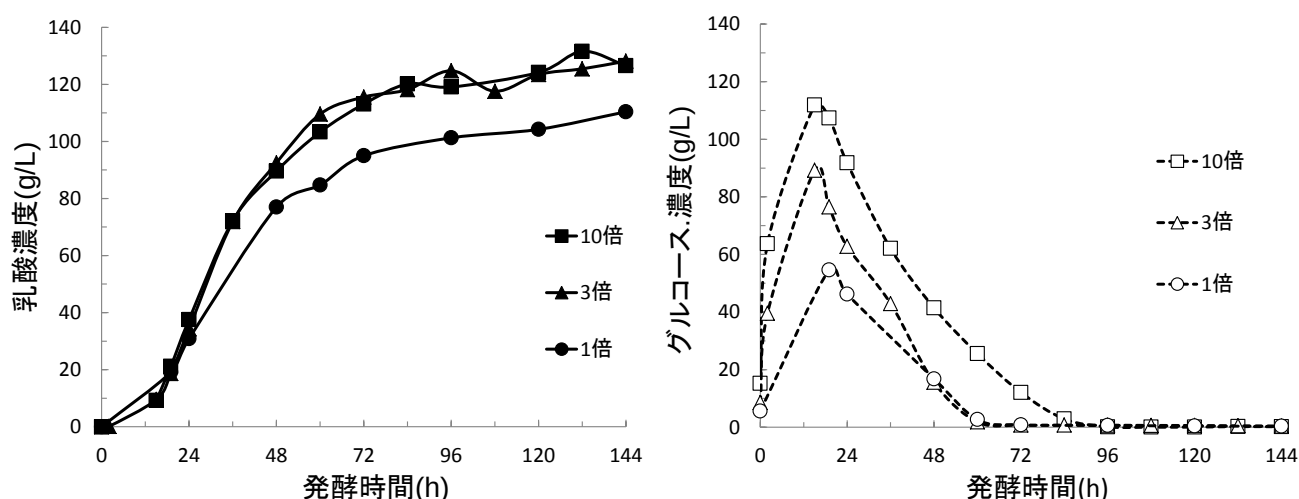


図 2-2-15 酵素量の増加による発酵時間の短縮（左図：乳酸濃度、右図：グルコース濃度）

図 2-2-15 に示すように、酵素を 1 倍量から 3 倍量まで増加させた場合、発酵速度が顕著に増加し、発酵 72～96 h で基準条件よりも高い乳酸濃度を得られることがわかった。発酵初期では酵素量が多い場合に発酵液中のグルコース濃度が著しく増加したが、このグルコースは発酵時間の経過と共に速やかに消費された。これは pH を意図的に低下させる発酵方法に特有の現象であり、酵素添加量が多い場合でも適用できることがわかった。すなわち、酵素添加量の増加により玄米の並行複発酵における糖化速度を改善し、さらに菌体の糖消費速度を改善する技術を適用することで、高濃度バイオマスから高い乳酸生産速度・量と極めて低い残存糖濃度の両方を達成できることを示した。酵素を 10 倍量まで増加させた場合は、さらなる発酵速度や乳酸収量の増加はみられなかったため、酵素 3 倍量の結果を以降の D-乳酸製造コストの試算に用いた。

固体状バイオマスから有用物質を製造する場合、製造後の残渣についても考慮する必要がある。玄米の乳酸発酵後の残渣を図 2-2-16 に示す。発酵条件にも左右されるが、投入バイオマス（玄米）重量に対する残渣（ストレーナー濾別）湿重量の割合はおよそ 0.66 g-wet/g-raw であった。このような残渣には、若干量の残糖のほか、ビタミン、ミネラル、繊維質なども含まれている。そのため、本開発技術の実用化においては、残渣を単なる廃棄物処理ではなく有価物としての利用を模索する必要がある。



図 2-2-16 発酵残渣（乾燥後）

・D-乳酸製造コストの評価

D-乳酸発酵プロセスの検討結果と既報のデータ（L-乳酸の参考値）に基づき、バイオマスから年産 2,000～50,000 トン規模で D-乳酸モノマーを製造する場合の固定費（表 2-2-4）、原材料やユーティリティなどの変動費、そして廃棄物処理費を含めたコストを算出した。

表 2-2-4 年産 2,000～50,000 トン規模での D-乳酸モノマー製造に関する固定費

変数	内容	単位	Case 1	Case 2	Case 3	備考
W	仕込量	t-wet/batch	36	178	887	玄米
D	稼働日数	日/年	330	330	330	
d	所要日数	日/batch	4	4	4	
Y_g	対糖収率	g-LA/g-gluc	0.90	0.90	0.90	並行複発酵(糖化率×発酵収率)
M_g	原料糖含量	g-gluc/g-raw	0.80	0.80	0.80	
Y_{LA}	乳酸収率	g-LA/g-raw	0.68	0.68	0.68	乳酸ブチルエステル蒸留法の回収率95%を適用
I	乳酸生産量	ton/batch	24.62	121.75	606.71	
L	乳酸生産量	ton/年	2031	10045	50053	
C_0	設備投資額	億円	29.0	75.6	198.1	発酵・精製設備の参照値を基に建設費の0.6乗則を適用
S	補助率	%	0	0	0	公的補助等の補助率
a	償却年	年	8	8	8	
C_1	減価償却費	万円/年	36202	94452	247577	$=C_0/a$
C_i	その他固定費	万円/年	6000	6000	6000	人件費(500万円×12人)
C_{fix}	固定費計	円/kg-LA	207.7	100.0	50.7	$=(C_1+C_i) \times 10/L$

玄米の並行複発酵方式と蒸留精製により年産 2,000、10,000、50,000 トンの D-乳酸を製造した場合の固定費はそれぞれ 207、100、50 円（乳酸 1 kg あたり）と見積もられた。また、変動費は原料（バイオマス）、栄養源、酵素、中和剤、その他副資材、ユーティリティ（電気・蒸気・水）を含めた場合に 103.7 円/kg-乳酸となり、廃棄物処理費については残渣と排水に対して 21.4 円/kg-乳酸と見積もられた。

以上より、年間 1 万トンの D-乳酸モノマーを発酵・蒸留精製法で製造する場合、D-乳酸 1 kg あたりの製造コストは 225 円と見積もられた。その内訳をみると、8 年償却とした設備コストが 42%と最も大きく、続いてユーティリティ、原料費、材料費が大きなコスト要因であることがわかった（図 2-2-17）。また、乳酸発酵プロセスの開発により、栄養源と酵素の費用が材料費に占める割合は小さくなり、乳酸の中和と精製に要する費用が大きいことが明らかとなった。

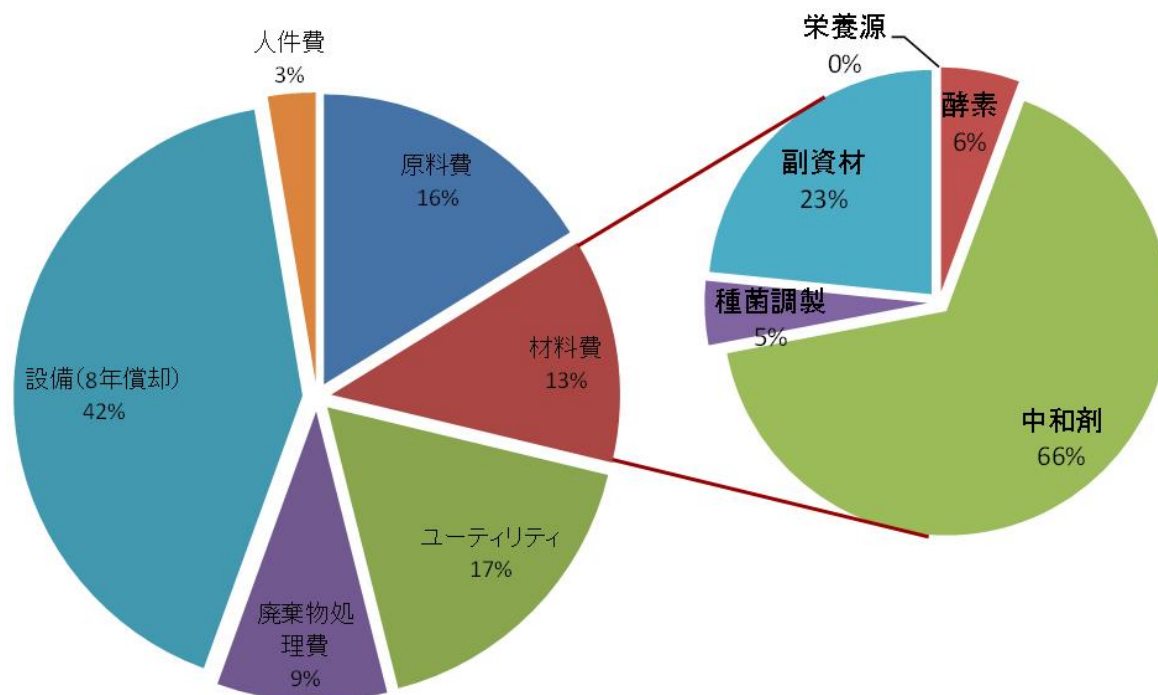


図 2-2-17 D-乳酸製造コストの内訳（年産 10,000 トン、225 円/kg）

本研究における D-乳酸製造コスト低減までの経過を図 2-2-18 に示す。開発初期には高価な栄養素を使用していたため材料費が高く、安価な栄養素を使用した場合は D-乳酸の光学純度が低下する問題があった。本研究により、未利用バイオマス为原料として栄養素を添加しない発酵法を開発することで、光学純度 99.5~99.8% の D-乳酸を少ない材料費で製造できることを示した。

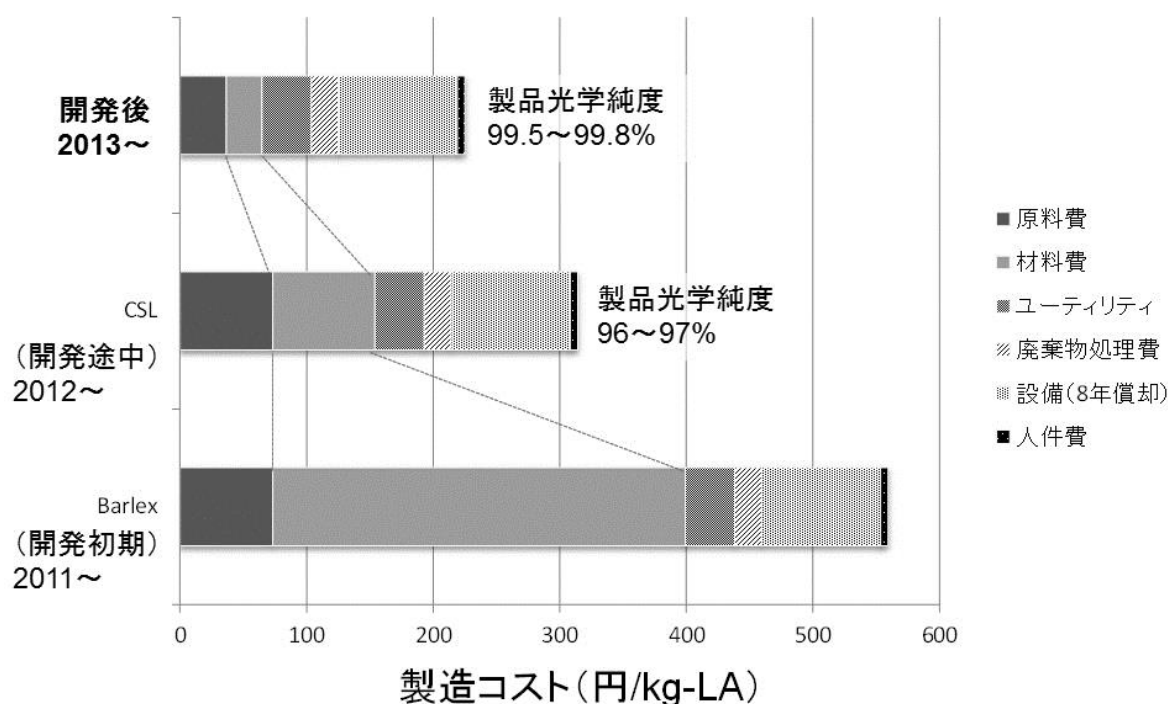


図 2-2-18 本研究における D-乳酸製造コスト低減までの経過

・D-乳酸製造コストの低減に向けた方策

バイオマスプラスチック原料として乳酸を製造するには、乳酸へ変換される糖を含むバイオマスの選定が重要である。この場合のバイオマスに求められる条件としては、(1)利用可能量が多い、(2)糖含量が高い、(3)季節変動が少ない、(4)低価格である等であり、以上の条件を満たす原料資源の探索と確保の重要性が極めて大きい。とうもろこしや小麦等に代表される生産資源はいずれも季節変動が激しいことが懸念され、事業を実施する場所によっては量の確保が困難である。一方、古米、屑米等の未利用・廃棄物系資源は季節変動がない上に糖含量も高く収集済みの資源であることから、安定した量と質の確保が比較的容易であり、国産資源としても望ましい特徴を有する。本研究では、米に含まれる成分が乳酸菌の生育に要する栄養素として作用することにより、従来よりも安価な原材料コストで D-乳酸を製造できることを示した。原料に関するその他の方策として、厨芥等の逆有償の資源を利用することも経済性向上に寄与するが、有害物質を含む、あるいは変質が早いなどの低品質資源については別途調査が必要である。

乳酸製造コストに占める設備費の割合が大きいいため、スケールメリットを狙う方策以外にも、発酵と精製工程に係る設備の材質や設計などプラントの合理化を図る必要がある。乳酸発酵工程としては pH を制御する以外に特別大がかりな制御は必要ないため、培養・発酵槽など既存設備を活用することも有効である。同じく、大きな費用負担の予測されるユーティリティについては、通常の流通価格で購入せず、既存設備と連携して安価な余剰エネルギーを有効利用するシステムを確立するべきであろう。

2-3 発酵液からのオリゴマー化最適条件の検索（大阪大学）

バイオマスからつくる樹脂（バイオプラスチック）の代表例としてポリ乳酸（図 2-3-1）が挙げられる。ポリ乳酸は既存のプラスチックに近い性質を示し、ポリプロピレンをはじめとする幾つかの石油由来のプラスチックの代替を目指した用途開発が積極的に検討されてきた。しかし、ポリ乳酸は石油由来のプラスチックの約 2 倍の価格であり、しかも、現時点では物性・機能も石油由来のプラスチックの同等以下である場合が多い。そのため、実用化例の多くが環境対応を目指す企業の限定された用途や官による助成事業（愛知万博等）に留まっている。

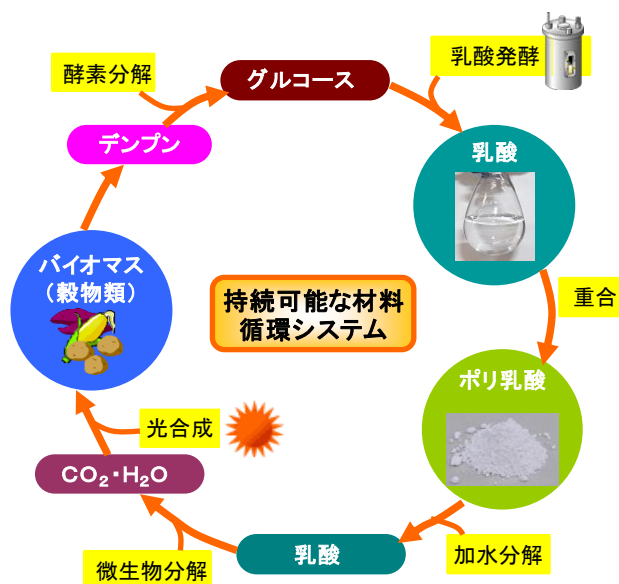


図 2-3-1

ポリ乳酸の価格面でのネックはモノマー価格にあり、既存の製造法では高純度の乳酸からラクチド（乳酸の環状二量体）を合成し、ラクチドをモノマーとする開環重合してポリ乳酸を製造している。この手法では大別して、高純度乳酸の合成（乳酸発酵液からの精製）、乳酸からのラクチドへの変換とその精製（開環重合には高純度のラクチドモノマーが必要）、ラクチドの開環重合、の三つの工程が必要であり、高純度モノマー合成の部分にかなりのコストを要する。本項目では、乳酸発酵液からの簡便な手法によるポリマー化に注力することにより、ポリ乳酸の製造コストとエネルギー使用量を大幅に低減し、環境調和型の革新的製造プロセスを確立することを目的とする。

現在のポリ乳酸の工業製造プロセスは発酵乳酸から乳酸エステル（あるいは乳酸カルシウム）に変換して精製し、これを乳酸に戻した後でラクチドを合成して、これを開環重合するというものである。このように多段階を要することが製造コスト低減のネックになっている。我々は乳酸発酵液を原料に用いてポリ乳酸を直接製造できれば、既存の製造プロセスを抜本的に変更することができると考え、ポリ乳酸の新しい製造技術の提案・開発を行ってきた。乳酸発酵液には乳酸、アミノ酸、塩類などが含まれており、既存技術では水溶性の乳酸の単離に水不溶性のカルシウム塩形成によるろ過精製、あるいはエステル化による蒸留精製を伴う。このような既存技術と異なり、我々は乳酸発酵液中の乳酸を選択的に水不溶性オリゴマーに変換することで他の発酵液成分を分離する方法の開発を目指す（図 2-3-2）。これらの技術に基づき粗乳酸（乳酸発酵液）⇒乳酸オリゴマー⇒高分子量ポリ乳酸の製造ルートを採用し、プロセス数の削減による製造コストとエネルギーの大幅な低減を目指した。

バイオマスを用いてポリ乳酸を製造する場合、下図の通り、現行の工業プロセスでは 10 ステッ

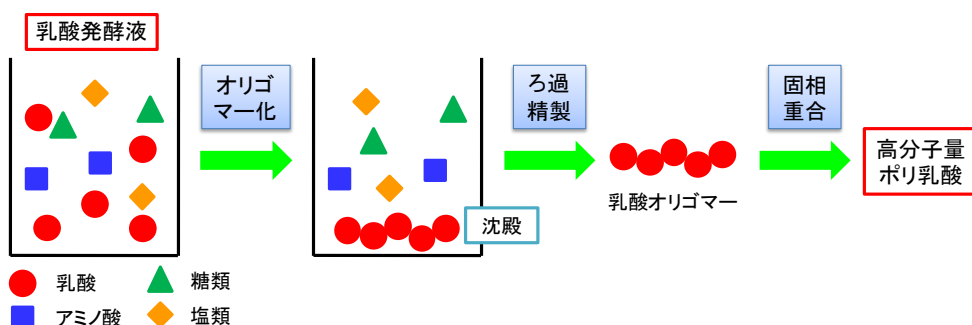


図 2-3-2

プ以上の多段階を要する。この多段階過程からポリ乳酸の低コスト化に限度があり、既存の石油

由来のプラスチックと対抗できない原因の一つである。現行のプロセスに基づく限り、価格面での見直しは大量製造によるコスト削減と乳酸発酵の効率化程度であり、価格のわずかな低減しか期待されない。そのため、ポリ乳酸の低価格化には、このプロセスの抜本的な見直しが必要である。本研究開発で目指すプロセスは工業原料米の粉碎→乳酸の直接発酵生産→乳酸発酵液からのオリゴマー合成→オリゴマーの精製→オリゴマーの重合によるポリ乳酸合成、の5段階であり、工程数が大幅に少なくなる。更に乳酸発酵液からの乳酸類の精製と比較し、オリゴマー精製のほうが技術的に容易であり、このプロセスに必要なエネルギーもはるかに低いと予想される。そのため、乳酸発酵液の直接利用が本研究の重要な特徴の一つであり、既存の手法より多くの面で優位性があると考えられる。また、乳酸発酵液からのオリゴマーの直接合成に関する技術は光学純度に依存しないため、用途に応じた様々なオリゴマー合成へ利用できる。

D 体を中心に、L 体やラセミ体を含め、乳酸のオリゴマー化の無触媒重合を検討した。試薬の乳酸（88%）を 100℃で 3 時間、減圧下で脱水縮合を行い、その後、所定温度、窒素雰囲気下で 1 時間反応させ、その後、少しずつ減圧して、30torr にて 6 時間反応を行った。140℃では反応が進行せず、160℃以上でオリゴマーが生成したことがわかり、温度の上昇とともに分子量が増大した。180℃の重合では若干の濁りがあるが、140℃では透明であった。この反応液からポリマーの単離を試みたところ、140℃の場合は粘り気の高い生成物が得られ、水洗できず、十分な精製が行えなかった。一方、160℃と 180℃の場合は水洗により、白色粉末を 80%以上の収率で得た。

次に乳酸オリゴマー化における触媒探索とそれに基づくモデル発酵液からの乳酸オリゴマーの合成を検討した。触媒としては安価かつ毒性の高いスズ系触媒を用いないことを念頭に、酸触媒を使用した。試薬乳酸（85~92%）を用い、100℃以下で減圧下で脱水（約 3 時間）を行い、その後、所定温度にて窒素下で 1 時間、反応を行い、引き続き、徐々に減圧し、30torr で 6 時間、反応を行った。硫酸と塩酸を触媒に用いたところ、無触媒系と比較して低温（150℃）でも重合は進行し、硫酸に用いた場合にほぼ定量的に白色粉末を得た。生成物の分子量は硫酸を触媒に用いた場合に最も高く（ $M_n=1600$ 、 $M_w/M_n=4.2$ ）、良好な結果を得た。硫酸を触媒に用いた系での添加量の影響を調べたところ、触媒量を減らすと収率が低下し、触媒量を増やすと黒色化した。分子量は触媒量が多いほうが若干高くなった。硫酸の使用量を 0.5%に固定し、精製における再沈殿溶媒を調べたところ、良溶媒にクロロホルムを用いたが、サンプルの一部が溶解しなかった。貧溶媒にメタノールを用いた場合には、メタノールが黄色に着色した。一方、エーテルを再沈殿に用いた場合には、そのような挙動が見られなかった。そのため、反応混合物中にメタノールに可溶の何らかの生成物が含まれることが示唆された。

室温でも溶融している塩であるイオン液体は「第3の液体」と呼ばれている。イオン液体の主な特徴として、極めて低い蒸気圧、難燃性、比較的高いイオン伝導性、広い電位窓などがあげられる。そして、種々の物質を溶かすことができるので、蒸発しない合成用溶媒や電気化学反応用電解質としての利用が開始された。蒸気圧が極めて低いということは、蒸発が起こりにくいことである。一部のイオン液体は、高温・高真空下の条件で非常にゆっくりと蒸発することが報告されているが、室温では蒸気圧は計測不能なほどに低く、真空中でも蒸発することはない。これは、通常の溶媒ではあり得ない特徴であるゆえ、減圧下や真空中でも扱える液体という視点での研究も行われるようになった。そこでイオン液体の乳酸あるいは乳酸発酵液の重合溶媒としての可能性を検証した。イオン液体として 1-エチル-3-メチルイミダゾリウムクロライドを用い、比較として従来の触媒である 2-エチルヘキサン酸スズ系との比較を行った。2-エチルヘキサン酸スズは水分により不活性化するため、脱水操作が必要であり、高温で長時間、重合反応を行う必要がある。一方、イオン液体を用いた場合、イオン液体は水と混和するため、初期に乳酸に添加することができ、図 2-3-3 の条件により低触媒量で重合が進行した。また、短時間、低温での反応によ

り、副反応や生成物の着色を抑制することができた。このように、イオン液体を触媒に用いることで乳酸の直接重縮合が進行することを見出した。

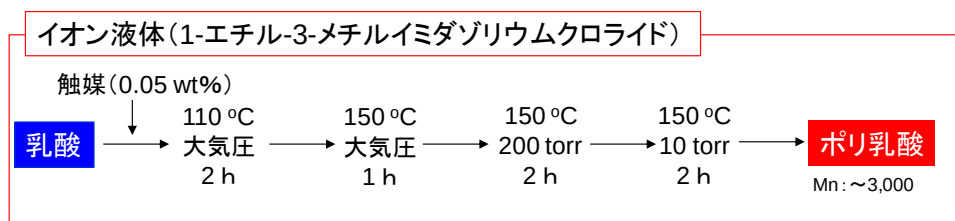


図 2-3-3

2-4 固相重合によるポリ乳酸の合成 (大阪大学)

固相重合については既報があり、その技術を活用することで、本研究開発で製造する乳酸オリゴマーの高分子量化が可能である。180°C、2700Pa の条件で分子量 5 百程度のオリゴマーを反応させると分子量 5 千程度のポリマーが得られた。また、少量のスズ触媒を添加することで分子量は 2 万以上に増大した。今後は、発酵液から合成した乳酸オリゴマーの開発にあわせてアウトプットのオリゴマーの分子量等を見極め、それに合わせた固相重合技術を構築する。

2-5 分岐状ポリ D-乳酸の合成 (大阪大学)

本項目では乳酸発酵液を用いてバイオポリオールであるトウゴマ由来のヒマシ油をコアとする分岐状ポリ乳酸を合成し、ポリ乳酸用添加剤としての応用を検討する。具体的にはモデルとして、主にラクチドあるいは試薬乳酸を用いて高純度の分岐状ポリ乳酸を合成し、その機能評価を行った。水酸基を開始点とし、オクチル酸スズ(Ⅱ)を用いたラクチドの開環重合はよく知られている。分子内に 3 個の水酸基を有するヒマシ油を重合の開始剤に用い、無溶剤(熔融系)で反応を検討したところ、ほとんど全てのモノマーが重合によって消費された。

ポリマーの分子量をポリスチレンスタンダードを利用した SEC 測定により求めた。分子量は仕込み比により直線的に増加した(図 2-5-1)。これより、ヒマシ油をコアとする分岐状ポリ乳酸の分子量はヒマシ油とラクチドの仕込み比により制御可能であることがわかった。得られたポリマーの分子量分布は 1.6 から 2.1 の間であった。

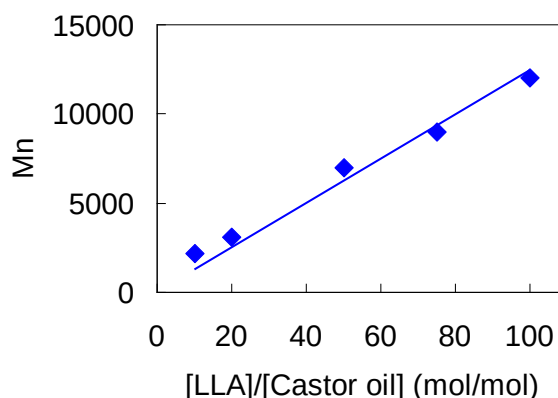


図 2-5-1

次に分岐状ポリ乳酸の熱的特性を調べた(図 2-5-2、(A) ガラス転移温度、(B) 融点、(C) 結晶化度)。DSC 測定によってポリ乳酸

と分岐状ポリ乳酸の熱的特性について調べた。ポリ乳酸はガラス転移温度(T_g)が 58°C、融点(T_m)が 167°Cである結晶性ポリマーである。分岐状ポリ乳酸は仕込み比を変えた全てのサンプルで、2nd heating において T_g と T_m がみられた。一方、100%結晶化したポリ乳酸の融解エンタルピー(93.7 J/g)に基づいて、分岐状ポリ乳酸の融解ピークから結晶化度(X_c)を求めた。 T_g 、 T_m 、 X_c は仕込み比のラクチドの割合の増加に伴って、徐々に上昇していることがわかった。分岐状ポリ乳酸の T_g と T_m はポリ乳酸の値よりも低く、 T_g は分岐状と直鎖状に大きな差がみられた。同様の傾向がポリグリシドールをコアとした分岐状ポリマーでもみられている。分岐状ポリ乳酸の X_c はポリ乳酸(45%)よりも低かった。

ポリ乳酸には、L 体の乳酸からなるポリ L-乳酸(PLLA)と D 体の乳酸からなるポリ D-乳酸

(PDLA) が存在する。これらは混合によりステレオコンプレックス結晶を形成することが知られている。ステレオコンプレックス結晶はホモ結晶よりも高融点となり、耐熱性の向上につながっている。そこで、D-ポリ乳酸を分岐鎖とする分岐状ポリ乳酸を合成し、L体ポリ乳酸への添加効果を検討した。得られた分岐状ポリ乳酸をポリ乳酸に 5 wt% 添加し、175℃でのホットプレス後、0℃に急冷することにより厚さ 100μm のフィルムを作製した。得られたフィルムは透明であった。DSC 測定 (図 2-5-3、A: ポリ乳酸単独、B: 分岐状ポリ乳酸添加系) において、左が溶融状態からの冷却過程のチャート、右がその後の昇温過程のチャートである。これより、毎分 10℃での冷却過程においてポリ乳酸単独ではピークが見られないのに対し、分岐状ポリ乳酸の添加により 2 つのピークが観測された。高温側がステレオコンプレックスの結晶化ピークであり、低温側がポリ乳酸のホモ結晶の結晶化ピークである。また、昇温過程において、ポリ乳酸単独では観測されたホモの結晶化ピークが分岐状ポリ乳酸の添加により消失していた。これより、分岐状ポリ乳酸の添加により冷却過程でポリ乳酸の結晶化が進行しており、分岐状ポリ乳酸がポリ乳酸の結晶核剤として作用していることがわかった。分岐状ポリ乳酸を添加した場合には、冷却初期に形成したステレオコンプレックスの微結晶が核となり、ポリ乳酸の結晶化を効果的に誘起していると考えられる。

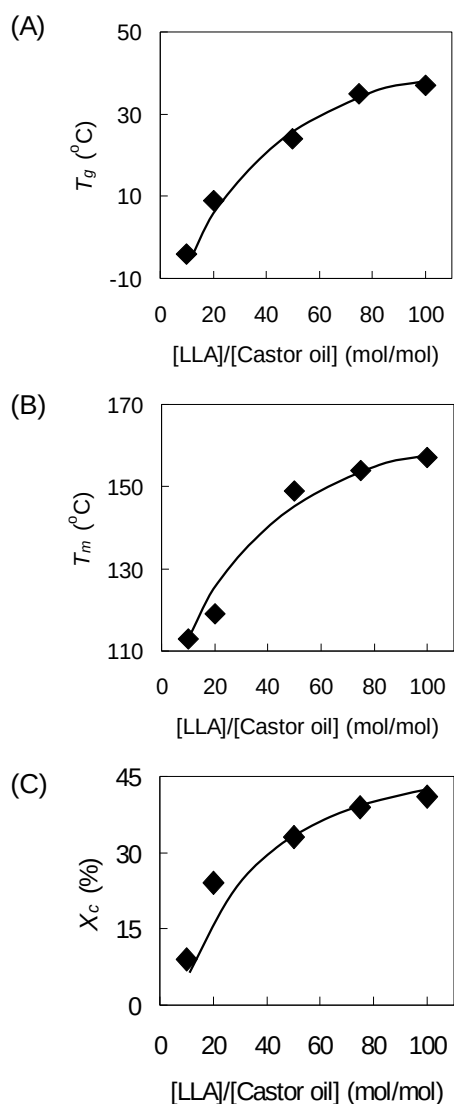


図 2-5-2

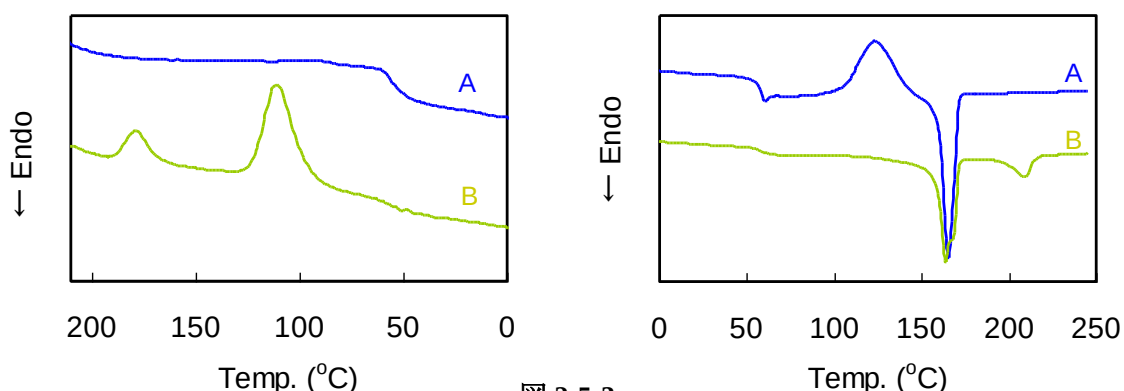


図 2-5-3

分岐状ポリ乳酸の応用として、末端水酸基の修飾による機能化を検討した。末端水酸基に対し、ピリジン存在下に酸無水物を反応させることでアセチル基等を定量的に導入した (図 2-5-4)。先にバイオベース社によりフタル酸塩 (BP-Ph) を導入したのについて、ポリ乳酸の優れた結晶核剤となることが見出されている。今回作製したものについて、ポリ乳酸に 5% 添加し、110℃における等温結晶化における半結晶化時間から結晶核剤としての性能を評価した先に優れた作用を見出しているフタル酸塩については、10%では優れた作用を示すが、5%では負の効果を示した。

一方、トリメリット酸を導入したもの（BP-Tr）についてのみ、半結晶化時間が大幅に短縮し、高い結晶化促進効果を示した。

性能の高かったトリメリット酸導入分岐状ポリ乳酸について、添加量と半結晶化時間の関係を図 2-5-5 左に示す。これより添加量は 5% で十分であることが明らかとなった。添加量の低減は実用的観点から重要である。

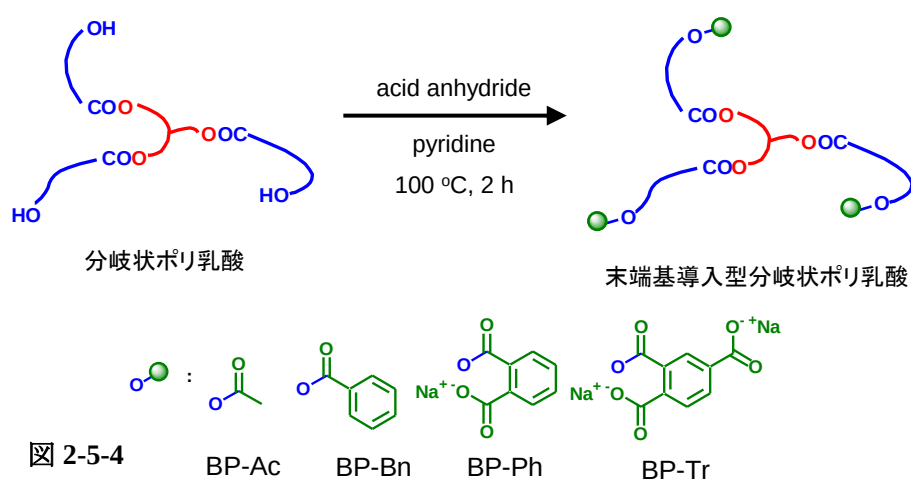


図 2-5-4

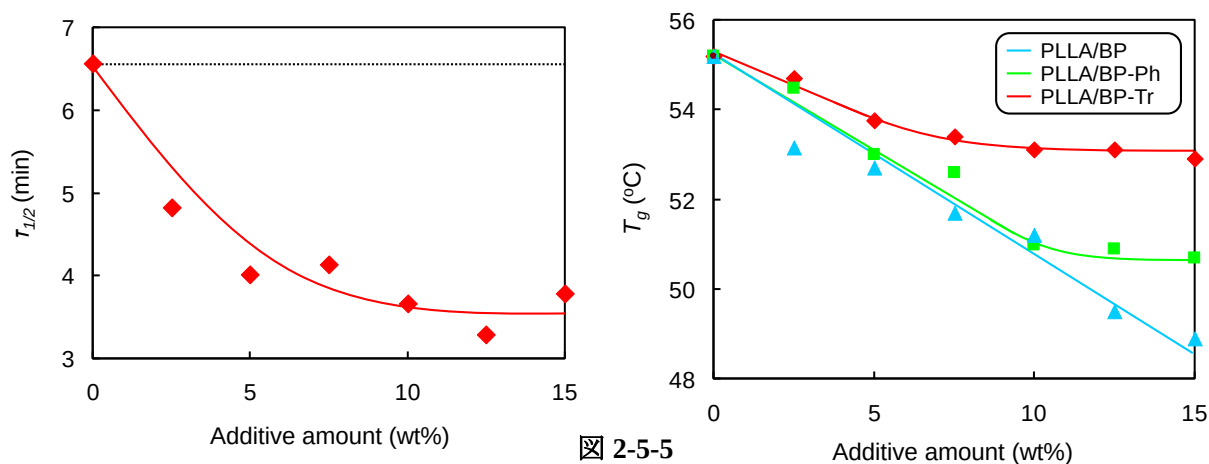
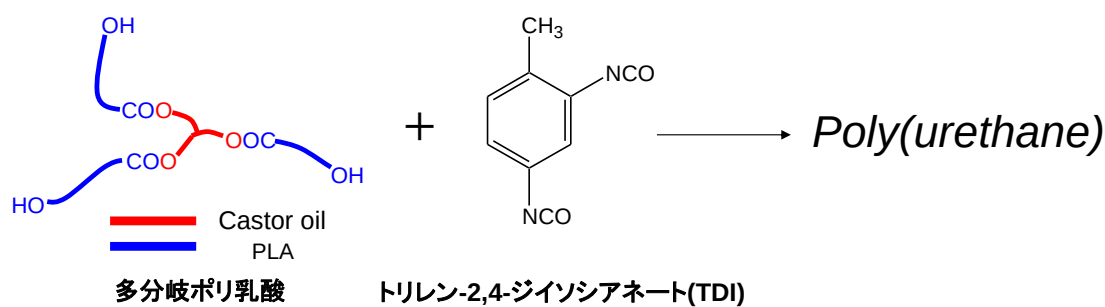


図 2-5-5

ポリ乳酸に分岐状ポリ乳酸（BP）と末端修飾分岐状ポリ乳酸を添加した場合の添加量に伴うガラス転移温度の影響を調べた（図 2-5-5 右）。一般に相溶系では添加剤の量に応じて比例的にガラス転移温度が変化する。分岐状ポリ乳酸添加の場合にそのような挙動が見られ、末端フタル酸修飾分岐状ポリ乳酸の場合も 10% までは直線的な関係が観測された。末端フタル酸修飾分岐状ポリ乳酸では添加量が低い場合には相溶しており、そのような添加量でも結晶促進の優れた効果が見出されている。一方、トリメリット酸修飾分岐状ポリ乳酸では低添加量でも直線的な関係は見られず、ポリ乳酸と非相溶の可能性が示唆された。ポリ乳酸を溶融させた状態から 110°C に冷ました状態で保持して偏光顕微鏡観察を行うと、ポリ乳酸単独では結晶析出が遅く、12 分後には大きな球晶が見られた。一方、トリメリット酸修飾分岐状ポリ乳酸を 5% 添加した場合、4 分後には非常に細かい結晶が見られた。ポリ乳酸の微細結晶の迅速な形成が優れた結晶核剤効果に密接な関係があると考えられる。得られたブレンド物の耐熱性を熱膨張率から評価した。ポリ乳酸単独と比して、トリメリット酸修飾分岐状ポリ乳酸を 5% 添加した場合に変形の抑制が見られ、耐熱性が向上したことがわかった。また、引っ張り試験によりフィルムの機械的強度を測定したところ、破断ひずみが増大し、靱性が向上した。

末端水酸基の分岐状ポリ乳酸の応用例として、発泡バイオポリウレタンを作製した（図 2-5-6）。分岐状ポリ乳酸をポリオールに用い、イソシアネート成分として TDI を用いた。ヒマン油を用いた場合は良好な発泡体は得られなかったが、ヒマン油（SCO）あるいはポリヒマン油（SPCO）を開始剤とする分岐状ポリ乳酸を用いた場合は発泡体が生成した。



左から Castor oil (CO)
 SCO-10
 SPCO-10

図 2-5-6

次にフィルム状のバイオポリウレタンの物性を動的粘弾性から評価した。分岐状ポリ乳酸におけるポリ乳酸鎖長の影響を調べたところ、ポリ乳酸鎖が長いほどガラス転移温度が上昇し、室温における貯蔵弾性率が増加することがわかった。これはポリ乳酸鎖を導入することでポリウレタンが硬質化したことを示し、ポリ乳酸の性質がポリウレタンに反映されたことを示唆する。分岐状ポリ乳酸の核部分の効果については、ポリヒマシ油を用いることでゴム領域における貯蔵弾性率の顕著な増大が見られた。核部分に分子量が高く柔軟な成分が導入されるため、あるいは分岐度が高くなることに起因するネットワーク構造の発達によるためと考えられる。

2-6 D-乳酸オリゴマーおよび分岐状ポリ D-乳酸製造 (Bio-energy 株式会社)

バイオマスから得た D-乳酸発酵液を原料とする D-乳酸ポリマー製造へ展開するため、実液を用いた D-乳酸オリゴマー製造試験を実施した。まず、実液から精製した D-乳酸モノマーの品質を評価し、その後、重合反応で生成・回収した D-乳酸オリゴマーの分子量評価を行った。

・乳酸発酵液（実液）からの D-乳酸モノマー精製工程の検証

L-乳酸モノマーの精製技術を参考に、乳酸ブチルエステル蒸留技術を D-乳酸モノマーの精製に適用した。玄米仕込み濃度 20%からの D-乳酸発酵液を原料とし、以下の工程で D-乳酸モノマーを精製した。それぞれの写真は作業の様子を示す。

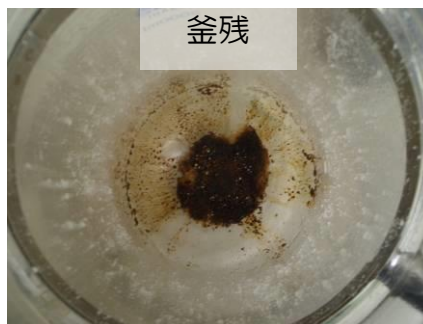
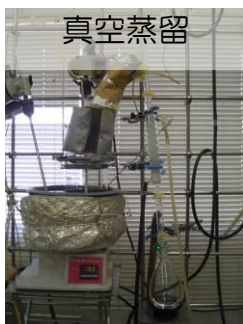
A) 脱水およびタンパク除去

- 原料を常圧・120℃加熱処理し、単蒸発濃縮した。
- 釜残液をネットフィルタ（11 μm）で粗濾過し、発生した凝集物を取り除いた。
- 濾液をさらにモジュール濾過し、タンパク質分等を除去した。



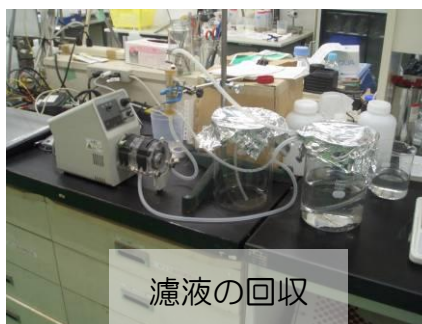
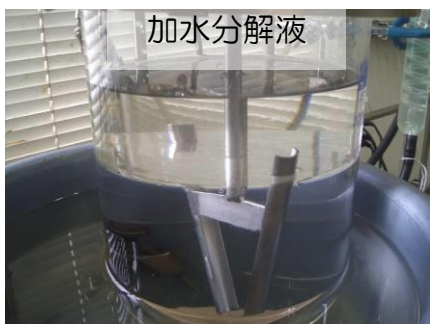
B) エステル化

- A) 濾液にアルコール (1-BuOH) および酸触媒 (H_2SO_4) を添加し、鉍酸にて反応系 pH を 1.0 に調整した (HCl 使用)。
- 1-BuOH と生成水との常圧・共沸蒸留を行いながら乳酸エステル化を進行させ、留出下相を抜出すと共に、1-BuOH を含む上相をディーンスターク管により釜へ還流させた。
- 下相の留出が確認されなくなった段階で反応を終了させ、下相を完全に除去した後に真空蒸発に運転を切り替え留出上相を回収・原料中の不純物からエステルを分離した。



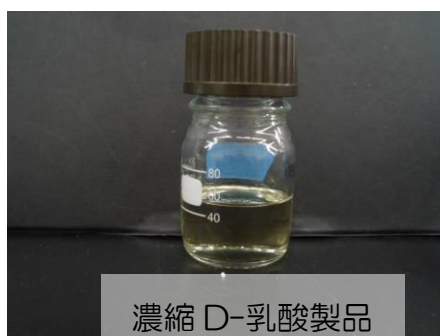
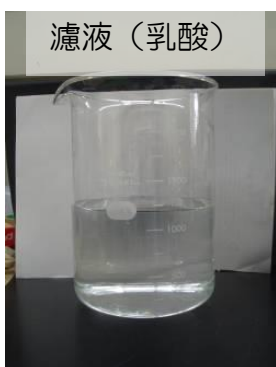
C) 加水分解

- B) 留出上相＝乳酸ブチル、1-BuOH 混液に固体触媒 (アンバーリスト 15J; 酸性イオン交換樹脂) および過剰量 H_2O を添加し、常圧にて加温・攪拌して加水分解した。
- 加水分解により生成した 1-BuOH を留出除去した。
- 留出上相の留出が確認されなくなった段階で反応を終了させ、釜残を濾別・生成 D-乳酸水溶液を得た。
- 必要に応じ、釜残 500 ml あたり活性炭 8 g (日本エンバイロイケミカルズ社 白鷺 P; 4g+精製白鷺; 4g) を投入し、室温・一昼夜攪拌し、再濃縮前に脱色処理を施した。
- 処理液をモジュール濾過し、濾液を回収・次工程に適用した。



D) 脱水再濃縮

- C) 加水分解濾液を真空度 10 kPa・60°C で真空蒸発させ、含有水分を留去。釜残を D-乳酸精製品として濃度測定、光学純度などを評価した。



以上の操作により、従来品である L-乳酸バルク品と同等の D-乳酸サンプル（乳酸濃度 90%以上）の生産スキームを構築した。精製に供した発酵液中の乳酸 D/L 比（光学純度）は 99.8%、精製後の D-乳酸水溶液では 99.7%となり、加熱操作を含む精製における光学純度の有意な変化は確認されず、高純度の D-乳酸であることがわかった。図 2-6-1 に示す工程で重量平均分子量が 1 万程度の D-乳酸ポリマーが得られることを確認できた。



図 2-6-1 精製 D-乳酸モノマーの加熱重合による D-乳酸オリゴマー製造および分子量評価

続いて、ポリ D-乳酸系材料の量産試作にあたり、ピーカースケール（200mL～2L）での合成実験を行った。

本実験で使用した重合反応装置の外観を図 2-6-2 に示した。乳酸の重合は、乳酸の縮合反応である。乳酸を加熱攪拌すると共に、生成する水を減圧により系外に排出することで、乳酸の正長反応は進み、重合度は増大する。この際、真空度を高めて生成水をできるだけ排出した方が重合は進むが、乳酸の重合度に見合った減圧にしないと、乳酸まで系外に失うことになる。また、乳酸の重合は平衡反応であるため、反応系以内には、乳酸、乳酸重合物、ラクチド、水が共存する系になる。減圧度を高め過ぎると、昇華性であるラクチドが排出され、重合単量体を失うことになる。このために、真空を制御する治具および反応容器の上蓋や真空経路を温調できるよう施されている。

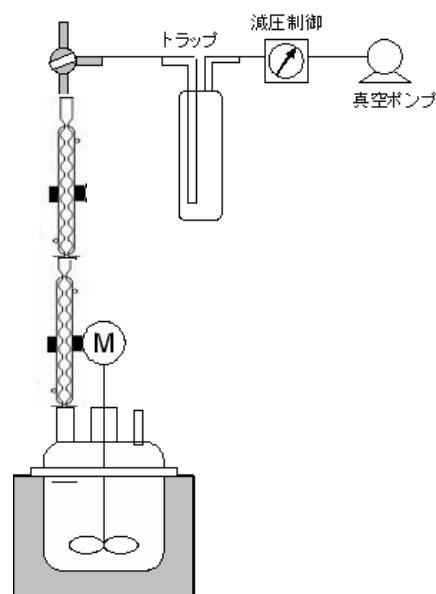


図 2-6-2 重合反応装置（200ml）

・D-乳酸のオリゴマー重合

D-乳酸を原料に、上述の重合装置を用いてオリゴマー化実験を行った。反応容器温度 170℃、反応容器上蓋温度 130℃、管路温度 10℃、真空度 大気圧～2600Pa（Stepwise）、触媒なしで反応を 8 時間行った。反応後に冷却すると、反応容器内に少し黄みがかった透明個体を得た。これをクロロホルムに依って溶解回収し、GPC により分子量測定を行った結果、数平均分子量（Mn）が 2,100、重量平均分子量（Mw）が 5,200 の乳酸オリゴマーを得た。再沈殿生成を行った結果、81%の収率でオリゴマー（白色沈殿）を回収することができた。結果を表 2-6-1 にまとめた。

表 2-6-1 D-乳酸のオリゴマー化実験結果

反応温度 (℃)	上蓋温度 (℃)	管路温度 (℃)	真空度 (Pa)	触媒	分子量 Mw/Mn	収率(%)
170	130	10	2600 ×8h	無	5,200/ 2,100	81

・D-乳酸オリゴマーからのポリオール合成

表 2-6-1 で合成した D-乳酸オリゴマーとひまし油を原料に、図 2-6-2 の重合装置を用いてポリオール合成を行った。反応容器温度 175℃、反応容器上蓋温度 130℃、管路温度 25℃、真空度大気圧～650Pa (Stepwise)、エチルヘキサン酸すずを触媒にして反応を 5 時間行った。反応後に冷却すると、反応容器内に黄みがかった透明個体を得た。これをクロロホルムによって溶解回収し、GPC により分子量測定を行った結果、分子量 (Mp) が 8,000 のポリオールを得た。乳酸オリゴマーとひまし油の仕込み比から計算される目標分子量とほぼ同等の分子量であった。また、分子量分布の単分散性より、ほぼホモポリマーなどの不純物は殆どないと思われる。収率は 80% であった。結果を表 2-6-2 にまとめた。

表 2-6-2 D-乳酸ポリオール合成の実験結果

反応温度 (℃)	上蓋温度 (℃)	管路温度 (℃)	真空度 (Pa)	触媒	分子量 (Mp)	収率(%)
175	130	25	2600～ 650 ×5h	エチルヘキサン酸 すず	8,000	80

・D-乳酸オリゴマーからのポリ D-乳酸重合結果

次に、真空度を高めて反応時間を長くとり、ポリ D-乳酸の重合を行った。反応容器温度、反応容器上蓋温度、管路温度、真空度、触媒、得られた重合物の分子量 (GPC で測定)、収率、外観は以下の通りである (表 2-6-3)。いずれも分子量 2～4 万のポリ乳酸を得ることができた。これ以降の重合は、熔融重合よりも結晶化度に応じた融点以下での固相重合の方が反応速度を高めることができる。

表 2-6-3 ポリ D-乳酸の重合実験結果

実験	反応温度 (℃)	上蓋温度 (℃)	管路温度 (℃)	真空度 (Pa)	触媒	分子量 (Mw)	収率 (%)	色目
1	180	120～ 130	95× 200mm	133～ 270 ×13.5h 67×8h	SnCl ₂	23,000	≒ 100	少し 着色
2	180	120～ 130	95× 200mm	67× 15h	SnCl ₂ / TSA	38,200	70	少し 着色
3	180 → 130	120	120× 300mm +95× 200mm	330× 25h	SnCl ₂ / TSA/ 亜リ酸トリ フェニル	36,000 (Mw/Mn =1.89)	85.6	白

* 触媒種は、SnCl₂ : 塩化スズ、TSA : トルエンスルホン酸

本実験で使用した 2L 重合反応装置の外観を図 2-6-3 に示す。図 2-6-2 の重合反応装置と同じく、加熱撹拌手段、減圧（制御）手段、凝縮手段、および反応容器の上蓋や真空経路の温調手段を備えている。

・D-乳酸のオリゴマー重合（2L）

D-乳酸を原料に、上述の重合装置を用いてオリゴマー化実験を行った。反応容器温度 170℃、反応容器上蓋温度 130℃、管路温度 10℃、真空度 大気圧～2600Pa（Stepwise）、触媒に塩化スズを用いて、10 時間反応を行った。反応後に冷却すると、反応容器内に少し黄みがかかった透明個体を得た。これをクロロホルムによって溶解回収し、GPC により分子量測定を行った結果、数平均分子量（Mn）が 1,800、重量平均分子量（Mw）が 4,500 の乳酸オリゴマーを得た。再沈殿生成を行った結果、75%の収率でオリゴマー（白色沈殿）を得た。結果を表 2-6-4 にまとめた。



図 2-6-3 重合反応装置外観（2L）

表 2-6-4 D-乳酸オリゴマー重合実験結果

反応温度 (℃)	上蓋温度 (℃)	管路温度 (℃)	真空度 (Pa)	触媒	分子量 (Mw)	収率(%)
170	130	10	2600 ×10h	SnCl ₂	4,500	75

・D-乳酸オリゴマーからのポリオール合成（2L）

D-乳酸とひまし油を原料に、上述の重合装置を用いてポリオール合成を行った。反応容器温度 170℃、反応容器上蓋温度 130℃、管路温度 25℃、真空度 大気圧～2600Pa（Stepwise）、エチルヘキサン酸すずを触媒にして反応を 10 時間行った。反応後に冷却すると、反応容器内に黄色透明個体を得た。これをクロロホルムによって溶解回収し、GPC により分子量測定を行った結果、分子量（Mp）が 5,500 のポリオールを得た。乳酸オリゴマーとひまし油の仕込み比から計算される目標分子量とほぼ同等の分子量であった。また、分子量分布の単分散性より、ほぼホモポリマーなどの不純物は殆どないと思われる。収率は 82%であった。結果を表 2-6-5 にまとめた。

表 2-6-5 D-乳酸ポリオール合成の実験結果

反応温度 (℃)	上蓋温度 (℃)	管路温度 (℃)	真空度 (Pa)	触媒	分子量 (Mp)	収率(%)
175	130	25	2600× 5h	1-ヘキサン酸 すず	5,500	82

・乳酸発酵液（実液）の直接重合による D-乳酸オリゴマー製造

発酵プロセスの開発で調製した乳酸発酵液を原料に用いてオリゴマー化実験を行った。初めに用いた発酵乳酸サンプルの分析表を表 2-6-6 に示す。

表 2-6-6 重合に供試した発酵乳酸サンプルの分析表

成分	濃度 (g/L)	測定法
乳酸	111.75	HPLC
グルコース	8.34	バイオセンサー
キシロース	0.76	
全糖濃度	28.76	硫酸フェノール法
タンパク濃度	0.47	Bradford 法

乳酸発酵液の重合に先立ち発酵原液の前処理を実施した。まず活性炭による脱色・脱臭処理後、酸性化処理を行った。ここで、発酵液中の乳酸はアルカリにより中和されているため、発酵乳酸は乳酸酸塩の状態にある。すなわち、本研究で使用したアルカリは NaOH であるため、発酵液は不純物を含む乳酸ナトリウム水溶液となる。解離している乳酸イオンでは重合反応性が乏しいため、酸を加えて非解離の乳酸状態にする必要がある。本研究の酸性化工程では、酸として硫酸を用いて発酵液を pH2.0 に調整した。乳酸の解離乗数 pKa が 3.8 であることから、ほとんどが非解離の乳酸になっていると思われる。実際、精製した発酵乳酸の pH を 2 以下に調整してから FT-IR 分析したところ、非解離型乳酸に特徴的な 1725cm⁻¹（カルボン酸 C=O）、1237cm⁻¹（カルボン酸 C-O）、1132cm⁻¹（アルコール C-O）などの吸収を確認した。

次に、脱水工程を実施した。乳酸の重合は、乳酸分子同士の結合とともに水が脱離する縮合反応であるので、系内の水分濃度の制御がそのまま反応制御となる。ここでは、エバポレーターを用いて脱水を行った。脱水は、減圧加熱による水分の留去によって行うが、温度は 35℃までの加温にとどめた。着色の原因となる反応や変性は全て、加温によって誘発されるためである。脱水により水分が無くなってくると、それまで水に溶けていた塩などが溶出してくる。主な成分は硫酸ナトリウムであるが、これら溶出物をフィルター濾過により除去し、濃縮により少し黄味を帯びた粗乳酸を得た。

以上のようにして得た粗精製乳酸を原料に、反応容器温度 150℃、真空度 大気圧～2700Pa（Stepwise）、触媒なしで加熱重合反応を 6 時間行った。反応後に冷却すると、黒色に近い褐色の固体を得た。これをクロロホルムにより溶解回収し、GPC により分子量測定を行った結果、数平均分子量（Mn）が 560、重量平均分子量（Mw）が 830 の乳酸オリゴマーを得た。結果を表 2-6-7 にまとめた。

表 2-6-7 発酵液乳酸のオリゴマー化実験結果

反応温度 (℃)	真空度 (Pa)	時間 (h)	触媒	分子量 Mw/Mn
150	大気圧～2700	6	無	830/560

発酵液から得た粗乳酸の溶融重合による着色が激しいため、次に、溶液重合を検討した。原料は、前頁の実験で使用したものと同一ロットの発酵乳酸を供試した。実験に使用した重合反応装置の外観を図 2-6-4 に示した。乳酸の重合は、乳酸の縮合反応である。乳酸を溶媒中で加熱撹拌すると共に、反応生成する水を溶媒との共沸により系外に排出することで、乳酸の正長反応は進み、重合度は増大する。この時、系外に排出された水は、凝縮後に溶媒との比重差によって分離されるが、本実験ではモレキュラーシーブズによる水分吸着除去も併用した。

反応容器温度 145℃、溶媒と触媒にそれぞれキシレンとエチルヘキサン酸すずを用いて、反応を 24 時間行った（図 2-6-5 に溶液反応の外観を示す）。反応初期は、キシレンと発酵乳酸が混ざらず、白濁状態であるが、時間とともに液は黄変し、反応容器壁面には褐色の固形分が付着した。24 時間後に反応液だけを回収し冷却すると、黄色透明だった液が徐々に濁り始め、不溶物が析出する（図 2-6-6）。この不溶物をクロロホルムによって溶解回収し、GPC により分子量測定を行った結果、数平均分子量（ M_n ）が 785、重量平均分子量（ M_w ）が 1,655 の乳酸オリゴマーを得た。結果を表 2-6-8 にまとめた。

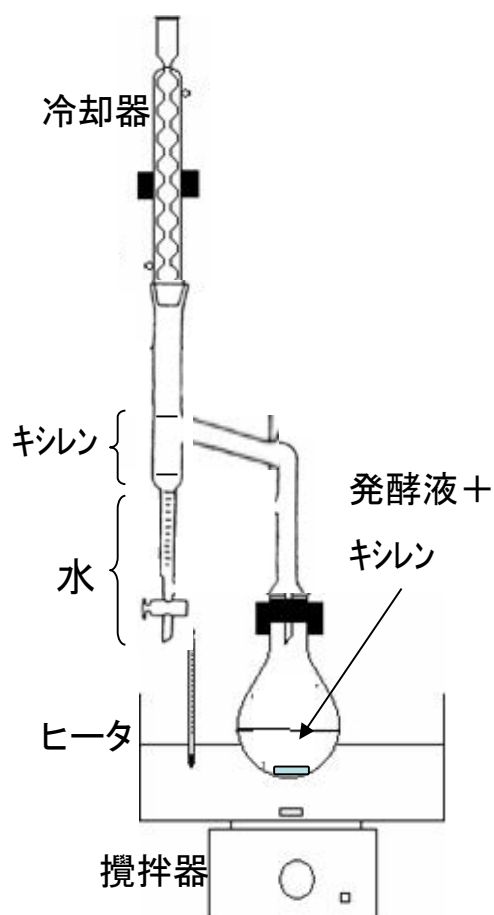
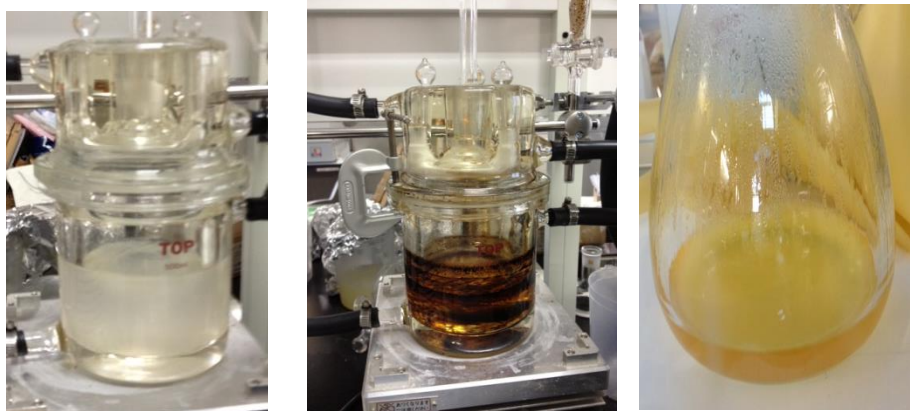


図 2-6-4 溶液重合反応装置



図 2-6-5 溶液反応の外観



(a) 反応初期 (b) 反応後壁面付着物 (c) 反応後溶液

図 2-6-6 溶液反応中の変化

表 2-6-8 発酵液乳酸のオリゴマー化実験結果

反応温度 (°C)	溶媒	時間(h)	触媒	分子量 Mw/Mn
145	キシレン	24	エチルヘキサン酸すず	1,655/785

溶液反応では、反応中に乳酸成分（乳酸及び乳酸重合物）のみキシレン相に溶解し、不純物などは不溶化、壁面固着するために、反応は阻害されず、着色も少ない。ここで、発酵乳酸の重合時の着色の主な原因として考えられるのは、不純物グルコース成分のカaramel反応や、アミノ酸成分のアミノカルボニル反応などの褐変現象である。いずれもカaramel、醤油や味噌の反応であり、発酵成分には付き物である。これら褐変現象を抑制するためには、発酵乳酸中の不純物の低減しかない。特に、本重合実験で使用した発酵液中には、8.34 g/L ものグルコースが存在しており、この低減が最優先課題である。

・乳酸発酵液（発酵プロセスを改良した実液）の直接重合による D-乳酸オリゴマー製造

発酵プロセスの検討から、発酵液中の残存グルコース濃度を低減することに成功したので、該発酵液を原料に供試し、重合実験を行った。表 2-6-9 に記載した成分の乳酸発酵液を原料に、図 2-6-2 の熔融重合装置を用いてオリゴマー化実験を行った。ただし、今回は常温で先に真空度を大気圧から 1000Pa (Stepwise) まで減圧した状態で反応温度を徐々に昇温し、最終 110°C に保持して反応を行った。触媒にはエチルヘキサン酸すずを用いた。

表 2-6-9 重合に供試した発酵乳酸サンプルの分析表

成分	濃度 (g/L)	測定法
乳酸	132.2	HPLC
グルコース	0.085	バイオセンサー
全糖濃度	3.76	硫酸フェノール法
タンパク濃度	0.06	Bradford 法

反応後に冷却すると、褐色の固体を得た。これまでの熔融重合生成物に比べて着色が非常に少ない。これをクロロホルムによって溶解回収し、GPC により分子量測定を行った結果、数平均分子量 (Mn) が 585、重量平均分子量 (Mw) が 1,029 の乳酸オリゴマーを得た。また、クロロ

ホルム溶解液を、メタノール貧溶媒に滴下したところ、再沈殿生成がみられたので、遠心分離して白色固体を得た。結果を表 2-6-10 と図 2-6-7 にまとめた。

表 2-6-10 重合実験結果 3

反応温度 (°C)	真空度 (Pa)	触媒	分子量 Mw/Mn
110	1,000	I 型ヘキサ酸すず	1,029/585



(a) 反応後重合物



(b) 重合物再沈生成物

図 2-6-7 重合物の外観

続いて、反応温度を上昇させた場合のオリゴマー化条件を検討し、D-乳酸オリゴマーの分子量増加を図った。常温で先に真空度を大気圧から 1,000 Pa (Stepwise) まで減圧した状態で反応温度を徐々に昇温し、最終 120°C に保持して反応を行った。反応後に冷却すると、着色が比較的少ない褐色の固体を得た。これをクロロホルムによって溶解回収し、GPC により分子量測定を行った結果、触媒無しでの分子量 (Mw) が 1,800、エチルヘキサ酸すずを触媒に用いた場合の分子量 (Mw) が 4,500 の乳酸オリゴマーを得た (表 2-6-11)。クロロホルム溶解液をメタノール貧溶媒に滴下して再沈殿物を遠心分離後に得られた白色固体を図 2-6-8 に示した。

表 2-6-11 溶融重合による実験結果

反応温度 (°C)	真空度 (Pa)	触媒	分子量 Mw/Mn
120	1,000	なし	1,800/400
120	1,000	I 型ヘキサ酸すず	4,500/2,200



反応前



反応後



再沈殿精製後

図 2-6-8 重合物の外観

以上の結果から、乳酸発酵プロセスの研究における成果物を使用し、酸性化した粗精製 D-乳酸発酵液の溶融重合により分子量 1,800~4,500 の比較的着色の少ない D-乳酸オリゴマー標品が得られることを明らかにした。

第3章 全体総括

化石資源の枯渇や地球温暖化防止の観点から、プラスチック材料の環境対応、高付加価値化、低コスト化への要請が高まっている。植物由来樹脂のなかでもポリ乳酸（PLA）は既に量産されており、力学物性等も既存の樹脂に近い性質を示すため期待されている材料であるが、ポリ L-乳酸（PLLA）単独では汎用プラスチックと比較して耐熱性、耐衝撃性に劣る。一方、PLLA に光学異性体であるポリ D-乳酸(PDLA)が混在すると、それらが対となって結晶格子に充填されたステレオコンプレックス結晶が生成するため、耐熱性の高いステレオコンプレックス型ポリ乳酸としての実用化が期待される。しかしながら、PDLA の原料となる D-乳酸は市場には殆ど出回っておらず、また非常に高価である。そこで本研究では、安価な D-乳酸の発酵生産技術と、発酵液に含まれる D-乳酸のオリゴマー重合および分岐状ポリ D-乳酸製造技術の開発を目的とした。

研究開発テーマ 1 では、デンプン分解能力の高い α -アミラーゼ遺伝子を導入することで、D-乳酸生産（組換え）菌 *Lactobacillus plantarum* のアミラーゼ活性を強化し、バイオマスからの乳酸発酵において発酵速度と乳酸収率の向上に寄与することを示した。本発酵系へ市販の α -アミラーゼを添加した場合は発酵速度がさらに向上するが、 α -アミラーゼを添加しない場合でも、菌体が生産したアミラーゼの活性によりバイオマスからの直接乳酸発酵が可能であった。

研究開発テーマ 2 では、安定した量と質の確保が期待できる米を原料資源として利用し、安価な D-乳酸発酵プロセスの構築を目指した。*L. plantarum* をはじめ乳酸菌は生育に要する栄養素の構成が複雑であり、このことが発酵コストを押し上げる原因となる。本研究では、高濃度の米を投入した並行複発酵を適用することで、米に含まれる栄養素を乳酸菌が利用し、高価な栄養素を一切使用することなく乳酸発酵を達成した。このような栄養素を制限した条件下では、乳酸発酵液中の糖（グルコースなど）の残存が顕著となり、以後の精製工程に悪影響を及ぼすことが懸念される。しかしながら、乳酸発酵液の pH を意図的に低下させる方法を適用することで菌体の糖消費速度が著しく改善されることを発見し、栄養素を制限した条件下であっても残存グルコース濃度を極めて低く抑えられる乳酸発酵技術を開発した。追加検討として、発酵プロセスのスケールアップや発酵液の保存・加熱などでデータの高い再現性を確認し、発酵液の D-乳酸光学純度が 99.5~99.8%であることを示した。以上の実験で取得したデータと既報データに基づき、固定費、変動費、そして廃棄物処理費を含めた年産 2,000~50,000 トン規模の D-乳酸製造コストを試算したところ、それぞれ 332 円/kg (2,000 トン/年)、225 円/kg (10,000 トン/年)、175 円/kg (50,000 トン/年) であった。

研究開発テーマ 3 では、ポリ乳酸の低エネルギーかつ高効率な新しい製造方法の開発を目標に、乳酸発酵液からのオリゴマー化最適条件を検討した。試薬乳酸を用いて酸触媒など重合触媒の探索を行ったところ、硫酸が最も効果的であり、触媒作用は添加量に依存することを見出した。また、イオン液体を触媒に用いた場合、低触媒量、短時間、低温での反応により重合が進行することも見出した。発酵液の含有成分の反応性に関する知見も蓄積し、重合物の着色と収率が酵母エキス濃度に依存することから、発酵液含有成分による重合への強い阻害作用が示唆された。

研究開発テーマ 4 では、乳酸オリゴマーを出発原料に用いて分子鎖の伸長反応による高分子量化を検討した。固相重合を取り入れることにより、短期に実用レベルの高分子量 D-ポリ乳酸を製造できる目途を立てた。乳酸オリゴマーを簡便かつ安価に製造できれば、固相重合による高分子量ポリ乳酸の変換に対しては従来技術を適用できると考えられた。

研究開発テーマ 5 では、非食用油脂であるヒマシ油に含まれる水酸基を開始点として利用し、スズ系触媒の存在下、分岐状 D-乳酸ポリマーを合成した。モノマーとヒマシ油の仕込み比によって生成物の分子量を制御できた。また、D-乳酸を分岐鎖とする分岐状ポリ乳酸を合成し、L 体ポリ乳酸への添加効果を検討することで、分岐状ポリ D-乳酸がポリ乳酸の結晶核剤として作

用することを示した。さらに、末端水酸基の修飾による機能化を検討したところ、トリメリット酸修飾分岐状バイオポリマーを 5%添加した場合にポリ乳酸の変形を抑制でき、耐熱性が向上することを見出した。末端水酸基の分岐状ポリ乳酸の応用例としては、発泡バイオポリウレタンを作製し、次にフィルム状のバイオポリウレタンの物性を動的粘弾性から評価した。分岐状ポリ乳酸におけるポリ乳酸鎖が長いほどガラス転移温度が上昇し、室温における貯蔵弾性率が増加することを明らかにした。

研究開発テーマ 6 では、D-乳酸発酵液から精製した D-乳酸モノマーと、粗精製発酵液の溶融重合で生成・回収した D-乳酸オリゴマーの評価試験を行った。発酵液から精製した D-乳酸が濃度 90%以上、光学純度 99.7%の高純度品であることを示し、該モノマーの加熱重合により容易に高分子量化できることを示した。粗精製発酵液の溶融重合では、段階的に減圧しながら重合温度を上昇させることで、分子量 1,800~4,500 の D-乳酸オリゴマーが得られた。

以上のように、未利用バイオマスからの安価な D-乳酸製造技術として、発酵プロセスにおいては当初の目標を上回る成果を上げ、さらに分岐状バイオポリマーを使用して PLA の物性・機能を向上させるなど、D-乳酸系ポリマーの新たな展開を示すに至った。本研究成果により、PDLA の原料や PLA の物性を向上する添加剤の製造技術を開発したことから、この技術を植物由来樹脂の用途拡大へと展開することで、地球温暖化の防止とプラスチック産業の発展に貢献することが期待される。