

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶	(45) 공고일자	1997년06월07일
C12P 13/00	(11) 공고번호	특1997-0009155
C12N 11/08	(24) 등록일자	1997년06월07일
(21) 출원번호	(65) 공개번호	특1999-0000001
(22) 출원일자	(43) 공개일자	1993년11월30일
(86) 국제출원번호	(87) 국제공개번호	W0 93/12072
(86) 국제출원일자	(87) 국제공개일자	1993년06월24일

(30) 우선권주장	809,803	1991년12월17일	미국(US)
------------	---------	-------------	--------

(73) 특허권자	에프엠씨코포레이션 미합중국 펜실베니아 19103 필라델피아 마켓트 스트리트 1735
(72) 발명자	스테펜 월터 앤드러스키 미합중국 뉴저지 08520 하이츠타운 트윈 리버스 드라이브 노쓰 718 브루스 골드버그
	미합중국 뉴저지 07012 클립튼 래보나 스트리트 48
(74) 대리인	김창세, 김 영, 장성구

심사관 : 송재옥 (책자공보 제5049호)(54) 효소를 사용한 광학 활성 시아노히드린의 제조방법**요약**

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

효소를 사용한 광학 활성 시아노히드린의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 시아노히드린의 제조방법에 관한 것이다.

보다 특히, 본 발명은 알데히드를 S-옥시니트릴라제 효소의 존재하에 하이드로시안산과 반응시킴을 포함하는, 공지된 피레트로이드 살충제의 제조에 중간체로 유용한 광학적으로 활성인 (S)-시아노히드린의 개선된 제조방법에 관한 것이다.

알데히드를 효소 옥시니트릴라제와 용매 디이소프로필 에테르이 존재하에 하이드로시안산과 반응시켜 광학적으로 활성인 시아노히드린을 제조하는 방법은 예를들면 본원에 참고로 인용된 에펜버거(Effenberger)등의 미합중국 특허 제4,859,784호에서 알려져 있다. 상기 특허에 교지되어 있듯이, 상기 반응은, 생성물을 회수하기 전에 먼저 용액을 걸러내야 하는 슬러리 형태로, 고정화된 형태, 예를들어 유리구, 이온-교환 수지 또는 셀룰로즈 입자의 표면에 결합된 효소를 사용하여 수행한다. 상기 방법은 의도한 목적에 효과적이진 하지만, 반응물을 고정화 효소에 단지 1회만 통과시키며, 상기 통과과정은 완료되는데 5 내지 6일이 소요됨을 특징으로 한다. 유사하게, 쿨라(Kula) 등의 오스트레일리아 특허원 제38104/89호는 효소 S-옥시니트릴라제를 특정 공급원(소르ghum bicolor))로부터 유래시키는 유사한 공정을 교지하고 있다. 이 공정에서는, 한 태양으로 효소를 고정화시키기 위한 아크릴계비이드, 즉 반응 매질 또는 칼럼에 혼탁하기에 유용한 상업적으로 시판하는 아크릴계 비이드인 유퍼제이트(Eupergit)^R C(다름스타트 소재의 Rohm사 제품)를 사용한다. 어느 경우에도, 상기 비이드는 다양한 유기 용매에 의해 아크릴계 비이드가 손상되는 것을 피하기 위해 수계중에서만 사용하여야 한다. 다우기, 결합된 효소를 사용하는 상기 후자의 공정에서는, 알데히드로서 4-하이드록시벤즈알데히드를 사용하여 3일간 연속 실시한 후에만 약 85중량%의 수율이 얻어진다. 또한 네이더메이어(Neidermeyer)의 미합중국 특허 제5,008,192, 유럽 특허 제326,063호 미합중국 특허 제3,862,030호, 및 독일 공개 특허 제3823864 A-1호(이들은 전술한 미합중국 및 오스트레일리아 특허에 상응한다)를 참조하시오.

상기 특허들 각각에서, 효소-격막-반응기가 언급되어 있다. 그러나, 상응하는 기술 문헌들에서 알 수 있듯이(예를들면, 문헌[Engineering Aspects of Enzyme Engineering, and footnotes 16and 17 therein, that is, Kragl et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 613, pp, 167-175(1990); 둉 Vasic-Racki et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, pp.215-222(1989)]참조), 상기 반응기들은 당시 효소가 물리적으로 투과할 수 없는 여과막에 의해 분리된 일련의 용기를 나타낼 뿐이다. 따라서, 상기 효소가 물리적으로 투과할 수 없는 여과 막에 의해 분리된 일련의 용기를 나타낼 뿐이다. 따라서, 상기 타입의 반응기에서, 반응은 분산된 효소를 함유하는 용액상태로 수행된 후, 반응물은 결국 확산에 의해 접촉하게 된다.

종합체성 막 반응기를 사용하여 효소를 결합시키는 것은 일반적으로 브루스 에스, 골드버그(Bruce S. Goldberg)의 미합중국 특허 제4,102,746호에서 공지되어 있다. 또한 상기 2개 미합중국 특허의 막 반응기를 더욱 기술하고 있는 문헌[A Novel Immobilized Enzyme Reactor System, Bruce S. AICHE, Goldberg, presented at the 27th Annual Spring Symposium Session on Non-Conventional Reactor Systems, AICHE, East Brunswick, N. J., May 10, 1984]을 참조하시오. 상기 2개 특허와 1984년 5월 10일자 AICHE presentation은 또한 본 원에 참고로 인용된다.

본 발명에 따르면, 촉매 효소 S^{L} -옥시니트릴라제 및 용매의 존재하에 알데하이드를 하이드로시안산과 반응시켜 광학적으로 활성인 S^{L} -시아노히드린을 제조하는 또 다른 공정에서의 반응 시간 및 반응물의 취급 용이성이, 알데하이드와 산의 용액을 S^{L} -옥시니트릴라제 효소가 화학적으로 결합된 하기에 정의하는 바와 같은 화학적 활성화된 다공성막에 통과시키는 경우 전술한 방법에 비해 상당히 향상될 수 있다.

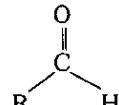
즉, 입체선택성 촉매의 부재하에 시아노히드린의 S^{L} - 및 R^{L} -거울상이성체 형태가 통상적으로 동량으로 형성되는 반면, 즉 50:50의 비로 존재하는 반면에, 본 발명의 목적은 개선된 촉매 및 반응 조건으로 적절히 선택함으로써 R^{L} -이성체에 대한 S^{L} -이성체의 비(S/R)를 증가시키는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 S^{L} -대 R^{L} -이성체의 선택성을 증가시키는 것 뿐 아니라, 가능한 한 짧은 시간내에 생성물로의 높은 전환율을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 최종 생성물로부터 효소를 물리적으로 분리함 없이 상기 목적들을 달성하는 것이다.

목적하는 광학적으로 활성인 시나오히드린을 제조하는 본 발명의 공정은 전술한 바와 같이, 즉 회분식 또는 연속 방법으로 선정된 시간동안 알데하이드와 하이드로시안산의 용액을 효소가 화학적으로 결합된 상기 정의한 다공성 막에 통과시키고 목적하는 광학적으로 활성인 시아노히드린을 회수함으로써 용이하게 수행된다. 상기와 같이 수행하는 경우, 놀랍게도 상기 선행 방법에 비해 목적하는 S^{L} -이성체에 대한 선택성 뿐 아니라 생성물의 전체 수율을 유지하거나 또는 몇몇 경우에는 증가시키는 동시에, 반응시간을 선행 방법의 6 또는 7일 이하에 반해 1일 정도로 감소시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 역으로, 및 보다 바람직하게는, 선행 기술에 따른 수일의 기간, 예를들면 6 내지 7일 이하의 기간을 이용하는 경우 상기 방법에 의해 전체 수율이 비례적으로 증폭될 수 있음을 알 것이다.

바람직하게, 상기 반응은 실질적으로 수-불용성이 알데하이드 및 생성된 시아노히드린이 용해될 수 있는 유기 시스템 중에서 수행하여야 한다. 소량의 수성 완충제, 즉 시스템의 총중량을 기준으로 약 1중량% 이하의 물을 사용할 수도 있지만, 가능한한 소량, 즉 약 0.03% 이하의 물을 사용하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 필수적으로, 하기에 상세히 설명하는 바와 같이, 유기 용매로 이루어진(임의로 수성 완충제를 함유하는)시스템, 알데하이드와 산 반응물, 및 정의한 다공성 막에 화학적으로 결합된 효소를 포함한다.

반응은 광범위한 온도 및 pH 조건하에서 수행할 수도 있지만 중요한 것은 아니다. 따라서, 예를들면 약 -6°C 내지 +30°C, 바람직하게는 약 +6°C 내지 +25°C의 온도가 허용될 수 있다. pH 조건은 중요한 것은 아니지만, 아세트산 나트륨, 시트르산 나트륨 또는 인산 나트륨과 같은 완충제 시스템에 의해 조절할 수 있으며, 약 3.5 내지 7.5의 pH 범위일 수 있다.

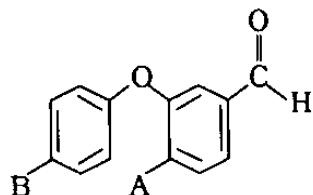
사용된 알데하이드는 통상적으로, 예를들면(절술한) 미합중국 특허 제4,859,784호에 교지되어 있으며, 상



기 특허는 본 원에 참고로 인용된다. 상기 특허에 기술된 바와 같이 일반식 (여기서, R은 할로겐으로 치환될 수도 있는 포화 또는 불포화, 지방족 또는 방향족의 황-, 질소- 또는 산소-함유 치환체일 수 있다)의 알데하이드가 상기 특허에 포함된다.

상기 공정을 위해 선택된 알데하이드는 바람직하게는 거의 수-불용성이어야 한다. 즉 이들은 본 발명의 유기 용매에 우선적으로 가용성이어야 한다. 따라서, 약 2.0 내지 0.01mg/ml 미만의 수중 용해도를 갖는 알데하이드가 바람직하며, 0.1mg/ml 미만 내지 약 0.01mg/ml 까지의 용해도를 갖는 알데하이드가 가장 바람직하다. 상기 수-불용성 알데하이드의 예로는 하기 일반식으로 나타내는 것들이 포함된다 :

화학식 1



상기식에서, A는 수소 또는 불소이고, B는 수소, 불소, 염소 또는 브롬이다. 이들 중에서, 3-페녹시 벤즈 알데하이드가 바람직하다.

알데하이드 대 하이드로시안산의 물비는 약 1:1내지 1:100이 바람직하며, 약 1:1 내지 1:2 가 보다 바람직하다.

사용된 유기 용매의 성질은 사용된 막 또는 반응 성질에 해로운 영향을 미치지 않는 것들 중에서 쉽게 선택할 수 있다.

따라서, 예를들면 한편으로는 디-n-부틸 에테르를 사용하는 것이 바람직한 반면, (전술한) 미합중국 특허 제4,859,784호의 공정에 사용된 디이소프로필 에테르는 예기치 않게 본 발명의 공정을 작업 불가능하게 만드는 것으로 밝혀졌다.

S-옥시니트릴라제 효소 측매(EC 4.1.2.11)는 시그마 케미칼 캄파니(Sigma Chemical Co.)에서 상업적으로 시판하거나, 또는 공지된 방법으로 소르검 종으로부터 단리할 수도 있다(문헌[Bove et al., J. Biol. Chem., 226(1), 207(1961)]참조). 알데하이드에 대한 효소의 사용량은 알데하이드 g당 효소 약 50 내지 2500 유니트가 바람직하며, 보다 바람직하게는 알데하이드 g당 약 500 내지 750 유니트이다. 효소는 하기에 기술하는 다공성막을, 예를들면 폴리 에틸렌이민의 5 중량% 수용액으로 처리하고, 마지막으로 적절한 완충제중의 S-옥시니트릴라제 효소 용액으로 처리함으로써 상기 다공성 막에 화학적으로 결합시키는 것이 편리할 수도 있다.

유리하게, 상기 효소는 한번에 수일동안 막에 고착된 채 유지되므로, 선행 기술의 방법에 비해 보다 안정하고 내구성이 배열을 나타낼 뿐 아니라, 미합중국 특허 제4,859,784 미 5,008,192호에서와 같은 슬리리 형태의 효소의 분리 및 회수와 같은 과정의 단계가 배제된다.

본 발명에 사용된 다공성 막은(전술한) 미합중국 특허 제4,102,746호에 상세히 기술되어 있으며, 상기 특허는 이들 효소-결합 물질, 이들을 제조하기 위한 특성 및 방법, 및 다양한 상기 물질들상에 효소의 고착 및 회수를 정의하고 있다. 기본적으로, 선정된 두께 및/또는 총을 갖는 이들 막은 미분 충진제 입자가 전체에 분산되어 있는 불용성의 3차원적 중합체성 수지상 결합제 및 그 중에 기공이 실질적으로 상호연결되어 있는 망상구조로 이루어지며, 이때 기공 크기는 매우 광범위할 수 있으며 약 0.01 내지 약 100 μ m이 가장 바람직하고, 상기 물질의 전체 다공도는 약 50 내지 75%이고, 상기 분산된 충진제 입자는 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 약 25중량%의 양으로 존재한다.

상기 막의 한가지는 70 내지 80% 범위의 기공 부피를 갖는 미공성 폴리(비닐 클로라이드)-실리카사이트인 MPS^R 막(미합중국 펜실바니아 필라델피아 소재의 에프엠씨 코포레이션)이다. 수은 관입 다공도측정계(Mercury Intrusion Porosimetry)로 측정할 때 기공 크기는 일반적으로 0.2 μ m 내지, 2.0 μ m 범위이다.

상기 지지체는 대단히 친수성이며, 양전하로 변화될 수 있는 음전하 및 80 m^2/g 의 표면적을 갖는다. 또한, 상기 물질은 표준 조건하에서 비-압착성이며, 0.45g/ m^2 의 낮은 건조 밀도를 갖는다.

활성부위는 다공성 매트릭스내에 함유된 실리카겔상에 존재하며 이로써 실리카 결합 화학에 의해 유기 작용기의 부가가 가능하게 된다. 상기 MPS막은 적어도 약 260 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 DNA 결합 용량을 갖는다. 더욱이, 상기 막 뿐 아니라, 본 발명에 사용할 수 있는 기타 적합한 막은 보통 수성 환경하에서만 사용되지만, 놀랍게도 본 발명 공정의 유기 용매 조건하에서 안정한 것으로 밝혀졌다.

막중의, 결합체를 형성하는 중합체, 즉 매트릭스는 매우 다양할 수 있으나, 그의 폴리(비닐 클로라이드)(PVC)가 바람직한 열가소성의 상업적으로 시판하는 수지가 바람직하다. 그러나, 실리카로 충진된 폴리에틸렌, 또는 PVC와 소량의 모노에틸렌성 단량체와의 공중합체(예를들면, 비닐 아세테이트, 비닐 리덴 클로라이드, 프로필렌 등)와 같은 물질들도 또한 사용할 수 있다. 또는, 폴리 테트라플루오로에틸렌(PTFE), 셀룰로즈 아세테이트 또는 트리아세테이트, 폴리아미드(예:나일론)등과 같은 물질로부터 매트릭스를 형성시킬 수도 있다. PTFE는 사용할 경우, 예를들면 그 종에 친수서인 흡수성 입자가 흔입된 섬유 매트릭스(미합중국 특허 제4,152,661호 및 4,373,519호)의 형태일 수 있다. 따라서, 일반적으로, 용매에 의해 용이하게 형성될 수 있고, 본 발명의 조건하에서 화학적 및 물리적으로 안정한 임의의 열가소성 수지를 또한 사용할 수도 있다.

바람직하게는 입상 형태의 충진제는 무기 물질, 예를들면 전술한 실리카 화합물, 또는 산화 또는 수산화 알루미늄과 같은 알루미늄 화합물; 또는 유기 충진제, 예를들면 활성 셀룰로즈 유도체를 비롯한 폴리사카라이드 둘 다를 포함할 수 있다(다른 한편으로 비활성화 셀룰로즈는 PVC와 함께 비효과적인 것으로 밝혀졌다).

생성된 막은 상기 막과 효소사이에, 즉 충진제 입자와 효소사이에 화학적 결합제를 제공하기 위해 공지된 방법으로 처리함으로써 활성화될 수도 있다. 상기 결합은 화학흡착, 공유결합 또는 중간 물질과 효소사이의 가교결합에 의해 일어날 수도 있다. 막에 제동될 수도 있는 결합 작용기중에는 임의의 유리아미노 작기뿐 아니라, 카복실, 이소니트릴, 알데하이드, 또는 케톤 그룹이 포함되며, 이들은 S-옥시니트릴라제 효소를 막 충진제에 결합시킬 것이다. 이들 중에서, 충진제상에 화학흡착될 수도 있는 폴리에틸렌 이민(PEI)이, 예를들면 글루타르알데하이드(효소가 다으로 여기에 결합된다)와 함께 바람직하다.

전술한 미합중국 특허 제4,102,746호에 개시된 바와 같이, 본 발명이 공정에 사용되는 막은 적당량의 미분 중합체 수지, 미분 무기 충진제, 용매(예:사이클로헥사논) 및 비-용매(예:물)를 낮은 전단 조건하에 혼합하여 안정하고 습윤성인, 유동성이 없는 분말을 생성함으로써 쉽게 제조할 수 있다. 이어서, 상기 분말 혼합물을 바람직하게는 압연시켜 목적하는 칫수의 거의 평면구조 또는 사이트를 형성시키고, 이어서 이것을 수성 욕조에 통과시켜 용매를 걸러낸 후, 연속하여 가열된 공기-오븐에 통과시켜 물을 제거할 수 있다. 그런 다음 본 발명에 따라서, 미공성의 칫수적으로 안정한 바, 반-강성, 불용성의 유체 투과성 막 형태의 생성된 제품을 효소를 상기 막에 커플링 또는 결합시키는 방식으로 처리할 수 있다.

한가지 바람직한 태양으로, 초기의 비-화학적으로 활성화된 막은 하기 방법으로 제조할 수도 있다:

180 μm 체(80매쉬)에 통과될 입자 크기를 갖는 Conoco^{TN} 5385 폴리(비닐 클로라이드)수지 20.0 l b(9.07kg) 및 침전된 수화 실리카인 Hi Sil^{TN} 233 40.0 l b(18.14kg)을 패터슨 켈리(Patterson Kelley) 저 전단 액체-고체 블렌더에서 약 3분간 먼저 건식 블렌딩시켜 다공성 물질의 사이트를 제조한다. 그런후에, 계속 교반하면서, 펌프를 사용하여 54.6 l b(26.8kg)의 물을 교반 블렌더중에서 후속 20분간 혼합물에 가하여 습윤성의 안정한 유동성이 없는 분말을 생성시킨다. 그런후에, 상기 분말을 약 120°C(48.9°C)의 배럴 온도를

갖는 스크루 압출기 내에 도입시키고, 압출물을 캘런더 둘 사이로 통과시켜 0.02인치(0.5fmm)의 두께를 갖는 거의 편평한 사이트를 수득한다. 이어서 상기 사이트를 170° F(76.7°C)에서 추출용 수욕에 통과시키고 연속하여 225° F(107.2°C)의 뜨거운 공기 오븐에서 6분간 건조시킨다. 완성된 다공성 사이트는 약 0.01 μ 내지 약 100 μ 까지의 비교적 광범위한 기공 크기 분포 및 수은 관입 방법으로 측정할 때 약 0.15 μ 내지 약 0.25 μ 범위의 평균 기공 직경을 갖는다. 상기 물질의 총 다공도는 약 65부피%이며, 분산된 충진제 성분(예:실리카)은 약 56중량%를 차지한다. 통상적인 시험에서, 예를들면 물은 압력을 걸어줄 필요없이 물질중에 신속히 침지될 것이며, 이것은 미공이 실질적으로 표면에서 표면으로 상호연결되어 있음을 말해준다.

그런 후에, 상기 제조한 막은 하기 수단에 의해, 경우에 따라 결합체를 사용하여 화학적으로 개질되어 S-옥시니트릴제를 보다 강하게 결합시킬 수 있다. 미처리된 막을 50,000몰 종량의 분지쇄 폴리에틸렌이민(PEI)의 5%(w/v) 수용액중에서 실온에서 1시간 동안 항온처리한다. 처리된 지지체를 물 및 1M NaCl로 플러싱하여 임의의 흡착되지 않은 PEI를 제거한다. 분석은 트리니트로벤젠 살포산 시험에 의해 수행할 수도 있다. 처리된 지지체 부재의 표면상에서 진한 오렌지색 트리니트로페닐아민 유도체가 관찰되므로, 이것은 충분한 지방족 아미노 작용기를 입증하는 것이다. 처리된 지지체 부재상에 질소 부하는 원소 분석에 의해 정량한다. 예를들면 건조 중량 기준으로 1.25% 질소 대 미처리 지지체 부재중의 0.02% 질소이다. 처리된 지지체 부재상의 PEI의 화학흡착은 실질적으로 비가역적이다. 즉, 3 내지 9의 pH 값에 불고 이온 농도 용액(예를들면, 1M NaCl 또는 1MK₂HOP₄/KH₂PO₄)과 함께 항온 처리함으로써 제거될 수 없다. 강 산성 조건의 경우(1M HCl 중에서 2시간동안 항온처리)에만 원소 분석에 의해 알 수 있듯이 질소 함량의 50%에 이르는 부분 탈착이 분명히 나타난다. 표준 BET 절차에 의해 처리된 지지체의 표면적은 대조용에 대한 81.1M²/g에 대해 55.4M²/g이다. PEI로 처리한 지지체 부재는 사용된 완충제 또는 이온 농도에 무관하게 미치리된 지지체 부재와 동일한 흐름 흐름 특성을 나타낸다. 이어서, 전술한 바와 같이 먼저 PEI에 의해 화학적으로 활성화된 후 효소가 궁극적으로 결합되는 글루타르알데하이드와 같은 연결 그룹에 의해 활성화된 막에 효소를 결합시킨다. 그런후에, 반응물을 이들이 막의 기공을 통해 흐를 때 효소와 접촉하도록 한다. 반응 매질의 흐름은, 막의 가장자리를 유지하여 반응기 유니트를 형성함으로써 이들 가장자리가 상기 흐름에 불투과성이 되도록 하는 하우징(housing) 또는 훌더에 막 또는 막의 층을 지지시켜 조절하는 것이 바람직하다. 경우에따라, 막의 표면에 근접함으로써 반응물을 반응기 코어의 기공을 향하도록 하여 강제로 반응기 코어의 기공을 통과하도록 하며 효소와 접촉하게 하는 유입구 및 유출구도 또한 제공될 수 있다. 디스크 형태의 전형적인 상기 타입의 반응기로는 ACTI-DISK^R 및 ACTI-MOD^R(미합중국 펜실바니아 필라델피아 소재의 에프엠씨 코포레이션)가 포함된다. 상기에서 후자의 디스크는 특히 여러층의 막으로 이루어져 보다 완전히 회수되도록 한다.

그러므로, 막이란 용어는 필요한 최종 두께가 통상적인 시험에 의해 쉽게 결정될 수 있는, 하나 이상의 막의 층을 포함하는 것이라 설명을 잘 알 것이다. 따라서, 하기 실시예에서, ACTI-DISK^R 내트릭스는 1 내지 약 5개의 막의 층, 예를들면 실시예 2,3,6 및 7에서 하나의 막, 및 실시예 1,4, 및 5에서의 5개 층을 함유한다.

그런후에, 종류에 의해 하이드로시안산 및 용매를 제거하므로써 목적하는 시아노하이드린 반응 생성물을 회수할 수 있다.

본 발명은 하기 실시예에 의해 더욱 예시된다. 본원에 사용된 바와 같이, 체 크기는 ASTM 표준 E11-87에 따라 표시된다.

실시예 1

주위 온도에서 디-n-부틸 에테르중의 시안화수소 및 3-페녹시벤즈알데하이드로부터 (S)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올의 제조

단계 A 다공성 매트릭스상에 S-옥시니트릴라제 효소의 고정화

폴리(비닐 클로라이드) 및 실리카 막(MPS^R 사이트 펜실바니아 필라델피아 소재의 에프엠씨 코포레이션)을 함유하며 폴리에틸렌이민으로 예비처리한 ACTI-DISK^R 지지체 매트릭스를 표준 펌프식 반응기내에 흔입시켰다. 상기 반응기는 투명하고 가요성인 관에 의해 그의 유출구로부터 ACTI-DISK^R 지지체매트릭스의 유입구에 연결되고, 상기 지지체 매트릭스는 차례로 그의 유출구로부터 100mL 수용기에 연결된, 최대 10mL/분을 펌핑할 수 있는 유체 계량 펌프로 이루어졌다. 상기 수용기는 관에 의해 펌프 유입부에 연결된다. ACTI-DISK^R 지지체 매트릭스(펜실바니아 필라델피아 소재 에프엠씨 코포레이션사, 생체지지 물질, 화학적 생성물 그룹)는 그의 편평면중 하나상에 유입구를 가지고 그 반대쪽 편평면상에 유출구를 갖는, 직경 63.5mm 및 두께 6.4mm 플라스틱 하우징으로 이루어졌다. 플라스틱 하우징내에는 폴리(비닐 클로라이드)의 소수성 중합체 매트릭스, 수지상 매트릭스 전체에 분산된 실리카의 미분진수성 충진제 및 물질 전체에 형성된 상호연결된 미공의 망상구조로 이루어진 유체 투과성 다공성 막의 5개층이 함유되었다.

효소의 N-말단의 PE-개설된 IACTI-DISK에 연결시키기 위해, 25mL의 5%(w/v) 글루타르알데하이드 수용액을 수용기에 불고, ACTI-DISK^R 지지체 매트릭스를 통해 60분간 8mL/분의 속도로 펌핑시켰다. 용액을 50mL의 물로 대체하고, ACTI-DISK^R 지지체 매트릭스를 통해 30분간 펌핑시켰다. 이어서, 물을 수용기로부터 제거하였다.

7일된 암황화(etiolated) 소르검/수단 그래스(Sorghum/Sudan grass) 하이브리드로부터 수득된 S-옥시니트릴라제 효소(단백질 분석: 5.4mg 단백질/mL: 효소 활성 분석: 10.7 유니트/mg 단백질)의 수영액 28mL를 0.05M 아세트산 나트륨 완충제(pH=5.4)용액을 사용하여 100mL로 희석하여 수용기에 넣었다. 용액을 ACTI-DISK^R 지지체 매트릭스를 통해 30분간 펌핑시켰다. 이 시간이 지난후에, ACTI-DISK^R 지지체 매트릭스를 통한 흐름을 펌프식 반응기에서 역전시켜 효소의 완전하고 균일한 부하를 촉진시켰다. 효소 용액을 30분간 더 지속하여 펌핑시켰다. 이어서, ACTI-DISK^R 지지체 매트릭스를 전술한 바와 같이 50mL의 물로 30분간 세척하

였다.

그런후에, S-옥시니트릴라제 효소가 고정화된 ACTI-DISK지지체 매트릭스를 함유한 하우징을 펌프식 반응기로부터 꺼내고 필요할 때까지 냉장고에 보관하였다.

단계 B 주위온도에서 디-n-부틸 에테르중의 시안화 수소 및 3-페녹시벤즈알데하이드로부터(S)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올의 제조

고정화 효소를 함유하는 상기 단계 A의 ACTI-DISK지지체 매트릭스를 표준 펌프식 반응기내에 훈힙시켰다. 이 시스템에서 수용기는 250m^l 이상의 용량을 갖는다. ACTI-DISK지지체 매트릭스를 통해 소량의 디-n-부틸 에테르를 연속적으로 약 30분간 펌핑시켜 잔류하는 물을 ACTI-DISK지지체 매트릭스로부터 제거하였다.

전형적인 배치로, 수용기에 디-n-부틸 에테르 100m^l중의 3-페녹시벤즈알데하이드 5.1g(0.026mole) 내지 24.8g(0.125mole)의 용액을 공급하였다. 여기에, 주사기로 1.1몰 당량의 시안화 수소를 가하였다. 용액을 교반시켜 시안화 수소를 완전히 용해시켰다. 1m^l/분 내지 5m^l/분의 펌프 속도로 ACTI-DISK지지체 매트릭스를 통해 용액을 순환시키는 것을 개시하였다. 하기에 기술하는 바와 같은 분석용으로 샘플을 주기적으로 취하였다. 반응이 종결되면(전형적으로 약 24시간 후에), 반응 혼합물을 반응기로부터 펌핑시켰다. 이어서, ACTI-DISK지지체 매트릭스를 통해 디-n-부틸 에테르 25m^l를 펌핑시킴으로써 상기 매트릭스를 세정하였다. 세정후에, 반응기는 양호한 상태로 또다른 배치공정에 적용된다.

반응 혼합물로부터 수거한 각 샘플에 대해 2가지 분석을 수행하였다. 한가지 분석은 3-페녹시벤즈 알데하이드의 (시아노)(3-페녹시페닐)메탄올로의 총 전환율을 측정하기 위해 수행한 반면, 2번째 분석은 상기와 같이 제조된 생성물의 S/R 비를 측정하기 위해 수행하였다.

(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올로의 전환율을 측정하기 위해, 반응 혼합물의 샘플 0.1m^l를 가스 크로마토그래피 자동샘플 채취기의 바이알에 넣고 메틸렌 클로라이드를 사용하여 약 1m^l로 희석하였다. 여기에, 약 1m^l의 N,O-비스(트리메틸실릴)트리플루오로 아세트아미드를 가하였다. 바이알을 폐쇄하여 진탕시킨 후, 15분간 정착시켰다. 용액 샘플을 적절히 프로그래밍된 가스 크로마토그래피 내에 주입하였다.

(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올의 S/R 비를 측정하기 위해, 반응 혼합물의 0.5m^l 샘플을 1g바이알에 넣었다. 여기에 3방울의 모셔(Mosher)산 클로라이드(S)-(−)- α -(트리플루오로메틸 페닐아세트산 클로라이드) 및 5방울의 피리딘을 가하였다. 생성된 반응 혼합물을 혼합한 후 1시간동안 반응시켰다. 그런후에, 물 1m^l와 에틸 아세테이트 m^l를 반응 혼합물에 가하였다. 혼합물을 진탕시키고, 에틸 아세테이트 층을 제거한 후 가스 크로마토그래피 자동샘플채취기 바이알에 넣었다. 용액의 샘플을 적절히 프로그래밍된 가스 크로마토 그래프에 주입하였다.

(S)-(시아노)-(3-페녹시페닐)메탄올을 제조하기 위한 7개-배치 공정의 결과를 하기에 나타낸다.

[표 1]

실시	알 데하이드 (몰)	펌프 속도	실시 시간	생성물로의 전환율	S/R 비
1	0.026	1m ^l /분	24시간	76.3%	91.4/8.6
2	0.026	5m ^l /분	23시간	91.8%	91.4/8.6
3	0.026	5m ^l /분	19시간	88.4%	92.4/7.6
4	0.026	5m ^l /분	24시간	91.2%	93.7/6.3
5	0.125	5m ^l /분	24시간	94.0%	91.0/9.0
6	0.125	5m ^l /분	24시간	90.7%	85.7/14.3
7	0.026	5m ^l /분	24시간	80.7%	75.5/24.6

실시예 2

6°C의 온도에서 디-n-부틸 에테르중의 시안화 수소 및 3-페녹시벤즈알데하이드로부터 (S)-(시아노)-(3-페녹시페닐)메탄올의 제조

이 실시예의 (S)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올은 실시예 1에 기술한 바와 같은 공정에 의해 제조하였다. 펌프식 반응기는 ACTI-DISK지지체 매트릭스가 S-옥시니트릴라제 효소가 고정화되는 유체투과성 미공성 부재의 하개 층만을 함유한다는 점에서 다르다. 본 공정에 사용된 ACTI-DISK지지체매트릭스는 6°C에서 유지시키는 항온 옥조에 침지시켰다. 총 16개의 배치를 반응시켰다. 각 배치는 디-n-부틸에테르 25m^l중의 3-페녹시벤즈알데하이드 1.0g(0.005몰) 및 시안화 수소 0.4 내지 0.5m^l(과량)로 이루어졌다. 펌프 속도는 4 내지 5m^l/분으로 유지하였다. (S)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올을 제조하기 위한 16개 배치공정의 결과를 하기에 나타낸다.

[표 2]

실시	실시 시간	생성물로의 전환율	S/R 비
8	23시간	70.0%	95.0/5.0
9	26시간	65.8%	93.2/6.8
10	24시간	62.8%	94.0/6.0
11	24시간	65.7%	93.0/7.0
12	27시간	63.9%	93.0/7.0
13	24시간	65.9%	93.4/6.6
14	36시간	76.9%	93.0/7.0
15	24시간	75.0%	93.5/6.5
16	23시간	78.2%	95.0/5.0
17	24시간	77.1%	96.0/4.0
18	23시간	76.4%	95.0/5.0
19	24시간	72.7%	94.5/5.5
20	24시간	69.2%	93.0/7.0
21	24시간	70.2%	90.0/10.0
22	24시간	68.2%	87.0/13.0
23	24시간	56.1%	81.0/19.0

실시예3

주위 온도에서 3급-부틸 메틸 에테르중의 시안화 수소 및 3-페녹시벤즈알데하이드로부터 (S^-)-(시아노)(3-페녹시페닐) 메탄올의 제조시 실시예의 (S^-)-(시아노)(3-페녹시페닐) 메탄올은 실시예 1에 기술된 공정으로 제조하였다. 펌프식 반응기는 ACTI-DISK지지체 매트릭스가 S^- -옥시니트릴라제 효소가 고정화되는 유체 투과성 미공성 부재의 1개 층만을 함유한다는 점에서 다르다. 총 3개의 배치를 반응시켰다. 각각의 배치는 3-페녹시벤즈알데하이드 1.0g(0.005mole) 및 시안화 수소 0.5mL(상기 시안화수소는 완전히 전환시키고, 증발로 인한 임의의 손실을 벌충하기 위해 과량이다)로 이루어졌다. 제1배치용 용매는 50mL의 디-n-부틸에테르였고, 하기 2개 배치용 용매는 각각 50mL의 3급-부틸-메틸 에테르였다. 각 배치는 24시간동안 반응시켰다. 펌프속도는 5mL/분으로 유지하였다. (S^-)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올을 제조하기 위한 3개 배치 공정의 결과를 하기에 나타낸다.

[표 3]

실시	용매	생성물로의 전환율	S/R 비
24	n-Bu ₂ O	95.0%	93.0/7.0
25	t-BuOMe	74.0%	58.0/42.0
26	t-BuOMe	88.5%	53.0/47.0

실시예 4

주위온도에서 아세토니트릴중의 시안화수소 및 3-페녹시벤즈알데하이드로부터 (S^-)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올의 제조

이 실시예의 (S^-)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올은 실시예 1의 공정으로 제조하였다. 유일한 배치는 아세토니트릴 100mL중의 3-페녹시벤즈알데하이드 25.0g(0.126mole) 및 시안화 수소 6mL(과량)로 이루어졌다. 반응은 5mL/분의 펌프 속도에서 24시간동안 수행하였다. 생성물로의 전환율은 88.9%였고, 생성물의 S/R 비는 52.0/48.0이었다.

실시예 5

주위온도에서 테트라하이드로푸탄중의 시안화 수소 및 3-페녹시벤즈알데하이드로부터 (S^-)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올의 제조

이 실시예의 (S^-)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올은 실시예 1의 공정으로 제조하였다. 유일한 배치는 테트라하이드로푸란 100mL 중에 3-페녹시벤즈알데하이드 5.0g(0.025mole) 및 시안화 수소 1.5mL(과량)로 이루어졌다. 반응은 5mL/분의 펌프 속도에서 24시간동안 수행하였다. 생성물로의 전환율은 82.0%였고, 생성물의 S/R 비는 48.0/52.0이었다.

실시예 6

주위 온도에서 용매로서 시안화 수소를 사용하여 3-페녹시벤즈알데하이드로부터 (S)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올의 제조

이 실시예의 (S)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올은 실시예 1의 공정으로 제조하였다. 펌프식 반응기 ACTI-DISK지지체 매트릭스가 S-옥시니트릴라제 효소가 고정화된 유체 투과성 미공성 부재의 1개 층만을 함유한다는 점에서 다르다. 유일한 배치는 시안화 수소 20mℓ중에 3-페녹시벤즈알데하이드 1.0g(0.005mole)로 이루어졌다. 반응은 5mℓ/분의 펌프 속도에서 24시간동안 수행하였다. 생성물로의 전환율은 96.7%였고, 생성물의 S/R비는 58.1/41.9였다.

실시예7

주위 온도에서 디오소프로필 에테르 중의 시안화 수소 및 3-페녹시벤즈알데하이드로부터 (S)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올의 제조

하기 실시예는 예를들면(전술한) 미합중국 특히 제4,859,784호에서 사용된 용매 디이소프로필에테르가 이 실시예에서는 용매로서 비효과적임을 나타낸다.

이 실시예의 (S)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올은 실시예 1의 공정으로 제조하였다. 펌프식 반응기는 ACTI-DISK지지체 매트릭스가 S-옥시티트릴라제 효소가 고정화되는 유체 투과성 미공성 막의 1개 층만을 함유한다는 점에서 다르다. 총 2개의 배치를 반응시켰다. 각 배치는 2.1g(0.011mole)의 3-페녹시벤즈알데하이드와 0.6mℓ(과량)의 시안화 수소로 이루어졌다. 제1배치용 용매는 50mℓ의 디-n-부틸 에테르였고, 제2 배치용 용매는 50mℓ의 디이소프로필에테르였고, 사용하기 전에, 500mℓ의 디이소프로필 에테르를 2.5cm × 28cm의 중성 알루미나 칼럼에 통과시켜 정제시켰다. 정제된 디이소프로필 에테르는 사용할 때까지 질소 대기하에 보관하였다.

펌프식 반응기에 배치 사이로 75mℓ의 정제된 디이소프로필 에테르로 풀러싱하였다. 각 배치는 23 내지 24시간동안 반응하였다. 펌프 속도는 5mℓ/분으로 유지하였다. (S)-(시아노)(3-페녹시페닐)메탄올을 제조하기 위한 2개 배치 공정의 결과를 하기에 나타낸다.

[표 4]

실시	용매	생성물로의 전환율	S/R비
27	n-Bu ₂ O	89.5%	94.0/6.0
28	i-Pr ₂ O	80.0%	66.0/34.0

(57) 청구의 범위

청구항 1

산 및 알데하이드를 함유하는 유기 용매를 효소 S-옥시 니트릴라제와 접촉시킴으로써 알데하이드와 하이드로시안산을 반응시켜 광학적으로 활성인 (S)-시아노하이드린을 제조하는 방법에 있어서, 상기 효소가 반응물이 통과되는 다공성 막을 포함하는 불용성 복합체에 화학적으로 결합되며, 상기 다공성 막이 미분된 충진체 입자가 전체에 분산되어 있는 중합체 수지상 결합체 및 형성된 기공이 상호연결되어 있는 망상구조를 포함하고 상기 반응물을 함유하는 유체 흐름에 투과성임을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

상기 효소가, 대량 표면 및 예정된 두께를 가지며 반응물들이 통과되는 다공성 막 또는 막들의 층을 포함하는 불용성 복합체에 화학적으로 결합되고, 상기 다공성 막이 미분된 충진체 입자가 전체에 분산되어 있는 중합체 수지상 결합체 및 형성된 기공이 상호연결되어 있는 망상구조를 포함하고, 상기 기공이 상기 수지상 결합체 내에, 상기 충진체 입자와 수지상 결합체 사이에 인접 충진체 입자들 사이에 형성되어 있고, 상기 기공들의 크기 분포가 수은 관입 방법(Mercury Intrusion Method)으로 다공도 측정에 의해 측정할 때 상기 표면들 각각 및 상기 예정된 두께를 가로질러 0.01μ 내지 100μ의 범위로 불균일하게 변화하며, 상기 다공성 막이 상기 표면들중 한 표면을 통한 유체의 흐름에 투과성임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 막이 폴리(비닐 클로라이드)결합체 및 실리카 충진제로 이루어짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 막이 가장자리를 통한 액체의 흐름을 방지하는 하우징의 가장자리에 의해 둘러쌓여 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 하우징이 막의 한쪽 표면에 근접한 유입구와 막의 반대쪽 표면에 근접한 유출구를 갖추고 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 막이 효소에 대한 결합제에 의해 화학적으로 활성화됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 효소가 결합제에 공유결합되거나 가교결합됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 막이 폴리에틸렌이민 및 글루타르알데하이드에 의해 화학적으로 활성화됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 알데하이드의 수용해도가 0.01 내지 2.0mg/ml임을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 알데하이드가 3-페녹시벤즈알데하이드임을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유기 용매가 디-n-부틸에테르임을 특징으로 하는 방법.