

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3827420号
(P3827420)

(45) 発行日 平成18年9月27日(2006.9.27)

(24) 登録日 平成18年7月14日(2006.7.14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
C 1 2 P 13/02 (2006.01)
C 1 2 R 1/01 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P 13/02
C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 R 1:01
C 1 2 P 13/02

請求項の数 6 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-255359
(22) 出願日 平成9年9月19日(1997.9.19)
(65) 公開番号 特開平11-89575
(43) 公開日 平成11年4月6日(1999.4.6)
審査請求日 平成15年5月6日(2003.5.6)

(73) 特許権者 000005887
三井化学株式会社
東京都港区東新橋一丁目5番2号
(72) 発明者 伊藤 潔
千葉県茂原市東郷1144番地 三井東庄
化学株式会社内
(72) 発明者 肉丸 誠也
千葉県茂原市東郷1144番地 三井東庄
化学株式会社内
(72) 発明者 阿部 剛也
千葉県茂原市東郷1144番地 三井東庄
化学株式会社内
(72) 発明者 鈴木 正
千葉県茂原市東郷1144番地 三井東庄
化学株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物を用いたアミド化合物の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体またはその菌体処理物を利用してアクリロニトリルからアクリルアミドを製造する方法であって、該微生物が発現しているニトリルヒドラーゼが、サブユニット内に配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列または配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有しており、且つ30重量%のアクリルアミド水溶液中で10にて60分間処理した後にもニトリルヒドラーゼの活性を保持しているような該微生物の菌体または菌体処理物を水性媒体中でアクリロニトリルと接触させてアクリルアミドを生成させる反応の反応開始時または反応途中のアクリロニトリル濃度が水性媒体中でのアクリロニトリルの飽和濃度以上となるように反応液にアクリロニトリルを添加することを特徴とするアクリルアミドの製造方法。

10

【請求項2】

反応終了後の反応液中のアクリルアミド濃度が30重量%以上となるようにアクリロニトリルを添加することを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

ニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体またはその菌体処理物を利用してメタクリロニトリルからメタクリルアミドを製造する方法であって、該微生物が発現しているニトリルヒドラーゼが、サブユニット内に配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列または配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有しており、且つ30重量%のアクリルアミド水溶液中で10にて60分間処理した後にもニトリルヒドラーゼの活性を保持し

20

ているような該微生物の菌体または菌体処理物を水性媒体中でメタクリロニトリルと接触させてメタクリルアミドを生成させる反応の反応開始時または反応途中のメタクリロニトリル濃度が水性媒体中でのメタクリロニトリルの飽和濃度以上となるように反応液にメタクリロニトリルを添加することを特徴とするメタクリルアミドの製造方法。

【請求項 4】

ニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体またはその菌体処理物を利用してクロトンニトリルからクロトンアミドを製造する方法であって、該微生物が発現しているニトリルヒドラーゼが、サブユニット内に配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列または配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列を有しており、且つ 30 重量%のアクリルアミド水溶液中で 10 にて 60 分間処理した後にもニトリルヒドラーゼの活性を保持しているような該微生物の菌体または菌体処理物を水性媒体中でクロトンニトリルと接触させてクロトンアミドを生成させる反応の反応開始時または反応途中のクロトンニトリル濃度が水性媒体中でのクロトンニトリルの飽和濃度以上となるように反応液にクロトンニトリルを添加することを特徴とするクロトンアミドの製造方法。

10

【請求項 5】

微生物が発現しているニトリルヒドラーゼが、サブユニット内に配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列または配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列を有しており、且つ 30 重量%のアクリルアミド水溶液中で 10 にて 60 分間処理した後にもニトリルヒドラーゼの活性を保持しているような該微生物が、ノカルディア(Nocardia)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、バチルス(Bacillus)属、好熱性のバチルス属、シュードモナス(Pseudomonas)属、マイクロコッカス(Micrococcus)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、キサントバクター(Xanthobacter)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属、リゾビウム(Rhizobium)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、エルウィニア(Erwinia)属、エアロモナス(Aeromonas)属、シトロバクター(Citrobacter)属、アクロモバクター(Achromobacter)属、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属またはシュードノカルディア(Pseudonocardia)属に属する微生物であることを特徴とする請求項 1 から請求項 4 に記載の製造方法。

20

【請求項 6】

微生物が発現しているニトリルヒドラーゼが、サブユニット内に配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列または配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列を有しており、且つ 30 重量%のアクリルアミド水溶液中で 10 にて 60 分間処理した後にもニトリルヒドラーゼの活性を保持しているような該微生物が、シュードノカルディア・サーモフィラ(Pseudonocardia thermophila JCM3095)由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子を発現させた遺伝子組換え微生物であることを特徴とする請求項 1 から請求項 4 に記載の製造方法。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物菌体またはその菌体処理物を用いて、水性媒体中でニトリル化合物より対応するアミド化合物を生成させる反応方法に関する。より詳細には、反応開始時または反応途中の該ニトリル化合物の濃度を水性媒体中での該ニトリル化合物の飽和濃度以上に設定することにより、効率的にニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法に関する。

40

【0002】

【従来の技術】

近年ニトリル基を水和シアミド基に変換するニトリル水和活性を有する酵素であるニトリルヒドラーゼが発見されている。該酵素、該酵素を含有する微生物の菌体またはその菌体処理物等を用いて水性媒体中でニトリル化合物より対応するアミド化合物を製造する方法が知られている(特公昭62-21519)。ニトリルヒドラーゼを用いたアミド化合物の製造方法では、それまでの化学的な方法と比べて、ニトリル化合物の転化率及び選択率が高いメリットがある。しかし、その一方で、酵素反応の基質となるニトリル化合物

50

や生成物であるアミド化合物は一般的に強い生物毒性を有する有機化合物であり、その反応系内の濃度が高くなるにつれて該酵素を急速に失活させることが従来より指摘されている。そのため、工業的にニトリル化合物からアミド化合物を製造するに際しては、反応系内のニトリル化合物及びアミド化合物の濃度を低く保つことにより、ニトリルヒドラーゼ活性を安定に保持して反応を円滑に進行させることが重要であると考えられてきた。

【0003】

一例を挙げると、ニトリル化合物よりアミド化合物を工業的に製造する方法として、長沢・山田の報文（遺伝、別冊1号、36頁から45頁、1988年3月）が知られている。該報文中（38頁、右段、下から8行目）には、アクリロニトリルからアクリルアミドを製造する方法について、「静止菌体を20mg/mlの濃度で5~15、pH7.0付近でアクリロニトリルと反応させる。このとき、高濃度のアクリロニトリルはニトリルヒドラーゼ活性を阻害するので反応の進行に伴い経時的に分割添加していく」と記載されている。

10

【0004】

特公昭56-38118号公報には、アクリロニトリルまたはメタクリロニトリルを基質とする該水和反応を氷点から15℃までの低温下で行わせる方法が開示されているが、その際の基質濃度について、「本酵素反応においては基質は反応系内において常に溶解状態となるように加えることが適当である」と記載されている。さらに、「回分法による場合には、通常フィーディング方式がとられるが、前記固定化菌体を含む水性懸濁液に温度を氷点~15℃に保ちつつアクリロニトリルまたはメタクリロニトリルを攪拌下に滴下すればよい。」と記載されており、ニトリル化合物の分割添加の必要性が示されている。

20

【0005】

特公昭57-1234号では、アクリロニトリルまたはメタクリロニトリルよりアクリルアミドまたはメタクリルアミドを連続的に製造するに際して、ニトリル化合物の濃度を反応混合物に対して溶解する範囲内の量で連続的に供給する方法が開示されており、当該公報においてもニトリル化合物の濃度を低くコントロールすることの重要性が示されている。

【0006】

ニトリルヒドラーゼを用いて水性媒体中でニトリル化合物を水和させてアミド化合物を製造する場合、反応の進行と共に生成したアミド化合物は水性媒体中に蓄積し続けてゆく。生成するアミド化合物の最大の濃度は、個々の微生物由来のニトリルヒドラーゼの性質と反応温度により決定される。すなわち、その反応温度において該酵素とアミド化合物を接触させた場合に、該酵素が直ちに失活してしまうアミド化合物濃度の下限値以上には、反応液中のアミド化合物の濃度は高くなることはない。尚、今後、このアミド化合物の濃度を限界のアミド化合物濃度と記す。

30

【0007】

前述の長沢・山田の報文では、「40%にも達するアクリルアミドの生産は現在の化学的方法によっては不可能とされ、ここにアクリルアミドの工業的製法としての酵素法の有効性が強く示唆された。」とある（39頁、左段、上から2行目）。このように、工業的には、反応終了時のアミド化合物の濃度が高いことが重要であり、この限界のアミド化合物濃度が高いニトリルヒドラーゼが有用である。

40

【0008】

反応液中のニトリル化合物濃度を低くコントロールして反応を行わせた場合、ニトリルヒドラーゼがニトリル化合物及びアミド化合物と接触する時間が相対的に長くなり、限界のアミド化合物濃度までアミド化合物濃度を蓄積させるためには、相対的に反応系内のニトリルヒドラーゼ活性を多くする必要がある。酵素使用量の増大は、工業的なアミド化合物の製造にとって、コスト面から不利になるので、反応液中のニトリル化合物濃度を低くコントロールする反応方法は、必ずしも効率的な反応方法とは言えない。

【0009】

ところで、ニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物菌株は、アミド化合物を対応する力

50

ルボン酸化合物に水和する酵素であるアミダーゼを有していることがほとんどである。このため、該微生物菌株を用いてニトリル化合物より対応するアミド化合物を生成させた場合、該アミダーゼによって対応するカルボン酸化合物が副成することが知られている。これを避けるためには、アミダーゼ活性を有していない変異微生物菌株を取得したり、アミダーゼ活性が相対的に低くなるような微生物菌体の調製方法を工夫したりする必要があった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、微生物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造するより効率的な方法を提供することにある。

10

【0011】

本発明の目的はニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体またはその菌体処理物を利用してニトリル化合物から対応するアミドを製造する方法において、より少ない菌体量でより高いアミド濃度の反応液を得ることにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前述の限界のアミド化合物濃度がある程度以上に高いニトリルヒドラーゼは対応するニトリル化合物に対する耐性も高いことを見出した。そしてそのようなアミド化合物に対する耐性がある程度以上に高いニトリルヒドラーゼを有する微生物の菌体またはその菌体処理物を利用してニトリル化合物から対応するアミドを生成する反応を行うと、その反応液中では、アクリロニトリルやメタクリロニトリル等の生物毒性の強いニトリル化合物による該酵素の失活は急速には進まず、水性媒体中の該ニトリル化合物の濃度が高くなるにつれて該酵素の反応速度が相対的に増加することが判明した。即ち、従来より行われていた反応系内のニトリル化合物の濃度を常に低く制御する必要のない、水性媒体中でのニトリル化合物の飽和濃度以上となるように反応液にアクリロニトリルを添加する反応方法が新たに見出された。

20

【0013】

そして、本発明者らによる検討の結果、新たに見いだされた反応方法によれば、同じ酵素量（活性量）を使用した場合に従来の方法に比してより短時間で該ニトリル化合物を対応するアミド化合物に変換できること、より少量の酵素量（活性量）でより高い濃度のアミド化合物水溶液を得ることができることが確認された。

30

本発明者らは以上の知見を基に本発明を完成させるに至った。

【0014】

すなわち、本発明は、ニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体またはその菌体処理物を利用してニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法であって、該微生物が発現しているニトリルヒドラーゼが、サブユニット内に配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列または配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有しており、且つ30重量%のアクリルアミド水溶液中で10にて60分間処理した後にもニトリルヒドラーゼの活性を保持しているような該微生物の菌体または菌体処理物を、水性媒体中でニトリル化合物と接触させてアミド化合物を生成させる反応の反応開始時または反応途中のニトリル化合物濃度が水性媒体中でのニトリル化合物の飽和濃度以上となるように反応液にニトリル化合物を添加することを特徴とするアミド化合物の製造方法を提供するものである。

40

【0015】

本発明によれば、ニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体または菌体処理物を用いて、水性媒体中でニトリル化合物より対応するアミド化合物を製造するに際して、ニトリル化合物より対応するアミド化合物を生成する反応の開始時またはその途中において、水性媒体中での該ニトリル化合物の飽和濃度以上に該ニトリル化合物を反応系内に添加することにより、効率的かつ短時間でニトリル化合物から対応するアミド化合物を高濃度で生成することが可能となる。

【0016】

50

【発明実施の形態】

以下、本発明の詳細について概説する。

本発明におけるニトリル化合物は炭素数が2～8のニトリル化合物である。その中でも、特にアクリロニトリル、メタクリロニトリル、クロトンニトリルを好適な例として挙げることができる。

【0017】

本発明におけるニトリルヒドラーゼとは、微生物が発現しているニトリルヒドラーゼが、サブユニット内に配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列または配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有しており、且つ30重量%のアクリルアミド水溶液中でニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体を10にて60分間処理した後も該ニトリルヒドラーゼの活性が保持されているニトリルヒドラーゼである。

10

【0018】

種々の微生物のニトリルヒドラーゼのアミド化合物に対する耐性は様々である。アミド化合物としてアクリルアミドを例にとると、ニトリルヒドラーゼをアクリルアミド水溶液中で10にて処理する場合、10重量%のアクリルアミド水溶液中で60分後に完全に失活してしまうニトリルヒドラーゼがある一方、50重量%のアクリルアミド水溶液中で60分間処理しても失活しないニトリルヒドラーゼがある。このように、前述したニトリルヒドラーゼの限界のアクリルアミド濃度は個々のニトリルヒドラーゼによって異なっている。

【0019】

工業的には、反応終了時のアミド化合物の濃度が高いことが重要であり、アクリルアミド水溶液中で10にて60分間処理した後に失活しない(活性を保持している)アクリルアミド濃度が30重量%以上のニトリルヒドラーゼの利用が特に有効である。また、工業的にアミド化合物を生産する場合、ニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体またはその菌体処理物を反応に供することがコスト面から有利である。

20

【0020】

即ち、本発明においては、ニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体をアクリルアミド水溶液中で10にて60分間処理した場合に、ニトリルヒドラーゼの活性が保持されるアクリルアミド濃度の上限が30重量%以上のニトリルヒドラーゼを産生する微生物の菌体またはその菌体処理物を用いることが好ましい。

30

【0021】

本発明における微生物とは、該微生物が発現しているニトリルヒドラーゼが、サブユニット内に配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列または配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有しており、且つ30重量%のアクリルアミド水溶液中で10にて60分間処理してもニトリルヒドラーゼの活性を保持している微生物である。具体的には、ノカルディア(Nocardia)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、バチルス(Bacillus)属、好熱性のバチルス属、シュードモナス(Pseudomonas)属、ミクロコッカス(Micrococcus)属、ロドクロウス(rhodochrous)種に代表されるロドコッカス(Rhodococcus)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、キサントバクター(Xanthobacter)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属、リゾビウム(Rhizobium)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、エルウィニア(Erwinia)属、エアロモナス(Aeromonas)属、シトロバクター(Citrobacter)属、アクロモバクター(Achromobacter)属、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属またはサーモフィラ(thermophila)種に代表されるシュードノカルディア(Pseudonocardia)属に属する微生物を好適な例として挙げる事ができる。

40

【0022】

また、該微生物よりクローニングしたニトリルヒドラーゼ遺伝子を任意の宿主で発現させた形質転換体も本発明でいうニトリルヒドラーゼを産生する微生物に含まれる。尚、ここでいう任意の宿主には、後述の実施例のように大腸菌(*Escherichia coli*)が代表例として挙げられるが、とくに大腸菌に限定されるものではなく枯草菌(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物菌株も含まれる。その様なものの例と

50

して、MT-10822（本菌株は、1996年2月7日に茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERMBP-5785として、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて寄託されている。）が挙げられる。また、組換えDNA技術を用いて該酵素の構成アミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換、欠失、削除もしくは挿入することにより、アミド化合物耐性やニトリル化合物耐性、温度耐性を更に向上させた変異型のニトリルヒドラーゼを発現させた形質転換体も本発明でいうニトリルヒドラーゼを産生する微生物に含まれる。

【0023】

本発明における微生物を本発明の製造方法に使用するに際しては、該微生物の菌体あるいは菌体処理物を用いる。菌体は、分子生物学・生物学・遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法を利用して調製すればよい。たとえば、LB培地やM9培地等の通常液体培地に該微生物を植菌した後、適当な培養温度（一般的には、20～50であるが、好熱菌の場合は50以上でもよい。）で生育させ、続いて、該微生物を遠心分離によって培養液より分離・回収して得る方法が挙げられる。

10

【0024】

また、本発明における微生物の菌体処理物は、上記微生物菌体の抽出物や磨砕物、該抽出物や磨砕物のニトリルヒドラーゼ活性画分を分離精製して得られる後分離物、該微生物菌体や該菌体の抽出物・磨砕物・後分離物を適当な担体を用いて固定化した固定化物等を指し、これらはニトリルヒドラーゼの活性を有している限りは本発明の菌体処理物に相当する。

20

【0025】

本発明における微生物の菌体または菌体処理物は、回分反応に供することもできるし、連続反応に供することもできる。また、懸濁床として用いてもよいし固定床として用いてもよい。その際の反応液中での該微生物の菌体または菌体処理物の濃度は、水性媒体とニトリル化合物の混合に支障をきたさない限り特に制限はされるものではない。

【0026】

本発明における水性媒体とは、水、または、リン酸塩等の緩衝剤・硫酸塩や炭酸塩等の無機塩・アルカリ金属の水酸化物・アミド化合物等を適当な濃度で溶解させた水溶液を示す。

30

【0027】

本発明においては、水性媒体中のニトリル化合物が反応の進行に伴って消費されると同時にニトリル相より供給されることにより、その濃度が飽和濃度前後に相対的に長時間維持されることが重要である。このため、回分反応または連続反応いずれの場合でも、必要なニトリル化合物の全量を反応開始時に一括して添加するか、反応途中における水性媒体中のニトリル化合物濃度が飽和濃度以上に保たれるようにニトリル化合物を逐次添加することが好ましい。また、回転翼やラインミキサー等の適当な混合装置を使用して、静置下において二相に分離する水性媒体相とニトリル相を十分に混和させることも重要である。

【0028】

ニトリル化合物を反応開始時に一括添加する場合のニトリル化合物の濃度の下限は、反応開始時において該ニトリル化合物の飽和濃度以上であればよい。一方、その濃度の上限は特に限定されるものではなく、想定する反応終了時のアミド化合物濃度およびニトリル化合物濃度により任意に決定すればよい。また、未反応のニトリル化合物は、反応後に蒸留等の手段により反応液より除去することもできる。よって、想定する反応終了時のアミド化合物濃度に達した時点でもニトリル化合物が過剰となるようにニトリル化合物を添加することもできる。

40

【0029】

具体的には、アクリロニトリルがニトリル化合物である場合、水に対する本化合物の飽和濃度は約7重量%であるので、約7重量%以上、50重量%以下の範囲が好適である。また、メタクリロニトリルまたはクロトンニトリルがニトリル化合物である場合、水に対す

50

るこれらの化合物の飽和濃度は約2重量%であるので、約2重量%以上50重量%以下の範囲が好適である。

【0030】

本発明における反応は、一般的には常圧下で行われるが、水性媒体中へのニトリル化合物の溶解度を高めるために加圧下で行うこともできる。また、反応温度に関しては、水性媒体の氷点以上であれば特に制限されないが、好ましくは0 から50、より好ましくは10 から30 の範囲内で行われる。一方、pHは、ニトリルヒドラーゼ活性が維持されている限りは特に制限されないが、好ましくはpH6からpH10、より好ましくはpH7からpH9の範囲内である。

【0031】

本発明の方法におけるアミド化合物を生成する反応においては、ニトリルヒドラーゼが直ちに失活するようなことはなく、むしろニトリル水和反応は良好に進行する。そればかりか、水性媒体相中のニトリル化合物は、反応の進行に伴って消費されると同時にニトリル相より供給されるため、その濃度は常に飽和濃度付近に維持される。このため、その反応温度における最大の反応速度またはそれに近い速度でニトリル水和反応が進行するので、相対的に短時間かつ効率的に該ニトリル化合物から対応するアミド化合物が生成することになる。

【0032】

また、ニトリル化合物を水性媒体中での飽和濃度以上に添加した後、反応の進行に伴って反応系内のニトリル化合物濃度は徐々に低下し、水性媒体中の飽和濃度以下になる。これにより反応速度も徐々に低下するが、その時点までは最大の反応速度またはそれに近い速度でニトリル水和反応が進行するので、実質的に短時間かつ効率的に該ニトリル化合物から対応するアミド化合物が生成することになる。

【0033】

さらに、本発明の製造方法によれば、水性媒体中の該ニトリル化合物の濃度を高くすることによって、微生物菌体中のアミダーゼによる対応するカルボン酸化合物の生成が相対的に抑制されるという副次的な効果を得ることもできる。

【0034】

得られたアミド化合物は、反応液より遠心分離等の通常の公知の方法により菌体または菌体処理物を分離した後、そのままの水溶液として利用してもよいし、膜濃縮やスプレードライ濃縮等の方法により濃縮して結晶を得ても良い。また、菌体または菌体処理物を分離した後、活性炭、イオン交換樹脂、イオン交換膜等も用いて着色物質等の不純物を除去することにより、アミド化合物の純度をさらに高めることもできる。

【0035】

【実施例】

以下の実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。

尚、各実施例及び比較例におけるHPLC分析は、カラムとして日本分光製のFinepak SIL C18-5(250×4.6 mm)を用い、4体積%のアセトニトリルを含む10mMリン酸水溶液を展開液として使用した。また、アクリルアミド、メタクリルアミド及びクロトンアミドは220nmの吸光度により検出し、アクリロニトリル、アクリル酸、メタクリロニトリル及びクロトンニトリルは210nmの吸光度により検出した。

【0036】

[実施例1] アクリルアミド濃度耐性の測定(1)

500mlのバツフル付三角フラスコに下記の組成の培地100mlを調製し、121・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が50µg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822株(FERM BP-5785)を一白菌耳植菌し、37・130rpmにて20時間培養した。遠心分離(15000G×15分間)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌

10

20

30

40

50

体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。

【0037】

培地組成	酵母エキストラクト	5.0 g/L
	ポリペプトン	10.0 g/L
	NaCl	5.0 g/L
	塩化コバルト・六水和物	10.0 mg/L
	硫酸第二鉄・七水和物	40.0 mg/L
	pH7.5	

10

【0038】

該湿菌体10mgを10gの50mMのトリス塩酸塩水溶液(pH8.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルの終濃度が14重量%になるように添加し、10にてかくはんを行いながら5分間反応を行った。10mMのリン酸水溶液を90g添加して反応を終了させた後、HPLC分析により反応終了液中のアクリルアミド濃度を測定した。続いて、単位湿菌体及び単位反応時間あたりのアクリルアミドの生成速度(=反応速度)を算出した。

【0039】

続いて、同じ該湿菌体50mgを40gの50mMのトリス塩酸塩を含む30重量%のアクリルアミド水溶液(pH8.0)に懸濁し、10にてゆるやかにかくはんさせながら60分間接触させた。この後、遠心分離(15000G×15分間)により菌体のみを懸濁液より分離した。続いて、50gの50mMのトリス塩酸塩水溶液(pH8.0)に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行う操作を2回繰り返すことにより該菌体を洗浄した。洗浄した該湿菌体10mgを10gの50mMのトリス塩酸塩水溶液(pH8.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルの終濃度が14重量%になるように添加し、10にてかくはんを行いながら5分間反応を行った。10mMのリン酸水溶液を90g添加して反応を終了させた後、HPLC分析により反応終了液中のアクリルアミド濃度を測定した。続いて、単位湿菌体及び単位反応時間あたりのアクリルアミドの生成速度(=反応速度)を算出した。

20

30

【0040】

30重量%のアクリルアミド水溶液と接触させる前の反応速度を100%とし、10にて60分間接触させた後の反応速度を相対値として比較した。その結果、相対値は70%であった。すなわち、活性残存率は70%であった。

【0041】

[実施例2] ニトリル化合物の濃度と反応速度の比較

実施例1と同様の方法により、MT-10822株の湿菌体を調製した。該湿菌体10mgを10gの50mMのトリス塩酸塩水溶液(pH8.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルが第1表(表1)に示した終濃度になるように添加し、10にてかくはんを行いながら5分間反応を行った。10mMのリン酸水溶液を90g添加して反応を終了させた後、HPLC分析により反応終了液中のアクリルアミド濃度を測定した。単位湿菌体及び単位反応時間あたりのアクリルアミドの生成速度(=反応速度)を算出し、反応開始時のアクリロニトリル濃度が1重量%の場合の反応速度を100%として、それぞれのアクリロニトリル濃度場合の相対値を相対反応速度として比較した(第1表(表1)及び第1図(図1))。

40

【0042】

【表1】

第1表

反応開始時の アクリロニトリル濃度 (重量%)	相対反応速度
1.0	100
2.0	107
4.0	118
7.0	133
10.0	139
14.0	142
21.0	144
35.0	145

10

20

30

【0043】

[実施例3] ニトリル化合物のアミド化合物への変換(1)

実施例1と同様の方法により、MT-10822株の湿菌体を調製した。該湿菌体1.5gを98.5gの50mMのトリス塩酸塩水溶液(pH8.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを36g一括添加して、10にてかくはんを行いながら反応した。反応開始から8時間後にHPLC分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはアクリルアミドのみが存在(濃度=35.0重量%)しており、アクリロニトリルは認められなかった。すなわち、転化率は100%であった。

40

【0044】

[実施例4] ニトリル化合物のアミド化合物への変換(2)

実施例1と同様の方法により、MT-10822株の湿菌体を調製した。該湿菌体1.5gを98.5gの50mMのトリス塩酸塩水溶液(pH8.0)に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを12g一括添加して、10にてかくはんを行いながら反応を開始した。さらに反応開始と同時にアクリロニトリルを1時間当たり12gの速度で2時間添加し、アクリロニトリルを合わせて36g添加した。反応開始から8時間後に、実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはアクリルアミドのみが存在(濃度=35.0重量%)しており、アクリロニトリルは認められなかった。すなわち、転化率は100%であった。

50

【 0 0 4 5 】

[比較例 1] ニトリル化合物のアミド化合物への変換 (1)

実施例 1 と同様の方法により、MT - 1 0 8 2 2 株の湿菌体を調製した。該湿菌体 1 . 5 g を 9 8 . 5 g の 5 0 m M のトリス塩酸塩水溶液 (p H 8 . 0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 1 時間当たり 2 g の速度で 1 8 時間添加した。反応開始から 8 時間後に実施例 1 と同様の H P L C 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は 1 7 . 4 重量 % であり、アクリロニトリル濃度は 0 . 8 重量 % であった。すなわち、転化率は 9 4 % であった。さらに、反応開始から 2 6 時間後に実施例 1 と同様の H P L C 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は 3 3 . 0 重量 % であり、アクリロニトリル濃度は 1 . 9 重量 % であった。すなわち、転化率は 9 3 % であった。

10

【 0 0 4 6 】

[比較例 2] ニトリル化合物のアミド化合物への変換 (2)

実施例 1 と同様の方法により、MT - 1 0 8 2 2 株の湿菌体を調製した。該湿菌体 1 . 5 g を 9 8 . 5 g の 5 0 m M のトリス塩酸塩水溶液 (p H 8 . 0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 1 時間当たり 1 . 2 g の速度で 3 0 時間添加した。反応開始から 8 時間後に実施例 1 と同様の H P L C 分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中のアクリルアミド濃度は 1 0 . 3 重量 % であり、アクリロニトリル濃度は 1 . 0 重量 % であった。すなわち、転化率は 8 8 % であった。さらに、反応開始から 3 8 時間後に実施例 1 と同様の H P L C 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は 3 2 . 6 重量 % であり、アクリロニトリル濃度は 2 . 1 重量 % であった。すなわち、転化率は 9 2 % であった。

20

【 0 0 4 7 】

[実施例 5] ニトリル化合物のアミド化合物への変換 (3)

実施例 1 と同様の方法により、MT - 1 0 8 2 2 株の湿菌体を調製した。該湿菌体 3 . 0 g を 9 7 . 0 g の 5 0 m M のトリス塩酸塩水溶液 (p H 8 . 0) に懸濁し、この懸濁液にメタクリロニトリルを 8 . 6 g 一括添加して、1 0 にてかくはんを行いながら反応を開始した。反応開始から 2 4 時間後に、実施例 1 と同様の H P L C 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはメタクリルアミドのみが存在 (濃度 = 1 0 . 0 重量 %) しており、メタクリロニトリルは認められなかった。すなわち、転化率は 1 0 0 % であった。

30

【 0 0 4 8 】

[実施例 6] ニトリル化合物のアミド化合物への変換 (4)

実施例 1 と同様の方法により、MT - 1 0 8 2 2 株の湿菌体を調製した。該湿菌体 1 . 5 g を 9 8 . 5 g の 5 0 m M のトリス塩酸塩水溶液 (p H 8 . 0) に懸濁し、この懸濁液にクロトンニトリル (但し、c i s 体と t r a n s 体の混合物) を 1 8 . 7 g 一括添加して、1 0 にてかくはんを行いながら反応を開始した。反応開始から 2 4 時間後に析出したクロトンアミドの結晶を 3 0 にて完全に溶解した後に、実施例 1 と同様の H P L C 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはクロトンアミド (但し、c i s 体と t r a n s 体の混合物) のみが存在 (濃度 = 2 0 . 0 重量 %) しており、クロトンニトリルは認められなかった。すなわち、転化率は 1 0 0 % であった。

40

【 0 0 4 9 】

[実施例 7] ニトリル化合物のアミド化合物への変換 (5)

5 0 0 m l のバッフル付三角フラスコに下記の組成の培地 1 0 0 m l を調製し、1 2 1 . 2 0 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に特開平 0 8 - 5 6 6 8 4 号記載のシュードノカルディア・サーモフィラ (*Pseudonocardia thermophila*) (J C M 3 0 9 5) を一白菌耳植菌し、5 0 . 1 3 0 r p m にて 7 2 時間培養した。遠心分離 (1 5 0 0 0 G × 1 5 分間) により菌体のみを培養液より分離し、続いて、5 0 m l の生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。

【 0 0 5 0 】

50

培地組成	酵母エキストラクト	5.0 g/L
	ポリペプトン	10.0 g/L
	trans-クロトンアミド	2.0 g/L
	塩化コバルト・六水和物	10.0 mg/L
	硫酸第二鉄・七水和物	40.0 mg/L
	pH 7.0	

【0051】

10

該湿菌体 10.0 g を 100 g の 50 mM のトリス塩酸塩水溶液 (pH 8.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 36 g 一括添加して、10 にてかくはんを行いながら反応を開始した。反応開始から 8 時間後に実施例 1 と同様の HPLC 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはアクリルアミドのみが存在 (濃度 = 35.0 重量%) しており、アクリロニトリルは認められなかった。すなわち、転化率は 100% であった。

【0052】

[実施例 8] アクリルアミド濃度耐性の測定 (2)

500 ml のバッフル付三角フラスコに下記の組成の培地 100 ml を調製し、121・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に特公平 06-55148 号記載のロドコッカス・ロドクロウス J-1 株 (FERM BP-1478 として、前記の寄託機関に特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて寄託されており、万人に対し請求により分譲される) を一白菌耳植菌し、30・130 rpm にて 72 時間培養した。遠心分離 (15000 G × 15 分) により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50 ml の生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。

20

【0053】

培地組成	グルコース	10.0 g/L
	リン酸二水素一カリウム	0.5 g/L
	リン酸一水素二カリウム	0.5 g/L
	硫酸マグネシウム・七水和物	0.5 g/L
	酵母エキストラクト	1.0 g/L
	ペプトン	7.5 g/L
	尿素	7.5 g/L
	塩化コバルト・六水和物	10.0 mg/L
	pH 7.2	

30

40

【0054】

該湿菌体 10 mg を 10 g の 50 mM のトリス塩酸塩水溶液 (pH 8.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルの終濃度が 14 重量% になるように添加し、10 にてかくはんを行いながら 5 分間反応を行った。10 mM のリン酸水溶液を 90 g 添加して反応を終了させた後、HPLC 分析により反応終了液中のアクリルアミド濃度を測定した。続いて、単位湿菌体及び単位反応時間あたりのアクリルアミドの生成速度 (= 反応速度) を算出した。

【0055】

続いて、同じ該湿菌体 50 mg を 40 g の 50 mM のトリス塩酸塩を含む 30 重量% のア

50

クリルアミド水溶液 (pH 8.0) に懸濁し、10 にてゆるやかにかくはんさせながら60分間接触させた。この後、遠心分離 (15000 G × 15分間) により菌体のみを懸濁液より分離した。続いて、50gの50mMのトリス塩酸塩水溶液 (pH 8.0) に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行う操作を2回繰り返すことにより該菌体を洗浄した。洗浄した該湿菌体10mgを10gの50mMのトリス塩酸塩水溶液 (pH 8.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルの終濃度が14重量%になるように添加し、10 にてかくはんを行いながら5分間反応を行った。10mMのリン酸水溶液を90g添加して反応を終了させた後、HPLC分析により反応終了液中のアクリルアミド濃度を測定した。続いて、単位湿菌体及び単位反応時間あたりのアクリルアミドの生成速度 (= 反応速度) を算出した。

10

【0056】

30重量%のアクリルアミド水溶液と接触させる前の反応速度を100%とし、10 にて60分間接触させた後の反応速度を相対値として比較した。その結果、相対値は95%であった。すなわち、活性残存率は95%であった。

【0057】

[実施例9] ニトリル化合物のアミド化合物への変換(6)

実施例8と同様の方法により、ロドコッカス・ロドクロウスJ-1株の湿菌体を調製した。該湿菌体0.15gを100gの50mMのトリス塩酸塩水溶液 (pH 8.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを60g一括添加して、20 にてかくはんを行いながら反応を開始した。反応開始から8時間後に実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはアクリルアミドのみが存在 (濃度 = 50.0重量%) しており、アクリロニトリルおよびアクリル酸は認められなかった。すなわち、転化率は100%であった。

20

【0058】

[実施例10] ニトリル化合物のアミド化合物への変換(7)

実施例8と同様の方法により、ロドコッカス・ロドクロウスJ-1株の湿菌体を調製した。該湿菌体0.15gを100gの50mMのトリス塩酸塩水溶液 (pH 8.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを60g一括添加して、10 にてかくはんを行いながら反応を開始した。反応開始から8時間後に実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は47.7重量%であり、アクリロニトリル濃度は1.9重量%であった。すなわち、転化率は95%であった。さらに、反応開始から12時間後に実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は50.0重量%、アクリル酸濃度は0.05重量%であり、アクリロニトリルは認められなかった。すなわち、転化率は100%であった。

30

【0059】

[実施例11] ニトリル化合物のアミド化合物への変換(8)

実施例8と同様の方法により、ロドコッカス・ロドクロウスJ-1株の湿菌体を調製した。該湿菌体0.15gを100gの50mMのトリス塩酸塩水溶液 (pH 8.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを20g一括添加して、10 にてかくはんを行いながら反応を開始した。さらに反応開始と同時にアクリロニトリルを1時間当たり20gの速度で2時間添加し、アクリロニトリルを合わせて60g添加した。反応開始から8時間後に実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は46.7重量%であり、アクリロニトリル濃度は2.6重量%であった。すなわち、転化率は93%であった。さらに、反応開始から12時間後に実施例1と同様のHPLC分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は50.0重量%、アクリル酸濃度は0.05重量%であり、アクリロニトリルは認められなかった。すなわち、転化率は100%であった。

40

【0060】

[比較例3] ニトリル化合物のアミド化合物への変換(3)

50

実施例 8 と同様の方法により、ロドコッカス・ロドクロウス J - 1 株の湿菌体を調製し、該湿菌体 0.15 g を 100 g の 50 mM のトリス塩酸塩水溶液 (pH 8.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 1 時間当たり 3 g の速度で 20 時間添加した。反応開始から 8 時間後に実施例 1 と同様の HPLC 分析により反応液の分析を行ったところ、反応液中のアクリルアミド濃度は 23.6 重量% であり、アクリロニトリル濃度は 1.7 重量% であった。すなわち、転化率は 91% であった。さらに、反応開始から 32 時間後に実施例 1 と同様の HPLC 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は 46.1 重量%、アクリル酸濃度は 0.2 重量% であり、アクリロニトリル濃度は 2.9 重量% であった。すなわち、転化率は 92% であった。

【0061】

10

[比較例 4] ニトリル化合物のアミド化合物への変換 (4)

実施例 8 と同様の方法により、ロドコッカス・ロドクロウス J - 1 株の湿菌体を調製し、該湿菌体 0.15 g を 100 g の 50 mM のトリス塩酸塩水溶液 (pH 8.0) に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 1 時間当たり 2 g の速度で 30 時間添加した。反応開始から 8 時間後に実施例 1 と同様の HPLC 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は 16.4 重量% であり、アクリロニトリル濃度は 1.5 重量% であった。すなわち、転化率は 89% であった。さらに、反応開始から 42 時間後に実施例 1 と同様の HPLC 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中のアクリルアミド濃度は 43.5 重量%、アクリル酸濃度は 0.3 重量% であり、アクリロニトリル濃度は 4.8 重量% であった。すなわち、転化率は 87% であった。

20

【0062】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、従来に比べより短期間内に少量の酵素量で高ニトリル濃度の反応液を得ることが可能であり、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を効率的に製造することが可能となる。しかも、本発明の方法によれば、ニトリル化合物に対応するカルボン酸化合物の副成も抑制される。そのため、本発明の方法は、ニトリルヒドラターゼを産生する微生物を利用した工業的なアミド化合物の生産にとって極めて有用である。

【0063】

【配列表】

【0064】

30

配列番号：1

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の特徴

他の情報：ニトリルヒドラターゼ α サブユニットの部分配列

配列

40

Val Cys Xaa Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro Xaa Leu Gly Leu Pro

5

10

15

Pro Xaa Trp Xaa Lys

20 21

【0065】

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の特徴

他の情報：ニトリルヒドラーターゼαサブユニットの部分配列

配列

10

Val Cys Xaa Leu Cys Ser Cys Xaa Trp Pro Xaa Leu Gly Leu Pro Pro

5

10

15

Xaa Trp Tyr Lys

20

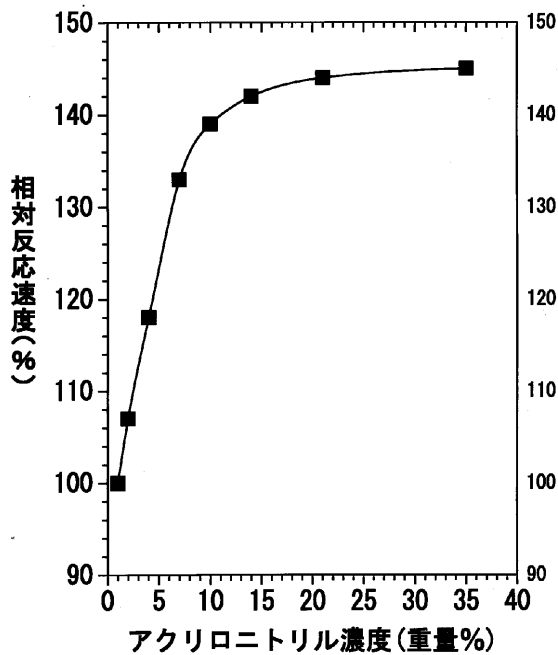
【図面の簡単な説明】

【図1】反応開始時のアクリロニトリル濃度に対する反応速度を比較した図である。横軸は反応開始時のアクリロニトリル濃度（重量％）、縦軸は相対反応速度（％）を表している。

20

【図1】

第1図



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 R 1:01

(72)発明者 中村 武史

千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 番地 三井東圧化学株式会社内

審査官 内藤 伸一

(56)参考文献 特開平 0 4 - 2 1 1 3 7 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C12N 15/09

C12P 13/02

CA(STN)

REGISTRY(STN)

WPIDS(STN)