

微生物由来のリパーゼを用いた植物油の BDF 化技術に関する検討

長岡技術科学大学 学生会員 ○坂本朝子
 長野県工業技術総合センター 戸井田 仁一
 長野工業高等専門学校 正会員 畠 俊 郎

1. はじめに

近年、二酸化炭素などの温室効果ガスによる地球温暖化対策としてバイオマスの有効利用に関する関心が高まっている。本研究では、その一つであるバイオディーゼルフューエル(BDF)に着目した検討を行っている。BDF は植物性油をメタノールと反応させメチルエステル化したものと定義される。本文では、触媒として微生物由来のリパーゼ(酵素剤)を対象とし、メタノールの比率や添加水分量がメチルエステル(脂肪酸メチル)生成に与える影響について検討した結果を報告する。あわせて、メタノール3段階添加法や菌体表面にリパーゼを保持する機能を付加した組換え微生物を用いた脂肪酸メチル生成実験の結果についても述べる。

2. 試験ケースの設定

本実験の試験ケースを表-1に示す。実験1, 2の手順は、それぞれの組成で38℃, 130rpmで振とう培養を行い、サンプリングは24時間後に行い0.5ml取り分け残りは廃棄した。実験3についてはメタノール3段階添加法を用いて、6, 14時間後にメタノールを1molずつ添加し、サンプリングを8, 16, 24時間後に行いそれぞれ0.5ml取り分けた。実験4については150時間連続試験を行った。これらサンプリングした試料はサンプル調整をし、ガスクロマトグラフで脂肪酸メチルの生成量を分析した。

表-1 試験ケースの設定

試験ケース	大豆油:メタノール	酵素溶液濃度	酵素剤
実験1	1:1	5%溶液0.5ml 1.25%溶液2ml	4種類の市販酵素剤 ¹⁾
実験2	1:0.67 1:1 1:1.5 1:2	5%溶液0.5ml	F-AP15
	1:1 1:1.5 1:2 1:3	1.25%溶液2ml	F-AP15
	1:1	1.25%溶液2ml	F-AP15
	1:1	—	—

3. 結果および考察

3-1. 実験1

微生物由来の市販酵素剤4種類を用い、酵素活性と水分量の違いによる脂肪酸メチルの収率を比較した。結果を図-1に示す。微生物由来の酵素製剤についても収率が異なることが明らかとなった。実験の結果から、酵素活性が高く、水分量の大小にかかわらず安定的に収率を得られる *Rhizopus oryzae* 由来のリパーゼ F-AP15 を以降の実験に用いることとした。

3-2. 実験2

実験1において有効性が確認された酵素製剤を用い、大豆油とメタノールのモル比率の変化が収率に与える影響の検証を行った。結果を図-2に示す。水分量が少ない場合は大豆油とメタノールの比率が1:1で高い収率を示した。

1) *Rhizopus oryzae* 由来のリパーゼ F-AP15, *Candida rugosa* 由来のリパーゼ AY「アマノ」30G, *Rhizopus niveus* 由来のニューラーゼ F3G, *Mucor javanicus* 由来のリパーゼ M「アマノ」10

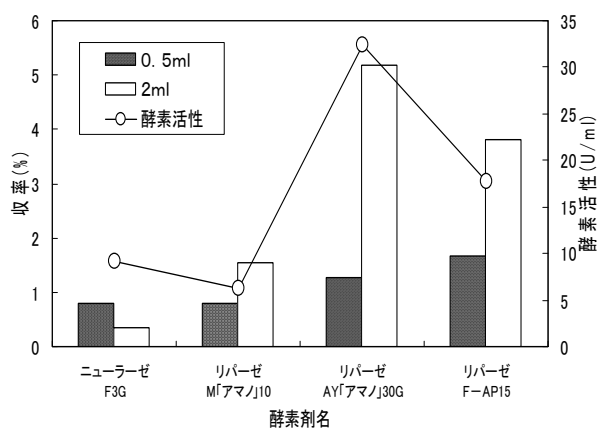


図-1 酵素活性および収率比較

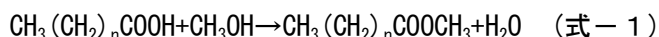
キーワード バイオディーゼル (BDF), メチルエステル化, リパーゼ, 酵素活性, 組換え微生物

連絡先 〒160-0004 長野県長野市徳間 716 長野工業高等専門学校 環境都市工学科 TEL 026-295-7096

しかしながら、水分量が増えた場合においては大豆油とメタノールのモル比率が 1:2 において最も収率が高かった。以上のことから、水分量と共にメタノール量を増やすことが大豆油からの脂肪酸メチル生成に大きく寄与すると考えられる。

3-3. 実験 3

遊離脂肪酸の生成抑制を目的とし、メタノールを段階的に添加することで脂肪酸メチルの収率を高めることが可能かどうかの検証実験を行った。メカニズムを式-1 に示す。



トリグリセリド(主成分:大豆油)1mol にメタノール 3mol を段階的に添加することで、遊離脂肪酸の生成抑制が期待できる。結果を図-3 に示す。メタノールを通常に 1mol 添加した場合よりも 3 段階に 3mol 添加の方が収率は上がることがわかる。

3-4. 実験 4

酵素剤の代わりに組換え微生物の利用が可能であるかの検証を目的とした脂肪酸メチル生成実験を行った。

実験には、*Bacillus subtilis* 168 を宿主として細胞表層に麹菌由来のリパーゼ活性を持つようにプラスミドを形質転換したものと、比較対象として大腸菌を宿主としてリパーゼ活性を持つようにプラスミドを形質転換した 2 種類の微生物を使用した。結果を図-4 に示す。麹菌由来のリパーゼ活性を付加した微生物により脂肪酸メチルの生成を確認することができるとともに、菌体表層にリパーゼを保持させる機能を付加した微生物の有効性を確認することができた。

4. まとめ

本実験で得られた知見は以下の通りである。

- ・ 酵素活性の高い微生物製剤については、水分の増加にあわせて収率増加が期待できる。
- ・ 大豆油よりメタノールのモル比率が高い場合においても、水分量を多くすることで酵素の失活は防ぐ効果が期待できる。
- ・ メタノールの段階的添加により、効果的な脂肪酸メチルの生成や反応時間の短縮が期待できる。
- ・ 微生物表層に麹菌リパーゼを局在させる機能を付加した微生物により少量の脂肪酸メチルが生成され、微生物を触媒として用いた場合においても脂肪酸メチル生成が可能であることが確認された。

参考文献：

- 1) Masaru KAIEDA, Taichi SAMUKAWA, Akihiko KONDO and Hideki FUKUDA: Effect of Methanol and Water Contents on Production of Biodiesel Fuel from Plant Oil Catalyzed by Various Lipases in Solvent-Free System, Journal of Bioscience and BioEngineering, Vol. 91, No. 1, pp. 12-15, 2001

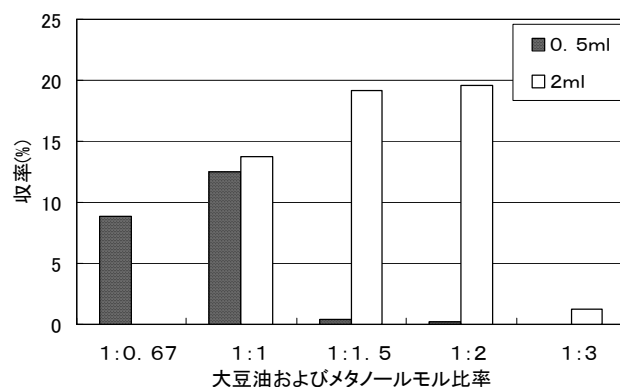


図-2 異なるモル比率による収率比較

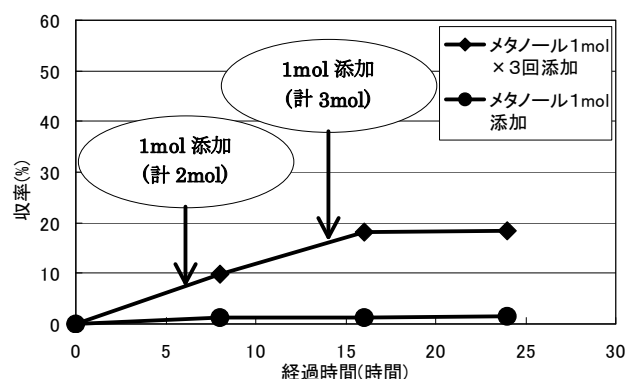


図-3 メタノール 3 段階添加による収率の推移

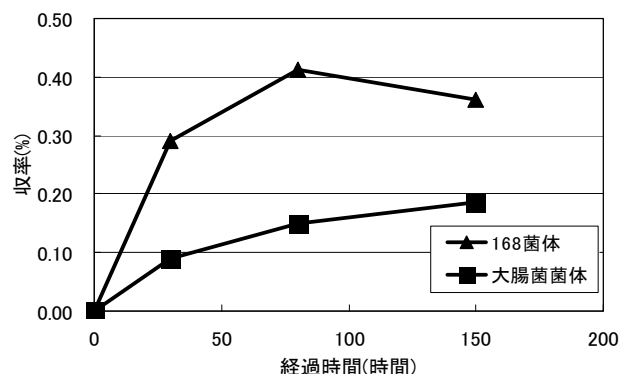


図-4 麹菌由来のリパーゼによる収率の推移