

(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  
2010年5月6日(06.05.2010)



PCT



(10) 国際公開番号  
WO 2010/050564 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12P 13/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/068611
- (22) 国際出願日: 2009年10月29日(29.10.2009)
- (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 2008-281662 2008年10月31日(31.10.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島三丁目2-4 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平井 義則 (HIRAI, Yoshinori) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 前原 克治 (MAEHARA, Katsuji) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島3丁目2-4 株式会社カネカ内 Osaka (JP). 諸島忠 (MOROSHIMA, Tadashi) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 金丸 博幸 (KANAMARU, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 岩崎 晃 (IWASAKI, Akira) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).
- (74) 共通の代表者: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION); 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島三丁目2-4 Osaka (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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: PROCESS FOR PRODUCING N-PROTECTED AMINO ACID

(54) 発明の名称: N-保護アミノ酸の製造法

(57) Abstract: An amino acid produced by using a biocatalyst such as a microorganism cell or an enzyme is subjected to the acidification treatment so that a reaction product containing the amino acid has pH 4 or lower, and subsequently the reaction for protecting an amino group in the amino acid is carried out under basic conditions, thereby producing an N-protected form of the amino acid without the need of isolating the amino acid. In this manner, even when an amino acid produced by using a biocatalyst is protected directly (without the need of isolating the amino acid), it becomes possible to produce a high-quality N-protected form of the amino acid quantitatively and with high efficiency by using a protective reagent in an equivalent amount or a slightly excessive amount.

(57) 要約: 本願では、微生物菌体や酵素等の生体触媒を用いて製造されたアミノ酸を単離する事無く、アミノ酸を含む反応物がpH4以下になるように酸性化処理を行い、その後、塩基性条件下にアミノ基の保護反応を行ってN-保護アミノ酸を得る。これにより、生体触媒を用いて製造されたアミノ酸に対して、直接(アミノ酸を単離することなく)保護反応を行う場合であっても、当量~小過剰量の保護試剤の使用で、定量的に効率よく高品質のN-保護アミノ酸を製造することが可能である。



WO 2010/050564 A1

## 明 細 書

**発明の名称**： N－保護アミノ酸の製造法

### 技術分野

[0001] 本発明は、医薬品または農薬の中間体として有用なN－保護アミノ酸の製造法に関する。

### 背景技術

[0002] アミノ酸は天然・非天然を問わず、医薬品や農薬の原料または中間体として汎用的に利用されている非常に有用な化合物である。

[0003] これらアミノ酸を原料または中間体として利用する場合、所望の反応に供する前に、当該反応での副反応を抑えるため、分子内に存在するカルボキシル基または／及びアミノ基に保護基を導入する。

[0004] この保護基導入においては、アミノ基の保護の場合、通常、塩基性条件下で、保護試剤を理論当量～小過剰量用いることにより、速やか、かつ、ほぼ定量的にN－保護アミノ酸を得ることが可能である（非特許文献1、特許文献1）。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0005] 特許文献1：特開2007-131589公報

#### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：日本化学会編 第5版実験科学講座16、221-226頁

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0007] 高い光学純度の光学活性アミノ酸が得られる等の理由から、しばしば、生体触媒を用いてアミノ酸の製造が行われる。生体触媒を用いるアミノ酸の製造は通常水系で行われるが、水系で反応を行った場合、水への溶解性が高いアミノ酸と共存する水溶性の無機塩の分離、アミノ酸と菌体・蛋白成分の分離という煩雑な操作が必要となる等の理由から、その単離精製は非効率で困

難である。また、これらの単離精製で回収できないアミノ酸がコスト面に不利を招くことは言うまでもない。従って、アミノ酸の保護体を得ることを目的とした場合、生産効率や費用等の観点から、反応液をそのまま用いてアミノ基の保護を行うことが望ましい。

[0008] しかし、発明者らの検討によれば、生体触媒を用いて製造されたアミノ酸の場合、従来の方法では、当量～小過剰量の保護試剤を使用するだけでは、定量的にN-保護アミノ酸が製造できない場合があることがわかった。特に、得られたアミノ酸を単離精製することなく、直接そのアミノ基の保護を行う際にこの傾向は強くなり、意外にも、過剰の保護試剤を存在させたとしても、当該保護反応が進行しにくくなることがわかった。これらは商業的な規模での生産において、製造効率の低下、高コスト化を招き、有用なアミノ酸保護体を安価に市場に供給する事を阻害するものと考えられる。

[0009] 本発明は、上記に鑑み、効率よく高品質のN-保護アミノ酸を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

[0010] 本発明者らは、この技術課題について鋭意検討した結果、生体触媒を用いて製造されたアミノ酸から効率よくN-保護アミノ酸を製造する為には、保護反応の前に酸性化処理を経る事が非常に有効であることを見出した。

[0011] すなわち、本発明は、生体触媒を用いて製造されたアミノ酸を単離する事無く、アミノ酸を含む反応物がpH4以下になるように酸性化処理を行い、その後、塩基性条件下にアミノ基の保護反応を行うN-保護アミノ酸の製造法に関する。

### 発明の効果

[0012] 本発明にかかる方法によれば、生体触媒を用いて製造されたアミノ酸に対して、直接（アミノ酸を単離することなく）保護反応を行う場合であっても、当量～小過剰量の保護試剤の使用で、定量的に効率よく高品質のN-保護アミノ酸を製造することが可能である。

### 発明を実施するための形態

[0013] まず、本発明で使用するアミノ酸について説明する。

[0014] 本発明において使用できるアミノ酸としては、特に制約なく、具体的には、グリシン、アラニン、3-クロロアラニン、 $\beta$ -アラニン、バリン、ノルバリン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン、アロイソロイシン、tert-ロイシン、フェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、チロシン、ジヨードチロシン、トレオニン、アロトレオニン、セリン、ホモセリン、イソセリン、プロリン、ヒドロキシプロリン、3,4-デヒドロプロリン、トリプトファン、チロキシン、メチオニン、ホモメチオニン、シスチン、ホモシスチン、 $\alpha$ -アミノ酪酸、 $\beta$ -アミノ酪酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸、アスパラギン酸、アスパラギン酸- $\beta$ -シクロヘキシルエステル、アスパラギン酸- $\beta$ -メチルエステル、アスパラギン酸- $\beta$ -イソプロピルエステル、アスパラギン酸- $\beta$ -ベンジルエステル、グルタミン酸、グルタミン酸- $\gamma$ -シクロヘキシルエステル、グルタミン酸- $\gamma$ -メチルエステル、グルタミン酸- $\gamma$ -イソプロピルエステル、グルタミン酸- $\gamma$ -ベンジルエステル、リジン、ヒドロキシリジン、オルニチン、ヒドロキシオルニチン、アルギニン、ヒスチジン、アンチカプシン、アダマンチルグリシン、タウリン、 $\gamma$ -ホルミル-N-メチルノルバリン、N<sub>g</sub>-トシルアルギニン、O-ベンジルセリン、O-ベンジルトレオニン、N<sup>in</sup>-ホルミルトリプトファン、2-(2-アミノ-4-チアゾリル)-2-ヒドロキシイミノ酢酸、2-(2-アミノ-4-チアゾリル)-2-メトキシイミノ酢酸、2-(2-アミノ-4-チアゾリル)-2-グリオキシ酢酸、2-(2-アミノ-4-チアゾリル)-2-ペンテン酸、3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸、3-アミノ-3-フェニルプロピオン酸、フェニルグリシン、4-ヒドロキシフェニルグリシン、4-クロロフェニルグリシン、4-クロロフェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-(2-ナフチル)アラニン、クレアチン、アゼチジン-2-カルボン酸、オルシルアラニン、エルゴチオネイン、ランチオニン、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジン等を挙げることができ

る。

[0015] グリシンを除くアミノ酸には、光学異性体や立体異性体が存在するが、本発明はその立体を問わずに使用することができ、言うまでもなく、それらの混合物や、ラセミ体であっても良い。

[0016] また、これらアミノ酸のカルボキシル基については他の官能基に変換されていても良く、具体的には、アミド体やエステル体に変換されていても好適に使用することが出来る。

[0017] 本発明で使用する生体触媒を用いたアミノ酸の製造は、たとえば以下の方法で実施することが出来るが、これらに特に限定されるものではない。

1) 対応するケト酸に、アミノ酸脱水素酵素、または該酵素の生産能を有する微生物の培養物を作用させ、D体またはL体選択的にアミノ化する。本反応に使用されるアミノ酸脱水素酵素としては、例えば、ロイシン脱水素酵素、アラニン脱水素酵素、フェニルアラニン脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、バリン脱水素酵素、リシン脱水素酵素、アスパラギン酸脱水素酵素などが挙げられる。

2) 対応するケト酸に、アミノ基転移酵素、または該酵素の生産能を有する微生物の培養物を作用させ、D体またはL体選択的にアミノ化する。

3) DL-アミノ酸アルキルエステルに、エステラーゼまたは該酵素の生産能を有する微生物の培養物を作用させ、D体またはL体を選択的に加水分解する。

4) L-N-アシルアミノ酸にアシラーゼまたは該酵素の生産能を有する微生物の培養物を作用させ、D体またはL体を選択的に加水分解する。

5) DL-アミノ酸アミドにアミダーゼ、または該酵素の生産能を有する微生物の培養物を作用させ、D体またはL体を選択的に加水分解する。

6) 5-置換ヒダントインにヒダントイナーゼ、または該酵素の生産能を有する微生物の培養物あるいはその処理物を作用させ、D体またはL体を選択的に加水分解する。

7)  $\alpha$ -アミノニトリル化合物にニトリラーゼ、または該酵素の生産能を有

する微生物培養物を作用させ、D体またはL体を選択的に加水分解する。

8) DL-アミノ酸に、D体又はL体を選択的に分解する微生物の培養物を作用させ、一方の立体のアミノ酸を分解する。

9) DL-アミノ酸にDまたはL-アミノ酸オキシダーゼ、アミノ酸脱水素酵素、および補酵素再生能を有する酵素、または該酵素の生産能を有する微生物の培養物を作用させて、理論収率100%にてDL-アミノ酸をD体またはL体のアミノ酸へと変換する。

[0018] 尚、本発明で言う「生体触媒」とは、アミノ酸の製造に利用される、上述のアミノ酸脱水素酵素等の酵素や、当該酵素の産生能を有する微生物の培養物またはその処理物を意味する。ここで、「微生物の培養物」とは、菌体を含む培養液或いは培養菌体を意味し、「その処理物」とは、物理的手法、酵素などで破碎して得た菌体の破碎物、破碎物から遠心分離などで不溶成分を除去して得た粗抽出液、凍結乾燥菌体、アセトン乾燥菌体等を意味する。

[0019] 「アミノ酸の製造に利用される酵素」としては、例えば、アミノ酸脱水素酵素、アミノ基転移酵素、エステラーゼ、アシラーゼ、アミダーゼ、ヒダントイナーゼ、ニトリラーゼが挙げられる。

[0020] アミノ酸脱水素酵素としては、例えば、ロイシン脱水素酵素、アラニン脱水素酵素、フェニルアラニン脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、バリン脱水素酵素、リシン脱水素酵素、アスパラギン酸脱水素酵素が挙げられる。

[0021] 具体的には、製造するアミノ酸がバリン、ロイシン、イソロイシン、ノルバリン、ノルロイシンやtert-ロイシンなどの脂肪族アミノ酸の場合、アミノ酸脱水素酵素としては、ロイシン脱水素酵素、バリン脱水素酵素が好適である。製造するアミノ酸がフェニルアラニン、チロシンやホモフェニルアラニン、アダマンチルグリシンなどの芳香族アミノ酸の場合、使用するアミノ酸脱水素酵素としてはフェニルアラニン脱水素酵素が好適である。製造するアミノ酸がグルタミン酸、6-ヒドロキシノルロイシンなどの場合、グルタミン酸脱水素酵素が好適である。製造するアミノ酸が $\alpha$ -アミノ酪酸、 $\alpha$ -アミノ吉草酸、セリン、グリシン、3-クロロアラニン、3-フルオロ

アラニンなどの場合、アラニン脱水素酵素が好適である。

[0022] このうち、ロイシン脱水素酵素としては、当該酵素活性を有するものであれば、いずれも利用できるが、例えば、バシラス属 (*Bacillus*)、サーモアクチノマイセス属 (*Thermoactinomyces*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) 微生物由来の酵素が挙げられ、好ましくは、バシラス・スファエリカス (*Bacillus sphaericus*)、バシラス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バシラス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バシラス・サブチルス (*Bacillus subtilis*)、サーモアクチノマイセス・インターメディス (*Thermoactinomyces intermedius*)、クロストリジウム・サーモセチカム (*Clostridium thermoaceticum*)、さらに好ましくはバシラス・スファエリカス (*Bacillus sphaericus*) NBRC 3341 株由来の酵素が挙げられる。

[0023] フェニルアラニン脱水素酵素としては、当該酵素活性を有するものであれば、いずれも利用できるが、例えば、バシラス属 (*Bacillus*)、スポロサルシナ属 (*Sporosarcina*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、サーモアクチノマイセス属 (*Thermoactinomyces*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、ミクロバクテリウム属 (*Microbacterium*) 微生物由来の酵素が挙げられる。好ましくは、バシラス・バディウス (*Bacillus badius*)、バシラス・スファエリカス (*Bacillus sphaericus*)、スポロサルシナ・ウレアエ (*Sporosarcina ureae*)、ロドコッカス・マリス (*Rhodococcus maris*)、サーモアクチノマイセス・インターメディウス (*Thermoactinomyces intermedius*)、さらに好ましくは、バシラス・バディウス (*Bacillus badius*) IAM 11059 株由来の酵素が挙げられる。

[0024] 他の脱水素酵素等についても、所望の酵素活性を有するものであればいずれも使用することができる。

[0025] なお、上記の各微生物は、特許微生物寄託機関やその他研究機関から入手可能である。例えば、NBRC番号で特定される微生物は、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門、IAM番号で特定される微生物は、

東京大学分子細胞生物学研究所細胞機能情報研究センターより入手可能である。

- [0026] 上記「アミノ酸の製造に利用される酵素の産生能を有する微生物」としては、野生株または変異株のいずれでもあり得る。あるいは、遺伝子操作などの遺伝学的手法により誘導された微生物もあり得る。
- [0027] 遺伝子操作された微生物としては、例えば、上記アミノ酸の製造に利用される酵素をコードするDNAを有するベクターで形質転換された形質転換体が挙げられる。
- [0028] アミノ酸の製造に利用される酵素がアミノ酸脱水素酵素の場合、該酵素とともに、該酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素の産生能を有する微生物が好ましく、例えば、アミノ酸脱水素酵素をコードするDNA、および該酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素をコードするDNAを有するベクターで形質転換された形質転換体が挙げられ、好ましくは、補酵素再生する能力を有する酵素がギ酸脱水素酵素、またはグルコース脱水素酵素である形質転換体が挙げられ、さらに好ましくは、前記ギ酸脱水素酵素がチオバチラス エスピー (Thiobacillus sp.) 由来である上記形質転換体、前記グルコース脱水素酵素がバシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来である上記形質転換体が挙げられる。ベクターを導入する宿主としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞が挙げられ、形質転換の容易さや酵素の発現効率の観点からは細菌が好ましく、大腸菌が特に好ましい。
- [0029] 例えば、アミノ酸の製造に利用される酵素がロイシン脱水素酵素の場合、生体触媒として使用される微生物としては、ロイシン脱水素酵素をコードするDNAを有するベクターで形質転換された形質転換体、好ましくは、ロイシン脱水素酵素をコードするDNAと上記ギ酸脱水素酵素をコードするDNAを有するベクターで形質転換された形質転換体が挙げられ、例えば、ロイシン脱水素酵素として、バシラス・スファエリカス (Bacillus sphaericus) NBRC 3341株由来の酵素を使用したWO 2007/015511号記

載のエシェリヒア コリ (Escherichia coli) HB 101 (pFTLB) が挙げられる。

- [0030] 上記酵素や微生物の培養物を、ケト酸等に作用させる際は、例えば、以下のようにして行うことができる。ただし、以下の方法に限定されるものではない。
- [0031] 水などの適当な溶媒中に、対応するケト酸、ギ酸アンモニウムや硫酸アンモニウムなどのギ酸およびアンモニアを含む無機塩類、NAD<sup>+</sup>などの補酵素、および上記アミノ酸脱水素酵素およびギ酸脱水素酵素の生産能を有する上記微生物の培養液またはその培養液から取得した培養菌体を添加して、pH調整下、攪拌して反応する。
- [0032] この反応は10～70℃、好ましくは20～60℃の温度で行われ、反応液のpHは4～12、好ましくは6～10に維持する。ケト酸は0.1%～60% (w/w)、好ましくは1%～30% (w/w) の仕込み濃度で添加するとよい。また、ケト酸は一括添加してもよいし、分割添加してもよい。
- [0033] 上記のようにして製造されたアミノ酸を含む反応物は、通常、水溶液の形態で得られるが、有機溶剤が共存していてもよく、更には、無機塩が共存していてもよい。また、本発明にかかる方法においては、得られたアミノ酸を単離することなく、アミノ酸を含む溶液やスラリーの形態で保護反応を行えばよいが、直接保護反応に供せずとも、不溶物の濾過等の精製を目的とした操作を経てもかまわない。具体的には、経路可能な操作としては、蛋白質等不溶物の濾過、溶媒留去、活性炭処理、遠心沈降による菌体分離、イオン交換樹脂による無機塩類の除去などが挙げられる。尚、これらの操作は必ずしも酸性化処理の前に行う必要は無く、酸性化処理の後でも好適に実施でき、更に複数の処理を組み合わせることも可能である。
- [0034] 次に酸性化処理について説明する。この処理によれば、N-保護アミノ酸の製造効率を高めることが可能である。
- [0035] 酸性化処理で使用できる酸としては、特に制限は無いが、通常は、例えば、塩酸、硫酸、硝酸等の鉱酸や、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸等の

有機酸を使用する。これらの酸は、単独で使用しても混合して使用しても良い。

[0036] 酸の添加形態については特に問わず、酸のみを添加しても、酸を水及び／または有機溶剤で希釈して用いてもよい。酸を有機溶剤で希釈して用いる場合、該有機溶剤は、酸と反応しないものであれば、特に制限はない。具体的には、メタノール、エタノール、2-プロパノール、トルエン等が使用可能な有機溶剤として挙げられる。

[0037] なお、これらの酸は、局部的に強酸性にならないように、攪拌等に注意して混合するのが好ましい。

[0038] 本発明では、これら酸の添加により、溶液pHを4以下、好ましくは3以下、さらに好ましくは2以下に調整する。これにより、理論当量～小過剰量の保護試剤の使用においても、N-保護アミノ酸を効率よく得ることが可能になる。

[0039] 溶液のpHを保持する時間は、好ましくは5分以上、更に好ましくは30分以上である。言うまでもなく、長時間の保持は製造効率を損なうことから、最適な保持時間を容易な実験によって設定すればよい。

[0040] 一連の操作温度は特に規定されないが、簡便な操作性を得るために、通常は0～50℃の範囲内に設定する。

[0041] このような酸性化処理を経たアミノ酸は、理論当量～小過剰量の保護試剤を用いることで、速やか、かつ、ほぼ定量的にアミノ基の保護を行うことが出来る。

[0042] アミノ基の保護に用いる保護試剤としては、特に制限はなく、公知のものが使用でき、例えばN-アルコキシカルボニル化剤、N-カルバモイル化剤、N-アシル化剤を用いることができる。より具体的には、ハロギ酸アルキル、二炭酸ジアルキル、アルキルイソシアネート、無水カルボン酸、アルキルカルボニルハライドが好適に使用され、中でも汎用性の観点からはクロロギ酸メチル、クロロギ酸エチル、クロロギ酸ベンジル、二炭酸ジメチル、二炭酸ジエチル、二炭酸ジ-tert-ブチル、tert-ブチルイソシアネ

ート、イソプロピルイソシアネート、フェニルイソシアネート、塩化ベンゾイル、塩化アセチル、無水酢酸が特に好適に使用される。

[0043] 保護反応条件は公知の条件が適用できる。最適な条件は、アミノ酸と用いる保護試剤の組み合わせによって異なる為、一概には規定できないが、通常は、塩基性条件下に行い、反応pHについては8~14、好ましくは9~14であり、反応温度については、-5~90℃、好ましくは0~50℃である。

[0044] また、保護試剤は、通常0.95当量以上1.20当量以下になるようにし、好ましくは0.98当量以上1.10当量以下、更に好ましくは0.99当量以上1.05当量以下である。

[0045] 以上のようにして、生体触媒を用いて製造されたアミノ酸から効率よくN-保護アミノ酸を製造することが可能である。

[0046] なお、このような保護反応によって製造されたN-保護アミノ酸は、その後、晶析、分別蒸留、カラムクロマトグラフィー等の一般的な方法によって精製・単離することが出来る。

## 実施例

[0047] 以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない

。

[0048] (参考例1) ロイシン脱水素酵素活性を有する微生物の培養菌体を用いたL-tert-ロイシンの製造

バクト・トリプトン1.6% (w/v)、バクト・イーストエキス1.0% (w/v)、NaCl 0.5% (w/v)の組成からなる2xYT培地 (pH7) 50mlを500ml容坂口フラスコに分注し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。

[0049] WO2007/015511号に記載の方法に従って得たロイシン脱水素酵素およびギ酸脱水素酵素活性を有する形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) HB101 (pFTLB)を植菌後、37℃で30時間、振

とうして好氣的に培養し、ロイシン脱水素酵素およびギ酸脱水素酵素活性を有する微生物の培養液を得た。培養液から遠心分離により菌体を集菌し、培養液上清にて菌体濃度が培養液の20倍になるように懸濁した。1L容のセパラブルフラスコに、3,3-ジメチルー2-オキソブタン酸(DMOB)40gを入れ、30重量%水酸化ナトリウム水溶液にてpHを7.3に調整後、ギ酸アンモニウム19.4g、硫酸アンモニウム8.2g、硫酸亜鉛・7水和物40mg、NAD61mg、イオン交換水256gおよびギ酸脱水素酵素活性3200u分の上記菌体懸濁液を添加し、攪拌条件下、55重量%硫酸にてpHを7.3にコントロールしながら33℃にて、19時間反応を行った。生成したL-tert-ロイシンの光学純度、含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析した結果、光学純度100%e.e.のL-tert-ロイシン38.8gを含有する菌体反応液が得られた。更に、得られた菌体反応液の一部から、遠心分離により菌体を除去し、L-tert-ロイシンを含む水溶液を得た。参考までに、蛋白含量は0.0~1.1mg/Lであった。

[0050] HPLC分析は、カラムとして、SUMICHIRAL OA-5000(4.6mm×150mm、住化分析センター社製)を用い、移動層としては、2mM硫酸銅水溶液とメタノールを容量比で95:5に混合した溶液を用い、流速は1.0mL/minとし、カラム温度は40℃とし、検出は210nmにて分析を行った。

[0051] (実施例1)

参考例に従って得られたL-tert-ロイシン2.48g(18.4mmol)を含む菌体反応液を、濃塩酸でpH4.0に調整した。2時間攪拌した後、30重量%水酸化ナトリウム水溶液によりpH7.0とし、遠心沈降により菌体成分を分離した。

[0052] 次に、得られた上澄み液を、30重量%水酸化ナトリウム水溶液でpH10.6に調整した。その後、40℃以下を維持しつつ減圧濃縮し、溶液量を30.1gに調整した。

[0053] この溶液に対して、氷冷攪拌下、クロロギ酸メチル1.78g(18.8mmol、1.02当量)をゆっくりと加えた。この時、クロロギ酸メチルを添加するに従いpHが低下したが、30重量%水酸化ナトリウム水溶液を並行して添加することにより、溶液のpHは9.5~10.5に維持した。クロロギ酸メチルの添加終了後、1時間攪拌した後、HPLC分析をした結果、変換率は98%であった。

[0054] なお、変換率は、以下の計算式を用いて計算した。

変換率(%) = (生成したN-保護-アミノ酸のピーク面積値) / (アミノ酸のピーク面積値 + 生成したN-保護-アミノ酸のピーク面積値) × 100

[0055] HPLC分析は、カラムとして、CAPCELLPAKSCX(250mm X 4.6mm i.d.)を用い、移動相としては、リン酸緩衝液(pH=3.3)とアセトニトリルを容量比で95:5に混合した溶液を用い、流速は1.0mL/minとし、カラム温度は、35°Cとし、検出器として、示差屈折率計を用いて、分析を行った。

[0056] 以下の実施例においても同様の計算を行った。

[0057] (実施例2)

参考例に従って得られたL-tert-ロイシン3.01g(23.0mmol)を含む水溶液を、濃塩酸でpH2.0に調整した後、2時間保持した。次に、30重量%水酸化ナトリウム水溶液でpH10.6に調整した後、40°C以下を維持しつつ減圧濃縮し、溶液量を29.7gに調整した。

[0058] この溶液に対して、氷冷攪拌下、クロロギ酸メチル2.19g(23.1mmol、1.01当量)をゆっくりと加えた。この時、クロロギ酸メチルを添加するに従いpHが低下したが、30重量%水酸化ナトリウム水溶液を並行して添加することにより、溶液のpHは9.8~12.9に維持した。クロロギ酸メチルの添加終了後、2時間攪拌した後、HPLC分析をした結果、変換率は99%であった。

[0059] (実施例3)

参考例に従って得られたL-tert-ロイシン1.96g(14.9m

mol)を含む菌体反応液を、濃塩酸でpH4.0に調整した。1時間攪拌した後、遠心沈降により菌体成分を分離した。

[0060] 次に、得られた上澄み液を、30重量%水酸化ナトリウム水溶液でpH10.6に調整した。その後、40°C以下を維持しつつ減圧濃縮し、溶液量を20.1gに調整した。

[0061] この溶液に対して、氷冷攪拌下、クロロギ酸エチル1.63g(15.0mmol、1.01当量)をゆっくりと加えた。この時、クロロギ酸エチルを添加するに従いpHが低下したが、30重量%水酸化ナトリウム水溶液を並行して添加することにより、溶液のpHは8.9~12.8に維持した。クロロギ酸エチルの添加終了後、2時間攪拌した後、HPLC分析をした結果、変換率は96%であった。

[0062] (実施例4)

参考例に従って得られたL-tert-ロイシン2.05g(15.6mmol)を含む水溶液を、濃硫酸でpH2.0に調整した後、30分保持した。次に、30重量%水酸化ナトリウム水溶液でpH10.7に調整した後、40°C以下を維持しつつ減圧濃縮し、溶液量を19.8gに調整した。

[0063] この溶液に対して、攪拌下、25°C以下を維持しつつ、クロロギ酸ベンジル2.70g(15.8mmol、1.00当量)をゆっくりと加えた。この時、クロロギ酸ベンジルを添加するに従いpHが低下したが、30重量%水酸化ナトリウム水溶液を並行して添加することにより、溶液のpHは9.9~12.5に維持した。クロロギ酸ベンジルの添加終了後、2時間攪拌した後、HPLC分析をした結果、変換率は97%であった。

[0064] (実施例5)

参考例に従って得られたL-tert-ロイシン2.03g(15.5mmol)を含む水溶液を、濃硫酸でpH2.0に調整した後、30分保持した。次に、30重量%水酸化ナトリウム水溶液でpH10.7に調整した後、40°C以下を維持しつつ減圧濃縮し、溶液量を19.6gに調整した。

[0065] この溶液に対して、攪拌下、室温で、二炭酸ジ-tert-ブチル3.4

1 g (15.6 mmol、1.00当量) をゆっくりと加えた。この時、ジ-tert-ブチルジカルボネートを添加するに従いpHが低下したが、30重量%水酸化ナトリウム水溶液を並行して添加することにより、溶液のpHは9.5~10.5に維持した。二炭酸ジ-tert-ブチルの添加終了後、2.5時間攪拌した後、HPLC分析をした結果、変換率は99%であった。

[0066] (比較例1)

参考例に従って得られたL-tert-ロイシン3.01 g (23.0 mmol) を含む水溶液を、30重量%水酸化ナトリウム水溶液でpH10.6に調整した後、40°C以下を維持しつつ減圧濃縮し、溶液量を30.3 gに調整した。

[0067] この溶液に対して、氷冷攪拌下、クロロギ酸メチル2.20 g (23.3 mmol、1.01当量) をゆっくりと加えた。この時、クロロギ酸メチルを添加するに従いpHが低下したが、30重量%水酸化ナトリウム水溶液を並行して添加することにより、溶液のpHは10.0~13.0に維持した。クロロギ酸メチルの添加終了後、2時間攪拌した後、HPLC分析をした結果、変換率は86%であった。

[0068] (比較例2)

参考例に従って得られたL-tert-ロイシン3.01 g (23.0 mmol) を含む水溶液を、30重量%水酸化ナトリウム水溶液でpH10.6に調整した後、40°C以下を維持しつつ減圧濃縮し、溶液量を30.3 gに調整した。

[0069] この溶液に対して、氷冷攪拌下、クロロギ酸メチル2.20 g (23.3 mmol、1.01当量) をゆっくりと加えた。この時、クロロギ酸メチルを添加するに従いpHが低下したが、30重量%水酸化ナトリウム水溶液を並行して添加することにより、溶液のpHは10.0~13.0に維持した。クロロギ酸メチルの添加終了後、2時間攪拌した後、HPLC分析をした結果、変換率は86%であった。

[0070] この反応液のpHを、30重量%水酸化ナトリウム水溶液を並行添加して

pH 10.0~13.0に維持しつつ、クロロギ酸メチル0.59 gを更に追加した（総使用量2.79 g、計29.5 mmol、1.28当量）。添加終了後、2時間攪拌し、HPLC分析した結果、変換率は90%であった。

[0071] さらに同様に、クロロギ酸メチル1.28 gを追加した（総使用量4.07 g、計43.1 mmol、1.87当量）。添加終了後、2時間攪拌した後、HPLC分析した結果、変換率は94%であった。

[0072] この結果から、酸性化処理を行わない場合、過剰の保護試剤を存在させたとしても、保護反応が十分進行しないことがわかる。

[0073] （比較例3）

参考例に従って得られたL-tert-ロイシン2.05 g（15.6 mmol）を含む水溶液を、濃硫酸でpH 5.1に調整した後、30分保持した。次に、30重量%水酸化ナトリウム水溶液でpH 10.6に調整した後、40°C以下に維持しつつ減圧濃縮し、溶液量を19.5 gに調整した。

[0074] この溶液に対して、氷冷攪拌下、クロロギ酸メチル1.49 g（15.8 mmol、1.01当量）をゆっくりと加えた。この時、クロロギ酸メチルを添加するに従いpHが低下したが、30重量%水酸化ナトリウム水溶液を並行して添加することにより、溶液のpHは9.9~11.4に維持した。クロロギ酸メチルの添加終了後、2時間攪拌した後、HPLC分析をした結果、変換率は89%であった。

[0075] （比較例4）

参考例に従って得られたL-tert-ロイシン1.52 g（11.6 mmol）を含む水溶液を、30重量%水酸化ナトリウム水溶液でpH 10.6に調整した後、40°C以下に維持しつつ減圧濃縮し、溶液量を15.7 gに調整した。

[0076] この溶液に対して、攪拌下、室温で、二炭酸ジ-tert-ブチル2.63 g（12.1 mmol、1.04当量）をゆっくりと加えた。この時、二炭酸ジ-tert-ブチルを添加するに従いpHが低下したが、30重量%

水酸化ナトリウム水溶液を並行して添加することにより、溶液のpHは9.6～10.5に維持した。二炭酸ジ-tert-ブチルの添加終了後、2.5時間攪拌した後、HPLC分析をした結果、変換率は92%であった。

## 請求の範囲

- [請求項1] 生体触媒を用いて製造されたアミノ酸を単離すること無く、アミノ酸を含む反応物がpH4以下になるように酸性化処理を行い、その後、塩基性条件下にアミノ基の保護反応を行うことを特徴とする、N-保護アミノ酸の製造法。
- [請求項2] アミノ酸が、tert-ロイシンであることを特徴とする、請求項1記載のN-保護アミノ酸の製造法。
- [請求項3] アミノ基の保護に用いる保護試剤が、N-アルコキシカルボニル化剤、N-カルバモイル化剤、またはN-アシル化剤であることを特徴とする、請求項1または2記載のN-保護アミノ酸の製造法。
- [請求項4] アミノ基の保護に用いる保護試剤が、クロロギ酸メチル、クロロギ酸エチル、クロロギ酸ベンジル、二炭酸ジ-tert-ブチルのいずれかであることを特徴とする請求項3記載のN-保護アミノ酸の製造法。
- [請求項5] 生体触媒が、アミノ酸脱水素酵素、アミノ基転移酵素、エステラーゼ、アシラーゼ、アミダーゼ、ヒダントイナーゼ、ニトリラーゼ、または該酵素の生産能を有する微生物の培養物である請求項1～4のいずれかに記載のN-保護アミノ酸の製造法。
- [請求項6] 生体触媒が、アミノ酸脱水素酵素、または該酵素の生産能を有する微生物の培養物である請求項5記載のN-保護アミノ酸の製造法。
- [請求項7] アミノ酸脱水素酵素が、ロイシン脱水素酵素、アラニン脱水素酵素、フェニルアラニン脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、バリン脱水素酵素、リシン脱水素酵素、またはアスパラギン酸脱水素酵素であることを特徴とする請求項6記載のN-保護アミノ酸の製造法。
- [請求項8] アミノ酸脱水素酵素がバシラス・スファエリカス (Bacillus sphaericus) 由来である事を特徴とする請求項7記載のN-保護アミノ酸の製造法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/068611

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P13/06 (2006.01) i

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)

C12P13/06

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 | 1996-2009 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2009 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2009 |

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages             | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y         | JP 2004-175703 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.),<br>24 June 2004 (24.06.2004),<br>(Family: none) | 1-8                   |
| Y         | JP 2007-131589 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.),<br>31 May 2007 (31.05.2007),<br>(Family: none)  | 1-8                   |
| Y         | WO 2007/015511 A1 (Kaneka Corp.),<br>08 February 2007 (08.02.2007),<br>& EP 1918375 A1         | 1-8                   |
| Y         | JP 40-6204 B1 (Ajinomoto Co., Inc.),<br>27 March 1965 (27.03.1965),<br>(Family: none)          | 1-8                   |

 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 November, 2009 (16.11.09)Date of mailing of the international search report  
01 December, 2009 (01.12.09)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/068611

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y         | US 3205261 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.),<br>07 September 1965 (07.09.1965),<br>& GB 973828 A & DE 1211118 B<br>& FR 1307136 A & CH 415665 A<br>& NL 272094 A & NL 122837 C<br>& BR 6243453 D & AT 250882 B | 1-8                   |
| Y         | US 3147302 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.),<br>01 September 1964 (01.09.1964),<br>& GB 937058 A & DE 1417592 A<br>& NL 121837 C & NL 268327 A   | 1-8                   |
| Y         | Edited by Koichi YAMADA, Amino-san Hakko (Ue)<br>Sorou, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., 20 February<br>1972 (20.02.1972), page 342  | 1-8                   |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P13/06(2006.01)i

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. C12P13/06

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 | 1971-2009年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2009年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2009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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), PubMed, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|--|----------------|
| Y               | JP 2004-175703 A (三菱レイヨン株式会社) 2004. 06. 24,<br>(ファミリーなし)     | 1-8            |
| Y               | JP 2007-131589 A (三菱レイヨン株式会社) 2007. 05. 31,<br>(ファミリーなし)     | 1-8            |
| Y               | WO 2007/015511 A1 (株式会社カネカ) 2007. 02. 08,<br>& EP 1918375 A1 | 1-8            |

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、一般的な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

16. 11. 2009

国際調査報告の発送日

01. 12. 2009

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)

三原 健治

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N

3644

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                |
|-----------------------|--|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| Y                     | JP 40-6204 B1 (味の素株式会社) 1965. 03. 27,<br>(ファミリーなし)   | 1 - 8          |
| Y                     | US 3205261 A (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.) 1965. 09. 07, & GB 973828<br>A & DE 1211118 B & FR 1307136 A & CH 415665 A & NL 272094 A &<br>NL 122837 C & BR 6243453 D & AT 250882 B | 1 - 8          |
| Y                     | US 3147302 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) 1964. 09. 01, & GB 937058<br>A & DE 1417592 A & NL 121837 C & NL 268327 A   | 1 - 8          |
| Y                     | 山田浩一編, アミノ酸発酵 (上) 総論, 共立出版株式会社,<br>1972. 02. 20, p. 342  | 1 - 8          |