[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 56, No. 12, pp. 1149~1153, 1982]

3-Methylundecane および 2-methyl- 2-nonanol の微生物転換

中島健二, 東原孝規, 佐藤昭雄, 福岡誠一,
谷口政信*, 保坂隆雄*

(工業技術院微生物工業技術研究所, *丸善石油化学株式会社研究所)

昭和 57 年 7 月 30 日 受 理

Microbial Conversion of 3-Methylundecane and 2-Methyl-2-Nonanol

Kenji NAKAJIMA, Takanori HIGASHIHARA, Akio SATO, Seiichi FUKUOKA,
Masanobu TANIGUCHI* and Takao HOSAKA*

Fermentation Research Institute, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305

*Research Center, Maruzen Petrochemical Co.,
3-Goi-Minamikaigan, Ichihara, Chiba 290

Alternating cooligomers (trimers) of 1,3-butadiene and propylene or 1-butene, and their derivatives were submitted to microbial conversion by hydrocarbon-oxidizing *Nocardia* sp. BPM 1613. Of these oligomers, 3-methylundecane was utilized by this strain as the sole source of carbon, and two oxidation products accumulated in the culture broth. The products were extracted with diethyl ether and isolated by preparative thin-layer chromatography on silica gel. These products were determined as 3-methylpentanoic acid and DL-3-hydroxy-3-methylpentanoic acid on the basis of IR, NMR and mass spectra examinations.

n-Hexadecane-grown cells of BPM 1613 strain produced an oxidation product from 2-methyl-2-nonanol, which was not utilized in growth of the strain. The product was extracted with diethyl ether from the culture broth and isolated by column chromatography on silica gel. The structure of this product was determined as a new compound, termed 8-hydroxy-8-methylnonanoic acid. (Received July 30, 1982)

緒 言

最近, イソブレン, 1,3-ブタジエンおよびプロピレンのようなジエン類およびオレフィン類を基本骨格とする交互重合オリゴマーの合成法が開発され^(1,2), 天然イソプレノイド炭化水素と類似した種々の化合物が合成されている。天然イソプレノイド炭化水素類の微生物転換については, テルペン類^(3,4), プリスタン⁽⁵⁻⁸⁾, スクアレ^(9,10)等に関して種々報告されている。しかしながら, このような合成オリゴマーの微生物転換に関する報告はほとんどみられない。著者らは, 前記合成オリゴマーからの微生物転換による有用物質の生産を目的として, これら化合物に対する微生物作用の検討および転換物質の検索など行っている。前報⁽¹¹⁾では, *Nocardia* sp. BPM

1613 を用いイソブレンとプロピレンの 3 量体 2,4-dimethyl-1,4-nonadiene の微生物転換を試み, 酸化生産物 4,6-dimethyl-3,6-heptadienoic acid が生成することを報告した。

今回は前記菌株を用いて, 1,3-ブタジエンとプロピレンの 3 量体 (Fig. 1; I, II), 1,3-ブタジエンと 1-ブテンの 3 量体およびその水素添加物 (Fig. 1; III~VI), 1,3-ブタジエンとプロピレンの 3 量体のアルコールおよびその水素添加物 (Fig. 1; VII~X), および 1,3-ブタジエンと 1-ブテンの 3 量体のアルコールおよびその水素添加物 (Fig. 1; XI~XII) からの微生物転換物質を検索し, 1,3-ブタジエンと 1-ブテンの 3 量体の水素添加物 3-methylundecane (Fig. 1; VI) から 3-methylpentanoic acid (Fig. 3; A) と 3-hydroxy-3-methylpenta-

Fig. 1. Structures of Synthetic Oligomers of 1,3-Butadiene and Propylene or 1-Butene. Trimers of 1,3-butadiene and propylene: **I**, 2,7-dimethyl-1,4-octadiene; **II**, 2-methyl-1,4-nonadiene. Trimers of 1,3-butadiene and 1-butene, and its hydrogenated compounds: **III**, 2-ethyl-7-methyl-1,4-nonadiene; **IV**, 2-ethyl-1,4-decadiene; **V**, 3,8-dimethyldecane; **VI**, 3-methylundecane. Alcohol of trimers of 1,3-butadiene and propylene, and its hydrogenated compounds: **VII**, 2,7-dimethyl-4-octen-2-ol; **VIII**, 2-methyl-4-nonen-2-ol; **IX**, 2,7-dimethyl-2-octanol; **X**, 2-methyl-2-nonanol. Alcohol of trimers of 1,3-butadiene and 1-butene, and its hydrogenated compound: **XI**, 3-methyl-5-undecen-3-ol; **XII**, 3-methyl-3-undecanol.

noci acid (Fig. 3; **B**) の生成, および 1,3-ブタジエンとプロピレンの 3 量体アルコールの水素添加物 2-methyl-2-nonanol (Fig. 1; **X**) から新規化合物 8-hydroxy-8-methylnonanoic acid (Fig. 3; **C**) の生成がそれぞれ認められたので, これらの結果について報告する。

実験方法

1. 供試菌株 実験に用いた菌株は, *n*-パラフィン, プリスタン等の炭化水素資化能を有する *Nocardia* sp. BPM 1613⁽⁶⁾ である。

2. 培地 NaNO_3 5.0 g, KH_2PO_4 1.5 g, Na_2HPO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 酵母エキスを蒸留水に溶かし 1 l とし, pH 7.2 に調整した A 培地および A 培地の酵母エキスを 2.0 g に置き換えた B 培地を用いた。

3. 培養方法 前培養は, A 培地に炭素源として 0.5% (v/v) の混合 *n*-パラフィン⁽²⁾ を加えた前培養培地 50 ml を 500 ml 容肩付フラスコに入れ滅菌後, 植菌し, 往復振盪機 (120 rpm) により 30°C, 2 日間行った。酸化生産物の検索は, A 培地 50 ml と別殺菌した基質 1% (v/v) を含む 500 ml 容肩付フラスコに前培養液 4 ml を接種し, 5 日間培養する培養法 (I), および炭素源として利用されないため菌の生育が起らない基質については, 生育炭素源として *n*-hexadecane 1% (v/v) を加えた B 培地 50 ml に前培養液 4 ml を加え 3 日間培養し, 菌を増殖させ, 培地中の *n*-hexadecane が消失した後, 基質 1% (v/v) を添加してさらに 5 日間培養する培養法 (II) で行った。3-methylundecane からの酸化生産物を単離するための培養は培養法 (I) により, 2-methyl-2-nonanol からの酸化生産物を単離するための培養は培養法 (II) により行った。

4. 使用した化合物 化合物 **I**~**XII** (Fig. 1) は谷口ら^(1,2)の方法により合成し, TLC および GLC によりいずれも単一物質であることを確認した。また標準の 3-methylpentanoic acid は東京化成工業(株)社製を使用した。

5. クロマトグラフィー 酸化生産物の検索およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーのモニタリングは TLC プレート (Silica Gel F₂₅₄, メルク社製) を用いて行った。ベンゼン-アセトン (20:1, v/v) を主な展開溶媒として使用したが, アルコール類からの酸化生産物の TLC にはベンゼン-アセトン (5:1, v/v) も併用し, 0.04% bromocresol green (96% エタノール中) の噴霧, および 60% 硫酸を噴霧した後の加熱により酸化生産物の検出を行った。酸化生産物の単離・精製は, 分取用 TLC プレート (Silica Gel 60 F₂₅₄, 厚さ 2 mm, 20×20 cm, メルク社製) あるいはシリカゲルカラム

(Silica Gel 200 mesh, 和光純薬工業(株)製)を用いて行った。また、酸化生産物の純度の検定は、TLC およびガスクロマトグラフィー (GLC) により行った。GLC は島津 GC-5A 型ガスクロマトグラフを使用し、ガラスカラム: 0.3 (i. d.) × 200 cm, 充填剤: 5% DEGS および 1% H_3PO_4 で処理した Chromosorb W AW (60~80 mesh), キャリヤーガス: N_2 40 ml/min, カラム温度: 120~200°C で行った。

6. 機器分析 赤外線吸収 (IR) スペクトルは日本分光 IR-G 型を用い、液膜法で測定した。プロトン核磁気共鳴吸収 (1H -NMR) スペクトルは日本電子 C 60-HL 型 (60 MHz, $CDCl_3$) を用いて、また炭素-13 核磁気共鳴吸収 (^{13}C -NMR) スペクトルは日本電子 FX-60 型 (15 MHz, $CDCl_3$) を使用して、テトラメチルシラン (TMS) を内部標準物質として測定した。マスマスペクトルは日立 K 53 型 (GLC)-日立 RMU-7 M 型 (MS) を用い下記の条件で測定した。GLC: 液相, 10% SE 30; カラム 0.3 (i. d.) × 100 cm; キャリヤーガス (He) 流量, 20 ml/min; カラム温度, 50~200°C (5°C/min). MS: イオン化電圧, 15 eV; イオン加速電圧, 3.2 kV; イオン源温度, 200°C.

実験結果

1. 酸化生産物の検索

各種の合成オリゴマー類からの酸化生産物の検索を、*Nocardia* sp. BPM 1613 を用いて培養法 (I) で行った。その結果、3-methylundecane (VI) からのみ酸化生産物の生成蓄積が認められたが、2,7-dimethyl-1,4-octadiene (I), 2-methyl-1,4-nonadiene (II), 2-ethyl-7-methyl-1,4-nonadiene (III), 2-ethyl-1,4-decadiene (IV), 3,8-dimethyldecane (V), 2,7-dimethyl-4-octen-2-ol (VII), 2-methyl-4-nonen-2-ol (VIII), 2,7-dimethyl-2-octanol (IX), 2-methyl-2-nonanol (X), 3-methyl-5-undecen-3-ol (XI) および 3-methyl-3-undecanol (XII) からの酸化生産物はいずれもほとんどみられなかった。そして、菌の生育が起らなかった 3-methylundecane 以外の合成オリゴマー類は炭素源として利用されず、*n*-hexadecane で菌を増殖させた後基質を加える培養法 (II) により転換物質の検索を行った結果、2-methyl-2-nonanol (X) から酸化生産物を認めた。

2. 3-Methylundecane (VI) および 2-methyl-2-nonanol (X) からの酸化生産物の単離

3-Methylundecane からの酸化生産物の単離は次のようにして行った。3-methylundecane を基質とした *Nocardia* sp. BPM 1613 の培養液 (5 l) を硫酸酸性下でエーテル抽出、部分濃縮後、不溶物を遠沈除去した。さらに、エーテルで 1 l とした後、pH 13 の緩衝液を加え酸性物質を分別した。基質の 3-methylundecane はエーテル層に残った。酸性物質を含む緩衝液区分を硫酸酸性下でエーテル抽出し、無水硫酸ナトリウムにより脱水・濃縮した。濃縮油状物質 (1.5 g) を分取用 TLC プレートにスポットし、ベンゼンで 5 回展開し、風乾後目的物質区分のシリカゲルをかきとり、乳ばちで粉碎し、これを三角フラスコに採り、シリカゲルの全体が湿る程度に 0.1 N 硫酸を加えた。さらにエーテルを加えてスターラーでかくはんしながら抽出を 3 回繰り返す、化合物 A (45 mg) と化合物 B を含む区分を得た。化合物 B を含む区分は、再び分取用 TLC プレートにスポットし、ベンゼン-酢酸 (10:1) で 2 回展開した後、上記と同様に抽出分離し、化合物 B (0.18 g) を得た。

また、2-methyl-2-nonanol からの酸化生産物の単離は下記により行った。培養液 (1.5 l) を酸性下でエーテル抽出し、エーテル区分に pH 13 の緩衝液を加え酸性物質を分別した。酸性物質を含む緩衝液区分を硫酸酸性下でエーテル抽出、部分濃縮後、不溶物を遠沈除去した。濃縮油状物質をシリカゲルカラム (35 × 300 mm) にかけて、ベンゼン-アセトン (5:1) で溶出し、化合物 C (0.4 g) を得た。

3. 3-Methylundecane (VI) および 2-methyl-2-nonanol (X) からの酸化生産物の同定

TLC および GLC により、化合物 A および B が単一物質であることを確認した後、以下のように構造の検討を行った。化合物 A は、GLC, IR およびマスマスペクトルが 3-methylpentanoic acid の標準物質と完全に一致したことから 3-methylpentanoic acid と同定した。化合物 B は、IR スペクトル $IR_{\nu_{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3100~3400 および 1710 (—COOH), 3300 (—OH), および 1380 (— $\dot{C}H_3$) より飽和ヒドロキシカルボン酸であることが明らかになった。化合物 B の 1H -NMR スペクトルは NMR $\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$: 0.92 (3H, t, — $\dot{C}H_2$ — $\dot{C}H_3$), 1.27 (3H, s, HO — $\dot{C}$ — $\dot{C}H_3$), 1.60 (2H, q, — $\dot{C}H_2$ — $\dot{C}H_3$), 2.53 (2H, s, — $\dot{C}$ — $\dot{C}H_2$ —COOH) および 6.60 (2H, s, —OH および —COOH) を、 ^{13}C -NMR

Fig. 2. IR Spectrum of Product C.

スペクトルは NMR $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$: 8.2 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 26.0 ($\text{HO}-\text{C}-\text{CH}_3$), 34.5 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 44.2 ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 71.7 ($\text{HO}-\text{C}-\text{CH}_3$) および 177.1 ($-\text{COOH}$) をそれぞれ示した。また化合物 **B** のマススペクトルの最大質量ピークとして m/z : 103 [$\text{M}^+ - (-\text{CH}_2\text{CH}_3)$] を検出した。なお、本化合物は光学不活性体 ($[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$; $c = 2.0$, EtOH) であった。以上の結果より、化合物 **B** は DL-3-hydroxy-3-methylpentanoic acid であることを確認した。

化合物 **C** は、TLC および GLC により単一物質であることを確認し、以下の機器分析により構造の検討を行った。化合物 **C** の IR スペクトル (Fig. 2) より IR_{max} cm^{-1} : 3200~3500 および 1720 ($-\text{COOH}$), 3400 ($-\text{OH}$), および 1380 ($-\text{CH}_3$) で飽和ヒドロキシカルボン酸であることが明らかになった。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは NMR $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$: 1.18 (6H, s, $-\text{C}-\text{CH}_3$), 1.35 [10H, s, ($-\text{CH}_2-$)₅], 2.25 (2H, t, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$) および 7.00 (2H, s, $-\text{OH}$ および $-\text{COOH}$) を、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは NMR $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$: 23.9 (C-6), 24.5 (C-3), 28.7 (C-5, 9), 29.6 (C-4), 33.9 (C-2), 43.7 (C-7), 71.4 (C-8) および 178.2 (C-1, $>\text{C}=\text{O}$) をそれぞれ示した。また化合物 **C** を hexamethyldisilazane と trimethylchlorosilane 混合物にてトリメチルシリル化したもののマススペクトルの最大質量ピークとして m/z : 317 [$\text{M}^+ - (-\text{CH}_3)$] を検出した。以上の結果から、化合物 **C** は新規化合物 8-hydroxy-8-methylnonanoic acid であることを確認した。

考 察

これまで、天然イソプレノイド炭化水素およびその誘導体の微生物転換についての研究は種々なされている

が⁽³⁻¹⁰⁾、化学合成のイソブレン系および関連化合物の微生物転換については研究例が少ない。イソブレン、1,3-ブタジエン、プロピレンおよび1-ブテンを基本骨格とした交互重合の合成オリゴマーの微生物転換については、*Nocardia* sp. BPM 1613 によるイソブレンとプロピレンの3量体 2,4-dimethyl-1,4-nonadiene からの 4,6-dimethyl-3,6-heptadienoic acid の生成⁽¹¹⁾が著者らにより報告された。

今回は、1,3-ブタジエンとプロピレンの3量体、1,3-ブタジエンと1-ブテンの3量体およびその水素添加物、1,3-ブタジエンとプロピレンの3量体のアルコールおよびその水素添加物、および1,3-ブタジエンと1-ブテンの3量体のアルコールおよびその水素添加物からの転換物質について検討した。その結果、使用した基質のうち、*Nocardia* sp. BPM 1613 は 1,3-ブタジエンと1-ブテンの3量体の水素添加物 3-methylundecane を唯一の炭素源として生育し、培養液中に代謝中間産物と考えられる 3-methylpentanoic acid および 3-hydroxy-3-methylpentanoic acid を生成蓄積した (Fig. 3)。これら酸化生産物の蓄積は、3-methylundecane が本菌株によりまずメチル側鎖から遠い末端が酸化され、次いで β -酸化が進み、3-methylpentanoic acid および水酸化された 3-hydroxy-3-methylpentanoic acid が生成するが、その後3位のメチル側鎖により β -酸化の速度が遅くなるためと推定している。これら酸化生産物はタバコの葉または香気中^(12,13)に含まれていることが知られており、これらのエステル類はタバコの香気改良剤としての用途が期待できる^(14,15)。

また、本菌株は 1,3-ブタジエンとプロピレンの3量体アルコールの水素添加物 2-methyl-2-nonanol を唯一の炭素源としては、ほとんど生育できなかったが、生育炭素源として *n*-hexadecane を添加した培地を用いること

Fig. 3. Structures of Substrates and Products. **VI**, 3-methylundecane; **X**, 2-methyl-2-nonanol; **A**, 3-methylpentanoic acid; **B**, DL-3-hydroxy-3-methylpentanoic acid; **C**, 8-hydroxy-8-methylnonanoic acid.

により、培養液中に末端酸化生産物 8-hydroxy-8-methylnonanoic acid を生成蓄積した (Fig. 3). 新規化合物 8-hydroxy-8-methylnonanoic acid はアリの分泌する生長阻害物質ミルミカシン (3-hydroxydecanoic acid) の近縁化合物であり^(16,17)、何らかの生理作用が期待できるものと考えられる。

要 約

炭化水素酸化菌 *Nocardia* sp. BPM 1613 による 1,3-ブタジエン、プロピレンおよび 1-ブテンを基本骨格とする交互重合オリゴマー (3 量体) およびそれらの誘導体からの酸化生産物の検索を行った。これらのオリゴマー類のうち、本菌株は 3-methylundecane を唯一の炭素源として生育し、培養液中に 2 種の酸化生産物を蓄積した。培養液のエーテル抽出物を分取用 TLC プレートにより単離・精製し、IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR スペクトル等により酸化生産物の構造を検討した結果、3-methylpentanoic acid および DL-3-hydroxy-3-methylpentanoic acid であることを確認した。これらの化合物は、3-methylundecane の本菌による代謝中間産物と考えられる。

また、本菌株は 2-methyl-2-nonanol を炭素源として利用できないが、*n*-hexadecane での培養菌体に本基質を添加して培養を続けたところ、培養液中に酸化生産物の生成蓄積が認められた。培養液のエーテル抽出物をシリカゲルカラムにより単離後・精製、酸化生産物の構造を検討した結果、2-methyl-2-nonanol の ω -位のメチルが酸化を受けた新規化合物 8-hydroxy-8-methylnonanoic

acid であることを確認した。

- (1) 谷口政信, 高橋俊明, 菊地栄幸, 川崎明裕, 古川淳三: 第 24 回高分子討論会要旨集, 1975, p.587.
- (2) 川崎明裕, 谷口政信, 丸山 功, 高橋英二, 松井正明: 特開昭, 56-164128.
- (3) 辰巳忠次: 石油と微生物, **11**, 1 (1974).
- (4) 辰巳忠次, 島 昭二, 野間義明: 石油と微生物, **13**, 33 (1975).
- (5) D. F. Jones: *J. Chem. Soc. (C)*, **1968**, 2809.
- (6) K. Nakajima, A. Sato, T. Misono, T. Iida and K. Nagayasu: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1859 (1974).
- (7) R. E. Cox, J. R. Maxwell, R. G. Ackman and S. H. Hooper: *Biochim. Biophys. Acta*, **360**, 166 (1974).
- (8) 中島健二, 佐藤昭雄: 農化, **55**, 825 (1981).
- (9) Y. Yamada, C. W. Seo and H. Okada: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1741 (1981).
- (10) 中島健二, 佐藤昭雄, 御園光信, 飯田武夫: 農化, **55**, 1187 (1981).
- (11) 中島健二, 佐藤昭雄, 高原義昌, 保坂隆雄, 谷口政信: 農化, **54**, 27 (1980).
- (12) T. Fukuzumi, H. Takahara and H. Kaneko: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 513 (1966).
- (13) T. Chuman and M. Noguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1021 (1977).
- (14) R. E. Means, A. G. Kallianos and K. P. Tenney: U. S. Patent, 3782391 (1974) [*C. A.*, **80**, 215 (1974)].
- (15) I. Ohnishi, I. Morishita, K. Sakurai, H. Takahara and T. Fukuzumi: Japan Patent, 7032919 (1970) [*C. A.*, **75**, 140 (1971)].
- (16) 岩垂 司, 岩波洋造: 油化学, **28**, 309 (1979).
- (17) 岩波洋造, 岩垂 司: 現代化学, No. 102, 14 (1979).