



Development of a process model for enzymatic biodiesel production from a broad range of feedstocks using *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts

足立, 大輔

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Date of Publication)

2013-05-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5764

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005764>

※ 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。



論文内容の要旨

氏 名 足立 大輔

専 攻 応用化学

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Development of a process model for enzymatic biodiesel
production from a broad range of feedstocks using *Aspergillus*
oryzae whole-cell biocatalysts

麹菌全細胞触媒を用いた多様な原料からの酵素法バイオデ
ィーゼル燃料生産を目指したプロセスモデルの開発

指導教員 近藤 昭彦

(注) 2, 000 字～4, 000 字でまとめること。

(氏名: 足立 大輔 NO. 1)

近年、資源問題や環境問題への対応策として、バイオマス資源の利用が進められている。バイオディーゼル燃料(BDF)は植物油の主成分であるトリグリセリド(TG)とアルコールの反応によって得られるアルキルエステルであり、既存の軽油に代替可能で、環境汚染物質をほとんど含まないクリーンなエネルギーとして注目を浴びている。現在、BDF 生産法として、アルカリ触媒法が実用化されているが、本手法はエネルギー消費の大きさや排水処理、生産物の回収等に問題を残している。そこでこれらの問題を解決できる酵素触媒法に注目が集まっている。しかし酵素触媒法は、触媒として用いる酵素(リパーゼ)自身のコストが高く、工業化は困難とされている。そこで我々は酵素生産能が高いことが知られている麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主とした遺伝子組み換えにより、リパーゼ高生産菌体を創製し、その菌体を多孔質の微生物保持粒子(BSPs)と共に固定化培養することで、whole-cell biocatalyst (固定化菌体触媒)を取得し、BDF 生産へと適用した。本手法を用いることにより、従来の酵素精製プロセスを大幅に簡略化できることから、安価な BDF 生産が可能となる。現在までに本技術の利用により、大豆油とメタノールを基質とした BDF 生産において、90%程度の BDF 収率を達成している。しかし、多様化する原料ニーズへと対応するため、より広範囲な原料からの高効率な BDF 生産が求められる。そこで、本研究では、*A. oryzae* whole-cell biocatalyst を用いて各種原料からの高効率 BDF 生産に有効なプロセスモデルの開発を目指した。

現在までに、*Fusarium heterosporum* 由来リパーゼ(FHL)発現菌体(r-FHL)を用いた植物油からの BDF 生産反応で 90%程度の BDF 転換率を達成している。しかし、FHL のみを用いた反応系では未反応の各種グリセリドが多量に反応液中に蓄積してしまう。BDF は実用化に際して、反応率や残存グリセリドに関して厳しい製品規格が定められている。よって実用化を目指すには、反応産物組成の更なる改善が必要となる。そこで残存グリセリドに特異的に作用することが知られているリパーゼ mono, di-glyceride lipase B (mdlB)に注目した。mdlB を従来の FHL と併用することで、反応産物中の残存グリセリドを全て BDF へと変換することが期待される。そしてこれら機能の異なる 2 種のリパーゼを導入した whole-cell biocatalyst (共発現菌体)を開発し、r-FHL と比較を行ったところ、本研究で開発した共発現菌体において副産物の生成が抑制され、収率が改善されることが明らかとなった。また本菌体の繰り返し利用に関する検討を行ったところ、90%以上の反応率を 10 サイクル維持しており、本菌体の長期安定性が示された。以上の結果より、本研究で開発した共発現菌体を用いたリパーゼ複合系は植物油からの BDF 生産において有効なシステムであることが示唆された。

パーム油は世界で最も生産量が多く、安価な植物油であるため、BDF 生産の原料として注目を浴びている。しかし、パーム油は室温で固化してしまうため、効率的な BDF 生産を行うためには高温(40-50℃)での反応が必要になる。しかし、従来使用していた r-FHL は熱安定性が低く、高温条件下での使用が困難であることから、高い熱耐性を有する触媒の開発が必要となる。そこで本研究では高温で高い安定性を示すことが知られている耐熱性バクテリア *Geobacillus thermocatenulatus* 由来のリパーゼ(BTL2)に注目し、*A. oryzae* whole-cell biocatalyst への導入を行った。作製した固定化菌体(r-BTL)の特性解析を行ったところ、r-FHL と比較して高い熱安定性と有機溶媒耐性を示したことから、r-BTL を高温条件下

(氏名： 足立 大輔 NO. 2)

(40-50℃)におけるパーム油からの BDF 生産へ適用した。r-FHL では温度の上昇に伴い大幅な収率の低下が見られたのに対して、r-BTL では高温条件下で高収率を達成していた。以上の結果から、本研究で開発した r-BTL は、高温条件下におけるパーム油からの BDF 生産に非常に効果的であることが示唆された。

BDF 生産において原料コストの占める割合は非常に大きい。そこで、脂肪酸(FA)を含む低コスト原料からの BDF 生産に関心が集まっている。しかし、FA を含む原料を用いる際、従来のアルカリ触媒法ではけん化により石鹸が生成するため、商用固定化リパーゼ Novozym 435 は FA による阻害を受けるため、その利用が困難である。そこで、FA 含有量が高い原料からの高効率な BDF 生産系の開発が求められる。そこで本研究では、FA のエステル合成を高効率に触媒することが可能な *Candida antarctica* lipase B (CALB)に注目し、以下のような 2 段階プロセスを検討した。まず一段階目として *Candida rugosa* lipase (CRL)により植物油を加水分解し、高 FA 含有率の加水分解物を取得、続いて 2 段階目にその加水分解物を基質とした CALB 発現菌体(r-CALB)を触媒とするエステル合成反応により、BDF を生産する。上記プロセスにおいて r-CALB は植物油加水分解物からの BDF 生産に有効に働き、反応開始 6 時間後に 90%以上の高収率を達成した。また本プロセスは、従来の r-FHL を用いたエステル交換反応とは異なり、触媒安定性を維持するために段階的なメタノール添加や水の添加が不要であった。また、r-CALB は回転式恒温槽を利用した繰り返しエステル合成反応において、90%以上の高収率を 20 サイクル維持していた。以上の結果から、本プロセスは植物油からの BDF 生産に有効であることが示唆された。

これまでの BDF 生産プロセスでは、原料に用いるアルコールが石油由来であることが問題点であった。そこで本研究ではメタノールの代わりに玄米由来のバイオエタノールを用いることで、石油資源に依存しない完全なバイオマス資源からの統合型 BDF 生産プロセスの開発を目指した。以前の研究においてエタノールを用いた BDF 生産を高効率に触媒し、高水分量の BDF 生産プロセスにおいて高い安定性を有していた r-FHL を本プロセスに利用した。また、エタノール発酵には酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (MNIV/GS)を使用し、発酵液を回収後、蒸留を行った後に BDF 生産へと利用した。r-FHL は商用の固定化リパーゼ Novozym 435 と比較してバイオエタノールを用いた BDF 生産を非常に高効率に触媒し、90%以上の高収率を達成することに成功した。また、r-FHL はバイオエタノールを用いた 5 サイクルの繰り返し BDF 生産において 80%以上の収率を維持しており、その安定性が確認できた。本プロセスでは、水分添加量を調整することで、バイオエタノールと水とリパーゼを混合するという操作のみで高効率な BDF 生産が行えることからその簡便性が示された。以上の結果から、本研究で開発した統合型 BDF 生産プロセスはバイオマス由来原料のみを用いた BDF 生産に有効であることが示唆された。

これらの成果に示されるように、本研究は酵素法 BDF 生産の実用化に向けて非常に有望な技術であることが示唆され、今後益々の発展が期待される。

(別紙 1)

論文審査の結果の要旨

氏名	足立 大輔		
論文 題目	Development of a process model for enzymatic biodiesel production from a broad range of feedstocks using <i>Aspergillus oryzae</i> whole-cell biocatalysts 麹菌全細胞触媒を用いた多様な原料からの酵素法バイオディーゼル燃料生産を目指したプロセスモデルの開発		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	近藤 昭彦
	副 査	教授	大村 直人
	副 査	教授	水畑 穰
	副 査	准教授	荻野 千秋
	副 査		
要 旨			
概要			
本論文では <i>Aspergillus oryzae</i> whole-cell biocatalyst を利用した酵素法による多様な原料からの高効率バイオディーゼル燃料(BDF)生産を目指したプロセスモデルの開発を行った。BDF は既存の軽油に代替可能で、環境汚染物質をほとんど含まないクリーンなエネルギーとして注目を浴びている。現在 BDF 生産法としてプロセスの省エネルギー化と簡便化を図れる酵素触媒法に注目が集まっているが、触媒として用いる酵素リパーゼのコストが高く、工業化は困難とされている。そこで本論文ではその安全性が認められ、高い酵素生産能を有することが知られている麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> を宿主とした遺伝子組み換えにより、リパーゼ高生産菌体を創製し、その菌体を多孔質の微生物保持粒子(BSPs)に固定化することで、whole-cell biocatalyst (固定化菌体触媒)を取得し、各種原料からの BDF 生産へと適用した。本手法を用いることにより、従来の酵素精製プロセスを大幅に簡略化できることから、安価な BDF 生産が期待できる。			
現在までに本技術の利用により、大豆油とメタノールを基質とした BDF 生産において 90%程度の BDF 収率を達成している。しかし、多様化する原料ニーズへ対応するため、より広範囲な原料からの高効率な BDF 生産が求められる。そこで、本研究では、各種リパーゼを発現する <i>A. oryzae</i> whole-cell biocatalyst を用いてそれぞれの原料に適した Whole-cell biocatalyst の開発を行うことで、各種原料からの高効率 BDF 生産に有効なプロセスモデルの開発を目指した。			
第一章では、残存グリセリドに特異的なリパーゼの使用により、従来系で問題となっていた残存グリセリドの減少を目指した。現在までに、 <i>Fusarium heterosporum</i> 由来リパーゼ(FHL)発現菌体(r-FHL)を用いた植物油からの BDF 生産反応で 90%程度の BDF 転換率を達成しているが、反応中間体である各種グリセリドの蓄積が問題となっていた。そこで本研究では、残存グリセリドに特異的に作用することが知られているリパーゼ mono, di-glyceride lipase B (mdlB)に注目した。mdlB を従来の FHL と反応系に併用することで、反応産物中の残存グリセリドを全て BDF へと変換することを目指した。そしてこれら機能の異なる 2 種のリパーゼを導入した whole-cell biocatalyst (共発現菌体)を開発し、BDF 生産への適用を行ったところ、従来系と比較して副産物の生成が大幅に抑制され、収率が改善されることが明らかとなった。また本菌体は 10 サイクルの繰り返し利用において、90%以上の高反応率を維持しており、その長期安定性を証明した。			
第二章では、耐熱性リパーゼを発現する whole-cell biocatalyst を作製し、高温条件下におけるパーム油からの高効率な BDF 生産を目指した。パーム油は世界で最も生産量が多く、安価なため、BDF 生産の原料として注目を浴びているが、室温で固化してしまうため、効率的な BDF 生産を行うためには高温での反応が必要になる。しかし従来使用していた r-FHL は耐熱性が低く、高温条件下では失活してしまうという問題があった。そこで本研究では高温条件下で高い触媒能を有する生態触媒を開発するため、耐熱性バクテリア <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> 由来のリパーゼ(BTL2)に注目し、 <i>A. oryzae</i> whole-cell biocatalyst への導入を行った。作製した固定化菌体(r-BTL)は従来のリパーゼと比較して高い熱安定性を有し、高温条件下(40-50℃)におけるパーム油からの BDF 生産を高効率に触媒することを可能にした。更			

氏名	足立 大輔
に r-BTL は高い有機溶媒耐性を有し、パーム油からの BDF 生産の際、従来系と比較して高濃度のメタノールを一度に加えた時にも高収率を達成したことから、r-BTL の使用により、従来系で不可欠であった多段階メタノール添加の改善の可能性が示唆された。 第三章では、低コストな BDF 生産プロセスを可能にするため、安価な原料が多く含む脂肪酸(FA)からの高効率な BDF 生産を目指した。BDF 生産において原料コストが占める割合は非常に大きく、FA を多く含む低コスト原料からの BDF 生産に関心が集まっている。しかし、FA を含む原料を利用する際、従来のアルカリ触媒法ではけん化により石鹸が生成するため、商用固定化リパーゼ Novozym 435 は FA による阻害を受けるため、その利用が困難であった。そこで本研究では、FA のエステル合成を高効率に触媒することが可能な <i>Candida antarctica</i> lipase B (CALB) に注目し、以下のような 2 段階プロセスを検討した。まず一段階目として加水分解活性が高い <i>Candida rugosa</i> lipase (CRL) を用いて植物油の加水分解を行い FA へと変換、続いて 2 段階目にその FA を基質とした CALB 発現菌体(r-CALB)を触媒とするエステル合成反応により、BDF へと変換するというプロセスである。本プロセスにおいて r-CALB は植物油由来の FA からの BDF 生産に非常に有効に働き、反応開始 6 時間後に 90% 以上の高収率を達成した。また本プロセスは、従来の r-FHL を用いたエステル交換反応とは異なり、触媒安定性を維持するために段階的なメタノール添加や水の添加が不要であるという工業利用に有効な利点を有していた。また、r-CALB は回転式恒温槽を利用した繰り返しエステル合成反応において、90% 以上の高収率を 20 サイクル維持していたことから、高い安定性を有していることが示された。 第四章では、これまで BDF 生産に用いてきた石油由来のアルコールをバイオマス由来のアルコールに置き換えることで、石油資源に依存しない完全なバイオマス由来原料からの BDF 生産を目指した。従来の BDF 生産プロセスでは、原料に用いるアルコールが石油由来であることが一つの問題点であった。そこで本研究では石油由来のメタノールの代わりに玄米由来のバイオエタノールを用いることで、完全なバイオマス資源からの統合型 BDF 生産プロセスの開発を目指した。本研究には過去の研究でエタノールを用いた BDF 生産を高効率に触媒し、高水分量の BDF 生産プロセスにおいて高い安定性を有していた FHL 発現菌体(r-FHL)を使用した。また、エタノール発酵には酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (MNIV/GS) を使用し、発酵液を回収後、蒸留を行った後に BDF 生産へと利用した。r-FHL は商用の固定化リパーゼ Novozym 435 と比較してバイオエタノールを用いた BDF 生産を非常に高効率に触媒し、90% 以上の高収率を達成することに成功した。また、r-FHL はバイオエタノールを用いた 5 サイクルの繰り返し BDF 生産において 80% 以上の収率を維持しており、その安定性が確認できた。本プロセスでは、水分添加量を調整することで、バイオエタノールと水とリパーゼを混合するという操作のみで高効率な BDF 生産が行えることからその簡便性が示された。 本論文は各種リパーゼを発現させた <i>A. oryzae</i> whole-cell biocatalyst を構築し、各種の実バイオマス原料からの BDF 生産において有用な技術を示している。また、本研究で提案されている BDF 生産技術は非常に高効率であるため、BDF の酵素生産についての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、学位申請者の足立大輔は、博士(工学)の学位を得る資格があると認める。	