報 文

デヒドロアビエチン酸の微生物変換

中島 路可・西井 重明・石田 徹・山本 二郎

鳥取大学工学部物質工学科 (〒680 鳥取市湖山町南4丁目101)

Biotransformation of Dehydroabietic Acid by Fungi

Ruka NAKASHIMA, Shigeaki NISHII, Tohru ISHIDA, and Jiro YAMAMOTO

Department of Materials Science, Faculty of Engineering, Tottori University

(4-101, Koyamacho-minami, Tottori-shi, 〒680)

Agar-wood (Jinkoh) has long been used as incense. It is thought to derive from the fungus-infected wood of old aquilaria trees through resignification of the essential oil.

The biotransformation of dehydroabietic acid (DHAA) is presently being attempted by fungi considered to have the ability to form "Jinkoh".

To date 2-hydroxydehydroabietic acid, 7-hydroxydehydroabietic acid, and 16-hydroxydehydroabietic acid from DHAA have been obtained.

1 緒 言

東洋的な香りとして愛好されている沈香は、ジンチョウゲ科, *Aquilaria* 属の老木に、虫食い、動物による傷害に伴って、数種の菌、例えば *Aspergillus* 属, *Penicillium* 属, *Fusarium* 属, *Torula* 属, *Epicoccum* 属, *Cylindrocephalum* 属などの菌が着生するとその部分が腐食して、沈香独特のにおいを形成するとされている¹⁾。

沈香は沈香樹に生成したテルペン類が、菌の作用で樹脂化した特殊なバルサムということになるが、このことは沈香の生合成の面からみると非常に興味深い。

我々は以前より、木材資源の有効利用の一つとして、菌類や²⁾、植物培養細胞による³⁾植物性有機資源の生物変換を行っているが、沈香の成因が、菌の作用による二次的な産物であることから、この沈香生成の成因をテルペン類の精密有機合成に応用しようと考え、松脂の主成分であるデヒドロアビエチン酸 (以下 DHAA と略す) を基質として、沈香生成菌を含む種々の菌株を用いて微生物変換を試み、今回いくつかの菌株によって DHAA が変換されることを見いだしたので報告する。

2 実 験

2.1 使用菌株

微生物変換に用いた菌株は、緒言の所でも述べたように、沈香生成菌として想定されている。*Aspergillus* 属, *Epicoccum* 属, *Penicillium* 属, *Fusarium* 属, *Torula*

属, *Cylindrocephalum* 属等の中より 39 菌株、またそれ以外の菌株として 12 菌株の計 51 菌株を使用した (Table-1)。いずれの菌株も継代培養中の菌株の変異による実験の再現性という点から、常に一定の物が入手できる財団法人 醸酵研究所 (IFO) の保存菌株リストより選んだ。

2.2 培地及び培養方法

菌の培養培地は、蒸留水 1 L 中に、 NaNO_3 3 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, Yeast Extract 0.5 g を含む培地に、基質の DHAA 0.5 g を 10 mL のエタノールに溶解したのち添加し、pH を 6.8 に調整したものを用いた。作成した培地は 500 mL 坂口フラスコに 200 mL ずつ分注し、綿栓をした後、培地とともに高圧滅菌 (120°C, 20 min) を行った。また変換に用いた菌体は、PSA (Potato Sucrose Agar) 培地 10 mL を試験管に分注した斜面培地で、温度 24°C で 5d 培養した増殖力旺盛な菌体を用い、これを前述の培地に無菌的に数白金耳を接種した。培養は温度 24°C の条件下で往復振とうにより行った。

2.3 抽出方法及び検索方法

所定日数培養後、吸引濾過によって培養細胞部と培養液部に分離し、培養液部を conc. HCl を用いて pH=2 とした後、培養液部 200 mL に対して 300 mL のクロロホルムで 2 回抽出した。抽出液は硫酸ナトリウム (無水物) で乾燥した後、減圧濃縮し、ジアゾメタンでメチル化処理後、ガスクロマトグラフィー (GLC) 及び薄層クロマトグラフィー (TLC) によって抽出物組成を検討

Table-1 List of Fungi

IFO 4046	: <i>Aspergillus conicus</i>
IFO 4089	: <i>Aspergillus ruber</i>
IFO 4414	: <i>Aspergillus niger</i>
IFO 6004	: <i>Aspergillus ruber</i>
IFO 7712	: <i>Aspergillus ruber</i>
IFO 8133	: <i>Aspergillus multicolor</i>
IFO 8864	: <i>Aspergillus wentii</i>
IFO 31125	: <i>Aspergillus niger</i>
IFO 31296	: <i>Aspergillus sydowi</i>
IFO 7808	: <i>Epicoccum purpurascens</i>
IFO 30392	: <i>Epicoccum purpurascens</i>
IFO 7190	: <i>Fusarium oxysporum</i>
IFO 7706	: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melongenae</i>
IFO 9971	: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pini</i>
IFO 30040	: <i>Fusarium merismoides</i> var. <i>acetilereum</i>
IFO 30198	: <i>Fusarium equiseti</i>
IFO 9462	: <i>Gibberella zeae</i>
IFO 30963	: <i>Gibberella lateritium</i>
IFO 31251	: <i>Gibberella fujikuroi</i>
IFO 6112	: <i>Penicillium varians</i>
IFO 6144	: <i>Penicillium chrysogenum</i>
IFO 7085	: <i>Penicillium oxalicum</i>
IFO 7724	: <i>Penicillium godlewskii</i>
IFO 7727	: <i>Penicillium lanosogriseum</i>
IFO 7730	: <i>Penicillium miczynskii</i>
IFO 7741	: <i>Penicillium trzebinskianum</i>
IFO 7744	: <i>Penicillium radulatum</i>
IFO 7904	: <i>Penicillium herquei</i>
IFO 8050	: <i>Penicillium adametzii</i>
IFO 8174	: <i>Penicillium asperosporum</i>
IFO 9651	: <i>Penicillium digitatum</i>
IFO 6213	: <i>Torula dematia</i>
IFO 6217	: <i>Torula antennata</i>
IFO 6857	: <i>Torula jeanselmei</i>
IFO 9500	: <i>Torula herbarum</i>
IFO 9594	: <i>Torula caligans</i>
IFO 9944	: <i>Torula herbarum</i>
IFO 30098	: <i>Torula terrestris</i>
IFO 4864	: <i>Ceratocystis fimbriata</i>
IFO 6128	: <i>Ceratocystis ulmi</i>
IFO 6702	: <i>Ceratocystis pilifera</i>
IFO 8664	: <i>Ceratocystis minor</i>
IFO 8665	: <i>Ceratocystis ips</i>
IFO 30501	: <i>Ceratocystis fimbriata</i>
IFO 6807	: <i>Cylindrocephalum aureum</i>
IFO 6848	: <i>Conoplea abietina</i>
IFO 7743	: <i>Eupenicillium pinetorum</i>
IFO 7824	: <i>Mortierella isabellina</i>
IFO 30258	: <i>Agrocybe praecox</i>
IFO 30322	: <i>Ascobolus denudatus</i>
IFO 31031	: <i>Phomopsis mari</i>

した。

2・4 クロマトグラフィー

GLC による検討結果後、変換物が得られた菌株に関して、それらの抽出物のメチル誘導体を TLC (Merck 社製 Art 5717 PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄) 及びカラムクロマトグラフィー [(株) 和光純薬工業製 Wakogel C-200] を用いてクロマトグラフィーを行った。展開溶媒にクロロホルム：エーテル：ベンゼン=7：2：1 を用いてそれぞれ溶出させ、溶媒を減圧下で留去し変換生成物を得た。

2・5 機器分析

GLC は島津 Gas Chromatograph GC-8 A, 使用カラムは 5% Silicone OV-17 (Chromosorb WAW DMCS, 60/80 mesh, ϕ 0.26 cm $\times$ 200 cm, ガラス製) カラムを用いた。測定温度は 180~280°C (昇温 10°C/min), キャリヤーガスは He (58.6 mL/min) である。IR は日立赤外分光光度計 260-50, また NMR は日本電子 JOEL JNM-GX 270 により測定した。GC-MS 分析は IFO 7808 による変換物の場合、日立 M-80 B-GC-MS system を用いた。測定条件はイオン化電圧 70 eV, 2% OV-1 (1 m), カラム温度 250°C (恒温), キャリヤーガス He (30 mL/min) で行った。IFO 7824, IFO 30392 による変換物の場合は測定条件はイオン化電圧 70 eV, 3% OV-25 (Gaschrom Q 80/100 mesh, ϕ 2 mm $\times$ 1.2 m), カラム温度 220°C, キャリヤーガス He (24.3 mL/min) で行った。また、IFO 7085 による変換物は日本電子 JMS-D300 により GC-MS 分析を行い、測定条件はイオン化電圧 70 eV, Methylsilicone fluid (5 m $\times$ 530 μ m i.d., wide-bore), カラム温度 180~250°C (昇温 5°C/min), キャリヤーガス He (7.5 mL/min) で行った。(なお、IFO 7824, IFO 30392 による変換物は、TMS 化後 GC-MS 分析を行った。)

3 結果と考察

3・1 GLC による DHAA 変換菌株の検索

Aspergillus 属 9 菌株, *Penicillium* 属 12 菌株 *Fusarium* 属 5 菌株, *Torula* 属 7 菌株, *Epicoccum* 属 2 菌株, *Gibberella* 属 3 菌株, *Ceratocystis* 属 6 菌株, その他 7 菌株, 計 51 菌株から GLC によって DHAA 変換菌株の検索を行った結果、沈香生成菌と考えられる IFO 7808, IFO 30392 (いずれも *Epicoccum purpurascens*), IFO 7085 (*Penicillium oxalicum*) の 3 菌株, またそれ以外の菌株として IFO 7824 (*Mortierella isabellina*) の計 4 菌株に関して高収率で DHAA を変換することがわかった。主要変換物のメチルエステルの GLC% は、IFO 7808 では 85%, IFO 30392 では 88%, IFO 7085 では 55%, そして IFO 7824 では 75% であった (Fig.-1~4)。他の菌株に関しては、わずかな割合

Fungi : IFO 7824 (*Mortierella isabellina*)

Fig.-1 Typical gas chromatogram of methyl derivatives of extracts from medium.

Fungi : IFO 7808 (*Epicoccum purpurascens*)

Fig.-2 Typical gas chromatogram of methyl derivatives of extracts from medium.

Fungi : IFO 30392 (*Epicoccum purpurascens*)

Fig.-3 Typical gas chromatogram of methyl derivatives of extracts from medium.

Fungi : IFO 7085 (*Penicillium oxalicum*)

Fig.-4 Typical gas chromatogram of methyl derivatives of extracts from medium.

で生成物が認められる菌株も数種あったが、ほとんどの菌株において DHAA 由来と考えられる選択的生成物は得られなかった。

3・2 変換物の単離と同定

3・2・1 IFO 7824 による変換物の単離と同定

Scheme-1 Biotransformation of DHAA.

IFO 7824 による抽出物のメチル誘導体 152.4 mg を 2・4 の操作に従って TLC を用いて単離した。それにより R_f 値が、0.14, 0.29, 0.64 の 3 画分を得、 R_f 値の順にそれぞれ分画 A, B, C とした。それぞれの分画を GLC で分析した結果、分画 B (99.3 mg, 収率 65.2%) に 91% の純度で変換物が含まれていることを確認した。

GC-MS を検討した結果、分子量 330 の物質であることを確認し、IR から DHAA のスペクトルデータと比較して $3200\sim3600\text{ cm}^{-1}$ にヒドロキシル基による吸収が認められた。また、 ^{13}C -NMR スペクトルの解析では、DHAA のメチルエステルの文献値⁵⁾と比較検討し、DHAA のメチルエステルの場合 18 ppm に現れている 2 番炭素のピークが消失して、新たに 65 ppm にピークが現れていることがわかった。これは 2 番炭素にヒドロキシル基が結合した場合の値に近く、これらのことから、2-ヒドロキシデヒドロアピエチン酸と同定

した。

2-ヒドロキシデヒドロアビエチン酸メチルの各スペクトルデータを以下に示す。

[$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)] δ =1.22 (6 H, d, J =6.8 Hz, C-16, 17 methyl), 1.31 (3 H, s, C-20 methyl), 1.60 (3 H, s, C-19 methyl), 3.68 (3 H, s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4.09 (1 H, tt, J =11.24 Hz, C-2H), 7.01 (1 H, d, J =7.81, C-12 H), 7.18 (1 H, d, J =7.81, C-11 H);

[$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3)] δ =17.51 (C-19), 20.91 (C-6), 23.96 (C-16, 17), 26.00 (C-20), 29.81 (C-7), 33.49 (C-15), 38.59 (C-10), 44.58 (C-5), 45.36 (C-3), 47.26 (C-1), 48.47 (C-4), 52.15 ($-\text{OCH}_3$), 65.14 (C-2), 123.88 (C-12), 124.09 (C-11), 126.99 (C-14), 134.22 (C-8), 145.97 (C-13), 146.11 (C-9), 177.91 (C-18);

[IR (KBr)] 3200~3600 cm^{-1} (OH), 1720 cm^{-1} (ester C=O);

[MS m/z (rel, intensity)] 402 (M^+ , 20), 387 (23), 297 (19), 237 (100), 195 (20), 186 (15), 73 (15);

3.2.2 IFO 7808 による変換物の単離と同定

IFO 7808 によって得られた抽出物のメチル誘導体 380 mg を 2.4 の操作と同様に TLC を行った結果, 4 画分を得た。 R_f 値 0.94 付近を分画 A, 0.82 付近を分画 B, 0.73 付近を分画 C, 0.57 付近を分画 D とし, 分画成分を GLC で検討した結果, 分画 D (145 mg, 収率 38.2%) に GLC% で 95% の変換物を得た。

IR を検討した結果 DHAA と比較して 3200~3600 cm^{-1} にヒドロキシル基による吸収が認められた。また $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルでは, DHAA のメチルエステルの場合, 文献値⁵⁾において 30 ppm に現れている 7 番炭素のピークが消失し, 新たに 70 ppm にピークが現れている。これは 7 番炭素にヒドロキシル基が結合した場合の値に近く, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果ともよく一致する。以上の結果及び GC-MS より分子量が 16 増加していることから 7-ヒドロキシデヒドロアビエチン酸と同定した。またヒドロキシル基の結合の配置によって異なった質量スペクトルが得られるが, 文献⁶⁾との比較から, ヒドロキシル基が 7 番炭素にエクアトリアル位に結合した 7 β -ヒドロキシデヒドロアビエチン酸であると結論した。

7 β -ヒドロキシデヒドロアビエチン酸メチルの各スペクトルデータを以下に示す。

[$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)] δ =1.24 (6 H, d, J =7 Hz, C-16, 17 methyl), 1.29 (3 H, s, C-20 methyl), 1.59 (3 H, s, C-19 methyl), 3.67 (3 H, s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4.87 (1 H, t, J =9.3, C 2 α -H), 7.00 (1 H, d, J =8 Hz, C-12 H), 7.17 (1 H, d, J =8 Hz, C-11 H);

[$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3)] δ =16.50 (C-19), 18.50 (C-

2), 23.90, 24.07 (C-16 or 17), 25.51 (C-20), 32.89 (C-6), 33.69 (C-15), 36.49 (C-3), 37.61 (C-10), 37.98 (C-1), 43.48 (C-5), 47.34 (C-4), 52.06 ($-\text{OCH}_3$), 70.75 (C-7), 124.20 (C-12), 125.27 (C-11), 125.90 (C-14), 137.59 (C-8), 146.52 (C-13), 146.72 (C-9), 178.74 (C-18);

[IR (KBr)] 3200~3600 cm^{-1} (OH), 1720 cm^{-1} (ester C=O);

[MS m/z (rel, intensity)] 402 (M^+ , 23), 359 (26), 237 (23), 234 (52), 191 (100), 155 (10), 73 (29);

3.2.3 IFO 30392 による変換物の単離と同定

IFO 30392 によって得られた抽出物のメチル誘導体 165 mg を 2.4 の操作と同様に TLC を行い, R_f 値 0.57 付近の分画を GLC で検討した結果, GLC で 95% の変換物を得た。

IFO 7808 によって得られた 7 β -ヒドロキシデヒドロアビエチン酸と IFO 30392 による変換物を GLC で比較したところガスクロマトグラム上で完全に一致した。また, $^1\text{H-NMR}$ スペクトル, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル, GC-MS スペクトルも一致することから 7 β -ヒドロキシデヒドロアビエチン酸と同定した。

3.2.4 IFO 7085 による変換物の単離と同定

IFO 7085 によって得られた抽出物のメチル誘導体 37.2 mg を 2.4 の操作に従いカラムクロマトグラフィーを行った。その結果, R_f 値 0.24 付近にガスクロマトグラム上で 85% 含む分画 18.4 mg (収率 49.4%) を得た。

IFO 7085 による変換物のメチル誘導体の IR を測定した結果, 3200~3600 cm^{-1} にヒドロキシル基による吸収が見られた。また, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルでは, 文献値⁵⁾より DHAA の場合, 23.99 ppm に現れている 16 番, 17 番炭素のピーク及び 33.46 ppm に現れる 15 番炭素のピークが消失し, 新しく 17.54 ppm, 41.87 ppm, 68.71 ppm にピークが現れている。これは 16 番炭素にヒドロキシル基が結合したことによる置換基効果により β 炭素である 15 番炭素が 41.87 ppm に, また γ 炭素である 17 番炭素が 17.54 ppm それぞれシフトしたと考えられる。つぎに GC-MS を測定した結果, 分子量 330 の物質であり, 以上のことから 16-ヒドロキシデヒドロアビエチン酸と同定した。

16-ヒドロキシデヒドロアビエチン酸メチルの各スペクトルデータを以下に示す。

[$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)] δ =1.21 (3 H, s), 1.22 (3 H, d J =12 Hz, $\text{H}_3\text{C-17}$), 1.28 (3 H, s) 1.4~1.9 (8 H, m), 2.20 (1 H, dd, J =2 and 12 Hz), 2.27 (1 H, br d, J =12 Hz), 2.86~2.89 (3 H, m), 3.66 (3 H, s), 3.67 (2 H, d, J =7 Hz, $\text{H}_2\text{C-16}$), 6.89 (1 H, d, J =2 Hz), 6.98 (1 H, dd, J =2 and 8 Hz), 7.21 (1 H, d, J

=8 Hz) ;

[^{13}C -NMR (CDCl_3)] δ =16.50 (C-19), 17.54 (C-17), 18.55 (C-2), 21.63 (C-6), 25.08 (C-20), 29.95 (C-7), 36.63 (C-3), 37.00 (C-10), 37.95 (C-1), 41.87 (C-15), 44.81 (C-5), 47.66 (C-4), 51.95 ($-\text{OCH}_3$), 68.71 (C-16), 124.55 (C-12), 124.83 (C-11), 128.06 (C-14), 135.17 (C-8), 140.44 (C-13), 147.90 (C-9), 179.1 (C-18) ;

179.1 (s, C-18) ;

[IR (KBr)] 3200~3600 cm^{-1} (OH), 1720 cm^{-1} (ester C=O) ;

[MS m/z (rel, intensity)] 330 (M^+ , 15), 315 (21), 299 (43), 255 (100), 237 (19), 133 (20), 131 (23) ;

以上4菌株によって、選択的にDHAAの2位, 7位, 16位へのヒドロキシル化に成功した。一般にDHAAのヒドロキシル化を選択的に行うのは難しく有機合成的にみてもたいへん興味深い反応であると思われる。また既に著者らは本誌に報告した⁹⁾植物培養細胞(ニンジンカルス)においても, IFO 7085と同様に16-ヒドロキシデヒドロアビエチン酸が得られることを見いだしており, ニンジンカルスと菌類の生物変換において共通点が多いことも興味あるところである。また現在著者らは, 沈香の前駆体となりうるかもしれないフェルネソール, ネロリドール等のセスキテルペンアルコールについても沈香生成菌による微生物変換を試みており, 興味ある結果を得ているのでこちらについても改めて報告する予定

である。

付 記

本研究を行うに当たり, 質量スペクトルの測定で便宜をはかっていただいた大日本製薬株式会社 総合研究所 荒河 敏氏, ならびに塩野香料株式会社 恒屋知之氏に深謝する。また本研究の一部は文部省科学研究費補助金 課題番号 (62101005) 及び, 昭和63年度松籟科学技術振興財団の研究助成による。

[平成元年 (1989) 10月14日受理]

文 献

- 1) a) M. Sadgopal, *Soap, Perfumery & Cosmetics*, **33**, 41 (1960)
b) 平泉貞吉, 香料, 1960 (58), 11
c) 山中昭彦, 香料, 1981 (134), 61
d) 長島 司, 高砂香料時報, 1984 (81), 25
- 2) 未発表, 荻原真司, 鳥取大学大学院工学研究科修士論文 (1986)
- 3) 重政好弘, 斎本博之, 博多宏一, 中島路可, 油化学 **37**, 124 (1988)
- 4) "Institute for Fermentation Osaka List of Cultures 1988 8th Ed, Vol.1," Institute for Fermentation Osaka (1988)
- 5) T. Ohmoto, K. Kanatani, K. Yamaguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 229 (1987)
- 6) R. A. Franichi, P. T. Holland, *Org. Mass. Spectrom.*, **20**, 695 (1985)