(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4372254号
(P4372254)

(45)発行日　平成21年11月25日(2009.11.25)　(24)登録日　平成21年9月11日(2009.9.11)

(51)Int.Cl.　F I
C12P 13/00 (2006.01)　Ｃ１２Ｐ 13/00

請求項の数 7　(全 15 頁)

(21)出願番号　特願平10-373392
(22)出願日　平成10年12月28日(1998.12.28)
(65)公開番号　特開平11-243983
(43)公開日　平成11年9月14日(1999.9.14)
審査請求日　平成17年11月21日(2005.11.21)
(31)優先権主張番号　A2192/97
(32)優先日　平成9年12月29日(1997.12.29)
(33)優先権主張国　オーストリア(AT)

(73)特許権者　599065370
デーエスエム・ファイン・ケミカルズ・オーストリア・ナッハフォルゲル・ゲゼルシヤフト・ミト・ベシユレンクテル・ハフツング・ウント・コンパニー・コマンデイトゲゼルシヤフト
オーストリア国、４０２１リンツ、ザンクト・ペーター－　ストラーセ、２５
(74)代理人　100069556
弁理士　江崎　光史
(74)代理人　100092244
弁理士　三原　恒男
(74)代理人　100093919
弁理士　奥村　義道

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酵素による（Ｓ）－シアノヒドリンの製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

アルデヒドまたはケトンを天然のまたは組換え（Ｓ）－ヒドロキシニトリルーリアーゼの存在下にシアニド基供与体と反応させることによって光学活性シアノヒドリンの（Ｓ）－エナンチオマーを製造する方法において、

ａ）水と混和しないかまたは僅かに混和する有機系希釈剤に溶解したアルデヒドまたはケトン、

ｂ）（Ｓ）－ヒドロキシニトリルーリアーゼ水溶液および

ｃ）シアニド基供与体

より成る反応混合物をエマルジョンが生じる様に５００Ｗ／ｍ^3 以上の攪拌エネルギーで攪拌し、このエマルジョンを攪拌によって反応の終わりまで維持し、次いで対応する（Ｓ）－シアンヒドリンを反応の終了後に相分離によって反応混合物から分離することを特徴とする、上記方法。

【請求項２】

脂肪族－、芳香族－またはヘテロ芳香族アルデヒドまたは非対称ケトンを反応させる請求項１に記載の方法。

【請求項３】

添加されるシアニド基供与体がシアン化水素酸である請求項１に記載の方法。

【請求項４】

使用されるヒドロキシニトリルーリアーゼがマニホットーエクスレンタ(Manihot escul

enta）またはパラゴム樹（Hevea brasiliensis）からの天然の（Ｓ）－ヒドロキシニトリルーリアーゼ、またはピヒアーパストリス(Pichia pastoris）またはビール酵母菌（Saccharomyces cerevisiae）から製造される組換え（Ｓ）－ヒドロキシニトリルーリアーゼである請求項１に記載の方法。

【請求項５】

使用される希釈剤が水と混和しないかまたは僅かに混和する場合によっては水素化された脂肪族－または芳香族炭化水素、アルコール、エーテルまたはエステルまたは混合物である請求項１に記載の方法。

【請求項６】

使用される希釈剤がメチル第三ブチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、酢酸エチルまたはメチル第三ブチルエーテルとトルエンとの混合物である請求項１に記載の方法。

【請求項７】

反応温度が０℃～３０℃である請求項１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の利用分野】

本発明は、酵素による（Ｓ）－シアノヒドリンの製造方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】

シアノヒドリンは例えばα－ヒドロキシ酸、α－ヒドロキシケトン、および生物活性物質、例えば製薬活性化合物、ビタミンまたはピレトリン類似化合物を得るために使用されるβ－アミノアルコールの合成にとって重要である。

【０００３】

シアンヒドリンの製造はシアン化水素酸（ＨＣＮ）をアルデヒドまたは非対称ケトンのカルボニル基に付加することによって行なうことができ、その際に非対称のシアンヒドリンのエナンチオマー混合物が生じる。

【０００４】

一般に生物活性エナンチオマー混合物中の二種類のエナンチオマーの一方だけが生物活性を示すので、光学活性シアンヒドリンの（Ｓ）－エナンチオマーをできるだけ高純度で製造する方法を見出す試みが尽くされてきた。

【０００５】

例えば Makromol. Chem. 186, (1985)、1755-62 には、アルデヒドを触媒としてのベンジルオキシカルボニルー（Ｒ）－フェニルアラニンー（Ｒ）－ヒスチジンメチルエステルの存在下にシアン化水素酸と反応させることによって（Ｓ）－シアノヒドリンを得る方法が開示されている。しかしながら得られる（Ｓ）－シアノヒドリンの光学的純度は極めて不満足なものである。

【０００６】

ヨーロッパ特許出願公開（Ａ）第３２６、０６３号明細書には、脂肪族－、芳香族－またはヘテロ芳香族アルデヒドまたはケトンとシアン化水素酸とを甘扁桃（prunus amygdalis）からの（Ｒ）－オキシニトリラーゼ（ＥＣ　４．１．２．１０）またはモロコシ属ビオカラー(Sorghum biocolor)からのオキシニトリラーゼ（ＥＣ　４．１．２．１１）の存在下に反応させることによって光学活性の（Ｒ）－または（Ｓ）－シアンヒドリンを酵素的に製造する方法が開示されている。脂肪族（Ｓ）－シアノヒドリンの立体特異的製法の例は記載されていない。ヨーロッパ特許出願公開（Ａ）第３２６、０６３号明細書にモロコシ属ビオカラー(Sorghum biocolor)からのオキシニトリラーゼの存在下にシアン化水素酸を使用したのでは脂肪族の（Ｓ）－シアノヒドリンを製造できないことを開示した発明者によってAngew. Chemie 102 (1990),No.4,第 423-425頁にこのことが言明されているので、驚くべきことではない。この発見は F.Effenberger等によって、Tetrahedron Letters Vol. 31 、No.9 (1990) 、第1249-1252 頁で確認されている。

【０００７】
更にヨーロッパ特許出願公開（Ａ）第６３２，１３０号明細書には、脂肪族アルデヒドまたは非対称脂肪族ケトンを立体特異的にシアン化水素酸またはパラゴム樹（ Hevea brasiliensis ）からのオキシニトリラーゼと反応させて（Ｓ）－シアノヒドリンを得る方法が開示されている。この反応は、有機溶剤がヨーロッパ特許出願公開（Ａ）第６３２、１３０号明細書に記載されている様に酵素の活性を速やかに抑制するので、ヨーロッパ特許出願公開（Ａ）第６３２，１３０号明細書に従って好ましくは有機溶剤を加えてない水性希釈状態で実施する。
【０００８】
今日まで知られているこれらの方法は大抵は相当に薄めた状態で、水性系または有機系または二相系で実施された。しかしながらこのやり方は多くの原料物質にとって不利である。例えば３－フェノキシベンズアルデヒドまたは４－フルオロ－３－フェノキシベンズアルデヒドまたは種々のケトン類は好ましくない物質であり、満足な収率で良好な光学的純度のシアノヒドリンを製造するためには多量の酵素を使用する必要がある。
【０００９】
　沢山のカルボニル化合物、例えば脂肪族－、脂環族－、不飽和－、芳香族置換された脂肪族－、芳香族－およびまたヘテロ芳香族アルデホドおよびケトンから対応するシアノヒドリンを高収率および光学的高純度で得る反応が、従来に比較してより濃厚な状態で、そして反応をエマルジョン状態で実施する場合にはより僅かな酵素使用量で実施できることは予期できなかった。多くの蛋白質の場合には失活してしまうエマルジョンの条件、例えば高攪拌エネルギーのもとでの酵素活性が安定していることは予期できなかった。
【００１０】
【発明の構成】
　それ故に本願発明は、アルデヒドまたはケトンを天然のまたは組換え（Ｓ）－ヒドロキシニトリルーリアーゼの存在下にシアニド基供与体と反応させることによって光学活性シアノヒドリンの（Ｓ）－エナンチオマーを製造する方法において、
ａ）水と混和しないかまたは僅かに混和する有期系希釈剤に溶解したアルデヒドまたはケトン、
ｂ）（Ｓ）－ヒドロキシニトリルーリアーゼ水溶液および
ｃ）シアニド基供与体
より成る反応混合物をエマルジョンが生じる様に攪拌し、このエマルジョンを攪拌によって反応の終わりまで維持し、次いで対応する（Ｓ）－シアンヒドリンを反応の終了後に相分離によって反応混合物から分離することを特徴とする、上記方法に関する。
【００１１】
　本発明の方法で使用される出発物質はアルデヒドまたはケトン、シアニド基供与体、天然のまたは組換えヒドロキシニトリルーリアーゼ（Ｈｎｌ）および水と混和しないかまたは僅かしか混和しない有機系希釈剤である。
【００１２】
ここにおいてアルデヒドとは脂肪族－、芳香族－またはヘテロ芳香族アルデヒドを意味する。そして脂肪族アルデヒドとは飽和－または不飽和脂肪族の直鎖状の、枝分かれしたまたは脂環式アルデヒドを意味する。有利な脂肪族アルデヒドは直鎖状アルデヒド、特に炭素原子数２～１８、中でも炭素原子数２～１２のものであり、これらは飽和でもまたは単一－または多重不飽和でもよい。その際、アルデヒドはＣ－Ｃ二重結合およびＣ－Ｃ三重結合を有していても良い。あるいは非置換でも、または反応の条件のもとで不活性である基、例えば場合によっては置換されたアリールーまたはヘテロアリール基、例えばフェニルーまたはインドリル基、またはハロゲン原子、エーテル基、アルコール基、アシル基、カルボン酸基、カルボン酸エステル基、ニトロ基またはアジド基で置換されていてもよい。
【００１３】
芳香族－またはヘテロ芳香族アルデヒドの例にはベンズアルデヒドおよび色々に置換され

たベンズアルデヒド、例えば３，４－ジフルオロベンズアルデヒド、３－フェノキシベンズアルデヒド、４－フルオロ－３－フェノキシベンズアルデヒド、および更にフルフラール、アントラセン－９－カルボアルデヒド、フラン－３－カルボアルデヒド、インドール－３－カルボアルデヒド、ナフタレン－１－カルボアルデヒド、フタルアルデヒド、ピラゾール－３－カルボアルデヒド、ピロール－２－カルボアルデヒド、チオフェン－２－カルボアルデヒド、イソフタルアルデヒドまたはピリジンアルデヒド類等がある。

【００１４】

ケトン類としてはカルボニル炭素原子が不均等に置換されている脂肪族－、芳香族－またはヘテロ芳香族ケトンがある。脂肪族ケトンは飽和または不飽和の直鎖状の、枝分かれしたまたは環状ケトンがある。ケトンは飽和でもまたは単一－または多重不飽和でもよい。これらは非置換でも、または反応の条件のもとで不活性である基、例えば場合によっては置換されたアリール－またはヘテロアリール基、例えばフェニル－またはインドリル基、またはハロゲン原子、エーテル基、アルコール基、アシル基、カルボン酸基、カルボン酸エステル基、ニトロ基またはアジド基で置換されていてもよい。

【００１５】

芳香族－またはヘテロ芳香族ケトンの例にはアセトフェノン、インドリルアセトン等がある。

【００１６】

本発明に従う方法に適するアルデヒドおよびケトンは公知であり、慣用の方法で製造できる。

【００１７】

シアン化水素酸はシアニド基供与体として添加する。シアン化水素酸はこの場合、それの塩の１種類、例えばＮａＣＮまたはＫＣＮから反応の直前にだけ放出されそして反応混合物に未希釈の状態でまたは溶解した状態で添加することができる。

【００１８】

ヒドロキシニトリルーリアーゼ（Ｈｎｌ）としては天然の（Ｓ）－ヒドロキシニトリルーリアーゼ、例えばキャッサバ（cassava)およびパラゴム樹（Hevea brasiliensis）からのものおよび組換え（Ｓ）－Ｈｎｌがある。天然のＨｎｌとしてはパラゴム樹（Hevea brasiliensis）またはマニホットーエスクレンタ(Manihot esculenta）からのＨｎｌを使用するのが有利である。適する組換え（Ｓ）－Ｈｎｌは例えば遺伝子変異微生物、例えばピヒアーパストリス(Pichia pastoris）またはビール酵母菌（Saccharomyces cerevisiae）から得られる。ピヒアーパストリス(Pichia pastoris）からの組換え（Ｓ）－Ｈｎｌを使用するのが有利である。

【００１９】

メチロトロフェン酵母（Methylotrophic yeast）のピヒアーパストリス(Pichia pastoris）を官能的に過剰表現すると、このＨｎｌは如何なる所望の量でも得ることができる（M. Hasslacher 等、J. Biol. Chem. 1996, 271, 第5884頁）。この表現システムは高い細胞密度で発酵させるのに特に適している。例えば１Ｌの発酵媒体当り約２０ｇの純粋酵素を得ることが可能である。精製した組換え蛋白質の達成可能な比活性度は、パラゴム樹（Hevea brasiliensis）の木の葉から単離された天然の酵素のそれの約２倍である。細胞の崩壊後にシトソル(cytosolic)-フラクションを更に精製することなしに使用することができ、それによって作業経費が最小限にされる。酵素はグリコシル化されておらず、そして蛋白質部分を崩壊させる際に不活性化に導く配合団を有していない。

【００２０】

Ｈｎｌは、活性を著しく損失することなしに数日の間室温で使用することができ、－２０℃で十分に長期間安定している。結果として同じ酵素バッチを繰返使用することが可能である。この酵素は要するに溶剤に対しての高い安定性にも特徴がある。それ故に、エマルジョンの生成を許容する色々な有機溶剤を酵素反応に使用することが可能である。このことは個々の方法の再現性に有利に作用する。

【００２１】

ヒドロキシニトリルーリアーゼは精製した状態でまたは非精製状態でそのまままたは固定して使用することができる。ヒドロキシニトリルーリアーゼは製造できそして例えば硫酸アンモニアでの沈殿処理および続いてのゲル濾過によって例えば D.Selmar 等、Physiologia Plantarum 75 (1989) 、第97-101頁に従って精製することができる。

【００２２】

使用可能な有機系希釈剤は水と混和しないかまたは僅かだけ混和する脂肪族－または芳香族炭化水素および場合によってはハロゲン化されたアルコール、エーテルまたはエステルまたはそれらの混合物である。

【００２３】

特にメチル第三ブチルエーテル（ＭＴＢＥ）、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテルおよび酢酸エチルまたはＭＴＢＥとトルエンとの混合物を使用するのが有利である。

【００２４】

１ｇのアルデヒドまたはケトン当り約０．１～１０ｇの希釈剤および１０～１０，０００ＩＵ、特に約５０～２０００ＩＵのヒドロキシニトリル活性リアーゼを添加する。

【００２５】

ＩＵ（国際単位）は、１分当りに１μモルの生成物を生成する触媒作用をする酵素の生産量を示している。必要とされる個々のヒドロキシニトリルーリアーゼの量は活性試験、例えば Selmar 等、Analytical Biochemistry 166 (1987)、第208-211 頁に従って精製する。

【００２６】

使用されるアルデヒド基またはケト基１モル当り少なくとも１モル、好ましくは１～５モル、特に好ましくは１～２モルのシアニド基供与体を添加する。

【００２７】

本発明の方法では、アルデヒドまたはケトンは有機系希釈剤に溶解されて存在している。酵素は水性の緩衝溶液の状態でこの溶液に添加される。この溶液のｐＨは７以下、好ましくは３～６．５である。

【００２８】

こうして得られる反応混合物をエマルジョンが得られる様に０℃～約３０℃の温度で攪拌する。そのためにこの場合に必要とされる攪拌機速度（Ｎ）は使用される攪拌機のいわゆる出力値（P_0）、攪拌機の直径（ｄ）、反応容積（Ｖ）および反応媒体の密度（ρ）に左右される。攪拌エネルギー、即ち反応容積（反応混合物の容量であり、装置の容積ではない）当りの攪拌機出力はこれらのファクターから算出できる。

【００２９】

$$P/V = \frac{P_0 \cdot \rho \cdot N^3 \cdot d^5}{V}$$

本発明の方法での攪拌エネルギーは５００W/m^3以上、殊に１０００W/m^3以上であるのが有利である。これに比較して水性系、有機系または二相系で行なわれる今日まで知られている方法では、約１００W/m^3の攪拌エネルギーしかである。

【００３０】

反応混合物がエマルジョンとして存在する場合に、シアニド基供与体を添加する。エマルジョンは攪拌によって反応の終わりまで維持する。この場合、反応の過程はアルデヒド含有量の減少に基づき測光器で監視することができる。

【００３１】

出発物質に依存して、測定は出発物質は吸収するが得られるシアノヒドリンは吸収しない波長について実施する。反応混合物の吸収は転化率の上昇に比例して減少する。

【００３２】

シアン化水素酸の塩を使用する場合には、シアン化水素酸を最初に例えばH_2SO_4また

はH_3 PO_4 を添加することによって塩の溶液から遊離してもよい。

【００３３】

シアン化水素酸のこの溶液のｐＨは７以下、好ましくは４～６．５であるべきである。

【００３４】

酵素水溶液、有機系希釈剤およびアルデヒドまたはケトンを次いでシアン化水素酸溶液に添加し、反応を開始しそして必要な場合にはｐＨを再調整する。

【００３５】

この他に、エマルジョンが生じる様に反応混合物を攪拌しそして反応の終わり頃まで攪拌によって維持する様に注意する必要がある。

【００３６】

反応混合物を後処理しそして生じるシアンヒドリンを単離するために、エマルジョンを初めて解乳化する慣用の技術、例えば濾過、遠心分離または合体処理を使用する。次いで生じた相を、場合によっては解乳化剤を添加して分離しそして生成物含有相を後処理する。

【００３７】

適当なシアンヒドリンを得るために最終生成物次第で公知の技術、例えば蒸留、抽出または結晶化処理をここで使用する。こうして得られるシアンヒドリンは場合によっては、後続の加工の前に酸の添加によって安定化してもよい。

【００３８】

【実施例】

実施例１～８：（Ｓ）－３－フェノキシベンズアルデヒド－シアノヒドリンの製造

実施例１

ａ）１５ｇ（０．０７５６モル）のｍ－フェノキシベンズアルデヒドを４５ｍＬのＭＴＢＥに溶解し、六枚羽根攪拌機を備えた１５０ｍＬの二重ジェケット式容器中に導入しそして反応混合物を１５℃にする。

【００３９】

２６．４ｍＬの酵素［ピヒアーパストリス(*Pichia pastoris*) からのＨｎｌ：未希釈の細胞レイゼートを遠心分離した上澄み］を、３３．６ｍＬの脱イオン水（ｐＨ５．８）に１．５ｇのソルビトールを溶解した溶液に混入し、希釈クエン酸溶液を用いてｐＨ５．５に調整しそして反応器に導入する。次いで３×５ｍＬのＨＣＮを３方向タップを備えたシリンジを介して添加する。この反応溶液はこの過程の間に既に６００回転／分で攪拌されている。

【００４０】

反応の間に、反応混合物がエマルジョンの状態で存在する様に８００回転／分で攪拌する。反応の過程をアルデヒド含有量の減少に関連してＩＰにより監視する（３０４ｎｍの吸光度）。この目的のために０．５～１ｍＬの反応溶液を除き、規定の反応時間の後に遠心分離処理する。１００μＬの有機相をＭＴＢＥで１０ｍＬに希釈し、それの２５０μＬを再びＭＴＢＥで１０ｍＬに希釈して、総希釈度を１００×４０＝４０００倍に相当する。

【００４１】

反応の終わり頃（転化率＞９５％）に吸光度は非常に小さくなり、正確さを高めるために二回目の希釈段階を省く。即ちこの場合の吸光度が転化率を計算する前に２回目の希釈ファクター（４０）で割る。

【００４２】

転化率（ｔ）＝［１－（吸光度（ｔ）／吸光度（出発））］×１００％

次の転化率が算出される：

反応時間	転化率
0	0
30	70
60	85
90	95
120	95・・・吸光度が既に非常に小さく、反応は停止している。

【0043】
（反応の終わりでの伝導率０．８ｍＳ）
ｂ）上記の反応を繰り返すが、１０００回転／分で攪拌する。
【0044】

反応時間	転化率
0	0
60	90
90	＞95
120	＞95・・・吸光度が既に非常に小さく、反応は薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）によると反応は９８％まで行なわれている。

【0045】
（反応の終わりでの伝導率０．７ｍＳ）
ｃ）比較のために上記の反応を更に繰り返すが、たった４００回転／分で攪拌する。
【0046】

反応時間	転化率
0	0
30	30
60	70
90	75

（反応の終わりでの伝導率０．８ｍＳ）
これらの３つのバッチの攪拌エネルギーは次の式で計算した：

$$P/V = \frac{P_0 \cdot \rho \cdot N^3 \cdot d^5}{V}$$

P_0：攪拌機の出力値、
ρ：密度［kg/m^3］
Ｎ：攪拌機速度［ｒｐｍ］
ｄ：攪拌機の直径（ｍ）
Ｖ：反応容積［m^3］

実施例１	回転数	撹拌エネルギー [W／m³]	
a	800	588	P_0・・・3
b	1000	1146	d.・・・0．5
c	400	73	V・・・134mL

実施例２

実施例１と同様に２２５ｍＬのＭＴＢＥに７５ｇ（０．３７８モル）のｍ－フェノキシベンズアルデヒドを溶解した溶液および１３２ｍＬの酵素溶液を、六枚羽根攪拌機を備えた７５０ｍＬの二重ジェケット式容器中で７３ｍＬ（１．８９モル）のＨＣＮと反応させる。

【００４７】

エマルジョンを得るために攪拌を７７０回転／分で実施する。これは約１１５０Ｗ／ｍ^{3}の攪拌エネルギーに相当する。

【００４８】

反応時間	吸光度	転化率
0		0
30	0．499	80
60	0．1	>95
90		>98

（１．５時間後に反応が完了する）

後処理：

１５０ｍＬの反応混合物を７５ｍＬのＭＴＢＥと一緒に震盪し、ガラスウールが充填されたカラム（高さ：９ｃｍ、直径３ｃｍ）に低圧で通す。流出液は透明な有機相および黄色の僅かに濁った水性相とより成る。次いで別の未希釈の反応混合物３００ｍＬを次いで同じカラムに通し、透明な相分離物を同様に得る。少量の固体がカラムで富化し、そを水およびＭＴＢＥで除く。次いで相分離のために再びカラムが使用できる。

【００４９】

ＭＴＢＥ相を集めそして回転式蒸発器で濃縮する。

【００５０】

残留物：（Ｓ）－３－フェノキシベンズアルデヒド－シアノヒドリン（ＳＣＭＢ）５２．７ｇ（９２％）。

【００５１】

実施例３

１３．８ｇ（０．２８モル）のＮａＣＮを１２ｍＬの脱イオン水に溶解し、丸底フラスコに入れそして水で濯ぐ（９０ｍＬになる）。１０％のH_2SO_4を滴加ロートから氷で冷しながら添加して５．６のｐＨにする。こうして得られる混合物を、六枚羽根攪拌機を備えた７５０ｍＬの二重ジェケット式容器中に導入する。２６．４ｍＬの酵素［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ：未希釈の細胞ライゼートを遠心分離した上澄み：８５０ＩＵ／ｍＬ］を水で１３０ｍＬに希釈しそして同様に反応器に導入する。この反応混合物のｐＨを５．５に再度調整し、１８０ｍＬのＭＴＢＥおよび３１ｇ（０．１５６モル）のｍ－フェノキシベンズアルデヒドを添加しそして反応を開始する。攪拌は５００回転／分（３．８ｋＷ／ｍ^3）で実施し、エマルジョンを得る。反応の過程を再び吸光測定により監視する。

【００５２】

反応時間	吸光度	転化率
0		
60	0．129	約70
120	0．079	約85
180	0．060	約90

実施例４
実施例３と同様に、６．９ｇ（０．１４１モル）のＮａＣＮ、１５．５ｇ（０．０７８１モル）のｍ－フェノキシベンズアルデヒド、４５ｍＬのＭＴＢＥ中２６．４ｍＬの酵素（８５０ＩＵ／ｍＬ）および１６．１ｍＬの水を、六枚羽根攪拌機を備えた１５０ｍＬの二重ジェケット式容器中でｐＨ５．６（１０％濃度H_2SO_4を使用して調整）で反応させる。この反応混合物をエマルジョンが生じる様に攪拌する。
【００５３】
攪拌速度は最初に１０００回転／分である。攪拌機の寸法から、反応装置の表示出力は１８６０回転／分に初めて達することが算出される。この回転数は２．５時間後にこの値に増加する。
【００５４】

反応時間	吸光度	転化率
0		
60	0．49	
120	0．36	60－65
180	0．20	約80
240	0．07	約90－95

１５０分後にこの攪拌機速度に増加する結果として、反応が著しく早められる。
【００５５】
実施例５
実施例４と同様に、１３．８ｇ（０．２８モル）のＮａＣＮ、３１ｇのｍ－フェノキシベンズアルデヒド、４５ｍＬのＭＴＢＥ中２６．４ｍＬの酵素および２２０ｍＬの水を、六枚羽根攪拌機を備えた７５０ｍＬの二重ジェケット式容器中でｐＨ５．６（１０％濃度H_2SO_4を使用して調整）で反応させる。この反応混合物をエマルジョンが生じる様に再び攪拌する。攪拌速度は５５０回転／分である（実際の反応容積について計算して５．１ｋＷ／m^3）。
【００５６】

反応時間	吸光度	転化率
０		
９０	０．２０	約７０
１６５	０．０４７	約９０
２１０	０．０４１	約９５

後処理をガラス製カラムに通すことによって実施する：
生成物を溶剤を留去することによって純粋な状態で得る。分析用サンプルを採取し、ジクロロメタン中での塩化アセチルとの反応によって慣用の方法でアセチル化しそしてその残留アルデヒド含有量およびそのエナンチオマー過剰量をガスクロマトグラフィーカラムでのクロマトグラフィーによって測定する：
ＧＣ分析：転化率９７％
ｅ．ｅ．９８％

実施例６
８８ｍＬの酵素（８５０ＩＵ／ｍＬ）を１１２ｍＬの水と混合し、０．１％濃度のクエン酸によってｐＨ５．５に調整しそして六枚羽根攪拌機を備えた７５０ｍＬの二重ジェケット式容器中に導入する。５０ｇ（０．２５２モル）のｍ－フェノキシベンズアルデヒドを１５０ｍＬのＭＴＢＥに溶解しそして酵素溶液に添加する。反応混合物を１５℃とし、エマルジョンが存在する様に５００回転度／分（６ｋＷ／m^3）で攪拌する。１２．３ｇ（０．４５４モル）のＨＣＮを滴加ロートを通して３０分の間に添加する。反応の過程を再び測光分析によって監視する。
【００５７】

反応時間	吸光度	転化率
0		
３０	０．７９５	約３０（滴加の終わり）
９０	０．２２７	約７５
１５０	０．０７９	約９２
１８０	０．０５７	約９５
２４０		約９８（ＴＬＣ）

反応混合物をガラスウールの充填されたカラムで相分離することによって後処理する。
【００５８】
ＧＣ分析：転化率　９８％
ｅ．ｅ．９９％

実施例７
パラゴム樹 (Hevea brasiliensis) からの４ｇの天然（Ｓ）－ヒドロキシニトリルーリアーゼ（Ｈｎｌ）を１００ｍＬのクエン酸ナトリウム緩衝液（５ｍｍｏｌ）に懸濁させ、室温で２．５時間攪拌しそして遠心分離しそして上澄み液を回転式蒸発器（３０℃、１ｍｂａｒ）で１０ｍＬに濃縮する。活性（３４８ＩＵ／ｇ）を測定した後に、酵素を２５ｍＬの丸底フラスコに移し、そして１ｇ（５ｍｍｏｌ）のｍ－フェノキシベンズアルデヒドおよび１．５ｍＬの第三ブチルメチルエーテル（ＭＴＢＥ）を添加する。
【００５９】
こうして得られた反応混合物を次いで約１ｋＷ／m^3 の攪拌エネルギー（マグネットスターラー）のもとでエマルジョンが生ずるまで０～５℃で攪拌する。０．３ｍＬのＨＣＮ（７．７ｍｍｏｌ）を次に迅速に滴加しそして攪拌エネルギーを低下させることなく攪拌を０～５℃で２３時間継続する。
【００６０】
反応の過程をｍ－フェノキシベンズアルデヒド含有量の減少をチェックするＩＰにより監視する（３０４ｎｍで測光的に測定する）。
【００６１】
反応溶液を反応の完了後に遠心分離し、酵素を除きそして残留溶液を２．５ｍＬのＭＴＢＥで希釈し、震盪しそして再び遠心分離する。
【００６２】
（Ｓ）－３－フェノキシベンズアルデヒドーシアノヒドリンが有機相に残留物として残る。（ｅ．ｅ．＝９０．６％、純度９１．４％）（ガスクロマトグラフィーで測定）。
【００６３】
転化率は２３時間後に９２．７％である。
【００６４】
比較実験

Tetrahedron 、第52巻、No.23 、第7833-7840 頁と同様に、（Ｓ）－３－フェノキシベンズアルデヒドを、ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌを使用して、ｍ－フェノキシベンズアルデヒドとＫＣＮとの反応によって水性クエン酸緩衝液（ｐＨ＝４．０～４．５）（ＨＣＮはその場で製造）中で製造する。この場合、攪拌エネルギーは約１００ｋＷ／$ｍ^3$ である。

【００６５】

（Ｓ）－３－フェノキシベンズアルデヒドがｅ．ｅ．＝９９％の光学純度で得られるが、収率は９％である。

【００６６】

実施例８

１２．５ｍＬのＭＴＢＥに４５．６ｇ（０．２３モル）のｍ－フェノキシベンズアルデヒドを溶解した溶液、１２．５ｍＬのトルエンおよび５２．９ｍＬの蒸留水および１２．５ｍＬの酵素［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ：５．２ｋＵ／ｍＬ］を、バッフル、パーフューサーポンプ（perfusor pump)、冷却器、温度計およびＫＰＧ攪拌機（３ｃｍ）を備えた不活性化された１００ｍＬのＳｃｈｍｉｚｏ装置中に充填し、こうして得られる反応混合物を約２０℃の温度に維持する。

【００６７】

この反応混合物を９５０回転／分（３．２ｋＷ／$ｍ^3$ の攪拌エネルギー）で攪拌してエマルジョンを製造する。

【００６８】

次いでエマルジョンを得た後に、１２．６ｍＬのシアン化水素酸（$Ｈ_2$ $ＳＯ_4$ を用いてＮａＣＮから放出される）を６０分に渡って継続的に計量供給する。

【００６９】

このエマルジョンを強力攪拌（９５０回転／分）の下で２．５時間保持する。反応の過程をアルデヒドの含有量の減少をチェックするＩＰにより監視する。

【００７０】

反応時間	吸光度	アルデヒド含有量
滴加の終了１時間後	０．９７８	＞３０　％
１．５時間	０．３９６	１０．３％
２　時間	０．２１３	５．６％
２．５時間	０．１３６	３．１％

反応溶液を後処理するために、更に２５ｍＬのＭＴＢＥおよび２５ｍＬのトルエンを添加しそして２０分攪拌する。

【００７１】

反応混合物を室温で夜通し放置する。

【００７２】

１５時間の放置時間の後のＩＰチェックで１．８％のアルデヒド含有量が測定された。

【００７３】

次いでこの反応溶液を３０分間、３０００回転／分で遠心分離処理し、上澄み有機相を吸引濾過しそして２５０ｍＬの丸底フラスコに移す（有機相１：８３．５５ｇ）。水性相を反応器に戻し、更に２５ｍＬのＭＴＢＥおよび２５ｍＬのトルエンを添加しそして９００回転／分で２０分攪拌する。次いでこの混合物を３０分遠心分離する。

【００７４】

一緒にした有機相中に残留物としてＳＣＭＢが残る。

【００７５】

（ｅ．ｅ．９８％、転化率：９２％）

実施例９（Ｓ）－４－フルオロ－３－フェノキシベンズアルデヒド－シアンヒドリン

実施例８と同様に、４０ｍＬのＭＴＢＥ中の１０．８ｇ（０．０５モル）の４－フルオロ－３－フェノキシベンズアルデヒドおよび１５ｍＬの酵素［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ：５．２ｋＵ／ｍＬ］を含有する２０ｍＬの水を８ｍＬのＨＣＮ

（硫酸によってＮａＣＮから遊離したもの）と１０～１５℃で反応させる。シアン化水素酸を３０分にわたって継続的に計量供給する。エマルジョンを得るために調整された撹拌速度は９５０回転／分である。

【００７６】

反応時間 （計量供給の終わり）	アルデヒド含有量 （反応終了するまで）
１時間	＞５０％
４時間	＞３０％

４時間後に撹拌速度を５００回転／分に落とし、反応混合物を１２－１５℃で１５時間撹拌する。全部で２０時間の後に、アルデヒド含有量は＞５％である。反応溶液を測定用シリンダーに流し込み（収量：６８．７２ｇ）、次いで３０００回転／分で２０分遠心分離する。有機相を取り出し（有機相１）、水性相を反応器に移し、２０ｍＬのＭＴＢＥで処理しそして９００回転／分で２０分撹拌する。次いで再び２０分間遠心分離し、有機相を引き出しそして有機相１と一緒にする。

【００７７】

一緒にした有機相を次いで回転式蒸発器で濃縮する。

収量：１１．４５ｇの（Ｓ）－４－フルオロ－３－フェノキシベンズアルデヒド－シアンヒドリン

（理論値：１２．１１ｇ）９４．５５％

ｅ．ｅ．：９５．４３％

<u>実施例１０</u>：（Ｓ）－３，４－ジフルオローベンズアルデヒド－シアノヒドリン

実施例８と同様に、４０ｍＬのＭＴＢＥ中の８．２ｇ（０．０５モル）の３，４－ジフルオロベンズアルデヒド、２０ｍＬのH_2 Ｏおよび１５ｍＬの酵素［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ：５．２ｋＵ／ｍＬ］を、１０～１５℃で９ｍＬのシアン化水素酸（ＮａＣＮから遊離される）と反応させる。

【００７８】

撹拌速度は再び９５０回転／分である。

【００７９】

この時にシアン化水素酸を１度に添加する。反応の過程はチェックするＩＰによって監視する。

【００８０】

３．５時間の反応時間の後に、アルデヒドはかろうじて検出でき、４．５時間後にアルデヒドの更なる変化は認められない。

【００８１】

反応溶液（６２．５ｇ）を実施例９と同様に後処理する。

【００８２】

収量：８．２５ｇ（９７．７４％）の（Ｓ）－３，４－ジフルオローベンズアルデヒド－シアノヒドリン（理論値８．４４ｇ）

ｅ．ｅ．：９５．６１％

<u>実施例１１</u>：

８ｍｍｏｌの３－メチル－２－ブタノン（８６０μｌ）を２．４ｍＬのメチル第三ブチルエーテルに溶解し、０℃に冷却する。７５０ＩＵの酵素水溶液［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ］の添加後（有機相と水性相との比は０．７５：１．０であり、クエン酸でｐＨ４．０に調整してある）、反応容器を耐圧密封し、エマルジョンが生じる様に撹拌する。４０ｍｍｏｌ（１．５２ｍＬ）のシアン化水素酸を０℃で添加し、次いで撹拌し続ける。反応の過程をＣ＝Ｏ結合（１７２０ｃｍ$^{-1}$）の減少をチェックするＩＲ分光分析によって監視する。３－メチル－２－ブタノンは２分後に完全に反応している。

【００８３】
反応溶液の相を分離し、水性相をＭＴＢＥで数度処理し、こうして得られるＭＴＢＥ溶液を一緒にする。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥しそして溶剤を４０℃、２０ｍｂａｒで留去する。
【００８４】
（Ｓ）－２－ヒドロキシ－２，３－ジメチルブタンニトリルが残留物として残る。
【００８５】
ｅ．ｅ．＝９８％（ガスクロマトグラフィーで測定）
転化率は９９％である。
【００８６】
実施例１２：
１２５０μＬの４－メチル－２－ペンタノン（１０ｍｍｏｌ）を攪拌下に3ｍＬのメチル第三ブチルエーテルに溶解し、０℃に冷却する。３．９ｍＬ（５８５ＩＵ／ｍｍｏｌ）の酵素水溶液［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ］を添加する。この酵素溶液をクエン酸を用いて予めｐＨ＝４．５に調整する。この混合物を５－１０分攪拌する。エマルジョンの生成後に５０ｍｍｏｌ（１．９ｍＬ）の無水シアン化水素酸を一度に速やかに添加し、反応容器を耐圧密封し、そしてこの混合物を０℃で５分攪拌する。次いでこの反応溶液の各相を分離し、水性相をメチル第三ブチルエーテルで数回処理しそしてこうして得られるＭＴＢＥ溶液を一緒にする。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥しそして溶剤を減圧下に除く。
【００８７】
（Ｓ）－２－ヒドロキシ－２，４－ジメチルペンタンニトリルが残留物として残る。
【００８８】
ガスクロマトグラフィー分析で＞９９％のエナンチオマー過剰が判明し、ＩＲスペクトロスコピーは８６％の転化率を明らかにする。
【００８９】
実施例１３：
４．６ｍｍｏｌの２－ペンタノン（４９３μｌ）を２．４ｍＬのメチル第三ブチルエーテルに０℃で攪拌下に溶解する。３．２ｍＬの酵素溶液［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ：１０５０ＩＵ／ｍｍｏｌ］を、クエン酸でｐＨ４．０に調整し、次いで初めて添加する。この後で混合物を５～１０分攪拌し、２５ｍｍｏｌ（９７３μＬ）の無水シアン化水素酸を、得られるエマルジョンに添加する。
【００９０】
反応容器を耐圧密封し、０℃で５分間攪拌する（１０００回転／分）。反応の過程をＣ＝Ｏ結合（１７２０ｃｍ$^{-1}$）の減少をＩＲ分光分析によって監視する。ＩＲ分光分析によると、この時間の後に転化が終了する。反応溶液の各相を互いに分離し、水性相をＭＴＢＥで数度処理し、こうして得られるＭＴＢＥ溶液を一緒にしそして反応溶液に添加する。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥しそして溶剤を４０℃、２０ｍｂａｒで留去する。
【００９１】
（Ｓ）－２－ヒドロキシ－２－メチルペンタンニトリルが残留物として残る。
【００９２】
ｅ．ｅ．＝７４％（ガスクロマトグラフィーで測定）
実施例１４：
１２１０μＬの２－ヘキサノン（１０ｍｍｏｌ）を４ｍＬのメチル第三ブチルエーテルに攪拌下に溶解し、０℃に冷却する。３．９ｍＬの酵素水溶液［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ：５８５ＩＵ／ｍｍｏｌ］の添加後に、反応容器を耐圧密封し、そしてこの混合物をエマルジョンが生じるまで攪拌する。５０ｍｍｏｌ（１．９ｍＬ）の無水シアン化水素酸を一度に速やかに添加し、次いで０℃で５分攪拌する。各反応相を互いに分離し、水性相をメチル第三ブチルエーテルで数回処理しそして一緒にしたＭＴＢＥ溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥しそして減圧下に溶剤を除く。

【００９３】
（Ｓ）－２－ヒドロキシ－２－メチルヘキサンニトリルが残留物として残る。
【００９４】
ガスクロマトグラフィー分析で９８．５％のエナンチオマー過剰および５８．５％の転化率が判った。
【００９５】
実施例１５：
５ｍｍｏｌのアセトフェノン（５８０μｌ）を１．９ｍＬのメチル第三ブチルエーテルに溶解し、０℃に冷却する。２．５ｍＬの酵素溶液［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ：７５０ＩＵ／ｍｍｏｌ］を、クエン酸でｐＨ３．７５に調整し、反応混合物に添加する。次いでこれを５～１０分攪拌する。２５ｍｍｏｌ（９７３μＬ）の無水シアン化水素酸を、得られるエマルジョンに添加する。次いで反応容器を耐圧密封し、０℃で５分間攪拌する。反応の過程をＩＲ分光分析によって監視する。反応溶液の各相を互いに分離する。水性相をメチル第三ブチルエーテルで数度処理し、ＭＴＢＥ溶液を一緒にする。有機相は無水硫酸ナトリウムで乾燥しそして溶剤を減圧下に除く。
【００９６】
（Ｓ）－２－ヒドロキシ－２－メチルフェニルアセトニトリルが残留物として残る。
【００９７】
ｅ．ｅ．＝９９％
ＩＲ分光分析にて転化率３８％が判る。
【００９８】
実施例１６：
５８０μＬのアセトフェノン（５ｍｍｏｌ）を１．９ｍＬのジイソプロピルエーテルに攪拌下に溶解し、０℃に冷却する。２．５ｍＬの酵素水溶液［ピヒアーパストリス(Pichia pastoris) からのＨｎｌ：７５０ＩＵ／ｍｍｏｌ］を添加し、この酵素溶液をクエン酸を使用して予めにｐＨ５．０に調整する。この混合物を５－１０分攪拌し、そしてエマルジョンが生じた後に、２５ｍｍｏｌ（０．９５ｍＬ）の無水シアン化水素酸を一度に速やかに添加する。反応容器を耐圧密封し、この反応溶液を更に５分、０℃で攪拌する。反応溶液の各相を互いに分離し、水性相をメチル第三ブチルエーテルで数回処理しそしてこうして得られるＭＴＢＥ溶液を一緒にする。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥しそして溶剤を減圧下に除く。
【００９９】
２－ヒドロキシ－２－メチルフェニルアセトニトリルが残留物として残る。
【０１００】
ガスクロマトグラフィー分析で９９％のエナンチオマー過剰が判明し、ＩＲ分光分析で４０％の転化率が明らかになる。

フロントページの続き

(74)代理人　100111486
弁理士　鍛冶澤　實
(72)発明者　ペーター・ペヒラウエル
オーストリア国、４０４０　リンツ、プロフエッソル・アントン・ルッツーヴエーク、８
(72)発明者　ミヒヤエル・シユミット
オーストリア国、８１１３　　ザンクト・オスヴアルト、プランケンヴアルト、９４
(72)発明者　イルマ・ヴイルト
オーストリア国、４４７０　　エンス、ゼーフエリヌスストラーセ、４
(72)発明者　ルードルフ・ノイホーフエル
オーストリア国、４２１０　ミッテルトレフリンク、ライトナーストラーセ、４
(72)発明者　アントニア・ツアベリンスカヤー　マッコーヴァ
オーストリア国、８０２０　　グラーツ、バーンホフギュルテル、２３／１
(72)発明者　ヘルフリート・グリーングル
オーストリア国、８０４７　　グラーツ、アルゲノットストラーセ、２３
(72)発明者　コル・ヴアン・デン・ブレク
オランダ国、６３７２　カー・イックス・ラントグラーフ、マリエ・ケネンストラーセ、８
(72)発明者　ラフ・ライントイエンス
オランダ国、４８７１　　ツエーハー・エッテンーロイル、ブラントゼヴエーク、４７
(72)発明者　ヘルマン・イエレ・ヴオリース
オランダ国、６２１５　　エーイヨット・マーストリヒト、ロムルスホーフ、４３

審査官　小金井　悟

(56)参考文献　特開平０５－３１７０６５（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－２１９３８８（ＪＰ，Ａ）
特開平０７－０５１０７６（ＪＰ，Ａ）
Tetrahedron，１９９３年　6月　3日，Vol.52，No.23 ，p.7833-7840
生化学辞典，株式会社東京化学同人，１９９８年１０月　8日，第3版，第３９６頁

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12P　13/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
CAplus(STN)