

# 親水性イオン液体と極限環境微生物の酵素を用いたバイオマス変換系の開発

倉田 淳志  
(近畿大学 農学部)

## 研究の目的

イオン液体はアニオンとカチオンから構成され、常温常圧条件で液体の塩である。水や有機溶媒との分離、溶媒リサイクル系の構築が容易であるため第3の溶媒として注目され、不揮発性・不燃性を示すことから環境調和に適合した溶媒である<sup>(1)</sup>。さらにアニオンとカチオンの組み合わせを変更することで疎水性や親水性を示すイオン液体を調製可能であり、現在、親水性イオン液体を利用した難水溶性バイオマスの溶解技術が開発されつつある<sup>(2, 3)</sup>。

我々は、疎水性イオン液体を溶媒に用いて、微生物のリパーゼを活用したバイオプロセスの開発に成功し、未利用のコーヒー生豆を原料として抗ガン作用を示す3-cyclohexylpropyl caffeateを変換収率94%で合成した<sup>(4)</sup>。さらに用いる親水性イオン液体によって、酵素が失活することを見いだした<sup>(5)</sup>。親水性イオン液体における酵素の失活は、高濃度の塩により酵素の構造が変化し失活することが示唆されており<sup>(6)</sup>、親水性イオン液体存在下でも安定して利用可能な酵素の開発が期待されている。

本研究では、親水性イオン液体存在下で生育する微生物の構造や代謝経路、耐性機構の理解、さらに親水性イオン液体存在下で様々なバイオマスに作用する酵素の取得を目的とする。親水性イオン液体への耐性菌や耐性酵素の適応機構を解明し、イオン液体と耐性酵素を利用したバイオマス利用技術を開発する。

## 方法

食品サンプルから、親水性イオン液体存在下で生育する微生物群集の探索を試みた。使用したイオン液体は以下のとおり：親水性イオン液体; 1-ethyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate ([EMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>])、1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate ([BMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>])、1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM][Cl])、疎水性イオン液体; 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF<sub>6</sub>])、1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ([BMIM][NTf<sub>2</sub>])。得られた単離株は16S rRNA遺伝子配列に基づいて同定を試みた。さらにLC-MS (Waters) を用いて、[BMIM] カチオン (分子イオン  $m/z$  139.1、フラグメントイオン  $m/z$  83.1) の定量方法を確立した。親水性イオン液体存在下の酵素活性の検出にはAPIZYM system (bioMérieux, France) を用いた。

## 結果

(1) 親水性イオン液体存在下で生育する微生物の獲得

くさや漬け汁由来の微生物群集は親水性イオン液体[EMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]存在下で、キム

チ由来の微生物群集は親水性イオン液体[BMIM][Cl]存在下および疎水性イオン液体[BMIM][PF<sub>6</sub>]存在下で良好な生育が認められた。[EMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]、[BMIM][Cl]、[BMIM][PF<sub>6</sub>]で生育可能な単離株は、16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、すべて *Staphylococcus* 属細菌と同定された。

### (2) 親水性イオン液体存在下での酵素活性の検出

くさや漬け汁由来の微生物群集を親水性イオン液体[EMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]で生育させ、培養液上清中の酵素活性の検出を試みた。APIZYM system (bioMérieux, France)を用いたところ、Alkaline phosphatase と Esterase の活性を検出した (図 1A)。

### (3) *Staphylococcus* 属細菌のイオン液体耐性

親水性イオン液体[EMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]存在下で生育した細菌 *Staphylococcus* sp. SM-1-W は、10% [BMIM][NTf<sub>2</sub>]や10% [BMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]存在下では生育しなかったが、10% [EMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]、10% [BMIM][Cl]、10% NaCl では良好に生育した。LC-MS での定量の結果、[BMIM]カチオンは分解されていなかったため、*Staphylococcus* sp. SM-1-W は親水性イオン液体 [BMIM][Cl] 耐性菌 (世代時間 102.2 min) であることが示された (図 1B)。

## 結論

食品サンプルから親水性や疎水性イオン液体存在下で生育する細菌を見いだした。親水性イオン液体 [EMIM][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]を含む培養液中に、Alkaline phosphatase と Esterase の活性を検出した。さらに親水性イオン液体耐性菌 *Staphylococcus* sp. SM-1-W を見いだした。[BMIM][Cl] や *N*-ethyl-*N'*-methylimidazolium methylphosphonate を利用すると、難水溶性バイオマスであるセルロースを溶解できることが指摘されている<sup>(2, 3)</sup>。我々は、*Staphylococcus* sp. SM-1-W の他に、Carboxymethyl cellulose と [BMIM][Cl] 存在下で良好に生育する微生物群集を見出している。これらの親水性イオン液体耐性菌や耐性酵素を利用することで、新規なバイオマス変換系の構築が期待できる。

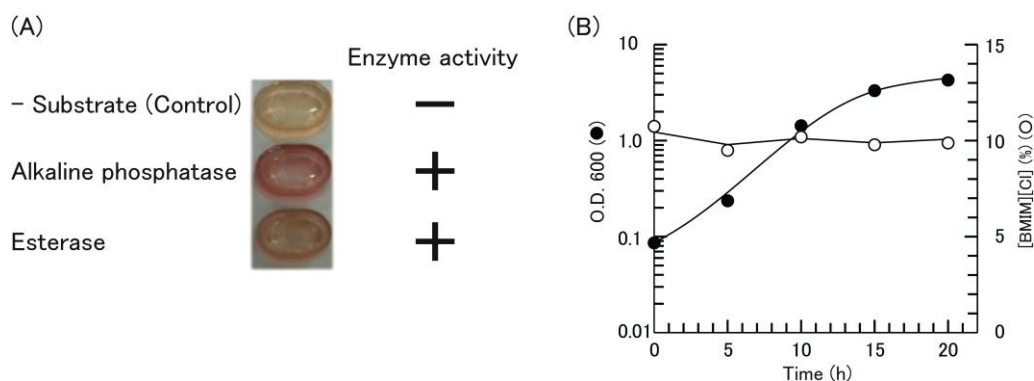


図 1. 微生物群集が育成した親水性イオン液体添加培地の酵素活性 (A)、*Staphylococcus* sp. SM-1-W の親水性イオン液体[BMIM][Cl]耐性 (B)

## 文献

- 1) Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S., and Chauhan, S. M. S. (2005) *Tetrahedron* **61**: 1015-1060.
- 2) Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey J. D., and Rogers, R. D. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 4974-4975
- 3) Fukaya, Y., Hayashi, K., Wada, M., and Ohno, H. (2008) *Green Chem.***10**: 44-46
- 4) Kurata, A., Takemoto, S., Fujita, T., Iwai, K., Furusawa, M., and Kishimoto, N. (2011) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **69**: 161-167
- 5) Kurata, A., Kitamura, Y., Irie, S., Takemoto, S., Akai, Y., Hirota, Y., Fujita, T., Iwai, K., Furusawa, M., and Kishimoto, N. (2010) *J. Biotechnol.* **148**: 133-138
- 6) Anderson, J. L., Ding, J., Welton, T., and Armstrong, D. W. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 14247-14254