

SDGs に向けたパーム油産業からの排水・廃油の有効利用方法

荻野千秋（神戸大学大学院 工学研究科 応用化学専攻・教授）

研究の目的

パーム油は食品や化成品の原料として用途も広く、世界の植物油脂のなかで使用量は最大である。需要拡大に伴い生産量も拡大し、世界の生産量は約 6000 万トンに達し、世界最大の植物油脂資源となっている。粗パームオイルを製造する工程では、滅菌工程、圧縮分離工程や油分分離工程から発生する油中の水可溶分や比重の大きい懸濁固形分が洗浄水と共に廃棄される。この **Palm Oil Mill Effluent (POME)** と呼ばれるパーム油廃水は、生産された粗パームオイルの 2.5 倍から 3.5 倍も排出されている。この搾油工場で発生した廃水は、ラグーンと呼ばれる嫌気性処理池、好気性処理池等で構成される開放池で処理され、最終的に河川へ排出されている（図 1）。ラグーンでの処理の際、炭酸ガス、メタンなどのバイオガスを大量に大気放散しており、地球温暖化への影響が懸念される。この POME には糖質やオレイン酸やパルミチン酸などの脂肪酸が多く含まれており、POME の処理技術と共にその再利用技術の開発が望まれている。



図 1 POME を処理するラグーン
メタンガスの自然発生が問題となっている

一方、パーム油を絞る際には、パーム椰子の空亡(実を覆っている植物繊維の部分)が著量に廃棄されており、パーム椰子空果房 (EFB: Empty Fruit Bunch) と呼ばれている。しかし、EFB に関してはそのほとんどが燃焼利用されているのみであり、それ以外の有効な利用方法は提案されていないのが現状である。燃焼利用されない多くの EFB は、農地に廃棄され、嫌気発酵の温床となっているのが現状である。このようにパーム産業においては、環境汚染の防止を指向したその廃液・廃材の処理技術が開発されてきた一方、その廃材廃液を再利用する技術が十分に開発されていない現状がある。

そこで本研究では、パーム産業にて排出されるこれらの残渣の有効活用方法を、生物学的資源を用いて、新しい価値を有する循環型資源へと変換することを目指す。パーム産業で大きな環境問題となっているパーム製油廃水(POME)と油分抽出後の農業残渣に着目する。微生物学的アプローチによって、PKC は機能性オリゴ糖、農業残渣 (パーム椰子房 (EFB)) はバイオエタノール、そして、POME はバイオディーゼル燃料へと変換する。そして、生産したバイオ燃料の発電用燃料としての機能評価と、環境改善効果の程度について総合的な評価を実施する。

内容・手法

申請書に基づき、以下の内容を実施した。

(1) 酵素法による PKC からの機能性オリゴ糖生産

パーム油を搾油した後の残渣であるパーム核粕 (Palm Kernel Cake: PKC) はグルコマンナン (マンノースがポリマー化されたもの) を多く含んでいる。近年、グルコマンナンやその分解物であるマンノースは、胃の中で水を吸って何十倍にも膨れるためダイエットに有効とされる。更には便秘解消や血糖値、血中コレステロールの低下にも効果があると言われている。そこで本研究項目では、パーム油残渣 PKC よ

りマンノースを効率的に生産する酵素変換技術を確立する。

PKC 分解酵素の探索：生物学的に PKC を分解可能とする酵素群の探索を行う。酵素探索用のライブラリーとして、研究室に所有している約 1500 株の放線菌ライブラリーを使用する。本来、放線菌は酵素資源の宝庫として認識されており、更には食文化にも古くから組み込まれている生物種であり、安全性は担保されている。この放線菌ライブラリーを使用して、PKC を唯一の炭素源とする培養を行い、探索を実施する。このライブラリー中で PKC を有効活用して生育可能な放線菌を同定し、その遺伝子情報を単離することを旨とする。

(2) 酵母を用いた EFB からバイオエタノール燃料生産

パーム油搾油で最も大量に廃棄されるのが、果実が外れた後の果房の EFB (Empty Fruit Bunch : 空果房) であり、肥料として農園に戻されるか、ボイラで焼却されているのが一般的である。しかしながら、搾油工程の初段階で高温処理を行うために、EFB には多くの水分を含んでおり、その残渣からは悪臭 (メタンガスなど) の問題があり、ボイラでの燃焼にも水分除去と言った問題が存在する。一方で、EFB はリグノセルロースであり、セルロースやヘミセルロースを著量含んでいる良質のバイオマス資源でもある。本研究項目では、EFB 中に存在するセルロースとヘミセルロースを効率良くグルコースとキシロースへと分解し、酵母菌によってエタノールへと変換するシステム構築を目指す。

EFB の物理的前処理：EFB は他のバイオマスと同様で、非常に強固な結晶構造を有している。一般的には、この構造を壊す (前処理) ために硫酸が用いられている。しかしながら、硫酸処理では、その語の中和処理が必要であり、工程が煩雑である。我々はこれまでに、有機酸 (マレイン酸) を硫酸に替わって用いる事で、同等以上の前処理効果が有ることが明らかとなっている。そこで初年度は、EFB を原料として、マレイン酸処理を施すことで、EFB の構造破壊を試みる。特に、前処理における温度、濃度、処理時間等を詳細に解析する。そして、その分解状況を GC-MS や HPLC にて解析を行う。

(3) 酵素法による POME からバイオディーゼル燃料生産

POME はパーム油の搾油工程で大量に発生する廃水である。一般的にこの廃水処理には、長時間を必要とし、メタン発酵などの悪臭発生が伴う。その為に、地域住民の健康被害にも大きく関係し、迅速な環境改善が望まれている。この POME には、油分や遊離脂肪酸が多く含まれており、これら成分が悪臭発生の原因となっている。そこで本研究では、POME 中の油分と遊離脂肪酸を、酵素 (リパーゼ) を用いて代替燃料として利用可能なバイオディーゼル燃料へと変換する事を目指す。

POME 油分と遊離脂肪酸の酵素変換に適したリパーゼの探索：一般的に、リパーゼ酵素、油、そしてメタノールを混合し、37°C 付近で酵素反応を行う事で、メチルエステルと言われるバイオディーゼル燃料が酵素変換される。しかしながら、POME 中には、油分 (油、トリグリセリド) と遊離脂肪酸が混在する。従って、この両者に対して酵素反応を可能とするリパーゼ酵素の探索を行う。前述の放線菌ライブラリーを用いて、POME に対して酵素変換反応を可能とする、リパーゼ酵素を探索する。具体的にはそれぞれの放線菌株を、POME を炭素源として用いて培養し、その培養上清を酵素源とする。そして、POME、メタノール、そして酵素溶液を混合する事で変換反応を行い、バイオディーゼル燃料の生産を確認する。

成果

(1) 酵素法による PKC からの機能性オリゴ糖生産

機能性オリゴ糖を生産する放線菌のスクリーニングにあたって、研究室保有の放線菌株に対してスクリーニングを行った。具体的には、放線菌培養後の培養上清を用いた前培養の後に、実バイオマス入りの最小液体培地で本培養を行った。その培養上清を3段階からなるスクリーニングで選抜を行った。第一に、カルボキシメチルセルロースを含むプレート上でのセルラーゼアッセイを行った(図2(A), (B))。第二に、カルボキシメチルセルロースを含むゲルあるいはキシランを含むゲルを用いて、SDS-PAGE法により酵素の分離(図2(C))、Congo red染色により分解能の確認を行った(図2(D), (E))。第三に、実バイオマスと反応させる糖化試験を行った。これらの3段階のスクリーニングにおいて、例えば酸性条件で実施することで効率的に評価可能であることや、多種のセルラーゼ、マンナーゼを分泌していることを見出し、スクリーニング手法として確立できた。

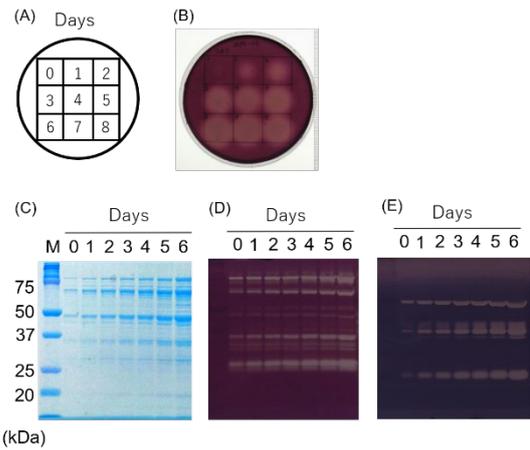
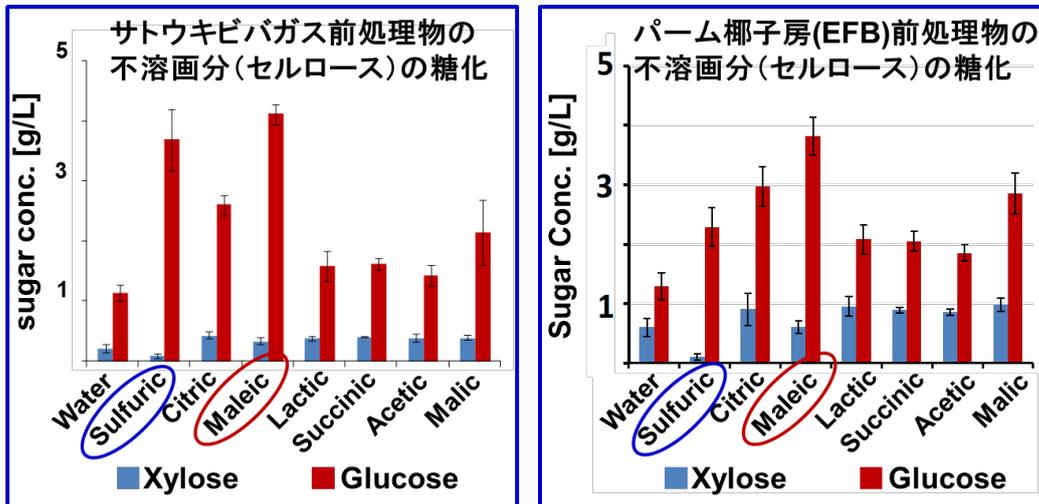


図2 スクリーニングの結果例

(2) 酵母を用いた EFB からバイオエタノール燃料生産

パーム由来の EFB を原料として、バイオエタノールを生産する際に必要とする原料の前処理を検討した。その結果、希硫酸前処理法に取って代わる新しい酸による前処理法の条件として、有機酸であるマレイン酸を見出し、その詳細な最適条件の確定を行うことができた。具体的には、一般的な希硫酸の前処理濃度である 1%と同じ濃度のマレイン酸を用いる事で、同等の前処理効果を得る事に成功した。また、処理温度も、比較的低温である 160°Cでの前処理を可能とすることに成功した(図3)。



(Pretreatment condition: $t = 45$ min; acid conc. 1% w/w; solid loading 7.5% w/w; $T = 160$ °C)

図3 各種有機酸によるバイオマス前処理結果

(3) 酵素法による POME からバイオディーゼル燃料生産

本研究では POME を原料とし、バイオディーゼル燃料へと変換するのに適したリパーゼ酵素に関して探索を行った。その結果、熱菌 *Thermomyces lanuginosus* 由来のリパーゼ TLL が有望であることが明らかとなった。

さらに、一般にバイオディーゼル生産に関わるエステル交換反応において、水は反応阻害剤であると考えられているが、POME とエタノールとの反応では、水を多分に含む 45vol%のエタノールを用いた場合であっても 80%以上の高い変換効率を有していた(図 4)。この成果は、これまでの理論に逆行する成果であり、非常に新しい知見である。酵素反応のエネルギー解析は、Wavefunction.inc のソフトウェアである Spartan'18 を用いた。各種脂肪酸と脂肪酸エステルとのエネルギー差を量子計算によって求めることで、本反応におけるエネルギー変化及び平衡定数を求めた。また、平衡定数から各エタノール濃度における収率の予測も行った。その結果、脂肪酸とエステルの間には約 10 kJ/mol のエネルギー差があり、このエネルギー差から平衡定数は 56 と求められ、実験データとの比較も行った。このエネルギー差及び平衡定数が原因となって、低濃度のエタノールを用いた場合であっても収率よくエステル交換反応が進行していたと考えらる。

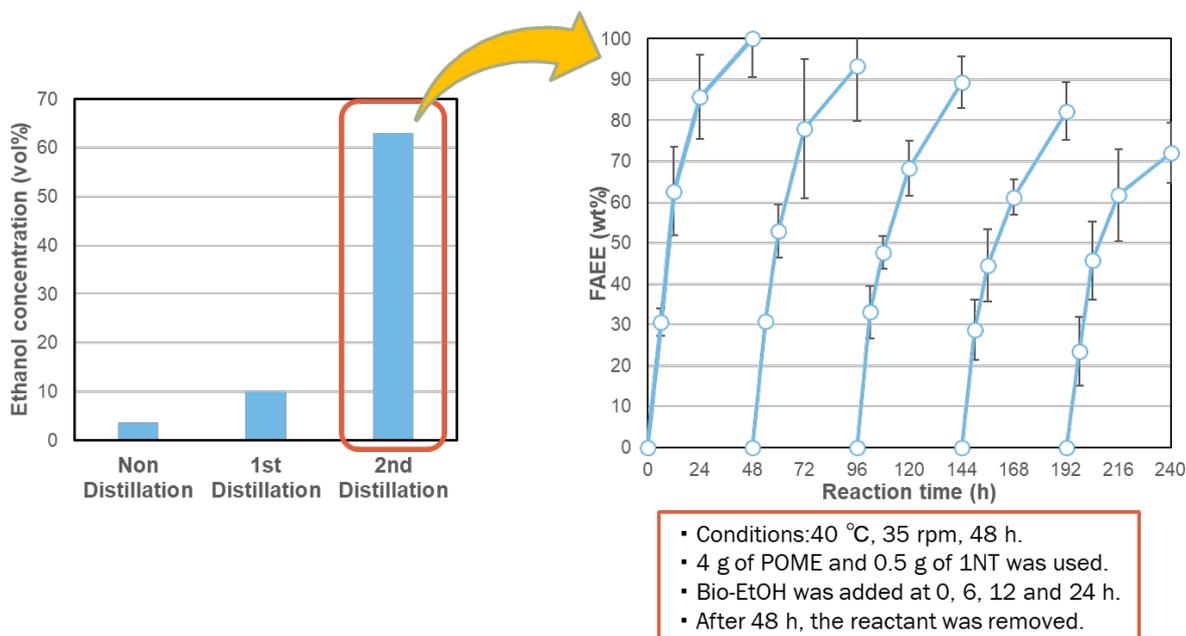


図 4 POME と希釈エタノールからのバイオディーゼル燃料生産

新たな知見

研究計画に則り、順調に研究を実施している。その中において、我々が考えていなかった新しい知見として、実施項目(3)において、希釈されたエタノールからのバイオディーゼル燃料生産がある。これまで、この反応においては、水分子は阻害要因として考えられてきたが、その概念の全く逆の事実が見いだされた。更には、その結果について、分子シミュレーションを行ったところ、その結果が理論的にも正しいことが明らかになり、非常に驚いている。現在、この結果については、論文投稿を行っており、査読審査中である。この研究成果は、パーム廃水中の POME を効率的にバイオディーゼル燃料へと変換する際に大いに寄与する新事実であると考えている。

今後の方向性や予定

申請計画に則り、2 年目は以下の項目を検討する計画である。

(1) 酵素法による PKC からの機能性オリゴ糖生産

PKC 分解酵素の発見：初年度のグルコマンナン文化酵素（複数）の単離・同定より、遺伝子配列情報が確定する。次年度は、その遺伝子情報を活用して、酵素の大量生産系の構築を目指す。これまでに、我々

は放線菌での分泌生産系の構築に成功しており、大量のタンパク質（マンノース分解酵素）を培養液中へと分泌生産させることが可能である。この手法を用いて、これまでにリン脂質分解酵素、脂質分解酵素、デンプン分解酵素などの分泌生産に成功しており、その実績は十分である。

初年度のグルコマンナン分解酵素の遺伝子を、本申請者が構築した発現プラスミド系へと組込むことで、その分泌生産を行う。より高濃度での生産を可能とするために、培地成分や培養温度等の諸条件を幅広く検討する計画である。そして、放線菌で分泌生産を 1g/L 以上で成功させることを目指す。

(2) 酵母を用いた EFB からバイオエタノール燃料生産

EFB の酵素学的前処理：前処理がなされた EFB を用いて、セルラーゼによる酵素分解を行う。より少ない酵素量による分解を可能とするために、物理的処理と連動し、度の前処理条件が、酵素分解条件に適しているのか、相互の連動性・関係性を解析する。最終目標としては、酵素使用量を、これまでの 10 分の 1 量（おおよそ 3 FPU/g-dry biomass）での完全分解を目指す。

(3) 酵素法による POME からバイオディーゼル燃料生産

発酵メタノールを用いたバイオディーゼル燃料生産の検討：(2)において生産するエタノールを、POME からのバイオディーゼル燃料生産の原料として検討する。初年度に検討した条件をエタノール条件下に変更する事で、エタノールから酵素変換されるエチルエステル(バイオディーゼル燃料)の酵素生産の探索を目指す。

コロナ禍が明ければ、パーム産業の盛んなインドネシアやマレーシアの現地を訪問し、実サンプルにおける効率について検討を始める予定である。既に、これまでにいくつかのパートナー研究機関を有しており、それらの研究機関での議論と、サンプル交換等を開始する計画である。