

酵素を用いたバイオディーゼル燃料の生産プロセス

神戸大学自然科学系先端融合研究環 環長 教授

化学工学会 副会長

福田 秀樹

1. はじめに——— 今、なぜバイオディーゼル燃料が注目されているのでしょうか

近年、植物油や廃食用油などの油脂類をメタノールのようなアルコール類と反応させて得られる脂肪酸メチルエステルが、既存のディーゼル燃料（軽油）に代替可能なバイオディーゼル燃料（BDF と略します）として、その利用が期待されています。BDF を使用することにより、排気ガス中に含まれる硫黄酸化物や浮遊性粒子状物質などの酸性雨や肺がんを引き起こす環境汚染物質の排出量を著しく低減させることができます。

ところで、BDF は油脂類などのバイオマスを原料としており、**図 1** に示すように燃焼後 CO₂ と水として排出されますが、再度バイオマスに固定化されますので、CO₂ の増加にはなりません。このような現象をカーボン・ニュートラルと呼ばれており、地球温暖化防止対策に役立つバイオ燃料として世界中で急速に普及してきております。BDF は EU 諸国では軽油に 5~30% 添加して利用されており、2005 年度においてドイツ、フランス、イタリアでは生産量がそれぞれ約 120 万トン/年、約 40 万トン/年、約 35 万トン/年にまで達しています。米国でも生産量は約 25 万トン/年に達しており増加傾向にあります。バイオマス資源が豊富なベトナム、タイ、インドネシアなどの東南アジア諸国においても、ココナツオイル、パーム油、ヤトロファ油など種々油脂類からの生産計画が進められています。我が国では、京都市において、1997 年から廃食

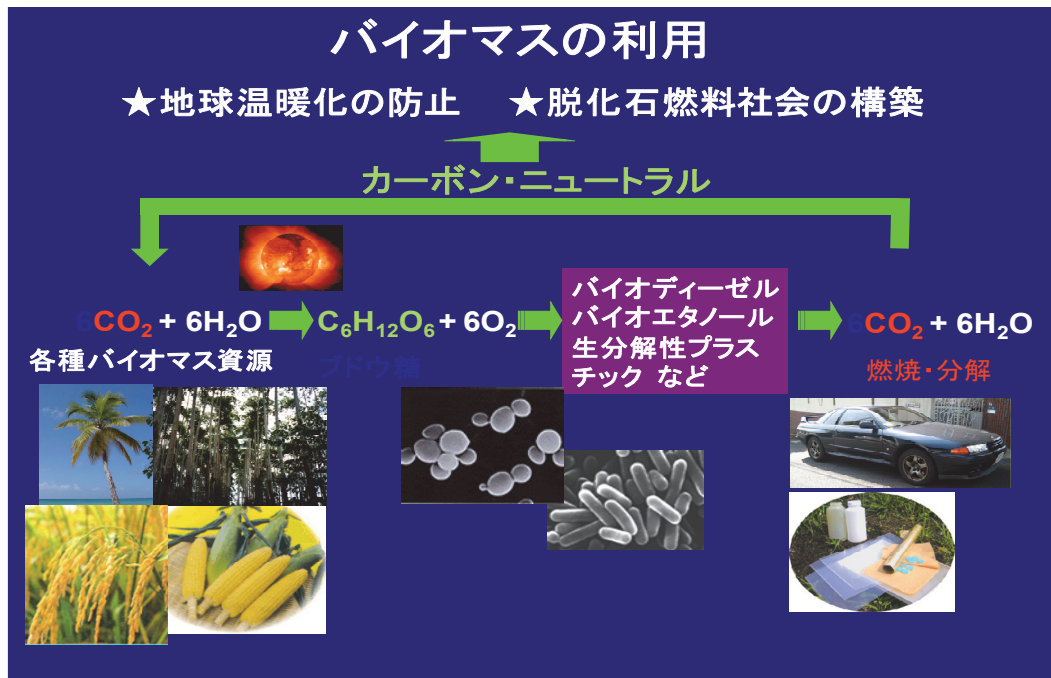


図1 カーボン・ニュートラル

用油をバイオディーゼル燃料に転換し 2000 年から市バスのディーゼル燃料に 20%添加されており、今後も拡大してゆくものと考えられます。

2. アルカリ触媒を用いるバイオディーゼル燃料の生産

BDF はメタノリシス反応 (図 2) と呼ばれる反応により生産され、反応触媒として水酸化カリウムや水酸化ナトリウムなどのアルカリ触媒を用いる方法が一般的です。アルカリ触媒は、コストが安価で経済的ではありますが、この方法では、(1)生産物



図2 メタノリシス反応

である BDF の精製のために多段階の水洗が必要なこと、(2)アルカリ石鹼による収率低下を防ぐため、原料中に含まれる遊離の脂肪酸の除去が必要なこと、(3)廃食用油を用いる場合、水の存在による触媒機能の低下を防ぐために脱水操作が必要なこと、(4)副生産物であるグリセリンの pH が著しく高く、回収・再利用のために複雑な工程を必要とすること、などいくつかの課題を残しております。

3. 酵素によるバイオディーゼル燃料の生産

アルカリ触媒が有する課題を克服する方法として、微生物が生産するリパーゼ酵素を用いる方法が検討されていますが、この方法では、(1)BDF の精製工程が簡単なこと、(2)遊離の脂肪酸の影響を受けずエステルに変換できること、(3)使用する酵素の種類により、水分の存在の影響を受けないこと、(4)副生産物のグリセリンの pH は中性付近で回収・再利用が容易なこと、などの特徴を有しております。

リパーゼ酵素を使用する場合には、(1)微生物が分泌した酵素を回収して利用する方法（分泌酵素触媒法）と(2)微生物の細胞内に蓄積した酵素あるいは細胞表層に提示した酵素を微生物菌体のまま直接利用する方法（全菌体生体触媒法）とが開発されています（図 3 参照）。

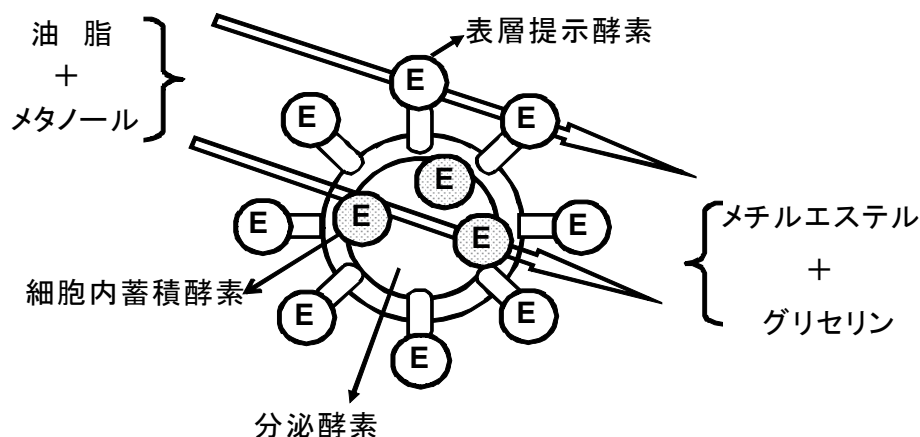


図 3 使用する各種酵素

3—1 分泌酵素触媒法

分泌した酵素を用いる場合の酵素生産は、微生物を培養後、培養液中に生産された酵素と微生物とを分離し、酵素を抽出、吸着、クロマト分離、晶析操作などによる精製を行います。さらに酵素を繰り返し使用するため、工業的には架橋法、包括法や共有結合法などの種々の固定化操作を行い固定化触媒として使用します。

分泌酵素を用いた代表的な研究例として、酵母 (*Candida antarctica*) 由来のリパーゼ酵素を固定化したノボザイム 435 (商品名: ノボザイムズ社製) を用いた例を挙げることができます。原料として、食用油の精製工程から排出されるアルカリ油滓由来の油分をバイオディーゼル燃料に変換させた場合、2L の回分式バイオリアクターにおいてエステルへの変換率が98%以上で100日以上連続使用も可能であることが報告されています。さらに、実用化への検討を行うために、30L スケールのパイロットプラントを用いた連続10回の繰り返し回分反応においても酵素活性の低下は見られず、エステルへの変換率98%以上が達成されております。

また、最近では、固定化酵素用で工業生産のためのパイロットプラントとして、**図4(A)**に示すような多段式連続カラムバイオリアクターが開発されました。



図4(A) パイロットプラント

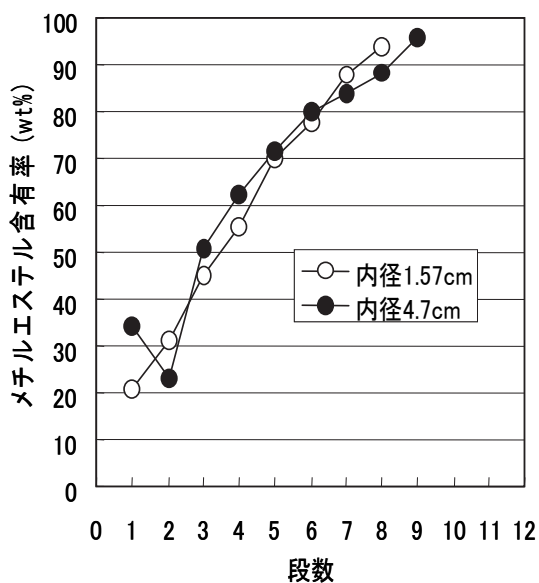


図4(B) パイロットによる実験結果

図 4 (B)のように、内径 4.7cm の触媒反応管を用いた場合、メチルエステル含有率は段数の増加に応じて上昇し、9 段目で 96 質量%にも達しております。同じ酵素充填率を有する内径 1.57cm の触媒反応管を用いた場合と比べても大きな差は見られず、スケールアップが可能であることが示されました。さらに、エステルへの変換率が 90%以上で長時間安定的に生産できることも証明されています。このバイオリアクターでは、副生産物のグリセリンも同時に分離・回収できることから新規な分離型バイオリアクターとしての機能も有しており実用化が期待されています。

3—2 全菌体生体触媒法

全菌体生体触媒は、図 3 に示すように、反応に用いる酵素を細胞内や細胞表層に蓄積あるいは提示させた微生物細胞を直接反応に用いる触媒のことを指し、微生物の培養後、菌体を回収して直ちに使用することができます。したがって、従来の分泌した酵素を用いる方法に比べ、複雑な精製工程や固定化工程を省略することが可能となりますので、経済的に有利な方法と考えられています。

3.2.1 糸状菌による全菌体生体触媒

3.2.1.(1) 糸状菌 *Rhizopus oryzae* 生産リパーゼ

糸状菌 *Rhizopus oryzae* が生産するリパーゼは、無溶媒および水分の存在下で油脂のメタノリシス反応を効率的に触媒することが証明されていますので、一定量の水や遊離脂肪酸の混在が発生する廃食用油などを原料とする場合にも有効と考えられます。筆者らは、リパーゼ生産能力の高い *R. oryzae* IFO 4697 株をポリウレタン製の多孔質担体 (Biomass support particles; 略称 : BSPs) に固定化させ、固定化菌体を直接リパーゼ酵素剤として用いる技術を開発しました。図 5 に示すように、*R. oryzae* は液体培養において菌糸を伸長させて生育し、BSPs と共存して培養する過程で、菌体は自発的に固定化されます。こうした培養操作で得られた固定化菌体は、ろ過などの分離操作を経て、固定化酵素と同じように反応に利用できます。

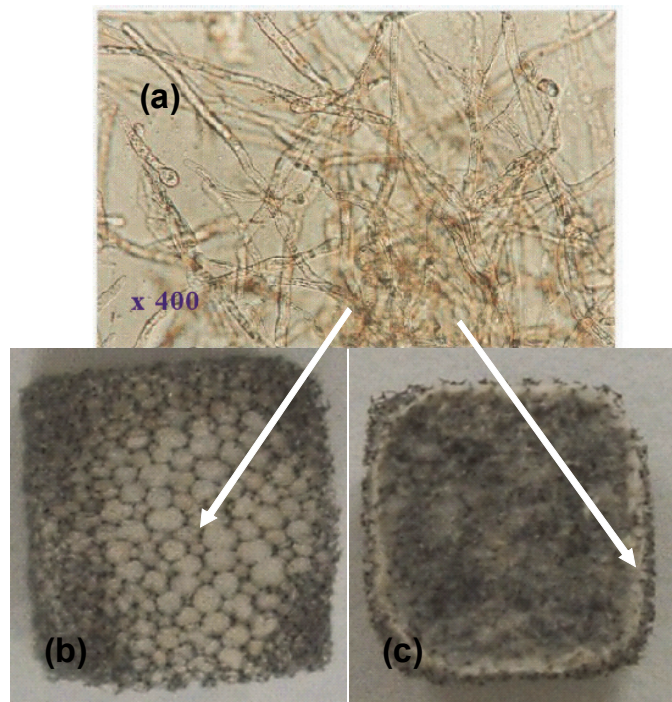


図5 (a) *Rhizopus oryzae* 菌体、(b) BSPs 表面、(c) BSPs 断面

固定化菌体のリパーゼ活性を高めるためには、培養液に添加する基質関連物質の種類が重要な因子で、オリーブ油やオレイン酸の添加が *R. oryzae* の菌体メタノリシス活性を向上させることが証明されております。こうして得られた菌体を、4-20% (w/w) の水を含む大豆油のメタノリシス反応の触媒に用いたところ、メチルエステル含有率は 80% (w/w) 以上の高い濃度にまで達しました。このように、本プロセスでは菌体と BSPs を加えて培養するだけで、高活性の固定化菌体が調製できますので省エネ型プロセスとして有利な方法と考えられます。

3.2.1.(2) *R. oryzae* の細胞におけるリパーゼの局在性

これまで多くの糸状菌リパーゼは、培養初期に細胞内で生合成され、一時的に細胞表面に留まった後、すみやかに細胞外へ放出される分泌型酵素であると考えられてきました。しかしながら、糸状菌の細胞を直接酵素剤として反応に用いる場合、リパーゼの菌体外への分泌を抑制し、いかにして菌体リパーゼ活性を高めるかが重要となり

ます。筆者らは、*R. oryzae* の培養条件の検討により、①菌体の BSPs への固定化や、②オリーブ油など基質関連物質の培養液への添加が、菌体メタノリシス活性を高めることを見出しました。以下では、各培養条件における *R. oryzae* が生産するリパーゼ (ROL) の種類の特定および ROL の局在部位などについて説明します。

R. oryzae の細胞を分画し、ウェスタンブロット法により解析した結果を図 6 に示します。培養時に BSPs を加えないサスペンション培養では、細胞膜画分に 31 kDa のリパーゼ (ROL31 と略します) のみが存在し、細胞壁および菌体外に 34 kDa のリパーゼ (ROL34 と略します) と ROL31 が存在することが分かりました。また、細胞壁における ROL34 の量は培養時間にほとんど影響を受けないのに対し、細胞膜画分の ROL31 は培養経時とともに著しく減少することも明らかになりました。

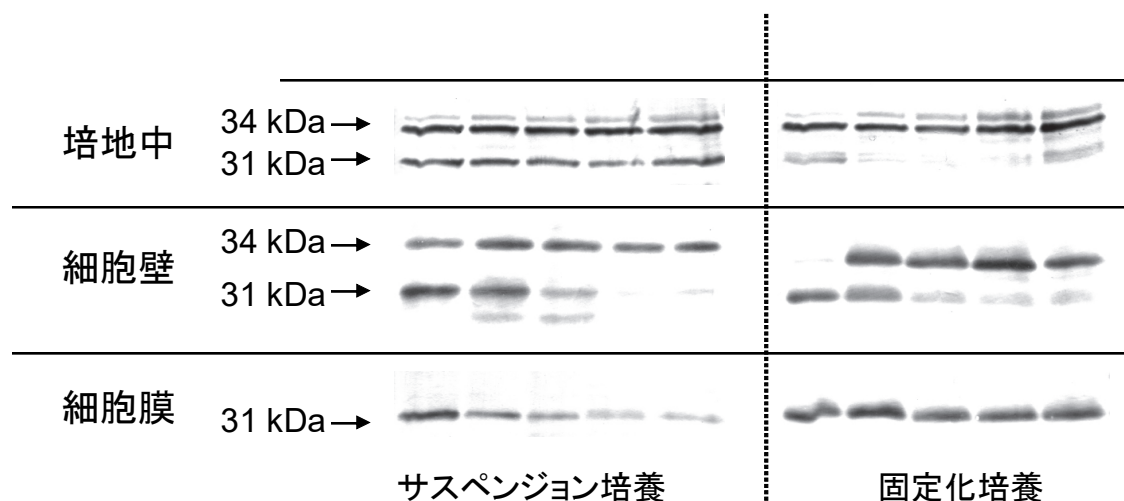


図 6 サスペンション培養 (左) および固定化培養 (右) での菌体外、細胞壁、細胞膜による *R. oryzae* リパーゼのウェスタンブロット解析

一方、菌体を BSPs に固定化させて培養した場合には、培養後期においても著量の ROL31 が細胞膜に存在し、菌体外では、ROL34 が大量に分泌されているのに対し、ROL31 の分泌は強く抑制されています。このような結果から、*R. oryzae* は少なくとも 2 種類のリパーゼ (ROL31 と ROL34) を生産し、菌体の BSPs への固定化操作は、

細胞膜に局在する ROL31 の菌体外への分泌を抑制することが明らかとなりました。

さらに、細胞膜局在型 ROL の量とメタノリシス活性の相関性を検討した結果、細胞膜の ROL31 の量と菌体の比メタノリシス活性との間には正の相関性が存在することも分かりました。このようなことから、*R. oryzae* の菌体メタノリシス活性には、細胞膜に局在する ROL31 が重要な役割を担っていることが分かりました。

3.2.1.(3) バイオリアクターを用いた BDF 生産

全容量 20L のエアリフト型培養装置を用いて *R. oryzae* を培養して得られた BSPs 固定化菌体を分離回収し、この菌体をカラム内に充填した充填層型バイオリアクターによって繰り返しのメタノリシス反応を行いました。結果として、1 サイクル目において 90% (w/w) を越える高いメチルエステル含有率を示し、10 サイクルの繰り返し反応においても 80% を維持できました。しかしながら、繰り返し反応においてメチルエステルの含有率は徐々に低下し、反応液中にモノグリセリド (MG) およびジグリセリド (DG) のような中間生成物が蓄積してくることが分かりました。

3.2.1.(4) 部分グリセリド特異的リパーゼによる BDF 生産

中間生成物の蓄積を低減させ、メチルエステル含有率の高い反応系を構築させるために、MG および DG に特異的なリパーゼを開発することにしました。*R. oryzae* 由来のリパーゼ (ROL) は、トリグリセリド (TG) 型リパーゼと言われるリパーゼで、TG、DG、MG に作用します。また ROL は、1,3 位置特異性を有しておりますが、2 位のアシル基が転移反応により 1,3 位に転移しますので高い反応率が得られます。

一方、*Aspergillus oryzae* 由来のリパーゼ (mdlB) は MG、DG 型リパーゼと言われるリパーゼで TG にはほとんど作用しないのですが、MG、DG に対して位置に関係なく特異的に作用し速やかに反応します。したがって、これらのリパーゼを組み合わせることにより、より高いメチルエステル含有率の BDF を生産することができます。具体的な操作法ですが、*A. oryzae* が持っている mdlB 遺伝子を過剰発現させるため、プロトプラスター-PEG 法を用いて *A. oryzae niaD300* 株に導入し形質転換しました。得

られた形質転換体は、ROL の場合と同様に BSPs と共にエアリフトで固定化培養により固定化菌体を回収し反応に用いました。図 7 に mdlB の基質特異性を検討した結果を示します。TG を基質に用いた場合、反応はほとんど進行しておらず、24 h では反応率は 5 wt%にも達しませんでした。これに対し、基質に MG、 DG を用いた場合には、24 h 後の反応率がそれぞれ 16 wt%、23 wt%程度に達することから、mdlB が MG および DG に特異的に作用することが確認できました。

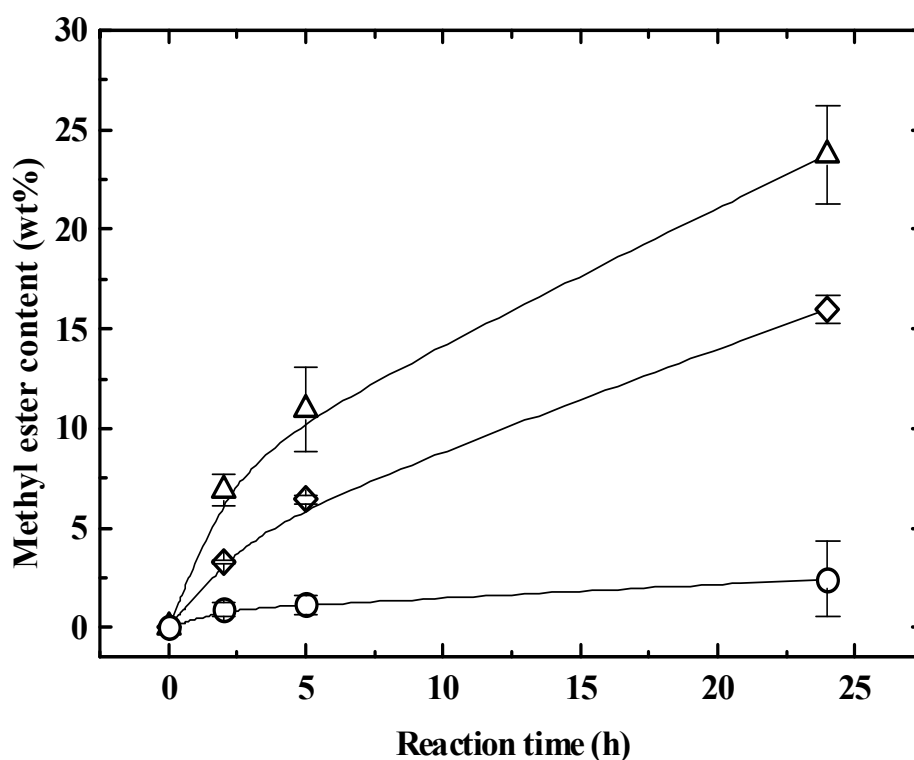


図 7 mdlB の基質特異性 ; (△)モノオレイン、(□)ジオレイン、(○)トリオレイン

続いて、ME 含有率が 82wt%の中間生成物を原料としてメタノリシス反応を行った結果を図 8 に示します。図よりわかりますように、MG、 DG 含有率が速やかに減少し、それに伴い ME 含有率が増加しているのが確認できます。MG, DG 量は反応 5 時間後にはそれぞれ GC 検出できないほど減少し、ME 含有率も反応 24 時間後には約 95wt%の高含有率を達成しました。一方、mdlB は TG に対してほとんど作用しないので、TG 量は反応を通してほとんど変化しませんでした。

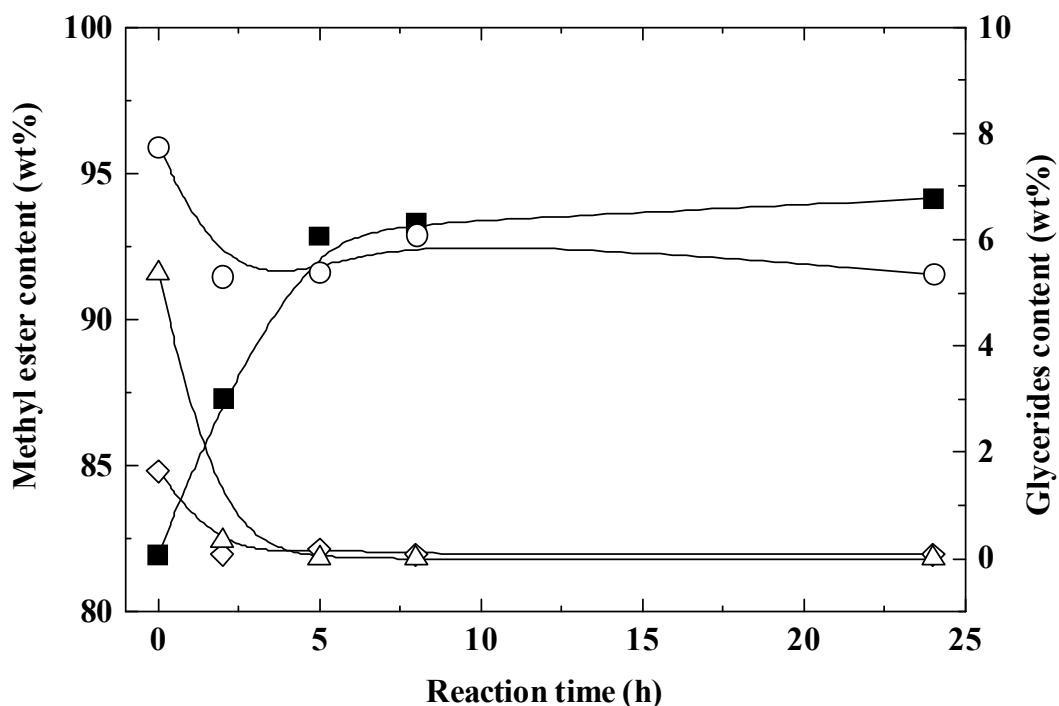


図8 中間生成物を原料としたメタノリシス反応結果；(■)メチルエステル、(△)MG、(□)DG、(○)TG

最後に、2本のカラムリアクターを用いた繰り返しメタノリシス反応を行った結果を図9に示します。ROLとmdlBを混合し、mdlBでMGおよびDGを、ROLでTGを反応させる2段階の反応系を検討しました。すなわち、ROLのみを充填したカラムで反応させた後の反応液を、ROLとmdlBを充填した2本目のカラムでさらに反応させるシステムを採用しました。最初のカラムで48h反応させた後、反応液を取り出し、2本目のカラムでの反応に移します。反応時間はそれぞれ48時間および24時間の合計72時間1サイクルの反応としました。

最初の反応では各サイクル80wt%程度（記号：ひし形）だったのですが、2本目の反応において90wt%を大きく超えるME含有率を達成しました。10サイクルの反応後においても、95wt%という著しく高いME含有率が得られました。

このような結果から、ROLおよび(ROL+mdlB)を充填した二段階反応システムが工業的BDF生産に適していると考えられます。

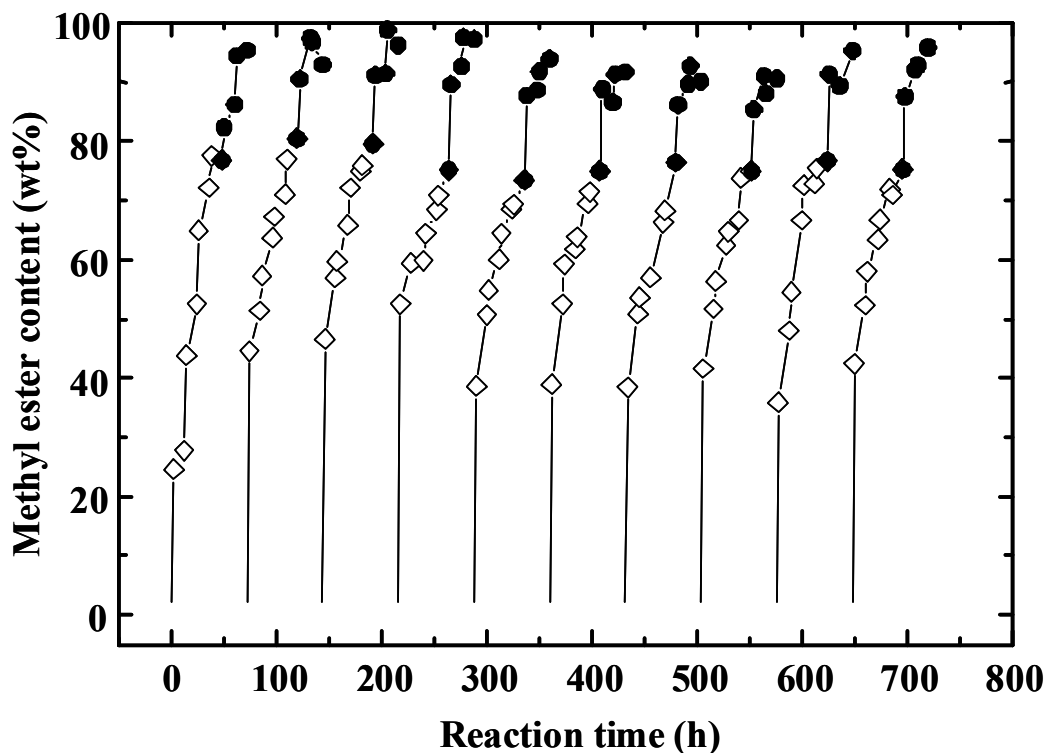


図9 二段階反応システムによる繰り返しメタノリシス反応

3.2.2 表層提示酵母による whole cell biocatalyst

細胞表層（細胞壁、細胞膜）は細胞の構造や形態を維持し、細胞や外界との隔離をするだけでなく、物質の認識やシグナルの伝達、酵素反応などの場として重要な役割を果たしています。この細胞表層のタンパク質と種々の機能性タンパク質やペプチドなどを融合させ、細胞表層に提示させることにより、新しい機能を持った細胞を創製することができます。このような微生物は、「アーミング微生物」と呼ばれており、種々の分野での応用が期待されています（図10）。筆者らは、バイオディーゼル燃料生産用として、*R. oryzae* IFO4697由来のリパーゼ酵素（ROL）を提示した酵母を用いました。

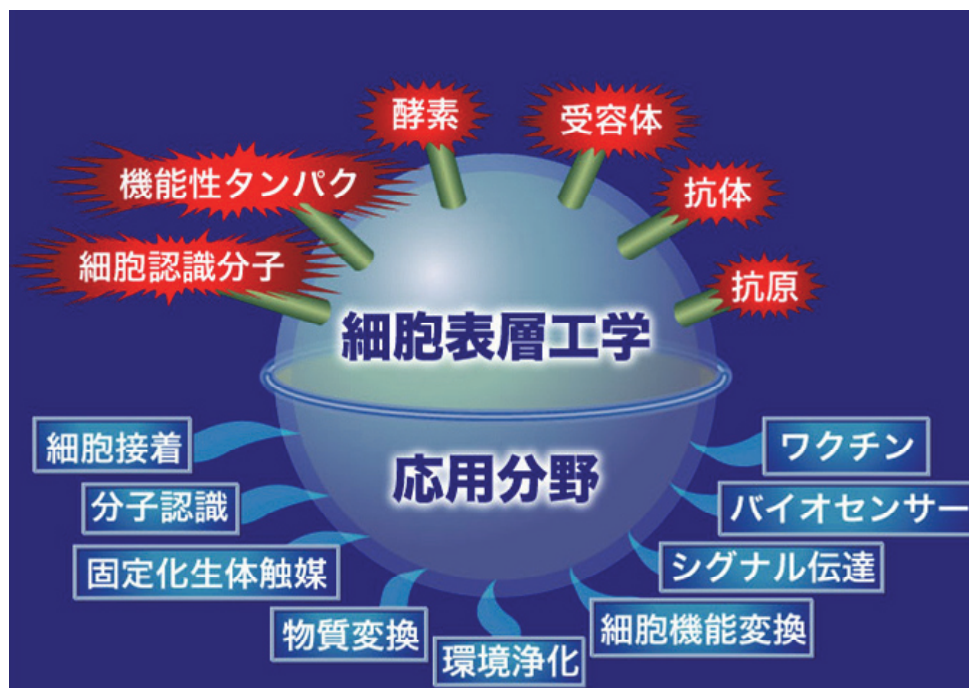


図 10 アーミング微生物と応用分野

3.2.2.(1) 表層提示用プラスミドおよび宿主酵母

ここで用いた提示用タンパク質である酵母の凝集性機能ドメインをコードした遺伝子 Flo1p を図 11 に示します。Flo1p タンパク質の長さの影響を検討するため、アミノ酸残基 1-1099 (FSPProROL) および 1-1417 (FLProROL) をコードする 2 種類のドメインを用いました。この場合、ROL 遺伝子の N 末端側が Flo1p タンパク質の C 末端側と結合され融合遺伝子が構築されることとなりますが、ROL の活性部位が C 末端側に存在しますので、Flo1p は ROL 提示用として有効なアンカータンパク質と考えられます。一方、従来より、酵母の表層提示用アンカータンパク質として α -アグルチニンがよく用いられていますが、この場合は ROL 遺伝子の C 末端側と Flo1p とが結合されるので酵素の活性は低いことが確認されています。

また、表層提示用プラスミドは図中 (B) に示す *pWIFSPProROL* および *pWIFLProROL* をそれぞれ使用し、いずれも分泌シグナルシーケンスを有していますが C 末端側の GPI アンカー付着シグナルは欠損しております。

宿主酵母は *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 (*MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3*) を用い、

SDC 培地 (2%カザミノ酸を含む SD 培地) にて培養後、回収した酵母によりメタノリシス反応を行いました。

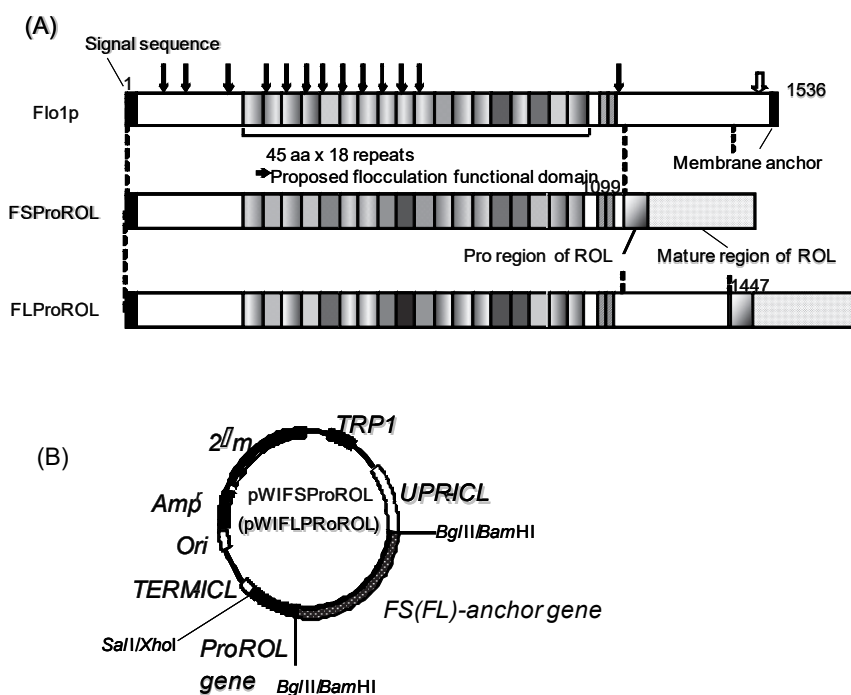


図 11 (A)表層提示用アンカータンパク質 Flo1p と FSPProROL および FLProROL 遺伝子の配列、(B)酵母発現用プラスミド

3.2.2.(2) 表層提示酵母によるメタノリシス反応

FSPProROL および FLProROL を表層提示した酵母を用いて、大豆油に対して 3 モル当量のメタノール逐次添加によるメタノリシス反応を行った場合の結果を図 12 に示します。FSPProROL および FLProROL の場合、72 時間後のメチルエステル含有率はそれぞれ 78.6%および 73.5%に達しました。また、FSPProROL の場合、初期速度を基準にしたメチルエステル生産性は 3.2 g-メチルエステル/L/min に達し、分泌酵素を用いた場合とほぼ同程度の高い水準となりました。従来の α -アグルチニンをアンカータンパク質として用いた場合、酵素活性は 4.1 IU/g-乾燥菌体と低い数値でしたが、FSPProROL および FLProROL のいずれの場合も酵素活性は 60 IU/乾燥菌体以上に達し、約 15 倍も増加しております。

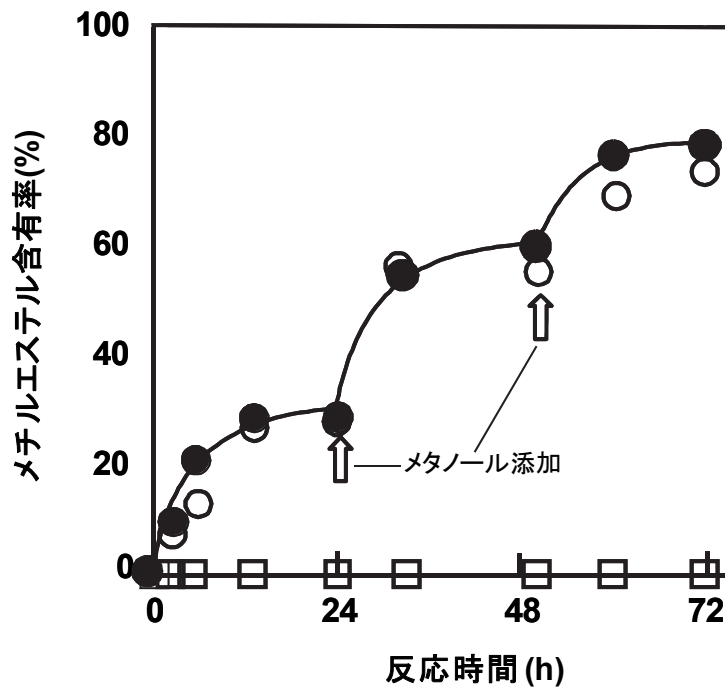


図 12 表層提示酵母によるメタノリシス反応

(●) *S. cerevisiae* MT8-1/pWIFSPProROL; (○) *S. cerevisiae* MT8-1/pWIFLProROL;
 (□) *S. cerevisiae* MT8-1/pWI3(対照)

以上のことから、Flo1p を表層提示用アンカータンパク質として用いた場合、C 末端側に活性部位のある ROL 酵素は高い活性を示し効果的なメタノリシス反応が可能であることがわかりました。

4. おわりに

地球温暖化防止対策として脱化石燃料社会の構築が急がれております。このため、バイオディーゼルやバイオエタノールなどのバイオ燃料のみならず、従来石油など化石資源から製造されていた一般化学汎用品などをバイオマス資源から製造する「バイオリファイナリー研究」が大変注目されています。ここで述べましたバイオディーゼル燃料もその一つとして、効率のよい安価な製造方法の確立が要求されており、実用

化を目指した取り組みを行ってゆきたいと考えております。

ところで、神戸大学では、脱化石燃料社会の構築のための技術確立を目的として、2007年に「統合バイオリファイナリーセンター」を大学のキャンパス内に設立し、産・学・官連携による新しい研究体制を整えました。今後の積極的な活動を図る予定ですが、皆様のご協力をお願いする次第です。

参考文献

- 1) Fukuda, H., A. Kondo and H. Noda: Biodiesel fuel production by transesterification of oils (REVIEW), *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 405-416 (2001)
- 2) Kaieda, M., T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtsuka, E. Izumoto and H. Fukuda: Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent, *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 627-631 (1999)
- 3) 福田秀樹: 「リパーゼ法」, バイオディーゼルのすべて (株式会社 アイピーシー 発行) ,95-110 (2006)
- 4) 福田秀樹: 「全細胞生体触媒によるバイオディーゼル生産」, バイオ液体燃料 (株式会社 エヌ・ティー・エス発行) , 306-314 (2007)
- 5) Hama, S., S. Tamalampudi, T. Fukumizu, K. Miura, H. Yamaji, A. Kondo and H. Fukuda: Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production, *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 328-333 (2006)
- 6) 「酵素法による連続式バイオディーゼル燃料の生産」 特願 2007-323381