

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3810860号
(P3810860)

(45) 発行日 平成18年8月16日(2006.8.16)

(24) 登録日 平成18年6月2日(2006.6.2)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 17/12 (2006.01)

C 1 2 P 17/12

C O 7 D 213/79 (2006.01)

C O 7 D 213/79

C O 7 D 241/24 (2006.01)

C O 7 D 241/24

C 1 2 R 1/05 (2006.01)

C 1 2 P 17/12

C 1 2 R 1:05

請求項の数 4 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平8-142719
 (22) 出願日 平成8年6月5日(1996.6.5)
 (65) 公開番号 特開平8-332094
 (43) 公開日 平成8年12月17日(1996.12.17)
 審査請求日 平成15年5月20日(2003.5.20)
 (31) 優先権主張番号 1664/95-9
 (32) 優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)
 (33) 優先権主張国 スイス(CH)
 (31) 優先権主張番号 1733/95-2
 (32) 優先日 平成7年6月13日(1995.6.13)
 (33) 優先権主張国 スイス(CH)

微生物の受託番号 DSM 6335

(73) 特許権者 391003864
 ロンザ リミテッド
 LONZA LIMITED
 スイス国 バーゼル ミュンヒェンシュタ
 イナーシュトラーク 38
 (74) 代理人 100058479
 弁理士 鈴江 武彦
 (74) 代理人 100084618
 弁理士 村松 貞男
 (74) 代理人 100068814
 弁理士 坪井 淳
 (74) 代理人 100092196
 弁理士 橋本 良郎
 (74) 代理人 100095441
 弁理士 白根 俊郎

最終頁に続く

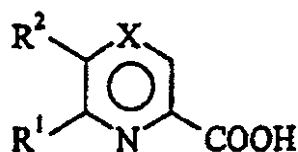
(54) 【発明の名称】 アルカリゲネス属の微生物を利用してヘテロ芳香族カルボン酸を製造する微生物学的方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

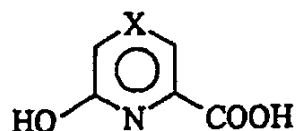
下記的一般式で表わされるヘテロ芳香族カルボン酸またはその生理的に許容される塩を製造する微生物学的方法において、

【化1】



I

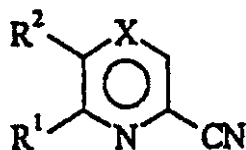
【化2】



II

[式中、R¹およびR²は同一または異なるものであって、水素またはハロゲンの原子を表

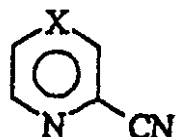
わし、Xは窒素原子または - C H - を著わす。]
 下記の一般式のヘテロ芳香族ニトリルを基質とし、
 【化3】



III

10

【化4】



IV

[式中、R¹、R²およびXは、上記した意味を有する。]
 これを、2-シアノピリジンを利用するアルカリゲネス属の微生物であって、生物学的転換に先立って0.1～20重量%のジカルボン酸、トリカルボン酸または炭水化物の存在下に培養されたものを使用して対応するカルボン酸に転化し、適切であればこれをさらに生理的に許容し得る塩に転化することを特徴とする方法。

20

【請求項2】

生物学的転換を、アルカリゲネス・フェーカリス種に属する寄託番号DSM 6335の微生物またはその機能的に同等な変異種および突然変異種を用いて実施することを特徴とする請求項1の方法。

【請求項3】

生物学的転換を、pH 4～10および温度10～50において実施することを特徴とする請求項1または2の方法。

30

【請求項4】

ピコリン酸またはその生理的に許容し得る塩を製造する方法であって、基質としての2-シアノピリジンを、2-シアノピリジンを利用するアルカリゲネス属の微生物であって、生物学的転換に先立って0.1～20重量%のジカルボン酸、トリカルボン酸または炭水化物の存在下に培養されたものを使用して対応するカルボン酸に転化し、適切であればこれをさらに生理的に許容し得る塩に転化することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

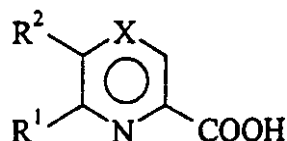
【発明の属する技術分野】

本発明は、下記の一般式で表わされる

40

【0002】

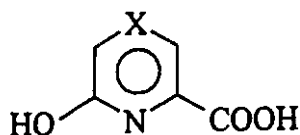
【化5】



I

【0003】

【化6】



II

【 0 0 0 4 】

〔式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なるものであって、水素またはハロゲンの原子を表わし、 X は窒素原子または $-CH-$ を表わす。〕

ヘテロ芳香族カルボン酸またはその生理的に許容される塩の、新規な微生物学的製造方法に関する。

【 0 0 0 5 】

たとえば 6 - ヒドロキシピコリン酸のようなヘテロ芳香族カルボン酸は、医薬品製造の中間体、たとえば 2 - オキシピリミジン (ベリヒテ・デア・ドイッチェン・ヒェミッシェン・ゲゼルシャフト 1912, 45, p. 2456 ~ 2467) または除草剤製造の中間体として重要である。

【 0 0 0 6 】

一般に、ニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼまたはニトリラーゼを含有する微生物は、ニトリルを対応する酸に転換することが知られている。たとえば EP - A 0 1 8 7 6 8 0 には、コリネバクテリウム属、ノカルディア属、バチルス属、バクテリジウム属、ミクロコッカス属およびブレヴィバクテリウム属の微生物を利用してニチコン酸を製造する、微生物学的方法が記載されている。この反応は、光のエネルギーの存在下を実施すること 20
を要する。EP - A 0 4 4 4 6 4 0 には、たとえばロドコッカス属の微生物を利用してニコチン酸を製造する微生物学的方法が開示されている。この反応は、ラクタムの存在下を実施することが必要である。

【 0 0 0 7 】

さらに、ロドコッカス・ロドクラス (*Rhodococcus rhodochrous*) J 1 種は、たとえば 2 - シアノピラジンをピラジンカルボン酸に転換することが知られている。(Kobayashi et al., J. of Antibiotics, 43, No. 10, 1990, p. 1316 ~ 1320) しかしながら、この微生物は 2 - シアノピリジンをピコリン酸に転換する能力はない (Mathew et al., Appl. Environmental Microbiology, 54, No. 4, 1988, p. 1 30
030 ~ 1032)。

【 0 0 0 8 】

2 - シアノピリジンを利用するアルカリゲネス属の微生物は 2 - シアノピリジンを 6 - ヒドロキシピコリン酸に変換することも、知られている (EP - A 0 5 0 4 8 1 8)。この方法の不利益な点は、6 - ヒドロキシピコリン酸が中程度の収率でしか生成しないことである。

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、ヘテロ芳香族カルボン酸またはその生理的に許容し得る塩、たとえばピラジンカルボン酸、ピコリン酸またはピコリン酸クロムを、アルカリゲネス属の微生物を利用して、より経済的な微生物学的製造方法であって、生成するカルボン酸またはその生理 40
的に許容し得る塩が高収率で得られるような製造方法を提供することにある。

【 0 0 1 0 】

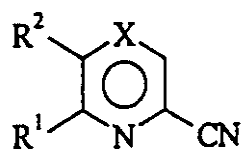
この目的は、請求項 1 に記載の方法により達成される。

【 0 0 1 1 】

本発明の製造方法は、下記の一般式で表わされるヘテロ芳香族ニトリル

【 0 0 1 2 】

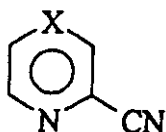
【 化 7 】



III

【 0 0 1 3 】

【 化 8 】



IV

10

【 0 0 1 4 】

〔 式中、X, R¹ および R² は前記した意味を有する。 〕

を基質とし、これを 2 - シアノピリジンを利用するアルカリゲネス属の微生物であって、生物学的転換に先立ってジカルボン酸、トリカルボン酸または炭水化物の存在下に培養したものを利用して、一般式 I または II のヘテロ芳香族カルボン酸に転換するような手法で実施される。ヘテロ芳香族カルボン酸は、ついで、所望によりその生理的に許容できる塩に転化される。これらカルボン酸の「生理的に許容できる塩」とは、以下、たとえばクロム、カルシウムまたはアンモニウムの塩である。

20

【 0 0 1 5 】

実際の生物学的転換に先立って、本発明の方法に使用するアルカリゲネス属の微生物は、通常の培養をして、その有効な酵素を 2 - シアノピリジンで好都合に誘起させる。2 - シアノピリジンは、この培養および誘起のために、0.01 ~ 20 重量 % の濃度で、好ましくは 0.1 ~ 1 重量 % の濃度で使用する。

【 0 0 1 6 】

「ジカルボン酸」の語は、以下、フマル酸、コハク酸、マレイン酸、グルタル酸、マロン酸またはそれらの塩および誘導体たとえばエステルを意味する。

【 0 0 1 7 】

「トリカルボン酸」の語は、以下、クエン酸、イソクエン酸またはそれらの塩および誘導体たとえばエステルを意味する。これらジカルボン酸およびトリカルボン酸の塩および誘導体であって使用に適するものは、フマレート、マレート、マロネート、オキサリセテート、サイトレート、アコニテート、イソサイトレート、2 - オキシグルタレート、サクシネートまたはサクシニル - CoA である。フマレート、マレートまたはサクシネートが好ましく使用される。

30

【 0 0 1 8 】

「炭水化物」の語は、以下、グルコースのようなモノサッカライド、シュクロース、トレハロースまたはマルトースのようなジサッカライド、ラフィノースのようなトリサッカライド、さらにはグリセロールのようなシュガーアルコールを意味する。グリセロールが、炭水化物としては好ましく使用される。

40

【 0 0 1 9 】

ジカルボン酸、トリカルボン酸または炭水化物は、0.1 ~ 20 重量 % の濃度、好ましくは 0.5 ~ 5 重量 % の濃度で好都合に使用される。

【 0 0 2 0 】

培地としては、当業者の間に常用されているもの、たとえば K u l l a e t a l . のミネラル塩培地 (A r c h . M i c r o b i o l . , 1 3 5 , 1 - 7 , 1 9 8 3) の低モル度リン酸緩衝液、または下記の表 1 に示されたものを使用することができる。好ましくは表 1 に記載のものを使用する。

【 0 0 2 1 】

培養期の後であって基質の添加の前に、微生物を常用の分離手段によって収穫してもよい

50

し、あるいはまた、基質を直接微生物に対して加えてもよい。

【0022】

生物学的転換に使用する基質である一般式IIIおよびIVのヘテロ芳香族ニトリルたとえば2-シアノピリジンは、市場で入手できる化合物である。

【0023】

一般式I～IVにおけるXは、窒素原子または-CH-を表わし、好ましくは-CH-である。基R¹およびR²は同一または異なるものであって、水素または、フッ素、塩素、臭素もしくはヨウ素のようなハロゲンを表わす。あり得る基質は、従って、2-シアノピリジン、6-クロロ-2-シアノピリジン、5,6-ジクロロ-2-シアノピリジン、2-シアノピラジン、6-クロロ-2-シアノピラジン、5-ブromo-6-クロロ-2-10
シアノピラジンである。2-シアノピリジン、2-シアノピラジンまたは6-クロロ-2-シアノピリジンが、基質として好都合に使用される。

【0024】

基質は、生物学的転換のためには、一時的に加えてもよいし、連続的に加えてもよい。基質は、培地中の基質濃度が20重量%を超えないようなやり方で、好ましくは基質濃度が10重量%を超えないようなやり方で加えるのがよい。

【0025】

生物学的転換は、通常は静止した細胞で行なわれ、2-シアノピリジンを利用するアルカリゲネス・フェーカリス種の微生物（この微生物はEP-A0504818に記載され、DSM6335の番号を与えられている）およびその機能的に同等な変異種および突然変異種を使用して実施する。上記の微生物は1991年1月3日に、ドイツ国ブラウンシュヴァイク・D-38124,マシェローダ・ヴェク1bのドイッチェ・ザムルング・フオン・ミクロオーガニズメン・ウント・ツェルクルトゥーレン・GmbHに、ブタペスト条約の規定に従って寄託された。20

【0026】

「機能的に同等な変異種および突然変異種」とは、もとの微生物と本質的に同じ性質と機能を有する微生物を意味する。このような変異種および突然変異種は、たとえば紫外線照射のような冒険的な方法によって得られる。

【0027】

生物学的転換には、微生物の培養に用いたものと同じ培地を使用することができる。生物学的転換はまた、上述したジカルボン酸、トリカルボン酸または炭水化物の存在下でも、不存在下でも起り得る。30

【0028】

pHは好ましくは4～10の範囲、より好ましくは5～9の範囲である。生物学的転換は、温度10～50において実施することができる。好ましい温度は、20～40である。

【0029】

通常の転換時間である6～100時間を経過した後、式IまたはIIに従う適切なカルボン酸が、常用の処理操作たとえば酸性化によって得られる。カルボン酸はまた、たとえばアンモニウム塩やクロム塩のような塩の形で単離することができる。40

【0030】

製造されたヘテロ芳香族カルボン酸が6-位においてヒドロキシル化されているもの（一般式II）である場合、生物学的転換は好氣的条件下に実施するのが有利である。しかしながら、ヒドロキシル化されていないヘテロ芳香族カルボン酸たとえばピコリン酸を製造しようとする場合、生物学的転換は嫌氣的条件下に実施するのが有利である。

【0031】

【実施例】

〔実施例1〕

6-ヒドロキシピコリン酸の製造

アルカリゲネス・フェーカリスDSM6335株を使用する6-ヒドロキシピコリン酸製50

造の条件は、下記のとおりである。 操作容積が 5 リットルある 7.5 リットル発酵容器を使用した。 アルカリゲネス・フェーカリス DSM 6335 を、フマル酸ナトリウムを唯一の炭素源およびエネルギー源とするミネラル塩培地(表 1)で、2-シアノピリジンをインデューサとして用い、30℃で、攪拌速度 600 rpm、pH 7.0 で培養した。その間、エアレーションの速度は約 3 リットル/分とした。 フマル酸ナトリウムの追加を、 pO_2 をコントロールして $pO_2 > 30\%$ であるときに行なった。 濃度 20% のフマル酸ナトリウムのストック溶液に、0.5% の 2-シアノピリジンを加えたものを使用した。 650 nm (OD_{650}) で測定した光学密度が 1.6 に至るまで、23 時間にかたって、生物学的転換がスタートするのに先立って細胞を培養した。 成長相において、約 160 g のフマル酸ナトリウムを、濃度 20% の溶液(約 800 ml)として使用した

10

【0032】

2-シアノピリジンの好気的な生物学的転換により 6-ヒドロキシピコリン酸にする間、炭素およびエネルギーの源を別に与えなかった。 生物学的転換は、静止した細胞で行なわれた。

【0033】

2-シアノピリジンの追加を、定量ポンプを使用して行なった。 ポンプ速度は、HPLC により「オンライン」でモニターした。 中間体であるピコリン酸の生成速度は、ピコリン酸を 6-ヒドロキシピコリン酸に転換する速度に対して約 2.5 倍大きく(4 g/l・h に対して 10 g/l・h)、ピコリン酸の濃度は 2 g/l 未満に制限した。 そうし

20

【0034】

2-シアノピリジンは室温で固体であるため、2-シアノピリジンを入れた貯蔵容器を 50℃に加熱して、2-シアノピリジンを液体の形で加えられるようにした。 このプロセスによって、75 g/l の 6-ヒドロキシピコリン酸を 31 時間のうちに製造することができた。 中間体であるピコリン酸は、生物学的転換の末期においては、もはや検出されなかった。

【0035】

この 6-ヒドロキシピコリン酸を単離するため、細胞を濾過により分離した。細胞を除いた溶液を次に 60℃に加熱し、濃硫酸で酸性にして pH を 2~2.5 とした。 この pH

30

【0036】

攪拌下にゆっくり冷却して 24℃にし、濾過してその残渣を脱ミネラル水で洗浄して乾燥した(100 mbar, 55℃)。 約 2 g/l の 6-ヒドロキシピコリン酸が母液中に残っていた。 収率は、使用した 2-シアノピリジン基準で 87% であった。

【0037】

表1

組 成	濃度 (g/l)	
フマル酸ジナトリウム	10	
酵母エキス	1	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.8	
Na ₂ SO ₄	0.25	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	10
NH ₄ Cl	2.33	
NaCl	0.2	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.16	
MnSO ₄	1.8×10 ⁻²	
H ₃ BO ₃	3×10 ⁻²	
NiCl ₂	2×10 ⁻³	
NaMoO ₄	3×10 ⁻³	20
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.3	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.75	
2-シアノピリジン	1	
KH ₂ PO ₄	0.4	
Na ₂ HPO ₄	0.96	

〔実施例2〕

ピコリン酸の製造

バイオマスを、実施例1と同様にして培養した。ピコリン酸の生成は、厳密に嫌氣的な条件下で起った。ゴム栓をそなえた500mlのガラス瓶を使用し、OD₆₅₀ = 2.0のバイオマス400mlを入れた。保温培養を30℃で行なった。生物学的転換の開始に先立って、混合物は純窒素で嫌気条件下に置いた。この目的のために、窒素ガス（ゲージ圧50mbar）を、攪拌されている混合物中に、針を通して約30分間注入し、酸素を定量的に追い出した。生物学的転換の間または2-シアノピリジンの添加の際に酸素が侵入するのを防ぐために、窒素ガスの導入を生物学的転換の操作の間、続けて行なった（ゲージ圧約10mbarで）。2-シアノピリジンを12回に分けて、各回1時間が経過するごとに10g/lずつ添加した。しかし、添加は連続的に行なうこともできる。HPLCを使用して、2-シアノピリジンが完全にピコリン酸に転化したかどうかをチェックした上で、次の添加を行なった。生物学的転換の間、検知されるほどのピコリン酸アミドの生成はなかった。この方法によって、約150g/lのピコリン酸を26時間の間に製造することができた。その間、6-ヒドロキシピコリン酸は生成しなかった。

【0038】

単離のため、細胞を除いたピコリン酸溶液にCaCl₂/H₂SO₄を加えて沈殿を生じさせた。この目的のため、実施例2の細胞を除いたピコリン酸溶液を3倍に希釈し、この細胞除去発酵溶液を90℃に加熱したのち、攪拌しながら、ピコリン酸の当量あたり0.5当量のCaCl₂を添加した。その結果、カルシウム/ピコリン酸錯体が直ちに生成し析出した。析出した錯体を攪拌下に4℃に冷却し、ガラスフリット（ポロシティ3）上で濾過し、脱ミネラル水で洗浄した。フィルターケーキを脱ミネラル水に分散し

30

40

50

、濃硫酸で酸性化してpHを2.5にした。この間、ピコリン酸は錯体から溶け出し、それと同時に不溶性の硫酸カルシウムが生成した。遊離のピコリン酸は水によく溶けるので、硫酸カルシウムを濾過により除去することができた。ピコリン酸溶液を蒸発して乾固し、分析した。粗生成物は収率70%、滴定により定めた純度86%であった。カール・フィッシャー法で測定した水分含有量は0.7%であった。

【0039】

〔実施例3〕

ピコリン酸クロム(III)の製造

500mlフラスコ中で、三塩化クロム六水塩の水溶液(23.95g, 水63ml中にCrが0.09モル)を、3.5時間かけて、pH7.1のピコリン酸アンモニウム溶液(271.4g, 0.325モル、16.8%)に、73で滴状にして加えた。その結果生じた紫色の溶液をさらに1時間攪拌し、それからゆっくりと3に冷却した。生成した赤色の固体が落ちていたところで、上澄みの青色の液をデカントして除去した。固体を100mlの水中に30分間懸濁させ、デカンテーションを繰り返した。50mlの水中で2回目の懸濁の後、固体を吸引濾過し、50で減圧下に乾燥した。33.64gの暗赤色結晶が得られた(収率90%)。

【0040】

〔実施例4〕

アルカリゲネス・フェーカリスDSM6335の種々の炭素源を使用しての培養A+N培地(表1、ただしフマル酸ジナトリウムを含まない)100mlを入れた300ml三角フラスコを使用して、アルカリゲネス・フェーカリス(DSM6335)を培養した。2g/lの2-シアノピリジンと10g/lの下記の炭素源のうちのひとつとを、培地に加えた。

【0041】

フマル酸ジナトリウム

グリセロール

マロン酸ジナトリウム

コハク酸ジナトリウム

保温培養はシェーカー中、30で行なった。16時間の成長の後、細胞を取り出し、新しいA+N培地(炭素源を含まない)の10g/lの2-シアノピリジンを含有するものに再懸濁した。細胞懸濁液650nm(OD₆₅₀)で測定した光学密度は、10であった。細胞懸濁液(全容積は10~20ml)を、再度30で保温培養した。6-ヒドロキシピコリン酸の生成を、分光分析により、細胞を除いた液の308nm光の吸収を測定して追跡した。6-ヒドロキシピコリン酸に関して、下記の平均生産性が得られた：

炭素源	生産性 (g/l・hr)
フマル酸ジナトリウム	2.4
グリセロール	2.0
マロン酸ジナトリウム	4.2
コハク酸ジナトリウム	0.14

〔実施例5〕

6-ヒドロキシピラジニカルボン酸の製造

アルカリゲネス・フェーカリス(DSM6335)を、炭素源としてフマル酸を使用して、実施例4と同様に培養した。洗浄した細胞を、10g/lの2-シアノピリジンを含有するA+N培地に再懸濁し(OD₆₅₀=10)、30で初期培養した。6-ヒドロキシピラジニカルボン酸の生成を、分光分析により、細胞を除いた溶液の320nm光の吸収を測定して追跡した。2-シアノピラジン(基質)濃度の減少を、270nm光の吸収を測定することにより決定することができた。使用した2-シアノピラジンの全量が

、7時間後に、6 - ヒドロキシピラジンカルボン酸に転化していた。

【0042】

〔実施例6〕

6 - クロロピコリン酸およびピラジンカルボン酸の製造

アルカリゲネス・フェーカリス (DSM 6335) を、フマル酸を炭素源として、実施例4と同様に培養した。洗浄した細胞を、ゴム栓のできるガラス容器中のA + N培地に再懸濁し ($OD_{650} = 10$)、窒素ガスを針を通して注入して、溶存している酸素を追い出した。続いて、2 - シアノピリジンまたは6 - クロロ - 2 - シアノピリジンを、細胞懸濁液に基質として加え、最終的な濃度を 10 g/l として、 30°C で初期培養した。

3時間後、出発原料である基質は、対応する酸に定量的に転化していた。〔薄層クロマトグラフィーによる検出：シリカゲル60、蛍光指示薬使用、移動相：クロロフォルム30 / エタノール55 / NH_4OH (25%) 10 / H_2O 5〕

10

フロントページの続き

- (72)発明者 アンドレアス キーナー
スイス国 カントン・ヴァリス ヴィスプ マイセンヴェク 5
- (72)発明者 ジャン・ポール ロデュイ
スイス国 カントン・ヴァリス グローヌ ロース(番地なし)
- (72)発明者 ライナー グレックラー
スイス国 カントン・ヴァリス ヴィスパーターミネンオブリ ビフィガ(番地なし)

審査官 内藤 伸一

- (56)参考文献 特開平05-115279(JP,A)
J.Chem.Soc.Perkin Trans. 1,(1993),(11),p1201-1202

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12P 17/12
C07D213/79
C07D241/24
CA(STN)
REGISTRY(STN)
WPIDS(STN)