PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/63104**
C12P 13/00, 41/00	**A1**	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Dezember 1999 (09.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03464

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. Mai 1999 (20.05.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 24 491.6 2. Juni 1998 (02.06.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D–51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: EFFENBERGER, Franz [DE/DE]; Schatzweg 5, D–70597 Stuttgart (DE). ROOS, Jürgen [DE/DE]; Forststrasse 148, D–70193 Stuttgart (DE). FISCHER, Reiner [DE/DE]; Nelly–Sachs–Strasse 23, D–40789 Monheim (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D–51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: METHOD FOR STEREOSELECTIVE PRODUCTION OF SUBSTITUTED CYCLOHEXYLCYANHYDRINS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR STEREOSELEKTIVEN HERSTELLUNG VON SUBSTITUIERTEN CYCLOHEXYLCYANHYDRINEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for stereoselective production of cyclohexylcyanhydrins by reacting 4–substituted cyclohexanones with a cyanide source in the presence of an oxynitrilase.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur stereoselektiven Herstellung von Cyclohexylcyanhydrinen durch Umsetzung von 4–substituierten Cyclohexanonen mit einer Cyanidquelle in Gegenwart einer Oxynitrilase.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Verfahren zur stereoselektiven Herstellung von substituierten Cyclohexylcyanhydrinen

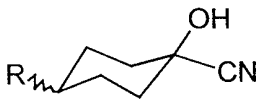
Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur stereoselektiven Herstellung von substituierten Cyclohexylcyanhydrinen.

Es ist bekannt, daß sich Cyanhydrine durch Umsetzung von Ketonen mit Blausäure herstellen lassen (siehe z.B. Beyer, Walter, Lehrbuch der Organischen Chemie, 21. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart 1988, Seite 213). An substituierten cyclischen Ketonen verläuft diese Reaktion mit sterisch wenig anspruchsvollen Resten jedoch nicht stereoselektiv.

Geschützte Cyanhydrine werden bei der Umsetzung von Ketonen mit Trimethylsilylcyanid erhalten (siehe die oben zitierte Literaturstelle, Beyer, Walter S. 535 ff., Hiyama, Saito, Synthesis 1985, 645-647). Bekannt ist auch die Verwendung von Oxynitrilasen zur Herstellung optisch aktiver Cyanhydrine (siehe z.B. EP-A-0 799 894).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren zur stereoselektiveren Herstellung von substituierten Cyclohexylcyanhydrinen bereitzustellen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur stereoselektiven Herstellung von Cyclohexylcyanhydrinen der Formel (I)

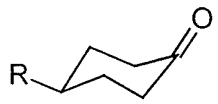


(I)

worin

R für jeweils gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Cycloalkyl (worin gegebenenfalls eine Methylengruppe durch Sauerstoff ersetzt ist), Alkoxy, Alkenyloxy, Cycloalkyloxy, Arylalkyloxy, Aryloxy oder Aryl steht,

welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man Cyclohexanone der Formel (II)



(II)

worin

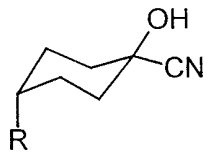
R die obengenannten Bedeutungen hat,

in Gegenwart einer Oxynitrilase und gegebenenfalls in Gegenwart eines Verdünnungsmittels mit einer Cyanidquelle umsetzt.

Die Schlangenlinie in der Formel (I) bedeutet, daß es sich bei den Verbindungen der Formel (I) um Gemische von cis- und trans-Isomeren folgender Struktur handelt:



cis



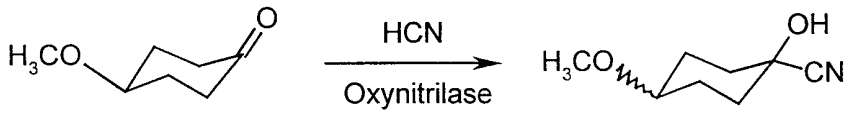
trans

Überraschenderweise werden die Verbindungen der Formel (I) in guter Ausbeute erhalten. Umsetzungen von Cycloalkanonen mit Oxynitrilasen zu Cyanhydrinen waren nicht bekannt.

Weiterhin verläuft das erfindungsgemäße Verfahren schneller als das rein chemische Verfahren.

Das erfindungsgemäße Verfahren liefert ferner überraschenderweise in Abhängigkeit von der eingesetzten Oxynitrilase einen Überschuß an gewünschten Isomeren (cis oder trans).

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich durch das folgende Formelschema wiedergeben, wenn als Cyanidquelle Blausäure verwendet wird:



Die als Ausgangsstoffe für das erfindungsgemäße Verfahren benötigten Verbindungen sind durch die Formel (II) allgemein definiert.

Bevorzugte Substituenten bzw. Bereiche des in den oben und nachstehend erwähnten Formeln aufgeführten Restes R werden im folgenden erläutert.

Bevorzugt werden in das erfindungsgemäße Verfahren Verbindungen der Formel (II) eingesetzt, worin

R für gegebenenfalls durch Halogen substituiertes C_1-C_8-Alkyl, für gegebenenfalls durch C_1-C_6-Alkyl oder C_1-C_6-Alkoxy substituiertes C_3-C_8-Cycloalkyl (worin gegebenenfalls eine Methylengruppe durch Sauerstoff ersetzt ist), für gegebenenfalls durch Halogen substituiertes C_1-C_8-Alkoxy, für gegebenenfalls durch Halogen substituiertes C_3-C_6-Alkenyloxy, für gegebenenfalls durch C_1-C_6-Alkyl oder C_1-C_6-Alkoxy substituiertes C_2-C_8-Cycloalkyloxy oder für jeweils gegebenenfalls durch Halogen, C_1-C_6-Alkyl, C_1-C_6-Halogenalkyl, C_1-C_6-Alkoxy oder C_1-C_6-Halogenalkoxy substituiertes Phenyl, Phenoxy oder Benzyloxy steht.

Besonders bevorzugt werden Verbindungen der Formel (II) eingesetzt, worin

R für gegebenenfalls durch Halogen substituiertes C_1-C_6-Alkyl, für gegebenenfalls durch C_1-C_4-Alkyl oder C_1-C_4-Alkoxy substituiertes C_3-C_6-Cycloalkyl (worin gegebenenfalls eine Methylengruppe durch Sauerstoff ersetzt ist), für gegebenenfalls durch Halogen substituiertes C_1-C_6-Alkoxy, für gegebenenfalls durch Halogen substituiertes C_3-C_6-Alkenyloxy, für gegebenenfalls durch C_1-C_4-Alkyl oder C_1-C_4-Alkoxy substituiertes C_3-C_6-Cycloalkyloxy oder für jeweils gegebenenfalls durch Halogen, C_1-C_4-Alkyl, C_1-C_2-Halogenalkyl, C_1-C_4-Alkoxy oder C_1-C_2-Halogenalkoxy substituiertes Phenyl, Phenoxy oder Benzyloxy steht.

Halogen steht in den obigen Definitionen für Fluor, Chlor, Brom und Iod, besonders für Fluor, Chlor und Brom, insbesondere für Fluor und Chlor.

Ganz besonders bevorzugt werden Verbindungen der Formel (II) eingesetzt, worin

R für Methyl, Ethyl, n-Propyl, i-Propyl, n-Butyl, i-Butyl, tert.-Butyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Allyloxy, 2-Butenyloxy, Methoxy, Ethoxy, n-Propoxy, iso-Propoxy, n-Butoxy, iso-Butoxy, tert.-Butoxy, Phenyl oder Benzyloxy steht.

Insbesondere seien die folgenden Verbindungen der Formel (II) genannt:

4-Methylcyclohexanon	4-Methoxycyclohexanon
4-Ethylcyclohexanon	4-Ethoxycyclohexanon
4-n-Propylcyclohexanon	4-n-Propoxycyclohexanon
4-iso-Propylcyclohexanon	4-iso-Propoxycyclohexanon
4-n-Butylcyclohexanon	4-n-Butoxycyclohexanon
4-iso-Butylcyclohexanon	4-iso-Butoxycyclohexanon
4-tert.-Butylcyclohexanon	4-tert.-Butoxycyclohexanon

4-Cyclohexylcyclohexanon	4-Allyloxycyclohexanon
4-Phenylcyclohexanon	4-Benzyloxycyclohexanon

Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen der Formel (I) sind teilweise bekannt oder lassen sich nach den in der eingangs zitierten Literatur beschriebenen Verfahren herstellen (M. Mousseron et. Al.; Bull. Soc. Chim. Fr. 4. 1435-39 (1970); P. Geneste et. al.; Bull. Soc. Chim. Fr., II, 187-191 (1980)).

Die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens als Ausgangsstoffe benötigten Verbindungen der Formel (II) sind teilweise bekannt oder lassen sich nach in Prinzip bekannten Verfahren herstellen (vergleiche Beispiel II-1 und z.B. J. Org. Chem. 47, 3881, 1982).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise in Gegenwart eines gegenüber den Reaktionsteilnehmern inerten Verdünnungsmittels durchgeführt.

Vorzugsweise verwendbar sind aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe, wie Benzin, Toluol, Xylol und Tetralin, ferner aliphatische oder aromatische Halogenkohlenwasserstoffe, wie Methylenchlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Chlorbenzol und o-Dichlorbenzol, weiterhin offenkettige oder cyclische Ether, wie Diethylether, Methyl-tert.-butylether, Diisopropylether, Tetrahydrofuran und Dioxan, ferner Carbonsäureester, wie Essigsäureethylester, und auch stark polare Solventien, wie Dimethylsulfoxid und Sulfolan, oder auch Alkohole wie Methanol, Ethanol, Isopropanol und tert.-Butanol.

Bevorzugte Verdünnungsmittel sind Ether (insbesondere Diisopropylether) und Carbonsäureester (insbesondere Essigsäureethylester).

Die erfindungsgemäße Umsetzung kann auch in einem Zweiphasensystem durchgeführt werden, das aus Wasser und einem mit Wasser nicht vollständig mischbaren organischen Lösungsmittel besteht. Als organische Lösungsmittel kommen hierfür

beispielsweise Methyl-tert.-butylether, Diisopropylether und Essigsäureethylester in Frage. Bevorzugt wird Diisopropylether verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich auch in einem wäßrigen System in Abwesenheit eines organischen Lösungsmittels bei einem bevorzugten pH <5, insbesondere bei einem pH-Wert zwischen 3 und 4 durchführen. Der pH-Wert wird durch einen Puffer eingestellt. Geeignete Puffer sind beispielsweise Natriumacetat oder Natriumcitrat. Bevorzugt wird ein 20 bis 500 mM Natriumcitrat-Puffer verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in Gegenwart einer Oxynitrilase (Hydroxynitril- Lyase) durchgeführt. Oxynitrilasen sind Enzyme, die die Spaltung und Bildung von Cyanhydrinen katalysieren. Oxynitrilasen sind lange bekannt (siehe z.B. EP-A-0 799 894; Chem. Commun. 1997, 1933; Angew. Chem. 1994, 106, 1609-1619; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1996, 35, 438; Enantiomer, Vol. 1, pp. 359-363).

Für das erfindungsgemäße Verfahren werden bevorzugt die folgenden Oxynitrilasen eingesetzt: (R)-Oxynitrilase aus der Bittermandel (Prunus amygdalus), (S)-Oxynitrilase aus Maniok (Manihot esculenta) und (S)-Oxynitrilase aus dem Gummibaum (Hevea brasiliensis). Besonders bevorzugt werden die (R)-Oxynitrilase aus der Bittermandel (Prunus amygdalus) und die (S)-Oxynitrilase aus Maniok (Manihot exculenta) eingesetzt. Ganz besonders bevorzugt wird die (R)-Oxynitrilase aus der Bittermandel (Prunus amygdalus) verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren führt in Abhängigkeit von der Art der eingesetzten Oxynitrilase zu einem Überschuß an trans- bzw. cis-Isomeren. In einigen Fällen ist darüber hinaus eine Abhängigkeit des Reaktionsverlaufs von der Art des Substituenten R zu beobachten.

Der Einsatz der (R)-Oxynitriliase aus Bittermandel führt grundsätzlich zu einem Überschuß an trans-Isomeren.

Bei Verwendung der (S)-Oxynitrilase aus Maniok überwiegt für die kleinen Reste R Methyl und Methoxy überraschenderweise das trans-Isomer, während für größere Reste R regelmäßig ein Überschuß des cis-Isomeren erhalten wird.

Die Verwendung der (S)-Oxynitrilase aus dem Gummibaum liefert bei kleineren Resten R (beispielsweise Methoxy) ebenfalls einen Überschuß an trans-Isomeren.

Die Gewinnung der genannten Oxynitrilasen ist in der Literatur beschrieben.

Für die Isolierung der (R)-Oxynitrilase [EC 4.1.2.10] aus Bittermandeln siehe z.B. Biochem. Z. 1963, 337, 156-166 und 1966, 346, 301-321; Proteins 1994, 19, 343-347; Helv. Chim. Acta, 1983, 66, 489. Für die Isolierung der (S)-Oxynitrilase [EC 4.1.2.37] aus Maniok siehe z.B. F.J.P. De C. Carvalho, Dissertation, University of California, Davis, 1981; Arch. Biochem. Biophys. 1994, 311, 496-502. Für die Isolierung der (S)-Oxynitrilase aus dem Gummibaum siehe z.B. Physiologia Plantarum 1989, 75, 97; Plant Science 1996, 115, 25-31.

Grundsätzlich können die Oxynitrilasen in verschiedenen Aufbereitungsformen in das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden.

Andererseits kann auch Rohenzym verwendet werden, d.h., das Enzym wird nicht isoliert, sondern es wird ein zellfreier Extrakt eingesetzt, den man erhält, indem man die Zellen mit Ultraschall aufschließt, den so gewonnenen Rohextrakt von den Zellwänden/-membranen abzentrifugiert und aufkonzentriert. Literatur z.B. (R)-Oxynitrilase: Tetrah. Lett. 1988, 29, 4485-88, Tetrah. Ass. 1996, 7, 1105-1116, Synthetic Communications 1991, 21, 1387-91.

Für die Verwendung von (R)-Oxynitrilen aus Bittermandeln eignet sich auch der Einsatz von vorzugsweise entfettetem Mandelmehl, das man erhält, indem man Bitter-

mandeln mahlt und mit z.B. Hexan oder Petrolehter extrahiert (käuflich bei Sigma) oder Lit.: Lett., 1988, 29, 4485-4488.

Bevorzugt wird gereinigtes Enzym verwendet.

Die Enzyme können für die Durchführung der erfindungsgemäßen Umsetzung an geeignetes Trägermaterial gebunden werden. Als Trägermaterial kommen beispielsweise Cellulosen in Frage, insbesondere Nitrocellulose und Cellulose P 100 PSC: Elcema®; Degussa, Teilchengröße 50-150 µm, an der Oberfläche mit 2 % amorpher Kieselsäure (Aerosil) überzogen. Diese Verfahrensweise ermöglicht nach beendeter Reaktion die Abfiltrierung von trägergebundenem Enzym und damit eine vereinfachte Aufarbeitung. Das so zurückgewonnene trägergebundene Enzym kann darüber hinaus erneut verwendet werden.

Das Enzym wird in der Regel auf den Träger aufgebracht, indem man die Enzymlösung auf den Träger tropft, siehe z.B. auch Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1996, 35, 439.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in Gegenwart einer Cyanidquelle durchgeführt.

Als Cyanidquelle kommen alle Verbindungen in Frage, die Cyanidionen (CN^-) freisetzen. Beispielsweise seien Blausäure, Cyanhydrine wie Aceton-cyanhydrin und Metallcyanide wie KCN genannt. Bevorzugt wird Blausäure oder KCN, besonders bevorzugt Blausäure verwendet.

Die Temperatur kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren in einem größeren Bereich variiert werden. Im allgemeinen arbeitet man bei Temperaturen zwischen -20°C und 80°C, bevorzugt zwischen 0°C und 40°C.

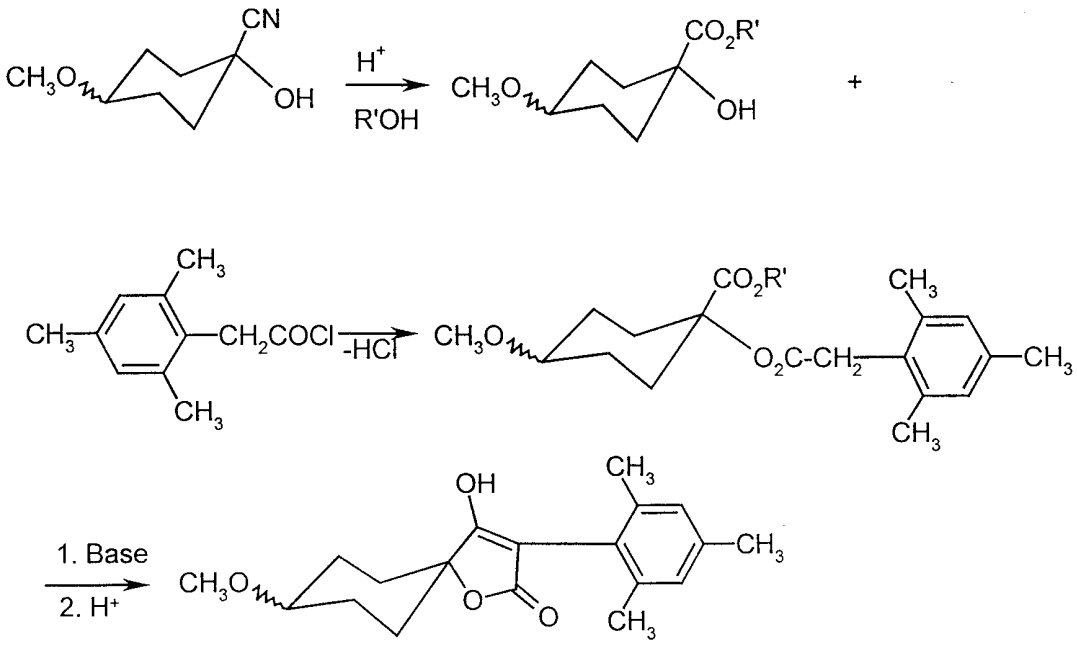
Das erfindungsgemäße Verfahren wird im allgemeinen unter Normaldruck durchgeführt.

Das molare Verhältnis an Verbindung der Formel (II) zu Cyanidionen liegt im allgemeinen zwischen 1:1 und 1:50, bevorzugt zwischen 1:1 und 1:4.

Im allgemeinen geht man bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens so vor, daß man die Verbindung der Formel (II) und die Cyanidquelle in einem geeigneten Verdünnungsmittel vorlegt, das immobilisierte Enzym zugibt und das Reaktionsgemisch bis zur beendeten Reaktion bei Raumtemperatur rührt. Anschließend wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat mit üblichen Methoden aufgearbeitet.

Grundsätzlich ist es auch möglich, die Umsetzung kontinuierlich durchzuführen, beispielsweise, indem man die Edukte im Verdünnungsmittel gelöst über eine Säule schickt, die mit dem trägerfixierten Enzym beladen ist oder in einem Membranreaktor reagieren läßt, wobei die Produkte von den Edukten und dem Katalysator durch Evaporation abgetrennt werden.

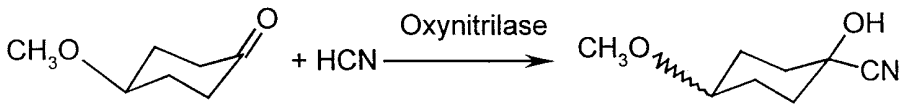
Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen der Formel (I) sind wertvolle Zwischenprodukte für die Herstellung von Herbiziden und Schädlingsbekämpfungsmitteln gemäß folgendem Reaktionsschema: (siehe z.B. EP 0 647 637).


CN
CH3O
OH
H+
R'OH
CO2R'
CH3O
OH
+
CH3
CH3
CH2COCl
CH3
-HCl
CH3O
CO2R'
O2C-CH2
CH3
CH3
CH3
1. Base
2. H+
CH3O
OH
O
O
CH3
CH3

Beispiele

Beispiel 1 (Substratkonzentration 0,2 mol/l)

Zu einer Lösung von 1 mmol Keton und 3,9 mmol Blausäure in 5 ml Diisopropylether wurde das auf Cellulose (*Prunus amygdalus*) bzw. Nitro-cellulose immobilisierte Enzym zugegeben und die angegebene Zeit bei Raumtemperatur gerührt.



Enzym aus	Units/mmol	Reaktions-dauer (h)	Umsatz* (%)	Isomerenverhältnis* (trans:cis)
a) Prunus amygdalus	100	4,5	92	92:8
b) Manihot esculenta	100	1	quant.	70:30
c) Hevea brasiliensis	1000**	2	quant.	65:35

* Die nicht enzymkatalysierte Konkurrenzreaktion fällt hier nicht ins Gewicht: sie erreicht lediglich 6 % Umsatz in 10 Stunden mit einem Isomerenverhältnis von 54:46 (cis:trans)

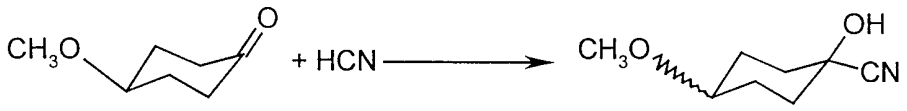
** Aktivitätstest mit (S)-Mandelonitril als Substrat

Die Enzyme wurden nach folgenden Vorschriften erhalten bzw. auf die Träger aufgebracht:

Die Enzymlösung der (R)-Oxynitrilase aus *Prunus amygdalus* gibt man auf den Celluloseträger, der zuvor in einem Natriumcitrat-Puffer (20mM, pH 3,3) gequollen und anschließend abgepreßt wurde. Den enzymbeladenen Träger verwendet man so direkt

Die Enzymlösungen der beiden (S)-Oxynitrilasen gibt man auf Nitrocellulose, die zuvor ebenfalls in einem Natriumcitrat-Puffer (20mM, pH 3,3) gequollen wurde und anschließend im Hochvakuum getrocknet wurde. Den enzymbeladenen Träger zentrifugiert man, um das überschüssige Wasser zu entfernen (Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 1996 35, No. 4, 437-439).

Es wurden in den folgenden Beispielen 2 bis 5 (R)-Oxynitrilase aus der Bittermandel verwendet (100 U des Enzyms pro 1 mmol Keton) und folgende Reaktion durchgeführt:



Beispiel 2 (Substratkonzentration 0,2 mol/l)

Lösungsmittel	Reaktionsdauer (h)	Umsatz (%)	Isomerenverhältnis (trans:cis)
a) Diisopropylether	4,5	92	92:8
b) tert.-Butylmethylether	23	82	87:13
c) Essigsäureethylester	24	17	74:26

Beispiel 3 (Substratkonzentration 0,2 mol/l)

Bei der Variation des Trägermaterials stand vor allem die Absenkung des Wassergehaltes auf dem Träger im Vordergrund. Durch die Zentrifugation der mit Enzymlösung beladenen Nitrocellulose gelingt es, den Wassergehalt sehr stark zu senken.

Träger	Reaktionsdauer (h)	Umsatz (%)	Isomerenverhältnis (trans:cis)
a) Cellulose P100PSC	4,5	92	92:8
b) Nitrocellulose	7	62	91:9

Beispiel 4 (Substratkonzentration 0,2 mol/l)

Reaktionstem-peratur (°C)	Reaktionsdauer (h)	Umsatz (%)	Isomerenverhältnis (trans:cis)
a) 0	1	41	91:9
b) 25	2	74	91:9
c) 42	2	quant.	89:11

Beispiel 5

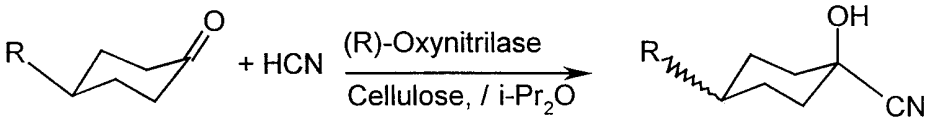
Substratkonz [M]	Reaktionsdauer (h)	Umsatz (%)	Isomerenverhältnis (trans:cis)
a) 0,2	4,5	92	92:8
b) 0,6	2	quant.	90:10
c) 1,0	2	87	82:18

Beispiel 6

(R)-Oxynitrilase-katalysierte Addition von Blausäure an Cyclohexanonderivate

Alle Umsetzungen wurden in Diisopropylether und bei Raumtemperatur durchgeführt. Die (R)-Oxynitrilase wurde auf Cellulose adsorbiert, die zuvor in 20 mM

Citratpufferlösung pH 3,3 gequollen wurde. Blausäure wurde im vierfachen Überschuß zum Substrat zugegeben. Zu jedem Enzymansatz wurde eine Blindprobe durchgeführt, um die chemische Reaktion abschätzen zu können.



1 2

Tabelle 1

		Cyanhydrin 2			Blindprobe [b]	
R	U/mmol	t [h]	Umsatz [%]	cis/trans [a] [%]	Umsatz [%]	cis/trans [a] [%]
Methyl-	200	1,5	99	3:97	4	17:83
Ethyl-	200	7,25	92	2:98	<0,5	n.b. [c]
Propyl-	200	22	73	2:98	<1	n.b.
*iso*Propyl-	200	22	94	1:99	<1	n.b.
tert.-Butyl-	200	216	50	10:90	2	13:87
Ethoxy-	200	24	99	11:89	78	43:57
Propoxy	200	48	60	14:86	21	46:54
Phenyl-	200	360	83	5:95	49	10:90

[a] Isomerenverhältnis nach Acetylierung mit Dimethylaminopyridin und Acetanhydrid gaschromatographisch bestimmt.

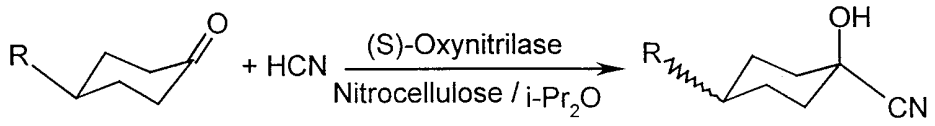
[b] Anstatt der Enzymlösung wurde eine entsprechende Menge eines 20 mM Natriumacetat-Puffers pH 5,4 verwendet.

[c] Nicht bestimmt.

Beispiel 7

(S)-Oxynitrilase-katalysierte Addition von Blausäure an Cyclohexanonderivate

Für die Umsetzungen von (S)-Oxynitrilase aus Maniak (Manihot esculenta) wurden bis auf Nitrocellulose als neues Enzymträgermaterial die gleichen optimierten Reaktionsbedingungen gewählt wie für die (R)-Oxynitrilase aus Bittermandeln.



1 2

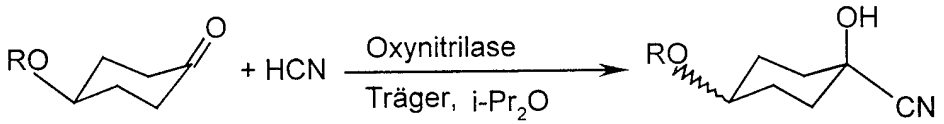
Tabelle 2

			Cyanhydrin 2		Blindprobe	
R	U/mmol	t [h]	Umsatz [%]	IV cis/trans [a] [%]	Umsatz [%]	cis/trans [%]
Methyl-	100	2	99	35:65		
Ethyl-	100	3	93	74:26	<0,5	n.b. [b]
Propyl-	100	5	96	96:4	<1	n.b.
*iso*Propyl-	100	5	93	97:3	<1	n.b.
tert.-Butyl	100	3	82	99:1		
Ethoxy-	100	1	99	61:39		
Propoxy-	100	2	91	87:13		
Phenyl-	100	3	95	99:1		

[a] Isomerenverhältnis nach Acetylierung mit Dimethylaminopyridin und Acetanhydrid gaschromatographisch bestimmt.

[b] Nicht bestimmt

Beispiel 8

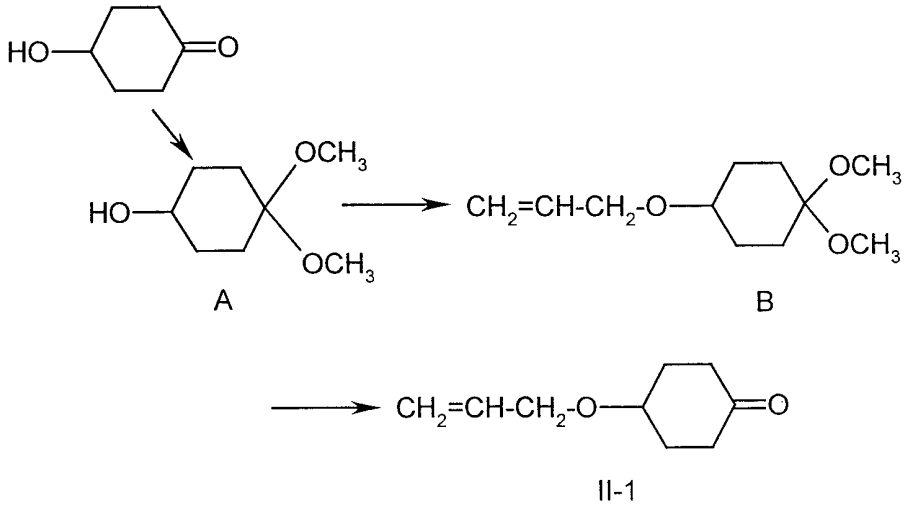


	(R)-Oxynitrilase aus Bittermandeln			(S)-Oxynitrilase aus Maniok		
R	Rkt.-dauer [h]	Umsatz [%]	Isomerenverhältnis cis:trans	Rkt.-dauer [h]	Umsatz [%]	Isomerenverhältnis cis:trans
Allyl-	22	97	8:92	3	99	87:13
i-Butyl-	46	18	16:84	46	52	90:10

Blindproben ohne Enzym

R	Rkt.-dauer [h]	Umsatz [%]	Isomerenverhältnis cis:trans
Allyl-	22	17	45:55
i-Butyl-	46	2	53:47

Beispiel (II-1)



Herstellung der Verbindung A

94 g käufliches 4-Hydroxycyclohexanon in 275 ml ortho-Ameisensäuretrimethylester werden bei Raumtemperatur mit 260 g Methanol und 5 mg para-Toluolsulfonsäure in 20 ml Methanol versetzt und 10 Minuten unter Rückfluß gekocht. Dann wird bei ca. 0°C mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und eingeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel mit dem Laufmittel Hexan/Aceton 7/3 chromatographiert.

Ausbeute: 125 g (95 % der Theorie).

Herstellung der Verbindung B

Zu 200 g der Verbindung A in 1500 ml tert.-Butanol gibt man bei Raumtemperatur 150 g Kalium-tert.-butylat und 151 g Allylbromid und rührt einen Tag bei ca. 60°C. Dann wird mit Wasser verdünnt, mit Methylenchlorid extrahiert und die organische Phase eingeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel mit dem Laufmittel Hexan/Aceton 10/1 chromatographiert.

Ausbeute: 215 g (86 % der Theorie).

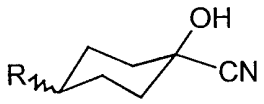
Herstellung der Verbindung (II-1)

233 g der Verbindung 3 werden in 1000 ml Tetrahydrofuran (THF) und 750 ml 1N HCl 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird mit Wasser versetzt und mit Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wird eingeengt.

Ausbeute: 157 g (88 % der Theorie).

Patentansprüche

1. Verfahren zur stereoselektiven Herstellung von Cyclohexylcyanhydrinen der Formel (I)

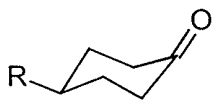


(I)

worin

R für jeweils gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Cycloalkyl (worin gegebenenfalls eine Methylengruppe durch Sauerstoff ersetzt ist), Alkoxy, Alkenyloxy, Cycloalkyloxy, Arylalkyloxy oder Aryl steht,

dadurch gekennzeichnet, daß man Cyclohexanone der Formel (II)



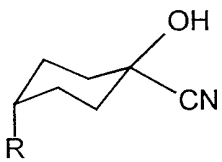
(II)

worin

R die obengenannten Bedeutungen hat,

in Gegenwart einer Oxynitrilase und gegebenenfalls in Gegenwart eines Verdünnungsmittels mit einer Cyanidquelle umsetzt.

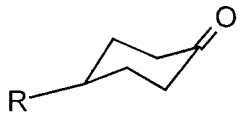
2. Verfahren zur Herstellung von trans-Cyclohexylcyanhydrinen der Formel (Ib)



(Ib)

worin

R die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen hat, durch Umsetzung von Cylcohexanonen der Formel (II)



(II)

mit einer Cyanidquelle in Gegenwart von (R)-Oxynitrilase aus Bittermandel und gegebenenfalls in Gegenwart eines Verdünnungsmittels.

3. Die nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1 erhältlichen Cyclohexylcyanhydrineisomerenmischungen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ EP 99/ 03464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER [6]:
IPC6: C12P 13/00, C12P 41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC6: C12P

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0799894 A2 (DEGUSSA AKTIENGESELLSCHAFT), 08 October 1997 (08.10.97)	1-3
A	DE 4102327 C1 (DEGUSSA AG), 04 June 1992 (04.06.92)	1-3
A	WO 9311255 A1 (NIEDERMEYER, UWE), 10 June 1993 (10.06.93)	1-3

-/--

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 October 1999 (08.10.99)	01 November 1999 (01.11.99)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/03464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent familiy member(s)	Publication date
EP 0799894 A2	08/10/97	DE 19703314 A	14/08/97
		JP 2812933 B	22/10/98
		JP 9227488 A	02/09/97
		US 5885809 A	23/03/99
DE 4102327 C1	04/06/92	NONE	
WO 9311255 A1	10/06/93	AU 4028893 A	28/06/93
		DE 4139987 C	15/04/93
		EP 0576638 A	05/01/94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/03464

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C12P 13/00, C12P 41/00
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C12P

Recherte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0799894 A2 (DEGUSSA AKTIENGESELLSCHAFT), 8 Oktober 1997 (08.10.97)	1-3
	--	
A	DE 4102327 C1 (DEGUSSA AG), 4 Juni 1992 (04.06.92)	1-3
	--	
A	WO 9311255 A1 (NIEDERMEYER, UWE), 10 Juni 1993 (10.06.93)	1-3
	--	

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.

☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachman naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
8 Oktober 1999	01. 11. 1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europaisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel(+31-70)340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax(+31-70)340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Carolina Gómez Lagerlöf/EÖ

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/03464

Im Recherchenbericht angefurtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0799894 A2	08/10/97	DE 19703314 A	14/08/97
		JP 2812933 B	22/10/98
		JP 9227488 A	02/09/97
		US 5885809 A	23/03/99
DE 4102327 C1	04/06/92	KEINE	
WO 9311255 A1	10/06/93	AU 4028893 A	28/06/93
		DE 4139987 C	15/04/93
		EP 0576638 A	05/01/94