

麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた BDF 生産用各種リパーゼの高生産

和田 純平¹・坪井 宏和¹・坊垣 隆之¹・広常 正人¹・野田 秀夫^{2,3}・福田 秀樹⁴
¹大関株式会社 総合研究所・²関西化学機械製作株式会社・³Bio-energy 株式会社・⁴神戸大学
¹〒663-8227 兵庫県西宮市今津出在家町 4-9 電話: 0798-32-2169 Fax: 0798-34-7475 E-mail: junpei.wada@ozeki.co.jp

バイオマスの利用に関し、省エネルギーで生産でき、且つ高効率のバイオディーゼル (BDF) が注目されている。その製造法として、副生物グリセリンの汚染がない固定化酵素法が環境調和型プロセスとして注目されているが、酵素の価格が高く、活性が実用レベルに達していないことが課題となっている。我々は、BDF 生産に有用とされる *tg1A*, *mdlB* (共に *Aspergillus oryzae* 由来)、*FHL* (*Fusarium heterosporum* 由来)、*CALB* (*Candida antarctica* 由来) の 4 種のリパーゼについて麹菌タンパク質高発現システムを用い、生産性の向上を試みた。また、得られたリパーゼ高生産株に対し γ 線照射による突然変異導入を試み、更に生産性の向上した株を取得した。

1. はじめに

温暖化ガス排出量の増大に基づく地球温暖化の防止に向け、バイオマスを利用したエネルギー開発は社会的に強く求められている技術である。バイオエネルギーに関し、日本ではバイオエタノールの注目度が高いが、バイオエタノールより省エネルギーで生産でき、且つ高エネルギー効率のバイオディーゼル(BDF)もグローバルなバイオエネルギー供給の観点から重要である。ヨーロッパでは BDF 製造が活発に行われており、全世界の 90%以上を占めている。BDF 製造では原料の約 10%のグリセリンが副生するが、現在最も普及している均相アルカリ法による BDF 生産で副生するグリセリンは汚染されているため、有効な用途が無く、廃棄方法やその費用が問題化している。

そこで、均相アルカリ法以外の BDF 製造法として、固定化酵素法が環境調和型プロセスとして注目されている。この方法では副生物グリセリンの汚染が無く、二次利用が可能となる。更に穏和な反応条件、遊離脂肪酸の除去処理が不要な点でも均相アルカリ法より優れるが、反応速度の低さから実用化には至っていない。これは固定化酵素が高価であり、その活性が実用化レベルにまで達していないことに起因する。

このような背景から、今後の BDF 製造においては固定化酵素法の技術を向上させ、実用レベルで BDF 製造できる高活性固定化酵素を開発することが必要である。そこで本研究では、BDF 製造に有用とされる

Aspergillus oryzae 由来 triacylglycerol lipase (*tg1A*)、*A.oryzae* 由来 mono-,diacylglycerol lipase (*mdlB*)、*Fusarium heterosporum* 由来 lipase (*FHL*)、*Candida antarctica* 由来 Lipase B (*CALB*)の 4 種のリパーゼについて麹菌高発現システムを用いて生産性の向上を試みた。

2. 解析データおよび方法

(1) 麹菌高発現システム

転写活性化因子である *AMYR* や *HAP-Complex* が結合する転写活性化因子結合領域(*Region III*)を麹菌の解糖系酵素であるエノラーゼのプロモーター領域に複数個導入した発現ベクターを使用することで、転写効率を大きく向上させた。また 5'非翻訳領域を *Heat Shock Protein* のものに変更することで、mRNA からタンパク質への翻訳効率も高めた (図 1)。

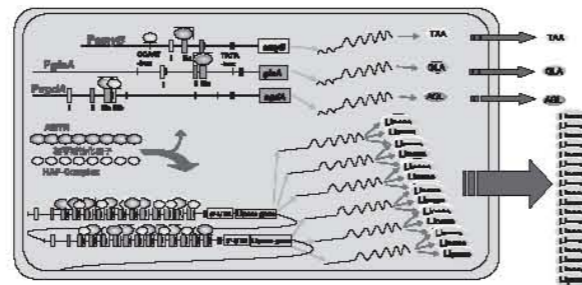


図 1、麹菌高発現システムの概要

(2) 各種リパーゼ高生産株の取得

前述の高発現ベクターに各種リパーゼ遺伝子を導入し、麹菌を形質転換後、得られた形質転換体より高生産株のスクリーニングを行った。pNPB を基質とした、リパーゼ加水分解活性による吸光度の変化率の大きさにより評価を行った。

(3) γ 線照射による突然変異導入

取得したリパーゼ高発現株のうち、特に有用性の高い *FHL* 及び *CALB* 高生産株に対して *Co60* 線源を用いた γ 線照射を行うことで、更なる生産能が付与された株のスクリーニングを行った。

3. 結果と考察

(1) リパーゼ高生産株の選抜

形質転換体を各リパーゼにつき 400 株以上取得し、スクリーニングを行った結果得られた高生産株の生産性の一例を以下に示す(図 2、図 3)。なお、導入コピー数はリアルタイム PCR により推定した。

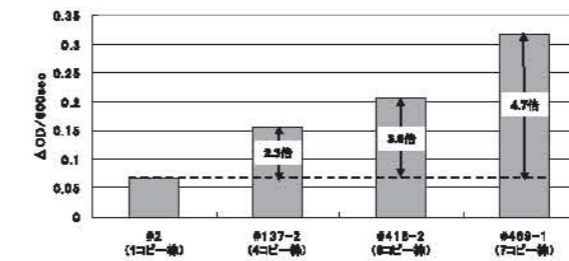


図 2、mdlB 高生産株活性測定結果

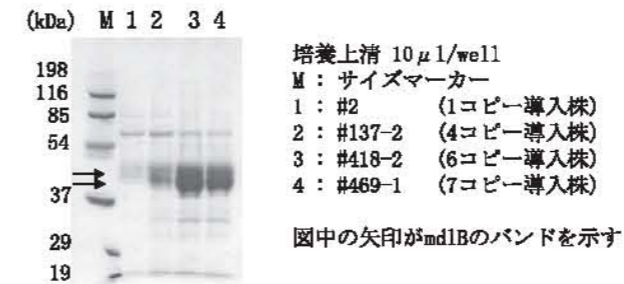


図 3、mdlB 高生産株生産性

結果、4 種のリパーゼについていずれも多コピー導入株を取得し、その活性値は各 1 コピー導入株と比べ、4 倍以上もの高い活性を示した。また、SDS-PAGE の結果、生産量も活性値に比例して増加しており、各種リパーゼが麹菌により高生産されることを確認した。

(2) リパーゼ高生産変異株の選抜

FHL 及び *CALB* 高生産株胞子に γ 線照射を行い、生育してきた株よりスクリーニングを行った結果 *FHL*、*CALB* ともに既存の高生産株の活性を上回る変異株を取得した。得られた変異株の生産性の一例を以下に示す。(図 4、図 5)

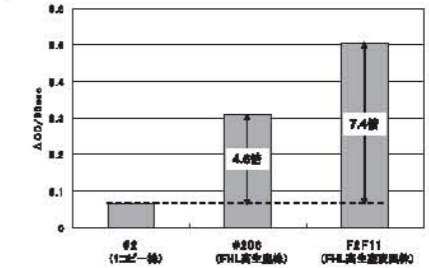


図 4、FHL 高生産変異株活性測定結果

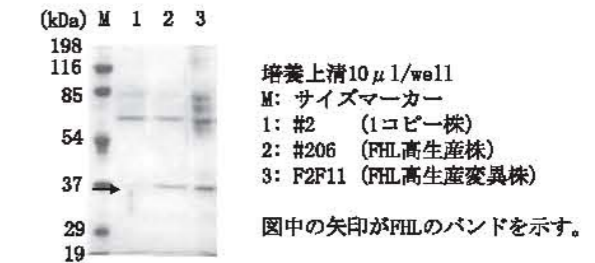


図 5、FHL 高生産変異株生産性

結果、*FHL* 及び *CALB* いずれにおいても、形質転換により得られた各リパーゼ高生産株を超える生産性 (1.4 倍〜) を示す変異株の取得に成功した。

4. 今後の展望

今回、4 種のリパーゼについて高生産麹菌の育種を試みた結果、多いものでは約 3g/L もの高い生産性を示す株を取得することができた。これら 4 種の高生産麹菌を全細胞生体触媒あるいは分泌リパーゼ固定化酵素として BDF 生産反応に供したところ、いずれも従来品より飛躍的に高い反応速度を示した。特に *CALB* 生産株に関しては、廃食用油からの高品質な BDF 製造に有効であることが分かった。今後、培養条件を検討することで更なる生産能の向上を目指す。このことから BDF 製造における大きなコストダウンが期待される。

また、酵素法での BDF 製造に伴い副生する汚染の無いグリセリンの利用として開発が進んでいる、バイオプラスチック用加剤などにも大きな期待がかかる。なお、本研究は近畿経済産業局「H20-21 年度地域イノベーション創出研究開発事業」の一環として実施した。