



Title	水一有機溶媒二相系微生物酸化反応プロセス開発に関する基礎研究
Author(s)	小西, 正朗
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45846">https://hdl.handle.net/11094/45846</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	小西正朗
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第19460号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	水-有機溶媒二相系微生物酸化反応プロセス開発に関する基礎研究
論文審査委員	(主査) 教授 大竹 久夫 (副査) 教授 塩谷 捨明 広島大学大学院先端物質科学研究科教授 加藤 純一 助教授 岸本 通雅

#### 論文内容の要旨

化学プロセスを環境によりやさしいバイオプロセスに変換すること目的とした基礎研究を行った。炭化水素を酸化する微生物は多く分離され、多様な反応が知られている。これらの反応の多くは有機溶媒を重層した条件でも進行する。その部位特異的な酸化反応が可能であることなどは化学反応には見られない特徴である。しかしながら、それらの反応を積極的に利用して物質を生産した例はまだ少ない。

疎水性で生物毒性の高い基質や生産物を微生物に作らせる場合、水に溶けない疎水性の基質や生産物を反応系に高濃度に存在させるためには有機溶媒の添加が必要となる。これらの条件では特に培養技術による生体触媒への機能支援が必要となる。また、細胞表面疎水性の高い微生物と低い微生物では有機溶媒との親和性が異なるため形成する水-有機溶媒二相系の特性は異なる。それゆえ、それぞれのモデル反応を構築し、その操作方法について検討を行った。

まず、第1章では細胞表面疎水性の高い微生物を用いた二相系反応をモデルとして、*Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1株を用いたジベンゾチオフェン(DBT)の酸化反応を検討した。硫黄源を指数的に流加することで非常に高活性の菌体を培養する技術を確立した。また、ジャーファーメンターで高密度化した培養液はモデル軽油中のDBTを効率的に脱硫することが可能であることを実証した。10時間で $1\text{ g l}^{-1}$ 以上の2-ヒドロキシビフェニルを生産することができた。

第2章では表面疎水性の低い微生物を用いた二相系反応のモデルとして、トルエンに耐性で資化性をもつ*Pseudomonas putida* T57株のtodD遺伝子破壊株を用いて、 $\alpha$ クレゾールを生産させた。ファーメンタースケールにおいて、毒性の低い有機溶媒を利用することで、よりマイルドな反応条件を維持することにより、非常に低い菌体濃度であるにもかかわらず、溶媒相に $50\text{ g l}^{-1}$ の $\alpha$ クレゾールを蓄積させることができた。その際、基質のトルエンや炭素源のブタノールの供給が重要であった。さらにジャーファーメンタースケールまでスケールアップする方法を示した。非常に毒性の高い $\alpha$ クレゾールのような物質を微生物で生産できることを示すことで、生体触媒を毒性の高い化学物質生産への利用が可能であることを示した。

第3章では多孔質テフロンチューブにより、比較的容易にリアクター内から有機溶媒を取り出すことが可能であることを示した。水-有機溶媒二相系微生物酸化反応において、生産物阻害や抑制は有機溶媒を添加するだけでなく、引

き抜きができれば、その阻害もしくは抑制効果を和らげ、さらに長時間、高効率の反応が可能になるかもしれない。本法はリアクターから直接有機溶媒を抜き取ることが可能なため、有機溶媒を引き抜きながらの培養などの応用にも利用できるかもしれない。

本稿では生物化学工学の視点から基礎的な技術に関する研究を行うことにより、有機溶媒二相系微生物酸化反応の可能性を高めた。

### 論文審査の結果の要旨

化学プロセスを環境によりやさしいバイオプロセスに変換すること目的とした基礎研究を行っている。炭化水素を酸化する微生物は多く分離され、多様な反応が知られている。これらの反応の多くは有機溶媒を重層した条件でも進行する。その部位特異的な酸化反応が可能であることなどは化学反応には見られない特徴である。しかしながら、それらの反応を積極的に利用して物質を生産した例はまだ少ない。

疎水性で生物毒性の高い基質や生産物を微生物に作らせる場合、水に溶けない疎水性の基質や生産物を反応系に高濃度に存在させるためには有機溶媒の添加が必要となる。これらの条件では特に培養技術による生体触媒への機能支援が必要となる。また、細胞表面疎水性の高い微生物と低い微生物では有機溶媒との親和性が異なるため形成する水・有機溶媒二相系の特性は異なる。それゆえ、それぞれのモデル反応を構築し、その操作方法について検討を行っている。

まず、第1章では細胞表面疎水性の高い微生物を用いた二相系反応をモデルとして、*Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1株を用いたジベンゾチオフェン(DBT)の酸化反応を検討している。硫黄源を指数的に流加することで非常に高活性の菌体を培養する技術を確立した。また、ジャーファーメンターで高密度化した培養液はモデル軽油中のDBTを効率的に脱硫することが可能であることを実証している。10時間で  $1\text{ g l}^{-1}$  以上の2-ヒドロキシビフェニルを生産することができている。

第2章では表面疎水性の低い微生物を用いたに相系反応のモデルとして、トルエンに耐性で資化性をもつ*Pseudomonas putida* T57株のtodD遺伝子破壊株を用いて、 $\alpha$ -クレゾールを生産させている。ファーメンタースケールにおいて、毒性の低い有機溶媒を利用することで、よりマイルドな反応条件を維持することにより、非常に低い菌体濃度であるにもかかわらず、溶媒相に  $50\text{ g l}^{-1}$  の $\alpha$ -クレゾールを蓄積させることができている。その際、基質のトルエンや炭素源のブタノールの供給が重要であった。さらにジャーファーメンタースケールまでスケールアップする方法を示している。非常に毒性の高い $\alpha$ -クレゾールのような物質を微生物で生産できることを示すことで、生体触媒を毒性の高い化学物質生産への利用が可能であることを示している。

第3章では多孔質テフロンチューブにより、比較的容易にリアクター内から有機溶媒を取り出すことが可能であることを示している。水・有機溶媒二相系微生物酸化反応において、生産物阻害や抑制は有機溶媒を添加するだけでなく、引き抜きができれば、その阻害もしくは抑制効果を和らげ、さらに長時間、高効率の反応が可能になるかもしれない。

以上のように、本論文は生物化学工学の視点から基礎的な技術に関する研究を行うことにより、有機溶媒二相系微生物酸化反応の可能性を高めている。よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。