

テルペン類の微生物転換

林 哲 吾

信州大学農学部応用微生物化学研究室

I 緒 言

PASTEUR¹⁾ が微生物の基礎を確立して以来最近まで、微生物の行なう物質転換の基質の大部分は carbohydrate であり、其他には少量の、簡単な aliphatic compounds か、構造の簡単な aromatic compounds, および steroid 類に限られていたようである。carbohydrate に関しては、膨大な数の研究があり、また steroid 類にも多くの優れた総説が刊行されている。

Hydrocarbone 関係は、1895年頃²⁾、既に微生物的な研究が開始されているが、以後はほとんど研究が中断されて、1960年頃より再び盛んとなって来ている。最近、Klaus KIESLI-CH³⁾ によると、hydrocarbone 関連の微生物の数は次のようであるとしている。

Micro organism	1942年	1970年	内 steroid 以外
Fungi (Molds)	40,000	150,000	430
Bacteria	2,000	4,000	700
Yeast	500	2,000	140

これより最近30年間で急増していることがわかる、しかし上述のように steroid 類以外としては、いまだに少ないようである。

我国における微生物利用は、戦前戦中においては、もっぱら醸造関係（酒精飲料、味噌、しょうゆ）が中心であり、其他は農産物の加工関係などであった。

したがって、微生物の転換基質は、やはり carbohydrate が主体であった。

戦後は、peniciline に喚起された、抗生物質の研究から始まったと云えよう。多くの微生物が検索され、多くの抗生物質が発見され生産され、現在では1000種類以上のものが報告されている。此の間に糖代謝の主経路とも考へられる Embden-MEYERHOF-PARNAS の経路が主として微生物酵素によって、細部まで追求され検討されて確立されるに到った。ついで我国では amino acid 発酵へと飛躍し、代謝制御の理論と共に発展して、現在では必須 amino acid の大部分が、直接または簡単な化学的方法との併用によって、発酵生産されるようになった。

同時に小玉⁴⁾により見出された呈味成分が、核酸の微生物分解を経て、遂に直接発酵法によって製造されるようになった。此等微生物の利用、特に amino acid や核酸関係においては、我国が常に世界の先頭にあることは、誠に慶賀にたえないところである。

ただし、此等に用いられる原料基質は、やはり carbohydrate であった。

この間、すなわち戦後における分析法、特に機器類の進歩も誠に著しいもので、赤外線吸収スペクトルはますます普及し、ガスクロマトグラフィー (GLC)、核磁気共鳴スペクトル (NMR) と、質量スペクトル (MS) などが実用化され、一般に普及されて来た。

一方戦後の航空機、自動車の普及などによる燃料の急速な需要は、石油精製工業の発展を促し、現在の公害の大なる遠因となつてはいるが、歴大な石油精製基地が、1955~1965年頃に各所に確立されるに到つた。この頃が善悪に関せず、我国の GNP 時代の基礎であり、我国を敗戦より立ち直らせ、戦前を上廻る発展をもたらしたものと云える。

一方戦後の人口増加は、平均2%を上廻ると云われ、我国の人口も軽く一億を突破し、世界人口約35億が西暦2000年には倍増する傾向を示して来た。したがって、これに見合う食糧の給源が問題となり検討され始めた。このような情勢のもとで、微生物食飼料が脚光をあび始めた訳である。

当然のことながら、微生物菌体の量産が、枯杭する carbohydrate 基質では意味をなさない訳である。

代替基質として、価格、量、および質 (資化性がある) などを検討して現在もっとも可能性のあるのが、hydrocarbone であり、その中で 燃料工業では、むしろ廃物である n-paraffine の利用が注目されて来た。

菌体の量産に依存しておる核酸関連工業はもちろん他の微生物関連工業も、その基質を検討、転換することが望ましい。したがって、さしずめは hydrocarbone を指向するであろう。

一時中断されていた、hydrocarbone と微生物との関係が再然し始めた本質的な理由は、このような情勢にあると推定される。

著者が terpene 類の微生物転換の研究を意図したのは1964年で、hydrocarbone の微生物転換が再び徐々ながら研究が再開され始めた時であった。ただいまだに機器分析は微生物関係には余り浸透してはいなかった。

前述したように非steroid の hydrocarbone 関係の微生物は、余り多いとは云えず、terpene 類関係は尚さらに少なく、特に系統的な研究はなく、以下に示すような報告が散発的に見出されるに過ぎなかった。

- 1 K. NEUBERG⁵⁾ (1915) : 酵母による citronellal の還元
(1918) : 酵母による citral の還元
- 2 E. MOLINARI⁶⁾ (1929) : *Acetobacter ascendans* による citronellal の酸化還元
- 3 C. NEUBERG⁷⁾ (1950) : 酵母による camphorquinone の還元
- 4 I. C. GUNSALUS et al.⁸⁾ (1959) : *Pseudomonade*, *Corynebacterium* による camphor の分解
- 5 W. SEUBERT (1960)⁹⁾ : *Pseudomonas citronella* による citronellal, farnesol の分解
- 6 S. C. BHATTACHARYYA et al.¹⁰⁾ (1944~1965) ; *Aspergillus niger* による camphen, longiforen, santaren, α . β -pinene などの分解
- 7 K. GOTO¹¹⁾ (1965~1966) : Fungi による一連の精油成分の分解を GLC にて検討

Terpenes 類とは、isoprene $\text{CH}_2=\overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{CH}_2$ (2-methyl butadien) 単位で重合した

化合物で $C_{10}H_{16}$ …monoterpene, $C_{15}H_{24}$ …sesquiterpene, $C_{20}H_{32}$ …diterpene, $C_{30}H_{48}$ …triterpene などと呼ばれる一連の化合物である。融点の比較的低い固体のもの、油状の液体をなすものなどがあり、水に不溶であるが alcohols, ether, benzen などの溶媒にとける。構造式より推定しても、変化しやすく、酸化剤で alcohol, aldehyde, ketone, acid, または分解生成物を作る。また halogens, oxygen, sulfur, などの試薬で附加化合物を作り、空気中の酸素で樹脂化する場合も多いし、硫酸添加で熱すると異性化する場合が多い。

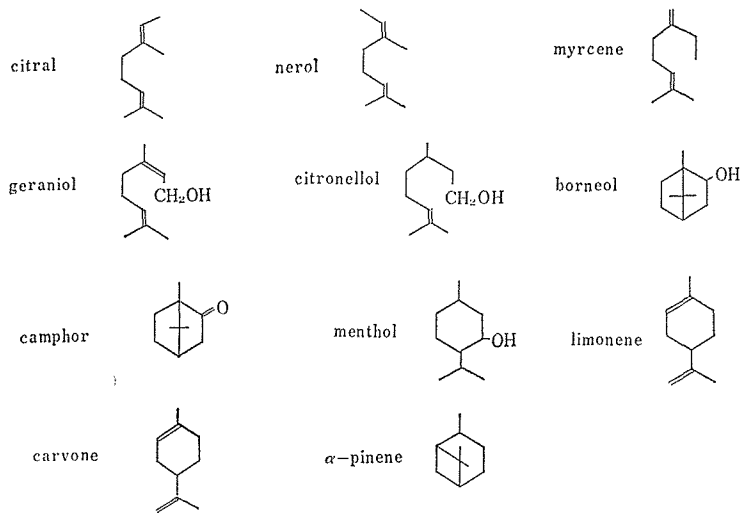
広く、微生物界、植物界、動物界に存在しており、種々の生理活性をもつものが多く、vitamins, steroids, 色素, 抗生物質などより精油類や chlorophylls なども terpene 類である。

Terpene 類の微生物転換は、当然 hydrocarbone の微生物転換に含まれて研究される可きであり、またその線に沿って為されているが、その場合の基質は大部分が、いわゆる steroid 関係である。steroid 以外の terpene は、ほとんど研究の対象になっていない。Terpene 類の中でも構造の複雑な steroid 類が取り上げられ、その研究も比較的に進んでいて、構造の比較的簡単なもの、特に mono terpene 類が大いに遅れている。

Steroid 類は、ホルモン剤として、あるいは其他の医薬用とかに多く使用されており経済的に有利であると云う簡単な理由であり、またその転換も脱水素、水酸基の附加などの比較的簡単な単位操作的作用が多いようである。一方 mono terpene 類は植物精油成分として存在するものが多いが量的には少なく、価格も比較的に高価で、特に古来抗菌抗微性をもつものとされて来た。

したがって外観的に微生物転換が困難と考えられていたことなどが、研究を遅らせた理由なのであろう。

Mono terpene 類は一般に essential oil として重要なものが多く、香気ある化合物で、種々の香料として用途が広い。Monoterpene 類の二三の例を見ると



類似構造が多く、不飽和結合による cis, trans 異性、不斉炭素による立体・光学異性などが多く、合成化学的にも興味ある化合物である。したがって微生物転換も基質特異性との関

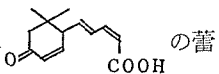
連性、立体特異性による dl 分割などの点に関して大いに興味ある研究であると云える。

Terpene 類の微生物転換としては、terpene 類の炭化水素としての、水に難溶性、変化性、また香料としての気化性などの点を考慮しなければならない。したがって、微生物転換の検討に関する作用条件、および測定法、あるいはまた転換生成物の抽出分離精製法なども時間的要因が加味される必要が生じて、簡単には実施できなかった。1955年頃より徐々に普及し、取入れられて来た機器分析が、1960年頃より微生物関係にも取入れられ、此处で始めて terpene 類の微生物転換の研究が立案され実際化されたと云えよう。

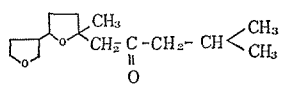
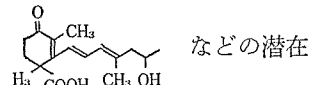
GLC, IR, NMR, MS などが微生物関係に取入れられることにより terpene 類の微生物転換の研究が軌道に乗ったと云っても過言ではなからう。

Terpene 類と微生物との関係は、古くより植物より精油を採取するさいに、もしその植物が微生物によって侵蝕されているような時には、精油の収量が増加すると云われており、Ager wood などが好例として知られている。すなわち植物中に存在する精油の precursor 的化合物を微生物の作用で精油に転換したと推定できる。

このような事例は、terpene 類と微生物との関係は、古くから存在しており、また一面 terpene 類の微生物転換の可能性をも示唆していることでもある。

Terpene 類には、上述のような潜在的な生理活性、たとへば abscisic acid の蓄


 や、棉の木の葉の規制物質、じゃが薯が傷ついたときに生成される ipomeamarone.


 $\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, caroten 化を規制する trisporic acid

 などの潜在的な生理活性物質を内蔵している場合が多い。微生物転換により、これらの活性の発現の可能性が期待できる。

現在、微生物の利用としては、量産による菌体およびその抽出物、第一次生産品（基質の分解による直接利用）第二次生産品（代謝生産物、酵素、amino acid, Vitamin etc）などが主体であるが、其の作用力などの利用面がいまだに大いに残されている。

微生物の生化学作用を検討すると、化学反応と異なった点が観察されるであろう。特に化学反応ではなかなか attack し難いような特異的部位を、微生物は巧妙に attack していることが見出されるであろう。また微生物作用では、発酵に見られるように、一連の生化学反応がうまく調整されて行なわれている。

また、この作用条件は極めて温和である。熱、酸、アルカリに影響をうけ易い化合物、terpene 類のように変化し易い化合物でも、微生物作用では安全かつ容易に転換させ得るのである。

Terpene 類の微生物転換も以上のような微生物転換の特性をもつのは当然であるが、更に潜在活性の発掘の可能性、立体特異性の利用すなわち立体特異性の選択的な発現などが期待される。

この分野の研究は日もまだ浅く、したがって新物質新活性物質の期待とともに、特殊な作用、あるいは、何らかの法則的な作用形式などの発見発掘などが期待される。

著者らは、以上のような観点から、一連の terpene 類の微生物転換の研究を行なった。

数種の acyclic, cyclic mono terpene について、各々対応する terpene の転換微生物を分

離することができた。これら転換微生物によって、新知見を含んだ興味ある転換物や作用機作などを見いだした。

限られた種類の研究であるため、将来の研究に俟つところが多いのであるが、これらの物質や作用などが、将来の研究に有用であり、またこのような研究のための多少のヒント、刺戟になり得ることを期待している。特に有機合成化学と微生物転換との関係、たとえば微生物転換物質または中間生成物などが有機合成の初発物質に用いられるとか、合成の最終反応に微生物転換を応用するなどの関係に用いられることを切に希望している。

II 研究 方 法 (微生物の検索と培養, 生成物の検討)

微生物の利用に関しては、種々の見方がある。すなわち第一次、第二次生産物の利用とか菌体そのものの利用とか、或いは微生物作用を利用するなどである。

いづれにしても、結局は微生物の生存生育のための代謝の利用であると云える。すなわち微生物のもつ、あるいは誘導された酵素の利用と云える。

Hydrocarbone 資化性微生物は、本来は carbohydrate を代謝して生育繁殖する微生物なのであるが、hydrocarbone を基質 carbohydrate の代替に添加されて、その資化性を誘導されたもので、すなわち誘導酵素 (induced enzyme) を生成したものである。

また、代謝とは生体内における酸化を主体としたものであり、この酸化も1956年頃に酸化酵素 (oxygenase) が見出されるまでは、加水して脱水素される現象のみで、すなわち dehydrogenase 脱水素酵素による脱水素とみなされていて、これらの酵素を oxidase としていた。早石ら¹²⁾は1955~1956年に分子状酸素が直接に有機化合物に添加されることを見出して、これを接触する酵素を酸化酵素 oxygenase とした。この種の酵素は植物並びに好氣的微生物に普遍的に存在しているようであり、特に微生物としては *Pseudomonas*, *Mycobacteria* などに存在しているようである。Oxygenase の作用機作も metapyrocatecase が最初の結晶酸化酵素として取出されて以来、相当明白になって来た。

Carbohydrate のような親水性のものは、通常上述したように、加水されて脱水素されることにより酸素添加の形となるが、hydrocarbone である terpene 類のような疎水性の、分子内に O₂ (酸素) の無いものや少ないものは、生体内で生理活性をもつために、OH, CHO, COOH などの活性基が導入されて、親水性となり、たんぱくや核酸などと反応し易くなる必要がある。この点 hydrocarbone 代謝系を検討すると、いづれも、その代謝経路の早い時機に、上述の oxygenase 系が存在していることが判る。

以上、oxygenase の概念と induced enzyme すなわち適応性を考慮して、好氣性細菌で適応性に富んでいるとされている *Pseudomonas* を目的として微生物の検索を行なった。したがって、基礎培地として次のような組成を選んだ。

Basic Medium

NH ₄ NO ₃	1.0g	Na ₂ HPO ₄ —12H ₂ O	9.55g
MgSO ₄ —7H ₂ O	0.2g	KH ₂ PO ₄	0.90g
CaCl ₂ —2H ₂ O	0.1g	H ₂ O	1000ml
FeSO ₄ —7H ₂ O	0.1g		
		pH	7.2—7.4

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.6mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.6mg

上記基礎培地に terpene を唯一の炭素源、エネルギー源として加え、菌源として土壌を用い、集積培養法を行なって、微生物の分離を行なった。転換生成物の検討のための培養も同様な基礎培地を用いた。

菌源の土壌は、香り良き草木の根元、石油に汚染された土地などより採取した。時には、土壌を対象 terpene を散布して放置後香りの変化したものを採取した。

検索には、土壌の少量を直接添加、或いはりん酸緩衝液 (pH=7.0) に投入後、その上澄液を添加し、常法によって検索分離した。

培養容器は 500~2000ml 坂口コルベン、多量培養は 20l jar fermentor を用い、検索用には 30ml 棉栓試験管の上部を 45° 曲げて用いた。

好気性細菌の検索であり、基質が hydrocarbone であることより、酸素導入には特に注意を払った。通常の場合 carbohydrate : hydrocarbone = 1 : 5 の酸素を必要とするので、常に振とう培養機 (10cm 振巾, 120回/分, 往復) を用いて培養した。また酸素導入と生成 CO_2 排除は、振とう回数と培地の表面積に影響されるので、培地は容器の $\frac{1}{5} \sim \frac{1}{10}$ として、表面積を広くし、jar fermentor 使用時は滅菌空気を、少なくとも培地と同量以上を吹込んだ。

Hydrocarbone の発熱量は大で carbohydrate の約 3 倍と云われるが、振とうであり、空気の相当量の吹込みのためか、特別の注意は不要であった。

場合によっては、極端に泡立ちを生じる場合もあったが消泡剤 (市販 Silicon 油, Antifo-
rm, 時に植物油) を用いたが、でき得るかぎり用いないように、培地量、空気吹込量などを考慮して培養した。

培養温度は、分離細菌によるが、一般に 27~30°C を用い、terpene の変化性・気化性などを検討しつつ行なった。

基質となる terpene は油状・固体の難溶性物質であり、微生物に吸収され難い、したがって、溶媒として ethanol, acetone, dimethyl formamide, dimethyl sulfoxide, hexane などを検討したが、転換生成物の分離精製過程、あるいは生成物の二次的变化などの複雑性を増加した。むしろ繊維素粉末、酸化アルミ粉末、Celite などの分散剤を用いて、単に物理的吸着を行ない、これを振とうすることによる微生物との接触回数の増加を意図する法などが、結果的には良好であった。馴養を継続することにより、溶媒、分散剤は不必要となり、camphor, menthone, menthol などの場合には糖脂質、糖たん白と推定できる界面活性剂的な作用物質が生成された。尚本物質は検討中である。

基質 terpene 濃度は、一般 hydrocarbone と同一で培地の 0.1~1% W/V または V/V を用いた。citronellal, geraniol では 2% 以上でも良好な転換を行なったが、menthone の場合のように 0.1% でも不可の場合もあり、0.1% は規準である。0.1% でも抗菌抗霉作用を起す場合は、より少く 0.01% 程度を時間を経て、数回に分けて添加し、所期の濃度にする、いわゆる Feed method で好結果を得た。

なお前述の溶媒を止むを得ず用いるとすれば、基質を溶媒の最小量に溶解して、最終溶媒量を極力小とした。実際に、固体は細粉、油状はそのままを用いて、量を小として用いた場合が好結果をもたらした。

培養時間は、微生物中に転換酵素が存在しておれば、酵素作用としては、例えば細菌の酸化、脱水素、脱水などの反応は極めて速やかである。したがって菌の増殖と酵素生成とが並行して行なわれていると推定して、細菌は24時間、酵母は24~48時間、黴で72時間程度を目途とした。

実際の培養上、管理可能な条件は、菌の作用力、作用量、培地組成、pH、温度、基質濃度、培養温度、酸素量などであるから、転換生成物の性質を検討して、培養時間の設定を行なうべきである。いたずらに長時間を要することは結果的に種々の疑問が生じ易くなる。

生成物質が明瞭に同定されるまでは、他の補助的な項目はなるべく簡単に、時間を最短限度に行なう程結果的には良好であった。

なおまた、微生物関連の作用であるから、培養中および生成物の単離までは、雑菌による汚染は極力防止したのは当然である。汚染による失敗は、時には生成物の分解などを起した場合もあった。

休止細胞を用いた場合も、菌を分離後、食塩水またはりん酸緩衝液での洗滌は、汚染防止と同時に結果に好結果をもたらした場合が多かった。

転換生成物の大部分は、細胞外の培地中に、溶けるかまたは分散した形で存在していた。したがって生成物質を得るために細胞を破碎して抽出する必要はなかった。ただし培地と細胞を分離した場合、特に基質濃度が高いような場合、或いは粘稠な場合には蒸留水、緩衝液(pH7.0)、時には溶媒で洗滌した。

培養中の経時変化の測定は、転換を充分に行わせるために有効であった。特に所期物質(それが代謝中間物質である場合はより効果的)の最高蓄積時を知ることができ、阻害剤の添加などにより所期物質の最大量を得られ、かつまた代謝経路の推定、作用機構の推定など利する処が大であった。

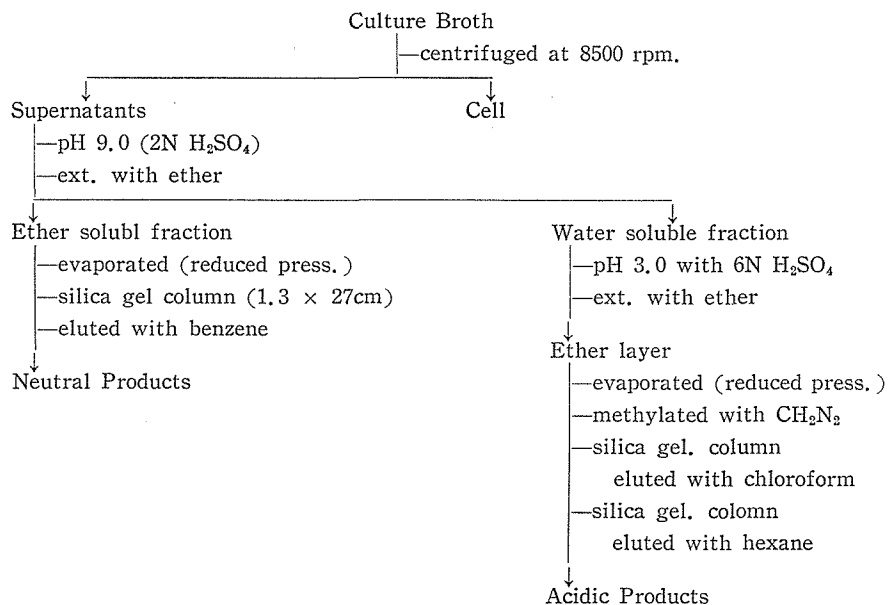


Fig. 1 Extraction and Isolation Procedure of Metabolic Products

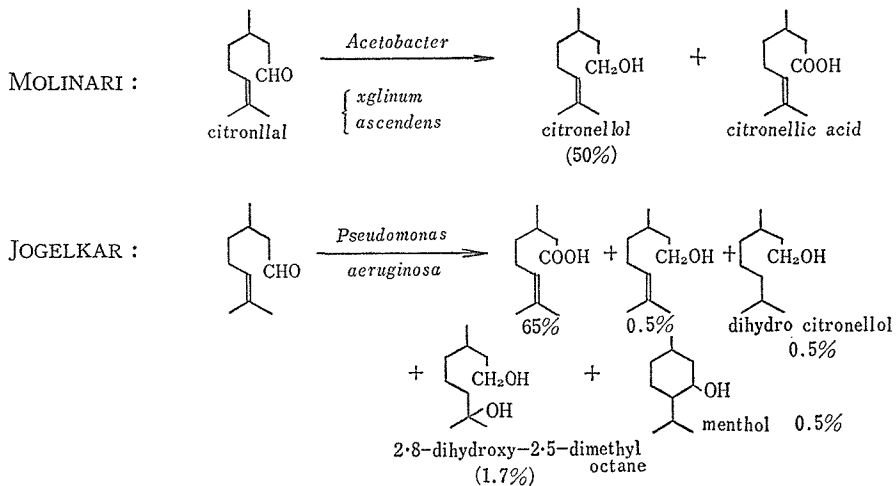
転換生成物の抽出分離法は、もちろん生成物により各々特徴があるのは当然であるが、概略を示すと、Fig. 1 のようである。転換生成物によって適当な修飾を行なうのはもちろんのことである。たとえば、溶媒を検討しても、親水性の強い物質であれば butanol, acetone を用い、比較的弱いものに対しては methyl acetate, methyl isobutyl ketone などを用いるなどである。気発性の物質は比較的安定な物質が多く、直接蒸留法を用いて、水蒸気蒸留して分離できたものもあった。水によく溶解する酸性物質は Ca^{2+} を加え、Ca 塩として分離できるし、培養液中に CaCO_3 を加えて、培地 pH の維持と共に Ca 塩の沈澱物を得る利点もある。

III 各 論

§ A Acyclic terpenes.

1-1 Citronellal の微生物転換

テルペン類の微生物による転換の最初の研究は、MAYER & NEUBERG¹³⁾が citronellal を酵母で citronellol に還元していることである。MOLINARI¹⁴⁾がこれを詳細に研究して、*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter ascendens* が嫌氣的条件で citronellol と citronellic acid に酸化還元されるとしている。最近高砂香料¹⁵⁾が racemic の citronellal に *Candida reukaufii* 又は特殊な酵母を作用させて *l*-体のみを還元するとしている。SEUBERT¹⁶⁾は *Pseudomonas citronellis* の無細胞抽出液で、WARBURG 検圧計による酸素吸収を認めて、検討している。著者らの研究とほぼ同時に JOGELKAR, DHAVALIKAR¹⁷⁾らは主産物として citronellic acid 其他の副産物と、閉環したもの、menthol を生成するとした。



この menthol への閉環は興味がある。BABICKA らは、この cyclization¹⁸⁾作用を menthol 合成に用いた。

著者らは、テルペン類の微生物転換の第一歩として、入手し易いことから、citronellal, citral, menthol より、研究を開始した¹⁹⁾。

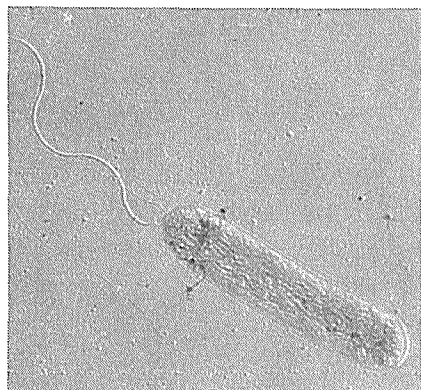


Fig. 2

市販 citronella oil は d-citronellal 35%, geraniol 32%, その他 geranylester, borneol, pinene などを含む。当初は含有テルペン中資化され得るテルペンについて検討を行なうことを予定したので、citronella oil はそのままの形で用い、精製しなかった。

菌源としては前記のように、各地より採取した土壌を用いて集積培養を繰り返して、citronellal 転換菌 1 株を得て、これを CDB₂-3b 菌とした。

Fig. 2 は CDB₂-3b の 6,000 倍電子顕微鏡写真で Table. II はその性質と type culture の性質

Table I. Descriptive Chart of the Isolated Microorganism

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IFO. 3445)	CDB ₂ -3b
Morphological characteristics	Rods, 0.5 to 0.3 by 1.5 to 2.0 Occuring singly and in pairs, short chain. Motile, with 1 polar flagellum. Gram negative.	Rods, 0.7 to 0.9 by 1.5 Occuring singly and in pairs. Motile, with 1 polar flagellum. Gram negative.
Gelatin colonies	Glistening white after greenish, Capitata, translucent edge rapidly liquefying.	Glistening white after greenish, Raised circular, undulate rapidly liquefying.
Gelatin stab	Rapid liquefaction, stratiform (Crateriform).	Rapid liquefaction, stratiform (Crateriform).
Agar colonies	Large, spreading, grayish with dark center and translucent, edge irregular. Medium greenish.	Large, spreading, translucent, edge irregular, dark center. Medium greenish.
Agar slant	Abundant, thin, white glistening, the medium turning green to dark brown.	Abundant, thin, white glistening, the medium turning green to dark brown.
Broth	Marked turbidity with thick pellicle and heavy sediment. Medium green to blue, fluorescent.	Turbidity, heavy sediment. Medium green to dark green. fluorescent.
Litmus milk	Not coagulate. Alkaline.	Not coagulate. Alkaline.
Patato	Luxuriant, darty blawn.	Green to dark green.
Indole	Not produced.	Not produced.
Carbohydrate	Glucose, mannitol, fructose, galactose, arabinose, maltose, lactose, sucrose, dextrin, innulin, glycerol and dulcitol are not fermented.	Glucose, mannitol, fructose, galactose, arabinose, maltose, lactose, sucrose, dextrin, innulin, glycerol and dulcitol are not fermented.
Nitrates	Reduced to nitrites.	Reduced to nitrites.
Free oxygen	Aerobic.	Aerobic.
Temperature	Opt. 37°C, good growth 42°C.	Good growth at 25°C to 42°C.
Source	Urine.	Soil.

の比較である。

CDB₂-3b 菌を citronella oil で培養すると、含有テルペンの内で主として citronellal を資化することを知り、以後の培養は citronellal を用いた。

1-2 生産物の分離固定

CDB₂-3b 菌を15cm×1.5cmの試験管に約8mlの肉汁寒天培地で、24時間、30°Cで振とう培養すると、乾燥菌体として15mgを得た。以後培養は培地100mlに対して15mgを用いた。培養終了後は第1図の方法で生産物を分離した。ただし citronellal の場合は酸性物質が60%程度存在しているので抽出法を多少修飾した。すなわち、菌体を除いた上澄液を中和して、直ちに水蒸気蒸留を行なって中性部を蒸留し、残液を酸性にしてエーテル抽出して酸性部を得た。

Fig. 4はその抽出法、Fig. 3は生産物の GLC である。

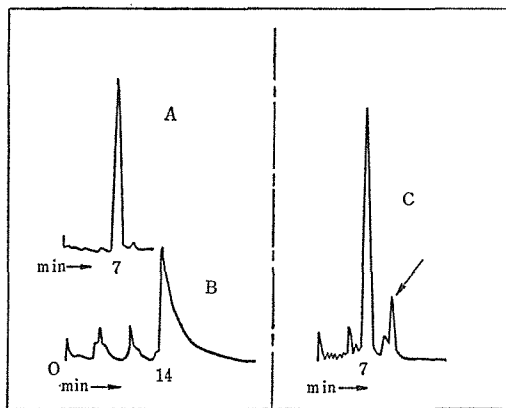


Fig. 3 Gas-Liquid Chromatogram of Product Ia (B), Controle (C) and Citronellal (A). Column: Apiezon L 2m×5mm, He 40 ml per min. temp. 180°C, sample 1 μ l.

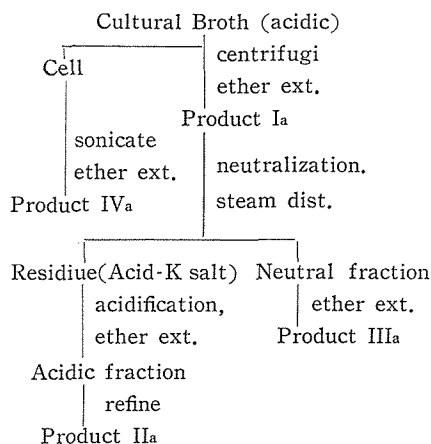


Fig. 4 Fractionation of the Products from Citronella Oil and Citronellal by the Sstrain CDB₂-3b

1-2-1 酸性物質 (Product II_a)

Fig. 4 のようにして得られた酸性物質は (Product II_a) 酸価282.1 (citronellal 0.83), BCG で酸性色を示す。Product II_a は酸価319.8, 平均分子量170で、炭素数10程度のカルボン酸と推定された。

一方 citronellal を酸化銀酸化して、citronellic acid を調製して転換生成物 Product II_a と比較した。

Fig 5, Fig 6 は Product II_a の GLC, TLC である。

Product II_a と合成 citronellic acid の p-phenylphenacyl ester の IR, および元素分析・融点が Fig. 7, Table II である。

Fig. 5, Fig. 6 によっても、citronellic acid に酷似している。元素分析, 融点も近い数値を示している。混融も37.0~37.5で、融点降下を示さなかった。また Fig. 7 の IR スペクト

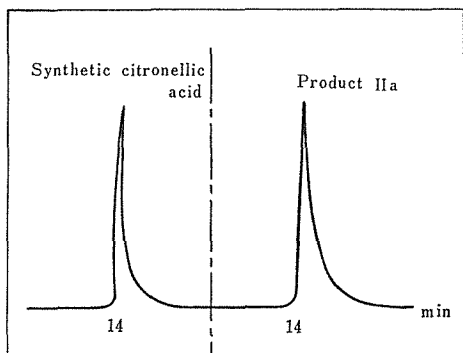


Fig. 5 Gas-liquid Chromatogram of Product IIa condition : same as Fig. 3

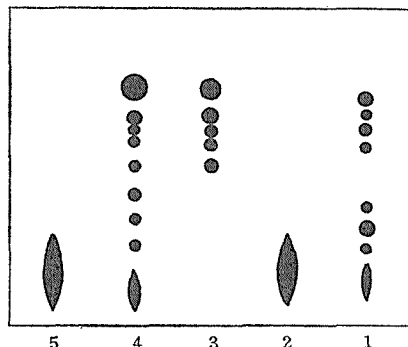


Fig. 6 Thin-Layer Chromatogram of Product Ia, IIa.

- 1. product Ia
- 2. product IIa
- 3. citronellal
- 4. control
- 5. citronellic acid

Solvent, Hexan : Et-acetate=4 : 1

Detect, vanilin 1% soln., 7% H₂SO₄.

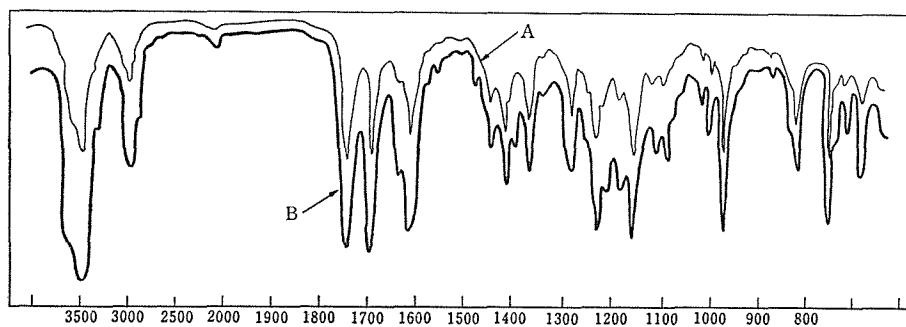


Fig. 7 Infrared Absorption Spectra of the product IIa.

A : authentic citronellic acid B : product IIa

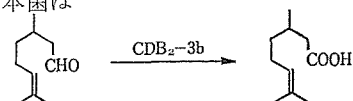
Table II Analysis and Melting Point of *p*-Phenylphenacyl Esters of Product IIa and Citronellic Acid

Subject	Theoretical value	Citronellic acid	Product IIa
Anal. foun			
C	79.09	78.85	78.56
H	7.74	7.58	7.55
O	13.19	13.57	13.89
m. p. (°C)		37.5	37.0~37.5

ルは3700~3500-cm 附近のカルボキシル

、840-cmの $\begin{matrix} R_1 & & R_3 \\ & \backslash & / \\ & C=C & \\ & / & \backslash \\ R_2 & & H \end{matrix}$ のメチレン

ン基の吸収が残っているなど、合成 citronellic acid と一致している。したがって本菌は



上の作用を行なうことがわかった。ま

た此の変化の収率は、市販 citronellal 1ml=0.8571g であり、60°Cで2時間乾燥したものを計量して、次のようであった。

Product Ia 0.5563 g 67%

Product II _a	0.4940 g	59.5%
Product III _a	0.0581	6.99%
Cont	0.8302	100%

1-2-2 中性物質²⁰⁾

水蒸気蒸留で得られた中性部は、更に精製すると、Fig. 8に見るように数種のものが含まれているが、このうちの生成量の多いものを逐次A, B, C, Dとした。

シリカゲルカラムを用いて Hexane : Ether=9 : 1 で分画すると、A・Bは単離できたがCDは単離不可能であった。GLCにおいて、充填剤を変えて検討したが、ABは何れも分離したがCDは分離不可能であった。Table III に各Rtを示す。

物質Aは油状物質で香気あり linalool よりやゝ強い。Fig. 9がそのIRスペクトルである。

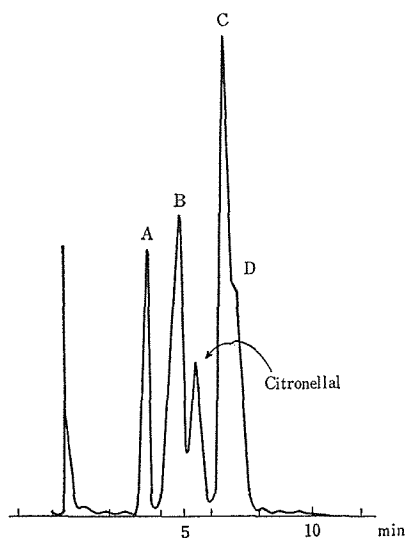


Fig. 8 Gas Liquid Chromatogram of Product III. Condition : He, 60ml/min, Temp. 180°C, PEG-6000, 2m.

Table III Retention Time of Neutral Compounds

Compound	Apiezon-L	P. E. G. 6000	P. E. G. Succinate
Peak A	5.7	4.6	6.2
Peak B	6.6	6.8	8.4
Linalool	6.6	6.8	8.4
Peak C	9.9	9.0	9.2
Isopulegol	9.9	9.0	9.2
Peak D	10.7	9.0	9.2
Neoisopulegol	10.7	9.0	9.2

Condition : He, 40ml/min, 180°C.

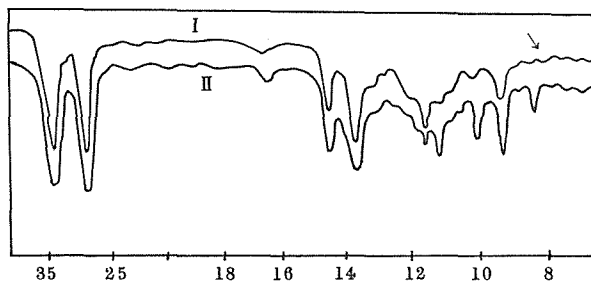
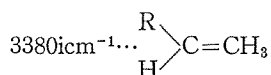
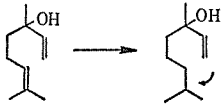
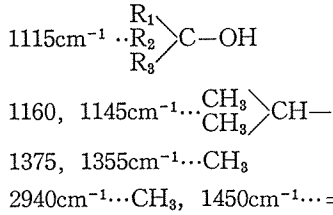


Fig. 9 Infrared Absorption Spectra of Peak A.
I, Peak A ; II, Authentic linalool.





などの各基が推定され、linalool とほとんど同様であるが、linalool のもつ 840cm^{-1} の isopropyl 基の不飽和結合を示す吸収が存在しない。したがって物質 A は linalool に水素が導入されたもの、linalool が dihydrolinalool になっているものと推定した。

物質 B は、その香気と GLC の保持時間および IR 吸収など完全に linalool と一致した。

物質 C と D は分離が困難であった。GLC の保持時間も Table III のように出現してくる。Apiezone L では根部が混在している。PEG6000 と PEG Succinate では共に 1 ピークを示している。異性体の存在が推定できる。

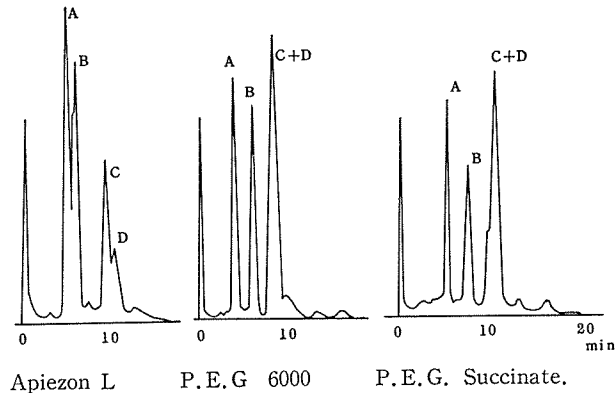


Fig. 10 Gas Liquid Chromatogram of the Neutral Fraction.
Condition: 180°C , He 60ml, column 5mm \times 2m.

さらに本混合物質の IR スペクトルを検討すると Fig. 11 に示すような各基が推定された。

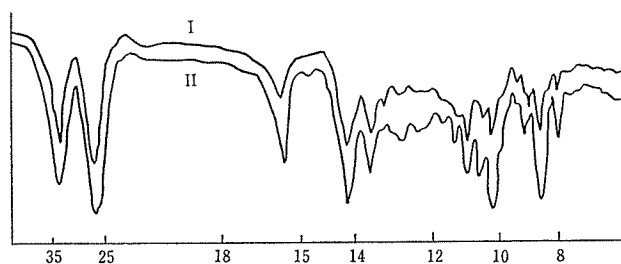
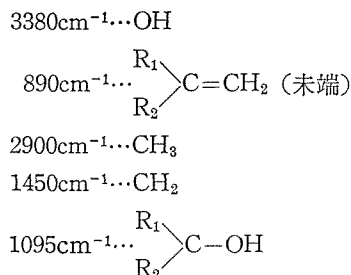
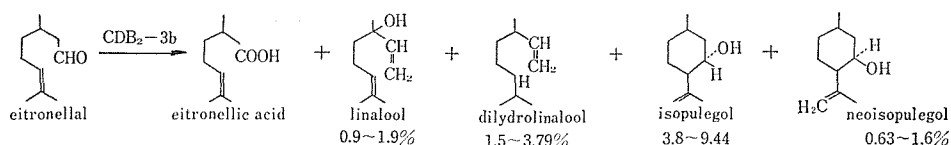


Fig. 11 Infrared Absorption Spectra of Peak C+D.
I, Peak C+D; II, Authentic isopulegol+Neoisopulegol.



以上の事より GLC が同様でこれらの官能基をもったものを検討して, Isopulegol, Neoisopulegol が該当することを見いだした。CとDの収率を考慮して GLC の面積比より, isopulegol : neoisopulegol=3 : 1 の混合物を調製した。その IR スペクトルが Fig. 11 の II である。product II と CD 混合物との IR スペクトルとはよく一致している。

以上のことより C は isopulegol, D を neoisopulegol と推定した。したがって CDB₂-3b 菌は citronellal を転換して主転換生産物として citronellic acid を, 副生産物として, dihydrolinolool, linolool, isopulegol, Neoisopulegol を生成することを確認した。



1-2-3 中性物質の成因

細菌による Hydrocarbone の転換は, 特殊な条件は別として, 主として酸化反応である。上述のような還元や閉環が起きるとすれば, はなはだ興味あることなのでその成因について二三の検討を行なった。

Citronellal 自体, ethylen 結合と aldehyde 基をもち, 変化するやすい物質で, 太陽光によって, acetone, β -methylhexoic acid, dihydroxy-citronellic acid あるいは isopulegol, menthone²⁰⁾などを生成し, 紫外線で閉環²¹⁾すると云われている。弱酸で isopulegol, menthoglycol, p-menthane-3, 8diol²²⁾を生成し, ギ酸やリン酸²³⁾で isopulegol ならびにその誘導体を生成するとの報文もある。貯蔵中にも少量ながら自然変化して中性物質が生成された。また本菌による発酵試験中にも, 無菌対照区に少量の中性物質の生成をみた。CDB₂-3b 菌によ

Table IV Yields of the Neutral Fraction at Different Condition
(% to Substrate by weight)

Condition	H ₂ SO ₄ 1ml/100ml,	citronellic acid 0.5ml,	Cont.
Neutral fraction	35%	25%	8%
Condition	Normal,	Chloramphenicol 4mg,	CaCO ₃ 1 g
*	7-17%	51%	18.4

* Lowest & highest value of normal fermentation.

る citronellal 転換の際の副生される中性物質が、微生物作用か化学作用によるものかを検討するために、下記の条件で発酵試験を行なった。

種々の物質を基質 100ml に対して添加後発酵を行ない中性物質の収量を求めたのが Table IV である。

Table IV に関連して、citronellic acid を 1% とした場合は、中性物質を作らず盛んに発酵して菌体を増加した citronellic acid は β 酸化を採り、逐次炭素数の少ないカルボン酸となることが GLC 測定により判った。

citronellol 1%v/v 添加時は citronellol \rightarrow citronellal \rightarrow citronellic acid への代謝経路をたどるが、中性物質は生成されなかった。石油系の Hydrocarbome の場合と同様に、アルコールによる保護作用²⁴⁾と推定した。

中性物質のみでは、0.1~1% 添加でも、全く資化されず、7日培養で菌は死滅し、添加物質は変化なく回収された。

以上の結果より、中性物質は細菌の minor action とするよりも、二次的な化学的酸化と推定するのがより妥当であると推定した。

1-3 Citronellic acid の生成条件

Citronellal 添加培地で CDB₂-3b を培養し、培地 10ml を 0.1N-カセイカリ液で酸度を測定して推定した。

- i) 始発 pH 7.0
- ii) 基質濃度、培養時間と相関するが 17~24hr で、1~1.5% (5%でも可能だが4~5日を要する)
- iii) 有機栄養源(必ずしも必要ではない)有機物として pepton 0.1%
- iy) 有機溶媒(基質の溶媒) Acetone 最終濃度 1%以下 (Feed method の場合にも適応する)
- v) 分散剤・乳化剤; celite 4mg/100ml

などが最適条件と推定された。ただし長期間の馴養によって、栄養源のペプトン添加、溶媒の使用、分散剤の添加などは不必要となった。

経時変化を見ると、最適条件下では、生酸は接種後15時間で最大となり中性物質は24時間で最高量を示し以後は変化しなかった。

1-4 酵素作用

1-4-1 酵素の分離精製

CDB₂-3b 菌を 1% citronellal 含有基礎培地で24時間振とう培養を行ない、次の方法で無細胞抽出液を得た。(Fig. 12)

Fig. 12 に示すように上清液と沈澱物のりん酸緩衝液懸濁液を用いて、citronellal の酸化を行なったところ、上清液のみに活性が存在した。

上清に硫酸を加え、各画分を $1/15$ リン酸緩衝液に加えて懸濁して活性を測定した。反応液組成は次の通りである。

各酵素液 2 ml

citronellal 9 μ l
 3 mM NAD 0.3ml
 $1/15$ M phosphate buffer (pH 7.5) Total 9 ml

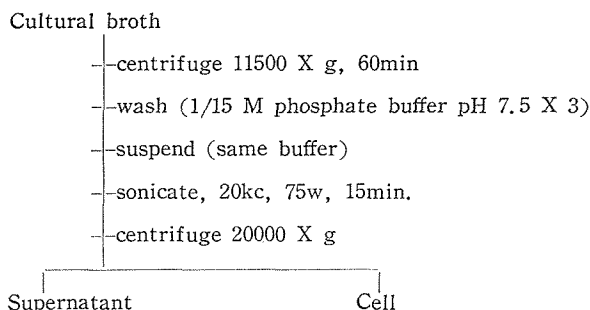


Fig. 12 Extractprocedure of the enzyme

反応は 30°C, 60分間振とうした。Ether を過剰に加えて反応を止め, ether 抽出して, GLC を測定し, 直接面積法で転換率をもとめた。

Table V Ammonium Sulfate Fractionation

Fraction	Protein	Activity	Specific Activity	Yield %
Crude Extract	30 mg/ml	45.1	0.75	100
0— 20 satu.	27	5.2	0.097	
20— 30 satu.	15	70.8	2.36	48
30— 40 satu.	16	42.3	1.31	23
40—100 satu.	31	5.8	0.094	

上表より, 以後は硫酸20~30%飽和画分を用いた。

Citronellal, citronellic acid の GLC 測定の標準曲線を求めた。すなわち citronellal, citronellic acid を各濃度調製し, 10 μ l の GLC を作り, グラフ紙を切抜いて秤量した。その量的関係は, citronellal の場合は直線であるが, citronellic acid の場合は2~8%濃度において直線を示した。

生成物質は酸であるから, citronellal を中性物質に転換しやすいので, 抽出時の pH を検討し, pH 5.0~6.0 が影響が少ないので以後抽出 pH は5.0~6.0とした。

蛋白定量は Warburg, christian²⁵⁾法で定量した。

1-4-2 酵素の性質

Thunberg Test²⁶⁾により methylen blue の脱色することより citronellal dehydrogenase の存在を推定した。これに要した時間は, しかしながら, 無細胞抽出液で8~9分, 20~30%硫酸飽和画分において22分を要した。この理由は dehydrogenase に対応する, 例えば diaphorase のような, 他の酵素の存在が必要であることを示すものと推定した。又 Thunberg 法は, 酵素測定に適当でないことを知った。比色測定は困難である。

助酵素の検討。

次いで無細胞抽出液の滯留水で4°C以下で透析を行ない, 助酵素の添加試験を行なった。

Table VI Effect of Co-Enzyme

Enzyme	Protein mg/ml	Activity %
1) Crude Extract	30	12.1
2) Dialysed for 10hr.	25	4.5
3) Dialysed for 24hr.	23	2.0
4) Dialysed for 34hr.	23	1.5
5) Dialysed for 34hr. + NAD*	23	9.3
6) Dialysed for 34hr. + NADP**	23	1.8

反応液組成 Citronellal 9 μ l
 enzyme solution 2 ml
 $1/15$ M phosphate buffer (pH 7.5) ... Total 9 ml.
 *0.3mM NAD 0.3ml **0.3mM NADP 0.3ml

透析34時間でほとんど酵素活性を消失し、NAD を加えると活性が回復することが認められた。(なお NADP では効果がない。) したがって本反応機構は



以上本酵素は NAD を助酵素とした脱水素酵素と推定できた。しかし NADH の 340m μ における吸光度の測定による活性度の測定は、反応が行われても増加は認められなかった。酵素液中になお $\text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2$ の作用を行なう還元型 NAD 酸化酵素が含まれていると推定される。そこで Citronellal dehydrogenase 活性と還元型 NAD 酸化酵素活性との反応速度を比較した。

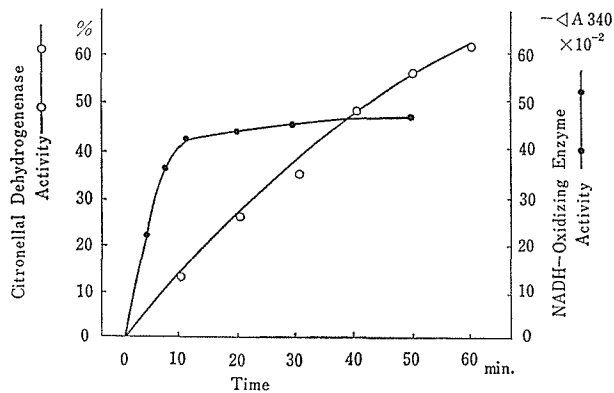


Fig. 13 Comparison of Reaction Rate of Citronellal Dehydrogenase and NADH—Oxidizing Enzyme

還元型 NAD 酸化酵素の方がすみやかに最大点に達している。したがって、この程度の精

製では、NADH の示す吸光度測定では dehydrogenase 活性測定は不可能である。

作用条件

硫安 20~30%飽和画分を用いて、GLC 切り抜き直接法で、最適 pH, 最適温度, 最適基質濃度, SH 化合物および金属の影響を検討した。

- 1 pH 7.6~7.8
- 2 温度 30°C
- 3 基質濃度 0.1%
- 4 培養時間 最大活性 20~24時間
- 5 SH 化合物, 特殊効果なし, cystein, mercaptoethanol, glnthathine などが僅かに賦活。
- 6 金属 Ca^{2+} , Fe^{2+} などが僅かに効果あり。

1-4-3 Citronellal dehydrogenase 部分精製

最適条件で部分精製して Table VII のごとく, 約30倍に精製できた。

Table VII Citronellal Dehydrogenase

Enzyme	Protein Total	Protein Activity Total			Specific Activity
	mg/ml	mg.	units/ml	Activity	
Crude Ext.	30.4	1216	18.1	724	0.595
$(NH_4)_2 SO_4$ 25-35% satu.	16.3	326	27.8	555	1.71
Ca-phosphate	3.3	33	19.9	200	6.05
sephadex-G 75*	1.4	14	25.3	254	18.15

Reaction mixture ; Citronellal 9 μ l, 0.3mM NAD 0.3ml, Enzyme 2ml,

Total 9 ml 1/15M phosphate buffer (pH 7.5) 10^{-4} M cystein, 10^{-4} M Fe^{2+} contained

Condition ; Temp. 30°C, 60min. 120 rpm/min shaken

* Enzyme 1ml

1-4-4 基質特異性

CDB₂-3b 菌の dehydrogenase を類似 terpene について検討し, Table VIII の結果を得た。

Table VIII Substrate Specificity of the Citronellal Dehydrogenase

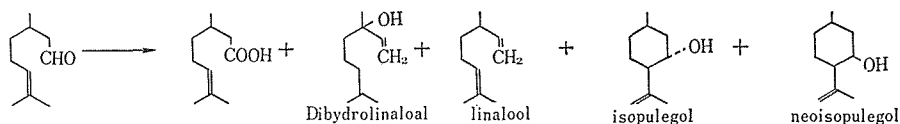
Substrate	Product	Crude Extract		20-40 $(NH_4)_2 SO_4$ Fraction	
		activity	S. A.	Activity	S. A.
Citronellal	Citronellic acid	52.3%	0.62	65.4 %	1.72
Citral-a	Geranic acid (trans)	18.5	0.22	4.19	0.12
Citral-b	Geranic acid (cis)	8.1	0.096	2.70	0.071
Citronellol	Citronellic acid	42.6	0.50	12.2	0.32
Geraniol	Geranic acid (trans)	28.4	0.54	6.85	0.18
Nerol	Geranic acid (cis)	16.0	0.19	1.22	0.033

Crude extract では巾広い特異性が見られたが、アリル位に不飽和結合をもった citral-a, citral-b, geraniol, nerol が、もたないものよりも酸化をうけ難い。特に cis 型異性体には活性が低い。精製すると citronellal のみ比活性が増大する。特に cis 型に対して活性が低くなった。

1-5 要 約

i) 土壌より citronellal を citronellic acid に転換する 1 菌株 *Pseudomonas aeruginosa* strain CDB₂-3b を得た。

ii) 本菌は citronellic acid を citronellic acid にすると同時に中性物質 linalool, isopulegol, neo-isopulegol などを培地内に生成したので、併せて此等の成因を検討した。



これら中性物質は微生物による転換と推定するよりも化学的、二次的に転換されると推定した方がより妥当であるとした。

iii) Citronellal は本菌により17時間前後で60%の転換を示すが、爾後逐次適応された酵素により β -oxidation の形で、炭素2個づきの割合で、代謝される、7~8日間で完全消費される。

iv) 本菌のもつ酸化酵素は、NAD 関与の脱水素酵素であり、pH 7.8, 30°C, 基質濃度 0.1%を越えると阻害、SH 化合物としてメルカプトエタノール、還元型ダルタチオンにより僅かに賦活、 Ca^{2+} , Fe^{2+} も僅かに賦活されるなどの作用条件をもっていた。

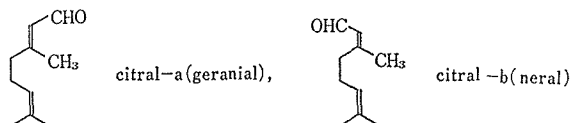
v) 約30倍に部分精製された。

vi) 測定はガスクロマトグラムの切抜き法で連換率を求めて活性度の単位とした。

vii) 基質特異性はアリル位に不飽和結合をもつものに対し 特異的で、cis 型に対して活性が低く、幾何特異性を示した。

2-1 Citral の微生物転換

Citral は Lemongrass oil などに存在している。レモンに似た甘い芳香ある物質である。その構造式は

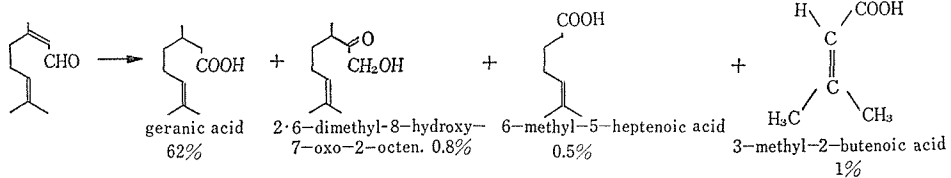


市販 Lemongrass oil 中には70~80%含有されている。末端不飽和結合の位置による異性体と、CHO 基の α 位の不飽和結合による cis, trans 異性体があるので、4個の異性体がある。

水に難溶性であり、かつ空气中に放置するとすこぶる粘稠となり取扱い困難となり、時に

溶媒を用いた。

1) 本物質の微生物転換として、最近、JOGLEKAR, DHAULIKAR が²⁷⁾ *Pseudomonas aeruginosa* を用いて、



が生成されたと報告している。

古典的になるが、前掲の NEUBERG の酵母による還元が報告されている。

2) JOGLEKAR より前に著者ら²⁷⁾は同様に citral の微生物転換を検討して以下の結果を得た。

細菌の検索分離同定および培養法、転換生成物の抽出単離同定はほとんど citronellal の場合と同様である。

したがって、その要点のみを述べる。

i) 分離菌 *Pseudomonas convexa* strain Le-X.

ii) 転換生成物、基質 0.5% v/v, 30°C で振とう培養して酸価320の転換生成物を89%の収率で得られた。これを citral (a : b = 67 : 33) を酸化して得た geranic acid と比較した。GLC, TLC 共に一致した。また両者の p-phenylphenacyl ester を合成して、融点、元素分析値、赤外線吸収スペクトルを比較した。

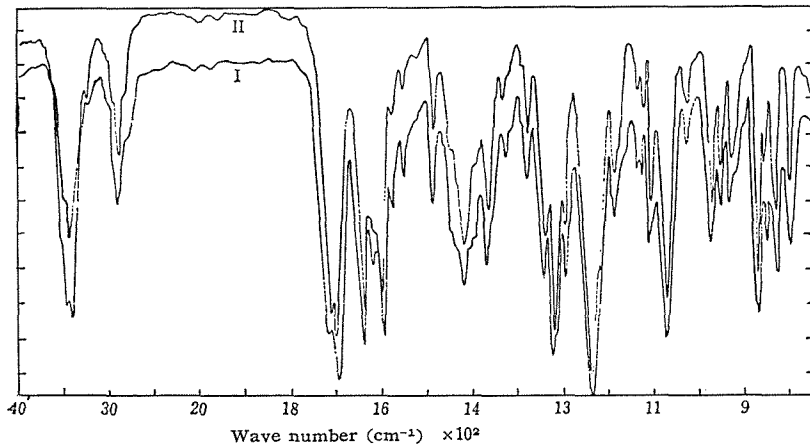


Fig. 14 Infrared Absorption Spectra of *p*-Phenylphenacyl Ester.

I: *p*-Phenylphenacyl ester of bacterial acid.

II: Authentic *p*-phenylphenacyl geranate.

いずれも調製 geranic acid とよく一致している。

Le-X は citral を転換して、geranic acid にする。

Table IX Chemical Properties of *p*-Phenylphenacyl Ester of Acid Isolated from the Broth of the Strain Le-X

	I	II	I, II mixture
m. p. (°C)	77.5 ~ 79.0	78.5 ~ 79.0	78.0 ~ 79.0
Anal.	C : 80.06	C : 79.81	theoretical C : 79.53
Found.	H : 7.43	H : 7.64	H : 7.23

I : *p*-Phenylphenacyl ester of bacterial acid.II : Authentic *p*-phenylphenacyl geraniate.

iii) Citral は、前述したように *cis*, *trans* 型がある。Le-X はこれに対してどのように作用するかを検討した。

geraniol, nerol を活性二酸化マンガンで酸化して、各対応する citral-a, citral-b を得て、Le-X を作用させた。転換生成物の GLC は Fig. 15 である。

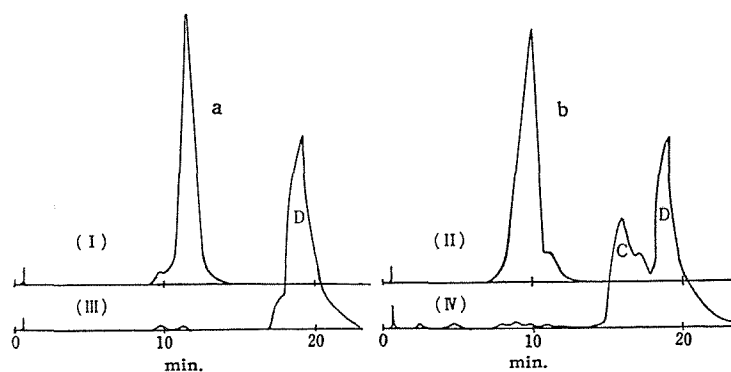


Fig. 15 Gas-Liquid Chromatograms of Citral-a (I), Citral-b (II), and the Acids Converted from Citral-a and Citral-b by the Strain Le-X (III, IV).

Stationary phase : Apiezon L 2m

Temperature : 180°C

Carrier gas : He

Flow rate : 40ml/min

Apparatus : YANAGIMOTO G.C.G.-2

Fig. 15 より、Le-X は citral-a を転換して、ほとんど単一の geranic acid を生成するようであるが、citral-b よりは geranic acid-a(D)…*trans* と geranic acid-b(C)が、ほぼ等量生成されている。citral-b より citral-a への自然変化は認められているが、短時間で50%量の変化はしない。

したがって Le-X には *cis*↔*trans* の isomerase (epimerase) 的酵素が存在するのではないかと推定される。

2-2 休止菌体による作用

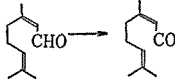
細菌を前培養を肉汁培地で行なったものと、citralを含む基礎培地で行なったものとを比較すると、肉汁培地よりの休止菌体では作用を認められなかった。

本菌のもつ酵素は citral により誘導された適応酵素である。本酵素の最適条件は

- i) 炭素源として、さらに glucose を加えた方がよかった。0.1g/100ml で citral のみの場合の約10倍となる。
- ii) 始発 pH 7.0
- iii) 基質濃度 1%v/v

2-3 要 約


1) Citral 転換菌 *Pseudomonas convexa* strain Le-X. を土壌より分離同定した。

2) Strain Le-X は  citral を geranic acid に転換し、蓄積した。この場合 glucose を添加することによって転換物は増加した。生産条件としては温度 30°C, 基質濃度 1%v/v, 始発pH 7.0, glucose 0.1%v/v, で収率80%であった。

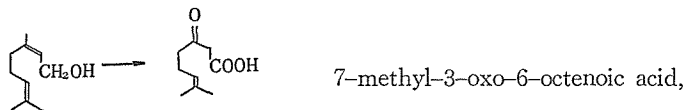
3) Le-X 株の酵素系には Citral a ⇌ citral b の cis, trans isomerase の存在を推定した。

4) Geraniol より転換した geranic acid は *Pseudomonas aeruginosa* strain GM₂ によって、速やかに代謝されるが *Pseudomonas convexa* strain Le-X では蓄積される。

3-1 Geraniol の微生物転換

Geraniol は香料関係で最も広く、多く利用されるものである。構造式は  で、cis, trans 型が考えられ、geraniol は trans 型とされている。パルマローザ油 (95%) ゼラニウム油 (40~50%) に含まれている。そう快なローズ様の香気をもっている。

1) SEUBERT⁹⁾の *Pseudomonas citronellolis* がその性質の中で、geraniol, geranic acid を分解するとしている。



2) 後藤建三¹⁰⁾は *Aspergillus niger* が geraniol を閉環して、linalool とし、これがさらに citral を経て分解されるとしているが詳細ではない。

3) 著者らは²⁸⁾monoterpene alcohol として普遍的で入手しやすいことより、geraniol の微生物転換を検討した。

Citronellal における方法と全く同様な方法を用いた。

- i) 分離細菌 *Pseudomonas aeruginosa* strain GM₂
- ii) 転換生成物は、大部分が酸性画分に存在し痕跡的中性物質を含んでいた。精製した酸性物質は、黄褐色油状物質で、Apiezone L カラムの GLC では単一物質を示した。活性炭脱色で無色粘稠液となるが、短時間の放置で再び黄ないし黄褐色となった。酸価320で

炭素数約10個のカルボン酸と推定した。

Geraniol より citral-a, geranic acid-a を調製して, 生成物と比較した。

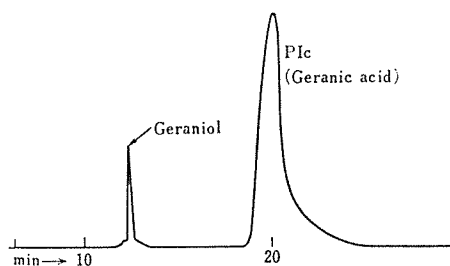


Fig. 16 Gas Liquid Chromatogram of P Ic. Condition : Apiezon L, 2m×5mm, He 40ml per min, recorder sens 4mV, temp. 180°C, bridge curr. 200mA, sample 1 μ l.

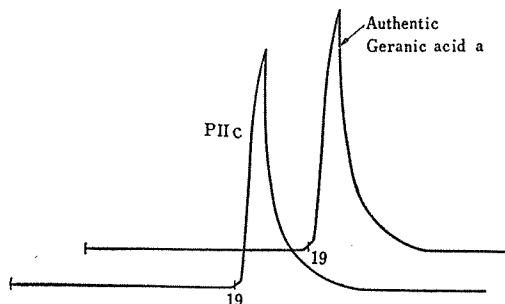


Fig. 17 Gas Liquid Chromatogram of P IIc and Geranic Acid. Condition : same as Fig. 2.

Fig. 16 は抽出物の GLC で, 未変化の geraniol が多少残るがほとんどが酸性物質である。

Fig. 17 は精製後, 調製 geranic acid との比較である。

Rt, tailing の状態など一致している。

Table X はその *p*-phenylphenacyl ester の元素分析, 融点の比較であり。

Fig. 18 はその IR の比較である。

いずれも調製 geranic acid とよく一致する。

CM₂-3b 菌は geraniol を転換して geranic acid にすることが確認された。

此の際の収量は

geraniol 1 ml	0.8389 g
Cell	0.75 g
転換生成物	0.2134 g
収率 (重量)	25.44%

ただし, 生成酸は速やかに代謝されるので, 上記は生成酸の絶対量ではない。

Table X Analysis and Melting Point of *p*-Phenylphenacyl Ester of Product IIc and Geranic Acid

Subject	Theoretical value	Geranic acid	P IIc
Anal. found			
C	79.53	79.81	79.61
H	7.23	7.64	7.32
O	13.24	12.55	13.07
	Geranic acid	P IIc	Mixture
mp (°C)	78.5~79.0	79.0	79.0

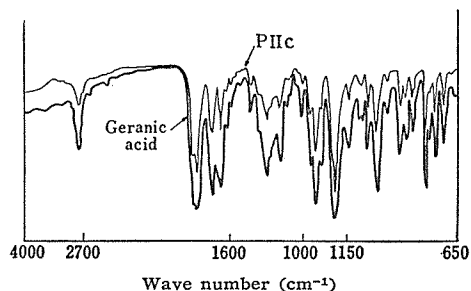


Fig. 18 Infrared Absorption Spectra of the *p*-Phenylphenacyl Ester of P IIc and Geranic Acid.

生酸条件

- i) 始発 pH 7.5~8.0
- ii) 基質濃度 1.5% (v/v)
- iii) 25~42°C

基質特異性については, Table XI に示すような類縁の Terpene 類を用いて検討した。

Table XI Conversion of Geraniol related Terpenes by the Strain GM₂

No.	Substrate	Structure	Substrate %, v/v	Culture hr	Cell g 100ml	PH		P Iic g/100ml	Yield %, w/w	Main product
						start	end			
1	Geraniol		1.00	48	2.00	7.5	7.15	0.4237	50.00	Geranic acid a
2	Citral b		0.25	54	0.63	7.2	6.60	0.1194	40.00	Geranic acid a [Nerol, Geraniol]
3	Citral a		0.25	96	0.62	7.2	6.89	0.1187	56.62	Geranic acid b [Nerol]
4	Geranic acid (a)		1.00	96	1.50	7.4	5.60	0.2321	26.60	Smaller molecular comps.
5	Citronellol		1.00	48	1.20	7.4	6.20	0.4675	56.89	Citronellal → Citronellic acid
6	Citronellal		1.00	20	1.50	7.4	6.40	0.4000	48.09	Citronellic acid, Neutral comps. (Hydrocarbons)
7	Citronellic acid		0.50	38	2.00	7.4	7.20	0.1047	22.83	Smaller molecular comps.
8	Nerol		0.10	120	—	7.2	7.03	—	—	—
9	Linalool		0.10	120	—	7.2	7.07	—	—	—

相当に広い特異性をもっているようであるが, その難易は, 濃度, 時間などに表現されている。

Citronellol は citronellal を経過して, alcohol→aldehyde→acid の状態が明瞭に観察されるが, geraniol の転換においては, 直接に geraniol→geranic acid となり中間体が未知であった。そこで接種後24時間後に 2,4-dinitrophenylhydrazine を添加すると citral-2,4-dinitrophenylhydrazone の結晶性沈澱が生じた。すなわち geraniol も同様に geranic acid (citral) を経て geranic acid に転換することが明瞭となった。ただその転換速度が速やかであると推定できる。

島²⁹⁾らは GM₂ 菌の生産する酵素, geraniol dehydrogenase を検討して, 20000~100,000 ×g の遠波で沈降する膜結合型酵素であるとしている。

pH 7.0~7.5, 30~35°C で最大活性を有し, Fe³⁺ を必要としかつ強く酵素, 膜と結合している。また NAD などの Pyridine-nucleotide 類の関与を要せず, Zn により阻害されるとしている。

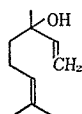
特異性として nerol (cis 型) に不活性であるが citronellol には活性を示したと述べている。

3-2 要 約

- 1) 土壌より分離した geraniol 転換菌 GM₂ 株は, *Pseudomonas aeruginosa* の近縁菌であった。
- 2) GM₂ 菌は geraniol → geranic acid に転換するが, 中間体として citral を経ることが判った。
- 3) 幾何異性体, 立体異性体の特異性が存在していた。
- 4) GM₂ 菌の場合は, 生成 geranic acid を β-oxidation により速やかに代謝する。

4 Linalool の微生物転換³⁰⁾

Linalool はローズウッド油 (d. 80~85%) 芳樟油 (l. 80~90%) に含まれた鈴蘭様の香気をもった鎖状 monoterpene である。の構造をもち, 末端不飽和結合の位置により d, l 型がある。



Linalool の微生物転換も上述の方法と全く同様な方法によって検討した。

土壌より *Pseudomonas pseudomallei* 近縁菌 strain A を得た。0.8%v/v を含む基礎培地で本菌を培養して転換生成物, 中性物質 VI-A, 酸性物質 VI-B, VI-C, VI-D を主成分として得た。

- 4-1) 中性物質 VI-A は樟脳臭を有する白色結晶で, IR 吸収などは全く樟脳と一致している。樟脳と同定した。
- 4-2) 酸性物質 VI-B は以下の性質を示した。
 - i 元素分析 C=69.48, H=7.68
 - ii 質量分析 分子量 126 (Fig. 19)

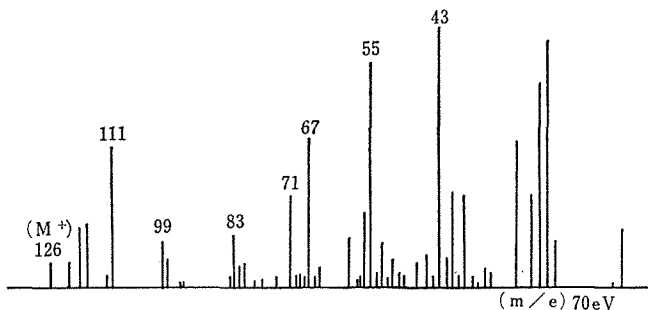
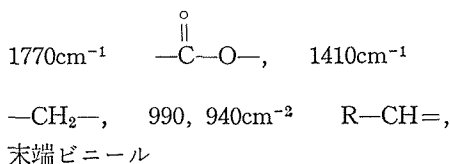


Fig. 19 Mass Spectrum of the Product VI-B.

- iii) 赤外線吸収スペクトル Fig. 20



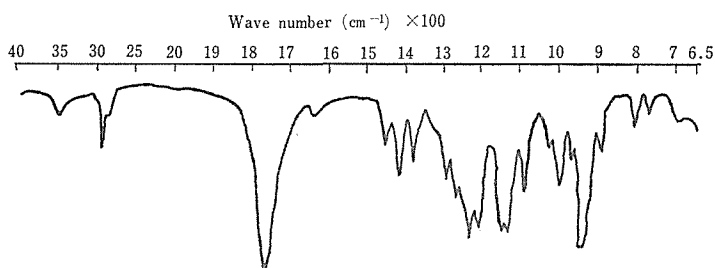


Fig. 20 IR Spectrum of the product VI-B.

iv 核磁気共鳴スペクトル Fig. 21

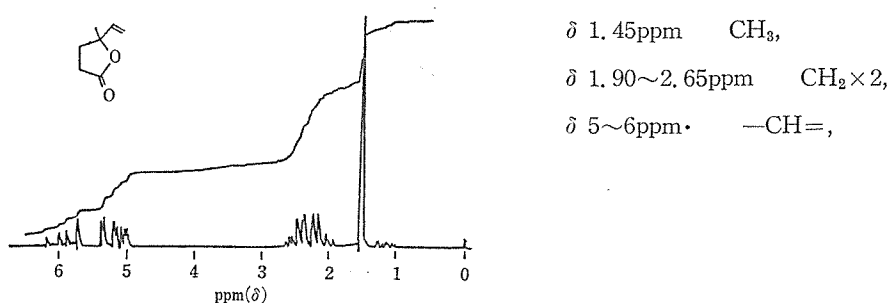


Fig. 21 NMR Spectrum of the Product VI-B.

以上のことより $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2$, CC(=C)C1OC(=O)C1 4-methyl-4-vinyl-butyro-lactone と推定した。

なお確認のために $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ Levulinic methyl ester, と CH_3Br methyl-bromide との Grignard reaction³¹⁾で, 4-methyl-4-ethylbutyrolactone を調製し, VI-Bの水添物との IR スペクトルの比較を行なった。Fig. 22 で両者が完全に一致していることが確認できる。

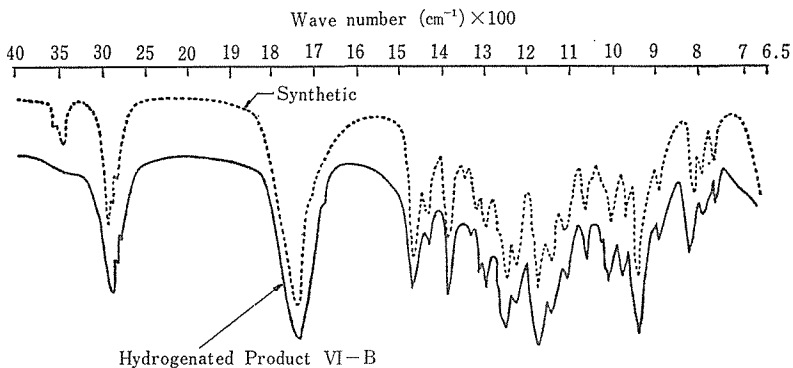


Fig. 22 IR Spectra of the Hydrogenated Product VI-B and Synthetic 4-Methyl-4-ethylbutyrolactone.

したがって、Product VI-B は 4-methyl-4-vinyl-butyro-lactone, 或いは 5-methyl-5-vinyl-tetrahydro-2-furanone である。

4-3) 酸性物質 VI-C 48時間培養した際の酸性部に存在する油状物質で、下記の検討を行なった。IR スペクトル, (Fig. 23) より 2700~2500, 1700 cm^{-1} カルボン酸, 840 cm^{-1} 三置換オレフィン。

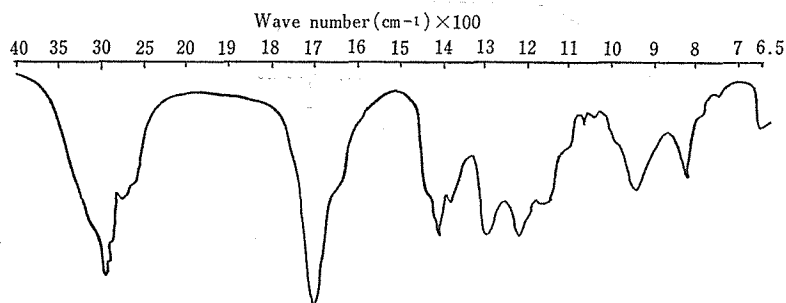


Fig. 23 IR Spectrum of the Product VI-C.

MS スペクトル (Fig. 24) より分子イオンピーク128が認められる。

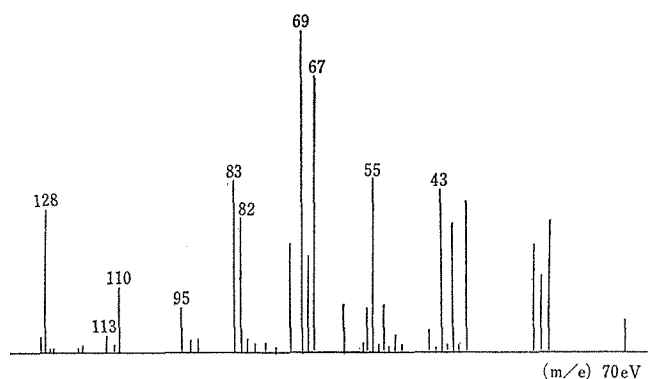


Fig. 24 Mass Spectrum of the Product VI-C.

NMR スペクトル (Fig. 28) より,

- δ 1.05ppm CH_3
- δ 1.65ppm CH_3
- δ 2.03ppm CH_2
- δ 5.36ppm CH_2
- δ 10.2ppm COOH

により, Fig. 中の I, II 構造が推定できる。cis, trans については三置換オレフィンの吸収帯が 840 cm^{-1} と高波数に存在していることなどより trans 体を推定している。

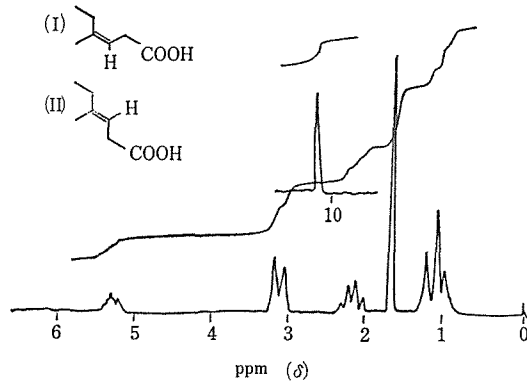


Fig. 25 NMR Spectrum of the Product VI-C.

以上のことより VI-C は 4-methyl-trans-3-hexenoic acid と構造 II の方を推定している。
 4-4) 酸性物質 product VI-D についても同様に次のように検討した。本物質は30時間培養時の酸性部の主成分で、汗臭をもつ油状物質である。

元素分析により C=64.06%, H=8.57% であり, Fig. 26 の質量スペクトルにより

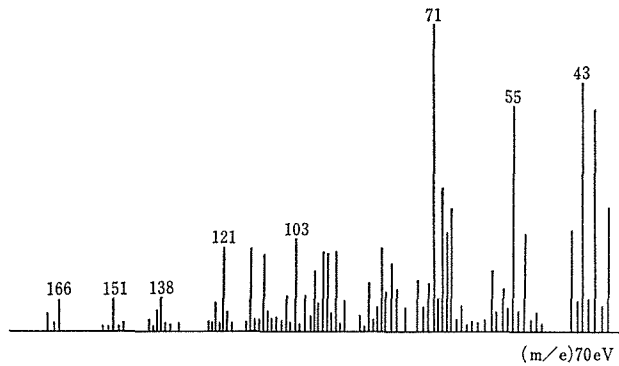


Fig. 26 Mass Spectrum of the Product VI-D.

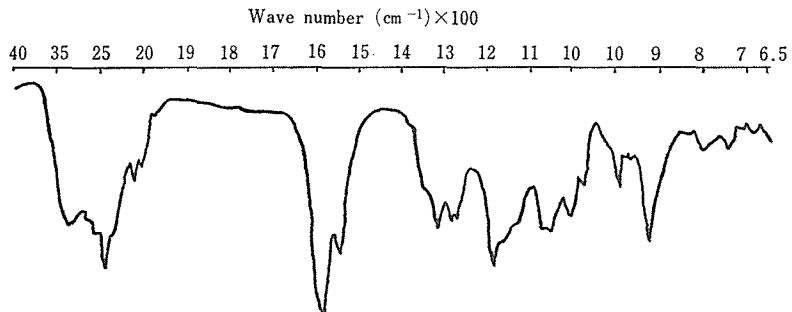


Fig. 27 IR Spectrum of Product VI-D.

m/e 169= M^+-CH_3 , m/e 166= M^+-H_2O , 酸価180より分子量 184, 分子式 $C_{10}H_{16}O_3$ と推定した。

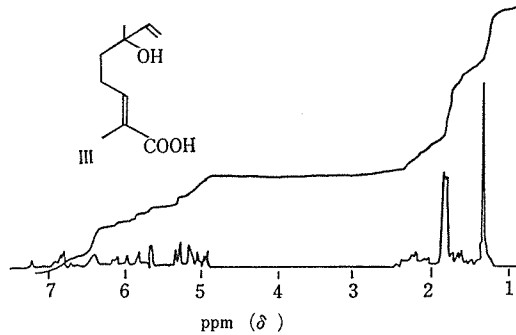


Fig. 28 NMR Spectrum of the Product VI-D.

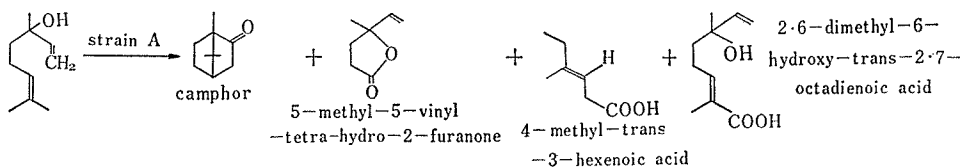
Fig. 27 の IR スペクトルにより, $3410, 1110\text{cm}^{-1}$ に OH, $990, 910\text{cm}^{-1}$ に一置換オレフィン, $2700, 2500, 1685\text{cm}^{-1}$ に, 不飽和カルボキシル基の吸収, などが見られ, isopropyl 基の 1 個が酸化された。Fig. 28 の III の構造式が推定される。さらに Fig. 28 の NMR スペクトルにより,

- δ 1.29ppm... CH_3 , δ 1.80ppm... CH_3
- δ 4.98~6.12ppm... 1 置換 olefine
- δ 6.44ppm...OH と COOH の平均 (2H)

したがって, IR によると同様 III 構造と推定できる。

さらに δ 6.89ppm のシグナルはトランスオレフィンのメチンプロトンと Pascual⁵⁰⁾の経験則を適用(計算値 6.78ppm)することにより, III 構造を推定できる。

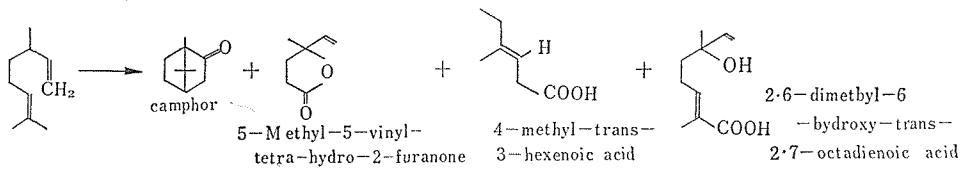
Product VI-D は, 以上の結果より 2,6-dimethyl-6-hydroxy-trans-2,7-octadienoic acid と推定した。



4-5 要 約

1) 土壌より linalool 転換菌 1 株を得, *Pseudomonas pseudomallei* 近縁菌であると同定した。

2) 本菌は linalool を転換して, 次のものを生成した。



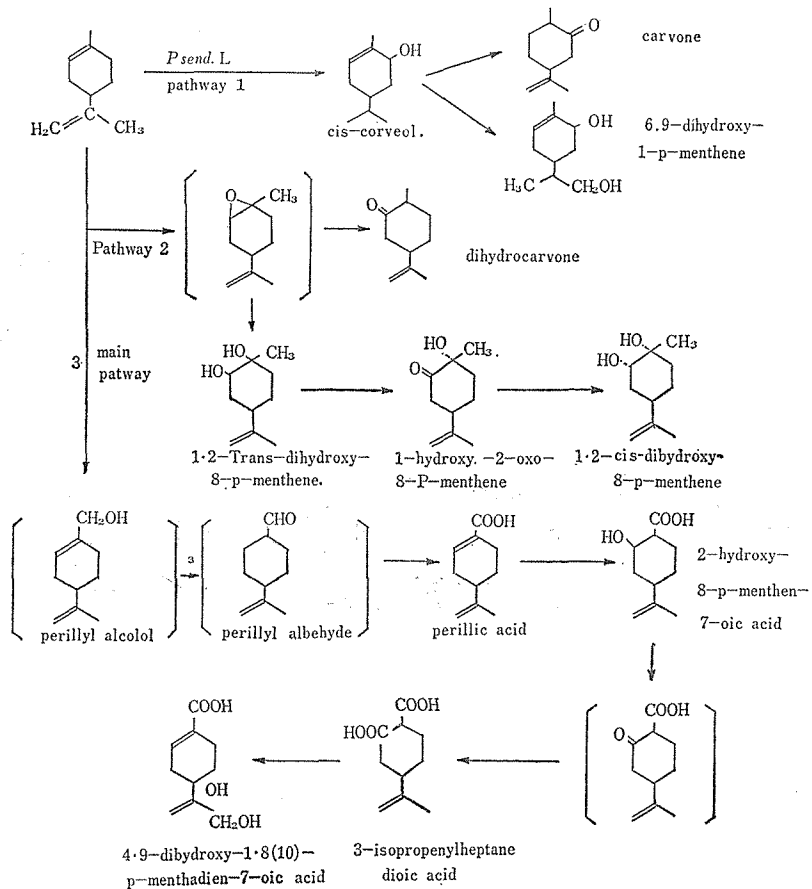
- 3) linalool が閉環して camphor になることは興味あることで、将来の検討を俟ちたい。
- 4) 末端ビニル基をもつ 5-methyl-5-vinyl-tetrahydro-2-furanone, 2,6-dimethyl-6-hydroxy-trans-2,7-octadienoic acid などの新化合物が生成されている。
- 5) linalool の微生物転換は本報が最初である。

B cyclic terpene

5 Limonene の微生物転換

Limonene は $\Delta^{1,8}$ -p-menthadien である、光学活性体を limonene, Racemi 体を dipentene と呼ばれる。

薄荷油中 (1) レモン油 (d) などに存在してオレンジ様の香気をもっている。BHATTA-



CHARYYA¹⁰⁾が *Aspergillus niger* で cis-carveol, carvone, α -Terpineol, 1-hydroxy-2,8-p-menthadien を得ている。また同様に *Pseudomonad* を用いて前頁の三方向の代謝経路を示している。

以上のうち pathway 3 が main 経路とされており。このうち perillyl aldehyde \rightarrow perillic acid が未知であったので、著者らは³²⁾*Pseudomonas aeruginosa* 近縁菌を用いて検討した。転換生成物の抽出精製は常法によった。約32%収率で、mp 125°C の結晶を得た。

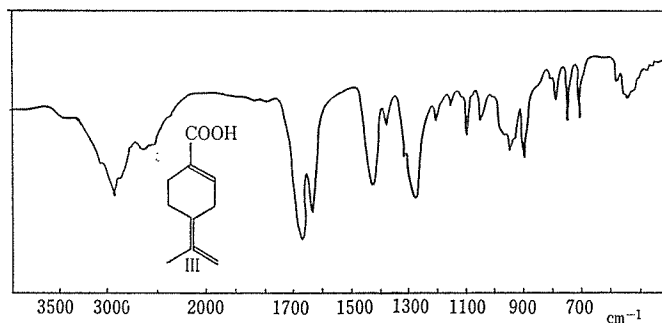


Fig. 29 IR spectrum of perillyl acid (KBr.)

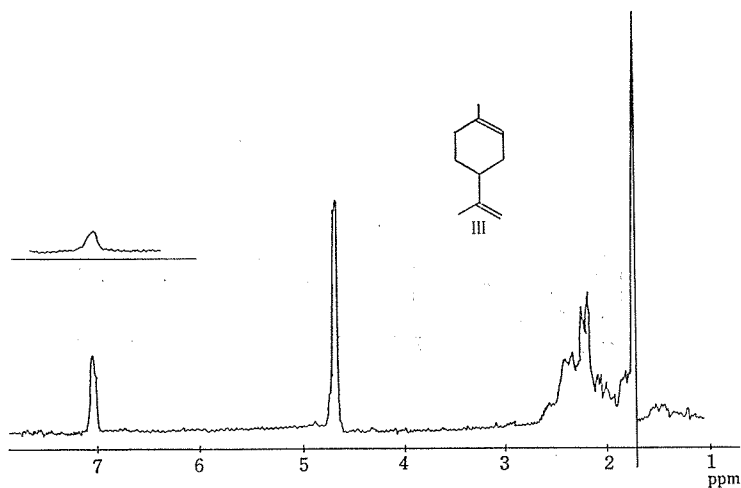
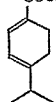


Fig. 30 NMR spectrum of perillyl acid (100MHz in CCl₄)

IR スペクトル： $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 2600, 1680, 1640, 1420, 1380, 1270, 950, 890, 780, 740, 700cm⁻¹

NMR スペクトル： δ 1.78ppm \cdots CH₃, δ 4.8, 7.05ppm= CH_2 (C₁, C₈), δ 12.0ppm \cdots COOH
これらの結果より Perillyl acid と同定できる。

同菌はさらに不飽和の位置の異なったもの、すなわち p-mentha-1,3-dien-7-al をも同様に酸化して、新しい型 COOH 4-isopropyl-1,3-cyclohexadienoic acid を生成した。



其他 Limonene については, BHATTACHARYYA¹⁰⁾一派が詳細な研究を行なっている。

要 約

1) Limonene に関する文献は多く, 特に BHATTACHARYYA らが詳細に研究して, 種々の転換生成物を報告している。

著者らは, その代謝経路中の perillaldehyde が酸化して perillic acid に成る点が未報告であったので, これを完成せんとした。

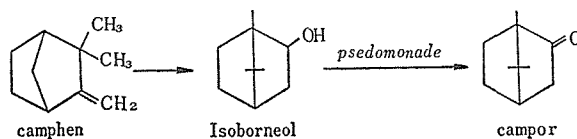
僅かに遅れて BHATTACHARYYA らが, 無細胞抽出液で, 詳細な報告を出している。

6 Camphor

Cyclic terpene 類のうちで最も多く研究されているのは camphor で, GUNSALUS⁸⁾らは1959年頃より多数の報告を行なっている。著者らも³³⁾, camphor 転換菌 *pseudomonas riboflavina* 類縁菌 strain C を得た。Strain C は camphor を転換して, GUNSALUS et al の報告の物質と異なる 1 物質 C₉-lactone を生成した。また後述する borneol の転換生成物を検討すると, borneol 転換菌³⁴⁾ *Pseudomonas pseudomallei* strain H が borneol を転換して先づ camphor と為し, 其の後の代謝経路は camphor の代謝経路と同じ経路を採ることを知った。したがって本章では C₉-lactone のみを述べて, 以下は borneol の章で述べることにする。

Camphor の代謝は, 医学関係においてもよく研究されていて, 古くは朝日奈・石館³⁵⁾らは動物体内の camphor は 5 または 3-hydroxycamphor, あるいは cis または trans の π -hydroxy camphor となって, これが glucuronic acid と抱合して体外へ排池されたとしている。

GUNSALUS⁸⁾らは *Pseudomonas putida*, *Corynebacterium* を用いて, camphor の転換生成物を検討し, 酵素レベルで行なっている。また BHATTACHARYYA¹⁰⁾ は camphene より *Pseudomonade* が



と転換するとしている。I. C. GUNSALUS が酵素レベルで検討した camphor の代謝経路は次のようである。(次頁)

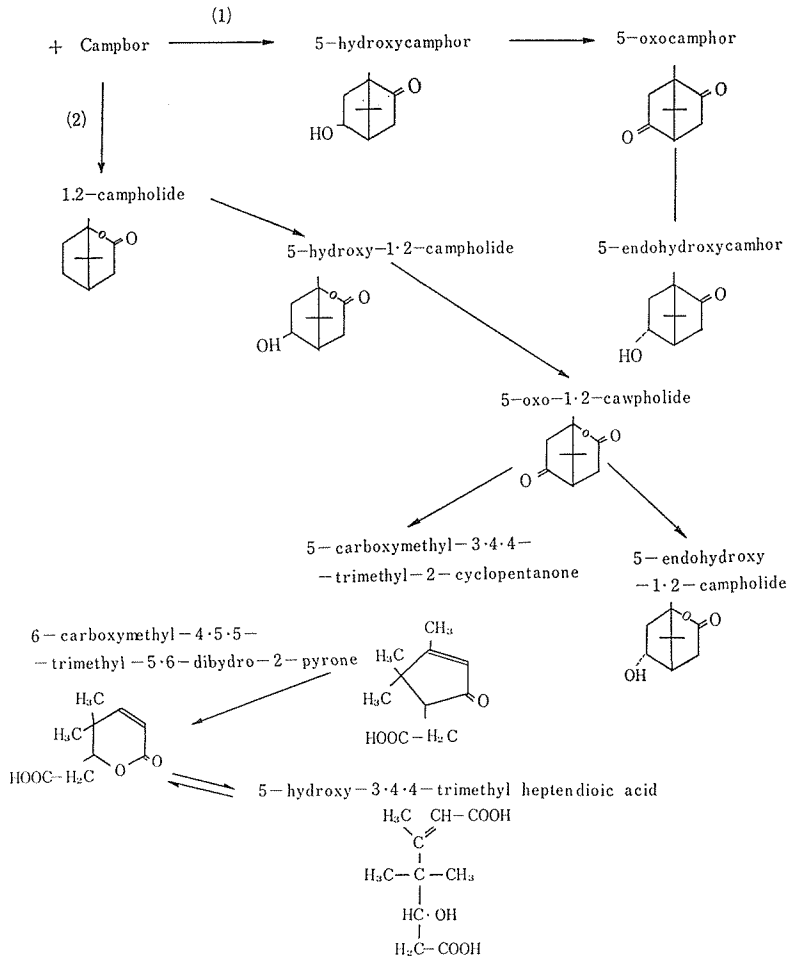
Campholide の開環には NADH+H⁺ と Co-factor として還元助剤 (Fe²⁺) を要する。(1), (2)両経路あり(2)が主経路と考えられ, *Pseudomonas putida* は両経路の酵素をもつとしている。

我々の検索した *Pseudomonas riboflavina* strain C は, camphor を転換して, 主生成物として, 中性物質を, 原料 camphor に対して約15%生成した。シリカゲルカラムクロマトグラフィで分画して, 昇華を行なうと, 無色昇華性, 吸湿性ある板状結晶で, 樟脳臭より刺戟臭を除いた清涼感のある物質を得た。GUNSALUS⁸⁾らの Campholide と推定したが, 次のような検討によると明瞭に区別された。本物質を便宜上 Product D とする。

6-1 Product D の同定

1) 元素分析。(Table XII)

元素分析より元素組成は, C₉H₁₄O₂ または C₁₀H₁₄O₂ と推定した。



2) 質量分析 (Fig. 31)

分子量154と推定されるので、元素組成を $C_9H_{14}O_2$ とした。

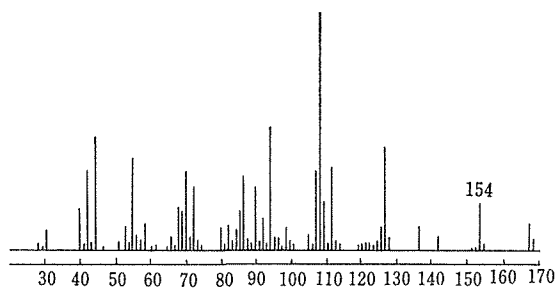


Fig. 31 Mass Spectrum of the Product D.

Table XII Elementary Analysis of the Product D

Product D found	Theoretical $C_9H_{14}O_2$	Theoretical $C_{10}H_{16}O_2$
C 70.30	70.10	71.39
H 9.97	9.15	9.54
O 19.73	20.75	19.02

mp : 156~157°C

3) 赤外線吸収スペクトル (Fig. 32)

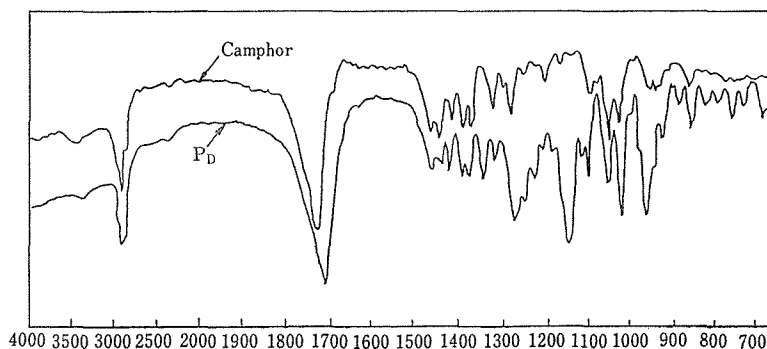
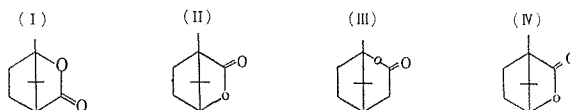


Fig. 32 IR Spectrum of the Product D.

1265, 1140 cm^{-1} ...CO—O, ラクトン, 1305, 1370 cm^{-1} ...CH₃, ゼミナル, 1730 cm^{-1} ...C=O, 1046 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} ...C—O—CO, 960 cm^{-1} ...CO—CO, などの吸収より camphor のブリッジリングをもち, ラクトン結合の導入が推定される。

推定構造式を次のように考えた。



炭素数 9 とすれば (I) (II) が該当してくる。

4) 旋光分散 (Fig. 33)

旋光分散の ORD 曲線はラクトン領域の 228 $m\mu$ に負の単一コットン効果が見られる。

また推定される立体構造より見て, Fig. 34 のようにラクトン則を適用すると (I) 構造が推定された。

なお UV スペクトルを検討したがなんの吸収をも示さず, ORD 曲線の信憑性を示した。

5) 核磁気共鳴スペクトル (Fig. 35)

δ 1.05, δ 1.09ppm, ゼミナルの CH₃

δ 1.31 CH₃ (10位)

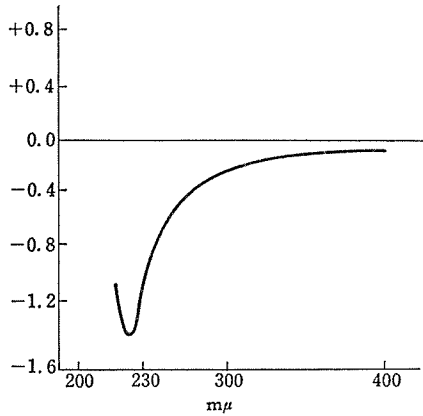


Fig. 33 ORD Curve of the Product D.
Optical path 0.01cm, Sens. ± 0.1 , Slit width automatic 1.7mm, Temp. 25°C, Solvent CH_3OH .

	I	II
Structure		
Snatzkes rule	-	+
Wolfs rule	-	+
Klynes sector rule	-	+
Stereostructure		

Fig. 34 Adaptation of Lactone Rule.

δ 2.00, δ 3.10 CH (4位, 5位)

またプロトン数は5個である。

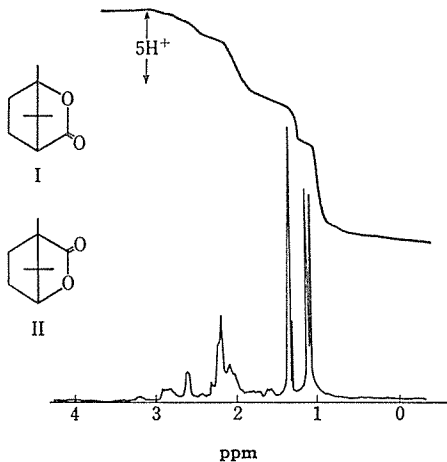


Fig. 35 NMR Spectrum of the product D.

以上の結果より $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2$ 組成で、立体構造は(I), (II)であろう。もしII構造を有するならば、 $\text{C}=\text{O}$ の反磁性異方性効果で、10位のメチル基は遮蔽領域に入るために、10位のメチルプロトンは高磁場シフトすべきであると予想されるが、実際は低磁場へシフトしている。これはI構造の2位の酸素のローンペアーの影響で、低磁場シフトを起こしているものと解釈することができる。

以上の(1)~(5)などによって、この中性生産物は(I)構造1・7・7-trimethyl-2-oxa-3-oxo-bicyclo [2.2.1]-heptane と推定した。本物質は PERKIN-THORP³⁴⁾が camphoric acid 合成の中間物として認めた campholytolactone と

一致し、mp も cis, trans の混合物 (155~157°C) と酷似している。

其他の転換生成物は Borneol 転換のなかで述べる。

6-2 要 約

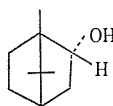
1) *Pseudomonas riboflovina* strain C によると camphor より C_9 -lactone=Campholytolactone を生成することを知った。

本物質は既報の文献にはなく、従って camphor 代謝経路も異なることを推定した。

2) 其他の生成物は *Pseudomonas pseudomallei* による borneol 代謝とほとんど同様なので、borneol の項で述べる。

7 Barneol の微生物転換³⁴⁾

Borneol はリヌーノウ樹や針葉樹に含有されているもので、石鹸、化粧品などによく使用されている。その構造より Borneo camphor などとも云われる。



gem-ジメチル架橋結合と OH 基は endo 結合で、isoborneol と立体異性体である。Borneol の微生物転換のために、常法により、土壌より一菌株 *Pseudomonas pseudomallei* strain H を得た。Borneol 0.5% w/v を含む基礎培地で H 菌を培養してその転換生成物を抽出した。転換生成物の GLC が Fig. 36 であり、

経時的な変化が Fig. 37 である。

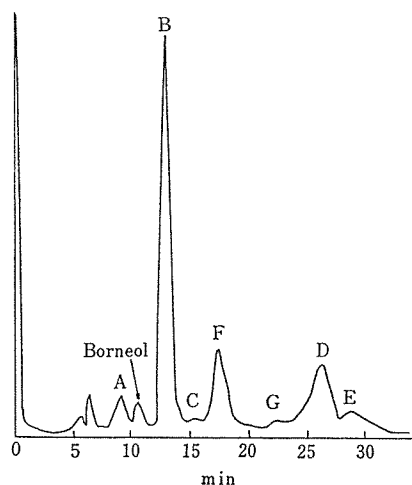


Fig. 36 Gas Liquid Chromatogram of the Product 1.

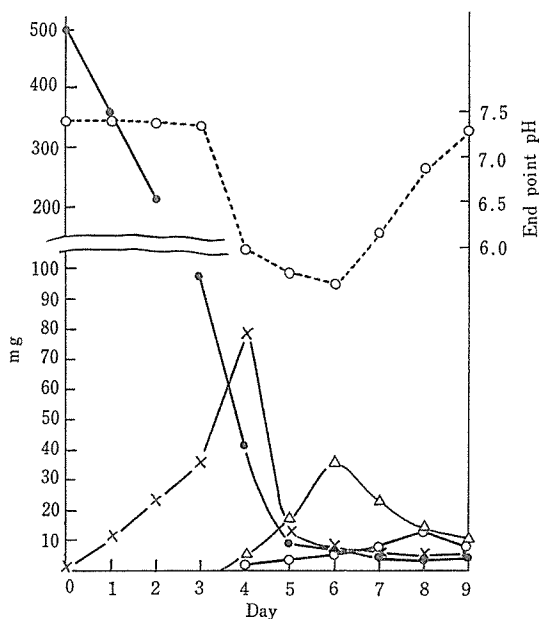


Fig. 37 Time Course Change in Borneol Fermentation.

●—● Borneol △—△ Product D
×—× Product A ○—○ Product B

抽出物 Product 1 の GLC 中で生産物を適宜 ABCDEFG とし、Fig. 37 の経時変化で最大収量の時点、すなわち

A	4 日目 (pH 6.6)	78mg [原料 500mg より]
D	6 日目 (pH 5.8, 最低)	37mg
B	8 日目 (pH 6.8)	12mg

培地 pH は 6 日目に pH 5.8 と最低を示し、以後は逐次上昇して 10 日目で最高 7.5 となり、以後は同様であるが、転換生産物は逐次代謝減少した。

7-1 Product A

Product A は、樟脳特有の刺戟臭をもつ、昇華性の白色板状結晶であり、以下のように検討した。

Table X III Elementary Analysis of the Product A

	Analytical Product A(%)	Authentic C ₁₀ H ₁₆ O(%)
C	77.94	78.90
H	11.01	10.59
O	11.15	10.51

Melting Point ; 179.0~179.8°C,
178.75°C.

(i) 元素分析, 赤外線吸収……Table X III, Fig. 38に示す。(混融 (camphor との) 試験での融点低下なし)

Fig. 38の IR スペクトラムに於ても camphor の吸収と完全に一致した。其故転換生成物Aは camphor と同定した。

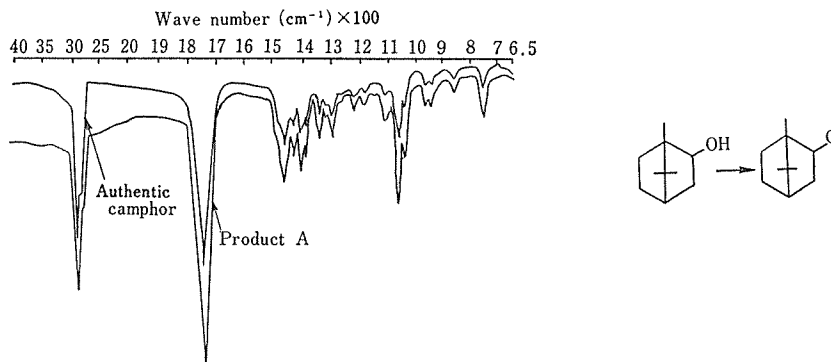


Fig. 38 IR Spectrum of the Product A.

7-2 Product D

Product D の GLC の Rt は camphor の転換生産物 campholytolactone と一致してゐる。昇華精製物も白色板状清涼感ある結晶であった。混融試験においても融点降下は認められなかった。

元素分析が Table XIV であり, ついで, IR チャートの比較も Fig. 39で, campholytolactone とよく一致してゐる。

Product D は 1.7.7-trimethyl-2-oxa-3-oxo-bicyclo-[2.2.1]-heptane = campholytolactone と同定した。

Table XIV Elementary Analysis of the Product D

	Analytical Product D(%)	Authentic C ₉ H ₁₄ O ₂ (%)
C	71.04	70.10
H	9.42	9.15
O	19.54	20.75

Melting point : 157.0 ~159.0°C,
156.0~157.0°C.

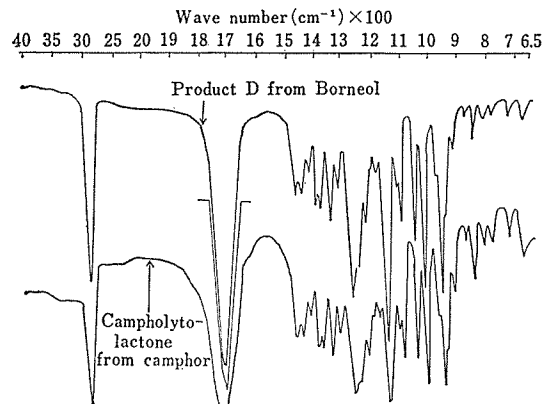


Fig. 39 IR Spectrum of the Product D.

7-3 Product B

8日目抽出物のGLCはFig. 40でproduct Bが最多である。Bを分画精製すると、昇華性で白色吸湿性の、フェノール臭をもった針状結晶が得られた。本結晶について下記の検討を行なった。

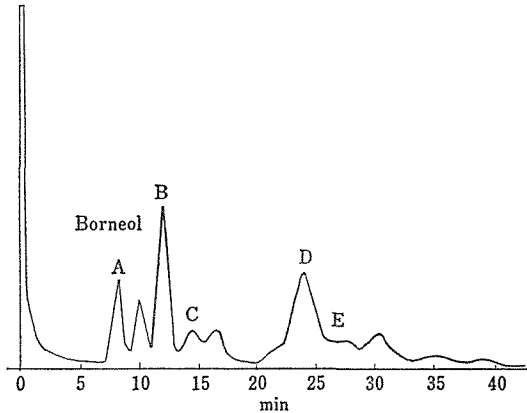


Fig. 40 Gas Liquid Chromatogram of the product 1 after Eight Days.

1) 元素分析 Table XV

Table XV Elementary Analysis of the Product B

	Analytical Product B (%)	Theoretical $C_{10}H_{14}O_2$ (%)
C	71.73	72.29
H	8.64	8.43
O	19.63	19.28

2) 質量分析 Fig. 41

これより分子量は166と推定される。

これより分子式 $C_{14}H_{18}O_2$ を推定した。

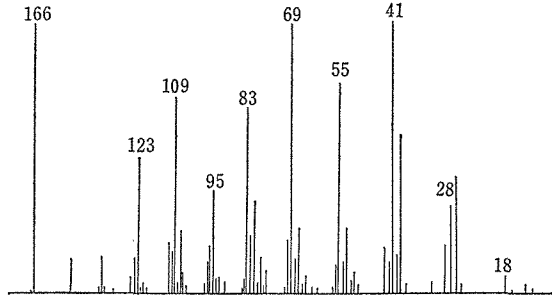


Fig. 41 Mass Spectrum of the Product B.

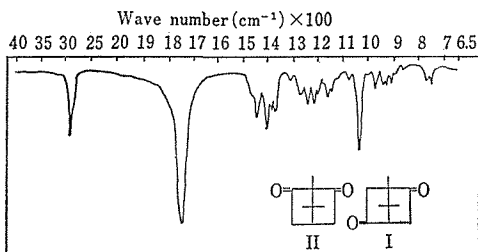


Fig. 42 IR Spectrum of the product B.

3) 赤外線吸収スペクトル (Fig. 42)

1755cm^{-1} ... 中広いカルボニル基の吸収

1420cm^{-1} ... カルボニル隣接メチレン基

$1390, 1380, 1170, 1150\text{cm}^{-1}$... Gem メチル基

1040cm^{-1} ... $\text{C}-\text{CO}-\text{C}$ の強い吸収

すなわち、Product B は、camphor の骨格を保持する、dicarbonyl 化合物、Fig. 42 中の I = 2・5-diketo camphane、かまたは II =

2・6-diketocamphan が推定される。

4) 核磁気共鳴スペクトル

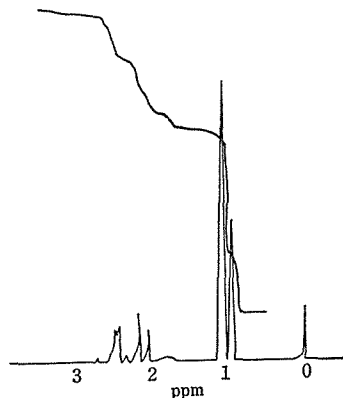


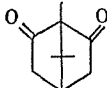
Fig. 43 NMR Spectrum of the Product B.

Table XVI NMR Spectrum of the Product B

Position	(ppm)
(3)-CH ₂a)	3.20 (d)
e)	2.50 (d)
(4)-CH.....	2.09 (s)
(5)-CH ₂a)	2.20 (d)
e)	2.50 (d)
(8)-CH ₃	1.03 (s)
(6)-CH ₃	
(10)-CH ₃	0.93 (s)

The Spectrum was obtained at 60 MC, on a Varian A-60 Spectrometer in CDCl₃.

Fig. 43 のスペクトルにより Table XVI の各シグナルの存在を知った。これより 2.6 位にカルボニル基の存在を推定、前掲の II 構造 1・7・7-trimethyl-2,6-dioxo-bicyclo-[2・2・1]-hep-

tane=2・6-diketo camphane と推定した。 尚三宅法³⁶⁾で camphore よりクロム酸

化により約30%の diketo camphane を得て、これを 2・5-diketo camphane (約18%) 2・6-diketo camphane (約12%) に分画して、product B と混融、IR吸収を比較して確認した。

7-4 Product F

同上抽出分離精製した product F を検討した。

i) 元素分析 (Table XVII)

Table XVII Elementary Analysis of the Product F

	Analytical Product F %	Authentic C ₁₀ H ₁₆ O ₂ %
C	71.30	71.43
H	9.38	9.52
O	19.32	19.05

これより推定分子組成 C₁₀H₁₆O₂ を得た。

ii) 赤外線吸収スペクトル (Fig. 44)

3450, 1040cm⁻¹ 二級水酸基

1740cm⁻¹ カルボニル基

1410cm⁻¹ 活性メチレン基

1390, 1370, 1230, 1025cm⁻¹...gem.

メチル基, の存在を確認

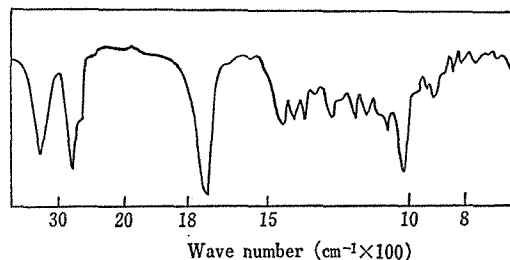


Fig. 44 Infrared Spectrum of the Product F.

iii) 質量分析 (Fig. 45)

分子イオンピークは168である。

従って、product Fは次のような構造をもつことが推定できる。

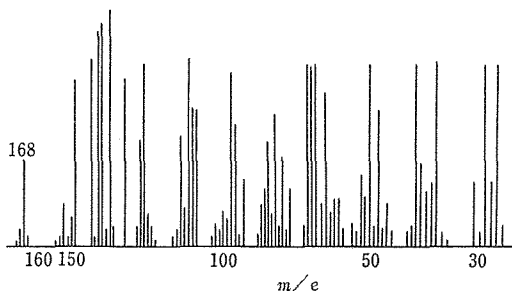
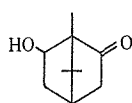
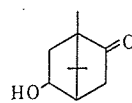


Fig. 45 Mass Spectrum of the Product F.



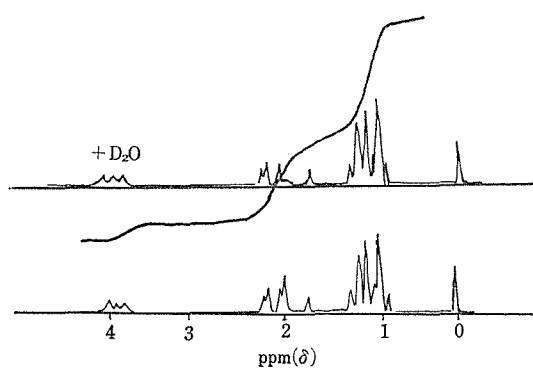
I



II

iv) 核磁気共鳴スペクトル (Fig. 46)

NMR スペクトルより各シグナルを帰属すると次のようになる。



各シグナルの帰属

position	δ (ppm)
(3)—CH ₂ —	2.20 (s)
(4)—CH—	1.70 (s)
(5)—CH ₂ —	2.05 (s)
(6)—CH—	3.80 (m)
(6)—OH	1.95 (s)
(8)—CH ₃	0.95 (s)
(9)—CH ₃	1.05 (s)
(10)—CH ₃	1.15 (s)

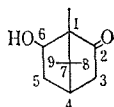
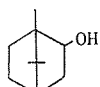


Fig. 46 NMR Spectrum of the Product F.

これより product F は I 構造すなわち、1·7·7-trimethyl-2-oxo-6-hydroxy-bicyclo-[2.2.1]-heptane と推定した。

以上のことより、borneol よりは次の転換生成物が生成されていることが確認された。



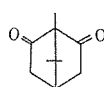
Borneol



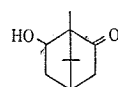
Camphor



Campholytolactone



2,6-diketocamphane



6-Hydroxycamphor

7-5 Campholytolactone C₉H₁₄O₂ の転換

GUNSAIUS et al⁸⁾ は camphor の転換生成物として、camphor lactone として 1·2-campholide (C₁₀) を確認している、我々は campholytolactone (C₉) の生成されることを認めた。そ

ここでこの確認のために2, 3の検討を行なった, その第一が, strain H の successive enzyme を推定した campholytolactone の転換である, 方法は既報と同様である。

Campholytolactone 0.5%を唯一の炭素源とした基礎培地で, strain H を培養して, 抽出後シリカゲルカラムを用い, Hexane : Ether=70 : 30 で分画精製する。

Fig. 47はその GLC である。転換生成物を適宜(1)(2)(3)(4)のように表示した。

精製段階で(4)が最も純度高く得られたので, まづ(4)について検討した。

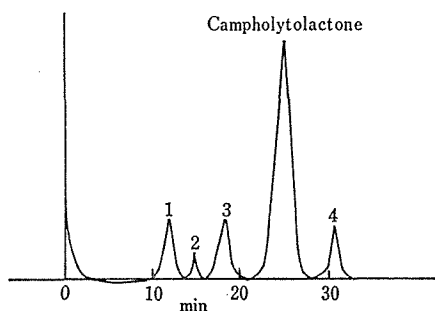


Fig. 47 Gas Liquid Chromatogram of the Derivative of Campholytolactone (Product 4).

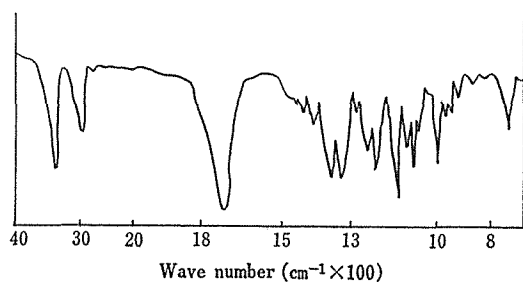
i) 元素分析 (Table XVIII)

Table XVIII Elementary Analysis of the Product 4

	Analytical Product 4 %	Authentic $C_9H_{14}O_3$ %
C	61.40	63.53
H	8.91	8.24
O	29.69	28.23

これより分子組成は $C_9H_{14}O_3$ を推定

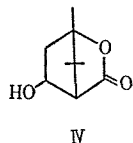
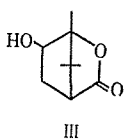
ii) 赤外線吸収スペクトル (Fig. 48)



3350, 1100 cm^{-1} ... 2級水酸基
1690 cm^{-1} ... ラクトン基
1390, 1375, 1200, 1170 cm^{-1} ... gem-メチル基

Fig. 48 IR Spectrum of the Product 4.

i), ii) よりの何れかの構造をもつと推定される



iii) 核磁気共鳴スペクトル, Fig. 49

これより各シグナルは次のように帰属させることができる。

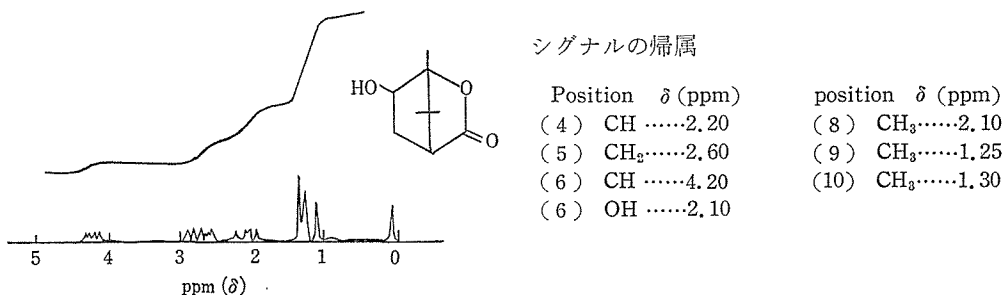


Fig. 49 NMR Spectrum of the Product 4.

NMR より検討しても, 本物質はⅢ構造, 1·7·7-Trimethyl-2-oxa-3-oxo-6-hydroxy-bicyclo-[2·2·1]-heptane=6-hydroxy-campholytolactone と推定される

7-6 Cempholide との比較

Campholytolactone 確認のために, SAUERS³⁷⁾法により, C₁₀ lactone=1·2-campholide を調製して, C₉ lactone=campholytolactone と比較した, GLC の Rt, IR 吸収などはよく似ている, しかし NMR に明瞭な差が認められた。

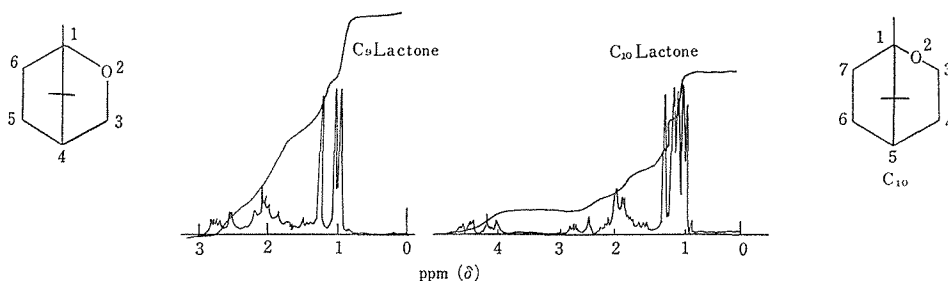


Fig. 50 NMR Spectrum of C₉ Lactone and C₁₀ Lactone.

Fig. 50 で明瞭のように C₁₀ lactone の4位のメチレンプロトンが δ 4.1 ppm 附近にあらわれている。

Borneol \rightarrow Camphor \rightarrow C₉-lactone であることが確認できた。

7-7 C₁₀-lactone の転換

1·2-campholide=C₁₀-lactone を同様に strain H にて転換し得るか否かを検討した。同様培地で C₁₀-lactone を唯一の炭素源として strain H を培養して, 転換生成物を得て同様に検討した。

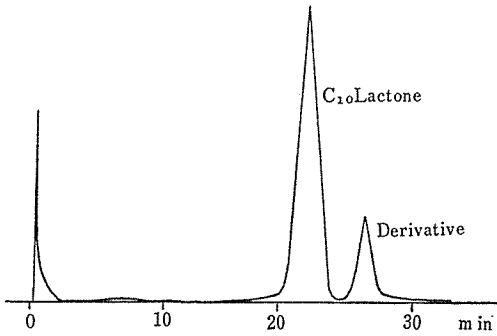


Fig. 51 Gas Liquid Chromatogram of derivative of C_{10} Lactone.

Table XIX Elementary Analysis of the Derivative of C_{10} lactone

	Analytical derivative %	Authentic $C_{10}H_{14}O_3$ %
C	64.62	65.93
H	8.07	7.69
O	27.31	26.38

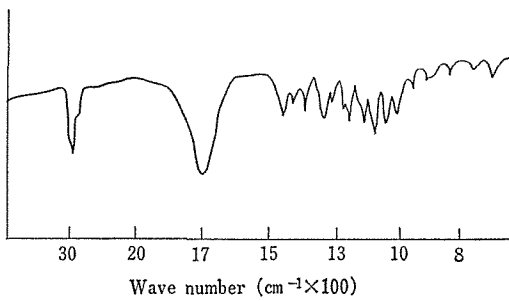


Fig. 52 IR Spectrum of Derivative of C_{10} Lactone.

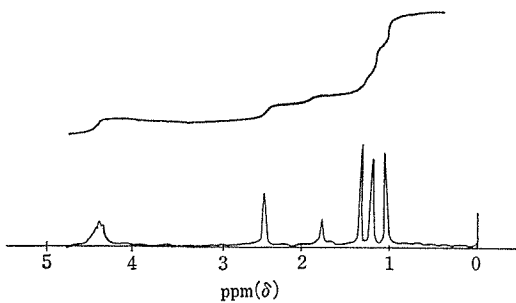
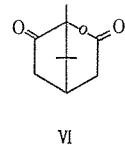
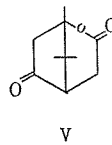


Fig. 53 IR Spectrum of Derivative of C_{10} Lactone.

i) ガスクロマトグラフィー Fig. 51に転換生成物のガスクロマトグラムを示す。 C_{10} ラクトンが転換されていることが判る。

転換物を分離精製したものの元素分析が Table XIX であり, 分子式 $C_{10}H_{14}O_3$ が推定される。

ii) 赤外線吸収スペクトル Fig. 52
 1750cm^{-1} ...カルボニル基
 1720cm^{-1} ...ラクトン基
 1410cm^{-1} ...メチレン基
 $1390, 1370, 1230, 1210\text{cm}^{-1}$...gem-メチル基
 などの吸収より, gem-メチル基をもったもの

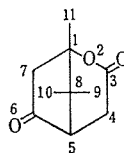


V, VI構造のいずれかであらうと推定できる。

iii) 核磁気共鳴分析, Fig. 53

この物質の NMR スペクトルが Fig. 53 である。各シグナルは、次のように帰属される。

position	δ (ppm)
(4) —CH ₂ —	4.40 (s)
(5) —CH—	1.80 (s)
(7) —CH ₂ —	2.45 (s)
(9) —CH ₃ —	1.05 (s)
(10) —CH ₃ —	1.20 (s)
(11) —CH ₃ —	1.34 (s)



以上の結果より V 構造, 1·8·8-trimethyl-2-oxa-3·6-dioxo-bicyclo-[2·3·1]-octane=3·6-diketo-1·2-campholide であることが確認された。

7-7 要約

1) Borneol は *Pseudomonas pseudomallei* strain H により, 代謝されて, camphor,

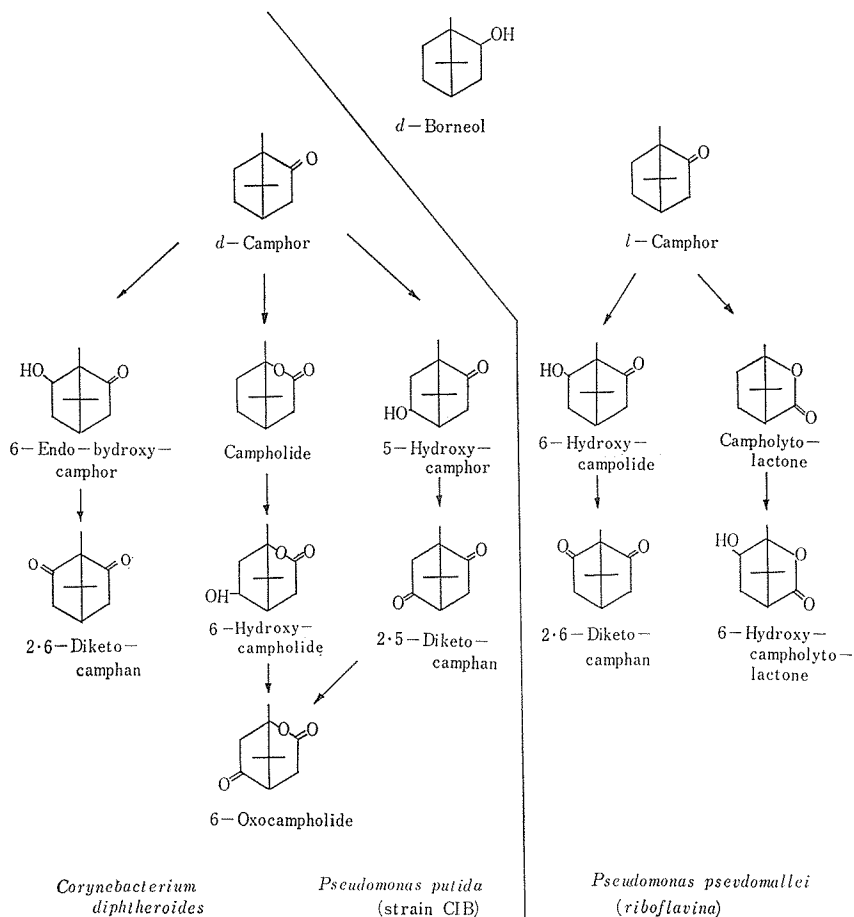


Fig. 53-A Proposed Metabolic Pathway of Camphor and Borneol

campholytolactone ($C_9H_{14}O_2$), 2,6-diketocamphane $C_{10}H_{14}O_2$, 6-hydroxy campholytolactone を生成することが認められた。

2) Strain H はまた合成 C_{10} -lactone (campholide) をも転換して 6-oxo-campholide を生成する。

3) Strain H は, 2,6-diketocamphane は資化せず蓄積する。

4) Strain H は Borneol を先ず camphor に転換し, 以後は camphor 転換菌 *Pseudomonas riboflavina* strain C とよく似た生成物を生成する。たゞ strain H は camphor, borneol を転換して, 2,6-diketocamphane を多く生成し蓄積するが, strain C は campholytolactone を多く生成するが, この物質は速やかに代謝, 発泡を伴なって開環へ進むようである。この際 campholytolactone は開環への end product である, 中間代謝物と云えよう。

5) *Pseudomonas pseudomallei* strain H, *Pseudomonas riboflavina* strain C, ならびに GUNSALUS et al の *Pseudomonas putida* strain C I B, *Corynebacterium diptheroide* の各代謝経路を比較したのが, Fig. 53-A である。

6) 上述のうち, campholytolactone したがって 6-hydroxy-campholytolactone は新代謝生産物である。

7) *Pseudomonas pseudomallei* および *riboflavina* の代謝経路は, camphor に転換後 2 経路となり, campholytolactone に進む経路と 6-hydroxy camphor に進む経路がある。

Campholytolactone 経路は, 6-hydroxy campholytolactone を経て速やかに開環し, 発泡を伴って代謝される。

一方 6-hydroxy camphor 経路は, 2,6-diketo camphane に転換して蓄積された。

8) 原料竜腦 (Borneol) は d 型であるが転換生成物は全て 1 型であった。

9) Borneol 分解菌 *Pseudomonas pseudomallei* strain H と camphor 分解菌 *Pseudomonas riboflavina* strain C との区別は, 馴養(酵素の誘導)を継続しておると一層明瞭となった。すなわち strain H は 2,6-diketo camphane をより多く, strain C は campholytolactone をより多く, 明瞭に区別ができる程に蓄積するようになった。ただし strain C の campholytolactone は, 速やかに代謝経路に入り, 減小するので, 培養開始後測定までの時間を限定して比較する必要がある。

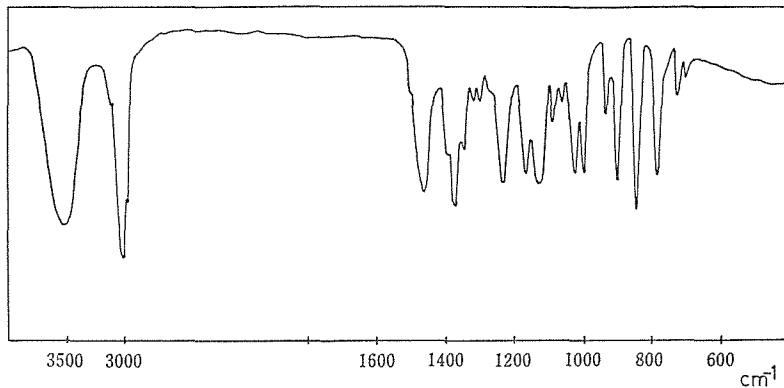
8 α -Terpineol の微生物転換^{39) 38)}

ライラックのような芳香をもち純品の時は結晶化する, テルペン油などに含有されているが, ピネン, ジベンテンなどより合成されている, 石鹼, 香料, 化粧品などに重要である, 本物質の微生物転換に関しては, camphor の生合成の際の中間物質であるなどとされているが具体的に α -Terpineol を転換させたと云う例はない。

著者らは, α -Terpineol 転換微生物として *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas aeruginosa* strain FB 3104, *Pseudomonas putida* strain T₂ を得て, 各転換物の検討を行なった。

8-1 *Pseudomonas pseudomallei*

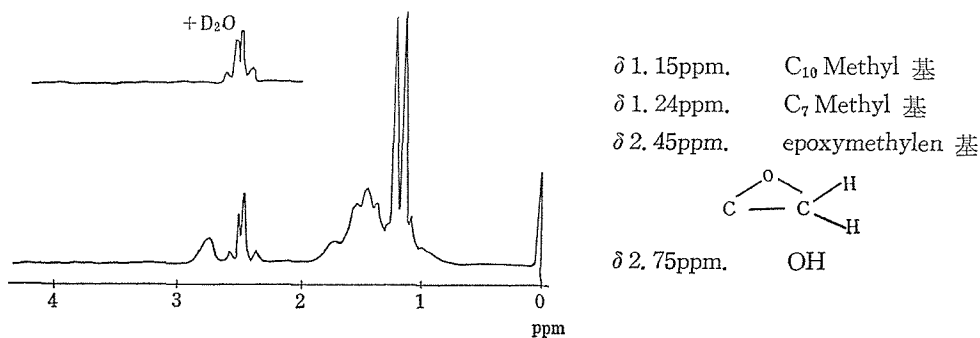
α -terpineol 0.3% 含有基礎培地で本菌を 30°, 24 時間, 振とう培養を行なって, 転換物質を得た。Fig. 54 はその IR スペクトル, Fig. 55 は NMR スペクトルである。

Fig. 54 IR Spectrum of 8,9-Epoxy-*p*-menthan-1-ol.

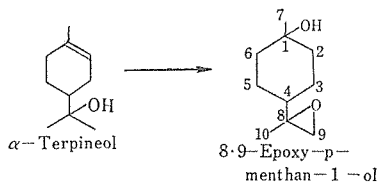
3500, 1010 cm^{-1} に OH の吸収

3015, 1225, 900, 840 cm^{-1} の吸収は epoxide を示す。

さらに本物質の核磁気共鳴分析による, その NMR スペクトル Fig. 55 を見ると

Fig. 55 NMR Spectrum of 8,9-Epoxy-*p*-menthan-1-ol (CDCl_3).

以上の結果より, 次のように推定した。



8-2 *Pseudomonas aeruginosa*

抽出した転換生成物の GLC が Fig. 56 である。2 個の転換物質を得て Product I, II とした。

i) Product I

本物質の核磁気共鳴スペクトルを Fig. 57 に示す。

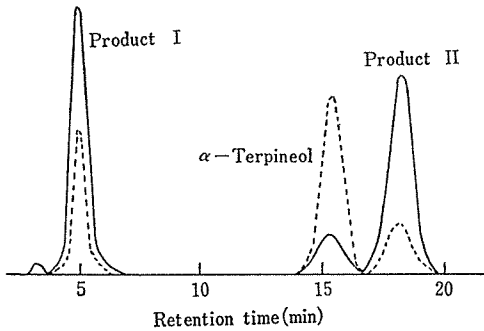


Fig. 56 Gas Liquid Chromatogram of the Metabolic Products of α -Terpineol.

Cultivation time 15hr (···), 20hr (-).

Conditions : 20% of PEG-20M ; 60~80 mesh ; 3m \times 3mm ; 185°C ; N₂-50ml/min.

Detector ; EID

δ 1.65ppm. CH₃ \times 3

δ 1.95~2.3ppm C₅, C₆ CH₂ \times 2

δ 5.35ppm. C₂ H

δ 2.72ppm. C₃ CH₂

このパターンは terpinolene の NMR スペクトルとよく致する。product I は terpinolene と推定した。

Product I の terpinolene は質量分析においても分子量を 136 と示し、よく一致した。たゞ初期に出現するが繰返して本菌を使用すると次第に減少してくる。

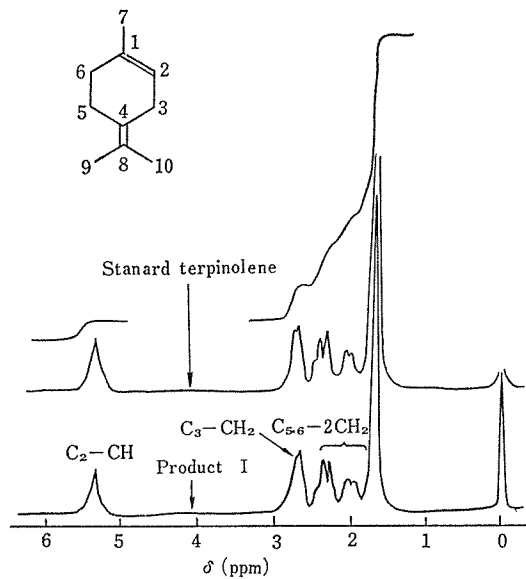


Fig. 57 NMR Spectrum of Product I (CDCl₃).

ii) Product II

Product II の TLC における R_f は 0.73, GLC の R_t も, PEG-20M では Borneol の R_f とよく一致している。又その赤外吸収スペクトル Fig. 58 もよく borneol と一致している。Product II は borneol と推定した。

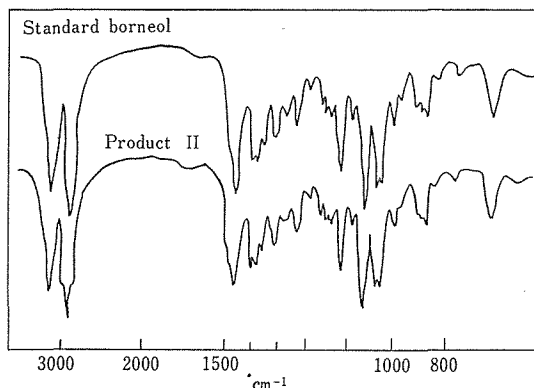
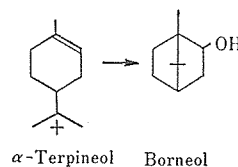


Fig.58 IR Spectrum of Product II (KBr).

Pseudomonas aeruginosa は



3) *Pseudomonas putida* 本菌は転換生成物の borneol に作用し, camphor に転換し, 以後は GUNSALUS⁸⁾ et al の経路に従って代謝した。

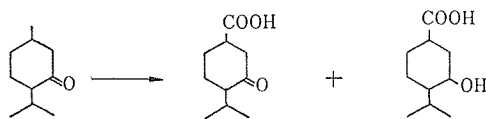
なお Terpinolene の生成は, 化学的か生物学的か, 目下検討中である。

要 約

1 単環 monoterpene を, その isopropyl 基を巻込んで, 双環にするのは, 鎖状 monoterpene を閉環する作用と共に, 興味あることである。

9 (一)-Menthone の微生物転換

Menthone, Menthol の微生物転換に関しては, 沢村, 島⁴¹⁾等が, 3-oxo-4-isopropyl-1-cyclohexane carboxylic acid, 3-hydroxy-4-isopropyl-1-cyclohexane carboxylic acid を得ている。



また本研究室にも menthol 生成の⁴⁰⁾予報を行なっているが, いずれも menthone 環の開環にまではおよんでいない。

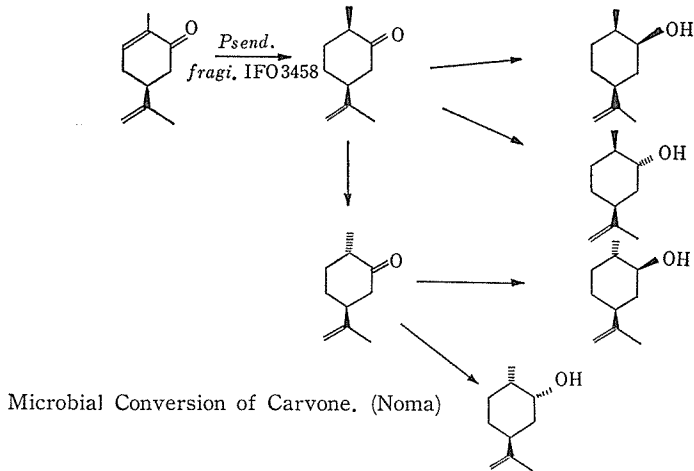
また menthone, menthol 関連物質として, Y. NOMA⁴²⁾らは, carvone の epimerisation について報告している。(次頁)

其他 menthol の dl 分割に関しては多くの検討が為されているようであるが, 転換生成物特に関環を伴う代謝経路についての文献はない。

著者らは⁴³⁾, (-)-menthone の初発酸化が C₃-C₄ 間の炭素炭素結合であり, その結果, 環の開裂を生じて, 転換生成物を生成していることを認めた。

既述の方法により, menthone 資化性微生物 *Pseudomonas putida* strain YK-2 を得た。

Menthone の抗菌力は強く, 0.1%w/v 以上では阻害作用を起こすので, 0.02~0.06%w/v



を菌体の増加に伴って添加し総計0.16%まで加えて4日間培養した。30°C, 振盪培養後転換物を抽出精製した。基本的な方法と変わらないが、再掲すると次のようである (Fig. 1)

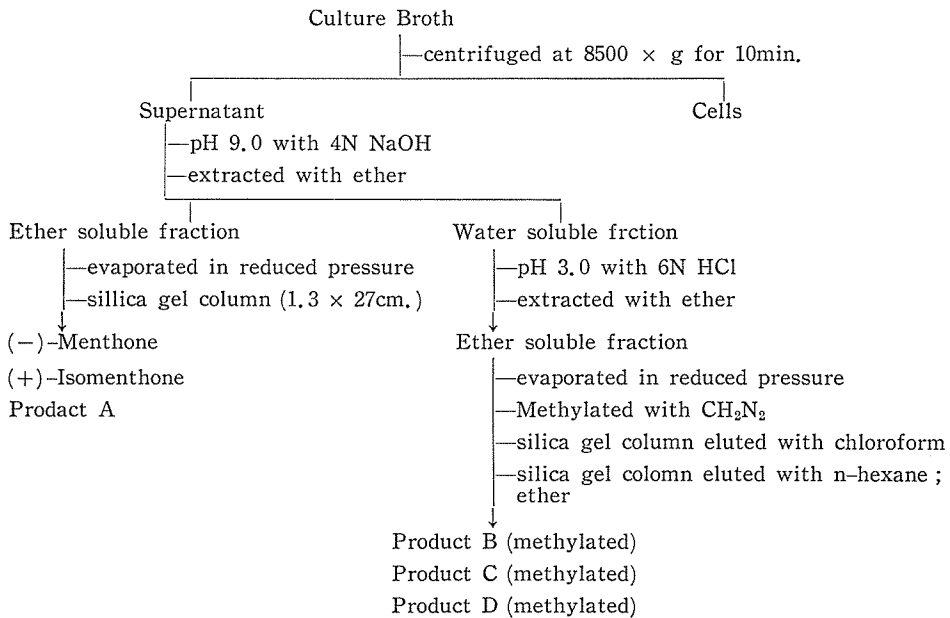


Fig. 1 Extraction and Isolation Procedure for Metabolic Products of (-)-Menthone

中性成分はそのままで、酸性成分はジアゾメタンでメチル化後に、GLC, TLC を行った。GLC は15% EGA を充填剤に用い、80~200°C の昇温式で N₂ ガスを流した。

TLC は中性部は n-hexane : ether = 15 : 1, 酸性部は 3 : 2 で展開, I₂ 又は2-4ジニトロフェニルヒドラジン塩酸溶液を用い検出した。中性部, 酸性部の各クロマトグラムを示す。

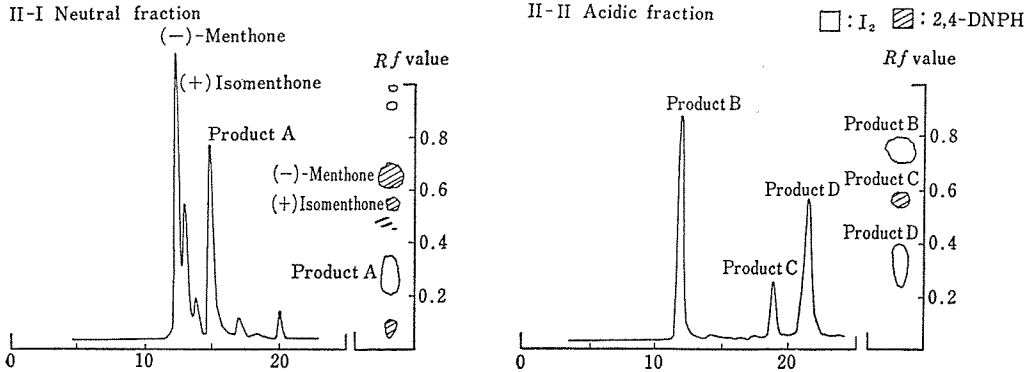


Fig. 59 GLC and TLC of the Metabolic Products from (-)-Menthone

各生成物を Product A (Rt 15.0min, Rf 0.3) Product B (Rt 12.5min, Rf 0.76) Product C (Rt 18.8min, Rf 0.58) Product D (Rt 22min, Rf 0.33) とした。Rt 12.8min, Rf 0.54 の物質は単離確認したが, (-)-menthone 由来の isomenthone であった。しかし (-)-menthone のエピメル化が微生物作用か否かは, より詳細な検討を要するので, ここではとりあげない。

前述した carvone のエピメル化⁴²⁾などの例もあるので, 微生物作用の可能性も多いとは考えている。

Product の生成量は (-)-menthone 28.8g より中性成分 1.0g, メチル化酸性成分 1.4g であった。

9-1 Product A

中性成分の主生成物で, 結晶体で mp. 49°C, $[\alpha]_D^{19}$ +44.2 (C=1.0, CHCl₃)。IR, NMR, Mass スペクトルは標品 (-)-menthol と完全に一致したので (-)-menthol と同定した。

このことより (-)-menthol 基質で本菌を培養したところ, 中性生成物として (-)-menthone, (+)-isomenthone を認めた。

Camphor, borneol の関係と似ている。

9-2 Product B

酸性生成物であるのでメチル化して検討した。メチルエステルは強い芳香ある油状物質である。

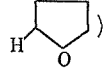
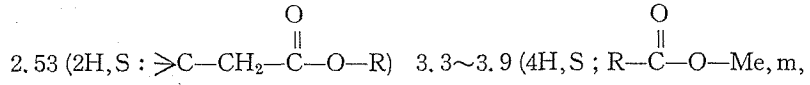
i) $[\alpha]_D^{25}$ +1 (C=0.856, CHCl₃) 2,4-DNP. に陽性

ii) IR : ν_{\max}^{film} 1735cm⁻¹...>C=O,
1750, 1370cm⁻¹... $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ > \text{CH} - \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
1110cm⁻¹...>C—O—C<

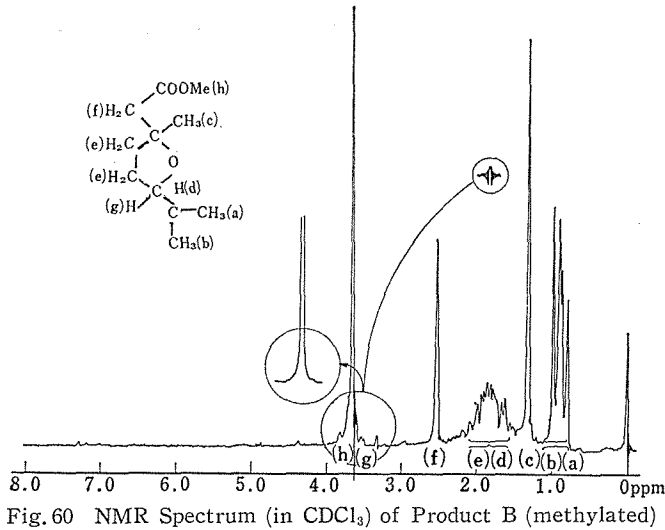
iii) Mass : m/e 200(M⁺), 169 (M⁺-CH₃O), 157 (M⁺-C₃H₇),
97 (C₆H₉O⁺), 71 (C₃H₇CO⁺), 59 (COOCH₃⁺)

iv) NMR : $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$ 0.85, 0.92 (6H, d, -CH> $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$)

1.31 (3H, s, >C-CH₃), 1.49~2.4 (5H, m, >CH, -CH₂-CH₂),



以上の結果より 3・7-dimethyl-3・6-epoxyoctanoic acid と決定した。



9-3 Product C

Product C も油状物質である。

i) $[\alpha]_D^{25} + 7.2$ ($C=0.46$, CHCl_3)

ii) IR : $\nu_{\text{max}}^{\text{Film}}$ 1710, 1725 cm^{-1} ... CH_3 (メチル化以外の CH_3 にあることを示唆)

iii) MS : m/e 200 (M^+), 169 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$), 157 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7$), 97 ($\text{C}_6\text{H}_9\text{O}^+$), 71 ($\text{C}_3\text{H}_7\text{CO}^+$), 69 (C_5H_9^+) etc.

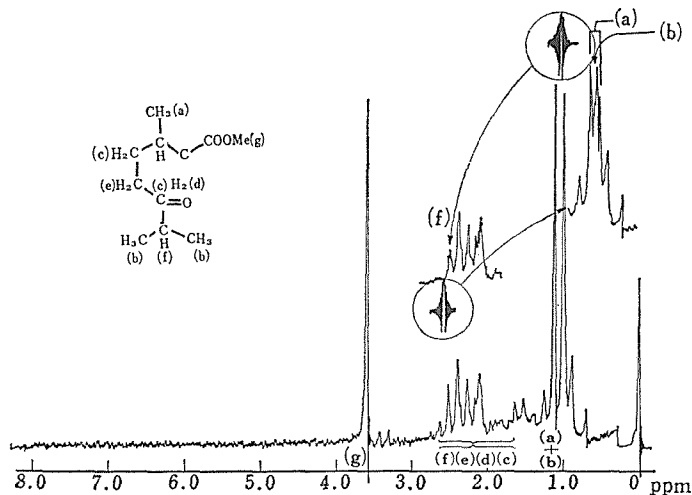
iv) NMR : $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CCl}_4}$ 1.05 (9H, d, $-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} > \text{CM}-\text{CH}_3$)

(Fig. 61)

() 1.36~2.0 (3H, m, >CH, -CH_2), 2.15 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-C(=O)-O-Me}$),

2.3~2.75 (3H, m, $-\text{CH}_2\text{-C(=O)-CH<}$), 3.59 (3H, S, $-\text{C(=O)-O-Me}$)

以上の結果より Product C は 3・7-dimethyl-6-oxo-octanoic acid と決定した

Fig.61 NMR Spectrum (in CCl_4) of Product C (methylated).

9-4 Product D

Product D も油状物質である。

i) $[\alpha]_D^{25} -6.0$ ($C=1.0, \text{CHCl}_3$)

ii) IR : $\gamma_{\text{max}}^{\text{Film}}$ $3400\text{cm}^{-1} \dots > \text{C-OH}$, $1730\text{cm}^{-1} \dots > \text{C=O}$,

$1370, 1385\text{cm}^{-1}$ ($\begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ > \text{CH}- \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$), 指紋領域は Product-C と酷似

iii) MS : m/e 171 ($M^+ - \text{CH}_3\text{O}$), 159 ($M^+ - \text{C}_3\text{H}_7$), 127 ($M^+ - \text{C}_2\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_3$), 43 etc.

分子イオンピーク, 脱水によるピーク ($M^+ - \text{H}_2\text{O}$) は認められない。本物質のトリメチルシリルベンゾエート (TMSBA) 処理による TMS 化誘導体は, 分子イオンピーク m/e 274 (M^+), 259 ($M^+ - \text{CH}_3$), 243, 231, 129 を示した。この m/e 274 から Product D (methylated) の分子

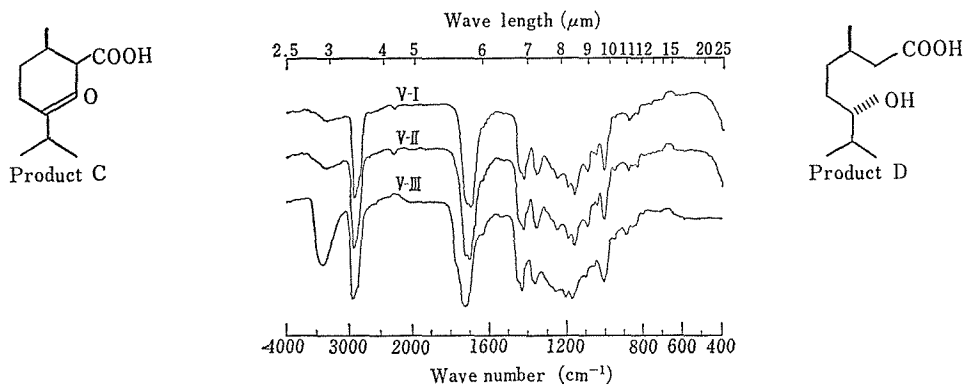


Fig. 62 Infrared Spectra of Product C, Product D, and Oxidized Product D.

V-I ; Product C (methylated), V-II ; oxidized Product D (methylated) by Johne's reagent, V-III ; Product D (methylated).

量202 (C₁₁H₂₂O₃) を推定した。

iv) NMR: $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CCl}_4}$ 0.85 (6H, d, $-\text{CH} \begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$), 0.96 (3H, d, $>\text{CH}-\text{CH}_3$),

1.2~1.98 (5H, m, $-\text{CH}_2-$, $>\text{CH}$), 2.20 (2H, t, $-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OR}$),

1.22 (1H, s, OH), 3.60 (3H, s, $\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{Me}$), 3.17 (1H, m, $>\text{CH}-\text{OH}$).

v) JOHN'S 試薬による酸化生成物と Product C のメチルエステルとの IR の比較を行な

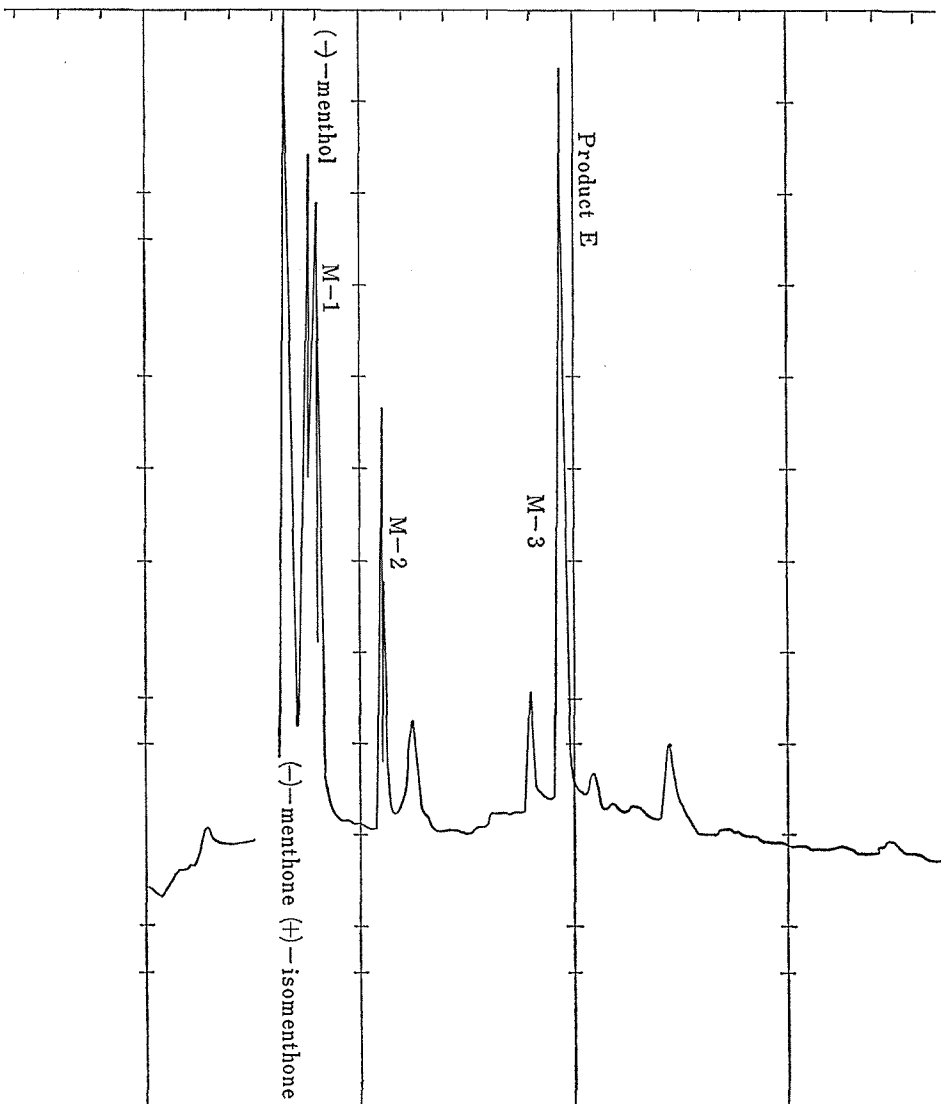


Fig. 63—A GC-Mass Chromatogram of the Neutral Product from (-)-Menthone
10% Silar 10 C, 2m×3mm, 80°C—200°C, He 30ml/min.

った。完全に一致することを認めた。Fig62

以上の結果より product D を 3,7-dimethyl-6-hydroxyoctanoic acid と決定した。

9-5 Product E

Product E は、シリカゲルカラムによる分画によっても単離し難く、分離困難であった。そこで GC-Mass によって検討した。Fig. 63, A, B は GC マスペクトルである。

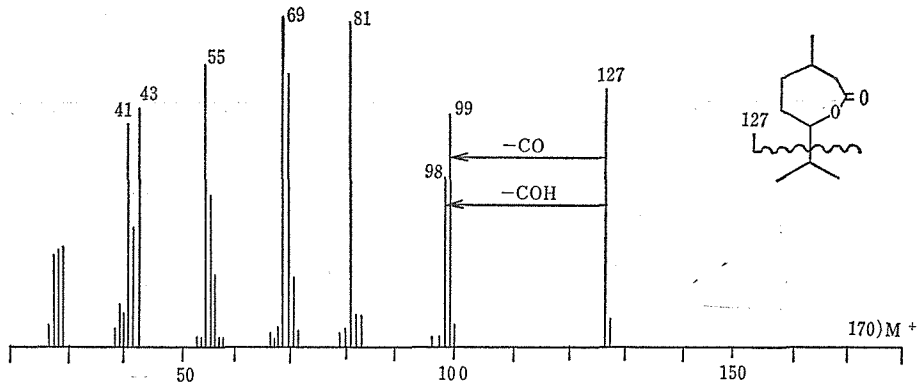


Fig. 63-B GC-Mass Spectrum of Product E.

GC-Mass : m/e 170 (M^+), 127 ($M^+ - C_3H_7$), 99 ($127 - CO$), 69 ($C_5H_9^+$),

一方において (-)-(3R : 6S)-3,7-dimethyl-6-octanolide (Xla) を合成した。すなわち m -クロロ過安息香酸 16.6g をベンゼン 100ml に溶解し、これに (-)-menthone 11.6g を一度に添加、室温にて反応させる。7日間反応後エーテルにて抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで n -hexan ether 混液の濃度を変えて、step wise に溶出精製した。収量 7.25g (収率56.6%) 本物質の性質は次のようである。

mp. $39^\circ C$, $[\alpha]_D^{29} -20.8$ ($C=1.0$, $CHCl_3$)

IR : ν_{max}^{Nujol} $1725cm^{-1} \dots >C=O$, 1365 , $1377cm^{-1} \dots \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ >CH- \\ | \\ CH_3 \end{matrix}$, $1115cm^{-1} \dots >C-O-$

NMR : $\delta_{Me_4Si}^{CCl_4}$ 0.96, 0.99, 1.04 $\dots (9H, d, -CH \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ >CH- \\ | \\ CH_3 \end{matrix}, CH-CH_3)$

1.23~2.24 (6H, m, $-CH_2-$, $\geq CH$)

2.4 (2H, t, $>CH_2 - \overset{O}{\parallel} C - O - R$)

3.9 (1H, m, $>CH - O - \overset{O}{\parallel} C - R$)

MS : m/e 170 (M^+), 127 ($M^+ - C_3H_7$), 99 ($C_6H_{11}O^+$)

81 ($M^+ - C_6H_{11}O$), 69 ($C_5H_9^+$)

合成した Octanolide と Product E とを比較した。

Rf 0.5, Rt 21.3min, は一致した, Mass スペクトルも一致するので, product E を 3,7-dimethyl-6-octanolide と同定した。

以上転換物の構造式が確認されたので, (-)-menthone の *Pseudonos putida* strain YK

2 菌による代謝経路を次のように推定した。

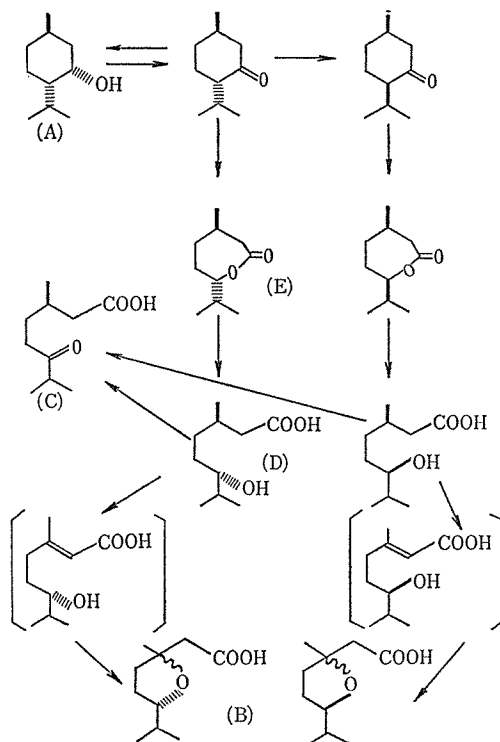


Fig. 64 Metabolic Pathways of (-)-Menthone by *Pseudomonas putida* YK-2

9-6 転換生成物の立体構造

立体構造検討のために、次の物質を合成した。

i) (-)-(3R-6R)-3·7-dimethyl-6-octanolide [XIa] (前述)

ii) (-)-(3R-6R)-3·7-dimethyl-6-octanolide [XIIa]

m-クロロ過安息香酸 28mg を benzen 3ml に溶解し、これに isomenthone (75%, $[\alpha]_D^{19.0} +53.2$) を一度に加え、ときどき攪拌しながら 7 日間室温で反応させた。Ether 抽出後カラムクロマトグラフィーを行ない、Hexane : ether = 4 : 1 にて溶出し、TLC にて分取した。

180mg より収量 43.6mg (収率 23.7%), mp 31°C,

$[\alpha]_D^{17.5} -33.6$ (C=1.0, CHCl_3)

IR : $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1725 cm^{-1} ...>C=O, 1365, 1377 cm^{-1} ...-CH< $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$, 1115 cm^{-1} ...>C-O-

NMR : $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CCl}_4}$ 0.94, 0.99, 1.02 (9H, d, -CH< $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$, >CH-CH₃),

1.50~2.20 (6H, m, -CH₂-, >CH),

2.00~2.95 (2H, m, -CH₂- $\overset{\text{O}}{\parallel}$ C-OR), 3.9 (1H, m, >CH-O- $\overset{\text{O}}{\parallel}$ C-R)

MS m/e : 170 (M⁺), 127 (M⁺-C₃H₇), 99 (C₆H₁₁O) 81 (M⁺-C₆H₁₁O), 69 (C₅H₉⁺),

iii) (-)-(3R:6S)-3,7-dimethyl-6-hydroxyoctanoic acid [XIIb] (methylated). 前記合成 (i) の (-)-(3R:6S)-3,7-dimethyl-6-hydroxyoctanolid. 3.8g を 5% 水酸化ナトリウムメタノール溶液に加え, 室温で 2.5 時間反応させた。2N 塩酸を滴下して pH6.8 に中和した。エーテル抽出し, エーテル留去後ジアゾメタンで Methyl 化した。

収量 4.2g (収率92.8%)

$[\alpha]_D^{20.0} -13.5$ (C=1.0, CHCl₃)

IR: ν_{\max}^{ilm} 3400cm⁻¹...>C—OH, 1730cm⁻¹...>C=O,

1370cm⁻¹, 1385cm⁻¹...—CH< $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$

NMR: $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CCl}_4}$ 0.89 (6H, d, —CH< $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$)

0.94 (3H, d, >CH—CH₃), 1.2~1.98 (5H, m, —CH₂, —>CH),

2.20 (2H, t, —CH₂— $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{C} \end{matrix}$ —O—R), 1.89 (1H, s, —OH),

3.63 (3H, s, R— $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{C} \end{matrix}$ —O—Me), 3.17 (1H, m, =CH—OH)

MS m/e: 202 (M⁺), 159 (M⁺—C₃H₇), 127 (M⁺—C₃H₇O²)

101 (M⁺—C₅H₉O₂), 81 (C₆H₉⁺), 55, 43 (C₃H₉⁺) 41

iv) (+)-(3R:6R)-3,7-dimethyl-6-hydroxyoctanoic acid [XIIIb]

金属ナトリウムに窒素気流中で無水メタノールを滴下してナトリウムメトキシドを作る。5%ナトリウムメトキシド溶液 0.6ml を (-)-(3R:6R)-3,7-dimethyl-6-octanolide 43.6mg に加えて, 湯浴中時間時煮沸して作用させた。

反応液を 2-N 塩酸で pH6.8 とし, 減圧下で溶媒を留去し後エーテルで抽出した。

収量 42.4mg (収率82%), $[\alpha]_D^{19.5} +17$ (C=0.74, CHCl₃)

IR: ν_{\max}^{film} 3400cm⁻¹...>C—OH, 1730cm⁻¹...>C=O,

1370, 1380cm⁻¹...—CH< $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$

NMR: $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CCl}_4}$ 0.86 (6H, d, —CH< $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$)

0.92 (3H, d, >CH—CH₃), 1.15~2.05 (5H, m, —CH₂—, >CH),

2.20 (2H, t, —CH₂— $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{C} \end{matrix}$ —O—Me)

1.65 (1H, s, >CH—OH), 3.2 (1H, m, >CH—OH)

3.59 (3H, s, R— $\begin{matrix} \text{O} \\ || \\ \text{C} \end{matrix}$ —O—Me)

MS: m/e 202 (M⁺), 159 (M⁺—C₃H₇), 127 (M⁺—C₃H₇O₂),

101 (M⁺—C₅H₉O₂), 81 (C₆H₉⁺), 55, 43 (C₃H₇⁺), 41,

v) 3,7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acid [XIII] (methylated)

3,7-dimethyl-6-hydroxyoctanoic acid (methylated) 150mg と酸化銀 250mg を 4mg の n-

pentane に溶解する。窒素気流中で攪拌しながら臭素 300mg を 5 時間で滴下する。滴下完了後も 20°C を保ちながら、さらに 2 時間攪拌を継続する。エーテル 50ml を加え生成物を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで、n-Hexane : Ether = 9 : 1 1000ml を流して分画した。収量原料 1.5g より 47mg (0.03%), $[\alpha]_D^{18.5}$ 0, (C=0.5, CHCl₃),


IR : $\gamma_{\max}^{\text{film}}$ 1735cm⁻¹...>C=O, 1350, 1370cm⁻¹...-CH< $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$

1110cm⁻¹...-C-O-C,

NMR : $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CCl}_4}$ 0.85, 0.92 (6H, d, -CH< $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$

1.31 (3H, s, >C-CH₃), 1.49~2.4 (5H, m, >CH', -CH₂)

2.53 (2H, s, >C-CH₂- $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{matrix}$ -O-Me),

3.3~3.9 (4H, s, R- $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{matrix}$ -O-Me, m, )

上記合成化合物 i)~v) を下記で表わす。

i) (-)-(3R : 6S)-3,7-dimethyl-6-octanolide = (-)-(3R : 6S)-XIa

ii) (-)-(3R : 6R)-3,7-dimethyl-6-octanolide = (-)-(3R : 6R)-XIa

iii) (-)-(3R : 6S)-3,7-dimethyl-6-hydroxy octanoic acid = (3R : 6S)-XIb

iv) (+)-(3R : 6R)-3,7-dimethyl-6-hydroxyoctanoic acid = (+)-(3R : 6R)-XIb

v) 3,7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acid = XII

次に合成系路および物理的数値をあげる。

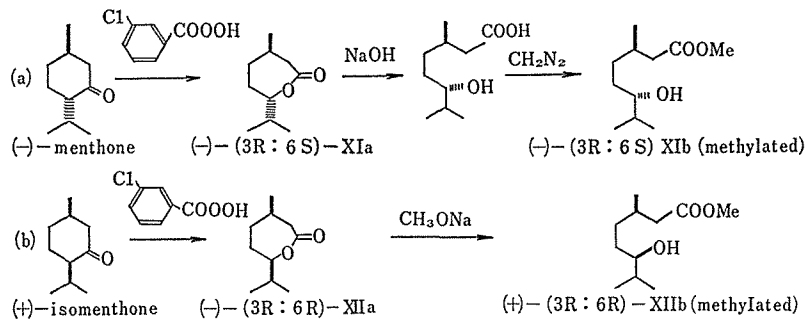


Fig. 65 Synthetic Procedure.

Table. XX. Physical Property

	$[\alpha]_D$	(c)	Rt	Rf
(-)-(3R : 6S)-XIa	-20.8	(1.0)	21.3	0.42
(-)-(3R : 6R)-XIa	-33.6	(1.0)	22.2	0.40
(-)-(3R : 6S)-XIb (methylated)	-13.5	(1.0)	23.4	0.27
(+)-(3R : 6R)-XIb (methylated)	+17	(0.74)	23.4	0.27
Product D (methylated)	-6.0	(1.0)	23.4	0.27

GLC ; 15% of EGA, 1.5m x 3mm, 80°C, -200°C, 6°C/min. N₂ 35ml/min.

TLC ; n-Hexane : Ether = 7 : 3

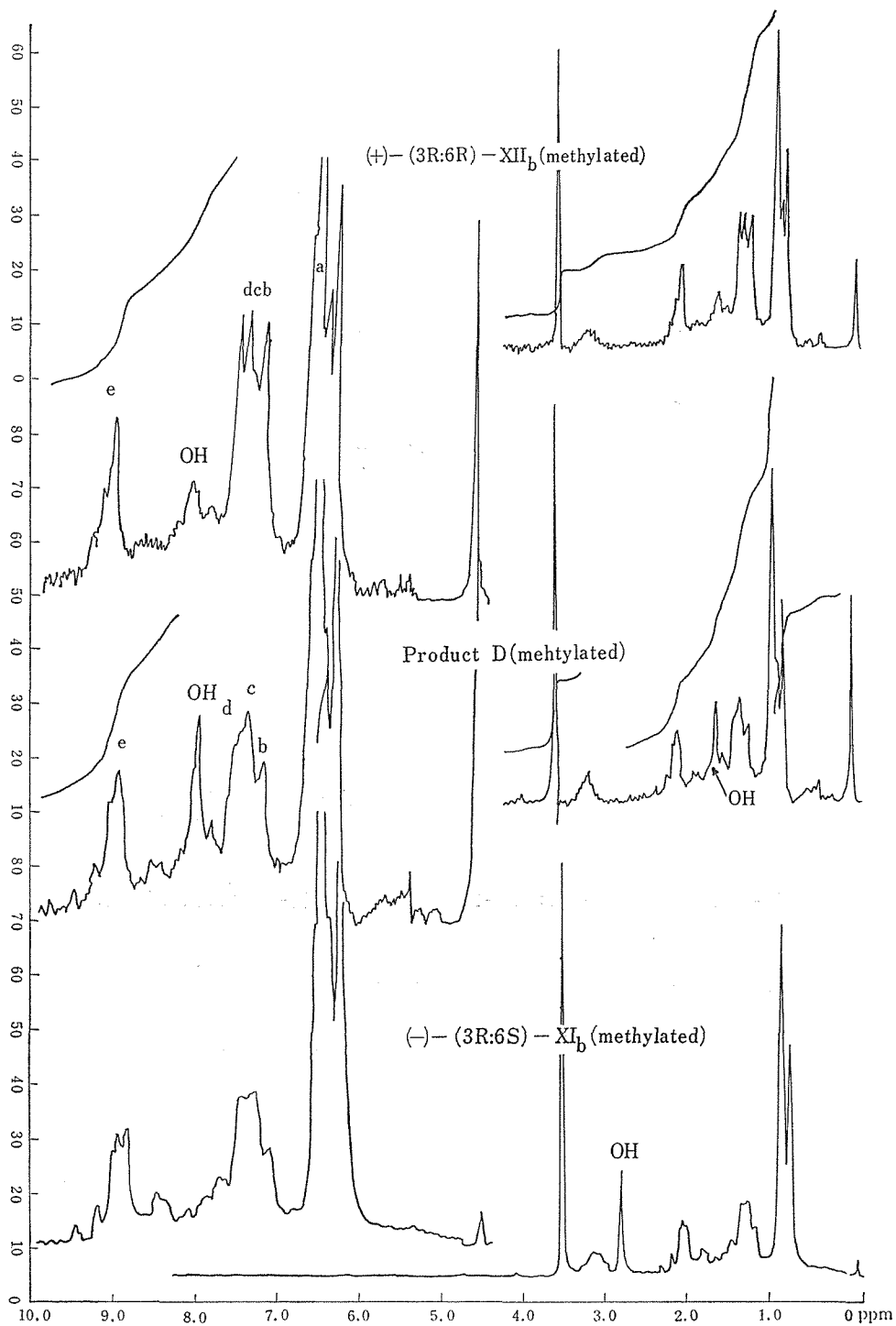


Fig.66 NMR Spectrum (in CCl_4) of $(-)-(3R:6S)$ XI_b (Methylated), $(+)-(3R:6R)$ XII_b (methylated) and Product D (methylated)

9-7 Product D の立体構造

以上合成物質のうち、(-)-(3R:6S)-XIa は前述のように Product E と一致した。本物質を水解しメチル化したものが (-)-(3R:6S)-XIb であり、これと Product D と比較した。Table XX の Rt, Rf, および IR スペクトルなどは大略に一致しておるが、たゞ旋光度のみ

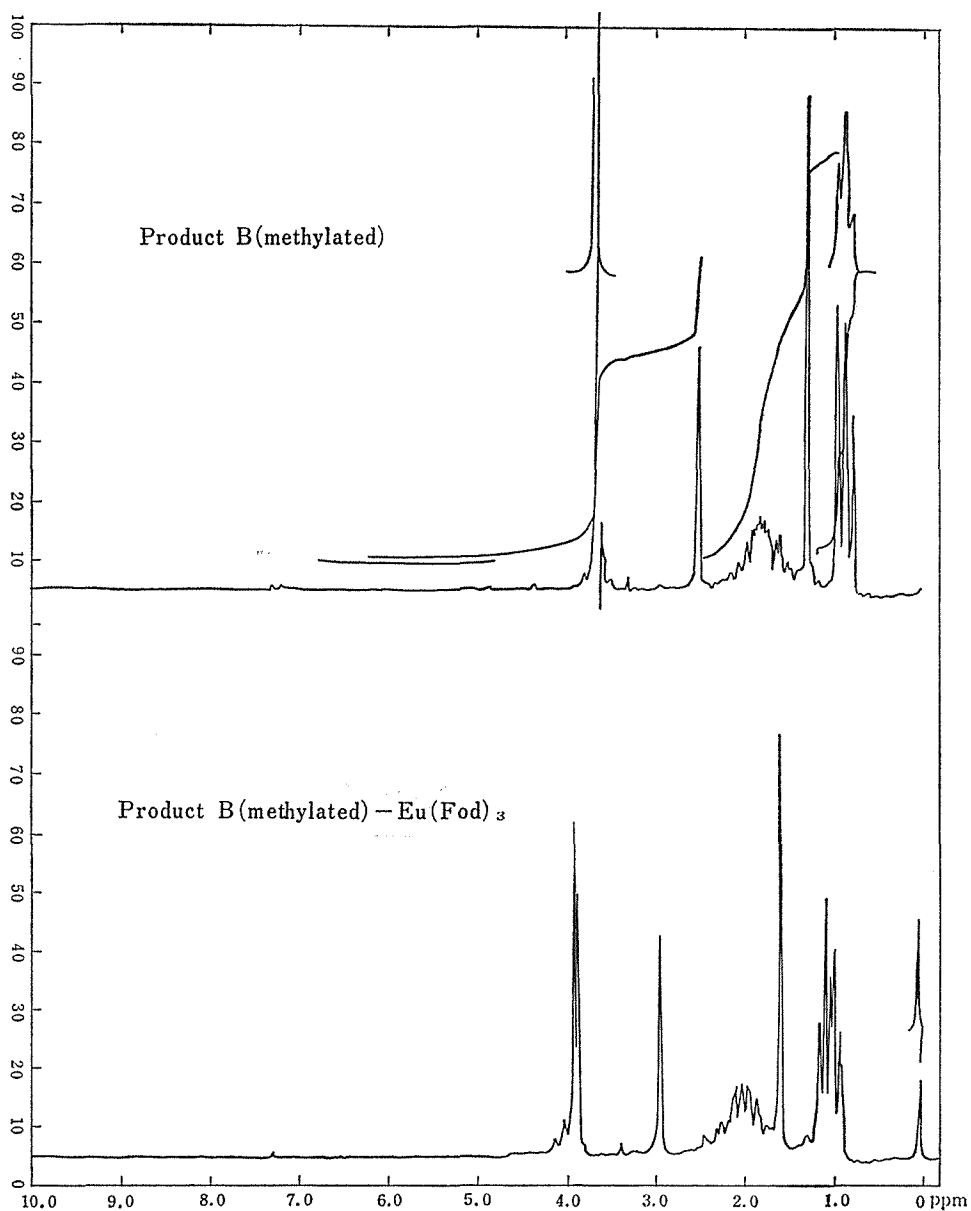


Fig. 67 NMR Spectrum (in CDCl_3) of Product B (methylated)- $\text{Eu}(\text{Fod})_3$ and Product B (methylated).

が Product D (methylated) は $[\alpha]_D^{25} -6$ であり合成 $(-)-(3R:6S)\text{-XIIb}$ (methylated) では $[\alpha]_D^{20.0} -13.6$ と異なっている。此の値は再度精製を行なっても変化せず一定値を示した。又NMRスペクトルも (Fig. 66) も大略は一致しておるが δ 0.95 (d, $\text{CH}_3\text{-CH}<$) 附近の分裂形, ならびに δ 値にも僅かながら差異が認められる。これは Product D (methylated) に分離精製過程において分画できなかったもの, 特にジアステレオマーの存在を推定した。

そこで Fig. 65 の合成経路の (b) より得られた, $(\pm)\text{-isomenthone}$ 由来の $(+)\text{-}(3R:6R)\text{-XIIb}$ と比較した。

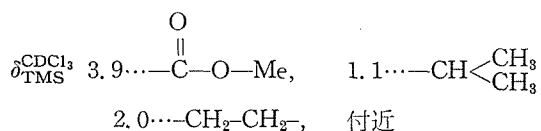
$(+)\text{-}(3R:6R)\text{-XIIb}$, $(-)-(3R:6S)\text{-XIIb}$, Product D (いずれも methylated) の三物質は Rt, Rf は一致しており, Fig. 66 の NMR の比較は product D (methylated) のシグナルに $(+)\text{-}(3R:6R)\text{-XIIb}$ のシグナルが混在していることを示している。すなわち, $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$ 0.95 (d, $>\text{CH-}$

$\text{CH}_3\cdots$ (a)) の分裂形, 1.3 (m, $-\text{CH}_2-$, (b), (c), (d),) 附近, 2.1 ($\text{C-CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C-Me}}$ (e)), などのシグナルの変化に見られる。


以上の事実より, Product D (methylated) は, $(-)-(3R:6S)\text{-XIIb}$ (methylated) に $(+)\text{-}(3R:6R)\text{-XIIb}$ (methylated) が混在していて, 旋光度からの計算では $(+)\text{-}(3R:6R)\text{-XIIb}$ が約23%程度含まれていると推定した。

9-8 Product B

先きに構造決定をした Product B : 3,7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acid (methylated) は GLC, TLC においても単一物質のごとく測定された。しかし Fig. 67 の NMR 測定において, シフト試薬 ($\text{Eu}(\text{Fod})_3$) を添加すると明らかにシグナルにズレが見られる。



などは顕著にあらわれている。これは Product B がジアステレオマーの混合体を示してい

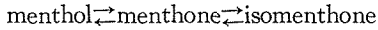
て, 2つの物質の立体的な相異により $\text{Eu}(\text{Fod})_3$ が , または $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C-O-Me}}$ への影響の異なるために生じたものと推定できる。

両物質が如何なる立体配置をしているかについては尚検討を要するが, $(-)-(3R:6S)\text{-XIIa}$, $(+)\text{-}(3R:6R)\text{-XIIb}$ の生成, またわ生体反応の立体特異性を考慮して, Product B は $(3R:6S)\text{-3,7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acid}$ [XIIa] と $(3R:6R)\text{-3,7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acid}$ [XIIb] の混合体であると推定した。

要 約

- 1) Menthone 転換微生物として *Pseudomonas putida* strain YK-2 菌を土壌より分離した。
- 2) 本菌によると menthone より, 次の物質が転換生成される。
 1. menthol,
 2. isomenthone,

3. 3·7-dimethyl-3·6-epoxy octanoic acid,
 4. 3·7-dimethyl-6-oxo octanoic acid,
 5. 3·7-dimethyl-6-hydroxy octanoic acid.
- 3) 以上のうち menthol, menthone, isomenthone は可逆的に生成される。



isomenthone の生成は、酵素的な作用か否かについては、検討を要する点が残っている。(目下検討中である)。野間⁴²⁾らの carvone に於ては epimerase の存在が認められており、menthone の場合も可能性は認められている。

4) 多くの単環 monoterpene の初発酸化は、BHATTACHARYYA¹⁰⁾らによると、側鎖に始まるものが多い、島、沢村⁴¹⁾らの報告も menthone の側鎖 methyl 基の酸化である。本研究での初発酸化は、転換生成物より検討すると、C₃-C₄ 間の炭素結合の開裂を示すことが認められた。

5) 開環後、再び 3·7-dimethyl-3·6-epoxy octanoic acid の生成による閉環現象は、その機構に興味をもたれる。

6) 転換生成物の立体構造を検討すると、ジアステレオマーの混在していることが認められた。これは、menthone の isomer の isomenthone 由来の化合物が混在するためと推定される。したがって、strain YK-2 は menthone と同様に、isomenthone も全く同様な機構

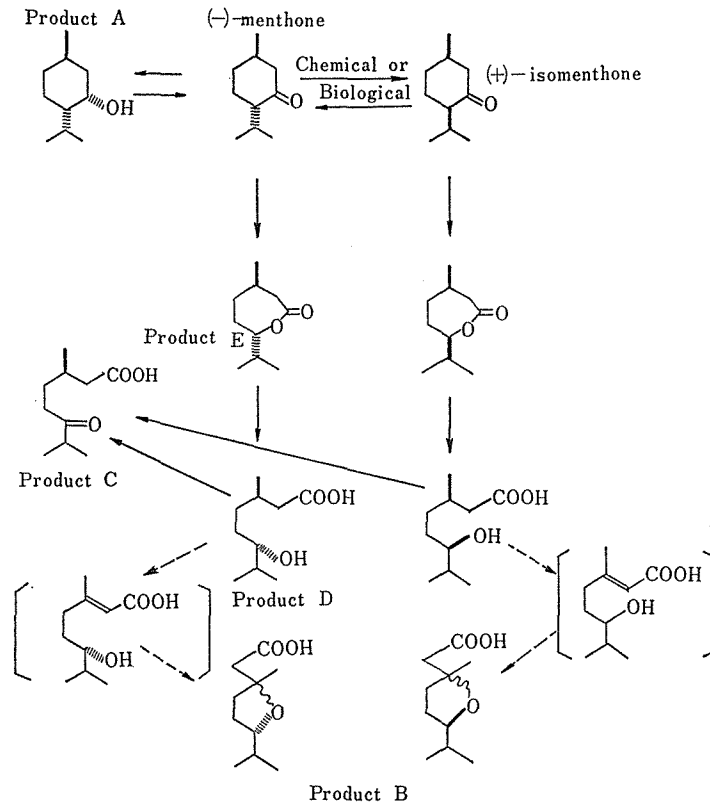


Fig.68 Proposed Metabolic Pathways of (-)-Menthone by *Pseudomonas Putida* strain YK-2

で転換していると推定できる。これは Gunsalus⁸⁾ らが camphor の微生物転換の際に認めていることとよく似ておる。

7) 7員環ラクトン, 3,7-dimethyl-6-octanolide の生成が確認されたことは, 本物質が menthone 開環の Key compound と推定されると共に, C₃-C₄ 間への酸素の添加反応, すなわち生体内において, Baeyer-Villiger 反応相似の反応が行なわれていることが推定された。

(-)-menthone の推定代謝経路を Fig. 68 に示す。

IV 総 括

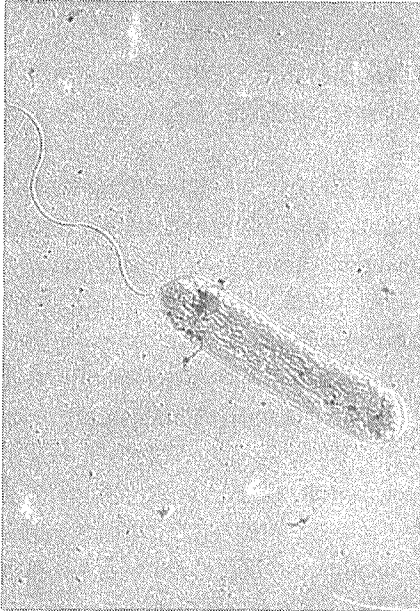
Terpene 類の微生物転換に関する研究を行なった。まず基本的問題を解明するために, 対象 Terpene を一連の Acyclic, Cyclic mono terpene より選んだ。次に転換微生物も, 研究実施上, 取扱い法・生成物質の抽出などおよび分解酵素の誘導などを考慮して, 主として細菌, その中でも *Pseudomonas* 系に目標をおいて, 検索分離して同定した。対応する monoterpene に対して, 次のような菌株を得た。(2, 3 の鞭毛染色写真を Fig. 68 に示す)

1 Citronellal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain CDB ₂ -3b
2 Citral	<i>Pseudomonas convexa</i> strain Le-X
3 Geraniol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain GM ₂
4 Linalool	<i>Pseudomonas pseudomallei</i> strain A
5 Perillyl aldehyde	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6 Camphor	<i>Pseudomonas riboflavina</i> strain C
7 Borneol	<i>Pseudomonas pseudomallei</i> strain H
8 α-Terpineol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain EB-3104 <i>pseudomallei</i> <i>putida</i> strain T
9 (-)-Menthone	<i>Pseudomonas putida</i> strain YK-2

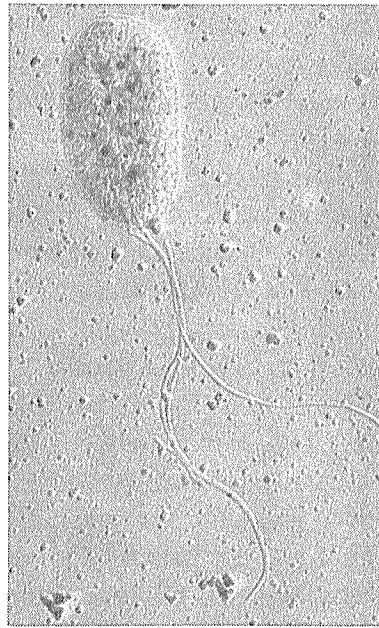
これら転換微生物のもつ terpene 転換酵素系は, いずれも誘導酵素であった。前培養を肉汁培地など栄養培地で行なうと, 酵素系は失活して作用をしなかった。

また時に原因不明の失活をすることもあった。したがって, 活性維持には十分な注意を要した。保存には terpene 含有液体培地による振とう培養と土壤浸出液20%を含む肉汁寒天斜面培養とを交互に行なうことにより好結果を得た。この方法を継続することにより酵素の誘導は進み, 活性も次第に増大した。Camphor 転換菌 *Pseudomonas riboflavina* strain C においては, 1ケ年の保存で, 転換生成物が時間的には半減し, 量的には倍増した例がある。ただし, 酵素誘導が進み, 転換速度が速やかとなるために, 中間生産物を認め難くなる場合も起るので注意を要した。

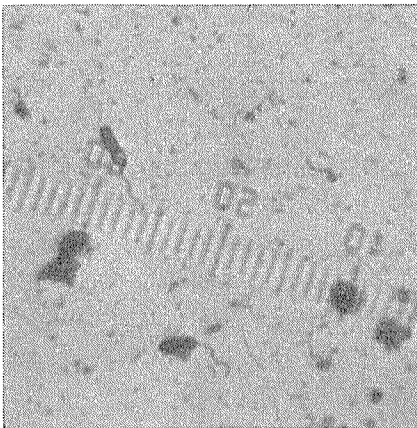
Acyclic monoterpene の微生物転換は, isoalkene の微生物転換と同様な性質を示した。すなわち terminal の飽和炭素を attack して, RCH₂OH, RCHO, RCOOH の順に酸化されるのが主経路と推定される。細菌による転換では, 酵母に見られる不飽和結合への attack は行なわれず, 枝分れした第三級炭素, また第四級炭素の転換も行ない得ない。生成酸は更に β-oxidation 形式で速やかに代謝されるのが常であった。ただ citral の場合のように, 例外的



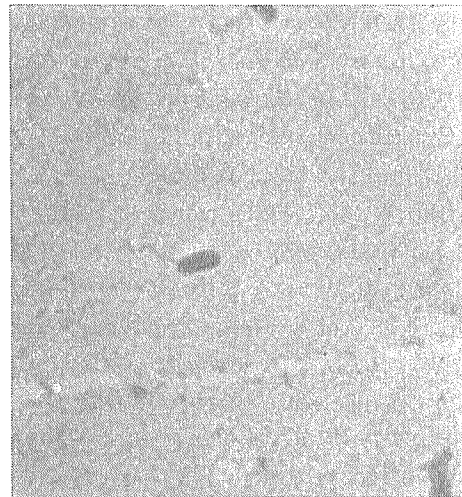
Pseudomonas convexa
strain LeX
(×5000)



Pseudomonas aeruginosa
Strain CDB-3b
(×6000)



Pseudomonas aeruginosa
strainr GM
(×2000)



Pseudomonas pseudomallei
strain H
(×2000)

Fig. 69 Pollar Elagella of Pseudomonade.

に、逐次適応酵素の誘導が遅れるのか、または転換条件の変化によるのか、geranic acid の蓄積が認められる場合もあった。

転換微生物の基質特異性、不飽和結合による cis, trans 特異性は、相当に明瞭にあらわれ、一般に trans 型の方が転換が容易であった。特にアリル位に不飽和結合をもつものは転換し難いようであった。

転換作用も特殊の場合を除いて、酵母のような還元作用はなく、一般に酸化的作用である。

Acyclic monoterpene の微生物作用による閉環現象は、興味ある作用であるが、比較的に研究は少ない。BABICKA¹⁸⁾らの、citronellal より menthol への閉環が、*Penicillium digitatum Sacardo var italica* により行なわれている。A. CIEGLAR⁵¹⁾が、より高級な tetra-terpene 類を含んで、閉環の例をあげている。著者らの linalool より camphor への環化などは興味ある例であろう。また代謝中間物であるが、linalool 代謝経路中の 4-methyl-4-vinyl butyrolactone などは、ラクトン化の環化であり、同じ代謝中間物の menthone より 3-7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acid の環化とは異なっている。

著者らが、citronellal 転換の際に見出した、pulegol, isopulegol などは、微生物による生化学的作用と推定するよりは、むしろ培地の酸性化などによる二次的な化学的閉環であると推定した。しかし上述 BABICKA らは citronellal より menthol への環化において、これら pulegol, isopulegol を中間体と推定している。はなはだ興味をもたれる所である。

α -Terpineol に関しては、BHATTACHARYYA¹⁰⁾らが *Brevibacterium* strain TH-4 により cis-terpinhydrate より α -terpineol を、同様に *Aspergillus niger* NCIM612 が limonene より α -terpineol を生成するとしておる。

しかし α -terpineol 自体の転換についての報告はない。

著者らは、*Pseudomonas aeruginosa* により、 α -terpineol の isopropyl 基を環内に巻きこんで、borneol に転換されることを見いだした。単環 terpene が双環 terpene に転換した生合成機構で、新発見と考えられる。

Cyclic monoterpene の微生物転換は、大別して2作用形式がある。(1)は側鎖のみの転換で、(2)は開環を伴う転換形式である。

(1)の例は多く、cyclic monoterpene 微生物転換の大部分の研究がこの部類に属している。Monoterpene であるから、その側鎖は比較的に簡単であるが、転換としては相当広い作用形式をもっている。SHIMA⁴¹⁾らの (-)-menthone の 3-hydroxy-4-isopropyl-cyclohexane carboxylic acid への転換、著者らの α -terpineol より 8,9-epoxy-p-menthane-1-ol の生成などより、NOMA らの carvone のエピメル化などの立体配置の転換あるいは、著者らの eugenol より ferulic acid 生成などに見る側鎖の不飽和結合の移動などである。(ただし eugenol の転換は、その成因が生化学的作用か否かの検討中で未発表である)

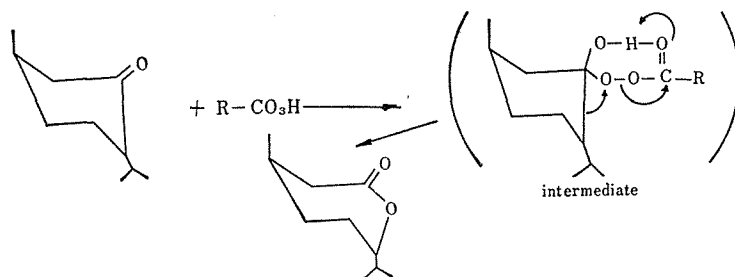
(2)の開環を伴う例は、比較的に少数で限定されてくる。GUNSALUS らの camphor, DHA-VLIKAR らの limonene の転換などが主なものであろう。

したがって、著者らの行なった、borneol, camphor や特に menthol, menthone は cyclohexane の形、すなわち飽和の cyclic monoterpene の開環であり、最初のものであろう。

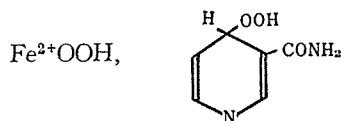
開環における key compound, すなわち開環直前の物質と推定されるもの GUNSALUS らの camphor においては campholide, 著者らの menthone においては octanolide などは、いづ

れも C—C 間に直接酸素原子が導入された形であり、いわゆる生体内の Baeyer-VILLIGER 型の酸化反応によって生成された物質である。これらの開環反応が Baeyer-VILLIGER 型の酸化によることは、はなはだ興味あることである。これらの作用を触媒する酵素が HAYASHI¹²⁾ らの monooxygenase であり、MASON⁴⁵⁾ らの mixed function oxidase と解釈できる。MEINWAID, WETTSTEIN⁴⁶⁾ は、Baeyer-VILLIGER 反応を次のように説明している。

過酸がカルボニル炭素を attack して、中間体 (intermediate) を経て次のように生成される。



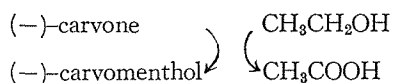
生体内においては、過酸に対応するものとして、2価の鉄と酸素、あるいはニコチンアミドと酸素などの錯体が推定される⁵²⁾。



生体内の酸化は長年にわたり、加水されて脱水素される酵素 (dehydrogenase) による酸化で、oxidase が主体であるとされていたが、oxygenase の発見 (1965) により酸素の直接添加による酸化もあることが認められ、この酸化で未解決の多くの現象が解明されてきた。天然界の高分子物質類、たとえば lignine の分解、あるいは公害物質特に hydrocarbone 系物質の分解などに oxygenase 系は大いに重要なものとなるであろう。

Menthone より menthol への還元は、細菌の代謝系としては興味あり、また検討を要する問題である。

Noma⁴²⁾らは、*Pseudomonas putida* により、(-)-carvone より (-)-carvomenthol を、かなりの高収量で得ている。生成機作として次のように説明している。すなわち培養時にエネルギー源として ethanol を使用して細菌を生育繁殖させ、その co-metabolism により carvone の還元が行なわれたとしている。



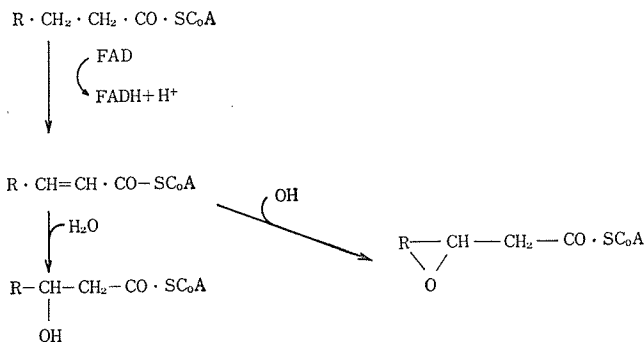
これと類似反応として cyclohexanone の ketone 基の還元を GRAVES,⁴⁷⁾ PRELOG⁴⁸⁾が行なっている。

Menthone の場合には、エネルギー源としては他物質の添加はない。(-)-menthol ⇌ (-)-

menthoneと(+)-isomenthoneの可逆的な反応が見られることより, menthoneの主代謝経路としては, (-)-menthoneの酸化的開環へ進む経路であることが推定できる。したがって(-)-menthoneが酸化されることによる co-metabolism によって(-)-mentholが生成される, すなわち生成された(-)-mentholは(-)-menthone代謝の副産物であらうと推定している。

(-)-menthoneの酸化経路上に生成される 3,7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acidの環化については, 3,7-dimethyl-6-hydroxyoctanoic acidからラジカル的に酸化されて生成し得ることは, 合成的な方法では可能であった。しかし生体内で, 生化学反応としては, いまだ疑問が残る。生化学反応としては, むしろ次のように推定するのが妥当ではなからうか。

すなわち, 開環後の脂肪酸は, β -oxidationにより代謝されるのが一般的である。したがって, その際に生成する α - β -不飽和酸は加水さたてオキシ酸となるのが普通の経路である。この際に水の代わりに水酸基が導入され, 環化されて epoxide が生成された。すなわち次の様式で



環状エーテルが生成したと推定した。

Benzenの *Pseudomonas* sp. による代謝の際に, 開環後再びラクトン化による環化の例⁴⁹⁾は多いが, このような, エーテル結合による環化の例は知られていない。生成物 3,7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acid は新化合物であり, 生成機作にも興味もたれる。

Menthoneの転換生成物 3,7-dimethyl-6-hydroxyoctanoic acid は (-)-(3R:6S), (+)-(3R:6R)-3,7-dimethyl-6-hydroxyoctanoic acidの混在する物質であり, 同様に 3,7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acid もまた (3R:6S), (3R:6R)-3,7-dimethyl-3,6-epoxyoctanoic acidのジアステレオマーの混合体であった。

これらの物質は, いづれもラクトンの開環を経て生成されたものであり, そのラクトンは生体内における Baeyer-VILLIGER 型反応によって生成されたものである。

Baeyer-VILLIGER 反応では, C_4 炭素のラセミ化は起こらないから, したがってジアステレオマーの各物質はその基源を, 最初の基質 (-)-menthone とそのエピメリ化により生成した (+)-isomenthone に由来したものであると推定される。

すなわち, *Pseudomonas putida* strain YK-2 は, (-)-menthone と (+)-isomenthone を全く同様な分解様式で酸化分解していることを示している。

元来 *Pseudomonas* sp. は種々の有機化合物の分解能⁵³⁾を有していると云はれているが,

この(-)-menthone 転換においても、(-)-menthone と (+)-isomenthone の相異、すなわちイソプロピル基の立体配置に関係なく分解している。

単独酵素の作用かあるいは特異的な複数の酵素作用であるのか、興味をもたれる。

以上限られた monoterpene 類の微生物転換の研究であるが、若干の新代謝生産物、興味ある作用機作などを見いだすことができた。

Terpene 類の微生物転換としては、第1歩を踏みだしたばかりで、将来の研究に俟つ所大である。

本報文が、将来この道に進まれる方たちに、あるいは、特に微生物と有機合成化学との連携上において、参考となり、刺戟となり、または多小のヒントを与へることとなるならば、著者のもっとも幸とするところである。

Reference

- 1) L. Pasteur, ; Acad. Sci., **45**, 913 (1857), Ann. Chim., Phys. **58**, 325 (1860), Ann. Sci. Nat. **16**, 5 (1861)
- 2) M. Miyoshi, ; *Johr. b. Wiss. Betan.* **28**, 165 (1895)
- 3) K. Kieslich, ; *Microbial Transformation of Non-Steroid Cyclic Compounds*, John Wiley & Sons (1976)
- 4) S. Kodama, Tohoku Univ. **34**, 751 (1913)
- 5) K. Neuberg, ; *Biochem. Z.*, **92** (1918)
- 6) E. Morinari, ; *Biochem. Z.* **216**, 187 (1929)
- 7) C. Neuberg, ; *Biochem. Biophys. Acta.* **4**, 170 (1950)
- 8) I. C. Gunsalus et al, ; *Federation Proc.* **20**, 48 (1961), *Bacteriol. Proc.* **183**, 666 (1961), *ibid.* **108**, 31 (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 924 (1965), *ibid.* **240**, 4038 (1965), *Bacteriol. proc.* **86**, 98 (1966), *Arch. Mikrobiol.* **59**, 113 (1967)
- 9) W. Seubert, ; *J. Bacteriol.*, **79**, 426 (1960)
- 10) S. C. Bhattacharyya et al, ; *J. Ind. Chem. Soc.*, **29**, 261 (1944), *Nature*, **187**, 689 (1960), *Appl. Microbiol.* **10**, 524 (1962), *ibid.* **10**, 529 (1960), *Ind. J. Biochem.*, **2**, 137 (1965), *ibid.* **5**, 1, 92 (1968)
- 11) K. Goto, ; *Bull. Obihiro Univ.*, **4**, 351 (1965)
- 12) O. Hayaishi, K. Block, ; *Biochem. & Chem. Aspect.* (Maruzen, Tokyo) (1966)
- 13) P. Meyer, C. Neuberg, ; *Biochem. Z.*, **71**, 174 (1915)
- 14) E. Morinari, ; *Biochem. Z.*, **216**, 187 (1929)
- 15) Takasago Perfumary, Japan Pat. 7316191 (1970)
- 16) W. Seubert, ; *J. Bacteriol.* **79**, 426 (1960)
- 17) S. S. Joglekar, R. S. Dhavlikar, *Current Sci. India*, **37**, 493 (1968) *Appl. Microbiol.*, **18**, 1084 (1969)
- 18) J. Babicka, J. Volf, J. Lebeda, ; *Czech. Rep. Acad. Sci.* **84320** 1952, *C. A.* **50**, 96866 (1956)
- 19) T. Hayashi, H. Takashiba, ; *Nippon Nogeikagaku.* **41**, 247 (1967)
- 20) E. Sernagiotto, *Atti. R. Acad. Rinsei*, **24**, 850 (1915)
- 21) M. T. Bogert, T. Hasselstrom, ; *J. Ameri. Chem. Sci.* ; **52**, 4093 (1930)
- 22) T. Babier, ; *Compt. Rend.*, ; **124**, 1308 (1897)

- 23) H. J. Prins, ; Chem. Weckblad, 14, 627 (1916)
- 24) A. C. Von der Linden, ; Advan. in Enzymol. **27**, 469 (1965)
- 25) O. Warburg, W. Christian, ; Biochem. Z., **310**, 384 (1941)
- 26) D. M. Webley, P. C. Dekock, ; Biochem. J., **51**, 371 (1952)
- 27) T. Hayashi, H. Takashiba, ; Nippon Nogeikagaku. **41**, 254 (1967)
- 28) T. Hayashi, H. Takashiba, ; Nippon Nogeikagaku. **42**, 190 (1968)
- 29) S. Shima, C. Tatsumi, ; J. Ferm. Tech., 53, 459 (1975)
- 30) S. Mizutani, T. Hayashi, ; Nippon Nogeikagaku. **45**, 368 (1971)
- 31) V. Grignard, ; Compt. Rend. **130**, 1322 (1900)
- 32) H. Kayahara, T. Hayashi. ; J. Ferm. Tech. Japan, **51**, 354 (1973)
- 33) T. Hayashi, M. Sakai, ; Nippon Nogeikagaku. **42**, 670 (1968)
- 34) T. Hayashi, T. Kakimoto, ; Nippon Nogeikagaku. **43**, 583 (1969) ibd. 44, 407 (1907)
- 35) E. Asahina, M. Ishidachi, ; Tennenbutsu Kagaku, 263 (1965) Hirokawa & Co. Tokyo
- 36) K. Miyake, ; Proc. Imp. Acad. Tokyo **11**, 106 (1935)
- 37) R. R. Sauer, ; J. Ameri. Chem. Soc., **81**, 925 (1959)
- 38) K. Tadasa, S. Fukazawa, M. Kunimatsu, T. Hayashi. ; Agr. Biol. Chem. 40, 1069 (1976)
- 39) T. Hayashi, S. Uedono, C. Tatsumi, ; Agr. Biol. Chem., **36** 690 (1972)
- 40) T. Hayashi, H. Kayahara, ; 16th TEAC Meeting 18p (1974)
- 41) S. Sawamura, S. Shima, H. Sakai, C. Tatsumi, ; 18th TEAC Meeting, 27p (1976)
- 42) Y. Noma, S. Nonomura, H. Sakai, ; Agr. Biol. Chem., **39**, 1637 (1974)
- 43) S. Nakajima, R. Irie, T. Hayashi, ; Nippon Nogeikagaku. **50**, 403
- 44) N. Yonezawa, S. Matsubayashi, T. Hayashi, ; (1976) Unpublishd.
- 45) H. S. Mason, ; Adv. in Enzymology, **19**, 79 (1957)
- 46) J. Meinwald, A. Wettstein, ; Experimentia, **9**, 371 (1953)
- 47) J. M. H. Graves, A. Clark, H. J. Ringol, ; Biochem. **4**, 2655 (1965)
- 48) V. Prelog, ; Chem. Nat. Prod. **3** 119 (1964)
- 49) K. Higuchi, O. Hayaishi, ; Arch. Biochem. Biophys., **120**, 243 (1967)
- 50) C. Pascual, ; Helv. Chem. Acta., **49**, 164 (1966)
- 51) A. Ciegler, ; Advan. Appl. Microbiol., **7**, 1 (1965)
- 52) D. C. Dittmer, R. A. Fourty, J. R. Potski, ; Chem. Ind. 152, (1964)
- 53) R. Y. Stanier, N. J. Pareroni, M. Doudoroff, ; J. Gen. Microbiol., **43**, 159 (1955)

Microbiological Conversion of Terpenes

By Tetsugo HAYASHI

Laboratory of Applied Microbiological Chemistry, Fac. Agric., Shinshu Univ.

Summary

Terpenoids are omnipresent groups of substances occurring in the microbial, plant and animal kingdom. Structures of all these compounds are based on the linking together of C₅, biological isoprenoid units.

The terpenes are important compounds for these reaction ability and stereochemical structures to the synthetic chemistry.

Among the studies of the microbiological conversion of hydrocarbons, the studies of terpenes are very behind from the other compounds such as aliphatic, aromatic hydrocarbons and steroids.

Most reserches, for their distinct and economical reason, devoted to the conversion of terpenoids have been concentrated on the steroids.

There has been comparatively little effort devoted to conversion of the nonsteroid terpenes.

We studied a series of microbiological conversion of terpenes from the viewpoints of their new metabolites, potential application and reaction mechanism, and attempted a detailed study of each step involving in the hope that these might throw light on the association of the synthetic and microbiological chemistry.

In order to test also generality of the microbiological conversion of terpenes, we chose various monoterpenes, namely, acyclic monoterpenes such as citronellal, citral, geraniol, linalool, and bicyclic monoterpenes such as camphor, borneol, and cyclic monoterpenes such as α -terpineol, menthone.

As the results we isolated several new bacteria for each terpenes and found a number of new metabolites and interesting reactions.

These conversions involve oxidation of alcohol or aldehyde, oxidation of methylene group of carbonyl, oxygenation of Baeyer-Villiger type reaction in the cell, and subsequent ring fission and stereochemical transitions.

In our limited studies it has shown that there is need for additional investigation dealing with both the microbiological conversion of biologically active terpenoids and the mechanisms involved in these conversion.

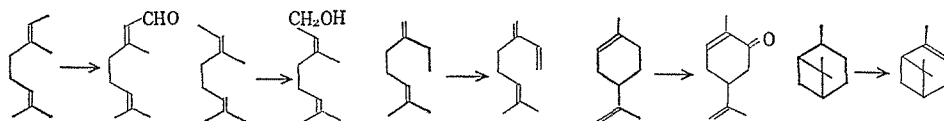
It is hoped that it will stimulate interest in incorporating microbial reactions into the field of chemical synthesis.

正 誤 表

都合により校正不十分でしたので、 下記の正誤表を作製しました。
御参照の上御訂正下されたく御願ひ申し上げます。(原文の誤→正)

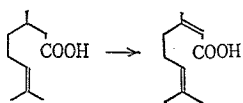
- P. 241) 9 Hydrocarbone→Hydrocarbon ; 11 hydrocarbone→hydrocarbon ;
12 Micro organism→Micro organism ; 21 peniciline→penicilline ;
杭生物質→抗生物質
- P. 242) 12 桔杭→拮抗 15 hydrocarbone→hydrocarbon ; 18 hydrocarbone→
hydrocarbon ; 20 hydrocarbone→hydrocarbon ; 22 hydrocarbone→
hydrocarbon ; 25 hydrocarbone→hydrocarbon ; 38 butadien→butadiene
- P. 243) 3 benzen→benzene ; 8 杭生物質→抗生物質 9 hydrocarbone→
hydrocarbon ; 17 杭菌黴性→抗菌黴性

図の中



- P. 244) 12 precuser→precursor ;
- P. 245) 14 hydrocarbone→hydrocarbon ; 25 hydrocarbone→hydrocarbon ;
28 hydrocarbone→hydrocarbon ;
- P. 246) 12, 13, 17及び32 hydrocarbone→hydrocarbon ; 34 杭菌杭黴→抗菌抗黴
- P. 247) Fig. 1. 6 Ether solubl→Ether soluble
- P. 251) Table II, 5 Theretical→Theoretical
- P. 252) Fig. 9, 3 3380icm⁻¹→3380 cm⁻¹
- P. 253) Fig. 9. $\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{matrix} \text{C-OH} \quad \begin{matrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \end{matrix} \text{C-OH}$
- 2 $\left. \begin{matrix} 1160, 1145 \text{ cm}^{-1} \dots\dots \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{CH-} \\ 1375, 1355 \text{ cm}^{-1} \dots\dots \text{CH}_3 \end{matrix} \right\} \rightarrow 1375, 1355 \text{ cm}^{-1} \dots\dots \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{CH-}$
- P. 254) 10 neoisoplegol→neoisopulegol ; 12 dihydro-linoolool→dihydro-linalool ;
linoolool→linalool ; Neoisopulegol→neoisopulegol ;
反応図式 : eitronellal→citronellal ; eitronellic acid→citronellic acid ;
9 Hydrocarbone→hydrocarbon ; 12 ethylen→ethylene ;
- P. 255) 9 Hydrocarbone→hydrocarbon ;
- P. 256) 1 Ether→ether ;
- P. 258) 9 mercaptoethanol→mercaptoethanol ; glnthathine→glutathione ;

P. 260) 反応図式



P. 259) 8 citronelic acid → citronellal

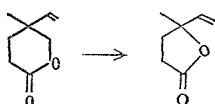
16 ダルタチオン → グルタチオン

P. 262) 21 geranic acid → geranic acid ;

P. 264) 8 Citronellol → Citronellol ; 10 2,4-dinitrophenylhydrazone → 2,4-dinitrophenylhydrazone ; 17 Pyridine-nucleotide → pyridine-nucleotide ;

P. 265) 4 geranic acid → geranic acid ;

P. 266) 1



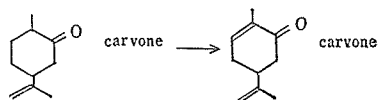
3 4-methyl-4-ethylbutyrolactone → 4-methyl-4-vinylbutyrolactone ;

Fig. 22, 4-methyl-4-ethylbutyrolactone → 4-methyl-4-vinylbutyrolactone ;

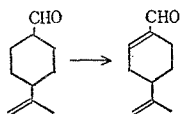
P. 270) 5 B cyclic terpene → § B cyclic terpene ;

7 p-menthadien → p-menthadiene ;

下图第一段 : cis-carveol → cis-carveol ;

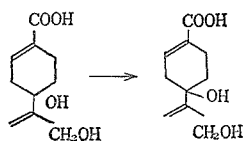


第三段 : 1,2-cis-dihydroxy-8-p-menthene → 1,2-cis-dihydroxy-8-p-menthene ;

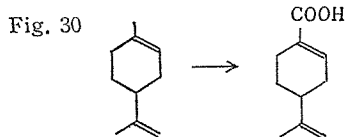
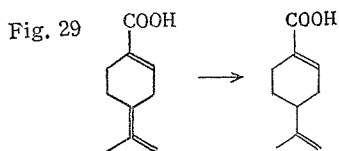


perillyl aldehyde → perillyl aldehyde

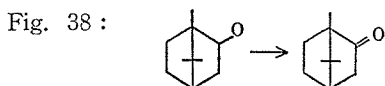
第五段 :



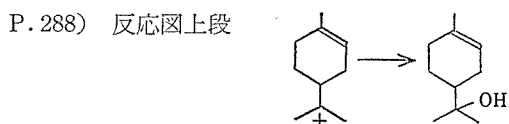
P. 271) 1 α-Terpineol → α-terpineol ; 2 p-menthadien → p-menthadiene ;



- P. 272) 18 排池 → 排泄 25 Pseudomonas → pseudomonas ;
 P. 273) 反応図式第 3 段 : 5-oxo-1,2-campholide → 5-oxo-1,2-campholide ;
 P. 277) 1 Table X III → Table X III ;
 Table X III, Melting point → Melting point ;

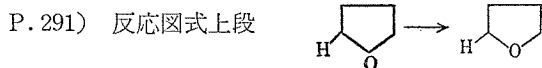


- P. 278) Table XV ; Tabel → Table ; Theoretical → Theoretical ;
 P. 282) 5 Campholide → Campholide ;
 P. 285) 8 campholylactone → Campholylactone ; 21 1 型 → l 型
 28 α-Terpineal → α-Terpineol ;
 P. 287) Fig. 56, Cultivation time → Cultivation time ; 8 terpinolen → terpinolene ;
 Fig. 57, Standard terpinolene → Standard terpinolene ;



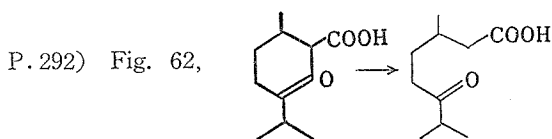
最下行 ; 抗菌力 → 抗菌力

- P. 289) Fig. 1, 6 Water soluble fraction → Water soluble fraction ;



5 1725 cm⁻¹ CH₃ (メチル化以外の C H₃にあることを示唆) → 1725 cm⁻¹
C=O

(Fig. 61)
 () → (Fig. 61)



- P. 294) 10 n-hexan ether → n-hexane ether ;
 P. 295) 5 benzen → Benzene
 P. 298) Fig. 66 グラフ中 : Product D (mehtylated) → Product D (methylated)
 P. 305) 11 hydrocarbone → hydrocarbon ;
 P. 306) 13 Benzen → Benzene ; 23 基源 → 起源
 P. 307) 9 多小 → 多少

以 上