



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

EPO-DG 1
18. 07. 2001
(54)

- (51) Int.Cl.: C 12 N 11/04 C 12 P 7/42
(21) Patentansøgning nr: PA 1989 05965
(22) Indleveringsdag: 1989-11-27
(24) Løbedag: 1989-11-27
(41) Alm. tilgængelig: 1990-05-29
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2001-07-16
(30) Prioritet: 1988-11-28 CH 4403/88

- (73) Patenthaver: NOVARTIS AG, Schwarzwaldallee 215, CH-4058 Basel, Schweiz
(72) Opfinder: Pierre Francois Fauquex, Salmenstrasse 1, 4127 Birsfelden, Schweiz
Gottfried Sedelmeier, Erlenweg 11, 7801 Schallstadt, Tyskland
(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Ostfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark

(54) Benævnelse: Biokatalysatorer samt fremgangsmåde til fremstilling deraf og fremgangsmåde til fremstilling af α -hydroxycarboxylsyrer

(56) Fremdragne publikationer:
Intet

(57) Sammendrag:

Perleformede biokatalysatorer med høj mekanisk styrke kan fremstilles ved, at enzymatisk aktivt materiale blandes med fældet kiseltsyre i fast form, en vandig pufferopløsning og en vandig opløsning af en kationisk polyelektrolyt, fortrinsvis chitosan, under undgåelse af skumdannelse til en suspension, som dråbevis indføres i et vandigt tværbindingsbad indeholdende polyvalente anioner, og de fremkomne biokatalysatorperler bringes til at skrumpe ind og stivne i tværbindingsbadet, hvorpå de eventuelt skilles fra tværbindingsbadet.

De perleformede biokatalysatorer kan anvendes til omsætning af organiske stoffer, f.eks. til fremstilling af α -hydroxycarboxylsyrer ud fra α -ketocarboxylsyrer, især af 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre ud fra 2-oxo-4-phenylsmørsyre.

Opfindelsen angår perleformede biokatalysatorer med høj mekanisk styrke, en fremgangsmåde til fremstilling deraf samt fremgangsmåde til fremstilling af α -hydroxycarboxylsyrer ved hjælp af biokatalysatorerne ifølge opfindelsen.

Begrebet biokatalyse omfatter i bredeste betydning alle former for katalyse, ved hvilke det aktiverende stof er et biologisk system, f.eks. hele celler, cellefragmenter eller celleorganeller, eller stammer fra et biologisk system, f.eks. enzymer. Enzymer er forbindelser, sædvanligvis proteiner eller glycoproteiner, der specifikt accelererer biokemiske reaktioner, idet de nedsætter aktiveringsenergien. I det følgende betegner udtrykket biokatalysator ikke blot det aktiverende stof selv, men kan eventuelt også omfatte komponenter, der anvendes til immobilisering, holdbarhed, regenerering osv. af det aktiverende stof.

Immobiliserede, dvs. i deres bevægelighed indskrænkede biokatalysatorer er især egnede til industrielle formål. Ved immobiliseringen bliver det muligt at udføre de katalyserede processer kontinuerligt og gentaget, at skabe og opretholde høje biokatalysatortætheder, at opnå høje tids-rum-udbytter og at sænke omkostningerne for udvinding af produktet fra reaktionsopløsningen.

Det biokatalytiske materiale kan til immobilisering eksempelvis indesluttet i polymere overtræksstoffer (matrix), i kapsler eller fibre af semipermeable membraner eller bag ultrafiltreringsmembraner, tværbinding med bi- eller multifunktionelle reagenser eller ved adsorption eller ionisk eller covalent binding fikseres på bærere af uorganisk materiale eller naturlige eller syntetiske polymere. Også en kombination af disse metoder er mulig.

Ved immobiliseringen må på den ene side den størst mulige bevaring af den biokatalytiske aktivitet og på den anden

side høj mekanisk styrke og kemisk stabilitet, men samtidig også god permeabilitet for biokatalysatoren sikres. En gængs immobiliseringsmetode er eksempelvis indeslutning ("entrapment") af det biologisk aktive materiale i en matrix af naturlige polymere, såsom cellulose, agar, gelatine og andre, eller af syntetiske polymere, såsom polyacrylamid, polyurethaner, epoxyharpikser og andre. Særlig skånende er immobiliseringen ved ionotrop geldannelse (ionisk tværbinding af matricestofferne), hvortil der som overtræksmateriale eksempelvis egner sig naturlige polyanioner, såsom alginat, pektin, carrageenan og andre. Ved inddrypning eller indsprøjtning af en suspension af enzymatisk aktivt materiale og en vandig opløsning af matricestoffet i en vandig tværbindingsopløsning, der indeholder polyvalente modioner, f.eks. Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} og andre, opnås chelatisering og dannelse af perleformede biokatalysatorer.

Ved den ionotrope geldannelse af organiske polymere såsom som regel kun relativt bløde, mekanisk ustabile immobilisatorer, der har tendens til kvældning og deformation, således at f.eks. deres anvendelse i fyldlegemereaktorer, således som de hyppigt anvendes industrielt til enzymatiske reaktioner, giver vanskeligheder. Hærdningsmetoder ved efterbehandling af immobilisatorerne eller ved forbehandling af det biologisk aktive materiale før tilsætningen til geleringsmidlet, i hvert tilfælde med multifunktionelle tværbindingsreagenser, såsom polyaldehyder, f.eks. glutaraldehyd, eller isocyanater, f.eks. hexamethylendiisocyanat, kan på grund af deres celle- og/eller enzymskadelige virkning kun anvendes meget begrænset. Et alternativ er anvendelsen af uorganiske stoffer, f.eks. den i tysk offentliggørelsesskrift nr. 3.520.001 beskrevne fremgangsmåde, der afslører immobiliseringen af enzymatisk materiale ved hjælp af silikasol og alginat. Også tørring og skrumpning af biokatalysatorperlerne anvendes til hærdning, da perlerne efter genbefugtning ikke atter kan

indtage deres oprindelige fugtige rumfang og forbliver hårdere. Tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.835.875 beskriver en fremgangsmåde til ionotrop geldannelse under
5 anvendelse af polyanioner, f.eks. natriumalginat, og eksempelvis calciumioner som tværbindingmiddel, ved hvilken de med enzymatisk stof ladede biokatalysatorperler tørres ved en temperatur indtil 80°C. Sådanne tørringstrin kan dog ikke altid gennemføres, når højfølsomme enzymer
10 eller enzymsystemer, især levende celler, skal immobiliseres, da de høje temperaturer ved tørringen eller den tørre tilstand inaktiverer cellerne eller enzymerne.

Endnu en ulempe ved de ved ionotrop geldannelse fremstillede calciumalginat-immobilisater er foruden de dårlige
15 mekaniske egenskaber også indskrænkningen i mulige reaktionsmedier ved den videre forarbejdning. Sådanne immobilisater er f.eks. kemisk ustabile i nærvær af ioner, som de gængse pufferopløsninger indeholder, såsom natrium eller kalium. I sådanne elektrolytopløsninger, især når de
20 er højkoncentreret, fortrænges f.eks. de gelstyrkende calciumioner i calciumalginat-geler, fordi natrium- og kaliumioner konkurrerer om alginatanionen. Også phosphationer fører efterhånden til opløsning af calciumalginat-biokatalysatorperler, da phosphater reagerer med calcium
25 og unddrager alginatet det strukturstyrkende middel. Opløsningen kan hindres, når der som matricestoffer anvendes polykationer, f.eks. chitosan, der tværbindes med polyvalente anioner, såsom $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, polyphosphater og lignende. De tyske patentskrifter nr.
30 3.005.632 og 3.005.633 beskriver fremstillingen af biokatalysatorperler under anvendelse af chitosan og $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Fremgangsmåden ifølge tysk patentskrift nr. 3.005.632 indeholder til hårdning af perlerne et tørringstrin ved en temperatur indtil 80°C. For at muliggøre
35 immobiliseringen af højfølsomt enzymatisk stof, indeholder fremgangsmåden ifølge tysk patentskrift nr. 3.005.633 ikke dette tørringstrin, hvilket dog fører til en ringere

mekanisk styrke af biokatalysatorperlerne.

Det er den foreliggende opfindelses opgave af stille
5 perleformede biokatalysatorer til rådighed,

- der har høj mekanisk styrke,
- hvis stabilitet også er sikret ved anvendelse af de
gængse biologiske opløsninger og puffersystemer, og
- som endvidere sikrer højfølsomt enzymatisk aktivt
10 materiales enzymatiske aktivitet.

Endvidere er det opfindelsens opgave at påpege egnede
fremgangsmåder til fremstilling af sådanne biokatalysa-
torer.

15

Som særlig egnede til løsning af disse opgaver viser sig
perleformede biokatalysatorer, der indeholder enzymatisk
aktivt materiale, en kationisk polyelektrolyt, fortrinsvis
chitosan, polyvalente anioner og kiselsyre. Sådanne bioka-
20 talysatorperler fremstilles i fast form ved en skånende
immobiliseringsfremgangsmåde ved ionotrop geldannelse og
ved anvendelse af kiselsyre og fremstilles ud fra en
suspension af det enzymatisk aktive materiale, kiselsy-
ren, pufferopløsning og polyelektrolytten, hvori slutkon-
25 centrationen af kiselsyre ligger i et interval mellem 2 og
15 vægt-%.

Opfindelsen angår perleformede biokatalysatorer med høj
mekanisk styrke omfattende enzymatisk aktivt materiale, en
30 kationisk polyelektrolyt og polyvalente anioner, som er
ejendommelige ved, at biokatalysatorerne ifølge opfindel-
sen indeholder kiselsyre og fremstilles ud fra en suspension
af det enzymatisk aktive materiale, kiselsyren, pufferopløs-
ning og polyelektrolytten, hvori slutkoncentrationen af
35 kiselsyre ligger i et interval mellem 2 og 15 vægt-%.

De perleformede biokatalysatorer ifølge opfindelsen er karakteristiske ved høj mekanisk styrke, hvilket kan føres tilbage til udviklingen af en Dual-gelmatrice-struktur. De har derfor gode pakningsegenskaber, eksempelvis ved fyldning af en reaktionsbeholder, og kan anvendes som fyldmateriale til fastlejlereaktorer. På grund af de milde immobiliseringsbetingelser, der ikke omfatter noget tørringstrin eller en behandling med skadelige stoffer, er biokatalysatorerne ifølge opfindelsen navnlig egnede til højfølsomt materiale, især til levende celler. Fremstillingen af de perleformede biokatalysatorer ifølge opfindelsen ved anvendelse af kiseltsyre i fast form har i forhold til de fra teknikens standpunkt kendte fremgangsmåder de fordele, at tids- og omkostningskrævende fremgangsmåder til forberedelse af de ved hærkningstrinnet anvendte tværbindingsmidler undgås. Endvidere kan biokatalysatorerne anvendes i puffersystemer, der indeholder ioner, der fører til opløsning af alginatgeler. Således kan biokatalysatorerne ifølge opfindelsen eksempelvis anvendes i opløsninger, der indeholder phosphationer, f.eks. i den meget billige og derfor til industrielle formål fordelagtige tripolyphosphatpuffer. De perleformede biokatalysatorer ifølge opfindelsen egner sig til omsætning af organiske stoffer. Da de kan anvendes til reaktioner, der kræver høje elektrolytkoncentrationer, egner biokatalysatorperler ifølge opfindelsen, der indeholder en bakterie af slægten *Proteus* eller en oxidoreduktase som enzymatisk aktivt materiale, sig eksempelvis til fremstilling af α -hydroxycarboxylsyrer ud fra α -ketocarboxylsyrer, f.eks. af 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre ud fra 2-oxo-4-phenylsmørsyre.

De perleformede biokatalysatorer ifølge opfindelsen har høj mekanisk styrke. Ved høj mekanisk styrke forstås eksempelvis høj trykstyrke, dvs. at biokatalysatorperler

ifølge opfindelsen med en gennemsnitlig størrelse på ca. 3 mm ved en belastning på 0,01 til 0,03 N, især 0,02 N, efter et til fem minutter har en maksimal deformation på 30 til 50 μ m, især 40 μ m, og efter 10 til 20 minutter, især 15 minutter ikke udviser yderligere deformations-tilvækst.

Arten af det enzymatisk aktive materiale, som biokatalysatorerne ifølge opfindelsen omfatter, er bestemt af den reaktion, hvortil biokatalysatorerne skal anvendes. Det består fortrinsvis af hele celler, cellefragmenter eller celleorganeller af en mikroorganisme, af enzymer eller af en vilkårlig kombination af disse arter enzymatisk aktivt materiale.

Mikroorganismen kan være af prokaryot eller eukaryot natur. Egnede mikroorganismer er eksempelvis

- en bakterie, f.eks. en mælkesyrebakterie (*Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*), *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Proteus* osv.,
- en svamp, f.eks. *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, især gærarter, såsom *Saccharomyces*, *Candida* osv.,
- en alge, f.eks. *Chlorella*, *Curvularia* osv., eller
- en plantecelle, f.eks. *Catharanthus roseus*, *Daucus carota*, *Digitalis lanata*, *Morinda citrifolia* osv..

Anvendelsen af hele celler, cellefragmenter eller celleorganeller, dvs. med membraner overtrukne eller af membransystemer bestående af celleunderenheder (chloroplaster, thylakoider, mitochondrier osv.), som enzymatisk aktivt materiale er fordelagtig, når den reaktion, der skal katalyseres, kræver et multienzymsystem, f.eks. når cofaktorer (pyridin- eller flavinnukleotider osv.) er nødvendige, eller når der i stedet for et katabolsk

produkt af en biosyntese f.eks. skal fremstilles et sekundært produkt, hvortil komplicerede stofskiftekæder er nødvendige.

5

Som enzymatisk aktivt materiale er også isolerede enzymer egnede. Typiske eksempler på sådanne enzymer er oxidoreduktaser (laktatdehydrogenase, alkoholdehydrogenase, glucoseoxidase og andre), transferaser (hexokinase, glutamin-
10 transaminase og andre), lyaser (fumarase, aspartase og andre), isomeraser (glucoseisomerase, mannoseisomerase og andre), ligaser (glutathionsyntetase, NAD-syntetase og andre) osv.

15 Som enzymatisk aktivt materiale kan biokatalysatorerne ifølge opfindelsen også omfatte en vilkårlig kombination af de beskrevne arter enzymatisk materiale, eksempelvis en kombination af hele celler af to eller flere arter eller stammer af mikroorganismer eller en kombination af hele
20 celler og enzymer. Grundtanken er kompletteringen af en celledes biokatalytiske egenskaber med yderligere enzymer, der ikke eller kun i ringe mængde er til rådighed i cellen.

25 Som enzymatisk materiale foretrækkes især hele celler af en bakterie eller en gærart, fortrinsvis en bakterie af slægten *Proteus*, især en bakterie af arten *Proteus vulgaris* og/eller arten *Proteus mirabilis*. Især foretrækkes arten *Proteus vulgaris*, f.eks. *Proteus vulgaris* ATCC 9484.
30 Ligeledes foretrækkes især et enzymatisk aktivt materiale, der indeholder en oxidoreduktase eller er en oxidoreduktase.

35

Den kationiske polyelektrolyt er en naturlig eller syntetisk polymer eller en naturlig polymer efter kemisk modifikation, eksempelvis en polymer med protoniserede aminogrupeer, fortrinsvis chitosan ($[2\text{-amino-2-deoxy-1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-glucopyranan; poly-(1,4-}\beta\text{-D-glucopyranosamin)]$). Chitosan er en lineær polymer med høj molvægt af glucosamin-underenheder, der fås ud fra chitin ved delvis deacetylering ved hjælp af koncentreret base og varme. Chitin er vidt udbredt i naturen, f.eks. i marine invertebrater, insekter og svampe. Til produktion af chitosan anvendes sædvanligvis chitin fra krabber, rejer, hummere osv.. De perleformede biokatalysatorer ifølge opfindelsen omfatter fortrinsvis chitosan med en molvægt fra ca. 50.000 til ca. 3.000.000.

Som polyvalente anioner er polyvalente uorganiske eller polyvalente organiske anioner egnede. De uorganiske anioner er fortrinsvis orthophosphat, metaphosphater, f.eks. hexametaphosphat, pyrophosphater, polyphosphater, f.eks. tri-, tetra- eller octapolyphosphat, eller cyanoferrater, f.eks. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ eller $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Især foretrækkes tripolyphosphat. De organiske anioner er fortrinsvis polymere organiske carboxylater, sulfonater eller hydroxyforbindelser.

Som kiselsyre egner sig fortrinsvis en fældet kiselsyre, især en fældet kiselsyre med en gennemsnitlig kornstørrelse i området fra 5 til 50 μm og en gennemsnitlig rumvægt i området fra 5 til 100 g pr. 100 ml, især fra ca. 20 til 50 g pr. 100 ml.

Endvidere angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af de perleformede biokatalysatorer ifølge opfindelsen med høj mekanisk styrke, som er ejendommelig ved, at enzymatisk aktivt materiale blandes til en suspension med fældet kisel-

syre i fast form, en vandig pufferopløsning og en vandig opløsning af en kationisk polyelektrolyt, idet skumdannelse undgås, suspensionen dråbevis indføres i et vandigt tværbindingsbad, indeholdende polyvalente anioner, og de fremkomne biokatalysatorperler bringes til at skrumpe ind og stivne ved at forblive i tværbindingsbadet i mindst ca. 1 time, hvorpå de eventuelt skilles fra tværbindingsbadet.

Undgåelse af skumdannelse ved fremstilling af suspensionen af enzymatisk aktivt materiale, fældet kiseltsyre i fast form, vandig pufferopløsning og en vandig opløsning af en kationisk polyelektrolyt er af afgørende betydning, da der ellers som følge opstår katalysatorperler med dårligere mekaniske egenskaber. Fortrinsvis undgås skumdannelse ved, at blandingen af de forskellige komponenter sker i nærværelse af kiseltsyren. Ellers er den rækkefølge, i hvilken stofferne bringes sammen, ligegyldig. Fortrinsvis blandes det enzymatiske materiale først med kiseltsyren i fast form, først derpå optages i vandig pufferopløsning, og derefter blandes med opløsningen af den kationiske polyelektrolyt.

Ved fremstillingen ifølge opfindelsen af biokatalysatorperler anvendes enzymatisk materiale som beskrevet ovenfor, dvs. hele celler, cellefragmenter eller celleorganeller af en mikroorganisme eller enzymer eller en kombination deraf. Hele celler kan derved foreligge levende, døde eller eksempelvis lyofiliserede eller dehydrerede. Dyrkningen af celler i et næringsmedium, der indeholder alle til opretholdelse af cellestofskiftet og til formeringen nødvendige organiske og uorganiske bestanddele (C-kilde, N-kilde, sporelementer, vækststoffer osv.), og cellefragmenteringen til fremstilling af cellefragmenter eller isolering af celleorganellerne sker ved i og for sig kendte metoder. Enzymer, der skal immobiliseres, forelig-

ger eksempelvis opløst, dispergeret, suspenderet, emulgeret eller tørret. Det nævnte og i det foregående nærmere definerede enzymatisk aktive materiale anvendes eksempelvis til fremgangsmåden ifølge opfindelsen som
5 celle-, cellefragment- eller celleorganellediment, -filtrat eller -suspension eller som enzym i vandig opløsning. I sammenhæng med den foreliggende beskrivelse betyder udtrykket "i vandig opløsning", at opløsningen yderligere kan indeholde uorganiske eller organiske salte
10 og lignende. Det kan eksempelvis dreje sig om en gængs biologisk puffer, såsom acetat-, fosfat-, tris-puffer og lignende.

Som vandig pufferopløsning egner sig eksempelvis biologiske puffer i et pH-interval fra pH 3 til 7, fortrinsvis ca. 5, f.eks. fosfat-, citrat- eller acetatpuffer.

De kationiske polyelektrolytter, der kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er beskrevet i det
20 foregående. Chitosan foretrækkes. Chitosan må til anvendelse til fremstilling af biokatalysatorperlerne først bringes i vandig opløsning for at udgøre integrerende bestanddel af immobilisatet. Dertil optages chitosan, der i ikke-protoniseret form er vandupløselig, i fortyndede
25 vandige, især organiske, syrer, eksempelvis i myresyre, eddikesyre, pyrodruesyre, æblesyre, citronsyre og lignende, fortrinsvis i eddikesyre, ved en pH-værdi 4-5, fortrinsvis pH 4 til 5,5, og opvarmes eventuelt til ca. 60°C for at støtte opløsningsprocessen. Chitosanopløs-
30 ningen filtreres derefter til fjernelse af uopløselige bestanddele. Til fremstilling af biokatalysatorperlerne ifølge opfindelsen anvendes fortrinsvis en vandig opløsning af chitosan med en viskositet i området fra 1000 til 20.000 cP i en koncentration i området fra 0,5 til 5
35 vægtprocent. Især foretrækkes anvendelsen af en vandig opløsning af højviskøst chitosan med en viskositet på ca. 10.000 cP i en koncentration på ca. 1,4 vægtprocent.

De anvendte stoffer anvendes fortrinsvis således, at vægtforholdet mellem kiselsyre og kationisk polyelektrolyt ligger i et område fra 1,5-50:1, især ved ca. 15:1. Slutkoncentrationen af kiselsyre i den ovenfor beskrevne suspension ligger i et område fra 2 til 15 vægtprocent, f.eks. 10%. Foretrukne slutkoncentrationer af kationisk polyelektrolyt i den ovenfor beskrevne suspension er 0,3 til 1,5 vægtprocent, især ca. 0,7%.

- 10 Den kiselsyre, der anvendes til fremstilling af biokatalysatorperlerne ifølge opfindelsen, er beskevet ovenfor. Den anvendes i fast form.

Ved tværbindingsbadet drejer det sig om en vandig opløsning af en polyvalent anion. De mulige anioner er beskrevet i det foregående. De anvendes til tværbindingsbadet i form af syrer eller som salte, f.eks. som alkalimetalsalte, eksempelvis natrium- eller kaliumsalte, endvidere også som ammoniumsalte. En vandig opløsning foretrækkes, til hvilken tripolyphosphorsyre eller et salt deraf, f.eks. natrium- eller kaliumtripolyphosphat, anvendes. I tværbindingsbadet foreligger de nævnte forbindelser eksempelvis i en koncentration i området fra 0,5 til 10% (v/r), fortrinsvis fra 1,5 til 3% (v/r).
25 Tværbindingsopløsningens pH-værdi ligger i et område fra pH 5 til 10, fortrinsvis på ca. pH 8.

Suspensionen af enzymatisk aktivt materiale, kiselsyre, pufferopløsning og polykation dryppes under omrøring til tværbindingsopløsningen, hensigtsmæssigt således, at tværbindingsbadets rumfang udgør mindst det tredobbelte af suspensionens rumfang. Den dråbevis tilsætning sker under anvendelse af en dyse med en lille åbning, eksempelvis en injektionssprøjte, en sprøjteligende injektionsindretning, en porøs plade eller et lignende egnet middel. Dråberne blæses eventuelt af dysens spids under

anvendelse af komprimeret luft, komprimeret nitrogen eller lignende. Suspensionen kan også indsprøjtes i tværbindingsoopløsningen, eksempelvis under anvendelse af et atomiseringsapparat, fortrinsvis et trykatomeringsapparat.

De ved den ovenfor beskrevne fremgangsmåde fremstillede
5 biokatalysatorperler forbliver mindst ca. en time, f.eks. natten over i tværbindingssbadet til indskrumpning og hærkning. Eventuelt skilles de fra tværbindingssbadet ved gængse, til adskillelse af faste og flydende faser egnede metoder, såsom dekantering, filtrering osv., og underkast-
10 tes før den yderligere anvendelse en fysiologisk vaskeproces, eksempelvis med fysiologisk natriumchloridopløsning.

Perleformede biokatalysatorer med høj mekanisk styrke, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er
15 ligeledes genstand for opfindelsen.

20 Opfindelsen angår desuden fremgangsmåder til fremstilling af α -hydroxycarboxylsyrer ud fra α -ketocarboxylsyrer, som er ejendommelige ved, at der til omsætningen anvendes perleformede biokatalysatorer ifølge den foreliggende opfindelse.

25 Alt efter arten af det immobiliserede enzymatisk aktive materiale er produktionen af et bredt spektrum af produkter mulig, der opstår ved fermenteringsprocesser, i primærstofskiftet, ved mikrobiel transformation osv., eksempelvis af

- 30 - kemikalier, f.eks. citronsyre ved *Aspergillus niger*, ethanol ved *Zymomonas mobilis*, L-æblesyre ved fumarase, H_2 ved *Chlorella-Clostridium*-coimmobilisater,
- næringsmidler, f.eks. sojasauce ved *Pediococcus halophilus*,
- 35 - enzymer, f.eks. amylaser ved *Aspergillus niger*,
- medikamenter, f.eks. penicilliner ved *Penicillium chrysogenum*, eller
- aminosyrer, f.eks. L-asparaginsyre ved L-aspartase.

Fremgangsmåder til fremstilling af α -hydroxycarboxylsyrer ud fra α -ketocarboxylsyrer ved hjælp af biokatalysatorer ifølge opfindelsen, hvis enzymatisk aktive materiale indeholder en oxidoreduktase, er en oxidoreduktase eller 5 består af hele celler af en bakterie af slægten *Proteus*, især arterne *Proteus vulgaris* og/eller *Proteus mirabilis*, fortrinsvis *Proteus vulgaris*, foretrækkes. Reduktionen af substratet sker derved med den såkaldte finale reduktase, f.eks. en substratspecifik dehydrogenase. Sædvanligvis 10 leveres de reduktionsækvivalenter, som den finale reduktase behøver, af et coenzym, f.eks. af pyridinnukleotider, såsom nikotinamidadenindinukleotid(phosphat) (NADH, NADPH) eller af flavinnukleotider, såsom flavinmononukleotid (FMNH) eller flavinadenindinukleotid (FADH). De redu- 15 cerede nukleotider opstår atter f.eks. ved elektronoverførsel over naturlige eller syntetiske elektronmediatorer med egnet redoxpotentiale, såsom ferredoxin eller bipyridyliumderivater, f.eks. 4,4'-bipyridyliumderivater (Viologen) eller 2,2'-bipyridyliumderivater (eksempelvis diquat- 20 kationer, såsom diquat-dibromid eller diquat-dichlorid). Der kendes også finale reduktaser, der kan optage elektronerne direkte fra mediatorerne.

25 Især foretrækkes en fremgangsmåde til fremstilling af 2-hydroxy-4-phenylsmørsyre, fortrinsvis af 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre, ud fra 2-oxo-4-phenylsmørsyre ved hjælp af biokatalysatorerne ifølge opfindelsen, hvis enzymatisk aktive materiale indeholder en oxidoreduktase eller er en 30 oxidoreduktase eller består af hele celler af en bakterie af slægten *Proteus*, især af arterne *Proteus vulgaris* og/eller *Proteus mirabilis*, fortrinsvis *Proteus vulgaris*. 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre er et værdifuldt mellemprodukt ved fremstillingen af ACE, angiotensinomdannende 35 enzym-("angiotensin converting enzyme")-inhibitorer eller deres forstadier. Dennes klasse aktive stoffer har i de

forløbne år fundet voksende interesse. Den udvider de tal-
rådighed stående antihypertensivas potentiale og dermed de
terapeutiske muligheder ved bekæmpelsen af højt blodtryk.
Af særlig interesse er derved fremstillingen af ACE-hæm-
5 meren 3-([1-ethoxycarbonyl-3-phenyl-(1S)-propyl]amino)-
2,3,4,5-tetrahydro-2-oxo-1H-1-(3S)-benzazepin-1-eddike-
syre-monohydrochlorid (= Benazepril).

Opfindelsen angår især en fremgangsmåde til fremstilling
10 af 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre ud fra 2-oxo-4-phenyl-
smørsyre, som er ejendommelig ved, at perleformede
biokatalysatorer ifølge opfindelsen, hvis enzymatisk
aktive materiale består af hele celler af en bakterie af
slægten *Proteus*, især af arterne *Proteus vulgaris* og/eller
15 *Proteus mirabilis*, fortrinsvis *Proteus vulgaris*, anvendes
i en fastleje- eller hvirvellagsreaktor, fortrinsvis i en
fastlejereaktor, gennem hvilken der kontinuerligt ledes en
vandig opløsning af substratet 2-oxo-4-phenylsmørsyre,
eksempelvis i en koncentration i området fra 50 til 200
20 mM, af formiat, eksempelvis et alkalimetalforniat, såsom
kalium- eller natriumformiat, eksempelvis i en koncen-
tration i området fra 100 til 500 mM, og en elektronme-
diator, f.eks. et 4,4'-bipyridyliumderivat, såsom
methylviologen, carbamoylmethylviologen eller benzylvio-
25 logen, eller et 2,2'-bipyridyliumderivat, såsom diguadri-
kation, eksempelvis i en koncentration i området fra 0,5
til 10 mM. Reduktionen af substratet katalyseres eksem-
pelvis af den i *Proteus vulgaris* indeholdte 2-oxocarboxyl-
syrrereduktase (2-hydroxycarboxylat-viologen-oxidoreduk-
30 tase). Da dette enzym har en høj enantiomeraselektivitet,
og produktet opstår med et enantiomerooverskud på mere end
99,8% ligger der en særlig fordel ved anvendelse af det
ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede produkt
i, at der ved syntesen af ACE-hæmmere, som forløber over
35 talrige trin, allerede i et relativt tidligt stadium af

syntesen kan anvendes en enantiomerren syntese. Den ovenfor beskrevne fremgangsmåde muliggør høje omsætninger på mere end 99%.

5 De følgende eksempler skal forklare opfindelsen.

Forkortelser

10 ee	enantiomeroverskud ("enantiomeric excess")
HPLC	high pressure liquid chromatography
rpm	omdrejninger ("revolutions") pr. minut

15 Eksempler

Eksempel 1

Fremstilling af perleformede biokatalysatorer med Proteus
20 vulgaris.

Proteus vulgaris (ATCC 9484) dyrkes i et fuldstændigt medium (gærekstrakt 5 g/l, glucose-monohydrat 5 g/l, K₂HPO₄ 5 g/l, pepton fra kød 20 g/l, pH 7,0) i 24 timer ved 37°C
25 under let gasning med nitrogen. De således fremkomne celler høstes ved 12°C i en CEPA-centrifuge type Z 41 G (gennemløb 300 l/time) under skyldning med nitrogen ved et omdrejningstal på 20.000 rpm (16.950 g). Ud fra 400 l kulturvæske fås 580 g bakteriesediment med et fugtigheds-
30 indhold på ca. 80%. 1 Vægt del fugtig bakteriemasse opslættes sammen med 1 vægt del kiseltsyre (Baker produkt nr. 254, kornstørrelse ca. 20 µm, 95% >3 µm, 95% <60 µm, rumvægt ca. 50 g/100 ml) i 3 vægtdele 50 mM natriumacetatpuffer med pH 5,0 og blandes derefter under kraftig omrø-
35 ring med 5 vægtdele af en 1,4 vægtprocents højviskøs vandig chitosan-acetat-opløsning (viskositet ca. 10.000 cP

ved 20°C og 10 rpm; pH 4,5 indstillet med eddikesyre; uopløselige bestanddele slet fra). Denne suspension (viskositet ca. 2000 cP) dryppes under let omrøring til en 1,5%'s (v/r) natriumtripolyphosphatopløsning (mindst tre-
5 dobbelt suspensionsrumfang; pH 8,1 indstillet med phosphorsyre). Dertil anvendes en sprøjte med en kanyleåbning med diameter 1,4 mm og med et gennemløb på 1 ml/min. Dråberne blæses af kanylen med komprimeret nitrogen (faldlængde 10-15 cm). Der opstår perleformede partikler med
10 en diameter på 2-3 mm, der forbliver i natriumtripolyphosphat-tværbindingsbadet i 2 timer til indskrumpning og hærkning. Ud fra 100 g suspension fås ca. 40 g perler (rysterumfang ca. 80 ml) med en cellekoncentration på 0,25 g fugtig bakteriemasse, henholdsvis 0,05 g tørre
15 celler pr. g perler, som i det følgende med henvisning til kiselsyrekoncentrationen i den sprøjtede suspension betegnes "10%'s kiselsyre-biokatalysatorperler".

Til sammenligning fremstilles "kontrol-biokatalysator-
20 perler" uden tilsætning af kiselsyre. Dertil opslæmmes 1 vægtdele fugtig bakteriemasse i 4 vægtdele natriumacetatpuffer med pH 5,0 og blandes derpå med 5 vægtdele af den ovenfor beskrevne chitosan-acetat-opløsning. Suspensionen dryppes til en natriumtripolyphosphatopløsning som angivet
25 ovenfor til fremstilling af perleformede partikler.

Ved fremstillingen af "kontrol-biokatalysatorperlerne" sker der ved opslæmningen en væsentlig skumdannelse, der udebliver ved fremstillingen af de "10%'s kiselsyre-bio-
30 katalysatorperler", da kiselsyren virker som antiskummiddel. Ved skumdannelsen bliver "kontrol-biokatalysatorperlerne" lettere end perlerne med kiselsyretilsætning og har tendens til at stige til overfladen i tværbindingsbadet.

Eksempel 2Bestemmelse af biokatalysatorperlernes trykstyrke

5 Biokatalysatorperlernes trykstyrke bestemmes med et måle-
system til termomekaniske analyser (TA 3000-system med
målecelle TMA 40, Mettler Instrumente AG, Greifensee,
Schweiz) efter en dags lagring ved 4°C i natriumtripoly-
phosphatopløsning med pH 8,1. Hver tre biokatalysator-
10 perler (diameter 3 mm) i fugtig tilstand lægges på prøve-
bordet grænsende op til hinanden i trekantorden og dækkes
centralt med en med natriumtripolyphosphatopløsning
gennemvædet keramiskskive (diameter 6 mm, tykkelse 0,7 mm,
tørvægt 70 mg), på hvilken måleføleren er anbragt. Prøvens
15 deformation (perlernes nedgang i tykkelse i μm) måles ved
nedtrykning af keramiskskiven under en belastning på 0,02
N isotermt ved 30°C som funktion af tiden. Resultaterne er
sammenfattet i tabel 1.

20

Tabel 1Bestemmelse af biokatalysatorperlernes trykstyrke

25

Deformation af 3 mm-biokatalysator-
perlerne [μm]

30

Tid [min.]	Kontrol-bio- katalysator- perler	10% 's kiselsyre- biokatalysator- perler
0,5	40	10
1	80	20
2	130	30
4	200	40

35

Tabel 1 viser klart, at de "10%'s kiselsyre-biokatalysatorperler" har en væsentlig højere trykstyrke end "kontrol-biokatalysatorperlerne". Efter 15 minutter udviser de "10%'s kiselsyre-biokatalysatorperler" næsten ingen yderligere deformationstilvækst.

Eksempel 3

Fremstilling af 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre ved hjælp af perleformede biokatalysatorer i laboratoriemålestok

48 ml (rysterumfang) "10%'s kiselsyre-biokatalysatorperler", der fremstilles ifølge eksempel 1 af 60 g suspension, skilles fra natriumtripolyphosphat-tværbindingssbadet og sættes til 200 ml af en med nitrogen forud gasbehandlet opløsning af 50 mM (1,84% v/r) natriumtripolyphosphatpuffer med pH 7,0, 100 mM kaliumformiat og 1 mM carbamoylmethylviologen (1,1'-dicarbamoylmethyl-4,4'-dipyridiniumdikation). I denne reduktionsopløsning forbliver perlerne under vakuum til afgasning indtil fuldstændig violetfarvning, der beror på reduktion af carbamoylmethylviologen ved den i *Proteus vulgaris* indeholdte formiatdehydrogenase. Derefter anbringes perlerne i en enzymfastlejerreaktor, dvs. i en med kappe forsynet glassøjle (indvendig diameter 1,6 cm, legehøjde 24 cm, 25°C). Den med nitrogen forud gasbehandlede substratopløsning (50 mM natriumtripolyphosphatpuffer pH 6,7, 100 mM 2-oxo-4-phenylsmørsyre, 300 mM kaliumformiat, 3 mM carbamoylmethylviologen) ledes kontinuerligt gennem søjlen ved hjælp af en doseringspumpe med overtryk 2,0-3,0 bar med et gennemløb på først 120 ml/time, derpå med 24 ml/time. Forløbet af reduktionen af 2-oxo-4-phenylsmørsyre til 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre, der katalyseres af den i *Proteus vulgaris* indeholdte 2-oxocarboxylsyre-reduktase (2-hydroxycarboxylat-viologen-oxidoreduktase), måles ved HPLC-analyse (søjle: Nucleosil C18, partikkelstørrelse 5

μm , længde 12,5 cm, indvendig diameter 4,6 mm; gennemløb 1,0 ml/min.; løbemiddel: 3 rumfangsdele acetonitril/8 rumfangsdele 100 mM kaliumphosphatpuffer pH 3,0).

5

På tilsvarende måde anvendes "kontrol-biokatalysator-perlerne" (rysterumfang 49 ml ud fra 60 g suspension ifølge eksempel 1) til reduktion af 2-oxo-4-phenylsmørsyre. Derved er det nødvendigt at indskrænke perlelejet
 10 med søjleadapteren, fordi perlerne overvejende svømmer ovenpå, og der derfor dannes tomme zoner i søjlen.

Resultaterne af produktivitetsbestemmelsen er sammenfattet i tabel 2.

15

Tabel 2

Fremstilling af 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre i fastleje-reaktor ved hjælp af perleformede biokatalysatorer i laborietorlemålestok (omsætning)

Omsætning i fastlejereaktor ved 25°C		
25 Gennemløb [ml/time]	Kontrol-bio- katalysatorperler	10%'s kiselsyre-bio- katalysatorperler
120	60%	70%
24	96%	>99,5%
30		

Af tabel 2 fremgår, at "kontrol-biokatalysatorperlen" har en klart ringere produktivitet end de "10%'s kiselsyre-biokatalysatorperler".

35

På grund af den tiltagende komprimering af perlerne er en varig drift af kontrol-enzymreaktoren ikke mulig, da søjlen allerede er tilstoppet efter en dag ved et gennemløb på 24 ml/time. Med "10%'s kiselsyre-biokatalysatorperlerne" er varig drift under de samme betingelser derimod problemløs.

Eksempel 4

10 Fremstilling af 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre ved hjælp af perleformede biokatalysatorer i pilotmålestok og isolering af produktet

Fremstillingen af de "10%'s kiselsyre-biokatalysatorperler" sker ud fra 573 g bakteriesediment ifølge eksempel 1, idet der dog i stedet for sprøjten anvendes en indretning bestående af en tandhjulspumpe (gennemløb 1,4 l/time; tryk ca. 0,5 bar) og en 7-strålet douche med 0,6 mm kapillærer til dråbedannelsen. Til forøgelse af afdrækningsfrekvensen eller til påvirkning af dråbestørrelsen har hvert kapillær en separat luftudstrømningskanal. Efter indskrumpning og hærkning i en 3%'s (v/r) natriumtripolyphosphatopløsning fås ud fra 573 g bakteriesediment ca. 4 l (rysterumfang) perler.

25 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre fremstilles på tilsvarende måde som angivet i eksempel 3. De 4 l (rysterumfang) "10%'s kiselsyre-biokatalysatorperler" skilles fra natriumtripolyphosphat-tværbindingsbadet og sættes til 6 l af en med nitrogen forud gasbehandlet opløsning af 100 mM (3,68% v/r) natriumtripolyphosphat pH 7,0, 100 mM kaliumformiat og 1 mM carbamoylmethylviologen. I denne reduktionsopløsning forbliver perlerne under vakuum til afgasning indtil fuldstændig violet farvning. Derefter anbringes perlerne i en kromatografisøjle (indvendig diameter 11,3 cm, grundareal 100 cm², længde 60 cm, leje højde 60

cm). Den med nitrogen forud gasbehandlede substratopløsning (100 mM natriumtripolyphosphatpuffer pH 6,7, 112,2 mM 2-oxo-4-phenylsmørsyre, 300 mM kaliumformiat, 1 mM carbamoylmethylviologen) sterilfiltreres og ledes kontinu-
5 erligt gennem søjlen ved hjælp af en doseringspumpe med overtryk 2,0-3,0 bar med et gennemløb på først 2,5 l/time. Den ved HPLC målte omsætning er >99,5%. Søjlen drives dag og nat uden afbrydelse ved stuetemperatur, dvs. ved ca. 23 til 26,5°C.

10

Omsætningen kontrolleres ved daglige HPLC-analyser og holdes ved omsætningsværdier >99,5% ved regulering af pumpehastigheden. Efter 25 dage er i alt ca. 800 l reaktionsopløsning omsat (gennemsnitlig omsætning 99,6%), og
15 gennemløbet udgør endnu 1 l/time.

1160 l omsat reaktionsopløsning blandes med 250 l ethylacetat og indstilles på pH 2,6 med 114 l 42,5%'s orthophosphorsyre. 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyren ekstraheres
20 i ethylacetat med et udbytte på 94%. Den i vandfasen resterende 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre ekstraheres endnu to gange med hver 120 l ethylacetat. Efter de tre ekstraktionstrin er ekstraktionen af 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre fuldstændig (99,8%). Efter samling af de tre ethyl-
25 acetatfaser (samlet rumfang 450 l), tilsætning af 250 l ethylacetat og afdestillering af 470 l af opløsningsmidlet klarfiltreres opløsningen gennem et enpladefilter. 50 l ethylacetat anvendes til skyldning af filteret og sættes til den klare opløsning. Efter afdestillering af 200 l af
30 opløsningsmidlet udgør opløsningens slutrumfang 80 l. Til denne opløsning sættes 400 l cyclohexan, og 200 l af opløsningsmidlet afdestilleres. Efter centrifugering af det udkrystalliserede produkt og tørring i vakuum ved 20-25°C indtil konstant vægt fås 23,4 kg krystallinsk
35 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre.

Til kontrol af enantiomerrenheden opløses en prøve af den krystallinske syre i absolut ethanol og bringes til omsætning med hydrogenchloridgas i 24 timer ved stuetemperatur. Efter afdestillering af alkoholen og kort afgangning i
5 højvakuum resterer en lysegul olie, der analyseres ved HPLC ved 25°C/32 bar på en chiral søjle (250 x 4,6 mm i.d., gennemløb 1 ml/min., stationær fase chiralcel OD [Stehelin, Basel] type OD-5-15-20925, mobil fase: 90% hexan/10% isopropanol/0,1% diethylamin). De stoffer, der
10 skal analyseres, foreligger i en koncentration på 1 mg/ml i løbemidlet (indsprøjtet mængde 10 µl). Scanningen sker ved en bølgelængde på 210 nm, bedømmelsen ved arealsammenligning med ekstern standard. Den bestemte ee-værdi er >99,8%.

15

20

25

30

35

P A T E N T K R A V

1. Perleformet biokatalysator med høj mekanisk styrke omfattende enzymatisk aktivt materiale, en kationisk polyelektrolyt og polyvalente anioner, kendetegnet ved, at biokatalysatoren indeholder kiselsyre og fremstilles ud fra en suspension af det enzymatisk aktive materiale, kiselsyren, pufferopløsning og polyelektrolytten, hvori slutkoncentrationen af kiselsyre ligger i et interval mellem 2 og 15 vægt-%.
2. Perleformet biokatalysator ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det enzymatisk aktive materiale består af hele celler af en bakterie eller af en gærart.
3. Perleformet biokatalysator ifølge krav 2, kendetegnet ved, at bakterien hører til arten *Proteus vulgaris* og/eller til arten *Proteus mirabilis*.
4. Perleformet biokatalysator ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det enzymatisk aktive materiale indeholder en oxidoreduktase eller er en oxidoreduktase.
5. Perleformet biokatalysator ifølge et af kravene 1 til 4, kendetegnet ved, at den kationiske polyelektrolyt er chitosan.
6. Perleformet biokatalysator ifølge et af kravene 1 til 5, kendetegnet ved, at de polyvalente anioner er triphosphat.
7. Perleformet biokatalysator ifølge et af kravene 1 til 6, kendetegnet ved, at kiselsyren er en fældet kiselsyre.
8. Fremgangsmåde til fremstilling af perleformede biokatalysatorer ifølge et af kravene 1 til 7, kende-

tegnet ved, at enzymatisk aktivt materiale blandes med fældet kiseltsyre i fast form, en vandig pufferopløsning og en vandig opløsning af en kationisk polyelektrolyt, under undgåelse af skumdannelse, til en suspension, som dråbevis
5 indføres i et vandigt tværbindingsbad indeholdende polyvalente anioner, og de fremkomne biokatalysatorperler bringes til at skrumpe ind og stivne ved at forblive i tværbindingsbadet i mindst ca. 1 time, hvorpå de eventuelt skilles fra tværbindingsbadet.

10

9. Fremgangsmåde til fremstilling af α -hydroxycarboxylsyrer ud fra α -ketocarboxylsyrer, kendetegnet ved, at der til omsætningen anvendes en perleformet biokatalysator ifølge krav 3 eller 4.

15

10. Fremgangsmåde ifølge krav 9 til fremstilling af 2-(R)-hydroxy-4-phenylsmørsyre ud fra 2-oxo-4-phenylsmørsyre, kendetegnet ved, at de perleformede biokatalysatorer anvendes i en fastlejerereaktor, gennem hvilken der
20 kontinuerligt ledes en vandig opløsning af substratet 2-oxo-4-phenylsmørsyre, af formiat og en elektronmediator.

25

30

35