

平成 28 年度採択
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「発酵ナノセルロース(NFBC)の効率的培養方法と
分離精製技術の確立による量産化」

研究開発成果等報告書

平成30年5月

担当局 北海道経済産業局
補助事業者 公益財団法人北海道科学技術総合振興センター
(ノーステック財団)

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	・・・ 2
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	・・・ 4
1-4 当該研究開発の連絡窓口	・・・ 4
第2章 本論	
I.発酵効率化	・・・ 5
II.分離精製	・・・ 6
III.規格化	・・・ 7
IV.販路開拓	・・・ 9
最終章 全体総括	・・・ 10
その他、補助事業の成果に係る発表、報道など	・・・ 11

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

【研究背景】

セルロースナノファイバー（CNF）は、軽量で高い剛性を有し、環境循環型の次世代素材として注目されている。電気やエレクトロニクス分野からは、高強度や高弾性、品質の均一性を満たす材料が求められ、食品・化学・製薬分野からは、分散性、生体適合性と安全性の高い材料が求められている。CNFの製法には、パルプなどの植物セルロースを物理・化学的に微細化する方法と微生物を用いた発酵法がある。前者では、植物（木材）から調製したパルプに対し化学処理、解繊、磨砕等を行うことにより製造される。一方、微生物を用いる後者の方法では、糖蜜（砂糖製造時の副生成物）などを原料とし、その中に含まれる糖分を微生物変換することによって、非常に均一性・分散性の高い発酵ナノセルロースを得ることが出来る。発酵ナノセルロースを生産する微生物は、酢の醸造に用いられている酢酸菌の一種でありナタデココとして食経験がある安全性の高いものである。草野作工では、平成25年から北海道大学大学院工学研究院と共同で発酵ナノセルロースの研究開発を行ってきた。その結果、“繊維が長く均質で緻密な網目構造”を持ち、“高い生体適合性”を特長とする高品質なナノセルロースファイバーの生産性を見出した。その特長を活かして、食品添加物や医薬品原料としての利用、音響材料、デバイス用材料としてのニーズが顕在化しており、発酵ナノセルロースを大量かつ、安定的に供給する技術の確立への期待が高まっている。

【研究目的及び目標】

微生物を用いた発酵ナノセルロースの生産技術は、北海道大学大学院工学研究院と草野作工の独自技術で、生産菌と物質において特許権を取得している。本開発では、発酵ナノセルロースの生産に向け、実用規模スケールでの生産方法の確立、品質管理及び差別化のための分析手法の確立を目的とした。発酵技術では、既存生産菌を用いた発酵の効率化（培養方法・基質添加法などの培養条件）、優れた生産菌のスクリーニングによって生産性を向上させる事を目標とする。発酵液からの分離精製では、発酵液中の固形分濃度や塩類濃度等を調査し、連続分離精製技術を確立し、パイロットスケールでの生産設備での製品供給の安定化を目標とする。また、医薬品、食品、各種工業品など幅広い産業分野で求められる性状や形態は異なる。そのため、製品の規格化や品質安定化のための発酵ナノセルロースの分析手法の確立を目標とした。

I 発酵効率化

発酵ナノセルロースの大量生産にむけた培養条件（温度、攪拌、通気、pH等）を300Lのパイロット規模で検証し、培養プログラム（SOP、Material balance、Time-table）を確立する。培養精度はロット差で±0.5%以内を目標値とし、分散性、粘度で評価する。

II 分離精製

量産を目指した連続遠心技術による処理条件の検討を行い、分離精製効率の向上を目指す。連続遠心分離器の排出方法、沈降性を高めるため、添加物などの条件を検証し、現状 10 日間程かかる分離精製を 1 日以内に連続回収する方法を確立する。

III 規格化

分散性評価及び構造評価に関する各種分析方法を検討し、発酵ナノセルロースの分析・規格化に適した分析条件を決定する。分散性評価については、偏光顕微鏡観察および透過率の測定を行なう。構造評価については、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR)、X 線回折 (XRD)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いる。

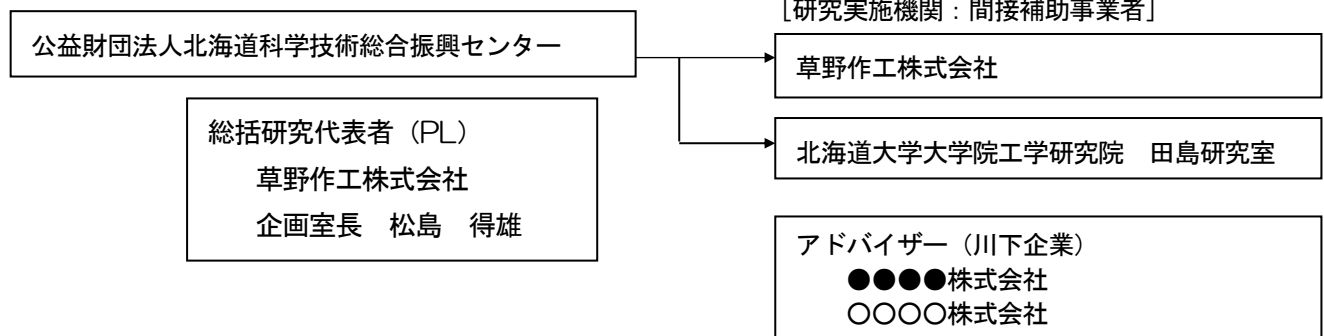
IV.販路開拓

展示会出展等を通して、川下産業のニーズを把握し、見込み顧客となる用途開発企業を発掘する。

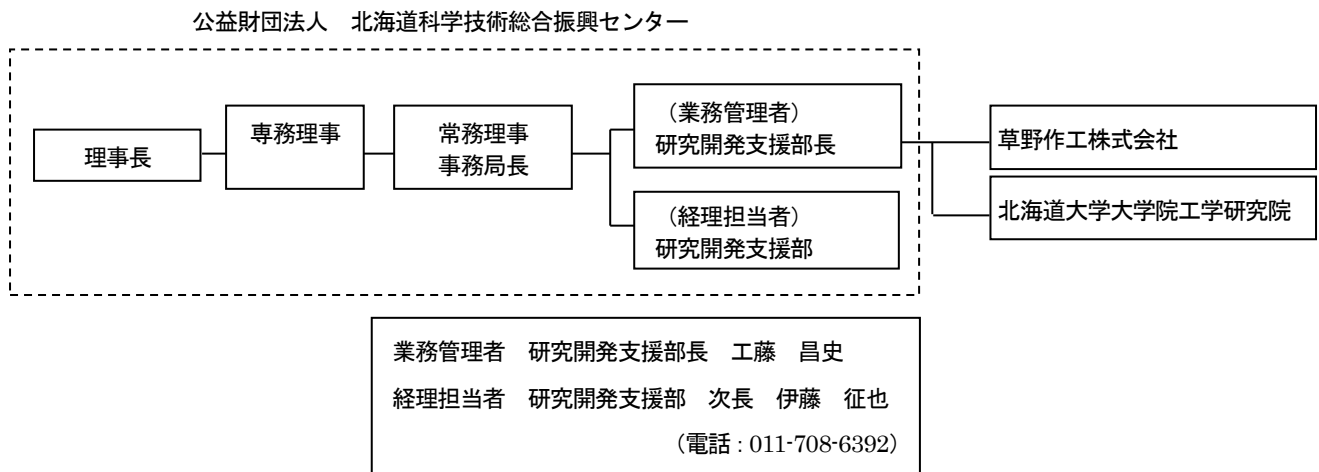
1-2 研究体制

研究組織 (全体)

[事業管理機関：補助事業者]



管理体制



1-3 成果概要

初年度、量産化に向けたパイロットプラント（培養設備）を導入し、培養条件の検証を進めたところ、300L 規模まで培養のスケールアップに成功した。更に、生産性の向上に向けた条件検討を進め、安定的かつ効率的な大量生産方法を確立し、製造マニュアルを策定した。また、2年度目に連続遠心分離機を導入、分離精製条件の検討を進めたところ、革新的な分離条件を確立し、90%以上と十分な回収率を達成できた。パイロットプラントにおける生産量は、初年度で年産3ト見込みであったが、年産5ト程度まで向上する見込みとなった。規格化については、本事業で導入した分子間力顕微鏡によるナノレベルでの構造解析を含めて分散性・構造評価を進め、発酵ナノセルロースの各種分析方法を確立し、分析マニュアルを作成した。これを基に規格化することで、川下企業の製品化を加速することができる。これらの成果により、事業化レベルの生産体制構築に向けて大きく前進した。

販路開拓では、川下企業（用途開発企業）との秘密保持契約締結を結び、サンプル供給を始めた他、引き合いのあった企業との共同開発、交渉を進めることができた。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

企業・団体名	公益財団法人北海道科学技術総合振興センター
所在地	札幌市北区北21条西12丁目コラボほっかいどう
氏名（ふりがな）	伊藤 征也（いとう ゆきや）
所属	研究開発支援部
役職	部長
電話番号	011-708-6392
FAX番号	011-747-1911
E-mail	y-ito@noastec.jp

第2章 本論

I 発酵効率化

I-1：培養条件の評価

発酵ナノセルロースの量産に向けた培養条件（温度、攪拌、通気、pH等）について、5Lスケールのミニファーマンターによる条件検討で基本的なデータ採取をおこない、培地組成及び培養方法について安定的な培養条件を見いだした。



5Lスケール ファーマンター

I-2：スケールアップ条件の評価

ミニファーマンターでの培養試験結果を基に、30L及び300Lファーマンターでのスケールアップ培養試験を実施。生産性と物性について解析（分散性、粘性、繊維径、電子顕微鏡下構造解析等）を行った。5Lスケールと30L、300Lスケールでの培養試験において溶存酸素の動態、pH制御のタイミング、培地成分の推移はほぼ同一で、培養ファクター（通気・攪拌・粘性等）の抽出と培養プログラム化による安定生産方を開発した。スケールアップ培養においても透過率35%以上（特許請求範囲）の分散性を持つ発酵ナノファイバースセルロース製造が可能であることを確認した。



左：30Lファーマンター、右：300Lファーマンターと制御板

I-3：量産性の評価

微生物の培養には、ファーマンターに仕込んだ培地を全量出し入れするバッチ方式と仕込んだ培地のうち、その適量を出し入れする半回分培養法がある。前者は短時間で増殖する微生物の培養に適し雑菌の侵入も少ない。一方、半回分培養法は、培養に時間がかかる場合や、初発の菌体濃度を高め短時間で培養を終結したい場合に適する方法とされる。この際、収率は相対理論培養時間(RRT: relative retention time)を設定しなければならない。また、雑菌の侵入を許す可能性が高い。今回、量産性の向上を目指し、連続大量生産に向けた半回分培養等による連続生産方法の検討を行った。仕込み量に対して一定量を抜取り、新たに一定量のフレッシュ培地を添加する方法で、生産性(乾物生産性、対糖収率)および発酵液の粘性を測定した。その結果、バッチ方式より収率は1.5倍、単位時間あたりの生産性は約2~3倍となることが示された。しかし、粘度は生産量とともに上昇傾向にあり、粘度管理が必要であることが示唆された。また、培養方法の違いによる繊維形状に優位な差は無かった。

また、新規に取得したセルロース合成菌を用いて生産性評価を行った。この菌が作る発酵ナノセルロースは分散性、構造ともに既存菌が合成するものと同様であり、ファーマンターにおける収量は既存菌よりも高かった。16SrDNAシーケンス解析、生理・性状試験の結果から、新規取得菌は *Komagataeibacter* sp. に同定された。生産性の高い菌株を使用する事により更なる生産性向上の可能性が示された。

II. 分離精製

II-1：分離条件の評価

大量生産に見合った分離精製技術の確立に向けて、連続遠心分離機を導入し、発酵ナノセルロースの分離精製条件の最適化を行った。300L発酵槽で作られた培養液を殺菌処理後、連続分離精製を試みた。その結果、培養液の希釈率、通液時間と排出間隔を適切に管理することにより通液条件を安定化させることで、連続回収が可能であることが分った。その他、添加物と添加条件による回収率向上を思案し、塩濃度(NaCl、KCl)による沈降係数の増加を検討したが、良い結果は得られなかった。



連続遠心分離機

II-2：回収率の向上

排出液の塩濃度、温度などの管理条件を詳細に検討し、回収率を向上させるための要因特定を試みた。その結果、通常法では1パス目、2パス目で5~20%のゾル回収であったが、通液管理を厳密化（詳細についてはノウハウのため記載しない）することにより1パス目、2パス目の回収率は50%、3パス目においては10%→30%のゾル回収率の向上となり、歩留まり90%以上で発酵ナノセルロースを回収することに成功した。分離機からの排出圧による物性変化について、電子顕微鏡での構造解析で確認したが、繊維形状に優位な差は見られなかった。

III. 規格化

偏光顕微鏡観察及び透明率測定による分散性評価と、本事業で導入した原子間力顕微鏡、その他、X線回折などにより構造評価を実施することで、発酵ナノセルロースの構造的特徴を見出す事ができた。

偏光顕微鏡観察および透過率の測定による分散性評価、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR)、X線回折 (XRD)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、原子間力顕微鏡 (AFM) による構造評価のそれぞれの方法を以下に示す。

偏光顕微鏡観察

発酵ナノセルロース分散液を0.100 wt %に希釈し、分散液50 μ Lをマイクロピペットで取りスライドガラス上に塗布して105 °Cで乾燥し水を除去した。その後、光学顕微鏡 BX40 OLYMPUS 及びポラライザー・アナライザーを用い、倍率200倍で偏光顕微鏡観察を行った。観察には倍率10倍の接眼レンズ及び倍率20倍の対物レンズを用いた。

透過率測定

発酵ナノセルロース分散液を0.100 wt %に希釈した。Milli-Q水を参照サンプルとして、HITACHI紫外可視分光光度計 U-2001 を用い、波長500nmにおける透過率を測定した。

FT-IR 解析

発酵ナノセルロース分散液を0.100 wt %に希釈し、20 μ Lをシリコン板状にキャストしてインキュベーター内 (37 °C) にて風乾した。水を除去した後、JASCO FT/IR-4000 を用いて測定波長域：500 ~ 4000 cm^{-1} 、積算回数：16回の条件でFT-IRスペクトルを測定した。得られた各発酵ナノセルロースのスペクトルは、BCの1161.9 cm^{-1} (β 1,4-グリコシド結合、C-O) のAbsorbanceの値を用いて規格化を行った。

XRD 解析

多糖吸着 BC をテフロンシート上に移し、40 °Cで乾燥した。風乾後、生成物を Si 無反射試料板に

固定し、Rigaku RINT2000 を用いて測定を行った。(測定条件：電流 20 mA、電圧 40 kV、測定範囲 $2\theta = 5 \sim 30^\circ$ 、スキャン速度 $3^\circ / \text{min}$ 、積算回数 3回)

TEM 観察

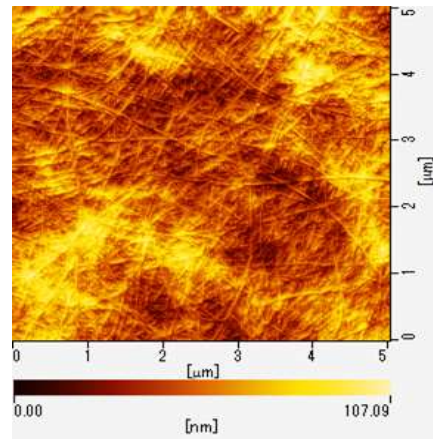
発酵ナノセルロース 分散液及び BC 離解液を 2.0×10^{-4} wt % に希釈した。100 メッシュ銅グリッド上にホルムバル膜を張り、希釈した発酵ナノセルロース 分散液及び BC 離解液を $5 \mu\text{L}$ 添加し、 37°C で一晩乾燥した。3 (w/v)% 酢酸ガドリニウム溶液 $2 \mu\text{L}$ 添加して繊維を染色し、余剰の酢酸ガドリニウムをろ紙で拭き取り、Milli-Q 水 $5 \mu\text{L}$ を添加し、ろ紙で拭き取る操作を 2 回行い洗浄した。その後、汎用 200 kV 透過型電子顕微鏡 JEM-2000FX により加速電圧 80 kV、倍率 80,000 倍の条件で観察を行った。

AFM 観察

発酵ナノセルロース分散液を 0.05wt% に希釈し、マイカ基板上にキャストした。 30°C で乾燥し、HITACHI AFM5100N を使い、ダイナミックフォースモード (DFM) における観察を行った。



左：顕微鏡本体 右：解析装置と操作・表示用 PC



AFM により取得した NFBC 画像。

今後調製した発酵ナノセルロースについては、これらの分析を行うことによって、用途毎に規格化を行う。そのため、研究成果を基に分析マニュアルを作成した。【添付：分析マニュアル参照】

用途 (ユーザー) 毎のニーズに合わせた発酵ナノセルロースとして、生産に使用するカルボキシメチルセルロース (CMC) の代わりに、両親媒性セルロース誘導体であるヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を用いることにより、両親媒性発酵ナノセルロース (HP-NFBC) を調製することに成功した。HP-NFBC は、メタノール、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフランなどの極性有機溶媒に対して分散性を示し、発酵ナノセルロースの用途拡大に寄与すると考えられる。得られた HP-NFBC について、上述の方法による解析を行った。HP-NFBC は CM-NFBC と同様に高い分散性を示しが、繊維幅につ

いては若干太いことが分かった。XRD 解析の結果、HP-NFBC は静置培養で得られた BC と同様なピークプロファイルを示し、マイクロフィブリルの凝集が CMC に比べて進行していることが示唆された。

輸送手段については、川下企業へのサンプル提供（輸送）や安全性試験サンプルの輸送及び検査を通して、密閉した状態で加熱殺菌する有効な条件を見出した。

IV. 販路開拓

展示会出展等のマーケティングを通して、本事業計画におけるアドバイザー企業以外の幅広い産業分野に本技術のプロモーションを行い、新たな川下企業（用途開発企業）を発掘した。セルロースナノファイバー関連の展示会では、パルプ由来のセルロースナノファイバーが主流となっており、発酵法によるナノセルロースファイバーの出展は唯一であったため注目度は高く、多くの企業と具体的な引き合いにつながる成果があった。5 回以上の展示会出展を行い、25 社を超える企業から具体的な引き合いがあった。現在、10 社以上との秘密保持契約の締結に至っている。

以上のように非常に多くの引合いがあり、複数社と今後の具体的な展開について交渉を始めている。そのため、本格的な事業化に向けた量産設備の導入に向けて検討を開始した。

最終章 全体総括

パイロットプラントにおける安定的かつ効率的な生産方法を見出し、製造マニュアルを策定した。効率的な培養方法をマニュアル化することで、生産量の増加、生産時間の短縮、品質の安定化を実現している。また、分離精製においては、革新的な分離条件を見出し、回収率を90%以上に向上させることができた。全体として生産性は向上し、パイロットプラントの生産能力は、当初の年産3トという見込みから、年産5ト程度まで向上する見込みである。また、分析マニュアルを策定したことにより、今後製造する発酵ナノセルロースを規格化し、物性や品質等の均一性を担保することで、川下企業の製品化を加速することができる。これらの成果により、事業化レベルの生産体制構築に向けて大きく前進した。

また、「販路開拓」では、ふじのくにCNFフォーラムを始め、CNF展示会や先端材料技術展・インターフェックス大阪など、多くの展示会に参加し、25社を超える具体的な引合いがあった。特に、付加価値の高い医療・化粧品分野からの注目が強く、今後のサンプル提供や共同開発など、事業化に向けた具体的展開を調整している。発酵セルロースはナタデココとしての長い食経験があるが、今回、自社で安全性試験を実施して十分な安全性データが得られたことから、事業化の取組は加速している。

経済産業省で実施されたセルロースナノファイバーに関する調査によると、2030年までにナノセルロース市場の規模が1兆円/年になると予想されており、次世代の繊維素材として、我が国の産業競争力強化に貢献するものと考えている。本事業成果が、その一端を担う可能性があると考えている。

その他、補助事業の成果に係る発表、報道など

講演会、学会発表

- 田島健次、低分子バイオマスを原料としたナノフィブリル化バクテリアセルロースの大量生産、2016年度 生物工学会北日本支部札幌シンポジウム「低炭素化社会に資する最先端バイオリファイナリー研究」、平成 28年9月2日、札幌
- 楠元領、磯野拓也、佐藤敏文、田島健次、ナノフィブリル化バクテリアセルロースの表面改質とその材料 応用、第65回高分子討論会、平成28年9月14日、横浜
- 穴井ひかる、高橋佳奈、藤田彩華、甲野裕之、田島健次、ナノセルロースの表層疎水化に関する研究、第 51回高分子学会北海道支部研究発表会、平成29年1月19日、札幌
- 高橋佳奈、穴井ひかる、藤田彩華、甲野裕之、田島健次、ナノセルロース表層上でのシクロデキストリング ラフト化とそのゲスト分子認識能、第51回高分子学会北海道支部研究発表会、平成29年1月19日、札幌
- 石井亨、村野玲奈、大場淳矢、楠元領、松島得雄、磯野拓也、佐藤敏文、田島健次、新規取得菌によるナ ノフィブリル化バクテリアセルロースの生産性評価、第51回高分子学会北海道支部研究発表会、平成29年 1月19日、札幌
- 田島健次、バクテリアを用いたナノセルロースのボトムアップ生産、セルロースナノフォーラム第10回技 術セミナー、平成29年7月6日、東京
- 田島健次、バクテリアを用いた発酵ナノセルロース (NFBC) の調製とその応用、バクテリア・ナノセル ロース勉強会、平成29年11月17日、京都
- Kenji Tajima, One-step production of amphiphilic nano-fibrillated cellulose using a cellulose-producing bacterium, The 3rd International Symposium on Bacterial Nano Cellulose, Oct. 16, 2017, Fukuoka
- Yukari Numata, Hiroyuki Kono, Minato Tsuji, Kenji Tajima Structural and Mechanical Characterization of Bacterial Cellulose Composite Hydrogels, The 4th International Cellulose Conference, Oct. 18, 2017, Fukuoka
- Shingo Nojima, Kayoko Ohuchi, Ayumi Fujishima, Koji Kato, Nobutaka Shimizu, Kento Yonezawa, Kenji Tajima, Min Yao, The structure analysis of flexible tandem repeat domain of cellulose synthase subunit C, The 4th International Cellulose Conference, Oct. 18, 2017, Fukuoka
- Ko Ishii, Junya Ohba, Ryo Kusumoto, Takuya Isono, Toshifumi Satoh, Kenji Tajima, Functionalization of nano-fibrillated bacterial cellulose via selective amide linkage formation by condensation reaction, The 4th International Cellulose Conference, Oct. 18, 2017, Fukuoka
- 梶田悠介、山本拓矢、磯野拓也、佐藤敏文、田島健次、縮合反応を用いたナノフィブリル化バクテリアセ ルロースへの機能性タンパク質の導入、第52回高分子学会北海道支部研究発表会、平成30年1月15日、 札幌
- 宇野大輝、岸本亮太、甲野裕之、松島得雄、磯野拓也、佐藤敏文、田島健次、ナノフィブリル化バクテリ アセルロースの選択的表層疎水化、第52回高分子学会北海道支部研究発表会、平成30年1月15日、札幌
- 田島健次、セルロース合成菌を用いたナノフィブリル化セルロースの大量生産とその応用【特別シンポジ ウム】ナノセルロースの技術開発最前線、平成30年2月15日、東京
- 田島健次、バクテリアを用いたナノセルロースの大量生産とその応用、北見工大バイオ関連セミナー、平 成30年2月23日、北見

新聞報道

- 化学工業日報、「酢酸菌由来安全性に強み」、平成 29 年 2 月 20 日掲載
- 北海道新聞、「発酵ナノセルロース」量産模索、平成 29 年 2 月 22 日掲載
- 北海道建設新聞、「発酵ナノセルロース試験生産開始」、平成 29 年 3 月 3 日掲載
- 日本経済新聞、「新繊維、量産技術確立急ぐ」、平成 29 年 3 月 21 日掲載
- 日刊工業新聞、「発酵ナノセルロース量産 草野作工・北大 量産体制を整備」、平成 29 年 5 月 11 日掲載
- 日刊工業新聞、「草野作工、発酵ナノセルロース販売 年 200 トン製造体制目指す」、平成 30 年 2 月 12 日掲載

日刊工業新聞 平成30年2月12日(月) 第3種郵便物認可



発酵ナノセルロースの試験製造設備

発酵ナノセルロース投入

草野作工 年200トン製造体制目指す

【札幌】草野作工（北海道江別市、草野貴友社長、011-382-2135）は、新素材「発酵ナノセルロース（NFBC）」の販売に乗り出す。価格はアルペーの濃度1%で、1㎡が1000円（消費税抜き）。年間100トンの需要が見込めれば、年200トンを製造できる体制を築く。その際は5億5000万〜6億円程度の設備投資に踏み切る構えだ。

まずNFBCの量産に向けた準備として、江別RTNパーク（北海道江別市）の敷地面積約1万3000平方メートルの用地について取得契約を交わした。取得額は5400万円。2月下旬開催の江別市議会で正式承認される見通し。

取得した用地は社内会議など「もう一つのNF」と異なり、主にテナ

本社機能として使用することも検討する」（草野社長）。

NFBCは鋼鉄の5分の1の軽さで5倍以上の強度があるセルロースナノファイバー（CNF）の一種。草野作工と北海道大学が北海道発の素材として研究開発を進めてきた。パルプ由来のCN

サイといった農作物を原料に使うため、医療や食品分野への展開も期待されている。

北大の田島健次准教授らが酢酸菌の発酵を生かす独自の製法を開発した。主にテンサイから砂糖を製造する工程で発生する糖蜜を発酵させて生産する。

草野作工は発酵・遠心分離で回収効率の向上などを目指し、300リットルの発酵槽を設けるなど試験製造を続けている。