



特集

バイオエタノール製造技術の現状と課題

神戸大学大学院工学研究科
教授 近藤 昭彦

私は昨日まで、オランダ、台湾に行っていました。各国政府レベルではバイオマスエネルギーに対して関心が高く、どの国もかなりの投資を行って研究を進めているのが現状です。こうした中で、本日は問題点や課題などについて話したいと思います。

●工業原料バイオマス

工業原料用のバイオマスを考えると、デンプン系、油系、リグノセルロース系。そして最近では微細藻類というのが注目されます。世界的にみると、デンプンから作られるのが第1世代のバイオ燃料、リグノセルロースから作られるのが第2世代のバイオ燃料といわれています。さらにブタノールなど、高級アルコール系の燃料価の高いものが2.5世代のバイオ燃料といわれています。じつは微細藻から作られていくようなものが第3世代のバイオ燃料といわれていて、実用化レベルのものも作られています。リグノセルロース系からの第2世代のバイオ燃料「エタノール」をいかに早く実用化できるかが世界の潮流であります。それは2015年から2020年であろうと見られていて、その頃から商業レベルで増えていくだろうということです。第3世代の微細藻のようなものから出てくるのが2020年から2030年だろうと考えられています。技術の進展で大きく変わってくるため、ロードマップのとおりとは行きませんが、現在の世界の関心事は第2世代のバイオ燃料を誰がどれだけ早く実用化できるかということです。本日は第2世代のリグノセルロースからのバイオ燃料を中心に話したいと思います。

これはリグノセルロースからの化学的構造を書いています。リグニンが15～25%、ヘミセルロースが23～32%、セルロースが38～50%というような組成からなっているのが一般的なリグノセルロースです。どこをとっても難しいというのが最初の話です。リグニンと呼ばれている部分は、たくさんエネルギーを持っている構造をしています。分解するのに難しく化学的には使いにくい。ですからエ

ネルギーがたくさんあることを利用して、燃焼しています。そしてプロセスの中で使うエネルギーを発生させて、できるだけプロセスを自律でエタノールができるようにするための、エネルギー源として使っているのが実情です。ヘミセルロースの部分と呼ばれるものは、分解すると似たように見えますが、ヘミセルロースはキシロースと呼ばれるカーボン5つからなる糖が主成分で、これが大きな問題です。じつはヘミセルロースは分解しやすいことはよいのですが、できたキシロースという糖を使おうとすると、ほとんどの微生物が発酵できません。一方、セルロースのほうはグルコースができてから分解さえすれば、グルコースですからほとんどの微生物がうまく発酵できます。ところが難分解性であるために、エネルギーが非常にかかるということです。このようにリグノセルロース系のバイオマスは、どこをとっても利用しやすい形になっていません。いかに省エネルギー的でシンプルなプロセスで分解していくか、それが大きな課題といえます。せっかくこんなによい構造なのだから、分解しないで何か新しい構造が作れないかという話もあります。しかし、それも化学的にも難しいということから、いずれの場合においても分解して、多くの場合、糖の部分だけを使っていこうということになります。



講師 近藤 昭彦 氏



バイオファイナリーのイメージで、大きく言えば熱化学プラットフォームと糖のプラットフォームというのがあって、これは世界的に研究されています。バイオマスにまず熱をかけるとガス化あるいは液化ができます。このようにガス化や熱分解、あるいは液化した後に例えばガス化すると、それを化学プロセスで燃料に持っていくことが可能です。一方、バイオのプロセスでは、バイオマスを前処理して、多くの場合はその後酵素を使って糖にまで分解してきたグルコース、キシロースのような糖をバイオプロセスで発酵し、エタノールなど多様な化学品を作っていくというのが糖のプラットフォーム、あるいはバイオテクノロジーを使った方法です。例えばアメリカの研究機関 NREL では、熱化学プラットフォーム、糖のプラットフォームでどれくらいの割合で研究しているかといえば、熱化学プラットフォームが2、糖のプラットフォームが8程度だそうで、世界的にもバイオのほうが研究されているということです。これはバイオマスがいろんな問題があったとしても、プロセスとしてうまく動くということです。

糖のプラットフォームをもう少し詳しく説明します。バイオマスのセルロース、ヘミセルロースの部分を使って、リグニンの部分は当面プロセスをまかなうためのエネルギー源として使おうというのが現状での考え方です。もちろんリグニンから有用化学品が作れないかという試みはされていますが、今のところの主流はエネルギー源としてまかなって、分解してできる糖。その中で炭素が6つのもの(C6糖)がグルコース、5つのもの(C5糖)がキシロースという糖です。それを微生物で分解して、このようなエタノールから始まる多様なC3、C4などのカーボンからなるビルディングブロック、モノマー体にもっていき、それを燃料として直接使う。あるいは

エタノールをエチレンにして、ポリエチレンにして汎用化学品にして使うなど、いろんな展開を考えていこうということです。一方が化学プロセスであり、一方がバイオプロセスですが、バイオと化学のプロセスを融合して、バイオマスからいろんな多様なものを作っていくというのが、糖のプラットフォームといわれるところであります。

もう1つの要素があって、前処理のプロセスはどちらかといえば化学機械、あるいは重工業的なプロセスです。これから考えても、重工業的なメカニカルなプロセスがあって、バイオのプロセスがあり、化学プロセスがある。これを実用化していこうとすると、かなりマルチディスシプリナリーになります。知を集めていかないと実用化できないようなプロセスだといえます。

ブラジルではサトウキビからエタノールが安価にできるため、エチレンにしてポリエチレンにする。カーボンニュートラルということで、CO₂削減効果が大きいといわれています。バイオマスから得られるエタノールというのはエネルギーだけでなく、非常にメジャーなパーツを占めるプラスチック、ポリエチレン、ポリプロピレンなどにも使われてきているのが現状です。いかに植物体を食料と競合しないで増産できるかが非常に重要なことですが、その次には、エネルギーを使わないでどのように生産するかというプロセスの開発が重要となります。ブラジルでは大規模なサトウキビ畑の中にエタノール工場があり、サトウキビの糖汁がエタノールをつくっていく。搾りかすをバイオマスボイラーで燃やしていますが、エネルギーを回収して、外部からの石油をほとんど使わずに全体のエネルギーをまかなっています。また、耕作に適さなかった半乾燥地でサトウキビをいかに大量に増産していくかという国家プロジェクトが動いています。

アメリカでは穀物メジャーのADM等が、トウモロコシからエタノールを作って、それが伸びてきたというのが現状です。日本の酒造りと同じようなプロセスであって、トウモロコシからのデンプンにアミラーゼ、アルファアミラーゼのような酵素を加えて煮ます。そして液化します。そしてグルコアミラーゼを加えて糖化して、酵母で発酵してやるということです。デンプンでは酵素を加えたり、煮ることが必要になってくるので、エネルギー的、コスト

的にブラジルのエタノール生産より高くつきます。このプロセスが批判対象にもなっています。バイオエタノールとして得られたエネルギーを、生産するために使ったエネルギーで割った数値が1.3ということで、いかにエネルギー効率を上げていくのかが重要なところといえます。

●セルロース系エタノール生産プロセスの開発

第2世代の燃料であるセルロースエタノール生産プロセスを、いかにつくっていくかが重要な課題となっています。現状ではそのプロセスがありませんので、これをいかに早く、商業的にもエネルギー的にもよい形のプロセスを開発して実用化するかが求められています。日本でもいくつかの試みがありますので、国内での利用を考えたプロセス、世界を視野に入れた最も効率のよい、最も優れたプロセスを考えようという2つのアプローチを紹介したいと思います。国内利用のものとしては、稲ワラのようなものを考えています。国内でやろうとすると組み換え体の利用が難しく、組み換え体を使わないとなれば、当然高くついてしまいます。世界を考えた場合は、組み換え技術でも何でも使ってもよいから最高の技術を使ってつくってくれということです。

まずは国内利用を想定して考えた技術です。エタノールの製造プロセスを分類すると、4つの形に分類されます。1番目の熱化学を除き、2番目の酵素を使うもの、3番目の一貫微生物を使うもの、4番目の非エタノール発酵系ということで発酵でないことも考えられています。これはバイオ燃料革新技术協議会のエタノール・ワーキンググループの資料です。本日紹介するのは2番目と3番目の技術です。1つは適切な前処理を行ったバイオマスを酵素で処理、糖化して、発酵によってエタノールにするという技術です。つまりバイオマスを前処理して、酵素で糖化分解して糖が得られます。それを微生物で発酵してエタノールを得て、それを濃縮・脱水してエタノールにするというプロセスです。発酵で使う微生物は非組み換え体を考えています。もう少しプロセス的に示したのがこの図です。バイオマスをまず粉碎する必要があります。稲ワラを考えると5mm程度角のサイズに粉碎し、酸やアルカリを使った前処理をするわけです。酵素を加えて、糖に分解し、発酵エタノールをつくるということになります。前処理



はここに示したように非常に多様なバリエーションが世界で考えられていて、いろんな方法で取り組まれています。しかし、私たちが特に注目したのは水だけを使う処理です。水だけを使う処理にはいろんな方法があります。高温高压の水を使う、蒸気を使う、いろんな形が考えられますが、もしも水だけを使って酵素分解が非常にしやすい形になるのであれば、これがいちばん良いと考えたのです。従来、世界で使われてきたのは希硫酸を使う方法でした。なぜ水熱処理法が使われてこなかったかといえば、エネルギー収支が非常に悪いと考えられたからです。それが最近では改良されて、エネルギー効率がよくなりました。そうなれば、水だけを使う方法が優れた方法だといえるわけです。

私たちは水熱処理法とこのようなかたちを組み合わせるものの開発を兵庫県で進めてきました。200で3メガパスカルくらいの高圧の水を使って、水熱処理法でバイオマスを処理しました。高温高压の水で処理すると、分解しやすいヘミセルロースの部分が分解されて、このような液体になってきます。これをさらに酵素分解して発酵します。じつは自然界のほとんどのものがキシロースは発酵できないといわれていましたが、生物の多様性で発酵できる酵母がいて、それはピキアスティピティスという酵母です。それを使って発酵する。セルロースの部分はさらに酵素で糖化する。これは通常に発酵で使われている酵母ができあがったグルコースを発酵しようというものです。フローを2つに分けて、1つはキシロースを発酵できる自然酵母、そしてC6を発酵できるサッカロマイセス・セレビシエという酵母を使って発酵していこうということです。

ここでは兵庫県のプロジェクトを紹介しますが、協議会をつくって、神戸大学と民間から重工業、発

酵工業、化学機械の企業が連携、農水省の支援を受けてプロセス開発をしています。このプロジェクトでは、稲ワラを天日乾燥して、水分を少なくする必要があります。乾燥後にロールベアラーでロール状にして貯蔵、そして運搬し、製造設備でエタノールへと発酵していく。こうした収集・運搬からエタノール発酵までの全体を通して、どれだけエネルギーがかかるかの評価もしていこうというものです。発酵残渣は畑地に戻すなど有効利用して、循環のシステムを考えています。これは組み換え体を使わない方法での挑戦であります。稲ワラは1年中収穫できるというものではないので、貯蔵がどの程度できるのかもポイントで、できるだけ低コストで貯蔵可能な方法が課題ともなります。

バイオ燃料の製造フローですが、組み換え体を使わないため、天然酵母を使います。水熱分解したものをC5(キシロース)の部分とC6(グルコース)の部分に分けて、さらに酵素を加えて分解します。そしてキシロースピキアスティピティスという酵母を使います。グルコースの発酵はサッカロマイセスセレビシエという酵母を使います。これで発酵してできたものを蒸留、脱水し、貯留するというのが製造工程になります。いっぱいタンクが必要、で酵素もいっぱい要るから、お金がかかりそうだということが分かると思います。国内でのいろんな制約を考えると、こんなようなプロセスを確かめているということです。三菱重工業の開発によるこの製造技術の特徴を言いますと、ポイントは1つです。いかに少ない加圧した水量で原料を処理して糖液を得るのか、あるいは処理液を得るかということです。この水をたくさん使えば、当然のようにエネルギー収支が合わなくなります。いかに水を減らせるかがエネルギー収率、あるいは最終的なバイオマス収率を考えても大事なことだと言えます。

このようなスキームで目標は1リッター90円程度に設定しています。そのぶん国内で受け入れられる技術だけを使って、やっていこうというものです。全国では他にもこれと似たようなアプローチが農水省の実証事業として進行しています。関西では兵庫県で三菱重工業のチームが行っています。

- CBP 一貫バイオプロセスによるエタノール生産次に世界に向けて、どんな組み換え技術を使って



もいい、とにかく最高の技術をつくってくださいという要請へのアプローチを紹介します。先ほど申しましたように、いっぱいのタンクを使っているのやるとお金がかかってしまうことがあります。やはり、できるだけインテグレートした、いろんなステップをまとめるシンプルプロセスのほうがお金もかからないことがあります。じつは前処理した後に酵素を加えていましたが、この酵素の値段がプロセスのコストを圧迫しているため、酵素をいかに減らせるか、できれば使わないでいけるかというのが大きな課題でした。ワンポット反応でエタノールを作れるようにできないかというのが一貫微生物系のアプローチです。

一貫微生物系のことを世界ではCBP(Consolidated Bioprocessing)と言いますが、日本には日本のオリジナルなアプローチがあり、これが神戸大学と京都大学で開発してきたアプローチです。一貫微生物を実現するために、細胞の表面にセルロースを分解できる酵素を集積して腕をつけた。これをアーミング技術といって、腕がいっぱい付いています。酵素を集積し、前処理したセルロースを分解してエタノールにする。こうした理想的な微生物ができれば、これだけ加えたら、いきなり発酵できるわけです。アーミングは千手観音から名付けられています。これを基盤にしながら技術開発を進めています。ポイントは微生物細胞工場、細胞を工場で行うようにつくり変えるというのがキーワードで、英語ではセル・ファクトリーと呼んでいます。セルは細胞のことです。細胞を、原料を搬入し、反応、製造して、製品として加工する、工場のように作りこみます。

バイオマスは高分子であるので、生物はいきなりそれを利用できません。ですから、アーミング技術

で酵素を大量に集積、バイオマスを分解して取り込ませます。取り込んだ後に目的の代謝物にブタモールを作りたいとか、イソプロパノールを作りたいとか、いろんな要請があります。そのような目的の製品になるように代謝経路をつくることになります。そのためにデザイン戦略が必要となります。デザイン戦略に基づき、細胞工場を操作して実際に作り込みます。それを発酵槽でテストします。多くの場合はなかなか目的の生産性能を目指せません。しかし、微生物の反応は非常に複雑です。従来は何が起こっていたのか分からなかったという状況でしたが、最近の生命化学の進展によってマルチオミックスといって、細胞の中の状態を網羅的に解析する技術、あるいは代謝経路の中でどの反応がどんな大きさで流れているかを解析する技術が出来上がってきています。これを使ってどこで何が起こったのかを解析します。ここで莫大なデータが出てきますので、インシリコでさらにシミュレーションして、どこをどうすればよいかの律速段階を特定し、律速段階を取り除くように再設計しながら、よいものができた段階でスケールアップをしていくことが必要になってきます。とにかく世界最高のものをつくらうということになりますので、先端バイオを総動員して設計していかないととてもできません。

インシリコ・シミュレーションとはどういうことなのか。設計図をつくる場所は、代謝経路をデザインするパスウェイマイニング、つまりどのような代謝経路をつくり込んだらよいのか、どれか遺伝子をなくしたらよいのではないのか、どこかの遺伝子の反応を強化したらよいのではないのかということがあります。キーワードは代謝です。微生物の代謝を目的の方向だけにもっていきたいわけで、そのような代謝をどう改善すればよいのかということになります。

最近ではゲノムスケールのシミュレーターがたくさん出てきています。ご存知のように、いろんな微生物のゲノムがあるのか分かりきっています。ということは、どんな酵素が要るのかも分かっているれば、どんな化学反応が細胞の中でいっぱい起こっているかが、化学反応式として書き表せます。その部分をコンピューターの中で表した数式の羅列、それがゲノムスケールモデルといわれるものです。それを使うと、インシリコの形質転換や変異がシミュレーショ

ンできます。実際に条件を与えて発酵してみても、どんな条件で発酵したらどの程度の成果が出るのかが想定できるようになっています。このようなものを使いながら、開発を進めているということでもあります。そして実測段階を特定するマルチオミックス、例えば代謝プロファイル解析といって代謝物の蓄積を見たり、素反応を解析したり、それに基づいて律速段階を特定するインシリコの技術とか、いろんなことができます。



●メタボローム解析による発酵阻害の解明

マルチオミックスの中のメタボローム解析が、いかに役立つかということについて少し紹介します。ゲノムがあり、その上にトランスクリプトームということで、メッセンジャーRNAになって、プロテーム、タンパク質になり、最終的にタンパク質がいろんな反応をして体の中には代謝物がいっぱいあるわけです。メタボロームというのは分子レベルでの細胞表現型で、細胞がどんな反応がどんなふうに行っているかは、代謝物の分布や流れを特定することで分かってきます。代謝プロファイル解析ということで、細胞の中にあるいろんなものを測ろうとすると、いろんな分析装置を駆使していく必要があります。これはガスクロマトグラフィー (GC) のTOFMS、こちらはキャピラリー電気泳動 (CE) のTOFMS、超高性能液体クロマトグラフィー (UPLC) のTOFMSというように、いろいろ組み合わせていかないと解析できません。こうしたことを地道にやっていると、イノベティブな細胞がつくれます。

このような最先端バイオを総動員しながら、CBP

微生物をつくっていく。酵素処理とエタノール発酵を同時にできるような微生物をつくり上げていくのが、ここでの課題であります。こちらのほうは経産省の支援を受け各企業と大学が結集して全体的なプロセス、前処理からCBPで発酵し、エネルギー（エタノール）を回収するということです。企業としては月桂冠、サントリー、関西化学機械、豊田中央研究所、鹿島建設、大学では京都大学、大阪大学、神戸大学、東北大学、名古屋大学が協力してこのようなプロセスを現在つくっております。微生物をスーパー化していくわけです。アーミングという技術を使って前処理したバイオマスを、アームをたくさん付けたもので分解、グルコースまでもっていったって発酵する。ヘミセルロースで分解した液も高分子が含まれているので、それを分解していくようなヘミセルラーゼという酵素が必要です。それを集積して分解、発酵していくという発酵経路を導入するような取り組みが必要で、あたかもアンドロイドのような細胞にしていこうとするものです。

こうしたものを使った発酵の1つの例が次のようなものです。代謝経路の中で発酵している酵母から、発酵に必要な遺伝子をサッカロマイセス・セレビシエという酵母に移植します。移植すると発酵できるようになります。さきほどの汚いC5液は、発酵の性能があまり出てきません。そこで腕（アーム）を付けてやりますと、前処理したものがさらに発酵できますので、たくさん発酵できるようになるということです。腕を付けることがとても大切だということです。

最後にマルチオミックスをどのように使っていくかの1例を紹介します。バイオマスを分解すると、酢酸や蟻酸など微生物にとって悪いものが出てきます。発酵には悪いものです。こうしたものがどのような悪影響を及ぼしているかをマルチオミックス技術で解析しました。これは発酵している図です。キシロースが発酵できるように代謝系を移植したスーパーなサッカロマイセス・セレビシエ、酵母です。酢酸がないときは青色で示したように糖が発酵時間とともになくなっていき、赤色で示したエタノールができてきます。ところが30ミリモルとか60ミリモル程度の酢酸を加えると、60ミリモルではほとんど糖がアルコールと変わらなくなってしまいます。何が起こったのか。このような時間でサンプリング



して、細胞をとってきて細胞の中がどうなっているかを、マルチオミックス技術で解析してやるわけです。山ほどデータが出てきますが、その中でペントースリン酸経路の中産代謝物を見たものがこのグラフです。S7Pが代謝物ですが、酢酸が存在していない時は発酵時間が経過して24時間後にはゼロになります。60ミリモルの酢酸が入っていると全く減らず細胞の中にたまったままです。このようないくつかの代謝物が見てとれます。他のものは発酵とともに減っていくわけですが、このように溜まってしまふようなものがあります。それはどこだろうと見ますと、この化合物があるのはペントースリン酸経路といわれるところです。例えばS7Pが溜まっていますので、これを先に進める酵素をたくさん作らせてやったらよいだろうということで、TAL1という酵素を酵母の中でもっと作らせてやる。さきほどの30ミリモルの酢酸を加えたものは発酵しなくなっていたのですが、これを加えることで発酵できるようになったということでもあります。

このようにどこが悪影響を受けているかを、代謝物を網羅的に解析することで明らかにして、ストップしている所を流れるように遺伝子操作することによって、酵母をタフにしていって、強くしていくことに取り組んでいます。

質疑

< Q > こうした研究開発は政府の補助なしではできないと思うが、実用化へ向けたデザインのようなものを聞きたい。

< A > 国内でバイオマスから作るには、やはり補助金なしではあり得ない。実用化問題は経済的に成り立つかどうかだろう。