

界面バイオリアクター

- 有機溶媒中における増殖微生物 を用いた物質生産システム -

Interface Bioreactors
Bioconversion System with a Microorganism
Growing in an Organic Solvent



技術研究所
第3部
小田忍
Shinobu
ODA

1. はじめに

微生物や酵素などの生体触媒を有機合成に適用するバイオコンバージョンは、高い選択性及び収率、さらには優れた環境調和性を有する物質生産技術であり、特に光学活性体などの精密化学品の合成に多用されている¹⁻⁵⁾。これら生体触媒は、本来は水相中で加水分解や酸化還元などの多様な反応を触媒するようにその立体構造や細胞構造が保持されているが、リパーゼのようなある種の酵素⁶⁻⁸⁾や *Rhodococcus* などの特殊な細菌^{9,10)} は有機溶媒中でも触媒活性を維持し得ることが報告されている。有機溶媒中で生体触媒活性を発現し得ることは、有機合成で扱う多くの基質あるいは生成物が水に不溶であるという観点から見て非常に重要な事実である。

しかしながら、リパーゼを除く多くの酵素は一般には有機溶媒中で速やかに失活するうえ、応用上重要な酸化還元反応では通常NAD(P)⁺やNAD(P)Hのような補酵素が必要であり、精製酵素(酸化還元酵素など)をこれら補酵素要求性反応に用いることは非現実的である。一方、触媒コストとして安価な微生物細胞を生体触媒として使用することも、一般に微生物は有機溶媒中では速やかに死滅してしまうため、これまた実用上多くの制約がある。

本稿で述べる界面バイオリアクターは、マクロな視点から見て、有機溶媒中で多くの微生物を生存もしくは増殖状態で種々のバイオコンバージョンに適用できるデバイスであり、高付加価値な化合物を高い濃度と選択性で製造できるシステムである。以下ではこのシステムについて、発明の経緯、その構成並びに特徴、各種バイオコンバージョンへの応用例、さらにはその高度利用法である代謝微生物変換融合システム(カップリングシステム)について概説する。

2. 界面バイオリアクター着想の経緯

1989年当時、筆者らは(RS)-1-phenyl-1,2-ethanediolの

立体選択的及び位置選択的な微生物酸化による(R)-mandelic acid(β-lactam系抗生物質の側鎖修飾剤)の合成研究に取り組んでおり、日本各地の土壌から芳香族化合物の資化性菌をスクリーニングしていた¹¹⁾。その際、寒天平板に植菌した微生物に対し、シャーレのフタに設置したろ紙に染み込ませたアルキルベンゼンを蒸気の形で炭素源として供給していたが、たまたまこのろ紙が平板表面に接触してしまうというアクシデントに遭遇した。その際、アルキルベンゼンに接した微生物のコロニーの方がその蒸気のみで成長したコロニーより先活発に増殖している現象を見出した。このアルキルベンゼンは比較的毒性が低いものであったが、100%の芳香族化合物に接した状態でも微生物が旺盛に増殖している現象は非常に驚きであった。そこで各種細菌、酵母、カビについて寒天平板と各種有機溶媒との固/液界面における増殖試験を行ったところ、供試菌すべてが炭素鎖長10~15のノルマルパラフィン類重層下で増殖し、多数の株が側鎖炭素鎖長3~5のアルキルベンゼン類及び分岐パラフィンのisooctane重層下で増殖した。さらに、有機溶媒耐性の非常に強い細菌である *Pseudomonas putida* に至っては、溶媒作用の強い *p*-xylene重層下でも増殖した¹²⁾。

上述の現象は、水不溶性基質のバイオコンバージョンにとって重要な発見へと導かれた。すなわち筆者らは、この固/液界面に位置する微生物が平板上に重層された疎水性有機溶媒に溶解させた脂溶性物質の毒性を著しく回避できるという事実を見出したのである¹²⁾。例えば、benzeneや toluene、cholesterolなどは水相中ではわずか0.2~0.5wt%程度でほとんどの微生物を死滅させてしまうが、筆者らの構築した固/液界面培養法では、tolueneで9~24wt%、propylbenzeneで21~60wt%、cholesterolで12wt%の添加限界濃度を示した。すなわち、従来の水相液体培養法と比較して数10~数100倍もの高濃度基質の添加が可能となったのである。この固/液界面培養法最大の特徴を筆者らは「固/液界面における疎水性物質の毒性緩和現象」と名付けたが¹²⁾、この発見は、以下に述べる高濃度水不溶

性基質の効率的なバイオコンバージョンシステム(界面バイオリアクター)構築の端緒となった。

3. 界面バイオリアクターの構築

水不溶性基質を水相中で反応に供する場合、反応系はエマルジョン系もしくはサスペンション系となり、非常に効率が悪くなる¹³⁻¹⁵。このような水相中反応法の欠陥を克服する手法として、界面活性剤¹⁶⁻¹⁸、水混和性有機溶媒¹⁹⁻²¹、あるいは水非混和性有機溶媒²²⁻²⁴を添加して基質の分散性や溶解性を高める方法、包括固定化生体触媒を有機溶媒相中で用いる方法²⁵⁻²⁷、あるいは、基質結晶と水相との固/液界面に微生物を位置させて反応に供する結晶発酵法²⁸など多様な手法が開発され、さらには有機溶媒耐性微生物の適用も検討されてきた²⁹⁻³³。しかしながら、これら多くの手法には様々な短所があり、実用化に至った例は非常に限られている。

筆者らが開発した界面バイオリアクターとは、上述の固/液界面培養法を微生物細胞によるバイオコンバージョン(微生物変換反応)に適用した非水系バイオリアクターである³⁴⁻³⁸。その原理を図1に示すが、栄養源及び水を含んだ親水性担体とノルマルパラフィンのような疎水性有機溶媒との固/液界面に増殖する微生物膜(菌体は担体への付着によって自然に膜状に成長する)を生体触媒とし、有機溶媒相に添加した脂溶性基質から脂溶性生成物を効率的に合成することができる³⁹。

界面バイオリアクターは大抵の微生物に適用可能であり、酸化、還元、加水分解、エステル化などの種々の微生物変換を効率的に実施可能である³⁹。その際、全ての反応系で非常に高い基質添加濃度並びに生成物蓄積濃度が達成され、反応種によっては従来技術であるエマルジョン系反応

法の730倍もの生成物の蓄積濃度を記録した。

上記の界面バイオリアクター最大の長所である固/液界面における毒性緩和現象の機構について基礎的な検討を種々加えたが、有機溶媒耐性菌や薬剤耐性菌の分野の研究者らが提示している諸仮説(図2)すなわち有機溶媒層による毒物分子のリザーバー化⁴⁰⁻⁴²、菌体外多糖層の毒物分子に対するバリアー化⁴³⁻⁴⁵、グラム陰性菌の外膜にある薬剤排出ポンプの寄与⁴⁶⁻⁴⁸、細胞膜の脂肪酸組成変化を通じての毒物分子に対するバリアー化^{49,50}、有機溶媒耐性遺伝子の存在^{51,52}などのうち、外膜や細胞膜の変化、及び有機溶媒耐性遺伝子の三者は筆者らの見出した現象の機構とは論理的になり得ない。なぜなら、その現象はグラム陰性菌や有機溶媒耐性微生物に限られるものではなく、様々な細菌、放線菌、酵母、及びカビについても認められるためである。有機溶媒層が毒物分子のリザーバーとして機能していることは容易に類推できるが、筆者らは、微生物の菌体外多糖層(夾膜多糖層)が寒天平板培養した場合に有意に肥厚化・高分子量化し、この親水性高分子層が疎水性毒物に対してバリアーとして機能している可能性を見出した(図3)。

新技術開発

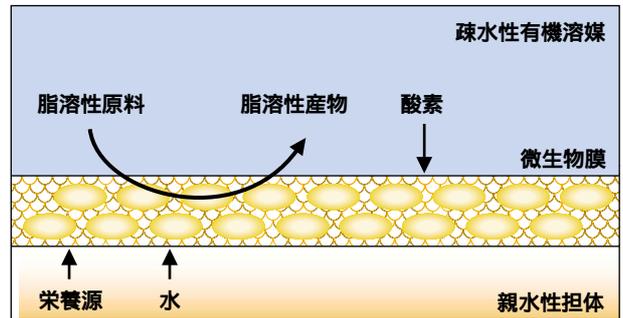


図1 界面バイオリアクターの原理
親水性担体と疎水性有機溶剤との固/液界面に膜状に増殖した微生物は、有機溶剤中に添加した高濃度基質を効率的に物質変換できる。

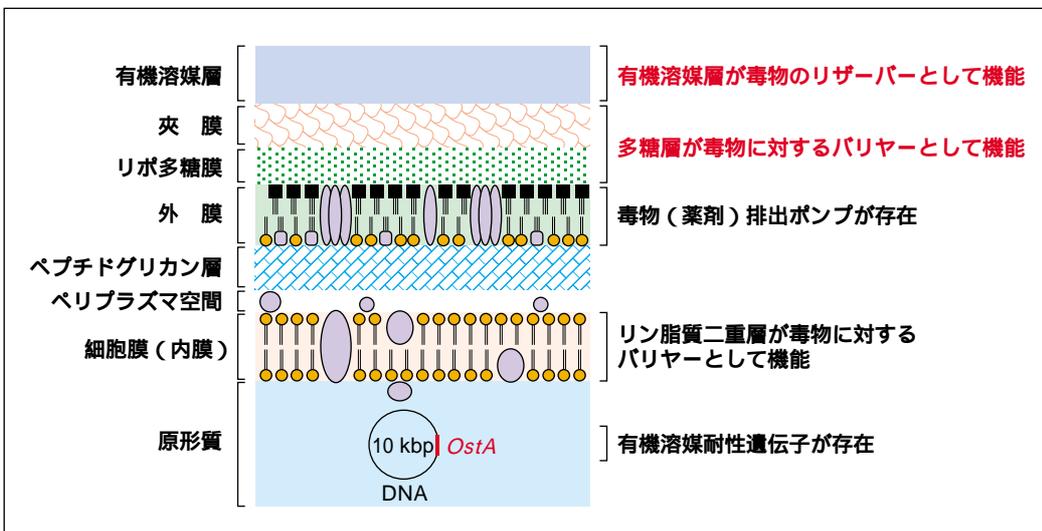


図2
固/液界面における疎水性毒物の毒性緩和の機構
本現象の機構としては、有機溶媒層の毒物分子に対するリザーバー化並びに菌体外(夾膜)多糖層の肥厚化・高分子量化に基づく毒物分子に対するバリアー化が想定される。

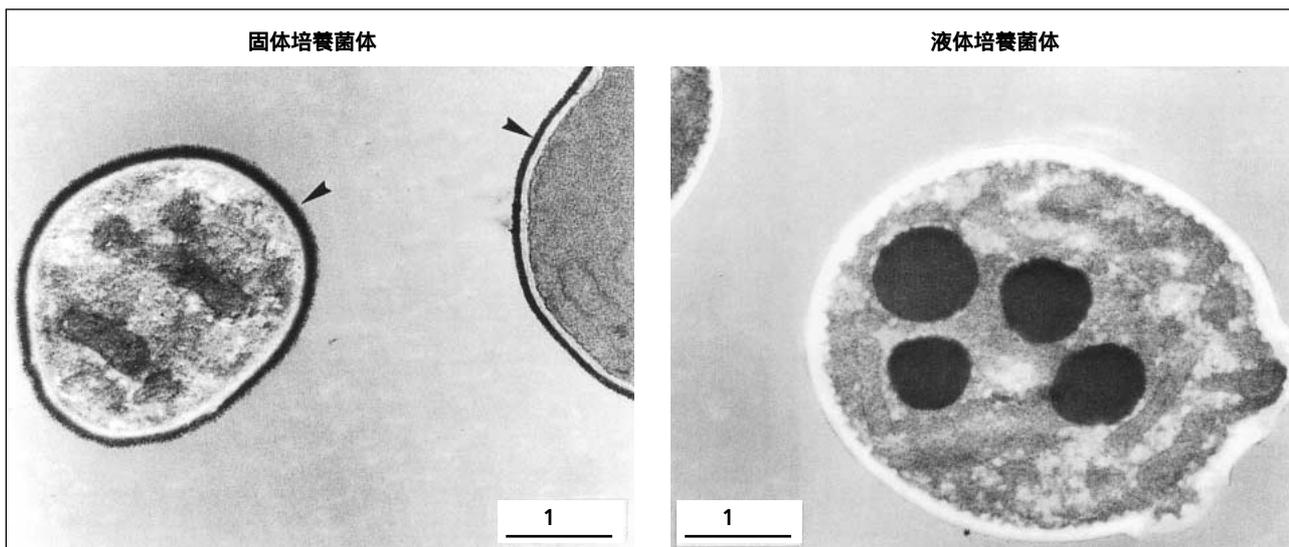


図3 固体培養、液体培養した酵母細胞の電子顕微鏡(T E M)写真
酵母は *Issatchenkia scutulata* var. *scutulata* IFO 10070. 菌体外(夾膜)多糖層はルテニウムで染色され、黒い帯として認識される。

4. 界面バイリアクターによる有用物質の合成

4.1 加水分解反応への応用(図4)

油脂の加水分解酵素であるリパーゼは水相中で種々の非天然エステルを高い反応速度と選択性で加水分解できるために、有用光学活性アルコールあるいはカルボン酸の合成に多用されている⁵³⁻⁵⁷。寒天平板型及び板状担体充填型界面バイリアクター(図5)を用いて、強力なリパーゼ生産性酵母の *Candida cylindracea* で 100% の 2-ethylhexyl acetate を加水分解した場合、生成物である 2-ethyl-1-hexanol(強毒性)の蓄積濃度は寒天平板型で 280g/L、板状担体充填型で 145g/L という有機合成に匹敵する成績が

得られた⁵⁸。なお、界面バイリアクター用担体として新たに開発した polyvinyl alcohol-glutaraldehyde 架橋と alginate-Ca²⁺ 塩架橋とを組み合わせた複合架橋ゲルは、上記加水分解反応において優れたゲル強度、耐熱性、耐乾燥性、さらにはゲル内部水の保持能を示し、実用担体足り得ることが証明された⁵⁸。

同じく加水分解反応への応用として、2-benzylcyclohexanone enol ester のエナンチオ面選択的加水分解による (*R*)-2-benzylcyclohexanone の合成が太田、須見らのもとで詳細に検討された。この標的物質は各種光学活性天然物の合成原料として有用であるが、寒天平板型界面バイリアクターに *Pichia farinosa* を適用することにより、高光学純度及び蓄積濃度での合成に成功している⁵⁹。

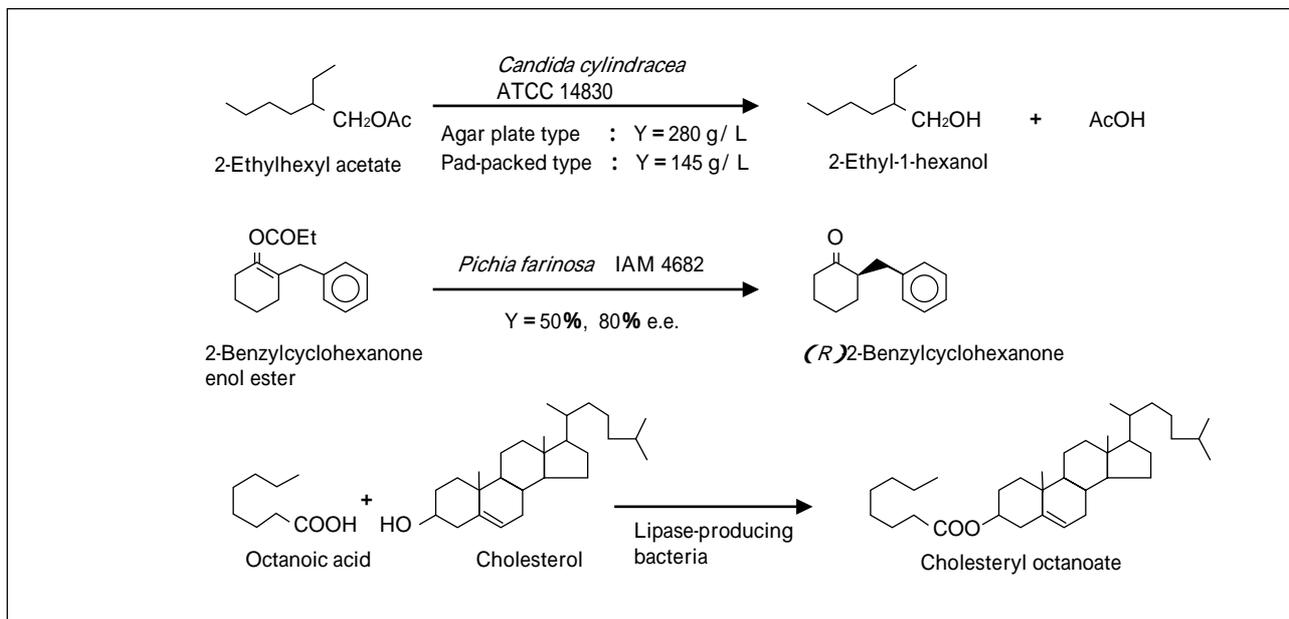


図4 界面バイリアクターを用いた微生物的加水分解、エステル化反応の例

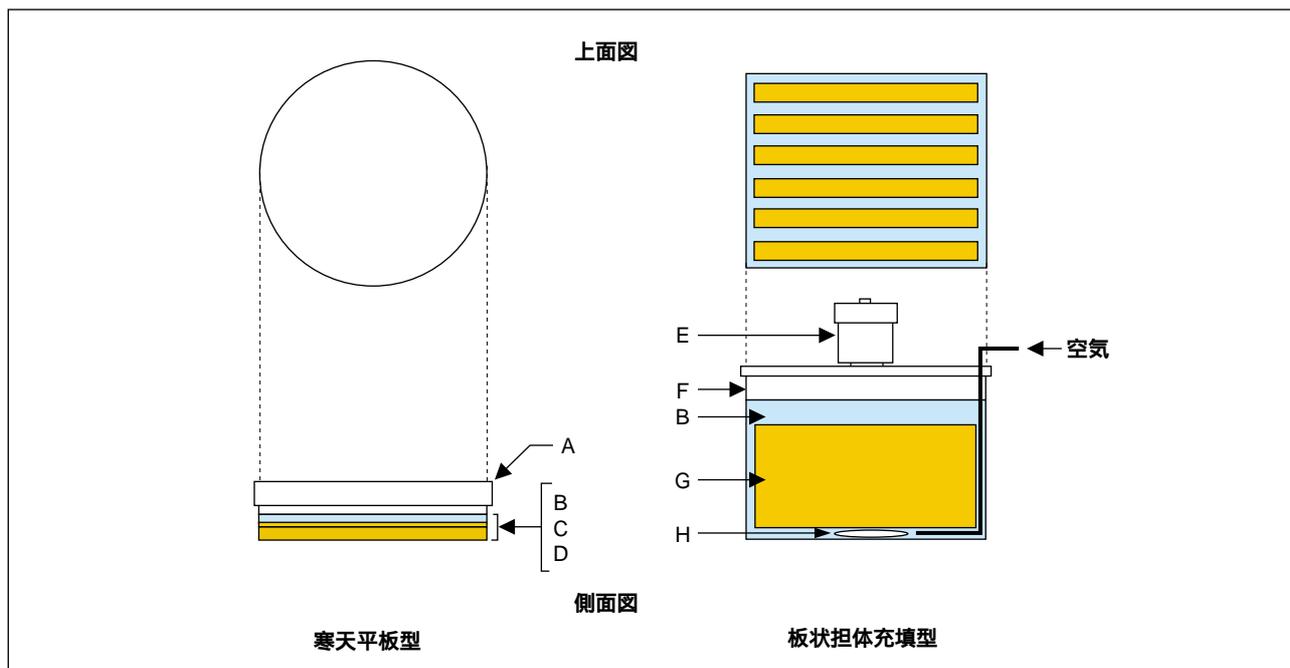


図5 寒天平板型及び板状担体充填型界面バイオリアクターの模式図

A. ガラスシャーレ; B. 有機溶媒層; C. 微生物膜; D. 栄養寒天平板;
E. オイルミストラップ; F. ステンレス鋼製リアクター本体; G. 親水性担体; H. 攪拌子

4.2 エステル合成反応への応用(図4)

上記の加水分解酵素リパーゼを有機溶媒中で使用すると反応平衡はエステル合成側に大きく傾くため、本酵素を用いたエステル化あるいはエステル交換反応による有用エステルの合成⁶⁰⁻⁶⁴⁾あるいは光学分割⁶⁵⁻⁶⁹⁾も盛んに検討されている。寒天平板型界面バイオリアクターを用いたリパーゼ生産性細菌によるcholesterolとoctanoic acidとのエステル化⁷⁰⁻⁷²⁾によるcholesteryl octanoate(化粧品原料)の合成では、供試菌全てが無溶媒系で効率的にこの標的物質を合成できた³⁹⁾。

4.3 還元反応への応用(図6)

バイオコンバージョンの中でも還元反応は理論収率100%の達成が可能であり、二重結合の立体選択的水素添加⁷³⁻⁷⁵⁾と並んでプロキラルなカルボニル化合物の不斉還元は有用光学活性アルコールの合成に多用されている⁷⁶⁻⁸⁰⁾。太田、須良らは寒天平板型界面バイオリアクターを用いて6-methyl-5-hepten-2-oneを酵母*Pichia farinosa*で不斉還元し、光学活性なアルカロイドの合成原料として有用な(R)-sulcatolを高光学純度で合成した。この場合、従来法であるエマルジョン系反応法に比べて必要菌体量は1/5以下に低

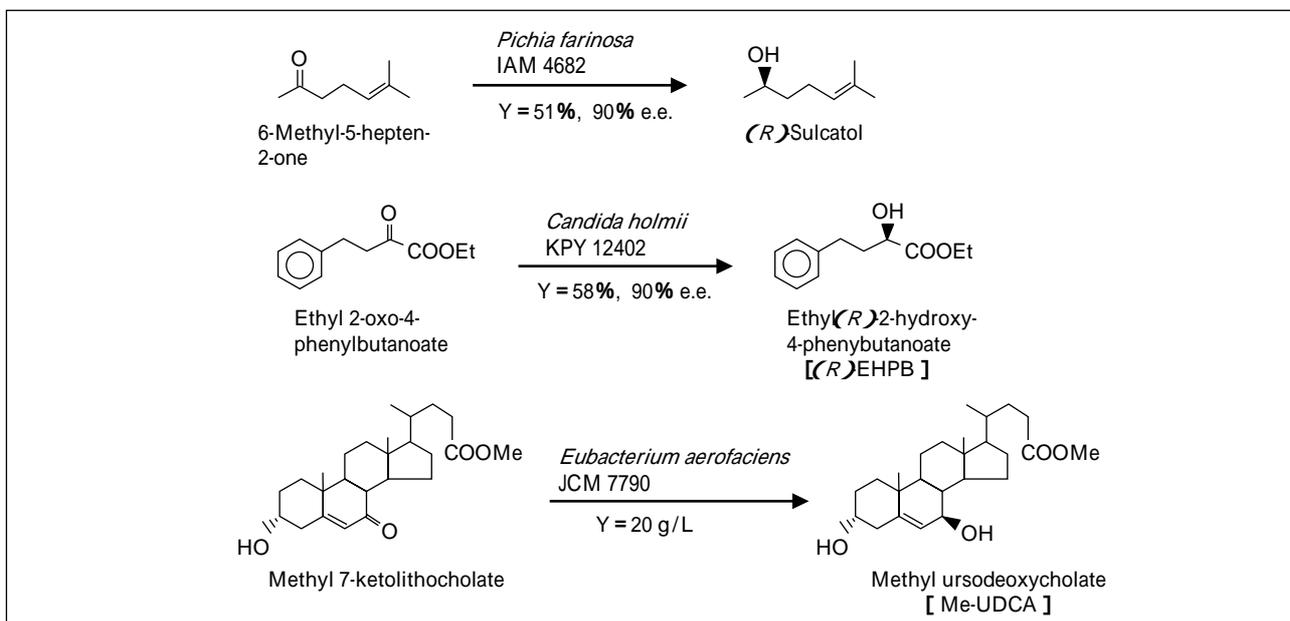


図6 界面バイオリアクターを用いた微生物的還元反応の例

減でき、基質濃度も10倍程度の高値に設定可能であった⁸¹⁾。

界面バイオリアクターはまた、酵母を用いたethyl 2-oxo-4-phenylbutanoateの不斉還元によるethyl(R)-2-hydroxy-4-phenylbutanoate [(R)-EHPB]の合成にも威力を発揮した⁸²⁾。この標的物質(R)-EHPBはenalaprilatやlisinoprilのような高血圧症治療薬(ACE阻害剤)の合成原料として有用であり⁸³⁾、酵素的加水分解⁸⁴⁻⁸⁶⁾やエステル交換による合成^{87,88)}と並んで微生物還元による合成法も種々提案されているが⁸⁹⁻⁹¹⁾、芳香族化合物である基質と生成物の毒性が大きなネックとなっている。筆者らは、岡山県の果樹園土壌から分離した酵母Candida holmiiを板状担体充填型界面バイオリアクターに適用することにより、目的の(R)-EHPBを高光学純度で合成することに成功した⁹²⁾。

さらなる還元反応への応用として、腸内細菌を用いたmethyl 7-ketolithocholateの7位ケト基の立体選択的な還元によるmethyl ursodeoxycholate [Me-UDCA]の合成を行った。Me-UDCAは胆石溶解剤として使用されているursodeoxycholic acid^{93,94)}の前駆体となるが、この反応で扱う腸内細菌のEubacterium aerofaciens JCM 7790は酸素が存在すると死滅してしまうため、これまで述べてきたタイプの界面バイオリアクターは不適である。そこで、寒天平板型リアクターの本体とフタとの密閉性を高め、リアクター内部に酸素除去用触媒を装填し、かつ、リアクター内部と基質を含んだ有機相を予め脱気-窒素置換することにより、目的の還

元反応は効率的に進行した。これら胆汁酸(エステル)は微生物に対して極めて強力な毒性を発揮することが知られており⁹⁵⁻⁹⁷⁾、これまでのUDCAの微生物的合成⁹⁸⁻¹⁰²⁾においても最大蓄積濃度はわずか1.2g/Lにすぎなかった¹⁰³⁾。これに対し、新たに開発した嫌気性界面バイオリアクターを用いると、20g/Lを超えるMe-UDCAが結晶(反応の進行に伴い析出)と溶液の形で回収でき、再結晶を経ることにより試薬を上回る純度で精製された。

4.4 酸化反応への応用(図7)

微生物的酸化反応も有用カルボン酸の合成やアルコールの光学分割に多用されている¹⁰⁴⁻¹⁰⁸⁾。界面バイオリアクターに用いられるパラフィン系反応溶媒は、一般に水の10倍程度の酸素溶解性を有しているため、界面バイオリアクターは各種微生物変換反応の中でも特に酸化反応に威力を発揮し、無通気、無攪拌条件下でも酸化反応は効率的に進行する³⁹⁾。このことは、リアクターのランニングコストが大きく低減できることを意味する。

図7には強毒性アルコールである1-decanolの酸化によるdecanoic acid(香料原料、防腐剤)の合成例を示してある¹⁰⁹⁾。1-Decanolのような中鎖アルカノールは微生物に対して強力な毒性を発現し¹¹⁰⁻¹¹²⁾、さらにdecanoic acidに至っては防腐剤として用いられるほどの強毒性であり¹¹³⁻¹¹⁵⁾、事実、多くの酵母はわずか0.2g/L程度の低水相中濃度で死滅してしまう¹¹⁶⁾。しかしながら、界面バイオリアクターを用いるとこ

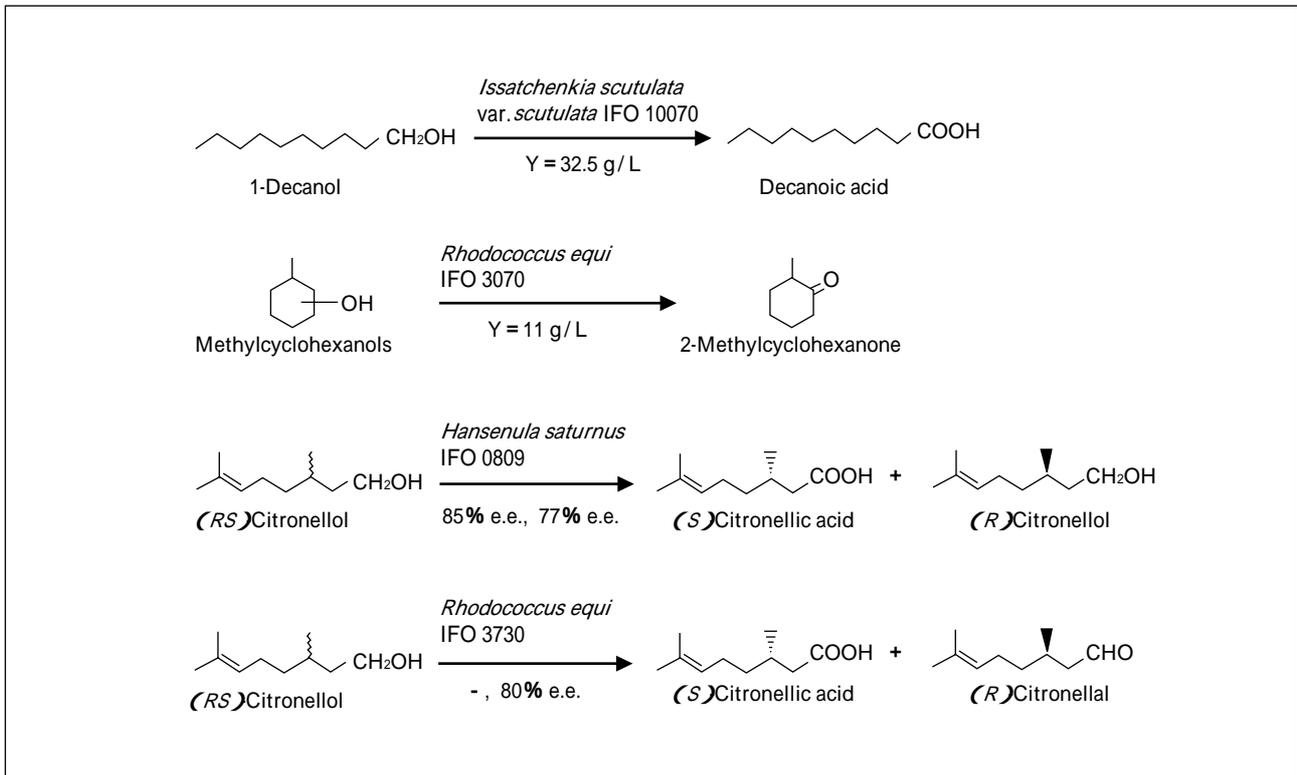


図7 界面バイオリアクターを用いた微生物的酸化反応の例

れら毒物の毒性は著しく回避され、基質濃度を8wt%とした場合、decanoic acidの蓄積濃度は32.5 g/Lに達した¹⁰⁹⁾。

界面バイオリアクターの酸化反応への応用でも、基質や生成物の毒性回避に加えて高い立体選択性や位置選択性が発揮できる。図7には *Hansenula saturnus*¹¹⁷⁾と *Rhodococcus equi*¹¹⁸⁾を用いた(RS)-citronellolの立体選択的酸化の結果を示してある。光学活性なcitronellolや citronellal, citronellic acidは昆虫フェロモンやアルカロイドなどの光学活性天然物の合成原料として有用であるが¹¹⁹⁻¹²³⁾、これらテルペノイドは極めて強い殺菌作用を有しており^{124,125)}、微生物的な高濃度生産は困難であった¹²⁶⁾。しかしながら、界面バイオリアクターを用いることにより、*H. saturnus*によって高濃度の(S)-citronellic acidと(R)-citronellol¹¹⁷⁾が、また、*R. equi*により(R)-citronellalが高い光学純度で合成できた¹¹⁸⁾。

位置選択的酸化反応の例としては、強毒性メチルシクロヘキサノールの酸化が挙げられるが、*R. equi*を用いて2-,3-,4-メチル体の酸化を行ったところ2-メチル体のみが高濃度で酸化され、2-methylcyclohexanone(強毒性)が11g/Lで調製できた(図7)³⁹⁾。

5. 代謝-微生物変換融合システム (カップリングシステム)

前節で述べた *Hansenula saturnus*による(RS)-citronellolのエナンチオ選択的酸化では、副生物としてcitronellyl acetateが生成する¹¹⁷⁾。このアセチル部分は酵母による糖質の代謝により生じるacetyl-CoAに由来し、このアセチルドナーがアセチル転移酵素alcohol acetyltransferase [AATFase]の作用によってcitronellolへ転移されることが明らかとなっ

た(図8)^{127,128)}。このAATFaseは清酒吟醸香の主成分である isoamyl acetateを生成する鍵酵素として有名であるが¹²⁹⁻¹³²⁾、有用物質合成への応用は当時は知られていなかった。筆者らは、*Hansenula*属あるいは *Pichia*属酵母を用いたカップリングシステムによって、アセチルドナーを添加することなく種々の脂肪族、芳香族、テルペンアルコールを定量的にアセチル化することに成功した¹²⁸⁾。

*H. saturnus*のAATFaseには残念ながら(RS)-citronellolの光学分割能はなかったが、*Pichia kluyveri*のAATFaseが高いエナンチオ選択性でこの一級テルペンアルコールを分割できることを見い出した¹³³⁾。(RS)-Citronellolは所謂“反応点と不斉点とが離れた一級アルコール”であり、リパーゼを用いたエステル化^{134,135)}やcitronellyl acetateの加水分解では光学分割が非常に困難である¹³⁶⁾。唯一、Klibanovらがpig liver carboxyl esteraseを用いて(RS)-citronellolの光学分割に成功しているが¹³⁷⁾、この酵素は非常に高価であり、さらには安定性が低いために実用化不能である。

*Pichia kluyveri*のAATFaseは(RS)-citronellolの中の(S)-体を優先的にアセチル化して、高光学純度の(S)-citronellyl acetateと(R)-citronellolを定量的に与えるが(E値 30~40)この酵母は極めて高いグルコースとcitronellolに対する耐性を有しており、前者については40wt%ものグルコースの存在下でも代謝活性とカップリング活性を維持した(図9)。また、後者については30wt%ものラセミ体citronellolを処理可能であり、その高いエナンチオ選択性も発揮された(図10)。このように、基質並びに生成物の毒性緩和に優れた界面バイオリアクターへ基質耐性に優れた *P. kluyveri*を適用することにより、長期安定的にラセミ体citronellolの光学分割を繰り返し実施できた(図11)¹³³⁾。

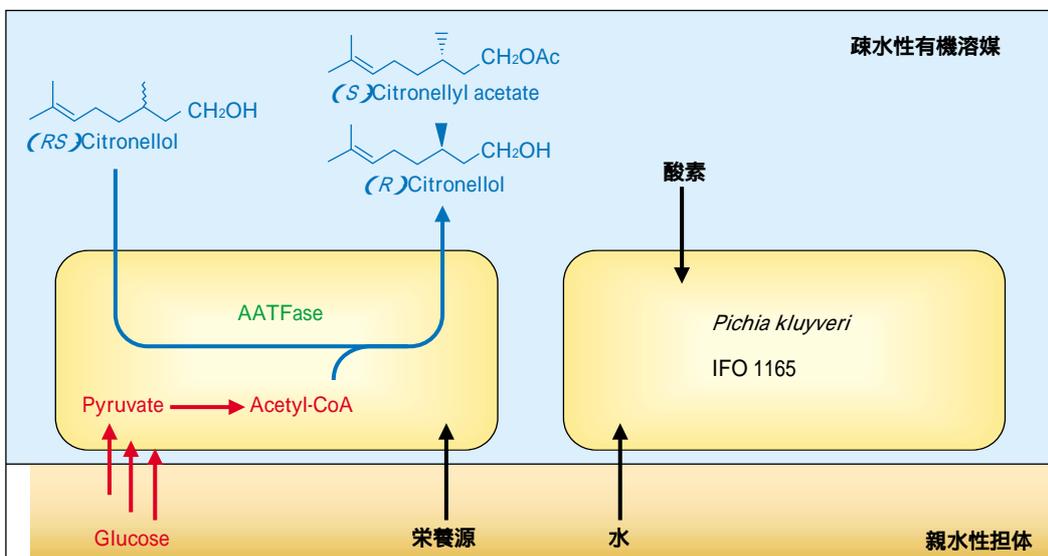


図8 代謝-微生物変換融合(カップリング)システムの原理

図は *Pichia kluyveri* IFO 1165を用いた(RS)-citronellolの光学分割を例として描かれている

AATFase, alcohol acetyltransferase

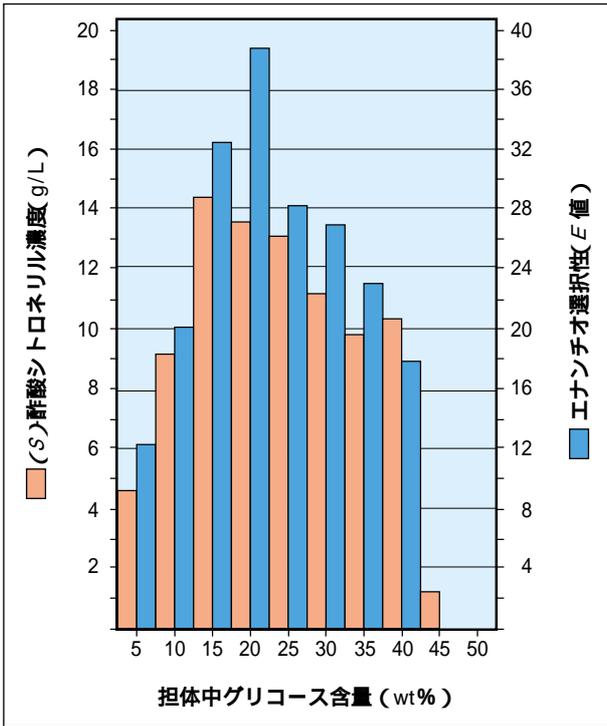


図9 *Pichia kluyveri* IFO 1165を用いた代謝 - 微生物変換融合システムにおける担体中グルコース含量の影響

図12には安価なラボ用リアクターとして開発した高層型界面バイオリアクターの模式図と写真、図13にはそれを用いて行った2wt% (*R*)-citronellolの光学分割のタイムコースを示してある。高層型リアクターは積み重ねられた寒天平板型界面バイオリアクターよりなる。各リアクターユニットの有機相はオーバーフローラインを経て順次直下のユニットへ自然流出し、ボトムユニットへ集まる有機相はダイヤフラムポンプによってトップユニットへ戻されることにより、各ユニット間における反応速度のバラツキが解消され、1点のみでの集中管理が可能となっている。この高層型リアクター(内部総容量100 L、有機相量6 L)を用いたカップリングシステムにより、高い光学純度の(*S*)-citronellyl acetate(アルカリ加水分解により(*S*)-citronellolへ誘導可能)と(*R*)-citronellolがそれぞれ50 g以上の収量で調製できた¹³³⁾。なお、本株のAATFase活性のさらなる引き上げを目的として、この酵素並びに対応する遺伝子の解析とAATFase高発現遺伝子組換え体の創製が九州大学大学院生物資源環境科学研究科の古川謙介教授と後藤正利助手のもとで進められている。また、本システムの実用研究も慶應義塾大学理工学部の太田博道教授と須貝威助教授のもとで進められており、両研究室における本システムの今後の発展が大いに期待される。

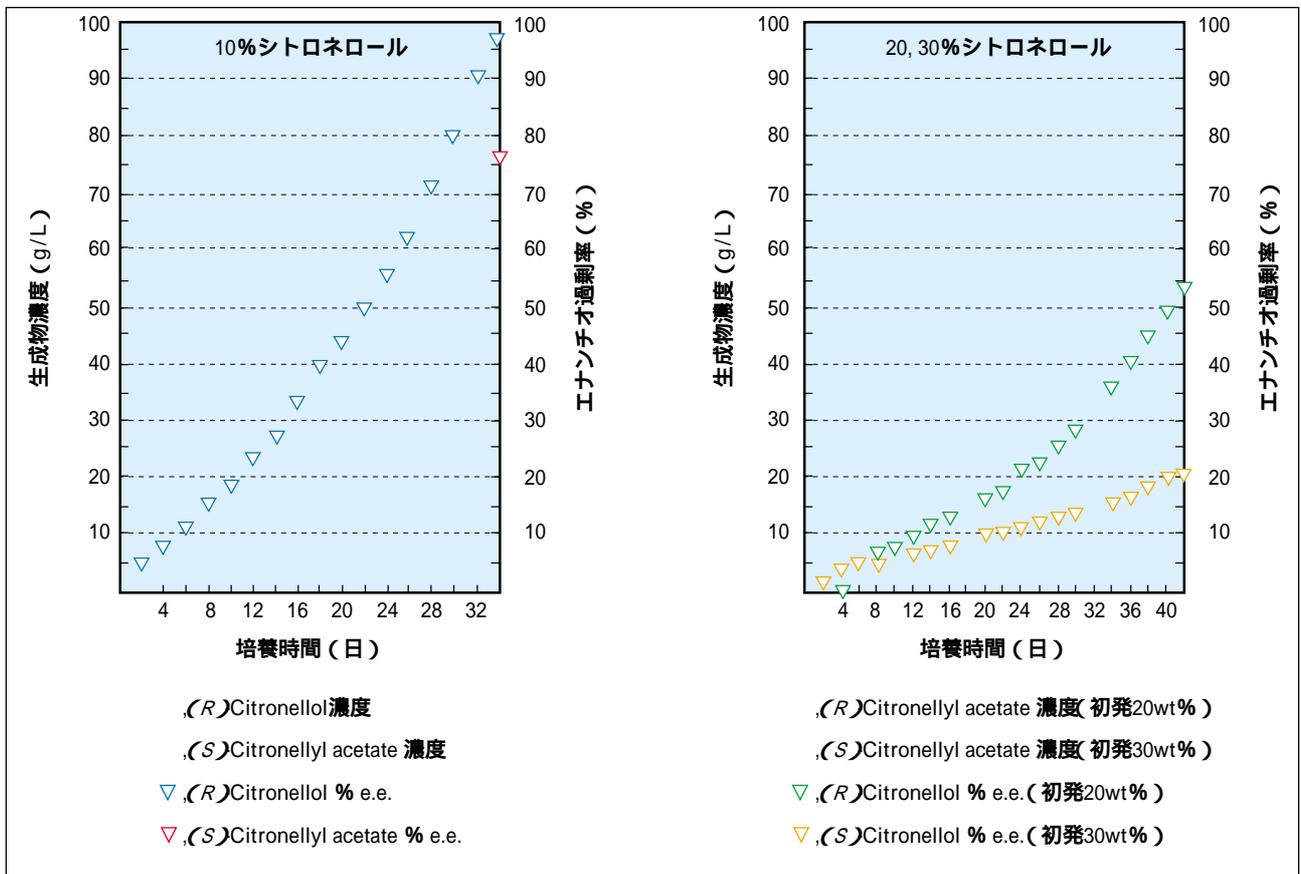


図10 *Pichia kluyveri* IFO 1165を用いた代謝 - 微生物変換融合システムによる高濃度(*RS*)-citronellolの光学分割

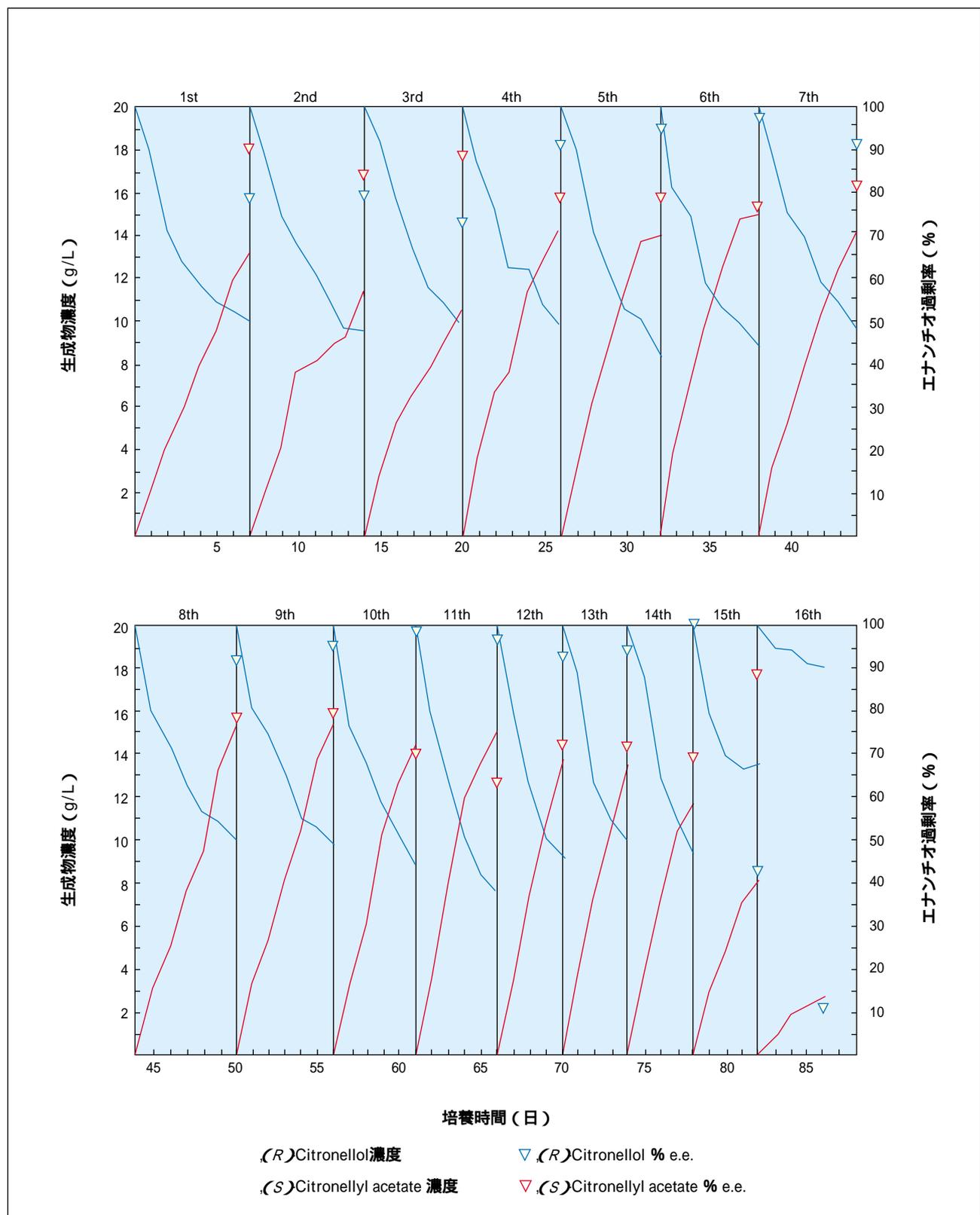


図11 *Pichia kluyveri* IFO 1165を用いた代謝 - 微生物変換融合システムによる(R,S)-citronellolの繰り返しバッチ光学分割1基の寒天平板型界面バイオリアクターにより、78日間に渡る14バッチの繰り返し反応に成功

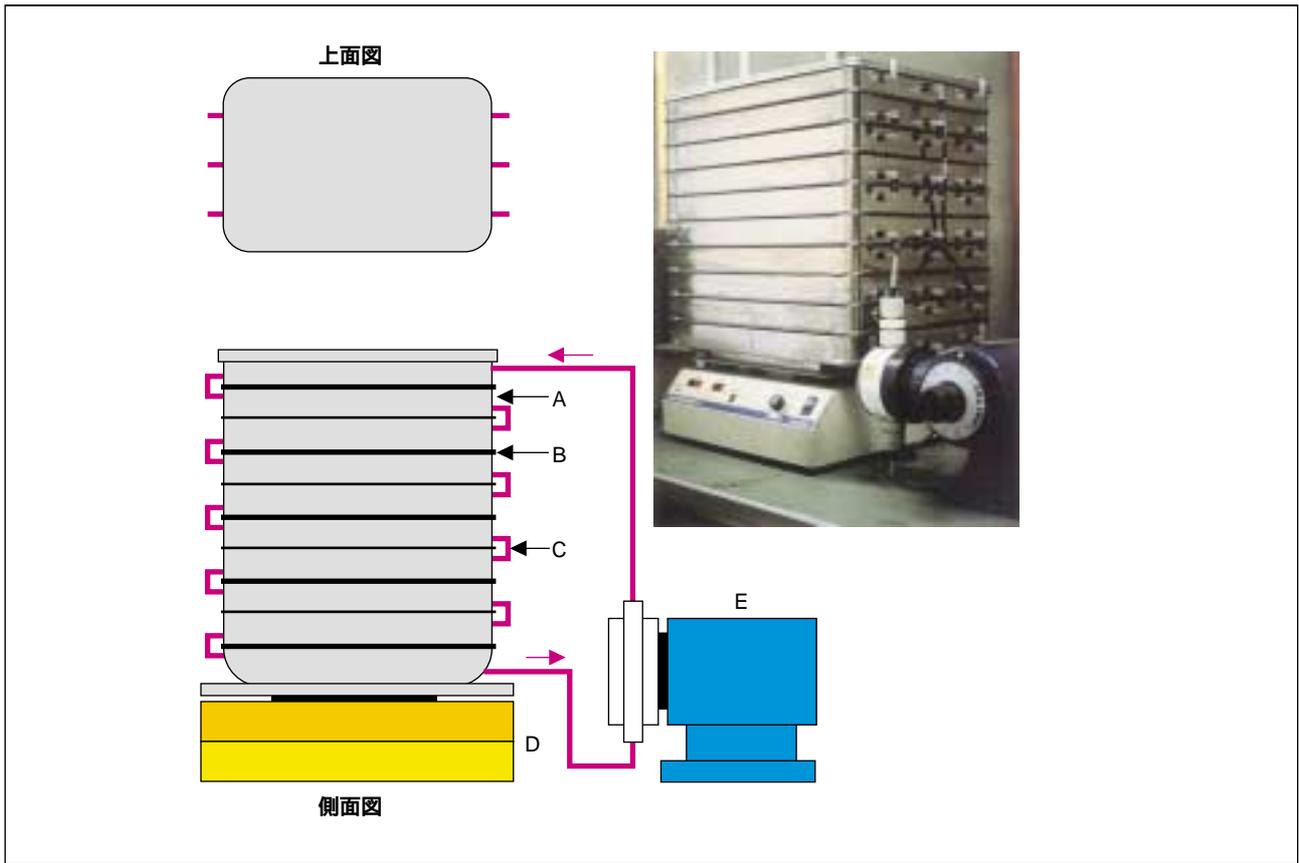


図12 高層型界面バイオリアクターの模式図並びに写真

A . ステンレス鋼製リアクターユニット (寒天平板型界面バイオリアクター) ; B . パイトンゴムパッキン ; C . オーバーフローライン ; D . シェーカー ; E . ダイアフラムポンプ。各リアクターユニット内の有機層はオーバーフローラインを通じた自然流出とダイアフラムポンプによるボトムユニットからトップユニットへの強制送液によって連結・循環される。リアクター内部総容量100L、有機層量6L

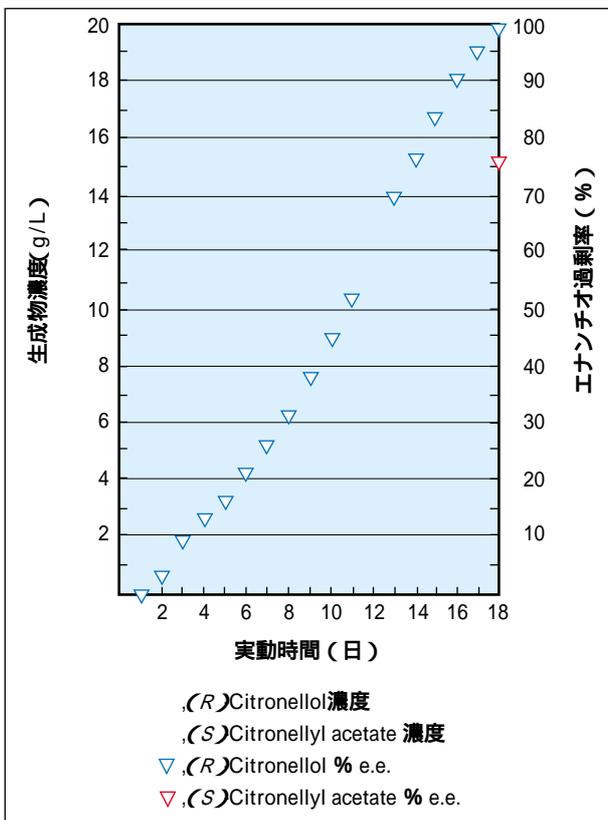


図13 高層型界面バイオリアクターを用いた 2wt% (RS)-citronellolの光学分割のタイムコース

6. おわりに

以上述べてきたように、界面バイオリアクターは水に不溶性基質の微生物変換に大きな威力を発揮し得るデバイスであり、高い生産性、収率、選択性、あるいは温和な条件下での実動性や広い汎用性など、種々の長所を有している。バイオコンバージョンは環境調和型の物質生産技術であり、その効率化を可能とする本システムの重要性も今後益々増大してくるものと期待される。もちろん、本システムの適用はバイオコンバージョンに限られるものではなく、水不溶性発酵産物の高濃度生産や水不溶性有害物質の分解除去、さらには植物細胞を用いた有用物質の生産など、幅広い応用が期待される。当社外においても、慶應義塾大学、九州大学、広島大学、東京理科大学、岡山理科大学、富山県立大学などいくつかの大学で本システムの基礎並びに応用研究が行われており、今後の発展を発明者として大いに期待している。

謝 辞

本研究は多くの先生方の御指導と基盤技術研究促進センターからの融資を受けて行われた。とりわけ、慶應義塾大学理工学部の太田博道教授並びに須貝威助教授からは本研究全般に渡って有為な御指導を多々頂いた。また、九州大学大学院生物資源環境科学研究科の古川謙介教授、園元謙二助教授、後藤正利助手、山口大学農学部の加藤昭夫教授、松富直利教授、足立収生教授、島根大学農学部の松田英幸教授、鳥取大学農学部の故濱崎敬教授、琉球大学農学部の屋宏典助教授、広島大学大学院理学研究科の平田敏文教授、そして大阪市立工業研究所の島田裕司博士からも様々な御指導並びに御支援を頂いた。紙面を借りて厚く御礼申し上げる。最後に、本研究の多くは基盤技術研究促進センターからの融資を受けて行われた。同センターに対しても深謝の意を表したい。

参考文献

- 1) 太田博道：生体反応論、三共出版(1996)
- 2) 谷吉樹、倉根隆一郎監修：バイオコンバージョン、医学出版センター(1993)
- 3) H. Ohta: Yukigoseikagaku Kyokaishi, **41**, p. 1018 (1983)
- 4) S. Shimizu and H. Yamada: Yukigoseikagaku Kyokaishi, **41**, p. 1064 (1983)
- 5) K. Mori and T. Sugai: Yukigoseikagaku Kyokaishi, **41**, p. 1044 (1983)
- 6) B. Herradon: J. Org. Chem., **59**, p. 2891 (1994)
- 7) B. Morgan et al.: J. Org. Chem., **57**, p. 3231 (1992)
- 8) F. Terradas et al.: J. Am. Chem. Soc., **115**, p. 390 (1993)
- 9) Y. Takazawa et al.: Agric. Biol. Chem., **48**, p. 2489 (1984)
- 10) M. Ueda et al.: Agric. Biol. Chem., **50**, p. 1533 (1986)
- 11) S. Oda et al.: Biosci. Biotech. Biochem., **56**, p. 1216 (1992)
- 12) S. Oda et al.: Biosci. Biotech. Biochem., **56**, p. 1515 (1992)
- 13) C.R. Thomas and P. Dunnill: Biotechnol. Bioeng., **21**, p. 2279 (1979)
- 14) T. Nakahara et al.: J. Ferment. Technol., **59**, p. 415 (1981)
- 15) J. Sikkema et al.: J. Bacteriol., **174**, p. 2986 (1992)
- 16) T. Nakahara et al.: J. Ferment. Technol., **61**, p. 19 (1983)
- 17) W.F. Guerin and G.E. Jones: Appl. Environ. Microbiol., **54**, p. 937 (1988)
- 18) M. Smith et al.: Appl. Environ. Microbiol., **59**, p. 1425 (1993)
- 19) T.G. Park and A.S. Hoffman: Biotechnol. Lett., **11**, p. 17 (1989)
- 20) T. Omata et al.: J. Ferment. Technol., **58**, p. 339 (1980)
- 21) A. Freeman and M.D. Lilly: Appl. Microbiol. Biotechnol., **25**, p. 495 (1987)
- 22) H.K. Santhanam and G.S. Shreve: Biotechnol. Prog., **10**, p. 187 (1994)
- 23) R. Bar: J. Chem. Technol. Biotechnol., **43**, p. 49 (1988)
- 24) M.K. Kim and J.S. Rhee: Enzyme Microb. Technol., **15**, p. 612 (1993)
- 25) A. Tanaka and K. Sonomoto: Chemtech, **20**, p. 112 (1990)
- 26) K. Sonomoto and A. Tanaka: Hakkokogaku, **61**, p. 153 (1983)
- 27) T. Omata et al.: J. Ferment. Technol., **58**, p. 339 (1980)
- 28) E. Kondo and E. Masuo: J. Gen. Appl. Microbiol., **7**, p. 113 (1961)
- 29) A. Inoue and K. Horikoshi: Nature, **338**, p. 264 (1989)
- 30) H. Nakajima et al.: Biosci. Biotech. Biochem., **56**, p. 1872 (1992)
- 31) H. Shima et al.: Agric. Biol. Chem., **55**, p. 1197 (1991)
- 32) R. Aono et al.: Biosci. Biotech. Biochem., **56**, p. 145 (1992)
- 33) T. Komatsu et al.: Biosci. Biotech. Biochem., **58**, p. 1754 (1994)
- 34) S. Oda and H. Ohta: J. Jpn. Soc. Colour Material, **70**, p. 538 (1997)
- 35) S. Oda and H. Ohta: Recent Res. Devel. Microbiol., **1**, p. 85 (1997)
- 36) S. Oda et al.: "Enzymes in Non-aqueous Organic Solvent," P. Halling et al. (eds.), Humana Press, UK, in press
- 37) S. Oda: Kagakukogyo, **2000**, p. 462 (2000)
- 38) S. Oda: Bio Industry, in press

- 39) S. Oda and H. Ohta: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, p. 2041 (1992)
- 40) M.V. Flores et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, p. 340 (1994)
- 41) R.Kaul et al. " *Biocatalysis in Organic Media* ", C. Laane et al.(eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 107 (1986)
- 42) G. Carrea: " *Biocatalysis in Organic Media* ", C. Laane et al.(eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 157 (1986)
- 43) J.P. Fay and R.N. Farias: *J. Bacteriol.*, **132**, p. 790 (1977)
- 44) C.W. Sheu and E. Freese: *J. Bacteriol.*, **115**, p. 869 (1973)
- 45) M.R.W. Brown and P. Gilber: *J. Appl. Bacteriol.*, **74**, p. 87S (1993)
- 46) S. Satake et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, p. 685 (1990)
- 47) B.L. Angus et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, p. 299 (1982)
- 48) C.A. Caulcott et al.: *FEMS Microb. Lett.*, **21**, p. 119 (1984)
- 49) A.J. Godfrey and L.E. Bryan : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, p. 1216 (1987)
- 50) R.I. Tomlins et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, p. 1110 (1982)
- 51) H. Shima et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, p. 1197 (1991)
- 52) R.Aono et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, p. 4624 (1994)
- 53) A. Gentile et al.: *J. Org. Chem.*, **57**, p. 6635 (1992)
- 54) K.Kawai et al.: *Tetrahedron Lett.*, **22**, p. 2527 (1981)
- 55) K. Matsumoto and H. Ohta: *Chem. Lett.*, **1989**, p. 1109 (1989)
- 56) H. Tomori et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, p. 207 (1996)
- 57) T. Miyazawa et al.: *Chem. Lett.*, **1989**, p. 2219 (1989)
- 58) S. Oda et al.: *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, p. 84 (1998)
- 59) O. Katoh et al.: *Tetrahedron: Asymm.*, **5**, p. 1935 (1994)
- 60) G. Langrand et al.: *Biotechnol. Lett.*, **10**, p. 549 (1988)
- 61) G. Langrand et al.: *Biotechnol. Lett.*, **12**, p. 581 (1990)
- 62) C.J. Gray et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, p. 800 (1990)
- 63) L.N.Yee and C.C. Akoh: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, p. 1379 (1996).
- 64) F. van Middlesworth et al.: *J. Org. Chem.*, **57**, p. 4753 (1992).
- 65) G. Kirchner et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, p. 7072 (1985)
- 66) S.-J. Kuo et al.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**, p. 1427 (1996)
- 67) S. Parida and J.S. Dordick: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, p. 2253 (1991)
- 68) T. Izumi and S. Murakami: *J. Chem. Tech. Biotech.*, **60**, p. 23 (1994)
- 69) K. Kato et al.: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, p. 206 (1996).
- 70) S. Osanai: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **35**, p. 955 (1986)
- 71) K. Myojo et al. : *Kagakukogyo*, **1987**, p.410(1987)
- 72) K. Myojo and Y. Matsufune: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **44**, p. 883 (1995)
- 73) P. Gramatica: *Experientia*, **38**, p. 775 (1982)
- 74) N. Hori et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, p. 123(1984)
- 75) H. Ohta et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, p. 665(1985)
- 76) K. Nakamura et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, p. 2738 (1993)
- 77) K. Nakamura et al. : *Tetrahedron Lett.*, **32**, p. 265 (1995)
- 78) W.-R. Sieh et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, p. 2993 (1985)
- 79) K. Matsumoto et al.: *Chem. Lett.*, **1998**, p. 283 (1998)
- 80) K. Ishihara et al.: *Chem. Lett.*, **1995**, p. 253 (1995)
- 81) T. Sugai et al.: *Tetrahedron*, **51**, p. 11987 (1995)
- 82) S. Oda et al. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, p.1762 (1998)
- 83) G. Iwasaki et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, p. 280 (1989)
- 84) K. Yamamoto and K. Ootsubo: *Japan Kokai Tokkyo Koho*, 192190 (Aug. 3, 1993)
- 85) M. Ito and Y. Kobayashi: *Japan Kokai Tokkyo Koho*, 281098 (Nov. 13, 1989)
- 86) A. Miyata and H. Sato: *Japan Kokai Tokkyo Koho*, 225499 (Sep. 8, 1989)
- 87) T. Sugai and H. Ohta: *Japan Kokai Tokkyo Koho*, 200391 (July 21, 1992)

- 88) T. Sugai and H. Ohta: Agric. Biol. Chem., **55**, p.293 (1991)
- 89) C.W. Bradshaw et al.: Bioorg. Chem., **19**, p. 29 (1991)
- 90) T. Nikaido et al.: Biosci. Biotech. Biochem., **56**, p. 2066 (1992)
- 91) D.H. Dao et al.: Bull. Chem. Soc. Jpn., **71**, p. 425 (1998)
- 92) S. Oda et al.: Biosci. Biotech. Biochem., **62**, p. 1762 (1998)
- 93) S. Nakagawa et al.: Lancet, **2**, p. 367 (1977)
- 94) A. Stiehl et al.: Gastroenterology, **75**, p. 1016 (1978)
- 95) I.A. Macdonald and P.D. Roach: Biochim. Biophys. Acta, **665**, p. 262 (1981)
- 96) S. Hirano and N. Masuda: Appl. Environ. Microbiol., **43**, p. 1057 (1982)
- 97) G. Carrea et al.: Biotechnol. Bioeng., **26**, p. 560 (1984)
- 98) R. Bovara et al.: J. Org. Chem., **58**, p. 499 (1993)
- 99) I.A. Macdonald et al.: Appl. Environ. Microbiol., **44**, p. 1187 (1982)
- 100) I.A. Macdonald et al.: J. Lipid Res., **22**, p. 458 (1981)
- 101) H. Hirano and N. Masuda: J. Lipid Res., **22**, p. 1060 (1981)
- 102) T. Fedorowski et al.: Gastroenterology, **77**, p. 1068 (1979)
- 103) S. Kulprecha et al.: Appl. Environ. Microbiol., **49**, p. 338 (1985)
- 104) H. Ohta et al.: Chem. Lett., **1987**, p. 2325 (1987)
- 105) H. Ohta and H. Tetsukawa: Chem. Lett., **1979**, p. 1379 (1979).
- 106) H. Ohta and H. Tetsukawa: Agric. Biol. Chem., **43**, p. 2099 (1979)
- 107) K. Nakamura et al.: Tetrahedron Lett., **35**, p. 4375 (1984)
- 108) T. Sawada et al.: Appl. Environ. Microbiol., **45**, p. 884 (1983)
- 109) S. Oda et al.: J. Ferment. Bioeng., **78**, p. 149 (1994)
- 110) J.S. Teh: Appl. Microbiol., **28**, p. 840 (1974)
- 111) T. Tawaratani et al.: J. Antibact. Antifung. Agents, **15**, p. 491 (1987)
- 112) J.J. Kabara et al.: Antimicrob. Agents Chemother., **2**, p. 23 (1972)
- 113) C.W. Sheu and E. Freese: J. Bacteriol., **111**, p. 516 (1972)
- 114) E. Freese et al.: Nature, **241**, p. 321 (1973)
- 115) H. Galbraith and T.B. Miller: J. Appl. Bacteriol., **36**, p. 647 (1973)
- 116) N. Kato and I. Shibasaki: J. Ferment. Technol., **53**, p. 793 (1975)
- 117) S. Oda et al.: J. Ferment. Bioeng., **80**, p. 559 (1995)
- 118) S. Oda et al.: Biosci. Biotech. Biochem., **60**, p. 83 (1996)
- 119) K. Mori et al.: Tetrahedron, **37**, p. 1329 (1981)
- 120) K. Mori et al.: Tetrahedron, **38**, p. 2291 (1982)
- 121) K. Mori et al.: Liebigs Ann. Chem., **1985**, p. 861 (1985)
- 122) K. Mori et al.: Liebigs Ann. Chem., **1991**, p. 783 (1991)
- 123) L. Poppe et al.: Tetrahedron Lett., **32**, p. 2643 (1991)
- 124) S. Gocho: J. Antibact. Antifung. Agents, **19**, p. 511 (1991)
- 125) S. Gocho: J. Antibact. Antifung. Agents, **20**, p. 585 (1992)
- 126) J. Schindler: Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., **21**, p. 537 (1982)
- 127) S. Oda et al.: Appl. Environ. Microbiol., **62**, p. 2216 (1996)
- 128) S. Oda and H. Ohta: J. Ferment. Bioeng., **83**, p. 423 (1997)
- 129) K. Kuriyama et al.: Hakkokogaku, **64**, p. 169 (1986)
- 130) K. Yoshioka and N. Hashimoto: Agric. Biol. Chem., **45**, p. 2183 (1981)
- 131) T. Minetoki: J. Brew. Soc. Jpn., **87**, p. 334 (1992)
- 132) T. Fujii et al.: Appl. Environ. Microbiol., **63**, p. 910 (1997)
- 133) S. Oda et al.: J. Biosci. Bioeng., **87**, p. 473 (1999)
- 134) T. Kawamoto et al.: Biocatalysis, **1**, p. 137 (1987)
- 135) Y. Yamaguchi et al.: Nippon Nogeikagaku Kaishi, **51**, p. 123 (1977)
- 136) Y. Yamaguchi et al.: Nippon Nogeikagaku Kaishi, **50**, p. 475 (1976)
- 137) B. Cambou and A.M. Klivanov: J. Am. Chem. Soc., **106**, p. 2687 (1984)