

食糧

その科学と技術

Shokuryo — food science and technology —

51

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所

NARO Food Research Institute (NFRI)

National Agriculture and

Food Research Organization (NARO)

2013.3

まえがき

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所は、国民に安全で豊かな食生活の提供，食に関わる適正な科学情報の提供，食に関わる行政施策への貢献，わが国の食品産業の健全な発展への貢献を使命とし，食品に関わる基礎から応用に至る幅広い研究を実施しています。

特に，糖質に関わる研究では長い歴史があり，サイクロデキストリンやエリスリトールなど様々な糖質素材の開発とともに，食品産業の発展に資する糖質関連酵素の開発研究も推進してきています。また，食品微生物に関わる研究では，味噌や醤油，漬け物，アルコール飲料，パンに関わる糸状菌や酵母の研究，微生物の機能解明とその改良，さらに，高機能微生物の利用技術の開発を目指して，様々な研究を推進してきました。

バイオマス研究においては，稲わらなど未利用バイオマスに含まれるセルロースなどの多糖をエタノールに変換する工程はデンプンを原料とする酒造りの工程と共通点が多く，実際，酵素糖化には糸状菌を，またエタノール発酵には酵母を利用しています。そのため，当所がこれまで糖質研究や食品微生物研究において培ってきた研究技術や知識をバイオマスエネルギー分野でも生かせるものと考え，2007年開始の農林水産省委託プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」に参画し，研究を推進して来ました。

我が国は，農業と競合しない植物細胞壁などのリグノセルロース系原料を中心に技術開発を目指していることから，これら原料に特有の多くの困難な課題がありますが，食総研の研究者は，これまでの研究蓄積の活用・発展ならびに他の機関との連携協力により，着実に課題解決に取り組めたと考えております。そこで，本書において，これまでの成果をご紹介しますと思います。

食品に係る研究者や技術者だけでなく，バイオエネルギーに関心をお持ちの多くの方々にもご覧いただき，食品総合研究所の研究について少しでもご理解戴ければ幸いです。

平成 25 年 2 月

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
所 長 林 清

目 次

解説	矢部 希見子	5
I 国産草本系原料を用いた4種類のバイオエタノール製造プロセス開発	徳安 健	13
II 多様なエタノール変換プロセスに対応可能な糖化酵素生産基盤技術の開発	池 正和	27
III バイオエタノール生産用ストレス耐性酵母の開発と特性評価	中村 敏英	47
IV バイオエタノール生産に適した五炭糖発酵性酵母の開発	榊原 祥清	65
V バイオエタノール生産に関するLCA解析	椎名 武夫・折笠 貴寛	85
VI エタノール製造コスト低減に向けて（連結バイオプロセスとヘミセルロースの利用）	金子 哲	99
VII 真に意義のあるバイオディーゼル燃料の製造・利用を目指して	鍋谷 浩志・蘓原 昌司	121

解 説

1. はじめに

農研機構 食品総合研究所では、食糧と競合しない未利用バイオマスであるリグノセルロース系原料（稲わらやサトウキビ搾汁残渣等）を用いたバイオエタノール製造技術にかかわる研究開発、及び廃棄物系バイオマスを利用したバイオディーゼル製造技術の研究を推進しています。また、農林水産省では、国産バイオマスエネルギーの利用促進を図り地域の活性化に貢献するためには、食料供給と両立する低コスト・高効率なバイオマス利用技術の開発が必要であるとの視点から、農林水産省委託プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発（2007-2011年）」を推進してきました。このプロジェクトでは、国産の稲わらや麦わら、また様々な資源作物等を原料として、独立行政法人、大学、公設試験機関など様々な研究機関が連携協力することにより研究を推進して来ています。食品総合研究所の研究者も本プロジェクトに参画してきましたが、本書では、当研究所の成果の中から特にバイオエネルギーに関連した成果について御報告します。これらの成果をより良く理解していただけるよう、ここでは、研究の背景についてできるだけわかりやすく解説したいと思います。

2. バイオマスエネルギーとは

バイオマス (biomass) は生物 (bio-) の量 (mass) を示し、化石燃料以外の生物に由来する資源を意味する言葉として使われています。特に、地球上では資源としての植物量が圧倒的に多く、また動物等植物以外の生物も植物に依存して生存していることから、多くの場合、バイオマスとは植物体を指します。植物は大気中の二酸化炭素を取り込み、太陽エネルギーを利用した光合成を行うことによって植物体を構築しています。二酸化炭素は地球上に広く存在し、また太陽光は地球に無尽蔵に降り注いでいることから、植物を利用して得るエネルギーは「再生可能エネルギー」と言えます。また、二酸化炭素は地球温暖化の原因である温室効果ガスの主要な一つであるため、植物の栽培は温暖化を抑制するためにも有用と考えられています。さらに、たとえ電気などのエネルギーを獲得するために植物体を燃やして二酸化炭素が発生したとしても、その二酸化炭素はかつて植物が成長するために大気中から吸収したものであることから、全体として大気中の二酸化炭素濃度には影響を与えません。このように、植物を利用したバイオマスエネルギーは環境に優しい「循環型エネルギー」と言えます。

一方、現在使われている石油、石炭、天然ガスなどは、地球誕生から有史以前の数十億年にわたる地質時代に存在した生物などの死骸が地中に堆積し、長い年月をかけて地圧・地熱などによって変成されてできたもので、「化石燃料」と呼

ばれています。18世紀の産業革命以降、化石燃料の使用量は飛躍的に増大し続けていますが、埋蔵量には限りがあり、現在わかっている埋蔵量を基に計算した場合、石油は40年程度、石炭は170年程度、天然ガスは60年程度で無くなると予測する研究者もいます。

さらに、太古の昔から時間をかけて大気中の二酸化炭素を固定して作られてきた化石燃料を人類は極めて短期間で大量に消費しているため、化石燃料の利用は大気中の二酸化炭素濃度の上昇を引き起こし、その温室効果によって気候変動が引き起こされることで、地球環境に大きな負の影響を与えていると言われていています。しかし、大気中の二酸化炭素から化石燃料を再生させることは現実的には不可能であるため、「化石燃料」に頼らないエネルギー資源の開発が地球規模で求められています。原子力発電は、二酸化炭素を出さないクリーンなエネルギーと考えられてきましたが、施設の維持管理、廃棄物の処理など課題が多く、また原発事故で明らかになったように、一旦事故が起きれば地球環境に大きな負の影響があることが顕在化してきています。

従って、地球の持続的繁栄のためには、地球環境に悪い影響を与えず、再生産が可能な新たなエネルギー資源が必要です。2008年に施行された「新エネルギー利用等の促進に関する特別措置法」（新エネ法）において、再生可能エネルギーは新エネルギーとして位置付けられ、従来からの水力、太陽熱、風力などの利用とともに、バイオマス、太陽光、地熱、波力、雪氷熱、温度差熱などの利用が進められています（「わかる新エネ」経済産業省資源エネルギー庁）。中でも、バイオマスは、燃料やガス生産などのエネルギー資源であるばかりでなく、近年は化学品やプラスチック原料など高付加価値物質の原料の資源として、ますます注目されてきています。

3. バイオマスエネルギーのコストについて

バイオマスエネルギーには、従来からの薪や動物の糞などを燃料として利用することも含まれますが、現在、大量に必要とされているエネルギー形態は、電気、ガス、輸送用液体燃料です。これらは、現在、石油等の化石燃料を用いて極めて安価に供給されているため、化学燃料の代替としてバイオマスエネルギーを社会に受け入れてもらうためには、少なくともこれまでと同程度の価格での供給が期待されます。また、バイオマスから得られる輸送用液体燃料を、自動車など輸送機器を大幅に改良することなく利用できれば、導入コストを下げることで、消費者も受け入れやすいと言えます。このように、バイオマスエネルギーの実用化を図るためには、その製造技術の開発だけでなく、いかに低コストで製造し、無理なく使ってもらえるかという視点が極めて重要です。そのため、実用化に繋がるバイオマスエネルギー開発には、様々な分野の連携協力が必要です。

4. 我が国の取り組みについて

エネルギー問題はどの国においても重要な課題ですが、我が国は、第4次中東戦争を契機に発生したオイルショック（1973年）によって石油供給不足の脅威を経験し、さらに、1979年には、前年からのイラン政変をきっかけに第2次オイルショックを経験しました。これらの経験から、石油への過度な依存から脱却することの重要性を痛感して、1980年には「石油代替エネルギーの開発及び導入の促進に関する法律」（代エネ法）を制定しました。これに基づいて省エネルギーの促進を図ることで、現在では、日本は世界でも最高水準のエネルギー使用効率を達成しています。さらに、深刻な気候変動問題の顕在化やエネルギーの安定供給の必要性に基づき、2001年の新エネルギー部会（経済産業省資源エネルギー庁）において、バイオマスエネルギーは「積極的に導入を図っていくことが適当な新エネルギー」として位置付けられました。2002年6月には「エネルギー政策基本法」が、翌年3月には「エネルギー基本計画」が閣議決定されるとともに、バイオマス利用については、2009年に「バイオマス活用推進基本法」が制定され、それに基づき2010年12月に「バイオマス活用推進基本計画」が閣議決定されました（「エネルギー白書」経済産業省資源エネルギー庁）。また、バイオマスの利活用推進に関する具体的取組や行動計画が「バイオマス・ニッポン総合戦略」として2002年12月に閣議決定され、2008年3月には、具体的な目標、技術開発、ロードマップ等を内容とする「バイオ燃料技術革新計画」が示されました。

このような状況に即して、本文の始めに記載したように、2007年から5カ年計画で農林水産省委託プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」が開始されました。現在は、その後継プロジェクトである農林水産省委託プロジェクト「農山漁村におけるバイオ燃料等生産基地創造のための技術開発」（2012-2015年）が推進されています。

5. バイオエタノールについて

バイオエタノールは輸送用液体燃料の一つで、一般的にガソリンと混合されて自動車の燃料として利用されます。日本では、通常のガソリン自動車の場合、混合率3%までの混合ガソリン（E3燃料）であれば安全であると認められており、既にE3燃料の一部実用化が始まっています。混合比率が高くなると車の十分な性能が得られなくなるため、混合ガソリンに対応した内燃機関の調整、もしくは混合ガソリンに特化した自動車が必要となります。実際、大規模エタノール製造を実用化させているバイオマス大国ブラジルでは、いかなる混合比でも利用可能な特別な自動車が販売されています。日本においては、ブラジルのようにバイオエタノール生産のために大量の穀物を収穫・利用できる環境にはありませんので、まずはE3燃料の普及に向けた技術開発が進められているところです。

世界においてバイオエタノールの生産量は、米国とブラジルが世界1位、2位

を占めています。アメリカでは主にトウモロコシ、ブラジルではサトウキビを原料として、これらに含まれるデンプンや廃糖蜜から糖液を調製し、酵母を利用してエタノール発酵しています。基本的に酒造りと同じやり方ですが、デンプンや糖を利用して作られるエタノールは、最初に実用化されたことから「第一世代のバイオエタノール」と呼ばれています（図1，左図）。第一世代は効率的なエタノール生産が可能ですが、原料となる作物は食糧としても利用されることから、バイオマス燃料生産への利用が穀物価格の高騰を引き起こしたり、作物生産を目的として大規模な森林伐採が起り自然環境の破壊につながるなど、深刻な問題が生じています。このような状況から、現在は、食糧と競合しない植物細胞壁を主成分とするリグノセルロース系原料の利用に関心が集まっており、地球の持続的発展に適した、いわゆる「第二世代バイオエタノール」の製造技術として期待されています（図1，右図）。

6. 第二世代バイオエタノールの製造工程について

リグノセルロース系原料を用いたエタノール製造では、原料に含まれる多糖（セルロースやヘミセルロース）を酵素糖化することで、グルコースやキシロースなどの単糖を得ます。しかし、リグノセルロース系原料中ではセルロース、ヘミセルロース、リグニン等が互いに強固に結合した構造をしているため、外から分解酵素を添加しただけでは糖化は起こりません。そのため、「前処理工程」が

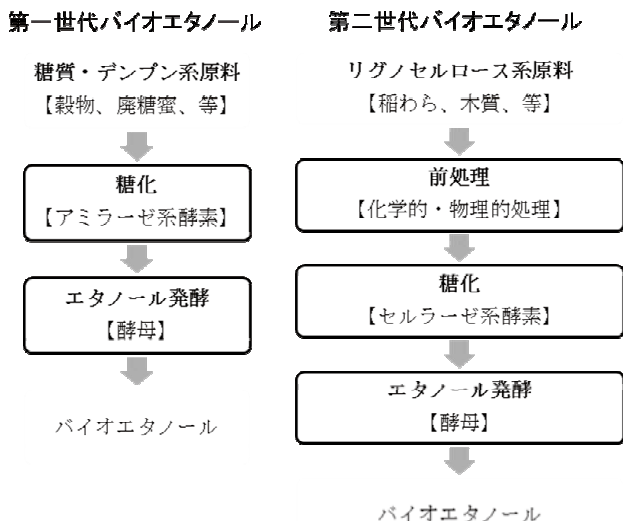


図1 第一世代（左）及び第二世代バイオエタノール（右）の製造工程

必要で、破碎や粉碎など物理的処理を原料に加えることでその構造をほぐし、さらにアンモニア処理、希硫酸処理、または煮沸処理などによってセルロースやヘミセルロースを表面に露出させ、糖化酵素が作用できる状態に持って行く必要があります。用いるバイオマス原料によって多糖成分の組成や量比、また構造等が大きく異なるため、原料毎に適した前処理条件を見出す必要があり、実際、同じリグノセルロース系原料であっても、稲わらと木質では必要な前処理条件は大きく異なります。また、「前処理工程」では多糖以外に多くの物質が生成され、それ以降の「糖化工程」や「発酵工程」の効率に大きく影響する可能性があります。従って、全体として高いエタノール変換効率を達成するのに適した前処理技術であることが望ましく、少なくとも、それ以降の工程を阻害しないことが必要です。そのため、多くの研究者が、用いるリグノセルロース系原料に最適な「前処理工程」の構築を目指して研究に取り組んでいます。

次の「糖化工程」では、前処理済みバイオマスにセルラーゼやヘミセルラーゼなどの糖化酵素を添加し作用させることで、セルロースやヘミセルロースをグルコースやキシロースなど単糖に変換します。ここで用いる糖化酵素は、基質特異性や酵素活性など性質が異なる多様な糖化酵素の混合物であり、これらが共同して作用することで効率的な糖化ができると考えられています。しかし、バイオマス原料によって、含まれる多糖の構造も量も大きく異なることから、「糖化工程」においても、バイオマス原料毎に、最適な反応条件を見出すことが必要です。従来、この工程では市販の糖化酵素を使用してきましたが、原料バイオマスの組成や濃度によって糖化効率が大きく異なるため、通常、十分な活性を得るためには比較的高濃度の酵素が必要でした。しかし、市販酵素が高価であるため、「糖化工程」が低コストエタノール生産を達成する際のボトルネックとなっていました。そのため、糖化酵素の低コスト生産技術の構築は重要な研究課題であり、新規糖化酵素の開発やオンサイト生産（エタノール生産現場における糖化酵素の生産）技術の開発などが精力的に研究されてきています。

「発酵工程」では、「糖化工程」を経て生じたグルコースやキシロースなどの単糖を、酵母を用いてエタノールに変換します。六炭糖であるグルコースは、第一世代エタノールの生産と同様、サッカロマイセスセレビシエという酵母によって容易にエタノールに変換されます。しかし、リグノセルロース系原料の糖化液には、ヘミセルロースから生じるキシロースなどの五炭糖が含まれ、サッカロマイセスセレビシエは五炭糖を発酵できないため、五炭糖は利用されず発酵残渣に残ることになります。稲わらなど多くのリグノセルロース系原料は比較的高濃度（25-30%）のヘミセルロースを含むため、バイオマスが有する糖の多くの部分が無駄にされることになります。従って、キシロースなど五炭糖を利用するには新たな酵母の開発が必要であり、多くの研究が進められています。また、エタノール変換効率の向上を目的として、「糖化工程」と「発酵工程」を、ワンポツ

トで同時に進行出来れば、工程間のロスもなく、また反応時間の短縮も可能です。しかし、「糖化工程」の最適温度は50℃程度であるのに対して、「発酵工程」は通常30℃程度です。そこで、もし、高温の40℃で高いエタノール発酵活性を示す酵母が得られれば、40℃での同時糖化発酵が可能になると期待されます。そこで、高温耐性の新たな酵母の開発も重要な研究課題となっています。

以上、第二世代のバイオエタノールの製造では、各工程で解決すべき多くの課題が存在しますが、実用化を目指した技術開発においては、さらに、生産コストや二酸化炭素発生量などの多様な視点からの環境影響評価（ライフサイクルアセスメント、LCA）の研究が必須です。たとえば、原料からエタノール生産までのLCA解析では、上記の各工程のコスト計算に加えて、バイオマス原料の価格、輸送費用、バイオエタノールの濃縮費用など、システムに関わるすべての工程のコスト計算が必要です。また、高効率のエタノール生産を実現するためには、原料からエタノール変換までの一貫システムの構築が求められていますが、構築されるシステムの有効性を証明するためにも、実験結果に基づいた精度の高いLCA評価が必要であり、そのための研究も行われています。

7. バイオディーゼルについて

輸送用液体燃料のもう一つの形態として、バイオディーゼルがあり、これはディーゼル車の燃料として利用されます。バイオディーゼル製造には、原料として廃棄物系バイオマスである様々な油脂が利用され、繰り返し利用された汚れた食用油であっても、精製することによりディーゼル燃料としての利用が可能です。従来廃棄されていたこのようなバイオマス原料を有効に活用できることから、バイオディーゼルは環境に優しいバイオ燃料として注目を集めています。特に欧州諸国ではディーゼル車に力を入れており、バイオディーゼル燃料を扱うスタンドが増えているほか、税金の面でも優遇されています。日本においてもバイオディーゼル燃料の効率的製造技術の研究開発とともに、導入に向けた様々な取り組みが行われています。

8. 本書の内容について

本書の「I 国産草本系原料を用いた4種類のバイオエタノール製造プロセス開発」では、4種類のバイオエタノール製造プロセスについて報告します。上述したように、バイオマス原料によって適する「前処理工程」が異なり、この工程がその後の工程のありようにも影響します。いろいろな草本系原料を利用する際、4種類のプロセスから最も適当なものを選び利用することによって、高効率かつ低価格なエタノール生産が可能になると期待されます。

「II 多様なエタノール変換プロセスに対応可能な糖化酵素生産基盤技術の開発」においては、酵素糖化にかかるコストの軽減を目的として、安価で効率的な

酵素生産に関する研究成果を報告します。微生物が生産する様々な糖化酵素はセルロースなどの基質の添加によって生産誘導され、グルコース添加によって抑制されます。そこで、酵素誘導の条件検討や微生物変異株を利用することで、糖化酵素の高生産条件を解明しました。

「Ⅲ バイオエタノール生産用ストレス耐性酵母の開発と特性評価」及び「Ⅳ バイオエタノール生産に適した五炭糖発酵性酵母の開発」では、酵母によるエタノール発酵に関する成果について報告します。酒造りに利用するサッカロマイセスセレビシエは高いエタノール発酵能及びエタノール耐性など優れた性質を有していますが、リグノセルロース系バイオマスを原料とした場合、その利用にはいくつかの問題点があります。そこで、酵母の改変や新たな有用酵母の選抜、また酵母の利用方法の検討を行うことで、問題点の解決に取り組みました。

「Ⅴ バイオエタノール生産に関する LCA 解析」では、バイオエタノール製造技術の評価を目的として、製造コスト及び環境負荷の視点で LCA 解析を行っています。

「Ⅵ エタノール製造コスト低減に向けて（連結バイオプロセスとヘミセルロースの利用）」では、食用担子菌にバイオエタノール生産の全工程を行わせる「連結バイオプロセス」構築への試みについて報告します。さらに、ヘミセルロース成分のエタノール生産以外の利用可能性についても言及します。

「Ⅶ 真に意義のあるバイオディーゼル燃料の製造・利用を目指して」では、廃食用油を原料としたバイオディーゼル燃料の製造技術に関して、研究成果及びその開発の動向について紹介します。

9. おわりに

バイオマスエネルギーは、これまで利用できずにいたものから産業に利用可能なエネルギーを獲得するという点で画期的なエネルギーであり、世界中でますます注目されています。世界ではバイオマスエネルギーの導入は既に始まっていますが、補助金に頼ることのない、独り立ちできるバイオマスエネルギー産業を実現するには、より一層の高効率、低コスト、環境負荷低減が達成できる技術の開発が必要です。未だ道半ばではありますが、本書により、この目標に向かって当研究所が推進している研究について御理解いただければ幸いです。

(食品バイオテクノロジー研究領域 矢部 希見子)

I 国産草本系原料を用いた4種類のバイオエタノール製造プロセス開発

1. はじめに

2007-2011年度に実施された農林水産省委託プロジェクト研究「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」では、主要な農産廃棄物である稲わら、麦わらや、資源作物としてのサトウキビ、スイートソルガム、バレイショ、カンショおよびテンサイを原料としたバイオエタノール製造技術の開発が行われた。特に、セルロースやキシランからなる繊維質を主成分とする稲わらの変換技術については、我が国における食料・飼料生産との競合を避けることが可能な重要技術として期待されてきた。このような中で、著者らの研究グループは、上記7種類の草本系原料に対応した変換技術開発の総合的推進を担当し、4種類のバイオエタノール製造プロセスの提案に至った。本稿では、これらの工程の開発経緯および特徴について概説する。

2. 本プロジェクトの特徴 ～小規模バイオエタノール製造技術開発～

我が国におけるバイオエタノール製造技術開発戦略を行うため、2007年11月に、経済産業省と農林水産省が連携し、関連業界や大学、独立行政法人試験研究機関等からなる「バイオ燃料技術革新協議会」を設置した。そして、翌年3月には、「バイオ燃料技術革新計画」を取りまとめている¹⁾。本報告書では、「バイオマス・ニッポンケース」および「技術革新ケース」という二つの政策シナリオを提示している。前者では、2015年までに、農産廃棄物である稲わら、スギ等の造林樹種などの国産資源を原料とし、年産15万kL規模でのバイオエタノールの製造コストを100円/Lに低減するためのシナリオを設定している。その一方で、技術革新ケースは、2030年までに、目的生産したセルロース系バイオマスを原料とし、国内外を問わず、年産10～20万kL規模で40円/L程度でのエタノール製造をめざすものである。

本稿で研究成果を紹介するプロジェクトは、バイオマス・ニッポンケースに則り、年産15万kL程度の極めて小規模のプラントでのバイオエタノール変換技術を、2012年頃までにラボスケールで完成させるものであった。本研究では、各原料の価格が設定されており、例えば、稲わらを原料とした場合には、乾燥稲わら15円/kgと設定し、廃液処理費用を含めて100円/L程度の価格のエタノールを製造する技術を開発することが求められた。

発酵によりエタノールを製造する際には、各原料からアルコール製造用微生物が発酵できる糖を取り出すための糖化工程を開発し、後段に酒造りと同様の発酵工程を連結することとなる(図1)。アルコール製造用微生物としては、酵母を

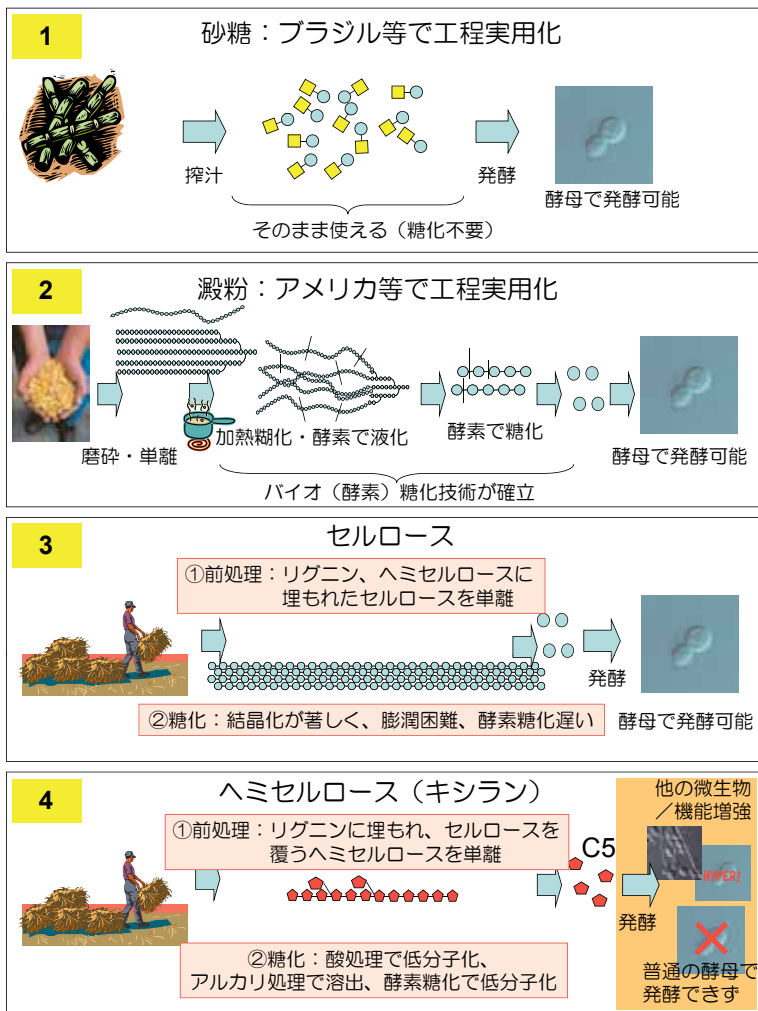


図1 草本原料中の主要糖質からエタノールへの変換プロセスの概要

用いることが一般的である。通常のアアルコール製造用酵母は、サトウキビやテンサイの主成分である砂糖（ショ糖）やスイートソルガム搾汁液の主成分であるブドウ糖や果糖を直接発酵できる。それに対して、バレイショおよびカンショの主成分である澱粉については、酵素糖化（低分子化）後にアルコール発酵を行う必要がある。また、稲わらなどの繊維質については、澱粉と同様に、主成分であるセルロース、キシラン等の細胞壁多糖を酵素等によって加水分解すれば、発酵性

の糖に変換できる。しかしながら、細胞壁多糖は、リグニン等を介して強固な組織構造を形成していることから、直接加水分解は極めて困難であり、化学的、物理学的あるいは生物学的な前処理による糖化工程の効率化が不可欠と考えられている。さらに、細胞壁主成分の一つであるキシランから得られる単糖キシロースやアラビノースは、通常のアルコール製造用酵母では直ちに発酵されない五炭糖（C5）であり、遺伝子組換え酵母の利用など、特殊な発酵技術の導入が必要となる。

3. 原料特性に対応した4種類の変換技術開発

冒頭で記述した7種類の草本系原料に対して、その特性に対応した4種類の変換技術を開発した。以下に各の技術の特徴を示す。

3.1 LTA（低温アルカリ前処理）法

サトウキビおよびスイートソルガムを資源作物として見なした場合には、搾汁液中の六炭糖（C6）であるショ糖、ブドウ糖や果糖のみならず、絞りかす（バガス）中の繊維質からも発酵性糖質を回収することが望ましい。サトウキビ精糖工程では、バガスの大部分（8-9割）はボイラー燃料として有効利用されているが、将来的には、サトウキビ茎部収穫時の残渣の燃料利用やボイラー燃焼効率の向上などにより、余剰バガスの糖化原料としての利用量が増加するものと期待される。バガス繊維質には、セルロースを構成するブドウ糖の他に、キシランを構成するキシロースが存在するが、資源作物の茎を原料全体として計算した場合、六炭糖／五炭糖の比は4.2～5.0程度の値となると考えられる。年産1.5万kLという小規模製造プロセスを考えると、設備費用を抑えたシンプルな工程を開発する必要がある。このため、これらの資源作物については、五炭糖発酵のための追加工程を積極的には導入せず、六炭糖のみの効率的回収を軸とした変換技術を開発することとした。

このような考え方の下で開発したプロセス（LTA法:Low Temperature Alkali pretreatment, 低温アルカリ前処理法）では、サトウキビまたはスイートソルガム茎部の搾汁後に得られるバガスを粉碎後、水酸化ナトリウム（NaOH）水溶液中で室温処理する。その後、スラリーを洗浄・中和して得られた繊維質中のセルロースを酵素糖化して六炭糖のブドウ糖を効率的に回収し、これを搾汁液とともに通常のアルコール製造用酵母を用いて発酵する（図2）²⁾。

サトウキビ「農林8号」の茎部を原料とした場合、生原料に含まれる125 g/kg程度の遊離糖（ショ糖、ブドウ糖および果糖）を搾汁工程で回収した後、残るバガス中のセルロースに由来するブドウ糖（49.0 g/kg生茎部原料）を効率的に回収でき、市販セルラーゼ製剤および β -グルコシダーゼ製剤を用いた際の24時間後の糖化率は9割程度に達した。本工程では、原料に含まれる、通常のアルコー

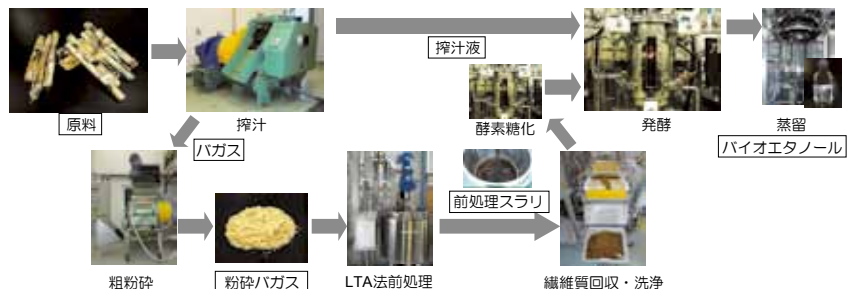


図2 LTA法によるサトウキビ茎部からのバイオエタノール製造工程の概要

ル製造用酵母が発酵可能な六炭糖（ブドウ糖および果糖）のほぼ全量を回収できる。それに対して、アルカリ処理によって大部分のキシランは遊離し、系外に除去されることとなる。多くの草本系原料では、繊維質の木化度が低いことから、高濃度のアルカリを用いて室温程度で数時間処理するだけで、効率的に脱リグニンを行うことができる。それに対して、木質系原料を用いる場合には、アルカリ蒸解パルプ製造工程のように、160℃程度の高温処理が必要となる。使用したアルカリは、前処理後に固液分離によって黒褐色の液相として回収し、パルプ工程における再生処理することにより、繰り返し利用が可能となると考えられる。

3.2 CARV（粘度低減後変換）法

本研究では、澱粉やショ糖の精製原料として栽培されているバレイショ、カンショおよびテンサイを資源作物として捉え、まず、繊維質の利用可能性を検討した。その結果、セルロースとペクチンを主成分とした繊維質は、含有量が低く、糖源としての品質も低いことが明らかとなった。また、地下部（根部または地下茎）の収穫時に副生する茎葉部は、繊維質の品質が低い上に腐敗性が高く、現行収穫体系では収集が困難であることから、原料に含めないこととした。さらに、地下部の繊維質は吸水性・保水性が高く、磨砕（すりおろし）時に澱粉やショ糖の回収性や廃棄物処理効率を低下させる一因となるものと推察された。類似の現象は、大量の搾り粕残渣が副生する芋焼酎製造工程でも見られており、このような高含水率の双子葉植物系原料を扱い、廃棄物処理を行う際には、吸水性・保水性の高い繊維質のハンドリングが大きい問題と考えられた。

原料中の糖源の大部分が澱粉またはショ糖であることから、既存のバレイショ澱粉の精製工程やテンサイ精糖工程をバイオエタノール用途に転用するのが、既存の原料収集インフラを活用しつつ設備コストを抑えることができる現実的な提案となる。国内テンサイ製糖工場でのバイオエタノール製造実証事業では、短冊

状に剥皮したテンサイを熱水とともに圧搾して糖液を回収し、濃縮糖液（シックジュース）としたものを発酵原料としている。また、バレイショおよびカンショについては、コーンのウェットミル法と類似の方法で、裁断後に地下部繊維質を洗浄して澱粉を分離精製する方法が有効と考えられている。しかしながら、既存設備を使うという利点を度外視した場合、食品製造時と比べて品質管理のグレードが低いバイオエタノール製造工程では、まだ低コスト化の余地が残っているものと考えられる。また、既存の工程で大量の水を使用することや、そのために熱濃縮工程が必要となることが、製造コストやエネルギー効率向上の際の課題になると考えられた。

そこで、本研究では、既存設備の利用を想定せず、シンプルな新規変換プロセスの開発を行うこととした。その際には、加水・洗浄操作を極力減らし、吸水性・保水性の高い繊維質のハンドリングに係る問題を最低限に抑えることを目標とした。その結果、地下部全体を磨碎し、澱粉またはショ糖と繊維質が混在する状態で酵素処理によって繊維質を軟化し、その後、処理物全体を用いて発酵を行うことを特徴とする、シンプルなバイオエタノール製造工程（CARV法:Conversion After Reduction of Viscosity, 粘度低減後変換法）を提案した（図3）³⁾。

バレイショおよびカンショは磨碎後に高粘性のスラリーとなるが、ペクチナーゼ製剤とセルラーゼ製剤を作用させることにより粘性低下し、ハンドリング性が大幅に向上する（図4）。本酵素処理により、磨碎スラリー中の澱粉液化処理（アミラーゼによる澱粉の部分加水分解）を行うことが可能となり、さらに、液化物を基質として糖化・発酵を同時に行う（並行複発酵）処理を行うことにより、10%（v/v）を超える高濃度のエタノールの効率的製造が可能となる。それと同時に、初段の繊維質分解酵素処理により、廃棄物として得られる蒸留残渣の保水性が低下し、残渣処理工程を効率化するものと期待される。

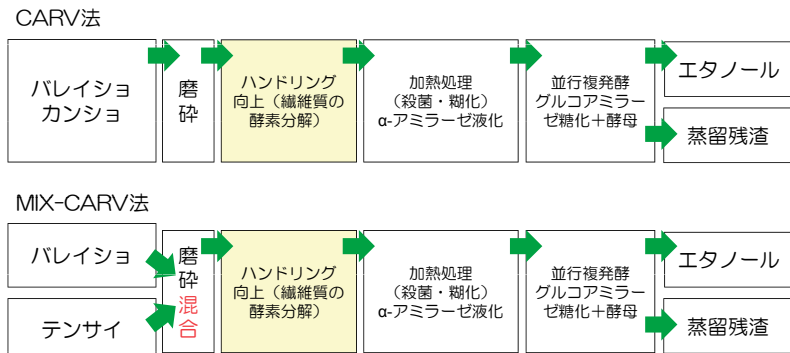


図3 CARV法およびMIX-CARV法の概要



図4 バレイショ磨碎物の繊維質分解酵素処理による粘性低下

(左：酵素処理前，右：酵素処理後)

それに対して、テンサイの磨碎物は、繊維質分解酵素が作用しにくく、粘性低下を促すためのpHシフト処理が必要と考えられた。また、澱粉を含まないので液化・糖化工程は不要となる一方で、磨碎物の糖濃度があまり高くないことから、8% (v/v) 程度の濃度のエタノールしか製造できず、培養槽の稼働効率が低いことが課題となった。さらに、熱処理工程を加えない場合には、雑菌汚染が問題となる。

そこで、著者らは、テンサイとバレイショを併用・混合することにより、製造工程のさらなる効率化を図った改良技術 (MIX-CARV 法) を提案した (図3)⁴⁾。これらの原料は、北海道の大規模輪作体系における主農産物であり、極近傍での安定調達が可能となる。

本法では、それぞれの原料を湿式グラインダー処理により無加水磨碎した後、それぞれを1:1の重量比で混合し、細胞壁分解酵素処理を行う。その後、耐熱性 α -アミラーゼを加えて95℃で30分澱粉液化処理を行い、バレイショでのCARV法と同様に並行複発酵を行いエタノールを製造する。本法によれば、繊維質分解酵素による粘性低下が可能となる。また、バレイショ中の澱粉を加えることにより糖液濃度を高めるとともに、95℃、30分間の澱粉液化工程により磨碎物の殺菌を行うことができる。本法では、並行複発酵48時間後にエタノール濃度14.2%(v/v)を記録し、その収率は発酵性糖質量から計算した理論収率の92.4%に達した。

テンサイは、北海道の大規模輪作体系における主農産物である一方で、事実上、精糖原料としての利用に限定されている。それに対して、MIX-CARV法は、既存設備に頼らない簡素な設備により、適正規模で発酵性糖質を供給するための新技術として、バイオエタノールのみならず、飲料用エタノールをはじめとする多様な製品を提供できる潜在性を有するものである。本技術が、高付加価値製品を与えるテンサイ新品種系統の開発等の受け皿として、国内地域産業の発展に貢献することを期待したい (図5)。

現状：テンサイ変換工程は一つだけ

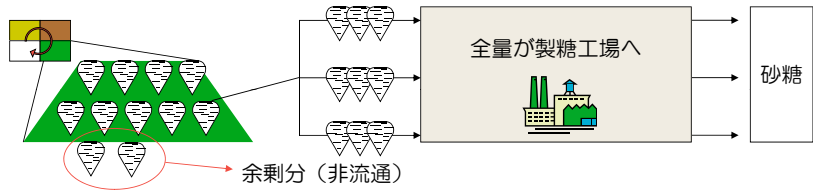


図5 テンサイの変換を軸とした新産業創出のイメージ

3.3 DiSC（稲わら稈部直接糖化）法

稲わら、麦わらなどのイネ科植物の茎葉部を糖化原料とする場合には、繊維質中の主要多糖であるセルロースおよびキシランを対象として、前処理技術を開発することとなる。著者らのデータでは、市販の稲わらには、セルロースおよびキシランが、乾燥重量あたりそれぞれ約30%および14%含まれていた。しかしながら、この値は満足できるものではなく、100円/Lでのバイオエタノール製造を実現するためには、原料品質の最適化の可能性を検討する必要がある。本プロジェクトでは、農研機構作物研究所に協力を仰ぎ、多様な稲わら試料を分析する機会を得た。その結果、全測定試料について、セルロースやキシランに加えて、澱粉、ショ糖、ブドウ糖、果糖、そして β -1,3-1,4-グルカンが存在することを確認することとなった（後者5つを総称して「易分解性糖質」と定義する）。作物学分野では、稲茎葉部にショ糖や澱粉等の非構造性炭水化物を蓄積する現象は広く知られており、稲の生長と子実の充実度との関係等について研究が行われてきた。しかしながら、バイオマス変換技術を開発する側からは、これらの易分解性糖質の存在は殆ど注目されず、その結果、主として繊維質からの糖回収のみを考慮した前処理法が検討されてきた。

この現象が注目されなかった背景には、重要な理由が隠れていると考えられ

る。上述した市販稲わらには、易分解性糖質は殆ど含まれていないのに対して、わら収集後に直ちに乾燥するなど、適切な方法で保存された実験用試料からは、セルロース量の数十％に相当する量の易分解性糖質が全点から検出された。実験室での試験でも、易分解性糖質は、日陰乾燥を行う間に急速に減耗・変質することが明らかとなった。これらのことは、稲わらの品質を高く保持するための収集・貯蔵技術や、その品質保持技術を支える迅速・効率的な収集体系の構築が極めて重要であることを示す。原料中に易分解性糖質が蓄積する現象は、三大穀物の他の二つに由来する農産廃棄物、麦わらやトウモロコシ茎葉部では観察されず、稲作文化圏のみでのチャンスと考えられる。

稲わら試料の中には、例えば、飼料稲品種リーフスター由来の稲わらのように、易分解性糖質の含有率が著しく高い品種系統が存在することが明らかとなった。このような試料の場合、六炭糖／五炭糖の比が高くなることから、六炭糖のみの回収・利用によるシンプルな変換工程の開発が望ましい。その一方で、易分解性糖質の主成分となる澱粉は熱糊化後に水に溶解する他、ショ糖は抽出性が高く、酸加水分解や水熱処理に対する安定性が低いため、過酷な前処理を行う際には注意が必要と考えられた。

そこで、セルロースの高効率糖化のために求められる過酷な前処理を行わず、代わりに易分解性糖質の回収を優先させたシンプルな変換技術を提案した(図6)。原料としては、稲わら中の易分解性糖質の殆どが存在している稈部(茎の内部)のみを用いることとし、風力選別による稈部回収技術も併せて開発した。本変換技術(DiSC法:Direct Saccharification of the Culms, 稈部直接糖化法)では、易分解性糖質の回収を優先させつつ、セルロースの一部のみを直接酵素糖化してブドウ糖に変換して取り出すこととなる⁵⁾。その後、通常のアルコール製造用酵母

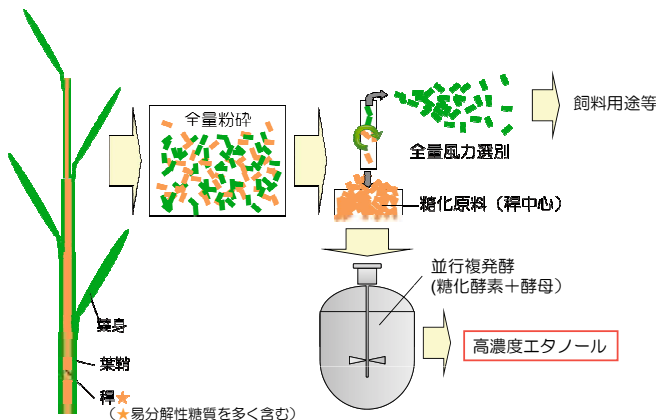


図6 DiSC法の概要

を用いて並行複発酵を行うことにより、繊維質原料から7% (v/v) を超えるエタノールの製造を可能とする。本法によれば、前処理から発酵までワンバッチでの操作が可能となるとともに、基質の糖濃度向上による変換装置サイズや蒸留装置サイズの縮小、生成エタノール濃度向上による蒸留コスト低減や廃液量減少などが期待される。

DiSC 法の実用性に影響を及ぼす最大の要因は、易分解性糖質量の多い原料の確保である。本研究に用いたリーフスターは、極めて著量の易分解性糖質を蓄積することが知られる一方で、十分な粉量が確保できないことから、粉の収穫と稲わら利用の両立を考える場合には、さらなる品種改良が必要となる。それに対して、主食米用稲から得られる籾収穫期の稲わらについて、易分解性糖質濃度が高いと考えられる地際付近から稲わらを回収し、直ちに易分解性糖質の減耗を抑えるような低温貯蔵した試料を分析した結果、セルロース量の3割を超える量の易分解性糖質の蓄積が観察されている(図7)⁶⁾。これは一例であり、品種以外にも、土地・気象条件、栽培条件、試料回収日などにも影響を受ける値となることに注意が必要であるが、DiSC 法を活用する際に有効性を発揮する稲わら試料が存在する可能性が期待できる。その一方で、これらの試料を安定に得るためには、粉の充実を前提とした易分解性糖質の効率的蓄積技術に係る育種・栽培研究のさらなる進展が待たれる。

3.4 CaCCO (炭酸ガス吹き付けによるカルシウム捕捉) 法

天日乾燥後の稲わらをはじめとする、通常の稲わらや麦わらについては、六炭糖/五炭糖の比が小さいことから、原料中の六炭糖と五炭糖の両方を回収し、エ

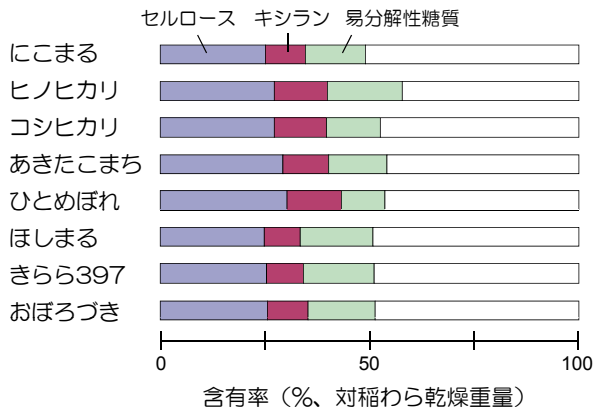


図7 主食用米用稲由来の稲わら中の繊維質多糖および易分解性糖質の量(例)

タノールに変換する工程の開発が必要となる。それに加えて、稲わらに含まれる易分解性糖質は貴重な六炭糖であり、その回収も大切となる。そこで、繊維質のセルロースおよびキシランの糖化を効率化するような前処理を行いつつ、易分解性糖質の流亡や分解を最低限に抑えるような工程の開発に取り組むこととした。

まず、著者らは、希硫酸処理、水熱処理、NaOH 処理等について稲わらへの適合性を検討した。その中で、酸処理時や水熱処理時には、果糖やキシロースの過分解が起こることを確認した。それに対して、NaOH 処理後の懸濁液中には、易分解性糖質やキシランの一部が遊離し、前処理後の固形分洗浄・アルカリ回収時に流亡した。逆に、前処理後の固形分中のアルカリは液中に遊離しにくいことから、固液分離工程、固形分の洗浄工程および懸濁液の中和・pH 調整工程の導入が必要と考えられた。アルカリ処理では、易分解性糖質のうち、ブドウ糖や果糖などの還元糖が過分解する。しかしながら、易分解性糖質のうちで高い割合を占めるショ糖および澱粉は変質しにくい。また、アルカリは、ヘミセルロースの酵素糖化性を顕著に向上するとともに、物理的障壁となるリグニンの一部が溶出されることから、繊維質に対する高い前処理効果が期待できる。

そこで、アルカリ処理のメリットを生かしつつ、糖の流亡の原因となる固液分離工程、洗浄工程を省略し、中和・pH 調整工程を効率化した前処理工程の開発を行うこととした。前処理後の固液分離を伴わず糖化工程に移行可能な候補物質として、揮発性を示すアンモニア水、そして炭酸ガスにより不溶化できる水酸化カルシウムを選定した。アンモニアは高価であり、加熱を伴う回収・再利用工程の開発が不可欠となるのみならず、臭気を有し、作業者への高い配慮が必要となることから、相当高度な設備が必要となり、自ずと設備規模が大きくなると考えられる。その一方で、水酸化カルシウムは、溶解性が低く pH 上昇には限界があるものの、比較的安価で汎用性の高い不揮発性アルカリである。そこで、本研究では、水酸化カルシウムを用いた前処理技術の開発を行うこととした。

その結果、バイオマスの水酸化カルシウム処理後に懸濁液を固液分離しないプロセスとして、前処理後に炭酸ガスを吹き込むことにより、水酸化カルシウムを炭酸カルシウムに変換して不溶化させることを特徴とする “CaCCO (Calcium Capturing by Carbonation (CO₂): 炭酸ガス吹き付けによるカルシウム捕捉) 法” を提案した (図 8)⁷⁾。

基本的な処理例を以下に示す: バイオマス原料の粉碎物に、原料の乾燥重量との比率で 5 ~ 20%(w/w) の水酸化カルシウムと原料の乾燥重量の 4 ~ 9 倍重量の水を混合し、加熱 (120℃, 1 時間) を行う。冷却後に、炭酸ガスを吹き付け、加圧条件下で pH を弱酸性として、酵素および酵母 (キシロース発酵性酵母: 遺伝子組換え菌または非組換え菌) を添加し、30 ~ 40℃ 程度で並行複発酵を行う。蒸留後の残渣は、遠心分離などの方法で固液分離を行う。固形分は燃焼し、熱回収するとともに、灰のキルン焼成により酸化カルシウムとして再生できる。廃液

は、メタン発酵に供した後、液肥利用する、または好気処理により環境へ戻す。本反応では、ワンポットでの反応が可能であり、設備投資を大きく低減できるものと期待される。

3.5 RT (室温処理) -CaCCO 法

CaCCO 法の改良を進める中で、基本条件としての $120^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 時間程度の水酸化カルシウム前処理条件を緩和するために検討を行った結果、室温で7日間程度の処理によって、上記熱処理と同程度の前処理効果が得られることを確認した。本方法を「RT-CaCCO 法 (Room Temperature (室温処理))」として報告した⁸⁾。本工程により、CaCCO 法における熱エネルギーや前処理設備コストが低減できるものと期待される。それに加えて、RT-CaCCO 法は、原料のハンドリング上の重要課題である、「貯蔵」の問題を解決できる可能性を有することを見出した (図9)。

草本系バイオマスの代表となる農産廃棄物 (コーンストーバー、麦わらおよび稲わら等) は、子実の収穫時において、40 ~ 60% またはそれ以上の高い含水率を示すことが少なくない。麦わらでは、含水率 20% 程度に下がる地域もあり、子実収穫時における地域の気候条件に大きく依存する。含水率が高い草本系バイオマスは、乾燥しない限り、易分解性糖質、タンパク質やペクチン質などが容易に腐敗、褐変、軟質化することとなり、変換原料として用いることが事実上不可

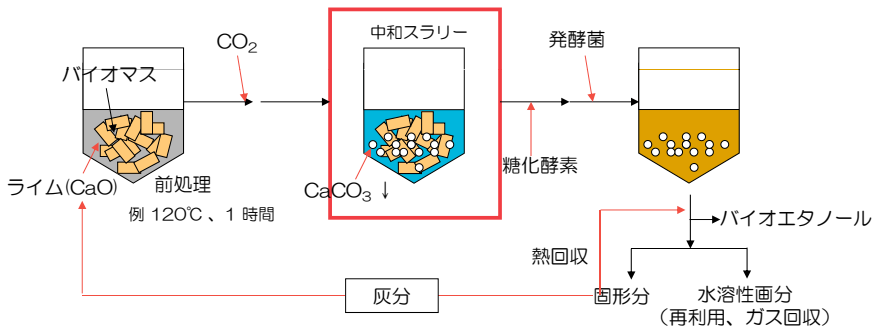


図8 CaCCO 法によるバイオエタノール製造工程の概要

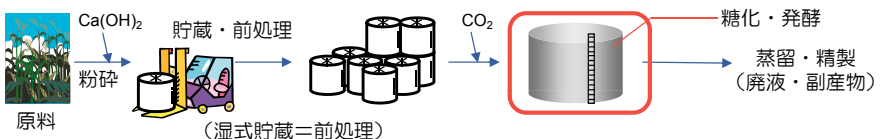


図9 湿式貯蔵と前処理を兼ねる RT-CaCCO 法の概要

能となる。また、稲わらに含まれている、澱粉、ショ糖等の易分解性糖質は、微生物汚染による腐敗のみならず、植物体自らの呼吸により分解されてしまい、原料中の有効糖質濃度を大幅に低減させると考えられる。このように、稲わらの貯蔵は、他の原料よりも重要な問題となる。

含水率の高い草本系原料を低コストで確実に保存する方法は全く存在しない。草本系原料の貯蔵技術は、乾式貯蔵技術と湿式貯蔵法に分けられる。乾式貯蔵技術には、天日（外気）乾燥法と強制乾燥法が考えられる。前者は、子実収穫後または原料収集後に天日下（外気）で自然乾燥するものであり、事実上、バイオマス変換原料の実用的乾燥技術となっている。しかしながら、天日（外気）乾燥の成否は、その年・地域の天候や水捌けなどの要因に大きく影響を受け、ある年の変換原料の品質が、次の年に確保できる保証は全くない。また、強制乾燥法は、原料を乾燥設備に輸送した後に、熱乾燥を行うというものである。火力発電所の余熱利用が可能な場合など、実施可能な例も見られるものの、極めて例外的なケースと考えられる。

その一方で、湿式貯蔵法については、畜産用サイレージの調製に関連付けて古くから多くの検討が行われている。例えば、乳酸菌等の微生物を接種し pH 低下や制菌を行う方法は実用化されており、保存畜産飼料の供給に欠かせないものとなっている。しかしながら、乳酸菌の使用により、バイオマス原料の貯蔵コストは向上し、バイオエタノール製造時において乳酸菌混入は最大の問題であり、殺菌目的で熱処理などの高度な処理を行う必要がある。さらに、乳酸菌の増殖には、遊離糖の消費が不可欠である。稲わらの場合、ショ糖等の易分解性糖質が分解することとなり、原料品質が低下する。

その他、硫酸、乳酸、アンモニア、尿素の導入などが試みられている。しかしながら、乳酸菌処理時と同様に、バイオマス変換原料の湿式貯蔵時におけるコストの許容範囲は、飼料としての許容範囲よりも小さいことから、これらの方法を変換原料に対して実用化するためには、コスト要因の解消が最大のポイントとなる。それに対して、RT-CaCCO 法における原料貯蔵コストを考えた場合には、使用する水酸化カルシウムのコストを前処理用の薬品分としてカウントすることにより、貯蔵コストを低く抑えることができる。これらを総合すると、RT-CaCCO 法は、農産廃棄物や資源作物などの高度利用に道を拓くための、世界初の湿式貯蔵・前処理技術を提供するものと期待される。

4. おわりに

本稿で概説した4つのプロセスによって、国内に存在する草本系原料の多くをカバーすることが可能となる（図10）。これらの小規模変換技術は、バイオ燃料製造を通じて地球温暖化を抑制するのみならず、地域活性化のための新たなチャンスを生むものと期待される。海外で、コーンストーバーやサトウキビバガス等

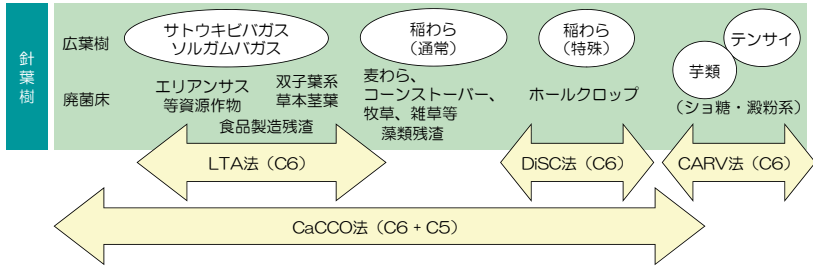


図 10 本プロジェクトで開発したプロセスの活用範囲のイメージ

を主要原料として技術開発が活発に進められる中で、我が国の主要原料となる稲わらの潜在能力や、資源生産・調達に係る国内事情に対して的確に対応した変換技術の総合的開発が不可欠と考えられる。特に、易分解性糖質を含む稲わらの生産、調達と変換に係る総合技術開発により、アジアを中心とした稲作文化圏における持続的・環境保全型農業のチャンスが生まれるものと強く期待される。

(謝辞)

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」によるものである。本研究を推進するにあたり、農研機構内外の多くの方々にご助力頂いた。特に、プロジェクト推進責任者である片山秀策氏および中川仁氏、II系推進リーダーの長島實氏、I系・II系研究者各位そして糖質素材ユニットの池正和氏をはじめとするバイオマス研究・支援スタッフ諸氏に深謝する。

(食品素材科学研究領域 糖質素材ユニット 徳安 健)

参考文献

- 1) <http://www.meti.go.jp/committee/materials/downloadfiles/g80326c05j.pdf>
- 2) Wu L., et al., *Bioresour. Technol.* **102**: 11183-11188 (2011).
- 3) Srichuwong S., et al., *Biomass Bioener.* **33**: 890-898 (2009).
- 4) Yun M-S., et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, **75**: 602-604 (2011).
- 5) Park J-Y., et al., *Bioresour. Technol.*, **102**: 6502-6507 (2011).
- 6) Park J-Y., et al., *Biomass Bioener.* **35**: 3733-3735 (2011).
- 7) Park J-Y., et al., *Bioresour. Technol.*, **101**: 6805-6811 (2010).
- 8) Shiroma R., et al., *Bioresour. Technol.*, **102**: 2943-2949 (2011).

Ⅱ 多様なエタノール変換プロセスに対応可能な 糖化酵素生産基盤技術の開発

1. はじめに

地球上で最も豊富に存在する有機資源であるセルロース系バイオマスから製造されるバイオエタノールは、従来の化石燃料に代わるクリーンな燃料として注目されている。セルロース系バイオマス中には、多糖成分としてセルロースやヘミセルロースなどが含まれており、それぞれの含有量は植物種により異なるものの、一般的に25～45%及び20～50%程度であるとされる¹⁾。セルロースはグルコースが β -1,4-グリコシド結合した直鎖状のホモポリマーであり、セルロース鎖が分子内及び分子間で水素結合することで、強固な結晶構造を形成している。ヘミセルロースは、セルロースとペクチンを除いた植物細胞壁多糖成分の総称である。ヘミセルロースは分岐構造を有するヘテロ多糖であり、その構造や糖組成は植物種によって大きく異なる(図1)。植物細胞壁中のセルロース基本骨格は、ヘミセルロースや高分子フェノール性化合物であるリグニンなどと互いに絡み合った状態で存在している。

セルロース系バイオマスの糖化、すなわちセルロースやヘミセルロースなどの

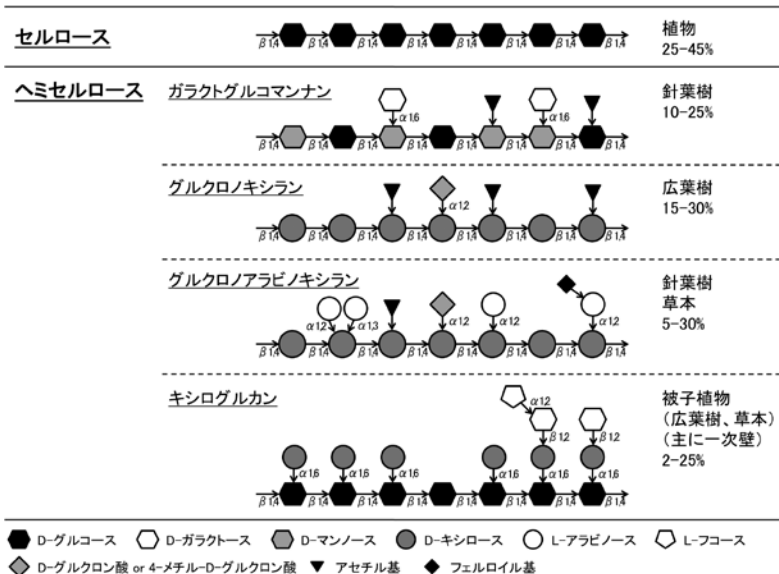


図1 セルロース・ヘミセルロースの構造、起源及び乾物あたりの含有量

植物細胞壁多糖成分から発酵性単糖を生産する工程は、バイオエタノール製造において非常に重要である。一般的にセルロース系バイオマスの糖化法として、硫酸などを用いる酸糖化法と、糖化酵素群を用いる酵素糖化法に大分される。このうち酵素糖化法は、比較的温和な条件（反応条件は糖化酵素に依存するが、一般的に30～50℃、pH 4～7程度）での糖化反応を行うことができ、過分解（生成した単糖がさらに分解され非発酵性の物質に変化すること）が起こらないため収率が高いなどのメリットがある。しかしながら、上述のように、植物細胞壁中のセルロース繊維は高度に結晶化しており、さらにヘミセルロースやリグニンなどの高分子化合物と絡み合った複雑な構造をとっているため、酵素による分解には、大量の酵素を長時間作用させる必要がある。このことが、酵素糖化に係るコストを引き上げており、セルロース系バイオマスからのバイオエタノール製造の実用化の際の大きな障壁となっている。我々の研究グループでは、酵素糖化工程に係るコストを低減するために、①「よく働く酵素を（糖化酵素群の高機能化）」、②「安く製造し（効率的生産技術開発）」、そして③「うまく利用する（効果的利用法の開発）」という3つの観点から総合的に技術開発を行っている。本稿では、セルロース系バイオマスの糖化酵素について解説すると共に、糖化酵素の効率的生産技術開発について紹介する。

2. セルロース系バイオマス分解酵素（表1）

セルラーゼはセルロース鎖の β -1,4-グリコシド結合を加水分解する酵素の総称であり、以下の3つに大分される。

- (1) セロビオヒドロラーゼ（CBH；EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.176）：結晶領域、非晶領域に関わらず、セルロース鎖の末端からセロビオース単位で切断していく酵素であり、非還元末端に作用するCBH（EC 3.2.1.91）と還元末端に作用するCBH（EC 3.2.1.176）とがある。
- (2) エンドグルカナナーゼ（EG；EC 3.2.1.4）：非晶領域セルロース鎖内部をランダムに切断する酵素であり、セロオリゴ糖、セロビオース、グルコースなどを生成する。結晶領域にはほとんど作用しない。
- (3) β -グルコシダーゼ（BGL；EC 3.2.1.21）：非還元末端の β -グリコシド結合を切断する酵素であり、上記2種の酵素により生成したセロオリゴ糖やセロビオースを加水分解し、グルコースを生成する。

結晶性セルロース分解の際、これらの3者が相乗的に作用して分解が進行していくと推察されている。すなわち結晶性セルロース中に部分的に存在する非晶領域をEGが切断し、新たな末端を生じる。この末端にCBHが作用し、結晶性セルロース繊維表面を削っていき、セルロース繊維内部の非晶領域が表面に露出し、EGが作用する。このようにCBHとEGが互いの作用可能領域を作り出すことで、相乗効果が生じると考えられている（エンド-エキソ相乗効果モデル、

表1 セルロース, ヘミセルロース分解酵素の種類

酵素	セルロース、ヘミセルロース分解における作用様式	CAZy Families ^a	EC number	
セルラーゼ	Cellobiohydrolase	セルロース鎖の各末端に作用 主にセロビオースを生成	GH 5, 6, 7, 9, 48 EC 3.2.1.91 EC 3.2.1.176	
	β -1,4-endoglucanase	非晶部セルロース鎖内部をランダムに切断 グルコース、セロビオース、セロオリゴ糖を生成	GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 74, 124 EC 3.2.1.4	
	β -1,4-glucohydrolase	セロビオース、セロオリゴ糖の非還元末端に作用 グルコースを生成	GH 1, 3, 30, 116 EC 3.2.1.21	
	endo- β -1,4-xylanase	キシラン主鎖内部をランダムに切断 主にキシロビオース、キシロオリゴ糖を生成	GH 5, 8, 10, 11, 43 EC 3.2.1.8	
	β -1,4-endomannanase	ガラクトグルコマンナン等に作用 主鎖内部のマンノース間の結合を切断	GH 5, 26, 113 EC 3.2.1.78	
	xyloglucan β -1,4-endoglucanase	キシログルカン主鎖に作用 主鎖内部のグリコシド結合を切断	GH 5, 12, 16, 44, 74 EC 3.2.1.151	
	β -1,4-xylosidase	キシロビオース、キシロオリゴ糖等に作用 非還元末端のキシロースを遊離	GH 3, 30, 39, 43, 52, 54, 120 EC 3.2.1.37	
	α -L-arabinofuranosidase	グルクロン/アラビノキシラン等の側鎖に作用 非還元末端から α -Lアラビノフラノースを遊離	GH 3, 43, 51, 54, 62 EC 3.2.1.55	
	ヘミセルラーゼ	β -mannosidase	ガラクトグルコマンナン等の分解物オリゴ糖等に作用 非還元末端から β -マンノースを遊離	GH 1, 2, 5 EC 3.2.1.25
		xylan α -1,2-glucuronidase	グルクロン/キシラン等の側鎖に作用 非還元末端からグルクロン酸を遊離	GH 67, 115 EC 3.2.1.131
α -galactosidase		ガラクトグルコマンナン等の側鎖に作用 非還元末端からガラクトースを遊離	GH 4, 27, 36, 57, 97, 110 EC 3.2.1.22	
β -galactosidase		キシログルカン等の側鎖に作用 非還元末端からガラクトースを遊離	GH 1, 2, 35, 42 EC 3.2.1.23	
α -fucosidase		キシログルカン側鎖に作用 末端のL-フコースを遊離	GH 29, 95 EC 3.2.1.51	
α -xylosidase		キシログルカン側鎖、イノプリメペロースに作用 非還元末端から α -Dキシロースを遊離	GH 31 EC 3.2.1.177	
acetylsterase		種々の糖質中のアセチル基を切断	CE 16 EC 3.1.1.6	
acetylxylan esterase		キシラン側鎖中のアセチル基を切断	CE 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12 EC 3.1.1.72	
feruloyl esterase	フェルロイル基と糖質間のエステル結合を切断	CE 1 EC 3.1.1.73		

^a CAZy - Carbohydrate-Active enZymes (<http://www.cazy.org/>).

GH: Glycoside Hydrolases, CE: Carbohydrate Esterases (19, Oct. 2012)

図2)。また、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー 61 に属する酵素や Swollenin など、単独では活性を示さないものの、CBH や EG と相乗効果を示す成分の存在が明らかとなってきている^{2), 3)}。尚、GH ファミリー 61 酵素は、以前は EG とされていたが、近年の研究で酸化還元酵素 (Cu-dependent polysaccharide monooxygenase) であることが明らかとなっている^{4), 5)}。セルラーゼには、触媒活性を担う触媒ドメインに加えて、糖質吸着モジュールを持つものもある。糖質吸着モジュールが基質であるセルロースと相互作用することで、触媒ドメインがセルロース表面に接近するため、セルロース分解の効率化に寄与していると考えられている。ヘミセルラーゼはヘミセルロースを分解する酵素の総称である。図1に示したように、ヘミセルロースはヘテロ多糖であり、その構造は植物種によつ

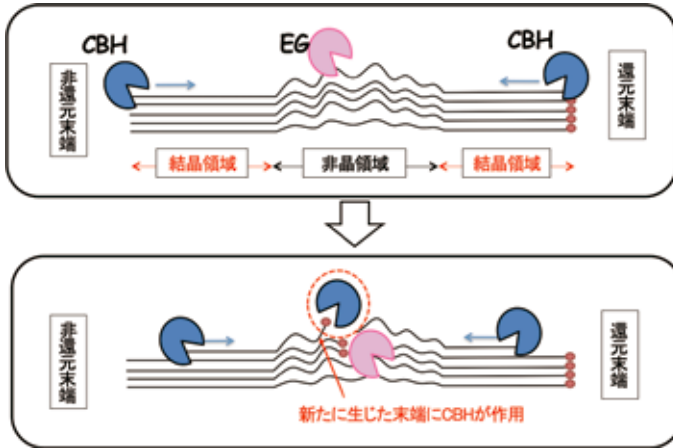


図2 CBHとEGの相乗作用によるセルロース分解モデル

て大きく異なるため、多くの種類の酵素がヘミセルロース分解に関わる（表1）。ヘミセルラーゼには、図1に示したようなヘテロ多糖の主鎖を切断するエンド型酵素（エンドマンナーゼ（EC 3.2.1.78）、キシラーゼ（EC 3.2.1.8）、キシログルカンエンドグルカナーゼ（EC 3.2.1.151））と、それぞれの多糖の側鎖に作用するエキソ型酵素とがある。ヘミセルロースの完全分解には、種々のエンド型、エキソ型の酵素が必要となるが、その分解過程は非常に複雑である。これはヘミセルロースが分岐構造をとることや、分解に関わる酵素の基質認識の違いなどに起因する。例えば、グルクロノアラビノキシランの分解には、キシラーゼ、 α -L-アラビノフラノシダーゼ、 α -グルクロニダーゼ、 β -キシロシダーゼ及び2種のエステラーゼが関わる。キシラーゼはキシラン主鎖をランダムに加水分解する酵素であるが、個々のキシラーゼの持つ基質特異性と基質側鎖の結合箇所との関係により、切断部位が制限される⁶⁾。また、キシラン側鎖のアラビノースを遊離する酵素である α -L-アラビノフラノシダーゼには、2つのアラビノースが結合しているキシロース残基の α -1,3結合を特異的に切断するものや、1つのアラビノースが結合しているキシロース残基のみからアラビノースを遊離するものなどがある⁷⁾。 α -L-アラビノフラノシダーゼによりアラビノース側鎖が除去されることにより、キシラーゼが作用可能な部位を生み出し、分解が進行していく。このようにヘミセルロース分解には各々性質の異なる多数のエンド型、エキソ型の酵素が協奏的に作用し、複雑な過程を経て完全分解に至る。

セルロース系バイオマス原料において、セルロース繊維は、前述の通り強固な結晶構造を有しており、さらにヘミセルロースやリグニンに取り囲まれること

で、繊維構造が強化されているため、セルラーゼやヘミセルラーゼによる分解速度は極端に遅い。このため、通常、酵素糖化の際には、セルロース繊維の結晶性の低下、ヘミセルロースやリグニンの分解・解離などの効果をもたらす物理的・化学的処理（粉碎・前処理）を施した原料を用いる。粉碎・前処理を行うことで糖化酵素が作用し易くなるものの、糖化工程は（少なくとも初期段階では）不均一な固液界面での非効率な酵素糖化を行うこととなるため、それでも尚、その分解速度は遅い。また、疎水性が高く酵素と非特異的に結合しうるリグニンが混在するなど、酵素糖化の阻害要因も少なくない。このような中で、セルロース繊維の糖化を最大限に効率化するために、上述のようなセルロース系バイオマス分解に関わる多種類の糖化酵素について、個々の酵素の組み合わせや比率などを最適化する試みが世界中で行われている。この際、セルロース系バイオマス原料の植物種や粉碎・前処理の工程によって繊維中多糖の組成や構造が大きく異なるため、各々の変換プロセスに応じた糖化酵素の最適化を図ることが重要である。

3. セルロース系バイオマス分解酵素生産微生物

セルラーゼを中心とする植物細胞壁分解酵素を生産する微生物は、自然界に幅広く分布している。代表的なセルラーゼ生産微生物を表2に示す。これらの微生物が生産する酵素をセルロース系バイオマスの糖化反応に利用するために、強力な植物細胞壁分解能力をもつ微生物の選抜や個々の生産酵素の機能解析が

表2 代表的なセルラーゼ生産微生物

好気性細菌	好気性真菌
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	<i>Acremonium cellulolyticus</i>
<i>Cellulomonas fimi</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>
<i>Streptomyces cellulolyticus</i>	<i>Humicola grisea</i>
<i>Thermobifida fusca</i>	<i>Irpex lacteus</i>
<i>Thielavia terrestris</i>	<i>Penicillium decumbens</i>
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	<i>Trichoderma reesei</i>
嫌気性細菌	嫌気性真菌
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	<i>Anaeromyces mucronatus</i> 543
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>Neocallimastix frontalis</i>
<i>Clostridium cellulovorans</i>	<i>Orpinomyces</i> sp.
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Piromyces</i> sp.
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	
<i>Ruminococcus albus</i>	
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	

古くから行われてきた。生産酵素群の植物細胞壁分解能力やそれらの生産性などの点から、*Trichoderma* 属、*Acremonium* 属、*Aspergillus* 属等の糸状菌類や *Clostridium* 属等の嫌気性細菌が研究対象として注目を集めてきた。いずれも、前項で述べたような植物細胞壁多糖成分の完全分解に必要な一連の酵素群を生産する。糸状菌類は一連の酵素群を大量に分泌生産することで知られており、すなわち酵素生産の面で大きなメリットを持つ一方、近年、分解速度の遅さや非生産的吸着（触媒作用を示さない部位に吸着すること）による作用効率の低さなどの問題点が明らかとなってきた。一方、嫌気性細菌である *Clostridium* 属は、セルロソームと呼ばれる巨大酵素複合体を細胞表層に生産し、極めて効率的にバイオマス分解を行う。セルロソームは、細胞表層に発現したセルロソーム骨格タンパク質に、数十もの酵素（多くの酵素の分子量は2万～10万程度）が配置・結合された酵素複合体であり、その総分子量は200～400万程度となる。多数の分解酵素が近傍に位置し、それぞれが協調的に作用することで効率的に分解を行うと推察されている。セルロソームの持つセルロース繊維分解能力は糸状菌由来酵素と比較して高く、高温での糖化も可能であるなどメリットも多い一方で、酵素生産量が低いという問題点がある。両者のセルロース繊維分解機構は大きく異なっており、それぞれの利点を活かした酵素糖化系の研究開発が世界各国で進められている。

4. 微生物セルラーゼ生産技術の開発と効率化

4.1. *Trichoderma reesei* を用いた糖化酵素生産技術開発戦略

セルロース系バイオマスの酵素糖化に係るコストを軽減するために、安価で効率的な酵素生産系の構築が重要な課題の一つである。前項で述べたように、セルラーゼを中心とする植物細胞壁分解酵素を生産する微生物は自然界に幅広く分布している。その中で、*Trichoderma* 属や *Acremonium* 属などの糸状菌類は大量の糖化酵素を菌体外に生産することが知られており、工業的にも酵素生産効率の面で大きなメリットを持つ。特に糸状菌 *T. reesei* はセルラーゼ生産菌として古くから研究されており、世界中の多くの研究室でセルラーゼ生産向上株が取得されてきている。本菌のセルラーゼ生産能力は非常に高く、セルロースを炭素源として培養を行うと、数十 g/L のタンパク質を菌体外に分泌し、そのほとんどがセルロース分解に関わる酵素である。また、野生株 *T. reesei* QM6a 株のゲノム配列解析が既に終了しており^{8),9)}、表3に示すようなセルロース系バイオマス分解に必要な一連の酵素遺伝子群を有していることが明らかとなっている¹⁰⁾。

T. reesei セルラーゼの大量生産のための炭素源として、微結晶性セルロースやセルロース系バイオマス前処理物等の固形分が用いられることが多い。この際、セルロース系バイオマス糖化酵素の多くは、不溶性セルロースに吸着する性質を有するため、生産酵素の一部が培地中に残存する固形分に吸着し、酵素回収

表3 *Trichoderma reesei* 由来セルロース・ヘミセルロース分解酵素
(ゲノム配列からの推定遺伝子数及び既に性質解明がなされている酵素)

CAZy Family & # of genes*1	Characterized enzyme*2,3	CAZy Family & # of genes*1	Characterized enzyme*2
GH1	2 BGL2(Cel1A)	GH43	2
GH2	7 β -mannosidase	GH45	1 EG5 (Cel45A)
GH3	13 BGL1(Cel3A), BXL1	GH54	2 ABF1, ABF3
GH5	11 EG2 (Cel5A), Man5A	GH61*4	3 EG4 (Cel61A)*4
GH6	1 CBH2 (Cel6A)	GH62	1 ABF2
GH7	2 CBH1 (Cel7A), EG1 (Cel7B)	GH67	1 α -glucuronidase
GH10	1 XYN3	GH74	1 Xyloglucanase (Cel74A)
GH11	4 XYN1, XYN2	GH95	4
GH12	2 EG3 (Cel12A)	GH115	1
GH27	8 AGL1, AGL3	CE1	3
GH30	2 XYN4	CE3	2
GH31	4	CE4	4
GH35	1 BGA1	CE5	4 AXE1
GH36	2 AGL2	CE16	2 AES1
GH39	1		

*1セルロース、ヘミセルロース分解に関与しない遺伝子も含む

*2遺伝子産物の酵素活性が解明されているものを示す

*3 CBH: cellobiohydrolase, EG: endoglucanase, BGL: β -glucosidase, XYN: endo- β -1,4-xylanase, Man: endomannanase, BXL: β -xylosidase, ABF: α -L-arabinofuranosidase, AGL: α -galactosidase, BGA: β -galactosidase, AES: acetylesterase, AXE: acetylxylan esterase

*4当初はEGとされていたが、近年copper-dependent polysaccharide monooxygenaseであることが判明

率が低下することが懸念される。また、不溶性セルロース自体は菌体に取り込まれず、セルロースの酵素分解により生成する低分子糖質が酵素生産の誘導物質となる一方で、最終分解物となる単糖グルコースは酵素生産を抑制するなど、固形分原料の分解状況に応じて酵素生産性が変化するため、現状では菌のもつ酵素生産における潜在力が十分に発揮されていないと考えられる。このような固形分原料を用いた際に考えられる問題点を解決しつつ酵素生産効率を向上させるため、著者らは、①グルコース抑制解除株を用いた、②可溶性炭素源からの酵素生産プロセスが有効であると考えた。グルコース抑制解除株を用いることで、抑制物質による生産速度低下の影響が抑えられると共に、グルコースなどの様々な糖源を酵素生産原料として使用することが可能となる。また、可溶性糖質を用いることで、残存原料への吸着による酵素回収率低下がなくなると共に、培養期間中における酵素生産最適条件の維持が容易になり、酵素生産効率の飛躍的な向上が期待できる(図3)。一方で、バイオマス原料の種類や前処理法に応じて、効率的な糖化に必要となる酵素群が異なるため、それぞれの変換プロセスに対応した糖

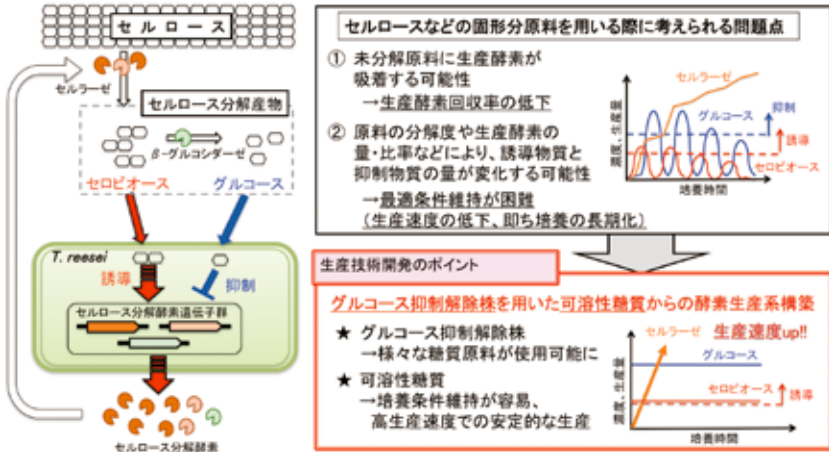


図3 *Trichoderma reesei* セルラーゼ酵素生産技術高度化戦略

化酵素の安定生産技術も併せて開発していく必要がある。以上のことから、*T. reesei* 糖化酵素生産技術開発を行うに当たり、可溶性糖質を原料とし、多様な変換プロセスに対応可能な糖化酵素の高効率生産系の構築を目指すこととした。

4.2. *Trichoderma reesei* グルコース抑制解除株の取得

これまでに取得されている *T. reesei* セルラーゼ高生産変異株の多くは、グルコースなどの抑制物質がなく、かつセルラーゼ誘導物質が存在する条件下でのセルラーゼ生産力が強化されたものである。そこで、現在公に入手可能で、最もセルラーゼ生産能力の高い変異株の一つである *T. reesei* ATCC66589 株を親株とした変異導入により、酵素生産の抑制物質であるグルコース存在下でもセルラーゼを生産する変異株の取得を試みた。*T. reesei* ATCC66589 の UV 照射株 (生存率約 2~3%) のおよそ 25,000 株について、10%グルコースおよびリン酸膨潤セルロース (PSC) を含むプレート上でのスクリーニングを行い、培養中に PSC を分解することで生じるハローを形成する計 78 株の変異株を取得した。図 4 に示すようにこれらの変異株のいくつかは誘導物質の有無にかかわらず、10%グルコース存在下でも明らかなハローを示した一方で、親株ではハローは見られなかった。このことは、取得した変異株のいくつかは、グルコース存在下でも充分量のセルラーゼを生産することを示している。

グルコース及びセルラーゼの誘導物質である L-ソルボースを用い、取得した変異株のセルラーゼ活性を評価した結果を表 4 に示す。L-ソルボースのみで培養した際には、親株を含めたすべてでセルラーゼ活性が認められた。一方で、グ

ルコースを唯一の炭素源とした場合には、M2-1, M3-1, M4-2 及び M8-1 株の 4 種において有意なセルラーゼ活性が検出され、特に、M2-1 及び M3-1 では誘導物質 L-ソルボースの共存下で特に高いセルラーゼ活性を示した。グルコース存在下でのセルラーゼ生産量が多いこと、及び誘導物質存在下におけるセルラーゼ生産能の点から、M2-1, M3-1 の 2 つの変異株が糖化酵素生産株として、より適していると考えられる。

4.3. 変異株 M2-1 及び M3-1 の酵素生産特性

前項で取得した変異株 (M2-1 株及び M3-1 株) を用いた酵素生産系を構築するに当たり、まず変異株の酵素生産特性について評価した。M2-1 株及び M3-1 株は、唯一の炭素源としてグルコースを用いた場合でもセルラーゼを生産する一方で、グルコース濃度とセルラーゼ生産性との関係において、両者で異なる特性を有することが明らかとなった。図 5 に示すように、M2-1 株では初期グルコース濃度が 100 mg/mL まで増加しても、セルラーゼ生産量はほぼ一定であったのに対し、M3-1 株ではグルコース濃度が高くなるにつれて、セルラーゼ生産量が低下した。また、グルコース消費量に関しては、M2-1 株は親株とほぼ同等



図 4 取得した変異株 (一部) のハロー形成及び顕微鏡写真

表 4 変異体 (一部) のグルコース、誘導物質存在下におけるセルラーゼ生産性

	ATCC 66589	M2-1	M3-1	M4-2	M5-1	M7-3	M8-1
Glc	-	+	++	++	-	-	+
Glc+Sor	-	+++++	++++	++	+	+	+++
Sor	++++	+++++	++++	++++	++++	+++	+++

0.4 mLの培地に各変異株胞子を約 10^4 個接種し、28°Cで7日間培養

CBH I及びEG IIに対する基質である

-nitrophenyl β -D-lactopyranosideに対する分解活性で評価

Glc: 50 mg/mL グルコース, Sor: 2 mg/mL L-ソルボース (誘導物質)

-: 未検出, +: <7 mU/mL, ++: 7-26 mU/mL, +++: 26-84 mU/mL, ++++: 84-142 mU/mL, +++++: >142 mU/mL

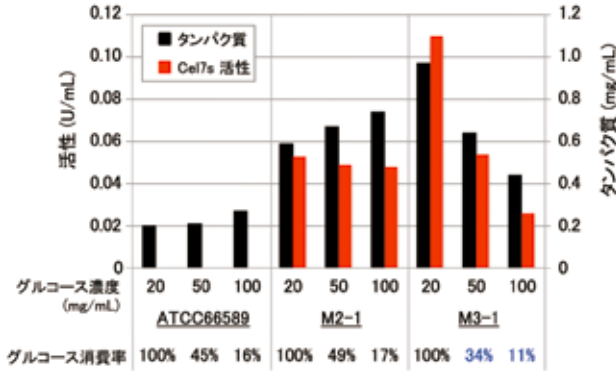


図5 初期グルコース濃度がセルラーゼ生産へ与える影響

各濃度のグルコースを炭素源とする培地 100mL (500mL フラスコ) に孢子 107 個を植菌し、28℃、180rpm で 5 日間培養を行った。セルラーゼ活性は、*Trichoderma reesei* が生産する主要なセルラーゼであるセロビオヒドロラーゼ I (CBH I) 及びエンドグルカナーゼ I (EG I) に対する活性 (Cel7s 活性) で評価。

であった一方で、M3-1 株では低下していた。両変異株共に「グルコースの存在下でもセルラーゼを生産する」という表現型を持つが、グルコース濃度に対する感受性が異なるという点は非常に興味深く、現在解析を進めている。誘導物質であるセルロースやセロピオース存在下におけるセルラーゼ生産性に関して、親株である *T. reesei* ATCC66589 株は、誘導物質が存在していても、一定濃度以上のグルコース存在下では少量のセルラーゼしか生産しない。これに対し、変異株 M2-1 株及び M3-1 株はグルコースの有無に関わらず、誘導物質存在下では高いセルラーゼ生産性を示した¹¹⁾。また、安価原料からの酵素生産を想定し、グルコースに加え、①セロピオース、キシロース、アラビノース、②澱粉、③ショ糖を炭素源とした際の酵素生産特性の評価結果を図6に示す¹²⁾。①はバイオマス原料の前処理工程や糖化工程より回収可能であり、②や③は比較的安価に入手できる糖源である。全てのケースにおいて、変異株は、親株と比べて高いセルラーゼ生産性を示した。糖源としてのキシロースやアラビノースの存在は、セルラーゼ生産性に大きな影響を与えることなく、キシラン分解酵素活性を増大させた。また、澱粉やショ糖を原料とした際、予め分解酵素で処理することで、高いセルラーゼ生産性を得ることができた。特に、ショ糖と原料とする場合には、*T. reesei* がインバルターゼ (ショ糖を分解し、グルコース及びフルクトースを生成する酵素) 遺伝子を持たないため、予備分解が必須であると考えられる。尚、変異株 M3-1 に関しても、生産活性量に関して多少の違いがあるものの、M2-1 と同様な傾向を示した。

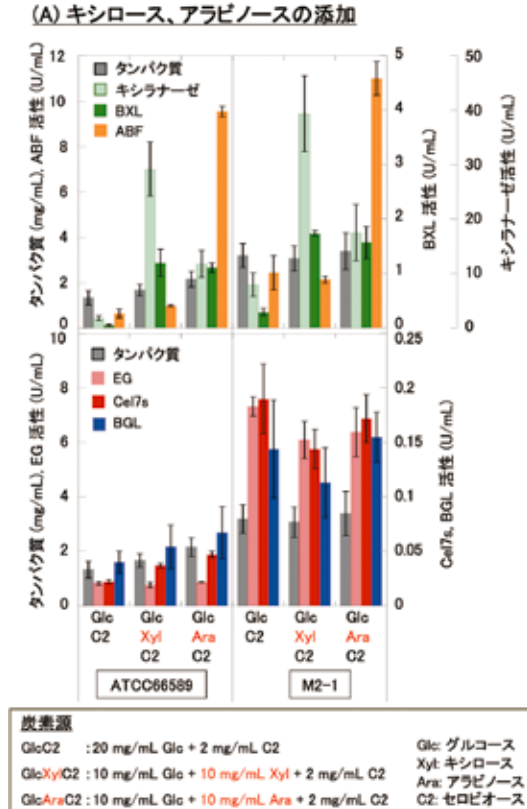


図6 種々の炭素源でのバッチ培養における生産酵素活性

グルコース培地での前培養液 100ml を、各炭素源を含む培地 1.1L (2L-fermenter) に添加し、28℃、300rpm、pH 4.0-4.2、通気量 1vvm で 4 日間培養

(A) グルコース、セロビオースへのキシロース、アラビノース添加

(B) 澱粉系原料の使用、(C) ショ糖の使用、

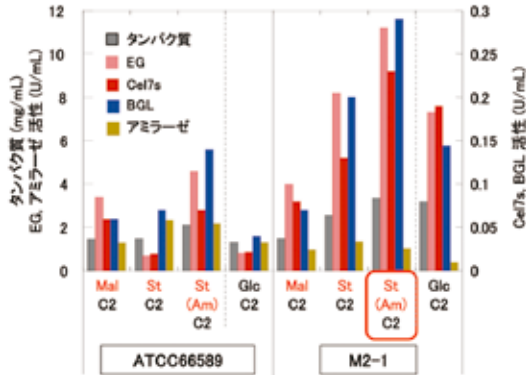
菌株: *Trichoderma reesei* ATCC66589 及び M2-1

Cel7s: セロビオヒドロラーゼ I + エンドグルカナーゼ I, EG: エンドグルカナーゼ, BGL: β -グルコシダーゼ, BXL: β -キシロシダーゼ, ABF: α -L-アラビノフラノシダーゼ

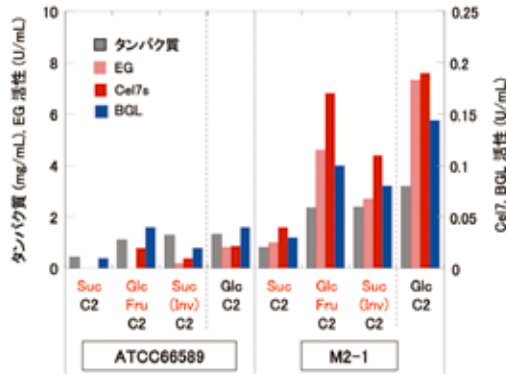
4.4. 可溶性糖源連続フィード培養による効率的セルラーゼ生産

先に述べたように、不溶性セルロース等を酵素生産原料とした場合、残存原料への吸着による生産酵素回収率の低下や最適生産条件の維持が困難などの問題が生じる可能性がある。そこで、グルコース存在下においてもセルラーゼを生産す

(B) 澱粉系原料



(C) ショ糖系原料



炭素源	
GlcC2	: 20 mg/mL Glc + 2 mg/mL C2
MalC2	: 20 mg/mL Mal + 2 mg/mL C2
StC2	: 20 mg/mL St + 2 mg/mL C2
St(Am)C2	: 20 mg/mL St(Am)* + 2 mg/mL C2 *アミラーゼで部分分解した可溶性澱粉
SucC2	: 20 mg/mL Suc + 2 mg/mL C2
GlcFruC2	: 10 mg/mL Glc + 10 mg/mL Fru + 2 mg/mL C2
Suc(Inv)C2	: 20 mg/mL Suc(Inv)* + 2 mg/mL C2 *インベルターゼで分解したショ糖

Glc: グルコース	Mal: マルトース
St: 可溶性澱粉	Fru: フルクトース
Suc: スクロース	C2: セロピオース

図6 種々の炭素源でのバッチ培養における生産酵素活性 (つづき)

る *T. reesei* 変異株を用いて、可溶性炭素源を用いた酵素生産系の構築を試みた。主要炭素源としてグルコース、誘導物質としてセロピオースを用い、原料供給様式を検討したところ、上記2種糖質を連続的に添加しつつ培養(連続フィード培

養)を行うことで、安定的かつ効率的な酵素生産が可能となった¹¹⁾。本培養に使用した装置等の写真を図7に示す。原料糖質の混合液を重量管理用天秤にセットし、ポンプを用いて一定速度で培養槽内に添加していく。図8に、*T. reesei* M2-1株を生産菌株としたセルロースバッチ培養及びグルコースを主要炭素源と



図7 連続フィード培養装置

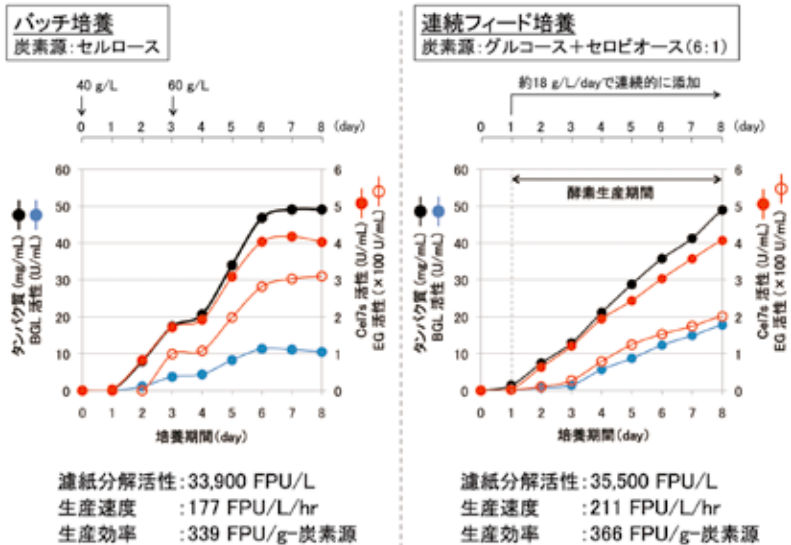


図8 バッチ培養及び連続フィード培養によるセルロース分解酵素生産

(左) セルロースでのバッチ培養。セルロースは2回に分けて添加

(右) グルコース、セロビオース混合液を用いた連続フィード培養

菌株: *Trichoderma reesei* M2-1株

Cel7s: セロビオヒドロラーゼI + エンドグルカナーゼI, EG: エンドグルカナーゼ, BGL: β -グルコシダーゼ

した連続フィード培養による酵素生産試験の結果について示す。連続フィード培養では、原料の連続供給開始（1日目）以降、培養液中のタンパク質濃度及びセルロース分解酵素活性が直線的に増加し、1週間の酵素生産期間で約50 g/Lのタンパク質及び35,500 FPU（濾紙分解活性単位）/Lのセルラーゼが生産された。この間のセルラーゼ生産速度及び投入炭素源あたりの生産効率は、それぞれ211 FPU/L/hr, 366 FPU/g 炭素源であり、セルロースバッチ培養での結果と比較して高い値であった。一方で、セルロースバッチ培養では、セルロース投入直後（3日目と4日目の間）や6日目以降のセルラーゼ活性増加が鈍いなど、生産速度が不安定であった。この原因としては、基質投入ストレスによる生産速度の一時的な低下、基質への酵素吸着、基質分解速度低下による炭素源や誘導物質濃度の低下などが挙げられる。可溶性炭素源を用いた連続フィード培養では、これらのような酵素生産速度の低下要因が軽減されるため、直線的な活性増加、即ち安定した酵素生産速度が得られたものと考えられる。また、可溶性物質を供給原料とすることで、培養の連続化、原料の滅菌工程簡略化、培養条件の維持制御が容易になる等のメリットが考えられる。

図8に例示したように、*T. reesei* 変異株 (M2-1) の連続フィード培養において、グルコースを酵素生産の主要原料としながらも、セルロースバッチ培養以上の効率で、かつ安定したセルラーゼ生産が達成された。供給量や培養条件などに多少左右されるものの、連続フィード培養系で、タンパク質濃度90 g/L程度（所要期間2週間程度）までは安定した生産性を示すことを確認している。炭素源供給量などの諸条件の最適化による生産効率や生産速度の更なる向上が今後の課題である。

4.5. 可溶性糖源連続フィード培養による糖化酵素組成改変技術

バイオマス原料の種類や前処理法により、効率的な糖化反応に必要な酵素群は異なってくる。例えば、CaCCO法（本書「国産草本系原料を用いた4種類のバイオエタノール製造プロセス開発」, p. 21 参照）のような希アルカリ処理バイオマスなどでは、ヘミセルロースも前処理物に多く残存する一方で、希硫酸処理バイオマスなどでは、固形分中の糖質の大部分がセルロースとなる。酵素糖化効率向上のためには、バイオマス基質の構造や変換プロセスの特徴に応じて酵素のラインアップを調整し、不要な酵素の生産を抑制するとともに、酵素カクテルとして組成を最適化する必要がある。従って、バイオマス糖化酵素の培養生産において、効率的生産（即ち「量」）と同時に、原料特性に応じた酵素組成（即ち「質」）の制御も重要となる。そこで、異なる原料・前処理法に応じた糖化酵素を効率的に生産するため、生産酵素組成の改変・調節システムを構築した。このシステムは、グルコース等の可溶性糖質混合液を酵素生産原料とした連続フィード培養法による酵素生産系であり、糖質混合液の組成と供給量等の添加様式を調節するこ

とで生産酵素群(酵素カクテル)の組成を制御することが可能となる¹³⁾。例えば、グルコース+セロビオース(A)、グルコース+キシロース+セロビオース(B)、グルコース+キシロース+アラビノース+セロビオース(C)の3種類の糖質混合液を用い、各々を連続供給しつつ、変異株 M2-1 を培養した場合、セルロース分解酵素活性はほぼ同等となる一方で、キシロースやアラビノースを含む混合液(B)や(C)で生産された酵素カクテルのヘミセルロース分解活性は、混合液(A)と比較して2倍以上高く、特に混合液(C)ではABF活性が5倍以上高かった(図9)。また、図10に示すように、混合液(A)及び(B)を用いて、キシロースの添加期間を変えて連続フィード培養を行うことで、最終生産酵素液中のキシラナーゼ及びBXL活性の量を調節することができた。高いヘミセルロース分解酵素活性を含むセルラーゼ製剤は、水酸化カルシウム前処理稲わらの糖化反応において、高い単糖遊離活性を有したことから(図11)、ヘミセルロースを多く含むバイオマス基質の糖化に有用であると考えられる。以上のように、グルコース、セロビオースを基本とし、キシロースやアラビノースの供給量を適切にコン

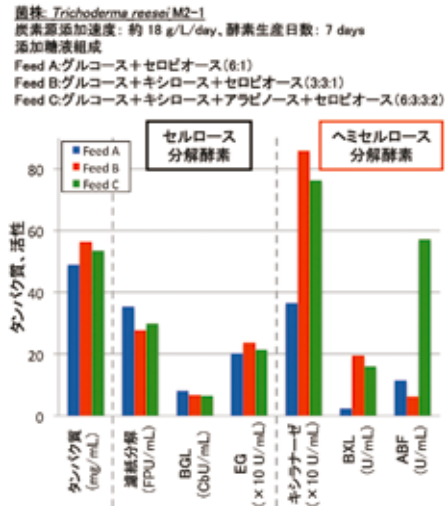


図9 3種の糖質混合液を用いた連続フィード培養により生産された酵素活性

EG: エンドグルカナーゼ, BGL: β -グルコシダーゼ, BXL: β -キシロシダーゼ, ABF: α -L-アラビノフラノシダーゼ

Feed BやFeed Cの条件で生産された酵素液中のセルロース分解酵素活性はFeed Aとほぼ同等であるのに対し、ヘミセルロース分解酵素活性はFeed Aのものよりも高い。

菌株: *Trichoderma reesei* M2-1

炭素源添加速度: 約 15 g/L/day、酵素生産日数: 7 days

添加様式 (A): グルコース+セロビオース (6:1)

(B): グルコース+セロビオース (6:1) → グルコース+キシロース+セロビオース (3:3:1)

(C): グルコース+キシロース+セロビオース (3:3:1)

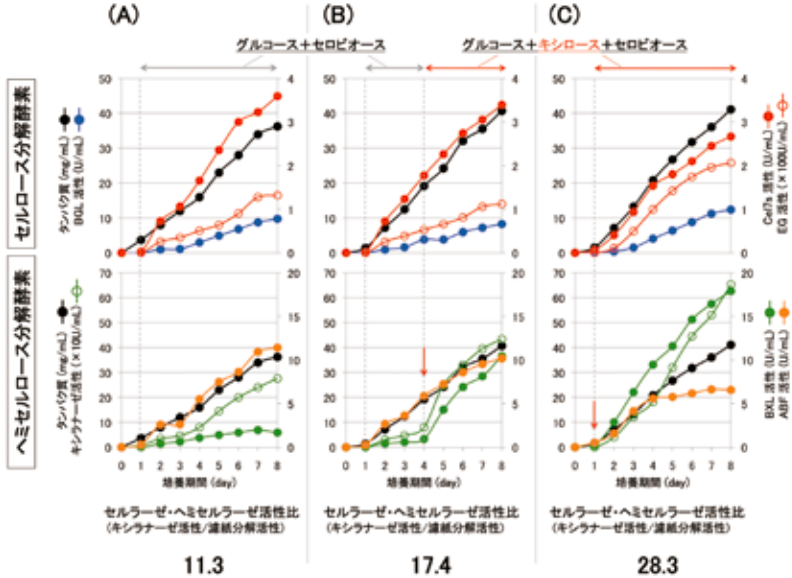


図 10 ヘミセルラーゼ活性量を調節したセルラーゼ生産

Cel7s: セロビオヒドロラーゼ I + エンドグルカナーゼ I, EG: エンドグルカナーゼ, BGL: β -グルコシダーゼ, BXL: β -キシロシダーゼ, ABF: α -L-アラビノフラノシダーゼ

供給糖液にキシロースが加わると (↓) キシラナーゼ及び BXL 活性の生産速度が増大。キシロース供給期間を調節することで、最終産物中のキシラン分解酵素活性量の調節が可能。

水酸化カルシウム処理稲わら

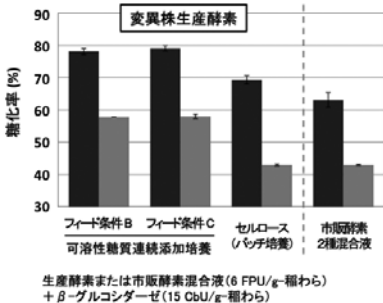


図 11 各生産酵素のアルカリ前処理原料に対する糖化試験

オンサイト酵素 (図9の Feed B 及び Feed C, 図8のセルロースバッチ培養) または市販酵素混合液 (セルラーゼ製剤+グルカナーゼ・ヘミセルラーゼ製剤) を用いて, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理稲わらを糖化 (50°C, 24 時間)。

■: グルカン糖化率, ■: キシラン糖化率。

生産酵素または市販酵素混合液 (6 FPU/g-稲わら) + β -グルコシダーゼ (15 CbU/g-稲わら)

トロールしながら *T. reesei* 変異株を培養することで、高いセルラーゼ生産性を維持しつつ、ヘミセルラーゼ活性量の異なる種々の酵素カクテルを生産することが可能となった (表5)。

これまでに構築した酵素生産プロセスである「可溶性炭素源連続フィード培養法」の概略を図12に示す。本プロセスは、*T. reesei* グルコース抑制解除株を用いて、グルコース等の可溶性糖質混合液を連続的に添加しつつ酵素生産培養を行

表5 可溶性炭素源連続フィード培養により生産した酵素の活性組成比較
(*Trichoderma reesei* M2-1 株；濾紙分解活性10単位あたり)

炭素源 ^{*1} 、添加量 (g/L/day)	生産 日数	濾紙分解 (FPU)	BGL ^{*3} (CbU)	EG ^{*3} (U)	キシラナーゼ (U)	BXL ^{*3} (U)	ABF ^{*3} (U)	
Cellulose	-	8	10	2.4	56	120	0.74	2.4
GC2	15	7	10	2.0	54	110	0.69	4.7
GC2	18	7	10	2.3	57	100	0.66	3.2
GC2→GXC2	15	7	10	1.7	45	170	4.2	4.1
GXC2	15	7	10	2.8	90	280	7.8	2.9
GXC2	18	7	10	2.4	86	310	7.0	2.3
GXAC2	18	7	10	2.2	72	260	5.4	19
糖化液 ^{*2}	7.3	5.5	10	1.4	95	190	7.5	18

^{*1} G: グルコース, X: キシロース, A: アラビノース, C2: セロビオース

(GC2) G:C2 = 6:1; (GXC2) G:X:C2 = 3:3:1; (GXAC2) G:X:A:C2 = 6:3:3:2

^{*2} 水酸化カルシウム処理稲わらをGXC2酵素で処理した糖化液上清(G:X:C2=10:5:1)

^{*3} EG: エンドグルカナーゼ, BGL: β -グルコシダーゼ, BXL: β -キシロシダーゼ,

ABF: α -L-アラビノフラノシダーゼ

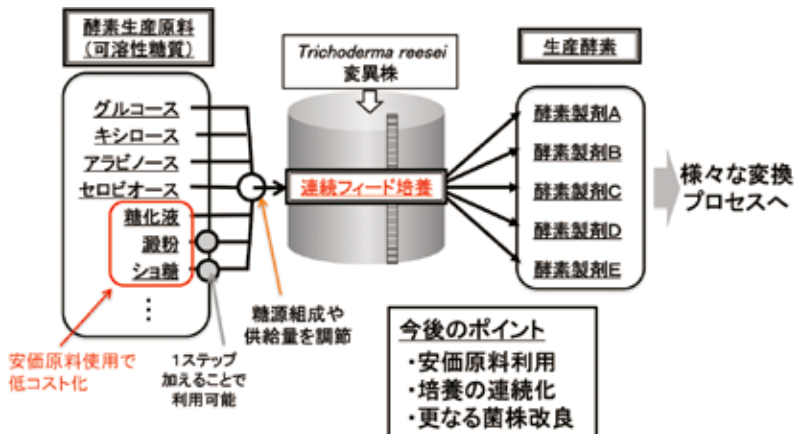


図12 可溶性炭素源連続フィード培養法による酵素生産概略

うものである。この際、供給糖源の組成や供給量を制御することで、生産酵素の組成を改変・調節することができるため、多様な原料や前処理法に応じた糖化酵素カクテルの生産が可能となる。酵素生産原料としては、セルロース系バイオマス糖化物の利用も可能と考えられる。夾雑成分が生産酵素の品質や生産量に及ぼす効果をより詳細に検証する必要があるものの、実際にアルカリ前処理稲わらの糖化液（図9Feed Bの条件で生産した酵素液を使用）の上清部を供給糖源とした場合でも、高効率での酵素生産が可能であることを確認している（未投稿、生産酵素組成は表5）。この時の投入炭素源あたりのセルラーゼ生産効率は、320 FPU/g-炭素源であり、セルロースバッチ培養での効率(335 FPU/g-炭素源)に匹敵した。さらに、変異株 M2-1 や M3-1 は、予め酵素分解を行うことで澱粉やショ糖なども使用可能であることが明らかとなっている(4.3参照)。セルロース系バイオマス糖化物や澱粉水解物等の低コスト・低純度の糖液を連続フィード培養の供給糖源として使用可能となれば、酵素生産原料コストの大幅な低減が期待できる。これと併せ、培養の連続化による生産コスト低減や、更なる菌株改良などによる高性能糖化酵素カクテルの高効率生産などが今後のポイントとなり、現在、研究開発を進めている。

5. おわりに

本稿では、糸状菌 *Trichoderma reesei* を用いたセルロース系バイオマス糖化酵素の生産技術開発について紹介してきた。セルロース系バイオマスからのエタノール製造に必要となる糖化酵素のコストを低減するため、糸状菌由来のセルラーゼを中心とした高機能型の酵素製剤が、世界中の企業により次々と製品化されてきている。これに対し、バイオエタノール製造プラント近くで酵素生産を行う、オンサイト酵素生産技術については、対応する原料に応じた酵素組成や、酵素の輸送・貯蔵などの点で、市販酵素と比較してメリットがあると考えられる。このような中で、我々は、*Trichoderma reesei* 変異株を用いた可溶性炭素源連続フィード培養による効率的酵素生産基盤技術を開発した。本技術は、可溶性原料の組成・添加量等の添加様式をコントロールすることで、高い酵素生産速度を維持しつつ、酵素組成の制御を行うものであり、多様な基質特性または変換プロセス特性に対応した酵素カクテルの組成制御が可能となる。また、本法による糖化酵素の長期連続生産が可能となれば、酵素生産設備費や運転に係るコスト等が低減し、酵素製造費用の大幅低減に繋がるものと期待される。さらに、可溶性原料として糖化液や澱粉水解物なども使用可能であることも確認しており、各地域で入手しやすい原料を用いるなど、地域特性に合わせた酵素生産様式にフレキシブルに対応が可能であるものと考えられる（図13）。現在、更なる生産性向上に向け変異株や培養技術の高度化を図ると共に、遺伝子発現やタンパク質発現の面から、効率的な酵素生産に繋がる情報の収集・整理を進めている。また、バイオ

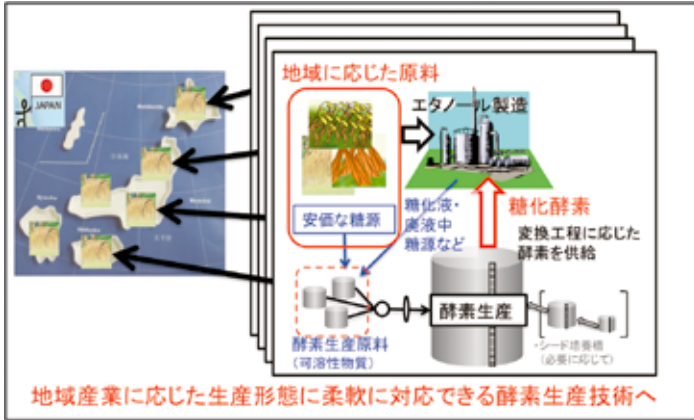


図 13 オンサイト酵素生産実用化のイメージ

エタノール製造の実用化に向け、酵素糖化に係るコストの低減が極めて重要な課題となっており、本稿で述べた酵素生産技術の効率化と併せて、糖化酵素の高機能化や使用酵素量の低減技術についても研究開発を進めていきたい。

尚、本研究は農林水産省委託研究プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」により実施されたものである。

(食品素材科学研究領域 糖質素材ユニット 池 正和)

参考文献等

- 1) Saha BC, Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 279-291 (2003)
- 2) Vaaje-Kolstad G et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* **330**, 219-222 (2010)
- 3) Merino ST and Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* **108**, 95-120 (2007)
- 4) Saloheimo M et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4202-4211 (2002)
- 5) Quinlan RJ et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 15079-15084 (2011)
- 6) 前原智子, 金子哲, ヘミセルロースの構造と分解酵素 - キシラン分解酵素

を例としたヘミセルロースの分解機構について - 応用糖質科学 **2**, 165-168 (2012)

- 7) Sørensen HR et al., A novel GH43 *a* -L-arabinofuranosidase from *Humicola insolens*: mode of action and synergy with GH51 *a* -L-arabinofuranosidases on wheat arabinoxylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 850-861 (2006)
- 8) Martinez D et al., Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*), *Nature Biotechnol.* **26**, 553-560 (2008)
- 9) <http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>
- 10) Kubicek CP et al., Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* **12**, R40 (2011)
- 11) Ike M. et al. Cellulase production on glucose-based media by the UV-irradiated mutants of *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 2059-2066 (2010)
- 12) 池正和ら, 様々な可溶性糖質を主要炭素源とした *Trichoderma reesei* セルラーゼ生産システムの構築, 日本応用糖質学会 応用糖質科学 **1**, 54 (2011)
- 13) Ike M. et al. Controlled preparation of cellulases with xylanolytic enzymes from *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) by continuous-feed cultivation using soluble sugars. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 161-166 (2013)

Ⅲ バイオエタノール生産用ストレス耐性酵母の 開発と特性評価

1. はじめに

近年、石油の枯渇や環境問題を解決するための代替エネルギーが注目されている。その中でガソリンの代替燃料として期待されているのがバイオエタノールである。バイオエタノールはバイオマス（植物由来原料）から作られるエタノールであり、燃焼しても植物が取り込んだ二酸化炭素を放出するだけで大気中の二酸化炭素を増やさないクリーンなエネルギーであると考えられている。バイオマスからのエタノール生産方法は多種多様であるが、まずバイオマスを破碎や分解（糖化）等の処理をすることで糖液を調製し、その後、微生物反応を利用して糖液からエタノールを生産することが基本の流れである。この微生物反応は酒造りにも利用されている発酵（エタノール発酵）と同じものである。エタノール発酵をする微生物には、酒類の製造で活躍する酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）やザイモナス菌（*Zymomonas mobilis*）の他に、コリネ型細菌（*Corynebacterium glutamicum*）等も知られている。しかしながら、細菌類はエタノール耐性が低い、ウイルスに弱い等の理由から、現在稼働している産業プラントのほとんどが発酵工程に酵母を利用している。また、バイオマスからのエタノール生産において、最大の課題は生産コストである。ガソリンの代替燃料として考えた場合、現状の生産コストではエタノールの価格はガソリン価格を上回ってしまうため、市場への普及は足踏み状態となっている。生産コストを下げるためには、バイオマスあたりのエタノール生産量を増やすこと、生産に必要なエネルギー消費量を減らすことなども重要となる。そこで筆者らは発酵工程の効率化・低コスト化を目的として、高効率にエタノールを生産できる酵母の開発を試みた。具体的には、エタノール生産性やストレス耐性に優れた酵母の検索と、育種による機能強化を行ったので、その概要について紹介する。

2. 酵母のエタノール発酵

バイオマスから得られる糖には、使用するバイオマスにより量や種類が異なるが、代表的なものとしてスクロース、グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノースなどがある。このうちセルロースや澱粉の主要構成成分であるグルコースが最も多く得られることから、グルコースの発酵が最も重要となる。エタノール発酵では1分子のグルコースから2分子のエタノールが生成する（図1A）。つまり理論的には100gのグルコースから51.1gのエタノールが生成する計算になる。ところが、実際には酵母の生育等にも5%程度が利用されるため、エタノールの対糖収率は良くても95%程度だと考えられている。

つまり、目標とする酵母の性能は、発酵工程において対糖収率 95%以上を示すことである。

稲わらや廃木材等をバイオマスとして利用する場合、グルコースに次いで多く得られる糖はキシロースやアラビノースなどの五炭糖である。これら五炭糖をエタノール発酵することで、エタノール収量の増加が期待される。特にキシロースは稲わらにおいてはグルコースの半分程度の量が含まれていることから、キシロースからのエタノール生産は非常に重要である。キシロースからエタノールを生成する場合、3分子のキシロースから5分子のエタノールが生成する（図1B）。キシロースもグルコースと同様に理論的には100gのキシロースから51.1gのエタノールが生成する。グルコースは*S. cerevisiae*をはじめとして、多くの種の酵母が発酵できるのに対し、キシロースを発酵できる酵母は、ごく限られた種のみである。キシロースを発酵できる代表的な種として、*Scheffersomyces stipitis*（以前は*Pichia stipitis*）、*Candida shehatae*、*Pachysolen tannophilus*などが知られているが、*S. cerevisiae*はキシロースを発酵できない。キシロースの発酵における特徴は、ほとんどのキシロース発酵性酵母において、キシロースの発酵に微量の酸素を必要とすることである。キシロースを発酵する際、溶液中の酸素が不足するとエタノールではなくキシリトールを生成し、逆に酸素が過剰にある場合、水と二酸化炭素にまで完全に分解される。この溶液中溶存酸素量の制御の難しさが、キシロースの発酵制御を非常に困難にしている。現状では、キシロースの発酵効率は80%程度であり、稲わら由来糖液を効率良く発酵ができればエタノールの収量はグルコースだけを発酵した場合に比べ1.3倍程度になる。

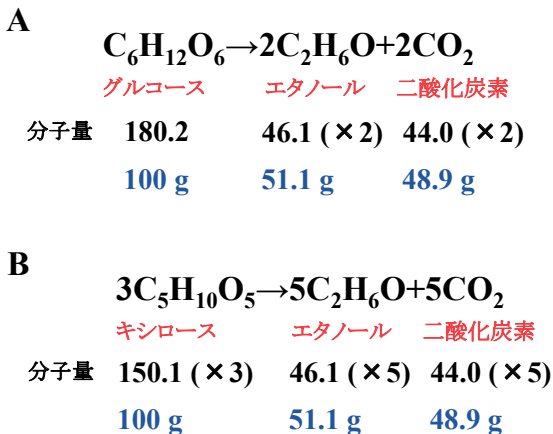


図1 エタノール発酵の化学式

A, グルコースのエタノール発酵； B, キシロースのエタノール発酵

3. バイオエタノール生産工程における環境ストレス

酵母にとってバイオエタノール生産工程は非常に過酷な環境である。例えば、発酵の進行に伴って発生する発酵熱は発酵槽の温度上昇を引き起こし、酵母に高温ストレスを与える。このようなストレスを受けたときに酵母は多かれ少なかれ適応する能力を有しているが、適応限度を超えたストレス下では生命活動の制限を余儀なくされる。ストレス耐性が高い酵母は適応能力が高いと考えられることから、ストレス耐性酵母を利用することがエタノール生産効率の向上に繋がると期待される。バイオマス由来の糖液には多くの場合、酵母の発酵を阻害する物質が含まれている。発酵阻害物質はバイオマスの糖化処理やその前段階に行われる前処理（脱リグニン等）で主に生成する。特に酸や加熱等の処理は、バイオマスに含まれる澱粉やセルロース、ヘミセルロース由来の糖を過分解し、フラン化合物（フルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール等）を生成する（図2）。他にもリグニンに由来するフェノール性化合物（バニリン、グアヤコール、4-ヒドロキシベンズアルデヒド等）や弱酸（酢酸、蟻酸等）等が生成する場合もある。これらの物質は酵母にストレスを与え、生育を阻害するだけでなくエタノール発酵も阻害するため、エタノール変換効率の低下を引き起こす大きな原因となる。また、前処理や糖化処理で使用された酸やアルカリの中和で生成する高濃度の塩、および糖化で生成した高濃度の糖は、その高い浸透圧によって細胞を脱水す

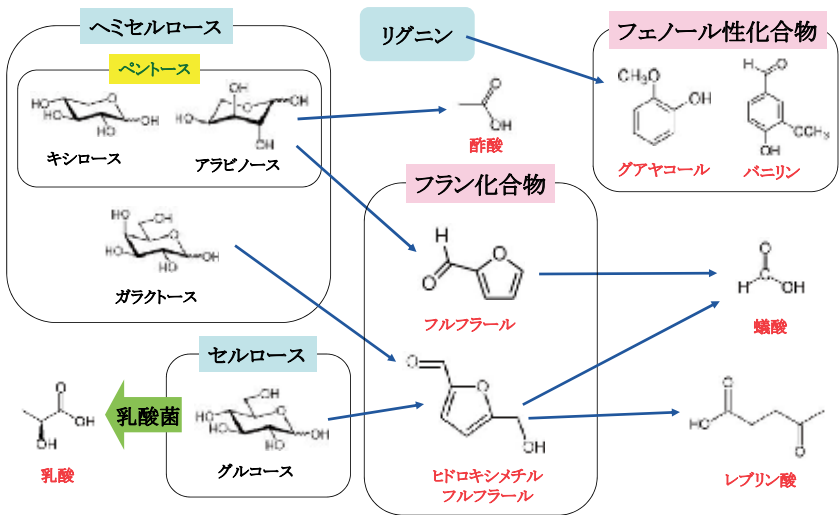


図2 バイオマスの前処理等で生成する発酵阻害物質

バイオマスを酸や熱で処理した時に生成する発酵を阻害する物質を赤字で示した。

るため、酵母にとって過酷なストレスとなる。さらに発酵生成物であるエタノールそのものも濃度が高くなると酵母にはストレスとなる。特に前述のキシロース発酵性酵母はエタノール耐性が低いため、自身の発酵産物であるエタノールにより生育が阻害され、高濃度のエタノールを生産することができないと考えられている。その他にも、糖液が乳酸菌等の細菌により汚染された場合には、糖の減少によりエタノール生産効率が低下するだけでなく、細菌の生産する乳酸等がストレスとなり、酵母の生育を阻害する。このように、バイオエタノール生産工程には様々な環境ストレスが存在し、発酵を阻害する要因となっている。また、使用するバイオマスや糖化方法により生成する発酵阻害物質の種類やその生成量が異なる。そのため、産業製造の場においてはそれぞれのストレス条件、糖液に適合した酵母を使ってエタノールを生産することが必要となる。

4. バイオエタノール生産用酵母の開発

4.1 環境ストレス耐性酵母の探索

バイオエタノール生産用のバイオマスは種類が多く、糖やエタノールへの変換技術もまた多岐にわたるため、糖液の種類に応じて様々なレベルのストレスが生じることが想定される。そこで我々は様々な糖液の発酵に対応できるように、想定されるストレスに高度に耐性を有する酵母の探索を行った。ストレスの種類としては、エタノール、高温、高浸透圧（高塩濃度、高糖濃度）、酸（乳酸、酢酸、硫酸）、アルカリ、フラン化合物（フルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール）、フェノール性化合物（バニリン）について試験を行った。また、エタノール生産において重要な形質である酵母のエタノール生産性についても調べた。ストレス耐性試験では、ストレス条件下での生育（増殖）をストレス耐性の指標とし、試験に供した株すべてについて段階的にストレスを与え、ストレス耐性を評価した。ストレス耐性試験に先立ち、花や果実、土壌、朽ち木、水などを分離源として酵母を採取した。研究室保存株および自然界からの新規分離株、併せて約1,700株の酵母を対象にストレス耐性を試験した結果、それぞれのストレスに対して高度に耐性を有する株を見出すことができた。表1に高度ストレス耐性株のストレス耐性をまとめた。高いストレス耐性を示した株については、それぞれ種の同定も行った。高いエタノール生産性を示した株には *S. cerevisiae* に属する酵母が多かったが、高度なストレス耐性を示す株のほとんどは *S. cerevisiae* 以外の酵母であった。ストレス耐性株の中には発酵阻害物質3種（フルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール、バニリン）に耐性を持つ株や、酸と高温、塩と高温など複数のストレスに耐性を持つ株もみられた。しかしながら、高度なストレス耐性とエタノール生産性を併せ持つ株はごく僅かであった。そこで高いエタノール生産性を示す株の中から、比較的ストレス耐性の高い株に着目した。*S. cerevisiae* に属する株の中には、産業利用経験のある株 (*S. cerevisiae*

表1 発酵阻害因子に対して耐性を有する酵母の検索

化合物・処理	濃度・温度	耐性株数
酢酸	1.2 % (v/v)	2
乳酸	9 % (v/v)	1
硫酸	40 mM pH1.65	2
硫酸ナトリウム	5 % (w/v) pH1.5	3
塩化ナトリウム	20 % (w/v)	1
水酸化ナトリウム	126 mM pH12.0	3
フルフラール	60 mM	3
5-ヒドロキシメチルフルフラール	60 mM	9
バニリン	40 mM	3
エタノール	15 % (v/v)	8
高温	48 ℃	3
凝集性		84
エタノール生産性	95 %	31

NBRC 0224 株) よりもストレス耐性能が高い株も見出すことができた。後述する *S. cerevisiae* NBRC 1950 株はバニリンに対する耐性が非常に高い株であった。また、これまでに産業利用経験のない酵母株の中にも次節で紹介する *Candida glabrata* のように有用な酵母があることが確認できた。

4.2 ストレス耐性酵母の発酵試験

1) 乳酸耐性株

評価を行った酵母株のうち、*C. glabrata* NFRI 3164 株は乳酸耐性や高温耐性に優れ、かつ高いエタノール生産性を示すことから、エタノール生産に有用であると考えられた。NFRI 3164 株の乳酸耐性を活用すれば、乳酸で雑菌の増殖を抑制しつつ、エタノール発酵をすることが可能になると期待された。従来、雑菌汚染を防ぐ方法として糖液に抗生物質の添加が行われてきたが、発酵・蒸留後の残渣を家畜の飼料として用いた場合、家畜に健康被害が生じることが報告されている¹⁾。また、抗生物質の多用は環境中に抗生物質の効かない耐性菌を生み出す危険性もある。これに対し、乳酸は乳酸菌などが作る酸の一種で自然界にも大量に存在し、環境中で容易に分解されるため、たとえ排水などに含まれていても環境に影響の少ない物質である。合成培地を使用した試験では、培地中に終濃度2% (v/v) の乳酸を添加することにより、汚染報告のある乳酸菌等の細菌はほとんど増殖できないことが確認できた。一方、NFRI 3164 株は上記乳酸添加条件においても高効率でエタノールを生産することができた²⁾。酵母と乳酸菌を同時に

接種して培養すると、エタノール生産量は著しく低下する（図3A）。しかしながら終濃度2%（v/v）の乳酸を加えることで乳酸菌による生産阻害は抑えられ、さらに、*S. cerevisiae* NBRC 0224株では発酵が大きく遅延したのに対し、NFRI 3164株では遅延はわずかであった（図3B）。

2) 酢酸耐性株

製糖副産物である糖蜜からのエタノール製造工程では、*Bacillus*属細菌等による汚染が問題となっている。そこで酢酸添加による雑菌汚染防除を検討した。その結果、酢酸耐性を有する*Schizosaccharomyces pombe* NFRI 3807株は、酢酸を添加した糖蜜からのエタノール製造に適していることが明らかとなった³⁾。NFRI 3807株は1%（v/v）酢酸を含む糖蜜培地でもエタノールを生産することが可能であった（図4）。0.7%（v/v）の酢酸を添加した条件でNFRI 3807株を用いて発酵を行った結果、*Bacillus*属細菌の増殖が抑えられ、エタノールを効率良く生産することができた。

3) 高糖・高温耐性株

エタノール製造の最終段階では、発酵後のもろみ（エタノールを含む発酵液）から蒸留等によりエタノールを精製する。このときもろみのエタノール濃度が高

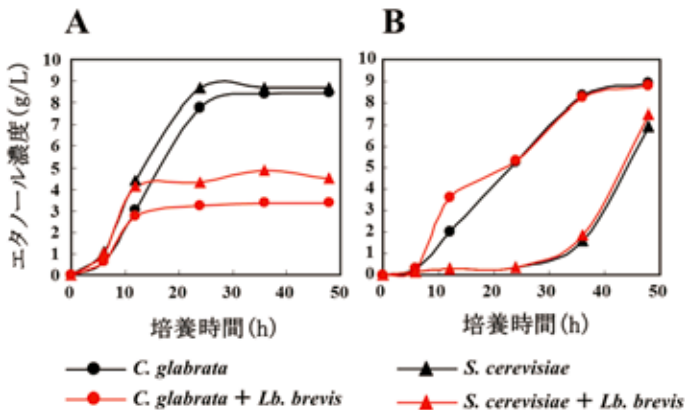


図3 *C. glabrata* NFRI 3164株のエタノール生産に与える乳酸菌および乳酸添加の影響評価

モデル混入雑菌として乳酸菌 (*Lactobacillus brevis*) を使用した。乳酸菌の存在下および非存在下における乳酸無添加 (A) および2% (v/v) 乳酸添加 (B) 培地でのエタノール生産を調べた。比較対照株として *S. cerevisiae* NBRC 0224株も同時に調べた。

いほど精製の効率が良くなることから、産業製造ではより高濃度の糖液を効率良くエタノール発酵することが重要である。澱粉質バイオマスや糖蜜等からは比較的高い濃度の糖液が得られやすく、高糖濃度液を発酵できる高糖濃度耐性株が必要となる。保存株の中で高糖濃度耐性かつ高エタノール生産性を示す3株(すべて *S. cerevisiae*) について、馬鈴薯を用いた超高密度での同時糖化発酵 (VHG-SSF) 試験を行い、高温条件下でも高い発酵能を示す *S. cerevisiae* NFRI 3225 株を選抜した (図5)。NFRI 3225 株の各種基質 (馬鈴薯, 甘藷, 甜菜, 易分解性糖質稲わら) を用いた発酵試験の結果, 投入した糖量 (六炭糖ベース) に対するエタノール収率は 90 ~ 95 % であり, 消費糖量に対するエタノール収率は 92 ~ 96% であった⁴⁾。NFRI 3225 株が糖質・澱粉質バイオマスからのエタノール生産に非常に有用であることが明らかとなった。

4.3 育種による機能強化

1) 凝集性変異株の分離

エタノール発酵工程において、酵母の再利用はコスト削減に大きく貢献する。糖蜜のように固形分をほとんど含んでいない液体を発酵する場合、酵母の再利用を目的として凝集性酵母が使用されている。凝集性酵母は発酵中には拡散している状態だが、発酵終了時には酵母同士が結合して塊を形成 (凝集) する特性を有する。通常、酵母を回収するためには、遠心分離機を用いて酵母を沈めることで

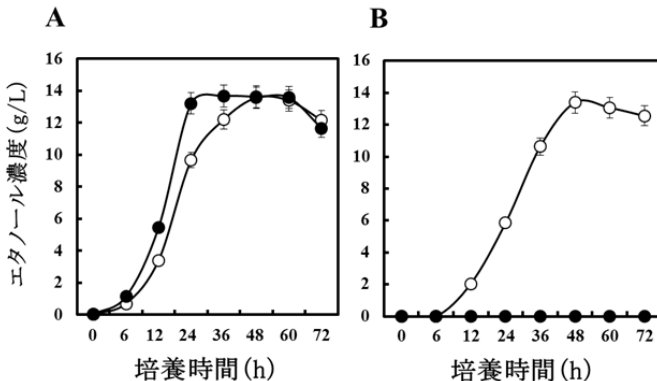


図4 *S. pombe* NFRI 3807 株のエタノール生産に与える酢酸添加の影響評価

酢酸無添加 (A) および 1% (v/v) 酢酸添加 (B) 培地でのエタノール生産を調べた。*S. pombe* NFRI 3807 株 (○), および比較対照株として *S. cerevisiae* NBRC 0224 株 (●) について発酵試験を行った。

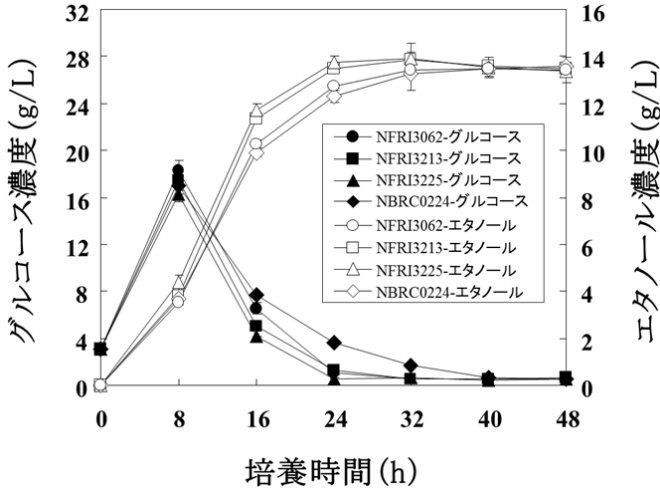


図5 馬鈴薯を用いた同時糖化発酵試験におけるエタノールおよびグルコース濃度の経時変化

粘性除去・液化処理後の茹でて潰した馬鈴薯の可溶性デンプン量をグルコース換算で30%に調整した後、糖化酵素および酵母を添加し、37℃で振とう培養を行った。酵母は高糖・高温耐性選抜株 (NFRI 3062 株, NFRI 3213 株, NFRI 3225 株) と比較対照株 (NBRC 0224 株) を用いた。

酵母ともろみを分離する。一方、凝集性酵母は発酵終了後、静置しておくだけで菌体は速やかに凝集・沈降するため、遠心分離を行う必要がない。そこで、糖蜜や糖化後の液体のみの発酵に利用することを想定した、*C. glabrata* NFRI 3165 株 (NFRI 3164 株とほぼ同等の発酵能を有する株) の凝集性変異株の分離を行った。変異は自然突然変異を利用し、合成培地で培養後、すばやく菌体が沈降する画分を分取し、再培養を行った。この操作を繰り返すことにより、強い凝集性を示す凝集性変異株を取得した⁵⁾。凝集性変異株の凝集性は二価の陽イオンに依存すること、ガラクトースで阻害されることが明らかとなった。また、高温条件下や pH3.5 でも凝集能を有することから、バイオエタノール製造においても有用な株であると考えられた (図6)。

2) 呼吸欠損変異株の分離

セルロースや澱粉を含むバイオマスからのエタノール生産においては、酵素による糖化と発酵を同時に行う同時糖化発酵 (SSF) が時間効率や糖化効率の良い発酵法である。SSF における糖化は糸状菌由来の酵素 (セルラーゼなど) が利用

されることが多く、酵素の至適温度は比較的高温（50～60℃）である。バイオマスの糖化反応において糖化効率を上げるためには、酵素反応に適した温度と攪拌が重要である。しかし、強い攪拌を行うと糖液の溶存酸素濃度が上昇し、酵母が呼吸（好気呼吸）によりエタノールを消費するため、エタノール収量の低下が生じる。そこで効率的な同時糖化発酵プロセスの構築に向けて、NFRI 3164 株の変異育種による機能強化を試みた。NFRI 3164 株を紫外線に変異処理し、呼吸をできなくした呼吸欠損変異株を分離した⁶⁾。呼吸欠損変異株は、高攪拌条件でもエタノール収率の低下はほとんど観察されなかった。さらに、親株（NFRI 3164 株）と同等の高温耐性も有しているため、42℃での同時糖化発酵が可能で

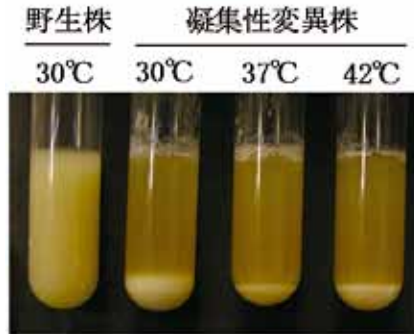


図6 凝集性変異株の凝集性における温度の影響

野生株および凝集性変異株を30～42℃で培養した。培養終了後、激しく攪拌し、60秒間静置した。

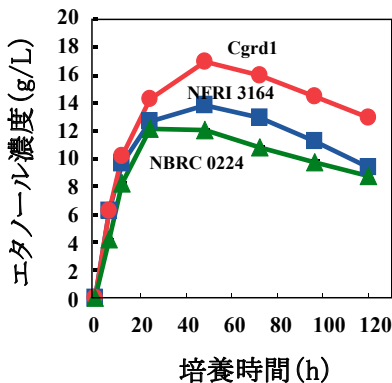


図7 高温条件下（42℃）でのアビセルの同時糖化発酵試験におけるエタノール濃度の推移

アビセル、セルラーゼおよび酵母の混合液を42℃、150 rpmで反応させ、エタノール濃度を経時的に測定した。酵母は呼吸欠損変異株（Cgrd1）およびその親株（*C. glabrata* NFRI 3164 株）、比較対照株（*S. cerevisiae* NBRC 0224 株）を使用した。

あった (図 7)。高温耐性呼吸欠損酵母は、SSF に最適であることが示唆された。

3) 複合的ストレス耐性酵母の育種

比較的ストレス耐性の高い *S. cerevisiae* 株については、遺伝資源として活用し、複合的な環境ストレス耐性を有する株の構築に取り組んでいる。遺伝資源を用いた育種は、基本的に遺伝子組換えを行わず、古典的な育種手法を用いている。具体的には、胞子形成する株については接合による交配 (交雑) を行い、胞子形成しない株については細胞融合により有用形質の付与を行っている。これまでに高温・エタノール耐性株や高温・発酵阻害物質耐性株、高温・酢酸耐性株などの作成に成功している。

4.4 五炭糖発酵性酵母の育種と新規酵母探索

1) 五炭糖発酵性酵母の変異育種

五炭糖発酵性酵母の多くはストレス耐性が低いため、実用レベルに達する株はほとんどない現状である。特にエタノール耐性や高温耐性が低いため、五炭糖発酵性酵母を使用して高濃度の基質を発酵 (高濃度のエタノールを生産) することは非常に困難である。そこで既存株のエタノール耐性の強化を試みた。*S. stipitis* NBRC 1687 株を紫外線 (UV) 照射による変異処理の後、エタノールを含む寒天培地に塗布し、生育の良いコロニーを選抜した。得られた変異株のエタノール耐性は親株とほぼ同等であったが、キシロース発酵速度が向上した変異株が取得できた⁷⁾。また、5%キシロースを含む培地での発酵試験の結果、変異株のエタノール収率は親株よりも優れていた。今回試行した UV 変異とエタノールを用いた選抜による育種は、キシロース発酵能を向上させることに有効である可能性がある。

2) 新規五炭糖発酵性酵母の分離

稲わら糖化液にはグルコースやキシロースの他にやや含有量は少ないものの、アラビノースも含まれている。アラビノースを発酵できる酵母は非常に少なく、*Candida arabinofermentans* に代表されが、そのエタノールの生産量は非常に少ない。そこでアラビノース発酵能の高い酵母を分離するため、自然界から分離した 36 株のキシロース発酵性酵母についてアラビノース発酵試験を行った。その結果、3 株がアラビノース発酵能を有していた。特につくば市のブルーベリー畑から分離した NY7122 株は発酵能が高く、また比較的高い高温耐性を有していた。種の同定を行った結果、NY7122 株は *Candida subhashii* に非常に近い種であると推測されたが、糖の発酵性がやや異なっている⁸⁾。NY7122 株は仮性菌糸を形成することも明らかとなった (図 8)。NY7122 株はキシロースおよびアラビノースからエタノールを生産できるが、特にアラビノースに関してはこれまでに報告されているどの酵母よりも高いエタノール生産性を示した (図 9)。今後、変異育種等により実用レベルにまで機能強化を図る予定である。

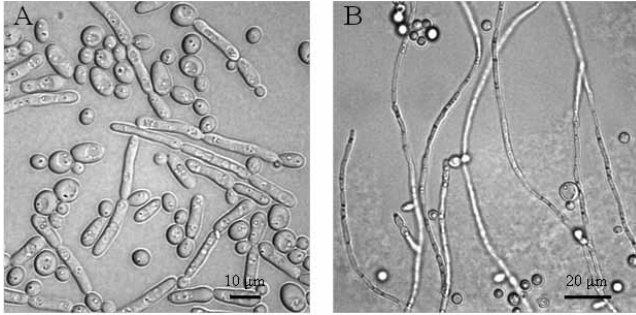


図8 NY7122 株の顕微鏡像

A, 栄養増殖細胞； B, コーンミールアガー上での仮性菌糸形成

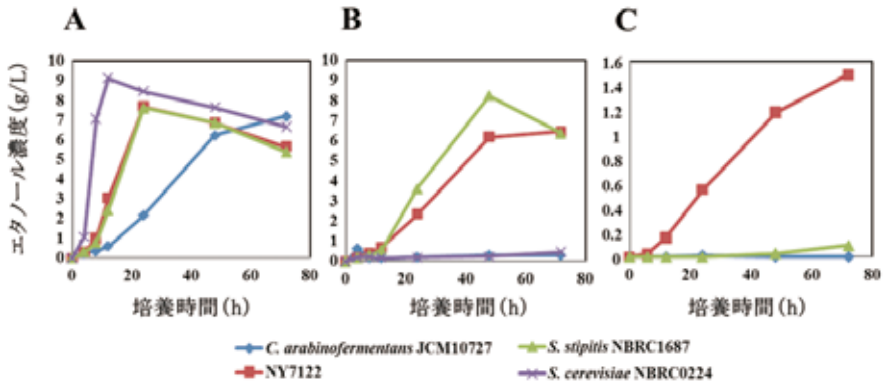


図9 NY7122 株および五炭糖発酵性酵母のエタノール生産性評価

S. cerevisiae NBRC 0224 株 (比較対照株), *C. arabinof fermentans* JCM 10727 株, *S. stipitis* NBRC 1687 株, NY7122 株について, グルコース (A), キシロース (B), アラビノース (C), それぞれ 2% からのエタノール生産を測定した。

4.5 固定化酵母の利用

4. 3 に記述のとおり, 糖蜜や糖化後の液体のみを発酵する場合は, 凝集性酵母等を利用することで比較的容易に酵母の再利用が可能である。一方, 稲わらのSSFの場合, もろみに固形分が多量にあるため, 発酵後に酵母と固形分を分けて回収することは非常に困難である。そこで稲わらのSSFにおいて酵母を回収・再利用するために, 酵母を水に不溶性の高分子カプセル中に包み込んで (固定化して) 利用することを検討した。稲わらのSSFでは, 特に発酵の初期に溶

液の粘度が非常に高いため、強い攪拌が必要になり、投入した担体にも強い負荷がかかることになる。固定化酵母作製では頻繁に利用されているアルギン酸ナトリウムで酵母を固定化したところ、担体の強度不足のために発酵中の攪拌で粉砕し、回収が不可能であった。そこで高強度の担体を作製するために、関西ペイント（株）が開発した光硬化性樹脂で酵母を固定化し、稲わらのSSF試験に供した（図10）。その結果、担体の破損も見られず、また直径2mm程度の穴のあいた網を用いることで担体（直径3mm程度）ともろみを容易に分離でき（稲わらは微粉砕したものを使用）、担体を回収することができた。この固定化酵母担体を利用して稲わらの繰り返し回分SSF試験を行ったところ、各回分とも安定してエタノールを生産することができ、繰り返し利用できることが確認できた（図11）。稲わらのSSFにおいては、固定化酵母が酵母再利用とエタノール安定生産に有用であることが明らかとなった⁹⁾。

4.6 耐性機構の解明

酵母のストレス耐性については様々なストレスで研究が行われ、そのメカニズムが解明されつつあるが、依然として不明な部分も多い。耐性のメカニズムに関する知見は、耐性株の育種や産業利用等の高度化に非常に重要である。酵母はストレスを受けたとき、生理レベルや代謝レベル等において適応を図る。これらの適応には遺伝子発現の変化を伴う場合も多々あり、発現の変化する遺伝子の中にはストレス耐性に重要な遺伝子も含まれている。そこで、セルフクローニング等によるストレス耐性酵母の分子育種に先駆け、ストレス耐性に関与する遺伝子の情報を収集した。実験ツールとして *S. cerevisiae* 遺伝子破壊株コレクション（非必須遺伝子を1つ破壊した約4,700株）を用い、破壊されるとストレス感受



図10 光硬化性樹脂で作成した固定化酵母担体

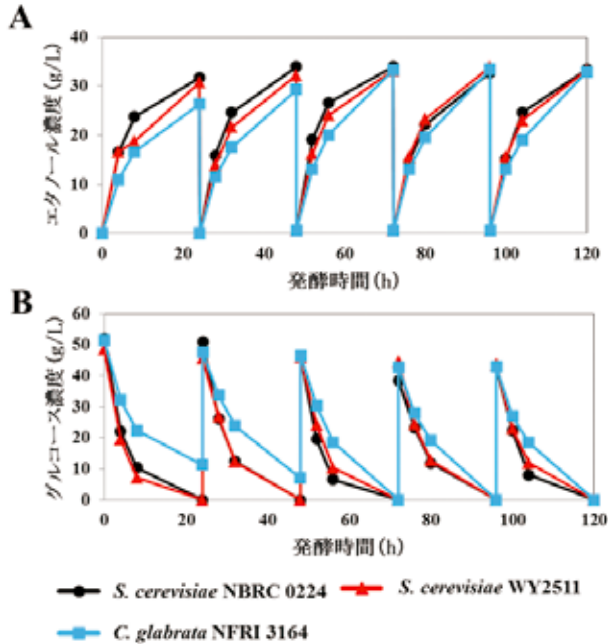


図 11 固定化酵母を利用した稲わらの繰り返し回分同時糖化発酵

3 種の酵母 (*S. cerevisiae* NBRC 0224 株, *S. cerevisiae* WY2511 株, *C. glabrata* NFRI 3164 株) を光硬化性樹脂を用いて固定化し, 20% 稲わらの同時糖化発酵を 30℃ で行い, エタノール濃度 (A) およびグルコース濃度 (B) を測定した。発酵 24 時間後に担体を回収し, 次の発酵に再利用した。

性になる遺伝子を網羅的に解析した。バニリンに感受性を示す遺伝子破壊株を検索した結果, エルゴステロール合成に関与する遺伝子の破壊株が強い感受性を示すことを見出した¹⁰⁾。また, エルゴステロール合成に関与する遺伝子の破壊株は, バニリン以外の発酵阻害物質にも感受性を示すことから, 発酵阻害物質耐性にはエルゴステロールが重要であると推測された (表 2)。そこで前出したバニリンに高度に耐性を有する *S. cerevisiae* NBRC 1950 株のエルゴステロール含量を調べたところ, 他の *S. cerevisiae* 株よりも高含量であることが判明した (図 12)。また, *S. cerevisiae* NBRC 1950 株ではエルゴステロール合成に関与する遺伝子の発現量が他の *S. cerevisiae* 株よりも高いことも明らかとなった¹¹⁾。以上の結果から, バニリン耐性の強度とエルゴステロール含量には相関がある可能性が示唆された。発酵阻害物質耐性能の強化には, 合成に関与する遺伝子を高発現させる等してエルゴステロール含量を増加する育種が有効であると考えられた。

表 2 エルゴステロール合成関連遺伝子破壊株の発酵阻害物質感受性

遺伝子	感受性 ^a						
	VA	HB	GU	SY	FU	HMF	AA
<i>ERG3</i>	0.20	0.05	0.06	0.12	0.05	0.26	0.02
<i>ERG6</i>	0.29	0.03	0.03	0.04	0.03	0.08	0.02
<i>ERG2</i>	0.03	0.06	0.03	0.13	0.05	0.57	0.02
<i>ERG24</i>	0.19	0.04	0.02	0.10	0.09	0.27	0.01

^a 発酵阻害物質存在下での野生株の生育 (OD630) を 1 とした時の破壊株の生育を示す。0.3 以下を感受性と定義し、網掛けで示した。

VA, バニリン; HB, 4-ヒドロキシベンズアルデヒド; GU, グアヤコール; SY, シリンガルデヒド; FU, フルフラール; HMF, 5-ヒドロキシメチルフルフラール; AA, 酢酸

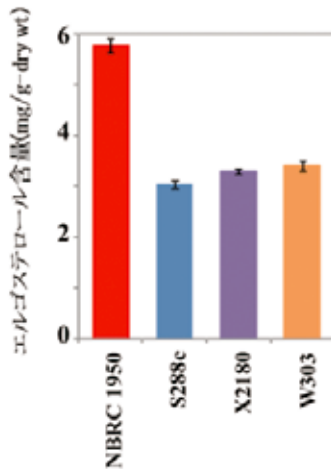


図 12 バニリン耐性株のエルゴステロール含量

S. cerevisiae NBRC 1950 株と *S. cerevisiae* 実験室株 (X2180 株, S288c 株, W303 株) のエルゴステロール含量を測定した。

5. おわりに

バイオ燃料は今後もその重要性が増すと考えられ、食料と競合しない稲わら等の作物未利用部分を原料としたバイオ燃料を如何に安く生産するかということが大きな課題である。本稿では、産業利用を想定したストレス耐性酵母の開発とその利用に関する取り組みを紹介した。ストレスの中でも特に高温耐性に関しては、発酵槽の冷却コスト削減に直結することから、研究者の注目を集めている。

筆者らも高温耐性に関与する新規マーカー遺伝子を同定しており、今後の育種等に役立てていきたいと考えている。また、酵母は遺伝子操作が比較的簡単であることから、遺伝子組換え酵母の開発を進めている研究グループも多くある。しかしながら遺伝子組換え酵母を利用するためには、環境への悪影響を避けるため、外部に洩れ出さないように封じ込める必要がある。発酵槽を密封するなど閉鎖系の施設が必要となり、また発酵残渣の適切な処理等も必要であるなど制約が多い上に、制約に対処するためのコストが加算される。このように実用が難しい現状を踏まえ、我々のグループでは新規酵母株の分離と育種によるストレス耐性酵母の開発を中心に研究を進めている。本研究では様々な糖液に対応できるように、発酵工程で想定されるストレスに対して耐性を有する酵母株の分離および育種を行った。発酵工程で生じるストレスにはエタノールや発酵熱といった普遍的なものもあれば、バイオマスの種類やその前処理・糖化方法に依存しているものも多くあることから、実用的なストレス耐性酵母の開発は前処理・糖化の研究との連携が重要となる。本研究がスムーズに進んだ要因として、馬鈴薯や稲わらのSSFを食品総合研究所の徳安グループの開発した方法^{12) 13)}をベースに行い、微粉碎稲わら等の原料や研究情報の提供を受けるといった連携が確立していることが挙げられる。今後もより早く、より沢山のエタノールを生産する酵母を開発することで、バイオエタノールの安定的な産業製造に貢献したい。

6. 謝辞

本稿で紹介した研究は、農林水産省農林水産技術会議事務局委託プロジェクト研究「稲わら等の作物の未利用部分や資源作物、木質バイオマスを効率的にエタノール等に変換する技術の開発」の研究の一環として実施した。また、本研究は酵母ユニット（当時）の島純ユニット長（現：京都大学特定教授）、安藤聡主任研究員（現：野菜茶業研究所）との共同研究成果である。

（応用微生物研究領域 酵母ユニット 中村 敏英）

参考文献

- 1) Basaraba, R.J., Oehme, F.W., Vorhies, M.W. and Stokka, G.L., Toxicosis in cattle from concurrent feeding of monensin and dried distiller's grains contaminated with macrolide antibiotics. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 79-86 (1999)
- 2) Watanabe, I., Nakamura, T. and Shima, J., A strategy to prevent the occurrence of *Lactobacillus* strains using lactate-tolerant yeast *Candida glabrata* in bioethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 1117-1122 (2008)

- 3) Saithong, P., Nakamura, T. and Shima J., Prevention of bacterial contamination using acetate-tolerant *Schizosaccharomyces pombe* during bioethanol production from molasses. *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 216-219 (2009)
- 4) Watanabe, T., Srichuwong, S., Arakane, M., Tamiya, S., Yoshinaga, M., Watanabe, I., Yamamoto, M., Ando, A., Tokuyasu, K. and Nakamura, T., Selection of stress-tolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash to ethanol. *Bioresour. Technol.*, **101**, 9710-9714 (2010)
- 5) Watanabe, I., Nakamura, T. and Shima, J., Characterization of spontaneous flocculation mutant derived from *Candida glabrata*: a useful strain for bioethanol production. *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 379-382 (2009)
- 6) Watanabe, I., Nakamura, T. and Shima, J., A strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* in bioethanol production. *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 176-179 (2010)
- 7) Watanabe, T., Watanabe, I., Yamamoto, M., Ando, A. and Nakamura, T., A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. *Bioresour. Technol.*, **102**, 1844-1848 (2011)
- 8) Watanabe, I., Ando, A. and Nakamura, T., Characterization of *Candida* sp. NY7122, a novel pentose-fermenting soil yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 307-315 (2012)
- 9) Watanabe, I., Ando, A. and Nakamura, T., Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Bioresour. Technol.*, **123**, 695-698 (2012)
- 10) Endo, A., Nakamura, T., Ando, A., Tokuyasu, K. and Shima, J., Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*, **1**, 3 (2008)
- 11) Endo, A., Nakamura, T. and Shima, J., Involvement of ergosterol in tolerance to vanillin, a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **299**, 95-99 (2009)
- 12) Sathaporn, S., Fujiwara, M., Wang, X., Seyama, T., Shiroma, R., Arakane, M., Mukojima, N. and Tokuyasu, K., Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass Bioenerg.*, **33**, 890-898 (2009)

- 13) Park, J.Y., Shiroma, R., Al-Haq, M.I., Zhang, Y., Ike, M., Arai-Sanoh, Y., Ida, A., Kondo, M. and Tokuyasu, K., A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw-calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. *Bioresour. Technol.*, **101**, 6805-6811 (2010)

Ⅳ バイオエタノール生産に適した 五炭糖発酵性酵母の開発

1. はじめに

世界におけるバイオエタノールの生産量は年間 8,000～9,000 万 kL で、そのうちの約 9 割はアメリカとブラジルで生産されている。JETRO の報告書¹⁾によると、世界最大のバイオエタノール生産国であるアメリカの年間生産量（2011 年）は約 5,300 万 kL であり、日本の年間ガソリン消費量（約 6,000 万 kL）にも迫る量である。現在のバイオエタノールの主要な原料は、いわゆる第一世代の原料と称されるトウモロコシやサトウキビ（デンプンやショ糖）であり、国際的な穀物需給に大きな影響を与えていることが問題視されている。現にアメリカでは、生産されたトウモロコシの約 40% がエタノール生産に回っているとされている。

一方、“第二世代”と呼ばれる、稲わらやバガス、廃材などのリグノセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノールの生産は、食料との競合を回避できることから、その実用化が大きく期待されているが、糖類を取り出すプロセスの難しさやコストの問題が解決されておらず、量産化への道程は遠い。2012 年には、米国においてベンチャー企業が中心となり、いくつかの第二世代バイオエタノールの商業プラントが立ち上がっているが、予想される生産量は 3,300 万 L とバイオエタノール生産量全体の 0.1% にも満たない¹⁾。しかしながら、地球温暖化への対策と深刻化が予測される食料問題への対応を両立させるには、“第二世代”への移行を着実に進めて行く必要があることに疑いはない。

本稿では、第二世代バイオエタノールの製造にとって欠かすことのできない五炭糖（キシロースおよび L-アラビノース）発酵について、はじめに世界における五炭糖発酵用酵母の研究開発状況を概説した後、著者らが研究を進めているキシロースの高温発酵について紹介する。

（光学異性体の表記について、本稿では D-キシロースのような D 体の糖類については、必要がない限り“D-”の表記を省略している。）

2. リグノセルロース系バイオマスの特徴

第二世代バイオエタノールの原料となるリグノセルロース系バイオマスを取り扱う上で、第一世代の原料と大きく異なる点として、①酵母などによる発酵の原料になる糖類を取り出すことが困難なこと、②取り出した糖類には複数の種類が含まれ、その中には酵母などがあまり発酵できないものが含まれていること、が挙げられる。リグノセルロースは植物の細胞壁に含まれ、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの三つの成分から構成されている。このうち、セルロースとヘミセルロースを分解することにより、発酵の原料となる糖類が得られる。セル

ローズからは専らグルコースが得られるが、ヘミセルローズには多様な糖類が含まれており、六炭糖であるグルコース、マンノース、ガラクトースに加え、五炭糖であるキシロースやL-アラビノースも得られる。Thalagalaらは、濃硫酸抽出により、種々の植物のセルローズおよびヘミセルローズに含まれている糖類の組成を調べ報告している²⁾(図1)。それによると、いずれもグルコースが一番多く、全糖類の5～7割がグルコースである。針葉樹(スギ、ヒノキ)では、キシロースとマンノースが同程度含まれ、それぞれ1～2割に相当する量が含まれている。一方、広葉樹(ナラ、ユーカリ)や草本(サトウキビバガス、稲わら)では、ヘミセルローズにキシロースが多く含まれ、広葉樹では約3割、草本では約4割の糖類がキシロースである。また、針葉樹や草本では、キシロース同様五炭糖であるL-アラビノースも2～5%程度含まれている。これらのことから、リグノセルローズ系バイオマスからより多くのエタノールを生産するためには、グルコース以外の糖類も効率良くエタノールに変換することが重要であることは明らかである。特に、稲わらなどの草本植物由来のバイオマスにおいては、キシロースの発酵収率が全体のエタノール収量に大きく影響することが予測される。

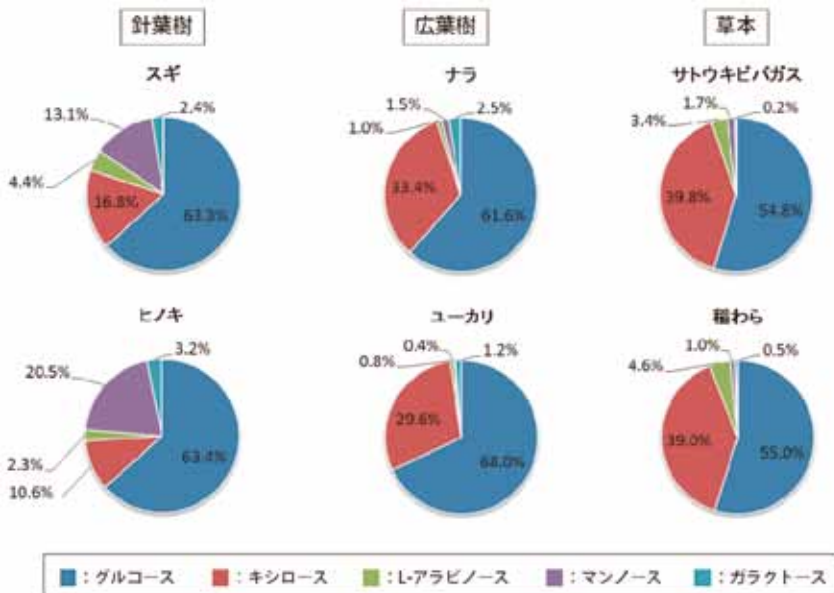


図1 各種リグノセルローズ系バイオマスに含まれる糖類組成

セルローズおよびヘミセルローズに含まれる糖類全量を100%としたときの割合で示す。Thalagala²⁾らのデータを基に作成した。

3. 五炭糖発酵の研究開発状況

3.1. 酵母の性質

バイオエタノールの生産に最もよく使われている微生物は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) である。*S. cerevisiae* は数多ある酵母種の中でも特に高いエタノール発酵能力とエタノール耐性を有しており、古来から醸造などのエタノール生産に利用されてきた。微生物にとっては、発酵はエネルギー (ATP) を生産するための仕組みであり、酸素のない嫌気条件下では呼吸の代わりに発酵を行うことによってエネルギーを獲得している。しかしながら、呼吸に比べると効率が悪く、得られるエネルギー量は格段に少ない。したがって、多くの微生物は、好気条件下では発酵から呼吸に積極的に代謝系を切り替えることで、より多くのエネルギーを獲得しようとする。しかし、*S. cerevisiae* のような一部の酵母では「クラブトリー効果」という現象が観察される。これは好気条件下であってもグルコースを添加すると酸素消費が抑制される現象であり、酸素が十分あっても糖 (グルコース) 濃度が高い時にはエタノール発酵が呼吸に優先して行われていることを示唆している。つまり、*S. cerevisiae* は、代謝経路がエタノール発酵に大きく傾いた例外的な微生物と言える。

S. cerevisiae は、デンプンなどから得られるグルコースを原料とした第一世代バイオエタノールの生産にはとても適している。しかし、前項で見たように、リグノセルロース系バイオマスには、グルコース以外の糖類、特にキシロースが多量に含まれている。残念なことに、*S. cerevisiae* はキシロースを利用することができず、そのまま第二世代バイオエタノールの生産に用いることは難しい。

一方、自然界にはキシロースからエタノールを作る、すなわちキシロース発酵を行う酵母も存在する。*Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*) や *Candida shehatae* といった酵母がキシロース発酵性酵母として知られている。これらの酵母を用いたエタノール生産の研究も進められているが、これらの酵母の特徴として、キシロースを代謝するために酸素を必要とする点が挙げられる。*S. stipitis* や *C. shehatae* は *S. cerevisiae* と異なり、クラブトリー効果を示さない酵母であり、酸素存在下ではエタノール発酵が進みにくくなる。しかも、酸素が十分にある条件下で糖が無くなると、折角作ったエタノールを今度は炭素源として酵母自身が消費してしまう。したがって、これらの酵母を使ってキシロースから無駄なくエタノールを得ようとする、発酵液中の溶存酸素濃度の厳密なコントロールが必要であり、大規模なエタノール製造には不向きである。

3.2. 微生物におけるキシロースの代謝経路

次に、微生物のキシロース代謝経路について見てみたい。自然界には、酵母以外のカビや細菌にもキシロースを栄養源として利用できる (資化できる) ものが存在している。キシロースがエタノールに変換される時の代謝経路は、酵母やカ

ビなどの真菌（真核生物）タイプと細菌（原核生物）タイプの2種類に大別することができる（図2）。真核生物の経路では、まず、キシロースがキシロースレダクターゼ（XR）によりキシリトールに還元され、次に、キシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）によりキシルロースに酸化される。生成したキシルロースはキシルロキナーゼ（XK）によりキシルロース5-リン酸となり、ペントースリン酸経路に送られ代謝される。その後、ペントースリン酸経路での反応によりグリセロアルデヒド三リン酸が生成され、解糖系に合流することにより最終的にエタノールになる。

一方、細菌の経路では、キシロースはキシロースイソメラーゼ（XI）により、キシルロースに直接変換される。キシルロースはXKによりリン酸化を受けた後、真菌の代謝系と同様にペントースリン酸経路を経てエタノールになる。なお、この代謝系は、以前は細菌に特有の経路と考えられていたが、近年、嫌気性

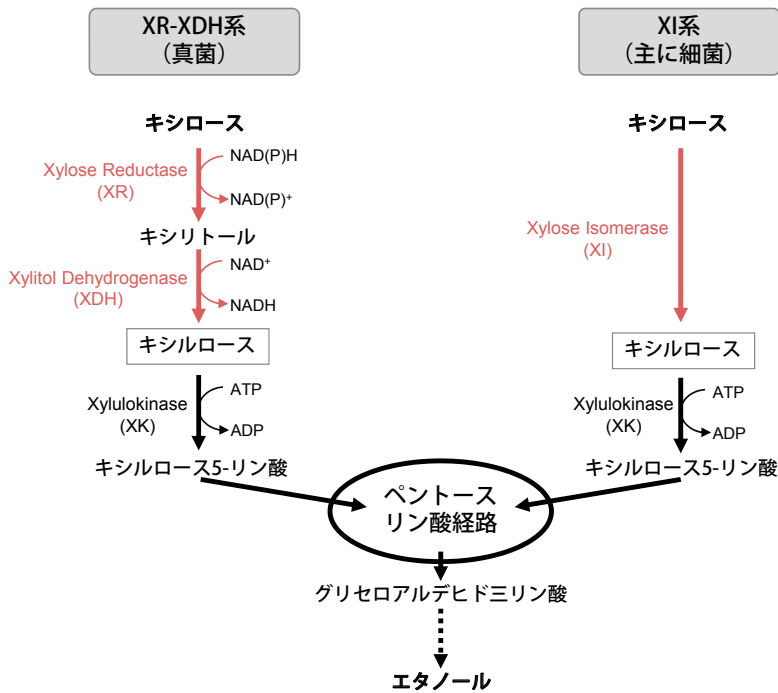


図2 キシロース代謝経路の模式図

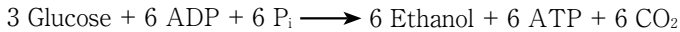
キシロース資化性微生物のみが有する代謝経路は赤で、*S. cerevisiae*にも存在する代謝経路は黒で示す。

真菌の中にキシロースイソメラーゼ酵素を持ち、細菌と同様の系でキシロースを代謝するものも見つかっている³⁾。本稿では、以下、この2種類のキシロース代謝系を「XR-XDH系」、「XI系」とそれぞれ呼ぶこととする。

すでに気付かれていると思うが、XR-XDH系、XI系とも、キシロース以降の代謝経路（図2の黒で示した部分）は共通しており、真核生物、原核生物問わず、さらにはキシロースを資化しない微生物でもこの部分の代謝経路を有している。したがって、キシロースを発酵できない*S. cerevisiae*であっても、キシロースの代謝中間産物であるキシロースはエタノールに発酵することができる。

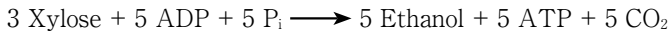
グルコースおよびキシロースをエタノールに発酵した際の収支式は以下の通りである。

（グルコースの場合）



エタノール理論収率：0.514 g/g glucose

（キシロースの場合）



エタノール理論収率：0.510 g/g xylose

※キシロース発酵の際の補酵素の収支は除く。

※P_i：リン酸

なお、本稿では、エタノールの理論収率を計算する際に、グルコースを基質とした際も、キシロースを基質とした際も、0.51 g/g substrate（1 gの基質から0.51 gのエタノールが生成）を使用している。

3.3. XR-XDH系を利用したキシロース発酵酵母の開発

キシロース発酵能を*S. cerevisiae*に付与しようという取り組みはかなり以前から行われており、すでに1980年代後半には遺伝子組換え技術を用いた研究が始められている。そして、世界で初めてキシロースを発酵する遺伝子組換え酵母が作り出されたのは、1993年のことである⁴⁾。米国Purdue大学のHoらは、キシロース発酵性酵母である*S. stipitis*由来のXR遺伝子とXDH遺伝子を*S. cerevisiae*で異種発現させた。これに加えて、元々*S. cerevisiae*が持っているXKについても、遺伝子組換えにより過剰発現させた。*S. cerevisiae*のXK活性は元々低く、効率的にキシロースを発酵させるためにはXKの活性強化も必要であった。このHoらの方法は、*S. cerevisiae*にキシロース発酵能を付与する手法として、その後、多くの研究で利用されている。

XRやXDHは酸化還元酵素であり、その反応に補酵素を必要とする。XRは補酵素としてNADP⁺やNADPHを、XDHはNAD⁺やNADHを利用する。（XRはNADP（H）だけでなくNAD（H）も利用できるが、NADP（H）の方が好

んで使われる。)したがって、XR-XDH系を利用したキシロース発酵では、XRとXDHの補酵素特異性の違いにより、キシロースの代謝効率が上がらないことが考えられる。キシロースからキシリトールへの反応の際には、NADPHからNADP⁺ができるのに対して、次のキシリトールからキシロースへの反応では、NAD⁺からNADHができ、補酵素のリサイクルが起こらない。特にNADHのNAD⁺への再生は、呼吸に依るところが大きいので、エタノール発酵に適した嫌気条件下ではNAD⁺の再生が不十分となる。このため、キシロース発酵が進むに連れNAD⁺が足りなくなり、その結果、代謝フローがキシリトールでストップしてしまい、発酵液中にキシリトールの蓄積が起こることが観察されている。

この問題を解消するために、代謝工学的な観点から様々なアプローチが試みられている。例えば、XRやXDHのアミノ酸配列を人工的に改変することにより、補酵素特異性が変化したXRやXDHの開発が行われている^{5,6)}。NADPHの代わりにNADHを反応に使うXR、あるいは、NAD⁺の代わりにNADP⁺を反応に使うXDHが作製され、補酵素特異性を揃えたXRとXDHを*S. cerevisiae*で発現させる研究が行われている。この他にも、内在性アルドースレダクターゼの欠損⁷⁾、グルタミン酸デヒドロゲナーゼの欠損や過剰発現⁸⁾、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼの過剰発現やグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼの欠損⁹⁾、XRとXDHの発現量の最適化などが行われている¹⁰⁻¹²⁾。これらの試みにより、酵母細胞内のキシロース代謝が改善され、エタノール収率が向上しているものの、キシリトールの蓄積を完全に抑制するには至っていない。

3.4. XI系を利用したキシロース発酵酵母の開発

もう一方のキシロース代謝系であるXI系を利用した遺伝子組換え酵母の開発も行われている。XI系ではXR-XDH系のような補酵素の不均衡やそれに由来するキシリトール蓄積の問題が起こらないため、理論上、XI系の方が優れていると考えられてきた。XI系を酵母に導入することによりキシロース発酵能を付与する試みが数多く行われてきたものの、XIが原核生物由来であるため、真核生物である酵母において、十分な機能(活性)をもった形でXIを発現させることが困難であった。

しかし、2003年になって、オランダDelft大学のPronkのグループによって、真菌由来のXI遺伝子を*S. cerevisiae*で発現させることに成功している³⁾。彼らは嫌気性腸内真菌の一種である*Pyromyces* sp. E2が、真菌の一般的なキシロース代謝系であるXR-XDH系ではなく、原核生物と同様のXI系を有していることを見出した。この発見を契機に*Pyromyces*類縁の真菌や他の嫌気性微生物からXI遺伝子の単離が行われ、XI系の研究開発が再び活発化している。日本の豊田中研と理研のグループは、シロアリの腸内原生物のcDNAライブラリーからXI遺伝子を単離し、*S. cerevisiae*に導入することにより、良好なキシロース

発酵能を得ている¹³⁾。

このように *S. cerevisiae* で機能する XI の発見によって、XR-XDH 系の最大の課題であった補酵素不均衡の問題を解消することができた。しかしながら、*S. cerevisiae* で発現させた XI は本来の活性よりも低く、キシロースを効率的にエタノール発酵させるには十分とは言えない。このため、多コピープラスミドを用いる¹⁴⁾、あるいは宿主酵母の染色体上に多コピーの XI 遺伝子を組み込むことによって¹⁵⁾、XI 遺伝子を大量発現させる必要がある。また、組換えを行った直後の酵母細胞ではキシロース発酵能が低いため、組換え体をキシロース培地でしばらく馴化させる工夫も行われている¹⁶⁾。加えて、XI 系の組換え体は XR-XDH 系の組換え体と比べ、エタノール収率は高いものの、生産性が低い（発酵速度が遅い）という問題点も指摘されている。

3.5. L-アラビノース発酵酵母の開発

リグノセルロース系バイオマスの中には、キシロース以外の五炭糖として L-アラビノースも含まれている。キシロースに比べると含有量は少ないものの、稲わらなどの草本系のバイオマスには 3~5% 程度の L-アラビノースが含まれている（図 1）。

キシロースの場合と同様、*S. cerevisiae* は L-アラビノースも利用することができないが、他の真菌や細菌の中には、L-アラビノースを資化できるものが存在している。そして、これもキシロースの場合と同様に、代謝経路は真菌と細菌との間で異なっている（図 3）。

真菌の場合は、まず L-アラビノースが XR によって L-アラビトールに還元される。（XR の基質特異性は広く、L-アラビノースにも反応する。）次に、L-アラビトール 4-デヒドロゲナーゼ（LAD）によって L-キシルロースに酸化される。L-キシルロースは、L-キシルロースレダクターゼ（LXR）によってキシリトールに還元され、キシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）によってキシルロースに酸化され、さらにキシルロース 5-リン酸にリン酸化される。その後、キシロースの場合と同様にペントースリン酸経路を介して代謝される。

一方、細菌の場合は、L-アラビノースは L-アラビノースイソメラーゼ（AI）によって、L-リブロースに変換された後、リブロキナーゼ（RK）によって L-リブロース 5-リン酸にリン酸化される。その後、L-リブロース 5-リン酸 4-エピメラーゼ（RPE）によってキシルロース 5-リン酸に変換され、ペントースリン酸経路に入る。

L-アラビノースをエタノールに変換する酵母を作り出すために、この 2 つの L-アラビノース代謝系の利用が行われている。Richard らは真菌の L-アラビノース代謝系を構成する 4 つの遺伝子（*Trichoderma reesei* 由来の LAD 及び LXR、*S. stipitis* 由来の XR 及び XDH）を *S. cerevisiae* 内で高発現させ、収率は低いもの

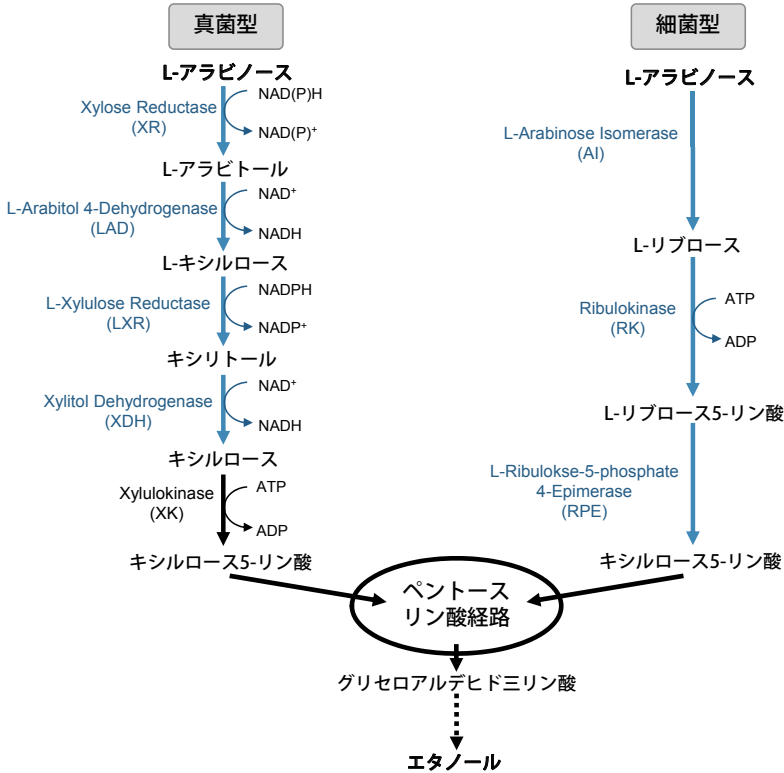


図 3. L-アラビノース代謝経路の模式図

L-アラビノース資化性微生物のみが有する代謝経路は青で、*S. cerevisiae* にも存在する代謝経路は黒で示す。

のL-アラビノースをエタノールに変換することに初めて成功した¹⁷⁾。

一方、Hoの研究グループは、細菌のL-アラビノース代謝系を利用して、大腸菌由来のAI, RK, RPEをコードする3つの遺伝子を*S. cerevisiae*で発現させた¹⁸⁾。組換え酵母内でこれら3つの酵素は活性を示したものの、エタノールは検出されず、細菌の代謝系の利用は困難と思われた。Beckerらは、大腸菌由来のAI遺伝子の代わりに枯草菌(*Bacillus subtilis*)由来のAI遺伝子を、大腸菌由来のRK, RPEと一緒に発現させることにより、L-アラビノースからエタノールを作り出している¹⁹⁾。この時、L-アラビノースの酵母細胞への取込能を増強するために、L-アラビノースに対して輸送活性を示すガラクトース輸送体遺伝子(*GAL2*)を酵母で高発現させる改良も付け加えている。また、遺伝子組換え

株をL-アラビノースを含む培地で馴化培養することによって、最終的にL-アラビノース（基質濃度：20g/L）の発酵収率を理論値の60%にまで高めることに成功している。さらに彼らは、この馴化の過程で、①組み込んだRKの活性が低下することと、②ペントースリン酸経路を構成するトランスアルドラーゼの発現量が増加することを発見しており、この2つの代謝調整がL-アラビノースの発酵能向上に有効であることを示唆している。また、Wisselinkらは、*Lactobacillus plantarum*のAI、RK、RPEを*S. cerevisiae*で発現させることにより、理論値の88%に相当する非常に高い収率のL-アラビノース発酵（基質濃度：20g/L）を達成している²⁰⁾。彼らは、AI遺伝子とRPE遺伝子は多コピープラスミドによって、RK遺伝子は単一コピーでの染色体への組み込みによって発現させることにより、先にBeckerらが示したような遺伝子発現量の調整を行っている。さらに、宿主酵母に対しても、遺伝子組換えによりペントースリン酸経路の高発現、内在性アルドースレダクターゼの欠損といった改良を加えている。

3.6. キシロース／L-アラビノース共発酵酵母の開発

L-アラビノース発酵の成功により、キシロースとL-アラビノースという2種類の五炭糖を同時に発酵する酵母の開発も可能となった。キシロース、L-アラビノース、それぞれに真菌型と細菌型の2種類の代謝系が存在することはこれまでに説明した。両者の組み合わせとして、①真菌型キシロース発酵系+細菌型アラビノース発酵系、②真菌型キシロース発酵系+真菌型アラビノース発酵系、③細菌型キシロース発酵系+細菌型アラビノース発酵系、の3種類がこれまでに行われている。

①の方法では、キシロース代謝系のXRがL-アラビノースに対しても反応し、ほとんどのL-アラビノースはL-アラビトールに還元されてしまい、細菌型のL-アラビノース代謝系では代謝することはできず、この方法で効率的にエタノールを生産することは出来なかった²¹⁾。

これに対して②の方法では、Bettigaらによって両ペントースからエタノールを生産することに成功している²²⁾。彼らは、*S. stipitis*由来のXRとXDHに加え、*T. reesei*由来のLAD、*Ambrosiozyma monospora*由来のLXRを遺伝子組換えにより*S. cerevisiae*に導入している。キシロース発酵の際に問題となったキシリトールの蓄積を抑制するために、導入する酵素の補酵素特異性が揃えられていることが注目される。野生型のXRはNADPHとNADHの両者を補酵素として用いるが、彼らは270番目のリジンがアルギニンに置換したXR(K270R)を用いており、この変異型XRは野生型に比べNADHに対する親和性が増している。さらに、通常のLXRはNADPH依存型であるのに対して、ここで用いられている*A. monospora*由来のLXRはNADH依存型であることが知られている。また、LAD、XDHも元々NAD依存型である。さらに、宿主の内在性アルド-

スレダクターゼ (NADPH/NADH 両依存性) の欠損や宿主細胞のペントースリン酸経路および XK の高発現も遺伝子組換えにより行っている。このような徹底した細胞内補酵素バランスの調整と宿主代謝系の増強により、グルコース、キシロース、L-アラビノースの混合物 (基質濃度: 各 20 g/L) から理論収率の 45% でエタノールを生産している。

③の方法は、Wisselink らによって、*Lactobacillus plantarum* の AI, RK, RPE と *Piromyces sp. strain E2* 由来の XI 遺伝子を導入することにより行われている²³⁾。宿主酵母には XK の高発現、ペントースリン酸経路の高発現、内在性アルドースレダクターゼの欠損をしたものを用いている。この組換え酵母をキシロースやアラビノースを含む培地で馴化培養することより、最終的にグルコース (30 g/L)、キシロース (15 g/L)、L-アラビノース (15 g/L) の混合物から、理論収率の 84-86% でエタノール発酵を行っている。

3.7. セロビオース発酵を利用したキシロース発酵の効率化

リグノセルロース系バイオマスには種類の異なる複数の糖が含まれており、バイオマスから実際にエタノールを製造する際には、複数の糖の混合物を発酵しなければならない。ここで問題となるのが、グルコースが存在すると他の糖の利用が抑制される、いわゆる「グルコースリプレッション」という現象である。これまでに数々の改良がなされてきたが、キシロースの発酵速度はグルコースのそれに比べ数段遅い。さらに、グルコース共存下ではグルコースが消費されるまでキシロースの発酵が妨げられるため、キシロース発酵にさらに時間がかかる。発酵にかかるコストを下げるためには、発酵収率の向上と並んで、発酵時間の短縮が重要な因子である。

リグノセルロース系バイオマスに含まれるグルコースは、最初はその大部分がセルロースの形で存在している。セルロースはエンドグルカナーゼとセロビオヒドラーゼの働きにより 2 分子のグルコースが繋がったセロビオースに分解され、さらに β -グルコシダーゼによりグルコースに分解される。セロビオースはグルコースリプレッションを起こさないため、グルコースまで分解せずに、セロビオースの形でキシロースと同時に発酵させる方法が考案された。この方法では、セロビオースのまま酵母菌体に取り込ませなければならない。Galazka ら²⁴⁾ や Harada ら²⁵⁾ は *Neurospora crassa* がセロデキストリン (セロビオース, セロトリオース, セロテトラオースなどの総称) の輸送体 (CDT-1) を有することを見出した。また、*N. crassa* は分泌型ではない細胞内に局在する β -グルコシダーゼ (GH1-1) を持つこともわかった。彼らは XR-XDH 系の導入によりキシロース発酵能を付与した *S. cerevisiae* に、CDT-1 と GH1-1 を組み込むことにより、セロビオースとキシロースを同時に発酵する酵母を開発した。100 g/L のグルコースと 60 g/L のキシロースの混合液を発酵させた場合は、72 時間経っても 1/3 のキシロ-

スが残存し、エタノール収率は理論値の61%であった。一方、100 g/Lの「セロビオース」と60 g/Lのキシロースの混合液を発酵させた場合には、72時間後にはすべてのキシロースが消費されエタノール収率も理論値の74%であった。

4. 高温キシロース発酵法の開発

本項では、著者らが行った高温でのキシロース発酵の意義と開発内容について紹介する。

4.1. 高温発酵の必要性

稲わらのようなリグノセルロース系バイオマスからエタノールを生産するためには、「前処理」、「糖化」、「発酵」の3つの工程が必要である。糖化と発酵の組み合わせには、糖化を行ってから発酵を行う単行複発酵 (Separate Hydrolysis and Fermentation 以下, SHF と略す)、糖化と発酵を同時に行う並行複発酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation 以下, SSF と略す) がある。

SSFでは糖化によって生成した糖が酵母によって速やかにエタノール発酵に利用されるため、糖化酵素の生成物阻害を回避できるという大きな利点がある。しかし、酵素糖化に最適な温度が50℃程度であるのに対して、*S. cerevisiae*による発酵に最適な温度は30℃程度であり、30℃でSSFを行った場合には、糖化収率（特にキシロースの糖化収率）が低下することがわかっている（図4）。糖化酵素の添加量を増やすことによってこの問題を解決することはできるが、大幅なコスト増に繋がる。したがって、40～45℃といった、より糖化酵素の至適温度に近い温度で発酵可能な酵母を利用した発酵方法の開発が、SSFの実用化に必要不可欠であると考えられている。高温発酵の導入は、SSFだけでなく、SHFにおいても、糖化工程から発酵工程に移る際の冷却エネルギーの節約に繋がることや、雑菌汚染のリスクを低減できることから、そのメリットは大きい。

食総研の徳安らが開発した前処理技術であるCaCCO法²⁶⁾は、洗浄工程を必要としないためキシランの流亡が極めて少なく、希硫酸法等と比べキシロースの回収率が高いことが1つの特徴である。したがって、効率的なキシロースの糖化及び発酵法を組み合わせることにより、CaCCO法の利点を最大限活用することが可能になる。

これまでの酵母を用いた高温発酵の研究では、グルコースの発酵については良好な結果が出ているものの、キシロースについては実用化に結び付くような高いエタノール収率を示す報告は無い。40℃以上の高温でもキシロースを資化できる酵母として、*Kluyveromyces* sp. IIPE453²⁷⁾ や *Hansenula polymorpha*²⁸⁾ が報告されているが、これらの酵母のエタノール発酵能はいずれも10%未満と低かった。

遺伝子組換えによりキシロース発酵能を付与した *S. cerevisiae* について、40℃以上の高温におけるエタノール発酵能を調べた報告が見当たらなかったことか

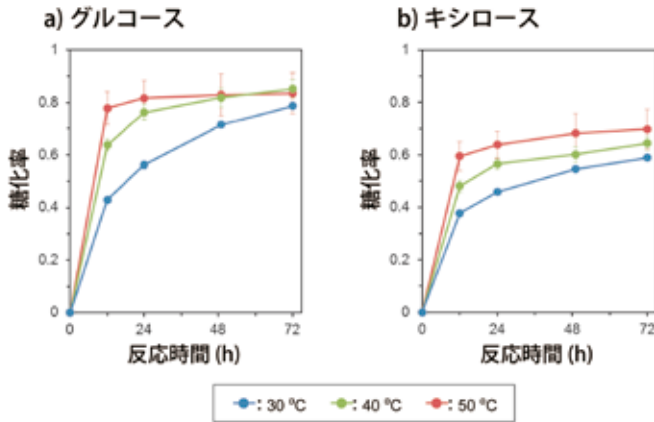


図4 稲わらの酵素糖化に対する温度の影響

CaCCO 法により前処理した稲わらを、30℃、40℃、50℃において、酵素（ノボザイム社 Celluclust 1.5L, Novozyme 188, Ultraflo L）を用いて糖化処理した。稲わら中に含まれる全グルコース量（a）、全キシロース量（b）を1として、糖化処理によって反応液中に遊離したグルコース（a）、キシロース（b）の割合を示した。

ら、著者らは XR-XDH 系を導入した組換え体を作成し、キシロース発酵に対する発酵温度の影響を調べた。宿主には、実験室株よりも温度などのストレスに対する耐性が高い実用株である *S. cerevisiae* NBRC0224 を用いた。その結果、グルコースについては40℃でも問題無く発酵できたのに対して、キシロース発酵能は37℃以上では顕著に低下することが認められた（図5a）。このことから、通常の *S. cerevisiae* を用いてキシロース発酵を高温で行うことは困難であると考えられた。

4.2. 高温同時異性化発酵のための酵母の選抜

キシロースの高温発酵（40℃）に適した酵母株を選抜するにあたって、キシロースの発酵能を指標にスクリーニングを行うこととした。3.2. で述べたように、キシロースを発酵できない *S. cerevisiae* のような酵母でも、キシロースを発酵することはできる。キシロース発酵能の優れた株を取得できれば、あとはキシロースからキシロースへの代謝系を補うことにより、目的とするキシロース発酵が可能であると考えた。

著者らは、食総研が所有する酵母株の中から、40℃でキシロース発酵可能な酵母株として、*Candida glabrata* NFRI3163 を単離した。この酵母はキシロース

ス発酵能が高いだけでなく、40℃において *S. cerevisiae* を上回るエタノール耐性を有していたことから、高温エタノール発酵に適した酵母株であると考えられた (図6)。

C. glabrata はそのゲノム配列の解析により、*S. cerevisiae* に近縁の酵母であることが明らかにされており²⁹⁾、*S. cerevisiae* の遺伝子組換えの手法が転用できることから、遺伝子組換えの宿主として扱いやすい。ただし、*S. cerevisiae* と同様に、キシロースを炭素源として利用することはできなかった。

著者らは、*C. glabrata* NFRI3163 について、*S. cerevisiae* と同様に XR-XDH 系を組み込んだキシロース発酵株を構築した。その結果、図5bに示すように、*S.*

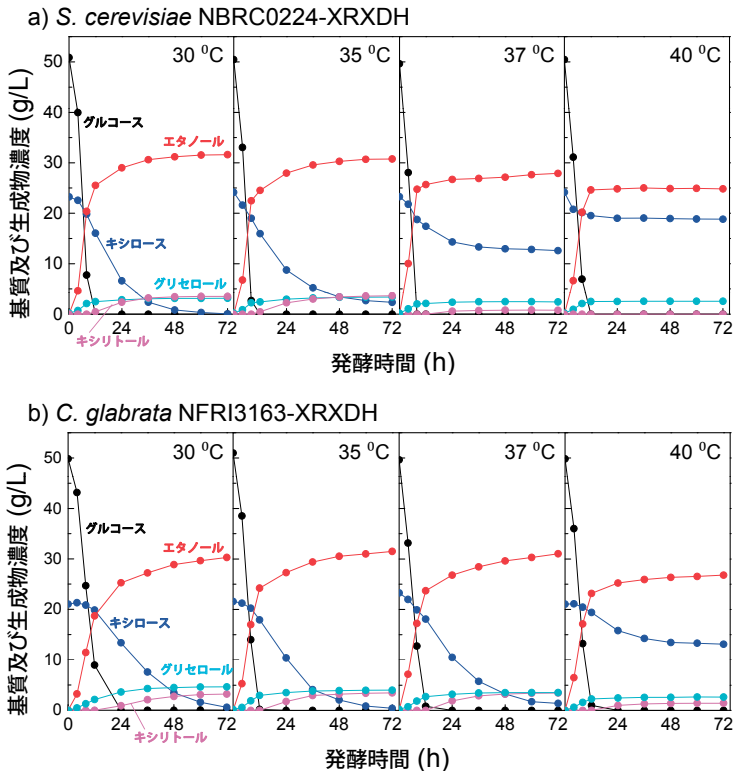


図5 XR-XDH系を導入した遺伝子組換え酵母によるエタノール発酵

50 g/L グルコース及び 20 g/L キシロースを含む培地を用いて各酵母を図中に示した温度で培養し、培養液中の糖類やエタノールの濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した。

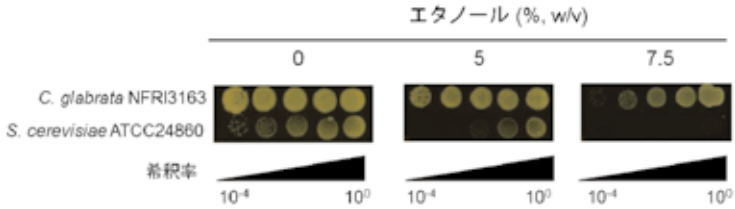


図6 40℃におけるエタノール耐性

5% (w/v), 7.5% (w/v)のエタノールを含む、あるいはエタノールを含まない寒天培地上に菌体濃度を変えて接種し、40℃で3日間静置培養した。

cerevisiae ではキシロース発酵能が低下した 37℃においても、NFRI3163 は高いキシロース発酵能を維持しており、NFRI3163 は *S. cerevisiae* よりも高温でキシロースの発酵ができることが明らかになった。しかし、40℃まで発酵温度を上げるとキシロース消費量の低下が見られた (図 5b)。NFRI3163 が 40℃でもキシロースを発酵できることは確認しており、この 40℃におけるキシロース発酵能の低下は、キシロースからキシルロースに至る経路の阻害に起因するものと考えられた。

そこで、同時異性化発酵法 (Simultaneous Isomerization and Fermentation 以下、SIF と略す) の利用を検討した。SIF におけるキシロース代謝反応は、微生物における XI 系の代謝反応 (図 2) と同じである。ただし、XI 代謝系では、細胞内にキシロースが取り込まれてからキシルロースへ変換されるのに対して、SIF では発酵液中に XI 酵素 (「グルコースイソメラーゼ」の名称で市販、以下 GI と略す) を添加することにより、発酵液中でキシロースがキシルロースに異性化され、生成したキシルロースを酵母が取り込み発酵することによってエタノールが生産される。SIF では、細胞内でのキシロースからキシルロースへの代謝を必要としないため、上で見られた高温におけるキシロースの代謝阻害を回避できるのではないかと考えた。

C. glabrata NFRI3163 を用いた 40℃における SIF によるキシロース発酵の実験結果を図 7b に示す。NFRI3163 は、コントロールとして用いた *S. cerevisiae* ATCC24860 株 (図 7a, キシルロース発酵能が高い *S. cerevisiae* 株³⁰⁾) よりも 2.5 倍高いエタノール収率を示した。しかし、発酵収率は理論値の半分程度にとどまり、NFRI3163 のキシルロース発酵能をさらに高める必要があると考えられた。また、キシリトールの蓄積が *S. cerevisiae* よりも多く見られた。SIF によるキシロース発酵では XR を利用しないことから、キシリトールの蓄積は起こらないと理論上は考えられる。しかし、実際には、*GRE3* 遺伝子によってコードされる基質特異性の広いアルドースレダクターゼが酵母細胞内に存在することが知られ

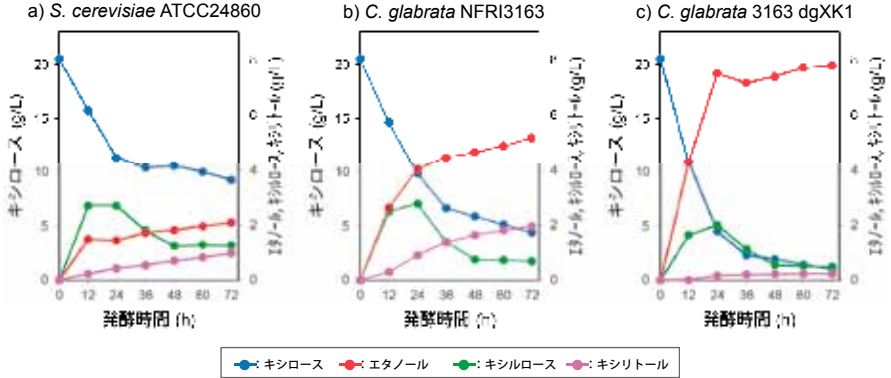


図7 40°Cにおける同時異性化発酵 (SIF) によるキシロース発酵

20 g/Lのキシロースを含む培地に、コントロール株である *S. cerevisiae* (a), NFRI3163 株 (b) NFRI3163 を改良した 3163 dgXK1 株 (c) を植菌し、40°Cで72時間発酵を行った。発酵液中の糖およびエタノール濃度はHPLCで定量した。

しており、この酵素の働きによってキシロースが非特異的に還元されたものと推測された。そこで次に、NFRI3163のキシロース発酵能の向上とキシリトール生成抑制を目指して、遺伝子組換えによる改良を行った。

4.3. 高温同時異性化発酵のための酵母の改良

キシロース発酵能の向上のために、*C. glabrata* NFRI3163 からキシロキナーゼをコードする *XK* 遺伝子をクローニングし、高発現プロモーターであるホスホグリセロキナーゼ (*PGK1*) プロモーターの下流に連結後、NFRI3163 の染色体に組み込んだ。一方、キシリトールの生成を抑えるために、*GRE3* 遺伝子を NFRI3163 からクローニングし、相同組換えによる遺伝子破壊に用いた。

C. glabrata と *S. cerevisiae* とは近縁の酵母であると述べたが、両者の遺伝子組換え機構には大きく異なる点がある。*S. cerevisiae* は相同組換えが高い頻度で起こるため、相同配列を付加することにより、染色体上の目的の位置に外来遺伝子を挿入することが容易にできる。これに対して、*C. glabrata* は相同組換えよりも非相同末端結合と呼ばれる様式の遺伝子組換えが起こりやすく、導入した遺伝子は染色体上のランダムな位置に挿入される。*C. glabrata* NFRI3163 の *GRE3* 遺伝子を破壊するために相同組換えを試みたが、得られた組換え体の96%はランダムな位置に外来のDNA断片が挿入されており、目的とする *GRE3* の位置にDNA断片が挿入されたものは4%に過ぎなかった (図8)。

XKの高発現と *GRE3* の欠損を行った遺伝子組換え株を 3163 dgXK1 と名付け、

40℃におけるキシロースのSIFを行った。その結果、発酵72時間で、20 g/Lのキシロースから7.8 g/Lのエタノールを生産した(図7c)。また、キシリトールの蓄積も極めて低く抑制されていた。エタノール収率は理論値の75%にあたり、40℃という高温において高いエタノール収率を得ることに成功した。

4.4. 高温同時異性化発酵の実用化に向けて

これまでSIFがあまり普及しなかった原因として、GIの至適pHが中性付近であるのに対して、酵母の発酵液のpHは酸性であることから、GIが十分機能できなかったことが考えられる。CaCCO法の特徴として、発酵液のpHが中性付近に維持されることが見出されており、CaCCO法はSIFに適した前処理方法

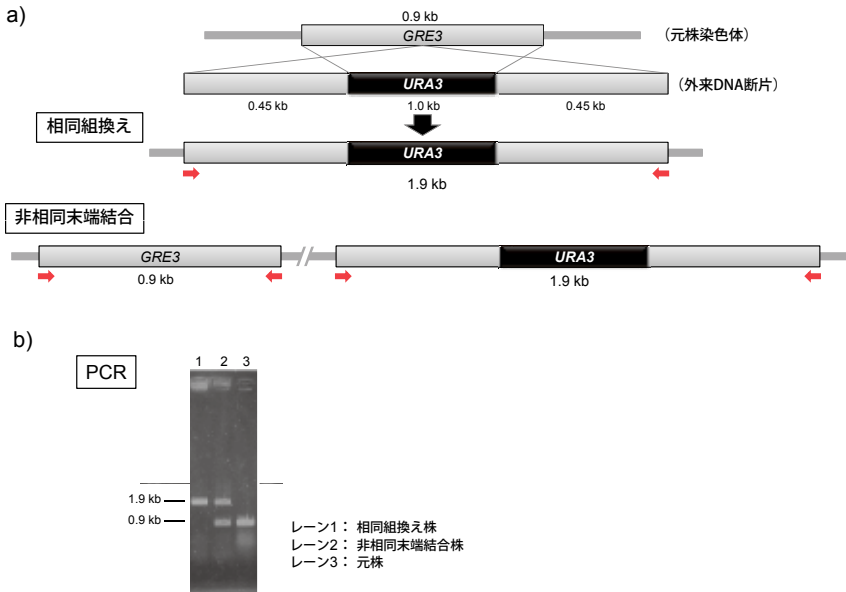


図8 相同組換えによるアルドースレダクターゼ (*GRE3*) 遺伝子の欠損

(a) 相同組換えと非相同末端結合による染色体への外来DNA断片 (*GRE3* 遺伝子の中央に *URA3* 遺伝子を挿入したもの) の挿入様式を模式図で示した。相同組換えが起こった場合のみに染色体上の *GRE3* 遺伝子の欠損が起こる。

(b) コロニーダイレクトPCRによる相同組換えと非相同末端結合の判別を示す。ウラシル要求性の消失を指標に選択した菌体を直接PCRにかけることにより、相同組換えを起こしたものでは1.9 kbのDNA断片のみ(レーン1)が、非相同末端結合を起こしたものでは1.9 kbと0.9 kbの2種類のDNA断片(レーン2)が得られる。用いたPCRプライマーの結合位置は、(a)中に赤矢印で示した。

と言える。実際に、CaCCO法で前処理した稲わらに対して、SSFとSIFとを組み合わせで発酵を行ったところ、40℃でグルコース、キシロースの双方からエタノールを生産できることを確認している³¹⁾。

これまでに報告されている高収率でキシロースを発酵する酵母の殆どは、異種遺伝子を含む遺伝子組換え体である。著者らが開発した高温SIFに適した酵母には異種遺伝子の導入が必須では無いため、将来的にはセルフクロニングや従来育種法によっても同様の性能を発揮することが可能であろう。このことは、リグノセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノール生産の実用化にとって、大きなメリットと言える。なお、本法が適用できる酵母は、今回用いた*C. glabrata* NFRI3163に限らない。高温でキシロース発酵能の優れた酵母であれば、同様の改良を行うことにより、高い収率でエタノール生産を行うことが可能になると考えられる。

5. おわりに

リグノセルロース系バイオマスからエタノールを作るためには、「前処理」、「糖化」、「発酵」の3つの工程が必要である。実際にバイオエタノールを生産する際には、これらの工程を切り分けることはできない。研究段階ではどうしても各論に入りがちだが、たとえ「発酵」の研究であっても、常に他の工程との関係を意識して、プロセス全体を最適化するという観点から研究開発を進めることが肝要であろう。特にバイオマス利用に関わる研究では、その時々々の社会情勢、すなわち経済状況、エネルギーや農産物の需給バランス、あるいは環境問題への人々の関心度、そして、それらを反映した国内外の法規制、ガイドラインや政府の施策、といった様々な外的要因にも大きく影響を受ける。我々の高温発酵の研究も開発途上であるが、着実に実用化に結び付くよう研究を進めていきたい。

謝辞

高温キシロース発酵法の開発については、農林水産省委託研究プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」によって実施されたものである。

(食品バイオテクノロジー研究領域 機能分子設計ユニット 榊原 祥清)

引用文献

- 1) 日本貿易振興機構農林水産・食品部：「平成23年度米国食糧及びバイオ燃料生産の現状と課題」(2012)。
- 2) Thalagala, T. A. T. P., Kodama, S., Mishima, T., Isono, N., Furujo, A., Kawasaki, Y., and Hisamatsu, M.: Study on ethanol fermentation using D-glucose rich fractions obtained from lignocelluloses by a two-step extraction

- with sulfuric acid and *Issatchenkia orientalis* MF 121, J. Appl. Glycosci., **56**, 7-11 (2009).
- 3) Kuyper, M., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S. M., de Laat, W. T. A. M., den Ridder, J. J. J., Camp, H. J. M. O. d., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.: High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?, FEMS Yeast Res., **4**, 69-78 (2003).
 - 4) Ho, N. W. Y., Chen, Z., and Brainard, A. P.: Recombinant yeasts for effective fermentation of glucose and xylose, US Patent 5,789,210 (1998)
 - 5) Jeppsson, M., Bengtsson, O., Franke, K., Lee, H., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F.: The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K_m for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnol. Bioeng., **93**: 665-673 (2006).
 - 6) Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T., and Makino, K.: Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, J. Biotechnol., **130**: 316-319 (2007).
 - 7) Träff, K., L., Cordero Otero, R. R., van Zyl, W. H., and Hahn-Hägerdal, B.: Deletion of the *GRE3* aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *xylA* and *XKSI* genes, Appl. Environ. Microbiol., **67**: 5668-5674 (2001).
 - 8) Roca, C. Nielsen, J., and Olsson, L.: Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production, Appl. Environ. Microbiol., **69**: 4732-4736 (2003).
 - 9) Verho, R., Londesborough, J., Penttilä, M., and Richard, P.: Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol., **69**: 5892-5897 (2003).
 - 10) Jin, Y. S. and Jeffries, T. W.: Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Biochem. Biotechnol., **105-108**: 277-286 (2003).
 - 11) Karhumaa, K., Fromanger, R., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F.: High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **73**: 1039-1046 (2007).
 - 12) Matsushika, A. and Sawayama, S.: Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of

- xylose reductase and moderate xylulokinase activity, *J. Biosci. Bioeng.*, **106**: 306-309 (2008).
- 13) 片平悟史, 徳弘健郎: 「キシロースイソメラーゼ及びその利用」, 特開 2011-147445 (2011).
 - 14) Madhavan, A., Tamalampudi, S., Ushida, K., Kanai, D., Katahira, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V. S., and Kondo, A.: Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 1067-1078 (2009).
 - 15) Tanino, T., Hotta, A., Ito, T., Ishii, J., Yamada, R., Hasunuma, T., Ogino, C., Ohmura, N., Ohshima, T., and Kondo, A.: Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 1215-1221 (2010).
 - 16) Madhavan, A., Tamalampudi, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V. S., and Kondo, A.: Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 1037-1047 (2009).
 - 17) Richard, P., Verho, R., Putkonen, M., Londesborough, J., and Penttilä, M.: Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway, *FEMS Yeast Res.*, **3**, 185-189 (2003).
 - 18) Sedlak, M. and Ho, N. W. Y.: Expression of *E. coli araBAD* operon encoding enzymes for metabolizing L-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, 16-24 (2001).
 - 19) Becker, J. and Boles, E.: A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4144-4150 (2003).
 - 20) Wisselink, H. W., Toirkens, M. J., Berriel, M. d. R. F., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T., and van Maris, A. J. A.: Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4881-4891 (2007).
 - 21) Karhumaa, K., Wiedemann, B., Hahn-Hägerdal, B., Boles, E., and Gorwa-Grauslund, M. F.: Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Microb. Cell Fact.*, **5**, 18 (2006).
 - 22) Bettiga, M., Bengtsson, O., Hahn-Hägerdal, B., and Gorwa-Grauslund, M. F.: Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway, *Microb. Cell*

- Fact., **8**, 40 (2009).
- 23) Wisselink, H. W., Toirkens, M. J., Wu, Q., Pronk, J. T., and van Maris, A. J. A.: Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 907-914 (2009).
 - 24) Galazka, J. M., Tian, C., Beeson, W. T., Martinez, B., Glass, N. L., and Cate, J. H.: Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production, *Science*, **330**, 84-86 (2010).
 - 25) Ha, S. J., Galazka, J. M., Kim, S. R., Choi, J. H., Yang, X., Seo, J. H., Glass, N. L., Cate, J. H., and Jin, Y. S.: Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 504-509 (2011).
 - 26) Park, J. Y., Shiroma, R., Al-Haq, M. I., Zhang, Y., Ike, M., Arai-Sanoh, Y., Ida, A., Kondo, M., and Tokuyasu, K.: A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw - Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process, *Bioresour. Technol.*, **101**, 6805-6811 (2010).
 - 27) Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M., and Adhikari, D. K.: Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp IPE453, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 1483-1489 (2009).
 - 28) Dmytruk, O. V., Voronovsky, A. Y., Abbas, C. A., Dmytruk, K. V., Ishchuk, O. P., and Sibirny, A. A.: Overexpression of bacterial xylose isomerase and yeast host xylulokinase improves xylose alcoholic fermentation in the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha*, *FEMS Yeast Res.*, **8**, 165-173 (2008).
 - 29) Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., et al.: Genome evolution in yeasts, *Nature*, **430**, 35-44 (2004).
 - 30) Yu, S., Jeppsson, H., and Hahn-Hägerdal, B.: Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 314-320 (1995).
 - 31) 榎原祥清, 王曉輝, 中村敏英, 徳安健: 「キシロースを高温で発酵する方法」, 特願 2012-135883 (2012).

V バイオエタノール生産に関する LCA 解析

1. はじめに

近年、新たな事業の事前評価、あるいは既存事業の事後評価の視点として、トリプルボトムライン、すなわち環境、経済、社会の各側面からの「持続可能性」の重要性が世界的に認識されている。これは、1984年に設置された国際連合「環境と開発に関する世界委員会（World Commission on Environment and Development, WCED）」（いわゆるブルントラント委員会）の1987年の報告書で示された、「将来世代のニーズを損なうことなく、現在の世代のニーズを満たすこと」という「持続可能な開発」に端を発している。

化石燃料の代替として注目されるセルロース系バイオマスを原料とするバイオエタノール生産についても、温室効果ガス・富栄養化・生物多様性などの環境的影響、生産コスト・雇用創出・経済波及効果などの経済的影響、農林地の保全・農山村の活性化・エネルギー安全保障などの社会的影響などを含め、「持続可能な開発」の視点に基づいた幅広い解析が行われている。

ライフサイクルアセスメント（Life Cycle Assessment, LCA）は、製品やサービスのいわゆる“ゆりかごから墓場まで”のライフサイクル全体について、物質やエネルギーの入力、出力を解析し、それらに起因する環境負荷を解析する手法であり、製品やサービスの環境影響評価に幅広く利用されており、ほぼ全てのバイオエタノール生産の解析に利用されている。

ここでは、草本系バイオエタノール生産に関するコストと環境負荷に関する LCA 解析の世界的動向を概説した後、筆者らが農林水産省委託プロジェクト研究「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」において実施した、草本バイオエタノール生産のコスト、エネルギーバランス、温室効果ガス排出量に関する LCA 解析結果を紹介する。

2. 草本系バイオエタノール製造プロセスの評価に関する報告

2.1 諸外国における解析事例

Roy ら¹⁾は、セルロース系バイオエタノール製造における LCA に関する報告を総説として取りまとめている。その中から、コストと環境負荷に関する報告の一部を以下に述べる。

a) エタノール製造コスト

セルロース系バイオエタノールの製造コストについて、コーンストーバー（トウモロコシ収穫後の茎葉部）から製造したエタノールの場合には 0.71-0.87\$/L²⁾（論文発表時の為替レートで 62～76 円/L。以下同じ。）、セルロース系残渣からのバイオエタノールの場合には 0.75-0.99 €/L³⁾（89～117 円/L）、などの報告例が

ある。セルロース系バイオエタノールは、ガソリンと比べて価格競争力がないとされているが、その理由として、酵素価格とプラントの建設コストが高いことがあげられ、セルラーゼ価格は全生産コストの40-55%を占めるとの報告³⁾もある。しかし、酵素コストについては文献により様々な値が報告されているのが現状である。これは、酵素をオンサイトで生産するか購入により供給するかなど、前提条件の違いに起因している。米国では、セルラーゼ生産コストについて将来的には0.1-0.5\$/gal (= 0.02-0.13\$/L) (1.8 ~ 11.4 円/L) 程度になるとの報告例が存在する。例えば、Seabraら⁴⁾は、2005年における酵素生産コストは1\$/gal (110 円/gal, 29 円/L) なのに対し、企業の積極的な投資や政府の研究費の投入により、2010年では0.5\$/gal (44 円/gal, 12 円/L) になるとしている²⁾。一方、欧州の報告事例ではセルラーゼコストだけで0.51 €/L (60 円/L) などの報告があり³⁾、酵素コストは文献によって大きな幅が見られる。各種報告におけるバイオエタノール製造における酵素コストの試算結果を、表1²⁾¹²⁾にまとめた。

一方、Wingren et al.¹³⁾は、木質系バイオエタノール製造プロセスにおいて、Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) と Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) のコストを0.57 (\$/L) (66 円/L) および0.63 (\$/L) (73 円/L) とそれぞれ算出している。両者の間でトータルコストに差が出た原因として、SSF プロセスにおけるプラント建設コストの減少と、エタノール収率の向上が挙げられている。バイオエタノールの製造コスト低減のためには、酵素コストの削減に加え、プロセスの簡略化や、エタノール変換効率を向上させるための技術開発の促進が期待される。

b) エタノール製造に伴う環境負荷

セルロース系バイオエタノール製造プロセスの環境負荷の評価にLCA手法が広く用いられている。セルロース系バイオエタノールは、エネルギー安全保障の観点や、温室効果ガス (Green House Gases (GHG)) の削減に効果的であるという報告¹⁴⁾²⁰⁾がある一方で、化石燃料と比べてGHGを多く排出するといった報告²¹⁾もあり、その評価が分かれている。ガソリンと比較したGHG排出削減効果については、コーンストーバーで65%²²⁾、スイッチグラス (*Panicum virgatum* L.) で94%²³⁾、などの報告があるが、製品 (エタノール) と副産物への環境負荷の配分方法 (アロケーション法) の違いによって数字が変動することに注意が必要である。稲わらのように農業廃棄物としての扱いが可能な場合は、稲わらの生産に係わる環境負荷を考慮せず、玄米にすべての環境負荷を配分することもできるが、原料バイオマスがエタノールの製造を目的に生産される資源作物等の場合は、作物生産に係わる環境負荷をバイオエタノールに配分することになる。

ところで、GHG削減効果がある場合であっても、一酸化炭素 (CO)、窒素酸化物 (NO_x)、硫黄酸化物 (SO_x) の排出量が増加するなど環境に対して負の影響

表 1 異なる供給原料のバイオエタノール製造コストに関する文献の概要

著者	原料と供給量, コストおよび収率		2 酵素使用量	酵素コスト (\$/L)	エタノール製造コスト (\$/L)						備考
	原料と供給量 (t/d)	コスト (\$/t)			収率 (L/t)	1999	2000	2002	2005	2010	
1Wooley et al., 1999 ²⁸	*CS, 2000	25.0	257.38-355.79	15-20 FPU	0.079	0.380	-	0.248	0.217	-	酵素コストを 1/10 にする必要がある (1997 年ドル価格基準)。
McAlloon et al., 2000 ²⁹	*CS, 1050	35.0	272.52	-	0.050	0.396	-	-	-	-	酵素生産工程に関して若干の情報が見られている (1999 年ドル価格基準)
1Aden et al., 2002 ³⁰	*CS, 2000	30.0	272.52-339.51	12-17 FPU	0.026	-	0.346	-	0.283	-	酵素は外部より購入 (2000 年ドル価格基準)
1Aden et al., 2008 ³¹	*CS, 2000	60.0-46.0	257.38	-	0.085-0.026	-	1.110	0.666	-	0.351	酵素コストは想定値 (2002 年ドル価格基準)
1Dutta et al., 2010 ⁴	*CS, 2000	60.1	-	30-40 mg protein	0.085	-	-	-	0.801	-	酵素コストは想定値 (2007 年ドル価格基準)
1Eggeman et al., 2005 ³²	CS, 2000	35	-	15 FPU	0.039	-	-	0.262-0.441	-	-	酵素コストは想定値
Reith et al., 2002 ⁵	1VG, 2000	20 ^e	152.49	-	0.510 ^e	-	0.920 ^e	-	-	-	酵素コストは想定値
Orikasa et al., 2009 ³³	*RS, 200	15000 ^y	250.0	-	-	-	-	-	-	-	酵素コストは想定値
3Barta et al., 2010 ^{33,34}	スプルス, 200000 ^z	68.15	254.0-270.0	10 FPU	0.058-0.073	-	-	-	0.548-0.722	-	酵素コストは想定値

CS: コーンストローバー; RS: 稲わら; VG: 雑草; FPU: filter paper unit (ろ紙分解活性); 1 プラント耐用年数: 20 年; 2 per g-cellulose; * 希酸前処理; L ライム前処理; 3 プラント耐用年数 15 年; e: ユーロコスト; a: 年換算

が増加する可能性も示唆されており²⁴⁾、GHG以外の項目も考慮して、バイオエタノール製造プロセスの環境負荷について評価することが期待される。

一方、Koga and Tajima²⁵⁾は、稲わらをバイオエタノールの原料として水田から持ち出した場合、水田から発生するメタン(CH₄)が大幅に減少する可能性を指摘している。CH₄は、地球温暖化係数(Global Warming Potential, GWP)が23²⁶⁾であり、その排出が削減されると、GHG排出量削減効果は非常に大きい(バイオマス輸送のための燃料消費量は比較的小さく¹⁰⁾、バイオマスの移動を考慮してもGHG削減効果は大きく減じない)。このように、バイオエタノール製造とは直接関係しない間接的な影響も含め、バイオエタノール製造の環境への影響について検討することが重要であると思われる。

2.2 我が国における報告事例

我が国におけるセルロース系バイオエタノール製造のLCAに関する報告事例は、諸外国と比較して極めて少ない。これは、バイオエタノール製造が商業的に実施されていないことが主因と思われる。その中で、濃硫酸加水分解法による報告事例が数例^{10, 27, 28)}存在する。これらの報告における製造プロセスに関する環境負荷因子とその量(インベントリ)は、NEDO報告書²⁸⁾を基に解析されており、酵素糖化法との単純な比較は困難であるが、バイオエタノール製造コストは55円/ℓ～124円/ℓとなっている。これらの解析のいずれにも共通するのが、原料コストが製造コストの大部分を占めるということである。例えば、折笠らの報告¹⁰⁾では、124円のうち原料コストが69.8円(全体の73%)となっており、コスト削減のためには原料価格を下げる取り組みや、原料投入量を大幅に減らす技術開発、すなわち、変換効率の向上を集中的に進める事の必要性について言及されている。また、CO₂排出量削減の観点からは、リグニンなどの残渣をボイラーの熱源として利用してエネルギー回収する必要があるとしており、もし、エネルギー回収がない場合は、大幅なCO₂削減効果が見込めないと報告されている。残渣の有効利用だけでなく、通常の熱源にバイオマスペレットを使用するなど、外部から投入されるエネルギーをカーボンニュートラルな資源であるバイオ燃料により賄うプロセスを想定し、最適なプロセスを検討する必要があると考えられる。ただし、その場合も、間伐材や廃木材といった原料自体はカーボンニュートラルであったとしても、原料の運搬、細断・粉碎、ペレット加工、ペレットの貯蔵・輸送などのプロセスでのCO₂排出量を考慮する必要がある。佐賀ら^{30, 31)}は、CO₂の削減効果について、副産物の利用はセルロース系バイオエタノール製造プロセスにおいてCO₂削減のための必要条件であり、最も効果的な副産物利用方法を検討する必要があるとしている。

これらの報告では、バイオエタノール単独でのCO₂削減効果を期待するのは厳しいとしており、ガス化発電、他産業からの廃熱利用、飼料・肥料化も含め、

副産物の利用を加味してバイオエタノール製造プロセスの最適化を検討する必要があると考えられる。また、既存の報告は濃硫酸加水分解法の解析が多いことも問題である。バイオエタノール変換技術開発の主流である、酵素加水分解法によるプロセスの評価を、早急かつ着実に実施していく必要がある。

3. プロジェクト研究における解析対象および目標

本特集の最初に解説されているように、Calcium Capturing by Carbonation (以下、CaCCO 法)³²⁾ や Direct Saccharification of Culum (以下、DiSC 法)³³⁾ など、高効率なバイオエタノール変換技術の確立に向けた研究開発が進んでいる。また、本プロジェクトにおいてはコスト目標も明確に定められており、原料の生産から廃液処理工程までを含めて 100 円 /L 程度と、低コストでバイオエタノールを製造する技術開発が求められている。一方、世界各国でバイオ燃料の二酸化炭素 (CO₂) 削減率に関して基準を策定する動きが進みつつあり、我が国においても「バイオ燃料導入に係る持続可能性基準等に関する検討会」において、バイオ燃料の CO₂ 削減率として 50% を一つの方向性と報告している。このような現状を受けて、新たな変換技術を用いたバイオエタノール製造プロセス全体の CO₂ 排出量がバイオエタノールの CO₂ 削減基準に合致するかについて評価する必要性が高まっている。

4. 23 年度までの解析結果の概要

DiSC 法や常温 CaCCO (RT-CaCCO) 法からバイオエタノールを生産した場合のコストおよび CO₂ 排出量について解析を行った。コストについては、DiSC 法および RT-CaCCO 法で、それぞれ 109 円 /L および 144 円 /L と試算された³⁴⁾ (図

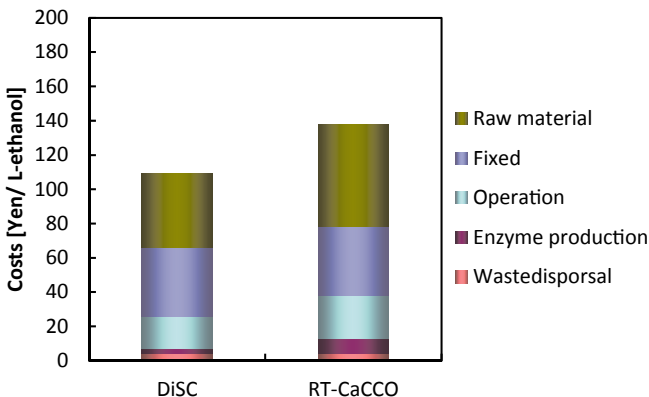


図 1 バイオエタノールの生産コスト内訳

1)。原料費と固定費の占める割合が最も大きいことから、変換効率の向上による原料コスト削減およびプロセスの簡略化による設備コスト低減を検討する必要があることを提言した。エタノール製造工程では、各種前処理工程および酵素生産工程におけるコスト負荷が大きいことが定量的に示された。

一方、RT-CaCCO法を基本としてコスト、CO₂排出量の縮減に寄与できると考えられる改善オプションを含むシナリオを設定した³⁵⁾。改善オプションとしては、①発酵・蒸留過程の効率化（減圧発酵&蒸留）、②年間施設稼働日数の増大（300日から350日）、③再生可能エネルギー推進施策の導入（バイオマスコストの低減）を設定した。シナリオごとでは、S1は基本ケース、S2では①と②、S3では、①、②、③の改善オプションを採用した。設定したシナリオの概要については表2に示した。その結果、コストについては基本ケースのS1に対して、改善ケースのS2およびS3で、それぞれ5.0%および35.6%、低減することが分かった（図2）。また、CO₂排出量については、基本ケースのS1に対して、改善

表2 新技術・新施策導入を想定したシナリオ設定

S1：基本ケース	通常の発酵と蒸留
S2：革新ケース	減圧発酵&蒸留
S3：将来ケース	減圧発酵&蒸留，再生可能エネルギー推進試作導入

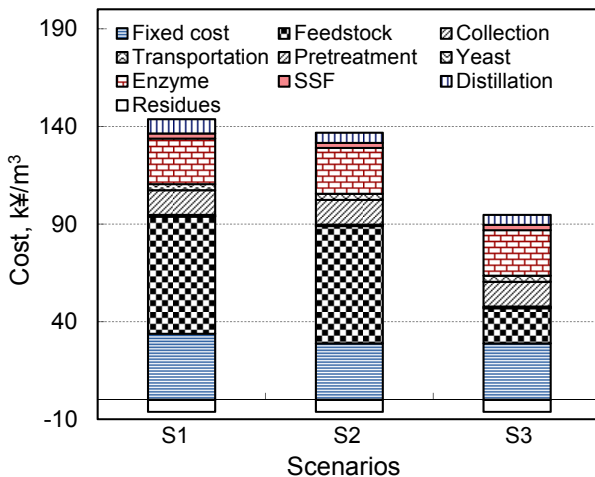


図2 RT-CaCCO法を基本としたシナリオベースのコスト解析

ケースの S2, S3 では 3.4% 低減することが分かった (図 3)。また, 酵素単価が全体コストに及ぼす影響を調べ, いずれのシナリオにおいても影響度が大きく, 酵素コストの低減がエタノール生産における今後の大きな課題であることを示した (図 4)。酵素コスト低減のためには, 低コスト生産技術の開発に加えて, 酵

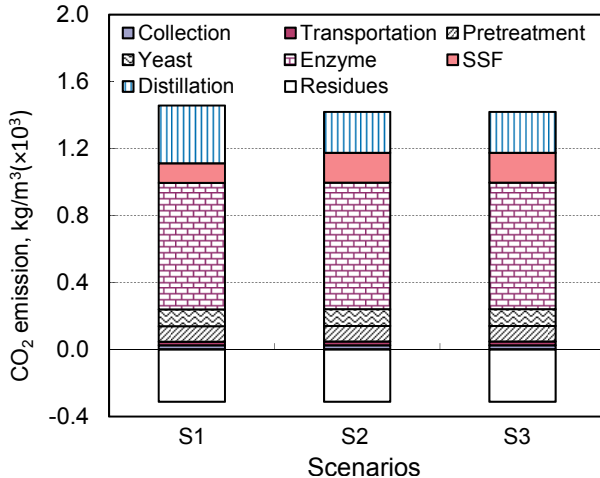


図 3 RT-CaCCO 法を基本としたシナリオベースの CO₂ 排出量解析

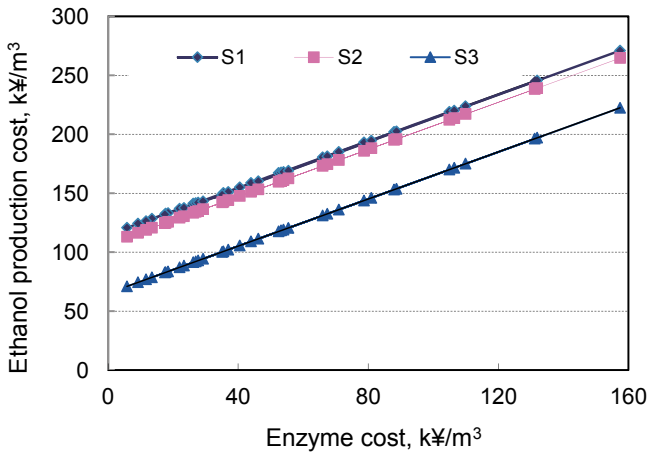


図 4 RT-CaCCO 法を基本としたシナリオベースのコスト解析
(酵素単価の影響)

素の再利用技術の開発も重要であるといえる。

原料生産部分がバイオエタノール生産プロセス全体のCO₂排出量に及ぼす影響を評価するため、RT-CaCCO法およびDiSC法による稲わらからのバイオエタノール生産について、原料生産工程のCO₂排出量を経済価値に基づいて玄米と稲わらへ配分し、原料バイオマス生産工程の影響も加味したライフサイクルCO₂(LC-CO₂)解析を行った³⁶⁾。その結果、水管理変化のない条件で生産されたバイオエタノールのCO₂排出量は、ガソリンのCO₂排出量(81.7g-CO₂/MJ)に対してRT-CaCCO法およびDiSC法でそれぞれ48g-CO₂/MJおよび33g-CO₂/MJであり、バイオエタノール導入に伴うCO₂削減率は、RT-CaCCO法およびDiSC法でそれぞれ41%および59%と試算された(図5)。水管理変化がある条件においても、RT-CaCCO法およびDiSC法のCO₂削減率は、それぞれ32%および52%程度と期待される(図5)。稲わらの水田外への持ち出しにより、稲わらからの肥料成分供給が無くなることに伴う投入窒素肥料の増分を考慮しても、メタンガス起因のCO₂発生量が4.5~6.1g-CO₂/MJ程度低減する効果が期待される。CO₂削減目標の視点からは、既存の水田が多い地域ではコシヒカリなどの稲わらを用いてRT-CaCCO法によりバイオエタノールを製造し、休耕田などが多い地域ではリーフスター由来稲わらを用いてDiSC法によりバイオエタノールを製造することが効果的と考えられる。地域の置かれた状況に応じてRT-CaCCO法とDiSC法を使い分けることにより、効果的にCO₂を削減できるバイオエタノールの製造が可能になると期待される。

5. おわりに

バイオ燃料の持続可能性に関しては、Global Bioenergy Partnership (GBEP)において検討が進められ、2011年に持続可能性指標(The Global Bioenergy

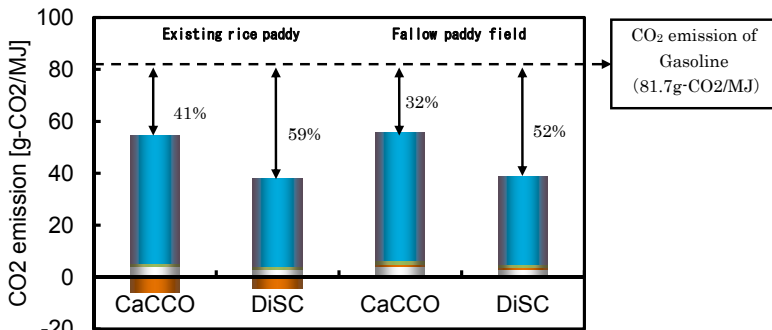


図5 CaCCO法およびDiSC法におけるCO₂排出量の比較
(原料栽培～原料収集～燃料製造)

Partnership Sustainability Indicators for Bioenergy)が公表されている³⁷⁾。一方、前述のように、わが国においてはバイオ燃料の持続可能性指標として温室効果ガス50%削減が一つの方向性として示されているが、これはEUにおける同様の検討に基づいて定められた「再生可能エネルギー指令」³⁸⁾、等を参考に設定されたものである³⁹⁾。

すなわち、環境負荷が小さそうだというイメージに頼ったバイオエタノール生産の事業化は世界的に許されず、環境（環境負荷）、経済（コスト）の視点での厳しい評価が求められる。一方で、発展途上国やBRICsにおける農業・農村振興、あるいは先進国であっても景観保護、地域振興などの社会の持続性を重視して、環境・経済の効能が大きくない場合であっても、バイオエタノール生産を実施するという選択もあり得る。

このような、複数基準を用いた評価の一般化は困難で個別の案件ごとの意志決定が必要であると考えられるが⁴⁰⁾、環境・経済・社会のトリプルボトムラインという視点に立った各側面の評価を正確に実施し、その結果を意思決定者や社会に正確に伝達することが重要であると考えている。

（農研機構食品総合研究所 椎名 武夫・
岩手大学農学部農学生命課程 折笠 貴寛）

引用文献

- 1) Roy, P., Tokuyasu, K., Orikasa, T., Nakamura, N., and Shiina, T. (2012). A review of life cycle assessment (LCA) of bioethanol from lignocellulosic biomass, *Japan Agricultural Research Quarterly* **46**, 41-57.
- 2) Dutta, A., Dowe, N., Ibsen, K. N., Schell, D. J., and Aden, A. (2010). An economic comparison of different fermentation configurations to convert corn stover to ethanol using *Z. mobilis* and *Saccharomyces*. *Biotechnol. Prog.* **26**, 64-72.
- 3) Reith, J.H., Uil, H.D., Veen, H.V, Laat, W.T.A.M.D, Niessen, J.J., Jong, E.D., Elbersen, H.W., Weusthuis, R., Dijken, J.P.V., and Raamsdonk, L. (2002). Co-production of bio-ethanol, electricity and heat from biomass residues. The 12th European Conference and Technology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection, Amsterdam, The Netherlands, June 17-21.
- 4) Seabra, J.E.A., Tao, L., Chum, H.L., and Macedo, I.C. (2010). A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. *Biomass and Bioenergy*, **34**, 1065-1078.

- 5) Wooley, R., Ruth, M., Sheehan, J., and Ibsen, K. (1999). Lignocellulosic biomass to ethanol—process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis—current and futuristic scenarios, Report No. TP-580-26157. National Renewable Energy Laboratory. Golden Colorado USA.
- 6) McAloon, A., Taylor, F., and Yee, W. (2000). Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, NREL/TP-580-28893.
- 7) Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheehan, J., and Wallace, B. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, Report No. NREL/TP-510-32438, <<http://www.nrel.gov/docs/fy02osti/32438.pdf>>.
- 8) Aden, A., (2008). Biochemical Production of Ethanol from Corn Stover: State of technology model. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, Report No. NREL/TP-510-43205, < <http://www.nrel.gov/docs/fy08osti/43205.pdf>>.
- 9) Eggeman, T. and Elander, R. (2005). Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* **96**, 2019–2025.
- 10) 折笠貴寛・徳安健・井上貴至・小島浩司・ロイ ポリトシユ・中村宣貴・椎名武夫 (2009), 稲わら由来のバイオエタノール生産におけるエタノール変換効率の違いがコスト, CO2 排出およびエネルギー収支に及ぼす影響, 農業機械学会誌 **71**(5), 45-53.
- 11) Barta, Z., Reczey, k., and Zacchi, G. (2010a). Techno-economic evaluation of stillage treatment with anaerobic digestion in a softwood-to-ethanol process. *Biotechnol. Biofuels* **3**: 21.
- 12) Barta, Z., Kovacs, K., Reczey, K., and Zacchi, G. (2010b). Process design and economics of on-site cellulase production on various carbon sources in a softwood-based ethanol plant. *Enzyme Research*, Article ID734182.
- 13) Wingren, A., Galbe M., and Zacchi, G. (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1109–1117.
- 14) Spatari, S., Zhang, Y., and MacLean, H. L. (2005). Life cycle assessment of switchgrass- and corn stover-derived ethanol-fueled automobiles. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 9750–9758.
- 15) Williams, P.R.D., Inman, D., Aden, A., and Heath, G.A. (2009). Environmental and sustainability factors associated with next-generation biofuels in the

- US: what do we really know. *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 4763–4775.
- 16) Mabee, W.E., and Saddler, J.N. (2010). Bioethanol from lignocellulosics: Status and perspectives in Canada. *Bioresour. Technol.* **101**, 4806–4813.
 - 17) Wyman, C. E. (1994). Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.* **50**, 3–15.
 - 18) Fleming, J.S., Habibi, S., and MacLean, H.L. (2006). Investigating the sustainability of lignocellulose-derived fuels for light-duty vehicles. *Transport. Res. Part D: Transport and Environ.* **11**, 146–159.
 - 19) González-García, S., Luo, L., Moreiraa, M.T., Feijoo, G., and Huppes, G. (2009). Life cycle assessment of flax shives derived second generation ethanol fueled automobiles in Spain. *Renew. Sustain. Revs.*, **13**, 1922–1933.
 - 20) Vliet, V.O.P.R., Faaij, A.P.C. and Turkenburg, W.C. (2009). Fischer-Tropsch diesel production in a well-to-wheel perspective: a carbon, energy flow and cost analysis. *Energy Con. Manag.* **50**, 855–876.
 - 21) Fu, G., Chan, A., and Minns, D. (2003). Life cycle assessment of bio-ethanol derived from cellulose. *Int. J. Life Cycle Assess.* **8**, 137–141.
 - 22) Spatari, S., Zhang, Y., and MacLean, H. L. (2005). Life cycle assessment of switchgrass- and corn stover-derived ethanol-fueled automobiles. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 9750–9758.
 - 23) Schmer, M.R., Vogel, K.P., Mitchell, R.B., and Perrin, R.K. (2008). Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **105**, 464–469.
 - 24) Sheehan, J., Aden, A., Paustian, K., Killian, K., Brenner, J., Walsh, M., and Nelson, R. (2003). Energy and environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol. *J. Ind. Ecol.* **7**, 117–146.
 - 25) Koga, N. and Tajima, R. (2011). Assessing energy efficiencies and greenhouse gas emissions under bioethanol-oriented paddy rice production in northern Japan. *J. Environ. Manag.* **92**, 967–973.
 - 26) 伊坪徳宏 (2007), 第4章・ライフサイクル影響評価「LCA 概論 (稲葉敦, 青木良輔監修), pp.127」, 丸善, 東京
 - 27) 朝野賢司・美濃輪智郎 (2007), 日本におけるバイオエタノールの生産コストとCO2削減コスト分析, 日本エネルギー学会誌, **86**, 957-963.
 - 28) 楊翠芬・玄地裕・匂坂正幸 (2011), 耕作放棄地利用を考慮したバイオエタノール生産プロセスのコスト・環境負荷の評価, 日本LCA学会誌, **7(3)**, 281-291.
 - 29) NEDO (2006), バイオマスエネルギー高効率転換技術開発／セルロース系バイオマスを原料とする新規なエタノール醗酵技術等により燃料用エタノール

- ルを製造する技術の開発 平成13年度～平成17年度成果報告書, 149-232.
- 30) 佐賀清崇・横山伸也・芋生憲司 (2008), 稲作からのバイオエタノール生産システムのエネルギー収支分析, エネルギー・資源学会論文誌, **29**(1), 30-35.
 - 31) 佐賀清崇・藤本真司・柳田高志・多田千佳・ベスピャトコ リユドミラ ユリイブナ・バティスタ エルマー, 美濃輪智郎 (2009), 前処理・糖化法の違いを考慮したセルロース系バイオエタノール製造プロセスの比較評価, エネルギー・資源学会論文誌, **30**(2), 9-14.
 - 32) Shiroma, R., Park, J-Y., Al-Haq, M.I., Arakane, M., Ike, M., and Tokuyasu K. (2011). RT-CaCCO process: an improved CaCCO process for rice straw by its incorporation with a step of lime pretreatment at room temperature. *Bioresourse Technology* **102**, 2943-2949.
 - 33) Park, J-Y., Ike, M., Arakane, M., Shiroma, R., Li, Y., Arai-Sanoh, Y., Kondo, M., and Tokuyasu, K. (2011). DiSC (direct saccharification of culms) process for bioethanol production from rice straw, *Bioresour. Technol.* **102**, 6502-6507.
 - 34) Orikasa, T., Tokuyasu, K., Park, J-Y., Kondo, M., Sanoh, Y., Inoue, T., Kojima, K., Yano, T., Roy, P., Nakamura, N., and Shiina, T. (2010). Soft-carbohydrate-rich rice straw: a potential raw material for bio-ethanol, *Proceedings of the 9th International Conference on Eco Balance*, 542-544.
 - 35) Roy, P., Orikasa, T., Tokuyasu, K., Nakamura, N., and Shiina, T. (2012). A techno-economic and environmental evaluation of the life cycle of bioethanol produced from rice straw by RT-CaCCO process, *Biomass and Bioenergy* **37**, 188-195.
 - 36) 折笠貴寛・徳安健・ロイ ポリトシュ・井上貴至・小島浩司・中村宣貴・矢野歳和・椎名武夫 (2011), 稲わらからの CaCCO 法および DiSC 法によるバイオエタノール生産の LC-CO₂ 評価, 第70回農業機械学会年次大会講演要旨集, 294-295.
 - 37) Global Bioenergy Partnership (2011). The Global Bioenergy Partnership Sustainability Indicators for Bioenergy, GBEP ホームページ, 入手先 < <http://www.globalbioenergy.org/programmeofwork/task-force-on-sustainability/gbep-report-on-sustainability-indicators-for-bioenergy/en/>> (2012年11月30日参照)
 - 38) Europe Commission (2008). EU Directive 2009/28/EC, , EU ホームページ, 入手先 < http://ec.europa.eu/energy/renewables/biofuels/sustainability_criteria_en.htm> (2012年11月30日参照)
 - 39) 椎名武夫・折笠貴寛・井上貴至・小島浩司 (2009): バイオ燃料の持続可能性基準, 農産物流通技術 2009, 農産物流通技術研究会編, 75-79

- 40) 林清忠 (2012) : 複数の意思決定者が複数の基準を用いて選択することの意味ーバイオマスを活用した持続可能な社会形成のためにー, 日本 LCA 学会誌, **8**(4), 349-355

Ⅵ エタノール製造コスト低減に向けて (連結バイオプロセスとヘミセルロースの利用)

1. はじめに

「地球温暖化対策(二酸化炭素の削減)、石油依存社会からの脱却へ向け、バイオ燃料を利用する必要がある。食糧と競合しないセルロース系バイオマスを利用する必要がある。しかしながら、セルロース系バイオマスを原料としたエタノール製造は製造コストが高く実用化が困難である。」というの、良く目にするフレーズである。しかしながら、このような記述には大きな落とし穴がある。セルロース系バイオマスを原料としたエタノールは本当に高価なのだろうか? 安価にエタノールを製造できたら、バイオ燃料の利用は実用化するのだろうか? 図1に物の需要と付加価値の関係を示したが、燃料は大量のニーズがあるものの付加価値が非常に低いものである。この様に安価な燃料としては、バイオ燃料の製造コストは高いのであって、現在の技術でも飲料用のアルコールに比べて非常に安価にエタノールを製造できる。しかしながら、飲料としてのエタノールは遙かに高価格であるが産業化されているという現実もある。このことから分かることは、逆ピラミッドの関係にある「物の需要と付加価値」に見合う産業化モデルを作り



図1 物の需要と付加価値の関係

物の需要と付加価値は互いに逆ピラミッドの関係にある。

上げなければ、バイオ燃料の利用を実用化することは厳しいということである。

また、バイオ燃料という言葉が先行している為に誤解を生じていると思うが、石油の利用は燃料に限ったものではない。図2に石油リファイナリーのイメージを示したが、原油を分留して様々な物質を取り出し、これを原料としてエネルギー製品の他、化学製品、素材など様々な物を作り出すことで、現在の石油化学産業が成り立っている。従って、石油をバイオ燃料で代替するためには、バイオマスリファイナリーを実現し、燃料以外の化学製品、素材などをバイオマスから作り出す必要がある。

植物細胞壁は地球上に最も多く存在するバイオマス資源であり、全世界で1年間に生産される植物の量は、乾燥重量として陸上で1000億トン、海で500億トンと見積もられている。植物の乾燥重量の約60%以上は細胞壁であり、植物細胞壁の主成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンといった成分である(図3)。現在のエタノール製造技術では、セルロース以外の成分からエタノールを製造することは困難であり、バイオマスの約3分の2を利用できていない。従って、ヘミセルロース、リグニンを原料として化学製品、素材などを作る技術確立し、バイオマスリファイナリーを可能にすることが、バイオ燃料を実用化していくためには必須であることは自明のことである。

本稿では、バイオ燃料実用化に向け、エタノール製造コストの削減、さらにはバイオリファイナリーの実現へ向け、著者らがこれまで行ってきた試みについて解説する。

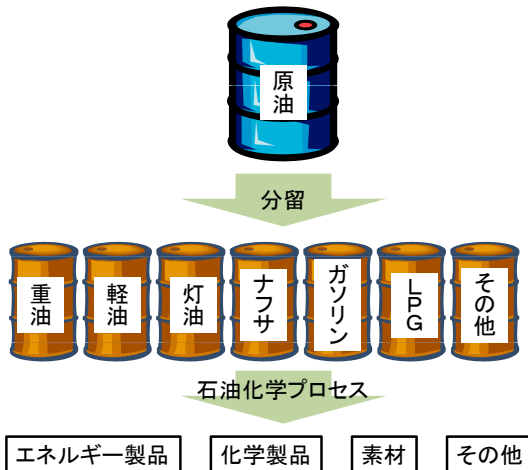


図2 石油リファイナリー

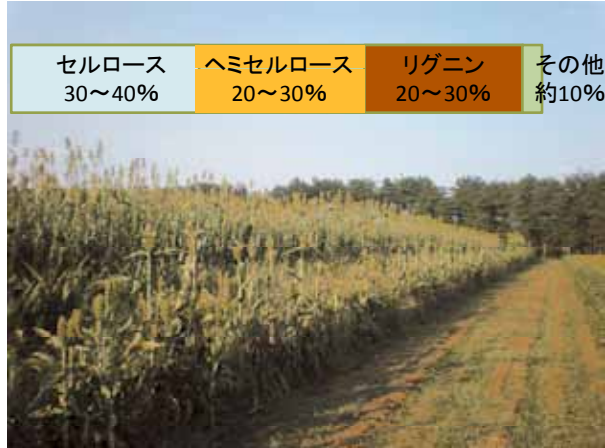


図3 バイオマスの組成

2. エタノール変換コストの削減に向けて

2.1 連結バイオプロセス

一般的なバイオマスのエタノールへの変換法は、「前処理」、「糖化」、「発酵」を段階的に別プロセスとして実施するものであるが、「前処理」及び「糖化酵素の生産または購入」に関わる費用が、コスト面の主要なハードルとなっていることが示されている¹⁾。リグノセルロース系バイオマスは前処理をしなければ糖化できないため、安価なエタノール製造法の開発へ向けには、糖化酵素の製造コスト削減や糖化酵素使用量の削減が重要な意味を持つ。このような背景から酵素生産から糖化、発酵までのプロセスを生物的に1バッチで行う「連結バイオプロセス (Consolidated Bioprocessing; CBP)」つまり、同一の生物に糖化酵素生産とエタノール発酵を行わせるという方法が、近年、注目を集めるようになってきた (図4)^{2,3)}。酵素生産をプロセスに含むことがCBPの最大の特徴であり、これにより従来法で問題となっている酵素の価格をゼロにできると共に、設備費や投入エネルギーを削減できるため、大幅な製造コストダウンに加え、二酸化炭素削減における貢献度も大きいことが期待される⁴⁾。しかしながら、本プロセスに適合する微生物は現時点では開発されていない。この優れた方法であるCBPを可能にするため、遺伝子組換えにより本プロセスに適合する微生物の開発が行われている。一つ目のやり方としては、セルラーゼを生産する微生物の改良である。本方向性の研究は、嫌気性菌である *Clostridium* 属を対象とした研究が中心であり、最初にCBPを提唱したLyndのグループにより研究が行われている。*Clostridium* 属の菌の中には、エタノール発酵能を有する種も存在す

酵素糖化系

適切な前処理を行なったバイオマスを経験処理で糖化し、発酵によりエタノールを得るもの

バイオマス → 前処理 → 酵素糖化 → 糖 → 発酵 → 濃縮脱水 → エタノール

一貫微生物系

(世界に開発例なし)

微生物技術を中心に、糖化・発酵同時反応など、ワンポット反応系でエタノールを得るもの

バイオマス → 前処理・糖化・発酵(同時) → 濃縮脱水 → エタノール

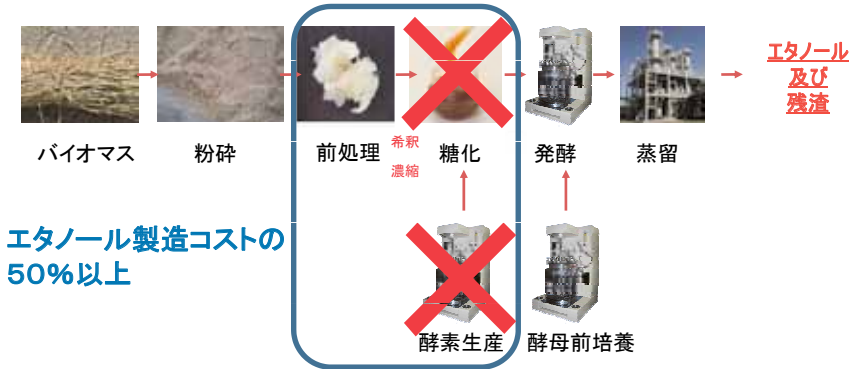


図4 エタノール製造プロセスの比較

酵素糖化系は一般的なプロセスである。それに対し、一貫微生物系はプロセスを統合し、バイオマスを直接エタノールへ変換するため、酵素生産設備、糖化設備が不要となる。また、一段階の反応となるため、投入エネルギーも減らすことが可能となる。

(平成20年3月 バイオ燃料技術革新計画の図を改変)

ることからCBP微生物として有望と考えられるが、エタノール耐性が極めて低い、ペントースを資化できない、バイオマスを前処理した際に生成する発酵阻害物質への耐性が低いなどの問題があげられている。これらの問題を解決した変異株の開発が求められているが、嫌気性菌の遺伝子組換えは非常に困難であることが大きな障害となっている。このような状況から2種の微生物を用いた変換が試みられ、CBPとしては最も効率の良い結果が得られたとして報告されている⁵⁾。*C. thermocellum*と*Thermoanaerobacterium sacchrolyticum*を混合培養した場合、アビセル原料から92.2 g/Lのエタノールが変換効率90%で生産されたという報告であるが⁵⁾、精製されたセルロースを原料とした実験であり、実バイオマスを原料とした場合の変換率は不明である。単独株を用いた実験では、*C. cellulolyticum*改良株がセルロースから50 g/Lのエタノールを生産した報告や*C. thermocellum*変異株がセルロースからのエタノール変換効率94%を達成した

報告があるが、前者は変換率が64%と低く⁶⁾、後者はエタノール濃度が19.5 g/Lと著しく低い⁵⁾。従って、*Clostridium* 属単独によるCBPは非常に難しいように思われる。

2つめのアプローチとしてエタノール生産性微生物の改良が行われている。本研究においては、*Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* などのエタノール生産性バクテリアや *Saccharomyces cerevisiae*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* などのエタノール生産酵母に遺伝子を組換えて、エキソ-グルカナーゼ、エンド-グルカナーゼ、ヘミセルラーゼなどの種々の糖化酵素生産能を付与し、さらにアラビノースやキシロースなども含めたバイオマスから得られる糖を全てエタノールに変換できるにすることが望まれる²⁾。しかしながら、これらエタノール生産微生物はエタノール生産能に優れる反面、バイオマスの糖化酵素をほとんど保有しないことから、詳細は「4. おわりに」の部分で説明するが、複雑な構造をしたバイオマスの糖化に対応するのは不可能であると考えられる。実際に、現状では糖化の壁を越えられておらず、*Trichoderma reesei* の培養液中の全タンパク質の約50~70%を占め、*T.reesei* の生産する酵素の中でセルロース分解に最も重要な役割を果たしていると考えられている酵素であるセロビオハイドロラーゼI (CBH I) およびII (CBH II) のうち、CBH II を *S. cerevisiae* の細胞表層へディスプレイした菌株を用いて、200 g/L の水熱処理したイナワラを変換効率89%でエタノールに変換したという報告があるが、変換には10 FPU/g バイオマス相当のセルラーゼの添加が必要である。また、5 FPU/g バイオマス量のセルラーゼを添加した場合にはエタノール収率が野生株とほぼ同じ値となり、CBH II を発現させた効果が出ない⁷⁾。また、CBH I は異種発現が極めて困難な酵素であり、*S. cerevisiae* で発現に成功したという近年の報告でも、全タンパクの4~5%に相当する量に留まるうえ⁸⁾、酵素生産は好気培養での結果であり、嫌気条件となるCBPにおける有用性は疑問視されている³⁾。

2.2 きのこによる連結バイオプロセス

筆者らは、新たなCBP生物の候補として、エタノールを生産する種が存在し、地球上で唯一単独でリグノセルロースの完全分解が可能な木材腐朽菌である“担子菌”に着目し研究を行ってきた。後述するメリットを考え、食用担子菌、つまりは「きのこ」を対象にエタノール生産性とバイオマス分解酵素の生産性を調べ、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) の野生株である Fv-1 株をCBPの候補株として選抜した⁹⁾。担子菌のエタノール発酵特性については、殆ど報告が無く、どの様な糖選択性を示すのか不明であったため、まず、単糖類の発酵特性を検討した(図5)。本菌は、グルコース、マンノース、フルクトースに関しては、培養開始直後より糖の消費が始まり、糖の消費に反比例してエタノールの生産が

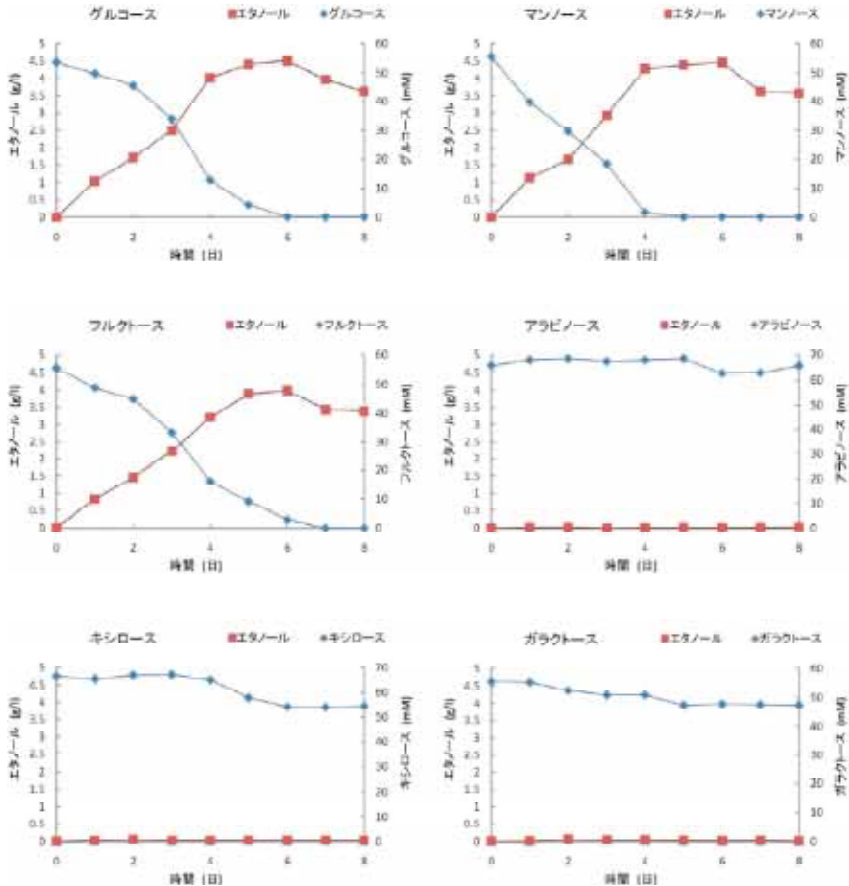


図5 エノキタケによるエタノール発酵における単糖類の発酵特性

観察された。培養開始6日後にエタノール濃度が最大になり、理論上のエタノール回収率はそれぞれ88%（グルコース）、86%（マンノース）、77%（フルクトース）となった。一方、キシロース、アラビノース等のペントースやガラクトースに関しては、殆ど糖が消費されず、エタノールの生産は見られなかったことから、エノキタケはこれらの糖類を嫌気条件下では殆ど代謝できないか、非常にゆっくり消費することが示唆された。以上の様に、単糖類の発酵特性は一般的にエタノール発酵に用いられている *S. cerevisiae* と同様であった。次に、エノキタケは糖化酵素を生産可能であることから、種々のオリゴ糖類の発酵特性を検討した。図6に示すように、エノキタケ Fv-1 株は、シヨ糖、マルトースを高度に発

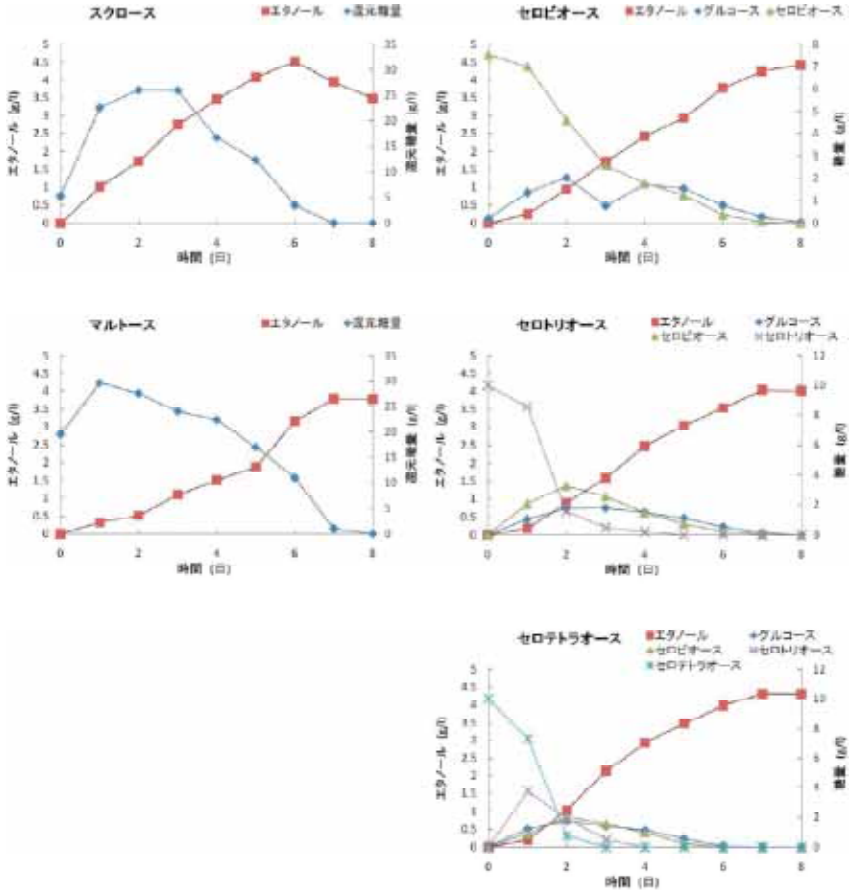


図6 エノキタケによるエタノール発酵におけるオリゴ糖類の発酵特性

酵することができた。培地の還元糖量が培養初期に一次的に増加し、徐々に低下することから、オリゴ糖を単糖に分解して代謝していることが示唆された。エタノール生産は培養6～7日目で最大となり、理論上のエタノール回収率はショ糖からは83%、マルトースからは77%であった。リグノセルロースを原料とした場合、セルロース成分を如何に発酵するかがポイントであるが、エノキタケは*S. cerevisiae*が発酵できないセロビオースを高度にエタノールに変換することができた(図6)。培養初期よりセロビオースの濃度は徐々に低下し、反比例してエタノール生産が見られた。培地中のグルコース濃度は培養2日目まで増加し、その後、一旦減少した後、再度上昇し、また減少した。この挙動はセロビオースが

β -グルコシダーゼにより、グルコースに分解され、代謝されていくことを示唆している。更に鎖長が長いセロオリゴ糖に対しても試験したが、エノキタケは、これらの糖類をグルコースと遜色なく発酵することができた(図6)。セロトリオースの場合、培養開始2日間で、約80%のセロトリオースがグルコースとセロビオースに分解され、5日後までには完全に分解された。セロビオースの場合と同様に、 β -グルコシダーゼにより、オリゴ糖を糖化しながら発酵していることが示唆された。セロテトラオースの場合には、培養2日目までに約90%のセロテトラオースが分解され、グルコース、セロビオース、セロトリオースが検出された。セロビオースが検出されたことから、セロテトラオースの分解には、 β -グルコシダーゼのみでなく、エンド型の酵素も糖化に関わっている可能性が示唆された。これらセロオリゴ糖からの理論上のエタノール回収率は83% (セロビオース)、76% (セロトリオース)、78% (セロテトラオース)であった。以上の様に、エノキタケはセルロースの発酵に適した能力を有することが明らかとなった。しかしながら、ペントースに対する発酵能がない為、キシロピオースは発酵できなかった。また、糖濃度を高くした場合にも、この糖選択性は同様であり、また、変換率もさほど低下することなく、15%のセロビオースから70 g/Lのエタノールを生産し、変換率は83%であった。

本菌が優れた特性を示すのは特に高濃度の原料を変換する時であり、サトウキビバガスより調整したセルロースを15% w/v という条件で、9 mg/g バイオマ

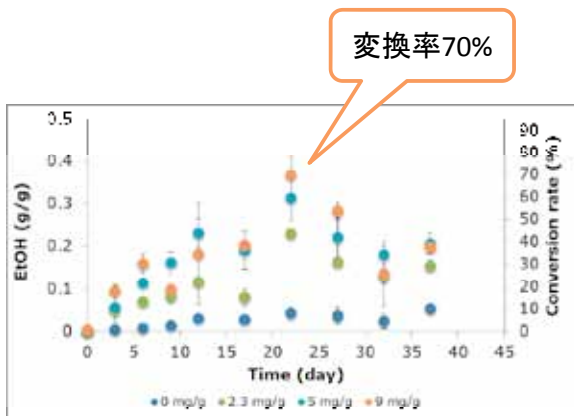


図7 サトウキビバガスより調整したセルロースを原料とした場合のエノキタケ CBP によるエタノール変換

15% w/v という高濃度の原料に対してもエノキタケは優れたエタノール変換能を有する。

ス相当の酵素を添加した場合、変換率は実に70%であった(図7)。この様な高い原料濃度では、酵素によるバイオマスの糖化は著しく困難になる。発酵と同条件下で、原料が使用したセルラーゼでどれだけ分解しているかを図8に示したが、9 mg/g バイオマス相当のセルラーゼではバイオマスを20%しか分解することができなかった。従って、酵素糖化法では、酵素の使用量を減らす為にバイオマス濃度を下げて分解し、エタノールを蒸留する際のコストを抑えるために、糖化された糖液を濃縮した後に酵母で発酵するというプロセスとなることから、本法は廃液の量や糖液の濃縮に関わるエネルギーを節約できるというメリットがある。このセルロースに対してごく僅かな酵素使用で高濃度のエタノールが得られる現象は、実バイオマスを用いた場合においても同じであり、アンモニア処理後のイナワラに対しては、5 mg/g バイオマスという、ごく少量の糖化酵素の添加を要するものの、バイオマス濃度30% (w/v) という高濃度条件下で、セルロースに対するエタノールの回収率76%という非常に高い変換率を達成しており、エノキタケはCBP生物として有望であると考えられる¹⁰⁾。筆者らは、エノキタケにおける異種遺伝子発現系を構築し^{11,12)}、異種発現が極めて困難である *T. reesei* のCBH I をエノキタケで発現させることにも成功しており、今後、糖化酵素の添加を要さないCBPに適したエノキタケ株の開発やエタノール生産性を向上させた株等を開発する基盤が整っている。

前述した理由以外にも、エノキタケをCBP生物としてバイオ燃料製造に利用

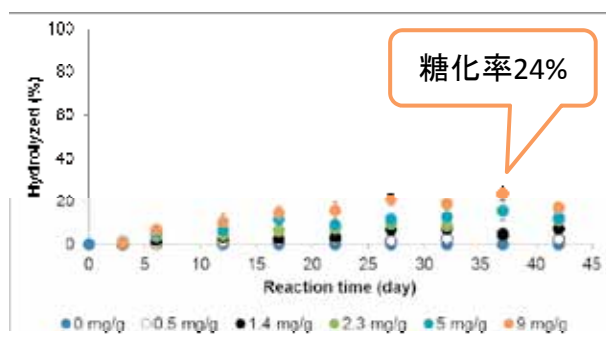


図8 図7の条件におけるサトウキビバガスの酵素による分解

15% w/v と原料濃度が高い場合、少量の酵素では、時間を掛けても十分な分解が得られない。エタノール製造コストを抑えるためには高濃度のエタノールを得ること、つまりは高濃度のバイオマスの変換が必須であるが、本結果は糖化酵素の使用量を低減させることは困難であることを示唆している。糖化酵素の使用量を減らすためには原料濃度を薄める必要があり、その場合には分解された糖液を濃縮する必要が生じ、投入するエネルギー量が増え、エタノール製造コストが増加する。

するメリットが存在する。エノキタケは言わずと知れた食用きのこであるが、きのこ産業は、国内の年間生産額が約 2240 億円（林業の総生産量の約 50% を占める）の巨大な産業である。近年のきのこ栽培は菌床栽培が主流であり、木粉、コーンコブ、バガス等のバイオマスを利用しているバイオマス利用産業である。きのこを収穫した後の廃菌床は年間 100 万トン発生すると言われており、これだけのバイオマスを利用している産業は他には存在しない。従って、きのこ産業は現在実用化しているバイオマス利用産業としては最大規模である。きのこ収穫後に不要となった廃菌床は、きのこ産業的には廃棄物であり、有料で処分している等、処分に困っているのが実状であるが、きのこを CBP 生物として利用する観点からみると、廃菌床は、きのこの菌糸とバイオマスの塊であり、木材腐朽菌による「前処理」と「糖化酵素生産」を終えた状態と捉えることができる。従ってバイオ燃料製造を、きのこ産業の廃棄物処理技術（図 9）と位置付けることにより、バイオマスより、付加価値の高いきのこ付加価値の低い燃料の両方を作り出すことが可能となる。さらに、バイオ燃料製造における前処理の部分をきのこ栽培（既に産業として成り立っているプロセス）として実施できることから、バイオ燃料製造プロセスより、前処理の部分の費用をゼロにできると共に糖

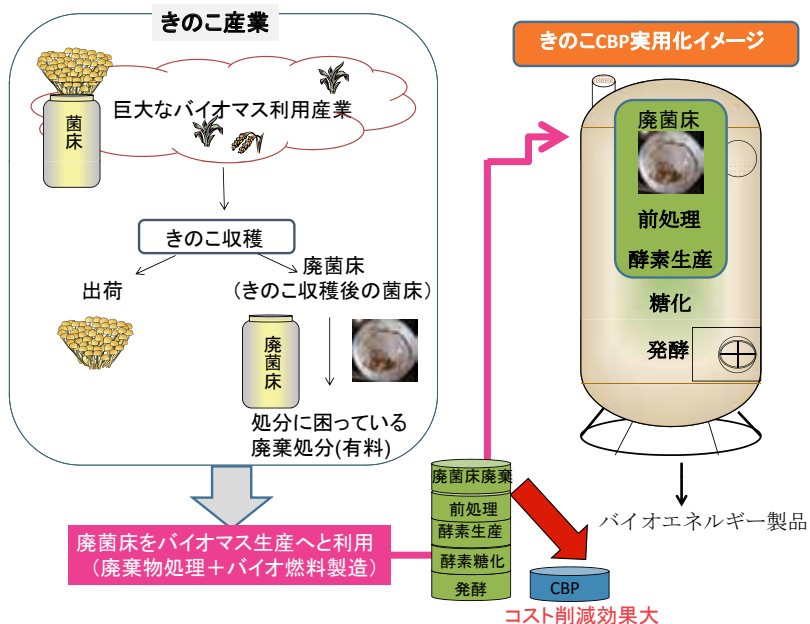


図 9 きのこによる CBP バイオエタノール製造と食用きのこ生産を融合する場合のメリット

化酵素生産や発酵菌の前培養を終えている状況となり（図10）、エタノール製造コストが高いという問題も解決できることが期待される。この組み合わせは双方にメリットがあるコラボレーションであり、実用化しているバイオマス利用産業としては最大規模であるきのこ産業に、バイオ燃料製造を組み込んだ新規なバイオリファイナーの形態を取れる可能性が高いことが、きのこによるCBPの最大の長所であり、従来の方法に比べ実用化に近い位置にいると考えられる。

3. ヘミセルロースの利用に向けて

3.1 ヘミセルロース

ヘミセルロースは、「水や0.2%程度のNaOH溶液に不溶であるが、4～5% NaOH溶液に溶ける植物細胞壁性の炭水化物で、薄い無機酸と共に加熱するとセルロースと比べてはるかに容易に加水分解され、ペントースとヘキソースを生ずるもの」と定義されている¹³⁾。ヘミセルロースの最大の特徴は、デンプンやセルロースと異なり、ヘテロ多糖であることである。従って複数の構成糖から構成され、分岐構造を有する複雑な構造をしている。さらに、構成糖の種類・分岐構造が植物種や植物の生長段階・部位により異なることが、よりヘミセルロース

(2) 酵素糖化系

適切な前処理を行なったバイオマスを酵素処理で糖化し、発酵によりエタノールを得るもの



(3) 一貫微生物系

(世界に開発例なし)

微生物技術を中心に、糖化・発酵同時反応など、ワンポット反応系でエタノールを得るもの

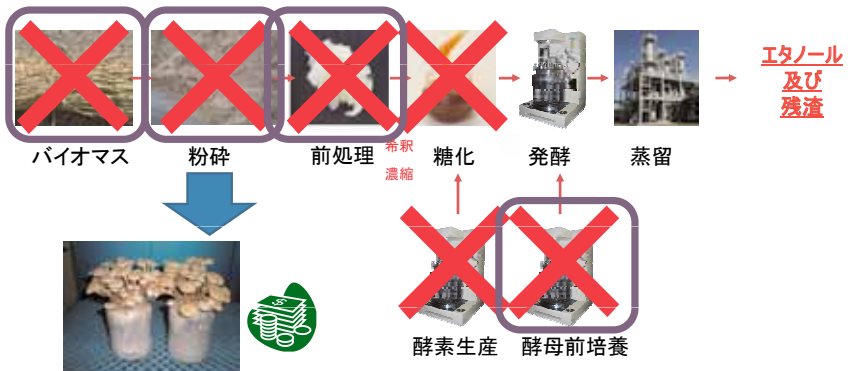


図10 きのこ産業ときのコによるCBPを統合した場合に不要となる工程

の理解を困難にし、敬遠される要因となっている。また、上述の様に、酸によって容易に分解されるため、希硫酸前処理や水熱前処理を行う場合にはバイオマスの前処理段階で分解されることから、バイオマスの糖化においてはあまり注目されていない。しかしながら、ヘテロ多糖を酸で完全分解した場合、分解物を利用するためには精製する必要がある。従ってヘミセルロースはヘテロ多糖で複雑な構造をしているからこそ、酵素を利用する必要がある。代表的なヘミセルロースとしては、マンナン、 β -1,3-1,4 グルカン、キシラン、キシログルカンがあげられるが、イナワラ、バガス、コーンストーパーといった世界中で利用が検討されているリグノセルロース系バイオマスに含まれるヘミセルロースはキシランが殆どを占める。従って、キシランは地上に最も多く存在するヘミセルロースであり、セルロースについて2番目に多く存在するバイオマス資源である。キシランの構造は図11に示すように、D-キシロースが β -(1 \rightarrow 4)結合した基本構造に対し、殆どの場合には側鎖を有している。側鎖の種類、分岐度は植物の種類、組織、加齢の程度で異なるが、一般的にはD-キシロースのO-3位にL-アラビノース残基、O-2位に4-O-メチル-D-グルクロン酸又はグルクロン酸残基が結合した構造である。また、主鎖にはアセチル基が、草本系のキシランの側鎖のL-アラビノースのO-5位にはp-クマル酸やフェルラ酸が部分的にエステル結合していることが知られている。キシランの完全分解には β -キシラナーゼ、 β -キシロシダーゼ、 α -L-アラビノフラノシダーゼ、 α -グルクロニダーゼ、アセチルキシランエステラーゼ、フェルラ酸エステラーゼといった酵素が必要であるが、キシランの側鎖やエステル基による修飾は、主鎖の分解に著しく影響を与える。従って、これらの修飾を除く酵素を如何に使うかが、ヘミセルロースの分解をコントロールすることになる。

3.2 キシラン分解酵素

キシラン分解酵素のうち、最も主要な酵素は主鎖をランダムに分解するキシラ

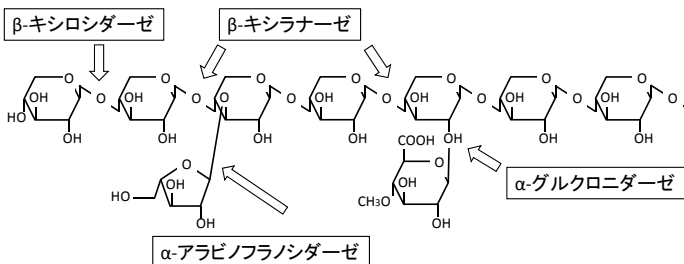


図11 キシランの構造と分解酵素

ナーゼである。前項で述べたように主鎖に作用する酵素は側鎖の影響を受けるが、この影響がキシラン分解にどのように反映されているかについては、あまり一般的に知られていない。エステル結合はアルカリ処理において容易に除かれるが、前処理を施していないバイオマスには、糖化酵素が作用できないことから、アセチル基やフェルラ酸が、酵素の基質認識にどれだけ影響するかは、不明な点が多い。木材を蒸射し、部分的にアセチル基を除いたサンプルにキシラナーゼを作用させて得られる分解産物を解析すると、その殆ど全てのプロダクトに最低1残基のアセチル基が残留していることが示されているが、アセチル基は分子内転移するため、酵素との相互作用については詳細が解明されていない。ここでは、アラビノースやグルクロン酸といった側鎖が、キシラナーゼがキシラン主鎖を分解する際に、どの様に影響するのかについて解説する。著者が研究している *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 のキシラナーゼを例として解説するが、ここで説明する基質認識のメカニズムは全ての糖加水分解酵素ファミリー (Glycoside Hydrolase family) GH10 及び GH11 キシラナーゼに共通である。

キシラナーゼはアミノ酸配列をもとに、GH5, 8, 10, 11, 30, 43 に見出されているが、殆どのキシラナーゼは GH10 と GH11 に分類されている。GH10 キシラナーゼと GH11 キシラナーゼでは、図 12 に示すように全く異なる立体構造をしてお

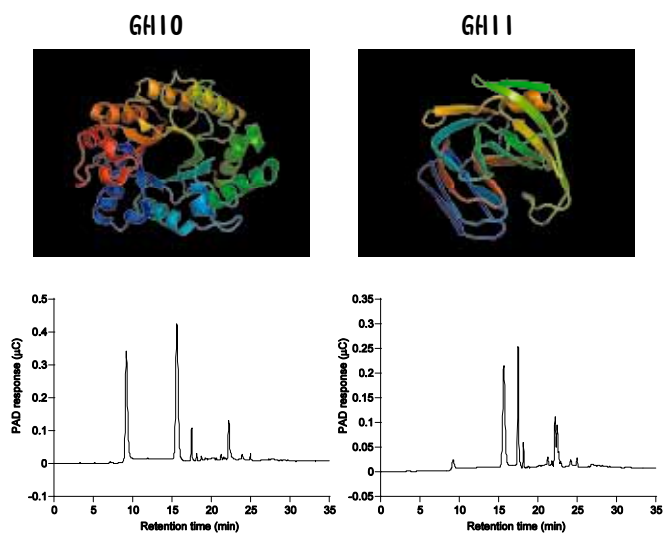


図 12 キシラナーゼのファミリーとキシラン分解特性の違い

GH10 キシラナーゼと GH11 キシラナーゼでは全く異なる立体構造をしており、キシランに作用した際に異なる生産物を生じる。

左 : SoXyn10A, 右 : SoXyn11A

り、そのキシラン分解特性も異なる。

GH10 キシラーゼ (SoXyn10A) は、立体構造が解明されており、本酵素がどのように基質と結合するかが明らかとなっている。SoXyn10A は5個のキシロースを認識する活性部位 (サブサイト-3 ~ +2) を有しており、4-O-Me-グルクロン酸側鎖を持つキシロース残基はサブサイト-3へ、アラビノース側鎖を持つキシロース残基はサブサイト-2へ、それぞれ結合している様子が観察されている¹⁴⁾。キシロース残基は隣の糖と120°回転した状態で基質結合クレフトに結合しているが、各サブサイトにおける糖認識の様子を詳細に観察すると、サブサイト-2, -1, +2に位置しているキシロースの2位水酸基部分は、クレフトの両壁や底部方向 (酵素側) を向いており、 α -1,2-結合のグルクロン酸側鎖が障害となり、グルクロン酸側鎖を有するキシロース残基はこれらのサブサイトには結合できないことが示唆される (図13)。一方、サブサイト-3と+1に位置するキシロース残基の2位水酸基は、溶媒面 (外側) を向いており、グルクロン酸側鎖が酵素とキシラン主鎖と結合する際に障害にならないと考えられる。同様に、 α -1,3-結合のアラビノース側鎖について見てみると、サブサイト-3, -2, +1, +2に位置するキシロース残基の3位水酸基は溶媒面を向いており、アラビノース側鎖を有することができるが、サブサイト-1のキシロース残基の3位水酸基は酵素側を向いており、アラビノースを有するキシロース残基が結合できないと考えられ

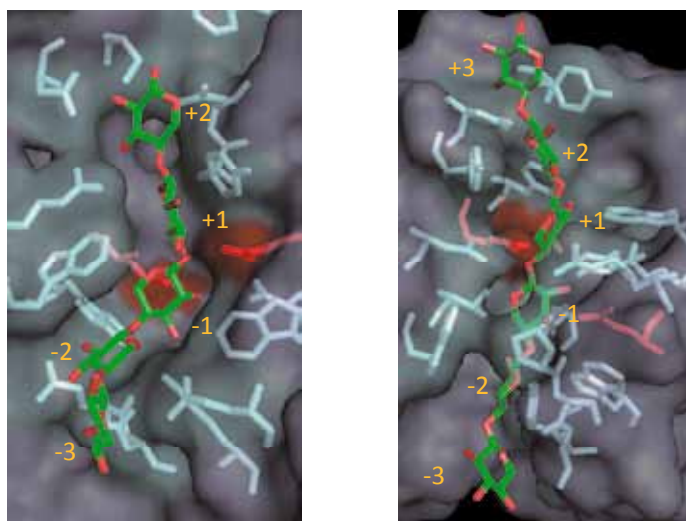


図13 キシラーゼの基質結合クレフト

左: SoXyn10A, 右: SoXyn11A

る。一方、GH11 キシラーゼ (SoXyn11A) については立体構造が解明されていないが、SoXyn11A の立体構造モデルから考察可能である。SoXyn11A にはサブサイトが6個 (-3 ~ +3) 存在している (図 13)。GH10 の場合と同様に、結合しているキシロース残基は隣接する糖と 120° 回転した状態で位置している。各サブサイトにおけるキシロースの 2 位水酸基の方向を見ると、サブサイト -3, +2, +3 に位置するキシロースの 2 位水酸基は溶媒面を向いており、 α -1,2-結合グルクロン酸側鎖を有するキシロース残基が結合可能であることが予想される (図 13)。またキシロース残基の 3 位水酸基の方向から、サブサイト -3, +2, +3 にはアラビノース側鎖を有するキシロース残基が結合できることが予想される。上記の様に、キシラーゼの側鎖認識は、側鎖がクレフトに入れるか否か、といった立体障害により識別されているが、GH10 及び GH11 の酵素全てに共通のメカニズムであり、規則性がある (図 14)。こうした規則性を明確にし、側鎖を除く酵素も含め、組合せていくことで、植物種や生育時期で異なる多様な構造をしたヘミセルロースに対応し、多様な生産物を作り出す技術を完成することができれば、ヘミセルロースの利用用途拡大に繋がるはずである。

ごく最近、新規なキシラーゼが見出された。これらは側鎖を積極的に認識する酵素であり、グルクロノキシラン特異的、アラビノキシラン特異的に作用する (図 15)。グルクロノキシラン特異的キシラーゼである *Erwinia chrysanthemi* 由来 XynA は GH30 に分類される TIM バレル型の酵素であり、還元末端側から 2 番目のキシロースにグルクロン酸側鎖を有するオリゴ糖を生産する。立体構造が解明され、 α -D-xylopyranosyl-(1 → 4)-[4-O-methyl- α -D-glucuronosyl-(1 → 2)]- α -D-xylopyranosyl-(1 → 4)-D-xylose (MeGlcA²Xyl₃) との結合構造から、側鎖の認識機構が解明されている。MeGlcA²Xyl₃ は XynA の基質結合クレフトの -1 ~ -3 に結合し、サブサイト -2 のキシロースの側鎖 MeGlcA は、近接する Trp 及び

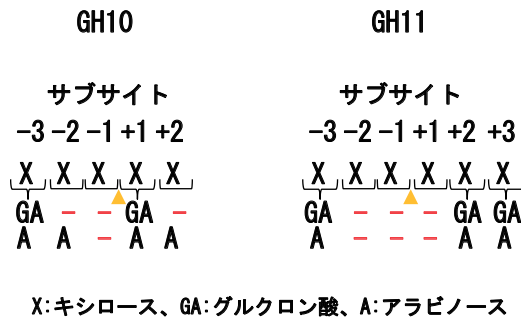


図 14 GH10 及び GH11 キシラーゼのサブサイトと側鎖を有するキシロース残基の結合の可否

グルクロノキシラン特異的キシラナーゼ GH30 アラビノキシラン特異的キシラナーゼ GH5

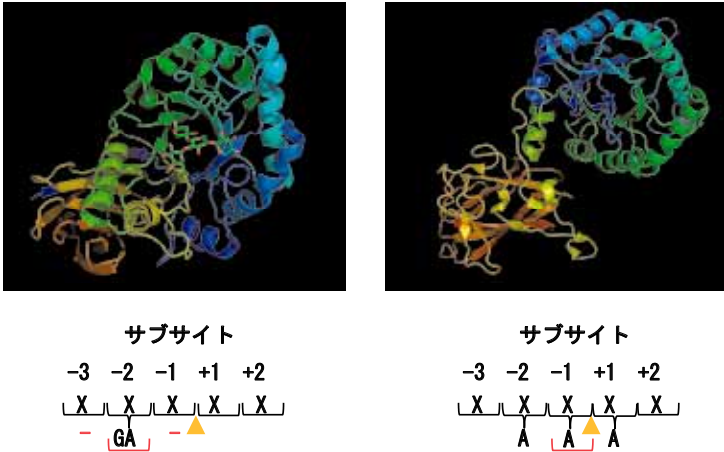


図 15 グルクロノキシラン特異的キシラナーゼとアラビノキシラン特異的キシラナーゼの構造と側鎖認識機構

Tyr と相互作用し，更に塩基性アミノ酸である Arg とグルクロン酸のカルボキシル基のイオニックな結合によって，酵素と強く結合していることが示された。この様にサブサイト -2 における MeGlcA と酵素の強い相互作用により，本酵素は還元末端側から 2 番目のキシロースにグルクロン酸側鎖を有するオリゴ糖を生産することが解明された¹⁵⁾。一方，アラビノキシラン特異的キシラナーゼである *Clostridium thermocellum* 由来 CtXyl5A は GH5 に分類され，アラビノキシランに作用した場合に重合度 3～5 のアラビノキシロオリゴ糖を主産物として生産する¹⁶⁾。基質との結合構造は解明されていないが，CtXyl5A の結晶構造と生産されたオリゴ糖の構造解析により，本酵素の基質認識機構が推察されている。本酵素は (β/α)₈-バレル型の酵素であり，マイナス側に 3 つ，プラス側に 2 つの計 5 つのサブサイトを有し，サブサイト -1 の部分に通常のエンド型酵素には存在しないポケットが観察された。反応生成物が還元末端のキシロースに必ずアラビノース側鎖を有することから，サブサイト -1 にアラビノシルキシロースが結合することが示唆された。また，本酵素の反応生成物の側鎖の位置から，サブサイト -2， -1， +1 の 3 箇所には側鎖を有するキシロース残基が結合できることが示唆された。この様にキシラナーゼの例のみを見ても，酵素の側鎖認識機構は非常に多様である。ヘミセルロースの分解は，酵素がヘミセルロースの分岐をどの様に認識しているかを理解することにつきる。側鎖を除く酵素については，多糖

に良く作用するものと、多糖には殆ど作用せず、オリゴ糖に良く作用する酵素が存在するが、いずれの場合にも分岐の形態で影響を受ける。従って、側鎖認識機構が解明された酵素を如何に多く保有し、それらを利用していかかということがヘミセルロースの利用を実用化するうえで、非常に重要である。また、バイオマスの糖化という側面からもヘミセルラーゼの側鎖認識機構を理解することは非常に重要である。図 14 に示す側鎖認識機構は、グルクロン酸側鎖を持つキシランを基質とした場合、グルクロン酸側鎖の結合しているキシロース間に、GH10 は最低 2 個、GH11 では最低 3 個の、アラビノースを側鎖に持つキシランを基質とした場合には、GH10 は最低 1 個、GH11 では最低 3 個の、側鎖を持たないキシロース残基が存在しなければ、酵素は作用できないということを意味する。従って、側鎖が多く存在する基質に対しては GH10 の方がより耐性があり、切断できる箇所が多くなることから分解率が高くなることが予想される。

側鎖を除く酵素についての詳細は紙面の都合で省略するが、著者が他で纏めたものがあるので、そちらを参照されたい¹⁷⁾。

4. おわりに

安価なエタノール製造を目指し、安価な原料を用いて酵素生産菌を培養する、酵素の生産量を上げる、といった糖化酵素の生産コスト削減へ向けた研究が行われている。しかし、ここにも大きな落とし穴があり、酵素のコストばかりに目が行き、酵素生産量の高い *Trichoderma* のセルラーゼのコストを如何に下げることかという方向に研究が収束していく方向にある。しかし、図 16 に示すように、バイオマスの糖化はヘミセルロースを如何に除くかに懸かっている。図 16 は、*Trichoderma* のセルラーゼ製剤（粗酵素のため、ヘミセルラーゼ活性を含む）の量を一定にし、先に示した放線菌 *S. olivaceoviridis* E-86 由来 GH10 キシラナーゼの量を変えて添加していった場合の結果である。通常、バイオマスの分解は縦軸に分解率（または還元糖量）、横軸に時間を表示して評価しているが、本結果は縦軸に発生したグルコース量、横軸に発生したキシロース量を表示している。*Trichoderma* のセルラーゼ製剤のみの場合もキシラナーゼを含むため、キシロースが生じるが、時間が経過しても発生するキシロース量とグルコース量には相関がある。少量のキシラナーゼを添加した場合、生じるキシロース量が増加し、それに従ってセルラーゼの量を増やしていないにも関わらず、グルコースの量が増加する。キシラナーゼの量を増やすほど分解率が高まり、生じるキシロースが増えるが、それに伴いグルコース量も高まる。使用するセルラーゼ量を 5 倍増やして実験を行った場合も同様であり、どの様な酵素比、どの反応時間のものでも、グルコースとキシロースの発生量は相関がある。このことはヘミセルロースを除かなければバイオマスは糖化できない（糖化率はキシランの分解率に一致する）ことを意味する他、かなり大量のセルラーゼを使用しているにも関わらず、

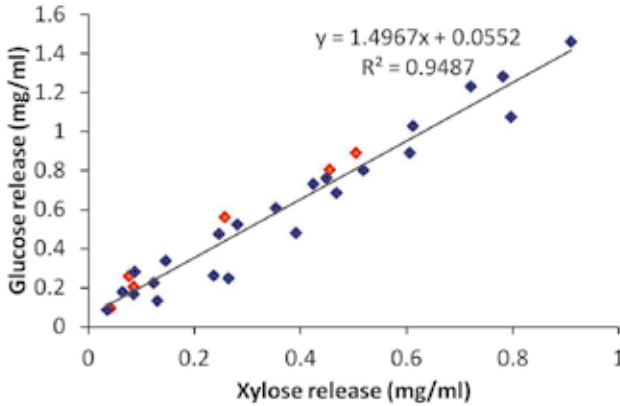


図 16 バイオマス分解におけるキシロース生成量とグルコース生成量の関係

キシロースとグルコースの生産量は反応時間、酵素使用量に関係なく、相関関係がある。キシラナーゼの添加によりキシラン分解量が増加すると、セルロースの分解も促進され、グルコース生成量も増加する。

アンモニア処理イナワラの 20 倍希釈したセルクラストによる分解 (赤)：反応時間は 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間, 20 倍希釈したセルクラストに *S. olivaceoviridis* 由来 GH10 キシラナーゼを 0.01 μ M, 0.5 μ M, 5 μ M 添加 (青)：反応時間は 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間

少量の放線菌のキシラナーゼの添加が糖化を促進することから、*Trichoderma* の酵素に含まれるヘミセルラーゼは性質が悪く、バイオマスの糖化に向かないということを示唆している。従って、付加価値の高い産物をヘミセルロースから生み出すという形態のバイオリファイナリーを実現し、バイオマスからヘミセルロースを除く工程を入れなければ、*Trichoderma* の酵素によってバイオマスの糖化を実現することは難しい。

近年、著者は未処理のイナワラを溶解できる放線菌を見出した (図 17)。こういった現象は *Trichoderma* では起こらない。本菌はバイオマス分解における重要な酵素、特に重要なヘミセルラーゼを持っていると考えられることから、本菌のゲノム DNA 配列解析を行なった。今後、本菌の生産するヘミセルラーゼを詳細に解析していくことで有用なヘミセルラーゼを数多く見出せることが期待される。また、先に示したエノキタケはペントース (キシラン) をエタノールに変換できないという性質を有していることから、エノキタケによる CBP にヘミセルロースを利用するバイオリファイナリーを組み込んで行ける可能性がある (図 18)。ヘミセルロースの利用やきのこを用いた CBP は、バイオマス利用を現実の

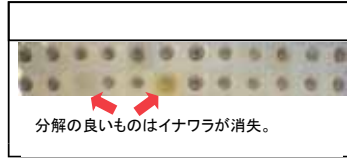


図 17 イナワラ分解に優れる放射菌



図 18 きのこ産業、ヘミセルロースの利用を実現したバイオリファインリーの実現による地域資源循環モデル

ものとするための核となるものであるが、これらの技術が二酸化炭素削減、石油依存型社会からの脱却における救世主となり得るかどうかは、今後の研究が鍵となる。

謝辞

エノキタケによる CBP の研究は農水省委託プロジェクト「地域活性化」の補助により推進された。ヘミセルラーゼの研究の一部は NEDO (先導技術開発) の助成により実施したものである。

引用文献

- 1) M.E. Himmel, S.Y. Ding, D.K. Johnson, W.S. Adney, M.R. Nimlos, J.W. Brady & T.D. Foust: *Science*, **315**, 804 (2007).
- 2) Q. Xu, A. Singh & M.E. Himmel: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 364 (2009).
- 3) D.G. Olson, J.E. McBride, A.J. Shaw & L.R. Lynd: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, 1 (2011).
- 4) L.R. Lynd, W.H. van Zyl, J.E. McBride & M. Laser: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 577 (2005).
- 5) D.A. Argyros, S.A. Tripathi, T.F. Barrett, S.R. Rogers, L.F. Feinberg, D.G. Olson, J.M. Foden, B.B. Miller, L.R. Lynd, D.A. Hogsett & N.C. Caiazza: *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8288 (2011).
- 6) E. Guedon, M. Desvaux & H. Petitdemange: *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 53 (2002).
- 7) Matano, Y., Hasunuma, T., Kondo, A: *Bioresource Technol.* **108**, 128 (2012).
- 8) M. Ilmén, R. den Haan, E. Brevnova, J. McBride, E. Wiswall, A. Froehlich, A. Koivula, S.P. Voutilainen, M. Siika-Aho, D.C. la Grange, N. Thorngren, S. Ahlgren, M. Mellon, K. Deleault, V. Rajgarhia, W.H. van Zyl, M. Penttilä: *Biotechnol Biofuels.* **4**, 30 (2011).
- 9) R. Mizuno, H. Ichinose, T. Maehara, K. Takabatake & S. Kaneko: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2240 (2009).
- 10) S. Kaneko, R. Mizuno, T. Maehara & H. Ichinose: in *Bioethanol*, 191 (2012).
- 11) T. Maehara, M. Yoshida, Y. Ito, S. Tomita, K. Takabatake, H. Ichinose & S. Kaneko: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1126 (2010).
- 12) T. Maehara, S. Tomita, K. Takabatake & S. Kaneko: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2523 (2010).
- 13) E. Schulze: Zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der pflanzlichen Zellmembranen. *Ber.*, **24**, 2277 (1891).
- 14) Z. Fujimoto, S. Kaneko, A. Kuno, H. Kobayashi, I. Kusakabe and H. Mizuno: Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9606-9614 (2004)
- 15) Ľ. Urbániková, M. Vršanská, K.B. Mørkeberg Krogh, T. Hoff, and P. Biely: Structural basis for substrate recognition by *Erwinia chrysanthemi* GH30 glucuronoxylanase. *FEBS J.*, **278**, 2105 (2011)
- 16) M.A. Correia, K. Mazumder, J.L. Brás, S.J. Firbank, Y. Zhu, R.J. Lewis, W.S.

York, C.M. Fontes, and H.J. Gilbert: Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. *J. Biol. Chem.*, **286**, 22510 (2011)

- 17) 金子哲：ヘミセルラーゼの構造, バイオマス分解酵素研究の最前線. 170 (2012)

VII 真に意義のあるバイオディーゼル燃料の製造・利用を目指して

1. はじめに

地球温暖化の防止，化石資源の保護といった観点から，バイオマスエネルギーの利用が世界的に推進されている。中でも，軽油代替燃料であるバイオディーゼル燃料は，EU を中心として広く利用が拡大しており，2009 年における生産量は，約 1800 万 k L に達しているとされる^{1,2)}。バイオディーゼル燃料の主成分は，脂肪酸メチルエステルであり，通常は，動植物油脂の主成分であるトリグリセリドとメタノールとのエステル交換反応により製造される（図1）。現在，ヨーロッパにおいては菜種油が，また，米国においては大豆油が，バイオディーゼル燃料の主たる原料として用いられているが，これらはいずれも食用として利用可能な油脂である。可食性の脂質資源をバイオディーゼル燃料の原料として用いることは，食料の供給に影響を及ぼし，食料価格の高騰を招く可能性がある。このため，非可食性の脂質を原料として活用することが望まれる。

ここでは，バイオディーゼル燃料の原料として利用が期待される非可食性の脂質資源について概説するとともに，こうした資源を効率的にバイオディーゼル燃

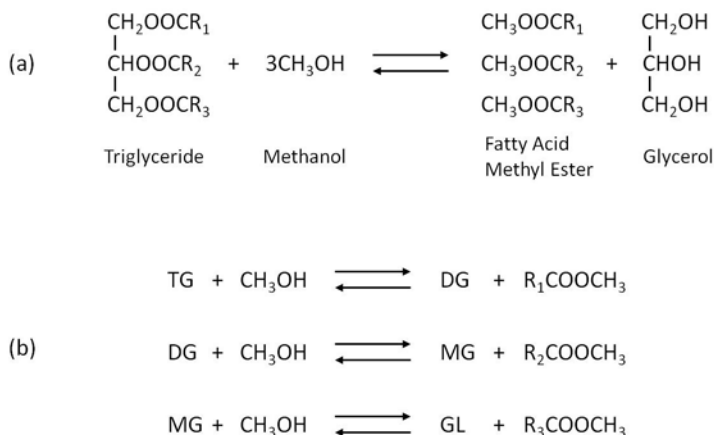


図1 動植物油脂の主成分であるトリグリセリド (Triglyceride) とメタノール (Methanol) のエステル交換反応による脂肪酸メチルエステル (Fatty Acid Methyl Ester: FAME) の生成。(a) は全体反応を表し，(b) は同反応を3段の平衡反応として記述。TG：トリグリセリド，DG：ジグリセリド，MG：モノグリセリド，GL：グリセリン (Glycerol)；通常はNaOHやKOH等のアルカリ触媒を使用

料に変換するための技術に関して、食品総合研究所での検討も含めて、その開発の動向を紹介する。

2. バイオディーゼル燃料の原料として有望な資源（非可食性の脂質）

前述のとおり、可食性の油脂をバイオディーゼル燃料の原料として利用することは、多くの問題を引き起こす可能性がある。このため、我が国を含むアジアの国々においては、一度食品として利用した後の食用油（廃食用油）、油脂の搾油工程から排出される廃液に含まれる脂質、油脂精製工程での副産物（遊離脂肪酸等）およびジャトロファ（*Jatropha curcas* L.）等の工芸作物から得られる油脂が、バイオディーゼル燃料製造用の原料として高い可能性を有しているものと考えられる。

我が国においては、廃食用油を原料としたバイオディーゼル燃料の製造が注目され、京都市等において、実際に活用されている³⁾。

インドネシアおよびマレーシアは、それぞれ世界第一位および第二位のパーム油生産量をほこっており、搾油工程から排出される廃液に含まれる脂質や油脂精製工程で排出される副産物だけでもかなりの賦存量になるものと考えられる。特に、油脂精製工程から排出される遊離脂肪酸の量は、少なくとも原料油の5～10%程度に達するとされる。しかも、これらの脂質は、パーム油工場に集中して存在するため、回収コストがかからないといった特長も有する。さらには、インドネシアやマレーシアにおいては、こうした脂質は、年間を通じてコンスタントに排出され、季節性がないといった特長も有する。このため、バイオディーゼル燃料の原料として活用した場合、バイオディーゼル燃料への変換装置の稼働率を高く維持できるものと考えられる。

ジャトロファは、年間降雨量400 mm以下のやせた土地でも生育可能であり、干ばつや害虫にも強いいため、インドネシア東部地域などオイルパームの栽培に向かない限界地（マージナルランド）でも生育が可能とされる⁴⁾（写真1）。また、ジャトロファの種子から採取した油には毒性があり非可食性の油脂であるため、パーム油のように食用需要と競合することはない。しかも、ジャトロファの導入は、マージナルランドへの農業の展開を可能とするものであり、こうした地域における社会貢献が期待される。このため、東南アジア、特にインドネシアにおいて、ジャトロファの増産が検討されている。ジャトロファから得られる粗油を精製することなくそのまま用いることができれば、精製のためのコストを削減することが可能となり、バイオディーゼル燃料の原料としてのポテンシャルはさらに高まるものと考えられる。

上述の非可食性の脂質資源は、いずれもトリグリセリド以外の成分、特に遊離脂肪酸を高濃度に含有するという共通の特徴を有している。



写真1 ジャトロファ (*Jatropha*): (A) 植え付け後6ヶ月のジャトロファ。植え付け後約8ヶ月で最初の収穫が得られる。(B) ジャトロファの実。実が、黄色みを帯びると収穫が可能となる。(C) 実から取り出した種子。一つの実には、3～4個の種子が入っている。種子に含まれる油の量は、30～40%程度。(D) 圧搾機で絞った油。1本の木から、年間40 kg(20 kg×2回)程度の種子が収穫される。木の寿命は、約50年。

3. 既存の変換技術を非可食性の脂質に適用した際の問題点

動植物油脂をバイオディーゼル燃料に変換する技術として実用化されている方法は、トリグリセリドとメタノールのエステル交換反応による脂肪酸メチルエステルの生成のみであり、副産物としてグリセリン (Glycerol) が生成する (図1)。既存の変換技術においては、図1の反応を促進させるために、NaOH や KOH などのアルカリ触媒が用いられる (アルカリ触媒法)。

アルカリ触媒法では、60℃程度の比較的温かな温度条件で反応が進行するが、反応後にアルカリ触媒を取り除く精製工程を設ける必要があり、この工程から多くの廃水が排出される。また、アルカリ触媒法では、原料油脂に遊離脂肪酸が含まれていた場合、アルカリ触媒が、遊離脂肪酸と反応して石けんを形成し、触媒としての効果を失ってしまう。このため、遊離脂肪酸を含有する脂質を原料として用いる場合には、前処理として脱酸工程が必要となるが、この工程が余分なコストを要するとともに、歩留まりを低下させる。

このように、既存の変換技術であるアルカリ触媒法は、非可食性の脂質資源に

適した方法とは言い難く、アルカリ触媒を用いずにバイオディーゼル燃料を生産できる方法が求められている。

4. 非可食性の脂質に適したバイオディーゼル燃料製造技術の開発

従来のアルカリ触媒を用いた方法に比較して、アルカリ触媒を用いない方法（無触媒法）は、いくつかの利点を有する。

無触媒法による製造プロセスにおいては、反応後にアルカリ触媒を除去するための精製工程が不要となる。このため、製造プロセス全体の構造が簡略化される。また、副産物であるグリセリンも不純物を含まないため、他の産業で直接利用することが可能となる。この結果、バイオディーゼル燃料製造に要する全体としてのコストが低減される。

さらに、無触媒法を用いた製造プロセスにおいては、トリグリセリドとメタノールとのエステル交換反応（図1）だけではなく、遊離脂肪酸とメタノールとの間のエステル化反応（図2）によっても脂肪酸メチルエステルが生成する可能性がある。このため、トリグリセリドだけではなく、遊離脂肪酸も脂肪酸メチルエステル（バイオディーゼル燃料）の原料になり得ることから、反応に先駆けて遊離脂肪酸を除去するための脱酸工程が不要となって、バイオディーゼル燃料の製造コストが低減されるとともに、製造プロセス全体としての歩留まりが向上することが期待される。

こうした利点に対する期待から、いくつかのグループが無触媒法を用いたバイオディーゼル燃料製造プロセスの開発に取り組んでいる。

4.1 超臨界メタノール法

アルカリ触媒を用いない脂肪酸メチルエステル製造法として、超臨界メタノール法が提案されている⁵⁾。この方法は、触媒を用いる代わりに、メタノールを臨界点（239℃，8.09 MPa）以上の高温・高圧にすることで反応性を高めるものである。菜種油 2.0 g を、350～400℃，45～65 MPa の高温高圧条件下で、メタノールと油のモル比を 42:1 として反応させた場合、240 秒で反応が終了する。また、亜臨界水による油脂の加水分解を組み合わせた二段階超臨界メタノール法⁶⁾

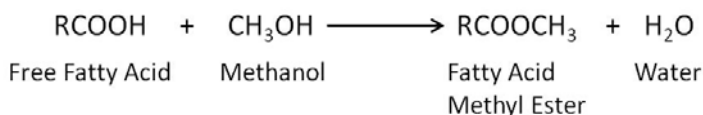


図2 遊離脂肪酸（Free Fatty Acid）とメタノール（Methanol）との間のエステル化反応による脂肪酸メチルエステル（Fatty Acid Methyl Ester）の生成

と呼ばれる方法も提案されている。この方法では、まず亜臨界状態の水を用いてトリグリセリドを加水分解して遊離脂肪酸とグリセリンを得た後に、超臨界メタノール中で遊離脂肪酸とメタノールを反応（エステル化反応）させて脂肪酸メチルエステルを得る。二段階超臨界メタノール法を用いることにより、製品中に含まれるモノグリセリド含量が低下し、製品の品質が向上するとされる。

4.2 STING 法

飯嶋ら⁷⁾は、油脂とメタノールと間のエステル交換と油脂の熱分解との同時反応に基づく STING (Simultaneous reaction of Trans-esterification and crack-ING) 法を提案している。この方法においては、超臨界状態のメタノール中において油脂のエステル交換反応と熱分解反応とが同時に進行し、中鎖脂肪酸からなるトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリドおよびメチルエステルならびに高級アルコール、低級アルコール、その他炭化水素等が生成する。これらの成分は単一の相を形成し、全体がディーゼル代替燃料として利用される。このため、このプロセスにおいては副産物（グリセリン）は生成せず、プロセス全体としての歩留まりを向上させることができる。また、STING 法により生成した製品は、アルカリ触媒法によるものと比較して粘度と流動点がともに低い。このため、その品質はアルカリ触媒法によるものに比較して高いとされる。さらに、装置の小型化が可能であるといった特長を有する。最近では、トラックの荷台に搭載することのできる可搬装置を用いた実証試験が実施されている。

4.3 過熱メタノール蒸気法

超臨界メタノール法や STING 法によるプロセスは、高温・高圧の条件下での操作を必要とするため、これらの方法を用いた際のイニシャルコストは比較的高価なものとなると考えられる。バイオディーゼル燃料の製造コストをさらに低減するための方法として、(独)農研機構食品総合研究所では、常圧付近で過熱メタノール蒸気を油脂中に吹き込むことにより脂肪酸メチルエステルを生成する過熱メタノール蒸気法を提案している^{8,9)}。図3に装置の概略を示す。植物油を満たした反応槽の底部より過熱状態のメタノール蒸気（温度：250～350℃）を大気圧の条件で供給する。過熱メタノール蒸気の泡が油脂中を浮上する間に、過熱メタノール蒸気と油脂との界面で、図1の反応が進行する。生成した脂肪酸メチルエステルとグリセリンは、未反応のメタノール蒸気とともに反応槽から流出し、凝縮器で凝集し、回収される。未反応のメタノール蒸気は、反応器に返送され再利用される。脂肪酸メチルエステルとグリセリンは、静置により二相に分離する。この方法においては、触媒は一切用いられないため、反応後におけるアルカリ触媒の除去工程が不要となるばかりではなく、常圧付近での反応であるため装置コストを低く抑えることができ、装置の大型化も容易になるものと期待される。

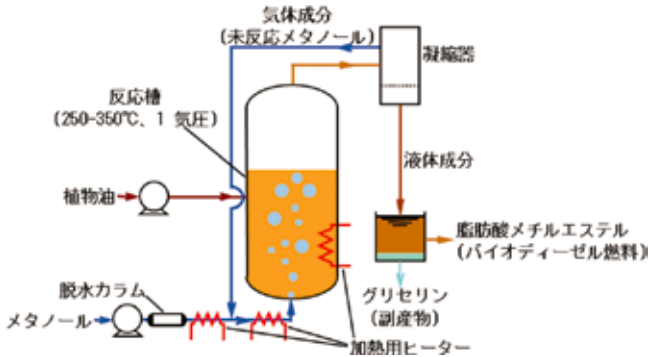
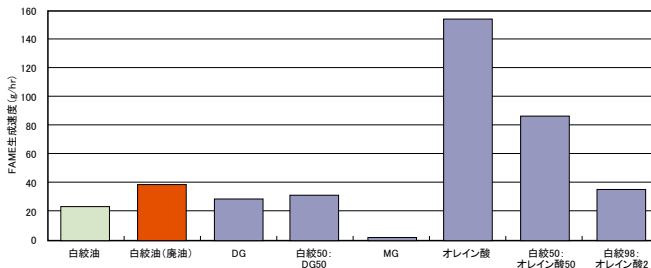


図3 過熱メタノール蒸気を用いた無触媒メタノリシス法（過熱メタノール蒸気法）に基づく反応装置の概略



試料	白絞油	白絞油(廃油)	DG	白絞50: DG50	MG	オレイン酸	白絞50: オレイン酸50	白絞98: オレイン酸2
TG	98.7	90.5	13.5	56.0	-	-	49.3	96.4
DG	1.0	5.0	82.5	41.8	-	-	0.5	1.0
MG	0.4	4.0	4.0	2.2	100.0	-	0.2	0.4
FFA	-	0.5	-	-	-	100.0	50.0	2.2
生成速度 (g/hr)	23.1	38.5	28.8	31.0	1.2	154.4	85.9	34.8

(FAME:脂肪酸メチルエステル、TG:トリグリセリド、DG:ジグリセリド、MG:モノグリセリド、FFA:遊離脂肪酸)

図4 油脂組成が過熱メタノール蒸気法における生成速度に及ぼす影響

図4には、原料油脂に含まれる不純物が過熱メタノール蒸気法における反応に及ぼす影響について検討を行った結果を示した。非可食性の脂質資源である廃食用油を原料とした場合、ジグリセリド、モノグリセリド、遊離脂肪酸といった成分が原料中に含まれる可能性がある。図4は、それぞれの成分が、過熱メタノール蒸気法における脂肪酸メチルエステルの流出速度に及ぼす影響を示したものである。この結果から、過熱メタノール蒸気法においては、トリグリセリドだ

けではなく、遊離脂肪酸からも脂肪酸メチルエステルが生成することが明らかとなっている。その際の、脂肪酸メチルエステルの生成速度は、トリグリセリド、すなわち、新油に比較して数倍程度大きなものとなった。また、遊離脂肪酸が少し加わることにより、トリグリセリドからの脂肪酸メチルエステルの生成が促進されることも明らかとなった。この結果は、過熱メタノール蒸気法が、遊離脂肪酸を高濃度を含む廃食用油等の原料に適した方法であるということを示している。すなわち、従来法であるアルカリ触媒法においては、遊離脂肪酸が、アルカリ触媒と結合して石けんを形成し、アルカリ触媒の効果を低下させ、エステル交換反応を阻害する。このため、遊離脂肪酸を含む脂質を原料とする場合には、反応の前に遊離脂肪酸を取り除く必要がある。これに対して、過熱メタノール蒸気法においては、遊離脂肪酸が、脂肪酸メチルエステルの原料となるばかりではなく、トリグリセリドからの脂肪酸メチルエステルの生成を助ける。このため、廃食用油等の遊離脂肪酸を含む原料に適用した場合には、反応に先駆けての前処理（脱酸工程）が要らなくなり、製造コストが低減されるばかりではなく、製品の歩留まりが向上すると期待される。実際に、廃食用油を用いた反応においても、脂肪酸メチルエステルの流出速度が、新油に比較して、大きくなっていることが、図4の結果から分かる。すなわち、遊離脂肪酸を高濃度を含む廃食用油等を過熱メタノール蒸気法で処理すると、エステル交換反応（図1）とエステル化反応（図2）との二つの反応により、脂肪酸メチルエステル（バイオディーゼル燃料）が生成する。しかも、遊離脂肪酸はエステル交換反応（図1）を促進する効果を有しており¹⁰⁾、過熱メタノール蒸気法が、遊離脂肪酸を高濃度を含む非可食性脂質からのバイオディーゼル燃料生産に適した方法であることが示された。

アルカリ触媒法と過熱メタノール蒸気法の工程を比較して図5に示した。過熱メタノール蒸気法では、前処理工程と水洗工程が不要となる。このため、アルカリ触媒法に比べて、安くバイオディーゼル燃料を作ることが可能となる。また、水洗工程がなくなることで廃水が発生しなくなり、環境への負荷が低減される。さらに、過熱メタノール蒸気法で生じるグリセリンは、アルカリ触媒法によるものとは異なり、不純物をほとんど含んでいない。このため、副産物であるグリセリンをいろいろな用途で有効利用することができる。

1日当たり400Lの脂肪酸メチルエステルを生産できる規模の実証プラントを建設し、実用化に向けての検討を行っている（写真2）。実証プラントを用いた製造実験で明らかになったエネルギー消費量を基に、6000kL/年規模の事業プラントを想定し製造コストを試算した結果、本法では45円/L以下（人件費、減価償却費を含む）でバイオディーゼル燃料を製造することが可能であり、従来法（アルカリ触媒法）と比較して製造コストを20円以上削減できる可能性が示されている（表1）。



図5 アルカリ触媒法と過熱メタノール蒸気法の工程の比較



写真2 過熱メタノール蒸気法に基づく実証規模プラントの外観
(生産能力：400L/日)

表1 過熱メタノール蒸気法（実証プラントおよび事業プラント）と従来法（アルカリ触媒法）との経済性の比較

項目		実証プラント	事業プラント(6,000 kL/y)		アルカリ触媒法
		146 kL/y	基本ケース	ゴミ焼却施設併設	1,500 kL/y
減価償却費	(円/kg)	39.2	8.6	8.6	36.1
補修費等	(円/kg)	0.9	0.2	0.2	0.8
人件費	(円/kg)	313.9	7.3	-	7.3
メタノール費	(円/kg)	18.0	10.0	10.0	25.2
熱源費	(円/kg)	82.7	13.6	-	1.2
電気代	(円/kg)	28.9	9.7	6.4	1.5
水酸化カリウム費	(円/kg)	-	-	-	4.1
合計	(円/kg)	483.6	49.5	28.5	76.1
	(円/L)	396.5	40.6	23.4	62.5

5. おわりに

以上、非可食性の脂質資源をバイオディーゼル燃料として利用するための研究の動向を紹介した。こうした研究の成果として、食用利用と競合しない脂質資源から低価格で効率よくバイオディーゼル燃料を製造する技術が確立され、地球温暖化の防止や化石資源の保護およびアジアにおける農村の活性化に貢献することを期待する。

(企画管理部業務推進室 鍋谷 浩志・
食品工学研究領域反応分離工学ユニット 蘆原 昌司)

- 1) Biofuels Platform, <http://www.biofuels-platform.ch/>, 最終アクセス日 2010年12月13日
- 2) U. S. National Biodiesel Board, <http://www.biodiesel.org/>, 最終アクセス日 2010年12月13日
- 3) 特集「バイオディーゼル燃料—現状と見通し—」, 油脂, **56**, 18-23 (2003).
- 4) 山崎理恵, 鍋谷浩志, 相良泰行; マレーシア・インドネシアにおけるパームディーゼル研究動向, 日本食品工学会誌, **6**, 105-111(2005).
- 5) Saka, S. and Kusdiana, D.; Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol, *Fuel*, **80**, 225-231(2001).
- 6) Kusdiana, D. and Saka, S.; Two-step preparation for catalyst-free biodiesel fuel production, *Applied Bio-chem. Biotechnol.*, 115, 781-792(2004).
- 7) 飯嶋渡; グリセリンを副生しない軽油代替燃料の製造技術, 農業技術, **60**, 512-516 (2005).

- 8) Yamazaki, R., Iwamoto, S., Nabetani, H., Osakada, K., Miyawaki, O., Sagara, Y.; Non-catalytic alcoholysis of oils for biodiesel fuel production by a semi-batch process. *Japan Journal of Food Engineering*, **8**, 11-18 (2007).
- 9) Joelianingsih, Maeda, H., Hagiwara, S., Nabetani, H., Sagara, Y., Soerawidjaya, T. H., Tambunan, A. H., Abdullah, K.; Biodiesel fuels from palm oil via the non-catalytic transesterification in a bubble column reactor at atmospheric pressure: a kinetic study. *Renewable Energy*, **33**, 1629-1636 (2008).
- 10) Joelianingsih, Nabetani, H., Hagiwara, S., Sagara, Y., Soerawidjaya, T. H., Tambunan, A. H., Abdullah, K.; Performance of a bubble column reactor for the non-catalytic methyl esterification of free fatty acids at atmospheric pressure. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **40**, 780-785 (2007).

食糧 —その科学と技術—
第51号

平成25年3月15日 印刷
(非売品)
平成25年3月15日 発行

〒305-8642
茨城県つくば市観音台2-1-12
独立行政法人
農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所
所長 林 清

URL : <http://www.naro.affrc.go.jp/nfri/>

印刷所 牛久印刷株式会社
〒300-1236
茨城県牛久市田宮町531-27