

## キリングループの環境への取組み

吉田 聡\*・足海 洋史・西田 武央・大澤 文・米田 俊浩  
藤井 敏雄・生嶋 茂仁・玉川 英幸・小林 統

キリングループは、キリンホールディングスを中心として、キリンビール、キリンビバレッジ、メルシャン、キリン協和フーズ、小岩井乳業、協和発酵キリンなどの事業会社からなる。キリングループは環境に対する基本方針として、『全ての事業の低炭素化に努め、環境保全の取組みを実施すると共に、お客様への環境価値提案を通して、自然と共生した豊かな社会の実現に貢献します』と謳っている。特に、技術面では『地球環境とお客様に価値ある自然と共生する技術開発』に取り組んでいる。本稿では、キリンビバレッジ、キリンビール、キリンホールディングスでの環境工学的な取組みについて、実例を挙げてそれぞれ紹介したい。

### 軽量化ペットボトルの開発

ペットボトルは主に飲料容器に用いられるが、ペット樹脂事業の国内総売り上げは約1000億円に上り、世界では4兆円という非常に大きな市場である。いわゆる容器包装ごみの多くが飲料包装によるものであり、その発生をいかにして減らすかが環境保全への大きな課題である。そのためには、3R (Reduce, Reuse, Recycle) が必要であり、特にReduceが最も効果がある試みとされている。そこで、キリンビバレッジでは容器包装ごみをReduceするため、キリンビール・パッケージング技術開発センターと共同で、容器そのものの軽量化に取り組んだ。初めに、2lのペットボトルの軽量化について、ボトルの胴部形状を工夫し、強度は従来以上で、約30%軽量化(63g→42g)したボトルを開発した(ペコロジーボトル)<sup>1)</sup>。このボトルは、使用後容易に潰すことができ、ペットボトルの回収効率の向上にも貢献した。なお、本発明で社団法人日本包装技術協会より第29回木下賞を受賞することができた。引き続き、ユニバーサルデザインを実現し、より軽量化した新2lボトルの開発を行った。設計にあたっては、キャップの開けやすさ、持ちやすさ、注ぎやすさ、ボトル強度、軽量化を追求した。その結果、最大で35gに軽量化することに成功した(図1)。本技術が認められ、APF (アジア包装容器連盟) よりアジアスター賞、WPO (世界包装容器機構) よりワールドスター賞、サステナビリティ賞金賞を受賞した。

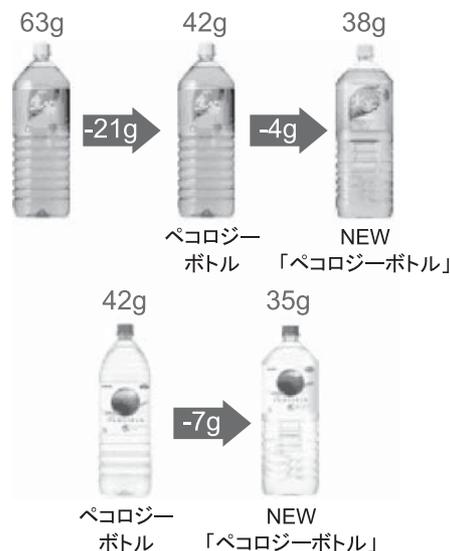


図1. 軽量化ペットボトルの開発

ペットボトルのPET (ポリエチレンテレフタレート) は、エチレングリコールとテレフタル酸が脱水重合して作られるが、原料に植物由来の樹脂を利用したペットボトルの導入も行っている。このように限りある資源である原油の使用量を削減することにも取り組んでおり、より環境負荷の低い容器の開発に努めている。

### バイオエタノール実証プロジェクト

キリンビールは、ビール、発泡酒などを製造、販売しており、酵母を用いたエタノール発酵生産の長年の技術蓄積がある。そこで、このような発酵技術の活用として、近年、石油代替エネルギーとして注目されているバイオエタノールの生産に取り組んだ。具体的には、国産バイオエタノールの生産に向けて、北海道十勝地区で、地域の特性を活かしたバイオエタノール生産プロジェクトに参画した。すなわち、バイオエタノールの原料調達から燃料の供給までを一体として、国産技術による事業を確立するための農林水産省国家プロジェクト(「燃料用バイオエタノール製造プロジェクト」)に参画した<sup>2)</sup>。そして、ホクレンの清水製糖工場構内に年間1.5万kl規模のバイオエタノール製造設備を建設し、酵母による発酵技術を用

\*著者紹介 キリンホールディングス・フロンティア技術研究所 (主任研究員) E-mail: satoshiy@kirin.co.jp

提供した。そして、原料として規格外小麦（でんぷん）、甜菜（蔗糖）を利用し、品質としては純度99.5%以上のエタノールを作ることに成功した。さらに、排水処理で出てくるメタンについてはバイオガスとして利用することで、より環境に配慮した生産システムを構築した。

以上のように、本取組みは、全世界的な課題である温室効果ガスの排出抑制による地球温暖化防止策として、バイオマスを用いたバイオエタノール混合ガソリン事業に貢献するものである。ビール工場における廃棄物の削減は勿論のこと、このように保有技術を新たな分野に展開することで、より環境に配慮した取組みを行っている。

### ビール仕込み粕からのバイオエタノール生産

バイオエタノール生産に関して、アメリカのトウモロコシのようにデンプン質を原料に用いた場合、時として食糧価格高騰などの問題を引き起こす。そのため、セルロース系原料からのエタノール生産への期待が高まっており、近年、全世界的に盛んに研究されている。そこで、本取組みにおいては、ビール仕込み粕からの糖化、およびエタノール生産を検討した。

ビール仕込み粕はビールの仕込みの過程で原料である麦汁を濾過するときに出てくる粕であり、飼料、土壌改良材などに使われてきたものである。まず初めに、ビール仕込み粕の構成糖を調査したところ、もっとも多く含まれる糖はセルロースとアラビノキシランであり、それらは全仕込み粕重量の半分近くを占めていることが明らかとなった(図2A)。そこで、ビール仕込み粕の水分含量が高い事を考慮し、酸加水分解と酵素処理による糖化

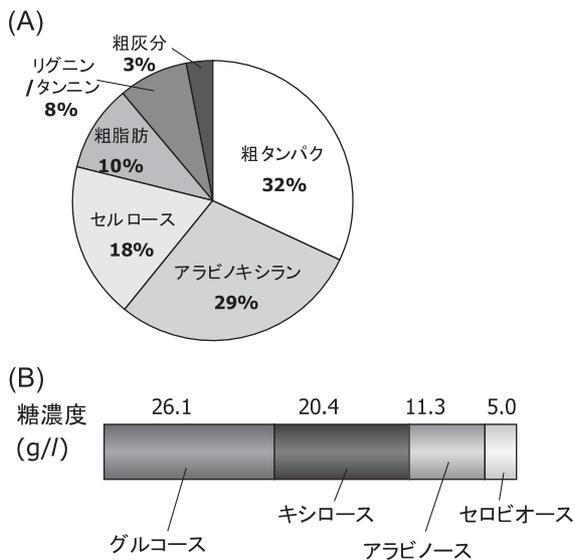


図2. ビール仕込み粕の構成成分 (A) と糖化液の糖組成 (B)

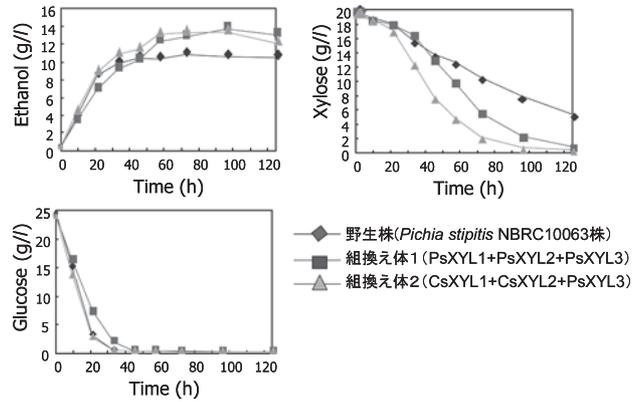


図3. 各種酵母株を用いたビール仕込み粕糖化液のエタノール発酵。Psは *Pichia stipitis* を, Csは *Candida shehatae* を示す。図はエタノール生産量, キシロース消費量, グルコース消費量の経時変化を示す。

法を検討した。さまざまな条件で酸処理を行ったところ、最終的に10% (w/v) の仕込み粕を3% (w/v) 硫酸中で、80°C、3時間の処理を行うことで、全糖の約90%を液化することができた。一方、高いエクソ型グルコシダーゼ活性を示す市販酵素剤を選抜し、反応条件を精査した結果、約90%の収率で単糖を生産させることができた。そこで、両者を組み合わせて糖化を行ったところ、48時間で約80%の糖化効率を得ることができ、その糖組成はグルコースとキシロースが主であった(図2B)。この糖化液をキシロース資化性酵母である *Pichia stipitis* 野生株により発酵させたところ、30°C、48時間で1.26% (w/v) のエタノールを生産させることに成功した<sup>3)</sup>。さらに、キシロースの資化性を向上させるために、キシロースからキシロース5リン酸までの代謝に関する遺伝子群 (*XYL1*, *XYL2*, *XYL3*) を *P. stipitis* において過剰発現させたところ、キシロース培地での発酵速度が最大で27%向上した。そして、ビール仕込み粕糖化液を用いた発酵においても、遺伝子群を導入していないコントロール株と比べて最終的にエタノール収率が20%向上した(図3)<sup>4)</sup>。

以上のようにビール仕込み粕は、バイオエタノールを生産するためのバイオマス資源としても活用できることが明らかになった。しかしながら、実用化には生産性の向上、糖化プロセスの低コスト化などの課題が残されており、この分野における更なる基礎的、応用的な技術開発が期待される。

### *Candida* 属酵母を用いたL-乳酸生産

地球温暖化現象が急速に深刻化している近年、世界規

模での二酸化炭素削減が必要であり、効率的な炭素循環システムの構築が望まれている。植物などのバイオマスから微生物発酵によって作られるバイオプラスチックは、焼却や分解で生じた二酸化炭素が元々は植物由来であり、追加的な二酸化炭素放出にならないという意味で、カーボンニュートラルとされている。また、生分解性プラスチックは環境に対する負荷が少ないという特徴も有している。このような状況で、生分解性プラスチックとして、バイオマスを発酵して得られるL-乳酸の重合体であるポリ乳酸の研究が世界で活発に行われている。現在、宿主として注目されている *Saccharomyces cerevisiae* は乳酸菌に比べてストレスに強いなどの特長がある一方で、Crabtree効果陽性であることから副産物としてエタノールを生成することが問題視されている。そこで、本取り組みではCrabtree効果陰性の酵母である *Candida* 属酵母を宿主とする効率的なL-乳酸生産システムの構築を試みた。具体的には、*Candida* 属酵母として、*C. boidinii* と *C. utilis* の2つの酵母について乳酸生産技術の開発を行った。

酵母による乳酸生成の育種は以下の戦略で行った。酵母はエネルギー源として取り込んだグルコースをピルビン酸に変換し、ピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) の働きによりアセトアルデヒドを経てエタノールを生成する。本来酵母は乳酸を生産しないので、外来の乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子 (*L-LDH*) を導入することにより、ピルビン酸を基質として乳酸を生産させる。その際、エタノールは副産物となるので、*PDC* 遺伝子を破壊することにより、エタノールへの経路をシャットアウトする、という戦略である (図4)。

初めに紹介する *C. boidinii* は、メタノール資化性の酵母であり、メタノール培地を用いたタンパク質生産誘導システムが開発されている<sup>5)</sup>。 *C. boidinii* の乳酸生産の

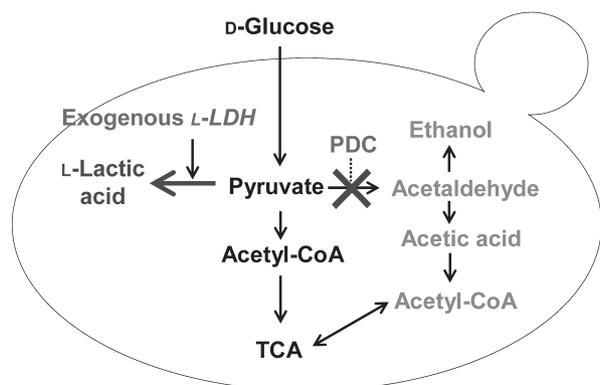


図4. 酵母における乳酸生産戦略

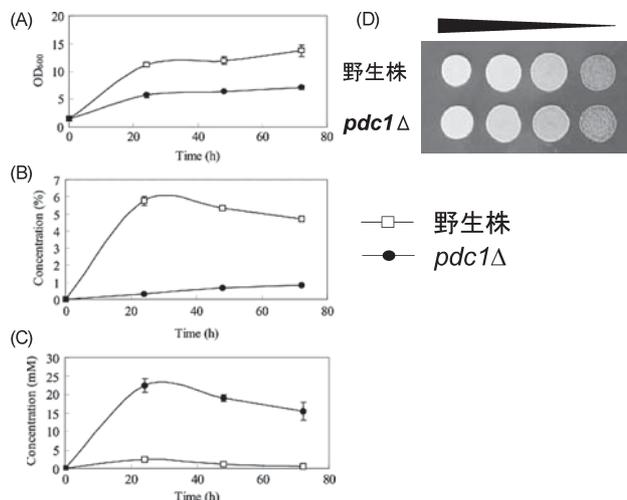


図5. *Cbpdcl*破壊株におけるピルビン酸、エタノール生産能と増殖能。図はYPD培地における増殖 (A), (D), エタノール生産量 (B), ピルビン酸生産量 (C) を示す。

ポテンシャルを探るために、まず初めに *C. boidinii* と *S. cerevisiae* のストレス耐性、特に低pHに対する耐性を比較した。その結果、*C. boidinii* は *S. cerevisiae* よりも低pHに対して耐性であることが明らかとなった<sup>6)</sup>。そこで、次にピルビン酸脱炭酸酵素をコードする *S. cerevisiae* の *ScPDC1* 遺伝子の活性領域の配列をもとに設計したプライマーで増幅したDNA断片をプローブとして、*C. boidinii* ゲノムより *CbPDC1* 遺伝子を新規にクローニングした。本遺伝子を破壊したところ、野生株に比べて若干の増殖遅延は示すものの、*S. cerevisiae* の場合のように致死となることはなかった。また、*CbPDC1* 遺伝子破壊株はエタノールをほとんど生産しないことが確認された (図5)。

次に、*C. boidinii* のコドン使用頻度にあわせて全合成したウシ *L-LDH* 遺伝子を *Cbpdcl* 遺伝子破壊株に導入した。その際、*CbURA3* 遺伝子座に入った場合と、*CbPDC1* 遺伝子座に入った場合で、乳酸生産量に差があることが明らかとなった。その原因は、*L-LDH* 遺伝子発現のために用いた *CbPDC1* プロモーターの長さであることが示唆された。そこで、もっとも生産効率の高かった *CbPDC1* 遺伝子座に入った株を用いてフラスコ、およびジャーファーマーターによる詳細な発酵条件の検討を行い、乳酸生産の最適条件を調査した。まずは、フラスコを用いて通気量、初発菌体量、発酵温度についてそれぞれ調査した。通気量については100 mlのフラスコに入れる培地の量を変化させ、また振とう培養のスピードを調整することにより実施した。その結果、初発の菌体量に関わらず、20 ml, 80~100 rpmで培養した

とき、もっとも乳酸生産効率が高かった。この時、乳酸生成量と最終ODは通気量が下がるにつれ同じように低下しており、*C. boidinii*においては増殖と発酵は連動していることが示唆された。そこで、それを示すために、グルコース単独の培地と10%のグルコースを含む富栄養培地 (YPD) での発酵実験を行った。その結果、グルコース培地ではほとんど乳酸を作っておらず、またグルコースの消費も低いことが明らかとなり、増殖と発酵が連動していることが示された。

次に、培養条件の検討として、発酵に供する前培養の菌体について対数増殖期の菌体、定常期の菌体、それぞれを用いて比較した。その結果、定常期の菌体を用いた場合、乳酸生産量が高いことが明らかとなった。さらに、発酵に供する菌体量についてOD<sub>660</sub>で2~15の間で検討したところ、発酵72時間後の結果としてOD<sub>660</sub>=15のときがもっとも乳酸生産量が高かった。発酵温度については、25°C~35°Cの間で検討を行ったところ、温度が低いとグルコース消費は多いが乳酸生産量が下がること、温度が高いと糖換算での乳酸生産効率は高いものの乳酸生産量が低下することが明らかとなった。この理由としては、前者では発酵よりも呼吸にグルコースが使用されていること、後者については高温にすることで菌体にストレスを与えていることが考えられた。最終的な結果として発酵最適温度は30~32°Cが良いことが明らかとなった。

さらに、この株を用いてpHの影響を調査した。pHを4~7で変化させたところ、中性付近で乳酸生産量が最も高いことが明らかとなり、効率的な生産には発酵過程での中和が必要であることが示唆された。そして、炭酸カルシウムで中和させた条件で発酵させたところ、L-乳酸の生産量が飛躍的に伸び、また非中和条件で生産されていたD-乳酸の生産量も大幅に低下し、結果として光学純度が72.7%から98.4%にまで上昇した。なお、中和剤として、炭酸カルシウム以外に、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムを検討したが、炭酸カルシウムでもっとも高い効率が得られた。

以上のフラスコ培養で得られた条件を基に、ジャーファーマンターを用いて2.5 lのYPD培地で48時間発酵させたところ、32°C、3% (w/v) 炭酸カルシウム添加により、100 gのグルコースからまったくエタノールを生産せずに、光学純度で99.6%のL-乳酸を80~90.4 g (生産効率0.77~0.96 g/g D-glucose) 生産させることに成功した(図6)<sup>6)</sup>。

同様のストラテジーで、Crabtree効果陰性である*C. utilis*においてL-乳酸生産を行った。*C. utilis*は、トルラ

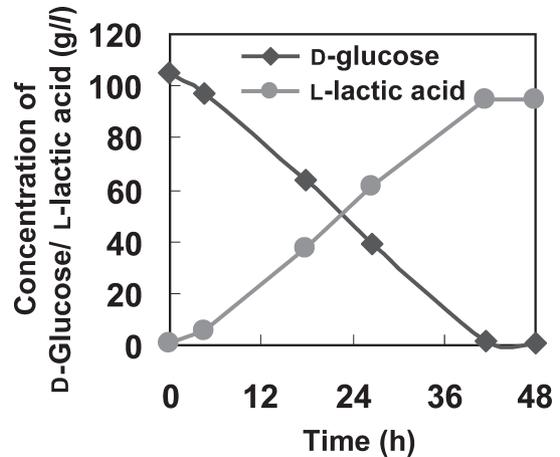


図6. ジャーファーマンターを用いた*C. boidinii*によるL-乳酸発酵

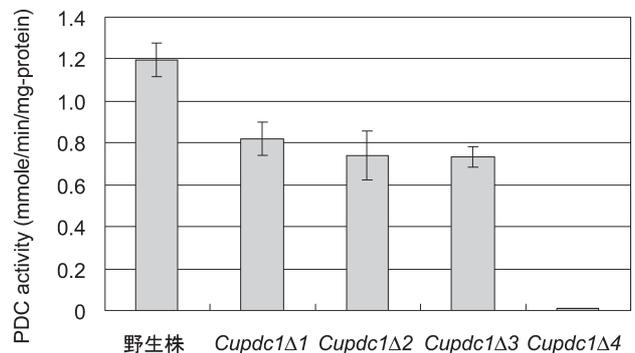


図7. 野生株と*Cupdc1*破壊株のPDC活性。*Cupdc1Δ1*, *Cupdc1Δ2*, *Cupdc1Δ3*, *Cupdc1Δ4*は、それぞれ1, 2, 3, 4コピーの*CuPDC1*遺伝子が破壊された株を示す。

酵母とも呼ばれ、*S. cerevisiae*と同じくアメリカ食品医薬局 (FDA) が食品添加物としての安全性を認可した食用酵母の1つである。また、無機窒素の同化能が高く、キシロースも資化できることから、広葉樹の糖化液や製紙工場から出る亜硫酸パルプを糖源として菌体の工業生産が行われた経緯がある<sup>7)</sup>。さらに、電気パルス法による形質転換法を含む遺伝子組み換えツールが整備され、モネリンなどの異種タンパク質の高生産にも利用されてきた酵母である<sup>8)</sup>。まず、この*C. utilis*において、*CuPDC1*遺伝子を単離、同定し、破壊することとした。*C. utilis*は高次倍数体であることが示唆されていたが、*CuPDC1*遺伝子を破壊する過程で、親株として用いた*C. utilis*株は4倍体であることが示唆された(図7)。また、*C. boidinii*同様、*Cupdc1*完全破壊株は*S. cerevisiae*のPDC破壊株のような重篤な生育遅延を示さなかった<sup>9)</sup>。

次に、この*Cupdc1*完全破壊株にウシ由来のL-LDH

表1. 各種酵母によるL-乳酸生産性の比較

	Sc	Kl	Ps	Cb	Cu
生産量 (g/l)	82.3	109	41	94.4	103
生産効率 (g/g Glc)	0.82	1.19	0.44	0.90	0.94
発酵時間 (h)	216	137	45	41	33
生産速度 (g/l/h)	0.38	0.80	0.91	2.27	3.12

Sc, *Saccharomyce cerevisiae*; Kl, *Kluyveromyces lactis*; Ps, *Pichia stipitis*; Cb, *Candida boidinii*; Cu, *Candida utilis*.

遺伝子を染色体に組み込んで発現させた。そのとき、コピー数の異なる株を取得し、2コピー組み込んだ形質転換体を用いて発酵試験を行い、温度などの最適条件をフラスコ培養で検討した。そして、最終的にジャーフェーマンターにおいて、中和剤として4.5% (w/v) 炭酸カルシウムを添加した35°Cでの発酵条件で、109 g/lのグルコースから、33時間で99.9%を越す光学純度のL-乳酸を103 g/l生産させることに成功した(表1)<sup>9)</sup>。

さらに、蔗糖からのD-乳酸の生産<sup>10)</sup>、キシロースからのL-乳酸生産<sup>11)</sup>についての検討も行い、それぞれ90%を超える収率で生産することに成功している。今後は、中和剤を使わずに生産することによる低コスト化、バイオマスからの生産などの課題が挙げられる。このような課題は、微生物を用いたさまざまな物質の生産での

課題でもあり、技術のブレークスルーにより、より一層環境に配慮した生産が期待される。

以上のようにキリングroupでは、「地球環境とお客様に価値ある自然と共生する技術開発に取り組む」行動方針の下、今後も新たな技術開発を行っていきます。

本報告にあたり、北海道バイオエタノール、トヨタ自動車、キリンビバレッジ、キリンビールの関係者の方々にご協力いただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) <http://www.beverage.co.jp/fun/kids/eco/pecology/point.html>
- 2) [http://www.kirin.co.jp/company/news/08/070619\\_1.html](http://www.kirin.co.jp/company/news/08/070619_1.html)
- 3) 足海洋史ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p.99 (2009).
- 4) 玉川英幸ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p.99 (2009).
- 5) Komeda, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 628 (2002).
- 6) Osawa, F. *et al.*: *Yeast*, **95**, 215 (2009).
- 7) Boze, H. *et al.*: *Crit. Rev. Biotechnol.*, **12**, 65 (1992).
- 8) Kondo, K. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **15**, 453 (1997).
- 9) Ikushima, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1818 (2009).
- 10) 堀江 暁, 生嶋茂仁: バイオインダストリー, **6**, 11 (2011).
- 11) Tamakawa, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 73 (2012).