テルペン類の微生物転換 (第9報)

リナロールの微生物転換 (その 1)

水谷信一, 林 哲吾*, 上田博夫, 辰巳忠次

(大阪府立大学農学部農芸化学科, *信州大学農学部農芸化学科)

昭和 45 年 12 月 7 日 受 理

Microbiological Conversion of Terpenes Part IX. Conversion of Linalool

By Shin-ichi MIZUTANI, Tetsugo HAYASHI, * Hiroo UEDA and Chuji TATSUMI
*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture University
of Osaka Prefecture ; *Department of Agricultural Chemistry,
College of Agriculture University of Shinshuu*

Microbiological conversion of linalool was studied by newly isolated *Pseudomonade* (Strain A) as a series of microbiological conversion of terpenes.

The strain A converted linalool to camphor, 4-methyl-4-vinyl-butylolactone, 4-methyl-*trans*-3-hexenoic acid and 2,6-dimethyl-6-hydroxy-*trans*-2,7-octadienoic acid.

(Received December 7, 1970)

緒 言

テルペン類の微生物転換に関する研究の一環として、リナロールの微生物転換について報告する。リナロール資化性細菌を土壌中より分離し、その菌学的性質およびそのリナロール代謝生産物を検討した。本菌は *Pseudomonas pseudomallei* 近縁株であり、その代謝生産物として、樟腦, 4-methyl-4-vinylbutyrolactone を同定し, 4-methyl-*trans*-3-hexenoic acid, 2,6-dimethyl-6-hydroxy-*trans*-2,7-octadienoic acid と推定する結果を得た。

実 験 方 法

1. 細菌の分離 既報^(1,2)と同様に基礎培地にリナロールを単一炭素源として添加して、集積法により土壌中より分離した。

2. 培養方法 既報^(1,2)と同様に、500 ml 容振とうフラスコにリナロール 0.6~1.2% (v/v) 含有の基礎培地を 100 ml 分注し、pH 7.2, 温度 30°C に設定し、振と

Fig. 1. Extraction and Purification of the Products of Microbiological Conversion of Linalool.

う回数 120 回/分, 振幅 5 cm の往復振とう機で振とう培養した。

3. 代謝生産物の検索 Fig. 1 に示すように, 培養液を遠心分離し菌体を除き, 2 N 硫酸で pH 3.0 以下としてエーテル抽出を行なった。得られた抽出物を中性部と酸性部に分画し, それぞれシリカゲルを 120 g 充填した内径 25 mm のカラムを用い, 濃度勾配をつけたヘキサン: エーテルの溶媒で分画した。画分をそれぞれ活性炭脱色し, 昇華, 薄層クロマトグラフィー等により精製単離し, ガスクロマトグラフィー, 赤外線吸収スペクトル, マススペクトル, 核磁気共鳴スペクトル, 元素分析等の測定を行ない同定した。

実験結果

1. 菌株の同定とその資化能の検討

分離した細菌の性質を Table I に, 4000 倍の電子顕微鏡写真を Fig. 2 に示す。"Bergey's Determinative Bacteriology," 7th edition に従うと, 本菌は *Pseudomonas pseudomallei* 近縁株と考えられる。本報では Strain A と仮称す。本菌の培養においては初発 pH 7.0~7.5 が適当で pH 6.5 以下では生育せず, リナロール濃度 0.5~1.0% が適当で, 2% 以上で生育阻害がみられる。

前記の基礎培地にリナロールのかわりに, 各種テルペ

Fig. 2. Electron Microscopic Photograph of Strain A (4000 times).

ン等を 0.1% 加え, その資化能を検討したところ, Strain A はゲラニオール, ネロール, シトロネラル, ゲラニウム酸, リナリルアセテート, *n*-アミルアルコール, イソアミルアルコール, *n*-オクチルアルコール等, 幅広い資化能を有する。しかし, リモネン, メントール, ペリリルアルコール, テルピネオール, ボルネオール等環状テルペンは資化しない。

2. 代謝生産物の検索

500 ml 容振とうフラスコにリナロール 0.8% (v/v) を含む基礎培地 100 ml 分注したものに, 肉汁寒天斜面で 20 時間培養した Strain A (乾量として約 15 mg) を接種して, 30°C で 30 時間から 48 時間培養し, それぞれの培養液から前記抽出法で生産物を抽出した。40 時間培養時のエーテル抽出物 (Ext. 1) のガスクロマトグラムは Fig. 3 に示すようである。なお図中の各生産物を Product VI-A, VI-B, VI-C, VI-D と表示した。

(a) 経時変化: この培養における培地 pH, 培地 100 ml あたりの菌体量, 各生産物の量等の時間的変化を Fig. 4 に示した。まず 30 時間前後で pH 6.5 とこの培養での最低値を示し, 次に再び上昇し, およそ 70 時間で pH 7.4 となり, 以後これを持続した。また 30 時間ころより発泡が始まり, およそ 6 日間続いた。各生産物の量はガスクロマト

Table I. Description of the Isolated Microorganism (Strain A)

Morphology	rods, 1.2~1.7×2.0~3.5 gram negative, single polar flagella
Gelatin stab	liquefaction, napiform
Agar colonies	smooth, circular, pulvinate, entire
Broth	pellicle, strongly turbid, viscid
Litmus milk	acidify, card
Potato slant	limited growth, brownish yellow
Nitrate	reduced to nitrite
H ₂ S	not produced
Indole	not produced
Carbohydrate	gas and acid from; maltose, sucrose, glucose, lactose, fructose, mannitol, arabinose, xylose gas from inulin
Free O ₂	aerobic
Nitrogen source	bouillon, peptone, potassium nitrate, ammonium chloride
p-Hydroxybenzoate	utilized
Acetylmethyl carbinol	not produced
Temperature	24~42°C
Source	soil

Fig. 5. IR Spectrum of the Product VI-A.

Fig. 6. Mass Spectrum of the Product VI-B.

Fig. 7. IR Spectrum of the Product VI-B.

Fig. 3. Gas Liquid Chromatogram of the Extract 1.

Column: PEG-20M 5% 1.5m
Temp. (program): 80°C ~ rate 6°C/min
Carrier gas: N₂ 50 ml/min, 0.95 kg/cm²
FID, Yanagimoto GCG 550

Fig. 4. Time Course Change in Microbiological Conversion of Linalool.

グラムの面積比により概算した。60 時間前後に Product VI-A, 50 時間前後に Product VI-B, 30 時間前後に Product VI-D がそれぞれ最大蓄積量を示した。

(b) 生産物の同定: リナロール 0.8% (v/v) 含有培地による 30 時間培養液および 48 時間培養液より生産物を抽出し, Product VI-A, B, C, D の単離同定を行なった。

(i) Product VI-A: 48 時間培養の中性部の主生産物であり, Fig. 1 に示す抽出法によって, 樟脳臭を有する白色結晶 Product VI-A を得た。本物質の IR スペクトラムを Fig. 5 に示す。標準標品樟脳の IR スペクトラムと完全に一致したので樟脳と同定した。

(ii) Product VI-B: 48 時間培養の酸性部の主成分として得られた Product VI-B は, 香気ある油状物質である。

元素分析より C; 69.48, H; 7.68% の分析値を得, マススペクトラム (Fig. 6) において分子量が 126 であることから, $C_7H_{10}O_2$ の分子式をもつ化合物であることが分かった。その IR スペクトル (Fig. 7) において, 1770 cm^{-1} に非常に強い吸収がみられ, 容易に γ -ラク톤の存在が推定できる。さらに 1410 cm^{-1} に活性メチレン基に由来するとおもわれる CH_2 の吸収帯があり, 990, 910 cm^{-1} に基質リナロールの 1 置換オレフィンの吸収帯が残っており, NMR スペクトラム (Fig. 8) において δ 1.45 ppm に酸素と結合した炭素上のメチル基のシグナルが存在し, δ 1.90~2.65 ppm のシグナルは 4 H 分に相当し, メチレン基 2 個, δ 5~6 ppm のシグナルは 1 置換オレフィンに由来する典型的な ABX 型のパターンを示していることから, Product VI-B の構造を 4-methyl-4-vinylbutyrolactone と推定した。

Fig. 8. NMR Spectrum of the Product VI-B.

この構造を確認するためレブリン酸メチルと臭化エチルとのグリニャ反応により, Product VI-B の水添物である 4-methyl-4-ethylbutyrolactone を合成⁽³⁾し, Fig. 9 に示すように, 両者の IR スペクトラムが完全に一致したので Product VI-B は 4-methyl-4-vinylbutyrolactone と同定した。

(iii) Product VI-C: 48 時間培養の酸性部に存在する油状物質である。本物質について以下の分析により同定を行なった。Fig. 10 に示す Product VI-C の IR スペクトルにおいて $2700\sim 2500$, 1700 cm^{-1} にカルボン酸の特徴的な吸収がみられ, また 840 cm^{-1} に 3 置換オレフィンの吸収が検出された。Fig. 11 に示す Product VI-C のマススペクトラムにおいて分子量が 128 と決定できるので, Product VI-C は $C_7H_{12}O_2$ の分子式を持つと推定した。Product VI-C の四塩化炭素中での NMR スペクトラム (Fig. 12) において, δ 1.05 ppm のメチル基に相当する triplet および δ 2.03 ppm にメチレンに由来する quartet がみられることからエチル基の存在が分かり, δ 1.65 ppm に二重結合に直結したメチル

Fig. 9. IR Spectra of the Hydrogenated Product VI-B and Synthetic 4-Methyl-4-ethylbutyrolactone.

Fig. 10. IR Spectrum of the Product VI-C.

Fig. 11. Mass Spectrum of the Product VI-C.

Fig. 12. NMR Spectrum of the Product VI-C.

基, δ 5.36 ppm にオレフィンのシグナル, δ 10.2 ppm に COOH のシグナルがみられることから生成物の構造を Fig. 12 に示す (I) あるいは (II) と推定した. *cis*, *trans* については目下検討しているが, IR スペクトラムにおいて, 3 置換オレフィンの吸収帯が 840 cm^{-1} と高波数に存在することから *trans* 体, すなわち 4-methyl-*trans*-3-hexenoic acid [(II) の構造] と推定している.

(iv) Product VI-D: Product VI-D は 30 時間培養時酸性部の主成分で, 汗臭い油状物質である. 以下の分析により同定を行なった.

元素分析値 (C: 64.06, H: 8.57%), および Fig. 13 に示すマススペクトラムで m/e 169 = $M^+ - \text{CH}_3$, m/e 166 = $M^+ - \text{H}_2\text{O}$, 酸価 180 前後であることから分子量 184, 分子式を $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$ と決定した. IR スペクトラム (Fig. 14) において 3410 cm^{-1} , 1110 cm^{-1} に水酸基に基づく吸収, 990 , 910 cm^{-1} に 1 置換オレフィンの吸収, $2700 \sim 2500\text{ cm}^{-1}$, 1685 cm^{-1} に不飽和カルボキシル基に由来する吸収がみられるところから, リナロールのイソプロピリデンの 1 個のメチル基が酸化された構造, すなわち Fig. 15 に示す (III) を推定した. Fig. 15 に示す NMR スペクトラムにおいて, δ 1.29 ppm に酸素と直結した炭素上のメチル基, δ 1.80 ppm に二重結合に直結したメチル基, δ 4.98 ~ 6.12 ppm に 1 置換オレフィンに特徴的な ABX 型のシグナルがみられ, かつ δ 6.44 ppm の幅広い 2 H 分のシグナルは分子内の OH と COOH の平均値と判断できるので, IR での推定構造を確認し,

Fig. 13. Mass Spectrum of the Product VI-D.

Fig. 14. IR Spectrum of the Product VI-D.

Fig. 15. NMR Spectrum of the Product VI-D.

さらに Pascual の経験則⁽⁴⁾を適用して δ 6.89 ppm のシグナルがトランスオレフィン (計算値 6.78 ppm) 上のメチンプロトンと推定できた。以上の結果より Product VI-D を 2,6-dimethyl-6-hydroxy-*trans*-2,7-octadienoic acid と推定した。

以上の結果から Strain A によるリナロール転換において、第 3 級アルコールの水酸基、末端の不飽和結合は比較的安定であると考えられる。また樟脳の生合成につ

いてはゲラニオール、テルピネオールからの反応機構が考えられているが、本菌によるリナロールからの樟脳生成はこの意味においても興味深い。

要 約

土壌中よりリナロール資化性細菌を分離し、菌学的検討の結果 *Pseudomonas pseudomallei* 近縁株であることを知った。本菌株によるリナロール転換物として、樟脳、4-methyl-4-vinylbutyrolactone を同定し、4-methyl-*trans*-3-hexenoic acid, 2,6-dimethyl-6-hydroxy-*trans*-2,7-octadienoic acid と考えられる物質を得た。

本報告の一部は、日本農芸化学会 45 年度大会において講演した。

- (1) 林 哲吾, 辰巳忠次: 農化, **41**, 190 (1967).
- (2) 林 哲吾, 辰巳忠次: 農化, **43**, 583 (1969).
- (3) 小畑繁雄: 薬誌, **73**, 1298 (1953).
- (4) C. Pascual, J. Meier: *Helv. Chem. Acta*, **49**, 164 (1966).