(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2008-148637
(P2008-148637A)
(43)公開日　平成20年7月3日(2008.7.3)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12P 13/02	(2006.01)	C12P 13/02		4B064

審査請求 未請求　請求項の数 2　ＯＬ　（全 10 頁）

(21)出願番号　特願2006-340962 (P2006-340962)
(22)出願日　平成18年12月19日 (2006.12.19)

(71)出願人　000006035
三菱レイヨン株式会社
東京都港区港南一丁目６番４１号
(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
(72)発明者　大泉　健一
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

Ｆターム(参考)　4B064 AE02 BJ20 CA02 CB30 CD12 CE16 CE20 DA01

(54)【発明の名称】４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法

(57)【要約】
【課題】　短時間で反応が完結でき、且つ多量の酵素を必要としない、ニトリルヒドラターゼによる４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法を提供する。
【解決手段】　４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを減圧乾燥した後、前記ニトリル化合物をニトリルヒドラターゼと接触させることを含む、４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法。好ましくは、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを凍結処理した後、減圧乾燥を行う、４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法である。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを減圧乾燥した後、前記ニトリル化合物をニトリルヒドラターゼと接触させる、４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法。
【請求項２】
４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを凍結処理した後、減圧乾燥を行う、請求項１記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法に関する。例えば４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドは、カルニチン、３，４－ジヒドロキシブタン酸などの種々の生理活性物質、医薬品、農薬などの合成原料として使用される。
【背景技術】
【０００２】
一般にニトリルの水和によるアミド化合物の製造法としては、塩酸などの鉱酸やアルカリを使用する方法、アルカリと過酸化水素を併用する方法などが知られているが、これらの方法では工程が煩雑となり、対応する酸が副生し収率が低下してしまうなどの問題があった（特許文献１）。また、生物学的反応としては、ニトリルヒドラターゼの作用によりニトリル化合物を水和してアミド化合物を製造する方法、例えば、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルにニトリルヒドラターゼを作用させて４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドを製造する方法が知られている（特許文献２）。しかし、この製造方法では、反応時間が長く、尚且つ、ニトリルヒドラターゼを大量に必要とするという問題があった。
【０００３】
一方、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルの製造方法としては、エピハロヒドリンと青酸のアルカリ金属塩を反応させる方法（特許文献３）、エピハロヒドリンと青酸を反応させる方法（特許文献４）、１，３－ジハロ－２－プロパノールに青酸または青酸のアルカリ金属塩を反応させる方法（特許文献５）などが知られている。
しかし、上記方法では、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを合成した後、反応液中に未反応の青酸が残存する。よって、次いでニトリルヒドラターゼにより、アミド化反応を実施する場合、残存している青酸により酵素が失活してしまうため、青酸を除去する必要がある。更に、青酸を例えば１ｐｐｍ以下に除去しても、アミド化反応の反応速度が非常に遅く、反応速度を上昇させるためには大量の酵素を必要とする場合があった。
【０００４】
【特許文献１】特開平１－２８７０６５
【特許文献２】特開平４－３６５４９１
【特許文献３】特開昭６３－３１６７５８
【特許文献４】特開２００２－２４１３５７
【特許文献５】特開平５－２１９９６５
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本発明は、短時間で反応が完結でき、且つ多量の酵素を必要としない、４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法の製造方法を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
そこで本発明者らが、上記課題に鑑み鋭意検討を行った結果、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを予め減圧乾燥処理をし、ニトリルヒドラターゼを作用させることで、煩雑な精製操作を必要とせずに、円滑にアミド化反応を進行させることができ、多量の酵素を必要とせず、短時間で４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法を製造でき

ることを見出し、本発明を完成させた。
【０００７】
すなわち本発明は、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを減圧乾燥した後、前記ニトリル化合物をニトリルヒドラターゼと接触させることを含む、４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法、である。
【発明の効果】
【０００８】
４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを減圧乾燥処理した後、前記ニトリル化合物をニトリルヒドラターゼと接触させることにより、煩雑な精製操作を必要とせずに、円滑にアミド化反応を進行させることができ、多量の酵素を必要とせず、短時間で４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドを製造できる。
【発明を実施するための最良の形態】
【０００９】
本発明は、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを減圧乾燥した後、前記ニトリル化合物をニトリルヒドラターゼと接触させることを含む、４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの製造方法以下、ニトリルヒドラターゼによる当該ニトリルからアミドへの変換反応を、「アミド化反応」と称す。
【００１０】
本発明において、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリル、４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミド、エピハロヒドリン、１，３－ジハロ－２－プロパノールの「ハロ」とはハロゲン元素を示し、具体的にはフッ素、塩素、臭素、ヨウ素を示す。好ましくは、塩素、臭素である。
【００１１】
４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルは、例えば、特開昭６３－３１６７５８号公報に記載の方法により合成することができる。また、アズマックス社等で市販されている市販品を使用しても良い。
本発明では、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルは、エピハロヒドリン又は１，３－ジハロ－２－プロパノール、及び青酸又は青酸のアルカリ金属塩とから酵素触媒を用いて調製されたものを使用することが好ましい。
【００１２】
上記方法により得られた４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルは、反応終了後の溶液、その溶液から当該ニトリルを抽出した抽出液、抽出液を濃縮した濃縮液、カラムクロマトグラフィー等の常法により精製された精製物等、いずれの状態で次に続く減圧乾燥処理に供してもよい。いずれの状態を選択するかは、アミド化反応の際に使用するニトリルヒドラターゼの反応速度及び酵素の使用量等を考慮し、適宜選択することができる。
【００１３】
４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルの減圧乾燥処理とは、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルそのもの、又はそれを含む溶液を減圧乾燥することをいう。
【００１４】
４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを含む溶液を減圧乾燥処理する場合、使用する溶媒としては、ヘキサン、ヘプタン、オクタンなどの炭化水素系溶媒、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、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、テロラヒドロフラン、ジメチルスルフォキシド等の有機溶媒、水などが挙げられる。これらの溶媒は、２種類以上の混合溶媒であっても構わない。
【００１５】
上記溶媒の内、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などのエステル系溶媒、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、テロラヒドロフラン、ジメチルスルフォキシド、又は水を使用することが好ましい。水を使用する場合、緩衝液を用いてもよい。例えば酸成分としては塩酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、アコニット酸、コハク酸、酢酸、クエン酸二水素カリウム、フタル酸水素カリウム、クエン酸水素二ナトリウム、マレイン酸、マレイン酸水素ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化アンモニウム、炭酸水素ナトリウム、四ホウ酸ナトリウムなど、塩基成分としては酢酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸水素二ナトリウム、酒石酸ナトリウム、クエン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、乳酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、四ホウ酸ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、酢酸ナトリウム、アンモニア、炭酸ナトリウム、Ｔｒｉｓなどが挙げられ、これら単独あるいは組み合わせで形成される緩衝液が挙げられる。

また前記溶媒に４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルが完全に溶解する必要は必ずしもない。

【００１６】

減圧乾燥方法は、常温、加温、各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溶液が水溶液である場合、試料を凍結した後、減圧乾燥する、すなわち凍結乾燥で処理することができる。

【００１７】

凍結乾燥処理は、ニトリルヒドラターゼによる４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルの４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドは反応速度を早める効果をもたらすだけでなく、処理方法が穏和であることから新たな不純物の生成を抑制し、ニトリル化合物のアミド化の効率を向上させる効果をもたらす故、好ましい。

【００１８】

乾燥時間は特に限定されないが、３～２４時間、さらには１２～１８時間であることが好ましい。

【００１９】

真空度は特に限定されないが、４００Ｐａ以下、さらには１０～５０Ｐａであることが好ましい。

【００２０】

４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルの水溶液を減圧乾燥処理する時、その分解を防ぐため、ｐＨは中性～酸性領域が好ましく、ｐＨ３～７がより好ましい。また減圧乾燥処理後にはニトリルヒドラ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。

【００２１】

次に上記のごとく減圧乾燥処理を行った４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルをニトリルヒドラターゼと接触させる。

【００２２】

使用するニトリルヒドラターゼ（国際的な酵素分類によればリアーゼに属する酵素）は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れば良い。

【００２３】

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（Klebsiela）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（Pseudonocar

dia）属、ロドコッカス(Rhodococcus）属、リゾビウム（Rhizobium）属、セラチア（Serratia）属、シクタリジウム（Syctalidium）属、ツカムレラ（Tukamurella）属、に属する微生物が産生するニトリルヒドラターゼである。

【００２４】

具体的には、アースロバクター　グロビフォルミス(Arthrobacter globi-formis)IFO 12138、ブレビバクテリウム　ヘルボラム(Brevibacterium helvolum)ATCC 11822 、コリネバクテリウム　フラベシエンス(Corynebacterium flaves-cens)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）HUT6142、ストレプトマイセス ヂアスタチカス（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 ルブロシアノヂアスタチカス（Streptomyces rubrocyanodiastaticus）HUT 6117、クレブシエラ ニュウモニアエ（Klebsiella pneumoniae）IFO 12019、IFO 3319、IFO12059、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 morganii）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、ミクロアスカス デスモスポラス(Microascus desmosporus)IFO6761、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である。

【００２５】

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ァーコレクション（ＡＴＣＣ）、から容易に入手することができる。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。

【００２６】

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〕、及び本発明者らの一部が土壌より分離したアースロバクター 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ターゼも挙げられる。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。

【００２７】

また、上記微生物のニトリルヒドラタ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タ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タ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タ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ターゼで形質転換した微生物などが挙げられる。

【００２８】

ニトリルヒドラタ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、微生物が生育でき、所望の酵素を産生するのであれば特に限定はない。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。

【００２９】

また場合により、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－ヒドロキシブチルアミド、プロピオンアミド、イソブチルアミドなどの各種アミド化合物などを培地に添加しても良い。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℃の範囲にて好気的に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。

【００３０】

アミド化反応に際し、上記のようにして得た微生物菌体は、培養液そのまま、遠心分離などにより得た菌体の懸濁液、菌体処理物（例えば菌体破砕物、菌体抽出物など）、常法により固定化した菌体または菌体処理物として使用することができる。上記のようにして得た菌体は、アミド化反応時に一括添加又は分割添加して反応を実施する。

【００３１】

なお、アミド化反応が発熱反応であることから菌体の懸濁液を基質の水溶液に添加することが好ましい。反応液中の基質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。反応温度は０～５０℃程度で、０～３０℃程度がより好ましい。反応液のｐＨは４～１０の範囲で、６～８程度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時間程度で終了するように設定することがより好ましい。

【００３２】

以上のようにして合成したｎ－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドは、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。

【００３３】

なお、４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリル、エピハロヒドリンには不斉炭素が存在するが、本発明ではラセミ体、光学活性体のどちらでも実施可能である。本発明において光学活性な４－ハロ－３－ヒドロキシブチロニトリルを出発として反応を行った場合、光学純度を低下させることなく対応する光学活性な４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドを生成することができる。４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドはカルニチン（４－トリメチルアミノ－３－ヒドロキシ酪酸）や３－ヒドロキシ－γ－ブチロラクトン合成の中間体として使用することができる。４－ハロ－３－ヒドロキシブチルアミドの光学活性体は、Ｌ－カルニチンの合成中間体として使用することが可能であるため非常に有用である。

【実施例】
【００３４】
以下、実施例によって本発明を具体的に説明する。
４－クロロ－３－ヒドロキシブチロニトリル（以下ＣＨＢＮと略す）及び４－クロロ－３－ヒドロキシブチルアミド（以下ＣＨＢＡと略す）の化学純度は、下記ＨＰＬＣ定量結果より算出した。
本発明において使用したＨＰＬＣはウォーターズ社製alliance2695もしくはアジレント社製HP1090である。詳細を以下に示す。
【００３５】
[ＨＰＬＣ分析条件]
試料調製方法　：反応液を移動相もしくは超純水に溶解
カラム　：Capcell Pak C18 MGII（資生堂製）
２．０ｍｍ Ｉ．Ｄ．×１００ｍｍ、 粒径３μｍ
カラムオーブン温度　：４０℃
移動相　：０．０５％ ナノフルオロペンタン酸水溶液
流速　：０．２ｍＬ/ｍｉｎ
検出器　：示差屈折計(ＳＨＯＤＥＸ製ＲＩ ＳＥ－６１)
ＣＨＢＮの標品は、アズマックス株式会社製(化学純度９８．９％)を用いた。ＣＨＢＡの標品は、前記アズマックス株式会社製ＣＨＢＮを原料とし、ニトリルヒドラターゼを用いて合成、酢酸エチルにより抽出後、シリカゲルカラムにより精製したＣＨＢＡを用いた。)
【００３６】
（Ｒ）－ＣＨＢＮの光学純度は、以下のようにして測定した。
（Ｒ）－ＣＨＢＮ１μｌにジクロロメタン２０μｌ、ピリジン２０μｌを加えた後、（Ｒ）－α－メトキシ－α－（トリフルオロメチル）フェニルアセチルクロライド（ＭＴＰＡ）２μｌを添加し、そのまま室温で５時間撹拌を行った。反応終了液にジイソプロピルエーテル３００μｌを添加し、続いて１Ｎ ＨＣｌ水溶液３５０μｌを用いて洗浄、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３５０μｌ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。
本分析に用いたＨＰＬＣシステムは以下の通りである。
【００３７】
[ＨＰＬＣ分析条件]
（Ｒ）－ＣＨＢＮ ＭＴＰＡエステル
（Ｓ）－ＣＨＢＮ ＭＴＰＡエステル
カラム　：Partisil-5(GL Science)
４．６ｍｍ×２５０ｍｍ
カラムオーブン温度　：４０℃
移動相　：ヘキサン：イソプロパノール＝９９：１
流量　：１ｍｌ／ｍｉｎ
検出器　：ＵＶ ２５４ｎｍ
保持時間　：（Ｒ）－ＣＨＢＮ ＭＴＰＡエステル：１１．９ｍｉｎ
（Ｓ）－ＣＨＢＮ ＭＴＰＡエステル：１３．０ｍｉｎ
【００３８】
＜参考例１＞
本発明で使用するニトリルヒドラターゼは、以下のようにして調製した。ニトリルヒドラターゼ活性を有するロドコッカス ロドクロウス(Rhodococcus rhodochrous)Ｊ－１(FERM BP-1478)を、３０Ｌ容ジャーファーメンター（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、２０Ｌの培地（ｐＨ７．０）に植菌し、温度３０℃で好気的に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、５０ｍＭリン

酸緩衝液（ｐＨ ７．７）にて２回洗浄後、懸濁することで保存菌体液とした。
＜実施例１＞
【００３９】
アズマックス社製、化学純度９８．９質量％、光学純度９９．２％ｅｅの（Ｒ）－４－クロロ－３－ヒドロキシブチロニトリル（以下（Ｒ）－ＣＨＢＮと略す）を採取し、超純水：９．０ｇを加えて試料溶液を調製した。この試料溶液を冷凍庫にて凍結処理した後、１５時間かけて凍結乾燥を行った。
乾燥後、３０ｍＭのリン酸バッファー（ｐＨ＝７．９）を９ｇ加えて再溶解し、試料溶液を再調製した。この再調製液に添加するＪ－１菌菌体液を算出するために、再調製液および凍結乾燥処理を実施する前の試料溶液に含まれている各（Ｒ）－ＣＨＢＮ濃度を先に示したＨＰＬＣ分析条件にて測定を行った。凍結乾燥処理を実施する前の試料溶液に含まれている（Ｒ）－ＣＨＢＮ濃度を１とした場合の再調製液に含まれている（Ｒ）－ＣＨＢＮ濃度の比を算出した。そして凍結乾燥処理を実施する前の試料溶液１ｇに対して参考例１で調製したＪ－１菌菌体液を１．５μＬ加えた場合と同じ割合となるように再調製液１ｇに参考例１で調製したＪ－１菌菌体液を加え、１０℃で反応を開始した。加えたＪ－１菌菌体液量および反応結果は表１のようになった。
【００４０】
＜比較例１＞
アゾマックス社製（Ｒ）－ＣＨＢＮ：２０ｍｇ（０．１６７ｍｍｏｌ）に３０ｍＭのリン酸バッファー（ｐＨ＝７．９）：９８０ｍｇを加えた。１０℃に冷却した後、参考例１で調製したＪ－１菌希釈溶液を１．５μＬ加え、１０℃で反応を開始した。反応結果は表１のようになった。
【表１】

	乾燥時間	未乾燥時の(R)－CHBN濃度を1とした場合の量比	J1菌添加量(μl)	CHBN転化率
実施例1	15	0.50	0.63	80.3
			0.50	81.5
			0.32	73.0
比較例1	0	1	1.5	59.8

＜実施例２＞
【００４１】
以下のようにして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を行い、それを用いて１，３－ジクロロ－２－プロパノールから（Ｒ）－ＣＨＢＮを合成し、ニトリルヒドラターゼによるアミド化反応を行った。詳細について順に示す。
【００４２】
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 P-12065、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、１ｍＭ ＩＰＴＧ、５０μｇ/ｍｌアンピシリン)を１００ｍＬ入れた５００ｍＬ容三角フラスコに植菌し、３７℃で２０時間振盪培養した。前記培養菌体を遠心分離により集菌し、集菌した菌体を５０ｍＭ トリス－硫酸緩衝液（ｐＨ ８．０）で洗浄し、５０ｍＭ トリス－硫酸緩衝液（ｐＨ ８．０）で懸濁した。この菌体懸濁液０．２５ｇを５０ｍＭ トリス－硫酸緩衝液（ｐＨ ８．０）１００ｍＬに

加え、さらに５０ｍＭ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、１１ｍＭであった。

【００４３】

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３００ｍＬ４つ口フラスコに水１２７．５５ｇ、ＨＣＮ４．４１ｇ（０．１６３２ｍｏｌ）を入れ、３０％ＮａＯＨ ０．６５ｇ（０．００４９ｍｏｌ）で、ｐＨ７．５に調整した。１，３-ジクロロ-２-プロパノール１０．００ｇ（０．０７７５ｍｏｌ）を入れ、均一に溶解するまで攪拌した。

【００４４】

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２０．００ｇ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０．５ｍｏｌ/ｋｇを超えないよう、また、系内のシアンイオン濃度を１．１ｍｏｌ/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０．７５３ｍｏｌ/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。

この反応液を塩酸でｐＨ＝５．０に調節し、６０℃、１４０ｔｏｒｒ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、１ｐｐｍ以下であることを確認した。

【００４５】

iii）アミド化反応

上述の方法で合成した（Ｒ）－ＣＨＢＮの反応終了水溶液１．５ｇを５０ｍｌのナスフラスコに採り、冷凍庫にて凍結処理した後、１５時間かけて凍結乾燥を行った。乾燥後、３０ｍＭのリン酸バッファー（ｐＨ＝７．９）を１．３５ｇ加えて再溶解し、試料溶液を再調製した。この再調製液に添加するＪ－１菌菌体液を算出するために、再調製液および凍結乾燥処理を実施する前の試料溶液に含まれている各（Ｒ）－ＣＨＢＮ濃度を先に示したＨＰＬＣ分析条件にて測定を行い、凍結乾燥処理を実施する前の試料溶液に含まれている（Ｒ）－ＣＨＢＮ濃度を１とした場合の再調製液に含まれている（Ｒ）－ＣＨＢＮ濃度の比を算出した。そして凍結乾燥処理を実施する前の試料溶液１ｇに対して参考例１で調製したＪ－１菌菌体液を１．５μＬ加えた場合と同じ割合となるように再調製液１ｇに参考例１で調製したＪ－１菌菌体液を加え、１０℃で反応を開始した。加えたＪ－１菌菌体液量および反応結果は表２のようになった。

【００４６】

＜比較例２＞

実施例２のｉ）～ii）で合成した（Ｒ）－ＣＨＢＮの反応終了水溶液１ｇを１０℃に冷却した後、参考例１で調製したＪ－１菌希釈溶液を１．５μＬ加え、１０℃で反応を開始した。反応結果は表２のようになった。

【００４７】

【表２】

	乾燥時間	未乾燥時の(R)－CHBN濃度を1とした場合の量比	J1菌添加量(μl)	CHBN転化率(%)
実施例2	15	0.51	0.77	96.8
比較例2	0	1	1.5	44.3