[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C12P 17/12
//C12P17/12,C12R1:72,
1:85,
1:84,1:865,1:125,1:11

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96113275.2

[43]公开日 1997 年 5 月 14 日

[11] 公开号 CN 1149626A

[22]申请日 96.8.28

[30]优先权

[32]95.8.28 [33]JP[31]219197/95

[32]95.8.28 [33]JP[31]219198/95

[71]申请人 东丽株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 宫田令子 米原彻

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 杨九昌

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 叶酸的生产方法

[57]摘要

公开了一种生产叶酸的方法，其中包括培养能够产生叶酸的酵母或者培养能够在每升培养液中产生 1 毫克或更多叶酸的细菌，以便在所说的培养液中积累叶酸。

权 利 要 求 书

1．一种生产叶酸的方法，其中包括培养能够产生叶酸的酵母或者培养能够在每升培养液中产生1毫克或更多叶酸的细菌，以便在所说的培养液中积累叶酸。

2．一种生产叶酸的方法，其中包括培养能够产生叶酸的酵母或者培养能够在每升培养液中产生1毫克或更多叶酸的细菌，以便在所说的培养液中积累叶酸，然后从所说的培养液中分离收集所说的叶酸。

3．按照权利要求1或2所说的生产叶酸的方法，其中能够产生叶酸的酵母属于假丝酵母属、球拟酵母属、酵母属和毕赤酵母属。

4．按照权利要求3所说的生产叶酸的方法， 其中能够产生叶酸的酵母是Candida famata、Candida guilliermondii（吉利蒙念珠菌）、 Torulopsis petrophilum、Pichia glucozymo、Torulopsis glabrata（光滑球拟酵母）或Saccharomyces cerevisiae（酿酒酵母）。

5．按照权利要求1或2所说的生产叶酸的方法，其中能够产生叶酸的细菌属于杆菌属细菌。

6．按照权利要求5所说的生产叶酸的方法， 其中所说的细菌是枯草杆菌或巨大芽胞杆菌。

7．一种生产叶酸的方法，其中包括在对氨基苯甲酸存在下使用微生物。

8．按照权利要求7所说的生产叶酸的方法，其中所说的微生物是霉菌、放线菌、酵母或细菌。

9．按照权利要求7所说的生产叶酸的方法， 其中所说的微生物属于杆菌属、短颈细菌属、红球菌属、球拟酵母属、酵母属、 毕赤酵母属或假丝酵母属。

10．按照权利要求7所说的生产叶酸的方法，其中所说的对氨基苯甲酸至少是从对氨基苯甲酸钾、对氨基苯甲酸钠、对氨基苯甲酸甲酯、 对氨基苯甲酸乙酯和对氨基苯甲酸丁酯中选出的一种物质。

说　　明　　书

叶酸的生产方法

本发明涉及叶酸的生产方法。

本文所说的叶酸包括具有叶酸活性的全部物质而不应当仅仅限制在以该词的狭窄含义通常叫做叶酸的蝶酰谷氨酸(以下记作PteGlu)上。 除了PteGlu之外，它还包括，例如蝶酰-聚-γ-谷氨酸(以下记作n=2-8的PteGlun)、四氢叶酸、5-甲酰基-四氢叶酸、10-甲酰基-四氢叶酸和5-甲基-四氢叶酸等等。

作为叶酸的PteGlu在工业上目前是利用化学合成的方法生产的。简言之，在乙酸钠溶液中，在亚硝酸钠存在下，使2，4，5-三氨基-6-羟基嘧啶、1，1，3-三氯丙酮和对氨基苯甲酸等三成分缩合，生成叶酸，PteGlu粗产物，并且利用重结晶法纯化该产物。

一些文章中指出，假单细菌、细球菌、葡糖杆菌、棒状杆菌、 气单胞菌和芽胞杆菌等菌属的细菌，在其培养液中产生少量(几十-一百几十微克/升)的具有叶酸活性的物质，参见〖细菌杂志〗， 104,197-201 页(1970)， 以及 Kor. J. Appl. Microbiol Bioeng, (16), 5, 352页 (1988)。

生产叶酸的传统的化学合成方法是已知的， 但是在这些已知的方法中使用的原料昂贵，而且产品的产率也低。因此，很难说该方法是有益的。 正如上面所提到的那样， 在一些报告之中披露若干种细菌能在培养液中产生具有叶酸活性的物质，但是所产生的该物质量极少。因此， 这些公开的提议是成问题的，因为这些提议不能直接导致所说物质的工业化生产。

本发明涉及生产叶酸的方法， 其中包括培养能够产生叶酸的酵母或者培养能够产生叶酸的细菌，使之在每升培养液中产生1毫克或更多的叶酸，以便使叶酸在所说的培养液中积累。

此外，本发明还涉及生产叶酸的方法， 其中包括在对氨基苯甲酸存在下使用微生物。

本文中所说的叶酸包括具有叶酸活性的全部物质，或者换句话说， 包括其生物活性可以通过需叶酸的乳酸菌菌株、干酪乳杆菌(Lactobacillus casei) ATCC7469)、粪链球菌(Streptococcus faecalis) ATCC 8043和啤酒小球菌

(Pediococcus cerevisiae) ATCC 8081的生长加以定量测定的那些物质。例如，作为具有叶酸活性的物质，可以提到以该词的狭窄含义通常叫做叶酸的蝶酰谷氨酸(以下记作PteGlu)、蝶酰-聚-γ-谷氨酸(以下记作n=2-8的PteGlun)、四氢叶酸、5-甲酰基-四氢叶酸、10-甲酰基-四氢叶酸和5-甲基- 四氢叶酸等等。

本发明中优选使用属于假丝酵母属、球拟酵母属、 酵母属和毕赤酵母属等属的酵母以及属于杆菌属、红球菌属和短杆菌属等属的细菌。

例如这样的酵母包括Candida famata ATCC 10536 、 Candida guilliermondii (吉利蒙念珠菌) ATCC 9058、Candida petrophilum ATCC 20226、Saccharomyces cerevisiae (酿酒酵母) ATCC 26108 、 Pichia glucozyma ATCC 18938、 Torulopsis Glabrata (光滑球拟酵母) ATCC 15126、 Torulopsis petrophilum ATCC 20225 等; 而且这样的细菌包括 Bacillus subtilis (枯草杆菌) ATCC 19219、Bacillus megaterium(巨大芽胞杆菌)ATCC 19218、Rhodococcus equi ATCC 21280 、 Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872等等。当然，优选使用的是Candida famata ATCC 10536、Candida guilliermondii (吉利蒙念珠菌)ATCC 9058 、 Torulopsis petrophilum ATCC 20225、Pichia glucozyma ATCC 18938 、 Torulopsis Glabrata ATCC 15126(光滑球拟酵母)和Saccharomyces cerevisiae(酿酒酵母)ATCC 26108等酵母; 以及Bacillus subtilis (枯草杆菌) ATCC 19219 、 Bacillus megaterium (巨大芽胞杆菌)ATCC 19218等细菌。

本发明中使用的细菌应当在其1升培养液中能够产生1毫克或更多， 优选1.5毫克或更多叶酸。 所说的生产能力可以按照〖维生素和辅助酶〗(Tokyo Kagaku Dojin co. 出版)最后卷第385-388页上记载的方法，通过测量基于需叶酸的菌株，粪链球菌(Streptococcus faecalis) ATCC 8043生长的生物活性加以定量测定。简言之，将试验溶液加入到具有下面提到组成的培养基之中，试验溶液的加入量与所说的培养基量相同， 然后在所说的培养基上接种上面提到的需叶酸菌株的细胞并且在37°C下在其中培养。24小时之后， 测量在该培养基中如此生长的细胞数量。 对于此数量与在作为标准对照使用的其中含有蝶酰谷氨酸的培养基中生长的粪链球菌(Streptococcus faecalis)ATCC8043细胞数进行比较。

酪蛋白水解产物	50mg	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1mg
L-色氨酸	1mg	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.1mg
L-胱氨酸盐酸盐	8mg	NaCl	0.1mg
L-天冬酰胺	1mg	硫胺素盐酸盐	5μg
腺嘌呤硫酸盐	0.1mg	核黄素	5μg
鸟嘌呤盐酸盐	0.1mg	烟酸	10μg
黄嘌呤	0.1mg	生物素	0.04μg
尿嘧啶	0.1mg	泛酸钙	5μg
乙酸钠	200mg	对氨基苯甲酸	1μg
葡萄糖	200mg	吡哆素盐酸盐	2μg
吐温 80	10mg	盐酸吡哆醛	5μg
$KHPO_4$	30mg	盐酸吡哆胺	2μg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2mg	抗坏白酸	10mg

重量/10ml（培养基）

对于欲在本发明中使用的酵母来说并无特别的限制，但是最好是能够在每升培养液中产生按照上面提到的方法测量时达300微克或更多叶酸的酵母。

为了按照本发明方法培养这样的酵母。适于使用的培养基是这样的，其中含有能被所说的酵母同化的碳源、能被其同化的氮源，以及其他无机盐和少量元素。所说的碳源包括糖类，例如葡萄糖、蔗糖和麦芽糖等；有机酸，例如乙酸、乳酸和富马酸等，醇类，例如，甲醇、乙醇和丙醇等以及例如甘油和豆油之类的油脂。所说的氮源包括无机和有机含氮化合物，例如硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、尿素、胨、肉羹、玉米浆和氨水等。所说的无机盐包括磷酸钾、磷酸钠和硫酸镁，以及铁、锰和其他金属的化合物。必要时，所说的介质还可以含有例如维生素、氨基酸和核酸之类的少量成分。此外，必要时也可以含有表面活性剂。优选再加入一些谷氨酸或其衍生物(0.01-5%)。特别是更优选加入谷氨酸、谷氨酸钠和谷氨酸钾。

在本发明方法中，一般在需氧的条件下进行培养比较有利。所说的培养过程，通常可以在15-40°C(优选在20-35°C)和2-10(优选3-8)pH下培养1-10(优选3-6)天。

为了按照本发明方法培养细菌，适于使用的培养基中应当含有能够被所说的细菌同化的碳源、能够被其同化的氮源、其他无机盐和少量成分。

所说的碳源包括例如葡萄糖、蔗糖和麦芽糖等糖类，例如乙酸、乳酸、富马酸、琥珀酸和马来酸等有机酸类，以及例如甘油和豆油之类的油脂。

所说的氮源包括所说的氮源包括无机和有机含氮化合物，例如硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、尿素、氨水、胨、肉羹、玉米浆、ajieki和酵母提取物等。所说的无机盐包括磷酸钾、磷酸钠和硫酸镁，以及铁、锰和其他金属的化合物。必要时，所说的介质还可以含有例如维生素、氨基酸和核酸之类的少量成分。优选再加入一些谷氨酸或其衍生物(0.01-5%)。特别是更优选加入谷氨酸、谷氨酸钠和谷氨酸钾。

在本发明方法中，一般在需氧的条件下进行培养比较有利。所说的培养过程，通常可以在15-40°C(优选在25-37°C)和5-10(优选6-9)pH下培养1-12(优选3-7)天。

本发明还提供一种生产叶酸的方法，其中包括在对氨基苯甲酸存在下使用微生物。本方法中使用的所说微生物并无特别限制，但是优选包括，例如

霉菌、放线菌类、酵母和细菌。除了这些之外，还优选使用产生谷氨酸的微生物。所说的酵母可以是属于球拟酵母属、酵母属、毕赤酵母属和假丝酵母属等属的酵母。其中优选Candida famata、Candida guilliermondii（吉利蒙念珠菌）、Torulopsis petrophilum、Pichia glucozyma、Torulopsis Glabrata(光滑球拟酵母)和Saccharomyces cerevisiae(酿酒酵母)等酵母。所说的细菌可以是属于杆菌属、红球菌属和短杆菌属等等的细菌。其中优选使用Bacillus subtilis（枯草杆菌）、Bacillus megaterium(巨大芽胞杆菌)、Rhodococcus equi 和Brevibacterium ammoniagenes等细菌。

正如上面所提到的那样，应当在对氨基苯甲酸存在下使用所说的微生物，但是优选使用能够在其每升培养液中产生1毫克或更多叶酸细菌的以及能够在其每升培养液中产生300微克或更多叶酸的酵母。

向培养微生物的所说的培养基中加入的对氨基苯甲酸类，可以象一种维生素那样，是任何能够基本上表现出对氨其苯甲酸(PABA)活性的物质；具体讲，其中包括对氨基苯甲酸以及基碱金属盐，例如对氨基苯甲酸钾、对氨基苯甲酸钠和对氨基苯甲酸的酯类，如对氨基苯甲酸甲酯、对氨基苯甲酸乙酯和对氨基苯甲酸丁酯。

需要使用的对氨基苯甲酸量，按其游离酸计应当处于0.01-5%（按液体重量计），优选0.1-2%(按液体重量计)范围内。此量对氨基苯甲酸可以一次全部加入，也可以相继分数次加入。

这样得到的培养液和从其中得到的细胞提取物，可以作为叶酸源直接加入到原料和其他物质中。必要时可以从中分离出叶酸。为了从中提取叶酸，可以方便地采用任何传统的方法。例如，可以采用〖维生素实验方法III〗(Tokyo Kagaku Dojin Co. 1985年出版)第304页及其后诸页上记载的方法。培养液中生成的叶酸，一部分以其γ-聚谷氨酸衍生物形式存在。因此，在测量存在于培养的细胞中的叶酸时，最好使用轭合酶预处理所说的细胞，使所说的聚谷氨酸部分水解，以便在测量之前使PteGlun转化成PteGlu。

为了从培养物上清液中分离叶酸以及从细胞提取物中分离出叶酸，可以采用任何通常的叶酸分离方法(参见〖维生素实验方法III〗304-309页)。例如，可以采用使用DEAE-cellulose、QAE-Sephadex A-25、Sephadex G-15 或G-25的化学分离法，以及高性能液相色谱的分配方法。

为了检测和定量测定叶酸化合物，可以使用乳酸菌的生物鉴定法，以及使用薄层色谱、离子交换色谱或反向交换色谱柱的高性能液相色谱法，同时使用紫外检测器或荧光检测器。

按照本发明得到的叶酸可以用作药品的营养剂、生产药品的原料和加工奶粉的配料，以及用作饲养动物饲料的添加剂和微生物培养时使用的添加剂。

实施例

以下，参照下列实施例进一步详细地说明本发明，但是本发明并不限制在这些实施例上。下列实施例中使用的细胞是ATCC(美国典型培养物保藏中心)获得的。

实施例1

取数只试管(直径18毫米)，每只试管中加入3毫升培养基(pH6.0)后灭菌；所说培养基是由5%葡萄糖、0.3%磷酸二氢钾、0.5%硫酸铵、0.3%谷氨酸钠、0.05%硫酸镁和0.3%碳酸钙组成。将如下表1中所示的、在葡萄糖-胨-琼酯培养基的斜面培养中生长的一铂环细胞接种到每只试管的培养基中，使这些细胞在其中于30°C下振荡培养75小时。每个培养物经离心分离后，利用微生物学测定法测量每只试管上清液中的总叶酸含量。所得到的结果示于表1之中。

表 1

菌 株	叶酸含量(*) (mg/升)
Candida famata ATCC 10536	4.0
Candida guilliermondii ATCC 9058	2.0
Torulopsis Petrophilum ATCC 20225	3.5
Pichia glucozyma ATCC 18938	1.5
Torulopsis glabrata ATCC 15126	3.1
Saccharomyces cerevisiae ATCC 26108	5.0

(*)总叶酸含量：测定方法如下：将待测定的液体样品加入到具有下面提到组成的培养基中，所加入的液体样品数量与所说的培养基量相同，然后在所说的培养基中接种需叶酸菌株(Streptococcus faecdlis ATCC 8043)的细胞并且在37°C下于培养基中培养。24小时之后，测量该培养基中如此生长的细胞数量；并且与在含有作为对照的蝶酰谷氨酸的培养基中生长的所说细胞的数量进行比较。

酪蛋白水解产物	50mg	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1mg
L-色氨酸	1mg	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.1mg
L-胱氨酸盐酸盐	8mg	NaCl	0.1mg
L-天冬酰胺	1mg	硫胺素盐酸盐	5μg
腺嘌呤硫酸盐	0.1mg	核黄素	5μg
鸟嘌呤盐酸盐	0.1mg	烟酸	10μg
黄嘌呤	0.1mg	生物素	0.04μg
尿嘧啶	0.1mg	泛酸钙	5μg
乙酸钠	200mg	对氨基苯甲酸	1μg
葡萄糖	200mg	吡哆素盐酸盐	2μg
吐温 80	10mg	盐酸吡哆醛	5μg
$KHPO_4$	30mg	盐酸吡哆胺	2μg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2mg	抗坏白酸	10mg

重量/10ml（培养基）

实施例2

对于下表2中提到的每种菌株准备数只试管(直径18毫米)，每只试管中加入3毫升培养基(pH6.0)后灭菌；所说的培养基是由6%葡萄糖、0.3% 磷酸二氢钾、1.0%硫酸铵、0.05%硫酸镁和0.3%碳酸钙组成。将如下表2中所示的、 在葡萄糖-胨- 琼酯培养基质的斜面培养中生长的一铂环细胞接种到每只试管的培养基质中，使这些细胞于30°C下振荡培养基24小时。培养基24小时之后，向含有每种菌株的一支试管中加入事先已经单独灭菌的对氨基苯甲酸钠(PABA. No)，使之浓度达到0.5%，并且使这些试管中的细胞再培养75小时。向其他试管中加入所说的盐并且对这些细胞再培养75小时。 每个试管中的培养物经离心分离后， 利用微生物学测定法测量每只试管上清液中的总叶酸含量，所得到的结果示于表2中。

表 2

菌株	总叶酸含量(*) (mg/升)	总叶酸含量(*) (mg/升)
	加入PABA.Na	未加PABA.Na
Candida famata ATCC 10536	22.1	2.6
Candida guilliermondii ATCC 9058	12.3	2.9
Torulopsis Petrophilum ATCC 20225	13.5	2.1
Pichia glucozyma ATCC 18938	5.7	0.5
Torulopsis glabrata ATCC 15126	13.9	0.3
Saccharomyces cerevisiae ATCC 26108	11.1	2.1

(*) PABA· Na: 对氨基苯甲酸钠

(*) 总叶酸含量的测定与实施例1所述的方法相同。

实施例3

取数只试管(直径18毫米)，每只试管中加入3毫升培养基(pH7.5)后灭菌；所说的培养基是由5%葡萄糖、0.3%磷酸二氢钾、0.5%硫酸铵、0.3%谷氨酸钠、0.05%硫酸镁和0.3%碳酸钙组成。将如下表3中所示的、在胨-琼酯培养基的斜面培养中生长的一铂环细胞接种到每只试管的培养基中，使这些细胞在于30°C下振荡培养68小时。每个培养物经离心分离后，利用微生物学测定法测量每只试管上清液中的总叶酸含量。所得到的结果示于表3之中。

表3

菌　株	总叶酸含量(*) (mg/升)
Bacillus subtilis ATCC 19219	3.9
Bacillus megaterium ATCC 19218	1.8

(*)总叶酸含量测定方法与实施例1中所述的方法相同。

实施例4

除了在每只试管中加入由6%蔗糖、0.5谷氨酸钠、0.3%磷酸二氢钾、0.5%硫酸铵、1.0%谷氨酸钠、0.05%硫酸镁和0.3%碳酸钙组成的3毫升培养基(pH7.5)然后灭菌，以及将如下表4中所示的、在胨-琼酯培养基的斜面培养中生长的一铂环细胞接种到每只试管的培养基中之外，与实施例2进行同样的试验，所得到的结果示于表4之中。

表4

菌　株	总叶酸含量(*) (mg/升)	总叶酸含量(*) (mg/升)
	加入PABA.Na	未加PABA.Na
Bacillus subtilis ATCC 19219	21.0	2.3
Bacillus megaterium ATCC 19218	12.3	1.9
Rhodococcus equi ATCC 21280	6.0	2.5
Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6872	8.9	2.1

(*) PABA· Na: 对氨基苯甲酸钠

(*) 总叶酸含量测定方法与实施例1中所述的方法相同。

实施例5

在十只容积5升的锥形瓶中，各加入具有与实施例2同样组成的培养基500毫升，然后灭菌。接着在每和瓶中接种一铂环Candida GuilliermondiiATCC 9058的细胞，并且在其中于30°C下振荡培养35小时。接着35小时之后，向每个培养基中加入经过单独灭菌的对氨基苯甲酸，使之浓度达到0.5%。然后再进一步培养85小时。对每个培养物进行离心，合并上清液共计2.3升。向其中加入250克活性碳(Hakutaka，Takeda Chemical co. 生产的)，在室温下搅拌1小时，然后抽滤。将收集到的活性碳残渣悬浮在1升由50%乙醇/5%氨水(9/1)组成的水溶液中，室温下搅拌1小时，然后抽滤。蒸发得到的滤液，得到500毫升浓缩液。接着使用HPLC 柱 C 18SG 120 (30×250mm) (Shiseido Co. 生产)化学分离此浓缩液，收集含有大量蝶酰谷氨酸的馏分。向其中加入2N硫酸，使此馏分的pH值调节到2.0，然后通过蒸发使之结晶，过滤得到3毫克结晶。测量此结晶的红外吸收光谱，使用高效液相色谱和荧光检测计（激发波长360nm，荧光波长455nm)测定其纯度为88.5%。

按照本发明可以有效地生产具有叶酸活性的化合物，该化合物可以用作药品的营养剂、生产药品的原料和加工奶粉的配料，以及用作饲养动物饲料的添加剂和微生物培养时使用的添加剂。