

2010年 生物工学賞 受賞



バイオマスのバイオガス化・ バイオエタノール化のための 基盤技術開発とその応用

木田 建次



Research and development of basic technology for the production of biogas and bioethanol from biomass

Kenji Kida (*Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Kumamoto 860-8555*) *Seibutsu-kogaku* **89**: 2-18, 2011.

はじめに

技術立国として高度成長したわが国は、大量生産、大量消費により生活の豊かさを得た反面、環境問題やエネルギー問題、食糧問題だけでなく、大量廃棄による廃棄物処理といった大きな問題を抱えるようになった。廃棄物に関しては、年間5億tも排出され、そのうち2億8千万tがほぼ廃棄物系バイオマスである¹⁾。一方、地球温暖化対策に関しては、京都議定書に基づき1990年度の温室効果ガス発生量の6%を削減する義務があるだけでなく、政府はエネルギー基本計画で二酸化炭素排出量を2030年までに1990年比30%削減を目標にしている。このように、わが国は多くの問題を抱えているが、持続的に発展していくためには廃棄物系バイオマスなどを活用して資源循環型社会を構築するとともに、再生可能な新エネルギーを開発し低炭素社会を構築していかなければならない。

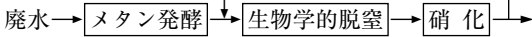
このような現状を鑑み、バイオマスを利活用し資源循環型プロセスを構築するために、ニューバイオを取り込みながらメタン発酵やエタノール発酵の基盤技術開発に長年取り組んできた。得られた研究成果に基づき、バイオマスのメタン発酵やエタノール発酵によるサーマルリサイクルの研究に取り組むとともに、この過程でエネルギー収支を高めるために、エタノール・メタン二段発酵によるバイオエタノール生産技術の開発を行い、現在、地燃料を核とする低炭素社会の構築を目指している。以下

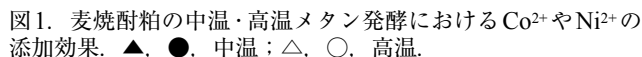
にこれまでの研究成果や取り組みに関して紹介する。

1. メタン発酵の基盤技術開発

メタン発酵法は、20世紀初めに英国で下水汚泥の減容化法として採用され、その後、産業廃水やし尿などの処理にも採用されるようになり、長い間好気性処理のための負荷軽減策として考えられてきた²⁾。このように一世紀にわたる技術であるが、反応部の解明はまったくなされずにブラックボックスとして有機物濃度の高い廃水や下水汚泥などの前処理技術として普及してきた。そのために、①限られた廃水に対する処理技術である、② NH_4^+ が増加する、③反応速度が遅い、④不安定な処理技術であるなどの問題点を抱えていた(表1)。

このような現状を踏まえ、表1に示したようにメタン発酵を汎用的水処理技術とするために、新規なリアクターを用いて種々の廃水を処理し³⁻⁵⁾、それぞれの廃水に適した処理プロセスの開発を行った。また、メタン発酵で残存する有機酸を利用して NH_4^+ を効率的に除去するプロセスを確立⁶⁾、さらに、 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加による反応速度の向上⁷⁾と、その添加効果を連続培養により補酵素レベルで明らかにした⁸⁾。そして、異なる希釈率で連続培養し反応に関与する微生物叢の解明と代謝変換を明らかにし⁹⁾、メタン発酵を外部から制御できるようにした。ここでは Co^{2+} や Ni^{2+} 添加による反応速度の向上と、微生物叢の解明と代謝変換に関して紹介する。

問題点	対 策
限られた廃水に対する処理技術	種々の有機物濃度を有する廃水・廃棄物の処理試験 →それぞれのプロセスを確立→汎用的水処理技術
NH ₄ ⁺ の増加	メタン発酵で残存する有機酸による同時除去  <pre> graph LR A[廃水] --> B[メタン発酵] B --> C[生物学的脱窒] C --> D[硝化] D --> C D --> E[] </pre>
反応速度が遅い	新規なリアクター Co ²⁺ および Ni ²⁺ の添加 } → TOC 容積負荷の向上 (焼酎粕で) 42 g/l/d (高温メタン発酵) 24 g/l/d (中温メタン発酵)
不安定な処理技術	分子生物学的手法による菌叢解析と代謝経路の解明



	平均世代時間	
	実験値	報告値 ¹⁰⁾
酢酸資化性メタン生成細菌 <i>Methanosarcina</i>	1～1.2日	3～7日
水素資化性メタン生成細菌 <i>Methanobacterium</i>		2～4時間
酢酸酸化分解菌	15～30日	約30日

1.2. メタン生成反応を制御する Co^{2+} および Ni^{2+} とそれに伴う補酵素の挙動 Co^{2+} および Ni^{2+} の添加効果を菌体レベルおよび酵素活性レベルで明らかにするために、酢酸合成廃水を用いて連続培養を行った⁸⁾。また研究結果に基づき代謝変換に関して考察した。

3

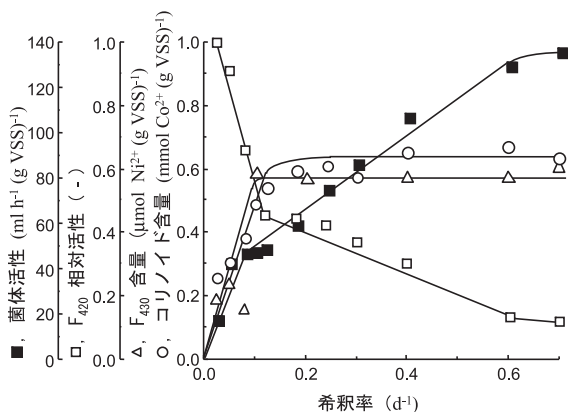


図2. 酢酸分解メタン発酵での補酵素含量および菌体活性に及ぼす希釈率の影響.

によるメタン生成反応 (C1 サイクル) に関与する F_{420} 相対活性は、希釈率を上げていくと逆に大きく減少した。コリノイドと F_{430} の増加傾向と菌体活性を比較すると、菌体活性が急激に増加する希釈率 0.1 d^{-1} までの範囲で補酵素含量も増加し、その後菌体活性が緩やかに増加する希釈率 0.1 d^{-1} 以上では補酵素含量は一定していた。このことから、酢酸資化性メタン生成アーキア的能力は補酵素含量により影響を受け、補酵素含量が一定した時点で能力 100 (潜在能力) を有するものと思われる。しかし、酢酸資化性メタン生成アーキアは、潜在能力を 100% 発現するのではなく希釈率、すなわち与えられた仕事量 (= 希釈率 × 基質濃度) に応じてその潜在能力の発現を制御しているものと思われる。すなわち高希釈率では Co^{2+} や Ni^{2+} 存在下で酢酸資化性メタン生成アーキアは能力を最大限発揮し、また増殖速度の遅い酢酸酸化細菌¹⁰⁾ (表2) は wash out され、その結果、酢酸は $\text{acetyl-CoA} \rightarrow$

methyl-CoM を経て直接メタンに変換される¹¹⁾。

一方、希釈率の低い条件では、 F_{420} 相対活性が大きく増加していた。これは低希釈率条件において C1 サイクルによる H_2 および CO_2 からのメタン生成活性が高いことを示す結果である。発生バイオガス中のメタン含量を測定したところ、高希釈率 ($D = 0.6 \text{ d}^{-1}$) で 50.7%、低希釈率 ($D = 0.025 \text{ d}^{-1}$) で 57.2% であった。酢酸資化性メタン生成アーキアは 1 mol の酢酸から 1 mol の CH_4 と 1 mol の CO_2 を生成する [表3 反応 (1)] ので、低希釈率条件における高いメタン含量は、水素資化性メタン生成アーキアの強い関与を示唆するものである。これらのことから、低希釈率条件では酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成アーキアの共生により酢酸が分解される反応 [表3 反応 (4)]¹²⁾ の占める割合が高くなっていると考えられる。

1.3. 酢酸を分解する微生物群集の構造と機能 代謝変換を明らかにするために、上述した連続培養において低希釈率 ($D = 0.025 \text{ d}^{-1}$) と高希釈率 ($D = 0.6 \text{ d}^{-1}$) の2つの条件での微生物群集の構造と機能を解析した^{13,14)}。

槽内液を採取し、FISH 実験を行った結果、低希釈率条件においても高希釈率条件においてもアーキアが優占していた。アーキアの細胞の形状には両希釈率で優占していた糸状のものと高希釈率で優占していた房型の2種類が検出され、それぞれ *Methanosaeta* 属と *Methanosarcina* 属であることが示された。槽内の微生物群集を明らかにするために、低希釈率と高希釈率の2条件での槽内液から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子ライブラリを構築し、塩基配列に基づく系統分類を行った。その結果、低希釈率条件では全体の 43% が、高希釈率条件では 72% がアーキアであった。両希釈率条件ともに、アーキアでは酢酸資化性の *Methanosaeta* 属および *Methanosarcina*

表3. 酢酸およびプロピオン酸のメタン発酵条件下の分解反応

反 応	$\Delta G^{0'}$ (kJ/reaction)
(1) 酢酸資化性メタン生成アーキアによる酢酸からのメタン生成 $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0
(2) 酢酸酸化細菌による酢酸の分解 $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+$	+104.6
(3) 水素資化性メタン生成アーキアによるメタン生成 $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135.6
(4) (2) + (3) の共役反応 $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0
(5) プロピオン酸酸化細菌によるプロピオン酸の分解 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + \text{H}^+$	+76.0
(6) (3) × 3 + (5) × 4 の共役反応 $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + 3\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-100.8
(7) (6) + (1) × 4 の共役反応 $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 7\text{CH}_4 + 5\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-224.8

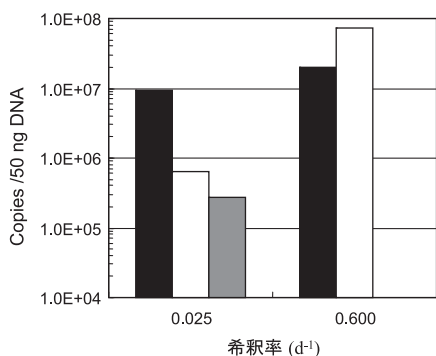


図3. 定量PCR法によるメタン生成アーキアの定量. ■, *Methanosaeta*; □, *Methanosarcina*; ■, *Methanoculleus*.

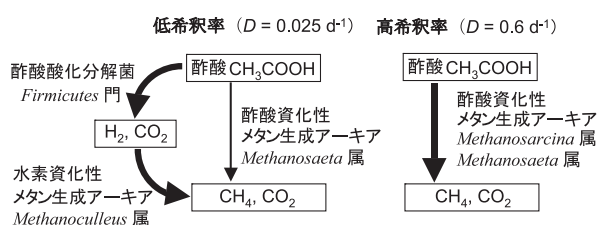


図4. 異なる希釈率条件での酢酸の代謝経路と関与する微生物群集

属に分類されるクローンが検出された。また、真正細菌では *Firmicutes* 門に分類されるクローンが多くを占めていた。次に、メタン生成アーキアに対する定量PCR実験を行った。図3に示したように、*Methanosaeta* 属の16S rRNA 遺伝子量は両希釈率で有意な差が認められなかったが、*Methanosarcina* 属は高希釈率条件の方が約100倍多く検出された。また、水素資化性の *Methanoculleus* 属が低希釈率条件でのみ検出された。

以上の結果から、図4に示したように高希釈率条件では *Methanosarcina* 属の酢酸資化性メタン生成アーキアが優占して酢酸の分解に関与することが示された。低希釈率条件でのみ検出された *Methanoculleus* 属の水素資化性メタン生成アーキアの酢酸分解に関する役割は、酢酸酸化細菌との共生分解であると考えられる。なぜなら、表2にも示したが酢酸酸化細菌の比増殖速度は $0.027 \sim 0.035 \text{ d}^{-1}$ と非常に低いからである¹⁵⁾。

そこで、両希釈率の発酵槽内液を採取し、安定同位体標識した基質を用いたトレーサー試験を行った。その結果、 CH_4 、 CO_2 いずれの物質を指標としてもメタン生成反応全体に占める共生経路の割合が、高希釈率では1～5%であったのに対して低希釈率では62～90%と高い結果になった。このことから、図4に示したように高希釈率条件では酢酸資化性メタン生成アーキアによる経路が、低希釈率条件では共生経路が、それぞれ主要な酢酸

分解経路であることが判明した。

1.4. プロピオン酸を分解する微生物群集の構造と機能

プロピオン酸は、酢酸と並んでメタン発酵の主要な中間産物とされている^{16,17)}。プロピオン酸の分解反応はメタン発酵プロセスの律速段階と考えられており、高負荷条件でメタン発酵処理したり、発酵槽のトラブルなどが生じると、主としてこの有機酸が発酵槽内に蓄積される。そこで、プロピオン酸を唯一の基質とする合成廃水を供給することにより分解に関与する微生物群集の連続培養を行った。リアクター中の種汚泥に対して、プロピオン酸合成廃水を連続供給したところ、プロピオン酸の分解は見られず、連続培養系の立ち上げに失敗した。これは表3に示した反応(5)が、吸エルゴン反応であり熱力学的に進行しにくいからである。そこで、表3の反応(7)に基づき酢酸とプロピオン酸をモル比で3:1になるように調製した酢酸・プロピオン酸合成廃水を $D = 0.01 \text{ d}^{-1}$ で供給した。その結果、運転開始から30日後に槽内のプロピオン酸濃度が検出限界以下まで低下した。そこで、70日目に酢酸を含まないプロピオン酸合成廃水に切り換え、希釈率を段階的に上げながら連続培養を継続したところ、 $D = 0.01 \sim 0.3 \text{ d}^{-1}$ の間で安定し、供給したプロピオン酸をほぼ完全に無機化していた。

槽内のメタン生成関連補酵素量を測定した結果、希釈率の増加に伴い補酵素 F_{430} およびコリノイド含量は増加した。一方、補酵素 F_{420} 相対活性は希釈率の増加に伴い減少した。この結果は、酢酸を分解する発酵槽での結果と一致していた。そこで、希釈率の異なる槽内液からそれぞれのDNAを抽出し、同様にして微生物群集を解析したところ、図5に示したように、低希釈率条件 ($D = 0.01 \text{ d}^{-1}$) と高希釈率条件 ($D = 0.3 \text{ d}^{-1}$) ではそれぞれの反応に関与する微生物群集は異なることが分かった。

酢酸やプロピオン酸以外の基質として酪酸、長鎖脂肪酸やグリセロール、またタンパク質(牛血清アルブミン)やグルコース、デンプンを炭素源とする各種の合成廃水を用いて連続培養を行い、それぞれの基質において異なる希釈率での微生物群集を解析した⁹⁾。その結果、長鎖

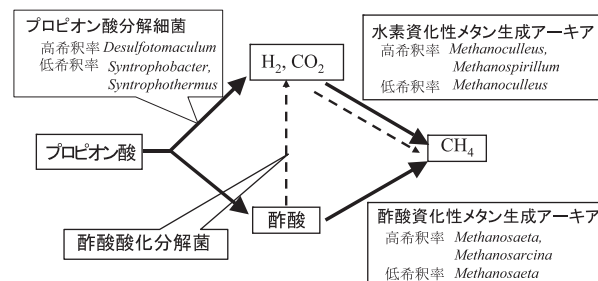


図5. プロピオン酸のメタン生成に関与する微生物群集

脂肪酸やグルコース、またタンパク質やデンプンのような高分子化合物は、プロピオン酸や酢酸などに酸化分解され、その過程で生じた H_2 や CO_2 はC1サイクルで CH_4 に、またプロピオン酸や酢酸は希釈率により異なる微生物群集により CH_4 に還元されることが分かった。

以上、工学的および分子生物学的手法により、メタン発酵は Co^{2+} や Ni^{2+} の添加、また希釈率により外部から制御できるようになり、安定した処理技術となった。

1.5. 超高温域でのメタン生成反応に関与する微生物叢の変化 高温でのメタン発酵速度は中温より速いので、高温条件をさらに超える温度でのメタン発酵が可能になれば処理速度のさらなる向上が期待できた。そこで、本研究では高温嫌気性消化汚泥を微生物源とし、グルコース合成廃水と機械攪拌型リアクターを用いて $60^{\circ}C$ 以上の高温域（超高温域）でのメタン発酵試験を行い、各温度における微生物叢の解析を行った¹⁸⁾。

TOC負荷 0.2 g/l/d の条件で、運転温度を $60^{\circ}C$ から $80^{\circ}C$ まで段階的に上げて運転した。安定してメタン発酵できた最高温度 $77.5^{\circ}C$ までは、温度の増加とともにTOCとVFAは徐々に増加するが、TOC除去率は95%以上で、グルコースのほとんどはガス化していた。しかし、 $80^{\circ}C$ では有機酸が急激に蓄積した。各温度の菌叢解析から図6に示したように、 $65^{\circ}C$ と $70^{\circ}C$ 以上では微生物群集だけでなく、メタン生成経路も異なることが分かった。 $65^{\circ}C$ では酢酸が直接 CH_4 に、また酸化分解後C1サイクルで CH_4 に、 $70^{\circ}C$ 以上では酢酸酸化性メタン生成アーキアが増殖できなくなりC1サイクルで CH_4 に変換され、さらに $80^{\circ}C$ になると酢酸酸化細菌の増殖が完全に抑えられ、メタン発酵そのものが起こらないことが分かった。このように超高温メタン発酵では微生物叢が限定されていた。したがって、固形物を含む廃棄物系バイオマスのメタン発酵は従来の高温メタン発酵か、超高温で液化後（酸生成）高温メタン発酵すべきと考えられる。

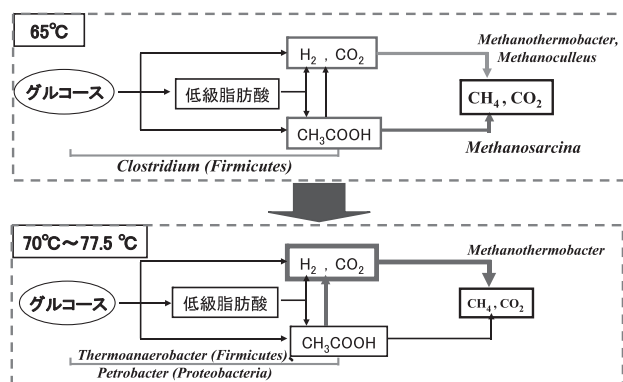


図6. 超高温メタン発酵による微生物群集の変化

2. 廃棄物系バイオマスのメタン発酵によるサーマルリサイクル

食品リサイクル法により2006年までに再生利用などの実施率を20%に向上させなければならない。また、家畜排泄物法により2004年11月までに排泄物の処理・保管施設の遵守が義務付けられた。既述したようにメタン発酵法を汎用的な水処理技術にするために、多くの基盤技術開発を実施し、最終的にメタン発酵を外部から制御できるようにした。そこで、これらの研究成果に基づき食品系廃棄物や廃棄物系バイオマスのバイオガス化、また下水汚泥の減容化に取り組んできたので、以下に紹介する。

2.1. コーヒー粕のスラリー状（乾式）メタン発酵

缶コーヒーの需要の増加に伴い製造工程から排出されるコーヒー粕（水分含量、約65%；有機物含量98.5% / 乾物）の処理が大きな問題となっている。研究開始当初、コーヒー粕そのものに対する研究例が皆無であったので、スラリー状態（20 w/v%）のコーヒー粕を完全混合型リアクターの液化槽と嫌気性流動床型リアクターであるガス生成槽からなる二相式メタン発酵法により回分式で処理試験を行った。1回の処理が終了した時点で、未分解のコーヒー粕を含む反応液を液化反応槽から引き抜き、固液分離した。上澄液は次の新しいコーヒー粕のメタアップ水として利用し、再度20 w/v%のスラリー状態で乾式メタン発酵処理したところ、安定して繰り返し処理することができた。コーヒー粕の消化率は70%、発生ガス中のメタン含量は60～70%、全容積に対するガス発生量は液化槽（pH 6制御）容積2 l、ガス化反応槽 0.45 l のときに1.43 l/dまで向上した。この値は pH を制御しなかったときの7倍に達していた¹⁹⁾。本条件でのガス生成収率は、消化されたコーヒー粕1 gあたり451 mlであり、コーヒー粕中の脂質、ホロセルロースおよびリグニンの分解率は、それぞれ91、70、45%であり、リグニンも一部分解されていた²⁰⁾。

2.2. 生ごみの高速度メタン発酵と硫化水素の低減

生ごみのメタン発酵は、人工生ごみとガス攪拌型メタン発酵装置（実容積5 l）を用いて行った。 Co^{2+} 、 Ni^{2+} および Fe^{2+} を微量添加することにより最大有機物負荷 8 g/l/d を達成することができ、高速度でメタン発酵が可能となった。生ごみ中の有機物1 gあたり900～1000 mlのバイオガス（メタン含量50%）が発生したが、バイオガス中の硫化水素濃度は約1000 ppmに達していた。この時、生ごみは約85%が消化されており、脂質およびホロセルロース分解率は90%強と高く、リグニンも66%分解されていたが、タンパク質は意外と低く59%であった。バイオガス中の硫化水素濃度が高かったので、

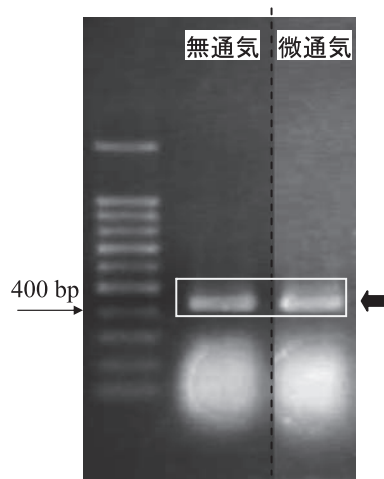


図7. 通気・無通気下でのRT-PCR

有機物負荷 6 g/l/d の条件でメタン発酵槽内に空気を供給し硫化水素濃度を低減させる検討を行った。その結果、バイオガス発生量に対して空気を 7.5% 添加することにより、バイオガス中の硫化水素濃度 800～1000 ppm を 5 ppm 以下に低減することができた²¹⁾。

硫化水素抑制機構を明らかにするために、実験室規模のガス攪拌型メタン発酵槽内の硫酸塩還元細菌とメタン生成アーキアの 16S rRNA 遺伝子および硫酸塩還元遺伝子 *dsrA* に基づく微生物叢を解析した²²⁾。その結果、微通気することにより、アーキアについては *Methanosarcina* に近縁なアーキアは減少するが、*Methanoculleus* に近縁なアーキアは大きく増加した。一方、優占した真正細菌と硫酸還元細菌にはあまり変化はなく、硫酸還元経路に重要な酵素 *dsr* 遺伝子は通気にもかかわらず転写されていたので(図7)、硫化水素に還元された後、化学的あるいは微生物学的に再度イオウあるいは硫酸イオンに酸化されることがわかった。

上述した実験結果に基づき 4000 倍に相当するガス循環式メタン発酵槽(実容積 20 m³)を建設し、実証試験を企業と共同で行った。メタン発酵槽には中温消化汚泥を入れた後、事業系生ごみを粉碎・選別後、2倍希釈したものをポンプで供給し、53°C の条件で高温嫌気性消化試験を行った。その結果、実験室規模と変わらない最大 TS 容積負荷 8 kg/m³/d を達成することができ、4000 倍のスケールアップに成功した。また、自動化装置を用いてバイオガス発生量の 7.5% に相当する空気を供給することにより、バイオガス中の硫化水素濃度を 1000 ppm から 100～200 ppm 以下に低減できた。嫌気性消化液の液肥としての施肥試験は、佐賀大学が中心となり大木町と共同で調査した。水稻に施肥(元肥→追肥→穂肥)し、食味では最高の評価を得た。また収量については 2002

年は若干落ちたが、2003 年は平均 510 kg に対して 480～510 kg とほとんど遜色なかった。

2.3. 家畜糞尿および糞尿搾汁液のメタン発酵 家畜糞尿は、一般的には堆肥化により肥料として利用されているが、九州では供給量が需要量を大きく上まわっている。農業環境三法で効率的な家畜糞尿処理法の開発が謳われ、北海道を中心として家畜糞尿のメタン発酵が行われるようになってきた。また、最近では単独処理よりも家畜糞尿の混合処理や、生ごみを混入した処理も行われ始めた。

このような現状を踏まえ、熊本県の調査資料を参考にして畜産業の盛んな阿蘇および菊池管内の人口および家畜頭数(豚、乳用牛)からそれぞれの混合比を決定し(表4)、メタン発酵によるバイオガス化の検討を行った²³⁾。表4は、単独処理および混合物の処理結果も示している。生ごみと乳牛搾汁液(機械攪拌型リアクター)以外は不織布を充填した固定床型リアクターを用いて高温メタン発酵処理した。生ごみのガス発生量は 875 ml/g-VTS と高かったが、家畜糞尿搾汁液ではガス発生量は低下し²⁴⁾、特に乳牛用搾汁液では VTS 消化率が 28% と低かったために 250 ml/g-VTS と非常に低かった。また、消化された有機物あたりのガス生成収率も示したが、乳用牛搾汁液のガス生成収率は他の値に比べて 893 ml/g-消化 VTS と低かった。単独処理からも予測されたが、乳用牛搾汁液の混合比が高くなると(菊池管内) VTS 消化率も低下し、バイオガス発生量は 250 ml/g-VTS、バイオガス発生収率は 625 ml/g-消化 VTS と、他の混合物のバイオガス値に比べて悪くなることが分かった²³⁾。以上の結果から家畜糞尿のメタン発酵によるサーマルリサイクルを実施する場合、他のバイオマス種との混合比を考慮する必要があることが分かった。

担体内での微生物群集を明らかにするために、不織布担体の中に吸着している菌および不織布担体表面に形成されたバイオフィルムを槽内からそのままの状態で採取した。その後、クリオスタットにより切片を作製後、これを FISH 法により染めて顕微鏡観察を行った。担体に付着した微生物の 16S rRNA 遺伝子のクローン解析の結果と併せると、担体表層に *Methanosarcina* 属が、担体内部に *Methanoculleus* 属が定着する傾向が見られた。一方、真正細菌は担体全体に見られた。泡盛蒸留廃液でも同じ結果が得られたので²⁵⁾、一般的に固定床型リアクターでは、担体表層部では酢酸が直接 CH₄ に、担体内部では酢酸を含む低級脂肪酸が酸化分解された後、C1 サイクルにより CH₄ に変換されていると考えられる。

2.4. 汚泥および窒素、リンを排出しない下水処理プロセスの開発 下水道の普及率は、先進国の指標の一つであるが、一世紀前に開発された下水処理技術は、ほ

表4. 家畜糞尿および混合物のメタン発酵によるサーマルリサイクル

項 目	処理条件	個別処理			混合物の処理		
		生ごみ	SM	DCM	生ごみ：SW	生ごみ：SM：DCM	
					1：1	1：16：27 (菊池)	1：19：12 (阿蘇)
投入物の性状 VTS (g/l) 粘度 (cp)		195.2 NM	49.4 200	52.7 4,900	110.1 NM	54.4 NM	50.0 280
消化槽タイプ, 処理温度 53°C		機械攪拌	固定床	機械攪拌	固定床		
最大 VTS (有機物) 負荷 (g//d)		8.0	15.0	8.0	12.0	8.0	10.0
処理日数 (d)		12.5	3.2	10.4	9.2	6.8	5.0
VTS (有機物) 消化率 (%)		82	42	28	78	40	47
バイオガス中にメタン含量 (%)		50	58	59	50	58	58
バイオガス発生量 (ml/g-供給 VTS)		875	460	250	730	250	464
バイオガス生成収率 (ml/g-消化 VTS)		1,067	1,095	893	936	625	987
メタン発生量 (ml/g-供給 VTS)		440	267	148	365	145	270

SM, 豚糞尿搾汁液；DCM, 乳用牛搾汁液；VTS, 全有機物；NM, 未測定.

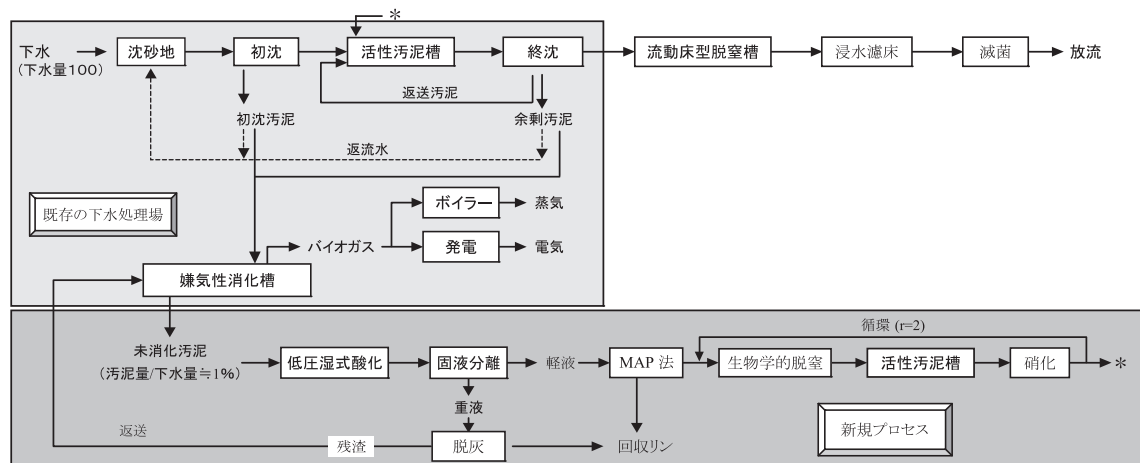


図8. 汚泥および窒素、リンを排出しない新規下水処理プロセスの開発

とんど変わることなく現在も踏襲されている。しかし、嫌気性消化槽（メタン発酵槽）で消化されなかった脱水汚泥の処理・利活用や窒素、リン対策が緊急の課題となっている。そこで、下水や返流水の分析を行った結果、消化槽や脱水工程からの返流水に多くの窒素やリンが含まれていることが分かった。また、消化槽から脱水工程に行く量は、下水量の1～2%に過ぎないことから（以後、未消化汚泥と呼ぶ。）、この未消化汚泥（VTS, 13.4 g/l）を低圧湿式酸化（操作圧10 kgf/cm²G以下、操作温度150°C）で2時間処理した。酸素を理論量の80%添加することによりVSS消化率は63%に達した。沈降性は向上していたので、軽く遠心分離した後、上澄液中のリン回収を検討した結果、MAP法により98%回収できた。また、重

液のpHを下げ脱灰した後、pHを7にすることにより、未消化汚泥中のリンをほぼ回収できた。さらに、脱灰後の残渣を嫌気性消化槽に返送したが消化槽内のSSおよびVSSは増加することなく一定しており、未消化汚泥すべてを分解することができた。また、MAP処理後の上澄液中に残存するNH₄⁺は循環式生物学的脱窒・硝化法により除去した。処理水に残存するNO₃⁻は、既設の活性汚泥槽に返送することにより容易に除去されることは明らかである。以上、図8に示したように既設の下水処理場に未消化汚泥処理プロセスを付設することにより汚泥および窒素を排出しないで、しかもリンを回収できる新規な下水処理プロセスを実験室規模で開発することができた²⁶⁾。

3. エタノール発酵の基盤技術開発

本研究を始めて30年が経とうとしているが、研究開始当初はエネルギーの多様化の一環としてバイオマスから発酵法により生産されるアルコールが注目されていた。すでにブラジルでは Melle Boinot 法と称される酵母菌体を再利用する半回分発酵法などによりサトウキビからの燃料用アルコールの生産が実用化されていた^{27,28)}。また、アルコールは燃料用以外に多くの用途を有しており、世界における製造量は年々増加していた。そのため、より安価で生産性の高いアルコール製造技術の開発が望まれ、菌体循環法²⁹⁾や固定化酵母法³⁰⁾による連続発酵法の研究開発が行われた。これらの技術は、発酵槽内に酵母を高濃度に保持することにより、エタノール生産性（以後、生産性とする）を高めようとするものである。しかし、前者では固液分離工程が、後者では固定化工程が必要となり複雑になる。燃料用、工業用アルコールのように大量生産を必要とするプロセスを実用化していくためには、生産性および発酵収率の向上はもちろんであるが、プロセスの単純化も重要な要素である。

そこで筆者らは、凝集性酵母法は固液分離や固定化工程が省略できるので、最も単純なプロセスになると考え、①使用する凝集性酵母の育種、②育種した凝集性酵母による糖蜜からの連続発酵法や繰返し回分発酵法によるバイオエタノール生産に関する基盤技術開発を行った³¹⁾。

3.1. 酵母の育種 プロトプラスト融合による凝集性酵母の育種以外に、現在セルロース系バイオマスから効率的にバイオエタノールを生産するために、耐熱性・耐酸性酵母や酢酸耐性を付与したキシロース代謝強化株の創製に取り組んでいる。

(1) 細胞融合による耐熱性・耐塩性凝集性酵母の育種^{32,33)} フィリピン人のアルコール工場で使用されていた耐熱性・非凝集性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* EP1 と凝集性酵母 *S. cerevisiae* IFO 1953 あるいは *S. cerevisiae* IR 2 とのプロトプラスト融合を行った。図9に示したように融合後、胞子を形成させて形質の安定化を図った。得られた育種株の発酵能を回分発酵試験により評価した後、凝集

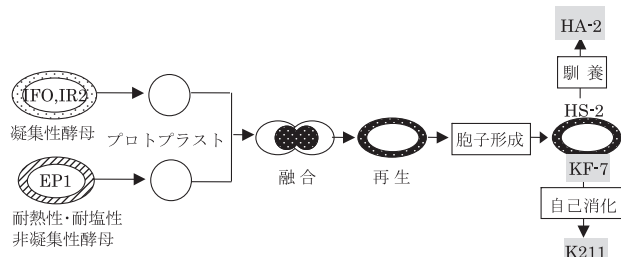


図9. プロトプラスト融合による凝集性酵母の育種

性酵母HA-2株（企業に在職中）およびKF-7株（熊本大学に赴任後）を優秀株として選抜した。HA-2株は、育種したHS-2株を馴養したもので糖蜜からの連続発酵試験に用いた。またKF-7は、当初、繰返し回分発酵試験に用いたが、その後は連続発酵試験に用いている。さらに、KF-7株から自己消化法³⁴⁾により耐塩性を有する凝集性酵母K211株を取得し³⁵⁾、高濃度仕込みでの繰返し回分発酵試験に使用した。

(2) 長期連続培養による耐熱性・耐酸性酵母の育種 KF-7由来の2倍体酵母Wild/wild株を用いて、酸性もしくは高温条件下で長期連続培養を行うことにより馴養した。その結果、馴養条件pH2.7でWild/wild 17を、馴養条件41°CでWild/wild 12'を取得した。この2株から四胞子解析により耐酸性もしくは耐熱性の1倍体酵母を得た。酸性下あるいは高温下で発酵能に優れた1倍体酵母を掛け合わせることで、耐酸性と耐熱性を併せ持つ2倍体酵母を創製した。15% YPD培地を用いて回分発酵試験（41°C, pH3.5）を行った結果、48時間後に約60 g/lのエタノールを生成する2倍体酵母を取得することができた。

(3) キシロース代謝強化株の *TAL1* プロモータの構成化による酢酸耐性株の創製 セルロース系バイオマスからの燃料用エタノール生産を実用化させるための一つの大きな要因は、キシロースを速やかに発酵させることである。そこで赤松らは、KF7M株からキシロース代謝強化2倍体株（NAPX37）を創製したが、酢酸により大きく阻害された。この対策として *TAL1* プロモータを構成化し、取得した株の発酵性能を評価した。本株およびNAPX37株を用いて、2.5% YPX培地（炭素源、キシロース）で回分発酵試験を行った。NAPX37株のキシロース発酵能は、酢酸1000 mg/lで約30%にまで低下したが、*TAL1* 構成化NAPX37株は阻害をまったく受けないだけでなく、キシロース発酵能も向上した。

3.2. 凝集性酵母による無殺菌連続発酵プロセスの開発 頭部に固気液三相分離部を有する塔型リアクター（実容積、0.45 l）と育種した凝集性酵母HA-2株を用いて、①単段連続発酵プロセスの開発、②通気下での連続発酵プロセスによる凝集性の安定化、③無殺菌長期連続発酵プロセスの開発、④二段直列連続発酵プロセスによる高濃度・高生産性・無殺菌連続発酵プロセスの手順で連続発酵プロセスの開発を行った。

(1) 塔型リアクターを用いた無殺菌連続発酵プロセスの開発³⁶⁾ 塔型リアクター1塔を用いて糖蜜を殺菌することなく連続発酵を可能とする条件を検討した結果、糖蜜培地にメタカリ（ $K_2S_2O_5$ ）200 mg/lを添加することにより $D = 0.4 \text{ h}^{-1}$ においても生成エタノール濃度は60 g/lと無殺菌連続発酵が可能となった。しかし、 D を 0.5 h^{-1}

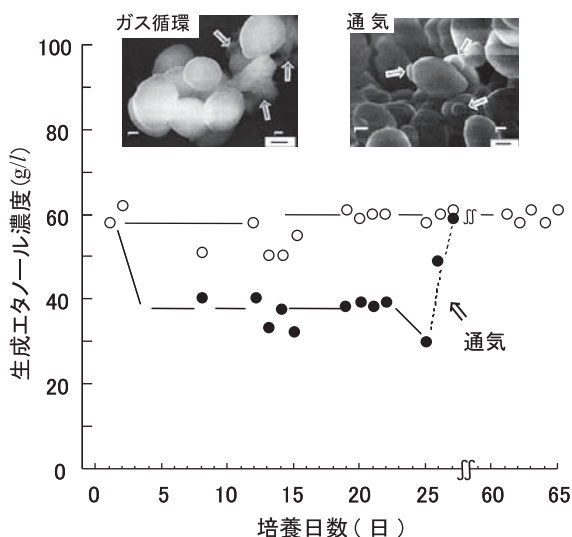


図10. ガス循環および空気供給を伴う連続発酵での生成エタノール濃度

に上げると5日目頃から凝集性は崩壊し、生成エタノール濃度は40～60 g/lと変動した。

(2) 通気による酵母の活性化と連続発酵の安定性³⁷⁾ ガス循環型および空気供給型のリアクターAおよびBを用いて、発酵温度30℃、 $D = 0.5 \text{ h}^{-1}$ の条件で連続発酵を行った。図10に示したように、リアクターAを用いてガス循環速度0.3 l/min (0.67 vvm に相当)の条件で連続発酵を行ったところ、やはりエタノール濃度は低かった。しかし、リアクターBを用いて通気量 0.67 vvm の条件で連続発酵を行うと、 $D = 0.5 \text{ h}^{-1}$ においても生成エタノール濃度は約 60 g/lと安定していた。そこで、リアクターAでガス循環を止め、通気したところ生成エタノール濃度は40から60 g/lに短時間で回復した。両条件での酵母を走査型顕微鏡で観察したところ、ガス循環系では酵母の細胞壁が一部壊れ、漏出が見られた。一方、通気系では酵母の多くは出芽しており、細胞壁の壊れたものはまったく見られなかった。以上の結果から、無通気下では不飽和脂肪酸が生成されにくくなり、そのために細胞壁が壊れ、分泌したプロテアーゼにより凝集性が崩壊していくものと考察した。また、凝集性酵母を用いた連続発酵においては通気が重要であることが明らかとなった。

(3) 菌体活性に及ぼす通気量の影響 機械攪拌型リアクターを用いて連続培養を行い、菌体活性に及ぼす通気量の影響を調べた³⁸⁾。まず、菌体活性に及ぼす糖蜜培地の糖濃度の影響を調べた後、糖濃度90 g/lの糖蜜培地を連続的に供給し通気量を0.15 vvmから0 vvmまで段階的に低減し、その影響を調べた。図11に示したように、 $k_L a$ 90 h^{-1} 以上で菌体活性は最大となった。

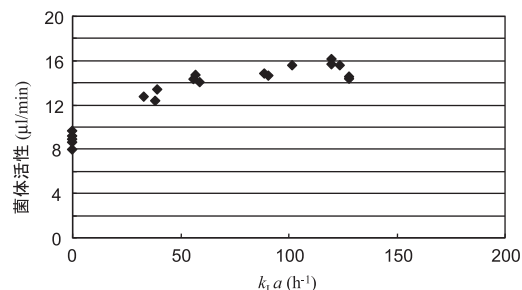


図11. 菌体活性に及ぼす通気量の影響

(4) 高濃度・高生産性および無殺菌連続発酵を可能とする二段直列連続発酵プロセスの開発³⁹⁾ 二段直列連続発酵の方が単段連続発酵よりも各糖蜜濃度において生成エタノール濃度が高かったので³⁶⁾、本方式において酵母の活性を維持するために各塔に微量通気、またエタノールによる阻害を考慮した発酵速度式(直線阻害式)に基づき1塔目の活性の高い酵母を2塔目に強制供給した。その結果、 $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ の条件においても2塔目の生菌数を $1.4 \times 10^9 \text{ cells/ml}$ に維持することができ、生成エタノール濃度85 g/l、エタノール生産性17 g/l/hを達成することができた。しかし、強制供給量を19%に下げると生成エタノール濃度は低下した(図12)。これらの性能は、長期無殺菌連続発酵条件下で達成したもので、世界的に高い評価を得ている。また、ベンチプラント(1槽の実容積17 l)を用いて同様にして二段直列連続発酵試験を行ったところ、強制供給比25%、 $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$ の条件で、生成エタノール濃度、生産性および生菌数はそれぞれ84 g/l, 21 g/l/h, $1.3 \times 10^9 \text{ cells/ml}$ を達成し、問題なくスケールアップすることができた。

(5) 発酵熱と生産性の関係 二段直列連続発酵法では1段目発酵槽で生産性が高くなることから、生産性と

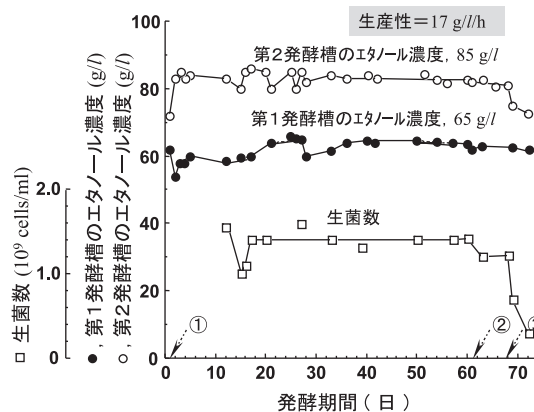


図12. 第1発酵槽の菌体供給を伴う二段直列連続発酵での経日変化。第1発酵槽内液の強制供給割合(オーバフローに対して): ①～②, 27%; ②～③, 23%; ③, 19%。

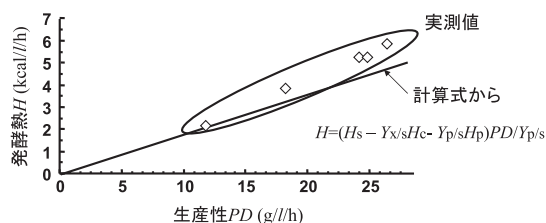


図13. 発酵熱と生産性の関係。H, 発酵熱; Hc, 菌体の燃焼熱; Hp, エタノールの燃焼熱; Hs, 全糖成分の燃焼熱; Yp/s, エタノール収率; Yx/s, 菌体収率。

発酵熱の関係を把握することは冷却面から重要である。そこで、発酵熱の理論的考察を行った後、ベンチプラントの二段直列連続発酵試験データから1段目発酵槽における発酵熱の算出を試み、理論式の妥当性を調べた。図13に示したように、発酵熱Hは生産性PDに依存し、1段目発酵槽での生産性26.5 g/l/hにおいて発酵熱は6.08 kcal/l/hであった。また図中の実線は、誘導した理論式に消費糖に対する平均エタノール生成収率0.498を代入して求めたもので、図から明らかなように実測値とよく一致していたので、理論式の妥当性が証明された³⁶⁾。

(6) 液深の影響 これまでは実験室規模で研究を行ってきた。しかし実装置になると、たとえばわが国で実用化されている発酵槽1基の容積は440 kl (実容積250 kl)であり、その液深は約7 mである。そこで、総容積50 lの発酵槽を用いて回分発酵試験を行い、空気を連続的に供給しながら窒素ガスを間欠的に供給する方式で、槽内圧を120秒サイクルで10 Pa→100 Pa→10 Paと変化させた。また、コントロールとして常圧での回分発酵試験も実施した。両条件ともに24時間後の生成エタノール濃度は70, 69 g/l, 総菌数は 3.2×10^8 , 3.3×10^8 , それぞれの生存率は87.3, 86.5%でありまったく遜色なかった。したがって、液深10 m程度での実装置であれば圧の影響を考慮することなく、実験室規模の結果をそのままスケールアップしていけることが分かった。

3.3. 沖縄産(宮古)糖蜜による連続発酵 上述してきた実績に基づき環境省プロジェクトで、海外産糖蜜に比べて塩濃度が約2.5倍高い沖縄産糖蜜(灰分含量, 150 mg/g-糖蜜)からのエタノール連続生産プロセスの開発を、塔型リアクター(実容積, 2.7 l)2基と凝集性酵母KF-7株を用いて行った。本研究開発では、後述する4.2.(1)に記載する理由から糖蜜培地にメタカリを添加しないで、また培地を殺菌することなく連続発酵試験を行った。発酵温度33°Cの条件で、活性の高い菌体を二塔目に供給する二段直列連続発酵プロセスにより生成エタノール濃度70 g/l, 生産性14 g/l/hを達成することができた。以上、メタカリを添加しなくても無殺菌・長期連続発酵が可能となった。

3.4. 機械攪拌型発酵槽を用いた繰返し回分発酵技術の開発

既存のプラント(発酵槽が主として機械攪拌型)を用いて高エタノール濃度下で工業用・燃料用エタノールが効率的に生産できないかとのニーズに応えるために、凝集性酵母KF-7株を用いた繰返し回分発酵技術の開発を行った^{33, 35)}。エタノール発酵用酵母でも高エタノール濃度下で基質がなくなると急激に死滅していくので、自動化繰返し回分発酵装置の開発を行った。回分発酵試験結果に基づき、発酵が終了すると通気と攪拌を自動的に停止させ、酵母が沈降した後、発酵醪を自動的に引き抜き、その後新しい糖蜜培地を供給し、通気と攪拌を始めることにより次の発酵を開始させるプログラムを作成した⁴⁰⁾。

繰返し回分発酵は、全糖濃度20 w/v%に調製した糖蜜培地を用いて発酵温度30～35°C, 連続通気下で行った。発酵時間は、30°Cで7時間, 33, 35°Cにおいても8～9時間であり、生成エタノール濃度および生産性はそれぞれ80～82 g/l および7.7 g/l/h とほとんど変わらなかった^{33, 41)}。生成エタノール濃度をさらに高めるために、KF-7の自己消化法により育種した耐塩性凝集性酵母K211株と全糖濃度22 w/v%に調製した糖蜜培地を用いて繰返し回分発酵試験を行った。回分発酵を2～3回繰り返すだけで発酵時間は22時間から13時間に短縮され、その後、安定して約50回の繰返し回分発酵を行うことができ、本条件で生成エタノール濃度91 g/l, 生産性5.3 g/l/hを達成することができた(図14)³⁵⁾。また本研究で、酵母の死滅とともに菌体中のトレハロース含量は減少し、また発酵温度が30°Cから33°C, 35°Cと高くなるほど減少することを明らかにした⁴²⁾。

繰返し回分発酵の特徴は、凝集性酵母を用いることにより発酵終了後、遠心分離機がなくても静置するだけで酵母を簡単に回収できることであり、回分発酵技術としては世界に冠たるものである。なお自動化されていない

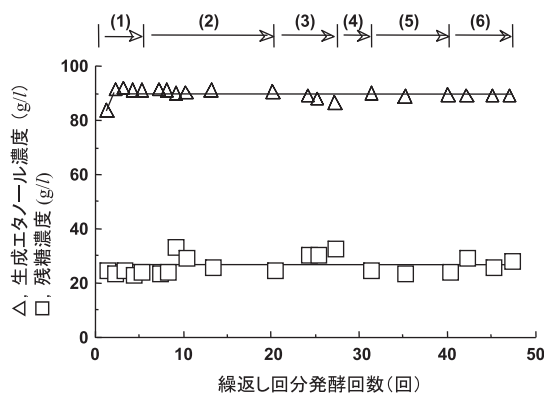


図14. 耐塩性・凝集性酵母による全糖濃度22%糖蜜培地での繰返し回分発酵。(1),(4), 30°C; (2),(5), 33°C; (3),(6), 35°C。

が、機械攪拌型発酵槽を用いた繰返し回分発酵法による工業用エタノール製造技術は、日本アルコール産業(株)出水工場で実用化されている。

3.5. 機械攪拌型発酵槽を用いた無殺菌・菌体供給式二段直列連続発酵プロセスの開発 中国では糖蜜を原料とするときに雑菌による汚染を防止するために一般的に硫酸処理されているが、蒸留廃液の処理や利活用で大きな問題となっている。そこで、硫酸処理しない、殺菌もしない糖蜜と既存の機械攪拌型発酵槽を用いて、高エタノール濃度下で長期連続発酵ができないかとのニーズに応えるために、後段に沈降分離槽を有する機械攪拌型発酵槽R1およびR2と活性の高いKF-7株を連続供給できる発酵槽R3を用いて菌体供給式二段直列連続発酵プロセスの検討を行った。各槽に空気を微量供給し、R3から活性の高い酵母をR2に連続供給することにより、 $D_t = 0.075 \text{ h}^{-1}$ の条件でR2の生菌数を $4\text{--}4.5 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ に維持することができ、その結果、生成エタノール濃度80 g/l、生産性6 g/l/hを達成することができた³⁸⁾。共同研究先である四川亜連科技有限责任公司は、2009年2月に南寧にあるアルコール工場で実証試験を行い、スケールアップに成功した。

以上、育種した凝集性酵母を用い糖蜜からの連続発酵および繰返し回分発酵試験を行い、得られた研究結果を表5にまとめた。海外産糖蜜で達成した生成エタノール濃度および生産性は世界のトップレベルにあり、また塩濃度が高いためにエタノール発酵が難しいとされている沖縄産糖蜜においても活性の高い菌体を供給することにより連続発酵が可能となった。

4. バイオマスのエタノール発酵によるサーマルリサイクル

地球温暖化対策の一つとして、バイオマスエネルギー特にバイオエタノールがわが国においても注目され、2006年5月、新・国家エネルギー戦略で2030年までに国内で使用する自動車ガソリンの全量をバイオエタノール10%混合(E10)に切り替えることが提唱された。一方、世界に目を転じると地球温暖化対策だけでなくエネルギー戦略、農業政策から、バイオマスからのバイオエタノールの生産が脚光を浴びている。

そこで筆者らは、基盤技術開発で得られた連続発酵技

術や繰返し回分発酵技術、またメタン発酵の基盤研究成果に基づき、現在、規格外農産物、生ごみ、資源作物およびセルロース系バイオマスからのエタノール発酵もしくはエタノール・メタン二段発酵によるバイオエタノール生産へと研究を展開している。ここでは生ごみおよびセルロース系バイオマスからのエタノール生産に関して紹介する。

4.1. 生ごみのエタノール・メタン二段発酵によるエタノール生産 人口減少の社会においても、2030年の人口予測では大都市や政令指定都市、県庁所在地の人口は増加する。そこで、筆者らは生ごみを都市型バイオマス資源としてとらえ、①熊大黒髪北キャンパスの生協食堂から排出される残飯の鮮度保持試験、②鮮度保持した生ごみを希釈後、酵素糖化し、その後固液分離した糖液からのエタノール生産(第一世代)、③希釈および固液分離することなく液化・糖化物からのエタノール生産(第二世代)について検討した。

(1) 鮮度保持⁴³⁾: 生協残飯の表面に乳酸菌を散布し、水を入れたビニール袋を重石としてのせ、この操作を毎日一度繰り返すことにより、少なくとも10日間は鮮度保持ができ、しかもグルコース回収率は85%と腐敗したものに比べて10%強向上した。

(2) 第一世代⁴³⁾: 鮮度保持した生協残飯を粗粉碎し、水で1.5倍に希釈して酵素糖化後、フィルタープレスで固液分離した。この糖液と凝集性酵母KF-7を用いて連続発酵($D = 0.8 \text{ h}^{-1}$, 30°C)試験を行い、生成エタノール濃度 $\approx 30 \text{ g/l}$ 、生産性 $\approx 24 \text{ g/l/h}$ を達成したが、固液分離によりグルコース回収率は57%に低下した。一方、固液分離残渣と蒸留廃液の湿式高温メタン発酵では、最大有機物(VTS)負荷6 g/l/dを達成し、この時のVTS消化率72%、ガス発生量790 ml/g-VTSであった。

(3) 第二世代⁴⁴⁾: 第一世代技術の問題点を改善するため、鮮度保持生ごみを希釈することなく酵素糖化後、固液分離せずに同時糖化発酵した(図19)。その結果、鮮度保持した生協残飯を用いて5回だけの繰返し同時糖化・発酵であったが、エタノール濃度44~46 g/l、生産性18 g/l/hが得られた。また、長期間の連続発酵試験(35°C , $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$)を行い、エタノール濃度41 g/l、発酵収率80%、生産性12 g/l/hを達成した。さらに、廃紙でC/N比を20に調整した蒸留残渣の乾式メタン発酵により、有機物負

表5. 育種した凝集性酵母による糖蜜からのバイオエタノール生産

	海外産糖蜜		沖縄産糖蜜	
	塔型リアクター		機械攪拌型	塔型リアクター
	二段直列連続	繰返し回分	二段直列連続	
エタノール濃度 (g/l)	85	91	80	70
生産性 (g/l/h)	17	5.3	6.1	12.6

荷3 g/kg/d, バイオガス発生量800 ml/g-VTSを達成した。本結果に基づきエネルギー収支をとったところ、生ごみのエネルギーの84%がエタノールとCH₄に変換されていた。また、元素分析値に基づく熱量計算からのエネルギー回収率は90%であった。

4.2. セルロース系バイオマスからのエタノールの生産

(1) 建築廃材からのバイオエタノール生産 日揮およびアルコール協会が中心となり大学との産学官共同研究で、建築廃材からのバイオエタノール製造プロセスの開発(2002～20005年度)が行われた。図15に示したように濃硫酸で加水分解した後、硫酸を分離して得られた糖化液を用いて凝集性酵母KF-7でエタノール連続発酵を行い、発酵醪を蒸留および膜脱水で燃料用エタノールを製造した。筆者らが担当した凝集性酵母によるエタノール連続発酵および蒸留廃液の処理プロセスの開発に関して概略する。

膜脱水に使用しているゼオライト膜にイオウが悪影響することから、メタカリを添加しないで無機塩を添加した糖液(補糖により糖濃度150 g/lに調整)とCSL溶液

を別々に塔型リアクター底部に連続的に供給し発酵試験を行った。発酵pH 4, D = 0.2 h⁻¹の条件で無殺菌・長期連続発酵が可能となり、本条件で生成エタノール濃度65 g/l, 発酵収率85%, 生産性13 g/l/hを達成することができた⁴⁵⁾。

一方、アルコール蒸留廃液(TOC濃度≒20,000 mg/l, NH₄⁺-N + NO₃⁻-N ≒ 460 mg/l)にはSO₄²⁻が約3000 mg/l含まれていたため、固定床型リアクターを用いてメタン発酵と脱硫同時処理を行い、その後循環式生物学的脱窒・硝化でNH₄⁺とメタン発酵で残存する有機酸を同時に除去した。生ごみ同様(2.2.参照)メタン発酵槽の上部に空気をバイオガス発生量に対して7.5%供給することにより、バイオガス中のH₂S濃度は約10,000 ppmから100 ppm以下に低減でき、TOC容積負荷を3 g/l/dまで高めることができた。また、循環式生物学的脱窒・硝化処理により処理水のTOC濃度と(NH₄⁺-N + NO₃⁻)-Nをそれぞれ270 mg/lおよび30 mg/lにまで低減することができた⁴⁶⁾。

(2) 竹からのバイオエタノール生産 建築廃材などは、チップ化後チップボイラーで、また石炭との混焼によりリサイクルするといった需要が高まっており、決して安価な原料とは言えない。一方、竹は表6に示したようにこの10年で竹林面積が約2倍に増加するぐらい成長速度が速く、そのために森を侵食する厄介ものとなり、九州各県でその対策が大きな課題となっている。そこで、森林整備も兼ねて竹からのバイオエタノール生産の研究開発を行っている。

前処理・酵素糖化について検討したところ、エタノールに占める酵素価格が高かったため、濃硫酸糖化について検討した。粗粉砕した竹(1-3 mm)を濃硫酸糖化(可溶化, 75%硫酸で30分間処理; 糖化, 30%硫酸, 80-85℃で1時間処理)することにより単糖で約70%を回収することができた。この濃硫酸糖化液から擬似移動床(陰イオン交換樹脂)により酸・糖分離した糖液を調製後、糖液に含まれるオリゴ糖を加水分解した。加水分解した糖液には主としてグルコースとキシロースが含まれており、それぞれの濃度は64.4 g/l, 44.3 g/lであった。pH調

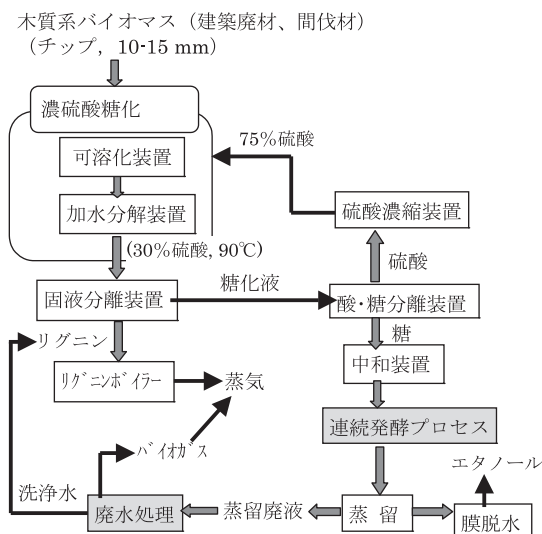


図15. 建築廃材からのバイオエタノール生産プロセス

表6. わが国の竹林面積と賦存量

1998年頃の調査事業		
順位	都道府県	竹林面積 (ha)
1	鹿児島	16,309
2	大分	13,338
3	山口	11,073
4	福岡	11,020
5	熊本	10,578
6	鳥取	9719

10年で
約2倍

27Jan08朝日新聞記事			
順位	都道府県	竹林面積 (ha)	平均乾燥重量 (万t)
1	鹿児島	31,500	196.9
2	大分	23,000	143.6
3	熊本	20,000	125.0
4	福岡	16,000	100.0
5	山口	15,000	93.8
6	宮崎	14,000	87.5

(平均5000本/ha, 平均乾重量12.5 kg/本)

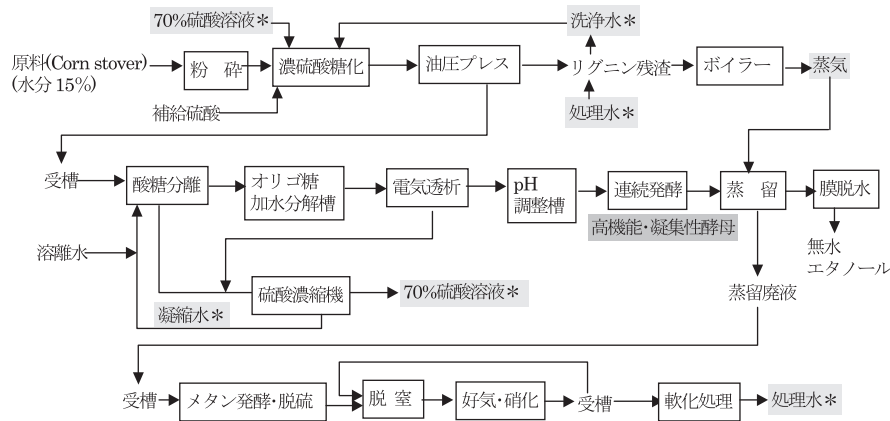


図16. コーンストーバからの環境調和型エタノール製造プロセスの開発（熊本大学，崇城大学，北京大学の共同研究）

整後，補糖することなく無機塩を添加した糖液とCSL濃縮溶液を塔型リアクター（実容積 450 ml）の底部に9：1になるように別々に供給し，発酵温度33°C，pH 4制御， $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$ ，通気 0.03 vvm の条件で単段式連続発酵試験を行った．濃硫酸糖化装置や酸糖分離装置の規模から約20日間の連続発酵試験であったが，生成エタノール濃度は27.2 g/lで，グルコースに対する発酵収率92.0%，生産性8.2 g/l/hと満足いく結果であった．しかし，キシロースはまったく発酵されていない．今後，現在育種しているTAL1プロモータを構成化したNAPX37株〔3.1.(3) 参照〕を用いて高効率な発酵プロセスを構築していきたい．また，エネルギー収支を高めるためにC/N比を約40に調整した蒸留廃液のメタン発酵を固定床型リアクターを用いて検討した．TOC容積負荷10 g/l/dにおいてもTOC除去率は92%以上で，ガス発生量は1700 ml/g-除去TOCとほぼ理論量発生しており，満足いく結果を得ている．

(3) 環境調和型エタノール製造プロセスの開発 中国では2020年の目標値1000万tを達成するために，セルロース系バイオマスからの燃料用エタノール生産の開発研究が行われており，主たるプロセスは前処理・酵素糖化であるが，糖回収率や酵素剤コスト，またキシロース発酵ができないといった問題点を抱えている．そこで，NEDO国際事業で建築廃材や竹で検討してきた濃硫酸糖化・連続発酵プロセスを中核技術として，硫酸の回収と再利用，工程水の削減を可能とする環境調和型生産プロセス（図16）の開発を目指した．

原料の粉碎から蒸留廃液まで処理する一貫プロセスからなるベンチプラント（2 kl-EtOH/y）を建設し，2009年10月～2010年1月末にかけて実証試験を行った．粗粉碎したコーンストーバを濃硫酸糖化後，活性炭で脱色，この糖化液を酸糖分離装置に40日間以上連続供給したが，安定して分画できた．この糖画分を電気透析後，連

続発酵試験（ $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ，pH 3.5，Temp. 35°C）を行った．発酵醪を蒸留・膜脱水することにより99.6%のエタノールを調製でき，また蒸留廃液のメタン発酵処理試験は，短期間であったがガス発生量約1.6 l/g-TOCを達成できた．酸画分の硫酸を再利用するために，硫酸濃縮装置で約70%まで濃縮し，この濃縮硫酸を用いて糖化試験を行ったところ，同程度の糖回収率を達成できた．また凝縮水は，酸糖分離の溶離水として使用することができ，当初の目標をほぼ達成することができた．

5. バイオガス化およびバイオエタノール化技術による資源循環型まちづくり構想

わが国のバイオマスは，海外に比べると資源量，資源規模，高い人件費などの理由から経済性において必ずしも使いやすくない．しかし，図17に示したように地域特性，具体的には畜産・酪農業を含む農業地域，県庁所在地や大都市，また疲弊していく地方都市などの特性を考慮し，種々のバイオマスをメタン発酵によるバイオガス化，またエタノール・メタン二段発酵によるバイオエタノール化することにより，それぞれに見合った資源循環型まちづくりが可能となる．これまでに取り組んだ，また取り組んでいる研究開発例を紹介する．

5.1. おおき循環センター「くるるん」 循環センター「くるるん」は，福岡県大木町の中心に環の交付金で2006年に建設された．これまで生ごみの処理は，隣接する大川市の清掃センターに焼却処理を委託していたが，処理費用の高騰やし尿処理の問題もあり，「バイオマスタウン構想」による循環型まちづくりを目指すことになった．図18に示したように，生ごみ，浄化槽汚泥，し尿をメタン発酵槽で処理するものであり，本プロセスの開発は大木町と当研究室の共同で実施したものである．本プロセスの特徴は，生ごみや浄化槽汚泥を60°Cの高温で2日間可溶化（液化処理）した後，可溶化物と

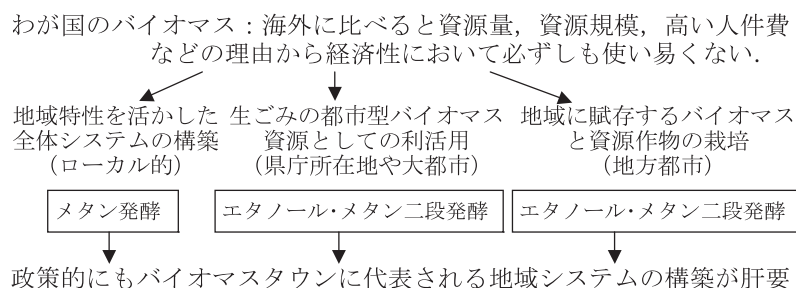


図 17. 地域特性を活かした資源循環型まちづくり

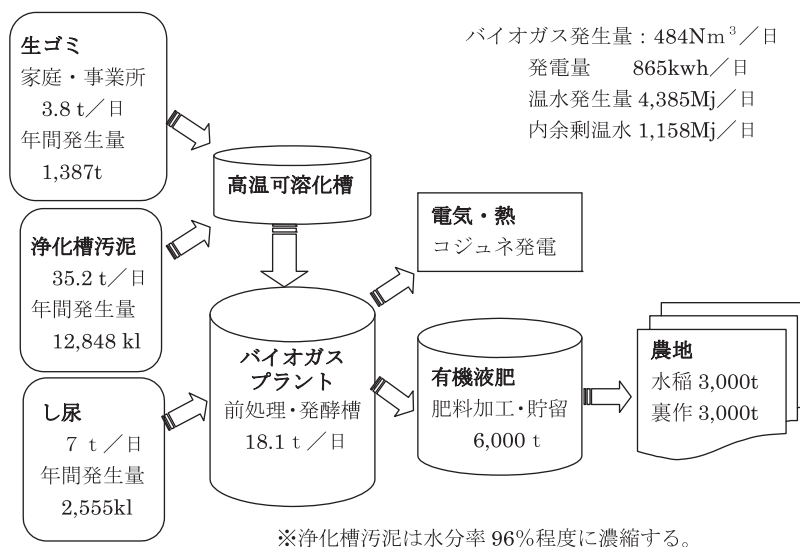


図 18. 生ごみを含む廃棄物系バイオマスのメタン発酵によるバイオマスタウン構想（福岡県大木町）

家庭から出るし尿を混合しメタン発酵させることである。高温可溶化することにより，単独でメタン発酵処理するよりもガス発生量は約1.2倍に向上した。また，バイオガスプラントは中温メタン発酵であるが，菌叢解析の結果，高温性のメタン生成に関連する細菌が優占していることが分かった。そのため，季節による槽内温度変動（37℃→42℃，42℃→37℃）にも影響を受けないことが分かった。発生するバイオガスはガスエンジンによるコージェネで発電や温水（発電効率，30数%；総合効率，80%）として利用されており，場内電力の70%を賄っている。また，メタン発酵消化液（年間約6000 t）はすべて液肥として農地に還元（水稻，6 t/10 a；麦，5 t/10 a）され，栽培された農産物は直売所で販売されている。なお，実プラントの立ち上げ時に手違いがあり，高温可溶化槽が機能していない状態であるが，3年間以上安定して稼動している。

5.2. 都市における可燃ごみ利活用による低炭素社会の構築 熊本大学の生協食堂で残飯の鮮度保持に成功

したので，生ごみのメタン発酵（2.2.参照）だけでなく，生ごみのエタノール・メタン二段発酵によるバイオエタノール生産を普及させるために，2006年度熊本市新町地区の25軒で鮮度保持試験を実施した。さらに，2007年度新町および尾上地区350軒の協力を得て熊本市が鮮度保持試験を行った。住民の方からは腐敗しない，異臭がしない，素晴らしい資源循環といった高い評価を得た。そこで，生ごみからのエタノール製造コストや製造量および製造に伴う二酸化炭素排出量を試算した。

(1) 製造コスト⁴⁷⁾ 熊本市を対象に実験結果に基づき[4.1.(3)参照]経済性評価を行った。湿潤混合生ごみ350 t/d（家庭系生ごみ200 t/d，事業系生ごみ100 t/d）から燃料用エタノールは5150 kl/y生産され，製造コストは140円/l-エタノールであったが，生ごみ処理費を5000円/tとすると製造コストは16円/l-エタノールとなった。

(2) わが国における生ごみからのバイオエタノール製造量⁴⁷⁾ エタノール製造量は，年間発生する食品系生ごみ量を事業系一般生ごみ600万t，家庭系一般生ごみ

表7. 家庭系・事業系・混合生ごみの糖組成と発酵収率

組成 (g/kg-湿潤生ごみ)	家庭系 生ごみ	事業系 生ごみ	混合 (100:75)
全糖	60.0	106.7	80.3
デンプン	33.0	76.0	51.60
ホロセルロース	21.0	20.0	20.64
発酵収率 (%)	70.0	85.0	78.6

$$\text{全糖} = (\text{デンプン} + \text{ホロセルロース}) \times 180/162$$

1000万t, 産業廃棄物340万tと仮定し, 家庭系生ごみと事業系生ごみ量の比を100:75として年間に利用できる食品系生ごみ量を1750万tとして算出した。また, 湿潤生ごみ1kg中の全糖量を80.3g, 発酵収率78.6%(表7)としてエタノール製造量を算出したところ, 次式のように約700,000klとなり, この値はわが国が目標とする6,000,000klの10%強となる。

$$\begin{aligned} \text{製造量} &= 17,500,000 \times 0.172 \times (0.3 + 0.12) \times \\ & \quad (180/162) \times (92/180) \times 0.786 \div 0.8 \div 705,000 \text{ kl} \end{aligned}$$

(3) エタノール製造に伴う二酸化炭素削減量⁴⁷⁾ 二酸化炭素削減量を, ①生ごみ1kgの焼却に必要なA重油量と二酸化炭素発生量(0.188 kg-CO₂/kg-生ごみ), および②生ごみから生成するエタノール1lに伴う二酸化炭素削減量(2.79 kg-CO₂/l-EtOH)を算出した後, ③生ごみを焼却しないで, 生ごみからエタノール1lを製造するときの二酸化炭素削減量(7.49 kg-CO₂/l-EtOH)を算出した。この値に年間エタノール製造量を乗じると約500万t強の二酸化炭素が削減できることが分かった。

これらの試算結果に基づき, 図19に示したように, 生ごみを都市型バイオマス資源としてとらえ, 分別した生ごみを希釈することなく連続同時糖化・発酵し, 工程から排出される蒸留残渣(廃紙の一部でC/N比を調整)の乾式メタン発酵によりエネルギー収支を高めたエタノール生産プロセスを確立すると共に, 廃プラと廃紙の

直接燃焼により発電する可燃ごみ利活用システムにより, 都市における低炭素社会の構築を目指していきたい。

5.3. 地方都市での発酵技術を核とする低炭素社会の構築

地方を活性化させるためには, そこに豊富に賦存するバイオマス資源を用いた資源循環型まちづくりを目指さなければならない。たとえば図20に示したように, 竹および耕作放棄田で栽培した資源作物(ケーンやソルガム)からバイオエタノールを生産し, 余剰酵母を配合飼料のタンパク源, この飼料で養豚業を活性化, さらに豚糞尿や分別された生ごみを蒸留廃液と混合してメタン発酵, この消化液を液肥として資源作物の畑や茶畑に還元する資源循環型まちづくりを実現し, 地域を活性化することにより持続可能な社会を構築するなどの方法がある。

そこで, 水俣地域を想定し竹からのバイオエタノール生産の可能性と二酸化炭素削減効果を試算した。水俣100km圏内の竹林面積は65,000haと見積もられ, 搬出可能竹林面積は17,000haあり, ここに賦存する竹林量は乾物換算で100万tに達し(表6), グルコースだけでなくキシロースも発酵できるとするとエタノール製造量は最大で280,000klになる。そこで, 50,000kl/yのエタノール製造プラントを想定し, エタノール製造に伴う二酸化炭素削減量と竹林の整備に伴う二酸化炭素吸収による副次的効果を試算した。これらの結果に基づき水俣市での二酸化炭素の収支を計算した。

(1) エタノール製造に伴う二酸化炭素削減効果 二酸化炭素削減量は, プラント(50,000kl/y)で製造されるエタノールの熱量が1,060,000GJとなるので, ガソリン製造およびバイオエタノール製造におけるGHG(greenhouse gas)排出量を86.7 kg-CO₂/GJ, 12.6 kg-CO₂/GJとすると, 年間78,500t [=1,060,000 × (86.7-12.6)/1000]となる。またGHG削減率は85.5% [=1-(12.6/86.7)]となり, その効果は大きい。

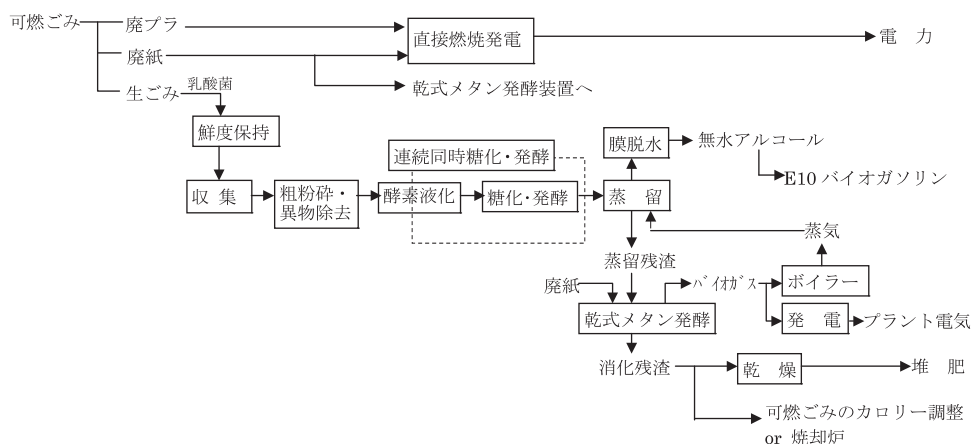


図19. 都市における可燃ごみ利活用・処理による低炭素社会の構築

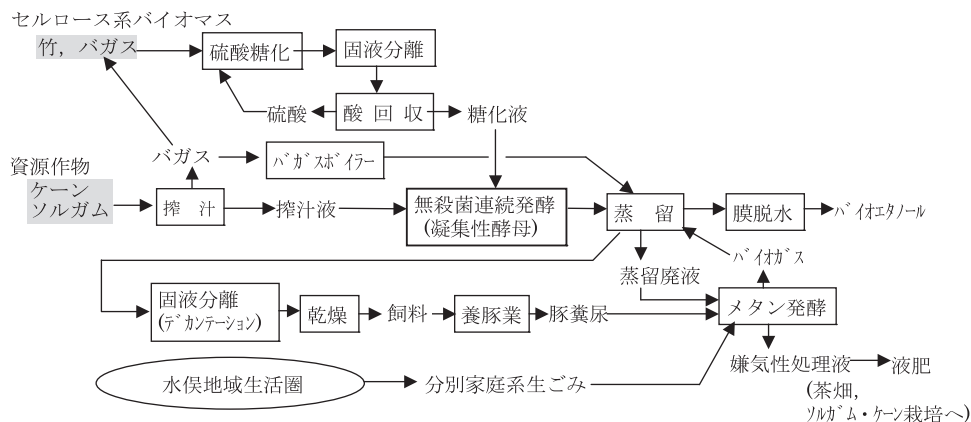


図20. 水俣地域での燃料用エタノールを中核技術とする資源循環型まちづくり

(2) 竹林整備による副次的二酸化炭素削減効果 年間エタノール製造量50,000 klに必要となる竹林面積は、竹林面積1 haあたりの竹乾燥重量およびエタノール生産量を62.5 t, 17.5 klとすると2857 haとなる。竹は1年で成長し3年サイクルで伐採すると仮定すると、竹林面積1 haの年間CO₂吸収量は39.5 tとなる。したがって、竹林2857 haはCO₂を110,000 t吸収することになり、その効果は甚大である。

(3) 水俣市を低炭素社会に 一所帯あたりのCO₂排出量を6.5 t/y（林野庁/環境省データ）、水俣の所帯数12,000とすると水俣市全所帯から排出されるCO₂量は78,500 tとなり、エタノール製造に伴うCO₂削減量78,555 t/yより若干少なくなり、竹林整備による副次効果を考慮しなくても水俣市を二酸化炭素排出ゼロ地域とすることができる。

九州で繁茂している厄介者の竹をバイオマス資源とし、バイオエタノールを生産することにより、水俣市を二酸化炭素排出ゼロ地域とするだけでなく、竹林の整備に伴う二酸化炭素排出権取引や雇用効果も期待でき、その効果は計り知れない。今後、九州でこのような取り組みを進めていくことにより、低炭素社会の実現に向けた社会システムを構築していくことになる。

おわりに

20世紀は化石資源の時代であったが、21世紀はバイオマス資源の時代であると言われている。わが国が持続的に成長していくためには、賦存するバイオマスを効率的に利用する技術開発を入口、出口も含めて行っていくことが強く望まれている。バイオマス利活用技術として燃焼やガス化以外にメタン発酵、乳酸発酵そしてエタノール発酵などのバイオテクノロジーがあげられる。これらバイオテクノロジーはオールドバイオを代表するものであるが、効率的な利活用技術を開発するためにはニューバイオを取り込んでいかなければならない。

この視点に立ち、メタン発酵やエタノール発酵にニューバイオを取り込み、基盤技術開発を行ってきた。そして、これらの技術を駆使しバイオマスのサーマルリサイクルの検討を行い、顕在化した環境問題やエネルギー問題の解決に取り組んできた。また、地方の疲弊が大きな問題となってきた時期であり、地域に賦存するバイオマス（廃棄物系も含む）をメタン発酵やエタノール・メタン二段発酵によりバイオガス化やバイオエタノール化する地縁技術を開発し、それらを地燃料として利用する応用研究にも取り組み始めた。地域との取り組みは緒に就いたばかりであるが、このような取り組みも含め今回の受賞につながったこと、会員の皆様のご理解に感謝する次第である。この賞を励みにまず地方で普及させていきたいが、地方自治体にも温度差があるので、国が打ち出したバイオマスタウン構想が、構想倒れにならないように尽力したい。また、この分野で研究開発に従事する研究者は、オリジナリティにこだわることなく住民参加型の技術を開発し、資源循環型まちづくりをすすめ、地域に貢献していかなければならない。そして、国内での実績に基づき東南アジア、東アジアと共同し、低炭素社会の構築に少しでも貢献していくべきである。

ここで紹介した研究は、日立造船在職中から始めたもので、熊本大学工学部応用化学科応用微生物研究室に着任（1986年12月）してからも園田頼和教授のご指導のもとで継続し、すでに30数年に亘るものである。この間、市川邦介教授（故人）、橋本 奨教授（故人）、永井史郎教授、菅 健一教授、新名惇彦教授、小川隆平教授、山田富明客員教授 他多くの先生方に公私にわたりご指導をいただいた。また、メタン発酵やエタノール発酵を研究していく過程で、研究を共にしてきた森村 茂准教授や重松 亨先生（現、新潟薬科大 准教授）、湯 岳琴先生（現、北京大学 教授）、赤松 隆教授（崇城大学）ら先生方にニューバイオを導入していただいたことは多大なものがある。そし

て、270名にのぼるドクター（社会人・留学生）、修士生、卒業生、研究員および事務補助員 皆様の成果の集約であることは言うまでもない。ここに深甚なる謝辞を表す。また、共同研究を通して有意義な助言をいただいた企業の方々に深謝する。なお、本研究の大部分は、経済産業省・NEDO、農林水産省、環境省および日本酒造組合中央会のプロジェクトからサポートを受けて実施したものである。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) 生物系廃棄物リサイクル研究会編：生物系廃棄物のリサイクルの現状と課題－循環型経済社会へのナビゲーターとして－, p.1-6, 有機質資源化促進会議, 東京(1999).
- 2) 園田頼和：廃水の生物処理（高原義昌編著）, p.167-215, 地球社（1980）.
- 3) Kida, K., Tenemura, K., and Sonoda, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 510-514 (1993).
- 4) Tanemura, K., Kida, K., Iwasaki, K., and Sonoda, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 332-335 (1992).
- 5) 木田建次, 森村 茂, 種村公平：生物工学, **74**, 381-396 (1996).
- 6) Kida, K., Nakano, Y., Sonoda, Y., Nomura, T., and Tomita, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 304-308 (1993).
- 7) Kida, K. and Sonoda, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 235-237 (1993).
- 8) Kida, K., Shigematsu, T., Kijima, J., Numaguchi, M., Mochinaga, Y., Abe, N., and Morimura, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 590 (2001).
- 9) 重松 亨, 湯 岳琴, 木田建次：生物工学, **87**, 570-596 (2009).
- 10) 鎌形洋一：嫌気性微生物学（上木勝司, 永井史郎編著）, p.95, 養賢堂（1993）.
- 11) 木田建次：環境管理, **35**, 539-546 (1999).
- 12) Schink, B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 262-280 (1997).
- 13) Shigematsu, T., Tang, Y., Kawaguchi, H., Ninomiya, K., Kijima, J., Kobayashi, T., Morimura, S., and Kida, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 547-558 (2003).
- 14) Shigematsu, T., Tang, Y., Kobayashi, T., Kawaguchi, H., Morimura, S., and Kida, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4048-4052 (2004).
- 15) Schnurer, A., Svensson, B. H., and Schink, B.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **154**, 331-336 (1997).
- 16) Shigematsu, T., Era, S., Mizuno, Y., Ninomiya, K., Kamegawa, Y., Morimura, S., and Kida, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 401-415 (2006).
- 17) Koch, M., Dolfing, J., Wuhrmann, K., and Zehnder, A. J. B.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1411-1414 (1983).
- 18) Tang, Y., Matsui, T., Morimura, S., Wu, X., and Kida, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 180-187 (2008).
- 19) Ikbal, Kida, K., and Sonoda, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 85-89 (1994).
- 20) Kida, K., Ikbal, Teshima, M., Sonoda, Y., and Tanemura, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 335-338 (1994).
- 21) Ikbal, Tang, Y., Shigematsu, T., Morimura, S., and Kida, K.: *Japanese J. Wat. Treat. Biol.*, **39**, 17-24 (2003).
- 22) Tang, Y., Shigematsu, T., Ikbal, Morimura, S., Kida, K.: *Water Research*, **38**, 2537-2550 (2004).
- 23) Liu, K., Tang, Y., Matsui, T., Morimura, S., Wu, X., and Kida, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 54-60 (2009).
- 24) Liu, K., Tang, Y., Fujimura, Y., Shigematsu, T., Morimura, S., and Kida, K.: *Japanese J. Wat. Treat. Biol.*, **42**, 93-98 (2006).
- 25) Tang, Y., Fujimura, Y., Shigematsu, T., Morimura, S., and Kida, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 281-287 (2007).
- 26) 木田建次, 森村 茂, 重松 亨：特許第4024045号.
- 27) Lindeman, L. R. and Rocchiccioli, C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1107-1119 (1979).
- 28) 上田誠之助：発酵と工業, **38**, 1028-1033 (1980).
- 29) Cysewski, G. R. and Wilke, C. R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1421-1444 (1978).
- 30) Wada, M., Kato, J., and Chibata, I.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 241-247 (1980).
- 31) 木田建次, 森村 茂, 鐘 亜鈴：生物工学, **75**, 15-34 (1997).
- 32) 浅野慎一, 久安智香, 山抱基純, 森村 茂, 岸本真希男, 木田建次：醸酵工学, **65**, 169-177 (1987).
- 33) Kida, K., Morimura, S., Kume, K., and Sonoda, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 169-173 (1992).
- 34) 渡辺誠衛, 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 吉沢 淑：醸協, **83**, 757-763 (1988).
- 35) Morimura, S., Zhong, Y., and Kida, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 271-274 (1997).
- 36) 木田建次, 森村 茂, 志摩宣行, 浅野慎一, 山抱基純, 宮沢俊樹：醸酵工学, **65**, 27-35 (1987).
- 37) Kida, K., Yamadaki, M., Asano, S., Nakata, T., and Sonoda, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 107-111 (1989).
- 38) Tang, Y., An, M., Zhong, Y., Syo, T., Morimura, S., Wu, X., and Kida, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **109**, 41-46 (2010).
- 39) Kida, K., Asano, S., Yamadaki, M., Iwasaki, K., Yamaguchi, T., and Sonoda, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 39-45 (1990).
- 40) Kida, K., Morimura, S., Kume, K., Suruga, K., and Sonoda, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 340-344 (1991).
- 41) 鐘 亜鈴, 森村 茂, 木田建次：生物工学, **73**, 109-112 (1995).
- 42) Zhong, Y., Morimura, S., and Kida, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 204-207 (1995).
- 43) Tang, Y., Koike, Y., Liu, K., An, M., Morimura, S., Wu, X. L., and Kida, K.: *Biomass and Bioenergy*, **32**, 1037-1045 (2008).
- 44) Koike, Y., An, M., Tang, Y., Syo, T., Osaka, N., Morimura, S., and Kida, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 508-512 (2009).
- 45) Tang, Y., An, M., Liu, K., Nagai, S., Shigematsu, T., Morimura, S., and Kida, K.: *Process Biochemistry*, **41**, 909-914 (2006).
- 46) An, M., Tang, Y., Morimura, S., and Kida, K.: *Japanese J. Wat. Treat. Biol.*, **43**, 209-217 (2007).
- 47) 木田建次, 湯 岳琴, 安 明哲, 山田富明：セルロース系バイオエタノール製造技術－食料クライシス回避のために－（近藤昭彦, 植田充美監修）, p.57-72, NTS (2010).