

有機溶媒耐性微生物を用いた非水系の世界でのものづくり

Bioproduction in Nonaqueous Environment Using Organic Solvent-Tolerant Microorganism

本田 孝祐^{1*}, 加藤 純一², 大竹 久夫¹

KOHSUKE HONDA, JUNICHI KATO and HISAO OHTAKE

¹ 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

² 広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能化学専攻 〒739-8530 広島県東広島市鏡山1-3-1

* TEL: 06-6879-7437 FAX: 06-6879-7439

* E-mail: honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp.

¹ Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University,
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

² Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University,
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan

キーワード: バイオプロセス, 有機溶媒耐性微生物, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus opacus*

Key words: bioprocess, organic solvent-tolerant microorganism, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus opacus*

(原稿受付 2006年10月23日 / 原稿受理 2006年11月30日)

1. はじめに

環境問題・エネルギー問題への関心の高まりから、化成品生産プロセスにおいても化石資源依存型プロセスからの脱却の必要性が叫ばれだして久しい。このような背景のもと、生物機能を積極的に活用した物質生産、いわゆるバイオプロセスには消費エネルギーの少ない持続可能な型の生産プロセスとしてこれまで以上の期待と注目が集まっている。特に生物的多様性に富む微生物(由来酵素)の利用はファインケミカル合成の場などを中心にすでに数多くの成功をおさめている^{18,20)}。バイオプロセスの成否は、目的酵素のポテンシャルをいかにして最大限に引き出すかに大きく依存する。このため生体触媒はその至適条件付近、すなわちこれらが本来機能している生体内環境に近い条件で用いられる必要がある。しかしながら私達の身のまわりを埋め尽くしたプラスチックや合成塗料に目をやれば容易に気づくことだが、汎用化成品のほとんどは水に全く、あるいはほとんど溶けない物質である。これらをバイオプロセスのターゲットとするためには、生体触媒にとっての最適環境とは大きく異なる、有機溶媒存在下における生産プロセスの開発が不可避となる。

目的の反応が1種類の酵素で触媒される比較的単純なものである場合、その酵素が有機溶媒に耐性を有し、十分な触媒能を示せば事足りる。事実、リパーゼなどの加水分解酵素を中心に有機溶媒中でも優れた活性を示すものが数多く見だされており、すでに実生産レベルで利用されているものも散見できる²⁹⁾。一方で多段階の酵素反応を経て生産される二次代謝産物や単一の酵素反応であっても NAD(P)H や ATP の供給など代謝経路からの

バックアップを必要とするものを対象とした場合、whole cell catalyst として用いられる微生物そのものに有機溶媒耐性が要求される。この場合の「耐性」微生物とは、有機溶媒共存下において文字どおり「耐え忍ぶ」だけでなく、生物としての異化・同化作用を発揮しうるものでなくてはならない。以上のような理由により有機溶媒耐性微生物がバイオプロセスのための新規で有用なプラットフォームとして近年にわかに脚光を浴び始めている。本稿ではこれら有機溶媒耐性微生物を用いた難水溶性物質の生産・変換プロセスについて著者らのグループで遂行中の研究成果を含むいくつかの具体例を交えながら解説していく。まずはこれに先立ち有機溶媒耐性微生物について現在までに知られるところの概要を述べたい。

2. 有機溶媒耐性微生物とは

有機溶媒耐性微生物に関する研究の歴史は、井上と堀越によるトルエン耐性細菌 *Pseudomonas putida* IH-2000 の発見・単離に端を発し⁹⁾、以来多くの研究者により新規耐性細菌の取得とそのキャラクター化が精力的に行われている(表1)。一般的に有機溶媒は生体膜中に蓄積し、これを破壊することで細胞構造を破壊、死に至らしめるとされる⁹⁾。有機溶媒耐性の分子メカニズムは *Pseudomonas* 属細菌を中心としたグラム陰性細菌について集中的に研究が行われてきており、これらの細菌は細胞膜上に存在する排出ポンプ、迅速な細胞膜の修復系、あるいは極めて透過性の低い細胞壁構造などといった特性により有機溶媒の毒性を回避していることが知られている¹⁹⁾。変異操作によりこれらの機能の一部を

表1. 既報に見る有機溶媒耐性細菌。

菌株	耐性溶媒	文献
<i>Pseudomonas putida</i> IH-2000	トルエン	6
<i>P. putida</i> DOT-T1E	トルエン	15
<i>P. putida</i> T-57	トルエン	5
<i>P. aeruginosa</i> PST-01	トルエン	12
<i>Flavobacterium</i> sp. DS-711	ベンゼン	7
<i>Enterobacter</i> sp. VKGH12	<i>n</i> -ブタノール	11
<i>Arthrobacter</i> ST-1	ベンゼン	7
<i>Bacillus</i> strain SB1	<i>n</i> -ブタノール	16
<i>Rhodococcus</i> sp. strain 33	ベンゼン	13
<i>Rhodococcus opacus</i> B-4	ベンゼン	9

付加することで有機溶媒感受性の野生株に耐性を付与することも可能である。溶媒の毒性は個々の化学構造ではなく、それらの細胞膜中への溶け込みやすさに強く依存する。一般的に各溶媒のオクタノール/水分配係数の対数値 ($\log P_{ow}$) がその細胞毒性を表す指標として用いられており、この値が小さい有機溶媒ほど細菌に対する毒性が高いとされる⁹⁾。しかし、ここ数年のうちに *Bacillus* 属や *Rhodococcus* 属などを中心にグラム陽性の有機溶媒耐性細菌が多く分離され始めており^{8,10,17)}、これらが示す溶媒耐性は必ずしも上述の $\log P_{ow}$ 則に従わない。例えば、ベンゼン ($\log P_{ow}=2.0$) 耐性細菌として分離された *Rhodococcus opacus* B-4 株は *n*-ヘプタノール ($\log P_{ow}=2.3$) 存在下では生育することができない¹⁰⁾。グラム陽性細菌は分厚いペプチドグリカン層に加え、その外側に多糖類などに富んだユニークな細胞表層構造を示すものが多く存在する。これらが有機溶媒耐性に影響を及ぼしている可能性も示唆されているが⁷⁾、その詳細については今後の研究報告を待ちたい。

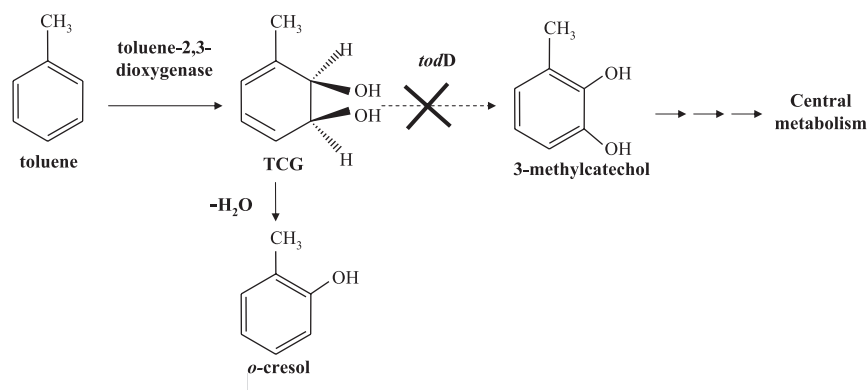
3. 水・有機溶媒 2 相系プロセス

では次に、これら有機溶媒耐性細菌を用いたバイオプロセスを順に紹介していきたい。難水溶性物質の微生物変換プロセスとして最も一般的に用いられているのは、水系培地上に目的の反応基質を溶解させた有機溶媒を重層させて反応を行わせる、いわゆる水・有機溶媒 2 相系

プロセスである。この場合、触媒となる微生物は水相に局在する。水・溶媒界面の比表面積を大きく保ち、基質と触媒微生物の接触効率を高めるため、反応液は絶えず攪拌されることになる。これら 2 相系反応における物質移動などプロセス工学的な見地からの研究例は未だ少ないが、Schmid らの総説などにおいて比較的詳細が解説されているので参照にされたい¹⁹⁾。

2 相系プロセスのメリットは基質・生成物の溶解度を高めることに加え、これら有機相中に偏在されることにより触媒微生物に対する毒性や反応阻害作用を低減させる点にある。先述のとおり生体反応にとっての本来の反応場は水系である。水に溶けない物質の多くは、生体にとってそもそも利用価値のないものであるばかりか、往々にして高い生物毒性を示す。また、高濃度の生成物の蓄積による酵素反応の阻害はこれらが難水溶性物質であるか否かに関わらずバイオプロセスにおける一般的な問題である。2 相系プロセスはこれらの問題を解決する有効な手段である。一例を挙げれば、*Pseudomonas oleovorans* を用いた 1,7-ジオクタジエンのエポキシ化において、シクロヘキサンを反応液に重層することで、毒性の高い生成物のエポキシドを有機層中に回収、反応収率を高めることに成功したとの報告がある²¹⁾。

著者らのグループでは *Pseudomonas putida* T-57 株を触媒としたトルエンからの *o*-クレゾール生産を例にとり 2 相系プロセスの有効性を検証した²⁵⁾。本菌はトルエン耐性を指標に分離された細菌であり、図 1 に示す代謝経路によって、各種芳香族化合物を分解資化する⁹⁾。図に示された酵素遺伝子はトルエン等を炭素源とした場合に発現誘導され、グルコースなどでリプレッションを受ける。ここでわれわれはトルエンシスグリコール (TCG) の酸化を触媒する TCG デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*todD*) を破壊することによって代謝経路を遮断した変異株を用い、これをトルエンとともに培養することで培養液中に著量の TCG を蓄積させた。TCG は化学的に不安定な物質であるため、低 pH 条件下において自発的な脱水を起こし、*o*-クレゾールへと変換される。生成物である *o*-クレゾールは殺虫剤の成分などとしても知られるとおり極めて高い生物毒性を有した物質である。酵素反応によるトルエンからの *o*-クレゾール生産を目指す場合、トルエンモノオキシゲナーゼを利用するほうがより直接的

図1. *P. putida* T-57 株によるトルエン代謝。

todD 破壊株では TCG にて代謝がストップする。培養液中に蓄積した TCG は酸性条件下で容易に脱水し、*o*-クレゾールへと変換される。

ではあるが、比較的毒性の低い TCG の形で生成物を蓄積させ、酵素反応終了後にこれを化学的に最終産物に変換するトルエンジオキシゲナーゼ反応の方が、触媒微生物への負担を減らし、より高濃度の生産物を得られる点で得策である。実際の反応は図 2 に示すように 5-L バイオリアクターを用いて行われた。反応中、基質トルエンおよび炭素源であるブタノールは恒常的に蒸気供給された。有機相としてオレイルアルコールを重層した場合とそうでない場合について *o*-クレゾール生産量を比較したところ、図 3 に示すとおり生産量に顕著な差が見られた。30時間の反応終了後の生成物量は有機相を重層しない場合の 4 倍近くまで増加し、有機相中のみに限って言えば *o*-クレゾール濃度は 40 g L^{-1} に達した。蒸気供給された基質トルエンの反応液中への溶解量を測定したところ、水系反応ではほとんど基質の取り込みが見られないのに対し、オレイルアルコール中では経時的にその濃度が上昇していくことが確認された。炭素源であるブ

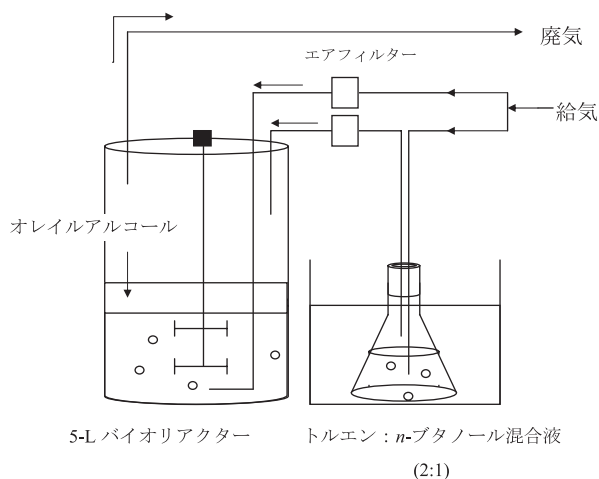


図 2. 水・有機溶媒 2 相系培養装置の模式図。

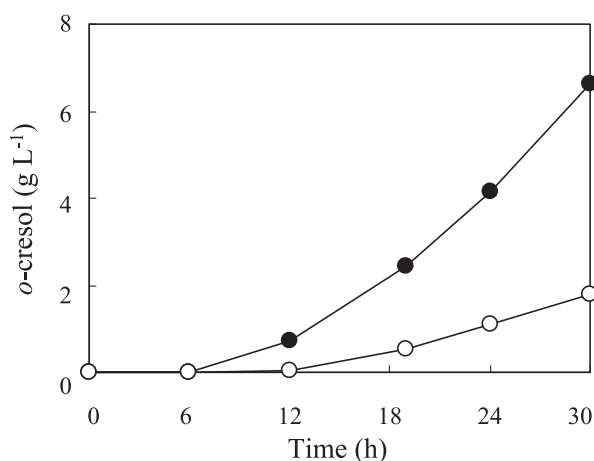


図 3. 水単相系ならびに水・有機溶媒 2 相系における *o*-クレゾール生産能の比較。

図 2 に示した反応槽を用いて、1000 mL の培養液に対し 100 mL のオレイルアルコールを重層した場合 (●) と、しなかった場合 (○) での生産量を比較した。2 相系での生産量は水相中および有機相中をあわせた総体積あたりの濃度で表記した。

タノールは、目的酵素の発現抑制を起こさず、また素早く代謝されるため反応に必要な NADH の再生が効率的に行われる。その一方でやはり高い毒性を有した「諸刃の剣」でもあるが、これらを有機相中に偏在させることにより、その毒性が緩和され、結果的に生産量が増加した可能性も考えられよう。なお、本法はベンゼンや *p*-キシレンといった化合物から対応する芳香族アルコールを生産することにも適用可能であり、またいずれの場合においても、酸添加による脱水を省略することによりシスジオールの形で生産物を得ることも可能であることを付記する。

4. 有機溶媒単相系プロセス

4.1. 有機溶媒中での酵素反応

先にも述べたとおり、ある種の酵素は水を全くあるいはほとんど含まない有機溶媒中においても優れた触媒活性を発揮する。単離酵素を非水環境下で用いた場合、しばしば通常的水系反応液中では見られないユニークな触媒特性を示すことが知られている。本稿の主旨からは少し脱線するが、有機溶媒中でのバイオプロセスの一例として、これらについてもいくつかの例を紹介したい。

化学合成で汎用される一般的な有機溶媒に比べ、水はそれ自身が反応性に富んだ物質である。ゆえに水が存在するか否かによって、そこで生じる化学反応のダイナミズムは大幅に異なる。特に水自身が基質のひとつとなる加水分解反応などの場合、水が少なければ反応の平衡は逆反応 (脱水・縮合) 側に大きく傾く。すなわちリパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼといった加水分解酵素を適当な基質の共存下、水を含まない有機溶媒中で用いると、これらはエステル化反応やエステル転移反応を効率よく触媒する。実際これまでに報告されている非水環境下での酵素利用の例としては加水分解酵素を用いたエステル生産、ポリマー生産に関するものが多数を占める²⁹⁾。これらの酵素は有機溶媒中での反応に供される場合、通常凍結乾燥あるいは結晶化されて用いられる。これらの操作により酵素は立体構造上のフレキシビリティを失うため、その触媒活性は低減する一方で安定性が大きく増すケースが多く見られる。例えば、リパーゼ²⁶⁾、リボヌクレアーゼ²³⁾、 α -キモトリプシン²⁸⁾ などにおいて、これらの凍結乾燥品を有機溶媒中で用いた場合、100°C におけるその活性の半減期は数時間に及ぶとの報告もある (もちろん水系中で同じことを行った場合、数秒のうちに酵素タンパク質は変性・不活化してしまう)。また酵素反応の最大の特徴ともいえる基質選択性、位置・立体選択性も有機溶媒中においては通常的水系中でのそれと大きく異なる。例えば、*N*-アセチル-L-フェニアラニンのエチルエステルは水中において α -キモトリプシンのよい基質となり、*N*-アセチル-L-セリンエチルエステルと比べ 50,000 倍の速度で加水分解を受ける。しかし、オクタン中で同じ酵素を用い、これら 2 つのアミノ酸誘導体を基質にエステル交換反応を行ったとき、前者に対する反応速度は後者に対するそれのおよそ 3 分の 1 と逆転してしまう²⁷⁾。選択性の変化は用いる有機溶媒の種類によっても引き起こされる。同じく α -キモトリプシンを用いてラセミ体のメチル 3-ヒドロキシ-2-

フェニルプロピオン酸に対するエステル交換反応を行った研究結果では、用いる溶媒によってその立体選択性が最大20倍も変化したとの報告もなされている²⁴⁾。酵素の基質認識において、疎水結合は主たるドライビングフォースのひとつである。有機溶媒中で反応を行った場合、疎水結合による分子間相互作用は水中でのそれに比べはるかに小さくなり、結果的に酵素の選択性に重大な影響が及ぼされるのであろう。

4.2. 非水環境下で機能する whole cell catalyst

このように水を全く含まない非水環境下においても酵素反応が進行しうることはすでによく知られるところとなっている。ただし現在までのところ、ほとんどの研究報告は単一の酵素反応の利用にとどまっております、またそのほとんどが加水分解酵素による比較的単純な反応に限定されている。非水系バイオプロセスの開発にとって次なるチャレンジは、反応の多段階化や補酵素・エネルギー供与を必要とする複雑な酵素反応の利用であろう。有機溶媒耐性細菌を宿主とした whole cell catalyst には、これを可能にするためのツールとしての期待がかかる。

残念ながら現在までのところ、水を含まない有機溶媒中に微生物触媒反応を行った報告例はほとんど見られないが、数少ないうちのひとつとして Dias らによる *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 を用いた β -シトステロールの側鎖分解が挙げられる⁴⁾。本報文では、セライト（珪藻土）に吸着させた固定化菌体を触媒に、ビス（2-エチルヘキシル）フタル酸（以下 BEHP）を溶媒に用いることで、初発濃度 5 g L^{-1} の基質より70%のモル変換率で生成物（4-アンドステロン-3,17-ジオン）を得ることに成功している。 β -シトステロールの側鎖分解は9種類の酵素による14段階の反応からなるものであり²⁵⁾、その中には補酵素要求型酵素も多く含まれるが、本菌は分解した側鎖そのものを代謝することで反応に必要な補酵素を再生していると考えられている。生育に必要な微量元素等の不在を考えると、BEHP 中において積極的な同化（ひいては微生物の増殖）が行われているとは考えにくい、少なくとも異化作用によるエネルギー生産能が維持されていることから、whole cell catalyst としての必要条件是満たすものといえよう。

一方、著者らのグループでは先述の *Rhodococcus opacus* B-4 を対象に有機溶媒中における本菌の微生物触媒としての応用可能性について検討を行っている。本菌はもともとベンゼンに対する耐性を指標に自然界から分離された細菌である¹⁰⁾。当初、*P. putida* T-57 を用いたプロセスにならない、水・有機溶媒 2 相系での利用を試みたところ、菌体が水相・有機相の界面に凝集してしまったことから、*R. opacus* B-4 が有機溶媒に対して非常に高い親和性を持った細菌であることが示唆された。本菌の湿菌体を直接有機溶媒（*n*-テトラデカン）にけん濁したところ、図 4a のようにこれらは見かけ上、均一に溶媒中に分散した。（顕微鏡下で観察すると、これらは完全に均一に分散しているわけではなく、 $100 \mu\text{m}$ 程度の大きさに凝集した菌体塊がけん濁状態にあることがわかる（図 4c）。）一方、同様の操作を *P. putida* T-57 で行った場合、湿菌体は溶媒からはじき出されガム状のペレットとして容器の底や側面に付着するのみであった（図 4b）。

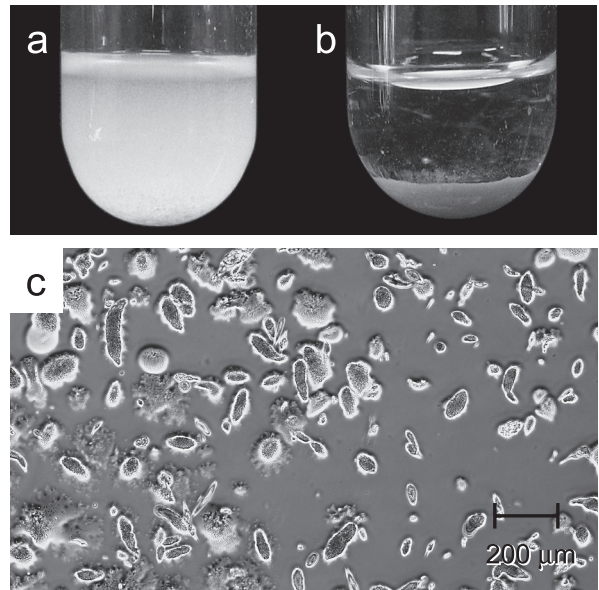


図 4. 有機溶媒（*n*-テトラデカン）にけん濁された *R. opacus* B-4 (a) ならびに *P. putida* T-57 (b)。約 50 mg の湿菌体に 2 mL の *n*-テトラデカンを加え、ボルテックスにて激しく攪拌した直後の様子を示す。*R. opacus* B-4 のけん濁液を顕微鏡下で観察すると菌体は凝集しあった状態で分散していることがわかる (c)。

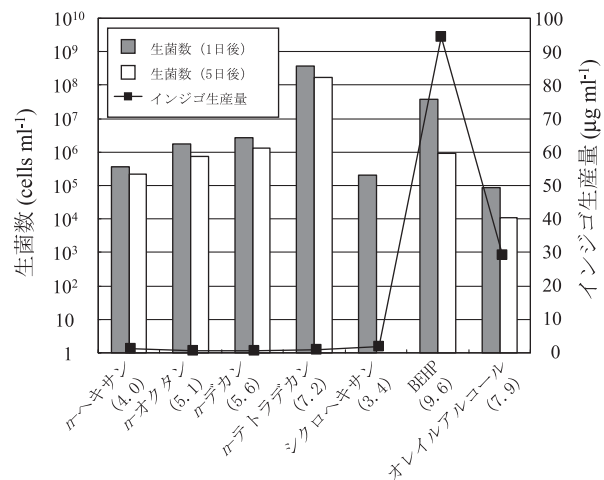


図 5. 有機溶媒中における *R. opacus* B-4 の生菌数ならびに BDO 発現強化株による各溶媒中でのインジゴ生産。*R. opacus* B-4 の湿菌体を初期菌体濃度が 2.4×10^9 cells mL^{-1} となるように各有機溶媒にけん濁し、振とう培養した。1日後および5日後に一部をプレーティングし、コロニー数を計測することで、生菌数を測定した。同様に BDO を発現強化した *R. opacus* B-4 を 5 mg mL^{-1} のインドールを含む各有機溶媒にけん濁し、 30°C にて12時間反応させた後のインジゴ生産量を測定した。括弧内の数字は各有機溶媒の $\log P_{ow}$ を示す。

これらの結果はそれまでひとくりにされてきた有機溶媒耐性細菌が溶媒への親和度、換言すれば親油性・親水性の違いで大別できること、そしてこれらの物質生産への応用を目指した場合、2相系なら親水性細菌、非水系なら親油性細菌とそれぞれに適した微生物を用いる必要があることを提唱するものである。

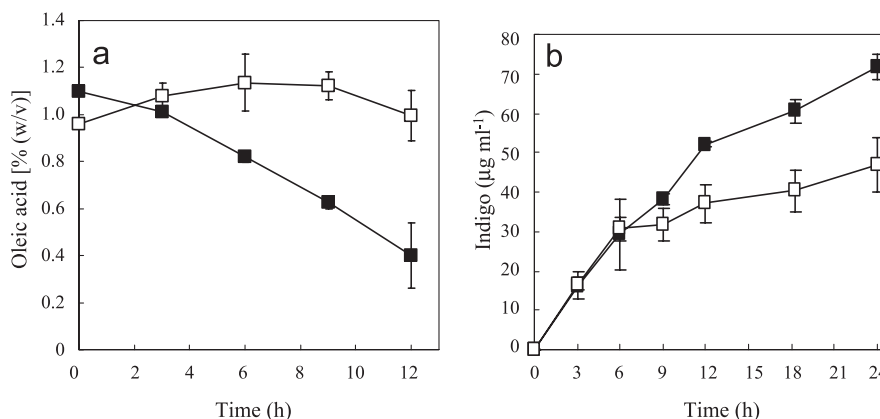


図6. BEHP 中における *R. opacus* B-4 のオレイン酸代謝活性とインジゴ生産への応用。

(a) 湿重 0.25 g の *R. opacus* B-4 を 1% (w/v) のオレイン酸を含む BEHP 10 mL 中でインキュベートした。生菌体 (■) では経時的なオレイン酸の減少が確認できたのに対して、予め熱処理 (90°C, 5 min) を施した死菌体 (□) では有意な減少は見られなかった。(b) BDO 発現強化株 (湿重 0.25 g) を 9 mg mL⁻¹ のインドールを含む BEHP (10 mL) 中で反応させた。1% (w/v) のオレイン酸の存在下 (■) では24時間以上に渡り経時的に反応が進行したのに対し、非存在下 (□) においては、初速度にこそ有意差はないものの反応開始から約6時間後以降、反応速度が低下していった。

R. opacus B-4 については、whole cell catalyst としての利用に不可欠となる宿主・ベクター系がすでに開発されており、任意の遺伝子の導入・発現が可能である¹⁴⁾。われわれは本菌由来のベンゼンジオキシゲナーゼ (BDO) 遺伝子をプラスミド型発現ベクターに導入して発現強化し、この組換え株を触媒としたインドールからのインジゴ生産をモデルに有機溶媒単相系での生産評価を行った。まず種々の有機溶媒中における *R. opacus* B-4 の生菌数およびインジゴ生産量の比較を行った。結果は図5に示すとおりで、生産性と生菌数の間に有意な相関は見られず、生産性については BEHP を溶媒とした場合に最も良好な結果が得られた。これについては各溶媒に対する基質の溶解度が生産性に大きな影響を及ぼしていると考えられる。次に脂溶性炭素源としてオレイン酸を用い、BEHP 中におけるこの消費を測定した。この結果、図6aに示すとおり *R. opacus* B-4 の生菌体が存在する場合にのみ経時的なオレイン酸の減少が見られ、有機溶媒中においても本菌が代謝活性を維持していることが確認された。このオレイン酸代謝を BDO によるインジゴ生産反応とカップリングさせることによってその生産性は有意に上昇する (図6b)。BDO は NADH 要求型酵素であることから、先ほどの Dias らの報告と同様に炭素源の異化に伴う補酵素の再生によって目的の酵素反応が推進されていると考えることができる。

凍結乾燥酵素を用いた場合とは異なり、厳密に言えば湿菌体に付着した水分量は無視できるものではなく、そもそも菌体内が水系の反応場であることを考えれば、極度に水の混在を嫌う有機合成反応にこれらの微生物反応を応用することは現時点では難しい。しかし、コンベンショナルな2相系反応に比べ、生成物の分離・回収といったダウンストリームの大幅な簡略化が期待できるほか、*Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 を用いた検討では、2相系反応よりも有機溶媒単相系を採用した場合のほうが長期間反応後の生菌率が優れていた、という意外な結果も報告されており³⁾、目的によっては十分なアドバンテージを持ったプロセスとして期待できる。

5. おわりに

有機溶媒耐性微生物をはじめとする極限生物の発見は、従来化学触媒に比べ脆弱と考えられてきた生体触媒の評価を一変させ、その応用可能性を大きく花開かせるものであった。近年盛んに行われているメタゲノム解析は、より広範な環境下におけるより雑多な生物の存在を裏付けており、発達しつづける分離・培養操作によって今後も多くの極限生物が発見、そして様々な分野に应用されていくだろう。

冒頭に述べたとおり、バイオプロセスの成否は目的の生体触媒反応のポテンシャルをいかにして最大限引き出すかに大きく依存している。極限微生物たちにとっての最適生育環境とは、われわれが通常考える従来のなものとは大きく異なることから、より柔軟な発想に基づいたプロセス設計が必要になるだろう。本稿ではこの点を意識し、ものづくりにおける有機溶媒耐性微生物の応用例を、2相系および単相系といったプロセスにより大別して紹介した。極限微生物を用いた場合に限らず、新規有用生体触媒の探索・単離とともに、これらを最大限活用するためのプロセス開発がバイオによるものづくりの両輪であることを最後に強調しておきたい。

謝 辞

本稿で紹介したもののうち、著者らのグループによる研究成果は NEDO「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」の一環として行われたものである。

文 献

- 1) Aono, R., K. Aibe, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1991. Preparation of organic solvent-tolerant mutants from *E. coli* K-12. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1935-1938.
- 2) Carrea, G., and S. Riva. 2000. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem.* 33: 2226-2254.

- 3) de Carvalho, C.C.C.R., A. Cruz, B. Angelova, P. Fernandes, M.N. Pons, H.M. Pinheiro, J.M.S. Cabral, and M.M.R. da Fonseca. 2004. Behavior of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 whole cells in aqueous, organic-aqueous and organic media studied by fluorescence microscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 695–701.
- 4) Dias, A.C.P., J.M.S. Cabral, and H.M. Pinheiro. 1994. Sterol side-chain cleavage with immobilized *Mycobacterium* cells in water-immiscible organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 708–714.
- 5) Faizal, I., K. Dozen, C.S. Hong, A. Kuroda, N. Takiguchi, H. Ohtake., K. Takeda, H. Tsunekawa, and J. Kato. 2005. Isolation and characterization of solvent tolerant *Pseudomonas putida* strain T-57, and its application to biotransformation of toluene to cresol in a two-phase (organic-aqueous) system. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 542–547.
- 6) Inoue, A., and K. Horikoshi. 1989. A *Pseudomonas putida* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338: 264–266.
- 7) Iwabuchi, N., M. Sunairi, H. Anzai, M. Nakajima, and S. Harayama. 2000. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5073–5077.
- 8) Kato, C., A. Inoue, and K. Horikoshi. 1996. Isolating and characterizing deep sea marine microorganisms. *Trends Biotechnol.* 14: 6–12.
- 9) Klivanov, A.M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409: 241–246.
- 10) Na, K.S., A. Kuroda, N. Takiguchi, T. Ikeda, H. Ohtake, and J. Kato. 2005. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strain. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 408–414.
- 11) Na, K.S., A. Kuroda, N. Takiguchi, T. Ikeda, H. Ohtake, and J. Kato. 2005. Development of a genetic transformation system for benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 408–414.
- 12) Neumann, G., Y. Veeranagouda, T.B. Karegoudar, Ö. Sahin, I. Mäusezahl, N. Kabelitz, U. Kappelmeyer, and H.J. Heipieper. 2005. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. Adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles* 9: 163–168.
- 13) Ogino, H., K. Yasui, T. Shiotani, T. Ishikawa, and H. Ishikawa. 1995. Organic solvent tolerant bacterium which secretes an organic solvent stable proteolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4258–4262.
- 14) Paje, M., B. Neilan, and I. Couperwhite. A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene. *Microbiology* 143: 2975–2981.
- 15) Ramos, J.L., E. Duque, M.T. Gallegos, P. Godoy, M.I. Ramos-Gonzalez, A. Rojas, W. Teran, and A. Segura. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 743–768.
- 16) Ramos, J.L., E. Duque, M. Huertas, and A. Haidour. 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* 177: 3911–3916.
- 17) Sardessai, Y., and S. Bhosle. 2002. Organic solvent tolerant bacteria in mangrove ecosystem. *Curr. Sci.* 82: 622–623.
- 18) Schmid, A., J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, and B. Witholt. 2000. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409: 258–268.
- 19) Schmid, A., A. Kollmer, R.G. Mathys, and B. Witholt. 1998. Development toward large-scale bacterial bioprocesses in the presence of bulk amounts of organic solvents. *Extremophiles*. 2: 249–256.
- 20) Schoemaker, H.E., D. Mink, and M.G. Wubbolts. 2003. Dispelling the myths –biocatalysis in industrial synthesis. *Science* 299: 1694–1697.
- 21) Schwartz, D.R., and C.J. McCoy. 1977. Epoxidation of 1,7-octadiene by *Pseudomonas oleovorans*: fermentation in the presence of cyclohexane. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 47–49.
- 22) Szentirmai, A. 1990. Microbial physiology of sidechain degradation of sterols. *J. Ind. Microb.* 6: 101–106.
- 23) Volkin, D.B., A. Staubli, R. Langer, and A.M. Klivanov. 1991. Enzyme thermoinactivation in anhydrous organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 843–853.
- 24) Wescott, C.R., H. Noritomi, and A.M. Klivanov. 1996. Rational control of enzymatic enantioselectivity through solvation thermodynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 10365–10370.
- 25) Yamashita, S., Y. Sameshima, M. Konishi, J. Kato, M. Kishimoto, K. Honda, T. Omasa, and H. Ohtake. 2006. Integrated biooxidation and acid dehydration process for mono-hydroxylation of aromatics. *Process Biochem.* in press. doi: 10.1016/j.procbio.2006.07.016.
- 26) Zacks, A., and A.M. Klivanov. 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science* 224: 1249–1251.
- 27) Zacks, A., and A.M. Klivanov. 1986. Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 2767–2768.
- 28) Zacks, A., and A.M. Klivanov. 1988. Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents *J. Biol. Chem.* 263: 3194–3201.