

# 有機溶媒耐性細菌を用いた水・有機溶媒二相系でのバイオプロセス開発

本田 孝祐  
(大阪大学大学院工学研究科)

## 研究の目的

生体触媒（酵素）反応を活用した化学品生産、いわゆるバイオプロセスは、エネルギー消費の少ない持続型生産プロセスとして期待されており、光学活性物質などのファインケミカル合成の場を中心にすでに多くの実用化例を持つ。一方、バイオプロセスにおいては酵素の能力を最大限引き出すため、それぞれの至適条件下、すなわちこれらが本来機能している生体内に近い反応条件が要求される。このため必然的にバイオプロセスの適用範囲は水系反応場において水溶性物質を原料とするものに限定されてきた。こういった背景のもと、バイオプロセスの応用可能性を高めるため、有機溶媒存在下でも利用可能な生体触媒の探索や育種に力が注がれている。

*Rhodococcus opacus* B4 は上記のような目的のもと、種々の有機溶媒に対する高い耐性を指標に自然界から単離された細菌である<sup>1</sup>。本菌は有機溶媒に対する優れた耐性に加え、疎水性に富む細胞表層構造を有し、有機溶媒に高い親和性を示す。本研究では*R. opacus* B4 のこのユニークな特性に着目し、従来の水・有機溶媒二相系プロセスから歩を進めた非水有機溶媒中での微生物変換反応系の構築を試みた。

## 方法

*R. opacus* B4 はTryptic Soy Broth培地にて 30°Cで好氣的に培養した。遠心集菌後、湿潤状態の菌体を有機溶媒に直接けん濁し、各種アッセイに供した。物質生産能は本菌由来のベンゼンジオキシゲナーゼ (BnzA)<sup>1</sup>によるインドールからのインジゴ生産を指標に評価した。BnzAを構成する 4 つのコンポーネント遺伝子を含む発現プラスミドベクター pROPtacBnzAを構築・導入し、BnzAを構成的に発現させた組換え*R. opacus* B4 を作成した。

## 結果

### 有機溶媒中での生残率と物質生産能

*R. opacus* B4 を各種有機溶媒にけん濁し、30°C、振とう条件下で 1~5 日間インキュベートした。けん濁液の一部をプレーティングし、コロニー形成数により生残数を確認した。この結果、中・長鎖のアルカン (C6~16)、オレイルアルコール、およびビス (2-エチルヘキシル) フタル酸 (BEHP) 中において少なくとも 5 日間の生存が確認された。生存の認められた有機溶媒中にpROPtacBnzAを有する組換え*R. opacus* B4 をけん濁し、インドールからのインジゴ生産を試みた。アルカン中ではインジゴの生産はほとんど見られず、オレイルアルコール、BEHP中において良好な生産が認められた。生残率とインジゴ生産能に有意な相関は見られず、反応収率はBEHP中において最大となった。この

原因として、インドールの有機溶媒への溶解度が反応効率に大きく影響を及ぼしていると予想される。

#### BEHP 中での代謝活性

非水有機溶媒中で *R. opacus* B4 が代謝活性を維持しているか否かを確かめるため、脂溶性炭素源の消費を追跡した。BEHP中に湿菌体を 2.5% (w/v)となるようにけん濁し、ここに終濃度 1% (w/v)のオレイン酸を添加、30°C、振とう条件下でインキュベートした。経時的にサンプリングを行い残存するオレイン酸量をHPLCにて定量した。湿菌体を加えた系では、時間経過とともに有意なオレイン酸の減少が認められた。12 時間のインキュベート後、残存するオレイン酸量は初期添加量の約 40%にまで減少した。一方、予め熱処理 (90°C、5 分間) を施した死細菌は、生菌と同様、BEHP中に均一にけん濁されたが、オレイン酸を消費することはなかった。これらの結果から *R. opacus* B4 の湿潤菌体がBEHP中でも脂溶性炭素源の代謝活性を維持していることが示された。

#### インジゴ生産

BnzA を構成的に発現させた組換え *R. opacus* B4 を触媒に BEHP 中でのインジゴ生産を測定した。また BnzA 反応に必要な還元力供給源としてオレイン酸添加の影響を検討した。反応開始から 6 時間までは、オレイン酸の有無に関わらず、経時的なインジゴの増加が認められた。オレイン酸を含まない系では、これ以降反応速度が緩やかになり、生産物量の頭打ちが生じたのに対し、オレイン酸共存下では持続的に反応が進行し続けた。24 時間反応後の最終生産物濃度はオレイン酸を含む系で、71.6 µg/ml となり、これはオレイン酸を含まない系の約 1.5 倍に相当した。オレイン酸添加により反応効率が増した原因として、基質・生成物の反応液への溶解度の変化や細胞膜透過性の向上なども考えられようが、この場合には反応初速度が向上するはずである。今回の結果では反応開始当初の変換速度に変化は見られず、その後の持続性が増すことにより反応収率が増加した。これはオレイン酸をエネルギー源とした代謝活性により BnzA 反応に必要な補酵素 NADH が再生されたためと考えられる。

#### 結論

本研究では疎水性有機溶媒耐性細菌である *R. opacus* B4 を用い、水を含まない有機溶媒中での物質変換反応が可能であることを示した。有機溶媒耐性細微生物を用いた物質生産プロセスとしては、通常の水系培養液に抽出相として有機溶媒を重層した二相系プロセスがよく知られる。油相からわずかに溶けだす基質は水相に局在する触媒微生物により変換され、再び油相に回収される、というのが本法の原理である。これにより基質の溶解度を高めるだけでなく触媒微生物に対する基質・生成物の毒性を低減させるメリットがある。これに対し、今回新たに提唱する「有機溶媒一相系」プロセスは、基質と触媒微生物の接触効率を大幅に向上させ、反応効率を高めることができると期待される。一方で、生物毒性の高い基質・生成物を用いる場合、その悪影響を直接的に被るデメリットも考慮に入れなければならない。各々のプロセスの得手不得手をより明確すること

で、難水溶性物質の微生物生産におけるプロセスデザインの可塑性を広げることが今後の課題である。

## 文献

- [1] Na, K.S., A. Kuroda, N. Takiguchi, T. Ikeda, H. Ohtake, and J. Kato (2005) Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 378-382.