



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 33 130 T2 2009.02.26

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 352 965 B1

(51) Int Cl.⁸: **C12P 13/02** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 33 130.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP01/11149**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 271 129.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/050297**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.12.2001**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **27.06.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.10.2003**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **05.03.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.02.2009**

(30) Unionspriorität:

2000387537 20.12.2000 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR

(73) Patentinhaber:

Dia-Nitrix Co.Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(72) Erfinder:

MURAO, Kozo, Yokohama-shi, Kanagawa 230-0053, JP; ISHII, Katsuo, Yokohama-shi, Kanagawa 230-0053, JP

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER AMIDVERBINDUNG UNTER VERWENDUNG EINES MIKROBIELLEN KATALYSATORS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Amidverbindung aus einer Nitrilverbindung unter Verwendung eines Mikroorganismus mit Nitrilhydratase-Aktivität.

Technischer Hintergrund

[0002] Kürzlich wurde ein Verfahren zur Synthesierung einer Verbindung unter Verwendung eines Bio-Katalysators zur Herstellung einer Vielzahl von Verbindungen verwendet, da es Vorteile, wie beispielsweise milde Reaktionsbedingungen, vereinfachte Reaktionsverfahren und eine hohe Reinheit der Reaktionsprodukte aufgrund geringer Mengen an Nebenprodukten gibt.

[0003] Seit der Entdeckung von Nitrilhydratase, einem Enzym, das eine Nitrilverbindung in eine Amidverbindung umwandelt, ist die Verwendung eines Biokatalysators zur Herstellung von Amidverbindungen aktiv untersucht worden (JP Patentveröffentlichung (Kokai) Nr. 11-123098, JP Patentveröffentlichung (Kokai) Nr. 7-265091, JP Patentveröffentlichung (Kokoku) Nr. 56-38118 und JP Patentveröffentlichung (Kokai) Nr. 11-89575).

[0004] Gegenwärtig wird ein Mikroorganismus, der Nitrilhydratase-Aktivität besitzt, zur Herstellung von Acrylamid, Nicotinamid oder ähnlicher auf industriellem Niveau für ein verbessertes Reaktionsverfahren unter Gesichtspunkten der Durchführbarkeit, der Sicherheit, der wirtschaftlichen Effizienz und anderer Faktoren verwendet.

[0005] Bis heute sind eine beträchtliche Anzahl Mikroorganismen gefunden worden, die Nitrilhydratase-Aktivitäten aufweisen. Beispiele hierfür schließen Mikroorganismen ein, die zu den Genera Nocardia, Corynebacterium, Bacillus, Pseudomonas, Micrococcus, Rhodococcus, Acinetobacter, Xanthobacter, Streptomyces, Rhizobium, Klebsiella, Enterobacter, Erwinia, Aeromonas, Citrobacter, Achromobacter, Agrobacterium und Pseudonocardia gehören.

[0006] Hierunter exprimieren die Genera Pseudomonas, Bacillus, Rhodococcus und Pseudonocardia eine Nitrilhydratase mit sehr hohem Niveau an Aktivität und Stabilität. Daher werden diese auf industriellem Niveau oder ähnlichen Niveaus verwendet.

[0007] Des Weiteren ist bei der Kultivierung dieser Mikroorganismen bekannt, dass eine mikrobielle Zelle mit hoher aktiver Nitrilhydratase durch ein Verfahren gewonnen wird, bei dem Nitrile oder Amide (JP Patentveröffentlichung (Kokoku) Nr. 61-43996 und 61-43999) zugegeben werden, ein Verfahren, bei

dem Aminosäure hinzugegeben wird (JP Patentveröffentlichung (Kokoku) Nr. 61-43997 und 61-43998), ein Verfahren, bei dem eine Art von Metallionen hinzugegeben wird (JP Patentveröffentlichung (Kokai) Nr. 61-162193, JP Patentveröffentlichung (Kokoku) Nr. 6-55148 und JP Patentveröffentlichung (Kokai) Nr. 8-187092), oder ähnliche.

[0008] Im Gegensatz dazu hat ein Biokatalysator im Hinblick auf die Wärme eine geringe Stabilität, und daher müssen die Reaktionen bei niedrigen Temperaturen durchgeführt werden. Das führt zu einer verminderten Reaktionsgeschwindigkeit pro Katalysator. Wenn eine Verbindung hergestellt wird, indem ein Biokatalysator auf industriellem Niveau hergestellt wird, sollte die Katalysatorkonzentration im Reaktionsgefäß daher erhöht werden.

[0009] Ein derzeit bekanntes industrielles Verfahren zur Herstellung einer Amidverbindung aus einer Nitrilverbindung unter Verwendung eines Biokatalysators wird gleichermaßen durch die Immobilisierung mikrobieller Zellen durchgeführt, um sie partikelförmig zu machen, die Katalysatorkonzentration im Reaktionsgefäß zu erhöhen, und die Abtrennung des Katalysators zu erleichtern (siehe Kagaku to Kogyo (Chemistry and Chemical Industry) Vol. 43, Nr. 7, S. 1098-1101 (1990), JP Patentveröffentlichung (Kokai) Nr. 54-143593 und 54-144889). Ebenfalls wird ein Verfahren zur Immobilisierung der Zelle untersucht (siehe JP Patentveröffentlichung (Kokai) Nr. 57-39792 und 62-294083). Wenn die effiziente Produktion einer Amidverbindung auf industriellem Niveau beabsichtigt wurde, wurde die Immobilisierung von Zellen in einer höheren Konzentration als wichtig angesehen (siehe JP Patentveröffentlichung (Kokai) Nr. 7-203964).

[0010] Jedoch haben die vorstehenden Erfinder eine mikrobielle Zelle, die eine starke Nitrilhydratase-Aktivität aufweist „entrap“-immobilisiert und sie in der Reaktion verwendet. Im Ergebnis wurde bestätigt, dass eine Nitrilverbindung als ein Reaktionssubstrat und/oder eine Amidverbindung als Reaktionsprodukt Diffusionsdefekte bei „entrap“-immobilisierten Partikeln verursacht, und die Reaktionsgeschwindigkeit wurde signifikant vermindert.

[0011] Beispielsweise war die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von den Reaktionsbedingungen bei einem Vergleich der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeiten zwischen den „entrap“-immobilisierten Zellen und den nicht immobilisierten Zellen signifikant auf ein Zehntel oder darunter vermindert. Nicht nur die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit wird signifikant verringert, sondern auch die Aktivität des Enzyms in dem „entrap“-immobilisierten Katalysator, welcher aufgrund eines Diffusionsdefektes nicht vollständig an der Reaktion teilnehmen kann, so dass diese während der Reaktion vermindert wird. Dies

vermindert auch die Menge der Amidverbindung, die pro Menge Zelleinheiten produziert wird.

[0012] Genauer führt die verminderte Reaktionsgeschwindigkeit oder die verringerte Menge der Amidverbindung, die pro Menge Zelleinheiten hergestellt wird, wie oben erwähnt wurde, zu nachteiligen Bedingungen. Unter derartigen Bedingungen dauert es lange, um die Zielverbindung anzuhäufen, wenn eine Amidverbindung in einer Batch-Reaktion hergestellt wird, und die Größen der Anlagen müssen im Falle einer kontinuierlichen Reaktion vergrößert werden.

[0013] Daher ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Probleme zu lösen, die beim Verfahren zur Herstellung einer Amidverbindung aus einer Nitrilverbindung unter Verwendung eines Biokatalysators auftreten, wie beispielsweise die verringerte Reaktionsgeschwindigkeit oder die verminderte Menge der Amidverbindung, die pro Menge Zelleinheit hergestellt wird. Diese Probleme werden durch die Verwendung einer immobilisierten mikrobiellen Zelle verursacht, die eine starke Hydronhydratase-Aktivität aufweist.

[0014] Um das obige Ziel zu erreichen, haben die vorstehenden Erfinder konzentrierte Untersuchungen bezüglich einer besser geeigneteren Form eines Katalysators als des immobilisierten Katalysators durchgeführt. Im Ergebnis haben sie herausgefunden, dass eine Amidverbindung effizienter hergestellt werden könnte, wenn eine mikrobielle Zelle verwendet wird, die eine hohe Nitrilhydratase-Aktivität von 50 U oder darüber pro mg trockener Zellen bei 10°C aufweist, und bei der die mikrobielle Zelle mit einer Nitrilverbindung in Kontakt gebracht wird, während diese in einem wässrigen Medium suspendiert sind, als im Falle, wenn die Zelle immobilisiert wird. Dies hat zur Vollendung der vorliegenden Erfindung geführt.

[0015] Genauer gesagt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Amidverbindung aus einer Nitrilverbindung unter Verwendung eines mikrobiellen Katalysators, wobei eine mikrobielle Zelle mit Nitrilhydratase-Aktivität von 50 U oder höher pro mg Trockenzellmasse bei Reaktionstemperaturen von 10°C mit einer Nitrilverbindung in einem wässrigen Medium in Kontakt gebracht wird, ohne immobilisiert zu sein.

Offenbarung der Erfindung

[0016] Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend im Detail beschrieben.

[0017] In der vorliegenden Erfindung kann ein Mikroorganismus verwendet werden, der eine Nitrilhydratase-Aktivität hat, die 50 U oder darüber pro mg Trockenzellmasse bei einer Reaktionstemperatur

von 10°C beträgt, welche durch FERM BP-1478 definiert wird.

[0018] Die Einheit „U“ der Enzymaktivität, die erfundungsgemäß verwendet wird, bedeutet, dass 1 µmol der entsprechenden Amidverbindung aus einer Nitrilverbindung pro Minute hergestellt wird. Der Begriff „Enzymaktivität“, der hier verwendet wird, bezieht sich auf den Wert der Enzymaktivität, welcher unter Verwendung einer Nitrilverbindung gemessen wird, die in der Produktion verwendet wird.

[0019] Die Enzymaktivität wird durch das Platzieren von 5 ml 50 mM Phosphatpuffer, welcher auf einen optimalen pH des Enzyms eingestellt ist (z. B. pH 7) in einem Teströhrchen mit einem Durchmesser von 30 mm, das Suspendieren von 2 mg der kultivierten und gewaschenen Zellen (Trockengewicht) hierin sowie das Schütteln des Röhrchens in einem Wasserbad bei 10°C gemessen. Ungefähr 5 Minuten später wird ein Phosphatpuffer, der zuvor hergestellt worden ist, und 1 bis 5% Nitrilverbindung enthält, bei 10°C platziert und auf den optimalen pH-Wert eingestellt wurde, hinzugegeben. Die Konzentration der Amidverbindung, die nach einer gewählten Reaktionsdauer generiert wird, wird unter Verwendung einer Analyseausstattung gemessen, wie beispielsweise der Gas-Chromatographie oder Flüssigkeits-Chromatographie, wodurch die Enzymaktivität berechnet wird.

[0020] Die Reaktionsdauer wird so bestimmt, dass eine Reaktionslösung eine Nitrilverbindung in einer Konzentration zurückhält, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit nicht verringert wird, und die Konzentration der Amidverbindung, welche erzeugt wird, hoch genug ist, um am Ende der Reaktion akkurat gemessen zu werden.

[0021] Die vorliegende Erfindung ist effizient, wenn eine mikrobielle Zelle mit einer Enzymaktivität von 50 U oder höher pro mg Trockenzellmasse bei 10°C verwendet wird. Sie ist effizienter unter Verwendung einer mikrobiellen Zelle mit einer Enzymaktivität von 80 U oder darüber, und noch effizienter bei einer Aktivität von 100 U oder darüber.

[0022] Die Nitrilverbindung wird durch die Einwirkung der Nitrilhydratase in eine entsprechende Amidverbindung umgewandelt. Beispiele hierfür schließen ein: aliphatische gesättigte Nitrile, die beispielsweise dargestellt werden durch Acetonitril, Propionitril, Succinonitril und Adiponitril; aliphatische ungesättigte Nitrile, die beispielhaft dargestellt werden durch Acrylonitril und Methacrylonitril; aromatische Nitrile, die beispielhaft dargestellt werden durch Benzoniitril und Phthalodinitril; und heterozyklische Nitrile, die beispielhaft dargestellt werden durch 3-Cyanopyridin und 2-Cyanopyridin. Aufgrund der chemischen und physikalischen Eigenschaften einer Nitril-

verbindung sind die Substratspezifität eines Nitrilhydrataseenzyms und vom industriellen Standpunkt aus gesehen, sind Acrylonitril und Cyanopyridin als Zielverbindungen der vorliegenden Erfindung bevorzugt.

[0023] Erfindungsgemäß ist ein mikrobieller Katalysator, der durch FERM BP-1478 definiert wird, ohne „entrap“-immobilisiert zu sein, so, dass die Membran der mikrobiellen Zelle mit der Reaktionslösung in direktem Kontakt ist. Ein Beispiel hierfür ist eine Form eines Katalysators, der in einem „entrap“-Immobilisierungsverfahren behandelt wird, bei dem die Zelle nicht von hoch-molekulargewichtigen Substanzen, wie Polyacrylamid, Polyvinylalkohol, Carrageenan, Agar, Gelatine oder Alginsäure eingefangen ist. Genauer gesagt ist der „Katalysator ohne „entrap“-immobilisiert zu sein“ gemäß der vorliegenden Erfindung eine mikrobielle Zelle, die durch FERM BP-1478 definiert wird, welche kultiviert wurde, und gegebenenfalls gewaschen oder anderen Behandlungsformen unterworfen wurde, eine mikrobielle Zelle, die chemisch mit einer Substanz behandelt worden ist, welche eine polyfunktionale Gruppe hat, beispielsweise Glutaraldehyd, oder eine mikrobielle Zelle, die chemisch an eine Oberfläche eines Glaskügelchens, Harzes, Kieselsäuregels oder ähnlicher gebunden wurde.

[0024] Die Verwendung einer Zelle als Katalysator, die chemisch mit Glutaraldehyd behandelt wurde, ist insbesondere unter dem Standpunkt der Verbesserung der Stabilität der Katalysator-Enzymaktivität vorzuziehen.

[0025] Der Arbeitsschritt, der eine mikrobielle Zelle mit einer Nitrilverbindung in einem wässrigen Medium in Kontakt bringt, bezieht sich darauf, eine mikrobielle Zelle mit Nitrilhydratase-Aktivität mit einer Nitrilverbindung in Wasser oder in einem wässrigen Medium in Kontakt zu bringen, das beispielsweise durch Lösen eines Stabilisators für die Innenstärke, pH-Puffer-Kapazität, oder Nitrilhydratase-Aktivität im Wasser hergestellt wurde. Diese kann in einem Batch-Verfahren oder kontinuierlichen System durchgeführt werden. Die Form der Reaktion wird in Abhängigkeit von Eigenschaften des Reaktionssubstrates, der Reaktionslösung, der Zielverbindung und ähnlicher oder dem Ausmaß der Produktion und des Reaktionsapparats, der entworfen wurde, welcher hierauf beruht, ausgewählt.

[0026] Vorzugsweise werden die Reaktionsbedingungen, wie beispielsweise die Reaktionstemperatur und der pH-Wert so kontrolliert, dass sie optimal dafür sind, dass eine Amidverbindung in geringerem Ausmaß oder in geringerer Zeit hergestellt werden kann.

[0027] Die Konzentration der Amidverbindung, die in dem oben erwähnten Verfahren angehäuft wird,

beträgt vom industriellen Standpunkt aus gesehen vorzugsweise 20% oder mehr, mehr bevorzugt 50% oder mehr.

[0028] Diese Beschreibung schließt alles oder einen Teil des Inhalts ein, der in der Beschreibung der Japanischen Patentanmeldung Nr. 2000-387537 offenbart ist, welche ein Prioritätsdokument der vorliegenden Anmeldung ist.

Beste Arten der Durchführung der Erfindung

[0029] Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend im Detail unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele beschrieben, obwohl sie nicht hierauf beschränkt ist. In den folgenden Beispielen bedeutet „%“ Masse-Prozent, sofern es nicht anders angegeben wurde.

[Beispiel 1] (Herstellung von Acrylamid unter Verwendung einer mikrobiellen Zelle in einem wässrigen Medium)

(1) Zellkultur

(i) Bedingungen der Präkultur:

(Zusammensetzung des Mediums)

2% Fructose, 5% Polypepton (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.), 0,3% Hefeextrakt (Oriental Yeast Co., Ltd.), 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7

(Kulturverfahren)

[0030] Medium (100 ml) wurde in konische Kolben von 500 ml aufgeteilt, und der Kolben wurde mit Baumwollstoff verschlossen, und er wurde dann in einem Autoklav bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. *Rhodococcus rhodochrous* J1 (FERM BP-1478) wurde inkuliert und für 48 Stunden bei 30°C einer Schüttelkultur unterworfen.

(ii) Bedingungen der Hauptkultur:

(Zusammensetzung des Mediums)

Ausgangsmedium: 0,2% Hefeextrakt, 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7, 0,002% $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025% Ammoniumsulfat, 2% Fructose, 2% Harnstoff, 0,4% Ethanol, 0,1% Pluronic L61 (Asahi Denka Co., Ltd.), pH 7 Später zugefügtes Medium: 20% Fructose, 5% Ethanol, 6% Ammoniumsulfat, pH 6,5

(Kulturverfahren)

[0031] Das Ausgangsmedium (2 Liter) wurde in einem 3-Liter-Mini-Bottich-Fermenter gegeben und in

einem Autoklav bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Separat wurden Fructose, Ethanol und Harnstoff aseptisch durch ein 0,45 Mikrometer Filterpapier (Advantec Toyo Kaisha, Ltd.) filtriert und zum Medium gegeben.

[0032] Die Kultur wurde unter Druck-Bedingungen innerhalb des Gefäßes von 0,098 MPa, einer Rührrate von 600 UpM, einer Luftzufuhrrate von 1 vvm, und einem pH-Wert von 7 sowie einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Die Kultur wurde beendet, sobald die maximale Enzymaktivität erreicht wurde. Danach wurde das Kulturprodukt mit einem 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,7) gewaschen, und eine Zellsuspension (Gewicht der Trockenzenellen: 15%) wurde gewonnen.

(2) Messung der Nitrilhydratase-Aktivität

[0033] 50 mM Phosphatpuffer (4,98 ml, pH 7,7) und 20 µl der Zellsuspension wurden in ein Teströrchen gegeben und gemischt, das einen Durchmesser von 30 mm hat, und das Rörchen wurde in einem Tank bei 10°C für 5 Minuten geschüttelt. 50 mM Phosphatpuffer (5 ml, pH 7,7), welcher 5,0% Acrylonitril enthält, welcher zuvor auf 10°C eingestellt wurde, wurde zugegeben, und das Produkt wurde für 10 Minuten reagieren gelassen, die Zellen wurden durch Filtrieren abgetrennt und das erzeugte Acrylamid wurde mittels Gaschromatographie (GC-14B, Shimadzu Corporation) quantifiziert. Die Analyse wurde unter Verwendung einer 1 m Glassäule, die mit Parabox PS (einem Säulenfüllmittel, Waters) gefüllt war, bei einer Säulentemperatur von 230°C durchgeführt und die FID-Detektion wurde bei 250°C durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass 1,2% des Acrylamids erzeugt wurden. Wenn „1 U“ als die Menge an Aktivität definiert wird, die daraus hervorgeht, wenn 1 µmol Acrylonitril in Acrylamid bei einer Reaktionstemperatur von 10°C innerhalb einer Reaktionsdauer von 1 Minute umgewandelt wird, betrug die Aktivität der Zelle zur Umwandlung von Acrylonitril in Acrylamid 56 U pro mg Trockenzellmasse bei 10°C.

(3) Umwandlung von Acrylonitril in Acrylamid

[0034] 50 mM Tris-(2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol)hydrochloridpuffer (664 g, pH 7,7) wurde in einem abtrennaren umhüllten 1-Liter-Kolben platziert. Die Suspension der Zellen, die oben gewonnen wurde, wurde hinzugegeben, um sie auf das Gewicht an Trockenzellmasse von 90 mg zu bringen. Acrylonitril wurde kontinuierlich bei einer Rührrate von 180 UpM bei 18°C zugegeben, um die Acrylonitril-Konzentration bei 2% zu halten.

[0035] Im Ergebnis erreichte die Konzentration des Acrylamids, die 25 Stunden nach der Initiierung der Acrylonitrilzugabe hergestellt worden war, das Zielniveau von 45%.

[Vergleichsbeispiel 1] (Herstellung von Acrylamid unter Verwendung einer „entrap“-immobilisierten mikrobiellen Zelle)

(1) Immobilisierung von Zellen

[0036] Die Suspension der Zellen, die in Beispiel 1 gewonnen wurde mit einer Aktivität von 56 U im Hinblick auf die Umwandlung von Acrylonitril und Acrylamid, wurde zu einer äquivalenten Menge einer wässrigen Lösung gut durchmischt 3% Natriumalginats (Kanto Kagaku) gegeben und gut durchmischt. Dieses Gemisch wurde durch ein Silikonrörchen mit einem inneren Durchmesser von 2 mm tröpfchenweise zu einer wässrigen Lösung aus 1 M Calciumchlorid gegeben. Auf diese Weise wurden Partikel aus immobilisierten Zellen mit Partikelgrößen von ungefähr 3 mm gewonnen. Die Partikel der immobilisierten Zellen wurden mit einer 50 mM Tris-Hydrochloridpuffer (eingestellt auf pH 7,7) gewaschen, um immobilisierte Zellen zu erhalten.

(2) Umwandlung von Acrylonitril in Acrylamid

[0037] 50 mM Tris-Hydrochloridpuffer (664 g, pH 7,7) wurden in einer getrennten 1-l-Flasche mit Verschluss platziert. Die immobilisierten Zellen, die oben gewonnen wurden, wurden hinzugegeben, um das Gewicht der Trockenzellmasse auf 90 mg zu bringen. Acrylonitril wurde kontinuierlich zugegeben, um die Acrylonitrilkonzentration bei einer Rührrate von 180 UpM bei 18°C bei 2% zu halten.

[0038] Im Ergebnis erreichte die Acrylamidkonzentration nicht das Zielniveau von 45%, selbst 50 Stunden nach dem Beginn der Acrylonitrilzugabe.

[Beispiel 2] (Herstellung von Acrylamid unter Verwendung einer mikrobiellen Zellen in einem wässrigen Medium)

(1) Zellkultur

[0039] *Pseudomonas chlororaphis* B23 (FERM BP-187) Zellen wurden in der Weise kultiviert, wie im Beispiel der JP Patentveröffentlichung (Kokai) Nr. 2-177883 beschrieben. Die Aktivität dieser Zellen zur Umwandlung von Acrylonitril in Acrylamid wurde in gleicher Weise wie in Beispiel 1 bei pH 7,7 gemessen. Im Ergebnis betrug die Aktivität 90 U pro mg Trockenzellmasse bei 10°C.

(2) Umwandlung von Acrylonitril in Acrylamid

[0040] 50 mM Phosphatpuffer (850 ml, pH 7,7) und 0,4 g Zellen (auf Trockengewichtsbasis) wurden in ein getrenntes verschließbares Gefäß gegeben (Innenvolumen 1 Liter). Die Reaktion wurde unter kontinuierlicher Zugabe von Acrylonitril unter Rühren bei 3°C durchgeführt, um die Acrylonitrilkonzentration

bei 2% zu halten.

[0041] Die Acrylamidkonzentration erreichte das Zienniveau von 20% drei Stunden später.

[Vergleichsbeispiel 2] (Produktion von Acrylamid unter Verwendung der „entrap"-immobilisierten mikrobiellen Zelle)

(1) „Entrap"-Immobilisierung von Zellen

[0042] Eine wässrige Lösung eines Monomeremischs wurde hergestellt, um 30%, 1% und 4% an Acrylamid, Methylenbisacrylamid bzw. 2-Dimethylaminopropylmethacrylamid zu enthalten.

[0043] Anschließend wurde die Suspension der Zellen mit Aktivität von 90 U im Hinblick auf die Umwandlung von Acrylonitril in Acrylamid, welche in Beispiel 2 gewonnen wurde, eine wässrige Monomerlösung, eine wässrige Lösung aus 10% N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin und eine wässrige Lösung von 10% Ammoniumpersulfat einer Leitungsmischung in einem Mischverhältnis von 50:20:1:1 unterworfen. Die Abflüsse wurden nacheinander auf eine Scheibe mit einer Größe von 300 × 300 × 30 mm gegeben und dann hierauf polymerisiert.

[0044] Die hergestellte Zell-immobilisierte Gelschicht wurde in kleine Stücke von ungefähr 0,5 mm² unter Verwendung eines Messers zerschnitten, um Partikel aus Acrylamidpolymer „entrap"-immobilisierten Zellen zu gewinnen. Die Partikel der immobilisierten Zellen wurden für die Herstellung durch Eintauchen in eine wässrige Lösung aus 0,1% Natriumacrylat gewaschen (eingestellt auf pH 7 mit Hilfe von Natriumhydroxid).

(2) Umwandlung von Acrylonitril in Acrylamid

[0045] Acrylonitril wurde unter Verwendung des Verfahrens und des Apparats, wie in Beispiel 2 beschrieben, umgewandelt.

[0046] Die Acrylamidkonzentration erreichte das Zienniveau von 20% acht Stunden später nicht.

[Vergleichsbeispiel 3] (Herstellung von Acrylamid unter Verwendung einer mikrobiellen Zelle mit niedriger Nitrilhydratase-Aktivität)

(1) Kultur der Zelle und Herstellung des Katalysators

[0047] In gleicher Weise wie in Beispiel 1 wurde die *Rhodococcus rhodochrous* J1 (FERM BP-1478) Zelle kultiviert. Wenn die Aktivität der Zelle zur Umwandlung von Acrylonitril in Acrylamid, welche auf Grundlage des Verfahrens zur Messung der Aktivität, das in Beispiel 1 beschrieben worden ist, gemessen wurde, 20 U pro mg Trockenzellmasse bei 10°C erreichte,

wurde die Kultur gestoppt. Danach wurde das Kulturprodukt mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,7) gewaschen, und eine Zellsuspension (Trockengewicht der Zellen: 15%) wurde gewonnen.

(2) Umwandlung von Acrylonitril in Acrylamid

[0048] In Übereinstimmung mit dem Verfahren, das in Vergleichsbeispiel 2 beschrieben wurde, wurde zuerst eine Suspension aus Acrylamidpolymer „entrap"-immobilisierten Zellen hergestellt.

[0049] Anschließend wurde die zuvor erwähnte Suspension der immobilisierten Zelle oder Suspension der nicht immobilisierten Zelle als ein Mikroorganismus in einer Menge von 225 mg bezogen auf das Gewicht der Trockenzelle verwendet, wodurch Acrylonitril in Acrylamid umgewandelt wurde. Im Ergebnis erreichte die Acrylamidkonzentration ungefähr 100 Stunden später das Zienniveau von 45% unter Verwendung einer Suspension von entweder den immobilisierten oder nicht immobilisierten Zellen.

[0050] Genauer gesagt gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen immobilisierten Zellen und nicht immobilisierten Zellen, wenn die Zelle eine Aktivität von 20 U aufwies.

Industrielle Anwendbarkeit

[0051] In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine mikrobielle Zelle, die durch FERM BP-1478 mit 50 U oder mehr pro mg Trockenzellmasse bei einer Reaktionstemperatur von 10°C, welche eine starke Nitrilhydratase-Aktivität aufweist, in der Reaktion verwendet, ohne „entrap"-immobilisiert zu sein. Auf diese Weise kann eine Amidverbindung wirksam aus einer Nitrilverbindung ohne die Probleme der verringerten Reaktionsgeschwindigkeit oder der geringeren hergestellten Menge pro Menge der Zelleinheit, welche durch die „Entrap"-Immobilisierung verursacht werden, hergestellt werden. Demgemäß kann eine Amidverbindung innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne im Fall einer Batch-Reaktion und mit einer sehr kleinen Anlage im Fall einer kontinuierlichen Reaktion hergestellt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Amidverbindung aus einer Nitrilverbindung unter Verwendung eines mikrobiellen Katalysators, wobei eine mikrobielle Zelle, die durch FERM BP-1478 definiert ist, mit Nitrilhydratase-Aktivität von 50 U oder höher pro mg des Gewichts der trockenen Zellen, bei einer Reaktionstemperatur von 10°C mit einer Nitrilverbindung in einem wässrigen Medium in Kontakt gebracht wird, ohne durch Einfangen immobilisiert zu sein.

2. Verfahren zur Herstellung einer Amidverbin-

dung gemäß Anspruch 1, wobei die Nitrilverbindung
Acrylonitril oder Cyanopyridin ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen