

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—98695

⑤ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開
C 12 P 17/04		7258—4 B	昭和59年(1984)6月7日
		6760—4 B	発明の数 1
//(C 12 P 17/04		6760—4 B	審査請求 未請求
C 12 R 1/01)		6760—4 B	
(C 12 P 17/04		6760—4 B	
C 12 R 1/645)		6760—4 B	
(C 12 P 7/42		6760—4 B	
C 12 R 1/01)		6760—4 B	
(C 12 P 7/42		6760—4 B	
C 12 R 1/645)		6760—4 B	(全 8 頁)

⑭ パント酸塩または / およびパントラクトンの製造方法

— 1

⑯ 特 願 昭57—207859

⑰ 発 明 者 清水昌

京都市中京区西ノ京伯楽町14

⑱ 出 願 昭57(1982)11月27日

⑲ 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

⑳ 発 明 者 山田秀明

地の1

京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

パント酸塩または / およびパントラクトンの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) α -ケートパント酸塩または α -ケートパントラクトンを、ムコール属、リゾーブス属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、フザリウム属、ジベラ属、グリオクラジウム属、オーレオバシジウム属、フイトフトラ属、シリンド^ルカルボン属、ピソクラミス属、ピチア属、ハンセヌラ属、シユバンニオマイセス属、デバリオマイセス属、スポロボロマイセス属、サツカロマイセス属、シゾサツカロマイセス属、クリプトコツカス属、トルロブシス属、キャンデイダ属、トルラ属、ロドトルラ属、^シンドマイコブシス属、シテロマイセス属、トラメテス属、ピクノボラス属、グレオフィラム属、エアロバクター属、セラチア属、アクロモバクター属、フラボバクテリウム属、アグロバクテリウ

ム属、ミクロコツカス属、コリネバクテリウム属、スタフィロコツカス属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属、アシネトバクター属、シユードモナス属、キサントモナス属、マイコバクテリウム属、ストレプトマイセ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パント酸塩または / およびパ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。

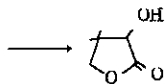
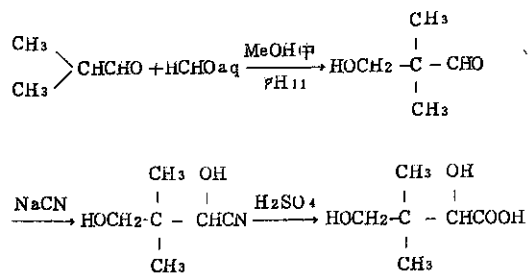
(3) 前記微生物の培養液より取り出した菌体を用いて還元する特許請求の範囲(1)記載の方法。

発明の詳細な説明

本発明はパント酸塩または / およびパントラクトンの製造方法に関する。

パントラクトンはパントテン酸、C₆A等の重要な合成中間体である。従来、パントラクトンは

通常下式に示す方法で化学的に合成される。



しかしこの方法には反応に毒性の強い青酸ソーダを用いねばならない欠点があつた。すなわちイソブチルアルデヒドと青酸ソーダを反応に用い、得られたシアンヒドリンを硫酸によりカルボン酸へと加水分解する。この工程で残留する青酸ソーダが有毒な青酸ガスとなる。この方法では青酸イ

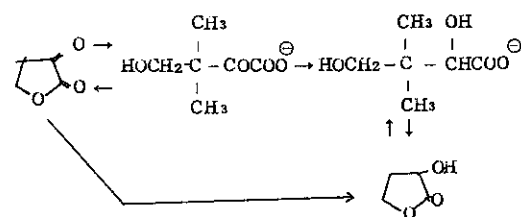
液より取出した菌体を利用するとさらに効果がある。この際 α -ケトバントラクトンはその開環体と平衡的に存在する。この開環体が微生物により還元されるか、 α -ケトバントラクトンが直接還元されるとバントラクトンとなる。ここでバントラクトンとバントラクトン間にも平衡が存在し、バントラクトンのみを得たいときは酸性化すると開環がおこりバントラクトンがバントラクトンとなる。

微生物を用いる α -ケトバントラクトンよりバントラクトンへの合成はこれまであまり多く報告されていない。たとえば Kuhn and Wieland (Ber. dent. chem. Ges, 75B. 121 - 123) には酵母を用いて α -ケトバントラクトンの還元を行なつたとの記載があるが、得られたバントラクトンの収率はわずかに 4.3%であつた。また特公昭 46-5396 にはシュードモナス・デニトリフィカツスを用いて最高 89.5%の収率でバントラクトンを得たとあるが、この収率はガスクロマトグラフィ(以下GCと略する)での分析値であり、かつ示されている菌種も少ない。

オンが常に存在するため、ケトバントラクトン取出時の操作および取出後の廃水処理にも困難を伴う。

そこで本発明者らは工業的に有利なバントラクトンまたは α -ケトバントラクトンの製造方法を種々検討し、微生物の有する還元力を利用すれば α -ケトバントラクトンあるいはその塩または α -ケトバントラクトンをバントラクトンあるいはその塩または α -ケト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、培地あるいは菌体懸濁液に α -ケトバ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。この際この培養

さらに Applied Microbiology . 27, 130-134 (1974) にはバントラクトンを 9.2%で得たとあるが、これも GC 分析値であり、さらに菌種もピソクラミス・フルバ以外に数種が示されているのみである。

そこで本発明者らは、高収率でバントラクトンを与える菌を鋭意探索し、多数の菌が高い収率でバントラクトンを与えることを見出した。

さらにこれらの菌体を遠心分離または濾過により培養液から取出したものを用いる還元系が培養液をそのまま還元系として用いるよりも高い還元収率、高いバントラクトン濃度を与えることを見出し本発明を完成した。

本発明の実施態様の一例を説明すると次のごとである。たとえば麦芽エキス 5%、酵母エキス 0.3% からなる液体培地 5ml に斜面培地から種菌を 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。この培養液に濃度が 1wt% となるように α -ケトバ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機

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濾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2%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燻処理をほどこし、パントラクトンの生成量をGCで測定した。

この方法で探査した結果、パントラクトンを高収率で与える微生物としては、ムコール属、リゾツプス属、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、グリオクラベジウム属、オーレオバシジウム属、フィトフトラ属、シリネカルボン属、ピソクラミス属、ピチア属、ハンヌラ属、シユパンニオマイセス属、デバリオマイセス属、スポロボロマイセス属、サツカロマイセス属、シゾサツカロマイセス属、クリプトコツカス属、トルロブシス属、キャンディダ属、トル

ラ属、ロドトルラ属、エンドマイコブシス属、シテロマイセス属、トラメテス属、ピクノボラス属、グレオフィラム属、シゾフィラム属、エアロバクター属、セラチア属、アクロモバクター属、フラボバクテリウム属、アグロバクテリウム属、ミクロコツカス属、コリネバクテリウム属、スタフィロコツカス属、アルスロバクター属、プレバクテリウム属、アシネトバクター属、イコバクテリウム属、ストレプトマイセス属に属し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、シユクロース、マルトースなどの糖類、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、アザミノ酸、コーンステープリルカー、ふすま、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、フアー

マメディア等を含む培地が用いられるが、これら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。また通液液量24ないし48時間の培養で菌を生育させた後、基質の α -ケトパントラクトンを添加するか、 α -ケ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。

あるいは菌を24ないし96時間の培養で菌を生育させた後、遠心分離あるいは濾過により菌体を取り出す。反応は得られた菌体を新たに調製した反応液に添加しさらに基質の α -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モル以下のリン酸パツフアールまたはおよび2.0%以下のグルコース、シユクロース等の糖質よりなる系であるが、水のみでも良いし、麦芽エキス、硫酸マグネシウムなどを少量添加する方がよい結果を与える場合もある。基質の α -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℃で12～96時間回転振盪下にて行なう。反応中の培養液のPHは菌体により多少異なり、fungiではPH2～6がbacteriaではPH5～9の範囲が好ましい。

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1

麦芽エキス5%、酵母エキス0.3%からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液で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表1に示す各種の種菌を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。

(1) コントロール

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。

(II) セバレート

遠心分離または濾過の後、2 ml の水で一度洗浄して得られた菌体を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-ケトバ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表の結果を得た。生成バントラクトン以外は残存の原料α-ケトバントラクトンである。

第 1 表

菌番号, 菌名	コントロール バントラクトン 収率 %	セバレート バントラクトン 収率 %
IFO6338 ムコール・サブテリシマス	90.1	
IFO4801 リゾプス・ジャンニカス	83.6	
IFO5440 リゾプス・オリザエ	45.0	83.7
IFO4343 アスペルギルス・ニガー	74.9	87.3

IFO4388 アスペルギルス・ウサミ	99.3	
IFO4040 アスペルギルス・フミガタス	70.5	98.0
IFO4301 アスペルギルス・パラシテイカス	83.1	94.7
IFO4626 ペニシリウム・クリソゲナム	98.4	
IFO5902 フザリウム・グルモラム	98.1	
IFO6356 ジベレラ・フジクロイ	97.9	
IFO6617 グリオクラジウム・デリクセ ^ケ セン ^ス	83.5	
IFO4465 オレオバシジウム・ブルランス	75.4	93.1
IFO4872 フイトフトラ・インフエスタンス	97.2	
IFO5998 シリンドカルボン・デストラクタンス	96.8	
IFO7901 ピソクラミス・フルバ	89.2	99.2
IFO0195 ピチア・ポリモルファ	95.0	
IFO0193 ピチア・フアリノサ	43.6	92.3

菌番号, 菌名	コントロール バントラクトン 収率 %	セバレート バントラクトン 収率 %
IFO1026 ピチア・シユードポリモルファ	94.3	99.3
IFO0569 ハンセスラ・アノマラ	92.6	98.7
IFO0974 ハンセスラ・キャプスレート	96.4	
IFO0807 ハンセスラ・シルピコラ	69.7	99.6
IFO0371 シユバンニオマイセス・オクシデンタリス	95.0	
IFO0794 デバリオマイセス・ハンセニカ	95.6	99.4
IFO1359 デバリオマイセス・カステリ	93.7	99.2
IFO1032 スポロボロマイセス・ホルサテイカス	97.6	99.8
IFO0422 サツカロマイセス・ファメンタテイ	63.8	96.5
IFO0259 サツカロマイセス・セレピシエ	34.4	93.7
IFO0346 シツサツカロマイセス・ボンベ	32.8	98.6
IFO0410 クリプトコツカス・ネオフオーマンス	73.3	99.5

菌番号, 菌名	コントロール バントラクトン 収率 %	セバレート バントラクトン 収率 %
IFO0380 トルロブシス・キャンデイダ	58.4	97.5
IFO0741 トルロブシス・ピナス	32.5	96.0
IFO0454 トルロブシス・キシリヌス	94.2	
IFO0601 キャンデイダ・アルピカンス	94.4	
IFO0708 キャンデイダ・ハラブシロシス	77.7	98.1
IFO0587 キャンデイダ・トロピカリス	80.7	97.3
IAd12247 キャンデイダ・マルト ^ザ	92.2	99.6
IFO95008 トルラ・ヘルバルム	93.0	
IFO0001 ロドトルラ・ルブラ	98.2	
IFO0920 ロドトルラ・ チキセツテス	75.6	100.0
IFO0700 ロドトルラ・グルチニス	98.0	99.4
IFO0803 エンドマイコブシス・ビスボラ	55.1	94.5

の方法で分析し第2表を得た。

第2表

菌番号, 菌名	コントロール パントラクトン 収率 %	セバレート パントラクトン 収率 %
IFO6430 グレオフィラム・トラベウム	43.4	96.3
IFO6503 シゾフィラム・コムネ	34.3	91.2
IFO6492 トラメテス・サンギネア	93.9	100.0
IFO9768 ピソノボラス・コシネウス	91.9	98.9

実施例3

シュエクロース5%, コーンステープリウムカー
ボラム, 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、内径16mm, 長
さ16.5cmの試験管に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表に示す各種の菌種を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 パントラクトン 収率 %	セバレート パントラクトン 収率 %
IFO1201 エンドマイセス・オペテンシス	69.5	95.0
IFO0954 シテロマイセス・マトリテンシス	49.5	94.1

実施例2

グルコース1%, エピオス0.5%からなる液体
培地をpH5.0とし、30ml試験管に5mlずつ
分注しオートクレーブ中121℃で15分間滅菌し
た。ここに斜面培地から第2表に示す種菌を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。実施例1と同様にしてこの
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。(コントロール)

また前記培養液より菌体を遠心分離でセバレ
ートし、5%グルコースおよび1%のα-ケトパ
ントラクトンを加えて28℃でさらに48時間回転
振盪した。このようにして得られた反応液を所定

(I) コントロール

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。

(II) セバレート

前記培養液を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2mlの水
で一度洗浄して得られた菌体を5%グルコース
-0.5M 磷酸カリ緩衝液(pH6.7)の系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
は原料の原料α-ケトパントラクトンである。

第3表

菌番号, 菌名	コントロール パントラクトン 収率 %	セバレート パントラクトン 収率 %
IAM1221 エアロバクター・クロアカエ	30.9	83.9
IFO3055 セラチア・プリムチカム	32.5	80.6

菌番号, 菌名	コントロール パントラクトン 収率 %	セバレート パントラクトン 収率 %
^{1268P} IFO3163 アクロモバクター・ネセロニス	37.6	88.7
IFO3752 フラボバクテリウム・スア・ホレンズ	34.2	78.3
IAM1493 フラボバクテリウム・フェルギネウム	30.8	86.9
IAM B-26-1 アグロバクテリウム・ツメファシエンシス	75.6	98.4
IFO13264 アグロバクテリウム・ツメファシエンシス	83.8	
IFO13256 アグロバクテリウム・ラジオバクター	69.3	95.5
IFO3064 マイクロツカス・ルテウス	32.9	77.6
IFO12154 コリネバクテリウム・アクアテイクム	77.2	
ATCC 13060 コリネバクテリウム・グルタミカス	36.1	87.5
IFO3060 スタフィロコツカス・オーレウス	30.6	76.3
IFO12137 アルスロバクター・グロビフォルミス	36.9	86.9
IFO12140 アルスロバクター・グロビフォルミス	74.6	

菌番号, 菌名	コントロール バントラクトン 収率 %	セバレート バントラクトン 収率 %
IFO12141 プレビオテリウム・リネンス	79.5	
IFO12145 プレビオテリウム・インセルタム	67.4	93.2
IAM1517 アシネトバクター・カルコアセテイカス	34.6	70.2
IFO3757 シユードモナス・シンシアネア	83.6	
IFO12655 シユードモナス・シリంగాエ	69.6	88.2
IAM1671 キサントモナス・キヤムベストリス	65.9	97.6
IFO13551 キサントモナス・キヤムベストリス	75.9	

実施例 4

グルコース 3.0%, 酵母エキス 1%, 食塩 0.3%, リン酸一カリウム 0.3%, リン酸二カリウム 0.3%, 硫酸マグネシウム 0.1% よりなる pH 7.0 の液体培地を用い、菌株としてマイコバクテリウム・アヴィウム (IFO 3082) を用いた以外は実施例 3 のコントロール法と同様に行ない、

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 96.3%, ケトバントラクトン 3.7% であった。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。この抽出液を乾燥するとバントラクトンの粗結晶 0.92 g が得られた。この結晶の融点は 63 ~ 65 °C であった。さらに n-ヘキサンによる再結晶により融点 66 ~ 68 °C となった。

実施例 6

シユークロース 5%, コーンステープリアカー 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・ツメアシエンス (IFO 13264) を用いた以外は実施例 5 と同様に行なつた。バントラクトンの粗結晶 0.76 g を得、再結晶により精結晶 0.72 g を得た。

実施例 7

実施例 5 の方法で、トルロブシス・キシリヌス

GC 分析でバントラクトン収率 78.4% を得た。

実施例 5

麦芽エキス 5%, 酵母エキス 0.3% からなる液体培地を苛性ソーダ水溶液で pH 5.0 とし、内径 16 mm, 長さ 16.5 cm の試験管に 5 ml 分注し、オートクレーブ中 121°C で 15 分間加熱滅菌した。

ここに斜面培地からロドトルラ・グルチニス (IFO 0711) を 1 白金耳量接種し、28°C, 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 0.3% 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°C 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°C, 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 -ケトバントラクトンを加え 28°C 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、上澄液を硫酸酸性とし、沸騰

(IFO 0454) の培養液を調製し、そこへ α -ケトバントラクトンの 50% 水溶液 2 g を 24 時間毎に 3 回添加した。その後さらに 48 時間、28°C で回転振盪したところ、バントラクトンの粗結晶 2.63 g を得、さらに再結晶により精結晶 2.38 g を得た。

実施例 8

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・ポリモルフア (IFO 0195) を用いた以外は実施例 5 と同様に行なつた。バントラクトンの粗結晶 0.89 g を得、再結晶により精結晶 0.75 g を得た。

実施例 9

実施例 1 のセバレート法と同様にして菌体を得、反応に 5% シユークロース水を用いた以外は実施例 1 と同様にし、第 4 表を得た。

第 4 表

菌番号, 菌名	コントロール パントラクトン 収率 %	セバレット パントラクトン 収率 %
LFO4343 アスペルギルス・ニガー	98.5	90.1
LFO7901 ヒソクラミス・フルバ	97.6	93.7
LFO0346 シゾサツカロマイセス・ボンベ	94.7	94.8
LFO0708 キャンデイダ・パラブシロス	98.4	95.8
LFO0920 ロドトルラ・テキセンシス	99.5	95.0

実施例 10

種菌としてキャンデイダ・パラブシロシス (LFO0708) を用い、実施例 1 と同様にして 5 ml 培養液 3 本を得た。さらに同様に操作し菌体を得た。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 α -ケトパ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、パントラクトン収率 95.7% であった。

パントラクトン 99.1% , α -ケトパントラクトン 0.9% であった。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。この抽出液を乾固すると粗結晶 7.85 g 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 7.59 g が得られた。この結晶の融点は 66 ~ 68 °C であった。

実施例 12

菌株にシゾサツカロマイセス・ボンベ (LFO0346) を用いた以外は実施例 11 と同様に行なった。D-パ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。

実施例 13

グルコース 5% , 酵母エキス 5% , 炭酸カルシウム 1% からなる pH 7.0 の液体培地を培養に用いた以外は実施例 2 と同様に行なった。結果を第 5 表に示す。

実施例 11

種菌としてロドトルラ・テキセンシス (LFO0920) を用い、実施例 1 と同様にして培養液 5 ml を得、これを種菌液とした。つぎにグルコース 5% , コーンステープリオリカ - 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 の坂口フラスコに 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種菌液を加え、28°C で 48 時間、回転振盪機上で好氣的に培養した。この培養液を遠心分離、さらに水 20 ml で洗浄し湿固体 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、 α -ケトパントラクトン 2.0 g を加え、28°C で回転振盪した。さらに 12 時間毎に α -ケトパントラクトン 2.0 g を 3 回加え回転振盪を続けた。最後の α -ケトパ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、上澄液を硫酸酸性とし、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

第 5 表

菌番号, 菌名	コントロール パントラクトン 収率 %	セバレット パントラクトン 収率 %
LFO3082 マイコバクテリウム・アビウム	64.1	76.9
LFO3355 ストレプトマイセス・グリセウス	52.4	92.3

出願人 製鉄化学工業株式会社
代表者 佐々木 浩

第1頁の続き

②発明者 畑啓之

加古川市上荘町国包189-1

特開昭59-98695(B)