

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4820277号
(P4820277)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月9日(2011.9.9)

(51) Int. Cl. F 1
 C 1 2 P 7/26 (2006.01) C 1 2 P 7/26
 C 1 2 P 7/04 (2006.01) C 1 2 P 7/04

請求項の数 6 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2006-342355 (P2006-342355)	(73) 特許権者	000000918
(22) 出願日	平成18年12月20日(2006.12.20)		花王株式会社
(65) 公開番号	特開2008-148663 (P2008-148663A)		東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
(43) 公開日	平成20年7月3日(2008.7.3)		〇号
審査請求日	平成20年12月12日(2008.12.12)	(74) 代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

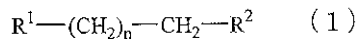
(54) 【発明の名称】 ケトン体及び／又は2級アルコールの製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロトテカ属に属し、次の一般式(1)

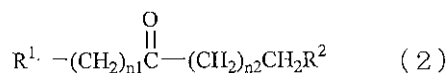
【化1】



(式中、R¹は置換基を有していてもよい炭化水素基を示し、R²は水素原子を示し、nは2~6の整数を示す)

で表される化合物を一般式(2)

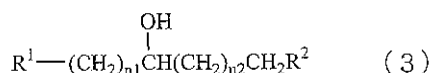
【化2】



(式中、n₂は1~3の整数を示し、n₁+n₂は1~5の整数を示し、R¹及びR²は前記と同じ)

で表されるケトン体及び／又は一般式(3)

【化3】



(式中、 R^1 、 R^2 、 n_1 及び n_2 は前記と同じ)

で表される2級アルコールに変換する能力を有する微生物を、当該一般式(1)で表される化合物の存在下に培養するか、又は当該微生物又はその処理物と当該一般式(1)で表される化合物とを接触させることを特徴とする当該一般式(2)で表されるケトン体及び/又は一般式(3)で表される2級アルコールの製造法。

【請求項2】

前記微生物が、プロトテカ ソフィ、プロトテカ スタグノラ、プロトテカ エリボトリアエ、プロトテカ サーモデュリカ、プロトテカ トリスポア、又はプロトテカ プロトリセンシスである請求項1記載の製造法。

10

【請求項3】

R^1 が炭素数1~20のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基又は芳香族炭化水素基である請求項1又は2項記載の製造法。

【請求項4】

R^1 が炭素数1~18のアルキル基、炭素数2~18のアルケニル基、炭素数2~18のアルキニル基、炭素数3~8のシクロアルキル基、炭素数4~8のシクロアルキニル基、又は炭素数6~14のフェニル基若しくはナフチル基である請求項3項記載の製造法。

【請求項5】

芳香族炭化水素基がフェニルアルキル基である請求項3項記載の製造法。

【請求項6】

n_2 が2~3である請求項1~5のいずれか1項記載の製造法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、各種化粧品等のフレーバーとして有用なケトン体及び2級アルコールを、微生物を利用して製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ケトンや2級アルコールの中には、化粧品のフレーバーとして、また香料や染料の溶剤として有用なものが数多く存在する。これらの化合物の多くは、天然物から抽出する手段の他、アルカンの酸化反応、ケトンやアルコールの酸化還元による相互変換等により製造されている。

30

【0003】

微生物を用いた油脂からメチルケトン及び/又は2級アルコールの製造法は知られており、その反応は油脂の加水分解、脂肪酸の位酸化、脱炭酸及びさらに一部還元によって進行するものと考えられており、脂肪酸からメチルケトン及び/又は2級アルコールに関してはフザリウム属等の微生物を用いれば製造できることが知られている(特許文献1及び2)。

【特許文献1】特開平2-265495号公報

【特許文献2】特開平3-247291号公報

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、アルカン類から直接ケトン体及び/又は2級アルコールを生産する微生物は知られていない。

従って、本発明は、アルカン類からケトン体及び/又は2級アルコールを直接、かつ効率良く生産する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

そこで本発明者は、アルカン類からケトン体及び/又は2級アルコールを直接生産する

50

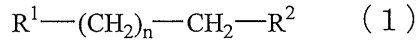
能力を有する微生物を探索したところ、酵母様微細藻であるプロトテカ (Prototheca) に属する微生物の中に、アルカン類の 2 ~ 6 位を酸化する能力を有するものが存在し、当該微生物をアルカン類の存在下に培養するか、当該微生物とアルカン類を接触させれば、ケトン体及び / 又は 2 級アルコールが効率良く製造できることを見出した。

【 0 0 0 6 】

すなわち、本発明は、プロトテカ属に属し、次の一般式 (1)

【 0 0 0 7 】

【化 1】



10

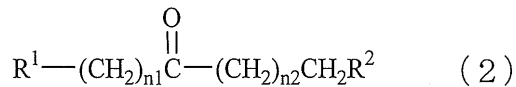
【 0 0 0 8 】

(式中、 R^1 は置換基を有していてもよい炭化水素基を示し、 R^2 は水素原子又は - C O O R^3 (R^3 は水素原子又は炭化水素基を示す) を示し、 n は 1 ~ 6 の整数を示す)

で表される化合物を一般式 (2)

【 0 0 0 9 】

【化 2】



20

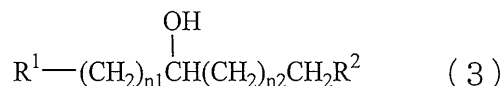
【 0 0 1 0 】

(式中、 n_1 は 0 ~ 5 の整数、 n_2 は 0 ~ 5 の整数を示し、 $n_1 + n_2$ は 0 ~ 5 の整数を示し、 R^1 及び R^2 は前記と同じ)

で表されるケトン体及び / 又は一般式 (3)

【 0 0 1 1 】

【化 3】



30

【 0 0 1 2 】

(式中、 R^1 、 R^2 、 n_1 及び n_2 は前記と同じ)

で表される 2 級アルコールに変換する能力を有する微生物を、当該一般式 (1) で表される化合物の存在下に培養するか、又は当該微生物又はその処理物と当該一般式 (1) で表される化合物とを接触させることを特徴とする当該一般式 (2) で表されるケトン体及び / 又は一般式 (3) で表される 2 級アルコールの製造法を提供するものである。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明方法によれば、種々のアルカン類から直接、かつ効率良く、ケトン体及び / 又は 2 級アルコールを製造することができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 4 】

本発明に用いられる微生物は、プロトテカ属に属し、一般式 (1) の化合物を、一般式 (2) のケトン体及び / 又は一般式 (3) の 2 級アルコールに変換する能力をするものであれば、特に限定されないが、プロトテカ ゾフィ (Prototheca zopfii)、プロトテカ

スタグノラ (Prototheca stagnora)、プロトテカ エリボトリアエ (Prototheca erio botryae)、プロトテカ サーモデュリカ (Prototheca thermoturica)、プロトテカ トリスポア (Prototheca trispoa)、プロトテカ プロトリセンシス (Prototheca protori censis) 等が挙げられる。具体的な菌株としては、Prototheca stagnora JCM 9642、Prot

50

otheca zopfii NBRC 6998、Prototheca zopfii NBRC 7532、Prototheca zopfii NBRC 7533、Prototheca zopfii NBRC 7534、Prototheca zopfii NBRC 7535、Prototheca zopfii NBRC 7536、Prototheca zopfii JCM 9400、Prototheca zopfii JCM 9646、Prototheca eriobotryae NBRC 32449、Prototheca thermoturica JCM 8557、Prototheca trispoa NBRC 6996、Prototheca protoricensis IAM C-177等が挙げられる。これらの菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構の生物遺伝資源部門（NBRC）、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（RIKEN NBRC-JCM）又は東京大学分子生物学研究所のIAMCCから入手可能である。

【0015】

本発明におけるケトン体及び/又は2級アルコールの製造は、一般式(1)の化合物の存在下に上記微生物を培養するか、又は上記微生物又はその処理物と一般式(1)の化合物とを接触させることによって行なわれる。

10

【0016】

まず、培養法については、通常、一般式(1)の化合物を含有する培地で上記微生物を培養し、当該培養物から目的ケトン体及び/又は2級アルコールを採取することにより行なわれる。

【0017】

ここで培地には、上記微生物の生育に必要な栄養源、例えば窒素源、無機物、微量栄養素、一般式(1)の化合物以外の炭素源を含有せしめるのが好ましい。窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酒石酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、アスパラギン、ペプトン、コーンステープリカー等が挙げられる。無機物、微量栄養素としては、硫酸マグネシウム、リン酸二水素カリウム、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅、塩化第二鉄、モリブデン酸アンモニウム、ヨウ化カリウム、ホウ酸、ビタミン類等が用いられる。また、炭素源としては、グルコース、スクロース、グリセリン、デキストリン、カルボキシメチルセルロース等が挙げられる。

20

【0018】

培地中における一般式(1)の化合物の濃度は、目的物の生産性及び回収性の点から、0.5~8質量%、さらに1~4質量%、特に2~4質量%が好ましい。

【0019】

培養条件は、好氣的条件下で液体培養法、例えば振盪培養法、通気攪拌培養法が好ましい。培養温度は28℃、pH5~7で3~7日間行なうのが好ましい。

30

【0020】

接触法は、一般式(1)の化合物を添加しない以外は前記条件と同様にして培養した上記微生物の培養上清、培養物から採取した酵素等に、一般式(1)の化合物を接触させることにより行なわれる。接触反応は、水性媒体、水性溶液中で28℃、pH5~7の条件で3~7日間行なうのが好ましい。また接触反応は、上記微生物を固定化した固定化菌体、酵素を固定化した固定化酵素を用いて行なうことも可能である。

【0021】

原料化合物を示す一般式(1)中、R¹で示される炭化水素基としては、炭素数1~20の炭化水素基、例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、芳香族炭化水素基等が挙げられる。

40

【0022】

アルキル基としては直鎖又は分岐鎖のアルキル基が好ましく、特に炭素数1~20、特に1~18のアルキル基が好ましい。アルケニル基としては、炭素数2~18のアルケニル基が好ましい。アルキニル基としては炭素数2~18のアルキニル基が好ましい。シクロアルキル基としては、炭素数3~8のシクロアルキル基が好ましい。シクロアルケニル基としては、炭素数4~8のシクロアルキニル基が好ましい。芳香族炭化水素基としては、炭素数6~14の芳香族炭化水素基、例えばフェニル基、ナフチル基等が好ましい。

【0023】

これらの炭化水素基に置換し得る基としては、ハロゲン原子、アルコキシ基、ハロゲノ

50

アルキル基、ハロゲンアルコキシ基等が挙げられる。これらの置換基の炭素数は1～8が好ましい。

【0024】

R^2 としては水素原子又は $-COOR^3$ (R^3 は水素原子又は炭化水素基を示す)を示すが、水素原子が好ましい。

【0025】

R^3 で示される炭化水素基としては、アルキル基、アルケニル基、芳香族炭化水素基等が挙げられる。特に炭素数1～8のアルキル基、炭素数2～8のアルケニル基、炭素数6～14の芳香族炭化水素基が好ましい。 R^3 としては、水素原子が好ましい。

【0026】

本発明方法によれば、アルカン類の末端から2～6位のメチレン基がケトン化及び/又はヒドロキシル化され、そのうち、3～5位のメチレン基、特に4～5位のメチレン基が主にケトン化及び/又はヒドロキシル化される。従って、目的物である一般式(2)及び(3)中、 n_1 が0～5であり、 n_2 が1～4であるのがより好ましい。さらに、 n_1 が0～3であり、 n_2 が3又は4であるのが特に好ましい。

【0027】

培養物又は接触反応混合物から、目的化合物を分離するには、各種溶媒による抽出、クロマトグラフィー等に付すことにより行なわれる。

【実施例】

【0028】

実施例1 ケトン体蓄積型プロトテカ属微生物のスクリーニング

プロトテカ属の各菌株を、試験管中の5mLのGY培地(2.0%酵母エキス, 1.0%グルコース)に4% n-ヘキサデカンを添加した液体培地に接種し、28℃で5日間往復振盪培養(140 rpm)した。培養終了液に1mLのクロロホルム及び2mLのメタノールを添加し激しく攪拌後10分間放置した。その後さらに1mLのクロロホルム及び1mLの1.5% KClを添加し攪拌後、遠心分離を行い、クロロホルム層(下層)を回収した。クロロホルムで抽出した脂溶性画分を遠心エバポレーターで濃縮しガスクロマトグラフィー(GC)に供し、保持時間8.8分に出現するヘキサデカノンの有無を確認した。その結果を表1に示した菌株で、ケトン体の生成が認められた。なおGC分析は、カラム: HR-52(信和化工)、分析装置: GC-17A(Shimadzu)、カラム温度: 180～240℃、2分昇温、注入口検出器温度: 250℃、検出器: FID、キャリアガス: He、メイクアップガス: N_2 の条件で行なった。

【0029】

10

20

30

【表 1】

菌株名	ケトン体生成の有無
<i>Prototheca stagnora</i> JCM	+
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC	+
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC	+
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC	+
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC	+
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC	+
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC	+
<i>Prototheca zopfii</i> JCM	+
<i>Prototheca zopfii</i> JCM	+
<i>Prototheca eriobotryae</i> NBRC	+
<i>Prototheca thermoturica</i> JCM	+
<i>Prototheca trispoa</i> NBRC	+
<i>Prototheca protoricensis</i> IAM C-177	+

10

20

【0030】

実施例 2 ケトン体高蓄積型菌株の選抜

実施例 1 によりケトン体の蓄積が確認された菌株を用い、20 mL 容三角フラスコ中の 4 mL の GY 培地 (0.5% 酵母エキス, 0.5% グルコース) に 4% n-ヘキサデカンを添加した液体培地に接種し、28℃ で 5 日間往復振盪培養 (140 rpm) した。培養終了後、培養液に内部標準として 7-ペンタデカノンを 250 μg 添加し、実施例 1 と同様に脂溶性画分をクロロホルムにて抽出し、GC 分析に供した。内部標準のピーク面積を元に算出したケトン体の生産量を表 2 に示した。

30

【0031】

【表2】

菌株名	ケトン体生産量 (mg/L)
<i>Prototheca stagnora</i> JCM 9642	35.4
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC 6998	17.8
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC 7532	18.4
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC 7533	4.6
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC 7534	3.9
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC 7535	212.6
<i>Prototheca zopfii</i> NBRC 7536	329.9
<i>Prototheca zopfii</i> JCM 9400	357.4
<i>Prototheca zopfii</i> JCM 9646	34.7
<i>Prototheca eriotryae</i> NBRC 32449	28.6
<i>Prototheca thermodurica</i> JCM 8557	31.9
<i>Prototheca trispora</i> NBRC 6996	185.5

10

20

30

【0032】

実施例3 ケトン体生産量

実施例2において最大の生産量が認められたプロトテカ ゾフィ JCM9400株 (*Prototheca zopfii* JCM9400) を用い、20mL容三角フラスコ中のYeast培地(0.5%酵母エキス)又はGly培地(0.5%グリシン、0.07%リン酸1カリウム、0.03%リン酸2カリウム、0.03%硫酸マグネシウム・7水和物、0.03%硫酸鉄・7水和物、10ppmチアミン塩酸塩)に4%から8%のn-ヘキサデカンを添加した液体培地に接種し、28℃で5日間から8日間往復振盪培養(140rpm)した。培養終了後、実施例2と同様に7-ペンタデカノンを内部標準として添加し、クロロホルムにて抽出した脂溶性画分をGC分析に供した。内部標準のピーク面積を元に算出したケトン体の生産量を表3に示した。

40

【0033】

【表 3】

アルカン濃度(%)	ケトン体生産量(g/L)	
	Yeast 培地	Gly 培地
4.0	0.7~0.9	0.7
5.0	1.0	1.5
8.0	1.70	0.02

【0034】

10

実施例 4 ケトン体の構成比（経時変化）

n - ヘキサデカンを資化させた際に蓄積するヘキサデカノンのケトン基の位置を確認するために、高極性カラムを用いたGC分析を行なった。使用したカラムはTC - WAX（GLサイエンス社製）、分析は、カラム温度：120～180 まで2 /分昇温、180～220 まで10 /分昇温、注入口検出器温度：250、検出器：FID、キャリアガス：He、メイクアップガス：N₂の条件で行った。プロトテカゾフィ JCM 9400株を用い、実施例2と同様の条件で培養を行ない、3日目から12日目までの培養液からそれぞれ抽出した脂溶性画分を上記GC分析条件により解析し、ヘキサデカン構成比率を算出した。結果を表4に示した。

【0035】

20

【表 4】

	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	10日目	12日目
5位ケトン体	73.4	73.4	71.6	74.2	72.9	77.2	76.7
4位ケトン体	24.5	24.8	26.5	24.0	25.2	21.0	21.7
3位ケトン体	2.1	1.8	1.8	1.8	1.9	1.8	1.6

構成比(%)

【0036】

実施例5 ケトン体の構成比(基質による変化)

炭素鎖長12から17までのn-アルカンをそれぞれ20mL容三角フラスコ中の4mLのGY培地に4%添加し、プロトテカゾフィJCM9400株を接種した。28℃で7日間往復振盪培養(140rpm)後、培養液から抽出した脂溶性画分を実施例3と同様の条件でGC分析に供し、ケトン体構成の95%以上を占める4位体、5位体の比率を算出した。結果を表5に示した。

【0037】

10

20

30

40

50

【表 5】

	C12	C13	C14	C15	C16
5位ケトン体	64.4	82.6	68.2	74.9	78.9
4位ケトン体	35.6	17.4	31.8	25.1	21.1

構成比(%)

【0038】

実施例 6 アルコール体生産量

実施例 2 に用いた菌株を、20 mL 容三角フラスコ中の 4 mL の G Y 培地（0.5% 酵母エキス，0.5% グルコース）に 4% n - ヘキサデカンを添加した液体培地に接種し、28 で 5 日間往復振盪培養（140 rpm）した。培養終了後、培養液に内部標準として 7 - ペンタデカノンを 250 μ g 添加し、実施例 2 と同様に脂溶性画分をクロロホルムにて抽出し、GC 分析に供した。保持時間 9.0 分に出現する内部標準のピーク面積を元に算出したアルコール体の生産量を表 6 に示した。

【0039】

【表 6】

菌株名	アルコール生産量 (mg/L)
<i>Prototheca stagnora</i>	13.5
<i>Prototheca zopfii</i>	48.4
<i>Prototheca zopfii</i>	18.4
<i>Prototheca zopfii</i>	4.6
<i>Prototheca zopfii</i>	18.6
<i>Prototheca zopfii</i>	19.9
<i>Prototheca zopfii</i>	28.2
<i>Prototheca zopfii</i>	20.4
<i>Prototheca zopfii</i>	37.3
<i>Prototheca eriobotryae</i>	19.7
<i>Prototheca thermoturica</i>	10.1
<i>Prototheca trispora</i>	46.7

10

20

30

【0040】

実施例7 ケトン体及びアルコール体の構造解析

4%のヘキサデカンを含むYeast培地(0.5%酵母エキス)500mLにて培養したプロトテカゾフィ JCM9400 (*Prototheca zopfii* JCM9400)より実施例1と同様に脂溶成分をクロロホルムにて抽出し、薄層クロマトグラフィーに供した。シリカゲルでコートされたMERCK社製1.05721(200×200×0.25mm)を用い、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸(80:20:1)にて展開した。展開後0.01%ブリン溶液を噴霧し、紫外線照射にて発色するRf値0.5以下のスポットを掻き取り、ヘキサン/水(4:1)を加えて混合し、脂溶成分であるヘキサン層を回収し減圧エバポレーター(EYERA社)によりヘキサンを除いた。

40

取得した脂質成分をアセトニトリル/水(80:20)に溶解しHPLCに供した。HPLCはSIMADZU社LC-10Aシステムを用い、カラム: Shim-pack CLC-ODS(M)、溶媒: アセトニトリル/水(80:20)、流量: 1mL/min、

50

検出器：R Iにて行なった。本条件下でR . T . 3 0 . 0分付近、3 3 . 1分付近の化合物を¹H - N M R解析に供したところ、それぞれ5 - ヘキサデカノール、5 - ヘキサデカノンと同定された。

【 0 0 4 1 】

なお、市販の試薬5 - ヘキサデカノール (S I G M A A L D R I C H) 及び5 - ヘキサデカノン (A l f a A e s a r) と培養サンプルのG C解析結果の比較により、各々の生産物の特定を行なった。また、G C - M S解析にても各々のフラグメントパターンが一致することを確認した。G C - M Sの解析条件は、カラム：H R - S S - 1 0 (信和化工)、分析装置：G C M S - Q P 5 0 5 0 (S h i m a d z u)、カラム温度：1 6 0 ~ 2 2 0 、 2 / 分昇温、注入口検出器温度：2 5 0 、検出器：F I D、キャリアガス：H e、メイクアップガス：N₂で行なった。

10

【 0 0 4 2 】

実施例 8

ヘキサデカンに代えて、1 - トリデセン、1 - ヘキサデセン、フェニルノナンを用いて、実施例 3 と同様に培養し、その培養液をG C分析したところ、1 - トリデセンからは1 - トリデセン - 9 - オンの生成を、1 - ヘキサデセンからは1 - ヘキサデセン - 1 2 - オンの生成を、フェニルノナンからは5 - フェニルノナノンの生成を確認した。

フロントページの続き

- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
- (74)代理人 100121153
弁理士 守屋 嘉高
- (74)代理人 100134935
弁理士 大野 詩木
- (74)代理人 100130683
弁理士 松田 政広
- (74)代理人 100140497
弁理士 野中 信宏
- (72)発明者 瀧村 靖
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2 6 0 6 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 清水 昌
京都府京都市右京区常盤山下町6 - 9
- (72)発明者 櫻谷 英治
京都府向日市上植野町車返8 - 1 0 京大向日職員宿舎4 - 2 0 5

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 特開平02 - 2 6 5 4 9 5 (J P , A)
特開平03 - 2 4 7 2 9 1 (J P , A)
Process Biochem., 2005, Vol.40, p.3429-3433
Process Biochem., 1998, Vol.33, p.541-546
J. Biosci. Bioeng., 2002, Vol.94, No.2, p.160-165

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 P 7 / 0 0 - 7 / 6 6
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
WPI