

琉球大学学術リポジトリ

[総説]有機溶媒中での増殖微生物を用いたテルペノイド変換:界面バイオリアクターによる光学活性シトロネロール関連化合物の合成

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): テルペノイド, シトロネロール, 微生物変換, 光学分割, 界面バイオリアクター キーワード (En): 作成者: 小田, 忍, Oda, Shinobu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016595

総説

有機溶媒中での増殖微生物を用いたテルペノイド変換：
界面バイオリクターによる光学活性シトロネロール関連化合物の合成

小田 忍

*関西ペイント株式会社技術研究所

**Conversion of terpenoid with microorganisms growing in
organic solvents: Syntheses of optically active citronellol and its
related compounds in interface bioreactors**

Shinobu Oda

Technical Research Laboratory, Kansai Paint Co., Ltd.,

Key words: テルペノイド、シトロネロール、微生物変換、光学分割、界面バイオリクター

はじめに

近年、精製酵素や微生物菌体、あるいは植物細胞のような生体触媒を用いて、安価な工業原料から医薬品原料のような高付加価値品を合成するバイオコンバージョンの研究・開発が世界中で活発化している¹⁻⁷⁾。その背景には、生体触媒反応の長所である高選択性、温和な条件下における反応性、環境調和性、省資源・省エネルギー性といったポイントがあり、グリーンケミストリーの名のもとに、国策としても重点化されつつある。

微生物菌体そのものを生体触媒として用いる微生物変換法は、精製酵素を用いる酵素法と比較して触媒コストが安価であり、酸化還元のような補酵素要求性の反応が容易に行えるという大きな長所があり、さらには、酵素法の多くが加水分解やエステル合成（交換）といった比較的単純な反応にその用途が限られるのに対し、微生物変換法は様々なタイプの反応に広く用いることができる。

また、植物細胞は微生物と比較して桁外れに多くの種類の酵素を有しており、これを用いたバイオコンバージョンは、微生物では実施困難な反応にも用いることができるという長所がある。しかしながら、同じ土俵においては微生物変換法に比較して反応速度が遅い、光照射を必要とするなどの短所がある。

微生物変換法には大別して、休止（休眠）状態の菌体を用いる手法と増殖菌体を用いる手法の二つがある。休止菌体法（洗浄菌体法）では一般に、その代謝活動が休止状態であるが故に補酵素のリサイクルが不可能であり、長期に渡る反応のためには逐次菌体を活性化（再培養）する必要性もあり、さらには大量の菌体を用いなければならないという短所がある。これに対し増殖菌体を用いる微生物変換法では、菌体は栄養源を消費して自然増殖するうえ活発に代謝活動を行っているため、休止菌体法に比べて初期触媒量は少なく済み、一般に長期反応性にも優れるといった大きな長所がある。

一方、微生物変換法を用いる基質の側からながめると、微生物変換法は水溶性か水不溶性か

*神奈川県平塚市東八幡 4-17-1

の2種の基質を対象にすることになる。水不溶性基質を水相中に投入して攪拌すると反応系は不均一なエマルジョン系もしくはサスペンション系となり、低反応速度、水/油界面における界面毒性の発現による菌体死滅、あるいは反応後の微生物菌体の分離困難などの問題が生じる。このエマルジョン系反応法の問題を解決するために、界面活性剤を添加する方法^{8, 9)}、水混和性有機溶媒を水相中に添加して基質の溶解性を高める方法^{10, 11)}、水と混和しない有機溶媒を水相中に添加して水/有機溶媒の二相系で反応させる方法¹²⁻¹⁵⁾、基質の結晶と水相の固/液界面に微生物を位置させて反応させる結晶発酵法¹⁶⁾、包括固定化した休止菌体を有機溶媒中で反応させる方法¹⁷⁻¹⁹⁾などの多くの手法が開発されてきた。また、*Rhodococcus*属放線菌などの特殊な微生物を遊離の形で有機溶媒中で反応に供する手法^{20, 21)}や、有機溶媒耐性菌を上記水/有機溶媒二相系反応法に適用する手法も報告されている²²⁻²⁶⁾。しかしながら、これら多くの手法には、使用できる基質や微生物が限られる、添加した有機溶媒により微生物がダメージを受ける、水/有機溶媒二相間の基質・生成物の分配が反応律速になるなどの多くの問題点があり、実用化に至った例は非常に限られている。

これら水不溶性基質の微生物変換を行う新規なデバイスとして、筆者らは次節で述べる界面バイオリクターを構築し、これを用いて様々なタイプの微生物変換反応に成功してきた。本稿においては、このシステムについて概説するとともに、各種微生物変換反応への応用、特に、熱帯の植物資源と関わりのあるシトロネロールの変換を中心に紹介したい。

界面バイオリクター

1989年当時筆者らは、ラセミ体の1-phenyl-1,2-ethanediolの位置選択的および立体選択的な微生物酸化による(*R*)-mandelic acidの合成研究に取り組んでおり²⁷⁾、日本各地の土壌から芳香族化合物資化性菌を分離していた。その際、

寒天平板上の微生物に対し、シャーレのフタに設置したろ紙にしみ込ませた芳香族化合物(炭素源)を蒸気の形で供給していたが、たまたまこのろ紙が寒天平板に接触するというアクシデントに見舞われた。この芳香族化合物(アルキルベンゼン)は比較的毒性の弱いものであったが、100%もの基質に接触した部分の細菌コロニーが、蒸気で増殖した細菌のコロニーよりも旺盛に増殖している現象に驚愕した。

そこで、栄養寒天平板上に爪楊枝で各種標準微生物を植菌し、その上に種々の有機溶媒を重層して培養したところ、炭素鎖長10~15の直鎖状パラフィンで供試菌すべてが旺盛に増殖し、propylbenzeneやpentylbenzene, isooctane重層下でも多くの細菌、酵母、糸状菌が増殖し得ることを確認した。さらには、有機溶媒耐性が強い*Pseudomonas*属細菌に至っては、*p*-xyleneのようなsolvent actionが非常に強い有機溶媒重層下でも増殖し得ることを見出した²⁸⁾。

さらには、微生物にとって毒性を示さない長鎖パラフィンに強毒性の疎水性化合物を添加して同様に寒天平板上に重層すると、微生物はこれら強毒性化合物に対して著しく高い耐性を発現することも見出した。例えば、tolueneやstyrene, cholesterolは水相中ではほとんどの微生物に対して極めて強い毒性を発現し、通常はわずか0.5%程度の低濃度であっても速やかに微生物を死滅させてしまうが、筆者らの有機溶媒重層平板培養法では、多くの微生物がtolueneで9~24%、styreneで9~36%、cholesterolで12%以上という添加限界濃度を示した。しかしながら、このような有毒有機化合物の毒性回避現象は疎水性化合物に対してのみ認められ、cresolやanilineのような親水性毒物に対しては全く認められなかった²⁸⁾。

このような有機溶媒重層下での固体培養における毒性緩和現象の機構については、有機溶媒耐性菌における溶媒耐性機構²⁹⁻³⁴⁾や、薬剤耐性菌における薬剤耐性機構³⁵⁻⁴³⁾の問題とも密接な関係があるものと考えられる。この問題につい

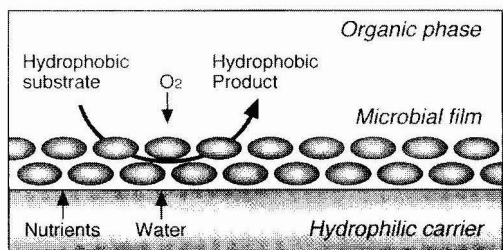


図1 界面バイオリアクターの原理

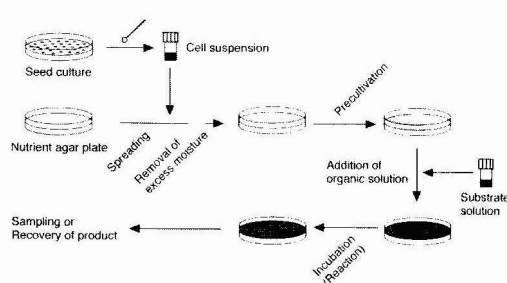


図2 寒天平板型界面バイオリアクターを用いた微生物変換試験法

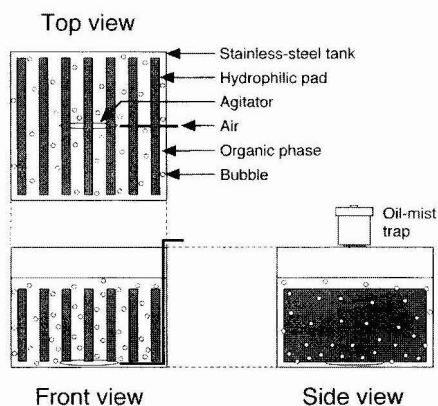


図3 板状担体充填型界面バイオリアクター

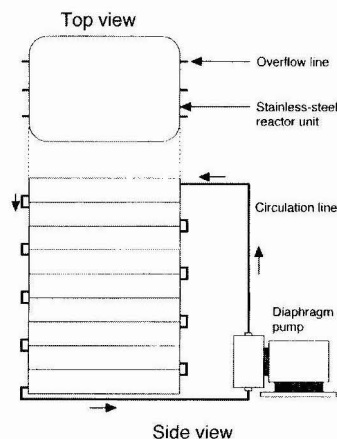


図4 高層型界面バイオリアクター

て種々検討を加えた結果、*Issatchenkia*属酵母を寒天平板のような固体表面で培養した場合、液体培養した場合に比べて有意に菌体外多糖層が肥厚化し、かつ高分子量化するという現象を見出した。固体表面への付着による微生物の生理学的性状変化としては、増殖速度の向上^{44, 45)}、孢子形成能の増大⁴⁶⁾、酸化能の低下⁴⁷⁾、酵素誘導期間の消失⁴⁷⁾などが報告されており、さらにはバイオフィーム形成能の増加もよく知られている^{38, 48, 49)}。この肥厚化・高分子量化した親水性の菌体外多糖層が疎水性の毒性化合物に対して一種のバリアとして機能していることが想定された。事実、固体培養より収穫した酵母は、液体培養から収穫した酵母よりも水系(エマルジョン系)で高い1-decanol耐性を発揮することを見出した。しかしながら一方で、液体培養より収穫した酵母を寒天平板/decane

の固/液界面に位置させた場合には、やはり著しく高い毒性緩和現象が認められることより、上記の固/液界面における毒性緩和現象は単に肥厚化・高分子量化した菌体外多糖層のバリア化が原因となるのではなく、重層した有機溶媒が毒物分子のリザーバーとして作用しているものと考えられる。

次に筆者らは、上述した有機溶媒重層固体培養法を微生物変換に応用したバイオリアクターとして、界面バイオリアクターを構築した⁵⁰⁻⁵⁵⁾。界面バイオリアクターの原理図を図1に示すが、栄養源と水を多量に含んだ親水性担体(寒天ゲルなど)とパラフィン系有機溶媒との固/液界面に微生物を膜状に増殖させ、この微生物膜を生体触媒としてパラフィン系有機溶媒中に添加した疎水性基質を有用な疎水性生成物に変換することができる。その際、固/液界面にお

ける毒性緩和現象に基づいて、添加できる基質並びに蓄積できる生成物の濃度は、従来法である水相系（エマルジョン系）反応法に比べて著しく高くすることができ、場合によっては1000倍近い濃度の生成物を蓄積することができる⁵⁰⁾。また本システムに適用した微生物は有機系反応溶媒に接触していても活発に代謝能を維持しているため、酸化還元のような補酵素要求性の反応や、代謝エネルギーを利用した物質生産反応を効率的に行うことが可能である。無論、基質や生成物は反応溶媒に溶解しているためにエマルジョン系反応のような不均一系反応と異なり、反応速度の高速化が可能であり、さらには、酸化反応の効率化（パラフィン系溶媒は水の10倍程度の酸素溶解力があるため、酸化反応ですらも静置培養で効率的に進行する）、産物回収コストの低減（菌体は界面バイオリアクターの担体（固体）表面に強固に付着しているため、反応後の菌体分離は問題とならない）、発酵やエマルジョン系反応法で問題となる廃水処理コストがかからない（反応溶媒を蒸留後、再使用すれば、ゼロエミッション化も可能）、高濃度生産が可能であるためリアクタースケールの小型化が可能である、汎用性が非常に広い（大抵の微生物は適用可能）、したがって、リアクターの稼働率を引き上げることができる、といった多くの長所が確認されている。さらには、次節で述べるように生体触媒反応特有の高い選択性が発揮できることも強調することができる。

寒天平板を用いるスタイル（寒天平板型界面バイオリアクター）は、ラボスケールでは調製が容易であり、図2に示すように実験操作も簡便であるが、スケールアップは困難である。担体ゲルの強度向上と繰り返し使用を想定し、ポリビニルアルコール-グルタルアルデヒド架橋とアルギン酸-カルシウムイオン塩架橋を複合させた新規担体の開発に成功し、その担体板を縦方向に配列したタイプ（板状担体充填型界面バイオリアクター、図3）も構築したが⁵⁶⁾、さらなる大形化を図る場合には担体のハンドリ

ングが問題となる。これらの問題を解決するために、寒天平板型界面バイオリアクターを積層したタイプ（高層型界面バイオリアクター、図4）を構築し、後述の代謝-微生物変換融合システムによる（RS）-citronellolの光学分割に大きな威力を発揮した。

なお、反応溶媒としては通常、炭素鎖長が10～14の直鎖状パラフィンが好適であるが、基質や生成物の極性がある程度高い場合には、それらの溶解性が問題となることがある。その際には、微生物に対して比較的毒性の低い中鎖エステルやエーテル類をパラフィンに任意の比率で混合してやれば、基質・生成物の溶解性を向上させることが可能である。

界面バイオリアクターを用いた有用物質の合成

前節で述べた通り、界面バイオリアクターは汎用性が非常に広く、多様な微生物を用いて下記のような種々の微生物変換反応を優れた成績で行うことができる。なお、光学活性なテルペノイドである(R)-, (S)-citronellol, citronellal, citronellic acidの合成については次節以降でさらに詳しく述べる。

まず、加水分解反応への応用について紹介する。油脂分解酵素であるリパーゼを用いた有用物質の合成については膨大な数の報告があり、特に光学活性アルコールおよびカルボン酸の合成を指向したものが多い⁵⁷⁻⁶⁰⁾。一方で、精製リパーゼではなく、リパーゼ生産菌をintact cellとして用いた加水分解例も非常に多く⁶¹⁻⁶⁷⁾、生体触媒コストの低減を可能にしている。

界面バイオリアクターを用いた微生物加水分解の例を図5に示すが、2-ethyl-1-hexanol^{50), 56)}や種々の光学活性天然物の合成原料として有用な(R)-2-benzylcyclohexanone⁶⁸⁾が高濃度、高光学純度で合成された。なお、後述するアセチル転移反応を利用したcitronellyl acetateの合成を除き、これまでエステル合成反応への応用に関してはさほど検討されていないが、各種リパーゼ生

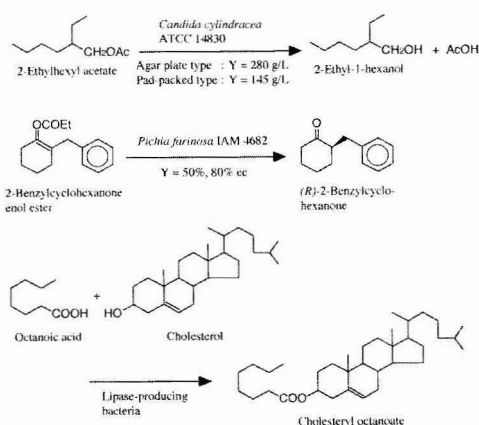


図5 界面バイオリアクターを用いた微生物的加水分解、エステル化反応

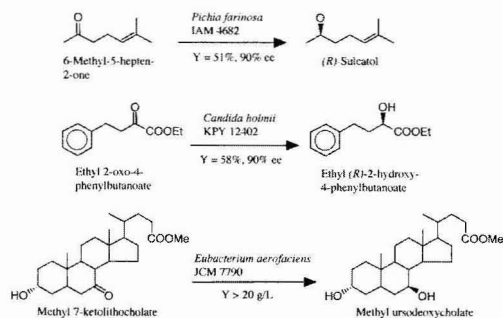


図6 界面バイオリアクターを用いた微生物還元反応

産性細菌を用いたcholesterolとoctanoic acidとの直接的エステル化によるcholesteryl octanoateの合成には成功している(図5)⁵⁰⁾。

加水分解やエステル合成(交換)反応のようなエナンチオ選択的な光学分割で得られる収率は一般には最大50%に過ぎず、残余の基質をラセミ化して出発原料に戻すか、あるいは他の有用物質に誘導して用いなければコスト的に成り立ち難い。これに対し還元反応、特にプロキラルなカルボニル化合物の還元で得られるアルコールの理論収率は最大100%となるため、数多くの有用光学活性アルコールの合成に利用されてきた⁶⁹⁻⁷⁶⁾。しかし、還元反応には通常NAH(P)Hのような補酵素が必要であり、これら補

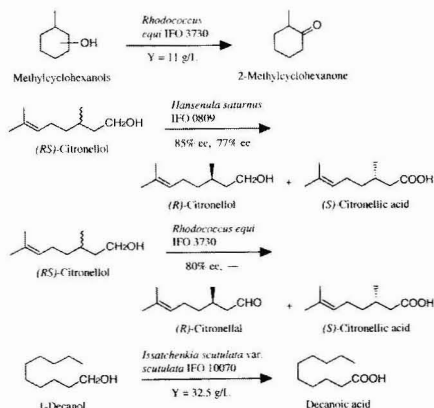


図7 界面バイオリアクターを用いた微生物酸化反応

酵素をリサイクルするためには、微生物菌体は生きた状態で活発に代謝活動を行っている必要がある。界面バイオリアクターでは、微生物は固/液界面で生存もしくは増殖した状態で活発に代謝活動を行っており、図6に示すような各種微生物還元反応を非常に効率的に実施することができる。これまで、天然アルカロイドの合成原料として有用な(R)-sulcatol⁷⁷⁾、高血圧症治療薬原料として用いられているethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutanoate⁷⁸⁾、胆石溶解剤原料として有用なmethyl ursodeoxycholate⁷⁹⁻⁸¹⁾などの有用物質の合成に成功している。

微生物酸化反応を利用した光学活性化合物の合成例も多数報告されている⁸²⁻⁸⁹⁾。上述した通り、パラフィン系有機溶媒は水と比較して10倍程度の酸素溶解性を有しており、界面バイオリアクターは特に微生物酸化反応に威力を発揮する。事実多くの微生物酸化反応は静置条件下でも効率的に進行する。界面バイオリアクターの微生物酸化反応への応用例を図7に示すが、これまで、methyl cyclohexanolの位置選択的な酸化⁵⁰⁾や後述のラセミ体citronellolのエナンチオ選択的酸化、あるいは強毒性なアルコールである1-decanolの酸化によるdecanoic acid(防腐剤)の高濃度生産⁹⁰⁾に成功している。

増殖微生物を用いた生分解反応は、有害物質の分解除去⁹¹⁻⁹⁵⁾のみならず、光学活性化合物の合

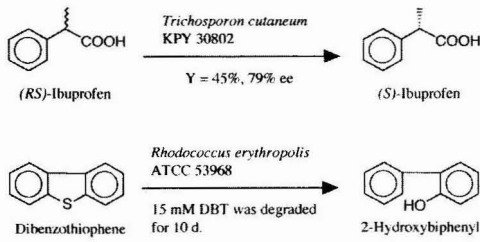


図8 界面バイオリアクターを用いた生分解反応

成^{96, 97)}にも汎用されている。酸化的分解反応による有用物質の合成として筆者らは、ラセミ体 *ibuprofen* のエナンチオ選択的生分解による (*S*)-*ibuprofen* (非ステロイド系抗炎症剤) の合成にも成功した (図8)⁹⁸⁾。これまで報告されてきた (*S*)-*ibuprofen* の合成法としては、対応するエステル⁹⁹⁻¹⁰¹⁾ やニトリル¹⁰²⁻¹⁰⁵⁾ の加水分解や、リパーゼを用いたエステル化¹⁰⁶⁻¹¹⁰⁾ などが知られているが、反応点の近傍にバルキーな芳香環を有する (*S*)-*ibuprofen* のリパーゼを用いた光学分割は一般に困難であり、酵素必要量が大きくなるため実用化には至っていない。この場合、標的化合物である (*S*)-*ibuprofen* の過剰な生分解を抑制する手段として、*hydroquinone* の添加が有効であった。

さらに、界面バイオリアクターは石油成分中の含硫化合物である *dibenzothiophene* の酸化的脱硫反応にも威力を発揮した (図8)¹¹¹⁾。この含硫有機化合物は軽油などの石油製品に含まれているが、酸性雨の原因物質の1つとして知られており、世界的にその効率的な除去が義務付けられようとしている。*Dibenzothiophene* は少段反応を経て硫酸と *2-hydroxybiphenyl* へと分解されるが、*2-hydroxybiphenyl* の毒性は界面バイオリアクターの固/液界面における毒性緩和現象によって十分に回避でき、最大15 mM もの *dibenzothiophene* を脱硫可能であった。しかし、界面バイオリアクターの担体中へ有害な硫酸および代謝中間体の *2-hydroxybiphenyl sulfinate* が蓄積

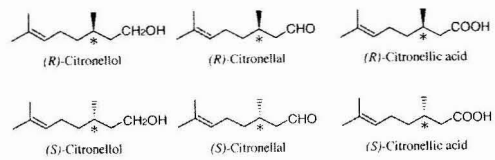


図9 光学活性シトロネロール関連化合物

するため、長期安定的に脱硫を行うためには担体中の水相が交換可能な界面バイオリアクターを構築する必要があることが強く示唆された。

以上述べたように界面バイオリアクターでは、水に不溶な基質を溶解させた有機溶媒相と接した状態でも微生物の増殖および代謝活性を維持させることができる。その際には、固/液界面における毒性緩和現象に従って、極めて高濃度の基質を添加可能であり、蓄積される生成物の濃度も水系反応法 (エマルジョン法) に比して飛躍的に向上する。無論、生体触媒反応特有の高い位置および立体選択性が得られることも特筆すべきであろう。

界面バイオリアクターを用いた光学活性テルペノイド群の合成

前節において、界面バイオリアクターが種々の微生物を用いた多様な微生物変換反応において威力を発揮することを述べた。本節では、南方資源として存在する *citronellol* 関連化合物の微生物変換に焦点を当て、その微生物酸化、還元、そして新規なアセチル化プロセスとして開発した代謝-微生物変換融合システム (カップリングシステム) について概説する。

Citronellol と *citronellal* はジャワおよび台湾産のシトロネラ油に光学活性体の形で含まれているが、その光学純度は65~80% ee程度と低い。これらテルペノイドのラセミ体は現在、イソブレン出発の有機合成法によって生産されているが、光学活性な (*R*)-および (*S*)-*citronellol*, *citronellal* は試薬として上市されているのみである。

光学活性な *citronellol*, *citronellal* および

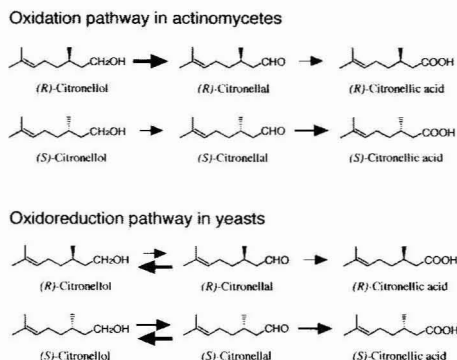


図10 放線菌、酵母のシトロネロール関連化合物の変換経路

citronellic acidは図9の構造式を見れば分かるように、不斉点(*)より向かって右側に酸素官能基、左側に二重結合を有しているため、絶対配置を保持したまま、右にも左にも任意に鎖長を伸長できる。これら光学活性テルペノイドはBINAPなどの触媒を用いた有機合成¹¹²⁻¹²¹⁾や生体触媒を用いた手法^{122,123)}により合成され、これらを用いて種々の昆虫フェロモン¹²⁴⁻¹³⁴⁾やアルカロイド¹³⁵⁾が合成されてきた。

筆者らは最初に、(RS)-citronellolのエナンチオ選択的酸化による光学分割を試みた。その結果、多くの酵母が(S)-citronellolを優先的にカルボン酸まで酸化して(S)-citronellic acidと(R)-citronellolを与えるのに対し、放線菌の*Rhodococcus equi*で(R)-citronellalが有意に蓄積することを見出した¹³⁶⁾。特に*R. equi* JCM 6187では、酸化産物としてcitronellic acidがほとんど蓄積せずに(R)-citronellalを与えるのみであり、有機合成でも困難なアルコール酸化のアルデヒドまでの制御が可能であった。また、酵母*Hansenula saturnus*で最も高いエナンチオ選択性が認められ、板状担体充填型界面バイオリアクター(図3)を用いることにより、82% eeの(S)-citronellic acidと77% eeの(R)-citronellolが好収率で調製できた¹³⁷⁾。無論、本反応についても界面バイオリアクター特有の固/液界面における毒性緩和現象が認められ、citronellolやcitronellalの強い微生物毒性¹³⁸⁻¹⁴¹⁾にもかかわらず、

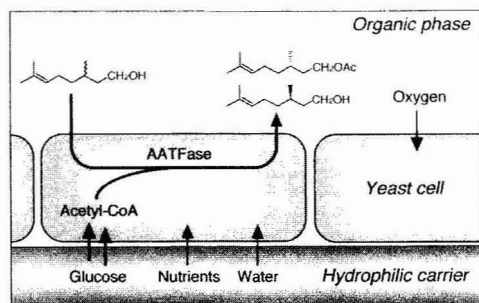


図11 代謝-微生物変換融合(カップリング)システムの原理

ならず、非常に高い生成物濃度が得られた。

*R. equi*が図10に示す変換経路に従って(RS)-citronellolを変換するのにに対し、酵母による(RS)-citronellolの変換経路はより複雑である(図10)。すなわち多くの酵母がcitronellolを酸化するとともに、その酸化中間体であるcitronellalを高い反応速度で還元することを見出した^{136, 137)}。詳細に検討した結果、*Hansenula*属酵母には、 NAD^+ -依存性のcitronellolおよびcitronellal酸化酵素(alcohol dehydrogenase)とともに、 NADH -依存性のcitronellal還元酵素が存在していた。したがって、(S)-優先的なcitronellolの酸化とエナンチオ選択性の低いcitronellal還元とが競争的に回転する一方で、酸化中間体であるcitronellalが(S)-優先的にcitronellic acidに酸化されると考えられる。

代謝-微生物変換融合システムを用いた光学活性テルペノイド群の合成

前節で述べた酵母によるcitronellolの微生物酸化についての検討を通じ、副生物としてその酢酸エステルであるcitronellyl acetateが蓄積してくることを見出した^{136, 137)}。この場合、反応系には何らアセチルドナーを添加していないので、citronellyl acetateのアセチル部は微生物によって生産されているはずである。種々検討を加えた結果、このアセチル基は界面バイオリアクターの担体中に添加したグルコースに由来するacetyl-CoAであり、これが酵母のアセチル転移酵素である alcohol

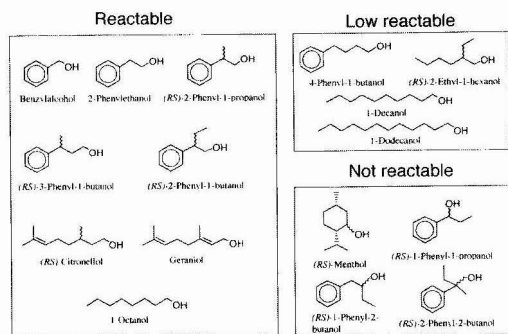


図12 アルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATFase) の基質特異性

acetyltransferase (AATFase) によってcitronellol にアセチル転移されることが明らかとなった。筆者らはこの新規なアセチル化プロセスを代謝-微生物変換融合システム (カップリング) システムと称した (図11)^{142, 143)}。

本反応系では、単にアセチル転移反応という一段階の酵素反応が進行するのみならず、グルコースが解糖系を経てacetyl-CoAとなる代謝系も深く関わっており、酵素反応 (バイオコンバージョン) と代謝とが融合した新規なバイオプロセスと考えることができる。代謝活動と単一酵素反応との融合としては、これまでuridine triphosphate (UTP) や guanosine-5'-monophosphate (GMP) などのヌクレオチド生産が知られていたが¹⁴⁴⁻¹⁴⁶⁾、一般には、一段もしくは少段反応であるバイオコンバージョンと多段よりなる代謝もしくは発酵とは全く別のプロセス、研究領域であった。筆者らはさらに進んで、酵母*Issatchenkia tericola*を用いたエタノール発酵と微生物的エステル化反応との融合にも成功したが¹⁴⁷⁾、増殖微生物の代謝・発酵と単一酵素反応とを組み合わせたバイオプロセスは新規な物質生産技術として注目され、今後さらに多くの複合反応系が構築されてくるものと期待される。

さて、アセチル転移酵素であるAATFaseは清酒の吟醸香を生成する酵素として広く知られており、醸造中に生成してくるisoamyl alcoholに

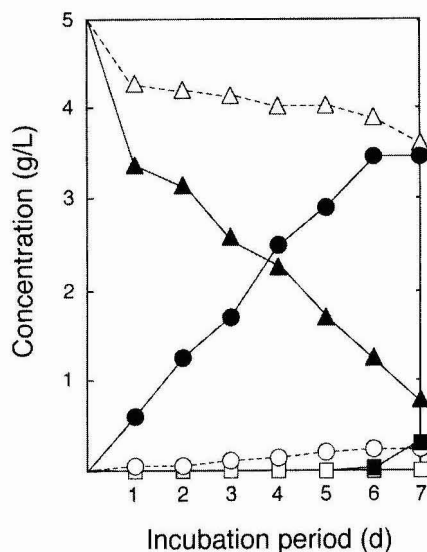


図13 *Pichia kluyveri* IFO 1165によるシトロネロールエナンチオマーの変換 ●、(S)-citronellyl acetate ; ▲、(S)-citronellol ; ■、(S)-citronellic acid ; ○、(R)-citronellyl acetate ; △、(R)-citronellol ; □、(R)-citronellic acid

acetyl-CoAのアセチル部を転移させるが¹⁴⁸⁻¹⁵²⁾、有用化合物合成への応用は当時は知られていなかった。これら酵母のAATFaseは一級アルコールに対する基質特異性は広いものの、アルコールの炭素鎖長が長くなるほど活性は低下し、また、DL-mentholのような二級アルコールのアセチル化能はまったく認められず (図12)¹⁴³⁾、AATFaseとリパーゼとは、基質特異性が大きく異なることが判明した。

残念ながら*H. saturnus*, *Pichia heedii*, *P. sargentensis*のAATFaseには (R,S)-citronellolの光学分割能は認められず、*P. quercuum*と*P. guilliermondii*のAATFaseは (R)-citronellolを優先的にアセチル化するものの、その選択性は非常に低い。しかしながら、*P. kluyveri*のAATFaseが高い選択性で(S)-citronellolを優先的にアセチル化し、79% eeの(S)-citronellyl acetateと99% eeの(R)-citronellolを定量的に与え、その際のエナンチオ選択性の指標であるE値が4達することを見い出した (図13)¹⁵³⁾。一般に、E値が20を超えると実用性が出てくると言われており、*P.*

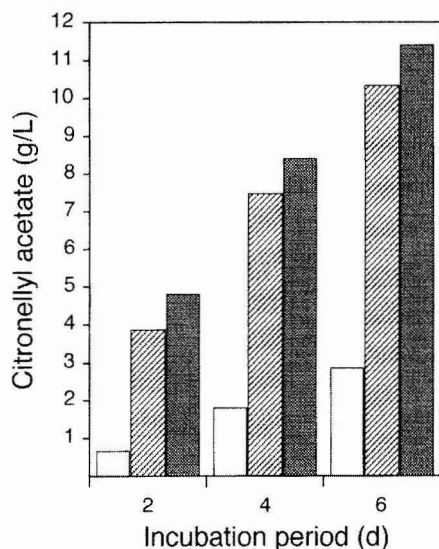


図14 カップリング反応に与えるリアクター振盪速度の影響 □、0 strokes/min；▨、40 strokes/min；■、80 strokes/min

*kluyveri*を用いたカップリングシステムで十分実用的に(*RS*)-citronellolを光学分割できる可能性を得た。なお、citronellolの構造式を見ると分かるように、この基質の不斉点と反応点との間にはメチレン基が1つ入っており、所謂、"反応点と不斉点とが離れた一級アルコール"に属する。このような基質の光学分割は一般に困難であり、事実、各種リパーゼを用いたエステル化^{154, 155}、エステル交換¹⁵⁶やその酢酸エステルの微生物的光学分割は不可能であるとされてきた¹⁵⁷。数少ない成功例として、pig liver carboxyl esteraseを用いたエステル交換反応¹⁵⁸と超臨界流体中でのリパーゼ反応¹⁵⁹で(*RS*)-citronellolが光学分割されているが、高価で不安定な酵素を用いることやスケールアップが困難なことなどの問題がある。

*P. kluyveri*を用いたカップリングシステムによる(*RS*)-citronellolの光学分割について詳細に検討した結果、バイオリアクターの振盪速度と担体中グルコース濃度がその成績に大きく影響することを見出した¹⁵³。寒天平板型界面バイオリアクターの振盪速度の影響を図14に示すが、カップリング反応速度はリアクターの振盪速度に大

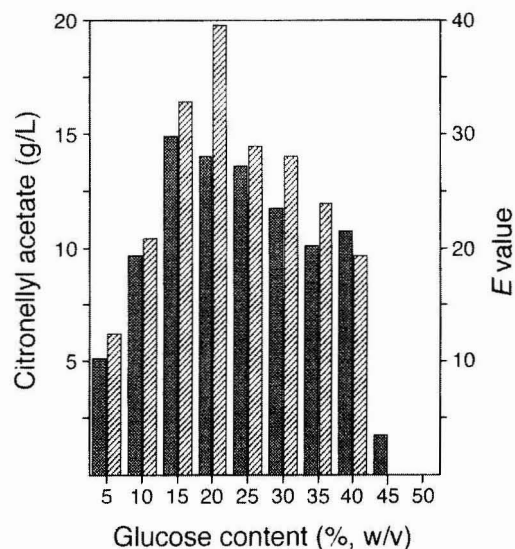


図15 カップリング反応に与える担体中グルコース濃度の影響 ■、citronellyl acetate concentration; ▨、E value

きく依存し、80 strokes/minで振盪すると静置時の約4倍の反応速度が得られた。*Saccharomyces*属酵母のAATaseは嫌気条件時に有意に高くなることが報告されており^{149, 152, 160}、*P. kluyveri*と*S. cerevisiae*, *S. sake*とでは、かなり挙動が異なった。

次に、担体中グルコースの影響を調べた結果を図15に示すが、*P. kluyveri*は非常に強い耐糖性を示し、寒天平板中グルコース濃度が40% (w/v)であっても活発に増殖してカップリング反応を触媒した。なお、(*RS*)-citronellolの光学分割における最大のエナンチオ選択性は、グルコース濃度20%で得られ、そのE値は39に達した¹⁵³。

担体中グルコース濃度は別の意味で本システムに重要な影響を及ぼす。*P. kluyveri*も*H. saturnus*同様(*RS*)-citronellolの(*S*)-選択的酸化能を有しており、グルコース濃度が低い場合、カップリング反応によるアセチル化とともにこの微生物酸化反応も進行する(図13)。しかしながら、担体中のグルコース濃度が5%を超えてくるとこの微生物酸化反応は全く進行しなく

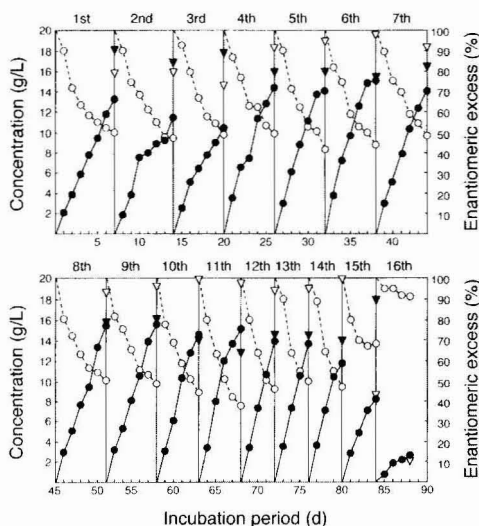


図16 寒天平板型界面バイオリアクターを用いたラセミ体シトロネロールの繰り返しバッチ式光学分割 ●、citronellyl acetate concentration ; ▼、(S)-citronellyl acetate % ee ; ○、citronellol concentration ; ▽、(R)-citronellol % ee

なる。この現象は、アルコール酸化酵素である alcohol dehydrogenase の生産が高濃度グルコースの存在によって抑制される事実¹⁶¹⁻¹⁶³⁾に基づくものであり、その意味で、高濃度グルコースの添加はカップリング反応の効率化・長期安定化のためのみならず、副反応たる酸化反応抑止という観点からも重要な条件となる。

次に、本システムの長期安定性を確認するために、寒天平板型界面バイオリアクターを用いた長期繰り返しバッチ試験を実施した。リアクターの振盪速度40 strokes/min、担体内グルコース濃度30% (w/v)、基質濃度2% (w/v)で繰り返し(RS)-citronellolを光学分割したところ、79日間(14バッチ)にも及ぶ繰り返し反応が可能であった(図16)。なお、担体内グルコースの枯渇により、15バッチ目以降カップリング活性の低下が認められたが、菌体のカップリング活性自体は初期と変わらないレベルで維持されていた。

上記の*P. kluyveri*を用いたカップリングシステムによる(RS)-citronellolの光学分割を図4に

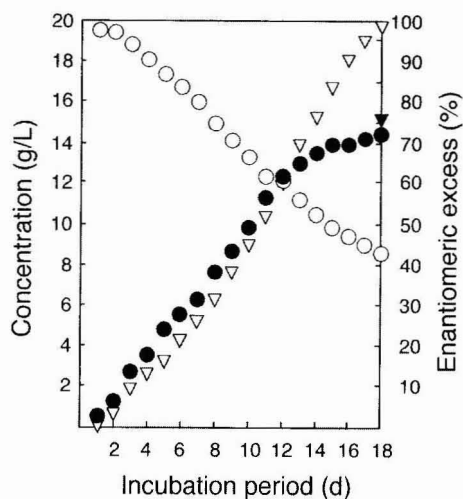


図17 高層型界面バイオリアクターを用いたラセミ体シトロネロールの光学分割 ●、citronellyl acetate concentration ; ▼、(S)-citronellyl acetate % ee ; ○、citronellol concentration ; ▽、(R)-citronellol % ee

示した高層型界面バイオリアクターに適用した。この高層型リアクターは安価なコストでスケールアップを可能とするために開発されたが、基本的な構造は寒天平板型界面バイオリアクターを縦方向に積み重ねたものである。各リアクター内の有機層はオーバーフローラインを通じて順次直下のユニットへ自然流出し、ボトムユニットに集まる有機層はダイヤフラムポンプによってヘッドユニットへ戻されるようになっており、各ユニット内の有機層は連結・循環されている。これによって、各ユニット間の反応速度のバラツキは改善され、一点のみでの集中管理が可能となる。この高層型リアクターのさらなるスケールアップを図るためには、各塔の拡大とともに多塔並列化が有効である。カップリングシステムの場合はリアクターの振盪が必要であるため(図14)、シェーカーを設置しなければならないが、通常の場合、酸化反応ですらも静置条件下で効率的に進行するため、一般的にはリアクターの振盪は不要であり、単なる有機層の連結・循環で十分と考えられる。この高層型界面バイオ

リアクター（内部総容量80 L、有機層量6 L）を用いて2%（w/v）の(RS)-citronellolを光学分割した結果を図17に示すが、反応は順調に推移して、最終的に79% eeの(S)-citronellyl acetateと98% eeの(R)-citronellolがともに50 g以上のスケールで調製できた¹⁵³⁾。

本システムのE値は30~40程度であるため、反応を過剰に進めた場合には、残余の(R)-citronellolの光学純度は非常に高くはなるが、反応生成物である(S)-citronellyl acetateの光学純度は逆に70% ee台に低下する。この低光学純度の(S)-citronellyl acetateはアルカリ加水分解後、もう一度カップリングシステムに供してやれば、ほぼ光学的に純粋な(S)-citronellyl acetateとして回収でき、そのアルカリ加水分解によってラセミ化することなく高光学純度の(S)-citronellolが得られる¹⁶⁴⁾。さらにはまた、得られた(S)-および(R)-citronellolを出発原料として、*R. equi*, *Geotrichum candidum*, あるいは*Candida viswanathii*などの微生物を用いて適宜微生物酸化を施すことにより、高い収率と光学純度で(R)-citronellal, (R)-citronellic acid, (S)-citronellic acidも合成することができた [(S)-citronellalは合成不能]¹⁶⁴⁾。かくして、citronellol, citronellal, citronellic acidの6種のエナンチオマーのうちの5種までが高収率、高光学純度で合成できるようになった。なお、ごく最近、カップリングシステムにおけるアセチルドナー源として、担体中にグルコース以外に酢酸塩を添加するタイプ¹⁶⁵⁾と有機相側に遊離の中鎖脂肪酸を添加するタイプ¹⁶⁶⁾も開発し、カップリング反応の高速化に成功したことも付記しておく。

おわりに

以上述べてきたように、界面バイオリアクターは有機溶媒中で微生物を生存もしくは増殖した形で種々の微生物変換反応に用いることができる有用なデバイスであり、生体触媒反応特有のメリットである高い選択性、収率、温和な条件を可能とする。さらに、水系バイオコンバージョン

ンでは困難であった水不溶性微生物変換反応を効率化できる技術であり、廃水処理工程が不要であること、反応溶媒は容易に回収可能であること、増殖菌体を用いるが故に長期安定性も有すること、さらには圧倒的な生成物濃度を達成できることなどの多くの長所も併せ持っていると言えよう。もちろん、水溶性基質の変換には不向きである、反応溶媒の選定に苦勞することがある（基質・生成物の溶解性向上と溶媒毒性発現のディレンマに陥る場合がある）、担体内への栄養源の添加が不能である、あるいは担体内への水溶性副生物の蓄積が問題になる場合がある（例えば、加水分解反応や発酵の進行に伴う水溶性有機酸の蓄積）などの短所もある。特に、担体内への栄養源の添加と担体内への副生物の蓄積阻止は実用上最も深刻な問題であり、今後解決を図らなければならない重要な課題である。

謝 辞

本研究は多くの先生方の御指導、御支援を頂いて行われた。とりわけ、慶應義塾大学理工学部の太田博道教授、須貝威助教授からは本研究全般に渡って有為な御指導を多々頂いた。また、九州大学大学院農学研究院の古川謙介教授、園元謙二教授、後藤正利助手、山口大学農学部の加藤昭夫教授、松富直利教授、足立収生教授、島根大学農学部の松田英幸教授、鳥取大学農学部の故濱崎徹教授、琉球大学農学部の屋宏典助教授、広島大学大学院理学研究科の平田敏文教授、鳥取大学工学部の和泉好計教授、そして大阪市立工業研究所の島田裕司博士からも多くの御指導、御支援を頂いた。紙面を借りて厚く御礼申し上げる。なお、本研究の多くの部分は基盤技術研究促進センターからの融資を受けて行われた。多大な融資を頂いた同センターに対しても、深謝の意を表したい。

参考文献

- 1) 太田博道、“生体反応論”、三共出版 (1996).
- 2) 大野雅二編著、“酵素機能と精密有機合成”、シーエムシー (1984).
- 3) 谷吉 樹、児玉 徹、倉根隆一郎監修、“バイオコンバージョン”、医学出版センター (1993).
- 4) 太田博道、有機合成化学協会誌, 41, 1918 (1983).
- 5) 清水昌、山田秀明、有機合成化学協会誌, 41, 1064 (1983).
- 6) 森謙治、須貝威、有機合成化学協会誌, 41, 1044 (1983).
- 7) Faber, K., “Biocatalysis in Organic Synthesis”, Springer-Verlag (1992).
- 8) Nakahara, T., Hisatsuka, K., and Minoda, Y., *J. Ferment. Technol.*, **59**, 415 (1981).
- 9) Nakahara, T., Kawashima, H., Sugisawa, T., Takamori, Y., and Tabuchi, T., *J. Ferment. Technol.*, **61**, 19 (1983).
- 10) Freeman, A. and Lilly, M.D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 495 (1987).
- 11) Pinheiro, H.M. and Cabral, J.M.S., *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 97 (1991).
- 12) Hocknull, M.D. and Lilly, M.D., in “Biocatalysis in Organic Media,” ed. by Laane, C., Tramper, J., and Lilly, M.D., Elsevier, Amsterdam, 1986, pp. 393-398.
- 13) Bar, R. and Gainer, J.L., *Biotechnol. Prog.*, **3**, 109 (1987).
- 14) Bar, R., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **43**, 49 (1988).
- 15) Lee, S.Y. and Rhee, J.S., *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 437 (1994).
- 16) Kondo, E. and Masuo, E., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 113 (1961).
- 17) Hocknull, M. D. and Lilly, M. D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 148 (1990).
- 18) Fukui, S., Ahmed, S. A., Omata, T., and Tanaka, A., *Eur. J. Appl. Biotechnol.*, **10**, 289 (1980).
- 19) Tanaka, A. and Sonomoto, K., *Chemtech*, **20**, 112 (1990).
- 20) Ueda, M., Mukataka, S., Sato, S., and Takahashi, J., *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1533 (1986).
- 21) Takazawa, Y., Sato, S., and Takahashi, J., *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2489 (1984).
- 22) Kim, M.K. and Rhee, J.S., *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 612 (1993).
- 23) Aono, R., Doukyu, N., Kobayashi, H., Nakajima, H., and Horikoshi, K., *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2518 (1994).
- 24) Abe, A., Inoue, A., Usami, R., Moriya, K., and Horikoshi, K., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1154 (1995).
- 25) Doukyu, N., Kobayashi, H., Nakajima, H., and Aono, R., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1612 (1996).
- 26) Doukyu, N., Arai, T., and Aono, R., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1075 (1998).
- 27) Oda, S., Kikuchi, Y., and Nanishi, Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1216 (1992).
- 28) Oda, S. and Ohta, H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1515 (1992).
- 29) Pinkert, H.C., Wolfram, J.W., Rogers, R., and White, D.C., *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1129 (1996).
- 30) Heipieper, H.J., Weber, F. J., Sikkema, J., Keweloh, H., and de Bont, J. A. M., *Trends Biotechnol.*, **12**, 409 (1995).
- 31) Aono, R., Negishi, T., and Nakajima, H., *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4624 (1994).
- 32) Asako, H., Nakajima, H., Kobayashi, K., Kobayashi, M., and Aono, R., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1428 (1997).
- 33) Aono, R., Kobayashi, M., Nakajima, H., and Kobayashi, H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 213 (1995).
- 34) Asako, H., Kobayashi, K., and Aono, R., *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 294 (1999).

- 35) 橋本一、細胞工学, 13, 862 (1994).
- 36) 中江太治、細胞工学, 13, 903 (1994).
- 37) 中江太治、化学と生物, 34, 353 (1996).
- 38) 坂川英一郎、小林宏行、バイオサイエンスとインダストリー, 53, 134 (1995).
- 39) 山口明人、化学と生物, 33, 208 (1995).
- 40) Rastogi, N., and Barrow, W.W., *Res. Microbiol.*, 145, 243 (1994).
- 41) Brown, M.R.W. and Gilbert, P., *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 87S (1993).
- 42) Juneja, V.K. and Davidson, P.M., *J. Food Protect.*, 56, 302 (1993).
- 43) Walker, J.T., Rogers, J., and Keevil, C.W., *Biofouling*, 8, 47 (1994).
- 44) Hattori, R., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18, 319 (1972).
- 45) Hattori, R. and Hattori, T., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27, 287 (1981).
- 46) Hattori, R., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 22, 215 (1976).
- 47) Hattori, T. and Frusaka, DC., *J. Biochem.*, 50, 312 (1961).
- 48) 森崎久雄、服部 勉、微生物, 4, 9 (1988).
- 49) 吉原一年、大久保哲朗、藤尾雄策、上田誠之助、醗酵工学, 57, 475 (1979).
- 49) Tetz, V.V., Rybalchenko, O.V., and Savkova, G.A., *J. Gen. Microbiol.*, 139, 855 (1993).
- 50) Oda, S. and Ohta, H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 2041 (1992).
- 51) Oda, S. and Ohta, H., *Recent Res. Devel. Microbiol.*, 1, 85 (1997).
- 52) 小田 忍、太田博道、色材協会誌, 70, 538 (1997).
- 53) 小田 忍、化学工業, 2000, 462 (2000).
- 54) 小田 忍、バイオインダストリー, 17(11), 39 (2000).
- 55) Oda, S., Sugai, T., and Ohta, H., in "Enzymes in Nonaqueous Solvents," ed. by Vulfson, E.N., Halling, P.J., and Holland, H.J., Humana Press, NJ, 2001, pp.401-416.
- 56) Oda, S., Tanaka, J., and Ohta, H. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 84 (1998).
- 57) Sakai, T., Iida, Y., Kikuyama, S., Tsuboi, S., and Utaka, M., *Chem. Lett.*, 1991, 1651 (1991).
- 58) Shimizu, M., Kawanami, H., and Fujisawa, T., *Chem. Lett.*, 1992, 107 (1992).
- 59) Horiuchi, K., Kobayashi, K., Nagata, H., Satoh, T., and Suemitsu, T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1330 (1994).
- 60) Tanaka, A., Tokuyama, T., Saito, A., and Oritani, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 2435 (1998).
- 61) 折谷隆之、山下恭平、有機合成化学協会誌, 41, 1054 (1983).
- 62) Horiuchi, K., Kobayashi, K., Nagata, H., Satoh, T., and Suemitsu, R., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1330 (1994).
- 63) Ohta, H., Matsumoto, K., Tsutsumi, S., and Ihori, T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1989, 485 (1989).
- 64) Kakeya, H., Sakai, N., Sugai, T., and Ohta, H., *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1877 (1991).
- 65) Kawai, K., Imuta, M., and Ziffer, H., *Tetrahedron Lett.*, 22, 2527 (1981).
- 66) Glänzer, B.I., Faber, K., and Griengl, H., *Tetrahedron*, 43, 5791 (1987).
- 67) 柴谷武爾、油化学, 44, 862 (1995).
- 68) Katoh, O., Sugai, T., and Ohta, H., *Tetrahedron: Asymm.*, 5, 1935 (1994).
- 69) 米谷 正、松野隆一、科学と工業, 71, 475 (1997).
- 70) 中村 薫、化学と生物, 35, 590 (1997).
- 71) Nakamura, K., Miyai, T., Nagar, A., Oka, S., and Ohno, A., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 62, 1179 (1989).
- 72) Brooks, D.W., Grothaus, P.G., and Irwin, W.L., *J. Org. Chem.*, 47, 2820 (1982).
- 73) Anderson, B.A., Hansen, M.M., Harkness, A.R., Henri, C.L., Vicenzi, J.T., and Zmijewski, M.J.,

- J. Am. Chem. Soc.*, 117, 12358 (1995).
- 74) Schmidt, E., Ghisalba, O., Gyax, D., and Seddelmeier, G., *J. Bacteriol.*, 24, 315 (1992).
- 75) Chartrain, M., McNamara, J., and Greasham, R., *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 507 (1996).
- 76) Lanzilotta, R.P., Braddley, D.G., and Beard, C.C., *Appl. Microbiol.*, 29, 427 (1975).
- 77) Sugai, T., Katoh, O., and Ohta, H., *Tetrahedron*, 51, 11987 (1995).
- 78) Oda, S., Inada, Y., Kobayashi, A., and Ohta, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1762 (1998).
- 79) Oda, S., Sugai, T., and Ohta, H., *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 178 (2001).
- 80) Oda, S., Sugai, T., and Ohta, H., *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 202 (2001).
- 81) Oda, S., Sugai, T., and Ohta, H., *J. Biosci. Bioeng.*, 92, 86 (2001).
- 82) Mori, T., Sakimoto, M., Kagi, T., and Sakai, T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1191 (1996).
- 83) Hasegawa, Y., Adachi, S., and Matsuno, R., *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 346 (1997).
- 84) Matsuyama, A. and Kobayashi, Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1148 (1994).
- 85) Matsuyama, A., Kawada, N., and Kobayashi, Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1595 (1993).
- 86) Kometani, T., Morita, Y., Furui, H., Yoshii, H., and Matsuno, R., *Chem. Lett.*, 1993, 2123 (1993).
- 87) Ohta, H., Tetsukawa, H., and Noto, N., *J. Org. Chem.*, 47, 2400 (1982).
- 88) Nakamura, K., Inoue, Y., and Ohno, A., *Tetrahedron Lett.*, 35, 4375 (1994).
- 89) Sawada, T., Ogawa, M., Ninomiya, R., Yokose, K., Fujiu, M., Watanabe, K., Suhara, Y., and Maruyama, H. B., *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 884 (1983).
- 90) Oda, S., Kato, A., Matsudomi, N., and Ohta, H., *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 149 (1994).
- 91) 倉根隆一郎, バイオサイエンスとインダストリー, 46, 3173 (1988).
- 92) 古川謙介, 化学と生物, 34, 778 (1996).
- 93) 古川謙介, ケミカル・エンジニアリング, 1997 (5), 24 (1997).
- 94) Ohshiro, T., Hirata, T., Hashimoto, I., and Izumi, Y., *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 610 (1996).
- 95) Ohshiro, T. and Izumi, Y., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 1 (1999).
- 96) Takahashi, E., Nakamichi, K., Furui, M., and Mori, T., *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 439 (1995).
- 97) Takahashi, E., Nakamichi, K., and Furui, M., *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 247 (1995).
- 98) Tanaka, J., Oda, S., and Ohta, H., *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 314 (2001).
- 99) Sih, C.J., Gu, Q. -M., Fulling, G., Wu, S. -H., and Reddy, D.R., *Dev. Ind. Microbiol.*, 29, 221 (1988).
- 100) Hernaiz, M.J., Sanches-Montero, J.M., and Sinisterra, J.V., *Tetrahedron*, 50, 10749 (1994).
- 101) Lee, W.H., Kim, K. -J., Kim, M.G., and Lee, S.B., *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 613 (1995).
- 102) Yamamoto, K., Ueno, Y., Otsubo, K., Kawakami, K., and Komatsu, K., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3125 (1990).
- 103) Takeya, H., Sakai, N., Sugai, T., and Ohta, H., *Tetrahedron Lett.*, 32, 1343 (1991).
- 104) Takagi, M., Shirokaze, J., Oishi, K., Otsubo, K., Yamamoto, K., Yoshida, M., and Fujimatsu, I., *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 191 (1994).
- 105) Takagi, M., Oishi, K., Ishimura, F., and Fujimatsu, Y., *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 54 (1994).
- 106) Mustranta, A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 61 (1992).
- 107) Hedstrom, G., Backlund, M., and Slotte, J.P., *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 618 (1993).
- 108) Arroyo, M. and Sinisterra, J.V., *J. Org. Chem.*, 59, 4410 (1994).
- 109) Duan, G. and Chen, J. Y., *Biotechnol. Lett.*, 16, 1065 (1994).

- 110) Kim, M.G. and Lee, S.B., *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 269 (1996).
- 111) Oda, S. and Ohta, H., *J. Biosci. Bioeng.*, submitted for publication.
- 112) Shono, T., Matsumura, Y., Hibino, K., and Miyawaki, S., *Tetrahedron Lett.*, 1974, 1295 (1974).
- 113) Hiramata, M., Noda, T., and Ito, S., *J. Org. Chem.*, 50, 127 (1985).
- 114) Takaya, H., Ohta, T., Sayo, N., Kumobayashi, H., Akutagawa, S., Inoue, S., Kasahara, I., and Noyori, R., *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 1596 (1987).
- 115) Hidai, M., Mizuta, H., Yagi, H., Nagai, Y., Hata, K., and Uchida, Y., *J. Organometal. Chem.*, 232, 89 (1982).
- 116) Mori, K., Masuda, S., and Suguro, T., *Tetrahedron*, 37, 1329 (1981).
- 117) Mori, K., Kuwahara, S., Levinson, H. Z., and Levinson, A.R., *Tetrahedron*, 38, 2291 (1982).
- 118) Mori, K., Tamada, S., and Matsui, M., *Tetrahedron Lett.*, 1978, 901 (1978).
- 119) Mori, K., Kato, M., and Kuwahara, S., *Liebigs Ann. Chem.*, 1985, 861 (1985).
- 120) Mori, K. and Wu, J., *Liebigs Ann. Chem.*, 1991, 439 (1991).
- 121) Hidai, M., Ishiwatari, H., Yagi, H., Tanaka, E., Onozawa, K., and Uchida, Y., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1975, 170 (1975).
- 122) Mori, K. and Sugai, T., *Synthesis*, 1982, 752 (1982).
- 123) Gramatica, P., Manitto, P., Ranzi, B. M., Delbianco, A., and Francavilla, M., *Experientia*, 38, 775 (1982).
- 124) Uematsu, T., Uemura, T., and Mori, K., *Agric. Biol. Chem.*, 47, 597 (1983).
- 125) Masuda, S., Kuwahara, S., Suguro, T., and Mori, K., *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2515 (1981).
- 126) Mori, K. and Watanabe, H., *Tetrahedron*, 40, 299 (1984).
- 127) Mori, K. and Igarashi, Y., *Liebigs Ann. Chem.*, 1988, 717 (1988).
- 128) Mori, K. and Wu, J., *Liebigs Ann. Chem.*, 1992, 83 (1992).
- 129) Mori, K. and Kato, M., *Liebigs Ann. Chem.*, 1985, 2083 (1985).
- 130) Mori, K. and Wu, J., *Liebigs Ann. Chem.*, 1991, 783 (1991).
- 131) 森 謙治、有機合成化学協会誌, 39, 63 (1981).
- 132) Poppe, Novák, L., Dévényi, J., and Szátay, C. S., *Tetrahedron Lett.*, 32, 2643 (1991).
- 133) Chattopadhyay, S., Mamdapur, V.R., and Chadha, M.S., *Indian J. Chem.*, 28B, 848 (1989).
- 134) Rossi, R., Salvadori, P.A., Carpita, A., and Niccoli, A., *Tetrahedron*, 35, 2039 (1979).
- 135) Chakraborty, T.K. and Thippeswamy, D., *Synlett*, 1999, 150 (1999).
- 136) Oda, S., Kato, A., Matsudomi, N., and Ohta, H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 83 (1996).
- 137) Oda, S., Inada, Y., Kato, A., Matsudomi, N., and Ohta, H., *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 559 (1995).
- 138) 岡村 博、香料, 1974, 9 (1974).
- 139) 牛腸 忍、防菌防黴, 19, 511 (1991).
- 140) 牛腸 忍、防菌防黴, 20, 585 (1992).
- 141) Schindler, J., *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 21, 537 (1982).
- 142) Oda, S., Inada, Y., Kobayashi, A., Kato, A., Matsudomi, N., and Ohta, H., *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2216 (1996).
- 143) Oda, S. and Ohta, H., *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 423 (1997).
- 144) 枅倉辰六郎、立木 隆、矢野俊博、門脇 節、有機合成化学協会誌, 39, 487 (1981).
- 145) 枅倉辰六郎、化学と生物, 31, 639 (1993).
- 146) 藤尾達郎、丸山明彦、森 英郎、バイオサ

- イエンスとインダストリー, 56, 737 (1998).
- 147) Oda, S. and Ohta, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1388 (2001).
- 148) Yoshioka, K. and Hashimoto, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2183 (1981).
- 149) 栗山一秀、芦田晋三、斉藤義幸、杉並孝二、今安 聡、*醗酵工学*, 64, 169 (1986).
- 150) 柳内敏靖、清川良文、若井芳則、*醗酵工学*, 67, 419 (1989).
- 151) 石川雄章、百瀬洋夫、吉沢 淑、*醸造協会誌*, 79, 62 (1984).
- 152) 峰時俊貴、*醸造協会誌*, 87, 334 (1992).
- 153) Oda, S., Sugai, T., and Ohta, H., *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 473 (1999).
- 154) Kawamoto, T., Sonomoto, K., and Tanaka, A., *Biocatalysis*, 1, 137 (1987).
- 155) 山口雄三、小松 昭、諸江辰男、*日本農芸化学会誌*, 51, 123 (1977).
- 156) de Castro, H.F., Anderson, W.A., Legge, R.L., and Moo-Young, M., *Indian J. Chem.*, 31B, 891 (1992).
- 157) 山口雄三、折谷隆之、田島 昇、小松 昭、諸江辰男、*日本農芸化学会誌*, 50, 475 (1976).
- 158) Cambou, B. and Klibanov, A.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 2687 (1984).
- 159) Ikushima, Y., Saito, N., Yokoyama, T., Hatakeda, K., Ito, S., Arai, M., and Blanch, H.W., *Chem. Lett.*, 1993, 109 (1993).
- 160) Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furusaka, S., and Tamai, Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 910 (1997).
- 161) Yadav, B.S., Osumi, K., Amemura, A., and Harada, T., *J. Ferment. Technol.*, 57, 244 (1979).
- 162) Schimpfessel, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 317 (1968).
- 163) Lutstorf, U. and Megnet, R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 933 (1968).
- 164) Oda, S., Sugai, T., and Ohta, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 73, 2819 (2000).
- 165) Oda, S., Sugai, T., and Ohta, H., *Chem. Lett.*, **2001**, 500 (2001).
- 166) Oda, S. and Ohta, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1917 (2001).