

溶媒発酵法 一有機溶媒に溶解した難溶性物質の微生物転換反応

東京工業大学生命理工学部生物工学科 青野力三

これまでに、さまざまな化合物の特異的な転換反応が、酵素あるいは微生物細胞を利用して確立されている。コレステロールなどのように水に難溶性の物質は、反応液あるいは培養液に懸濁したり、界面活性剤を加えて溶解することが行われる。また、溶解効率を向上させるために、転換を目的とする難溶性物質を有機溶媒に溶解することも行われる。多くの有機溶媒は、微生物に対して毒性を示す。そのため、有機溶媒を用いる場合には、生育後の休止菌体または酵素を用いた転換反応が行われている。このような反応系は、水—有機溶媒による二相反応系と総称される。毒性の有機溶媒が存在していても生育することができる耐性微生物を上記の二相系において培養することができれば、微生物の生育中に有機溶媒に溶解した難溶性物質に対して作用する酵素が誘導的に生産されることが期待される。このため、休止菌体では行えないような転換反応をも行うことができるようになると考えられる。

近年になって、トルエンなどの毒性の有機溶媒が高濃度に存在していても生育できる微生物が、自然界から分離されるようになった。¹⁻³⁾これらの有機溶媒耐性菌は、培養液と二相を形成するほどの多量の有機溶媒を添加した状態でも生育することができる。そのため、水に難溶性の物質を微生物転換するためのバイオリクターとして応用できると考えられる。すなわち、転換を目的とする難溶性基質を培養液に懸濁するのではなく、難溶性基質を溶解した有機溶媒を微生物培養液に重層する。このことによって、有機溶媒に均一に溶解した基質溶液相と培養液相との間で、基質分子を分配させることができる。培養液に懸濁された個体状の難溶性基質よりも、速やかに分配平衡が成立すると考えられる。そして、培養液相に分配された基質分子を発酵菌と接触させることができる。また、転換反応後の生産物も有機溶媒相に溶解しやすく、その回収も容易であると考えられる。このような微生物転換系は、溶媒発酵法 (Oleosus Fermentation) と称されている。⁴⁾

溶媒発酵法は、生育後の休止菌体あるいは抽出した酵素を用いた水—有機溶媒二層系による転換法よりも、簡便な転換法となり得ることが期待される。実際に、培養液に懸濁された難溶性物質よりも、有機溶媒に溶解した難溶性物質が効率的に微生物によって転換されることが、有機溶媒相に溶解した cholesterol (2%濃度) を *Pseudomonas putida* に酸化させることによって確認された。⁴⁾この培養系では、ほぼ全量の cholesterol が酸化された。また、cholesterol だけではなく、steroid 骨格を有する cholesterol 類似体基質の3位のケト化および6位の水酸化とそれに続くケト化反応だけを行った。

さまざまな難溶性基質に対する溶媒発酵法を確立するためには、個々の基質の転換に適した多種類の溶媒耐性微生物を分離する必要がある。あるいは、目的とする難溶性物質の転換系酵素遺伝子群を発現させるための有機溶媒耐性菌を宿主とした、宿主—ベクター系が確立される必要がある。そして、多様な有機溶媒を用いた多様な転換系が確立される必要があるものと考えられる。また、有機溶媒に対する微生物の耐性機構を理解する必要がある。

低度あるいは高度の有機溶媒耐性度を示すさまざまな微生物を、自然界から分離する技術がすでに確立された。¹⁻³⁾ここで用いられた分離方法はさらに洗練されていくと思われる。分離された耐性株を宿主としたホスト—ベクター系の構築も現在検討されている。また、野生型の大腸菌や *P. putida* あるいは *P. aeruginosa* などの有機溶媒耐性度を向上させる試みも成功している。⁵⁾ *P. putida* 由来のアルカン代謝遺伝子によって形質転換された大腸菌が、*n*-オクタンをオクタン酸に酸化できることが認められている。⁶⁾そして、大腸菌の有機溶媒耐性度の向上に関与する遺伝子群の座位解析およびクローニングも進行している。⁷⁾このような基礎的な研究を通じて得られた知見を基にして、多様な不溶性基質に対する広範な溶媒発酵法が確立していくことが期待される。

- 1) Inoue, H. and Horikoshi, K.: *Nature*, **338**, 264 (1989).
- 2) Aono, R. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 145 (1992).
- 3) Nakajima, H. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1872 (1992).
- 4) Aono, R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2518 (1994).
- 5) Aono, R. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1935 (1991).
- 6) Favre-Bull, O. et al.: *Bio/Technol.*, **9**, 367 (1991).
- 7) Aono, R. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1231 (1994).