

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-143238

(P2012-143238A)

(43) 公開日 平成24年8月2日(2012.8.2)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 P 17/06 (2006.01)	C 1 2 P 17/06 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 R 1/645 (2006.01)	C 1 2 P 17/06	
	C 1 2 P 17/06	
	C 1 2 R 1:645	

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2012-51374 (P2012-51374)	(71) 出願人	000000918 花王株式会社
(22) 出願日	平成24年3月8日 (2012.3.8)		東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1 〇号
(62) 分割の表示	特願2006-344452 (P2006-344452) の分割	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
原出願日	平成18年12月21日 (2006.12.21)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	特願2006-48550 (P2006-48550)	(72) 発明者	五十嵐 一暁 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会 社研究所内
(32) 優先日	平成18年2月24日 (2006.2.24)	(72) 発明者	龍澤 修一 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会 社研究所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規微生物、当該新規微生物を用いたドデカヒドロ-3a, 6, 6, 9a-テトラメチルナフト [2, 1-b] フラン中間体の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 スクラレオールを基質としてドデカヒドロ-3a, 6, 6, 9a-テトラメチルナフト [2, 1-b] フラン中間体を効率よく生成する。

【解決手段】 目的の特性を有する微生物を単離、同定すべく鋭意検討した結果、従来公知の微生物には分類されない、目的の特性を有する複数の新規微生物を単離、同定した。新規微生物は、子囊菌綱 (Ascomycetes) に属し、スクラレオールを基質として、ドデカヒドロ-3a, 6, 6, 9a-テトラメチルナフト [2, 1-b] フラン中間体を生成する能力を有する。当該能力を有する子囊菌綱 (Ascomycetes) に属する微生物は新規な知見であり、ドデカヒドロ-3a, 6, 6, 9a-テトラメチルナフト [2, 1-b] フラン及びその中間体の製造に有用な微生物となりうる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

子囊菌綱 (Ascomycetes) に属し、スクラレオール (Sclareol) を基質として、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン合成過程における中間体を生成する能力を有し、以下の表 1 のいずれかに記載された菌学的性質を有し、

【表 1】

炭素源資化性試験	KSM-JL2842 受託番号FERM BP-10713	KSM-J3571 受託番号FERM BP-10712	KSM-JL4651 受託番号FERM BP-10714
D-Glucose	+	+	+
D-Galactose	+	+	+
L-Sorbose	+	+	w
D-Ribose	w	w	w
D-Xylose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
D-Arabinose	+	w	w
L-Rhamnose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Maltose	+	+	+
α, α -Trehalose	+	+	+
Me α -D-glucoside	+	+	w
D-Cellobiose	+	+	+
Salicin	-	w	w
Melibiose	+	+	+
Lactose	+	+	w
D-Raffinose	+	+	+
Melezitose	+	+	+
Inulin	-	w	-
Soluble starch	w	+	+
Glycerol	+	+	w
meso-Erythritol	+	+	w
Ribitol	w	-	w
D-Sorbitol	+	+	w
D-Mannitol	+	+	w
D-Galactitol	-	-	-
myo-Inositol	+	w	w
Glucono-1,5-lactone	w	w	-
Ca 2-keto-gluconic acid	-	-	w
Ca 5-keto-gluconic acid	-	-	w
DL-Lactate	+	+	w
Succinate	+	+	+
Citrate	-	w	w
Methanol	-	-	-

10

20

30

糖醱酵性試験	KSM-JL2842 受託番号FERM BP-10713	KSM-J3571 受託番号FERM BP-10712	KSM-JL4651 受託番号FERM BP-10714
D-Glucose	-	-	-

40

窒素源資化性試験	KSM-JL2842 受託番号FERM BP-10713	KSM-J3571 受託番号FERM BP-10712	KSM-JL4651 受託番号FERM BP-10714
Potassium nitrate	+	+	+

配列番号 1 ~ 3 のいずれかに示す塩基配列に対して95%以上の相同性を有する塩基配列からなる28S rDNAを有する、又は配列番号 4 ~ 6 のいずれかに示す塩基配列に対して95%以上の相同性を有する塩基配列からなる18S rDNAを有することを特徴とする微生物を、スクラレオール (Sclareol) を含有する培地で培養し、スクラレオールを基質としてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン合成過程における中間体を生成する、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造方法。

50

【請求項 2】

上記中間体として、デカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフタレンエタノール及び/又はスクラレオリド（デカヒドロ3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン-2(1H)-オン；(Sclareolide)）を回収する工程を有することを特徴とする請求項1記載のドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、スクラレオール（Sclareol）を基質としてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を生成する新規微生物に関し、さらに当該新規微生物を用いたドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン（アンプロキササン（商標）と呼ばれる場合もある）は残香性の高い香料であり、主にクラリーセージ（*Salvia sclarea*）から抽出されたスクラレオール（Sclareol）から化学変換によって製造されている。スクラレオールからドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フランを生産する工程を図1に示す。図1に示すように、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体としては、デカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフタレンエタノール及びスクラレオリド（デカヒドロ3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン-2(1H)-オン；(Sclareolide)）が知られている。また、図1には示さないが、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体としては、環状エーテル体（8,13-オキシド-12,13-デヒドロ-15,16-ジノルラブダン）が知られている。

20

【0003】

微生物によるスクラレオールからドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の変換反応は、例えば特許文献1～4に記載されている。特許文献1には*Hyphozyma roseoniger* ATCC20624によるデカヒドロ-2-ヒドロヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフタレンエタノールの生産が開示されている。また、特許文献2には*Cryptococcus laurentii* ATCC20920によるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生産が開示され、特許文献3には*Bensingtonia cillliata* ATCC20919によるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生産が開示され、特許文献4には*Cryptococcus albidus* ATCC20918及び*Cryptococcus albidus* ATCC20921によるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生産が開示されている。

30

【0004】

このように、スクラレオールを基質としてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を生産する能力を有する微生物としては、特許文献1～4に開示されたように担子菌綱もしくは*Hyphozyma*に属する微生物が知られているに過ぎなかった。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第2547713号

【特許文献2】特許第2802588号

【特許文献3】特許第3002654号

【特許文献4】特許第2063550号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

50

そこで、本発明は、上述したような実状に鑑み、スクラレオールを基質としてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を効率よく生成することができる新規な微生物を提供することを目的とし、更に、当該微生物を用いたドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上述した目的を達成するため、本発明者等は、栃木県芳賀郡及び栃木県宇都宮市の土壌を分離源として目的の特性を有する微生物を単離、同定すべく鋭意検討した結果、従来公知の微生物には分類されない、目的の特性を有する複数の新規微生物を3株単離、同定することができた。本発明は、これら新規微生物が有するスクラレオールを基質としてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生成を行うことができるといった知見に基づいてなされたものである。

10

【0008】

本発明に係る新規微生物は、いずれも子囊菌綱(Ascomycetes)に属し、スクラレオールを基質として、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を生成する能力を有する。当該能力を有する子囊菌綱(Ascomycetes)に属する微生物は新規な知見であり、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン及びその中間体の製造に有用な微生物となりうる。本発明者らが単離、同定した新規微生物に関して28S rRNAをコードする遺伝子(以下、28S rDNAと称する)の塩基配列を決定したところ、配列番号1~3に示す塩基配列であった。また、当該新規微生物に関して18S rRNAをコードする遺伝子(以下、18S rDNAと称する)の塩基配列を決定したところ、配列番号4~6に示す塩基配列であった。さらに、当該新規微生物は表1に示す菌学的性質を示した。

20

【0009】

【表 1】

炭素源資化性試験	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-Glucose	+	+	+
D-Galactose	+	+	+
L-Sorbose	+	+	w
D-Ribose	W	w	w
D-Xylose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
D-Arabinose	+	w	w
L-Rhamnose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Maltose	+	+	+
α, α -Trehalose	+	+	+
Me α -D-glucoside	+	+	w
D-Cellobiose	+	+	+
Salicin	-	w	w
Melibiose	+	+	+
Lactose	+	+	w
D-Raffinose	+	+	+
Melezitose	+	+	+
Inulin	-	w	-
Soluble starch	W	+	+
Glycerol	+	+	w
meso-Erythritol	+	+	w
Ribitol	W	-	w
D-Sorbitol	+	+	w
D-Mannitol	+	+	w
D-Galactitol	-	-	-
myo-Inositol	+	w	w
Glucono-1,5-lactone	W	w	-
Ca 2-keto-gluconic acid	-	-	w
Ca 5-keto-gluconic acid	-	-	w
DL-Lactate	+	+	w
Succinate	+	+	+
Citrate	-	w	w
Methanol	-	-	-
糖類資化性試験	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-Glucose	-	-	-
窒素源資化性試験	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
Potassium nitrate	+	+	+

10

20

30

40

【0010】

本発明者は、配列番号 1 ~ 3 に示す 28S rDNA の塩基配列、配列番号 4 ~ 6 に示す 18S rDNA の塩基配列、

50

NAの塩基配列及び表1に示す菌学的性質に基づいて新規微生物の同定を行ったところ、当該新規微生物は子囊菌綱(Ascomycetes)に属する以外は同定不能であった。すなわち、新規微生物は、子囊菌綱(Ascomycetes)に属する既知の属及び種には分類されず、新属を構成すると結論付けられた。なお、菌学的性質を用いた分類は、Barnett, J. A., Payne, R. W., and Yarrow, D. (2000) *Yeasts: Characteristics and identification*, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (1998) *The Yeasts, a taxonomic study*, 4th edition. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. に従った。

【0011】

なお、新規微生物は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(IPOD : 〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に2006年1月12日付けで受託番号FERM BP-10713及びFERM BP-10712、2006年7月13日付けで受託番号FERM BP-10714として寄託した。

【0012】

すなわち、本発明に係る微生物は、子囊菌綱(Ascomycetes)に属し、スクラレオールを基質としてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン合成過程における中間体を生成する能力を有する微生物である。また、本発明に係る微生物は、配列番号1~3に示す塩基配列に対して95%以上の相同性を有する塩基配列からなる28S rDNAを有する、又は配列番号4~6に示す塩基配列に対して95%以上の相同性を有する塩基配列からなる18S rDNAを有することが望ましい。さらに、本発明に係る微生物は、表1に記載された菌学的性質を有することが望ましい。さらにまた、本発明に係る微生物は、受託番号FERM BP-10713、FERM BP-10712もしくはFERM BP-10714で特定される子囊菌綱酵母、当該子囊菌綱酵母の属する属、好ましくは種、より好ましくは株に属する微生物であることが望ましい。

【0013】

本発明において上記中間体としては、デカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフトレンエタノール及び/又はスクラレオリド(デカヒドロ3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン-2(1H)-オン)を挙げることができる。

【0014】

一方、本発明は、本発明に係る新規微生物を使用したドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造方法を提供することができる。すなわち、本発明に係るドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造方法は、スクラレオールを含有する培地で上記新規微生物を培養し、スクラレオールを基質としてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン合成過程における中間体を生成するものである。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、子囊菌綱(Ascomycetes)に属し、スクラレオールを基質としてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン合成過程における中間体を生成する能力を有する新規微生物を提供することができる。この中間体からは、香料等の原料となるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フランを製造することができる。したがって、本発明に係る新規微生物を使用することによって、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フランを低コストに製造することができる。

【0016】

また、本発明によれば、香料等の原料となるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フランの原料となるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造方法を提供することができる。本発明に係るドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造方法によれば、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フランを低コストで製造することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0017】

【図1】スクラレオールからドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フランを生産する工程を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明を詳細に説明する。

新規微生物

本発明に係る新規微生物は、子囊菌綱 (Ascomycetes) に属し、スクラレオールを基質としてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン合成過程における中間体 (ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体) を生成する微生物である。ここで、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体とは、デカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフトレンエタノール及びスクラレオリド (デカヒドロ3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン-2(1H)-オン) を意味する。

10

【0019】

本発明に係る新規微生物は、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生成能を指標として、土壌から単離することができる。ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生成能は、供試微生物をスクラレオール含有培地にて培養し、培地中に含まれるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を検出することで評価することができる。培地中に含まれるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体は、供試微生物を除去した後の培地から有機溶媒を用いてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を抽出した後、例えばガスクロマトグラフィー (GC) 等によって検出することができる。

20

【0020】

なお、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の検出には、GCに限らず、例えば、気液クロマトグラフィー (GLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、高圧液体クロマトグラフィー (HPLC)、赤外スペクトル (IR) 及び核磁気共鳴 (NMR) のような従来公知の分析方法を使用することができる。

【0021】

本発明者は、このような手法によって栃木県芳賀郡及び栃木県宇都宮市の土壌から子囊菌綱 (Ascomycetes) に属する新規微生物を単離している。単離した新規微生物は、スクラレオールを含有する培地で培養することによって、培地中にドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を生成する能力を有している。本発明者は、この新規微生物を *Ascomycete* sp. KSM-JL2842、*Ascomycete* sp. KSM-J3571 及び *Ascomycete* sp. KSM-JL4651 と命名し、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IP OD: 〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) にそれぞれ受託番号 FERM BP-10713、FERM BP-10712 及び FERM BP-10714 として寄託している。

30

【0022】

本発明に係る新規微生物は、当該受託番号 FERM BP-10713、FERM BP-10712 もしくは FERM BP-10714 で特定される子囊菌綱 (Ascomycetes) に属する酵母及び、当該酵母と同一の属に分類され、好ましくは当該酵母と同一の種に分類され、より好ましくは当該酵母と同一の株に分類され且つドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を生成する能力を有する微生物を含むこととなる。

40

【0023】

また、受託番号 FERM BP-10713、FERM BP-10712 及び FERM BP-10714 で特定される子囊菌酵母は、それぞれ配列番号 1、2 及び 3 に示す塩基配列を含む 28S rDNA を有している。したがって、本発明に係る新規微生物は、配列番号 1 ~ 3 のいずれか 1 に示す塩基配列に対して 95% 以上、好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の相同性を有する塩基配列を含む 28S rDNA を有する子囊菌酵母であって、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生成能を有する微生物を含むこととなる。

50

【0024】

さらに、受託番号FERM BP-10713、FERM BP-10712及びFERM BP-10714で特定される子囊菌酵母は、それぞれ配列番号4、5及び6に示す塩基配列を含む18S rDNAを有している。したがって、本発明に係る新規微生物は、配列番号4～6のいずれか1に示す塩基配列に対して95%以上、好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の相同性を有する塩基配列を含む18S rDNAを有する子囊菌酵母であって、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生成能を有する微生物を含むこととなる。

【0025】

新規微生物によるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造

上述した本発明に係る新規微生物を使用して、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を製造することができる。製造されたドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体は、付加価値の高い、残香性の高い香料であるドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン（ドデカヒドロ3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン）を製造する際の原料として使用することができる。

【0026】

本発明に係る新規微生物を使用してドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を製造する際には、先ず、本発明に係る新規微生物を、スクラレオールを含有する培地で培養する。培地としては、子囊菌綱に属する微生物が生育可能である培地であれば如何なる組成の培地をも使用することができる。使用可能な培地は、炭素源、窒素源、金属ミネラル類及びビタミン類等を含有する固体培地及び液体培地等を挙げることができる。なお、本発明に係る新規微生物を培養するための培地には、培養条件等に応じて界面活性剤や消泡剤を添加してもよい。

【0027】

培地に添加される炭素源としては、単糖、二糖、オリゴ糖及び多糖が挙げられ、これら2種以上を混合して用いてもよい。ここで糖質以外の炭素源としては、例えば酢酸塩等の有機酸塩が挙げられる。ここで、炭素源としては、これら各成分を単独で使用しても良いし、必要に応じ複数成分を混合して使用しても良い。

【0028】

また、窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム及び酢酸アンモニウム等の無機並びに有機アンモニウム塩、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス及びカゼイン加水分解物等の窒素含有有機物、グリシン、グルタミン酸、アラニン及びメチオニン等のアミノ酸等が挙げられる。ここで、窒素源としては、これら各成分を単独で使用しても良いし、必要に応じ複数成分を混合して使用しても良い。

【0029】

さらに、金属ミネラル類としては、例えば塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛及び炭酸カルシウム等が挙げられる。ここで、金属ミネラル類としては、これら各成分を単独で使用しても良いし、必要に応じ複数成分を混合して使用しても良い。

【0030】

本発明に係る新規微生物を培養する際の培養条件としては、特に限定されず、至適範囲のpH及び温度に調整して行われる。具体的にpHの至適範囲は、3～8、好ましくは4～8、より好ましくは5～7である。また、温度の至適範囲は、10～35、好ましくは15～30、より好ましくは20～30である。培養は、振とう培養、嫌気培養、静置培養、醗酵槽による培養の他、休止菌体反応及び固定化菌体反応も用いることができる。

【0031】

このような組成の培地に添加するスクラレオール濃度は、特に限定されないが、0.1%～50%とすることが好ましい。スクラレオールは、培養に先立って培地に添加しても良いし、培養途中で添加（流加培養）してもよい。また、スクラレオール以外の組成、例えば炭

10

20

30

40

50

素源、窒素源、ビタミン、ミネラル、界面活性剤、消泡剤も同時に流加することが可能である。

【0032】

ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体は、上述したように新規微生物を培養した後、培地から回収することができる。ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を培地から回収する方法は、公知の方法に従って行えば良く、特に限定されない。例えば、培地から菌体を分離除去した後、遠心分離、限外ろ過、イオン交換、逆浸透膜、電気透析、塩析、晶析等を組み合わせることによりドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を単離・精製することができる。

10

【0033】

製造されたドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を用いてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フランを製造する方法としては、特に限定されず、従来公知の方法を適宜使用することができる。具体的には、スクラレオリドは、例えば水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、又は水素化ホウ素カリウム/塩化リチウム混合物で還元することによって、デカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフタレンエタノールに変換する。デカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフタレンエタノールは、酸性触媒、例えば、p-トルエンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸クロリド、触媒量の硫酸及び酸性イオン交換体を用いて、種々の溶媒中で脱水環化によりドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フランに変換される。

20

【実施例】

【0034】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

【0035】

〔実施例1〕新規微生物の単離

以下のようにして、栃木県芳賀郡及び栃木県宇都宮市の土壌より新規微生物の単離を行った。

先ず、0.2% 酵母エキス、0.2% 硝酸アンモニウム、0.1% リン酸1カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム・7水和物、2.0% 寒天、1.0% スクラレオール（別滅菌）及び0.5% ツイーン80（別滅菌）からなる寒天培地上に土壌懸濁液を100 μ l塗布した。25 $^{\circ}$ Cにて7~14日間培養し、生育したコロニーを0.2% 酵母エキス、0.2% 硝酸アンモニウム、0.1% リン酸1カリウム及び0.05% 硫酸マグネシウム・7水和物を含有する液体培地に接種し、25 $^{\circ}$ Cで1日間培養し種菌とした。次に、0.2% 酵母エキス、0.2% 硝酸アンモニウム、0.1% リン酸1カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム・7水和物、1.0% スクラレオール（別滅菌）及び0.5% ツイーン80（別滅菌）を含有する培地に種菌を1%植菌し、25 $^{\circ}$ Cにて1週間培養した。

30

【0036】

培養終了後、培養液0.1mlを使用し、酢酸エチル0.6mlにて目的物質を抽出し、適宜希釈してガスクロマトグラフィー（GC）分析を行った。GC分析装置はAgilent technologies 6890Nで行い、分析条件は以下のとおりである。検出器としてはFID（Flame Ionization Detector）を使用し、注入口温度を250 $^{\circ}$ Cとし、注入法をスプリットモード（スプリット比100:1）とし、トータルフローを200ml/分とし、カラム流速を0.4ml/分とし、カラムとしてはJ&W社製のDB-WAX（0.1mm \times 10m）を使用し、オープン温度を250 $^{\circ}$ Cとした。本条件により、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体である環状エーテル体は0.8分付近にピークが現れ、スクラレオリドは2.4分付近にピークが現れ、スクラレオールは2.7分付近にピークが表れ、デカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフタレンエタノールは3分付近にピークが現れた。

40

【0037】

本条件で6950個の種菌についてドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フ

50

ラン中間体の生成能を評価したところ、主としてデカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフタレンエタノールを生成することができる新規微生物を単離することができた。単離した新規微生物をKSM-JL2842、KSM-J3571及びKSM-JL4651と命名した。

【0038】

〔実施例2〕新規微生物の分類

実施例1で単離したKSM-JL2842、KSM-J3571及びKSM-JL4651の菌学的性質を特定するとともにrDNAを解析することで、これらの菌株の分類を試みた。

【0039】

先ず、KSM-JL2842の菌学的性質を以下のように特定した。YM寒天（Becton Dickinson）平板培地上において湿性で淡赤色のコロニーが観察され、コロニーの周辺部はやや平滑状を示した。微視的特徴を観察した結果、卵形～楕円形、円筒形の栄養細胞の形成が認められ、栄養細胞は出芽によって増殖する様子が観察された。生化学的性状試験を行った結果、表2に示す結果が得られた。なお、表2において、+は反応が陽性、-は反応が陰性、wは弱い陽性反応が認められたことを示す。また、本KSM-JL2842は25℃で生育し、30℃以上では生育しなかった。

10

【0040】

KSM-J3571の菌学的性質を以下のように特定した。YM寒天（Becton Dickinson）平板培地上において湿性で淡赤色～黄赤色のコロニーが観察され、コロニーの周辺部は平滑状を示した。微視的特徴を観察した結果、卵形～楕円形、紡錘形の栄養細胞の形成が認められ、栄養細胞は出芽によって増殖する様子が観察された。生化学的性状試験を行った結果、表2に示す結果が得られた。また、本KSM-J3571は25℃で生育し、30℃で弱い生育が認められ、35℃以上では生育しなかった。

20

【0041】

KSM-JL4651の菌学的性質を以下のように特定した。YM寒天（Becton Dickinson）平板培地上において湿性で淡赤色のコロニーが観察され、コロニーの周辺部はやや平滑状を示した。微視的特徴を観察した結果、卵形～楕円形、円筒形の栄養細胞の形成が認められ、栄養細胞は出芽によって増殖する様子が観察された。生化学的性状試験を行った結果、表2に示す結果が得られた。また、本KSM-JL4651は30℃で生育し、35℃以上では生育しなかった。

【0042】

30

【表 2】

炭素源資化性試験	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-Glucose	+	+	+
D-Galactose	+	+	+
L-Sorbose	+	+	w
D-Ribose	W	w	w
D-Xylose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
D-Arabinose	+	w	w
L-Rhamnose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Maltose	+	+	+
α, α -Trehalose	+	+	+
Me α -D-glucoside	+	+	w
D-Cellobiose	+	+	+
Salicin	-	w	w
Melibiose	+	+	+
Lactose	+	+	w
D-Raffinose	+	+	+
Melezitose	+	+	+
Inulin	-	w	-
Soluble starch	W	+	+
Glycerol	+	+	w
meso-Erythritol	+	+	w
Ribitol	W	-	w
D-Sorbitol	+	+	w
D-Mannitol	+	+	w
D-Galactitol	-	-	-
myo-Inositol	+	w	w
Glucono-1,5-lactone	W	w	-
Ca 2-keto-gluconic acid	-	-	w
Ca 5-keto-gluconic acid	-	-	w
DL-Lactate	+	+	w
Succinate	+	+	+
Citrate	-	w	w
Methanol	-	-	-
糖醱性試験	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
D-Glucose	-	-	-
窒素源資化性試験	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
Potassium nitrate	+	+	+

10

20

30

40

次に、KSM-JL2842、KSM-J3571及びKSM-JL4651のrDNAを以下のように解析した。すなわち、O'Donnell等の方法(O'Donnell, K. 1993. *Fusarium and its near relatives*. In 50

Reynolds, D. R. and Taylor, J. W. (Eds) *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, CAB International, Wallingford) により、28S rDNA D1/D2領域及び18S rDNAの解析を行い、帰属分類群を推定した。28S rDNA D1/D2領域の塩基配列を決定した結果をそれぞれ配列番号1～3に示す。また、18S rDNAの塩基配列を決定した結果をそれぞれ配列番号4～6に示す。なお相同検索はBLASTを用いた。

【0043】

KSM-JL2842から得られた28S rDNA D1/D2領域塩基配列は子囊菌類の一種である*Pseudourotium zonatum* (AF096198)の塩基配列と94.9%、*Crinula caliciiformis* (AY544680)の塩基配列と94.6%の相同性を示した。また、18S rDNA塩基配列は子囊菌の一種である*Bulgaria inquinans* (AJ224362)の塩基配列と98.8%、*ascomycete sp.* BBA71218 (AJ301960)の塩基配列と98.9%、*Cryptosporiopsis radicicola* (DQ002903)の塩基配列と98.9%などのように高い相同性を示した。しかしながら、KSM-JL2842は、網レベル以下の分類群の推定は困難であり、子囊菌綱に分類される全く新規な属を構成する酵母であると結論付けられた。本実施例の結果から、本菌を*Ascomycete sp.* KSM-JL2842として同定することができた。

【0044】

KSM-J3571から得られた28S rDNA D1/D2領域塩基配列は子囊菌類の一種である*Pseudourotium zonatum* (AF096198)の塩基配列と94.9%、*Leuconeurospora pulcherrima* (AF096193)の塩基配列と94.8%、*Crinula caliciiformis* (AY544680)の塩基配列と94.6%の相同性を示した。また、18S rDNA塩基配列は子囊菌の一種である*ascomycete sp.* BBA71218 (AJ301960)の塩基配列と99.0%、*Bulgaria inquinans* (AJ224362)の塩基配列と98.8%の相同性を示した。しかしながら、KSM-J3571は、網レベル以下の分類群の推定は困難であり、子囊菌綱に分類される全く新規な属を構成する酵母であると結論付けられた。本実施例の結果から、本菌を*Ascomycete sp.* KSM-J3571として同定することができた。

【0045】

KSM-JL4651から得られた28S rDNA D1/D2領域塩基配列は子囊菌類の一種である*Pseudourotium zonatum* (AF096198)の塩基配列と94.6%、*Leuconeurospora pulcherrima* (AF096193)の塩基配列と94.4%の相同性を示した。また、18S rDNA塩基配列は子囊菌の一種である*ascomycete sp.* BBA71218 (AJ301960)の塩基配列と99.0%、*Bulgaria inquinans* (AJ224362)の塩基配列と98.8%の相同性を示した。しかしながら、KSM-JL4651は、網レベル以下の分類群の推定は困難であり、子囊菌綱に分類される全く新規な属を構成する酵母であると結論付けられた。本実施例の結果から、本菌を*Ascomycete sp.* KSM-JL4651として同定することができた。

【0046】

なお、*Ascomycete sp.* KSM-JL2842及びKSM-J3571は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD: 〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に2006年1月12日付けで受託番号FERM BP-10713及びFERM BP-10712として、*Ascomycete sp.* KSM-JL4651は、2006年7月13日にFERM BP-10714として寄託した。

【0047】

〔実施例3〕ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生産性検討

本実施例では、*Ascomycete sp.* KSM-JL2842のドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生産性を検討した。まず、*Ascomycete sp.* KSM-JL2842を2.1% YM broth (Becton Dickinson)に1白金耳植菌し、25℃にて2日間振とう培養したものを種菌とした。次に、2.1% YM broth、0.1% 硫酸マグネシウム・7水和物、1% ツイーン80及び2% スクラレオールからなる培地へ種菌を2%植菌し、25℃にて振とう培養を行った。培養液は実施例1の手法にて抽出及びGC分析を行い、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生産量を求めた。結果を表3に示す。なお、表3に示した数値の単位は“g/L”である

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

【 表 3 】

	4日	7日	10日
スクラレオリド	0.3	0.4	0.2
デカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a- テトラメチルナフタレンエタノール	12.0	15.7	14.5
環状エーテル	0.5	0.4	0.8

【 0 0 4 9 】

表 3 に示した結果より、Ascomycete sp. KSM-JL2842は、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体のうち主としてデカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a-テトラメチルナフタレンエタノールを生成できることが明らかとなった。

10

【 0 0 5 0 】

〔実施例 4〕ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の製造方法

本実施例では、Ascomycete sp. KSM-JL2842、KSM-J3571及びKSM-JL4651のドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生産性を検討した。まず、これらの菌株を0.2% Yeast extract (Becton Dickinson)、0.2% 硝酸アンモニウム、0.1% リン酸 1 カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム・7水和物、1.0% グルコースに1白金耳植菌し、25℃にて2日間振とう培養したものを種菌とした。次に、0.2% Yeast extract (Becton Dickinson)、0.2% 硝酸アンモニウム、0.1% リン酸 1 カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム・7水和物、1.0% グルコース、0.5% ツイーン80及び1.0% スクラレオールからなる培地へ種菌を1%植菌し、25℃にて6日間振とう培養を行った。培養液は実施例1の手法にて抽出及びGC分析を行い、ドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体の生産量を求めた。結果を表4に示す。なお、表4に示した数値の単位は“g/L”である

20

【 0 0 5 1 】

【 表 4 】

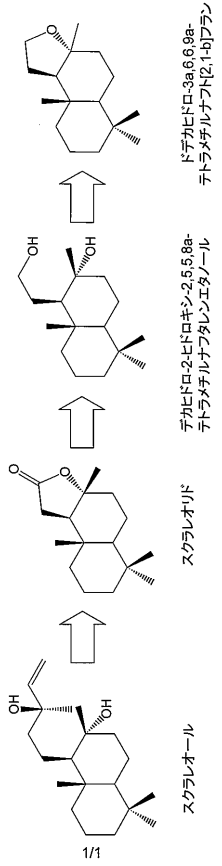
	KSM-JL2842	KSM-J3571	KSM-JL4651
スクラレオリド	0.4	3.1	0.4
デカヒドロ-2-ヒドロキシ-2,5,5,8a- テトラメチルナフタレンエタノール	2.0	0.2	0.7
環状エーテル	trace	0.1	trace

30

【 0 0 5 2 】

表 4 に示した結果より、Ascomycete sp. KSM-JL2842、KSM-J3571及びKSM-JL4651はドデカヒドロ-3a,6,6,9a-テトラメチルナフト[2,1-b]フラン中間体を生産することが明らかとなった。

【 図 1 】



【 配列表 】

2012143238000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 檜垣 紀彦

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 萩原 浩

和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内

Fターム(参考) 4B064 AE45 AE46 CA05 CB16 CB21 CC03 CD05 DA20