

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3614366号

(P3614366)

(45) 発行日 平成17年1月26日(2005.1.26)

(24) 登録日 平成16年11月12日(2004.11.12)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 P 7/62

C 1 2 P 7/62

C 0 7 B 53/00

C 0 7 B 53/00

G

C 0 7 C 51/285

C 0 7 C 51/285

C 0 7 C 67/08

C 0 7 C 67/08

C 0 7 C 69/003

C 0 7 C 69/003

B

請求項の数 13 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-561346 (P2000-561346)
 (86) (22) 出願日 平成11年7月23日(1999.7.23)
 (65) 公表番号 特表2002-521394 (P2002-521394A)
 (43) 公表日 平成14年7月16日(2002.7.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR1999/000396
 (87) 国際公開番号 W02000/005400
 (87) 国際公開日 平成12年2月3日(2000.2.3)
 審査請求日 平成13年1月23日(2001.1.23)
 (31) 優先権主張番号 1998/29912
 (32) 優先日 平成10年7月24日(1998.7.24)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 500473427
 サムスン ファイン ケミカルズ カンパ
 ニー リミテッド
 大韓民国 ケオンサンナムードウ 680
 -090 ウルサン ナムーク イェオチ
 ェオンードン 190
 (74) 代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100065189
 弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学的に純粋な (S) - 3, 4 - ジヒドロキシ酪酸誘導体の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、多糖類から次の式(1)で表される光学的に純粋な(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルを製造する方法。

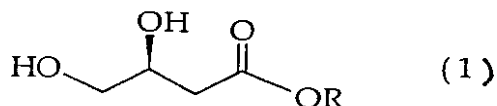
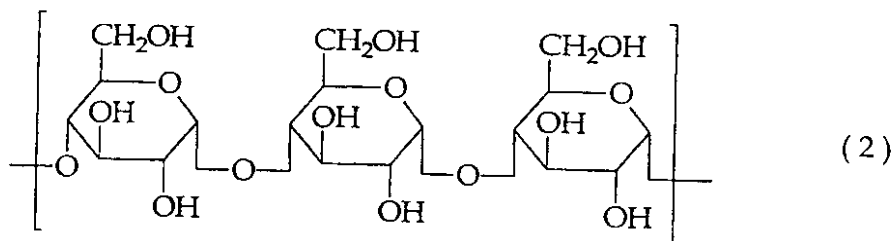
(i) アミロペクチンと - アミラーゼとを反応させて分解生成物を製造する工程；

(ii) 前記 - アミラーゼを不活性化する工程；

(iii) 前記分解生成物とプルラーゼを反応させて式(2)で表される - (1,4)結合したオリゴサッカライドを製造する工程；及び

(iv) 前記オリゴサッカライドを塩基の存在下で酸化剤により酸化させた後に、酸触媒の存在下で式：ROHのアルコールによるエステル化を行う工程。

【化1】



式中、RはC₁₋₅の線状又は分岐のアルキル基を示す。

【請求項2】

前記オリゴサッカリドが、3-50のグルコース単位を有することを特徴とする請求項1記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項3】

前記酸化が、30-65 の条件下で行われることを特徴とする請求項1記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項4】

前記酸化に使用される塩基が、アルカリ金属水酸化物及びアルカリ土類金属水酸化物の中から選ばれたことを特徴とする請求項1記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項5】

前記塩基が水酸化ナトリウムであることを特徴とする請求項4記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項6】

前記塩基が、アミロペクチンのグルコース単位1モルに対して2-4当量の範囲で使用されることを特徴とする請求項1 或いは4 記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項7】

前記酸化に使用される酸化剤が、過酸化水素、過酸化アルカリ金属、過酸化アルカリ土類金属及びアルキルヒドロペルオキシドの中から選ばれたことを特徴とする請求項1 記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項8】

前記酸化剤が過酸化水素であることを特徴とする請求項7 記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項9】

前記酸化剤がt-ブチルヒドロペルオキシドであることを特徴とする請求項7 記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項10】

前記酸化剤が、アミロペクチンのグルコース単位1モルに対して1-3当量の範囲で使用されることを特徴とする請求項1 或いは7 記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項11】

前記エステル化が、30-80 の条件下で行われることを特徴とする請求項1 記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項12】

前記エステル化に使用される酸触媒が、塩酸、硫酸、リン酸及び硝酸の中から選ばれた無

10

20

30

40

50

機酸であることを特徴とする請求項 1 記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【請求項 1 3】

前記エステル化に使用される酸触媒が、フルオロアルキルスルホン酸、アラルキルスルホン酸、アラルキルスルホン酸の水和物及びトリフルオロ酢酸の中から選ばれた有機酸であることを特徴とする請求項 1 記載の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

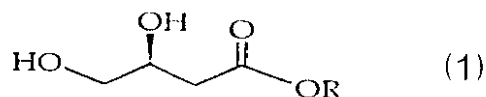
本発明は、以下の工程を含む、次の化学式 1 で表される光学的に純粋な(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体の製造方法に関するもので、より詳細には次の方法により光学的に純粋な(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体を経済的に大量生産が可能である製造方法に関するものである。

(a) 天然物から容易に得られるアミロペクチンを特定の条件下で酵素と反応させて目的化合物の製造に適合する糖の分布を有する、(1,4)結合したオリゴサッカリドを製造する工程、及び

(b) これを連続的に特定の条件下で酸化及びエステル化する工程。

【0002】

【化 2】



式中、Rは C₁ - 5 の線状又は分岐のアルキル基を示す。

【0003】

【従来の技術】

(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体及び(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラク トンは、多様なキラル化合物を製造するために中間体の合成用原料として使用されている。上記の化合物は例えば、神経調節剤としての(R)-GABOB [Tetrahedron, 46, 4277 (1990)]、高脂血症薬剤(Atorvastatin; HMG-CoA レダクターゼ阻害剤) [Tetrahedron Lett., 33, 2279 (1992)]、抗AIDS薬剤(Agenerase; HIV protease inhibitor)の核心中間体である(S)-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン[J. Am. Chem. Soc., 117, 1181 (1995); 国際特許公開 WO94/05, 639号]、脳代謝改善剤としての(S)-オキシラセタム [International patent publication WO93/06, 826]、健康補助剤としての1-カルニチン[国際特許公開 WO99/05, 09 2号]、(S)-mono-ベータラクタム[日本特許公開昭64-13, 069号(1989)]、(S)-3-ヒドロキシ-4-プロモ酪酸のエステル[日本特許公開平4-149, 151号(1992); 日本特許公開平6-172, 256号(1994)]、飽満剤の潜在的な中間体原料[Bull. Chem. Soc. Jpn., 61, 2025 (1988)]、神経弛緩剤の中間体原料[USP 4, 138, 484]、天然物を合成するために有用な中間体[J. Org. Chem., 50, 1144 (1985); Can. J. Chem., 65, 195 (1987), Tetrahedron Lett., 507 (1992)]等の製造に重要な中間体として機能することが良く知られている。

このように、(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体及び(S)-3-ヒドロキシ-

10

20

30

40

50

- ブチロラク톤は、各種のキラル化合物を製造する時に広く使用されている重要な化合物であるので、多くの研究がなされて来た。これらの化合物の製造に最も重要なことは、光学純度である。

【0004】

これらのキラル化合物を製造する時に中間体として有用な(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体及び(S)-3-ヒドロキシ-ブチロラク톤の製造に関連する従来の技術を説明すれば次のようである。

- ケトエステルを酵素或いは触媒を利用した還元反応により(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸の誘導体を得る方法が報告されている [J . A m . C h e m . S o c . , 1 0 5 , 5 9 2 5 - 5 9 2 6 (1 9 8 3) ; T e t e r a h e d r o n L e t t . , 3 1 , 2 6 7 - 2 7 0 (1 9 9 0) ; ヨロッパ公開特許第452,143A2号]。上記の方法によると、プロキラル中心炭素を一方向に還元してキラル中心を形成しなければならない難しさがあり、高価な金属触媒を使用しなければならない短所もある。

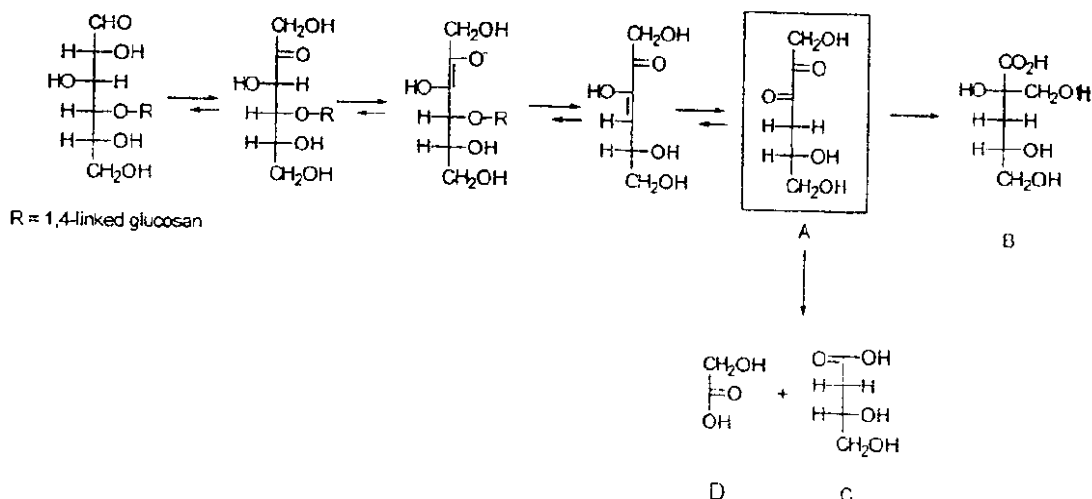
また、(1)-リンゴ酸をエステル化させた後に、選択的な還元反応により(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステル及び(S)-3-ヒドロキシ-ブチロラク톤を合成する方法が報告されている [C h e m . L e t t . , 1 3 8 9 - 1 3 9 2 (1 9 8 4) ; U S P 5 , 8 0 8 , 1 0 7]。この技術も2つのエステル官能基の中で1つの官能基だけを還元させる難しさがある。

他の方法としては、炭水化物から化学的な方法により(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体及び(S)-3-ヒドロキシ-ブチロラク톤を合成する多くの方法が報告されている。

【0005】

反応式 1

【化3】



既存に報告された文献によると、C-4の位置にグルコース置換基を持つ炭水化物、例えば4-O-メチル-(d)-グルコース、麦芽糖、アミロース及びセルロースを塩基の存在下で反応させ、C-4の位置に存在するグルコース置換基を離脱基として除去して上記の反応式1に示すジカルボニル化合物(A)(4-デオキシ-2,3-ヘキソジウロース)を生成させ、これを塩基と反応させてイソサカリン酸(B)、或いは(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸(C)を製造する技術が報告されている [J . C h e m . S o c . , 1 9 2 4 - 1 9 3 1 (1 9 6 0)]。しかし、(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸(C)の収率は低い。

また、上記したようなグルコース置換基を持つ炭水化物を塩基の存在下で反応させてジカルボニル化合物(A; 4-deoxy-2,3-hexdiulose)を生成し、ジカ

ルポニル化合物を分離して過酸化水素と反応させて(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸(C)とグリコール酸(D)を主生成物として得ている[J. Chem. Soc., 1932-1938(1960)]。この方法によると、反応混合物からジカルポニル化合物(A)を分離する時に互変(tautomerization)によりジカルポニル化合物(A)の異性体(isomer)が存在し、又は環式化合物の水和物の生成により多量のジカルポニル化合物(A)を分離することができない問題がある。さらに、生成された(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸が過度の酸化によりギ酸及びグリコール酸に分解されるという問題もある。

【0006】

上記と類似な技術としては、炭水化物から塩基単独、又は塩基の存在下で酸素を利用して(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸を合成している。上記の反応式1に示したように、ジカルポニル化合物(A)を中間体として約30%の低い収率である(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸が生成されたと報告している[J. Res. Natl. Bur. Stand., 32, 45(1944); J. Am. Chem. Soc., 2245-2247(1953); J. Am. Chem. Soc., 1431-1435(1955); Carbohydr. Res., 11, 17-25(1969); J. Chromatography, 549, 113-125(1991)]。この方法によると、グリコール酸(D)、イソサカリン酸(B)、ギ酸、ケトン、ジケトン、グリセリン酸等のように各種の酸混合物が主に生成され、(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸も生成される。しかし、上記の方法による(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸の収率が極めて低いので、産業的な技術価値はないと判断される。(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸を製造する他の方法としては、二糖(乳糖)から塩基と酸化剤を使用して製造された(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸を(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンで環化させ、これを再び開環反応によりメチル(S)-3,4-O-イソプロピリデン-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルに分離したと報告している[International patent publication WO98/04543]。この方法により反応混合物の中で存在する(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンを生成することにおいて、開環反応の後に2つのヒドロキシ官能基により保護されたアセトニドエステルに転換させ、これを酸触媒の存在下で環化させて(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンを得る追加的な精製工程を経る。

【0007】

一方、C-4の位置にグルコース置換基を持つ炭水化物を塩基の存在下で酸化剤による酸化させる工程が含まれる(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸及びその誘導体の製造方法が報告されている[米国特許第5,292,939、第5,319,110及び第5,374,773(1994)]。しかし、中間体であるジカルポニル化合物(A)を形成した後に、(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸(C)とグリコール酸(D)を合成したと報告しているが、キラル化合物の中で最も重要な物性である光学純度に対して何の言及もしていない。その上、反応メカニズムの面において、出発物質として麦芽糖、或いは乳糖のように二糖を使用する時に、二糖の中で1つのグルコースだけが(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸及びその塩を生成させ、他の1つのグルコースは離脱基として作用するので、目的化合物と離脱基が1:1の比率で混合されている。この反応混合物から(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸と(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンとを分離・精製することは極めて難しい。上記した方法によると、使用した原料重量に対して生成される(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンの理論的な最大収率が28.3重量%であり、相対的な収率が低い限界点がある。詳しく述べると、100gの二糖(麦芽糖或いは乳糖)から生成される(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンの理論的な最大収率が28.3gである。しかし、マルトデキストリン、澱粉及びセルロースのような多糖の場合には、グルコースの連結単位として(1,4)結合及び/或いは(1,6)結合が網のように連結されており、(1,4)結合からなる糖還元基(reducing ends)から段階的な(step-by-step)酸化が進行しているが、(1,6

結合からなる部分で酸化が終結されて所望量の目的化合物を製造することができない問題がある。また、上記した多糖の高分子においては、塩基の存在下で酸化剤（過酸化水素）を使用して酸化を進行させれば糖還元基の過度酸化によりギ酸、シュウ酸、グリコール酸、エリトロン酸等のような酸混合物に分解されたと報告している [*J. Am. Chem. Soc.*, 81, 3136 (1959); *Starch* 41 Nr. 8, S. 303-309 (1989); *Synthesis*, 597-613 (1997)]。

【0008】

一方、多糖の反応収率を高めるために、高分子のグルコースを酸、或いは塩基を利用した加水分解により相対的な低分子のグルコースに分解させたと報告している [*Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd ed. 492-507]。この方法の反応性はある程度増大するが、(1,4)結合と(1,6)結合との選択的な加水分解が起こらないので、不規則的に分解される多糖の生成により(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸及びその誘導体を高い収率で製造することは根本的に難しい問題がある。

一般的に、(1,4)結合の多糖を使用して(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトンを製造する場合には、糖還元末端から非還元末端に向かって段階的な酸化が、最後の糖鎖単位（離脱基）が残存するまで連続的に進み、(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸が生成される。即ち、(1,4)結合の多糖を使用して(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトンを合成する場合には、使用した原料重量に対して理論的な最大収率が63重量%であるので、二糖の使用に比べて約2倍ほど高い。詳しく述べると、(1,4)結合である100gの多糖から生成される(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトンの理論的な最大量は63gである。また、二糖の使用に比べて離脱基の残存率が小さいので、目的化合物を容易に精製することができる長所がある。従って、原料物質として(1,4)結合の多糖を使用することが二糖より生産性が高い。しかし、一般的な多糖を使用する場合には、段階的な酸化により目的化合物と副産物（ギ酸、シュウ酸、グリコール酸、エリトロン酸等のような酸類）が競争的に生成されるので、(1,4)結合した適切な分布範囲のグルコースに分解する技術が追加的に要求される。

【0009】

一方、高分子のグルコースを低分子のグルコースに転換させて産業的に有用な物質として製造するために、生物学的酵素処理を報告する文献が多い。

上記の文献による技術の例としては、澱粉を酵素処理してグルコース或いは麦芽糖を製造する技術とアルコールを発酵原料として使用する技術 [米国特第3,791,865号(1974); 米国特許第3,922,200号(1975); 米国特許第4,855,232号(1989); 日本特許公開平4-158,795号(1992); *Methods Carbohydr. Chem.*, 10, 231-239(1994); *Methods Carbohydr. Chem.*, 10, 245-248(1994)]、適切なグルコース当量(DE)を有するマルトデキストリンを製造する技術 [米国特許第3,986,890号(1976); 米国特許第4,447,532号(1984); 米国特許第4,612,284号(1986); 米国特許第5,506,353号(1996)] 等が挙げられる。これらの文献では、高分子多糖を分解及び転換させて、医薬品、食品添加剤、診断試薬の原料物質を得ている。

しかし、光学的に純粋な(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトンを製造することにおいて、本発明により多糖の生物学的酵素処理により(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトンの製造に適合する、(1,4)結合を有するオリゴサッカリドを製造しようとする例は未だにない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

このような研究の一環として、本発明者らは、商業的に獲得が容易なアミロペクチンを使用して光学的に純粋な(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体を経済的に製造すること

10

20

30

40

50

ができる方法を開発しようと努力して来た。その結果、アミロペクチンを特定の条件下で順次的に酵素反応させて - (1 , 4) 結合したオリゴサッカリドを製造して酸化させることにより、上記のオリゴサッカリドの構造的の特異性により酸化により生じる副産物の生成を抑制し、またオリゴサッカリドに対する別の分離・精製工程を経ないで1つの反応器内で連続的に酸化を行うことを見出して本発明を完成した。

従って、本発明は、中間生成物に対する別の精製工程なく、経済的に進歩された技術により高い収率で簡便に光学的に純粋な (S) - 3 , 4 - ジヒドロキシ酪酸誘導体を大量生産する方法を提供することにその目的がある。

【 0 0 1 1 】

【 発明の構成及び作用 】

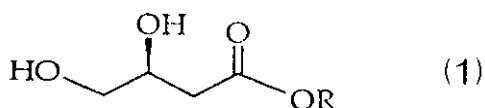
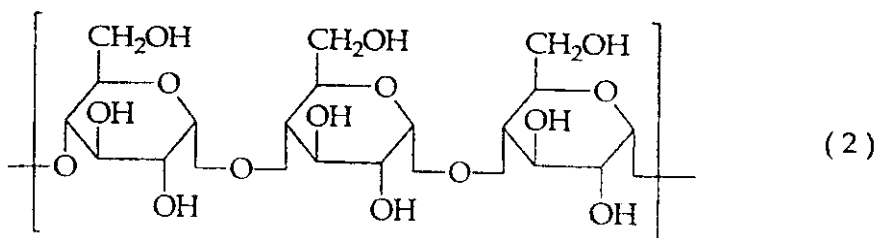
本発明は、以下の工程を含む。

(a) アミロペクチンを酵素反応させて次の化学式 2 で表される - (1 , 4) 結合したオリゴサッカリドを製造する工程、及び

(b) 上記のオリゴサッカリドを塩基の存在下で酸化剤により酸化させた後に、酸触媒の存在下でアルコールによるエステル化を行って次の化学式 1 で表される (S) - 3 , 4 - ジヒドロキシ酪酸誘導体を製造する工程。

【 0 0 1 2 】

【 化 4 】



式中、RはC₁ - 5 の線状又は分岐のアルキル基を示す。

【 0 0 1 3 】

このような本発明をさらに詳細に説明すれば次のとおりである。

本発明は、アミロペクチンを原料物質として (S) - 3 , 4 - ジヒドロキシ酪酸誘導体を製造する方法において、より効率的に酸化を行うために特定の酵素を使用してアミロペクチンの中で - (1 , 4) 結合と - (1 , 6) 結合を選択的に分解させて目的化合物の製造に適合するグルコースの分布を持つ、 - (1 , 4) 結合したオリゴサッカリドに転換させた後に、段階的に酸化、エステル化及び環化させることを基本的な発明思想とするものである。

即ち、本発明は、使用された各酵素の特異性に基づいたものであり、特定の酵素を順次的使用によりアミロペクチンを分解させて - (1 , 4) 結合したオリゴサッカリドに転換し、転換されたオリゴサッカリドを利用して 高い収率で光学的に純粋な (S) - 3 , 4 - ジヒドロキシ酪酸誘導体を製造する方法に関するものである。

本発明により原料物質として使用されるオリゴサッカリドは、アミロペクチンの生物学的酵素処理により調製される。特に、オリゴサッカリドを製造するために使用されるアミロペクチンは商業的に購入が容易である。特に、アミロペクチンは、澱粉やセルロースのよ

10

20

30

40

50

うに他の多糖に比べて本発明により酵素反応での反応溶媒として使用している水、或いは pH 4.0 - 8.0 の緩衝溶液に対する溶解度が高い。従って、アミロペクチンにより酵素反応に対する相対的活性が増加し、(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体の製造に適合するグルコースの分布を持つオリゴサッカリドの製造に非常に効果的である。

【0014】

本発明による製造方法を設計する工程の中、上記のアミロペクチンを適切なグルコースの分布を持つオリゴサッカリドに転換させるために、アミロペクチンの(1,6)結合を選択的に分解する酵素としてプルラーゼを試みたが、低下されるアミロペクチンの溶解度とプルラーゼの活性減少が問題として提起された。従って、1つのプルラーゼだけを適用する代わりに、 α -アミラーゼを反応させて適切なグルコースの分布によりアミロペクチンを低分子化させて反応性を増加した後に、プルラーゼを順次的に処理する方法を選択した。しかし、このような酵素反応の場合には、プルラーゼにより酵素反応の中に残存する α -アミラーゼの活性が継続的に発揮され、 α -アミラーゼの特性により長時間にわたって酵素反応が進行すればアミロペクチンが過度に低糖に転換されて目的とするオリゴサッカリドを製造することができない。従って、本発明ではプルラーゼによる酵素反応に前もって α -アミラーゼによる酵素反応が終ってから残存する α -アミラーゼを不活性化する技術を導入した。

10

【0015】

このような本発明の製造方法を細分化すれば次のとおりである。

1) 特定の酵素を利用した生物学的処理方法によりアミロペクチンを選択的に分解させて上記の化学式2で表される特性的な(1,4)結合のオリゴサッカリドを利用して化学的な酸化を行う工程と、また2) 生成された(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸塩をエステル化させて上記の化学式1で表される(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体を製造する工程からなる。特に、本発明による製造方法は、上記した反応中に生成される(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルの精製工程がなく、1つの反応器内で連続的に反応を行って目的化合物である(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体を得ることにその長所がある。

20

本発明の酵素反応によると、 α -アミラーゼの酵素反応が終った後に順次的にプルラーゼを使用する。 α -アミラーゼは(1,4)結合を選択的に分解し、プルラーゼは(1,6)結合を選択的に分解することを特徴とする酵素である。

30

一般的な加水分解の場合には、(1,4)結合或いは(1,6)結合の分解に対する選択性を持たずに、アミロペクチンを不規則的に分解させる。これに対して、本発明の加水分解では(1,4)結合或いは(1,6)結合に選択的に作用する酵素を選んで使用することにより、温和な条件下でアミロペクチンを目的化合物の製造に適合する、グルコースの分布を持つオリゴサッカリドに転換させて光学的に純粋な(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸エステルを製造することにその長所がある。

【0016】

本発明の α -アミラーゼによる酵素反応は、水の単独溶媒、又は pH 4.0 - 8.0 の緩衝溶液を利用して 40 - 120 の条件下で行う。 α -アミラーゼはアミロペクチンに対して 0.001 - 10 重量% の範囲で使用し、 α -アミラーゼによる酵素反応を 30 分 - 4 時間にわたって処理した後に、残存する α -アミラーゼを不活性化させる。この時、上記の不活性化は酸性 (pH 2.0 - 4.5) 及び高温 (60 - 150) の条件下で 10 分 - 4 時間にわたって行う。

40

上記した α -アミラーゼによる酵素反応が終った後に、プルラーゼをアミロペクチンの重量に対して 0.001 - 10 重量% の範囲で使用し、 α -アミラーゼによる酵素反応を 10 - 40 時間にわたって処理して得た大部分のオリゴサッカリドは 3 - 50 のグルコース単位を有する範囲で分布される。生成されたオリゴサッカリドは光学分析器により糖還元基 (reducing end units) 及び dextrose equivalent) 分析、HPLC 分析及びゲル透過クロマトグラフィ (GPC) 分析を通じて相対的な糖還元基と分子量の分布を分析した。

50

【 0 0 1 7 】

本発明のオリゴサッカリドはアミロペクチンを選択的に酵素分解することにより得たものであり、その大部分が3 - 50のグルコース単位、望ましくは5 - 50のグルコース単位を有する範囲で分布する。また、グルコースとグルコースの間はその大部分が - (1 , 4) 結合により連結されているので、次に行われる酸化での副産物 (例 例 えば、ギ酸、シュウ酸、グリコール酸、エリトロン酸等のような酸混合物) の生成を最小化させ、段階的な反応を連続的に行うことにより高収率で (S) - 3 , 4 - ジヒドロキシ酪酸誘導体が得られる長所がある。また、得られた (S) - 3 , 4 - ジヒドロキシ酪酸誘導体は光学的に極めて純粋であることが認められた。

一方、オリゴサッカリドの酸化は、30 - 65 の条件下で6 - 36時間にわたって塩基及び酸化剤を滴下して行われる。この時、酸化剤の例としては、過酸化水素、過酸化アルカリ金属、過酸化アルカリ土類金属及びアルキルヒドロペルオキシドが挙げられ、望ましくは過酸化水素を使用する。上記の酸化剤は、アミロペクチンのグルコース単位1モルに対して1 - 3当量の範囲で使用される。また、塩基の例としては、アルカリ金属或いはアルカリ土類金属が挙げられ、望ましくは水酸化ナトリウム或いは水酸化カリウムを使用する。上記の塩基は、アミロペクチンのグルコース単位1モルに対して2 - 4当量の範囲で使用される。

【 0 0 1 8 】

また、本発明のエステル化は、酸触媒の存在下で反応溶媒とエステル化剤としてアルコールを使用して30 - 80 の条件下で行う。この時、酸触媒の例としては、塩酸、硫酸、リン酸及び硝酸などの有機酸、或いはフルオロアルキルスルホン酸、アラルキルスルホン酸、アラルキルスルホン酸の水和物及びトリフルオロ酢酸等の有機酸を使用する。アルコールの例としては、C₁ - 5 の線状又は分岐アルコールを使用する。

一方、酸化において、使用される原料物質の選択による収率を比較すれば次のとおりである [実験例 1 を参照]。即ち、上記の化学式 1 で表される (S) - 3 , 4 - ジヒドロキシ酪酸誘導体を、酸触媒の存在下で30 - 80 で2 - 5時間にわたって攪拌させ、環化を進めることにより (S) - 3 - ヒドロキシ - - ブチロラクトンが得られる。その時、酸触媒の例としては、塩酸、硫酸、リン酸及び硝酸等の無機酸、或いはフルオロアルキルスルホン酸、アラルキルスルホン酸の水和物及びトリフルオロ酢酸等の有機酸が挙げられる。その結果、麦芽糖 (二糖) 或いはチーズの副産物から得られた乳糖 (二糖) を原料物質として (S) - 3 - ヒドロキシ - - ブチロラクトンを製造する場合には、使用された原料重量に対して (S) - 3 - ヒドロキシ - - ブチロラクトンの最高収率が28.3重量%を超えない。これに対して、50以上のグルコース単位を有する多糖の中、 - (1 , 4) 結合により連結された純粋なアミロースを原料物質として (S) - 3 - ヒドロキシ - - ブチロラクトンを製造する場合には、その理論収率はアミロペクチンと同じである。しかし、極端に強い分子内の水素結合によりダブルヘリックス (d o u b l e h e l i x) を形成しているため、段階的な酸化が制約を受けて理論収率に達しない極めて低い結果が認められた。これに対して、本発明のオリゴサッカリドを原料物質として (S) - 3 - ヒドロキシ - - ブチロラクトンを製造する場合には、使用された原料重量に対する収率が57.2重量%と非常に高い。

上に述べたように、本発明では特異的な酵素を適用してアミロペクチンをオリゴサッカリドに転換させることにより酸化に対するアミロペクチンの低い反応性を克服し、副産物の生成を最小化すると共に精製工程が非常に単純な製造方法として光学的に純粋な高収率の (S) - 3 , 4 - ジヒドロキシ酪酸誘導体を製造することにより生産性を極大化させうることにその長所がある。

このような本発明を次の実施例に基づいてさらに詳細に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

【 0 0 1 9 】

実施例 1 : (S) - 3 , 4 - ジヒドロキシ酪酸メチルエステルの製造

50 L の反応器に10 L の水及び乾燥された5 k g のアミロペクチンを入れ、温度を

10

20

30

40

50

55 まで上昇させた後に、12 gの α -アミラーゼ (BAN; EC 3.2.1.1 from *Bacillus licheniformis*, Novo Nordisk) を加えた。つづいて、上記の反応液の温度を75 まで上昇させ、同じ温度で2時間にわたって攪拌させた。5 mLの0.1 N塩酸水溶液を使用してpHを3.0 - 3.5の範囲に調節した後に、90 で1時間にわたって攪拌して残っている α -アミラーゼを不活性化させた。上記の反応混合液を30 に徐々に冷却させた後に、3.7 Lの4 M酢酸緩衝溶液 (pH 5) 及び1.3 Lの水を入れてpHを5に調節した。その後、上記の反応液の温度を60 まで上昇させ、同じ温度で62.5 gのプルラーゼ (Promozyme; EC 3.2.1.4 from *Bacillus acidopullulyticus*, Novo Nordisk) を入れて22時間にわたって攪拌させた。上記の反応液に0.54 kgの40% NaOHを入れて酢酸を中和させた後に、温度を60 まで上昇させた。また、上記の反応液に8.64 kgの40% NaOH溶液と5.25 kgの30% H₂O₂ 溶液を24時間にわたって滴下した後に、同じ温度で1時間にわたって攪拌させた。この時、生成された(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸ナトリウム塩の存在は核磁気共鳴分析法により認められた。

¹H-NMR (D₂O, ppm) : 2.27 (dd, 1H), 2.39 (dd, 1H), 3.41 (dd, 1H), 3.51 (dd, 1H), 3.8 - 3.9 (m, 1H)

【0020】

上記の反応液を濃縮させた後に、10 Lのメタノールを添加した。濃硫酸を加えてpHを4 - 5の範囲に調節して50 で3時間にわたって攪拌させた。上記の溶液に炭酸ナトリウムを入れて酸を中和させた後に、ろ過して生成された塩等の副産物を除去し、メタノールで濃縮して(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸メチルエステルを得た。これを核磁気共鳴分析法により内部標準物質に比較して(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸メチルエステル (転換率: 92%) の生成が認められた。

¹H-NMR (CDCl₃, ppm) : 2.5 (dd, 2H), 3.5 (dd, 1H), 3.6 (dd, 1H), 3.7 (s, 3H), 4.1 (m, 1H)

【0021】

実施例2: (S)-3-ヒドロキシ- γ -ブチロラク톤の製造

50 Lの反応器に10 Lの水及び乾燥された5 kgのアミロペクチンを入れ、温度を55 まで上昇させた後に、12 gの α -アミラーゼ (Teramyl; EC 3.2.1.1 from *Bacillus amyloliquefaciens*, Novo Nordisk) を加えた。つづいて、上記の反応液の温度を85 まで上昇させ、同じ温度で2時間にわたって攪拌させた。5 mL of 0.1 N塩酸水溶液を使用してpHを3.0 - 3.5の範囲に調節した後に、90 で1時間にわたって攪拌して残っている α -アミラーゼを不活性化させた。上記の反応混合液を30 に徐々に冷却させた後に、3.7 Lの4 M酢酸緩衝溶液 (pH 5) 及び1.3 Lの水を入れてpHを5に調節した。その後、上記の反応液の温度を60 まで上昇させ、同じ温度で62.5 gのプルラーゼ (Promozyme; EC 3.2.1.4 from *Bacillus acidopullulyticus*, Novo Nordisk) を入れて22時間にわたって攪拌させた。上記の反応液に0.54 kgの40% NaOHを入れて酢酸を中和させた後に、温度を60 まで上昇させた。また、上記の反応液に8.64 kgの40% NaOH溶液と5.25 kgの30% H₂O₂ 溶液を24時間にわたって滴下した後に、同じ温度で1時間にわたって攪拌させた。この時、生成された(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸ナトリウム塩の存在は核磁気共鳴分析法により認められた。

¹H-NMR (D₂O, ppm) : 2.27 (dd, 1H), 2.39 (dd, 1H), 3.41 (dd, 1H), 3.51 (dd, 1H), 3.8 - 3.9 (m, 1H)

【0022】

上記の反応液を濃縮させた後に、10 Lのメタノールを添加した。メタンスルホン酸を加

10

20

30

40

50

えてpHを4-5の範囲に調節して50で3時間にわたって攪拌させた。上記の溶液に炭酸ナトリウムを入れて酸を中和させた後に、ろ過して生成された塩等の副産物を除去し、メタノールを濃縮して(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸メチルエステルを得た。これを核磁気共鳴分析法により内部標準物質に比較して(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸メチルエステル(転換率:93%)の生成が認められた。

¹H-NMR(CDC1₃, ppm): 2.5(dd, 2H), 3.5(dd, 1H), 3.6(dd, 1H), 3.7(s, 3H), 4.1(m, 1H)
上記から生成された(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸メチルエステルを、別に分離しない状態で0.5重量%の濃い塩酸を入れて65と減圧の条件下で環化させた。上記の生成物を酢酸エチルに溶解させて炭酸ナトリウムで中和し、ろ過・濃縮して(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトン(2.86kg、使用したアミロペクチンの重量に対して57.2重量%)を得た。

¹H-NMR(CDC1₃, ppm): 2.28(dd, 1H), 2.74(dd, 1H), 4.13(dd, 1H), 4.32(dd, 1H), 4.4-4.5(m, 1H)

【0023】

実施例3:(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトンの製造

上記の実施例2と同様の方法により製造された(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸メチルエステルの環化において、濃塩酸の代わりに1重量%のメタンスルホン酸を入れて65と減圧の条件下で環化させた。上記の生成物を酢酸エチルに溶解させて炭酸ナトリウムで中和し、ろ過・濃縮して(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトン(2.85kg、使用したアミロペクチンの重量に対して57重量%)を得た。

¹H-NMR(CDC1₃, ppm): 2.28(dd, 1H), 2.74(dd, 1H), 4.13(dd, 1H), 4.32(dd, 1H), 4.4-4.5(m, 1H)

【0024】

実施例4:(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸メチルエステルの製造

上記の実施例1の製造方法において酸化剤として過酸化水素の代わりにt-ブチルヒドロペルオキシド(4.16kg)を入れ、同様の製造工程により(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸メチルエステルを得た。これを核磁気共鳴分析法により内部標準物質に比較して(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸メチルエステル(転換率:91%)の生成が認められた。

¹H-NMR(CDC1₃, ppm): 2.5(dd, 2H), 3.5(dd, 1H), 3.6(dd, 1H), 3.7(s, 3H), 4.1(m, 1H)

【0025】

比較例1:澱粉から(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトンの製造

50Lの反応器に20Lの水及び乾燥された5kgの澱粉を入れて温度を70まで上昇させた。この反応液に40%NaOH溶液(8.64kg)と30%H₂O₂溶液(5.25kg)を48時間にわたって滴下した後に、同じ温度で1時間にわたって攪拌させた。つづいて、上記の実施例2と同様の方法によりエステル化及び環化させて(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトン(1.1kg、使用した澱粉に対して22.0重量%)を得た。

【0026】

比較例2:澱粉から(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラクトンの製造

50Lの反応器に乾燥された5kgの澱粉と10Lの0.5N塩酸溶液を入れて100で20分にわたって澱粉を加水分解させた後に、20に冷却させて100mLの40%NaOH溶液で中和してから温度を70まで上昇させた。この反応液に40%NaOH溶液(8.64kg)と30%H₂O₂溶液(5.25kg)を48時間にわたって滴下した後に、同じ温度で1時間にわたって攪拌させた。つづいて、上記の実施例2と同様の方法によりエステル化及び環化させて(S)-3-ヒドロキシ-β-ブチロラク

10

20

30

40

50

ン(1.22kg、使用した澱粉に対して24.4重量%)を得た。

【0027】

比較例3：アミロースから(S)-3-ヒドロキシ-β-D-ブチロラク톤の製造

50Lの反応器に20Lの水及び乾燥された5kgのアミロースを入れて温度を70℃まで上昇させた。この反応液に40%NaOH溶液(8.64kg)と30% H_2O_2 溶液(5.25kg)を48時間にわたって滴下した後に、同じ温度で1時間にわたって攪拌させた。つづいて、上記の実施例2と同様の方法によりエステル化及び環化させて(S)-3-ヒドロキシ-β-D-ブチロラク톤(1.35kg、使用したアミロースに対して27.0重量%)を得た。

【0028】

実験例1：原料物質による(S)-3-ヒドロキシ-β-D-ブチロラク톤の生成量の比較
次の表1に示したように、それぞれの炭水化物が含まれている反応液を実施例2と同様の方法により酸化及びエステルを行って(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体を製造した。つづいて、環化を行って(S)-3-ヒドロキシ-β-D-ブチロラク톤を得た。炭水化物の使用量に対する(S)-3-ヒドロキシ-β-D-ブチロラク톤の生成量を次の表1に示す。

【0029】

【表1】

原料物質(5kg)		生成量(原料物質に対する重量%)
本発明のオリゴサッカリド(実施例2)		2.86kg(57.2重量%)
ポリサッカリド	アミロペクチン	1.01kg(20.2重量%)
	アミロース	1.35kg(27.0重量%)
二糖(麦芽糖) ^{a)}		1.19kg(23.7重量%)
^{a)} 米国特許第5,292,939号、第5,319,110号及び第5,374,773号の実施例1及び2による。		

【0030】

上記の表1によると、二糖を使用した時に用いられた原料の重量に対する相対的な収率は23.7重量%と低かった。これに対して、本発明によりアミロペクチンを適切に酵素処理してオリゴサッカリドに転換させた場合には、二糖を使用した場合と比べて原料物質の重量に対する相対的な収率は57.2重量%と約2倍程度に上昇する優れた結果が認められた。酵素処理しなかったアミロペクチンの場合には、原料物質の重量に対する相対的な収率は約20.2重量%と比較的に低かった。

【0031】

実験例2：(S)-3-ヒドロキシ-β-D-ブチロラク톤の光学純度の分析

本発明及び従来の方法により製造された(S)-3-ヒドロキシ-β-D-ブチロラク톤の光学純度を分析するために、次のような方法により(S)-3-アセトキシ-β-D-ブチロラク톤を合成した。

それぞれの方法により合成された102mgの(S)-3-ヒドロキシ-β-D-ブチロラク톤(1mmol)を3mLの塩化メチレンに溶解させた後に、0.4mLのピリジン(5mmol)及び0.47mLの無水酢酸(5mmol)を入れて常温で3時間にわたって反応させてから1N塩酸で反応を終結した。生成された(S)-3-アセトキシ-β-D-ブチロラク톤を有機層から抽出して得た後に、これを濃縮してシリカゲルカラムクロマトグラフィで分離させた。得られた(S)-3-アセトキシ-β-D-ブチロラク톤を塩

10

20

30

40

50

化メチレンに溶解させた後に、注射器で0.5 μlを取ってGCで分析した結果を次の表2及び図1a～1cに示す。

【0032】

【表2】

原料	光学純度
二糖(麦芽糖) ^{a)}	94%ee
本発明のオリゴサッカリド(実施例2)	99.9%ee

^{a)}米国特許第5,292,939号、第5,319,110号及び第5,374,773号の実施例1及び2による。

10

【0033】

キラル化合物の場合、薬効の向上及び副作用を最小化するためには、99.5%ee以上の高い光学純度が要求される。上記の表2によると、従来の製造方法に比べて本発明の製造方法により合成された(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンは、その光学純度が99.9%eeとして非常に純粋であるので、ほかのキラル化合物を合成する時に中間体として有用である。

20

【0034】

【発明の効果】

本発明による製造方法は、アミロペクチンを特定の条件下で酵素と反応させて(1,4)結合したオリゴサッカリドを製造し、これを酸化及びエステル化させて従来の製造技術に比べて副産物の生成が最小化されると同時に、精製工程が極めて単純な工程により光学的に純粋な大量の(S)-3,4-ジヒドロキシ酪酸誘導体を得ることができるので、産業的な価値が非常に有用である。

また、高価な金属触媒を使用した選択的還元反応のような従来の短所を克服し、光学活性を有している低価の天然物から容易に製造することができるので、あらゆる医薬品のキラル中間体として産業的な有用性を最も極大化させることが可能である。

30

さらに、本発明で原料物質として利用されているアミロペクチンは乳糖、或いは麦芽糖に比べて天然物から容易に得られるので、低価の原料を円滑に確保することができると共に光学的に純粋な目的物が得られる長所がある。さらに、使用した原料の重量に対する相対的な収率が二糖の使用に比べて約2倍ほど高いので、生産性が極大化される効果を持つ。

【図面の簡単な説明】

【図1a】ラセミ3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンの光学純度をガスクロマトグラフィ(GC)により分析した結果を示す。

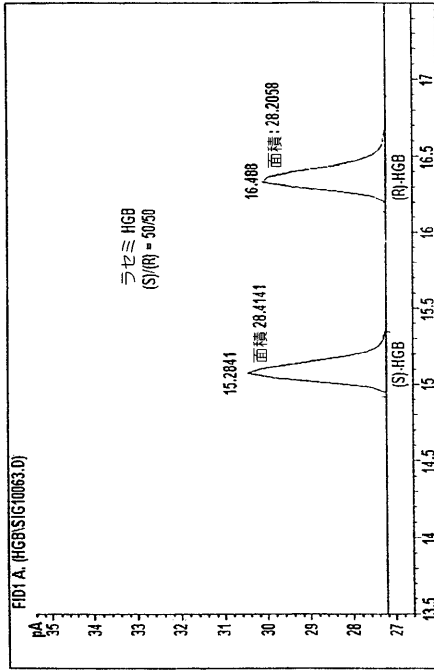
【図1b】従来方法の原料物質(二糖)により製造された(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンの光学純度をガスクロマトグラフィ(GC)により分析した結果を示す。

【図1c】図1cは、本発明の原料物質(オリゴサッカリド)により製造された(S)-3-ヒドロキシ- -ブチロラクトンの光学純度をガスクロマトグラフィ(GC)により分析した結果を示す。

40

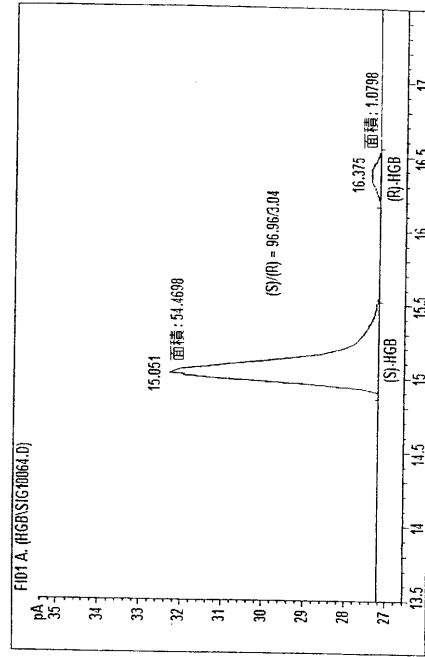
【 1 a 】

Fig. 1a



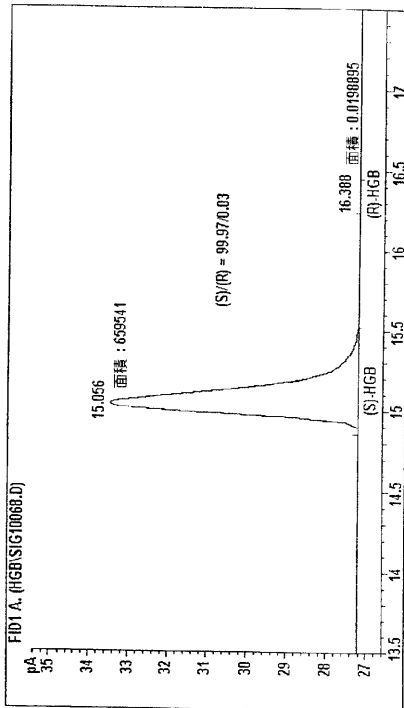
【 1 b 】

Fig. 1b



【 1 c 】

Fig. 1c



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	
C 0 7 C 69/675	C 0 7 C 69/675	
C 0 7 D 307/33	C 1 2 P 19/14	Z
C 1 2 P 19/14	C 1 2 P 19/16	
C 1 2 P 19/16	C 0 7 D 307/32	Q
// C 0 7 B 61/00	C 0 7 B 61/00	3 0 0
C 0 7 M 7:00	C 0 7 M 7:00	

(74)代理人 100096194

弁理士 竹内 英人

(74)代理人 100074228

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 チョー イク ヘン

大韓民国 デジョン 3 0 2 - 1 2 0 セオ - ク デュンサン - ドン パランサエ アパートメン
ト 1 0 3 - 2 0 5

(72)発明者 チュン ジョンピル

大韓民国 デジョン 3 0 5 - 5 0 3 ユースン - ク ソンガン - ドン チュンソル アパートメ
ント 5 1 4 - 1 4 0 5

(72)発明者 バク ヨンミ

大韓民国 デジョン 3 0 5 - 5 0 3 ユースン - ク ソンガン - ドン チュンソル アパートメ
ント 5 1 3 - 1 4 0 1

(72)発明者 ロウ キョンロク

大韓民国 デジョン 3 0 5 - 3 9 0 ユースン - ク ジョンミン - ドン セジョン アパートメ
ント 1 0 5 - 1 0 0 7

(72)発明者 ユー ホー スン

大韓民国 デジョン 3 0 5 - 3 9 0 ユースン - ク ジョンミン - ドン セジョン アパートメ
ント 1 0 9 - 4 0 6

(72)発明者 フワン ダエイル

大韓民国 デジョン 3 0 5 - 5 0 3 ユースン - ク ソンガン - ドン チュンソル アパートメ
ント 5 1 3 - 1 4 1 0

審査官 高 美葉子

(56)参考文献 特開平02-49594(JP,A)

特表2000-515882(JP,A)

特開平04-338359(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12P7/00-17/18

CA(STN)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)