



Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst and its applications in Industrial Biocatalysis

TAMALAMPUDI, SRIAPPAREDDY

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2007-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4074

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004074>

※ 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。



氏 名 SRIAPPAREDDY TAMALAMPUDI

博士の専攻分野の名称 博士（工学）

学 位 記 番 号 博い第 473 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 19 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cellbiocatalyst and its applications in
Industrial Biocatalysis (異種リパーゼを発現する組換え *Aspergillus oryzae* 全細胞触媒の開発とその
工業的生体触媒反応への応用)

審 査 委 員

主 査 教 授 福田 秀樹

教 授 近藤 昭彦

教 授 上田 裕清

Introduction:

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are the versatile group of enzymes that have the ability to hydrolyze triglycerides at a lipid-water interface. This phenomenon of interfacial activation distinguishes lipases from other esterases. Moreover, lipase enzymes show wide substrate specificity and they are often used in chemo, enantio and stereo selective reactions of biotechnological importance. The tolerance of lipases to organic solvents renders them more attractive for transesterification and other synthetic reactions of commercial importance. The process economics involved with the downstream processing of lipases hindering their usage in industrial biocatalysis. In order to overcome this problem, whole cell biocatalysis in non-conventional media was investigated and immobilization of whole-cells on porous biomass support particles (BSPs) made of polyurethane foam has been extensively studied.

There are several reports on the utilization of a number of microorganisms like bacteria, yeast and fungi as whole cell biocatalysts to improve the cost effectiveness of various bioconversion processes. Among the established whole cell biocatalyst systems, filamentous fungi are proved to be the more robust whole cell biocatalyst for the industrial applications. Further more, immobilization of filamentous fungi on biomass support particles (BSPs) made of polyurethane foam (PUF) can be achieved spontaneously during batch cultivation. The immobilized BSPs can be easily separable from the reaction mixture to facilitate their repeated use in bioconversion process.

Filamentous fungi are well recognized for their ability to secrete large amounts of proteins and among them, *Aspergillus* species is widely used for the production of industrial enzymes. In particular *Aspergillus oryzae* is often used for the production of enzymes and as a host for the expression of heterologous proteins. In the recent times several attempts have been made to develop improved promoters for the high level expression of heterologous proteins. Therefore recombinant *A. oryzae* immobilized in BSPs may initiate momentum for the utilization of whole cell biocatalyst in industrial biocatalysis.

Part I Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst expressing lipase-encoding gene from *Candida antarctica*.

To expand the industrial applications of *Candida antarctica* lipase B (CALB), we developed *Aspergillus oryzae* whole cell biocatalyst expressing the lipase encoding gene from *Candida antarctica*. *A. oryzae* niaD300, which was derived from the wild type strain RIB40, was used as the host strain. The CALB gene was isolated from *C. antarctica* CBS6678 and expression plasmids were constructed with and without secretion signal peptide. The lipase gene was expressed under the control of improved glaA and P.No-8142 promoters of plasmids pNGA142 and pNAN8142 respectively. The southern blot analysis demonstrated the successful integration of CALB gene in the genome of *A. oryzae*. To determine the role of signal peptide, the expression plasmids were constructed with homologous and heterologous secretion signal sequences of triacylglycerol lipase gene (tglA) from *A. oryzae* and lipase B (CALB) from *C. antarctica* respectively. The C-terminal FLAG tag does not alter the catalytic properties of the lipase enzyme and western blotting analysis using anti FLAG antibodies demonstrated the presence of cell wall and membrane bound lipase responsible for the biocatalytic activity of whole-cell biocatalyst. The resultant recombinant *A. oryzae* was immobilized within Biomass support particles (BSPs) made of polyurethane foam (PUF) and the BSPs were successfully used for the hydrolysis of Para-nitrophenol butyrate (p-NPB) and for the optical resolution of (RS)-1- phenyl ethanol by enantioselective transesterification with vinyl acetate as acyl donor. Collectively this work provided framework for the utilization of recombinant whole cell biocatalyst in the resolution of chiral compounds and in the bioconversion of low cost oils in to value added products like biodiesel fuel.

Tamalampudi, S., Talukder, M. M. R., Hama, S., Suzuki, Y., Kondo, A., Fukuda H. (2007). Development of recombinant whole cell biocatalysts of *Aspergillus oryzae* expressing lipase-encoding gene from *Candida antarctica*. Applied Microbiology and Biotechnology, 75, 387-395

Part II Immobilized recombinant *Aspergillus oryzae* expressing heterologous lipase: an efficient whole cell biocatalyst for enantio-selective transesterification in organic solvent

Organic esters are used in various industries such as perfumery, flavor and pharmaceutical intermediates. The use of biocatalysts for esterification and transesterification reaction under ambient reaction conditions gives better products for use in flavors and fragrance industries. In the current study, enantioselective transesterification reaction was developed by using recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst expressing lipase encoding gene from *Candida antarctica*. The recombinant fungal cells were immobilized on Biomass Support Particles (BSPs) to facilitate the reusability of whole-cell biocatalyst. The immobilized CALB expressing whole-cell biocatalyst was used for the optical resolution of (RS)-1-phenylethanol by enantioselective transesterification with vinyl acetate as acyl donor. The activity of the whole-cell biocatalyst was optimized and compared with the other whole-biocatalysts *E. coli* displaying CALB, *S. cerevisiae* displaying ROL and *A. oryzae* whole-cell biocatalyst expressing tglA lipase. The initial activity of immobilized CALB expressing *A. oryzae* was at least 15 folds higher than that of *A. oryzae* expressing tglA lipase. The maximum yield of (R)-1-phenylethyl acetate reached 88.1% with an enantiomeric excess (ee) of >99% after 3.5h reaction, while tglA lipase expressing *A. oryzae* showed 90% yield and 95% ee after 48h. The recombinant *A. oryzae* retained its activity in hexane, heptane, toluene, cyclohexane and octane. Moreover, whole-cell biocatalyst maintained its activity for more than 15 batch reaction cycles. Current study demonstrated the applicability of recombinant whole-cell biocatalyst to bioconversion process in non-aqueous medium.

Tamalampudi, S., Hama, S., Tanino, T., Talukder, M. M. R., Kondo, A., Fukuda, H. (2007) Immobilized recombinant *Aspergillus oryzae* expressing heterologous lipase: an efficient whole cell biocatalyst for enantio-selective transesterification in organic solvent. *Journal of Molecular Catalysis B*, doi:10.1016/j.molcatb.2007.05.007 (available online)

Part III Biodiesel fuel production using fungal whole-cell biocatalysts.

Chapter I *Jatropha* oil as a potential substrate for whole-cell catalyzed biodiesel fuel production.

Biodiesel (BD) as alkyl esters of long chain fatty acids can be produced by alcoholysis of vegetable oils using lipase as a biocatalyst. The lipase cost associated with its purification from culture broth is the main obstacle for enzymatic production of biodiesel. The large percentage of BD cost also associated with feedstock oil. The lipase producing whole-cells of *Rhizopus oryzae* (ROL) immobilized onto biomass support particles (BSPs) is thus used for the production of BD from relatively low cost non-edible oil from the seeds of *Jatropha curcas*. The activity of ROL is optimized and compared with that of commercially available most effective lipase (Novozym 435). Different alcohols as a hydroxyl donor are tested, and methanolysis of *Jatropha* oil progresses faster than other alcoholysis regardless of lipases used. The maximum methyl esters content in the reaction mixture reaches 80 wt% after 60h using ROL, whereas it is 76% after 90h using Novozym 435. Both the lipases can be repeatedly used and both lipases exhibit more than 90% of their initial activities after 5 cycles. Our results suggest that whole-cell ROL immobilized on BSP is a promising biocatalyst for producing BD from *Jatropha* oil.

Ref: **Tamalampudi, S., Talukder, M. M. R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A., Fukuda, H.** Enzymatic Production of Biodiesel from *Jatropha* Oil: A comparative study of immobilized whole-cell and powder lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal* (submitted revision)

Chapter II Biodiesel fuel production using recombinant *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase

In this study, we used recombinant *Aspergillus oryzae* whole cell biocatalyst expressing lipase encoding gene from the *Fusarium heterosporum* (FHL) for the production of Biodiesel fuel. This is the first report on the utilization of recombinant fungus for BDF production. The recombinant *A. oryzae* expressing FHL showed high methyl ester yield of 85 wt% in 72 h. Despite of no chemical treatment methods like glutaraldehyde for lipase stabilization, recombinant whole cell biocatalyst retained its activity in fourth batch reaction cycle. Therefore, the recombinant *A. oryzae* cells expressing FHL is considered to be promising for industrial biodiesel production.

氏名	TAMALAMPUDI SRIAPPAREDDY		
論文 題目	Development of recombinant <i>Aspergillus oryzae</i> whole-cell biocatalyst and its applications in industrial biocatalysis 異種リパーゼを発現する組換え <i>Aspergillus oryzae</i> 全細胞触媒の開発と その工業的生体触媒反応への応用		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	福田 秀樹 印
	副 査	教 授	近藤 昭彦 印
	副 査	教 授	上田 裕清* 印
	副 査		印
	副 査		印
要 旨			
<p>リパーゼ(tryacylglycerol acylhydrolases; EC3.1.1.3)は油水面においてトリグリセリドの加水分解能を有する用途の広い酵素群であり、この界面活性化現象により他のエステラーゼと区別されている。リパーゼは広い基質特異性を示し、生物工学的に重要な化学ー、エナンチオー、立体ー選択反応にもしばしば用いられる。しかしながら、リパーゼの後処理に関わるプロセスの経済性が工業用生体触媒としての使用に際して妨げとなっている。この問題を克服するため whole-cell biocatalyst と、ポリウレタンフォーム(PUF)製の多孔質のバイオマス保持担体(biomass support particles; BSPs)への whole-cell の固定化が広く研究されている。</p> <p>糸状菌は多量のタンパク質を分泌生産可能であることが知られている。その中でも <i>Aspergillus</i> 種は工業酵素の生産に広く用いられ、特に <i>Aspergillus oryzae</i> は酵素生産、異種タンパク質生産の宿主として頻繁に用いられている。これらの理由から、BSPs に固定化した組換え <i>A. oryzae</i> は工業用生体触媒としての whole-cell biocatalyst 利用の契機となり得ると考えられる。</p>			
<p>第一部</p> <p><i>Candida antarctica</i> 由来リパーゼをコードする遺伝子を発現する組換え <i>Aspergillus oryzae</i> whole-cell biocatalyst の開発</p> <p><i>Candida antarctica</i> lipase B (CALB)の工業的用途を拡大するため、我々は <i>C. antarctica</i> 由来リパーゼをコードする遺伝子を発現する <i>A. oryzae</i> whole-cell biocatalyst を開発した。ホストとして <i>A. oryzae</i> RIB40 株に由来する <i>A. oryzae</i> niaD300 株を用いた。CALB 遺伝子は <i>C. antarctica</i> CBS6678 株より単離し、分泌シグナルペプチドの有無について異なる発現プラスミドを作成した。プラスミド pNGA142 ならびに pNAN8142 を用い、それぞれ glaA プロモーター、P.No-8142 プロモーター制御下でリパーゼ遺伝子を発現させた。得られた組換え <i>A. oryzae</i> を PUF 製の BSPs に固定化し、これを用いた para-nitrophenol butyrate(p-NPB)の加水分解反応に成功した。</p>			
<p>第二部</p> <p>固定化異種リパーゼ発現 <i>Aspergillus oryzae</i> : 有機溶媒中でのエナンチオ選択的エステル転移反応において効率的な whole-cell biocatalyst</p> <p>前部で開発した固定化した CALB 発現 whole-cell biocatalyst を、酢酸ビニルをアシルドナーとしたエステル転移反応による (<i>R,S</i>)-1-フェニルエタノールの光学分割反応に用いた。固定化した CALB 発現 whole-cell biocatalyst の活性を最適化し、他の whole-cell biocatalyst、CALB 表層提示 <i>E. coli</i>, <i>Rhizopus oryzae</i> 由来リパーゼ(ROL)表層提示 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, tglA リパーゼ発現 <i>A. oryzae</i> whole-cell biocatalyst との比較を行った。固定化した CALB 発現組換え体 <i>A. oryzae</i> の初期活性は tglA リパーゼ発現 <i>A. oryzae</i> の少なくとも 15 倍高い活性を示した。tglA リパーゼ発現 <i>A. oryzae</i> では反応 48 時間で (R)-酢酸フェニルエステルの最大収率 90%、エナンチオ過剰率(enantiomeric excess: ee)95%であったのに対し、固定化した CALB 発現組換え体 <i>A. oryzae</i> では反応 3.5 時間で最大収率 88.1%、エナンチオ過剰率 99% 以上であった。組換え体 <i>A. oryzae</i> はヘキサン、ヘプタン、トルエン、シクロヘキサン、オクタン中で活性を保ち、15 サイクル以上のバッチ反応後も活性を保っていた。</p>			
<p>第三部・第一章</p> <p>ジャトロファ油からの酵素を用いたバイオディーゼル生産:生体触媒としての固定化 whole-cell と粉末リパーゼの比較</p>			

氏名	TAMALAMPUDI SRIAPPAREDDY
<p>リパーゼを生産する <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL)の whole-cell を BSPs に固定化し、<i>Jatropha curcas</i> の種子からとれる比較的低コストな非食用油からのバイオディーゼル(BDF)生産に用いた。ROL の活性を市販の最も効果的とされるリパーゼ(Novozyme 435)と比較した。様々なアルコールを水酸基供与体として試験した結果、用いたリパーゼによらずジャトロファ油のメタノリシス反応は他のアルコリシス反応よりも早く進行することが明らかとなった。Novozyme 435 を用いた場合では反応混合物中の最大メチルエステル含量は反応 90 時間で 76 wt%であったのに対し、ROL を用いた場合では反応 60 時間で 80 wt%に達した。両リパーゼとも繰り返し利用が可能であり、5 サイクルの反応後でも初期活性の 90 %以上を保っていた。これらの結果から BSP に固定化した ROL whole-cell はジャトロファ油からの BDF 生産において有望な生体触媒であるといえる。</p>	
<p>第三部・第二章</p> <p><i>Fusarium heterosporum</i> リパーゼ発現組換え <i>Aspergillus oryzae</i> を用いたバイオディーゼル燃料の生産</p> <p><i>Fusarium heterosporum</i> 由来リパーゼ(FHL)をコードする遺伝子を単離し、<i>A. oryzae</i> ゲノム上で pNAN8142 プロモーター制御下にて発現させた。この組換え体の whole-cell biocatalyst を BDF 生産のための植物油のエステル転移反応に供した。<i>R. oryzae</i> whole-cell biocatalyst では、活性の安定化のためにグルタルアルデヒドによる処理が必要であったのに対し、FHL 発現 <i>A. oryzae</i> ではグルタルアルデヒド処理無しで優れた活性の安定性を示した。4 回のバッチ反応後、組換え体の whole-cell biocatalyst はメチルエステル収率 88 wt%を達成する残存活性を保っていた。</p>	
<p>本研究は組換え <i>Aspergillus oryzae</i> を用いたバイオ変換技術について、その whole-cell biocatalysts の創製および有用物質変換プロセスへの応用を研究したものであり、新規生体触媒に関する基礎研究および効率的生産技術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。</p> <p>よって学位申請者の TAMALAMPUDI SRIAPPAREDDY は、博士(工学)の学位を得る資格があると認める。</p>	