(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12P 41/00

(45) 공고일자 1997년04월11일
(11) 공고번호 특1997-0005052

(21) 출원번호	특1988-0701515	(65) 공개번호	특1989-0700680
(22) 출원일자	1988년11월22일	(43) 공개일자	1989년04월26일
(86) 국제출원번호	PCT/US 88/01098	(87) 국제공개번호	WO 88/07582
(86) 국제출원일자	1988년03월31일	(87) 국제공개일자	1988년10월06일
(81) 지정국	국내특허 : 미국		
(30) 우선권주장	033,962 1987년04월01일 미국(US)		
(73) 특허권자 세프라코오르 인코포레이티드 스테펜 엘. 매트손
미합중국, 매사추세츠 07152, 마를브로우, 로케 드라이브 33
(72) 발명자 스테펜 엘. 매트손
미합중국 매사추세츠 01752 마를브로우 로케 드라이브 33
(74) 대리인 강명구

심사관 : 이세진 (책자공보 제4935호)

(54) 다상 및 추출막 반응기중에서의 입체이성체의 분할방법

요약

내용없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

다상 및 추출막 반응기중에서의 입체이성체의 분할방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 유기용매중에서 효소활성막의 한쪽에다 공급된 라세미 혼합물을 효소로 입체특이성이 있게 가수분해하여 생성시킨 광학성이 풍부한 유기산(및 수용성 알코올 부생물)을 막의 다른쪽으로 공급되는 역류수성 공정액으로 분리하는 유기가용성 에스테르의 라세미 혼합물의 분할방법의 개략도.

제2도는 반응공정에 있는 각종 유기가용성 및 수용성 물질들의 상분배거동과 확산 및 반응유량을 설명할 목적으로 접촉해 있는 유기 및 수성공정액과 더불어 다상막 반응기 공정중에서의 효소활성막의 단면개략도.

제3도는 종래의 분산상의 다상 바이오리액터 조작시의 3상의 거동을 비교한 도면.

제4도는 비대칭의 친수성 미세다공질 유공섬유막내에 효소가 가역적으로 들어있는 것을 예시한 본 발명의 바람직한 실시태양의 개략도.

제5도는 유기상 및 수성상 공급물이 있고 생성물을 장치로 공급하고 제거하는 유공섬유로된 다상효소막 반응기의 개략도.

제6도는 제5도의 반응기내에서 유기상 공급물중의 유기 가용성의 에스테르의 라세미 혼합물을 공급하여 비교적 비반응성인 R-에스테르와 S- 산이 풍부한 유기상 및 수성상 생성물을 각각 제거함으로서 유기 및 수성유동물중에 포함된 물질을 광학적으로 정제해서 반대되는 입체화학적 배위를 가지도록 하는 비대칭 S-산의 광학분할 방법을 예시한 도면.

제7도는 비활성 이성체를 라세미화하여 공정중에 재순화시켜 필요로 하는 입체 화학배위를 가진 물질만을 제조하는 공정에서 광학적으로 정제된 생성물만을 분할/라세미화/재순환시키는 전공정도.

제8도는 수용액중에서 효소 활성막의 한쪽에다 혼합물을 공급하고 효소촉매 에스테르화 반응에서 라세미산 혼합물의 이성체성분을 수용성 알코올과 입체선택적으로 혼합하여 막의 반대쪽으로 공급되는 에스테르 생성물용의 물과 비혼화성인 유기용매로된 역류 공정액에 의해 광학적으로 풍부한 에스테르 반응 생성물을 제거하는 유기산의 라세미 혼합물의 분할방법의 개략도.

제9도는 반응공정에 있는 각종 유기가용성 및 수용성 물질들의 상분배거동과 확산 및 반응유량을 설명하는 목적으로 접촉해 있는 유기 및 수성공정액과 더불어 추출막 반응기내에 있는 효소막의 단면개략도.

제10도는 종래의 분산상의 추출 바이오액터 조작시의 3상의 거동을 비교한 도면.

제11도는 유기상 공정액을 통해 효소활성막의 한쪽에다 공급된 라세미 혼합물중의 한가지 에스테르 이성체를 효소에 의하여 입체특이성있게 가수분해하여 비대칭 및 유기가용성 알코올(및 상응한 수용성 산)로 제조함에 있어서 미반응 에스테르 이성체와 생성물인 알코올 이성체를 유기공정액을 통해 막반응기로부터 배출시키며 산성의 생성물을 수성상을 통해 배출시키는 유기가용성 에스테르의 라세미 혼합물의 분할방법의 개략도.

제12도는 나프록센의 에스테르 유도체의 라세미 혼합물을 유기용매 형태의 반응기로 공급하고 수성 완충액을 통하여 필요로 하는 분할된 S산 생성물을 제거하고 미반응R-에스테르를 라세미화해서 반응기로 재순환시켜 필요로 하는 S-나프록센산 생성물로 전환시킴으로써 S 활성효소를 이용한 광학적으로 정제된 나프록센의 다상효소막 반응기에 의한 제조방법을 예시한 도면.

제13도는 나프록센산의 라세미 혼합물을 수용액형태의 반응기로 공급하고 불필요한 R형의 산을 알코올성 공반응물(예시되어 있지 않음)과 반응시켜 유기가용성의 나프록센의 R 에스테르를 제조하며 또한 이 R 에스테르를 유기용매를 통해 반응기로부터 제거한 다음 라세미화하고 가수분해하여 다시 산으로 만들어 공정중으로 재순환시켜 최종적으로 필요한 S-나프록센산 생성물로 전환시킴으로써 광학적으로 정제된 나프록센의 R 활성 효소를 이용한 추출 효소막 반응기에 의한 제조방법을 예시한 도면.

제14도는 수성의 공정액을 통해 막반응기로부터 수용성의 D-아미노산 생성물을 얻고 미반응의 S형의 유기가용성 효소에 의한 전환 반응처리를 함으로써 라세미의 유기가용성 치환된 히단토인 선구물질로부터 D-입체선택성 히단토이나 아제 효소를 이용한 분할된 D-아미노산의 다상 효소막 반응기에 의한 제조공정도.

제15도는 수용성 D-아미노산을 제조하여 수성공정액을 통해 막반응기로부터 분리하고 필요에 따라서는 산가수분해법에 의해 임의로 상응한 D-아미노산으로 전환시키고, 미반응의 L형 유기가용성 아미노 니트릴을 자연 라세미화하여 결과적으로 효소에 의한 전환 반응처리를 함으로써 라세미의 유기가용성 아미노 니트릴 선구물질로부터 D-입체선택성 니트릴라아제 또는 니트릴 히드라타아제 효소를 이용한 분할된 D-아미노 아미드와 D-아미노산의 다상 효소막 반응기에 의한 제조공정도.

제16도는 유기상 글리시딜 부티레이트 입체이성체의 라세미 혼합물을 리파아제 활성막의 한쪽표면에다 공급하고 불필요한 S 에스테르중에서 유기상을 선택적으로 소모시킨 다음 필요로 하는 R 에스테르가 풍부한 생성물을 제조함으로써 광학적으로 분할된 R-글리시딜 부티레이트의 다상 효소막 반응기에 의한 제조공정 및 반응물/생성물 정제공정도.

[발명의 상세한 설명]

1.0. 본 발명의 배경

효소에 의한 분할방법은 오래전부터 알려져 있는터이고 라세미 혼합물의 분리에 특히 이용되어 왔다. 불행하게도 상업적인 중요성을 가진 여러 가지 많은 비대칭 화합물은 소수성(hydrophobic)이기 때문에 그 물에 대한 용해도는 극히 낮다. 효소는 수용액중에서 작용하지만 유기용매중에서는 작용하지 않는 것이 일반적이므로 효소촉매에 의한 생물학적 전환 후 선택된 수용성이 불량한 광학이성체의 분리가 어려웠다.

1.1. 광학적인 순도의 중요성

수만은 유기화합물들은 광학활성인 형태로 존재하는데 즉 평면 편광면을 회전시킬 수 있는 능력을 가지고 있다. 광학 활성화합물을 기술함에 있어서 D 및 L 또는 R 및 S 등의 접두사를 사용해서 비대칭 중심(chiral center)주위에 있는 분자의 절대배위를 나타내고 있다. 접두사(+) 및 (-) 또는 d 및 ℓ을 사용해서 화합물에 나타내는 평면 편광의 회전부호를 나타내는데, (-) 또는 ℓ은 화합물의 좌선성(levorotatory)임을 뜻하는 것이고 (+) 또는 d는 화합물이 우선성(dextrorotatory)임을 뜻하는 것이다. 주어진 화학구조에 있어서 입체이성체로 불리우는 이들 화합물은 이들이 상호간에 거울상 관계라는 점외에는 동일하다. 특수한 입체이성체를 거울상 이성체라하기도 하며 이러한 이성체의 혼합물을 흔히 거울상 이성체 혼합물 또는 라세미 혼합물이라고도 한다.

광학활성의 특징은 4개의 상이한 원자 또는 분자에 결합돈 탄소원자들 주위의 분자 비대칭에 기인하고 있다. 비대칭 탄소가 하나뿐이던지 간혹 비대칭 중심(chiral center)이라고도 하는 것이 하나뿐일 때는 두가지 입체이성체가 가능하다. n개의 비대칭 탄소 즉 비대칭 중심이 있을때는 가능한 입체이성체의 수는 2까지 증가한다. 따라서 비대칭 중심이 3개인 분자의 입체이성체는 8개이다.

입체이성체 사이의 구조적인 차이는 이해하기 어렵고 정상적인 화학반응에 있어서 중요성이 없겠으나 생물학적인 계(system)가 관여하게 될 경우 즉 화합물들을 효소 촉매반응에 이용할 경우에는 심각해진다. 이와 같이 L-아미조산은 인체내에서 신진대사를 일으키지만 상응한 D-유사체들은 그러하지 아니하고 D-글루코오스만이 포스포릴화 하여 글리코겐으로 되던지 중간대사중의 해당(解糖)과정 및 산화과정에 의해 분해된다. 마찬가지로 베타차단제, 페로몬, 프로스테글란딘, 스테로이드, 향미제, 향료, 의약물, 살충제, 제초제 및 기타 허다한 화합물들은 중요한 입체 특이성을 나타낸다. 살충제 분야에 있어서 Tessier가 보고한 바에 의하면(Shemistry and Industry, March 19, 1984, p.199) 피레트로이드(pyrethroid)계 살충제인 델타메트린(deltamethrin)의 8가지 입체이성체중 불과 두가지만이 생물학적인 활성을 가지고 있다는 것이다.

단일 이성체에 있어서 생체활성과 관련된 동일한 내용이 페녹시 프로피오네이트와 할로프로피오네이트 유도체(이들은 각각 비대칭 중심이 하나이고 두가지 광학이성체 형태로 존재함)를 비롯해서 수다한 여러 가지 살충제에 관해서 나와있다. 입체 화학적인 순도는 약제학 분야에서 마찬가지로 중요한데 20가지의 가장 중요한 약물중에서 12가지가 비대칭성을 가지고 있다. 한가지 경우를 보건데 나프록센(naproxen), 즉 (+)-S-2(6-메톡시-2-나플틸)프로피온산은 2-아릴-프로피온산에 속하는 가장 중

요한 두가지중 한가지로서 관절염 치료등에 사용되는 비스테로이드성 소염활성을 가지고 있는 것이다. 이경우에 있어서 약물의 S(+) 거울상 이성체는 R(-) 거울상 이성체보다 치료효능이 28배나 크다. 비대칭성 의약물의 또다른 예로서는 베타차단제(beta-blocker)의 경우를 볼 수 있는데 L형 프로프라놀은 D-거울상 이성체 보다 100배나 큰 효능을 가지고 있다.

표준 유기합성법에 의해 비대칭(chiral)화합물을 제조하면 일반적으로 라세미 혼합물이 되는데 이것은 혼합물중의 어떤 입체이성체는 생물학적으로 또는 기능적으로 비활성이기 때문에 특수한 생물학적인 활성이 비교적 작다. 결과적으로 다량의 물질을 사용해야만 효과적인 용량(用量)이 되고 입체화학적으로 주정확하고 비활성인 성분이 첨가되기 때문에 제조경비도 비싸진다.

몇가지 경우에 있어서 어떤 이성체들은 단순히 비활성이라기 보다 오히려 실제로 유해하다. 예컨데 탈리도마이드(thalidomide)의 D-거울상 이성체는 안전하고도 효과적인 진정제여서 임신중 입덧을 없애주는데 처방되고 있다. 그러나 이것의 L-탈리도마이드 거울상 이성체는 돌연변이유발원(mutagen)임이 밝혀졌다.

1.2. 광학적으로 순수한 화합물의 종래 제조방법.

입체선택적인 합성법이 여러 가지가 있다. 예를들자면 광학적으로 순수한 델타메트린 즉 [(1R,3R)-3-(2,2-디브로모비닐)-2,2-디멜틸 시클로프로판 카르복신산]의 합성 방법이 개발되어 있지만 이 방법은 합성 시간이 길고 복작하며 경비가 소요되는 방법이다[Tessier, J Dhem. and Ind, Marsh 9, 1984, p.199]. 더욱이 한가지 특수한 거울상 이성체를 제조할 수 있는 합성법을 광학적으로 활성인 다른 화합물을 제조하는 방법느로 사용할 수 없다. 현재 필요로 하는 것은 정상적인 화학반응에 의해 제조되는 라세미 혼합물의 일반화된 분할방법인데 현재 여러 가지 접근방법을 사용하고 있다.

라세미 혼합물이란 최소한 1차 및 2차 입체이성체가 어떠한비율로 존재하는 혼합물을 일컫는 말이다. 더욱이 분할이란 말은 1차 라세미 혼합물을 분리해서 2차 및 3차 혼합물을 얻는 방법을 말하는데 여기서 2차 및 3차 혼합물에 있어서의 두가지 입체이성체의 비율은 1차 라세미 혼합물에 있어서 비율의 경우보다 상이한데 즉 그 비율은 다른것에 비해 훨씬 크다. 널리 이용되는 접근방법은 라세미 혼합물로부터 필요로 하는 화합물들을 선택적으로 침전시키는 것이다. 예컨데 Yoshioka 등의 방법 [미국 특허 제3,879,451호]에서는 광학활성의 방향족 아민을 사용하여 (±)-cis- 및 (±)-trans)-크리산템산의 아민염을 회수하고 있는 것이다. Paven등[미국 특허 제4,257,976호]은 L 또는 D N-메틸-에페드린을 사용해서 혼합물을 처리하여 상응한 염을 얻는다음 이것들을 분리해서 가수분해하여 분할된 산을 제조함으로써 D,L-cis-크리산템산과 D,L-trans-크리산템산을 분할하였다. Halmos의 방법(미국 특허 제4,151,198호)에서는 D-(-)-2-(2,5-디메틸벤질아미노)-1-부탄올로 N-아실-D,L-(±)-페닐알라닌 이성체의 혼합물을 처리하여 결정질의 염을 얻고 이것으로부터 N-아실-[(+)-페닐알라닌을 회수하고 있다. Kameswaran[미국특허 제4,454,344호]은 라세미산(racemic acid)을 광학활성인 아민으로 처리하여 우선성의 2-(p-디플루오로메톡시페닐)-3-메틸부티르산을 분리하였다. 신코니딘, 글루카민 또는 N-메틸글루카민등과 같은 아민분할제에 의해 생성된 부분 입체이성체의 염을 입체선택적인 결정화법에 의해 나프록센의 S(+)-거울상 이성체를 얻을 수 있다[Harrison, I.T. et al., J. Med. Dhem., 13:203(1970) ; Felder, E. et al., 영국 특허출원 GB 2025968A(1980)].

몇가지 경우에 있어서 Dannennberg등(미국 특허 제4,285,884호)이 방향족 o-히드록시알데히드로 먼저 혼합물을 처리해서 아조메틴 유도체를 얻음으로써 라세미 D,L-알파-아미노카르복실산을 분할한 경우와 같이 2단계법을 사용하고 있다. 이 유도체를 광학적으로 활성인 아민염기로 즉시에 처리하면 염이 생성시켜 이것을 분리하였다. 이 염을 산가수분해 처리하여 필요로 하는 알파-아미노카르복실산 이성체를 얻었다.

위에 나온 여러 방법들에 의해 성공적으로 라세미 혼합물을 분할했는데 그 이유는 초기의 라세미 화합물들과는 달리 상이한 물리적인 성질을 가징 부분 입체이성체가 광학적으로 순수한 시약들에 의해 제조되었기 때문이다. 따라서 분열 결정화 또는 기타 물리적인 수단을 사용해서 부분입체 이성체를 분리할 수 있다.

부분입체 이성체를 크로마토그래피에 의해 분리할 수도 있다. 예를들자면 Pollock등[J, Gas Chromatogr. 3:174(1965)]은 가스크로마코그래피에 의해 부분입체 이성체인 아미노산을 분할하였다. Mikes등[J. Chromatogr. 112:205(1976)]은 액체 크로마토그래피를 사용하여 부분입체 이성체인 디펩디드를 분할하였다. 대부분의 경우에 있어서, 크로마토그래피에 의한 분리도중 정지상에서 광학활성인 시약을 사용하고 라세미 혼합물을 얻어 이것을 광학적으로 순수한 시약과 금속이온을 함유하는 용리액으로 처리했다. 생성된 부분입체 이성체인 착화합물이 크로마토그래피계에 있어서 상이한 분배계수를 가졌기 때문에 분할이 된 것이다.

1.3. 효소에 의한 분할

이제까지 나온 모든 방법들은 적당한 광학적으로 활성인 시약을 사용하고 있으나 이런 시약들은 흔히 구할 수 없거나 그 용도가 생각할 수 없을만큼 고가이다. 그 대체적인 방법으로 효소에 의한 분할법이 개발되었다. 가수분해효소(hydrolase)(특히 키모 트립신 같은 에스테라아제와 리파아제), 리아제(lyase) 및 산화환원효소(oxidoreductase)(예: 아미노산 산화효소와 알코올 환원효소) 등을 비롯해서 여러 가지 수많은 종류의 효소를 사용해서 입체이성체를 분할하고 있다. 일반적으로 말해서 분할에 쓰이는 효소는 이상적으로 광법위한 기질 특이성을 나타내어 광범위한 정상적이 아닌기질들의 반응을 촉진하고 고도의 입체특이성을 가져 한가지 이성체의 반응을 촉진시킬 수 있어야 한다.

가수분해효소(예: 리파아제와 에스테라아제)는 적당한 가격으로 시중에서 구할 수 있고 값비싼 인자를 내포하지 않으며 이들중 몇가지는 유기용매에 대해 적당한 내성을 가지고 있다는 이유로 해서 분할용으로는 보다 매력적인 효소에 속한다. 더욱이 비대칭 화학에는 알코올, 카르복실산, 에스테르, 아미드 및 비대칭 탄소가 있는 아민이 가끔 포함되는데 이런것들이 반응에 대한 입체 선택성의 촉매로서는 카르복실 가수분해 효소가 바람직하게 선택되고 있다[Cambou, B. and A,m, Klibanov,

Biotechnol. Bioeng., 26:1449(1984)].

예를 들자면 효소처리방법을 사용해서 아미노산 에스테르의 라세미 혼합물을 분할하고 있는 것이다. Stauffer(미국 특허 제3,963,573호)는 미생물 단백분해효소(microbial protease)를 사용하여 N-아실-D,L-메티오닌 에스테르를 처리하여 그 생성물인 산을 반응혼합물로부터 분리함으로써 광학적으로 순수한 N-아실-L-메티오닌을 제조했다. 마찬가지로 Bauer(미국 특허 제4,262,092호)는 N-아실-D,L-페닐알라닌 에스테르의 라세미 혼합물을 세린 단백분해효소로 처리하고 미반응의 N-아실-D-페닐알라닌 에스테르를 분리한 후 N-아실 및 에스테르 그룹을 제거함으로써 광학적으로 순수한 D-페닐알라닌 에스테르를 제조했다. Clement와 Potter[J. Chem. Ed, 48 : 695(1971)]은 키모트립신을 사용해서 페닐알라닌을 분하라였고, Matta등[J, Org. Chem, 39:2291(1974)]은 동일한 효소를 사용하여 약물인 3-(3,4-디히드록시페닐)알라닌, 즉 도파(dopa)의 선구물질을 분할했다.

키노트립신으로 아미노산 분할을 함에 있어서 먼저 표준방법에 따라 아실 및 에스테르 유도체를 제조한다음 라세미 혼합물을 효소에 의한 가수분해 처리하는 방법이 포함된다. 비활성의 수용성이 불량한 D-에스테르를 유기용매로 선택적인 추출을 하여 수용성이 훨씬큰 N-아실화 L-아미노산으로부터 분리하는 것이 일반적이다. 유리 L- 및 D-아미노산을 필요에 따라 회수(예 : 산가수분해)하고 불필요한 이성체를 라세미화해서 재순환시킨다. 또다른 방법으로는 원심분리에 의해 제거되거나 라세미 혼합물이 통과할 수 있는 칼럼속에다 충전할 수 있는 고체 지지체에다 효소를 부착시켜 주면 효소로부터 반응생서물이 용이하게 분리된다. Matson[Membrane Reactors, 박사학위 논문, University of Pennsylvania(1979)]은 막에다 부동화(不動化)시킨 키모트립신을 사용하여 N-아세틸-D,L-티로신 에틸에스테르의 수성 라세미 혼합물중에서 L-아미노산 에스테르 결합을 선택적으로 분열시켰다. Scollar등[Biotech. Bioeng., 27:247 (1985)]은 산성의 포스파타아제(phosphatase)를 사용하여 D,L-트레오닌을 분할하였다.

여러 가지 효소를 사용해서 위에 나온 아미노산 이외에 기타 여러 가지 화합물을 분할하고 있다. 특히 Cambou와 Klibanov[Biotech. Bioeng., 26:1449(1984)]는 다공성 비이드(bead)에서 부동화시킨 리파아제를 사용하여 (R,S)-2-(p- 클로로페녹시)-프로피온산(여기서 R 이성체는 제초제임)과 이들의 각종 에스테르로된 혼합물을 효소에 해 분할한데 곤한 연구를 하였다. 이들의 연구결과에 의하면 부동화된 리파아제는 특히 효소에 의한 가수분해나 에스테르 교환반응에 의해 혼합물을 분할한다는 것이다. 2상 가수분해 반응의 경우에 있어서 사용된 산과 에스테르의 용해도가 상이하므로해서 부동화된 고체상효소, 완충액 및 용매와 반응물을 함유하는 물과 혼화하지 않는 유기상 등으로된 혼합물을 분산 및 교반시킬 필요가 있었는데 이것은 비교적 비효율적인 방법이다.

여러 가지 효소를 사용해서 살충제의 광학 이성체를 분할한다. 예를들자면 Mitsuda등[유럽 특허출원 공고 0 080 827 A2] 은 2상계(예 : 수성/유기분산액)중에서 미생물계 및 동물계의 입체선택성 에스테라아제로 (R,S)-알파-시아노-3-페녹시벤질 알코올의 라세미 아세트산 에스테르 유도체를 처리했다. S- 에스테르를 선택적으로 가수분해함으로써 피레들이드계 살충제의 알코올 성분인 (S)-(-)-알파-시아노-3-페녹시벤질 알코올을 제조했다. 광학적으로 정제된 피레드로이드에 관한 관련된 연구에 있어서 Mitsuda등[미국 특허 제4,607,013호)은 미생물 에스테라이제를 사용해서 (±)-4-히드록시-3-메틸-2,2'-프로피닐-2-시클로펜테논의 라세미 화합물을 광학분할 하였다. 이 화합물의 (+)-이성체는 (-)-이성체 보다 살충력이 수배나 강하다. Klibanov등(미국 특허 제4,601,987)은 유기매체중에서 실시한 리파아제에 의한 에스테르화 반응을 이용하여 라세미 2-할로프로피온산을 분할하였다. 이렇게 해서 제조된 분할된 2-할로프로피온산을 사용해서 2-페녹시프로피온산과 이들의 에스테르를 합성한다. 이들은 R 광학이성체만이 생물학적인 활성을 나타내므로 제초제로 널리 이용되고 있다.

광학적으로 정제된 약품제조에 적용된 최신의 효소중개 분할법에 관한 예가 추가로 나와 있기도 하다. Sih(미국 특허 제4,584,270호)에 의하면 L-카르니틴 제조에 있어서 중요한 중가체인 광학적으로 순수한 (R)-4-아미노-3-히드록시부티르산의 효소에 의한 제조방법을 기술하고 있다. L-카르티닌 제조에 대한 미생물중개 또는 효소중개에 의한 접근방법에 관해서는 Aragozzini등[Biotechnol. Letters, 8:95(1986)] 및 Yokozeki등[유럽 특허출원공고 0 122 794 A2]에 의해 개시되어 있다. 또한 Shi[Tetrahedron Letters, 27:1763(1986)]은 (R,S)- 나프록센의 에스테르 유도체의 2상반응매체중에서 미생물 리파아제를 입체선택 가수분해에 적용하여 광학적으로 일부 정제된 (S)-나프록센산을 제조하는 방법에 관하여 기술하고 있다. 최종적으로(페닐글리신과 4-히드록시페닐글리신 같은 D-아릴글리신을 특히 포함해서) 어떤 광학적으로 순수한 D-아미노산을 반합성 페니실린 및 세팔로스포린 제조시 측쇄로 사용한다. Schutt등[Biotechnol. Bioeng., 27:420(1985)]은 2상계중에서 비극성 N-아실-D,L-아미노산 에스테르의 라세미 혼합물을 서브틸리신의 가수분해작용으로 처리하여 광학적으로 정제된 D-아미노산을 얻었다.

1.4. 친유성 화합물의 효소촉매에 의한 생물적 전환

대부분의 경우에 있어서 대규모 공업적인 생물적 변화법으로 효소에 의한 촉매작용을 이용하고자 하는 생화학 엔지니어들의 시도의 초점은 수용성 기질을 함유하는 수성의 반응계내에서 효소를 사용하는데 있었다. 글리코오스 이성체화 효소(isomerase)에 의한 글루코오스의 프럭토오스로의 전환이 그 한가지예이다. 그러나 친유성(親油性)(예:수용성이 없는 것)기질을 생물학적으로 전환시키는데도 효소를 사용한다. 예를들자면 수많은 구조적으로 복잡한 분자들은 비대칭일때가 흔히 있다. 불행하게도 이들 복잡한 분자들은 비대칭일때가 흔히 있다. 불행하게도 이들 복잡한 분자들중 많은 것들이 물에 대한 용해도가 극히 작으므로 균질의 수용액 중에서 이들 수용성이 불량한 기질을 종래의 부동화된 효소 바이오리액터(bioreactor)에다 공급함에 있어서 일반적으로 실용적이 되지 못하는데는 몇가지 이유가 있다. 한편으로는 이러한 묽은 반응계를 취급하게 되어 있는 효소 반응기는 과도하게 대형이어야 하고 이런 묽은 수성의 공정액으로부터 생물학적 생성물을 회수하여 농축한다는 것은 말할 수 없을 정도로 경비가 많이 소요되는 것이다. 몇가지 종래의 접근방법을 사용해서 수용성 기질의 효소 촉매 전환을 보다 효율적으로 하고 있다.

1.5. 물 혼화성 공용매

여러 가지 물혼화성 유기용매를 사용하여 친유성 기질(예: 스테로이드)의 수용성이 불량한 경우에 있어서 균질 기질/효소용액을 제조한 바 있다[Tanka, A 및 S. Fukui, Bioconversion of zlipophilic compoundsby Immobilized Biocatalysis in the Presence of Organic Solvents, pp.149-176 in Unzymes and Immobilized Cells in Biotechnology, A.I. Laskin, ed., Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park, CA(1985); Klibanov, A.M. el a., Biotechnol. Bieong., 19:1351(1977)]. 이러한 목적으로 사용되는 유기공용매로는 저급알코올(특히 메탄올과 에탄올), 아세톤, 디메틸포름아미드 및 디메틸술폭시드가 있다. 불행하게도 효소활성, 선택성 및/또는 안정성이 감소된데에도 불구하고 유기공용매만으로 혼화성을 얻고 있는게 보통이다. 더욱이 이러한 계는 친유성인 기질을 용해할 정도로 충분한 소수성의 것이 아닐때가 있다. 이러한 이유들로해서 친유성 기즐의 효소촉매 생물적 전환을 용이하게 하는데 공용매를 있어서 그 제한이 있다.

1.6. 다상 반응계

다상계중에서 수용성이 없는 기질을 효소촉매 생물적 전환처리함으로써 이들 문제중 어떤 것을 해결할 수 있다[Lilly, M., J. Chem. Tehcn. Biotechnol., 32:162(1982) ; Carrea, G., Trends in Biotechnol., 2:102(1984)]. 한편으로 유리효소가 연속수성상(aqueous phase)중에 용해되어 있고 수성상내에 분산된 별도의 불혼화성 유기산중에 기질이 존재하고 있는 2상계중에서 효소에 의한 반응을 실시한다. 또다른 방법으로는 연속 유기상내에 수성상을 분산시키는 것이다. 표면적이 큰 지지체 위에 효소를 부동화하여 회수와 재사용을 하고자 할 필요가 있는 기타의 경우에 있어서는 최소한 원칙적으로 3상반응계를 사용한다. 3상계에 있어서 수용성 기질을 유기상에서(유기용매를 첨가 또는 첨가하지 않고) 공급하는데 이때 유기상은 연속수성 상중에 분산된 것이다. 이어서 제3의 고체상위나 내에 효소를 부동화하고 세가지 상(相)들을 교반된 용기 또는 충전층내에서 접촉시킨다. 대부분 보편적인 경우에 있어서 유기상중에 기질과 생성물이 발견된다[Brink, L.E.S. and J. Tramper. Biotechnol. Bioeng., 27:1258(1985)].

수많은 의약과 농약은 물에 용해도가 극히 작기 때문에 이러한 화합물들에 대한 효소중개에 의한 여러 가지 광학적인 분할방법을 다상반응조건에서 실시하고 있다. 한가지 예르들자면 Cambou 및 Klibanov의 연구[Biotechnol. Bioeng., 26:1449(1984)]에서는 2-(p-클로로페녹시)-프로피온산(이것의 유도체는 제초제임)의 리파아제 중개에 의한 분할방법을 실시하고 있다. 이들의 연구결과에 의하면 효모 리파아제(Candida cylindracea)를 사용해서 라세핀산의 단순 에스테르(예 : 메틸에스테르)의 가수분해를 촉진시킬 경우 (R,S)-2(p-클로로페녹시)-프로피온산 분할시에 이 효모리파아제는 고도의 입체특이성을 발휘한다는 것이다. 이들 에스테르는 거의 물에 불용성이기 때문에 세가지 별도의 상이 존재하는 다상반응계에서 분할법을 실시할 필요가 있었다. 즉 라세미 반응물 에스테르, 수성완충액 및 부동화된 효소를 유기상중에서 실시하는 것이었다. 전형적으로 표면적이 큰 ㅡ로모소르브(Chromosorb) 나 티타니아비이드(titania bead)에 리파이제를 함입(含入) 및 흡착시켜 리파아제를 부동화 하고 반응물을 함유하는 유기상과 이 고체상 효소를 격렬히 진탕시켜 에멀젼을 만들어줌으로써 수성상내에 분산시켰다. 이러한 방법으로 Cambou 및 Klibanov는 필요로 하는 R산을 100g(85 % 수득율 순도 97%)얻었다. R산이 S 에스테르보다 거울상 이성체가 96% 과잉으로 있음이 확인되었다.

다상의 생체촉매반응이 다른예로서는 트리클리세리드(예 : 올리브기름)을 효소 가수분해하여 지방산을 얻는다던지[Linfield, W.M. et al., JAOCS, 61 : 191(1984)]알켄에서부터 광학적으로 활성인 에폭시트(예 : 1,2-에폭시옥탄)를 미생물에 의해 제조하는 방법[van der Meer, Chem. Eng. Sci., 41:607(1986)]등이 있다.

불행하게도 다상 반응계는 특히 공업적인 규모에 있어서 여러 가지 결점을 가지고 있다. 예컨데 스케일 업(scale-up) 및 신뢰성에 관한 문제가 분산 및 에멀젼 처리시에 자주 발생하며 계속적인 조작과 pH 조절(특히 가수분해 반응시)이 어렵다. 더욱이 각 상들을 분리한 후 생성물을 회수해야 하고, 과도한 중간상 물질 전달저항이 수성상중에서의 용해도가 불량한 기질의 확산가 관련하여 자주 발생한다.

종래의 다상 효소반응계에서의 이들 여러 가지 제약점중 어떤것들에 관해서 일반적인 방식으로 이미 토의된 바 있다[Matson, S.L., pp.597-610 in Thr Eorld Biotech Report 1985--Vol.1 : Europe, proceedings of Biotech 85 Europe, Geneva, May, 1985; Michaels A.S. and S.L. Matson, Desalination, 53:231(1985)].

1.7. 유기용매중에서의 효소촉매반응

물에 불용성인 기질과 관련해서 효소를 사용하는데 대한 또다른 접근방법으로는 거의 수분이 없는 유기반응 매체중에서 반응시키는 것이거나[Z만, A. and A.M. Klibanov, Science, 224 : 1249(1984) ; Butler, L.G., Enzyme Microb. Technol., 1:253(1979)] 또는 함입된 효소를 함유하는 역미셀(reversed micelle) 존재하에 반응시키는 것이다[Han,D. and G.Klrchner, 미국 특허 제4,601,987호]이들은 극히 일반적인 것이 아니다. 특히 허다한 효소들은 모두 순수하거나 물론 포화된 유기용매중에서는 비활성이고 다소의 활성을 가지고 있는 것들이라고 해도 그 선택성이 변했거나 안정성이 저하된 것들이다. 더욱이 효소반응시 pH 조절은 유기용매에서는 문제점이 있고 유기용매중에 불용성 효소를 효과적으로(예 : 분자수준) 분산시키기가 어렵다. 결국 반응물 또는 생성물로서 물을 포함하는 가수분해 반응을 거의 무수상태의 반응매체중에서 대규모의 연속식으로 실시할 수가 없다 하겠다.

현재 필요한 것은 부동화된 효소반응기 설계 및 공정을 개선하여 수용성이 불량한 기질을 효소촉매에 의해 효율적으로 전환 반응시켜 주는 것이다.

1.8. 효소막 반응기

근년에 와서 몇가지 종류의 막반응기를 개발하여 효소촉매 생물학적 전환반응을 실시하고 있다. 그 중에서 가장 간단한 것은 효소 연속교반-탱크/한외여과(CSTR/UF : continuous-stirred-tank/ultrafiltration) 반응기인데 여기서 연속 교반 탱크 반응기(CSTR/UF : continuous stirred tank reactor)내에 들어있는 효소 수용액을 한외여과기를 통해 계속 순환시키고 한외여과기로부터는 신선한 효소 전환반응용 기질을 계속해서 수용액중의 반응기로 공급하는 것이다. 이렇게 함으로써 효소를 상실함이 없이 효소에 의해 변환된 생성물을 계속해서 제조하고 분리하는 것이다. 이렇게 함으로써 효소를 상실함이 없이 효소에 의해 변환된 생성물을 계속해서 제조하고 분리하는 것이다. 일본괴-독일에서는 균질의 단일상 CSTR/UF 막 반응기에서 실시되는 효소 반응을 통해 공업적인 규모로 다수의 영양학적으로 중요성이 있는 아미노산과 2-히드록시산을 합성하거나 광학적으로 분할하고 있다[Michaels, A.S. et al., J. Memb. Sci., 15:118(1983) ; Jandel, A-S. et al., Eur. T. Appl. Microbiol, Biotechnol., 15:59(1982) ; Wichmann, R. et al., Annals N.Y. acad. Sci., 434 : 87(1984)]. 위에 나온 접근방법의 한가지 변형으로 상향류막 표면에서 편광시켜 효소를 농축함으로써 막한이 여과기내에서 계속해서 효소에 의한 변환을 시키는 것이다 [Drioli, E. and V. Scardi., J. Memb. Sci., 1:237(1976) ; Greco, G. et al., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechno l., 8:249(1979) ; Graco, G. and L. and L. Gianfreda, Biotechnol. Bioeng., 23:219 9(1981)]. 기질 수용액을 연속 한외여과하면 기질은 막상부에 있는 효소겔 층을 통과할 때 변환되어 수성의 생성물을 형성하여 반대편 막 표면으로부터 투과물로 해서 나온다.

다소 상이한 막/부동화 효소반응기에서는 유공(有孔)섬유 다발로된 한외여과기의 표피쪽으로 농축된 효소 수용액이 수용되는데, 이때 기질 수용액은 섬유의 내강(內腔 : lumen)을 계속통과하게 된다 [Waterland, L.R. et al., Aiche J., 20:50(1979) ; Michaels, A.S. et al., 미국 특허 제4,440,853호 ; Breslau, B.R., 미국 특허 제4,266,026호]. 반응공학적으로 제한된 전환을 이런 방식으로 진행시켰다. 그이후 여러 가지 많은 유공섬유 부동화-호교 반응기 구조가 개발되었다. 더욱이 내부 표면적이 큰 미세다공질 막에다 효소를 공유결합식으로 결합시켜 수성상의 반응생성물을 얻고 있다 [Simon, S., 미국 특허 제4,251,631호 ; Gregor, H.P., 미국 특허 제4,033,822호].

몇가지 경우에 있어서 바람직하다고 확인된 것은 개별적인 효소보다 오히려 세포의 전체 촉매작용성 기계를 사용해서 생물학적인 전환을 일으키게 하는 점이다. 유공 섬유 세포배양과 생체촉매반응에 있어서 막장치의 한격실을 전체 세포로 채우고난 다음 장치에다 기질과 영양제를 함유한 수성의 공급물을 관류(灌流)시킨다[Michaels, A.S. et al., 미국 특허 제4,440,853호 ; Inloes, D.S. et al., Biotechnol. Bioeng., 25 : 2653(1983) ; Hopkinson, J., Biotechnology, 3:225(1985)]. 세포가 생존하자면 산소공급수단과 이산화탄소 제거수단이 필요하다[Kornfield, J. et al., Biotechnol. Progress, 2:98(1986)].

1.9. 다상막 반응기 및 관련된 방법

다상 반응계에서 필수적으로 다음 두가지 의미에서 막을 효소 방응기로 사용하고 있다. 즉 (i) 유공섬유 세포배양 및 발효방법과 그 장치, (ii) 물과 혼화하지는 않으나 대칭인 반응물과 대칭인 생성물의 다상 효소 촉매작용.

유공섬유 세포배양의 예는 풍부하다. 대표적으로 유공섬유막 뮤듈(module)의 스폰지상 섬유벽을 생존력 있는(그러나 이상적으로 잔존하는) 세포로 채우고 유공섬유의 속으로 영양분이 있는 용액을 통과시킨다. 몇가지 경우에 있어서 유공섬유 배양계를 2상식(biphasic mode)로 조작하고 있다. 에컨데 생존력 있는 세포, 즉 생균(生菌)을 유공섬유장치의 다공질 막 벽내에 함입시키고 섬유의 내강(lumen)을 통해 수성의 영양액을 통과시키며 산소가스를 외부격실을 통해 동시에 통과시킨다 [Michaels, A.S. et al., 미국 특허 제4,440,853호]. 이 장치의 수성 공급물로부터 세포격실속으로 확산해 들어간 영양분 궁극적으로 대사물과 기타 생성물로 전환되고 다시 내강속에 있는 수성액 속으로 확산되므로 해서 세포배양장치가 활성화 되는 것이다. 세포에 산소를 공급하는 외에도 가스상태의 공정액도 장치로부터 가스상태의 폐생성물(예:이산화탄소)를 운반해 가는 역할을 한다.

이러한 기본적인 유공섬유 세포배양법과 장치의 여러 가지 변형이 있다. 예로서 J.P. tharakan와 P.C. 초며 Biotechnol. Bioeng., 18:329(1986)]은 방사상 유동식 유공섬유 세포배양장치를 기술하고 있는데 이 장치에서는 유공섬유 외부에 세포를 채우고 수성의 영양분을 세포를 함유한 표피쪽 격실에다 공급하며 가스 상태의 영양분(예:02)을 섬유내경으로 공급하고 있다. 조작시에는 세포내에서 수성 영양분의 대류성 방사상 유동이 일어나서 점차 유공섬유 벽에서도 일어나고 이때 섬유내강을 통과하는 가스의 흐름도 필요한 생성물을 함유하는데 폐수성 매체를 장치밖으로 배출하는 역할을 한다.

Cho와 Shuler에 의하면 두 개의 소수성막과 하나의 친수성막등 세가지 막에 의해 분리되는 가스, 세포, 영양분 및 용매로된 4가지 층을 가진 복수막 바이오리액터를 기술하고 있다. 이들 막중 어느것도 효소활성화되는 것이 아니다[Cho, T. and M.L. Shuler, Biotechno. Progress, 2:53(1986)]. 이 복수막계를 추출에 사용하여 효모(Saccharomyces cerevisiae)의 발효세포로부터 억제 에탄올을 제거하고 있다.

위에 나온 유공섬유 세포배양법과 발효법은 모두가 본 발명의 방법과는 쉽게 구별이 된다. 이들중 어느것도 효소수단에 의한 입체화학적으로 정제된 화합물 제조가 발효법이나 세포 배양법의 목적이라는 것을 가르키고 있지 않다. 비대칭 화합물의 입체선택성 생물학적 변환을 위해 특수한 효소 활성을 이용하는 대신 발효공정 또는 세포배양 공정에 생균전부를 사용하는 것만 나와 있다. 라세미 혼합물에서 광학 이성체를 분리하거나 대칭 선구물질로부터 비대칭 생성물을 제조하는 것은 이들 계에서는 목적으로 하지도 않고 달성할수도 없다.

각종 기질 또는 트리클리세리드, 예컨데 올리브 기름이나 지방산도 막반응시킬 수 있다. Kerkhof에

의하면 막반응기 중에서 물과 혼화하지 않는 트리글리세리드를 재생 셀룰로오스로 되었고 효소겔 층으로 코우팅된 유공섬유 속으로 공급하고 물을 섬유외부로 공급하여 지질을 효소에 의해 가수분해하는 방법을 기술하고 있다[Kerkhof, P.I.A.M., et al., Enzymatic Hydrolysis of Lipids in a Membrane Reactor, a poster presented at the International Membrane Technology Symposium, Lund, Sweden, May 28-30, 1985]. 기타 여러 다른 사람들도 지질 가수분해에 대해 동일한 방법을 연구하였다[Molinari, R. and E. Deioli, Proc. Nat. Congr. Ind. Chem. Div. Sci., Siena, June, 10-12, 1985]. 일본의 학자들은 막반응기중에서 분리된 막의 반대편 표면을 반응물과 생성물을 함유한 유기상 및 수성상과 접촉시켜 트리글리세리드를 효소에 의해 합성된 바 있다[Yamane, T. et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 43(4:558(1984). 그러나 이러한 계에 있어서 사용된 리파아제 효소는 수성상에 용해된다(Yamane등의 연구에서).

2.0. 본 발명의 요약

광학활성유기산, 알코올, 에스테르, 아미드, 아민, 니트릴, 히단토인 및 기타 tnaksgg은 의약품, 향료 및 향미제, 농약(예:살충제와 제초제) 및 기타 여러 가지 화공약품들을 포함하는 비대칭 화합물의 대칭 선구물질로부터 효소에 의한 합성 및 라세미 혼합물의 분할등에 대한 방법과 장치가 제공되어 있다. 효소 함유 다상 및 추출막 바이오리액터, 다상 용매계 및 막반응기 조작조건을 사용하여 효율적인 방식으로 반응시키고 생성물을 반응물로부터 깨끗이 분리함으로써 입체 선택반응을 실시한다. 라세미 혼합물의 비대칭 특성에 따라 여기서 얻는 생성물중에는 광학적으로 순수한 화합물도 함유되기도 하고 특히 이성체가 풍부한 물질도 함유된다. 특히 본 발명은 수용성이 나쁘거나 생성물 억제반응을 통해 생겨나는 화합물의 비대칭 합성과 효소에 의한 분할에 특히 유용하다. 본 발명에서 처리되는 라세미 혼합물로는 비대칭 유기알코올, 산, 에스테르, 아민, 아미드 및 기타 화합물의 이성체의 혼합물이 있다.

본 발명 실시에 특히 유용한 가수분해서 효소로는 리파아제, 카르복실 에스테라아제 및 아미다제가 있다. 본 발명의 방법에 따라 생체변환되어 귀중한 비대칭 생성물로 되는 대칭형 선구물질에 속하는 것으로는 히단토인과 아미노 니트릴 화합물이 있는데 이들을 입체 선택적으로 전환시켜 아미노산(예: D-아미노산 및 메틸도파)과 아미노 아미드 같은 귀중한 생성물로 만든다.

본 발명의 방법을 기술할 목적으로 다상(multiphase) 및 추출막 반응기법에 대해 각각 토의해 보는 것이 좋은데 그 이유는 본 발명의 특수한 적용분야는 이들 두가지 범주에 속하기 때문이다. 본 명세서에 나오는 막반응기법(membrane reactor precess)이란 주반응물을 물과 혼화하지 않는 유기상을 통해 공급할 경우에는 추출막 반응기법으로 이해하면 된다. 그러나 여기서 알 수 있는 것은 이들 다상막 반응기와 추출막 반응기의 구성과 조작 및 입체이성체 분리 합성법은 대부분의 중요한 면에 있어서 동일하다.

본 발명의 다상막 반응기법에 있어서의 효소 활성막은 여러 가지 수단에 의해 표명의 한가지 이상의 지점이나 내부에 적당한 효소를 결합시켜 주면 적절히 활성화되는 다공질의 친수성(예:습윤성)막으로 되어 있는 것이 대표적이다. 이러한 효소에 의해 활성화되는 막의 한쪽표면을 공급액인 1차 공정액과 접촉시키는데 이 액에는 효소에 대해 수용성이 불량한(즉 물과 혼화성인 없는) 기질이 함유되어 있다. 대표적으로 이러한 물과 혼화성이 없는 (유기계의)공급액중에는 순수 유기액상의 반응물만을 함유하거나 담체액으로 작용하는 물과 불혼화성 유기용매에 용해된 불용성이고 유기 가용성인 반응물로 되어 있다. 기타 공반응물도 이 공액중에 존재할 수도 있다. 동시에 효소활성막의 2차표면을 수성공정액과 접촉시키는데, 이 공정액은 반응수를 공급 또는 제거하고 반응 pH를 조절하는 수단을 제공하며(어떤 경우에 있어서는 막중에 함유된 효소에 접근하게 하고), 수용성 반응 생성물을 제거하는 수단을 제거하는 등 한가지 이상의 목적으로 사용되고 있다.

적절히 조작하면 물과 혼화하지 않는 유기공급액과 접해 있는 습윤되고 효소활성화된 막표면에 수성상과 유기상의 경계가 위치하게 되고 상당한 수성분위기가 조성되어 친수성의 습윤막중에서 효소 작용을 하게 되는 것이다. 두가지 유입액(예:공급)과 두가지 유출액(예:생성물)이 본 발명의 공정에 공급되고 이 공정으로부터 배출되므로 막반응기 모듈을 두가지 유입구와 두가지 유출구로 구성해야 한다. 이들중 유출구/유입구 한쌍은 유기상의 공정액을 공급하고 배출하는데 이용되는 반면 나머지 한쌍은 수성의 공정액을 공급하고 배출한데 이용된다. 친수성 또는 습윤되고 효소 활성화된 막에 있어서 막의 반대쪽 표면과 접해 있는 수성의 공정액에 대하여 약간이 정압(正壓)하에 유기공정액을 두는 것이 바람직하다. 막에 대해 이렇게 해서 생긴 약간의 유기 대 수성의 압력차로 인하여 막에 대해 수성의 공정액의 일부가 한외여과성 유동을 하지 못하게 된다. 이와 동시에 이런 방식으로 공정을 조작함으로써 접해 있는 막표면에 작용하는 모세관력에 의해 습윤된 효소막의 기공속으로 유기상이 침입하지 못하게 된다.

본 발명의 실시에 있어서 수용성이 불량한 바람직하게는 유기 가용성 반응물을 물과 혼화하지 않는 유기 공정액중에 있는 막반응기에다 공급하여 효소활성을 가지는 막의 1차표면과 접하게 된다. 따라서 반응물의 분자들은 막의 1차표면에 위치한 수성상과 유기상의 계면쪽으로 확산해서 막의 수성영역으로 분배되어 효소촉매 전환반응을 하여 생성물을 만든다. 최소한 한가지 반응생성물이 상당한 수용성을 나타낼 경우, 특히 반응물 보다 수용성이 큰 경우에는 이 생성물은 막으로부터 확산하여 효소 활성막의 2차표면과 접해 있는 수성의 공정액속으로 들어간 다음 반응기에서 제거되어 궁극적으로 입체화학적인 순도가 크게 회수된다. 공급액중의 미반응물(예:효소가 활성을 나타내지 않는 쪽에 있는 라세미 공급혼합물의 유기 가요성 거울상 이성체)은 유기상중에 잔류하며 수용성 효소반응 생성물로부터 분리된다.

요약하건데 이러한 연속 다상 바이오리액터법의 효소활성화된 막은 세가지 역할, 즉 표면적이 큰 유기상과 수성상의 접촉장치로서 유기상과 수성상의 분리장치로서 그리고 계면생체 촉매로서의 역할을 한다. 큰막면적의 충전밀도를 특징으로 하는 막모듈중에서의 불포화성의 수성상과 유기상 사이의 계면에 친수성막을 설치하면 한가지 불혼화성의 상을 다른 상대로 분산시킬 필요없이 유기/수성 및 유체/막 접촉면적을 크게 할 수 있다.

이런 방식으로 다상막 반응기는 예측성 결핍, 신뢰서 불량 및 실행가능서 부족등과 관련된 분산상계에 제약을 가하고 있다. 더욱이 다상막 반응기 및 추출막 반응기에 의하여 곤란한 에멀젼을 취급하고 세가지 불혼화성의 상(예:유기, 수성 및 고체)을 서로 간에 계속불리한 다음 생성물을 회수하거나 반응물을 재순화시켜야 하는 필요성에 따른 어려움을 피할 수 있는 것이다. 막반응기법의 또다른 장점은 연속조작(이것은 회분식 조작에 반대되는 것임)이 훨씬 용이해진다는 점이다. 분산상 반응기(제3도)에 있는 부피가 큰 수성상의 중재없이 반응물 함유 유기상과 효소함유 고체상 사이의 직접 접촉을 위한 수단을 제공하는 것이다. 특히 종래의 분산상 촉매반응기에 골치덩어리이던 중요한 색상 물질전달 제약점을 피할 수 있고 촉매전환반응의 효율도 따라서 증가된다. 더욱이 미반응의 물에 불용성이며 유기가용성인 반응물, 공생성물 또는 부생물 및 무반응성 물질을 물에 불혼화성인 유기 공정액에서 제거하는 한편, 수용성의 유기불용성 반응생성물을 2차 공정액에서 제거한다. 이렇게 함으로써 반응계중의 기타 친유성성분으로부터 수용성 생성물을 분리하게 되는 것이다. 마지막으로 유기공정액과 수성의 공정액간의 상비율 또는 유속을 조절하면 반응생성물을 풍부히 할 수 있고 따라서 공급액중의 반응물이나 유기상의 선구물질의 농도보다 큰 농도에서 수성상의 생성물을 제거하게 되는 것이다.

대표적으로 본 발명에 사용된 막부동화 효소는 물에 불용성인 공급물 이성체의 라세미(R 및 S) 공급물 혼합물중의 한가지 반응성 입체이성체를 화학조성이 변화된 수용성의 생성물 이성체(R 또는 S)로 입체 선택적으로 전환시킨다. 이러한 수용성 생성물 이성체는 수성의 공정액을 통하여 효소막 반응기를 나가는 반면 라세미 공급물중에 있는 미반응의 물에 불용성인 반응물 이성체(S 또는 R)는 유기 공정액을 통해 반응기를 나가게 된다.

전반적인 결과는 상이한 입체배위를 한 이들 두가지 물질을 서로간으로부터 분리하므로서 최소한 부분적으로 광학적으로 풍부하게 된다. 이와 같이 해서 라세미 공급 혼합물의 광학 분할을 다상막 반응기에서 실시한다. 마찬가지 방법으로 다상 효소막 반응기법에 의해 다상막 반응기를 나가는 수성의 공정액 중에 있는 수용성의 유기생성물 입체이성체를 유기공정액중에 잔존하는 유기가용성이며 비교적 물에 불용성인 대칭성 선구물질로부터 제조와 동시에 분리할 수 있다.

본 발명의 추출막 반응기법은 라세미 혼합물의 분할과 대칭성 선구물질로부터 비대칭성 생성물의 효소에 의한 합성에도 이용된다. 이 방법의 실시태양은 생성물의 적당한 농도에 의하여 효소반응을 반응공학적으로나 열역학적으로 억제하던지 또는 반응조건하에서 반응생성물이 한정된 화학적인 안전성을 가지는 경우에 특히 적당하다. 특히 추출막 반응기는 열역학적으로 불필요한 생합성 반응 및 생성물 억제효소화 되먹임(feedback) 제어효소에 의해 촉진디는 생체전환 반응과 관련한 촉매의 생산성과 율을 저하시키는 대해 제약을 가하고 있다.

추출막 반응기법의 효소활성화막은 본 발명의 다상막 반응기법의 실시태양에서와 같이 친수성이며 미세다 공성이며 불혼화성의 수성의 공정액과 유기공정액과 반대쪽에서 서로 접촉시켜 사용한다. 따라서 추출막 반응기법과 다상막 반응기법에 있어서 효소활성화막은 이들 불혼화성의 공정액 이의 접촉표면적을 크게해주고 이들을 분리하는 역할도 한다.

그러나 추출막 반응기법의 경우에 있어서 효소활성막에 공급된 라세미 공급 혼합물중의 입체이성체나 대칭성 선구물질은 본 발명 방법의 다상막 반응기 실시태양의 경우에서처럼 유기가용성에 대하여 수용성인 것이 바람직하다. 따라서 추출막 반응기에 공급된 공급액은 유기질이라기 보다 수성이다. 추출막 반응기법에서 제조된 비대칭성의 흇 반응생성물은 수용성이라기 보다는 유기가용성이 크므로 대부분의 경우 유기공 정액으로 분배되어 반응기를 나간다.

추출막 반응기법의 조작에 있어서 수성의 공급액을 통해 효소활성화막에다 적어도 수용이고 유기불용성인 반응물(예: 라세미 혼합물이나 대칭성 선구물질중의 입체이성체)을 공급하는 것이 바람직하다. 물이 함유된 반응물은 친수성의 습윤된 막속으로 확산해 들어가서 여기서 효소를 만나 기타 공반응물과 더불어 선택적으로 전혼 반응을 촉진시켜 생성물을 생성시킨다. 이렇게 생성된 반응생성물중 최소한 한가지는 유기상에서 상당한 용해도를 나타내게 된다. 따라서 이것은 유기상과 접해 있는 효소활성화막 표면에 있는 수성/유기체면쪽으로 확산하여 여기서 물에 불혼화성인 유기 공정액으로 분배된 다음 반응기를 나간다.

유기가용성의 억제성 및/또는 불안정한 반응 생성물을 선택적으로 제거하여 추출막 반응기 공정의 유기공정액으로 만들어 주기 때문에 효소반응계가 생산성이 훨씬 증가되는 것이다. 추출막 반응기에 있어서 억제성의 또는 불안정한 반응 생성물이 유기추출용매에 인접하여 생성된다. 확산거리를 극소화하면 막공정은 제10도에 있는 형식의 종래의 분산상 반응계에서 나타나는 통상적인 경우에 비하여 제품의 추출효율이 개선된다. 효소가 입상(粒狀)의 지지체에서 부동화되는 이들 종래의 계에 있어서는 개입하는 부피가 큰 수성상과 관련하여 상당한 물질 전달 저항에 의해 효소상으로부터 반응생성물을 효율적으로 분리하여 유기추출용매속으로 유입하는 것을 저해하고 있는 것이다.

유기추출용매에 인접해 있는 효소활성막에서 억제성의 반응 생성물이 제조도는 사실로 인해 입상의 지지체에서 부동화된 효소가 있는 종래의 분산상 반응계에 비해(수성상 확산거리를 극소화함으로써)생성물의 추출효율을 향상시켜 준다. 효소촉매의 입체선택성으로 인하여 공정에서 나오는 생성물중 최소한 한가지는 입상의 입체이성체가 많이 기타의 입체이성체, 대칭성 성구물질 및/또는 대칭성 공반응물 및 부생물로부터 거의 분리된다.

이런 방식으로 다상막 반응기법과 추출막 반응기법을 사용하여 물에 대한 제한된 용해도를 가진 반응물이나 생성물이 제한되는 특성을 가진 반응에서 종래의 효소에 의한 분할법을 효율적으로 실시할 수 없었던 경우에 있어서도 라세미의 광학적으로 비활성인 공급혼합물 또는 대칭성의 선구물질로부터 입체화학적으로 정제되거나 광학적으로 풍부한 생성물을 효율적으로 제조할 수 있는 것이다.

4.0. 발명의 상세한 설명

3.1. 효소에 의한 라세미 혼합물의 분할

일반적으로 말해서 본 발명에서 제공하는 라세미 혼합물의 분할방법은 :

a. 1차 유체중에 최소한 1차 및 2차 입체이성체를 가지는 라세미 혼합물을 효소활성화막의 한쪽에다 공급하여 막을 활성화하는 효소가 1차 입체이성체의 반응을 촉진시켜 화학조성이 변화된 비대칭 화합물을 생성시키고 ;

b. 1차 유체중에서 거의 혼화하지 않는 2차 유체를 효소활성화막의 반대쪽에 동시에 공급하여 ;

효소활성화막으로부터 2차 유체속으로 주로 확산해 들어가는 a단계의 비대칭 생성물로 라세미 혼합물을 분할함으로써 2차 유체에는 주로 비대칭 생성물이 함유되게 하고 1차 유체에는 주로 2차 입체이성체가 함유되게 하는 것이다.

또한 본 발명에서 제공하는 라세미 혼합물의 분할방법은 :

a. 1차 유체중에 최소한 1차 및 2차 입체이성체를 가지는 라세미 혼합물을 효소활성막에다 공급하여 막을 활성화하는 효소가 1차 입체이성체의 반응을 촉신지켜 화학조성이 변화된 비대칭 생성물과 2차 생성물을 생성시키고 ;

b. 1차 유체중에서 거의 혼화하지 않는 2차 유체를 효소활성화막의 반대쪽에 동시에 공급하여 효소활성화막으로부터 1차 유체속으로 주로 a단계의 비대칭 생성물이 확산해 들어가게 하고 2차 유체속으로 주로 2차 생성물이 확산해 들어가게 함으로써 ;

2차 입체이성체 및 화학적으로 성질이 다른 비대칭 생성물을 함유하는 1차 유체를 사용하여 라세미 혼합물을 분할하는 것이다.

더욱이 본 발명에서 제공하는 대칭성 선구물질로부터 비대칭 생성물의 제조방법은 :

a. 비대칭 선구물질을 함유하는 1차 유체를 효소활성화막의 한쪽에다 공급하여 막을 활성화하는 효소가 대칭성 선구물질의 반응을 촉진시켜 비대칭 생성물을 생성하게 하고 ;

b. 1차 유체중에서 거의 혼화하지 않는 2차 유체를 효소활성화막의 반대쪽에다 동시에 공급하여 a단계의 비대칭 생성물이 효소활성화막으로부터 2차 유체속으로 주로 확산해 들어가게 하여 2차 유체중에 비대칭 생성물이 함유되게 하는 것이다.

특히 본 발명은 한가지 이성체 또는 대칭성 선구물질의 전환반응을 입체선택적으로 촉진시켜 화학적으로 성질이 다른 광학활성 화합물을 제조할 수 있는 효소를 지지하거나 함입하거나 함유하는 막이 있는 다상 및 추출효소막 반응기에서 위의 여러 가지 방법을 사용해서 비대칭 유기산, 알코올, 아민, 에스테르, 아미드, 니트릴, 히단토인 및 기타 비대칭 화합물들의 라세미 혼합물을 입체선택적으로 합성하거나 분할하는 방법에 관한 것이다. 효소는 합성 또는 분할된 분자가 결합하는 비대칭의 촉매활성위치를 가지고 있는한 입체선택 촉매작용의 역할에 아주 적합하다. 이들 효소활성위치는 그 자체가 비대칭이기 때문에 주어진 라세미 기질의 두가지 거울상 이성체가 상이하게 작용받도록 하여 대칭성 선구물질로부터 비대칭 생성물을 생성시킨다.

예를 들자면 에스테르와 아미드와 화학관능기의 가수분해나 축합반응을 효과적으로 촉진시키는 효과가 많이 존재한다. 이들 효소전부는 아니나 대다수는 위원회[the Recommmmendations of Commission on Biochemical Nomenclature, Elsevier, Amsterdam, The Nomenclature and Classification of Enzymes(1972) p.17-22]에서 정의되어 있는 바와 같이 가수분해 효소(hydrolase) 또는 리아제(lyase)로 알려진 두가지 주요 효소 류중 한쪽에 속한다. E.C. 다음에 여러 가지 일련의 숫자가 나오는데 이것은 위의 위원회의 추천에 따른 효소의 확인방법이다.

이러한 효소에 대한 특수한 예를보자면 트립신, 키모트립신, 더어모라이신, 레닌 펩신, 파라인, 카르복시펩티다아제, 아미노 펩티다아제, 페니실린 및 세팔로스포린 아실라아제, 아세틸 콜린 에스테라아제, 콜레스테롤 에스테라아제 및 포유동물의 췌장 리파아제와 펩티다아제등이 있다.

예를 들자면 일반적으로 바람직한 리파아제(E.C. 3.1.1.3)의 공급원은 캔디다 실린드라세아(C. rugosa)이고 대표적으로 바람직한 에스테라아제는 키모트립신(E.C. 3.4.21.1) 및 γ(E.C. 3.4.21.14)가 있는데 이들은 구하기가 쉽고 선택성이 크며 기질범위가 넓다는 장점이 있다. 기타 리파아제의 미생물 공급원으로는 슈우도모나스 에루기노사, 슈우도모나스 플로우레센스, 리조푸스 아리저스, 리조푸스 멜레마르, 리조푸스 니베우스, 리조푸스 오리제, 리조푸스 야포니커스, 크로모박테리움 비스코숨, 제오트리치움 칸디둠, 아스퍼질러스 니제르, 아스퍼질러스 소예, 아스퍼질러스 오리제, 뮤코르 미헤이, 페니실리움 로퀘포르티, 페니실리움 시클로피움, 아크로모박테르 리폴리티컴, 알칼리제네스 SP, 테르모마이세스 라누기노서스, 피코마이세스 니텐스, 아르트로박테르 SP, 푸사리움 옥시스포리움, 칸디다 리폴리티카 및 후미콜라 라누기노사등이 있다. 각종 포유동물 종자에서 얻는 리파아제와 밀눈에서 얻는 리파아제도 사용할 수 있다. 기타 포유동물에서 얻는 에스테라아제(e.c. 3.1.1.7), 펩신(E.C. 3.4.23.1) 및 트립신(E.C. 3.4.21.4)가 있다. 기타 미생물 공급원으로는 바실러스 더어모프로테오리티커스(더어모라이신), 바실러스 아밀로리쿼파시엔스, 스트렙토마이세스 그리세우스, 파파야 라텍스에서 유도된 파파인(E.C. 3.4.22.2)가 있다.

그 공급원에 따라 리파아제와 에스테라아제의 실질적인 작용 pH 범위는 약 2-약 10인데 이들의 적절한 pH 범위는 일반적으로 5.0-8.5이다. 대부분의 효소의 온도범위는 15-70℃이고 가장 효율적인 성능을 발휘하는 온도 범위는 20-45℃이다.

위에서 나온 바와 같이 본 발명은 비대칭 유기니트릴의 라세미 혼합물을 분할할 때 막바이오리액터의 이용에 관한 것이가도 하다. 이러한 목적에 적합한 효소는 니트릴 기능기의 가수분해를 촉진시켜 상응한 아미나 또는 곧바로 상응한 카르복실산으로 전환시켜 주어야 한다. 이러한 효소를 가수분해 효소로 알려진 효소로부터 얻는다. 현재 니트릴을 아미로 변환시키는 효소를 니트릴 수화효소(水化酵素 : hydratase)라 하고 있고 니트릴을 직접 카르복실산으로 변환시키는 효소를 니트릴라아제(nitrilase)라 하고 있다. 이들 명칭은 공식적인 것은 아니다. 현재 문헌에서 널리 사용하고 있다.

니트릴 수화효소는 미국 화학회 초록의 등재번호[82391-37-5]를 가지고 있고 니트릴라아제는 등재번호가 [9024-90-2]이다. 여기서 알 수 있는 것은 본 발명의 범위내에 아미다아제(amidase)활성과 더불어 니트릴을 상응한 카르복실산으로 변환시키는 니트릴수화효소의 용도를 포함하기도 한다는 점이다.

본 발명에서 미생물중에서 발견되고 있는 니트릴 기능기 변환에 사용되는 효소들이 있다. 니트릴수화효소활성이 발견되고 있는 미생물은 에로모나스, 아르트로박테르, 브레비박테리움 및 슈우도모나스와 같은 속(屬)에 함유괴어 있다. 니트릴라아제활성이 발견되고 있는 미생물은 아르트로박테르, 아스퍼질러스, 바실러스, 박테리디움, 코리네박테리움, 푸사리움, 클렙시엘라, 마이크로코커스 및 노카르디아 같은 속에 함유되어 있다. 이들 두가지 효소에 의한 활성중 두가지 또는 한가지는 아그로박테리움, 아트로모박테르, 로도토룰라, 파파코커스, 아세토박테르 및 에스체리치아 같은 속에서 관찰되고 있다.

라세미 아미노산 히단토인을 입체특이서 가수분해하여 광학활성의 카르바모일 아미노산을 생성시킬 때는 공식적으로 히단토이나아제로 보다더 잘 알려진 디히드로피리미디나아제(E.C. 3.5.2.2.)의 범주에 속하는 효소를 사용하여 반응을 촉진시킨다. 디히드로피리미디나아제를 박테리아, 방사선균, 곰팡이, 효모 및 불완전 균주를 비롯한 미생물 공급원이나 소의 간장에서 얻는다. 박테리아성 효소 공급원의 예로서는 아크로모박테르, 에로박테르, 에로모나스, 아그로박테리움, 알칼리제네스, 아르트로박테르, 비실러스, 브레비박테리움, 코리네박테르, 프로테우스, 슈우도모나스, 사르시나, 세라타 미 크산토모나스가 있다. 방사선균의 예로는 악티노마이세스, 악티노플라네스, 마이코박테리움, 노카르디아 및 스트렙토마이세스가 있다. 곰팡이에 속하는 것으로는 아스퍼질러스, 페실로마이세스 및 페니실리움이 있고, 효모에 속하는 것으로는 칸디다, 로도토룰라피치아 및 토룰롭시스가 있다. 히단토이나아제가 활성을 나타내는 pH 및 온도의 넓은 작용범위가 기타 가수분해 효소에 대해 위에서 나온 바와 같은 것에 대체로 상응한다하더라고 이들의 적정 pH 범위는 대표적으로 약간 높던지 약 pH 7-8정도이다.

분리정제된 효소외에도 여기서 알아두어야 할 것은 효소활성화막가 관련된 효소활성이 다소 감소한다하더라도 세포추출물 세포용해산물 및 부분적으로 정제된 효소 분리물로부터 유도된 것들과 같이 비교적 불순하고/또는 불균질 효소조제물을 사용해서 본 발명의 방법을 실시할 수도 있다는 점이다. 실제로 살아있던지 그렇지 아니하던지간에 전세포내에 들어있는 효소를 본 발명의 실시에 사용해도 되기 때문에 여기서 목적으로 하는 것은 효소란 말은 이들 모든 형태의 생체촉매작용을 가진 효소를 폭넓게 포함하고 있다는 점이다.

본 발명의 반응을 실시할 때 사용되는 효소반응의 유형은 다음과 같다 :

· 에스테르를 가수분해하여 포름산과 알코올을 얻는 반응 ;

· 산과 알코올로부터 에스테르의 생성반응(예 : 에스테르화 반응) ;

· 에스테르 교환반응(예 : 에스테르와 알코올 또는 산을 반응시켜 상이한 에스테르와 상이한 알코올 또는 산을 제조하는 반응);

· 아미노기 전달반응(예 : 알파케토산과 아미노산과의 반응);

· 아미노(펩티드결합과 N-아실화합물 포함)을 가수분해하여 산과 아민을 생성시키는 반응;

· 산과 아민(또는 아미논산)으로부터 아미드(펩티드포함)의 생성반응 ;

· 아미노산 히단토인을 가수분해하여 카르바모일 아미노산과 아미노산을 얻는 반응 ;

· 니트릴을 가수분해하여 상응한 아미드와 카르복실산을 생성시키는 반응(특히 아미노 니트릴의 가수분해로 아미노 아미드와 아미노산 생성반응).

본 발명의 방법에서 화학적으로 합성된 거울상 이성체의 라세미 혼합물의 비대칭(chiral 또는 asymmetric) 효소에 의한 합성 및/또는 효소에 의한 분할을 하고자 할 때의 특히 비대칭 화합물가 선구물질 또는 이들의 유도체로는 나프록센 즉 2-(6-메톡시-2-나프틸)프로피온산; 이부프로펜, 즉 2-(4-이소부틸페닐)「프로피온산; 케토프로펜 즉 2-(3-벤조일페닐)프로피온산; 플루르비프로펜 즉 2-(2-플루오로-4-비페닐)프로피온산; S-벤조일-베타-메르캅토 이소부티르산; 2-브로모 프로피온산 및 이들의 에스테르 ; 2-클로로프로피온산 및 이들의 에스테르; 파라-히드록시페닐글리신 및 페닐글리신; 2-아미노-2,3-디메틸부티르산 및 2-아미노-2,3-디메틸부티르아미드; L-도파 및 메틸도파를 비롯한 아미노산; 베타-메르캅토이소부티르산; 글리시돌 및 글리시딜 부티레이트; 락트산; 카르니틴; 타르타르산; 2-브로모페닐부티르산 에틸 에스테르; 아스파탐 및 알리탐을 비롯한 펩티드; 프로프라놀롤 및 1-아세톡시-2-아릴옥시-프로피오니트릴(예:1-아세톡시-2-알파-나프틸옥시 프로피오니트릴)을 비롯한 아릴옥시프로판올아민; 알파-아일옥시 프로피온산 및 이들의 에스테르 유도체[예:2-페녹시프로피온산, 부틸 2-[4-[[5-)트리플루오로메틸)-2-피리디닐]옥시]페녹시]프로파노에이트, 메틸 2-[4-[[5-(트리플루오로메틸)-2-피리디닐]옥시]페녹시]프로파노에이트 및 메틸 2-(4-히드록시페녹시)프로피오네이트]; 5-치환 히단토인 및 티오히단토인; 사이퍼메트린 및 플루발리네이트를 비롯한 피레드로이드 살충제 ; 2-(p-클로로페녹시)-프로피온산 ; 알파-시아노-3-페녹시벤질 알코올을 비롯한 시아노히드린; 4-히드록시-3-메틸-2,2-프로피닐-2-시클로펜탄언 ; 4-아미노-3-히드록시부티르산; 1-메톡시-2-히드록시프로한; 4-에틸-2-피페리딘카르복실산; N-[2-히드록시-2-(3-포름아미도-4-히드록시페닐)]-1-페닐-3-아미노부탄; N-(1-카르복시에틸-3-페닐프로필)-2-아미노프로피온산; 2-인돌렌카르복실산; 2-아미노-2-메틸-3-(3,4-디히드록시페닐)프로피오니트릴 및 2-아미노-2-메틸-3-(3-메톡시-4-히드록시페닐)프로피오니트릴; 메틸-2-아미노-3-히드록시-3-(4-니트로페닐)프로피오네이트;2-[1-카르바모일-1,2-디메틸프로필)-카르바모일]-니코틴산 및 2-[(1-시아노-1,2-디메틸프로필)-카르바모일)]-니코틴산; 및 N-(3-페닐-1-카르복시프로필)-2-아미노프로피온산 및 이들의 에스테르등이 있다.

허다한 특수 반응물과 생성물의 화학적인 특성(예:기능기의 특성)은 위에 나온 반응종류, 반응 및

그 생성물로부터 명백해진다. 이들 반응종류로부터 알수 있는 것은 대다수의 반응은 (i) 거의 물에 불용성이고 유기 가용성인 반응물을 수용성 생성무로 전환하던지, (ii) 수용성의 유기불용성 반응물을 유기 가용성 생성물로 전환시키는 두가지 반응중 어느 한가지에 속하게 된다. 이러한 반응종류는 다상막 반응기법과 추출막 반응기법을 실시할 때 특히 적합하다. 앞서 나온 반응종류의 한가지 예로서 물에 불용성인 에스테르는 가수분해하여 다상막 반응기법에서 수용성산을 얻는데 특히 효과적인 것이다. 이에 상응한 알코올성공생물은 수성상 또는 유기상에 가용성인 것이 바람직하다. 역으로 말하자면 그들의 전기적인 특성으로 인하여 유기용매에는 거의 용해하지 않으나 물에는 극히 잘용해하는 산은 추출막 반응기법에서 에스테르로 전환시키는데 효과적인 반면, 실제로 에스테르는 유기용매에 대한 용해도가 상당히 크르로 이들의 선택적인 추출특성으로 인해 반응대로부터 용이하게 제거되어 용매중으로 들어간다. 이경우에 있어서 알코올의 용해도 특성에 따라 수성의 공급액 또는 유기공급액을 통해 알코올성 공반응물을 추출막반응기로 공급한다.

다상막 반응기와 추출막 반응기에 있어서 필요로 하는 화합물의 라세미형 그 자체를 반응혼합물로 사용하던지 그 단순한 화학적인 유도체를 반응 혼합물로 사용해서 입체선택성 효소반응을 실시한다. 특히 비대칭산이나 비대칭 알코올의 효소에 의한 분하를 막반응기에서 여러 가지 방법으로 실시할 수 있는데 즉 두가지 바람직한 막반응기법에 있어서 그 첫 번째는 다상막 반응기에서 필요로 하는 생성물의 에스테르 유도체의 라세미 혼합물을 입체선택성의 효소에 의해 가수분해 시키는 방법이고, 그 두 번째는 추출막 반응기에서 비대칭산이나 알코올의 입체선택성의 효소에 의해 에스테르와 시키는 방법이다. 두가지 경우에 있어서 필요로 하는 비대칭 알코올이나 비대칭 산으로 에스테르 유도체를 제조하는데 사용되는 산성분이나 알코올성분을 선택한다는 것은 막반응기법을 효율적으로 실시하는데 중요하다. 예컨데 화합물을 선택해서 에스테르 유도체의 수용성을 조절하고 동시에 유도체에 대한 효소 활성과 입체선택성을 극대화할 수 있다. 나프록센과 이부프로펜 같은 비대칭 산들을 에스테르화 하는데 사용되는 알코올로는 RCH_2OH[여기서 R은 수소, 탄소원자수가 1-8인 알킬그룹, -CN, CCl_3 - CH_2Cl,-$CHNO_2CH_3$, -C=CH, -CH=CH_2 , -$COCH_4$, -COO-alk 또는 CH_2O-alk(여기서 alk는 탄소원자수가 1-4인 알킬그룹)임]로 나타내어지는 화합물들이 있다. 글리시돌과 멘톨같은 비대칭 알코올을 에스테르화 하는 산으로는 RCOOH(여기서 R은 탄소원자수가 1-18인 알킬그룹이거나 -CH_2CH_2 COOH임)로 나타내어지는 화합물들이 있다. 이런 점에 있어서 유용한 것들은 비대칭 알코올의 인산 에스테르이다.

예를 들자면 본 발명의 방법에 따라 분할되는 라세미 혼합물인 바람직한 비대칭 에스테르로는 글리시딜부티레이트와 메틸 2-(4-히드록시페녹시)프로피오네이트가 있다. 본 발명에 의해 2-브로모페닐부티르산 에틸 에스테르, S-벤조일-베타-메르캅토 이솝티르산(티올에스테르), 2-[4-[[5-(트리플루오로메틸)-2-피리디닐]옥시]페녹시]프로피온산의 부틸에스테르와 메틸에스테르, 메틸 2-[4-(2,4-디클로로페녹시)페녹시]프로피오네이드, 사이퍼메트린과 플루발리네이트를 포함하는 알파-시아노에스테르 피레드로이드, 메틸 2-아미노-3-히드록시-3-(4-니트로페닐)프로피오네이트 및 1-아세톡시-2-알파-나프틸옥시프로피오니트릴을 포함하는 1-아세톡시-2-아릴옥시 프로피오니트릴중에서 선택되는 비대칭 에스테르의 라세미 혼합물을 분할할 수 있다는 것도 생각할 수 있다.

본 발명의 방법에 따라 분할되는 라세미 혼합물인 바람직한 비대칭 산으로는 나프록센, 이부프로펜, 케토프로펜 및 플루리프로펜 ; S-벤조일-베타-메르캅토 이소부티르산 ; 2-클로로프로피온산 및 2-브로모프로피온산을 포함하는 2-할로프로피온산 ; 도파, 페닐글리신 및 파라히드록시테릴글리신을 포함하는 아미노산 ; 2-페녹시프로피온산, 2-(p-클로로페녹시)프로피온산 및 2-(4-히드록시페녹시)프로피온산을 포함하는 알파-아릴옥시프로피온산 등이 있다. 또한 본 발명의 방법을 사용하여 베타-메르캅토 이소부티르산; 메틸 도파; 아스파탐 및 알리탐을 포함하는 펩티드; 2-아세틸아미노-2,3-디메틸부티르산; 카르티닌; 락트산 및 타르타르산 ; 2-브로모페닐부티르산; 2-아세틸아미노-2,3-디메틸부티르산; 카르티닌; 락트산 및 타르타르산; 2-브로모페닐부티르산; 2-[4-[[5-트리플루오로메틸)-2-피리디닐]옥시]페녹시]프로피온산, 2-[-(2,4-디클로로페녹시)페녹시]프로피온산; 크리산템산 및 이들의 유도체; 4-아미노-3-히드록시부티르산; 4-에틸-2-피페리딘-카르복실산; N-(1-카르보에틸-3-페닐프로필)-2-아미노프로피온산; 2-인돌렌 카르복실산; 2-아미노-3-히드록시-3-(4-니트로페닐)프로피온산; 및 N-(3-페닐-1-카르복시프로필)-2-아미노프로피온산중에서 선택되는 비대칭 산의 라세미 혼합물을 분할할 수 있다는 것도 알 수 있다.

이러한 비대칭 산들의 라세미 혼합물을 곧바로 다상 막반응기나 추출막 반응기로 공급해서 비대칭 산들을 분할한다. 또한 이들 라세미산과 알코올 또는 아민을 반응시킨 다음 에스테르 또는 아미드 유도체의 라세미혼합물을 막반응기로 공급해서 간접법으로 원래의 라세미산 혼합물을 분할함으로써 비대칭 산의 에스테르 또는 아미드 유도체의 라세미 혼합물을 먼저 제조한다.

본 발명의 또다른 바람직한 실시태양에 있어서 비대칭 알코올 즉 알파-시아노-3-페녹시벤즈알데히드 또는 4-히드록시-3-메틸-2,2'-프로피닐-2-시클로펜텐온을 포함하는 시아노히드린 알코올 카르티닌 글리시딜등의 라세미 혼합물을 분할하는 것이다. 본 발명의 실시에 있어서 예측되는 것은 프로프라놀롤을 포함하는 아릴옥시프로핀올아민; 파라-히드록시페닐글리신을 포함하는 측쇄 히드록실 그룹을 가진 아미노산; 베타-메르캅토 이소부티르산(엄격히 말해서 티올); 4-아미노-3-히드록시부티르산; 1-메톡시-2-히드록시프로판;
N-[2-히드록시-2-(3-포름아미드-4-히드록시페닐)]-1-페닐-3-아미노부탄; 2-아미노-2-메틸-3-(3,4-디히드록시페닐)프로피오니트릴 및 2-아미노-2-메틸-3-(3-메톡시-4-히드록시페닐0프로피오니트릴; 및 2-아미노-3-히드록시-3-(4-니트로페닐)프로피온산과 그 메틸에스테르 중에서 비대칭 알코올을 선택한다는 점이다.

한편으로 본 발명의 효소막 반응기에다 바로 라세미 알코올 혼합물을 공급해서 이러한 비대칭 알코올의 라세미 혼합물을 분할한다. 다른 한편으로는 라세미 알코올 혼합물과 산을 반응시킨 다음 막반응기에다 라세미 에스테르 혼합물을 공급하여 간접법으로 라세미 알코올 혼합물을 분할하므로서 비대칭 에스테르 유도체의 라세미 혼합물을 우선 제조한다.

막반응기에 공급되어 분할되는 라세미 혼합물인 바람직한 비대칭 아미드로는 2-아미노-2,3-디메틸부티르아미드, 2-아세틸아미노-2,3-디메틸부티르산 및 아스파탐과 알티님을 포함하는 펩티드가 있다.

본 발명을 측쇄 아미드 그룹을 가진 라세미 아미노산의 분할과 2-[(1-카르바모일-1,2-디메틸프로필)-카르바모일]-니코틴산에 적용할 수 있다.

본 발명의 막반응기에 공급되어 분할되는 라세미 혼합물인 바람직한 비대칭 아민은 페닐글리신인데 여기서 입체선택적인 효소에 의한 반응에는 알파-아미노 그룹이 개입된다. 본 발명에서는 2-아미노-2,3-디메틸부티로니트릴; 2-아미노-2,3-디메틸부티르아미드; 도판 및 파라-히드록시페닐글리신을 포함하는 아미노산; 아스파탐 및 알타탐을 포함하는 펩티드; 프로프라놀롤을 포함하는 아릴옥시프로판올아미; 4-아미노-3-히드록시 부티르산; 4-에틸-2-피페리딘카르복실산; N-(1-카르복시에틸-3-페닐프로필)-2-아미노 프로피온산; 2-아미노-2-메틸-3-(3,4-디히드록시페닐)프로피오니트릴 및 2-아미노-2-메틸-3-(3-메톡시-4-히드록시페닐)프로피오니트릴; 및 2-아미노-3-히드록시-3-(4-니트로페닐)프로피온산과 그 메틸에스테르중에서 선택되는 라세미 아민을 분할할 수도 있다.

한편으로는 막반응기에다 바로 라세미 아민 혼합물을 공급하여 비대칭 아민의 라세미 혼합물을 분할한다. 또한 라세미 아민 혼합물과 산을 반응시킨 다음 여기서 얻는 라세미 아미드 혼합물을 효소막반응기에서 분할함으로써 비대칭 아미드 유도체의 라세미 혼합물을 먼저 제조한다. 결과적으로 원래의 라세미 아민 혼합물은 간접적으로 분할된다.

마지막으로 본 발명을 이요해서 2-아미노-2,3-디메틸부티로니트릴; 1-아세톡시-2-아릴옥시프로피오니트릴(예:1-아세톡시-2-알파-나프틸옥시프로피오니트릴); 2-아미노-2-메틸-3-(3,4-디히드록시페닐)프로피오니트릴 및 2-아미노-2-메틸-3-(3-메톡시-4-히드록시페닐)프로피오니트릴; 및 2-[(1-시아노-1,2-디메틸프로필)카르바모일]-니코틴산중에서 선택되는 각종 비대칭 니트릴화합물의 라세미 혼합물을 분할할 수 있다.

다막상 반응기중에서의 주요 반응물과 생성물의 용해도 차이는 비교적 비극성 및/또는 하전이 없는 관능기(예:에스테르 결합 또는 아미드결합)을 극성이 많고/또는 하전된 관능기(예:카르복실산)로 전환시킬 때 대표적으로 나타나는 반면, 막추출 반응기에서는 그 반대현상도 일어나는 것이 일반적이다(즉 극성의 하전된 관능기들이 비교적 무극성의 하전되지 아니한 그룹으로 변환된다). 대표적이기는 하나 꼭 그러한 것은 아닌데 분배계수 즉 상평형에서 유기상 대 수성상의 농도비 또는 수성상 대 유기상의 농도비는 주요 반응물과 생성물에 대해서는 2를 넘어서며 바람직하게는 주요성분들의 분배비는 다상막 반응기와 추출막 반응기의 적정한 성능을 발휘하자면 약 10을 넘어야 한다. 이상적인 조건하에서는 분배계수는 100 이상이 되는데 이렇게 되면 반응기 조작가 반응물/생성물의 입체이성체 분리는 극히 효율적이 되지만 용해도차가 극단적이되면 본 발명을 실시할 수 없게 된다. 수성상과 유기상에 있어서 반응물과 생성물의 절대적인 용해도는 본 발명의 실시에 중요성이 없는데 다상막 반응기법과 추출막 반응기법은 한가지 이상의 상에서 반응물이나 생성물의 농도가 수마이크로몰/ℓ 이하인 조건하에서는 성공적으로 작동한다. 극단적으로 거꾸로 말하자면 효소에 의한 반응온도에서 액체인 물에 불용성인 반응물을 극히 큰농도에서 순수한 액체로 해서 다상막 반응기에다 바로 공급한다. 또한 수용성이 없는 반응물이 고체이던지 극히 점성이큰 액체일 때는 유기용매에 용해하여 여기서 얻은 용액이 물과 혼화하지 않는 정도로 하는 것이 좋다. 이런 목적으로 사용되는 용매로는 지방족 및 방향족 탄화수소(예:헥산, 톨루엔); 염소화용매(예:염화메틸렌, 클로로포름); 물에 불용성인 알코올(예:아밀알코올, 옥탄올, 데칸올); 에스테르(예:아밀아세테이트): 및 케톤류(예:메틸 이소부틸케톤)등이 있다. 다상막 반응기법이나 추출막 반응기법에 사용되는 용매를 선택함에 있어서 중요한 고려사항으로는 막물질 및 효소와의 적합성, 독성, 점성, 용해도와 혼화성 및 다른 반응성분으로부터의 분리의 용이성등이 있다.

4.2. 막 구조와 효소 함입

본 발명의 실시에 적당한 효소활성막을 선택할 때 몇가지 유의해야할 사항은 화학, 형태학 및 효소활성화 방식이다. 이들중 첫 번째에 관하여는 막물질이 반응계중의 성분중 어떤 성분, 특히 유기반응물, 생성물 및/또는 용매에 의하여 나쁜 영향(예:팽윤이나 화학적인 공격등)을 받지 않아야 한다. 무기물질(예:요업제품)도된 막을 본 발명에 사용할 수 있다하더라도 중합체로된 막이 바람직하다. 특히 내용매성 중합체로된 막은 본 발명의 방법에 잘 맞는다. 본 발명의 실시에 적합한 막으로 되는 대표적인 중합체 물질은 재생 셀룰로오스, 셀룰로오스의 에스테르(및 특히 바람직한 부분적인 아세테이트와 질산), 폴리 아크릴로니트릴 및 그 공중합체(특히 아크릴아미드, 아크릴레이트, 및/또는 메타크릴레이트 관능성이 결합된 공중합체를 포함한 친수성의 것), 폴리우레탄 함유 공중합체, 폴리아릴술폰 및 폴리아릴에테르술폰(폴리술폰; 폴리에테르술폰; 폴리에틸렌옥사이드, 폴리히드록시에테르, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐알코올, 폴리카프로락탐 및 폴리에피할로게노히드린등과 같은 친수성 공중합체와의 블랜드), 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리비닐알코올, 지방족 폴리아미드, 폴리아미드, 폴리에테르이미드, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 폴리올레핀(예:폴리프로필렌, 폴리비닐클로라이드) 폴리벤즈이미다졸 및 폴리벤즈이미다졸론등이 있다.

효소 활성막의 효소성분은 수성(aqueous)이 우세한 환경에서 가장 효과적으로 작용하는데 이런 이유로 해서 바람직한 것은 막이 습윤성이 없거나 친수성이라야 하는 것이다. 위에 나온 막중합체중 어떤 것들은 원래부터 친수성인 것이 있다(예: 셀룰로오즈, 커다란 폴리아크릴로니트릴 공중합체 및 폴리아미드). 그러나 원래부터 친수성이 아닌 것들일지라도 적당히 화학 또는 물리적으로 표면처리를 함으로서(예:친수성 관능기를 유도하거나 이들을 결합시키던지 단순히 적당한 계면활성제로 접촉시키는등) 본 발명의 실시에 적합하게 되거나 소수성 중합체 기공벽면을 친수성 물질로 코우팅하던지 비대칭의 미세다공질막의 기공체적을 고수분 함량의 겔형태의 친수성 효소로 단순히 충전시켜 주는 것만으로도 본 발명의 실시에 적합하게 된다. 효소지지체로 사용하기 적합한 막은 몇가지 형태학중 한가지를 나타낸다. 특히 이들은 미량여과법에 일반적으로 사용되는 조유의 미세다공질막으로서 기공크기는 약 수백분의 1마이크론에서 수마이크론까지이고 기공공극체적은 수%-90% 이상이다.

더욱이 겔형 투석막(예:혈액투석에 사용되는 종류의 재생 셀룰로오스막)을 특히 막표면에 효소가 위치한 것을 사용하기도 한다. 이런 막은 외부표면에 효소가 공유결합하던지 한쪽표면에 동적인 효소겔 편광된 2차막층을 생성시켜 주면 표면이 활성화된다. 바람직한 실시예에 있어서 막은 대부분이 미세다공질이고 비교적 공극체적이 크며 아주 미세한 해면상 기질영역을 가지고 있다는 특징이 있으

나 한쪽 외부표면에는 한외여과형의 표피가 있다. 이러한 막의 형태학에 의해 효소충전을 고도로 할 수 있고 주기적으로 효소를 바꾸어 줄 수 있다. 이런 바람직한 형태학을 가진 표피가 있는 미량여과막의 사용에 관해서는 효소활성화 방식에 관련하여 후술하기로 한다.

본 발명의 실시에 사용되는 막의 기하학적 구조는 이차적인 고려사항이고 평판상, 바람직하게는 직경이큰 튜우브 및 여러 가지 직경의 유공섬유(hollow fiber)형태의 막은 모두 사용된다. 막모듈에는 두 개의 유입구와 두 개의 유출구가 있어야 하기 때문에 평평한 프레임모양 즉 카세트형 하우징이 있어야 나선형으로 권취 또는 다섬유막 모듈에 효과적으로 충전되는데 이러한 구조는 원통다관식 열교환기의 것과 유사하다.

유공섬유 모듈형식의 막은 대부분의 면적을 견고하고도 경제적으로 충전되게 한다. 막의 상(membrane phase)내에 효소를 함입시키거나 부동화 하기 때문에 막으로부터 효소가 누설되어 수성의 공정액이나 유기공정액으로 들어갈 수 없게 되어 있다. 효소를 결합시키는 적당한 방법으로는 비대칭(예: 표피가 있는)의 미세다공질 막구조의 공극(pore space)내에 함입시키던지 막의 기공벽면에 흡착시키던지, 막의 기공내에 있는 중합체 겔중에 함입 또는 캡슐화한다던지 막의 기공벽에다 공유결합시키던지 공극내에 효소를 교차결합시키거나 막의 기공벽면에 효소를 흡착시키는 등이 있다.

특히 효소로 막을 활성화하는데는 여러 가지 다른 방법이 있다. 가장 직접적인 접근방법은 생체촉매를 비막성분 지지체에다 결합시키기 위해 개발된 종래의 여러 가지 효소부동화 화학을 이용해서 막의 외표면이나 내표면에다 효소를 공유결합시키는 것이다[Zaborsky, O.R., Immobilized Enzymes, CRC Press, Cleveland, OH(1973) ; Weetal, H.H., Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides : Enzymology, Vol.1 Marcel Dekker, N.Y.(1975) ; Emery, A. et al., Biotechnol. Bioeng., 16:1359(1974)]. 효소를 다공질막에 교차 결합시키거나 [Thomas, D. and S.R. Caplan, pps. 351-398 in Membrane Separation Processes, P. Meares, ed., Elsevier, Amsterdam(1976)], 막의 겔중에 함입시키거나[Blaedel, W.J. et al., Anal. Chem., 44:2030(1972)], 이온 교환 또는 기타 특수하거나 특수하지 않는 단백질-표면 상호작용을 통하여 막내에 또는 막표면에 흡착시키거나 캡슐화 하기도 한다.

본 발명의 실시에 있어서 어떤 경우 있어서는 위에 나온 여러 방법들을 병용하는게 좋다. 예컨데 우선막 외부표면이나 기공벽면에다 효소를 흡착시킨다음 흡착된 효소층을 제자리에 교차결합시키므로서 보다 튼튼히 고정시킨다. 바람직한 실시태양에 있어서 미국 특허출원 제912,595호(1986.10.1)에 나온 바와 같이 표피가 있는 미세다공질 막속에 효소를 가역적으로 함입시키는 것이다. 이러한 막구조는(제4도) 두 경계사이에 효소를 함입시켜 정상적인 막반응기 조작조건하에서는 빠져나오지 못하게 할 수 있다. 이들 두가지 경계는 다음의 두기지로 구성되어 있다. 즉 (1) 효소 활성화막의 표피 즉 표면층으로 되어 있는데 여기에는 막의 다공질 외부로부터 이것과 접해 있는 수성의 공정액으로 거대분자상 효소가 이동하여 누설되지 못하게 하는 것이고, (2) 반대쪽막 표면에 수성상과 유기상의 경계로 되어 있는데 유기용매중에서는 대부분의 효소가 불용성이 있기 때문에 유기 공정액을 통해 막으로부터 효소가 누설되지도 못하고 막속으로 효소가 분배되어 들어가지도 못하게 되어있다. 이러한 막은 그속으로 다공질막 속에 결합된 활성 효소를 극히 많이 충전시켜 효소수용액을 한외여과하면 효소에 의해 활성화된다. 이러한 방식의 효소활성화가 주는 추가적인 이익은 그 가역성이다. 즉 탈화성화된 효소를 백-플러쉬(back-flushing)조작으로 막으로부터 제거함으로써 효소촉매를 주기적으로 보충해줄 수 있다.

다상막 반응기법과 추출막 반응기법에 쓰이는 막의 활성화에 대한 또다른 바람직한 접근방법은 혈액투석이나 혈액여과에 사용되는 종류의 겔형 막이나 한외여과막의 표면위에 동적인 효소-겔 편광막을 생성시키는 것이다. 재생 셀룰로오스 또는 친수성 폴리아크릴로니트릴로된 중합체 및 공중합체로된 투석/한외여과막은 중히 미세하여 물투과성이라고 막의 유효 표면 기공 크기가 너무 작아 효소를 수용할 수 없다. 그러나 입증된 바에 의하면[Kerkhof, P.I.A.M., et a., Enzymatic Hydrolysis of Lipids in a Membrane Reactor, a poster presented at the International Membrane Technology Symposium, Lund, Sweden, May 28-30, 1095 ; Molinari, R. and E. Drioli, Proc, Nat, Congr. Ind. Chem. Div. Sci., Siena, June, 10-25 1985] 막 전체에 대해 수성의 효소용액을 한외여과에서 막의 필름의 한쪽표면이나 막섬유의 한쪽표면에 진한 효소겔층을 침착시켜줌으로써 이러한 막들을 효과적으로 효소로 코우팅할 수 있다는 것이다. 유기공정액을 활성화된 막의 표면과 접촉시켜주면 효소가 유기용매에 뚜렷이 가용성이 아니한 효소겔층은 막표면에 고정되어 잔류하는 경향을 가진다. 이 방법을 더 구체화하고자 본 발명인들은 효소단백질을 화학적으로 교차결합시켜 주므로서 효소표면층 또는 동적으로 생성된 막을 안정화시켰다.

4.3. 반응 및 분할방법 파라미터

본 발명의 다상 반응기법과 추출막 반응기법을 실시함에 있어서 두가지 공정액 즉 한쪽은 수성의 공정액(즉 1차 유체)이고 다른쪽은 물에 불혼화성인 유기액체 또는 유기용액(즉 2차 유체)인데 이들을 효소활성화막의 반대편과 접촉시킨다. 보통 바람직한 것은 효소활성막의 반대편과 접촉시킨다. 보통 바람지직한 것은 효소활성화막이 친수성이어서, 접촉시 수성상에 의해 습윤되어야 하는 것이다. 그 이유는 효소는 유기용매중에서 보다 수성의 조건에서 보다 효과적이기 때문이다. 실제로 막이 물로 습윤되면 막의 한쪽에 있는 유체를 다소 상이한 압력으로 유지하여 주어 막에는 약간의 정압차(正壓差)가 생기게 하고 이대 유기상을 큰 압력하에 유지한다(예: 배압 조정기나 기타 압력조절장치를 사용함).

이와 같이 조작하면 유기공정액과 접해 있는 막표면에 수성상과 유기상의 경계가 위치하게 되고 이 위치는 안전한 것이다. 막에서 수용액을 한외여과하게 되는 것을 방지하자면 반대되는 압력차(즉 유기 대 수성)를 이용해야 하나 효소활성화막의 친수성에 의해 수성상이 막을 습윤시키게 된다. 유기 대 수성의 압력차의 크기에 대한 주된 제약은 비습윤성 유기상에 의하여 막의 기공속으로 침투하기 위한 침입압을 능가해서는 안된다는 것이고, 이때 침입압(P)은 다음과 같은 Toung-LaPlace 식으로부터 구한다:

$$P = (2 \times \gamma / R_{기공}) \times \cos\theta$$

위의 식에서 γ 는 유기상과 수성상 사이의 계면장력이고, $R_{기공}$ 은 유효기공 반경이며 θ는 막물질 및 이것과 접해 있는 유체사이의 3상 접촉각이다. 대표적으로 침입압이 최소한 수 psi, 바람직하게는 최소한 10psi되게 해서 안전한 조작압력창문을 구성하게 하고 효소활성화막이 상분리기로서의 역할을 안정하게 할 수 있을 정도로 막의 기공크기를 선택해야 한다.

초기반응물을 막모듈속으로 운반하여 효소활성화막과 접촉시키는 공급액을 특질상 물과 불혼화 되는 유기질의 것으로 하거나(이 경우에 있어서 공정을 다상막 반응기법이라 한다) 수성으로 한다(이 경우에 있어서 공정을 추출막막 반응기법이라 한다). 공급액의 유속을 적절히 조절하여 주요 반응물이 효소에 의해 필요한 정도로 전환반응을 하게한다(즉 라세미 공급 혼합물중의 한가지 입체이성체 또는 필요로 하는 이성질 생성물의 대칭성 선구물질). 막의 반대쪽에 있는 액의 유속을 적절히 조절하여 효소에 의한 반응 생성물중 한가지가 적당한 농도로 유출되게 한다.

예를 들자면 반응물의 수용성이 극히 없고 생성물은 수용성이 극히 큰 다상막 반응기법에 있어서 중요한 것은 생성물의 유속을 비교적 느린 값으로 유지하여 될 수 있는한 수성상 생성물을 농축시킬 수 있어야 하는 점이다. 이런 방식의 조작에 의해 생성물을 수득율을 높이는데 즉 유기상의 선구물질의 경우보다 훨씬 큰 농도의 수성상 생성물을 제거하게 된다. 이렇게 함으로써 필요로 하게되는 그 다음의 생성물 농축공정 및/또는 정제공정의 어려움이 극소화 하게 된다. 역으로 주요 반응물이 수용성이고 유기용매속으로 추출하여 억제성 또는 불안정한 유기 가용성 반응 생성물을 제거할 필요가 있는 추출막 반응기계에 있어서 필요로 하는 것은 효소활성화막을 지나는 유기공정액의 유속을 비교적 크게 유지해야 하는 것이다. 이와 같은 방식으로 조작하면 유기 공정액의 유속이 커져서 생성물의 농도를 저하시키기 때문에 효소반응대로부터 생성물을 신속하고도 효과적으로 제거할 수 있게된다. 이처럼 효소반응의 수득율과 생산성이 개선된다.

유기공정액과 수성의 공정액의 유속 사이의 관계에 따라 공정에서 나오는 생성물의 입체화학적인 순도에 중요한 영향을 미친다. 예를들자면 다상막 반응기법의 경우에 있어서 물에 불용성이고 유기 가용성인 입체 이성체의 라세미 혼합물을 공급해서 유기공급액의 유속을 조절하여 라세미체에 입체이성체중 한가지의 전환율이 극히 크도록 해주면 기존의 유기공정액중에 있는 반대되는 이성체(예:미반응의 것)의 광학적인 순도를 향상된다. 마찬가지 의미에서 수성의 공정액의 유속을 조절하여 수용성 생성물이 상당히 많이 생기게 해주면 수성의 공정액의 광학적인 순도가 향상되는데 그 이유는 수성상중에 용해하는 반대되는 비교적 반응성이 없는 이성체중 어떤 것이 이런 방법으로는 농축되지 않기 때문이다. 아래에 나오는 실시예 14가 이런 효과를 극적으로 설명해준다.

제7도에 있는 바와 같이 효소막 반응기에 있는 두가지 흐름중 최소한 하나를 재순화시켜 불필요한 이성체를 라세미화 한다. 예를 들자면 연속공정에 있어서(즉 라세미 에스테르로부터 광학적으로 순수한 산이나 알코올의 제조)공정에 공급되는 라세미 반응물의 몰공급속도와 광학적으로 정제된 생성물의 몰제거속도는 정상상태의 조작조건에서는 일반적으로 동이하고, 내부 재순환액의 유속은 필요로 하는 입체이성체의 매회 통과당 전환율에 역비례한다. 특히 재순환액의 유속을 설정하여 반응성 입체이성체의 매회 통과당 전환율에다 혼합된 보충액 및 재순환액에 있는 소요의 입체이성체의 반응기에 대한 몰공급속도를 곱한 값이 생성물 액중에 있는 전환되고 정제된 입체이성체의 몰제거속도와 동일하게 하도록 한다. 회분식 방법에 있어서 라세미 반응혼합물을 한번 계에 공급해서 효소막 반응기와 라세미화 반응장치(필요에 따름)속으 순환시켜 반응물질(초기의 반응성 입체이성체와 그 다음의 미반응 이성체의 라세미화 반응에서 유도된 것)을 소진시킨다. 효소의 입체 선택성이 절대값 이하이면 생성물의 입체화학적 순도와 공급물질의 재순환 정도사이에서 자주 상쇄가 일어난다. 예컨데 효소가 라세미 공급물중에 있는 두가지 입체이성체쪽을 향해 활성을 나타낸단면 최고의 광학적 순도를 가진 생성물을 낮은 반응기 전환율로 얻게되지만 매회 통과당 전환율을 낮게해서 조작하면 내주 재순환 속도가 커지고 라세미화 반응 및/또는 유도 반응용 화공약품과 공정장치에 대한 투자가 커지게 된다.

특수한 방법이 여러 가지 많은 비대칭 화합물에 있어서 라세미화 반응(예:비대칭 탄소 주위에서의 입체화학의 무작위 반전)과 에피머화 반응(예:S중심으로부터 R중심을 생성시키거나 그 반대로 하기 위해 비대칭 중심의 특수한 반전)에 대해 발표된 바 있는데 다상막 반응기와 추출막 반응기에서는 크게 변함이 없이 사용되고 있다. 예컨데 순수한 유기 액체로서의 수성용액중에서 가열하던지(환류조건에서 처리) 유기용매중에 용해시켜 가열해서 많은 비대칭 화합물을 라세미화한다. 무기 및 유기산(예 : 무기산, 아세트산 무수물등)이나 염기(예:KOH 또는 트리에틸아민)를 사용하여 라세미화 반응속도를 가속화한다. 라세미화 반응이란 무작위 라세미화 반응과 특수한 에피머화 반응 모두를 포함하는 것이다.

수성의 공정액과 유기 공정액의 유속을 향류로 하던지 역류로 하고 막반응기를 연속시의 회분식(필요에 따라 두가지 공정액중 한가지 또는 두가지를 재순환시킴)또는 반회분식으로 조작한다. 유동구조에 관하여 구체적인 사항에 따라 생성물의 순도, 반응물의 전환율, 상분리 및 pH 조절을 비롯해서 막반응기법의 수행상 여러 가지 2차적인 특징에 영향을 주고 있다. 유기공정액이나 수성의 공정액을 효소활성화막을 통과시킬 필요는 없고 오히려 이들 불환화성의 공정액의 대류 유동을 막의 외부 표면을 지나가게 하는 것이 좋다. 국부적인 농도기울기에 응답하여 수성/유기분배거동과 일치하는 확산 방법에 따라 반응물을 유입시키고 생성물을 효소활성막을 나가게 한다.

막반응기 및 이 막반응기로 공급되는 수성 및 유기공급액의 온도를 효소활성과 안정성이 보장되는 적절한 범위에서 유지시키고 마찬가지로 pH도 유지시킨다. 막반응기에 있는 두가지 반응 생성물 또는 한가지에 대해 처리조작을 할 때(즉 입체이성체의 라세미 혼합물중에 있는 불필요한 이성체를 온-라인 라세미화 하거나 기타 화학반응을 시켜 공정을 재순환시킴) 공정액의 온도, pH, 기타 특성을

효율적인 효소 조작을 위해 필요한 범위밖에서 조절해 둔다. 이 경우에 있어서 최초의 pH 및 온도조건에 이러한 공정액을 복귀시킨 다음 막반응기속으로 되돌린다. 이것은 제13도에 예시되어 있는데 즉 R-나프록센을 함유하는 유기 공정액을 수성의 염기와 접촉시켜 에스테르의 라세미화와 화학적으로 가수분해를 일으켜 주로 라세미 나프록센산 이성체를 함유하는 생성된 수성의 공정액을 산성화하고 재순환시킨다.

이상적인 조건하에서 라세미 혼합물중에 있는 불필요한 이성체를 자연적으로 효소반응조건에서 라세미화하는데 이 경우에 있어서 라세미화 반응과 재순화 조작을 위한 추가되는 공정단계와 장치를 피할 수 있다. 이것이 바로 제14도와 제15도에 있는 방법인데 이 도면들은 광학적으로 순수한 아미노산과 아미노 아미드를 제조하는 것이다. 여기서 히단토인과 아미노 니트릴 선구물질이 자연적으로 라세미화한다.

추가되는 공정단계(즉, 막반응기법의 반복적용, 라세미 혼합물 유체의 재순화 및 미전환 반응물 및/또는 생성물의 정제등)에 의하여 다상/추출막 반응기법의 효율이 향상되고 생성된 비대칭 생성물의 화학적 순도와 입체 화학적 순도가 향상된다. 예를들자면 광학적으로 분할된 생성물이 카르복실산염의 수용액(예:나프록센)르로 다상 효소막 반응기에 존재하면 이러한 수성의 공정액을 저류 탱크로 펌프하여 보내서 무기산으로 산성화하여 산을 정제된 형태로 용액으로부터 침전시킨다. 또한 산성화된 생성물을 종래의 용매 추출법으로 유기용매중으로 추출하고 산을 분리해서 휘발성 유기용매를 증발시켜 정제한 후 분할된 산생성물을 결정화 한다. 광학적으로 정제된 유기가용성 생성물이 유기공정액중에서 순수한 유기액체(예:R-글리시딜 부티레이트 :제 16도) 형태 또는 휘발성 유기용매중의 용액으로 막반응기에 존재한다면 증류법이나 용매 증발법으로 생성물을 다시 정제한다. 제16도는 다상막 반응기에 있는 수성의 공정액중의 불순물인 소량의 R-글리시딜 부티레이트를 회수하는 공정인데 즉 수성의 공정액을 용매 추추하여 다량의 수용성 글리시돌 이성체로부터 유기기용성의 부티레이트 에스테를 분리회수한다. 경우에 따라서는 효소막 반응기중에서 생긴 광학적으로 정제된 물질은 필요로 하는 최종 생성물이라기 보다 오히려 중간 화합물이며 다음의 화학 반응과 정제공정 단계를 필요로 한다. 이것은 제14도와 제15도에 나와 있는데 즉 D-카르바모일 아미노산과 D-아미노아미드 중간생성물을 각각 산가수분해하여 필요로 하는 화학적 및 입체화학적으로 정제된 형태의 D-아미노산 생성물을 회수한다.

본 발명을 물에 불용성인 반응물의 라세미 혼합물의 분할에 적용함에 있어서(제2도와 제5도), 막내부 또는 막에 함입되거나 부동화돈 효소를 선택하여 공급혼합물중에 있는 한가지 이상의 특수한 광학이성체를 생체 전환시킴에 있어서 최대의 입체선택성을 나타내게 한다. 수용성이 나쁜 이성체를 최소한 한가지의 수용성이 보다큰 반응생성물로 전환시킬 때는 막내에 있는 효소에 의해 반응을 촉진시키고 이러한 수용성 생성물을 보다큰 반응생성물로 전환시킬 때는 막내에 있는 효소에 의해 반응을 촉진시키고 이러한 수용성 생성물을 비교적 광학적 순도가 큰 상태로 수성의 공정액에서 제거한다. 이와 동시에 공급 이성체 혼합물을 입체선택성 효소에 대해 보다 양호한 기질로 작용하는 특수한 광학 이성체중에서 소진시키고 이와 같이 기존의 유기상 공급액을 동시에 광학적으로 정제하고 수성상의 생성물과는 반대되는 입체배위를 가진 무반응성 이성체가 많이 있도록 한다. 여기서 얻은 순수한 결과는 R 및 S 광학 이성체의 유기상 혼합물을 두가지 공정액으로 분리하는데 즉 그 한가지는 원래의 공정액(공급액)중에 있는 미반응의 친유성 이성체를 함유하는 유기상 생성물인 반면, 나머지 하나는 반대되는 입체 화학적인 배위를 가지는 비교적 수용성이 있는 효소반응 생성물을 함유하는 수성의 공정액이라는 점이다. 이와 같은 방식으로 R과 S광학 이성체의 혼합물을 함유하는 공급액을 처리해서 두가지 생성물액을 얻는데 즉 한가지는 R(또는 S)배위가 있는 물질을 많이 함유한 것인 반면 나머지 한가지는 S(또는 R)배위가 있는 물질을 많이 함유한 것이다. 이 생성물의 필요로 하는 거울상 이성체의 전반적인 수득율은 기존의 액중 한가지에 있는 물질을 라세미화한 다음 제7도에 있는 분활공정의 유입구로 재순환시켜 주면 향상된다.

비대칭 에스테르 또는 산의 입체화학적 정제에 필요한 본 발명의 다상막 반응기의 실시에 있어서 막내에 리파아제나 에스테라아제 효소를 함입시키고 반대편을 역류하는 수용액(대표적으로 저농도의 완충액 함유)과 제1도, 제6도 및 제12도의 반응물 에스테르의 수용성이 불량한 입체이성체의 라세미 혼합물을 함유하는 유기용매로 접촉시킨다. 유기산은 수용액에는 가용성이나 유기용매에는 그렇지 아니하므로 그리고 유기 에스테르의 용해도 특성은 정확히 반대되기 때문에 고농도의 수성의 공정액(즉 수성의 공정액의 유속은 느림)중에 있는 다상막 반응기로부터 광학적으로 정제된 생성물인 산을 배출하는 한편 라세미 에스테르 공급 혼합물의 비교적 무반응성의 입체이성체는 유기공정액중에 잔류하게 하는 것이 좋다.

반응물과 생성물 사이에 적절한 분배선택성을 주는 유기용매를 사용하고 수성의 공정액 중에서 생성물의 농축을 용이하게 하는 유기상/수성상의 비를 크게하여 반응기를 조작하면 생성물의 분리와 농축이 잘된다. 한편으로는 정확한 입체 화학적인 배위를 가지는 효소 반응활성이 없는 에스테르인 경우에는 유기상중에서 공정으로부터 제거해서 분리하고 만일 이러한 이성체가 산성형이면 광학적으로 정제된 에스테르를 화학적으로 가수분해하여 광학적으로 정제된 산을 필요로 하는 생성물로 얻게된다. 한편으로 수성상의 카르복실한(및 알코올)생성물은 소요의 입체화학적인 배위를 가지는 물질중에서 소진되어 불필요한 물질이 많아진 것인데 이것을 임의로 다시 에스페르화한다음 라세미화해서 공정으로 재순환시킨다. 다른 한편으로는 정확한 입체화락적 배위를 가지는 보다 효소반응성이 큰 에스테르인 경우에는 소요의 생성물을 광학적으로 정제된 산의 형태로 얻게되는데 이것을 분리해서 필요에 따라 비라세미화 재에스테르화 조건하에 처리하여 상응한 광학적으로 정제된 에스테르 유도체로 다시 전환시킨다.

따라서 위에 나온 다상막 반응기법에서는 R 및 S 에스테르의 유기상 혼합물을 분리해서 두가지 공정액으로 만드는데 즉 그 한가지는 원래의 공급액중에 있는 친유성 에스테르의 미전화 입체이성체를 함유하는 유기공정액이고 나머지 한가지는 반대되는 입체확학적 배위를 가진 비교적 수용성이 있는 산의 이성체를 함유하는 수성의 공정액이다. 이와 같이 R과 S 에스테르의 혼합물을 함유하는 공급액을 처리하여 두가지 생성물액을 얻는데 그중 한가지는 R 배위가 있는 물질이 많은 것이고 다른 한가지는 S 배위가 있는 물질이 많은 것이다. 제6도에 있는 것처럼 S형의 에스테르에 대해 효소가 활성

을 가지고 R 이성체가 필요로 하는 생성물이면 화학저긍로 가수분해한 후 직접적으로 또는 R 에스테르 형태로 또는 간접적으로 R산의 형태로 해서 기존의 유기공정액으로부터 회수한다. 필요로 하는데 S-이성체이면 입체화학을 보전해 주는 비라세미화 조건하에서 분할된 산을 다시 에스테르화 한다음 이러한 입체 화학적인 배위를 가진 물질을 직접 S산 형태로 또는 간접적으로 S 에스테르 형태로 수성의 공정액으로부터 분리한다.

제1도는 비대칭 중심이 산성분쪽에 있는 경우에 라세미 에스테르와 산의 분할을 하기 위한 특수한 다상효소막 반응기법을 예시한 것이다. 그러나 이런 종류의 다상 효소막 반응기를 비대칭 탄소가 알코올 성분쪽에 있는 경우에 라세미 에스테르와 알코올의 광학적 분할에도 적용할 수 있다. 이들 경우에 있어서 알코올은 수용성이거나 유기가용성일 수 있다. 특히 제11도는 알코올이 비대칭이고 유기가용성인 경우의 총체적인 예인 반면 제16도는 알코올 성분이 비대칭이나 수용성인 경우의 라세미 에스테르(R-글리시딜 부티레이트)의 분할인 특수한 경우를 나타낸 것이다.

제8도와 제9도는 추출 효소막 반응기법을 나타낸 것인데 여기서는 수용성인 여러 가지 산들의 라세미 공급혼합물을 분할한 후 광학적으로 정제된 수성의 산과 유기 에스테르를 제조하는 것이다. 제8도와 제9도에서 생각할 수 있는 입체선택성 효소(예:리파아제 또는 에스테라아제)는 상분리막에 부동화되거나 그속에 함입되고 그 반대편은 두가지 역류액과 접하는데 즉 그 첫 번째는 수용성의 유기 불용성산의 라세미 혼합물을 함유하는 수성의 공급액이고 그 두 번째는 에스테르 반응생성물을 추출할 수 있는 물과 불혼화성인 유기용매이다. 유기추출용매의 유속을 충분히 크게 유지하여 억제성 에스테르 생성물의 수성상 농도를 극히 낮게한다. 이와 같이해서 수성매체중에서 열역학적으로 불필요한고 생성물 억제성인 산의 에스테르로의 생체 전환반응을 합리적인 생산성으로 큰 전환율로 시행할 수 있다.

제8도에 있는 특수한 공정에 있어서 효소의 입체선택성에 따라(즉 R 형 또는 S형 에스테르 합성시 효소가 가장 활성인가에 따라)유기상중에 있는 추출효소막 반응기로부터 R(또는 S)에스테르를 선택적으로 제거한다. 이러한 유기 생성물액중에는 효소의 R(또는 S) 입체선택성과 산의 입체이성체의 불량한 유기상 용해도로 인하여 비교적 S(또는 R)물질이 거의 함유되지 않는다. 이와 동시에 효소에 의하여 에스테르로 전환된 R(또는 S)산 중에서 수성상의 생성물이 소진되기 때문에 이 수성상의 공정액은 상응하게 S(또는 R)산 입체이성체가 광학적으로 많아진다.

본 발명의 다상막 반응기 실시태양에 관해 구체적으로 설명한 바와 같이 R 선택성 또는 S 선택성이 있는 효소를 사용하여 에스테르화 반응 방식에 따라 추출막 반응기를 조작하여 비대칭산, 알코올 또는 에스테르의 S형 또는 R형을 제조할 수 있다. 이것은 추출막 반응기법을 적당한 화학적인 유도화 반응, 가수분해, 라세미화반응 및/또는 생성물 분리단계등과 결합하여 실시한다. 유사한 추출막 반응기법을 적용하여 산, 알코올 및 에스테르 이외의 기타 비대칭 화합물의 분할이나 비대칭 합성을 할 수도 있다.

마지막으로 제2도와 제9도에 있는 종류의 다상 및 추출막 반응기법에는 공급물에 미반응 입체이성체가 없는데 이 방법들을 사용하여 효소반응의 비대칭 선구물질과 비대칭 생성물이 상이한 상에 대해 특히 가용성인 경우에 대칭성 유기화합물을 선택적으로 전환 반응시켜 정제된 입체이성체를 얻을 수 있다. 대칭성 선구물질이 수용성이 없는 것일때는 순수한 액체 또는 물에 불용성인 유기용액으로 하여 다상 효소막 반응기에 공급해서 효소 활성화 막과 접촉시켜 입체선택적으로 전환반응을 하여 수용성 생성물을 얻는다(제2도).

이런 종류의 다상막 반응기법을 특수하게 적용하는 것은 물에 불용성인 대칭성 디에스테르를 피지간의 에스테라아제로 입체 선택적으로 가수분해 반응을 촉진시켜 비대칭성의 수용성 산에스테르 생성물을 얻는데 있다. 이러한 적용에 있어서 대칭성 디에스테르 반응물을 유기상중의 다상막 반응기에 공급하고 비대칭성의 광학적으로 정제된 산에스테르 생성물을 상분리막의 반대쪽에 있는 수성상에서 배출한다. 대칭성 선구물질이 수용성이고 비대칭 생성물이 유기 가용성인 경우에는 대칭성 반응물을 효소활성화막의 한쪽 표면과 접해 있는 수용액으로 하여 추출효소막 반응기로 공급한다. 여기서 생성되는 유기 가용성의 대칭성 반응 생성물을 막의 반대편과 접해 있는 유기용매 속으로 추출하여 이 유기액 중의 반응기로부터 제거한다. 이러한 종류의 추출막 반응기의 적용예는 생체촉매로서 D-옥시니트릴라이제(E.C. 4.1.2.10)를 사용하여 대칭성 선구물질-즉 순수한 벤즈알데히드 및 시안화수소의 수성의 메탄올성 용액-로부터 유기 가용성의 D-만델로니트릴의 대칭합성을 하는 것이다. 이 효소는 벤즈알데히드의 카르보닌 이중결합에 대해 HNC의 비대칭 입체 선택성 첨가를 촉진시킨다. 특히 착화제를 사용하여 아미노산 생성물의 유기상 용해도를 증가시킬 경우에는 입체선택성 암모니아 리아제와 아미노기 전달효소(transaminase)효소 화학에 입각한 기타 다상 및 추출막 효소반응기들을 사용하여 트란스 신남산과 암모니아 같은 대칭 선구물질(예:L-페닐알라닌의 대칭 선구물질)과 알파 케토산으로부터 광학적으로 정제된 아미노산을 합성한다. 암모니아 리아제에 의해 촉진되는 페닐알라닌의 제조방법에 있어서 트란스 신남산의 탄소-탄소 이중결합에 대하여 암모니아는 비대칭적 입체선택적으로 첨가된다.

따라서 본 발명에서는 다상막 중개에 의한 효소반응계와 추출막 중개에 의한 효소반응계에서 비대칭 아미드, 산, 알코올, 아민, 니트릴, 히단토인 및 기타 귀중한 비대칭 화합물을 효소에 의해 분할하거나 합성하는 효율적인 방법을 제공하고 있다. 이들 효소막 반응기 조작 및 조작에 관한 위에 기술내용과 다음에 나오는 각 실시예에 관한 기술내용은 입체화학적으로 순수한 화합물제조에 있어서 본 발명을 폭넓게 이용할 수 있다는 것을 뜻하는 것이지 이들 다상막 반응기법과 추출막 반응기법에서 목적으로 하고 있는 조작방식이나 본 발명의 범위에 결코 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 실시예에 있어서 U 자 단독 또는 접두어로서의 U자는 마이크로를 뜻하는 것이다.

실시예 1

나프록센 분할

폴리아크릴로니트릴 한외여과 유공섬유(Asahi Medical Company PAN-200 혈액필터로 조립된 0.85㎡의

주문 제작된 내용매성 막모듈을 사용하여 다상 바아오리액터를 만들었다. 효소(candida cylindracea)로부터 유도된 리파아제로서 Genzyme Corporation)는 비중이 10,500단위/mg(1단위=37℃에서 1시간당 올리브 기름에서 방출되는 지방산(pH 7.7) 1μmol)이었다. 이 효소는 나프록센[2-(6-메톡시-2-나프틸)프로피온산]의 에스테르를 입체선택적으로 가수분해하는 것으로 알려져 있다.

증류수 500ml에 리파아제 3.0g을 용해하여 만든 용액을 한외여과 방식으로 외피로부터 내강속으로 재순환시켰다가 다시 저장조로 되돌리기를 30분 계속했다. 저장조가 텅빌때까지 한외여과물을 수거하고 외피속으로 메틸 이소부틸 케톤(MIBK)를 펌프해 넣고 5-7psig의 외피압에서 400-450ml/min에서 재순환시켜 잔존하는 효소용액을 외피로부터 제거했다.한외여과물 시료를 취해 트리아세틴에 대한 분석을 해본 결과 출발당시 용액에 비하여 효소활성이 5% 이하 잔존해 있음을 알 수 있었다. 200ml의 인산칼륨 완충액(25mM, pH 8.5)을 외피를 통해 350-400ml/min에서 재순환시켰다.

라세미 나프록센의 메틸 에스테르를 합성했다. 여기서 알아두어야 할 것은 이 에스테르의 물에 대한 용해도는 약 0.1-0.2mM인 반면 MIBK에서의 용해도는 약 1.3M이라는 점이다. 고체 나프록센 에스테르 42g을 MIBK에 서서히 가하여 최종농도가 0.75M이고 전체 유기체적이 약 225ml 되게 하였다. 장치(Brinkman Dosimat 665 pH-stat)를 사용해서 0.25M NaOH로 pH가 8.50±0.01되게 조절하였다.

주기적으로 시료를 채취하여 나프록센 농도를 분광광도계로 측정(E_{320} =1250)함으로써 반응을 모니터링하였다. 첫 번째 45분간의 평균속도는 35μmol였고 그다음 36시간동안의 가수분해 속도는 9-14μmol/hr의 범위에 있었다.

실시예 2

이부프로펜 분할

효소를 장입(裝入)하는 동일한 방식을 사용하여 실시예 1(나프록센)에서와 마찬가지로 반응기를 만들었다. 캔디다 리파아제(Genzyme Corporation), 3.0g을 외피로부터 내강속으로 한외여과한 다음 효소를 중류수 2-3ℓ로 세척하고 인산칼륨 완충액(0.01M, pH 7.7) 1ℓ로 세척하고나서 모듈에서 배출시켰다.

라세미 이부프로펜[2-(4-이소부틸페닐)-프로피온산]의 트리플루오로에틸 에스테르를 합성하였다. 이 에스테르의 물에 대한 용해도는 약 0.4mM이다. 액상의 이부프로펜 에스테르 265g을 반응기 외피속으로 펌프해 넣고 외압 5-8psig에서 400-450ml/min으로 재순환시켰다. 지질이 이미 물과 불혼화성인 액체로 됨에 따라 유기용매를 피요로 하지 않았다. 인산염 완충액을 신속히 내강속으로 펌프하여 400-450ml/min으로 순환시켰다. 수성상의 체적은 약 650ml였고 pH를 1.0M NaOH로 7.7±0.01되게 조절하였다.

수산화물 적정(滴定)데이터에 입각해서 산을 제조함으로써 반응을 모니터링하였다. 첫 번째 60분간의 평균 가수분해속도는 160μmol/min였다. 76분후 완충액을 교체하고 클로로프롬 약 200ml 존재하에 진한 HCl로 산성화하여 pH2.0이 되게 했다. 클로로포름을 NaCl 포화용액으로 세척한 후 황산마그네슘에서 건조시켰다. 이부프로펜 용액을 증발건조시켜 조(粗)이부프로펜 2.13g을 회수하였다. 그다음의 76시간의 평균 가수분해 속도는 적정법으로 측정한 결과 21μmol/min 였다. 이 값은 산으로의 전환율 약 9.8%에 해당된다. 수성상의 저장조를 이 시간동안 6회 교환하여 이부프로펜 약 15g을 얻었다. 이 물질을 헥산에서 재결정하였다. 이 물질의 융점은 51-53℃이다(문헌에서는 (S)-이부프로펜의 융점이 50-52℃인 반면 라세미 이부프로펜의 융점은 75-77℃이다). 이 물질의 비선광도는

$[\alpha]_D$=+55.5°C (c=1, C_2H_2OH)였다.

실시예 3

올리브 기름 가수분해

막면적이 1.0m^2 인 폴리아크릴로니트릴 혈액여과기(hemofilter Asahi Medical Company제 ; model PAN 150)를 사용하여 반응기를 만들었다. 사용된 효소는 리파아제(candida cylindracea lipase Sigma Chemical Co.제 비활성 700단위/mg)였다. 이 효소를 위치 특이성이 없다고 보고되어 있기 때문에 이것은 올리브 기름 같은 트리글리세리드를 가수분해하여 유리지방산과 글리세롤을 생성한다. 캔디다 리파이제 5.0g을 증류수 1ℓ에 용해시켜 효소용액을 만들어 이것을 한외여과 방식으로 외프로부터 내강속으로 다시 저장조로 90분간 재순화시켰다.

한외 여과물을 헥산으로 채워주어 잔존하는 모든 물을 외피로부터 제거하였다. 식용 올리브 기름(Welch, Holmes Clark Co.제)로 외피로부터 헥산을 세척하고 내강을 증류수 400ml로 세척했다. 올리브 기름을 유입구압력 8-12psig에서 250ml/min로 외피속을 순환시켰고 전체 기름세척은 약 250ml였다. 총체적은 270ml로 해서 물을 80ml/min로 순환시켰다. 모듈과 두 저장조를 37℃의 물중탕속에 잠기게 했다.

기름 시료를 채취하여 50mM 에틴올성 NaOH로 적정하여 유리 지방산 분석을 하였다. 에멀젼이 없는 조작을 24시간 한다음 기름상을 측정한 결과 1g당 산이 3.45m mol 함유되었는데 이 값은 트리글리세리드 전환율 약 97%에 상당하는 것이다. 조작도중 수성상의 pH가 6.4에서부터 5.7로 서서히 떨어졌고 최종 글리세롤 농도는 굴절계로 측정해서 약 8%였다.

실시예 4

올리브 기름 가수분해

캔디다 리파아제 3.8g을 사용해서 마찬가지의 충전 방식을 사용하는 위의 방식에 따라 반응기를 만들었다. 2.5% 글루타르 알데히드 용액을 외피속으로 3시간 재순환시켜 막에 이 효소를 교차결합시켰다. 3시간후 증류수로 외피와 내강을 세척하고 외피를 올리브 기름 275ml로 채워 유입구 압력 8psig

에서 340ml/min로 재순환시켰다. 몰상의 체적은 275ml였고 이것을 80ml/min로 재순환시켰다.

실온에서 에멀젼이 함유되지 않는 조작을 22시간한 후의 유기 시료중의 유리지방산 함량은 1.16mmol/g이었는데 이값은 올리브 기름 전환율 33%에 해당한다.

실시예 5

올리브 기름 가수분해

막면적이 0.8m^2인 재생 셀룰로오스로된 유공섬유신장(Kidney)(Asahi Medica l Co. 제:Model AM100L)을 사용하여 반응기를 만들었다. 0.1M NaCl 500ml에 효소 3.0g을 용해하여 캔디다 리파아제 용액을 만들었다. 효소용액을 내강을 통해 저장조속으로 70ml/min에서 재순화시키고 투과물을 외피에서 수거하여 저장조를 비웠다. 효소는 막에서 제거되어(분자량 분리 약 1.000) 막위에 게층으로 축적되었다. 이 효소를 2.5% 글루타르알데히드로 위에서처럼 교차결합시켰다.

3시간 후 증류수로 글루타르알데히드를 세척한 다음 내강을 올리브 기름으로 세척하여 잔존하는 물을 제거하였다. 올리브 기름을 유입구 압력 8psing에서 40ml/min로 내강을 재순환시켰고 총체적은 약 200ml였다. 물상을 총체적 200ml로 하여 20ml/ min로 재순화시켰다.

에멀젼이 없는 상태의 조작을 4시간한 후의 올리브 기름중의 산의 함량은 0.35 mmol/g이었는데 이 값은 올리브 기름 전환율 10%에 해당한다.

실시예 6

페녹시아세테이트 메틸에스테르 가수분해

물 1.25ℓ에 캔디다 리파아제(분자량 100,000 ; Sigma Chemical Co. Cat #L 1754) 50g을 용해하여 효소용 액을 만든다음 여과하여 불용성물질을 제거했다. 이러한 계면작용이 있는 효소는 여러 가지 유기에스테르를 가수분해하는데 그중에서도 페녹시 아세테이트 메틸에스테르와 아릴에스테르를 가수분해한다.

PAN-200 혈액여과기(ASAHI Medical 하는 Co. 제)에서 취한 비등방성 폴리아크릴로니트릴(PAN) 유공섬유로 조립된 것으로 주문 제작된 0.85m^2의 내용제성 막모듈속에 효소를 장입하였다. 이 막의 형태학은 분자량이 50,000 이상인 단백질을 90% 제거하는 특징을 가진 비대칭 친수성의 내부표피가 있는 유공섬유이다. 효소용액을 외피쪽에서부터 내강쪽으로 다시 용액 저장조쪽으로 한외여과 방식으로 재순환시켰다. 충전과정을 통해 한외여과 속도를 조절(일반적으로 200-20ml/min)하여 주어 외피와 내강 격실간의 압력차를 8psi까지 유지하였다. 이 과정을 1시간 이내에 끝마쳤다. 초기 및 최종 효소용액의 활성은 다음과 같다:

	비활성*(μmole/min-ml)	총활성(μmole/min)
초기용액	7.84	9800
최종용액	0.05	63

* 0.2M NaCl 20ml+페녹시아세테이트 메틸 에스테르(Aldrich Co.제) 0.5m+효소용액 2.5ml 로된 용액중에서 pH 7.8을 유지하기 위해 필요로 하는 25mM NaOH의 첨가속도를 측정하여 결정한 값임.

반응기속에 효소를 넣은 다음 외피쪽에서 페녹시아세테이트 메틸 에스테르 1140ml의 재순환을 시작했다. 이 에스테르의 물에 대한 용해도는 약 25mM였다. 재순환 속도는 150ml/min였고 외피격실에 대한 평균압력은 외피쪽 출구에 있는 드로틀 밸브(throttling valve)를 조절하으로써 6.5psi로 유지하였다. 내강쪽에서는 0.1M NaH CO_3 2ℓ를 300ml/min로 재순환시켰다. 50% NaOH를가하여 수성상 저장조의 pH를 7.8로 유지했다. 반응기를 수성상 저장조의 반응생성물 용액과 완충액을 매일 교체해주면서 5일동안 계속 작동시켰다. 실험을 통해 완충액 저장조의 효소분석을 한 결과 수성상중에서는 효소활성이 검출되지 않았다.

NaOH 소모를 추적하고 유기상 저장조의 수준을 관찰하여 반응진행 정도와 반응속도를 모니터링 하였다.

실험초에 에스테르의 가수분해속도는 300μmol/min이었고 실험말기에는 150 0μmol/min이었다. 진한 HCl로 산성화하여 pH 1.0으로 하여 침전된 고체를 여과함으로써 수성상 저장조에 있는 페녹시아세트산 생성물을 회수하였다. 건조한 후 적정법으로 고체를 분석한 결과 산이 96.3%였다. 건조된 고체시료를 클로로포름과 물의 혼합물중에 용해한 후 클로로포름상을 건조, 증발시켰다. 이 정제단계에서 잔존하는 고체를 적정법으로 분석한 결과 순도가 99.5%-103℃였다(페녹시아세트산의 융점은 98-100℃). 회수된 페녹시아세트산의 총량은 0.953kg이었다.

실시예 7

아밀 아세테이트 가수분해

효소는 그대로 막에 있도록 하고 실시예 6에 있는 동일한 막도듈을 사용하여 아밀 아세테이트를 가수분해 하였다. 이 에스테르의 물에 대한 용해도는 약 13mM/min이었으며 외피격실에 대한 평균압력은 외피쪽 출구에 있는 드로틀 밸브를 조절함으로써 6.5psi로 유지했다. 내강쪽에 있는 0.05M $NaHCO_3$ 1ℓ를 300ml/min의 속도로 재순환시켰다. 5.57M NaOH를 가하여 수성상 저장조의 pH를 7.8로 유지했다. 아밀 아세테이트 가수분해 속도를 측정한 결과 250μmol/min였다. 아밀 아세테이트의 가수분해 속도가 일단 측정되고 나면 반응을 중지시키고 계를 내강이나 외피쪽을 모두 물로 세척한 다음 내강쪽에서 들어와서 외피쪽으로 나가는 유속이 50ml/min인 여과(0.2μm 여과기)된 상수도물로

반응기를 백플러쉬(backflush)하였다. 8M 유레아 2ℓ를 상수도물의 경우처럼 백플러쉬한 후 외피와 내강 격실들을 증류수 4ℓ로 세척했다. 25mM NsOH를 사용하여 위에 나온 것과 마찬가지로 해서 반응기속의 아민 아세테이트의 가수분해 속도를 측정했다. 반응속도는 6.8μmol/min 이었는데 이값은 초기활성의 3%에 해당된다.

실시예 8

아밀 아세테이트 가수분해

실시예 7에 나온 막재생법에 따라 모듈을 캔디다 리파아제(실시예 6과 동일한 농도 및 동일한 종류) 20g 으로 채우고 아밀 아세테이트를 기질로 사용해서 실시예 7과 같이 반응기를 조작했는에 측정된 반응속도는 70μmol/min 였다.

실시예 9

에틸부티레이트 가수분해

0.2M 인산염완충액(pH 8.0) 300ml중에 돼지간 에스테라아제 제제(분자량 150,000 ; 11mg/ml, Sigma Chemical Co., Cat #E3128) 10.8ml을 용해하여 효소용액을 만들었다. 에스테라아제의 범부에 속하는 이 효소는 물에 용해된 에틸 부티레이트를 가수분해 하는데 즉 반응은 균일반응이고 유기-수성 계면의 존재를 필요로 하지 않는다.

외피쪽으로부터 내강쪽으로 다시 용액 저장조로 한외여과방식으로 효소용액을 순환시킴으로써 실시예 6과 동일한 막모듈에다 효소를 장입(裝入)시켰다. 장입공정도중 한외여과속도를 조절함으로써(일반적으로 200-20ml/min 사이) 외피와 내강격실들 사이의 압력차가 9.5psi까지 되게 하였다. 이 공정을 1시간 이내에 끝마쳤다. 초기 및 최종 효소용액의 활성은 다음과 같다:

	비활성*(μmole/min-ml)	총활성(μmole/min)
초기용액	7.84	9800
최종용액	0.05	63

* 0.1M 인산염완충액(pH 8.0) 20ml+에틸부티레이트(Aldrich Co.제) 0.2g+효소용액 1.0ml로된 용액중에서 pH 8.0을 유지하기 위한 필요한 20mM NaOH 첨가속도를 측정하여 결정한 값임.

반응기에 효소를 장입한 다음 외피쪽에 있는 에틸부티레이트 500ml의 순환은 시작하였다. 이 에스테르의 물에 대한 용해도는 59mM였다. 외피쪽 출구에 있는 드로틀 밸브를 조절함으로써 외피격실에 대한 평균압력을 6.5psi로 유지하였고 재순환 속도는 500ml/min였다. 내강쪽에 대해서는 0.2M 인산염완충액(pH 8.0) 1ℓ를 500ml/ min으로 재순환시켰다. 6.0M NaOH를 가하여 수성상 저장조의 pH를 8.0로 유지하였다. 에틸부티레이트의 가수분해속도를 측정한 결과 96000μmol/min 이었다. 에틸 부티레이트의 가수분해 속도가 측정되고 나면 반응을 중지시키고 내강과 외피쪽에 대해 물로 계속 세척했다.

다음과 같은 방법으로 반응계로부터 효소를 제거하였다 :

-내강쪽으로 유입되고 외피쪽으로 유출되는 유속이 50ml/min인 증류수 6ℓ로 백플러쉬하고

-내강쪽과 외피를 모두 다음의 것으로 세척했다.

a)1.0M NaCl 4ℓ

b)12$ $(NH_4)_2SO_4$500ml

c)8M 우레아 500ml

d)1.0M NaCl 2ℓ

25mM NaOH를 사용하고 위에 나온 것과 동일한 방법으로 반응기중에서의 에틸부티레이트의 가수분해속도를 측정했다. 반응속도는 30μmol/min 이었는데 이것은 모듈에서의 초기활성의 0.3%에 해당한다.

실시예 10

BTEE 가수분해

0.1M K_2HPO_4 /1.0M NaCl pH 7.8 1ℓ중에 효소 0.5g을 용해하여 키모트립신(분자량 23,000, Sagma Chemical Co. Cat #C4129)의 효소용액을 만들었다. 1m^2 ASAHI PAN-150 혈액 여과기(ASAHI Medical Co.)의 외피쪽에서 50ml/min의 유속으로 위 용액을 1시간 순환시켰다. 외피로부터 내강쪽으로 효소용액의 유동이 없었기 때문에 확산방식으로 막속에다 효소를 장입하였다. 효소용액의 외피쪽을 배출하고 나서 압력을 9psi로 유지하면서 외피격실쪽에서 실리콘 오일(Petrarch Systems Inc.) 1ℓ을 재순환시키기 시작했다. 이어서 0.1M K2HP04/1M NaCl pH 7.8중에 N-벤조일-L-티로신 에틸에스테르(BTEE, Sigma Chemical Co.)를 가해서된 0.22mM 용액을 1ℓ/min의 유속으로 모듈의 내강속으로 통과시켰다. 반응기에서 나오는 수성상중에 존재하는 BT산의 양을 측정하여 모듈의 활성을 계산하였는데 모듈의 활성은 80μmol/min이었다. 이어서 막모듈에서 용매와 완충액을 배출하고 0.1M 인산염 완충액 10ℓ로 백플러쉬 처리했다. BETT 용액을 53ml/min의 유속으로 막속에 펌프로 넣는 것외에는 위에 나온 것과 같은 방법으로 막모듈의 활성을 측정했는데 4μmol/min이었고 이같은 초기활성의 5% 상당하는 것이다.

실시예 11

BTEE 가수분해

0.1M 인산염 완충액 pH 7.0 500ml중에 실시예 10에서 사용된 동일한 키모트립신 100mg을 용해하여 효소용액을 제조했다. 외피쪽에서부터 내강쪽으로 그리고 다시 용액 저장조쪽으로 한외여과 방식으로 효소용액을 재순환시켜 실시예 10에서 사용된 것과 동일한 $1m^2$ ASAHI PAN-150 혈액여과기에 효소를 장입하였다. 이 과정을 2.5시간이내에 끝마쳤다.

효소를 반응기에 장입한 다음 아밀 아세테이트에 10mM BTEE를 가해서된 용액 1ℓ를 외피쪽에서 재순환시키기 시작했다. 순환속도는 10ml/min이었고 외피 격실에 대한 평균압력은 외피쪽 출구에 있는 드로틀밸브를 조절하여 6.5psi로 유지하였다. 내강쪽에 대해서는 2mM 인산염 완충액 pH 7.8 200ml/min으로 재순환시켰다. 1M NaOH를 가하여 수성상 저장조의 pH를 7.8로 유지하였다. BTEE 가수분해 초기속도는 45μmol/min 이었다.

실시예12

BTEE 가수분해

실시예 6-11에 사용된 유공섬유에 의해 포착되는 키모트립신의 양을 증가시키기 위해 글루타르알데히드를 사용하여 소혈청 알부민(Sigma Chemical Co., Cat #A4503)으로 교차결합시킨다음 종래의 화학방법으로 처리하여 효소의 분자량을 증가시켰다. 겔투과 크로마토그래피 결과를 보면 접합 단백질의 80% 이상은 분자량이 100,000 이상이었다. 최종 효소용액은 0.1M K2HP04/1M NaCl pH 7.8 1ℓ로 되어 있었고 BTEE 활성은 10μmol/min-ml이었다. 외피쪽으로부터 내강쪽으로 용액을 20ml/min의 유속으로 한외여과하여 실시예 10에서 사용된 것과 동일한 $1m^2$ ASAHI PAN-150 혈액여과기에 효소를 장입하였다.

반응기에 효소를 장입한 후 n-옥탄올(Aldrich Co.제)중에 40mM BTEE를 가해서된 용액 500mM를 외피쪽에서 재순환시키기 시작했다. 재순환 속도는 500ml/min였고 외피격실에 대한 평균압력은 외피쪽 출구에 있는 드로틀 밸브를 조절하여 6.5psi로 유지했다. 내강쪽에서는 0.1M K2HP04/1M NaCl 완충액 pH 7.8 1ℓ를 500ml/min으로 재순환시켰다. 수성상 저장조의 pH를 1M NaOH를 첨가하여 7.8로 유지하였고 BTEE 가수분해 초기속도는 70μmol/min 이었다.

실시예 13

2-클로로프로피온산의 분할

피리딘 240ml와 테트라히드로푸란 50ml중에서 2-클로로프로피오닐 클로라이드 127g(1.0몰)과 n-옥탄올 130g(1.0몰)을 반응시켜 라세미 2-클로로프로피오네이트 옥틸 에스테르를 제조하였다. 반응을 24시간 시킨 다음 용액을 : 1) 1N HV1, 2) $NaKCO_3$ 포화용액 각 500ml씩으로 하고 유기상을 마지막으로 MgS04에서 건조시켰다. 수득된 2-클로로프로피오네이트 옥틸 에스테르의 총중량은 210g(0.96몰)이었다.

물 0.75ml중에 캔디다 리파아제(분자량 100,000 ; Sigma Chemical Co. Cat #L1754) 30g을 용해하여 효소용액을 만든다음 여과하여 불용성 물질을 제거하였다. PAN-200혈액여과기(ASAHI Medical Co.제)에서 취한 비등방성 폴리아크릴로니트릴(PAN) 유공섬유로 조립된 것으로 0.85㎡의 주문된 내용제성막 모듈에다 효소를 장입하였다. 이 막의 형태는 분자량이 50,000 이상인 단백질이 90%를 배제하는 특징을 가진 비등방성 및 친수성의 내부표피가 있는 유공섬유로 되어 있는 것이다. 외피쪽에서부터 내강쪽으로 그리고 다시 용액 저장조쪽으로 한외여과방식으로 효소를 재순환시켰다. 장입과정을 통해 한외여과 속도를 조절함으로써(일반적으로 200-30ml/min 사이) 외피와 내강격실들간의 압력차를 8psi 되게 유지하였다. 이 과정을 1시간내에 끝마쳤다.

효소를 반응기에 장입한 다음 외피쪽에 대해 라세미 2-클로로프로피오네이트 옥틸 에스테르 210g(0.96몰)의 재순환을 시작하였다. 이 에스테르의 물에 대한 용해도는 약 1.2mM이다. 재순환 속도는 400ml/min이었고 외피 격실에 대한 평균압력은 외피쪽 출구에 있는 드로틀 밸브를 조절하여 6.5psi로 유지하였다. 내강쪽에 대해서는 0.05M K2P04 1ℓ를 400ml/min의 속도로 재순환시켰다. 1M NaOH를 가하여 수성상 저장조의 pH를 7.0으로 유지하였고 반응기를 계속하여 6.8일간 작동시켰다.

NaOH 소모량을 따라 반응진행정도와 반응속도를 모니터링하였다. 실험초기에는 에스테르 가수분해 속도가 186μmol/min 이었다. 초기 에스테르의 41%가 가수분해 되었을 때 실험을 끝마쳤다. 최종 에스테르 혼합물의 선광도는 $[\alpha]_D$ =-0.41° (c=50, $CHCl_3$)이었다. 반응기에 들어가는 초기 에스테르 기질은 선광도가 없었다.

실시예 14

N-벤조일-티로신 에틸 에스테르의 분할

건조 에탄올 400ml중에 N-벤조일-L-티로신 에틸 에스테르(Sigma Chemical Co. 제) 25mg을 용해한 후 나트륨 5.6g이 미리 용해되어 있는 메탄올 400ml을 가하여 라세미 N-벤조일-티로신 에틸에스테르를 제조하였다. 이 용액을 아르곤 분위기에서 하루밤 교반한 다음 물 1ℓ를 혼합하고 나트륨에 의해 생성된 NaOH를 중화하기에 필요한 만큼의 HCl를 가하였다. 이 용액을 클로로포름으로 추출하고 나서 탄산수소나트륨염 완충액으로 클로로포름을 세척한 후 $MgSO_4$ 위에서 건조시켰다. 클로로포름을 증발시키고 나서 융점이 125-126℃이고 선광도가 전혀 없는 고체 14.2g을 얻었는데 이것은 라세미 BTEE(L-BTEE의 mp. 118-121℃)였다.

유공섬유에다 효소를 흡착시킨 다음 0.05M 인산염 완충액 pH 7.0중에서 2.5% 글루타르알데히드 용액

으로 효소를 교차결합시킴으로써 1m^2 PAN-150 혈액여과기(ASAHI Madical Co.제)중에 키모트립신(Sigma Chemical Co.제) 4g을 부동화시켰다.

반응기에 효소를 장입한 다음 외피쪽에서 n-옥탄올 용액중의 29.8mM 라세미 BTEE 1.13ℓ을 재순환시키기 시작했다. 재순환 속도는 400ml/min이었고 외피격실에 대한 평균 압력은 외피쪽 출구에 있는 드로틀 밸브를 조절하여 6.5psi 되게 하였다. 내강쪽에 대해서는 0.1M K_2HPO_4 0.21ℓ를 400ml/min으로 재순환시켰다. NaOH를 가하여 수성상 저장조의 pH를 7.8로 유지하였고 반응기를 18시간 계속 작동시켰다.

실험이 끝났을 때 유기상과 수성상을 분석하였는데 그 결과는 표 1과 같다.

[표 1]

표 1

화합물/상	초기		최종	
	농도(mM)	mMole	농도(mM)	mMole
D-BTEE/유기	14.9	16.8	14.9	16.79
L-BTEE/유기	14.9	16.8	0.0	0.0
L-BT/유기	0.0	0.0	0.12	0.14
D-BTEE/수성	0.0	0.0	0.07	0.01
L-BTEE/수성	0.0	0.0	0.0	0.0
L-BT/수성	0.0	0.0	80.0	16.7

유가성 거울상 이성체 과잉=98%

수성상 거울상 이성체 과잉=99.8%

실시예15

N-아세틸-티로신 에틸에스테르 분할

효소를 유공섬유에 흡착시킨 다음 0.05M 인산염 완충액 pH 7.0중에서 2.5% 글루타르알데히드 용액으로 효소를 교차 결합시켜 1m PAN-150(ASAHI Medical Co.제)에 키모트립신(Signma Chemical Co.제) 4g을 부동화시켰다.

반응기에 효소를 장입한 다음 외피쪽에 대해 n-옥탄올 용액중에서 2.86mM 라세미 ATEE(Sigma Chemical Co.제) 1ℓ의 재순환을 시작했다. 이 재순환 속도는 400ml/min였고 외피격실에 대한 평균 압력은 외피쪽 출구에 있는 드로틀 밸브를 조절하여 6.5psi로 유기하였다. 내강쪽에 대해서는 0.1M KPO/1.0M NaCl pH 7.8로 유지하였고 반응기를 하루밤 계속해서 작동시켰다.

소모된 염기의 양(1.43mmole)과 옥탄올과 물사이의 에스테르 분배계수(3.0)로부터 농도를 계산했는데 그 결과는 표 2에 있는 바와 같다.

[표 2]

표 2

화합물/상	초기		최종	
	농도(mM)	mMole	농도(mM)	mMole
D-ATEE/유기	1.43	1.43	1.36	1.36
L-ATEE/유기	1.43	1.43	0.0	0.0
L-AT/유기	0.0	0.0	--	—
D-ATEE/수성	0.0	0.0	0.45	0.07
L-ATEE/수성	0.0	0.0	0.0	0.0
L-AT/수성	0.0	0.0	9.53	1.43

유기상 거울상 이성체 과잉은 99% 이상

수성상 거울상 이성체 과잉=91%

실시예 16

BTEE 가수분해와 생성물 함량증가의 실증

효소를 유공섬유에 흡착시킨 다음 0.05M 인산염 완충액 pH 7.0에서 2.5% 글루타르알데히드 용액으로 효소를 교차 결합시켜 1m PAN-150 혈액여과기(ASAHI Medical Co.제)에 키모트립신(Sigma Chemical Co.제) 4g을 부동화시켰다.

반응기에 효소를 장입하고나서 외피쪽에 대해 n-옥탄올용액중에서 37.7mM N-벤조일-L-티로신 에틸에스테르(L-BTEE) 1.07ℓ의 재순환을 시작하였다. 재순환 속도는 500ml/min이었고 외피격실에 대한 평균 압력은 외피출구쪽에 있는 드로틀 밸브를 조절하여 6.5psi로 유지하였다. 내강쪽에 대해서는 0.1M KPO 0.19ℓ를 500ml/min으로 재순환시켰다. NaOH를 가해서 수성상 저장조의 pH를 7.8로 유지하였다. NaOH 소모량을 따라 반응진행정도와 반응속도를 모티터링하였다. 수성상과 유기상의 시료를 간헐적으로 취하여 BTEE와 BT산의 존재여부를 분석하였다.

실험이 끝난 후 결과를 요약해 보건대 ;

총 경과시간 : 205분

유기상중에서의 초기 BTEE 농도 : 37.7mM

유기상중에서의 최종 BTEE 농도 : 1.8mM

가수분해된 BTEE의 총략 : 38.41mmole

수성상중에서의 BT(생성물)의 최종농도 : 187mM

수성상중에서의 BT(생성물)의 총량 : 35.5mmole

반응기 생산성 : 98mole/yr-㎥

대조용 실험으로서 옥탄올중의 40mM BTEE 1.1ℓ와 1M 인산염 완충액 pH7.8 0.11ℓ

를 기어펌프를 사용하여 혼합해서 분산상을 얻었다. 내강쪽에는 유동시키지 않고 막바이오리액터의 외피쪽으로 이 분산액을 펌프로 재순환시켰다. 분산액의 유속은 500ml/min였다. 200분 경과 후 유기상중에서의 BTEE 농도는 19.4 mM였다. 이값은 다상막 바이오리액터에서 동일한 시간동안 얻은 전환율의 54%에 상당한다.

실시예 17

그리시딜 부티레이트 분할

PAN-200 혈액여과기(Asahi Medical Co.제)에서 취한 폴리아크릴니트릴 한외여과 유공섬유로 조립된 것으로서 0.85㎡의 주문 제작된 내용제성 막모듈을 사용하여 다상 바이오리액터를 만들었다. 돼지췌장에서 얻은 리파아제인 효소(Sigma Chemical Co.제)의 비중은 70단위/mg이였고 이 효소는 글리시딜(비대칭 알코올)의 에스테르를 입체 선택적으로 가수분해한다고 알려져 있는 것이다.

증류수 1ℓ에 리파아제 35g을 용해하고 실시예 1에서 이미 나온 막속에다 효소를 장입하였다. 외피를 헥산으로 채워 잔존하는 물을 제거하였다. 내강을 인산칼륨완충액(50mM, pH 7.8) 0.5ℓ로 채우고 250-350ml/min으로 재순환시켰다.

부티릴 클로라이드와 글리시돌로부터 라세미 글리시딜 부티레이트를 합성하였다. 이 에스테르의 물에대한 용해도는 약 180mM이다. 헥산을 배출하고 액상의 에스테르 425g을 외피속으로 펌프하여 넣었다. 유출구 압력 4-7psig로 250-350ml/min에서 에스테르를 재순환시켰다. 완충액의 pH를 9.98M KOH로 하여 7.8로 하였다.

NaOH 소모량을 따라 반응속도를 모니터링하였다. 첫 번째 36분동안의 평균 가수분해 속도는 15,300 μmol/min 이었고 이것은 에스테르의 전환율 18.6%에 상응한 값이다. 두가지 상의 시료를 주기적으로 취하였다. 5.88시간 후에 반응을 정지시켰는데 이것은 74.7%의 전환율에 해당된다. 반응기의 평균 가수분해 속도는 6250μmol/min 이었다.

유기시료를 에테르와 혼합하고 탄산수소나트륨, 증류수 및 염화나트륨으로 세척한 다음 황산마그네슘에서 건조시켜 부티르산, 글리시돌 및 물을 제거하였다. 최종 글리시딜 부티레이트의 광학분할은 [α]=-25.2(c=1,CHCl) 이었다.

실시예 18

부틸 2-클로로프로피오네이트의 분할

산존재하에 동물량의 라세미 2-클로로프로피온산 1-부탄올을 반응시키고 공비 증류법으로 계속해서 물을 제거하여 라세미 부틸 2-클로로프로피오네이트 에스테르를 제조했다.

물에 캔디다 리파아제(Sigma Chemical Co.제) 50g을 용해한 다음 이 용액을 여과하여 효소용액을 제조해서 실시예 3에 나온 것과 유사한 방법에 따라 실시예1에 나온 것과 유사한 0.85㎡의 주문 제작된 내용제성 막모듈속에 효소를 장입하였다.

반응기에 효소를 장입하고 나서 외피쪽에 대해 R.S -부틸 2-클로로프로피오네이트 에스테르 500g(3.03몰)의 재순환을 시작하였다. 재순환 속도는 300ml/min이었고 외피 격실에 대한 평균압력은 외피쪽 출구에 있는 드로틀 밸브를 조절하여 6.5psi로 유지하였다. 내강쪽에 대해서는 0.05M 인산염 완충액 pH 7.0 1ℓ를 300ml/min의 속도로 재순환시켰다. 수성상 저장조를 10N NaOH로 적정하고 pH를 7.0으로 유지함으로써 반응을 모니터링하였다.

에스테르의 60%가 가수분해한 뒤(10.5시간) 반응을 정치시키고 잔존하는 유기상을 등체적의 1M 탄산수소나트륨으로 세척하였다. 유기상을 측정한 결과 에스테르가 72.0%(W/W)(HPLC에 의함)이었고 비선

광도는 [α]=+5.34(c=1, CHCl)이었다.

실시예 19

N-벤조일 티로신 에스테르화 반응

폴리아크릴로니트릴(한외여과 유공섬유)을 함유하는 1m PAN-150 혈액여과기(Asahi Medical Co.제)를 사용하여 추출성 바이로리액터를 만들었다. 효소(α-키모트립신; Sigma Chemical Co.제)는 TypeII이었고 비활성도는 40-60BTEE단위/mg 단백질이었다.

효소를 섬유에 흡착시킨 다음 0.05M 인산염 완충액 pH 7.0중에서 2.5% 글루타르알데히드 용액으로 효소를 교차결합시켜 섬유에다 α-키모트립신 3g을 부동화시켰다.

반응기에다 효소를 장입하고나서 외피를 n-옥탄올 200ml로 채워 잔존하는 물을 제거했다. 유출구 압력을 6-7psig로 해서 400ml/min에서 재순환시켰다. 내강을 인산염완충액을 세척하고 재순환 속도가 400ml/min인 50ml 저장조를 설치했다. 에탄올 87ml으 계에 넣고 수성상 저장조를 N-벤조일-L-티로신 용액[인산염 완충액, pH 6.0중에서 BT 4.85g(17mmol)]으로 갈아주어 반응을 시작시켰다. 수성상 저장조의 pH를 0.5M HCl로 6.0되게 조절하였다.

산소모에 따라 반응을 추적하였고 120시간 후 산소모량이 없었으며 유기시료를 취하여 α-키모트립신으로 효소에 의한 가수분해를 함으로써 N-벤조일-L-티로신 에틸에스테르(BTEE)에 대해 분석하였다. 옥탄올중에서 BTEE 농도는 8.7mM이었는데 이것은 에스테르로의 전환율 10%에 해당된다. 여기서 알아 두어야 할 것은 함유된 용매를 추출하지 않고 평형전환율을 계산한 결과 0.1% 이하였다는 점이다.

상비(phase ratio ; 유기/수성) Θ는 옥탄올 500ml와 에탄올 84ml을 가함으로써 Θ=1로부터 Θ=4.5로 증가하였다. 또다시 105시간 지난후 옥탄올중에서의 BTEE 농도는 4.8mM였는데 이값은 36% 전환율에 해당되는 것이다. 추출용매가 증가하면 평형 전환율을 크게 해준다.

실시예20

이부프로펜 에스테르화 반응

PAN-20 혈액여과기(Asahi Medical Co.제)로부터 취한 폴리아크릴로니트릴 한외여과 유공섬유로 조립된 것으로서 0.85㎡의 주문 제작된 내용제성 막모듈을 사용하여 추출성 바이오리액터를 만들었다. 효소(Candida cylindrace에서 유도된 리파아제 ; Genzyme Coporation제)의 비활성은 10500단위/mg이었다.

이 효소는 이부프로펜[2-(4-이소부틸페닐)-프로피온산]의 에스테르를 입체선택적으로 가수분해하였다.

증류수 500ml에 리파아제 12g을 용해한 것을 3-5psig의 정압으로 외피속을 재순환시켰다. 저장조가 텅빌때까지 내강쪽으로부터 한외여과액을 수거하여 잔존활성을 분석하였는데 심각한 정도의 활성은 없었다.

외피속으로 1-펜탄올 1ℓ를 펌프하여 넣고 유출구 압력을 5-8psig로 하여 300ml/min으로 재순환시켰다. 펜탄올은 알코올 공여체 및 추출용매의 두가지 기능을 한다. 내강을 인산칼륨 완충액(20mM, pH 5.5) 250ml로 세척하였다. 완충액 50ml를 설정하고 300ml/min 으로 재순환시켰다.

유기상 저장조로 라세미 이부프로펜(펜탄올 100ml에 용해시킨 것) 41g을 가하여 반응을 시작했다. 68시간 후 페탄올 시료를 적외선 분광분석기(Nicolet 5D×C Fourier Transform)로 분석하였는데 1735cm에서 에스테르의 흡광이 확인되었고 이것은 효소에 의한 에스테르화 반응이 있었으을 나타내는 것이다.

실시예 21

PAN-200 혈액여과기(Asahi Mwdical Co.제)로부터 취한 폴리아크릴로니트릴 한외여과 유공섬유로 조립되었고 0.85㎡의 주문 제작된 내용제성 막모듈을 사용하여 추출성 바이오리액터를 만들었다. 이런 종류의 추출성 반응기를 작동시켜 화학적으로 반응성인 생성물을 유기상층으로 계속 추출할 수 있음을 입증하였다. 효소(Chromobacterium viscosum으로부터 유도된 리파아제 ; United States Biochemicals Corpo ration제)의 비활성은 204,000단위/mg이었다.

20mM 인산칼륨 완충액(pH 6.5) 250ml중에 이 효소 64mg을 용해해서된 용액을 실시예 2에 나온 막속으로 장입하였다. 여액을 분광광도계로 모니터링한 결과 효소의 약 50%가 막에 포착되었음을 알 수 있었다. 외피격실을 헥산 250ml로 채워 잔존하는 물을 제거하고 유출구 압력 5-7psig에서 350-450ml/min으로 헥산을 재순환시켰다. 내강속으로 인산칼륨 완충액(20mM, pH 6.5) 300ml을 350-450ml/min으로 재순환시켰다. 라세미 페녹시-벤즈알데히드 시아노히드린과 숙신산의 반에스테르를 합성하였다. 4℃의 증류수 20ml에 반숙신산 에스테르 1.4g을 용해하고 이염기성 인산칼륨의 1M 용액으로 pH를 6.4-6.6되게 조절하여 나트륨염 수용액을 제조하였다. 에스테르 용액을 내강속으로 제조하였다. 에스테르 용액을 내강속으로 첨가하여 반응을 시작하였다. 0.1M NaOH로 pH가 6.65되게 조절하였다.

반숙신산 에스테르의 효소에 의한 가수분해는 입체선택적이어서 (S)-페녹시-벤즈알데히드 시아노히드린을 생성한다. 시아노히드린을 계속 헥산중으로 추출하여 대칭성 페녹시벤즈알데히드와 시아나이드는 화학적인 가수분해 반응을 극소화한다. 반응을 2시간 시키고나서 수산화물의 소모량으롤부터 에스테르가 시아노히드린과 숙신산으로 48% 전환했음을 알 수 있었다. 최종 헥산상의 선광도(나트륨D선, 1dm 통로길이)는 0.042℃였다.

이 선광도로부터 효소에 의한 가수분해를 통해 거울상 이성체가 많이 생성되었음을 알 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

a. 1차 유체중에 최소한 1차 및 2차 입체이성체를 가지는 라세미 화합물을 효소활성화막의 한쪽에다 공급하여 막을 활성화하는 효소가 1차 입체이성체의 반응을 촉진시켜 화학조성이 변화된 비대칭 화합물을 생성시키고, b. 1차 유체중에서 거의 혼합하지 않는 2차 유체를 효소활성화막의 반대쪽에 동시에 공급하여 ; 효소활성화막으로부터 2차 유체속으로 주로 확산해 들어가는 a단계의 비대칭 생성물로 라세미 혼합물을 함유함으로써 2차 유체에는 주로 비대칭 생성물이 함유되게 하고 1차 유체에는 주로 2차 입체이성체가 함유되게 하는 라세미 혼합물의 분할방법.

청구항 2

a. 1차 유체중에 최소한 1차 및 2차 입체이성체를 가지는 라세미 혼합물을 효소활성화막에는 공급하여 막을 활성화하는 효소가 1차 입체이성체의 반응을 촉진시켜 화학조성이 변화된 비대칭 생성물과 2차 생성물을 생성시키고 ; b. 1차 유체중에서 거의 혼합하지 않는 2차 유체를 효소활성화막의 반대쪽에 동시에 공급하여 효소활성화막으로부터 1차 유체속으로 주로 a단계의 비대칭 생성물이 확산해 들어가게 하고 2차 유체속으로 주로 2차 생성물이 확산해 들어가게 함으로써 ; 2차 입체이성체 및 화학적으로 성질이 다른 비대칭 생성물을 함유하는 1차 유체를 사용하여 라세미 혼합물을 분할하는 방법.

청구항 3

a. 대칭성 선구물질을 함유하는 1차 유체를 효소활성화막의 한쪽에다 공급하여 막을 활성화하는 효소가 대칭성 선구물질의 반응을 촉진시켜 비대칭 생성물을 생성하게 하고 ; b. 1차 유체중에서 거의 혼합하지 않는 2차 유체를 효소활성화막의 반대쪽에다 동시에 공급하여 a단계의 비대칭 생성물이 효소활성화막으로부터 2차 유체속으로 주로 확산해 들어가게 하여 2차 유체중에 비대칭 생성물이 함유되게 하는 대칭성 선구 물질로부터 비대칭 생성물의 제조방법.

청구항 4

제1항 내지 3항에 있어서, 1차 유체가 유기 용액인 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 3항에 있어서, 2차 유체가 수용액인 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항에 있어서, 1차 유체가 수용액인 제조방법.

청구항 7

제1항 내지 3항에 있어서, 2차 유체가 유기 용액인 제조방법.

청구항 8

제1항 내지 3항에 있어서, a단계의 반응을 에스테르 가수분해, 에스테르 생성반응, 에스테르 교환반응, 아미노기 전달반응, 아미드 가수분해, 아미드 생성반응 및 니트릴 가수분해중에서 선택하는 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 2항에 있어서, 라세미 혼합물이 에스테르, 아미드, 카르복실산, 알코올, 아민, 히단틴 또는 니트릴 성분물의 두가지 이성질체로 구성된 제조방법.

청구항 10

제3항에 있어서, 라세미산 또는 라세미 알코올산과 알코올을 반응시켜 만든 에스테르의 두가지 이성질체로 구성된 라세미 혼합물인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제3항에 있어서, 라세미산과 아민을 반응시켜 만든 아미드의 두가지 이성질체로 구성된 라세미 혼합물인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제1항 내지 3항에 있어서, 라세미 혼합물에 베타차단제, 페로몬, 프로스태글란딘, 스테로이드, 향미제, 향료, 의약, 상충제 및 제초제중에서 선택되는 화합물을 포함하는 분할방법.

청구항 13

제1항 내지 3항에 있어서, 막이 친수성막인 분할방법.

청구항 14

제1항 내지 3항에 있어서, 막이 미세다공질막인 분할방법.

청구항 15

제1항 내지 3항에 있어서, 막을 활성화하는 효소가 가수분해 효소인 분할방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 막을 활성화하는 효소를 리파아제, 카르복실 에스테라아제, 콜레스테롤 에스테라아제, 아세틸콜린 에스테라아제, 펩티타아제, 프로테아테, 트립신, 키모트립신, 서브틸리신, 레닌, 펩신, 파파인, 카르복시 펩티다이제, 아미노 펩티다아제, 아미다아제, 아실라아제, 페니실리 아실라아제, 니트릴라아제 및 히단토이나아제중에서 선택하는 분할방법.

청구항 17

제1항 내지 3항에 있어서, 막을 활성화하는 효소를 막의 표면에 결합시키는 분할방법.

청구항 18

제1항 내지 3항에 있어서, 막을 활성화하는 효소를 막의 양면에 결합시키는 분할방법.

청구항 19

제1항 내지 3항에 있어서, 막을 활성화하는 효소를 막속에 위치하게 하는 분할방법.

청구항 20

제1항 내지 3항에 있어서, 비대칭의 미세다공질막의 공극내에 효소를 함입시키는 분할방법.

청구항 21

제1항 내지 3항에 있어서, 막의 기공벽 표면에 있는 막에다 효소를 흡착시키는 제조방법.

청구항 22

제1항 내지 3항에 있어서, 막의 기공내에 있는 중합체 겔내에 효소를 함입시키는 제조방법.

청구항 23

제1항 내지 3항에 있어서, 막의 기공벽 표면에다 효소를 공유 결합시키는 제조방법.

청구항 24

제1항 내지 3항에 있어서, 막의 공극내에 효소를 교차 결합시키는 제조방법.

청구항 25

제1항 내지 3항에 있어서, 막의 기공벽표면에 효소를 교차 결합시키는 제조방법.

청구항 26

제1항 내지 3항에 있어서, 정제된 효소, 세포 추출물, 세포 용해물, 부분적으로 정제된 효소 및 전세포중에서 선택되는 형태로 효소를 공급하는 제조방법.

청구항 27

제1항 내지 3항에 있어서, 효소를 니트릴 가수분해제, 트랜스아미나제, 옥시니트릴라제와 리아제로 구성된 집단에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 28

제1항 내지 3항에 있어서, 미생물로부터 효소를 유도하는 제조방법.

청구항 29

제1항 내지 3항에 있어서, 포유동물로부터 효소를 유도하는 제조방법.

청구항 30

제1항 내지 3항에 있어서, 막의 형태가 평편상, 유공섬유 및 관모양중에서 선택되는 제조방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 막의 표피가 있는 미세다공질막인 제조방법.

청구항 32

제1항 내지 3항에 있어서, 재생셀룰로오스, 셀룰로오스의 에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 폴리아크릴로니트릴 공중합체, 폴리우레탄함유 공중합체, 폴리아릴술폰, 폴리아릴 에테르술폰, 폴리아릴술폰 블랜드, 폴리아릴 에테르술폰 블랜드, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리비닐 알코올, 지방족 폴리아미드, 방향족 폴리아미드, 폴리이미드, 폴리에테르이미드, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 폴리올레핀, 폴리벤즈이다졸 및 폴리벤즈이미다졸론중에서 선택되는 물질로 막을 만드는 제조방법.

청구항 33

제1항 내지 3항에 있어서, 막이 소수성이고 1차 또는 2차 유체중 하나가 수용액이며 수용액을 가압하에 두는 제조방법.

청구항 34

제1항 내지 3항에 있어서, 막이 친수성이고 1차 또는 2차 유체중 하나가 유기용액이며 유기용액을 가압하에 두는 제조방법.

청구항 35

제6항에 있어서, 1차 유체의 pH 범위가 약 2-약 10인 제조방법.

청구항 36

제35항에 있어서, pH 범위가 5.0-약 8.5인 제조방법.

청구항 37

제1항 내지 3항에 있어서, 반응온도가 약 15℃-약 70℃인 제조방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 반응온도가 약 20℃-약 45℃인 제조방법.

청구항 39

제1항 내지 3항에 있어서, 비대칭 생성물이 1차 유체중에서 보다 2차 유체중에서 훨씬 가용성인 제조방법.

청구항 40

제1항 내지 3항에 있어서, 대칭성 선구물질이 2차 유체중에서 보다 1차 유체중에서 훨씬 가용성인 제조방법.

청구항 41

제1항 내지 3항에 있어서, 2차 유체에 대해 역류방향으로 1차 유체를 이동시키는 제조방법.

청구항 42

제1항 내지 2항에 있어서, 라세미 혼합물에 아미드의 입체이성체 최소한 두가지를 포함하고 비대칭 생성물이 카르복실산 또는 알코올인 불할방법.

청구항 43

제1항 내지 2항에 있어서, 라세미 혼합물에 아미드의 입체이성체를 최소한 두가지 포함하고 비대칭 생성물이 카르복실산 또는 아민인 분할방법.

청구항 44

제1항 또는 2항에 있어서, 1차 유체로부터 비대칭 생성물을 분리하는 분할방법.

청구항 45

제1항 또는 2항에 있어서, 1차 유체부터 2차 입체이성체를 분리하는 분할방법.

청구항 46

제1항 또는 3항에 있어서, 1차 유체에서 1차 입체이성체가 거의 소진되는 분할방법.

청구항 47

제1항 또는 2항에 있어서, 라세미 혼합물을 막으로 계속해서 순환시키는 분할방법.

청구항 48

제1항 또는 2항에 있어서, 2차 입체이성체를 함유하는 1차 유체를 효소활성화막으로부터 분리하고, 2차 입체이성체를 라세미화한 후 1차 유체중의 라세미화된 입체이성체를 효소활성화막에 재차 도입하는 분할방법.

청구항 49

제1항 또는 2항에 있어서, 비대칭 생성물을 함유하는 2차 유체를 효소활성화막으로부터 분리하고 비대칭 생성물을 라세미화하여 라세미화된 생성물을 1차 및 2차 입체이성체의 화학적인 형태로 화학적으로 전환시킨 후 1차 유체중의 라세미화된 입체이성체를 효소활성화막에 다시 도입하는 분할방법.

청구항 50

제1항 또는 2항에 있어서, 효소활성화막을 지나 이동하는 1차 유체 및 2차 유체의 체적유속의 차이가 약2-약10정도인 분할방법.

청구항 51

제3항에 있어서, 효소를 리파아제, 카르복실 에스테라아제 및 아미다아제중에서 선택하는 제조방법.

청구항 52

제3항에 있어서, a단계의 반응이 탄소-탄소 또는 탄소-탄소 이중결합에 대해 화학성분의 비대칭 첨가중의 하나인 제조방법.

청구항 53

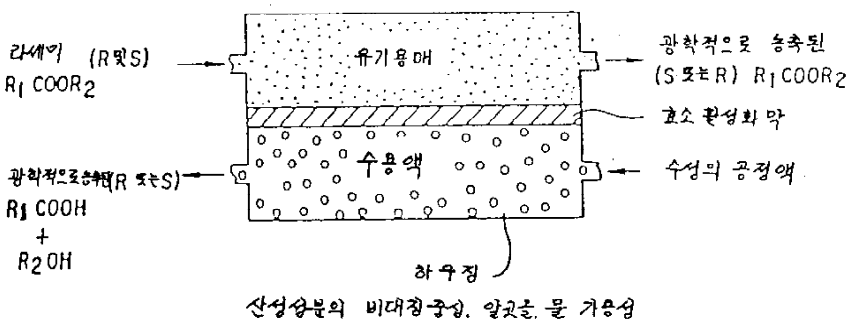
제42항에 있어서, 막을 활성화하는 효소가 리아제인 제조방법.

청구항 54

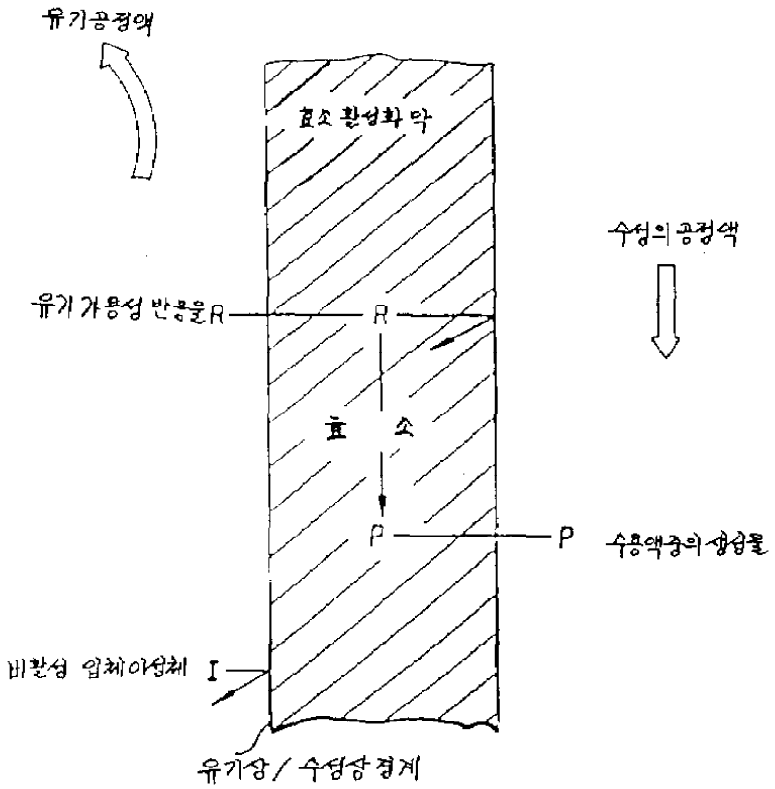
제52항에 있어서, 리아제가 옥시니트릴라이제이거나 암모니아 리아제인 제조방법.

도면

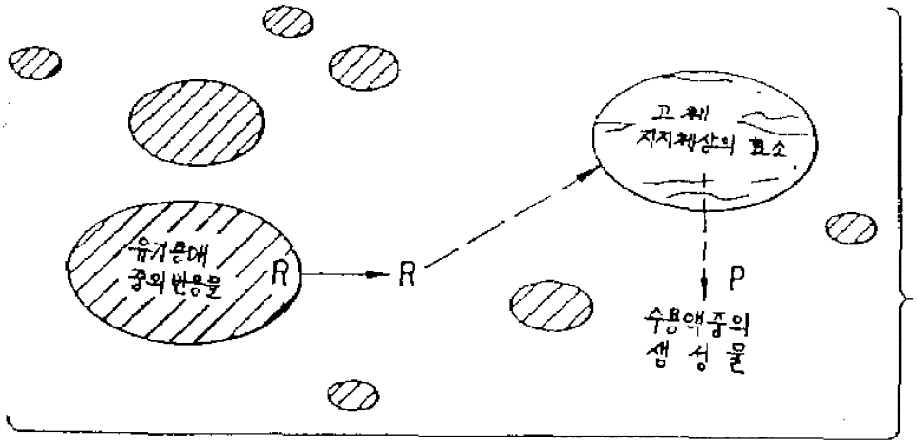
도면1



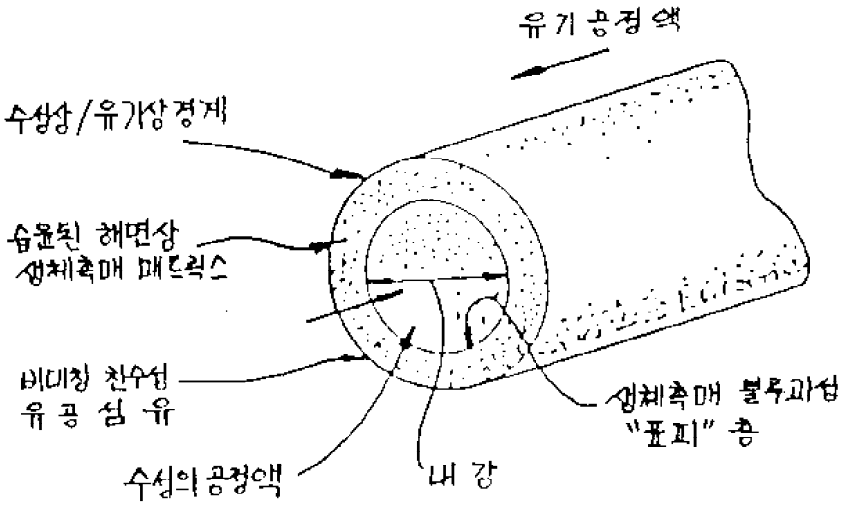
도면2



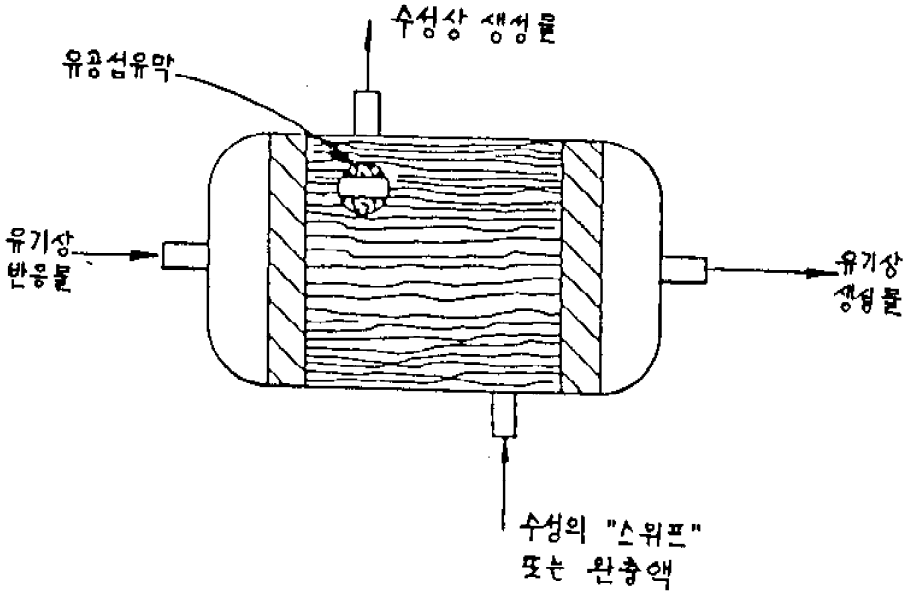
도면3


고체
지지체상의 효소
유기용매
중의반응물
R
R
P
수용액중의
생 성 물

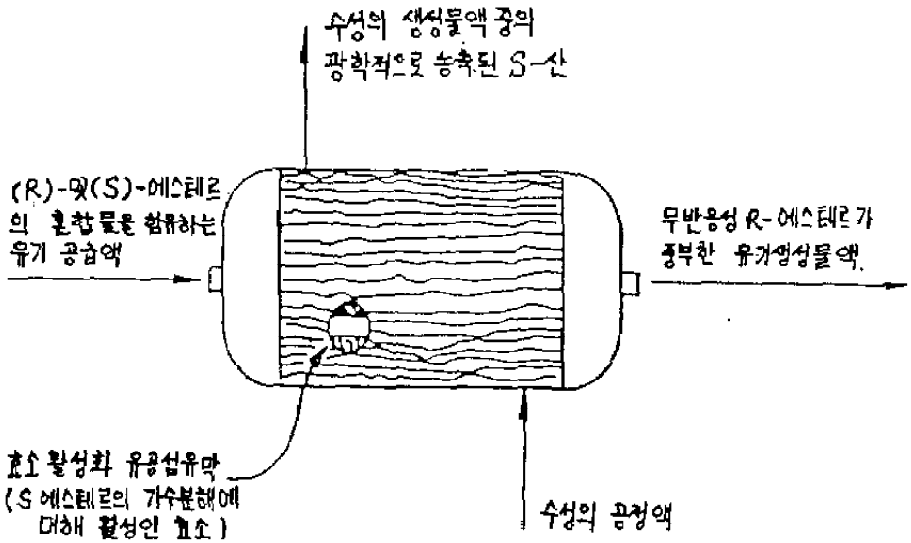
도면4


유기 용정 액
수상상/유기상경계
습윤친 해면상
생체촉매 매트릭스
비대칭 친수성
유 공 심 유
수심의 공정액
내 강
생체촉매 불투과성
"표피" 층

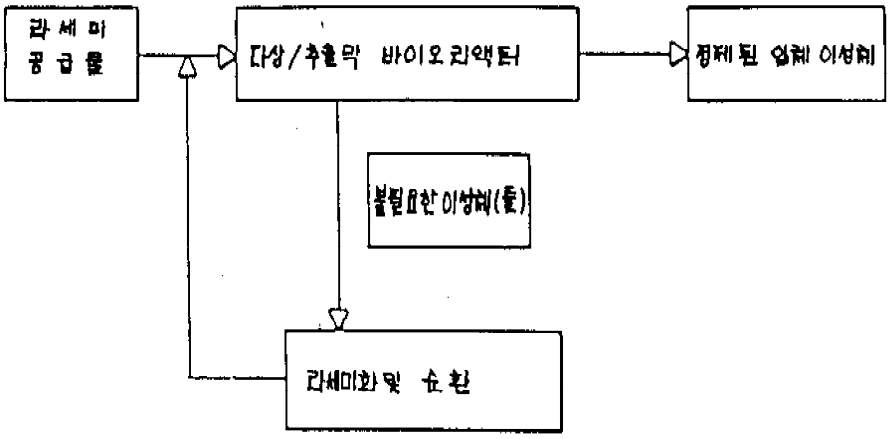
도면5


수성상 생성물
유공섬유막
유기상
반응물
유기상
생성물
수성의 "스위프"
또는 완충액

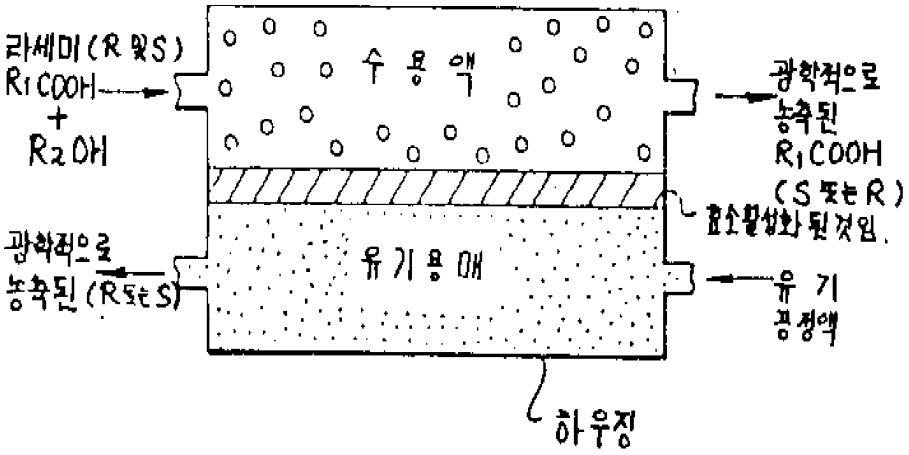
도면6


수성의 생성물액중의
광학적으로 농축된 S-산
(R)-및(S)-에스테르
의 혼합물을 함유하는
유기 공급액
무반응성 R-에스테르가
풍부한 유기생성물액
효소 활성화 유공섬유막
(S 에스테르의 가수분해에
대해 활성인 효소)
수성의 공정액

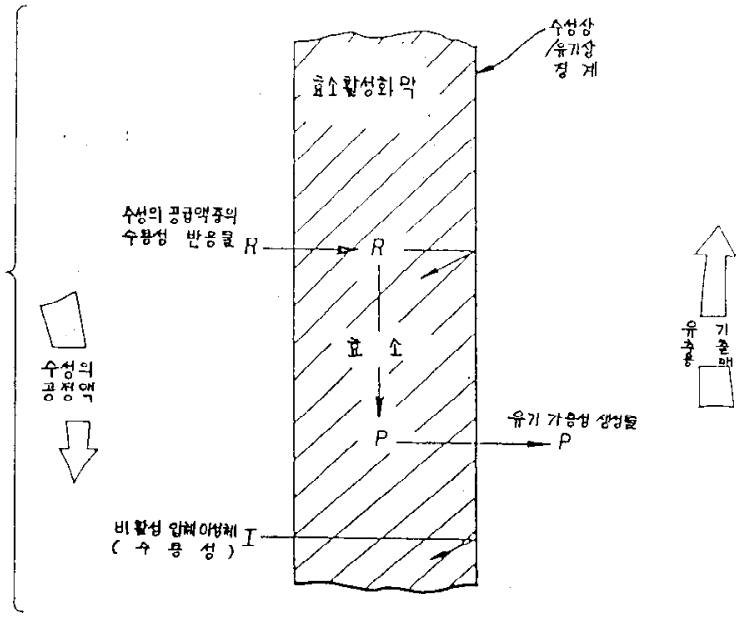
도면7


라세미
공급물
다상/추출막 바이오리액터
정제된 입체 이성체
불필요한 이성체(들)
라세미화 및 순환

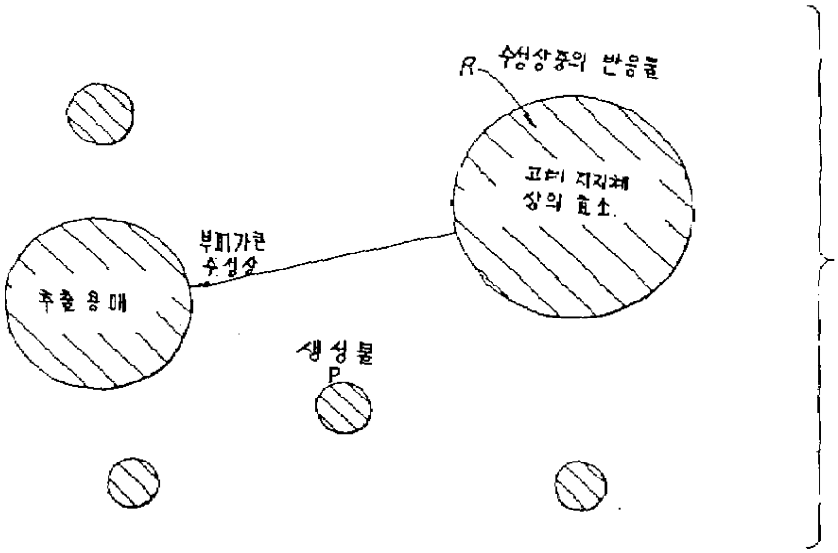
도면8


라세미(R및S)
R1COOH
+
R2OH
수용액
광학적으로
농축된
R1COOH
(S또는R)
효소활성화된것임.
광학적으로
농축된(R또는S)
유기용매
유기
공정액
하우징

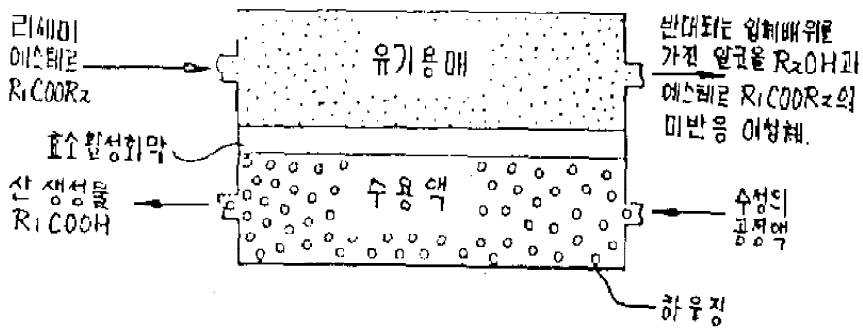
도면9


수성상
유기상
경 계
효소활성화막
수성의 공급액중의
수용성 반응물 R
R
효 소
P
유기 가용성 생성물
P
수성의
공정액
비활성 입체이성체 I
(수 용 성)
유기
추출매

도면10

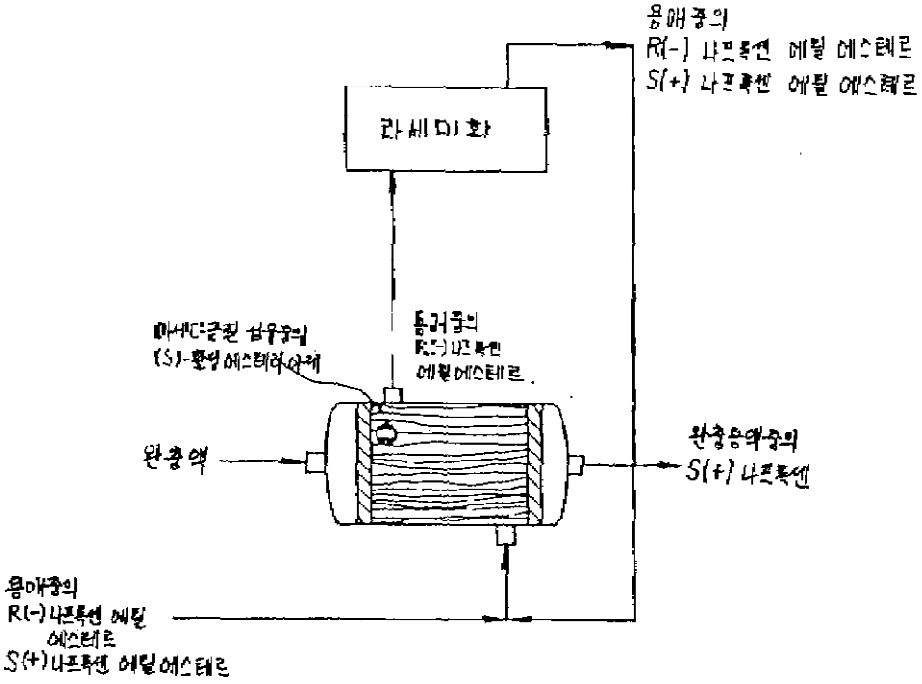

R 수성상중의 반응물
고분자 지지체
상의 효소
부피가큰
수성상
추출용매
생성물
P

도면11

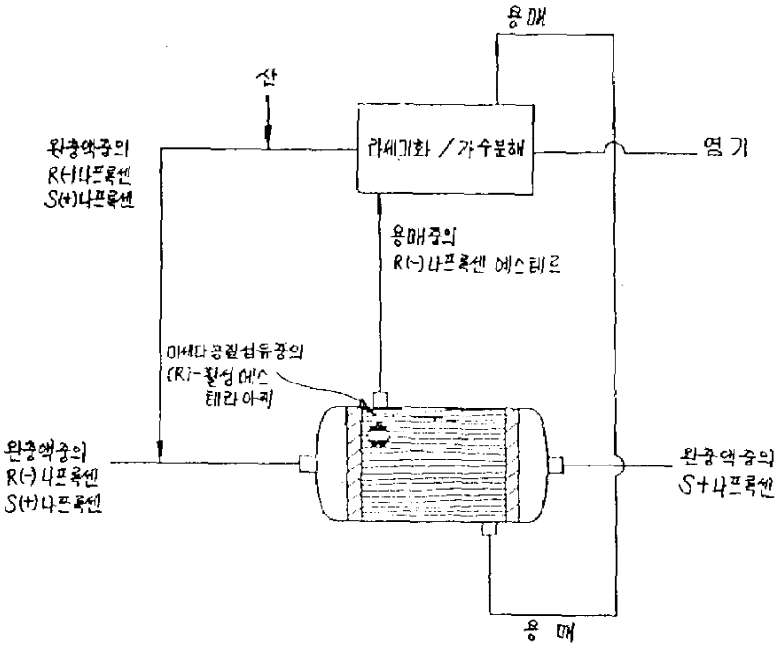


알코올 선택의 비대칭중심. 알코올 유기가용성.

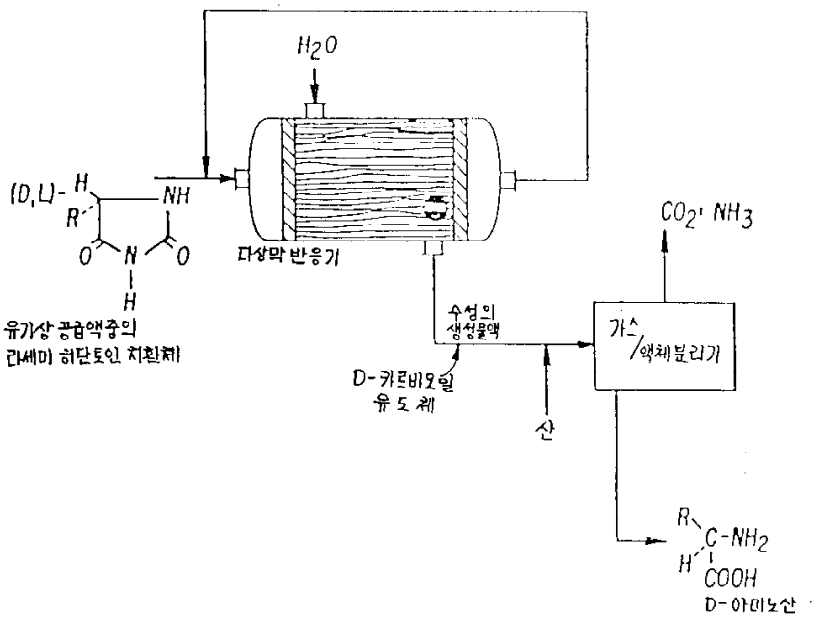
도면12



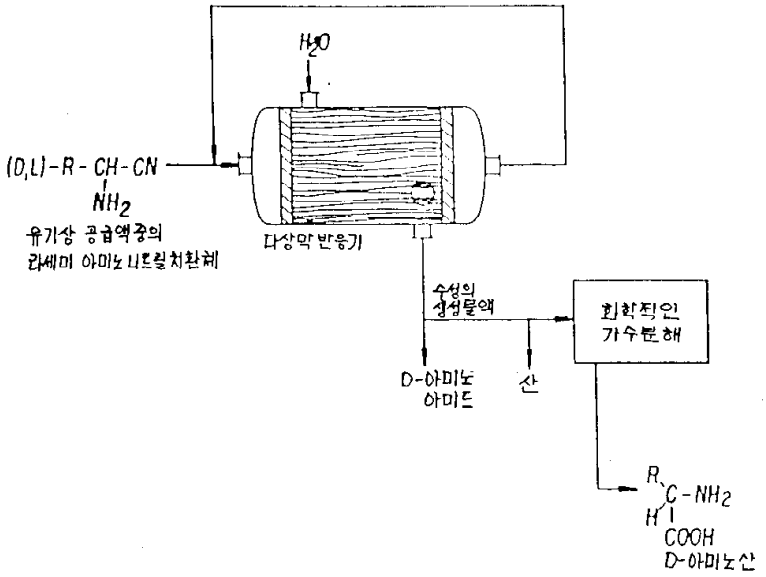
도면13


용매
산
라세기화 / 가수분해
염기
완충액중의
R(+)나프록센
S(+)나프록센
용매중의
R(-)나프록센 에스테르
아세다공질섬유중의
(R)-활성 에스
테라아제
완충액중의
R(-)나프록센
S(+)나프록센
완충액중의
S+나프록센
용 매

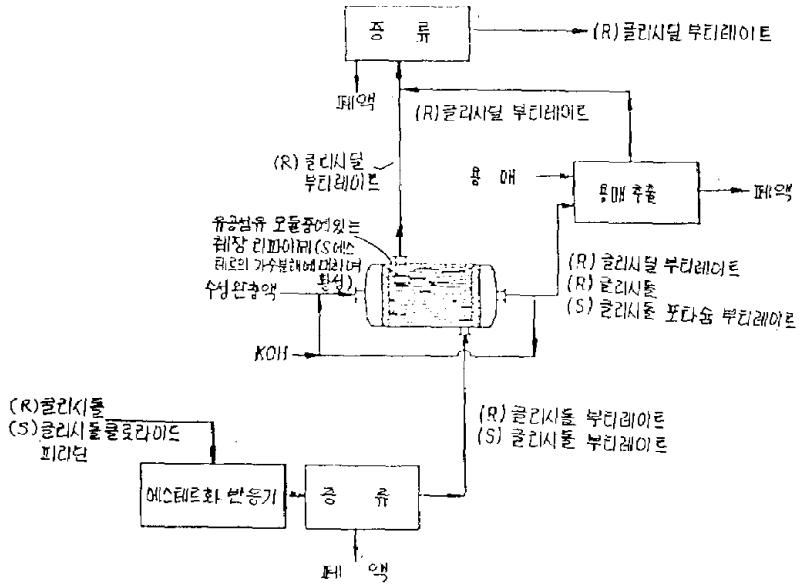
도면14


H_2O
(D,L)-
R
NH
O
N
O
H
유기상 공급액중의
라세미 히단토인 치환체
다상막 반응기
수성의
생성물액
D-카르바모일
유도체
산
CO_2, NH_3
가스
/액체분리기
R
C-NH_2
H
COOH
D-아미노산

도면15


H_2O
(D,L)-R-CH-CN
NH_2
유기상 공급액중의
라세미 아미노니트릴화합체
다상막 반응기
수성의
생성물액
회학적인
가수분해
D-아미노
아미드
산
R
C-NH_2
H
COOH
D-아미노산

도면16


증 류
(R)클리시딜 부티레이트
폐액
(R)클리시딜 부티레이트
(R)클리시딜
부티레이트
용 매
용매 추출
폐액
유공섬유 모듈중에있는
쉘상 리파아제(S에스
테르의 가수분해에의하여
생성)
수성완충액
(R)클리시딜 부티레이트
(R)클리시돌
(S)클리시돌 포타슘 부티레이트
KOH
(R)클리시돌
(S)클리시돌클로라이드
피리딘
(R)클리시돌 부티레이트
(S)클리시돌 부티레이트
에스테르화 반응기
증 류
폐 액