

Jatropha curcas を原料としたバイオディーゼル生産工程で排出される phorbol ester 類の定量分析松川 哲也¹, 鈴木 遥¹, 梶山 慎一郎¹

要旨

トウダイグサ科の熱帯性植物である *Jatropha curcas* は、種子に重量比 40-60% の中性脂質を含み、半乾燥地や貧栄養土壌などの荒廃地でも生育可能であるため、近年新たなバイオディーゼル燃料の原料植物として注目されている。しかし、本植物の種子には発ガン促進物質である phorbol ester を始めとする種々の毒性物質を含んでおり、その生産者の健康や環境への影響が懸念されている。そこで、本研究では精油工程で産出される廃棄物や、中間生成物に含まれる phorbol ester 類の定量分析を行った。その結果、搾油工程および脱ガム工程では中間生成物および廃棄物ともに phorbol ester 類が多く含まれていた。一方、脱酸工程、メチル化工程では phorbol ester 量が減少することが見いだされた。また、最終生産物であるバイオディーゼル燃料からも phorbol ester 類が微量検出された。本研究の結果は、*J. curcas* 由来バイオディーゼルのリスク評価に寄与すると期待される。

緒論

近年、エネルギー需要の急激な増加に伴う原油価格の高騰や、化石燃料の環境に与える負荷の大きさから、代替エネルギーの構築が進められている。中でも植物由来のバイオ燃料は、大気中の二酸化炭素を固定したカーボンニュートラル燃料であり、かつ再生可能な燃料であるため、大きな期待が寄せられている。しかし、現在代表的なバイオ燃料として用いられているバイオエタノールやバイオディーゼルは、その原料が主にトウモロコシやサトウキビなどの食用植物であり、原料植物の競合による食糧価格の高騰や生産地域の拡大による環境破壊など新たな社会問題が生じている。このような背景から、非食用バイオ燃料の早期実用化が求められている。

熱帯性植物 *Jatropha curcas* は、その種子に豊富な油脂を含む非食用油脂生産植物であり、従来のバイオ燃料作物に替わる新たなバイオ燃料原料植物として近年注目を集めている。*J. curcas* はトウダイグサ科の落葉低木であり、種子中に約 40-60% の油脂成分を含む⁽¹⁾。その油脂成分はエステル交換反応によりディーゼル燃料へと転換することが可能であり、現在普及している内燃機関を利用できるという点で大きな利点を有している。また、本植物は半乾燥地、貧栄養土壌でも生育可能であるため、食用植物の生産地を避けて栽培可能であり、エネルギー生産と荒廃地の緑化を同時に達成できるという点で他のバイオ燃料資源植物には見られない高い優位性を持っている⁽²⁾。また、本植物は高い生長性を示し、さらに挿し木により容易に繁殖可能であるなど工業生産に適した性質も併せ持つため、*J. curcas* を原料としたバイオディーゼル(biodiesel, BDF)燃料の実用化に向けて既に各国で試験的な栽培が行われている。

J. curcas は上記のように様々な利点を有する一方で、今後世界的に大量栽培するにあたっては留意すべき問題点も有している。第一には、現在栽培されている *J. curcas* は野生種であるため、油脂の含量や組成、生産性など BDF 製造に関わる特性が最適化されたものでないことが挙げられる。第二には、*J. curcas* は毒性タンパク質 curcin⁽³⁾ や phorbol ester (PE) を始めとして多くの毒性物質を含むことが挙げられる。タンパク質である curcin は比較的不安定な物質であるため、BDF 燃料製造工程で無毒化することが可能であるが、PE は加熱処理や漂白処理を行っても分解されないことが報告されており⁽⁴⁾、その生産者および生産地域の動物・微生物などに与える環境負荷が懸念されている。

原稿受付 2010 年 6 月 18 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No. 08-II-02 の助成を受けた。

本研究の一部は住友財団奨励金の助成を受けた

1. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

Phorbol は, *tigliane diterpene* として知られる多環式化合物の総称であり, 13 位と 16 位のヒドロキシル基が脂肪酸によりエステル化されることにより, 多様な構造を持つ PE 類を形成する。PE 類はトウダイグサ科の植物に広く分布する化合物であり, *J. curcas* からはこれまでに 6 種の PE 類が同定されている (図 1)。これらはいずれも 12-deoxy-16-hydroxy phorbol を基本骨格としており, 脂肪酸側鎖部分が異なる構造異性体であることが知られている⁽⁵⁾。これまでの研究により, PE 類に継続的に被曝したマウスでは腫瘍形成が促進されることが報告されており, PE 類は発ガン促進物質として機能することが知られている^(7,8)。また, PE 類の発ガン促進活性はプロテインキナーゼ C の活性化に起因するものであることが明らかになっており^(5, 6, 9), 発ガン促進活性の他にも様々な生理反応を引き起こすことが知られている⁽¹⁰⁾。そのため, BDF の大規模実用化に向けて PE 類の動態に関する知見およびその無毒化法の確立が求められている。

これまでも, BDF 製造工程における PE 含量の変化や無毒化についての知見はいくつか報告されている^(4, 11)。しかし, これらの報告はいずれも BDF 製造工程をラボスケールで再現したものであり, 実際の工業レベルでの製造工程における PE 類含量の変化に関する知見は極めて乏しい。また, BDF を製造する過程で産出される廃棄物あるいは廃水に関しては調査されておらず, 実用的な知見が不足しているのが現状である。そこで本研究では, 工業的に製造された BDF およびその副生成物を対象とし, 各試料に含まれる PE 類の定量を行った。

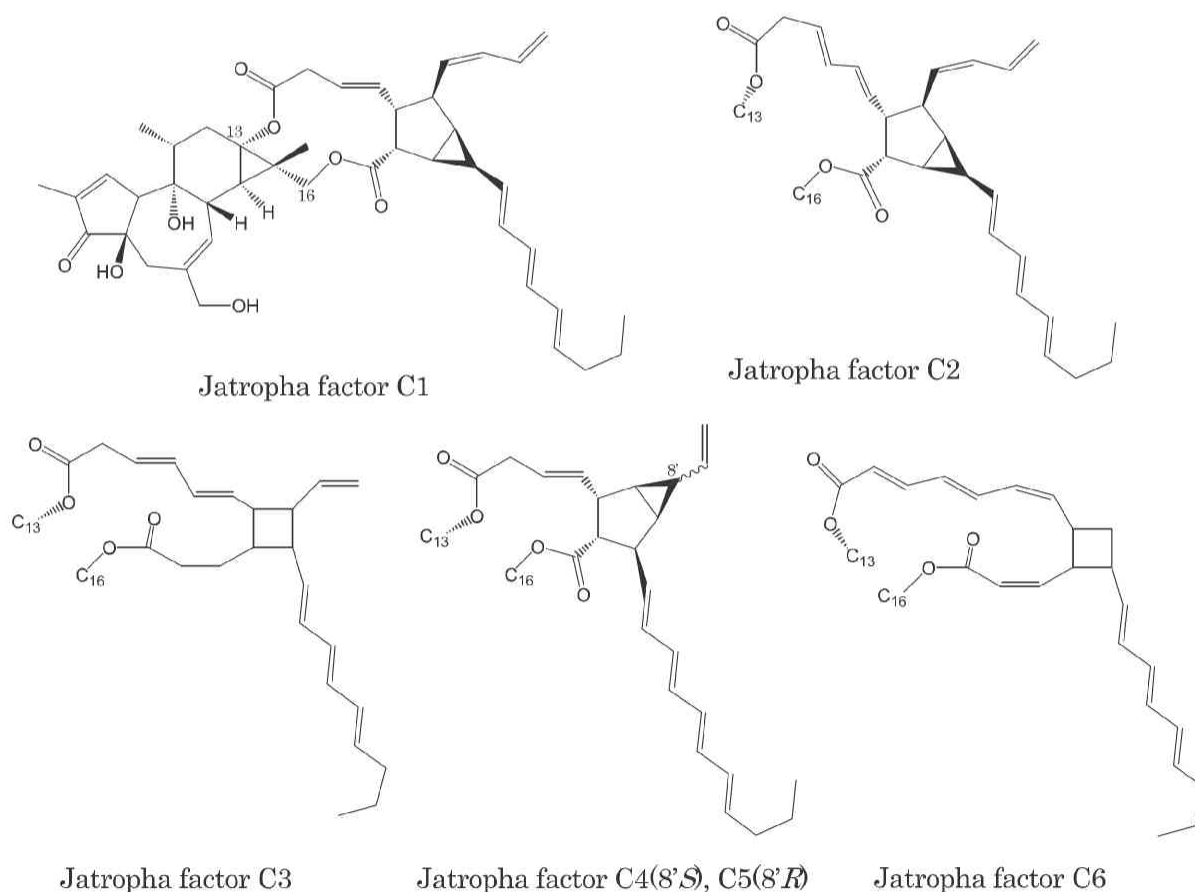


図 1. *J. curcas* に含まれる PE 類の化学構造

材料および方法

実験材料

植物材料は、2008 年 4 月にフィリピンミンダナオ島南コタバト州ジェネラルサントスで栽培、収穫された *J. curcas* Hybrid No. 2 を使用した。BDF 製造工程において産出される中間生成物および副生成物は前述の種子を原料として株式会社ポーラズ研究所において図 2 に示す工程で製造されたものを用いた。

PE 類の抽出

種子、加熱処理種子、搾油ケーキ、種子殻、種子仁などの固体試料は Highflex Homogenizer に供し、8000 rpm で 5 分間粉碎後、20 g 秤量した。秤量後の粉末に MeOH を加えて 200 ml とし、4°C で 1 日間静置することにより抽出を行った。粗油、脱ガム油、洗浄排水などの液体試料は 20 g に秤量後、同様に MeOH を用いて 200 ml にメスアップ後、直接抽出液として用いた。

分析試料の調製

MeOH 抽出液に内部標準として 1 mg/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) MeOH 溶液を 1 ml 加えた。得られた溶液にシリカゲル(Wakogel C-100)を 100 g 加え、減圧乾固することにより PE 類をシリカゲルに吸着した。吸着後のシリカゲルを *n*-hexane により懸濁後、あらかじめ *n*-hexane で平衡化したシリカゲルオープンカラム(50×500 mm)に供した。溶出溶媒には *n*-hexane と EtOAc の混合溶媒を用い、EtOAc 濃度を 0, 30, 70% に段階的に増加させることにより溶出を行った。各組成の溶媒は 1500 ml ずつ溶出し、300 ml ずつ分画した。TLC 分析により PE 類の存在が認められた画分を減圧乾固後、残渣を MeOH を用いて 10 mg/ml に調製したものを PE 類分析試料とした。また、EtOAc 溶出後のカラムをさらに 1000 ml の MeOH で溶出して得られた MeOH 溶出画分を乾燥後、少量の蒸留水に溶解した。得られた水溶液を逆相系カートリッジカラム (BOND ELUT-C18 500mg, Varian) に供し、5 ml の蒸留水で洗浄後、10 ml の 80% acetonitrile 水溶液で溶出した。溶出された 80% acetonitrile 画分を濃縮乾固後、蒸留水に溶解したものを 12-deoxy-16-hydroxy phorbol 分析試料とした。

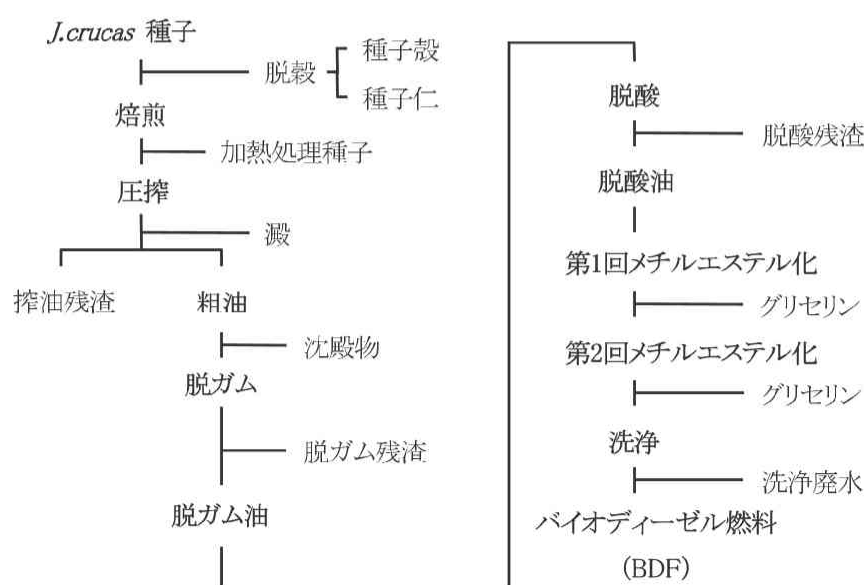


図 2. *J. curcas* を原料としたバイオディーゼル製造工程

LC-MS/MS 分析

PE 類の検出は、イオンスプレーLC-MS/MS 分析により行った。HPLC 分析には島津製 LC-10A μ システムを用いた。カラムには逆相系カラム Inertsil ODS-3 (2.1 \times 150 mm, GL Science)を用い、溶出溶媒には 0.1%ギ酸水溶液とアセトニトリル溶液を用いた。溶出は、流速 0.2 ml/min, 溶媒濃度を最初の 20 分間でアセトニトリル溶液濃度を 50%から 100%まで直線的に増加させ、その後 5 分間 100%で維持することにより行った。質量分析は、ESI-QTRAP システム (Applied Bioscience) を用い、MRM (multiple reaction monitoring)モードで行った。PE 類の検出は、precursor ion には $m/z=728.5$, product ion には $m/z=293.3$ を用い、内部標準の PMA の検出は、precursor ion に $m/z=617.7$, product ion に $m/z=311.2$ を設定して行った。

12-Deoxy-16-hydroxy phorbol の検出は、同じシステムを用い、溶出溶媒には 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液を用いた。溶出は、流速 0.2 ml/min, 溶媒濃度を最初の 20 分間で 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液濃度を 5%から 50%まで直線的に増加することにより行った。検出は、12-deoxy-16-hydroxy phorbol のプロトン付加イオンの $m/z=365$ を用いて行った。

HPLC 分析

Phorbol ester 類の定量は、島津製 LC-10A システムを用いた HPLC 分析により行った。カラムは逆相系カラム Inertsil ODS-3 (4.6 \times 150 mm, GL Science)を用いた。溶出は、0.03% ギ酸を含む 70% アセトニトリル水溶液を用い、流速 1.0 ml/min で行った。溶出された PE 類は、254 nm の吸収で検出した。

結果および考察

PE 類の検出

まず始めに、本研究で使用した、BDF の原料種子に PE 類が含まれていることを確認し、そのクロマトグラフィー上での挙動に関する知見を得るため、*J. curcas* Hybrid No. 2 種子から PE 類を抽出し、シリカゲルカラムを用いた順相クロマトグラフィーに供した。得られた画分を TLC により分析した結果、hexane/EtOAc 3/7 溶出画分において、代表的な PE の 1 つである PMA ($R_f=0.5$)と発色が類似したスポットが $R_f=0.52$ に検出され、本画分に *J. curcas* の PE が含まれていると推測された。

次に、これらの画分を詳細に解析するため、イオンスプレーLC-MS/MS 分析に供した (図 3)。その結果、 $m/z=728$ のイオンシグナルを与える特徴的なピークが保持時間 12 分から 20 分の間に溶出されることが示された (図 3A)。前述の通り、*J. curcas* に含まれる PE 類は、いずれも脂肪酸側鎖部分の構造異性体であり、分子量 710.4 であることが報告されている。そのため、本研究で見いだされたピークは、PE 類のアモニウム付加イオンであると推測された。そこで、これらのピークが PE 類であることを確認するため、見いだされた $m/z=728$ のピークの MS/MS スペクトルの解析を行った。その結果、 $m/z=329$, 311, 293, 265 に特徴的な MS シグナルが見いだされた (図 3B)。これらの MS シグナルのうち、 $m/z=329$ のシグナルは PE 類から脂肪酸側鎖部分が脱離したフラグメントイオンであり、 $m/z=311$, 293, 265 は、それぞれ脂肪酸側鎖が脱離したジテルペノイド部分から、さらに水分子が脱離したフラグメントイオンであると考えられた。これらの結果は、種々の PE 類の LC/MS/MS 分析を行った過去の報告⁽¹²⁾と良く一致しており、本研究で見いだされた $m/z=728$ のイオンシグナルを与えた複数のピークが PE 類であることが示唆された。

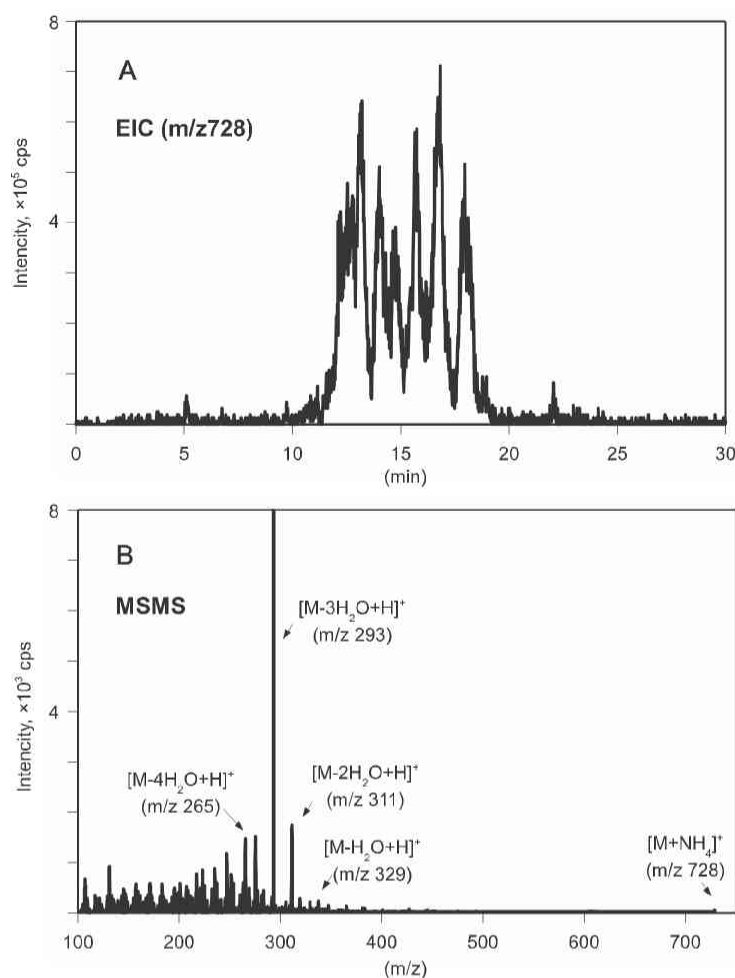


図3. *J. curcas* 種子に含まれる PE 類の LC-MS/MS 分析

Jatropha curcas 種子から PE 類を抽出し、順相クロマトグラフィーにより分画したものを LC-MS/MS 分析に供した。A: PE 類の アンモニウム付加イオン $m/z = 728$ の extract ion chromatogram (EIC)。B: 保持時間 13 から 18 分の MS/MS スペクトル。

PE 類の定量法の確立

見いだされた PE 類の正確な定量法を検討するため、内部標準として代表的な PE である PMA を用い、粗油の LC-UV 分析および LC-MS/MS を用いた MRM 測定を行った (図 4)。その結果、UV クロマトグラムおよび MRM 測定において、同じ保持時間に特徴的な複数のピークが見いだされた (図 4A, B)。また、UV クロマトグラムで見られた保持時間 17 分から 20 分のピークは、MRM 測定において、 m/z 728 \rightarrow 293 の XIC で見られたピークと良く一致していたことから、これらのピークは *J. curcas* 由来の PE 類であることが示された (図 4A, B)。保持時間 21 分に溶出されたピークは、 m/z 617.7 \rightarrow 311.2 の XIC で顕著に見いだされたことから、このピークは内部標準として加えた PMA であることが見いだされた (図 4C)。しかし、UV クロマトグラムと MRM 測定によるイオンクロマトグラムを比較したところ、各ピークの面積比にわずかながら違いが見いだされた。PE 類はジテルペン骨格が同じで、側鎖部分の構造異性体であり、その構造を考慮すると 254 nm の吸収の差異は少ないと考えられる。一方、MRM では PE 類をイオン化し、イオン化された PE 類をフラグメンテーションして検出するため、イオン化効率やフラグメンテーション効率に差異が生じると思われる。そこで、本研究では、LC-MS によるピーク同定後、HPLC-UV システムを用いた UV クロマトグラムにより定量を行った。

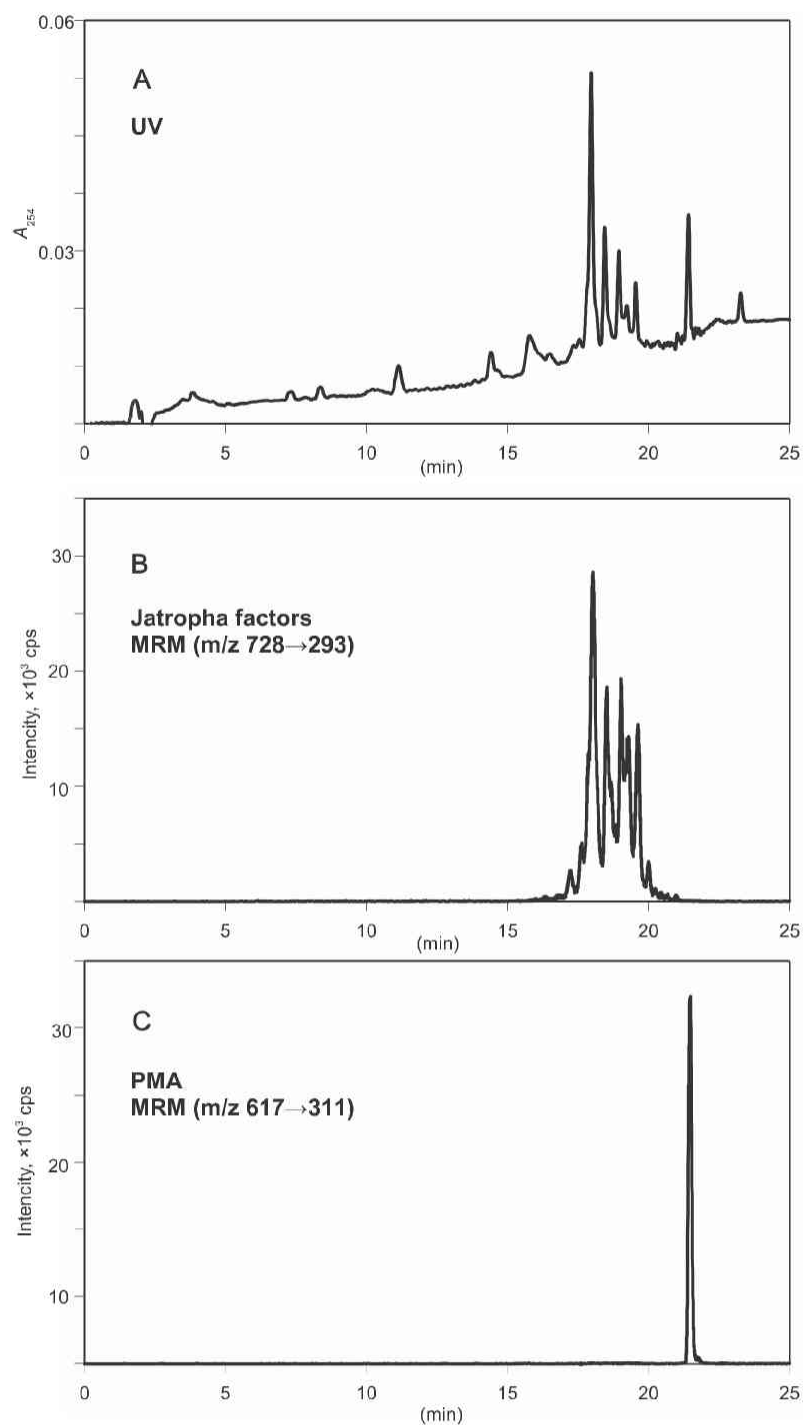


図4. 粗油に含まれる PE 類の LC-MS/MS 分析

粗油から PE 類を抽出し、順相クロマトグラフィーにより分画したものを LC-MS/MS 分析に供した。A: 254 nm の吸収で検出した UV chromatogram。B: m/z 728→293 で検出した MRM。C: m/z 617.7→311.2 で検出した MRM。

表 1. BDF 製造各工程産出物に含まれる PE 類含量

試料	重量 (kg)	重量比 (%)	PE 濃度 ¹ (mg/g)	PE 総量 ¹ (mg)
種子 ²	—	—	0.428	—
加熱処理種子	38.40	100	0.509	19546
粗油	10.10	26.3	0.429	4333
搾油残渣	24.20	63.0	0.093	2251
粗油澱	1.55	6.6	0.237	367
粗油沈殿物	0.29	0.8	0.110	32
脱ガム油	9.38	24.4	0.382	3583
脱ガム残渣	0.24	0.6	0.084	20
脱ガム澱	2.53	6.6	0.030	76
脱酸油	7.63	19.9	0.141	1076
脱酸残渣	2.03	5.3	ND ³	ND
グリセリン(1 回目)	1.00	2.6	ND	ND
グリセリン(2 回目)	0.25	0.7	ND	ND
洗浄廃水	2.38	6.2	ND	ND
BDF	6.88	17.9	0.016	110

¹ PE 濃度, PE 総量はいずれも PMA 換算量で表した。

² 種子は BDF 製造原料と同一品種を用いたが, 製造工程に直接関与しないため, 濃度のみを表した。

³ ND: Not detected (検出されず)。

BDF 製造工程産出物に含まれる PE 類の定量

まず始めに, 原料となる *J. curcas* の収穫後種子に含まれる PE 量を検討したところ, 0.428 mg/g の PE 類が含まれていた。BDF 原料として輸入される *J. curcas* 種子は, 加熱処理により不活化されたものが検疫に供される。そこで, 工業原料として輸入された加熱処理後の種子についても同様に PE 含量を定量したところ, 0.509 mg/g であった。この結果は, 収穫後の種子中に含まれる PE 類が熱に対して安定であることを示している。また, 含量が収穫後種子よりも高い値を示したのは, 加熱処理により種子中の水分が消失したためであると考えられる。

次に, BDF 製造工程において産出される中間産物および副産物に含まれる PE 類の定量を行った (表 1)。その結果, 原料加熱種子 38.4 kg から搾油した粗油には, 4333 mg の PE 類が含まれており, その濃度も 0.429 mg/g と高い値を示した。一方, 搾油後の残渣は 0.093 mg/g と濃度は比較的低い値を示したが, 総量では 2251 mg と多量の PE 類が含まれていた。この結果から, 種子中に含まれる PE 類は, 搾油工程では除去されず, 中間生成物および副生成物ともに比較的多くの PE 類が含まれていることが示唆された。また, 粗油に含まれる澱に関しても PE 含量を検討したところ, 澱には 0.237 mg/g の濃度で PE 類が含まれていたが, 総量は 367 mg と比較的少ない PE 含量であった。PE 類は脂肪酸のトリグリセリドと極性が類似した化合物であるため, 搾油により生じた油脂が溶媒として作用していると考えられる。

脱ガム工程では, 中間産物の脱ガム油に 3583 mg と大部分の PE 類が含まれており, 粗油に含まれていた PE 量の 82.7% が脱ガム油に残存していた。一方, 脱ガム工程で産出される副産物である脱ガム残渣および脱ガム澱には極めて少量の PE 類しか含まれていなかった。脱酸工程では, PE 類は約 30% にまで減少しており, 脱

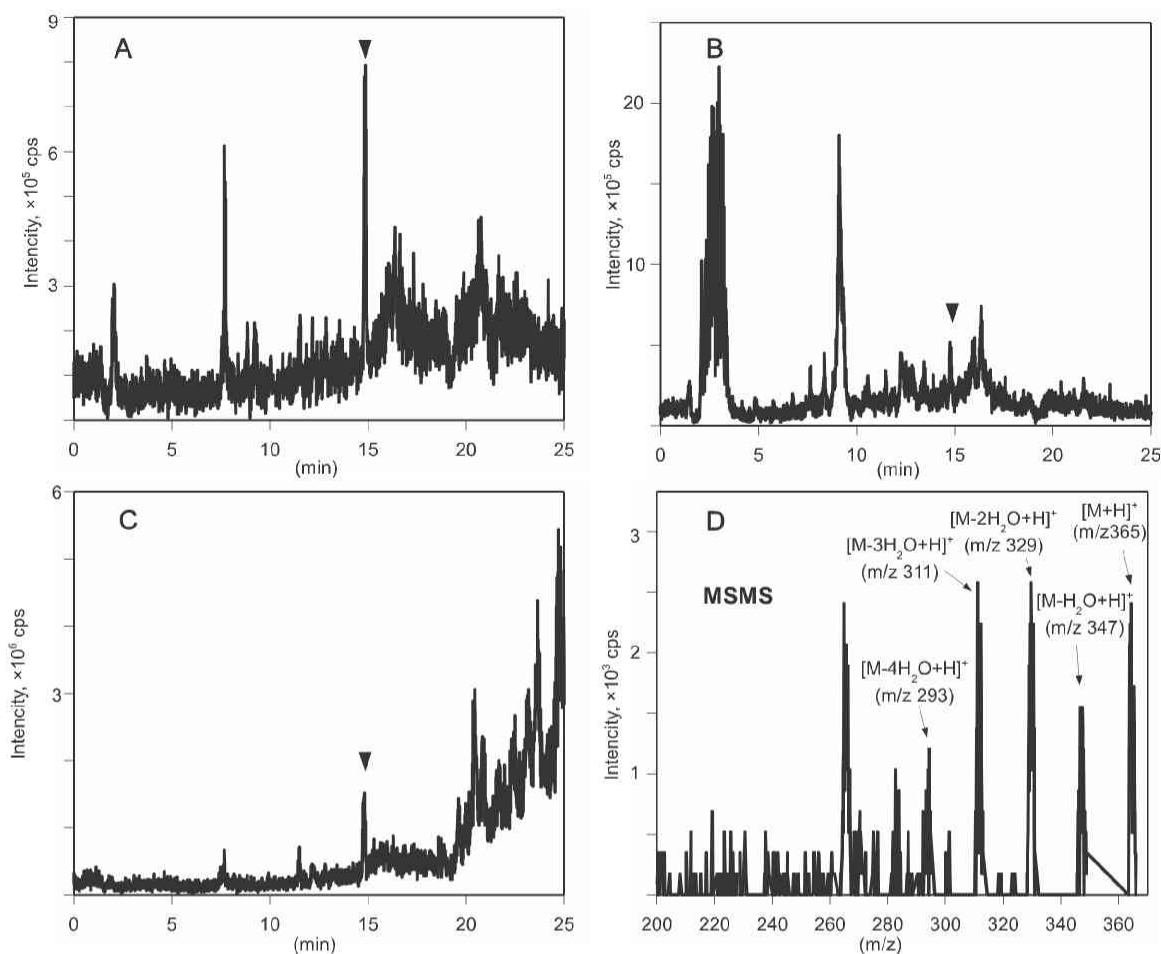


図 5. 12-Deoxy-16-hydroxy phorbol の LC-MS/MS 分析

各試料から 12-deoxy-16-hydroxy phorbol を抽出し、順相クロマトグラフィーにより分画したものをを用いた m/z 365 の EIC クロマトグラム。A: 脱酸残渣から得られた EIC。B: メチル化処理後のグリセリン画分から得られた EIC。C: 洗浄廃水から得られた EIC。D: 保持時間 15 分のピークの MS/MS スペクトル。

酸残渣では PE 類は検出されなかった。過去の報告では、脱ガム工程は油に含まれる PE 量にほとんど影響を与えないことが示されている^(4, 11)。また、同じ報告の中で、脱ガム後の工程である脱酸工程において PE 類が約 30%減少することが示唆されている。本研究の結果は、これらの報告と類似した傾向を示したが、その PE 類の減少量には大きな違いが見られた。これらの報告では、BDF 製造工程をラボスケールで再現しており、使用した機器に関しても研究用のものを用いていた。また、PE 類のピークの同定に関しても、これらの報告では HPLC クロマトグラム上での挙動のみで判断しており、厳密な同定がなされていなかった。一方、本研究では工業的に生産された試料を用い、PE 類のピークも MS/MS スペクトルを用いて同定しており、これらの手法の違いが減少量の差異に現れたと推測された。

BDF 製造工程の最終段階であるメチル化工程では、副産物であるグリセリンおよび洗浄排水には PE 類は検出されなかったが、最終産物である BDF にはわずかに PE 類が含まれていた。しかしながら、その含量は脱酸油の約 10%にまで減少していた。メチル化工程では、脂肪酸のトリグリセリドである油脂を強塩基条件下でエステル交換反応させ、メチルエステルへと変換させる。一方、PE 類もジテルペンと脂肪酸とのエステルである。そのため、強塩基条件下でエステル部分が加水分解され、PE 類の含量が顕著に減少したものと考えられる。

次に、PE 類が検出されなかった脱酸残渣、メチル化工程のグリセリン画分、洗浄廃水を LC-MS/MS 分析に

供し、PE 類が加水分解されて生成される 12-deoxy-16-hydroxy phorbol の検出を行った (図 5)。検出は 12-deoxy-16-hydroxy phorbol のプロトン付加イオンである $m/z = 365$ を用いた。その結果、いずれの試料からも共通して現れるピークが保持時間 15 分に見いだされた。このピークをさらに詳細に解析するため、MS/MS スペクトル解析を行ったところ、12-deoxy-16-hydroxy phorbol から水分子が脱離して生じる $m/z = 347, 329, 311, 293$ に特徴的な MS シグナルが見いだされた (図 5D)。この結果から、PE 類の含量が顕著に減少する工程では、PE 類が加水分解されていることが示唆された。

結論

本研究では、工業的に生産された BDF、中間生産物および副産物に含まれる PE 類の定量を行った。これまでの研究から、粗油に 3 mg/g の PE 類が含まれていることが報告されている。一方、本研究の結果では、搾油後の粗油に 0.429 mg/g の PE 類が含まれていることが示唆された。*J. curcas* 種子に含まれる PE 量は、その産地や系統により大きく異なることが知られている¹⁾。そのため、本研究で用いた Hybrid No. 2 が比較的少ない PE 類を含む優良品種である可能性が考えられる。しかし、過去の報告では HPLC クロマトグラム上での挙動から PE 類のピークを同定しているため化学的根拠が乏しく、PE 類と異なる代謝物を含めて定量している可能性も考えられる。本報告では、LC-MS/MS 解析により PE 類の同定を行ったが、その定量は PMA を内部標準として行っている。今後、さらに厳密な定量のため、PE 類の単離・同定を行い、標準物質を得ることが必要であると思われる。

本研究の結果から、脱ガム工程に至る中間生産物および副産物全てに PE 類が含まれていることが示唆された。搾油残渣はすでに家畜飼料として用いられており、その使用には安全性のさらなる検討が必要であろう。また、中間生産物、副産物に加えて最終生産物である BDF にも PE 類が含まれていた。PE 類は継続的な被爆により発ガン促進活性を示すことから、製造に関わる生産者や廃棄物の環境負荷などの検討も課題として挙げられる。

研究室内で BDF 製造工程を再現して得られた中間生産物に含まれる PE 類に関する研究はこれまでもいくつか報告されていたが、実際の工業レベルでの議論は乏しかった。本研究で得られた知見は、*J. curcas* 由来 BDF の大規模な実用化に際し、そのリスク評価およびその対処法の検討に大きく寄与するものと期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、試料の提供をいただいた(株)ポーラズ研究所西田富男氏、NMR測定を行っていただいた、京都大学農学研究科入江一浩教授に深謝申しあげます。

本研究は、近畿大学生物理工学部戦略的研究費 (08-II-02) および、一部(財)住友財団寄付研究費により行われたものであり、ここに深謝いたします。

参考文献

- (1) Makkar, H. P. S., Becker, Z.K., Sporer, F., Wink, M. (1997) Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3152-3157.
- (2) Becker, K., Makkar, H.P.S. (2008) *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. *Lipid Technol.* 20, 104-107
- (3) Stripe, F., Pession-Brizzi, A., Lorenzoni, E., Strocchi, P., Montanaro, L., Sperti S. (1976) Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and *Jatropha curcas*. *Bochem. J.* 156, 1-6
- (4) Haas, W., Mittelbach, M. (2000) Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops Products* 12, 111-118.

- (5) Hirota, M., Suttajit, M., Sygyri, H., Endo, Y., Shudo, K., Wongchai, V., Hecker, E., Fujiki, H. (1988) A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxy phorbol. *Cancer Res.* 48, 5800-5804.
- (6) Haas, W., Sterk, H., Mittelbach, M. (2002) Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. *J. Nat. Prod.* 65, 1434-1440.
- (7) Van Durren, B. L., Orris, L. (1965) The tumor-enhancing principles of *Croton tiglium* L. *Cancer Res.* 25, 1871-1875.
- (8) Baird, W. M., Boutwell, R. K. (1971) Tumor-promoting activity of phorbol and four diesters of phorbol in mouse skin. *Cancer Res.* 31, 1074-1079.
- (9) Wink, M., Koschmieder, C., Sauerwein M., Sporer, F. (1997) Biofuel and Industrial Products from *Jatropha curcas*. 160-166, Dbv-Verlag University of Graz.
- (10) Aitken, A. (1986) Naturally Occurring Phorbol Esters. 271-288, CRC Press.
- (11) Makkar, H., Maes, J., De Greyt, W., Becker, K. (2009) Removal and degradation of phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 173-181.
- (12) Vogg, G., Achatz, A., Kettrup, A., Sandermann Jr., H. (1999) Fast, sensitive and selective liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of tumor-promoting diterpene esters. *J. Chromatogr. A* 855, 563-573.

英文抄録

Quantitative analysis of phorbol esters in the wastes and intermediate products of *Jatropha* bio-diesel production.

Tetsuya Matsukawa¹, Haruka Suzuki¹, Shin'ichiro Kajiyama¹

Jatropha curcas, a tropical plant belonging to the family of Euphorbiaceae, has recently been attracted the considerable attention as a potential source for bio-diesel due to the high adaptability to semi-arid areas and the high oil content (40-60%) in seed kernel. The seed, however, contains several toxic compounds including phorbol ester, well known as a tumor promoting agent. Therefore, influence of these toxic compounds on environment and people engaged in the production should be concerned. In this study, the levels of phorbol esters in the wastes and intermediate products of different refining steps were quantitatively analyzed. Our results showed that both intermediate products and wastes obtained from pressing and degumming processes exhibited high phorbol esters contents, whereas levels of phorbol esters decreased during neutralization and transesterification. In addition, bio-diesel fluid, the final products of refining steps, also contains trace amount of phorbol esters. Our results may contribute to assess the risk of *J. curcas* bio-diesel.

¹. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan