

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310065

研究課題名(和文) バイオ燃料・有用ケミカル・電気エネルギーを同時に作り出す生産プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of bio-fuels, bio-chemicals and electricity production

研究代表者

福田 秀樹 (Fukuda, Hideki)

神戸大学・その他部局等・その他

研究者番号：30263396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：低炭素社会の構築、エネルギー問題の解決に向け、再生可能な資源であるバイオマスの有効利用法の開発が急務である。固定化菌体触媒を用いたバイオディーゼル生産は、環境に優しい生産技術である。しかし、バイオディーゼルの生産性の向上とともに副生成物であるグリセリンも大量に生じるという問題点がある。本研究では、このバイオディーゼル燃料から生じるグリセリンを有用物質へと変換する技術の開発を行った。固定化担体、固定化方法などの固定化菌体触媒の条件を検討することで、有用物質であるグリセリン誘導体の生産プロセスの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Production of biodiesel using whole-cell biocatalyst is one of the important technologies for environment-friendly bioprocess. One of the major issues of biodiesel production is a by-product, glycerol. Here, we developed useful glycerol-derived compound production as well as bio-diesel production. Optimization of immobilized support, immobilization method, and whole-cell biocatalyst, successfully production of glycerol-derived compounds was carried out.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオリファイナリー

1. 研究開始当初の背景

低炭素社会の構築、エネルギー問題の解決に向け、再生可能な資源であるバイオマスの有効利用法の開発が急務である。バイオリファイナリーは、巨大な市場を創出して工業及び農林水産業を活性化しながら、化石資源への全面依存から脱却して低炭素社会を構築することができるグリーン・イノベーションである。このグリーン・イノベーションは、資源・エネルギー安全保障を確保するとともに、地球温暖化防止、環境問題の解決に大きく貢献する重要性の高い研究分野である。数年後にはバイオベース化学品の市場は、かなりの規模に達すると推定されており、日本の化学品をバイオベース化した場合、CO₂ 総排出量の大幅な削減が期待できるため、社会からの要請は非常に強い。バイオリファイナリーは、CO₂ をバイオマスとして資源化し、先端バイオ技術を駆使して再生可能なエネルギーや化学品を高効率生産する革新技术である。申請者はこれまで微生物を用いてバイオマスから燃料や化成品原料等の有用物質を生産する技術の開発に成功してきた。セルロースからのバイオエタノール生産や植物油からのバイオディーゼル生産技術は、現在のガソリン/軽油に代替可能なエネルギーとして実用化へ着々と進んでいる。バイオマスという環境に優しい資源を原料とし、さらに生体反応を利用した物質生産という低環境負荷な生産技術を用いることで、環境問題、エネルギー問題の両者を同時に解決できる可能性を持つ。

研究代表者はこれまで、固定化菌体触媒を用いたバイオディーゼル生産技術の開発を世界に先駆けて行ってきた。省エネルギーのままバイオディーゼルの連続生産できる技術の開発に成功し、環境に優しい生産技術として非常に高く評価を受けている。しかし、バイオディーゼルの生産性の向上とともに副生成物であるグリセリンも大量に生じるという問題点がある。これまで、このグリセリンを有効利用しようという試みはいくつも研究例があるが、いずれもその生産性や生産工程に問題点がある。

一方で、現在の社会の大半を担う電気エネルギーをバイオマスから作るという試みは、上述の物質生産技術に比べてやや遅れているのが現状である。バイオエタノール等の燃料を通常の火力発電に用いたのでは、その発電効率は石油資源からの発電と同じくおよそ半分ほどであり、エネルギー

ロスが非常に大きい。すなわち、バイオマスから直接電流を取り出す事ができれば、環境に優しいクリーンなエネルギーとして社会に大きく貢献できると考えられる。研究代表者はこれまでの研究で、固定化菌体技術を用いたバイオマスからの電気エネルギー生産技術を開発してきた。この研究成果としてバイオマス(糖類)から直接電気エネルギーを取り出すことに成功したと共に、電気エネルギーを取り出しながらその原料を有用ケミカルに変換できる可能性を見出すことに成功してきた。

そこで本研究では、このグリセリンに着目しつつ、それを原料として様々な有用物質を生産するという環境に優しい技術の開発、という着想に至った。

2. 研究の目的

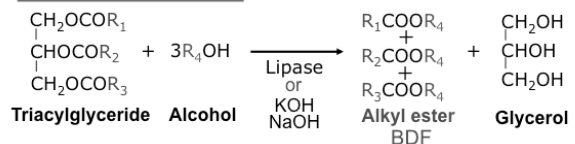
本研究では、「バイオ燃料・有用ケミカル・電気エネルギーをバイオマスから同時に生産することで環境負荷を低減する基盤技術の開発」を目指す。具体的には、固定化菌体触媒技術を用いてグリセリンからの有用ケミカル生産技術の開発を行った。

3. 研究の方法

バイオディーゼルは、植物油脂を原料とした軽油の代替となる、環境に優しい燃料である。その生成反応は以下で表される。

主に植物の油脂を原料とした、軽油の代替となる燃料

Alcoholysis Reaction



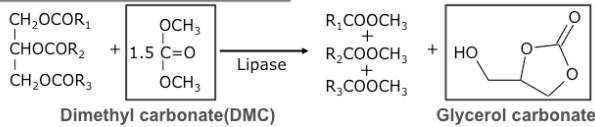
上記より、バイオディーゼルとなるアルキルエステルと同等のグリセリンが生産する。そこで本研究では、バイオディーゼルの効率良く生産するためのプロセス条件検討(=グリセリンを大量に生産するための条件検討)をはじめに行った。続いて、得られたグリセリンから有用物質を生産するプロセスの開発を行った。

固定化触媒は、検討をしやすいするためにまずは固定化酵素触媒を調整し、様々な条件検討を行った。続いて、固定化菌体触媒を調製して実験を行った。また、グリセロールの粘性に対する適応性を向上させるために、酵素が失活しにくい耐熱性固定化菌体触媒についても検討を進めた。

グリセロールからの有用物質生産

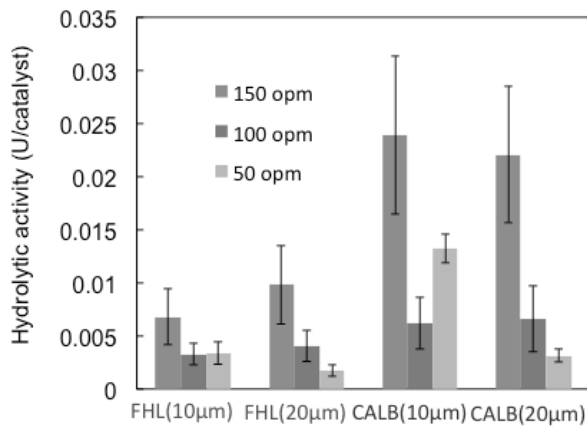
においては、dimethyl carbonateを系内に添加することで、グリセロール誘導体を生産するプロセスを構築し、バイオディーゼルとグリセロール誘導体を同時に生産するための検討を行った。

●グリセロール誘導体同時生産法

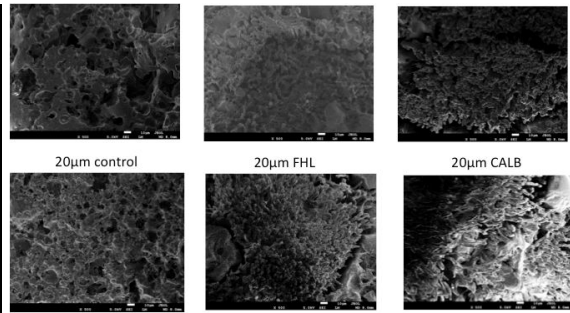


4. 研究成果

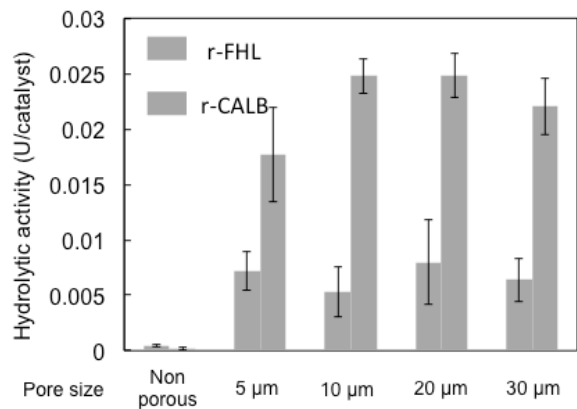
固定化酵素触媒、及び固定化菌体触媒については、担体の選択、固定化方法、そして固定化された状態の評価が重要となる。そこで、これまで利用されていたポリウレタンに対して、ガラスビーズの検討も並行して進めた。ポリウレタンは菌体等が絡みつきやすく固定化が容易である反面、担体としての耐久性が低いため、長期の使用に耐えないという点が課題である。一方、ガラスビーズにおいては、担体それ自体の剛直性は高いものの、その固定化能が低い点が問題である。本研究で用いている糸状菌を菌体触媒として、これらの固定化担体への固定化能を評価した。固定化の際の攪拌数を上げることで、それぞれの菌体触媒を効率良く固定化出来ることが示された。



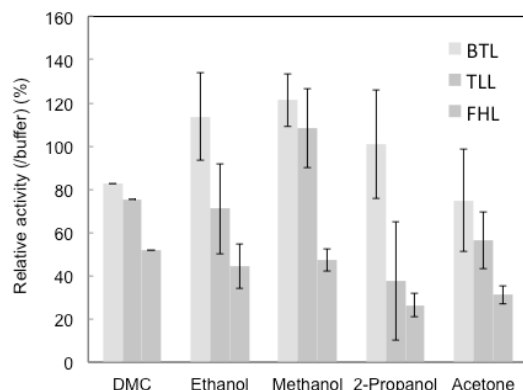
また、それぞれの固定化菌体の様子をSEMにて観察したところ、低い活性の固定化菌体触媒においては、固定化量のごくわずかであったが、活性の上昇とともに固定化量の増加が観察された。このことより、固定化量の増加が優れた菌体触媒を構築する上で重要な因子であることが明らかとなった。また、固定化方法により固定化量変動すること、及び固定化を直接確かめることに成功した。



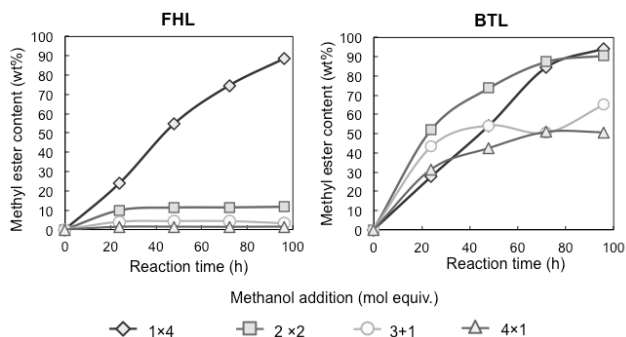
続いて、固定化菌体における固定化単体について、担体の細孔径の検討を行った。結果を以下に示す。これより、孔径が大きくなるにつれて活性も上昇することがわかった。また、ある程度の孔径があれば十分であることが示された。



続いて、グリセロール利用に向けた、耐久性の高い固定化菌体触媒の開発を目指した。一般的に耐熱性の酵素は、その耐久性が高いと考えられる。本研究では、耐熱性の菌体触媒として *Bacillus thermocatenulatus* 及び *Thermomyces lanuginosus* 由来の酵素をそれぞれ選択し、それらを発現させた菌体触媒を調製し、担体へ固定化させた。初めにそれらの有機溶媒耐性を評価した結果を以下に示す。これより、*B. thermocatenulatus* 由来の酵素を持つ菌体触媒が最も耐性が高いことがわかった。

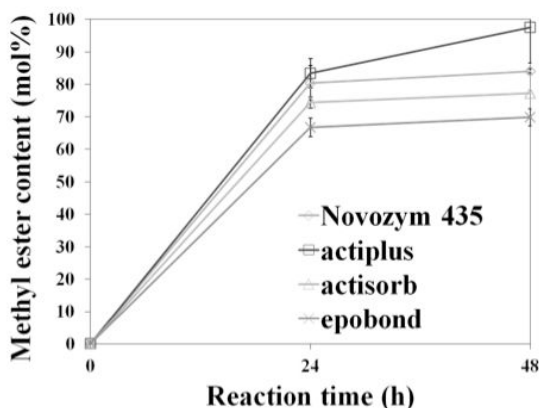


同様にバイオディーゼル合成における耐性を評価したところ、やはり *B. thermocaenulatus* 由来の酵素を持つ菌体触媒が最も高い性能を示した。



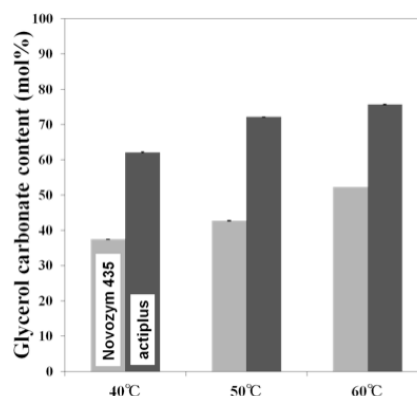
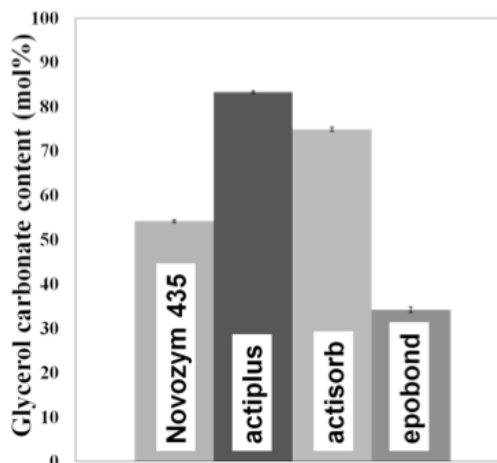
並行して、グリセロールからの有用物質生産について検討を進めた。上述の通り、グリセロール誘導体を生産するプロセスとして、Dimethyl carbonate (DMC) を添加する生産技術の検討を行った。

まず初めに、固定化酵素を用いて本プロセスの可能性について検討した。4種類の固定化酵素を用いてバイオディーゼルの生産量を評価したところ、すべての酵素においてバイオディーゼルが生産されていた(下図)。これより、同様にグリセロール誘導体が生産されていると期待される。



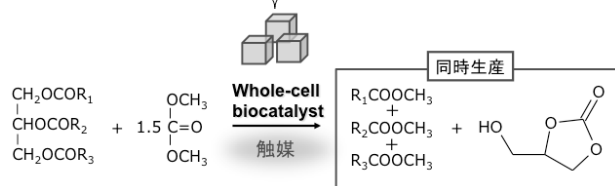
同様にグリセロール誘導体(グリセロールカーボネート)の生産量を評価したところ、これら4つの酵素すべてにおいてこの誘導体が生産されていた。また、その生産量は actiplus を用いた場合が最も高く、その転換率は7割以上であった。これより、バイオディーゼルとグリセロール誘導体の同時生産が可能であることが示された。

同様に温度の検討を行ったところ、反応温度は60度の時に高い転換率を示した。

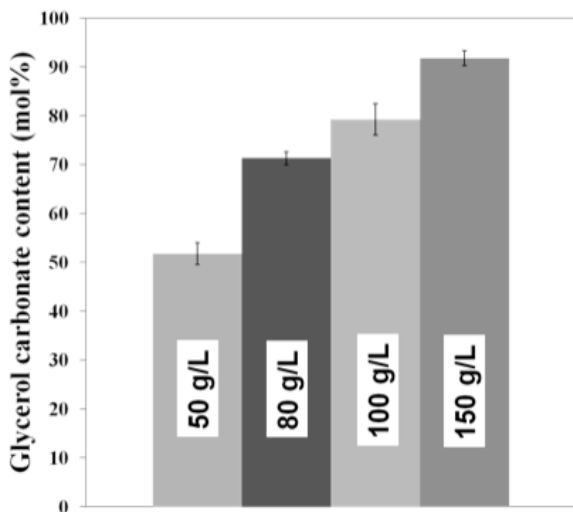
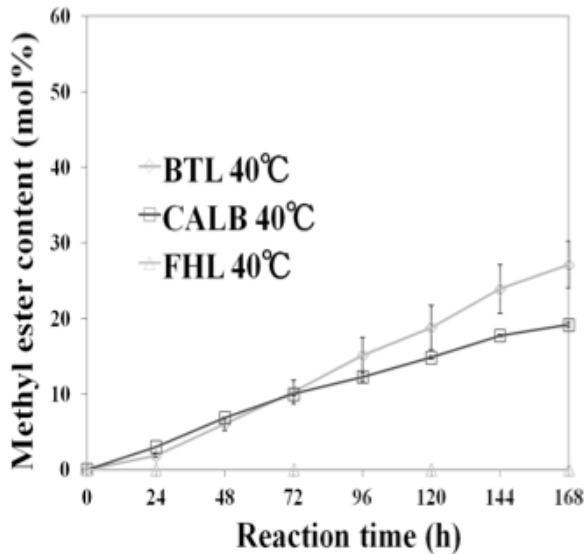


これらの検討を元に、固定化菌体触媒を用いてグリセロール誘導体の生産技術の開発を行った。初めに、それぞれの固定化菌体を調製し、それぞれ単独で生産反応を行った。

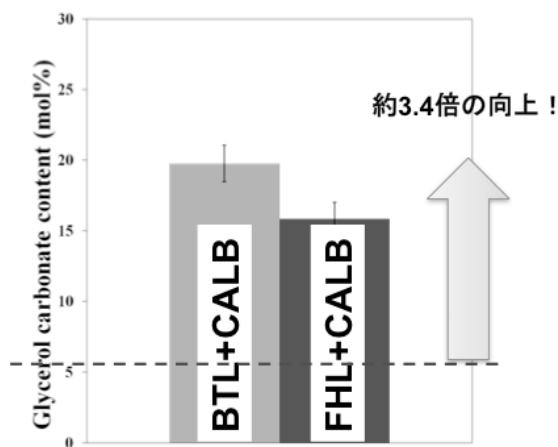
- ◆ *Fusarium heterosporum* lipase (FHL)
- ◆ *Candida antarctica* lipase B (CALB)
- ◆ *Geobacillus thermocatenuatus* lipase (BTL)



バイオディーゼル生産量を見るといづれの菌体触媒を用いた場合も固定化酵素に比べて低く、十分な値ではなかった。一方で、グリセロール誘導体においても、同様に低い値となった。これは、酵素に比べて菌体は基質の拡散が低いためである可能性が考えられるとともに、またそれぞれの酵素のもつ特性のためであるとも考えられた。



そこで、これらの菌体触媒を混合して用いることで、それぞれに得意な反応を有利に進行させ、全体として反応率の向上を目指した。結果を以下に示す。菌体を混合して用いることで、半効率を約3倍向上させることに成功した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Adachi, D., Koh, FH., Hama, S., Ogino, C., Kondo, A. (2013) A robust whole-cell biocatalyst that introduces a thermo- and solvent-tolerant lipase into an immobilized *Aspergillus oryzae*: Characterization and application to enzymatic biodiesel production., *Enzyme and Microbial Technology*, **52**, 331-335

Adachi, D., Hama, S., Nakashima, K., Bogaki, T., Ogino, C., Kondo, A. (2013) Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B., *Bioresour. Technology*, **135**, 410-416

Adachi, D., Koda, R., Hama, S., Yamada, R., Nakashima, K., Ogino, C., Kondo, A. (2013) An integrative process model of enzymatic biodiesel production through ethanol fermentation of brown rice followed by lipase-catalyzed ethanolysis in a water-containing system., *Enzyme and Microbial Technology*,

[学会発表](計 11件)

Chiaki Ogino, "Microbial screening for biorefinery research" The 20th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2014.11.6-8. National Chung Cheng University.

小倉一真・荻野千秋・近藤昭彦「酸触媒イオン液体前処理を用いた新規バイオプロセス構築」日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会(第481回講演会) 2013年9月5日~6日 広島大学

小倉一真・荻野千秋・近藤昭彦「バイオマス分解性向上を目的とする酸導入イオン液体を用いた新規前処理法開発」第65回日本生物工学会

大会 2013年9月18日～20日 広島

小倉 一真・荻野 千秋・近藤 昭彦「イオン液体と酸を用いた新規バイオマス前処理法の開発と応用」化学工学会第79年会 2014年3月18日～20日
岐阜大学

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 秀樹 (FUKUDA Hideki)
神戸大学 学長
研究者番号：30263396

(2) 研究分担者

荻野 千秋 (OGINO Chiaki)
神戸大学大学院工学研究科 准教授
研究者番号：00313693

田中 勉 (TANAKA Tsutomu)
神戸大学大学院工学研究科 准教授
研究者番号：90436551

山田 亮祐 (YAMADA RyoSuke)
神戸大学自然科学系先端融合研究環 助教
研究者番号：40608626

松本 拓也 (MATSUMOTO Takuya)
神戸大学自然科学系先端融合研究環 助教
研究者番号：40727161

(3) 連携研究者
()

研究者番号：