

戦略的国際共同研究プログラム(SICORP)  
日本・タイ、インドネシア、ラオス共同研究  
終了報告書 概要

1. 研究課題名：「サトウキビ収穫廃棄物の統合バイオリファイナリー」
2. 研究期間：平成31年4月～令和5年3月
3. 主な参加研究者名：  
日本側チーム

|               | 氏名    | 役職  | 所属              | 研究分担               |
|---------------|-------|-----|-----------------|--------------------|
| 研究代表者         | 渡辺 隆司 | 教授  | 京都大学生存圏研究所      | WP1, WP2, WP3, WP4 |
| 主たる共同研究者      | 大垣 英明 | 教授  | 京都大学エネルギー理工学研究所 | WP5                |
| 主たる共同研究者      | 片平 正人 | 教授  | 京都大学エネルギー理工学研究所 | WP1, WP2, WP3      |
| 研究参加者         | 永田 崇  | 准教授 | 京都大学エネルギー理工学研究所 | WP1, WP2, WP3      |
| 研究参加者         | 小瀧 努  | 准教授 | 京都大学エネルギー理工学研究所 | WP2, WP3           |
| 研究参加者         | 西村 裕志 | 助教  | 京都大学生存圏研究所      | WP1, WP4           |
| 研究期間中の全参加研究者数 |       |     | 11名             |                    |

相手側 (タイ・インドネシア・ラオス) チーム

|               | 氏名                    | 役職                                      | 所属   | 研究分担          |
|---------------|-----------------------|---|--|---------------|
| 研究代表者         | Verawat Champreda     | Research Unit Director                  | National Science and Technology Development Agency (NSTDA) | WP1, WP2      |
| 主たる共同研究者      | Euis Hermiati         | Researcher                              | National Research and Innovation Agency (BRIN)             | WP3, WP4, WP5 |
| 主たる共同研究者      | Keonakhone Khounvilay | Head of Chemical Engineering Department | Faculty of Engineering, National University of Laos        | WP2           |
| 研究参加者         | Widya Fatriasari      | Researcher Professor                    | National Research and Innovation Agency (BRIN)             | WP4           |
| 研究期間中の全参加研究者数 |                       |   | 41名  |               |

4. 国際共同研究の概要

本研究は、サトウキビ収穫廃棄物を原料としてバイオ燃料や有用化学品をつくることにより、既存の製糖産業やエタノール工場をバイオリファイナリー工場に再構築し、持続発展可能な地域社会の創成に貢献することを目的とする。このため、サトウキビ収穫廃棄物からの糖生産に最適化した前処理法や高活性多糖分解酵素の研究、合成生物学を用いた酵母のセルフファクトリー構築とバイオエタノールやイソブタノールの生産研究を行った。また、リグニンからの界面活性剤の合成、キシランからのキシリトールの生産研究、開発プロセスの社会 LCA 解析を日本、タイ、インドネシア、ラオス 4ヶ国の国際連携のもとに実施した。

## 5. 国際共同研究の成果

### 5-1 国際共同研究の学術成果および実施内容

本事業により、サトウキビ収穫廃棄物の成分解析、前処理・酵素糖化システム、バイオ燃料やイソブタノール、キシリトールへの変換微生物の育種と発酵システムの開発、リグニン由来サーファクタントの合成、社会 LCA 解析を行った。

タイの NSTDA、BIOTEC の Verawat Champreda 氏と京都大学は、研究者の受け入れ、留学生の受け入れを通して、酵素糖化の鍵酵素である溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO) の研究や酵母の育種研究、マイクロ波による酵素糖化前処理発酵の共同研究を行った。サトウキビ収穫廃棄物の前処理・糖化発酵研究では、タイ政府からのグラントで6ヶ月京大生生存圏研究所に留学した Chotirotsukon C. 氏の筆頭著者の共著論文を、*Industrial Crops and Products* (IF 6.449) や *BioEnergy Res.* (IF 3.852) に論文発表した。この他、国際共著論文として、*Applied Microbiology and Biotechnology* (IF 5.560)、*Biomass Conversion and Biorefinery* (IF 4.050)、*BioEnergy Research* (IF 3.852) を発表した他、Al-Azhar 大学准教授であり京都大学で研究をしている Sadat M. R. Khattab 氏が京都大学でゲノム編集により作出したグリセロールとグルコースの混合液からエタノールを高効率でエタノールに変換する論文を、米国微生物学会発行の *Applied and Environmental Microbiology* (IF 5.005) で発表し、この論文が、同誌の *Spotlight Article (Articles of Significant Interest Selected from This Issue by the Editors)* に選抜された。さらに、タイとの MTA のもとに輸送したタイ産のサトウキビ収穫廃棄物を、グリセロールを溶媒として用いたマイクロ波ソルボリシスにより前処理し、前処理物を、この組換え酵母でエタノールに変換した。この成果を、*Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* (IF 7.670) に発表した。この研究に関連し、Al-Azhar 大学から、Mohamed Ali 氏がエジプト政府の経費で京都大学に留学した。これにより、グリセロールからのエタノール生産微生物の遺伝子組換え研究の発展研究として、グリセロールから 2,3-butanediol を生産する酵母の育種研究を実施した。このように、本研究は、ASEAN や日本に留まらず、北アフリカ地域との国際共同研究に展開した。モンクット王工科大学トンブリ校の大学院生で NSTDA BIOTECH で研究をしている Chotirotsukon C. 氏は、京都大学にタイ政府のグラントで留学して共同研究を行い、*Industrial Crops and Products* (IF 6.449) に論文を発表した。この論文は、グリセロールからエタノールを生産する Sadat M. R. Khattab 氏らが開発した組換え酵母を用いており、タイ、日本、エジプト間の多国間国際共同研究となった。

酵素糖化に関しては、糖化の鍵酵素である溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO) をメタゲノムにより取得し、その酵素学特性を京都大学と共同で解析し、論文を *Applied Microbiology and Biotechnology* に国際共著論文として発表した。京都大学では、白色腐朽菌から LPMO を取得し、その結晶構造や糖化促進作用を明らかにした。BIOTECH では、グルコースとキシロースからイソブタノールを生産するため、キシロース代謝系酵素遺伝子と、アミノ酸合成経路及び2-ケト酸分解経路の酵素遺伝子を酵母 *Pichia pastoris* に組み込みイソブタノールを生産した。開発した組換え酵母は、サトウキビ収穫廃棄物の糖化物を原料とし、イソブタノールを 48.2 g/L の濃度で生産した。この酵母は、キシロース代謝系をもたない PPY0300 より、イソブタノールの生産性が 34% 高かった。これに加えて、BIOTEC では、サトウキビ収穫廃棄物からの乳酸発酵の研究も行い、乳酸を 1.0 g/g グルコースの濃度で生産した。高選択的に D-乳酸を生産する *Leuconostoc lactis* も見出し、0.79 g/g 糖の濃度で D-乳酸を生産した。キシリトールの生産は、LIPI と BIOTEC が連携して研究を行い、高生産株の選抜、キシロースデヒドロゲナーゼ遺伝子の導入、培養条件の最適化により、実用濃度でキシリトールを生産した。LIPI では、京都大学と連携し、サトウキビ収穫廃棄物から分離したリグニンからサーファクタントを合成した。社会 LCA 解析では、タイでの調査を中心として、開発したプロセスの環境、経済、地域社会に与える影響を評価した。

以上のように、サトウキビ収穫廃棄物を対象として、前処理、糖化酵素、バイオエタノール、イソブタノール、キシリトール、乳酸発酵菌の育種と、これらの有用物質の高効率生産に成功した。

## 5-2 国際共同研究による相乗効果

タイの NSTDA、BIOTEC とは、留学生（大学院生）を含む人材交流を行い、バイオマスからの前処理・酵素糖化・発酵プロセスによるバイオ燃料や化学品製造の成果を分野トップクラスの国際誌に発表し、若手人材の育成にも大きく貢献した。また、タイやインドネシアの大手製糖企業との産学連携の国際ネットワークを新たに構築した。

サトウキビ収穫廃棄物に対して有効な前処理法、鍵酵素である溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (LPMO) の特性解析、サトウキビ収穫廃棄物からのキシリトール生産、イソブタノール発酵菌、エタノール発酵菌、乳酸発酵菌の分子育種を行い、国際誌に共著論文を出版した。社会 LCA 解析では、タイ、インドネシア、ラオスの研究者との研究ネットワークを構築した。このように、コロナ禍の影響を受けつつも、多国間連携ネットワークを、様々な分野で強化・構築した。

## 5-3 国際共同研究成果の波及効果と今後の展望

本 e-ASIA プロジェクトにより、タイ、インドネシア、ラオス、日本間の研究連携が強固になるとともに、ASEAN 地域とエジプトの研究者との連携も新たにできて、バイオマス変換研究の国際ネットワークが拡大した。タイの大学院生を留学生として受け入れた他、研究員の受け入れによる共同研究を通して、若手人材の育成にも効果があった。今後、本研究に参画した若手研究員が、中心的な研究者となり活発な国際共同研究を行うことが期待される。

Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)  
Japan – Thailand, Indonesia, Laos Joint Research Program  
Executive Summary of Final Report

1. Project title : 「Integrated biorefinery of sugarcane trash」
2. Research period : April 2019 ~ March 2023
3. Main participants :  
Japan-side

|  | Name              | Title               | Affiliation   | Role in the research project |
|--|-------------------|---------------------|---|------------------------------|
| PI   | Takashi Watanabe  | Professor           | Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University | WP1, WP2, WP3, WP4           |
| Co-PI  | Hideaki Ohgaki    | Professor           | Institute of Advanced Energy, Kyoto University                    | WP5                          |
| Co-PI  | Masato Katahira   | Professor           | Institute of Advanced Energy, Kyoto University                    | WP1, WP2, WP3                |
| Collaborator   | Takashi Nagata    | Associate Professor | Institute of Advanced Energy, Kyoto University                    | WP1, WP2, WP3                |
| Collaborator   | Tsutomu Kodaki    | Associate Professor | Institute of Advanced Energy, Kyoto University                    | WP2, WP3                     |
| Collaborator   | Hiroshi Nishimura | Assistant Professor | Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University | WP1, WP4                     |
| Total number of participants throughout the research period: |                   |                     |   | 11                           |

Partner (Thailand,Indonesia,Laos) -side

|  | Name                  | Title                                   | Affiliation   | Role in the research project |
|--|-----------------------|---|---|------------------------------|
| PI   | Verawat Champreda     | Research Unit Director                  | National Science and Technology Development Agency  | WP1, WP2                     |
| Co-PI  | Euis Hermiati         | Researcher                              | National Research and Innovation Agency (BRIN)      | WP3, WP4, WP5                |
| Co-PI  | Keonakhone Khounvilay | Head of Chemical Engineering Department | Faculty of Engineering, National University of Laos | WP2                          |
| Collaborator   | Widya Fatriasari      | Researcher Professor                    | National Research and Innovation Agency (BRIN)      | WP4                          |
| Total number of participants throughout the research period: |                       |   |   | 41                           |

#### 4. Summary of the international joint research

This study aims at contributing to sustainable development of local communities by reconstructing existing sugar refinery industries into biorefinery plants by producing useful chemicals and biofuels from sugarcane trash. To this end, precise structural analysis of sugarcane waste, pretreatment, and conversion methods to useful substances were studied by international collaboration of four countries, Japan, Thailand, Indonesia and Laos. Social LCA analysis of the entire process was also conducted. The research includes pretreatment methods, highly active polysaccharide-degrading enzymes optimized for sugar production from the sugarcane trash, and yeast cell factory producing bioethanol and isobutanol using synthetic biology. In addition, research on the synthesis of surfactants from lignin and production of xylitol from xylan in sugarcane trash was conducted under the international collaboration. In addition, social LCA analysis of the development process was carried out in these ASEAN countries through field surveys including interviews.

Through joint research by the four country teams, it is expected that highly economical biomass component separation technology, highly functional cell factories, and highly efficient conversion processes to fuels and chemicals have been established.

#### 5. Outcomes of the international joint research

##### 5-1 Scientific outputs and implemented activities of the joint research

In this study, precise structural analysis of sugarcane trash, pretreatments, and conversion methods to useful chemicals and biofuels such as bioethanol, isobutanol, xylitol, lactic acid and lignin-derived surfactants were conducted by international collaboration of four countries, Japan, Thailand, Indonesia and Laos. Social LCA analysis of the entire process was also conducted. As a result of the international collaboration, we published the scientific achievements in top-class international journals in the field. It should be noted that bioethanol, isobutanol, lactic acid and xylitol were produced in a high efficiency and conversion yields from the sugarcane trash. We also elucidated structure and functions of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMO) which are the key enzyme in hydrolysis of cellulosic biomass. Through scientist exchange and invitation of international students to Kyoto University, we made a significant contribution to the development of young human resources. We also strengthen the network with big sugar companies in Thailand and Indonesia, Mit Phor and PTPN X. In addition, social LCA analysis of the developed process in Thailand was carried out, giving the basis for the assessment of industrial implementation in these ASEAN countries.

##### 5-2 Synergistic effects of the joint research

With NSTDA in Thailand, we exchanged human resources, including international students (graduate students), and published the results of biofuels and chemicals production from sugarcane trash through pretreatments, enzymatic saccharification, and fermentation processes in top-class international journals in the field, making a significant contribution to the development of young human resources. Information was exchanged with a Thai sugar company, Mit phor by inviting the staff in an e-Asia workshop held in Thailand, sharing the significance and content of this project. An agreement was made between NSTDA and the company through the activity. Similarly, information was exchanged with PTPN X, a major Indonesian sugar company, through LIPI in Indonesia, and a staff of PTPN X participated in the e-Asia workshop held in Thailand. The collaboration with PTPN X led to an MOU between BRIN and PTPN X. Thus, an international network of industry-academia collaboration was newly established.

Kyoto University, BIOTEC, LIPI, and National University of Laos studied the optimization of processing conditions for effective pretreatment methods for sugarcane trash and found efficient pretreatment methods. In enzymatic saccharification, research on LPMO was conducted in Kyoto University and BIOTEC in Thailand and the research papers were published in highly reputable journals in the field.

Xylitol production from sugarcane harvesting waste was studied by LIPI of Indonesia, and BIOTEC of Thailand. Researchers from LIPI in Indonesia were sent to BIOTEC in Thailand to conduct substantial international collaborative experiments and found high xylitol producing strains and optimized culture conditions.

The production of surfactants from lignin was conducted by LIPI Indonesia in collaboration with Kyoto University. In addition, BIOTEC and Kyoto University established the basis for molecular breeding of isobutanol- and ethanol-fermenting microorganisms. Joint research was also conducted with researchers from Al-Azhar University in Egypt.

In social LCA analysis, we established a research network with researchers in Thailand, Indonesia, and Laos. Thus, we build multilateral collaborative networks in various fields, despite the impact of the COVID-19 pandemic.

### 5-3 Scientific, industrial or societal impacts/effects of the outputs

There are a limited number of scientific reports on the production of chemicals and biofuels by enzymatic and microbial conversion of sugarcane trash. This study sheds light on the utilization of sugarcane trash as an unutilized biomass resource by integrating advanced scientific and technological approaches such as microwave solvolysis, protein engineering of polysaccharide degrading enzymes, cell factory developed through genome editing and metabolic engineering and social LCA analysis. In Southeast Asia, sugarcane trash has been burned on arable lands, causing smoke pollution. This research will change the value of sugarcane trash from the unutilized wastes to renewable resources producing the high value-added products, thereby contributing to the SDGs such as No. 7, 9, 1, 2, and 3.

Students who studied at Kyoto University through this research are still enrolled after the completion of this project, and we expect them to become young leaders in the field of biorefinery. Through this project, LIPI (BRIN) in Indonesia contracted an MOU with PTPN X, the largest sugar company in Indonesia. Discussion on the utilization of sugarcane trash has also been made with the largest sugar company in Thailand. The industry-government-academia collaborations established in his research will continue to implement the process in the ASEAN region.

## 国際共同研究における主要な研究成果リスト

## 1. 論文発表等

\*原著論文 (相手側研究チームとの共著論文) 発表件数 : 7 件

・査読有り : 発表件数 : 計 7 件

1. E. Hermiati, R.P.B. Laksana, W. Fatriasari, L.N. Kholida, A. Thontowi, Yopi, D.R. Arniyanto, V. Champreda, and T. Watanabe, "Microwave-assisted acid pretreatment for enhancing enzymatic saccharification of sugarcane trash." *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2020, 12, 3037–3054 DOI: 10.1007/s13399-020-00971-z
2. C. Chotirotsukon, M. Raita, M. Yamada, H. Nishimura, T. Watanabe, N. Laosiripojana, and V. Champreda, "Sequential fractionation of sugarcane bagasse using liquid hot water and formic acid-catalyzed glycerol-based organosolv with solvent recycling." *BioEnergy Research*, 2020, 14, 135–152 DOI: 10.1007/s12155-020-10181-0
3. B. Bunternngsook, W. Mhuanong, P. Kanokratana, Y. Iseki, T. Watanabe, and V. Champreda, "Identification and characterization of a novel AA9-type lytic polysaccharide monooxygenase from a bagasse metagenome." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105, 197-210 DOI: 10.1007/s00253-020-11002-2
4. C. Chotirotsukon, M. Raita, M. Yamada, H. Nishimura, T. Watanabe, N. Laosiripojana, and V. Champreda, "Sequential fractionation of sugarcane bagasse using liquid hot water and formic acid catalyzed glycerol-based organosolv with solvent recycling." *BioEnergy Research*, 2021, 14, 135-152 DOI: 10.1007/s12155-020-10181-0
5. B. Bunternngsook, W. Mhuanong, P. Kanokrattana, Y. Iseki, T. Watanabe, and V. Champreda, "Identification and characterization of a novel AA9-type lytic polysaccharide monooxygenase from a bagasse metagenome." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105, 197-210 DOI: 10.1007/s00253-020-11002-2
6. C. Chotirotsukon, S.M.R. Khattab, N. Kobayashi, N. Laosiripojana., V. Champreda, and T. Watanabe, "Microwave-accelerated glycerolysis of sugarcane trash using Lewis acid  $AlK(SO_4)_2$  as catalyst." *Industrial Crops and Products*, 2022, 190, 115849 DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.115849
7. Oktaviani M, Sari FP, Bunternngsook, Hermiati, Champreda, Watanabe T. 2022. Influence of different pretreatment methods and yeast strains on xylitol production from sugarcane trash hemicellulose hydrolysate. *Proceedings of The International Conference on Radioscince, Equatorial Atmospheric Science and Environment and Humanosphere Science*. 2021. Springer Proceedings in Physics 275

・査読無し : 発表件数 : 計 0 件

該当なし

\*原著論文 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの論文) : 発表件数 : 計 3 件

・査読有り : 発表件数 : 計 3 件

1. S.M.R. Khattab, and T. Watanabe, "Efficient conversion of glycerol to ethanol by an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain." *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(23), e0026821 DOI: 10.1128/AEM.00268-21 (Selected Paper)
2. H. Nguyen, K. Kondo, Y. Yagi., Y. Iseki, N. Okuoka, T. Watanabe, B. Mikami, T. Nagata, and M. Katahira, "Functional and structural characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase, which cooperates synergistically with cellulases, from *Ceriporiopsis subvermispora*." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, 10, 923-934 DOI: 10.1021/acssuschemeng.1c06810
3. S.M.R. Khattab, H. Okano, C. Kimura, T. Fujita, and T. Watanabe, "Efficient integrated production of bioethanol and antiviral glycerolysis lignin from sugarcane trash." *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16, 82 DOI: 10.1186/s13068-023-02333-z

・査読無し：発表件数：計 0 件

該当なし

\*その他の著作物 (相手側研究チームとの共著総説、書籍など)：発表件数：計 0 件

\*その他の著作物 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの総説、書籍など)：発表件数：計 1 件

片平正人、NMR で迫るヒト生細胞中の核酸分子の挙動と木質バイオマスの超微細構造、海洋化学研究、35 巻、1 号、43-49、2022

## 2. 学会発表

\*口頭発表 (相手側研究チームとの連名発表)

発表件数：計 2 件 (うち招待講演：0 件)

\*口頭発表 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表)

発表件数：計 24 件 (うち招待講演：2 件)

\*ポスター発表 (相手側研究チームとの連名発表)

発表件数：計 0 件

\*ポスター発表 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表)

発表件数：計 2 件

## 3. 主催したワークショップ・セミナー・シンポジウム等の開催

1. e-ASIA Kick-off Workshop "Integrated Biorefinery of Sugarcane Trash"、主催者：渡辺隆司 (京都大学・教授)、Windsor Suites Hotel Bangkok、バンコク、タイ、2019 年 10 月 13 日、参加人数 22 名
2. e-Asia WP5 Group Workshop on Integrated Biorefinery of Sugarcane Trash、主催者：大垣英明 (京都大学・教授)、オンライン、2021 年 2 月 10 日、参加人数 8 名
3. e-Asia workshop "Integrated Biorefinery of Sugarcane Trash"、主催者：渡辺隆司 (京都大学・教授)、オンライン、2021 年 2 月 26 日、参加人数 50 名
4. e-Asia WP5 Group workshop "Integrated Biorefinery of Sugarcane Trash"、主催者：大垣英明 (京都大学・教授)、ハイブリッド、2022 年 3 月 8 日、参加人数 10 名
5. e-Asia workshop "Integrated Biorefinery of Sugarcane Trash"、主催者：渡辺隆司 (京都大学・教授)、オンライン、2022 年 3 月 30 日、参加人数 38 名

## 4. 研究交流の実績 (主要な実績)

### 【学生・研究者の派遣、受入】

- ・2020 年 1 月にインドネシアの LIPI から研究員 2 名を京都大学生存圏研究所に 17 日間受け入れ、リグニン系界面活性剤と原料リグニンの構造解析実験を行った。
- ・MEXT 奨学金の e-ASIA 枠で、タイから 1 名博士課程学生として受け入れた。
- ・タイの NSTDA から研究員 1 名が京都大学エネルギー科学研究科博士課程に自費にて入学し、WP5 共同研究を進めた。

## 5. 特許出願

研究期間累積出願件数：5 件



6. 受賞・新聞報道等

なし

7. その他

京都大学の18の附置研究所・センター群の連携組織「研究連携基盤」が統括するプロジェクト「未踏科学研究ユニット」の一つ「持続可能社会創造ユニット」の異分野融合の新領域開拓プログラムに、本 e-ASIA 業の研究者 Sadat Mohamed Rezk Khattab 氏のテーマが採用され、広く研究紹介を行った。Sadat Mohamed Rezk Khattab 氏は、「持続可能社会創造ユニット」の推薦を受けて、京大生圏研究所の特定講師に採用された。2024年度からは、京都大学エネルギー理工学研究所の特定講師に採用されることが、2023年度中に決定した。