テルペン類の微生物転換 (第8報)

シトロネラルの転換 (その3) 中性物質について

林 哲 吾, 辰巳 忠 次
(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 45 年 3 月 2 日 受 理

Microbiological Conversion of Terpenes Part VIII. Conversion of Citronellal (3)

By Tetsugo HAYASHI and Chuji TATSUMI
Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture
University of Osaka Prefecture

In the previous paper it was reported that *Pseudomonas aeruginosa* (strain CDB₂-3 b) convert citronellal to citronellic acid as main product and some neutral compounds as by-product. In this paper the identification of these neutral compounds and investigation of the cause of the conversion are described. Three main neutral compounds are identified as linalool, isopulegol and neoisopulegol. Besides other one compound is deduced as dihydrolinalool. The cause of the conversion to these compounds seems to be the chemical reaction rather than the microbiological conversion. (Received March 2, 1970)

緒 言

テルペン類の微生物転換の一環として, 著者らは, さきにシトロネラルの微生物転換について報告⁽¹⁾した。すなわちシトロネラルは, 土壌より新分離した *Pseudomonas aeruginosa* CDB₂-3 b 株により, 主としてシトロネル酸に転換され, そのさいに少量ではあるが数種の中性物質が, 常に培養液中に存在していたことを報告した。

本報においては, これら中性物質のうちで量的に多いと推定されるもの 4 種の分離同定, ならびに中性物質の成因について検討し, 若干の結果を得たので報告する。

実 験 方 法

既報のように, シトロネラル 1% v/v 含有の, Table I に示す基礎培地に, CDB₂-3 b 株を接種して, 30°C, 24 時間振とう培養して, 培地より Fig. 1 に示す方法で生産物を抽出して, 主産物のシトロネル酸と数種の中性物質を得た。中性物質はさらにカラムクロマトグラフィー, 薄層クロマトグラフィー, ガスクロマトグラフィーなど

Table I. Basic Medium

NH ₄ NO ₃	1.0 g	MnSO ₄	0.6 mg
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.2 g	Peptone	0.25 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.1 g	Na ₂ HPO ₄	9.55 g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.1 g	KH ₂ PO ₄	0.90 g
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0.6 mg	H ₂ O	1000 ml
(pH 7.3)

Fig. 1. Extraction and Purification of the Products.

を用いて分離精製した。

精製した中性物質をガスクロマトグラフィー, 赤外線吸収スペクトルを行なって, 標準標品と比較同定した。

実験結果と考察

1. 培養および抽出分離

既報と同様に Table I に示す基礎培地に、1% v/v のシトロネラルを添加した培養液に *CDB₂-3 b* 株 (培地 100 ml に乾燥菌体量として 16 mg) を接種して、30°C, 24 時間振とう培養した。培養液を Fig. 1 に示す方法で、すなわち遠沈 (12,500×g, 10 min) し菌体を除き、pH 5.0 の硫酸酸性としてエー

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

Fig. 3. Thin-layer Chromatogram of Product III.
Solvent: hexan: ethylacetate=90:10
Detect.: 7% H₂SO₄

Fig. 4. Infrared Absorption Spectra of Peak A.
I, Peak A; II, Authentic linalool.

テル抽出を行なって product I を得た。

Product I を中和後水蒸気蒸留し、留出物をエーテル抽出して product III を得た。product III のガスクロマトグラムを Fig. 2, 薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示す。これらより product III は 5~6 種の中性物質が含まれていると推定される。Fig. 2 に示すように、そのうちのおもなものを A, B, C, D と表示した。

Product III をシリカゲルカラムを用いて、ヘキサン: エチルアセテート=90:10 で分画すると A, B および C と D の混合物が得られた。C, D 混合物はさらに薄層クロマトグラフィー, ガスクロマトグラフィーを用いて分取を試みたが分離困難であった。

2. 同 定

物質 A: 無色油状物質でリナロールよりやや強いにおいをもつ。ガスクロマトグラフィーの保持時間もリナロールとほとんど一致している。Fig. 4 にリナロールと比較した赤外線吸収スペクトルを示す。これよりつぎのような

などの各基の存在が推定され、標準標品リナロールと一致している。ただ物質 A のスペクトルには 840 cm^{-1} の吸収が存在しない。標準標品リナロールの赤外線吸収スペクトルの 840 cm^{-1} 吸収はイソプロピル基の不飽和結合を示す吸収である。したがって、物質 A はリナロールに水素が導入されたもの、すなわち、

と推定した。

物質 B : 無色油状物質で, リナロールと同様なお

いをもち, ガスクロマトグラフィーの保持時間もリナロールと完全に一致する. Fig. 5 は物質 B と標準標品リナロールとの赤外線吸収スペクトルの比較である. 各吸収とも完全に一致しており, 物質 B はリナロールと同一とした。

物質 C+D : C と D は分離困難であった. そこで異性体を考慮して, ガスクロマトグラフィーのカラム充填

剤を替えて検討を試み, Fig. 6, Table II に示す結果を得た。

Apiezon-L カラムでは 2 個のピークを示したが, PEG-6000, PEG-Succinate カラムでは分離不十分で単一のピークを示した. また本混合物の赤外線吸収スペクトル Fig. 7 を検討すると,

3380 cm^{-1}OH,

1095 cm^{-1} $\begin{matrix} \text{R} \\ \diagup \\ \text{C}-\text{OH} \\ \diagdown \\ \text{R}' \end{matrix}$,

890 cm^{-1} $\begin{matrix} \text{R} \\ \diagup \\ \text{C}=\text{CH}_2 \\ \diagdown \\ \text{R}' \end{matrix}$ (末端),

2900 cm^{-1} CH_3 ,

1450 cm^{-1} $=\text{CH}_2$

などの基をもつことが推定される. そこでテルペン類の中で, これらの官能基をもち, ガスクロマトグラフィーで Fig. 6, Table II の保持時間をもつ物質を検討して, isopulegol とそのコンフォーマーの neoisopulegol を推定した. そこで C

Fig. 5. Infrared Absorption Spectra of Peak B. I, Peak B; II, Authentic linalool.

Fig. 6. Gas Liquid Chromatogram of the Neutral Fraction. Condition: 180°C, He 60 ml, column 5 mm $\times$ 2 m.

Fig. 7. Infrared Absorption Spectra of Peak C+D. I, Peak C+D; II, Authentic isopulegol+Neoisopulegol.

Table II. 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, 40 ml/min, 180°C.

Table III. Components and Yields of the Neutral Fraction

A	$ \begin{array}{c} \text{H}_3 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array} $	Dihydrolinalool 1.50%
B	$ \begin{array}{c} \text{H}_3 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array} $	Linalool 0.9~1.9%
C	$ \begin{array}{c} \text{H}_3 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array} $	Isopulegol 3.8~9.44%
D	$ \begin{array}{c} \text{H}_3 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array} $	Neoisopulegol 0.63~1.6%

と D の収率を考慮して, isopulegol : neoisopulegol = 3 : 1 の混合物を調製して, その赤外吸収スペクトルを比較したのが Fig. 7 である. 両者はよく一致した. また, においもよく似ていた. なお Fig. 6, Table II の関係より C を isopulegol, D を neoisopulegol と同定した.

以上, 生産された中性物質のおもなものは Table III のような収率であった.

3. 中性物質の成因の考察

細菌によるテルペン類の転換は, 既報したように酸化的な転換が多く, 上述の中性物質のように還元されるとすれば, 細菌作用として興味もたれるので, その成因について検討を行なった.

元来, シトロネラルはエチレン結合とアルデヒド基をもち, はなはだ変化しやすい物質で, 太陽光線によりアセトン, β -methyl-hexanoic-acid, dihydroxy-citronelllic acid, あるいは isopulegol, メントンなどを生成⁽²⁾し, 紫外線照射で閉環⁽³⁾するといわれている. 弱酸で isopulegol, menthoglycol, *p*-menthan-3,8-diol⁽⁴⁾などが生成され, ギ酸, リン酸で isopulegol およびその誘導体が生成するとの報文⁽⁵⁾もある. 原料貯蔵中にも自然変化による中性物質が少量生成される. また本菌による発酵試験中も無菌対照区に少量ながら生成された.

CDB₂-3b 株によるシトロネラル転換のさいに副生される中性物質が, 上記の物質のように化学作用によるものか, 本株により転換生成されるものかを検討するために, 下記のような条件で発酵試験を行なった.

(1) 1% シトロネラル含有基礎培地に下記の物質を添加して, 30°C, 24 時間振とう培養し, その中性物質をガスクロマトグラフィーで検討した.

i) 1% 硫酸添加: 菌体量および中性物質は増加するが Fig. 8 に示すように生成物質は異なっていた.

ii) クロラムフェニコール 4 mg/100 ml 添加して生成酸の β 酸化による消費を防ぐ: 中性物質は同様な物質であり, 生成量は非常に増加した. Fig. 9 は生成中性物質のガスクロマトグラフィーである.

Fig. 8. Gas Liquid Chromatogram of the Neutral Products from the Broth Contain 1% H₂SO₄.

Condition; Apiezon-L, column 2 m, He gas 60 ml/min, 180°C.

Fig. 9. Gas Liquid Chromatogram of the Neutral Products from the Broth Contain Chloramphenicol (4 mg/100 ml).

Condition; Apiezon-L, column 2 m, He gas 60 ml/min, temp. 180°C.

iii) 沈降炭酸石灰 1 g/100 ml 添加: 平常発酵とすべ
て同一な結果を示した。

iv) 0.5% シトロネラル酸添加: 生成物は同種であるが,
生成量は増加を示した。

(2) 基礎培地に下記の物質を単一炭素源として添加
して, 30°C, 24 時間培養して, その中性物質をガスクロ
マトグラフィーで検討した。

i) シトロネラル酸 1 ml/100 ml: 発泡をともなって発
酵する。菌体もシトロネラル炭素源のときと同様に増
加する。ただし, 中性物質は Fig. 10 に示すように生成
されず, シトロネラル酸はカルボン酸の微生物代謝形式を
とり β -酸化され, 逐次炭素数の少ない酸に転換されて,
7 日間で完全に消費された。

ii) シトロネロール 1 ml/100 ml 添加: Fig. 11 に示
すように, シトロネロールを経てシトロネラル酸となり代
謝経路に入る。このとき菌量は増加されるが中性物質は
生成されない。

Fig. 10. Gas Liquid Chromatogram of the Product from the
Broth of Citronellic Acid as Sole Carbon Source.

Condition; Apiezon-L, column 2 m, He gas 40 ml/min, 180°C.

Fig. 11. Gas Liquid Chromatogram of the Pro-
duct from the Broth of Citronellol as
Sole Carbon Source.

Condition; Apiezon-L, column 2 m, He gas
40 ml/min, 180°C.

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

Condition	H ₂ SO ₄ 1 ml/100 ml	Citronellic acid 0.5 ml/100 ml	Control
Neutral fraction %	35	25	8
Condition	Normal*	Chloramphenicol 4 mg/100 ml	CaCO ₃ 1 g/100 ml
Neutral fraction %	7~17	51	18.4

* Lowest and highest value of normal fermenta-
tion.

iii) 発酵により生成された中性物質の混合物: 添加量
を 0.1% v/v と下げても全然発酵されない。7 日間培養
を継続すると CDB₂-3 b 株は死滅したが, 中性物質は変
化なく回収された。

以上の発酵試験の中性物質の収率を Table IV に示
す。この結果よりつぎのように推定した。

(1) 中性物質はシトロネラルより生成されてい
る。

(2) 中性物質は本株 CDB₂-3 b
により転換生成したものでなく, 生
成したシトロネラル酸が触媒的な作用
をして, シトロネラルより二次的,
化学的に還元開環されて生成したも
のである。したがって無機硫酸添加
時とシトロネラル酸添加時では生成物
の異なることも理解できる。

なお, シトロネロール転換生成物
としてのシトロネラルよりの転換
生成物として, 中性物質の生成され
ないのは, 石油系炭化水素の微生物転換のさいに見られ
る⁽⁶⁾アルコールの保護作用のためと推定できる。

要 約

(1) シトロネラルを *Pseudomonas aeruginosa*
strain CDB₂-3 b で転換させる際に, 主生産物のシトロ
ネラル酸のほかに常に 7~17% の収率で副生される中性
物質のうちのおもなものはつぎのようなものであった。
すなわち dihydrolinalool と推定される物質, および
linalool, isopulegol, neoisopulegol と同定された物質
であった。

(2) これらの中性物質は, 微生物によって転換生成
されたのではなく, 微生物作用により転換生成したシ

トロネル酸が触媒的な作用を直接にシトロネールに与えて, 二次的に化学反応により生成されたものと推定した。

本報は昭和 44 年 10 月, 日本化学会テルペン部会, 鹿児島で報告した。

(1) T. Hayashi, C. Tatsumi : *Nippon Nogeikaga-*

ku Kaishi, **41**, 247 (1967).

(2) E. Sernagiotto : *Atti. R. Acad. Linsei*, **24**, 850 (1915).

(3) M. T. Bogert and T. Hasselstrom : *J. Amer. Chem. Soc.*, **52**, 4093 (1930).

(4) T. Babier : *Compt. Rend.*, **124**, 1308 (1897).

(5) H. J. Prins : *Chem. Weekblad.*, **14**, 627 (1916).

(6) A. C. von der Linden : *Advance in Enzymology*, **27**, 469 (1965).