

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-293386

⑬ Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公開 昭和61年(1986)12月24日
C 12 P 7/50		8213-4B	
		7823-4B	
/(C 12 P 7/50			
C 12 R 1:365)			
(C 12 P 7/50			
C 12 R 1:01)			
(C 12 P 7/50			
C 12 R 1:32)			
(C 12 P 7/50			
C 12 R 1:465)			

審査請求 未請求 発明の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 D-パント酸塩または/およびD-パントラクトンを製造する方法

⑯ 特 願 昭60-136385

⑰ 出 願 昭60(1985)6月21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

⑳ 発 明 者 畑 啓 之 加古川市上荘町国包189-1

㉑ 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-パント酸塩または/およびD-パントラクトンを製造する方法

2. 特許請求の範囲

(1) L-パント酸塩または/およびL-パントラクトンを微生物を用いて酸化することを特徴とするD-パント酸塩または/およびD-パントラクトンの製造方法。

(2) L-パント酸塩または/およびL-パントラクトンがD-L-パント酸塩または/およびD-L-パントラクトンに含まれるものである特許請求の範囲(1)記載の方法。

(3) 微生物が、ノカルディア(Nocardia)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、ノカードイオアイデス(Nocardioideis)属、マイコバクテリウム(Mycobacterium)属、ストレプトスプランギウム(Streptosprangium)属、ストレプトマイセス

(Streptomyces)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)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種の微生物である特許請求の範囲(1)記載の方法。

(4) 微生物を用いて酸化する際に、培養液を用いる特許請求の範囲(1)記載の方法。(培養法)

(5) 微生物を用いて酸化する際に、培養液より分離した菌体を、新たに調製した基質溶液に添加する特許請求の範囲(1)記載の方法。(菌体法)

(6) 微生物を用いて酸化する際のpHを5~10とする特許請求の範囲(1)記載の方法。

(7) 培地にポリオールを加えて培養する特許請求の範囲(1)記載の方法。

(8) 基質溶液にポリオールを加える特許請求の範囲(5)記載の方法。

(9) ポリオールが、1, 2-プロパンジオールである特許請求の範囲(7)または(8)記載の方法。

(10) L-パント酸塩または/およびL-パントラクトンを微生物を用いて変換することを特徴と

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。

(4) L-バント酸塩または／およびL-バントラクトンがD-バント酸塩または／およびD-バントラクトンに含まれるものである特許請求の範囲(4)記載の方法。

(5) 微生物が、ノカルディア(Nocardia)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、ノカーディオアイデス(Nocardioideis)属、マイコバクテリウム(Mycobacterium)属、ストレプトスプランギウム(Streptosprangium)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)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種の微生物である特許請求の範囲(5)記載の方法。

(6) 微生物を用いて変換する際に、培養液を用いる特許請求の範囲(6)記載の方法。(培養法)

(7) 微生物を用いて変換する際に、培養液より分離した菌体を、新たに調製した基質溶液に添加

する~~ことを特徴とする~~特許請求の範囲(7)記載の方法。(菌体法)

(8) 微生物を用いて変換する際のpHが6~10である特許請求の範囲(8)記載の方法。

(9) 培地にポリオールを加えて培養する特許請求の範囲(9)記載の方法。

(10) 基質溶液にポリオールを加える特許請求の範囲(10)記載の方法。

(11) ポリオールが、1, 2-プロパンジオールである特許請求の範囲(11)または(12)記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

[発明の目的]

本発明は、L-バントラクトンよりケトバントラクトンを経て、D-バントラクトンを製造する方法に関する。

(産業上の利用分野)

D-バントラクトンは、バントテン酸、CoA等の重要な合成中間体である。

(従来の技術)

(発明が解決しようとする問題点)

ケトバントラクトンは不斉還元によりバントテン酸、CoA等の重要な合成中間体であるD-バントラクトンへと導かれる。従来、ケトバントラクトンは化学的に合成されたD-L-バントラクトンを臭素あるいは、次亜塩素酸カルシウム等の酸化剤を用いて化学的に合成される。しかしながらこの方法では、酸化剤が高価であったり、バントテン酸、CoA等の出発原料であるD-バントラクトンも同時に酸化されたりするため良い方法とはいえない。

一方、D-バントラクトンは(1)化学的に合成されたD-L-バントラクトンより光学分割剤を用いてD-体のみを取り出す方法。(2)ケトバントラクトンをキラールナリガノドを持つロジウム触媒で不斉還元する方法が知られているが(1)ではキニーネ、プルシン等の高価な分割剤が必要であること。(2)では高価な触媒を多量に用いねばならないこと、水系加圧下の反応であるため取扱いが厄介である

こと等の欠点があった。

本発明者らは工業的に有利な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を種々検討した。

即ち、微生物の有する立体選択性に着目し、L-バントラクトンのみを酸化してケト体を与える菌株を探索し、スクリーニングの結果、特定の菌株がL-バントラクトンのみをケトバントラクトンへ導くことを見出した。(特願昭59-56397, 特願昭60-84775)

この発明の菌株を用いてD-L-バントラクトンまたはL-バントラクトンを酸化すれば、D-バントラクトンは何ら変化することなく、L-バントラクトンだけがケトバントラクトンに変化する。

さらに微生物菌体の還元力を利用して、ケトバント酸あるいは、その塩またはケトバントラクトンをD-バント酸あるいは、その塩または／およびD-バントラクトンに有利に導き得ることを見出し、さきに特許出願した。(特開昭59-25690)

菌を培養した培養物、培地または菌体懸濁液あるいは培養液より取出した菌体にケトパントラクトンを固体のまま加えるか、あるいは水溶液として添加する。この際、ケトパントラクトンはその開環体と平衡的に存在する。この開環体が微生物により立体特異的に還元されるとD-パント酸塩となる。またケトパントラクトンが直接立体特異的に還元されるとD-パントラクトンとなる。ここでD-パント酸塩とD-パントラクトン間にも平衡が存在し、D-パントラクトンのみを得たいときは酸性化すると閉環がおこりD-パント酸塩がD-パントラクトンとなる。

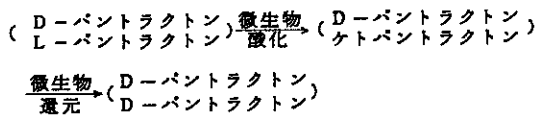
しかしながら、この方法では酸化反応と還元反応で用いる微生物が異なるために、2度の微生物的処理が必要であった。必然的に培養費用および工程数が増え、まだまだ経済的な方法とはいえなかった。

〔発明の構成〕

本発明の要旨は、L-パント酸塩または/および

ラクトンだけがケトパントラクトンに変化する。得られたケトパントラクトンは、微生物学的な還元をほどこせば容易にD-パントラクトンとなり(特開昭59-25690参照)結果的にDL-パントラクトンからD-パントラクトンが得られることになる。

即ち、本発明は次式で表わすことができる。



さらに本発明者らは、上述の酸化能力と還元能力を同時に合わせ持つ菌株を広くスクリーニングにより求めた。その結果、放線菌、細菌中に目的とする菌株を見出し、即ちこの菌株を用いると酸化および還元能力を同時に合わせもつので、同一系内においてL-パントラクトンより、D-パントラクトンへの変換を一挙に行なうことができる。本発明の方法に用いる微生物は、ノカルディア

びL-パントラクトンを、微生物を用いて酸化することを特徴とするケトパント酸塩または/およびケトパントラクトンの製造方法であり、さらにこれを微生物を用いて還元することを特徴とするD-パント酸塩または/およびD-パントラクトンの製造方法である。

前者の場合、生成したケトパントラクトンを従来公知の方法で還元することもできるが、後者の方法によると、L-パント酸塩または/およびL-パントラクトンを出発原料として同一の微生物を用いて同一系内で酸化と還元を行ないD-パント酸塩または/およびD-パントラクトンを得ることができ、一度の微生物的処理で済むのでより好ましい。

(問題点を解決するための手段)

(作用)

本発明の菌株を用いてDL-パントラクトンまたはL-パントラクトンを酸化すれば、D-パントラクトンは何ら変化することなく、L-パント

(Nocardia)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、ノカルディオアイデス(Nocardioideus)属、マイコバクテリウム(Mycobacterium)属、ストレプトスプランギウム(Streptosprangium)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)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種の微生物であり、さらにこれらの菌株については、酸化反応と並行してケトパントラクトンのD-パントラクトンへの還元反応も同時に起っていることがわかった。

菌の培養条件は使用する菌株により多少異なるが、一般的にいえば炭素源としてグルコース、フラクトース、シェークロース、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、硝酸カリウム、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、フーマメディア等を含む培地を用いられるが、これらに限定されるものではない。

本発明者らは、1,2-プロパンジオール等の天然にはまれな型のポリオールを培地や反応系に添加すると菌体の酸化活性が向上することを見い出した。ここに添加するポリオールは菌体の活性を高めさえすれば、1,2-プロパンジオール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。培養に適した温度は15~60℃、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が、基質のペントラクトンは培養初期から加えても良いし、数回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ペ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、界面活性剤を添加する方法が良い結果を与える場

合もある。

破砕菌体や固定化菌体を用いてもよく、また変異処理により高い活性が得られる場合もある。

基質のペントラクトンは、固体または水溶液あるいは、そのナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩等の形で添加する。

前記、培養法または菌体法を用いて、基質を交換する時のpHは6~10の範囲が良く、さらに好ましくは7~8の範囲に維持すると良い結果が得られる。この際、必要に応じて塩酸、硫酸等の酸や、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等の塩基でpH調整をすると好結果が得られる。

例えば、本発明の実施態様の一例を説明するとペプトン 1.5%、酵母エキス 0.3%、肉エキス 1%、 K_2HPO_4 0.3%、NaCl 0.2%および1,2-プロパンジオール 1.5%からなる液体培地 5 ml に斜面培地からノカルディア アステロイデス(IFO3384)の菌種を1白金耳量接種し、28℃で2日間、回

転振盪機上で好氣的に培養した。このようにして得られた培養液は、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ペントラクトンあるいはペントラクトンへと環化し、ペントラクトン中のD-ペ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-ペントラクトンの割合は、DL-ペントラクトンをD-クロル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。^{マクニカルバイオケミストリー}(Anal. Biochem), 112, 9-16(1981)

本発明の方法において添加できるL-ペントラクトンまたはDL-ペントラクトンの濃度は通常1~10%の範囲が適当である。濃度が高いときには、ペントラクトンが良い収率で生ずる。

また、濃度が低く、菌体量を多くし処理時間を長くすると生じたペントラクトンが、さらに還元されて好収率でD-ペントラクトンに交換さ

れる。

次に、本発明の製造方法の具体例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-ペントラクトン 0.5%よりなる液体培地をpH 7.0とし、内径 1.4 cm、長さ 16 cm 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表に示す菌種を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。このようにして得られた培養液を所定の方法で分析し、第1表の結果を得た。生成ペントラクトン以外は、ペントラクトンである。ペントラクトン中のD-ペントラクトンの割合はD-ratio(%)で示した。

第 1 表

菌 名	ケトペントラクトン 収 率 (%)	D-ratio (%)
ノカルディア アステロイデス IFO3384	51.6	36.8
ロドコッカス エリスロポリス IFO12320	52.4	44.1
ノカルディアオアイデス アルプス IFO13917	56.6	36.0
マイコバクテリウム アビウム IFO3082	50.6	42.9
ストレプトスプランギウム ロゼウム IFO3776	41.5	44.8
ストレプトマイセス フラディアエ IFO3360	42.3	39.0
コリネバクテリウム イクイ IAM1038	49.5	47.4

実施例 2

L-ペントラクトンを含まない実施例 1 の液体培地を用いた。斜面培地から第 2 表に示す種菌を

実施例 3

グルコース 4%、ポリペプトン 1%、酵母エキス 0.5%、リン酸二水素カリウム 0.5% および硫酸マグネシウム 0.2% よりなる pH 7 の培地を用いた以外は、実施例 2 と同様に行ない第 3 表の結果を得た。

第 3 表

菌 名	ケトペントラクトン 収 率 (%)	D-ratio (%)
ノカルディア アステロイデス IFO3384	49.9	32.3
ロドコッカス エリスロポリス IFO12320	45.2	39.1
コリネバクテリウム イクイ IAM1038	55.6	42.2

実施例 4

1, 2-プロパンジオール 0.5% を培地に加え、た以外は、実施例 1 と同様に行ない第 4 表の結果

1 白金耳量接種し、28℃で2日間、回転振盪機上で好氣的に培養した。そこに 1 wt% となるように L-ペントラクトンを添加し、さらに4日間振盪を続け第 2 表の結果を得た。

第 2 表

菌 名	ケトペントラクトン 収 率 (%)	D-ratio (%)
ノカルディア アステロイデス IFO3384	47.5	37.2
ロドコッカス エリスロポリス IFO12320	45.7	35.0
ノカルディアオアイデス アルプス IFO13917	55.6	28.7
マイコバクテリウム アビウム IFO3082	55.1	34.8
ストレプトスプランギウム ロゼウム IFO3776	43.6	36.9
コリネバクテリウム イクイ IAM1038	45.8	43.8

を得た。

第 4 表

菌 名	ケトペントラクトン 収 率 (%)	D-ratio (%)
ノカルディア アステロイデス IFO3384	74.6	47.3
ロドコッカス エリスロポリス IFO12320	75.9	56.2
コリネバクテリウム イクイ IAM1038	72.6	55.5

実施例 5

実施例 4 の培地で2日間培養した菌体を用いて反応を行なった。即ち、遠心分離により得た試験管 2 本分 (5 ml × 2) の菌体に L-ペントラクトンを 0.1 g (2%)、0.2 M のリン酸カリ緩衝液 (pH 7.0) 5 ml を加え、4日間28℃で振盪した。この反応液を分析し、第 5 表の結果を得た。

第 5 表

菌 名	ケトパントラクトン 収 率 (%)	D-ratio (%)
ノカルディア アステロイデス IFO3384	85.9	62.2
ロドコッカス エリスロポリス IFO12320	88.4	67.0
コリネバクテリウム イクイ IAM1038	86.3	53.8

実施例 6.

ノカルディア アステロイデス (IFO3384) の菌体を用いて反応を行なった。反応時間を6日とした以外は、実施例5と同様である。分析の結果、反応液中にはケトパントラクトン、D-パントラクトンおよびL-パントラクトンがそれぞれ92.1%、7.0%および0.9%の収率で含まれた。

実施例 7.

実施例4と同様の方法で得た菌体を用いて反応

カリ緩衝液を含むpH8の液を用い、反応時間を2日とした以外は、実施例7と同様に行なった。反応液を分析するとケトパントラクトン、D-パントラクトンおよびL-パントラクトンがそれぞれ83.3%、7.5%および9.2%の収率で含まれていた。

実施例 10.

L-パントラクトンにかえて0.50gのDL-パントラクトンを用いた以外は、実施例9と同様に行なった。反応液を分析するとケトパントラクトン、D-パントラクトンおよびL-パントラクトンがそれぞれ40.6%、53.1%および6.3%の収率で含まれていた。

実施例 11.

ペプトン1.5%、酵母エキス0.3%、肉エキス1%、 K_2HPO_4 0.3%、NaCl 0.2%、1, 2-プロパンジオール1.5%よりなるpH7.0の液体培地にノカルディア アステロイデス IFO3384の種菌を接種し、28℃で2日間、回転振盪機上

を行なった。試験管2本分(5ml×2)のノカルディア アステロイデス (IFO3384)の菌体にL-パントラクトンを0.1g(2%)、0.2Mの K_2HPO_4 5mlを加え、4日間28℃で振盪した。この反応液を分析するとケトパントラクトン収率は100%であった。

実施例 8.

実施例2の培地で2日間培養したノカルディア アステロイデス (IFO3384)の菌体を用いて反応を行なった。試験管2本分(5ml×2)の菌体に1, 2-プロパンジオール0.05g(1%)、L-パントラクトン0.1g(2%)、0.2Mのリン酸カリ緩衝液(pH7)5mlを加え、28℃で4日間振盪した。分析の結果、反応液中にはケトパントラクトン、D-パントラクトンおよびL-パントラクトンがそれぞれ87.1%、7.5%および5.4%の収率で含まれた。

実施例 9.

L-パントラクトン0.25g、0.3Mのリン酸

で好氣的に培養した。この培養液より遠心分離により菌体を得た。この湿菌体2g、DL-パントラクトン0.8gおよび炭酸カルシウム0.1gよりなるpH7に調整した溶液10mlを28℃で2日間、回転振盪することにより反応を行なった。反応が進むと反応系のpHが低下するので、6時間毎にNaOH溶液でpH7に調整した。得られた反応液を分析すると、D-パントラクトン、L-パントラクトンおよびケトパントラクトンがそれぞれ57%、3%および40%収率で生じていた。

実施例 12.

DL-パントラクトンにかえて、L-パントラクトン0.8gを用いた以外は実施例11と同様に行なった。得られた反応液を分析すると、D-パントラクトン、L-パントラクトンおよびケトパントラクトンが18%、1%および81%収率で生じていた。

実施例 13.

菌株として、ロドコッカス エリスロポリス

IFO12540を用い、DL-パントラクトンにかえて、L-パントラクトン0.5gを用いた以外は実施例11.と同様に行なった。得られた反応液を分析すると、D-パントラクトン、L-パントラクトンおよびケトパントラクトンがそれぞれ32%、27%および41%収率で生じていた。

実施例14.

酵素反応時の菌体量を2倍とし、L-パントラクトン100mgを用い、反応時間を4日とした以外は実施例13.と同様に行なった。得られた反応液を分析するとD-パントラクトン、L-パントラクトンおよびケトパントラクトンがそれぞれ88%、3%および9%の収率で生じていた。

実施例15.

第6表にある菌株を用いた以外は、実施例14と同様に行ない第6表の結果を得た。

菌 名	収 率 (%)		
	D-PL	KPL	L-PL
ノカルディア アステロイデス IFO3384	81	19	0
ノカルディオアイデス アルプス IFO13917	68	27	5
マイコバクテリウム アビウム IFO3082	68	25	7
ストレプトスプランギウム ロゼウム IFO3776	60	28	12
ストレプトマイセス フラディアエ IFO3360	53	21	26
コリネバクテリウム イクイ IAM1038	63	23	14

実施例16.

L-パントラクトンにかえて、DL-パントラクトン100mgを用いた以外は実施例14.と同様に行なった。得られた反応液を分析するとD-パントラクトン、L-パントラクトンおよびケトパントラクトンがそれぞれ96%、1%および3%の収率で生じていた。

〔発明の効果〕

本発明を実施することにより、重要な中間体であるD-パントラクトンをL-パントラクトンから工業的に製造することができる。特に1種類の菌体で酸化と還元を同一系内で行なり方法は従来例の無い所であり、医薬業界に貢献する所大である。

出 願 人 製鉄化学工業株式会社

代 表 者 佐々木 浩

手続補正書 (自発)

昭和60年12月14日

特許庁長官 宇賀 道郎殿

1 事件の表示

昭和60年特許願第136385号

2. 発明の名称 D-パントラクトンまたは/および D-パントラクトンを製造する方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

〒675-01 (☎0794-37-2151)

住所 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

名称 製鉄化学工業株式会社

代表者 増田 裕治

4. 補正の対象 明細書

5. 補正の内容

(1) 明細書第12頁第15行「パントン」の前に以下の文を加入する。

「L-パントラクトン0.5%を含む」

以上

60.12.18

出願第三係
75