

(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **282 822 A7**

5(51) C 12 N 11/00

PATENTAMT der DDR

(21) AP C 12 N / 315 477 4

(22) 06.05.88

(45) 26.09.90

(71) siehe (73)

(72) Miethe, Peter, Dr. Dipl.-Chem.; Voß, Harald, Prof. Dr. Dipl.-Ing.; Gruber, Ronald, Dipl.-Chem., DD

(73) Martin-Luther-Universität Halle – Wittenberg, Halle, 4010, DD

(54) **Verfahren zur biokatalytischen Umsetzung von organischen Substanzen**

(57) Die Erfindung betrifft ein biokatalytisches Verfahren zur Umsetzung von organischen, insbesondere schlecht wasserlöslichen Substanzen. Die Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß Enzyme, pro- und eukariotische Zellen oder Kombinationen von Enzymen und Zellen in lyotropen Flüssigkristallen (Mesophasen) vorzugsweise mit inverser Phasenstruktur, immobilisiert werden und über eine oder mehrere Lösungsmittelphasen, die sich im thermodynamischen Gleichgewicht mit der Mesophase befinden, die Substratzuführung und Produktabführung realisiert wird. Als Lösungsmittelphasen dienen organische Lösungsmittel. Zusätzlich kann auch eine wäßrige Phase vorhanden sein. Zur Herstellung dieser Zwei- und Dreiphasensysteme werden Dreikomponentensysteme, bestehend aus Wasser, organischem Lösungsmittel und Tensid, eingesetzt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Umsetzung von organischen Substanzen in Gegenwart einer biokatalysatorhaltigen lyotropen Mesophase auf der Basis eines Mehrkomponentensystems aus Wasser, organischem Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch sowie Tensid bzw. Tensidgemisch, **gekennzeichnet dadurch**, daß das System neben der den Biokatalysator enthaltenden lyotropen Mesophase zur Zuführung von Substrat und Produkt mindestens eine organische Lösungsmittelphase oder eine organische Lösungsmittelphase und eine wäßrige Phase, die sich im thermodynamischen Gleichgewicht mit der Mesophase befindet, enthält.
2. Verfahren gemäß Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß im Zweiphasengebiet, bestehend aus lyotroper Mesophase und organischem Lösungsmittel, die Substratzuführung und Produktabführung über die organische Lösungsmittelphase erfolgt.
3. Verfahren gemäß Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß in einem Dreiphasengebiet, bestehend aus lyotroper Mesophase, organischem Lösungsmittel und Wasser, die Substratzuführung über die Lösungsmittelphase, die Produktabführung über die Wasserphase der umgekehrt erfolgt.
4. Verfahren gemäß Punkt 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß lyotrope Mesophasen mit inverser Phasenstruktur zur Solubilisierung des Biokatalysators eingesetzt werden.
5. Verfahren gemäß Punkt 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Biokatalysatoren Enzyme, pro- und eukariotische Zellen oder Enzyme in Kombination mit Zellen eingesetzt werden.
6. Verfahren gemäß Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein poröses Trägermaterial mit lyotroper biokatalysatorhaltiger Mesophase beladen und in dieser Form eingesetzt wird.
7. Verfahren gemäß Punkt 1, 2, 4 und 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Substrat im Zweiphasengebiet in fester Form zugegeben und direkt in der Mesophase gelöst wird.
8. Verfahren gemäß Punkt 1, 2, 4 und 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Substrat als Gas zugeführt und/oder das Produkt als Gas abgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur biokatalytischen Umsetzung von organischen Substanzen.

Charakteristik bekannter technischer Lösungen

Biokatalytische Umsetzungen werden gegenwärtig überwiegend in wäßrigen oder zumindest stark wasserhaltigen Systemen ausgeführt. Diese Art der Prozeßführung ist dann ungünstig, wenn schlecht wasserlösliche bzw. wasserunlösliche, hydrophobe Substrate, wie z. B. Steroide, Lipide, Kohlenwasserstoffe, langkettige aliphatische oder aromatische Alkohole, Aldehyde, Carbonsäuren, durch Biokatalyse umgesetzt werden sollen oder wenn eine enzymkatalysierte Synthese in Umkehrung einer Hydrolysereaktion durchgeführt werden soll.

Darüber hinaus können auch Enzyme selbst stark hydrophobes Verhalten zeigen, was in wäßrigen Systemen zu einer Agglomeration und damit zu einem Verlust der biokatalytischen Eigenschaften führt.

Die bisher bekannten und verwendeten Prozeßvarianten zur biokatalytischen Umsetzung hydrophober Substrate sind:

1. Die Verwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln oder wasserhaltigen Lösungsmittelgemischen /1, 9/.
2. Die Verwendung von zwei- und mehrphasigen Systemen /4, 10/.
3. Die Verwendung von reversmizellaren Phasen und lyotropen Mesophasen /2, 3/.

Bei Systemen vom Typ 1. besteht die Gefahr einer Enzymdenaturierung/3/. Durch die Wahl von geeigneten Lösungsmitteln und durch die Enzymimmobilisierung kann diese lediglich verlangsamt werden. Die Standzeiten der Katalysatoren sind deshalb nur niedrig. Der Einsatz von Mikroorganismen und anderen Zellen als Biokatalysatoren ist nicht möglich.

Auch bei flüssigen Systemen vom Typ 2. besteht die Gefahr einer Denaturierung an der Phasengrenze. Außerdem ist die Reaktionsgeschwindigkeit in der Wasserphase klein. Eine vorteilhafte Variante vom Typ 2. ist die Verwendung von hydrophilen Polymergelen zum Enzymeinschluß. Diese Polymergele, z. B. auf der Basis von Gelatine, Agar oder Alginat, können auch in organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden/10/. Aufgrund des hydrophilen Charakters des Polymergels ist die Konzentration des hydrophoben Substrates im Gel jedoch nur niedrig. Die Folge ist eine geringe Umsatzrate bei der Biokatalyse. Günstigere Eigenschaften besitzen diesbezüglich Systeme vom Typ 3. Reversmizellen sind globuläre Tensidaggregate, die von amphiphilen Substanzen in organischen Lösungsmitteln wie beispielsweise Hexan, Heptan, Cyclohexan, Benzen, Dodecanol in Gegenwart geringer Mengen Wasser ausgebildet werden können/5/.

Das Wasser bildet im Inneren der Mizelle einen „waterpool“, in dem Enzyme eingelagert (solubilisiert) werden können. Es ist vielfach gezeigt worden, daß die Enzymaktivität dabei über längere Zeit erhalten bleiben kann.

Darüber hinaus ist bekannt, daß Mikroorganismen wie beispielsweise E.coli oder B.subtilis in derartigen Phasen einen Teil ihrer Enzymaktivität aufrecht erhalten können/6/. Hydrophobe Substrate können bei den reversmizellaren Systemen im allgemeinen direkt in das organische Lösungsmittel gegeben werden. Bei dieser Prozeßführung sind jedoch Aufarbeitungsschritte zur Rückhaltung der Tensidaggregate und zur Abtrennung der Produkte notwendig. Diese verursachen erhebliche Kosten. Eine Verbesserung der Effektivität ist bei kontinuierlicher Prozeßführung unter Verwendung immobilisierter Reversmizellen möglich.

Dazu wurde ein Hohlfasermembransystem vorgeschlagen/7/. Diese Membranen sind ein bedeutender Kostenfaktor, sie sind oft nicht lösungsmittelbeständig, neigen zur Verstopfung und stellen erhebliche Strömungswiderstände dar, wodurch der Prozeß unter Druck geführt werden muß.

Lytrope Mesophasen sind optisch transparente hochviskose Systeme, denen nicht gepackte Tensidaggregate zugrunde liegen. Sie besitzen hinsichtlich der Enzym-solubilisierung ähnliche Eigenschaften wie Reversmizellen/3/. Aufgrund der hohen Viskosität und des hohen Tensidanteils sind reine lyotrope Mesophasen für eine technische Biokatalyse unbrauchbar, da insbesondere die Probleme einer einfachen Abtrennung des Produktes, der Entfernung von Tensidverunreinigungen aus dem Syntheseprodukt und der kontinuierlichen Prozeßführung bisher ungelöst sind. Außerdem war der Einsatz dieser Systeme bisher auf reine Enzyme beschränkt.

Ziel der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Umsetzung organischer Substanzen in Gegenwart einer einen Biokatalysator enthaltenden lyotropen Mesophase unter Vermeidung einer Schädigung des Biokatalysators bei kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Prozeßführung und einfacher Abtrennung eines tensidfreien bzw. tensidarmen Produktes.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß werden in lyotropen Mesophasen immobilisierte Biokatalysatoren zur Umsetzung von organischen Substanzen entweder in einem thermodynamisch stabilen Zweiphasengebiet oder in einem thermodynamisch stabilen Dreiphasengebiet eines Dreikomponentengemisches aus Wasser, organischem Lösungsmittel bzw. -gemisch und Tensid bzw. -gemisch eingesetzt. Im Zweiphasengebiet, bestehend aus lyotroper Mesophase und organischem Lösungsmittel, erfolgt die Substratzuführung und Produktabführung über die organische Lösungsmittelphase, im Dreiphasengebiet, bestehend aus lyotroper Mesophase, organischem Lösungsmittel und Wasser, die Substratzuführung über die Lösungsmittelphase, die Produktabführung über die Wasserphase oder umgekehrt, wobei dann entsprechend Produkt bzw. Substrat wasserlöslich sein müssen.

Darüber hinaus können im Zweiphasengebiet Substrate in fester Form zugegeben und direkt von der Mesophase gelöst werden. Substrate können auch als Gas zugeführt und/oder als Gas abgeführt werden.

Ein prozeßtechnisch besonders vorteilhaftes Verfahren besteht darin, die lyotrope Mesophase durch Temperaturerhöhung zu schmelzen und poröse Trägermaterialien, wie Glas- und Keramikinterkörper damit zu beladen. Nach Abkühlung bildet sich die biokatalytisch aktive Mesophase in den Poren zurück.

Als organische Lösungsmittel können hydrophobe Lösungsmittel wie z. B. Hexan, Heptan, Octan, Cyclohexan, Decanol, Butylacetat, Diethylether oder Lösungsmittelgemische wie Hexan/Aceton, Hexan/Butanol verwendet werden.

Als Tenside können anionische Tenside wie z. B. Alkalialkylsulphate, Alkalidialkylsulfosuccinate, Erdalkalidialkylsulfosuccinate oder kationische Amphiphile wie Alkylammoniumsalze, Alkylpyridiniumsalze, Alkyltrimethylammoniumsalze oder zwitterionische Amphiphile wie z. B. Phospholipide, Sulfobetaine, Carbobetaine oder richtungis Amphiphile wie Polyoxyethylenether, Polyoxyethylenester, Polyoxyethylensorbitanester, Alkylphenolpolyethylenglykolether, Copolymerisate von Polyethylen und Polypropylen oder entsprechende Tensidgemische verwendet werden.

Als Biokatalysatoren können neben isolierten Enzymen wie z. B. Alkoholdehydrogenase, Chymotrypsin, Lipase auch pro- und eukariontische Zellen z. B. von *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* oder koimmobilisierte Enzyme und Zellen eingesetzt werden. Es wurde gefunden, daß sowohl kubische, kubisch bikontinuierliche, hexagonale als auch lamellare lyotrope Mesophasen zur Solubilisierung von Biokatalysatoren geeignet sind. Dabei wird die größte biokatalytische Aktivität bei Verwendung inverser Phasen erzielt. Sowohl Zellen als auch isolierte Enzyme zeigen in einem Mehrphasensystem bestehend aus Mesophase und einer oder mehrerer Lösungsmittelphasen eine hohe Aktivität. Im erfindungsgemäß verwendeten Mehrphasensystem wurde überraschend gefunden, daß die biokatalytische Aktivität im Gegensatz zu einem normalen zweiphasigen flüssigen System auch nach längeren Lagerzeiten und Reaktorstandzeiten nur wenig absinkt, daß nur sehr geringe Diffusionswiderstände in Erscheinung treten und daß die Lösungsmittelphase nur extrem wenig Tensid enthält, wodurch die Abtrennung eines nahezu tensidfreien Syntheseproduktes möglich ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich vorteilhaft z. B. bei der Umsetzung von organischen Substanzen wie Steroiden, Lipiden, Kohlenwasserstoffen, langkettigen aliphatischen und aromatischen Alkoholen, Aldehyden, Carbonsäuren, Estern, Aminosäuren und Peptiden anwenden. Der Einsatz von Biokatalysatoren für derartige Synthesen wird insbesondere bei Vorliegen von hydrophoben Substraten und Produkten wesentlich vereinfacht und verbilligt möglich. Biokatalyse ist dabei beeinflusst von den jeweiligen Verteilungskoeffizienten der Komponenten in den Phasen und kann über den HLB-Wert des Tensides gesteuert werden.

Bei Verwendung geeigneter, einfacher Reaktionsapparate ist es ohne weiteres möglich, das biokatalysatorhaltige flüssigkristalline System mit Hilfe mechanischer Rückhaltevorrichtungen (Absetzer, Separatorlamellen, Umlenkleche, Filter) zurückzuhalten.

Die Erfindung soll nachstehend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden:

Beispiel 1

136 ml einer 10 Gew.-%igen Lösung von Tetraethylenglykoldodecylether in Hexan werden mit 10 ml einer 21 mM wäßrigen NAD-Lösung versetzt und geschüttelt. In dieses zunächst trüb erscheinende dreiphasige System werden 5 ml einer wäßrigen Lösung von Hefe-Alkoholdehydrogenase und Natriumchlorid eingespritzt. Die Salzkonzentration beträgt dabei 0,1 Mol/l und die Enzymkonzentration 0,5 g/l. Nach kurzem Schütteln entsteht daraus ein zweiphasiges System, bestehend aus einer klaren viskosen lyotropen Mesophase und reinem Hexan. Dem System können beliebige Mengen an Hexan zugesetzt werden. Ein gut handhabbares System entsteht bei Zugabe von 600 ml Hexan. Bei einem Batch-Verfahren werden in dieses System etwa 15 ml

Ethanol als Substrat zugespritzt. Es erfolgt die enzymatische Oxidation zum Azetaldehyd unter Bildung von NADH. Dieses ist spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm in der Mesophase nachweisbar. Das System zeigt auch nach einer Lagerzeit von zwei Monaten bei Zimmertemperatur noch 80% der Ausgangsaktivität.

Gibt man als zweites Substrat 2 ml Zimtaldehyd zu, so wird dieser unter Verbrauch des gebildeten NADH zu Zimtalkohol reduziert.

Auf diese Weise ist die Herstellung von Zimtalkohol möglich, der ohne Schwierigkeiten aus der Hexanphase, beispielsweise durch Ausschütteln mit Wasser oder anschließender Wasserdampfdestillation abgetrennt werden kann.

Beispiel 2

Es wird in gleicher Weise verfahren, wie in Beispiel 1. An Stelle der 5 ml wäßrigen Enzymlösung wird dem System eine Suspension von *Saccharomyces cerevisiae* der Konzentration 10 g/l (bezogen auf Trockenmasse) zugesetzt. Der spektroskopische Nachweis des gebildeten NADH und die Produktaufarbeitung können in analoger Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben, vorgenommen werden.

Beispiel 3

130 ml einer 10 Gew.-%igen Lösung von Tetraethylglykoldodecylether in Hexan werden mit 10 ml einer 21 mM wäßrigen NAD-Lösung versetzt, anschließend werden 5 ml einer wäßrigen Lösung von Hefe-Alkoholdehydrogenase analog Beispiel 1 zugegeben. Es werden weitere 80 ml Wasser zugegeben, anschließend wird zentrifugiert. Es scheiden sich 3 Phasen, die Hexan-, die lyotrope Mesophase und eine Wasserphase ab. Die lyotrope Mesophase enthält das zugegebene Enzym. Jetzt können in analoger Weise wie in Beispiel 1 etwa 10 ml Ethanol und 2 ml Zimtaldehyd in die Hexanphase gespritzt werden. Nach etwa 20 Minuten ist in der Wasserphase spektroskopisch bei $\lambda = 245$ nm Zimtalkohol nachweisbar.

Beispiel 4

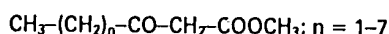
Es werden 136 ml einer 10 Gew.-%igen Lösung von Tetraethylglykoldodecylether in Hexan mit 15 ml einer wäßrigen Suspension von *Aspergillus glaucus* versetzt. Die Konzentration der Suspension liegt dabei im Bereich von 5–8 g/l (bezogen auf Trockenmasse). Nach Schütteln und Zentrifugieren entsteht ein Zweiphasensystem, bestehend aus einer klaren lyotropen Mesophase und Hexan. Anschließend werden 5 ml Zimtaldehyd zugegeben. Nach 3 Stunden Standzeit ist im Hexanüberstand Tyrosin nachweisbar. Der Nachweis kann dünnschichtchromatographisch auf einer Silicagelplatte, Butanol/Essigsäure/Wasser = 4/1/1 als L. ummittelbar erfolgen.

Beispiel 5

Ein weiteres zweiphasiges System in dem lyotrope Mesophase und organisches Lösungsmittel koexistieren und in den Biokatalysen entsprechend Beispiel 1, 2 ausgeführt werden können, kann auf folgende Weise hergestellt werden: Man stellt eine 5 Gew.-%ige Lösung von Polyoxyethylensorbitantrioleat (Tween 85) in Heptan her. 1,4 ml dieser Lösung werden mit 800 μ l Wasser oder biokatalysatorhaltiger wäßriger Lösung versetzt und geschüttelt. Es entsteht eine klare hochviskose lyotrope Mesophase, die sich im Gleichgewicht mit reinem Heptan befindet.

Beispiel 6

Es werden 500 ml einer 10 Gew.-%igen Lösung von Prävozell (Gemisch verschiedener Alkylpheno!ethoxylate, Chemische Werke Buna) in Hexan mit 40 ml einer 75 μ M wäßrigen NADH-Lösung versetzt und geschüttelt. In dieses zunächst trübe dreiphasige System werden 10 ml einer 10^{-8} M wäßrigen Lösung von Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (SERVA) und $0,5 \cdot 10^{-7}$ M Formiatdehydrogenase (SERVA) eingespritzt. Nach kurzem Schütteln entsteht ein zweiphasiges System, bestehend aus lyotroper Mesophase und Hexan. Werden als Substrat 100 μ l einer prochiralen Verbindung des Typs:



in der Hexanphase gelöst, so lassen sich nach etwa 10 bis 20 Minuten die entsprechenden β -Hydroxyverbindungen gaschromatographisch nachweisen. Die Reduktion erfolgt stereospezifisch und es wird ein Enantiomerenexzeß der R-Form von 90 bis 97% erreicht. Eine Regenerierung des verbrauchten NADH kann durch Zugabe von 200 μ l Ameisensäure erreicht werden. Mit dem System sind bis zu 200 Reaktionszyklen möglich. Darüber hinaus ist auch eine kontinuierliche Prozeßführung in einem Mixer-Settlersystem oder einem Membranreaktor möglich.

Beispiel 7

Zu 5 ml einer 10%igen Lösung von Prävozell (Gemisch verschiedener Alkylpheno!ethoxylate, Chemische Werke Buna) in Hexan werden 50 ml einer Suspension von *Arthrobacter simplex* in Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7,0) gegeben. Nach Schütteln entsteht eine Mesophase und überstehendes Hexan. Dieses wird abgegossen und 250 ml eines Lösungsmittelgemisches aus 1 Volumenteil Toluol und 4 Volumenteilen Hexan, welches 1 mg/ml Progesteron enthält, wird zugegeben. Das System wird bei 20°C mit 500 rpm gerührt. Nach 10 Stunden kann im Überstand 1-Dehydroprogesteron nachgewiesen werden. Der Nachweis kann dünnschicht- bzw. gaschromatographisch erfolgen.

Beispiel 8

Es wird analog zu Beispiel 7 ein zweiphasiges System hergestellt. An Stelle der wäßrigen Enzym- und Cofaktorklösung werden 50 ml einer Suspension von *Pseudomonas E3* der Konzentration 20 mg/ml (bezogen auf Masse feuchte Zellen) zugesetzt. Das System wird bei 40°C kontinuierlich mit einem Propen/Luft-Gemisch begast. Das entweichende Gas wird durch eine Tetrachlorkohlenstoff enthaltende Kühlfalle geleitet. Nach etwa 2 Stunden ist gaschromatographisch im Tetrachlorkohlenstoff Propylenoxid nachweisbar.

Literaturanhang

- 1 A. Zaks, A. M. Klibanov, Proc. Natl. Acad. sci. USA 82 (1985) 1392–1394
- 2 P. L. Luisi, Angew. Chem. 97 (1985) 449–460
- 3 K. Martinek, A. V. Levashov, N. Klychko, Y. L. Khmelnitzki, I. V. Berezin, Eur. J. Biochem. 155 (1986) 453–468
- 4 USA Patent Nr. 3926726
- 5 H. Wennerström, B. Lindmann, Physical Reports, Review Section of Phys. Let. 52 (1979) 1–86
- 6 G. Häring, P. L. Luisi, F. Meussdoerffer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 127 (1985) 911–915
- 7 P. Lüthi, P. L. Luisi, J. Am. Chem. soc. 106 (1984) 7285–7290
- 8 L. E. S. Brink, I. Tramper, Biotechnol. Bioeng. 27 (1985) 3192–3199
- 9 Europatent Nr. EP 0054987
- 10 Europatent Nr. EP 0068594