

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 9 月 9 日(09.09.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/140233 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 7/04 (2006.01) *C12N 1/16* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/056325
- (22) 国際出願日: 2016 年 3 月 2 日(02.03.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-041696 2015 年 3 月 3 日(03.03.2015) JP
- (71) 出願人: 公立大学法人富山県立大学(PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION TOYAMA PREFECTURAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9390398 富山県射水市黒河 5 1 8 0 Toyama (JP). セントラル硝子株式会社 (CENTRAL GLASS COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒7550001 山口県宇部市大字沖宇部 5 2 5 3 番地 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: 浅野 泰久(ASANO Yasuhisa); 〒9390398 富山県射水市黒河 5 1 8 0 富山県立大学工学部生物工学科内 Toyama (JP). 磯部 公安(ISOBE Kimiyasu); 〒9390398 富山県射水市黒河 5 1 8 0 富山県立大学工学部生物工学科内 Toyama (JP). 上田 量子(UEDA Ryoko); 〒9390398 富山県射水市黒河 5 1 8 0 富山県立大学工学部生物工学科内 Toyama (JP). 西井 哲郎(NISHII Tetsuro); 〒3501159 埼玉県川越市中台 2 丁目 1 7 番地 5 セントラル硝子株式会社化学研究所内 Saitama (JP). 石井 章央(ISHII Akihiro); 〒3501159 埼玉県

川越市中台 2 丁目 1 7 番地 5 セントラル硝子株式会社化学研究所内 Saitama (JP).

- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR INDUSTRIAL MANUFACTURE OF CHIRAL-1,1-DIFLUORO-2-PROPANOL

(54) 発明の名称: キラルー 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールの工業的な製造方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for the industrial manufacture of chiral-1,1-difluoro-2-propanol. In particular, a chiral-1,1-difluoro-2-propanol can be manufactured with high optical purity and good yield by causing a micro-organism having assymmetric reduction activity on 1,1-difluoroacetone, or an enzyme having said activity, to act on 1,1-difluoroacetone. The industrial implementation of this manufacturing method is simple.

(57) 要約: 本発明においては、キラルー 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールの工業的な製造方法を提供する。詳しくは、1, 1-ジフルオロアセトンに、該アセトンを不斉還元する活性を有する微生物または該活性を有する酵素を作用させることにより、キラルー 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを高い光学純度で収率良く製造することができる。本発明の製造方法は、工業的な実施が容易である。



WO 2016/140233 A1

明 細 書

発明の名称：

キラルー 1， 1－ジフルオロ－2－プロパノールの工業的な製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、医農薬中間体として重要なキラルー 1， 1－ジフルオロ－2－プロパノールの工業的な製造方法に関する。

背景技術

[0002] キラルー 1， 1－ジフルオロ－2－プロパノールは、種々の医農薬中間体として重要な化合物である。これまでに、化学触媒 B－クロロジイソピノカンフェイルボラン（商品名：D I P－C h l o r i d e）と B－イソピノカンフェイル－9－ボラビシクロ[3. 3. 1]ノナン（登録商標：R－A l p i n e－B o r a n e）とを 1， 1－ジフルオロアセトンに作用させて不斉還元し、キラルー 1， 1－ジフルオロ－2－プロパノールを得る方法が、特許文献 1 で開示されている。しかし、得られた生成物の光学純度はそれぞれ 5 % e e（R）、16 % e e（S）と低く、医農薬中間体として求められる光学純度には到達していなかった。なお、本明細書において、「e e」とは鏡像体過剰率（e n a n t i o m e r i c e x c e s s）を意味する。

[0003] 他方、関連化合物のキラルー 1， 1， 1－トリフルオロ－2－プロパノールについては、1， 1， 1－トリフルオロアセトンの不斉還元して得る方法が知られている。当該方法のうち、生物学的な方法については、例えば、特許文献 1 では、99 % e e 以上の光学純度を持つキラルー 1， 1， 1－トリフルオロ－2－プロパノールを、アルコール脱水素酵素を用いた 1， 1， 1－トリフルオロアセトンの不斉還元により製造する方法が、特許文献 2 では、市販の乾燥パン酵母により 1， 1， 1－トリフルオロアセトンの不斉還元することで、93～99 % e e の（S）－1， 1， 1－トリフルオロ－2－プロパノールを製造する方法が、特許文献 3 では、アルコール脱水素酵素、カルボニル還元酵素等の酵素を機能的に発現する微生物、もしくは形質転換

体、又はそれらの処理物を1, 1, 1-トリフルオロアセトンに作用させる工程を含む、キラル-1, 1, 1-トリフルオロ-2-プロパノールの製造方法が、非特許文献2では、アルコール脱水素酵素を用いて1, 1, 1-トリフルオロアセトンを不斉還元することにより、キラル-1, 1, 1-トリフルオロ-2-プロパノールを得る方法が、非特許文献3では、乾燥パン酵母を用いて、1, 1, 1-トリフルオロアセトンを不斉還元することにより (S)-1, 1, 1-トリフルオロ-2-プロパノールを約80% eeの光学純度で得る方法が、開示されている。また、化学的な方法については、例えば、非特許文献1では、化学触媒を用いて1, 1, 1-トリフルオロアセトン进行不斉還元して90% eeの (S)-1, 1, 1-トリフルオロ-2-プロパノールを得る方法が開示されている。本発明者らも野生株酵母を用いた方法を開示している (特許文献4、5)。

先行技術文献

特許文献

- [0004] 特許文献1：国際公開第2007/054411号
特許文献2：国際公開第2007/006650号
特許文献3：国際公開第2007/142210号
特許文献4：特開2011-182787号公報
特許文献5：特開2012-5396号公報

非特許文献

- [0005] 非特許文献1：P. Veeraraghavan Ramachandran et al., Journal of Fluorine Chemistry, 128巻, 844-850頁, 2007年
非特許文献2：T. C. Rosen et al., Chimica Oggi Suppl., 43-45頁, 2004年
非特許文献3：M. Bucciarelli et al., Synthesis, 11巻, 897-899頁, 1983年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 前述のとおり、これまでに、化学触媒を用いて 1, 1-ジフルオロアセトン¹を不斉還元し、キラル-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを得る方法が非特許文献 1 で開示されているが、光学純度は 16% ee と低かった。非特許文献 1 の方法では、1, 1-ジフルオロ-2-プロパノール以外に、種々のフッ素を含む基質についても化学触媒を用いた不斉還元を検討しており、化合物によっては高い光学純度 (>99% ee) で不斉還元反応が進む場合もあり、本発明で対象とする 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールの関連化合物である 1, 1, 1-トリフルオロ-2-プロパノールについて高い光学純度 (>90% ee) で得られることが確認されている。生物学的な方法についても、関連化合物であるキラル-1, 1, 1-トリフルオロ-2-プロパノールでは、生物の酵素を用いた方法で高い光学純度 (90% ee 以上) が特許文献 1、特許文献 3、非特許文献 2 で確認されている。

[0007] 前述の非特許文献 1 の方法では、1, 1, 1-トリフルオロアセトンでは化学触媒で高い光学純度が確認されたが、1, 1, 1-トリフルオロアセトンの CH_3 基が CF_2H 基に置き換わった化合物の 1, 1-ジフルオロアセトンに化学触媒を作用させた場合、置換基の電気陰性度や水素原子による立体障害のため触媒の立体選択性が低下し、光学純度が低下していた。このような現象は、1, 1, 1-トリフルオロアセトンと 1, 1-ジフルオロアセトンの関係だけでなく、 CF_3COR (R は $\text{Ph}-\text{C}$ 、 $n\text{-Bu}-\text{C}$ または $n\text{-Hex}$) の CH_3 基が CF_2H 基に置き換わった場合でも同様の現象が確認されており (非特許文献 1)、 CH_3 基と CF_2H 基はフッ素の数が一つ違うだけのフルオロメチル基であるものの、触媒の立体選択性に対して明確な違いが生じていた。ジフルオロメチル基に隣接するケトンの不斉還元の検討において、化学触媒の適用が上手く進まない中、生物学的方法についても検討が見送られ、キラル-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールの合成法については近年進展がなかった。このような中、分子中の CF_2H 基と CH_3 基と

がほぼ同じ大きさである擬似対象ケトンと言える 1, 1-ジフルオロアセトンの立体構造を厳密に判別する触媒等の開発が望まれていた。

[0008] そこで、本発明の課題は、キラルー 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを高い立体選択性で製造する方法を提供することにある。

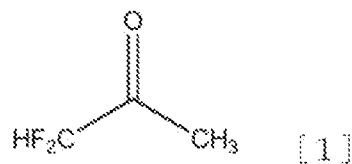
課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく、鋭意検討した結果、1, 1-ジフルオロアセトンに特定の生体触媒を作用させることにより、高い立体選択性で不斉還元が生じ、両立体のキラルー 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを得られる方法を見出し、本発明を完成した。

[0010] [発明 1]

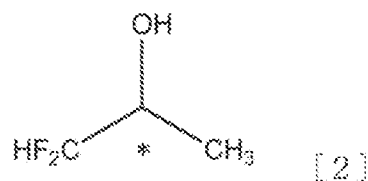
下記式 [1] :

[化1]



で表される 1, 1-ジフルオロアセトンに、該アセトンを不斉還元する活性を有する微生物または該活性を有する酵素を作用させることを特徴とする、下記式 [2] :

[化2]



[式中、*は不斉原子を表す。以下本明細書において同じ。]

で表されるキラルー 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールの製造方法。

[0011] [発明 2]

前記微生物が、キャンディダ・グイリエルモンディ (Candida guilliermond

ii)、キャンディダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、キャンディダ・ビニ(*Candida vini*)、キャンディダ・ビスワナシイ(*Candida viswanathii*)、クリプトコッカス・ラウレンティ(*Cryptococcus laurentii*)、クリプトコッカス・カルバタス(*Cryptococcus curvatus*)、デバリヨマイセス・マラムス(*Debaryomyces maramus*)、クルイベロマイセス・マーキシアヌス(*Kluyveromyces marxianus*)、オガタエア・ポリモルファ(*Ogataea polymorpha*)、ピキア・アノマラ(*Pichia anomala*)、ピキア・ファリノーサ(*Pichia farinosa*)、ピキア・ハプロフィラ(*Pichia haplophila*)、ピキア・ミヌタ(*Pichia minuta*)、ロドトルラ・ムクラギノーサ(*Rhodotorula muculaginosus*)、サッカロマイセス・ロウキシイ(*Saccharomyces rouxii*)、トルラスポーラ・デルブルエキイ(*Torulaspora delbrueckii*)、ウィッカーハモマイセス・サブペリクロサ(*Wickerhamomyces subpelliculosa*)、およびジゴサッカロマイセス・ロウキシイ(*Zygosaccharomyces rouxii*)からなる群より選ばれる少なくとも1種である、発明1に記載の製造方法。

[0012] [発明3]

前記微生物が、下記表に示す受託番号の微生物であることを特徴とする、
発明2に記載の製造方法。

[0013]

[表1]

微生物	受託番号	寄託機関
キャンディダ・グリエルモンディ (<i>Candida guilliermondii</i>)	NBRC10279	独立行政法人製品評価技術基盤機構
キャンディダ・パラプシロシス (<i>Candida parapsilosis</i>)	NBRC0708	独立行政法人製品評価技術基盤機構
キャンディダ・ビニ (<i>Candida vini</i>)	NBRC1247	独立行政法人製品評価技術基盤機構
キャンディダ・ビスワナシ (<i>Candida viswanathii</i>)	NBRC10321	独立行政法人製品評価技術基盤機構
クリプトコッカス・ラウレンティ (<i>Cryptococcus laurentii</i>)	NBRC0609	独立行政法人製品評価技術基盤機構
クリプトコッカス・カルバタス (<i>Cryptococcus curvatus</i>)	NBRC1159	独立行政法人製品評価技術基盤機構
デバリオマイセス・マラムス (<i>Debaryomyces hansenii</i>)	NBRC0668	独立行政法人製品評価技術基盤機構
クルイベロマイセス・マーキシアヌス (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	NBRC10005	独立行政法人製品評価技術基盤機構
オガタエア・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>)	NBRC0799	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・アノマラ (<i>Pichia anomala</i>)	NBRC0118	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・ファリノーサ (<i>Pichia farinosa</i>)	NBRC0462	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・ハプロフィラ (<i>Pichia haplophila</i>)	NBRC0947	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・ミヌタ (<i>Pichia minuta</i>)	NBRC0975	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ロトトルラ・ムクラギノーサ (<i>Rhodotorula muculaginosus</i>)	NBRC0001	独立行政法人製品評価技術基盤機構
サッカロマイセス・ロウキシイ (<i>Saccharomyces rouxii</i>)	NBRC0493	独立行政法人製品評価技術基盤機構
トルラスポーラ・デルブルエキ (<i>Torulaspora delbrueckii</i>)	NBRC0381	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ウィッカーハモマイセス・サブペリクローサ (<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i>)	NBRC0198	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ジゴサッカロマイセス・ロウキシイ (<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)	NBRC10671	独立行政法人製品評価技術基盤機構

[0014] [発明 4]

前記微生物を、微生物菌体またはその細胞抽出物として作用させることを特徴とする、発明 1 乃至 3 の何れかに記載の製造方法。

[0015] [発明 5]

前記酵素が、オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea polymorpha*)、オガタエア・パラポリモルファ (*Ogataea parapolymorpha*)、ピキア・アノマラ (*Pichia anomala*)、またはピキア・ミヌタ (*Pichia minuta*) 由来の精製酵素であることを特徴とする、発明 1 に記載の製造方法。

[0016] [発明 6]

前記オガタエア・ポリモルファ (Ogataea polymorpha) が、オガタエア・ポリモルファ (Ogataea polymorpha) NBRC0799菌株である、発明 5 に記載の製造方法。

[0017] [発明 7]

前記作用させる際の温度 (反応温度) が、 5°C ～ 60°C であることを特徴とする、発明 1 乃至 6 の何れかに記載の製造方法。

[0018] [発明 8]

前記作用させる際の pH (反応時における pH) が、 4.0 ～ 8.0 の範囲であることを特徴とする、発明 1 乃至 7 の何れかに記載の製造方法。

[0019] [発明 9]

前記作用させた後 (反応終了後) に得られる 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールおよび不純物を含む混合液 (反応終了液) を蒸留することにより、該混合液から不純物を分離し、1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを精製する工程を含む、発明 1 乃至 8 の何れかに記載の製造方法。

[0020] 前述したように、1, 1, 1-トリフルオロアセトンに高い立体選択性を示した化学触媒を 1, 1-ジフルオロアセトンに作用させ立体選択的に不斉還元し、キラル 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを得ようとする方法が検討されたが、その光学純度は最大でも 16% ee と低いものであった。一般に、フッ素原子の van der Waals 半径は $1.47\text{\AA}$ であり、水素原子 $1.20\text{\AA}$ と近い大きさであることから、水素原子がフッ素原子に置き換わった化合物が元の化合物を認識する生体触媒や化学触媒の活性部位に同様に取り込まれる (ミミック効果と呼ばれる) ことが知られている。しかしながら、フッ素原子の持つ電機陰性度や C-F 結合の強さなどにより、元の化合物と異なる性質を示す場合が多く (薬効の増大、毒性の増大・低減)、医薬品に頻繁に使用されている。同様に、トリフルオロメチル (CF_3) 基とジフルオロメチル (CF_2H) 基とはフッ素原子が一つしか違わない極めて類似した置換基であるが、生体触媒に及ぼす影響については未解明な部分が多く、それぞれの置換基を持つ化合物を実際に生体触媒に作用させて反応性を調査する必要がある。

あった。

[0021] そこで本発明者らは、微生物菌体や精製酵素といった生体触媒の中から本発明の目的を達成することができる生体触媒のスクリーニングを鋭意実施し、従来技術では成し得なかった高い光学純度のキラルー１，１－ジフルオロ－２－プロパノールを与える生体触媒を見出し、本発明を完成するに至った。

[0022] またその過程において、本発明者らは、用いる生体触媒を変えることで、キラルー１，１－ジフルオロ－２－プロパノールの両光学異性体を作り分けることができるという、大変有用な知見を得た。

[0023] また、詳細は後述するが、本発明者らは、有機溶媒を特定の濃度に設定して添加することで、反応が円滑に進行すると言う、好ましい知見も得た。

[0024] 本発明においては、１，１－ジフルオロアセトンの濃度は、反応液中の該アセトンの濃度（w／v）のことを意味し（還元された生成物の濃度は考慮されない（除外される））、反応全体を通しての該アセトンの添加総量を規定するものではない。

[0025] 本発明のように、高い光学純度で目的物を与える微生物または酵素を見出し、これを１，１－ジフルオロアセトンに作用させることにより、高い光学純度（８５％*ee*～１００％*ee*）の両光学異性のキラルー１，１－ジフルオロ－２－プロパノールを効率よく製造できる知見は従来知られていなかった。

発明の効果

[0026] 本発明によれば、医薬品中間体として重要なキラルー１，１－ジフルオロ－２－プロパノールを、高い光学純度で効率良く製造することができる。

[0027] 本発明の製造方法において用いる微生物または酵素は、１，１－ジフルオロアセトンのカルボニル基を水酸基へと高い光学純度で還元し得るものであり、さらに不斉還元の反応方法（補酵素NAD（P）Hを外部から新たに加えることなく、脱水素酵素により再生させる方法など）を考案することにより、工業的に採用可能な生産性でキラルー１，１－ジフルオロ－２－プロパ

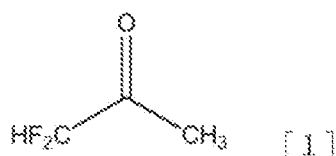
ノールを提供することができる。

発明を実施するための形態

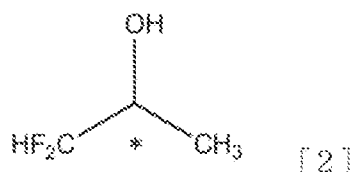
[0028] 以下に、本発明について詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施することができる。なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願2015-041696号明細書（2015年3月3日出願）の全体を包含する。

[0029] 本発明に係るキラルー 1， 1－ジフルオロ－2－プロパノール（下記式 [2]）の製造方法（以下、本発明の方法）において用いる 1， 1－ジフルオロアセトン（下記式 [1]）は、公知の化合物であり、従来技術を基に当業者が適宜調製してもよいし、市販されているものを用いてもよい。

[0030] [化3]



[0031] [化4]



[0032] 本発明の方法において、1， 1－ジフルオロアセトンは、化合物そのものの自体は当然、それ以外に水または炭素数1から4のアルコールとの混合物も同等に用いることができる。該アセトンを水を主成分とする反応液に直接投入することもできるが、該アセトンは水と水和する際、発熱を生じるため、事前に水和した後に投入するほうが好ましい。

[0033] 本発明の方法に用い得る微生物、すなわち、1， 1－ジフルオロアセトンをキラルー 1， 1－ジフルオロ－2－プロパノールへ還元する活性を有する

微生物は、特に限定はされないが、例えば、キャンディダ・グイリエルモンディ (*Candida guilliermondii*)、キャンディダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、キャンディダ・ビニ (*Candida vini*)、キャンディダ・ビスワナシイ (*Candida viswanathii*)、クリプトコッカス・ラウレンティ (*Cryptococcus laurentii*)、クリプトコッカス・カルバタス (*Cryptococcus curvatus*)、デバリオマイセス・マラムス (*Debaryomyces maramus*)、クルイベロマイセス・マーキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea polymorpha*)、ピキア・アノマラ (*Pichia anomala*)、ピキア・ファリノーサ (*Pichia farinosa*)、ピキア・ハプロフィラ (*Pichia haplophila*)、ピキア・ミヌタ (*Pichia minuta*)、ロドトルラ・ムクラギノーサ (*Rhodotorula muculaginos*a)、サッカロマイセス・ロウキシイ (*Saccharomyces rouxii*)、トルラスポーラ・デルブルエキイ (*Torulaspora delbrueckii*)、ウィッカーハモマイセス・サブペリクロサ (*Wickerhamomyces subpelliculosa*)、ジゴサッカロマイセス・ロウキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*) からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、好ましくは、キャンディダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、キャンディダ・ビニ (*Candida vini*)、クリプトコッカス・カルバタス (*Cryptococcus curvatus*)、デバリオマイセス・マラムス (*Debaryomyces maramus*)、クルイベロマイセス・マーキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea polymorpha*)、ピキア・アノマラ (*Pichia anomala*)、ピキア・ハプロフィラ (*Pichia haplophila*)、ピキア・ミヌタ (*Pichia minuta*)、ロドトルラ・ムクラギノーサ (*Rhodotorula muculaginos*a)、サッカロマイセス・ロウキシイ (*Saccharomyces rouxii*)、トルラスポーラ・デルブルエキイ (*Torulaspora delbrueckii*) からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられ、より好ましくは、クリプトコッカス・カルバタス (*Cryptococcus curvatus*)、クルイベロマイセス・マーキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea polymorpha*)、ピキア・アノマラ (*Pichia anomala*)、ピキア・ハプロフィラ (*Pichia haplophi*

la)、ロドトルラ・ムクラギノーサ (*Rhodotorula muculaginos*)、トルラ
スポーラ・デルブルエキイ (*Torulaspora delbrueckii*) からなる群より選ば
れる少なくとも1種が挙げられる。

[0034] これらの微生物については、それぞれ下記表に示す受託番号を得て、独立
行政法人製品評価技術基盤機構（〒151-0066 東京都渋谷区西原2-49-10）に
寄託されている。これらの微生物は、他の微生物株保存機関にも相互に寄託
されている場合があり、同様に利用することができる。なお、これらの微生
物は一般に公開されているものであり、当業者が容易に入手できる。

[0035] [表2]

微生物	受託番号	寄託機関
キャンディダ・グイリエルモンディ (<i>Candida guilliermondii</i>)	NBRC10279	独立行政法人製品評価技術基盤機構
キャンディダ・パラプシロシス (<i>Candida parapsilosis</i>)	NBRC0708	独立行政法人製品評価技術基盤機構
キャンディダ・ビニ (<i>Candida vini</i>)	NBRC1247	独立行政法人製品評価技術基盤機構
キャンディダ・ビスワナシイ (<i>Candida viswanathii</i>)	NBRC10321	独立行政法人製品評価技術基盤機構
クリプトコッカス・ラウレンティ (<i>Cryptococcus laurentii</i>)	NBRC0609	独立行政法人製品評価技術基盤機構
クリプトコッカス・カルバタス (<i>Cryptococcus curvatus</i>)	NBRC1159	独立行政法人製品評価技術基盤機構
デバリオマイセス・マラムス (<i>Debaryomyces maramus</i>)	NBRC0668	独立行政法人製品評価技術基盤機構
クルイベロマイセス・マーキシアヌス (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	NBRC10005	独立行政法人製品評価技術基盤機構
オガタエア・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>)	NBRC0799	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・アノマラ (<i>Pichia anomala</i>)	NBRC0118	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・ファリノーサ (<i>Pichia farinosa</i>)	NBRC0462	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・ハプロフィラ (<i>Pichia haplophila</i>)	NBRC0947	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・ミヌタ (<i>Pichia minuta</i>)	NBRC0975	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ロドトルラ・ムクラギノーサ (<i>Rhodotorula muculaginos</i>)	NBRC0001	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ザッカロマイセス・ロウキシイ (<i>Saccharomyces rouxii</i>)	NBRC0493	独立行政法人製品評価技術基盤機構
トルラスポーラ・デルブルエキイ (<i>Torulaspora delbrueckii</i>)	NBRC0381	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ウィッカーハモマイセス・サブベリクロサ (<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i>)	NBRC0198	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ジゴザッカロマイセス・ロウキシイ (<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)	NBRC10671	独立行政法人製品評価技術基盤機構

[0036] 本発明の方法に用いる微生物としては、培養した菌体をそのまま用いるこ

とができるのは勿論、超音波やガラスビーズで破碎した菌体、アクリルアミド等で固定化した菌体、アセトンやグルタルアルデヒドなどの有機化合物で処理した菌体、アルミナ、シリカ、ゼオライトおよび珪藻土等の無機担体に担持した菌体、該微生物より調製した無細胞抽出液や精製酵素、該微生物よりクローニングした酵素の遺伝子を導入した遺伝子組換え体も用いることができる。

[0037] 本発明の方法に用い得る酵素、すなわち、1, 1-ジフルオロアセトンを経ル-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールへ還元する活性を有する酵素は、特に限定はされないが、例えば、アルコール脱水素酵素またはカルボニル還元酵素が挙げられる。上記活性を有する酵素は、1, 1-ジフルオロアセトンを基質に用いたスクリーニングを行うことで選抜することができる。

[0038] アルコール脱水素酵素は、例えば、オリエンタル酵母工業株式会社の「アルコール脱水素酵素、酵母由来」、ユニチカ株式会社の「アルコール脱水素酵素（Z M-A D H）」、株式会社ダイセルのChiralscreen(登録商標) 0H E 001（以下同じ）、E007、E008、E031、E039、E072、E077、E082、E092から選ばれる少なくとも1種が挙げられ、好ましくはE001、E007、E008、E031、E039、E077、より好ましくはE001、E031、E039、E077である。また、当該酵素を発現する遺伝子組換え微生物も同様に用いることができる。

[0039] 他方、カルボニル還元酵素は、例えば、オガタエア・ポリモルファ（*Ogataea polymorpha*）、オガタエア・パラポリモルファ（*Ogataea parapolyomorpha*）、ピキア・アノマラ（*Pichia anomala*）、ピキア・ミヌタ（*Pichia minuta*）などのサッカロミセス目の酵母から産生される酵素が挙げられる。該酵素の精製には、硫安分画、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの一般的なタンパク質の精製方法が適用できる。

[0040] 前記微生物の培養には、通常、微生物の培養に用いられる栄養成分を含む培地（固体培地または液体培地）が使用できるが、水溶性である1, 1-ジ

フルオロアセトンの還元反応を行う場合には、液体培地が好ましい。培地は、炭素源としてグルコース、スクロース、マルトース、ラクトース、フルクトース、トレハロース、マンノース、マンニトール、デキストロース等の糖類、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、グリセロール等のアルコール類、クエン酸、グルタミン酸、リンゴ酸等の有機酸類が、そして窒素源としてアンモニウム塩、ペプトン、ポリペプトン、カザミノ酸、尿素、酵母エキス、麦芽エキス、コーンステーパーリカー等が用いられる。さらに、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム等の他の無機塩や、イノシトール、ニコチン酸等のビタミン類等の培地組成が適宜添加できる。

[0041] これらの炭素源、窒素源、無機塩のうち、炭素源については微生物が十分に増殖する量且つ増殖を阻害しない量を加えることが好ましく、通常、培地 1 L に対して 5 ~ 80 g、好ましくは 10 ~ 40 g 加える。窒素源についても同様で、微生物が十分に増殖する量かつ増殖を阻害しない量を加えることが好ましく、通常、培地 1 L に対して 5 ~ 60 g、好ましくは 10 ~ 50 g、栄養源としての無機塩については微生物の増殖に必要な元素を加える必要があるが、高い濃度の場合には増殖が阻害されるため、通常、培地 1 L に対して 0.001 ~ 10 g 加える。なお、これらは微生物に応じて複数の種類を組み合わせ使用することができる。

[0042] 培地における pH は微生物の増殖に好適な範囲で調整する必要があり、通常 4.0 ~ 10.0、好ましくは 6.0 ~ 9.0 で行う。培養における温度範囲は微生物の増殖に好適な範囲で調整する必要があり、通常 10 ~ 50℃、好ましくは 20 ~ 40℃で行う。培養中は培地に空気を通気する必要があり、好ましくは 0.3 ~ 4 vvm (「vvm」は 1 分間当たりの培地体積に対する通気量を意味する。volume / volume / minute)、より好ましくは 0.5 ~ 2 vvm で行う。酸素の要求量が多い微生物に対しては、酸素発生器等を用いて、酸素濃度を高めた空気を通気しても良い。また、試験管やフラスコ等の任意の通気量を設定し難い器具については、該器

具の容積に対して培地量を20%以下に設定し、綿栓やシリコン栓等の通気栓を取り付ければ良い。培養を円滑に進めるためには培地を攪拌することが好ましく、培養槽の場合には該装置の攪拌能力の好ましくは10~100%、より好ましくは20~90%で行う。一方、試験管やフラスコ等の小規模な器具の場合には振盪機を用いて行うのが良く、好ましくは50~300 rpm、より好ましくは100~250 rpmで行う。培養時間は微生物の増殖が収束する時間であれば良く、6~72時間、好ましくは12~48時間で行う。

[0043] 基質である1, 1-ジフルオロアセトンに前記微生物を作用させるには、通常、微生物を培養した懸濁液をそのまま反応に使用することができる。培養中に生じる成分が還元反応に悪影響を与える場合には、遠心分離等の操作で培養液から菌体を1度回収して得られた菌体（静止菌体）を用いて再び懸濁液を調製して反応に使用しても良い。また、培養した微生物菌体の細胞を破碎等して得られたものや、培養した微生物菌体から調製した酵素などの、各種細胞抽出物も反応に使用することもできる。他方、基質である1, 1-ジフルオロアセトンに前記酵素（精製酵素）を作用させる場合には、該酵素を溶解させた緩衝液中で行うことができる。本反応は還元反応であることから、弱酸性の緩衝液が好ましく、リン酸ナトリウム緩衝液、リン酸カリウム緩衝液、クエン酸ナトリウム緩衝液、クエン酸カリウム緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸カリウム緩衝液が挙げられる。

[0044] 前記微生物を用いた反応を効率的に進めるには、これらの懸濁液中の菌体の密度を高める必要があるが、密度が高過ぎると自己溶解酵素の産生や終末代謝産物の蓄積等により反応が阻害される場合があるため、通常 $10^6 \sim 10^{12}$ cfu/ml（「cfu」は寒天培地上に形成されるコロニーの数を意味する、colony forming units）、好ましくは $10^7 \sim 10^{11}$ cfu/ml、より好ましくは $10^8 \sim 10^{10}$ cfu/mlで行う。他方、前記酵素を用いた反応を効率的に進めるためには、緩衝液中の酵素の濃度を高める必要があるが、酵素を使用しすぎると経済的ではないため、好ましくは0

、 $0.1\text{ g/L} \sim 20\text{ g/L}$ 、より好ましくは $0.1\text{ g/L} \sim 10\text{ g/L}$ の範囲で使用する。

[0045] これらの懸濁液または緩衝液への1, 1-ジフルオロアセトンの添加において、該アセトンの濃度は、還元反応が円滑に進み且つ微生物または酵素の活性に悪影響を与えない濃度を維持することが好ましい。該アセトンの濃度は、 5% (w/v) より高い場合、微生物が死滅したり、酵素が変性することがあるため、この数値以下の濃度、すなわち、通常 $0.01 \sim 10\%$ (w/v)、好ましくは $0.05 \sim 6\%$ (w/v)で行う。該アセトン濃度算出の容量の根拠は、例えば、後述する実施例1では蒸気滅菌前の試験管に分注した培養液量を、後述する実施例3では培養後の微生物の懸濁液総量を、目安として考えれば良い。

[0046] 基質である1, 1-ジフルオロアセトンに前記微生物または酵素を作用させる際の温度（すなわち反応温度）は、該微生物または酵素に好適な範囲を維持する必要がある、通常 $5 \sim 60^\circ\text{C}$ 、好ましくは $15 \sim 50^\circ\text{C}$ 、より好ましくは $15 \sim 38^\circ\text{C}$ である。また、上記作用させる際のpH（すなわち反応時のpH）も、好適な範囲を維持する必要がある、通常 $4.0 \sim 8.0$ 、好ましくは $5.5 \sim 8.0$ 、より好ましくは $5.5 \sim 7.0$ である。

[0047] 微生物懸濁液または酵素緩衝液が静置状態にあると反応効率が低下するため、反応時は反応液を攪拌しながら行う。また、反応時は無通気で行うことができるが、必要に応じて通気を行ってもよい。その際、通気量が多過ぎる場合には1, 1-ジフルオロアセトンおよびキラルー1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールが系外に気体として飛散するおそれがあるため、通気量は、 0.3 vvm 以下が好ましく、より好ましくは 0.1 vvm 以下である。反応時間は、目的物の生成具合によって決定すればよく、通常 $6 \sim 312$ 時間である。

[0048] 本発明では、還元反応に利用される補酵素NAD(P)H（水素供与体）は、微生物が本来持つ脱水素酵素、大腸菌に組み込まれた脱水素酵素を利用して補酵素NAD(P)より再生されるため、懸濁液に水素源となる基質を

別途存在させて還元反応を行うのが好ましく、ここでは糖類やアルコール類も使用可能である。補酵素NAD(P)Hは市販されているものを別途加えて還元反応を行うことも可能であるが、非常に高価なため経済的ではない。本発明のように補酵素NAD(P)Hを外部から新たに加えることなく、脱水素酵素により再生させることで、1菌体当たりの還元回数が増え、経済的に且つ高い生産性で目的物を製造することができる。

[0049] 本発明の方法は、1, 1-ジフルオロアセトンからキラル-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールへ変換する際に、工業的な製造方法を目的とし、好適な反応条件を採用することで、キラル-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを大量に製造することが可能である。

[0050] なお、本発明の方法では、光学活性体のアルコール、すなわちキラル-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを、実用的にも採用できる光学純度として、85% ee以上、特に好ましくは98% ee以上で得ることができる。

[0051] 微生物の菌体を用いた場合、菌体内には多数の酸化還元酵素が混在することから、全体として見た場合、光学純度が低下するが、目的の酵素を精製して用いることで光学純度を向上することができる。

[0052] 生成したキラル-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを反応終了液（反応終了後の不純物などを含む混合液）から回収するには、有機合成における一般的な単離方法が採用できる。反応終了後、蒸留や有機溶媒による抽出等の通常の後処理操作を行うことにより、粗生成物を得ることができる。特に、反応終了液または必要に応じて菌体を取り除いた後の濾洗液を直接、蒸留に付すことで簡便に且つ収率良く回収することができる。得られた粗生成物は、必要に応じて、脱水、活性炭、分別蒸留、カラムクロマトグラフィー等の精製操作を行うことができる。

[0053] [実施例]

次に実施例を示すが、本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

実施例 1

[0054] [1, 1-ジフルオロアセトンに対する微生物の反応性調査（スクリーニング）結果]

蒸留水1000ml、ポリペプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム10gの組成からなる液体培地を調製し、試験管（φ1.8cm×18cm）に5mlずつ分注し、下記表Aに示す各微生物を接種し、28℃、160rpmで24時間の培養を行った。培養終了後、1, 1-ジフルオロアセトンを1%wt/vとなるように添加し、28℃、160rpmで還元反応を24時間行った。反応後の変換率の測定は、¹⁹F-NMRの内部標準法により行い、光学純度の測定は、反応液に酢酸エチルを加えて混合し、1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを有機層に抽出し、後述するキラルカラムを用いたガスクロマトグラフィー法での分析により行った。用いた微生物ごとに、変換率及び光学純度の測定結果をそれぞれ下記表Aに示した。（変換率及び光学純度の測定方法は以下同）

[0055] [表3]

表A

微生物	受託番号	変換率	光学純度	立体
<i>Candida guilliermondii</i>	NBRC10279	81.8%	78.3% ee	S
<i>Candida parapsilosis</i>	NBRC0708	67.9%	81.8% ee	S
<i>Candida vini</i>	NBRC1247	78.4%	82.3% ee	S
<i>Candida viwanathii</i>	NBRC10321	81.6%	79.5% ee	S
<i>Cryptococcus laurentii</i>	NBRC0609	19.6%	76.9% ee	S
<i>Cryptococcus curvatus</i>	NBRC1159	43.3%	90.3% ee	S
<i>Debaryomyces hansenii</i>	NBRC0668	9.7%	81.8% ee	S
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NBRC10005	53.6%	90.7% ee	S
<i> Ogataea polymorpha</i>	NBRC0799	63.5%	86.8% ee	S
<i>Pichia anomala</i>	NBRC0118	14.0%	89.8% ee	S
<i>Pichia farinosa</i>	NBRC0462	31.5%	75.0% ee	S
<i>Pichia haplophila</i>	NBRC0947	10.6%	83.8% ee	S
<i>Pichia minuta</i>	NBRC0975	93.3%	80.5% ee	S
<i>Rhodotorula muculaginosa</i>	NBRC0001	100.0%	90.1% ee	S
<i>Saccharomyces rouxii</i>	NBRC0493	62.2%	86.5% ee	S
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	NBRC0281	16.1%	85.6% ee	S
<i>Wickerhamomyces subpelliculosus</i>	NBRC0198	32.7%	79.5% ee	S
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	NBRC10671	68.4%	72.7% ee	S

[0056] [キラルカラムを用いたガスクロマトグラフィー法の分析条件]

酢酸エチルに抽出された1, 1-ジフルオロアセトンに対して、無水酢酸

1. 2 当量、ピリジン 1. 2 等量を反応させ、アセトキシ体に誘導し、分析試料とした。ガスクロマトグラフィーのカラムにはアジレント・テクノロジー社製の Cyclosil-B ($0.25\text{ mm} \times 30\text{ m} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) を用い、キャリアガスは窒素、圧力は 100 kPa 、カラム温度は $60 \sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) $\sim 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$)、気化室・検出器 (FID) 温度は $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ の分析条件で得られるピークの面積により光学純度を算出した。1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールのそれぞれのエナンチオマーの保持時間は、S 体が 4.6 min 、R 体が 5.3 min であった。立体配置の決定は (-)-モッシャー酸クロリドを用いた新モッシャー法により決定した ($^1\text{H-NMR}$ 化学シフト: [S-MTPA エステル] CF_2H 6.06 、 H 5.42 、 CH_3 1.44 、[R-MTPA エステル] CF_2H 6.18 、 H 5.44 、 CH_3 1.36)。

実施例 2

[0057] [微生物菌体による (S)-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールの製造]

前培養の培地として、蒸留水 1000 ml 、ポリペプトン 10 g 、酵母エキス 5 g 、塩化ナトリウム 10 g の組成からなる液体培地を調製し、試験管 ($\phi 1.8\text{ cm} \times 18\text{ cm}$) に 5 ml ずつ分注し、 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 15 分間の蒸気滅菌を行った。この液体培地に *Opuntia polymorpha* NBRC0799 菌株を白金時で無菌的に接種し、 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 160 rpm で 16 時間の培養を行い、 $1.4 \times 10^7\text{ cfu/ml}$ の前培養液を得た。本培養の培地として、蒸留水 500 ml 、グルコース 16.25 g 、酵母エキス 12.5 g 、ポリペプトン 7.5 g 、リン酸二水素カリウム 1.2 g 、リン酸水素二カリウム 0.625 g 、消泡剤 (旭化成製、FC2901) 0.2 g の組成からなる液体培地を調製し、容量 1 L の培養槽 ((株)エイブル製、BME01 型) に張り込み、 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 15 分間の蒸気滅菌を行った。この培養槽に前培養液を無菌的に 5 ml 接種し、 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、通気 1vvm 、攪拌 700 rpm で 18 時間培養し、 $1.7 \times 10^9\text{ cfu/ml}$ (湿菌重として 28 g/L) の懸濁液を調製し

た。培養時のpHは20%重炭酸ナトリウム水溶液、42.5%リン酸水溶液を用いてpH6.5に調整した。培養終了後、通気を0vvmに変更し、培養液に対して1,1-ジフルオロアセトン1%wt/v、グルコースを6.25gwt/vとなるように添加し、28℃で還元反応を43時間行った。反応後の変換率は100%、光学純度は93.4%ee(S)であった。反応後の培養液から直接蒸留により(S)-1,1-ジフルオロ-2-プロパノールの水溶液を9.8g回収した。この水溶液に水酸化カルシウム(無水)を加え脱水し、水分濃度2.1%の(S)-1,1-ジフルオロ-2-プロパノールを4.1g得た。

実施例 3

[0058] [無細胞抽出液による(S)-1,1-ジフルオロ-2-プロパノールの製造]

実施例2で培養した*Ogataea polymorpha* NBRC0799菌株の菌体懸濁液を500ml容の遠沈管に移液し、18,000×g、30分間の遠心分離を行い、菌体を回収した。回収した湿菌体に0.2MのpH7.0のリン酸緩衝液を15ml加え、懸濁液を調製した。ビーズ式細胞破碎装置(BioSpec社製、ビードビーター)を用いて、懸濁液中の細胞を破碎し、ガラスビーズを除去後、20,000×g、30分間の遠心分離を行い、無細胞抽出液を調製した。この無細胞抽出液1mlに1,1-ジフルオロアセトンを1%wt/v、2Mグルコースを250μL添加し、28℃で還元反応を24時間行った。反応後の変換率は100%、光学純度は95.6%ee(S)であった。

実施例 4

[0059] [*Ogataea polymorpha* NBRC0799菌株からのカルボニル還元酵素の精製]

Ogataea polymorpha NBRC0799菌株を、グルコース10g/L、ペプトン5g/L、酵母エキス3g/L、麦芽エキス3g/L、リン酸二水素カリウム3g/L、リン酸水素二カリウム2.0g/Lの組成からなるpH6.5の液体培地を5ml分注した試験管(φ1.4cm×18cm)を121℃で

15分間蒸気滅菌した後、白金時で無菌的に接種し、30℃、300rpmで24時間の培養を行い、 3.84×10^{10} cfu/mlの前々培養液を調製した。

[0060] 200mlの上記液体培地を含む500ml三角フラスコを、121℃で15分間の蒸気滅菌を行い、前培養液を無菌的に2ml添加し、30℃、攪拌180rpmで24時間培養し、 3.8×10^{10} cfu/mlの前培養液を調製した。

[0061] 上記と同一の培地を2L容の坂口フラスコに1000mlずつ分注し、121℃で15分間の蒸気滅菌し、前培養液を無菌的に10ml添加し、30℃、96rpmで24時間培養した。培養液を500ml容の遠沈管に移し、 $3000 \times g$ 、8分間の遠心分離を行い、菌体として回収した。

[0062] [酵素活性測定方法]

酵素活性は、酵素または微生物を含む168mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)にNADHを終濃度0.1mMとなるように添加し、この反応溶液に終濃度50mMとなるように1,1-ジフルオロアセトンを追加して反応を開始した(反応液1mL)。反応は30℃で行い、分光光度計(日本分光株式会社、V-630BIO)を用いてNADHの減少を340nmの吸光度でモニターした。なお、酵素活性は、1分当たり1μmolのNADHの酸化を触媒する酵素量を1U(ユニット)として定義した。

[0063] [無細胞抽出液の調製]

回収した菌体に10mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)を菌体の5倍量加え、懸濁液を調製した。ビーズ式細胞破碎装置(安井器械株式会社、マルチビーズショッカー)を用いて、菌体を破碎し、 $20,000 \times g$ 、10分間の遠心分離を行い、上清を無細胞抽出液として使用した。

[0064] [硫安分画]

30%飽和硫安濃度になるように硫安を無細胞抽出液に添加し、氷上で3時間攪拌した。 $20,000 \times g$ 、30分間の遠心分離を行い、上清を30%飽和硫安画分として次の精製過程に使用した。

[0065] [疎水クロマトグラフィー—Phenyl Toyopearl]

30%飽和硫酸溶液で平衡化した60mlのPhenyl-Toyopearl（東ソー株式会社、TOYOPEARL（登録商標）Phenyl-650M）カラムに上記の30%飽和硫酸上清画分を供した。300mMの硫酸を含む、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）300mlで洗浄し10mMリン酸ナトリウム緩衝液で溶出した。得られた活性画分をプールしPhenyl-Toyopearl活性画分として、次の精製ステップに使用した。

[0066] [イオン交換クロマトグラフィー—Q-sepharose]

上記、Phenyl-Toyopearl活性画分を10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で平衡化した30mlのQ-sepharose（GE Healthcare UK Ltd.、Q-sepharose Fast Flow）カラムに供した。そして、カラムを10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）150mlで洗浄後、0～150mMの塩化ナトリウムのリニアグラジェントにより溶出した。得られた活性画分をQ-sepharose活性画分として次の精製ステップに用いた。

[0067] [ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー—Hydroxyapatite]

Q-sepharose活性画分を10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化した10mLのHydroxyapatite（ナカライテスク株式会社、ヒドロキシアパタイト）カラムに供した。10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）100mlで洗浄し、10mMと300mMのリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）によるリニアグラジェントにより溶出した。活性を示した画分をプールし、遠心式フィルターユニット（Merck Millipore、Amicon Ultra-15、10kDa）で濃縮し、酵素を単離した。

精製酵素は最終的に比活性29.8U/mgとなった。

実施例 5

[0068] [Ogataea polymorpha NBRC0799菌株由来のカルボニル還元酵素の1, 1-ジフルオロアセトンに対する反応性の確認]

Ogataea polymorpha NBRC0799菌株から精製した酵素を含む168 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) にNADHを終濃度0.1 mMとなるように添加し、この反応溶液に終濃度50 mMとなるように、下記表Bに示す各基質を添加して反応を開始した (反応液1 mL)。30℃で反応を行い、分光光度計 (日本分光株式会社、V-630BIO) を用いてNADHの減少を吸光度340 nmにより測定した。

[0069] Relative activity (相対活性) とは、アセトンを経験に用いた際の酵素の活性を100%として、それと比較した場合の各基質の酵素活性 (変換速度) の割合を示し、1, 1-ジフルオロアセトンや1, 1, 1-トリフルオロアセトンを基質として供した場合、酵素の変換速度自体は低下している (時間を掛ければ反応は完結する)。アセトンについてはどちらのメチル基も同一のため、酵素の認識部位に区別なく取り込まれるが、1, 1-ジフルオロアセトンや1, 1, 1-トリフルオロアセトンでは、フルオロメチル基とメチル基を認識しながら酵素の活性部位に取り込まれるため速度が遅くなっていると考えられる。他方、1, 3-ジフルオロアセトンについては、フッ素が導入されることで電気陰性度などがアセトンと比べて変化したと考えられる。

[0070]

[表4]

表B

Substrate	Relative Activity (%)
(a)Reduction reaction	
Acetone	100
Fluoroacetone	211
1,1-Difluoroacetone	58
1,3-Difluoroacetone	52
1,1,1-Trifluoroacetone	50
4,4,4-Trifluoro-2-butanone	228
2-Butanone	132
Formaldehyde	16
Acetaldehyde	330
Propionaldehyde	141
Butyraldehyde	193

実施例 6

[0071] [1, 1-ジフルオロアセトンに対する市販のアルコール脱水素酵素の反応性の調査（スクリーニング）結果]

1 ml の 200 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 6.5、206 mM ギ酸ナトリウム、222 mM グルコース、5 mM NAD⁺、（NAD⁺:ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型、以下同じ）5 mM NADP⁺（NAD⁺:ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸酸化型、以下同じ））に1, 1-ジフルオロアセトン1重量%になるように添加し、下記表Cの「酵素名」に示す株式会社ダイセルのChiralscreen(登録商標) 0H（アルコール脱水素酵素）を、それぞれ5 mg 加えてマグネチックスターラーで攪拌しながら25℃で2日間反応させた。反応後の変換率と光学純度を測定し、下記表Cに示した。

[0072]

[表5]

表C

酵素名	反応時間	変換率	光学純度	立体
E001	22 h	100%	96.68% ee	S
E007	22 h	100%	76.20% ee	S
E008	22 h	100%	83.04% ee	S
E031	19 h	100%	98.40% ee	S
E039	19 h	100%	96.62% ee	R
E072	22 h	13%	83.94% ee	S
E077	22 h	18%	96.82% ee	S
E082	22 h	84%	60.66% ee	S
E092	24 h	100%	61.36% ee	S

[0073] [比較例 1]

実施例 5 と同様の方法で、下記表 D の「酵素名」に示す株式会社ダイセルの Chiralscreen(登録商標) 0H (アルコール脱水素酵素) の、1, 1-ジフルオロアセトンに対する反応性を評価し、下記表 D にその結果を示した。

[0074] [表6]

表D

酵素名	反応時間	変換率	光学純度	立体
E004	22 h	0%	未測定	未決定
E005	22 h	0%	未測定	未決定
E019	22 h	0%	未測定	未決定
E021	19 h	0%	未測定	未決定
E048	19 h	0%	未測定	未決定
E051	19 h	0%	未測定	未決定
E057	19 h	0%	未測定	未決定
E073	22 h	0%	未測定	未決定
E078	22 h	0%	未測定	未決定
E079	22 h	0%	未測定	未決定
E080	22 h	0%	未測定	未決定
E085	45 h	0%	未測定	未決定
E086	24 h	0%	未測定	未決定
E087	24 h	0%	未測定	未決定
E119	24 h	0%	未測定	未決定
E128	24 h	0%	未測定	未決定
E146	24 h	0%	未測定	未決定

実施例 7

[0075] [アルコール脱水素酵素を発現する遺伝子組換え大腸菌による (R) - 1, 1

ージフルオロー２－プロパノールの製造]

前培養の培地として、蒸留水1000ml、ポリペプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム10gの組成からなる液体培地を調製し、試験管(φ1.6cm×15cm)に5mlずつ分注し、121℃で15分間の蒸気滅菌を行った。この液体培地に、株式会社ダイセルのChiralscreen(登録商標)0H E031のアルコール脱水素酵素を大量発現する遺伝子組換え大腸菌を白金時で無菌的に接種し、30℃、160rpmで一晩培養を行い、波長600nmでの光学濃度(OD600)7.7の前培養液を得た。

[0076] 本培養の培地として、蒸留水2000mlに酵母エキス、グルタミン酸ナトリウム、グルコース、ラクトース、無機塩類、消泡剤からなる液体培地を調製し、容量5Lの培養槽((株)丸菱バイオエンジ製、MDN型5L(S))に張り込み、121℃で30分間の蒸気滅菌を行った。この培養槽に前培養液を無菌的に5ml接種し、30℃、通気0.5vvm、攪拌しながら40時間培養し、光学濃度(OD600)24の懸濁液を調製した。培養時のpHは28%アンモニア水溶液、50%リン酸水溶液を用いてpH7.0付近に調整した。培養終了後、通気を0vvmに変更し、培養液に対して1, 1ージフルオロアセトン(3.6%wt/v(72g))となるように添加し、補酵素の再生を行いながら20℃、pH6.5で還元反応を24時間行った。反応後の変換率100%光学純度は96.9%ee(R)であった。

[0077] 反応後の培養液から直接蒸留により(R)-1, 1ージフルオロー2ープロパノールの水溶液を102g回収した。この水溶液に水酸化カルシウム(無水)を加え脱水し、水分濃度1.2%の(R)-1, 1ージフルオロー2ープロパノールを70g得た。この(R)-1, 1ージフルオロー2ープロパノール70gをヘリパックパッキンNo. 1(トウトクエンジ株式会社製)を充填したφ2cm×30cmの精留塔を用いて分別蒸留を実施し、蒸気温度87~88℃で留分を回収した。回収した留分をアジレント・テクノロジー社製のCyclosil-B(0.25mm×30m×0.25μm)を用いたガスクロマトグラフィー[キャリアガスは窒素、圧力は100kPa]

a、カラム温度は60～90℃（1℃／min）～150℃（10℃／min）、気化室・検出器（FID）温度は230℃]によりピークを取得し、全体の面積に占める1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールの面積を算出したところ99.0%であった。

産業上の利用可能性

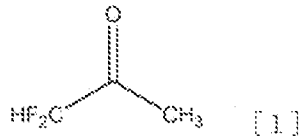
[0078] 本発明によれば、医薬品中間体として重要なキラル-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを、高い光学純度で効率良く製造することができる。

[0079] 本発明の製造方法において用いる微生物または酵素は、1, 1-ジフルオロアセトンのカルボニル基を水酸基へと高い光学純度で還元し得るものであり、さらに不斉還元の方法（補酵素NAD（P）Hを外部から新たに加えることなく、脱水素酵素により再生させる方法など）を考案することにより、工業的に採用可能な生産性でキラル-1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを提供することができる。

請求の範囲

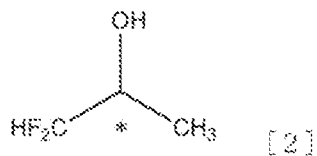
[請求項1] 式 [1] :

[化1]



で表される 1, 1-ジフルオロアセトンに、該アセトンを不斉還元する活性を有する微生物または該活性を有する酵素を作用させることを特徴とする、式 [2] :

[化2]



[*は不斉原子を表す。]

で表されるキラルー 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールの製造方法。

[請求項2] 前記微生物が、カンディダ・グイリエルモンディ (*Candida guilliermondii*)、カンディダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、カンディダ・ビニ (*Candida vini*)、カンディダ・ビスワナシイ (*Candida viswanathii*)、クリプトコッカス・ラウレンティ (*Cryptococcus laurentii*)、クリプトコッカス・カルバタス (*Cryptococcus curvatus*)、デバリヨマイセス・マラムス (*Debaryomyces maramus*)、クルイベロマイセス・マーキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea polymorpha*)、ピキア・アノマラ (*Pichia anomala*)、ピキア・ファリノーサ (*Pichia farinosa*)、ピキア・ハプロフィラ (*Pichia haplophila*)、ピキア・ミヌタ (*Pichia minuta*)、ロドトルラ・ムクラギノーサ (*Rhodotorula muculaginosus*)、サッカロマイセス・ロウキシイ (*Saccharomyces rouxii*)、トルラスポーラ

・デルブルエキイ (*Torulaspora delbrueckii*)、ウィッカーハモマイセス・サブペリクロサ (*Wickerhamomyces subpelliculosa*)、およびジゴサッカロマイセス・ロウキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*) からなる群より選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 1 に記載の製造方法。

[請求項3] 前記微生物が、下記表に示す受託番号の微生物であることを特徴とする、請求項 2 に記載の製造方法。

[表1]

微生物	受託番号	寄託機関
キャンディダ・グイリエルモンディ (<i>Candida guilliermondii</i>)	NBRC10279	独立行政法人製品評価技術基盤機構
キャンディダ・パラプシロシス (<i>Candida parapsilosis</i>)	NBRC0708	独立行政法人製品評価技術基盤機構
キャンディダ・ビニ (<i>Candida vini</i>)	NBRC1247	独立行政法人製品評価技術基盤機構
キャンディダ・ビスワナシー (<i>Candida viswanathii</i>)	NBRC10321	独立行政法人製品評価技術基盤機構
クリプトコッカス・ラウレンティ (<i>Cryptococcus laurentii</i>)	NBRC0809	独立行政法人製品評価技術基盤機構
クリプトコッカス・カルバタス (<i>Cryptococcus curvatus</i>)	NBRC1159	独立行政法人製品評価技術基盤機構
デバリオマイセス・マラムス (<i>Debaryomyces hansenii</i>)	NBRC0688	独立行政法人製品評価技術基盤機構
クルイペロマイセス・マーキシアヌス (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	NBRC10005	独立行政法人製品評価技術基盤機構
オガタエア・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>)	NBRC0799	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・アノマラ (<i>Pichia anomala</i>)	NBRC0118	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・ファリノーサ (<i>Pichia farinosa</i>)	NBRC0462	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・ハプロフィラ (<i>Pichia haplophila</i>)	NBRC0947	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ピキア・ミヌタ (<i>Pichia minuta</i>)	NBRC0975	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ロドトルラ・ムクラギノーサ (<i>Rhodotorula muculaginosus</i>)	NBRC0001	独立行政法人製品評価技術基盤機構
サッカロマイセス・ロウキシイ (<i>Saccharomyces rouxii</i>)	NBRC0493	独立行政法人製品評価技術基盤機構
トルラスポーラ・デルブルエキイ (<i>Torulaspora delbrueckii</i>)	NBRC0381	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ウィッカーハモマイセス・サブペリクロサ (<i>Wickerhamomyces subpelliculosa</i>)	NBRC0188	独立行政法人製品評価技術基盤機構
ジゴサッカロマイセス・ロウキシイ (<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)	NBRC10671	独立行政法人製品評価技術基盤機構

[請求項4] 前記微生物を、微生物の菌体またはその細胞抽出物として作用させることを特徴とする、請求項 1 乃至 3 の何れかに記載の製造方法。

[請求項5] 前記酵素が、オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea polymorpha*)、オガタエア・パラポリモルファ (*Ogataea parapolymorpha*)、ピキア・

アノマラ (*Pichia anomala*)、またはピキア・ミヌタ (*Pichia minuta*) 由来の精製酵素であることを特徴とする、請求項 1 に記載の製造方法。

[請求項6] 前記オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea polymorpha*) が、オガタエア・ポリモルファ (*Ogataea polymorpha*) NBRC0799菌株である、請求項 5 に記載の製造方法。

[請求項7] 前記作用させる際の温度が、5℃～60℃であることを特徴とする、請求項 1 乃至 6 の何れかに記載の製造方法。

[請求項8] 前記作用させる際の pH が、4.0～8.0 の範囲であることを特徴とする、請求項 1 乃至 7 の何れかに記載の製造方法。

[請求項9] 前記作用させた後に得られる 1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールおよび不純物を含む混合液を蒸留することにより、該混合液から不純物を分離し、1, 1-ジフルオロ-2-プロパノールを精製する工程を含む、請求項 1 乃至 8 の何れかに記載の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/056325

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/04(2006.01)i, C12N1/16(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P7/04, C12N1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/CASREACT (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RAMACHANDRAN, P. Veeraraghavan et al., The influence of fluorine on the asymmetric reduction of fluoromethyl ketones, Journal of Fluorine Chemistry, 2007, Vol.128, p.844-850, formulae (9), (12)	1-9
Y	JP 2009-514542 A (Evonik Degussa GmbH), 09 April 2009 (09.04.2009), entire text; particularly, paragraph [0012]; claims 9, 10 & WO 2007/054411 A1 page 5, line 3; claims 9, 10 & EP 1945785 A1 & CN 101305098 A	1, 2, 4, 7-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 May 2016 (18.05.16)

Date of mailing of the international search report
31 May 2016 (31.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/056325

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-501007 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 15 January 2009 (15.01.2009), entire text; particularly, claims 1, 3 & US 2007/0009999 A1 & WO 2007/006650 A2 entire text; particularly, claims 1, 3 & EP 1904640 A1 & KR 10-2008-0018939 A & CN 101218350 A	1, 7-9
Y	WO 2007/142210 A1 (Daicel Chemical Industries, Ltd.), 13 December 2007 (13.12.2007), entire text; particularly, page 3, line 4; paragraphs [0056] to [0058], [0072] & US 2009/0203096 A1 paragraphs [0008], [0107] to [0109], [0127] & EP 2034026 A1 & KR 10-2009-0033864 A & CN 101501202 A	1, 2, 4, 7-9
Y	JP 2011-182787 A (Toyama-Ken), 22 September 2011 (22.09.2011), entire text; particularly, table 1; claims 4, 5; paragraph [0046] & US 2013/0005007 A1 table 1; claims 4, 5; paragraph [0054] & WO 2011/099595 A1 & EP 2511376 A1 & CN 102762734 A	1-9
Y	JP 2012-5396 A (Toyama-Ken), 12 January 2012 (12.01.2012), entire text; particularly, table 1; claims 4, 5; paragraph [0042] (Family: none)	1-4, 7-9
Y	ROSEN, Thomas C. et al., Biocatalyst vs. Chemical Catalyst for asymmetric reduction, Chimica oggi, 2004, Vol.22, No.5, suppl., p.43- 45, entire text, particularly, page 44, paragraph of "ADHs ARE HIGHLY SELECTIVE", page 45, paragraph of "ADHs ARE AVAILABLE IN DIFFERENT SPECIFIC FORMS"	1-9
Y	BUCCIARELLI, Maria et al., Asymmetric Reduction of Trifluoromethyl and Methyl Ketones by Yeast; An Improved Method, Synthesis, 1983, Vol.11, p.897-899, entire text	1, 7-9
Y	Motoko HAYASHI et al., "Fusei Gosei-yo Seitai Shokubai Library Chiralscreen®", Kagaku to Seibutsu, 2014, vol.52, no.10, pages 699 to 702, ISSN 0453-073X, entire text	1, 7-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/04(2006.01)i, C12N1/16(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/04, C12N1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/CASREACT (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	RAMACHANDRAN, P. Veeraraghavan et al., The influence of fluorine on the asymmetric reduction of fluoromethyl ketones, Journal of Fluorine Chemistry, 2007, Vol.128, p.844-850, 式(9)、(12)	1-9
Y	JP 2009-514542 A (エボニック デグサ ゲーエムベーパー) 2009.04.09, 文献全体、特に【0012】、請求項9、10 & WO 2007/054411 A1 第5頁第3行目、請求項9、10 & EP 1945785 A1 & CN 101305098 A	1, 2, 4, 7-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.05.2016

国際調査報告の発送日

31.05.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松浦 安紀子

4N

3336

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2009-501007 A (エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー) 2009.01.15, 文献全体、特に請求項 1、3 & US 2007/0009999 A1 & WO 2007/006650 A2 文献全体、特に請求項 1、3 & EP 1904640 A1 & KR 10-2008-0018939 A & CN 101218350 A	1, 7-9
Y	WO 2007/142210 A1 (ダイセル化学工業株式会社) 2007.12.13, 文献 全体、特に第 3 頁 4 行目、[0056]-[0058]、[0072] & US 2009/0203096 A1 [0008]、[0107]-[0109]、[0127] & EP 2034026 A1 & KR 10-2009-0033864 A & CN 101501202 A	1, 2, 4, 7-9
Y	JP 2011-182787 A (富山県) 2011.09.22, 文献全体、特に表 1、請 求項 4、5、【0046】 & US 2013/0005007 A1 表 1、請求項 4、5 [0054] & WO 2011/099595 A1 & EP 2511376 A1 & CN 102762734 A	1-9
Y	JP 2012-5396 A (富山県) 2012.01.12, 文献全体、特に表 1、請求 項 4、5、【0042】 (ファミリーなし)	1-4, 7-9
Y	ROSEN, Thomas C. et al., Biocatalyst vs. Chemical Catalyst for asymmetric reduction, Chimica oggi, 2004, Vol.22, No.5, suppl., p.43-45, 文献全体、特に第 44 頁 "ADHs ARE HIGHLY SELECTIVE" 欄、 第 45 頁 "ADHs ARE AVAILABLE IN DIFFERENT SPECIFIC FORMS" 欄	1-9
Y	BUCCIARELLI, Maria et al., Asymmetric Reduction of Trifluoromethyl and Methyl Ketones by Yeast; An Improved Method, Synthesis, 1983, Vol.11, p.897-899, 文献全体	1, 7-9
Y	林素子 ほか, 不斉合成用生体触媒ライブラリー Chiralscreen®, 化学と生物, 2014, Vol.52, No.10, p.699-702, ISSN 0453-073X, 文 献全体	1, 7-9