

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4857754号  
(P4857754)

(45) 発行日 平成24年1月18日(2012.1.18)

(24) 登録日 平成23年11月11日(2011.11.11)

(51) Int.Cl. F 1  
**C 1 2 P** 11/00 (2006.01) C 1 2 P 11/00  
**C 1 2 N** 1/32 (2006.01) C 1 2 N 1/32  
**C 1 2 R** 1/01 (2006.01) C 1 2 P 11/00  
 C 1 2 R 1:01

請求項の数 4 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2005-361488 (P2005-361488)	(73) 特許権者	000002093
(22) 出願日	平成17年12月15日(2005.12.15)		住友化学株式会社
(65) 公開番号	特開2007-159501 (P2007-159501A)		東京都中央区新川二丁目27番1号
(43) 公開日	平成19年6月28日(2007.6.28)	(74) 代理人	100113000
審査請求日	平成20年6月23日(2008.6.23)		弁理士 中山 亨
		(72) 発明者	朝子 弘之
			大阪市此花区春日出中3丁目1番98号
			住友化学株式会社内
		審査官	小川 明日香

最終頁に続く

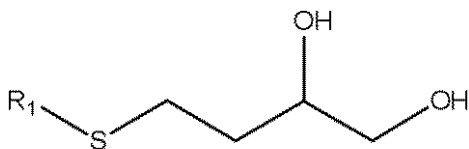
(54) 【発明の名称】 含硫ヒドロキシカルボン酸の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(1)：

【化1】

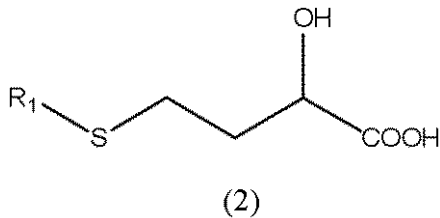


(1)

(式中、R<sup>1</sup>は水素、炭素数1-8のアルキル基を表す。)

で示される含硫ジヒドロキシ化合物に、当該含硫ジヒドロキシ化合物を対応する - ヒドロキシカルボン酸化合物に酸化する能力を有するロドコッカス・ロドクラウス (Rhodococcus rhodochrous) に属する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させる式(2)：

## 【化 2】



(式中、R<sup>1</sup> は前記と同じ意味を表す。)

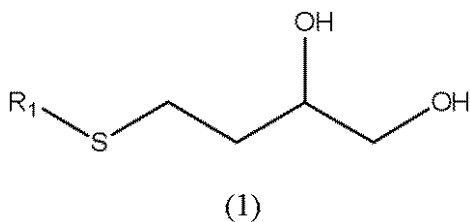
で示される含硫 - ヒドロキシカルボン酸化合物の製造法であり、且つ前記微生物が、式 (1) で示される含硫ジヒドロキシ化合物に前記微生物の菌体又は菌体処理物を作用させる前に、1 級または 2 級のアルコール存在下で培養した微生物であることを特徴とする製造法。

10

## 【請求項 2】

式 (1) :

## 【化 3】

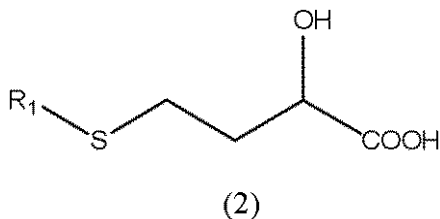


(式中、R<sup>1</sup> は水素、炭素数 1 - 8 のアルキル基を表す。)

で示される含硫ジヒドロキシ化合物に、当該含硫ジヒドロキシ化合物を対応する - ヒドロキシカルボン酸化合物に酸化する能力を有するロドコッカス・ロドクラウス (*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC15610 株、または、ロドコッカス・エスピー (*Rhodococcus sp*) ATCC19148 株の微生物の菌体又は菌体処理物を作用させる式 (2) :

20

## 【化 4】



(式中、R<sup>1</sup> は前記と同じ意味を表す。)

で示される含硫 - ヒドロキシカルボン酸化合物の製造法であり、且つ前記微生物が、式 (1) で示される含硫ジヒドロキシ化合物に前記微生物の菌体又は菌体処理物を作用させる前に、1 級または 2 級のアルコール存在下で培養した微生物であることを特徴とする製造法。

30

## 【請求項 3】

1 級または 2 級のアルコールが 1 級または 2 級の炭素数 1 ~ 5 のアルコールである請求項 1 または 2 記載の製造法。

40

## 【請求項 4】

1 級または 2 級のアルコールがメタノール、エタノール、1 - プロパノール、2 - プロパノール、1 - ブタノール、2 - メチル - 1 - プロパノールまたは 2, 2 - ジメチル - 1 - プロパノールである請求項 1 または 2 記載の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、含硫ヒドロキシカルボン酸の製造法等に関する。

## 【背景技術】

50

## 【 0 0 0 2 】

従来、含硫ヒドロキシカルボン酸を製造するには、シアンヒドリンを加水分解する方法が用いられていた。工業的には触媒として硫酸を使用する方法が知られている。また、ヒドロキシニトリル化合物を微生物の作用により加水分解して対応するヒドロキシカルボン酸に変換する方法（例えば、特許文献 1、特許文献 2、特許文献 3 参照）等が知られている。

しかしながら、触媒として硫酸を使用する方法では、ヒドロキシニトリル化合物と硫酸とが反応した結果、目的物であるヒドロキシカルボン酸と等モル量の硫酸アンモニウムとが副生するために当該副生物の回収工程等が必要となり、工程が煩雑になり、また、微生物を用いてヒドロキシニトリル化合物から対応するヒドロキシカルボン酸化合物を製造する  
10  
方法では、ヒドロキシニトリル化合物からの分解物であるシアン等により微生物が保持する酵素活性が阻害されたり、生成する大量のアンモニウム塩の処理等が必要となるという問題点があり、製造コストの増大を伴うものであった。

## 【 0 0 0 3 】

【特許文献 1】特公昭 5 8 - 1 5 1 2 0 号公報

【特許文献 2】特開平 2 - 8 4 1 9 8 号公報

【特許文献 3】特開平 4 - 4 0 8 9 8 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 0 4 】

大量の副生物の生成や酵素活性の阻害される恐れのない含硫ヒドロキシカルボン酸の製造法を提供する。

【課題を解決するための手段】

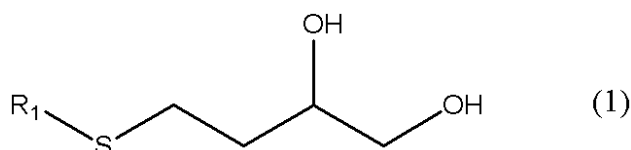
## 【 0 0 0 5 】

即ち、本発明は、

1. 式 ( 1 )

## 【 0 0 0 6 】

【化 1】

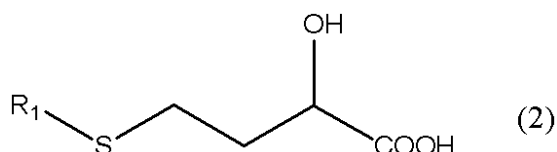


( 式中、 $\text{R}^1$  は水素、炭素数 1 - 8 のアルキル基、または、炭素数 6 - 2 0 のアリール基を表す。 )

で示される含硫ジヒドロキシ化合物に、当該含硫ジヒドロキシ化合物を対応する - ヒドロキシカルボン酸化合物に変換する能力を有する、1 級または 2 級のアルコール存在下で培養したロドコッカス・ロドクラウス ( *Rhodococcus rhodochrous* )、または、ロドコッカス・エスピー ( *Rhodococcus sp.* ) に属する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させることを特徴とする、式 ( 2 )

## 【 0 0 0 7 】

【化 2】



( 式中、 $\text{R}^1$  は前記と同じ意味を表す。 )

で示される含硫 - ヒドロキシカルボン酸化合物の製造法 ( 以下、本発明製造法と記すこともある。 ) ;

2. 前記微生物が、ロドコッカス・ロドクラウス ( *Rhodococcus rhodochrous* ) ATCC15610 株、または、ロドコッカス・エスピー ( *Rhodococcus sp.* ) ATCC19148 株の微生物である  
50

前項 1 記載の製造法；

3 . 式 ( 1 ) で示される含硫ジヒドロキシ化合物における R<sup>1</sup> が炭素数 1 - 8 アルキル基である前項 1 又は 2 記載の製造法；

4 . 1 級または 2 級のアルコールが 1 級または 2 級の炭素数 1 ~ 5 のアルコールである前項 1 ~ 3 記載の製造法；

5 . 1 級または 2 級のアルコールがメタノール、エタノール、1 - プロパノール、2 - プロパノール、1 - ブタノール、2 - メチル - 1 - プロパノール、2, 2 - ジメチル - 1 - プロパノールである前項 1 ~ 3 記載の製造法；

等を提供するものである。

【発明の効果】

10

【0008】

本発明により、大量の副生物の生成や酵素活性の阻害される恐れもなく、含硫ヒドロキシカルボン酸化合物を効果的に製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明製造法について説明する。

式 ( 1 ) で示される含硫ジヒドロキシ化合物、及び、式 ( 2 ) で示される含硫ヒドロキシカルボン酸化合物において、R<sup>1</sup> で示される炭素数 1 - 8 アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基を挙げることができる。また、R<sup>1</sup> で示される炭素数 6 - 20 のアリール基としては、例えば、フェニル基、トリル基、キシリル基、ナフチル基等が挙げられる。

20

式 ( 1 ) で示される含硫ジヒドロキシ化合物における R<sub>1</sub> は、好ましくは、炭素数 1 - 8 のアルキル基である。

尚、本発明製造法により製造され反応液から回収される、式 ( 1 ) で示される含硫ジヒドロキシ化合物に対応した式 ( 2 ) で示される含硫ヒドロキシカルボン酸化合物は、塩の形であってもよい。

式 ( 1 ) の化合物は、例えば、EP1260500もしくはJ. Agri. Food Chem.(1975)1137に記載の方法またはそれに準じて製造することもできる。

【0010】

30

本発明製造法において用いられる含硫ジヒドロキシ化合物を対応する - ヒドロキシカルボン酸に変換する能力を有する、ロドコッカス・ロドクラウス (*Rhodococcus rhodochrous*)、ロドコッカス・エスピー (*Rhodococcus sp.*) 等の微生物であってアルコール存在下で培養した菌体又は菌体処理物としては、例えば、含硫ジヒドロキシ化合物を対応する - ヒドロキシカルボン酸に変換する能力を有する、ロドコッカス・ロドクラウス (*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC15610及びロドコッカス・エスピー (*Rhodococcus sp.*) ATCC 19148の微生物であって、水の存在下に培養された菌体又は菌体処理物が挙げられる。

【0011】

本発明の方法によれば、式 ( 1 ) で示される含硫ジヒドロキシ化合物の一級ヒドロキシル基を優先的に酸化できる。ここで「優先的に酸化できる」とは、含硫ジヒドロキシ化合物の二級ヒドロキシル基の酸化やスルフィド酸化よりも一級ヒドロキシル基の酸化が優先的に進行するという意味である。

40

【0012】

本発明製造法において用いられるロドコッカス・ロドクラウス (*Rhodococcus rhodochrous*)、ロドコッカス・エスピー (*Rhodococcus sp.*) 等の微生物は、炭素源、窒素源、有機塩、無機塩等を適宜含有する各種の微生物を培養するための培地を用いて培養すればよい。

【0013】

当該培地に含まれる炭素源としては、例えば、グルコース、スクロース、グリセロール、でんぷん、アルコール、有機酸及び廃糖蜜が挙げられる。アルコール類としては特に、

50

1級または2級の炭素数1～5までのアルコール類がよく、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-メチル-1-プロパノール、2,2-ジメチル-1-プロパノールが挙げられる。アルコールを添加した培地上記微生物を培養することにより、反応性を高めることができる。窒素源としては、例えば、酵母エキス、肉エキス、ペプトン、カザミノ酸、麦芽エキス、大豆粉、コーンスティプリカー(corn steep liquor)、綿実粉、乾燥酵母、硫酸及び硝酸ナトリウムが挙げられ、有機塩及び無機塩としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸ナトリウム、リン酸1カリウム、リン酸2カリウム、炭酸カルシウム、酢酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸第1鉄及び塩化コバルトが挙げられる。

【0014】

培養方法としては、例えば、固体培養、液体培養(試験管培養、フラスコ培養、ジャーファーメンター培養等)が挙げられる。

培養温度及び培養液のpHは、本微生物が生育する範囲であれば特に限定されるものではないが、例えば、培養温度は約15～45の範囲、培養液のpHは約4～8の範囲を挙げることができる。培養時間は、培養条件により適宜選択することができるが、通常、約1～7日間である。

【0015】

培養された菌体は、そのまま本発明製造法に用いることができる。本微生物の菌体をそのまま用いる方法としては、(1)培養液をそのまま用いる方法、(2)培養液の遠心分離等により菌体を集め、集められた菌体(必要に応じて、緩衝液又は水で洗浄した後の湿菌体)を用いる方法等を挙げることができる。

【0016】

また本発明製造法においては、上記のように得られた菌体処理物を用いることもできる。当該菌体処理物としては、例えば、培養して得られた菌体を有機溶媒(アセトン、エタノール等)処理したもの、凍結乾燥処理したもの若しくはアルカリ処理したもの、又は、菌体を物理的若しくは酵素的に破碎したもの、又は、これらのものから分離・抽出された粗酵素等を挙げることができる。さらに、菌体処理物には、前記処理を施した後、公知の方法により固定化処理したものも含まれる。

【0017】

本発明製造法は、通常、水の存在下で行われる。この場合の水は、緩衝液の形態であってもよい。当該緩衝液に用いられる緩衝剤としては、例えば、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸のアルカリ金属塩、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の酢酸のアルカリ金属塩等が挙げられる。

また本発明製造法は、さらに疎水性有機溶媒を用いて、水と疎水性有機溶媒との存在下で行うこともできる。この場合に用いられる疎水性有機溶媒としては、例えば、ギ酸エチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチル等のエステル類、n-ブチルアルコール、n-アミルアルコール、n-オクチルアルコール等のアルコール類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、メチル-t-ブチルエーテル等のエーテル類、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類及びこれらの混合物が挙げられる。

また本発明製造法は、さらに親水性有機溶媒を用いて、水と親水性有機溶媒との存在下で行うこともできる。この場合に用いられる親水性有機溶媒としては、例えば、メタノール、エタノールなどのアルコール類、アセトンなどのケトン、ジメトキシエタン、テトラヒドロフラン、ジオキサンなどのエーテル類及びこれらの混合物が挙げられる。

【0018】

本発明製造法は、通常、水層のpHが3～10の範囲内で行われるが、反応が進行する範囲内で適宜変化させてもよい。

【0019】

本発明製造法は、通常、約0～60の範囲内で行われるが、反応が進行する範囲内で

10

20

30

40

50

適宜変化させてもよい。

【0020】

本発明製造法は、通常、約0.5時間～約10日間の範囲内で行われる。反応の終点は、原料化合物である含硫ジヒドロキシ化合物の添加終了後、例えば、反応液中の当該含硫ジヒドロキシ化合物の量を、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー等により測定することにより確認することができる。

【0021】

本発明製造法における原料化合物である含硫ジヒドロキシ化合物の濃度は、通常、50% (w/v) の以下であり、反応系中の当該含硫ジヒドロキシ化合物の濃度をほぼ一定に保つために、当該含硫ジヒドロキシ化合物を反応系に連続又は逐次加えてもよい。

10

【0022】

本発明製造法では、必要に応じて反応系に、例えば、グルコース、シュークロース、フルクトース等の糖類、又は、Triton X-100 (登録商標) 若しくはTween 60 (登録商標) 等の界面活性剤等を加えることもできる。

【0023】

反応終了後、反応液を有機溶媒抽出、濾過、濃縮等の通常の後処理を行うことにより、前記含硫ジヒドロキシ化合物に対応した含硫ヒドロキシカルボン酸化合物を反応液から回収すればよい。回収された含硫ヒドロキシカルボン酸化合物は、必要に応じて、カラムクロマトグラフィー、蒸留等によりさらに精製することもできる。

【実施例】

20

【0024】

以下、本発明製造法を実施例により詳細に説明するが、本発明製造法はこれらの例に限定されるものではない。

【0025】

4 - (メチルチオ)ブタン - 1, 2 - ジオールの合成例

磁気回転子を付した100mLフラスコに、3 - プテン - 1, 2 - ジオール 880mg とアゾビスイソブチロニトリル10mg とを加えた。当該混合物を25℃保温下で攪拌しながら、これにメタンチオールを1時間バブリングした。さらに、当該混合物を同温度で1時間攪拌した後、これに窒素を0.5時間バブリングすることにより、残存するメタンチオールを除去し、最終的に1245mgの無色オイルを得た。このオイルをガスクロマトグラフィー面積百分率法により分析したところ、4 - (メチルチオ)ブタン - 1, 2 - ジオールの収率は72.5%であった。尚、未反応のまま残存した3 - プテン - 1, 2 - ジオールの量は、仕込み量の26.6%であった。

30

次いで、得られた無色オイルに、4 - (メチルチオ)ブタン - 1, 2 - ジオールの濃度が10% (w/v) となるように水を加えた後、当該混合物から不溶分 (即ち、アゾビスイソブチロニトリル) をろ過操作によって除去することにより、実施例1、または実施例2で用いられる原料 (10% (w/v) の4 - (メチルチオ)ブタン - 1, 2 - ジオール水溶液) を得た。

【0026】

実施例1 (本発明製造法による、含硫ジヒドロキシ化合物からの含硫ヒドロキシカルボン酸化合物の製造例)

40

試験管に滅菌済み培地 (1Lの水に、表1で示された各種アルコール類20g、ポリペプトン5g、酵母エキス3g、肉エキス3g、硫酸アンモニウム0.2g、リン酸2水素カリウム1g及び硫酸マグネシウム7水和物0.5gを加えた後、pHを7.0に調整したもの) 5mlを入れ、これにRhodococcus rhodochrous ATCC15610株を植菌した。これを30℃で好気条件下、振盪培養した。培養終了後、遠心分離により菌体を分離することにより、生菌体を得た。ねじ口試験管に0.1Mリン酸カリウムバッファー (pH7) を1ml入れ、これに上記の生菌体を加えた後、懸濁した。当該懸濁液に、原料 (10% (w/v) の4 - (メチルチオ)ブタン - 1, 2 - ジオール水溶液) を0.1ml (即ち、4 - (メチルチオ)ブタン - 1, 2 - ジオールが最終濃度として1% (w/v) となるように

50

)を添加した後、得られた混合物を30 で24時間振盪させた。

反応終了後、反応液を0.5mlサンプリングした。当該サンプリング液から菌体を除去した後、生成した2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の量を液体クロマトグラフィーにより分析した。得られた結果を表1に示す。

(含量分析条件)

カラム：Cadenza CD-C18(4.6mm x 15cm、3μm)(Imtakt社製)

移動相：A液 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液、B液 メタノール

時間(分) A液(%) : B液(%)

0 80 : 20

10 80 : 20

20 50 : 50

30 50 : 50

30.1 80 : 20

流量：0.5ml/分

カラム温度：40

検出：220nm

【0027】

【表1】

添加アルコール	2-ヒドロキシ-4-メチル チオ酪酸の生成濃度(g/L /g-湿菌体)
無し	21.8
メタノール	63.7
エタノール	48.4
1-プロパノール	56.8
2-プロパノール	51.2
2-メチル-1-プロパノール	57.6
1-ブタノール	76.3
2,2-ジメチル-1-プロパノール	54.0

【0028】

実施例2 (本発明製造法による、含硫ジヒドロキシ化合物からの含硫ヒドロキシカルボン酸化合物の製造例)

試験管に滅菌済み培地(1Lの水に、表2で示された各種アルコール類20g、ポリペプトン5g、酵母エキス3g、肉エキス3g、硫酸アンモニウム0.2g、リン酸2水素カリウム1g及び硫酸マグネシウム7水和物0.5gを加えた後、pHを7.0に調整したもの)5mlを入れ、これにRhodococcus sp. ATCC19148株を植菌した。これを30 で好気条件下、振盪培養した。培養終了後、遠心分離により菌体を分離することにより、生菌体を得た。ねじ口試験管に0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH7)を1ml入れ、これに上記の生菌体を加えた後、懸濁した。当該懸濁液に、原料(10%(w/v)の4-(メチルチオ)ブタン-1,2 ジオール水溶液)を0.1ml(即ち、4-(メチルチオ)ブタン-1,2 ジオールが最終濃度として1%(w/v)となるように)を添加した後、得られた混合物を30 で24時間振盪させた。

反応終了後、反応液を0.5mlサンプリングした。当該サンプリング液から菌体を除去した後、生成した2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の量を液体クロマトグラフィー

10

20

30

40

50

により分析した。得られた結果を表 2 に示す。

(含量分析条件)

カラム：Cadenza CD-C18 (4.6 mm × 15 cm、3 μm) (Imtakt 社製)

移動相：A 液 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液、B 液 メタノール

時間(分) A 液(%) : B 液(%)

0 80 : 20

10 80 : 20

20 50 : 50

30 50 : 50

30.1 80 : 20

流量：0.5 ml / 分

カラム温度：40

検出：220 nm

【0029】

【表 2】

添加アルコール	2-ヒドロキシ-4-メチル チオ酪酸の生成濃度(g/L /g-湿菌体)	
無し	12.5	
メタノール	63.4	
エタノール	38.9	
1-プロパノール	49.9	
2-プロパノール	25.3	
2-メチル-1-プロパノール	90.7	
1-ブタノール	81.4	
2,2-ジメチル-1-プロパノール	187.2	10

【産業上の利用可能性】

【0030】

本発明により、含硫ヒドロキシカルボン酸化合物を効率的に製造することができる。



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平10-174594(JP,A)  
特開2001-054380(JP,A)  
特開平05-192189(JP,A)  
欧州特許出願公開第01260500(EP,A1)  
ATCC BACTERIA and BACTERIOPHAGES, ATCC, 1996年, 19th edition, p.306-307

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 11/00  
C12N 1/32  
CA/REGISTRY(STN)  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)