

## 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

公募区分：革新型研究開発（若手枠）

研究実施期間：令和3(2021)年度～令和5(2023)年度

課題番号：【1RF-2105】

体系的番号：(JPMEERF20211R05)

研究課題名：「メタンを炭素源とする有価物生産システムの構築に向けた微生物培養と晶析技術の開発」

Research Title: Development of Microbial Cultivation and Crystallization Strategies for the Production of Valuable Materials Using Methane as a Carbon Source.

研究代表者名：甘利 俊太郎

研究代表機関名：東京農工大学

研究分担機関名：広島大学

研究領域：統合領域

キーワード：メタン、メタン酸化細菌、エクトイン、晶析、連続プロセス

令和6（2024）年5月

## 目次

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書.....      | 1  |
| [課題概要].....                   | 3  |
| 1. はじめに(研究背景等).....           | 6  |
| 2. 研究開発目的.....                | 6  |
| 3. 研究目標.....                  | 7  |
| 4. 研究開発内容.....                | 8  |
| 5. 結果及び考察.....                | 15 |
| 6. 目標の達成状況と環境政策等への貢献.....     | 38 |
| (1) 研究目標の達成状況.....            | 38 |
| (2) 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献..... | 41 |
| 7. 研究成果の発表状況.....             | 44 |
| (1) 成果の件数.....                | 44 |
| (2) 誌上発表.....                 | 44 |
| (3) 口頭発表.....                 | 45 |
| (4) 知的財産権.....                | 47 |
| (5) 「国民との科学・技術対話」の実施.....     | 47 |
| (6) マスメディア等への公表・報道等.....      | 47 |
| (7) 研究成果による受賞.....            | 47 |
| (8) その他の成果発表.....             | 47 |
| 8. 国際共同研究等の状況.....            | 47 |
| 9. 研究者略歴.....                 | 48 |
| Abstract.....                 | 49 |

別紙 公募審査・中間評価等への対応

## [課題概要]

## &lt;課題情報&gt;

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 公募区分：                 | 革新型研究開発（若手枠）                              |
| 研究実施期間：               | 令和3（2021）年度 ～ 令和5（2023）年度                 |
| 課題番号：                 | 【1RF-2105】                                |
| 研究課題：                 | 「メタンを炭素源とする有価物生産システムの構築に向けた微生物培養と晶析技術の開発」 |
| 研究代表者：                | 甘利 俊太郎（東京農工大学、助教）                         |
| 重点課題（主）：              | 【重点課題④】環境問題の解決に資する新たな技術シーズの発掘・活用          |
| 重点課題（副）：              | 【重点課題⑦】気候変動の緩和策に係る研究・技術開発                 |
| 行政要請研究テーマ<br>（行政ニーズ）： | 非該当                                       |
| 研究領域：                 | 統合領域                                      |

## &lt;キーワード&gt;

|         |
|---------|
| メタン     |
| メタン酸化細菌 |
| エクトイン   |
| 晶析      |
| 連続プロセス  |

## &lt;研究体制&gt;

サブテーマ1 「メタン酸化細菌による有価物生産に向けた技術開発」

## &lt;サブテーマ1 リーダー及び研究分担者&gt;

| 機関名  | 部署名        | 役職名 | 氏名    | 参画期間 |
|------|------------|-----|-------|------|
| 広島大学 | 先進理工系科学研究科 | 助教  | 末永 俊和 |      |

## ＜サブテーマ1 研究協力者＞

| 機関名  | 部署名        | 役職名 | 氏名                        |
|------|------------|-----|---------------------------|
| 広島大学 | 先進理工系科学研究科 | 学生  | 二宮 竜<br>(2022. 4-2024. 3) |

## サブテーマ2 「夾雑物から高純度な有価物を得るための晶析プロセスの開発」

## ＜サブテーマ2 リーダー及び研究分担者＞

| 機関名    | 部署名      | 役職名 | 氏名     | 参画期間 |
|--------|----------|-----|--------|------|
| 東京農工大学 | 大学院工学研究院 | 助教  | 甘利 俊太朗 |      |

## ＜サブテーマ2 研究協力者＞

| 機関名    | 部署名       | 役職名 | 氏名                          |
|--------|-----------|-----|-----------------------------|
| 東京農工大学 | 工学府応用化学専攻 | 学生  | 宇野 沙映<br>(2021. 4-2023. 3)  |
| 東京農工大学 | 工学府応用化学専攻 | 学生  | 笠井 つばさ<br>(2022. 4-2024. 3) |
| 東京農工大学 | 工学府応用化学専攻 | 学生  | 細川 真子<br>(2022. 4-2024. 3)  |
| 東京農工大学 | 工学府応用化学専攻 | 学生  | 大橋 沙李<br>(2022. 4-2023. 3)  |

## ＜研究経費（間接経費を含む）＞

| 年度   | 直接経費       | 間接経費      | 経費合計       |
|------|------------|-----------|------------|
| 2021 | 4, 155 千円  | 1, 245 千円 | 5, 400 千円  |
| 2022 | 4, 155 千円  | 1, 245 千円 | 5, 400 千円  |
| 2023 | 4, 163 千円  | 1, 237 千円 | 5, 400 千円  |
| 合計   | 12, 473 千円 | 3, 727 千円 | 16, 200 千円 |

## <研究の要約>

メタン発酵により生成したバイオマス由来のメタンは主に燃料として利用されている。しかし、メタンを燃料として利用する場合、小規模な設備では経済的メリットが少ない。持続可能な社会の実現に向け、メタン発酵技術の普及と未利用バイオマスの活用を促進するためには、バイオマス由来のメタンの新たな利用価値の創出が求められる。

本研究では、メタン酸化細菌を利用してメタンから高付加価値な物質として知られるエクトインを製造するプロセスをロールモデルとして採用し、微生物の代謝機能を利用してメタンから有価物を生産する新たな製造プロセスの開発を目指した。具体的には、メタン酸化細菌によるエクトインの生産に向けた合成プロセスの技術開発と、分離精製プロセスの晶析にて所望の特性を有するエクトインの結晶粒子群を獲得するための操作条件を検討した。

調査の結果、メタン酸化細菌の増殖速度やエクトインの生成量に対する培養時の窒素源と塩濃度の影響が明らかとなり、合成プロセスにてエクトインの生産量が最大となるメタン酸化細菌の培養条件を見出した。さらに、バイオガス中の硫化水素がメタン酸化細菌の増殖速度やエクトインの生成量に及ぼす影響も明らかにした。また、生産性の律速要因として報告されている晶析工程での操作条件がエクトインの結晶粒子群特性に及ぼす影響を明らかにし、エクトインの結晶粒子群特性を制御するために重要な操作条件を見出すことができた。さらに、生産性の向上と環境負荷低減の観点から、合成プロセスではメタン酸化細菌用の連続通気リアクターの作製を試み、分離精製プロセスでは連続式晶析装置の操作条件と結晶粒子群特性との関係や、収率の改善が見込まれる新たな晶析手法を開発した。

得られた成果は、未利用バイオマスの活用やメタン発酵技術の普及促進に関する資源循環政策や、製造プロセスの連続化に基づく持続可能なものづくりや脱炭素化政策への貢献が期待される。

## 1. はじめに（研究背景等）

地球温暖化に起因する気候変動は昨今急速に顕著化している。2023年に公表されたIPCC AR6では、人間活動による温室効果ガスの排出によって地球温暖化が引き起こされたことは疑う余地がないと結論づけられた。さらに、1850～1900年を基準とした世界平均気温は既に1.1℃の温暖化に達し、人為的な気候変動が広範な悪影響を及ぼしていることも示されている。実際、日本各地で豪雨や酷暑といった極端現象が頻発しており、その対策の喫緊性は一般社会でも広く認識されている。

2013年に公表されたIPCC AR5では、2100年の時点で地球全体の気温上昇を最小限に抑えるシナリオ（RCP 2.6）を達成するためにCO<sub>2</sub>等の温室効果ガス（GHG）の排出を実質ゼロからマイナスにすることが求められると示され、これを踏まえたパリ協定が2015年に締結された。さらに、2023年に公表された先述のIPCC AR6では、1.5度に気温上昇を抑えるためには2035年までに世界全体のGHGの排出量を2019年比で60%削減する必要があることを指摘している。日本は2021年の気候サミットにて、2030年度のGHG排出量を2013年度比で46%削減する目標を示しており、温暖化防止に向けた実効性の高い政策と共に、これまでの通説や常識を打破する新技術の開発が望まれる状況である。

CO<sub>2</sub>に次いで排出量が多く、CO<sub>2</sub>の25倍（GWP換算）の温室効果能力を有するメタンも同様に排出量削減技術の開発が求められるが、その対策は進んでいない。一方メタンは、バイオマスからエネルギー回収を担える物質でもあり、世界的にも利用が進められている。ただしメタン発酵施設は、大規模で実施しなければバイオマスの集約や維持管理にコストがかかり、生成したメタンの用途も主に燃料と限られるため、日本では思うように普及していない現状である。少量のメタンからも高付加価値を創出する手法やプロセスの開発が実現すれば、小規模なメタン発酵設備の普及に繋がり、バイオマス由来としてカーボンフットプリントゼロ、さらにはマイナスの要素（未利用バイオマスへの適用や既往技術との置き換え）として炭素の循環サイクルに組み込むことが可能である。しかし、メタンの利用の難しさから有価物生産は未だ研究段階であり、実用化には至っていない。さらに、微生物代謝物から有価物を分離・精製する技術も改善の余地があり、高純度な有価物を低コスト且つ効率的に獲得するための技術革新が求められる。

## 2. 研究開発目的

メタン酸化細菌の代謝機能を利用して、メタンを有価物の炭素源としてカーボンフットプリントゼロで再び炭素循環系に乗せるコンセプトを提案し、その実証を目的とする。具体的には、バイオマス由来のメタンから新たな利用価値を創出するために、メタン酸化細菌による有価物生産に向けた技術開発（サブテーマ1）と、夾雑物から高純度な有価物を得るための晶析プロセスの開発（サブテーマ2）の2つのテーマを設定し、提案するコンセプトの実証を目指す。本研究では、高塩耐性メタン酸化細菌が合成し、環状アミノ酸の一種であるエクトインを有価物のターゲットとする。エクトインは保湿効果や生体由来の物質の安定化など、生物にとって有用な機能を多数有し、市場価格も高いことから収益性の高い物質である（図1）。そこで、サブテーマ1では、化学工学と環境微生物学の観点から、メタンの高効率利用を可能とする新規バイオリクターを開発、培養条件や微生物代謝に基づいた有価物回収方法などを検討することで、有価物を安定して生産する新たな技術の開発を目指す。サブテーマ2では、結晶化学の視点に基づき、サブテーマ1で生成した有価物を夾雑物中から結晶化させ、製品として分離・精製するための具体的な晶析操作の設計指針を見出す。

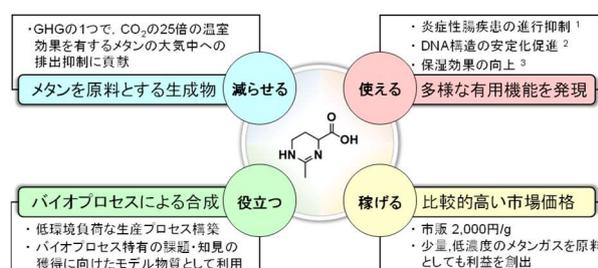


図1 本研究課題で有価物として着目したエクトインが有する性質

[1] Bethlehem, L. *et al.*, *Pharmacol. Res.*, 164, 105389 (2021). [2] Schnoor, M. *et al.*, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 322 (3), 867-872 (2004). [3] Graf, R. *et al.*, *Clin. Dermatol.*, 26 (4), 326-333 (2008).

## 3. 研究目標

|      |   |
|------|---|
| 全体目標 | <p>微生物を利用して有価物を安定的な生産を可能にする新技術の開発と、その有価物を夾雑物から単離、精製する操作指針を確立することによって、本研究が提案するコンセプトの実証と実現可能度の評価を目指す。</p> <p>本研究ではロールモデルとして、メタンからエクトインを合成、分離、精製するプロセスを採用した。</p> <p>具体的には、微生物学の観点からメタン酸化細菌を利用して、メタンからエクトインを高効率で生産するための技術開発を目指す。さらに、結晶化学の知見を利用し、エクトインと抽出時に混入した不純物を含む夾雑物からエクトインのみを単離、精製するための操作指針の確立を図る。</p> <p><u>初年度：微生物による有価物の生産、ならびに結晶化による分離手法の確立</u></p> <p>初年度では、有価物の合成ならびに分離・精製の各工程にて、基盤となる動力学的パラメータや物性データの収集と、操作条件が生成物の状態に及ぼす影響を明らかにする。具体的には、サブテーマ1でエクトインが生産される微生物の代謝機能を促進する条件を探索し、メタンからエクトインを生産する方法を見出す。更に、専用のバイオリアクターを作製し、メタン酸化細菌の高密度培養を試みる。サブテーマ2では生成したエクトインを結晶として単離することを目指し、晶析操作を設計する上で基礎的なデータであるエクトインの多成分相図の作図と、エクトインの結晶粒子群の品質と晶析操作の相関関係を解明する。</p> <p><u>次年度：有価物の生産工程と分離・精製工程の融合</u></p> <p>メタン酸化細菌からのエクトイン回収プロセスの検討と、生成したエクトインを夾雑物から結晶粒子群として分離する手法の確立を目指す。サブテーマ1では、メタン酸化細菌細胞内に蓄積しているエクトインを意図的に放出させる培養条件の選定、並びにプロセスとして運転する際のシーケンス操作手法の検討を行い、エクトインの回収技術の確立を行う。また、サブテーマ2では、前年度に作成した多成分相図を利用し、サブテーマ1で得られたエクトインを含む培養液（原料溶液）中から、エクトインの結晶を得るために適切な晶析操作指針を検討する。さらに、原料溶液に含まれる不純物が結晶“粒子群”の品質に与える影響を解明し、サブテーマ1へフィードバックして、高品位な有価物の結晶粒子群を獲得するための回収環境条件や操作の設計指針を検討する。</p> <p><u>最終年度：メタンの新たな利用先プロセスとしての実現可能性に関する評価</u></p> <p>最終製品として想定される有価物の結晶粒子群の生産効率向上を目指し、各工程にて操作の設計指針の最適化を図る。高効率化や省エネルギー化に向け、原料の供給から有価物を製造するプロセスの連続化等を検討する。さらに、本プロセスによる環境負荷やコストを概算し、本研究が提案するコンセプトが達成された場合に見込まれるGHG排出量の削減を考慮した上で社会的インパクトを明らかにする。本研究が提案するバイオマス由来のメタンガスから高付加価値の製品を生み出すコンセプトのロールモデルの実証を目指すと共に、今後に向けて事業化した場合の課題等を洗い出す。</p> |
|------|---|

|             |  |
|-------------|--|
| サブテーマ1      | メタン酸化細菌による有価物生産に向けた技術開発  |
| サブテーマ1 実施機関 | 広島大学   |
| サブテーマ1目標    | <ul style="list-style-type: none"> <li>供給メタンの80%程度を微生物により消費することを目標とする、高効率な中空糸ガス透過膜バイオリアクターを作製し、メタン酸化細菌の高密度培養を達成する(初年度)。</li> <li>純菌株を用いた基礎的な生理活性評価によって増殖速度等の知見を得ることで、リアクターの運転パラメータを策定する(初年度)。</li> </ul> |

|  |  |
|--|--|
|  | <ul style="list-style-type: none"> <li>メタン酸化細菌からのエクトイン回収時の培養条件の選定を行う。塩濃度をシークエンス的に変化させることで、エクトインをどの程度細胞からバルク液中に放出されるのか明らかにする。更に、再びエクトインが細胞内に蓄積される期間(回復期間)も明らかにすることで、培養と回収のサイクルを確立する(次年度)。</li> <li>回収工程における夾雑物の混入をできるだけ少なくするよう有価物回収運転を最適化する(次年度-最終年度)。</li> <li>供給メタンに対する回収・精製工程でのエクトインの収率を明らかにする(次年度-最終年度)。</li> <li>プロセス全体としての炭素の物質収支、エネルギー推定消費量を推算し、環境影響評価にかけることで本コンセプトの実現可能性や、GHG 排出量の削減効果に対する寄与を明らかにする(最終年度)。</li> </ul> |
|--|--|

|             |  |
|-------------|--|
| サブテーマ2      | 夾雑物から高純度な有価物を得るための晶析プロセスの開発  |
| サブテーマ2 実施機関 | 東京農工大学   |
| サブテーマ2目標    | <ul style="list-style-type: none"> <li>所望の結晶粒子群を得るための晶析操作を設計する上で基盤データとなるエクトインを含む多成分相図を新たに作成する。また、エクトイン-水の単純な二成分系から得られる純粋なエクトインの結晶粒子群の品質を明らかにする(初年度)。</li> <li>サブテーマ1から供給される原料溶液から晶析操作により、目的成分であるエクトインの結晶粒子群を獲得する。さらに、多成分相図を利用して、得られたエクトインの結晶粒子群品質(純度・粒径・粒径分布・形態等)と晶析操作の相関関係を解明する(初年度-次年度)。</li> <li>培養後の溶液中に含まれる不純物をリストアップし、各不純物存在下で析出させたエクトインの結晶粒子群の品質がどの程度変化するか明らかにする(次年度)。</li> <li>不純物の影響を考慮し、実際の原料溶液中に含まれるエクトインを、製品として安全性を満たし、従来法と同程度の純度(98%)を有する結晶粒子群として分離・精製するために晶析プロセスを確立する(次年度-最終年度)。</li> <li>前年度までに得られた操作条件に基づいて、連続式晶析装置の攪拌条件や冷却速度、滞留時間等を設計し、プロセスシミュレータを用いて、エクトインの粒子群を連続で製造可能なプロセスフローシートを作成する(最終年度)。</li> </ul> |

#### 4. 研究開発内容

< 【サブテーマ1】 「メタン酸化細菌による有価物生産に向けた技術開発」の研究開発内容 >

サブテーマ1の研究開発計画に則り、以下の通り検討を実施した。大きく回分試験による培養条件の検討と、中空糸ガス透過膜を利用した連続通気リアクターで培養した場合の検討を行った。

##### 4.1.1 メタン酸化細菌の培養条件の検討 (回分実験)

###### 4.1.1.1 塩濃度、窒素源、増殖フェーズによる菌体増殖傾向とエクトイン蓄積量

###### 4.1.1.2 エクトイン回収ステップの検討と菌体の再利用性の検証

##### 4.1.2 連続通気リアクターでの培養可能性の検討 (リアクター実験)

###### 4.1.2.1 連続通気リアクターでの培養の確認と窒素源の影響

また、採択時のコメントと、研究の進行に伴い検討の必要性が生じたため、下記の項目を連続通気リアクターで検討した。

#### 4.1.1.3 硫化水素のメタン酸化細菌とエクトインに対する影響評価(回分)

#### 4.1.2.2 メタンの間欠供給による菌体収率の改善の試み (リアクター)

### 培養条件の検討

- 塩濃度の影響 (4.1.1.1)
- 窒素源の影響 (4.1.1.1)
- 増殖フェーズの影響 (4.1.1.1)
- 回収ステップにおける溶出液塩濃度 (4.1.1.2)
- 回収ステップにおける溶出時間 (4.1.1.2)
- エクトイン回収後の菌体の再利用性(4.1.1.2)
- 硫化水素の影響 (4.1.1.3)

### 連続培養に向けた検討

- 連続通気リアクターでの培養の確認と窒素源の影響(4.1.2.1)
- 間欠供給によるメタン利用量削減の試み (4.1.2.2)

以後それぞれの実施内容を説明する。

#### 4.1.1 メタン酸化細菌の培養条件の検討 (回分実験)

##### 4.1.1.1 菌体収率、塩分濃度の増殖への影響の把握

エクトインはある程度の塩存在下で好氣的にメタンを酸化することで増殖し、その際に菌体の高塩濃度からの防御機構の一つとしてエクトインの蓄積が報告されている。菌体のポテンシャル把握として、消費されたメタン当たりの菌体収率を確認した。また、塩分濃度がメタン酸化細菌の増殖に与える影響を確認した。エクトイン蓄積量エクトインの蓄積や菌体への大きな影響が考えられる因子として、塩濃度と添加する窒素源が挙げられる。また、菌体の増殖フェーズ (対数増殖期、もしくは停滞期) によってエクトインの蓄積量が変わっているのか明らかにした。連続的に菌体増殖を追跡できる装置と、密閉容器による回分試験を実施した。

##### 4.1.1.2 エクトイン回収ステップの検討と菌体の再利用性の検証

メタン酸化細菌を連続培養に供した際に蓄積したエクトインの菌体内からの回収が課題となる。既往の研究でバルク液の塩濃度を低下させることで、菌体内のエクトインが菌体外に放出されることが報告されている。本研究ではその条件を明らかにすることで、連続培養プロセスでこの機構を利用可能か検討した。また、エクトインを回収後の菌体を再び培養に供した場合、菌体増殖とエクトインの再蓄積が可能か検証した。

##### 4.1.1.3 硫化水素のメタン酸化細菌とエクトインに対する影響評価

メタン酸化細菌の基質となるメタン供給源として、バイオマス等のメタン発酵プロセス由来のメタンの利用も想定できる。一方で発酵プロセス由来のメタンには硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) が含まれているため、これがメタン酸化細菌の増殖やエクトイン蓄積に悪影響を与えないか評価した。

#### 4.1.2 連続通気リアクターでの培養可能性の検討

#### 4.1.2.1 連続通気リアクターでの培養の確認と窒素源の影響

中空糸ガス透過膜を利用した連続培養装置でメタン酸化細菌を培養する場合の課題を抽出するため、メタンと空気を連続通気可能な培養装置を作製した。メタン酸化細菌を培養し供給メタン量に対する菌体収量等を明らかにした。また、回分試験にて明らかになった窒素源( $\text{NH}_4^+$ または  $\text{NO}_3^-$ )の違いによるエクトイン蓄積量の違いを連続通気リアクターでも再現可能か試験した。

#### 4.1.2.2 メタンの間欠供給による菌体収率の改善の試み

上記の連続通気リアクターによる試験により供給メタンあたりの菌体収率が低い課題が新たに挙げられた。そこで、メタンを使用された分だけ供給するような間欠供給を試み、その場合の菌体収率の向上を試みるとともに、エクトイン蓄積量への影響を明らかにした。

### <【サブテーマ2】「夾雑物から高純度な有価物を得るための晶析プロセスの開発」の研究開発内容>

サブテーマ2では、当初の研究計画に則って検討を実施し、主な研究開発内容は大きく分けて下記の5項目である。

#### 4.2.1 晶析操作を設計する上で有用なエクトインを含む多成分相図の作成

#### 4.2.2 単純な二成分系から得られるエクトインの結晶粒子群特性

#### 4.2.3 サブテーマ1から供給された原料溶液を用いたエクトインの結晶化の検討

#### 4.2.4 溶液に含まれる不純物がエクトイン結晶粒子群特性に及ぼす影響の解明

#### 4.2.5 エクトインの結晶粒子群の連続製造を指向した連続式晶析装置の操作条件と結晶粒子群特性の関係解明

また、研究の進捗に従って検討が必要になった項目、また想定とは異なる挙動を見出したことによる展開として下記の4項目を当初の研究計画に加えて実施した。

#### 4.2.6 生産速度を制御するために必要なエクトインの結晶成長速度の評価

#### 4.2.7 混合溶媒組成が結晶粒子群特性に及ぼす影響

#### 4.2.8 エクトインが構築する複数の溶媒和物結晶間の転移条件の解明

#### 4.2.9 本研究課題で提案したプロセスのフィージビリティおよびGHGの削減効果に関する検討

#### 4.2.1 晶析操作を設計する上で有用なエクトインを含む多成分相図の作成

結晶粒子群の粒径や形状、粒径分布、多形といった特性は結晶化現象の推進力である過飽和に依存する。過飽和は実験系の相図を利用して推算できるが、本研究課題開始時はエクトインの相図はもとより、溶解度の温度依存性さえも報告されていなかった。そこで、過飽和に基づいて操作条件を設計するために、エクトインの晶析工程で用いる可能性がある実験系の多成分相図を作成した。具体的には、エクトインの分離精製プロセスで用いられている可能性がある溶媒に対するエクトインの溶解度を蒸発乾固法により算出した。

#### 4.2.2 単純な二成分系から得られるエクトインの結晶粒子群特性

エクトインの結晶化に関する既往の研究では、エクトインの単結晶、すなわち結晶一粒の分子構造の違いが多数報告されている。一方、実際の晶析工程では結晶を粒子“群”として析出させる。また、結晶粒子群の特性は後工程の操作性に直接影響を及ぼし、最終的に製造プロセスの生産性や製品特性を左

右する。したがって、所望の特性を有する結晶粒子群を得るための晶析操作を検討するために、晶析によって得られるエクトインの結晶粒子“群”が有する特性を明らかにした。

具体的には、エクトインと純粋な溶媒（水、メタノール）の二成分系にて、初年度に立ち上げた回分冷却晶析装置（図 2）を用いてエクトイン飽和水溶液を異なる速度で冷却し、析出した結晶粒子群の結晶形を XRD で同定し、光学顕微鏡で結晶外形を観察した。当初の研究計画では、エクトイン-水の二成分系のみでの検討を予定していた。しかし、プロジェクト 2 年目のタイミングでサブテーマ 1 から供給される原料溶液に含まれる不純物を除去するためにアルコールを溶媒として用いる可能性も出てきたため、エクトイン-メタノールの二成分系でも同様の検討を行った。

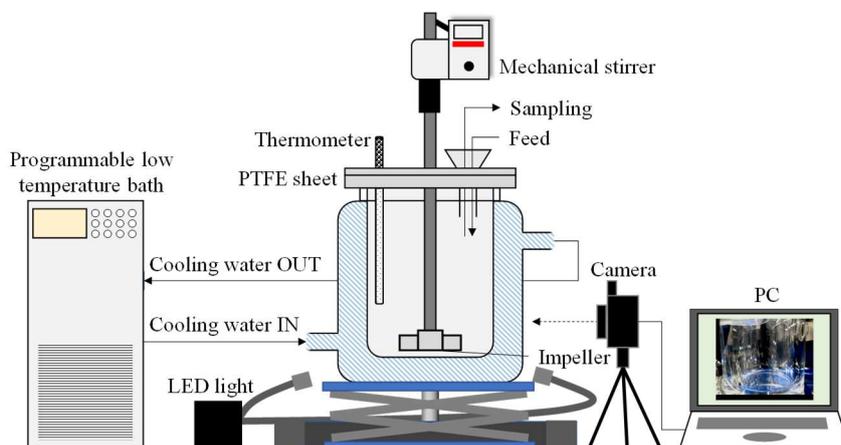


図 2 新たに立ち上げた回分冷却晶析用実験装置の概略図

#### 4.2.3 サブテーマ 1 から供給された原料溶液を用いたエクトインの結晶化の検討

本研究課題が提案している製造プロセスの実用化を見据え、実際に合成プロセスから得られる原料溶液を用いてエクトインの結晶化を試みた。従来のエクトイン製造プロセスでは、膜分離や透析等の工程を経て晶析用の原料溶液となる。しかし、導入コストが高く、結果が得られるまでに長時間を要することから、本研究課題の期間中には全ての分離精製工程をラボスケールで実施する設備を準備することができなかった。代替として、合成プロセスから供給される溶液から分離精製せずに直接エクトインを結晶化させることが可能か否か検討した。合成プロセスから供給される溶液から直接エクトインを結晶化させることができれば、分離精製工程の簡素化や生産コスト削減が見込める。具体的には、サブテーマ 1 と共同研究者から合成プロセスの出口溶液に相当するエクトインを含む実際の原料溶液を提供いただき、この溶液を用いてエクトインの結晶化を検討した。結晶化の有無は溶液から得られた固体の XRD スペクトルがエクトイン由来のピークを有するか否か判定した。

#### 4.2.4 溶液に含まれる不純物がエクトインの結晶粒子群特性に及ぼす影響の解明

サブテーマ 1 の共同研究者と合成プロセスでの培養条件に関して情報を共有し、晶析時の原料溶液に水を用いる場合には不純物として塩 (NaCl) が混入することが予想された。そこで、不純物として NaCl を含む溶液からのエクトインの結晶化を試み、NaCl がエクトインの結晶粒子群特性に及ぼす影響を検討した。具体的には、NaCl を 0.1、1、10wt% 添加したエクトイン飽和水溶液から冷却晶析によりエクトインの結晶化が可能な条件を見出した。

#### 4.2.5 エクトインの結晶粒子群の連続製造を指向した連続式晶析装置の操作条件と結晶粒子群特性の関係解明

生産性の向上や運転コストの削減、粒子群特性の厳密な作り分けを目指し、完全フロー型の連続式装置の導入を検討した。当初の研究計画では、高い剪断力を伴う Taylor-Couette (TC) 流れを利用した完全フロー型晶析装置 (TC 装置) をエクトインの晶析に導入し、TC 装置の仕様や操作条件がエクトインの

結晶粒子群特性に及ぼす影響について検討することを予定していたが、下記に示す2つの理由によりエクトインを用いた実験系では検討することができなかった。

**理由①** 連続式の実験では、装置の定常化に長時間要することや、装置の操作が複雑なので、回分式に比べて大量の試薬（溶液）が必要となる。あいにく、エクトインの試薬は国内メーカーでほとんど取り扱われておらず、本研究課題で使用する分は海外メーカーから購入していたが、コロナ禍による納期の遅れや、円安に伴う試薬価格の高騰で、試薬のエクトインを大量購入することが難しくなった。

**理由②** TC 装置は2液混合によって結晶が析出する系に多用されているが、プロジェクト2年目までに2液混合にてエクトインの結晶粒子群が析出する実験系の探索を終えることができなかった。

そこで、将来的にTC装置をエクトインの晶析工程に導入することを目指し、本研究課題では、2液混合によって結晶が析出する別の実験系を用いて、TC装置の操作条件と得られる結晶粒子群の特性との関係や、TC装置を用いて生産性を改善するための手法について検討した。具体的な開発内容を以下に示す。

#### 4.2.5.1 TC装置の仕様と操作変数が結晶粒子群特性に及ぼす影響

TC装置で得られる結晶粒子群は、従来法のMixed Suspension Mixed Product Removal (MSMPR)装置で得られる結晶粒子群とは異なることが報告されている。しかし、所望の特性を有する結晶粒子群を得るために必要なTC装置の仕様や操作条件の設計指針は十分に検討されていない。そこで、TC装置の剪断力と滞留時間を決定する装置の仕様（外筒と内筒のギャップの大きさ、管の長さ）と操作変数（原料の流量、内筒の回転数）が析出する結晶粒子群特性に及ぼす影響を整理した。具体的には、滞留時間を一定とし、装置の仕様である間隙のサイズと、操作変数である内筒の回転速度で決まる剪断力を変更した時の影響や、剪断力を一定とし、装置の仕様である管の長さで決まる滞留時間を変更した時の影響を明らかにした。

#### 4.2.5.2 低過飽和条件での結晶化の促進

晶析後に本来廃棄されるはずの結晶化成分の濃度が希薄な（過飽和が低い）溶液から結晶を析出させることができれば、収率の改善に繋がる。また、低過飽和条件で結晶化した場合、高過飽和条件に比べて、結晶同士が凝集しにくく、高品質な結晶粒子群が得られることが予想される。しかし、結晶化の速度は過飽和の関数であるため、低過飽和条件ではそもそも結晶化が起こりにくい。そこで、結晶化を促すために、低過飽和条件での晶析に高剪断力を伴うTC装置を利用して収率（懸濁密度）や結晶粒子群特性の改善を検討した。

#### 4.2.5.3 従来の連続式晶析装置にTC装置を組み合わせたカスケード型連続晶析プロセスの開発

現在、晶析の連続式装置としてMSMPR装置が多用されている。しかし、MSMPRでは、結晶粒子群の特性に影響を及ぼす核化と成長が常に同一空間でランダムに発生するため、MSMPR装置単体では、粒子群特性の作り分けに限度がある。これに対して、研究代表者は直近の研究で、MSMPR装置とTC装置を組み合わせた新規カスケード型連続晶析プロセスを提案した（図3）。カスケード型連続晶析プロセスでは、TC装置とMSMPR装置に原料溶液を分配して供給することで、結晶化の推進力である過飽和を装置ごとに制御できるため、粒子群特性の緻密な作り分けが可能である。

しかし、カスケード型連続晶析装置の操作条件と粒子群特性との関係は十分に検討されていない。そこで、将来的にエクトインの晶析にカスケード型連続晶析プロセスを導入することを見据えて、カスケード型連続晶析プロセスの操作条件と結晶粒子群特性との関係を調査した。具体的には、カスケード型連続晶析プロセスを構成するTC装置とMSMPR装置へ供給する原料溶液の流量比率を変更し、得られる結晶粒子群の特性や収率への影響を明らかにした。

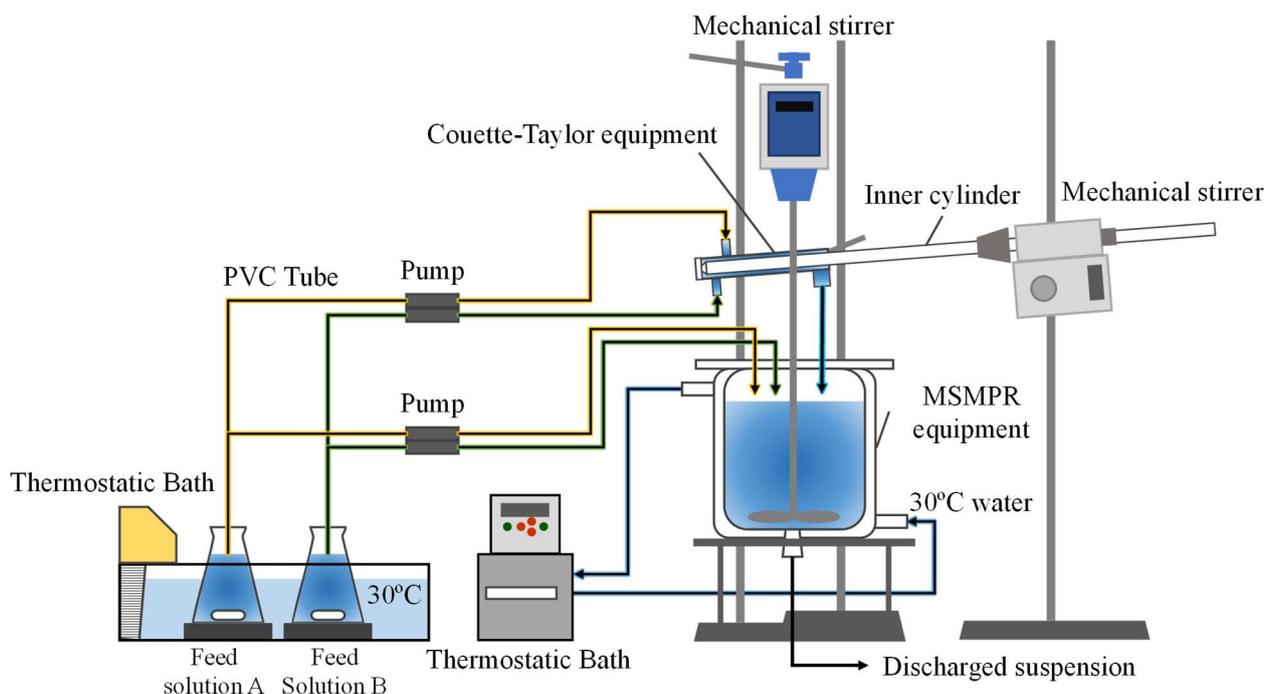


図 3 MSMPR 装置に TC 装置を組み合わせた新規カスケード型連続晶析プロセスの概略図

#### 4.2.5.4 微結晶による成長促進現象を利用した生産性の改善

エクトインの生産速度を改善するためには、結晶の成長速度を促進し、装置内の懸濁密度を高くすることが望まれる。結晶の成長速度を向上させる手法の1つとして、今回は微結晶による成長促進 (Growth Rate Enhancement: GRE) 現象に着目した。

微結晶による GRE は、結晶が成長している近傍で発生した微結晶が結晶の成長単位として取り込まれることによって、一時的に成長速度が飛躍的に上昇する現象である。先行研究では、供給した微結晶が単一結晶の成長速度に及ぼす影響が議論されてきた。しかし、実際の晶析工程では、溶液中に複数の結晶が懸濁している。また、供給した微結晶が懸濁液中の結晶に取り込まれなかった場合、微結晶そのものが成長し、微結晶由来の小さな結晶が析出して、最終的に得られる結晶粒子群の粒径分布が悪化することが懸念される。そこで、微結晶による GRE を実プロセスで応用するために、複数の結晶が懸濁した状態で異なる粒径の微結晶を添加し、添加前後での成長速度や粒径分布の違いを明らかにした。

本研究を実施するにあたり、研究代表者は 4.2.5.3 で提案した晶析プロセスでは、上段に設置した TC 装置が下段の MSMPR 装置にとって種結晶添加装置として機能していることに気がついた。そこで、エクトイン結晶の生産速度を向上させるために、結晶が複数存在する懸濁型晶析にて微結晶の添加が GRE や最終的に得られる結晶粒子の特性に及ぼす影響を明らかにした。

#### 4.2.6 生産速度を制御するために必要なエクトインの結晶成長速度の評価

晶析工程にて結晶粒子群の生産速度は主に結晶の成長速度  $G$  [m/s] に依存することが多い。成長速度  $G$  は過飽和  $\sigma$  [-]、速度定数  $k$  [m/s]、過飽和への依存度  $g$  [-] を用いて下記の式で表現される。

$$G = k \cdot \sigma^g$$

そこで、晶析時のエクトインの生産速度を調整する指針を推定するために、成長速度  $G$  に寄与する  $k$  と  $g$  を実験的に求めた。エクトインの結晶成長速度関数を決めるために、図 4 に示した実験装置を用いて、様々な過飽和にてエクトイン単一結晶の成長速度  $G$  を測定した。

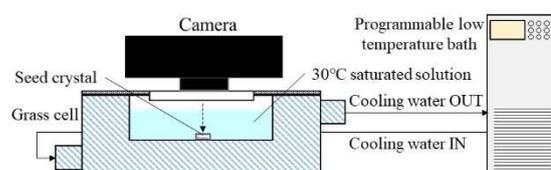


図 4 単結晶成長速度用の実験装置の概略図

#### 4.2.7 混合溶媒組成が結晶粒子群特性に及ぼす影響

研究計画に沿って実験を進めた結果、エクトインは水およびメタノールと溶媒和物を形成し、原料溶液の溶媒によって、析出する溶媒和物に変化することが明らかとなった。水とメタノールは相溶性の関係であり、任意の比率で混合する。研究代表者は、溶質が溶媒と共に結晶化（溶媒和物を形成）する物質の場合、溶質が溶けている溶媒の組成によって析出する固体の溶媒和物が異なる可能性があると考えた。エクトインの製造プロセスでは、水はエクトインの合成プロセスで用いられているのに対して、メタノールは分離精製プロセスにて主な不純物である NaCl を分離するための抽出溶媒として用いられていた。したがって、エクトインの製造プロセスでは晶析工程の原料溶液が水とメタノールの混合溶媒になる可能性もある。そこで、混合溶媒中の組成と析出する溶媒和物との関係を調査した。具体的には、水-メタノールを異なる比率で混合して溶媒を用いてエクトイン飽和溶液を調製し、図 2 に示した回分冷却晶析装置を用いて冷却晶析を行い、混合溶媒の組成析出する溶媒和物やその特性に及ぼす影響について明らかにした。

#### 4.2.8 エクトインが構築する複数の溶媒和物結晶間の転移条件の解明

本研究課題を進めていく中で、デシケーター内で保管していたエクトイン二水和物の結晶粒子群の見た目が保管時間と共に変化している様子が見られた。結晶の多形（溶媒和物）が変化すると、多くの場合、粒子群特性も変化する。しかし、4.2.2 でも述べたように、エクトインの結晶化に関する既往の研究では、主に単結晶構造解析によってエクトインが複数の溶媒和物を構築することは報告している。一方、溶媒和物の転移条件の詳細は報告されていない。そこで、湿度を制御可能な装置を購入し、湿度に対する XRD スペクトルの挙動を明らかにした。

#### 4.2.9 本研究課題で提案したプロセスのフィージビリティおよび GHG の削減効果に関する検討

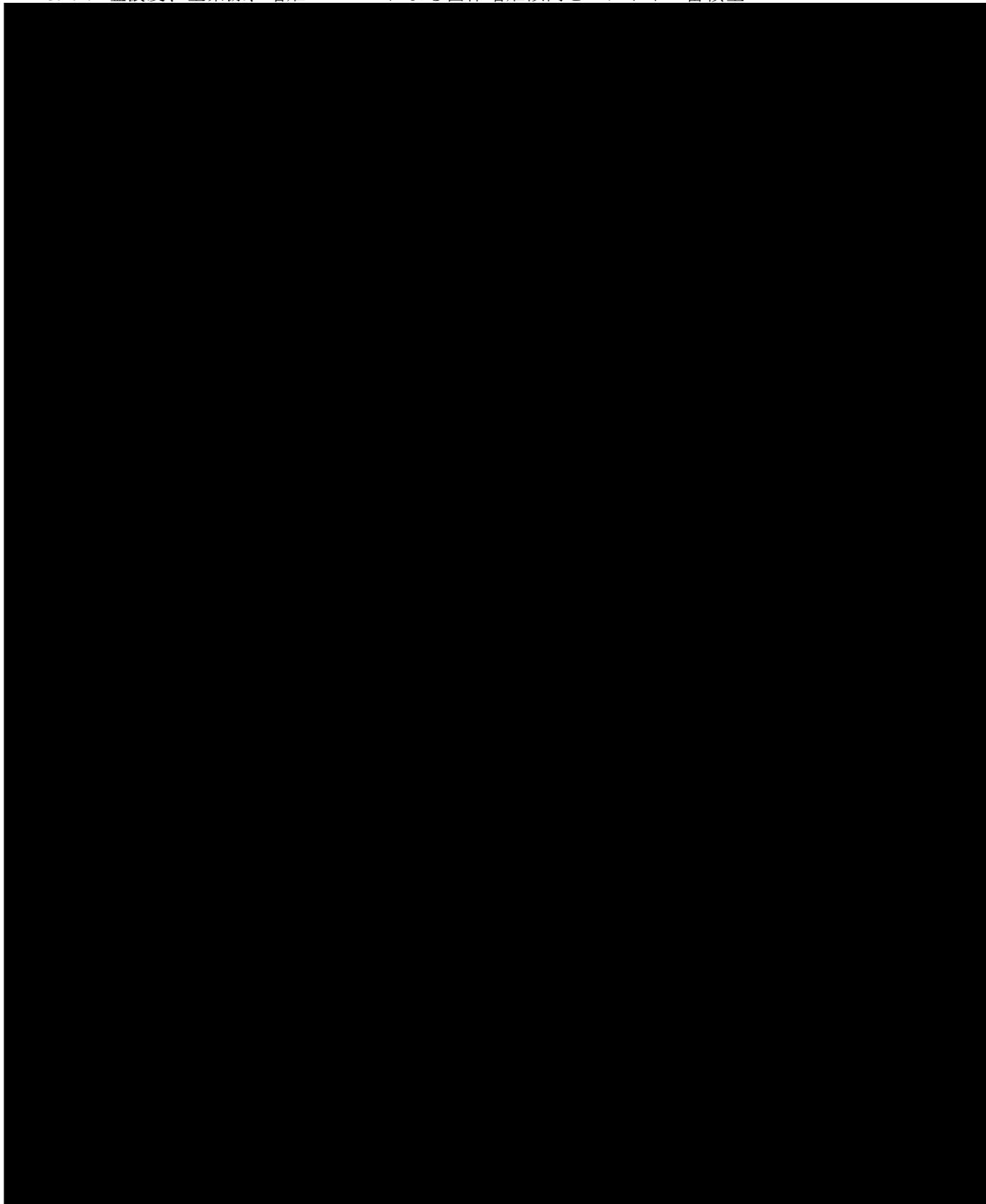
採択時と中間評価時のコメントに基づき、当初の研究計画よりも前倒して、本研究課題で提案するメタンから有価物であるエクトインを製造するプロセスのフィージビリティについて検討を開始した。これまで、メタン発酵技術はスケールメリットの大きいため、中小規模の施設で得られる廃棄物量では売電による利益が乏しく、メタン発酵設備の導入を妨げる一因となっている。そこで、中小規模施設から得られるメタンガスの量を基準に、採算をとる上で必要なエクトインの最低生産量を推算した。さらに、中間評価時のコメントに基づき、本研究課題で提案するエクトインの製造プロセスが構築できた場合に見込まれる CO<sub>2</sub> の削減効果についても検討した。

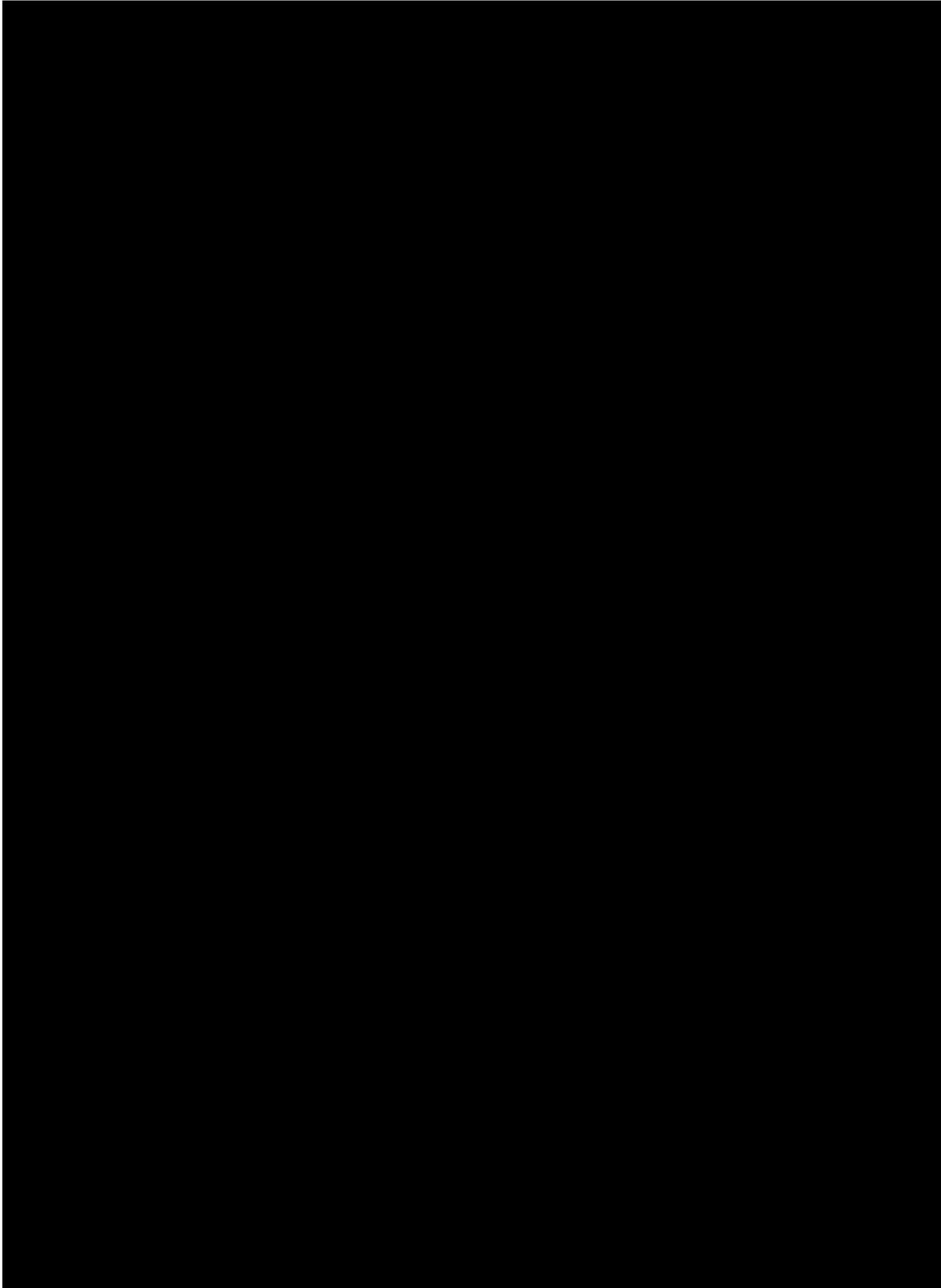
## 5. 結果及び考察

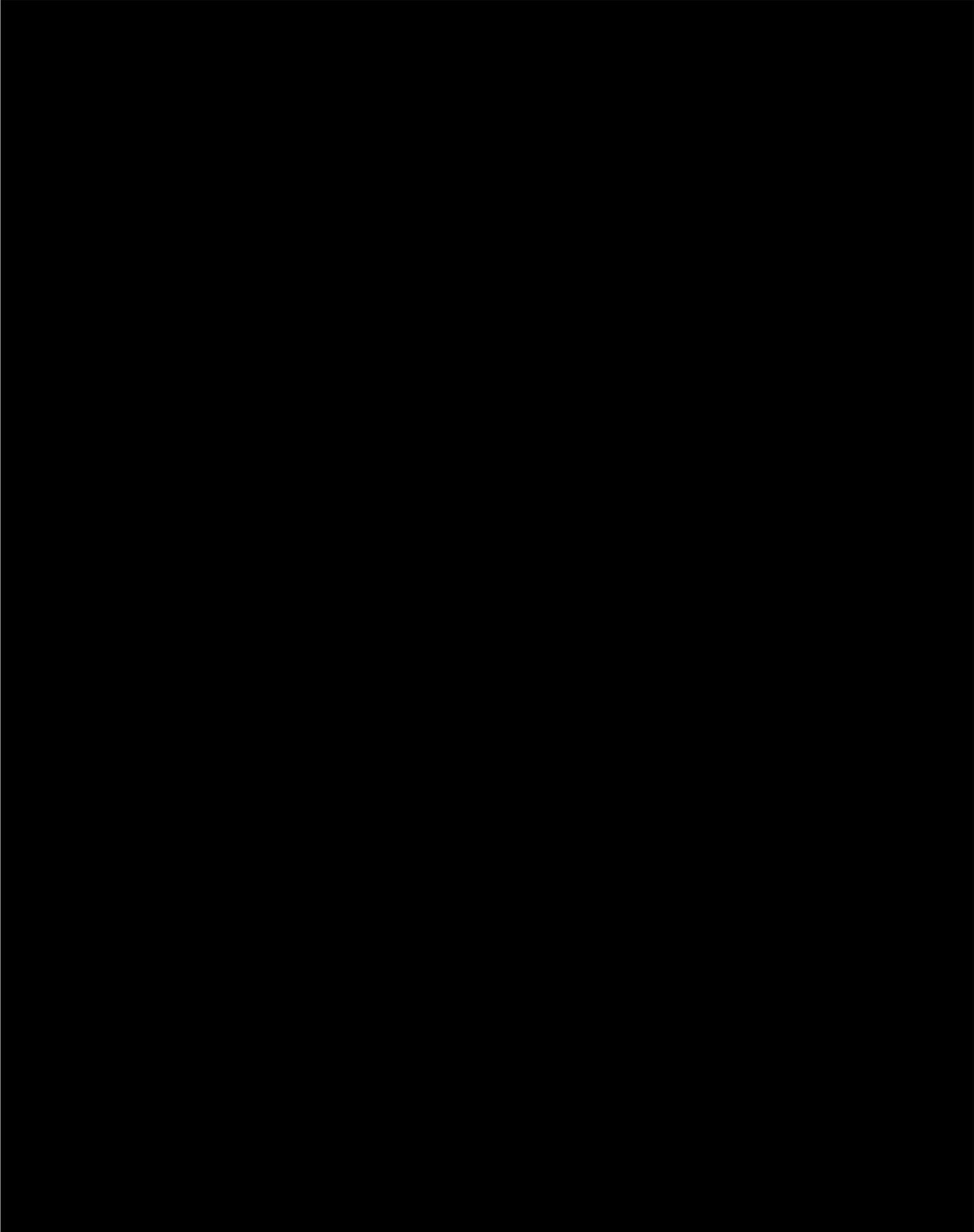
<【サブテーマ1】「メタン酸化細菌による有機物生産に向けた技術開発」結果及び考察>

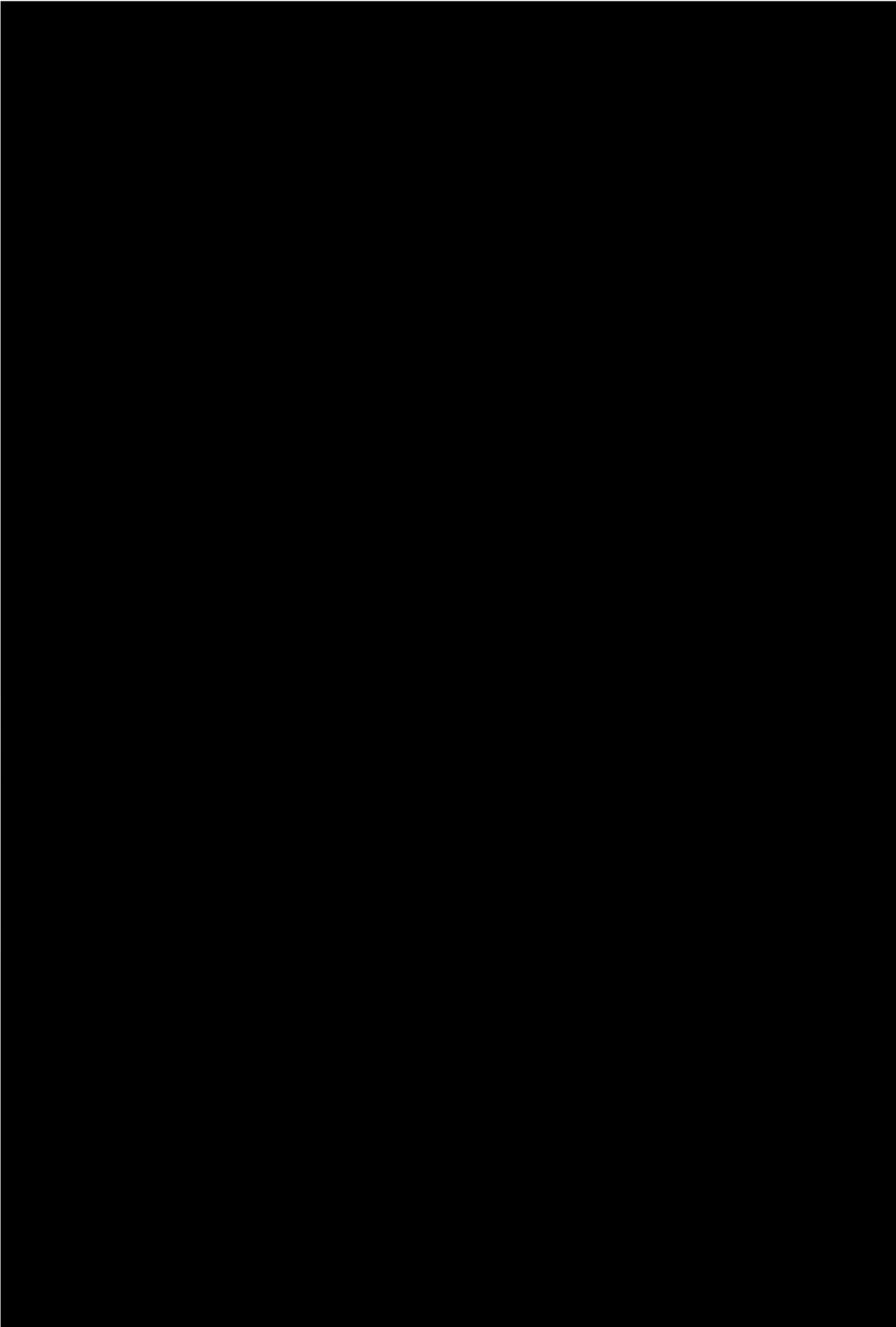
### 5.1.1 メタン酸化細菌の培養条件の検討 (回分実験) 【成果3】 【成果12】

#### 5.1.1.1 塩濃度、窒素源、増殖フェーズによる菌体増殖傾向とエクソイン蓄積量

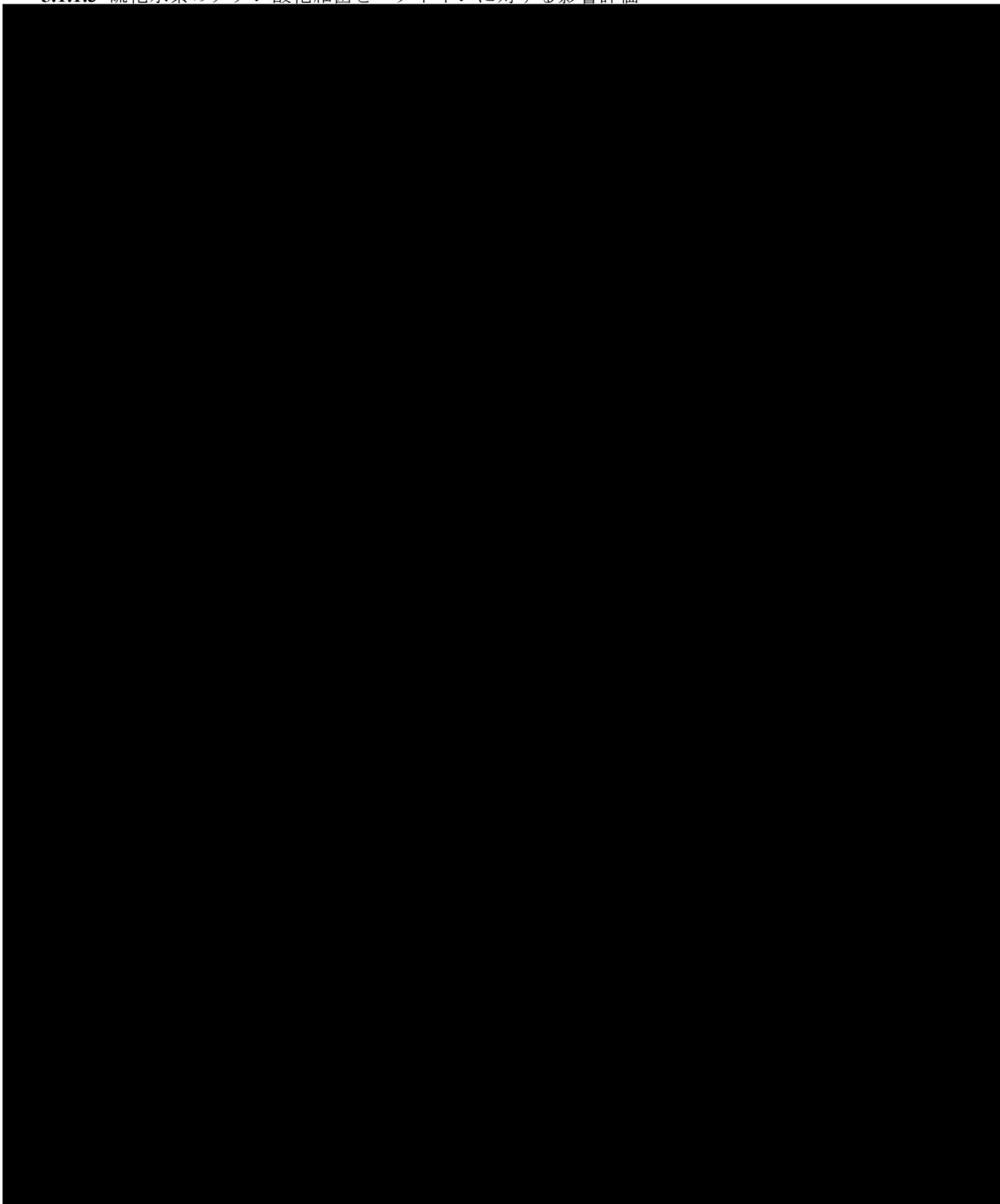






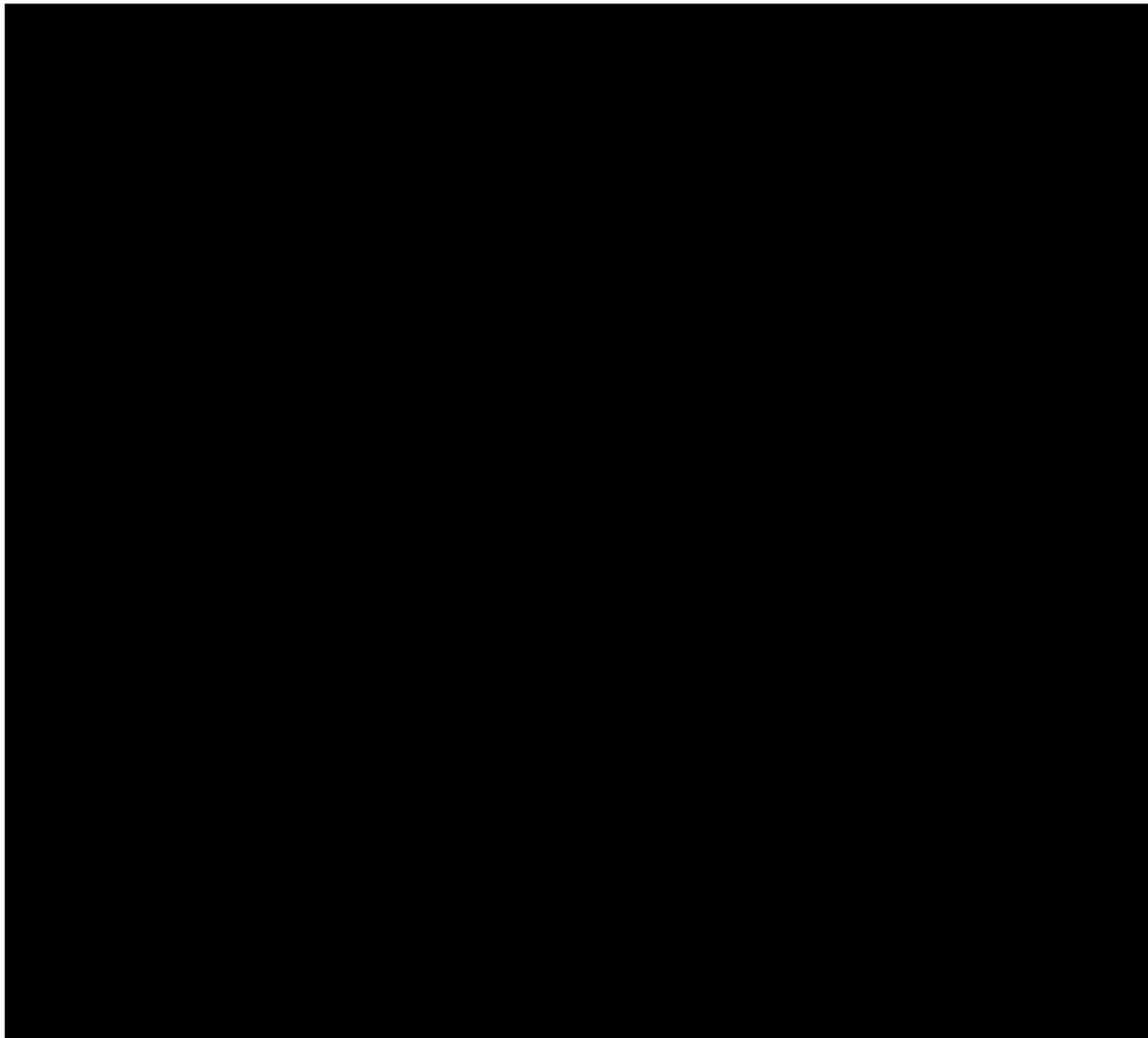


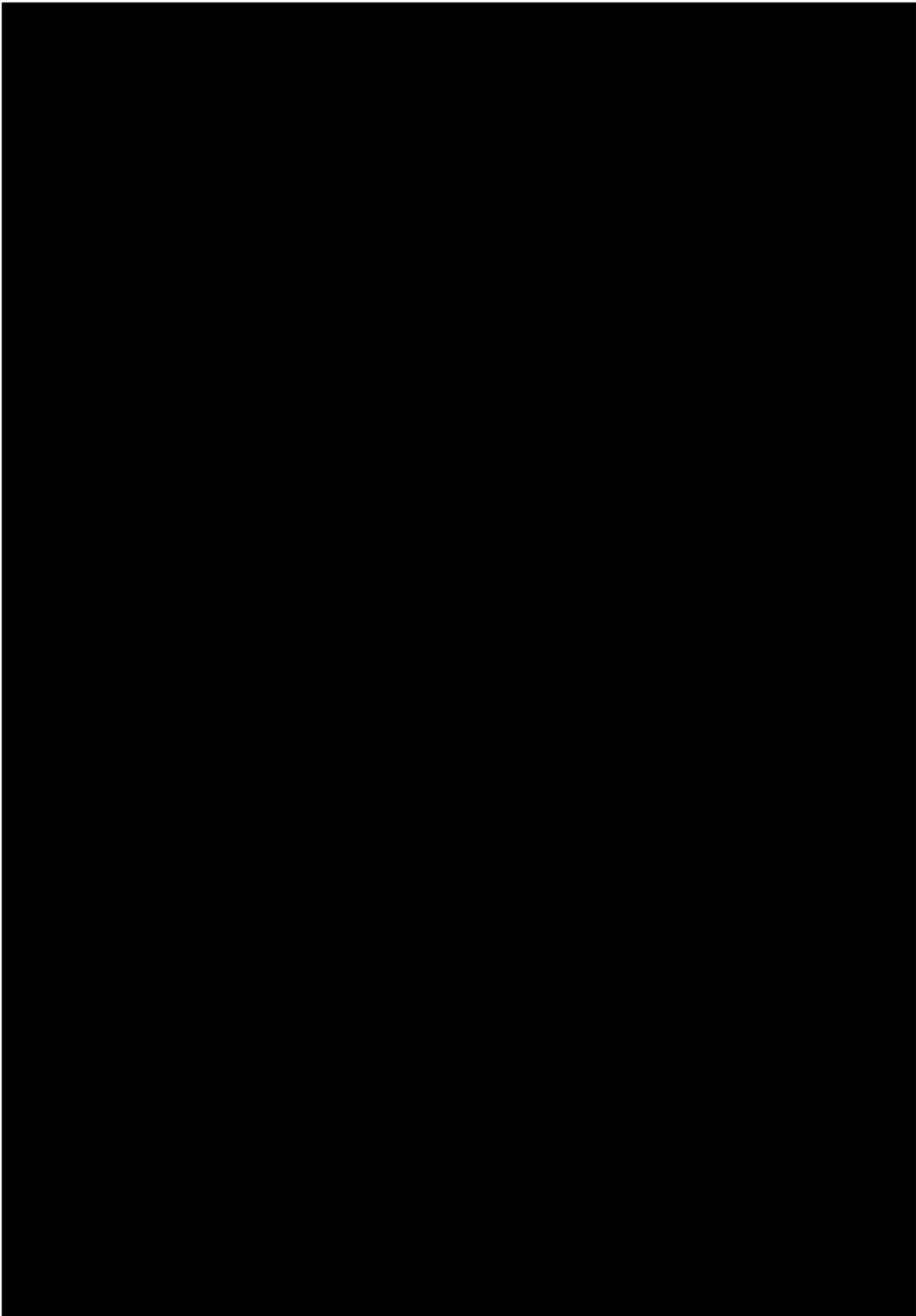
5.1.1.3 硫化水素のメタン酸化細菌とエクトインに対する影響評価



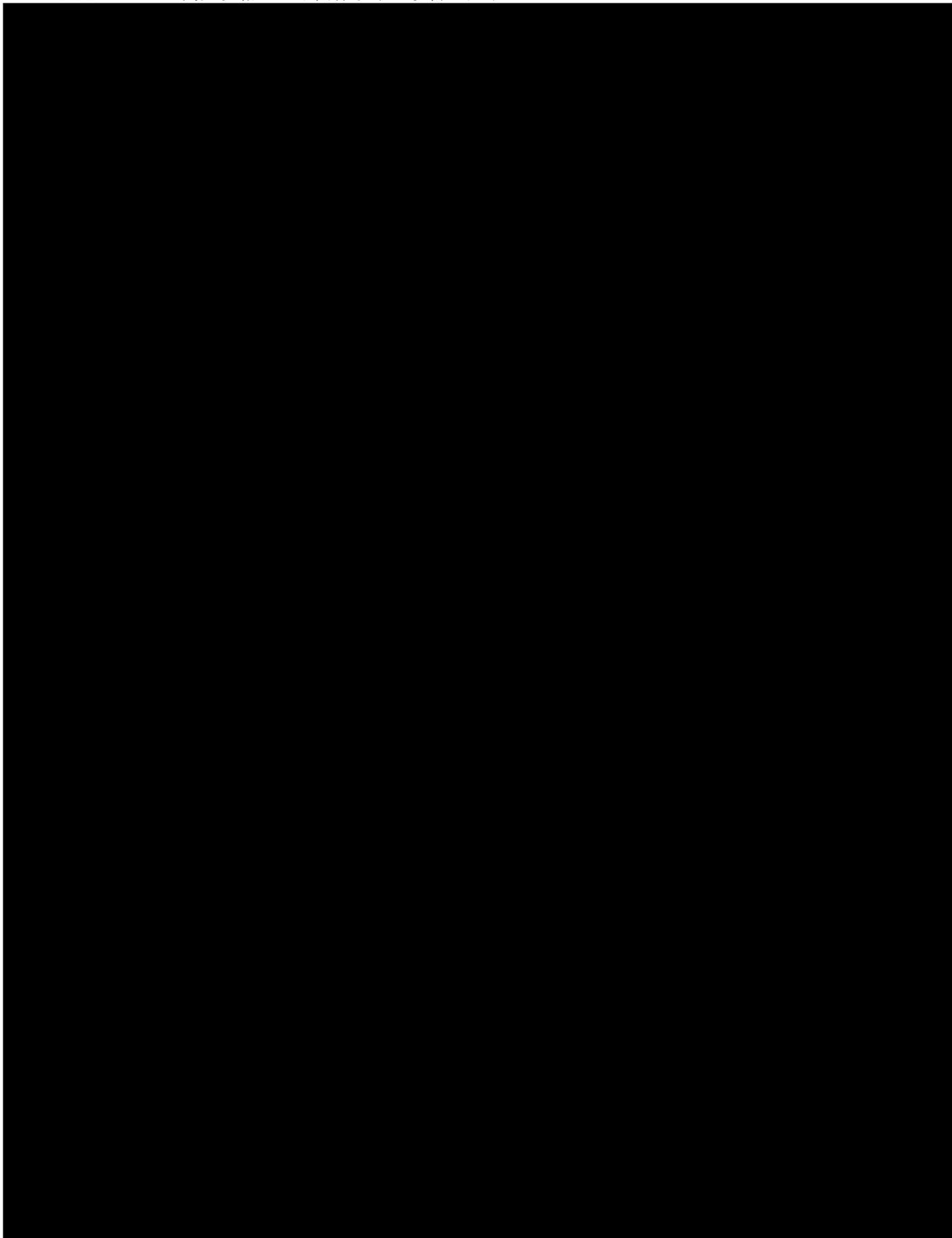
**5.1.2 連続通気リアクターでの培養可能性の検討 (リアクター実験)**

**5.1.2.1 連続通気リアクターでの培養の確認と窒素源の影響**





5.1.2.2 メタンの間欠供給による菌体収率の改善の試み



< 【サブテーマ2】 「夾雑物から高純度な有価物を得るための晶析プロセスの開発」  
結果及び考察 >

5.2.1 晶析操作を設計する上で有用なエクトインを含む多成分相図の作成【成果5】【成果9】【成果12】  
【成果17】

蒸発乾固法により、下記の実験系での溶媒に対するエクトインの溶解度を測定した。

- ・エクトイン-水（二成分系，図 14(a)）
- ・エクトイン-メタノール（二成分系，図 14(a)）
- ・エクトイン-水-エタノール（三成分系，図 14(b)）
- ・エクトイン-水-メタノール（三成分系，図 14(c)）
- ・エクトイン-水-NaCl（三成分系，図 14(d)）

その結果、エクトイン-水およびエクトイン-メタノールの二成分系では、溶媒に依らずエクトインの溶解度は温度低下に伴って一様に減少することが明らかになった（図 14(a)）。また、メタノールに対するエクトインの溶解度は水に比べて 1/10 程度であることが分かった。

次に、エクトインの結晶粒子群を非溶媒添加晶析によって析出させることを想定して多成分相図を作成した。非溶媒添加晶析に注目した理由は、蒸発晶析や冷却晶析に比べて結晶粒子群を析出させるための操作に必要なエネルギー消費量が少なく、環境負荷が低い晶析手法として多用されているためである。

そこで、エクトインの結晶化に関する既往の研究で用いられていたメタノールとエタノールを非溶媒とするエクトイン-水-エタノールとエクトイン-水-メタノールの多成分相図を作成した。

その結果、エタノールを非溶媒として用いた場合、エタノール比率が増加に応じて、エクトインの溶解度は線形的に減少した（図 14(b)）。また、メタノールを非溶媒として用いた場合、メタノール組成が増えても溶解度の低下はみられず、水-メタノールはエクトインに対して混合溶媒効果を示すことが分かった（図 14(c)）。収率の観点から非溶媒添加晶析法を用いる場合には、非溶媒の混合比の増加に伴って溶解度が著しく低下する系が望ましい。したがって、エクトイン-水-エタノールは析出量がわずかであり、エクトイン-水-メタノールは混合溶媒効果が確認されたことからいずれも非溶媒添加晶析には適していないことが明らかとなった。

最後に、晶析時の原料溶液の溶媒として水を用いた場合に不純物として混入することが想定される NaCl を考慮したエクトイン-水-NaCl の相図を作成した（図 14(d)）。その結果、この三成分系では共晶点が存在することが分かり、かつ溶解度曲線と共晶点に基づき、相図を特定の成分が析出する領域に分割することができた。特に、エクトイン水溶液中に NaCl が比較的低濃度で存在していた場合、晶析によってエクトインのみを結晶化させることも可能であることを見出した。

以上の結果を踏まえ、サブテーマ 1 の共同研究者に合成プロセスでの培養条件を確認した結果、晶析工程に供給される原料溶液中の NaCl 濃度はエクトインのみを析出させることが可能な NaCl 濃度よりも 10 倍以上高いことが分かった。したがって、サブテーマ 1 から供給される原料溶液から晶析によってエ

## 5.2.2 単純な二成分系から得られるエクトインの結晶粒子群特性

### 5.2.2.1 エクトイン結晶の粒子群特性【成果 5】【成果 9】【成果 12】【成果 13】【成果 18】

研究計画の段階で単純な二成分系として選定したエクトイン-水と、研究の進捗に伴って追加したエクトイン-メタノールにて回分冷却晶析を行い、得られた結晶粒子群を光学顕微鏡で観察した結果、いずれも明確な面をもつ粒子群が得られた。そこで、XRD を測定したところ、エクトイン-水からはエクトイン二水和物、エクトイン-メタノールからはエクトインメタノール和物由来のシャープなピークが検出された（図 15）。したがって、エクトイン-溶媒の二成分系では、それぞれエクトインの溶媒和物が結晶として析出することが分かった。

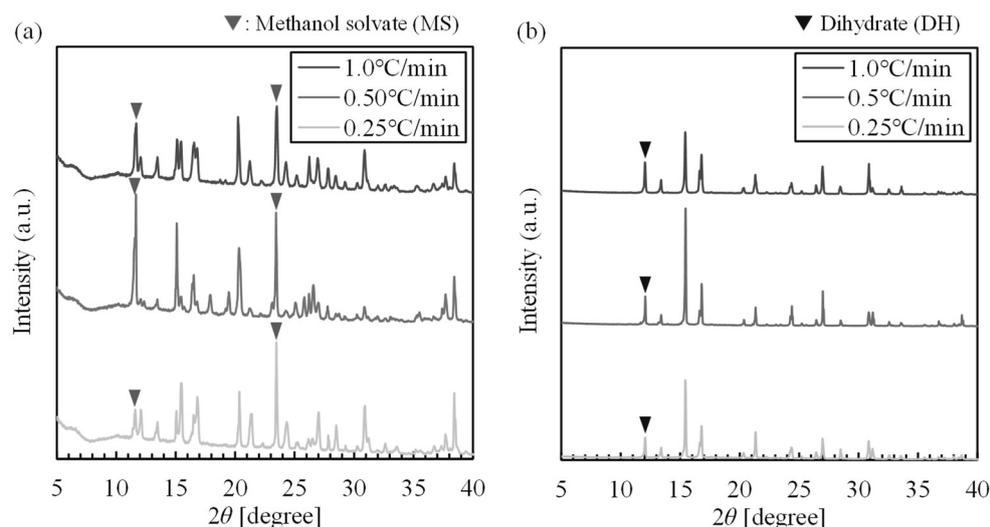


図 15 各冷却速度にて(a)メタノールおよび(b)水から析出した結晶粒子群の XRD スペクトル（論文①査読中）

さらに、画像解析の結果、エクトインの結晶粒子群特性は、用いる溶媒と過飽和の生成する操作（冷却）の速度の組み合わせによって制御できることを見出した（図 16）。

具体的には、溶媒として水を用いるとメタノールを用いた場合と比べて、平均粒径が約 2 倍異なる粒子群が析出し、冷却速度を速くすると結晶粒子群の平均粒径は小さくなることを見出した（図 16(a)）。したがって、エクトインの結晶粒子群の粒径は、用いる溶媒と冷却速度によって制御可能であることを見出した。

また、粒子の長軸および短軸の長さの比率（アスペクト比）で形状を評価した結果、溶媒として水を用いると、メタノールを用いた場合よりもアスペクト比が 1 に近い結晶粒子群が得られたが、いずれの溶媒を用いた場合でも、冷却速度の変更によってアスペクト比はほとんど変わらなかった（図 16(b)）。すなわち、エクトインの結晶粒子群の形状を制御する場合には、用いる溶媒を変更することが有効であることを見出した。

次に、粒径のばらつきを示す  $CV_N$  値を求めたところ、メタノールの用いた場合には、冷却速度によって  $CV_N$  値はほとんど変わらなかったのに対して、水を用いた場合では冷却速度を速くすると  $CV_N$  値は改善することが分かった（図 16(c)）。したがって、エクトインの結晶粒子群の粒径分布を制御する場合には、冷却速度を考慮すべきか否かが用いる溶媒によって変わることを見出した。

以上より、後工程での操作性や最終製品で求められる品質に応じてエクトインの結晶粒子群特性を作り分けるために必要な晶析工程での操作条件と結晶粒子群特性の関係を明らかにすることができた。

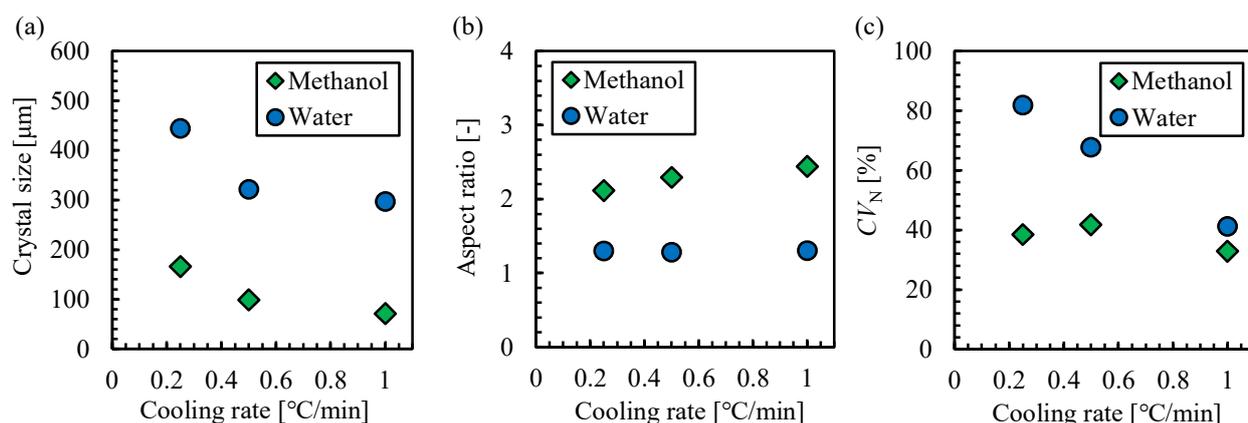


図 16 各溶媒にて析出するエクトイン結晶粒子群の(a)粒径、(b)アスペクト比、(c)CV<sub>N</sub> 値 (論文①査読中)

### 5.2.2.2 過飽和と粒子群特性の関係【成果 5】【成果 9】【成果 12】【成果 13】【成果 18】

エクトインの結晶粒子群特性を制御するための操作指針を検討するうえで、結晶化の推進力である過飽和の観点から考察を行うため、5.2.1 で作成した多成分相図を用いて、各実験条件で結晶化が始まった時の過飽和を推算した (図 17)。

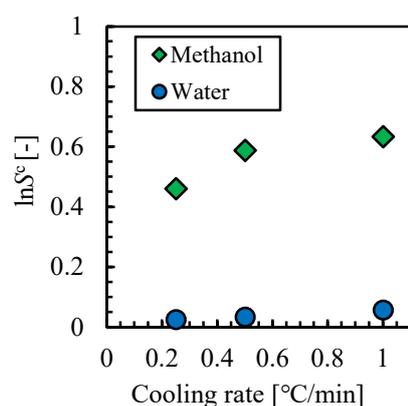


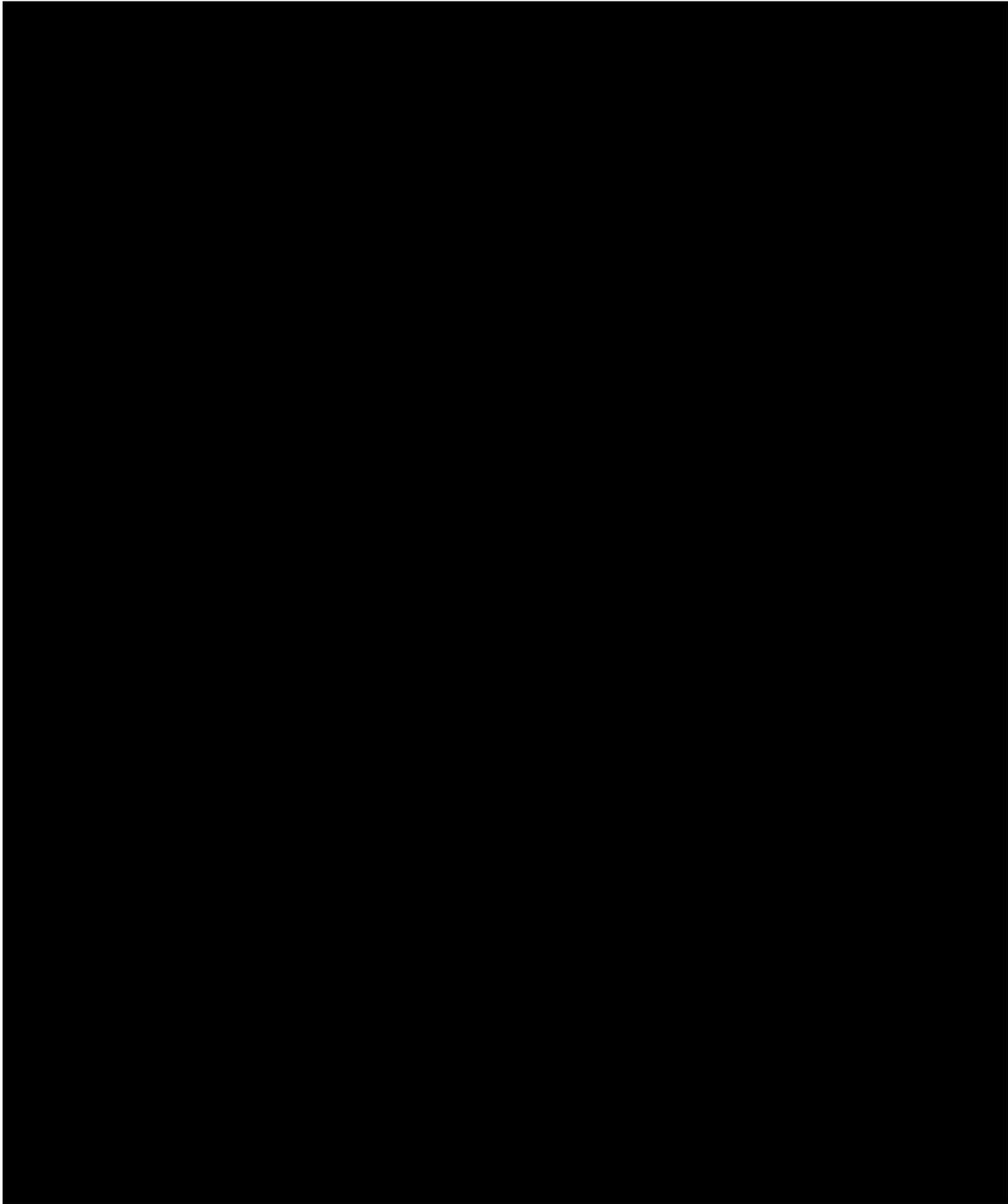
図 17 各晶析条件での結晶化時の過飽和 (論文①査読中)

その結果、冷却速度に関係なく、水を用いた場合に比べ、メタノールのほうが結晶化時の過飽和は大きくなるのが分かった。通常、核化時の過飽和が大きいほど、核化数が増加するため、析出する結晶一粒の大きさは小さくなる。したがって、5.2.2.1 にてメタノールを用いた場合に小粒径の結晶粒子群が得られていた理由は、核化時の過飽和が大きい事に起因していることを見出した。エクトインの結晶化に関する既往の研究にて、アルコールを用いてエクトインの晶析を行った際に微細な結晶粒子群が析出し、固液分離性が著しく悪化することが報告されていたが、その理由も、核化時の過飽和が大きい事に起因していると考えられる。固液分離工程での操作性を考慮すると、多くの場合、晶析によって大粒径かつ単峰性の結晶粒子群を析出させることが望ましい。したがって、晶析工程の溶媒としてメタノールを用いる場合には、大粒径の結晶粒子群を得るために、超音波やエアレーションといった核化を誘発する操作を導入し、溶液が低過飽和状態の時に核化を引き起こすことが必要であると考えられる。

以上より、エクトイン-水およびエクトイン-メタノールの二成分系にて、5.2.1 で作成した相図を用いて過飽和度を推算することで、固液分離工程の操作性を改善するために適した特性を有する結晶粒子群を析出させるための晶析操作を提案することができた。現在、得られた結果を学術論文としてまとめ *Chemical Engineering Research & Design* に投稿し、Under Review の状態である。

5.2.3 サブテーマ1から供給された原料溶液を用いたエクトインの結晶化の検討

5.2.4 溶液中に含まれる不純物がエクトイン結晶粒子群特性に及ぼす影響の解明【成果5】【成果12】【成果17】



**5.2.5** エクトインの結晶粒子群の連続製造を指向した連続式晶析装置の操作条件と結晶粒子群特性との関係解明

**5.2.5.1** TC 装置の仕様と操作変数が結晶粒子群特性に及ぼす影響【成果 2】【成果 6】【成果 11】

滞留時間が一定で、内筒と外筒のクリアランスが狭い場合には、内筒の回転数を上げて剪断力を大きくすると結晶粒子群の粒径と粒径分布の幅は小さくなることがわかった。一方、剪断力が一定で、TC 装置の管の長さを長くした場合には、滞留時間が長いほど粒径と粒径分布の幅が狭くなった。

粒径と粒径分布の幅がともに小さくなるのは、剪断力と滞留時間がともに大きくなる条件であったため、「剪断力×滞留時間」という指標を新たに定義し、粒径と粒径分布の幅との関係性を評価した。その結果、「剪断力×滞留時間」と粒径および粒径分布の幅には相関があることがわかった（図 21）。

したがって、TC 装置をエクトインの晶析工程に導入して粒径および粒径分布の幅を制御する場合、剪断力と滞留時間を決める操作変数や仕様に着目することが重要であることがわかった。

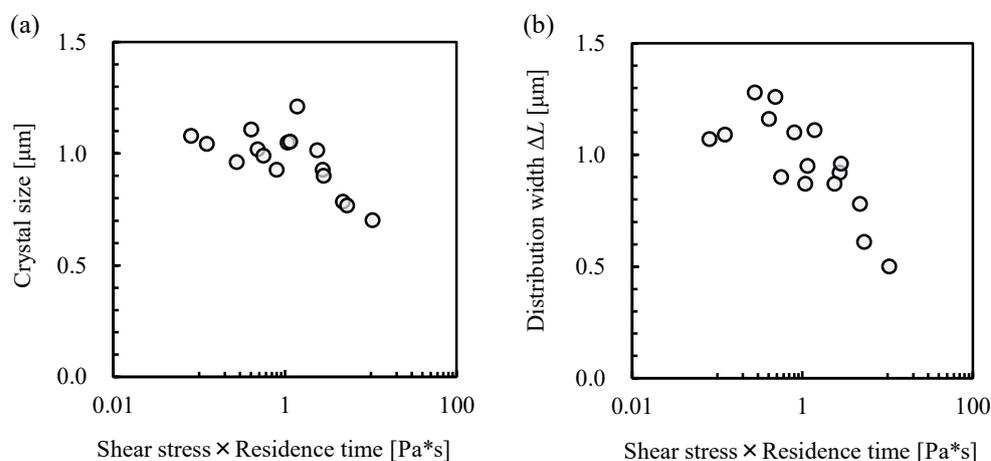


図 21 TC 装置で得られる結晶粒子群の(a)粒径および(b)粒径分布の幅と剪断力×滞留時間の関係

#### 5.2.5.2 収率改善に向けた低過飽和での結晶化【成果 14】【成果 15】【成果 16】【成果 20】

各過飽和条件で結晶粒子群の析出量を算出した結果、従来の連続式晶析装置（MSMPR）に比べ、本研究課題で着目した TC 装置のほうが理論析出量に近い量の結晶粒子群が析出していることが分かった（図 22）。特に、過飽和が低い条件では析出量の差が顕著に表れた。したがって、エクトインの晶析工程に低過飽和の溶液が供給された場合でも TC 装置を用いることで、生産性を改善することが可能であることを実験的に見出すことに成功した（論文②査読中）。

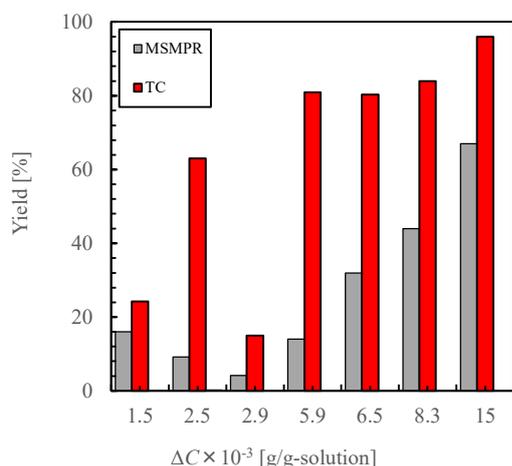


図 22 従来の MSMPR 装置と本研究が着目した TC 装置を各過飽和条件で操作した場合の収率（論文②査読中）

#### 5.2.5.3 カスケード型連続晶析プロセスを用いた結晶粒子群製造【成果 4】【成果 10】【成果 13】【成果 14】【成果 16】

カスケード型連続晶析プロセスの原料溶液の総流量に対する TC 装置へ供給する流量の比率を TC 装置の負荷率 ( $\zeta_{TC}$ ) と定義し、 $\zeta_{TC}$  がカスケード型連続晶析プロセス出口で得られた結晶粒子群の特性と収率に及ぼす影響を評価した。その結果、原料溶液の濃度は同じにもかかわらず、 $\zeta_{TC}$  に応じて結晶粒

子群特性は大きく変化することがわかった（図 23）。すなわち、原料溶液の総流量や濃度が同じ条件でも  $\xi_{TC}$  を変更することによって、所望の特性を有する結晶粒子群を生産できる可能性を見出した。逆に、原料溶液の総流量や濃度が異なる場合でも  $\xi_{TC}$  を変更することによって、結晶粒子群特性のばらつきを抑制できる可能性がある。

さらに、従来の連続式晶析装置（MSMPR）の場合に比べ、粒径分布のばらつきを示す  $CV_N$  値は約 20 ポイント改善し、収率は最大で約 25 ポイント改善することを見出した。今回の実験条件では理論収量は  $\xi_{TC}$  によらず一定であるため、収率の増加は生産性の向上を意味する。すなわち、研究代表者が提案したカスケード型連続晶析プロセスをエクトインの晶析工程に導入することによって、生産性を約 25%改善できる可能性があることを見出した。

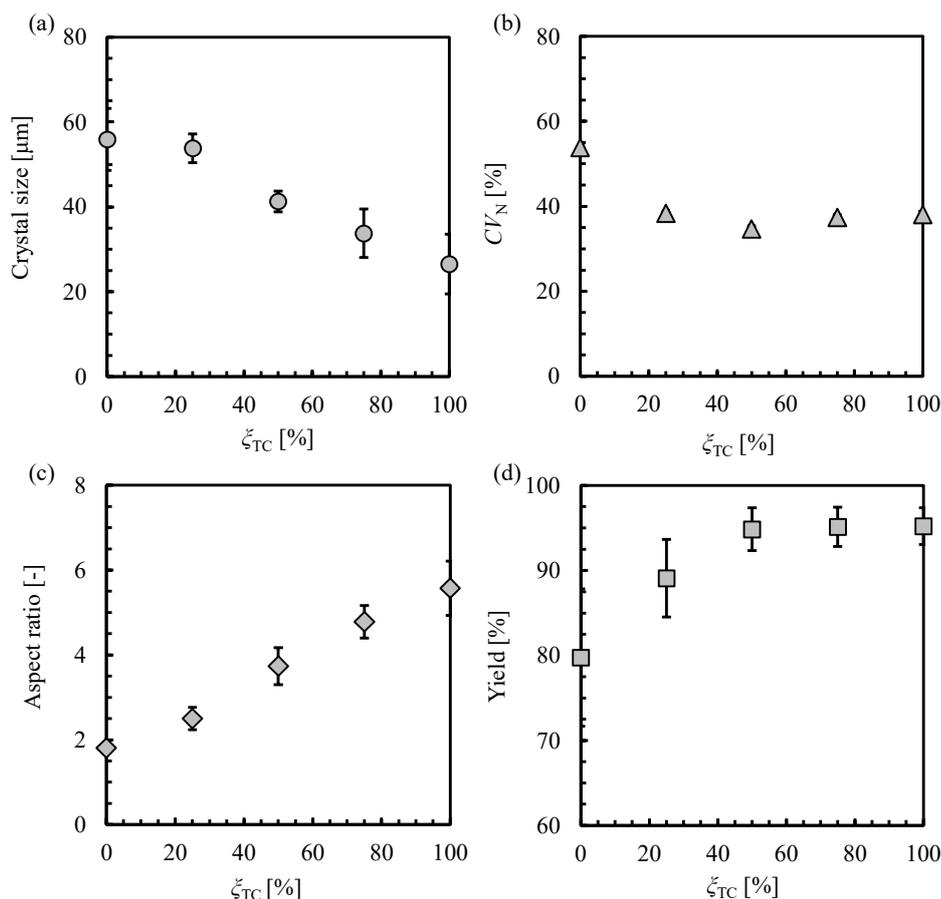


図 23 カスケード型連続晶析プロセスの  $\xi_{TC}$  を変更した際に得られる結晶粒子群の(a)粒径、(b) $CV_N$  値、(c)アスペクト比、(d)収率

結晶工学の観点から、カスケード型連続晶析プロセスで生産性が改善する要因を明らかにするため、Population density plot（図 24）の傾きと切片から各  $\xi_{TC}$  での核化速度と成長速度を概算した。その結果、従来の MSMPR 装置を用いた場合に比べ、カスケード型連続晶析プロセスでは近似直線の切片の値が大きくなっていることがわかった。

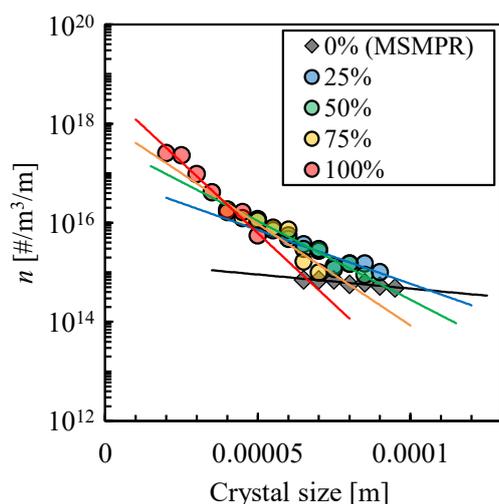


図 24 カスケード型連続晶析プロセスの各  $\zeta_{TC}$  での population density plot

これは、核化速度が著しく増加していることを意味しており、TC 装置の高い剪断力によって核化が促進されたことに起因していると考えられる。以上より、TC 装置を従来の連続式晶析装置 (MSMPR) と組み合わせることによって、晶析プロセス全体の見かけの核化速度が増加し、結果として生産性が改善したと考えられる。

#### 5.2.5.4 生産性の向上に向けた微結晶による成長促進現象の利用【成果 1】【成果 19】

TC 装置で調製した異なる粒径 (7.5  $\mu\text{m}$ 、12.3  $\mu\text{m}$ 、19.7  $\mu\text{m}$ ) の微結晶を結晶が懸濁している晶析装置に供給したときに得られた結晶粒子群の粒径と  $CV_N$  値の経時変化を比較したところ、微結晶を供給した直後に結晶粒子群の平均粒径が増大し、成長速度が促進している様子が見られた (図 25)。したがって、懸濁型晶析でも成長速度が促進できることがわかった。

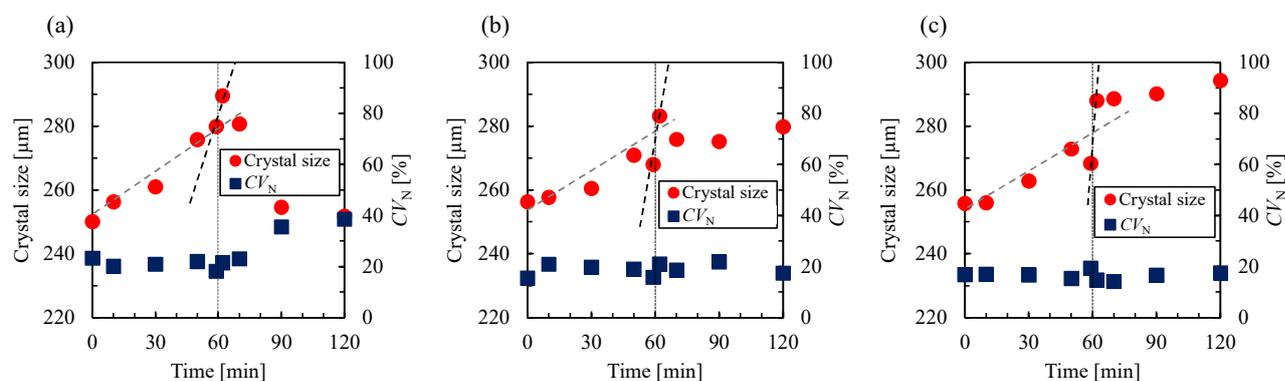


図 25 異なる粒径 ((a)19.7 $\mu\text{m}$ , (b)12.3 $\mu\text{m}$ , (c)7.5  $\mu\text{m}$ ) の微結晶を添加した際に得られる結晶粒子群の粒径と  $CV_N$  値の経時変化

また、19.7  $\mu\text{m}$  の微結晶を供給したとき、供給後に  $CV_N$  値は悪化し最終製品の粒径分布は二峰性になっていたのに対して、12.3  $\mu\text{m}$ 、7.5  $\mu\text{m}$  のとき  $CV_N$  値は一定で粒径分布は単峰性であった (図 26)。

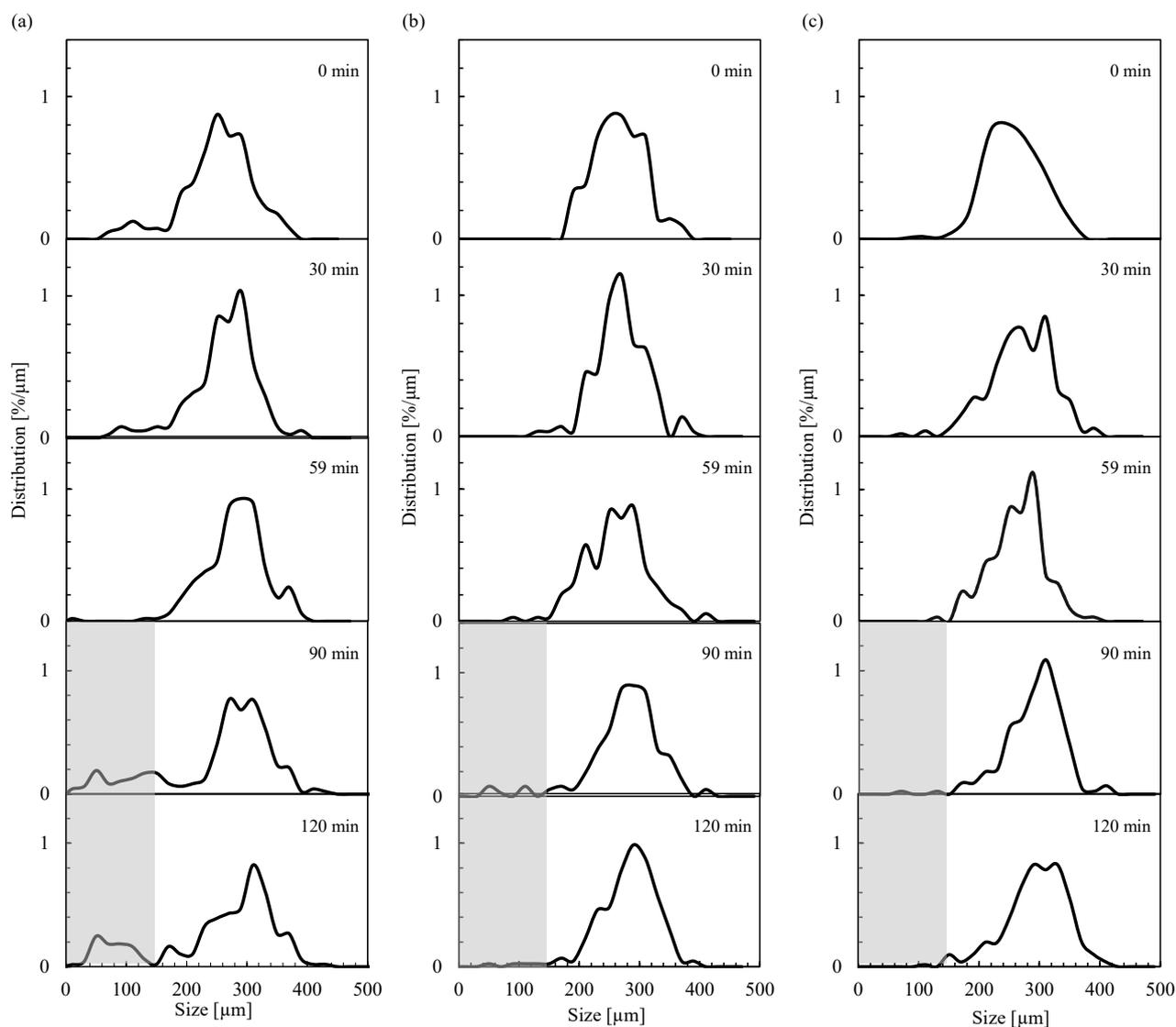


図 26 異なる粒径 ((a)19.7 $\mu\text{m}$ , (b)12.3 $\mu\text{m}$ , (c)7.5  $\mu\text{m}$ ) の微結晶を添加した際に得られる結晶粒子群の粒径分布の経時変化

次に、微結晶添加前後の成長速度の比を成長促進係数  $\varepsilon$  [-] と新たに定義し、供給した微結晶の平均粒径との関係を整理した結果、微結晶の粒径が小さいほど  $\varepsilon$  が大きくなることが分かった (図 27(a))。また、全体の結晶数に対して微結晶を添加する前に懸濁していた結晶以外の結晶の割合を  $\eta$  [%] として算出した結果、微結晶の粒径が小さいほど  $\eta$  が小さくなった (図 27(b))。すなわち、微結晶の粒径が小さいほど、懸濁している結晶の成長に関与する微結晶の割合が増加し、結晶成長に取り込まれずそのまま成長する微結晶の割合が減少したことを意味している。

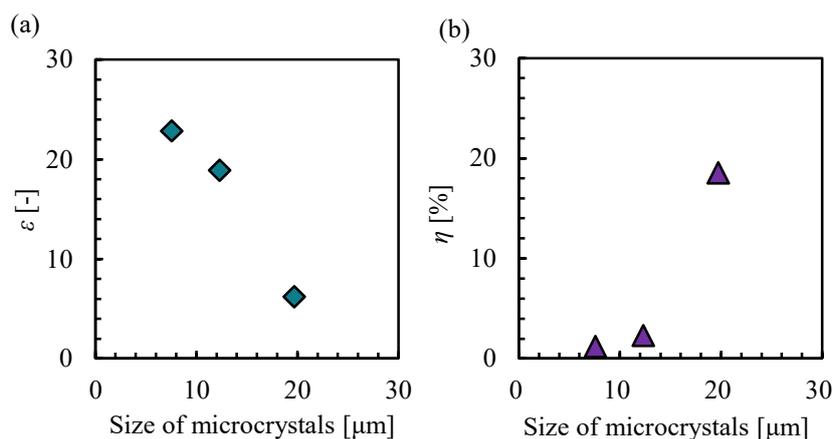


図 27 添加する微結晶の粒径が(a)成長促進係数  $\varepsilon$  と(b) 装置内に元々懸濁していた結晶以外の結晶の割合  $\eta$  に及ぼす影響

以上より、TC 装置から供給する微結晶の特性を適切に設計することによって、最終的に得られる結晶粒子群の粒径分布を悪化させることなく、懸濁液中の結晶の成長速度を促進できる可能性を見出した。結晶の成長速度は晶析工程での生産性に影響し、成長速度の増加は生産性の向上に相当する。したがって、TC 装置を微結晶の添加装置として利用することによって、エクトインの晶析工程の生産速度を改善できる可能性が見出された。

### 5.2.6 生産速度を制御するために必要なエクトインの結晶成長速度の評価【成果 12】

エクトイン-水およびエクトイン-メタノールの二成分系でエクトインの単結晶の成長速度を測定した結果、メタノールに比べ、水のほうが結晶の線成長速度が速いことが分かった (図 28(a))。さらに、図 28(b)から結晶の成長速度定数  $k_g$  [m/s] と成長速度の過飽和依存性  $g$  [-]を求めた結果、メタノールに比べて水の速度定数は大きく、過飽和依存性は同程度であることがわかった。

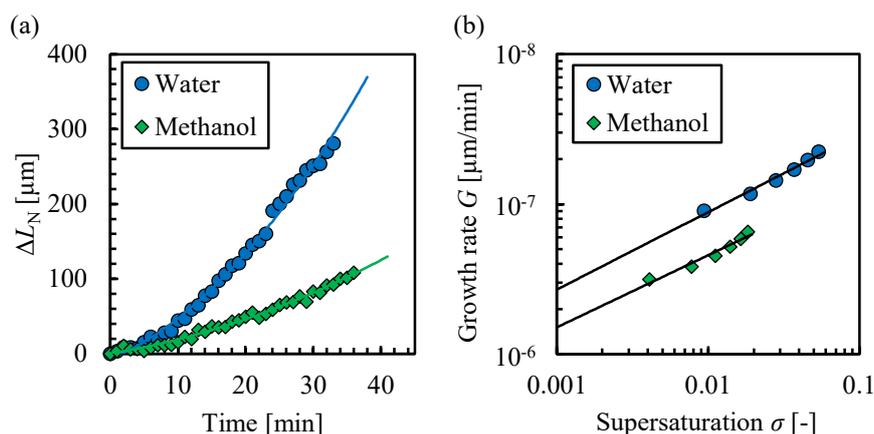
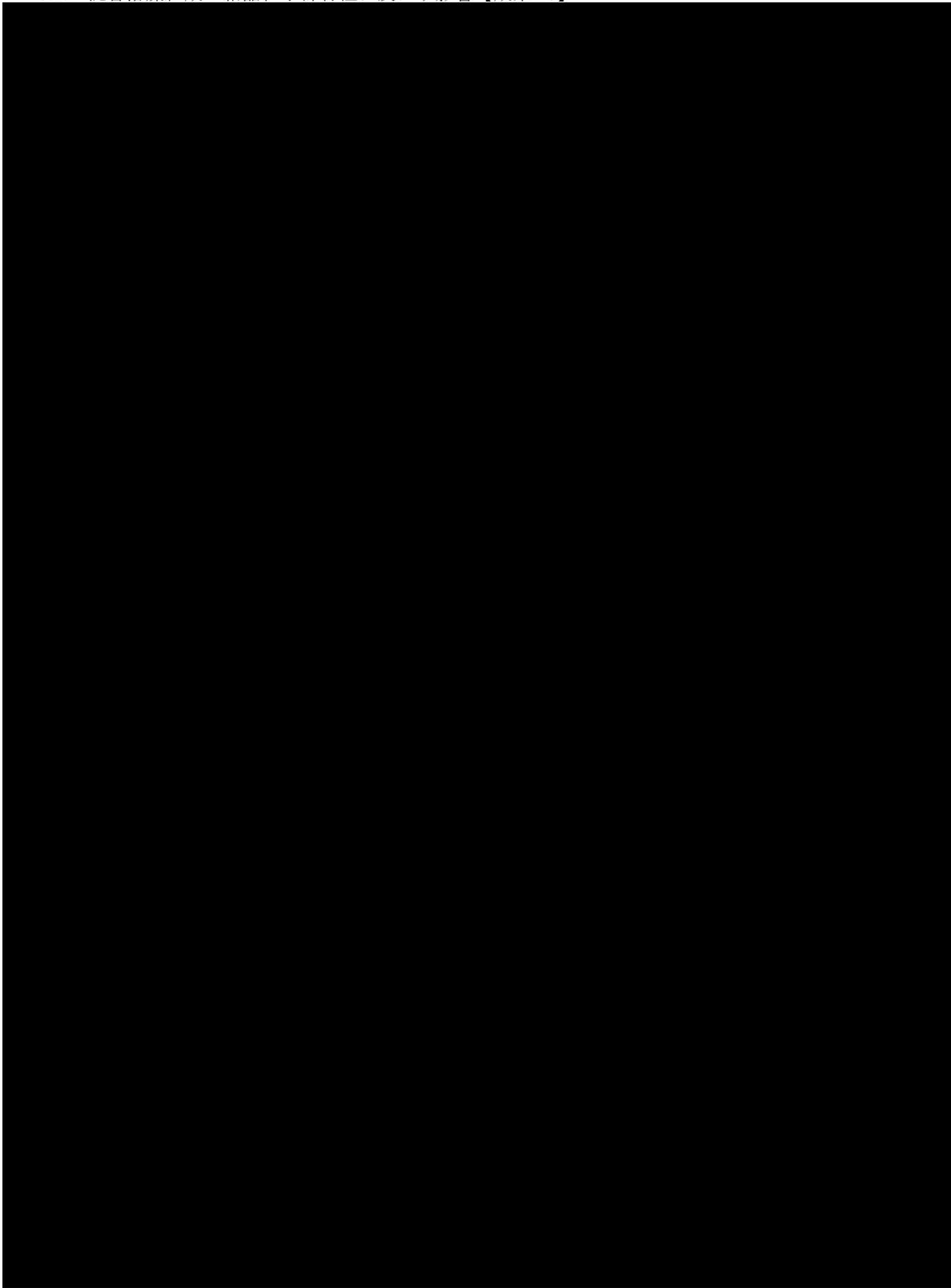
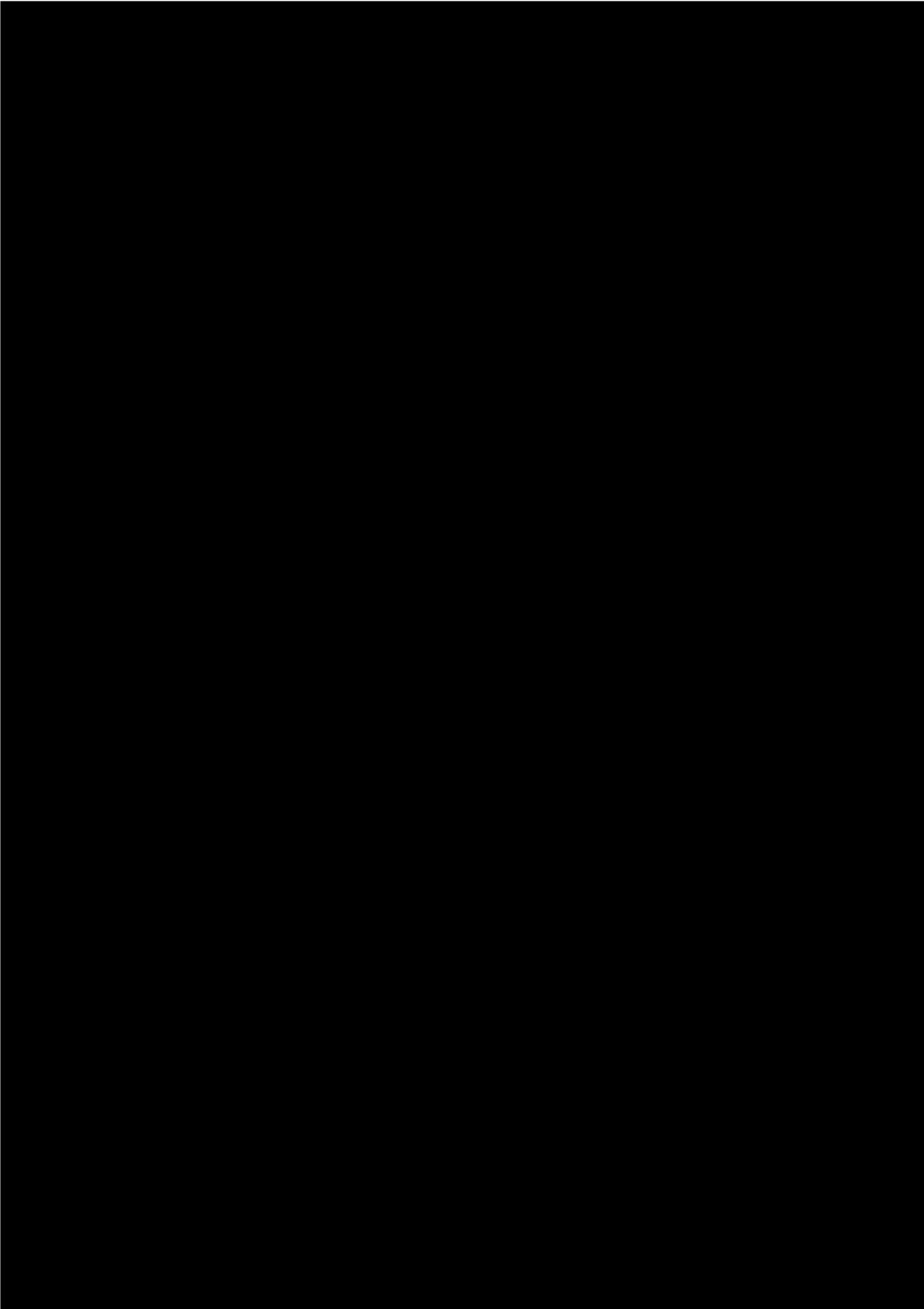


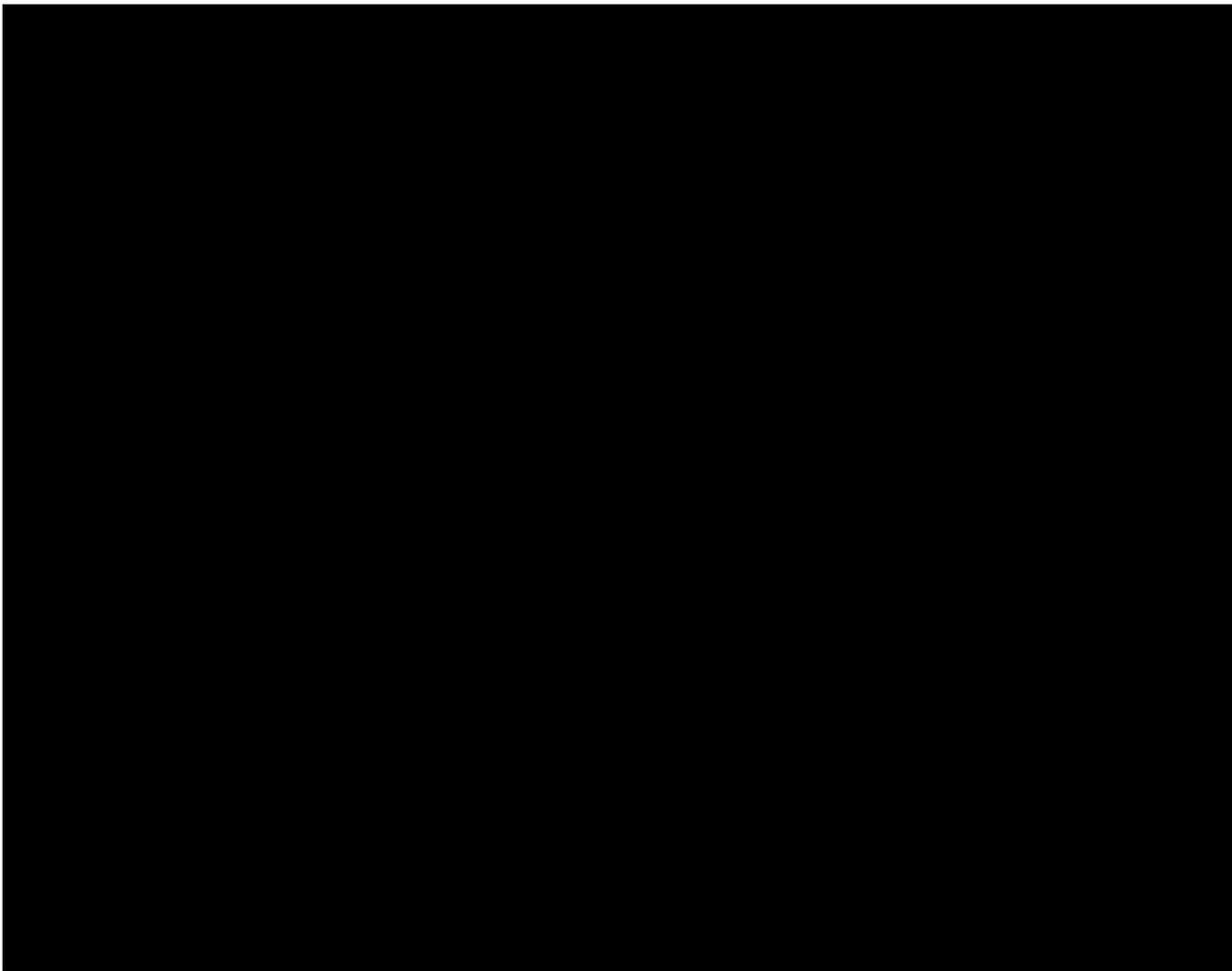
図 28 (a)異なる溶媒中でのエクトインの粒径の経時変化  $\Delta L_N$  と(b)過飽和度と成長速度の関係

以上より、水およびメタノール中での単結晶の成長速度を評価し、晶析工程での生産速度を決定するために必要な結晶成長に関する値を獲得できた。今後、求めた値に基づいて、所望の生産速度を達成するために望ましい過飽和度を推算し、その過飽和度を満たす操作条件を推定することができると思われる。

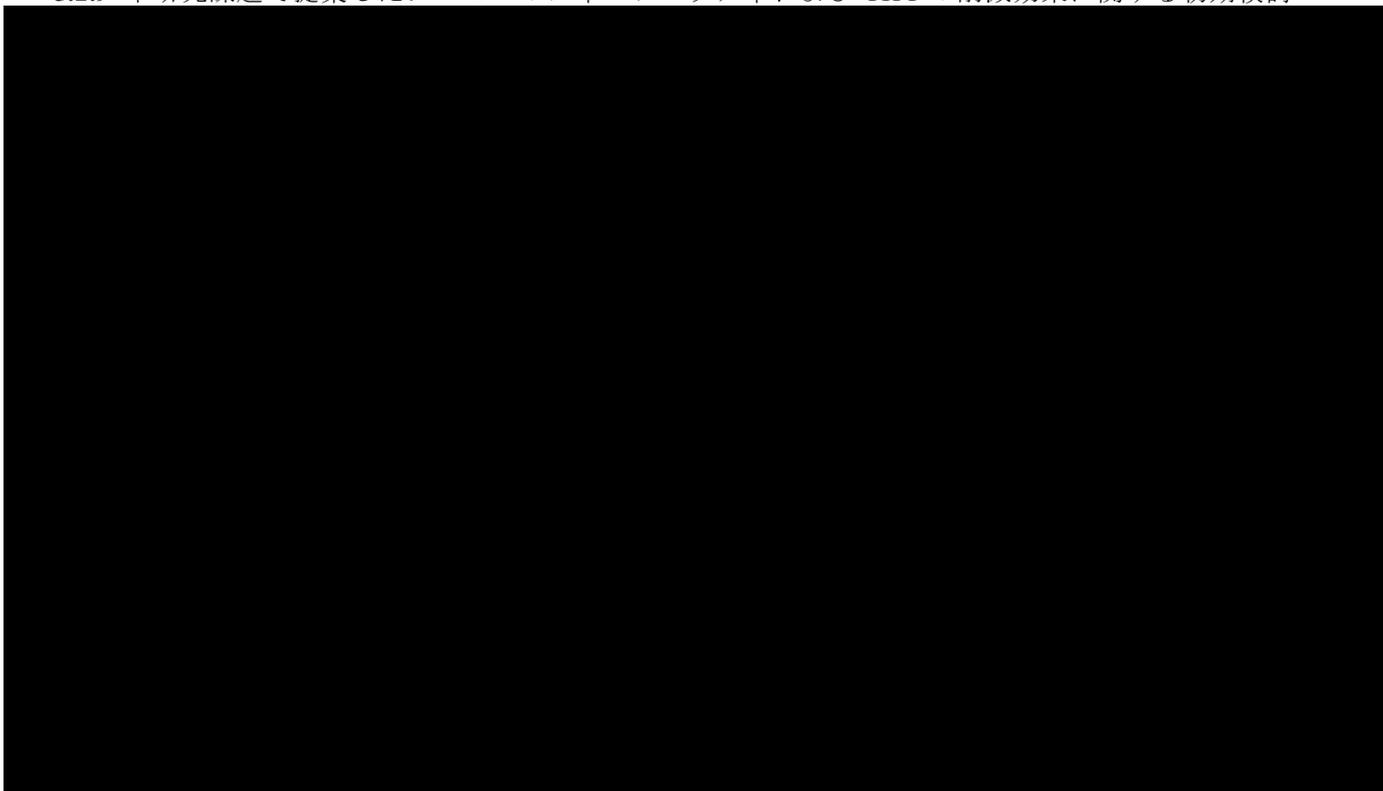
5.2.7 混合溶媒組成が結晶粒子群特性に及ぼす影響【成果 18】

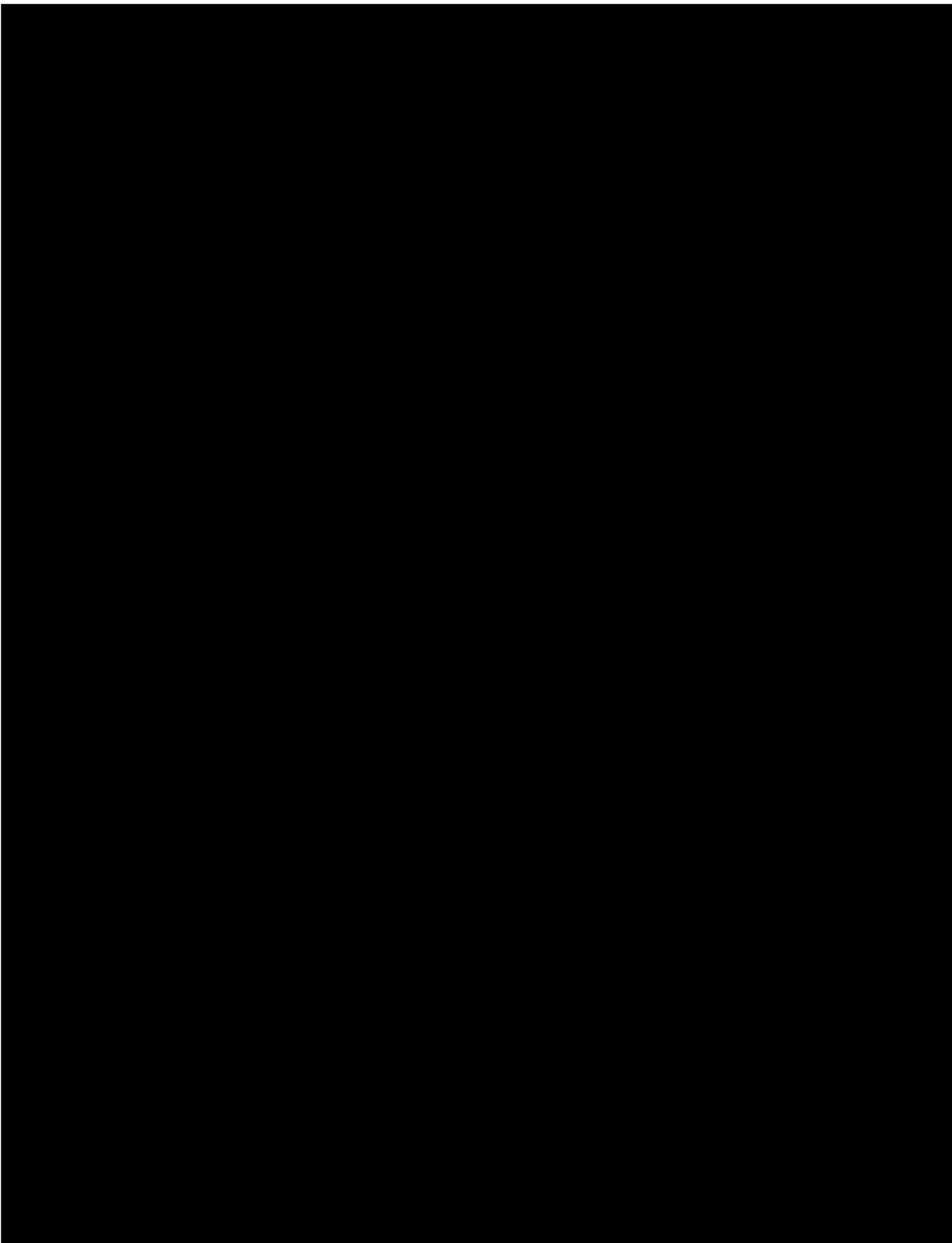






**5.2.9** 本研究課題で提案したプロセスのフィージビリティおよび GHG の削減効果に関する初期検討





- [4] 亀岡 俊則, 特集 1 家畜ふん尿の高度化処理の現状と課題 : メタン発酵処理技術の現状と課題(2006)
- [5] Chen, R., *et al.*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 116 (2017).
- [6] Perez, V. *et al.*, *ACS Sustainable. Chem. Eng.*, 9, 17371-17380 (2021).

## 6. 目標の達成状況と環境政策等への貢献

## (1) 研究目標の達成状況

<全体の達成状況>・・・・・・・・・・・・・・・・ 3. 目標どおりの成果をあげた

「メタンを炭素源とする有価物生産システムの構築に向けた微生物培養と晶析技術の開発」

| 全体目標  | 全体の達成状況   |
|---|---|
| <p>微生物を利用して有価物を安定的な生産を可能にする新技術の開発と、その有価物を夾雑物から単離、精製する操作指針を確立することによって、本研究が提案するコンセプトの実証と実現可能度の評価を目指す。</p> <p>本研究ではロールモデルとして、メタンからエクトインを合成、分離、精製するプロセスを採用した。具体的には、微生物学の観点からメタン酸化細菌を利用して、メタンからエクトインを高効率で生産するための技術開発を目指す。さらに、結晶化学の知見を利用し、エクトインと抽出時に混入した不純物を含む夾雑物からエクトインのみを単離、精製するための操作指針の確立を図る。</p> <p><u>初年度：微生物による有価物の生産、ならびに結晶化による分離手法の確立</u></p> <p>初年度では、有価物の合成ならびに分離・精製の各工程にて、基盤となる動力学的パラメータや物性データの収集と、操作条件が生成物の状態に及ぼす影響を明らかにする。具体的には、サブテーマ1でエクトインが生産される微生物の代謝機能を促進する条件を探索し、メタンからエクトインを生産する方法を見出す。更に、専用のバイオリクターを製作し、メタン酸化細菌の高密度培養を試みる。サブテーマ2では生成したエクトインを結晶として単離することを目指し、晶析操作を設計する上で基礎的なデータであるエクトインの多成分相図の作図と、エクトインの結晶粒子群の品質と晶析操作の相関関係を解明する。</p> <p><u>次年度：有価物の生産工程と分離・精製工程の融合</u></p> <p>メタン酸化細菌からのエクトイン回収プロセスの検討と、生成したエクトインを夾雑物から結晶粒子群として分離する手法の確立を目指す。サブテーマ1では、メタン酸化細菌細胞内に蓄積しているエクトインを意図的に放出させる培養条件の選定、並びにプロセスとして運転する際のシークエンス操作手法の検討を行い、エクトインの回収技術の確立を行う。また、サブテーマ2では、前年度に作成した多成分相図を利用し、サブテーマ1で得られたエクトインを含む培養液（原料溶液）中から、エクトインの結晶を得るために適切な晶析操作指針を検討する。さらに、原料溶液液に含まれる不純物が結晶”粒子群”の品質に与える影響を解明し、サブテーマ1へフィードバックして、高品位な有価物の結晶粒子</p> | <p>初年度では、ロールモデルとして採用したメタンからエクトインを合成、分離精製を目指し、初年度ではサブテーマ1、2共に新たな実験設備を立ち上げ、目標としていた動力学的パラメータや物性データの獲得に成功し、サブテーマ2では、当初の研究計画で想定していなかった実験系の物性データも獲得することができたため、目標を上回る成果をあげたと判断した。</p> <p>次年度では、研究目標の達成に向けて、サブテーマ間での情報共有を密に行いながら研究を遂行した。サブテーマ1では初年度に確立した回分実験に加えて、連続通気リアクターも本格的に利用しながら提案手法による連続培養の実現に向けた検討を行った。その中で、エクトイン含有量向上を示唆する実験結果が幾つか得られ、特に窒素源としてNH<sub>4</sub><sup>+</sup>を添加することにメリットがある事が示された。</p> <p>サブテーマ2では、初年度に作成した多成分相図を用いて、結晶化の推進力である過飽和とエクトインの結晶粒子群特性との関係を明らかにしたことや、サブテーマ1での培養条件から推定される不純物がエクトインの結晶化に及ぼす影響について検討できたため、目標を通りの成果をあげたと判断した。</p> <p>最終年度では、当初の目標達成に向けてメタン利用率の向上に向けた運転方法の検討や、エクトイン含有量に影響する因子の解明を行った。</p> <p>さらに、独自のフィージビリティ評価と先行研究の結果に基づき、本研究課題で提案している製造プロセスは経済的に採算がとれ、且つGHG排出量の削減効果があることも見出すことができた。</p> <p>また、コロナ禍や円安の影響を受け、当初の計画で予定していたエクトインの連続晶析については検討することができなかったが、将来的に晶析工程を導入することを見据え、別の実験系を用いて検討を進めた。その結果、連続晶析装置の操作条件が結晶粒子群特性に及ぼす影響だけでなく、生産性と品質の改善を指向した新しい連続晶析プロセスに関する知見や連続晶析装置</p> |

|  |   |
|--|---|
| <p>群を獲得するための回収環境条件や操作の設計指針を検討する。</p> <p><u>最終年度：メタンの新たな利用先プロセスとしての実現可能性に関する評価</u></p> <p>最終製品として想定される有価物の結晶粒子群の生産効率向上を目指し、各工程にて操作の設計指針の最適化を図る。高効率化や省エネルギー化に向け、原料の供給から有価物を製造するプロセスの連続化等を検討する。さらに、本プロセスによる環境負荷やコストを概算し、本研究が提案するコンセプトが達成された場合に見込まれる GHG 排出量の削減を考慮した上で社会的インパクトを明らかにする。本研究が提案するバイオマス由来のメタンガスから高付加価値の製品を生み出すコンセプトのロールモデルの実証を目指すと共に、今後に向けて事業化した場合の課題等を洗い出す。</p> | <p>の新たな利用方法を見出すことができ、想定していた結果とは異なるものの、当初の研究計画の目標以上に革新的で発展性のある研究成果をあげたと判断した。</p> <p>なお、コロナ禍の中で初年度が開始し、研究室への入構制限などがあり実験の実施に支障が出たが、2、3年目で出来るだけリカバリーした。また初年度にサブテーマ1研究分担者の所属変更に伴い、研究環境が申請時より大きく変化したため、研究環境や実験系の構築に当初の予定より時間を要した。</p> |
|--|---|

### <【サブテーマ1】達成状況>・・・・・・・・ 3. 目標どおりの成果をあげた

#### 「メタン酸化細菌による有価物生産に向けた技術開発」

| サブテーマ1目標  | サブテーマ1の達成状況   |
|---|---|
| <p>1. 供給メタンの80%程度を微生物により消費することを目標とする、高効率な中空糸ガス透過膜バイオリアクターを作製し、メタン酸化細菌の高密度培養を達成する(初年度)。</p> <p>2. 純菌株を用いた基礎的な生理活性評価によって増殖速度等の知見を得ることで、リアクターの運転パラメータを策定する(初年度)。</p> <p>3. メタン酸化細菌からのエクトイン回収時の培養条件の選定を行う。塩濃度をシークエンス的に変化させることで、エクトインをどの程度細胞からバルク液中に放出されるのか明らかにする。更に、再びエクトインが細胞内に蓄積される期間(回復期間)も明らかにすることで、培養と回収のサイクルを確立する(次年度)。</p> | <p><u>目標どおりの成果を上げた</u></p> <p>ガス透過膜を利用したリアクターを作成し、実証した結果、メタンの供給方法を工夫することで、供給したメタンの22.9%の菌体を得ることが出来た。回分試験で消費されたメタンあたりの菌体収率は57%であったので、供給メタンの40.2%が菌体に利用されたと推定される。当初挙げた80%という数値には届かなかったが、これは実験による結果であり、今後の改良により更なる向上が期待できるため。</p> <p><u>目標を上回る成果を上げた</u></p> <p>特に影響が大きいと見込まれた塩濃度、窒素源等に対する菌体増殖やエクトイン含有量を一通り精査できた。また追加事項として、H<sub>2</sub>Sのメタン酸化細菌への影響評価を行い、当初予定していたより多くの検討を行えたため。</p> <p><u>目標どおりの成果をあげた</u></p> <p>回分試験にて菌体内へのエクトイン蓄積後の回収の際に必要な条件精査を行って成果が得られた。また、細胞内へのエクトイン蓄積と増殖フェーズとの関係性を明らかにし、この点に関しては、特に課題とならないことが確認できた。一方で、研究の過程で好気性メタン酸化細菌が十分なバイオフィルムを形成しない性質が明らかとなり、生物膜の形成を想定したシークエンス運転は実現が難しいことが明らかとなった。</p> <p>このような点から、シークエンス的な蓄積と回収プロセスには遠心分離または膜分離等の菌体分離工程を導入する必要があることが分かった</p> |

|   |  |
|---|--|
| <p>4. 回収工程における夾雑物の混入をできるだけ少なくするよう有価物回収運転を最適化する(次年度-最終年度)。</p> <p>5. 供給メタンに対する回収・精製工程でのエクトインの収率を明らかにする(次年度-最終年度)。</p> <p>6. プロセス全体としての炭素の物質収支、エネルギー推定消費量を推算し、環境影響評価にかけることで本コンセプトの実現可能性や、GHG 排出量の削減効果に対する寄与を明らかにする(最終年度)。</p> | <p>ため、連続的なプロセスの試行は今後の課題となった</p> <p><u>目標にはやや及ばないが一定の成果をあげた</u><br/>         エクトイン回収液に含まれる培養液由来のNaClの除去が課題であることが明らかとなった一方で、具体的な解決策や最適化は引き続き検討課題として残ったため。</p> <p><u>目標どおりの成果をあげた</u><br/>         回収工程では菌体内で生成したエクトインの80%を回収液側に移行させ精製工程に送ることができることが明らかとなった。一方で、回収液に含まれる夾雑物を除外するための工程の影響評価は今後の検討課題である。</p> <p><u>目標どおりの成果をあげた</u><br/>         回分実験等より得られた暫定的なデータを基に、プロセスのフィージビリティの検討を行った。また、研究課題開始後に類似した論文が出版された為、その内容を元に実現可能性やGHG排出量に関する考察を行えたため。</p> |
|---|--|

<【サブテーマ2】達成状況>・・・・・・・・ 2. 目標を上回る成果をあげた

「夾雑物から高純度な有価物を得るための晶析プロセスの開発」

| サブテーマ2目標   | サブテーマ2の達成状況  |
|--|--|
| <p>1 所望の結晶粒子群を得るための晶析操作を設計する上で基盤データとなるエクトインを含む多成分相図を新たに作成する。また、エクトイン-水の単純な二成分系から得られる純粋なエクトインの結晶粒子群の品質を明らかにする(初年度)。</p> <p>2 サブテーマ1から供給される原料溶液から晶析操作により、目的成分であるエクトインの結晶粒子群を獲得する。さらに、多成分相図を利用して、得られたエクトインの結晶粒子群品質(純度・粒径・粒径分布・形態等)と晶析操作の相関関係を解明する(初年度-次年度)。</p> | <p><u>目標を大きく上回る成果を上げた</u><br/> <b>5.2.1、5.2.2</b>で示した通り、想定される実験系の多成分相図を新たに作成し、当初計画していたエクトイン-水での晶析の操作条件と結晶粒子群特性の関係に加え、エクトイン-メタノールの二成分系についても操作条件と結晶粒子群特性の関係を明らかにしたため。また、当初の計画では予定していなかった混合溶媒からの結晶化について検討し、エクトインの粒子群特性が組成に応じて著しく変化することを新たに見出したため。</p> <p><u>目標どおりの成果を上げた</u><br/>         サブテーマ1から供給された原料溶液と試薬を用いて調製した擬似溶液からエクトインの結晶化に成功したため。<br/>         さらに、初年度に作成した多成分相図から推算した過飽和の観点から操作条件と結晶粒子群特性の相関関係を考察することができたため。</p> |

|   |  |
|---|--|
| <p>3. 培養後の溶液中に含まれる不純物をリストアップし、各不純物存在下で析出させたエクトインの結晶粒子群の品質がどの程度変化するか明らかにする（次年度）</p>                                | <p><u>目標どおりの成果を上げた</u><br/>サブテーマ1と連携して不純物をリストアップし、その中でも主要な不純物として考えられるNaClがエクトインの結晶化や粒子群特性に及ぼす影響を明らかにすることができたため。また、初年度に作成した多成分相図を利用して、NaClが混入しない条件で結晶化することを確認できたため。</p>   |
| <p>4. 不純物の影響を考慮し、実際の原料溶液中に含まれるエクトインを、製品として安全性を満たし、従来法と同程度の純度（98%）を有する結晶粒子群として分離・精製するために晶析プロセスを確立する（次年度-最終年度）。</p> | <p><u>目標には及ばないが一定の成果を上げた</u><br/>固液分離性を考慮し、エクトインの結晶粒子群特性を制御するための重要な操作条件を見出すことはできた。一方、実プロセスの原料溶液中から所望の特性を有するエクトインの結晶粒子群を得るための操作条件の確立までは至らなかった。費用面の問題はあがるが、今後、各分離精製工程をラボスケールで実施可能な設備を導入し、実プロセスでの組成に近い原料溶液を大量に調製することができれば、試行回数を増やすことができ、当初掲げた目標どおりの成果が得られると考えられる。</p> |
| <p>5. 前年度までに得られた操作条件に基づいて、連続式晶析装置の攪拌条件や冷却速度、滞留時間等を設計し、プロセスシミュレータを用いて、エクトインの粒子群を連続で製造可能なプロセスフローシートを作成する（最終年度）。</p> | <p><u>目標を上回る成果を上げた</u><br/>コロナ禍や円安といった不可抗力事案が発生し、試薬の安定確保が困難となり、当初予定していた実験系を用いて検討することができず、プロセスフローシートの作成するためのデータを獲得することができなかった。しかし、エクトインの晶析工程に導入することを想定して、別の実験系を用いて、着目した連続式晶析装置の操作条件と結晶粒子群特性との関係や、収率を改善するためのプロセス設計などを達成することができ、結果的に想定以上の研究成果を上げることができたため。</p>        |

## （2） 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

### <得られた研究成果の学術的意義>

サブテーマ1では、メタン酸化細菌の培養方法に関して、従来の曝気を基本とする方法に対し、新たに中空糸ガス透過膜によって液中にメタンを供給することでメタン酸化細菌を培養可能であるということを示した点は先導性がある。

また、メタンの供給方法として、連続的に供給するだけでなく、メタン供給圧力を指標とした間欠供給運転がメタンの効率的な利用に有効で、エクトインの含有量にも影響がない点を実証できたのは独創性を有する。

さらに、培養条件に関して既往の報告ではNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を培養に必要な窒素源として利用していたが、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を利用した場合、エクトインの含有量の向上が見込まれ、培養系の安定運転にも寄与する傾向が掘めた点は、メタン酸化細菌の適用範囲を広げることに繋がるため発展性を有する。

サブテーマ2では、下記の3項目について、学術的意義の高い成果が得られたと考えている。

- ・ 晶析の操作条件とエクトインの結晶粒子群特性との関係

エクトインの結晶化に関する既往の研究では、主に単一結晶構造解析の結果が報告されており、エクトインの結晶粒子群特性（粒径、形状、粒径分布）については全く報告例がない。したがって、エクトインの結晶粒子群特性に対する晶析の操作条件の影響は本研究課題を実施したことで初めて明らかにされた知見であるという点で先導性がある（論文①査読中）。

- ・ 複数の溶媒と溶媒和物を構成する化合物の粒子群特性と操作条件の関係

医薬品分野では生物学的利用能を向上させる手法の1つとして、難溶解性物質の溶媒和物結晶の作製が挙げられるなど、溶媒和物に関する研究例は数多く存在する。しかし、製造プロセスの開発に向けて、溶媒和物の粒子群特性に着目し、その特性の作り分けに向けて晶析の操作条件を検討した研究例はほとんどない。したがって、他の研究グループに先駆けて、溶媒和物を形成するエクトインの晶析操作と結晶粒子群特性の関係を明らかにしたサブテーマ2の成果は溶媒和物結晶の粒子群特性を制御するための操作指針を検討するモデルケースとして有用であり、先導性かつ発展性がある。

さらに、エクトインがエクトインメタノール和物とエクトイン二水和物を形成し、かつ水とメタノールが相溶性の関係にあるという点に着目し、両方の溶媒が存在している混合溶媒中からの結晶化について検討した。複数の溶媒と溶媒和物を形成する化合物は報告されているが、その混合溶媒からの結晶化や、特定の溶媒和物が析出する条件を検討した研究例はなく、今後溶媒和物が析出する条件やそのメカニズムの推定、メカニズムの一般化が必要であるという点で発展性がある。

また、5.2.7の結果は、異なる溶媒和物が析出する境界条件を理論的に推定する方法や、ユニークな特性を有する粒子群が析出するメカニズムの推定、推定したメカニズムに基づいて新たな特性を有する粒子群の作製方法の検討といった、新たな研究シーズを生み出すトリガーとなっており、極めて発展性に富んだ研究成果である。

- ・ TC装置を利用した結晶化手法

生産性の向上や環境負荷低減の観点から、回分式から連続式へのパラダイムシフトが起きており、エクトインの晶析工程への導入を計画していた高い剪断力を有するTC装置は晶析分野で注目されている。しかし、結晶化学分野では、TC装置の操作変数と装置の仕様が結晶粒子群の特性に及ぼす影響について十分に検討されていない。これに対して、TC装置の操作変数および装置の仕様によって決まる変数と粒子群特性との関係を明らかにした。したがって、5.2.5.1で示した結果は、他研究グループに先駆けてTC装置を新たな連続式の晶析装置として利用する際の操作設計に必要な基礎的知見に相当する研究成果であり、先導性があると考えている。

### <環境政策等への貢献に関する成果>

本研究課題は“新たな技術シーズの発掘”に該当する。そのロールモデルとして、本研究ではメタン酸化細菌の代謝機能によるエクトインの生産プロセスに着目した。結果として、環境負荷に関する詳細な検討といった課題は残ったものの、サブテーマ1、2の研究成果によって、本研究課題で提案したエクトインの製造プロセスは、メタンから直接有価物を合成する手法の1つとして実現可能性があることを示しており、バイオマス由来のメタンの新たな利用価値を見出せたと考えている。

最終的に提案するプロセスが達成された場合には、下記の項目がメリットとして挙げられる。

- ・ 有価物の生産から分離・精製まで基本的に常温・常圧下で実施するため、小規模なメタン発酵プロセスの事業化を促進する。
- ・ 小型化によりオンサイト処理も想定範囲となり、バイオマス集約化に伴う輸送コストや初期投資を低く抑え、メタン発酵施設の新規導入を後押しできる。
- ・ 既往技術とバッティングしないバイオマスも利用可能なため、地域での未利用バイオマスの活用等

新たなシーズを掘り出す可能性を秘めている。

- ・ バイオマス由来のメタンを原料とした有価物を含む商品は、環境影響を抑えた商品として新たな市場価値が期待できる（SDGs-⑫, ⑬項目に対応）。
- ・ バイオプロセスからの有価物回収は夾雑物の影響により難しく、コストが高い。晶析技術の活用は他のバイオ産業へも展開でき、産業全体の省エネルギー、省コスト化への貢献が期待できる。

その他、本研究課題で得られた研究成果は下記の点で環境政策への貢献が見込まれる。

- ・ TC 装置を用いた難結晶化合物の分離精製

5.2.5.2 より、TC 流れを利用することによって、従来法と比較して、析出する結晶の量が増加し、収率は向上することが分かった。過飽和が低い条件下にて結晶化を誘発可能であることを見出した今回の成果は、難結晶化合物の分離精製が求められる環境晶析への応用も期待されるため、資源循環や環境浄化といった観点でサステナブルなものづくりの推進にも貢献できる可能性がある（論文②査読中）。

- ・ 新たな連続式晶析プロセスとしての利用

持続可能な社会の構築に向け、経済性・生産性の観点から、晶析分野でも連続式への移行が急務となっている。

5.2.5.3 より、TC 装置と従来の MSMPR 装置を組み合わせたカスケード型連続晶析プロセスの操作条件と粒子群特性の関係を明らかにし、原料溶液の濃度や総流量を変更することなく、TC 装置と MSMPR 装置へ供給する原料の分配比を変更するだけで、様々な特性を有する結晶粒子群を得られることを見出した。したがって、カスケード型連続晶析プロセスは、従来の

MSMPR では成し得なかった柔軟な品質の作り分けが可能であるため、今後 MSMPR に代わる新たな晶析プロセスとして、連続式への移行が十分に進んでいない分野での導入が期待され、連続式へのパラダイムシフトの促進および持続可能なものづくりに関する環境政策に貢献すると考えられる（図 34）。

- ・ 濃縮海水からの脱塩技術としての利用

近年、水資源の確保が世界的課題であり、水不足解消のために海水淡水化技術が急速に進展している。しかし、淡水化の際に副生成物として生じる塩濃度が高い濃縮海水を排出すると海洋環境への影響が大きいため、塩濃度を下げる必要がある。一方、晶析では溶液中から溶質が固相として生成し、溶液中の溶質濃度は低下するので、晶析操作は溶液中の塩濃度を下げる技術としても捉えることができる。

5.2.5.4 より、微結晶による成長促進現象を利用して、粒径分布が悪化することなく、成長速度を促進できることを見出した。したがって、微結晶による成長促進現象を濃縮海水から塩を除く“脱塩（晶析）”工程で利用し、塩の生産速度を向上させることによって、塩濃度を効率的に下げ、淡水化の際に副生成物として生じる濃縮海水の効率的な処理方法として応用できる可能性がある。

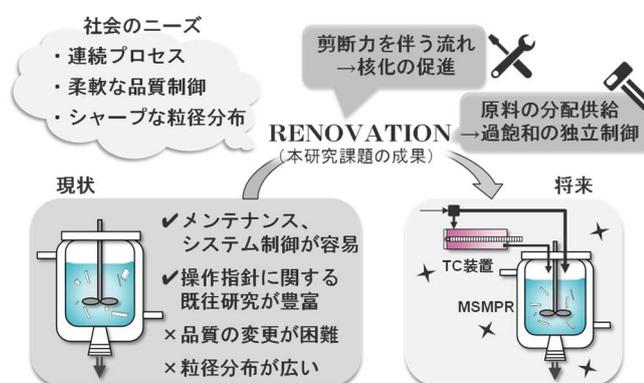


図 34 本研究の成果が晶析工程の連続化に向けて果たす役割と位置づけを示した概念図

## 7. 研究成果の発表状況

## (1) 成果の件数

| 成果の種別                      | 件数 |
|----------------------------|----|
| 査読付き論文：                    | 2  |
| 査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）： | 0  |
| その他誌上発表（査読なし）：             | 0  |
| 口頭発表（国際学会等・査読付き）：          | 4  |
| 口頭発表（学会等・査読なし）：            | 13 |
| 知的財産権：                     | 0  |
| 「国民との科学・技術対話」の実施：          | 0  |
| マスコミ等への公表・報道等：             | 0  |
| 研究成果による受賞：                 | 0  |
| その他の成果発表：                  | 1  |

## (2) 誌上発表

## &lt;査読付き論文&gt;

| 成果番号 | 【サブテーマ2】の査読付き論文   |
|------|---|
| 1    | <b>Amari, S.</b> , Ohashi, S., Takiyama, H. (2023).<br>Effect of properties of microcrystals and impurities on the growth rate enhancement of crystalline particles in suspension.<br><i>Desalination</i> , 567, 116987.<br><a href="https://doi.org/10.1016/j.desal.2023.116987">https://doi.org/10.1016/j.desal.2023.116987</a> |
| 2    | Hosokawa, M., <b>Amari, S.</b> , Takiyama, H. (2024).<br>Investigating the characteristics of MnCO <sub>3</sub> crystalline particles under high shear field.<br><i>Powder Technology</i> , 433, 119277.<br><a href="https://doi.org/10.1016/j.powtec.2023.119277">https://doi.org/10.1016/j.powtec.2023.119277</a>               |

<その他誌上発表（査読なし）>  
特に記載すべき事項はない。

(3) 口頭発表

<口頭発表(国際学会等・査読付き)>

|      |   |
|------|---|
| 成果番号 | 【サブテーマ1】の口頭発表（国際学会等・査読付き）   |
| 3    | ○Ryu NINOMIYA, Satoshi NAKAI, Wataru NISHIJIMA, Takehiko GOTOH, and <b><u>Toshikazu SUENAGA</u></b> *<br>Investigation of Culture Conditions for Ectoine Discharge and Accumulation for Practical Application of Ectoine Production Process<br>WET2023-online, 2023.7.8-9, Oral |

|      |  |
|------|--|
| 成果番号 | 【サブテーマ2】の口頭発表（国際学会等・査読付き）  |
| 4    | ○ <b><u>Shuntaro AMARI</u></b><br>[Invited Lecture] Novel cascade-type crystallizer using continuous flow with high shear stress.<br>ICPAC Bali 2023 (Bali, Indonesia / ONLINE) 2023.9.12-17, PCC20, Oral.   |
| 5    | ○ <b><u>Shuntaro AMARI</u></b><br>Investigating the effect of operation conditions on the properties of ectoine particles for improvement of the purification process.<br>International Powder and Nanotechnology Forum2023 (IPNF2023) (TOKYO BIG SIGHT) 2023.9.20-21, 3-3, Oral & Poster  |
| 6    | ○Mako HOSOKAWA ・ <b><u>Shuntaro AMARI</u></b> ・ Hiroshi TAKIYAMA<br>The effects of design and manipulated variables under high shear field on the characteristics of MnCO <sub>3</sub> crystals in tubular type crystallizer.<br>The 12th International Conference on Separation Science and Technology (ICSST23) (Okinawa, JAPAN) 2023.11.15-17, BP-06, Poster. |

## &lt;口頭発表（学会等・査読なし）&gt;

|      |  |
|------|--|
| 成果番号 | 【サブテーマ1】の口頭発表（学会等・査読なし）  |
| 7    | ○末永 俊和, 二宮 竜, 甘利 俊太郎, 中井 智司, 後藤 健彦, 西嶋 涉<br>好気性メタン酸化細菌から有価物（エクトイン）生産に向けた基礎的培養条件の検討<br>化学工学会第53回秋季大会, 信州大学長野(工学)キャンパス, 2022年9月, BB115, 口頭 |
| 8    | ○二宮竜, 中井智司, 後藤健彦, 末永俊和*<br>メタン酸化細菌によるエクトイン排出と蓄積の促進に関する培養条件の検討<br>中四国若手CE合宿2023（休暇村大久野島, 広島）2023年8月, ポスター                                 |

|      |  |
|------|--|
| 成果番号 | 【サブテーマ2】の口頭発表（学会等・査読なし）  |
| 9    | ○宇野 沙映・笠井 つばさ・末永 俊和・滝山 博志・甘利 俊太郎<br>エクトイン結晶粒子群製造のための晶析に関する基礎研究<br>化学工学会新潟大会2022（朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター）<br>2022.11.9-19, D217, 口頭       |
| 10   | ○甘利 俊太郎<br>[依頼講演]高剪断場を利用したカスケード型連続フロー晶析装置の開発<br>化学工学会新潟大会2022（朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター）<br>2022.11.9-10, B125, 口頭                         |
| 11   | ○細川 真子・甘利 俊太郎・滝山 博志<br>電池材料の連続フロー晶析での操作条件と結晶粒子群特性との関係第25回化学工学会学生発表会（オンライン）2023.3.4, M33, 口頭  |
| 12   | ○甘利 俊太郎・末永 俊和<br>[依頼講演]メタンを原料とする有価物生産プロセスの構築を志向した微生物培養条件と晶析法の検討化学工学会第88年会（東京農工大学 小金井キャンパス）2023.3.15-17, R312, ポスター                   |
| 13   | ○甘利 俊太郎<br>[招待講演]異分野協創による高分子電解質膜および晶析プロセスの設計・開発<br>化学工学会山形大会2023（三支部合同大会）（山形テルサ）2023.8.8-9<br>D233, 口頭                               |
| 14   | ○甘利 俊太郎<br>[招待講演]高剪断場を利用した晶析プロセスの開発と結晶粒子群の特性制御<br>中四国若手CE合宿2023（休暇村大久野島, 広島）2023.8.30-31, L02, 口頭                                    |
| 15   | ○甘利 俊太郎・高橋 龍二・細川 真子・滝山 博志<br>[注目講演]高剪断場を利用した低過飽和条件下での結晶粒子群品質と生産性の向上<br>化学工学会第54回秋季大会（福岡大学 七隈キャンパス / オンライン）<br>2023.9.11-13, G319, 口頭 |

|    |  |
|----|--|
| 16 | ○ <b>Shuntaro AMARI</b><br>Continuous crystallization using high shear stress.<br>Japan-Thailand online joint seminar on crystallization technology (ONLINE)<br>2023.12.21, Oral |
| 17 | ○吉田 陽翔・ <b>甘利 俊太朗</b> ・滝山 博志<br>非溶媒添加晶析を用いた Ectoine の結晶化に対する NaCl の影響<br>第 26 回化学工学会学生発表会（オンライン）2024.3.2, G30, 口頭  |
| 18 | ○ <b>甘利 俊太朗</b> ・宇野 沙映・笠井 つばさ・ <b>末永 俊和</b> ・滝山 博志<br>溶媒和物を形成するエクトイン結晶粒子群の特性制御に向けた晶析条件の検討<br>化学工学会第 89 年会（大阪公立大学 中百舌鳥キャンパス）2024.3.18-20<br>J122, 口頭                              |
| 19 | 【予定】○ <b>甘利 俊太朗</b> ・大橋 沙李・滝山 博志<br>微結晶による食塩結晶粒子群の成長促進現象に対する夾雑イオンの影響<br>日本海水学会第 75 年会（沖縄科学技術大学院大学）2024.6.26-27, 口頭&ポスター  |

## (4) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

## (5) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

## (6) マスメディア等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

## (7) 研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

## (8) その他の成果発表

|      |   |
|------|---|
| 成果番号 | 【サブテーマ 2】のその他の成果発表  |
| 20   | 成果番号 15 について、1050 件の講演から実行委員会にて選定された注目講演（プレスリリース対象講演）として採択された。プレスリリースは講演要旨公開日（2023 年 8 月 28 日）に化学工学会トップページの「プレスリリース」欄にて一般公開（ <a href="https://www.scej.org/docs/general/press-release/54f-press.pdf">https://www.scej.org/docs/general/press-release/54f-press.pdf</a> ）となり、報道機関等にも上記の資料が送付された。 |

## 8. 国際共研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 9. 研究者略歴

## ＜研究代表者略歴＞

| 代表者氏名  | 略歴（学歴、学位、経歴、現職、研究テーマ等）   |
|--------|--|
| 甘利 俊太郎 | 東京工業大学大学院総合理工学部化学環境学専攻修士<br>博士（工学）<br>日本学術振興会特別研究員（DC2）<br>英国ケンブリッジ大学化学科博士研究員を経て<br>現在、東京農工大学大学院工学部助教<br>専門は結晶化学、研究テーマは多成分晶析 |

## ＜研究分担者（サブテーマリーダー）略歴＞

| 分担者氏名    | 略歴（学歴、学位、現職、研究テーマ等）  | 参画期間            |
|----------|--|-----------------|
| 1) 末永 俊和 | 東京農工大学大学院工学部応用化学専攻農学研究<br>科修士<br>博士（工学）<br>日本学術振興会特別研究員（DC2）<br>東京農工大学グローバルイノベーション研究院特<br>任助教を経て<br>現在、広島大学先進理工系科学研究科助教<br>専門は、環境工学、環境微生物学 | 2021. 4-2024. 3 |

## Abstract

## [Research Title]

Development of Microbial Cultivation and Crystallization Strategies for the Production of Valuable Materials Using Methane as a Carbon Source.

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Project Period (FY) :    | 2021-2023  |
| Principal Investigator : | Shuntaro Amari   |
| (PI ORCID) :             | 0000-0001-9155-4014  |
| Principal Institution :  | Tokyo University of Agriculture and Technology<br>2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo, 184-8588, JAPAN<br>Tel: +81-42-388-7729<br>Fax: +82-42-388-7729<br>E-mail: amari@go.tuat.ac.jp |
| Cooperated by :          | Hiroshima University   |
| Keywords :               | Methane, Methane-oxidizing bacteria, Ectoine , Crystallization, Continuous process   |

## [Abstract]

Biomass-derived methane produced by methane fermentation is mainly used as fuel gas. However, when methane is used as fuel, there is little economic benefit for small-scale facilities. Therefore, it is necessary to create new value for biomass-derived methane to promote the dissemination of methane fermentation technology and the utilization of unused biomass for the establishment of a sustainable society.

In this study, we aimed to develop a process for producing valuable substances from methane using the metabolism of microorganisms. The process of producing ectoine, known as a high value-added substance, from methane using the halophilic aerobic methane-oxidizing bacteria was adopted as a role model. Specifically, we focused on the technological development of a synthesis process to produce ectoine by methane-oxidizing bacteria (sub-theme 1) and the operating conditions for obtaining crystalline particles of ectoine with desired characteristics by crystallization in a separation and purification process (sub-theme 2).

In sub-theme 1, the effects of nitrogen source and salinity during the cultivation were determined from growth rate and ectoine production. In addition, we found the culture conditions that maximize the amount of ectoine in the synthesis process. The effect of hydrogen sulfide on the growth rate and the ectoine production was also investigated. Finally, a lab-scale continuous gas-flow bioreactor with a hollow-fiber gas-permeable membrane was constructed and operated to demonstrate of synthesis process.

In sub-theme 2, the effects of operating conditions during the crystallization process, which is known to be a rate-limiting factor for productivity, on the characteristics of ectoine crystalline particles were found. Furthermore, experimental result indicates the important operating conditions for controlling the characteristics of ectoine crystalline particles. In the separation and purification process, the relationship between the operating conditions of the continuous crystallizer and characteristics of crystalline particles was revealed from the viewpoint of improving productivity and reducing environmental impact.

## [References]

Amari, S., Ohashi, S., Takiyama, H. (2023). Effect of properties of microcrystals and impurities on the growth rate enhancement of crystalline particles in suspension. *Desalination*, 567, 116987. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2023.116987>

This research was funded by the Environment Research and Technology Development Fund (ERTDF).

## 別添

(参考資料) 公募審査・中間評価等への対応

| 指摘等  | 対応状況・非対応理由等   |
|--|---|
| <p>採択時コメント「メタンからエクトインを製造する基礎研究としては評価できるが、これが実用化されることによってメタンによる温暖化がどのくらい抑制されるかと言った検討が不足している。このため、環境政策等への貢献が見えない。」</p> | <p>循環型社会の構築に向け、カーボンニュートラルなバイオマスの利用拡大のために目指すべき取り組みとして「より経済的な価値を生み出す高度利用」や、バイオマス事業化戦略の出口戦略の1つである「高付加価値製品の創出による事業化の推進」が挙げられています（農林水産省 食料産業局 令和3年3月）。したがって、仮に、本研究課題が提案するメタンを原料とする有価物の生産プロセスが経済的に問題なく実用化されれば、国の環境政策に貢献できると考えています。</p> <p>また、本研究課題で想定している製造プロセスに類似したプロセスの経済性を検証した論文（Perez, V. <i>et al.</i>, 2021, <i>ACS Sustainable. Chem. Eng.</i>, 9, (17371-17380)）が本研究課題の実施期間中に発表され、メタンからエクトインを製造するプロセスは収益性が高いと結論づけていることから、本研究課題で提案している製造プロセスの実現可能性も全くないわけではないと考えています。本研究課題では、限られた時間と費用を有効活用するため、詳細なフィージビリティ評価については先行研究の内容を引用する形といたしました。</p> <p>一方、サブテーマ1、2共に研究目標に掲げていたエクトインの合成方法の開発や晶析工程の最適化の検討に時間を要したため、ご指摘いただいた点については製造プロセスの消費電力に基づいたCO<sub>2</sub>排出量の観点でしか評価することができませんでし</p> |

|  |   |
|--|---|
|  | <p>た。実用化に向け、ご指摘頂いた点を検討するために、今後はプロジェクトのメンバーとして LCA の専門家にご参画いただくことを検討しております。</p>  |
| <p>採択時コメント「メタン排出抑制効果の具体的な総量とコストについての見込みが欲しい。」</p>  | <p>コストに関して、当初は本研究課題で具体的に検討することを予定していましたが、初年度に本研究課題で想定している製造プロセスに類似したプロセスの経済性を検証した論文 (Perez, V. <i>et al.</i>, 2021, <i>ACS Sustainable. Chem. Eng.</i>, 9, (17371-17380)) が発表され、メタンからエクトインを製造するプロセスは収益性が高い見込みであることが示されておりました。したがって、先行研究を引用する形とはなりますが、本研究課題で提案した製造プロセスの実現可能性は高いと考えています。</p>  |
| <p>採択時コメント「興味あるテーマで有り、目的や方法はクリアである。しかしながら、基礎的データが示されておらず、フィージビリティに疑問が残る。採択された場合、これが評価できるデータを早急に整えることを期待したい。」</p> | <p>ご指摘に基づき、各サブテーマとも研究計画の1-2年目で基礎的データの獲得に注力し、本研究課題で提案しているプロセスの実現可能性を検証するために必要な最低限の結果を得ることができました。詳細については 5.1.1、5.2.1、5.2.2 等をご参照ください。また、フィージビリティについては本研究課題の初年度に発表された論文 (Perez, V. <i>et al.</i>, 2021, <i>ACS Sustainable. Chem. Eng.</i>, 9, (17371-17380)) にて、類似の製造プロセスの収益性が詳細に検討されておりました。本研究課題では、限られた時間と費用を有効活用するため、詳細なフィージビリティ評価については先行研究を引用する形となりますが、本研究課題で提案した製造プロセスは十分に収益性がある製造プロセスであると考えています。</p> |
| <p>採択時コメント「有価物としてエクトインをターゲットとする意義がよくわからず、需要と供給の観点から、他のバイオマス資源からとれるグルコースからの生成でも十分ではないかと</p>                       | <p>本研究では、温室効果ガスであるメタンの新たな活用法の実現可能性を探るための“ロールモデル”としてメタンを原料とする微生物から生産されるエクトインをターゲット物質に選択しま</p>  |

|  |   |
|--|---|
| <p>思う。その点、効率やコスト、回収率などの数値的な目標が示されていないことで説得力に欠ける。」</p>  | <p>した。着目したエクトインは保湿剤として利用されており、近年ではDNAや酵素といった生体構造の安定化を促進する機能を有する物質として注目が集まっていることから、仮に提案した生産プロセスが確立できた場合、実用化を検討する余地は充分にあると考えました。</p> <p>また、コメントに基づいて、サブテーマ1の実験結果（菌体収率、エクトイン収率）と本研究で着目している小規模施設（例：養豚では豚1,000頭前後）から生成するメタンガス量を参照し、本研究で提案しているエクトインの製造プロセスの実現性について検証することで、売電による利益と同等の利益をもたらすために必要な合成プロセスでの生産量や、現状の晶析工程の収率を改善する手法を検討しました。詳細については5.2.5.3や5.2.9をご参照ください。</p> |
| <p>採択時コメント「温室効果ガスであるメタンを用いての有価物質の新規合成法の開発としては興味あるが、環境問題、特に温室効果ガスの削減に寄与するものを目指すのであれば、使用する試薬等の調製や、反応プロセス等にかかるエネルギーに付随するCO<sub>2</sub>放出量などを総合的に考慮に入れて温室効果ガスの削減につながるのか試算しておく必要がある。」</p> | <p>サブテーマ1、2共に研究目標に掲げていたエクトインの合成方法の開発や晶析工程の最適化の検討に時間を要したため、ご指摘いただいた範囲まで考慮してCO<sub>2</sub>排出量を求めることができず、今回は製造プロセスの消費電力に基づいたCO<sub>2</sub>排出量での比較に留まりました。</p> <p>ご指摘頂いた点は実用化に向けて検討しなければいけない内容だと認識しております。一方で、現在のプロジェクトメンバーでは人数的に詳細なフュージビリティ評価を検討することが難しいと感じました。ご指摘頂いた点を検討し、実用化に向けて取り組んでいくためにも、今後、プロジェクトのメンバーとしてLCAの専門家にご参画いただくことを予定しています。</p>                           |
| <p>採択時コメント「活用したいメタンの発生の現場の情報を研究者としての的確に把握することが十分に為されていないので、</p>  | <p>コメントに基づき、サブテーマ1の実験結果（菌体収率、エクトイン収率）と本研究で着目している小規模施設（例：養豚では</p>  |

|   |  |
|---|--|
| <p>メカニズムやユニット操作（中空膜など）の自らの学術的アイデアの活用の側面が強すぎて、環境研究としてのフレームを的確に提示し得ていない。まずはマスバランスの概要をおさえること。学内の研究支援の経験豊富な方の支援を受けることを願う。」</p>              | <p>豚 1,000 頭前後) から生成するメタンガス量に基づいて、本研究で提案しているエクトインの製造プロセスの実現性について検証することで採算をとるための合成プロセスでの生産量や、現状の晶析工程で収率を改善する手法について検討しました。詳細については <b>5.2.5.3</b>、<b>5.2.5.4</b>、<b>5.2.9</b> をご参照ください。</p>   |
| <p>採択時コメント「アイデア自身は面白いが、これまでのデータから実現性が評価できない。最低限の基盤データを示したうえで提案して欲しい。」</p>   | <p>コメントに基づき、サブテーマ 1 の実験結果（菌体収率、エクトイン収率）と本研究で着目している小規模施設（例：養豚では豚 1,000 頭前後）から生成するメタンガス量に基づいて、本研究で提案しているエクトインの製造プロセスの実現性について検証することで採算をとるための合成プロセスでの生産量や、現状の晶析工程で収率を改善する手法について検討しました。詳細については <b>5.2.5.3</b>、<b>5.2.5.4</b>、<b>5.2.9</b> をご参照ください。</p> <p>また、研究期間内はサブテーマ 1、2 共にご指摘いただいた基盤データの獲得に注力しました。詳細な結果につきましては <b>5.1.1</b> および <b>5.2.1</b>、<b>5.2.2</b> を中心にご参照いただければと存じます。</p> |
| <p>採択時コメント「研究のストーリーは良く練られているが、定量性が欲しい。」</p>   | <p>コメントに基づいて、本研究で着目している小規模施設（例：養豚では豚 1,000 頭前後）から生成するメタンガス量に基づいて、売電による利益と同等の利益をもたらすエクトインの生産量や分離精製プロセスの収率を改善する手法を検討しました。結果の詳細については <b>5.2.5.3</b>、<b>5.2.5.4</b>、<b>5.2.9</b> をご参照ください。</p>   |
| <p>中間評価コメント「メタン発酵の普及、メタンと CO<sub>2</sub> の排出量削減による環境政策への貢献を目指し微生物培養と晶析技術の開発の課題である。有価物としてエクトインの需要はどれくらいあるのか、売電利益の約 10 倍に相当する生産量を実現でき</p> | <p>近年、エクトインが保湿効果だけでなく、DNA や酵素といった生体構造の安定化を促進することが報告されており、エクトインのポテンシャルの高さが明らかになってきています。さらに、エクトインの製造プロセスの収益性を検証している論文 (Perez, V. et al., 2021, <i>ACS Sustainable. Chem. Eng.</i>, 9, (17371-17380)) で</p>   |

|   |   |
|---|---|
| <p>る可能性が示唆されており、社会実装を念頭に省エネ・省コスト化の検討も期待する。」</p>   | <p>も、市場価格の変動した場合でも今後 20 年の収益性には大きな影響を与えないと推定されていたことから、需要が極端に減少することはないと考えております。</p> <p>また、ご指摘頂いた製造プロセスの省エネ、省コスト化に向けて、両サブテーマでは合成プロセスと晶析工程の連続化を検討しました。結果として、サブテーマ 2 では、従来の連続晶析装置よりも、収率が 10 ポイント以上改善する連続晶析プロセスを提案することができました（結果の詳細については <b>5.2.5.3</b> および <b>5.2.5.4</b> をご参照ください）。</p> <p>実用化を向けて、提案した連続晶析装置の導入によってどの程度の省エネ・省コストが達成できるのか定量的に評価することが現在の課題であると認識しており、今後取り組んで参りたいと思います。</p> |
| <p>中間評価コメント「計画に沿ってステップバイステップで着実な進行を図って成果を得ている。連続化に向けた完全フロー型装置導入の検討を想定しているが、ラボスケールでもいいので、研究期間内に取り組んでもらいたい。」</p>                                  | <p>試薬の安定確保が困難となったため、エクトインを用いた検証は断念しましたが、コメントに基づき、別の実験系を用いてラボスケールの連続晶析装置の生産性について検討しました。結果の詳細につきましては <b>5.2.5</b> をご参照いただければと存じます。</p>  |
| <p>中間評価コメント「フィジビリティで検討されている図からは、エクトイン生成の阻害検討として塩を取り上げているが、廃棄物からメタン回収してメタン酸化に利用するなら、塩は阻害にならず、むしろメタンガスに含まれる様々な混合ガス、例えば硫黄などの影響を評価すべきではないだろうか。」</p> | <p>コメントに基づき、バイオマス由来のメタンガスに含まれていることが予想される硫化水素の影響について検討いたしました。結果の詳細については <b>5.1.1.3</b> をご参照ください</p>  |
| <p>中間評価コメント「開発したプロセスが、CO<sub>2</sub>、CH<sub>4</sub>の環境低減にどれくらい貢献するかを評価してもらいたい。」</p>   | <p>ご指摘頂いた CO<sub>2</sub> 排出量について、本研究で提案している製造プロセスに類似したプロセスの収益性について検証した論文（Perez, V. <i>et al.</i>, 2021, <i>ACS Sustainable. Chem. Eng.</i>, 9, (17371-17380)）で報告されていた消費電力に基づいて、簡便ではありま</p>  |

|   |   |
|---|---|
|   | <p>すが、削減効果について検証いたしました。結果と今後の課題については <b>5.2.9</b> をご参照いただければと存じます。</p>  |
| <p>中間評価コメント「メタン酸化細菌を使ってメタンから直接有価物質を生成するプロセスは有望と思える。コストなどの算出も今後進めて有効な脱炭素の一助となるように進めていただきたい。」</p> | <p>本研究課題の実施期間中に、本研究で提案している製造プロセスに類似したプロセスの収益性について検証した論文 (Perez, V. et al., 2021, <i>ACS Sustainable. Chem. Eng.</i>, 9, (17371-17380)) が発表され、筆者らは今後 20 年間は十分に収益性のあるプロセスと結論づけています。したがって、本研究で提案しているプロセスも経済的な実現可能性があると考えております。本研究課題では、限られた時間と費用を有効活用するため、詳細なフィージビリティ評価については先行研究を引用する形とさせていただきます。</p> <p>また、GHG の削減効果については、上記の論文で報告されていた数値に基づいて概算しました。詳細につきましては、<b>5.2.9</b> をご参照頂ければと存じます。</p> |
| <p>中間評価コメント「物質収支・元素収支を明らかにして、FS 等の評価に耐える定量性があるデータの取得を期待したい。要素技術として斬新な成果も期待したい。」</p>             | <p>本研究課題の実施期間中に、本研究課題で想定していた製造プロセスと極めて似た工程のプロセスの物質収支が先行研究 (Perez, V. et al., 2021, <i>ACS Sustainable. Chem. Eng.</i>, 9, (17371-17380)) によって報告されました。そこで、本研究課題では、限られた時間と費用を有効活用するため、詳細なフィージビリティ評価については先行研究の内容を引用する形といたしました。</p>   |