クリーンエネルギー（バイオディーゼル燃料）

Production of biodiesel fuel as clean energy

神戸大学大学院自然科学研究科
福田 秀樹 Hideki FUKUDA

Key words: biodiesel fuel; methanolysis; lipase; whole cell biocatalyst; cell surface engineering

はじめに

最近、植物油およびその廃食油とメタノールとの反応（メタノリシス反応と呼ぶ）により得られるメチルエステルはバイオディーゼル燃料としてその利用が期待されている。バイオディーゼル燃料は、酸性雨の原因となる硫黄酸化物(SO_x)がほとんど発生せず、バイオマス資源由来であるため、炭素および水素以外に酸素が含まれることから、黒煙が軽油に比べて少なくなり、排気ガスのクリーン化といった効果が得られる。軽油と比較して若干発熱量は低下するが、走行にはほとんど問題なく、性状も軽油と似ており、軽油の強制規格基準をほぼ満足している。このような利点から、すでに欧州、米国、日本などで実用化され、ディーゼル燃料に5～50%添加する形で普及し始めている。

現在、バイオディーゼル燃料は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使用する方式が採用されているが、アルカリ触媒法は、触媒コストは安価な利点を有する反面、①生産物の精製のために多段階の水洗が必要、②遊離脂肪酸の除去が必要、③副生産物のグリセリンの回収が困難、などいくつかの課題を残している。筆者らは、このような欠点を克服できる生産方式として固定化菌体および細胞表層提示酵母を直接リパーゼ酵素触媒（“whole cell biocatalyst”と呼ぶ）として利用する方式を検討してきた。ここでは、酵素の生産プロセスが簡単な“whole cell biocatalyst”について簡単に解説したい。

1. 固定化菌体によるメタノリシス反応

カビの一種である *Rhizopus oryzae* IFO4697 菌体内酵素を“whole cell biocatalyst”として用いる場合、ポリウレタンフォームの多孔質担体（biomass support particles, 略称 BSPs と呼ばれる^{1)~3)}）による固定化法が可能となり、培養の過程で微生物の固定化が自然に行われ、得られた固定化菌体は直接酵素剤として反応に使用できるのでプロセスが大幅に省略でき酵素製造コストの低減が図れる。

固定化菌体内のリパーゼ活性を高めるためには、培養基質中に添加する基質関連物質の種類・添加量および回収した固定化菌体の細胞処理法が重要な因子となる。基質関連物質としては、オリーブオイルおよびオレイン酸の添加が無添加の場合に比べ、メチルエステル変換率を向上させるが、グルコースの添加はほとんど効果のないことを明らかにした。また、有機溶媒による細胞膜処理は必要でなく、固定化菌体は無処理の方が好ましいことも示した⁴⁾。

このようにして調整された固定化菌体を用いて6回の繰り返し使用した場合の結果を図1に示す。反応は、容積50 mL 瓶を用い、1回の反応サイクル(72 h)において大豆油9.65 g, メタノール0.35 g (3回の逐次添加)、温度35℃、水分濃度15%の条件下で実施した。グルタルアルデヒド(GA)による架橋処理した場合(条件: GA 水溶液濃度: 0.1%, 温度: 25℃, 浸漬時間: 1時間)、各反応サイクルにおける初速度は初期の場合とほとんど変わらず活性の低下が見られなかった。また、反応液中のリパーゼ酵素の漏出をSDS-PAGEにより分析した結果、架橋処理した場合ではほとんど検出されず漏出は認められなかった。このことから架橋処理した固定化菌体は“whole cell biocatalyst”として利用でき、多数回の繰り返し反応に対しても安定していることが確認された⁴⁾。

図1 固定化菌体を用いた繰り返し反応
(●) 架橋処理をした場合; (○) 未処理の場合

図2 Flo1 タンパク質の構造および発現ベクター

2. 細胞表面提示酵母によるメタノリシス反応

細胞表面（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る．この細胞表面のタンパク質と種々の機能性タンパク質やペプチドを融合させ，細胞表面に提示させることにより，新しい機能をもった細胞を創製することができるので，細胞表面工学として積極的な研究がなされている．酵母細胞表面提示には，GPI（グリコシルフォスファチジルイノシトール）アンカー付着シグナルをもち，グルカン層に共有結合して表面に局在するタンパク質が用いられ，その中でも主に性凝集性 α -アグルチニンでの研究例が多い^{5)~9)}．しかしながら，*R. oryzae* 由来のリパーゼはC末端側近傍に活性部位を有するため， α -アグルチニンによる方法では表面提示が困難である．そこで，筆者らは，凝集タンパク質のFlo1の糖鎖結合ドメインを用いて，リパーゼ酵素のN末端側で表面提示することを試みた．

図2にFlo1タンパク質の構造および発現ベクターを示す．筆者らは，UPR-ICL（イソクエン酸リアーゼ）プロモーターを用いて，Flo1のC末端側に*R. oryzae* 由来のリパーゼを融合させた形で発現させる2種類のプラスミド

図3 リパーゼ表面提示酵母を用いたメタノリシス反応

(pWIFSProROL および pWIFLProROL) を構築した．これを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1 に形質転換し発現させた結果，細胞表面へのリパーゼの局在性は，いずれのプラスミドにおいても蛍光抗体染色による顕微鏡観察によって確認できた¹⁰⁾．

このようにして得られた表面提示酵母の加水分解活性は，FSPProROL および FLProROL の場合それぞれ 61.3 IU/g-cell および 28.0 IU/g-cell に達し，従来の α -アグルチニンを用いた場合に比べ数十倍もの高い数値が得られ

た。次に、表層提示酵母 (0.3 g) を大豆油 9.65 g, メタノール 0.35 g (計 3 回の添加), および 1 mL 酢酸バッファーの反応液に混合し、回分によるメタノリシス反応を行いメタノリシス反応特性を検討した (図 3)。FSProROL および FLProROL 提示酵母においては、72 h の反応においていずれも 75~80% の高い反応率が得られ、*R. oryzae* の場合とほぼ同等の反応速度に達していることが示された。一方、対照とした酵母では全く反応せず、表層提示されたリパーゼ酵素が効果的に反応を触媒していることが証明された¹⁰⁾。

以上のことから、細胞の表層にリパーゼを提示した酵母は“whole cell biocatalyst”としての利用が期待できる。

おわりに

バイオディーゼル燃料は、前にも述べたとおり再生可能資源を利用し、ディーゼル燃料よりも燃焼ガスがクリーンである。しかも、通常のディーゼルエンジンに必要なオーバーホールも必要でない。このような利点から、メチルエステルをディーゼル燃料として利用するバイオディーゼル燃料の開発は欧米を中心に進められており、欧州では軽油にメチルエステルを混合した燃料の販売やバイオディーゼル車が実用化され EU 全体の生産が 1999 年度で 80 万トンに達している。米国では、ディーゼル燃料にバイオディーゼル燃料 20% 添加した燃料「B20」を採用した車輪は、石油代替燃料車輛を購入したと同等と見なす旨が法制化され、すでにアリゾナ、デラウェア、アイオワ、オハイオ、

ミズリーの 5 州が採用を決定、国防省も採用を検討中である。さらに、大気汚染のみならずエネルギー安全保障などの観点から、2010 年までに輸入ディーゼル燃料の 30% をバイオディーゼル燃料で代替するとの目標を掲げている。

ここで示した“whole cell biocatalyst”法は、酵素の製造コストの大幅な低減化が可能で実用化が期待される。

- 1) H. Fukuda and H. Morikawa: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 15-20 (1987).
- 2) T. Nakashima, H. Fukuda, S. Kyotani, and H. Morikawa: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 441-448 (1988).
- 3) Y. Liu, A. Kondo, H. Ohkawa, N. Shiota, and H. Fukuda: *Biochem. Eng. J.*, **2**, 229-235 (1998).
- 4) K. Ban, S. Hama, K. Nishizuka, M. Kaieda, T. Matsumoto, A. Kondo, H. Noda, and H. Fukuda: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **17**, 157-165 (2002).
- 5) T. Murai, M. Ueda, H. Atomi, Y. Shibasaki, N. Kamazawa, M. Osumi, T. Kawaguchi, M. Arai, and A. Tanaka: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 499-503 (1997).
- 6) M. Ueda and A. Tanaka: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 125-135 (2000).
- 7) A. Kondo, H. Shigechi, M. Abe, K. Uyama, T. Matsumoto, S. Takahashi, M. Ueda, A. Tanaka, M. Kishimoto, and H. Fukuda: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 291-296 (2002).
- 8) H. Shigechi, K. Uyama, Y. Fujita, T. Matsumoto, M. Ueda, A. Tanaka, H. Fukuda, and A. Kondo: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **17**, 179-187 (2002).
- 9) Y. Fujita, S. Takahashi, M. Ueda, A. Tanaka, H. Okada, Y. Morikawa, T. Kawaguchi, M. Arai, H. Fukuda, and A. Kondo: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5136-5141 (2002).
- 10) Matsumoto, H. Fukuda, M. Ueda, A. Tanaka, and A. Kondo: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4517-4522 (2002).