



BIODIESEL FUEL PRODUCTION USING FUNGUS WHOLE CELL BIOCATALYSTS

Hama, Shinji

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Date of Publication)

2012-05-29

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3533

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003533>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 292 】

氏 名・(本 籍) 濱 真司 (徳島県)

博士の専攻分野の名称 博士(工学)

学 位 記 番 号 博い第390号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

BIODIESEL FUEL PRODUCTION USING FUNGUS
WHOLE CELL BIOCATALYSTS
(糸状菌全細胞触媒を用いたバイオディーゼル
燃料生産)

審 査 委 員

主 査 教 授 福 田 秀 樹
教 授 上 田 裕 清
教 授 近 藤 昭 彦

本論文では、多孔質担体に固定化させた糸状菌を直接酵素剤として用いるバイオディーゼル燃料(BDF)生産について記した。このような酵素剤は“whole-cell biocatalyst”と呼ばれ、複雑な精製プロセスを要する既存の酵素剤と比べて大幅な生産コストの削減が可能となる。これまで、リパーゼを生産・保持する糸状菌 *Rhizopus oryzae* 株を、植物油のメタノリシス反応(BDFの生産反応)の触媒として利用可能であることが明らかにされている。しかしながら、多くのリパーゼは一般的に分泌型(菌体外)酵素として見なされ、菌体内リパーゼの生産挙動に関する学術的知見が極めて少ないことが、高機能な触媒を設計する上での障壁となっている。また、実用的な BDF 生産を目標とした場合、菌体酵素の安定性の向上や適切なバイオリクターの使用が不可欠である。このような背景から、本研究では以下の点を目的とした。

- (1) 糸状菌リパーゼの菌体内生産挙動の解明
- (2) BDF 生産における菌体内酵素の安定化
- (3) 微生物充填式カラムバイオリクターによる BDF 生産

第一章にて、糸状菌リパーゼの局在性を免疫化学的および遺伝子工学的手法を用いて解析した。まず第一部では、高いメタノリシス活性を有する *R. oryzae* 株の菌体内リパーゼ(ROL)の局在性を解明した。*R. oryzae* 株は、分子量の異なる 2 種類のリパーゼ(34 kDa, 31 kDa)を生産し、前者(ROL34)は細胞壁に結合し培地へ容易に分泌され、後者(ROL31)は細胞膜に結合し菌体内酵素としての挙動を示すことが分かった。この 2 種類のリパーゼの N 末端アミノ酸配列を解析したところ、ROL31 は前駆体アミノ酸の成熟領域と一致しており、ROL34 は成熟領域(ROL31)の N 末端側に pro 領域の C 末端 28 アミノ酸配列が結合したものであることが明らかとなった。すなわち、菌体内における ROL の前駆体からのプロセシングの違いが、酵素の局在性を大きく支配している可能性が示された。また、以前までの研究により、糸状菌の担体への固定化や油脂の培地への添加が、菌体内リパーゼ活性を高めるのに有効であることが明らかにされているため、この条件下のリパーゼ局在性を解析した。その結果、これらの培養条件がリパーゼの培地への分泌を強く抑制する効果のあることが初めて定量的に示された。さらに、細胞壁および細胞膜結合リパーゼの相対量と菌体の見かけのメタノリシス活性との相関性を詳細に解析したところ、細胞膜結合リパーゼ(ROL31)が活性に大きく寄与していることが明らかとなった。

第一章・二部では、前述した ROL34 の N 末端 28 アミノ酸配列の役割を明確にするため、遺伝子工学的手法を用いて菌糸内のリパーゼを可視化した。本実験では、遺伝子操作の容易さと安定性、また将来的な有用タンパク質大量生産系の構築を考慮し、麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主に用いて解析を行った。分泌シグナルと ProROL をコードする遺伝子を導入した *A. oryzae* は ROL34 を効率的に生産・分泌し、緑色蛍光タンパク質(GFP)を ROL の C 末端に融合したときも同様の分泌挙動を示した。また ProROL-GFP 融合タンパク質を生産する *A. oryzae* は、従来報告されている分泌タンパク質と同様の蛍光パターンを示し、この宿主における ROL の分泌生産・可視化システムの構築に成功したといえる。続いて、この ProROL 遺伝子の N 末端欠失変異体を作成し、GFP と融合発現させた。ROL 成熟領域の N 末端に付加

する 28 アミノ酸配列が存在する場合、融合タンパク質は効率的に培地へ分泌されたのに対し、この付加配列が無い場合では酵素が培地へ一切分泌されず、菌糸の隔壁方向へ蛍光が蓄積する様子が観察された。これらは、ROL 成熟領域の細胞毒性や不完全なフォールディング等に菌体が反応し、酵素を液泡へと輸送して分解する様子であり、前述の N 末端配列は酵素を小胞体へ輸送するのに重要な配列であると予想された。この 28 アミノ酸配列を分泌シグナルと GFP の間に挿入したところ、培養中期にて小胞体の典型的な蛍光像が得られ、その後培地に大量の GFP が検出された。したがって、ROL 由来 N 末端 28 アミノ酸配列はタンパク質の小胞体内腔への輸送を介助する役割を有し、分泌の困難な細胞質タンパク質でさえも菌体外へ放出させることのできる有用な配列であることが見いだされた。

第二章では、細胞膜局在リパーゼが *R. oryzae* のメタノリシス活性に大きく寄与している結果をもとに、膜組成がリパーゼの安定性に及ぼす影響を調べた。*R. oryzae* の膜脂質組成は、培地へ様々な脂肪酸を添加することで容易に制御できることが分かった。概して、分子内に二重結合を有する不飽和脂肪酸を添加した場合、メタノリシス活性は高いが安定性の低い菌体を得られ、飽和脂肪酸を添加した場合は、活性が低いものの安定性の高い菌体を得ることが分かった。これらは、膜の組成がその物質透過性や強度に影響し、菌体の有機溶媒耐性を変化させたためと推察される。最適な膜組成を決定するため、不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の混合比(R_f)を制御し、菌体のメタノリシス活性および安定性への影響を調べたところ、 $R_f=0.67$ と決定された。この菌体をメタノリシス反応の触媒として繰り返し用いたところ、高い生産性と安定性を示し、10 回目の反応でおよそ 60%程度の BDF を生産することが可能であった。以上の結果より、*R. oryzae* の膜組成を制御することで、活性および安定性の高い whole-cell biocatalyst が得られ、実用的な BDF 生産に応用可能であることが明らかとなった。

第三章では、糸状菌 whole-cell biocatalyst による BDF 大量生産系の構築として、*R. oryzae* 固定化菌体をガラスカラム内に充填したバイオリクターを用いてメタノリシス反応を行った。反応速度はカラム内における基質—菌体表面の接触効率に影響を受けるため、直方体型の担体に菌体を固定化し、基質に接触し得る菌体の面積を増加させることが有効であった。この whole-cell biocatalyst を全容量 20L のエアリフト槽にて大量に培養・調製し、カラムリアクター内の触媒に用いた。基質を超音波処理によってエマルジョン化した後、供給ポンプの回転速度を 200 rpm (25 l/h) に設定してカラム内に基質を供給し、メタノールを段階的に添加すると、非常に高い反応速度で 90%の反応率が得られた。この反応における酵素の安定性を調べたところ、10 回目の反応で約 80%の反応率を維持した。本研究で開発した反応系は、菌体をカラム内に固定して基質を適切な速度で供給することが可能なため、菌体への物理的な衝撃やメタノールによる酵素の失活を防ぐ点において従来の振とう反応系より有利であることが示唆された。

氏名	濱 真司		
論文題目	BIODIESEL FUEL PRODUCTION USING FUNGUS WHOLE CELL BIOCATALYSTS 糸状菌全細胞触媒を用いたバイオディーゼルの燃料生産		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	福田 秀樹
	副査	教授	上田 裕清
	副査	教授	近藤 昭彦*
	副査		

要 旨

本論文では、多孔質担体に固定化させた糸状菌を直接酵素剤として用いるバイオディーゼルの燃料(BDF)生産について記した。このような酵素剤は"whole-cell biocatalyst"と呼ばれ、複雑な精製プロセスを要する既存の酵素剤と比べて大幅な生産コストの削減が可能となる。これまで、リパーゼを生産・保持する糸状菌 *Rhizopus oryzae* 株を、植物油のメタノリシス反応 (BDFの生産反応) の触媒として利用可能であることが明らかにされている。しかしながら、リパーゼは一般的に分泌型酵素として見なされており、菌体外への生産挙動に比べて菌体内のそれに関する知見は極めて少なく、より能力の高い触媒を設計する上での障壁となっている。また、実用的な BDF 生産を目標とした場合、菌体酵素の安定性の向上や適切なバイオリクターの使用が不可欠である。このような背景から、本研究では以下の点を目的とした。

- (1) 糸状菌リパーゼの菌体内生産挙動の解明
- (2) BDF 生産における菌体内酵素の安定化
- (3) 微生物充填式カラムバイオリクターによる BDF 生産

第一章にて、糸状菌リパーゼの局在性を免疫化学的および遺伝子工学的手法を用いて解析した。まず第一部では、高いメタノリシス活性を有する *R. oryzae* 株の菌体内リパーゼ(ROL)の局在性を解明した。*R. oryzae* 株は、分子量の異なる2種類のリパーゼ(34 kDa, 31 kDa)を生産し、前者(ROL34)は細胞壁に結合し培地へ容易に分泌され、後者(ROL31)は細胞膜に結合し菌体内酵素としての挙動を示すことが分かった。この2種類のリパーゼのN末端アミノ酸配列を解析したところ、ROL31は前駆体アミノ酸の成熟領域と一致しており、ROL34は成熟領域(ROL31)のN末端側にpro領域のC末端28アミノ酸配列が結合したものであることが明らかとなった。すなわち、菌体内におけるROLの前駆体からのプロセッシングの違いが、酵素の局在性を大きく支配している可能性が示された。また、以前までの研究により、糸状菌の担体への固定化や油脂の培地への添加が、菌体内リパーゼ活性を高めるのに有効であることが明らかにされているため、この条件下のリパーゼ局在性を解析した。その結果、これらの培養条件がリパーゼの培地への分泌を強く抑制する効果のあることが初めて定量的に示された。さらに、細胞壁および細胞膜結合リパーゼの相対量と菌体の見かけのメタノリシス活性との相関性を詳細に解析したところ、細胞膜結合リパーゼ(ROL31)が活性に大きく寄与していることが明らかとなった。

第一章・二部では、前述したROLのN末端28アミノ酸配列の役割を明確にするため、遺伝子工学的手法を用いて菌糸内のリパーゼを可視化した。本実験では、遺伝子操作の容易さと安定性、また将来的な有用タンパク質大量生産系の構築を考慮し、麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主に用いて解析を行った。分泌シグナルとProROLをコードする遺伝子を導入した *A. oryzae* はROL34を効率的に生産・分泌し、緑色蛍光タンパク質(GFP)をROLのC末端に融合したときも同様の分泌挙動を示した。またProROL-GFP融合タンパク質を生産する *A. oryzae* は、従来報告されている分泌タンパク質と同様の蛍光パターンを示し、この宿主におけるROLの分泌生産・可視化システムの構築に成功したといえる。続いて、このProROL遺伝子のN末端欠失変異体を作成し、GFPと融合発現させた。ROL成熟領域のN末端に付加する28アミノ酸配列が存在する場合、融合タンパク質は効率的に培地へ分泌されたのに対し、この付加配列が無い場合では酵素が培地へ一切分泌されず、菌糸の隔壁方向へ蛍光が蓄積する様子が観察された。これらは、ROL成熟領域の細胞毒性やフォールディング等に菌体が反応し、

氏名	濱 真司		
論文題目	酵素を液相へと輸送して分解する様子であり、前述のN末端配列は酵素を小胞体へ輸送するのに重要な配列であると予想された。この28アミノ酸配列を分泌シグナルとGFPの間に挿入したところ、培養中期にて小胞体の典型的な蛍光像が得られ、その後培地に大量のGFPが検出された。したがって、ROL由来N末端28アミノ酸配列は酵素を小胞体内腔へ輸送する役割を有し、分泌の困難な細胞質タンパク質でさえも菌体外へ放出させることのできる有用な配列であることが見いだされた。		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	福田 秀樹
	副査	教授	上田 裕清
	副査	教授	近藤 昭彦*
	副査		

第二章では、細胞膜局在リパーゼが *R. oryzae* のメタノリシス活性に大きく寄与している結果をもとに、膜組成がリパーゼの安定性に及ぼす影響を調べた。*R. oryzae* の膜脂質組成は、培地へ様々な脂肪酸を添加することで容易に制御できることが分かった。概して、分子内に二重結合を有する不飽和脂肪酸を添加した場合、メタノリシス活性は高いが安定性の低い菌体を得られ、飽和脂肪酸を添加した場合は、活性が低いものの安定性の高い菌体を得られることが分かった。これらは、膜の組成がその物質透過性や強度に影響し、菌体の有機溶媒耐性を変化させたためと推察される。最適な膜組成を決定するため、不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の混合比(R_f)を制御し、菌体のメタノリシス活性および安定性への影響を調べたところ、 $R_f=0.67$ と決定された。この菌体をメタノリシス反応の触媒として繰り返し用いたところ、高い生産性と安定性を示し、10回目の反応でおよそ60%程度のBDFを生産することが可能であった。以上の結果より、*R. oryzae* の膜組成を制御することで、活性および安定性の高い whole-cell biocatalyst が得られ、実用的な BDF 生産に応用可能であることが明らかとなった。

第三章では、糸状菌 whole-cell biocatalyst による BDF 大量生産系の構築として、*R. oryzae* 固定化菌体をガラスカラム内に充填したバイオリクターを用いてメタノリシス反応を行った。反応速度はカラム内における基質—菌体表面の接触効率に影響を受けるため、直方体型の担体に菌体を固定化し、基質に接触し得る菌体の面積を増加させることが有効であった。この whole-cell biocatalyst を全容量 20L のエアリフト槽にて大量に培養・調製し、カラムリアクター内の触媒に用いた。基質を超音波処理によってエマルジョン化した後、供給ポンプの回転速度を 200 rpm に設定してカラム内に基質を供給し、メタノールを段階的に添加すると、非常に高い反応速度で 90% の反応率が得られた。また、同条件で従来の振とう反応の結果と比較したところ、菌体の剥離が少なく酵素の安定性が高いことが分かった。

本研究は、バイオディーゼルの燃料生産について、その生体触媒として用いられる糸状菌の細胞内リパーゼ局在性を解明し、細胞の高機能化を研究したものであり、バイオディーゼルの生産系について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の濱 真司は、博士(工学)の学位を得る資格があると認める。