

エコテクノ2008
バイオマス・ニッポン in 九州セミナー
～食料と競合しないバイオ燃料の推進～

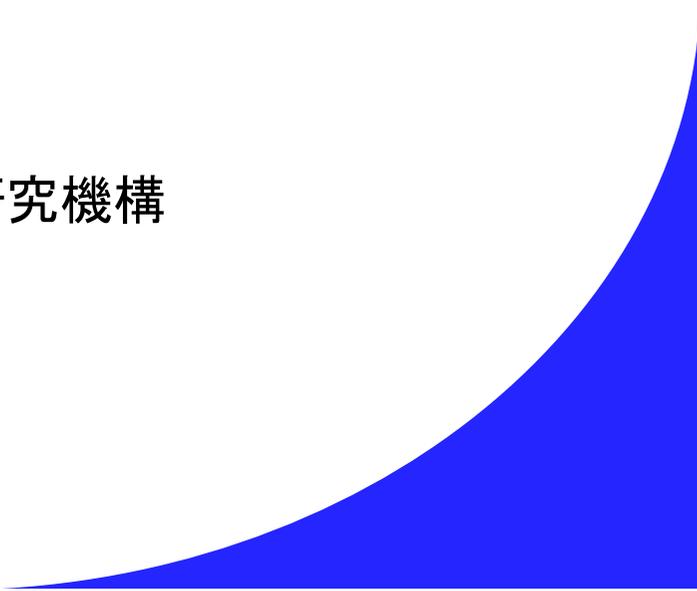
2008年10月24日

RITEのソフトバイオマス原料エタノール生産技術開発

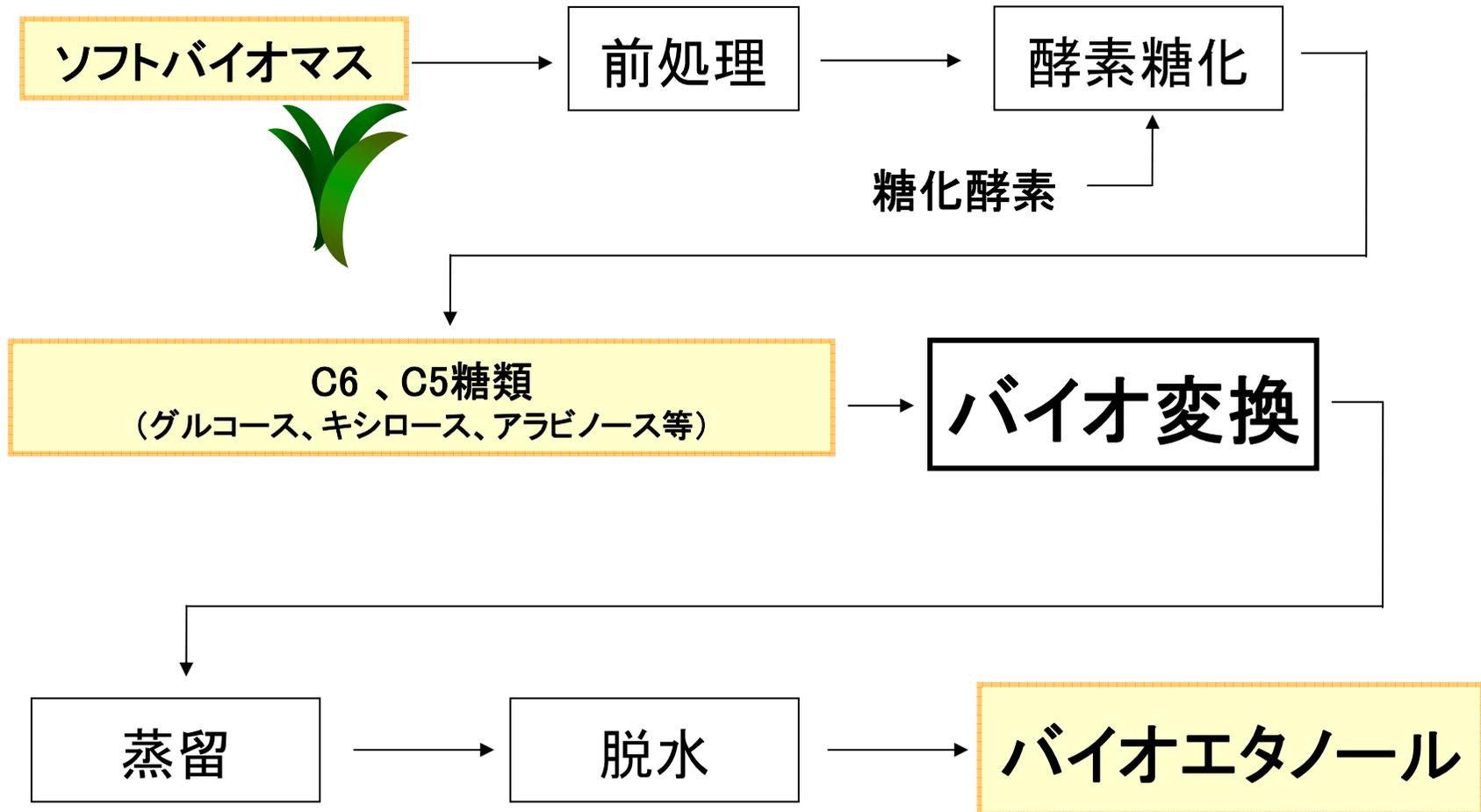
A thick, horizontal blue bar with a slight gradient, spanning the width of the slide.

財団法人地球環境産業技術研究機構
バイオ研究グループ

湯川 英明

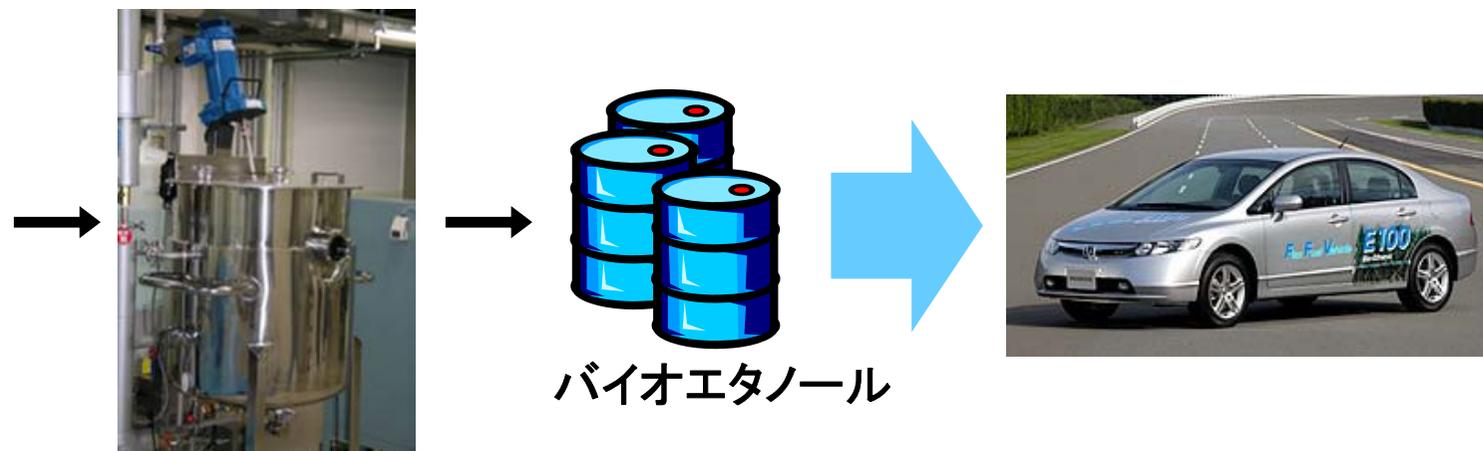
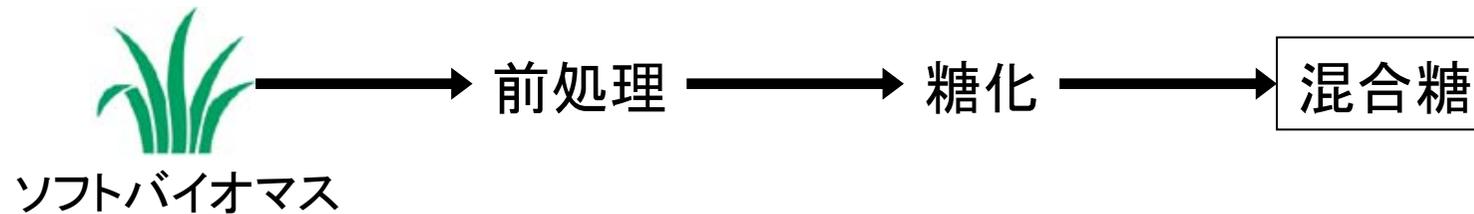
A large, curved blue shape in the bottom right corner of the slide, resembling a stylized wave or a corner graphic.

ソフトバイオマスからのエタノール生産プロセス



セルロース原料エタノール 開発状況 with HONDA

- 小型設備による主要データ確認(2007年末)
- 実証設備テスト(2008年～)



最近のトピックス

■ 洞爺湖サミット： 福田首相による提言

非食料からのバイオ燃料

製造技術開発／実用化推進

■ 日経環境技術賞大賞 受賞

「セルロースからの混合糖同時変換による

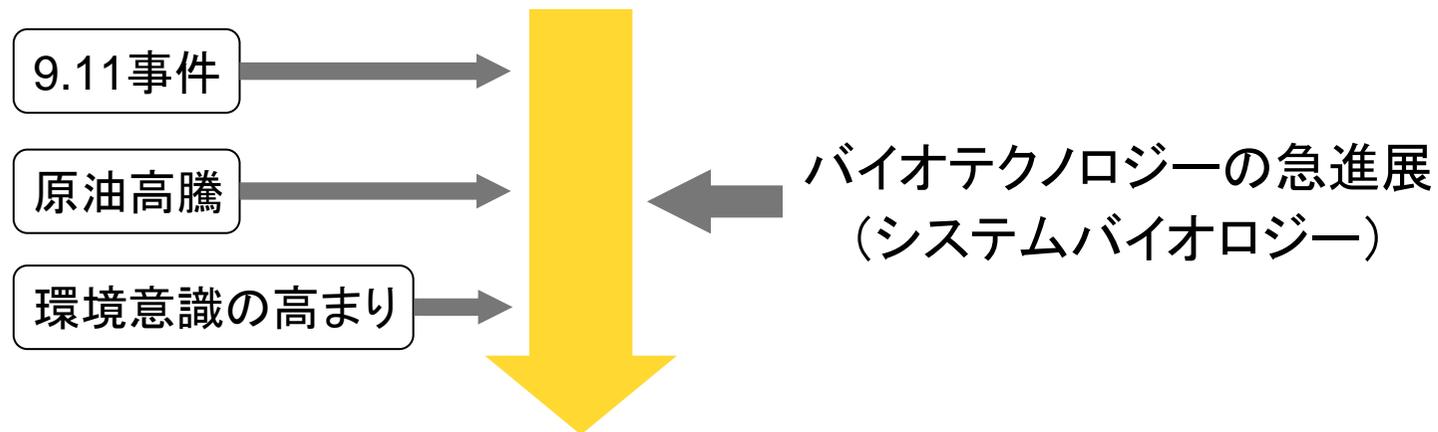
エタノール製造技術」

セルロースエタノール実証計画 in 米国

企業	生産開始時期	醗酵方法	生産規模(万kL/y)	酵素供給元	微生物	建設地
POET (Broin)	2011	C5C6同時	11.7	Novozymes	<i>Z. mobilis</i>	アイオワ
Verenium	2010	2段発酵	11.4	自社酵素	<i>E.coli</i> KO11 <i>K. oxytoca</i> BW34	ルイジアナ
Bluefire Ethanol Inc.	2009	C5C6同時	7.2	酸加水分解	Yeast	カリフォルニア
Abengoa	2011	2段発酵	4.3	Novozymes, Genencor, Dyadic, DSM		カンザス
Dupont/Genencor J/V	2012	C5C6同時	商業スケール	Genencor	<i>Z. mobilis</i>	USA
Colusa Biomass Energy Corporation	2010	2段発酵	4.7			アーカンソー
SunOpta Inc./GreenField Ethanol J/V	2010		3.8			
Mascoma	2009	CBP	1.9	Genencor, 自社酵素		ミシガン
Pacific ethanol	2009	2段発酵	1.0	Novozymes	Yeast Themophilic anaerobe	オレゴン
Western Biomass Energy	2007		0.6	Novozymes		ワイオミング
ICM	2010	C5C6同時	0.6	Novozymes		ミズーリ
SunEthanol Inc.		CBP			<i>Clostridium</i> <i>phytofermentans</i>	
Flambeau River Biorefinary	2009		2.274			ウィスコンシン
RSE Pulp & Chemical, LLC	2010		0.8338			メイン
Lignol Innovations	2010(2012)		0.9475		Yeast	
Ecofin, LLC	2010		0.4927			ケンタッキー

米国の戦略

- 1990年前後より、IT産業とバイオリファイナリー産業を21世紀の新規産業と位置付け、国による重点支援
- 1999年8月、大統領令にて更なる国の支援方針明確化



- 脱石油 (National Security、温暖化対策)
- 環境技術でリード
- 農業活性化
- 新規雇用

バイオ燃料推進

石油化学からグリーン化学への変革

■ Sustainability ?

バイオ燃料の“光と影”

■ 温暖化対策としての認識

CO₂削減効果の定量化

影を解析すると・・・

EU

Sustainabilityへの疑念
“Sustainable Biofuel理念”
Traceability等

食料との競合



環境破壊



熱帯雨林
サバンナ (Cerrado)

出典: WWF



パーム椰子栽培

出典: WWF

Ethics問題



出典: Ethical Sugar

食料との競合

コーン、サトウキビ原料法

■ コーン: 価格UP

■ 栽培面積の拡大



[他の農産物]からの転作



価格UP

パーム椰子(バイオディーゼル原料)栽培面積拡大

- 森林破壊

- ・ “生物多様性保持”の危機
- ・ 絶滅危惧種(オランウータン、ゾウ他)

ブラジル地域

- 熱帯雨林破壊

- サバンナ(Brazilian Cerrado)破壊



出典: "The oil for ape scandal: How palm oil is threatening the orang-utan"
Friends of the Earth

中南米のサトウキビ生産地域

- Forced Labor
- Minimum wage under living standard
- Child Labor

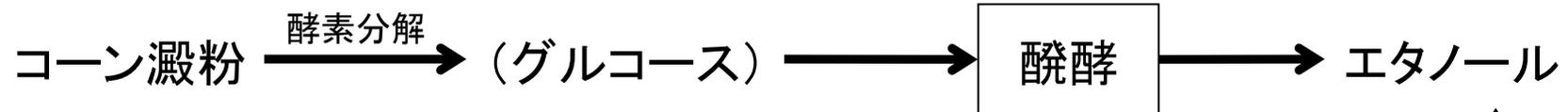
- バイオ燃料に対して“基本的”に高評価
温暖化対策、地政学上の利点 等
- Sustainable Biofuelを前提として
Traceability提唱も

セルロース原料バイオ燃料 in 米国

今後の動向

バイオエタノール製造法 in 米国

Today



Tomorrow



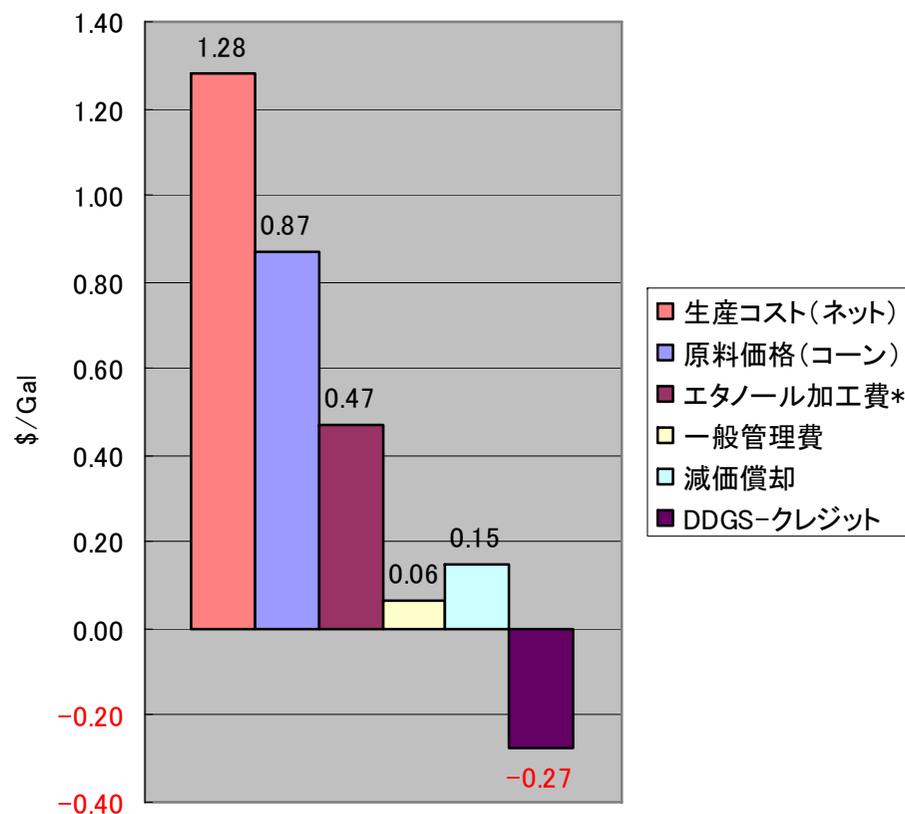
Future



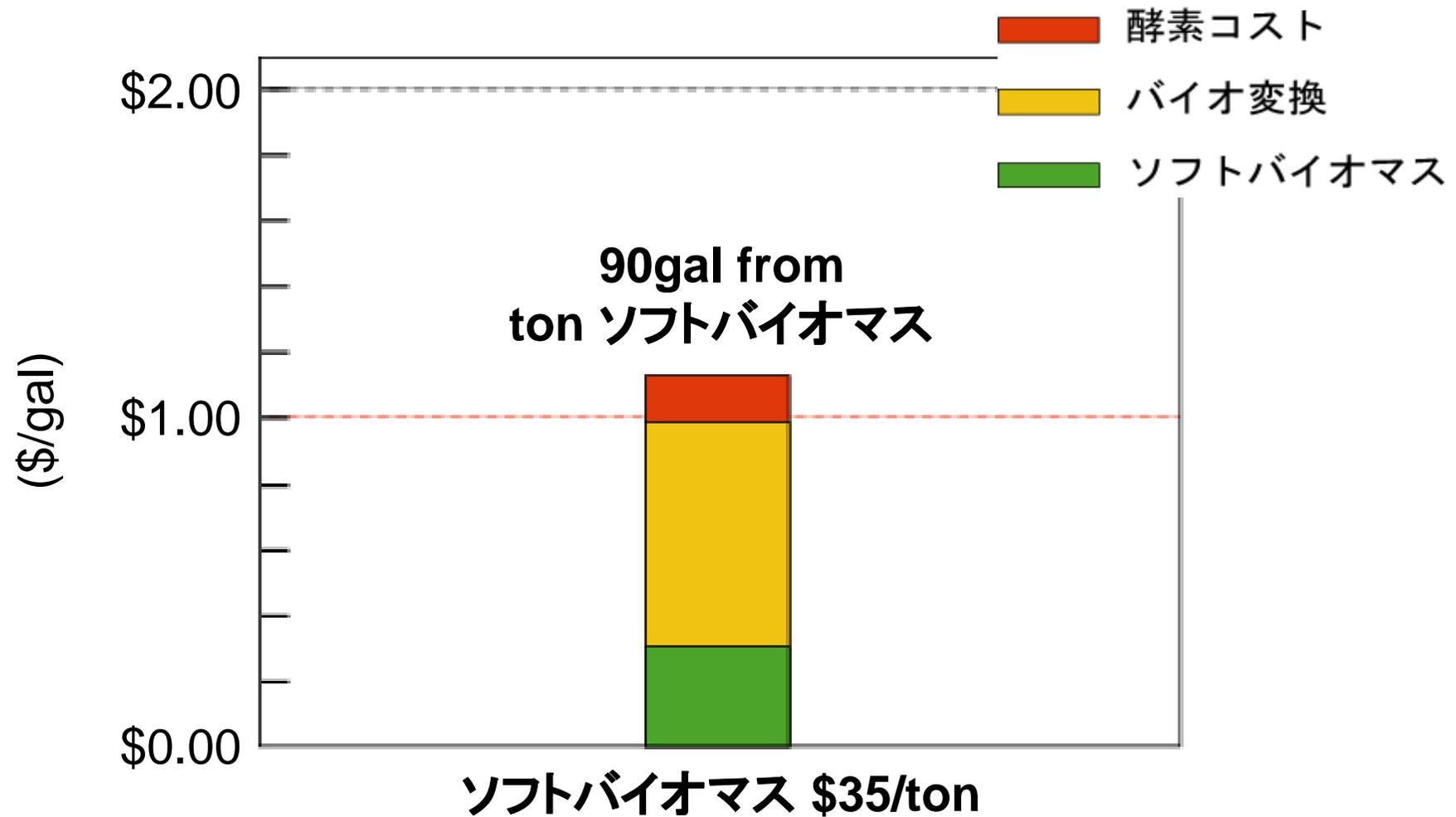
コーン原料コスト

コーン原料

US\$1.28/Gallon (33.82C/L) FOB Plant Gate



セルロース原料法コスト



セルロース原料バイオエタノール 温暖化対策として有効性認識

Well to Wheel 評価

エタノール1ℓ使用 ↔ 1.7kgCO₂削減

- Science, Vol. 311, P. 506, 27 January 2006
“Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals”
- Argonne National Laboratory レポート 7 November 2006
“Fuel-Cycle Assessment of Selected Bioethanol
Production Pathways in the United States”

セルロース原料エタノール生産 "Take off"のシナリオ(米国)

- * **技術実証期(~2010): ~10万KL生産/site**
 - ・国の補助金制度活用(ベンチャー等)
 - ・先行投資(大手企業)

- * **技術改良期(2010年代前半)**
 - ・エネルギー作物の普及
 - ・生産菌育種(C₆&C₅同時利用)
 - ・各工程の効率化: 糖化、バイオ変換、回収

- * **事業展開(2010年代後半)**
2億KL生産へ

セルロースエタノール実証計画 in 米国



企業	生産開始時期	醗酵方法	生産規模(万kL/y)	酵素供給元	微生物	建設地
POET (Broin)	2011	C5C6同時	11.7	Novozymes	<i>Z. mobilis</i>	アイオワ
Verenium	2010	2段発酵	11.4	自社酵素	<i>E.coli</i> KO11 <i>K. oxytoca</i> BW34	ルイジアナ
Bluefire Ethanol Inc.	2009	C5C6同時	7.2	酸加水分解	Yeast	カリフォルニア
Abengoa	2011	2段発酵	4.3	Novozymes, Genencor, Dyadic, DSM		カンザス
Dupont/Genencor J/V	2012	C5C6同時	商業スケール	Genencor	<i>Z. mobilis</i>	USA
Colusa Biomass Energy Corporation	2010	2段発酵	4.7			アーカンソー
SunOpta Inc./GreenField Ethanol J/V	2010		3.8			
Mascoma	2009	CBP	1.9	Genencor, 自社酵素		ミシガン
Pacific ethanol	2009	2段発酵	1.0	Novozymes	Yeast Themophilic anaerobe	オレゴン
Western Biomass Energy	2007		0.6	Novozymes		ワイオミング
ICM	2010	C5C6同時	0.6	Novozymes		ミズーリ
SunEthanol Inc.		CBP			<i>Clostridium phytofermentans</i>	
Flambeau River Biorefinary	2009		2.274			ウィスコンシン
RSE Pulp & Chemical, LLC	2010		0.8338			メイン
Lignol Innovations	2010(2012)		0.9475		Yeast	
Ecofin, LLC	2010		0.4927			ケンタッキー

CBP: consolidated bio-process

セルロース原料バイオエタノールへ向けて 何が起きているか？

- 米国ビッグスリーの参入

- 投資(家)業界からの資金流入



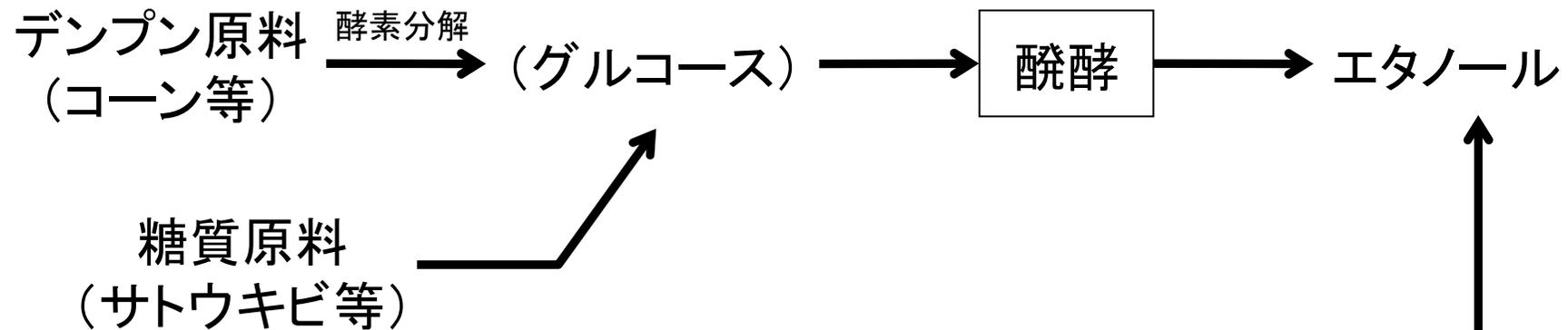
- 石油メジャー(最大抵抗勢力)のスタンスシフト

R&Dへの積極的取組み

- 州・連邦政府の積極的支援

エタノール製造法

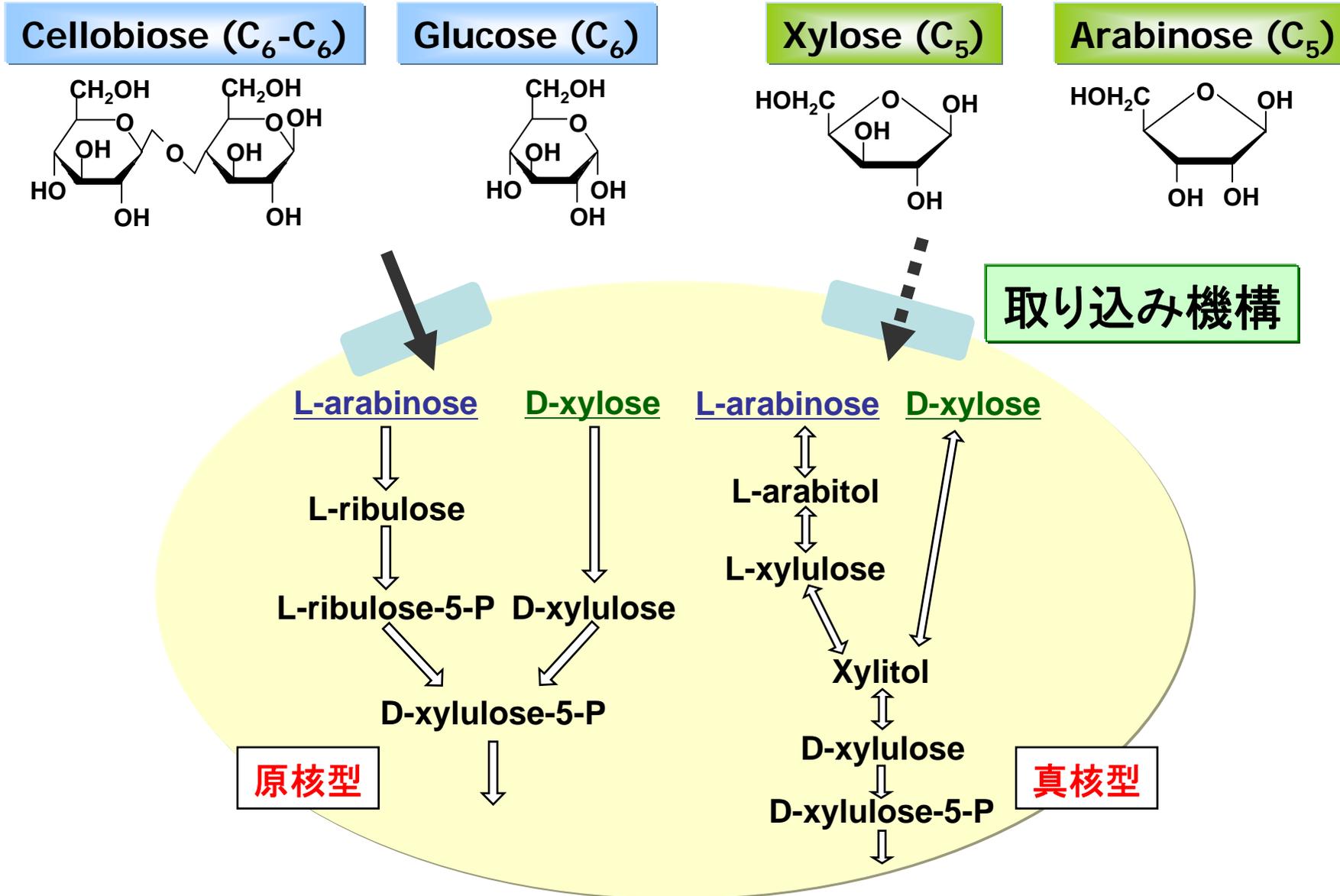
Today



Tomorrow



C5 C6 混合糖利用の技術課題



混合糖(C6) 特許“制圧” 機能の付与

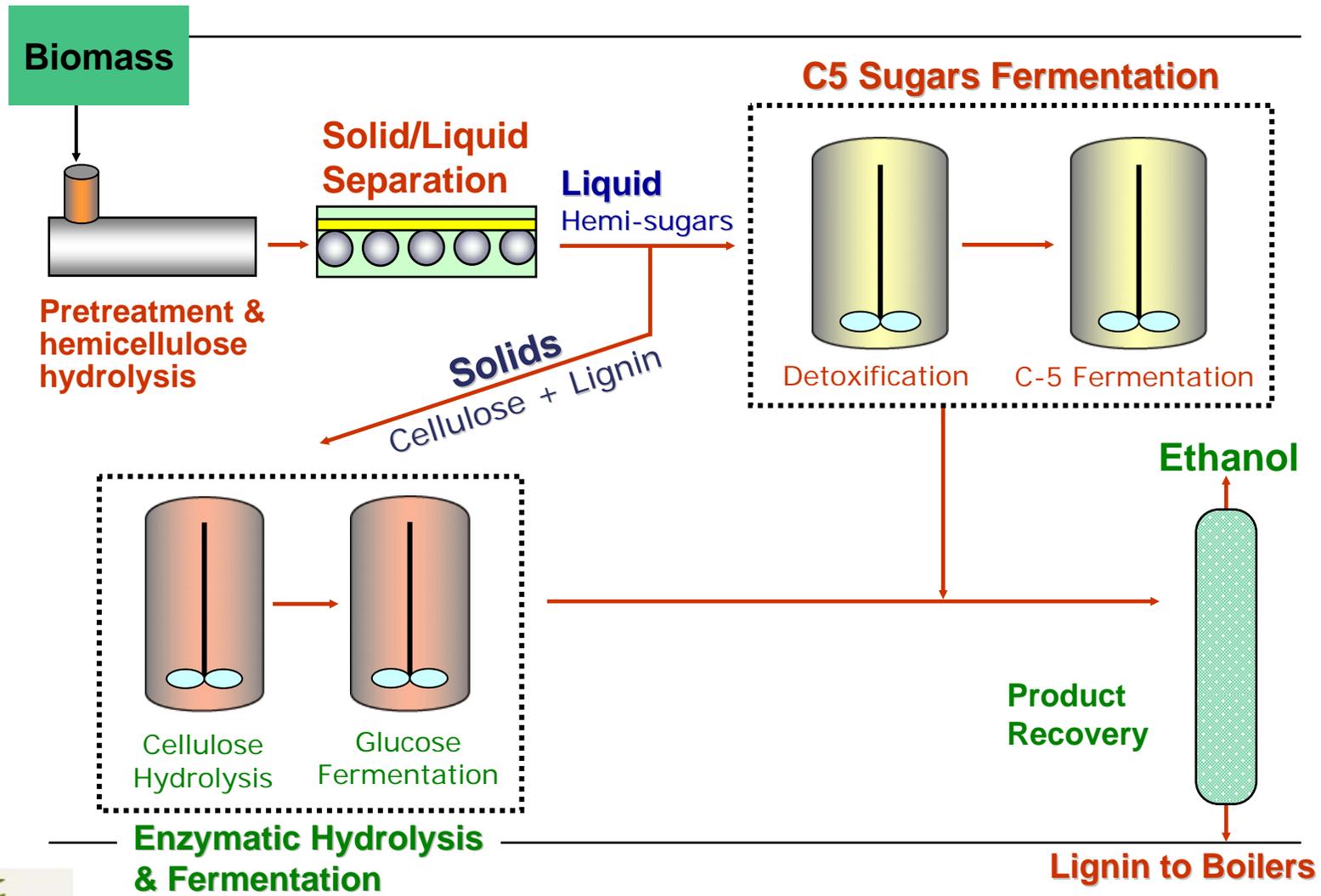
セルロースエタノール実証計画 in 米国

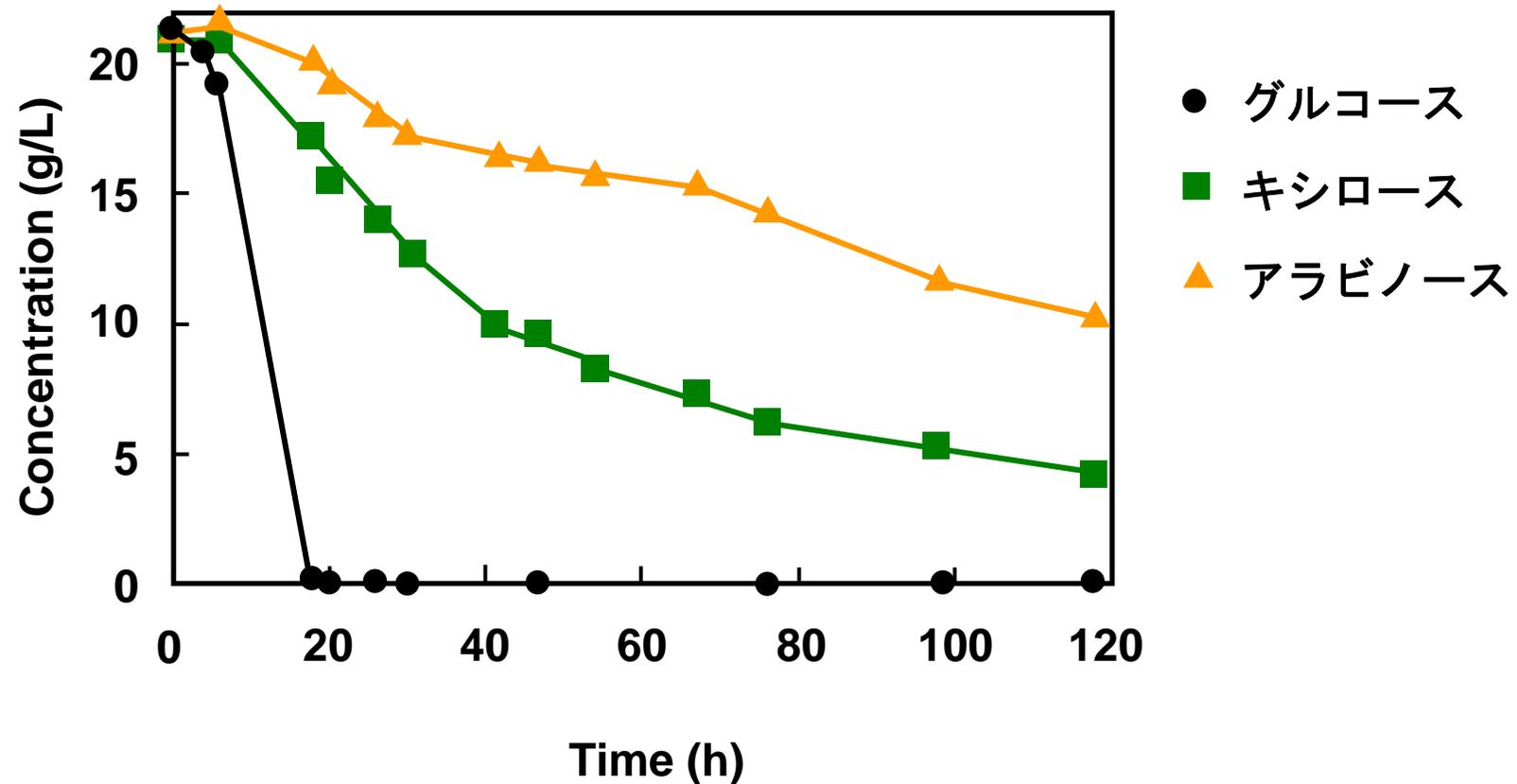


企業	生産開始時期	醗酵方法	生産規模(万kL/y)	酵素供給元	微生物	建設地
POET (Broin)	2011	C5C6同時	11.7	Novozymes	<i>Z. mobilis</i>	アイオワ
Verenium	2010	2段発酵	11.4	自社酵素	<i>E.coli</i> KO11 <i>K. oxytoca</i> BW34	ルイジアナ
Bluefire Ethanol Inc.	2009	C5C6同時	7.2	酸加水分解	Yeast	カリフォルニア
Abengoa	2011	2段発酵	4.3	Novozymes, Genencor, Dyadic, DSM		カンザス
Dupont/Genencor J/V	2012	C5C6同時	商業スケール	Genencor	<i>Z. mobilis</i>	USA
Colusa Biomass Energy Corporation	2010	2段発酵	4.7			アーカンソー
SunOpta Inc./GreenField Ethanol J/V	2010		3.8			
Mascoma	2009	CBP	1.9	Genencor, 自社酵素		ミシガン
Pacific ethanol	2009	2段発酵	1.0	Novozymes	Yeast Themophilic anaerobe	オレゴン
Western Biomass Energy	2007		0.6	Novozymes		ワイオミング
ICM	2010	C5C6同時	0.6	Novozymes		ミズーリ
SunEthanol Inc.		CBP			<i>Clostridium phytofermentans</i>	
Flambeau River Biorefinary	2009		2.274			ウィスコンシン
RSE Pulp & Chemical, LLC	2010		0.8338			メイン
Lignol Innovations	2010(2012)		0.9475		Yeast	
Ecofin, LLC	2010		0.4927			ケンタッキー

CBP: consolidated bio-process

C6, C5糖の二槽発酵



組換え *Saccharomyces cerevisiae* による混合糖の利用

Gorwa-Grauslund, MF (Lund Univ.) et al.
(2006) Microb Cell Fact, 5:18

Mission

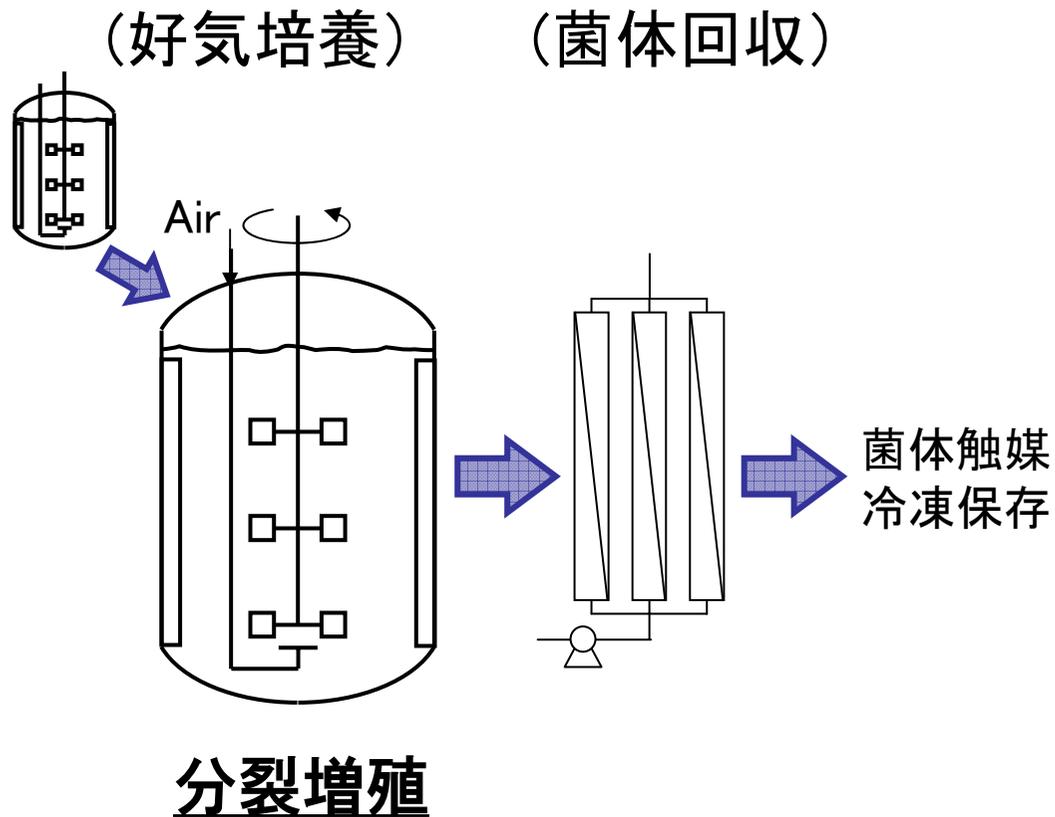
- 革新技術確立 (RITEバイオプロセス)
- 産業界への技術移転 (共同開発)
早期実用化 by “日の丸”技術

RITEバイオプロセス概要

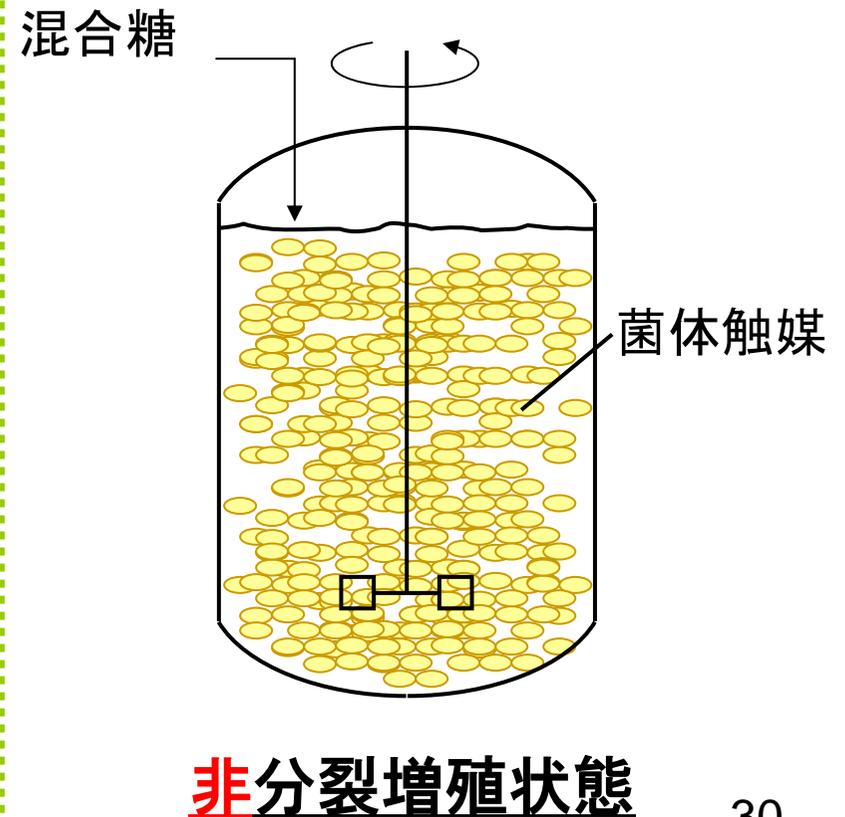
JP-Patent 3869788

INDIA 209524

菌体触媒調製



バイオ変換



RITE strain

Corynebacterium glutamicum

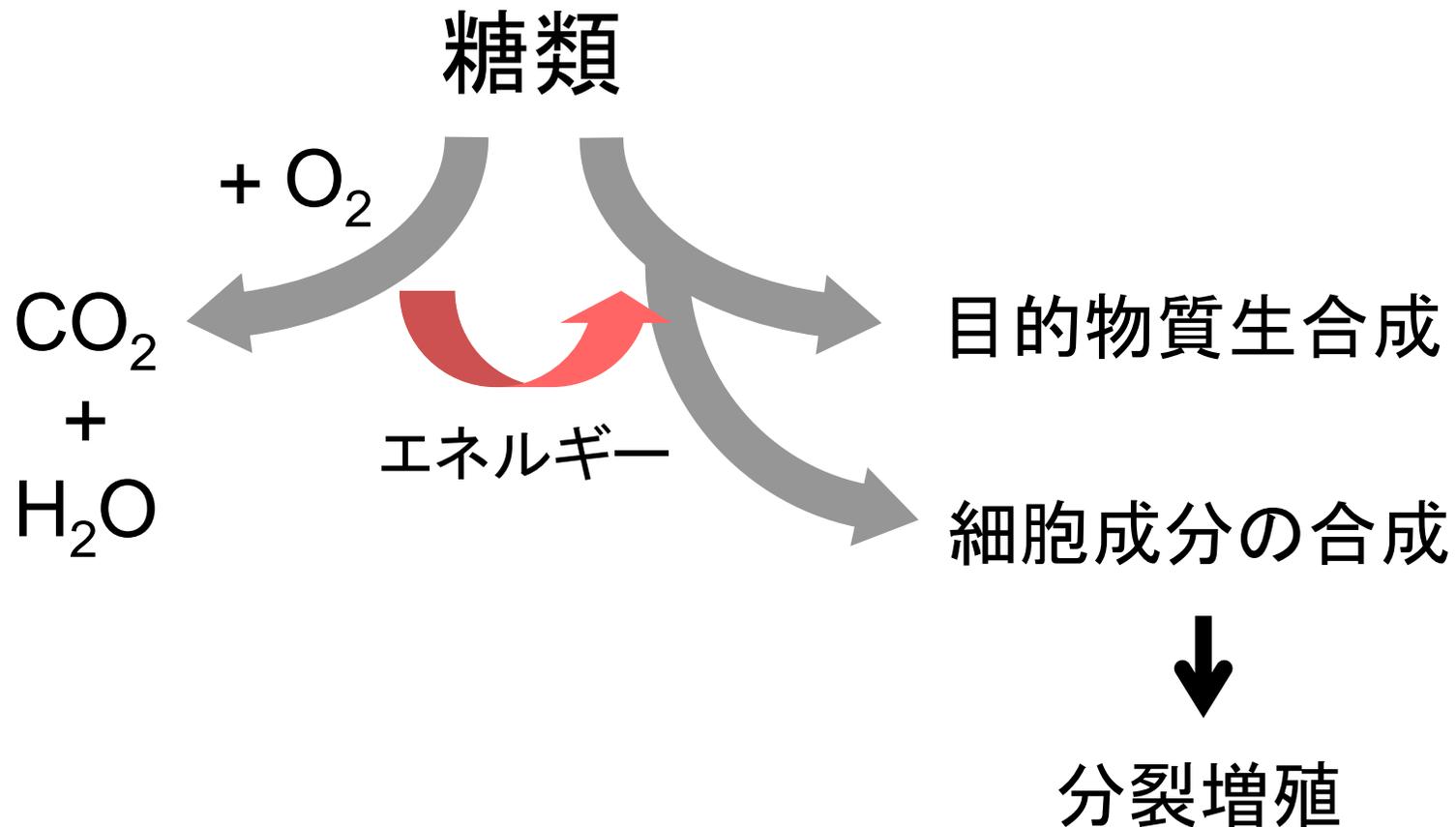
Under oxygen deprivation

- Growth-arrested

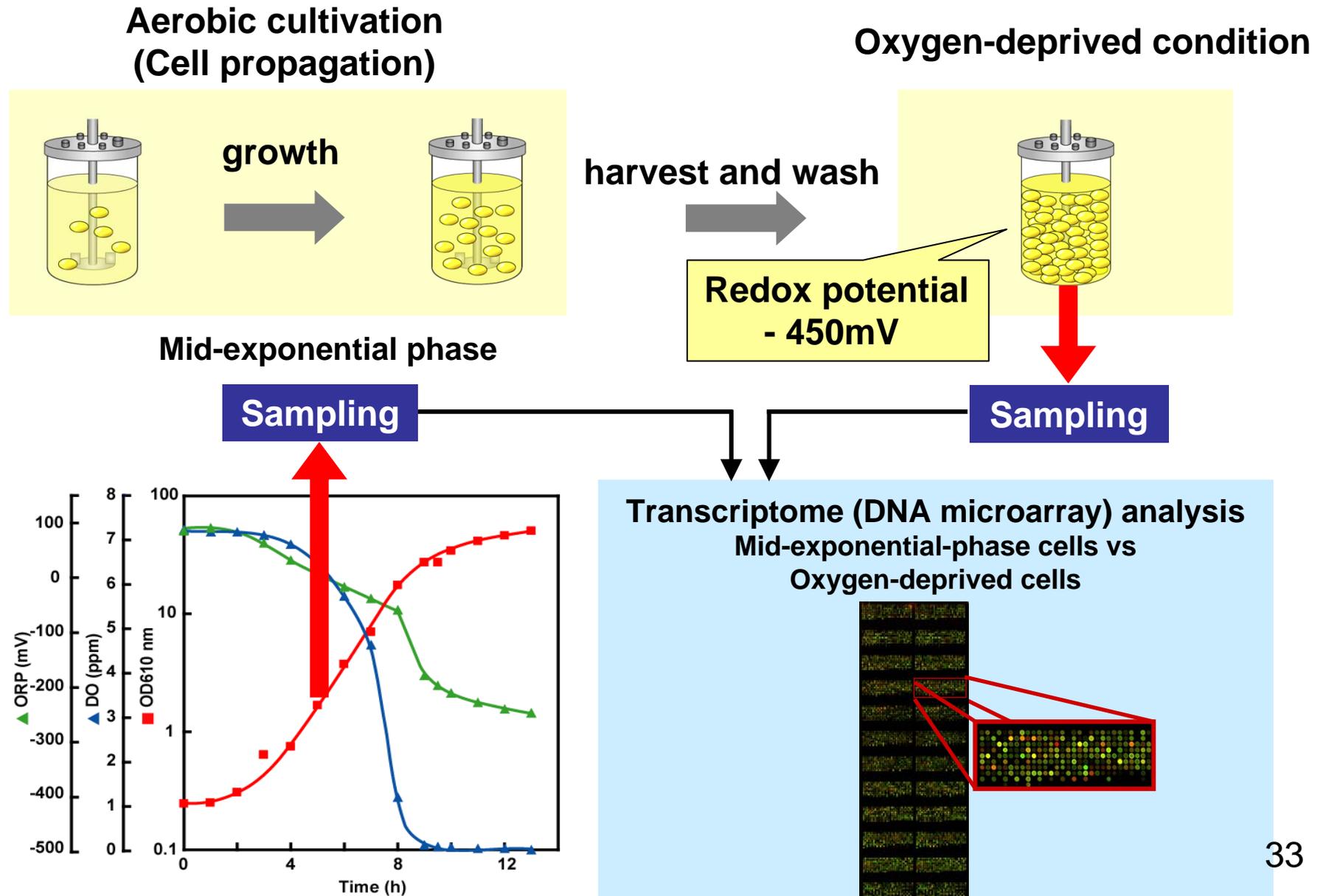
**- Maintains main
metabolic capabilities**



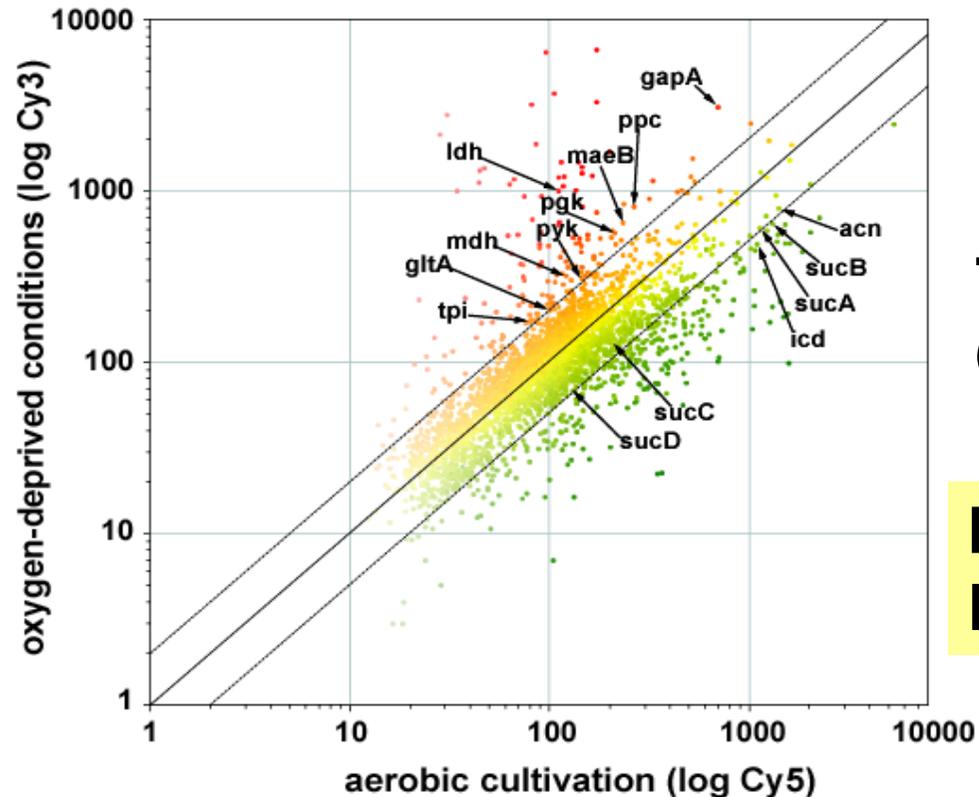
既存の微生物プロセス



Analysis of metabolic shift under oxygen deprivation



Gene expression analysis



- Entire gene (3080 genes)

The ratios of mRNA levels
(oxygen-deprived conditions
/aerobic cultivation)

More than 2-fold	161 genes
Less than 1/2-fold	221 genes

A gene expression profile is different greatly between aerobic and oxygen-deprived conditions

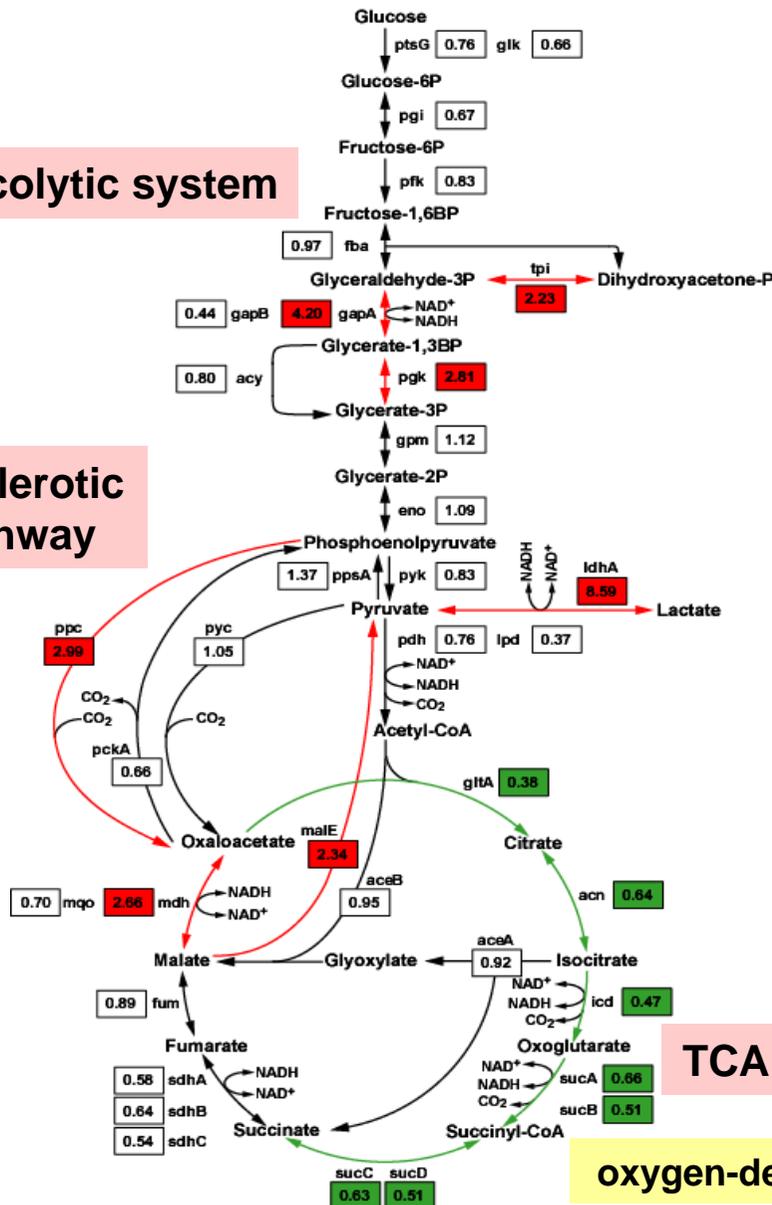
Functional classes of the genes in the expression data

COGs functional annotation*	Number of genes	More than 2-fold	Less than 1/2-fold
Information storage and processing			
Translation, ribosomal structure and biogenesis	145	1	48
Transcription	180	12	3
DNA replication, recombination and repair	126	3	1
Cellular processes			
Cell division and chromosome partitioning	22		
Post-translational modification, protein turnover, chaperones	82	6	8
Cell envelope biogenesis, outer membrane	131	2	9
Cell motility and secretion	49		5
Inorganic ion transport and metabolism	189	19	16
Signal transduction mechanisms	60	1	5
Metabolism			
Energy production and conversion	138	15	15
Carbohydrate transport and metabolism	192	9	15
Amino acid transport and metabolism	225	20	15
Nucleotide transport and metabolism	73	3	10
Coenzyme metabolism	117	11	2
Lipid metabolism	72		3
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	85	4	4
Poorly characterized			
General function prediction only	263	14	11
Function unknown	161	9	10
No match COG	770	32	41
Total	3080	161	221

Expression analysis of glucose metabolism

glycolytic system

anaplerotic pathway



Enzyme	Relative enzyme activities	
	oxygen-deprived conditions / aerobic	
GAPDH	5.3	
PGK	10.5	
TPI	19.1	
PEPC	4.5	
LDH	14	
MDH	25.8	

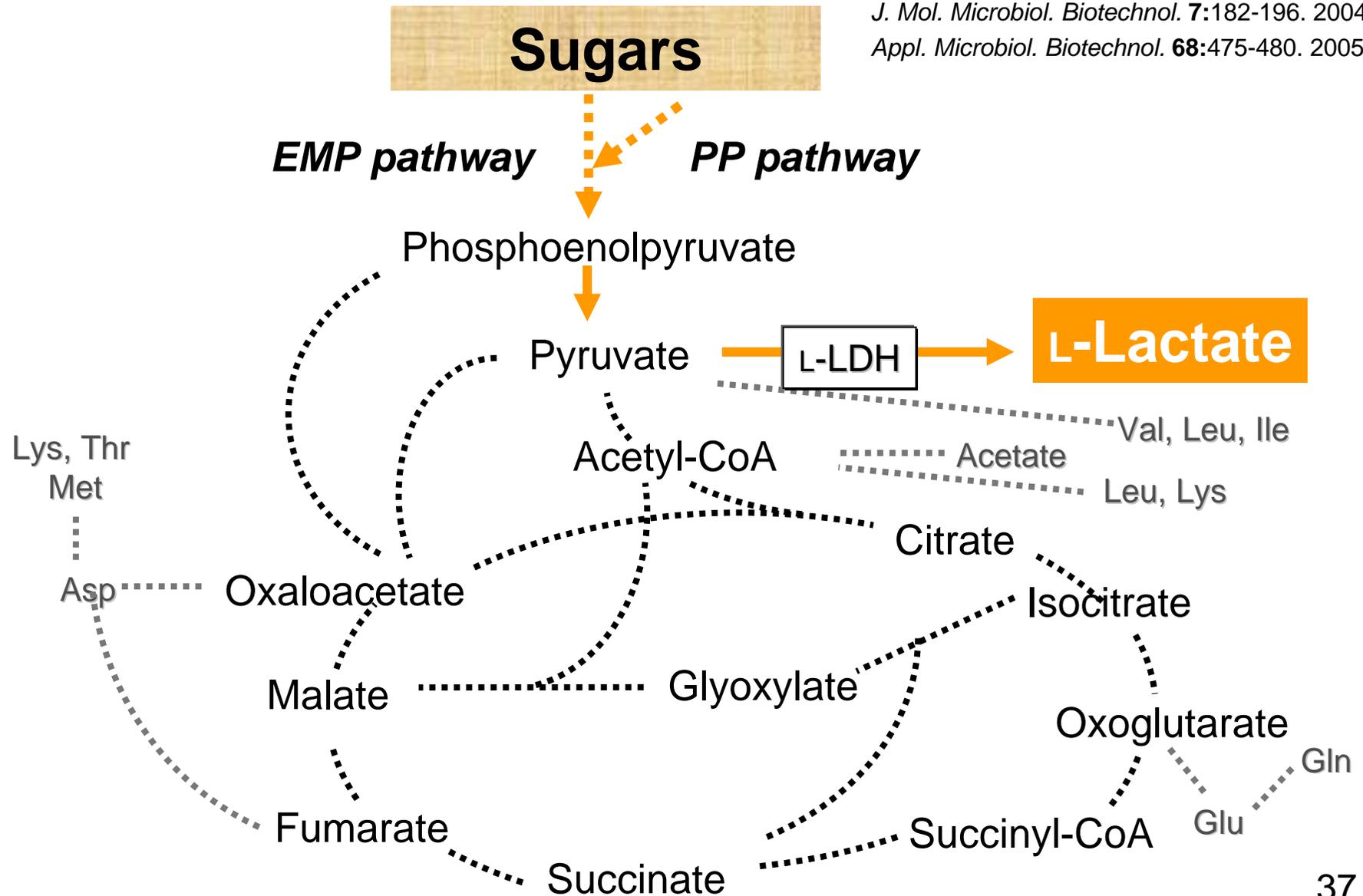
Genes encoding several key enzymes involved in the glycolytic and organic acid production pathways were significantly up-regulated under growth-arrested bioprocess.

Microbiology. 153:2491-2504. 2007

TCA cycle

oxygen-deprived conditions / aerobic cultivation

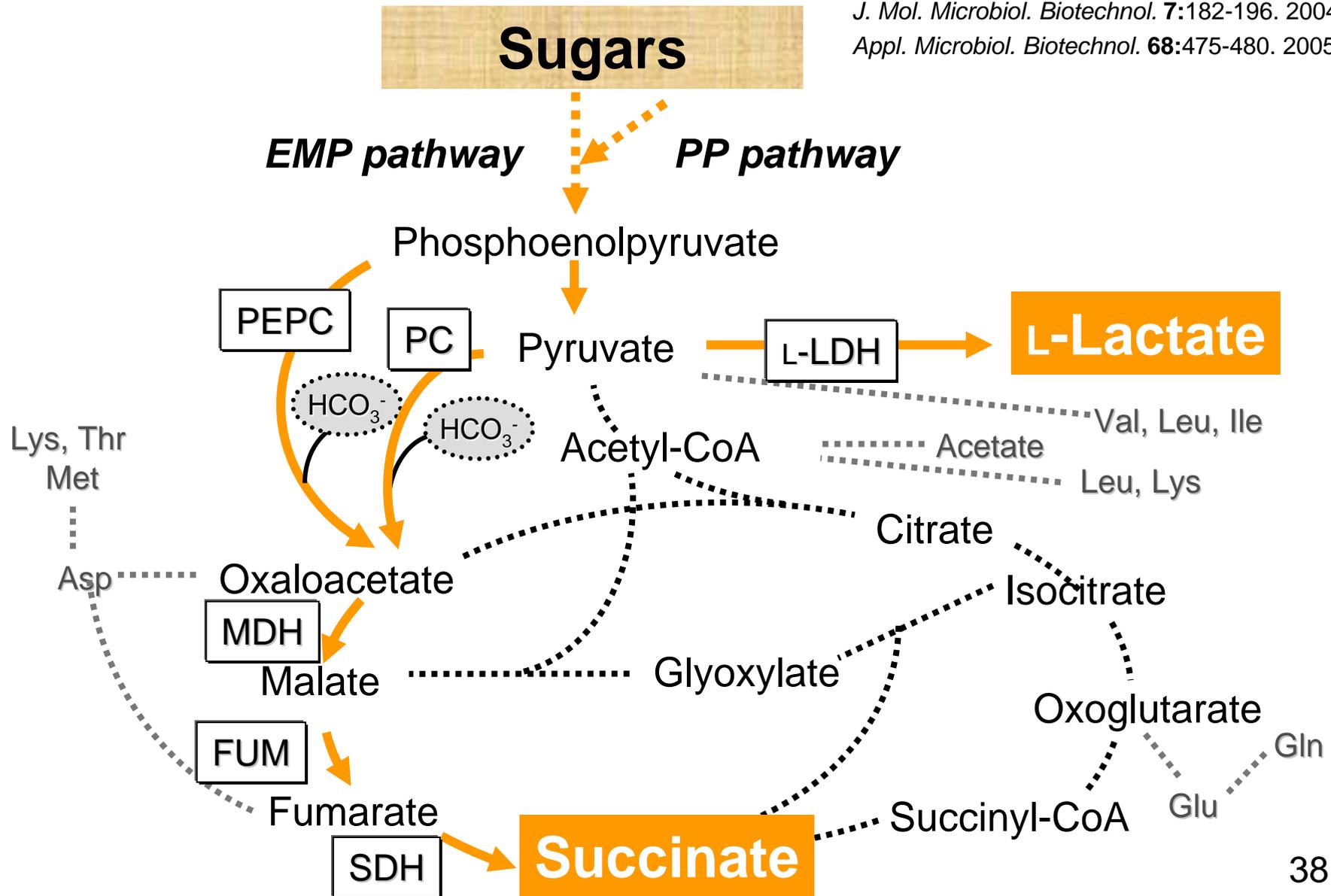
Metabolic pathways of *C. glutamicum* under oxygen deprivation (without CO₂)



J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **7**:182-196. 2004.

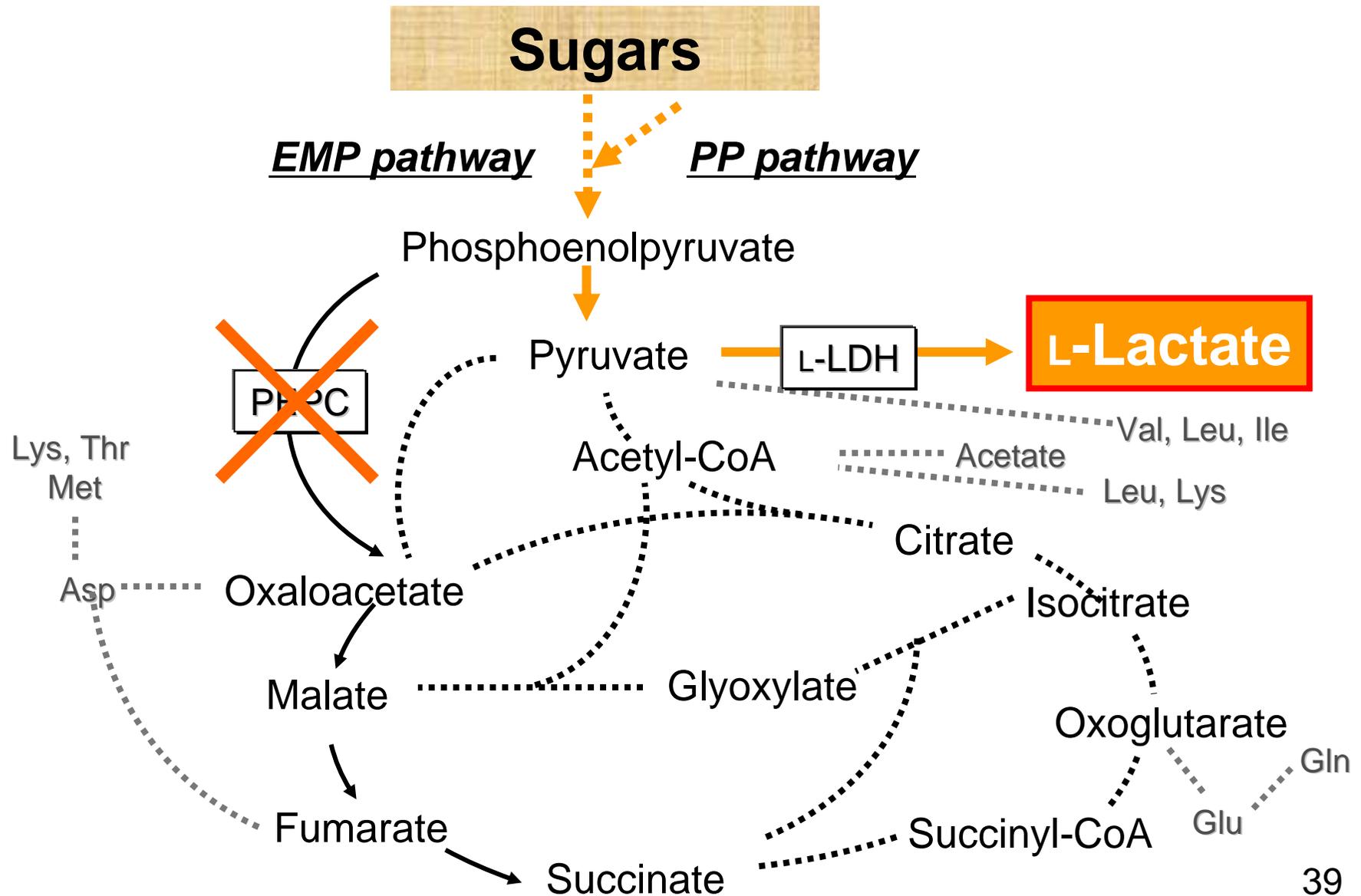
Appl. Microbiol. Biotechnol. **68**:475-480. 2005.

Metabolic pathways of *C. glutamicum* under oxygen deprivation (with CO₂)

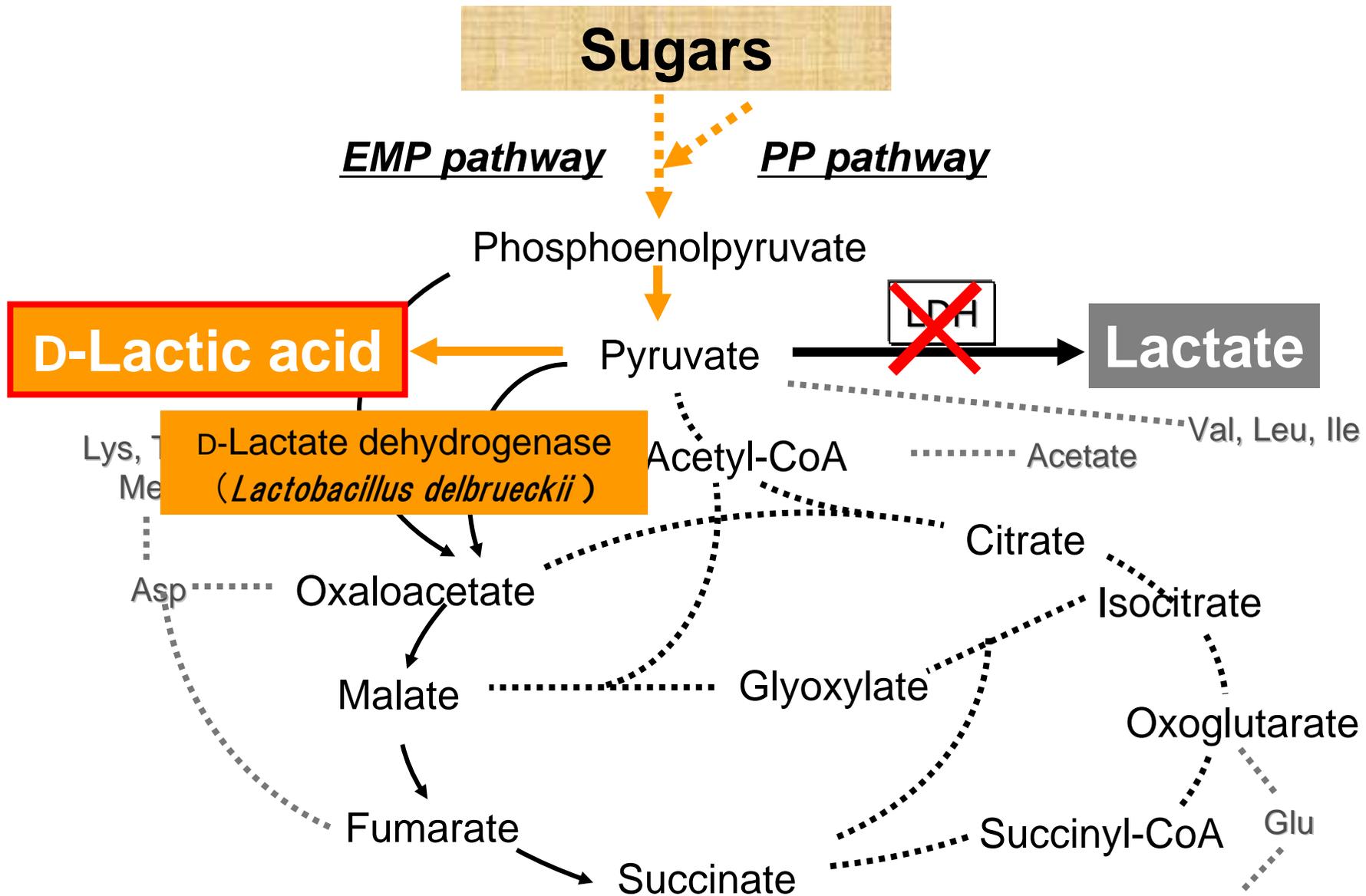


J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7:182-196. 2004.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 68:475-480. 2005.

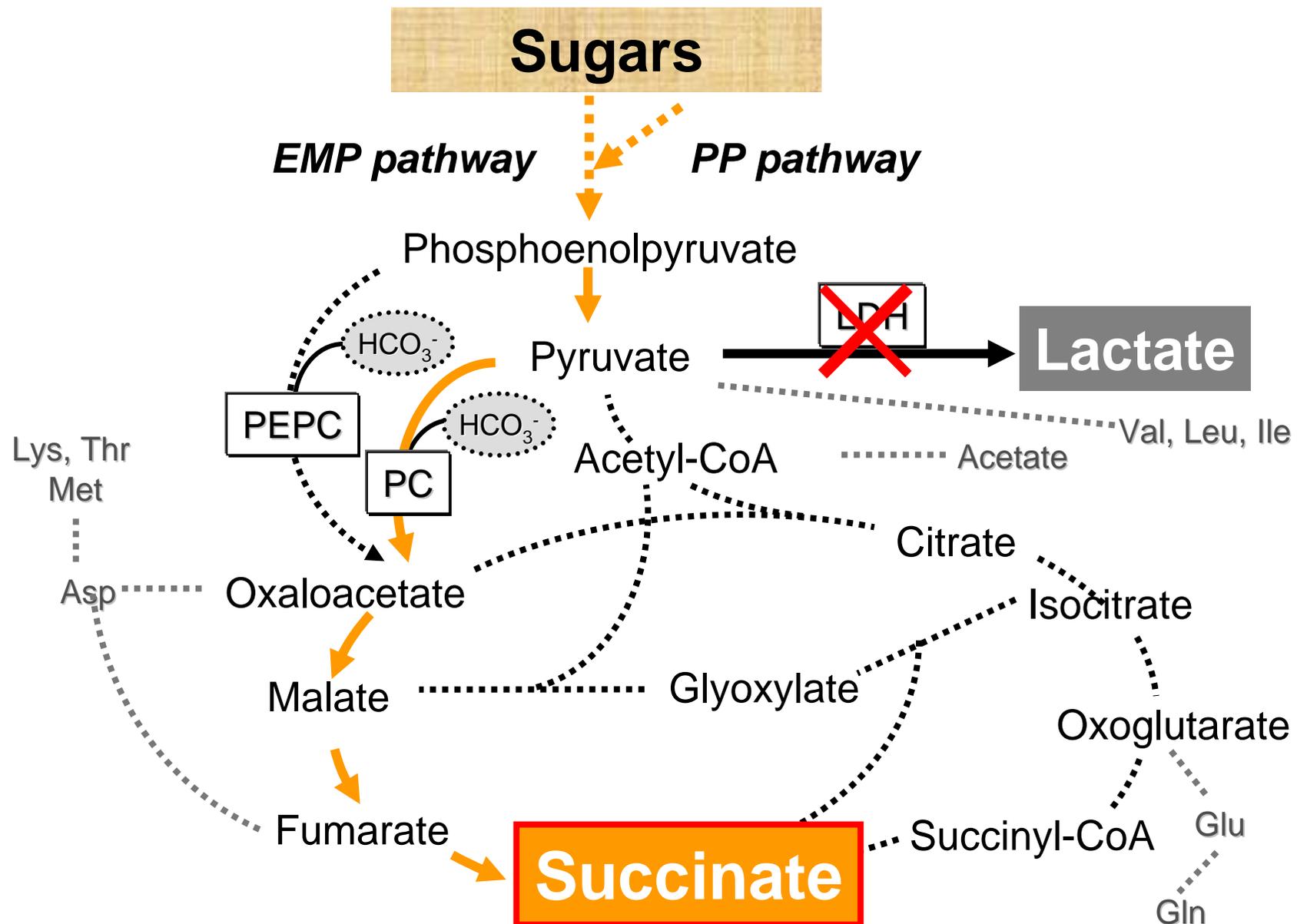
Metabolic engineering for L-Lactate production



Metabolic engineering for D-Lactate production



Metabolic engineering for succinic acid production



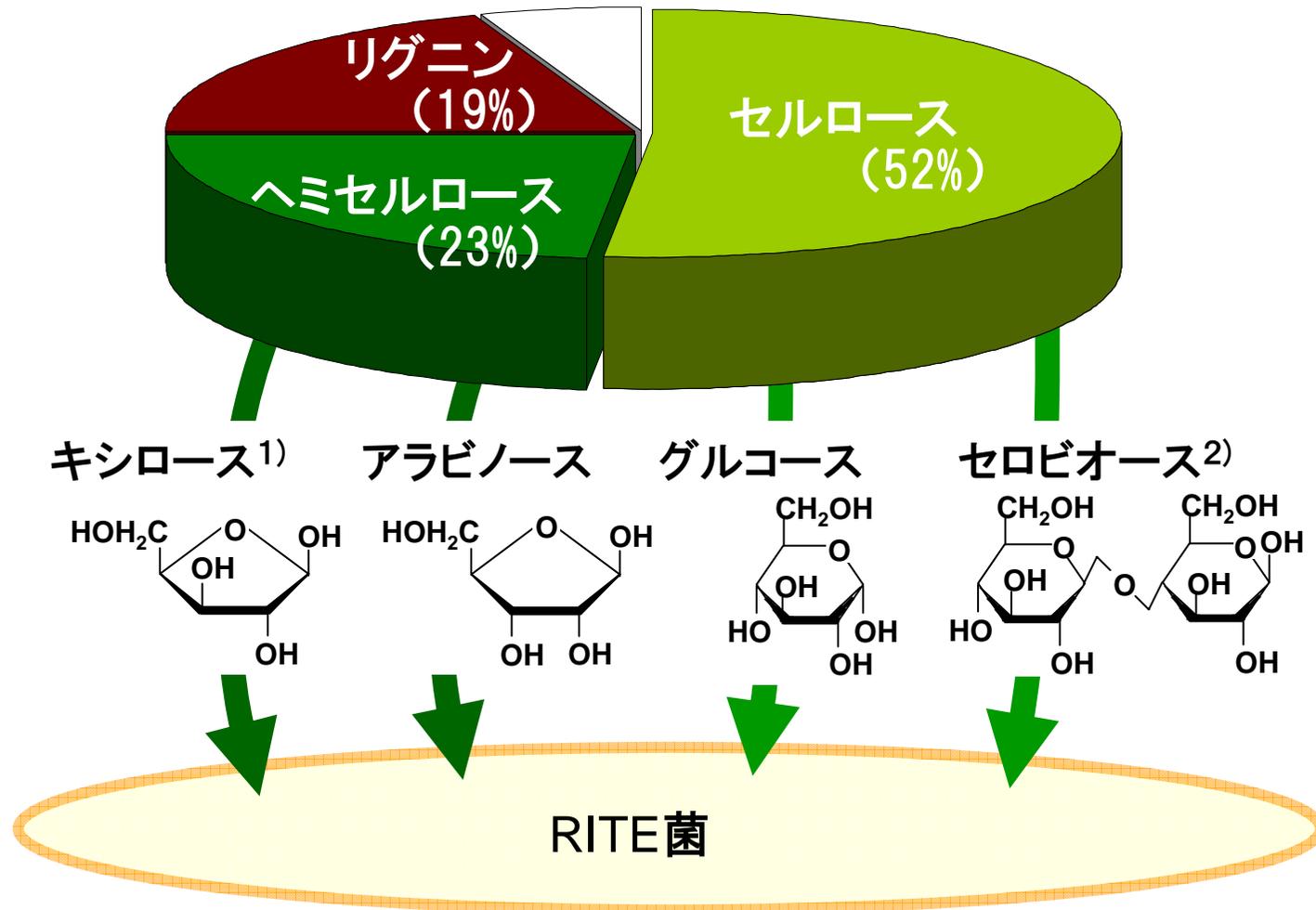
セルロース原料法

RITEバイオプロセス特性

- 高速生産性
- 混合糖類(C6、C5糖)の同時利用能の付与
- “醗酵阻害物質”への高度耐性

混合糖利用能の付与

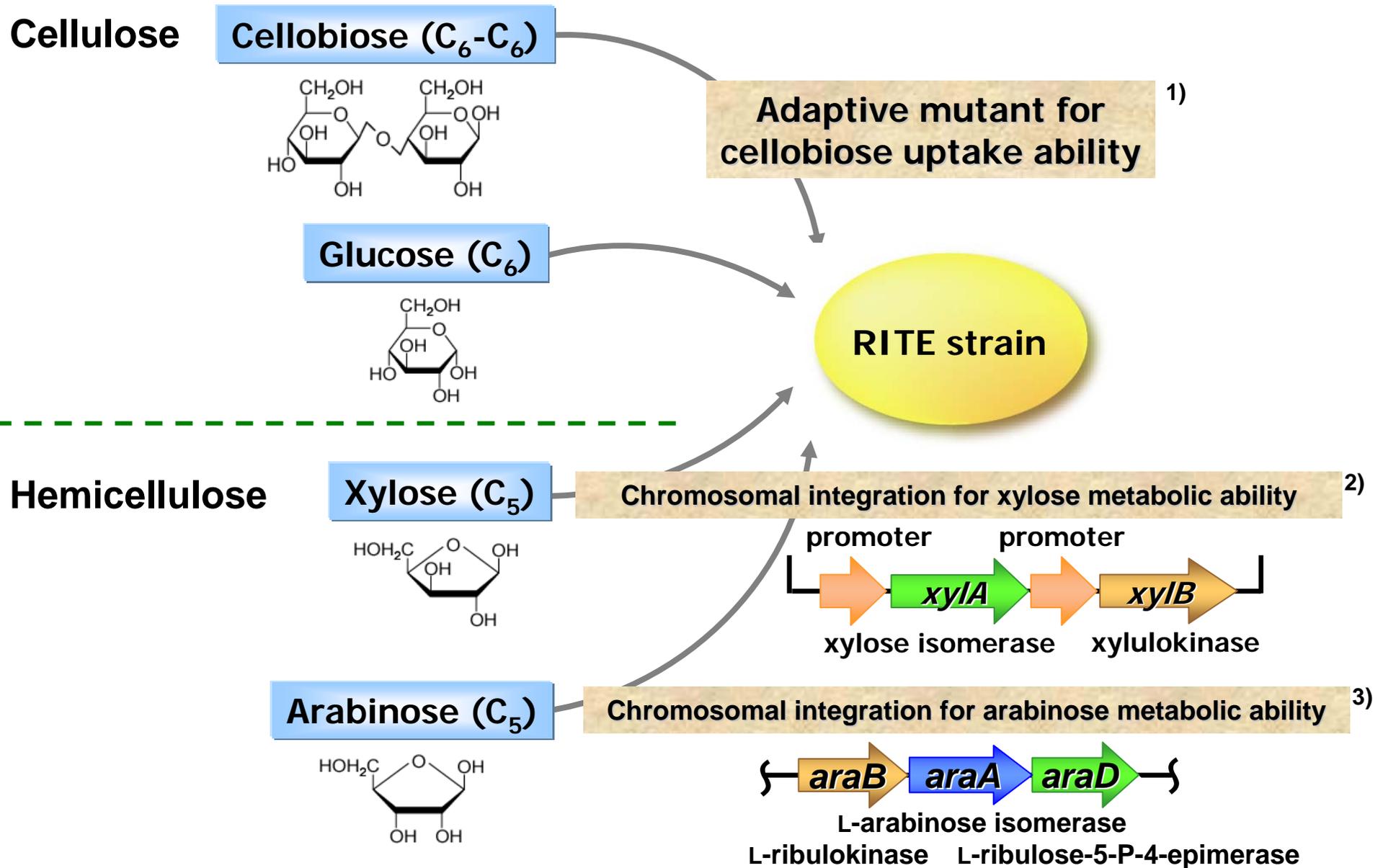
ソフトバイオマス: Switch grass



1) Appl. Environ. Microbiol. 72:3418-3428. 2006

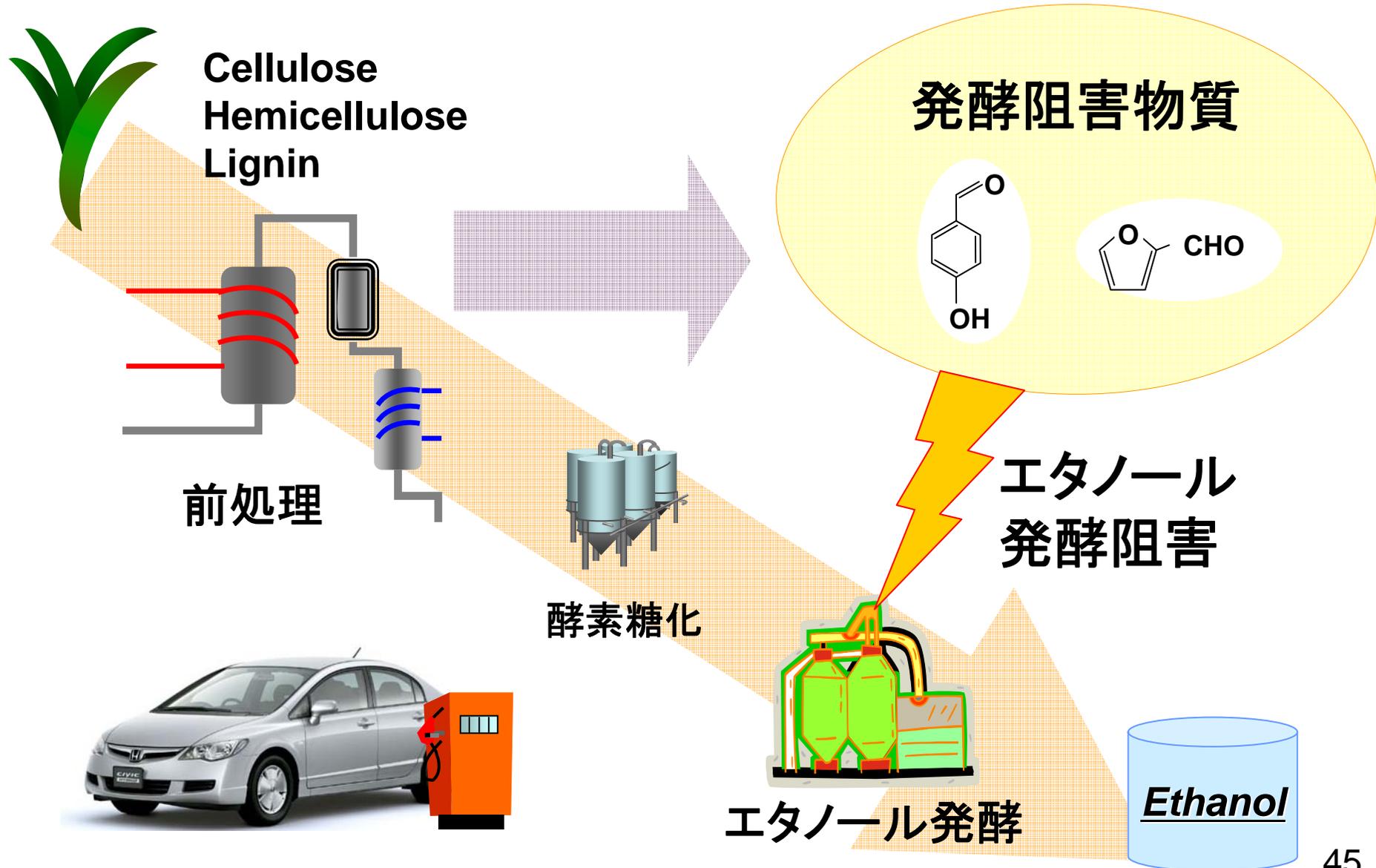
2) Microbiology 149:1569-1580. 2003

Introducing ability to utilize sugars derived from biomass

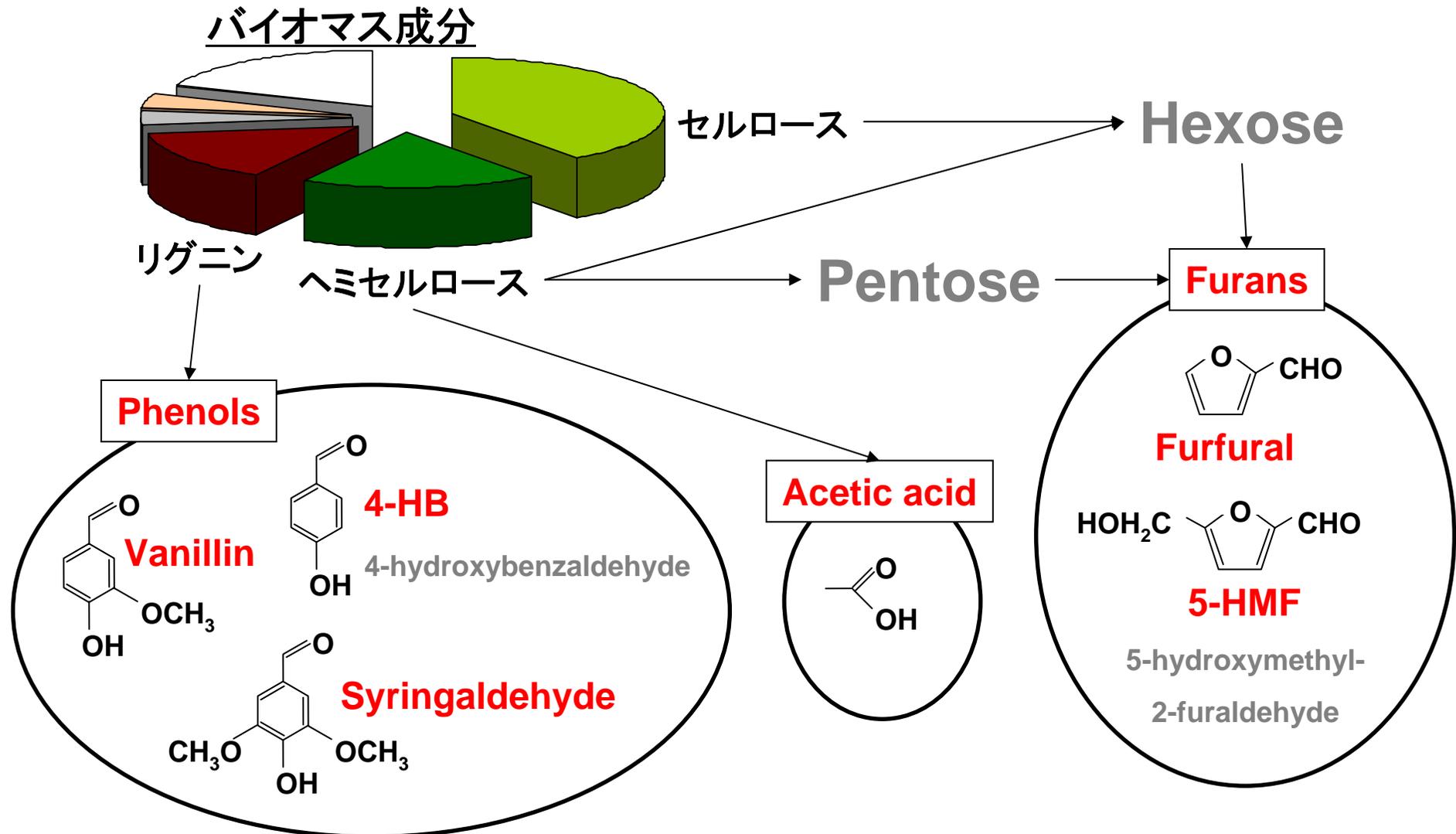


1) *Microbiology* **149**:1569-80. 2003. 2) *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3418-28. 2006. 3) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**:1053-62. 2008.

発酵阻害物質とは？



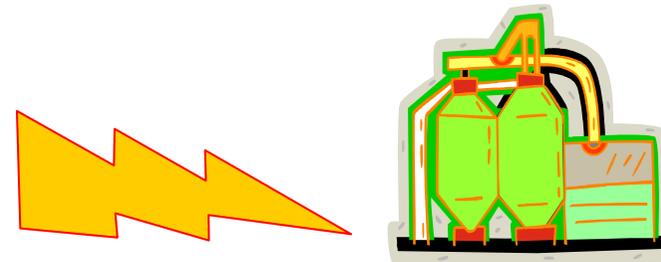
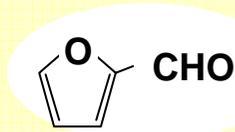
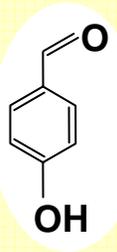
主な阻害物質



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

“発酵阻害物質”の阻害機構？

発酵阻害物質



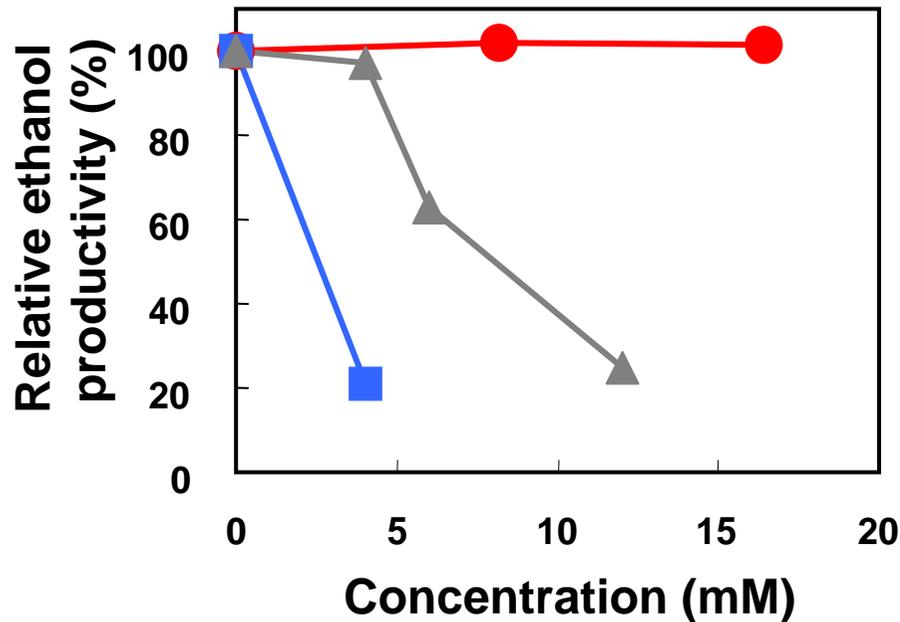
エタノール発酵

- 増殖阻害？
- エタノール生成阻害？

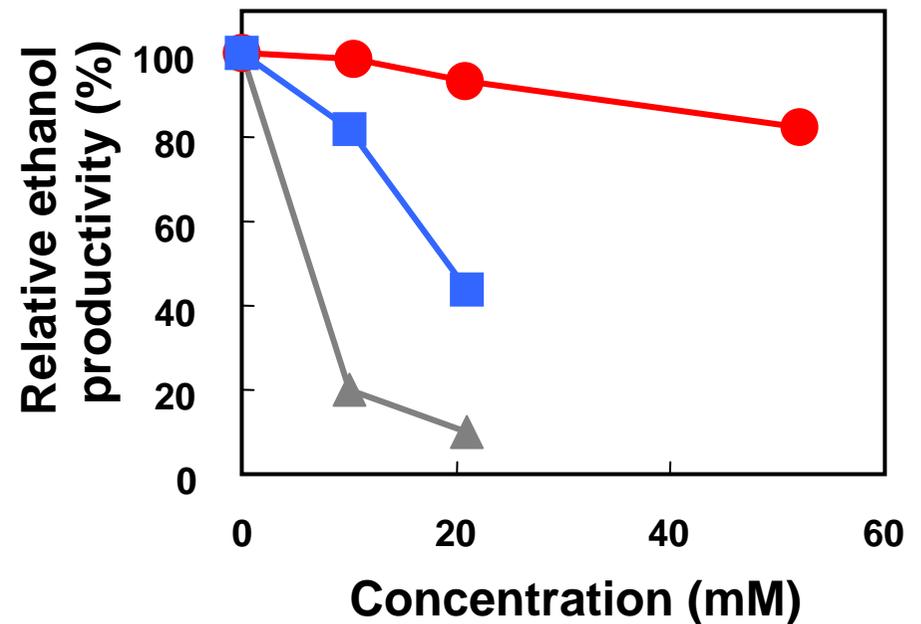
阻害物質の影響

● RITE Bio-Process ■ ザイモモナス菌※ ▲ アルコール酵母※

4-HB



フルフラール



Appl. Environ. Microbiol.
(2007) 73:2349-2353

ホンダとの共同開発

RITEバイオプロセスの応用の一環として
“バイオエタノール製造”の早期工業化を図る

Next Generation of Biofuel?

セルロース原料バイオ燃料
研究開発ターゲット

米国： バイオブタノール

EU： バイオエタノール

次世代バイオ燃料：バイオブタノール

■ 激しいR&D競争：“工業的微生物”による製法開発
デュポン、BP等大手企業、ベンチャー

■ BP+デュポン：クロストリジウム法（ABE醗酵法）
2007年末より生産開始表明

「アセトン・ブタノール・エタノール醗酵法」
（クロストリジウム菌）

20世紀初め：生産開始
両大戦時に航空燃料として生産
生産性低く、経済性なし

“燃料”としてのバイオブタノール

- 軽油との混合可
- エネルギー密度： 高
- 水への溶解度： 極めて小

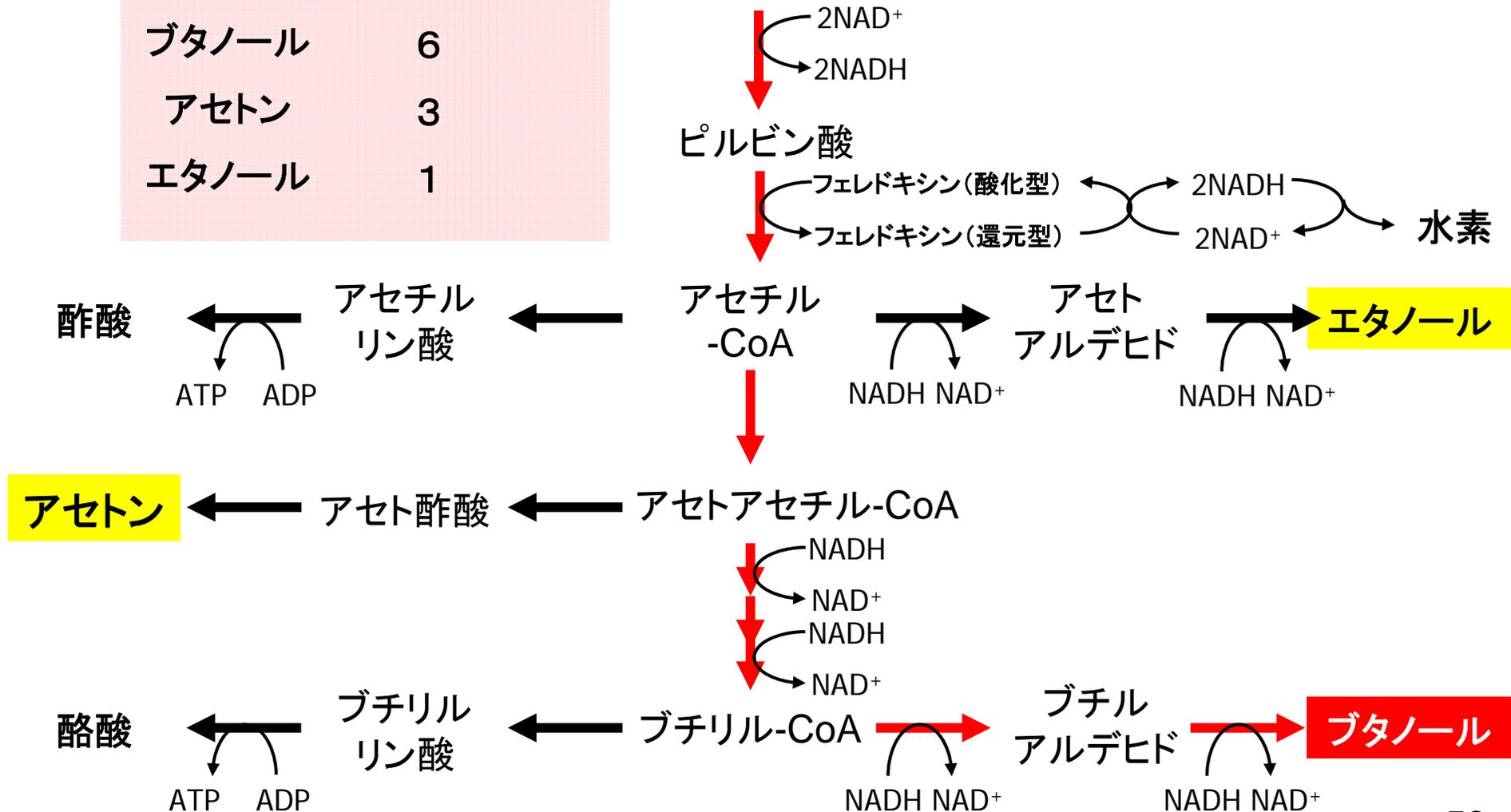
期待効果

- ジーゼルエンジン用燃料
- 航空機燃料
- エタノール – ブタノール： 補完的使用

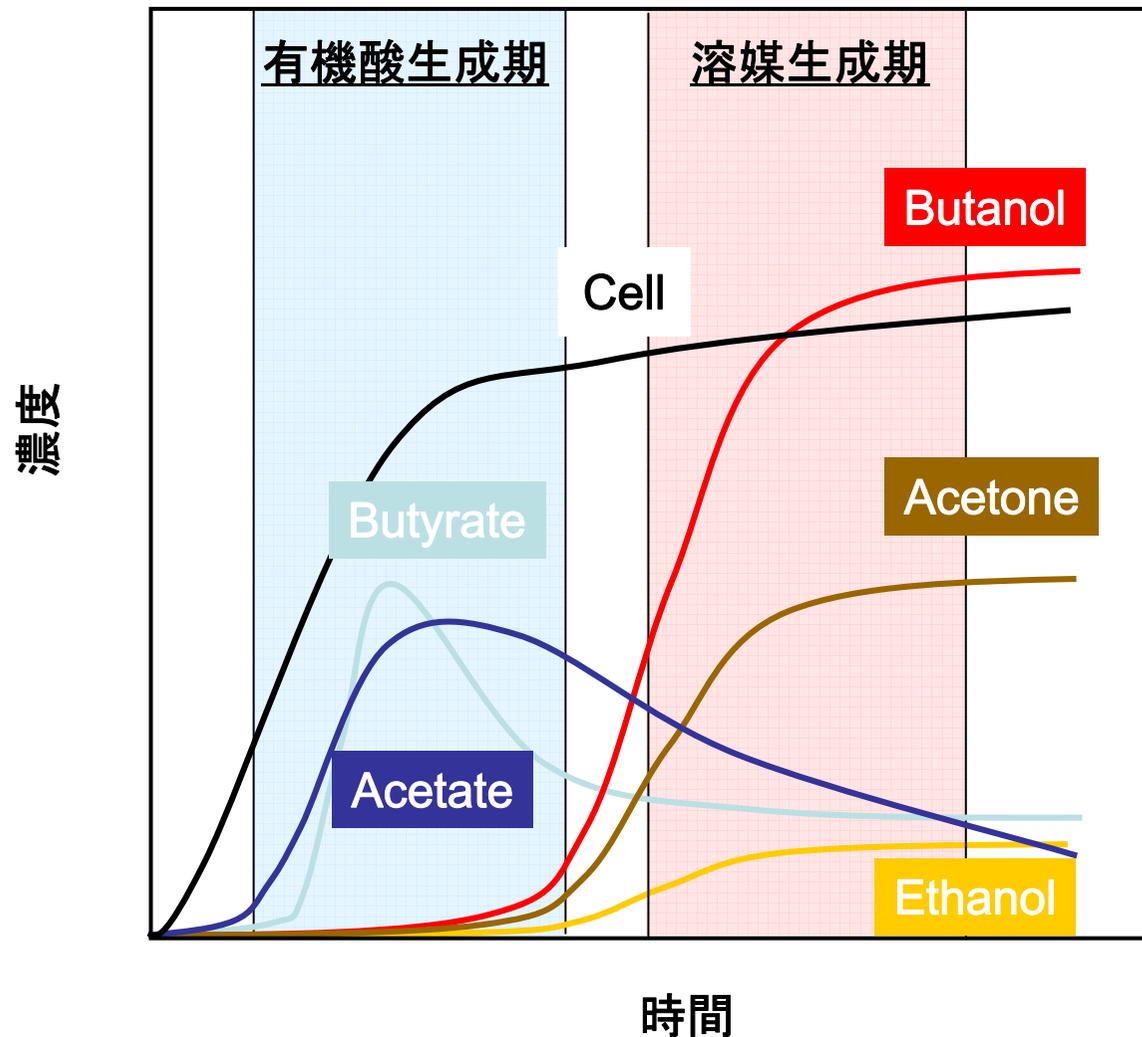
Clostridium属細菌のABE発酵経路

生成割合(モル収率)	
ブタノール	6
アセトン	3
エタノール	1

混合糖



ABE発酵における酸生成期と溶媒生成期



バイオブタノールR&D動向

- ABE発酵の改良
- 新規生産微生物創製
システムバイオロジー

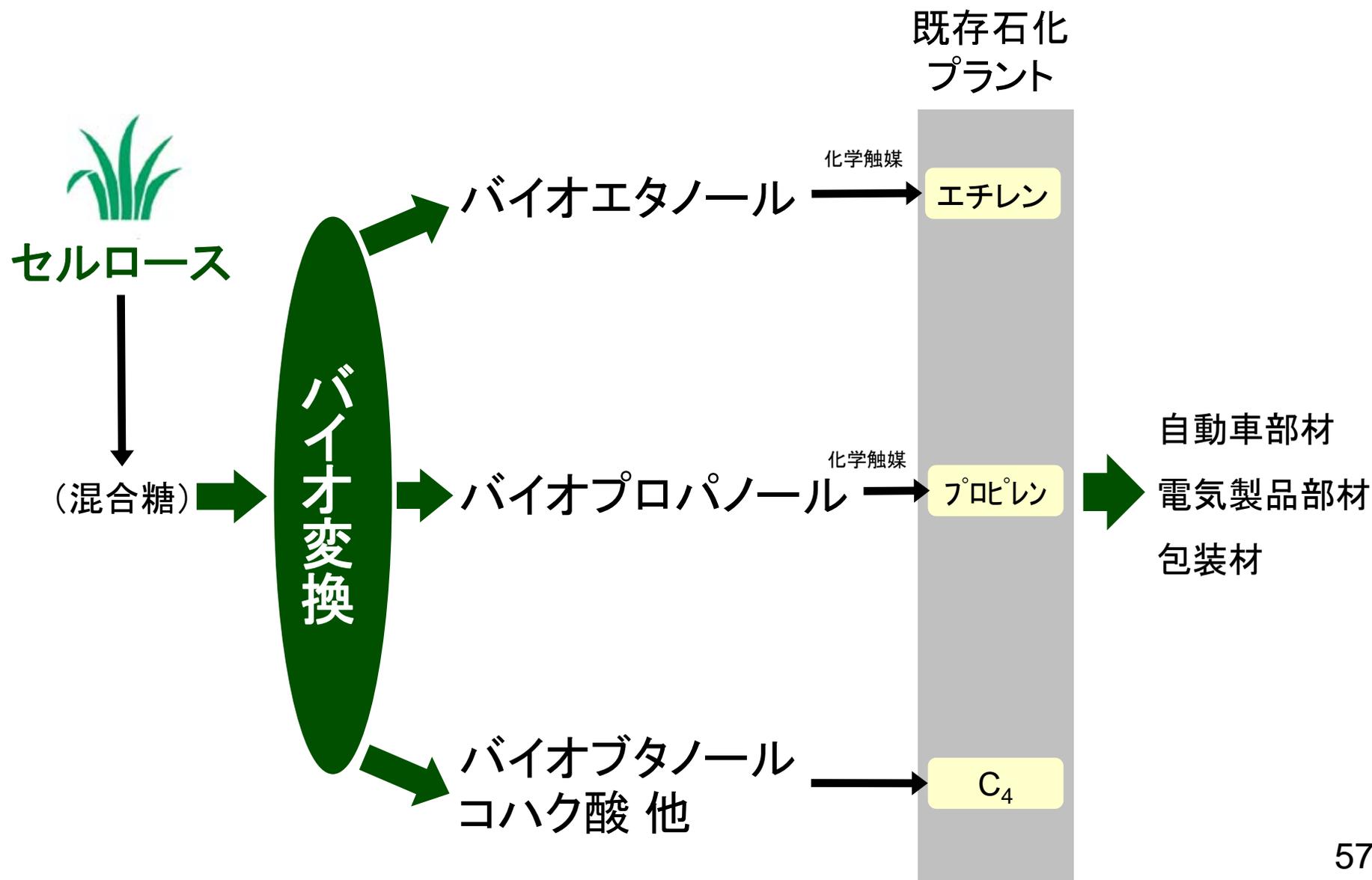
今後の予測

工業化時期： 5年以内

工業化には2つのベクトル

- “New chemicals”: $C_3 \sim C_6$ 化合物中心
乳酸、コハク酸、プロパンジオール、イタコン酸・・・
既存石油化学プロセスでは、経済的生産困難
- 新しい“流れ”登場

グリーン化学工業



まとめ

■ バイオ燃料の大規模実用化



温暖化対策の“切札”
(国内立地は、別の視点要)

■ 我が国独自技術としての展開
バイオエタノール
バイオブタノール

■ グリーン化学工業
自動車、家電業界等の要望に応えるべく
早期実用化

RITE bioprocess

Host vector system

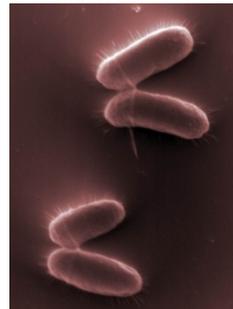
- *Agric. Biol. Chem.* **54**:443-447. 1990.
- *J. Industrial. Microbiol.* **5**:159-165. 1990.
- *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:759-764. 1991.
- *Res. Microbiol.* **144**:181-185. 1993.
- *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**:2036-2038. 1993.

Gene transformation methods

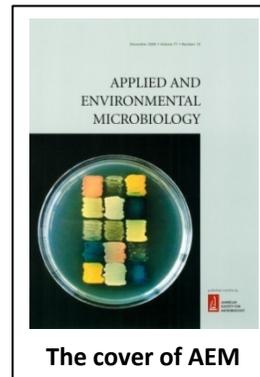
- *Mol. Microbiol.* **11**:739-746. 1994.
- *Mol. Gen. Genet.* **245**:397-405. 1994.
- *Biotech. Lett.* **17**:1143-1148. 1995.

Physiology of corynebacteria

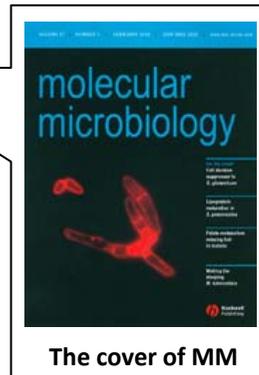
- *DNA seq.* **11**:383-394. 2000.
- *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**:1307-1313. 2001.
- *J. Biosci. Bioeng.* **92**:502-517. 2001.(Review)
- *Mol. Gen. Genomics.* **271**:729-741. 2004.
- *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **8**:91-103. 2004.
- *Microbiology* **153**:1042-1058. 2007.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**:889-897. 2007.
- *Microbiology* **153**:2190-2202. 2007.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**:1347-1356. 2007.
- *Microbiology* **154**:264-274. 2008.
- *Mol. Microbiol.* **67**:597-608. 2008.
- *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **15**:264-276. 2008.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**:309-318. 2008.
- *J. Bacteriol.* **190**:3264-3273. 2008.
- *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5290-5296. 2008.
- *Microbiology* **154**:3073-3083. 2008.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press)



C. glutamicum R



The cover of AEM



The cover of MM

RITE bioprocess

- *Microbiology* **149**:1569-1580. 2003.
- *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**:182-196. 2004.
- *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **8**:243-254. 2004.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:475-480. 2005.
- *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3418-3428. 2006.
- *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2349-2353. 2007.
- *Microbiology* **153**:2491-2504. 2007.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**:853-860. 2007.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**:1053-1062. 2008.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**:449-454. 2008.
- *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5146-5152. 2008.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press)
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press)
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press)

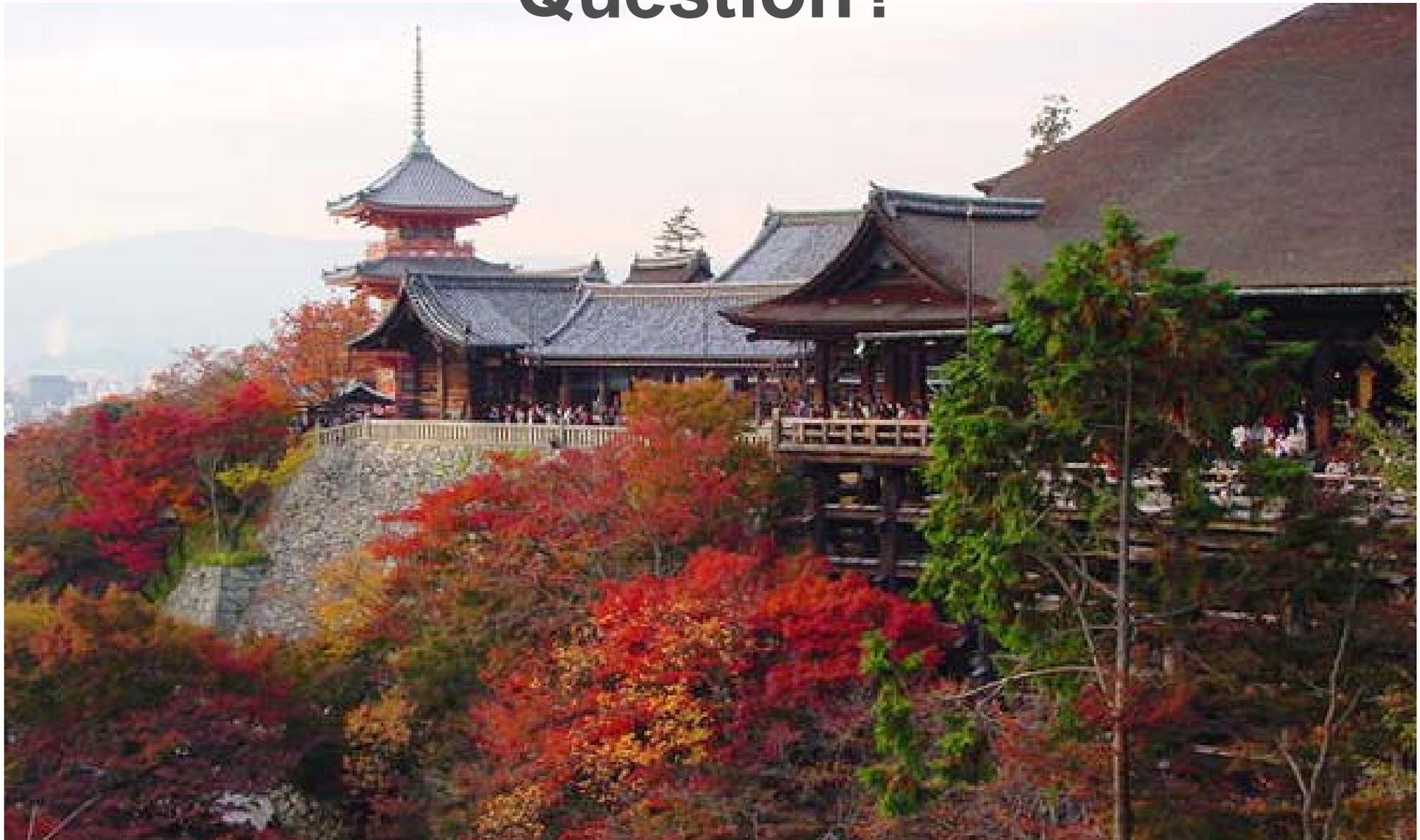
Chromosome engineering methods

- *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:407-416. 2005.
- *Microbiology* **151**:501-508. 2005.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**:225-233. 2005.
- *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3369-3372. 2005.
- *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **8**:243-254. 2005.
- *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7633-7642. 2005.(Review)
- *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8472-8480. 2005.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**:151-161. 2005.
- *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3750-3755. 2006.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:1333-1341. 2007.
- *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**:1683-1690. 2007.
- *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**:519-526. 2008.(Mini-Review)

Gene expression system

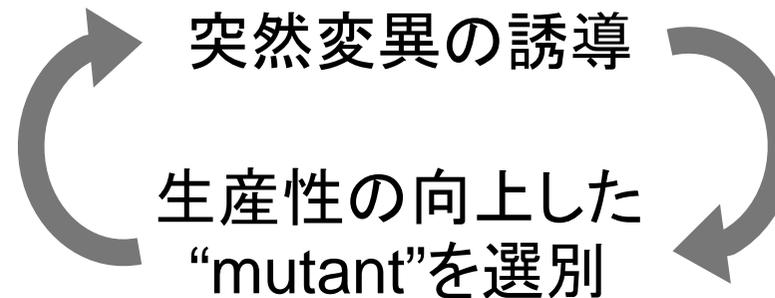
- *FEMS Microbiol. Lett.* **131**:121-126. 1995.

Thank you for your attention
Question?



＜システムバイオロジー＞ “微生物改良法”の革新

旧来：



ポストゲノム
(システム
バイオロジー)

代謝調節機構の“完全”解析



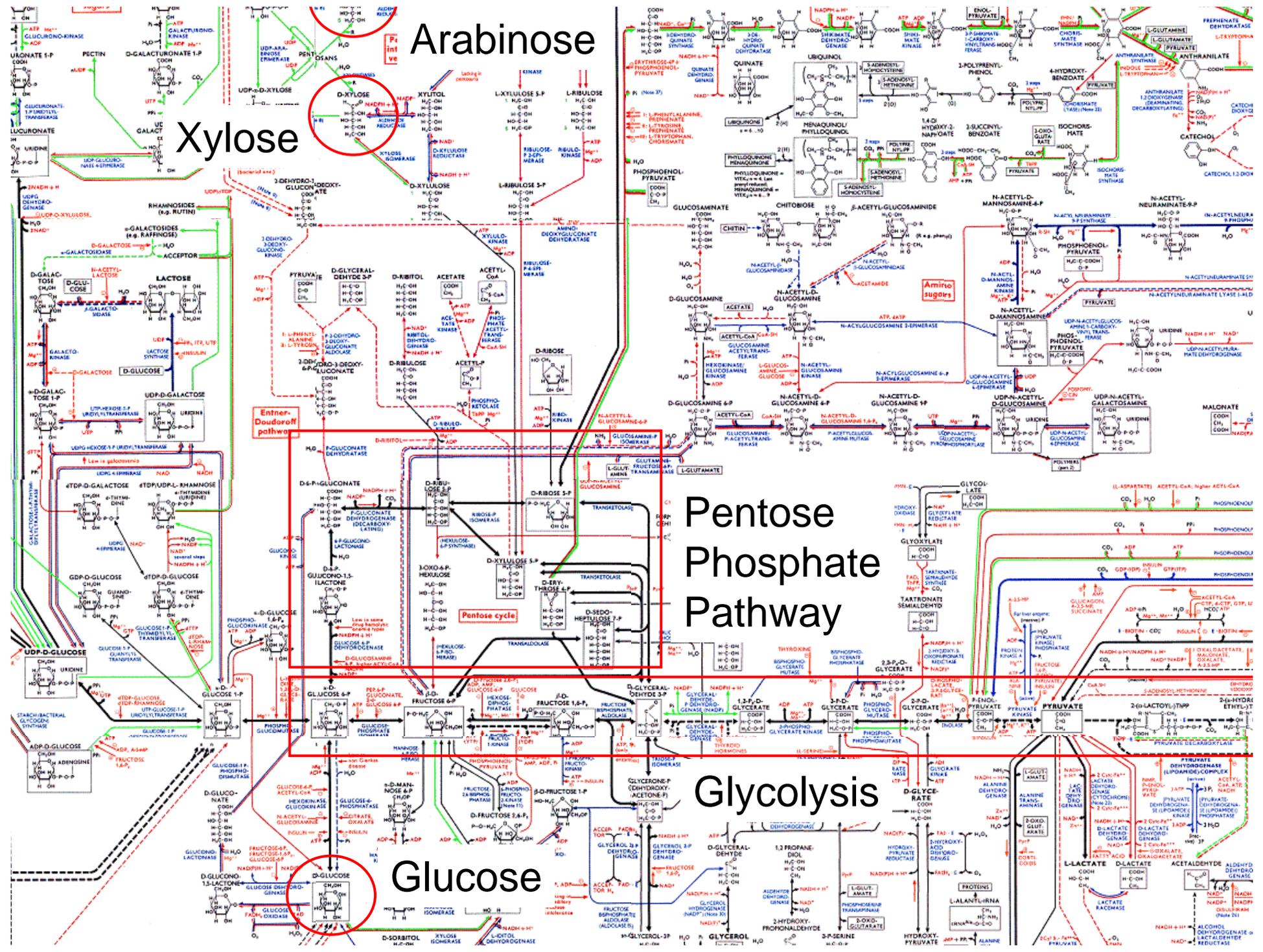
メタボリック解析

高生産性の新微生物創製

目的物質の生合成機能強化

副生物抑制

他の(微)生物からの機能付与



Arabinose

Xylose

Pentose Phosphate Pathway

Glycolysis

Glucose

Entner-Doudoroff pathway

Pentose cycle

Amino sugars

