

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

**PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE**

(10) FI 931583 A7

**(12) JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **931583**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C12P 41/00
C12P 13/00**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **13.11.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **07.04.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **18.06.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **13.11.1992 PCT/US1992/009945**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

17.12.1991 US 809803

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • FMC Corporation, 1735 Market Street, Philadelphia, PA 19103, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Andruski, Stephen Walter, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Goldberg, Bruce, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä optisesti aktiivisten syaanihydriinien valmistamiseksi entsy ymien avulla

Förfarande för framställning av optiskt aktiva cyanhydriner med hjälp av enzymer

Menetelmä optisesti aktiivisten syaanihydriinien valmistamiseksi entsyymien avulla

Tämä keksintö koskee menetelmää syaanihydriinien valmistamiseksi. Erityisesti se koskee parannettua menetelmää optisesti aktiivisten (S)-syaanihydriinien valmistamiseksi, jotka ovat käyttökelpoisia välituotteina valmistettaessa tunnettuja pyretroidi-insektisidejä, jolloin mainitussa menetelmässä aldehydit saatetaan reagoimaan hydroस्याаниhapon kanssa S-oksinitrilaasientsyymien läsnä ollessa.

Menetelmä aldehydien saattamiseksi reagoimaan hydroस्याаниhapon kanssa oksinitrilaasientsyymien ja di-isopropyylieetteriliuottimen läsnä ollessa optisesti aktiivisten syaanihydriinien muodostamiseksi on tunnettu esimerkiksi US-patentista 4 859 784 (Effenberger et al.), joka liitetään tähän viitteenä. Kuten tässä viitteessä opetetaan, reaktio toteutetaan käyttäen entsyymiä immobilisoidussa muodossa, kuten sidottuna lasipallojen, ioninvaihtohartsien tai selluloosahiukkasten pinnalle lietteen muodossa, joka täytyy ensin suodattaa liuoksesta, ennen kuin tuote voidaan ottaa talteen. Vaikka tämä menetelmä on tehokas tarkoitustaan varten, se on tunnettu vain yhdestä reagoivien aineiden kulusta immobilisoidun entsyymien läpi, jolloin yksi kulku vie 5 - 6 päivää tapahtuakseen täydellisesti. Samoin AU-patenttihakemus 38104/89, Kula et al., opettaa samankaltaisen menetelmän, jossa entsyymi, S-oksinitrilaasi, on johdettu erityisestä lähteestä (*Sorghum bicolor*). Tässä menetelmässä yhdessä suoritussuodossa käytetään akryylihelmiä entsyymien immobilisoimiseksi, nimittäin tuotetta Eupergit® C (Rohm, Darmstadt), joka on kaupallisesti saatavissa oleva akryylihelmituote, joka on käyttökelpoinen suspendoituna reaktioväliaineeseen tai pylvääseen. Kummassakin tapauksessa sitä tulee käyttää vain vesipitoisessa järjestelmässä, jotta vältetään eri-

laisten orgaanisten liuotinten mikä tahansa hyökkäys akryylihelmiin kimppuun. Lisäksi tässä jälkimmäisessä menetelmässä, jossa käytetään sitoutuneita entsyymejä, saanto on noin 85 paino-%, mutta vain 3-päiväisen keskeytymättö-
 5 män toiminnan jälkeen, jolloin aldehydinä käytetään 4-hydroksibentsaldehydiä. Katso myös US-patentti 5 008 192, Neidermayer, EP-patentti 326 063, US-patentti 3 862 030 ja DE-patenttijulkaisu 3823864 A-1, joka on edellä mainittuja US-viitettä ja AU-viitettä lisäävä tai vastaava.

10 Kaikissa edellä mainituissa patenteissa viitataan "entsyymi-kalvo-reaktoriin". Kuitenkin, kuten vastaava kirjallisuus paljastaa [katso esimerkiksi teos "Engineering Aspects of Enzyme Engineering", ja siinä alaviitteet 16 ja 17, nimittäin Kragl et al., Ann. N.Y. Acad. Sci.,
 15 613, sivut 167 - 175, (1990) ja Vasic-Racki et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, sivut 215 - 222 (1989)], tällaiset reaktorit eivät edusta muuta kuin sarjaa säiliöitä, joita erottavat suodatusmembraanit, jotka ovat entsyymiä läpäisemättömiä. Siten tämän tyyppisessä reaktorissa reaktio toteutetaan liuoksessa, joka sisältää dispergoituneen entsyymien, jonka kanssa reagoivien aineiden täytyy sitten lopulta joutua kosketukseen diffundoitumalla.

Polymeeristen membraanireaktoreiden käyttö entsyymien sitomiseksi on yleisesti tunnettu US-patenteista
 25 4 102 746 ja 4 169 014, jotka molemmat on myönnetty Bruce S. Goldbergille. Katso myös julkaisu "A Novel Immobilized Enzyme Reactor System", Bruce S. Goldberg, joka on esitetty symposiumissa the 27th Annual Spring Symposium Session on Non-Conventional Reactor Systems, AIChE, East Brunswick,
 30 N. J., May 10, 1984, ja jossa edelleen kuvataan näiden kahden US-patentin membraanireaktoreita. Nämä kaksi jälkimmäistä patenttia ja AIChE-esitys 10. toukokuuta, 1984, liitetään myös tähän viitteenä.

Tämän keksinnön mukaisesti reaktioaikaa ja reagoivien aineiden käsittelyä muuten tunnetussa menetelmässä
 35

optisesti aktiivisten (S)-syaanihydriinien muodostamiseksi saattamalla aldehydit reagoimaan hydroस्याаниhapon kanssa katalyyttisen entsyymin, S-oksinitrilaasin ja liuottimen läsnä ollessa voidaan merkitsevästi parantaa edellä kuvattuihin menetelmiin verrattuna, kun aldehydin ja hapon liuos kuljetetaan kemiallisesti aktivoituneen, huokoisen membraanin läpi, kuten jäljempänä on määritetty, jolloin S-oksinitrilaasientsyymin on kemiallisesti sidottu mainittuun membraaniin.

5
10 Koska syaanihydriinin enantiomeeriset (S)- ja (R)-muodot muodostuisivat normaalisti yhtä suurina määrinä, nimittäin suhteessa 50 : 50, stereoselektiivisen katalyytin puuttuessa, tämän keksinnön kohde on lisätä (S)-isomeerin ja (R)-isomeerin välistä suhdetta ("S/R") valikoidulla sopivasti parannettu katalyytti ja reaktio-olosuhteet. Tämän keksinnön muu kohde on paitsi lisätä S-isomeerin selektiivisyyttä R-isomeeriin nähden, myös tuottaa suuri lähtöaineiden muuttuminen tuotteeksi niin lyhyessä ajassa kuin mahdollista. Vielä muu tämän keksinnön kohde
15
20 on saavuttaa nämä tavoitteet tarvitsematta erottaa fyysikaalisesti entsyymiä lopputuotteesta.

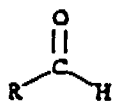
Tämän keksinnön menetelmä haluttujen optisesti aktiivisten syaanihydriinien valmistamiseksi toteutetaan helpposti, kuten edellä on kuvattu, nimittäin kuljettamalla
25 aldehydin ja hydroस्याаниhapon liuos määrätyn huokoisen membraanin läpi, johon entsyymin on kemiallisesti sidottu joko erämenetelmää tai jatkuvaa menetelmää käyttäen valitun ajanjakson ajan ja ottamalla talteen haluttu optisesti aktiivinen syaanihydriini. On havaittu toteutettaessa menetelmä näin, että ylläyttäen reaktioaikaa voidaan lyhentää
30 niinkin lyhyeen kuin yhteen päivään vastakohtana aikaisempiin menetelmiin, jotka vievät 6 tai 7 päivää, samanaikaisesti säilyttäen tai joissakin tapauksissa lisäten tuotteen kokonaissaantoa sekä selektiivisyyttä halutun S-isomeerin osalta verrattuna näihin aikaisempiin menetelmiin.
35

Sitä vastoin ja edullisemmin on ymmärrettävää, että tätä menetelmää käyttäen kokonaissaanto voidaan moninkertaistaa suhteellisesti, kun käytetään aikaisempien menetelmien ajanjaksoja, jotka ovat esimerkiksi 6 - 7 päivää.

5 Reaktio pitäisi toteuttaa mielellään orgaanisessa järjestelmässä, johon olennaisilta osin veteen liukenematon aldehydi ja tulokseksi saatava syaanihydriini ovat liukoisia. Vaikka voidaan käyttää pieniä määriä vesipitoista puskuria, nimittäin enintään noin 1 paino-%:a vettä
10 perustuen järjestelmän kokonaispainoon, on edullista, että käytetään niin vähän vettä kuin mahdollista, so. noin $\leq 0,03$ %. Siten tämä keksintö käsittää oleellisesti järjestelmän, joka koostuu orgaanisesta liuottimesta (joka mahdollisesti sisältää vesipitoisen puskurin), aldehydistä
15 ja haposta reagoivina aineina ja entsyymien, joka on sidottu kemiallisesti määrättyyn huokoiseen membraaniin, kuten jäljempänä kuvataan yksityiskohtaisesti.

Reaktio voidaan toteuttaa hyvin erilaisissa lämpötila- ja pH-olosuhteissa, jotka eivät ole ratkaisevia.
20 Siten hyväksyttäviä ovat esimerkiksi lämpötilat noin -6 °C:sta $+30$ °C:seen, edullisesti noin $+6$ °C:sta $+25$ °C:seen. Vaikka pH-olosuhteet eivät ole ratkaisevia, niitä voidaan säätää puskurijärjestelmien, kuten natriumasetaatin, natriumsitraatin tai natriumfosfaatin, avulla
25 ja pH-alue voi vaihdella välillä noin 3,5 - 7,5.

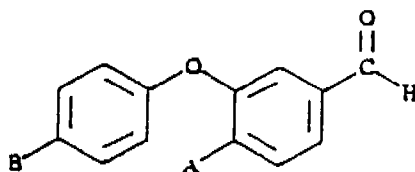
Käytettävät aldehydit ovat aldehydejä, jotka on opetettu tavanomaisesti esimerkiksi US-patentissa 4 859 784 (edellä), ja ne kaikki liitetään tähän viitteenä. Niihin sisältyvät, kuten tässä patentissa on kuvattu,
30 aldehydit, joilla on kaava



jossa R voi olla tyydyttynyt tai tyydyttymätön, alifaattinen tai aromaattinen ja se voi olla substituoitu halogeenilla tai rikkiä, typpeä tai happea sisältävillä substituentteilla.

5 Tätä menetelmää varten valittujen aldehydien pitäisi olla mielellään olennaisilta osin veteen liukenemattomia, so. niiden pitäisi olla valikoivasti liukoisia tämän keksinnön orgaanisiin liuottimiin. Siten edullisia ovat aldehydit, joiden liukoisuus veteen on vähemmän kuin noin
10 2,0 - 0,01 mg/ml, edullisimpia aldehydejä ovat ne, joiden liukoisuus on vähemmän kuin 0,1 mg/l - noin 0,01 mg/ml. Esimerkkeihin näistä veteen liukenemattomista aldehydeistä sisältyvät aldehydit, joita esittää kaava

15



20 jossa A on vety tai fluori ja B on vety, fluori, kloori tai bromi. Näistä 3-fenoksibentsaldehydi on edullinen.

Aldehydin ja hydroksyaanihapon moolisuhde on toivotavasti noin 1 : 1 - 1 : 100 ja edullisemmin noin 1 : 1 - 1 : 2.

25 Käytettävä orgaaninen liuotin voidaan helposti valita niistä liuottimista, jotka eivät vaikuta haitallisesti käytettävään membraaniin tai reaktion luonteeseen. Siten esimerkiksi di-n-butyylieetterin käyttö on toisaalta edullista, kun taas di-isopropyylieetterin, jota käytetään
30 US-patentin 4 859 784 (edellä) menetelmässä, on havaittu muuttavan odottamatta tämän menetelmän toimimattomaksi.

S-oksinitrilaasientsyymikatalyytti (EC 4.1.2.11) on kaupallisesti saatavissa yhtiöltä Sigma Chemical Co. tai se voidaan eristää sorgumin versoista käyttäen tunnettuja
35 menetelmiä [katso julkaisu Bove et al., J. Biol. Chem.,

226 (1), 207, (1961)]. Käytettävän entsyymin määrä suhteessa aldehydiin on toivottavasti noin 50 - 2 500 yksikköä entsyymiä/g aldehydiä, edullisemmin noin 500 - 700 yksikköä/g aldehydiä. Entsyymi voidaan sitoa tarkoituksenmukaisesti kemiallisesti huokoiseen membraaniin, kuten jäljempänä on kuvattu, käsittelemällä membraani esimerkiksi 5-paino-%:isella polyeteeni-imiinin vesiliuoksella ja sen jälkeen esimerkiksi 5-paino-%:isella glutaraldehydin vesiliuoksella ja lopuksi S-oksinitrilaasientsyymin liuoksella sopivassa puskurissa.

Edullisesti entsyymi pysyy kiinnittyneenä membraaniin useiden päivien ajan kerrallaan ja siten se ei edusta vain stabiilimpaa ja kestävämpää järjestelyä aikaisempiin menetelmiin verrattuna, vaan tällöin myös vältetään ylimääräinen entsyymin erottamis- ja talteenottovaihe, entsyymin ollessa lietteen muodossa US-patenttien 4 859 784 ja 5 008 192 menetelmissä.

Tässä käytettävät huokoiset membraanit on kuvattu täydellisesti US-patentissa 4 102 746 (edellä), joka määrittelee nämä entsyymiä sitovat aineet, niiden luonteen ja menetelmän niiden valmistamiseksi ja entsyymien kiinnittämisen ja talteenoton tällaisten erilaisten aineiden pinnalta. Pohjimmiltaan nämä membraanit, joilla on valittu paksuus ja/tai valitut kerrokset, koostuvat liukenemattomasta, kolmiulotteisesta polymeerisesta hartsisideaineesta, johon on kauttaaltaan dispergoituneina hienojakoisia täyteainehiukkasia ja jossa on olennaisilta osin toistensa kanssa yhteydessä olevia huokosia, jolloin huokoskoko voi vaihdella laajasti, mieluiten välillä noin 0,01 - 100 mikronia, ja aineen kokonaishuokoisuus on noin 50 - 75 % ja mainittuja dispergoituneita täyteainehiukkasia on läsnä vähintään noin 25 paino-% perustuen koostumuksen kokonaispainoon.

Yksi tällainen membraani on MPS®-membraani (FMC Corporation, Philadelphia, Pa., USA), joka on mikrohuokoi-

nen poly(vinyylikloridi)piidioksidilevy, jonka huokostilavuus on 70 - 80 %. Huokoskoko määritettynä Mercury Intrusion Porosimetry -laitteella on yleensä 0,2 - 2,0 μm . Tämä alusta on äärimmäisen hydrofiilinen, sillä on negatiivinen varaus, joka voidaan muuttaa positiiviseksi, ja sen pinta-ala on 80 m^2/g . Tämä aine on myös kokoonpuristumaton normaaleissa olosuhteissa ja sillä on matala kuiva ominaistiheys, joka on 0,45 g/cm^3 . Aktiiviset paikat ovat huokoiseen matriisiin sisältyvän piidioksidin pinnalla, mikä tekee mahdolliseksi orgaanisen funktionaalisuuden lisäämisen piidioksidin kiinnityskemian kautta. Tämän MPS-membraanin DNA-sitomiskapasiteetti on vähintään noin 260 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Lisäksi on havaittu, että tämä membraani, kuten muutkin sopivat membraanit, joita voidaan käyttää tässä, vaikka niitä käytetään normaalisti vain vesipitoisissa ympäristöissä, ovat yllättävän stabiileja tämän menetelmän orgaanisen liuottimen olosuhteissa.

Vaikka membraanin polymeerit, jotka muodostavat sideaineen, so. matriisin, voivat vaihdella laajasti, ne ovat mielellään termoplastisia, kaupallisesti saatavissa olevia hartseja, joista poly(vinyylikloridi) (PVC) on edullinen. Kuitenkin voidaan myös käyttää tällaisia aineita kuten polyeteeniä, joka on täytetty piidioksidilla, tai sekapolymeereja, jotka on muodostettu PVC:stä ja pienistä määristä monoeteenisistä monomeereja, kuten vinyyliasetaatia, vinylideenikloridia, prolyleeniä tai vastaavaa. Vaihtoehtoisesti matriisi voidaan muodostaa tällaisista aineista kuten polytetrafluorieteenistä (PTFE), selluloosa-asetaatista tai triasetaatista, polyamideista (kuten nailonista) tai vastaavasta. PTFE, mikäli sitä käytetään, voi olla fibrillimatriisin muodossa (katso US-patentit 4 152 661 ja 4 373 519), jolloin siihen on lisätty hydrofiillisiä, imukykyisiä hiukkasia. Siten yleensä voidaan käyttää mitä tahansa termoplastista hartsia, jonka liuotin pehmittää helposti tai joka voidaan sintrata läm-

mön tai paineen avulla tai joka voidaan muodostaa helposti lähtien läpäisevästä matriisista ja joka on kemiallisesti ja fysikaalisesti stabiili tämän keksinnön olosuhteissa.

Täyteaineisiin, jotka ovat edullisesti hienojakoisessa muodossa, voivat sisältyä sekä epäorgaaniset aineet, kuten edellä mainitut piidioksidiyhdisteet, tai esimerkiksi alumiiniyhdisteet, kuten alumiinioksidi tai -hydroksidi, tai orgaaniset täyteaineet, kuten polysakkaridit, mukaan luettuna aktivoituneet selluloosajohdannaiset. (Aktivoimattoman selluloosan on toisaalta havaittu olevan tehoton yhdistelmässä PVC:n kanssa).

Tulokseksi saatu membraani voidaan aktivoida käsittelemällä se tunnetulla tavalla siten, että tuotetaan kemiallinen sitova aine sen ja entsyymin välille, so. täyte-
 ainehiukkasten ja entsyymin välille. Tämä sitoutuminen voi tapahtua kemiadsorption, kovalenttisen sidoksen tai silloittamisen avulla välituoteaineen ja entsyymin välillä. Sitoviin funktionaalisuuksiin, joita voidaan käyttää membraaniin, sisältyvät mitkä tahansa vapaat aminojäännökset, sekä karboksyyli-, isonitriili-, aldehydi- tai ketoniryhmät, jotka sitovat S-oksinitrilaasientsyymin membraanin täyteaineeseen. Näistä polyeteeni-imiini (PEI), joka voi kemiadsorboitua täyteaineen pinnalle, on edullinen yhdistelmässä esimerkiksi glutaraldehydin kanssa, johon entsyymi sitten sitoutuu.

Kuten US-patentissa 4 102 746 (edellä) on julkaistu, tämän keksinnön menetelmässä käytetty membraani voidaan valmistaa helposti sekoittamalla sopivat määrät hienojakoista polymeerista hartsia, hienojakoista epäorgaanista täyteainetta, liuotinta (esimerkiksi sykloheksanonia) ja ei-liuotinta (esimerkiksi vettä) matalan leikkauksen olosuhteissa stabiilin, kostean, vapaasti virtaavan jauheen muodostamiseksi. Jauheseos voidaan sitten pursottaa ja kalanteroida edullisesti, jotta saadaan olennaisilta osin tasomainen rakenne tai levy, jolla on halutut di-

mensiot ja joka voidaan seuraavaksi kuljettaa vesipitoisen kylvyn kautta liuottimen uuttamiseksi pois ja sitten kuumentetun kuivausuunin läpi veden poistamiseksi. Tämän keksinnön mukaisesti tulokseksi saatu tuote, joka on mikrohuokoisen, dimensionaalisesti stabiilin, puolijäykän, liukenemattoman, nestettä läpäisevän membraanin muodossa, voidaan sitten käsitellä siten, että siihen kytketään tai sidotaan entsyymit.

Yhdessä edullisessa suoritusmuodossa alustava, ei-kemiallisesti aktivoitu membraani voidaan valmistaa seuraavalla tavalla: valmistetaan huokoisen aineen levy sekoittamalla ensin noin kolmen minuutin ajan kuivana 9,07 kg:aa Conoco™ 5385 -poly(vinyylikloridi)-hartsia, jolla on hiukkaskoko, joka läpäisee 180 µm:n seulan (80 mesh) ja 18,14 kg:aa Hi Sil™ 233:a, saostettua, hydrattua piidioksidia, Patterson Kelley -sekoittimessa, joka on "matalan leikkauksen" sekoitin nesteitä ja kiinteitä aineita varten. Sen jälkeen sekoittaen jatkuvasti lisätään 24,8 g liuotinta (sykloheksanonia) 20 minuutin kuluessa pumpun avulla. Sitten seokseen lisätään 26,8 kg vettä sekoittimessa 20 minuutin kuluessa, jolloin muodostuu kostea, stabiili, vapaasti virtaava jauhe. Sitten jauhe lisätään ruuviekstruuderiin, jonka sylinterin lämpötila on noin 48,9 °C ja pursote kuljetetaan kalenterirullien välistä, jotta saadaan olennaisilta osin tasainen levy, jonka paksuus on 0,5 mm. Sitten levy kuljetetaan veden uuttokylvyn läpi (76,6 °C) ja sen jälkeen sitä kuivataan kuumassa kuivausuunissa 107,2 °C:n lämpötilassa 6 minuutin ajan. Valmiin huokoisen levyn suhteellisen laaja huokoskokojakautuma ulottuu noin 0,01 mikronista noin 100 mikroniin ja keskimääräinen huokosen halkaisija on noin 0,15 - 0,25 mikronia määritettynä Mercury Intrusion -menetelmän avulla. Tämän aineen kokonaishuokoisuus on noin 65 % tilavuuden mukaan ja dispergoidun täyteaineen pitoisuus (esimerkiksi piidioksidin) käsittää noin 56 % painon mukaan.

Rutiinikokeessa esimerkiksi nestemäinen vesi imeytyy nopeasti aineeseen ilman paineen käyttöä, osoittaen, että mikrohuokokset ovat olennaisilta osin yhteydessä toisiinsa pinnasta pintaan.

- 5 Edellä valmistettu membraani voidaan sitten muuntaa kemiallisesti sideaineen avulla, mikäli halutaan, jotta se sitoo lujemmin S-oksinitrilaasin, seuraavin keinoin: käsittelemätöntä membraania inkuboidaan 5-%:isessa (paine/tilavuus) haaraketjuisen polyeteeni-imiinin (PEI) vesiliuoksessa, mainitun polyeteeni-imiinin molekyylipainon ollessa 50 000, huoneenlämpötilassa yhden tunnin ajan. Käsiteltyä alustaa huuhdotaan sitten vedellä ja 1 M NaCl:lla adsorboitumattoman PEI:n poistamiseksi. Määritys voidaan tehdä käyttäen trinitrobentseenisulfonihappokoetta: voimakkaan oranssinvärinen trinitrofenyyliamiinijohdannainen havaitaan käsitellyn alustaosan pinnalla osoittaen siten huomattavaa alifaattista aminohappofunktionaalisuutta. Käsitellyn alustaosan pinnalla oleva typpikuoritus määritetään alkuaineanalyysin avulla, esimerkiksi 20 1,25 % typpeä kuivapainon mukaan verrattuna käsittelemättömän osan 0,02 %:iin typpeä kuivapainon mukaan. PEI:n kemiadsorptio käsitellyn alustaosan pinnalle on käytännöllisesti katsoen palautumaton, so. sitä ei voida poistaa inkuboimalla erittäin suuren ionivahvuuden omaavien liuosten kanssa (esimerkiksi 1 M NaCl tai 1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4) pH-arvon ollessa 3 - 9. Vain vahvasti happamien olosuhteiden tapauksessa (inkuboiminen 1 M HCl:ssa 2 tunnin ajan) saat- 25 taisi ilmetä osittaista desorptiota, jonka määrä on enintään 50 % typpipitoisuudesta osoitettuna alkuaineanalyysin avulla. Käsitellyn alustan pinta-ala tavanomaisen BET-menetelmän mukaan on 55,4 M²/g verrattuna kontrollin 81,1 M²:iin/g. PEI:llä käsitelty alustaosa osoittaa identtisiä virtausominaisuuksia verrattuna käsittelemättömään alustaosaan riippumatta käytetystä puskurista tai ionivahvuudesta. 35 ta.

Sitten entsyymi sidotaan membraaniin, joka on aktivoitu kemiallisesti ensin PEI:llä, kuten edellä on kuvattu, ja sitten sitovalla ryhmällä, kuten glutaraldehydillä, johon entsyymi lopulta sitoutuu. Reagoivat aineet saate-
5 taan sitten kosketukseen entsyymien kanssa, kun ne kulkevat membraanin huokosten läpi. Reaktioväliaineen virtausta säädetään mielellään tukemalla membraania tai membraanien kerroksia kotelossa tai pidikkeessä, joka pitämällä membraanin reunoja reaktorin yksikön muodostamiseksi tekee
10 nämä reunat mainitulle virralle läpäisemättömiksi. Haluttaessa voidaan myös tuottaa syöttö- ja poistoaukot, joista on pääsy membraanin pinnoille, ohjaten ja pakottaen siten reagoivat aineet reaktorin ytimen huokosten läpi ja kosketukseen entsyymien kanssa. Tämänäyttypisiin tyypillisiin
15 reaktoreihin levyjen muodossa sisältyvät Acti-Disk® - ja Acti-Mod®-reaktorit (FMC Corporation, Philadelphia, PA, USA). Erityisesti jälkimmäinen levy koostuu useista membraanikerroksista täydellisemmin talteenoton varmistamiseksi. Siten koko kuvauksen osalta on ymmärrettävä, että
20 termin "membraani" ymmärretään sisältävän yhden tai useammat membraanien kerrokset, jolloin tarvittava, lopullinen paksuus voidaan määrittää helposti rutiinikokeiden avulla. Siten seuraavissa esimerkeissä Acti-Disk®-matriisi sisälsi missä tahansa 1 - 5 membraanikerrosta, esimerkiksi yhden
25 membraanin esimerkeissä 2, 3, 6 ja 7 ja 5 kerrosta esimerkeissä 1, 4 ja 5.

Haluttu syaanihydriinireaktiotuote voidaan sitten ottaa talteen poistamalla hydrosyaanihappo ja liuotin tislamalla.

30 Tätä keksintöä kuvataan edelleen seuraavien esimerkkien avulla. Tässä käytettynä seulan koot on osoitettu julkaisussa ASTM Standard E11-87.

Esimerkki 1

(S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistus vetysyanidista ja 3-fenoksibentsaldehydistä di-n-butyylieetterissä ympäröivässä lämpötilassa

5 Vaihe A. S-oksinitrilaasientsyymin immobilisoiminen huokoisen matriisin pinnalle

Acti-Disk®-alustamatriisi, joka sisälsi poly(vinyylidikloridista) ja piidioksidista koostuvan membraanin (MPS®-levyt, FMC Corp., Philadelphia, PA) ja oli esikäsitelty polyeteeni-imiinillä, lisättiin tavanomaiseen pumppureaktoriin (pump-around reactor). Reaktori koostui nesteenannostelupumpusta, jonka maksimaalinen pumppauskyky oli 10 ml/min ja joka oli yhdistetty poistokohdastaan kirkkaalla, taipuisalla muoviputkella Acti-Disk-alustamatriisin syöttöaukkoon, joka oli vuorostaan yhdistetty poistoaukostaan 100 ml:n säiliöön. Säiliö oli yhdistetty putkella pumpun syöttöön. Acti-Disk -alustamatriisi (Biosupport Materials, Chemical Products Group, FMC Corporation, Philadelphia, PA) koostui muovisesta kotelosta, jonka halkaisija oli 63,5 mm ja paksuus 6,4 mm ja jolla oli syöttöaukko toisella sen tasaisista puolista ja poistoaukko vastakkaisella tasaisella puolella. Muovisen kotelon sisällä oli viisi kerrosta nestettä läpäisevää huokoista membraania, joka koostui hydrofobisesta, polymeerisesta poly(vinyylidikloridi)matriisista, hienojakoisesta, hydrofiilisestä piidioksiditäyteaineesta, joka oli dispergoitunut kaikkialle hartsimatriisiin, ja kaikkialle aineeseen muodostuneista, keskenään yhteydessä olevien mikrohuokosten verkostosta.

30 Säiliöön pantiin 25 ml 5-%:ista (paino/tilavuus) glutaraldehydin vesiliuosta entsyymin N-terminaalin silloittamiseksi PEI-muunnettuun Acti-Disk-matriisiin ja sitä pumppattiin nopeudella 8 ml/min Acti-Disk-alustamatriisin läpi 60 minuutin ajan. Liuos korvattiin 50 ml:lla vettä ja

tätä pumpattiin Acti-Disk-alustamatriisin läpi 30 minuutin ajan. Sitten vesi poistettiin säiliöstä.

Laimennettiin 100 ml:aan 0,05 M natriumasetaattipuskuriliuosta (pH = 5,4) 28 ml S-oksinitrilaasientsyymin vesiliuosta, jolloin mainittu S-oksinitrilaasientsyymin oli saatu 7-päivän ikäisistä etioloiduista sorgum/Sudan-heinähybridin versoista (valkuaisanalyysi: 5,4 mg valkuais-
5 ta/ml; entsyymiaktiivisuusanalyysi: 10,7 yksikköä/mg valkuais-
ta) ja saatu liuos lisättiin säiliöön. Liuosta pumpattiin Acti-Disk-alustamatriisin läpi 30 minuutin ajan.
10 Tämän jälkeen virtaus Acti-Disk-alustamatriisin läpi käännettiin pumppureaktorissa (pump-around reactor) entsyymin täydellisen ja tasaisen jakautumisen edistämiseksi. Entsyymiliuoksen pumppaamista jatkettiin vielä 30 minuutin
15 ajan. Sitten Acti-Disk-alustamatriisia pestiin 50 ml:lla vettä 30 minuutin ajan, kuten edellä on kuvattu. Tämän ajan kuluttua kotelo, joka sisälsi Acti-Disk-alustamatriisin, johon S-oksinitrilaasientsyymin oli immobilisoitu, poistettiin pumppureaktorista (pump-around reactor) ja
20 sitä varastoitiin jääkaapissa, kunnes sitä tarvittiin.

Vaihe B. (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistus vetysyanidista ja 3-fenoksibentsaldehydistä di-n-butyylieetterissä ympäröivässä lämpötilassa

Vaiheen A Acti-Disk-alustamatriisi, joka sisälsi immobilisoidun entsyymin, lisättiin tavanomaiseen pumppureaktoriin (pump-around reactor). Tässä järjestelmässä
25 säiliön tilavuus oli 250 ml tai enemmän. Jäljellä oleva vesi poistettiin Acti-Disk-alustamatriisista pumppaamalla pientä määrää di-n-butyylieetteriä keskeytymättömästi
30 Acti-Disk-alustamatriisin läpi noin 30 minuutin ajan. Tyyppillisessä erässä säiliöön pantiin liuos, jossa oli 5,1 g (0,026 moolia) - 24,8 g (0,125 moolia) 3-fenoksibentsaldehydiä 100 ml:ssa di-n-butyylieetteriä. Tähän lisättiin
35 ruiskun avulla 1,1 mooliekvivalenttia vetysyanidia. Liuosta sekoitettiin vetysyanidin täydellisen liukenemisen var-

mistamiseksi. Liuoksen kierrättäminen Acti-Disk-alustamatriisin läpi aloitettiin pumpppausnopeuden ollessa 1 - 5 ml/min. Määräajoin otettiin näytteet analyysiä varten, kuten jäljempänä on kuvattu. Kun reaktio oli saatu päätökseen (tyypillisesti noin 24 tunnin kuluttua), reaktioseos pumpattiin ulos reaktorista. Sitten Acti-Disk-alustamatriisi huuhdottiin pumpppaamalla 25 ml di-n-butyylieetteriä sen läpi. Huuhtomisen jälkeen reaktori oli kunnossa toisen erän käsittelemiseksi.

5 Jokaisesta reaktioseoksesta otetusta näytteestä tehtiin kaksi analyysiä. Toisessa analyysissä määritettiin 3-fenoksibentsaldehydin muuttuminen (syaani)(3-fenoksifenyyli)metanoliksi kokonaisuudessaan, kun taas toinen analyysi toteutettiin näin valmistetun tuotteen S/R-suhteen määrittämiseksi.

10 Mainitun aldehydin muuttuminen (syaani)(3-fenoksifenyyli)metanoliksi määritettiin siten, että 0,1 ml:n näyte reaktioseoksesta pantiin kaasukromatogafin automaattisen näytteenottajan lasipulloon ja laimennettiin noin 1 ml:ksi metyleenikloridilla. Tähän lisättiin noin 1 ml N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluoriasetamidia. Lasipullo suljettiin ja sitä ravistettiin, minkä jälkeen sen annettiin seistä 15 minuutin ajan. Liuoksen näyte ruiskutettiin sopivasti ohjelmoituun kaasukromatografiin.

25 (Syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin S/R-suhteen määrittämiseksi 0,5 ml:n näyte reaktioseoksesta pantiin pieneen lasipulloon. Tähän lisättiin kolme tippaa Mosherin happokloridia [S-(-)- α -metoksi- α -(trifluorimetyyli)fenyylietikkahappokloridia] ja viisi tippaa pyridiinia. Tulokseksi saatua reaktioseos sekoitettiin ja sitten sen annettiin reagoida yhden tunnin ajan. Tämän jälkeen reaktioseokseen lisättiin 1 ml vettä ja 1 ml etyyliasetaattia. Seosta ravistettiin ja etyyliasetaattikerros poistettiin ja pantiin kaasukromatogafin automaattisen näytteenotta-

jan lasipulloon. Liuoksen näyte ruiskutettiin sopivasti ohjelmoituun kaasukromatografiin.

Seuraavassa esitetään 7 erää käsittävän menetelmän tulokset (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistamiseksi:

	Ajo	Aldehydi (moolia)	Pump- pausno- peus	Ajoaika	Muut- tumi- nen tuot- teeksi	S/R-suhde
	1	0,026	1 ml/min	24 h	76,3 %	91,4/8,6
	2	0,026	5 ml/min	23 h	91,8 %	91,4/8,6
10	3	0,026	5 ml/min	19 h	88,4 %	92,4/7,6
	4	0,026	5 ml/min	24 h	91,2 %	93,7/6,3
	5	0,125	5 ml/min	24 h	94,0 %	91,0/9,0
	6	0,125	5 ml/min	24 h	90,7 %	85,7/14,3
	7	0,026	5 ml/min	24 h	80,7 %	75,5/24,6

15

Esimerkki 2

(S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistus vetysyanidista ja 3-fenoksibentsaldehydistä di-n-butyylieetterissä 6 °C:n lämpötilassa

20 Tämän esimerkin (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanoli valmistettiin käyttäen menetelmää, joka on kuvattu esimerkissä 1. Pumppureaktori (pump-around reactor) poikkesi siinä, että Acti-Disk-alustamatriisi sisälsi vain yhden nestettä läpäisevän mikrohuokoisen osan kerroksen, 25 jonka pinnalle S-oksinitrilaasientsyymi oli immobilisoitu. Tässä menetelmässä käytetty Acti-Disk-alustamatriisi upotettiin vakio­lämpötilassa olevaan kylpyyn, jota pidettiin 6 °C:ssa. Saatettiin reagoimaan yhteensä 16 erää. Jokainen 30 erä koostui 1,0 g:sta (0,005 moolista) 3-fenoksibentsaldehydiä ja 0,4 - 0,5 ml:sta (ylimäärästä) vetysyanidia 25 ml:ssa di-n-butyylieetteriä. Pumppausnopeutta pidettiin 4 - 5 ml:ssa/min. Seuraavassa esitetään 16 erää käsittävän

menetelmän tulokset (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistamiseksi:

	Ajo	Ajoaika	Muuttuminen tuotteeksi	S/R-suhde
5	8	23 h	70,0 %	95,0/5,0
	9	26 h	65,8 %	93,2/6,8
	10	24 h	62,8 %	94,0/6,0
	11	24 h	65,7 %	93,0/7,0
10	12	27 h	63,9 %	93,0/7,0
	13	24 h	65,9 %	93,4/6,6
	14	36 h	76,9 %	93,0/7,0
	15	24 h	75,0 %	93,5/6,5
	16	23 h	78,2 %	95,0/5,0
15	17	24 h	77,1 %	96,0/4,0
	18	23 h	76,4 %	95,0/5,0
	19	24 h	72,7 %	94,5/5,5
	20	24 h	69,2 %	93,0/7,0
	21	24 h	70,2 %	90,0/10/0
20	22	24 h	68,2 %	87,0/13,0
	23	24 h	56,1 %	81,0/19,0

Esimerkki 3

(S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistus vetysyanidista ja 3-fenoksibentsaldehydistä tert-butyyylimetyylieetterissä ympäröivässä lämpötilassa

Tämän esimerkin (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanoli valmistettiin käyttäen esimerkissä 1 kuvattua menetelmää. Pumppureaktori (pump-around reactor) poikkesi siinä, että Acti-Disk-alustamatriisi sisälsi vain yhden nestettä läpäisevän mikrohuokoisen osan kerroksen, jonka pinnalle S-oksinitrilaasientsyymi oli immobilisoitu. Saatettiin reagoimaan yhteensä 3 erää. Jokainen erä koostui 1,0 g:sta (0,005 moolista) 3-fenoksibentsaldehydiä ja 0,5 ml:sta vetysyanidia (jälkimmäistä oli ylimäärin täydelli-

sen muuttumisen varmistamiseksi ja minkä tahansa haihtumisesta johtuvan häviön korvaamiseksi). Ensimmäisen erän liuotin oli 50 ml di-n-butyylieetteriä ja seuraavien kahden erän liuotin oli kummassakin tapauksessa 50 ml tert-butyylimetyylieetteriä. Jokaisen erän annettiin reagoida 24 tunnin ajan. Pumppausnopeutta pidettiin 5 ml:ssa/min. Seuraavassa esitetään kolme erää käsittävän menetelmän tulokset (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistamiseksi:

10	Ajo	Liuotin	Muuttuminen tuotteeksi	S/R-suhde
	24	n-Bu ₂ O	95,0 %	93,0/7,0
	25	t-BuOMe	74,0 %	58,0/42,0
	26	t-BuOMe	88,5 %	53,0/47,0

Esimerkki 4

15 (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistus vetysyanidista ja 3-fenoksibentsaldehydistä asetonitriilissä ympäröivässä lämpötilassa

Tämän esimerkin (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanoli valmistettiin käyttäen esimerkissä 1 kuvattua menetelmää. Ainoa erä koostui 25,0 g:sta (0,126 moolista) 3-fenoksibentsaldehydiä ja 6 ml:sta (ylimäärästä) vetysyanidia 100 ml:ssa asetonitriiliä. Reaktioaika oli 24 tuntia pumppausnopeuden ollessa 5 ml/min. Muuttuminen tuotteeksi oli 88 % ja tuotteen S/R-suhde oli 52,0/48,0.

25 **Esimerkki 5**

(S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistus vetysyanidista ja 3-fenoksibentsaldehydistä tetrahydrofuraanissa ympäröivässä lämpötilassa

30 Tämän esimerkin (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanoli valmistettiin käyttäen esimerkissä 1 kuvattua menetelmää. Ainoa erä koostui 5 g:sta (0,025 moolista) 3-fenoksibentsaldehydiä ja 1,5 ml:sta (ylimäärästä) vetysyanidia 100 ml:ssa tetrahydrofuraania. Reaktioaika oli 24

tuntia pumppausnopeuden ollessa 5 ml/min. Muuttuminen tuotteeksi oli 82,0 % ja tuotteen S/R-suhde oli 48,0/52,0.

Esimerkki 6

5 (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistus
3-fenoksibentsaldehydistä ympäröivässä lämpötilassa
käyttäen vetysyanidia liuottimena.

Tämän esimerkin (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)me-
tanoli valmistettiin käyttäen esimerkissä 1 kuvattua mene-
telmää. Pumppureaktori (pump-around reactor) poikkesi sii-
10 nä, että Acti-Disk-alustamatriisi sisälsi vain yhden nes-
tettä läpäisevän mikrohuokoisen osan kerroksen, jonka pin-
nalle S-oksinitrilaasientsyymi oli immobilisoitu. Ainoa
erä koostui 1,0 g:sta (0,005 moolista) 3-fenoksibentsal-
dehydiä 20 ml:ssa vetysyanidia. Reaktioaika oli 24 tuntia
15 pumppausnopeuden ollessa 5 ml/min. Muuttuminen tuotteeksi
oli 96,7 % ja tuotteen S/R-suhde oli 58,1/41,9.

Esimerkki 7

(S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistus
20 vetysyanidista ja 3-fenoksibentsaldehydistä di-iso-
propyyllieetterissä ympäröivässä lämpötilassa

Seuraava esimerkki osoittaa, että di-isopropyyli-
eetteri-liuotin, jota on käytetty esimerkiksi US-patentis-
sa 4 859 784 (edellä), on tehoton liuottimena tässä mene-
telmässä.

25 Tämän esimerkin (S)-(syaani)(3-fenoksifenyyli)me-
tanoli valmistettiin käyttäen esimerkissä 1 kuvattua mene-
telmää. Pumppureaktori (pump-around reactor) poikkesi sii-
nä, että Acti-Disk-alustamatriisi sisälsi vain yhden nes-
tettä läpäisevän mikrohuokoisen osan kerroksen, jonka pin-
30 nalle S-oksinitrilaasientsyymi oli immobilisoitu. Saatet-
tiin reagoimaan yhteensä kaksi erää. Kumpikin erä koostui
2,1 g:sta (0,011 moolista) 3-fenoksibentsaldehydiä ja
0,6 ml:sta (ylimäärästä) vetysyanidia. Ensimmäisen erän
liuotin oli 50 ml di-n-butyylieetteriä ja toisen erän
35 liuotin oli 50 ml di-isopropyyllieetteriä. Ennen käyttöä

500 ml di-isopropyylieetteriä puhdistettiin juoksuttamalla se 2,5 cm x 28 cm:n suuruisen pylvään läpi, jossa oli neutraalia alumiinioksidia. Puhdistettua di-isopropyylieetteriä varastoitiin typpi-ilmakehän alla, kunnes se oli valmis käytettäväksi. Pumppureaktoria huuhdottiin 75 ml:lla puhdistettua di-isopropyylieetteriä erien välillä. Jokaisen erän annettiin reagoida 23 - 24 tunnin ajan. Pumppausnopeutta pidettiin 5 ml:ssa/min. Seuraavassa esitetään kaksi erää käsittävän menetelmän tulokset (S)-

10 (syaani)(3-fenoksifenyyli)metanolin valmistamiseksi:

Ajo	Liuotin	Muuttuminen tuotteeksi	S/R-suhde
27	n-Bu ₂ O	89,5 %	94,0/6,0
28	i-Pr ₂ O	80,0 %	66,0/34,0

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä optisesti aktiivisten (S)-syaanihydriinien valmistamiseksi saattamalla aldehydi reagoimaan
5 hydrosyaanihapon kanssa saattamalla hapon ja aldehydin sisältävä orgaaninen liuotin kosketukseen S-oksinitrilaa-
sientsyymin kanssa, t u n n e t t u siitä, että entsyymi on sidottu kemiallisesti liukenemattomaan komposiittiin,
joka sisältää huokoisen membraanin, jonka läpi reagoivat
10 aineen kulkevat, jolloin mainittu huokoinen membraani sisältää polymeerisen hartsisideaineen, jolloin hienojakoiset täyteainehiukkaset ovat kauttaaltaan dispergoituneet mainittuun sideaineeseen, ja huokoiseen membraaniin on muodostunut olennaisilta osin toistensa kanssa yhteydessä
15 olevien huokosten verkosto, jolloin huokoinen membraani läpäisee mainittuja reagoivia aineita sisältävän nesteen virran.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä optisesti aktiivisten (S)-syaanihydriinien valmistamiseksi
20 saattamalla aldehydi reagoimaan hydrosyaanihapon kanssa saattamalla hapon ja aldehydin sisältävä orgaaninen liuotin kosketukseen S-oksinitrilaasientsyymin kanssa, t u n n e t t u siitä, että entsyymi on kemiallisesti sidottu liukenemattomaan komposiittiin, joka sisältää huokoisen
25 membraanin tai membraanien kerroksia, ja jolla on ainakin pari vastakkaista pintaa ja ennalta määrätty paksuus, jonka läpi reagoivat aineet kulkevat, jolloin mainittu huokoinen membraani sisältää polymeerisen hartsisideaineen, johon on kauttaaltaan dispergoituneina hienojakoisia täyteainehiukkasia ja johon on muodostunut olennaisilta osin
30 toistensa kanssa yhteydessä olevien huokosten verkosto, jolloin mainitut huokokset ovat muodostuneet mainitun hartsisideaineen sisään, mainittujen täyteainehiukkasten ja hartsisideaineen välille ja vierekkäisten täyteainehiukkasten välille, jolloin dispergoituneita täyteainehiukka-
35

sia on läsnä mainitussa huokoisessa membraanissa painon mukaan vähintään noin 25 %, mainittujen huokosten kokojakautuman vaihdellessa epäyhtenäisesti kutakin mainittua pintaa pitkin ja mainitun ennalta määrätyn paksuuden poikkei 0,01 mikronista 100 mikroniin määritettynä Mercury Intrusion -menetelmän avulla, jolloin huokoinen membraani läpäisee nesteen virran vähintään yhden pinnan läpi mainituista pinnoista.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että membraani koostuu poly(vinyylikloridi)sideaaineesta ja piidioksidi-täyteaineesta.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että membraani sisältyy reunojaan pitkin koteloon, joka estää nesteen virran reunojen läpi.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että koteloa on muunnettu syöttöaukolla, josta on pääsy membraanin yhdelle pinnalle, ja poistoaukolla, josta on pääsy membraanin vastakkaiselle pinnalle.

6. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että membraani aktivoidaan kemiallisesti sideaineen avulla entsyymiä varten.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että entsyymi sidotaan kovalenttisesti tai silloitetaan sideaineeseen.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mebraani aktivoidaan kemiallisesti polyeteeni-imiinin ja glutaraldehydin avulla.

9. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että aldehydin liukoisuus veteen on vähemmän kuin noin 2,0 mg/ml.

10. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että aldehydi on 3-fenoksibentsaldehydi.

11. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että orgaaninen liuotin on di-n-
butyylietteri.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av optiskt aktiva (S)-cyanohydriner genom reaktion av en aldehyd med cyanväsyra genom kontaktande av ett organiskt lösningsmedel, vilket innehåller syran och aldehyden, med enzymet S-oxinitrilas, k ä n n e t e c k n a t därav, att enzymet är kemiskt bundet vid en olöslig komposit som omfattar ett poröst membran, genom vilket reaktanterna leds, varvid det porösa membranet omfattar ett polymeriskt, hartsartat bindemedel med finfördelade fyllmedelpartiklar helt dispergerade i bindemedlet och ett nätverk av sammankopplade porer, vilka utformats däri, och det porösa membranet är genomträngligt vid genomströmningen av en vätska som innehåller reaktanterna.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, för framställning av optiskt aktiva (S)-cyanohydriner genom reaktion av en aldehyd med cyanväsyra genom kontaktande av ett organiskt lösningsmedel, vilket innehåller syran och aldehyden, med enzymet S-oxinitrilas, k ä n n e t e c k n a t därav, att enzymet är kemiskt bundet vid en olöslig komposit som omfattar ett poröst membran eller membranskikt, vilka har åtminstone ett par motsatta ytor och en i förväg bestämd tjocklek och genom vilka reaktanterna leds, varvid det porösa membranet omfattar ett polymeriskt, hartsartat bindemedel med finfördelade fyllmedelpartiklar helt dispergerade i bindemedlet och ett nätverk av sammankopplade porer, vilka utformats däri, och porerna har bildats inom det hartsartade bindemedlet, mellan fyllmedelpartiklarna och det hartsartade bindemedlet och mellan närliggande fyllmedelpartiklar, varvid de dispergerade fyllmedelpartiklarna är närvarande i det porösa membranet i en vikt mängd av åtminstone ca 25 % och storleksfördelningen av porerna varierar oenhetligt över var och en av de nämnda ytorna och över den i förväg bestämda tjockleken i

området från 0,01 till 100 mikron vid bestämning porositetetriskt genom kvicksilverintrusionsförfarandet, varvid det porösa membranet är genomträngligt för genomströmning av en vätska genom åtminstone en av de nämnda ytorna.

5 3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att membranet består av ett bindemedel av poly(vinylklorid) och fyllmedel av kiseldioxid.

10 4. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att membranet i kanterna fasthålls i ett hus, vilket förhindrar vätskeströmning genom kanterna.

15 5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att huset modifierats med åtminstone en ingångsöppning med tillgång till åtminstone en yta av membranet, och med en utloppsöppning med tillgång till den motsatta ytan av membranet.

20 6. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att membranet är kemiskt aktiverat med ett bindemedel för enzymet.

 7. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att enzymet är kovalent bundet vid eller tvärbundet med bindemedlet.

25 8. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att membranet kemiskt aktiverats med polyetylenimin och glutaraldehyd.

 9. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att lösligheten hos aldehyden i vatten är lägre än ca 2 mg/ml.

30 10. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att aldehyden är 3-fenoxibensaldehyd.

35 11. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att det organiska lösningsmedlet är di-n-butyleter.

Patentti- ja innovaatiolinja

TUTKIMUSRAPORTTI

HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
931583	C12 P 41/50, 51/50
	☐ jatkuu kääntöpuolella

TUTKITTU AINEISTO	
Patenttivirastojen julkaisut FI, SE, NO, DK, DE , CH , EP, WO, GB, US:	
C12P 41/50, 13/00	
☐ jatkuu kääntöpuolella	
Muu aineisto	
☐ jatkuu kääntöpuolella	

[illegible]

TUTKITTU AINEISTO (jatkoa etusivulta)

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There is no handwriting or other markings on the paper.

MUU AINEISTO (jatkoa etusivulta)

[illegible]

VIITEJULKAISUT (jatkoa etusivulta)

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There is no handwriting or other markings on the paper.