

プロジェクト研究の紹介

テンサイでもチーズホエーでもエタノールにする新しい酵母の発見

—「フレックス酵母によるエタノール高効率生産技術の開発」の提案に至る経緯—

帯広畜産大学・食品科学研究部門 小田 有二

1. はじめに

2006年4月、現在の大学への移籍で新たな研究体制を立ち上げることになった。6年間勤務した北海道農業研究センター芽室研究拠点ではおもに微生物による畑作物の加工・利用に関して研究したが、これを機に大学の看板である畜産物にも対象を広げたいと思っていた。ちょうどその頃、道内企業のF氏からチーズホエーからのエタノール生産に関する問い合わせがあった。生ホエー中にはラクトースが豊富に含まれているものの、濃度は5%程度で通常のエタノール発酵の初発糖濃度15~20%よりもかなり低い。このときは否定的な見解を伝えたが、「ホエーからエタノール」という言葉が頭に残った。

2. ホエーからのエタノール生産に関する現状

チーズホエーとは、生乳を凝固させてチーズを製造する際に副生する液体のことで、主成分はラクトース、ホエータンパク質、無機塩類およびビタミンなどである。チーズホエーは原料乳の約90%に相当する量が発生し、廃液として処理するには大きな環境負荷がかかるため、全量をホエーパウダーと呼ばれる乾燥品にしたり、あるいはろ過、濃縮、乾燥などの処理によってタンパク質およびラクトースを分別・回収して食品素材や飼料としても利用されている。しかし、チーズの生産が盛んな地域では大量に発生するため、その処理に苦慮することが少なくない。

チーズホエーの有効活用のひとつであるエタノール製造は1970年代に始まっており、技術的には完成の域に達している。ニュージーランドでは、すでに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2万キロリットルのエタノールを製造しているというが、日本ではこのように上手くはいかない。

3. ホエー混合原料からのエタノール生産

生チーズホエーは直接発酵させるとエタノール濃度が約2.5%(w/v)にしかならないため、生産効率は良くない。ホエーパウダーを使用して培地の糖濃度を高めることもあるが、乾燥には化石エネルギーを消費するのでコスト高になりやすい。もっとも簡便な方法は、糖濃度の高い糖蜜などをチーズホエーで希釈した混合原料として使用する方法である。通常のエタノール生産用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はラクトースを発酵できないため、チーズホエーからエタノールを製造するには、上記のニュージーランドを含めて *K. marxianus* などのラクトース発酵性酵母を使用している。ところが、著者がテンサイ糖蜜とホエーパウダーを糖源としてエタノール発酵させたところ、ラクトースはまったく消費されずに残ってしまった。このとき使用した *K. marxianus* はスクロースとラクトースのどちらも発酵できる菌株であったが、スクロースの加水分解で生成したグルコースとフルクトースが代謝する際、細胞自身がラクト

ースの代謝系酵素の発現を停止させてしまったのである。これは微生物に広く観察されるカタボライトリプレッションと呼ばれる現象であり、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、微生物で有用物質を工業生産するときには複数の糖が混在したような安価なものが原料となることが多いため、収率を低下させるような不都合な性質になる。海外におけるチーズホエーからのエタノールを製造する際の原料はホエー単独であるため、酵母のカタボライトリプレッションは問題となっていない。しかし、畑作と酪農の両方が盛んであり、テンサイとチーズホエーが容易に入手できる十勝地域では両方の混合原料からのエタノール生産も考えられることから、それを実現するような酵母菌株が取得できれば、新規性のみならず地域貢献度の高い重要な技術になると確信した。

4. カタボライトリプレッション変異株

テンサイとチーズホエーの混合原料からエタノールを生産する酵母を取得するには、カタボライトリプレッションが発現しないような変異株を分離できれば可能であり、そのような目的で使用される試薬として 2-デオキシグルコース(2-DOG)がある。例えば、*S. cerevisiae* のガラクトース代謝系酵素はカタボライトリプレッションを受けるため、グルコースとガラクトース共存下ではグルコースが優先的に消費される。そのため、ガラクトースを糖源とする最少培地に 2-DOG を添加しておくと、2-DOG は代謝されずにカタボライトリプレッションを引き起こすために生育できない。この培地に生育可能となった 2-DOG 耐性株には、グルコースとガラクトースを同時に利用するカタボライトリプレッション変異株が出現することになる。このように目的とする変異株は簡単に取得できるよ

に思えるが、実験を行うには苦い思い出があるために躊躇した。

20 年以上前、著者は優良形質を備えたパン酵母菌株を見出し、その菌株の糖無添加パン生地発酵力の改良に取り組んでいた。一般にパン酵母菌株は糖無添加パン生地中にわずかに存在する単糖類を発酵して 1 時間以内に消費し、その後の 2~3 時間は小麦粉に含まれる B-アミラーゼなどの作用によってデンプンから生成するマルトースを発酵する。そのため市販のパン酵母には小麦粉にあらかじめ存在する単糖からマルトースへの変化に迅速に適応可能なマルトース発酵性を備えた菌株が使用されている。すなわち、マルトース代謝系酵素の発現がカタボライトリプレッションを受けにくい特徴を有している。2-DOG 耐性を付与することにより、糖無添加パン生地発酵力が改良されたという文献もあったため、さっそく同様の実験を行った。ところが、分離した 2-DOG 耐性株のパン生地発酵力は親株よりも著しく低下しており、時間をかけたにもかかわらず使用できるものはひとつもなかった。2-DOG はグルコース代謝の様々な反応に作用しており、2-DOG 耐性を獲得してもカタボライトリプレッションの変異による確率は高くなかったのである。

5. フレックス酵母の完成

最初に行った実験はテンサイ糖蜜とチーズホエーをそれぞれ糖源とする培地でエタノールを生成する菌株の選抜で、*K. marxianus* NBRC 1963 に絞り込んだ。2-DOG 耐性は菌株によって大きな差があるが、この菌株の最少阻害濃度は 0.1% で感受性が高かった。それまでの経験から 2-DOG 耐性株の中にカタボライトリプレッション変異株が出現する頻度は低いと予想して、強力な変異誘発剤であるエチルメタンサルフォネートで処理することにした。変異処理後一週間ほど経過してから数十枚の寒天平板培地上から分離した

2-DOG 耐性株を発酵試験に供したところ、残念ながら生成エタノール量が親株よりも著しく低下したもののばかりであった。「やはり、だめか・・・」と片付けようとしたところ、変異処理をせずに2週間以上放置しておいた寒天平板培地上に小さな斑点が見えるのに気付いた。これらは自然突然変異を起こして 2-DOG 耐性を獲得した細胞によるコロニーであった。最後と思って、これらをテンサイ糖蜜とホエーパウダーを含む培地で培養したところ、幸運にもエタノールを活発に生成するひとつの菌株 KD-15 を見出すことができた¹⁾。

6. 競争的資金への応募と採択

基盤技術となる酵母菌株の発見で実用化への展望が開けたため、農林水産省の競争的資金である「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」に応募することにした。当該事業は技術シーズのための基礎研究と新事業創出のための応用研究の両面性が要求され

ているため、特許申請を急いだ²⁾。実用化のためのベンチプラント試験については、財団法人十勝圏振興機構に共同研究機関としての参画を要請した。応募書類の作成は、これまでに競争的資金に度々応募してきた経験が役立ち、さほど苦労はしなかったが、迷ったのは課題名であった。応募者はどれも選りすぐりの内容を出してくるので、一目で好印象をもつような工夫が必要である。そこで思いついたのが「フレックス酵母」という単語であった。テンサイ、チーズホエーおよびその混合原料のいずれからもエタノールを生成する性質が、いろいろな濃度のエタノールを含むガソリンに対応したフレックスエンジンに似ているからで、エタノールに関する新技術であること示唆する意図もあった。そして「フレックス酵母によるエタノール高効率生産技術の開発」という課題名で応募したところ、書面および対面審査を経て採択された。(図1)

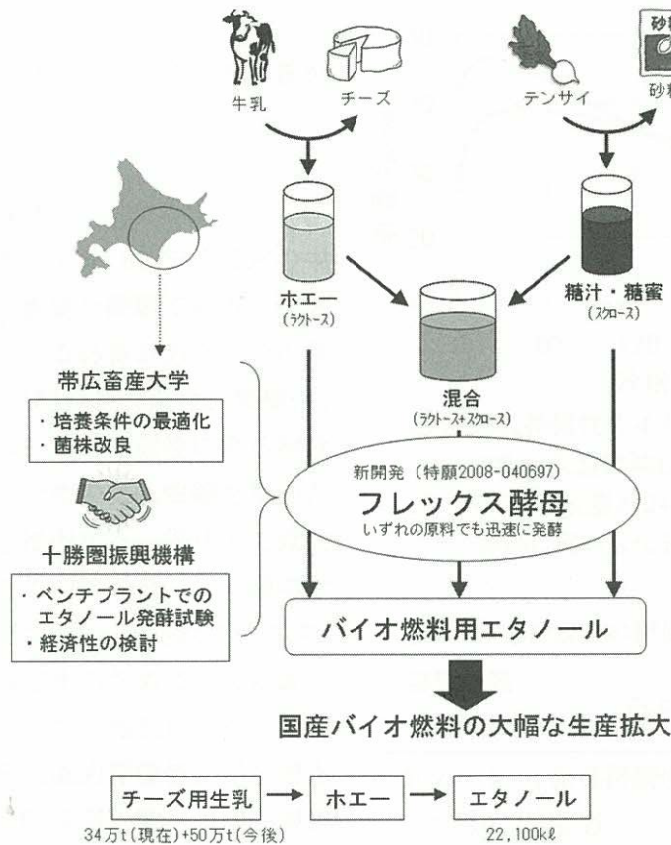


図1 フレックス酵母による高効率エタノール生産技術の開発

7. おわりに

当初はテンサイ糖蜜およびホエーパウダーを原料として実験を開始したが、その後、実際のバイオエタノール工場で使用しているテンサイシックジュース（濃縮汁）およびチーズ工場で排出された直後の生ホエーに切り替えた。フレックス酵母 KD-15 はカタボライトリプレッションを感知するヘキソースの透過系に何らかの変異を起こしているため、親株と比較するとエタノール生産速度がわずかに遅いが、どのような原料混合比率でもエタノールに変換できることを確認した³⁾。現在、ベンチプラント試験に向けた最終準備を進めているところであり、それらの成果については改めて紹介したい。

なお、本研究は平成 21 年度「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の一環として実施した。

8. 参考文献

- 1) Y. Oda and K. Nakamura (2009) Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*, *FEMS Yeast Res.*, 9, 742-748.
- 2) 小田有二, エタノール製造方法, 特願 2008-040697
- 3) Y. Oda *et al.* (2009) Ethanol fermentation of sugar beet thick juice diluted with crude cheese whey by the flex yeast *Kluyveromyces marxianus* KD-15, submitted.