



Title	Bio-Based Production by Hydrophilic and Hydrophobic Solvent-Tolerant Bacteria
Author(s)	山下, 志保
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48440
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	山 下 志 保
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 2 1 1 2 8 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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	Bio-Based Production by Hydrophilic and Hydrophobic Solvent-Tolerant Bacteria (親水性および疎水性有機溶媒耐性細菌を用いた物質生産に関する基礎研究)
論文審査委員	(主査) 教授 大竹 久夫 (副査) 教授 塩谷 捨明 教授 清水 浩 助教授 大政 健史

論 文 内 容 の 要 旨

第一章では、有機溶媒耐性細菌には親水性と疎水性の2種類あることを示し、本論文の構成を述べた。

第二章ではモデル系として、親水性有機溶媒耐性細菌の *Pseudomonas putida* T-57 株の *todD* 遺伝子破壊株を用い、トルエンから σ クレゾールを高効率で生産することを試みた。基質のトルエンは水に殆ど溶けず高い生体毒性を有するので、蒸気で培養槽に供給した。オレイルアルコールを有機溶媒として用いて水-有機溶媒二相培養系を組立てた。また、生産物の σ クレゾールは生体毒性が特に強いので、菌体によりトルエンを σ クレゾールの前駆体であるトルエンシグリコールにまで変換させ、培養終了後に pH を下げて σ クレゾールを特異的に生産した。生産された σ クレゾールの殆どは有機溶媒相に回収され、その濃度は 30 h で約 40 g l^{-1} にまで達した。

第三章では有機溶媒一相という過酷な状況下で、疎水性有機溶媒耐性細菌の *Rhodococcus opacus* B-4 株は生体触媒反応を行われているかどうかを調べた。まず B-4 株は有機溶媒一相でも 5 日間以上生存していることが明らかとなった。さらに、疎水性のオレイン酸を炭素源またはエネルギー源として消費した。次に、モデルケースとして水に不溶性のインドールからインジゴの生産を行うことができた。ここでは、オレイン酸を添加すると、インジゴの生産量が増加した。このことから、オレイン酸は NADH の再生に寄与しているのではないかと考えられる。以上のことから、疎水性有機溶媒耐性細菌を用いた有機溶媒一相において、生体触媒反応が行われていることが明らかとなった。

第四章では、本来障害となるエマルジョンを敢えて活用した water-in-oil エマルジョンカルチャーの優位性を示した。第三章における培地の水分量を 10% に増やすと、安定した water-in-oil エマルジョンを形成することが分かった。共焦点レーザー顕微鏡観察により、菌体が水滴の周囲を取り囲み、水滴どうしが融合するのを妨げている様子が観察された。形成された水滴は比重の低い有機溶媒中において沈降し、たやすく分離できる。また、親水性のグルコースばかりでなく、疎水性のオレイン酸もエネルギー源として消費することが分かった。そして、water-in-oil エマルジョンカルチャーにおいて、モデルケースとしてインドールからインジゴ、およびトルエンから σ クレゾールの水酸化反応を行うことができた。ここでも、オレイン酸を添加すると、生産量が増加した。

第五章では、本論文で得られた知見をまとめ、有機溶媒耐性機構について考察した。

論文審査の結果の要旨

本論文は有機溶媒耐性細菌には親水性および疎水性の2種類あることを示し、これらの菌を用いた二相系、有機溶媒一相、**water-in-oil** エマルジョンカルチャーにおける物質生産について論述したものである。

第一章緒論では本研究の背景について説明している。

第二章では、親水性の有機溶媒耐性細菌 *Pseudomonas putida* T-57 株を用いたバイオリアクターレベルにおける、トルエンから σ -クレゾールのモデルコンバージョンを行い、水一相系と比較することによって、水-有機溶媒二相系の優位性を示している。なお、 σ -クレゾールの中間体である有用物質のシスグリコールも同手法で生産できることも示している。

第三章では、疎水性有機溶媒耐性細菌 *Rhodococcus opacus* B-4 株を用いて、水のほとんどない有機溶媒一相において、5日間以上生存し、代謝活性を有し、さらにインドールからインジゴへのバイオコンバージョンを行うことができることを示し、生体触媒反応が行われていたことを明らかにしている。

第四章では、有機溶媒に対して水を全体の10%加えたところ、B-4株によって、安定した **water-in-oil** エマルジョンが形成される。エマルジョンは沈降しやすく分離もたやすい。また、二相系と比較して表面積も増加する。よって、**water-in-oil** エマルジョンカルチャーシステムの優位性が高いことを示している。

第五章では本論文の結果をまとめ、有機溶媒耐性細菌を用いた物質生産、および未解明な疎水性有機溶媒耐性細菌の有機溶媒耐性機構について考察している。

以上のように、本論文は親水性および疎水性の有機溶媒耐性細菌の特質を生かして、有機溶媒を用いた物質生産の優位性を示している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。