最近の食品製造に見る R&D: チーズ製造副産物を原料とした新しいバイオエタノール生産技術

小田有二（帯広畜産大学）

1.はじめに

地球温暖化の原因となる炭酸ガス排出量の削減やエネルギーの安定供給に向けた取り組みとして、世界各国で植物に由来するバイオ燃料の導入が急速に拡大している。わが国でもエタノール混合ガソリンの本格的な普及のために、実証規模によるバイオマスからの燃料用エタノール（バイオエタノール）の生産が各地で開始され、そのうちの大規模な二つの事業が北海道で行われている。使用される原料は、十勝管内清水町の工場が交付金対象外となったテンサイおよび規格外小麦、苫小牧市の工場は余剰米であり、生産能力はそれぞれ 15,000 kL/年である。しかし、2010年に設定された導入目標 50 万 kL の大部分は、輸入によって占められているのが現状である。食料自給率の低い日本においてこれ以上の国内農産物をバイオエタノール原料として供給するのは難しく、将来的には食料と競合しないワラなどの草本系および木質系資源からの生産を主流となるが、この方法には技術的な課題が未だ残されている。一方、植物以外で豊富に存在する資源として挙げられるものとして、チーズ加工副産物のホエーがある。本稿では、著者らが開発したチーズホエーを原料とした新しいバイオエタノール生産技術（図 1）について紹介したい。

2.チーズホエーとは

チーズは、発酵・熟成によってつくられた自然のままのナチュラルチーズおよびナチュラルチーズを加熱・溶解して加工したプロセスチーズの二つに大別される。わが国では、ナチュラルチーズの国内生産量が 2009 年度に 45,000 トンに達し、今後もさらに増加する傾向にある（図 2）。チーズホエーとは、このナチュラルチーズを製造する際、原料乳に酸またはレンニンなどの凝乳酵素を添加してできる凝固物（カード）を除いた液状の副産物であり、チーズ 1 kg を製造すると約 9 kg 発生する。世界におけるナチュラルチーズの年間生産量は 17.6 百万トン(2005 年)であることから、チーズホエーの発生量は膨大と推定される。

チーズホエーの BOD は 30,000～50,000 mg/L、COD は 60,000～80,000 mg/L であり、し尿の BOD (8,000～15,000 mg/L)および COD(3,000～9,000 mg/L)を上回る [1)]。高い汚染度の原因となっているのはガラクトースとグルコースから構成される二糖のラクトース（図 3）で、チーズホエー中のタンパク質を回収しても COD は 10,000 mg/L 程度しか減少しない。このような状況からチーズホエーの積極的な利用が推奨されており、そのような用途のひとつと考えられるのがバイオエタノールである。

3.酵母によるエタノール発酵

バイオエタノール生産においてもっとも重要な工程は、酵母がグルコースやスクロースなどの糖をエタノールと炭酸ガスへと変換するエタノール発酵である。穀類やイモ類などを原料とする場合、あらかじめ酵素処理によってデンプン質を発酵可能なグルコースにまで加水分解する必要がある。一方、テンサイやサトウキビに含まれるスクロース（図 3）は酵母が分泌する酵素によってグルコースとフルクトースに加水分解後、細胞内に取り込まれて代謝される。使用される酵母は醸造や製パンと同様に、迅速に高濃度のエタノールを生成する能力を備えた *Saccharomyces cerevisiae* の菌株である。*S. cerevisiae* という酵母種には、人間に例えると個人に相当する様々な菌株（きんかぶ）があり、それぞれ個性があるように発酵特性も異なる。しかし、*S. cerevisiae* に属する菌株はすべてラクトースを発酵できないため、チーズホエーから中のラクトースからエタノールを生産するには、*Kluyveromyces marxianus* などの酵母が使用されている。*K. marxianus* は *S. cerevisiae* ほどエタノール生産能力が高くないものの、乳製品に広く生息しており、ラクトースを発酵する能力を有している菌株が多い。

4.チーズホエーからのエタノール生産と問題点

チーズホエー中のラクトース量は 1.0～5.0 %(w/v)と低く、このままの状態で発酵させるとエ

タノール濃度が 0.5～2.5 %(w/v)にしかならず、蒸留によるエタノール抽出の効率は低い。ラクトース濃度を少なくとも 10～12%(w/v)にまで上昇させておくと、発酵から蒸留・脱水に至るエタノールの製造コストは改善するとされている。ニュージーランドではチーズホエー中のタンパク質を除去・濃縮したホエーパーミエートから年間 2 万 kL のエタノールを製造し、酒類、食品、医薬品、工業用およびバイオ燃料用として利用されている [2]。乾燥させたホエーパウダーを高濃度に溶解することによりラクトース濃度を高めることもできるが、いずれの方法も費用がかさむことになる。もっとも簡単なのは糖濃度の高い原料をチーズホエーで希釈する方法であり、北海道で調達可能なものとしてテンサイからショ糖を製造する際の中間生成物シックジュースがある（図 4）。

ここで問題となるのは、ラクトース発酵性の酵母であってもテンサイシックジュース・チーズホエー混合原料のようにスクロースおよびラクトースが混在する条件下では、スクロース由来のグルコースとフルクトースを優先的に取り込み、ラクトース代謝系酵素の発現が遺伝子レベルで制御され、ラクトースが発酵されないという現象（図 5）、いわゆるカタボライトリプレッションが起こることである [3]。グルコースとフルクトースが消費されてからラクトース代謝系酵素が発現されるため、ラクトースの発酵が停止したり、あるいは徐々にしか進行しないために発酵が完了するまでに長時間を必要とするのである。カタボライトリプレッションは、利用しやすい糖の代謝にエネルギーを集中させるという厳しい生存競争を潜り抜けるために獲得した必須の形質と言える。その一方で、工業生産では複数の糖を含む安価な素材を原料とすることが多いため、収率を低下させるような不都合な性質になる。

5. フレックス酵母の作出

酵母 *S. cerevisiae* の野生株は、グルコースの 2-ヒドロキシル基が水素に置換された 2-デオキシグルコース(2-DOG)とガラクトースを含む最少培地で生育できない。2-DOG が細胞内でリン酸化された 2-DOG-6-リン酸は解糖経路で代謝されないが、カタボライトリプレッションを引き起こしてガラクトースの発酵に関与する遺伝子群の発現を抑制するのである。ところが、この培地で生育可能な 2-DOG 耐性変異株の中からグルコースとガラクトースの両方を迅速かつ完全に発酵するカタボライトリプレッション非感受性株が出現する。そこで、このような変異株を *K. marxianus* から分離することにした [4]。

製品評価技術基盤機構(NBRC)保有の各種 *K. marxianus* 菌株をテンサイ糖蜜またはホエーパウダーを含む糖濃度 20%(w/v)の培地で培養し、生成エタノール量を比較した。培地に含まれる 20%(w/v)のスクロースまたはラクトースがすべてエタノールへと変換されるとすると、その生成量は理論的に 108(mg/mL)となる。生成エタノール量は 8～90 (mg/mL)と菌株間に大きな差異が認められたが、糖蜜培地およびホエーパウダー培地のいずれにおいても生成エタノール濃度が高かった菌株は、*K. marxianus* NBRC 1735 および NBRC 1963 の 2 株であった。これらの両株は培地の糖蜜とホエーを等量混合すると生成エタノール量は半分まで減少し、その他の菌株にも同様の傾向がみられた。この減少は、培地中のスクロースから生成するグルコースとフルクトースによってカタボライトリプレッションが起こり、ラクトースの代謝を抑制しているためと推察された。

次に *K. marxianus* NBRC 1963 から 2-DOG を含む最少培地において、10^{-10} の頻度で出現した変異株 8 株(KD-12～KD-18)を分離した。これらの 2-DOG 耐性株の中には変異株の中には、糖蜜培地およびホエーパウダー培地での生成エタノール量が親株の NBRC 1963 よりも低いものがある一方で、糖蜜･ホエーパウダー混合培地において NBRC 1963 を上回るものもあった。そのうち KD-15 と NBRC 1963 を比較してみると、糖蜜培地およびホエーパウダー培地において、KD-15 は NBRC 1963 よりも立ち上がりが遅れるものの徐々にエタノールを生成した（図 6）。糖蜜培地での最終的な生成エタノール量がホエーパウダー培地よりも 15%程度少ないのは、糖蜜によって酵母の生育が阻害されているためと考えられる。糖蜜・ホエーパウダー混合培地において、NBRC 1963 の生成エタノール量は培養 24 時間に 44 mg/mL で停止し、それ以降に増加することはなかった。一方、KD-15 では、糖蜜培地における発酵速度が NBRC 1963 よりも遅く、生成エタノール量が最高に達するまで 120 時間を要したが、その水準は NBRC 1963 と同程度であった。ホエーパウダー培地においては NBRC 1963 とほぼ同様の発酵経過を示した。また、混合培地においては糖蜜培地と同等のエタノールを生成したことから、KD-15 はカタボライトリプレッション非感受性の変異株と考えられた。テンサイ、チーズホエー、その混合原料のいずれからもエタノールを生成するという性質は、

ガソリン、エタノール、任意の比率で混合した燃料に対応したフレックスエンジンの特徴に似ていることから、KD-15をフレックス酵母と命名した（図5）。

5.ベンチプラントでの製造試験

テンサイ糖蜜とホエーパウダーは入手しやすく常温での長期保存が可能であることから、前項の実験で使用した。しかし、北海道でのバイオエタノール生産に使用されている原料は糖蜜ではなくシックジュースである。一方、ホエーパウダーは食品素材として利用可能であり、問題となるのは乾燥前の液体、すなわち生チーズホエーのほうである。そこで、2 L ファーメンターでシックジュースおよび生チーズホエーを原料とした発酵試験を実施し [5]、さらにベンチプラントにおいてバイオエタノール製造試験を行った（図7）。

最初にフレックス酵母 KD-15 を 2%スクロース（シックジュース）、0.2%尿素および無機塩類を含む培地50 Lに接種後、200 L発酵槽中で通気撹拌(67 L/分、150 rpm)培養し、菌体を十分に増殖させた。この種培養液のうちの 10 L を残し、全容量 50 L、糖濃度 15%(w/v)となるようにシックジュースおよび生チーズホエーを混合した（図 7①）。通気量を 0.5 L/分まで絞って撹拌(150 rpm)して発酵させると（図7②)、36時間で糖を完全に消費してエタノールを生成し、その変換率は 86%であった。次にこの発酵液を多段式蒸留装置でエタノール濃度 95%(v/v)の粗留液を分離し（図7③)、脱水カラムを通すことにより 99.5%(v/v)にまで濃縮してバイオエタノールにした（図7④)。さらに9倍容量のガソリンと混合し（図7⑤)、10%エタノール混合(E10)ガソリンを調製したところ、小型トラクタの走行に問題なく使用できた（図7⑥)。

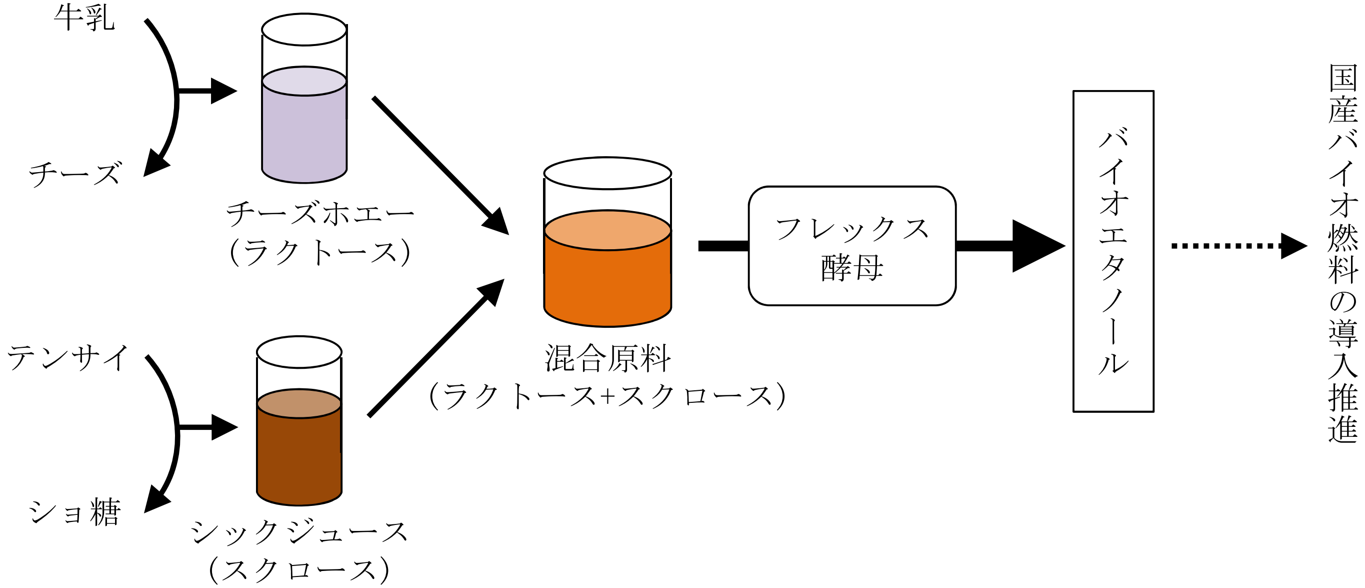
6.おわりに

カタボライトリプレッション非感受性のフレックス酵母によって、チーズホエーを処理すると同時にバイオエタノールを生産することが可能となった。テンサイシックジュース以外の原料としては、規格外小麦やバレイショなどのデンプン質を含む作物と組み合わせることもできる。また、チーズホエーの代わりに賞味期限切れで廃棄される牛乳や乳製品も原料になる。今後は、工業規模での生産に適用するための条件検討を進めたいと考えている。

ベンチプラントでのバイオエタノール製造試験で多大なご協力をいただいた北海道立十勝圏食品加工技術センター・四宮紀之研究員に感謝いたします。なお本研究は、農林水産省が実施する新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「フレックス酵母による高効率エタノール生産技術の開発」（平成20～22年度）の研究課題として実施したものである。

参考文献

1) M. I. González-Siso, *Bioresour. Technol.* 57, 1-11 (1996)
2) A. Ahmed, D. Morris, Alcohol fuels from whey: novel commercial uses for a waste product. Institute for Local Self-Reliance, Minneapolis, MN (1991)
3) K. J. Verstrepen *et al.*, *Trends Biotechnol.* 22, 531-537 (2004)
4) Y. Oda, K. Nakamura, *FEMS Yeast Res.* 9, 742-728 (2009)
5) Y. Oda *et al.*, *Biomass Bioenergy* 34, 1263-1266 (2010)



牛乳
チーズ
チーズホエー
（ラクトース）
テンサイ
ショ糖
シックジュース
（スクロース）
混合原料
（ラクトース+スクロース）
フレックス
酵母
バイオエタノール
国産バイオ燃料の導入推進

図1. 研究の概要

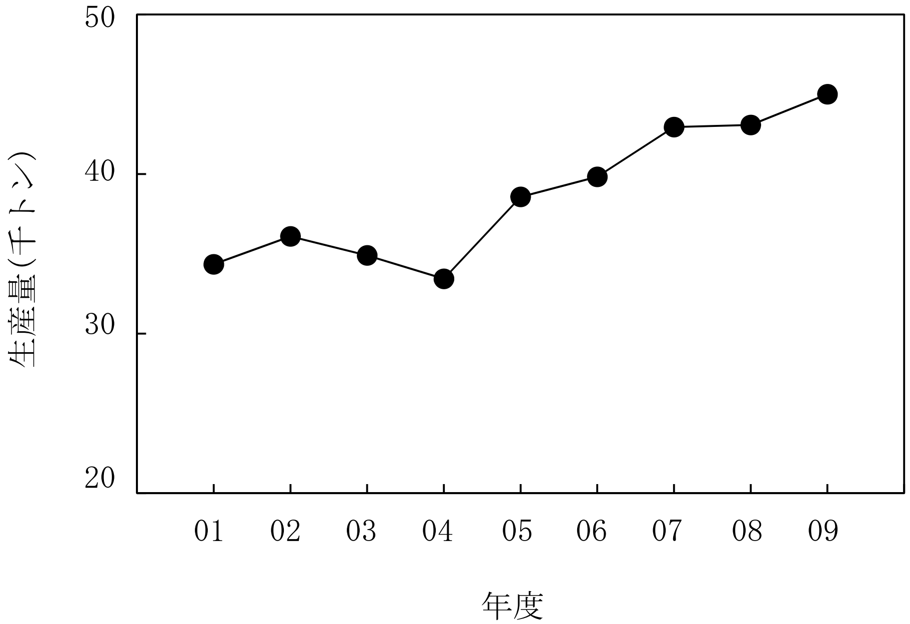


図2. 国産ナチュラルチーズ生産量の推移（農林水産省 平成21年度チーズ需給表から作成）

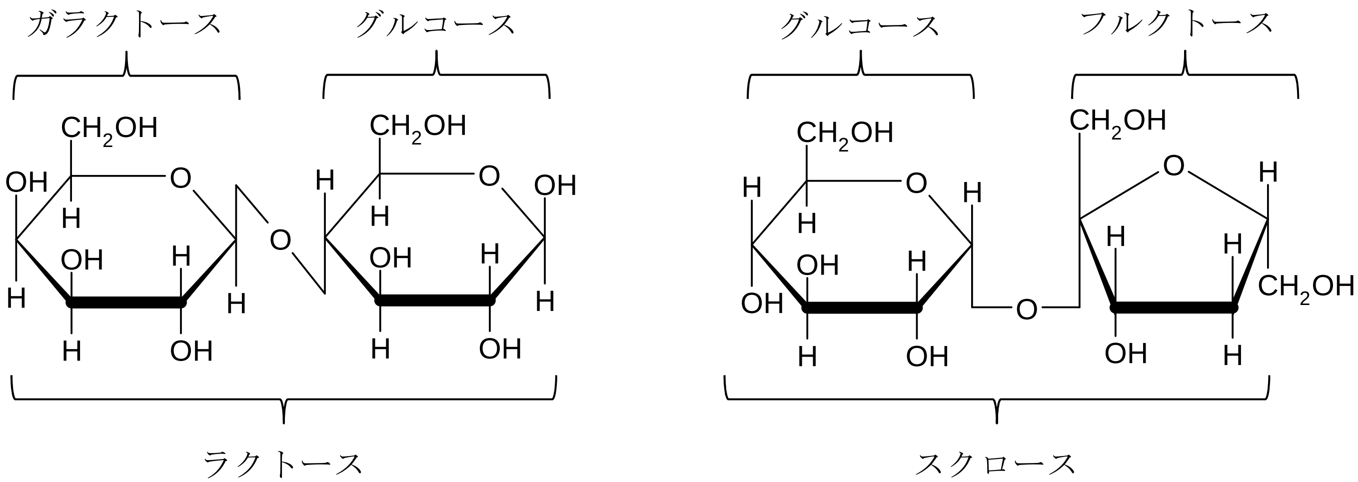


図3. チーズホエーおよびテンサイに含まれる主要な糖の構造

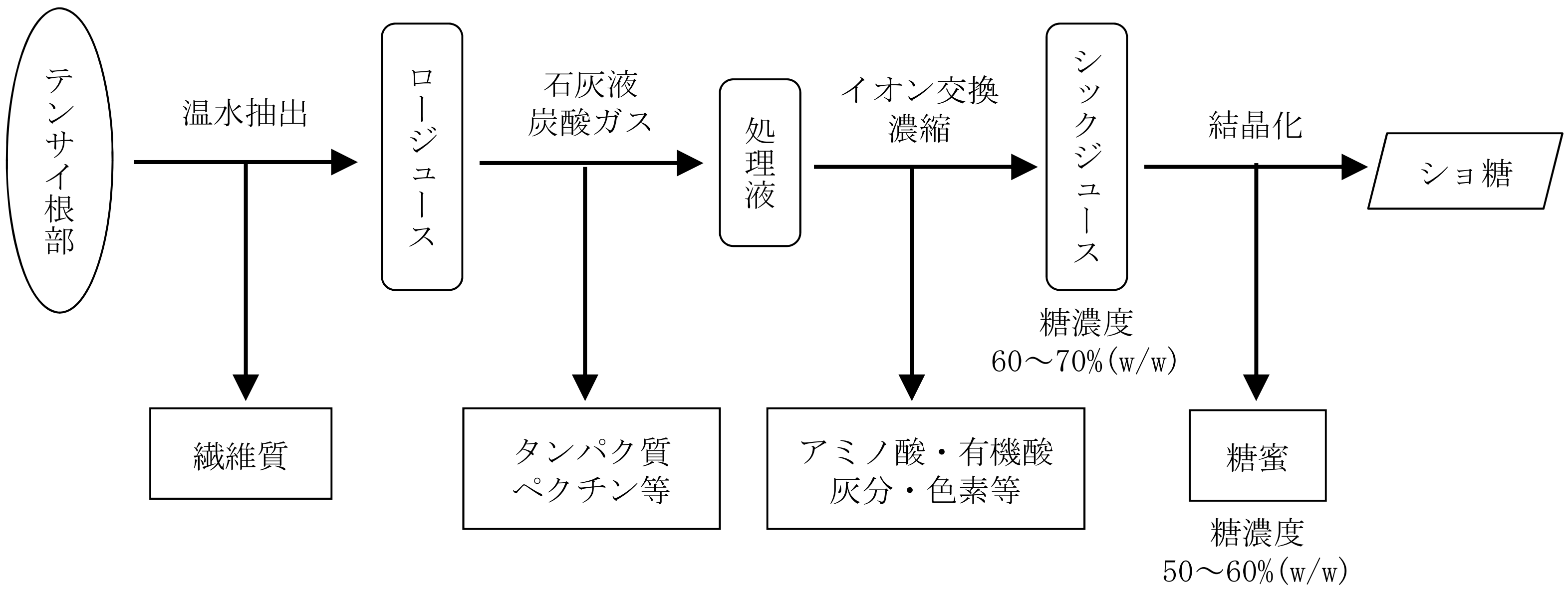


図4. テンサイからショ糖の製造工程

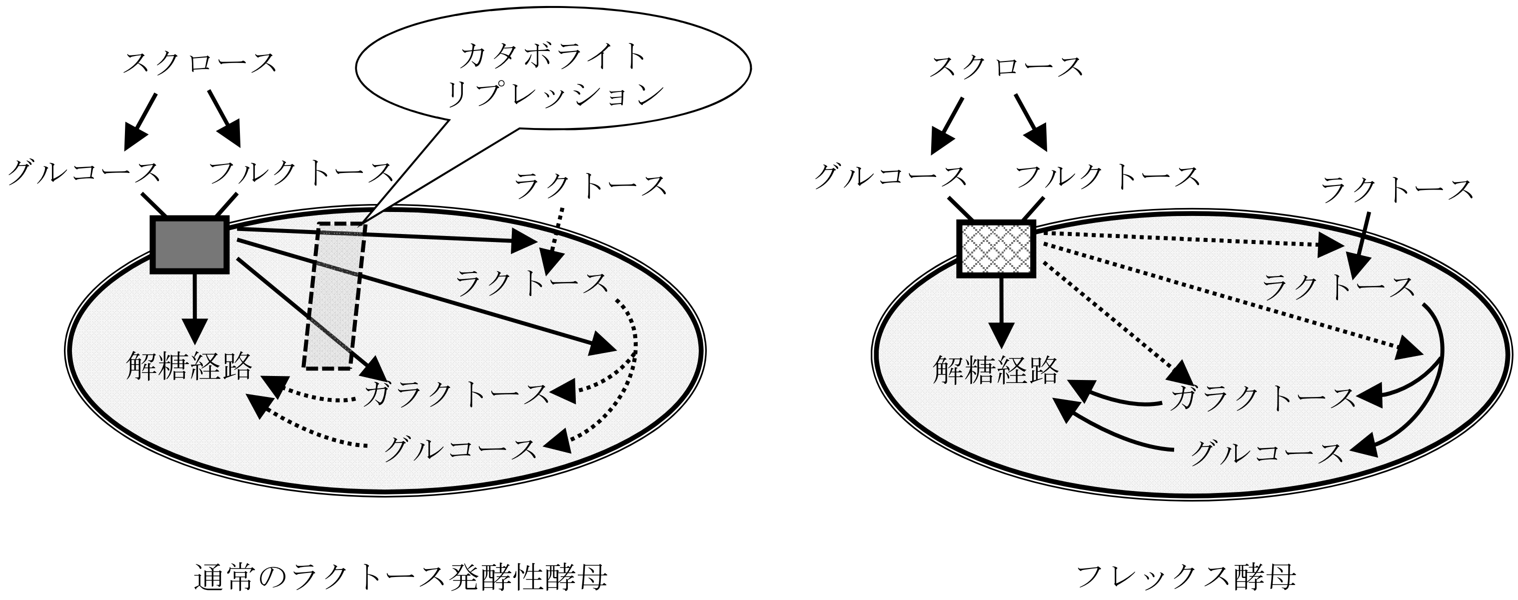


図5. 酵母細胞におけるラクトースとスクロースの代謝

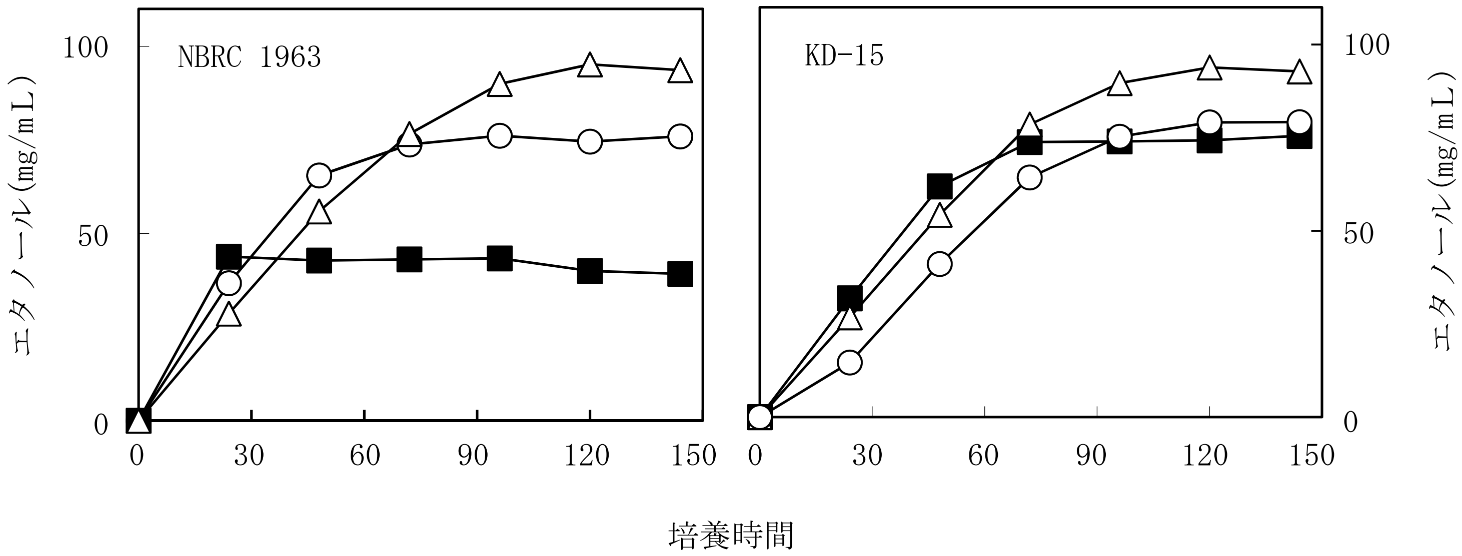


図6. *K. marxianus* NBRC1963およびKD-15の3種類の培地における生成エタノール量の変化(Oda and Nakamura, 2009: *FEMS Yeast Res*, 9, p744 Fig.1より転載)

○, 糖蜜培地; △, ホエーパウダー培地; ■, 混合培地

①原料混合

②エタノール発酵

③蒸留

④ゼオライト樹脂による脱水

⑤ガソリンとの混合

⑥小型トラクタ走行試験

図7. ベンチプラントでのバイオエタノール製造試験