(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
2024年9月26日(26.09.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/195653 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 13/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/009781

(22) 国際出願日： 2024年3月13日(13.03.2024)

(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 2023-043453 2023年3月17日(17.03.2023) JP

(71) 出願人: 三菱ケミカル株式会社(**MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目１番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 加納 誠(**KANO Makoto**); 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目１番１号 三菱ケミカル株式会社内 Tokyo (JP). 山口 隆文(**YAMAGUCHI Takafumi**); 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目１番１号 三菱ケミカル株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 田 ▲ 崎 ▼ 聡, 外 (**TAZAKI Akira** et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING AMIDE COMPOUND

(54) 発明の名称： アミド化合物の製造方法

(57) **Abstract:** The present invention provides a method in which a biocatalyst is used to efficiently produce an amide compound from a nitrile compound, and which produces an amide compound aqueous solution having low foamability. Provided is a method for producing an amide compound by performing a hydration reaction of a nitrile compound in the presence of a biocatalyst having nitrile hydratase activity, wherein the pH of a reaction liquid is raised during the hydration reaction. In one example, the hydration reaction is performed in a manner such that the pH of the reaction liquid in the latter half of the reaction, in which the content of the amide compound with respect to the total amount of the reaction liquid is not less than 40 mass%, is set higher than the pH of the reaction liquid in the first half of the reaction, in which the content of the amide compound is less than 40 mass%.

(57) 要約：生体触媒を用いて効率良くニトリル化合物からアミド化合物を製造し、且つ、発泡性が低いアミド化合物水溶液を製造する方法を提供する。ニトリルヒドラターゼ活性を有する生体触媒の存在下にニトリル化合物を水和反応させてアミド化合物を製造する方法において、水和反応の途中で反応液のｐＨを上昇させる。一例では、前記反応液の総質量に対する前記アミド化合物の含有量が４０質量％未満である反応前半における前記反応液のｐＨよりも、前記アミド化合物の含有量が４０質量％以上となった反応後半における前記反応液のｐＨを高く設定して水和反応を行う。

WO 2024/195653 A1

明　細　書

発明の名称 ： アミド化合物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ニトリルヒドラターゼ活性を有する生体触媒を用いてニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法に関する。

本願は、２０２３年３月１７日に、日本に出願された特願２０２３－０４３４５３号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 近年、生体触媒を利用して化合物を製造する方法は、反応条件が温和であること、反応プロセスが簡略化できること、及び副生成物が少ないことで反応生成物の純度が高いこと等の利点があるため、多くの化合物の製造に用いられている。

アミド化合物の製造においても、ニトリル化合物からアミド化合物に変換する酵素、ニトリルヒドラターゼが見出されて以来、盛んに生体触媒の利用が検討されている（特許文献１～６等）。また、プロセスも盛んに研究されており、回分反応、半回分反応、多槽連続反応、パイプリアクター等、多数の提案が行われている。

[0003] 例えば、特許文献５には、反応熱を効率的に除熱するための、冷却水温度と反応温度の差が開示されており、エネルギーコストを低減することにより、低コストでアミド化合物を製造する方法が示されている。

また、特許文献６には反応時のアクリロニトリルの揮発を防ぎつつ、効率的な反応液の混合を行える、撹拌動力やフルード数が開示されており、低コストで省ニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法が示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開平１１－１２３０９８号公報

特許文献2：特開平７－２６５０９１号公報

特許文献3：特公昭５６－３８１１８号公報

特許文献4：特開平１１－８９５７５号公報

特許文献5：国際公開第２０１０／０３８８３２号

特許文献6：国際公開第２００９／１１３６５４号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、生体触媒を工業的に利用するには、低コストでアミド化合物を製造するだけでなく、製造されたアミド化合物が一定の品質を満たすことが望まれている。生体触媒法により製造されたアミド化合物水溶液には、不純物として生体触媒由来のタンパク質が含まれるため、得られたアミド化合物水溶液は発泡し易いという問題がある。そのため、アミド化合物水溶液を移液、運搬、貯蔵する際の取り扱いが難しくなる。さらに、アミド化合物を重合させてアミド化合物系重合体を得る際に、発泡によりアミド化合物水溶液が重合釜から溢流し、アミド化合物系重合体の収率が低下するという問題があった。

特許文献１～６の方法では、不純物であるタンパク質によるアミド化合物水溶液の発泡を充分に抑制するこができない。

[0006] 本発明は、発泡性が低いアミド化合物水溶液を製造する方法を提供することを、主な目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、従来技術の問題点に鑑みて鋭意研究を重ねた結果、水和反応の途中で反応液のｐＨを上昇させることにより、得られたアミド化合物水溶液の発泡を抑制できることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、以下の［１］～［８］に関する。

[0008] ［１］ ニトリルヒドラターゼ活性を有する生体触媒の存在下にニトリル化合物を水和反応させてアミド化合物を製造する方法において、

前記水和反応の途中で反応液のｐＨを上昇させる、アミド化合物の製造方法。

［２］　反応途中で前記反応液のｐＨを反応開始時におけるｐＨよりも上昇させる、［１］に記載のアミド化合物の製造方法。

［３］　前記反応液の総質量に対する前記アミド化合物の含有量が４０質量％未満である反応前半の少なくとも一部における前記反応液のｐＨよりも、前記アミド化合物の含有量が４０質量％以上となった反応後半における前記反応液のｐＨを高く設定して水和反応を行う、［１］又は［２］アミド化合物の製造方法。

［４］　前記反応液のｐＨを０．３～１．５上昇させる、［１］～［３］のいずれかに記載のアミド化合物の製造方法。

［５］　反応開始時における前記反応液のｐＨが６．６～７．５である、［１］～［４］のいずれかに記載のアミド化合物の製造方法。

［６］　前記反応前半における前記反応液のｐＨを６．６～７．５、前記反応後半における前記反応液のｐＨを７．５以上８．５未満に設定して水和反応を行う、［３］～［５］のいずれかに記載のアミド化合物の製造方法。

［７］　前記ニトリル化合物がアクリロニトリル又はメタクリロニトリルである、［１］～［６］のいずれかに記載のアミド化合物の製造方法。

［８］　前記アミド化合物がアクリルアミド又はメタクリルアミドである、［１］～［６］のいずれかに記載のアミド化合物の製造方法。

発明の効果

[0009]　本発明の方法によれば、生体触媒を用いてニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法において、水和反応の途中で反応液のｐＨを上昇させることにより、得られた反応液、すなわちアミド化合物水溶液の発泡を抑えることができるため、反応液の取り扱いが容易になる。

発明を実施するための形態

[0010]　本明細書において「～」で表される数値範囲は、「～」の前後の数値を下限値及び上限値として含む数値範囲を意味する。

本明細書に開示する含有量、種々の物性値、性状値の数値範囲は、その下限値及び上限値を任意に組み合わせて新たな数値範囲とすることができる。

[0011] 実施形態に係るアミド化合物の製造方法は、ニトリルヒドラターゼ活性を有する生体触媒の存在下にニトリル化合物を水和反応させてアミド化合物を製造する方法である。本態様の実施形態の一例にあっては、水和反応の途中で反応液のｐＨを上昇させる。

以下、本態様の実施形態の一例を説明する。

[0012] （１）ニトリルヒドラターゼ活性を有する生体触媒

本実施形態において、ニトリルヒドラターゼとは、ニトリル化合物を加水分解して、対応するアミド化合物を生成する能力を持つ酵素をいう。ニトリルヒドラターゼ活性を有する生体触媒はニトリルヒドラターゼタンパク質そのものでもよいが、ニトリルヒドラターゼを含んだ動物細胞、植物細胞、細胞小器官、又は微生物の菌体、及びそれらの処理物でもよい。

[0013] 前記処理物としては、動物細胞、植物細胞、細胞小器官又は、微生物の菌体を破砕した破砕物、又は菌体から抽出された酵素（素酵素又は精製酵素）；動物細胞、植物細胞、細胞小器官、微生物の菌体又は酵素自体を担体に固定化したもの；等が挙げられる。

また、前記処理物には、薬剤処理により増殖能を失わせた、動物細胞、植物細胞、細胞小器官又は、微生物の菌体も含まれる。薬剤処理により増殖能を失わせた微生物の菌体は「死滅化菌体」と呼ばれることもある。

[0014] 固定化方法としては、包括法、架橋法、担体結合法、等が挙げられる。包括法とは、高分子被膜によって被覆する方法である。架橋法とは、酵素を２個又はそれ以上の官能基を持った試薬、すなわち多官能性架橋剤で架橋する方法である。担体結合法とは、水不溶性の担体に酵素を結合させる方法である。

[0015] 固定化に用いる担体としては、例えば、ガラスビーズ、シリカゲル、ポリウレタン、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、カラーギナン、アルギン酸、寒天及び、ゼラチン等が挙げられる。

[0016] このような微生物の代表例としては、例えばニトリルヒドラターゼ活性を持つロドコッカス（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｕｓ）属、ゴルドナ（Ｇｏｒｄｏｎａ

）属、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属、シュードノカルディア（Ｐｓｅｕｄｏｎｏｃａｒｄｉａ）属、ジオバチルス（Ｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ）属、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属、バクテリジューム（Ｂａｃｔｅｒｉｄｉｕｍ）属、マイクロコッカス（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ）属、ブレビバクテリウム（Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ノカルディア（Ｎｏｃａｒｄｉａ）属、ミクロバクテリウム（Ｍｉｃｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）属、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、アシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）属、キサントバクター（Ｘａｎｔｈｏｂａｃｔｅｒ）属、ストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）属、リゾビウム（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ）属、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）属、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）属、エルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）属、パントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）属、キャンディダ（Ｃａｎｄｉｄａ）属、エアロモナス（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ）属、シトロバクター（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）属、アクロモバクター（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ）属等に属する微生物が挙げられる。

[0017] より詳細には、特公昭５６－１７９１８号公報に記載のノカルディアｓｐ．Ｎ－７７５、特公平０６－５５１４８号公報に記載のロドコッカス・ロドクロウス（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ　ｒｈｏｄｏｃｈｒｏｕｓ）Ｊ－１、国際公開第２００５／０５４４５６号に記載のロドコッカス・ロドクロウスＮＣＩＭＢ４１１６４株、特開平０５－３０９８２号公報に記載のクレブシエラｓｐ．ＭＣＩ２６０９、特開平０５－３０９８３号公報に記載のエアロモナスｓｐ．ＭＣＩ２６１４、特開平０５－３０９８４号公報に記載のシトロバクター・フロンディ（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ　ｆｒｅｕｎｄｉｉ）ＭＣＩ２６１５、特開平０５－１０３６８１号公報に記載のアグロバクテリウム・リゾゲネス（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｒｈｉｚｏｇｅｎｅｓ）ＩＡＭ１３５７０及びアグロバクテリウム・トゥメファシエンス（Ａｇｒｏｂａ

ｃｔｅｒｉｕｍ　ｆａｃｉｅｎｓ）、特開平０５－１６１４９５号公報に記載のキサントバクター・フラブス（Ｘａｎｔｈｏｂａｃｔｅｒ　ｆｌａｖａｓ）ＪＣＭ１２０４、エルウィニア・ニグリフルエンス（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｎｉｇｒｉｆｌｕｅｎｓ）ＭＡＦＦ０３－０１４３５、特開平０５－２３６９７５号公報に記載のエンテロバクターｓｐ．ＭＣＩ２７０７、特開平０５－２３６９７６号公報に記載のストレプトマイセスｓｐ．ＭＣＩ２６９１、特開平０５－２３６９７７号公報に記載のリゾビウムｓｐ．ＭＣＩ２６１０、リゾビウムｓｐ．ＭＣＩ２６４３、リゾビウム・ロティ（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｌｏｔｉ）ＩＡＭ１３５８８、リゾビウム・レグミノサーラム（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｌｅｇｍｉｎｏｓａｒｕｍ）ＩＡＭ１２６０９及びリゾビウム・メリオティ（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｍｅｒｉｏｔｉ）ＩＡＭ１２６１１、特開平０５－１５３８４号公報に記載のキャンディダ・グイリエモンディ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｇｕｉｌｌｉｅｒｍｏｎｄｉｉ）ＮＨ－２、パントエア・アグロメランス（Ｐａｎｔｏｅａ　ａｇｇｌｏｍｅｒａｎｓ）ＮＨ－３及びクレブシエラ・ニュウモニアエ・スブスピーシス・ニュウモニアエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）ＮＨ－２６Ｔ２、特開平０６－１４７８６号公報に記載のアグロバクテリウム・ラジオバクター（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｒａｄｉｏｂａｃｔｅｒ）ＳＣ－Ｃ１５－１、特開平０７－２５４９４号公報に記載のバチルス・スミシー（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｍｉｔｈｉｉ）ＳＣ－Ｊ０５－１、特開平０８－５６６８４号公報に記載のシュードノカルディア・サーモフィラ（Ｐｓｅｕｄｏｎｏｃａｒｄｉａ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌａ）ＡＴＣＣ１９２８５、特開平０９－２７５９７８号公報に記載のシュードノカルディア・サーモフィラ（Ｐｓｅｕｄｏｎｏｃａｒｄｉａ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌａ）ＪＣＭ３０９５等を挙げることができる。

[0018] 特公平０６－５５１４８号公報に記載されるロドコッカス・ロドクロウスＪ－１株は、受託番号「ＦＥＲＭ　ＢＰ－１４７８」として、１９８７年９月１８日に独立行政法人製品評価技術基盤機構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（以下、本明細書において同様））に寄託されている。

[0019] 国際公開第２００５／０５４４５６号に記載のロドコッカス・ロドクロウスＮＣＩＭＢ４１１６４株は、２００３年３月５日にＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ，Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｍａｒｉｎｅ Ｂａｃｔｅｒｉａ，Ｌｔｄ.（ＮＣＩＭＢ）（ＮＣＩＭＢ Ｌｔｄ Ｆｅｒｇｕｓｏｎ Ｂｕｉｌｄｉｎｇ Ｃｒａｉｂｓｔｏｎｅ Ｅｓｔａｔｅ Ｂｕｋｓｂｕｒｎ Ａｂｅｒｄｅｅｎ ＡＢ２１ ９ＹＡ）に受託番号ＮＣＩＭＢ４１１６４として寄託されている。

[0020] 特開平０９－２７５９７８号公報に記載されるシュードノカルディア・サーモフィラ（Ｐｓｅｕｄｏｎｏｃａｒｄｉａ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌａ ＪＣＭ３０９５）は、受託番号「ＦＥＲＭ ＢＰ－５７８５」として、１９９６年２月７日に独立行政法人製品評価技術基盤機構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）に寄託されている。

[0021] 本実施形態においては、前記微生物から選択される望ましい特性を有する１種を単独で、又は２種類以上を組み合わせて用いることができる。

[0022] ニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子は、通常の分子生物学的手法によって微生物細胞内に導入及び発現可能である。これらの分子学的手法については、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，“Ｍｏｌｅｒｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照することができる。すなわち、本実施形態においては、天然のニトリルヒドラターゼ（野生型）又はその変異体（改良型）をコードする核酸を微生物細胞内で発現させて得られる酵素を用いることもできる。

[0023] 本実施形態においては、前記酵素から選択される１種を単独で又は、２種以上を組み合わせて用いることができる。

[0024] 野生型ニトリルヒドラターゼのアミノ酸配列はＧｅｎＢａｎｋ（ｈｔｔｐ

：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／）等のＮＣＢＩのデータベースに公表されている。

例えば、ロドコッカス・ロドクロウスＪ１（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１４７８）由来のαサブユニットのアクセッション番号（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．）は「Ｐ２１２１９」であり、βサブユニットのアクセッション番号は「Ｐ２１２２０」である。また、ロドコッカス・ロドクロウスＭ８（ＳＵ１７３１８１４）由来のαサブユニットのアクセッション番号は「ＡＴＴ７９３４０」であり、βサブユニットのアクセッション番号は「ＡＡＴ７９３３９」である。さらに、シュードモナス・サーモフィラ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌａ）ＪＣＭ３０９５由来のαサブユニットのアクセッション番号は「１ＩＲＥＡ」であり、βサブユニットのアクセッション番号は「１ＩＲＥＢ」である。

[0025] 野生型のニトリルヒドラターゼ遺伝子が導入された形質転換体としては、アクロモバクター（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ）属のニトリルヒドラターゼで形質転換した大腸菌ＭＴ１０７７０（ＦＥＲＭ　Ｐ－１４７５６）（特開平８－２６６２７７号公報）、シュードノカルディア（Ｐｓｅｕｄｏｎｏｃａｒｄｉａ）属のニトリルヒドラターゼで形質転換した大腸菌ＭＴ１０８２２（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５７８５）（特開平９－２７５９７８号公報）、又はロドコッカス・ロドクロウス（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ　ｒｈｏｄｏｃｈｒｏｕｓ）種のニトリルヒドラターゼ（特開平４－２１１３７９号公報）で形質転換した微生物が例示されるが、これらには限定されない。

[0026] 野生型ニトリルヒドラターゼにアミノ酸置換を施した改良型（変異型）ニトリルヒドラターゼが知られている（特開２０１０－１７２２９５号公報、特開２００７－１４３４０９号公報、特開２００７－０４３９１０号公報、特開２００８－２５３１８２号公報、特開２０１９－０８８３２６号公報、特開２０１９－０８８３２７号公報、国際公開第２００５／１１６２０６号、国際公開第２０１２／１６４９３３号、国際公開第２０１２／１６９２０３号、国際公開第２０１５／１８６２９８号等）。

本実施形態の方法においては、これらの改良型ニトリルヒドラターゼが導入された微生物を使用することもできる。

[0027] これらニトリルヒドラターゼ活性を有する微生物、又はその処理物は、菌体の調製直後にアミド合成反応に用いることは勿論、菌体の調製後に保管し、必要に応じてアミド合成反応に使用することもできる。菌体を調製するための微生物の培養方法は、微生物の種類に応じて適宜選択できる。本培養の前に種培養を行ってもよい。

ニトリルヒドラターゼ活性を有する微生物の菌体又は、その処理物は、回分反応に使用することもでき、連続反応に使用することもできる。また、反応形式は流動床、固定床、懸濁床等、適切な形式を選択できる。その際の反応液中での生体触媒温度は、水性媒体とニトリル化合物の混合に支障をきたさない限り、特に限定されるものではない。

[0028] （２）ニトリル化合物

本実施形態の製造方法において原料として使用されるニトリル化合物は、ニトリルヒドラターゼ活性を有する生体触媒によりアミド化合物へ変換される化合物であれば特に限定されない。例えばアセトニトリル、プロピオニトリル、サクシノニトリル、アジポニトリルのような脂肪族飽和ニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリルのような脂肪族不飽和ニトリル、ベンゾニトリル、フタロジニトリルのような芳香族ニトリル及びニコチノニトリルのような複素環式ニトリルが挙げられる。本実施形態におけるニトリル化合物は、好ましくはアセトニトリル、プロピオニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、ｎ－ブチロニトリル、イソブチロニトリル等の炭素原子数２～４のニトリル化合物であり、特に本実施形態が効果を示すのは、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、アセトニトリルである。

[0029] （３）原料水

原料として使用する水（原料水）は、アクリルアミドを生成する際に、アクリロニトリルとの水和反応に利用されるものである。水としては、純水；酸、塩類等を水に溶解した水溶液等が挙げられる。酸としては、リン酸、酢

酸、クエン酸、ホウ酸、アクリル酸、ギ酸等が挙げられる。塩類としては、前記酸のナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩等が挙げられる。水の具体例としては、特に限定されるものではないが、例えば、純水、超純水、市水等の水；トリス緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等の緩衝液が挙げられる。原料水の２０℃におけるｐＨは、５～９が好ましい。

[0030] （４）生体触媒を用いた、ニトリル化合物からアミド化合物の製造

本実施形態にかかる、ニトリルヒドラターゼ活性を有する生体触媒を用いてニトリル化合物からアミド化合物を製造する方法は、以下の（ｉ）～（ｉｉｉ）のいずれの反応を適用することもできる。

（ｉ）生体触媒、アクリロニトリル、原料水を含む反応原料を反応器に一度に全量仕込んでから反応させる方法（回分反応）

（ｉｉ）反応原料の一部を反応器に仕込んだ後、連続的又は間歇的に残りの反応原料を供給して反応させる方法（半回分反応）

（ｉｉｉ）反応原料の連続的又は間歇的な供給と、反応原料及び生成したアクリルアミドを含む反応混合物の連続的又は間歇的な取り出しとを行いながら、反応器内の反応混合物を全量抜き出すことなく連続的に製造する方法（連続反応）

[0031] 反応器の形式は、特には限定されず、例えば、撹拌型、固定層型、流動層型、移動層型、塔型及び管型等、種々の形式の反応器を用いることができる。これらの中でも、原料の分散及び混合を促進できる撹拌型が好ましい。形式の異なる反応器を組み合わせて連結することもできる。

[0032] 多槽連続反応で使用する装置は、直列に連結された２以上の反応槽を備え、各反応器内における生体触媒を用いた連続反応によってニトリル化合物と水からアミド化合物を製造するものである。より詳細には、連続反応装置では、最も上流に位置する反応器及びこれに連結された反応槽に初めて反応させる原料を添加して反応を開始させ、反応液を順次下流側に位置する反応槽へ移動させながら反応を進行させる。そして、最も下流に位置する反応槽か

ら生成したアミド化合物を含む反応液、すなわち目的のアミド化合物水溶液を回収すればよい。回収した反応液から生体触媒を分離して、再度、反応槽へ供給してもよい。

[0033] 反応器（反応槽）の数は特には限定されず、反応条件等に応じて適宜選択することができる。例えば、２～２０個が好ましく、２～１２個がより好ましく、２～１０個がさらに好ましい。反応器には、必要に応じて並列的に連結されたものが存在しても構わない。反応器は、それぞれが独立したものであってもよく、大きな反応器を隔壁により複数に仕切ったものであってもよい。隔壁により仕切られた反応器である場合、隔壁で分けられたそれぞれの空間を１つの反応器とみなす。

[0034] ニトリル化合物、生体触媒、原料水及びその他の助剤等の供給を行う槽は、最上流の１槽に限定されず、１槽であっても２槽以上の複数の槽であってもよい。後半（下流）の槽は反応の押切リ、熟成に用いられ、最下流の槽（最終槽）又はその上流に存在する槽から生成物を含む反応液を抜き出すことができる。

原料の供給を行う槽の数、熟成等を行う槽の数は、反応条件、反応規模等に応じて適宜選択することができる。

[0035] 撹拌装置としては撹拌翼が好ましい。撹拌翼の形状も特には限定されるものではなく、例えば、パドル、ディスクタービン、プロペラ、ヘリカルリボン、アンカー、ファウドラー等が挙げられる。

[0036] 反応液中には、炭素原子数２以上の水溶性モノカルボン酸塩を添加することができる。水溶性モノカルボン酸塩を添加するタイミングは特には限定されず、最も上流側に位置する反応器中に添加し、当該反応液中に含まれる水溶性モノカルボン酸塩が反応液とともに下流側に移動することにより、各反応器中の反応液に含まれるようにすることもできる。また、反応を開始する前、又は反応を開始した後に、各反応器中に添加してもよい。

[0037] 炭素原子数２以上の水溶性モノカルボン酸塩を添加することにより、反応液中でのアクリルアミドの安定性を向上させることができる。

水溶性モノカルボン酸塩は、飽和モノカルボン酸塩及び不飽和モノカルボン酸塩のいずれでもよい。飽和カルボン酸としては、酢酸、プロピオン酸、ｎ－カプロン酸等が挙げられる。不飽和カルボン酸としてはアクリル酸、メタクリル酸、等が挙げられる。塩としては、前記飽和モノカルボン酸又は不飽和モノカルボン酸のナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩が挙げられる。これらの水溶性モノカルボン酸塩は、１種を単独で使用することもできるし、２種以上を併用することもできる。

水溶性モノカルボン酸塩の添加量は、生成するアクリルアミドに対し、酸として２０～５０００ｍｇ／ｋｇが好ましい。

[0038] ＜反応液のｐＨ制御＞

本実施形態において、アクリロニトリルを水和してアクリルアミドを生成させる反応液のｐＨに関して、水和反応の途中で反応液のｐＨを上昇させる。水和反応の途中で反応液のｐＨを上昇させることにより、得られたアミド化合物水溶液の発泡を抑制し、発泡性を低くすることができるため、反応液の取り扱いが容易になる。

反応液のｐＨ測定方法は、公知の方法を採用でき、例えば、指示薬法、金属電極法、ガラス電極法、半導体センサ法等が挙げられる。本実施形態においては、工業的に広く利用されているガラス電極法による測定が好ましい。

[0039] 実施形態の一例では、例えば、水和反応の途中で、反応液のｐＨを、反応開始時におけるｐＨよりも上昇させる。

反応開始時における反応液のｐＨは、例えば６．６～７．５とすることができ、６．８～７．５とすることが好ましく、６．９～７．４とすることがより好ましく、７．０～７．３とすることが更に好ましい。反応開始時における反応液のｐＨを前記範囲内とすることにより、効率良くニトリル化合物からアミド化合物を得ることができる。

反応液のｐＨを上昇させる際のｐＨの上昇幅は、０．３～１．５が好ましく、０．４～１．４がより好ましく、０．５～１．２がさらに好ましい。ｐＨの上昇幅が前記範囲内であれば、得られたアミド化合物水溶液の発泡を抑

制しやすく、また水和反応の効率を向上させる効果が高い傾向がある。

[0040] 好適例では、反応前半における反応液のｐＨよりも反応後半の少なくとも一部におけるｐＨを高く設定して水和反応を行う。

ここで、「反応前半」とは、「反応開始時点から反応液中のアミド化合物の濃度が４０質量％未満まで」を指し、「反応後半」とは、「反応液中のアミド化合物の濃度が４０質量％以上又は４０％を超えた時点以降」を指す。換言すると、反応液の総質量に対する生成物のアミド化合物の含有量が４０質量％未満である期間を反応前半といい、反応液の総質量に対する生成物のアミド化合物の含有量が４０質量％以上又は４０質量％超の期間を反応後半という。反応液の総質量は、着目する反応槽に入っている反応液全体の質量をいい、アミド化合物やニトリル化合物の質量を含む。

[0041] 反応後半の少なくとも一部における反応液のｐＨを反応前半における反応液のｐＨよりも高くすることにより、反応効率を下げることなく反応を行うことができ、更に得られたアミド化合物水溶液の発泡を抑制し、発泡性を低くすることができるので、反応液の取り扱いが容易になる。

反応後半における反応液のｐＨは、反応後半の一部だけで反応前半における反応液のｐＨよりも高くしてもよく、反応後半の全体にわたって反応前半における反応液のｐＨよりも高くしてもよい。なかでも、得られたアミド化合物水溶液の発泡性を低くしやすいことから、反応後半の全体にわたって、反応後半における反応液のｐＨを反応前半における反応液のｐＨよりも高く設定することが好ましい。

[0042] 反応前半における反応液のｐＨは、例えば６．６～７．５とすることができ、６．８～７．５とすることが好ましく、６．９～７．４とすることがより好ましく、７．０～７．３とすることが更に好ましい。反応前半における反応液のｐＨを６．６～７．５とすることにより、効率良くニトリル化合物からアミド化合物を得ることができる。

反応後半における反応液のｐＨは、例えば７．５以上８．５未満とすることができ、７．５～８．４とすること好ましく、７．６～８．３とすること

がより好ましく、７．８～８．３とすることが更に好ましい。反応後半における反応液のｐＨを７．５以上とすることにより、反応液の発泡を十分に抑制することができる。反応後半における反応液のｐＨを８．５未満とすることにより、効率的なアミド化合物の製造を行うことができる。

[0043] 本実施形態において、反応後半における反応液のｐＨが反応前半における反応液のｐＨよりも高ければ、その差は限定されないが、例えば、反応後半における反応液のｐＨと反応前半における反応液のｐＨとの差を０．３～１．５とすることができ、０．４～１．４とすることが好ましく、０．５～１．２とすることがより好ましい。

[0044] 本実施形態において、反応液のｐＨを調整する方法は限定されない。反応液のｐＨに応じて適宜、酸又は塩基を反応液に添加することにより反応液のｐＨを調整することができる。

[0045] 酸としては、無機酸、有機酸のいずれも用いることができる。無機酸としては、例えば、塩化水素、臭化水素、沃化水素等のハロゲン化水素酸、次亜塩素酸、亜塩素酸、塩素酸、過塩素酸、次亜臭素酸、亜臭素酸、臭素酸、過臭素酸、次亜沃素酸、亜沃素酸、沃素酸、過沃素酸等のハロゲン化オキソ酸、硫酸、硝酸、燐酸、硼酸等が挙げられる。有機酸としては、例えば、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、アクリル酸、メタクリル酸、クロトン酸、蓚酸、マロン酸、フマル酸、マレイン酸、クエン酸、乳酸、安息香酸等のカルボン酸やメタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸等のスルホン酸が挙げられる。

[0046] これらの酸を使用するときは、気体、固体、液体のいずれの状態でも用いることができるが、反応槽への供給の容易性を考慮すると、液体又は固体の状態のものを用いることが好ましい。酸を液体として用いる場合の酸の濃度は特には限定されず、適宜選択することができる。

[0047] 塩基としては、無機塩基、有機塩基のいずれも用いることができる。無機塩基としては、例えば、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属の水酸化物、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等

のアルカリ土類金属の水酸化物、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属の炭酸塩、炭酸水素リチウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等のアルカリ金属の炭酸水素塩、アンモニア等が挙げられる。有機塩基としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、アニリン、ピリジン等が挙げられる。

[0048] これらの塩基を使用するときは、気体、固体、液体のいずれの状態でも用いることができるが、反応槽への供給の容易性を考慮すると、液体又は固体の状態のものを用いることが好ましい。塩基を液体として用いる場合の塩基の濃度は特には限定されず、適宜選択することができる。

[0049] アクリロニトリルを水和する際の反応温度、すなわち反応液の温度は、特には限定されないが、１０～５０℃であることが好ましく、１５～４０℃であることがより好ましく、２０～３５℃であることがさらに好ましい。反応温度を１０℃以上とすることにより、生体触媒の反応活性を充分に高めることができる。また、反応温度を５０℃以下とすることにより、生体触媒の失活を防ぐことができる。また、反応器の除熱負荷を低減させるために、供給する水又はアクリロニトリルは、反応温度よりも５℃以上低くして供給することが好ましい。

[0050] 触媒の量は、実際は触媒の実重量ではなくユニットで比較される。ニトリルヒドラターゼ活性では、１分間に１マイクロモルのアクリルアミドを精製する酵素量を１Ｕと定義する。本実施形態のニトリルヒドラターゼの比活性は、例えば、乾燥菌体ベースで５０Ｕ／ｍｇ以上、好ましくは８０Ｕ／ｍｇ以上、より好ましくは１００Ｕ／ｍｇ以上が挙げられる。

実施例

[0051] 以下、実施例および比較例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。実施例中、「％」は「質量％」を示す。

[0052] 〔生体触媒の調製〕

＜ロドコッカス・ロドクロウスＪ１菌由来の菌体触媒の作成＞

前培養条件：

（培地組成）

フルクトース：２％、ポリペプトン：５％（日本製薬株式会社）、酵母エキス：０．３％（オリエンタル酵母工業株式会社）、KH_2PO_4：０．１％、K_2HPO_4：０．１％、$MgSO_4$ H_2O：０．１％、ｐＨ７。

（培養方法）

５００ｍＬの三角フラスコに培地を１００ｍＬ分注して綿栓をし、１２１℃で２０分間、オートクレーブで滅菌した。Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ ｒｈｏｄｏｃｈｒｏｕｓ Ｊ１（ＦＥＲＭ ＢＰ－１４７８）を接種して、３０℃で４８時間振とう培養した。

[0053] 本培養条件：

（培地組成）

初期培地；酵母エキス：０．２％、KH_2PO_4：０．１％、K_2HPO_4：０．１％、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$：０．１％、$CoCl_2 \cdot 6H_2O$：０．００２％、硫安：０．０２５％、フルクトース：２％、尿素：２％、エタノール：０．４％、プルロニックＬ６１：０．１％（旭電化工業株式会社）、ｐＨ７。なお、「プルロニック」は登録商標である。

後添加培地；フルクトース：２０％、エタノール：５％、硫安：６％、ｐＨ６．５。

（培養方法）

３Ｌのミニジャーファーメンターに初期培地２Ｌを分注し、１２１℃で２０分間のオートクレーブにより滅菌した。但し、フルクトース、エタノール及び尿素は、別途、無菌的にろ過して培地に加えた。ろ過にはアドバンテック東洋株式会社製の０．４５μｍのろ紙を使用した。

槽内圧力０．０９８ＭＰａ、撹拌数６００ｒｐｍ、通気量１ｖｖｍ、ｐＨ７、温度３０℃で４３時間培養した後、５０ｍＭのリン酸バッファー（ｐＨ７．７）にて洗浄して、乾燥菌体重量１５％の菌体懸濁液を得た。

[0054] ＜実施例１＞

ジャケット冷却器付反応槽（内容積：１．３Ｌ）の７槽を直列に、１槽目から７槽目まで反応液が順に流通するように連結した。

第１槽目に、５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）を５２５ｍＬ／ｈｒ、アクリロニトリルを１５０ｍＬ／ｈｒ、及び、乾燥菌体重量１５％の菌体懸濁液を５０ｍＭリン酸緩衝液で４０倍希釈した、希釈菌体懸濁液を１００ｍＬ／ｈｒで連続的に供給した。第２槽目に、アクリロニトリルのみを１２０ｍＬ／ｈｒで連続的に供給し、第３槽目に、アクリロニトリルのみを１２０ｍＬ／ｈｒで連続的に供給し、第４槽目にアクリロニトリルのみを８０ｍＬ／ｈｒで連続的に供給して反応を開始した。

[0055] 第１槽から第７槽までの各槽の反応液量が１Ｌとなるように、各槽の反応液が流出するオーバーフロー管の高さの位置を調整し、オーバーフローにより次の槽へ反応液を送液した。第１槽から第７槽までの反応液温度がそれぞれ２０℃となるようにジャケットの冷却水（１０℃）を用いて温度制御した。

[0056] ２枚パドル翼（翼径：３５０ｍｍ、翼幅：１００ｍｍ）を用いて、第１槽から第７槽までの全ての反応器における反応液流体あたりの撹拌動力を０．０８ｋＷ／m^3となるように調整した（フルード数：０．０５７）。ここで、反応液流体あたりの撹拌所要動力は、各反応器における攪拌所要動力を液量（１Ｌ＝０．００１m^3）で除して算出した。

[0057] 各槽の反応液のｐＨをＫＣｌ補給形ｐＨ検出器で測定し、設定値となるように０．０６Ｎ水酸化ナトリウム水溶液を自動添加してｐＨを調節した。

第１，２，３，４，５，６，７槽の反応液のｐＨは、各々、７．２、７．２、７．２、７．５、７．７、８．０、８．０とした。

[0058] 反応開始から１日後、各反応槽のｐＨが設定した値を維持していることを確認した後、各反応槽内の反応液のアクリルアミド濃度を屈折計（アタゴ社製：ＲＸ－５０００）で測定した。第１，２，３，４，５，６，７槽のアクリルアミド濃度は、１９、３１、３８、４３、４９、５０、５０％であり、第７槽から流出する反応液のアクリルアミド濃度は、目的濃度の５０％に到

達した。また、第７槽の反応液のアクリロニトリル濃度を、ガスクロマトグラフィー（カラム：Ｗａｔｅｒｓ社製、ＰｏｒａＰａｋ－ＰＳ、１ｍ、１８０℃；キャリアガス：ヘリウム；検出器：ＦＩＤ）により測定した。第７槽の未反応のアクリロニトリル（ＡＮ）は、１０ｐｐｍであり、反応効率が高かった。未反応のアクリロニトリル濃度が１００ｐｐｍ以下であると、アクリルアミドを重合するときの品質がより良好となる点でも好ましい。

[0059] 次に、５００ｍＬのメスシリンダーに第７槽の反応液を３００ｍＬ入れて、２５℃の恒温槽に１０分静置した。メスシリンダーの中心部、底から５ｍｍの位置にガラスボールフィルター（木下式ガラスフィルター５０４Ｇ）を入れて圧力０．５ｋｇ／ｃｍ^{3}の空気を８００ｃｃ／ｍｉｎで通気させた。反応液が泡立ちはじめ、泡の高さが安定したところで通気を止めて、消泡するまでの時間を測定した。消泡するまでの時間が短いほど、生体触媒からアクリルアミド水溶液に持ち込まれたタンパク分が少ないことを示す。消泡するまでの時間は、３０秒以内であることが品質上求められている。消泡までの時間は５秒であり、要求される品質を満たした。

[0060] ＜実施例２＞

第１、２、３、４、５、６、７槽の反応液のｐＨを６．８、７．０、７．５、８．３、８．３、８．３、８．３とした以外は、実施例１と同様に反応させた。

反応開始から１日後、各反応槽のｐＨが設定した値を維持していることを確認した後、各反応槽内の反応液のアクリルアミド濃度を測定した結果、第１、２、３、４、５、６、７槽のアクリルアミド濃度は、１８、３１、３６、４２、４８、５０、５０％であり、第７槽から流出する反応液のアクリルアミド濃度は、目的濃度の５０％に到達した。また、第７槽の反応液のアクリロニトリル濃度を測定した結果、未反応のアクリロニトリル濃度は、２０ｐｐｍであり、反応効率が高かった。

第７槽の反応液を用いて消泡時間を測定した結果、２秒であり要求される品質を満たした。

[0061] ＜実施例３＞

第１、２、３、４、５、６、７槽の反応液のｐＨを６．８、６．８、６．８、８．３、８．３、８．３、８．３とした以外は、実施例１と同様に反応させた。

反応開始から１日後、各反応槽のｐＨが設定した値を維持していることを確認した後、各反応槽内の反応液のアクリルアミド濃度を測定した結果、第１、２、３、４、５、６、７槽のアクリルアミド濃度は、１８、３０、３５、４１、４７、４９、５０％であり、第７槽から流出する反応液のアクリルアミド濃度は、目的濃度の５０％に到達した。また、第７槽の反応液のアクリロニトリル濃度を測定した結果、未反応のアクリロニトリル濃度は、３０ｐｐｍであり、反応効率が高かった。

第７槽の反応液を用いて消泡時間を測定した結果、２秒であり要求される品質を満たした。

[0062] ＜実施例４＞

第１、２、３、４、５、６、７槽の反応液のｐＨを７．５、７．５、７．５、８．５、８．５、８．５、８．５とした以外は、実施例１と同様に反応させた。

反応開始から１日後、各反応槽のｐＨが設定した値を維持していることを確認した後、各反応槽内の反応液のアクリルアミド濃度を測定した結果、第１、２、３、４、５、６、７槽のアクリルアミド濃度は、１８、３０、３４、４１、４７、４９、５０％であり、第７槽から流出する反応液のアクリルアミド濃度は、目的濃度の５０％に到達した。また、第７槽の反応液のアクリロニトリル濃度を測定した結果、未反応のアクリロニトリル濃度は３００ｐｐｍであり、反応後半のｐＨが８．５未満に制御されている実施例１～３の方が反応効率は高かった。

第７槽の反応液を用いて消泡時間を測定した結果、２秒であり要求される品質を満たした。

[0063] ＜比較例１＞

第１、２、３、４、５、６、７槽の反応液のｐＨを全て７．０とした以外は、実施例１と同様に反応させた。

反応開始から１日後、各反応槽のｐＨが設定した値を維持していることを確認した後、各反応槽内の反応液のアクリルアミド濃度を測定した結果、第１、２、３、４、５、６、７槽のアクリルアミド濃度は、１９、３１、３６、４４、４９、５０％であり、第７槽から流出する反応液のアクリルアミド濃度は、目的濃度の５０％に到達した。また、第７槽の反応液のアクリロニトリル濃度を測定した結果、未反応のアクリロニトリル濃度は、検出されず、要求される品質を満たした。

第７槽の反応液を用いて消泡時間を測定した結果、１５０秒であり要求される品質を満たさなかった。

[0064] ＜比較例２＞

第１、２、３、４、５、６、７槽の反応液のｐＨを全て７．５とした以外は、実施例１と同様に反応させた。

反応開始から１日後、各反応槽のｐＨが設定した値を維持していることを確認した後、各反応槽内の反応液のアクリルアミド濃度を測定した結果、第１、２、３、４、５、６、７槽のアクリルアミド濃度は、１８、３０、３６、４３、４９、５０、５０％であり、第７槽から流出する反応液のアクリルアミド濃度は、目的濃度の５０％に到達した。また、第７槽の反応液のアクリロニトリル濃度を測定した結果、未反応のアクリロニトリル濃度は、１０ｐｐｍであり、要求される品質を満たした。

第７槽の反応液を用いて消泡時間を測定した結果、８０秒であり要求される品質を満たさなかった。

[0065] ＜比較例３＞

第１、２、３、４、５、６、７槽の反応液のｐＨを全て８．０とした以外は、実施例１と同様に反応させた。

反応開始から１日後、各反応槽のｐＨが設定した値を維持していることを確認した後、各反応槽内の反応液のアクリルアミド濃度を測定した結果、第

１、２、３、４、５、６、７槽のアクリルアミド濃度は、１７、３０、３５、４１、４８、５０、５０％であり、第７槽から流出する反応液のアクリルアミド濃度は、目的濃度の５０％に到達した。また、第７槽の反応液のアクリロニトリル濃度を測定した結果、未反応のアクリロニトリル濃度は、１２０ｐｐｍであり、要求される品質を僅かに満たさなかった。

第７槽の反応液を用いて消泡時間を測定した結果、４５秒であり要求される品質を満たさなかった。

[0066]

[表1]

反応槽		1	2	3	4	5	6	7	反応性	泡切れ
【実施例1】	AAM [%]	19	31	38	43	49	50	50	○	○
	pH	7.2	7.2	7.2	7.5	7.7	8.0	8.0	AN 10ppm	5秒
【実施例2】	AAM [%]	18	31	36	42	48	50	50	○	○
	pH	6.8	7.0	7.5	8.3	8.3	8.3	8.3	AN 20ppm	2秒
【実施例3】	AAM [%]	18	30	35	41	47	49	50	○	○
	pH	6.8	6.8	6.8	8.3	8.3	8.3	8.3	AN 30ppm	2秒
【実施例4】	AAM [%]	18	30	34	41	47	49	50	×	○
	pH	7.5	7.5	7.5	8.5	8.5	8.5	8.5	AN 300ppm	2秒
【比較例1】	AAM [%]	19	31	36	44	49	50	50	○	×
	pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	検出されず	150秒
【比較例2】	AAM [%]	18	30	36	43	49	50.0	50.0	○	×
	pH	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	AN 10ppm	80秒
【比較例3】	AAM [%]	17	30	35	41	48	50	50	×	×
	pH	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	AN 120ppm	45秒

[0067] 実施例１～３の結果をまとめると次の通りである。各反応槽毎の反応液の総質量に対するアミド化合物の含有量が４０質量%未満である反応前半（第

１槽、第２槽、第３槽）においては、反応液のｐＨを第一のｐＨに設定してニトリル化合物の水和反応を行った。この水和反応により、反応液が第１槽から第３槽へ進むにつれて反応液中のアミド化合物の濃度が高まった。第３槽から第４槽に入った反応液の総質量に対するアミド化合物の含有量は４０質量％以上であり、第４槽以降の反応後半においては、反応液のｐＨを第二のｐＨに設定し、引き続き水和反応を継続させた。ここで、第二のｐＨは第一のｐＨよりも高いことを条件とした。その結果、実施例１～４のいずれにおいても、第７槽で得たアクリルアミド水溶液は、発泡が抑制されており発泡性が低かった。また、反応後半の第二のｐＨが８．５未満に制御されている実施例１～３は、第二のｐＨが８．５である実施例４に比べて未反応のアクリロニトリル濃度が低く、反応効率がより高かった。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明は、アクリルアミドやメタアクリルアミド等のアミド化合物の工業生産において有用である。

請求の範囲

[請求項1] ニトリルヒドラターゼ活性を有する生体触媒の存在下にニトリル化合物を水和反応させてアミド化合物を製造する方法において、

前記水和反応の途中で反応液のｐＨを上昇させる、アミド化合物の製造方法。

[請求項2] 反応途中で前記反応液のｐＨを反応開始時におけるｐＨよりも上昇させる、請求項１に記載のアミド化合物の製造方法。

[請求項3] 前記反応液の総質量に対する前記アミド化合物の含有量が４０質量％未満である反応前半における前記反応液のｐＨよりも、前記アミド化合物の含有量が４０質量％以上となった反応後半の少なくとも一部における前記反応液のｐＨを高く設定して水和反応を行う、請求項１又は２に記載のアミド化合物の製造方法。

[請求項4] 前記反応液のｐＨを０．３～１．５上昇させる、請求項１～３のいずれか一項に記載のアミド化合物の製造方法。

[請求項5] 反応開始時における前記反応液のｐＨが６．６～７．５である、請求項１～４のいずれか一項に記載のアミド化合物の製造方法。

[請求項6] 前記反応前半における前記反応液のｐＨを６．６～７．５、前記反応後半における前記反応液のｐＨを７．５以上８．５未満に設定して水和反応を行う、請求項３～５のいずれか一項に記載のアミド化合物の製造方法。

[請求項7] 前記ニトリル化合物がアクリロニトリル又はメタクリロニトリルである、請求項１又は２に記載のアミド化合物の製造方法。

[請求項8] 前記アミド化合物がアクリルアミド又はメタクリルアミドである、請求項１又は２に記載のアミド化合物の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/009781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 13/02(2006.01)i
FI: C12P13/02

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)

C12P13/02

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2019-089727 A (MITSUI CHEMICALS, INC.) 13 June 2019 (2019-06-13) example 1	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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 April 2024	**14 May 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/009781

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2019-089727 A	13 June 2019	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/009781

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12P 13/02(2006.01)i
FI: C12P13/02

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））

C12P13/02

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	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2019-089727 A (三井化学株式会社) 13.06.2019 (2019-06-13) 実施例１	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、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
30.04.2024	14.05.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

長谷川　強 4N 1783

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/009781

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2019-089727 A	13.06.2019	（ファミリーなし）	