

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5214249号
(P5214249)

(45) 発行日 平成25年6月19日(2013.6.19)

(24) 登録日 平成25年3月8日(2013.3.8)

(51) Int.Cl.		F I
C 0 7 C 227/18	(2006.01)	C O 7 C 227/18
C 0 7 C 229/22	(2006.01)	C O 7 C 229/22
C 0 7 C 231/12	(2006.01)	C O 7 C 231/12
C 0 7 C 237/06	(2006.01)	C O 7 C 237/06
C 1 2 P 13/02	(2006.01)	C 1 2 P 13/02

請求項の数 13 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-555405 (P2007-555405)	(73) 特許権者	000006035
(86) (22) 出願日	平成19年11月9日(2007.11.9)		三菱レイヨン株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/072237		東京都千代田区丸の内一丁目1番1号
(87) 国際公開番号	W02008/056827	(74) 代理人	230104019
(87) 国際公開日	平成20年5月15日(2008.5.15)		弁護士 大野 聖二
審査請求日	平成22年11月9日(2010.11.9)	(74) 代理人	230111590
(31) 優先権主張番号	特願2006-303972 (P2006-303972)		弁護士 金本 恵子
(32) 優先日	平成18年11月9日(2006.11.9)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 森田 耕司
		(74) 代理人	100105991
			弁理士 田中 玲子
		(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健
		(74) 代理人	100156915
			弁理士 伊藤 奈月

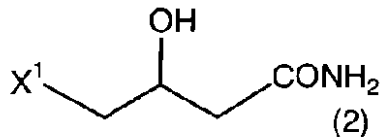
最終頁に続く

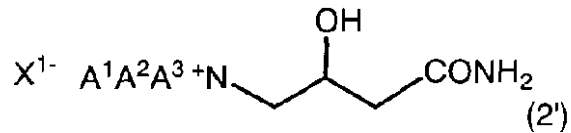
(54) 【発明の名称】 ベタインの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

次式(2)：

[式中、X¹は、ハロゲン原子である。]で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを(N A¹ A² A³)で示されるトリアルキルアミンで4級アミノ化する工程を含む、次式(2')：



[式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基であり、 X^1 は、ハロゲン原子である。]

10

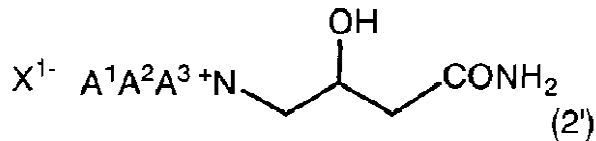
で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の製造方法。

【請求項2】

前記トリアルキルアミンがトリメチルアミンである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

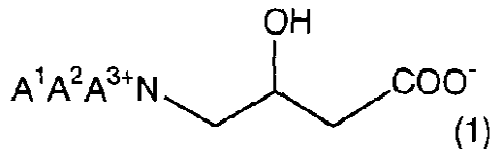
請求項1記載の方法により次式(2'):



20

[式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基であり、 X^1 は、ハロゲン原子である。]

で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物を製造し、加水分解する工程を含む、次式(1):



30

[式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基である。]

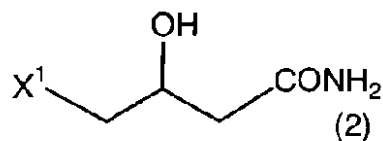
で示されるベタイン、またはベタインの塩の製造方法。

【請求項4】

A^1 、 A^2 および A^3 がメチル基である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

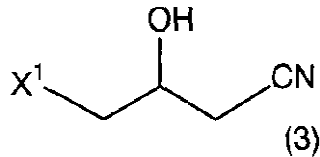
次式(2):



40

[式中、 X^1 は、ハロゲン原子である。]

で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドは、次式(3):



[式中、X¹ は、ハロゲン原子である。]

で示される 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルをアミド化する工程により得られるものである、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 6】

アミド化がニトリルヒドラーゼで処理するものである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ニトリルヒドラーゼが、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属、アシドボラックス (*Acidovorax*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、パークホルデリア (*Burkholderia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、カセオバクター (*Caseobacter*) 属、コマモナス (*Comamonas*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ディーツィア (*Dietzia*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、ジオバチルス (*Geobacillus*) 属、ゴルドナ (*Gordona*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、マイクロアスカス (*Microascus*) モルガネラ (*Morganella*) 属、パントエア (*Pantoea*) 属、プロテウス (*Proteus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、シュードノカルディナ (*Pseudonocardia*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、シクタリジウム (*Syctalidium*) 属、ツカムレラ (*Tukamurella*) 属に属する微生物からなる群より選択される微生物によって産生される、請求項 6 に記載の方法。

20

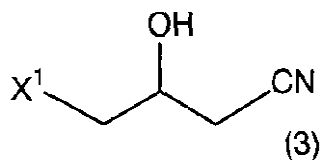
30

【請求項 8】

前記 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブタンアミドの製造工程が、反応液が凍らない温度 ~ 5 で行われる、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

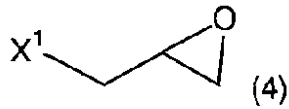
次式 (3) :



40

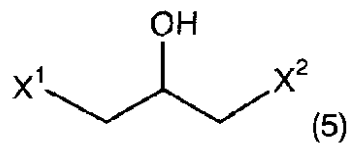
[式中、X¹ は、ハロゲン原子である。]

で示される 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルは、次式 (4) :



[式中、 X^1 は、ハロゲン原子である。]
 で示されるエピハロヒドリン、
 または、次式 (5) :

10



[式中、 X^1 は、上記の意味を有する。 X^2 は、 X^1 と互いに独立し、同一または異なっ
 たハロゲン原子である。]
 で示される 1, 3 - ジハロ - 2 - プロパノールと、
 青酸または青酸塩とを反応させる工程により得られるものである、請求項 5 ~ 8 のいずれ
 か 1 項に記載の方法。

20

【請求項 10】

青酸または青酸塩との反応が酵素触媒の存在下で行われるものである請求項 9 に記載の
 方法。

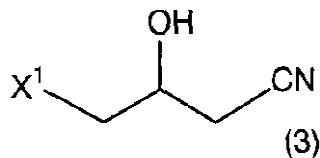
【請求項 11】

前記酵素触媒がハロヒドリンエポキシターゼである請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

次式 (3) :

30



[式中、 X^1 は、ハロゲン原子である。]
 で示される 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルが、(R) 体過剰で製造される、請
 求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記ハロヒドリンエポキシターゼが、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、アグロバクテリ
 ウム属、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属およびアースロバクター
 (*Arthrobacter*) 属に属する微生物からなる群より選択される微生物によっ
 て産生される、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、ベタイン、特にカルニチンの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ベタインの一種であるL-カルニチンはビタミンB₁₂とも言われ、生体内で脂肪酸の代謝に関係している重要な化合物である。心臓疾患治療剤（特開昭54-76830号）、過脂肪質血症治療剤（特開昭54-113409号）、静脈疾患治療剤等（特開昭58-88312号）としても注目されてきた。

ベタインの一種であるカルニチンの製造方法としては、特開昭57-165352号には、D-マンニトールを原料としてL-カルニチンを得る方法、特開昭62-272983号には、(R, S)-3,4-エポキシ酪酸エステルを出発として不斉加水分解酵素を用いて選択的に(R)-3,4-エポキシ酪酸エステルを単離、それにトリメチルアミンまたはトリメチルアミン塩酸塩を作用させてL-カルニチンに導く方法、特表2002-544252号には、(S)-()クロロコハク酸誘導体を対応する酸無水物に変換後、トリメチルアミンを用いてL-カルニチンに導く方法、特表2002-529528号には、アルキル-4-クロロ-3-オキソブチレートを用いて選択的に不斉水素還元してアルキル-(R)-(+) -4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを製造、続いてトリメチルアミンによる4級アミノ化反応を経てL-カルニチンを得る方法など、多くの報告がある。

上記特許文献にもあるように、カルニチン製造工程においてC₄骨格にトリメチルアミンを用いて4級アミノ基を導入する工程は避けて通れない重要な工程であり、またこの工程の収率が全体の収率に大きな影響を及ぼすことが多い。この4級アミノ化反応について特開平2-142758号には、4-ハロゲノ-3-ヒドロキシ酪酸メチルをケトン溶媒下でトリメチルアミンを用いて4級アミノ化し、続いて得られた酪酸エステル誘導体を加水分解する方法が示されている。この4級アミノ化反応はアルコールを溶媒として無水トリメチルアミンを用い、オートクレーブ中で80 もの高温で反応させるが、4-ハロゲノ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの脱水反応が進行してオレフィンが生成するため、選択率は30~40%程度と著しく低く、反応時間も20時間以上と長い。またケトン溶媒を用いると選択性が向上すると記述されているが、選択率は大幅に向上するものの反応時間はさらに長くなり、50時間を超えても4-ハロゲノ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの転化率は80%程度に過ぎない。溶媒にエーテル系、トルエン等を用いた場合は反応時間はさらに遅延する上、選択率も高くない。

特開平2-27995号には、 -クロロ- -ヒドロキシブチロニトリルに30%のトリメチルアミン水溶液を加えて4級アミノ化する方法が示されている。4 で一晩放置後、反応液を減圧濾過することで得られる固体は、純度100%のカルニチンニトリルクロライドとしても収率75%程度に過ぎず、高収率であるとはいえない。特開昭60-258487号には、4-クロロ-3-ヒドロキシブチロニトリルに大過剰の無水トリメチルアミンを加え、無溶媒で100 オートクレーブ中で反応させ、カルニチンニトリルクロライドを収率94%で得る反応が示されているが、反応条件が厳しく、反応時間も24時間と長い。

一方、4級アミノ化反応ではないがアミノ基を導入する反応例として、特公昭53-13611号には -クロロ- -ヒドロキシブタン酸アミドに約100当量という大過剰なアンモニアを用いて20 程度で16時間反応をさせ、 -アミノ- -ヒドロキシブタン酸アミドを得ているが、大過剰のアンモニアを使用することと反応時間が長いという点で問題があった。同様の反応がHeterocycles, Vol. 53, No. 1, 2000に示されており、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタンアミドに約100当量の大過剰なアンモニア水溶液を加えて、密閉系、120 で8時間作用させ、アミノ基を導入する反応が示されているが、やはり大過剰のアンモニアを使用することと反応時間が長いという点で問題があった。

10

20

30

40

50

このように 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブタンアミドに大過剰のアンモニアを作用させて長時間反応させればアミノ基が導入される知見はあったが、トリアルキルアミンを作用させた場合については全く知られていなかった。

また、カルニチンなどのベタイン製造工程において全体の収率に大きな影響を及ぼすトリアルキルアミンによる 4 級アミノ化工程は、従来の 4 - ハロゲノ - 3 - ヒドロキシ酪酸メチルや - クロロ - - ヒドロキシブチロニトリルのトリメチルアミンによる 4 級アミノ化反応では副反応の進行が多く、目的の 4 級アミノ化生成物を高収率で得ることが困難であった。

【発明の開示】

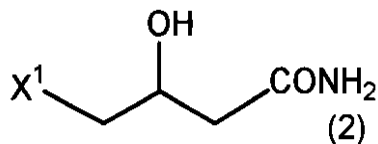
【 0 0 0 3 】

そこで本発明では、カルニチンなどのベタイン製造工程で重要な 4 級アミノ化工程において副反応を従来よりも大幅に防ぎ、カルニチンなどのベタインを高収率で得ることを目的とする。

この従来のカルニチン製造工程における 4 級アミノ化反応の副反応を防止するため本発明者らが鋭意検討した結果、4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブタンアミドを 4 級アミノ化反応の反応基質として用いることで、ブチロニトリルや酪酸エステルの特リアルキルアミンによる 4 級アミノ化反応時に起こっていた副反応を大幅に抑えることに成功した。この 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブタンアミドを、カルニチン製造工程における 4 級アミノ化反応の反応基質として用いてカルニチンを製造すると、従来の方法よりも収率が大幅に向上するとともに、反応時間も短縮し、副生成物を大幅に抑えることが可能である。また、この製造方法は、カルニチンのみならず、一定のベタインに適用可能である。

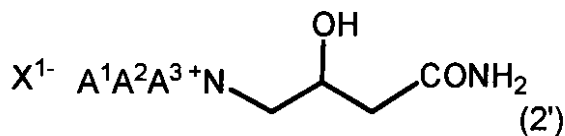
すなわち、本発明は以下に関する。

(1) 次式 (2) :



[式中、 X^1 は、ハロゲン原子である。]

で示される 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブタンアミドを ($\text{N A}^1 \text{A}^2 \text{A}^3$) で示されるトリアルキルアミンで 4 級アミノ化する工程を含む、次式 (2') :



[式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ 炭化水素基であり、 X^1 は、ハロゲン原子である。]

で示される 4 - トリアルキルアミノ - 3 - ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の製造方法。

(2) 前記トリアルキルアミンが、トリメチルアミン、トリエチルアミンおよびトリブチルアミンからなる群より選択されるものである、(1) に記載の方法。

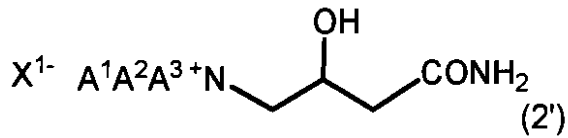
(3) 次式 (2') :

10

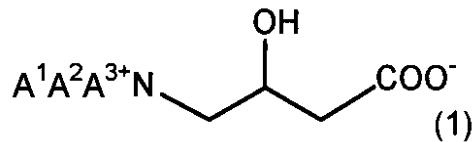
20

30

40



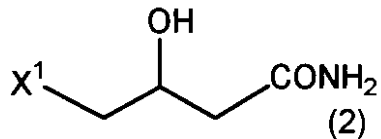
[式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ 炭化水素基であり、 X^1 は、ハロゲン原子である。] 10
 で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物を加水分解する工程を含む、次式(1)：



[式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $\text{C}_1 \sim \text{C}_{20}$ 炭化水素基である。] 20
 で示されるベタイン、またはベタインの塩の製造方法。

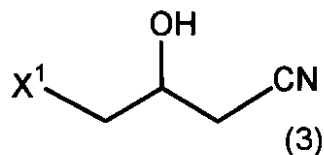
(4) A^1 、 A^2 および A^3 がメチル基である、(3)に記載の方法。

(5) 次式(2)：



[式中、 X^1 は、ハロゲン原子である。] 30

で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドは、次式(3)：



[式中、 X^1 は、ハロゲン原子である。] 40

で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルをアミド化する工程により得られるものである、(3)または(4)に記載の方法。

(6) アミド化がニトリルヒドラーゼで処理するものである、(5)に記載の方法。

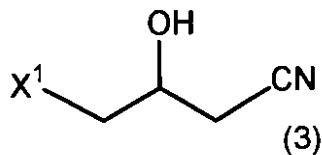
(7) 前記ニトリルヒドラーゼが、アクロモバクター(*Achromobacter*)属、アシドボラックス(*Acidovorax*)属、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属、アースロバクター(*Arthrobacter*)属、バチルス(*Bacillus*)属、ブレヴィバクテリウム(*Brevibacterium*)属、バークホルデリア(*Burkholderia*)属、キャンディダ(*Candida*)属、カセオバクター(*Caseobacter*)属、コマモナス(*Comamonas*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、ディーツィア(*Dietzia*)属、エンテロバクター(*Enterobacter*)属、エルビニア(*Erwinia*)属、ジオバチルス(*Geobacillus*)属、ゴルドナ(*Gordona*)属、ク 50

レブシエラ (*Klebsiella*) 属、ミクロアスカス (*Microascus*) モルガネラ (*Morganella*) 属、パントエア (*Pantoea*) 属、プロテウス (*Proteus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、シュードノカルディナ (*Pseudonocardia*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、シクタリジウム (*Syctalidium*) 属、ツカムレラ (*Tukamurella*) 属に属する微生物からなる群より選択される微生物によって産生される、(6)に記載の方法。

(8) 前記 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブタンアミドの製造工程が、反応液が凍らない温度 ~ 5 で行われる、(5) ~ (7) のいずれか 1 項に記載の方法。

10

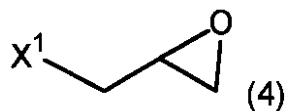
(9) 次式 (3) :



[式中、X¹ は、ハロゲン原子である。]

で示される 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルは、次式 (4) :

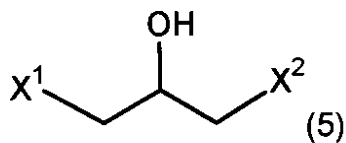
20



[式中、X¹ は、ハロゲン原子である。]

で示されるエピハロヒドリン、
または、次式 (5) :

30



[式中、X¹ は、上記の意味を有する。X² は、X¹ と互いに独立し、同一または異なったハロゲン原子である。]

で示される 1, 3 - ジハロ - 2 - プロパノールと、

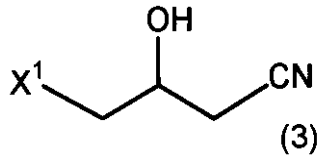
青酸または青酸塩とを反応させる工程により得られるものである、(5) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(10) 青酸または青酸塩との反応が酵素触媒の存在下で行われるものである (9) に記載の方法。

(11) 前記酵素触媒がハロヒドリンエポキシターゼである (10) に記載の方法。

(12) 次式 (3) :



[式中、 X^1 は、ハロゲン原子である。]

で示される 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルが、(R) 体過剰で製造される、(1 1) に記載の方法。

10

(1 3) 前記ハロヒドリンエポキシターゼが、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、アグロバクテリウム属、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属およびアースロバクター (*Arthrobacter*) 属に属する微生物からなる群より選択される微生物によって産生される、(1 1) または (1 2) に記載の方法。

本発明によれば、カルニチン等のベタインの製造工程において重要なトリアルキルアミンを用いた 4 級アミノ化反応を、4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブタンアミドを基質として用いることにより、主たる副生物であるクロトン酸誘導体の生成を従来よりも大幅に抑えることが可能となり、高収率でカルニチンなどのベタインを製造することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

20

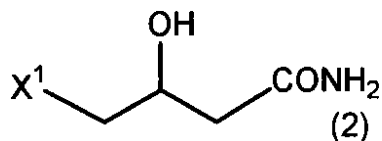
【 0 0 0 4 】

以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施形態は、本発明を説明するための単なる例示であって、本発明をこの実施形態にのみ限定することは意図されない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施することが可能である。

なお、本明細書において引用した全ての刊行物、例えば、先行技術文献および公開公報、特許公報その他の特許文献は、その全体が本明細書において参照として組み込まれる。本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願 2 0 0 6 - 3 0 3 9 7 2 号明細書の内容を包含する。

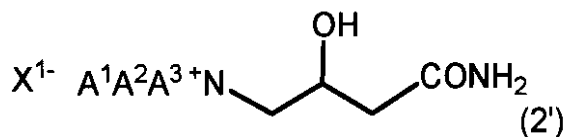
本発明では、次式 (2) :

30



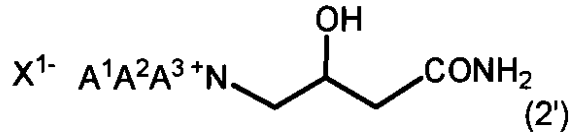
[式中、 X^1 は、ハロゲン原子である。]

で示される 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブタンアミドを ($NA^1A^2A^3$) で示されるトリアルキルアミンで 4 級アミノ化する工程を含む、次式 (2') :

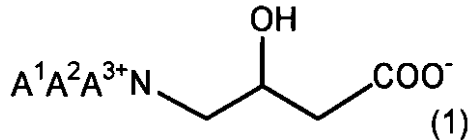


40

[式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基であり、 X^1 は、ハロゲン原子である。] で示される 4 - トリアルキルアミノ - 3 - ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物を製造する方法が提供される。また、本発明は、次式 (2') :

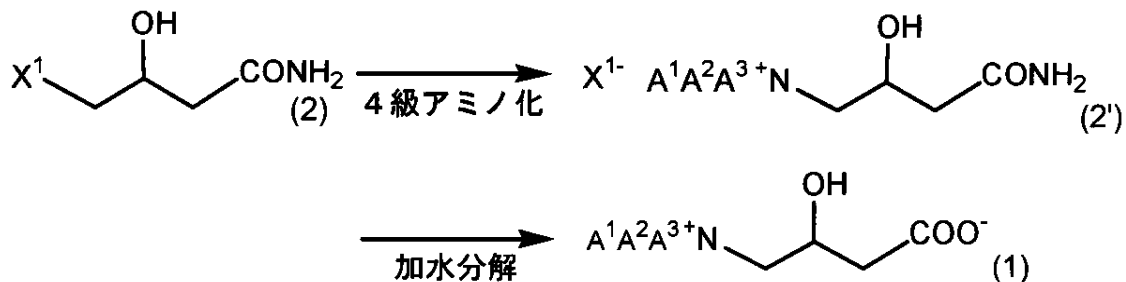


[式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基であり、 X^1 は、ハロゲン原子である。] 10
 で示される 4 - トリアルキルアミノ - 3 - ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物を加水分解する工程を含む、次式 (1) :

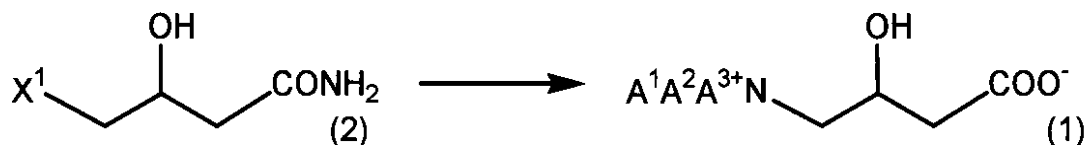


[式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基である。] で示されるベタイン、またはベ 20
 タインの塩を製造する方法が提供される。

さらに、本発明において、下記式 (2) で示されるアミドを 4 級アミノ化する工程と、アミド基を加水分解する工程とを含む、下記式 (1) で示されるベタインの製造方法が提 30
 供される。



[式中、 X^1 、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、上記の意味を有する。] 40
 本発明では、下記式 (2) で示されるアミドを 4 級アミノ化する工程を含む、下記式 (1) で示されるベタインの製造方法が提供される。



上記式中、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ、互いに独立し、同一または異なって、置換基を有していてもよい $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基である。

本明細書において、「 $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基」の炭化水素基は、飽和若しくは不飽和の非環式であってもよいし、飽和若しくは不飽和の環式であってもよい。 $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基が非環式の場合には、線状でもよいし、枝分かれでもよい。「 $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基」には、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル基、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル基、 $C_4 \sim C_{20}$ アルキルジエニル基、 $C_6 \sim C_{18}$ アリール基、 $C_7 \sim C_{20}$ ア 50

ルキルアリアル基、 $C_7 \sim C_{20}$ アリアルアルキル基、 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルキル基、 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルケニル基、($C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル) $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基などが含まれる。

本明細書において、「 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基」は、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基であることが好ましく、 $C_1 \sim C_6$ アルキル基であることが更に好ましい。アルキル基の例としては、制限するわけではないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ドデカニル等を挙げることができる。

本明細書において、「 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル基」は、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル基であることが好ましく、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル基であることが更に好ましい。アルケニル基の例としては、制限するわけではないが、ビニル、1-プロペニル、2-プロペニル、イソプロペニル、2-ブテニル等を挙げることができる。

10

本明細書において、「 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル基」は、 $C_2 \sim C_{10}$ アルキニル基であることが好ましく、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル基であることが更に好ましい。アルキニル基の例としては、制限するわけではないが、エチニル、プロピニル、ブチニル等を挙げることができる。

本明細書において、「 $C_4 \sim C_{20}$ アルキルジエニル基」は、 $C_4 \sim C_{10}$ アルキルジエニル基であることが好ましく、 $C_4 \sim C_6$ アルキルジエニル基であることが更に好ましい。アルキルジエニル基の例としては、制限するわけではないが、1,3-ブタジエニル等を挙げることができる。

20

本明細書において、「 $C_6 \sim C_{18}$ アリアル基」は、 $C_6 \sim C_{12}$ アリアル基であることが好ましい。アリアル基の例としては、制限するわけではないが、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、インデニル、ビフェニル、アントリル、フェナントリル等を挙げることができる。

本明細書において、「 $C_7 \sim C_{20}$ アルキルアリアル基」は、 $C_7 \sim C_{12}$ アルキルアリアル基であることが好ましい。アルキルアリアル基の例としては、制限するわけではないが、*o*-トリル、*m*-トリル、*p*-トリル、2,3-キシリル、2,4-キシリル、2,5-キシリル、*o*-クメニル、*m*-クメニル、*p*-クメニル、メシチル等を挙げることができる。

本明細書において、「 $C_7 \sim C_{20}$ アリアルアルキル基」は、 $C_7 \sim C_{12}$ アリアルアルキル基であることが好ましい。アリアルアルキル基の例としては、制限するわけではないが、ベンジル、フェネチル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル、2,2-ジフェニルエチル、3-フェニルプロピル、4-フェニルブチル、5-フェニルペンチル等を挙げることができる。

30

本明細書において、「 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルキル基」は、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル基であることが好ましい。シクロアルキル基の例としては、制限するわけではないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等を挙げることができる。

本明細書において、「 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルケニル基」は、 $C_4 \sim C_{10}$ シクロアルケニル基であることが好ましい。シクロアルケニル基の例としては、制限するわけではないが、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル等を挙げることができる。

40

本明細書において、 A^1 、 A^2 及び A^3 で示される「 $C_1 \sim C_{20}$ 炭化水素基」には、置換基が導入されていてもよい。この置換基としては、例えば、 $C_1 \sim C_{10}$ アルコキシ基(例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ等)、 $C_6 \sim C_{12}$ アリアルオキシ基(例えば、フェニルオキシ、ナフチルオキシ、ビフェニルオキシ等)、アミノ基、水酸基、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素)又はシリル基などを挙げることができる。この場合、置換基は、置換可能な位置に1個以上導入されていてもよく、好ましくは1個~4個導入されていてもよい。置換基数が2個以上である場合、各置換基は同一であっても異なってもよい。

50

本明細書において、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、それぞれ互いに独立し、同一または異なって、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基、 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルキル基、または $C_6 \sim C_{18}$ アリール基であることが好ましく、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル基、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル基、または $C_6 \sim C_{12}$ アリール基であることが更に好ましく、なかでもメチル基は生体内で脂肪酸の代謝に関係している重要な化合物であるカルニチンに導かれることから、特に好ましい。

本明細書において、ベタインの塩とは、ベタインと、塩酸、硫酸、硝酸などの鉱酸との塩、フマル酸、酒石酸などの有機酸との塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの塩基との塩などを示す。例えばカルニチン塩酸塩、カルニチンフマル酸塩、カルニチン酒石酸塩などが挙げられる。

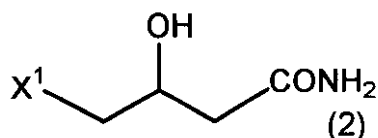
上記式中、 X^1 は、ハロゲン元素を指し、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素を示すが、入手し易さから塩素、臭素であることがより好ましい。

上記式(3)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリル、上記式(4)で示されるエピハロヒドリン、上記式(2)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミド、上記式(2')で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物、上記式(1)で示されるベタインには不斉炭素が存在するが、本発明はラセミ体、光学活性体のどちらでも実施可能である。また上記のような光学活性な原料を用いたり、光学活性な化合物を製造して以降の各反応を行った場合も、本発明は温和な条件下での反応が可能であることから、光学純度を低下させることなくベタインまで製造することができる。

本明細書において水性溶媒とは、水または、水と有機溶剤との混合物のことである。水と有機溶剤は二相系でも構わない。使用される有機溶剤としては特に制限はないが、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノールなどのアルコール系溶媒、アセトン、メチルイソブチルケトンなどのケトン系溶媒、酢酸エチル、プロピオン酸エチル、メタクリル酸メチルなどのエステル系溶媒、ペンタン、ヘキサン、ヘプタンなどの炭化水素系溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレンなどの芳香族系溶媒、ジクロロメタン、クロロホルムなどの塩素系溶媒、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシドなどが挙げられ、これらの混合溶剤を用いても構わない。水への溶解度が高いアルコール系溶媒、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドを使用することがより好ましい。水に溶解する範囲で有機溶剤を使用することがより好ましく、水が多いと反応速度が速くなることから、水を単独で使用する

ことが特に好ましい。

本発明の製造方法では、下記式(2)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを経由する工程を含む。本明細書において、「經由する」とは、下記式(2)で示されるアミドを出発物質として用いる場合と、出発物質としては他の物を用いるが、中間体として下記式(2)で示されるアミドを経由する場合との双方を意味する。



[式中、 X^1 は、上記の意味を有する。]

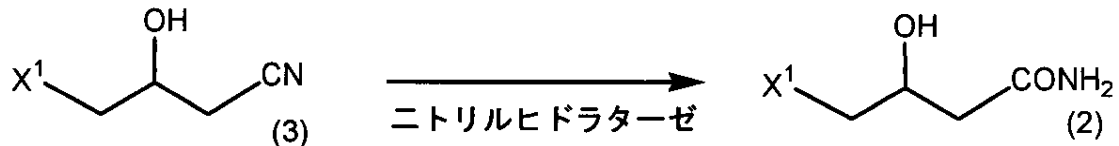
本発明にかかるベタインの製造方法では、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを4級アミノ化反応の基質として用いることが好ましい。この方法は従来の方法よりも4級アミノ化生成物収率が大幅に改善し、副生成物を大幅に抑えることが可能である。

上記式(2)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドの製法は特に制限はない。例えば化学的反応により得る方法として、エステルとアンモニアを用いてアミドに変換する方法、酸ハロゲン化物とアンモニアを用いてアミドに変換する方法、酸や塩基を触

媒としてニトリルをアミドに変換する方法などが挙げられ、いずれの方法でも構わない。ニトリルからアミドに変換する方法としては、塩酸などの鉱酸やギ酸などを使用する方法、過酸化水素とアルカリを作用させる方法、二酸化マンガンをを用いる方法などが知られており、いずれの方法を用いてもよい。

またニトリルヒドラーゼの作用により前記式(3)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルをアミド化して上記式(2)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを製造することもできる。この反応は温和な条件下で行うことが可能であるため、厳しい条件や複雑な操作を必要とする酸・塩基触媒を用いた際の副反応の進行を抑制することが可能である。

10

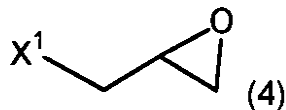


[式中、X¹は、上記の意味を有する。]

上記式(3)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルにニトリルヒドラーゼを作用させた場合、上記式(2)で示されるアミドからさらに加水分解反応が起こることはなく、温和な条件下で、しかもほぼ定量的に上記式(2)で示されるアミドを得ることができる。

20

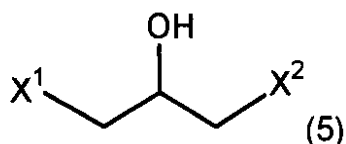
本発明において、上記式(2)で示されるアミドの前駆体である、4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルの製法は特に限定されないが、たとえば、下記式(4)で示されるエピハロヒドリンと青酸とから合成する方法(特開2002-241357に示されている)、エピハロヒドリンと青酸塩とから合成する方法(特開2004-182607参照)、



30

[式中、X¹は、上記の意味を有する。]

下記式(5)で示される1,3-ジハロ-2-プロパノールと青酸とから合成する方法(特開平5-219965参照)



40

[式中、X¹は、上記の意味を有する。X²は、X¹と互いに独立し、同一または異なったハロゲン原子である。]

など、いずれの方法で合成したものも使用することができる。ここで、青酸塩としては、青酸のアルカリ金属塩を用いることが好ましく、NaCN、KCN、LiCNを用いることがより好ましい。また、前記式(4)で示されるエピハロヒドリンの光学活性体を用いた場合、光学活性な4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルを製造することも可能である。

また、酵素触媒(ハロヒドリンエポキシダーゼ)を用いることにより、前記式(4)で示されるエピハロヒドリンや前記式(5)で示される1,3-ジハロ-2-プロパノール

50

から、直接光学活性 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルを製造してもよい。

本発明において、ハロヒドリンエポキシダーゼは前記式(4)で示されるエピハロヒドリンや前記式(5)で示される 1, 3 - ジハロ - 2 - プロパノールから、4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルを生成する機能を有すれば特に限定されない。

ハロヒドリンエポキシダーゼを産生する微生物としては、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、ミクロバクテリウム(*Microbacterium*)属、アグロバクテリウム属、マイコバクテリウム(*Mycobacterium*)属およびアースロバクター(*Arthrobacter*)属に属する微生物である。

具体的微生物としては、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*) sp. N - 1074 (FERM BP - 2643)、ミクロバクテリウム(*Microbacterium*) sp. N - 4701 (FERM BP - 2644)、アグロバクテリウムラジオバクター(*Agrobacteriu radiobacter*) AD1、マイコバクテリウム(*Mycobacterium*) sp. GP1およびアースロバクター(*Arthrobacter*) sp. AD2等が挙げられる。

特に好ましい微生物は、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*) sp. N - 1074 (FERM BP - 2643)、及びミクロバクテリウム(*Microbacterium*) sp. N - 4701 (FERM BP - 2644)である。N - 4701株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1 - 1 - 1中央第6)に平成1年4月19日付で寄託されており、その受託番号はFERM BP - 2643及びFERM BP - 2644である。

また、上記微生物のハロヒドリンエポキシダーゼ遺伝子をクローニングし、形質転換(導入)した微生物も、上記のハロヒドリンエポキシダーゼを産生する微生物として含まれる。

ハロヒドリンエポキシダーゼ遺伝子は、例えば、GenBankに公表されており、コリネバクテリウム sp. (*Corynebacterium*) N - 1074由来のハロヒドリンエポキシダーゼ遺伝子(hheB)のAccession番号はD90350である。

本発明に係るハロヒドリンエポキシダーゼは、上述の方法で調製されたハロヒドリンエポキシダーゼ活性を有する微生物を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。

ハロヒドリンエポキシダーゼ活性を有する微生物を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が挙げられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステイープリカー等が挙げられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅若しくは炭酸カルシウム等が挙げられる。

上記微生物の培養は常法によればよく、例えばpH 4 ~ 10、温度10 ~ 45 の範囲にて好氣的に10 ~ 180時間培養する。培養は液体培養、固体培養のいずれでも行うことができる。形質転換体の培養は、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、30 ~ 40で行うことが好ましい。培養中は必要に応じてアンピシリンやカナマシンの抗生物質、インデューサーを培地に添加してもよい。

上記の方法で調製したハロヒドリンエポキシダーゼを培養して得られる培養物またはその処理物は前記式(4)で示されるエピハロヒドリンや前記式(5)で示される 1, 3 - ジハロ - 2 - プロパノールから、4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルを製造することができる。「処理物」とは、菌体の破砕物、薬剤処理した菌体、固定化した菌体、粗酵素・精製酵素等の菌体抽出物を意味する。

反応液の溶媒としては、特に制限はないが、一般には前記水性溶媒を用いる。特に水が好ましく、酵素活性の最適 pH 4 ~ 10 の付近である水または緩衝液を使用する。緩衝液としては、例えば、リン酸、ホウ酸、クエン酸、グルタル酸、リンゴ酸、マロン酸、o-フタル酸、コハク酸又は酢酸等の塩等によって構成される緩衝液、Tris 緩衝液あるいはグッド緩衝液等が好ましい。

反応温度は、5 ~ 50、反応 pH は 4 ~ 10 の範囲で行うことが好ましい。反応温度は、より好ましくは 10 ~ 40 である。反応 pH は、より好ましくは pH 6 ~ 9 である。反応時間は基質等の濃度、菌体濃度あるいはその他の反応条件等によって適時選択するが、1 ~ 120 時間で終了するように条件を設定することが好ましい。尚、本反応においては、反応の進行に伴い生成する塩素イオンを適当なアルカリで中和することでより反応を円滑に進行させることができる。

また、シアン化合物としては、シアン化水素、シアン化カリウム、シアン化ナトリウム、シアン酸又はアセトンシアンヒドリン等の反応液中に添加した際にシアンイオン (CN⁻) 又はシアン化水素を生じる化合物又はその溶液を用いることができる。

反応液中の基質濃度は、酵素安定性の観点から 0.01 ~ 20 (W/V) % が好ましく、0.01 ~ 10 % が特に好ましい。

また、シアン化合物の使用量は、酵素安定性の観点から基質の 1 ~ 3 倍量 (モル) が好ましい。

以上のような方法で製造された上記式 (3) で示される 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルは、公知の方法を用いて採取および精製することができる。例えば、反応液から遠心分離等の方法を用いて菌体を除いた後、酢酸エチルなどの溶媒で抽出を行い、減圧下に溶媒を除去することにより 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルのシロップを得ることができる。しばしば着色が発生し反応液が褐色になるが、活性炭などにより脱色操作を行ってもよい。また、これらのシロップを減圧下に蒸留することによりさらに精製することもできる。

光学活性な 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルを用いて本発明を実施する場合、その光学純度は、以後の反応が温和な条件であることから、光学純度を低下させることなくベタインまで製造することが可能である。

本発明において、ニトリルヒドラターゼは特に限定されないが、上記式 (3) で示される 4 - ハロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリルのニトリルをアミドへ変換する反応を触媒する酵素であり、国際的な酵素分類によればリアーゼに属する酵素である。本発明で使用するニトリルヒドラターゼを有する微生物は、例えば、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属、アシドボラックス (*Acidovorax*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、バークホルデリア (*Burkholderia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、カセオバクター (*Caseobacter*) 属、コマモナス (*Comamonas*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ディーツィア (*Dietzia*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、ジオバチルス (*Geobacillus*) 属、ゴルドナ (*Gordona*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、マイクロアスカス (*Microascus*) モルガネラ (*Morganella*) 属、パントエア (*Pantoea*) 属、プロテウス (*Proteus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、シュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、シクタリジウム (*Syctalidium*) 属、ツカムレラ (*Tukamurella*) 属に属する微生物である。

本発明で使用するニトリルヒドラターゼとしては、具体的には、アースロバクター グロビフォルミス (*Arthrobacter globiformis*) IFO 12138、ブレビバクテリウム ヘルボラム (*Brevibacterium helvo*

10

20

30

40

50

lum) ATCC 11822、コリネバクテリウム フラベシエンズ (*Corynebacterium flavescens*) IAM 1642、ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) IFO 12540 および IFO 12539、ストレプトマイセス アルボグリセルス (*Streptomyces albogriseolus*) HUT 6045、ストレプトマイセス クリゾマルス (*Streptomyces chrysomallus*) HUT 6141、ストレプトマイセス シネレオルバー (*Streptomyces cinereouruber*) HUT 6142、ストレプトマイセス ディアスタチカス (*Streptomyces diastaticus*) HUT 6116、ストレプトマイセス オリバセウス (*Streptomyces olivaceus*) HUT 6061、ストレプトマイセス ルブロシアノディアスタチカス (*Streptomyces rubrocyano diastaticus*) HUT 6117、クレブシエラ ニュウモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*) IFO 12019、IFO 3319、IFO 12059、IAM 1063、クレブシエラ ニュウモニアエ サブスピーシズ ニュウモニアエ (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) NH-36T2 株、セラチア ピリムシカ (*Serratia plymuthica*) IFO 3055、セラチア マルセッセンス (*Serratia marcescens*) IAM 1105、エルビニア キャロトボラ (*Erwinia carotovora*) IFO 3057、ツカムレラ ポーロメタボラム (*Tukamurella paurometabolum*) JCM 3226、ゴルドナ ルブロペルチンクタス (*Gordona rubropertinctus*) JCM 3227、モルガネラ モルガニ (*Morganella morgani*) IFO 3848、プロテウス ブルガリス (*Proteus vulgaris*) IFO 3167、エンテロバクター エアロジェネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 12010、マイクロアスカス デスモスポラス (*Microascus desmosporus*) IFO 6761、キャンディダ グイリエモンディー (*Candida guilliermondii*) NH-2 株 (FERM P-11350 号)、パントエア アグロメランス (*Pantoea agglomerans*) NH-3 株 (FERM P-11349 号) などが産生するニトリルヒドラターゼが挙げられる。

なお、ATCC 番号が付与された微生物菌株は、各々アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) から容易に入手することができる。また、IFO 番号の付された微生物は、(財) 醗酵研究所 (IFO) 発行の「List of Cultures、第8版、第1巻 (1988)」に記載されており、現在は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門遺伝資源保存課から入手できる。IAM 番号の付された微生物は東京大学応用微生物学研究所から入手できる。JCM 番号の付された微生物は、理化学研究所 系統微生物保存機関発行の「Catalogue of strains 第4版 (1989)」に記載されており、理化学研究所 系統微生物保存機関より入手できる。HUT 番号の付された微生物は、日本微生物保存連盟 (JFCC) 発行の「Catalogue of Cultures、第4版 (1987)」に記載されており、広島大学工学部から入手できる。FERM 番号の付された微生物は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターから入手できる。

さらに、本発明で使用するニトリルヒドラターゼとしては、さらに山田らが土壌より分離したロドコッカス ロドクロウス J-1 [FERM BP-1478 号]、及びアースロバクター sp. SK103 [FERM P-11300 号]、カセオバクター sp. BC23 [FERM P-11261 号]、シュードモナス sp. BC15-2 [FERM BP-3320 号]、シュードモナス sp. SK31 [FERM P-11310 号]、シュードモナス sp. SK87 [FERM P-11311 号]、シュードモナス sp. SK13 [FERM BP-3325 号]、ロドコッカス sp. SK70 [FERM P-11304 号]、ロドコッカス sp. HR11 [FERM P-11306 号] およびロドコッカス sp. SK49 [FERM P-11303 号] など

が産生するニトリルヒドラーゼも挙げられる。これらの細菌は、それぞれ上記寄託番号にて独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されている。

また、上記微生物のニトリルヒドラーゼ遺伝子をクローニングし、形質転換（導入）した微生物も、上記のニトリルヒドラーゼを産生する微生物として含まれる。例えば、米国特許第5807730号に記載のシュードノカルディア（*Pseudonocardia*）属のニトリルヒドラーゼ遺伝子で形質転換した大腸菌（MT-10822株（FERM BP-5785））、特開平8-266277号公報記載のアクロモバクター（*Achromobacter*）属のニトリルヒドラーゼで形質転換した大腸菌（MT-10770株（FERM P-14756））、特開平4-211379号公報記載のロドコッカス・ロドクロウス（*Rhodococcus rhodochrous*）種のニトリルヒドラーゼで形質転換した微生物などが挙げられる。

本発明で使用するニトリルヒドラーゼを産生する微生物を培養するための培地組成としては、特に限定されないが、通常これらの微生物が生育し得るものならば何でも使用することができる。例えば、炭素源としてグルコース、フラクトース、シュークロース、マルトースなどの糖類、酢酸、クエン酸などの有機酸類、エタノール、グリセロールなどのアルコール類など、窒素源としてペプトン、肉エキス、酵母エキス、タンパク質加水分解物、アミノ酸類などの天然窒素源の他に各種無機、有機酸アンモニウム塩などが使用でき、このほか、無機塩、微量金属、ビタミンなどが必要に応じて適宜使用される。この際、より高い酵素活性を誘導させるために4-クロロ-3-ヒドロキシブチロニトリル、プロピオニトリル、イソブチロニトリル、ベンジルシアニドなどの各種ニトリル化合物、4-クロロ-3-ヒドロキシブタンアミド、プロピオンアミド、イソブタンアミドなどの各種アミド化合物などを培地に添加することがより好ましい。上記微生物の培養は常法によればよく、例えばpH4~10、温度10~45の範囲にて好氣的に10~180時間培養する。培養は液体培養、固体培養のいずれでも行うことができる。

本発明において、4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルに酵素を作用させて4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを得る方法としては特に限定されないが、上記のようにして得たニトリルヒドラーゼを産生させた微生物の培養液あるいは遠心分離などにより得た菌体の懸濁液に基質を添加する方法、前記微生物菌体処理物（例えば菌体破砕物、菌体抽出物など）、ニトリルヒドラーゼ粗酵素、精製酵素などの懸濁液に基質を添加する方法、あるいは常法により固定化した菌体または菌体処理物、粗酵素、精製酵素などを反応液に添加する方法、微生物の培養時に基質を培養液に添加して培養と同時に反応を行う方法、基質の水溶液を調製して上記のようにして得た微生物培養液、微生物菌体、微生物菌体処理物、ニトリルヒドラーゼ粗酵素、精製酵素、あるいはそれらを固定化したものを一括若しくは分割して添加する方法などが挙げられるが、このアミド化反応が発熱反応であり、発熱による反応の暴走を防ぐことから菌体の懸濁液を基質の水溶液に添加し、反応速度を制御することが好ましい。

エピハロヒドリンや1,3-ジクロロ-2-プロパノールを原料とし、青酸または青酸塩と作用させて4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルを製造する方法などで合成した反応終了液をそのまま用いて、次のニトリルヒドラーゼによるアミド化反応を行ってもよい。この場合、系内に残存している青酸化合物がニトリルヒドラーゼを失活させてしまうことがしばしばある。それを防止するために予め酸性条件下で加熱、減圧、トッピングなどの操作を行い、系内の青酸濃度を10ppm以下、さらには1ppm以下にすることがより好ましい。

さらに、系内の青酸濃度を1ppm以下にしても4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルのアミド化反応が迅速に進行しない場合は、4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルまたはその溶液を加熱処理することでアミド化反応が迅速に進行する場合がある。

その加熱方法は、本発明の目的が達成されれば特に制限はなく、加圧、減圧、常圧条件下のいずれも選択できる。また4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルおよびその溶液を、その沸点以上に加熱し、還流又は留去する方法などが挙げられる。溶液は有機溶剤でも水溶液でもそれらの混合液でも構わないが、通常アミド化反応は水溶媒中で行われ、連

10

20

30

40

50

続いて反応を行うことが可能であることから、水溶媒中で加熱処理することが好ましい。

加熱時間は、0.1～100時間程度で、0.5～50時間が好ましく、さらに好ましくは1～10時間である。加熱温度は、40℃程度から4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルが分解しない温度までの範囲で処理することが可能であり、60～150℃が好ましい。4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルの水溶液を加熱処理する時、その分解を防ぐため、pHは中性～酸性領域が好ましく、pH1～7がより好ましい。

また、微量の金属塩を添加することで、4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリル中に極微量含まれるシアニオンを金属錯体とすることで低減させることにより、アミド化反応を迅速に進行させることもできる。金属錯体とする方法は、該ニトリルとニトリルヒドラーターゼを接触させる前に、青酸と反応して金属シアニ化物錯体を形成する金属を、該ニトリルまたは該ニトリルを含む溶液に金属塩として添加することにより、シアニオンを金属シアノ化錯体とする方法である。金属としては、コバルト、ニッケル、亜鉛が好ましく、塩の形態としては、特に制限されないが、硝酸塩、塩化物、硫酸塩、カルボン酸塩が例示できる。また水和物を用いてもよい。

微量の金属塩を添加する時には、4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルを含む溶液に含まれるシアニオン濃度に応じた量の金属塩を添加する必要がある。金属添加量が不十分な場合ではシアニオンの影響を十分に除去できない。また、金属添加量が過剰な場合では逆にアミド化反応を阻害するようである。また、金属塩の添加後にはニトリルヒドラーターゼが高活性を示す至適pHに再度調節してから、アミド化反応に移ることが好ましい。

本発明におけるニトリルヒドラーターゼによるアミド化反応の条件に特に制限がなく、その反応温度は使用する酵素によって適宜決定される。一般には反応液が凍らない温度～50℃程度である。「反応液が凍らない温度」とは、どのような反応液中でアミド化反応を行うかにより、その温度は異なる。希薄溶液での反応であれば、反応液に溶解している溶質のモル濃度(mol/kg)と溶媒のモル凝固点降下の値からその温度は算出できる。例えば、水媒体に溶解した14%程度の4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルをアミド化反応に供する場合、その反応液が凍らない温度とは、水の凝固点降下が1.858、4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルのモル濃度(mol/kg)が1.171であるので、凝固点は約-2℃程度となる。特許第3014171号には4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルに酵素を作用させて4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを合成する反応温度は、5～50℃と記載されている。本発明において特にベタインの製造を行う目的での4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルの4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドへのアミド化反応は、副反応の進行を抑制するために反応液が凍らない温度～30℃程度がより好ましく、反応液が凍らない温度～50℃が特に好ましい。4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリル濃度は特に限定されないが、0.01～50(W/V)%程度が通常で、0.1～40%程度がより好ましい。反応液のpHは4～10の範囲が好ましく、6～9で行うことがより好ましい。反応時間は基質濃度、菌体濃度あるいはそのほかの反応条件によって変わるが、通常0.5～120時間で終了するように条件を設定することが好ましく、副反応の進行を抑制するためにも、0.5～24時間程度、さらには0.5～15時間程度で終了するように設定することがより好ましい。

以上のようにして合成した4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドは、抽出、カラム分離、再結晶等の定法に従い、単離精製することができる。ニトリルヒドラーターゼを有する微生物を用いた場合、反応終了後に菌体等を濾過してもよいが、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドは水溶液中で不安定であり、低温で濾過操作を行う必要がある。0～10℃程度で操作を行うことがより好ましい。

4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルの光学活性体をアミド化反応の基質として用いた場合、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドも光学活性体となるが、光学活性体のどちらか一方が過剰な状態であれば、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドの再結晶操作などを行えば光学純度を向上させることが可能である。またラセミ体の4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを製造した場合は、光学分割剤などを用いて光学活性な4-ハロ

10

20

30

40

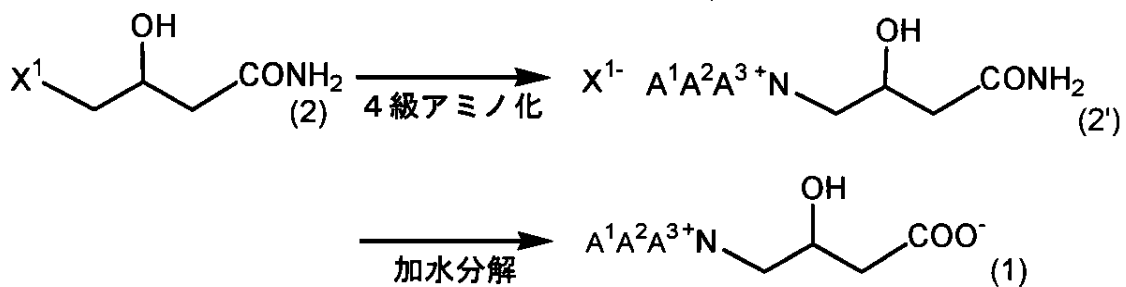
50

- 3 - ヒドロキシブタンアミドを得ることも可能である。

本発明で使用する上記式(2)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドは、精製したものを使用してもよく、ニトリルヒドラーゼを作用させた後の水溶液の状態でもよい。但し、前述のように4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドは水溶液中で不安定であり、単離精製を行うとさらなる反応を起こして収率の低下を招くことがある。この点、カラム精製等による単離精製は、複雑な上80%程度の単離精製収率であること、また最終生成物までのトータル収率を考慮すると、ニトリルヒドラーゼを作用させたあとの水溶液をそのまま使用することが好ましい。

前述のように4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドは水溶液中で不安定であることから、副反応を抑制するために4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドの製造終了後、48時間以内にトリアルキルアミンによる4級アミノ化反応に移ることがより好ましく、10時間以内であることが特に好ましい。またトリアルキルアミンと接触させるまで、反応終了液の温度は0~10℃に保つことが好ましい。

本発明において、下記式(1)で示されるベタインの製造方法は、下記式(2)で示されるアミドを4級アミノ化する工程と、アミド基を加水分解する工程とを含むことが好ましい。化合物(2)の加水分解反応は様々な副反応が起こるため、収率向上の観点から4級アミノ化工程を先に行って化合物(2')で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物を製造し、続いて加水分解工程を行う。



[式中、 X^1 、 A^1 、 A^2 及び A^3 は、上記の意味を有する。]

本発明において、上記式(2)で示されるアミドを4級アミノ化する工程において、トリメチルアミン、トリエチルアミン、トリブチルアミン等のトリアルキルアミン($NA^1A^2A^3$)を使用することが好ましい。本発明で使用するトリアルキルアミンは、無水の状態でも水溶液の状態でも構わない。

4級アミノ化反応において、上記式(2)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドの溶液を用いて反応を行う場合、その溶媒は特に限定されるものではないが、前記水性溶媒を用いることが好ましい。

4級アミノ化反応において、上記式(2)で示される4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドの溶液を用いて反応を行う場合、この反応の際に使用するトリアルキルアミンは、無水のトリアルキルアミンでもその水溶液でもどちらでも構わないが、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミド溶液の溶媒として、水と相溶性のある有機溶剤を用いた場合は、トリアルキルアミンの水溶液を用いた方が高収率と高反応速度をもたらすことが多いためより好ましく、水を単独で用いて反応を行う方が高収率と高反応速度をもたらすため、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドの水溶液、あるいは、4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルからニトリルヒドラーゼを作用させて4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを合成した反応あがりの水溶液をそのまま用いることが、特に好ましい。

水性溶媒中で4級アミノ化反応を開始する時は、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドにトリアルキルアミンを添加しても、トリアルキルアミンに4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを添加しても、どちらでも構わない。添加が完了した後に所定の温度へ上昇させることが好ましい。

4級アミノ化反応における4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドの濃度は、特に限定

されるものではないが、通常0.1～50%程度であり、1～20%程度がより好ましい。一方、トリアルキルアミンの使用量は、特に限定されるものではないが、通常4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドに対して1.0～20.0当量(モル)であり、1.1～8.0当量程度がより好ましい。反応温度は特に限定されるものではないが、通常-10～60程度であり、0～50程度がより好ましい。

またトリメチルアミンなどの沸点が低いトリアルキルアミンを使用する時は、トリアルキルアミンの揮発によるトリアルキルアミンの減少に注意を払うことが好ましい。特に反応に用いるトリアルキルアミンの当量数が、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドに対して1.2当量以下などの比較的低下当量である時、酸化しないように注意を払った場合とそうでない場合との4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の収率には顕著な違いが見られる。

10

4級アミノ化反応では褐色に着色することがある。この脱色のため、活性炭などによる脱色操作を行ってもよい。

以上のようにして合成した上記式(2')で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物は、抽出、カラム分離、再結晶、電気透析、イオン交換法等の定法に従い、単離精製することができる。

4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルまたは4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドの光学活性体を4級アミノ化反応の前駆体、若しくは基質として用いた場合、上記式(2')で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物も光学活性体となるが、光学活性体のどちらか一方が過剰な状態であれば、上記式(2')で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の再結晶操作などを行えば光学純度を向上させることが可能である。またラセミ体の4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物を製造した場合は、光学分割剤などを用いて光学活性な4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物を得ることも可能である。

20

4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドを基質として用い、水性溶媒中で4級アミノ化反応を行うと、これまで報告されたような4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルや4-ハロ-3-ヒドロキシ酪酸エステルの4級アミノ化反応と比較して、格段に4級アミノ化生成物の収率が高い。4級アミノ化反応は、ハロヒドリン化合物から脱塩酸反応が起こってエポキシ化合物が生成した後、トリアルキルアミンの求核攻撃により4級アミノ化物が生成する反応が主反応、クロトン酸誘導体への異性化反応が副反応であると想定される。このクロトン酸誘導体への異性化反応の起こりやすさが4級アミノ化生成物の収率の高低を左右し、異性化のし易さを決定するのは官能基の電子吸引性であると予想される。ニトリルやエステルといった官能基よりもアミドの方が電子吸引性が低く、クロトン酸誘導体への異性化反応が起こりにくい。このためエポキシ体 クロトン酸誘導体への異性化反応の割合が減少し、その分トリアルキルアミンの求核攻撃の割合が上昇して4級アミノ化生成収率が高くなったものと想定される。

30

本発明において、上記式(2')で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物を加水分解する工程において、加水分解反応の方法は特に限定されず、酸触媒、塩基触媒を用いた種々の公知の方法で行うことができる。例えば特公昭43-26849、特開昭55-13299にはシュウ酸を用いて加水分解反応を行う方法、特公昭43-26850にはn-亜硝酸ブチルと氷酢酸及び塩酸ガスを用いて加水分解する方法、特開平1-287065には、カルニチンニトリルクロライドから一貫してアルカリ金属水酸化物やアルカリ土類金属水酸化物などの塩基触媒を用いてニトリルアミドカルボン酸への加水分解する方法が示されている。また特開平04-320679にはカルニチンアミドをL-カルニチンに変換する酵素を用いる方法が示されているが、酸触媒、塩基触媒、酵素触媒のいずれの方法にも限定されるものではない。

40

4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の加水分解反応における主な副生成物は、脱水体であるクロトノベタインである。

4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の酸触媒による加

50

水分解反応では、このクロトノベタインの副生を抑える（対ベタインで0.1wt%以下）ことが可能であるが、反応速度が遅いために厳しい反応条件が必要である。使用される酸性物質としては、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸などの鉱酸や、酢酸、トリフルオロ酢酸などの比較的低碳素数の有機酸などが使用されるが、工業的によく使用される塩酸や硫酸を使用することが好ましい。

4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の塩基触媒による加水分解では、酸触媒の場合よりもクロトノベタインの生成量が多いが、塩基の種類によっては室温下でも効率よく加水分解反応を進めることができ、このような穏やかな反応条件下であればクロトノベタインの生成を抑える（対ベタインで1wt%以下程度）ことも可能である。また塩基触媒の場合は副生するアンモニアを気化除去できるため、加水分解後の中和の際に副生する塩を少なくすることが可能になる。使用される塩基性物質としては、アルカリ金属水酸化物、アルカリ土類金属水酸化物、アルカリ金属の炭酸塩または重炭酸塩、第3級アミン、第4級アンモニウムヒドロキシド、塩基性陰イオン交換樹脂などが挙げられ、具体的にはNaOH、KOH、Ca(OH)₂、Na₂CO₃、K₂CO₃、トリエチルアミン、NH₄OH、陰イオン交換樹脂IRA-400などが挙げられる。これらは単独で用いても、2種類以上を組み合わせ用いてもよい。特にNaOH、KOHは反応を室温下でも効率よく進めることができ、しかもクロトノベタインの副生が少ないので好ましい。

酸、塩基の使用量は、上記式(2')で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物に対して等モル以上になるように加えればよく、1.1~5.0当量程度がより好ましい。上記式(2')で示される4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の濃度は特に限定されないが、通常は1~50%程度で、5~30%程度がより好ましい。反応温度は特に限定されないが、通常は5~100℃が好ましい。酸触媒を用いた場合はクロトノベタインの生成は極めて少ないため、反応時間の観点から60~100℃が特に好ましい。また塩基触媒を用いた場合を鋭意検討した結果、クロトノベタインの副生量は反応温度に依存し、反応温度を低くしたほうが生成を抑えられることがわかった。よって塩基触媒を用いた場合は、クロトノベタインの副生を抑える観点から、10~60℃がより好ましい。

溶媒としては特に制限はないが、前記水性溶媒が好ましく、反応速度と副反応抑制の観点から水単独を溶媒として使用することが特に好ましい。また4級アミノ化反応を水性溶媒で行った場合は、そのまま水性溶媒で加水分解反応を行うことがより好ましい。

これまで述べてきた4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルのアミド化反応、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミドの4級アミノ化反応、4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の加水分解反応は、反応速度の観点からいずれも水性溶媒中で行うことが好ましい。特に、水単独を反応溶媒とすることでさらにその効果は顕著となる。また、エピハロヒドリンまたは1,3-ジハロ-2-プロパノールから4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリルを合成する反応も、通常は水性溶媒中で行われる。よって前述のすべての反応において水を単独で溶媒として用いると、出発原料からベタインまでワンポットで反応させることもできるため、より好ましい。

加水分解反応では、薄い褐色に着色することがある。また加水分解反応終了後の中和後にも着色することがある。この脱色のため、活性炭などによる脱色操作を行ってもよい。

上記のようにして得られたベタインは、抽出、カラム分離、再結晶、電気透析、イオン交換法等の定法に従い、単離精製することができる。

4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリル、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミド、4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物の光学活性体を加水分解反応の前駆体、若しくは基質として用いた場合、得られたベタインも光学活性体となるが、光学活性体のどちらか一方が過剰な状態であれば、ベタインの再結晶操作などを行えば光学純度を向上させることが可能である。またラセミ体のベタインを製造した場合は、光学分割剤などを用いることによって、光学活性なベタインを得ることも可能である。

4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミド、4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブ

タンアミドハロゲン化物およびベタインのいずれの段階でも再結晶操作などで光学純度を向上させることが可能であるが、各反応工程において副生成物が発生するため、ベタインまで製造してから精製を兼ねた再結晶操作などにより光学純度向上操作をまとめて行うことがより好ましい。

本発明において、光学活性なエピハロヒドリン、4-ハロ-3-ヒドロキシブチロニトリル、4-ハロ-3-ヒドロキシブタンアミド、4-トリアルキルアミノ-3-ヒドロキシブタンアミドハロゲン化物を製造または使用してベタインの製造を行った場合、光学純度を低下させることなく対応する光学活性なベタインを生成することができる。すなわち本発明は、光学活性なベタイン、特にL-カルニチンを製造する方法として有用である。

【実施例】

10

【0005】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこの例のみに限定されるものではない。

本発明において使用した各種定量分析方法について、分析方法詳細を以下に示す。

分析方法(1)

・ 分析対象化合物

◇ 1, 3-ジクロロ-2-プロパノール (以下DCPと略す)

◇ エピクロロヒドリン (以下ECHと略す)

20

◇ 4-クロロ-3-ヒドロキシブチロニトリル (以下CHBNと略す)

- ・ 試料調製方法 : 反応液を移動相に溶解
- ・ カラム : Inertsil ODS-3V, 4.6mm
I.D. x 250mm, 粒径5μm (GLサイエンス製)
- ・ カラムオープン温度 : 40
- ・ 移動相 : 水/アセトニトリル/りん酸 = 70/30/0.1、
1mL/min
- ・ 検出器 : 示差屈折計(RI)
- ・ 注入量 : 20μl
- ・ 保持時間 : DCP 15.7min
: ECH 11min
: CHBN 7.2min

30

分析方法(2)

・ 分析対象化合物

◇ 4-クロロ-3-ヒドロキシブチロニトリル (以下CHBNと略す)

◇ 4-クロロ-3-ヒドロキシブタンアミド (以下CHBAと略す)

◇ 4-ヒドロキシクロトンアミド (以下HCAmと略す)

40

- ・ 試料調製方法 : 反応液を移動相に溶解
- ・ カラム : Inertsil ODS-3V,
4.6mm I.D. x 250mm、粒径5μm
(GLサイエンス製)
- ・ カラムオープン温度 : 40
- ・ 移動相 : 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液、1mL/min
- ・ 検出器 : 示差屈折計(日本分光製RI-2031)
- ・ 注入量 : 20μl
- ・ 保持時間 : CHBN 11.0min

50

: CHBA 6.7 min

: HCAM 4.4 min

分析方法 (3)

- 分析対象化合物

- ◇ カルニチンアミドクロライド (以下Car-アミドと略す)

- ◇ カルニチンニトリルクロライド (以下Car-ニトリルと略す)

- ◇ カルニチン (以下Carと略す)

10

- 試料調製方法 : 反応液を移動相に溶解
- カラム : Shodex IC YK-421,
4.6 mm I.D. x 125 mm (GLサイエンス製)
- カラムオープン温度 : 40
- 移動相 : 3 mM HNO₃ aq / ATN = 4 / 6、1 mL / min
- 検出器 : 電気伝導度検出器 (CD-5) Shodex 製
- 注入量 : 20 μl
- 保持時間 : Car-アミド 10.2 min
: Car-ニトリル 8.9 min
: Car 7.9 min

20

分析方法 (4)

- 分析対象化合物

- ◇ カルニチン (以下Carと略す)

- ◇ クロトノベタイン (以下CBと略す)

- 試料調製方法 : 反応液を移動相に溶解
- カラム : Nucleosil 100-5N (CH₃)₂,
4.6 mm I.D. x 250 mm (GLサイエンス製)
- カラムオープン温度 : 40
- 移動相 : 50 mM KH₂PO₄ (pH = 4.7) aq / ATN
= 35 / 65、1 mL / min
- 検出器 : UV検出器 (205 nm) 日本分光製 UV-930
- 注入量 : 5 μl
- 保持時間 : Car 10.8 min
: CB 13.0 min

30

分析方法 (5) (R) - CHBN 光学純度測定法

(R) - CHBNの光学純度は、以下のようにして測定した。

(R) - CHBN 1 μl にジクロロメタン 20 μl、ピリジン 20 μl を加えた後、(R) - -メトキシ - - (トリフルオロメチル) フェニルアセチルクロライド (MTPA) 2 μl を添加し、そのまま室温で5時間撈拌を行った。反応終了液にジイソプロピルエーテル 300 μl を添加し、続いて1N HCl水溶液 350 μl を用いて洗浄し、有機層を回収した。さらに有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 350 μl で洗浄し、有機層を減圧乾燥、残渣をイソプロパノールに溶解させ、これをHPLCで分析を行った。

40

本分析に用いたHPLCシステムは以下の通りである。

- 分析対象化合物

- ◇ (R) - CHBN MTPAエステル

- ◇ (S) - CHBN MTPAエステル

50

- ・ カラム : Partisil - 5 (G L Science)
4 . 6 mm × 2 5 0 mm
- ・ カラムオープン温度 : 4 0
- ・ 移動相 : ヘキサン : イソプロパノール = 9 9 : 1、1 ml / min
- ・ 検出器 : UV 2 5 4 nm
- ・ 保持時間 : (R) - CHBN MTPAエステル : 1 1 . 9 min
: (S) - CHBN MTPAエステル : 1 3 . 0 min

分析方法 (6) L - カルニチンの光学純度測定

L - カルニチンの光学純度は、J . Pharm . Bio . Anal . , 1 4 (1 9 9 6) 1 5 7 9 - 1 5 8 4 に従い、以下のようにして測定した。

光学純度を測定したいカルニチン乾燥試料に、2 mg / ml の 9 - アントロイルニトリルの DMSO 溶液 1 ml と、0 . 1 mg / ml キヌクリジンのアセトニトリル溶液 1 ml を加えて溶解し、8 0 ° で 9 0 分間反応をさせる。室温まで冷却した後、シリカゲルカートリッジカラム (1 cc Bond Elut (Varian)) に乗せ、メタノール / アセトニトリル = 9 : 1 溶液 1 0 ml で未反応の 9 - アントロイルニトリル、キヌクリジンを洗い流す。続いて 5 ml の超純水を流し、得られた溶液を以下の HPLC で解析を行う。

- ・ 分析対象化合物

◇ L - カルニチン

◇ D - カルニチン

- ・ カラム : Ultron ES - OVM (信和化工社製)
2 . 0 mm × 1 5 0 mm
- ・ カラムオープン温度 : 4 0
- ・ 移動相 : アセトニトリル / 2 0 mM KH₂PO₄
(pH = 4 . 5) = 1 7 / 8 3
- ・ 流量 : 0 . 2 ml / min
- ・ 検出器 : UV 2 5 4 nm
- ・ 注入量 : 2 5 μ l
- ・ 保持時間 : L - カルニチン : 6 . 8 min
: D - カルニチン : 5 . 2 min

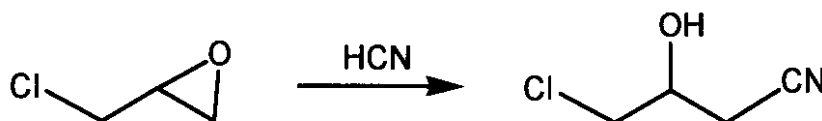
L - カルニチンの光学純度は上記 D , L - カルニチンの AREA から、下記式にて表される。

$$\text{光学純度 (\% ee)} = \frac{(\text{L - カルニチン AREA} - \text{D - カルニチン AREA})}{(\text{L - カルニチン AREA} + \text{D - カルニチン AREA})} \times 100$$

I . 4 - クロロ - 3 - ヒドロキシブチロニトリル (CHBN) 合成

[実施例 1]

エピクロロヒドリン + 青酸 CHBN 合成 (特開 2 0 0 2 - 2 4 1 3 5 7 参照)



攪拌機、温度計、ジムロート冷却管を備えた 3 L セパラブルフラスコに、エピクロロヒドリン 2 7 4 . 9 3 g (2 . 9 7 mol)、水 1 2 7 1 . 3 g、硫酸ナトリウム 1 9 1 . 7 5 g (1 . 3 5 mol) を仕込み、温水浴中で攪拌しながら内温 5 0 ~ 6 0 ° でシアン化水素 7 2 . 3 g (2 . 7 0 mol) を 1 時間かけて反応液中に直接供給した。その後、内温 5 0 ~ 6 0 ° で熟成を 6 時間行った。反応液を水浴で冷却した後、酢酸エチル 1 L で

10

20

30

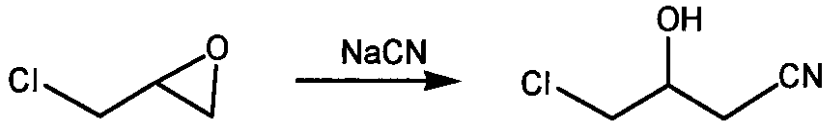
40

50

1 回抽出を行った。有機層を減圧下に濃縮し、CHBNの粗生成物を249.33 g 得た。GC分析の結果、純度80.9%、収率62.5%であった。上記の抽出CHBN(粗生成物)を単蒸留により精製を行い、精製品187.51 g を得た。

[実施例2]

エピクロロヒドリン + 青酸ナトリウム CHBN合成(特開2004-182607参照)

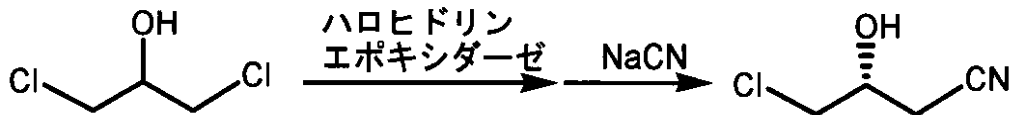


10

攪拌機、滴下漏斗、温度計、pH計を備えた密閉型のガラスフラスコに、窒素雰囲気下でエピクロロヒドリン262.3 g、水700 gを仕込み、攪拌下に40℃で反応液のpHが8となるように制御しながら30.6 wt%青酸ナトリウム水溶液432.3 g(2.7 mol)と65 wt%硫酸水溶液203.7 g(1.35 mol)を3時間かけて同時に滴下した。滴下後、攪拌下40℃で5時間反応させた。次いで、ガラスフラスコを密閉したまま酢酸エチル250 mlを加えて40℃で抽出操作を行った。内容物を分液漏斗に移して有機層を取得し、得られた有機層を減圧下50℃で濃縮し、さらに減圧蒸留を行ってCHBN190.6 gを得た。得られたCHBNの実得収率は58.1%であった。

[実施例3]

1,3-ジクロロ-2-プロパノール + 青酸ナトリウム CHBN合成



20

i) ハロヒドリンエポキシダーゼ発現形質転換微生物の培養

ハロヒドリンエポキシダーゼ活性を持つ大腸菌(*Escherichia coli*) JM109/pST111(FERM ABP-10922、特開平5-317066号参照)を、LB培地(1%バクトトリプトン、0.5%バクトイーストエキス、0.5% NaCl、1 mM IPTG、50 μg/mlアンピシリン)が100 mlずつ入れた500 ml容三角フラスコ、20本それぞれに植菌し、37℃で20時間振盪培養した。20本分の培養菌体を遠心分離により集菌し、集菌した菌体を50 mM トリス-硫酸緩衝液(pH 8.0)で洗浄し、50 mM トリス-硫酸緩衝液(pH 8.0)を20 gになるように加え、懸濁した。この菌体懸濁液0.25 gを50 mM トリス-硫酸緩衝液(pH 8.0)100 mlに加え、さらに50 mMとなるように1,3-ジクロロ-2-プロパノールを加え、20℃で10分間反応した。HPLCにより反応液中のエピクロロヒドリンの量を測定したところ、11 mMであった。

30

なお、pST111は、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*) sp. N-1074のハロヒドリンエポキシダーゼ遺伝子(hheB)を含むBamHI-PstI1.1 Kb断片をpUC118に結合させたプラスミドである。また、pST111は、特開平5-317066公報に記載されており、JM109/pST111は、受領番号FERM ABP-10922として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1-1-1中央第6)に平成3年3月1日付けで国際寄託されている。

40

ii) 1,3-ジクロロ-2-プロパノールからの(R)-CHBNの合成

pH電極、ならびにpHコントローラーにより制御されたアルカリ投入配管を装着した500 ml容フラスコに水170.6 g、1 mol/kg トリス-硫酸緩衝液(pH 8.0)33.5 g、6 mol/kg NaCN水溶液57.0 gを入れ、98%硫酸 1

50

5.5 gで、pH 8.0に調整した。1,3-ジクロロ-2-プロパノール 13.3 gを入れ、均一に溶解するまで攪拌した。

系内のpHを7.9~8.0に維持するよう、6 mol/kg NaCN水溶液を投入するようにpHコントローラーを設定し、i)で調製したハロヒドリンエポキシダーゼ活性を持つ菌体懸濁液 47.2 g (18.9 kU)を加え、20 で反応を開始した。

20 で系内のpHを7.9~8.0に維持しながら、反応開始直後より、1,3-ジクロロ-2-プロパノール 36.7 gを4.5時間かけて均等に滴下した。その後、20 で系内のpHを7.9~8.0に維持しながら、1.5時間(反応開始から6時間)反応させた。反応終了時、6 mol/kg NaCN水溶液は、54.4 g投入されており、反応液の全量は428.2 gであった。このとき、反応系内の1,3-ジクロロ-2-プロパノールの濃度は3.7% (15.8 g)であり、4-クロロ-3-ヒドロキシブチロニトリルの濃度は7.1% (30.4 g; 収率65.6%)であった。また、このときの4-クロロ-3-ヒドロキシブチロニトリルの光学純度は92% e eの(R)-体過剰であった。

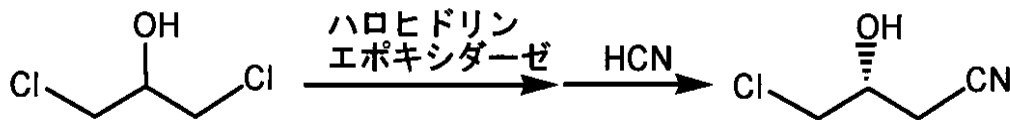
10

この反応液を塩酸でpH = 5.0に調節し、60、140 torrで減圧して11時間HCNの除去を行い、反応系内のHCNを硝酸銀で滴定、1 ppm以下であることを確認した。

[実施例4]

1,3-ジクロロ-2-プロパノール + 青酸 CHBN合成

20



i) ハロヒドリンエポキシダーゼ発現形質転換微生物の培養は実施例3と同様に行った。

ii) 1,3-ジクロロ-2-プロパノールからの(R)-CHBNの合成

pH電極、ならびにpHコントローラーにより制御されたアルカリ投入配管を装着した300 mL 4つ口フラスコに水 127.55 g、HCN 4.41 g (0.1632 mol)を入れ、30% NaOH 0.65 g (0.0049 mol)で、pH 7.5に調整した。1,3-ジクロロ-2-プロパノール 10.00 g (0.0775 mol)を入れ、均一に溶解するまで攪拌した。

30

上記i)の方法により調製したハロヒドリンエポキシダーゼ活性を持つ菌体懸濁液 20.00 gを加え、20 で反応を開始した。系内のpHを7.5~7.6に維持するよう、30% NaOHを投入するようにpHコントローラーを設定し、投入されたNaOHとほぼ等モルの割合で1,3-ジクロロ-2-プロパノール、HCNを追加していくことで、系内の1,3-ジクロロ-2-プロパノールの濃度を0.5 mol/kgを超えないよう、また、系内のシアニオン濃度を1.1 mol/kgを超えないようにした。

23時間後、4-クロロ-3-ヒドロキシブチロニトリルを0.753 mol/kg蓄積することができ、その光学純度は94.8% e . e .の(R)-体過剰であった。反応により消費された1,3-ジクロロ-2-プロパノールからの収率は96.3%であった。

40

この反応液を塩酸でpH = 5.0に調節し、60、140 torrで減圧して11時間HCNの除去を行い、反応系内のHCNを硝酸銀で滴定、1 ppm以下であることを確認した。

II. 4-クロロ-3-ヒドロキシブタンアミド合成

[実施例5]

本発明で使用したニトリルヒドラーゼは、以下のようにして調製した。

(培養及び反应用菌体液の調製方法)

ニトリルヒドラーゼ活性を有するロドコッカス ロドクロウス (Rhodococcus

50

s rhodochrous) J - 1 (FERM BP - 1478) を、30 L 容ジャーファーマンター (高杉製作所社製) にてグルコース 2 質量%、尿素 1 質量%、ペプトン 0.5 質量%、酵母エキス 0.3 質量%、塩化コバルト 0.05 質量% を含む、20 L の培地 (pH 7.0) に植菌し、温度 30 で好氣的に 60 時間培養した。上記の方法により培養して得た菌体を遠心分離により集菌し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.7) にて同量で 2 回洗浄後、懸濁し、反应用菌体液とした。

[実施例 6]

CHBN (実施例 1) CHBA 合成



10

実施例 1 で合成した精製品 CHBN : 16 g (134 mmol) を採取し、130 で 2 時間加熱を行った。冷却後、20 mM のリン酸バッファー (pH = 7.5) 84 g を加え、実施例 5 で調製した J - 1 菌を 200 μL 滴下し氷浴下 2 で反応を開始した。3 時間後 CHBN の転化率は 100% に達し、CHBA が 18.3 g (収率 99.3%) 生成していることを確認した。

上記反応終了液 50.1 g (CHBA 9.20 g 含有) を採取し、セライト 5 g を加えてエバポレーターで 40 で乾固した。残渣をシリカゲル 30 g の上に乗せ、酢酸エチル 400 g をキャリアーとして流して溶出させた。溶出した酢酸エチル溶液をエバポレーターで乾固し、CHBA の白色固体を 7.27 g (単離収率 79%) で得た。

20

[実施例 7]

CHBN (実施例 2) CHBA 合成

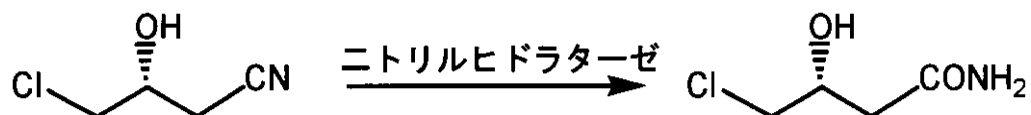


30

実施例 2 で合成した蒸留品 CHBN : 1.6 g (13.4 mmol) を採取し、20 mM のリン酸バッファー (pH = 7.5) 8.4 g を加え、CoCl₂ · 6H₂O の 1 mg / ml 水溶液を 388 μL 添加して 2 時間攪拌した後、実施例 5 で調製した J - 1 菌を 20 μL 滴下し氷浴下で反応を開始した。3 時間後 CHBN の転化率は 100% に達し、CHBA が 1.84 g (収率 99.8%) 生成していることを確認した。

[実施例 8]

CHBN (実施例 3) CHBA 合成



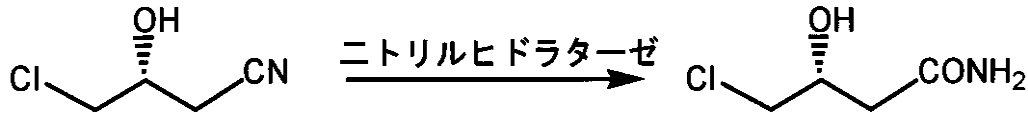
40

実施例 3 で合成した (R) - CHBN 水溶液 : 10.0 g ((R, S) - CHBN 濃度 16.7%、13.97 mmol 含有) を採取し、100 で 4 時間加熱を行った。冷却後、NaOH aq で中和して pH = 7.02 とし、実施例 5 で調製した J - 1 菌を 63 μL 滴下し氷浴下で反応を開始した。2 時間後 CHBN の転化率は 100% に達し、(R) - CHBA が 1.91 g (収率 99.4%) 生成していることを確認した。

[実施例 9]

CHBN (実施例 4) CHBA 合成

50



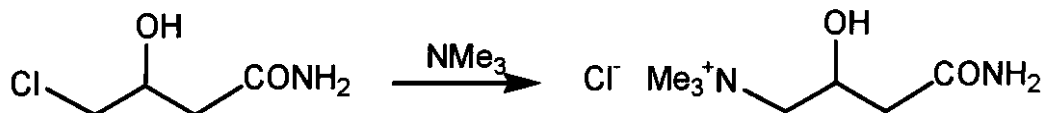
実施例 4 で合成した (R) - CHBN 水溶液 : 50.0 g ((R, S) - CHBN 濃度 14.0%、58.6 mmol 含有) を採取し、CoCl₂ · 6H₂O の 1 mg/ml 水溶液を 1.7 ml 添加した後、NaOH aq で中和して pH = 7.06 とし、2 時間攪拌した。その後実施例 5 で調製した J - 1 菌を 270 μL 滴下し氷浴下で反応を開始した。2 時間後 CHBN の転化率は 100% に達し、(R) - CHBA が 8.04 g (収率 99.7%) 生成していることを確認した。

10

III. CHBA の 4 級アミノ化反応 (カルニチンアミドクロライド合成)

[実施例 10]

CHBA (精製品) の 4 級アミノ化反応

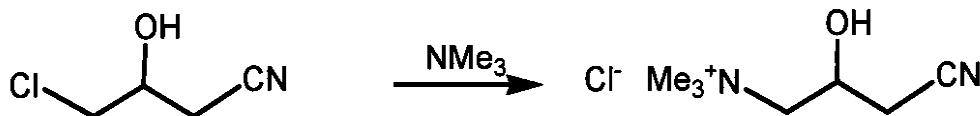


20

実施例 6 で合成した精製品 CHBA : 1.84 g (13.4 mmol) に純水を加えて 10.2 g にし、30% トリメチルアミン水溶液 3.15 g (16.0 mmol) を加え、30 で反応を開始した。4 時間後 CHBA の転化率は 100% に達し、Car - アミドが 2.48 g (収率 94.0%)、HCAM が 0.071 g (収率 5.2%) 生成していることを確認した。

[比較例 1]

CHBN (実施例 1 精製品) の 4 級アミノ化反応

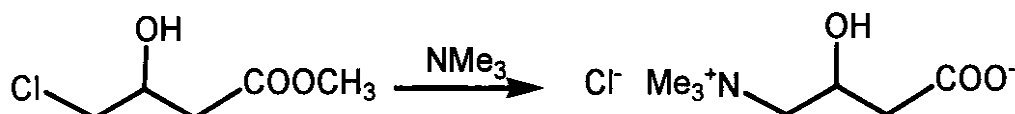


30

実施例 1 で合成した精製品 CHBN : 1.6 g (13.4 mmol) に純水を加えて 10.2 g にし、30% トリメチルアミン水溶液 6.60 g (33.5 mmol) を加え、30 で反応を開始した。7 時間後 CHBN の転化率は 100% に達し、Car - ニトリルが 1.56 g (収率 65.1%) 生成していることを確認した。

[比較例 2]

4 - クロロ - 3 - ヒドロキシ酪酸メチルの 4 級アミノ化反応



40

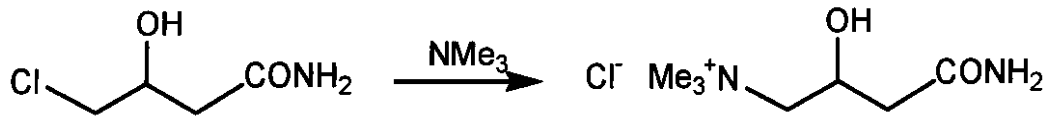
4 - クロロ - 3 - ヒドロキシ酪酸メチル : 2.0 g (13.1 mmol) に純水を加えて 10.0 g にし、30% トリメチルアミン水溶液 5.16 g (26.2 mmol) を加え、30 で反応を開始した。反応途中で β - ヒドロキシブチロラクトンが観測され、7 時間後 4 - クロロ - 3 - ヒドロキシ酪酸メチルの転化率は 100% に達した。この時エステルメチル基と β - ヒドロキシブチロラクトンが消滅していることを確認、Car が 0

50

．36 g (収率17.1%)生成していることを確認した。¹H, ¹³C-NMR測定により、Carの他に3,4-ジヒドロキシ酪酸が生成していることを確認した。

[実施例11]

CHBA(実施例7水溶液)の4級アミノ化反応

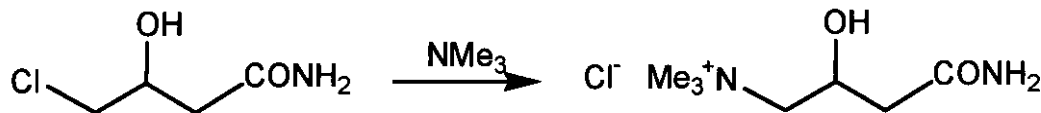


実施例7の反応終了液10.18 g (CHBA 1.84 g 含有)に30%トリメチルアミン水溶液21.15 g (107.3 mmol)を加え、30℃で反応を開始した。0.75時間後CHBAの転化率は100%に達し、Car-アミドが2.55 g (収率96.9%)、HCAMが0.057 g (収率4.2%)生成していることを確認した。

10

[実施例12]

CHBA(実施例9水溶液)の4級アミノ化反応

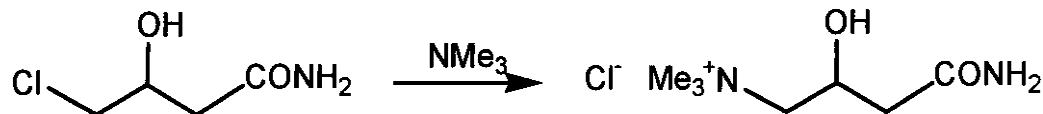


実施例9の反応終了直後26.0 g (CHBA 4.02 g 含有)を取り出し、ただちに30%トリメチルアミン水溶液8.3 g (35.0 mmol)を加え、30℃の水浴につけて反応を開始した。4時間後CHBAの転化率は100%に達し、Car-アミドが5.42 g (収率94.4%)、HCAMが0.15 g (収率5.0%)生成していることを確認した。

20

[実施例13]

CHBA(実施例9水溶液)の4級アミノ化反応



実施例9の反応終了直後、26.0 g (CHBA 4.02 g 含有)を取り出して20℃で15時間放置した。HPLC分析の結果、CHBAは2.84 gに減少していた。そのまま30%トリメチルアミン水溶液8.3 g (35.0 mmol)を加え、30℃の水浴につけて反応を開始した。4時間後CHBAの転化率は100%に達し、Car-アミドが3.84 g (収率94.6%)、HCAMが0.10 g (収率4.8%)生成していることを確認した。実施例9のアミド化反応終了直後のCHBA量(4.02 g)を基準にすると、Car-アミドの収率は66.8%、HCAMの収率は3.4%である。

30

40

以上4級アミノ化反応をまとめると以下ようになる。CHBAを基質として用いて4級アミノ化反応を用いる優位性は明らかである。

	基質	NMe ₃ 当量数	反応温度 (°C)	反応時間 (h)	4級アミノ化生 成物収率 (%)
実施例10	CHBA	1.19	30	4	94.0
実施例11	CHBA	7.98	30	0.75	96.9
実施例12	(R)CHBA	1.21	30	4	94.4
実施例13	(R)CHBA	1.70	30	4	94.6
比較例1	CHBN	2.50	30	7	65.1
比較例2	4-クロロ- 3-ヒドロキ シ酪酸メチル	2	30	7	17.1 (Car)

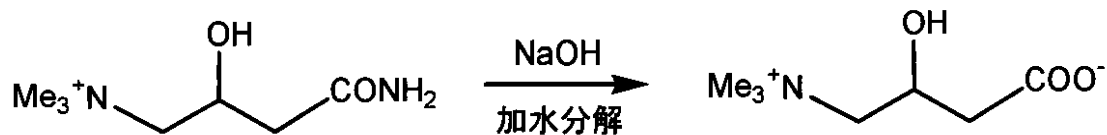
10

IV. カルニチンアミドクロライドの加水分解反応

20

[実施例14]

Car-アミド(実施例10水溶液)の加水分解反応

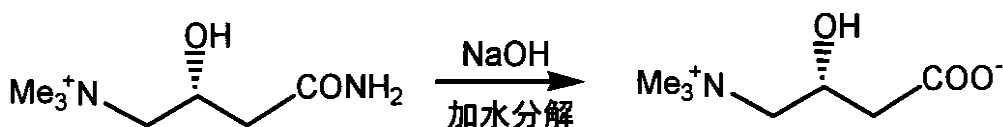


実施例10の反応終了液13.20g(Car-アミド2.45g含有)に30%NaOH aqを2.68g(20.0mmol)加え、50で反応を開始した。5時間後、Car-アミドの転化率は100%に達し、反応を終了した。系内をHCl aqで中和後、エバポレーターで減圧して水を除去し、次いでエタノール10mlを加えてさらに水を共沸除去させた。このエタノールによる水の共沸除去操作を計3回行い、析出した白色固体に再度エタノール10mlを加えてよく攪拌する。溶けない白色固体はNaClであり、これを吸引濾過で濾別して濾液中のCarを定量すると、Car1.94g(収率96.6%)、CB0.03g(対Car1.5wt%)が生成していることがわかった。

30

[実施例15]

Car-アミド(実施例12) Car合成



40

実施例12の反応終了液16.37g(Car-アミド2.59g含有)に48%NaOH aqを2.2g(26.4mmol)加え、30で反応を開始した。8時間後、Car-アミドの転化率が80%に達した後40に昇温して、さらに6時間反応をさせたところ、Car-アミドの転化率が100%に達し、反応を終了した。系内をHCl aqで中和後、反応液中中の(L)-CarとCBを定量すると、(L)-Carが2.09g(収率98.5%)、CBが0.015g(対Car0.7%)生成していることがわか

50

った。この水溶液の一部を採取して乾燥させ、Carの光学純度を測定したところ、94.2% e.e.であった。

[実施例16]

Car-アミド(実施例12) Car合成



実施例12の反応終了液16.37g(Car-アミド2.59g含有)に36% HCl aqを4.01g(39.6mmol)加え、80℃で反応を開始した。8時間後、Car-アミドの転化率が100%に達し、反応を終了した。系内をNaOH aqで中和後、反応液中の(L)-CarとCBを定量すると、(L)-Car 2.11g(収率99.4%)、CB 0.001g(収率0.05%)が生成していることがわかった。この水溶液の一部を採取して乾燥させ、Carの光学純度を測定したところ、94.5% e.e.であった。

10

【産業上の利用可能性】

【0006】

本発明により、ベタインの製造方法が提供される。本発明は、副反応を従来よりも大幅に防ぎ、カルニチン等のベタインを高収率で得ることができる点で有用である。

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 13/00 (2006.01) C 1 2 P 13/00

(74)代理人 100119183

弁理士 松任谷 優子

(72)発明者 大石 康介

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社 横浜技術研究所内

(72)発明者 佐藤 栄治

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社 横浜技術研究所内

(72)発明者 森 浩幸

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社 横浜技術研究所内

(72)発明者 吉岡 彰

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱レイヨン株式会社 横浜技術研究所内

審査官 吉住 和之

(56)参考文献 特開平01-287065(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

CA/REGISTRY(STN)