



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ **CH 651 066 A5**

⑤① Int. Cl.4: **C 12 P** 13/06
C 12 N 11/08
C 08 L 75/08

// (C 12 P 13/06, C 12 R 1:05)
(C 12 P 13/06, C 12 R 1:38)

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 5956/81	㉔ Inhaber: W. R. Grace & Co., New York/NY (US)
㉒ Anmeldungsdatum: 15.09.1981	
㉓ Priorität(en): 17.09.1980 US 187939	㉕ Erfinder: Swann, Wayne Elliott, Pasadena/MD (US) Fusee, Murray Campbell, Ellicott City/MD (US) Calton, Gary Jim, Elkridge/MD (US)
㉔ Patent erteilt: 30.08.1985	
㉕ Patentschrift veröffentlicht: 30.08.1985	㉖ Vertreter: Dr. A. R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von L-Alanin und Mittel zu dessen Durchführung.**

⑤⑦ Zur Herstellung von L-Alanin aus L-Asparaginsäure auf mikrobiologischem Weg werden Mikroorganismen, welche L-Asparaginsäure-beta-decarboxylase zu bilden imstande sind, in speziellen Polyäther/Polyurethan-Schäumen immobilisiert.

Die Schäume enthalten, in den Polyäthersegmenten des Polyurethans, mindestens 50 Mol.-% der Alkylenoxideinheiten in Form von Äthylenoxid.

Beispiele von geeigneten Mikroorganismen sind *Alcaligenes faecalis* und *Pseudomonas dacunhae*.

Zur Herstellung des hydrophilen Polyäther/Polyurethan-Schaumes wird vorteilhafterweise die Kultur des Mikroorganismus mit dem dazugehörigen Wasser mit einem hydrophilen Polyätherurethanpräpolymer gemischt. Das Präpolymer weist mindestens 50 Mol.-% der Alkylenoxide in Form von Äthylenoxid auf. Das Präpolymer wird dadurch geschäumt und schliesst dabei den Mikroorganismus ein und immobilisiert ihn so. Der Schaum kann je nach Vernetzungsgrad starr oder flexibel sein.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von L-Alanin, gekennzeichnet durch das Inkontaktbringen eines hydrophilen Polyäther-Polyurethanschäum, in dem mindestens 50 Mol.-% der Alkylenoxideinheiten in den Polyäthersegmenten des Polyurethans Äthylenoxid sind und welcher Schaum einen Mikroorganismus immobilisiert enthält, welcher L-Asparaginsäure- β -dekarboxylase zu bilden imstande ist, mit einem L-Asparaginsäure enthaltenden Substrat.

2. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat eine wässrige Lösung mit pH 3 bis 11 ist und dass es eine Temperatur von 15 bis 60°C hat.

3. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Pseudomonas dacunhae* ist und dass das Substrat Pyridoxal-5-phosphat enthält.

4. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Alcaligenes faecalis* ist.

5. Verfahren gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt wird.

6. Hydrophiler Polyäther-Polyurethanschäum als Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er mindestens 50 Mol.-% der Alkylenoxideinheiten in den Polyäthersegmenten des Polyurethans Äthylenoxid enthält und einen Mikroorganismus immobilisiert enthält, welcher L-Asparaginsäure- β -dekarboxylase zu bilden imstande ist.

7. Schaum gemäss Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 90 Mol.-% der Alkylenoxideinheiten darin Äthylenoxid sind.

8. Schaum gemäss Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Schaum in starrer Ausformung vorliegt.

9. Schaum gemäss Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Schaum in flexibler Ausformung vorliegt.

10. Schaum gemäss Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass in ihm das Verhältnis der Trockengewichte von Polyurethanpolymer zum Mikroorganismus zwischen 10:1 und 1:10 liegt.

11. Schaum gemäss Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass in ihm als Mikroorganismus *Pseudomonas dacunhae* oder *Alcaligenes faecalis* vorliegt.

Die hier beschriebene Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Alanin unter Verwendung eines immobilisierten, Asparaginsäuredekarboxylase produzierenden Mikroorganismus, sowie ein Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens.

In der folgenden Beschreibung steht Asparaginsäuredekarboxylase für L-Asparaginsäure- β -dekarboxylase gemäss Enzymklassifikation Nr. 4-1-1-12).

Es sind verschiedene Verfahren bekannt, um L-Alanin aus der L-Asparaginsäure oder ihren Salzen mittels enzymatischer Reaktion von Asparaginsäuredekarboxylase auf die genannten Ausgangsverbindungen bekannt. Beispielsweise kann L-Alanin dadurch erhalten werden, dass ein Mikroorganismus kultiviert wird, welcher Asparaginsäuredekarboxylase zu bilden imstande ist. Die Kultivierung geschieht in einer Kulturbrühe, welche anschliessend mit der L-Asparaginsäure umgesetzt wird (publizierte JP-Patentanmeldung Nr. 7560/1971). Andererseits kann L-Alanin erhalten werden, indem ganze Zellen, welche Asparaginsäuredekarboxylaseaktivität aufweisen, mit L-Asparaginsäuresalze oder Ester umgesetzt werden. Die Enzyme können aber

auch vorerst extrahiert und erst dann mit den Ausgangsverbindungen in Kontakt gebracht werden (Biochimica et Biophysica Acta, volume 67, 1963). Das in den oben beschriebenen Verfahren erhaltene L-Alanin enthält jedoch verfahrensinhärenterweise Enzyme, Enzymreste, Zellen, Zellbestandteile, Bestandteile aus der Kulturbrühe und weitere Verunreinigungen wie Proteine. Dementsprechend müssen den obigen Herstellungsverfahrensschritte Reinigungsschritte angeschlossen werden, um ein L-Alanin von hoher Reinheit zu erhalten. Ebenso kommt es bei den obengenannten Umsetzungen oft vor dass die Reaktionslösung nach Abschluss der Umsetzung aufgeköcht oder angefeuert werden muss, um das Enzym oder den Mikroorganismus auszufällen. Der ausgefallene Feststoff wird dann abfiltriert. Dies bedeutet, dass das Enzym oder der Mikroorganismus dann nur einmal verwendet werden kann.

Um die genannten Nachteile auszuschalten, ist die Immobilisierung von Mikroorganismen, welche L-Asparaginsäuredekarboxylase zu bilden vermögen, in polymeren Trägerstoffen vorgeschlagen worden. Die US-Patentschrift 3 989 128 zum Beispiel beschreibt diese Immobilisierung in semipermeablen Polyacrylamidmembranen. Die US-Patentschrift 3 458 400 andererseits beschreibt die enzymatische Umsetzung von L-Asparaginsäure zu L-Alanin unter Einsatz von *Pseudomonas dacunhae* oder *Achromobacter* pestifer als Mikroorganismen, welche Asparaginsäuredekarboxylase zu bilden imstande sind.

Auch die Immobilisierung von Mikroorganismen in hydrophilen Polyurethanschäumen ist schon vorgeschlagen worden. Die US-Patentschrift 3 905 923 (Erfinder: Klug) und die US-Patentanmeldung Serial Nr. 362 488 vom 21. Mai 1973 (Erfinder Louis L. Wood et al) mit dem Titel «Herstellung und Verwendung von an Polyurethan gebundenen Enzymen) ist ein Beispiel einer solchen Veröffentlichung. Die Immobilisierung von Enzymen an Polyurethanen wird auch in der US-Patentschrift 3 672 955 (Erfinder Stanley) speziell in Kolonne 5, Zeilen 27 bis 35, beschrieben. Hydrophile Polymere sind auch als Träger für andere Chemikalien, beispielsweise Bakteriostaten und Fungiziden, vorgeschlagen; siehe dazu die US-Patentschrift 3 975 350 (Erfinder: Hudgin). Es ist ebenfalls bekannt, Bakterienzellen in hydrophoben Polyurethanen zu immobilisieren; siehe das Beispiel 4 der GB-Patentschrift 953 414. Die Immobilisierung einer grossen Zahl von Enzymen in hydrophilen Polyurethanen wird auch in der US-Patentanmeldung Serial Nr. 849 999 (Erfinder Hartdegen et al) vom 9. November 1977 mit dem Titel «Immobilisiertes biologisches Material» gelehrt.

Weitere einschlägige Referenzen umfassen:

50 Sonomoto et al; Agric. Biol. Chem., 44 (5), Seiten 1119 bis 1126, 1980. In dieser Arbeit werden Steroidkonversionen ausgeführt unter Einsatz von Bakterienzellen, die in Polyurethanen eingeschlossen sind. Polyurethane werden aus Urethanpräpolymeren erhalten.

55 Fukui et al, Biochimie, 1980, 62, Seiten 381 bis 386. In dieser Arbeit wird die Verwendung von Enzymen beschrieben, welche in photo-vernetzbaaren Präpolymeren und Urethanpräpolymeren immobilisiert sind und zur Herstellung von L-Aminosäuren geeignet sind. Auch die Immobilisierung von Bakterienzellen unter Verwendung von Urethanpräpolymeren wird beschrieben.

In einer unlängst abgehaltenen «Gordon Research Conference» vom August 1980 ist über die Immobilisierung von ganzen Zellen unter Verwendung von Urethanpräpolymeren diskutiert worden. Beispiele solcher Zellen sind genetisch manipulierte *E. coli*, die grosse Mengen von Penicillinamidase enthalten. An der gleichen Konferenz wurde

auch berichtet von Biotransformationssystemen für die Herstellung von L-Serin und L-Tryptophan.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von L-Alanin ist im vorangehenden Patentanspruch 1 charakterisiert.

Bevorzugterweise enthalten die Polyäthersegmente des Polymethans mindestens 90 Mol.-% an Äthylenoxideinheiten. Je nach Menge des eingesetzten Vernetzungsmittels kann der Schaum als starrer Körper oder als flexibles Mittel vorliegen. Bezogen auf das Trockengewicht des eingesetzten Mikroorganismus liegt das Gewichtsverhältnis des Polyurethanpolymeren zum Mikroorganismus im Schaum normalerweise zwischen 1:10 und 10:1, bevorzugterweise zwischen 2:1 und 4:1. Vor der Zugabe der Kultur zum Präpolymeren kann das Trockengewicht des Mikroorganismus in der Kultur durch Abdampfen der flüssigen Phase der Kultur bestimmt werden. Dieses Abdampfen geschieht bei einer geeigneten Temperatur, beispielsweise bei 50°C. Anschliessend wird, wenn eine derartige Kultur mit dem Präpolymer geschäumt wird, 10 bis 90% des Mikroorganismus im Schaum eingeschlossen und immobilisiert.

In frisch zubereiteten derartigen Schäumen sind Auswaschraten von Enzymzellen von normalerweise unter 25 Gew.-% der eingesetzten Kultur beobachtet worden. Im allgemeinen nimmt diese Auswaschraten mit dem Beladungsgrad des Schaums zu. Auch wenn während der Zumischung in der Masse Klumpen verbleiben, d.h. wenn der Mischungsgrad ungenügend ist, steigt der anschliessende Auswaschgrad. Unter dem Ausdruck «Immobilisierung» wird in dieser Schrift die Tatsache verstanden, dass die Mikroorganismen im Schaum zurückbehalten werden und nicht beim Kontaktieren des Schaumes mit einem wässrigen Medium daraus herausgespült werden. Es wird angenommen, dass die Mikroorganismen so im Schaum eingeschlossen werden, dass sie dort praktisch immobilisiert werden. Es ist auch anzunehmen, dass während des Schäumungsprozesses zwischen den Isocyanatgruppen des Präpolymeren und zwischen Gruppen auf der Oberfläche des Mikroorganismus, zum Beispiel Aminogruppen, Verbindungen hergestellt werden.

Die Schäume können dadurch erhalten werden, dass die Kulturen mit den Mikroorganismen, welche L-Asparaginsäuredecarboxylase zu bilden imstande sind, direkt mit einem Urethanpräpolymer in Anwesenheit von genügend Wasser unter Bedingungen, die zu Schäumen führen, gemischt werden. Normalerweise ist das Wasser der Organismuskultur genügend; dies ist zum Beispiel der Fall, wenn die genannten Kulturen 10 bis 90 Gew.-% Wasser enthalten. Bedingt durch die Anwesenheit von Wasser wird das Präpolymer schäumen und gleichzeitig den Mikroorganismus im Schaum einschliessen und immobilisieren. Um die Immobilisierung zu optimieren, sollte der pH der wässrigen Phase der Kultur zwischen 3 und 11 liegen, bevorzugterweise liegt er über 7. Während der Immobilisierung beträgt das Gewichtsverhältnis zwischen Präpolymer und Wasser im allgemeinen 2:1 bis 1:2, bevorzugterweise 3:2 bis 2:3. Wenn das Wasser der Kultur nicht genügt, wird vor oder während der Vermischung Wasser zugegeben.

Nach der Zumischung der Kultur läuft die Schäumungsreaktion im allgemeinen innerhalb von 5 bis 10 Minuten ab. Der Schaum wird dann ausgehärtet zu seiner Schlussumformung, die sowohl starr wie flexibel sein kann. Diese Aushärtung dauert nochmals 5 bis 10 Minuten. Wenn die hergestellten Schaummassen sehr gross dimensioniert sind, können sowohl Schäumungszeiten wie auch Aushärtungszeiten wesentlich grösser sein.

Diejenigen Mikroorganismen, welche Asparaginsäuredecarboxylase zu bilden imstande sind und daher im erfin-

dungsgemässen Verfahren eingesetzt werden können, umfassen Stämme von:

- Alcaligenes faecalis
- 5 Pseudomonas dacunhae
- Clostridium perfringens
- Nocardia globurela
- Desulfovibrio desulfuricans
- Achromobacter pestifer.

10 Die Liste stellt Beispiele der erfindungsgemässen einzusetzenden Mikroorganismen dar.

Alle die in der obigen Liste aufgeführten Mikroorganismen sind von Kulturkollektionsstellen frei erhältlich. Die 15 Stämme daraus, welche L-Asparaginsäuredecarboxylase zu bilden imstande sind, können bestimmt werden durch Konsultierung der entsprechenden Beschreibungen der Sammlungen; beispielsweise dem ATCC Katalog. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die vorliegend beschriebene Erfindung nicht auf die obigen spezifischen Mikroorganismen beschränkt ist; die Erfindung umfasst vielmehr alle 20 L-Asparagindecarboxylase produzierenden Mikroorganismen.

L-Alanin kann nun erfindungsgemäss dadurch erhalten 25 werden, dass der präparierte Schaum mit L-Asparaginsäure kontaktiert wird. Normalerweise wird die L-Asparaginsäure in Form einer 0,1 bis 1,5 molaren, wässrigen Lösung mit einem pH zwischen 3 und 7 eingesetzt. Zur Einstellung des geeigneten pH-Wertes können Ammoniumhydroxid, 30 Phosphorsäure und andere Verbindungen verwendet werden.

Der Schaum mit dem immobilisierten Mikroorganismus wird mit der Substratlösung in Kontakt gebracht und die Mischung wird bei Temperaturen zwischen 15 und 60°C 35 unter Rühren solange inkubiert, bis die Umsetzung abgeschlossen ist. Nach Abschluss der Umsetzung wird der Schaum abgetrennt und kann unter Kühlen bis zur nächsten Verwendung gelagert werden. Das L-Alanin wird aus dem Substrat mittels konventioneller Methoden gewonnen. Alternativ kann die enzymatische Reaktion in einer Kolonne 40 ausgeführt werden, d.h. das Verfahren geschieht kontinuierlich. Beispielsweise wird der Schaum in eine Kolonne gepackt und zwar in einer derartigen Raumdichte, um das Durchfliessen des Substrates zu ermöglichen. Die Substratlösung, wiederum mit einem pH zwischen 3 und 7 und die L-Asparaginsäure enthaltend, wird bei einer Temperatur von 15 bis 60°C und unter einer geeigneten Durchflussgeschwindigkeit über die Kolonne gegeben. Als Ausfluss 45 wird eine L-alaninhaltige Lösung erhalten. Diese Lösung kann, falls nötig, umgepumpt werden. Das L-Alanin kann daraus entsprechend der Methode des weiter unten folgenden Beispiels 4 gewonnen werden.

Die zur Herstellung des Polyurethanschaums zu verwendenden Urethanpräpolymere werden beispielsweise folgender- 55 massen erhalten: ein Polyoxyalkylenpolyol wird mit einem Überschuss von Polyisocyanat, beispielsweise Toluoldiisocyanat, umgesetzt. Vor der Umsetzung sollte das Polyol ein mittleres Zahlenmolekulargewicht zwischen 200 und 20 000, bevorzugterweise zwischen 600 und 6 000 aufweisen. Die 60 Hydroxylfunktionalität des Polyols und die entsprechende Isocyanatfunktionalität nach der Umsetzung liegt zwischen 2 und 8. Falls Schäume aus Präpolymeren mit einer Isocyanatfunktionalität von ungefähr 2 gebildet werden, ist das erhaltene Produkt im wesentlichen linear und hat nicht 65 die Zugfestigkeit eines entsprechenden vernetzten Materials. Daher wird ein Hydroxygruppengehalt von mehr als 2 pro Molekel angestrebt. Dies kann dadurch erreicht werden, dass Mischungen von Diolen und Triolen oder höher funktion-

neller Polyole mit Di- oder Polyisocyanaten umgesetzt werden.

Beispiele von einsetzbaren Polyolen (für die Umsetzung mit den Polyisocyanaten) umfassen: (A) im wesentlichen lineare Polyole, beispielsweise erhalten durch Umsetzung von Äthylenoxid mit Äthylenglykol als Initiator. Mischungen von Äthylenoxid mit anderen Alkylenoxiden können ebenfalls verwendet werden; der Molanteil von Äthylenoxid muss jedoch mindestens 50 Mol.-% betragen. Wenn die linearen Polyäther Mischungen von Äthylenoxiden mit beispielsweise Propylenoxid sind, kann das Polymer sowohl ein Random- oder ein Blockpolymer sein. Die Endgruppen können dann entweder Oxyäthylen oder Oxypropylen sein.

Eine zweite Gruppe von Polyolen (B) umfassen diejenigen mit einer Hydroxyfunktionalität von 3 oder mehr. Solche Polyole werden normalerweise durch Umsetzung von Alkylenoxiden mit polyfunktionalen Initiatoren wie Trimethylolpropan, Pentaerythritol, usw. erhalten. Bei der Gewinnung der Polyole der Gruppe B sind die eingesetzten Alkylenoxide entweder Äthylenoxid oder Mischungen von Äthylenoxid mit anderen Alkylenoxiden.

Eine weitere, beispielhafte Gruppe der einzusetzenden Polyole (C) umfasst die linearen, verzweigten polyfunktionalen Polyole wie in den Gruppen R und B weiter oben, zusammen mit einem Initiator oder Verzweigungsagens. Ein spezifisches Beispiel aus der Gruppe C ist eine Mischung von Polyäthylenglykol mit einem mittleren Molekulargewicht von 1 000 mit Trimethylolpropan, Trimethyloläthan oder Glycerin. Diese Mischung kann anschliessend mit einem Überschuss an Polyisocyanat umgesetzt werden, um so ein Präpolymer zu erhalten, welches erfindungsgemäss eingesetzt werden kann. Andererseits können auch lineare oder Verzweigt-Polyole (z.B. Polyäthylenglykol) separat mit einem Überschuss an Polyisocyanat reagiert werden. Der Initiator, beispielsweise das Trimethylolpropan, kann auch getrennt davon mit dem Polyisocyanat umgesetzt werden. Die beiden vorbehandelten Materialien können anschliessend dann kombiniert werden, um so das Präpolymere zu bilden.

Geeignete Polyisocyanate und Initiatoren sind zum Beispiel diejenigen, die in der US-Patentschrift 3 903 232 beschrieben sind. Die Initiatoren sind normalerweise wasserlösliche oder Wasser dispergierbare Vernetzungsmittel, wie sie in der gleichen US-Patentschrift beschrieben sind.

Zur Herstellung des Präpolymers A werden zwei Moläquivalente Polyäthylenglykol mit einem mittleren Zahlenmolekulargewicht von 1000 und 0,66 Moläquivalente von Trimethylolpropan gemischt. Die Mischung wird nun bei 100 bis 110°C und bei einem Druck von 5 bis 15 Torr getrocknet, um das Wasser zu entfernen. Die erhaltene, getrocknete Mischung wird langsam, während ungefähr 1 Stunde, in einen Rührbehälter gegeben, welcher 5,52 Moläquivalente Toluoldiisocyanat enthält. Die Temperatur wird während der Zugabe bei 60°C gehalten; nach Beendigung der Zugabe wird 3 Stunden lang weiter gerührt. Nun werden nochmals 0,78 Moläquivalente Toluoldiisocyanat zugegeben, wobei wiederum gerührt wird. Auch nach dieser Zugabe wird noch 1 Stunde lang bei 60°C weiter gerührt. Die Reaktionsmischung enthält nun einen 5%igen molaren Überschuss an Toluoldiisocyanat. Alle Hydroxylgruppen reagieren mit Isocyanat und es erfolgen Kettenverlängerungen wegen der Vernetzung der Polyole mit dem Toluoldiisocyanat.

Beispiel 1

Zellen von *Alcaligenes faecalis* (ATCC Nr. 25 094) wurden mit 5 g Präpolymer A, dessen Herstellung weiter oben

beschrieben ist, gemischt. 8 g Zellenkultur wurden dabei eingesetzt. Das Trockengewicht der Zellen in der Kultur betrug 1 g. Durch das Wasser in der Kultur entstand ein flexibler, hydrophiler Polyurethanschaum, welcher in ungefähr 15 Minuten aushärtete. Die Kulturzellen waren im Schaum selber oder auf der Oberfläche davon ein- bzw. angeschlossen.

Beispiel 2

Der Schaum aus dem Beispiel 1 wurde in eine Kolonne gegeben und oben und unten je mit einem Millipore-Filter abgedeckt. Am unteren Ende der Kolonne wurde ein Behälter mit 50 g L-Asparaginsäure in Kontakt mit der Kolonne befestigt. Nun wurden von unten her 4 lt einer Lösung mit 40 ml NH_4OH und 10 ml Tween 80 mit einem pH von 10 (eingestellt mit 50%iger H_3PO_4) durch die 11-Asparaginsäure und dann durch die Kolonne gepresst. Die Lösungstemperatur lag bei ungefähr 25°C und die Durchflussgeschwindigkeit bei ungefähr 0,67 ml pro Minute. Während der ersten 40 Durchflusstunden ergaben sich 0,90 mg/ml L-Alanin im Ausfluss, dies entspricht einer Produktionsmenge von 0,60 mg/Min. Anschliessend wurde die Durchflussgeschwindigkeit auf 0,34 ml/Min. reduziert, wodurch die Konversionsgeschwindigkeit auf 1,62 mg/ml stieg. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,17 ml pro Minute stieg die Umsetzung auf 2,66 mg/ml.

Die Gehaltsbestimmung an L-Alanin wurde mittels des Technicon-Autoanalysers unter Einsatz von L-Aminosäureoxidase ausgeführt. Das L-Alanin wird dabei zur entsprechenden α -Ketosäure, Ammoniak und H_2O_2 umgesetzt. Das entstandene Peroxid wird mit 2,4-Dichlorphenol und 4-Aminoantipyren umgesetzt, in Anwesenheit der entsprechenden Peroxidase. Das resultierende Reaktionsprodukt, ein Chinoneimin-Farbstoff, wurde colorimetrisch bei 505 nm bestimmt.

Beispiel 3

Schaum, wie er im Beispiel 1 hergestellt worden ist, wurde zerkleinert und dann in eine Kolonne gepackt. Die Kolonne wies einen Doppelmantel auf. Die Temperatur wurde durch Durchleiten von Wasser im genannten Doppelmantel eingestellt. Das Substrat wurde mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,67 ml pro Minute durchgeleitet. Es bestand aus 500 ml entionisiertem Wasser, welches 10 ml einer konzentrierten NH_4OH -Lösung und 2,5 ml Tween 80 enthielt. Das Substrat trat, vor Eintritt in die gepackte Kolonne, durch einen Behälter, der 53 g feste L-Asparaginsäure bei Raumtemperatur enthielt. Beim Durchtritt durch die Kolonne wurde das Substrat auf 27°C aufgewärmt und anschliessend, vor Rückkehr in den Substratbehälter, wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Im genannten Behälter lag die feste L-Asparaginsäure vor. Durch den Kontakt der beiden Substanzen bildete sich ein Lösungsgewicht in der Vorlage aus. Das Substrat wurde kontinuierlich durch die Kolonne gegeben. Das Verfahren wurde bei Temperaturen von 37 und 50°C wiederholt. Der Lauf bei 27°C dauerte 20 Stunden, derjenige bei 37°C 72 und der letzte bei 50°C etwa 24 Stunden. Die Umsetzungsgeschwindigkeit für die Bildung von L-Alanin wurde gleich bestimmt wie im Beispiel 2; sie betrug bei 27°C 112,5 mg/h, bei 37°C 334 mg/h und bei 50°C 0 mg/h.

Beispiel 4

26 g Zellen von *Pseudomonas dacunhae* (ATCC Nummer 21 192) wurden mit 20 g Präpolymer A gemäss Beispiel 1 gemischt; die Mischung wurde anschliessend geschäumt und ausgehärtet. Der Schaum wurde nun in Würfel von ungefähr 1 cm^3 Grösse geschnitten und in eine 100 cm^3 Kolonne gegeben. Ein Substrat von ungefähr 0,5 m

L-Asparaginsäure wurde durch die Kolonne gegeben. Der pH des Substrates wurde durch Zugabe von H_2SO_4 auf 5,3 eingestellt; derselbe enthielt auch 10 mg/l Pyridoxal-5-phosphat und 2,5 g/l Tween 80. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 0,65 ml/min, was zu einer Umsetzung von L-Asparaginsäure zu L-Alanin (analysiert wie im Beispiel 2) von 14 bis 17 mg/ml ergab. Das Substrat wurde nicht umgewälzt, d.h. es floss nur einmal durch die Kolonne. Nachdem 700 cm³ durch die Kolonne geflossen waren, wurde das L-Alanin aus der Austrittslösung isoliert. Dazu wurde das Substrat auf 85°C erwärmt, der pH desselben auf 5,5 gebracht und schliesslich die Lösung auf 15°C abgekühlt. Dabei fielen sowohl die L-Asparaginsäure wie auch das L-Alanin aus. Die abgetrennten Feststoffe wurden in entionisiertem Wasser aufgenommen, wobei L-Alanin in Lösung ging. Die nicht aufgelöste L-Asparaginsäure wurde abfiltriert. Unter Vakuum wurde nun das Wasser aus der Lösung abgedampft und man erhielt Kristalle von L-Alanin. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 151,4 g.

Beispiel 5

Das Verfahren gemäss Beispiel 4 wurde ungefähr 2 Wochen lang betrieben. Anschliessend wurde mit der gleichen Kolonne ein anderes Substrat umgesetzt. Dieses neue Substrat war 1 Molar bezüglich L-Asparaginsäure und enthielt zusätzlich 125 cm³ NH_4OH /lt. Der pH des neuen Substrates wurde durch Zugabe von 60%iger H_2SO_4 auf 5,3

eingestellt. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 0,65 ml pro Minute. Die anfängliche Umsetzungsgeschwindigkeit betrug ungefähr 14 mg/ml. Nun wurde ein drittes Substrat eingesetzt und zwar eins, welches nur 0,05 Molar war in bezug auf L-Asparaginsäure pro lt. Die Konversionsgeschwindigkeit erniedrigte sich zu 4 bis 5 mg/ml.

Andere, neue Ansätze mit Substraten, die 1 Molar waren bezüglich L-Asparaginsäure ergaben Umsetzungsgeschwindigkeiten von 27 bis 32 mg/ml. Bei Umwälzen der Flüssigkeit wurden Umsetzungen von 45 bis 50 mg/ml erreicht. Durch Zugabe von Pyridoxal-5-Phosphat (12,5 mg/l) wurden durchschnittliche Umsetzungen von ungefähr 36 mg/ml erhalten. Anschliessende Ansätze ohne Pyridoxal-5-phosphat aber mit Umwälzungen ergaben 45 mg/ml L-Alanin. Nachdem die gleiche Kolonne ungefähr 45 Tage lang in Betrieb gewesen war, fiel der Umsetzungsgrad auf ungefähr 16 mg/ml. In dieser Zeit wurde jedoch hauptsächlich ohne die Zugabe von Pyridoxal-5-phosphat gearbeitet, und, bei neuerlicher Zugabe der genannten Verbindung (12,5 mg/ml) stieg die Umsetzungsgeschwindigkeit wiederum auf 40 mg/ml. Bei Umwälzungen dieses neuen Substrates während 24 Tagen erhöhte sich zum einen der pH des Substrates auf ungefähr 8,7, was einer Konversionsrate von über 90% entspricht. Der Gehalt an L-Alanin in der Lösung wurde gemäss dem Verfahren aus dem Beispiel 2 festgestellt. Am Schluss stand eine Umsetzung von L-Asparaginsäure zu L-Alanin von 94% fest.