(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12P 41/00

(11) 공개번호 10-2004-0099348
(43) 공개일자 2004년11월26일

(21) 출원번호 10-2004-7014868
(22) 출원일자 2004년09월21일
번역문 제출일자 2004년09월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/008941
(87) 국제공개번호 WO 2003/083126
(86) 국제출원출원일자 2003년03월21일
(87) 국제공개일자 2003년10월09일

(30) 우선권주장 60/366,767 2002년03월22일 미국(US)

(71) 출원인 다우 글로벌 테크놀로지스 인크.
미국 48674 미시건주 미들랜드 워싱턴스트리트 빌딩 1790

(72) 발명자 레스닉,솔,엠.
미국 92024 켈리포니아주 엔시니타스 나도 로드 818

도네이트,펠리페,에이.
미국 48642 미시간주 미드랜드 런드 드라이브 4608

프랭크,티모티,씨.
미국 48642 미시간주 미드랜드 폭스포인트 서클 5001

타인,토마스,씨.
미국 77566 텍사스주 레이크 잭슨 크로커스 스트리트 111

폴리,파울
미국 48642미시간주 미드랜드 게티스버그 스트리트 3919

(74) 대리인 장수길
김영

심사청구 : 없음

(54) 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 에테르아세테이트의 효소적 분할

요약

글리콜 에테르 아세테이트, 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트는 높은 기질 농도에서 가수분해효소를 사용한 거울상이성질체 선택적 가수분해에 의해 효소적으로 분할될 수 있으며; 일부 실시양태에서, 가수분해효소는 리파아제이다. 글리콜 에테르, 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르는 높은 기질 농도에서 아실 도너의 존재하에 가수분해효소를 사용한 거울상이성질체 선택적 에스테르교환에 의해 효소적으로 분할될 수 있으며; 일부 실시양태에서, 가수분해효소는 리파아제이다.

대표도

도 5

색인어

프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트, 아실 도너, 비닐 아세테이트, 가수분해효소, 리파아제, 가수분해, 에스테르교환, 효소적 촉매

명세서

기술분야

본 발명은 생체촉매반응 분야에 관한 것이다. 본 발명은 글리콜 에테르 및 글리콜 에테르 아세테이트의 효소적 분할 방법, 및 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 효소적 분할에 관한 것이다.

배경기술

거울상이성질체 (enantiomer)는 공간적으로 다른 배위를 갖는 2개의 다른 이성질 형태로 존재할 수 있는 비대칭 분자이다. 거울상이성질체는 대칭면을 갖지 않으므로 그들의 거울상과 동일하지 않으며, 2개의 거울상이성질 형태로 존재하는 분자는 '좌측' 및 '우측' 형태로 존재하는 것으로 간주될 수 있음을 의미하는 키랄이다. 유기 분자에서의 키랄성의 가장 공통적인 원인은 4개의 다른 치환체 또는 기에 결합된 사면체 탄소의 존재이다. 그러한 탄소는 키랄 중심 또는 입체 중심으로 불리운다. 입체 중심에서 3차원적 원자 배열 (또는 배위)을 나타내는 방법은 우선 순위가 가장 낮은 기를 가상 관찰자로부터 가장 먼 쪽으로 배열시키는 기의 우선 순위 배열을 나타낸다. 우선 순위가 더 높은 곳에서 낮은 곳까지의 나머지 3 개의 기의 배열이 시계 방향이면, 입체 중심은 'R' (또는 'D') 배향을 갖고, 그 배열이 반시계 방향이면, 입체 중심은 'S' (또는 'L') 배향을 갖는다.

거울상이성질체는 동일한 실험식을 가지며, 일반적으로 그의 반응면에서 화학적으로 동일하다. 그러나, 거울상이성질체는 다른 비대칭 화합물에 대해 다른 화학적 반응성을 나타내며, 비대칭 물리적 교란에 대해 다르게 반응한다. 가장 공통적인 비대칭 교란은 편광이다.

거울상이성질체는 평면 편광을 회전시킬 수 있으며, 따라서 거울상이성질체는 광학적으로 활성이다. 동일한 화합물의 2개의 다른 거울상이성질체는 평면 편광을 반대 방향으로 회전시킬 것이며, 따라서 빛은 가상 관찰자에 대해 좌측 또는 반시계 방향으로 회전될 수 있거나 (이는 좌선성 (levarotatory) 또는 'l', 또는 마이너스 또는 '-'임) 또는 빛은 우측 또는 시계 방향으로 회전될 수 있다 (이는 우선성 (dextrorotatory) 또는 'd', 또는 플러스 또는 '+'임). 광학 회전 표시 (+) 또는 (-)는 R, S 명칭과 관련이 없다. 동일량의 2개의 키랄 거울상이성질체의 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체로 불리우며, 우선성 및 좌선성 형태의 혼합물을 나타내기 위해 부호 (+/-) 또는 접두어 'd, l'로 표시된다. 라세미 혼합물은 동일량의 (+) 및 (-) 형태가 존재하므로 제로 광학 회전을 나타낸다. 그러나, 일반적으로 단일 거울상이성질체의 존재는 빛을 한 방향 만으로 회전시키며, 따라서 단일 거울상이성질체는 광학적으로 순수한 것으로 불리운다.

광학적으로 순수한 화합물은 키랄 합성단위체로서 중요하다. 한가지 이유는 생물체에서의 비대칭 분자는 일반적으로 그의 가능한 키랄 형태 중 하나에만 존재 하기 때문이다. 대조적으로, 키랄 유기 화합물이 실험실에서 합성될 때, 합성 반응 (비대칭 촉매 부재)은 일반적으로 양쪽 키랄 형태를 동일한 속도로 생산하여 생성 이성질체의 등몰량 또는 라세미 혼합물을 유도하게 된다. 라세미 혼합물을 그의 2개의 구성 거울상이성질체로 분리하는 것을 분할 (resolution)로 칭하지만, 라세미 혼합물을 분리하는 것은 매우 어렵다 (한가지 방법은 라세미체를 표준 비대칭 화합물과 반응시키고, 다른 물리적 성질을 갖는 결과 생성물 (부분입체 이성질체)을 분리하고 그후에 표준 비대칭 화합물을 제거하는 것이다). 그러나, 생체분자의 3차원적 형태, 또는 입체화학은 그의 생물학적 기능에 매우 중요하다. 더우기, 동일한 구조의 거울상이성질체는 아주 다른 생물학적 효과를 가질 수 있다. 예로서, 탈리도마이드 약물은 라세미체로서 합성되고 투여되며, 하나 만의 거울상이성질체가 효과적인 항오심 약물인 반면, 다른 거울상이성질체는 임신 여성에게 라세미체를 투여한 후에 바람직하지 못한 것으로 밝혀진 사실상의 기형발생 인자이다.

그러므로, 생물학적 기능을 위한 분자 (예를 들면, 약물)의 합성은 목적하는 생물학적 활성 생성물을 형성하게 될 단일 거울상이성질체로부터 실시하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 키랄 1,2-프로판디올은 심혈관 약물, 항바이러스 약물 및 거울상으로 순수한 크라운 에테르의 제조에 유용하다 (Hoff et al. (1996) Tetrahedron: Asymmetry 7:3181-3186). 이들 및 관련 키랄 화합물은 키랄 중합체, 크로마토그래피 매질에 대한 합성단위체로서, 또는 LC 또는 NMR에 의한 키랄 산의 입체화학적 분석을 위한 유도체화 시약으로서 작용할 수도 있다. 제약 및 농업 분야 외에, 광학적으로 활성인 이차 알코올, 특히 플루오로알킬기를 함유하는 비대칭 탄소를 가진 것 (예를 들면, 트리플루오로메틸-)은 중요한 강유전성 및 반-강유전성 액정 재료이다 (미국 특허 제6,239,316 B1; EPO 출원 제99115154.9).

광학적 순수 화합물은 화학적으로 합성될 수 있지만, 비대칭 화학 합성은 주로 값비싸고 환경적으로 유해할 수 있는 촉매를 필요로 하며, 또한 그러한 합성은 통상적으로 다단계이고, 주로 특정 화학에 대한 구조적 요건을 포함하는 기질로 제한된다. 전형적인 화학 합성의 결과인 이성질체 또는 거울상이성질체의 혼합물은 화학적으로 또는 효소적으로 분할 (또는 순수한 거울상이성질체로 분리)될 수 있다. 라세미체의 화학적 분할은 상기한 바와 같다. 라세미체의 효소적 분할은 기질로서의 라세미체의 한 이성질체에 대한 효소의 선호도 또는 선택성에 좌우되며, 그 결과 우선적으로 선호되는 기질로부터 생성물이 형성되고 선호되지 않는 기질은 주로 원래 이성질체로서 남게 된다. 라세미체의 한 이성질체에 대한 효소의 선호도는 거울상이성질체 선택성으로서 알려져 있다. 거울상이성질체의 혼합물을 역학적 분할시키기 위한 에스테라제, 리파아제 및 프로테아제의 사용은 잘 알려져 있다. 그러나, 거울상이성질체 혼합물의 거울상이성질체 선택적 분할은 효소의 선택 뿐만 아니라 효소 기질의 화학 구조에 크게 좌우된다. 일정 기질 또는 일련의 관련 기질을 분할하기 위한 효소의 최적의 선택은 쉽게 예측되지 않으며, 잠재적인 기질의 화학 구조를 변화시키면서 각종 효소를 주위깊게 스크리닝할 필요가 있다.

몇몇 프로필렌 글리콜 에테르 및 관련 유도체의 효소 촉매적 분할의 일부 예가 과학 및 특허 문헌에 기재되어 있다. (±)-1-메톡시-2-프로판올의 아세테이트 및 부티레이트 에스테르를 포함한, 분할하기 어려운 기질의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 위한 스크리닝은 최근에 개시되었다 (Baumann et al. (2000) Tetrahedron: Asymmetry 11:4781-4790). 칸디다 안타르크티카 (*Candida antarctica*)로부터의 리파아제 분획 B (CAL-B)가 (R)-1-메톡시-2-프로판올 아세테이트의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 촉매작용하여 최대 수율 (50%)로 99% ee 초과의 (R)-알코올 및 상응하는 (S)-아세테이트를 얻게 되는 것으로 보고되었다. 분취 스케일 반응은 50 ㎖ 스케일로 5.28% (w/v) 1-메톡시-2-프로판올 아세테이트 (20 mmol 기질을 기준으로 계산됨, 1.0 ㎎/㎖로 50 ㎎ 효소)를 사용하여 분명하게 수행되었다. 헥산 중의 2.7% (w/v) (±)-1-메톡시-2-프로판올을 아실 도너로서 비닐 아세테이트를 사용하여 거울상이성질체 선택적 아실화한 결과 98% ee 및 20% 수율 기질 전환으로 (R)-1-메톡시-2-프로판올 아세테이트가 제공되는 것으로 보고되었다 (Baumann et al. (2000) Tetrahedron: Asymmetry 11:4781-4790).

CAL-B 리파아제 (Novozyme 435)를 사용한 광학 분할의 또다른 예는 4-이소프로필옥시부탄-2-올을 비닐 프로피오네이트와 거울상이성질체 선택적 에스테르교환반응시켜 (R)-(+)-4-이소프로필옥시부탄-2-프로피오네이트를 생산하는 촉매작용이다 (미국 특허 제6,239,316 B1; EPO 출원 제99115154.9). 에스테르의 화학적 가수분해는 95% ee 초과의 상응하는 (R)-알코올을 제공하였다.

개개의 프로필렌 글리콜 에테르 (예를 들면, 프로필렌 글리콜 페닐 에테르 또는 1-페녹시-2-프로판올) 및 그의 상응하는 아세테이트 (예를 들면, 프로필렌 글리콜 페닐 에테르 아세테이트 또는 1-페녹시-2-프로필 아세테이트)는 많은 그룹에 의한 생체촉매적 분할의 중심점이었다. 3개의 일본 특허는 라세미 아세테이트를 전세포, 그의 조제물 또는 그로부터의 리파아제로 처리하여 (R)- 및 (S)-1-아릴옥시-2-알칸올 둘다를 제조하는 것에 대해 기술하고 있으며 (일본 특허 출원 JP 1991-262377, JP 1991-262378 및 JP 1991-262379); 이들 특허에 기재된 많은 연구 작업들이 이후에 공개되었다 (Yanase et al. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. 57:1334-1337). 또한, 1-페녹시-2-프로판올의 부탄산 에스테르의 가수분해적 분할은 CAL-B 및 기타 리파아제에 의해 연구되어 왔다 (Hoff et al. (1996) Tetrahedron: Asymmetry 7:3181-3186). 1-페녹시-2-프로판올과 2-클로로에틸부타노에이트 및 기타 아실 도너와의 에스테르교환은 생체촉매적 분할에서 거울상이성질체 비 및 평형 상수를 계산하기 위한 컴퓨터 프로그램 개발에 사용되어 왔다 (Anthonsen et al. (1995) Tetrahedron: Asymmetry 6:3015-3022; Hoff et al. (1996) Tetrahedron: Asymmetry 7:3187-3192). 1-페녹시-2-프로판올의 에스테르교환 (약 3% w/v)은 아실 도너로서 비닐 프로피오네이트를 사용하여 돼지 간 에스테라제 (PLE)의 중합체 활성화된 형태에 의해 입증되었다 (Gais et al. (2001) J. Org. Chem. 66:3384-3396).

그러나, 효소적 가수분해 또는 아실화를 통한 거울상이성질체 선택적 분할은 관련 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 그의 상응하는 아세테이트의 라세미체에 대해서는 보고된 바가 없으며, 이들 관련 글리콜 에테르의 예로는 프로필렌 글리콜 에틸 에테르, 프로필렌 글리콜 n-프로필 에테르, 프로필렌 글리콜 이소프로필 에테르, 프로필렌 글리콜 n-부틸 에테르, 프로필렌 글리콜 t-부틸 에테르 및 그의 상응하는 아세테이트를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 높은 기 질 농도에서 프로필렌 글리콜 메틸 에테르 또는 프로필렌 글리콜 페닐 에테르 또는 그의 상응하는 아세테이트를 가수분해 또는 아실화하여 높은 거울상이성질체 순도 및 높은 수율로 생성물을 형성하게 하는 반응 조건은 개시된 바가 없다.

글리콜 에테르 및 그의 상응하는 아세테이트, 및 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 그의 상응하는 아세테이트는 상업적으로 용이한 방식으로 분할하기가 특히 어렵다. 그러므로, 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 그의 상응하는 아세테이트의 라세미 혼합물의 분할 방법으로서, 효소를 이용하여 고수율로 고도로 분리되게 하는 신속하고 경제적인 방법을 개발하는 것이 유용하다.

정의 및 약어

본 발명의 이해를 돕기 위해, 본원에 사용된 많은 약어, 용어 및 구를 아래에 정의한다.

'칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B'는 CALB 또는 CAL-B로 약칭된다.

'효소 활성 단위'는 U로 약칭된다.

'거울상이성질체 과잉율'은 ee로 약칭된다.

'거울상이성질체 선택성'은 E로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 메틸 에테르' (또한 1-메톡시-2-프로판올)는 PM으로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 메틸 에테르 아세테이트' (또한 1-메톡시-2-프로판올 아세테이트)는 PMA로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 에틸 에테르' (1-에톡시-2-프로판올)는 PE로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 에틸 에테르 아세테이트' (1-에톡시-2-프로판올 아세테이트)는 PEA로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 n-프로필 에테르' (1-n-프로필옥시-2-프로판올)는 PnP로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 n-프로필 에테르 아세테이트' (1-n-프로필옥시-2-프로판올 아세테이트)는 PnPA로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 이소프로필 에테르' (1-이소프로필옥시-2-프로판올)는 PiP로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 이소프로필 에테르 아세테이트' (1-이소프로필옥시-2-프로판올 아세테이트)는 PiPA로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 n-부틸 에테르' (1-n-부틸옥시-2-프로판올)는 PnB로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 n-부틸 에테르 아세테이트' (1-n-부틸옥시-2-프로판올 아세테이트)는 PnBA로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 tert-부틸 에테르' (1-tert-부틸옥시-2-프로판올)는 PtB로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 tert-부틸 에테르 아세테이트' (1-tert-부틸옥시-2-프로판올 아세테이트)는 PtBA로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 페닐 에테르' (1-페녹시-2-프로판올)는 PPh로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 페닐 에테르 아세테이트' (1-페녹시-2-프로판올 아세테이트)는 PPhA로 약칭된다.

'프로필렌계 글리콜 에테르' 또는 'P-계 글리콜 에테르' 또는 'P-계 기질'은 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르에 관한 것이며, 상기한 화합물, PM, PE, PnP, PiP, PnB, PtB 및 PPh를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 부류의 화합물은 일반적으로 염기성 조건하에서 프로필렌 옥사이드를 알코올 관능기 함유 화합물과 반응시켜 제조한 임의의 글리콜 에테르를 포함한다.

'프로필렌계 글리콜 에테르 아세테이트' 또는 'P-계 글리콜 에테르 아세테이트' 또는 'P-계 아세테이트 기질'은 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트에 관한 것이며, 상기한 화합물, PMA, PEA, PnPA, PiPA, PnBA, PtBA 및 PPhA를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 부류의 화합물은 일반적으로 상기한 '2-프로판올의 1-치환된 에테르'의 C-2 히드록실 위치에서 주로 아세테이트 유도체를 포함한다.

'프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르'는 PGAE로 약칭된다.

'프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트'는 PGAEA로 약칭된다.

'아실화 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르'는 아실-PGAE로 약칭되며, 그것은 PGAEA를 포함한다.

'부틸 아세테이트'는 BA로 약칭된다.

'4-에틸 페닐 아세테이트'는 EPA로 약칭된다.

'에틸 아세테이트'는 EtA로 약칭된다.

'에틸 트리클로로아세테이트'는 EtCA로 약칭된다.

'에틸 트리플루오로아세테이트'는 EtFA로 약칭된다.

'이소프로페닐 아세테이트'는 IPA로 약칭된다.

'비닐 아세테이트'는 VA로 약칭된다.

'에틸 메톡시아세테이트'는 EMA로 약칭된다.

'2,2,2-트리플루오로에틸 부티레이트'는 TfEB로 약칭된다.

'디케텐'은 DK로 약칭된다.

'비닐 프로피오네이트'는 VP로 약칭된다.

'락티드'는 3,6-디메틸-1,4-디옥산-2,5-디온이다.

비 'v/v'는 용적/용적을 의미한다.

용어 '이성질체'는 분자식은 동일하지만 구조는 다른 화합물을 의미한다. 배위 및(또는) 형태만 다른 이성질체는 '입체 이성질체'로서 불리운다. 용어 '이성질체'는 거울상이성질체를 의미하는 것으로 사용된다.

용어 '거울상이성질체'는 서로 거울상이며 중첩될 수 없는 한쌍의 분자 이성질체 중의 하나를 설명하는데 사용된다. 거울상이성질체를 지칭하거나 의미하는데 사용되는 다른 용어는 '입체 이성질체' (키랄 중심 주위의 다른 배열 또는 입체화학성 때문에, 모든 거울상이성질체는 입체 이성질체이지만, 모든 입체 이성질체가 거울상이성질체는 아님) 또는 '광학 이성질체' (순수한 거울상이성질체의 광학 활성 때문에, 다른 순수한 거울상이성질체는 평면-편광을 다른 방향으로 회전시키는 능력이 있음)를 포함한다. 거울상이성질체는 일반적으로 융점 및 비점과 같은 동일한 물리적 특성을 가지며, 또한 동일한 분광 특성을 갖는다. 거울상이성질체는 평면-편광과의 상호작용에 대하여 또한 생물학적 작용에 대하여 서로 다를 수 있다.

'R' 및 'S'란 표시는 그의 키랄 중심(들) 주위의 분자의 절대 배위를 나타내는데 사용된다. 표시는 접두어로서 또는 접미사로서 나타낼 수 있고, 그것은 하이픈에 의해 이성질체와 분리되거나 분리되지 않을 수 있으며, 그것은 하이픈으로 연결되거나 연결되지 않을 수 있으며, 그것은 괄호안에 넣어지거나 넣어지지 않을 수 있다.

표시 또는 접두어 '(+) 및 (-)'는 화합물에 의해 평면-편광 회전의 신호를 나타내는데 이용되며, (-)는 화합물이 좌선성 (좌측으로 회전)임을 의미한다. (+)의 접두어가 있는 화합물은 우선성 (우측으로 회전)이다.

용어 '라세미 혼합물', '라세미 화합물' 또는 '라세미체'는 한 화합물의 두 거울상이성질체의 혼합물을 의미한다. 이상적인 라세미 혼합물은 (+) 거울상이성질체의 광학 회전이 (-) 거울상이성질체의 광학 회전을 상쇄시키도록 화합물의 두 거울상이성질체의 50:50 혼합물인 것이다.

용어 '분할하는' 또는 '분할'은 라세미 혼합물에 대하여 사용될 때 라세미체를 두 거울상이성질 형태 (즉, (+) 및 (-); (R) 및 (S) 형태)로 분리하는 것을 의미한다. 용어는 또한 라세미체의 한 이성질체를 생성물로 거울상이성질체 선택적 전환하는 것을 의미한다.

용어 '거울상이성질체 과잉' 또는 'ee'는 하나의 거울상이성질체가 다른 것보다 과잉으로 생성되는 반응 생성물을 의미하며, 그것은 (+)- 및 (-)-거울상이성질체의 혼합물에 대해 정의되며, 조성은 몰 또는 중량 또는 용적 분율 $F_{(+)}$ 및 $F_{(-)}$ 로서 표시된다 ($F_{(+)}$ 및 $F_{(-)}$ 의 합 = 1). 거울상이성질체 과잉은 $*F_{(+)} - F_{(-)}*$로서 정의되며, 거울상이성질체 과잉 백분율은 $100 \times *F_{(+)} - F_{(-)}*$로서 정의된다. 거울상이성질체의 '순도'는 그의 ee 또는 백분율 ee 값 (% ee)으로 설명된다.

'정제된 거울상이성질체' 또는 '순수한 거울상이성질체' 또는 '분할된 거울상이성질체' 또는 '거울상이성질체 과잉의 화합물'로서 표시되는 경우에, 용어는 한 이성질체의 양이 다른 이성질체의 양보다 많은 것을 나타낸다. 따라서, 거울상이성질체 제제를 나타낼 때, 주요 거울상이성질체의 백분율 (예를 들면, 몰 기준 또는 중량 기준 또는 용적 기준) 및(또는) 주요 거울상이성질체의 거울상이성질체 과잉 백분율 둘다 (또는 어느 하나)는 제제가 정제된 거울상이성질체 제제인지를 확인하는데 사용될 수 있다.

이성질체의 '거울상이성질 순도' 또는 '거울상이성질체 순도' 용어는 정제된 거울상이성질체의 정성적 또는 정량적 측도를 의미하며, 일반적으로 그 측정치는 ee 또는 거울상이성질체 과잉 기준으로 표시된다.

용어 '실질적으로 정제된 거울상이성질체', '실질적으로 분할된 거울상이성질체', '실질적으로 정제된 거울상이성질체 제제'는 한 거울상이성질체가 다른 것에 비해 풍부하며, 더욱 바람직하게는 다른 거울상이성질체가 거울상이성질체 또는 거울상이성질체 제제의 20% 미만, 더욱 바람직하게는 10% 미만, 더욱 바람직하게는 5% 미만, 더욱 더 바람직하게는 2% 미만인 제제 (예를 들면, 광학적으로 비활성인 출발 물질, 기질 또는 중간체로부터 유래됨)를 나타내는 것을 의미한다.

용어 '정제된 거울상이성질체', '분할된 거울상이성질체' 및 '정제된 거울상이성질체 제제'는 한 이성질체 (예를 들면, R-거울상이성질체)가 다른 것에 비해 풍부하며, 더욱 바람직하게는 다른 이성질체 (예를 들면, S-거울상이성질체)가 제제의 30% 미만, 더욱 바람직하게는 20% 미만, 더욱 바람직하게는 10% 미만 (예를 들면, 이러한 특별한 경우에, R-거울상이성질체는 실질적으로 S-거울상이성질체를 포함하지 않음)인 제제 (예를 들면, 광학적으로 비활성인 출발 물질, 기질 또는 중간체로부터 유래됨)를 나타내는 것을 의미한다. 정제된 거울상이성질체는 실질적으로 다른 거울상이성질체 없이 합성되거나, 정제된 거울상이성질체는 입체우선 방법으로 합성되고, 그후에 분리 단계가 이어지거나, 또는 정제된 거울상이성질체는 라세미 혼합물로부터 유래될 수 있다.

부호 'E'로 표시되는 거울상이성질체 비로 불리우기도 하는 용어 '거울상이성질체 선택성'은 라세미 기질로부터 라세미 혼합물 중의 다른 거울상이성질체에 대해 한 거울상이성질체를 생성시키는 효소의 선택적 능력을 의미하며, 즉, 그것은 거울상이성질체 사이를 구별하는 효소의 능력의 측도이다. 비-선택적 반응은 1의 E를 가지며, 20 이상의 E에 의한 분할은 일반적으로 합성 또는 분할에 유용한 것으로 간주된다. 거울상이성질체 선택성은 해당 거울상이성질체 사이의 전환율의 차이에 있다. 반응 생성물은 거울상이성질체 중의 하나가 풍부한 것으로 얻어지며, 반대로 잔여 기질에는 다른 거울상이성질체가 풍부하다. 실제적인 목적을 위하여, 일반적으로 거울상이성질체 중의 하나가 큰 과량으로 얻어지는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 일정한 전환도로 전환 공정을 종결함으로써 이루어진다.

E의 계산은 세가지 변수: 출발 물질의 거울상이성질체 순도 (ee_s), 생성물의 거울상이성질체 순도 (ee_p) 및 전환도 (c) 중 두가지의 측정치를 기초로 하며, 그후에 다음 세가지 방정식 중의 하나를 이용할 수 있다 (Hydrolases in Organic Synthesis, Bornscheuer, UT and Kazlauskas, RJ (1999) Wiley-VCH, New York, section 3.1.1; and Chen et al., J. Am. Chem. Soc. 104: 7294-7299 (1982)):

$$E = \ln [1-c(1+ee_p)]/\ln [1-c(1-ee_p)]$$

$$E = \ln [(1-c)(1-ee_s)]/\ln [(1-c)(1+ee_s)]$$

$$E = \ln \{(1-ee_s)/[1+(ee_s/ee_p)]\}/\ln \{(1+ee_s)/[1+(ee_s/ee_p)]\}$$

용어 '아실 도너'는 효소적 촉매 및 기질의 존재하에 에스테르의 형성을 유도하는 적당하게 반응하는 화합물을 의미한다. 본 발명에서, 기질은 글리콜 에테르, 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르이며, 효소적 촉매는 가수분해효소, 바람직하게는 리파아제, 더욱 바람직하게는 CAL-B이다. 아실 도너는 비활성화 또는 활성화 아실 도너를 포함한다. 비활성화 아실 도너의 비제한적 예는 프로필렌 글리콜 메틸 에테르 아세테이트 (PMA), 프로필렌 글리콜 에틸 에테르 아세테이트 (PEA), 프로필렌 글리콜 n-프로필 에테르 아세테이트 (PnPA), 에틸 아세테이 트 (EA), 부틸 아세테이트 (BA) 및 에틸 페닐 아세테이트 (EPA)를 포함한다. 활성화 아실 도너의 비제한적 예는 활성화 에스테르 (트리플루오로에틸 부티레이트, S-에틸 티오-옥타노에이트 및 비아세틸 모노-옥심 아세테이트를 포함하지만, 이에 제한되지는 않음), 에놀 에스테르 (비닐 아세테이트, 이소프로페닐 아세테이트 및 1-에톡시비닐 아세테이트 및 디케텐에 제한되지는 않음) 및 무수물 (아세트산 무수물, 락티드 및 숙신산 무수물)이다. 아실 도너의 비제한적 예는 부틸 아세테이트 (BA), 에틸 페닐 아세테이트 (EPA), 에틸 아세테이트 (EtA), 에틸 트리클로로아세테이트 (EtCA), 에틸 트리플루오로아세테이트 (EtFA), 이소프로페닐 아세테이트 (IPA), 비닐 아세테이트 (VA), 에틸 메톡시 아세테이트 (EMA), 2,2,2-트리플루오로에틸 부티레이트 (TfEB), 디케텐 (DK), 비닐 프로피오네이트 (VP), PMA 및 PnPA를 포함한다.

용어 '수율'은 효소 촉매화된 반응에서 생성물의 생산을 설명하는데 사용될 때 반응에서 생성물로 전환되는 기질의 양을 의미한다. 수율은 반응 혼합물에 원래 존재하는 기질의 양 및 생성물로 전환되는 기질의 백분율 (%)을 기준으로 한다. 용어 '수율'은 또한 효소 촉매화된 반응에서 남아있는 비전환된 기질의 양을 설명하는데 사용된다.

용어 '전환'은 효소 촉매화된 반응에서 생성물의 생산을 설명하는데 사용될 때 반응에서 생성물로 전환되는 기질의 비율 또는 백분율을 의미한다.

용어 '반응 혼합물'은 효소가 기질을 생성물로 전환시키는 반응을 촉매화하는, 효소 촉매 및 기질의 배합물을 의미하

며, 여기에는 하나 이상의 기질 (예를 들 면, PGAE 및 아실 도너) 또는 하나 이상의 생성물 (예를 들면, PGAEA 및 PGAE)이 존재할 수 있다. 반응 혼합물에 추가의 성분이 존재할 수도 있다.

용어 '반응 매트릭스'는 효소 촉매가 존재하지 않는 반응 혼합물을 의미하며, 따라서 매트릭스는 효소 촉매가 제거된 반응 혼합물일 수 있거나, 그것은 효소 촉매를 제외한 반응 혼합물 성분의 배합물일 수 있다.

용어 '반응 매질'은 효소 촉매 및 1종 이상의 기질이 배합 (예를 들면, 용해 또는 현탁 또는 혼합)된 용액을 의미한다. 매질은 바람직하게 완충되는 수성일 수 있거나, 그것은 물과 별도로 또는 본질적으로 물 대신 용매를 함유할 수 있다. 용매는 수용성이거나 수불용성일 수 있다. 용매는 단일 화합물 또는 몇가지 화합물의 배합물일 수 있다. 반응 매질 중의 용매의 양은 매질의 0 내지 약 100%일 수 있다.

용어 '2상 반응 매질'은 수성상과 그 수성상에 불혼화성이고 기질 (그들 자체가 용매임)과 별도로 존재하는 용매를 포함하는 반응 매질을 의미하며, 따라서 2상 반응 매질은 2가지의 불혼화성 용매를 포함하여 2상으로 분리된다. 전형적으로, 그러한 반응 매질은 수성상 (일반적으로 완충됨) 및 수성상에 제한된 용해도를 갖는 유기 용매를 포함한다. 수성상은 매우 작을 수 있다 (총 반응 혼합물 용적의 약 3%에서 약간만 초과될 수 있다).

용어 '비양자성' 또는 '비수성'은 반응 매질에 관하여 사용될 때 실질적으로 수성상을 갖지 않으며 (수성상이 총 반응 혼합물 용적의 약 3% 이하임), 바람직하게는 비극성이며, 바람직하게는 유기 용매인 1종 이상의 용매를 포함하는 반응 혼 합물을 의미한다.

용어 '공용매'는 반응 매질에 관해 사용될 때, 기질 및 생성물 그 자체가 용매인 경우, 비-기질 및 비-생성물 용매를 의미한다.

용어 '효소 촉매'는 기질을 생성물로 전환시킬 수 있는 효소를 의미한다. 바람직하게는, 기질은 거울상이성질체 선택적으로 생성물로 전환된다.

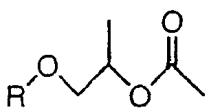
용어 '유효량'은 효소에 관해 사용될 때 기질이 적당한 기간내에 적당한 수준으로 생성물로 전환되도록 반응을 촉매화하는 반응 혼합물에 존재하는 효소의 양을 의미한다. 라세미 혼합물에 대한 생성물로의 적당한 수준의 거울상이성질체 선택적 기질 전환율은 생성물 또는 남아있는 생성물의 목적하는 수율 및 목적하는 순도 둘다에 좌우될 것이며, 전형적으로 수율은 목적 생성물의 약 30% 내지 50%의 범위이며 (반응 전환율이 기질의 80%에 가까울 때에도), 순도는 약 75% ee 내지 99% ee 초과의 범위이다. 적당한 시간은 상업적으로 결정되며; 라세미 혼합물에 대한 생성물로의 거울상이성질체 선택적 기질 전환율의 경우, 시간은 전형적으로 약 1시간 내지 약 80시간이며, 그 시간은 배치 공정의 경우 배치 반응 시간 또는 연속 공정의 경우 액체 충전된 반응기 용적을 용적 액체 유량으로 나누어 제시한 액체 체류 시간이다.

용어 '재순환'은 효소 촉매에 관해 사용될 때 반응 혼합물의 하나 이상의 배치에서의 효소 촉매의 회수 및 재사용 또는 연속 반응 공정에서 재사용을 통해 용적 생산성을 증가시키는 것을 의미한다. 용어 '고생산성'은 효소 촉매에 관해 사용될 때, 촉매를 배치 또는 연속 방식의 작업에서 사용하여 활성 손실이 거의 없게 촉매 단위 중량 당 대량의 공급액을 처리할 수 있음을 의미한다.

발명의 요약

본 발명은 하기 화학식 I의 프로필렌 글리콜 에테르 아세테이트 라세미체와 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를 반응 혼합물에서 접촉시켜 라세미체의 (R 또는 S)-거울상이성질체를 상응하는 프로필렌 글리콜 에테르로 거울상이성질체 선택적 가수분해시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

화학식 I

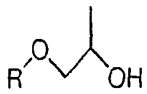


상기 식에서, R은 알킬 또는 아릴 기로부터 선택된다.

상기 화학식 I에서 R의 비제한적 예는 CH_3, CH_3CH_2, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH(CH_3)_2$, $C(CH_3)_3$ 및 C_6H_5이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 가수분해효소는 리파아제, 에스테라제, 아실라제 및 프로테아제로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직한 가수분해효소는 리파아제 및 에스테라제이다. 가장 바람직한 가수분해효소는 리파아제이고, 특히 바람직한 리파아제는 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B, 리파아제 LP 'S', 슈도모나스 속 지단백질 리파아제, 슈도모나스 속 리파아제 및 슈도모나스 세파시아 리파아제로 이루어진 군에서 선택된다. 가장 바람직한 리파아제는 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B이다. 바람직한 에스테라제는 E001, E002 및 E003 (Thermogen Inc.에 의해 판매됨) 및 돼지 간 에스테라제 (PLE)를 포 함한다. 반응 혼합물 중의 라세미체의 농도는 약 10% v/v를 초과하며, 바람직하게는 약 20% v/v를 초과한다. 일부 실시양태에서, 가수분해는 수성 반응 매질에서 일어나며, 대안적 실시양태에서 가수분해는 2상 반응 매질에서 일어난다. 또다른 실시양태에서는, 라세미체의 약 30% 내지 약 50%가 가수분해된다. 또다른 실시양태에서, 가수분해된 라세미체의 거울상이성질체 순도는 약 70% ee 이상이다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 반응 혼합물로부터 R-프로필렌 글리콜 에테르를 회수하는 것을 더 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 반응 혼합물로부터 미반응된 S-거울상이성질 기질을 회수하고, S-거울상이성질 기질을 화학적 가수분해 또는 에스테르교환과 같은 방법에 의해 전환시켜 상응하는 S-프로필렌 글리콜 에테르를 얻는 것을 더 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 효소 촉매를 재순환시키는 것을 더 포함한다.

다른 면에서, 본 발명은 약 5% v/v 이상의 농도인 하기 화학식 II의 프로필렌 글리콜 에테르 라세미체와 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를, 아실 도너를 추가로 포함하는 반응 혼합물에서 접촉시켜 라세미체의 R-거울상이성질체를 상응하는 R-아실화 프로필렌 글리콜 에테르로 거울상이성질체 선택적 에스테르교환시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

화학식 II



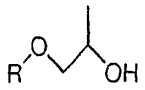
상기 식에서, R은 알킬 또는 아릴 기로부터 선택된다.

상기 화학식 II에서 R의 비제한적 예는 CH_3, CH_3CH_2, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH(CH_3)_2$, $C(CH_3)_3$ 및 C_6H_5이다. 아실 도너는 비활성화 또는 활성화 아실 도너일 수 있다. 활성화 아실 도너는 활성화 에스테르, 에놀 에스테르 및 무수물로부터 선택된다. 적합한 활성화 아실 도너의 비제한적 예는 비닐 아세테이트, 비닐 프로피오네이트, 2,2,2-트리클로로에틸 아세테이트, 2,2,2-트리플루오로에틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 에틸 페닐 아세테이트, 이소프로페닐 아세테이트, 에틸 메톡시아세테이트, 1-에톡시비닐 아세테이트, 디케텐, 트리플루오로에틸 부티레이트, 아세트산 무수물, 락티드 및 숙신산 무수물이다. 바람직한 활성화 아실 도너는 비닐 아세테이트 및 이소프로페닐 아세테이트이다. 적합한 비활성화 아실 도너의 비제한적 예는 에틸 아세테이트 및 키랄 아실 도너 화합물, 예를 들면 라세미 1-메톡시-2-프로판올 아세테이트 (PMA), 프로필렌 글리콜 에틸 에테르 아세테이트 (PEA), 프로필렌 글리콜 n-프로필 에테르 아세테이트 (PnPA), 에틸 아세테이트 (EA), 부틸 아세테이트 (BA) 및 에틸 페닐 아세테이트 (EPA)이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 가수분해효소는 리파아제, 에스테라제, 아실라제 및 프로테아제로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직한 가수분해효소는 리파아제 및 에스테라제이다. 가장 바람직한 가수분해효소는 리파아제이고, 특히 바람직한 리파아제는 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B, 리파아제 LP 'S', 슈도모나스 속 지단백질 리파아제, 슈도모나스 속 리파아제 및 슈도모나스 세파시아 리파아제로 이루어진 군에서 선택된다. 가장 바람직한 리파아제는 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B이다. 바람 직한 에스테라제는 중합체 활성화된 돼지 간 에스테라제 (PLE)이다. 라세미체 및 아실 도너는 반응 혼합물의 약 100% v/v를 구성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 라세미체 및 아실 도너는 라세미체의 약 50%가 아실화 프로필렌 글리콜 에테르로 전환되는 비로 존재한다. 일부 실시양태에서는, 라세미체의 약 30% 내지 약 50%가 에스테르교환되며 아실화 프로필렌 글리콜 에테르의 거울상이성질체 순도는 약 70% ee 이상이다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 반응 혼합물로부터 R-아실화 프로필렌 글리콜 알킬 에테르를 회수하고, R-아실화 프로필렌 글리콜 알킬 에테르를 전환시켜 상응하는 R-프로필렌 글리콜 알킬 에테르를 얻는 것을 더 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 반응 혼합물로부터 미반응된 S-거울상이성질 기질을 회수하는 것을 더 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 효소 촉매를 재순환시키는 것을 더 포함한다.

또다른 면에서, 본 발명은 (a) 전환된 기질의 목적하는 거울상이성질체 수율 (일반적으로, 약 30% 내지 약 50%) 및 전환 및 비전환된 기질의 목적하는 순도 (일반적으로, 약 30 내지 약 70%의 전환율, 및 순도 >90% ee)를 결정하고; (b) 목적하는 수율 및 순도를 얻기 위한 제1 기질 및 제2 기질의 몰 비를 계산하고; (c) 상기 몰 비를 기준으로 목적하는 수율 및 순도를 이론적으로 얻기 위한 제1 기질 및 제2 기질의 양을 계산하고; 및 (d) 하기 화학식 II의 프로필렌 글

리콜 에테르의 라세미 혼합물을 포함하는 제1 기질의 제1 계산량 및 활성화 에스테르, 비활성화 에스테르, 에놀 에스테르 및 무수물로 이루어진 군에서 선택된 아실 도너를 포함하는 제2 기질의 제2 계산량과, 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를 반응 혼합물에서 배합하 여 라세미체의 제1 거울상이성질체를 상응하는 제1 거울상이성질체 아실화 프로필렌 글리콜 에테르로 거울상이성질체 선택적 에스테르교환시키는 것을 포함하는 방법으로서, 제1 기질인 프로필렌 글리콜 에테르를 제2 기질인 아실 도너에 의해 에스테르교환시키는 에스테르교환 반응에 의해 프로필렌 글리콜 에테르의 라세미 혼합물을 분할하는 방법에서 기질 전환도를 조절하는 방법을 제공한다.

<화학식 II>



상기 식에서, R은 알킬, 아릴, 아릴-치환된 알킬, 알릴릭 또는 아세탈 기로부터 선택된다.

일부 실시양태에서, 제1 기질의 제1 계산량은 제1 용적이며 제2 기질의 계산량은 제2 용적이다. 일부 실시양태에서, 제1 기질의 제1 계산량 및 제2 기질의 제2 계산량은 반응 혼합물의 반응 매트릭스의 약 100%를 구성한다. 적합한 아실 도너는 비활성화 또는 활성화 아실 도너일 수 있다. 활성화 아실 도너는 활성화 에스테르, 에놀 에스테르 및 무수물로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직한 활성화 아실 도너의 비제한적 예는 비닐 아세테이트, 비닐 프로피오네이트, 2,2,2-트리클로로에틸 아세테이트, 2,2,2-트리플루오로에틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 에틸 페닐 아세테이트, 이소프로페닐 아세테이트, 에틸 메톡시아세테이트, 1-에톡시비닐 아세테이트, 디케텐, 트리플루오로에틸 부티레이트, 아세트산 무수물, 락티드 및 숙신산 무수물이다. 바람직한 활성화 아실 도너는 비닐 아세테이트 및 이소프 로페닐 아세테이트이다. 적합한 비활성화 아실 도너의 비제한적 예는 에틸 아세테이트 및 키랄 아실 도너 화합물, 예를 들면 라세미 1-메톡시-2-프로판올 아세테이트 (PMA), 부틸 아세테이트 (BA), 에틸 페닐 아세테이트 (EPA), 에틸 아세테이트 (EtA) 및 PnPA이다. 상기 화학식 II에서 R의 비제한적 예는 CH_3, CH_3CH_2, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH(CH_3)_2$, $C(CH_3)_3$, C_6H_5, $C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_2C_6H_5$, $C(CH_3)(C_6H_5)_2$, $C(C_6H_5)_3$, $C(CH_3)_2CH_2CH_3$, $CH_2C_6H_5$, $CH_2CH{=}CH_2$, $CH_2C{\equiv}CH$, $CH_2OCH_2CH_2OCH_3$ 및 CH_2OCH_3 이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 가수분해효소는 리파아제, 에스테라제, 아실라제 및 프로테아제로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직한 가수분해효소는 리파아제 및 에스테라제이다. 가장 바람직한 가수분해효소는 리파아제이고, 특히 바람직한 리파아제는 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B, 리파아제 LP 'S', 슈도모나스 속 지단백질 리파아제, 슈도모나스 속 리파아제 및 슈도모나스 세파시아 리파아제로 이루어진 군에서 선택된다. 가장 바람직한 리파아제는 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B이다. 바람직한 에스테라제는 중합체 활성화된 돼지 간 에스테라제 (PLE)이다. 일부 실시양태에서, 라세미체의 (R)-거울상이성질체는 상응하는 (R)-거울상이성질체 아실화 프로필렌 글리콜 에테르로 거울상이성질체 선택적으로 에스테르교환된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 반응 혼합물로부터 제1 거울상이성질체 아실화 프로필렌 글리콜 알킬 에테르 생성물을 회수하고, 그 생성물을 가수분해 또는 에스테르교환과 같은 적당한 방법에 의해 전환시켜 상응하는 제1 거울상이성질체 프로필렌 글리콜 알킬 에테르를 얻는 것을 더 포함한다. 또다른 실시양태에 서, 본 발명의 방법은 반응 혼합물로부터 미반응된 제2 거울상이성질체 프로필렌 글리콜 알킬 에테르를 회수하는 것을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 효소 촉매를 재순환시키는 것을 더 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 아실화 프로필렌 글리콜 에테르의 수율 및 아실화 또는 비아실화 프로필렌 글리콜 에테르의 거울상이성질체 순도를 모니터하고, 제1 기질 대 제2 기질의 비를 조정하여 목적하는 수율 및 순도를 얻는 것을 더 포함한다. 다른 실시양태에서, 아실 도너로서 라세미 글리콜 에테르 아세테이트를 사용하는 본 발명의 방법은 성분의 전환율을 증가시키기 위해 반응 혼합물로부터 부산물 알코올을 제거하고 동일한 반응에서 4개 이하의 키랄 화합물을 발생시키는 것을 더 포함한다.

또 다른 면에서, 본 발명은

(a) 하기 화학식 II의 프로필렌 글리콜 에테르 라세미체와, 리파아제, 에스테라제, 아실라제 및 프로테아제로 이루어진 군에서 선택된 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를, 활성화 에스테르, 비활성화 에스테르, 에놀 에스테르 및 무수물로 이루어진 군에서 선택된 아실 도너를 더 포함하는 반응 혼합물에서 약 4 ℃ 내지 약 80 ℃의 온도에서 접촉시켜 (S)-1-알콕시-2-프로판올 및 (R)-1-알콕시-2-프로판올 아실레이트를 얻는 단계;

(b) 증류 또는 추출과 같은 적당한 분리 방법을 이용하여 단계 (a)에서 형성된 (S)-1-알콕시-2-프로판올과 (R)-1-알콕시-2-프로판올 아실레이트를 분리하는 단계;

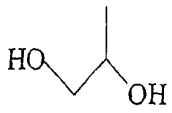
(c) 단계 (b)에서 분리된 (S)-1-알콕시-2-프로판올을, 약 5-15 중량%, 바람 직하게는 5-10 중량%의 양의 산 촉매, 예를 들면 p-톨루엔 술폰산 또는 술폰화 이온 교환 수지의 존재하에 온화한 반응 조건하에서 탈알콕실화하여 (S)-1,2-프로판디올을 얻는 단계;

(d) 추출 및(또는) 증류와 같은 적당한 분리 방법을 이용하여 단계 (c)에서 얻은 (S)-1,2-프로판디올을 단리하는 단계; 및 임의로

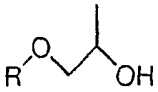
(e) 약 5-15 중량%, 바람직하게는 5-10 중량%의 양의 산 촉매, 예를 들면 p-톨루엔 술폰산 또는 술폰화 이온 교환 수지의 존재하에 온화한 반응 조건하에서 단계 (b)에서 분리된 (R)-1-알콕시-2-프로판올 아실레이트를 탈알콕실화하여 (R)-1,2-프로판디올을 얻는 단계; 및

(f) 추출 및(또는) 증류와 같은 적당한 분리 방법을 이용하여 단계 (e)에서 얻은 (R)-1,2-프로판디올을 단리하는 단계를 포함하는, R 또는 S 배위의 하기 화학식 III의 키랄 화합물의 제조 방법을 제공한다.

화학식 III



<화학식 II>



상기 식에서, R은 알킬, 아릴-치환된 알킬, 알릴릭 또는 아세탈 기로부터 선 택된다.

상기 화학식 II에서 R의 비제한적 예는 $C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_2C_6H_5$, $C(CH_3)(C_6H_5)_2$, $C(C_6H_5)_3$, $C(CH_3)_2CH_2CH_3$, $CH_2C_6H_5$, $CH_2CH{=}CH_2$, $CH_2C{\equiv}CH$, $CH_2OCH_2CH_2OCH_3$ 및 CH_2OCH_3 이다. 아실 도너는 비활성화 또는 활성화 아실 도너일 수 있다. 활성화 아실 도너는 활성화 에스테르, 에놀 에스테르 및 무수물로부터 선택된다. 적합한 활성화 아실 도너의 비제한적 예는 비닐 아세테이트, 비닐 프로피오네이트, 2,2,2-트리클로로에틸 아세테이트, 2,2,2-트리플루오로에틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 에틸 페닐 아세테이트, 이소프로페닐 아세테이트, 에틸 메톡시아세테이트, 1-에톡시비닐 아세테이트, 디케텐, 트리플루오로에틸 부티레이트, 아세트산 무수물, 락티드 및 숙신산 무수물이다. 바람직한 활성화 아실 도너는 비닐 아세테이트 및 이소프로페닐 아세테이트이다. 적합한 비활성화 아실 도너의 비제한적 예는 에틸 아세테이트 및 키랄 아실 도너 화합물, 예를 들면 라세미 1-메톡시-2-프로판올 아세테이트 (PMA), 프로필렌 글리콜 에틸 에테르 아세테이트 (PEA), 프로필렌 글리콜 n-프로필 에테르 아세테이트 (PnPA), 에틸 아세테이트 (EA), 부틸 아세테이트 (BA) 및 에틸 페닐 아세테이트 (EPA)를 포함한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 가수분해효소는 리파아제, 에스테라제, 아실라제 및 프로테아제로 이루어진 군에서 선택된다. 바람직한 가수분해효소는 리파아제 및 에스테라제이다. 가장 바람직한 가수분해효소는 리파아제이고, 특히 바람직한 리파아제는 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B, 리파아제 LP 'S', 슈도모나스 속 지단백질 리파아제, 슈도모나스 속 리파아제 및 슈도모나스 세파시아 리파아제로 이루어진 군에서 선택된다. 가장 바람직한 리파아제는 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B이다. 적합한 탈알콕실화 촉매의 비제한적 예는 p-톨루엔 술폰산 (p-TSA), DOWEX DR-2030 이온 교환 수지, DOWEX MSC-1H+ 이온 교환 수지, 산성 백토, 나피온 (Nafion) H+ 촉매 및 황산과 같은 무기산이다. DOWEX는 다우 케미칼 캄파니의 상표이다. 나피온은 듀폰의 상표이다. 탈알콕실화 단계는 약 40 내지 약 130 ℃, 바람직하게는 약 80 ℃ 내지 약 100 ℃의 온도에서 용이하게 수행된다.

상기한 라세미 혼합물의 통상의 역학적 분할은 거울상이성질체 생성물의 이론적 최대 수율이 50%라는 단점을 갖는다. 라세미 기질에 존재하는 단일 거울상이성질체의 완전한 변환은 동력학적 분할을 통해 이루어질 수 있다. 이 방법은 기질의 루테늄 촉매화된 라세미화와 리파아제 촉매화된 아실화를 조합하여 생성물을 고수율 및 고광학 순도로 형성 가능하게 한다. 동력학적 분할에서, 기질의 미반응성 거울상이성질체 (리파아제와 반응하지 않거나 단지 서서히 반응함)는 연속적으로 라세미화되고 생성물은 이론적으로 광학적으로 순수한 형태로 100% 수율로 얻어질 수 있다. 이러한 접근법의 예는 이차 알코올 (Larsson, A.L.E. et al. 1997. Angew. Chem., Int Ed. Engl. 36:1211-1212; Kim, M.-J. et al. 2001. J. Org. Chem. 66:4736-4738), 디올 (Pearson, B.A. et al. 1999. J. Org. Chem. 64:5237-5249) 및 알파-히드록시 산 에스테르 (Huerta, F.F. et al. 2000. Org. Lett. 2: 1037-1040)에 대해 입증된 바 있다. 사실상, 약 6% (w/v) 1-페녹시-2-프로판올의 루테늄- 및 효소 촉매화된 동력학적 분할은 아실 도너로서 4-클로로페닐 아세테이 트를 사용하여 CAL-B에 의해 입증되었으며 (Persson et al. 1999. J. Am. Chem. Soc. 121:1645-1650); R-1-페녹시-2-프로판올은 생성물로서 88%의 수율 및 >99%의 % ee로 보고되었다. 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 에스테르교환에 기초한 분할에 이러한 접근법을 적용하여 목적하는 아실화 키랄 생성물 또는 그

로부터 유래된 물질의 수율을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 일련의 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 그의 상응하는 아세테이트를 나타낸다.

도 2는 GC/FID에 의해 분석된 반응 혼합물로부터의 (S)-PMA의 분할을 나타낸다. 반응 혼합물은 수성 매질 (인산 나트륨 완충액, pH 7.2) 중에 CAL-B (1.0 ㎎/㎖ 키라자임 L-2 lyo.) 및 25% (v/v) PMA를 함유하였다. 체류 시간은 라세미체 PM, 2.81 분; PMA-S, 4.10 분; PMA-R, 4.24 분이다.

도 3은 (S)-PMA의 분할을 CAL-B 효소 농도의 함수로서 나타낸다. 수성 반응 혼합물은 PMA를 25% (v/v)로 또한 키라자임 L-2 lyo.를 0.1 ㎎/㎖ (속이 채워진 사각형), 0.5 ㎎/㎖ (속이 채워진 원), 1.0 ㎎/㎖ (속이 빈 사각형) 및 2.0 ㎎/㎖ (속이 빈 원)로 함유하였다.

도 4는 키라자임, L-2, c.-f., C2 첨가량의 함수로서 측정된 (a) (±)-1-메톡시-2-프로판올 (PM) 및 (b) (±)-1-페녹시-2-프로판올 (PPh)의 에스테르교환을 나타낸다. (R)-PM 및 (R)-PPhA의 거울상이성질체 과잉율 (% ee) 및 전환율 (%)은 이론적 전환율을 각각 35% 및 45%로 한정하는 비의 PM/VA (75:25, % v/v) 및 PPh/VA (80:20, % v/v)를 포함하는 반응 혼합물에서 측정되었다. 부호 설명에 있는 수치는 반응에서의 키라자임, L-2, c.-f., C2의 농도 (㎎/㎖)를 나타낸다.

도 5는 CAL-B (1 ㎎/㎖)를 포함하는 반응 혼합물에서 비닐 아세테이트 30% (v/v)에 의한 PPh 70% (v/v)의 거울상이성질체 선택적 아실화를 나타낸다.

도 6은 PEA 가수분해를 위한 효소 재순환을 나타낸다. PEA의 분할 (% ee로 표시됨)은 CAL-B의 3가지의 다른 농도에 대한 효소 주기의 함수로서 나타내어져 있으며; 주기 길이는, 주기 3 (48 시간) 및 주기 8 및 13 (60 시간)을 제외하고는 24시간이다.

도 7은 스케일 확대 조건하에 PEA 가수분해를 위한 효소 재순환을 나타낸다. PEA의 분할 (% ee로 표시됨)은 배양 시간의 함수로서 나타내어져 있으며, 여기서 각 주기는 샘플을 제거하고 분석하여 반응 경로 중에 모니터되었고; 각 주기 길이는 약 2시간 내지 약 9시간으로 가변적이었다. 반응 혼합물은 1.5 l였고, PEA는 20% v/v로 존재하였고, 고정화 CAL-B 효소를 반응기에 보유하여, 소비된 반응 혼합물을 주기 말기에 반응기로부터 제거하고, 새로운 반응 혼합물을 첨가하여 새 주기를 시작하였다. 주기 8, 10, 16 및 25에서 반응이 느려졌을 때 새로운 효소 (초기 첨가량의 10%)를 첨가하였다.

도 8은 최대 32 주기 동안 스케일 확대 조건하에 PEA 가수분해를 위한 효소 재순환을 나타낸다. 두 (S)-PEA 및 (R)-PE의 분할 (% ee로 표시됨) 및 총 전환율 (% ee로 표시됨)은 주기 수의 함수로서 나타내어져 있다. 반응 혼합물은 1.5 l였고, PEA는 20% v/v로 존재하였고, 고정화 CAL-B 효소를 반응기에 보유하여, 소비 또는 분할된 반응 혼합물을 주기 말기에 반응기로부터 제거하고, 새로운 반응 혼합물을 첨가하여 새 주기를 시작하였다. 각 주기는 반응 (도 7에 나타낸 반응과 유사함) 경로 중에 모니터되었고, 최종 샘플은 분할 및 전환율을 계산하는데 사용하였다.

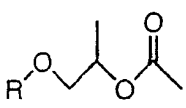
발명의 상세한 설명

본 발명은 글리콜 에테르 및 글리콜 에테르 아세테이트의 효소적 분할 방법, 및 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 효소적 분할에 관한 것이다.

본 발명은 글리콜 에테르 및 글리콜 에테르 아세테이트, 및 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 효소적 분할 방법을 제공한다.

예시적인 글리콜 에테르 아세테이트는 다음 화학식의 구조를 갖는다.

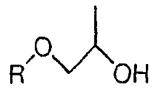
<화학식 I>



상기 식에서, R은 알킬 또는 아릴 기로부터 선택된다. 상기 화학식 I에서 R로 표시되는 알킬 및 아릴 기의 비제한적 예는 CH_3, CH_3CH_2, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH(CH_3)_2$, $C(CH_3)_3$ 및 C_6H_5이다.

예시적인 글리콜 에테르는 다음 화학식의 구조를 갖는다.

<화학식 II>



상기 식에서, R은 알킬 또는 아릴 기로부터 선택된다. 상기 화학식 II에서 R로 표시되는 알킬 및 아릴 기의 비제한적 예는 CH_3, CH_3CH_2, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH(CH_3)_2$, $C(CH_3)_3$ 및 C_6H_5이다.

상기 화학식 I로 표시되는 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트 및 화학식 II로 표시되는 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 비제한적 예는 도 1에 도시되어 있다.

라세미 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 효소적 분할을 위한 효소 촉매는 라세미 혼합물의 높은 비율의 전환율 (예를 들면, 일부 실시양태에서 약 40%, 다른 실시양태에서 약 50% 전환율)로 높은 수준의 거울상이성질체 선택성 (예를 들면, 잔여 기질의 거울상이성질체 과잉율 (ee)이, 일부 실시양태에서 약 90%를 초과하고, 다른 실시양태에서 약 95%를 초과함)을 갖고 라세미 혼합물에 존재하는 두 거울상이성질체 중 하나 만의 아세테이트를 가수분해하여 잔여 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트 혼합물이 고도로 분할되도록 (예를 들면, 일부 실시양태에서 혼합물은 약 97.5%를 초과하는 S-이성질체 및 약 2.5% 미만의 R-이성질체를 포함하고, 다른 실시양태에서 혼합물은 약 97.5%를 초과하는 R-이성질체 및 약 2.5% 미만의 S-이성질체를 포함함)하는 것이다. 분할된 (S)-프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 아세테이트를 형성하게 하는 R-이성질체의 거울상이성질체 선택적 가수분해의 이점은 (S)-글리콜 에테르 아세테이트가 상응하는 (S)-글리콜 에테르로 비교적 쉽게 화학적으로 전환된다는 것이다.

키랄 화합물의 라세미 혼합물의 효소적 분할에서 전환율에 대한 ee 및 거울상이성질체 선택성 (E)의 계산법은 개시되어 있다 (미국 특허 제5,541,080호).

본 발명의 개발 중에, 110종이 넘는 시판 가수분해효소 (리파아제, 에스테라제, 아실라제 및 프로테아제)를 처음에 시험 글리콜 알킬 에테르 아세테이트, (±)-PMA [(±)-1-메톡시-2-프로판올 아세테이트]의 라세미 혼합물의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 촉매화하는 능력에 대해 스크리닝하였다. 효소 스크리닝을 수성 반응 조건하에서 0.5% (v/v) PMA로 수행하였다. β-DEX 325 칼럼을 가진 키랄 모세관 기체 크로마토그래피를 사용하여 아세테이트 기질의 거울상이성질체 조성 및 알코올 생성물, 1-메톡시-2-프로판올 (PM)의 형성을 모니터하였다. 효소적 생체공정의 개발을 촉진시키기 위해 초기 스크리닝 중에 높은 거울상이성질체 선택성을 나타내는 한 효소를 선택하여 이후에 여러가지 파라메터 (즉, 높은 기질 농도, 2상 조건, 온도 등)에서의 그의 성능을 시험하였다. 동일한 효소는 또한 추가의 관련 프로필렌 글리콜 알킬 또는 아릴 에테르 아세테이트의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 촉진시킬 수 있다 (실시예 5 참조).

110종이 넘는 시판 가수분해효소의 스크리닝에 기초한 결과는 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B (CAL-B)가 글리콜 에테르 알킬 아세테이트의 (S)-거울상 이성질체의 분할 (99 % ee를 초과함)을 일으키는 PMA [(±)-메톡시-2-프로판올 아 세테이트]의 (R)-거울상 이성질체의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 촉매화하였음을 나타내었다 (실시예 3 참조). 동일한 효소 CAL-B는 또한 비양자성 용매 또는 비수성 조건하에 아실 도너에 의한 PM의 라세미 혼합물의 거울상이성질체 선택적 아실화 (에스테르교환)를 촉매화하여 거울상이성질체적으로 풍부한 (R)-PMA 및 미반응된 (S)-PM을 생산하는 것으로 밝혀졌다 (실시예 6 참조). 일반적인 조건은 생체촉매반응 공정에서 광활성 PMA 또는 PM을 고수율로 분할하기 위한 CAL-B 또는 유사한 리파아제의 사용에 대해 결정되었다. 분할된 광활성 화학종 (글리콜 에테르 아세테이트 및 글리콜 에테르) 둘다는, 제한되는 것은 아니지만 액체-액체 추출, 열활성화 분리, 증류, 고상 추출법, 액체-고체 흡착 또는 그의 조합을 포함한 많은 기술에 의해 반응 혼합물로부터 회수 및 단리될 수 있으며, 바람직한 실시양태에서 분할된 광활성 종은 증류된다. 회수된 광활성 글리콜 에테르 아세테이트의 화학적 가수분해 또는 에스테르교환과 같은 방법에 의해 순수한 형태의 상응하는 키랄 글리콜 에테르를 쉽게 얻을 수 있다.

110종이 넘는 시판 가수분해효소의 패널은 추가의 관련 글리콜 에테르 아세테이트의 거울상이성질체 선택적 가수분해에 대해 스크리닝되었다. 예시적 기질은 (±)-1-에톡시-2-프로판올 아세테이트 (PEA), (±)-1-n-프로필옥시-2-프로판올 아세테이트 (PnPA), (±)-1-이소프로필옥시-2-프로판올 아세테이트 (PiPA), (±)-1-n-부틸옥시-2-프로판올 아세테이트 (PnBA) 및 (±)-1-페녹시-2-프로판올 아세테이트 (PPhA) (PMA와 함께, 이들 기질은 총체적으로 P-계 기질로 칭해짐)를 포함한다. 스크리닝된 P-계 기질의 경우, 칸디다 안타르크티카 리파아제 B (CAL-B)가 가장

거 울상이성질체 선택적인 효소였다 (예들은 표 1-5에 나타내어져 있음). 슈도모나스 속 리파아제 (PSL), 칸디다 안타르크티카 리파아제 A (CAL-A) 및 칸디다 루고사 리파아제 (CRL)를 포함한 기타 가수분해효소는 또한 기질의 일부의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 촉매화하였다.

또한, 리파아제 CAL-B는 또한 각종 아실 도너 (예를 들면, 에틸 아세테이트 및 비닐 아세테이트를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아님)에 의한 유기 용매 중의 PE, PnP, PiP, PnB, PtB 및 PPh의 에스테르교환 반응에 기초한 분할에 사용되었다. 기질 전환도에 따라서, 상응하는 글리콜 에테르 아세테이트의 (R)-거울상이성질체가 높은 광학 순도의 생성물로서 형성되었으며, 또한 비전환된 잔여 (S)-거울상이성질체가 높은 광학 순도로 존재하게 된다.

따라서, 본 발명은 2가지 다른 유형의 기질, 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 효소적 분할 방법을 제공한다. 효소적 촉매는 가수분해효소이며, 바람직하게는 에스테르의 가수분해를 가역적으로 촉매화한다. 따라서, 효소적 촉매 가수분해효소는 또한 에스테르교환을 촉매화한다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 효소는 라세미체 기질과 적절한 반응 조건에 따라서 2가지 다른 반응 중의 하나를 촉매화한다.

일부 실시양태에서, 촉매화된 반응은 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트가 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르로 가수분해되어 아세테이트 기가 아세트산으로 유리되는 가수분해이다. 가수분해 반응에서, 효소는 한 이성질체를 거울상이성질체 선택적으로 가수분해하며, 그 결과 이 이성질체의 가수 분해 생성물이 풍부해지고 그 생성물로 쉽게 전환되지 않는 다른 이성질체의 기질이 풍부해진다. 따라서, 특별한 실시양태에서 효소가 CAL-B이고 기질이 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 라세미체인 경우, 본 발명의 방법으로 주로 R 형태가 생성물로 전환되므로 S-프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 기질이 풍부해지고, S 형태가 생성물로 신속하게 전환되지 않으므로 R-프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 생성물이 풍부해진다. 따라서, 이러한 실시양태에서 가수분해 반응의 말기에, 두 주요 거울상이성질체는 S-프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트 및 R-프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르이다.

다른 실시양태에서, 촉매화된 반응은 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르가 아실 기에 의해 에스테르화되는 에스테르교환 반응이다. 에스테르교환 반응에서, 효소는 한 이성질체를 거울상이성질체 선택적으로 아실화하며, 그 결과 이 이성질체의 아실화 생성물이 풍부해지고 그 생성물로 쉽게 전환되지 않는 다른 이성질체의 기질이 풍부해진다. 특별한 실시양태에서 효소가 CAL-B이고 기질이 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 아실 도너의 라세미체인 경우, 본 발명의 방법으로 주로 R 형태가 생성물로 전환되므로 S-프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 기질이 풍부해지고, S 형태가 생성물로 신속하게 전환되지 않으므로 R-아실 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 생성물이 풍부해진다. 따라서, 에스테르교환 반응의 말기에, 두 주요 거울상이성질체는 S-프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 및 R-아실 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르이다.

따라서, 일부 실시양태에서 본 발명은 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 라세미체와 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를 반응 혼합물에서 접촉시켜 라세미체의 한 이성질체를 상응하는 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르로 거울상이성질체 선택적 가수분해시키는 것을 포함하는, 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 라세미 혼합물의 분할 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 효소적 촉매는 리파아제 칸디다 안타르크티카 리파아제 B (CAL-B)이다. 효소 촉매화된 가수분해에 의해 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 라세미 혼합물을 분할하기 위한 본 발명의 방법의 특별한 바람직한 실시양태에 관한 추가의 정보는 아래에 제공되어 있다.

다른 실시양태에서, 본 발명은 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 라세미체 및 아실 도너와 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를 반응 혼합물에서 접촉시켜 라세미체의 한 이성질체를 상응하는 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아실레이트로 거울상이성질체 선택적 에스테르화하는 것을 포함하는, 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 라세미 혼합물의 분할 방법을 제공한다. 아실 공여체로서 일반적으로 사용되는 '아실 도너'란 용어는 다른 에스테르의 형성을 유도하는 다른 적합한 반응 화합물로 대체될 수 있으며, 비제한적 예로서 비닐 프로피오네이트의 존재하의 에스테르교환 반응은 프로피오닐 에스테르의 형성을 유도한다. 일부 실시양태에서, 효소적 촉매는 리파아제 칸디다 안타르크티카 리파아제 B (CAL-B)이다. 효소 촉매화된 에스테르교환에 의해 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 라세미 혼합물을 분할하기 위한 본 발명의 방법의 특별한 바람직한 실시양태에 관한 추가의 정보는 아래에 제공되어 있다.

위와 아래에 기재된 바와 같은 가수분해 또는 에스테르교환에 의한 라세미체의 분할 시에, 반응, 또는 기질의 생성물로의 전환은 수많은 공지된 수단에 의해 모니터될 수 있으며, 바람직한 방법은 기체 크로마토그래피 (GC)에 의한 반응물 및 생성물의 분석을 포함하며, 몇가지 다른 방법이 실시예에 기재되어 있다 (실시예 1 참조). 생성물의 수율은 생성물로 전환된 기질의 백분율로서 표시되며, 이 백분율은 일반적으로 몰 기준으로 표시되지만, 그것은 중량 또는 용적 기준으로 표시될 수도 있다. 이상적인 라세미 혼합물의 임의의 특별한 하나의 거울상이성질체에 대한 이론적인 최대 수율은 50% (몰 기준으로 표시)이며, 이는 다른 이성질체가 아닌 하나의 이성질체 전부를 생성물로 전환시키는 것을 나타낸다. 그러나, 임의의 특별한 반응을 위하여, 이론적인 최대 수율은 100%이며, 이는 모든 기질이 생성물로

전환되는 것을 나타낸다. 반응 중의 특별한 시점에서 생성물 또는 남아있는 기질의 순도는 거울상이성질체 과잉율 또는 ee로서 표시된다. ee는 생성물 또는 기질의 거울상이성질체 풍부함을 나타내며, 이론적인 최대치는 100%이다. 반응 조건은 효율 및 비용 효과 기준으로 기질 전환을 실시하는 동안 특별한 거울상이성질체에 대해 이론적인 최대 수율 및 ee 근사치를 얻도록 하는 것이 최적이다. 최적 반응 조건은 50% 전환을 가능하게 하며 그 결과 거울상 순수한 제품 (99% ee 초과)이 형성된다. 높은 거울상이성질체 순도의 한 생성물 또는 다른 생성물의 40-50% 전환 및 분할을 가능하게 하는 조건이 또한 바람직하다. 호모키랄은 아니고, 하나 또는 다른 거울상이성질체가 풍부한 회수된 생성물을 순차적 분할을 위한 기질로서 이용 하여 목적하는 거울상이성질체 순도를 제공할 수 있다.

다음 설명은 본 발명의 특별한 바람직한 실시양태에 관한 추가의 정보를 제공한다.

효소적 촉매

프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트 라세미체의 분할 방법을 제공하는 본 발명의 일부 실시태양에서, 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 라세미체의 분할을 위한 효소적 촉매는 라세미체의 한 이성질체를 거울상이성질체 선택적으로 가수분해하는 가수분해효소이며, 바람직하게는 거울상이성질체 선택적 가수분해는 생성물 또는 출발 물질의 높은 거울상이성질체 순도를 갖게 한다. 일반적으로, 생성물의 높은 거울상이성질체 순도는 기질의 생성물로의 50% 미만의 전환 (또는 아세테이트의 가수분해)에서 얻어지는 반면, 기질의 높은 거울상이성질체 순도는 50% 초과의 전환에서 얻어진다. 바람직하게는, 글리콜 에테르 생성물의 거울상이성질체 순도는 약 55% ee 초과이며, 더욱 바람직하게는 약 70% ee 초과이며, 더욱 더 바람직하게는 약 80% ee 또는 85% ee 초과이며, 가장 바람직하게는 약 95% ee 또는 98% ee 초과이다. 바람직한 실시양태에서, 효소적 촉매는 R-이성질 아세테이트를 가수분해한다.

가수분해효소는 리파아제 또는 에스테라제이다. 리파아제 및 에스테라제, 특히 카르복실산 에스테라제는 에스테르의 가수분해를 촉매화한다. 예시적인 가수분해효소는 표 1-5에 기록되어 있으며, 칸디다 안타르크티카 리파아제 B, 슈도모나스 속 지단백질 리파아제, 슈도모나스 속 리파아제, 슈도모나스 세파시아 리파아제 및 에스테라제를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 바람직한 실시양태에서, 가수분해효소는 수불용성 에스테르의 가수분해를 우선적으로 촉매화하는 리파아제이다.

프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 라세미체를 분할하는 방법을 제공하는 본 발명의 다른 실시양태에서, 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 라세미체의 분할을 위한 효소적 촉매는 아실 도너의 존재하에 라세미체의 한 이성질체를 거울상이성질체 선택적으로 에스테르교환시키는 가수분해효소이며, 거울상이성질체 선택적 에스테르교환은 생성물 또는 출발 물질의 높은 거울상이성질체 순도를 갖게 하는 것이 바람직하다. 일반적으로, 생성물의 높은 거울상이성질체 순도는 기질의 생성물로의 50% 미만의 전환 (또는 글리콜 에테르의 에스테르화)에서 얻어지는 반면, 기질의 높은 거울상이성질체 순도는 50% 초과의 전환에서 얻어진다. 바람직하게는, 글리콜 에테르 아실레이트 생성물의 거울상이성질체 순도는 약 55% ee 초과이며, 더욱 바람직하게는 약 70% ee 초과이며, 더욱 더 바람직하게는 약 80% ee 또는 85% ee 초과이며, 가장 바람직하게는 약 95% ee 또는 98% ee 초과이다. 바람직한 실시양태에서, 효소적 촉매는 R-이성질 에테르를 에스테르교환시킨다.

가수분해효소는 리파아제 또는 에스테라제이다. 리파아제 및 에스테라제, 특히 카르복실산 에스테라제는 에스테르의 가수분해를 촉매화한다. 예시적인 가수분해효소는 표 1-5에 기록되어 있으며, 칸디다 안타르크티카 리파아제 B, 슈도모나스 속 지단백질 리파아제, 슈도모나스 속 리파아제, 슈도모나스 세파시아 리파아제 및 에스테라제를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 바람직한 실시양태에서, 가수분해효소는 수불용성 에스테르의 가수분해를 우선적으로 촉매화하는 리파아제이다.

반드시 동일한 효소가 본 발명의 다른 실시양태에 이용되어야 하는 것은 아니다. 따라서, 한 효소가 거울상이성질체 선택적 가수분해에 의한 글리콜 에테르 아세테이트의 라세미체의 분할에 이용될 수 있고, 다른 효소가 거울상이성질체 선택적 에스테르교환에 의한 글리콜 에테르의 라세미체의 분할에 이용될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 효소적 촉매는 칸디다 안타르크티카 리파아제 B (CAL-B)이다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 이 효소는 가수분해 및 에스테르교환 반응 둘다에 이용된다.

칸디다 안타르크티카 리파아제 B (CAL-B)는 공개된 절차 (Patkar et al. (1993) Ind J. Chem. Sect. B 32B: 76-80)에 따라서 칸디다 안타르크티카 세포로부터 단리하거나 시판되는 공급원 (예를 들면, NOVO Nordisk로부터의 SP 525; Roche Molecular Biochemicals로부터의 CHIRAZYME.RTM.L-2.lyo)으로부터 얻을 수 있으며 어떠한 전처리 없이 촉매로서 사용할 수 있다. CAL-B는 또한 중합체 매트릭스 내에, 가용성 또는 불용성 유기 지지체 (예를 들면, Novo Nordisk로부터의 NOVOZYM.RTM.435; Roche로부터의 키라자임 L-2, c.-f., lyo, (담체 1); Roche로부터의 키라자임 L-2, c.f., C2 (담체 2)) 상에, 또는 재사용을 위한 촉매 회수를 간단하게 하는 불용성 무기 지지체 상에 고정될 수 있으며; 이들 고정화 방법은 널리 보고되어 있으며 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다. 반응 혼합물로부터의 가용성 효소의 막 분리를 또한 이용할 수 있다.

CAL-B와 유사한 기질 활성 및 거울상이성질체 특이성을 가진 리파아제 (일반적으로, 변형된 CAL-B를 포함)를 또한 본 발명에 이용할 수 있다. 다른 실시양태에서, 효소적 촉매는 CAL-B 또는 다른 적합한 리파아제 또는 에스테라제를 발현하는 유전 공학처리된 전세포 형질전환체로부터, 또는 당업계에 공지된 방법에 의해 그러한 형질전환체로부터 얻어지는 제제로부터 얻을 수 있다.

가수분해에 의한 분할

글리콜 에테르, 및 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 라세미체의 분할을 위한 가수분해 반응의 다른 파라메터를 평가하여 최적화할 수 있다 (실시예 3-5 참조). 가수분해 반응은 효소가 기질을 생성물로 전환시키는 거울상이성질체 선택적 가수분해 반응을 촉매화하는, 효소 촉매 및 라세미 기질의 배합물인 반응 혼합물에서 일어나며, 여기에는 하나 이상의 기질 또는 하나 이상의 생성물이 존재할 수 있다. 반응 혼합물에 추가의 성분이 존재할 수도 있다. 반응 조건은 다른 반응 파라메터의 상대적 중요성 및 반응 중에 얻어져야 하는 다른 파라메터의 목적값에 따라서 최적화된다. 다른 파라메터의 비제한적 예에는 분할될 거울상이성질체의 종류, 목적하는 수율 및 순도, 분할되어야 하는 라세미체의 양 또는 분할 거울상이성질체의 목적량, 필요한 반응 기간 및 효소적 촉매의 첨가량이 포함된다. 따라서, 일부 실시양태에서는 저농도의 효소를 사용하여 높은 기질 첨가량으로 고순도의 분할 거울상이성질체를 얻기 위하여 PMA의 라세미체의 거울상이성질체 선택적 가수분해에 대한 최적의 또는 거의 최적의 조건을 이용한다. '기질 첨가량'은 반응 혼합물에 존재하는 기질의 초기량 또는 초기 농도를 의미한다. 일반적으로, 전환율은 약 30% 내지 약 50%이며, 가수분해된 생성물의 거울상이성질체 순도는 약 70% ee 이상, 바람직하게는 약 80% ee 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% ee 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 95% ee 이상이다. 이상적으로, CAL-B가 높은 선택성을 나타내는 경우, 바람직한 조건은 분할된 기질 및 생성물의 50% 수율 및 >99% ee를 가능하게 한다. 주로, 기질의 거울상이성질체 순도가 높지만, 일반적으로 생성물의 순도만큼 높지는 않으며, 50%를 초과하는 전환에서는 일반적으로 기질의 거울상이성질체 순도가 더 높게 얻어진다. 본 발명의 반응 조건하에서 가수분해는 가역적인 반응이 아니며, 즉 가수분해 생성물은 현저하게 수성인 반응 조건하에서 (또는 약 10% 초과의 물의 조건하에서도) 에스테르 교환 반응을 겪지 않는다. 남아있는 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 글리콜 아세테이트 (비전환된 기질)는 가수분해된 글리콜 에테르 생성물에 대한 아실 도너로서 작용하지 않는다.

일부 실시양태에서, 가수분해 반응에 의해 분할된 라세미체는 글리콜 에테르 아세테이트, 및 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트이며, 예시적인 글리콜 에테르는 상기 화학식 I로 표시되어 있다. 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트의 비제한적 예는 도 1에 예시되어 있다. 다른 실시양태에서, 분할된 라세미체는 글리콜 에테르 부티레이트, 및 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 부티레이트, 및 글리콜 에테르 프로피오네이트, 및 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 프로피오네이트이다.

다른 실시양태에서, 기질 라세미체의 농도는 약 0.5% 내지 약 50% v/v로 가 변적이며, 바람직하게는 기질의 농도는 약 10% v/v를 초과한다. 임의의 특별한 아실화 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 (예를 들면, PGAEA)의 가장 효과적인 농도는 반응 혼합물의 다른 조건 및 반응 말기에 남아있는 기질 또는 생성물의 목적하는 최종 전환율 및 순도에 따라서 변화될 것이다. 그러나, 다음 농도가 효과적인 것으로 밝혀졌다 (% v/v로서 표시됨); PMA, 약 25% 내지 약 40%, 바람직하게는 수성 반응에서 약 25%, 및 2상 반응에서 약 10%; PEA, 약 0.5 내지 약 50%, 바람직하게는 수성 반응에서 약 20 내지 약 25%; PPhA, 약 15% 내지 약 50%, 바람직하게는 수성 반응에서 약 10 내지 약 25%; PnPA, PiPA, PnBA, 약 0.5% 내지 약 50%, 바람직하게는 수성 반응에서 약 10 내지 약 25%.

반응 혼합물 중의 효소 촉매 제제 (비고정화 또는 고정화됨)의 양 (㎎/㎖)은 원하는 반응 속도를 얻기 위한 것으로 선택되며, 효소 촉매의 제제의 특이적 활성에 좌우된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 가수분해 반응에서의 비고정화 CAL-B (정제된 단백질이 아닌 조효소 제제로서)의 양은 반응 혼합물 ㎖ 당 약 0.001 내지 약 5 ㎎일 수 있으며, 일반적으로 총 반응 용적 ㎖ 당 약 0.5 내지 약 2 ㎎의 CAL-B이며, 가장 바람직하게는 총 반응 용적 ㎖ 당 약 1 내지 약 2 ㎎의 CAL-B이다.

다른 실시양태에서, 본 발명의 가수분해 반응에서의 고정화 CAL-B (정제된 단백질이 아닌 조효소 제제로서)의 양은 반응 혼합물 ㎖ 당 약 0.1 ㎎ 내지 약 1 g일 수 있으며, 일반적으로 반응 혼합물 ㎖ 당 약 0.5 ㎎ 내지 약 0.5 g의 고정화 CAL-B이며, 바람직하게는 반응 혼합물 ㎖ 당 1 ㎎ 내지 200 ㎎의 CAL-B이다. 고정화 CAL-B의 경우에, 분할은 반응 용기 (예를 들면, 나사모양 캡이 있는 반응 바이 알 또는 반응기) 중의 반응 혼합물에 효소를 첨가하거나, 라세미 기질을 포함하는 반응 혼합물을 고정화 효소를 포함하는 칼럼에 통과시키거나, 또는 보유된 효소에 의한 반응 혼합물의 확산을 가능하게 하는 멤브레인 반응기를 사용함으로써 이루어질 수 있다. 고정화 효소는 아래에 더 설명되는 바와 같이, 다중 반응에 사용하기 위해 재순환될 수도 있다.

일부 실시양태에서, 효소 촉매 및 1종 이상의 기질이 배합된 용액, 또는 반응 매질이 수성이며; 다른 실시양태에서 반응 매질은 2상 매질이다. 수성 반응 매질, 또는 2상 매질의 수성 성분은 완충되는 것이 바람직하다. 반응 혼합물의 초기 pH의 유지는 반응 혼합물의 목적하는 pH의 대략 하나의 pH 단위 내에 pKa를 갖는 적절한 완충액을 충분한 농도로 포함함으로써 이루어질 수 있다. 5.0, 6.0 및 7.0의 반응 pH를 위하여, 각각 아세테이트, 시트레이트-포스페이트 및 포스페이트 완충액이 이용될 수 있으며, 완충액의 선택이 이들 예에 한정되지는 않는다. 반응은 또한 첨가된 완충

액의 부재하에 전개될 수도 있으며, 여기서 반응 혼합물의 pH는 반응 경로 중에 모니터되고 반응 혼합물의 pH를 소정의 수치로 유지하기 위해 산 또는 염기가 첨가된다. 완충액의 농도가 다양할 수 있지만, 약 25 mM 내지 약 200 mM의 값이 일반적이다. 반응의 pH는 약 3 내지 약 8.5로 다양할 수 있으며, 바람직한 pH는 약 7이다.

2상 반응 매질은 수성상 (상기한 바와 같음)과 그 수성상에 불혼화성이고 기질 (그들 자체가 용매임)과 별도로 존재하는 용매를 포함한다. 따라서, 2상 반응 매질은 2상으로 분리되는 2종의 불혼화성 용매를 포함한다. 반응 혼합물의 근원적 인 기전을 반드시 이해하고 본 발명을 다음 가정에 의해 제한하려고 하는 것은 아니지만, 수성상이 초기에 용해된 효소를 함유하더라도 효소는 수성상과 불혼화성 기질 함유 유기상 사이의 계면에서 활성이 있는 것으로 생각된다. 반응은 또한 가수분해 반응 및 효소 활성의 유지에 필요한 적어도 최소량의 물이 첨가된 유기 용매로 주로 이루어진 반응 혼합물에서 진행될 수도 있다. 또한, 반응은 물 및 물과 혼화성인 극성 유기 용매를 포함하는 단일상 수성 혼합물을 사용하여 진행될 수도 있다.

각종 용매는 2상 반응에 이용될 수 있으며, 그 예는 헥산 및 톨루엔을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 용매의 농도는 예를 들면, 25% 내지 65% (v/v)로 가변적일 수 있다. 바람직하게는, 용매는 약 40% 내지 약 50% (v/v)로 존재한다. 메탄올, 디옥산 또는 아세톤과 같은 극성 유기 용매는 저농도 (예를 들면, 0.25% 내지 10% v/v)로 첨가되어 거울상이성질체 선택성을 증가시킬 수도 있다.

바람직하게는, 반응 혼합물은 수성이다. 수성 혼합물의 한가지 이점은 가수분해가 유리한 것으로 보인다는 점이다.

대부분의 실시양태에서, 가수분해 반응의 온도는 반응 속도, 효소 촉매 활성의 안정성, 효소의 거울상이성질체 선택성 및 기질의 안정성을 최적화하는 것으로 선택된다. 예를 들면, 배양 온도의 효과는 25% (v/v) PMA 및 1.0 및 0.5 ㎎/㎖ CAL-B (키라자임 L-2 lyo)를 함유하는 수성 반응 혼합물에서 30 내지 50 ℃ (5 ℃ 증분)에서 시험되었다. 이러한 조건하에, PMA 가수분해는 40 ℃에서 가장 신속하 였으며 최종 거울상이성질체 순도는 이 온도에서 영향받지 않았다. 그러나, 더 낮은 효소 농도로 35 ℃에서 배양된 반응물은 40 ℃에서 배양된 반응물보다 더 긴 시간 동안 지속적인 촉매반응을 나타내었으며 더 높은 (S)-PMA 거울상이성질체 순도를 얻게 되었다. 50 ℃에서의 배양은 5시간 내에 효소를 불활성화하였다. 측정된 속도가 온도 유도된 기질 용해도 차이와 무관하다면, 그 결과는 CAL-B (키라자임 L-2 lyo)에 최적인 온도가 약 40 ℃이지만, 수성 반응 혼합물에서는 35 ℃에서 더 큰 효소 안정성이 관찰되었음을 나타낸다. 따라서, 바람직한 온도는 약 35 내지 40 ℃이며, 일반적으로 약 37 ℃의 온도가 이용된다.

대부분의 실시양태에서, 반응 혼합물은 교반되면서 배양되며, 그러한 교반을 실시하는 수단은 회전 진탕, 기계적 교반 또는 임펠러 구동 교반을 포함한다.

정해진 작업 온도에서, 반응 속도는 반응에 존재하는 리파아제의 양에 좌우된다. 그러므로, 반응 시간은 리파아제의 첨가량에 좌우된다. 따라서, 예를 들면 50% 헥산을 가진 2상 조건하에 10% (v/v) PMA의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 실시하는데 필요한 최소 활성 단위를 결정하기 위해 1.0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.001 ㎎/㎖의 농도로 CAL-B (키라자임 L-2 lyo, 120 U/㎎ lyo.를 초과함)를 포함하는 반응 혼합물을 사용하였다. 2시간 후에, 1.0 및 0.5 ㎎/㎖의 효소 첨가량을 포함하는 반응은 PMA의 (S)-거울상이성질체를 거의 이론적 수율로 98% ee를 초과하는 수준으로 분할하였다. 72시간까지, 0.01 ㎎/㎖ 이상의 효소 첨가량을 포함하는 반응은 (S)-PMA를 99.5% ee를 초과하는 수준으로 분할하였다. 그러나, 연장된 배양은 남아있는 (S)-PMA 기질의 추가의 가수분해를 유도하여 0.5 및 1.0 ㎎/㎖의 효 소를 포함하는 반응에서 (S)-PMA의 수율을 각각 약 25% 및 10%까지 저하시켰다 (50%의 최대 이론치 기준).

유사한 실험에서, 거울상이성질체 선택적 가수분해는 25% (v/v) PMA를 함유하는 수성 반응 혼합물에서 효소 농도의 함수로서 시험하였다. 그 결과는 2.0, 1.0 및 0.5 ㎎/㎖의 농도에서의 CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)가 각각 4, 6 및 24시간 내에 99% ee를 초과하는 수준으로 (S)-PMA의 완전한 분할을 실시하였음을 나타내었다 (실시예 4 참조). 대조적으로, 0.1 ㎎/㎖ CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)를 포함하는 반응 혼합물은 30시간 내에 (S)-PMA를 부분적으로 분할하였다 (<60% ee).

그러므로, 대부분의 실시양태에서 반응 시간은 약 2 내지 약 72시간으로 가변적이지만, 바람직하게는 약 4 내지 약 24시간이고, PMA의 경우 반응 시간은 더욱 바람직하게는 약 4 내지 약 6시간이고, PEA의 경우 반응 시간은 더욱 바람직하게는 약 8 내지 10시간이다.

일부 실시양태에서, 가수분해 반응은 단일 배치 반응으로 수행되며; 다른 실시양태에서 가수분해 반응은 연속 방법으로 수행된다.

에스테르교환에 의한 분할

글리콜 에테르, 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 라세미체의 분할에 대한 에스테르교환 또는 아실화 반응의 여러가지 파라메터가 평가되고 최적화될 수 있다 (실시예 6, 7 및 11 참조). 에스테르교환 반응은 효소가 기질

을 아실화 생성물로 전환시키는 에스테르교환 반응을 촉매화하는, 효소 촉매 및 라세미 기질의 배합물인 반응 혼합물에서 일어나는데, 이때 하나 이상의 기질 또는 하 나 이상의 생성물이 존재할 수 있다. 추가의 성분들이 또한 반응 혼합물에 존재할 수 있다. 반응 조건은 상이한 반응 파라메터의 상대적 중요도 및 반응하는 동안 달성될 여러가지 파라메터의 목적하는 수치에 따라 최적화된다. 여러가지 파라메터에 대한 비제한적 예에는 분할될 거울상이성질체의 종류, 목적하는 수율 및 순도, 분할되어야 하는 라세미체의 양 또는 분할 거울상이성질체의 목적량, 필요한 반응 기간 및 효소적 촉매의 첨가량이 포함된다. 수율은 보통 약 30% 내지 약 50%이고, 아세틸화 생성물의 거울상이성질체의 순도는 보통 약 80% ee 초과, 더욱 바람직하게는 약 90% ee 초과, 보다 더 바람직하게는 약 95% ee 초과이다. 종종, 기질의 거울상이성질체 순도도 역시 높으나, 일반적으로 생성물의 순도 만큼은 높지 않은데, 기질의 보다 높은 거울상이성질체 순도는 보통 약 50% 초과의 전환에서 얻을 수 있다. 그런데, 수율 및 순도 모두는 분할될 거울상이성질체의 종류 및 반응 조건에 따라 다르다. 이는 부분적으로는 형성된 생성물의 잠재적 가수분해 또는 알코올분해에 기인한다. 즉, 에스테르교환의 생성물인 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르 아세테이트는 가수분해효소의 효소적 촉매에 의해 상응하는 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르로 가수분해 또는 탈에스테르화될 수 있으며, 이때 이 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르는 다시 에스테르교환 반응에 대한 기질이 되나, 이때의 반응은 기질의 유효성 때문에 제한되게 된다. 그러므로, 역반응이 잔여 출발 물질의 거울상이성질체 순도를 저하시켜 분할 효율성을 감소시킨다. 수율 및 순도의 상호작용은 하기와 같이 상세히 더 설명된다.

반응 혼합물 중에서 비고정화 또는 고정화 효소 촉매 제제의 양 (㎎/㎖)이 목적하는 반응 속도를 얻기 위해 선택되며, 이 양은 효소 촉매 제제의 특이 활성에 따라 다르다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 에스테르교환 반응 중 (정제된 단백질이 아닌 조효소 제제로서) 고정화 CAL-B의 양은 약 0.001 내지 약 50 ㎎/㎖의 범위이지만, 일반적으로는 총 반응 용적 ㎖ 당 CAL-B 약 0.5 ㎎ 내지 약 2 ㎎의 범위이며, 가장 바람직하게는 총 반응 용적 ㎖ 당 CAL-B 약 1 ㎎ 내지 약 2 ㎎의 범위이다. 실제, 효소 첨가량을 조절하는 것이 반응 공학을 통해 생성물 광학 순도를 증가시키는 효과적인 방법임이 입증되었다.

다른 실시양태에서, 본 발명의 에스테르교환 반응 중 (정제된 단백질이 아닌 조효소 제제로서) 고정화 CAL-B의 양은 반응 혼합물 ㎖ 당 고정화 CAL-B 약 0.1 ㎎ 내지 약 1 g의 범위이며, 일반적으로는 약 1 ㎎ 내지 약 0.5 g의 범위이며, 바람직하게는 약 2.5 ㎎ 내지 약 200 ㎎의 범위이다. 고정화 CAL-B의 경우, 분할은 배치 방식으로 반응을 진행시킴으로써, 예를 들면 반응 용기 (예를 들면, 나사모양 캡이 있는 반응 바이알 또는 반응기) 중에서 반응 혼합물에 효소를 첨가시킴으로써 또는 효소를 보유하기 위해 멤브레인을 사용함으로써 달성될 수 있으며, 또한 분할은 라세미 기질을 함유하는 반응 혼합물을 고정화 효소를 함유하는 칼럼에 통과시키는 연속 방식으로 행해질 수도 있다. 배치 방식으로 사용되는 경우, 효소를 하기에 추후 기술하는 바와 같이 재순환시킬 수 있다.

에스테르교환을 위한 반응 매질은 바람직하게는 비양자성 또는 비수성이며, 따라서 다른 실시양태에서, 매질은 1종 이상의 용매 또는 이온성 액체를 포함하며, 바람직하게는 극성인 1종 이상의 유기 용매를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 하 나의 유기 용매이다. 그러한 용매의 예로는 톨루엔 및 헥산, 및 이온성 액체를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 용매의 추가 예는 자체가 유기 용매인 기질 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르, 및 역시 유기 용매인 형성되는 생성물, 즉 상응하는 아실화 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르이다. 비기질형 및 비생성물형 용매는 공용매로서 불리운다. 이온성 액체로는 1-에틸-3-메틸이미다졸륨 (예를 들면, [EMIM]-[BF4]) 및 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 (예를 들면, [BMIM]-[PF6]) (여기서, BF4 및 PF6는 반대 이온, 특히 음이온 성분으로서 역할을 한다)을 들 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다 [(Kim, K.-W., et al. 2001. Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. Organic Letters, 3: 1507-1509) and (Lau, R. M. , et al. 2000 Organic Letters, 2: 4189) 참조].

기타 실시양태 (실시예 9 내지 11 참조)에서, (±)-1-메톡시-2-프로판올 아세테이트 (PMA)는 효소적 에스테르교환에 기초한 분할 공정에서 거울상이성질체 선택적 아실화에 대한 아실 도너로서 사용된다. 아실 도너로서 라세미 키랄 글리콜 에테르를 사용하면 아실화제 뿐만 아니라 분할된 아세테이트 및 알코올 또는 아민 거울상이성질체 기질의 자발적 분할이 가능하다. 그러므로, 효소적으로 분할된 기질 이외에, 아실 도너의 부산물은 또한 분할된 키랄 글리콜 에테르 및 글리콜 에테르 아세테이트 화합물을 나타낸다. 효소적 에스테르교환에 기초한 분할 공정에서 거울상이성질체 선택적 아실화에 대한 아실 도너로서 PMA 및 기타 비활성화 PGAEA 화합물의 유용성은 비활성화 아실 도너로서 PMA를 포함하는 반응-스트리핑 실험을 통해 입증되었다.

에스테르교환 반응에 의해 분할된 기질은 글리콜 에테르, 특히 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르, 및 아실 도너의 라세미 혼합물이며; 글리콜 에테르 아세테이트의 예가 상기 화학식 I로 기술되어 있다. 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 비제한적 예가 도 1에 도시되어 있다. 아실 도너는 활성화된 아실 도너, 예를 들면 활성화 에스테르 (트리플루오로에틸 부티레이트, S-에틸 티오-옥타노에이트, 및 비아세틸 모노-옥심 아세테이트가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아님), 에놀 에스테르 (비닐 아세테이트, 이소프로페닐 아세테이트, 및 1-에톡시비닐 아세테이트 및 디케텐이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아님), 및 무수물 (아세트산 무수물, 락티드 및 숙신산 무수물)을 포함한다. 아실 도너로서 에놀 에스테르 및 산 무수물을 사용하면 실제로 비가역적인 아실화 반응이 일어난다. 이는 특히 알코올 분할시에 유용한데, 그 이유는 역 반응이 잔여 출발 물질의 거울상이성질체 순도를 낮추기 때문이다. 일부 실시양태에서, 아실 도너에는 비닐 아세테이트, 비닐 프로피오네이트, 2,2,2-트리클로로에틸 아세테이트, 2,2,2-트리플루오로에

틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 에틸 페닐 아세테이트, 이소프로페닐 아세테이트, 에틸 메톡시아세테이트, 1-에톡시비닐 아세테이트, 디케텐, 트리플루오로에틸 부티레이트, 아세트산 무수물, 락티드, 및 숙신산 무수물이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 초기 실험에 의하면 기술된 처음 2개의 아실 도너를 사용하였을때, 시험된 모든 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 전환이 아실 도너로서 비닐 아세테이트를 사용한 경우 가장 신속하였다. 본 발명의 실행 기전을 이해 할 필요가 없고, 또한 본 발명이 근원적인 기전에 의해 제한되는 것은 아니지만, 신속 반응은 상기 에스테르화제가 에놀 에스테르이기 때문이고, 그에 대한 생성물인 알코올은 카르보닐 화합물로 호변이성질체화됨으로써 반응이 유도되고 알코올분해에 의한 잠재적 생성물 억제가 해소되는 것으로 생각된다. 아실 도너에는 또한 비활성화된 아실 도너, 예를 들면 에틸 아세테이트 및 라세미 키랄 화합물, 예를 들면 라세미 1-메톡시-2-프로판올 아세테이트 (PMA)가 포함된다. 비활성화된 아실 도너의 추가의 비제한적 예는 부틸 아세테이트 (BA), 에틸 페닐 아세테이트 (EPA), 에틸 아세테이트 (EtA) 및 PnPA가 있다. 이 경우, 정반응을 진행시키고 성분의 전환율을 증가시키기 위해 반응 혼합물로부터 부산물 알코올을 제거하는 것이 유익하다. 본 발명자는 부산물인 알코올이 제거되지 않는한, 반응은 평형을 이루게 되어 정반응과 역반응의 속도가 본질적으로 동일하게 되어 전환 반응이 한계치에 도달하게 된다는 사실을 발견하였다.

부산물의 예로는 에틸 아세테이트로부터 생성된 에탄올, 및 그의 상응하는 키랄 아세테이트로부터 생성된 일반 부류의 키랄 이차 알코올을 들 수 있다. 반응 용기는 부산물인 알코올을 제거하기 위해 반응 용기로부터 기체의 주기적 제거를 수반하는 반배치 작업 방식으로 조작시킬 수 있다. 또한, 상기 조작은 기류 중에서 제거된 시약을 대체시키기 위해 시약의 주기적 첨가를 수반할 수도 있다. 본 발명은 또한 연속적으로 행할 수도 있다. 이는 반응 용기로부터 기체를 연속 제거하고 시약을 연속 첨가하는 것을 포함한다. 반응은 또한 증류탑과 조합하여 수행될 수도 있다. 이는 전환 반응을 추진시키기 위해 반응기에 시약을 공급하고, 그 다음엔 부산물 알코올을 제거하기 위해 증류탑에 시약을 공급하여 알코올 성분이 적은 시약류를 반응기로 되돌리는 방법을 포함한다. 반응과 기체 제거 또는 증류의 조합에 의하여 반응 혼합물로부터 부산물 알코올을 스트리핑할 수 있어 부산물 알코올을 제거하지 않은 상태에서 가능한 속도보다 더 높은 전환 속도로 반응을 유도할 수 있다.

비반응성 스트리핑제를 또한 반응 혼합물에 첨가하여 부산물 알코올의 제거를 촉진시킬 수 있다. 예를 들면, 질소 또는 n-헥산과 같은 스트리핑제를 사용하면 소정의 작동압에서 반응 혼합물의 비점 미만의 온도에서 기체를 제거할 수 있기 때문에 총 공정에 유익할 수도 있다. 스트리핑제를 사용하는 것이 유익하든 아니든 또한 반응 혼합물의 조성, 부산물 알코올의 휘발성, 및 촉매의 감열성에 기인한 작업 온도 및 압력에 대한 제한, 또는 압력이 얼마나 낮을 것인지에 대한 실제적 한계에 따라 가장 적절한 스트리핑제의 선택이 결정되든지 간에, 공정 장치는 작동될 수 있다. 공급액으로부터 경질 성분의 제거를 촉진시키기 위해 일반적으로 스트리핑제를 사용하는 것은 당해 분야에 공지되어 있다.

다른 실시양태에서, 기질인 라세미체의 농도는 용적을 기준으로 하여 약 0.5% 내지 약 85% 초과이며, 바람직하게는 기질 농도는 약 5% 초과이며, 목적하는 전환도를 얻기에 필요한 충분한 양의 아실 도너를 충당하여야 하긴 하지만, 기질 농도는 가능한 한 높은 것이 가장 바람직하다. 반응 매질이 아실 수용체 (예를 들면, 프로필렌 글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르) 및 아실 도너를 포함하는 약 100% (v/v) 기질일 수 있다는 사실이 판명되었는데, 이 사실은 상기 기질이 그 자체가 유기 용매이기 때문이며, 또한 반응 매질이 비양자성 또는 비극성인 것이 바람직하기 때문인 것으로 생각된다. 예를 들면, 아실 수용체 (프로필렌 글리콜 에테르 알킬 (또는 아릴) 에테르)의 농도는 약 30% (v/v) 내지 약 70% (v/v)로 다양할 수 있으며, 이때 총 반응 혼합물 용적 100%에 대한 잔여 용적 (또는 약 70% (v/v) 내지 약 30% (v/v))은 아실 도너 (예를 들면, 비닐 아세테이트)를 포함한다. 이러한 발견에 의해 에스테르교환 반응을 수행하는데 대한 새로운 접근 방법이 제공된다. 이 접근 방법은 또한 몇몇 이점을 제공한다. 그 중 하나가 반응이 매우 높은 기질 농도에서 일어날 수 있으며 매우 높은 농도의 생성물을 생성한다는 점이다. 다른 이점으로는 분할된 거울상이성질체 (생성물 및 기질)를 추출할 필요가 없다는 것인데, 그 이유는 분할된 거울상이성질체 자체가 유기 용매이기 때문이며, 따라서 반응 혼합물로부터 고정화 생체촉매를 분리시킨 후 분할된 거울상이성질체를 잔여 반응 혼합물 (또는 반응 매트릭스)로부터 직접 증류시킬 수 있는데, 이는 분할된 거울상이성질체를 보다 신속히 회수하게 하므로 더욱 효율적이고 더 저렴하다.

반응 혼합물에 물이 존재하면, 예를 들면 물을 혼합물에 약 1% (v/v) 내지 약 3% (v/v) 첨가하는 경우, 반응 속도가 느려지는 것으로 보인다. 그런데, 물의 효과는 반응 정도를 조절하기 위한 유용한 방법일 수 있다. 한편, 반응 혼합물 중 물의 존재는 경쟁적 효소 반응인 아실화 생성물의 가수분해의 작용을 유발시키는 것으로 보인다. 그러므로, 반응 혼합물 중 물의 부재는 아실화 생성물의 가수분해 가능성을 현저히 감소시키는 것으로 여겨진다. 물이 리파아제를 작용시키기에 필요한 것처럼 생각되긴 하지만, 대부분의 시판용 유기 용매 또는 대부분의 시판용 효소 제제 중에 충분량으로 존재하여 반응 혼합물에 물을 추가로 첨가하는 것은 보통 불필요한 것으로 보인다.

또한, 단지 기질 용매의 반응 매질 중 에스테르교환 반응을 수행함으로써 그리고 2가지의 반응 기질, 즉 아실 수용체 또는 PGAE 및 아실 도너의 비율을 조절함으로써 생성물 수율 및 분할된 거울상이성질체 순도를 조절할 수 있다는 사실이 발견되었다. 그러므로, 본 발명은 또한 단지 기질 용매의 반응 매질 중에서 효소적으로 촉매화된 에스테르교환 반응을 조절함으로써 그리고 2가지의 반응 기질, 즉 아실 수용체 또는 PGAE 및 아실 도너의 비율을 조절함으로써 생성물 수율 및 분할된 거울상이성질체 순도를 조절하는 방법을 제공한다. 아실 도너 (예를 들면, 비닐 아세테이트)의 농도를 제한하지 않으면서, 아실 수용체 (예를 들면, PGAE)의 출발 농도를 가능한 한 높게 하는 것이 목표이며, 이 목

표는 분할된 아실화 생성물 또는 가능한 잔여 기질을 최고량으로 만드는 것을 충족시키게 된다. 하기 전제들을 기준으로 하여 상기와 같이 조절한다. 기질들이 라세미 혼합물이기 때문에, 어느 한쪽 거울상이성질체의 그의 상응하는 생성물 (아실화된 PGAE)로의 이론적 최대 전환율은 50%이다. 그런데, 촉매적 가수분해효소 (바람직하게는 리파아제 또는 에스테라제)는 기질로서의 양쪽 거울상이성질체를 아실화하는 것으로 간주되는데, 사실상 하나의 거울상이성질체만 아실화시키는 것 (예를 들면 CAL-B는 R-이성질체를 거울상이성질체 선택적으로 아실화시키는 것처럼, 예를 들면 그것은 하나의 거울상이성질체를 거울상이성질체 선택적으로 아실화함)이 바람직하긴 하다. 그러므로, 50%의 총 기질 전환율에서, 적어도 소량의 일부 생성물은 제1 이성질체 생성물의 순도를 저하시키는 원인이 되는 다른 이성질체인 것으로 여겨진다. 그러므로, 기질 전환 반응을 약간 낮추면 (50% 보다 약간 더 낮게, 예를 들면 약 45%), 제2 이성질체 생성물이 덜 생성되며, 따라서 여전히 고수율로 생성되는 제1 이성질체 생성물의 순도가 더 높아진다. 역으로, 50%의 총 기질 전환율에서, 적지만 가능하게는 유의적 비율의 제1 이성질체 기질이 전환되지 않았다. 그러므로, 기질 전환율이 약간 더 높은 경우 (50% 보다 약간 더 높게, 예를 들면 약 55%)에는 제1 이성질체 기질이 덜 남게 되며, 따라서 여전히 고수율로 존재하는 제2 기질의 순도가 더 높게 된다. 그러므로, 본 발명의 일부 실시양태에서, 라세미 기질의 전환도는 두 기질, 즉 아실 수용체 (또는 라세미 기질) 및 아실 도너의 비율에 의해 조절될 수 있다. 그러므로, 아실 도너 (예를 들면, 비닐 아세테이트)에 대한 아실 수용체 (즉, PGAE)의 몰비 2:1이 이론적으로 약 50%의 총 기질 전환율을 이끌어낼 수 있는데, 아실 도너에 대한 아실 수용체의 비율은 아실 도너 1몰이 아실 수용체 2몰 중 1몰 또는 라세미 기질 약 1/2과 선택적으로 반응하도록 선택된다. 상기 비율을 변화시켜, 기질 전환도를 조절할 수 있으며, 따라서 제1 이성질체 중 생성물 또는 제2 이성질체 중 잔여 기질을 고수율에서 우수한 순도로 풍부하게 한다. 예를 들면, 목적 라세미체 (생성물 또는 잔여 기질)의 약 90% ee 초과의 순도가 약 35% 내지 약 65%의 기질 전환에 의해 얻어질 수 있다.

기질 (글리콜 에테르 및 아실 도너)의 분자량 및 밀도를 사용함으로써, 총체적으로 선택적인 에스테르교환을 가정하여, 목적하는 전환도 (최적 수율) 및 거울상이성질체 순도를 얻기 위해 계산되는 상이한 몰비를 알아내기 위해 필요한 용적 을 산출할 수 있으며, 그러면 상기 최적 수율 및 이론적 거울상이성질체 순도는 예상 수치가 된다. 그 다음 산출된 용적의 기질을 표준 반응 조건 (이하에 추가 기술됨) 하에 효소적 촉매와 합하고, 기질 전환도, 및 제1 이성질체 생성물 또는 잔여 제2 이성질체 기질의 상대적 순도를 모니터하였다. 때때로, 실험적 또는 실제 관찰된 수율 및 순도는 예상 수치와 다르다. 예를 들면, CAL-B의 존재하에 PPh와 비닐 아세테이트의 반응에서, 70/30 (v/v) 비율이 약 75%의 기질 전환을 일으키는 것으로 예상되지만, (S)-PPh 및 (R)-PPhA 순도가 각각 약 80% ee 내지 약 98.5% ee 초과일 때, 약 45%의 전환이 실제 관찰된다. 기질의 비율을 76/24 (v/v)로 변화시키면 약 55%의 기질 전환이 일어나는 것으로 예상되지만, (R)-PPhA의 순도가 약 98% ee 초과이고 (S)-PPh의 순도가 약 60% ee 일때 약 40%의 전환이 실제 관찰된다. 요약하면, 본 발명은 아실 도너의 양을 제한하여 목적 생성물을 높은 % ee로 생성하기 위해 기질 전환도를 조절하는 효과적인 방법을 제공한다.

그러므로, 일부 실시양태에서, 기질 전환율을 조절하는 방법은 먼저 키랄 GC 또는 HPLC 분석 (예를 들면, 실시예에 기술된 바와 같음)에 의해 산정되는 바, 전환된 (또는 아실화된) 기질의 최적 수율, 및 전환 또는 비전환된 기질의 거울상이성질체 순도를 결정한 다음, 예를 들면, 전환율을 45% 내지 55%로 제한하는 양의 아실 도너를 제공하면서 상기 수율을 얻기 위한 기질의 적절한 몰비를 결정한 다음, 기질의 몰 중량 및 밀도를 기준으로 하여 상기 몰비를 얻기 위해 기질의 용적을 계산한 다음, 상기 계산된 기질 용적을 효소적 촉매와 합하고 생성된 반응 혼합물을 표준 반응 조건하에 배양하는 것으로 이루어진다. 생성물 수율 및 거울상 이성질체 순도를 모니터하고, 경우에 따라서 관찰된 수율 및 거울상이성질체 순도를 기준으로 하여 기질의 비율을 조정하여 목적하는 전환도 (수율) 및 최적 거울상이성질체 순도를 얻는다.

그러므로, 다른 실시양태에서, 기질의 농도는 약 10% 내지 약 90% (v/v)로 다양할 수 있으며, 이때 아실 수용체 및 아실 도너의 총 백분율 합은 총 반응 혼합물의 약 100% (v/v)이다. 별법으로, 기타 실시양태에서, 기질의 농도는 약 20% 내지 약 80% (v/v)로 다양할 수 있으며, 이때 아실 수용체 및 아실 도너의 총 백분율 합은 약 100% (v/v) 미만이며, 이 경우, 잔여 용적은 유기 용매로서 공급된다.

에스테르교환 반응의 온도는 반응 속도, 거울상이성질체 선택성, 효소 촉매의 안정성 및 기질의 안정성이 최적화되도록 선택한다. 예를 들면, 반응 온도를 감소시키면 PM의 에스테르교환에 기초한 분할의 경우 리파아제 CAL-B의 거울상이성질체 선택성이 증가되는 결과가 생긴다. 그러므로, 분할 속도가 느려졌다 하더라도, 반응 온도를 낮추는 것이 생성물 광학 순도를 증가시키기 위한 효과적인 방법이었다. 이 효과는 -20 ℃ 내지 30 ℃의 온도에서 나타났다. 그러므로, 다른 실시양태에서, 바람직한 온도는 특정 기질에 따라 다른데, PPh 에스테르화의 경우, 바람직한 반응 온도는 약 20 ℃ 내지 30 ℃이며, 통상적으로 약 25 ℃의 온도가 사용된다.

반응은 교반하면서 수행되며, 이 교반을 행하기 위한 수단으로는 회전 진탕 또는 임펠러 구동 교반이 있다.

반응 속도는 반응에 존재하는 리파아제의 양에 좌우된다. 그러므로, 반응 시간은 리파아제의 첨가량에 좌우된다. 에스테르교환의 경우, 반응 시간은 약 2 내지 약 96 시간이나, 바람직하게는 약 4 내지 약 72 시간이며, 더욱 바람직하게는 약 4 내지 약 48 시간이다.

에스테르교환 반응은 단일 배치 반응 또는 연속식 공정에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 멤브레인이 있는 반응기를 사용하여 고정화 효소를 효과적으로 보유할 수 있다.

글리콜 에테르 분할에 대해 상기 기술된 에스테르교환 반응의 몇가지 이점이 존재한다. 그 중 하나가 리파아제에 의해 촉매화된 아실화의 경우 장쇄 알킬- 및 아릴- 치환된 글리콜 에테르 및 그의 아세테이트가 가수분해적 분할 조건하에서 한정된 수용성을 갖는다는 것이다. 더욱이, 유기 용매/기질 중 리파아제에 기초한 아실화는 매우 높은 기질 첨가량에서 진행되어, 고 용적 생산성이 제공되고 증류 및 생성물 단리 전 반응 물질의 추출 필요성이 없어진다.

생체촉매의 재순환

가수분해 및 에스테르교환 반응 둘다에 활용되는 효소 촉매는 재순환될 수 있는데, 이는 효소가, 촉매화된 반응이 완결된 혼합물로부터 회수되어 새로운 반응 혼합물에 첨가될 수 있다는 것을 의미한다. 효소의 회수 및 재사용은 효소 재순환으로 불리우며, 따라서 재순환에 의해 반응물, 생성물 및 반응 혼합물 중 기타 성분들로부터 생체촉매가 분리되게 된다. 효소의 재순환은 주기 당 반응 비용을 절감시키는 것을 포함하여 몇몇 이점을 제공한다.

효소는 수성 반응 혼합물을 여과하여 효소를 필터에 보유시킴으로써 재순환 될 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 재순환은 바람직하게는 고정화 효소를 사용한다. 그 다음 고정화 효소를 다양한 수단 (예를 들면, 원심분리, 여과가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다)에 의해, 또는 침전에 의한 것과 같은 중량 침강법을 통해 반응기에 보유시키고, 반응기로부터 잔여 반응 혼합물을 배출시킨 다음, 새로운 반응 매트릭스 (어느 효소적 촉매도 포함하지 않은 반응 혼합물임)를 첨가함으로써 반응 혼합물로부터 분리시킬 수 있다.

예를 들면, CAL-B의 고정화 형태, 즉 키라자임 L-2 c.-f. C2 lyo. (Roche)는 기질 첨가량 25% 이하에서 프로필렌 글리콜 에테르 아세테이트 기질 각각을 분할시킬 수 있었다. 고정화 CAL-B는 PPhA의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 시험하기 위해 사용되기도 한다. PPhA에 대한 거울상이성질체 선택성은 우수하였으며, 따라서 99% ee 초과 수준에서 (S)-PPhA 및 (R)-PPh의 분할이 일어나고 25% v/v의 PPhA 첨가량에서 기질 전환율은 약 50%가 되었다. 분할은 50% 이하의 기질 첨가량에서 24 시간째에 45%의 기질 전환율 및 99% ee 초과의 (R)-PPh 순도 및 75% ee의 (S)-PPhA 순도를 나타내었다. 그러나, 고정화 CAL-B는 다주기 분할의 경우 25% (v/v) PPhA의 기질 첨가량에서 (S)-PPhA 및 (R)-PPh 둘다의 효율적 분할을 촉매화하였다.

기타 실시예에서, 키라자임 L-2, c.-f. C2 (효소 첨가량: 30, 60 및 120 U/㎖)의 성능은 20% (v/v)의 기질 첨가량에서 PEA 가수분해에 대해 실험실 규모로 시험되었는데, 여기서 효소 재순환은 15 주기를 초과하는 것으로 입증되었다 (실시예 8 및 도 6 참조). 다주기에 대한 분할 성능은 효소 첨가량이 120 U/ml일때 가장 우 수하였다. 효소 재순환은 또한 고정화 CAL-B (키라자임 L-2, c.-f. C2, lyo.; Roche 제품)를 사용하여 25% PMA의 가수분해의 30 배치 (또는 주기)에 대해서도 입증되었다. (S)-PMA의 거울상이성질체 순도는 20% 또는 25% 기질 농도로 수행된 실험에서 30 반응 주기에 걸쳐 약 97 % ee였다.

스케일 확대 실험에서, 고정화 CAL-B (키라자임 L-2, c.-f. C2; 약 240 U/㎖)는 1.5 리터 규모로 25% PMA의 15 주기의 거울상이성질체 선택적 가수분해에 사용하였다. 주기 시간은 2.5 시간 내지 6 시간이었다. 반응 파라메터는 37 ℃의 반응 온도, 200 rpm의 교반 (임펠러 속도) 및 20% (w/v) 수산화 나트륨의 첨가에 의해 유지된 약 7의 pH를 포함하였다. 다른 스케일 확대 실험에서, 고정화 CAL-B (키라자임 L-2, c.-f. C2; 약 240 U/㎖)는 기질로서 20% (v/v) PEA를 사용한 30 주기 이상의 거울상이성질체 선택적 가수분해에 사용하였다 (실시예 7 및 도 7 및 9 참조). 약 8 시간의 주기 시간은 높은 거울상이성질체 순도의 (S)-PEA 및 (R)-PE의 분할을 가능하게 하였다. 추가의 효소 (~10%의 원래 첨가량)을 주기 8, 10, 16 및 25에 제공하여 목적하는 반응 주기 시간을 유지하였다. 32 반응 주기에 대한 평균 생성물 순도는 97.9% ee 초과의 (S)-PEA 및 95% ee 초과의 (R)-PE였다. 반응 파라메터는 PMA에 대한 것이었다. 이 실험에 대한 생성물 회수는 아래에 설명되어 있다.

분할된 거울상이성질체의 회수

두종의 분할된 광학적으로 활성인 화학종 (글리콜 에테르 아세테이트 및 글리콜 에테르)를 액체-액체 추출법, 열 활성화에 의한 분리, 증류, 액체-고체 흡착 법 또는 그의 병용에 의해 반응 매트릭스로부터 회수 및 단리시킬 수 있다.

예를 들면, 상기한 스케일 확대 실험의 첫번째 설정에서, 염화 메틸렌을 사용한 액체-액체 추출에 의해 99% ee 초과의 (S)-PMA 및 약 85% ee의 (R)-PM을 함유하는 혼합물의 회수가 촉진되었다. 그런데, 키랄 (R)-PM은 수용성이어서 수성 반응 혼합물의 추출에 의해 회수가 어려운 것으로 입증된다.

기타 실시예에서, 상기한 스케일 확대 실험의 두번째 설정에서, 염화 메틸렌을 사용한 반응 혼합물의 추출에 의해 각각 98% ee 및 95% ee의 (S)-PEA 및 (R)-PE의 혼합물을 얻었다.

또 다른 실시예에서, 15 배치의 PMA 가수분해 반응 및 32 배치 이상의 PEA 가수분해 반응에서 얻은 물질을 증류시켜 키랄 글리콜 에테르 및 그의 상응하는 대척 (antipodal) 아세테이트를 단리한다.

분할된 거울상이성질체의 활용

본 발명의 방법은 상술한 바와 같이 제약 (Hoff et al. (1996) Tetrahedron: Asymmetry 7: 3181-3186) 및 농업 분야에서 다수 응용되는 분할된 거울상이성질체를 제공한다. 예를 들면, 분할된 화합물들은 제약, 조합화학, 및 강유전성 액정 응용의 경우 가능한 합성 단위체로서 예기된다. 상기 화합물들은 또한 부분입체 이성질체 에스테르 (라세미 에스테르 대신)를 형성하기 위해 화학-효소적 공정으로의 통합에 의해 생체분할의 선택성을 향상시키는 것이 예기된다. 기타 응용면에서, 상기 분할된 화합물은 선택성 증가에 대한 효소 성능을 향상시키는 것으로 예기된다. 다른 면에서, 상기 분할된 화합물은 경제적인 극성 키랄 용매를 제공하는 것이 예상되는데, 이 용매는 결정화를 기본으로 하는 '전통적인 분할 방법'에서의 용매 또는 공용매 뿐만 아니라 생체촉매적 반응에서의 공용매 또는 에스테르교환에서의 용매로서 유용하다. 또한, 상기 용매는 결정화 유도된 동적 분할 (CIDR)에 유용할 수도 있다. 추가로, 상기 화합물은 함께 증류되는 경우 키랄 물질을 선택적으로 또는 부분 선택적으로 공비 증류시키는데 사용할 수 있다는 점이 예기된다. 키랄 크로마토그래피에서, 분할된 화합물은 이동상으로 존재하는 단순 알코올을 대신하여 기존의 키랄 분리를 증진시키는 것으로 예기되거나, 또는 키랄 분리시 고체 상에 결합하기 위한 리간드로서의 용도가 예기된다. 기타 용도가 키랄 염기 (알콕시드)의 제조, 및 TiC14 와의 반응에 의한 키랄 루이스 산의 제조에 관한 것이다. 후자의 것은 올레핀의 샤플리스 (Sharpless) 에폭시화와 같은 선택적인 산화반응 및 설파이드의 설폭시드로의 산화 반응에서 사용될 수 있다.

실시예

다음 실시예는 본 발명의 특정의 바람직한 실시양태 및 일면을 입증하고 더 예시하기 위해 제공되며 그의 영역을 제한하는 것으로서 간주되지 않아야 한다.

다음의 실험 설명에서, 다음 약어가 적용된다: N (노르말); M (몰의); mM (밀리몰의); μM (마이크로몰의); mol (몰); mmol (밀리몰); μmol (마이크로몰); nmol (나노몰); pmol (피코몰); g (그람); ㎎ (밀리그람); ㎍ (마이크로그람); ng (나노그람); ℓ 또는 L (리터); ㎖ (밀리리터); ㎕ (마이크로리터); ㎝ (센티미터); ㎜ (밀리미터); ㎛ (마이크로미터); ㎚ (나노미터); U (효소 활성의 단위; 일반적으로 전환된 기질의 몰로 표시됨); ℃ (섭씨 온도); % (퍼센트); (v/v) (용적/용적); % C (% 전환율); ee (거울상이성질체 과잉율); E (거울상이성질체 선택성).

실시예 1

재료 및 분석 방법

기질

P-계 글리콜 에테르 및 아실레이트를 기질로서 사용하였다. 이 계열에는 다음과 같은 화합물이 포함된다:

프로필렌 글리콜 메틸 에테르 (또한 1-메톡시-2-프로판올, PM).

프로필렌 글리콜 메틸 에테르 아세테이트 (또한 1-메톡시-2-프로판올 아세테이트, PMA).

프로필렌 글리콜 에틸 에테르 (1-에톡시-2-프로판올, PE).

프로필렌 글리콜 에틸 에테르 아세테이트 (1-에톡시-2-프로판올 아세테이트, PEA).

프로필렌 글리콜 n-프로필 에테르 (1-n-프로필옥시-2-프로판올, PnP).

프로필렌 글리콜 n-프로필 에테르 아세테이트 (1-n-프로필옥시-2-프로판올 아세테이트, PnPA).

프로필렌 글리콜 이소프로필 에테르 (1-이소프로필옥시-2-프로판올, PiP).

프로필렌 글리콜 이소프로필 에테르 아세테이트 (1-이소프로필옥시-2-프로판올 아세테이트, PiPA).

프로필렌 글리콜 n-부틸 에테르 (1-n-부틸옥시-2-프로판올, PnB).

프로필렌 글리콜 n-부틸 에테르 아세테이트 (1-n-부틸옥시-2-프로판올 아세테이트, PnBA).

프로필렌 글리콜 t-부틸 에테르 (1-tert-부틸옥시-2-프로판올, PtB).

프로필렌 글리콜 t-부틸 에테르 아세테이트 (1-tert-부틸옥시-2-프로판올 아세테이트, PtBA).

프로필렌 글리콜 페닐 에테르 (1-페녹시-2-프로판올, PPh).

프로필렌 글리콜 페닐 에테르 아세테이트 (1-페녹시-2-프로판올 아세테이트, PPhA).

효소

상이한 리파아제, 에스테라제 및 프로테아제를 상업적 공급업자로부터 구입하였으며, 그 예로는 키로스크린 (ChiroScreen) ™ EH 키트 (Altus Biologics Inc. (Cambridge, MA) 제품), 키라자임 (Chirazyme)(등록상표) 리파아제 amp; 에스테라제 스크리닝 세트 2, 글루타릴 아실라제 및 페니실린 G 아미다제 (Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany; US distribution via BioCatalytics Inc., Pasadena, CA) 제품), 써모캐트 ™ 퀵스크린 ™ (ThermoCat ™ QuickScreen ™) 에스테라제 키트 (Thermogen Inc. (Lemont, IL) 제품), 리파아제 익스텐션 키트 및 재조합 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B (Fluka BioChemika AG (Buchs, Switzerland) 제품) 및 산업용 효소 샘플 (Amano Pharmaceutical Co. (Nagoya, Japan) 제품), 노보 노르디스크 (Novo Nordisk), 및 제넨코르 인터내셔날 (Genencor International (Rochester, NY) 제품)을 포함하였다. 효소는 제조업자의 추천에 따라서 4 ℃ 또는 -20 ℃에서 저장하였다.

화학물질 및 용액

아세토니트릴, 헥산 (HPLC-등급), 비닐 아세테이트, 인산 칼륨 일염기성 (KH_2PO_4, 99.0% min.) 및 인산 나트륨 이염기성 (Na_2HPO_4, ≥99.0%)을 피셔 사이언티픽 (Fisher Scientific)으로부터 구입하였다. (S)-프로필렌 옥사이드는 키렉스로부터 구입하였다 (배치 T67893, 키렉스 주문 번호 607). 소렌센 인산염 완충액을 규정된 농도로 29.6 mol% KH_2PO_4 및 70.4 mol% $Na_2HP0_4 x H_20$로부터 제조하고, pH를 필요에 따라 7.2로부터 조정하였다.

다음 프로필렌 글리콜 알킬/아릴 에테르 및 그의 아세테이트는 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich)로부터 구입하였다: PM (99.5%), PMA (99.5%), PEA (95%), PnP (99%), PnB (99%), PtB 및 PPh (93%, 7% 이하의 디(프로필렌 글리콜) 페닐 에테르; DPPh를 함유함). PE, PiP, PiPA, PnPA, PnBA, PPhA 및 글리콜 에테르의 거울상이성질체 표준물질 (이하의 비대칭 합성 참조)은 더 다우 케미칼 캄파니 (The Dow Chemical Company)에서 제조하였다. PtBA 거울상이성질체의 비-라세미 혼합물은 PtB와 비닐 아세테이트 (1:2 몰 비)를 5 ㎎/㎖ 키라자임 L-10 (Roche Molecular Biochemicals)의 존재하에 반응시켜 제조하였다.

비대칭 거울상이성질체 표준물질

라세미체의 거울상이성질체가 효소적 촉매화된 반응에서 가수분해되는지 에 스테르교환되는지를 확인하기 위해, 분석 방법에 사용하기 위한 공지된 입체화학의 표준물질을 얻을 필요가 있었다. 이러한 표준물질의 사용은 GC 체류 시간과 특별한 공지된 화합물의 상관관계를 가능케 하였다. 이를 위하여, P-계 글리콜 에테르의 개개의 성분 및 그의 상응하는 아세테이트의 순수한 거울상이성질체를 화학적으로 합성하였다.

초기에, (S)-PM 및 (S)-PMA를 합성하고 (실시예 2 참조), 그의 GC 용리 시간을 확인하고, (S)-PM 및 (S)-PMA의 용리 시간을 상응하는 라세미체의 용리 시간과 비교하여 2개의 거울상이성질체에 대한 용리 시간의 상대적인 순서를 확인하였다. 이용된 분석 조건하에서, (S)-PMA가 (R)-PMA 전에 용리되었고 (각각 4.1분 및 4.24분), 동일한 상대적인 용리 순서가 비-아실화 거울상이성질체 (S)-PM 및 (R)-PM에 대해 관찰되었다. 다른 거울상이성질체에 대한 상대적인 용리 시간은 P-계 글리콜 에테르의 다른 성분 및 그의 상응하는 아세테이트와 유사하게 연장되었고, 이러한 계열을 포함한 효소 촉매화된 반응의 생성물 및 남아있는 기질의 분석에 이용되었다. 이후에, P-계 글리콜 에테르의 다른 성분 및 그의 상응하는 아세테이트의 순수한 (S)-거울상이성질체를 또한 화학적으로 합성하였으며 (이들에는 (S)-PE 및 (S)-PEA, (S)-PnP 및 (S)-PnPA, (S)-PnB 및 (S)-PnBA, 및 (S)-PPh 및 (S)-PPhA가 포함됨), 상대적인 용리 순서를 보정으로서 확인하였다 (아래에 나타낸 바와 같음). GC 분석의 결과는 PE, PEA, PnP, PnPA, PnB, PnBA, PPh 및 PPhA의 (S)-거울상이성질체가 분할된 라세미 표준물질에서 관찰되는 상응하는 1-알콕시-2-프로판올 (또는 1-알콕시-2-프로판올 아세테이트) 거울상이성질체의 제1 용리 피크에 해당함 을 나타내었다.

분석 방법

기체 크로마토그래피 방법

표준 모세관 주입구, 불꽃 이온화 검출기 (FID) 및 LEAP-CTC 자동 주입기 (100 샘플 트레이)가 장치된 휴렛-팩카드 6890 기체 크로마토그래프를 분석에 사용하였다. 다른 P-계 기질을 함유하는 샘플의 분석에 5가지의 GC 방법을 이용하였다. 다른 GC 방법은 동일한 오븐 온도 프로그램을 사용하였지만, 스크리닝 중에 사용된 기질에 특이적인 화합물 보정 및 적분 정보를 포함하였다. 간단하게, β-DEX 325 키랄 모세관 칼럼 (30 m x 0.25 ㎜ ID 0.25 ㎛ 막 두께) (Supelco 제품)을 분리에 사용하였다. 칼럼 온도는 PM 및 PMA에 대해 70 ℃에서 120 ℃까지 10 ℃/분으로 프로그래밍하고, 다른 기질 및 생성물에 대해서는 150 ℃까지 프로그래밍하였다. 운반 기체는 18.0 psi (정압)에서 헬륨이었다. 주입구 및 검출기의 온도는 각각 200 ℃ 및 250 ℃였다. 아세토니트릴 또는 물에서 200:1로 희석된 샘플을 25:1의 분할비로 주입하였다 (1.0 ㎕). 이 방법을 다우 케미칼 또는 시그마-알드리치로부터의 라세미 샘플을 0.005 내지 0.5% 범위의 농도로 이용하여 보정하고 모든 화합물에 대해 r^2 >0.99를 나타내었다.

상기 조건하에서의 화합물 체류 시간을 글리콜 에테르 생성물의 주요 성분을 나타내는 이차 알코올 및 그의 상응하는 아세테이트에 대해 기록한다. PE, PnP, PiP, PnB, PPh 및 그의 상응하는 아세테이트의 절대 입체화학은 분할된 라세미체에 대해, 표준물질로서 합성된 (S)-거울상이성질체의 용리 순서 기준으로 정해졌다. 각 경우에, 이차 알코올 및 그의 아세테이트의 (S)-거울상이성질체는 상응하는 (R)-거울상이성질체 전에 용리되었다. (±)-PM의 경우에, 거울상이성질체의 기저선 분리는 이루어지지 않았다. 설명된 조건하에서, 화합물에 대한 체류 시간은 다음과 같았다: (±)-PM (2.811 분), (S)-PMA (4.104 분), (R)-PMA (4.246 분), (S) -PE (3.203 분), (R)-PE (3.248 분), (S)-PEA (4.774 분), (R)-PEA (4.936 분), (S)-PnP (4.157 분), (R)-PnP (4.224 분), (S)-PnPA (6.0 분), (R)-PnPA (6.145 분), (S)-PiP (3.629 분), (R)-PiP (3.718 분), (S)-PiPA (5.316 분), (R)-PiPA (5.448 분), (S)-PnB (5.394 분), (R)-PnB (5.484 분), (S)-PnBA (7.42 분), (R)-PnBA (7.545 분), (S)-PtB (5.559 분), (R)-PtB (5.908 분), (S)-PtBA (7.529 분) 및 (R)-PtBA (7.679 분).

(±)-PM 거울상이성질체는 20.0 psi (정압)에서 운반 기체로서의 헬륨을 사용하고 50 ℃에서 150 ℃까지 10 ℃/분으로 프로그래밍된 오븐 온도를 이용하여 α-Dex 120 키랄 모세관 칼럼 (30 m x 0.25 ㎜ ID 0.25 ㎛ 막 두께) (Supelco 제품) 상에서 크로마토그래피법으로 분할할 수 있었다. 주입구 및 검출기의 온도는 각각 200 ℃ 및 250 ℃였으며, 아세토니트릴 또는 물에서 200:1로 희석된 샘플을 25:1의 분할비로 주입하였다 (1.0 ㎕). 이 조건에서 (S)-PM 및 (R)-PM이 각각 3.136 분 및 3.192 분에서 분할되었다.

액체 크로마토그래피 방법

4차 LC 펌프, 다이오드 어레이 검출기 (DAD), 펠티어 칼럼 오븐 및 시리즈 200 자동주입기가 장치된 퍼킨-엘머 (Perkin-Elmer) 시리즈 200 액체 크로마토그래프를 DOWANOL (등록상표) PPh (1-페녹시-2-프로판올; PPh) 및 그의 아세테이트 (PPhA)를 함유하는 샘플의 분석에 사용하였다. 화합물을 등용매 10/40/50 에탄올/아세토니트릴/물 이동상을 0.65 ㎖/분의 유속으로 사용하여 35 ℃에서 유지된 칼럼 온도를 가진 키랄셀 OD-RH 칼럼 (4.6 x 150 ㎜; Chiral Technologies, Inc., Exton, PA) 상에서 분리하였다. 이러한 조건하에서, (R)-PPh, (S)-PPh, (R)-PPhA 및 (S)-PPhA에 대한 체류 시간은 각각 6.0 분, 7.3 분, 12.6 분 및 13.1 분이었다. 이 방법은 GC-방법에 의해 완전히 분할되지 않은 PPh 거울상이성질체의 기저선 분할을 제공하였으므로 PPh ee 측정에 유용하다. 또한, PPh 및 PPhA는 디(프로필렌 글리콜)페닐 에테르 (DPPh; PPh의 시판 제제에서 7% 이하로 존재함) 및 그의 아세테이트, DPPhA인 것으로 추정되는 미량의 불순물로부터 충분히 분리되었다.

실시예 2

(S)-PM 및 (S)-PMA의 비대칭 합성

(S)-1-메톡시-2-프로판올 [(S)-PM]

3구 100 ㎖ 둥근 바닥 플라스크에는 냉각수 응축기, 써모웰, 가열 맨틀/온도 제어기, 자석식 교반 막대 및 고무 격막이 장치되어 있다. 그후에, 플라스크를 교반 판 상에 놓여있는 가열 맨틀로 옮기고 질소 패드를 응축기 상단에 있는 반응 설비 위에 놓고 반응 내내 유지하였다. 플라스크에 메탄올 (22.99 g)을 넣고 수산화 칼륨 (0.0322 g)을 교반시키며 첨가하고 설정치를 45 ℃로 조정하였다. 용액이 소정의 온도에 도달하였을 때, 미리 냉각된 (S)-프로필렌 옥사이드 [(S)-PO; 키렉스 배치 T67893, Chirex 주문 번호 607]를 시린지를 사용하여 약 5 ㎖ 증분으로 고무 격막을 통해 반응 플라스크에 첨가하였다. 총 12.19 g의 PO를 반응 플라스크에 전달하였다. GC 분석 (하기 분석 방법 참조)은 메탄올 및 PO가 목적하는 프로필렌 글리콜 메틸 에테르 (PM 글리콜 에테르)로 최소로 전환되었음을 나타내었다. 추가의 0.0294 g의 KOH를 첨가하고 반응기를 50 ℃에서 약 15시간 동안 가열하였다. 샘플링 및 GC 분석은 단지 0.007%의 미반응 (S)-PO를 나타내었다. PM 글리콜 에테르를 내부 온도를 150 ℃로 증가시켜 촉매 및 고비점 부산물로부터 기화시켰다. PM 글리콜 에테르 분획은 91 ℃ 내지 118 ℃의 오버헤드 온도에서 비등하기 시작하였고 약 15 ㎖의 액체가 수집되었다. 기화된 재료의 GC 분석은 95.4%의 1-메톡시-2-프로판올 (PM-2) 및 3.2%의 2-메톡시-1-프로판올 (PM-1)을 나타내었다.

(S)-PO의 염기 촉매화된 가수분해가 친핵성 치환이 일어나는 탄소에서 완전히 반전되며 진행되므로 (Ege, 1989), PM-2를 생산하는 개환 반응은 키랄 중심에서 배위를 유지하며 일어나고 결과의 이차 알코올은 (S)-배위를 갖는다. 대조적으로, 미량의 PM-1 생성물은 C2 탄소에서의 치환을 통해 형성되며 결과의 일차 알코올은 (R)-배위를 갖는다.

(S)-1-메톡시-2-프로판올 아세테이트 [(S)-PMA]

25 ㎖ 플라스크에 4.0 g (0.044 mole)의 (S)-PM-2/(R)-PM-1 혼합물과 0.02 g의 무수 염화 아연을 첨가하였다. 건조 관을 가진 환류 응축기를 부착하고 건조 관을 잠시 들어올려서 4.7 g (0.046 mole)의 아세트산 무수물을 첨가하였다. 혼합물을 약 118 ℃에서 2시간 동안 환류시키고 그후에 냉각되게 하였다. 물 중의 1% 용액의 GC-분석은 시판되는 PMA-2 거울상이성질체에 대해 관찰되는 제1 피크에 매치되는 체류 시간으로 PMA-2에 대한 단일 피크를 나타내었다. 이 결과는 제1 PMA-2 피크가 (S)-거울상이성질체임을 나타내었다. 단일 피크는 또한 PMA-1 거울상이성질체에 대해서도 관찰되었다. 이 피크는 또한 시판되는 혼합물에서 ~3%로 존재하는 PMA-1에 대한 제1 피크와 매치되었으며, 이는 그 피크가 (R)-2-메톡시-1-프로판올 아세테이트였음을 암시한다. 이 결과는 (R) 및 (S) PMA-1 거울상이성질체가 상응하는 PMA-2 거울상이성질체에 대해 관찰되는 것과 반대 용리 순서를 나타냄을 입증한다. 혼합물을 2.44 g (0.024 mol)의 무수 탄산 나트륨을 첨가하고 CO_2 발생시키며 약 1시간 동안 교반시켜 중화하였다. 단로 증류 헤드를 부착하고 열원으로서 열총을 사용하여 반응 생성물을 증류시켰다. 95-137 ℃ 범위에서 비등하는 약 5.0 g의 재료가 수집되었다. GC 분석 결과 샘플 순도가 약 95%인 것으로 나타났다 (S-PMA-2: 92.6% 및 R-PMA-1: 2.7%).

실시예 3

PMA의 가수분해: 효소 스크리닝

110종이 넘는 시판 가수분해효소의 패널은 PMA의 거울상이성질체 선택적 가수분해에 대해 스크리닝되었다.

방법

PMA의 거울상이성질체 선택적 가수분해에 대한 시판되는 효소의 초기 스크리닝을 0.065 M $KNaPO_4$ (pH 7.2) 소렌센 인산염 완충액 중에 0.5% (v/v) 기질 (10% 수 성 원액으로부터 첨가됨) 및 1.0 ㎎/㎖ 효소를 함유하는 0.2 ㎖ 반응물에서 수행하였다. 기질을 첨가하여 반응을 시작하고 300 rpm에서 수평 진탕시키며 1.8 ㎖ 테플론계 나사모양 캡 자동주입기 바이알에서 30 ℃ (달리 명시하지 않으면)에서 배양하였다. 효소가 없는 대조 반응을 이용하여 무생물적 전환을 평가하였다. 0.8 ㎖ 아세토니트릴을 첨가하여 반응을 종결하였다. 결과 용액을 1시간 이상 동안 냉동시킨 후 GC-FID에 의해 분석하였다 (이하 참조).

결과

분석된 초기 기질, PMA의 경우, 110종이 넘는 시판 가수분해효소의 스크리닝에 기초한 결과는 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B (CAL-B)가 PMA의 (R)-거울상이성질체 [(R)-1-메톡시-2-프로판올 아세테이트; (R)-PMA]의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 촉매화하여 99% ee가 넘는 (S)-PMA의 분할이 일어났음을 나타내었다 (표 1에 나타냄; 이 표는 PMA의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 촉매화한 효소를 기록한다). CAL-B의 고도로 거울상이성질체 선택적인 성능은 키라자임 L-2, lyo., (Roche), 알투스 13 (Altus Biologics, Inc.), 리파아제 SP-435 (Novo Nordisk) 및 재조합 CAL-B (Fluka BioChemika)로서 공급된 효소 제제에서 관찰되었다. 이 실시예에서 CAL-B로 설명된 추가의 연구는 키라자임 L-2, lyo. (Roche)로 수행되었다.

스크리닝 분석에서 유사한 거울상이성질체 선택성을 나타내지만, 일반적으로 더 낮은 거울상이성질체 순도 (80% ee를 초과함)를 나타내게 하는 다른 효소는 슈도모나스 속 리파아제 (Chirazyme L-6, lyo; Roche), 슈도모나스 속 지단백질 리파 아제 (Fluka Biochemika), 리파아제 PS-C 1 (Amano) 및 슈도모나스 세파시아 리파아제 (Altus Biologics, Inc)를 포함한다 (표 1). CAL-B에 대해 반대 거울상이성질체 선택성을 나타내는 효소는 에스테라제 E001, E002 및 E003 (Thermogen, Inc.)을 포함한다.

[표 1]

번호	효소	효소원 (공급업자)	(S)-PMA (% v//v)	(R)-PMA (% v/v)	PMA (% ee)
1	키라자임 L-2, lyo	칸디다 안타르크티카 리파아제 B	0.0642	0.0001	99.7% S

		(Roche Molecular Biochem.)			
33	리파아제 SP-435	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Novo Nordisk)	0.0593	0.0001	99.7% S
49	알투스 13	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Altus Biologics, Inc.)	0.0775	0.0001	99.7% S
106	리파아제 B, 재조합	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Fluka Biochemika)	0.0732	0.0001	99.7% S
91	리파아제 LP 'S'	리파아제 (Amano)	0.0666	0.0001	99.7% S
115	지단백질 리파아제	슈도모나스 속 지단백질 리파아제 (Fluka Biochemika)	0.0567	0.0001	99.6% S
5	키라자임 L-6	슈도모나스 속 리파아제 (Roche Molecular Biochem.)	0.0594	0.0050	84.5% S
95	리파아제 PS-C I	슈도모나스 세파시아 리파아제 (Amano)	0.0894	0.0157	70.1% S
38	알투스 2	슈도모나스 세파시아 리파아제 (Altus Biologics, Inc.)	0.0707	0.0186	58.3% S
66	E001	에스테라제 (Thermogen, Inc.)	0.0043	0.0431	81.9% R
67	E002	에스테라제 (Thermogen, Inc.)	0.0001	0.0208	99.0% R
68	E003	에스테라제 (Thermogen, Inc.)	0.0082	0.0476	70.6% R
[1] 결과는 GC/FID 분석에 의해 확인되고 본문에 기재된 바와 같이 20시간 동안 배양된 0.5% PMA 및 약 1.0 ㎎/㎖ 효소를 함유하는 스크리닝 분석의 1:5 희석액에 대해 % 용적/용적 (% v/v)으로서 보고되었다.					

실시예 4

가수분해: 최적화

실험실 규모 및 반응기 규모 (또는 스케일 확대)에 대해, 수율 또는 전환율 (가수분해된 기질의 비율 또는 양으로서 정량화됨), 이성질체 순도 (% ee로서 측정됨), 기질 첨가량 (또는 농도), 효소 첨가량 및 반응 시간, 온도 및 매질을 포함한 각종 반응 파라메터가 최적화될 수 있는 조건을 결정하기 위해 실험을 수행하였다.

방법

기질 가수분해 속도 및 분할된 기질의 거울상이성질체 과잉율을 일반적으로 1.8 ㎖ 테플론계 나사모양 캡 자동주입기 바이알에 있는 0.5 ㎖ 반응 혼합물에서 평가하였다. 달리 명시하지 않으면, 반응 혼합물을 생체촉매로서 CAL-B (키라자임 L-2, lyo., 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B, 120 U/㎎ lyo를 초과함)를 사용하여 일반적으로 30 ℃에서 회전 진탕시키며 (300 rpm) 수평으로 배양하였다. 10% (v/v) 이상의 기질을 포함하는 반응물을 샘플링하고 분석 전에 아세토니트릴에서 1:100으로 희석하였다. P-계 글리콜 에테르 아실레이트의 가수분해적 분할을 위한 효소적 촉매로서의 CAL-B의 성능을 체계적으로 평가하고 효율적인 효소적 분할 생체공정을 위한 조건을 확인하기 위해 일련의 연구를 수행하였다. 다음 조건들을 독립적인 스크리닝 실험에서 시험하였다:

· 다른 용매에 의한 2상 반응 혼합물 (상 비 0.5)

· 다른 2상 반응 혼합물 중의 증가된 기질 농도

· 수성 반응 혼합물 중의 다른 기질 농도에서의 증가된 생성물 농도

· 수성 및 2상 반응에서의 증가된 완충 용량

· 완전한 거울상이성질체 선택적 가수분해를 위한 최대 기질 농도

· 2상 반응에서의 다른 효소 농도

· 높은 효소 및 기질 농도에 의한 말단점 전환 반응

· 수성 반응에서의 다른 배양 온도

결과

톨루엔 및 헥산에 의한 2상 반응

효소적 촉매 CAL-B (키라자임 L-2)에 의한 기질 (PMA)의 가수분해를 2상 반응 조건하에서 더 높은 기질 농도 및 다른 공용매를 사용하여 시험하였다. 톨루엔 및 헥산을 10% (v/v) PMA를 포함하는 반응에서 0.5 (50% v/v)의 상 비로 공용매로서 첨가하였다. 10% 및 50% (v/v)의 PMA를 기질 및 용매 둘다로서 사용하여 유사한 반응을 진행하여 CAL-B (키라자임 L-2)의 성능을 시험하였다. 그 반응물을 30 ℃에서 16시간 동안 배양하고, 생성물을 GC에 의해 분석하였다.

그 결과는 다음과 같은 결론을 지지한다. 기질 및 용매 둘다로서의 50% (v/v)의 PMA는 반응을 약간 억제하였다. 50% (v/v)의 톨루엔은 공용매로서 적합하였지만, 분할된 (S)-PMA의 최종 수율은 더 낮았다 (감소된 수율은 더 낮은 거울상이성질체 선택성이나 더 빠른 촉매반응으로 인하여 잔여 (S)-PMA를 가수분해하는데 더 긴 시간이 걸리게 하기 때문인 것으로 생각된다). 50% (v/v)의 헥산은 99% ee를 초과하는 (S)-PMA의 관찰된 고수율을 기준으로 하여 최상의 공용매였다. 수성 반응에서의 10% (v/v)의 PMA는 효율적으로 가수분해되어 99% ee를 초과하는 수준으로 높은 수율로 (S)-PMA 분할되었다.

헥산 및 톨루엔 2상 반응에서의 증가된 PMA 농도

기질 농도를 증가시키는 효과는 헥산 또는 톨루엔을 공용매로서 함유하는 2상 반응에서 시험되었다.

PMA 첨가량을 10%에서 25% (v/v)로 증가시키고 공용매로서 50% (v/v) 헥산을 사용함으로써 (S)-PMA의 최종 거울상이성질체 순도가 99% ee를 초과하는 수준에서 87% ee를 초과하는 수준으로 감소되었다. 50% PMA와 25% 및 40% 헥산을 포함하는 반응 결과 각각 83% ee 초과 및 66% ee 초과의 최종 (S)-PMA 순도를 얻게 되었다.

생성 억제없이 완전한 거울상이성질체 선택성을 가능하게 하는 최고 기질 농도는 25% v/v의 일정한 수성상 농도와 공용매로서 헥산 및 톨루엔 (25% 내지 65%, v/v)을 사용하는 반응에서 10 내지 50% (v/v) PMA의 가수분해를 측정함으로써 결정되었다. 종말점 분석은 헥산을 더 우수한 공용매로서 확인시켜 주었고, 공용매로서 헥산을 사용한 경우 10% (v/v) PMA가 (S)-PMA를 99% ee 초과 수준으로 분할하였음을 또한 나타내었다. 동일한 조건하에서 20% (v/v) PMA를 사용한 경우, (S)-PMA의 거울상이성질체 순도는 93% ee로 감소되었다.

수성 반응에서 10% amp; 25% PMA에 의한 증가된 PM 농도의 효과

CAL-B (키라자임 L-2)가 PM에 의한 생성 억제를 받는지를 확인하기 위해, PM의 농도를 증가시키며 수성 조건하에서 PMA의 가수분해를 시험하였다.

15% (v/v) 이하로 첨가된 PM의 존재하에 10% (v/v) PMA를 포함하는 반응에서 가수분해도는 영향받지 않았으며; 최대 이론적 수율의 99,5% ee 초과의 (S)-PMA의 분할은 2시간 사이에 실시되었다. 그러나, 20% (v/v) PM을 포함하는 반응에서는 약간의 억제가 이루어져 (S)-PMA 거울상이성질체 순도가 ~96% ee로 저하되었다. 이러한 한계치는 첨가된 PM의 농도를 증가시키며 (0에서 50%) 25% (v/v) PMA의 가수분해를 시험하여 추가로 분석하였다. 이러한 조건하에서, 기질의 완전한 거울상이성질체 선택적 가수분해는 약 12.5% PM을 유리시키는 것으로 예상되었고, 최종 생성물의 첨가는 전환도를 억제하고 (S)-PMA의 최종 거울상이성질체 순도를 감소시켰다. 따라서, 이러한 결과는 바람직한 기질 농도가 약 25% (v/v)임을 나타낸다.

이들 반응의 최종 pH는 3.5 내지 4.5의 범위였다. 따라서, 알코올성 최종 생성물에 의한 억제 이외에, 아세트산의 유리로 인한 pH 억제의 가능성이 고려되었다 (하기 참조).

상기 결과를 바탕으로 선택적인 통합 생성물 회수 및 제거 방법이 더 높은 기질 농도에서 반응이 진행되도록 할 수 있음이 예기된다 (예를 들면, Indlekofer, M. et al. (1996) Biotechnology and Bioengineering, 52:459-471; and Indlekofer, M. et al. (1995) Biotechnology Progress 11:436-442 참조).

증가된 완충액 농도

50% (v/v) PMA 및 1 ㎎/㎖ CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)를 함유하는 수성 및 2상 (25% (v/v) 헥산) 반응에서 완충액 농도를 증가시키는 효과를 시험하였다.

0, 66 및 200 mM 소렌센 인산염 완충액 (pH 7.2)을 포함하는 반응은 44시간 동안 PMA 가수분해 속도 또는 정도의 차이를 나타내지 않았다. 수성 및 2상 반응에 대해 18시간까지 도달되는 최종 생성물 거울상이성질체 순도는 각각 93% ee 초과 및 84% ee 초과의 (S)-PMA에 해당하였다. 이 결과는 기질 가수분해 동안 유리된 아세트산이 반응 진행을 억제하지 않았음을 암시하였다. 물, 66 mM 완충액 및 200 mM 완충액에서 진행된 반응의 최종 pH는 각각 3.0-3.5, 4.0-4.5 및 4.5의 범위였다.

수성 및 2상 반응에서 완전한 거울상이성질체 선택적 가수분해가 일어나는 최대 PMA 농도

수성 및 2상 조건 (0.2의 상 비의 n-헥산) 하에서 완전한 거울상이성질체 선택적 가수분해를 일으키는 최대 PMA 농도를 확인하기 위해 기질 가수분해도 및 그의 최종 % ee를 기질 농도의 함수로서 측정하였다. 효소적 촉매는 1 ㎎/㎖의 CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)였다.

99.5% ee를 초과하는 (S)-PMA의 완전한 분할은 25% (v/v) 이하의 PMA를 함유하는 수성 반응으로 64시간까지 관찰하였다. 30% (v/v) 및 40% (v/v) PMA를 함유하는 유사한 반응은 각각 97.5% ee 초과 및 95.5% ee 초과의 (S)-PMA를 제공하였다. 20% (v/v) 헥산을 이용한 2상 반응 조건하에서, 더 낮은 생성물 거울상이성질체 순도가 관찰되었다: 20% (v/v), 25% (v/v) 및 40% (v/v) 첨가량의 PMA는 64시간내에 각각 98.5% ee 초과, 97% ee 초과 및 92% ee의 수준으로 (S)-PMA로 분할되었다.

이들 결과는 PMA가 수성 조건하에서 가장 효율적으로 가수분해되었고, 25% (v/v) PMA의 최대 농도에서, 이용된 실험 조건하에 완전한 거울상이성질체 선택적 가수분해가 일어남을 나타내었다 (도 2에 나타낸 바와 같음).

수성 및 50% 헥산 2상 반응에서 PMA의 가수분해에 대한 효소 농도의 효과

50% (v/v) 헥산을 가진 2상 조건하에 10% (v/v) PMA의 거울상이성질체 선택 적 가수분해를 실시하는데 필요한 최소 활성 단위를 결정하기 위해 1.0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.001 ㎎/㎖의 농도로 CAL-B (키라자임 L-2 lyo., 120 U/㎎를 초과함)를 포함하는 반응물을 사용하였다.

2시간 후에, 1.0 및 0.5 ㎎/㎖의 효소 첨가량을 포함하는 반응은 PMA의 (S)-거울상이성질체를 거의 이론적 수율로 98% ee를 초과하는 수준으로 분할하였다. 72시간까지, ≥0.01 ㎎/㎖의 효소 첨가량을 포함하는 반응은 (S)-PMA를 99.5% ee를 초과하는 수준으로 분할하였다. 그러나, 연장된 배양은 0.5 및 1.0 ㎎/㎖의 효소를 포함하는 반응에서 (S)-PMA의 수율을 각각 약 25% 및 10%까지 감소시키는 추가의 가수분해를 유도하였다 (50%의 최대 이론 수율 기준).

유사한 실험에서, 가수분해는 25% (v/v) PMA를 함유하는 수성 반응에서 효소 농도의 함수로서 시험하였으며, 그 결과는 도 3에 나타내었다. 결과는 2.0, 1.0 및 0.5 ㎎/㎖의 농도에서의 CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)가 각각 4, 6 및 24시간 내에 99% ee를 초과하는 수준으로 (S)-PMA의 완전한 분할을 실시하였음을 나타내었다 (도 3). 대조적으로, 0.1 ㎎/㎖ CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)를 포함하는 반응은 30시간 내에 (S)-PMA를 부분적으로 분할하였다 (<60% ee).

거울상이성질체 선택성에 대한 높은 효소 및 PMA 농도의 효과

2.0 및 5.0 ㎎/㎖의 CAL-B (키라자임 L-2 lyo.) 및 25% (v/v) 내지 50% (v/v) 농도 범위의 PMA를 포함하는 반응물을 사용하여 효소 선택성 및 기질 전환도를 평가하였다.

2.0 및 5.0 ㎎/㎖의 효소 첨가량을 함유하는 수성 반응은 6시간내에 40% (v/v) 이하의 PMA 첨가량의 분할을 일으켜서 최대 수율로 95% ee를 초과하는 (S)-PMA를 형성하였다. 30시간의 배양 후에 (S)-PMA의 % ee 또는 수율의 현저한 감소가 일어나지 않았으며, 이는 CAL-B 제제가 명시된 조건하의 (R)-PMA 가수분해에 대해 극히 거울상이성질체 선택적이었음을 나타낸다.

수성 반응에서 PMA의 가수분해에 대한 온도의 효과

30 ℃ 내지 50 ℃ 사이의 배양 온도 (5 ℃ 증분)의 효과는 PMA 25% (v/v) 및 1.0 및 0.5 ㎎/㎖ CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)를 함유하는 수성 반응물에서 시험하였다. 이러한 조건하에, PMA 가수분해는 40 ℃에서 가장 신속하였으며, 최종 거울상이성질체 순도는 이 온도에서 얻어지지 않았다. 그러나, 더 낮은 효소 첨가량을 사용하여 35 ℃에서 배양

된 반응물은 더 장시간의 지속적인 촉매반응을 나타내었고 40 ℃에서 배양된 반응물보다 더 높은 (S)-PMA 거울상이성질체 순도를 얻게 되었다. 50 ℃에서의 배양은 5시간 내에 효소를 불활성화하였다.

측정된 가수분해 속도가 온도 유도된 기질 용해도의 차이와 무관함을 가정하여, 결과는 CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)에 대한 최적 온도가 약 40 ℃이지만, 35 ℃에서 더 큰 효소 안정성이 관찰되었음을 나타내었다.

실시예 5

추가의 P-계 글리콜 에테르 아세테이트의 거울상이성질체 선택적 가수분해

가수분해: 효소 스크리닝

PMA의 거울상이성질체 선택적 가수분해에 대해 스크리닝된 110종이 넘는 시판 가수분해효소의 동일한 패널이 추가의 P-계 글리콜 에테르 아세테이트의 거울상 이성질체 선택적 가수분해에 대해서도 스크리닝되었다. 이들 효소는 일반적으로 실시예 2에 설명된 바와 같이 초기에 스크리닝되었으며, 이 경우 기질 농도는 0.5% (v/v)였다. 2가지 반응을 각 기질에 대해 설정하고 4시간 및 24시간에 종결하였다. 아주 신속한 가수분해를 촉매화하는 선택적인 효소를 동정하기 위해 4시간 샘플링을 실시하였다. 초기에, PMA 거울상이성질체의 용리 순서를 동일한 GC 조건하에서 분리되는 PEA, PnPA, PiPA 및 PnBA 거울상이성질체의 절대 배위를 정하는 기초로서 사용하였으며, 가장 초기에 용리되는 거울상이성질체는 실험적으로 (S)-배위인 것으로 정해졌다. 이러한 용리는 이후에 공지된 입체화학의 거울상이성질체적으로 순수한 화학 합성 화합물로 확인되었다 (실시예 1에 기재된 바와 같음).

각 기질의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 촉매화하는 몇가지 효소가 동정되었으며, 이들 효소는 '히트 (his)'인 것으로 칭해진다. 동정된 대부분의 히트는 글리콜 에테르 아세테이트 기질의 (R)-거울상이성질체를 가수분해하여 아세테이트의 (S)-거울상이성질체를 85% ee를 초과하는 수준으로 분할하였다. 반대 거울상이성질체 선택성을 나타내는 효소도 존재하여 초기 효소 스크리닝에서 동정되었다. 이들 효소는 에스테라제 E001, E002 및 E003 (Thermogen, Inc.)를 포함한다. 그러나, 이들 초기 스크리닝 반응에서 관찰되는 그의 거울상이성질체 선택성은 그의 대응 효소만큼 높지 않았다.

가장 거울상이성질체 선택적인 효소를 ~2 ㎎/㎖ 효소 및 0.5%, 10%, 25% (v/v)의 글리콜 에테르 아세테이트 기질을 함유하는 수성 0.5 ㎖ 반응물에서 다시 스크리닝하였다. 이들 이차 스크리닝 반응을 이용하여 더 높은 기질 농도에서의 거울상이성질체 선택적 효소의 성능을 시험하였다. PEA, PnPA, PiPA 및 PnBA의 가수분해를 위한 가장 거울상이성질체 선택적인 효소를 표 2-5에 기록하였다. 그 중에서도, 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B (CAL-B)가 글리콜 에테르 아세테이트 기질 각각에 대해 가장 선택적이었다. CAL-B의 선택적인 성능은 키라자임 L-2, lyo., (Roche), 알투스 13 (Altus Biologics, Inc.), 리파아제 SP-435 (Novo Nordisk) 및 재조합 CAL-B (Fluka BioChemika)로서 공급된 효소 제제에서 관찰되었다. 다수의 히트가 다른 상업적 공급업자로부터 동일한 효소로 동정되므로, 스크리닝된 효소의 수집시의 중복성은 유리한 것으로 고려되었다.

[표 2]

효소	효소원 (공급업자)	R-PE % ee (% v/v)	S-PEA % ee (% v/v)	E 값 [2] (% C)
리파아제 B, 재조합	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Fluka Biochemika)	91.50% (7.16)	98.74% (6.52)	113 (53)
키라자임 L-2, lyo	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Roche Molecular Biochem.)	85.19% (8.94)	98.45% (7.99)	60 (54)
알투스 13	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Altus Biologics, Inc.)	88.81% (6.66)	98.44% (6.01)	81 (54)
리파아제 SP-435	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Novo Nordisk)	95.93% (8.46)	97.11% (6.95)	205 (55)
리파아제	슈도모나스 플루오레센스 (Fluka Biochemika)	49.92% (6.60)	97.61% (4.20)	12 (67)
리파아제 PS-C II				

	슈도모나스 세파시아 리파아제 (Amano)	88.98% (8.01)	91.35% (7.49)	55 (52)
알투스 2	슈도모나스 세파시아 리파아제 (Altus Biologics, Inc.)	90.09% (8.90)	88.52% (8.26)	57 (52)
리파아제 PS	슈도모나스 세파시아 리파아제 (Amano)	90.43% (6.84)	87.64% (6.64)	57 (50)
지단백질 리파아제	슈도모나스 속 지단백질 리파아제, 타입 B (Fluka Biochemika)	92.22% (5.31)	74.12% (5.68)	55 (46)
키라자임 L-6	슈도모나스 속 리파아제 (Roche Molecular Biochem.)	93.40% (5.03)	57.12% (6.19)	52 (40)

[1] 결과는 GC/FID 분석에 의해 확인되고 본문에 기재된 바와 같이 24시간 동안 배양된 PEA 10% (v/v) 및 약 2.0 ㎎/㎖ 효소를 함유하는 스크리닝 분석의 1:10 희석액에 대해 % (v/v)로서 보고되었다.

[2] E = ln((1-ee% PEA)/(1+ee% PEA/ee% PE))/ln((1+ee% PEA)/(1+ee% PEA/ee% PE))
용적%를 기준으로 산출된 전환 백분율, %C:
[(S)PE+(R)PE]/[(S)PEA+(R)PEA+(S)PE+(R)PE] x 100

[표 3]

효소	효소원 (공급업자)	시간 (시)	R-PnP % ee (% v/v)	S-PnPA % ee (% v/v)	E 값 [2] (% C)
키라자임 L-2, lyo	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Roche Molecular Biochem.)	4	99.07% (12.86)	95.53% (6.13)	827 (67)
키라자임, L-2, c.-f., C2, lyo	고정화 칸디다 안타르크티카 리파아제 B	1	98.84% (6.88)	92.86% (3.24)	587 (67)
		4	96.33% (6.96)	91.14% (2.59)	171 (72)
키라자임 L-6	슈도모나스 속 리파아제 (Roche Molecular Biochem.)	4	92.79% (7.22)	73.16% (4.58)	59 (59)
리파아제 LP S	리파아제 (Amano)	1	80.46% (7.39)	94.45% (5.96)	33 (57)
		4	50.12% (9.36)	90.42% (2.98)	9 (80)

[1] 결과는 GC/FID 분석에 의해 확인되고, 특정 시간 동안 교반시키며 (300 rpm) 30 ℃에서 배양된 PnPA 10% (v/v) 및 2.0 ㎎/㎖ 효소를 함유하는 스크리닝 반응의 1:100 희석액에 대해 % (v/v)로서 보고되었다. 1a에 대한 효소 농도는 53.2 ㎎/㎖였다.

[2] 거울상이성질체 선택성 또는 '거울상이성질체 비' (E):
E = ln((1-ee% PnPA)/(1+ee% PnPA/ee% PnP))/ln((1+ee% PnPA)/(1+ee% PnPA/ee% PnP))
용적%를 기준으로 산출된 전환 백분율, %C :
[(S)PnP+(R)PnP]/[(S)PnPA+(R)PnPA+(S)PnP+(R)PnP] x 100

[표 4]

효소	효소원 (공급업자)	시간 (시)	R-PIP % ee (% v/v)	S-PIPA % ee (% v/v)	E 값 [2] (% C)
키라자임 L-2, lyo	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Roche Molecular Biochem.)	24	94.4% (3.10)	94.14% (2.32)	149 (54)
키라자임, L-2, c.-f., C2, lyo	고정화 칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Roche Molecular Biochem.)	1	96.5% (3.39)	98.76% (1.16)	287 (60)
키라자임 L-6	슈도모나스 속 리파아제 (Roche Molecular Biochem.)	24	94.86% (3.03)	84.42% (2.25)	102 (56)
키라자임 L-10	알칼리기네스 속 리파아제 (Roche Molecular Biochem.)	24	94.8% (2.99)	79.0% (2.3)	90 (54)
알투스 19	슈도모나스 세파시아 리파아제 (Altus Biologics)	1	94.46% (3.16)	95.5% (3.06)	135 (51)
리파아제 LP S	리파아제 (Amano)	1	95.47% (3.02)	95.27% (2.89)	164 (51)
리파아제 PS	리파아제 (Amano)	24	95.64% (3.14)	94.12% (2.31)	160 (57)

[1] 결과는 GC/FID 분석에 의해 확인되고, 특정 시간 동안 교반시키며 (300 rpm) 30 °C에서 배양된 PiPA 10% (v/v) 및 2.0 ㎎/㎖ 효소를 함유하는 스크리닝 반응의 1:100 희석액에 대해 % (v/v)로서 보고되었다. 1a에 대한 효소 농도는 53.2 ㎎/㎖였다.

[2] 거울상이성질체 선택성 또는 '거울상이성질체 비' (E):

$E = \ln((1-ee\%\ PIPA)/(1+ee\%\ PIPA/ee\%\ PnP))/\ln((1+ee\%\ PIPA)/(1+ee\%\ PIPA/ee\%\ PIP))$

용적%를 기준으로 산출된 전환 백분율, %C:

$[(S)PIP+(R)PIP]/[(S)PIPA+(R)PIPA+(S)PIP+(R)PIP] \times 100$

[표 5]

효소	효소원 (공급업자)	시간 (시)	R-PnB % ee (% v/v)	S-PnBA % ee (% v/v)	E 값 [2] (% C)
키라자임 L-2, lyo	칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Roche Molecular Biochem.)	4	99.95% (3.10)	96.5% (2.81)	>500 (52)
키라자임, L-2, c.-f., C2, lyo	고정화 칸디다 안타르크티카 리파아제 B (Roche Molecular Biochem.)	4	99.95% (2.24)	98.29% (1.16)	>500 (66)
키라자임 L-6	슈도모나스 속 리파아제 (Roche Molecular Biochem.)	4	87.01% (2.88)	81.19% (2.89)	36 (49)
키라자임 L-8	써모마이세스 속 리파아제 (Roche Molecular Biochem.)	24	99.95% (1.8)	75% (1.05)	>500 (60)
알투스 2		24			

	슈도모나스 세파시아 리파아제 (Altus Biologics)		91.26% (1.97)	63.64% (1.17)	42.1 (59)

[1] 결과는 GC/FID 분석에 의해 확인되고, 특정 시간 동안 교반시키며 (300 rpm) 30 ℃에서 배양된 PnBA 10% (v/v) 및 2.0 ㎎/㎖ 효소를 함유하는 스크리닝 반응의 1:100 희석액에 대해 % (v/v)로서 보고되었다. 1a에 대한 효소 농도는 53.2 ㎎/㎖였다.

[2] 거울상이성질체 선택성 또는 '거울상이성질체 비' (E):

$E = \ln((1-ee\%\ PnBA)/(1+ee\%\ PnBA/ee\%\ PnP))/\ln((1+ee\%\ PnBA)/(1+ee\%\ PnBA/ee\%\ PnB))$

용적%를 기준으로 산출된 전환 백분율, %C:

[(S)PnB+(R)PnB]/[(S)PnBA+(R)PnBA+(S)PnB+(R)PnB] x 100

500을 초과하는 E 계산값은 >500으로 보고된다.

CAL-B에 의한 PEA, PnPA, PiPA 및 PnBA의 선택적 분할을 기초로 하여 (상기 표 2-5에 나타낸 바와 같음), 키라자임 L-2, lyo 및 키라자임 L-2, c.-f., C2, lyo를 별도로 사용하여 높은 기질 농도에서의 PPhA의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 시험하였다. 1.0 ㎎/㎖ 키라자임 L-2, lyo. 또는 26.6 ㎎/㎖ 키라자임 L-2, c.-f., C2, lyo 및 PPhA를 10, 15, 25, 35 및 50% (v/v)로 함유하는 수성 0.2 ㎖ 반응액을 사용하여 효소 선택성 및 PPhA 전환도를 평가하였다. 키라자임 L-2, c.-f., C2, lyo.를 함유하는 수성 반응의 분석은 (S)-PPhA 및 (R)-PPh 둘다가 25% 이하의 기질 첨가량에서 99% ee (50% 수율)로 분할되었음을 나타내었다. (S)-PPhA의 부분적인 분할은 35% (81% ee) 및 50% (74% ee)의 기질 첨가량에서 관찰되었다. 키라자임 L-2, lyo를 포함하는 반응은 10%의 첨가량 (99% ee를 초과함)에서 (S)-PPhA의 완전한 분할을 실시하였으며, 15%, 25%, 35% 및 50% (v/v)의 기질 첨가량에서는 PPhA가 약 95 % ee, 86% ee, 79% ee 및 69% ee로 분할되었다.

CAL-B의 거울상이성질체 선택성

다른 P-계 글리콜 에테르 아세테이트에 대한 CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)의 거울상이성질체 선택성은 다양한 조건하에 수성 반응에서 시험하였다. 몇가지 실험 조건 및 결과를 하기 표 6에 요약하였다.

[표 6]

기질	농도 (v/v%)	온도 (℃)	리파아제 [1] (㎎/㎖)	반응시간 (시)	전환율 (%)	(R)-에테르 % ee	(S)-아세테이트 % ee
PMA	20	40	26.6	4	37.6	n.d.	>99
	20	40	26.6	20	48.9	n.d.	>99
	25	40	26.6	2	35.6	n.d.	>99
	25	40	26.6	30	54.9	n.d.	97.0
	35	40	26.6	22	38.7	n.d.	95.1
	45	40	26.6	22	34.2	n.d.	94.0
	50	40	26.6	30	33.4	n.d.	92.2
	75	40	26.6	6.5	29.3	n.d.	79.1
PEA	10	40	26.6	1.5	53.2	97.3	98.7
	20	40	26.6	3	55.2	96.4	97.1
	25	40	26.6	1.5	56.2	97.3	95.3
	30	40	26.6	3	51.7	96.8	94.6
	35	40	26.6	5	54.4	96.9	93.3
	40	40	26.6	5	51.1	97.3	91.7
	50	40	26.6	20	43.2	97.1	88.2
PnPA	15	30	26.6	4	73.2	>99	91.4

	25	30	26.6	4	59.6	>99	89.7
	35	30	26.6	4	63.2	>99	86.0
	50	30	26.6	24	55.6	>99	80.3
PiPA	15	30	26.6	24	66.2	95.4	90.2
	25	30	26.6	24	68.1	96.4	89.2
	35	30	26.6	24	55.6	97.3	85.6
	50	30	26.6	24	42.1	97.4	79.7
PnBA	15	30	26.6	4	81.7	97.9	93.6
	25	30	26.6	4	50.4	98.9	87.5
	35	30	26.6	4	48.5	>99	83.5
	50	30	26.6	4	47.8	>99	76.9
PPhA	10	30	26.6	4	50.0	>99	>99
	15	30	26.6	4	68.6	>99	>99
	25	30	26.6	4	50.6	>99	>99
	35	30	26.6	24	44.8	>99	81.5
	50	30	26.6	24	41.3	>99	73.7

[1] 담체 고정화 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B, 키라자임 L-2, c.-f., C2, lyo (~10 U/㎎, Roche Molecular Biochemicals)로서 시판됨.
n.d. 측정되지 않음

결과는 CAL-B가 PEA, PnPA, PiPA, PnBA 및 PPhA의 거울상이성질체 선택적 가수분해를 촉매화하여 (S)-아세테이트 및 (R)-에테르가 둘다 높은 순도로 형성되게 함을 나타낸다. 그 결과는 또한 CAL-B가 폭넓은 기질 특이성을 나타내지만, 대부분의 경우에 시험된 조건하에 모든 기질 첨가량에서 높은 거울상이성질체 선택성을 유지함을 나타낸다.

높은 기질 농도 (50% 내지 70% v/v)까지 각각의 글리콜 에테르 아세테이트 기질의 각종 농도 및 각종 효소 농도에서의 CAL-B의 거울상이성질체 선택적 분할 성능을 표 7에 요약하였다. 또한, 글리콜 에테르 아세테이트의 거울상이성질체 선택적 가수분해에 대한 일부의 최적 파라메터를 표 7에 요약하였다.

[표 7]

기질	스크리닝된 효소의 수, 이차 (일차)	CAL-B의 경우 기질 농도 범위 (% v/v)	CAL-B에 의한 효소 농도 범위	CAL-B에 의한 최적 조건		
				기질 농도 (% v/v)	효소 첨가량	입증된 재순환 수
PMA	4 (>110)	0.5-70	120-180 U/㎖	25	120 U/㎖	30
PEA	12 (>110)	0.5-50	15-120 U/㎖	20	120 U/㎖	16
PnPA	8 (>110)	0.5-50	120-240 U/㎖	10	240 U/㎖	n.d.
PiPA	7 (>110)	0.5-50	120-240 U/㎖	10	240 U/㎖	n.d.
PnBA	8 (>110)	0.5-50	120-240 U/㎖	10	240 U/㎖	n.d.
PPhA	2	0.5-50	120 U/㎖	15	120 U/㎖	5

n.d. 측정되지 않음

실시예 6

에스테르교환: 초기 평가

CAL-B에 의한 PM의 에스테르교환

글리콜 알킬 (또는 아릴) 에테르의 에스테르교환을 촉매화하는 CAL-B의 능력을 몇가지 다른 반응에서 초기에 시험하였다. 0.5 ㎖의 이 반응물은 아실 도너로서 비닐 아세테이트 또는 에틸 아세테이트를 사용하고, 비극성 공용매로서 톨루엔 또는 헥산을 사용하거나 사용하지 않고 5.0 ㎎/㎖의 CAL-B (키라자임 L-2 lyo.) 및 10% (v/v) PM을 함유하였다. 그 결과는 표 8에 나타내었다.

[표 8]

용매/아실 도너	초기 PM (% v/v)	PM (% v/v)	(S)-PMA (% v/v)	(R)-PMA (% v/v)	(R)-PMA (% ee)
비닐 아세테이트	10%	1.15	9.40	12.48	14%
톨루엔/비닐 아세테이트 (8:1)	10%	0.08	11.06	12.20	5%
헥산/비닐 아세테이트 (8:1)	10%	0.09	8.92	9,98	6%
톨루엔/에틸 아세테이트 (8:1)	10%	6.85	0.62	3.70	71%
에틸 아세테이트	10%	5.80	0.86	9.19	83%
[1] 결과는 본원에 기재된 조건하에서 16시간 배양 후의 반응의 GC/FID 분석을 기초로 한다.					

16시간으로 수행된 종말점 분석은 CAL-B가 아실 도너로서 비닐 아세테이트 또는 에틸 아세테이트를 사용한 PM의 거울상이성질체 선택적 아실화를 촉매화하였음을 입증하였다 (표 8에 나타낸 바와 같음). 추가의 실험은 가장 높은 거울상이성질체 선택성이 에틸 아세테이트를 90% (v/v)로 사용하는 무수 조건하에서 초기에 일어난 것임을 나타내었다. 그러나, 우선적인 알코올 거울상이성질체의 더욱 신속한 에스테르화에 이어서 덜 선호되는 알코올 거울상이성질체의 느린 아실화가 이루어진다는 가정으로, 비닐 아세테이트에 의한 높은 초기 거울상이성질체 선택성이 예외적이지 않을 수 있다. 이러한 가정은 5.0 ㎎/㎖ CAL-B (키라자임 L-2 lyo.)가 아실 도너로서 비닐 아세테이트 또는 에틸 아세테이트를 사용한 50% (v/v) 이하의 PM의 거울상이성질체 선택적 아실화를 촉매화하였음을 나타내는 반응의 일시적인 분석에 의해 확인되었다. 각각 50% (v/v)의 PM 및 에틸 아세테이트를 포함하는 반응에서, 결과의 (R)-PMA는 1시간 내에 98% ee를 초과하는 수준으로 형성되었다.

비활성화 에스테르인 에틸 아세테이트가 이 반응에 대한 아실 도너로서 작용할 수 있다는 관찰은 광활성 P-계 글리콜 에테르가 고수율로 생성될 수 있음을 암시한다.

CAL-B에 의한 추가의 P-계 글리콜 에테르의 에스테르교환

P-계 글리콜 에테르 PM, PE, PnP, PiP, PnB 및 PPh의 에스테르교환에 기초한 분할은 아실 도너로서 에틸 아세테이트 및 비닐 아세테이트를 사용하고, 유기 용매의 반응 매질을 사용하여 효소적 촉매 CAL-B로 시험하였다. 상응하는 글리콜 에테르 아세테이트의 (R)-거울상이성질체는 생성물로서 높은 광학 순도로 형성되었다.

시험된 모든 글리콜 에테르의 전환은 아실 도너로서 비닐 아세테이트를 사용한 경우에 가장 신속한 것으로 초기에 관찰되었다.

실시예 7

에스테르교환: 최적화

실험실 규모 및 반응기 규모 (또는 스케일 확대)에 대해, 수율 또는 전환율 (아실화된 기질의 비율 또는 양으로서 정량화됨), 이성질체 순도 (% ee로서 측정됨), 기질 첨가량 (또는 농도), 효소 첨가량 및 반응 시간, 온도 및 매질을 포함한 각종 반응 파라메터가 최적화될 수 있는 조건을 결정하기 위해 실험을 수행하였다.

효소 농도 및 온도의 효과

효소 첨가량의 조정이 반응 공학을 통한 생성물 광학 순도를 증가시키는 효과적인 방법인 것으로 밝혀졌다.

75/25% (v/v) PM/VA 및 80/20% (v/v) PPh/VA의 기질/아실 도너 비로 1.0 ㎖ 반응물에 포함된, PM 및 PPh의 거울상이성질체 선택적 에스테르교환 반응은 26.6, 13.3 및 6.7 ㎎/㎖의 담체 고정된 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B (키라자임 L-2, c.-f., C2, lyo.)로 시험되었다. 그 결과는 PMA 및 PPhA의 (R)-거울상이성질체 아세테이트 생성물에 대한 가장 높은 % ee가 감소되는 농도의 효소를 포함하는 반응물과 상관관계가 있음을 나타내었으며, 이 상관관계는 전환도와는 무관하였다. PM에 대한 전체적인 전환율이 3가지 효소 첨가량에 대해 계산된 이론적 전환율 (아실 도너의 양을 기준으로 함)보다 ~10% 더 높았으며, 반면에 PPh의 전환율은 계산된 이론적 전환율보다 ~10% 더 낮았다. (R)-PMA 및 (R)-PPhA 생성물에 대한 선택적인 아실화의 결과는 도 4에 나타내었다. 그 결과는 (R)-PM 및 (R)-PPhA 생성물의 최고 % ee를 유도하는 조건이 전환 %와 무관하고 시험된 효소 첨가량이 최저 (6.6 ㎎/㎖)인 반응물과 상관관계가 있음을 나타낸다.

비닐 아세테이트에 의한 PM의 에스테르교환 반응을 다른 효소 첨가량으로 시험한 추가 실험의 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

반응 온도를 감소시킨 결과 PM의 에스테르교환에 기초한 분할에 대한 CAL-B의 거울상이성질체 선택성이 증가되었다. 분할 속도는 더 느렸지만, 반응 온도를 낮추는 것이 생성물의 광학 순도를 증가시키는 효과적인 방법이었다. 이 효과는 -20 ℃ 내지 30 ℃ 범위의 온도에서 입증되었다.

75/25% 또는 70/30% (v/v)의 PM/비닐 아세테이트 비로 1.0 ㎖ 반응물에 포함된, PM의 거울상이성질체 선택적 에스테르교환 반응은 30, 20, 4 및 -20 ℃ (±2 ℃)에서 교반시키지 않고 배양된 26.6, 13.3, 6.7, 3.3 및 1.7 ㎎/㎖의 담체 고정 된 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B (키라자임 L-2, c.-f., C2, lyo.)로 시험되었다. 최저 효소 첨가량을 함유하고 최저 온도 (-20 ℃)에서 배양된 반응물이 최고 % ee의 (R)-PMA를 가장 느린 속도로 생성하였다. 그러나, 결과는 목적하는 분할 성능에 적합한 조건이 배양 온도 및 효소 첨가량을 최적화함으로써 확인될 수 있음을 나타낸다. 각종 온도에서 배양된 다른 효소 첨가량을 포함하는 반응의 성능은 표 9에 나타내었다.

[표 9]

기질	아실 도너	기질/아실 도너 비	온도 (℃)	효소 첨가량 [1] (㎎/㎖)	시간 (시)	전환율 (%)	(S)-글리콜 에테르 % ee	(R)-아세테이트 % ee
PM	VA	75/25	30	26.8	2	44.6	n.d.	90.34
				26.8	8	44.8		82.32
PM	VA	70/30	4	26.8	4	20.7		95.3
				26.8	24	53.6		87.6
PM	VA	70/30	-20	26.8	4	8.3		97.6
				26.8	52	45.5		96.3
PM	VA	75/25	30	13.4	2	37.3		93.2
				13.4	8	45.9		88.7
PM	VA	70/30	4	13.4	4	15.3		96.5
				13.4	26	51.9		91.7
PM	VA	70/30	-20	13.4	4	5.7		98.0
				13.4	52	35.5		97.7
PM	VA	75/25	30	6.8	2	24.3		94.7
				6.8	8	46.9		91.7
PM	VA		20	6.8	6	24.5		92.1
				6.8	22	42.4		87.7
PM	VA		4	6.8	6	20.0		96.6
				6.8	48	46.0		93.0

PM	VA		-20	6.8	6	5.5		98.4
				6.8	48	26.3		97.9
PM	VA	75/25	30	3.4	2	12.1		94.4
				3.4	6	25.5		92.5
PM	VA		20	3.4	6	17.8		93.5
				3.4	22	32.9		91.3
PM	VA		4	3.4	6	11.4		97.0
				3.4	48	40.4		94.6
PM	VA		-20	3.4	6	2.6		98.5
				3.4	48	14.6		98.3
PM	VA	75/25	30	1.7	2	6.7		94.8
				1.7	6	23.1		92.6
PM	VA		20	1.7	6	11.0		94.6
				1.7	22	30.2		92.8
PM	VA		4	1.7	6	6.3		97.3
				1.7	48	30.1		96.3
PM	VA		-20	1.7	6	1.6		98.3
				1.7	48	9.8		98.4

[1] 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B, 담체 고정된 형태 (키라자임 L-2, c.f., C2, lyo (~10 U/mg, Roche Molecular Biochemicals)로서 시판됨)

수분의 효과

아실화 및 거울상이성질체 선택성에 대한 수분 활성 및 인산염 완충액 (<3% 용적)의 효과는 PM 및 PPh로 증명되었다. 함유 수분 (수분 활성)은 반응 속도를 느리게 하였지만, 함유 수분을 반응 진행 조절에 이용할 수 있음이 예측된다.

기질 농도의 효과

CAL-B는 표 10에 나타낸 바와 같은 50 내지 150 초과의 거울상이성질체 선택성 (E) 값을 갖고, 70 % (v/v) 이하의 기질 농도에서 글리콜 에테르 PM, PE, PnP, PiP, PnB 및 PPh의 거울상이성질체 선택적 분할을 촉매화하는 것으로 밝혀졌다.

[표 10]

기질	시간 (시)	(S)-OH % ee	(R)-OAc % ee	E 값
PE	6시간	37%	96%	71
PnP	5시간	95%	89%	65
PiP	6시간	92%	87%	49
PnB	4시간	>99%	82%	59
PPh	4시간	>99%	94%	160

[1] 반응 용적은 0.5 ㎖이고, 효소 농도는 1.0 ㎎/㎖이고, 기질 농도는 70% (v/v)이고, 아실 도너는 비닐 아세테이트였다.

(R)-에스테르의 순도는 반응 기간, 또는 생성물이 분석되는 단계에 좌우되며; 그것은 또한 기질 전환율이 50%보다 더 큰지 작은지에 좌우된다 (CAL-B에 의해 촉매화되는 비닐 아세테이트에 의한 PPh의 에스테르교환에 대한 결과는 도 5에 나타냄). 일반적으로, 50% 미만의 기질 전환율에서, (R)-에스테르가 높은 ee 값으로 존재한다. 따라서, (R)-아세테이트의 경우, PEA는 약 96% ee 초과이며, PPhA는 약 95% ee 초과이며, P-계 글리콜 에테르에 대한 잔여 (R)-아세테이트는 약 80% ee 초과이다 (예를 들면, 약 87%, 89% 및 82%의 ee 값은 PnBA에 대해 관찰되었다).

아실 도너

다른 가능한 아실 도너의 성능은 6.6 ㎎/㎖의 키라자임 L-2, c.-f., C2, lyo., 기질 또는 아실 수용체로서의 PE 및 1.0 몰 당량에 해당하는 양의 아실 도너를 함유하는 1.0 ㎖ 반응물에서 시험되었다. PE의 결과의 기질 첨가량의 범위는 35% 내지 55% (v/v)였으며, 잔여 반응 용적은 아실 도너였다. 유사한 반응에서, PnP는 1:1 및 1:2에 해당하는 몰비로 아실 도너와 기질로서 제공되었다. PnP의 결과의 기질 첨가량의 범위는 31% 내지 59% (v/v)였으며, 잔여 반응 용적은 아실 도너였다. 시험된 아실 도너는 부틸 아세테이트 (BA), 에틸 페닐 아세테이트 (EPA), 에틸 아세테이트 (EtA), 에틸 트리클로로아세테이트 (EtCA), 에틸 트리플루오로아세테이트 (EtFA), 이소프로페닐 아세테이트 (IPA), 비닐 아세테이트 (VA), 에틸 메톡시 아세테이트 (EMA), 2,2,2-트리플루오로에틸 부티레이트 (TfEB), 디케텐 (DK) 및 비닐 프로피오네이트 (VP)를 포함하였다. 반응물은 30 ℃에서 배양하고 24시간에 걸쳐 샘플링하였다. 분할된 (S)-기질 및 형성된 (R)-에스테르의 % ee 및 전환 %는 표 11에 나타내었다.

[표 11]

기질	아실 도너 [1]	기질/아실 도너 비 (v/v)	온도 (℃)	리파아제 [2] (㎎/㎖)	시간 (시)	전환율 (%)	(S)-글리콜 에테르 ee (%)	(R)-아세테이트 ee (%)
PE	BA	47/53	30	6.7	20	16.9	11.7	94.9
	BA	47/53	30	6.7	24	17.8	9.5	94.7
	EPA	39/61	30	6.7	20	2.1	-1.5	51.0
	EtA	54/46	30	6.7	20	17.5	9.8	94.3
	EtA	54/46	30	6.7	24	18.4	3.1	96.7
	ETFA	42/58	30	6.7	20	1.0	-9.4	15.6
	IPA	51/49	30	6.7	20	51.6	72.4	95.6
	IPA	51/49	30	6.7	24	54.5	77.5	95.3
	VA	55/45	30	6.7	20	44.7	51.8	95.2
	VA	55/45	30	6.7	24	47.4	54.9	95.0
	EMA	47/53	30	6.7	24	1.0	10.7	11.6
	TFEB	38/62	30	6.7	20	60.6	54.5	63.9
	TFEB	38/62	30	6.7	24	63.9	58.7	65.0
	VP	51/49	30	6.7	20	62.5	73.2	67.3
	VP	51/49	30	6.7	24	65.3	77.9	67.8
PnP	BA	50.5/49.5	30	6.7	2	7.4	5.2	98.4
	BA	50.5/49.5	30	6.7	20	17.2	17.4	96.1
	BA	34/66	30	6.7	6	17.1	16.4	97.6
	BA	34/66	30	6.7	24	24.1	23.9	94.9
	EtA	58/42	30	6.7	4	11.4	9.5	98.1
	EtA	58/42	30	6.7	24	18.7	17.2	95.6
	EtA	41/59	30	6.7	4	16.0	15.3	98.0
	EtA	41/59	30	6.7	24	25.7	25.1	95.3
	IPA	55/45	30	6.7	4	33.5	38.6	97.8
	IPA	55/45	30	6.7	20	54.9	98.7	91.8

	IPA	38/62	30	6.7	6	45.1	62.5	96.9
	IPA	38/62	30	6.7	20	58.7	98.0	88.1
	VA	59/41	30	6.7	1	32.0	35.1	97.4
	VA	59/41	30	6.7	6	52.6	85.2	93.6
	VA	59/41	30	6.7	20	60.7	98.3	74.3
	VA	42/58	30	6.7	1	39.3	47.2	96.7
	VA	42/58	30	6.7	6	56.5	95.5	90.1
	VA	42/58	30	6.7	20	66.1	97.7	66.8
	TFEB	47/53	30	6.7	20	61.9	77.2	81.0
	TFEB	47/53	30	6.7	24	61.6	76.1	81.0
	TFEB	31/69	30	6.7	20	59.5	71.3	80.4
	TFEB	31/69	30	6.7	24	62.9	80.5	81.4
	VP	55/45	30	6.7	6	62.7	86.7	81.8
	VP	55/45	30	6.7	24	66.8	99.2	82.6
	VP	38/62	30	6.7	6	61.6	93.8	82.4
	VP	38/62	30	6.7	24	68.2	99.0	82.7

[1] 시험된 아실 도너: 부틸 아세테이트 (BA), 에틸 페닐 아세테이트 (EPA), 에틸 아세테이트 (EtA), 에틸 트리플루오로아세테이트 (ETFA), 이소프로페닐 아세테이트 (IPA), 비닐 아세테이트 (VA), 에틸 메톡시 아세테이트 (EMA), 2,2,2-트리플루오로에틸 부티레이트 (TFEB), 비닐 프로피오네이트 (VP)

[2] 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B, 담체 고정된 형태 (키라자임 L-2, c.f., C2, lyo (~10 U/mg, Roche Molecular Biochemicals)로서 시판됨)

아실 도너로서 에틸트리클로로 아세테이트 또는 디케텐을 사용한 경우 상당한 에스테르교환이 검출되지 않았다. 그 결과는 비닐 아세테이트 및 이소프로페닐 아세테이트가 글리콜 에테르 아실화에 대한 높은 선택성을 제공하는 효율적인 아실 도너임을 나타낸다.

추가의 사항은 적절한 아실 도너의 선택을 가능하게 하며, 그러한 사항으로는 반응 중에 형성된 생성물의 유형, 및 그의 휘발성 및 독성을 포함한 특성이 포함된다. 예를 들면, 아실 도너로서 비닐 아세테이트를 사용하면 아세트알데히드로 호변이성질체화되는 것으로 이해되는 비닐 알코올의 생성이 이루어지며; 아세트알데히드는 매우 인화성 (인화점 -40 ℃)이고, 그것은 의심되는 동물 발암물질이며, 증류에 의해 효율적으로 회수되기가 어렵다. 따라서, 생성물은 안전 위험요소, 건강 위험요소, 및 분할된 거울상이성질체를 분리하는데 사용되는 증류 기구의 가능한 오염물질을 나타낸다. 한편, 아실 도너로서 이소프로페닐 아세테이트를 사용하면 아세톤으로 호변이성질체화되는 것으로 생각되는 이소프로페닐 알코올의 생성이 이루어지며; 아세톤은 더 높은 인화점 (-17 ℃)을 가지며, 아세트알데히드만큼 인화성이 아니며, 그것은 의심되는 발암물질이 아니며, 분할된 거울상이성질체로부터 증류하기가 더욱 적당한 것임을 입증할 수 있다. 또한, 표 12에 나타낸 추가의 실험은 이소프로페닐 아세테이트가 PM, PE, PnP, PnB 및 PPh에 대한 효율적이고 선택적인 아실 도너임을 입증하였다.

[표 12]

기질	아실 도너 [1]	기질/아실 도너 비 (v/v)	기질/아실 도너 몰비	리파아제 [2] (㎎/㎖)	시간 (시)	전환율 (%)	(S)-글리콜 에테르 ee (%)	(R)-글리콜 에테르 아세테이트 ee (%)
PE	IPA	51/49	1/1	6.7	20	51.6	72.4	95.6
	IPA	51/49	1/1	6.7	24	54.5	77.5	95.3

	VA	55/45	1/1	6.7	20	44.7	51.8	95.2
	VA	55/45	1/1	6.7	24	47.4	54.9	95.0
PnP	IPA	55/45	1/1	6.7	4	33.5	38.6	97.8
	IPA	55/45	1/1	6.7	20	54.9	98.7	91.8
	IPA	38/62	1/2	6.7	6	45.1	62.5	96.9
	IPA	38/62	1/2	6.7	20	58.7	98.0	88.1
	VA	59/41	1/1	6.7	1	32.0	35.1	97.4
	VA	59/41	1/1	6.7	6	52.6	85.2	93.6
	VA	59/41	1/1	6.7	20	60.7	98.3	74.3
	VA	42/58	1/2	6.7	1	39.3	47.2	96.7
	VA	42/58	1/2	6.7	6	56.5	95.5	90.1
	VA	42/58	1/2	6.7	20	66.1	97.7	66.8
PnB	IPA	57/43	1/1	6.7	4	40.1	53.3	96.7
	IPA	57/43	1/1	6.7	6	44.8	61.2	95.9
	IPA	57/43	1/1	6.7	20	58.0	99.5	81.7
	IPA	40/60	1/2	6.7	6	47.6	67.4	95.4
	IPA	40/60	1/2	6.7	20	58.7	>99	79.2
	IPA	40/60	1/2	6.7	24	60.3	>99	74.4
	VA	61/39	1/1	6.7	4	52.1	82.7	92.6
	VA	61/39	1/1	6.7	6	54.3	86.4	89.3
	VA	61/39	1/1	6.7	20	66.5	>99	56.7
	VA	44/56	1/2	6.7	2	38.5	51.5	95.2
	VA	44/56	1/2	6.7	6	55.9	>99	87.0
	VA	44/56	1/2	6.7	20	68.1	>99	53.5
PPh	IPA	57/43	1/1	6.7	6	29.8	51.3	96.4
	IPA	57/43	1/1	6.7	20	43.5	97.9	93.1
	IPA	57/43	1/1	6.7	24	44.1	98.2	92.0
	IPA	40/60	1/2	6.7	6	35.8	62.4	95.0
	IPA	40/60	1/2	6.7	20	44.5	96.1	90.5
	IPA	40/60	1/2	6.7	24	45.0	98.1	89.5
	VA	61/39	1/1	6.7	6	38.4	73.3	95.3
	VA	61/39	1/1	6.7	20	45.8	97.6	87.5
	VA	61/39	1/1	6.7	24	46.2	98.1	86.2
	VA	44/56	1/2	6.7	4	39.9	73.6	93.7
	VA	44/56	1/2	6.7	6	43.1	>99	92.8
	VA	44/56	1/2	6.7	20	47.6	98.1	81.7

[1] 시험된 아실 도너: 이소프로페닐 아세테이트 (IPA) 및 비닐 아세테이트 (VA)
[2] 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B, 담체 고정된 형태 (키라자임 L-2, c.f., C2, lyo (~10 U/㎎, Roche Molecular Biochemicals)로서 시판됨)

기질 대 아실 도너의 비: 기질 전환도의 조절

PM 및 PPh의 CAL-B 촉매화된 에스테르교환은 각각 80% 및 84% 이하의 기질 첨가량으로 입증되었다. 잔여 반응 용적은 비닐 아세테이트 (아실 도너로서)였다. 아실 도너의 양을 제한하는 것은 기질 전환도를 조절하는 효율적인 방법이며, 따라서 아실 도너의 양은 50%보다 약간 낮은 또는 약간 높은 기질 전환을 가능하게 하기에 충분한 양으로 공급된다. 이러한 개념은 또한 목적하는 전환도를 가능하게 하는 최고 기질 농도의 사용을 강조함으로써 용적 생산성을 최대화하게 된다.

추가의 실험은 각종 비의 비닐 아세테이트 아실 도너에서의 글리콜 에테르 기질의 에스테르교환을 시험하였으며, 그 결과는 하기 표 13에 나타내었다.

[표 13]

기질	아실 도너	기질/아실 도너 비	온도 (℃)	효소 농도 [1] (㎎/㎖)	시간 (시)	전환율 (%)	(S)-글리콜 에테르 ee (%)	(R)-아세테이트 ee (%)
PM	VA	50/50	30	1.0	2	59.9	n.d. [2]	94.8
					22	84.3	n.d.	56.2
PM	VA	70/30	30	1.0	2	59.6	n.d.	94.3
					22	68.7	n.d.	81.6
PnB	VA	50/50	30	1.0	2	51.9	75.3	86.2
					22	70.5	99.0	47.6
PnB	VA	70/30	30	1.0	2	52.4	79.0	88.1
					6	59.9	99.0	76.3
PE	VA	50/50	30	1.0	4	39.6	95.7	95.7
					22	52.3	77.2	94.3
PE	VA	70/30	30	1.0	4	33.8	32.9	95.9
					22	39.6	45.4	95.7
PiP	VA	50/50	30	1.0	2	53.8	73.2	87.7
					22	65.4	95.1	73.2
PiP	VA	70/30	30	1.0	2	43.9	50.4	91.1
					22	63.6	96.9	79.4
PnP	VA	50/50	30	1.0	2	48.7	70.3	94.4
					22	67.6	99.0	59.7
PnP	VA	70/30	30	1.0	2	47.5	67.6	94.6
					5	58.4	95.4	89.0
PPh	VA	50/50	30	1.0	2	38.9	74.7	94.9
					22	52.5	99.0	68.0
PPh	VA	70/30	30	1.0	2	33.3	62.1	95.9
					6	46.0	99.0	92.2
PtB	VA	73/27	30	6.7	6	41.6	54.4	>99
					20	55.6	96.5	>99
PtB	VA	76/24	30	6.7	6	41.8	54.9	>99
					20	54.5	91.6	>99

[1] 칸디다 안타르크티카 리파아제 타입 B (키라자임 L-2, lyo (~120 U/㎎, Roche Molecular Biochemicals)로서 시판됨). 키라자임 L-2, c.f., C2, lyo (~10 U/㎎, Roche Molecular Biochemicals)로서의 고정된 형태를 기질로서 PtB를 포함하는 반응에 사용하였다.
[2] n.d. 측정되지 않음

실시예 8

촉매의 재순환

가수분해 또는 에스테르교환에 대한 효소 촉매는 재순환될 수 있다. 프로필렌 글리콜 에테르 아세테이트의 거울상이성질체 선택적 가수분해에 사용될 때 CAL-B를 재순환시키기 위한 여러가지 파라메터를 평가하고 최적화하기 위해 다음 실험 을 수행하였다.

효소 재순환은 25, 35 및 45% (v/v) 농도의 PMA 및 13 ㎎/㎖의 키라자임 L-2, c.-f., C2 (약 10 U/㎎)를 함유하는 0.5 ㎖ 수성 반응물에서 시험하였다. 반응물을 300 rpm으로 회전 진탕시키며 40 ℃에서 배양하였다. 분석은 24시간 주기에 걸쳐 수행하였으며, 그 시간에 반응 용액을 제거하고 기질을 함유하는 새로운 완충액을 원래 고정화 효소에 도입하여 다음 반응 주기를 시작하였다. 35% 및 45%의 기질 농도에서, 분할은 두 효소에 의해 주기 3까지 불완전하여 (S)-PMA를 92% ee 이하의 순도로 생산하였다. 대조적으로, 25% PMA를 포함하는 반응은 일반적으로 6 반응 주기를 통해 (S)-PMA를 >96-98% ee로 분할하였다. 추가의 효소 재순환 연구는 20% 및 25% 기질 첨가량으로 수행되었다. 키라자임 L-2, c.-f., C2의 경우, (S)-PMA의 거울상이성질체 순도는 20% 또는 25% 기질 농도로 수행된 실험에서 30 반응 주기에 걸쳐 약 97% ee였다.

PMA 분할의 스케일 확대는 25% (v/v) PMA의 기질 농도로 바이오플로 3500 퍼멘토르 (New Brunswick Scientific)에서 1.5 리터 반응 용적으로 수행되었다. 26.6 ㎎/㎖ 키라자임 L-2, c.-f., C2 (약 280 U/㎖)의 초기 효소 첨가량으로, 25% PEA의 분할을 각 반응 주기를 약 2 내지 5시간으로 하여 15 주기까지 관찰하였다. 각 주기의 말기에, 교반을 중단하고 침전된 고정화 CAL-B 생체촉매를 반응기에서 유지하면서 분할된 반응 매트릭스를 제거하였다. 라세미 PMA를 함유하는 새로운 완충액을 반응기에 첨가하여 다음 주기를 시작하였다. 15 분할 주기에 걸쳐 추가의 효소를 첨가하지 않았다. 15 분할 주기 동안 염화 메틸렌 추출 후에 회수된 (S)-PMA 및 (R)-PM의 평균 거울상이성질체 순도는 각각 >99.5% ee 및 >85% ee였다.

고정화 CAL-B (키라자임 L-2, c.-f., C2; 약 240 U/㎖)를 기질로서 PEA를 사용한 몇가지 다른 효소 재순환 실험에 사용하였으며, 이 실험은 실험실 규모 (<5 ㎖) 및 1.5-L의 규모였다. 한 실험에서, 1 ㎖ 반응 용적의 20% (v/v) PEA의 분할을 15 주기 이상 동안 3가지의 다른 효소 첨가량에 대해 관찰하였으며, 주기 시간은 일반적으로 약 24시간으로 하였다. 이 실험에서, 반응 매트릭스를 각 주기 말기에 고정화 CAL-B로부터 제거하고 새로운 반응 매트릭스를 고정화 효소에 첨가하여 다음 주기를 시작하였다. 반응 혼합물은 약 40 ℃에서 배양하였다. 도 6에 나타낸 결과는, 이용된 실험 조건하에서 (S)-PEA의 매우 양호한 분할이 수개의 주기에 대해서 관찰될 수 있으며 효소 농도가 높을수록 더 많은 수의 주기 동안 더 많은 분할을 일으킨다는 것을 나타낸다.

또다른 실험에서, 20% (v/v) PEA의 분할은 바이오플로 3500 퍼멘토르 (New Brunswick Scientific)에서 1.5 리터 반응 용적으로 스케일 확대되었다. 생체촉매 재순환은 30 주기에 걸쳐 CAL-B에 의한 분할을 가능하게 하였고, 각 주기의 길이는 약 2 내지 약 9시간으로 다양하였다. 이 실험에서, 반응 매트릭스를 주기 말기에 반응기 내의 고정화 CAL-B로부터 제거하고 분석하고, 새로운 반응 매트릭스를 고정화 효소에 첨가하여 다음 주기를 시작하였다. 반응 혼합물을 (20% 수산화 나트륨의 첨가에 의해) pH 7.2로 유지하고 37 ℃에서 배양하였다. 생성물의 거울상이성질체 순도는 각 주기 경로 중에 샘플을 제거하고 분석하여 모니터하였다. 처음 18 주기의 결과를 도 7에 나타내었다. 기질 분할에 필요한 반응 주기 시간이 증가된 경우, 새로운 효소 (원래 첨가량의 10%)를 주기 8, 10, 16 및 25에서 반응기에 첨가하였다. PEA 분할의 32 주기에 걸친 성능은 도 8에 나타내었다. 각 주기의 최종 샘플을 사용하여 (S)-PEA 및 (R)-PE의 분할 (% ee로서 표시됨) 및 총 전환율 (%로서 표시됨)을 계산하였다. 그 결과는 도 8에 나타내어져 있으며, 이는 스케일 확대 조건 하에서, (S)-PEA 및 (R)-PE의 매우 우수한 분할, 및 높은 전환도가 수개의 주기에 걸쳐 관찰될 수 있음을 입증한다. 또한, 이 실험은 주기 당 효소 비용 부담을 상당히 감소시키는 스케일 확대 조건하에서 키라자임 L-2, c.-f., C2의 효율적인 재순환을 입증하며; 추가의 효소 재순환은 더욱 바람직한 공정 효율성 및 전체 생산 경제성을 제공할 수 있다. 고농도의 PPh의 에스테르교환에 기초한 분할은 다음 조건 하에서 아실 도너로서 비닐 아세테이트를 사용하고 키라자임 L-2, c.-f., C2 (6.6 ㎎/㎖)를 사용하여 1.0-L 규모로 증명되었다. <50%로 전환된 반응물은 70/30 내지 76/30의 PPh/VA 비로 만들어져 실온에서 높은 % ee로 (R)-PPhA를 계속 생산하였다. >50% 전환이 필요한 반응의 경우, 70/30의 PPh/VA 비를 이용하여 4 ℃에서 더 높은 거울상이성질체 선택성을 얻었으며, 일반적으로 (S)-PPh 및 (R)-PPhA에 대한 생성물 거울상이성질체 순도는 각각 >90% ee 및 95% ee였다. 교반은 자석식 교반 막대로 행하고, 반응으로부터의 고정화 효소의 분리는 여과에 의해 이루어질 수 있다. 이러한 조건 하의 효소 재순환은 5-8 주기 동안 이루어질 수 있다.

다른 PGEA 기질을 사용하여 1.0-리터 규모로 에스테르교환 조건하에서 추가의 반응을 수행하여 상응하는 (S)-PGAE 및 (R)-PGAEA를 높은 거울상이성질체 순도 로 분할하였다. 이 연구에 사용된 효소를 다중 배치 분할 주기에 재사

용하였다. 조건 및 분할 성능은 하기 표 14에 요약하였다.

[표 14]

배치 번호	기질	아실 도너	기질/아실 도너 (v/v)	온도 (℃)	이론 전환율 % (관찰 전환율 %)	CAL-B, L-2, C2 (㎎/㎖)	주기수	(S)-글리콜 에테르 ee (%)	(R)-글리콜 에테르 아세테이트 ee (%)
1	PM	VA	62/38	4	65 (68)	10.00	10	95.47	80.02
2	PM	IPA	69/31	4	40 (~43)	13.4	3	27.56	95.44
3	PnP	VA	69/31	4	65 (~63)	10	21	98.6	88.2
4	PnP	VA	78.5/21.5	4	40 (~44)	3.3-6.6	8	47.55	97.1
5	PnB	IPA	69/31	4	61 (~59)	6.7-18.6	7	99.9	92.1
6	PnB	IPA	73/27	4	50 (~45)	6.7	8	55.7	97.7
7	PtB	VA	73/27	24	60 (~56)	6.7	12	95.5	99.6
8	PPh	VA	76/24	20	56 (~45)	6.7	5	62.64	96.06
9	PPh	VA	70/30	4	66 (~51)	6.7	2	78.9	97.08

실시예 9

키랄 아실 도너로서 라세미 PMA

방법 :

1.8 ㎖ 바이알에 다음 양의 라세미 1-tert-부톡시-2-프로판올 (PtB), 기록된 아실 도너 및 생체촉매 (효소)로서의 키라자임 L-2 C2를 첨가하였다. 나타낸 PtB의 대략의 이론적 전환율은 기질 및 아실 도너의 몰 비를 기준으로 한다. 100%를 초과하는 이론적 전환율 값은 제공된 아실 도너의 화학양론적 과량을 의미한다.

반응 번호	아실 도너 (용적%)	효소 (㎎/㎖)	기질	PtB (μL)	아실 도너 (μL)	이론 전환율 %
1	PMA 50%	13.4	PtB	500	500	104
2	PMA 70%	13.4	PtB	700	300	45
3	비닐 아세테이트 70%	13.4	PtB	700	300	70
4	에틸 아세테이트 70%	13.4	PtB	700	300	66

총 용적 1.0 ㎖의 반응 혼합물을 교반시키며 4 ℃에서 배양하였다. 서브샘 플을 65시간 주기로 제거하고 키랄 GC에 의해 분석하여 PtB의 전환율 및 결과 아세테이트 생성물, 1-tert-부톡시-2-프로판올 아세테이트 (PtBA), 및 PMA 및 PM의 거울상이성질체 순도를 모니터하였다.

결과 :

표 15에 나타낸 결과는 DOWANOL PMA가 PtB의 효소적 에스테르교환에서 아실 도너로서 작용하여 (R)-PtBA를 높은 거울상이성질체 순도 (>99% ee)로 생산할 수 있음을 입증한다. (R)-PtB의 고도로 선택적인 아실화 이외에, 키랄 아실 도너 PMA의 이용에서 효소 선택성이 또한 관찰되었다. 반응 1 및 2는 CAL-B가 (R)-PMA를 아실 도너로서 우선적으로 이용하여 부산물로서의 (R)-PM의 형성 및 PtB 아실화와 동시에 일어나는 (S)-PMA의 부분적인 분할을 유도함을 나타낸다. 글리콜 에테르 기질 (예를 들면, PtB) 대 키랄 PMA의 비 및 휘발성 (R)-PM의 제거는 원리적으로

반응 전환도를 조절하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 50:50 (반응 1) 및 70:30 (반응 2)의 용적 비로 PtB/PMA를 포함하는 반응은 각각 31% 및 20%의 PtB 전환율로 >99% ee의 R-PtBA를 생산하였다. 또한, 효소 농도, 반응 시간 및 배양 온도를 반응 속도 및 거울상이성질체 선택성을 조절하는데 이용할 수 있음을 주목하여야 한다. 그 결과는 하기 표 15에 나타내어져 있다.

[표 15]

반응 번호	시간 (시)	(S)-PtB (% ee)	(R)-PtBA (% ee)	PtB 전환율 (%) [1]	(R)-PM (% ee)	(S)-PMA (% ee)	PMA 전환율 (%)
1	0	0	0	0	0	0	0
	18	22	>99	23	93	22	12
	24	25	>99	25	96	24	13
	47	32	>99	30	86	28	16
	65	34	>99	31	84	28	17
2	0	0	0	0	0	0	0
	18	13	>99	15	94	39	19
	24	15	>99	17	92	43	21
	47	17	>99	19	87	49	24
	65	18	>99	20	84	48	26
3	0	0	0	0	- [2]	-	-
	18	73	>99	49	-	-	-
	24	84	>99	53	-	-	-
	47	95	>99	56	-	-	-
	65	94	>99	56	-	-	-
4	0	0	0	0	-	-	-
	18	11	>99	13	-	-	-
	24	12	>99	15	-	-	-
	47	15	>99	17	-	-	-
	65	15	>99	17	-	-	-

[1] PtB 전환율은 PtBA 형성에 따라서 보고되고, GC-FID (피크 면적) 분석을 기초로 하며 [총 PtBA/총 PtBA+총 PtB] x 100으로 정의된다.

[2] 아실 도너 부산물은 비닐 아세테이트 또는 에틸 아세테이트를 포함하는 반응에서 측정되지 않았다.

실시예 10

키랄 아실 도너로서 라세미 PMA

방법 :

글리콜 에테르 기질 및 아실 도너의 비를 변화시키는 효과를 더 시험하였다. 30:70, 40:60, 50:50, 60:40 및 70:30의 용적비의 PtB/PMA를 포함하는 반응 혼합물을 사용하여 R-PtBA, S-PtB, R-PM 및 S-PMA에 대해 얻어진 전환 및 분할 정도를 시험하였다. 반응은 1.8 ㎖ 바이알에 다음 양의 라세미 PtB, 아실 도너로서의 PMA 및 생체촉매 (효소)로서의 키라자임 L-2 C2를 함유하였다.

반응 번호	기질/아실 도너 (비)	효소 (㎎/㎖)	PtB (μL)	PMA (μL)	이론 전환율 (%)
1	PtB/PMA (30:70)	13.4	300	700	244.09
2	PtB/PMA (40:60)	13.4	400	600	156.91
3	PtB/PMA (50:50)	13.4	500	500	104.61
4	PtB/PMA (60:40)	13.4	600	400	69.74
5	PtB/PMA (70:30)	13.4	700	300	44.83

100%를 초과하는 이론적 전환율 값은 제공된 아실 도너의 화학양론적 과량을 의미한다. 1.0 ㎖의 반응 혼합물을 교반시키며 4 ℃에서 배양하였다. 서브샘플을 48시간 주기로 제거하고 키랄 GC에 의해 분석하여 PtB의 전환율 및 PtB, PtBA, PMA 및 PM의 거울상이성질체 순도를 모니터하였다.

결과 :

다른 용적 비의 PtB/PMA를 포함하는 반응은 PtB 전환도의 변화가 >99% ee의 R-PtBA 및 가변 거울상이성질체 순도의 (S)-PtB의 분할을 일으킴을 나타내었다 (표 15 참조). 30:70 비의 PtB/PMA를 포함하는 반응은 PtB의 최고 전환율을 나타내었으며 그것을 증가 비율의 PtB 및 더 적은 양의 아실 도너를 포함하는 반응보다 더 높은 거울상이성질체 순도로 분할하였다. 또한, 키랄 아실 도너로서 R-PMA를 선택적으로 이용한 결과 R-PM이 효과적으로 분할되고 S-PMA 거울상이성질체가 풍부하게 되었다. 그 결과를 하기 표 16에 나타내었다.

[표 16]

반응 번호	시간 (시)	(S)-PtB (% ee)	(R)-PtBA (% ee)	PtB 전환율 (%) [1]	(R)-PM (% ee)	(S)-PMA (% ee)	PMA 전환율 (%) [2]
1	0	1	71	1	91	1	0
	2	18	98	19	93	8	5
	5	36	>99	32	87	12	7
	20.5	57	>99	42	68	12	10
	51	52	>99	40	50	7	11
2	0	0	34	0	0	0	0
	2	16	>99	17	93	10	6
	5	30	>99	29	88	16	10
	20.5	45	>99	38	67	17	14
	51	50	>99	39	39	12	15
3	0	0	18	0	0	0	0
	2	12	>99	14	94	12	7
	5	23	98	24	90	21	12
	20.5	36	>99	33	72	25	17
	51	40	>99	34	49	19	19
4	0	0	8	0	0	0	0
	2	7	>99	8	93	10	6
	5	17	98	19	90	25	14
	20.5	28	>99	27	74	34	22

	51	31	>99	29	51	26	24
5	0	0	6	0	0	0	0
	2	4	98	6	93	10	6
	5	11	98	14	91	28	16
	20.5	20	>99	21	77	45	26
	51	22	>99	23	56	37	29

[1] PtB 전환율은 PtBA 형성에 따라서 보고되고, GC-FID (피크 면적) 분석을 기초로 하며 [총 PtBA/총 PtBA+총 PtB] x 100으로 정의된다. 계산된 전환율에 대한 정확도는 대략 ±10%이다.

[2] PMA 전환율은 GC-FID (피크 면적) 분석을 기초로 보고되며 [총 PM/총 PM+총 PMA] x 100으로 정의된다. 계산된 전환율에 대한 정확도는 대략 ±10%이다.

실시예 11

키랄 아실 도너로서 라세미 PMA

실험 A

방법 :

이전의 반응에서 보여진 전환도를 기초로 하여, 60:40의 용적비로 PtB/PMA를 함유하는 100 ㎖ 반응물에 대해 감압하에 PM 스트리핑 효과를 시험하였다. PM 제거 이후에, 반응물에 추가의 PMA를 넣었다. 반응 #1로부터의 R-PM의 배치식 제거 및 이후의 새로운 아실 도너 (PMA)의 첨가를 이용하여 반응성 증류 과정의 개념을 입증하였다. PM 스트리핑 없이 전환도 및 생성물 거울상이성질체 순도를 평가하기 위한 대조 반응은 (i) PMA의 단일 첨가 (반응 #2) (ii) 배치식 PMA 첨가 (반응 #3)를 포함하였다. 반응은 다음 양의 라세미 PtB, 아실 도너로서의 PMA 및 생체촉매 (효소)로서의 키라자임 L-2 C2를 함유하였다.

반응 번호	반응 조건	효소 (㎎/㎖)	기질	기질 용적 (mL)	아실 도너 용적 (mL)	스프리핑 간격
1	스프리핑됨	40.2	PtB	60	40 [1]	1.5시간
2	대조군 #2	40.2	PtB	60	40 [2]	-
3	대조군 #3	40.2	PtB	60	40 [3]	-

[1] 반응 1은 40 ㎖ PMA 분취량을 포함하여 반응을 시작하고 1.5, 3.0 및 4.5시간에서 PM-스트리핑하였다.

[2] 대조군 반응 2는 아실 도너로서 40 ㎖ PMA 만을 포함하여 반응을 시작하였다.

[3] 대조군 반응 3은 스트리핑되지 않았고 40 ㎖ PMA 분취량을 포함하여 반응을 시작하고 1.75, 3.25 및 4.75시간에서 샘플링하였다.

반응 혼합물을 30 ℃에서 교반시키며 250 ㎖ 유리 바이알에서 배양하였다. 반응 1의 스트리핑은 다음과 같이 1.5시간 간격으로 실시하였다: 액체상을 고정화 효소로부터 둥근 바닥 플라스크에 붓고 감압하에 74 ℃에서 회전 증발시켜 PM을 제거하였다. PM 제거 이후에, 반응 내용물을 냉각시키고 (30 ℃), 샘플링하고 추가의 PMA를 제공하였다.

결과 :

표 17에 나타낸 결과는 반응 1 및 3에서 얻어진 PtB의 (R)-PtBA로의 최종 전 환이 각각 70% 및 46%였음을 나타낸다. 이 차이는 반응 3에서 아실 도너 부산물 (PM)의 축적으로 인한 것이며 바람직하지 않은 반응 평형은 추가의 전환을 억제한다. 두 반응에서 형성된 (R)-PtBA는 >99% ee였다. 그러나, 키랄 부산물 (R)-PM을 스트리핑함으로써 이루

어진 더 높은 전환은 (S)-PtB가 반응 1에서 >84% ee로 분할되게 하였으며, (S)-PtB는 반응 3에서 65.6% ee 만으로 분할되었다. 반응 1이 70%의 PtB 전환을 나타내었지만 여전히 >99%의 (R)-PtBA를 함유하였다는 사실은 스트리핑 과정 중에 반응으로부터 PtB의 부분적인 손실로 인한 것이다. 아실 도너로서의 PMA의 거울상이성질체 선택적 이용은 1.5, 3.0 및 4.5 시점에서 모여진 재료에 대해 66% ee 내지 74% ee의 거울상이성질체 순도 범위를 갖는 반응 1로부터 회수된 (R)-PM의 분석에 의해 증명된다.

이 실험이 오프-라인의 부산물 제거하며 배치 방식으로 수행되지만, 그 개념은 타당하며 반응성 증류 과정에서 연속 생산물 제거를 위해 연장될 수 있다. 회수된 (R)-PM은 아실 도너로서 비닐 아세테이트를 사용하는 제2 분할에서 증가되어 높은 거울상이성질체 순도의 (R)-PMA를 생산할 수 있다.

[표 17]

반응 번호	시간 (시)	(S)-PtB (% ee)	(R)-PtBA (% ee)	PtB 전환율 (%) [1]	(S)-PMA (% ee)	PMA 전환율 (%) [2]	스트리핑 (R)-PM (% ee) [3]
1	0	0	0	0	0	0	
	0.5	10	>99%	12	16	9	
	1	16	>99%	18	24	14	
	1.5	21	>99%	22	29	16	70
	1.75	22	>99%	27	7	3	
	2	35	>99%	34	12	7	
	2.5	40	>99%	38	14	8	
	3	44	>99%	40	15	9	74
	3.25	46	>99%	53	6	-- [4]	
	3.5	60	>99%	56	8	--	
	4	65	>99%	58	8	--	
	4.5	71	>99%	59	8	--	66
	4.75	68	>99%	67	4	--	
	20.5	85	99	70	3	--	
2	0	0	0	0	0	0	
	0.5	10	99	13	16	9	
	1	17	>99%	19	24	13	
	1.5	21	>99%	22	29	16	
	1.75	22	>99%	23	29	17	
	2	25	>99%	25	31	18	
	2.5	26	>99%	26	32	19	
	3	27	>99%	27	32	20	
	3.25	28	>99%	27	32	20	
	3.5	28	>99%	27	32	21	
	4	29	>99%	28	32	21	
	4.5	29	>99%	28	31	21	
	4.75	29	>99%	28	31	21	
	20.5	36	99	32	15	26	
3	0	0	0	0	0	0	
	0.5	10	>99%	12	15	8	
	1	17	>99%	18	23	13	

	1.5	21	>99%	22	28	16	
	1.75	22	>99%	23	12	8	
	2	29	>99%	28	15	9	
	2.5	33	>99%	30	17	11	
	3	36	>99%	32	18	12	
	3.25	37	>99%	33	11	8	
	3.5	41	>99%	35	12	8	
	4	44	>99%	37	13	9	
	4.5	47	>99%	38	13	9	
	4.75	47	>99%	38	9	7	
	20.5	66	99	46	6	9	

[1] PtB 전환율은 PtBA 형성에 따라서 보고되고, GC-FID (피크 면적) 분석을 기초로 하며 [총 PtBA/총 PtBA+총 PtB] x 100으로 정의된다. 계산된 전환율에 대한 정확도는 대략 ±10%이다. 반응 1에서 >50%의 PtB 전환율 (>99% ee의 (R)-PtBA와 동시)은 부분적으로 스트리핑 과정 중에 반응으로부터의 PtB의 부분적인 손실로 인한 것이다.
[2] PMA 전환율은 GC-FID (피크 면적) 분석을 기초로 보고되며 [총 PM/총 PM+총 PMA] x 100으로 정의된다. 계산된 전환율에 대한 정확도는 대략 ±10%이다.
[3] 스트리핑된 (R)-PM은 회전 증발에 의해 반응으로부터 제거된 PM 분획을 의미한다.
[4] nd, 측정되지 않음.

실험 B

방법 :

두번째 실험은 50:50의 용적비로 PtB/PMA를 함유하는 100 ㎖ 반응물에서 감압하의 PM 스트리핑 효과를 시험하기 위해 수행되었다. 실험 조건은 명시된 경우 50 ㎖의 PMA를 아실 도너로서 제공한 것을 제외하고는 실험 A에 기재된 바와 동일하였다. 반응은 다음 성분들을 함유하였다.

반응 번호	반응 조건	효소 (㎎/㎖)	기질	기질 용적 (mL)	아실 도너 용적 (mL)	스프리핑 간격
1	스프리핑됨	40.2	PtB	50	50 [1]	1.5시간
2	대조군 #2	40.2	PtB	50	50 [2]	-
3	대조군 #3	40.2	PtB	50	50 [3]	-

[1] 반응 1은 50 ㎖ PMA 분취량을 포함하고 1.5, 3.0 및 4.5시간에서 PM-스트리핑하였다.
[2] 대조군 반응 2는 아실 도너로서 50 ㎖ PMA 만을 포함하여 반응을 시작하였다.
[3] 대조군 반응 3은 스트리핑되지 않았고 반응 1에 따라 계획된 추가의 50 ㎖ PMA 분취량을 포함하였다.

결과 :

실험 B의 결과 (표 18)는 실험 A에서 밝혀진 효과를 확인한다. 반응 1 및 반응 3에서 얻어진 PtB의 (R)-PtBA로의 최종 전환율은 각각 77% 및 43%였다. 50% 아실 도너가 존재하는 경우에도, 반응 3에서 아실 도너 부산물 (PM)의 축적은 실험 A에서 관찰된 수준 이상의 전환을 억제한다. 다시 보면, 양 반응에서 형성된 (R)-PtBA는 >99% ee에 도달하였다. 반응 1에서 (R)-PM을 스트리핑함으로써 얻어지는 더 높은 전환은 (S)-PtB를 5시간 내에 >80% ee로 분할하게 하는 반면, 반응 3에서 (S)-PtB는 60% ee 만으로 분할되었다. 아실 도너 부산물의 제거는 기질이 더 높은 거울상

이성질체 순도의 생성물로 더 많이 전환시키는데 분명한 이점을 나타낸다. 실험 B에서 반응 1로부터 회수된 스트리핑 (R)-PM의 거울상이성질체 순도는 69% ee 내지 87% ee의 범위였다. 스트리핑 효과는 PtB 전환 정도 및 반응 1 및 3의 생성물 거울상이성질체 순도를 비교함으로써 분명해진다.

[표 18]

반응 번호	시간 (시)	(S)-PtB (% ee)	(R)-PtBA (% ee)	PtB 전환율 (%) [1]	(S)-PMA (% ee)	PMA 전환율 (%) [2]	스트리핑 (R)-PM (% ee) [3]
1	0	0	0	0	0	0	
	0.5	11	98	14	12	7	
	1	21	>99%	21	19	11	
	1.5	27	>99%	26	23	13	87
	2	45	>99%	46	10	4	
	2.5	55	>99%	50	11	5	
	3	59	>99%	51	11	5	70
	4	77	>99%	69	5	-- [4]	
	4.5	79	>99%	70	5	--	69
	5	80	>99%	76	3	--	
	5.5	80	>99%	76	3	--	
	6	83	>99%	77	3	--	
2	0	0	0	0	0	0	
	0.5	11	98	13	11	6	
	1	20	>99%	21	18	10	
	1.5	26	>99%	26	22	13	
	2	30	>99%	29	24	14	
	2.5	33	>99%	30	25	15	
	3	34	98	31	25	15	
	4	37	>99%	33	24	15	
	4.5	37	>99%	33	24	16	
	5	38	>99%	33	23	17	
	5.5	39	>99%	34	22	17	
	6	39	>99%	34	22	18	
3	0	0	0	0	0	0	
	0.5	10	98	13	11	6	
	1	19	99%	20	18	10	
	1.5	26	>99%	25	22	12	
	2	32	>99%	30	12	7	
	2.5	37	>99%	33	13	8	
	3	42	>99%	35	14	9	
	4	51	>99%	40	10	7	
	4.5	54	>99%	41	10	7	
	5	57	>99%	43	7	5	
	5.5	58	>99%	43	7	6	

	6	60	>99%	43	7	6	

[1] PtB 전환율은 PtBA 형성에 따라서 보고되고, GC-FID (피크 면적) 분석을 기초로 하며 [총 PtBA/총 PtBA+총 PtB] x 100으로 정의된다. 계산된 전환율에 대한 정확도는 대략 ±10%이다. 반응 1에서 >50%의 PtB 전환 (>99% ee의 (R)-PtBA와 동시)은 부분적으로 스트리핑 과정 중에 반응으로부터의 PtB의 부분적인 손실로 인한 것이다.
[2] PMA 전환율은 GC-FID (피크 면적) 분석을 기초로 보고되며 [총 PM/총 PM+총 PMA] x 100으로 정의된다. 계산된 전환율에 대한 정확도는 대략 ±10%이다.
[3] 스트리핑된 (R)-PM은 회전 증발에 의해 반응으로부터 제거된 PM 분획을 의미한다.
[4] nd, 측정되지 않음.

실시예 12

(R,S)-1-tert-부톡시-2-프로판올로부터 (S)-1,2-프로판디올의 제조

단계 (a): (R,S)-1-tert-부톡시-2-프로판올의 효소적 분할

366 ㎖의 (R,S)-1-tert-부톡시-2-프로판올 (PtB) 및 134 ㎖의 비닐 아세테이트를 함유하고 있는 1.0-L 반응 용기에 키라자임 L-2 C2로서 3.35 g의 고정화 CAL-B를 첨가하였다. 73:27의 용적비 (PtB를 PtBA로 약 60% 전환하는데 충분함)로 (R,S)-1-tert-부톡시-2-프로판올과 비닐 아세테이트를 함유하는 500 ㎖ 반응물을 30 ℃에서 교반시키며 배양하였다. 생성물의 수율 및 거울상이성질체 순도를 20-24시간 배양 기간 동안 키랄 GC에 의해 모니터하였다. 생성물의 수율은 일반적으로 반응물의 용매상이 여과에 의해 고정화 효소 입자로부터 분리되는 20시간 내에 약 50%의 전환을 나타내었다. 고정화 효소는 추가의 500 ㎖ 용적의 (R,S)-1-tert-부톡시-2-프로판올 및 비닐 아세테이트를 73:27 용적비로 도입함으로써 10 분할 주기에 걸쳐 이 방식으로 아실화 촉매로서 재순환되었다.

GC 분석 결과로서 반응의 회수된 용매상이 >99% ee의 (R)-1-tert-부톡시-2-아세톡시 프로판 (R-PtBA) 및 >96% ee의 (S)-1-tert-부톡시-2-프로판올 (S-PtB)의 분할된 생성물을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 아세트알데히드는 효소적 아실화의 부산물로서 얻어졌다. 키랄 생성물은 이후에 단계 (b)에 기재된 바와 같이 증류에 의해 단리되었다.

단계 (b): 증류에 의한 (S)-PtB/(R)-PtBA의 분리

단계 (a)로부터의 키랄 생성물을 2단계로 정제하였다. 제1 단계에서, 아세 트알데히드를 반응 혼합물로부터 제거하였다. 일반적인 진행에서, 3790 g의 아세트알데히드/(S)-PtB/(R)-PtBA 혼합물을 5-L 둥근 바닥 플라스크에 놓았다. 플라스크를 1/4' 세라믹 새들로 팩킹된 2피트 유리 칼럼 및 냉매 (-15 ℃로 셋팅)로서 SR-1을 갖춘 자기 환류 응축기 헤드로 구성된 진공 증류 기구에 부착하였다. 플라스크를 2/2 환류/전진비로 350 ㎜Hg의 압력에서 47 ℃로 가열하였다. 아세트알데히드의 대부분은 3.5시간 후에 제거되었다. 그후에, 아세트알데히드가 없는 (S)-PtB/(R)-PtBA 혼합물을 1/4' 세라믹 새들로 팩킹된 6피트 칼럼이 장치된 유사한 증류 기구에서 증류시켰다. 이 단계에서, 물을 냉매로서 사용하였다. 일반적인 진행에서, 4033 g의 (S)-PtB/(R)-PtBA 혼합물을 5-L 플라스크에 놓고, 그후에 그것을 2/1 환류/전진비로 6 내지 36 ㎜Hg의 압력에서 74 ℃ 내지 89 ℃로 가열하였다. 24 유출분을 취하였다. 이 유출분을 모세관 GC에 의해 분석하고 유사한 조성을 가진 것을 합하였다. 조합물 b (유출분 7-16)의 중량은 1265 g이고 98.4% (S)-PtB를 함유하였다. 조합물 e (유출분 20-24)의 중량은 1990 g이고 99.5% (R)-PtBA를 함유하였다. 각 조합물의 희석 샘플 (수중 희석, 200:1 비)의 분석 결과 (S)-PtB 및 (R)-PtBA 둘다가 >99.5% ee로 존재하였음을 알게 되었다.

단계 (c-1): (S)-PtB의 (S)-PG로의 탈알콕실화

10 ㎖ 2구 원추형 바닥 플라스크에 단계 (b)에서 얻어진 5.0032 g의 (S)-PtB 및 0.1888 g의 p-톨루엔 술폰산 (p-TSA) 촉매를 넣었다. 무수 $CaSO_4$ 건조관을 갖춘 응축기를 플라스크의 입구 중의 하나에 부착하였다. 격막을 플라스크의 다른 입구 에 부착하였다. 플라스크를 100 ℃로 가열된 실리콘유 배쓰에 놓았다. 반응을 13시간 동안 진행되게 하면서 때때로 샘플을 취하여 GC에 의해 분석하였다. 반응이 완결된 후에, (S)-PtB의 98.6%가 반응되었고 (S)-PG에 대해 81.6%의 선택성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (표 18 참조). 수중 희석 (200:1 비)된 (S)-PG 생성물을 키랄 GC에 의해 분석한 결과 >99.5% ee인 것으로 밝혀졌다.

단계 (c-2): (R)-PtBA의 (R)-PG로의 가수분해 및 탈알콕실화

10 ㎖ 2구 원추형 바닥 플라스크에 단계 (b)에서 얻어진 5.0375 g의 (R)-PtBA, 15.0919 g의 증류수 및 0.4671 g의 p-TSA 촉매를 넣었다. 무수 $CaSO_4$ 건조관을 갖춘 응축기를 플라스크의 입구 중의 하나에 부착하였다. 격막을 플라스크의 다른 입구에 부착하였다. 플라스크를 100 ℃로 가열된 실리콘유 배쓰에 놓았다. 반응을 33시간 동안 진행되게 하면서 때때로 샘플을 취하여 GC에 의해 분석하였다. 반응이 완결된 후에, (R)-PtBA의 100%가 반응되었고 (R)-PG에 대해 86.5%의 선택성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (표 18 참조). 수중 희석 (200:1 비)된 (R)-PG 생성물을 키랄 GC에 의해 분석한 결과 >99.5% ee인 것으로 밝혀졌다.

단계 (d): 탈알콕실화 생성물로부터 (S)-PG의 단리

5 ㎖ 둥근 바닥 플라스크에 단계 (c-1)에서 얻은 생성물 혼합물 및 교반 막대를 넣었다. 온도계, 진공 코넥터 및 저장기가 장치된 마이크로-플래쉬 증류 기구를 플라스크에 부착하였다. 열총을 사용하여 84-87 ℃ 및 10 ㎜Hg에서 생성물을 기화시켰다. 단리된 생성물을 GC에 의해 분석한 결과 89% PG를 함유하는 것으로 밝혀졌다. 적외선 분광법으로 단리된 생성물 내의 주요 성분이 PG와 약간의 카르보닐 불순물임을 확인하였으며, 이는 나중에 GC-MS에 의해 프로필렌 글리콜의 모노- 및 디-아세테이트로서 동정되었다. 단리된 (S)-PG (수중 희석, 200:1 비)를 키랄 GC에 의해 분석한 결과 >99.5% ee인 것으로 밝혀졌다.

단계 (e): (S)-PtB로부터 잔류 아세트산의 제거에 의한 수율의 증가

이전 단계에 설명된 프로필렌 글리콜 아세테이트는 단계 (b)에서 (R)-PtBA의 부분 크랙킹으로부터 발생되는 (S)-PtB 내의 잔류 아세트산의 존재로 인해 형성된 것으로 생각되었다. 이를 염두에 두고, 소량의 (S)-PtB를 소량의 10 N NaOH로 처리한 후에 플래쉬 증류하였다. 그후에, 처리된 (S)-PtB를 사용하여 표 19에 나타낸 바와 같이 단계 (c-1)의 실험을 반복하였다. 이 때의 (S)-1,2-프로판디올에 대한 선택성은 >95% (99.5% ee)였다. 상기한 바와 같이 플래쉬 증류 후에 생성물을 IR 분석한 결과 아세테이트 피크는 보이지 않았다. 이는 (S)-PtB 내의 유리 아세트산의 유해한 효과를 입증하는 것이다. 당업자는 단계 (b)에서 더욱 주의깊게 증류를 실시함으로써 아세트산의 형성이 감소 또는 해소될 수 있음을 인식할 것이다.

[표 19]

반응물	전환율 %	(R) 또는 (S)PG에 대한 선택성 %	온도 (℃)	반응 시간 (시)	촉매	촉매 중량% (반응물 중량 기준)	물 (몰 과량)
(S)-PtB	65.4	68.3	40-80	5.5	스티렌계 비드 *	10.1	n.a. **
(S)-PtB	81	73.6	80	10.5	스티렌계 비드 *	17	n.a. **
(S)-PtB	96.4	82.8	100	14.5	스티렌계 비드 *	14	n.a. **
(S)-PtB	98.6	81.6	100	13	p-TSA	3.8	n.a. **
(S)-PtB (NaOH 처리됨)	98.8	95.9	100	19	p-TSA	7.9	n.a. **
(R)-PtB	87.7	5.1	80	6.5	스티렌계 비드 *	9.8	n.a. **
(R)-PtB	100	31.3	100	13.5	p-TSA	4.1	1
(R)-PtB	100	86.5	100	33	p-TSA	3.1	29

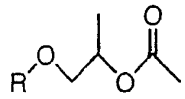
* 더 다우 케미칼 캄파니에 의해 상품명 DOWEX DR-2030 이온 교환 수지로 판매되는 술폰산기 (산 농도 >2M)로 관능화된 스티렌계 비드
** 반응에서 물이 사용되지 않음

상기 명세서에 언급된 모든 공보 및 특허 문헌들은 본원에 참고로 인용된다. 본 발명의 설명된 방법 및 시스템의 각종 변형 및 변화는 본 발명의 영역 및 취지에서 벗어나지 않고 당업자에게 자명할 것이다. 본 발명이 특정의 바람직한 실시양태와 관련하여 설명되긴 하였지만, 청구된 발명은 그러한 특정 실시양태에 부당하게 제한되지 않아야 함을 이해하여야 한다. 사실상, 재료과학, 화학 및 분자 생물학 또는 관련 분야의 숙련인에게 자명한 본 발명을 수행하기 위한 방식의 각종 변형은 다음 청구 범위의 영역 내에 들도록 의도된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
하기 화학식 I의 프로필렌 글리콜 에테르 라세미체와 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를 반응 혼합물에서 접촉시켜 라세미체의 거울상이성질체를 상응하는 프로필렌 글리콜 에테르의 거울상이성질체로 거울상이성질체 선택적 가수분해시키는 것을 포함하는 방법.

<화학식 I>



상기 식에서, R은 알킬 또는 아릴 기로부터 선택된다.

청구항 2.
제1항에 있어서, 라세미체가 약 10% v/v를 초과하는 농도인 방법.

청구항 3.
제1항 또는 2항에 있어서, 라세미체의 R-거울상이성질체가 상응하는 R-프로필렌 글리콜 에테르로 거울상이성질체 선택적으로 가수분해되는 방법.

청구항 4.
제1항 또는 2항에 있어서, 라세미체의 S-거울상이성질체가 상응하는 S-프로필렌 글리콜 에테르로 거울상이성질체 선택적으로 가수분해되는 방법.

청구항 5.
제1항 내지 4항 중 어느 한 항에 있어서, R이 CH_3, CH_3CH_2, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH(CH_3)_2$, $C(CH_3)_3$ 및 C_6H_5로부터 선택되는 방법.

청구항 6.
제1항 내지 4항 중 어느 한 항에 있어서, 가수분해효소가 리파아제인 방법.

청구항 7.
제6항에 있어서, 리파아제가 칸디다 안타르크티카 (*Candida antarctica*) 리파아제 분획 B, 리파아제 LP 'S', 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 속 지단백질 리파아제, 슈도모나스 속 리파아제 또는 슈도모나스 세파시아 (*Pseudomona cepacia*) 리파아제인 방법.

청구항 8.
제7항에 있어서, 리파아제가 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B인 방법.

청구항 9.
제2항에 있어서, 라세미체가 약 20% v/v 이상의 농도인 방법.

청구항 10.
제8항에 있어서, 라세미체의 약 30% 내지 약 50%가 가수분해되는 방법.

청구항 11.
제8항에 있어서, 가수분해된 라세미체의 거울상이성질체 순도가 약 70% ee 이상인 방법.

청구항 12.
제3항에 있어서, b) 라세미 혼합물로부터 R-프로필렌 글리콜 에테르를 회수하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 13.
제3항에 있어서,

a) 반응 혼합물로부터 미반응된 S-거울상이성질체 기질을 회수하고;

b) S-거울상이성질체 기질을 전환시켜 상응하는 S-프로필렌 글리콜 에테르를 얻는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 14.
제4항에 있어서, b) 라세미 혼합물로부터 S-프로필렌 글리콜 에테르를 회수하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 15.
제4항에 있어서,

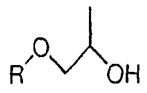
a) 반응 혼합물로부터 미반응된 R-거울상이성질체 기질을 회수하고;

b) R-거울상이성질체 기질을 전환시켜 상응하는 R-프로필렌 글리콜 에테르를 얻는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 16.
제1항에 있어서, b) 효소 촉매를 재순환시키는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 17.
약 5% v/v 이상의 농도인 하기 화학식 II의 프로필렌 글리콜 에테르 라세미체와 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를, 활성화 에스테르, 에놀 에스테르 및 무 수물로 이루어진 군에서 선택된 활성화 아실 도너인 아실 도너를 추가로 포함하는 반응 혼합물에서 접촉시켜 라세미체의 거울상이성질체를 상응하는 아실화 프로필렌 글리콜 에테르의 거울상이성질체로 거울상이성질체 선택적으로 에스테르교환시키는 것을 포함하는 방법.

<화학식 II>



상기 식에서, R은 알킬 또는 아릴 기로부터 선택된다.

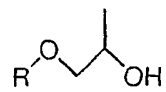
청구항 18.
제17항에 있어서, R이 CH_3, CH_3CH_2, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH(CH_3)_2$, $C(CH_3)_3$ 및 C_6H_5 로부터 선택되는 방법.

청구항 19.
제18항에 있어서, 아실 도너가 비닐 아세테이트, 에틸 아세테이트, 비닐 프로피오네이트, 2,2,2-트리클로로에틸 아세테이트, 2,2,2-트리플루오로에틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 에틸 페닐 아세테이트, 이소프로페닐 아세테이트, 에틸 메톡시아세테이트, 1-에톡시비닐 아세테이트, 디케텐, 트리플루오로에틸 부티레이트, 아세트산 무수물, 락티드 및 숙신산 무수물로부터 선택되는 방법.

청구항 20.
제19항에 있어서, 아실 도너가 비닐 아세테이트 및 이소프로페닐 아세테이트 로부터 선택되는 방법.

청구항 21.
약 5% v/v 이상의 농도인 하기 화학식 II의 프로필렌 글리콜 에테르 라세미체와 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를, 에틸 아세테이트 및 키랄 아실 도너로 이루어진 군에서 선택된 비활성화 아실 도너인 아실 도너를 추가로 포함하는 반응 혼합물에서 접촉시켜 라세미체의 거울상이성질체를 상응하는 아실화 프로필렌 글리콜 에테르의 거울상이성질체로 거울상이성질체 선택적으로 에스테르교환시키는 것을 포함하는 방법.

<화학식 II>



상기 식에서, R은 알킬 또는 아릴 기로부터 선택된다.

청구항 22.
제21항에 있어서, R이 CH_3, CH_3CH_2, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH(CH_3)_2$, $C(CH_3)_3$ 및 C_6H_5로부터 선택되는 방법.

청구항 23.
제22항에 있어서, 아실 도너가 라세미 1-메톡시-2-프로판올 아세테이트 (PMA), 라세미 1-에톡시-2-프로판올 아세테이트 또는 라세미 1-프로필옥시-2-프로판올 아세테이트인 방법.

청구항 24.
제18항 또는 22항에 있어서, 가수분해효소가 리파아제인 방법.

청구항 25.
제24항에 있어서, 리파아제가 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B인 방법.

청구항 26.
제17항 또는 21항에 있어서, 라세미체 및 아실 도너가 라세미 혼합물의 약 100% v/v를 구성하는 방법.

청구항 27.
제26항에 있어서, 라세미체 및 아실 도너가, 라세미체를 아실화 프로필렌 글리콜 에테르로 약 50% 전환시키는 비로 존재하는 방법.

청구항 28.
제17항 또는 21항에 있어서, 라세미체의 약 30% 내지 약 50%가 에스테르교환되는 방법.

청구항 29.
제17항 또는 21항에 있어서, 아실화 프로필렌 글리콜 에테르의 거울상이성질체 순도가 약 70% ee 이상인 방법.

청구항 30.
제17항 또는 21항에 있어서,

a) 반응 혼합물로부터 아실화 프로필렌 글리콜 알킬 에테르의 목적하는 거울상이성질체를 회수하고;

b) 회수된 아실화 프로필렌 글리콜 알킬 에테르 거울상이성질체를 전환시켜 상응하는 프로필렌 글리콜 에테르의 거울상이성질체를 얻는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 31.
제17항 또는 21항에 있어서, 반응 혼합물로부터 미반응된 거울상이성질체 기질을 회수하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 32.
제17항 또는 21항에 있어서, 효소 촉매를 재순환시키는 것을 더 포함하는 방법.

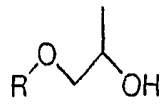
청구항 33.
a) 전환된 기질의 목적하는 거울상이성질체 수율 및 전환 및(또는) 비전환된 기질의 목적하는 순도를 결정하고;

b) 목적하는 수율 및 순도를 얻기 위한 제1 기질 및 제2 기질의 몰 비를 계산하고;

c) 상기 몰 비를 기준으로 목적하는 수율 및 순도를 이론적으로 얻기 위한 제1 기질 및 제2 기질의 양을 계산하고;

d) 하기 화학식 II의 프로필렌 글리콜 에테르의 라세미 혼합물을 포함하는 제1 기질의 제1 계산량 및 활성화 에스테르, 비활성화 에스테르, 에놀 에스테르 및 무수물로 이루어진 군에서 선택된 활성화 또는 비활성화 아실 도너인 아실 도너를 포함하는 제2 기질의 제2 계산량과, 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를 반응 혼합 물에서 배합하여 라세미체의 제1 거울상이성질체를 상응하는 제1 거울상이성질체 아실화 프로필렌 글리콜 에테르로 거울상이성질체 선택적으로 에스테르교환시키는 것을 포함하는 방법으로서, 제1 기질인 프로필렌 글리콜 에테르를 제2 기질인 아실 도너에 의해 에스테르교환시키는 에스테르교환 반응에 의해 프로필렌 글리콜 에테르의 라세미 혼합물을 분할하는 방법에서 기질 전환도를 조절하는 방법.

<화학식 II>



상기 식에서, R은 알킬, 아릴, 아릴-치환된 알킬, 알릴릭 또는 아세탈 기로부터 선택된다.

청구항 34.
제33항에 있어서, 제1 기질의 제1 계산량 및 제2 기질의 제2 계산량이 반응 혼합물의 반응 매트릭스의 약 100%를 구성하는 방법.

청구항 35.
제33항에 있어서, R이 CH_3, CH_3CH_2, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH(CH_3)_2$, C_6H_5, $C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_2C_6H_5$, $C(CH_3)(C_6H_5)_2$, $C(C_6H_5)_3$, $C(CH_3)_2CH_2CH_3$, $CH_2C_6H_5$, $CH_2CH=CH_2$, $CH_2C\equiv CH$, $CH_2OCH_2CH_2OCH_3$ 및 CH_2OCH_3 으로부터 선택되는 방법.

청구항 36.
제33항에 있어서,

a) 반응 혼합물로부터 제1 거울상이성질체 아실화 프로필렌 글리콜 알킬 에테르 생성물을 회수하고;

b) 그 생성물을 전환시켜 상응하는 제1 거울상이성질체 프로필렌 글리콜 알킬 에테르를 얻는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 37.
제33항에 있어서, 반응 혼합물로부터 미반응된 제2 거울상이성질체 프로필렌 글리콜 알킬 에테르를 회수하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 38.
제33항에 있어서, 효소 촉매를 재순환시키는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 39.
제33항에 있어서,

a) 아실화 프로필렌 글리콜 에테르의 수율 및 아실화 또는 비아실화 프로필렌 글리콜 에테르의 거울상이성질체 순도를 모니터하고;

b) 제1 기질 대 제2 기질의 비를 조정하여 목적하는 수율 및 순도를 얻는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 40.
(a) 하기 화학식 II의 프로필렌 글리콜 에테르 라세미체와, 리파아제, 에스테라제, 아실라제 및 프로테아제로 이루어진 군에서 선택된 유효량의 효소 촉매 가수분해효소를, 활성화 에스테르, 에놀 에스테르 및 무수물로 이루어진 군에서 선택된 아실 도너를 더 포함하는 반응 혼합물에서 접촉시켜 (S)-1-알콕시-2-프로판올 및 (R)-1-알콕시-2-프로판올 아실레이트를 얻는 단계;

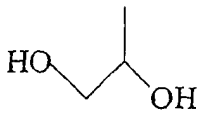
(b) 단계 (a)에서 형성된 (S)-1-알콕시-2-프로판올과 (R)-1-알콕시-2-프로판올 아실레이트를 분리하는 단계;

(c) 단계 (b)에서 분리된 (S)-1-알콕시-2-프로판올을 산 촉매의 존재하에 온화한 반응 조건하에서 탈알콕실화하여 (S)-1,2-프로판디올을 얻는 단계; 및

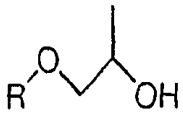
(d) 단계 (c)에서 얻은 (S)-1,2-프로판디올을 단리하는 단계

를 포함하는 하기 화학식 III의 키랄 화합물의 제조 방법.

<화학식 III>



<화학식 II>



상기 식에서, R은 알킬, 아릴-치환된 알킬, 알릴릭 또는 아세탈 기이다.

청구항 41.
제40항에 있어서,

(e) 상기 단계 (b)에서 분리된 (R)-1-알콕시-2-프로판올 아실레이트를 산 촉매의 존재하에 온화한 반응 조건하에서 탈알콕실화하여 (R)-1,2-프로판디올을 얻는 단계; 및

(f) 단계 (e)에서 얻은 (R)-1,2-프로판디올을 단리하는 단계

를 더 포함하는 방법.

청구항 42.
제40항 또는 41항에 있어서, R이 $C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_2C_6H_5$, $C(CH_3)(C_6H_5)_2$, $C(C_6H_5)_3$, $C(CH_3)_2CH_2CH_3$, $CH_2C_6H_5$, $CH_2CH=CH_2$, $CH_2C\equiv CH$, $CH_2OCH_2CH_2OCH_3$ 및 CH_2OCH_3 으로부터 선택되는 방법.

청구항 43.
제42항에 있어서, R이 $C(CH_3)_3$ 인 방법.

청구항 44.
제40항 내지 43항 중 어느 한 항에 있어서, 가수분해효소가 리파아제 또는 에스테라제인 방법.

청구항 45.
제44항에 있어서, 가수분해효소가 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B인 방법.

청구항 46.
제40항 내지 45항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c)에서의 산 촉매가 p-톨루엔 술폰산 또는 이온 교환 수지인 방법.

청구항 47.
제40항에 있어서,

(a) (R,S)-1-tert-부톡시-2-프로판올과 유효량의 칸디다 안타르크티카 리파아제 분획 B를, 비닐 아세테이트를 더 포함하는 반응 혼합물에서 접촉시켜 (S)-1-tert-부톡시-2-프로판올 및 (R)-1-tert-부톡시-아세톡시 프로판을 얻는 단계;

(b) 증류에 의해 (S)-1-tert-부톡시-2-프로판올과 (R)-1-tert-부톡시-아세톡시 프로판을 분리하는 단계;

(c) 단계 (b)에서 분리된 (S)-1-tert-부톡시-2-프로판올을 p-톨루엔 술폰산의 산 촉매의 존재하에 온화한 반응 조건하에서 탈알콕실화하여 (S)-1,2-프로판디올을 얻는 단계; 및

(d) 단계 (c)에서 얻은 (S)-1,2-프로판디올을 단리하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 48.
제44항에 있어서,

(e) 상기 단계 (b)에서 분리된 (R)-1-tert-부톡시-아세톡시 프로판을 p-톨루엔 술폰산의 산 촉매의 존재하에 온화한 반응 조건하에서 탈알콕실화하여 (R)-1,2-프로판디올을 얻는 단계; 및

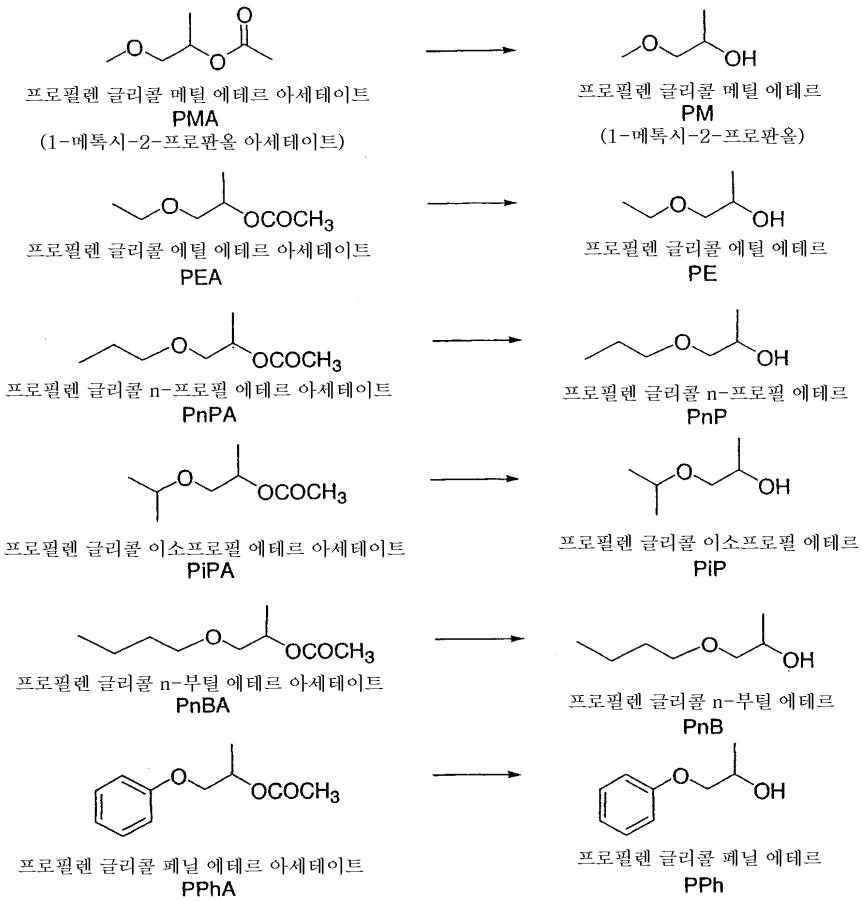
(f) 단계 (e)에서 얻은 (R)-1,2-프로판디올을 단리하는 단계

를 더 포함하는 방법.

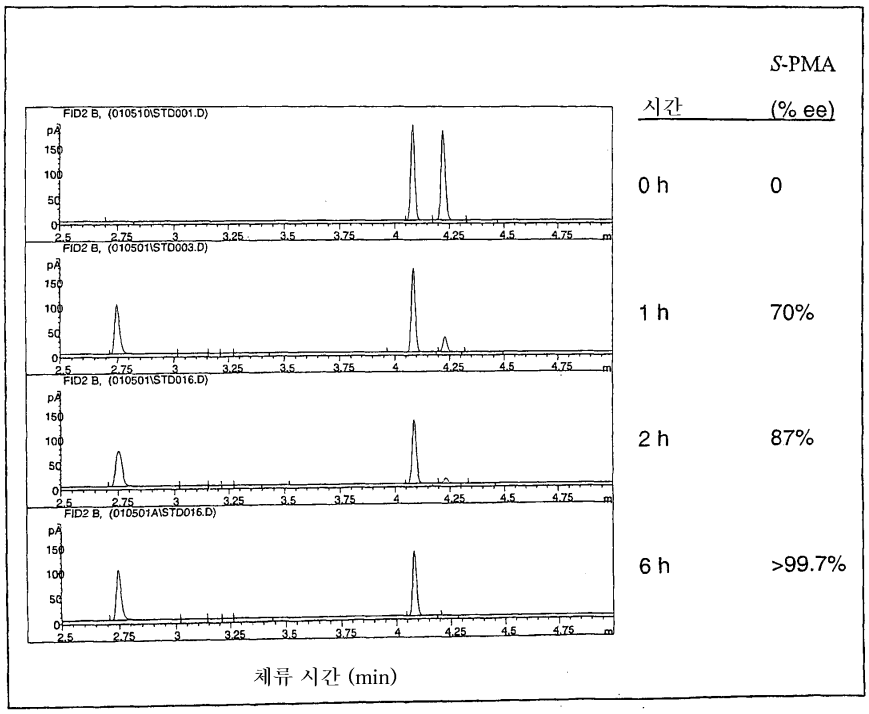
청구항 49.
제21항에 있어서, 아실 도너가 라세미 글리콜 에테르 아세테이트이고, 상기 방법이 반응물을 합하고 증류 또는 스트리핑을 통해 부산물 알코올을 제거하는 것 을 포함하는 방법.

도면

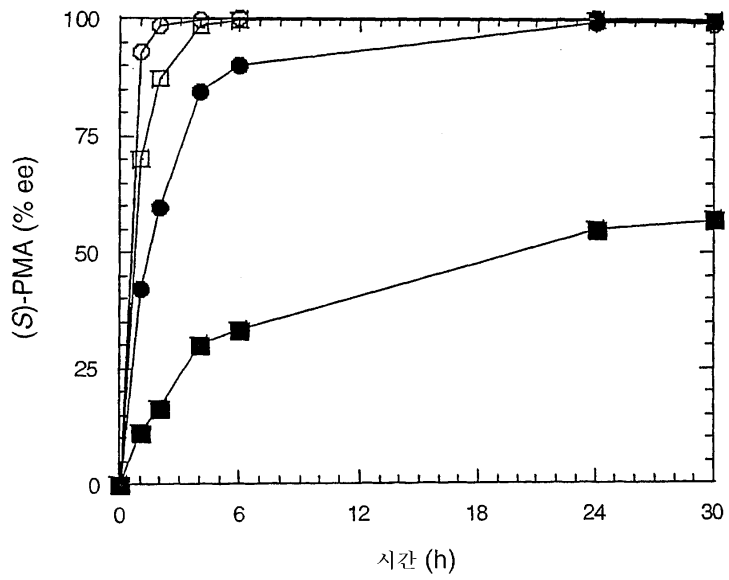
도면1



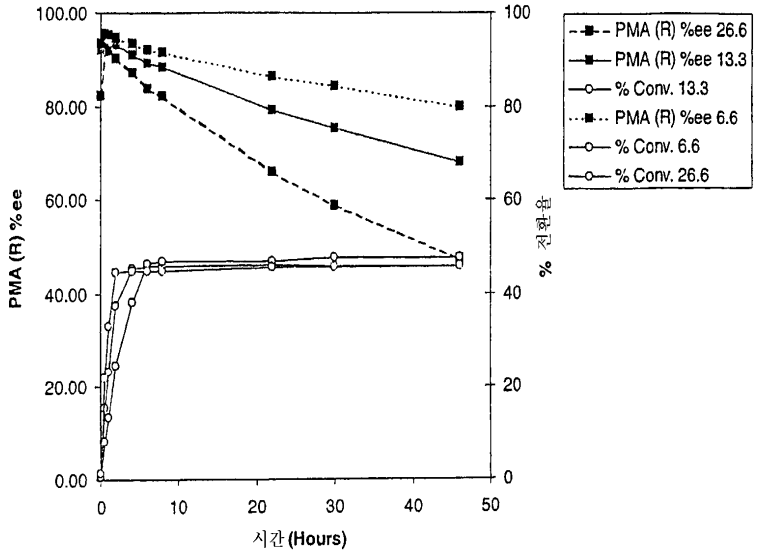
도면2


S-PMA
시간
(% ee)
0 h
0
1 h
70%
2 h
87%
6 h
>99.7%
체류 시간 (min)

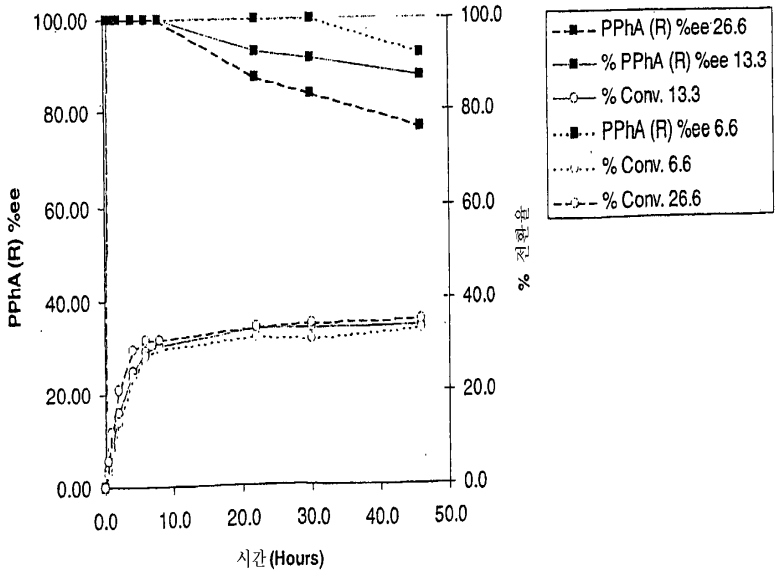
도면3


100
75
50
25
0
(S)-PMA (% ee)
0
6
12
18
24
30
시간 (h)

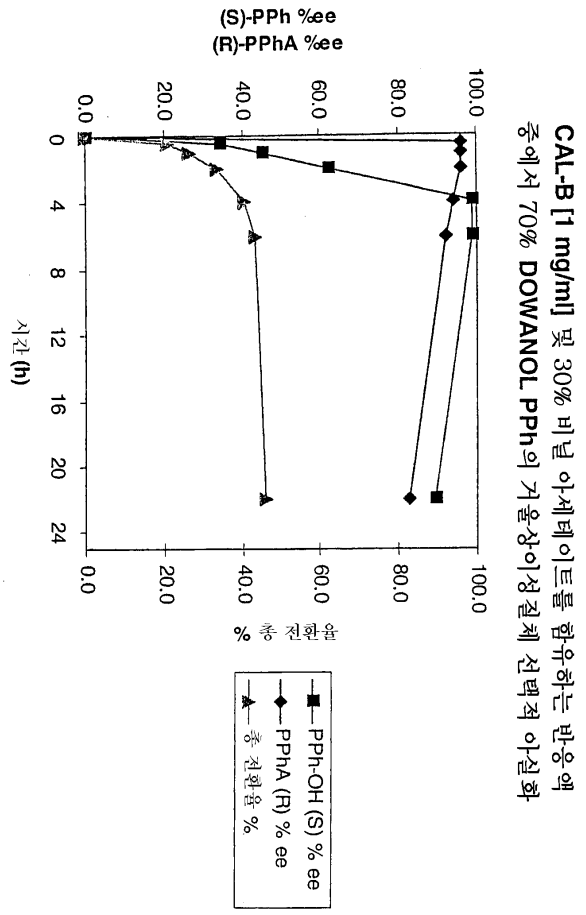
도면4A


100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
PMA (R) %ee
100
80
60
40
20
0
% 전환율
0
10
20
30
40
50
시간 (Hours)
PMA (R) %ee 26.6
PMA (R) %ee 13.3
% Conv. 13.3
PMA (R) %ee 6.6
% Conv. 6.6
% Conv. 26.6

도면4B


100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
PPhA (R) %ee
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
% 전환율
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
시간 (Hours)
PPhA (R) %ee 26.6
% PPhA (R) %ee 13.3
% Conv. 13.3
PPhA (R) %ee 6.6
% Conv. 6.6
% Conv. 26.6

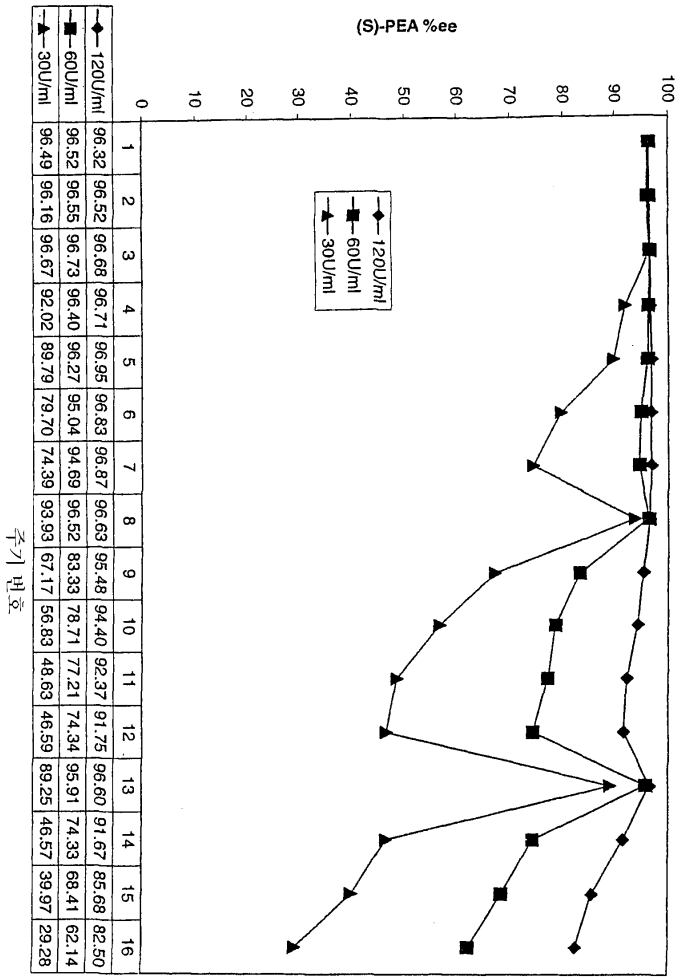
도면5



CAL-B [1 mg/ml] 및 30% 비닐 아세테이트를 함유하는 반응액 중에서 70% **DOWANOL PPh**의 거울상이성질체 선택적 아실화

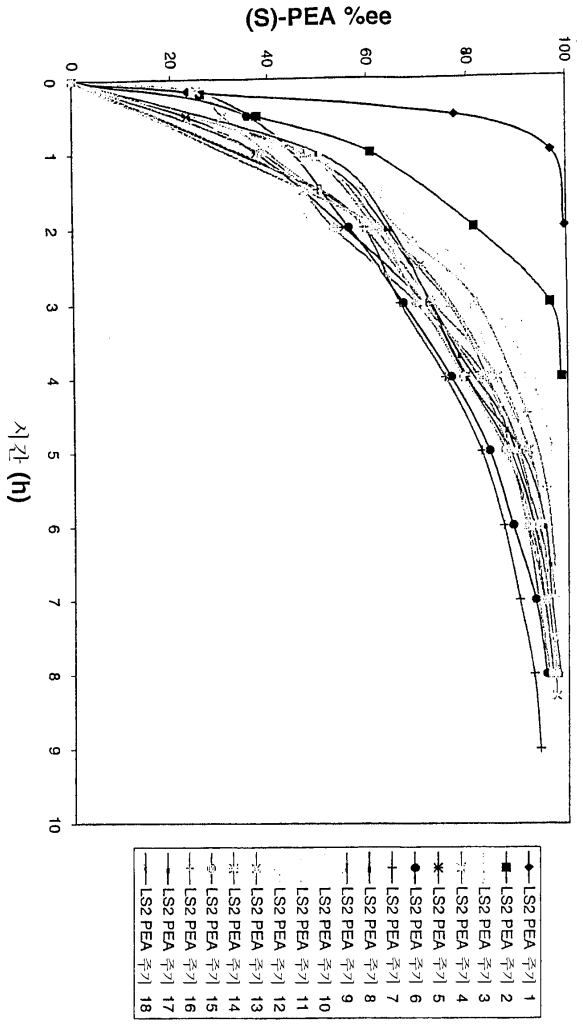
도면6

20% PEA의 분할 & 다른 첨가량의 키라자임 L-2 C2의 재순환
(주기 시간 = **24h**, 단, **No. 3 = 48h, No. 8 & 13 = 60h**) PEA_02



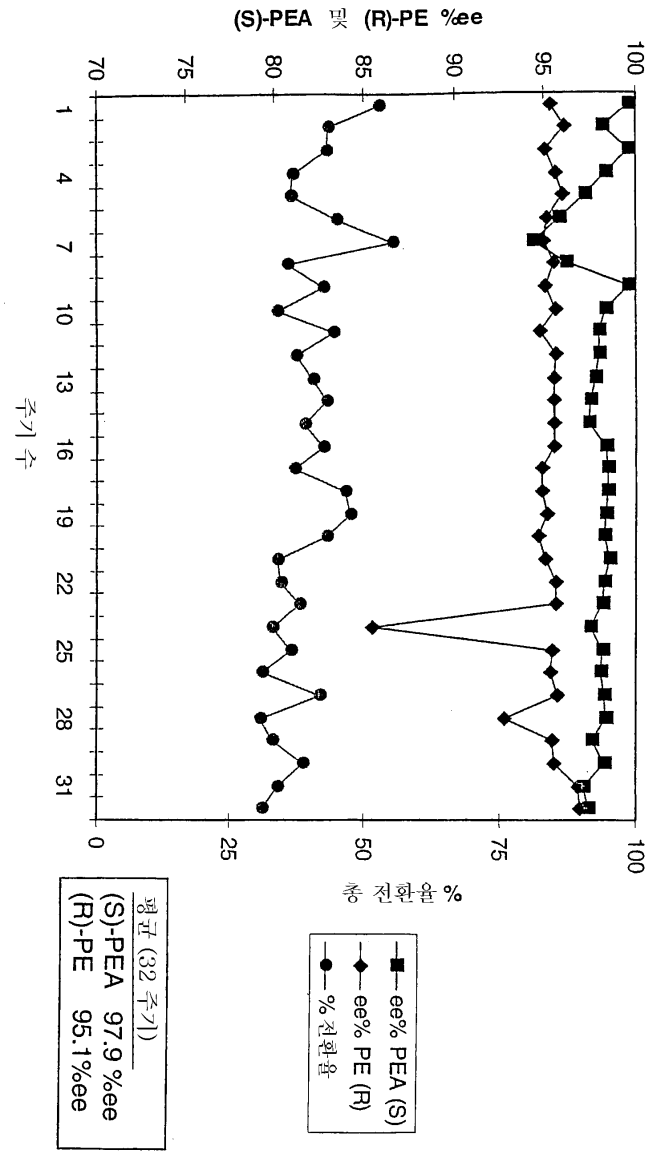
주기 번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
120U/ml	96.32	96.52	96.68	96.71	96.95	96.83	96.87	96.63	95.48	94.40	92.37	91.75	96.60	91.67	85.68	82.50
60U/ml	96.52	96.55	96.73	96.40	96.27	95.04	94.69	96.52	83.33	78.71	77.21	74.34	95.91	74.33	68.41	62.14
30U/ml	96.49	96.16	96.67	92.02	89.79	79.70	74.39	93.93	67.17	56.83	48.63	46.59	89.25	46.57	39.97	29.28

도면7



20% PEA의 거울상이성질체 선택적 가수분해 및
고정화 CAL-B, 키라자임 L-2 C2에 의한 효소 재순환

도면8


(S)-PEA 및 (R)-PE %ee
70
75
80
85
90
95
100
1
4
7
10
13
16
19
22
25
28
31
주기 수
0
25
50
75
100
총 전환율 %
ee% PEA (S)
ee% PE (R)
% 전환율
평균 (32 주기)
(S)-PEA 97.9 %ee
(R)-PE 95.1%ee