(-)Carvone の *Pseudomonas ovalis*, 6-1 菌 による転換 (その 1)*

野間 義明, 辰巳 忠次
(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 48 年 6 月 8 日 受理

Conversion of (-)-Carvone by *Pseudomonas ovalis*, Strain 6-1 (1) (Microbial Conversion of Terpenes Part XIII)

By Yoshiaki NOMA and Chuji TATSUMI
Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture, Sakai

As a part of the series on the microbial conversion of terpenes, the conversion of (-)-carvone by a newly isolated microorganism, *Pseudomonas ovalis*, strain 6-1, has been extensively investigated.

(-)-Carvone is easily reduced to give (+)-dihydrocarvone, (+)-isodihydrocarvone, (+)-neodihydrocarveol, (-)-dihydrocarveol, (+)-isodihydrocarveol, and (+)-neoisodihydrocarveol by the action of this bacteria; (+)-dihydrocarvone and (-)-dihydrocarveol are the major products.

The metabolic pathways are also discussed.

(Received June 8, 1973)

緒 言

著者らは一連のテルペン類 (特にモノテルペン類) の微生物転換に関する研究の一環として, 土壌より集積法によって新たに分離した *Pseudomonas* に属する 1 菌株を用いて, 特に (-)-carvone の転換について研究した。

その結果, 使用菌株は (-)-carvone を還元的に転換し, (+)-dihydrocarvone, (-)-dihydrocarveol を主生産物, (+)-isodihydrocarvone, (+)-neodihydrocarveol, (+)-neoisodihydrocarveol, (+)-isodihydrocarveol を副生産物として生成することがわかった。

(+)-dihydrocarvone の生成に関しては Dhavalikar⁽¹⁾ らが *Pseudomonad* による *d*-limonene の転換生産物として, (+)-carvone とともに報告しているが, 彼らは (+)-carvone が接触還元された場合, (-)-dihydrocarvone が得られることから, *Pseudomonad* においては *d*-limonene → limonene 1,2-epoxide → (+)-dihydrocarvone の酸化経路の存在を推定している。

* テルペン類の微生物転換 (第 13 報)。

Fig. 1. Proposed Metabolic Pathways of (-)-Carvone by *Pseudomonas ovalis*, Strain 6-1.

A. (+)-dihydrocarvone, B. (+)-isodihydrocarvone, C. (+)-neodihydrocarveol, D. (-)-dihydrocarveol, E. (+)-isodihydrocarveol, F. (+)-neoisodihydrocarveol.

しかし著者らのように (一)-carvone の環内二重結合が還元され, dihydrocarvone が生成され, またさらにカルボニル基が還元され dihydrocarveol が生成された報告はない。

本報では上記転換生産物の同定および, その生成に対する培養条件の検討, ならびに菌株の同定について報告する。

実験の材料と方法

試薬 基質として用いた (一)-carvone は $[\alpha]_D^{25} = -58.28 (c=1.6, 99.5\% \text{ エタノール})$ を示し, ガスクロマトグラフィーにおいても単一ピークであった。同定の際に用いた (+)-dihydrocarvone, (+)-isodihydrocarvone は O. Wallach⁽²⁾ および J. Read⁽³⁾ の方法に従って (一)-carvone を 25% KOH-エタノール溶液中で Zn 粉末により還元することによって調製した。また (+)-dihydrocarvone は上田⁽⁴⁾ に従って (一)-carvone を アンモニア水-ベンゼン溶液中で金属ナトリウムで還元することによって得た (一)-dihydrocarveol をクロム酸酸化⁽⁵⁾ することによっても調製した。dihydrocarveol の 4 異性体すなわち (一)-dihydrocarveol, (+)-neodihydrocarveol, (+)-isodihydrocarveol, (+)-neoisodihydrocarveol は Meerwein-Ponndorf 還元法⁽⁶⁾ に従って (+)-dihydrocarvone, (+)-isodihydrocarvone より調製した。

細菌の分離および同定 基礎培地として 1/5 M-KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 緩衝液 (pH 7.2) 50 ml, NH₄NO₃ 1 g, KCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 粉末酵母エキス 0.5 g にイオン交換水を加えて 1 l にしたものを用いた。(一)-carvone 5 mg を 0.1 ml のエタノールにとかしたものを加えた基礎培地 10 ml を用いて, 各地より採集した土壌から常法に従って (一)-carvone 転換菌を分離した。(一)-carvone 添加培地による培養を数回反復してスクリーニングを行ない, 逐次純粋培養に到達した。細菌の同定は駒形⁽⁷⁾, 飯塚および瀬戸⁽⁸⁾, そして Bergey's Manual (7th edition) に従った。

培養および保存 培養条件の検討, 転換に対する経時的变化および生産物の同定に際しては, 500 ml 容丸底フラスコに 90 ml または 100 ml の基礎培地と 40~100 mg の (一)-carvone (そのまま, または 0.25~2.0 ml のエタノールにとかして) を加え, 1 白金耳の菌体または 30 ml 容試験管で前培養した菌体懸濁液 10 ml を接種

し, 3~7 日間 30°C で振盪培養 (100 回/分) を行なった。

菌株の保存は, 基礎培地 10 ml に (一)-carvone 5 mg を 0.1 ml のエタノールにとかして加えた寒天培地またはブイヨン寒天培地に逐次植えついで行なった。

転換生産物の検索および同定 3~4 日間の培養液を Fig. 2 に示すように, 遠沈して菌体を除き, 上澄をエーテル抽出したものを Product I とし, 残りの水層をさらに 3N HCl で pH 3.0 としてエーテル抽出したものを酸性物質とした。Product I 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, 分取ガスクロマトグラフィーにより分離, 精製し, Product I-A, B, C, D, E, F とし, authentic な化合物と比較することによって同定した。各生産物の検出にはガスクロマトグラフィー (島津 GC-4A 型) と薄層クロマトグラフィー (Kiesel gel G : Kiesel gel GF₂₅₄ = 2 : 1) を行なった。薄層クロマトグラフィーの展開溶媒は (A) *n*-hexane : benzene : ethyl acetate (40 : 80 : 10), (B) benzene : methanol (10 : 90), (C) *n*-hexane : ether (95 : 5) を, 発色剤は 1% 硫酸バニリン溶液と BPB 溶液を用いた。分取ガスクロマトグラフィーは Varian aerograph series 1700 (10% PEG-20M, 10 feet×3/8 inch, He ガス 80 ml/分, 温度 180°C), 旋光度は Jasco 旋光計 DIP-SL 型, IR スペクトルは日立赤外分光光度計, PMR スペクトルは Jeol-NMR-instrument model JNM-MH-60, マススペクトルは Gas chromatograph-mass spectrometer 島津-LKB-9000 で測定した。

Fig. 2. Fractionation of the Cultivation Products.

結果および考察

菌株の同定

集積培養を行ない, 常法に従って 20 菌株を分離した。そのうちの 1 菌株を選択し, 6-1 菌株と呼称した。6-1 菌株の taxonomic な性質を Table I に, 顕微鏡写真を Fig. 3 に示した。

“Bergey's Manual” および駒形⁽⁷⁾に従えば, 6-1 菌株は *Pseudomonas* sp., の fluorescent group に分類され, *Pseudomonas ovalis* によく性質が一致した。

培養条件

(1) Product I-A の生産に対する有機栄養源, 分散媒および乳化剤の影響: (一)-carvone を唯一の炭素源として培養した場合, Fig. 4 に示すように転換率 3~5%, 菌体量 3mg (最初生産物として Product I-A のみがガスクロマトグラフィーにて検出されたので, 転換率は I-A の生成率としてあらわし, 菌体量は培地 100 ml 当りの乾燥重量としてあらわした) と非常に悪かったの

Table I. Taxonomic Properties of Strain 6-1

Rods, 1.0 to 1.2 by 1.5 to 1.7 microns; short with rounded ends occurring singly or in pairs; motile by means of one to five polar flagella (Fig. 3); gram negative
Gelatin colonies: irregular, lobate, slightly granular, translucent, grayish becoming bluish
Agar colonies: circular, opaque, entire, fluorescence greenish
Glutamate broth: growth and water soluble green pigment produced
Nutrient gelatin stab: no liquefaction
B. C. P. milk: alkaline, not peptonized, not coagulated
Litmus milk: alkaline, not reduced
Nitrate not reduced to nitrite in nitrate broth and succinate-nitrate broth, growth in succinate-nitrate broth
Anaerobical growth with nitrate: negative
Indole: not produced
Hydrogen sulfide: not produced
Starch: not hydrolyzed
Acetylmethylcarbinol: not produced
Catalase: positive
Acid from xylose (卅), glucose (卅), galactose (卅), fructose (+), glycerol; not from sucrose, lactose, maltose, mannitol, soluble starch, dextrin; Gas was not produced.
p-Hydroxybenzoate: assimilated
Source: isolated from soil

で, 有機栄養源としてグルコース (1%), 分散媒としてエタノール (1%), 乳化剤として Triton X-100 (0.01%) を添加して I-A の生産に対する影響を検討した。

Fig. 4 に示すようにエタノールを添加した実験 2 の場合, 転換率 15%, 菌体量 48 mg と他のものに比べて著しく増大することがわかった。またエタノールのみで生育させた実験 6 の場合も, 実験 2 の場合と同程度の菌体量が認められることから, 6-1 菌株は分散媒として用いられたエタノールを栄養源として利用しているものと考えられた。

(2) エタノール濃度の影響: そこで分散媒および栄養源として, エタノールを 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10% (v/v) に調節し, Product I-A の生産および菌体増殖に対するエタノール濃度の影響を検討した。

Fig. 5 に示すように 0.25~2.5% までは同程度の菌体量および転換率を示した。

(3) 沈降炭酸石灰添加の影響: しかしエタノールを添加して培養した場合, 酸性物質として酢酸が生成され, 培地 pH が 4.75 付近まで低下することが見だされたので, 中和剤として沈降炭酸石灰 (1%) を加えて培養した。培地の pH は 7.35 付近に維持された。

Fig. 6 に示すようにガスクロマトグラフィーおよび薄

Fig. 3. Microscopic Photograph of Strain 6-1 (×1000).

Flagella was stained according to Nishizawa and Sugawara.⁽⁸⁾

Fig. 4. Effects of Organic Nutrient, Carrier Solvent and Emulsifier on the Formation of the Products and the Growth of Microorganism, with the Gas Liquid Chromatogram of Exp. No. 2.

Conditions of the cultivation: added to the 100 ml of basal medium Exp. No. (1) 60 mg of (-)-carvone only, (2) 60 mg of (-)-carvone+1% of ethanol, (3) 60 mg of (-)-carvone+1% of glucose, (4) 60 mg of (-)-carvone+0.01% of Triton X-100, (6) 1% of ethanol only. No. (5) presents the inoculated cell.

Gas liquid chromatography conditions: 5 % of PEG-20M, 3 m×3 mm, 160°C, N₂ 45 ml/min.

層クロマトグラフィーにより、生産物として Product I-A とともに Product I-B, C, D が検出された。なお菌体量も約 150 mg と増大した。

(4) (-)-carvone の転換に対する経時的変化: 沈降炭酸石灰を添加して培養したときの (-)-carvone 転換生産物および培地 pH の経時的変化を Fig. 7 に示した。

主生産物として Product I-A (最高収量 37%), I-D (35%), また副生産物として I-B (8%), I-C (15%) を確認した。

Fig. 5. Effect of Ethanol Concentration on the Formation of the Products and the Growth of Microorganism.

Fig. 6. Gas Liquid Chromatogram and Thin Layer Chromatogram of the Conversion Products of (-)-Carvone, When CaCO₃ was Added to the Medium.

Conditions: gas liquid chromatography; same as in Fig. 4, thin layer chromatography; n-hexane: benzene: ethyl acetate = 40: 80: 10, detect; 5% H₂SO₄, 1% vanillin.

生産物の同定

(-)-carvone 100 mg を 1 ml のエタノールにとしたものを 1% 沈降炭酸石灰含有の基礎培地 100 ml に加え、3~4 日間培養後、Fig. 2 に示された方法に従って生産物を分別し、Product I-A, B, C, D, E, F および酸性物質の同定を行なった。

(1) Product I-A および I-B: Product I-A と I-B は立体異性体と考えられ、分離が非常に困難であったので、ガスクロマトグラムにおける割合がそれぞれ 85:15

Fig. 7. Time Course Change of Fermentation of (-)-Carvone by Strain 6-1.

と 65 : 35 のものについて, その立体構造について検討した。

Product I-A と I-B は無色透明の油状物質で, IR スペクトルで 1700 cm^{-1} における飽和ケトン, 1640 および 890 cm^{-1} にイソプロペニル基に起因する吸収を示し, 比旋光度は $[\alpha]_D^{25} = +13.12$ ($c=6$, 99.5% エタノール, 85 : 15) を与え, ガスクロマトグラフ-マススペクトロメトリーでそれぞれ分子量 152 を示すことより, Product I-A と I-B はそれぞれ (+)-dihydrocarvone, (+)-isodihydrocarvone と推定した。

そこで Product I-A と I-B を authentic な (+)-dihydrocarvone, (+)-isodihydrocarvone とガスクロマトグラフィー (Fig. 8), IR, PMR, 2, 4-dinitrophenylhydrazone (R_f 値 0.43, 0.34, 溶媒 C) で比較したところ全く一致したので, それぞれ (+)-dihydrocarvone, (+)-isodihydrocarvone と同定した。

(2) Product I-C および I-D : Product I-C と I-D はそれぞれ無色透明の油状物質として単離され, 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +32.30$ ($c=1.5$, 99.5% エタノール), $[\alpha]_D^{20} = -30.30$ ($c=2.0$, クロロホルム) を与え, マススペクトロメトリーで分子量 154 を示した。そして Product I-C と I-D は合成した (+)-neodihydrocarveol, (-)-dihydrocarveol と同定した。

Fig. 8. Gas Liquid Chromatogram of the Product I-A and I-B.

Conditions : same as in Fig. 4.

と IR (Fig. 9), PMR, ガスクロマトグラフィー, 薄層クロマトグラフィーのすべての面で一致したので, Product I-C は (+)-neodihydrocarveol, Product I-D は (-)-dihydrocarveol と同定した。

Fig. 9. IR Spectra of the Product I-C and I-D.

Fig. 10. Gas Liquid Chromatogram of the Conversion Products of (+)-Dihydrocarvone Plus (+)-Isodihydrocarvone. Conditions: same as in Fig. 4.

(3) Product I-E および I-F: Fig. 10 および Table III に示すように, 代謝中間体である Product I-A と I-B を添加培養したとき, 上記の Product I-C, I-D 以外に Product I-E, I-F が検出された。

Product I-E および I-F はマスペクトロメトリーでそれぞれ 154 の分子量を示し, 合成した (+)-isodihydrocarveol, (+)-neoisodihydrocarveol とガスクロマトグラフィー (Fig. 10) において一致することより Product I-E と I-F は Product I-B がさらに転換された (+)-isodihydrocarveol, (+)-neoisodihydrocarveol と考えられた。

(4) 酸性物質: エタノールを添加した場合にのみ酢酸を同定した。

休止菌体を用いての (-)-carvone の転換
基礎培地に 0.5% (v/v) のエタノールまたは 0.2% (w/v) の酢酸ナトリウムを唯一の炭素源として 6-1 菌株を増殖させ, 調製した休止菌体を用いて Table II に示した条件で (-)-carvone の転換反応を行なった。

その結果, 休止菌体によっても (-)-carvone は (+)-dihydrocarvone, (+)-isodihydrocarvone に転換されることがわかった。

中間体添加培養による転換経路の推定

(-)-carvone の転換経路を解明する目的で, 代謝中間体である (+)-dihydrocarvone (I-A), (+)-isodihydrocarvone (I-B), (+)-neodihydrocarveol (I-C), (-)-dihydrocarveol (I-D)

Table II. (-)-Carvone Conversion by Resting Cell*

1st culture	2nd culture		
	Products (% of the total)		
Substrate for growth	(-)-Carvone (recovered)	(+)-Dihydrocarvone	(+)-Isodihydrocarvone
Ethanol (0.5%, v/v)	91	8	1
Sodium acetate (0.2%, w/v)	82	13	5

* The culture was incubated with 0.2% (w/v) of sodium acetate or 0.5% (v/v) of ethanol as a sole carbon source for 24 hr at 30°C and the cell was harvested by centrifugation at 8000rpm for 10 min. Then the cell was washed twice with the sterilized ion exchanged water, and suspended with 1/20 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer (pH 7.2).

After shaking for 2 hr and centrifugation at 8000rpm for 10 min, about 50 mg of the harvested cell (presented as the dried cell) was suspended in 10 ml of the same buffer and shaken at 30°C for 24 hr with 10 mg of (-)-carvone in the 30 ml of test tube.

Gas liquid chromatography conditions: same as in Fig. 4.

を添加して培養した。そして, その結果を Table III に示した。

(-)-carvone は (+)-dihydrocarvone, (+)-isodihydrocarvone に転換され, それらはさらに (-)-dihydrocarveol, (+)-neodihydrocarveol, (+)-neoisodihydrocarveol, (+)-isodihydrocarveol に転換された。(+)-neodihydrocarveol と (-)-dihydrocarveol の

Table III. Gas-liquid Chromatographic Analysis of Conversion Products

Substrate*	Products (% of the total)						
	(-)-Carvone	I-A	I-B	I-C	I-D	I-E**	I-F**
(-)-Carvone***	24	27	5	13	31	—	+
(+)-Dihydrocarvone (I-A) + (+)-isodihydrocarvone (I-B) (80:20)	—	43	12	10	29	1	6
(+)-Neodihydrocarveol (I-C)	—	29	3	59	9	—	—
(-)-Dihydrocarveol (I-D)	—	3	—	—	97	—	—

* Medium composition: substrate each 60 mg and ethanol 1 ml per synthetic medium 100 ml.

** I-E = (+)-isodihydrocarveol, I-F = (+)-neoisodihydrocarveol.

*** 1% of CaCO_3 was added to the medium.

Gas liquid chromatography conditions: same as in Fig. 4.

(+)-dihydrocarvone への逆反応が観察され, その転換率は (+)-neodihydrocarveol 41%, (一)-dihydrocarveol 3% であった. このことより, Fig. 7 で指摘された (+)-neodihydrocarveol が多量に蓄積されない原因が明らかとなった.

以上の結果, *Pseudomonas ovalis*, 6-1 菌株による (一)-carvone の転換はエタノールを栄養源として生育した菌体が栄養源として利用しない (一)-carvone を純粋に転換する反応で, 今までよく知られている co-oxidation^(9,10) という概念を適用すれば co-reduction という用語で表現することが妥当と考えられる. そしてその初期転換経路を Fig. 1 に示し, 主経路として (一)-carvone $\longrightarrow$ (+)-dihydrocarvone $\longrightarrow$ (一)-dihydrocarveol を推定した.

要 約

本報はテルペン類の微生物転換に関する研究の一環として, 土壌より新たに分離し, 同定した *Pseudomonas ovalis*, 6-1 菌株を用いて (一)-carvone の転換反応について行なったものである. その結果, 次のことが明らかとなった.

(1) 6-1 菌株による (一)-carvone の転換反応はエタノールを栄養源として菌体増殖を行ない, 栄養源として利用され得ない (一)-carvone を純粋に転換する co-reduction と考えられた. また栄養源としては, エタノール以外に *n*-プロパノール, *n*-ブタノールがよく利用されたが, メタノール, *n*-アミルアルコールではほとんど生育されなかった. そしてアルコール類の利用に際しては, 中和剤として加えた沈降炭酸石灰が有効であった.

(2) 6-1 菌株による (一)-carvone の転換経路として, Fig. 1 に示しているように, (一)-carvone $\longrightarrow$

(+)-dihydrocarvone $\longrightarrow$ (一)-dihydrocarveol を主経路とし, (+)-isodihydrocarvone, (+)-neodihydrocarveol, (+)-isodihydrocarveol, (+)-neoisodihydrocarveol の生成を副経路とする還元過程の存在することが明らかとなった. そして (一)-carvone に見られるような微生物による環内二重結合, カルボニル基の 2 段階還元過程は興味深いものと考えられた.

本報告の大意は, 日本農芸化学会 48 年度大会において講演した.

本研究を行なうに当たり, ご教示, ご討議をいただき, 終始ご鞭撻くださった本学農学部農産製造学研究室野々村誠一博士に感謝いたします. また, ご助言をいただいた農業化学研究室上田博夫博士に感謝いたします.

- (1) R. S. Dhavalikar and P. K. Bhattacharyya: *Indian J. Biochem.*, **3**, 144 (1966); R. S. Dhavalikar, P. N. Rangachari and P. K. Bhattacharyya: *ibid.*, **3**, 158 (1966).
- (2) O. Wallach: *Ann.*, **286**, 131 (1895).
- (3) J. Read: *J. Chem. Soc.*, **1934**, 229.
- (4) H. Ueda and S. Shimizu: *Bull. Agr. Chem. Soc., Japan*, **23**, 524, 526 (1959).
- (5) L. T. Sandborn: "Organic Synthesis," Coll. Vol. I, John Wiley & Sons, Inc., New York & London, p. 340.
- (6) A. L. Wilds: "Organic Reactions," Vol. II, John Wiley & Sons, Inc., New York & London, p. 198.
- (7) 駒形和男: 農化, **35**, 981 (1961).
- (8) 飯塚 廣, 瀬戸尚典: 醸協誌, **20**, VII 14~25 (1962).
- (9) B. J. Abbott and W. E. Gledhill: *Advances in Applied Microbiology*, **14**, 324 (1971).
- (10) R. S. Horvath: *Bacteriological Reviews*, **36**, 146 (1972).