

解 説

Pseudomonas nitroreducens p7 による *p*-menthane からの trans-*p*-menthane-1-ol の生産条件と *P. nitroreducens* p7 の基質特異性 玉村朋大¹⁾, 亀谷将之¹⁾, 金政 真²⁾, 石田康行¹⁾, 和田俊夫³⁾, 塚本義則¹⁾

¹⁾中部大学応用生物学部応用生物化学科, ²⁾中部大学応用生物学部環境生物科学科

³⁾中部大学応用生物学部食品栄養科学科

要 旨

テルペン化学工業界においては利用方法がない副産物として *p*-menthane が大量に副生してその高付加価値化が求められていた。そこで、このような状況を鑑みて *p*-menthane から微生物の光学的選択能を利用した *p*-menthane の 3 位の水酸化による高付加価値香料である *l*-menthol の一段階生産を試みた結果、1 位が水酸化された *o*-menthane-1-ol を生産する微生物 *Pseudomonas nitroreducens* p7 を見出すことに成功した。本研究では、当該微生物を用いた *p*-menthane からの trans-*p*-menthane-1-ol の生産性向上を目的として、*p*-menthane から trans-*p*-menthane-1-ol への微生物変換の培養に関わる物理的及び化学的因子の影響について検討した。その結果、界面活性剤 Triton X-100 の 0.1%(v/v)添加により trans-*p*-menthane-1-ol の生産濃度が無添加と比べて 2.41 倍に増加することが分かった。物理的因子については、培養液量 5ml, pH 7.3, 培養温度 30℃で最も高い trans-*p*-menthane-1-ol 濃度が得られた。但し、菌の生育は 25℃が最適であった。化学的因子については、炭素源は *p*-menthane 単独で初発基質濃度 4%(w/v)、窒素源は硝酸アンモニウムが最適であった。金属イオンの影響においては、Mg²⁺を除去すると完全に trans-*p*-menthane-1-ol が生成されなかったことから Mg²⁺が不可欠因子と推定された。今回の実験で得られた最も高い *p*-menthane から trans-*p*-menthane-1-ol への変換収率とモル変換効率率はそれぞれ最大 23.6 と 21.2%であった。

当該菌の基質特異性について 20 種類のモノテルペンアルコールを調べた結果、citronellol と tetrahydroperillyl alcohol の 2 つに対してのみ資化性が認められ、前者からはその酸化生成物の citronellic acid が検出されたが、後者は速やかに消費されて目立った代謝産物は認められなかった。

1. はじめに

筆者らは、前報(1)において、唯一の炭素源として *p*-menthane を利用できる *Pseudomonas nitroreducens* p7 が *p*-menthane から cyclohexanebutanoic acid, *p*-menthane-2-ol, *p*-menthane-7-ol, や *p*-menthane-9-ol などを含む 8 つの代謝物を伴って、trans-*p*-menthane-1-ol を主要代謝物として立体選択的に生成することを報告した。加えて、我々は trans-*p*-menthane から trans-*p*-menthane-1-ol への生産収量とモル変換効率が 13.7 及び 12.3%と見積もら

れることを報告した。この *p*-menthane からの trans-*p*-menthane-1-ol の微生物変換による生成に関しては最初の報告であった(2-4)。

当該物質 trans-*p*-menthane-1-ol は、香料原料としての用途がある。それに加えて最近、では *p*-menthane-1-ol と *p*-menthane-8-ol のそれぞれ *cis* 型と *trans* 型の 4 種混合物(ジヒドロテルピネオール)とその酢酸誘導体はラミネートセラミックコンダクター製造用の原材料として利用されてきている。本研究成果はこの有用原材料の効率的な立体特異的生産方

法を提供するものと期待される。(5-17).

本報告では, *trans-p*-menthane-1-ol の特異的生成の微生物変換効率の改善を目的として pH, 培養温度, 培養容量などの物理的および初発基質濃度, 界面活性剤, 炭素源, 窒素源などの化学的因子の *trans-p*-menthane-1-ol 生成に対する影響について調べた結果について報告する.

2. 実験材料及び実験方法

実験材料 基質の *p*-menthane(50.03%*cis* 型と 49.97%*trans* 型の混合物)及び基質特異性の試験に用いた 10 種類のモノテルペンアルコール(*cis-p*-menthane-1-ol, *trans-p*-menthane-1-ol, citronellol, *l*-menthol, geraniol, α -terpineol, dihydroterpineol, terpinene-4-ol tetrahydroperillyl alcohol, linalool)は日本テルペン化学株式会社(神戸, 日本)より提供を受けた. 界面活性剤の Tween 20, Triton X-100 and PEG-6000, 炭素源の glucose, fructose, galactose, lactose, maltose, mannose, sorbitol, xylose, xylitol, arabinose, glycerol, sodium acetate, sodium succinate, ethanol, 窒素源の yeast extract, poly-peptone, urea, sodium nitrate, potassium nitrate と ammonium sulfite, 無機イオン源としてのリン酸二水素ナトリウム・12 水和物, リン酸二水素カリウム, 硫酸マグネシウム・7 水和物, 硫酸マンガン・5 水和物及び塩化第二鉄・6 水和物は和光純薬工業社(大阪, 日本)製を購入して用いた.

使用菌株 全ての試験区には *Pseudomonas nitroreducens* p7 を用いた. 尚, 当該菌は前報(1)に記載した通り筆者らが土壌から分離した.

基本培地 前報に記載した *p*-menthane と NH_4NO_3 をそれぞれ唯一の炭素源及び窒素源とする基本液体培地(pH 7.3, 界面活性剤無添加)を菌の保存用の培養及び種培養に用いた.

菌の保存と種培養 当該菌は *p*-menthane を 4%(w/v) 含有する基本液体培地で 3 日間培養した培養液とグリセリンを 1:1 で混合したものを液体窒素で瞬時に凍結させて -80℃ のデープフリーザーに保存した. 種培養は凍結保存された当該菌を氷上で融解したものを *p*-menthane 4%(w/v) を含有する新鮮な基本液体培地に 1%(v/v) 接種して 30℃ で 3 日間培養したものを種培養液として各試験区に 1%(v/v) 接種して用いた.

培養装置 全ての培養はタイテック株式会社,(福島, 日本)製の振盪培養機 Taitec personal-11 を用いて振盪数は 160rpm で行った.

培養条件 全ての試験区はそれぞれ N=5 で行われ, 培養期間については, 前報で報告した通り *trans-p*-menthane-1-ol の最大生成濃度を示した 6 日間とした. 物理的因子としては, 界面活性剤の添加, pH, 培養温度及び培養容量について菌体生成と *trans-p*-menthane-1-ol の生成濃度について検討した. pH と培養温度以外の検討においては, pH 7.3 と培養温度を 30℃ で培養した. 界面活性剤については, Triton X-100, Tween 20, PEG-6000 をそれぞれ 0.01%(w/v) 添加した試験区の中から最も *trans-p*-menthane-1-ol の生産性に効果が認められたものを以下の全ての試験区に 0.01%(w/v) 添加した. pH の試験区はそれぞれ 1mol 水酸化ナトリウムあるいは 0.1mol 塩酸水溶液で pH を 5.0, 6.0, 7.3, 8.0, 9.0, 10.0 に調整したものを用いた. 培養温度は, 30℃ を対照として, 25℃, 35℃ 及び 40℃ で比較された. 培養容量は, 5ml, 10ml 及び 15ml の 3 試験区で調べた. 化学的因子としては, 基質濃度, 炭素源, 窒素源及び金属イオンについて検討した.

炭素源としては, 前述の 6 種類の単糖, 2 種類の糖アルコール, 3 種類の二糖及び 2 種類の有機酸ナトリウムを基本培地にそれぞれ 0.1%(w/v) 上乗せ添加した.

窒素源については, アンモニア態(塩化アンモニウム, 硫酸アンモニウム, 酢酸アンモニウム, 尿素, ポリペプト

ン,酵母エキス)あるいは硝酸態(硝酸カリウム,硝酸ナトリウム)窒素化合物で対照区の硝酸アンモニウム 0.9%(w/v)添加時と同量の N 含量になるようにそれぞれ置換した. 基本培地から 2 価の金属イオン Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} イオンをそれぞれ添加しない場合の影響について調べた.

菌体濃度の測定 全ての試験区において, 菌体濃度をそれぞれ見かけ上の菌体濁度と実際の菌体濁度として測定した. 見かけ上の濁度は培養液 0.5ml に 4.5ml の蒸留水を加えて 10 倍希釈したものについてアペレ光電比色計(アペレ株式会社, 埼玉, 日本)を用いて 600nm の吸光度として表わされた. 実際の濁度は培養液 0.5ml を久保田 3520 型遠心分離機(久保田製作所, 東京, 日本)を用いて 8,000rpm で 10 分間遠心分離した菌体を 5ml の蒸留水によく懸濁しものを同様に 600nm の吸光度として表わした.

生成物 *trans-p*-menthane-1-ol の測定 全ての試験区において, FIDと PEG-10を充填したガラスキャピラリーカラムを装着した島津ガスクロマトグラフ GC-14B(島津製作所, 京都, 日本)を用いたガスクロマトグラフィーを用いて測定された. 各分析は注入温度 200°C, カラム温度 160°C, オープン温度 200°C, 空気, 水素及び窒素ガスの圧力が 50, 50, 100kPa の条件下で, 1%(w/v)linallol を内部標準として 50 μ l を加えた培養液のジエチルエーテル抽出物を用いて生成物の *trans-p*-menthane-1-ol 濃度(w/v)を測定した.

標準偏差と有意差の検定 全ての試験区の菌体濃度及び *trans-p*-menthane-1-ol 濃度は全て 5 連のデータの平均値で表わし, それぞれの標準偏差値を算出した. また, それぞれの試験区については t-test による有意差検定を行い, $p < 0.05$, $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$ で表わした. データ比較はそれぞれの試験区の対照を 100 とした相対比で表わした.

3. 結果

界面活性剤の添加効果 図 1 に示す通りに, Triton X-100 添加区においてのみ菌体生成, *trans-p*-menthane-1-ol 生成共に, 対照と比べて有意に高い値を示し, *trans-p*-menthane-1-ol の濃度は対照の 2.41 倍であった.

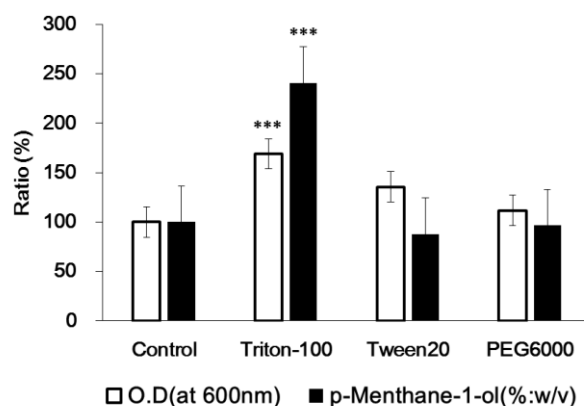


図 1 Effect of Surfactant on Cell Growth and *trans-p*-Menthane-1-ol Production.

Each optical density and concentration of produced *trans-p*-menthane-1-ol was determined as absorbance at 600 nm and by gas chromatography of diethyl ether extract of culture broth with 50 μ l of 1%(w/v) solution of linalool as internal standard, respectively. Each value was calculated as the mean for each five independent cultures ($n=5$), and consequently it was expressed as the ratio against the control. Each value was calculated as the mean for five independent cultures ($n=5$), and consequently it was expressed as the ratio to the control (with no surfactant).

pH の影響 図 2 に示す通りに, 酸性側では pH 6.0 以下では, 特に *trans-p*-menthane-1-ol 生成が対照と比較して有意に低下した. アルカリ側では, pH7 ~9 では菌体生成 *trans-p*-menthane-1-ol 生成ともに安定していたが, pH 10.0 では *trans-p*-menthane-1-ol 生成が有意に低下した.

培養温度の影響 図 3 に示す通り, 菌体生成においては, 25°C, 35°Cでは対照区(30°C)と比べて有意差はなかったものの 40°Cでは全く生育が観察されなかった. 一方, *trans-p*-menthane-1-ol 生成において

は、30℃以外では対照(30℃)と比べて有意に低下し、特に40℃では全くtrans-*p*-menthane-1-olが認められなかった。

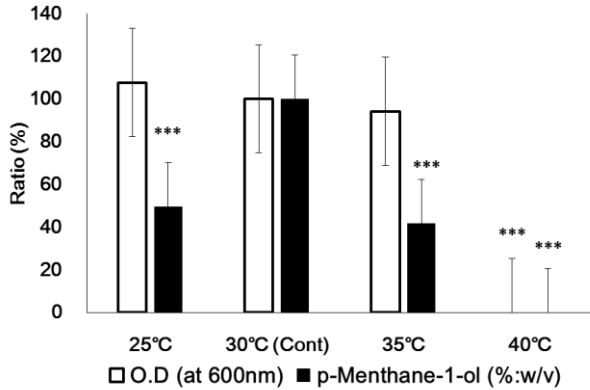


図3 Effect of Cultivation Temperature on Cell Growth and trans-*p*-Menthane-1-ol Production.

Each optical density and concentration of produced trans-*p*-menthane-1-ol was expressed as the ratio to the control (30℃) using each mean for five independent cultures (n=5) as described in figure 1.

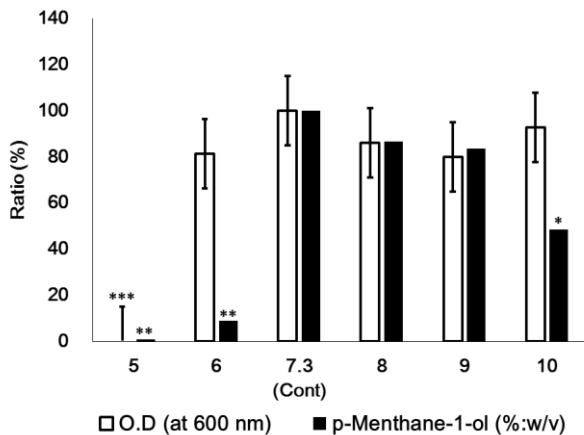


図2 Effect of pH on Cell Growth and trans-*p*-Menthane-1-ol Production.

Each optical density and concentration of produced trans-*p*-menthane-1-ol was expressed as the ratio to the control (pH 7.3) using each mean for five independent cultures (n=5) as described in figure 1.

培養容量の影響 図4に示すように、培養容量の違いによる通気性の違いの影響について調べた結果、菌体生成、trans-*p*-menthane-1-ol生成共に最も培養容量が最も少ない対照の5mlが有意に高い値を示した。

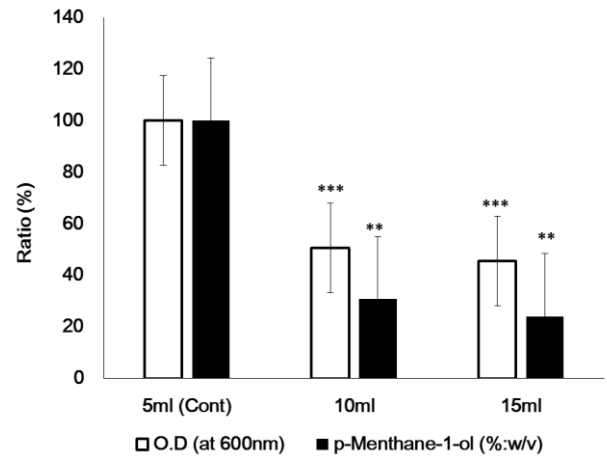


図4 Effect of Cultivation Volume on Cell Growth and trans-*p*-Menthane-1-ol Production.

Each optical density and concentration of produced trans-*p*-menthane-1-ol was expressed as the ratio to the control (5ml) using each mean for five independent cultures (n=5) as described in figure 1.

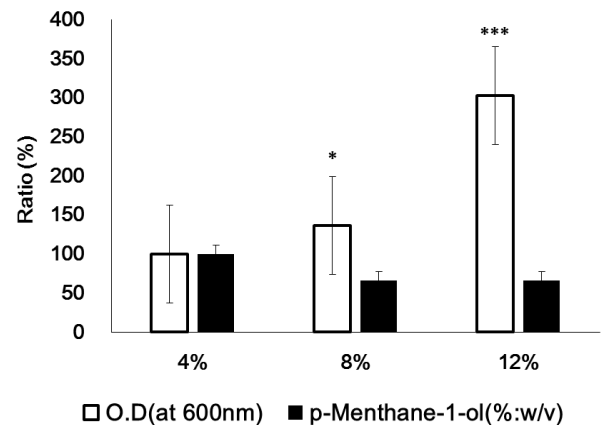


図5 Effect of Initial Substrate Concentration on Cell Growth and trans-*p*-Menthane-1-ol Production.

Each optical density and concentration of produced trans-*p*-menthane-1-ol was expressed as the ratio to the control (5%:w/v) using each mean for five independent cultures (n=5) as described in figure 1.

初発基質濃度の影響 図5に示すように、菌体生成においては、*p*-menthane添加濃度に比例して増加したが、trans-*p*-menthane-1-ol生成には有意差はないものの4%(w/v)が最も高かった。

炭素源の影響 図6に示すように、菌体生成においては、マルトース添加で有意に増加が認められたものの、*trans-p*-menthane-1-ol生成に対してはいずれの炭素源も添加効果が認められず、ある種の糖の添加はむしろ菌体生成を促進するものの *trans-p*-menthane-1-ol 生成を抑制した。

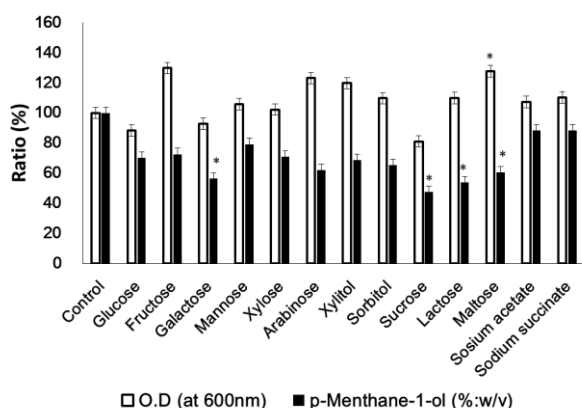


図6 Effect of Carbon Source on Cell Growth and *trans-p*-Menthane-1-ol Production.

Each carbon source was supplementary added to basal medium containing 5% (w/v) of *p*-menthane. Each optical density and concentration of produced *trans-p*-menthane-1-ol was expressed as the ratio to the control (5%:w/v) using each mean for five independent cultures (n=5) as described in figure 1.

窒素源の影響 図7に示すように、菌体生成に対しては、二つのアンモニア態窒素化合物、塩化アンモニウムと硫酸アンモニウムに有意な増加効果が認められたものの、*trans-p*-menthane-1-ol生成は硫酸アンモニウム、尿素、ポリペプトン及び酵母エキスで有意に低下し、*trans-p*-menthane-1-ol生成に関しては対照の硝酸アンモニウムが最適であった。

金属イオンの影響 図8に示すように、菌体生成においては、基本培地からの Zn^{2+} の除去により有意な増加を、逆に、 Mg^{2+} の除去は有意な低下をそれぞれ引き起こした。一方、*trans-p*-menthane-1-ol生成においては、いずれの金属イオンの除去も有意な低下が認められたが、中でも Mg^{2+} の除去は *trans-p*-menthane-1-olの生成を完全に停止したことが

ら、*p*-menthaneの水酸化には、 Mg^{2+} の存在が不可欠であることが分かる。

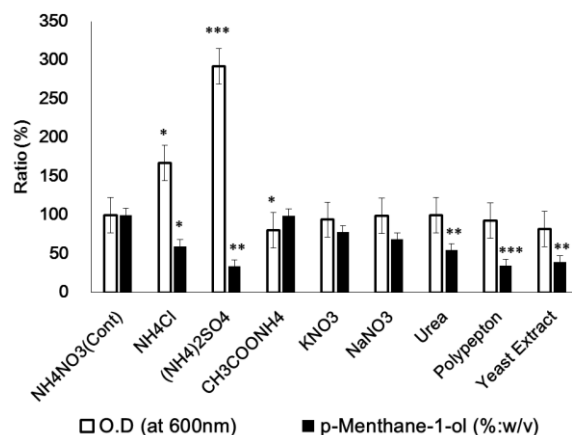


図7 Effect of Nitrogen Source on Cell Growth and *trans-p*-Menthane-1-ol Production.

Each nitrogen source was added to basal medium as the replacement with an equivalent amount of nitrogen containing in 0.1 % (w/v) of NH_4NO_3 . Each carbon source was supplementary added to basal medium containing 5% (w/v) of *p*-menthane. Each optical density and concentration of produced *trans-p*-menthane-1-ol was expressed as the ratio to the control (5%:w/v) using each mean for five independent cultures (n=5) as described in figure 1.

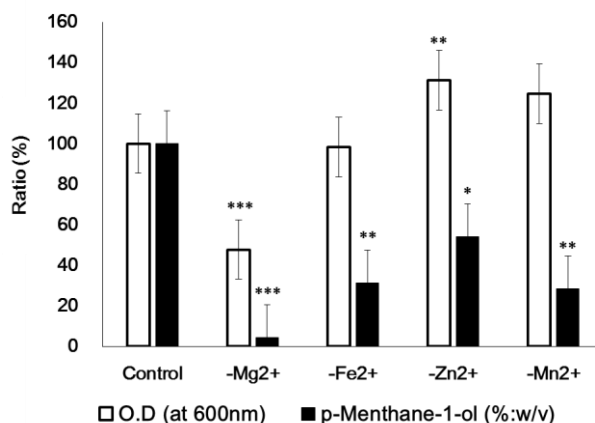


図8 Effect of Metal Ion on Cell Growth and *trans-p*-Menthane-1-ol Production.

Each metal ion was removed separately from basal medium. Each optical density and concentration of produced *trans-p*-menthane-1-ol was expressed as the ratio to the control (basal medium containing all the metal ions) using each mean for five independent cultures (n=5) as described in figure 1.

trans-*p*-Menthane-1-ol 生成の重量及びモル変換効率 今回の研究の各試験区において最大の trans-*p*-Menthane-1-ol 生成の重量及びモル変換率が得られたのは界面活性剤の Triton X-100 を添加した試験区で, trans-*p*-menthane-1-ol が trans-*p*-menthane のみから生成すると仮定した場合に, それぞれ 23.6, 21.2%と算出され, 前報と比べて約 1.72 倍に向上した.

当該菌の基質特異性 表 1 に示す通り, 当該菌のモノテルペンアルコール類に対する基質特異性は比較的狭く, tetrahydroperillyl alcohol と citronellol だけが唯一の炭素源として利用可能であることが分かった. 図 9 に示すように, citronellol からは主要代謝産物として citronellic acid が生成されたのに対して, tetrahydroperillyl alcohol からは全く代謝産物が認められず短時間に完全に消費されることが分かった.

Terpene alcohol	Usage
Geraniol	-
α -Terpineol	-
Tetrahydroperillyl alcohol	+
Menthol	-
Linallol	-
Terpinene-4-ol	-
Dihydroterpineol	-
Citronellol	+
trans- <i>p</i> -Menthane-1-ol	-
cis- <i>p</i> -Menthane-1-ol	-

表 1 Substrate Specificity of the Strain p7 toward monoterpene alcohols.

5% (w/v) of each monoterpene alcohol was added to basal medium as a sole carbon source instead of *p*-menthane, respectively. Each cultivation was performed at 30°C and 160 spm by seeding 1% (v/v) of the culture inoculated frozen strain p7 and cultivated for 3 days in advance. Cell growth was checked visually every day. Additionally, consumption of substrate and formation of metabolite was determined by gas chromatography every day. Symbol (+) and (-) in array of cell growth mean cell growth and no cell growth, respectively. Symbol (-) in formation of metabolite means no formation of metabolite.

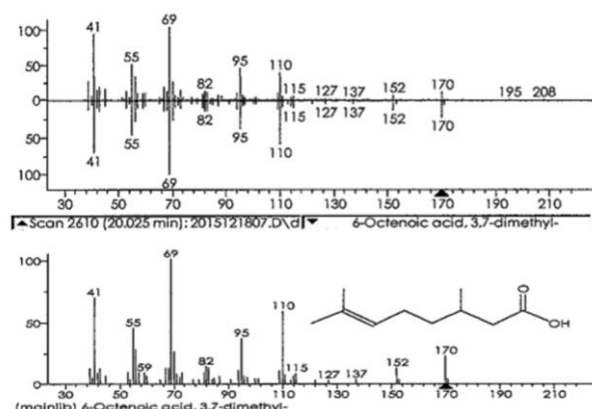


図 9 Mass spectrometry of Metabolite from Citronellol by the Strain p7.

Cultivation with 5% (w/v) of citronellol as a sole carbon source was carried out at 30°C and 160 spm by seeding 1% (v/v) of the culture inoculated frozen strain p7 and cultivated for 3 days in advance. Production of metabolite was checked by gas chromatography every 3 days. Mass spectrometer of metabolite from citronerlol were performed under the condition described in Material and method.

4. 考察

今回, 菌体生成と trans-*p*-menthane-1-ol の生成に対する培養の物理的及び化学的因子の影響について調べた結果, 界面活性剤の Triton-100 の 0.01% (w/v) 添加が最も効果的で界面活性剤無添加の対照と比較して菌体生成で 167%, trans-*p*-menthane-1-ol 生成に対しては 241%にも増大した. この結果は, 適当な界面活性剤の添加が当該菌の細胞内への *p*-menthane の取り込みの促進によって炭素源及び基質の両方の取り込みが加速された結果と推定される. 他方, Tween-20 と PEG-6000 の添加は対照と比較して, 菌体生成は僅かに増加したものの, trans-*p*-menthane-1-ol の生成に対しては同等かやや低下傾向を示した.

今回の結果から界面活性剤の種類によって trans-*p*-menthane-1-ol の生成に対する影響が異なることが分かったが, これは界面活性剤の種類によっては, 基質の *p*-menthane の乳化による細胞膜透過性

に際のあることが推定されるが、詳細は今後明らかにしたい。

pH の影響については、菌体生成は pH 6.0~10 の間では対照の 7.3 に対して僅かに抑制気味であったのに対して pH 5.0 では菌体生成は完全に停止した。また、*trans-p*-menthane-1-ol の生成においては、pH 6.0 ではほぼ停止に近く、pH 10.0 でも著しく低下した。このことから、当該菌による *trans-p*-menthane-1-ol の生成に関与する酵素は酸性側の pH では極端に不活性化することが推定された。

培養温度の影響については、菌体生成においては、25℃の方が 30℃の 169%に増加したのに対して、40℃では全く菌体生成は起こらなかった。一方、*trans-p*-menthane-1-ol の生成は 30℃が最適で 40℃では全く生成が認められず、25℃と 35℃では対照の 30℃の 50%以下に低下した。

培養容量の影響については、菌体生成及び *trans-p*-menthane-1-ol の生成共に、容量に反比例して低下したが、これは培養液への酸素の溶解込みが低下したことがその原因と推定される。

化学的因子に関しては、初発基質濃度の影響については、*p*-menthane の増加に比例して菌体生成は増大されたが、*trans-p*-menthane-1-ol の生成は逆に低下し、基質阻害が生じることが分かった。

炭素源の添加の影響については、グルコースとガラクトースを除く全ての糖では菌体生成は促進されたが、*trans-p*-menthane-1-ol の生成に対しては、全ての糖で低下傾向を示したことから、*p*-menthane と比較して菌体生成に好ましいと想定される炭素源の存在はその菌体生成への利用を優先した結果として、*p*-menthane と比べて *trans-p*-menthane-1-ol の生成が低下したものと推定される。

窒素源の影響については、菌体生成においては、

アンモニア態窒素を有する塩化アンモニウムと硫酸アンモニウムが対照の硝酸アンモニウムと比較してそれぞれ 167, 292%と顕著に増加したが、それ以外はいずれも対照よりも僅かに低下した。一方、*trans-p*-menthane-1-ol 生成に関しては、アンモニア態窒素と硝酸態窒素を併せ持つ対照の硝酸アンモニウムが最も高い*trans-p*-menthane-1-ol 生成を示し、それ以外のすべての窒素源は対照と比較して著しく低下した。この原因についても今後詳細に検討したい。

金属イオンの影響については、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} の除去は、菌体生成をむしろ増大させたが、 Mg^{2+} の除去は著しい菌体生成を低下させた。*trans-p*-menthane-ol の生成に対してはどの金属イオンの除去でも *trans-p*-menthane-1-ol 生成の著しい低下を引き起こし、特に Mg^{2+} の除去は *trans-p*-menthane-1-ol の生成がほぼ停止された。当該菌による *p*-menthane から *p*-menthane-1-ol への水酸化には所謂、酸素添加酵素(5, 6)が関与しているものと推定されるが、これらの酸素添加酵素はいずれもその水酸化酵素反応に補欠因子として Mg^{2+} を必須としている事実とよく一致している。

今回の研究において、当該菌による *p*-menthane から *trans-p*-menthane-1-ol への生産収量とモル変換効率は最大で 23.6 と 21.2%と算出された。今回の研究では、各種の化学的及び物理的因子の単独での影響について調べたが、*p*-menthane から *trans-p*-menthane-1-ol へのより高い変換効率を目指したこれらのパラメーターの組み合わせによる最適条件の探索が将来望まれる。

当該菌の基質特異性については、当該菌のモノテルペンアルコール類に対する基質特異性は比較的狭く、生成物の *trans-p*-menthane-1-ol さえも利用できず、tetrahydroperillyl alcohol と citronellol だけが唯一の炭素源として利用可能で、citronellol からは主要代謝産物として citronellic acid が生成されたのに対して tetrahydroperillyl alcohol からは全く代謝産物が認め

られず短時間に完全に消費されることが分かった。
citronellol は直鎖状のモノテルペンアルコールでその末端の水酸基は容易に酸化された後、 β -酸化で炭素源として利用されていくものと推定された。一方、tetrahydroperillyl-alcohol については、何一つ代謝産物が見当たらないことからどのような代謝経路を経て利用されるのか今回は不明であるが、いずれにしても非常に素早く代謝利用されるものと推定される。その詳細な代謝経路の解明は今後の課題である。

5. 謝辞

筆者らは、*p*-menthane とモノテルペンアルコールの標準品並びにそれらのガスクロマトグラフのデータの提供に対して日本テルペン化学株式会社に感謝します。

引用文献

- Tamamura Y, Kamegai M, Kanamasa S, Ishida Y, Wada T. and Tsukamoto Y. Production Condition of trans-*p*-Menthane-1-ol from *p*-Menthane by *Pseudomonas nitroreducens* p7 and Substrate Specificity of *P. nitroreducens* p7. 生物機能開発研究所紀要, 17, 61-72 (2017).
- Tsukamoto Y, Nonomura S, Sakai H. and Tatsumi C. Microbiological oxidation of *p*-menthane 1. Formation of cis-*p*-menthane-1-ol, *Proc. 18th TEAC*, 24-26 (1974).
- Tsukamoto Y, Nonomura S. and Sakai H. Formation of cis-*p*-Menthane-1-ol from *p*-Menthane by Microbial Hydroxylation. *Agric. Biol. Chem.*, 39, 617-620 (1975).
- Noma Y. Microbial production of mosquitocidal (1R,2S,4R)-(+)-menthane-2,8-diol. In: *Aromatic Plants from Asia their Chemistry and Application in Food and Therapy*, L.Jiarovetz, N.X.Dung and V.K.Varshney, 169-186, Deharadun: Har Krishan Bhalla & Sons (2007).
- Carmen, G., and Hancu, G.: Antimicrobial and antifungal activity of *Pelargonium roseum* essential oils. *Adv. Pharm. Bull.*, 4, 511-514 (2014).
- Popovic, V.B. Petrovic, S.D., Milenkovic, M.T., Drobac, M.M., Couladis, MA., and Niketic, M.S.: *Chem. Biodivers.*, 12, 170-177 (2015).
- Omori, T., Abe, M., and Iwata, K.: Japan Kokai Tokyo Koho, 67000 (Oct. 22, 2012).
- Nomura, R., Kaneno, K., Kito, A., and Kanzaki, Y.: Japan Kokai Tokkyo Koho, 192401 (Sep. 29, 2011).
- Higashidaira, M., Otani, T., Kataoka, M., Hirasawa, K., Kosaka, S., and Uchida, N.: Japan Kokai Tokkyo Koho, 138704 (Jul. 14, 2011).
- Yamamoto, S., Yasumura, T, Morishita, N., and Ochiai, N.: Japan Kokai Tokkyo Koho, 60752 (Mar. 24, 2011).
- Yasutomi, Y., Morota, K., Yamanaka, I., and Takahashi, H.: Japan Kokai Tokkyo Koho, 200009 (Sep. 3, 2009).
- Yasutomi, Y., Morota, K., Yamanaka, I., Takahashi, H, and II, T.: Japan Kokai Tokkyo Koho, 282763 (Nov. 20, 2008).
- Yasutomi, Y., Morota, K., Takahashi, H., and I,I T.: Japan Kokai Tokkyo :Koho, 116083 (May. 10, 2007).
- Ikeda, H., Sugiura, T., and Sugimura, K.: Japan Kokai Tokkyo Koho, 134726 (May. 25, 2005).

Kunihiro, Y., and Iwasaki, S.: Japan Kokai Tokkyo Koho, 197079 (Jul. 21, 2005).

Kunihiro, Y., Yonezawa, M., and Iwasaki, S.: Japan Kokai Tokkyo Koho, 26217 (Jan. 27, 2005).

Miyazaki, S., Inoue, K., and Saito, K.: 228319 (Aug. 12, 2004).

Title : Production conditions of trans-*p*-menthane-1-ol from *p*-menthane by *Pseudomonas nitroreducens* p7 and substrate specificity of *P. nitroreducens* p7

Author(s): Tomohiro Tamamura, Masayuki Kamegai, Shin Kanamasa, Yasuyuki Ishida, Toshio Wada, Yoshinori Tsukamoto

Address(es): College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

Keywords : *p*-menthane; trans-*p*-menthane-1-ol; *Pseudomonas nitroreducens*; production condition; substrate specificity