

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-293384

⑮ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)12月24日

C 12 P 7/42  
 //(C 12 P 7/42  
 C 12 R 1:365)  
 (C 12 P 7/42  
 C 12 R 1:01)  
 (C 12 P 7/42  
 C 12 R 1:32)  
 (C 12 P 7/42  
 C 12 R 1:465)

8213-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 D-パント酸または/およびD-パント酸塩の製造方法

⑯ 特 願 昭60-136659

⑰ 出 願 昭60(1985)6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-パント酸または/およびD-パント酸塩の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) ケトパント酸または/およびその塩を微生物を用いて、還元することを特徴とするD-パント酸または/およびその塩の製造方法。

(2) 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(Nocardioides)属、マイコバクテリウム(Mycobacterium)属、ストレプトスランギウム

(Streptosprangium)属およびストレプトマイセス(Streptomyces)

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。

(3) 微生物を用いて還元する際に、培養法を用いる特許請求の範囲(1)記載の方法。

(4) 微生物を用いて還元する際に、培養液より分離した菌体を、新たに調整した基質溶液に添加する特許請求の範囲(1)記載の方法。(酵素法)

(5) 微生物を用いて還元する際のpHが6~10である特許請求の範囲(1)記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

以降の説明において、ケトパント酸または/およびその塩をKPA、パント酸または/およびその塩をPA、ケトパントラク톤をKPL、パントラク톤をPLと略記する。また、PA、PLが光学活性を持つ場合は、DPA、LPAおよびDPL、LPLと記した。

本発明は、DPAの製造方法に関する。

DPAより容易に導くことのできるDPLは、パントテン酸、CoA等の重要な合成中間体である。従来、DPLは

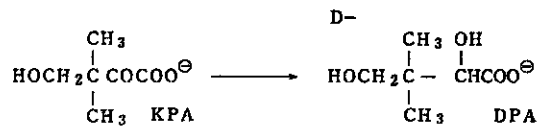
(1) 化学的に合成されたDL-PLより光学分割剤を用いて、D-体のみを取り出す方法。

(2) KPL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、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DPA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KPAをDPAに有利に導き得ることを見出し、本発明に至った。

即ち、本発明は次式で示すことができる。



KPAは、化学的に容易に合成できるKPL(特開昭58-198480)の加水分解により簡単に合成できる。

菌を培養した培養物、培地あるいは菌体懸濁液にKPAを加えると、立体特異的に還元が起こりDPAとなる。この生成物は、酸性条件下で容易

に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、エタノール、プロパノール等のアルコール類、炭化水素類、有機酸類等、窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸カリウム等の硝酸塩類、尿素、アミノ酸、ペプトン、カザミノ酸、コーンステアブリッカー、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が用いられるが、特に、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。また菌は、通常1日ないし4日の培養で菌を生育させて後、基質のKPA

に閉環が起こりDPLとなる。

微生物を用いるKPAよりDPAへの還元は、現在までほとんど報告がない。関連する事項として、わずかにウィルケン(Wilken)等が、サッカロマイセス セレピシエ、エシェリヒア コリの菌体処理物にKPA還元酵素活性が認められると記しているにすぎない。ザ ジャーナルオブ バイオロジカルケミストリー(The Journal of Biological Chemistry) 250, 2311-2314 (1975)

本発明者らは、広くType Culture および土壌より、スクリーニングを重ねた結果、KPAを還元して、DPAを与える菌株が広く存在し、その種類は、カビ、酵母、細菌、放線菌、担子菌、乳酸菌にわたっていることを知った。中でも、放線菌 特にノカルディア属、ロドコッカス属、ノカディオアイデス属、マイコバクテリウム属、ストレプトスプランギウム属、ストレプトマイセス属に属する菌株が強い還元能力を示した。

を添加するが、KPA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KPA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。

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。反応中の培養液または酵素反応液のpHは使用する菌株により多少異なるが一般的にpH6～10、好ましくはpH7～8の範囲が好結果を与える。

一定時間後の培養液または酵素反応液は、ペーパクロマトグラフィーを用いることにより、バント酸が生成していることを確認した。ザ ジャーナルオブ バイオロジカルケミストリー(The Journal of Biological Chemistry) 249, 4689-4695(1974)

これらの液より遠心分離により菌体を取り除いた上清は、塩酸等で酸性とした後加熱するとKPAおよびPAは、それぞれKPLおよびPLへと閉

環した。

生じたKPLとPLの量は、ガスクロマトグラフィー(GC)により、定量した。さらに、このPLは、D-ク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、アナリティカルバイオケミストリー(Analytical Biochemistry) 112, 9-16(1981)により、その中にしめるDPLの比率を正確に求めた。その結果、上掲のいずれの菌株においても生じたPLは、すべてDPLであることがわかった。

本発明の実施態様一例を説明すると、例えばペプトン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pH 7.0の液体培地に、ノカルディア アステロイデス IFO3384の菌株を接種し、28℃で2日間、回転振盪機上で好氣的に培養した。この培養液より遠心分離により菌体を得た。

この湿菌体3g、ケトパント酸100mgおよび

炭酸カルシウム0.1gよりなるpH 7に調整した溶液10mlを28℃で4日間、回転振盪することにより反応を行なった。反応液のペーパークロマトグラフィにより生成物がPAであることを確認した。所定の方法により処理後、分析するとDPL 74%が生成していた。

反応の酵素液としては、菌体のほかに菌体より公知の処理方法により得られた当該酵素活性画分も利用できる。例えば、公知の方法で得た固定化菌体、あるいは固定化酵素も有効である。

固定化に用いる担体としては、カラギーナン、アルギン酸、寒天、コラーゲン、ゼラチン、ペクチン等の天然化合物、あるいはまたポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、エチレンアクリル酸共重合体、光架橋性樹脂等の合成高分子が利用できる。また、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よい結果を与える場合もある。変異処理をほどこした菌体であっても、当該酵素活性を有する限り

本発明に含まれる。

以下に実施例をあげて本発明を具体的に説明する。

#### 実施例 1

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pH 7.0の液体培地に第1表に示す菌株を接種し、28℃で2日間回転振盪機上で好氣的に培養した。この培養液より遠心分離により菌体を得た。この湿菌体3g、ケトパント酸100mgおよび炭酸カルシウム0.1gよりなるpH 7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。反応液をペーパークロマトグラフィで分析すると、いずれの菌株においてもパント酸が生成していた。所定の方法で閉環後、分析すると第1表に示す収率で、D-パントラクトンおよびケトパントラクトンが生じていた。

第 1 表

菌 名	生成物 収率 (%)	
	DPL	KPL
ノカルディア アステロイデス IFO3384	83	17
ロドコッカス エリスロポリス IFO12539	90	10
ノカルディア オイデス アルプス IFO13917	73	27
マイコバクテリウム アビウム IFO3082	69	31
ストレプトスプランギウム ロゼウム IFO3776	72	28
ストレプトマイセス フラディアエ IFO3360	51	49

#### 実施例 2

実施例1の液体培地に、さらに1%濃度のケトパント酸を添加して、pH 7.0に調整した液体培地を用い、ロドコッカス エリスロポリス IFO

12540を菌株として、28℃で5日間回転振盪機上で好氣的に培養した。反応液をペーパークロマトグラフィーで分析するとパント酸が生成していた。

所定の方法で分析すると、D-パントラクトンおよびケトパントラクトンが、それぞれ77%および23%収率で生じていた。

出願人 製鉄化学工業株式会社  
代表者 佐々木 浩