

Technical Paper

Improvement of the Fermentation Process for Bioethanol — High Speed Fermentation Process —

Hiroshi IWASAKI^{*1}, Nobuhide TAKAHASHI^{*3}, Atsushi KOBAYASHI^{*3}, and Koichi YAMADA^{*1*2}

(Received November 21, 2005)

バイオエタノール発酵プロセスの合理化 —高速度発酵プロセス—

岩崎 博^{*1}, 高橋伸英^{*3}, 小林 敦^{*3}, 山田興一^{*1*2}

Biomass is a carbon neutral material and the development of processes for the use of the bioethanol is accelerating worldwide as the demand for its use as an alternate transportation fuel increases. The bioethanol has various advantages in the fuel performances of the environmental and the octane number, etc. But the amount of heat of combustion for each unit volume is about 70% of gasoline, the price of bioethanol is necessary to be less than 70% of the gasoline with competitive for gasoline. It is assumed a current gasoline refinery cost is about ¥40/L (crude oil, \$50/bbl). The ethanol production cost is preferable to be less than ¥20/kg to be competitive to gasoline cost. Then the rationalization of the bioethanol process is necessary. The examination of the use of the lignocellulosic biomass with the possibility of cheap and a large amount of supply as a raw material biomass and the rationalization in the process are necessary. We reported on the rationalization process in the refinement process of the bioethanol by the former report¹⁾. Herein, the design of a high speed fermentation process which uses recombinant *Coryneform* type bacteria transformed by a recombinant DNA technology for the cost reduction is reported. A high speed fermentation of 30kg-ethanol·m⁻³·h⁻¹ was assumed by the application of a high bacteria concentration of 30wt% (wet base). The production cost including both fixed and variable cost of the newly designed process was evaluated at an annual production rate of 206,000t-ethanol. The resulting cost was compared with the production cost using a future NREL (National Renewable Energy Laboratory) process. The high speed fermentation process, whose retention time was 1.7h, required smaller volume of fermentators than those for NREL process by 5%. This reduced the investment cost by ¥0.3/kg-ethanol compared to that of NREL process. The variable cost of the new process could be reduced by ¥1.1/kg-ethanol. Further research work to attain the above cost reduction is for the confirmation of high bacteria concentration fermentation with low nutrient dose.

Key Words

Bioethanol, Lignocellulosic biomass, Cost reduction, Fermentation, Biocatalyst, Bacteria

1. 緒 論

バイオマスはカーボンニュートラルな特性をもち、バイオマスを原料とする燃料用バイオエタノールを自動車用燃料と

して代替利用する検討が加速している。バイオエタノールは、環境面、オクタン価などの燃料性能に種々の利点をもつが、単位容量あたりの燃焼熱量はガソリンの約70%程度であり、ガ

- * 1 Faculty of Engineering, Seikei University
3-3-1 Kichijoji Kita-machi, Musashino-shi, Tokyo 180-8633, Japan
- * 2 Chemical Research Group, Research Institute of Innovative Technology for the Earth
9-2 Kizugawa-dai, Kizu-cho, Soraku-Gun, Kyoto 619-0292, Japan
- * 3 Dept. of Fine Material Engineering, Shinsyu University
3-15-1 Tokida, Ueda-shi, Nagano 386-8567, Japan

- * 1 成蹊大学理工学部
〒180-8633 東京都武蔵野市吉祥寺北町3-3-1
- * 2 (財)地球環境産業技術研究機構 化学研究グループ
〒619-0292 京都府相楽郡木津町木津川台9-2
- * 3 信州大学繊維学部精密素材工学科
〒386-8567 長野県上田市常田3-15-1

ソリンに対して競争力をもつにはガソリンの70%程度の価格となる必要がある。現状でのバイオエタノール価格は卸値で約30～40円/Lであり、一方、ガソリン製油所原価は約40円/L(原油50ドル/bblの時)である。原油の価格が高騰している現時点では、エタノール価格はガソリンに対して競争力を持ちつつあるが、バイオマスの単価変動の可能性等を考慮する時、エタノール製造原価については更なる合理化検討が必要であり20円/L程度まで低減することが望ましい。そのために、原料バイオマスとして安価で大量の供給の可能性のあるセルロース系バイオマスの利用検討やプロセスの合理化検討が必要である。セルロースを原料とするエタノール製造プロセスは、バイオマスを分解してセルロースを分離する工程、セルロースを糖化し発酵する工程、生成したエタノールを精製する工程、リグニンなどの残渣バイオマスを燃焼しエネルギーを回収する工程などから構成される。我々は前報¹⁾にて、エタノールを精製する工程の合理化プロセスを報告した。また現状の発酵工程は、発酵速度が遅いため大容量の発酵槽が必要であり、設備費が高くなる一因となり、合理化が必要である。本報では、発酵工程において、遺伝子組換えなどにより形質転換され、嫌気性条件下での発酵においては菌の増殖がなく、高速度のエタノール発酵が期待される *Coryneform* バクテリアをバイオ触媒として使用した、高速度の発酵プロセスを設計し評価した。現状での開発目標プロセスの一つである、*Zymomonas mobilis* (*Z.mobilis*) 型バクテリアを利用する National Renewable Energy Laboratory (USA) の将来プロセス (NREL プロセス)²⁾ と経済性を比較して、発酵工程における合理化の可能性を検討した。

2. 発酵バイオ触媒の開発状況と想定した高速度発酵プロセス

2.1 発酵バイオ触媒の開発状況

セルロース系バイオマスを原料としてエタノール発酵する時、グルコース (glucose) と共に、キシロース (xylose) もエタノールに効率良く転換する必要がある。またバイオ触媒として次の項目が要求される³⁾。

- 1) グルコース、キシロースなどのエタノール発酵収率が高い
 - 2) エタノールの発酵速度が早い
 - 3) 生成エタノールや酢酸などの副生物への耐性が強い
 - 4) 発酵に必要な栄養分が少なくよい
 - 5) 発酵槽の操作条件域が広い
- などである。

そのために遺伝子組換えなどの技術を用いて、*Saccharomyces cerevisiae* (*Scerevisiae*), *Z.mobilis*, *Escherichia coli* (*E.coli*), *Klebsiella oxytoca* (*K.oxytoca*) などの形質転換を行い、キシロースのエタノール発酵、エタノール収率の向上やエタノールの発酵速度の向上などが検討されている。*Scerevisiae* はグルコースのエタノール発酵には発酵速度も速く、かつエタノールや副生する酢酸への耐性も強く優れた酵母であるが、キシロース同化経路を持たずキシロースをエタノールに発酵出来なかった。近年になり組み替え DNA 技術により、*Pichia stipitis* (*P.stipitis*) のようなキシロース発酵バクテリアから、キシロース還元遺伝子やキシリトール脱水素遺伝子を *S.*

cerevisiae に導入して形質転換し、セルロース系バイオマスからのエタノール発酵に適用させる検討が進んでいる⁴⁾。また *Z.mobilis* は、古くからリュウゼツラン酒やパームワインのようなアルコール飲料を作るときに使用されていたエタノール発酵に優れたバクテリアである。25%以上のグルコース濃度、13%以上のエタノール濃度にも対応できる性質をもつがキシロースのエタノール発酵は出来なかった。プラスミドを利用した遺伝子転移技術を用いた形質転換により、キシロースのエタノール発酵も可能にした。通常の酵母より発酵速度は3～4倍、グルコースやキシロースなどの混合した糖に対してもエタノール収率は90～95%程度期待可能であり、NRELを中心に検討が進められている^{4) 5)}。*E.coli* は大腸菌であり、遺伝子組み換え技術が誕生した時から最も多く用いられているバクテリアであり、形質転換の技術蓄積は多い。エタノール発酵に用いるバクテリアとして知られていなかったが、*E.coli* に *Z.mobilis* 由来のピルビン酸脱炭酸遺伝子やアルコール脱水素遺伝子 (PET オペロン) を導入することによって、キシロースも含む混合系の糖からエタノール発酵が可能となり、かつ理論収率に近いエタノール発酵収率を得ることができた。しかしエタノール耐性が低く、かつ副生する酢酸などに影響を受けやすいなどの欠点を持っている^{4) 5)}。*K.oxytoca* は製紙工場の排水中に存在する β -グルコシダーゼを生産するバクテリアであり、セロビオースやセロトリオースを輸送し、かつ利用する。PET オペロンを含むプラスミドの挿入などにより形質転換し、セルロース系バイオマスから効率の良いエタノール発酵が検討されている⁵⁾。これ等の形質転換されたバイオ触媒をもちいたエタノール生産は、現時点ではまだ研究室段階からパイロット試験段階であると思われる。Table 1に主なる開発結果を示す^{5) 6) 7)}。Table 1より、エタノール収率はバイオ触媒により差異はあるが、理論収率に対して、グルコースとキシロースなどの糖分の混合系の場合98～80%、キシロース単体の場合95～86%を期待できる。またエタノールの発酵液あたりの生産性(発酵速度)は、最大1.7g/l・hである。

しかし *E.coli* 由来のバイオ触媒は、*E.coli* の溶菌による毒性問題の懸念などの問題点がある。湯川等の開発したバイオ触媒は、遺伝子組み替えした *Coryneform* バクテリアであり、*Z.mobilis* 由来の遺伝子や *E.coli* で開発された形質転換技術を応用している。嫌気性条件下、バクテリアの増殖しない条件下で高密度にバクテリアを存在させることにより、現状より飛躍的に高いエタノール生産性が期待できると言われている⁷⁾。

2.2 想定した高速度発酵プロセス

Z.mobilis を用いた NREL プロセスでは、設計基準としてエタノールの発酵液あたりの発酵速度は1.5g/l・h、発酵槽での平均滞留時間は36時間としている。現状での最高の発酵速度である1.5g/l・hを期待しても、エタノールの年間生産規模が206千トンの大規模な設備では、発酵槽は容量3650m³の大規模タンクが5槽も連なる大設備となり、設備費用、攪拌動力費、必要な敷地面積、メンテナンスなどの点から発酵槽容量の削減などの合理化が必要である。本報告では、嫌気性発酵

Table 1 Performances of biocatalysts on ethanol yield and productivity

Biocatalyst	Substrate ^a (g/l)	Ethanol (g/l)	Ethanol yield (%)	Ethanol productivity (g/l·h)	References
<i>Saccharomyces 1400</i>	Corn fiber AFEX ^b hydrolysate (G35,X7.5,A5,G all)	21	98	1.6	Moniruzzaman et al.(1997)
<i>E.coli KO11</i>	Corn fiber AFEX hydrolysate	27.1	92	1.05	Moniruzzaman et al.(1997)
<i>E.coli KO11</i>	Corn-fiber acid hydrolysate	34.7	80	1.16	Dien et al.(1997)
<i>Z.mobilis CP4</i>	Corn-fiber acid hydrolysate	22.6	88	1.04	Bothast et al.(1999)
<i>Z.mobilis CP4</i>	G25,X25	24.2	95	0.81	Zhang et al.(1995)
<i>Z.mobilis CP4</i>	X25	11	86	0.57	Zhang et al.(1995)
<i>Z.mobilis AX101</i>	G40,X40,A20	42	84	0.61	Mohaghehi et al.(2002)
<i>Z.mobilis CP4</i>	X60	23	94	0.32	Lawford and Rousseau(1999)
<i>E.coli KO11</i>	X90	41	89	0.85	Yomano et al. (1998)
<i>E.coli FBR5</i>	G30,X30,A15	34	90	0.92	Dien et al. (2000)
<i>Coryneform ATCC13032</i>	G96	7		1.7	Yukawa et al.(2001)
<i>K.oxytoca M5Al</i>	X100	46	95	0.96	Ohta et al. (1991)

^a G glucose, X xylose, A arabinose, The number specifies sugar concentration in g/l.

^b AFEX : ammonia fiber explosion, a detoxification procedure

でバクテリアが増殖せずにエタノール発酵が可能であり、当初から発酵槽中に高濃度にバクテリアを充填可能である *Coryneform* バクテリアを想定して合理化検討を行った。湯川等は、*Coryneform* バクテリアである *Corynebacterium glutamicum* を用いて、バクテリアの増殖を抑制した嫌気性条件下で、グルコースから乳酸やコハク酸を発酵する実験結果を報告している。発酵液中のバクテリア濃度を60g-乾燥菌体/lの高濃度で発酵した時、乳酸の発酵速度が42.9g/l·h、コハク酸は11.7g/l·hの高速度発酵の結果を得たこと、また発酵液中のバクテリア濃度と発酵速度との間には一次の相関関係があったことを報告している⁸⁾。エタノール発酵についても、近い将来に、形質転換した *Coryneform* バクテリアなどのバイオ触媒を用い、バクテリアの増殖を抑制した嫌気性条件下で、高濃度発酵により、エタノールの生産性の大きい高速度発酵が可能と想定した。一般にエタノール発酵は、菌体濃度1wt%-wet-base近傍で行われている⁹⁾が、高速度発酵を期待するため、今回合理化のため設計した高速度発酵プロセスでは、発酵槽での菌体濃度を30wt%-wet base (dry base: 6 wt%)とし、エタノールの発酵速度を現状の約30倍である30g/l·hと想定した。またNRELプロセスでは、バクテリア濃度は0.3wt%-dry baseである。高速度発酵プロセスではNRELプロセスに比較して約20倍程度バクテリア濃度は高いが、バクテリアは比重も1近傍であり、発酵槽の運転操作などには影響ない。エタノールの発酵速度はバクテリア濃度にはほぼ比例すると仮定できる^{8) 10)}ので、バクテリア濃度を30wt%-wet baseとしたとき、Table 1の文献値(エタノール発酵速度の最大値: 約1 g/l·h)からもエタノールの発酵速度を30g/l·hと想定して良いが、実験による確認は必要である。またグルコースとキシロースのエタノール収率は、NRELプロセスと同様、グルコースについては理論収率比95%、キシロースについては85%とした。現時点では、*Coryneform* バクテリアでは、キシロースのエタノール収率が85%程度に改質されたとの報告はない

が、Table 1に示すように、*E.coli KO11*ではキシロースのエタノール収率89%まで改質転換されている。また *K.oxytoca M5Al* ではエタノール収率95%のデータが報告されている。*Coryneform* バクテリアでも、将来形質転換が進みキシロースのエタノール収率は85%程度まで改善されると仮定したが、今後技術開発が必要である。更にキシロースのエタノール収率が40% (形質転換がうまくいかない場合)、95% (Table 1: 文献での最高値) になった時の製造コストへの影響も考察した。原料組成は、セルロース系バイオマスであるトウモロコシわら (corn stover) を原料とし、前処理工程、糖化工程後の液であり、代表組成は、NRELプロセスと同等としグルコースについては7.7wt%、キシロースについては4.5wt%とした。Fig. 1に基準とするNRELプロセスを示す。エタノール生産規模は年間206千トンである。今回の検討対象はFig. 1において点線で囲ったエタノール発酵工程である。

2.2.1 NREL プロセス

基準とするNRELプロセスでの発酵工程を、Fig. 2に示し、NRELの設計条件および用いた実験データをTable 2に示す。バイオマスを、前処理、糖化の後、バイオ触媒として *Z.mobilis* を用いて温度41℃で発酵を行う。発酵液は、グルコース6.5%、キシロース3.8%、リグニン (lignin) など不溶性固形分5.0%を含んでいる。発酵槽での平均滞留時間は1.5日 (エタノール生産性: 1.5g/l·hに相当) であり、グルコース、キシロースのエタノール収率は、実験結果を参考に理論収率の各々95%、85%を想定している。発酵槽での平均滞留時間は、実験データでは7日 (エタノール発酵速度: 0.3g/l·h) であるが、設計では1.5日 (エタノール発酵速度: 1.5g/l·h) とし、将来の技術開発の期待値を見込んでいる。

2.2.2 高速度発酵プロセス (New process)

我々は、高効率高生産性のエタノール生産を目標として、

- 1) 発酵槽の前工程で、リグニンを分離する。
- 2) 発酵菌は *Coryneform* バクテリアを用い、エタノール生産速度を高めるために、槽中のバクテリア濃度は30wt%-wet base (dry base : 6 wt%) と高密度化し、エタノールの発

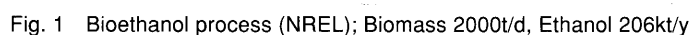


Table 2 Design conditions of NREL and new processes

	NREL process		New process	
	Experimental condition	Design condition	Experimental condition	Design condition
1)Mode	Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation (SSCF)	Co-fermentation	Co-fermentation	Co-fermentation
2)Organism	<i>Zymomonas mobilis</i> 39676-pZB4L	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Corynebacterium</i> ATCC13032	<i>Coryneform</i>
3)Temperature	32℃	41℃	30℃	30℃
4)Initial solid level	12.60%	20%	9.60%	20%
5)Ethanol production rate	0.3kg/m ³ · h	1.5kg/m ³ · h	1.7kg/m ³ · h	30kg/m ³ · h
6)Residence time	7 days	1.5 days	37hours	1.7hours
7)Inoculum level		0.3wt% (dry base)		6wt%(dry base)
8)Nutrient	Corn steep liquor,diammonium phosphate	Corn steep liquor, diammonium phosphate	Ammonium sulfate, kalium phosphat, minerals etc	Diammonium phosphate

Fermentation reaction and conversion

1)Glucose \rightarrow 2Ethanol+2CO ₂	0.95	0.95	0.95
2)Glucose \rightarrow Others	0.041	0.047	
3)3Xylose \rightarrow 5Ethanol+5CO ₂	0.902	0.85	0.4 or 0.85 or 0.95
4)Xylose \rightarrow Others	0.084	0.093	

Saccharification condition

1)Mode	SSCF	Saccharification	Saccharification
2)Temperature	32°C	65°C	65°C
3)Initial solids level	6%-cellulose	22%-total solids	22%-total solids
4)Residence time	7days	1.5days	1.5days
5)Cellulase loading	15FPU/g-cellulose	12FPU/g-cellulose	12FPU/g-cellulose

Saccharification reaction and conversion

1) Cellulose + nH ₂ O → nGlucose	0.9	0.9	0.9
---	-----	-----	-----

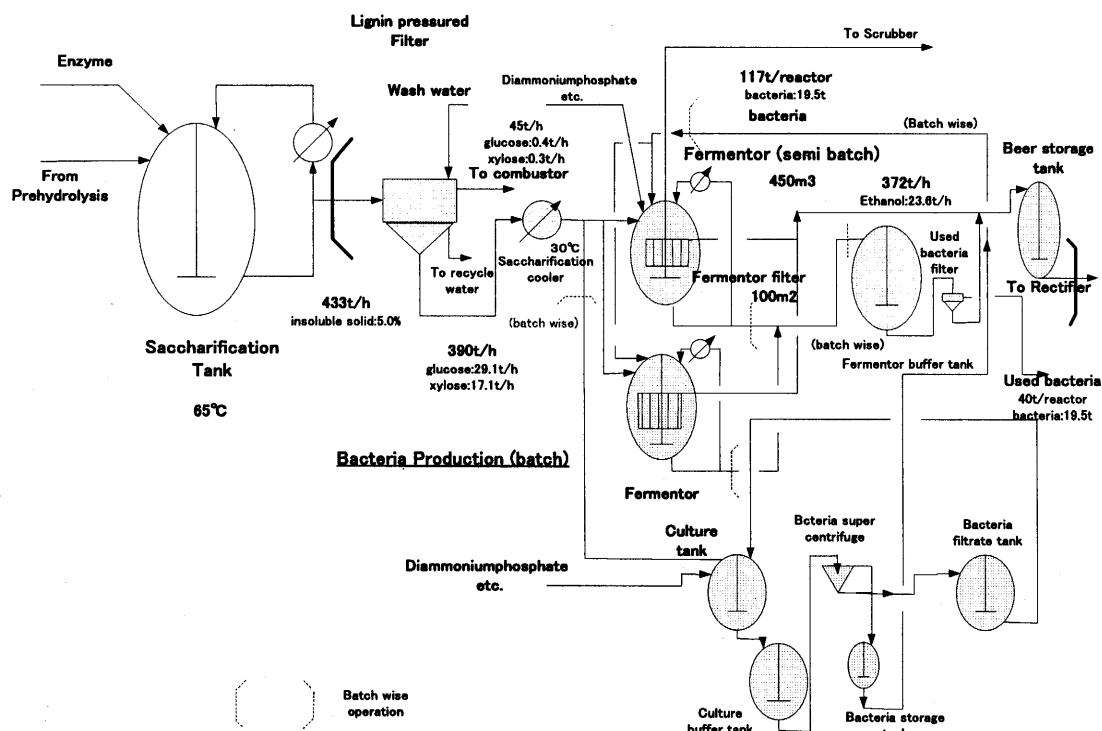


Fig. 3 High speed fermentation process (*Coryneform* bacteria)

酵速度は $30\text{g/l}\cdot\text{h}$ とした。またバクテリアの寿命は 30 日とした。

- 3) 発酵液は膜を通過して、連続に排出されるが、バクテリアの寿命のため、30日毎に発酵操作を停止し、バクテリアを発酵槽から排出し、その後新たにバクテリアを発酵槽に充填する。
 - 4) 発酵は嫌気性で行い、バクテリアは増殖しない。
 - 5) バクテリアは培養工程で培養し、遠心分離機でバクテリアを分離し発酵に用いる。
- プロセス設計に用いた条件など次の通りである。

2.2.2.1 糖化

糖化の条件は NREL プロセスと同一である。セルラーゼ (cellulase) をもちいて、セルロースをグルコースにする。グルコースへの転化率は 90% である。

リグニンの発酵に対する阻害などを防ぐため、糖化工程出口液を圧力フィルターでろ過し、リグニン等不溶分を発酵槽の前で除去する。フィルタースラッジの含水率は 100wt% (乾量基準) とし、不溶分の捕集率は 98wt% とする。スラッジ中の残液中の有効成分であるグルコースやキシロースを回収するため、洗浄を強化し残液中の有効成分を 70wt% 回収し、回収水はリサイクル水として他の工程で再利用する。

2.2.2.2 発酵

バイオ触媒として、形質転換した *Coryneform* バクテリアを用いる。特許 (W001/096573)⁷⁾ を参考にして、高速度発酵プロセスを設計した。発酵でのバクテリア濃度は 30wt%-wet base (dry base: 6 wt%) 程度と想定し、嫌気性条件下 30℃ でエタノール発酵をおこなう。嫌気性条件では、バクテリアは増殖しない。バクテリアの寿命を 30 日程度と想定し、回分条件で使用し、30日間使用した後寿命の尽きたバクテリアを系外に排出する。その後新しいバクテリアを所定の濃度が発酵槽に充填する。バクテリアが有効に作用する間は、液は連続して供給し、エタノールを含む生成液は発酵槽に浸漬したメンブレンフィルターから連続して抜き出す。発酵槽内のバクテリア濃度を最初から高濃度にするのができ、発酵期間中を通して高効率にエタノール生産が可能である。バクテリアに対するエタノール阻害などを避けるため、生成エタノール濃度は 5wt% 程度とする。バクテリアは形質転換されており、キシロースもエタノール発酵可能である。キシロースのエタノール収率は NREL プロセスと同様に、85% とした。エタノール製造コスト比較では、キシロースのエタノール収率が 95% (Table 1 に示した、キシロースでの最高エタノール収率) の場合、また形質転換がうまくいかず、40% と低い場合も評価した。グルコースのエタノールへの転化率は、NREL プロセスと同等に 95% とした。

エタノールの発酵速度は、 $30\text{g/l}\cdot\text{h}$ とした。

またバクテリアはバッチ態様で使用するため、発酵槽を 2 系列とし切り替え運転をおこなう (30 日間連続発酵運転し、その後 3 日間でバクテリア交換する)。寿命の尽きたバクテ

アはろ過後焼却炉で処理する。

発酵のための栄養分は、特許 (W001/096573) の記載によれば、硫酸、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4\cdot \text{nH}_2\text{O}$ 、d-ビオチン、塩酸チアミン、炭酸ナトリウムである。特許では、窒素源である硫酸、pH 調整のための炭酸ナトリウムなど多量に添加しており、栄養分のコストに占める割合が莫大となる。バクテリアは発酵工程では増殖しないため、基本的には発酵のためにはリン酸塩とマグネシウム塩など微量のミネラル成分のみで良いと考えた。リン酸塩としては、NREL プロセスと同様に安価なリン酸二アンモニウム (DAP) を使用し、微量金属類は原料等から補給されるとし、リン酸塩のみ補給する。発酵液 pH は糖化槽の液 pH と同一で良いとし、特別な pH 調整は不要とした。

しかし添加すべき栄養分については、実験による確認が必要である。菌は浸漬式中空糸メンブレン¹¹⁾ (孔径 $0.1\mu\text{m}$ 程度の精密ろ過膜) でろ過し、エタノールを含む液を抜き出す。膜での透過流速は、 $6\text{ml}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$ 程度を想定した¹²⁾。主たる設計条件を Table 2 に示す。

2.2.2.3 *Coryneform* バクテリアの培養

別ラインで好気性の条件下 30℃ でバッチ培養する。ただし一回目の接種バクテリアは購入とするが、2 回目以降は培養バクテリアを再利用できると仮定する。培養は、約 1 日 (20 時間) で、菌を 10wt%-wet base (dry base: 2 wt%) まで培養する。培養液は、プロセス液に栄養成分を添加して使用する。栄養成分は、特許では尿素、硫酸、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4\cdot \text{nH}_2\text{O}$ 、d-ビオチン、塩酸チアミン、酵母エキス、カザミノ酸を使用しているが、リン酸源としては NREL プロセスと同様に安価なリン酸アンモニウムを用いた。

バクテリアのろ過は、バクテリアの捕集や細胞の採取・濃縮などに使用されている、遠心効果 (分離機の遠心力と重力の比) 20,000 程度の超遠心分離機¹³⁾ で含水率 500% 程度まで分離する。分離後バクテリア貯蔵タンクに移送し、嫌気性雰囲気中で最大 15 日程度保管し発酵に供する。なお分離ろ液は培養に再使用する。

3. 高速度発酵プロセス (New process) と NREL プロセスの比較

設備費用、製造変動費など、エタノール製造原価への合理化効果を検討し、高速度発酵プロセスと基準とする NREL プロセスを比較検討した。

3.1 エタノール生産量

高速度発酵プロセスでは、NREL プロセスに比べてリグニンなどの不溶分の分離を、糖化槽と発酵槽の間で実施する。そのためろ過スラッジに伴う液中のグルコースやキシロースなどの有用成分の損失によりエタノールの生産可能性が低下する。液中にはグルコース、キシロース、アラビノース (arabinose)、セロビオース (cellobiose)、オリゴマーなどが含

まれているが、生産可能量の減少は、代表組成として液中のグルコースとキシロースの減量で求めた。基準とする NREL プロセスの場合、グルコースとキシロースから生成するエタノールで全生成エタノールの97%を占めるので、液中のグルコースとキシロースを代表組成としてよい。New プロセスの場合、リグニン等不溶分の洗浄を強化して有用成分を回収するとしてもエタノール生産量は98.4%程度に低下する。また寿命の尽きたバクテリアを分離除去する時にも、分離スラッジ中のエタノールは損失となり、エタノール生産量は減少するが、その割合は小さく0.01%である。

また *Coryneform* バクテリアによるキシロースのエタノール収率が95%または40%と仮定するとき、NREL プロセスに比べ、エタノールの生産量はリグニン等不溶分分離時の有用成分の損失を含めると各々102.2%、81.1%となる。

3.2 設備費用

NREL プロセスについては、NREL の報告書の数値を用いた。高速度発酵プロセスについては NREL プロセスでの設備

費用をもとに、必要に応じて0.7乗則でスケールダウンして算出した。NREL の報告書にデータのない、浸漬型メンブランフィルターや超遠心分離機については、ヒアリング数値を参考にして設備費用を算出した。主要設備とその費用を Table 3 に示した。発酵工程の設備費用は、NREL プロセスでは1252百万円に対し、高速度発酵プロセスでは955百万円であった。設備費用は297百万円削減できた。但しプロセス比較の整合性をとるために、NREL プロセスには、濃縮工程でリグニン等不溶分を分離する圧力ろ過器の費用を加算した。また高速度発酵プロセスにはリグニン分離フィルターのスラッジ洗浄機構を強化した費用として10百万円を加算した。削減の主要要因は、発酵槽の小型化である。エタノールの発酵速度差による発酵タンクの容量減であり、NREL プロセスでは3650m³のタンクが5基必要であったが、高速発酵プロセスでは、450m³のタンク2基で充分である。発酵槽関連の設備費用では、NREL プロセスでは455百万円であるが、高速度発酵プロセスでは177百万円で278百万円節減される。グルコース、キシロースのエタノール収率を各々95%、85%とすると、エタ

Table 3 Comparison of the main equipment of New process with that of NREL process

NREL process				New process			
Main equipment	Specification	Number	Cost(M¥)	Main equipment	Specification	Number	Cost(M¥)
(Fermentation zone)			(Σ455)	(Fermentation zone)			(Σ177)
Fermentor	3650m ³	5	330	Fermentor	450m ³	2	31
Agitator for fermentor	75hp	10	27	Agitator for fermentor	18hp	2	3
Fermentation cooler	220m ²	6	10	Fermentation cooler	220m ²	6	10
Fermentor recycle pump	4m ³ /min	6	26	Fermentor recycle pump	4m ³ /min	6	26
				Fermentor feed pump	4m ³ /min	2	9
				Fermentor filter	UF 100m ²	2	10
				Fermentor filtrate pump	190m ³ /hr	2	10
				Fermentor buffer tank	450m ³	1	17
				Used bacteria filter	3.2m ³ /hr	1	20
				Used bacteria feed pump	4m ³ /hr	1	7
Beer storage tank	1730m ³	1	36	Beer storage tank	1000m ³	1	23
Agitator for beerstorage tank	137hp	2	14	Agitator for beerstorage tank	26hp	1	2
Rectifier feed pump	6m ³ /min	2	12	Rectifier feed pump	4m ³ /min	2	9
(Culture zone)			(Σ174)	(Culture zone)			(Σ156)
1 st -5 th Seed fermentor/Agitator	Σ180m ³ /25hp	5	136	Culture tank/agitator	100m ³ /8hp	1	8
				Culture tank pump	65m ³ /hr	1	7
Seed hold tank	880m ³	1	21	Culture buffer tank/agitator	100m ³ /8hp	1	8
				Centrifuge feed pump	16m ³ /hr	1	7
				Bacteria super centrifuge	5m ³ /hr	2	100
				Bacteria filtrate tank/agitator	100m ³ /8hp	1	8
Seed transfer pump	2.3m ³ /min	2	17	Bacteria feed pump	23m ³ /hr	1	7
				Bacteria storage tank/agitator	170m ³ /14hp	1	11
(Others)			(Σ604)	(Others)			(Σ614)
Lignin pressured filter	390m ³ /hr	4	588	Lignin pressured filter	390m ³ /hr	4	598
Saccharification cooler	120m ²	3	16	Saccharification cooler	120m ²	3	16
Others			19	Others			8
Σ			1252	Σ			955

ノール生産量はNRELプロセスでは年間206千トンに対して、高速度発酵プロセスでは、リグニン分離フィルターでの有用成分の損失分のため203千トンと僅か減少するが影響は1%であり小さく無視してよい。設備関連償却費用等を年間設備費用の20%として設備関連固定費用を求めると、NRELプロセスでは1.22円/kg-エタノール、高速度発酵プロセスでは0.94円/kg-エタノールとなり、約0.26円/kg-エタノールのコスト削減となる。

3.3 変動費用

3.3.1 バクテリアによる発酵のための栄養分

発酵工程、バクテリアの培養工程でのバクテリアの栄養分に関する費用を比較する。高速度発酵プロセスについては、特許(W001/096573)ベースで検討した。発酵工程については菌の増殖はないので、原理的にはリン酸源のみでよい¹⁴⁾。リン酸源として、リン酸水素カリウムの代わりに安価なリン酸2アンモニウム(DAP)を使用し、使用量は、特許での使用量を基準としてモル換算により求めた。またpH調整は不要とした。想定した栄養源は、発酵槽供給液1m³あたり0.65kgに相当し、リン酸2アンモニウムの単価をNREL試算ベースの17.1円/kg(110円/ドルで換算)とすると、栄養分の変動費用は0.14円/kg-エタノールとなる^{脚注1)}。NRELプロセスでは、バイオ触媒である*Zmobilis*が発酵槽で増殖するので栄養分として、トウモロコシ中の可溶性成分抽出液(corn steep liquor)とリン酸2アンモニウムを供給している。栄養分の変動費はcorn steep liquor 1.03円/kg-エタノール、リン酸2アンモニウム0.11円/kg-エタノール、計1.15円/kg-エタノールである。バクテリアの培養工程でも栄養分が必要である。窒素源、リン酸源、Mg等の微量ミネラル成分など特許ベースの添加量で見積り、培養したバクテリアのろ液を培養液にリサイクル可能とし、遠心分離したバクテリアに同伴する栄養分の損失のみ評価する。培養に必要な栄養分費用は0.01円/kg-エタノール程度であり大きくない^{脚注2)}。

3.3.2 電力

グルコースからのエタノール生成反応は、発熱反応であり、標準発熱量は101.4kJ/mol-グルコースである。また発酵温度を30℃とし、糖化温度は65℃であるので、発酵工程では冷却が必要である。冷却水の費用は約0.1円/kg-エタノール以下と小さいので無視できる。ここでは費用要素の大きい変動費として電力費用のみ比較した。

関連する設備対応の運転に必要な電力の比較をTable 4に、費用の比較をTable 5に示す。総使用電力は、NRELプロセス

では1267kWである。高速度発酵プロセスでは791kWであり、476kW削減される。発酵槽容積の削減による攪拌機の所用動力削減の効果が大きい。ポンプ類については、発酵槽循環ポンプは発酵での熱量除去基準で設置するため、両プロセスで差はない。ただ高速発酵プロセスでは、機器の基数が多く、その分NRELプロセスよりポンプに要する電力は多い。また高速度発酵プロセスでは、培養したバクテリアの分離に遠心分離機を使用するので、その分電力は多い。発酵プロセスでの電力費用は、電力単価を4.5円/kWhとする時、NRELプロセスでは0.23円/kg-エタノール、高速度発酵プロセスでは0.15円/kg-エタノールとなり、コスト削減額は0.08円/kg-エタノールとなる。

3.4 製造コスト比較

高速度発酵プロセスと、基準とするNRELプロセスでの発酵工程における製造コスト比較をTable 5に示す。

Table 5にて、高速度発酵プロセス(New process)(1)は、キシロースのエタノール転化率が、NRELプロセスと同じである85%の場合、高速度発酵プロセス(2)は転化率が95%と高く仮定した場合、高速度発酵プロセス(3)は転化率が40%と低い仮定した場合である。高速度発酵プロセス(1)とNRELプロセスを比較する時、発酵工程におけるエタノールコスト改善の効果は1.37円/kg-エタノールであり、内設備改善による効果は0.36円/kg-エタノール(内訳:固定費0.28円/kg-エタノール、電力費で0.08円/kg-エタノール)であり、改善費用のうち26%である。添加すべき必要栄養分の費用削減効果の方が大きい。

エタノール収率は、エタノールの生産量に直接影響するため、発酵工程よりもむしろ上流の工程で要する原材料原単位に大きな影響を与える。NRELプロセスでは、前工程で使用するバイオマス、硫酸、石灰、セルラーゼによる費用の合計は17.2円/kg-エタノールであるが、高速度発酵プロセス(1)では、17.5円/kg-エタノール、高速度発酵プロセス(2)では、16.8円/kg-エタノール、高速度発酵プロセス(3)では、21.2円/kg-エタノールとなる。発酵工程でのコストを加算して、NRELプロセス、高速度発酵プロセス(1)、高速度発酵プロセス(2)、高速度発酵プロセス(3)では、各々19.8円/kg-エタノール、18.7円/kg-エタノール、18.0円/kg-エタノール、22.7円/kg-エタノールとなる。NRELプロセスと比べ、xyloseのエタノール収率が85%とNRELプロセスと同等の高速度発酵プロセス(1)では、1.1円/kg-エタノールのコスト削減となる。

Fig. 4, Table 6に、NRELプロセスに対して、高速度発酵

脚注1) 特許ベースの成分(但し、炭酸ナトリウムは除く)を成分単価、硫酸15円/kg、リン酸1水素カリウム550円/kg、硫酸マグネシウム・7水塩60円/kgと仮定する時、栄養分の添加費用は約13円/kg-エタノールとなり、変動費用が高すぎて、プロセスとして妥当でない。

脚注2) 培養したバクテリアのろ液を培養液にリサイクルしないときは、培養に必要な栄養分は、0.1円/kg-エタノールとなる。

Table 4 Comparison of the power consumptions

Equipment	NREL process	New process
Pump etc	527kW	574kW
Agitator	626kW	75kW
Filter, centrifuge	114kW	142kW
Σ	1267kW	791kW

Table 5 Cost comparison of New process with that of NREL process

	NREL process	New process (1)	New process (2)	New process (3)
Sugar conversion to ethanol	G 95%,X 85% ^a	G 95%,X 85%	G 95%,X 95%	G 95%,X 40%
Productivity	1	0.984	$0.984 \times 1.039 = 1.022$	$0.984 \times 0.824 = 0.811$
Production rate	206kt/y	203kt/y	210kt/y	167kt/y
Fermentation zone				
				¥/kg-Ethanol
Installed equipment cost	1252M¥	955M¥	955M¥	955M¥
Variable cost				
Nutrient consumption	1.15¥/kg	0.14¥/kg	0.13¥/kg	0.17¥/kg
Power consumption	0.23¥/kg	0.15¥/kg	0.14¥/kg	0.18¥/kg
Fixed cost	1.22¥/kg	0.94¥/kg	0.91¥/kg	1.14¥/kg
Manufacturing cost (A)	2.60¥/kg	1.23¥/kg	1.18¥/kg	1.49¥/kg
Material cost in the upstream				
				¥/kg-Ethanol
biomass feedstock ^b (3.1¥/kg)	12.3¥/kg	12.5¥/kg	12.0¥/kg	15.1¥/kg
sulfuric acid(3.0¥/kg)	0.4¥/kg	0.4¥/kg	0.4¥/kg	0.5¥/kg
lime(8.4¥/kg)	0.8¥/kg	0.8¥/kg	0.8¥/kg	1.0¥/kg
cellulase(13.4¥/kg)	3.7¥/kg	3.8¥/kg	3.6¥/kg	4.6¥/kg
Σ(B)	17.2¥/kg	17.5¥/kg	16.8¥/kg	21.2¥/kg
A + B	19.8¥/kg	18.7¥/kg	18.0¥/kg	22.7¥/kg

^a G : glucose, X : xylose , ^b (): unit price

プロセスにおける xylose のエタノール収率 (対理論値) とエタノールコスト削減の関係を示す。高速度発酵プロセスでコスト削減効果を得るには, xylose のエタノール収率は 73% 以上であることが必要である。エタノールコスト削減のためには, 設備の縮小・簡素化による効果よりも, 収率向上の効果

が大きいことがわかる。バイオマス原料原単位や栄養分原単位及びそれら単価のエタノールコストに与える影響は大きい。

4. 結 論

セルロース系バイオマスを原料とするエタノール製造プロセスの発酵工程について, 今後の合理化の可能性を検討し, 次の事を明らかにした。尚, ここで想定した高速度発酵プロセスは, 高効率高生産性のエタノール発酵を目標とした DNA を形質転換した *Coryneform* バクテリアを用い, そのバクテリアが増殖しない反応条件下で発酵させるプロセスであり, 比較の対象は, NREL のプロセス (エタノール生産量: 206 千 t/年) である。

1) 高速度発酵のため, 発酵槽容量が NREL プロセスでは約 18000m³ に対し, 900m³ に大幅に削減できる。そのため設備費用は, 約 297 百万円削減でき, 製造固定費は約 0.3 円/kg-エタノール, 必要電力関連の製造変動費は約 0.1 円/kg-エタノール, 合計約 0.4 円/kg-エタノール コスト削減できる。

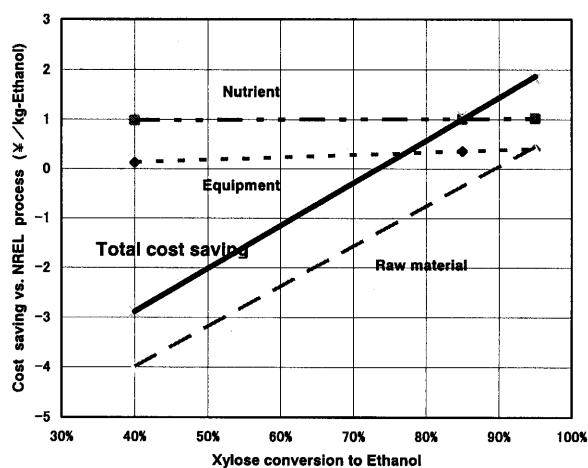


Fig. 4 Effect of xylose conversion to Ethanol on cost

Table 6 Cost saving in the high speed fermentation process

	Manufacturing cost (¥/kg-Ethanol)	Cost saving (¥/kg-Ethanol)
NREL process (Base process)	19.8	—
High speed fermentation process		
1)xylose yield 73% + Nutrient:only phosphate	19.8	0
2)xylose yield 85% + Nutrient:only phosphate	18.7	1.1
3)xylose yield 95% + Nutrient:only phosphate	18.0	1.8

- 2) バクテリアによる発酵のために添加する栄養分は、菌が増殖しないために基本的にリン酸源のみ必要とするときは、約1.0円/kg-エタノールのコスト削減できる可能性がある。しかし現在の栄養塩使用量を基準にすると、12円/kg-エタノールのコスト増となり、栄養塩の量削減はコスト低減に必須である。
- 3) 発酵槽上流でのリグニン分離に伴うグルコースなどの有効成分損失のため、エタノール生産量が減少し、それによるコスト増は約0.3円/kg-エタノールである。
- 4) 以上より、キシロースのエタノール収率を85%とするNRELプロセスと同等の場合は、約1.1円/kg-エタノールのコスト削減の可能性がある。
- 5) キシロースのエタノール収率を95%と想定できるとき、エタノール生産量が増加し、約1.8円/kg-エタノールのコスト削減の可能性をもっている。
- 6) *Coryneform* バクテリアでのキシロースのエタノール収率は、合理化効果を得るためには最低73%以上が必要である。
- 7) 本報告書では文献調査によりプロセス設計計算基準を決めた。そのため、高速発酵技術の中でバクテリア高濃度発酵、低栄養塩添加での発酵、キシロース高転換効率、バクテリア長寿命などの項目については、実験的に確認の必要がある。
発酵プロセスでは、バイオ触媒である菌の性能向上（エタノール発酵速度、エタノール転化率、エタノールや副産物への耐性、温度やpHなどの発酵条件など）の検討と共に、発酵のための必要栄養分の最適化検討は製造コストに与える影響が大きく重要である。菌の改良については、特にキシロースのエタノール転化率の向上が必須である。

謝 辞

本研究はNEDOのthe International Joint Research Grand Projectの費用でおこなわれました。関係各位に御礼申し上げます。

文 献 : References

- 1) 岩崎博, 野中寛, 松村幸彦, 山田興一, 日エネ誌, **84**, 852 (2005) : Iwasaki, H., Nonaka, H., Matsumura, Y., Yamada, K., *J.Jpn.Inst.Energy*, **84**, 852 (2005)
- 2) National Renewable Energy Laboratory (USA), Technical Report: Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover, (2002)
- 3) Charles E. Wyman, Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, (Taylor & Francis), p. 165 (1996)
- 4) Charles E. Wyman, Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, (Taylor & Francis), p. 164 (1996)
- 5) Dien, B. S., Cotta, M. A., Jeffries, T. W., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 258 (2003)
- 6) Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 17 (2001)
- 7) 湯川英明, 国際公開番号 WO01/96573, (2001) : Yukawa, H., International Patent Public Number, WO01/96573, (2001)
- 8) Okino, S., Inui, M., Yukawa, H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 475 (2005)
- 9) Nigam, J. N., *J. of Biotechnology*, **87**, 17 (2001)
- 10) 海野肇, 中西一弘, 白神直弘, 丹治保典, 新版生物化学工学, (講談社サイエンティフィク), p. 91 (2004) : Unnno, H., Nakanishi, K., Shirakami, N., Tannji, Y., New Edition : Biochemical Engineering, (Koudansha Scientific), p. 91 (2004)
- 11) 三菱レイヨン(株), ステラポアーSUN™: Mitsubishi Rayon Co., Ltd. Sterapore SUN™
- 12) (財)地球環境産業技術研究機構, 平成14年度エネルギー使用合理化古紙等有効利用二酸化炭素固定化技術開発報告書, (2003) : Research Institute of Innovative Technology for the Earth, Research and Development of Technologies for Paper Wastes Reuse for Energy Use Rationalization and for Atmospheric CO₂ Fixation (2003)
- 13) 巴工業(株), ASM円筒型超遠心分離機®, <http://www.tomoe.co.jp/> : Tomoe Engineering Co., Ltd. Super centrifuge®
- 14) Voet, D., Voet, J. G., (田宮信雄他訳), ヴォート生化学(下), (東京化学同人) p. 378 (1992) : Voet, D., Voet, J. G., (Tamiya, N., etc., translation), Biochemistry (N.2), (Tokyo Kagaku Dozin), p. 378 (1992)