

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—25690

⑮ Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑯ 公開 昭和59年(1984)2月9日
C 12 P 7/26		6760—4B	
// C 12 R 1/025		6760—4B	発明の数 1
1/13		6760—4B	審査請求 未請求
1/15		6760—4B	
1/20		6760—4B	
1/265		6760—4B	
1/38		6760—4B	
1/425		6760—4B	
1/44		6760—4B	
1/64		6760—4B	
1/66		6760—4B ※	

(全 11 頁)

⑭ 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

京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19—1

⑰ 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

⑱ 特 願 昭57—136154

⑲ 出 願 昭57(1982)8月3日

⑳ 発 明 者 山田秀明

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

D—パント酸塩または / および D—パントラクトンの製造方法

2. 特許請求の範囲

α—ケトパント酸塩または α—ケトパントラクトンを、リゾプス属、アスペルギルス属、ピソクラミス属、オーレオパシジウム属、サツカロマイセス属、シソサツカロマイセス属、ビチア属、ハンセスラ属、エンドマイコプシス属、シテロマイセス属、デパリオマイセス属、スポロボロマイセス属、クリプトコッカス属、トルロブシス属、キャンディダ属、ロドトルラ属、トリコスボロン属、アグロバクテリウム属、エアロバクター属、アクロモバクター属、フラゴバクテリウム属、コリネバクテリウム属、スタブイロコッカス属、マイクロコッカス属、アルソロバクター属、セラチア属、プレビバクテリウム属、アシネトバクター属、シュードモナス属、キサントモナス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

B. 発明の詳細な説明

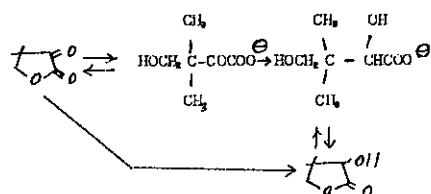
本発明は D—パント酸塩または / および D—パントラクトンの製造方法に関する。

D—パントラクトンはパントテン酸、C<sub>6</sub>A等の重要な合成中間体である。従来、D—パントラクトンは(1)化学的に合成された D—パ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)ケトパントラクトンをキラールなジカン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、ブ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、水素加圧下の反応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—パント酸塩または / および D—パントラクトンの製造方法を種々検討した。結果、微生物の有する還元力を利用して α—ケトパント酸あるいはその塩を

たはα-ケトパントラクトンをD-パント酸あるいはその塩または/およびD-パントラクトンに有利に導き得ることを見出し、本発明に至つた。

すなわち本発明は次式で示すことができる。



菌を培養した培養物、培地あるいは菌体懸濁液にα-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α-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α-ケトパントラクトンが直接還元されると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する。

ロル炭酸メンチルによりジアステレオマーとした後、GCで分析する方法(Anal. Biochem, 112, 9-16 (1981))を用いて、反応液中のパントラクトンのD, L体の比率を正確に求める方法により検討を進め、多数の菌が高い選択率でD-パントラクトンを生成することを見出し、本発明に至つた。

本発明の一例を説明すると、たとえば麦芽エキス5%、酵母エキス0.8%からなる液体培地5%に斜面培地から複菌を1白金耳量接種し、28℃、48時間、回転振盪機上で好氣的に培養した。この培養液に濃度が1wt%となるようにα-ケトパントラクトンを添加し、さらに28℃で48時間好氣的に回転振盪した。

このようにして得られた反応液は、遠心分離あるいは濾過により菌体を取り除いたのち塩酸処理をほどこし、パントラクトンの生成量およびそのD, L体の比率をGCで測定した。

この方法によつて探索した結果、D-パントラクトンを高選択率で与える微生物は、リゾツ

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。

微生物を用いるα-ケトパントラクトンよりD-パントラクトンへの合成は今までに数例報告されている。たとえばKuhn and Wieland (Ber. deut. chem. Ges., 75 B, 121-123)には酵母を用いて立体特異的に還元を行なつた記載があるが、これはUSP 8, 850, 750の中で追試して立体選択的に還元が進んだのではなく、再結晶の段階で高純度のD体になつたと結論していることから選択的に還元されたものではないといえる。また特公昭46-6896については、同じくUSP 8, 850, 750で、菌体により立体特異的に還元が進んだのか、分析までの工程でD選択率が向上したのか不明であると述べられている。さらにUSP 8, 850, 750においては特許となり得る菌は *Byssoschlamys fulva* 1株のみであつた。このような状況に鑑み、本発明者らは反応液中に生成したD-L-パントラクトンをD-ク

ブス属、アスペルギルス属、ピソクラミス属、オーレオパシジウム属、サツカロマイセス属、シゾサツカロマイセス属、ピチア属、ハンセセラ属、エンドマイコブシス属、シテロマイセス属、デバリオマイセス属、スポロボロマイセス属、クリプトコッカス属、トルロブシス属、キャンデイダ属、ロドトルラ属、トリコスボロン属、アグロバクテリウム属、エアロバクター属、アクロモバクター属、フラボバクテリウム属、コリネバクテリウム属、スタフィロコッカス属、ミクロコッカス属、アルスロバクター属、セラチア属、プレバクテリウム属、アシネトバクター属、シュードモナス属、キサントモナス属に属していることがわかつた。

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、シュクロース、マルトースなどの糖質、エタノール、プロパノールなどのアルコール類、炭化水素類、有機酸類など炭素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなど

のアンモニウム塩、硝酸カリウムなどの硝酸塩類、尿素、アミノ酸、ペプトン、ガザミノ酸、コーンステープリツカー、ふすま、米ぬか、酵母エキスなど、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など、他の栄養源として麦芽エキス、肉エキス、フアマメデア等を含む培地が用いられるが特に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、さらに好ましくは20~40℃である。また菌は通常24ないし48時間の培養で菌を生育させて後、基質の $\alpha$ -ケートパントラクトンを添加するが、 $\alpha$ -ケートパントラクトンを最初から加えてもよいし、数回に分けて添加する方がよい結果を与える場合もある。基質の $\alpha$ -ケート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、カリウム塩、アンモニウム塩などの形で添加する。一般に反応は基質添加後12~96時間回転振

盪下にて行なり。反応中の培養液のPHは菌体により多少異なり、カビ、酵母ではPH2~8が、細菌ではPH8~9が好ましい。

実施例1

麦芽エキス5%、酵母エキス0.8%からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液でPH5.0とし、80ml試験管に5mlずつ分注しオートクレーブ中121℃で15分間加熱滅菌した。ここに斜面培地から第1表に示す各種の種菌を1白金耳量接種し、28℃、48時間、回転振盪機上で好氣的に培養した。この培養液中の濃度が1wt%となるように $\alpha$ -ケートパントラクトンを添加し、さらに28℃で48時間好氣的に回転振盪した。このようにして得られた反応液を所定の方法で分析し、第1表を得た。生成パントラクトン以外は残存の原料 $\alpha$ -ケートパントラクトンである。D%は生成パントラクトン中の $\alpha$ -ケートパントラクトンのパーセントを示す。

第1表

菌番号	菌名	パントラクトン収率%	D%
IPO 5440	リゾツプス・オリサエ	45.0	97.7
IPO 4848	アスペルギルス・ニガー	74.9	91.8
IPO 4040	アスペルギルス・フィカタス	70.5	91.8
IPO 4801	アスペルギルス・ノランティカス	88.1	86.3
IPO 7901	ピソクラミス・フルバ	80.2	94.0
IPO 4465	オーレオウシディム・フルランス	75.4	86.0
IPO 0422	サツカロマイセス・フアメンタテイ	60.8	88.5
IPO 0259	サツカロマイセス・セネビシエ	34.4	92.5
IPO 0346	シゾリツカロマイセス・オシベ	82.8	97.2
IPO 0198	ビチア・フアリノサ	43.6	88.7
IPO 1026	ビチア・シユートリノモルファ	94.8	98.1
IPO 0569	ハンセスラ・アノマラ	92.6	87.3
IPO 0807	ハンセスラ・シルピコラ	69.9	89.8
IPO 0808	エンドマイコフシス・ピスタラ	55.1	98.0
IPO 1201	エンドマイコフシス・オペテンシス	68.5	86.4
IPO 0954	シテロマイセス・マトリテンシス	49.5	87.2
IPO 0794	テリオマイセス・ソシセル	95.6	92.1
IPO 1859	テリオマイセス・カステリ	98.7	86.6
IPO 1082	スピロトロマイセス・ホルサテイクス	97.6	91.4
IPO 0410	クリプトコッカス・ネオフオーマンス	78.8	87.0
IPO 0880	トルロフシス・キヤンデイダ	58.4	88.4
IPO 0741	トルロフシス・ピナス	82.5	89.0
IPO 0708	キヤンデイダ・ノラプシロス	77.7	93.4
IPO 0587	キヤンデイダ・トロピカリス	80.7	88.5
IAM 12247	キヤンデイダ・マルサヤ	92.2	86.8
IPO 0982	ロトセラ・テキセンシス	75.6	94.3
IPO 0700	ロトセラ・グレンシス	98.0	86.0
IPO 0748	トリコステロン・キヤビテイタム	89.7	87.7

実施例2

シユークロース5%、コーンステープリツカー8%、炭酸カルシウム1%からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液でPH7.0とし、80ml試験管に5mlずつ分注しオートクレーブ中121℃で15分間加熱滅菌した。ここに斜面培地から第2表に示す各種の種菌を1白金耳量接種し、

28℃、48時間、回転振盪機上で好氣的に培養した。この培養液中の濃度が1wt%となるようにα-ケトパントラクトンを添加し、さらに28℃で48時間好氣的に回転振盪した。このようにして得られた反応液を所定の方法で分析し、第2表を得た。生成パントラクトン以外は残存の原料α-ケトパントラクトンである。

第2表

菌番号	菌名	パントラクトン収率%	D%
IAM 1221	エプロバクター・クロアチエ	80.9	98.9
IFO 8055	セラチア・プリムチカム	82.5	99.8
IFO 8160	アクロモバクター・ポリモルフ	87.6	92.9
IFO 8752	フラバクトリウム・スアベロレンズ	84.2	96.2
IAM 1498	フラバクトリウム・フェルギネアム	80.8	98.8
IAM B-26-1	アグロバクテリウム・ツメファシエンス	75.6	98.5
IFO 13256	アグロバクテリウム・ラジホクター	69.8	98.2
IFO 8064	ミクロツカス・ルデウス	82.9	97.4

液でPH 5.0とし、500ml坂口フラスコに100ml分注し、オートクレーブ中121℃で15分間加熱滅菌した。ここに先程調整した種菌液を加え、28℃、48時間、回転振盪機上で好氣的に培養した。この培養液に1wt%となるようにα-ケトパントラクトンを加え、28℃で48時間、回転振盪機上で培養した。得られた培養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。この段階のU.C分析でパントラクトン78.1%、ケトパントラクトン21.9%であつた。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5回抽出した。この抽出液を乾固すると粗結晶0.65gが得られた。更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0.51gが得られた。この結晶の比旋光度は $[\alpha]_D^{20} = -49.5^\circ$ であつた。

実施例4

ATCC 18080	コリネバクテリウム・グルタミカス	86.1	98.9
IFO 8060	スタフィロコッカス・オーレアス	80.6	97.6
IFO 12187	アルスロバクター・グロビフォルミス	86.9	92.8
IFO 12145	フレバクトリウム・インセルタム	67.4	89.9
IAM 1517	アシネトバクター・カルロアセチカス	84.6	91.5
IFO 12655	シュードモナス・シリシガエ	69.6	89.4
IAM 1671	キリントモナス・キヤムベストリス	65.9	87.7

実施例8

麦芽エキス5%、酵母エキス0.8%からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液でPH 5.0とし、80ml試験管に5ml分注しオートクレーブ中121℃で15分間加熱滅菌した。ここに斜面培地からロドトルラ・テキセンシス(IFO 0982)を1白金耳接種し、28℃、24時間、回転振盪機上で好氣的に培養し、これを種菌液とした。つぎに麦芽エキス5%、酵母エキス0.8%よりなる液体培地を苛性ソーダ水

溶液にデバリオマイセス・ハンセル(IFO 0794)を用いた以外は実施例8と同様に行なつた。D-パントラクトンの粗結晶0.80gを得、再結晶により精結晶0.70gを得た。この精結晶の比旋光度は $[\alpha]_D^{20} = -49.9^\circ$ であつた。

実施例5

シュエクロース5%、コーンステープリツカー3%、炭酸カルシウム1%からなるPH 7.0の液体培地を用い、菌株にアグロバクテリウム・ツメファシエンス(IAM B-26-1)を用いた以外は実施例8と同様になつた。D-パントラクトンの粗結晶0.76gを得、再結晶により精結晶0.72gを得た。この精結晶の比旋光度は $[\alpha]_D^{20} = -50.0^\circ$ であつた。

実施例6

実施例8の方法で、スポロボロマイセス・ホルサチカス(IFO 1082)の培養液を調整し、そこへα-ケトパントラクトンの5%水溶液2gを24時間毎に3回添加した。その後さら

特開昭59-25690(5)

に48時間、28℃で回転振蕩したところ、D-バントラクトンの粗結晶2.44gを得、さらに再結晶により精結晶2.02gを得た。この結晶の比旋光度は $[\alpha]_D^{20} = -49.7^\circ$ であつた。

実施例7

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%、硫酸マグネシウム0.2%よりなる液体培地を用い、ピチアシュートポリモルファ(IFO 1026)を用いた以外は実施例8と同様に行なつた。D-バントラクトンの粗結晶0.81gを得、再結晶により精結晶0.69gを得た。この精結晶の比旋光度は $[\alpha]_D^{20} = -50.0^\circ$ であつた。

実施例8

菌株としてキャンデイダ・トロピカリス(IFO 0587)を用い、実施例7の条件のうちグルコースをノルマルアルカン2%にかえた培地を用いた以外は実施例7と同様に行なつた。D-バントラクトンの粗結晶0.66gを得、精結晶0.48gを得た。この精結晶の比旋光度は

$[\alpha]_D^{20} = -50.0^\circ$ であつた。

実施例9

実施例8の培地のうち、ノルマルアルカンエタノール2%にかえた以外は実施例8と同様に行なつた。D-バントラクトンの粗結晶0.69gを得、精結晶0.53gを得た。この精結晶の比旋光度は $[\alpha]_D^{20} = -49.8^\circ$ であつた。

出願人 製鉄化学工業株式会社

代表者 佐々木

手続補正書(目録)

昭和57年12月25日

第1頁の続き

Int. Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号
//C12R	1/72	6760-4B
	1/78	6760-4B
	1/84	6760-4B
	1/845	6760-4B
	1/85	6760-4B
	1/88	6760-4B

発明者 清水昌  
 京都市中京区西ノ京伯楽町14  
 発明者 畑啓之  
 加古川市上荘町国包189-1

特許庁長官 若杉和天殿



1. 事件の表示 昭和57年特許願第136154号
2. 発明の名称 D-バントラクトンまたはノルマルアルカン2%の製造方法
3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 〒675-01

住所 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

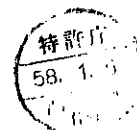
名称 製鉄化学工業株式会社(TEL0794-37-2101)

代表者 佐々木 浩



4. 補正の対象 明細書
5. 補正の内容

明細書全文を別紙訂正明細書のとおり補正する。



訂正明細書

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

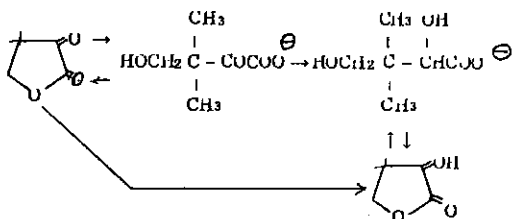
2. 特許請求の範囲

(1) α-ケトバント酸塩またはα-ケトバント  
ラクトンを経ルゾップス属、アスペルギルス属、ピ  
ソクラミス属、オーレオバシジウム属、サツカロ  
マイセス属、シゾサツカロマイセス属、ヒチア属、  
ハンセヌラ属、エンドマイコブシス属、シテロマ  
イセス属、デバリオマイセス属、スポロボ<sup>ロ</sup>マイセ  
ス属、クリプトコツカス属、トルロブシス属、ヤ  
ヤンディダ属、ロドトルラ属、トリコスボロン属、  
アグロバクテリウム属、エノロバクター属、アク  
ロモバクター属、フラボバクテリウム属、コリネ  
バクテリウム属、スタフィロコツカス属、ミクロ  
コツカス属、アルスロバクター属、セラチア属、  
ブレビバクテリウム属、アシホトバクター属、シ  
ユードモナス属、キサントモナス属に属する微生

物であるため取扱いが危介であること等の欠点があつた。

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  
々検討した結果、微生物菌体の有する還元力を利用  
してα-ケトバント酸あるいはその塩またはα  
-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、本発明に至つた。

すなわち本発明は次式で示すことができる。



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α-ケトバント  
ラクトンを菌体のまま加えるか、あるいは水溶液

物よりなる群より選ばれた少くとも1種の微生物  
により還元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。

(2) 前記微生物の培養液をそのまま還元を用い  
る特許請求の範囲(1)記載の方法。

(3) 前記微生物の培養液より取出した菌体を用  
いて還元する特許請求の範囲(1)記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はD-バント酸塩または／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>O<sub>4</sub>A<sub>2</sub>等  
の重要な合成中間体である。従来、D-バントラ  
クトンは(1)化学的に合成されたDL-バントラ  
クトンより光化学分割剤を用いてD-体のみを取り  
出す方法、(2)ケトバントラクトンをキラルなリ  
ガン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、ブルシン等の高  
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

として添加する。この際α-ケトバントラクトン  
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-バン  
ト酸塩となる。またα-ケトバントラクトンが直  
接立体特異的に還元されるとD-バントラクトン  
となる。ここでD-バント酸塩とD-バントラク  
トン間にも平衡が存在し、D-バントラクトンの  
みを得たいときは酸性化すると閉環がおりD-  
バント酸塩がD-バントラクトンとなる。

微生物を用いるα-ケトバントラクトンよりD  
-バントラクトンへの合成は今までに数例報告さ  
れている。たとえばKuhn and Wieland (Ber. deut.  
chem. Ges., 75 B, 121 - 123)には酵母を用いて  
立体特異的に還元を行なつた記載があるが、これ  
はUSP 8, 850, 750の中で相試しているごとく  
立体選択的に還元が進んだのではなく、母結晶の  
段階でD-バントラクトンがなくなりD-~~バント~~  
~~ラクトンがなくなり~~D-バントラクトンのみの高  
純度の結晶になつたものであるから選択的に還元

されたものではなくその収率も不明である。また特公昭46-6896号ではUSP 3, 850, 750と同じく菌体により立体的特異的に還元が進んだのか、分析までの工程でD体選択率が向上したのか不明であるばかりでなく、原料である $\alpha$ -ゲトパントラクトンの残りが認められた。さらにUSP 3, 850, 750においても原料残りが認められたうえ特許となり得る菌は*Byssosclania fulva* 1株のみであった。このような状況に鑑み、本発明者らは反応液中に生成したD-L体パントラクトンをD-クロロ炭酸メチルによりジアステレオマーとした後、ガスクロマトグラフィー(以下G.Cと称する。)で分析する方法(Anal.Biochem., 112, 9-16 (1981))を用いて、反応液中のパントラクトンのD-L体の比率を正確に求める方法により検討を進め、多数の菌が高い選択率でD-L体パントラクトンを生成することを見出した。さらに検討を重ねた結果、遠心分離またはろ過により培養液より取り出した菌体を用いる還元系が、

をほどこし、パントラクトンの生成量およびそのD, L体の比率をG, Cで測定した。

この方法によつて探索した結果、D-L体パントラクトンを高選択率で与える微生物は、リゾツブス属、アスペルギルス属、ピソクラミス属、オーレオバシジウム属、サツカロマイセス属、シゾサツカロマイセス属、ピチア属、ハンセヌラ属、エンドマイコブシス属、シテロマイセス属、デバリオマイセス属、スポロボロマイセス属、クリプトコツカス属、トルロブシス属、キヤンデイダ属、ロドトルラ属、トリコスボロン属、アグロバクテリウム属、エアロバクター属、アクロモバクター属、フラボバクテリウム属、コリネバクテリウム属、スタフィロコツカス属、ミクロコツカス属、アルスロバクター属、セラチア属、プレバクテリウム属、アシネバクター属、シユードモナス属、キサントモナス属のいずれかに属していることがわかつた。

菌の培養条件は使用する菌体により多少異なる

さらに高い還元収率および高いD-L体パントラクトン濃度を与え、しかも生成パントラクトン中のD体の比率が高いことを見出し本発明に至つた。

本発明の実施態様の一例を説明すると次のごとくである。たとえば麦芽エキス5%、酵母エキス0.5%からなる液体培地5mlに斜面培地から細菌を1白金耳接種し、28℃、48時間、回転振盪機上で好氣的に培養した。この培養液に濃度が1wt%となるように $\alpha$ -ゲトパントラクトンを添加し、さらに28℃で48時間好氣的に回転振盪した。

さらにまたこのようにして得られた培養液から遠心分離あるいはろ過により菌体を得た。この菌体が最初の菌体濃度となるように5%グルコース水を加えさらに濃度が1%となるように $\alpha$ -ゲトパントラクトンを添加し、28℃で48時間好氣的に回転振盪した。

このようにして得られた反応液は、遠心分離あるいはろ過により菌体を取り除いたのちろ液処理

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、シユクロース、マルトースなどの糖質、エタノール、プロパノールなどのアルコール類、炭化水素類、有機酸類など、窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどのアンモニウム塩、硝酸カリウムなどの硝酸塩類、尿素、アミノ酸、ペプトン、ガザミノ酸、コーンステアブリツカー、ふすま、米ぬか、酵母エキスなど、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など、他の栄養源としては麦芽エキス、肉エキス、ファーマンデリア等を含む培地が用いられるが特にこれに限定されるものではない。この培地に菌体を接種し、好氣的または嫌氣的に培養する。培養温度は15~60℃が、さらに好ましくは20~40℃が適当である。また通常24~48時間の培養で菌を生育させて後、培養液そのままを反応液として用いるかあるいは遠心分離またはろ過により菌体を取り出し新たに

調整した反応液にこれを添加し、さらに基質の $\alpha$ -ケトパントラクトンを加えることにより行なう。反応系の一例としては2.0セル以下のリン酸バッファーまたは/および2.0%以下のグルコース、シユークロス等の糖質からなる系が通常用いられるが、水のみでも良いし、麦芽エキス、豌豆マグネシウムなどを少量添加する方が良い結果を与える場合もある。反応系に基質の $\alpha$ -ケトパントラクトンを添加するには最初から加えてもよいし、後回に分けて添加する方が良い結果を与える場合もある。基質の $\alpha$ -ケト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、カリウム塩、アンモニウム塩などの形で添加する。一般に反応は基質添加後15~60℃の温度で12~96時間回転振盪下に行なう。反応中の培養液のpHは菌体により多少異なり、カビ、酵母ではpH2~6が、細菌ではpH5~9が好ましい。

## 実施例1

麦芽エキス5%, 酵母エキス0.8%からなる液

体培地を前記ソード水溶液でpH5.0とし、30ml試験管に5mlづつ分注しオートクレーブ中121℃で15分間加熱滅菌した。ここに斜面培地から第1表に示す各種の細菌を1白金耳接種し、28℃で48時間、回転振盪機上で好氣的に培養した。

(1)コントロール

この培養液中の濃度が1wt%となるように $\alpha$ -ケトパントラクトンを添加し、さらに28℃で48時間好氣的に回転振盪した。

(2)セパレート

遠心分離またはろ過の後、2mlの水で一度洗浄して得られた固体を5%グルコース水溶液5mlに加え、さらに濃度が1wt%となるように $\alpha$ -ケトパントラクトンを添加し、28℃で48時間好氣的に回転振盪した。

このようにして得られた反応液を所定の方法で分析し、第1表を付た。生成パントラクトン以外は残存の原料 $\alpha$ -ケトパントラクトンである。D%は生成パントラクトン中のD-パントラクトンのパーセントを示す。

第1表

菌番号・菌名	コントロール		セパレート		菌番号・菌名	コントロール		セパレート	
	パントラクトン 収率%	D%	パントラクトン 収率%	D%		パントラクトン 収率%	D%	パントラクトン 収率%	D%
IFU5440 リゾツプス・オリサエ	45.0	97.7	83.7	98.1	IFU0569 ハンセヌラ・アノマラ	92.6	87.3	98.7	91.9
IFU4343 アスペルギルス・ニガー	74.9	91.8	87.3	93.8	IFU0807 ハンセヌラ・シルビコラ	69.9	89.8	99.6	90.2
IFU4440 アスペルギルス・フミガタス	70.5	91.8	98.0	92.5	IFU0808 エンドマイコフシス・ビスボラ	55.1	93.0	94.5	95.1
IFU4301 アスペルギルス・パラシテイカス	83.1	86.3	94.7	88.2	IFU1201 エンドマイコフシス・オペテンシス	68.5	86.4	95.0	86.3
IFU7901 ピソクلاميス・フルバ	89.2	94.0	99.2	94.6	IFU0954 シテロマイセス・マトリテンシス	49.5	87.2	94.1	88.2
IFU4455 オレオノバジウム・ブルランシ	75.4	86.0	93.1	87.2	IFU0794 テトリオマイセス・ハンセコル	95.6	92.1	99.4	94.9
IFU0422 サソカロマイセス・フアメンタテ	63.8	88.5	96.5	90.3	IFU1359 テトリオマイセス・カステリ	93.7	86.5	99.2	90.6
IFU0259 サソカロマイセス・セレピシエ	34.4	92.5	93.7	93.7	IFU1032 スポロボロマイセス・ホルサテイカス	97.6	91.4	99.8	93.9
IFU0346 シソサソカロマイセス・ボンベ	32.8	97.2	98.6	97.5	IFU0410 クリプトコツカス・ネオフオーマンシ	73.3	87.0	99.5	87.9
IFU0193 ビチア・フアリノサ	43.6	88.7	92.3	88.4	IFU0380 トルロフシス・キャンデイダ	58.4	88.4	97.5	90.2
IFU1026 ビチア・シユードボリモワア	94.3	93.1	99.3	93.1	IFU0741 トルロフシス・ピナス	32.5	89.0	96.0	92.1
					IFU0708 キャンデイダ・パラブシロシス	77.7	93.4	98.1	94.2



菌番号・菌名	コントロール		セバレート	
	パントラクトン 収率%	D%	パントラクトン 収率%	D%
IFO0587 キャンディグ・トロピカリス	80.7	88.5	97.3	89.3
IAM12247 キャンディグ・マルトサ	92.2	85.3	99.6	88.3
IFO0920 ロドトルラ・テキセンシス	75.6	94.3	100.0	94.8
IFO0700 ロドトルラ・グルチニス	98.0	86.0	99.4	90.1
IFO0743 トリコスボロン・キャピタム	39.7	87.7	99.1	88.0

実施例 2

シュエクロース 5%、コーンステープリツカー 3%、炭酸カルシウム 1% からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液で pH 7.0 とし、30 ml 分注し、オートクレーブ中 121℃ で 15 分間加熱滅菌した。ここに斜面培地から第 2 表に示す各種の細菌を 1 白金耳量接種し、28℃、48 時間回転振盪機上で好氣的に培養した。

菌番号・菌名	コントロール		セバレート	
	パントラクトン 収率%	D%	パントラクトン 収率%	D%
IFO3055 セラチア・プリムチカム	32.5	89.8	80.6	90.5
IFO3160 アクロモツター・ポリモルフ	37.6	92.9	88.7	93.6
IFO3752 フラボツテリウム・スアベロレンズ	34.2	96.2	78.3	96.7
IAM 1493 フラボツテリウム・フェルギネアム	30.8	93.8	86.9	93.4
IAM B-26-1 アグロツテリウム・ツメアシエンシス	75.6	98.5	98.4	99.2
IFO 13256 アグロツテリウム・ラジオツター	69.3	98.2	95.5	99.4
IFO 3064 ミクロツツカス・ルテウス	32.9	97.4	77.6	97.6
ATCC 13060 コリネツテリウム・グダミカス	36.1	93.9	87.5	93.5
IFO 3060 スタフィロツツカス・オーレアス	30.6	97.6	76.8	97.2
IFO 12137 アルスロツター・グロビオアルミス	36.9	92.8	86.9	93.9
IFO 12145 プレビツテリウム・インセルタム	67.4	89.9	93.2	91.5
IAM 1517 アシノツター・カルコアセチカス	34.6	91.5	70.2	92.7

(1) コントロール

この培養液中の濃度が 1 wt% となるように α- ケトパントラクトンを添加し、さらに 28℃ で 48 時間好氣的に回転振盪した。

(2) セバレート

軽く遠心分離して炭酸カルシウムの大部分を除いた後、遠心分離および 2 ml の水で一度洗浄して得られた固体を 5% グルコース・0.5 M リン酸カリ緩衝液 (pH 6.7) の希 5 ml に加え、さらに濃度が 1 wt% となるように α- ケトパントラクトンを添加し、28℃ で 48 時間好氣的に回転振盪した。

このようにして得られた反応液を所定の方法で分析し、第 2 表を得た。生成パントラクトン以外は残存の原料 α- ケトパントラクトンである。

第 2 表

菌番号・菌名	コントロール		セバレート	
	パントラクトン 収率%	D%	パントラクトン 収率%	D%
IAM 1221 エアロバクター・クローバエ	30.9	98.9	83.9	93.9

菌番号・菌名	コントロール		セバレート	
	パントラクトン 収率%	D%	パントラクトン 収率%	D%
IFO 12655 シユードモナス・シリガエ	69.6	89.4	88.2	87.5
IAM 1671 キリントモナス・キヤムベトリス	65.9	87.7	97.6	90.9

実施例 3

麦芽エキス 5%、酵母エキス 0.8% からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液で pH 5.0 とし、30 ml 分注しオートクレーブ中 121℃ で 15 分間加熱滅菌した。ここに斜面培地からロドトルラ・テキセンシス (IFO 0982) を 1 白金耳量接種し、28℃、24 時間、回転振盪機上で好氣的に培養し、これを種菌液とした。つぎに麦芽エキス 5%、酵母エキス 0.8% よりなる液体培地を苛性ソーダ水溶液で pH 5.0 とし、500 ml 坂口フラスコに 100 ml 分注し、オートクレーブ中 121℃ で 15 分間加熱滅菌した。ここに先程調製した種菌液を加え、28℃、48 時間、回転振盪機上で好氣的に培養した。この培養液に 1 wt% となるように α-

α-ケトパントラクトンを加え、28℃で48時間、回転振盪機上で培養した。得られた培養液より菌体を遠心分離で除去したのち上清液を緩酸酸性とし、沸騰浴中で15分間加熱し、ラクトン化した。この段階のG.C分析でパントラクトン78.1%、α-ケトパントラクトン21.9%であった。この溶液を苛性ソーダ水溶液でpH7.3に調整し、ただちに同容量のクロロホルムで5回抽出した。この抽出液を乾固すると粗結晶0.65gが得られた。更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0.51gが得られた。この結晶の比旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} = -49.5^{\circ}$ であった。

#### 実施例4

菌株にテバリオマイセス・ハンセニル(IFO0794)を用いた以外は実施例3と同様に行なつた。D-パントラクトンの粗結晶0.80gを得、再結晶により精結晶0.70gを得た。この精結晶の比旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} = -49.9^{\circ}$ であった。

#### 実施例7

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%、硫酸マグネシウム0.2%よりなる液体培地を用い、ピチアシュートポリモルフア(IFO1026)を用いた以外は実施例3と同様に行なつた。D-パントラクトンの粗結晶0.81gを得、再結晶により精結晶0.69gを得た。この精結晶の比旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} = -50.0^{\circ}$ であった。

#### 実施例8

菌株としてキヤンデイダ・トロピカリス(IFO0587)を用い、実施例7の条件のうちグルコースをノルマルアルカン2%にかえた培地を用いた以外は実施例7と同様に行なつた。

D-パントラクトンの粗結晶0.66gを得、精結晶0.48gを得た。この精結晶の比旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} = -50.0^{\circ}$ であった。

#### 実施例9

実施例8の培地のうち、ノルマルアルカンをエ

#### 実施例5

シュエクロース5%、コーンステープリツカー3%、炭酸カルシウム1%からなるpH7.0の液体培地を用い、菌株にアグロバクテリウム・ツメファシエンス(IAMB-26-1)を用いた以外は実施例3と同様に~~行な~~<sup>製し</sup>た。D-パントラクトンの粗結晶0.76gを得、再結晶により精結晶0.72gを得た。この精結晶の比旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} = -50.0^{\circ}$ であった。

#### 実施例6

実施例3の方法で、スピロボロマイセス・ホルサティカス(IFO1032)の培養液を調整し、そこへα-ケトパントラクトンの50%水溶液2gを24時間毎に3回添加した。その後さらに48時間、28℃で回転振盪したところ、D-パントラクトンの粗結晶2.44gを得、さらに再結晶により精結晶2.02gを得た。この結晶の比旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} = -49.7^{\circ}$ であった。

マノール2%にかえた以外は実施例8と同様に行なつた。D-パントラクトンの粗結晶0.69gを得、精結晶0.53gを得た。この精結晶の比旋光度は $[\alpha]_{D}^{20} = -49.8^{\circ}$ であった。

#### 実施例10

グルコース5%、コーンステープリツカー5%からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液でpH6.0とし、30ml試験管に5mlずつ分注し、オートクレーブ中121℃で15分間加熱滅菌した。ここに斜面培地から第3表に示す各種の菌株を1白金耳量接種し、28℃で48時間回転振盪機上で好氣的に培養した。その後遠心分離またはろ過により菌体を分離し、さらに2mlの水で洗浄した。得られた菌体を5%グルコース水溶液5mlに加え、さらに濃度が1wt%となるようにα-ケトパントラクトンを添加し、28℃で48時間好氣的に回転振盪した。

このようにして得られた反応液を所定の方法で分析し、第3表を得た。生成パントラクトン以外

は残存の原料  $\alpha$ -ケトバントラクトンである。

第 3 表

菌番号	菌名	バントラクトン収率%	D%
IFO4343	アスペルギルス・ニガー	99.5	90.8
IFO7901	ビソクラミス・フルバ	97.1	93.1
IFO0346	シゾサツカロマイセス・ボンベ	93.2	95.1
IFO0708	キャンディダ・パラブシロシス	98.9	96.3
IFO0920	ロドトルラ・テキセンシス	99.8	95.5

## 実施例 11

実施例 10 と同様にして菌体を得、反応に 5% シュークローズ水を用いた以外は実施例 10 と同様にし、第 4 表を得た。

第 4 表

菌番号	菌名	バントラクトン収率%	D%
IFO4343	アスペルギルス・ニガー	98.5	90.1
IFO7901	ビソクラミス・フルバ	97.6	93.7
IFO0346	シゾサツカロマイセス・ボンベ	94.7	94.8
IFO0708	キャンディダ・パラブシロシス	98.4	95.8
IFO0920	ロドトルラ・テキセンシス	99.5	95.0

培養液を遠心分離、さらに水 20 ml で洗浄し湿菌体 6.3 g を得た。得られた菌体を 5% グルコース水 100 ml に加え、 $\alpha$ -ケトバントラクトン 2.0 g を加え 28°C で回転振盪した。さらに 12 時間母に  $\alpha$ -ケトバントラクトン 2.0 g を 3 回加え回転振盪を続けた。最後の  $\alpha$ -ケトバントラクトンを加えてから 72 時間後に培養液より菌体を遠心分離で除去し、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。この段階の GC 分析でバントラクトン 99.1%、 $\alpha$ -ケトバントラクトン 0.9%、バントラクトン中の D-バントラクトンの比率は 98.8% であつた。この溶液をただちに同容量のクロロホルムで 5 回抽出した。この抽出液を乾燥すると粗結晶 7.85 g 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液で再結晶すると精結晶 7.59 g が得られた。この結晶の比旋光度は  $[\alpha]_D^{20} = -50.0^\circ$  であつた。

## 実施例 12

菌としてキャンディダ・パラブシロシス (IFO 0708) を用い、実施例 10 と同様にして 5 ml 培養液 3 本を得た。さらに同様にして菌体を得た。得られた菌体をまとめて 5% グルコース水溶液 5 ml に加え、さらに濃度が 3 wt% となるようにケトバントラクトンを加えた。28°C で 24 時間回転振盪したのち分析すると、バントラクトン収率 95.7%、D% 97.6% であつた。

## 実施例 13

菌としてロドトルラ・テキセンシス (IFO 0920) を用い、実施例 10 と同様にして培養液 5 ml を得、これを菌液とした。つぎにグルコース 5%、コーンステープリツカー 5% よりなる液体培地を苛性ソーダ水溶液で pH 6.0 とし、500 ml の坂口スラスコに 100 ml 分注し、オートクレーブ中 121°C で 15 分間加熱滅菌した。ここに先程調製した菌液を加え、28°C で 48 時間、回転振盪滅菌上で好氣的に培養した。この培

## 実施例 14

菌株にシゾサツカロマイセス・ボンベ (IFO 0346) を用いた以外は実施例 13 と同様に行なつた。D-バントラクトンの粗結晶 7.76 g を得、再結晶により精結晶 7.13 g を得た。この精結晶の比旋光度は  $[\alpha]_D^{20} = -49.9^\circ$  であつた。

出願人 製鉄化学工業株式会社

代表者 佐々木 浩