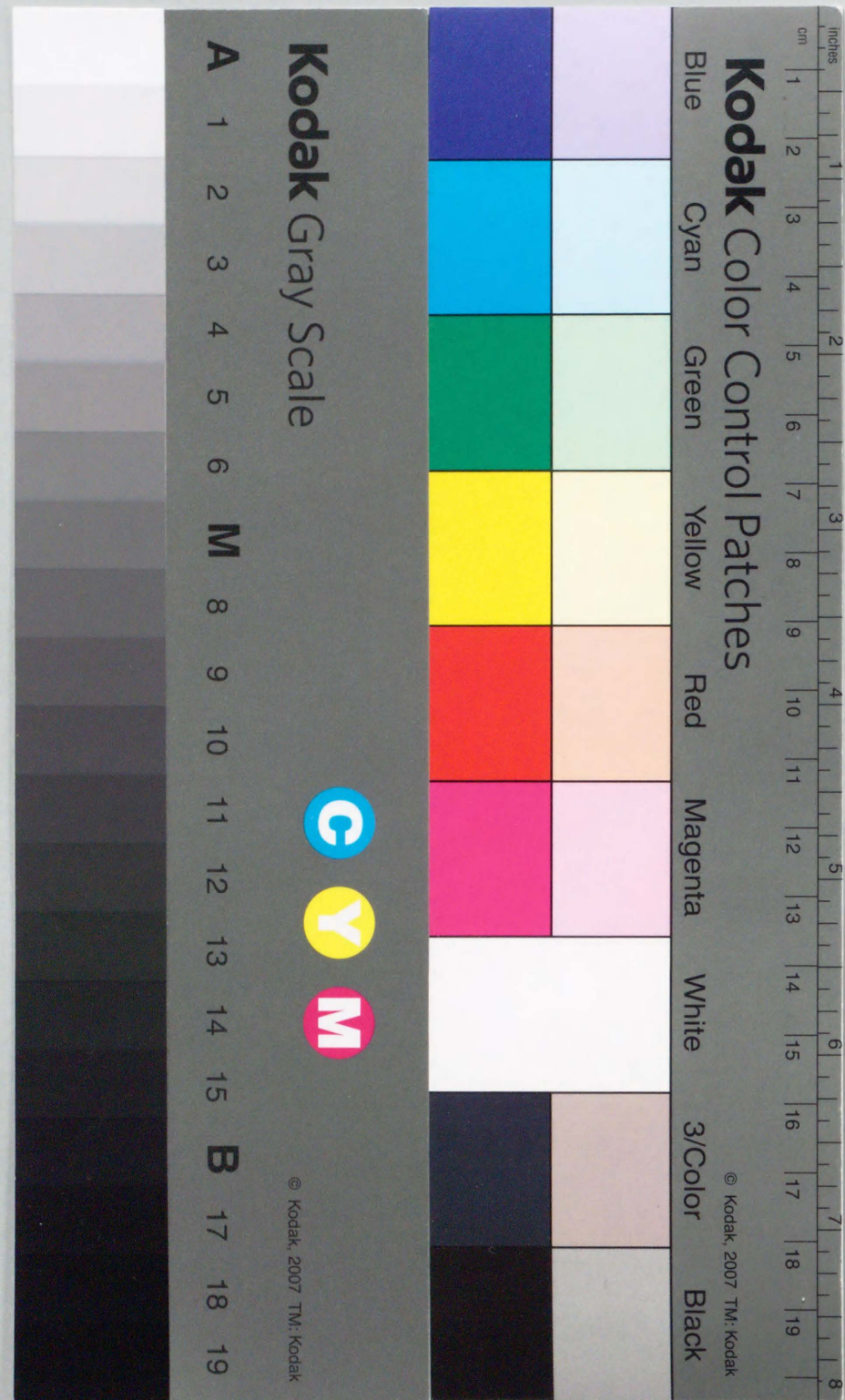


バクテリアによる芳香族化合物の水酸化と
ケトン基の還元に関する研究

1998年3月

富山大学大学院工学研究科

井上 智実



博 士 論 文

井上 智実

目次

| | |
|------|---|
| 序論 | 5 |
| 引用文献 | 7 |

第1部 バクテリアを用いた芳香族炭化水素の酸化

第1章 菌体の分離および最適培養法の検討

| | |
|--------------------------|----|
| 第1節 緒言 | 8 |
| 第2節 実験 | 8 |
| 2.1 標準培地の調製 | |
| 2.2 ナフタレン酸化バクテリアのスクリーニング | |
| 2.3 生成物の分析 | |
| 第3節 結果 | 9 |
| 3.1 ナフタレン酸化バクテリアのスクリーニング | |
| 3.2 培養条件が菌体の増殖に及ぼす影響 | |
| 第4節 結論 | 15 |
| 第5節 引用文献 | 16 |

第2章 ナフタレン類の酸化条件の検討

1 ナフタレンの酸化条件の検討

| | |
|---|----|
| 第1節 緒言 | 17 |
| 第2節 実験 | 17 |
| 2.1 菌株および培養 | |
| 2.2 ナフタレンの反応および生成物の分析 | |
| 第3節 結果と考察 | 19 |
| 3.1 ナフタレンの酸化 | |
| 3.2 ナフタレンの酸化生成物の分離と分析 | |
| 3.3 ナフタレンおよび酸化生成物が <i>B. cereus</i> の増殖に及ぼす影響 | |
| 3.4 反応条件が1-ナフトール収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.1 溶解剤が収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.2 反応手順が収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.3 反応温度、培地pHが収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.4 培地濃度が収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.5 基質添加量が収率に及ぼす影響 | |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.4.6 | 菌体量が収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.7 | ナフタレン酸化物が収率に及ぼす影響 | |
| 3.5 | ナフタレンの酸化反応における <i>B. cereus</i> 酵素系の検討 | |
| 第4節 | 結論 | 33 |
| 第5節 | 引用文献 | 34 |
| 2 | メチルナフタレン類の酸化生成物および酸化条件の検討 | |
| 第1節 | 緒言 | 35 |
| 第2節 | 実験 | 35 |
| 2.1 | メチルナフタレン類の反応および生成物の分析 | |
| 第3節 | 結果と考察 | 36 |
| 3.1 | メチルナフタレン類の酸化 | |
| 3.2 | メチルナフタレン類の酸化活性の比較 | |
| 3.3 | メチルナフタレン類の酸化生成物の分離と分析 | |
| 3.3.1 | 1-Me-naphの酸化生成物の分離と分析 | |
| 3.3.2 | 2-Me-naphの酸化生成物の分離と分析 | |
| 3.3.3 | 2,6-Me ₂ -naphの酸化生成物の分離と分析 | |
| 3.4 | 反応条件が収率に及ぼす影響 | |
| 3.5 | 標品の合成 | |
| 3.5.1 | 2,6-(HOCH ₂) ₂ -naphの合成 | |
| 3.5.2 | 2-(HOCH ₂)-6-Me-naphの合成 | |
| 3.5.3 | 6-Me-2-(COOH)-naphの合成 | |
| 第4節 | 結論 | 46 |
| 第5節 | 引用文献 | 47 |
| 3 | ビフェニルの酸化条件の検討 | |
| 第1節 | 緒言 | 48 |
| 第2節 | 実験 | 49 |
| 2.1 | 菌株および培養 | |
| 2.2 | ビフェニルの反応および生成物の分析 | |
| 第3節 | 結果と考察 | 50 |
| 3.1 | ビフェニルの酸化 | |
| 3.2 | ビフェニルの酸化活性の比較 | |
| 3.3 | ビフェニルの酸化生成物の分離と分析 | |
| 3.4 | ビフェニルおよび生成物が <i>B. brevis</i> の増殖に及ぼす影響 | |
| 3.5 | 反応条件が収率に及ぼす影響 | |
| 3.5.1 | 反応温度が収率に及ぼす影響 | |
| 3.5.2 | 培地 pH が収率に及ぼす影響 | |

| | | |
|-------|-----------------------|----|
| 3.5.3 | 培地濃度が収率に及ぼす影響 | |
| 3.5.4 | 基質添加量が収率に及ぼす影響 | |
| 3.5.5 | 菌体量が収率に及ぼす影響 | |
| 3.6 | ビフェニルの反応経路の検討 | |
| 3.7 | ビフェニルの酸化反応が生菌体数に及ぼす影響 | |
| 第4節 | 結論 | 62 |
| 第5節 | 引用文献 | 63 |
| 第3章 | 1-ナフトール収率増加法の検討 | |
| 第1節 | 緒言 | 64 |
| 第2節 | 実験 | 64 |
| 2.1 | アニオン交換樹脂の調製 | |
| 2.2 | 菌体の固定化 | |
| 第3節 | 結果と考察 | 65 |
| 3.1 | アニオン交換樹脂が収率に及ぼす影響 | |
| 3.2 | 添加物がナフタレンの酸化に及ぼす影響 | |
| 3.2.1 | 金属イオンがナフタレンの酸化に及ぼす影響 | |
| 3.2.2 | バルビタールがナフタレンの酸化に及ぼす影響 | |
| 3.3 | 固定化バクテリアを用いた酸化 | |
| 第4節 | 結論 | 73 |
| 第5節 | 引用文献 | 74 |

第2部 バクテリアを用いたケトン基の還元および生成物の膜分離

| | |
|--|----|
| 第1章 ケトン基の還元における反応条件の検討 | |
| 第1節 緒言 | 75 |
| 第2節 実験 | 75 |
| 2.1 9-フルオレノンの反応および生成物の分析 | |
| 2.2 1-アセナフテノールの反応および生成物の分析 | |
| 第3節 結果と考察 | 76 |
| 3.1 9-フルオレノンの還元 | |
| 3.2 9-フルオレノンの還元活性の比較 | |
| 3.3 9-フルオレノンの還元による生成物の分離と分析 | |
| 3.4 反応条件が収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.1 基質添加量が収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.2 反応雰囲気は9-フルオレノール収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.3 メタンガス雰囲気が収率に及ぼす影響 | |
| 3.4.4 培地pHが収率に及ぼす影響 | |
| 3.5 <i>B. brevis</i> と酵母菌の9-フルオレノンに対する還元性の比較 | |
| 3.6 9-フルオレノンの反応における <i>B. brevis</i> 酵素系の検討 | |
| 第4節 結論 | 83 |
| 第5節 引用文献 | 84 |
| 第2章 生成物の膜分離法の検討 | |
| 第1節 緒言 | 85 |
| 第2節 実験 | 86 |
| 2.1 9-フルオレノンの反応 | |
| 2.2 生成物の分析 | |
| 2.3 膜分離装置 | |
| 第3節 結果 | 87 |
| 第4節 結論 | 87 |
| 総括 | 88 |
| 業績一覧 | 89 |
| 謝辞 | 90 |

序論

現在、芳香族炭化水素に対する酸化反応は金属錯体触媒存在下で過酸化水素や酸素を用いるなど激しい条件が必要とされている。また、芳香環のアルキル側鎖に対して水酸基を効率的に導入する反応は、多段階で行われており直接水酸基を導入することは困難とされている。

化学薬品や染料の原料として広く用いられている含酸素芳香族炭化水素は石炭、石油タール中より分離されるか、スルホン化とアルカリ溶融によって製造されている。ベンジルアルコールをトルエンから工業的に合成する場合、煮沸トルエンに塩素を通じて塩化ベンジルに変換し、その後、塩化ベンジルと炭酸ソーダとの加溶媒反応でベンジルアルコールを合成している。この様にハロゲン化と後に続く過程も高温高圧の反応条件が要求される。したがって、温和な条件下で安全かつ選択性良く酸化反応を行うことが望まれている。

近年、生体触媒を用いた芳香族炭化水素からフェノール類への転換に関する研究が環境浄化や有用物質生産、反応機構の見地から行われている。石油、石炭中に多量に含まれる多環芳香族化合物は生体内や環境微生物により分解を受けることが見出されているが^{1,2,3)}、この際、微生物による酸化はフェノールあるいはカテコールを経て分解されている⁴⁾。ベンゼン環側鎖のメチル基酸化ではメチル基がヒドロキシメチル体を経由してカルボン酸にまで酸化される。例えば、メチルナフタレン⁵⁾、キシレン⁶⁾、p-シメン⁷⁾などはそれぞれナフトエ酸、トルイル酸、p-イソプロピル安息香酸に変換されることが報告されている。また、カルボン酸にまで酸化されずアルコールが生成する例も報告されている。例えば、1-(3-クロロ-4-メチルフェノール)ピペラジンハイドロクロライドは、*Aspergillus*属のカビによって2-クロロ-4-(1-ピペラジル)ベンジルアルコールに変換されている⁸⁾。しかしながら、アルキル基を持つ多環芳香族化合物は一般に微生物に対して毒性を示し^{9,10)}、選択性も低いので有用化合物の合成手段として利用しようとする試みは少ない。

一方で、微生物や酵素を触媒とするアルコールの酸化ではラセミ体の分割に興味を持たれており、生体酸化は、酸化剤として重金属や過酸化水素を必要とせず、室温、水溶媒中で安全に行える利点を持っているので注目されている。

一般に生体触媒を用いた反応は、常温、常圧の温和な反応条件で選択的に効率よく行える利点を持っている。しかしながら、基質およびその代謝物により反応が阻害されやすく、反応条件のわずかな違いが収率に大きく影響を及ぼす。また、収率が低い等の問題がある。近年、遺伝子組み替えや新たな有用菌株の探索などにより、これらの問題が改善されつつある。しかしながら、それには

膨大な費用、時間が費やされることとなる。

本研究では、微生物のうちバクテリアの有する生体触媒系に注目し温和な条件下で安全かつ選択性良く酸化あるいは還元反応を行うことを目的とした。

第1部第1章では、本研究に使用した野生種バクテリアの分離、同定、最適培養方法について述べた。

第2章では、ナフタレン、メチルナフタレン類、ビフェニルの酸化反応における最適反応条件を検討した。すなわち、反応温度、pH、培地濃度、菌体量等が収率に及ぼす影響を検討した。

第3章では、1-ナフトール収率の増加法について検討を行った。すなわち、1-ナフトールが一定濃度に達すると酸化が停止するため、反応系にアニオン交換樹脂を添加し、逐次的に生成してくる1-ナフトールを吸着除去しながら反応を進め収率増加を試みた。また、微量金属イオン、酵素活性物質等を添加し収率増加の可能性を探った。さらに、菌体を固定化することにより菌体の再利用を試みた。

第2部第1章では、適用範囲を広げるためにさまざまな芳香族炭化水素の反応をバクテリアを用いて行ったところ、9-フルオレノンにおいてケトン基の還元反応が起こることが認められた。そこで、9-フルオレノンの還元反応について最適反応条件の検討を行った。また、*B. brevis* とパン酵母を用い還元反応性の比較を行った。

第2章では、生成物の膜分離法について検討を行った。すなわち、ガラス管に透析膜チューブを通し、チューブ内に反応液を流してその外側のガラス管内に向流的に水を流し、連続的に生成物の抽出を行った。さらに、この抽出液を吸着カラムに通し、樹脂上に吸着させ生成物をアルコールで溶出した。

引用文献

- 1) J. B. Davis, and R. L. Raymond, *Appl. Microbiol.*, **9**, 383, (1961).
- 2) R. L. Raymond, J. W. Jamison, and J. O. Hudson, *Appl. Microbiol.*, **15**, 857 (1967).
- 3) P. M. Fedorak, and D. W. S. Westlake, *J. Microbiol.*, **27**, 432 (1988).
- 4) P. A. Williams, and M. J. Worsey, *J. Bacteriol.*, **125**, 818 (1976).
- 5) G. Baggi, P. Barbieri, E. Galli, and S. Tollari, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2129 (1987).
- 6) T. Omori, Y. Jigami, and Y. Minoda, *Biol. Chem.*, **39**, 1775 (1970).
- 7) M. H. Rogoff, and I. Wender, *J. Bacteriol.*, **77**, 783 (1959).
- 8) D. Rosi, T. R. Lewis, R. Lorenz, H. Freele, D. A. Berberian, and S. Archer, *J. Med. Chem.*, **10**, 877 (1967).
- 9) Y. Z. Lee, E. A. Leighton, D. B. Peakall, R. J. Norstrom, P. J. O'Brien, J. F. Payne, and A. D. Rahimtula, *Environ. Res.*, **36**, 248 (1985).
- 10) K. A. Griffin, C. B. Johnson, K. Breger, and R. B. Franklin, *Toxicology*, **26**, 213 (1983).
- 11) K. Klingenberg, *Jahresber. Fortschr. Tierchem.*, **21**, 57-58 (1891).

第1部 バクテリアを用いた芳香族炭化水素の酸化

第1章 菌体の分離および最適培養法の検討

第1節 緒言

微生物は枯れた植物や動物の死がい、排泄物などを分解し自然の循環系へもどす役割をなしている。また、デンプンなどを分解し種々な物質を生産し、人間に恩恵をもたらしている。さらに、動植物の生産する天然物の代謝にとどまらず石油、石油化学製品の分解にその作用を発揮している^{1,2,3)}。

ここでは、芳香族炭化水素の有用物質への変換を目的としたバクテリアの探索を行い、さらに、最適増殖条件を検討した。

第2節 実験

2.1 標準培地の調製

本実験で用いた標準培地は、1 Lの蒸留水に10 gの魚肉エキス、10 gのポリペプトン、2 gの塩化ナトリウム（和光純薬工業(株)製）を溶解させ、pH 7.4に調製した後オートクレーブで120℃、20分間滅菌したものを使用した。また標準培地に寒天末（和光純薬工業(株)製）を1.5%となるように加えたものをプレート上、室温で硬化させ寒天平板培地として用いた。

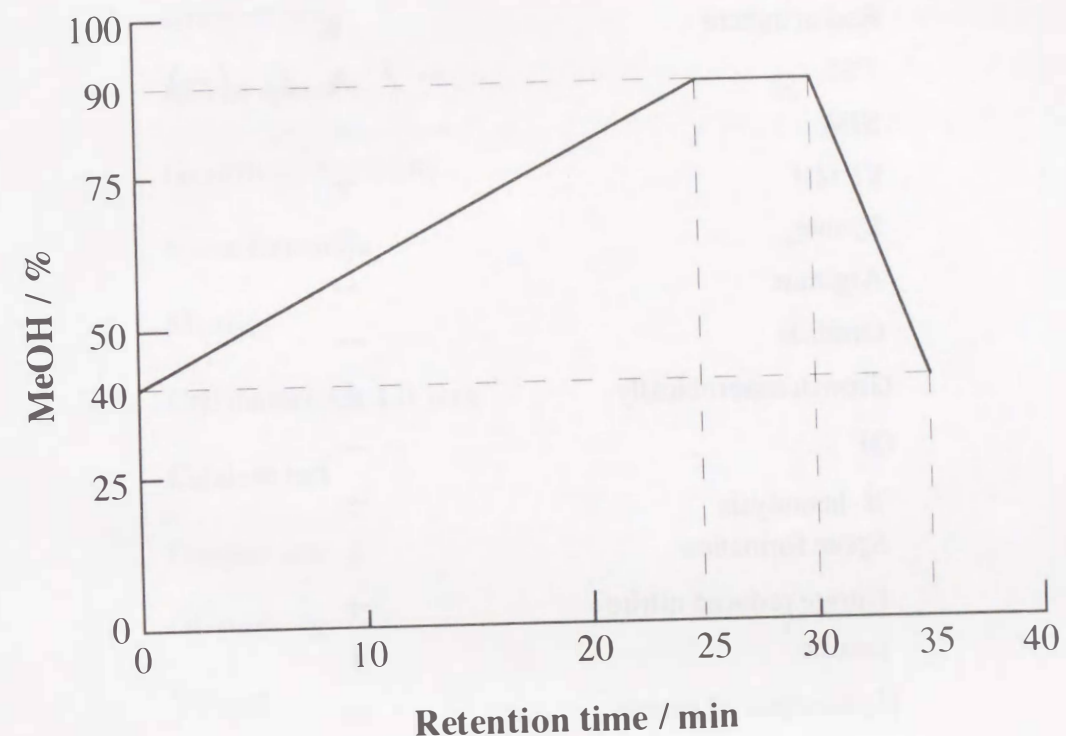
2.2 ナフタレン酸化バクテリアのスクリーニング

標準培地 10 mLを入れたL字管に平板寒天培地で分離した菌体を加え30℃で12時間培養した。次にナフタレン-アセトン溶液を培地中濃度720 μ mol/Lとなるように添加し、30℃で24時間反応を行った。

2.3 生成物の分析

反応終了後、反応液を滅菌したピペットで10 mL サンプルングし、酢酸エチル 2 mLで3回抽出し、一定量に希釈したのち高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)で測定した。HPLCはM&S GILSON HPLC SYSTEM (Pump, MODEL 302, UV-Detector, MODEL 1001)、カラムはYMC PACK ODS-A (4.6 mm i.d. \times 150 mm, YMC製)を使用した。溶出液はメタノール-水を用い、流速 1 mL/minで4:6から9:1まで25分間勾配溶離させた(Scheme 1)。

カラム温度は室温、検出波長は 230 nm で分析を行った。



Scheme 1 Gradient profile of HPLC.

第3節 結果

3.1 ナフタレン酸化バクテリアのスクリーニング

富山県および岐阜県の水中および土壌中より単離したバクテリア25株を用い、ナフタレンの酸化活性をHPLCで調べた結果、25株中2株にナフタレンの減少および生成物が認められた。

ナフタレンの酸化活性を示した2種の菌体についてBargeyの分離法に従って同定を行った(表 1,2)。その結果、それぞれ*Bacillus cereus* および*Bacillus brevis* と同定された。

Table 1 Characteristics of *B. cereus* isolated from the soil of TOYAMA Prefecture (GOFUKU)

| | |
|-------------------------|-------------|
| Gram staining | + |
| Rod or sphere | R |
| TSI | - / A G (-) |
| SIM | - - + |
| VP test | + |
| Lysine | - |
| Arginine | - |
| Ornithine | - |
| Growth anaerobically | ± |
| OF | - |
| β-hemolysis | + |
| Spore formation | + |
| Nitrate reduced nitrite | + |
| Esculin | + |
| Hydrolysis of gelatin | + |
| Glucose | + |
| Arabinose | - |
| Mannose | - |
| Mannitol | - |
| Maltose | + |
| Gluconic acid | + |
| Urease | + |
| Adipic acid | - |
| Malic acid | + |
| Citric acid | + |

Table 2 Characteristics of *B. brevis* isolated from the soil of GIFU Prefecture (MIYAGAWA)

| | |
|-------------------------|---|
| Gram staining | + |
| Rod or sphere | R |
| Growth anaerobically | - |
| Spore formation | + |
| Motility | + |
| Cell diameter > 1.0 μm | - |
| Catalase test | + |
| Oxidase test | - |
| OF test | F |
| VP test | - |
| Hydrolysis of gelatin | + |
| Formation of indole | - |
| Utilization of citrate | - |
| Nitrate reduced nitrite | + |
| Growth at pH 5.7 | + |
| Growth at 40 °C | + |

3.2 培養条件が菌体の増殖に及ぼす影響

菌体の増殖は分光光度計(660nm)を用い濁度を測定することにより経時的に調べた。

30 mLのL字管に10 mLの標準培地および菌体を入れ、20-35°Cの範囲で*B. cereus* および*B. brevis* の培養を行い、培養温度が菌体増殖に及ぼす影響を調べた(図1-a,b)。図より20°C、25°Cでは増殖速度が遅く、35°Cでは初期増殖速度は速いが、定常期における菌体濃度は低かった。これらの結果より、最適増殖温度は、両菌体とも30°Cであった。また、その時の倍加時間は20分であった。

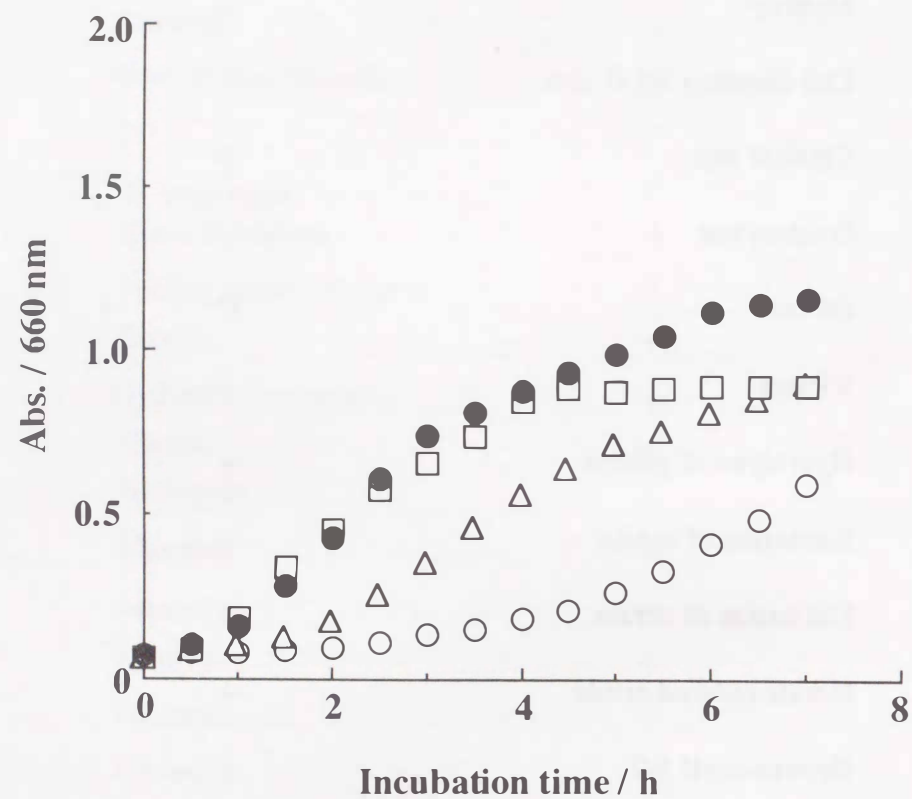


Fig. 1-a Effects of temperature on the growth of *B. cereus*.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution and 0.1 mL pre-cultured solution. The incubation was carried out by slow shaking.

○: 20 °C, △: 25 °C, ●: 30 °C, □: 35 °C.

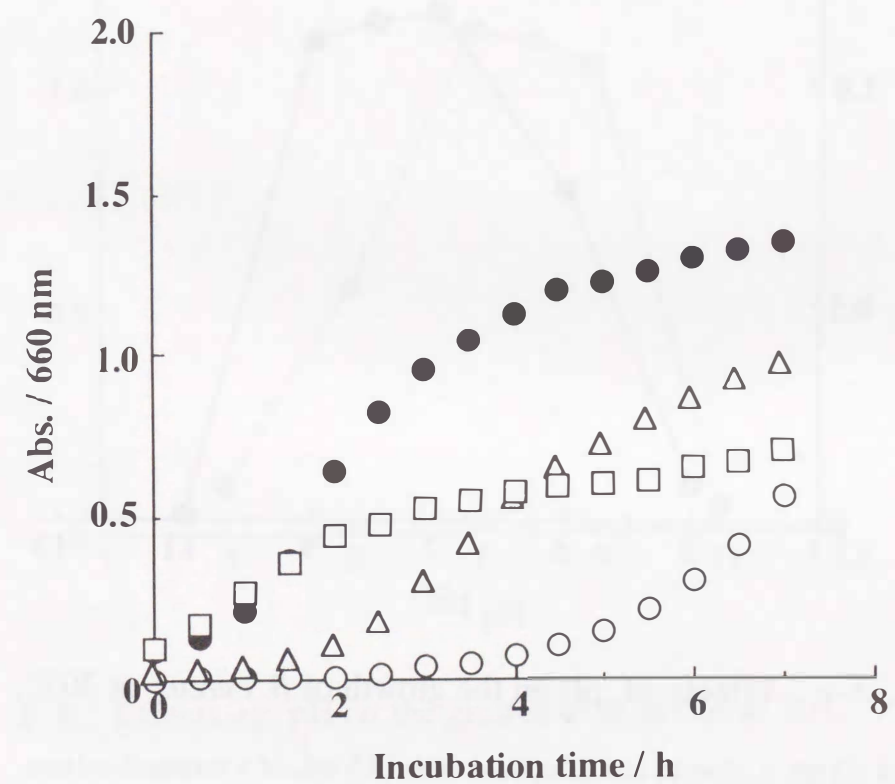


Fig. 1-b Effects of temperature on the growth of *B. brevis*.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution and 0.1 mL pre-cultured solution. The incubation was carried out by slow shaking.

○: 20 °C, △: 25 °C, ●: 30 °C, □: 35 °C.

30 mLのL字管に、塩酸および水酸化ナトリウム水溶液を用いpH3-11に調整した培地10 mLを加え、30 °Cで*B. cereus* および*B. brevis* を培養し、pHが菌体の増殖に及ぼす影響を調べた(図 2-a,b)。図よりpH3 および pH11ではほとんど増殖せずpH5 では増殖が低下した。これらの結果より増殖における最適 pHは7-9であった。

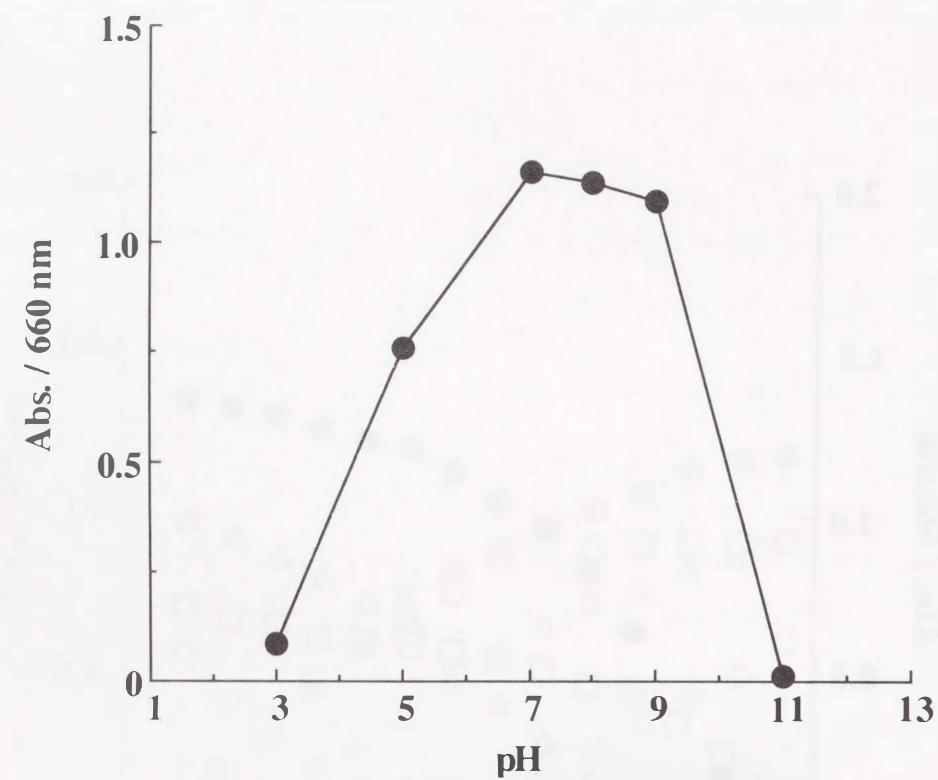


Fig. 2- a Effects of pH on the growth of *B. cereus* at 30°C.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution and 0.1 mL pre-cultured solution. The incubation was carried out by slow shaking for 4h.

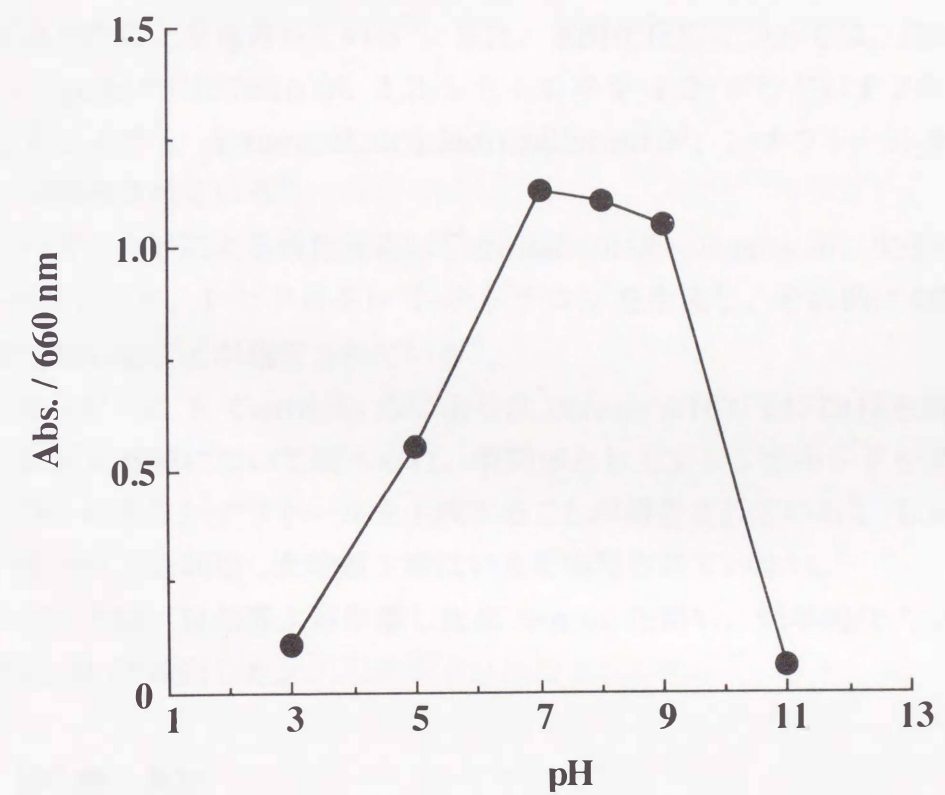


Fig. 2- b Effects of pH on the growth of *B. brevis* at 30°C.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution and 0.1 mL pre-cultured solution. The incubation was carried out by slow shaking for 4h.

第4節 結論

- 1) ナフタレン活性を示したバクテリアは *B. cereus* および *B. brevis* であった。
- 2) *B. cereus* および *B. brevis* の最適増殖条件は30 °C、pH7-9であった。

第5節 引用文献

- 1) A. Dardas, D. Gal, M. Barrelle, G. S. Ignazi, R. Strerjiades, and J. Pelmont, *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**, 585-592 (1985).
- 2) R. Masse, F. Messior, L. Pelouin, C. Ayotte, and M. Sylvestre, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 947-951 (1984).
- 3) B. E. Haigler, C. A. Pettigrew, and J. C. Spain, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2237-2244 (1992).

第2章 ナフタレン類の酸化条件の検討

1 ナフタレンの酸化条件の検討

第1節 緒言

ナフタレンのバクテリアによる酸化は古くより研究されており、1956年にR. E. Klausmeier らが、*Pseudomonas aeruginosa* を用いて、サリチル酸が生成されたことを報告している¹⁾。また、水酸化反応については、*Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816 が、1,2-ジヒドロキシ-1,2-ジヒドロナフタレンを生成したことや²⁾、*Agmenellum quadruplicatum* が、1-ナフトールを生成したことが報告されている³⁾。

一方、カビによる酸化反応は *Cunninghamella elegans* が、主生成物として1-ナフトール、4-ヒドロキシ-1-テトラロンを生成し、その他に4種の副生成物を生成したことが報告されている⁴⁾。

さらに、C. E. Cerniglia らにより *B. cereus* ATCC 14579 株を用いナフタレンの反応機構について調べられ、中間体としてアレンオキシドを経由し、NIHシフトにより1-ナフトールを生成することが報告されている⁵⁾。しかしながら、バクテリアを利用した物質生産ははまだ実現されていない。

ここでは、自然界より単離した *B. cereus* を用い、効率的なナフタレンの酸化について検討した。

第2節 実験

2.1 菌株および培養

菌株は、スクリーニングで最も高いナフタレン活性を示した *B. cereus* を用いた。前培養は、10 mL の標準培地を入れた30 mLのL字管に白金耳で *B. cereus* を植菌し、30℃の恒温槽中で12時間振盪を行った。また、本培養は、500 mL三角フラスコに標準培地100 mLと前培養液1 mLを加え30℃の恒温槽中で12時間振盪培養を行った。

2.2 ナフタレンの反応および生成物の分析

本培養後、遠心分離(800×G 5 min)で集菌し2回洗浄した後、培地に再懸濁した。その懸濁液を500 mLの坂口フラスコに入れ、ナフタレン(関東化学(株)製)のアセトン溶液(アセトンは培地の1%容量とした。以下、同様とした。)

を加え、30℃の恒温槽中で振盪(4.5 cm, 110 r.p.m.)し反応を行った。

生成物を定量するために、一定時間毎に滅菌したピペットで反応液を10 mL サンプルングし、酢酸エチル 2 mL で 3 回抽出し、前章と同様 HPLC で測定した。

また、水層中の抱合体を検出するために TLC を使用し分析を行った。反応液中に含まれる基質および生成物をジエチルエーテルで完全に抽出した後、残留液を凍結乾燥させた。次に、残留物をエタノールに溶解し、シリカゲルプレート(20×66 mm, Kieselgel 60 F256, Merck Co.) 上で展開し、UV 照射で蛍光スポットの R_f 値を測定した。

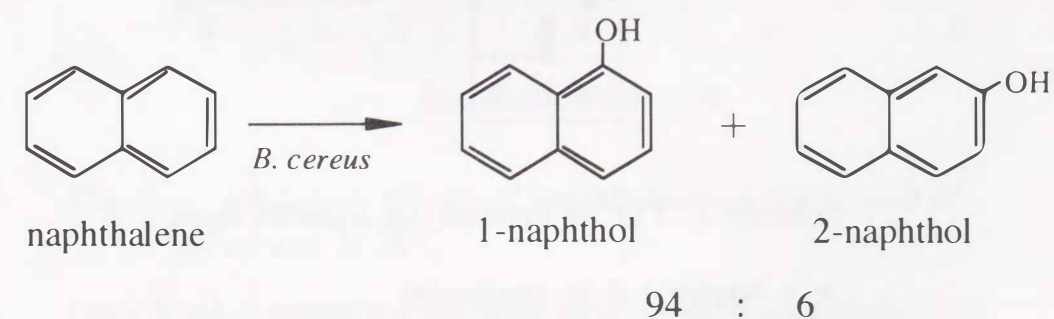
第3節 結果と考察

3.1 ナフタレンの酸化

30 mL の L 字管に 10 mL の標準培地および *B. cereus* を加え 30℃ で 12 時間培養を行った。培養後、培地中濃度が 720 μmol/L となるナフタレン-アセトン溶液を加え、24 時間反応を行った。反応液 10 mL を 2 mL の酢酸エチルで 3 回抽出し HPLC で分析を行った。その結果、保持時間 14.2 分(A), 15.1 分(B) に生成物のピークが認められた。ナフタレン酸化物の標品との比較から、生成物 A は 1-ナフトール、生成物 B は 2-ナフトールの保持時間とそれぞれ一致した。

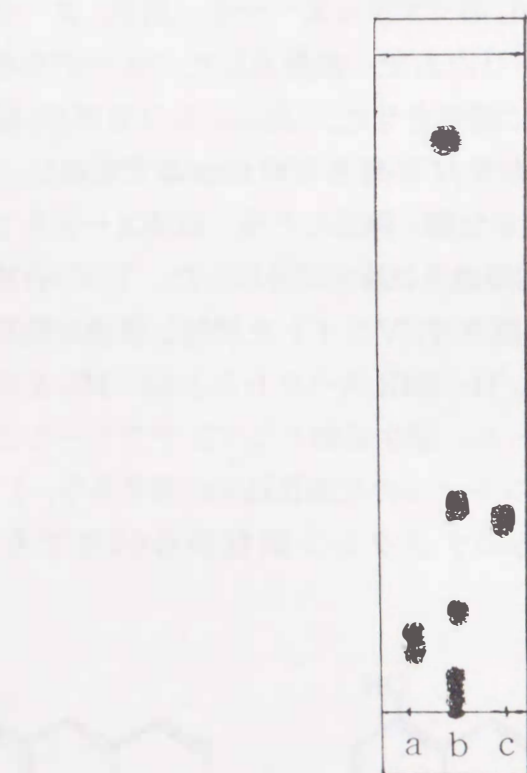
3.2 ナフタレンの酸化生成物の分離と分析

500 mL の坂口フラスコに標準培地 250 mL および前培養液 1 mL を加え 30℃ で 48 時間培養を行った。次に、培地中濃度が 720 μmol/L となるようにナフタレン-アセトン溶液を加え 48 時間反応させた。この反応を同時に 4 本行い、反応終了後、反応液 250 mL に対し 50 mL のジエチルエーテル (以下、エーテル) で 3 回抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで一晩脱水した。エーテルを留去した後、残留物を少量のエタノールに溶解させた。次に、シリカゲル (Kieselgel 60, Merck 製) を内径 14 mm のカラムに高さ 200 mm まで充填し、生成物を石油エーテルで展開しナフタレンを分離、除去した後、石油エーテル : エーテルを 8 : 2 から 5 : 5 に勾配溶離させ溶離液を試験管に分取した。TLC (石油エーテル : エーテル = 7 : 3) で溶離液を展開させ UV ライトを照射し蛍光を観察し、生成物を含む留出液から溶媒を留去し ¹H-NMR スペクトルと GC-MS を測定した。その結果、主生成物は 1-ナフトール、副生成物として 2-ナフトールと同定された。また、1-ナフトール、2-ナフトールの生成比は 94 : 6 であり、1-ナフトール収率は 17% に達し、本反応のナフタレン回収率は 65% であった (Scheme 2)。



Scheme 2 Oxidation of naphthalene by *B. cereus*.

*Cunninghamella elegans*を用いたナフタレンの酸化では、 α -ナフチルサルファイトや、 α -ナフチル- β -D-グルクロニドのような、ナフトール抱合体の存在が報告されている⁶⁾。そこで、薄層クロマトグラフィー (TLC) により反応液中の水溶性代謝物の検出を行った。500 mLの坂口フラスコに蒸留水250 mL、培地中濃度が720 μ mol/Lのナフタレン-アセトン溶液と12 g-wet/Lの菌体を加え30 $^{\circ}$ Cで24時間振盪し反応を行った。反応終了後、反応液を酸性条件および塩基性条件下で生成物を酢酸エチルで抽出し、水層を凍結乾燥を行い水を除去した。次に、残留物のエタノール溶液と α -ナフチルサルファイト、 α -ナフチル- β -D-グルクロニドをシリカゲルプレート上にヘキサン：酢酸：酢酸エチル=17:1:2の割合で展開し抱合体の検出を試みた(Scheme 3)。その結果、 α -ナフチルサルファイトと α -ナフチル- β -D-グルクロニドは、検出されなかった。したがって、*B. cereus*によるナフタレンの酸化において抱合体を生成する可能性は低いものと考えられた。



Scheme 3 TLC of products in aqueous layer.

- a: α -Naphthyl- β -D- glucuronide
- b: products in aqueous layer
- c: α -naphthylsulfate

3.3 ナフタレンおよび酸化生成物が*B. cereus*の増殖に及ぼす影響

30mLのL字管に標準培地10 mL、前培養液 0.1 mL、培地中濃度1.0-2.0 mmol/Lのナフタレン、1-ナフトールおよび2-ナフトールのアセトン溶液をそれぞれ添加し30 $^{\circ}$ Cの恒温槽中で振盪(110 r.p.m.)させ30分おきに波長 660 nm で吸光度を測定した(図 3-a,b,c)。

ナフタレンは、増殖阻害を示さなかった(図 3-a)。一方、1-ナフトールは、1.0 mmol/Lで阻害を示し、1.5 mmol/Lで増殖を完全に阻害した(図 3 b)。また、2-ナフトールは1.0 mmol/Lで阻害を示し、2.0 mmol/Lで増殖を完全に阻害した(図 3-c)。ナフタレンによる増殖阻害が認められないのは、ナフタレンの溶解度が低いためによるものと推察された。

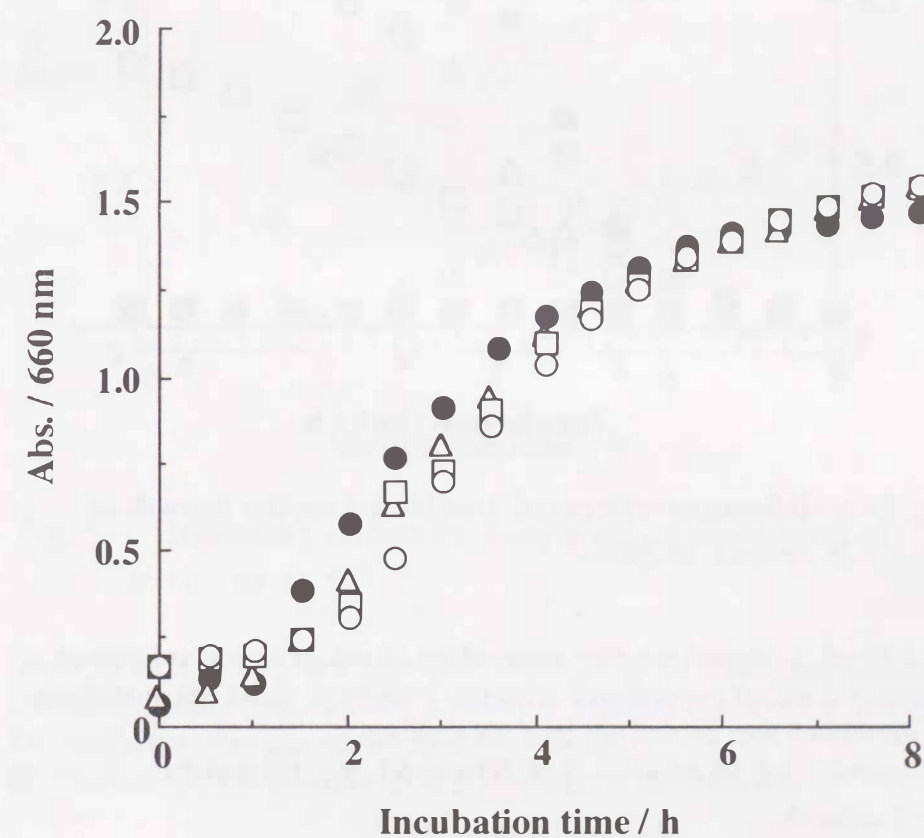


Fig. 3- a Inhibitory effects of naphthalene on the growth of *B. cereus* at 30 $^{\circ}$ C.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 0.1 mL of pre-cultured solution, and dissolved in acetone. The incubation was carried out by slow shaking.

●: Control, Δ : 1.0 mmol/L, \square : 1.5 mmol/L, \circ : 2.0 mmol/L.

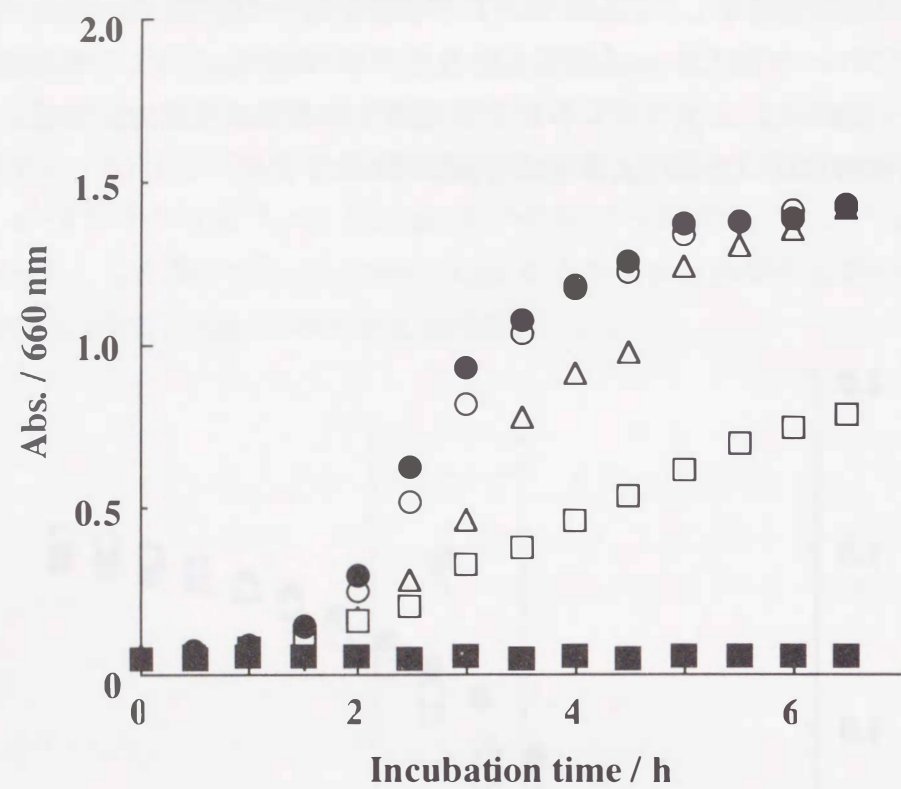


Fig. 3- b Inhibitory effects of 1-naphthol on the growth of *B. cereus* at 30°C.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 0.1 mL of pre-cultured solution, 1-naphthol dissolved in acetone. The incubation was carried out by slow shaking.

●: Control, ○: 0.10 mmol/L, △: 0.50 mmol/L, □: 1.0 mmol/L,
■: 1.5 mmol/L.

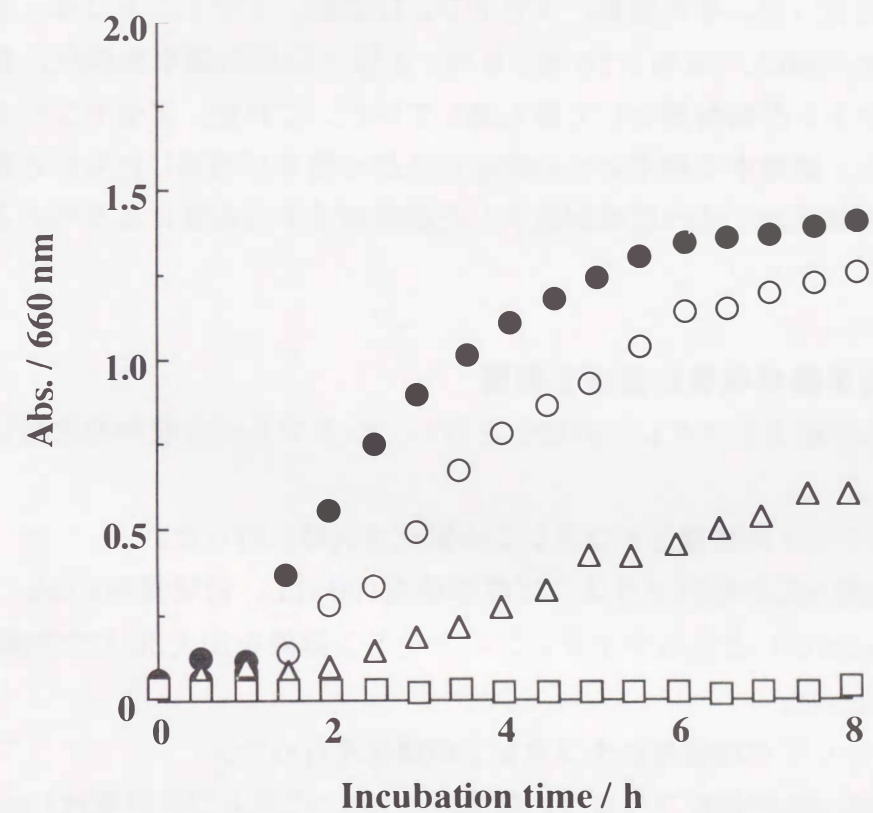


Fig. 3- c Inhibitory effects of 2-naphthol on the growth of *B. cereus* at 30°C.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 0.1 mL of pre-cultured solution, 2-naphthol dissolved in acetone. The incubation was carried out by slow shaking.

●: Control, ○: 1.0 mmol/L, △: 1.5 mmol/L, □: 2.0 mmol/L

3.4 反応条件が1-ナフトール収率に及ぼす影響

3.4.1 溶解剤が収率に及ぼす影響

ナフタレンを培地に分散させるため少量の有機溶媒を用いた。500 mLの坂口フラスコに標準培地250 mLおよび前培養液1 mLを加え30℃で48時間培養を行った。その後、培地中濃度が720 $\mu\text{mol/L}$ となる量のナフタレンをアセトン、DMSO、アセトニトリル、エタノールにそれぞれ5 mL溶解させ、培地に添加し48時間反応を行った。その結果、アセトン、DMSO、アセトニトリル、エタノール、無添加の順に、18%、16%、8%、2%、15%の収率を得た。これらの結果、アセトンが溶解剤として最も適していた。これは、アセトンにナフタレンが溶解し、培地中で効率よく分散されたため収率が増加したものと推察された。また、無添加に比べ収率が低下した溶解剤はその毒性によるものと予測された。

3.4.2 反応手順が収率に及ぼす影響

4種類の反応手順でナフタレンの酸化を行い、1-ナフトール収率を比較した(表3)。

手順A；バクテリアの増殖とナフタレンの酸化を同時に行った。

すなわち、500 mLの坂口フラスコに標準培地100 mL、前培養液1 mL、培地中濃度720 $\mu\text{mol/L}$ となるナフタレン-アセトン溶液を加え30℃で24時間振盪し反応を行った。

手順B；バクテリアの増殖後にナフタレンの酸化を行った。

すなわち、500 mLの坂口フラスコに標準培地100 mLおよび前培養液1 mLを加え30℃で48時間培養を行った。その後、培地中濃度が720 $\mu\text{mol/L}$ となるナフタレン-アセトン溶液を加え24時間反応を行った。

手順C；バクテリアを系外に取り出し、新しい培地にこの菌体を加えナフタレンの酸化を行った。

すなわち、500 mLの坂口フラスコに標準培地100 mLおよび前培養液1 mLを加え30℃で48時間培養を行った。その後、遠心分離で集菌し、菌体(1 g)および培地中濃度が720 $\mu\text{mol/L}$ となるナフタレン-アセトン溶液を、新しい標準培地100 mLに加え24時間反応を行った。

手順D；反応方法は手順Cと同様に行い、ここでは培地として蒸留水を用い24時間反応を行った。

これらの結果、手順Aは反応終了後100 mLの反応液中に1gのバクテリアが存在したが、1-ナフトールは生成していなかった。手順Bは反応終了後、100 mLの培地中に1gのバクテリアが存在しており、1-ナフトール収率は13%であっ

た。手順Cは、収率が3%であった。手順Dは収率が16%に達した。

手順AおよびCの方法は、手順BおよびDと比較して収率が低かった。これは培地中栄養物と基質の間で代謝の競合が生じたため反応が阻害されたものと思われる。事実、手順Cにおいて120時間反応を行うことにより収率が14%まで増加した。これらの結果より、ナフタレンの酸化は蒸留水または貧栄養培地が適していた。

Table 3 Effects of procedures on the oxidation of naphthalene to 1-naphthol ^{a)}

| Run | Procedure | Medium / mL | Bacteria / g-wet | Yield of 1-naphthol / % |
|-----|-----------------|-----------------------|------------------|-------------------------|
| 1 | A ^{b)} | 100 | (1.0) | 0 |
| 2 | B ^{c)} | 100 | (1.0) | 13 |
| 3 | C ^{d)} | 100 | 1.0 | 3 |
| 4 | D ^{e)} | 100 (distilled water) | 1.0 | 16 |

a) Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added medium and 720 μ mol/L of naphthalene dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30°C for 24h.

b) Procedure A; The reaction was started by the addition of a seed bacteria and naphthalene in nutrient.

c) Procedure B; After 48-h incubation, reaction was started by the addition of naphthalene.

d) Procedure C; After 48-h incubation at 30°C, bacteria was collected by centrifuge from a 100 mL of culture solution.

e) The reaction was carried out by the addition of the bacteria and 720 μ mol/L of naphthalene in 100 mL of fresh nutrients.

Procedure D; After 48-h incubation at 30°C, bacteria was collected by centrifuge from a 100 mL of culture solution.

The reaction was carried out by the addition of the bacteria and 720 μ mol/L of naphthalene in 100 mL of distilled water.

3.4.3 反応温度、培地pHが収率に及ぼす影響

500 mLの坂口フラスコに蒸留水100 mL、培地中濃度が720 μ mol/Lとなるナフタレン-アセトン溶液および10 g-wet/Lとなる菌体を加え、20-35°Cで24時間反応を行った結果を図4に示す。図より酸化は30°Cで最も高い活性を示し、24時間後に最高収率18%に達し、その後は一定値を保った。一方、20°Cでは反応の進行が遅く徐々に収率は増加した。35°Cでは6時間後、収率が10%に達したのち収率は増加せず、さらに、坂口フラスコ上部にナフタレンの結晶が認められたことより反応液中の基質濃度の低下が予測された。

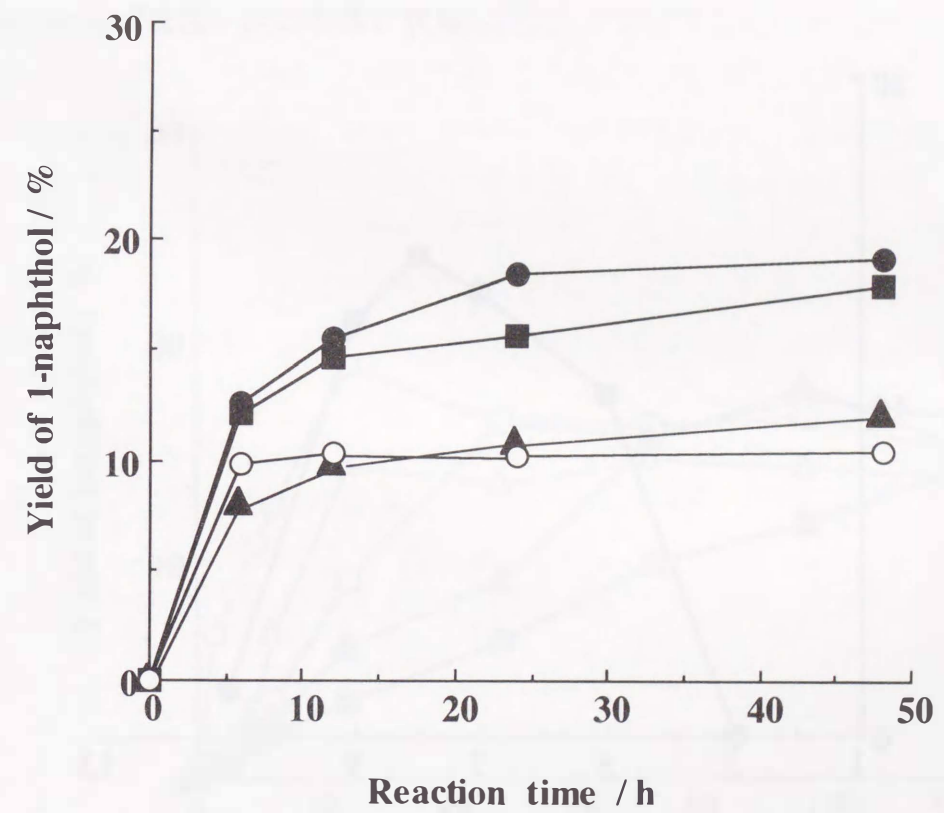


Fig. 4 Effects of temperature on the oxidation of naphthalene.

Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added 100 mL of distilled water, 10 g-wet/L of bacteria, and 720 μ mol/L of naphthalene dissolved in acetone.

▲: 20 °C, ■: 25 °C, ●: 30 °C, ○: 35 °C.

塩酸及び水酸化ナトリウムを用いpH 3-11 に調整した蒸留水100 mL中に、培地中濃度が720 $\mu\text{mol/L}$ となるナフタレン-アセトン溶液および10 g-wet/Lとなる菌体を加え、30 $^{\circ}\text{C}$ で12時間反応を行った結果を図5に示す。この結果、pH 5-9までの比較的広い範囲で1-ナフトールが生成し、pH 8で最高収率15%に達した。また、pH 3及びpH 11では、ほとんど反応しなかった。また、pH 5-9では、反応終了後のpHは約8.4を示した。これは、菌体自体のpH調整機構が働いていると考えられた。

これらの結果は、バクテリアの最適増殖条件に一致し、反応は菌体の増殖に適した条件下において最も高い収率を与えることが示された。

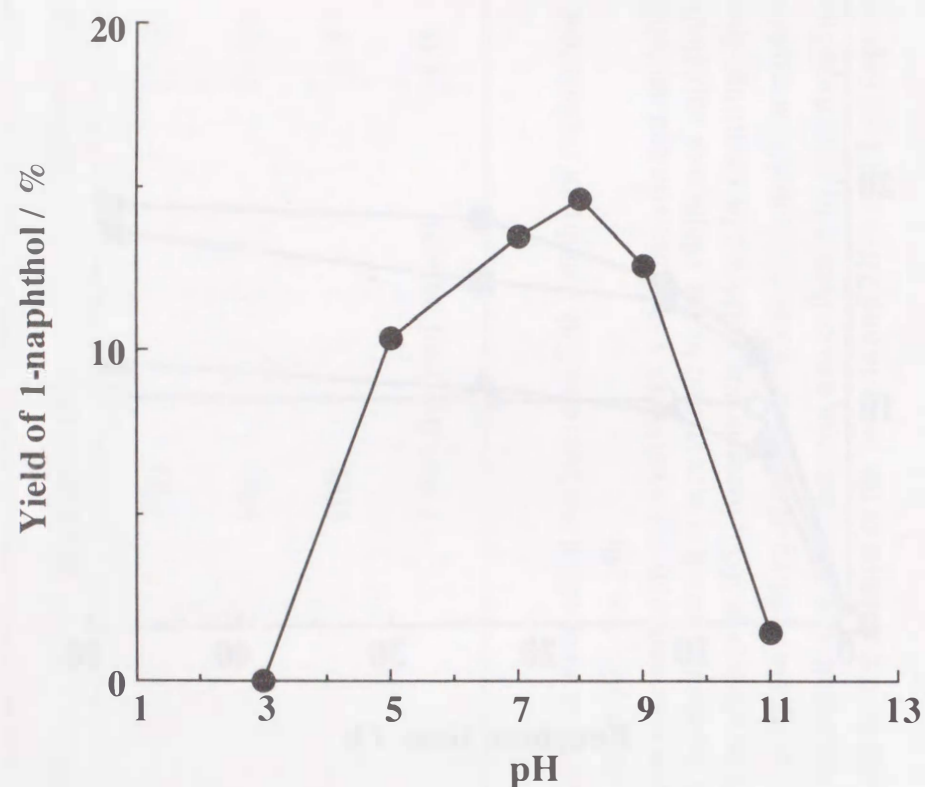


Fig. 5 Effects of pH on the oxidation of naphthalene at 30 $^{\circ}\text{C}$.

Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added 100 mL of distilled water, 12 g-wet/L of bacteria, and 720 $\mu\text{mol/L}$ of naphthalene dissolved in acetone. The reaction was carried out for 12 h.

3.4.4 培地濃度が収率に及ぼす影響

培地は、菌体の維持と増殖に密接な関係があるため、培地濃度が基質の反応速度および収率に影響を及ぼすことが予測された。そこで、培地濃度を変化させ反応を行った結果を図6に示す。標準培地を段階的に10倍まで希釈した培地、または蒸留水250 mL中に、それぞれ培地中濃度が720 $\mu\text{mol/L}$ となるナフタレン-アセトン溶液および12 g-wet/Lとなる菌体を加え30 $^{\circ}\text{C}$ で振盪し反応を行った。この結果、培地を希釈するにつれ初期反応速度は速くなり、蒸留水のみでは無希釈培地に比べ初期速度が約6倍速くなった。すなわち、蒸留水を用いた場合、24時間後に収率が18.8%に達したのに対し、無希釈培地では3.5%であった。これは、培地中の栄養物と基質のナフタレンが競合し、反応速度に影響を及ぼしたものと推測された。事実、120時間後は培地濃度の濃淡にかかわらずほぼ一定の収率に収束した。

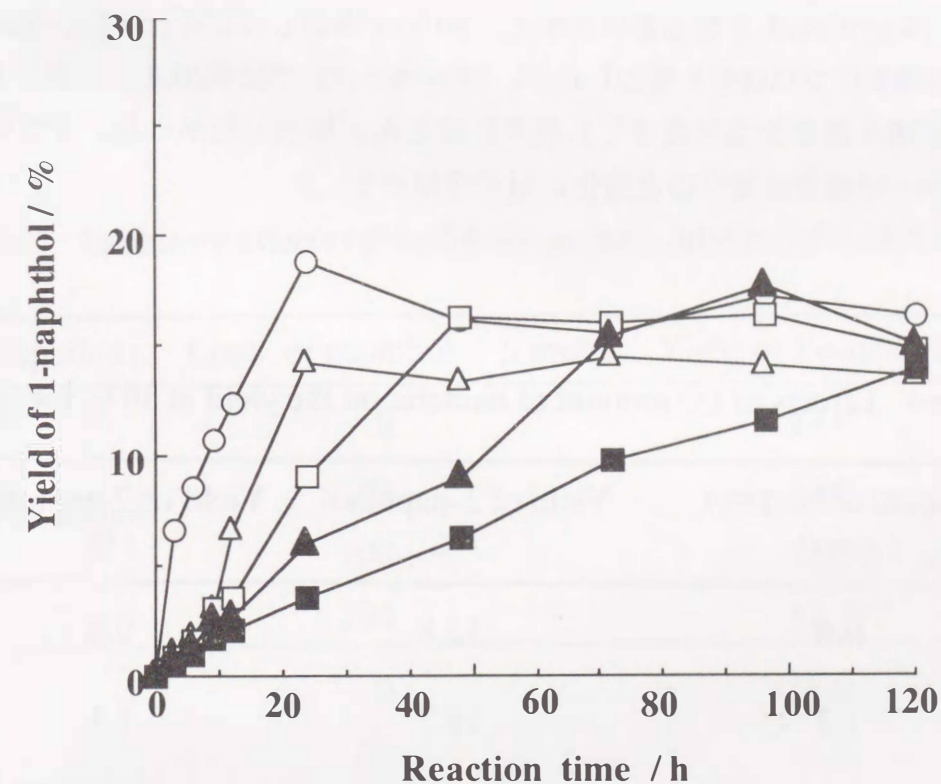


Fig. 6 Effects of culture solution on the oxidation of naphthalene at 30 $^{\circ}\text{C}$.

Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added 250 mL of medium, 12 g-wet/L of bacteria, and 720 $\mu\text{mol/L}$ of naphthalene dissolved in acetone.

■: Culture solution, ▲: culture solution of 2-fold dilution, □: culture solution of 5-fold dilution, △: culture solution of 10-fold dilution, ○: distilled water.

3.4.5 基質添加量が収率に及ぼす影響

菌体量に対し、一定の基質消費量が存在することが予測された。そこで、500 mLの坂口フラスコ中に蒸留水100 mL、培地中濃度が240–2400 $\mu\text{mol/L}$ となるナフタレン–アセトン溶液および10 g-wet/Lとなる菌体を加え、30 $^{\circ}\text{C}$ で24時間振盪させ反応を行った。基質量を減少させるにつれ収率は増加したが、基質を720 $\mu\text{mol/L}$ 以下に減少させても収率は増加しなかった。したがって、ナフタレンの酸化では培地中濃度が720 $\mu\text{mol/L}$ となる添加量が最も効率的であった。

3.4.6 菌体量が収率に及ぼす影響

収率は生体触媒としての菌体量に比例し増加することが期待された。そこで菌体量を変えてナフタレンの酸化を行った(表4)。500 mLの坂口フラスコに蒸留水100 mL、培地中濃度が720 $\mu\text{mol/L}$ となるナフタレン–アセトン溶液および6–24 g-wet/Lとなる菌体を加え、30 $^{\circ}\text{C}$ で振盪し反応を行った。表より、菌体量の増加につれ収率も増加したが、18 g-wet/Lで収率26.4%に達すると、それ以上菌体濃度を増加させても収率はほとんど増加しなかった。すなわち、生成物が一定濃度に達すると酸化に阻害作用が生じた。

Table 4 Effects of the amount of bacteria on the yield at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h ^{a)}

| Amount of bacteria / g-wet | Yield of 1-naphthol / % | Yield of 2-naphthol / % |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0.6 | 12.8 | 0.8 |
| 1.2 | 18.7 | 1.1 |
| 1.8 | 26.4 | 1.6 |
| 2.4 | 27.1 | 1.6 |

a) Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added bacteria, 100 mL of distilled water, and 720 $\mu\text{mol/L}$ of naphthalene dissolved in acetone.

3.4.7 ナフタレン酸化物が収率に及ぼす影響

バクテリアの酸化反応により生成された1-ナフトール、2-ナフトールを反応溶液中に添加し、ナフトールがナフタレンの酸化に及ぼす影響を調べた(表5)。

L字管に蒸留水10 mL、培地中濃度が20–200 $\mu\text{mol/L}$ となるナフトール、720 $\mu\text{mol/L}$ となるナフタレン–アセトン溶液および10 g-wet/Lとなる菌体を加え30 $^{\circ}\text{C}$ で振盪し反応を行った。これらの結果、2-ナフトールは添加濃度が200 $\mu\text{mol/L}$ で、1-ナフトール収率が10.7%に減少した。しかしながら、表4の収率が飽和に達した反応液中の2-ナフトール生成濃度は、8 $\mu\text{mol/L}$ であるため、2-ナフトールが反応を阻害したとは考えられない。一方、1-ナフトールは、添加量に応じて収率が減少し、200 $\mu\text{mol/L}$ の添加で1-ナフトール生成は停止した。これは、表4の収率が飽和に達した反応液中の1-ナフトール生成濃度に一致した。したがって、酸化阻害は、主に1-ナフトールによって生じたものと推測された。

Table 5 Inhibitory effects of naphthols on the oxidation of naphthalene ^{a)}

| Naphthols | Conc. of naphthol / $\mu\text{mol/L}$ | Yield of 1-naphthol / % |
|------------|---------------------------------------|-------------------------|
| 2-naphthol | 0 | 17.0 |
| | 20 | 15.3 |
| | 100 | 11.7 |
| | 200 | 10.7 |
| 1-naphthol | 0 | 17.0 |
| | 20 | 15.3 |
| | 100 | 8.5 |
| | 200 | 0 |

a) Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of distilled water, 10 g-wet/L of bacteria, and 720 $\mu\text{mol/L}$ of naphthalene dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h.

3.5 ナフタレンの酸化反応における*B. cereus* 酵素系の検討

ナフタレンの酸化反応は核への直接酸化による1位または2位へのヒドロキシ化であった。したがって、モノオキシゲナーゼによるものと推察された。細菌の持つヒドロキシ化反応の酵素として代表的なものは、フラビンモノオキシゲナーゼやシトクロム P-450がある。そこで、フラビンモノオキシゲナーゼの阻害剤であるメチマゾールおよびシトクロム P-450の阻害剤であるメチラポンを添加して反応を行ったところ、メチラポン添加の場合にのみナフタレン酸化を阻害した。したがって、ここではシトクロム P-450に類する酵素系の関与が推察された。

第4節 結論

自然界より単離した*B. cereus* を用いナフタレンの酸化条件を検討し、以下の結論を得た。

- 1) ナフタレンの反応において、30℃、pH 7-9で高い活性を与えた。この条件はバクテリアの最適増殖条件に一致した。
- 2) 初期反応速度は培地を希釈するにしたがい大となり、蒸留水のみの系では標準培地に比べ初期速度が約6倍大となった。
- 3) 生成物が一定濃度に達すると酸化に阻害作用を及ぼした。

第5節 引用文献

- 1) R. E. Klausmeier and R. J. Strawinski, *J. Bacteriol.*, **73**, 461-464 (1957).
- 2) B. D. Ensley, D. T. Gibson, and A. L. Laborde, *J. Bacteriol.*, **149**, 948-954 (1982).
- 3) C. E. Cerniglia and D. T. Gibson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 50-58 (1979).
- 4) C. E. Cerniglia and D. T. Gibson, *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 363-370 (1977).
- 5) C. E. Cerniglia, J. P. Freeman, and F. E. Evans, *Arch. Microbiol.*, **138**, 283-286 (1984).
- 6) C. E. Cerniglia, J. P. Freeman and R. K. Mitchum, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1070-1075 (1982).

2 メチルナフタレン類の酸化生成物および酸化条件の検討

第1節 緒言

現在、芳香環のアルキル側鎖を効率的に水酸化する工業的反応は激しい条件下で多段階に行われており、直接水酸基を導入することは困難とされている。したがって、一段階、常温、常圧で水酸化することのできるより温和な反応系が求められている。

近年、自然環境中に存在する多環芳香族化合物が生体内や環境微生物によって分解を受けることが見出されてきた^{1,2,3)}。この際、酸化によりフェノールあるいはカテコールを経て分解することが確認されている⁴⁾。

アルキル基を持つ多環芳香族化合物は一般に微生物に対して毒性を示し^{5,6)}、選択性も低いので有用化合物の合成手段として利用する試みは少ない。例えば、*Pseudomonas*属のバクテリアを用い、1-メチルナフタレンから1-ヒドロキシメチルナフタレンへの変換が試みられたが収率は低かった⁷⁾。

ここでは、ナフタレン酸化菌*B. cereus*および*B. brevis*を用い、メチルナフタレン類の酸化について検討した。

第2節 実験

菌体、培養、HPLCは第2章ナフタレンの酸化と同様に行った。

2.1 メチルナフタレン類の反応および生成物の分析

本培養後、遠心分離(800×G 5 min)で集菌し、菌体を2回洗浄した後、培地に再懸濁した。その溶液を500 mLの坂口フラスコに入れ、培地中濃度が720 μmol/Lとなる基質-アセトン溶液を加え、30℃の恒温槽中で振盪(4.5 cm, 110 r.p.m.)し、*B. cereus*および*B. brevis*のメチルナフタレン類への酸化活性を調べた。

生成物を単離するためにTLC(シリカゲルプレート20×66 mm, Kiesel gel 60 F256, Merck Co.)を使用した。基質、生成物、予想生成物の標品をヘキサノール-エーテル(1:1)の混合液を用いて展開し、UVライト照射し蛍光を観察した。また、発色にはGibbs' 試薬(2,6-dichloro-*p*-benzoquinone-4-chloroimineの2%メタノール溶液)を用いた。

生成物を定量するため、一定時間毎に反応液を5 mL サンプルングし、そのサンプルを酢酸エチル1 mLで3回抽出し、調製したのちHPLCで測定し

た。溶出溶媒はアセトニトリル-水を用い流速 1 mL/min で勾配溶離させ分析を行った。カラム 温度は室温、検出波長は 230 nm で行った。

第3節 結果と考察

3.1 メチルナフタレン類の酸化

土壌中から単離されたバクテリア25株中、ナフタレンの酸化活性を示した2株、すなわち、*B. cereus*と*B. brevis*を用いて1-メチルナフタレン(関東化学(株)製)(以下、1-Me-naph)、2-メチルナフタレン(関東化学(株)製)(以下、2-Me-naph)および2,6-ジメチルナフタレン(関東化学(株)製)(以下、2,6-Me₂-naph)の酸化活性を調べた。

1-Me-naphの反応では、両菌体とも保持時間13.1分(A)と15.3分(B)に生成物のピークを検出した。生成物Aは標品の1-ヒドロキシメチルナフタレン(関東化学(株)製)(以下、1-(HOCH₂)-naph)の保持時間と一致した。生成物Bは保持時間の一致する標品を見いだせなかった。

2-Me-naphの反応では、両菌体とも13.6分(C)と16.1分(D)に生成物のピークを検出した。生成物Cは標品の2-ヒドロキシメチルナフタレン(Aldrich Chem. Co. 製)(以下、2-(HOCH₂)-naph)の保持時間と一致した。生成物Dは保持時間の一致する標品を見いだせなかった。

2,6-Me₂-naphの反応では、両菌体とも8.6分(E)と14.4分(F)に生成物のピークを検出した。生成物Eは標品の2-ヒドロキシメチル-6-メチルナフタレン(以下、2-(HOCH₂)-6-Me-naph)の保持時間と一致し、生成物Fは2,6-ビスヒドロキシメチルナフタレン(以下、2-(HOCH₂)-6-Me-naph)と保持時間が一致した。

3.2 メチルナフタレン類の酸化活性の比較

標準培地 10 mLを入れたL字管に、*B. cereus*、*B. brevis*をそれぞれ加え30℃で培養を行った。12時間後、培地中濃度が720 μmol/Lとなるメチルナフタレン-アセトン溶液を添加し、24時間振盪し反応を行った(表6)。その結果、1-Me-naphの反応において*B. cereus*は1-(HOCH₂)-naphを10.3%生成し46.1%の選択率を示した。一方、*B. brevis*では1-(HOCH₂)-naphを9.1%生成し40.4%の選択率を与えた。2-Me-naphの反応では、*B. cereus*は2-(HOCH₂)-naphを22.1%生成し62.7%の選択率を与えた。一方、*B. brevis*では2-(HOCH₂)-naphを18.1%生成し57.2%の選択率を与えた。2,6-Me₂-naphの反応では、*B. cereus*は2-(HOCH₂)-6-Me-naphを11.3%生成し27.0%の選択率を与えた。一方、*B. brevis*では2-(HOCH₂)-6-Me-naph

を7.0%生成し22.9%の選択率を与えた。これらの結果、全ての基質において*B. cereus*は*B. brevis*よりも高い収率および選択率を与えた。したがって、これら基質の酸化は*B. cereus*を用い検討を行った。

Table 6 Oxidation of methyl naphthalenes by *B. cereus* and *B. brevis* a)

| Substrate | Product | Bacteria | Conversion / % | Select. / % | Yield / % |
|---------------------------|----------------------------------|------------------|----------------|-------------|-----------|
| 1-Me-naph | 1-(HOCH ₂)-naph | <i>B. cereus</i> | 22.6 | 46.0 | 10.3 |
| | | <i>B. brevis</i> | 22.6 | 40.4 | 9.1 |
| 2-Me-naph | 2-(HOCH ₂)-naph | <i>B. cereus</i> | 35.4 | 64.6 | 22.1 |
| | | <i>B. brevis</i> | 31.9 | 57.2 | 18.1 |
| 2,6-Me ₂ -naph | 2-(HOCH ₂)-6-Me-naph | <i>B. cereus</i> | 42.1 | 27.0 | 11.3 |
| | | <i>B. brevis</i> | 30.7 | 22.9 | 7.0 |

a) After 12-h incubation. 720 μmol/L of substrates dissolved in acetone added into a L-shaped test tube were at 30°C for 24 h.

3.3 メチルナフタレン類の酸化生成物の分離と分析

本培養後、菌体を遠心分離で集菌し滅菌水で2回洗浄し30 g-wet/Lになるように標準培地に再懸濁した。その懸濁液100 mLを容量500 mLの坂口フラスコに入れ72 μmolの基質-アセトン溶液を加えた。その後、30°Cの恒温槽中で振盪(4.5 cm, 110 r.p.m.)し24時間反応を行った。この操作を20本分行い、反応終了後、反応液100 mLに対し20 mLのエーテルで2回抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水、エーテルを留去した後、残留分をヘキサンに溶解させた。次に、シリカゲル (Kiesel gel 60, Merck Co.)を内径14 mmのカラムに高さ200 mm充填し、原料をヘキサンで溶出除去した後、ヘキサンにエーテルを混合しながらエーテルの割合を50%まで徐々に増やし溶離液を分取した。溶媒を留去しTLC(厚さ1 mm)で反応生成物を展開して溶媒抽出により生成物を単離した。

3.3.1 1-Me-naphの酸化生成物の分離と分析

1-Me-naphの生成物をTLCにて展開したところ、スポット1(Rf, 0.55)は、アンモニア蒸気にさらした後Gibbs'試薬の噴霧により青く発色し、芳香環に水酸基が存在することが推測できた。スポット2(Rf, 0.37)は黄色に発色し、1-(HOCH₂)-naphの標品のRf値と一致した。また、生成物のGC-MSと¹H-NMRスペクトルを測定した結果、生成物1(スポット1)はM/Z 158(M; 19%), 141(M-OH; 24%), 129(M-CHO; base peak)であった。生成物2(スポット2)はM/Z 158(M; base peak), 129(M-CHO; 25%)であった。生成物2の¹H-NMRの分析は、δ 2.5(3H; -CH₃), δ 4.8(2H; -CH₂-), δ 7.3-7.7(6H; aromatic)であった。

これらの結果より生成物2は1-(HOCH₂)-naphと同定できた。生成物1は水酸基の位置までは同定できなかったが芳香環水酸化物であることが認められた(Scheme 4-a)。

3.3.2 2-Me-naphの酸化生成物の分離と分析

2-Me-naphの生成物をTLCにて展開したところ、スポット1(Rf, 0.55)は、アンモニア蒸気にさらした後Gibbs'試薬の噴霧により青く発色し、芳香環に水酸基が存在することが推測できた。スポット2(Rf, 0.33)は黄色に発色し、2-(HOCH₂)-naphの標品のRf値と一致した。また、生成物のGC-MSと¹H-NMRスペクトルを測定した結果、生成物2(スポット2)はM/Z 158(M; base peak), 129(M-CHO; 24%)であった。生成物1(スポット1)はM/Z 158(M; 25%), 141(M-OH; 16%), 129(M-CHO; base peak)であった。¹H-NMRの分

析は δ 4.8(2H; -CH₂-), δ 7.4-7.8(7H; aromatic)であった。

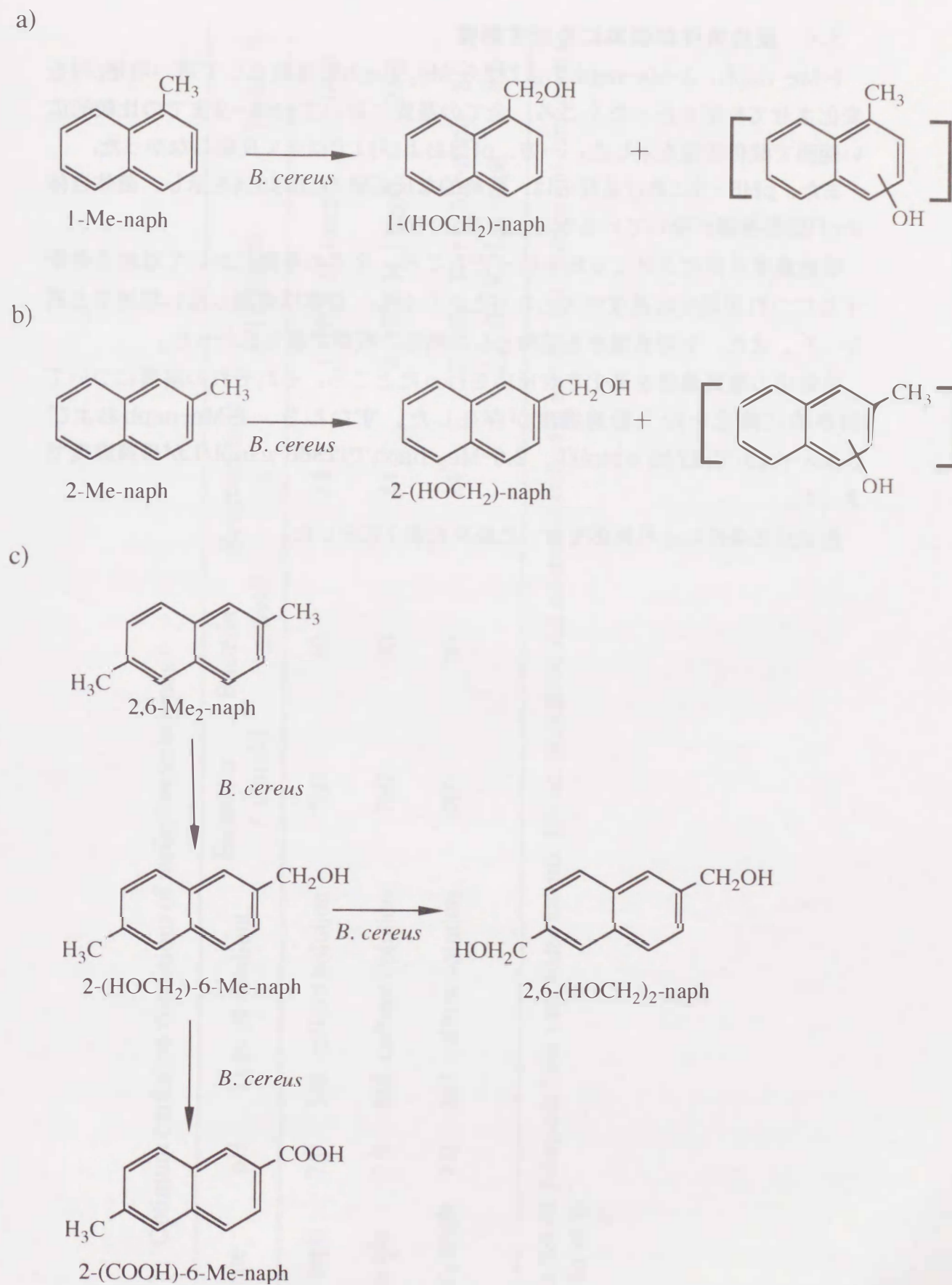
これらの結果より生成物2は2-(HOCH₂)-naphと同定できた。生成物1は水酸基の位置までは同定できなかったが、芳香環水酸化物であることが認められた (Scheme 4-b)。

3.3.3 2,6-Me₂-naphの酸化生成物の分離と分析

2,6-Me₂-naphの生成物をTLCにて展開したところ、スポット1 (Rf, 0.35)はアルコールの存在により茶褐色に発色し、2-(HOCH₂)-6-Me-naph標品のRf値と一致した。

生成物1(スポット1)の¹H-NMRスペクトルとGC-MSを測定した結果。生成物1はM/Z 172 (M; 16%), 154 (M-OH; 13%), 129 (M-CHO; base peak)であった。¹H-NMRの分析結果は、 δ 2.5(3H; -CH₃), δ 4.8(2H; -CH₂-), δ 7.3-7.7(6H; aromatic)であった。これらの結果より、標品2-(HOCH₂)-6-Me-naphと同定できた。また、生成物2(スポット2)は少量であったがHPLCの保持時間が2,6-(HOCH₂)₂-naphと一致した。

次に、酸性生成物の抽出を行った。まず、反応溶液を水酸化ナトリウム水溶液で塩基性 (pH12) にして酢酸エチルで抽出し、中性、塩基性化合物を取り除いた。次に、塩酸で酸性 (pH3) にして抽出を行った。GC分析した結果、保持時間8.8分にピークが現れ、TLCではRf値は0.75であった。これを標品と比較することにより6-メチル-2-ナフタレンカルボン酸 (以下、6-Me-2-(COOH)-naph)と同定できた。ここで、予測される反応経路をScheme 4-cに示した。



Scheme 4 Oxidation of methylnaphthalenes by *B. cereus*.

3.4 反応条件が収率に及ぼす影響

1-Me-naph、2-Me-naphおよび2,6-Me₂-naphを基質として用い培地pHを変化させて反応を行ったところ、全ての基質においてpH5-9までの比較的広い範囲で酸化活性を示した。一方、pH3および11では全く反応しなかった。

また、pH5-9における反応は、最終的な反応液のpHは8.4を示し、菌体自体のpH調整機構が働いているものと推察された。

培地濃度を变化させて反応を行ったところ、全ての基質において培地を希釈するにつれ初期反応速度が大となった。しかし、収率は希釈しない培地ほど高かった。また、生理食塩水を培地とした場合、収率が最も低かった。

培地中の基質濃度を变化させ反応を行ったところ、それぞれの基質について効率的に酸化を行う最適濃度が存在した。すなわち、1-Me-naphおよび2-Me-naphでは720 μmol/L、2,6-Me₂-naphでは360 μmol/Lが最適濃度であった。

最適反応条件により反応を行った結果を表7に示した。

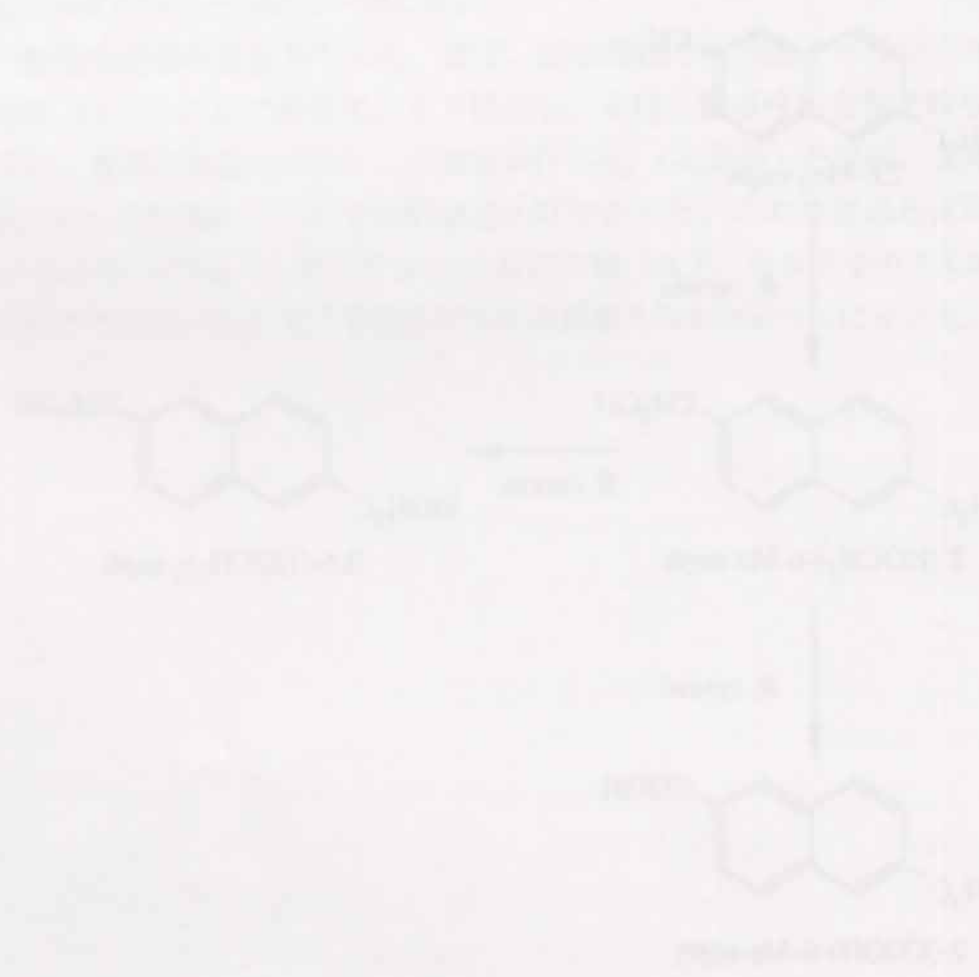


Table 7 Optimum oxidation conditions of methyl-naphthalenes a)

| Substrate | pH | Type of medium | Substrate / μmol/L | Bacteria / g-wet/L | Reaction time / h | Products | Yield / % |
|---------------------------|-----|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---|------------|
| 1-Me-naph | 7.0 | Std. culture solution | 760 | 30 | 24 | 1-(HOCH ₂)-naph | 16.0 |
| 2-Me-naph | 7.0 | Std. culture solution | 760 | 30 | 24 | 2-(HOCH ₂)-naph | 24.8 |
| 2,6-Me ₂ -naph | 9.0 | Std. culture solution | 360 | 30 | 24 | 2-(HOCH ₂)-6-Me-naph 2,6-(HOCH ₂) ₂ -naph | 8.3 8.6 |

a) Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added bacter ia|00 m l of medium, and substrate dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30 °C for 48 h.

3.5 標品の合成

生成物のうち 2,6-(HOCH₂)₂-naph、2-(HOCH₂)-6-Me-naph、6-Me-2-(COOH)-naphは別途に合成し標品として用いた。

3.5.1 2,6-(HOCH₂)₂-naph の合成

1) 2,6-Naphthalene dicarboxylic acid (2.00 g)をK₂CO₃ (3.20 g)と共にDMSO(50 mL)中、室温で1時間反応させた。次いで、CH₃I(3.30 g)を12時間かけて加え、35°Cで反応を行った。反応後、水で10倍に希釈したのち1 M HClで酸性にしジクロロメタン10 mLで3回抽出した。有機層を0.1 Mチオ硫酸ナトリウム水溶液で洗浄し、次いで、水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去するとエステル誘導体が定量的に得られた(2.01 g)。

2) 前記のエステル誘導体(2.01 g)を50 mLのTHFに加え、LiAlH₄(0.81 g)を25 mLのTHFに分散させたのち、30分間でエステル誘導体のTHF溶液に加え、水中で反応を行った。還元剤を徐々に分解し、THFを留去した後、30 mLのエーテルで3回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去して得られた粗結晶をクロロホルムを用いて再結晶した。エタノールから再結晶を行い1.2 gの2,6-(HOCH₂)₂-naph が得られた。

Mp : 175-176°C

Anal. Calcd : C ; 76.57, H ; 6.43. Found : C ; 76.59, H ; 6.45

MS : e/z 188(M ; 16.8%), 171(M-OH ; 3.4%), 157(M-CH₂OH ; 10.8%), 141(M-CH₂OH ; 7.2%), 129(M-CH₂OH×2 ; base peak)

¹H-NMR : δ 7.8 (4H, t, aromatic), δ 7.5 (2H, d, aromatic), δ 4.9 (4H, s, -CH₂-), δ 1.6 (1H, s, -OH, D₂O 処理にてピーク消滅)

3.5.2 2-(HOCH₂)-6-Me-naph の合成

1) 2,6-Me₂-naph(2.51 g)とN-プロモスクシンイミド(2.76 g)を四塩化炭素(25.11 g)に溶解し、12-14時間穏やかに還流した。その後、水中で結晶を析出させ吸引濾過を行い分離した。濾液に冷やした1 M NaOHと水を加え20 mLの四塩化炭素で3回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。

2) ブロモ体の粗結晶(0.295 g)とAgNO₃(0.295 g)を90%アセトン水溶液に加え、室温で2時間反応を行った。沈殿を濾過したのちアセトンを留去し、水を加えて10 mLのエチルエーテルで3回抽出した。有機層を水で洗浄し無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。粗結晶をエチルエーテル-石油エーテル(1:1; vol/vol)とシリカゲルカラム(Kiesel gel 60, Merck)を用いて精製し、

エタノールで再結晶すると0.18 gの2-(HOCH₂)-6-Me-naphが得られた。

Mp : 133-135°C

Anal. Calcd : C ; 83.69, H ; 7.02. Found : C ; 83.82, H ; 7.10

MS : e/z 172 (M ; base peak), 157 (M-CH₃ ; 4.1%), 155 (M-OH ; 3.9%), 141 (M-CH₂OH ; 11.6%), 128 (M-CH₃, CH₂●H ; 8.3%), 115 (M-CH₃, C-CH₂OH ; 7.4%)

¹H-NMR : δ 7.7 (3H, t, aromatic), δ 7.5 (1H, s, aromatic), δ 7.4 (1H, d, aromatic), δ 7.3 (1H, d, aromatic), δ 4.8 (2H, s, -CH₂-), δ 2.5 (3H, s, -CH₃), δ 1.9 (1H, s, -OH; D₂O 処理にてピーク消滅)

3.5.3 6-Me-2-(COOH)-naph の合成

2-(HOCH₂)-6-Me-naph (350 mg)のアセトン溶液に4-5時間かけてKMnO₄ (10 mg)水溶液を加え、室温で反応を行った。EtOHで酸化剤を分解した後、MnO₂を濾過した。アセトンで濾紙を洗浄し、濾液と洗浄液を合わせ1 M NaOHで塩基性にし、10 mLのエーテルで3回抽出した。その後、1 M HClで酸性にし、10 mLのエーテルで3回抽出した。それぞれの有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。酸性抽出物の粗結晶を酢酸エチルとシリカゲルカラム(Kiesel gel 60(Merck))を用いて精製すると70 mgの6-Me-2-(COOH)-naphが得られた。

Mp : 131-135°C

Anal. Calcd : C ; 77.20, H ; 5.41. Found : C ; 77.20, H ; 5.60

MS : e/z 186 (M ; base peak), 141 (M-COOH ; 17.7%)

¹H-NMR : δ 10.1 (1H, s, COOH), δ 8.3 (1H, s, aromatic), δ 7.9 (2H, t, aromatic), δ 7.8 (1H, d, aromatic), δ 7.3 (1H, s, aromatic), δ 7.1 (1H, d, aromatic), δ 1.8 (3H, s, -CH₃)

第4節 結論

B. cereus を用い、側鎖にメチル基を持つ1-メチルナフタレン、2-メチルナフタレンおよび2,6-ジメチルナフタレンを反応させ、以下の結論を得た。

- 1) すべての基質において *B. cereus* は *B. brevis* よりも高い収率と選択率を示した。
- 2) ¹H-NMR スペクトルと GC-MS を測定した結果、1-メチルナフタレンの酸化では1-ヒドロキシメチルナフタレンおよび芳香環水酸化物が生成し、2-メチルナフタレンの酸化では2-ヒドロキシメチルナフタレンおよび芳香環水酸化物が生成した。2,6-ジメチルナフタレンの酸化では2-ヒドロキシ-6-メチルナフタレン、2,6-ビスヒドロキシメチルナフタレンおよび6-メチル-2-ナフタレンカルボン酸が生成した。

第5節 引用文献

- 1) J. B. Davis, and R. L. Raymond, *Appl Microbiol.*, **9**, 383, (1961).
- 2) R. L. Raymond, J. W. Jamison, and O. J. Hudson, *Appl. Microbiol.*, **15**, 857 (1967).
- 3) P. M. Fedorak, and D. W. S. Westlake, *J. Microbiol.*, **27**, 432 (1988).
- 4) P. A. Williams, and M. J. Worsey, *J. Bacteriol.*, **125**, 818 (1976).
- 5) Y. Z. Lee, E. A. Leighton, D. B. Peakall, R. J. Norstrom, P. J. O'Brien, J. F. Payne, and A. D. Rahimtula, *Environ. Res.*, **36**, 248 (1985).
- 6) K. A. Griffin, C. B. Johnson, K. Breger, and R. B. Franklin, *Toxicology*, **26**, 213 (1983).
- 7) 大隅孝治, 竹下徳末, 公開特許広報, 平成2年-145190.

3 ビフェニルの酸化条件の検討

第1節 緒言

近年、ビフェニルは液晶物質の基礎骨格として注目を集めている。また、抗真菌薬の自然界における分解や環境における PCB 分解などのモデル化合物として興味もたれている。ビフェニルは、加熱溶媒や柑橘類の殺菌剤として用いられており、ベンゼンの熱による脱水素二量化反応で製造されている。

ビフェニルの酸化物は、相当するアミノ体のジアゾ化や、ジフェニレンオキシドのナトリウムによる分解、転位反応などにより得られる。しかしながら、これらの方法は工程が複雑であるため、安全で効率の良いヒドロキシビフェニルの製造方法の開発が求められている。

微生物によるビフェニルの酸化は属や種の間で幅広く異なっており、カビの一種の *Absidia* sp.¹⁾ は4-ヒドロキシビフェニルと4,4'-ジヒドロキシビフェニルのみを生成するが、同じくカビの一種である *Cunninghamella elegans*²⁾ は主生成物として4-ヒドロキシビフェニルと4,4'-ジヒドロキシビフェニルを生成し、副生成物として2-ヒドロキシビフェニルと3-ヒドロキシビフェニルを生成する。また、グラム陰性菌の *Pseudomonas* SG1043 株³⁾ は2-ヒドロキシビフェニルと3-ヒドロキシビフェニルを生成するが、*Pseudomonas putida* はビフェニルを2,3-ジヒドロキシビフェニルに酸化し、C-1位とC-2位の開裂によって2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエノートに代謝し、さらに安息香酸にまで分解する^{4,5,6)}。グラム陰性菌の *Zoogloea ramigera* はビフェニルと共に通気培養を続けるとベンゼン環に水酸基が1個又はそれ以上置換し、その後、水酸基がカルボキシル基に酸化され、最終的には二酸化炭素と水にまで分解される⁷⁾。

ここでは、グラム陽性菌の *B. brevis* と *B. cereus*⁸⁾ のビフェニルに対する酸化活性を比較し、さらに、ビフェニルの酸化生成物を分離、同定し、温和な条件下における選択的水酸化法の可能性について検討した。

第2節 実験

2.1 菌株および培養

前培養は、冷凍保存された菌体を10 mLの標準培地を入れた30 mLのL字管に白金耳で植菌し、30℃の恒温槽中で12時間振盪を行った。また、本培養は、500 mL三角フラスコに標準培地100 mLと前培養液1 mLを加え30℃の恒温槽中で12時間振盪(100 r.p.m.)を行った。

2.2 ビフェニルの反応および生成物の分析

本培養後、遠心分離(800×G 5min)で菌体を集め、菌体を2回洗浄した後、培地に再懸濁した。その溶液を500 mLの坂口フラスコまたは30 mLのL字管に入れ、ビフェニル(Ph₂)(和光純薬工業(株)製)のアセトン溶液を加え、30℃の恒温槽中で振盪(100 r.p.m.)し反応を行った。

生成物を単離するためにTLC(シリカゲルプレート(20×66mm, Kiesel gel 60 F256, Merck Co.))を使用した。基質、生成物、予想生成物の標品をヘキサン100%で展開し、UV照射で蛍光スポットのRf値を測定した。

生成物を定量するために一定時間毎に反応液を5 mLサンプリングし、酢酸エチル1 mLで3回抽出してHPLCで測定した。溶出液はアセトニトリル-水を用い、3:7から7:3まで18分間勾配溶離させた。検出波長は254 nmとした。

第3節 結果と考察

3.1 ビフェニルの酸化

土壌中から単離されたバクテリア25株中、ナフタレンの水酸化を選択的に行った2株 *B. cereus* と *B. brevis* を用いてビフェニルの酸化活性を調べた。両菌体をそれぞれ標準培地 10 mL を入れた L 字管に植菌し 30 °C で 12 時間培養した後、培地中濃度が 1.0 mmol/L となるビフェニル-アセトン溶液を添加し、24 時間反応を行った。反応液 10 mL を 2 mL の酢酸エチルで 3 回抽出し HPLC で分析を行った。その結果、*B. cereus*、*B. brevis* の両菌体にビフェニルの酸化活性が認められた。

両菌体とも原料のビフェニルよりも極性の高い 6.6 分(A) および 13.6 分(B) に生成物のピークが認められた。生成物 A は標品の 4,4'-ジヒドロキシビフェニル (和光純薬工業(株)製) (以下、4,4'-(OH)₂-Ph₂) の保持時間と一致した。また、生成物 B は 4-ヒドロキシビフェニル (和光純薬工業(株)製) (以下、4-(OH)-Ph₂) の保持時間に一致した。

3.2 ビフェニルの酸化活性の比較

標準培地 10 mL を入れた L 字管に *B. cereus*、*B. brevis* をそれぞれ加え 30 °C で培養を行った。12 時間後、培地中濃度が 1.0 mmol/L となるビフェニル-アセトン溶液を添加し、さらに 24 時間振盪して反応を行った(表 8)。*B. cereus* の反応では 4-(OH)-Ph₂ を 6.4% 生成し、4,4'-(OH)₂-Ph₂ を 0.4% 生成した。一方、*B. brevis* では 4-(OH)-Ph₂ を 8.0% 生成し、4,4'-(OH)₂-Ph₂ を 0.8% 生成した。これらの結果、*B. brevis* は *B. cereus* より高い収率を示した。したがって、ビフェニルの反応には *B. brevis* を用いた。

Table 8 Oxidation of biphenyl by *B. brevis* and *B. cereus* a)

| Bacteria | Yield / % | |
|------------------|------------------------|---|
| | 4-(OH)-Ph ₂ | 4,4'-(OH) ₂ -Ph ₂ |
| <i>B. brevis</i> | 8.0 | 0.8 |
| <i>B. cereus</i> | 6.4 | 0.4 |

a) After 24-h incubation, 100 μmol/L of biphenyl dissolved in acetone were added into a 30 mL L-shaped test tube containing 10 mL of culture solution. The reaction was carried out at 30°C for 24h.

3.3 ビフェニルの酸化生成物の分離と分析

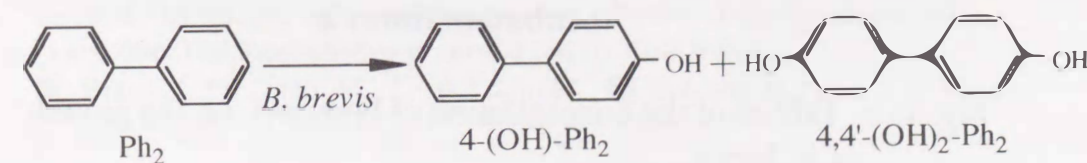
本培養後、菌体を遠心分離で集菌し滅菌水で 2 回洗浄し 30 g-wet/L となるように標準培地に再懸濁した。その懸濁液 100 mL を 500 mL の坂口フラスコに入れ 500 μmol のビフェニル-アセトン溶液を加えた。その後、30 °C の恒温槽中で 24 時間反応を行った。この操作を同時に 50 本行い 24 時間後、反応液 100 mL に対し 25 mL のジエチルエーテルで 2 回抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水、エーテルを留去した後、残留分を石油エーテルに溶解させた。次に、シリカゲル (Kiesel gel 60, Merck Co.) を内径 14 mm のカラムに高さ 200 mm まで充填し、原料を石油エーテルで除いた後、石油エーテルにエーテルを混合しながらエーテルの割合を 50 % まで徐々に増やし、溶離液を分取した。溶媒を留去しシリカゲルプレート(厚さ 1 mm)を用い反応生成物をヘキサン：エーテル = 60 : 40 で展開した。

TLC にて展開した結果、スポット 1 (Rf, 0.12) は 4,4'-(OH)₂-Ph₂ の Rf 値と一致した。スポット 2 (Rf, 0.33) は 4-(OH)-Ph₂ の Rf 値と一致した。

生成物の ¹H-NMR スペクトルと GC-MS の測定値は、それらの標品と一致し、スポット 1 は 4,4'-(OH)₂-Ph₂、スポット 2 は 4-(OH)-Ph₂ と同定できた⁹⁾ (Scheme 5)。

また、酸性条件下における抽出では生成物は検出されなかった。

さらに、抱合体の有無を確認するために、サンプル 5 mL を酢酸エチル 1 mL で 6 回抽出し、HPLC で酢酸エチル溶出物がないことを確認した後、濃塩酸を等量加え、80 °C で 1 時間加熱した。その後、酢酸エチルで抽出し、その抽出液を HPLC で分析した。その結果、ヒドロキシビフェニル誘導体は認められなかった。



Scheme 5 Oxidation of biphenyl by *B. brevis*.

3.4 ビフェニルおよび生成物が *B. brevis* の増殖に及ぼす影響

標準培地10 mL、前培養液0.1 mL、培地中濃度が0.1–0.4 mmol/Lとなるビフェニル、4-(OH)-Ph₂、4,4'-(OH)₂-Ph₂をそれぞれアセトンに溶解させ、30 mLのL字管に加え、30℃の恒温槽中で振盪した。また、波長660 nmで30分毎に吸光度を測定した。

ビフェニルは増殖阻害を示さなかった(図7-a)。4-(OH)-Ph₂は増殖阻害が強く0.1 mmol/Lで阻害作用を示し、0.4 mmol/Lで完全に増殖を阻害した(図7-b)。また、4,4'-(OH)₂-Ph₂は弱い増殖阻害を示した(図7-c)。これらの結果より、4-(OH)-Ph₂が反応液中に蓄積されることにより菌体に毒性が生じることが予測された。

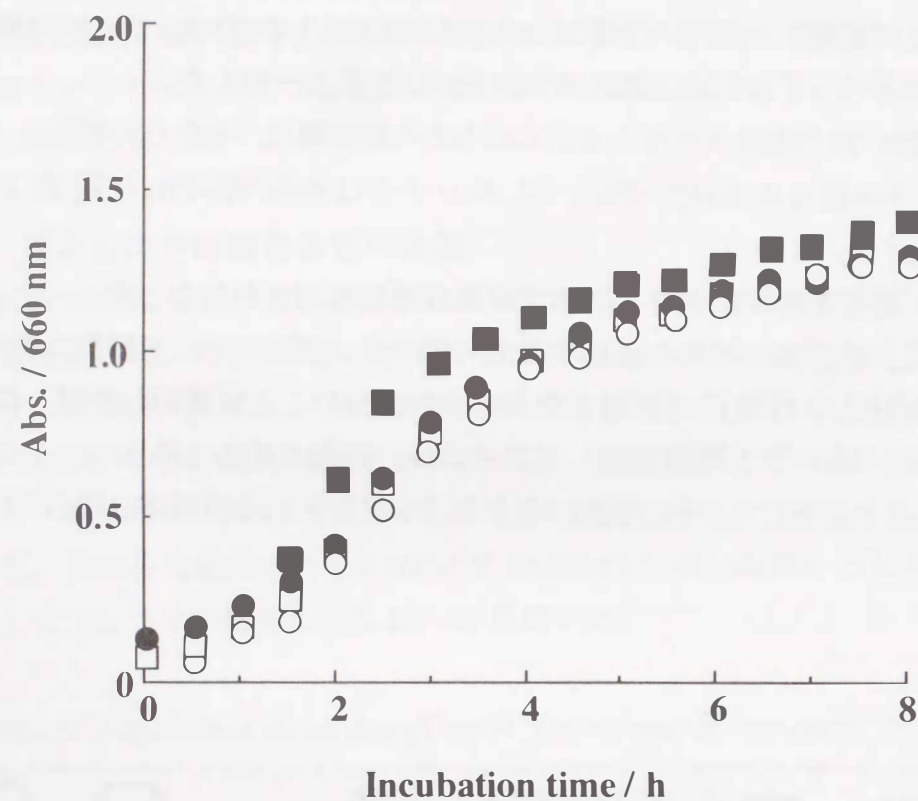


Fig. 7- a Effects of the concentration of biphenyl on the growth of *B. brevis*.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 0.1 mL pre-cultured solution, and biphenyl dissolved in acetone. The incubation was carried out by slow shaking.

■: Blank, ○: 0.1 mmol/L, □: 0.2 mmol/L, ●: 0.4 mmol/L.

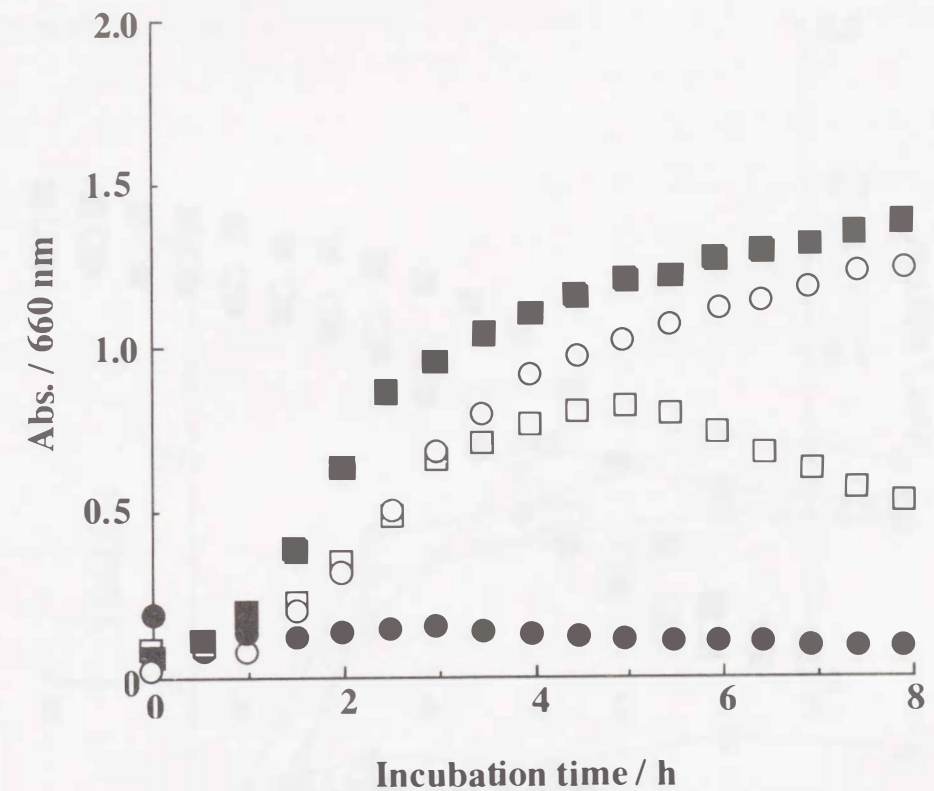


Fig. 7- b Effects of the concentration of 4-hydroxybiphenyl on the growth of *B. brevis*.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 0.1 mL pre-cultured solution, and 4-hydroxybiphenyl dissolved in acetone. The incubation was carried out by slow shaking.

■: Blank, ○: 0.1 mmol/L, □: 0.2 mmol/L, ●: 0.4 mmol/L.

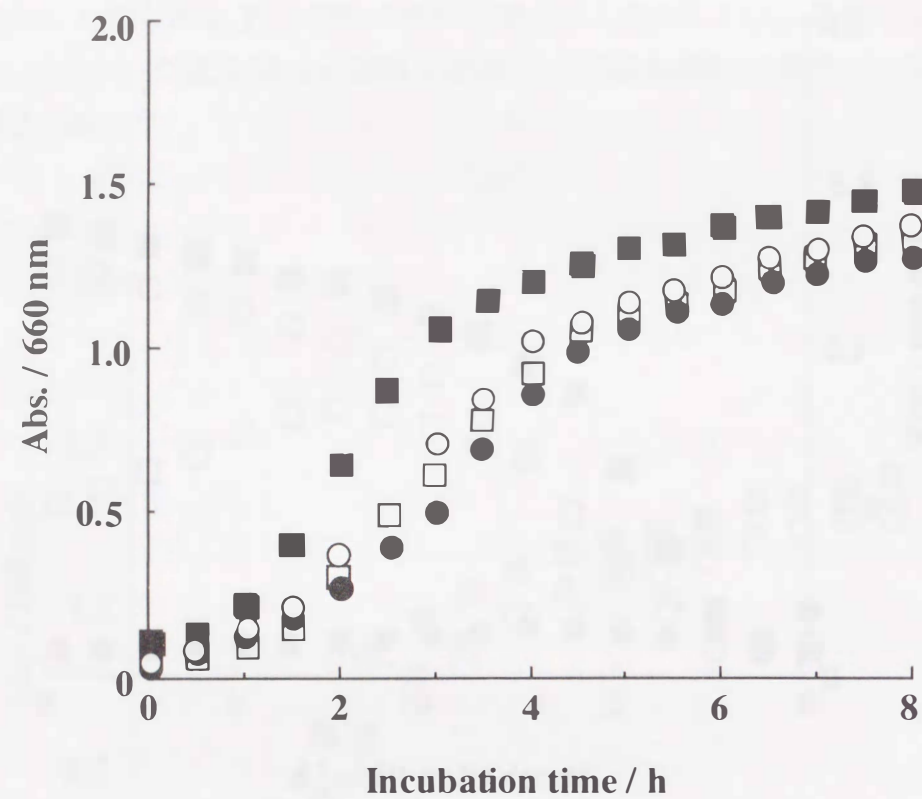


Fig. 7- c Effects of the concentration of 4,4'-dihydroxybiphenyl on the growth of *B. brevis*.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 0.1 mL pre-cultured solution, and 4,4'-dihydroxybiphenyl dissolved in acetone. The incubation was carried out slow shaking.

■: Blank, ○: 0.1 mmol/L, □: 0.2 mmol/L, ●: 0.4 mmol/L.

3.5 反応条件が収率に及ぼす影響

3.5.1 反応温度が収率に及ぼす影響

L字管に標準培地 10 mL、培地中濃度が $500 \mu\text{mol/L}$ となるビフェニル-アセトン溶液、30 g-wet/L となる菌体を加え 20–35°C で 24 時間反応を行った結果を図 8 に示した。

この結果より、20–30°C で高い活性を示したが、35°C では活性が極端に低下し 4,4'-(OH)₂-Ph₂ が生成されなかった。また、35°C では、ビフェニルの昇華が認められた。

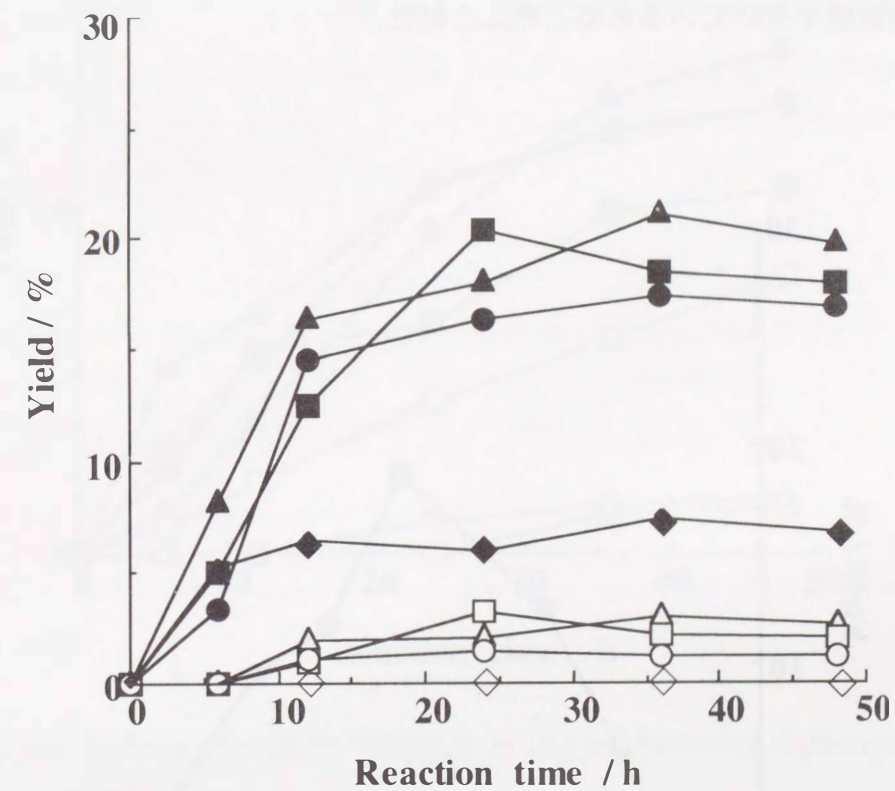


Fig. 8 Effects of temperature on the oxidation of biphenyl.

Into a 30mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 30 g-wet/L of bacteria solution and $500 \mu\text{mol/L}$ of biphenyl dissolved in acetone.

▲: Yield of 4-(OH)-Ph₂ at 20 °C, △: yield of 4,4'-(OH)₂-Ph₂ at 20 °C,
 ■: yield of 4-(OH)-Ph₂ at 25 °C, □: yield of 4,4'-(OH)₂-Ph₂ at 25 °C,
 ●: yield of 4-(OH)-Ph₂ at 30 °C, ○: yield of 4,4'-(OH)₂-Ph₂ at 30 °C,
 ◆: yield of 4-(OH)-Ph₂ at 35 °C, ◇: yield of 4,4'-(OH)₂-Ph₂ at 35 °C.

3.5.2 培地 pH が収率に及ぼす影響

30 mLのL字管に塩酸および水酸化ナトリウムを用い pH3 -11 に調整した標準培地10 mL、培地中濃度が500 $\mu\text{mol/L}$ となるビフェニル-アセトン溶液、30 g-wet/Lとなる菌体を加え30 $^{\circ}\text{C}$ で24時間振盪し反応を行った結果を図9に示す。

その結果、pH7で最高収率を示し、ナフタレン反応の最適 pH(図5)よりも低かった。また、pH8より大の場合にはナフタレンに比べ収率が低下した。これは、培地栄養分の代謝物であるアンモニウムが阻害作用を示したものと推察された。pH3 および pH11 では生成物が全く認められなかった。4,4'-(OH)₂-Ph₂ が生成されたのは pH5-9 の範囲であった。

また、pH5-9 では反応終了後の pH は約 8.4 を示した。これは、菌体自体の pH 調整機構が働いているものと考えられた。

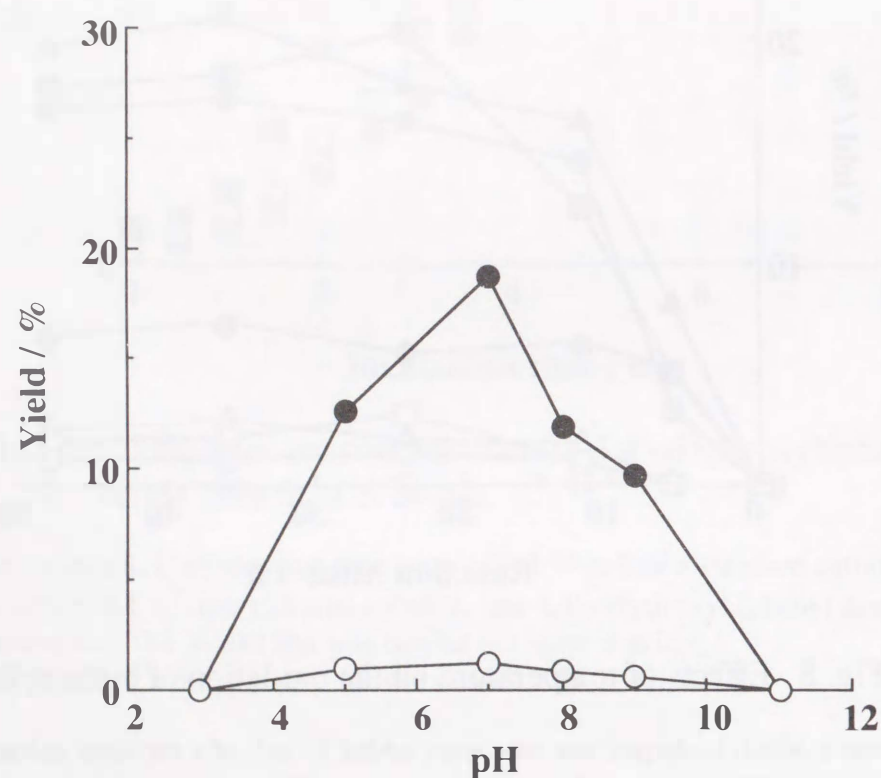


Fig. 9 Effects of pH on the oxidation of biphenyl.

Into a 30mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 30 g-wet/L of bacteria, and 500 $\mu\text{mol/L}$ of biphenyl dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h.

●: Yield of 4-(OH)-Ph₂, ○: yield of 4,4'-(OH)₂-Ph₂.

3.5.3 培地濃度が収率に及ぼす影響

500 mLの坂口フラスコ中に、標準培地に対し 1/10 -2 倍の濃度に調整した培地または生理食塩水100 mL、培地中濃度が500 $\mu\text{mol/L}$ となるビフェニル-アセトン溶液、30 g-wet/Lとなる菌体を加え30 $^{\circ}\text{C}$ で振盪し反応を行った(図10)。

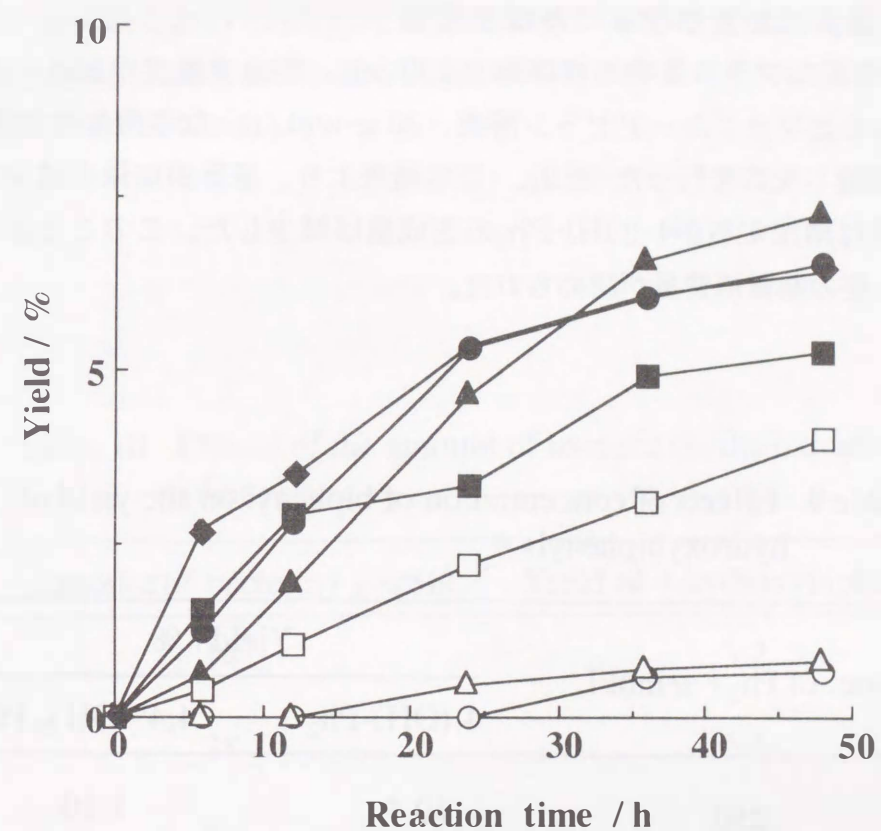


Fig. 10 Effects of culture solution on the oxidation of biphenyl at 30 $^{\circ}\text{C}$.

Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added 250 mL of medium, 30 g-wet/L of bacteria, and 500 $\mu\text{mol/L}$ of biphenyl dissolved in acetone.

▲: Yield of 4-(OH)-Ph₂ in culture solution,
 △: yield of 4,4'-(OH)₂-Ph₂ in culture solution,
 ●: yield of 4-(OH)-Ph₂ in 2-fold dilution,
 ○: yield of 4,4'-(OH)₂-Ph₂ in 2-fold dilution,
 ■: yield of 4-(OH)-Ph₂ in 10-fold dilution,
 □: yield of 4-(OH)-Ph₂ in 2-fold concentration,
 ◆: yield of 4-(OH)-Ph₂ in saline.

これらの結果より、4-(OH)-Ph₂と4,4'-(OH)₂-Ph₂の収率を最も高く示したのは無希釈培地を用いた場合であった。また、培地を希釈するにつれて収率は低下した。これは、培地濃度が低下するにつれ、生成物の強い毒性が現れ菌体に毒性を与えたためと推察された。10倍希釈培地及び生理食塩水では4,4'-(OH)₂-Ph₂は生成されず4-(OH)-Ph₂のみ生成した。逆に培地を2倍に濃縮した場合においても4,4'-(OH)₂-Ph₂は生成されず4-(OH)-Ph₂の収率も減少した。これは、培地中栄養物と基質の競合が生じたためと考えられた。

3.5.4 基質添加量が収率に及ぼす影響

500 mLの坂口フラスコ中に標準培地100 mL、培地中濃度が250-1000 μmol/Lとなるピフェニルアセトン溶液、30 g-wet/Lとなる菌体を加え30 °Cで24時間振盪し反応を行った(表9)。この結果より、基質添加量を減少させるにつれ収率は増加するが4-(OH)-Ph₂の生成量は減少した。このことより菌体量に対し一定の基質消費量が認められた。

Table 9 Effects of concentration of biphenyl on the yield of hydroxybiphenyls ^{a)}

| Conc. of Ph ₂ / μmol/L | Yield / % | |
|-----------------------------------|------------------------|---|
| | 4-(OH)-Ph ₂ | 4,4'-(OH) ₂ -Ph ₂ |
| 250 | 10.4 | 1.10 |
| 500 | 6.5 | 0.62 |
| 1000 | 4.8 | 0.43 |

a) Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added 100 mL of a standard culture solution, 30 g-wet/L of bacteria, and biphenyl dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30 °C for 48h.

3.5.5 菌体量が収率に及ぼす影響

500 mLの坂口フラスコに生理食塩水100 mL、培地中濃度が500 μmol/Lとなるピフェニルアセトン溶液、14-112 g-wet/Lとなる菌体を加え30 °Cで48時間振盪し反応を行った(表10)。

菌体濃度を増加させるにつれ収率も増加したが、菌体量が56 g-wet/Lを越えると、4-(OH)-Ph₂の収率増加は停止した。このことより、ピフェニルを基質に用いた場合においても、ナフタレン酸化と同様に生成物が一定濃度に達することにより収率は飽和した。

また、本実験において培地は生理食塩水を用いたことにより、標準培地を用いた場合と比べ生成物の強い反応阻害が現れ、菌体量の増加に対する収率の増加する割合は小さかった。

Table 10 Effects of the amount of bacteria on the oxidation of biphenyl ^{a)}

| Amount of bacteria / g-wet/L | Yield of 4-hydroxybiphenyl / % |
|------------------------------|--------------------------------|
| 14 | 3.2 |
| 28 | 6.4 |
| 56 | 10.8 |
| 112 | 8.6 |

a) Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added 100 mL of saline, bacteria, and 500 μmol/L of biphenyl dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30 °C for 48h.

3.6 ビフェニルの反応経路の検討

500 mLの坂口フラスコに標準培地100 mLまたは生理食塩水100 mL、培地中濃度が100 μ mol/Lとなる4-(OH)-Ph₂および4,4'-(OH)₂-Ph₂のアセトン溶液、32 g-wet/Lとなる菌体を加え30 °Cで48時間振盪し反応を行った(表 11)。

標準培地において4,4'-(OH)₂-Ph₂を基質として用いた場合、生成物は検出されなかった。さらに、4-(OH)-Ph₂からビフェニル、4,4'-(OH)₂-Ph₂から4-(OH)-Ph₂への逆反応は認められなかった。したがって、4,4'-(OH)₂-Ph₂の生成は、ビフェニルの酸化により生成された4-(OH)-Ph₂の逐次酸化によって生成したものであった。

また、生理食塩水では、4-(OH)-Ph₂を基質として用いた場合4,4'-(OH)₂-Ph₂は検出されなかった。

Table 11 Metabolism of 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl by *B. brevis* ^{a)}

| Type of medium | Substrate | Yield / % | | |
|---------------------------|---|------------------------|---|-----------------|
| | | 4-(OH)-Ph ₂ | 4,4'-(OH) ₂ -Ph ₂ | Ph ₂ |
| Standard culture solution | 4-(OH)-Ph ₂ | — | 6.1 | 0 |
| | 4,4'-(OH) ₂ -Ph ₂ | 0 | — | 0 |
| Saline | 4-(OH)-Ph ₂ | — | 0 | 0 |
| | 4,4'-(OH) ₂ -Ph ₂ | 0 | — | 0 |

a) Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added 100 mL of medium, 30 g-wet/L of bacteria, and substrate dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30 °C for 48h.

3.7 ビフェニルの酸化反応が生菌数に及ぼす影響

液体培地および生理食塩水を用いて菌体濃度30 g-wet/Lとなるように調整した懸濁液10 mLをL字管に入れ、ここに500 μ mol/Lとなるビフェニルアセトン溶液を加えた。一定時間毎に5 μ Lずつサンプリングし、10,000倍に希釈したものを50 μ Lずつ平板寒天培地にまき、コンラージ棒でむらなく塗り広げ、35°Cで12時間培養後コロニー数を計測した。さらに、コントロールとしてビフェニルを加えていない場合についても同様に行い*B. brevis*の生菌数を求めた(表12)。

この結果より、液体培地と生理食塩水培地の両方において生菌数は時間が経過するにつれ減少し、生理食塩水の方が減少速度が大であった。さらに、ビフェニル存在下ではその傾向を強く示した。ビフェニルは菌体の増殖阻害をほとんど示さなかったことより、生菌数の減少は主に生成物の毒性によるものであると考えられた。また、生理食塩水中ではビフェニルを加えていない場合においても生菌数は12時間後に大幅に減少した。この結果より、効率的にビフェニルの反応を行う場合には、培地中に栄養分が必要であった。

Table 12 Number of living cells under the various conditions

| Time / h | Number of living bacteria / 10 ⁶ cell/mL | | | |
|----------|---|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| | standard culture solution | | saline | |
| | Control ^{a)} | Ph ₂ ^{b)} | Control ^{a)} | Ph ₂ ^{b)} |
| 0 | 8.89 | 5.18 | 8.11 | 7.29 |
| 12 | 5.05 | 2.78 | 1.23 | 1.93 |
| 24 | 6.26 | 1.56 | 1.29 | 1.17 |
| 48 | 4.36 | 0.69 | 1.09 | 0.25 |

a) Into a 30 mL L-shaped test tube containing 10 mL of medium were added bacteria. The incubation was carried out at 30°C.

b) Into a 30 mL L-shaped test tube containing 10 mL of medium were added bacteria, 500 μ mol/L of biphenyl dissolved in acetone. The incubation was carried out at 30°C.

第4節 結論

B. brevis を用いビフェニルの反応条件を検討し、以下の結論を得た。

- 1) ビフェニルの酸化により 4-ヒドロキシビフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシビフェニルが生成した。また、これらの抱合体は検出されなかった。
- 2) pH7 で最高収率を示し、pH5-9 で、4-ヒドロキシビフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシビフェニルが生成した。
- 3) 標準培地を用いた場合に 4-ヒドロキシビフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシビフェニルの収率が最も高く、培地を希釈するにつれて収率は低下した。
- 4) 菌体量が増加するにしたがい収率も増加したが、菌体量が一定値に達すると収率は飽和に達した。
- 5) 4,4'-ジヒドロキシビフェニルは生成した 4-ヒドロキシビフェニルの逐次酸化によって生成した。

第5節 引用文献

- 1) R. D. Schwartz, A. L. Williams, and D. B. Hutchinson, *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 702-708 (1980).
- 2) R. H. Dodge, C. E. Cerniglia, and D. T. Gibson, *Biochem. J.*, **178**, 223-230 (1979).
- 3) 村上信雄, 石山三郎, 白井勝久, 久塚謙一, 特公昭 60-38116 号 (1985).
- 4) D. Catelani, C. Sorlini, and V. Treccani, *Experientia.*, **27**, 1173-1174 (1971).
- 5) D. Catelani, and A. Colombi, *Biochem. J.*, **143**, 431-434 (1974).
- 6) Catelani, D. A. Colombi, C. Sorlini and V. Treccani, *Biochem. J.*, **134**, 1063-1066 (1974).
- 7) 花田信次郎, 特開昭 50-125087 号 (1975).
- 8) M. Inoue, T. Inoue, M. Okami and Y. Hirai, *Chem. Lett.*, 1315 (1994).
- 9) R. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morill 著, 荒木峻, 益子洋一郎, 山本修, 訳, 有機化合物のスペクトルによる同定法, 東京化学同人, (1992).

第3章 1-ナフトール収率増加法の検討

第1節 緒言

生体触媒を用いた反応は、常温、常圧の温和な反応条件で選択的に効率よく反応を行う利点を持っているが、基質およびその代謝物により反応が阻害されやすく、収率が低いという欠点がある。

このような問題の解決法として、反応液中の生成物を反応系から逐次的に除去する¹⁾、培地中に添加物を加え酵素活性を高める²⁾、菌体を固定化し生体触媒の失活を防ぐ³⁾、などが考えられている。

ここでは、上記で述べたさまざまな解決法を利用し、収率増加の可能性について検討した。

第2節 実験

菌体、培養、HPLCは第2章ナフタレン酸化と同様の条件で行った。

2.1 アニオン交換樹脂の調製

アンバーライト IRA-402、IRA-400、IRA-93、IR-45(Rohm & Haas Co.製)を4% NaOHでイオン交換した後、蒸留水で洗浄した。次に Na_2HPO_4 と KH_2PO_4 の5%リン酸溶液でpH7に調製し、蒸留水で洗浄して使用した。

2.2 菌体の固定化

蒸留水20 mL中に κ -カラギーナン(和光純薬工業(株)製)0.7 gを添加し攪拌した後、オートクレーブで120℃20分間滅菌し約40℃になるまで放置した。菌体は大量培養後、培養液から集菌された細菌を先に調製した κ -カラギーナン溶液に加え分散させた。この溶液を10 mLの注射器に流し込み2.5% KCl水溶液中に滴下して直径2-3 mmの固定化ビーズを作成した。アルギン酸ナトリウム(和光純薬工業(株)製)を固定化担体として用いた場合は、0.8% CaCl_2 溶液に滴下し固定化ビーズを作成した。

第3節 結果と考察

3.1 アニオン交換樹脂が収率に及ぼす影響

反応が進行するにつれ蓄積される1-ナフトールを、アニオン交換樹脂上に逐次的に吸着させて、反応液中の濃度を低く保つことを試みた。

500 mLの坂口フラスコ中に蒸留水100 mL、培地中濃度が $720 \mu\text{mol/L}$ となるナフタレン-アセトン溶液、30 g-wet/Lとなる菌体、リン酸緩衝液で調製したアニオン交換樹脂を加え、30℃で振盪し反応を行った。48時間反応後にアニオン交換樹脂を回収し、樹脂上に吸着された生成物を酢酸エチルで抽出した。また、溶液中の生成物も酢酸エチルで抽出し、両方の収率の合計を1-ナフトール収率とした。反応は異なるタイプのアニオン交換樹脂を用い試験を行った(表13)。この結果、イオン交換樹脂無添加の反応では収率25%を得た。一方、強塩基多孔質性のアニオン交換樹脂(IRA-402, 1 mL)の添加では、樹脂から1-ナフトール収率を25%、反応液中より20%の1-ナフトールが抽出され48時間の反応で合計収率45%を得た。したがって、反応液中より生成物を逐次的に除去することにより収率の増加が可能となった。しかし、アニオン樹脂添加量を増加してゆくとつれ、1-ナフトール収率が減少した。これは、細菌の生体維持に必要な成分が樹脂上に吸着され、酸化活性が失われたためと推察された。

また、弱塩基性の樹脂IR-45や巨大網状タイプの樹脂IR-A93では1-ナフトール収率は低い結果となった。

Table 13 Effects of anion-exchange resins on the yield of 1-naphthol ^{a)}

| Run | Type of resin | Amount of resin / mL | Yield of 1-naphthol / % | | |
|-----|-----------------------|----------------------|-------------------------|-----------|-------|
| | | | On resin | In medium | Total |
| 1 | None | 0 | — | 25 | 25 |
| 2 | IRA-402 ^{b)} | 1 | 25 | 20 | 45 |
| 3 | IRA-402 | 2 | 21 | 5 | 26 |
| 4 | IRA-402 | 5 | 8 | 6 | 14 |
| 5 | IRA-400 ^{c)} | 2 | 20 | 2 | 22 |
| 6 | IRA-93 ^{d)} | 2 | 8 | 0 | 8 |
| 7 | IR-45 ^{e)} | 2 | 7 | 0 | 7 |

a) Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added 100 mL of distilled water, 30 g-wet/L of bacteria, anion-exchange resin, and 720 μ mol/L of naphthalene dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30°C for 48 h.

b) Strongly basic porous quaternary-ammonium type of polystyrene resin.

c) Strongly basic quaternary-ammonium-polystyrene type of polystyrene resin.

d) Macro-reticular type of polystyrene resin.

e) Weakly basic type of polystyrene-polyamine resin.

3.2 添加物がナフタレンの酸化に及ぼす影響

3.2.1 金属イオンがナフタレンの酸化に及ぼす影響

ある種の金属イオンは微生物の酵素系を活性化させることが報告されている。ここでは、様々な種類と量の金属イオン存在下で反応を行った。L字管に蒸留水10 mL、培地中濃度が720 μ mol/Lとなるナフタレン-アセトン溶液、10 g-wet/Lとなる菌体、および金属イオンを加え30°Cで振盪し反応を行った(表14)。硫化チタン(III)を0.05 mg/mL添加した場合、無添加の場合に比べ収率が1.2倍増加したが、0.1 mg/mLの添加では効果がなかった。一方、Cu(II), Zn(II), Mn(II), Co(II), Cr(VI)のような遷移金属イオンの添加では酸化を大きく阻害した。特に、硫酸銅(II)の0.05 mg/mL添加では完全に酸化を阻害した。これらの金属イオンの添加では、ナフタレン酸化の促進効果は見出されなかった。

3.2.2 バルビタールがナフタレンの酸化に及ぼす影響

バクテリアのオキシゲナーゼタンパク質の誘導は、酵素活性を増加させるための一つの方法である。バルビタールは*Bacillus megaterium* 酵素の効果的な誘導物質として知られている。ここではペントバルビタール(12.5-50 mg/L)を誘導物質として用いた。500 mLの坂口フラスコ中に標準培地100 mL、前培養液1 mL、ペントバルビタールを加え30°Cで振盪し反応を行った(表15)。ペントバルビタール無添加の場合、集菌量は1.5gであったが、2.5 mg添加した場合、集菌量は2.9 gとなり2倍の収量のバクテリアが得られた。一方、1-ナフトール収率は、添加の有無に関わらずにほぼ一定であった。したがって、ペントバルビタールは酵素活性を増加せず他のタンパク質を誘導したものと考えられた。

Table 14 Relative activity for the oxidation of naphthalene in the presence of metal ions^{a)}

| Metal ions | Relative activity | | |
|---|---------------------|-----------|------------|
| | Conc. of metal ions | | |
| | 10 mg / L | 50 mg / L | 100 mg / L |
| Na ₂ CO ₃ | 1.00 | 1.01 | 0.98 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 1.16 | 1.05 | 1.10 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 1.14 | 1.08 | 1.03 |
| Ti ₂ (SO ₄) ₃ · 8H ₂ O | 1.13 | 1.21 | 1.13 |
| CrCl ₃ · 6H ₂ O | 1.00 | 0.68 | 0.34 |
| MnSO ₄ · 6H ₂ O | 0.85 | 0.34 | 0.28 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 1.15 | 1.03 | 1.06 |
| CoSO ₄ · 7H ₂ O | 0.41 | 0.29 | 0.31 |
| NiSO ₄ · 6H ₂ O | 0.84 | 0.92 | 0.81 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.77 | 0.00 | 0.00 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 1.04 | 0.65 | 0.55 |
| SrCl ₂ · 6H ₂ O | 1.13 | 0.92 | 0.81 |
| SnCl ₂ · 2H ₂ O | 1.02 | 0.66 | 0.68 |

a) Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of distilled water, 10 g-wet/L of bacteria, and 720 μ mol/L of naphthalene dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30°C for 24 h.

Table 15 Effects of pentobarbital on the growth of *B. cereus*^{a)} and yield of 1-naphthol^{b)}

| Conc. of pentobarbital / mg/L | Yield of bacteria / g-wet | Yield of 1-naphthol / % |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 0 | 1.5 | 16.8 |
| 12.5 | 2.2 | 19.4 |
| 25 | 2.9 | 15.5 |
| 50 | 3.6 | 18.7 |

a) Incubation of bacteria was carried out in a 500 mL Sakaguchi-flask by the addition of 150 mL of a standard culture solution, 1 mL of pre-incubated bacteria, and pentobarbital at 30°C for 48 h.
 b) Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added centrifuged bacteria, 100 mL of distilled water, and 720 μ mol/L of naphthalene dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30°C for 24 h.

3.3 固定化バクテリアを用いた酸化

κ -カラギーナンやアルギン酸カルシウムのような高分子物質に酵母菌やカビを固定化し、固定床やバッチ槽で利用されている。ここでは、2.4 g(wet)のバクテリアを含んだ κ -カラギーナンビーズ(20 mL)を調製し、500 mLの坂口フラスコ中に培地、培地中濃度720 μ mol/Lとなるナフタレン-アセトン溶液、および固定化菌体を加えナフタレンの酸化を30°Cで行った(表 16)。

これらの結果、10倍希釈培地を使用した場合24時間後、収率は20%に達した。アルギン酸カルシウムの固定化物を用いた場合も収率20%に達した。一方、5%グルコース溶液を培地として用いた場合、収率が低く、ヘキサンを培地とした場合では反応しなかった。

次に、10倍希釈培地を用い15時間おきに固定化物を回収し、2.5%KCl溶液で洗浄して反応を繰り返したところ反応を10回繰り返した後も10%の1-ナフトール収率は保たれた(図 11)。また、10回繰り返し使用後、固定化物1粒を砕き、36°C、24時間、寒天プレート上に培養したところ、多数の菌体コロニーが確認された。したがって、繰り返し反応に使用した後も、固定化物中のバクテリアは生存していることが示された。

Table 16 Oxidation of naphthalene to 1-naphthol on immobilized *B. cereus* a)

| Run | Type of polymers | Bacteria / g-wet | Type of medium | Amount of medium / mL | Yield of 1-naphthol / % | | |
|-----|-------------------|------------------|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|-----|-----|
| | | | | | 12h | 24h | 48h |
| 1 | Car ^{b)} | 1.2 | 10-fold diluted nutrients | 100 | 14 | 19 | 18 |
| 2 | Car | 2.4 | 10-fold diluted nutrients | 100 | 17 | 20 | 19 |
| 3 | Alg ^{c)} | 2.4 | 10-fold diluted nutrients | 100 | 15 | 20 | 18 |
| 4 | Car | 2.0 | 5% glucose solution | 200 | 0 | 3 | 7 |
| 5 | Car | 1.2 | hexane | 150 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | Car | 1.2 | hexane+10-fold diluted nutrients | 50+100 | 0 | 0 | 0 |

a) Into a 60 mL Sakaguchi-flask were added medium, 20mL of immobilized bacteria, and 720 μ mol/L of naphthalene dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30°C.

b) κ -Carrageenan.

c) Calcium alginate.

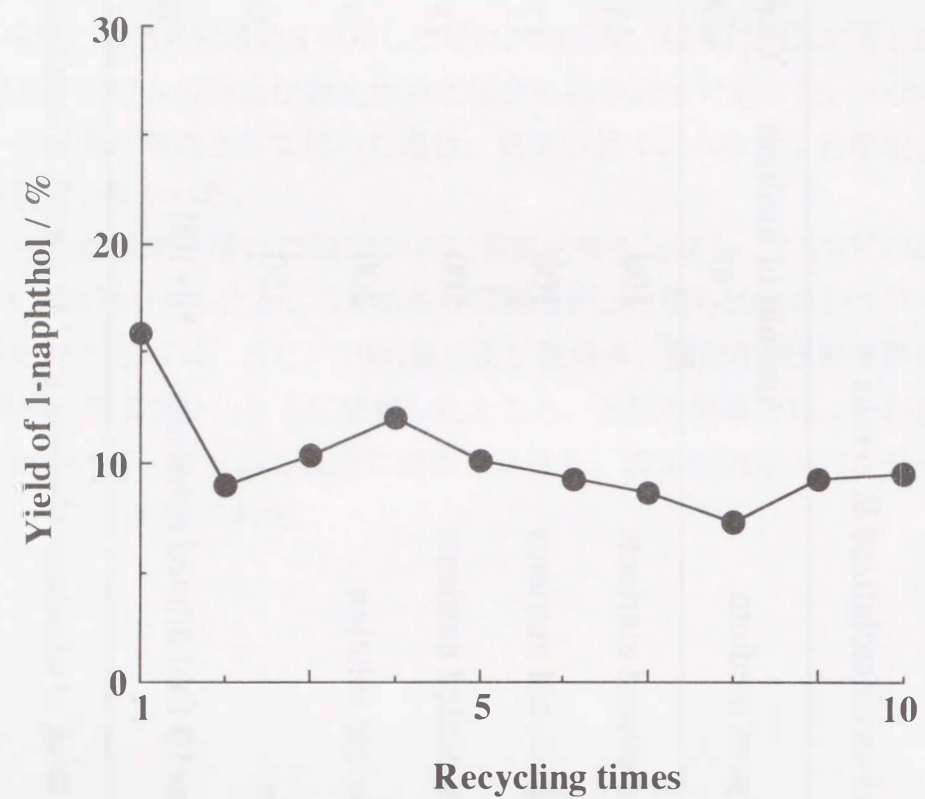


Fig. 11 Oxidation of naphthalene with recovered bacteria immobilized in κ -carrageenan.

Into a 500 mL Sakaguchi-flask were added 100mL of 10-fold diluted nutrient, immobilized bacteria (2.4 g in 20 mL κ -carrageenan solution), and 720 μ mol/L of naphthalene dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30 °C for 15 h.

第4節 結論

1-ナフトール収率増加法の検討を行い、以下の結論を得た。

- 1) 強塩基多孔質性のアニオン交換樹脂を用い、生成物を逐次的に除去することにより収率の増加が可能となった。
- 2) 10倍希釈培地を用い、反応を10回の繰り返した後も1-ナフトール収率10%が保たれた。

第5節 引用文献

- 1) R. L. Raymond, J. W. Jamison, and J. O. Hudson, *Appl. Microbiol.*, **15**, 857 (1967).
- 2) T. Ishikura, H. Nishida, K. Tanno, N. Miyachi and A. Okazaki, *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 12-20 (1968).
- 3) I. Takata, T. Tosa and I. Chibata, *Appl. Biochem. Biotech.*, **8**, 39-54 (1983)

第2部 バクテリアを用いたケトン基の還元および生成物の膜分離

第1章 ケトン基の還元における反応条件の検討

第1節 緒言

ケトン基の還元には、これまで多数の水素化触媒、還元試薬が開発されてきた。他方で、ある基質を立体選択的に一段階で変換する目的で生体触媒がしばしば利用されている¹⁾。代表的な例は加水分解酵素によるエステル類の光学分割や脱水素酵素によるケトンの不斉還元である^{2,3,4)}。これらの反応を利用して光学活性アルコールの合成が行われている。

ここでは、体制が単純で増殖が速く、後処理の容易なバクテリアを用い、室温、水溶液中で、合成樹脂の原料等に利用されている9-フルオレノンの還元を試みた。また、反応条件が収率、生成物に及ぼす影響を調べ、効率的な9-フルオレノンの還元について検討した。さらに、微生物による還元反応の代表的な酵母菌との間で反応の比較を行った。

第2節 実験

菌体、培養は第2章ピフェニル酸化と同様の条件で行った。

2.1 9-フルオレノンの反応および生成物の分析

B. brevis を 10 mL の液体培地を加えたL字管に植菌し、30℃の恒温槽中で24時間振盪させ培養を行った。培養終了後、培養液中に9-フルオレノン(東京化成工業(株)製)を添加し30℃で反応を行った。

生成物を単離するためにTLC(シリカゲルプレート 20×66 mm, Kiesel gel 60 F256, Merck Co.)を用いた。また、基質、生成物、予想生成物の標品をヘキサン100%で展開し、UV照射により蛍光スポットのRf値を測定した。

生成物を定量するために一定時間毎に反応液を10 mL サンプルングし、そのサンプルを酢酸エチル2 mL で3回抽出し、一定量に調製したのち HPLC で測定した。溶出液はアセトニトリル-水を用い、流速 1 mL/min で4:6から8:2まで15分間勾配溶離させた。カラム温度は室温、検出波長は253 nmで分析を行った。

2.2 1-アセナフテノールの反応および生成物の分析

1-アセナフテノール(東京化成工業(株)製)、および生成物の分析は、HPLCを用い、CHIRALCEL OB (4.6 mm i.d.×250 mm, DAICEL CHEMICAL 製)を使用した。溶出液はヘキサン-2-プロパノールを用い、流速 1 mL/min で9:1で25分間溶離させた。カラム 温度は室温、検出波長は254 nmで分析を行った。

第3節 結果と考察

3.1 9-フルオレノンの還元

土壌中から単離されたバクテリア25株中、ナフタレンの水酸化を選択的に示した2株 *B. cereus*と*B. brevis*を用い9-フルオレノンについて活性を調べた。両菌体をそれぞれ標準培地10 mLを入れたL字管に加え30℃、12時間培養し、培地中濃度が1.1 mmol/Lとなる9-フルオレノン-アセトン溶液を添加し、24時間反応を行った。反応液10 mLを2 mLの酢酸エチルで3回抽出しHPLCで分析を行った。その結果、*B. cereus*、*B. brevis*の両菌体に9-フルオレノンの活性が認められた。両菌体とも12.5分に生成物のピークが現れ、標品の9-フルオレノールと保持時間が一致した。

3.2 9-フルオレノンの還元活性の比較

30 mLのL字管中に標準培地10 mL、培地中濃度が1.1 mmol/Lとなる基質アセトン溶液および20 g-wet/Lとなる*B. brevis*または*B. cereus*を加え30℃で24時間振盪し反応を行った(表17)。これらの結果より、*B. cereus*は24時間後に変換率71.6%、収率35.0%を得た。一方、*B. brevis*は24時間後に変換率56.8%、収率34.1%に達し、*B. cereus*に比べ選択率が高かった。ここでは、選択率の高い*B. brevis*を用い9-フルオレノンの反応を行った。

Table 17 Reduction of 9-fluorenone by *B. brevis* and *B. cereus* ^{a)}

| Bacteria | Conv. of 9-fluorenone / % | Select. of 9-fluorenone / % | Yield of 9-fluorenone / % |
|------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <i>B. cereus</i> | 71.6 | 48.8 | 35.0 |
| <i>B. brevis</i> | 56.8 | 60.0 | 34.1 |

a) Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 20 g-wet/L of bacteria, and 1.1 mmol/L of 9-fluorenone dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30℃ for 24h.

3.3 9-フルオレノンの還元による生成物の分離と分析

本培養後、*B. brevis*を遠心分離で集菌し滅菌水で2回洗浄した後、20 g-wet/Lとなるように標準培地に再懸濁した。その懸濁液200 mLを容量500 mLの坂口フラスコに入れ2.2 mmolの9-フルオレノン-アセトン溶液を加えた。その後、30℃の恒温槽中で24時間反応を行った。反応終了後、反応液100 mLに対し20 mLのエーテルで3回抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水、エーテルを留去した後、留分をヘキサンに溶解させた。次に、シリカゲル(Kiesel gel 60, Merck製)を内径14 mmのカラムに高さ200 mmまで充填し、ヘキサン100%でカラムクロマトグラフィーを行い生成物を単離した。生成物はGC-MS、¹H-NMRスペクトル、で測定を行った。MS m/z: 182 (100) (M)⁺, 181 (92) (M-H)⁺, 165 (17) (M-OH)⁺, 152 (45) (M-CH-OH)⁺であった。¹H-NMR(400MHz, CDCl₃)の分析結果は、 δ 5.61 (1H; -OH), δ 5.59 (1H; -CH-), δ 7.64-7.67 (8H; aromatic)であった。

これらの結果より、生成物は9-フルオレノールと同定された。

3.4 反応条件が収率に及ぼす影響

3.4.1 基質添加量が収率に及ぼす影響

30 mLのL字管中に標準培地10 mL、培地中濃度が0.55–5.5 mmol/Lとなる9-フルオレノン-アセトン溶液、培地中濃度が0 g-wet/Lとなる菌体を加え30 °Cで12時間振盪させ反応を行った(表 18)。

基質添加量を減少させるにつれ収率は増加し、培地中濃度が0.55 mmol/L、1.1 mmol/Lでそれぞれ、82.5、75.0%の収率を得た。一方、5.5 mmol/Lでは収率15.6%と低く、菌体量に対し一定の基質消費量が認められた。

Table 18 Effects of the concentration of 9-fluorenone on the yield of 9-fluorenoneol ^{a)}

| Conc. of 9-fluorenone / mmol/L | Yield of 9-fluorenoneol / % |
|--------------------------------|-----------------------------|
| 0.55 | 82.5 |
| 1.1 | 75.0 |
| 2.2 | 26.9 |
| 5.5 | 15.6 |

a) Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 20 g-wet/L of bacteria, and 9-fluorenone dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30 °C for 24h.

3.4.2 反応雰囲気は9-フルオレノール収率に及ぼす影響

B. brevis は、通気下、すなわち酸化雰囲気では9-フルオレノンの還元活性を示した。ここでは、酸化雰囲気であるにも関わらず収率50%を得た。そこで、様々なガス雰囲気条件下で反応を行い収率に及ぼす影響を調べた。

メタンガス(住友精化(株)製)、水素ガス、窒素ガス(サカイ産業(株)製)、二酸化炭素ガス、酸素ガス(サカイ産業(株)製)雰囲気下、それぞれ30mLのL字管に標準培地10 mL、培地中濃度が1.1 mmol/Lとなる9-フルオレノン-アセトン溶液、20 g-wet/Lとなる菌体を加え30 °Cで24時間振盪し反応を行い、空気存在下における反応と比較した(表 19)。

その結果、メタン、水素、窒素ガス雰囲気下での反応は79–92%と高い収率を示した。一方、二酸化炭素、酸素ガスの雰囲気下では、それぞれ16.6%、5.4%と収率が低かった。これは、炭酸ガスによる培地中のpHの低下、酸素による還元反応の阻害が推察された。

Table 19 Reduction of 9-fluorenone under various atmosphere ^{a)}

| Atmosphere | Yield of 9-fluorenoneol / % |
|-----------------|-----------------------------|
| Air | 50.0 |
| CH ₄ | 92.3 |
| H ₂ | 88.6 |
| N ₂ | 78.8 |
| CO ₂ | 16.6 |
| O ₂ | 5.4 |

a) Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 20 g-wet/L of bacteria, and 1.1 mmol/L of 9-fluorenone dissolved in acetone. The reaction was carried out at 30 °C for 24h.

3.4.3 メタンガス雰囲気収率が収率に及ぼす影響

ガス雰囲気を換えて反応を行ったところ、メタンガスが最も高い収率を与えた。そこで、メタンガス雰囲気下および通気下における反応の経時変化を比較した。

30 mLのL字管に標準培地10 mL、培地中濃度が1.1 mmol/Lとなる9-フルオレノン-アセトン溶液、20 g-wet/Lとなる菌体を加え30 °Cで24時間振盪し反応を行った。その結果、12時間後、通気下における還元反応は収率75%を示したが、メタン雰囲気下での反応は収率97%に達し、高い9-フルオレノール収率を示した。

3.4.4 培地pHが収率に及ぼす影響

メタンガス雰囲気下、30 mLのL字管に塩酸及び水酸化ナトリウム水溶液を用いpH2-13に調整した標準培地10 mLに、培地中濃度が1.1 mmol/Lとなる9-フルオレノン-アセトン溶液、20 g-wet/Lとなる菌体を加え30 °Cで12時間振盪し反応を行った。その結果、9-フルオレノンの還元はpH7-8で高い収率を得た。pH2及びpH13では反応しなかった。

3.5 *B. brevis* と酵母菌の9-フルオレノンに対する還元性の比較

微生物による有機化合物の還元反応は酵母菌が一般的に用いられている。ここでは、パン酵母(BY)と*B. brevis*の反応を比較した。

メタンガス雰囲気下、または通気下で30 mLのL字管に標準培地10 mL、培地中濃度が1.1 mmol/Lとなる9-フルオレノン-アセトン溶液、20 g-wet/Lとなる*B. brevis*、または20 g-dry/LとなるBY(日清製粉(株)製)を加え30 °Cで24時間振盪し反応を行った(図 12)。BYは、果糖を添加することにより収率の増加が見込まれるため、ここでは10 mLの液体培地中に0.2 gの果糖を添加し反応を行った。

その結果、メタンガス雰囲気下において、BYは3時間後収率42.7%を得た。一方、*B. brevis*は収率71.2%に達した。さらに、BYは24時間後に収率が飽和に達するのに対し、*B. brevis*は12時間後、飽和に達した。

ここでは、乾燥菌体重量で*B. brevis*がBYの10分の1以下の量であるにもかかわらず、反応を速く進行させ還元活性が大であった。

また、BYにおいてもメタンガス雰囲気下では、空気中の反応に比べ反応が速く進行した。

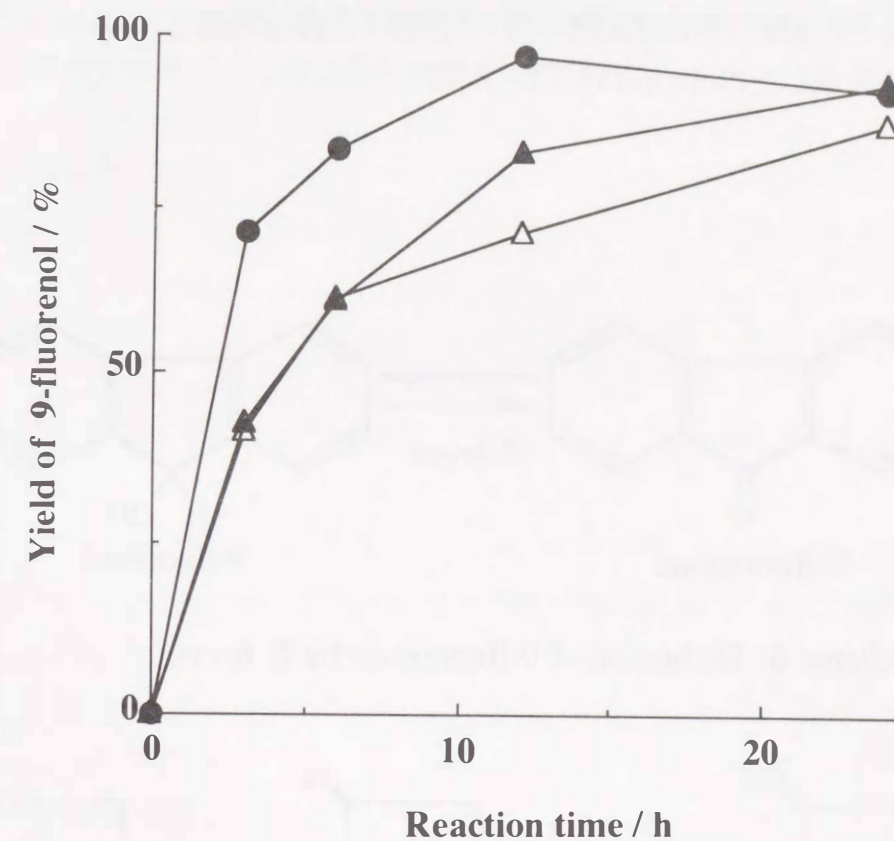


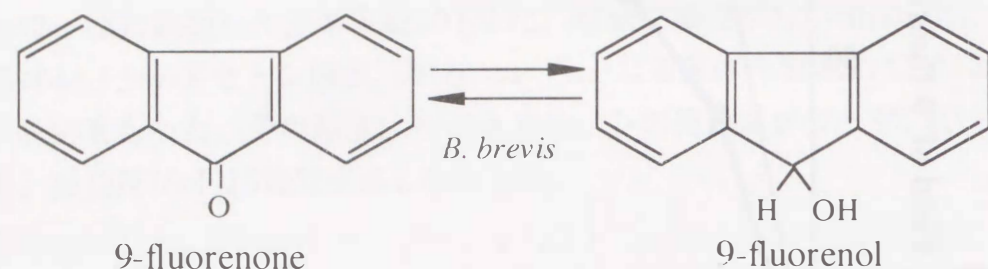
Fig. 12 Reduction of 9-fluorenone to 9-fluorenoneol by baker's yeast and *B. brevis*.

Into a 30 mL L-shaped test tube were added 10 mL of a standard culture solution, 1.1 mmol/L of 9-fluorenone dissolved in acetone, and microorganisms.

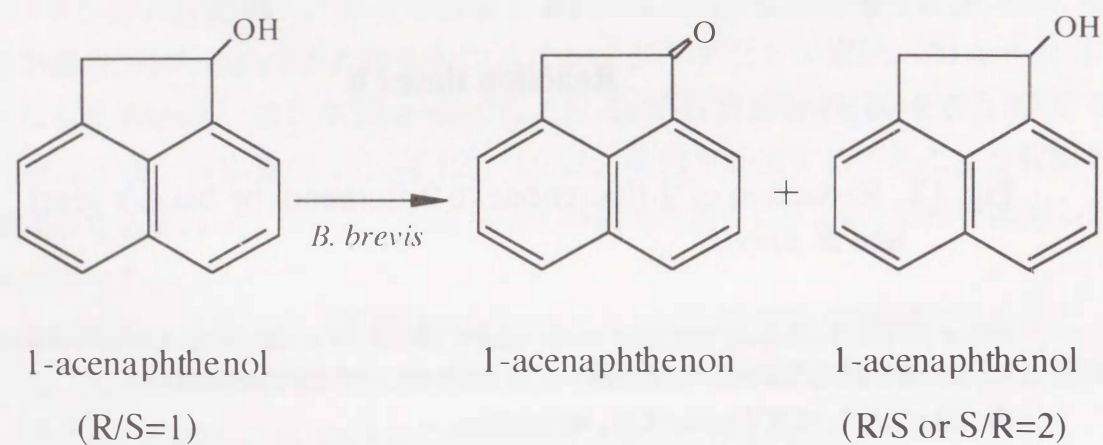
- ▲: 20 g-dry/L of BY under CH₄ atmosphere,
- △: 20 g-dry/L of BY under air atmosphere,
- : 20 g-wet/L of *B. brevis* under CH₄ atmosphere.

3.6 9-フルオレノンの反応における*B. brevis* 酵素系の検討

B. brevis はメタンガス雰囲気下で収率良く9-フルオレノンを還元し、9-フルオレノールを生成した。また、酸化雰囲気下、たとえば通気下で9-フルオレノールを基質とした場合、24時間後には選択率76.4%、収率64.9%で9-フルオレノンを生成し高い酸化活性を示した(Scheme 6)。このことより酵素系はオキシドレダクターゼの存在が示唆された。また、*r*-体、*s*-体の比が1:1の1-アセナフテノールを、約1:2 (または2:1) の割合で立体区別酸化を行い、1-アセナフテノンと1-アセナフテノールを生成した(Scheme 7)。



Scheme 6 Reduction of 9-fluorenone by *B. brevis*.



Scheme 7 Oxidation of 1-acenaphthenol by *B. brevis*.

第4節 結論

B. brevis を用い9-フルオレノンの反応条件を検討し、以下の結論を得た。

- 1) 9-フルオレノンを還元し、9-フルオレノールを生成した。また、9-フルオレノールを酸化し、9-フルオレノンを生成した。
- 2) 9-フルオレノンの還元反応は、メタンガス雰囲気下で反応で高い収率を得た。
- 3) *B. brevis* は、メタンガス雰囲気下で酵母菌よりも高い還元活性を示した。
- 4) 1-アセナフテノールの立体区別酸化を行った。

第5節 引用文献

- 1) R. Csuk and B. I. Glanzer, Chem. Rev., **91**, 49-97 (1991).
- 2) W. Shieh, A. S. Gopalan, and C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., **107**, 2993-2994 (1985).
- 3) 宇高正徳, 酒井高志, 坪井貞夫, 有機合成化学, **49**, 647-655 (1991).
- 4) 中村薫, 化学と生物, **38**, 590-598 (1997).

第2章 生成物の膜分離法の検討

第1節 緒言

バクテリアによる反応は水中で行うのが一般的であり、生成物の分離は反応液から直接溶媒で抽出される。すなわち、酢酸エチルエステルなどの有機溶媒で抽出する必要がある。したがって、抽出時における菌体との接触や抽出後の有機溶媒の処理など、人体や環境に与える影響は少なくない。生成物の抽出方法は、この直接溶媒抽出法の他、電気泳動法や、濃度差、電場、圧力の駆動力を利用した膜分離法などがある。ここでは、人体および環境への負荷を軽減する目的で透析膜を利用した生成物の分離を検討した。

第2節 実験

菌体、培養は第2章ピフェニル酸化と同様の条件で行った。

2.1 9-フルオレノンの反応

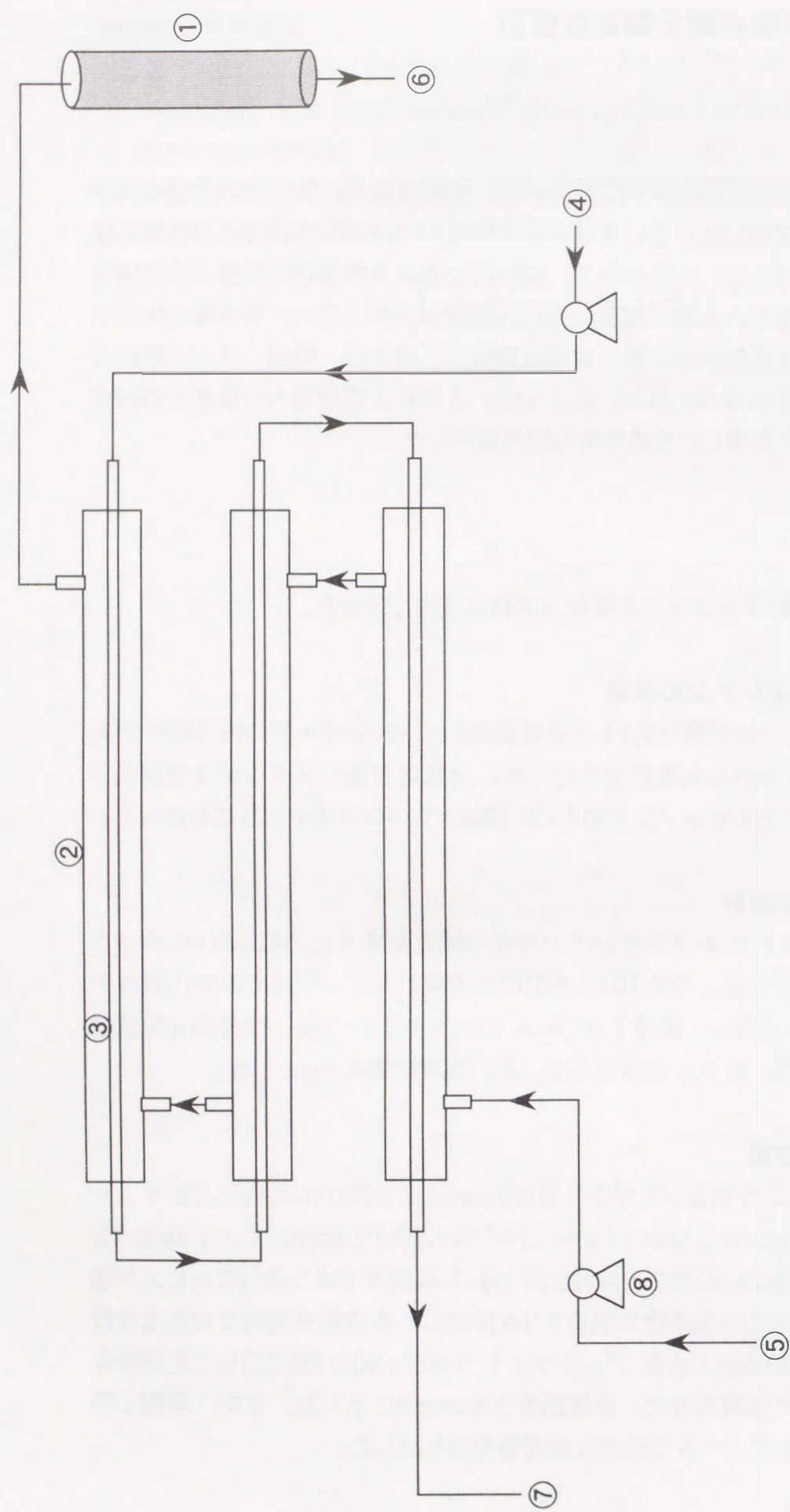
2 L三角フラスコに標準培地1 Lと前培養液2 mLを加え30 °Cの恒温槽中で36時間振盪(100 r.p.m.)し大量培養を行った。大量培養後、メタンガス雰囲気下で1 mmol/Lの9-フルオレノンを加え72時間30 °Cの恒温槽中で反応を行った。

2.2 生成物の分析

樹脂上に吸着された9-フルオレノールを分離定量するために400 mLのメタノールで溶離させた後、その10 μ lをHPLCで測定した。HPLCの溶出液はアセトニトリル-水を用い、流速1 ml/minで4:6から8:2まで15分間勾配溶離させ分析を行った。カラム温度は室温、検出波長は253 nmとした。

2.3 膜分離装置

蒸留水を300 ml/hで流したガラス管(20 mm i.d.×700 mm)内に透析チューブ(Spectra/Por Biotech Membranes MWCO:3,500)(3.8mm i.d.×700mm)を通し、チューブ内に反応液を向流的に20 mL/hの速さで流し込むことにより生成物を溶出した。この生成物分離管を3本接続し、生成物を溶出させた水を吸着カラム(Rohm&Haas,Co.製 デュオライト S-877; 50 g)層に通し、生成物をイオン交換樹脂に吸着させた。装置図をScheme 8に示した。また、樹脂に吸着した生成物はメタノールで洗浄し生成物を取り出した。



Scheme 8 Schematic diagram of an extraction apparatus for products.

① : Adsorption column, ② : separation tube, ③ : membrane tube, ④ : reaction solution, ⑤ : water, ⑥, ⑦ : waste fluid, and ⑧ : pump.

第3節 結果

反応終了後、反応液の一部を分取し、酢酸エチルで抽出したところ、9-フルオレノールの収率は95.9%であった。一方、この反応液を膜分離装置に通し9-フルオレノールを抽出したところ、89.3%の収率を得た。この結果より、膜分離装置を利用して従来の有機溶媒による抽出の約90%を抽出することができた。残りの10%は樹脂上に吸着され抽出できなかったものと思われた。

第4節 結論

透析膜を利用した生成物の分離で、以下の結論を得た。

膜分離装置を用い9-フルオレノールを抽出しところ、従来の有機溶媒による抽出に比べ、その約90%が抽出できた。

総括

本研究では、バクテリアの有する生体触媒系に注目し、温和な条件下で安全かつ選択性良く反応を行うことを目的として、有用菌株の分離および芳香族環状化合物の効率的な反応条件の検討を行った。

第1部第1章では、自然界に生息する有用物質生産菌の探索を目的とし、水中および土壌より単離した *Bacillus cereus* および *Bacillus brevis* がナフタレンを選択的に酸化することを見い出した。

第2章では、ナフタレン、メチルナフタレン類、ピフェニルの酸化反応による生成物の同定を行い、最適反応条件を検討した。ナフタレンの反応では、1-ナフトール、2-ナフトールを生成し、その生成比は94:6であった。

1-メチルナフタレンの酸化では1-ヒドロキシメチルナフタレンおよび芳香環水酸化物を生成し、2-メチルナフタレンの酸化では2-ヒドロキシメチルナフタレンおよび芳香環水酸化物を生成した。2,6-ジメチルナフタレンの酸化では2-ヒドロキシ-6-メチルナフタレン、2,6-ビスヒドロキシメチルナフタレンおよび6-メチル-2-ナフタレンカルボン酸を生成した。ピフェニルの酸化では、4-ヒドロキシピフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシピフェニルを生成した。

第3章では1-ナフトール収率の増加法について検討した。アニオン交換樹脂の添加が逐次的に生成する1-ナフトールを吸着除去しながら反応を進め収率を増加させた。また、菌体の固定化を行い、 κ -カラギーナン固定化物を回収しながら反応を繰り返し、10回程度10%の1-ナフトール収率を保つことができた。

第2部第1章では、*Bacillus brevis* を用い、9-フルオレノン還元条件の検討を行った。メタンガス雰囲気下において12時間後、収率97.3%で9-フルオレノールを生成した。

第2章では、透析膜を利用した膜分離装置を開発した。

透析膜の内側と外側で反応液と水を向流的に流すことにより、生成物の抽出を行った。この抽出液を吸着性樹脂に通し吸着回収し高い抽出率を得た。

業績一覧

- 1) Masami INOUE, Tomomi INOUE, Mituaki OKAMI, Michio SAYAMA, Yoshihiro HIRAI
「Bacterial Oxidation of Naphthalene to 1-Naphthol」
Chemistry Letters, pp. 1315-1316, 1994.
- 2) 井上智実, 安吉孝明, 森下信彦, 佐山三千雄, 井上正美
「バクテリアによる多環芳香族化合物の酸化」
日本化学会誌, (3), 196-200 (1998).
- 3) Tomomi INOUE, Tetsuya TASAKA, Reiji MARUYAMA, Yasuteru SUMITA, Shin ONO, Masami INOUE
「Bacterial Reduction of 9-Fluorenone to 9-Hydroxyfluorene」
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, in press.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻とご助言を賜りました、井上正美教授に厚く御礼申し上げます。さらに、本論文の研究成果をご検討およびとりまとめにあたり適切なご意見とご指導を頂きました、島崎長一郎教授ならびに、長谷川淳教授に深く感謝いたします。最後に実験にあたってご指導、ご助言をいただきました諸先生方、論文作成に協力していただいた学生諸君に感謝いたします。

