

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Thermal analysis for differentiating between oleaginous and non-oleaginous microorganisms |
| Author(s)    | Bongmun, Kang   |
| Citation     | 大阪大学, 2011, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/26872">https://hdl.handle.net/11094/26872</a>       |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | ボムン カン<br>Bongmun Kang   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (工学)  |
| 学位記番号      | 第 24973 号  |
| 学位授与年月日    | 平成 23 年 12 月 12 日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>工学研究科生命先端工学専攻  |
| 学位論文名      | Thermal analysis for differentiating between oleaginous and non-oleaginous microorganisms<br><br>(オイル生産微生物と非生産微生物とを識別するための熱分析に関する研究) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 大竹 久夫<br><br>(副査)<br>教授 福崎英一郎 教授 藤山 和仁 准教授 本田 孝祐  |

## 論文内容の要旨

Oils produced by crops and microorganisms are potentially renewable and carbon-neutral alternatives to petroleum fuels. The use of vegetable oils as raw materials for fuel production would compete with edible oils, thus leading to the soar of food price. Oil-accumulating microorganisms are likely to produce oils more efficiently than crop plants. Consequently, microbial oils, which have a composition of fatty acids similar to that of vegetable oils, are now believed as a promising potential feedstock for fuel production. Microorganisms, which accumulate more than 20-25% of their weight as lipids, are referred to as oleaginous species. Biodiesel production using oleaginous microorganisms has attracted great attention in the whole world. Oleaginous microorganisms store energy in a form that can be accessible through thermo-chemical conversion. It seems possible to screen oleaginous microorganisms based on the burning characteristics of microbial cells. However, little information is available on the physical and chemical changes occurring in microorganisms when they are heated in air. Thermal analysis comprises a group of techniques in which a physical property of a substance is measured as a function of temperature, while the substance is subjected to a controlled temperature program. Thermogravimetry (TG) is the study of the relationship between a sample's mass and its temperature. It can be used to study any physical or chemical process that causes a material to lose volatile gases. Differential thermal analysis (DTA) measures the temperature difference that develops between a sample and an inert reference material, when both are subjected to identical heat treatments. DTA curves indicate the heat energy absorbed or evolved in the sample corresponding to chemical and physical changes occurring at definite temperatures. Considerable attention has been paid to simultaneous TG/DTA analysis, because it is potentially useful for characterizing thermal behaviors of materials. However, the literature provides very little TG/DTA analysis for microorganisms.

Simultaneous TG/DTA was applied to microorganisms, including three non-oleaginous species (*Escherichia coli* JM109, *Rhodococcus opacus* B-4, and *Saccharomyces cerevisiae*) and four oleaginous species (*Mortierella alpina* IF032281, *Mortierella alliacea* YN-15, *Aurantiochytrium* sp. CB 15-5, and *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK 16). The mass-difference baseline method, where the DTA curve for a small-mass sample was used as the baseline for a large-mass sample, was employed to quantify the endothermic and exothermic peaks on the DTA curves. A marked difference in heat energy between the oleaginous fungus and the non-oleaginous microorganisms was detected in the temperature range from 280 to 360 °C. The heat evolved from *M. alpina*

IF032281 in this temperature range was approximately 5.5 kJ/g, which was 3.3- to 11-fold greater than those detected from the non-oleaginous microorganisms.

To resolve overlapping DTA peaks between 280 and 360 °C, the furnace temperature was linearly increased from 30 to 280 °C, decreased to 30 °C, linearly increased from 30 to 360 °C, and then isothermally held at 360 °C for 30 min. This two-step linear temperature program was effective in resolving overlapping exothermic peaks in the DTA curves in the temperature range from 280 to 360 °C. Heat evolved from a microbial sample was estimated from the area under the exothermic peak between 280 and 360 °C using indium as a standard material. There was a linear relationship between the exothermic heat and total lipid content of the tested microorganisms. Exothermic heat per dry sample mass (kJ/g) in the temperature range from 280 to 360 °C is a promising measure for differentiating between oleaginous and non-oleaginous microorganisms. Future study is directed toward the development of an inexpensive, high-throughput instrument for the screening of oil-accumulating microorganisms.

## 論文審査の結果の要旨

近年、バイオマスからバイオ燃料を生産するための研究に関心が集まっているが、バイオ燃料生産微生物の燃焼特性を調べた研究はまだ殆どない。本論文では、微生物の燃焼特性の解析に示差熱重量同時測定法を適用し、オイル生産微生物と非生産微生物とを識別するための熱分析法について論じている。

第 1 章では、微生物を用いたバイオ燃料生産の最近動向を要約し、熱分析法の原理と既往の適用例を紹介した後で、本研究の目的と本論文の構成について概説している。

第 2 章では、示差熱重量同時測定法により得られるデータより、Mass-difference-baseline method (質量差ベースライン法)を用いて発生熱量を算出するための理論について解説するとともに、オイル生産およびオイル非生産微生物へ本法を適用するための実験方法について述べている。

第 3 章では、示差熱重量同時測定法を、オイル生産微生物である *Mortierella alpina* IF032281 とオイル非生産微生物である *Escherichia coli* JM109, *Rhodococcus opacus* B-4 および *Saccharomyces cerevisiae* の培養細胞に適用し、Mass-difference-baseline method を用いることにより、安定して発熱量の簡易計測ができることを示している。本法により、オイル生産およびオイル非生産微生物の燃焼パターンを解析したところ、280 から 360°C の温度領域において、両者の発熱量に大きな違いが認められた。この温度領域におけるオイル生産微生物である *Mortierella alpina* IF032281 の発熱量は約 5.5 kJ/g であり、この値はオイル非生産微生物の発熱量よりも約 3.3 から 11 倍も大きかった。この結果は、温度 280 から 360°C の領域における発熱量を測定することにより、オイル生産微生物と非生産微生物を識別することが可能であることを示唆している。

第 4 章では、*Mortierella alpina* IF032281, *Mortierella alliacea* YN-15, *Aurantiochytrium* sp. CB 15-5 および *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK 16 の 4 種のオイル生産微生物と *Escherichia coli* JM109, *Rhodococcus opacus* B-4 および *Saccharomyces cerevisiae* の 3 種のオイル非生産微生物を用いて、温度 280 から 360°C の領域における発熱量を測定することにより、微生物のオイル蓄積量が推定できるかどうか調べている。温度 280 から 360°C の領域における発熱量をより正確に測定するため、Two-step linear temperature program (二段階線形温度プログラム)を用い、重なりあう測定ピーク分離を行っている。また、上記 7 種の微生物の培養細胞から脂質成分を抽出し、抽出された脂質成分が温度 280 から 360°C の領域において燃焼し、示差熱重量同時測定法により発熱量が計測できることを確認している。オイル生産微生物と非生産微生物の温度 280 から 360°C の領域における発熱量と細胞から抽出された総脂質量とを比較したところ、両者には高い相関が認められた ( $R^2=0.93$ )。

第 5 章では、第 3 および第 4 章に記載された実験結果を総括し、示差熱重量同時測定法を用いて温度 280 から 360°C の領域における発熱量を測定することが、微生物によるオイル蓄積量を簡便に計測する上で有効であると結論づけている。

以上のように、本論文は熱測定によりオイル生産微生物と非生産微生物とを識別することが可能であり、その結果オイル生産微生物を簡便に識別する新しい熱測定装置の開発が可能であることを示唆するものであり、その成果は生物工学の発展に大いに寄与するものと評価できる。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。