

## 非食料資源からのバイオ燃料製造

### Production of Biofuels from Non-food Based Biomass

乾 将行, 湯川英明\*

MASAYUKI INUI and HIDEAKI YUKAWA

財団法人地球環境産業技術研究機構バイオ研究グループ 〒619-0292 京都府木津川市木津川台9-2

\* TEL: 0774-75-2308 FAX: 0774-75-2321

\* E-mail: mmg-lab@rite.or.jp

*Molecular Microbiology and Biotechnology Group, Research Institute of Innovative Technology for the Earth (RITE),  
9-2 Kizugawadai, Kizugawa, Kyoto 619-0292, Japan*

キーワード: バイオ燃料, バイオリファイナリー, 増殖非依存型バイオプロセス, *Corynebacterium*

Key words: Biofuels, Biorefinery, Growth arrested bioprocess, *Corynebacterium*

(原稿受付 2009 年 10 月 28 日 / 原稿受理 2009 年 11 月 6 日)

#### 1. はじめに

近年の石油価格の高騰や地球温暖化に対する意識の向上が契機となり, 日本国内においてバイオエタノールやバイオディーゼルが注目されている。しかし, 米国では 1990 年代よりバイオエタノールを含め, バイオマスからのエネルギーや化学品の大規模製造を新規コンセプトの「バイオリファイナリー」として注目し, 国家戦略として技術開発を強力に推進してきた。

こうした背景から, バイオエタノールの市場規模は予測を上回るペースで拡大している。しかしながら, バイオ燃料の生産急増は, 原料作物や他の農産物価格の高騰, 農地拡大による森林伐採などの環境破壊を引き起こすなど, 負の側面も指摘されるようになってきた。これに対し, 非可食資源であるリグノセルロース系バイオマスからのバイオ燃料製造は, LCA (Life Cycle Assessment) 評価からも二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) 排出削減に高い効果が示されるなど, クリーンな燃料として大きな期待を集めている。

このような状況の下, 地球環境産業技術研究機構 (RITE) ではリグノセルロース系バイオマス, 中でもリグニン含有量が比較的少ないソフトバイオマスからのバイオ燃料・化学品製造技術の開発を行ってきた。本稿では, 米国におけるバイオ燃料, バイオ化学品の現状と今後の動向, および RITE における研究開発について紹介する。

#### 2. 米国におけるバイオリファイナリーの現状と今後

##### 2.1. バイオエタノールの動向

米国では 1999 年の大統領令を発端にバイオマスの利用技術開発が国家戦略の一つとして位置づけられ, エネルギー省や農務省などの政府機関による研究支援が強化

された。2007 年の年頭教書でブッシュ前大統領は, 10 年間でガソリン使用量を 20% 削減するという意欲的な「Twenty in Ten」の目標を設定し, 同年 12 月にはこれに沿ったエネルギー法案として, 2022 年までに 1 億 3660 万 kL のエタノールを主とするバイオ燃料の使用義務を示した Energy Independence and Security Act of 2007 (EISA 法) が発効された。このような背景の下, バイオエタノールは生産と消費の両面から手厚い補助を受け, 生産量が増加しており, 2008 年度の生産量は「EISA 2007」の 2008 年使用義務量を超える量まで増大した<sup>1)</sup>。しかしながら, このようなバイオエタノール生産量の急増は原料作物 (コーン, サトウキビ) の価格急騰の要因と指摘されるなど, バイオ燃料の負の側面も顕在化してきた。

現在, 米国においてバイオエタノールの原料はトウモロコシを指すが, 「Twenty in Ten」計画や「EISA 法」はトウモロコシだけを原料としたものではない。もともと農務省は, トウモロコシからの生産量の限界を約 2800 万 kL とし, それ以上の生産は, ソフトバイオマスを原料とする計画であった。具体的には, 非可食資源である農業廃棄物 (稲わら等) やエネルギー作物 (スイッチグラス等) に由来するセルロース類を原料とするため, 食料との競合を軽減可能としている。

米国エネルギー省は, セルロース系バイオマスからのエタノール生産を加速するため, 2007, 2008 年に, 関連プロジェクトに対し合計 10 億ドル以上の助成を発表している<sup>2)</sup>。

##### 2.2. ソフトバイオマス原料法への期待

###### (1) CO<sub>2</sub> の削減効果

米国のアカデミアで長年, 論争となっていたバイオエタノールの温室効果ガス削減効果に対する LCA 評価議

論には、ほぼ結論が下されている。2004年に国際エネルギー機関 (IEA: International Energy Agency) は、ガソリンが排出する温室効果ガスに対しコーン原料のバイオエタノールでは20~40%、セルロース原料のバイオエタノールでは70~90%の削減効果があるとの調査結果を発表した<sup>2)</sup>。さらに、各種自動車燃料のLCA解析評価法で最も定評のある、米アルゴンヌ国立研究所のGREETモデルにおいても、セルロース原料のバイオエタノールはガソリンに比べて温室効果ガス排出量が25%以下であり、他の燃料の中で最も削減に貢献できる可能性があることを示している (図1)。

## (2) ソフトバイオマス原料法の経済性

ソフトバイオマスは、商品作物に比べて気候や栽培地の適合性に関するハードルが低く、栽培可能地域がはるかに広い。従って、世界中で低価格なバイオ燃料の生産が可能と期待されている。

さらに、ソフトバイオマスからのバイオ燃料生産は地政学的なエネルギー・リスクを低減させ、貧困地域 (国) の農業振興、新規雇用の発生といったグローバルなプラスの効果を生むことへの期待も大きい。

## 3. ソフトバイオマス原料法の開発

### 3.1. 要素技術

ソフトバイオマスからのバイオエタノール生産は2つの要素技術から構成される (図2)。すなわち、ソフトバイオマスからの糖類生成工程、生成糖類からエタノールへのバイオ変換工程である。前者は使用する酵素 (セルラーゼ) のコストが鍵であり、酵素メーカーによる技術改良、大規模生産による大幅なコストダウンが見込まれている。従って、後者のバイオ変換工程の技術確立が現在の最大の課題と考えられている。

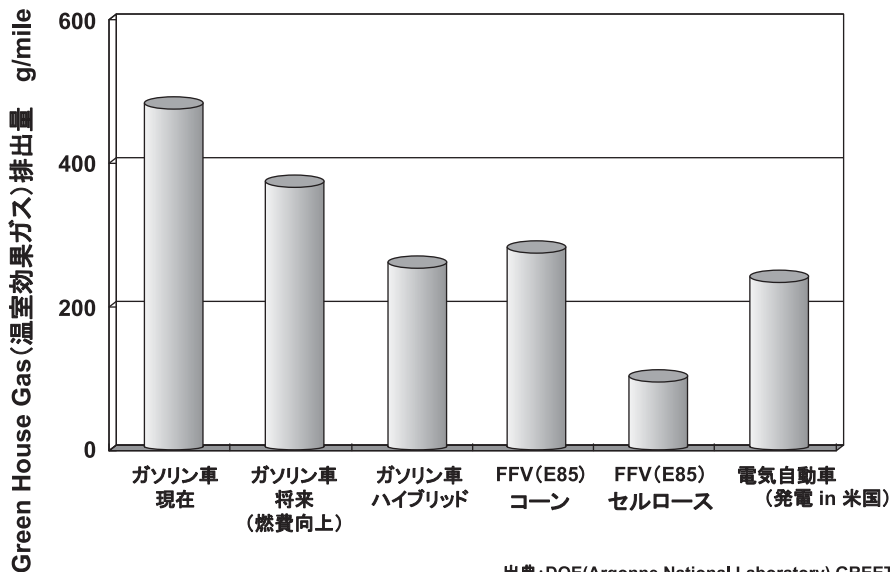


図1. 自動車の技術別 Green House Gas (温室効果ガス) 排出量

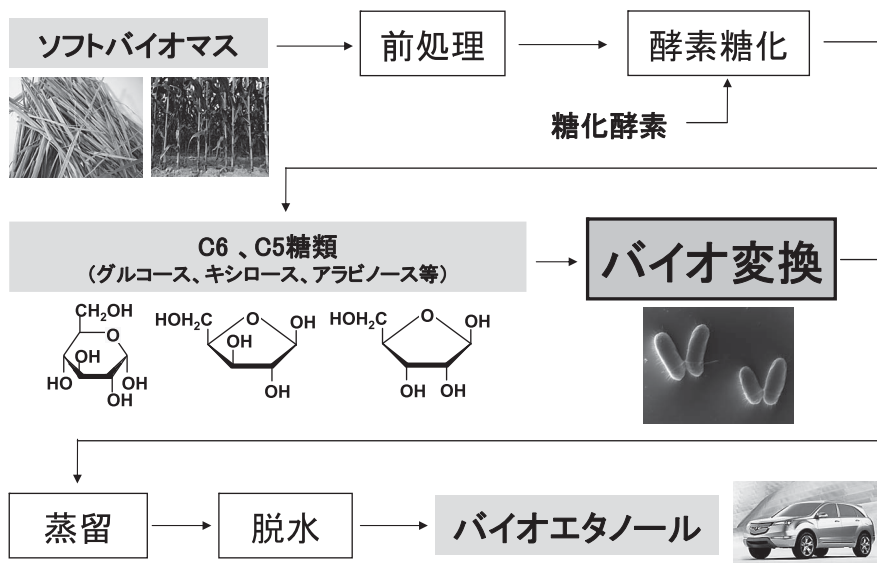


図2. ソフトバイオマスからのエタノール生産プロセス

### 3.2. バイオ変換工程に必須な技術特性

ソフトバイオマス原料法におけるバイオ変換工程には次の3つの技術特性が要求される<sup>4)</sup>。

- ・高生産性
  - ・C6, C5 糖類からの同時利用
  - ・リグノセルロース由来「発酵阻害物質」に対する耐性
- デンプン系バイオマスの構成糖はグルコースなどのC6糖類であるが、ソフトバイオマスにはキシロースやアラビノースなどのC5糖類も共存する。そのため、エタノール変換工程に用いる微生物は、C6糖類, C5糖類を同時利用できることが必要となる。さらに、ソフトバイオマスからの糖類生成工程では、酵素糖化を容易にするために、水熱などによる前処理を必要とするが、バイオマスの過分解によってフェノール類やアルデヒド類, 有機酸類などが副生成する(図3)。これらの副生物は発酵微生物に対して強力な生育阻害作用を示し、「発酵阻害物質」として大きな問題となっている<sup>11)</sup>。物理・化学的除去方法の開発も進められているが<sup>11)</sup>、新たな工程の追加はコスト高になるため、発酵阻害物質に影響を受けない開発技術が求められている。

従来の酒やワインの発酵生産に用いられてきた酵母などの微生物は、デンプン系バイオマス原料法には利用できるが、ソフトバイオマス原料法に利用するには上述の技術特性をクリアすることが課題となっている。

## 4. RITE における技術開発

我々はこれまでに、工業的に多用され優秀な物質生産能を所持するコリネ型細菌を用いた、新規コンセプトに基づく高生産性バイオプロセス「RITE バイオプロセス」の基盤技術を確立している<sup>6,7,14)</sup>。この技術をソフトバイオマスからのバイオエタノール生産プロセスの開発に応用し、世界に先駆けて前記の技術特性の確立の目処を得た。以下にその特徴について紹介する。

### 4.1. 高生産性 RITE バイオプロセス

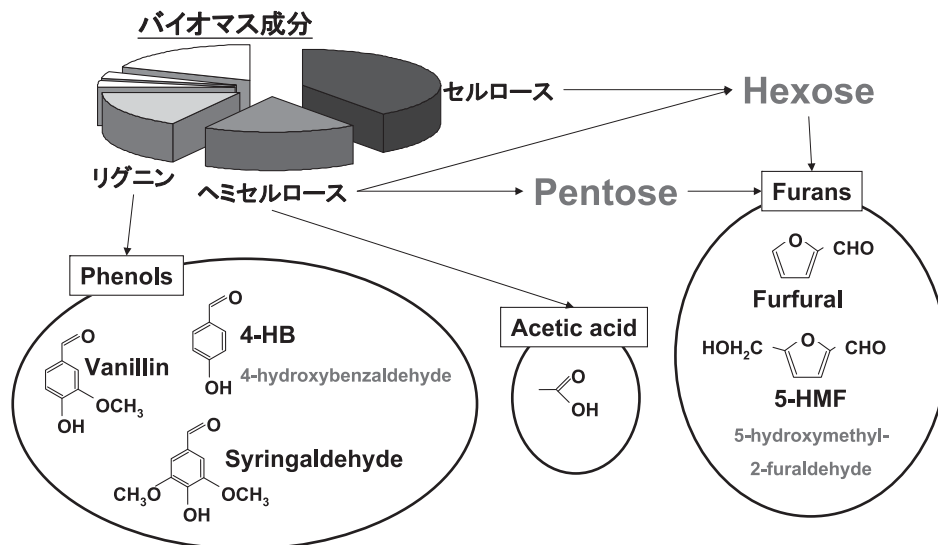
RITE バイオプロセスの高効率の鍵は、図4に示すように微生物細胞の分裂増殖を人為的に停止した状態で化合物を製造させることにある。このプロセスでは、遺伝子レベルで機能改善した微生物細胞(RITE 菌; *Corynebacterium glutamicum R*)を大量に培養し、反応槽に高密度に充填する。そして細胞の分裂増殖を停止させた状態で高速度の反応を行う。これにより微生物細胞をあたかも化学プロセスにおける触媒のように利用でき、通常の化学プロセスと同等以上の生産性(space time yield; STY, 単位反応容積の時間あたりの生産量)が実現される<sup>6,7,14)</sup>。この技術を応用したバイオエタノール生産に関しても従来の発酵プロセスと比較して格段に高い生産性を実現した<sup>5)</sup>。我々はこれまでに、このRITEプロセスの基盤となる現象、すなわち“還元条件下における*C. glutamicum*の糖代謝系の向上メカニズム”に関する基礎解析結果を発表してきたが<sup>6,7,13)</sup>、最近、EUの研究グループにより同現象を追試した研究成果が公表された<sup>12)</sup>。今後、海外研究グループとの間で同プロセスの応用に関する研究開発競争の激化が予想される。

### 4.2. 高生産性「エタノール RITE 菌」の創製

RITE では近年急速に進歩したシステムバイオロジーに基づいて微生物細胞を開発するための基盤技術として、*C. glutamicum R*の全ゲノム配列の解読を終了し<sup>20)</sup>、遺伝子レベルでの革新的改良法を確立している<sup>18,19)</sup>。この技術を応用して、コリネ型細菌にエタノール高生産性能を付与した「エタノール RITE 菌」の構築に成功した<sup>5)</sup>。

### 4.3. C6 糖類, C5 糖類の同時利用

RITE 菌には、ソフトバイオマスに含まれるC5糖類利用のために、キシロースおよびアラビノース利用に関する他微生物由来遺伝子を導入している<sup>8-10,16)</sup>。さらに、RITE 菌を用いたRITE バイオプロセスにおいては、C6糖類およびC5糖類の完全同時利用を確認しており、



E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal Bioresource Technology 74 (2000) 25-33 より改変

図3. 主な阻害物質

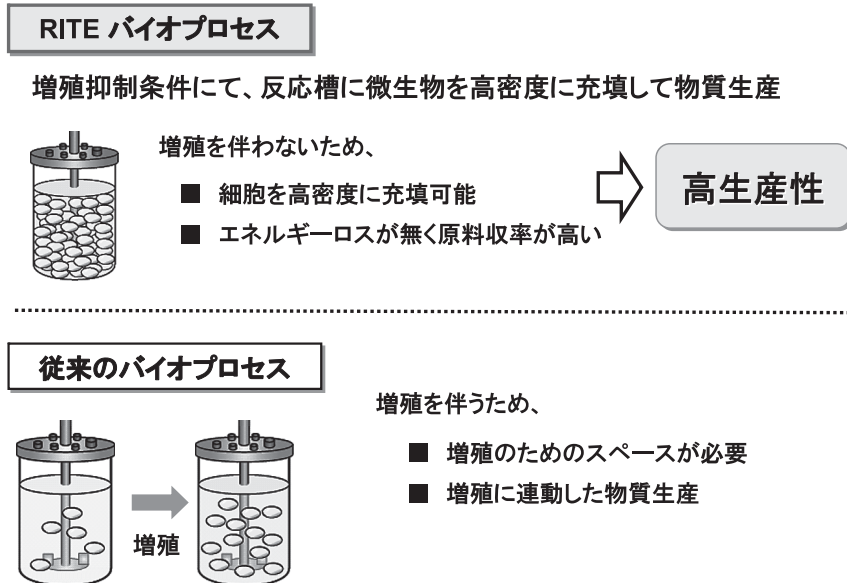


図 4. RITE バイオプロセスと従来法との比較

効率的な原料利用が可能となっている<sup>17)</sup>。

#### 4.4. 発酵阻害物質に対する高度耐性

RITE バイオプロセスにおいては、フェノール類やアルデヒド類、有機酸類などの発酵阻害物質によるエタノール生産性の低下がないことを認めている<sup>15)</sup>。発酵阻害物質の作用機構は増殖阻害であるが、本プロセスにおいて微生物細胞は非増殖状態にあることから、エタノール生産に関与する代謝には影響を与えないことを明らかにした。

#### 4.5. 工業化に向けた取り組み

上述のように、RITE ではソフトバイオマス原料法における技術要素確立の目処を得たことから、早期工業化を目指し、2006年9月に(株)本田技術研究所との共同研究開発を表明した。2007年4月より、(株)本田技術研究所の研究センター内において、工業化基礎検討を進めており、これまでに工業化基礎データの取得を完了した。さらに昨年より工業生産へ向けてFS (Feasibility Study)を開始している。

### 5. バイオ燃料の「光と影」

日本ではバイオ燃料に対する負の懸念として、食糧問題等への影響が大きく取り上げられているが、バイオ燃料への批判はこれに留まらない。多くの要素が指摘されているが、主要な点は「食糧資源との競合」、「CO<sub>2</sub>削減効果は?」、「Ethics 問題」及び「環境破壊（熱帯雨林破壊等）」となる。

トウモロコシなどのデンプン・糖質系原料からのバイオエタノール生産では、食飼料用途農産物をバイオ燃料の原料とすることによる価格上昇、および食用農産物生産から燃料向け農産物へのシフトを誘発する等の、食糧資源との競合が問題となっている。さらに、トウモロコシ原料からのエタノール生産については、LCA 評価でトウモロコシ生産に要する投入エネルギー・資源材料の

大きさが問題とされており、CO<sub>2</sub>削減への有効性が疑問視されている。さらに、熱帯雨林破壊等などの地球環境問題に対する懸念も高まっている。特にアジア地域において、既存の植物油由来「バイオディーゼル燃料」の原料となるパームヤシの栽培地拡大に対しては、EU、環境NGO等が強い懸念を表明している。

このような食糧資源との競合、CO<sub>2</sub>削減効果に対する懸念は、「現状技術による生産状況」を解析しての批判が主となっている。これらに対し、EUや世界的規模の環境NGO等は、そろって革新技術「非食料のソフトバイオマスからのバイオ燃料製造」の早期実現による解決を促進すべきと主張している。

### 6. おわりに

ソフトバイオマスからのバイオエタノール製造法に関しては基礎研究段階を既に過ぎ、工業化の検討段階となっている。一方、基礎研究レベルにおいては、ソフトバイオマス原料からのバイオブタノール生産が注目されている。ブタノールはディーゼルエンジンの燃料である軽油への混合が可能なバイオ燃料であり、地球環境と経済性で大きな問題を抱えている既存の植物油由来のバイオディーゼル燃料に代替できることから実用化への期待は大きい。

2009年1月に就任したオバマ大統領はエネルギー新政策「New Energy for America」を発表し、今後10年間で1500億ドル(約13兆5000億円)を再生可能エネルギーなどの事業に注ぎ、500万人の雇用を創出する目標を示した。さらに、自然エネルギーを導入割合で2025年までに25%、温室効果ガスを2050年までに1990年度比で80%削減する長期目標も掲げている。こういった地球温暖化対策に関する動きは、今後も世界レベルで拡大し続けると予想される。我々RITEもこのような動きの一端を担うべく、バイオエネルギーの革新的製法確立に向けて引き続き全力で研究に取り組んでいきたい。

## 文 献

- 1) F.O.Licht "World Ethanol & Biofuels Report" 2009年1月15号.
- 2) International Energy Agency (IEA): "Biofuels for Transport-An International Perspective" (2004), [http://www.iea.org/Textbase/publications/free\\_new\\_Desc.asp?PUBS\\_ID=1262](http://www.iea.org/Textbase/publications/free_new_Desc.asp?PUBS_ID=1262)
- 3) US DOE: <http://apps1.eere.energy.gov/news/doe.cfm>
- 4) Dien, B. S., M. A. Cotta, and T. W. Jeffries. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 258–266.
- 5) Inui, M., H. Kawaguchi, S. Murakami, A. A. Vertès, and H. Yukawa. 2004. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* 8: 243–254.
- 6) Inui, M., S. Murakami, S. Okino, H. Kawaguchi, A. A. Vertès, and H. Yukawa. 2004. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7: 182–196.
- 7) Inui, M., M. Suda, S. Okino, H. Nonaka, L. G. Puskás, A. A. Vertès, and H. Yukawa. 2007. Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology* 153: 2491–2504.
- 8) Kawaguchi, H., M. Sasaki, A. A. Vertès, M. Inui, and H. Yukawa. 2008. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 1053–1062.
- 9) Kawaguchi, H., M. Sasaki, A. A. Vertès, M. Inui, and H. Yukawa. 2009. Identification and functional analysis of the gene cluster for L-arabinose utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 75: 3419–3429.
- 10) Kawaguchi, H., A. A. Vertès, S. Okino, M. Inui, and H. Yukawa. 2006. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 72: 3418–3428.
- 11) Klinke, H. B., A. B. Thomsen, and B. K. Ahring. 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 10–26.
- 12) Neuweger, H., M. Persicke, S. P. Albaum, T. Bekel, M. Dondrup, A. T. Huser, J. Winnebal, J. Schneider, J. Kalinowski, and A. Goesmann. 2009. Visualizing post genomics data-sets on customized pathway maps by ProMeTra-aeration-dependent gene expression and metabolism of *Corynebacterium glutamicum* as an example. *BMC Syst Biol* 3: 82.
- 13) Nishimura, T., A. A. Vertès, Y. Shinoda, M. Inui, and H. Yukawa. 2007. Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 889–897.
- 14) Okino, S., M. Inui, and H. Yukawa. 2005. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 475–480.
- 15) Sakai, S., Y. Tsuchida, H. Nakamoto, S. Okino, O. Ichihashi, H. Kawaguchi, T. Watanabe, M. Inui, and H. Yukawa. 2007. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Appl Environ Microbiol* 73: 2349–2353.
- 16) Sasaki, M., T. Jojima, M. Inui, and H. Yukawa. 2008. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 81: 691–699.
- 17) Sasaki, M., T. Jojima, H. Kawaguchi, M. Inui, and H. Yukawa. 2009. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 105–115.
- 18) Suzuki, N., S. Okayama, H. Nonaka, Y. Tsuge, M. Inui, and H. Yukawa. 2005. Large-scale engineering of the *Corynebacterium glutamicum* genome. *Appl Environ Microbiol* 71: 3369–3372.
- 19) Vertès, A. A., M. Inui, and H. Yukawa. 2005. Manipulating corynebacteria, from individual genes to chromosomes. *Appl Environ Microbiol* 71: 7633–7642.
- 20) Yukawa, H., C. A. Omumasaba, H. Nonaka, P. Kós, N. Okai, N. Suzuki, M. Suda, Y. Tsuge, J. Watanabe, Y. Ikeda, A. A. Vertès, and M. Inui. 2007. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* 153: 1042–1058.