PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C12M 1/40, C12P 1/00

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 96/11256**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. April 1996 (18.04.96)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01399

(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Oktober 1995 (07.10.95)

(30) Prioritätsdaten:
P 44 36 149.1 11. Oktober 1994 (11.10.94) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen Strasse, D-52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: KRUSE, Wolfgang [DE/DE]; Combahnstrasse 2, D-53225 Bonn (DE). KRAGL, Udo [DE/DE]; Artilleriestrasse 48, D-52428 Jülich (DE). WANDREY, Christian [DE/DE]; Wolfshovener Strasse 139, D-52428 Jülich (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, D-52425 Jülich (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

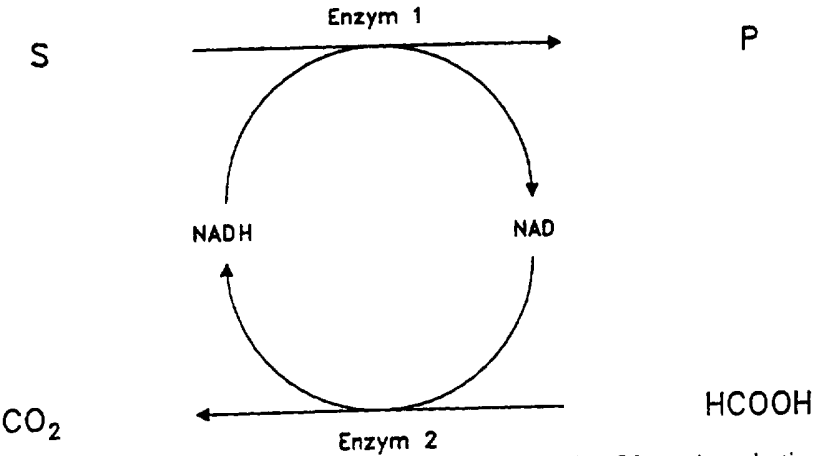
Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROCESS FOR THE CONTINUOUS ENZYMATIC EXTRACTION OF HYDROPHOBIC PRODUCTS AND DEVICE SUITABLE THEREFOR

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KONTINUIERLICHEN ENZYMATISCHEN GEWINNUNG HYDROPHOBER PRODUKTE UND DAFÜR GEEIGNETE VORRICHTUNG

(57) Abstract

The invention concerns the extraction, into an organic solvent, of hydrophobic products from the aqueous product-containing reaction mixture (product flow) of a continuous enzyme-catalyzed process through a microporous product-permeable membrane, whilst the reaction mixture depleted of product is recycled for production purposes. The enzyme-catalyzed reaction occurs in particular in a reactor containing an immobilised enzyme, preferably in the enzyme membrane reactor. In order to separate the product, the product-containing reaction mixture preferably passes through a hollow fibre membrane bundle around which the product-solvent flows externally, in particular in counterflow. The effective pore size of the membrane ranges in particular from 5 to 500 µm and the process is performed in particular at a differential pressure between the aqueous phase and organic solvent of 0.5 to 5 bars. A production circuit incorporating an extraction cartridge, in particular in the form of a hollow fibre membrane bundle, with a product-permeable porous membrane is suitable as a device for carrying out the process.



(57) **Zusammenfassung**

Hydrophobe Produkte werden aus der wäßrigen produkthaltigen Reaktionsmischung (Produktstrom) eines kontinuierlichen enzymkatalysierten Prozesses durch eine produktdurchlässige mikroporöse Membran in ein organisches Lösungsmittel extrahiert, während die produktverarmte Reaktionsmischung zur Produktion rezykliert wird. Die enzymkatalysierte Umsetzung erfolgt insbesondere in einem Reaktor mit darin immobilisiertem Enzym, vorzugsweise im Enzymmembranreaktor. Die produkthaltige Reaktionsmischung wird zur Abtrennung des Produkts vorzugsweise durch ein Hohlfasermembranbündel geschickt, das von außen - insbesondere im Gegenstrom - von Produkt-Lösungsmittel umströmt wird. Die effektive Porengröße der Membran liegt insbesondere im Bereich von 5 bis 500 μm, und es wird insbesondere mit einem Differenzdruck zwischen wäßriger Phase und organischem Lösungsmittel von 0,5 bis 5 bar gearbeitet. Als Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens eignet sich ein Produktionskreis, in den eine Extraktionspatrone - insbesondere in Form eines Holfasermembranbündels - mit produktdurchlässiger poröser Membran einbezogen ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	**GA**	Gabon	**MR**	Mauretanien
AU	Australien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MW**	Malawi
BB	Barbados	**GE**	Georgien	**NE**	Niger
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**NL**	Niederlande
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland	**NO**	Norwegen
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**NZ**	Neuseeland
BJ	Benin	**IE**	Irland	**PL**	Polen
BR	Brasilien	**IT**	Italien	**PT**	Portugal
BY	Belarus	**JP**	Japan	**RO**	Rumänien
CA	Kanada	**KE**	Kenya	**RU**	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**KG**	Kirgisistan	**SD**	Sudan
CG	Kongo	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SE**	Schweden
CH	Schweiz	**KR**	Republik Korea	**SI**	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kasachstan	**SK**	Slowakei
CM	Kamerun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Senegal
CN	China	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tschad
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**TG**	Togo
CZ	Tschechische Republik	**LV**	Lettland	**TJ**	Tadschikistan
DE	Deutschland	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	**MD**	Republik Moldau	**UA**	Ukraine
ES	Spanien	**MG**	Madagaskar	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	**ML**	Mali	**UZ**	Usbekistan
FR	Frankreich	**MN**	Mongolei	**VN**	Vietnam

Beschreibung

Verfahren zur kontinuierlichen enzymatischen Gewinnung hydrophober Produkte und dafür geeignete Vorrichtung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur kontinuierlichen enzymkatalytischen Gewinnung hydrophober Produkte in wäßriger Lösung sowie auf eine dafür geeignete Vorrichtung.

Biotransformationen im allgemeinen und enzymatische Verfahren im besonderen gewinnen zunehmend an Bedeutung für die Synthese von optisch aktiven Substanzen, aber auch für Bulkchemikalien, wobei von der im allgemeinen äußerst selektiven chemischen Wirksamkeit der im wäßrigen Milieu aktiven Enzyme Gebrauch gemacht wird.

Schwierigkeiten entstehen, wenn Substrate umgesetzt werden sollen und Produkte entstehen, die schlecht wasserlöslich sind. Zur Lösung dieses Problems existieren verschiedene Ansätze wie z.B. die Anwendung der Enzyme in auf einem festen Träger immobilisierter Form, der im organischen Lösungsmittel suspendiert wird, der Einsatz der Enzyme in homogener Lösung mit einem wassermischbaren Lösungsmittel oder der Einschluß von Enzymen in Reversmicellen.

Die direkte Gegenwart von organischen Lösungsmitteln (wassermischbar oder nicht wassermischbar) wird nur von wenigen Enzymen vertragen, die zur Klasse der Hydrolasen gehören, (z.B. WO 89/04784). Solche Enzyme werden dabei in der Regel zweidimensional in einer Membran immobilisiert eingesetzt. Unter dem Gesichtspunkt der besseren Katalysatorausnutzung in Bezug auf Aktivität und produktmengen-spezifischem Verbrauch

sowie einer leichteren Handhabung ist ein homogen in Lösung verteilter Katalysator jedoch vorteilhaft.

Da - wie bereits erwähnt - die Gegenwart größerer Mengen organischer Lösungsmittel im Reaktionsraum zur Desaktivierung bzw. Denaturierung der Enzyme führt, wird erfindungsgemäß auf organische Lösungsmittel im Reaktionsraum verzichtet und durch eine direkte kontinuierliche Einspeisung des umzusetzenden Substrats im Reaktionsraum eine Substratkonzentration entsprechend der maximalen Löslichkeit desselben aufrechterhalten und das sich bildende hydrophobe Produkt (zusammen mit Substratresten) aus der Reaktionsmischung über einen selektiven Trennvorgang entfernt (unter Anwendung einer entsprechend produktdurchlässigen Membran von ausreichender Fläche), während die wasserlöslichen Komponenten der Reaktionsmischung unverändert in Lösung bleiben.

Das erfindungsgemäße Verfahren der eingangs genannten Art ist mithin im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß man das Produkt aus der produkthaltigen Reaktionsmischung über eine produktdurchlässige, mikroporöse Membran in ein organisches Lösungsmittel extrahiert und die produkt-verarmte Reaktionsmischung zur Produktion rezykliert.

Als "mikroporös" werden hier perforierte Membranen verstanden mit Porengrößen bis herab zu wenigen nm, insbesondere aber $\geq$ 10 nm. Die Obergrenze ist nicht kritisch. Voraussetzung ist, daß die Phasengrenze stabilisiert wird. So kann mit Porengrößen von 10 µm und darüber eine sichere Arbeitsweise erreicht werden. Die Membrandicke soll - insbesondere bei sehr feinporigen Membranen - für einen intensiven Austausch möglichst gering sein.

Vorzugsweise wird dabei mit einer mikroporösen hydrophoben Membran gearbeitet, speziell mit einem Hohlfasermembranbündel, wodurch große Membranflächen und geringe Flüssigkeitsschichtdicken realisiert werden können, die eine der Geschwindigkeit der enzymatischen Produktbildung angemessene Produktabtrennung zulassen.

Weitere Besonderheiten ergeben sich aus den Patentansprüchen und der nachfolgenden Beschreibung.

Zwar ist aus der DE 40 41 896 C1 ein Verfahren zur enzymatischen Synthese von organischen Verbindungen bekannt, bei dem die im Reaktionsraum gebildete „organische Verbindung" vom Enzym bzw. den Enzymen durch eine Lösungsdiffusionsmembran abgetrennt wird, die funktionelle Gruppen mit selektiver Wechselwirkung zur abzutrennenden Verbindung enthält. Dabei werden z.B. sulfonierte Polymermembranen vorgesehen und die organische Verbindung durch pervaporativen oder pertraktiven Austrag von der Membran abgeführt. Im letzteren Falle erfolgt die "Desorption" mit einer sogenannten Spülflüssigkeit, der z.B. zur Cyanhydrin-Abtrennung Methylenchlorid, Essigsäureanhydrid und alternativ Acethylchlorid zugesetzt werden.

Im Zusammenhang mit dieser Variante zu der seit langem bekannten Selektion von Komponenten mit Hilfe von Membranen wird auf die Nichtporosität derselben besonders hingewiesen, insbesondere unter Bezugnahme auf den Enzym-Membran-Reaktor, bei dem ein Reaktionsgemisch vom höhermolekularen Enzym getrennt wird.

Erfindungsgemäß erfolgt dem gegenüber eine selektive Produktabtrennung eines hydrophoben Produkts aus einer Reaktionsmischung durch eine Abwandlung der Flüssig/Flüssig-Extraktion, bei der eine an Mikroporen gebildete Grenzfläche - insbesondere im Gegenstrom - kontinuierlich erneuert wird.

Grundsätzlich ist die Erfindung durch Anwendung solcher Membranpatronen realisierbar, die in einen Produktionskreislauf eingesetzt werden, in dem die wäßrige Phase rezykliert. Bei einer solchen Ausgestaltung kommt das Enzym an der membranstabilisierten Grenzfläche mit dem organischen Lösungsmittel bei Verwendung mikroporöser Membranen in Kontakt, was gegebenenfalls zu einer Beeinträchtigung der Enzymaktivität führen kann. In solchen Fällen wird zweckmäßigerweise für eine Reaktionszone mit darin immobilisiertem Enzym, zweckmäßigerweise in Form eines Enzymmembranreaktors, gesorgt.

Erfindungsgemäß kann durch direkte Einspeisung der reinen Edukte und Austrag der hydrophoben Produkte eine produktabgereicherte Reaktionsmischung mit darin gelösten Enzymen und Cofaktoren rezykliert werden, was zur Erhöhung der Zykluszahlen und damit zu einer Kostenreduzierung führt.

Besonders vorteilhaft werden erfindungsgemäß Hohlfaserbündel aus hydrophoben Materialien, wie gegebenenfalls fluorierten Kohlenwasserstoffpolymeren, wie insbesondere Polypropylen und Polyäthylen verwendet, deren relativ hohe Porosität und geringe Wandstärke bei relativ kleiner Porenöffnung für eine zweckmäßige Realisierung der Erfindung geeignet sind.

Es werden mikroporöse Membranen angewandt, die hydrophob oder auch hydrophil sein können, vorzugsweise aber hydrophob sein sollten.

Die organische Lösungsmittelphase kommt an der durch die Membran gebildeten Grenzfläche mit der wäßrigen Phase in Kontakt und würde (bei Verwendung einer hydrophoben Membran) in deren Raum übertreten, weshalb für eine relativ geringe positive Druckdifferenz zwischen wäßriger und organischer Phase gesorgt wird.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen sowie eines Durchführungsbeispiels näher erläutert; es zeigen schematisch:

Figur 1: ein Reaktionsschema;

Figur 2: ein Extraktionsmodul;

Figur 3: ein Extraktionsmodul eingebunden in eine erfindungsgemäße Produktionsanlage

Figur 4: eine Anordnung gemäß Fig. 3 gekoppelt mit einer kontinuierlichen Extraktionsmittelrektifikation; und

Figur 5: eine erfindungsgemäße Produktionsanlage mit einem dem Extraktionsmodul vorgeschalteten Enzymmembranreaktor.

In Figur 1 ist eine typische Reaktion gezeigt, die in einer erfindungsgemäßen Anlage durchgeführt werden kann. Ein hydrophobes Substrat S wird in einer durch ein Enzym 1 katalysierten Reaktion zu einem hydrophoben Produkt P umgesetzt. Dazu wird ein Cofaktor, hier NADH, benötigt, der zu NAD abreagiert und in einer zweiten, durch ein Enzym 2 katalysierten Reaktion (Oxidation von Ameisensäure zu CO_2) regeneriert wird.

In Figur 2 wird ein Extraktionsmodul (1) gezeigt, das Bestandteil einer erfindungsgemäßen Anlage sein kann. Hier wird aus einer typischen wäßrigen Produktlösung mit Puffer, nicht umgesetztem Substrat S, durch enzymkatatysierte Reaktion entstandenem Produkt P, Cofaktor in reduzierter (NADH) und oxidierter Form (NAD) und Cosubstrat (in diesem Falle Ameisensäure (HCOOH)) über eine poröse Membran (2) mittels eines hydrophoben Lösungsmittels im Gegenstrom selektiv Substrat S und Produkt P extrahiert. Der Puffer, der Cofaktor (NAD(H)) und das

Cosubstrat (HCOOH) verbleiben aufgrund ihrer Hydrophilie in der wäßrigen Phase.

Die Membran (2) dient zur Stabilisierung der Phasengrenzfläche zwischen hydrophober und wäßriger Phase. Die Auslegung der Membran (2) als Hohlfaserbündel fährt zu großen Phasengrenzflächen, was einen schnellen Stoffübergang befördert.

Um, im Falle einer hydrophoben, porösen Membran das Penetrieren des hydrophoben Lösungsmittels in die wäßrige Phase zu verhindern, muß auf der Seite des wäßrigen Mediums ein Überdruck ($P_2 > P_1$) aufgeprägt werden. Desgleichen muß bei Nutzung einer *hydrophilen*, porösen Membran ein Überdruck ($P_1 \geq P_2$) auf der Seite des hydrophoben Lösungsmittels aufgeprägt werden, um das Austreten der wäßrigen Reaktorlösung in die hydrophobe Phase zu verhindern.

Die in Figur 3 skizzierte erfindungsgemäße Anlage bindet das in Figur 1 dargestellte Extraktionsmodul (1) in einen Reaktorkreislauf (3) ein. Die Reaktionslösung wir durch die Umlaufpumpe (4) im Reaktorkreislauf (3) geführt. Neben den Enzymen (5) enthält die Reaktorlösung vor dem Extraktionsmodul (1) die Cofaktoren NAD und NADH, das Cosubstrat HCOOH, nicht umgesetztes Substrat S und durch enzym-katalysierte Reaktion entstandenes Produkt P. Letztere werden im Extraktionsmodul (1) in das hydrophobe Lösungsmittel extrahiert, welches im Gegenstrom zur wäßrigen Phase mit der Extraktionsmittelpumpe (6) in das Extraktionsmodul gepumpt wird. Dem das Extraktionsmodul vorlassenden wäßrigen Strom mit den verbliebenen hydrophilen Bestandteilen (Enzyme, NAD(H), HCOOH) wird durch Nachdosierung bei (7) wieder Substrat S zugesetzt. Ebenfalls wird durch die Nachdosierung bei 7 durch Reaktion verbrauchtes Cosubstrat HCOOH und durch Deaktivierung verlorener Cofaktor NAD ersetzt.

Die in Figur 4 gezeigte Anordnung entspricht z. T. Figur 3 mit Extraktionsmodul (1) und Reaktorkreislauf (3); sie ist jedoch durch einen Hexankreislauf (8) erweitert. In diesen Hexankreislauf (8) ist eine kontinuierliche Rektifikationskolonne (9) eingebunden, in der die extrahierten Substanzen (Substrat S, Produkt P) vom Extraktionsmittel Hexan getrennt werden.

Rektifiziertes Hexan wird durch die Extraktionsmittelpumpe (6) wieder dem Extraktionsmodul (1) zugeführt. Somit wird die effektive zur Extraktion benötigte Lösungsmittelmenge verringert.

Die in Figur 5 dargestellte erfindungsgemäße Anordnung besteht aus einem Reaktorkreislauf (3), in dem durch die Reaktorkreislaufpumpe (4) eine Substratlösung bestehen aus Substrat S, Cofaktoren NAD(H) und Cosubstrat HCOOH in den Enzymmembranreaktor (10) gepumpt wird. Der Enzymmembranreaktor (10) ist als Kreislauf ausgelegt, der aus der Enzymkreislaufpumpe (11) und dem Ultrafiltrationshohlfasermodul (12) besteht. In diesem Kreislauf sind die Enzyme (5) hinter einer hydrophilen Ultrafiltrationsmembran (13) immobilisiert.

Aus der auf der Filtratseite des Ultrafiltrationshohlfasermoduls (12) den Enzymmembranreaktor (10) verlassenden enzymfreien Produktlösung wird im Extraktionsmodul (1) das nicht umgesetzte Substrat S und das entstandene Produkt P in einen kontinuierlichen Hexanstrom extrahiert. Der Substrat S und Produkt P enthaltende Hexanstrom wird in einer kontinuierlichen Rektifikationskolonne (9) in ein Substrat S /Produkt P Gemisch und Hexan getrennt. Das Hexan wird über den Hexankreislauf (8) wieder dem Extraktionsmodul (1) zugeführt.

Die durch die Extraktion an Produkt P verarmte, wäßrige Lösung kann durch die Nachdosierung von Substrat S und Cofaktor NAD bei (7) und durch ph-geregelte Nachdosierung von Cosubstrat HCOOH bei (14) wieder als Substratlösung dem Enzymmembranreaktor (10) zugeführt werden.

Die in Figur 5 skizzierte Anordnung wurde zur Produktion von (S)-1-Phenyl-2-Propanol verwendet. Die Prozeßbedingungen sind im nachfolgenden Beispiel aufgeführt.

Beispiel 1

In einen 50 ml-Enzymmembranreaktor (EMR) mit einem Ultrafiltrationshohlfasermodul (Amicon hollow fibre, Typ H1P10-43, cut off: 10000 Da) mit zugeordneter Kreislaufpumpe wurden die Enzyme:

Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis:* 0,9 U/ml EMR-Vol.

Formiatdehydrogenase aus *candida boidinii:* 1,9 U/ml EMR-Vol.

gegeben und als Reaktionsmischung eine wäßrige Lösung von pH 6,7 mit

Phenylaceton	9 mM
NAD	0,124 mM
Natriumformiat	50 mM
Ameisensäure	14,15 mM
di-Kaliumhydrogenphosphat	60 mM

zugeführt.

Bei einer mittleren Verweilzeit von 0,33 h im EMR (Gesamtreaktorumlaufstrom: 150 ml/h) und einer Reaktionstemperatur von 20 °C betrug der Umsatz

bezüglich des Substrates Phenylaceton 73%.

Die den Enzymmembranreaktor verlassende Produktlösung wurde kontinuierlich einem mit einer hydrophoben, mikroporösen Polypropylenmembran (Membranfläche: 0,23 m^2; effektive Porengröße: 0,05 µm) ausgestatteten Flüssig/Flüssig-Hohlfaserextraktionsmodul (Liqui-Cel^R Phasenkontakt-Labormodul 5PCM - 106 der Hoechst Celanes Corp.) zugeführt. Hier wurde durch einen kontinuierlichen Hexangegenstrom (1000 ml/h) aus der Produktlösung kontinuierlich (S)-1-Phenyl-2-Propanol und das nicht umgesetzte Phenylaceton extrahiert. Die produkthaltige Hexanlösung wurde einer kontinuierlichen Rektifikation zugeführt und rektifiziertes Hexan erneut zum Extraktionsmodul gepumpt. Das Gesamtvolumen der Hexanphase betrug 800 ml.

Das Penetrieren von Hexan durch die hydrophobe Membran wurde durch das Aufprägen eines Überdruckes von 0,5 bar auf der wäßrigen Seite verhindert.

Die das Extraktionsmodul verlassende produktfreie wäßrige Lösung wurde mittels kontinuierlicher Nachdosierung von Phenylaceton (1,35 mmol/h), ph-geregelter Nachdosierung von Ameisensäure und Ersetzen des durch Deaktivierung verlorenen Cofaktors (0,724 µmol/h) wieder als Reaktionslösung verwendet und erneut dem Enzymmembranreaktor zugeführt.

Das Gesamtvolumen der wäßrigen Phase betrug 450 ml.

Die Raum/Zeit-Ausbeute betrug bezogen auf das EMR-Volumen 64,3 $g/(^1EMR^{*d})$.

Die Wechselzahl des Cofaktors betrug 1361 mol_p/mol_{NAD} ($73\%*1,35*1000/0,724\ \mu mol_p/\mu mol_{NAD}$).

Die Wechselzahl des Cofaktors im Vergleichsfall, d.h. ohne kontinuierliche Produktextraktion aus dem zum EMR

zurückführenden Rezyklierungsstrom beträgt 53 mol_p/mol_{NAD} (73%*9,0/0,124 $mmol_p/mmol_{NAD}$).

Somit ergibt die erfindungsgemäße, extraktive Rezyklierung eine mehr als 25-fach bessere Ausnutzung des teuren Cofaktors.

Die erfindungsgemäße kontinuierliche Produktentnahme aus der Reaktionsflüssigkeit, die ansonsten insgesamt zum Enzymmembranreaktor zurückgeführt wird, macht die sonst notwendige stetige Einspeisung von Cofaktor in den EMR (im allgemeinen zusammen mit der Substratlösung) praktisch überflüssig; es müssen lediglich die bei wenigen Prozent der erforderlichen Menge liegenden (durch thermische Deaktivierung hervorgerufenen) Verluste ausgeglichen werden. Hydrophobe Membranen, insbesondere in Form von Hohlfaserbündeln, wie vorstehend erläutert, sind an sich seit gut 10 Jahren bekannt und erhältlich, ohne daß von ihrer außerordentlich nutzbringendem Wirkung für die enzymatische Gewinnung hydrophober Produkte Gebrauch gemacht worden wäre.

Beispiel 2

Unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 1 wurde 4-Phenyl-2-butanon zu (S)-4-Phenyl-2-butanol reduziert.

Durch kontinuierliche Substratzugabe wurde eine Zulaufkonzentration an 4-Phenyl-2-butanon in den EMR-Kreislauf von 12 mmol/L eingestellt. Um einen genügend hohen Umsatz zu erzielen, mußte die NAD(H)-Konzentration auf 1,2 mmol/L angehoben werden.

Bei einer Verweilzeit von 0,33 Std. im EMR betrug der mittlere Umsatz 80 % bei einer Raum Zeit-Ausbeute von 103,8 g/(l x d).

Entsprechend der Desaktivierung des Cofaktors wurde dieser mit 9,1 µmol/Std. nachdosiert.

Die Wechselzahl des Cofaktors betrug 158 mol_p/mol_{NAD}.

Die Wechselzahl des Cofaktors im Vergleichsfall, d.h. ohne Extraktion und Rückführung, beträgt 8 mol_p/mol_{NAD}. Die im Vergleich zum Beispiel 1 niedrigeren Werte für die Wechselzahl beruhen auf der notwendigen höheren Konzentration des Cofaktors von 1,2 mmol/L.

Dennoch ergibt sich auch hier durch die erfindungsgemäße extraktive Rezyklierung eine 20-fach bessere Ausnutzung des Cofaktors.

Beispiel 3

Unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 1 wurde 6-Methyl-5-hepten-2-on(S)-6-Methyl-5-hepten-2-ol ((S)-(+)-Sulcatol) reduziert. (S)-(+)-Sulcatol ist das männliche Pheromon der Borkenkäfer *Gnathotrichos sp.* und kann als Lockstoff in Fallen zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt werden.

Durch kontinuierliche Substratzugabe wurde eine Zulaufkonzentration an 6-Methyl-5-hepten-2-on in den EMR-Kreislauf von 10 mmol/L eingestellt. Die stationäre NAD(H)-Konzentration wurde auf 0,2 mmol/L eingestellt.

Bei einer Verweilzeit von 0,33 Std. im EMR betrug der mittlere Umsatz 67 % bei einer Raum Zeit-Ausbeute von 60 g/(l x d).

Entsprechend der Desaktivierung des Cofaktors wurde dieser mit 1,5 µmol/Std. nachdosiert.

Die Wechselzahl des Cofaktors betrug 747 mol_p/mol_{NAD}.

Für den Vergleichsfall, d.h. ohne Extraktion des Produktes und Rückführung, beträgt die Wechselzahl 33 mol_p/mol_{NAD}.

Durch die Anwendung der erfindungsgemäßen extraktiven Rezyklierung wurde die Ausnutzung um den Faktor 23 verbessert.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist selbstverständlich nicht auf rein enzymatische Verfahren beschränkt, sondern prinzipiell für die Abtrennung hydrophober Produkte aus wäßriger Reaktionsmischung geeignet, die zu Reaktionshemmungen führen oder Folgereaktionen eingehen können.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur kontinuierlichen enzym-katalysierten Gewinnung hydrophober Produkte in wäßriger Lösung,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man das Produkt aus der produkthaltigen Reaktionsmischung über eine produktdurchlässige mikroporöse Membran in ein organisches Lösungsmittel extrahiert und die produktverarmte Reaktionsmischung zur Produktion rezykliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß eine hydrophobe Membran verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß eine Cofaktor-abhängige enzymatische Umsetzung mit Cofaktor-regenerierung durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die enzym-katalysierte Umsetzung in einem Reaktor mit darin immobilisiertem Enzym durchfuhrt.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die Umsetzung in einem Enzymmembranreaktor durchführt.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die produkthaltige Reaktionsmischung zur Abtrennung des Produkts durch ein Hohlfasermembranbündel schickt, das von außen von organischem Lösungsmittel umströmt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Hohlfasermembranbündel vom organischen Lösungsmittel im Gegenstrom zur Reaktionsmischung umströmt wird.

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mit einer mikroporösen Membran mit einer effektiven Porengröße von 5 - 500 µm und mit einem Differenzdruck zwischen wäßriger Phase und organischem Lösungsmittel von 0,5 - 5 bar gearbeitet wird.

9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch die Produktion chiraler Alkohole, Amine, Cyanhydrine.

10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch einen Rezyklierungskreis für das organische Lösungsmittel, in den die Produktextraktion einbezogen ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch eine damit verbundene Produktisolierung und Rückführung von Substrat zur Produktion.

12. Vorrichtung zur kontinuierlichen Gewinnung hydrophober Produkte aus wäßriger Reaktionsmischung, geeignet zur Durchführung des Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, g e k e n n z e i c h n e t d u r c h einen Produktionskreis, in den eine Extraktionspatrone mit produktdurchlässiger, mikroporöser Membran einbezogen ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Extraktionspatrone ein Hohlfasermembranbündel aufweist.

14. Vorrichtung nach Anspruch 12 oder 13, g e k e n n z e i c h n e t d u r c h Mittel zur Erzeugung eines Differenzdrucks zwischen wäßriger und organischer Phase in der Patrone.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 - 14, g e k e n n z e i c h n e t d u r c h eine EMR-Anordnung für die enzymatische Umsetzung im Produktionskreis.

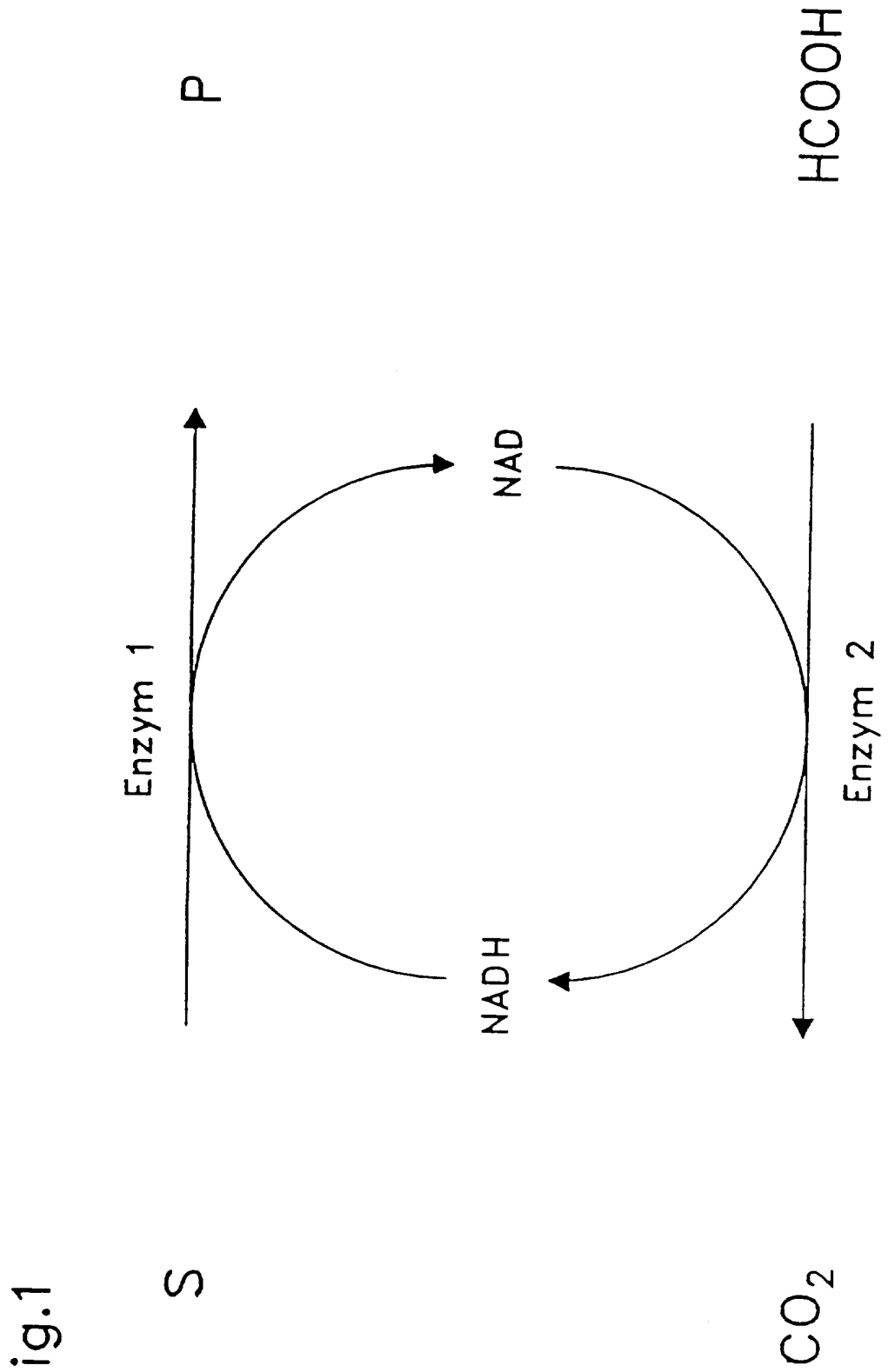


Fig.1

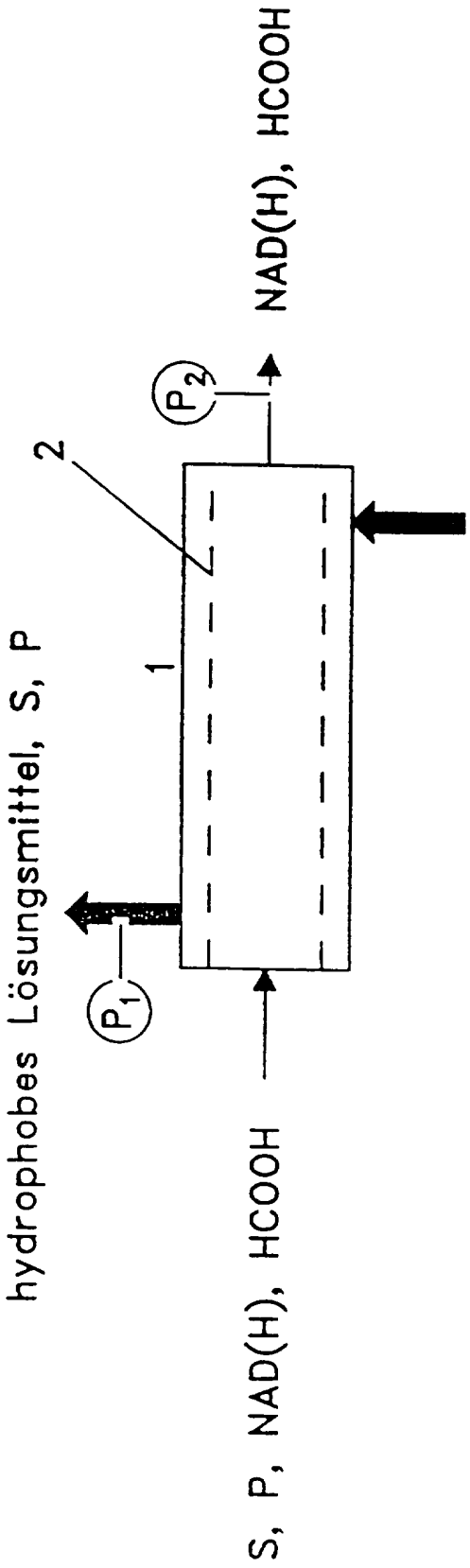

NAD(H), HCOOH
P2
2
1
hydrophobes Lösungsmittel
hydrophobes Lösungsmittel, S, P
P1
S, P, NAD(H), HCOOH

Fig. 2

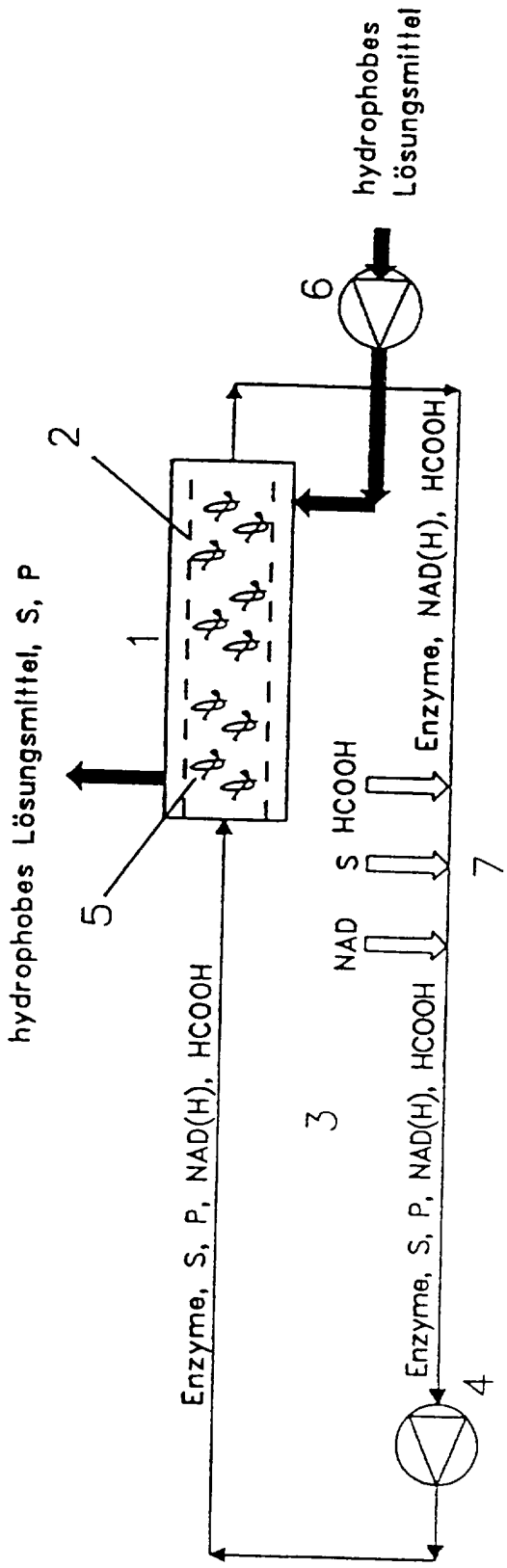

hydrophobes Lösungsmittel
6
2
1
hydrophobes Lösungsmittel, S, P
5
Enzyme, NAD(H), HCOOH
S HCOOH
NAD
7
3
Enzyme, S, P, NAD(H), HCOOH
Enzyme, S, P, NAD(H), HCOOH
4

Fig. 3

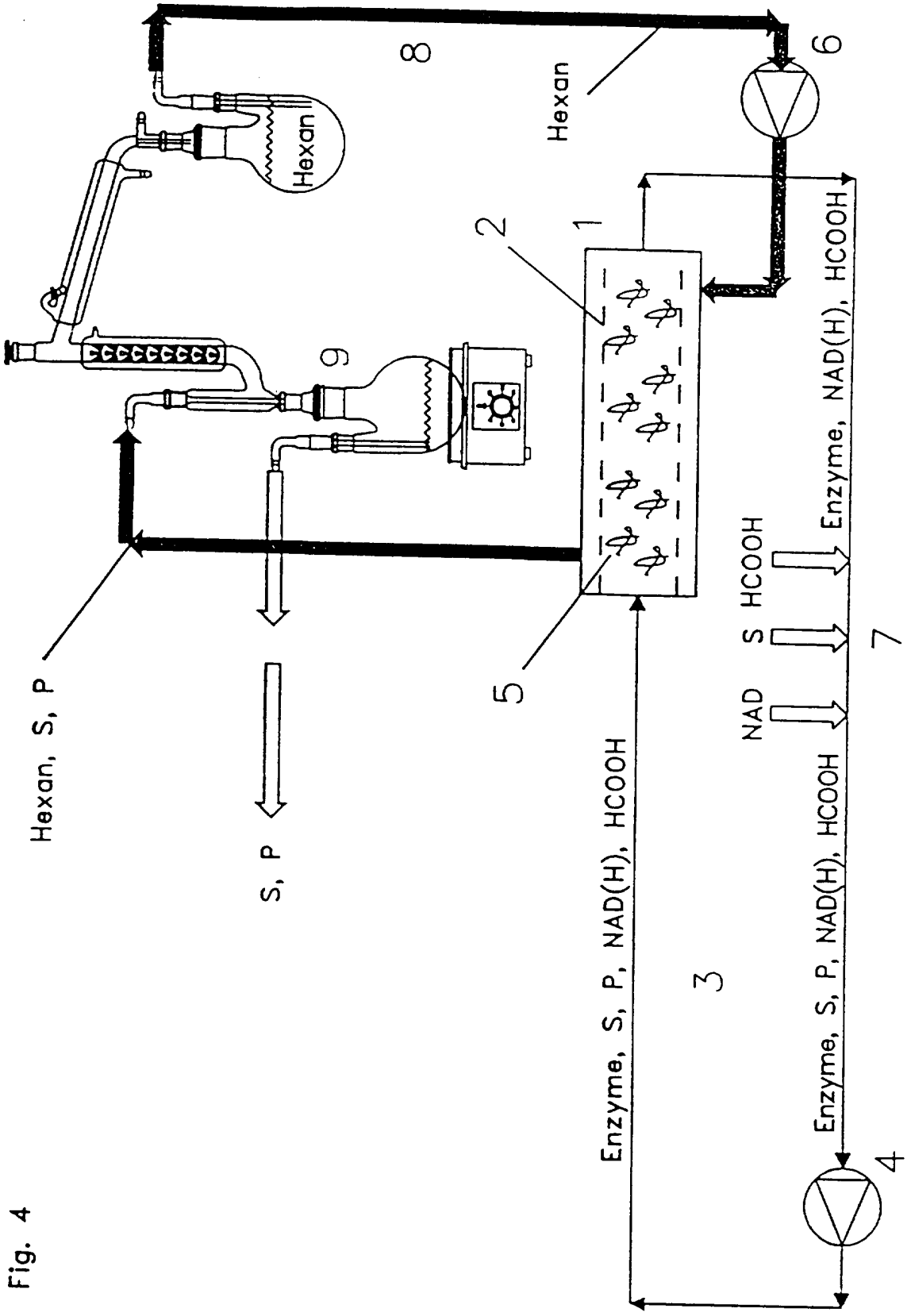

8
Hexan
6
Hexan
2
1
9
Enzyme, NAD(H), HCOOH
S HCOOH
NAD
7
Hexan, S, P
5
S, P
Enzyme, S, P, NAD(H), HCOOH
3
Enzyme, S, P, NAD(H), HCOOH
4

Fig. 4

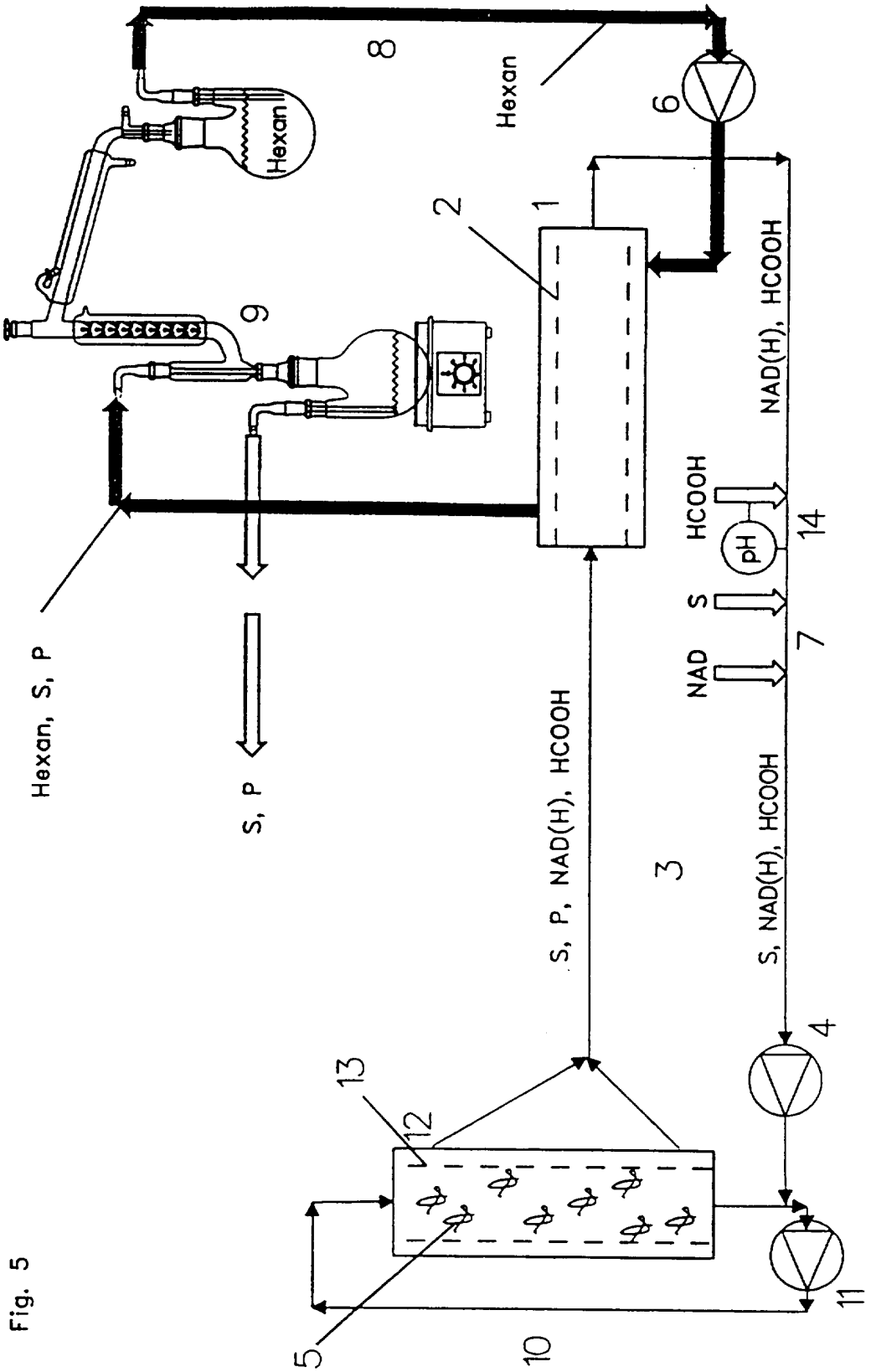

8
Hexan
6
Hexan
2
1
9
NAD(H), HCOOH
HCOOH
pH
14
S
7
NAD
Hexan, S, P
S, P
S, P, NAD(H), HCOOH
3
S, NAD(H), HCOOH
4
13
12
5
10
11

Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter onal Application No
PC1/DE 95/01399

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12M1/40 C12P1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,88 07582 (SEPRACOR INC) 6 October 1988 see claims 1,4-6,20,22-32,36,38	1,3-14
Y	see claims 52,55,57,59,62,63,78,80 see page 47; claims 145,146; figures 7-9,16	2,3,9

X	US,A,3 915 802 (LEO A. KOMINEK) 28 October 1975	1,4-8, 10-14
Y	see claims; figure 2	2,3,9

X	WO,A,88 07075 (BRUNSWICK CORPORATION) 22 September 1988 see page 5, line 1 - line 13; claims 1-13; figure 4	1,2,4-8, 10-14
Y	see page 18, line 1 - line 18 see page 25, line 11 - line 33	2,3,9

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

3

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 March 1996	15. 03. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer Coucke, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 273 679 (EASTMAN KODAK CIE) 6 July 1988	1,4-8
Y	see column 3, line 34 - line 50; claims 1,4,6	2,3,9
Y	WO,A,87 02381 (SEPRACOR) 23 April 1987 see claims; figures	2

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 95/01399

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-8807582	06-10-88	US-A-	4800162	24-01-89
		AT-T-	120495	15-04-95
		AU-B-	605589	17-01-91
		AU-B-	1681488	02-11-88
		CA-A-	1266248	27-02-90
		DE-D-	3853478	04-05-95
		DE-T-	3853478	17-08-95
		EP-A-	0353248	07-02-90
		JP-T-	2502875	13-09-90
		SU-A-	1825378	30-06-93
		US-A-	5077217	31-12-91
US-A-3915802	28-10-75	JP-C-	1313793	28-04-86
		JP-A-	51044691	16-04-76
		JP-B-	60036752	22-08-85
WO-A-8807075	22-09-88	US-A-	4956289	11-09-90
		AU-B-	1365588	10-10-88
		US-A-	5057421	15-10-91
EP-A-273679	06-07-88	JP-A-	63169985	13-07-88
WO-A-8702381	23-04-87	US-A-	4795704	03-01-89
		AU-B-	597284	31-05-90
		AU-B-	6473986	05-05-87
		CA-A-	1289493	24-09-91
		DE-A-	3688908	23-09-93
		DE-T-	3688908	20-01-94
		EP-A,B	0243404	04-11-87
		JP-T-	63501612	23-06-88
		KR-B-	9405577	21-06-94
		SU-A-	1787044	07-01-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 95/01399

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12M1/40 C12P1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,88 07582 (SEPRACOR INC) 6.Oktober 1988 siehe Ansprüche 1,4-6,20,22-32,36,38	1,3-14
Y	siehe Ansprüche 52,55,57,59,62,63,78,80 siehe Seite 47; Ansprüche 145,146; Abbildungen 7-9,16	2,3,9

X	US,A,3 915 802 (LEO A. KOMINEK) 28.Oktober 1975	1,4-8, 10-14
Y	siehe Ansprüche; Abbildung 2	2,3,9

X	WO,A,88 07075 (BRUNSWICK CORPORATION) 22.September 1988 siehe Seite 5, Zeile 1 - Zeile 13; Ansprüche 1-13; Abbildung 4	1,2,4-8, 10-14
Y	siehe Seite 18, Zeile 1 - Zeile 18 siehe Seite 25, Zeile 11 - Zeile 33	2,3,9

	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
8.März 1996	15. 03 96
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	**Bevollmächtigter Bediensteter** Coucke, A

3

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 95/01399

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 273 679 (EASTMAN KODAK CIE) 6.Juli 1988	1,4-8
Y	siehe Spalte 3, Zeile 34 - Zeile 50; Ansprüche 1,4,6	2,3,9
Y	WO,A,87 02381 (SEPRACOR) 23.April 1987 siehe Ansprüche; Abbildungen	2

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlich.. .n, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter..onales Aktenzeichen
PC1/DE 95/01399

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-8807582	06-10-88	US-A-	4800162	24-01-89
		AT-T-	120495	15-04-95
		AU-B-	605589	17-01-91
		AU-B-	1681488	02-11-88
		CA-A-	1266248	27-02-90
		DE-D-	3853478	04-05-95
		DE-T-	3853478	17-08-95
		EP-A-	0353248	07-02-90
		JP-T-	2502875	13-09-90
		SU-A-	1825378	30-06-93
		US-A-	5077217	31-12-91
US-A-3915802	28-10-75	JP-C-	1313793	28-04-86
		JP-A-	51044691	16-04-76
		JP-B-	60036752	22-08-85
WO-A-8807075	22-09-88	US-A-	4956289	11-09-90
		AU-B-	1365588	10-10-88
		US-A-	5057421	15-10-91
EP-A-273679	06-07-88	JP-A-	63169985	13-07-88
WO-A-8702381	23-04-87	US-A-	4795704	03-01-89
		AU-B-	597284	31-05-90
		AU-B-	6473986	05-05-87
		CA-A-	1289493	24-09-91
		DE-A-	3688908	23-09-93
		DE-T-	3688908	20-01-94
		EP-A,B	0243404	04-11-87
		JP-T-	63501612	23-06-88
		KR-B-	9405577	21-06-94
		SU-A-	1787044	07-01-93