

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭60-199388

⑬ Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公開 昭和60年(1985)10月8日
C 12 P 7/42		8213-4B	
		7732-4B	
//(C 12 P 7/42		8213-4B	
C 12 R 1:06)		6760-4B	
(C 12 P 7/42		8213-4B	
C 12 R 1:72)		6760-4B	審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 D-バント酸塩または/およびD-バントラクトンの製造方法

⑯ 特 願 昭59-55398

⑰ 出 願 昭59(1984)3月22日

⑱ 発 明 者 山 田 秀 明 京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1  
 ⑲ 発 明 者 清 水 昌 京都市中京区西ノ京伯楽町14  
 ⑲ 発 明 者 畑 啓 之 加古川市上荘町国包189-1  
 ⑳ 出 願 人 製鉄化学工業株式会社 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

明 細 書

1. 発明の名称

D-バント酸塩または/およびD-バントラクトンの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) L-バント酸塩または/およびL-バントラクトンをアルスロバクター属、アシネトバクター属、およびキャンディダ属に属する微生物よりなる群より選ばれた、少なくとも1種の微生物により処理した溶液のpHを下げることを特徴とするD-バント酸塩または/およびD-バントラクトンの製造方法。

(2) 前記溶液にグルコース、シュークロース、ソルビトール、フラクトース、キシロースよりなる群より選ばれた、少なくとも1種の糖を添加する特許請求の範囲(1)記載の方法。

(3) 前記溶液にアルコール類を添加する特許請求の範囲(1)記載の方法。

(4) 前記溶液にムコール属、リゾプス属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、フザリウム属、ジベレラ属、グリオクラジウム属、オーレオバシジウム属、フィトフトラ属、シリニドカルボン属、ビンクラミス属、ピチア属、ハンセヌラ属、シュバニオマイセス属、デバリオマイセス属、スロボロマイセス属、サッカロマイセス属、クリプトコッカス属、トルロブシス属、キャンディダ属、トルラ属、ロドトルラ属、シゾサッカロマイセス属、シテロマイセス属、エンドマイコブシス属、トラメテス属、ビシノボラス属、アグロバクテリウム属、ユリネバクテリウム属、エアロバクター属、アクロモバクター属、プレバクテリウム属、シュードモナス属、キサントモナス属、マイコバクテリウム属、セラチャ属、アシネトバクター属に属する微生物よりなる群より選ばれた少なくとも1種の微生物を加える特許請求の範囲(1)記載の方法

3. 発明の詳細な説明

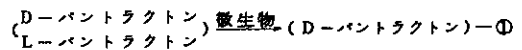
本発明はD-バントラクトン<sup>塩</sup>または/およびD-バントラクトンの製造方法に関する。

D-バントラクトンはバントテン酸、C<sub>6</sub>A等の重要な合成中間体であり、従来化学的に合成されたDL-バントラクトンを光学分割することにより得られる。しかしながらこの分割にはキニーネ、ブルシン等の高価な有機塩基が必要であることや、残りのL-バントラクトンをアルカリ性下加熱処理してラセミバントラクトンとする必要があった。そこで本発明者らはラセミバントラクトンよりD-バントラクトンを得る方法について鋭意検討を加え、微生物の有する立体選択性を利用してL-バントラクトンまたは、DL-バントラクトンよりD-バントラクトンを得る方法を開発した。すなわち本発明者らは広範なスクリーニングの結果、L-バントラクトンのみを特異的に変化させて、D-バントラクトンを与える菌体を見出し、さらにこれら菌体の少なくとも1種で処理した溶液のpHを下げることにより高い収率で目的物を得る

ことを知り本発明を完成した。

すなわち、本発明の要旨はL-バントラクトンまたは/およびL-バントラクトンをアルスロバクター属、アシネトバクター属およびキャンディダ属に属する微生物よりなる群より選ばれた、少なくとも1種の微生物により処理した溶液のpHを下げることを特徴とするD-バントラクトンまたは/およびD-バントラクトンの製造方法である。

本発明は次式①で示すことができる。



本発明の一例を説明すると、例えばグリセロール1.0%、ペプトン1.5%、酵母エキス0.3%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%、NaCl 0.2%およびL-バントラクトン0.5%からなるpH7の液体培地5mlに斜面培地からAcinetobacter calcoaceticus (IFO 13006)の菌を1白金耳量接種し、28℃で4日間、回転振盪機上で好氣的に培養した。このとき若干のD-バントラクトンも系内に

生じているが、さらにpHを2~6へと変化させることにより高い収率でD-バントラクトンを得ることができる。このとき、グルコース、シュークロース、ソルビトール、フラクトース、キシロース、グリセロール等の糖や、その他のエネルギー源、例えばアルコールや酸類等を加えても高い収率でD-バントラクトンを得ることができる。さらに他の属に属する菌との組み合わせも良い結果が得られる。同様に培養液から取り出した菌体を用いて反応を行なった場合にも良い収率でD-バントラクトンが得られる。この場合も反応系のpHを変化させる方法、種々の糖を加える方法および他の属に属する菌と組み合わせて使用する方法が良い結果を与える。

反応には、通常リン酸カリ緩衝液、クエン酸ナトリウム緩衝液、トリス緩衝液等を用いるが、これに限定されるものではない。緩衝液を用いないときや、緩衝液濃度が薄いときには、反応が進むに従い自動的にpHが変化し、D-バントラクト

ンを良い収率で与える場合が多い。

菌の培養条件は使用する菌株により多少異なるが、一般的に言えば炭素源としてグルコース、フラクトース、シュークロース、マルトース等の糖質、窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、アミノ酸、ペプトン、カザミノ酸、コーンステープリッカー、ふすま、米ぬか、酵母エキス等、無機塩類として硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム等、他の栄養源として麦芽エキス、肉エキス、ファーマメディア等を含む培地が用いられるが、これに限定されるものではない。この培地に菌株を接種し、好氣的または嫌氣的に培養する。培養温度は15~60℃が好ましく、さらに好ましくは20~40℃である。通常2~6日の培養で菌を生育させる。

最初にアシネトバクター属、アルスロバクター属または/およびキャンディダ属に属する菌を生育させる。基質のL-バントラクトンまたはDL

ーパントラクトンは最初から加えても良いし、数日に分けて添加する方が良い結果を与える場合もある。さらに培養液から取り出した菌体とパントラクトンの混合により反応を行なわせたり、acetone powder や dry cell に処理した菌体を用いたり、場合によっては界面活性剤を添加する方法が良いD-パントラクトン収率を与える場合もある。基質のパントラクトンは、固体または水溶液あるいは、そのナトリウム塩等の形で添加する。得られた反応液は遠心分離により菌体を取り除いたのち塩酸処理をほどこしてパント酸あるいはケトパント酸をパントラクトンあるいはケトパントラクトンへ $\gamma$ 環化し、ケトパントラクトンの生成量およびパントラクトン中のD-パントラクトンの割合をガスクロマトグラフィーで分析した。D-パントラクトンの割合は、D-パントラクトンをD-クロロ炭酸メンチルによりジアステレオマーとしたのち、ガスクロマトグラフィーで分析することにより求めた。(Anal. Biochem., 112,

9-16 (1981))

次に本発明を実施例により説明する。

## 実施例 1.

グリセロール1%、ペプトン1.5%、酵母エキス0.3%、 $K_2HPO_4$  0.3%、NaCl 0.2%およびL-パントラクトン0.5%よりなる液体培地をpH 7.0とし、内径1.4cm、長さ16cmの試験管に分注し、オートクレーブ中で121℃で15分間加熱滅菌した。ここに斜面培地から第1表に示す種菌を1白金耳量接種し、28℃で好氣的に4日間培養した。(培養液A)このようにして得られた培養液を6N HClによりpH 4.0とし、さらに2日間28℃で振盪を続け第1表の結果を得た。

第 1 表

菌番号	菌名	収率(%)		
		D-パントラクトン	L-パントラクトン	ケトパントラクトン
IFO 12552	アシネトバクター・カルコアセチカス	64.4	31.2	4.4
IFO 13006	アシネトバクター・カルコアセチカス	61.4	29.9	8.7
IFO 3530	アルスロバクター・シンプレックス	70.0	23.7	6.3
IFO 12961	アルスロバクター・アレグネス	72.6	21.3	6.1

## 実施例 2

実施例 1. で菌株としてアルスロバクター・シンプレックス (IFO 3530) を用いて得られた培養液 A に、3%濃度となるように第 2 表に示す糖質を加え、さらに 2 日間 28℃ で振盪を続け、第 2 表の結果を得た。

第 2 表

糖質	収率(%)		
	D-パントラクトン	L-パントラクトン	ケトパントラクトン
グルコース	74.2	11.1	14.7
シュクロース	40.7	13.6	45.7
ソルビトール	68.8	11.8	19.4
フラクトース	72.7	15.1	12.2
キシロース	61.8	14.1	24.1
グリセロール	48.3	16.9	34.8
無添加	24.2	19.8	56.0

## 実施例 3.

糖質を加えると同時に、6N HCl で pH を 4 とした以外は、実施例 2 と同様にしない第 3 表の結果を得た。

第 3 表

糖質	収率(%)		
	D-パントラクトン	L-パントラクトン	ケトパントラクトン
グルコース	79.1	8.2	9.8
シュクロース	51.0	9.3	39.7
ソルビトール	74.8	11.1	14.1
フラクトース	76.0	13.7	10.3
キシロース	70.7	9.9	19.4
グリセロール	57.3	11.0	31.7
無添加	38.3	11.3	50.4

## 実施例 4.

実施例 1. と同様にして得られたアシネトバクター・カルコアセチカス (IFO 13006) とアルスロバクター・シンプレックス (IFO 3530) の培養液 A に、pH 6 に調整したグルコース 5% と コーンステープリッカー 5% の系 5 ml 中で 28℃ で 2 日間振盪培養したのち集菌した第 4 表に示す菌体を添加し、さらに 28℃ で 2 日間振盪して第 4 表の結果を得た。

第 4 表

アシネトバクター・カルコアセチカス (IFO 13006)

加えられた菌体	収 率 (%)		
	D-パントラクトン	L-パントラクトン	ケトパントラクトン
ロドトルラ・ミスダ (IFO 0932)	70.8	24.0	5.2
スゴロロマイセス・ホルサチカス (IFO 1032)	72.5	24.5	3.0
キャンディダ・パラブシロシス (IFO 0708)	75.9	20.4	3.7
アスペルギルス・ニガー (IFO 4343)	77.0	18.9	4.1
無 添 加	17.1	25.3	57.6

アルスロバクター・シンプレックス (IFO 3530)

加えられた菌体	収 率 (%)		
	D-パントラクトン	L-パントラクトン	ケトパントラクトン
ロドトルラ・ミスダ (IFO 0932)	70.2	26.9	2.9
スゴロロマイセス・ホルサチカス (IFO 1032)	75.0	20.1	4.9
キャンディダ・パラブシロシス (IFO 0708)	73.2	24.5	2.3
アスペルギルス・ニガー (IFO 4343)	75.9	20.0	4.1
無 添 加	17.8	30.9	51.3

え、さらに2日間 28℃で振盪した。反応液を分析し、第6表の結果を得た。

第 6 表

菌番号	菌名	収 率 (%)		
		D-パントラクトン	L-パントラクトン	ケトパントラクトン
IFO 12552	アシネトバクター・カルコアセチカス	84.8	11.6	3.6
IFO 13006	アシネトバクター・カルコアセチカス	87.4	10.1	2.5
IFO 3530	アルスロバクター・シンプレックス	78.1	17.9	4.0
IFO 12961	アルスロバクター・アレゲネス	83.0	15.2	1.8

実施例 7.

実施例 6.と同様にして得たアシネトバクター・カルコアセチカス (IFO 13006) の菌体を用いて反応を行なった。反応は L-パントラクトンのかわりに L-パントラクトンナトリウム 0.13g を添加し、さらに 1M のリン酸二水素カリウム水溶液 0.5 ml と同時に 3% に相当するグルコースを加えた以外は、実施例 6.と同様に行なった。反応液中の収

実施例 5.

グルコース 5%, コーンステアブリッカー 5% および L-パントラクトン 0.5% よりなる pH 6 の培地を用いた以外は、実施例 1.と同様に行ない第 5 表の結果を得た。

第 5 表

菌番号	菌名	収 率 (%)		
		D-パントラクトン	L-パントラクトン	ケトパントラクトン
IFO 0587	キャンディダ・トロピカリズ	56.8	39.8	3.4
IFO 1403	キャンディダ・トロピカリズ	59.3	33.9	6.8

実施例 6.

最初の培地に加える L-パントラクトンの量を 0.1% としたほかは、実施例 1.と同様にして得られた培養液 A より遠心分離で得た菌体を用いて反応を行なった。得られた菌体に L-パントラクトン 0.1g と pH 7 の 0.05M リン酸カリ緩衝液 4.8ml を加え 28℃ で 4 日間振盪した。得られた反応液に 1M のリン酸二水素カリウム水溶液を 0.5 ml 加

率は D-パントラクトン 89.2%, L-パントラクトン 10.4% およびケトパントラクトン 0.4% であった。

実施例 8.

スケールを 20 倍とした以外は、実施例 7.と同じ方法で操作を進めた。得られた反応液中の収率は、D-パントラクトン 92.3%, L-パントラクトン 7.4% およびケトパントラクトン 0.3% であった。反応液より菌体を遠心分離で除去したのち上清液を硫酸酸性とし、沸騰浴中で 15 分間加熱し、ラクトン化した。この溶液を苛性ソーダ水溶液で pH 7.3 に調整し、ただちに同容量のクロロホルムで 3 回抽出した。この抽出液を乾固すると D-パントラクトンの粗結晶 1.67g が得られた。さらにジエチルエーテルと石油エーテルからなる混合溶媒で再結晶すると精結晶 1.38g が得られた。この結晶の水溶液中での比旋光度は  $[\alpha]_D^{20} = -50.0^\circ$  であった。

実施例 9.

実施例 6.と同様にして得られたアシネトバクテ  
ー・カルコアセチカス (IFO 13006) の菌体  
を用いて反応を行なった。得られた菌体に DL-  
バントラクトン 0.2 g と pH 7 の 0.05 M リン酸カリ  
緩衝液 4.7 ml を加え、28℃ で 4 日間振盪した。  
得られた反応液に 1 M のリン酸二水素カリウムお  
よび 2% 濃度になるようにグルコースを加え、さ  
らに 2 日間 28℃ で振盪した。反応液中の収率は  
D-バントラクトン 93.7%, L-バントラクトン  
5.9% および ケトバントラクトン 0.4% であった。

#### 実施例 10.

グルコースに加えて、pH 6 に調整したマルト  
ース 5% および肉エキス 5% の系 5 ml 中で 28℃,  
2 日間振盪培養したのち集菌したキャンディダ・  
バンプシロシス (IFO 0708) の菌体を用いた以  
外は、実施例 9.と同様に行なった。反応液中の収  
率は、D-バントラクトン 97.2%, L-バントラ  
クトン 2.8% および ケトバントラクトン 0% であ  
った。

#### 実施例 11.

実施例 6.と同様にして得られたアシネトバクテ  
ー・カルコアセチカス (IFO 12552) の菌体  
を用いて反応を行なった。得られた菌体に DL-  
バントラクトン 0.2 g と 0.05 M のリン酸一水素  
カリウム 4.7 ml を加え、28℃ で 4 日間振盪した。  
この溶液に 1 M のリン酸二水素カリウムおよび 2  
% 濃度になるようにグルコースを加え、さらに 2  
日間 28℃ で振盪した。反応液中の収率は、D-  
バントラクトン 99.6%, L-バントラクトン 0.1%  
および ケトバントラクトン 0.3% であった。

#### 実施例 12.

実施例 6.と同様にして得られたアシネトバクテ  
ー・カルコアセチカス (IFO 12552) の菌体  
を用いて反応を行なった。得られた菌体に DL-  
バントラクトン 0.2 g と水 4.7 ml を加え、28℃ で  
4 日間振盪した。反応液中の収率は、D-バント  
ラクトン 83.4%, L-バントラクトン 12.8% およ  
び ケトバントラクトン 3.8% であった。