

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：91108316

※申請日期：91.4.23 ※IPC 分類：C12P13/02

壹、發明名稱：(中文/英文)

利用控制反應溫度的活體觸媒之化合物的製造方法
A PRODUCING METHOD OF USING CONTROL
REACTIVE TEMPERATURE OF A LIVING CATALYST
OF CHEMICAL COMPOUND

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

三菱麗陽股份有限公司 / MITSUBISHI RAYON CO., LTD.

代表人：(中文/英文) 皇 芳之 / SUMERAGI, YOSHIYUKI

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本東京都港區港南一丁目 6 番 41 號

6-41, KONAN 1-CHOME, MINATO-KU, TOKYO, JAPAN

國 籍：(中文/英文) 日本 / JAPAN

參、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 村尾 耕三 / MURAO, KOZO
2. 石井 勝男 / ISHII, KATSUO
3. 番場 啟泰 / BANBA, HIROYASU

住居所地址：(中文/英文)

1-3. 日本神奈川縣橫濱市鶴見區大黑町 10-1

10-1, Daikoku-cho, Tsurumi-ku, Yokohama-shi, Kanagawa, Japan

國 籍：(中文/英文)

1-3. 日本 /JAPAN

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項 第一款但書或 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本；2001/06/22；2001-189894

2.

3.

4.

5.

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

國 籍：(中文/英文)

1-3. 日本 /JAPAN

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項 第一款但書或 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本；2001/06/22；2001-189894

2.

3.

4.

5.

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

發明領域

本發明是關於一種製造使用活體觸媒的化合物的方法。

發明背景

菌胞(cell)、固定化菌胞(immobilized cell)或固定化酵素(immobilized enzyme)等的活體觸媒(以下統稱活體觸媒)係具有簡化反應流程、或減少副產物之產生以提高反應生成物之純度、或是在穩定之反應條件下穩定地進行富含反應性之物體的製造等優點。因此，近年來常被使用於大多數之化合物的製造中。

然而，活體觸媒在反應中，會導致其觸媒活性之降低(失去活性)。因此，爲了提高每單位觸媒量之化合物之生成量，亦即觸媒之生產性(以後，統稱單位生產性)，因而對如何抑制失去活性的方法進行研究。例如是，在從冰點至攝氏15度的低溫下進行反應的方法(日本專利特公昭56-38118號公報)、從多個供應口連續提供低濃度之基質的方法(日本專利特公昭57-1234號公報)、在有機溶劑中對微生物或其處理物進行處理的方法(日本專利特開平5-308980號公報)、在高級不飽和脂肪酸存在之下進行反應的方法(日本專利特開平7-265090號公報)、以及菌胞以戊二醛(glutaraldehyde)等進行架橋處理的方法(日本專利特開平7-265091號公報、日本專利特開平8-154691號公報)等。

然而，使用上述方法僅僅能使觸媒之生產性變得充

分，仍然無法降低化合物製造時之觸媒使用量，因而導致化合物之製造原價仍然居高不下，且其處理方法中也存在有廢觸媒過多的問題。

發明概述

本發明之目的係提供一種在低成本下可以有效率的、低環境負荷型的化合物製造方法，藉由有效率地使用活體觸媒，已在提高觸媒之生產性的同時可以降低化合物製造時之觸媒比例的費用，並減少其廢棄物。

本發明提出一種使用活體觸媒之化合物的製造方法，其方法係在使用活體觸媒進行化合物之製造之際，爲了抑制其失去活性，較佳係在低溫下進行反應。另外，本發明者發現在此反應槽內之觸媒所流經之抽出觸媒側的反應槽溫度高於添加觸媒側時，會提高觸媒之生產性，進而進行深入研究而得到本發明。另外，在反應爲發熱反應時，可以藉由減少反應槽之除熱量，而以操作上較爲經濟且容易的方法達成本發明。

亦即，本發明具有下列特徵：

(1)一種化合物的製造方法，係適用於在兩個以上之複數個反應槽內，對使用活體觸媒之化合物進行連續製造的方法，活體觸媒係選自於微生物菌胞及其處理物等所組成之族群，所製造之化合物包括醯胺化合物，此方法包括在反應槽內或反應槽之間的抽出觸媒側反應溫度高於添加觸媒側反應溫度。

(2)如(1)所述之化合物的製造方法，其中在反應槽內或

反應槽之間的抽出觸媒側反應溫度至少比添加觸媒側反應溫度高攝氏1度以上。

(3)如(1)所述之化合物的製造方法，其中在反應槽內或反應槽之間的抽出觸媒側反應溫度至少比添加觸媒側反應溫度高攝氏5度以上。

(4)如(1)所述之化合物的製造方法，其中所製造之化合物係選自於丙烯醯胺、煙醯胺、5-氰戊醯胺等所組成之族群。

(5)如(1)至(4)中任一項所述之化合物的製造方法，其中在反應槽內之活體觸媒之流向係與反應液之流向並行流動。

為讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例作詳細說明如下：

較佳實施例之詳細說明

接著，對本發明進行詳細的說明。

本發明係適用於將使用活體觸媒之化合物於反應槽中進行連續製造的方法。此將使用活體觸媒之化合物於反應槽中進行連續製造的方法，對使用含有生化學反應器（酵素反應器）及生物反應器（微生物反應器）的生化反應器（bioreactor）的化合物製造方法而言，係使用攪拌槽型、固定層型、流動層型、移動層型等種種形式的反應器進行操作。此時，在反應槽內進行製造化合物的反應時，反應槽可以為1個也可以為多個。當反應槽使用2個以上之個數時，可以提高溫度控制或易於進行觸媒置換等之操作性，

並提高反應效率等。

在本發明中，所使用之活體觸媒係為可反應得到目的產物的觸媒，此觸媒包括含有酵素之動物細胞、植物細胞、細胞小器官、菌胞（生菌胞或死菌胞）或其處理物。對處理物而言，係包括從細胞所抽出之粗酵素或精製酵素、或利用包括法、架橋法、擔體結合法等方法將動物細胞、植物細胞、細胞小器官、菌胞（生菌胞或死菌胞）或酵素本身固定化之物體。對活體觸媒所使用之菌胞而言，例如是，如 *Rhodococcus rhodochrous*、*Pseudomonas chlororaphis* 等的微生物之菌胞、或是如由酵素或前述微生物所產生之腈水化酶(nitril hydratase)。在此，包括法係為將菌胞或酵素包入高分子凝膠之細微的晶格中，並以半透膜性之高分子皮膜覆蓋的方法。架橋法係為將含有2個或2個以上的官能基的酵素作為測試藥品（多官能性架橋劑）的方法。擔體結合法係為在水不溶性之擔體上結合酵素的方法。用以固定化的固定化擔體例如是玻璃氣泡珠(glass bead)、矽膠(silica gel)、聚氨基甲酸酯(poly urthane)、聚丙烯醯胺(poly acrylamide)、聚乙烯醇(poly vinyl alcohol)、角叉菜(carrageenan)、炔羧酸(alkynecarboxylic acid)、瓊脂(agar)、明膠(gelatin)等。

在對菌胞進行固定化的方法中，由於包括固定法所得之固定化菌胞的菌胞濃度較高，因此在工業上，大多係使用此種方法。例如，使用丙烯醯胺(acrylamide)及/或丙烯醯胺的衍生物作為包括固定化用單體(monomer)，如同日本

專利特公昭58-35078號公報或日本專利特開平7-203964號公報所揭露之內容。本發明所製造之化合物並不限於在活體觸媒之作用下所製造的化合物。例如，醇(alcohol)類或醯胺(amide)類等泛用化學品、或氨基酸(amino acid)或抗生物質・生理活性物質等的食品・化妝品・醫藥品或其原材料或中間體等。較特別的是，對泛用化學品之製造而言，從經濟性之觀點來看，係為減少觸媒使用量之重要且不可或缺的因素。因此，本發明較佳係於泛用化學品之活體觸媒之下進行製造。具體而言，使用目前活體觸媒進行大量製造時，較佳係為屬於泛用化學品的醯胺化合物之製造。對醯胺化合物而言，例如是丙烯醯胺、煙醯胺(nicotinamide)、5-氰戊醯胺(5-cyanovaleramide)。

本發明之連續製造方法，係為將原料化合物以連續的或間斷的添加入反應槽內，且以連續的或間斷的方式抽出反應液，以順利地將反應槽內之反應液之全量抽出的製造方法。亦即，定期將所製造之反應液之全量抽出。而不是意指所謂の間歇反應或半間歇反應（批次(batch)或半批次(semi-batch)反應）。在使用本發明之活體觸媒的化合物進行連續製造的反應樣式中，可考慮使用固定層、移動層、流動層、攪拌槽等進行反應的樣式。在前述任何一種樣式中，本發明所使用之反應槽可藉由裝備套管(jacket)、冷卻或加熱旋管(coil)、外部循環冷卻裝置或外部循環加熱裝置等的冷卻或加熱裝置，或是將反應器之全體或部分置入恆溫槽內等的方法，進行冷卻或加熱。再者，也可以在反應槽之

間插入熱交換器。

在上述之樣式中，為避免活體觸媒在任一情形下所發生之過時的失去活性，因此活體觸媒必需在連續的或間斷的加入反應槽內之同時，從反應槽內抽出。為此，在連續的製造方法中，活體觸媒保持有一定之流動，亦即發生從上流側至下流側的流動。本發明之上流側係意指反應槽內添加觸媒之一側，而下流側則意指與前述相反方向之抽出觸媒的一側。

對反應之樣式進行具體的說明，在固定層之情形下，所使用之多槽的固定層係以使用疑似移動層（使用旋轉(merry-go-round)方式）為前提，而在流動層或攪拌槽之情形下，則以多槽連續的方式為前提。此情形的上流側的反應槽係為多個反應槽中位於添加觸媒之一側的反應槽，而下流側的反應槽則為位於將觸媒從反應系統中抽出之一側的反應槽。再者，當在1個反應槽內活體觸媒隨著反應液之流動而移動之移動層的情形時，上流側係在所謂之反應槽輸入口附近添加觸媒，而下流側則在所謂之反應槽輸出口附近將觸媒從反應系統中抽出。而且，此時之移動層也包括使用流通管形反應槽的反應樣式。

因此，在反應槽內之觸媒之流動的下流側反應溫度比上流側反應溫度之一方高，此意指上述之觸媒在下流側之反應溫度會比上流側之溫度高。具體而言，在使用多槽的連續樣式中，多槽中之位於較下流側之位置的反應槽的溫度高於位於較上流側之位置的反應槽的溫度。例如當使用4

槽的反應槽時，第4槽的反應槽溫度高於第1槽的反應槽溫度。再者，當使用移動槽等的單槽的連續樣式時，靠近反應槽出口之部分的溫度係高於靠近反應槽入口之部分的溫度。在此，較高之反應溫度係指在量測範圍內確認至少高出攝氏0.1度以上。為使本發明可更有效果地進行，因此較佳係為至少高出攝氏1度以上，更佳係至少高出攝氏5度以上。再者，反應溫度較佳係依據反應中所使用之觸媒的安定性等進行適當地選擇。

在本發明中，觸媒之流動方向較佳係與反應液之流動方向並行，觸媒之流動方向與反應液之流動方向並行係意指反應液與觸媒之流動方向在同一方向上。其中，觸媒與反應液在同一方向上流動，且反應係為發熱反應的情形時，則可以藉由對除熱量的調節而進行反應溫度的調節，因此可以輕易地使觸媒在反應槽內流動之下流側反應溫度高於上流側反應溫度。

以下藉由實例對本發明進行具體的說明。但，本發明所提及之實例並不限定本發明之技術範圍。

實例1

(1)活體觸媒之調製

具有脲水化酶活性的 *Rhodococcus rhodochrous* J1 株（受託號碼 FERM BP-1478，於 1987 年 9 月 18 日寄託於獨立行政法人 產業技術綜合研究所 特許生物寄託中心（日本國茨城縣市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6））係在含有葡萄糖 (glucose) 2%、尿素 1%、胨 (peptone) 0.5%、酵母萃取物

(extract)0.3%、氯化鈷0.05%（全質量%）的培養環境（pH7.0）中，於攝氏30度之下細心培養而得。再將前述產物利用離心分離機及50mM磷酸緩衝液（pH7.0），以得到已集菌洗淨的菌胞懸浮混濁液（乾燥菌胞15質量%）。

(2)從3-氰戊醯胺至煙醯胺的反應

內容積為1L且附有套管的分離式燒瓶(separable flask)以4槽直線排列之方式相連結。在第1號槽內，以200ml/hr之流速連續添加溶解有15%之3-氰戊醯胺的50mM之磷酸緩衝液（pH8），及以0.3ml/hr之流速連續添加菌胞懸浮混濁液，並於添加之同時進行攪拌。此時，第1號槽至第4號槽的反應槽之溫度分別利用套管之冷卻水（攝氏20度）將反應溫度控制在攝氏30度、攝氏30度、攝氏32度、攝氏35度，以進行反應。

3日之後，將從第4號槽所流出之反應液，利用液體色層分析法(chromatography)（試管(column)：ODS-80A（GL科學公司製），溶解分離液：5%乙腈(acetonitrile)，10mM磷酸緩衝液（pH7），檢測：200nm）進行分析，沒有檢測出3-氰戊醯胺，而可檢測出17%左右的煙醯胺。

比較例1

使用由實例1所作成之菌胞懸浮混濁液，除了將4槽之全部反應溫度變更成攝氏30度之外，其餘皆與實例1相同。

3日之後，同樣將從第4號槽所流出之反應液，利用液體色層分析法進行分析，檢測出所生成的煙醯胺為16%左右，以及檢測出為反應之3-氰戊醯胺為1%左右。

比較例2

使用由實例1所作成之菌胞懸浮混濁液，除了將4槽之全部反應溫度變更成攝氏35度之外，其餘皆與實例1相同。

3日之後，同樣將從第4號槽所流出之反應液，利用液體色層分析法進行分析，檢測出所生成的煙醯胺為15%左右，以及檢測出為反應之3-氰戊醯胺為2%左右。

實例2

(1)活體觸媒之調製

具有脗水化酶活性的 *Pseudomonas chlororaphis* B23 (受託號碼 FERM BP-187, 於1981年11月16日寄託於獨立法人 產業技術總合研究所 特許生物寄託中心 (日本國茨城縣市東1丁目1番地1中央第6)) 係在含有蔗糖 (sucrose) 1.0%、甲基丙烯腈 (methacrylonitrile) 0.5%、酮 0.3%、磷酸二氫一鉀 0.1%、磷酸一氫二鉀 0.1%、硫酸鎂 0.1%、酵母萃取物 0.3%、硫酸第一鐵 0.001% (全質量%) 的培養環境 (pH 7.5) 中，於攝氏 25 度之下細心培養而得。再將前述產物利用 50mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 洗淨，以得到菌胞懸浮混濁液 (乾燥菌胞 12 質量%)。

另一方面將丙烯醯胺、亞甲基-N,N'-雙丙烯醯胺 (N,N'-methylene-bis-acrylamide) 及 2-二甲胺基丙基甲基丙烯醯胺 (2-dimethylamino propyl methacrylamide) 分別以 30 質量%、1 質量%、4 質量% 的比例調製成單體混合水溶液。

接著，將菌胞懸浮混濁液、單體水溶液、10 質量% 之 N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (N,N,N',N'-tetramethylethylene

diamine)水溶液、及10質量%之過硫酸銨水溶液分別以5L/hr、2 L/hr、0.1 L/hr、0.1 L/hr的流速進行線性混合(line mixing)之聚合之後，得到截斷成1mm見方的粒子的固定化菌胞粒子。此固定化菌胞粒子通過流動化之50mM磷酸緩衝液(pH7.0)洗淨，而形成固定化菌胞觸媒(本觸媒中，乾燥菌胞質量為8%左右)。

(2)藉由固定化觸媒進行從丙烯腈(acrylonitrile)至丙烯醯胺的反應

在與實例1相同之裝置中，於來自各反應槽之反應液出口處安裝金屬網，以防止來自各反應層之固定化菌胞觸媒流出。在各反應層中，添加50g之固定化菌胞觸媒。在第1號槽中，以155ml/hr之流速連續添加50mM磷酸緩衝液(pH7)及以25g/hr之流速連續添加丙烯腈。在第2號槽中，僅以20g/hr之流速連續添加丙烯腈。同時，於各槽中進行攪拌。此時，第1號槽至第4號槽的反應槽之溫度分別利用套管之冷卻水(攝氏5度)將反應溫度控制在攝氏10度、攝氏10度、攝氏12度、攝氏15度，以進行反應。接著，一日一次，為達到置換反應槽內之觸媒的目的，因此從第4號槽之金屬網上抽出觸媒6g。再者，藉著分別從第3號槽抽出6g觸媒至第4號槽、從第2號槽抽出6g觸媒至第3號槽、從第1號槽抽出6g觸媒至第2號槽，以及在第1號槽中追加6g觸媒等的動作，以連續進行丙烯醯胺製造反應。

將從第4號槽所流出之反應液，一日一次地利用氣體色層分析法(試管：PraPak-PS(Waters公司製)，1m，攝

氏180度，負載氣體(carrier gas)：氮氣，檢測器：FID) 進行分析。在大約3個月的運轉中，僅檢測出30%之丙烯醯胺，而未檢測出未反應之丙烯腈。

比較例3

使用由實例2所作成之固定化菌胞觸媒，除了將4槽之全部反應溫度變更成攝氏10度之外，其餘皆與實例2相同。

從第1.5個月開始，從第4號槽所流出之反應液開始殘留未反應之丙烯腈，丙烯醯胺製品的品質開始降低。然，當觸媒之添加抽取量變更爲一日8g時，則不會檢測出未反應之丙烯腈。

產業上之利用性

藉由本發明，可以輕易地減少化合物製造時之活體觸媒之使用量。此結果顯示，可以降低化合物製造時之觸媒比例費用，並減少廢棄物。亦即，可於低成本之情形下，提供有效率的、低環境負擔型的化合物製造方法。

在本說明書中所引用之全部刊物，其內容之全部係引用於本說明書中。再者，雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者爲準。

伍、中文發明摘要：

一種使用活體觸媒之化合物的製造方法。在1個或複數個反應槽內，對使用活體觸媒之化合物進行連續製造的方法，係包括在反應槽內或反應槽之間的下流側反應溫度高於上流側反應溫度。

陸、英文發明摘要：

A producing method of a chemical compound is using a living catalyst. In one or more reactive tank, the way is continuous to produce the chemical compound by using the living catalyst. The characteristic of the way is that the reactive temperature of a flow down side is higher than the reactive temperature of a flow above side in the reactive tank or among the reactive tanks.

公告本

97年3月4日修(更)正本

拾、申請專利範圍：

1.一種化合物的製造方法，係適用於在兩個以上之複數個反應槽內，對使用一活體觸媒之一化合物進行連續製造的方法，該活體觸媒係選自於微生物菌胞及其處理物所組成之族群，所製造之該化合物包括醯胺化合物，該方法包括：

在反應槽內或反應槽之間的一抽出觸媒側反應溫度高於一添加觸媒側反應溫度，其中在反應槽內或反應槽之間的該抽出觸媒側反應溫度至少比該添加觸媒側反應溫度高攝氏5度以上。

2.如申請專利範圍第1項所述之化合物的製造方法，其中所製造之該化合物係選自於丙烯醯胺、煙醯胺、5-氰戊醯胺等所組成之族群。

3.如申請專利範圍第1項或第2項所述之化合物的製造方法，其中在反應槽內之該活體觸媒之流向係與一反應液之流向並行流動。

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：