

氏名	ほり うち けん いち 堀 内 健 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2357 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Biotransformation of Organic Residues to Useful Materials by <i>Burkholderia cepacia</i> ( <i>Burkholderia cepacia</i> による有機環境残留物質の有用化合物への変換)
論文調査委員	(主 査) 教 授 上 野 民 夫    教 授 加 藤 暢 夫    教 授 大 東 肇

### 論 文 内 容 の 要 旨

供試菌は塩化ベンザルコニウム水溶液より単離し、(財)阪大微生物病研究会にて *Burkholderia cepacia* と同定され、(財)発酵研究所に IFO15124株として寄託している。*B. cepacia* は点眼液などの医薬品や、シャンプーなどのトイレタリー製品の汚染菌として、さらに病院などで日和見感染症の一原因菌としても問題となっている。供試菌は多岐にわたる有機化合物を利用できる細菌で、純水中でも長期間生存が可能である。ただし45℃、1時間の加熱で死滅し、10%以上のメタノール溶液中では生存出来ないことが判明している。代表的な防腐剤・消毒剤である塩化ベンザルコニウムおよび *p*-ヒドロキシ安息香酸エステル(パラベン)に耐性を示す本細菌は、有機環境残留物質に対して高い分解能力を有することが期待された。本論文は、この供試菌を用いて様々な有機化合物の分解を試みるとともに、その反応を制御することにより、有用物質の生産に適応することを検討したものであり、主な内容は以下の通りである。

1. パラベンが供試菌により資化され、3週間で消滅することを明らかにし、変換物として *p*-ヒドロキシ安息香酸・プロトカテク酸を同定した。
2. さらに本供試菌が多くの有機環境残留物質を分解することを明らかにし、その変換物も同定することによって *B. cepacia* が有機環境残留物質を分解するために有用な細菌であることを示した。
3. これまで微生物による芳香族化合物の酸化では、酸素原子の芳香環への導入によって生成した化合物が、さらなる酸化を受けて速やかに開環して資化されるので、有用化合物の蓄積は期待できない場合が多いと考えられていた。けれども、本供試菌による方法ではサリチルアルコールのさらなる変換が抑制されて、ベンジルアルコールが効率よくサリチルアルコールに変換されることを明らかにした。サリチルアルコールはそれ自体、局所麻酔剤であり、また合成反応の重要な出発化合物でもある。
4. 供試菌はアミノ酸を、その種類によってD-選択的あるいはL-選択的に代謝することを示した。特にトリプトファンをL-特異的に代謝し、D-トリプトファンが蓄積するので、これにより供試菌を用いたD-トリプトファン生産の可能性が示唆された。
5. 供試菌は1-フェニルエチルプロピオネートを(R)-選択的に加水分解し、(S)-(-)-1-フェニルエチルプロピオネートを回収するとともに(R)-(+)-1-フェニルエタノールを生成することを明らかにした。同様に1-フェニル-1-プロピル(-2-プロピル)-アセテート(-プロピオネート)をいずれも(R)-選択的に加水分解し、対応する光学活性なアルコールおよびエステルを生成することを示した。
6. 供試菌を固定化することにより、上記の反応がさらに向上することを示した。すなわちポリアクリルアミドで包括固定化した供試菌は代表的な殺虫剤であるカルバリルを生菌の場合よりも速やかに分解した。この理由は分解物である1-ナフトールが固定化材であるポリアクリルアミドに容易に吸着されること、またそのことによって1-ナフトールも速やかに分解されることにあると推察した。
7. 供試菌はアルコールの存在下でエステル交換反応を触媒することを見出し、アルコールの種類を選択することにより、

対応する種々のエステル合成反応に適用できることを明らかにした。すなわち供試菌は基質に対して過剰のアルコール存在下でエステル交換反応を触媒し、アルコール量が多いほど副反応が起こり難いため変換効率は高くなることを示した。

8. 供試菌は10%メタノール存在下で死滅するが、アルギン酸を用いて固定化した場合、菌体が示すエステル交換反応活性は30%メタノール中でも維持される。この固定化菌体法を適用することにより、生菌では不可能な高濃度のアルコールが使用でき、変換効率がさらに向上した。この固定化法により、生菌では不可能な特性をエステル交換反応において賦与できることを明確にした。

### 論文審査の結果の要旨

供試菌は塩化ベンザルコニウム水溶液より単離し、*Burkholderia cepacia*と同定された。本論文は、本供試菌による様々な有機環境残留物質の分解・変換反応に検討を加え、その反応を制御することにより、有用物質の生産に本供試菌を適用することが有効であることを示したものであり、評価すべき主な点は以下の通りである。

(1) パラベン (*p*-ヒドロキシ安息香酸エステル)が供試菌により資化され、3週間で消滅することを明らかにし、変換物として *p*-ヒドロキシ安息香酸・プロトカテク酸を同定した。また、本菌が多くの有機環境残留物質を分解することを認め、その変換物を確定した。

(2) 供試菌により、ベンジルアルコールが効率よくサリチルアルコールに変換されることを明らかにした。サリチルアルコールはそれ自体、局所麻酔剤であり、合成反応の重要な出発化合物で有用な化学工業原料でもある。

(3) 供試菌はトリプトファンをL-特異的に代謝し、D-トリプトファンを蓄積することを明らかにした。

(4) 供試菌は1-フェニルエチルプロピオネートを(R)-選択的に加水分解し、(R)-(+)-1-フェニルエタノールを生成し、(S)-(-)-1-フェニルエチルプロピオネートを回収することを明らかにした。*B. cepacia*の生産する加水分解酵素が光学分割に有用である可能性を示した。

(5) 供試菌を固定化することで本菌による有機環境残留物質に対する分解特性が向上することを示した。すなわち、代表的な殺虫剤であるカルバリルはポリアクリルアミドで包括固定化した供試菌により、生菌の場合よりも速やかに分解されることを証明した。

(6) 供試菌がアルコールの存在下でエステル交換反応を触媒することを見出し、種々のエステルのアルコール部分の変換に幅広く適用できることを明らかにした。

(7) 生菌は10%以下のメタノール存在下で死滅したが、アルギン酸固定化菌体は30%メタノール中でもエステル交換活性を維持することを認め、生菌では不可能な高濃度のアルコールを使用して、高効率なエステル交換反応を達成した。

以上のように本論文は、*B. cepacia*が有機環境残留物質を分解することを明らかにするとともに、反応を制御することにより有用化合物の生産に適用できること、さらに、菌体を固定化することにより生菌では起こり得ない反応にも応用できることを見出したもので、生物機能制御化学、分子生体触媒化学、酵素化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年1月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。