

# 固体併行複発酵による地域分散型バイオエタノール生産

片倉 啓雄

持ち運び可能な燃料となり、化学繊維などの原料にもなるバイオエタノールは、世界中でその生産方法が研究されている。しかし、その目的は化石資源を私たちの子孫のために温存し、地球温暖化を遅らせることにあるのであるから、エタノールの生産に投入するエネルギーは、得られるエネルギーに比べて十分に小さくしなければならない。食糧と競合しないリグノセルロースを原料にエタノールを生産するには、原料の確保、輸送、保管、前処理、糖化、発酵、蒸留（精製）、そして元素循環を考慮した廃水・廃棄物処理まで、すべてのプロセスにおいて、生産コストの低減だけでなく、省エネルギー化のための技術開発を進めなければならない。本稿では、各プロセスの現状と課題を概説したうえで、地域分散型小規模生産でありながら、省エネ低コストを実現できるエタノール生産システムを紹介する。

## 各プロセスの現状と課題

**原料の確保** 2008年にバイオ燃料技術革新協議会が策定したバイオ燃料技術革新計画<sup>1)</sup>では、国内で利用可能なバイオマスとして、稲わら(690万t/年)、林地残材(330万t/年)、笹(300万t/年)、竹(330万t/年)、古紙(280万t/年)を挙げている。しかし、これらのバイオマスから生産できるエタノールは、収率を0.3 kl/dry-tとすれば、580万kl/年であり、国内のガソリン消費量6000万kl/年の1/10に満たない。このため、同協議会は、粗放栽培でも単位面積あたりの年間収穫量が大きいバイオマスの栽培が必要であるとして、サトウキビ、エリアンサス、ネビアグラスなどの草本系バイオマス、ヤナギ、ポプラなどの木質系バイオマスを例示している。また、約90万t/年が利用可能な廃綿繊維、約500万t/年が利用可能な食品系廃棄物も無視できないバイオマスである。

**輸送と保管**<sup>2-5)</sup> 年産10万klの製造プラントを想定するなら、稲わらであれば30万tが必要であり、水田1haあたり6tの稲わらが収穫できるとして、500km<sup>2</sup>の水田から収集しなければならない。また、設備コストを低減するため、製造プラントを年間を通して稼働させるには、バイオマスが腐敗しないよう水分15%以下に乾燥して保管しなければならない。しかし、乾燥稲わらの密度はロールベイラーなどで圧縮して収穫しても0.1 t/m<sup>3</sup>程度であり、その体積は300万m<sup>3</sup>(東京ドーム約2杯分)にもなる。林地残材、笹、竹については、急峻な山で収穫して搬出するための機械装置、道路整備なども必要であり、化石燃料の消費を抑えた効率的な方法で輸送し、

保管する方法が求められている。

**前処理**<sup>2,3)</sup> 植物はセルロースがヘミセルロースで束ねられ、リグニンに覆われている。リグニンはモノリグノールが重合した複雑な網目構造をもち、酵素を含めた分子量10k以上の物質はその網目を通過することができない。このため、セルロースやヘミセルロースを酵素糖化するには、リグニンの障壁を除去する前処理が必要となり、これまでにさまざまな脱リグニン法が開発されている。ディスクミルなどによる磨り潰し、爆砕、マイクロ波処理などの物理的な方法は設備コストとエネルギー消費をいかにして低減するかが課題である。重臨界水処理、酸・アルカリ加水分解などの化学的な方法は、コスト低減と省エネルギー化に加えて、糖の過分解によって生じる酢酸、ギ酸、フルフラール類、リグニンの分解によって生じるフェノール化合物がその後の微生物による発酵を阻害するため<sup>6)</sup>、これらの生成の抑制が課題になっている。これに対して、腐朽菌を用いる生物的な方法は<sup>7)</sup>、エネルギー消費、コスト共に小さく、発酵阻害物の生成も問題にならないが、処理に月単位の長い時間を要し、腐朽菌自身が炭水化物を消費してしまうという課題が残されている。

**糖化**<sup>2,3)</sup> 超臨界水処理や濃硫酸による加水分解を行えば、セルロースを単糖にまで分解できるが、過分解を避けることができず、上述の発酵阻害物が高濃度に生じる。このため、前処理はリグニンの除去にとどめ、セルロースは酵素によって糖化する方法が主流になっている。しかし、セルロースの大部分は固い結晶構造をとるため消化性が悪く、酵素の使用量および酵素の調製コストの低減が重要な課題である。バイオ燃料技術革新計画<sup>1)</sup>では技術革新ケースでのエタノールの価格を40円/lとしているが、1gの酵素で1kgの糖を得て、酵素を2円/gで調達できるようになって、ようやくエタノール1lあたりの酵素のコストを約4円に抑えることができる。市販セルラーゼ製剤の多くは*Trichoderma reesei*の培養液から調製され、この糸状菌は数十g/lものセルラーゼの生産能力をもつが、上述の2円/gの生産コストの達成は容易ではない。また、後述するように、蒸留コストの節減と省エネには高濃度の糖化液を得る必要があるが、グルコースによる生産物阻害で糖化酵素のみかけの比活性が低下するため、上述の1gの酵素で1kgの糖を得ることも、やはり容易ではない。生産物阻害を受けにくく、高比活性のセルラーゼの開発も進められているが、*T. reesei*なみの生産性を実現できなければ、実生産でのコスト低

減には結びつかないところに難しさがある。

**発酵<sup>2,3)</sup>** 発酵プロセスでは以下の点に留意する必要がある。

(1) ペントースの発酵性 ペントースはリグノセルロースの4割前後を占め、これを発酵できる微生物を用いなければ高い収率は望めない。組換えでペントース発酵能を付与したパン酵母も開発されているが<sup>8)</sup>、キシリトールやグリセロールが副生し、高濃度のグルコースが存在するとペントースの取り込みが抑制される課題が残されている。

(2) エタノール終濃度と発酵速度 蒸留プロセスの省エネとコストダウンには、最低でも数%(w/v)のエタノール終濃度が必要とされる。これを実現するために、糖化工程で10%以上の糖濃度が得られるように原料を仕込むと、生産物阻害によってセルラーゼのみかけの比活性が低下し、酵素コストの増大もしくは糖化時間の延長による設備コストの増大を招く。糖化が律速となるように併行複発酵を行えば生産物阻害は回避できるが、反応温度を酵母に合わせて下げざるを得ず、やはり酵素コストの増大、もしくは反応時間が延び、設備コスト増につながる。

(3) 酵母の調製コストと発酵力の維持 パン酵母の発酵力(エタノール比生産速度)は、最大でも $1.0\sim 1.5\text{ g}\cdot\text{g-dry-cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 程度であり、エタノール濃度の上昇と共に低下する。 $1\text{ l}$ (約 $800\text{ g}$ )のエタノールを得るには、酵母の平均の発酵力を $0.8\text{ g}\cdot\text{g-dry-cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ としても $1000\text{ g-dry-cell}\cdot\text{h}$ が必要になる。エタノール $1\text{ l}$ あたりの酵母のコストを1円に抑えたとすれば、酵母の調製には安く見積もっても $1\text{ g-dry-cell}$ あたり0.2円は必要であるから、使用できる酵母は $5\text{ g-dry-cell}$ である。したがって、平均 $0.8\text{ g}\cdot\text{g-dry-cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ の発酵力を200時間維持しなければ酵母の調製コストを1円//に抑えることができない(仮に20時間の発酵を行った酵母を使い捨てにすれば、酵母の調製コストは10円//に跳ね上がる)。このため、酵母の回収再利用は必須であり、さらに発酵力を維持するためにエタノールに耐性があり、前処理の項で述べた発酵阻害物質に対する耐性をもつ酵母<sup>9)</sup>を育種する必要がある。

(4) 雑菌対策 糖化・発酵プロセスが乳酸菌などの雑菌に汚染されればエタノールの収率は低下するが、工業スケールの生産において原料、糖化酵素、副原料などの滅菌はエネルギー的、コスト的に現実的ではない。このため、酵母が低pHに耐性があることを利用して、発酵工程から回収した酵母を希硫酸処理で滅菌するなどの対策が講じられている。また、乳酸菌などの雑菌が生育できないpH 4以下でも発酵力を維持できる酵母の育種も行われている。

**蒸留・精製** エタノールをガソリンに添加する場合、現状では99.5%以上に濃度を高める必要がある。このため、ベンゼンなどの第三成分を加えた共沸蒸留の他に、

よりエネルギー消費が少ないゼオライトなどによる水分の吸着除去、水を選択的に透過する膜を利用したパーバレーション法などが開発されている。90%程度のエタノールを使用できる自動車エンジンの開発も進められているが、省エネの観点から言えば、ポリプロピレンの製造や燃料電池など、通常の蒸留で得られる濃度のエタノールでも使用できる用途に用いるべきであろう。

**後処理と元素循環** エタノール濃度が10%の発酵液を得たとしても、得られるエタノールの9倍の廃水を処理しなければならず、廃水処理に要するコストは全設備コストの1/3以上になるという試算もある。廃水からはメタン発酵によって、リグニンからは燃焼によってエネルギーを回収することができるが、これらの処理方法では、バイオマスに含まれる窒素、リン酸、カリウム、およびその他の微量元素を回収してバイオマスを収穫した土地に戻すことが難しい。現在、水田に鋤き込むことによって処理されている稲わらを原料とするなら、これらの元素に相当する肥料を製造するエネルギーとコストも勘案しなければならない。リン酸とカリウムは市場価格も高騰しており、廃水や残渣を堆肥化して農地に戻す実用的な方法を、省エネ低コストの輸送方法を含めて考えておかなければならない。

### 日本の現状に適した生産システム

生産スケールを大きくすれば、単位エタノールあたりの生産コスト(投入エネルギー)を節減できるが(図1細線)、バイオマスおよび堆肥化した残渣の輸送に要するコスト(破線)は増大する。このためトータルコスト(太線)は、ある生産スケールにおいて最少となる。サトウキビやトウモロコシを原料とする場合(図1A)に比べて、稲ワラなどのリグノセルロースを原料とする場合(図1B)、前処理と糖化の工程が複雑になるため、生産コストは上昇する(図1B細線)。また、日本の主なバイオマスは単位耕作面積当たり年間に得られる炭水化物量がサトウキビの1/3程度しかなく、収穫地も分散しているため、輸送コストも増大する(図1B破線)。このため、最適なスケールで生産したとしてもトータルコストはサトウキビやトウモロコシよりも著しく上昇する(図1太線)。したがって、原料の輸送コストを低減する努力も必要であるが、バイオマスと堆肥化した残渣の輸送距離を最小限にし、かつ食品系廃棄物のような多品種のバイオマスに柔軟に対応するためには、地域分散型の小規模生産であっても生産コストと投入エネルギーが大きくなりすぎないシステム(図1C細線)が必要である。

### CCSSFシステム

上述のようにリグノセルロースからエタノールを生産するには、原料の収集から廃液処理と元素循環にまで配慮した小規模でも省エネ低コストのプロセスの開発が必

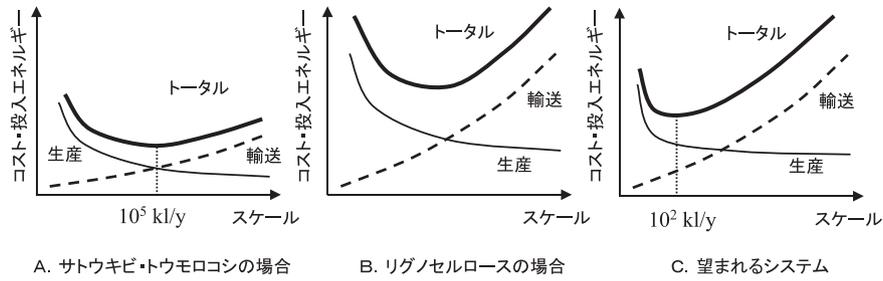


図1. 生産スケールとコスト（投入エネルギー）の関係

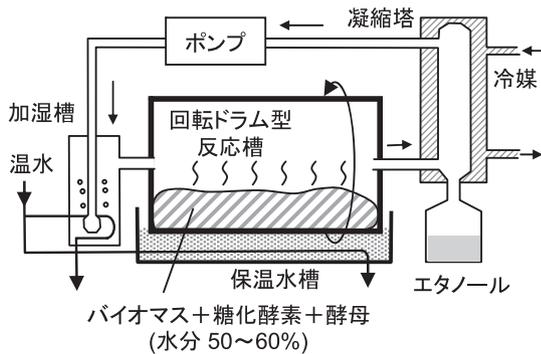


図2. CCSSF システム

要である。既往のバイオエタノール生産は液体発酵であるため、得られる発酵液の9割以上は水であり、大量の廃水を処理しなければならない。見方を変えれば、わざわざ水を入れ、再び水を取り除く非効率的なシステムとも言える。ところで、パン生地は水分が50%前後しかないが、酵母は旺盛に発酵する。ただし、水が少ないので発酵を続けるとエタノール濃度がすぐに上昇し、酵母の発酵力は低下してしまう。そこで筆者らは、水分を最小限に抑えた固体発酵を行い、発酵槽のヘッドスペースからエタノールを連続的に回収する consolidated continuous solid state fermentation (CCSSF) system を開発した<sup>10)</sup> (図2)。

このシステムはドラム型の発酵槽、凝縮塔および加湿槽からなり、発酵槽では前処理したバイオマスに糖化酵素、酵母、および50~60%(w/w)の水を加えて混合し、半固体状で併行複発酵を行う。混合物中のエタノールが適当な含有率になった時点で、ヘッドスペースガスを凝縮塔に循環させてエタノールを回収する。エタノールと共に水分も凝縮塔に移行するので、加湿槽の温度を調節して混合物の水分を一定に保つ。図3はデンプンをモデルバイオマスとしてCCSSFを行った結果であり、反応槽内のエタノール濃度を、循環ポンプの流速を調節して40 g・kg<sup>-1</sup>前後に保った。デンプンが約8割消化された時

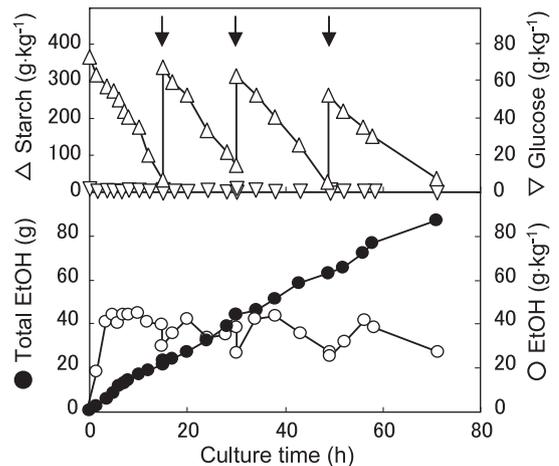


図3. CCSSFの経時変化。内径10 cm長さ15 cmの発酵槽にコーンスターチ50 g、パン酵母30 g (乾燥重量6 g)、 $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ各2000 units、YP培地(1% 酵母エキス、2% ペプトン、0.5% 二亜硫酸二カリウム) 65 mlを入れ、37°Cの恒温チャンバー内で8 rpmで回転させた。

点で40 gずつデンプンを追加して運転を継続しところ、凝縮塔から20~25%(w/v)のエタノールを連続的に回収でき、理論収率の93%のエタノールが得られた。槽内エタノール濃度を50~70 g・kg<sup>-1</sup>に制御すれば、回収エタノール濃度を38~43%(w/v)に高めることができたが、酵母のエタノール比生産速度が時間と共に有意に低下した。より高い濃度のエタノールを持続的に得るためには、よりエタノール耐性が高い酵母が必要であり、さらに糖化酵素の至適温度により近い高温にも耐える酵母の開発が課題である。

既存のエタノール生産プロセスは、そのコストとエネルギーを節減するため、大規模プラントでの製造を前提としているが、少量多品種のバイオマスが分散して存在する日本には必ずしも適していない。これに対して地域分散型の小規模生産を前提とした本システムは、バイオマスの輸送および堆肥化した残渣の農地への返送に要す

るエネルギーとコストを最少にすることができ、収穫の季節変動や多品種にも柔軟に対応可能であり、以下のような長所をもつ。

- (1) コンパクトなので、既存の工場やゴミ処理場の一角などに設置でき、トレーラーに載せれば、バイオマスの収穫時期と場所に合わせて移動することも可能。
- (2) バイオマスを繰り返し投入できるので、コストがかさむ糖化酵素と酵母を実質的に再利用できる。
- (3) 反応槽の保温と加湿には、既存工場の低温廃熱が利用でき、さらに冬場は凝縮に外気を利用すれば、さらに大幅な省エネが可能。
- (4) 原料の収集時もしくは反応開始時にエタノールを  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  程度添加しておけば、防腐剤や抗生物質を添加しなくても乳酸菌などの雑菌を抑制でき、添加したエタノールは回収することができる<sup>11)</sup>。
- (5) 回収されるエタノールは清澄な蒸留液であるため、既存の選択膜での省エネ濃縮が可能。80~90%程度に濃縮して最終精製施設に運べば、輸送エネルギーの最少化とガソリン添加に必要な品質管理を両立できる。
- (6) 処理コストを要する廃水がほとんどでない。
- (7) 発酵残渣は、簡単な後処理を行えば、そのまま堆肥として農地に還元でき、低水分であるため、その輸送に要するエネルギーも少ない。

直径3 m (道路輸送可能な最大径)、長さ6 m、実容積  $40 \text{ m}^3$  の発酵槽に5 tのバイオマスを仕込み、年間300日稼働させ、理論収率の90%のエタノールが得られるとすれば、たとえば炭水化物含量90%の廃綿繊維を3日で糖化・発酵でき、炭水化物含量50%のデンプン系食品廃棄物を1日で糖化・発酵できるとすれば、それぞれ年間に280 klおよび460 klのエタノールを得ることができる。この規模の発酵槽は約2億円で作成できると見積もられ、10年で償却するとすれば、設備コストはエタノール1 lあたりそれぞれ72円および43円となるが、同一規格の発酵槽を工場で量産して建造費を下げ、国や自治体から建設費の補助を受ければ事業としても成り立つと考えられる。

### 今後の課題

CCSSFシステムは冒頭に述べた各プロセスの課題のかなりの部分を解決し得るが、次のような課題が残されている。まず、地域分散型の省エネ低コストの脱リグニン法の開発が必要である。著者らはコンポストから単離した好熱性桿菌 *Ureibacillus thermosphaericus* が、少なくとも草本系バイオマスについては脱リグニン能をもち、また糖をまったく資化しないことを見いだしており、このバクテリアを用いた生物的脱リグニンプロセスの研究を進めている。次に、セルロースを迅速低コストに糖

化できるプロセスの開発が必要である。これにはセルロソームなどを参考にして、結晶性セルロースに対するセルラーゼのみかけの比活性を桁で上げるとともに、基質の結晶性を下げて消化性を改善するアプローチも必要であると考えられる。また、 $45^\circ\text{C}$ 程度の高温で発酵阻害物に耐え、10%近いエタノール濃度でも発酵力を維持できるペントース発酵性の酵母の育種が必要である。この酵母は、地域分散型を前提とする場合、自然界への拡散を防止することが難しいため、遺伝子組換えを用いなくて育種することが望ましい。何らかの方法で滅菌すれば「組換え生物」ではなくなるものの、組換えDNAは残り、残渣を堆肥化して農地に戻すのであれば、その安全性の評価は重要な問題である。 $0.8 \text{ g} \cdot \text{g-dry-cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ の比生産速度の酵母を200時間使用して廃棄するとすれば、200万kl/年のエタノールを製造する場合には1万t/年の酵母が必要になり、結果として $10^{20} \sim 10^{21}$ の組換えDNA分子を環境に放出することになる。このような桁違いに大量の組換えDNAの放出の可否は、研究者や行政だけで判断できる問題ではなく、遺伝子の水平伝搬の影響などを十分に検討した上で、民主的な手続きを経て判断しなければならない。

バイオマスを確保し、元素循環も考慮して省エネ低コストで有効に利用するには行政、経済、社会科学などの専門家との連携も不可欠であり、その実生産においては、市民との十分なリスクコミュニケーションが必要になる。私たち研究・開発に携わる者は、広い視野と知識が求められていることを自覚しなければならない。

### 文 献

- 1) <http://www.enecho.meti.go.jp/policy/fuel/080404/hontai.pdf>
- 2) 稲わら等バイオマスからのエタノール生産、地域資源循環技術センター(2008)。
- 3) バイオエタノール製造技術、アルコール協会編、工業調査会(2007)。
- 4) 佐賀清崇ら：エネルギー・資源学会論文誌，**29** (1), 30 (2008)。
- 5) 佐賀清崇ら：エネルギー・資源学会論文誌，**29** (6), 8 (2008)。
- 6) Okuda, N. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 128 (2008)。
- 7) Watanabe, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 215 (2010)。
- 8) Tanino, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 1215 (2010)。
- 9) Hasunuma, T. *et al.*: *Microb. Cell Fact.*, **10**, 2 (2011)。
- 10) Moukamnerd, C. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 87 (2010)。
- 11) Katakura, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 343 (2011)。