Octrooiraad

(10)A **Terinzagelegging** (11) **8020306**

Nederland (19) **NL**

(54) Katalysatoren voor biochemische omzettingen, en werkwijze voor het bereiden van zulke katalysatoren.

(51) Int.Cl³.: C12N11/18.

(71) Aanvrager: Hägerdal, Bärbel. te Lind, Zweden.

(72) Uitvinder(s): - -

(74) Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuyperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

(21) Aanvrage Nr. 8020306.

(86) Aanvraagnummer oorspronkelijke internationale aanvrage: PCT/SE 80/00216.

(22) Ingediend 22 augustus 1980.

(32) Voorrang vanaf 23 augustus 1979.

(33) Land van voorrang: Zweden (SE).

(31) Nummer van de voorrangsaanvrage: 7907035.

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 1 juli 1981.

(87) Publicatiedatum oorspronkelijke internationale aanvrage: 5 maart 1981.

(87) Publicatienummer oorspronkelijke internationale aanvrage: WO 81/00576.

Deze octrooiaanvrage werd ingediend als internationale octrooiaanvrage onder de bepalingen van het Verdrag tot samenwerking inzake octrooien (PCT). De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van een Nederlandse vertaling van de oorspronkelijk in een andere taal ingediende beschrijving met conclusie(s) en tekening(en). De Nederlandse octrooiaanvrage wordt geacht te zijn ingediend op de indieningsdatum van de internationale octrooiaanvrage.

8020306

Katalysatoren voor biochemische omzettingen, en werkwijze voor het bereiden van zulke katalysatoren.

Deze uitvinding betreft een katalysator voor biochemische omzettingen van het soort dat in twee of meer stappen verloopt van een substraat of mengsel van substraten tot het gewenste eindprodukt via één of meer tussenprodukten, waarbij sommige stappen de aanwezigheid van een of meer enzymen vergen en andere stappen de aanwezigheid van een of meer microörganismen vergen.

De uitvinding betreft ook een werkwijze voor de bereiding van zo'n katalysator.

Een zeer groot aantal verschillende biochemische omzettingen is bekend die in principe in de vorm verlopen van een keten van een aantal opeenvolgende reacties, waarbij voor sommige stappen de aanwezigheid van enzymen en in andere stappen de aanwezigheid van microörganismen nodig is. Deze biochemische omzettingen zijn dus in principe van het soort

$$\text{Substraat} \xrightarrow{E} \text{Produkt 1} \xrightarrow{M} \text{Produkt 2, of}$$

$$\text{Substraat} \xrightarrow{M} \text{Produkt 1} \xrightarrow{E} \text{Produkt 2,}$$

waarin E een of meer enzymen voorstelt en M een of meer microorganismen voorstelt. Men zal begrijpen dat de reactieketen vaak meer dan twee stappen zal omvatten.

Voorbeelden van omzettingen van het eerste soort zijn

$$\text{Cellulose} \xrightarrow{E} \text{oligosacchariden} \xrightarrow{E} \text{cellobiose} \xrightarrow[\beta\text{-glucosidase}]{} \text{glucose} \xrightarrow[\text{Bakkersgist}]{M} \text{ethanol;}$$

$$\text{cellulose} \xrightarrow{E} \text{oligosacchariden} \xrightarrow{E} \text{cellobiose} \xrightarrow[\beta\text{-glucosidase}]{E} \text{glucose} \xrightarrow[\text{bacteriën}]{M} \text{butanol;}$$

8020306

zetmeel $\xrightarrow[\text{amulase}]{E}$ glucose $\xrightarrow[\text{Bakkersgist}]{M}$ ethanol;

lactose (wei) $\xrightarrow[\beta\text{-galactosidase}]{E}$ $\{$ galactose / glucose $\}$ $\longrightarrow$

$\xrightarrow[\text{Bakkersgist}]{M}$ ethanol;

xylose $\xrightarrow[\text{xylose isomerase}]{E}$ xylulose $\xrightarrow[\text{Bakkersgist}]{M}$ ethanol.

Een voorbeeld van een omzetting van het andere type is

substraat $\xrightarrow[\text{Penicillium sp}]{M}$ benzylpenicilline $\xrightarrow[\text{acylase}]{E}$

$\longrightarrow$ 6-aminopenicillaanzuur (6-APA).

Dit zijn slechts enkele voorbeelden uit een groot aantal in de techniek bekende biochemische omzettingen.

Een kenmerk van deze biochemische reacties is dat de reactiesnelheid door de aanwezigheid van het gevormde produkt beïnvloed wordt, zodanig dat de reactie steeds langzamer gaat lopen en tenslotte helemaal tot stilstand komt als het gehalte aan gevormd produkt toeneemt. Als de verschillende reactiestappen van de bereiding in porties uitgevoerd worden zal de reactie dus automatisch bij een betrekkelijk lage opbrengst stoppen, waarna het nodig is het gevormde produkt van het substraat en de gebruikte katalysator te scheiden, dus van het gebruikte enzym of microörganisme, zodat de katalysator, die vaak kostbaar is, opnieuw gebruikt kan worden. Ook mag de katalysator niet in het afgescheiden eindprodukt aanwezig zijn, daar die aanwezigheid vaak ongewenst is. Deze scheidingen zijn echter vaak ingewikkeld en kostbaar om uit te voeren. Het is dan ook wenselijk dat de verschillende stappen van zo'n proces op een continue wijze uitgevoerd kunnen worden waarbij de reactieprodukten continu uit de reactieruimte afgevoerd worden, opdat de reactie zonder hinder kan verlopen en men aldus een hoge opbrengst krijgt. Bij zo'n continue werkwijze moet de gebruikte katalysator, dat is het enzym of het microörganisme, op een of andere wijze vast-

gelegd zijn, zodat genoemde katalysator de continue stroom van reactieprodukten uit de reactieruimte niet begeleidt, maar in genoemde ruimte blijft. Verder zou het erg voordelig zijn, zowel economisch als praktisch, twee of meer stappen van de biochemische omzetting van het bedoelde soort in één en hetzelfde reactievat uit te voeren, bijvoorbeeld in één en dezelfde kolom. Maar daarvoor is echter de gelijktijdige aanwezigheid in het reactievat van enzymen en microörganismen voor de verschillende stappen nodig, en dat genoemde enzymen en microörganismen in onbeweeglijke toestand in het reactievat verkeren. Bepaalde werkwijzen zijn voorgesteld waarbij zowel een enzym als een microörganisme tegelijkertijd in het reactievat aanwezig zijn voor een gelijktijdig uitvoeren van twee onderling verschillende stappen van een biochemische omzetting. Daar men in deze gevallen echter met portiegewijze bereidingen te maken had werden slechts lage opbrengsten bereikt en was het nodig na het aflopen van de reactie te trachten enzym en microörganismen van de reactieprodukten te scheiden. Met het doel de diverse reactiestappen continu uit te voeren zijn werkwijzen voor het vastleggen van elk der enzymen en microörganismen op zich in onderling verschillende soorten dragers voorgesteld. Een ernstig probleem dat men bij het vastleggen van enzymen tegenkomt is dat enzymen betrekkelijk kleine moleculaire afmetingen hebben en dus niet gemakkelijk vastgelegd kunnen worden door alleen absorptie of fysiek insluiten in een drager. Dit leidt tot een belangrijk verlies of "weglekken" van het enzym uit de drager, waardoor de activiteit snel achteruit loopt en de enzym-katalysator zijn effect verliest, waarna de katalysator verwisseld moet worden. Om de verschillende, onderling uiteenlopende reactiestappen van een biochemische omzetting effectief tegelijkertijd in één en dezelfde ruimte uit te voeren is het verder nodig dat het in een voorafgaande stap (bijvoorbeeld onder invloed van een enzym) gevormde produkt zo snel en doeltreffend mogelijk in contact gebracht wordt met het enzym of het microörganisme dat men voor de volgende reactiestap nodig heeft. Dit lijkt moeilijk te realiseren als de benodigde enzymen en microörganismen op zich in onderling verschillende dragers vastgelegd zijn.

Het is daarom een doel van de uitvinding een nieuwe en doeltreffende katalysator te verschaffen die gebruikt kan worden door het continu in één en dezelfde reactieruimte uitvoeren van twee of meer verschillende stappen van een biochemische omzetting die voor bepaalde reactiestappen de aanwezigheid van tenminste één enzym en voor andere reactiestappen de aanwezigheid van tenminste één microörganisme vereist.

Dit doel wordt bereikt met een katalysator volgens de uitvinding, die in hoofdzaak gekenmerkt wordt doordat genoemde katalysator uit vaste dragerlichamen van één of meer polymeren bestaat, waarvan er tenminste één een verknoopt polymeer is, doordat tenminste één enzym door covalente bindingen aan het polymere materiaal van de dragerlichamen gebonden is, en doordat tenminste één microörganisme fysiek ingesloten is in het driedimensionele ruimtenetwerk van genoemde lichamen.

Doordat het microörganisme door covalente bindingen aan het polymere materiaal van de dragerlichamen gebonden is is het verlies of "weglekken" van het enzym uit genoemde lichamen tijdens het verloop van de reactie erg klein, waardoor de katalysator een lang nuttig leven heeft. De microorganismen zijn van zodanige moleculaire afmetingen dat ze zonder moeite effectief aan de dragerlichamen gehouden kunnen worden, dankzij het feit dat ze fysiek ingesloten zijn in het driedimensionele rooster dat gevormd wordt door het verknoopte polymeer van de dragerlichamen. Doordat zowel het enzym als de microörganismen in dezelfde dragerlichamen gebonden zijn liggen enzym en microörganisme ruimtelijk heel dicht bij elkaar, waardoor de verschillende stappen van de omzetting zeer snel na elkaar kunnen verlopen, hetgeen gebleken is tot hoge opbrengsten te leiden.

In principe kan een katalysator volgens de uitvinding op de volgende wijze bereid worden:

Een enzym wordt aan een polymeer of monomeer in oplossing of suspensie toegevoegd, nadat eerst geschikte bindende groepen van hetzij polymeer of monomeer hetzij van het enzym geactiveerd zijn, zodat bij het samenbrengen van polymeer of monomeer en enzym het enzym door covalente bindingen aan de

polymeer- of monomeer-moleculen gebonden wordt. Dan wordt aan de aldus ontstane suspensie of oplossing van polymeer of monomeer, met het covalent gebonden enzym, een ander polymeer of monomeer toegevoegd, dat gelijk aan of verschillend van het eerst gebruikte polymeer of monomeer kan zijn, maar dat verknopen kan, en ook een microörganisme, waarna het systeem aan verknoping onderworpen wordt, zodat vaste lichamen van een driedimensioneel verknoopt polymeer ontstaan, waarin het enzym door covalente bindingen aan het polymere materiaal gebonden is en de microörganismen fysiek in het driedimensionele netwerk van het verknoopte polymeer ingesloten liggen.

Bij zo'n katalysatorbereiding volgens de uitvinding zijn twee mogelijkheden denkbaar. Een mogelijkheid is dat de "schijnbare" molecuulafmetingen van het enzym zodanig "vergroot" worden, doordat het met covalente bindingen aan het eerste polymeer verbonden is, dat deze polymeer-enzym-aggregaten gemakkelijk in het driedimensionele netwerk van het daarna te vormen verknoopte polymeer ingesloten en vastgehouden kunnen worden, net zoals het microörganisme. De andere mogelijkheid is dat het polymeer of monomeer met daaraan het covalent gebonden enzym als integraal deel in de structuur van het daarna bereide verknoopte polymeer opgenomen wordt.

Voor het instellen van de covalente bindingen tussen enzym en polymeer of monomeer kunnen verschillende chemische groepen in de moleculen van het enzym of polymeer of monomeer gebruikt worden. Hieronder vallen bijvoorbeeld hydroxy-, carboxy-, fenyl-, tyrosine-, amino- en thiol-groepen. Al deze activeerbare groepen worden normaliter in het enzym gevonden, terwijl het polymeer of monomeer normaliter slechts één of twee activeerbare groepen vertoont. Activering van de te gebruiken bindende groepen kan hetzij aan het enzym hetzij aan het polymeer of monomeer plaats vinden. Bij voorkeur is het het polymeer of monomeer dat geactiveerd wordt, daar het enzym in vele gevallen door de activeringsreactie schade kan oplopen. De covalente bindingen tussen enzym en polymeer of monomeer kunnen omkeerbaar of onomkeerbaar zijn.

Diverse activeringsreacties kunnen gebruikt worden voor het activeren van de hierboven genoemde activeerbare groepen. Voorbeelden van zulke reacties zijn acylering, arylering, alkylering, activering met broomcyaan, carbamylering, thiocarbamylering, amidine-vorming, reacties met polymere aldehyden en glutaaraldehyde, diazotering, thiol-disulfide-uitwisselingsreacties en vier-component-condensatiereacties. Dergelijke activeringsreacties voor het scheppen van covalente bindingen tussen verschillende moleculen zijn voldoende bekend.

De werkwijze volgens de uitvinding kan op vele uiteenlopende polymeren toegepast worden. Voorbeelden van te gebruiken polymeren omvatten polysacchariden zoals cellulose, zetmeel, agarose, dextran (oplosbaar of onoplosbaar), carrageeenan, alginaten en chitine, vinyl-polymeren, polyaminen, eiwitten, polyaminen en polyurethanen.

De verknopende polymerisatie die nodig is voor het inkapselen van het eerst bereide enzym-polymeer-complex of enzym-monomeer-complex en het microörganisme kan op verschillende wijze gerealiseerd worden, afhankelijk van het gebruikte polymeer, bijvoorbeeld door verandering van temperatuur (bijvoorbeeld bij carrageenan), door verandering van de ionensamenstelling van het medium (bijvoorbeeld in het geval van alginaat), door fotometrische processen (bijv. in het geval van urethaan) en door toevoegen van een geschikte polymerisatiekatalysator (bijv. in het geval van polyacrylamide). Het is gemakkelijk als de bereide polymeer-lichamen met de covalent gebonden enzymen en de fysiek ingesloten microörganismen de vorm van kleine parels hebben, met een doorsnede van enige tienden van een millimeter tot enige millimeters. Men begrijpt natuurlijk dat lichamen met andere vormen en/of afmetingen ook gebruikt kunnen worden.

Praktisch alle soorten microörganismen kunnen bij de werkwijze toegepast worden, waaronder wieren, bacteriën, bacteriofagen, schimmels, virussen en antisera, protozoën en gisten. Voorbeelden van dergelijke microörganismen vindt men in de katalogus van stammen, deel I, (1978) van de American Type

Culture Collection, en in "General Microbiology" van R.Y.Stainer, E.A. Adelberg en J.L. Ingraham (Macmillan Press Ltd., 4de uitgave, 1979).

De uitvinding kan ook toegepast worden op praktisch alle soorten enzymen, zoals oxidoreductasen, transferasen, hydrolasen, lyasen, isomerasen en ligasen. Enzymen die tot deze zes groepen behoren zijn opgesomd in "Enzyme Nomenclature, Recommendations" (1978) van het Nomenclatuur-Committee van de Internationale Vereniging voor Biochemie, gepubliceerd voor deze Internationale Vereniging voor Biochemie door Academic Press Inc.

De uitvinding is voornamelijk beproefd op de vervaardiging van katalysatoren voor het omzetten van cellobiose via glucose in ethanol, in overeenstemming met de reacties ten die in het begin genoemd werd, in welke katalysator het covalent gebonden enzym, het fysiek ingesloten microörganisme Bakkersgist (Saccharomyces cerivisiae) en het polymere materiaal alginaat.

De uitvinding wordt nu nader toegelicht aan de hand van de volgende voorbeelden.

Voorbeeld I

In 2 ml gedestilleerd water werd 100 mg natriumalginaat gesuspendeerd, en om het alginaat te activeren werden 32 mg N-hydroxysuccinimide en 28 mg EDC in 1 ml gedestilleerd water toegevoegd. Het activeren van het alginaat vond in 15 minuten bij kamertemperatuur plaats. Toen werd 15 mg β-glucosidase in 1 ml water toegevoegd. Men liet het koppelen van het alginaat met het enzym zich overnacht in een koude omgeving voltrekken. De volgende dag werd een suspensie van nog 200 mg alginaat in 6 ml gedestilleerd water met het aldus verkregen alginaat-β-glucosidase-complex gemengd, zodat men een eindvolume van 10 ml had. Toen werd 500 mg bakkersgist gesuspendeerd in 5 ml 0,1 M acetaat-buffer met pH = 4,9 aan de oplossing toegevoegd, zodat de suspensie nu een volume van ongeveer 15 ml had. Met deze suspensie werd een calciumalginaat-gel gemaakt door de suspensie langzaam in een oplossing van 0,1 M $CaCl_2$ in 0,1 M

acetaat-buffer van pH = 4,9 te druppelen, waarbij kleine parels alginaat-gel met een gemiddelde doorsnede van 2 mm verkregen werden. De gel-parels liet men tenminste 3 uur in de calciumchloride-oplossing, waarbij verknoping van het alginaat-gel plaatsvond, waarna de parels afgescheiden en in een acetaatbuffer met 0,01 M $CaCl_2$ bewaard werden. Uit een suspensie van ongeveer 15 ml aglinaat-sol werd ongeveer 7,4 g (nat) gel verkregen.

De aldus gemaakte alginaat-parels, die covalent gebonden β-glucosidase en fysiek ingesloten bakkersgist bevatten, werden gebruikt voor de bereiding van ethanol met 5 % cellobiose als uitgangsstof. De alginaat-parels werden in een kolom opgesteld. Het volume van de kolom was 7,5 ml en hij bevatte 5,25 g (natte) alginaat-parels, en hij werd gebruikt bij een temperatuur van 22°C. De omzetting van cellobiose in ethanol verliep na drie dagen bijna helemaal volgens de theorie, toen de ethanol-vorming een stationaire waarde van 1,5 % (gewicht/volume) bereikt had, wat overeenkomt met 60 % van de theoretische waarde. De activiteit van de alginaat-parels bleek bij genoemde werktemperatuur tenminste 4 weken stabiel te zijn. Het verloop van dit proces is weergegeven in de onderste curve van de hierbij behorende tekening.

Alginaat-parels die op de beschreven wijze vervaardigd waren, maar driemaal zoveel enzym bevatten, werden op eenzelfde wijze beproefd, en het resultaat daarvan wordt weergegeven door de bovenste curve van de tekening. Met de alginaat-parels van hogere enzym-activiteit werd de opbrengst van 60 % op 80 % van de theoretische waarde gebracht. De activiteit van de aldus gevormde, uit alginaat bestaande parels bleek ook in dit geval tenminste 4 weken stabiel te zijn.

Op een wijze overeenkomstig die van voorbeeld I werden ook katalysatoren bestaande uit parels van calciumalginaat-gel bereid waarin het covalent gebonden enzym respectievelijk β-galactosidase, amylase, een mengsel van endo- en exoglucanasen met β-glucosidase of β-galactosidase was. Het β-galactosidase ontleedt lactose, bijvoorbeeld in wei, in glucose, en dus

kunnen de alginaat-parels die dit enzym bevatten, gebruikt worden voor de bereiding van ethanol uit wei. Het enzym amylase ontleedt zetmeel tot glucose, en dus kunnen alginaat-parels die dit enzym bevatten gebruikt worden voor de bereiding van ethanol uit zetmeel. De cellolulytische enzymen endo-glucanase, exo-glucanase en β-glucosidase breken samen cellulose tot glucose af, volgens de reactievergelijkingen die in de inleiding genoemd zijn, en dus kunnen alginaat-parels die een mengsel van deze enzymen bevatten gebruikt worden voor de bereiding van ethanol uit een cellulose-hydrolysaat.

Indien het enzym dat op de in voorbeeld I beschreven wijze aan de alginaat-parels gebonden werd xylose-isomerase is krijgt men een katalysator die gebruikt kan worden voor de bereiding van ethanol uit xylose, met xylulose als tussenprodukt.

Bij gebruik van Penicillium sp. als microorganisme en acylase als enzym is het mogelijk op de in voorbeeld I beschreven wijze een katalysator te bereiden die gebruikt kan worden voor de bereiding van 6-APA volgens de reactie-vergelijking die in de inleiding genoemd is.

Hoewel de uitvinding in het voorafgaande voornamelijk toegelicht is betreffende katalysatoren bestaande uit polymere alginaat-parels die fysiek ingesloten bakkersgist als microörganisme en diverse covalent gebonden enzymen bevatten, voor de bereiding van ethanol uit diverse substraten, begrijpt men dat vele andere katalysatoren volgens de uitvinding bereid kunnen worden uit vele andere soorten polymeer materiaal dan wat hier genoemd werd, met behulp van uiteenlopende enzymen en microörganismen, in overeenstemming met de voorbeelden in het voorafgaande, voor het uitvoeren van vele uiteenlopende biochemische omzettingen.

Conclusies

1. Katalysator voor biochemische omzettingen die de aanwezigheid van tenminste één enzym en tenminste één microörganisme vergen, waarbij genoemde katalysator uit vaste dragerlichamen van een of meer polymeren bestaat, waarvan er tenminste één een verknoopt polymeer is, waarin tenminste één enzym door covalente bindingen aan het polymere materiaal van de dragerlichamen gebonden is, en er tenminste één microörganisme fysiek in de driedimensionele structuur van het verknoopte polymeer ingesloten is.

2. Katalysator volgens conclusie 1, waarin het enzym covalent gebonden is door middel van carboxy-, hydroxy-, fenyl-, tyrosine-, amino- of thiol-groepen van het polymeer of het enzym.

3. Katalysator volgens conclusie 1 of 2, waarin de vaste lichamen de vorm van parels met een doorsnede van de orde van enige tienden van een millimeter tot enige millimeters hebben.

4. Katalysator volgens een der conclusies 1 t/m 3, waarin het polymere materiaal in de vaste lichamen een polysaccharide, zoals cellulose, zetmeel, agarose, dextran, carrageenan, alginaat of chitine is, of een vinyl-polymeer of een polyamine of een eiwit of een polyamide of een polyurethaan.

5. Katalysator volgens een der conclusies 1 t/m 4, waarin het enzym een oxidoreductase, een transferase, een hydrolase, een lyase, een isomerase of een ligase is.

6. Katalysator volgens een der conclusies 1 t/m 5, waarin het microörganisme tot de wieren, bacteriën, bacteriofagen, schimmels, virussen, antisera, protozoën of gisten behoort.

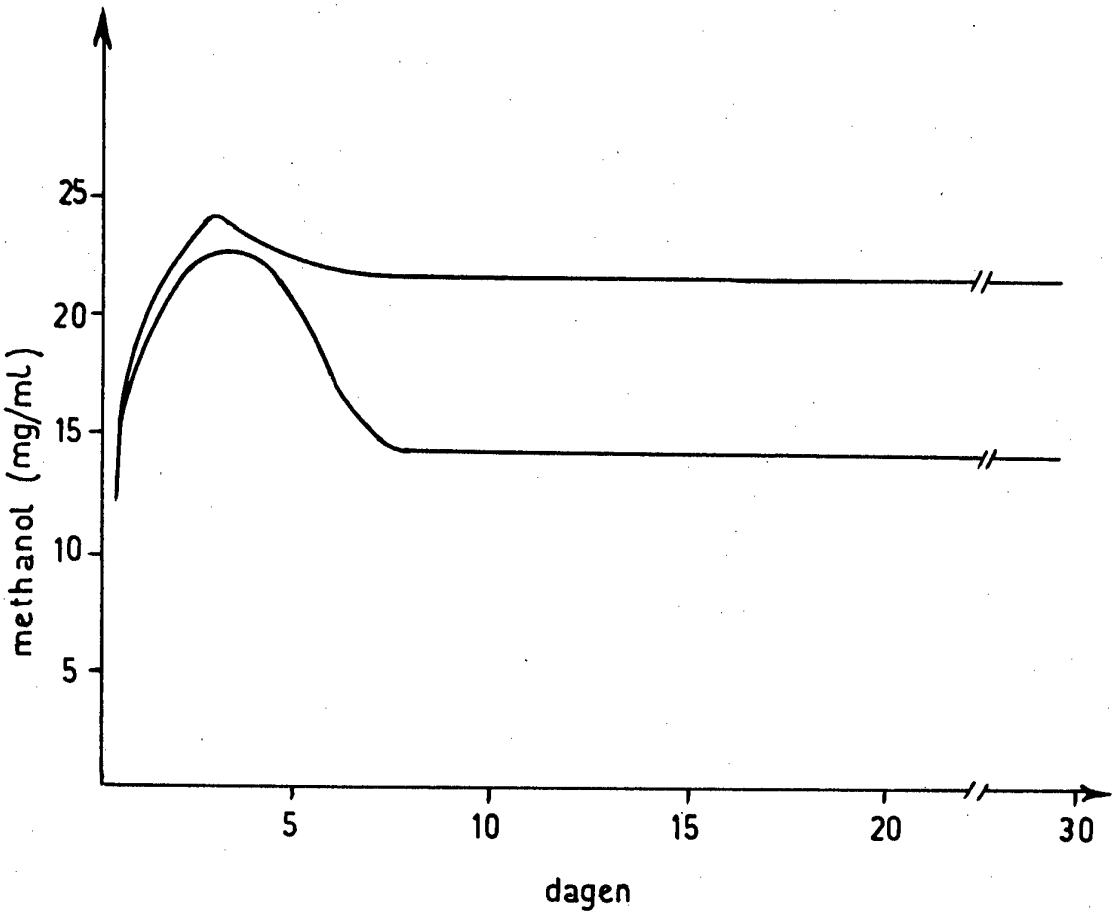
7. Katalysator volgens conclusie 1 voor het bereiden van ethanol, bestaande uit parels van verknoopt calciumalginaat met fysiek ingesloten bakkersgist en een of meer covalent gebonden enzymen uit de groep van β-glucosidase, β-galactosidase, amylase, een mengsel van endo-glucanasen en exo-glucanasen met β-glucosidase en xylose-isomerase.

8. Werkwijze voor het bereiden van een katalysator voor biochemische omzettingen, waarbij aan een polymeer of monomeer in oplossing of suspensie tenminste één enzym toegevoegd wordt, nadat eerst geëigende molecuulgroepen van het enzym of van polymeer of monomeer geactiveerd zijn, zodat bij het samenbrengen van enzym en polymeer of monomeer het enzym de covalente bindingen aan de moleculen van genoemde polymeer of monomeer gebonden wordt, waarna het polymeer of monomeer met het daaraan covalent gebonden enzym in oplossing of suspensie met tenminste één verknoopbaar polymeer of monomeer gemengd wordt, waarna het aldus verkregen mengsel onderworpen wordt aan een verknopende polymerisatie zodat vaste lichamen ontstaan van polymeer dat een covalent aan het polymeer-materiaal gebonden enzym en een fysiek in het driedimensionale netwerk van deze lichamen ingesloten micro-organismen bevat.

9. Werkwijze volgens conclusie 8, waarbij met het oogmerk tussen het genoemde enzym en het genoemde polymeer of monomeer covalente bindingen in te stellen, hydroxy-, carboxy-, fenyl-, tyrosine-, amino- of thiol-groepen van het enzym of van het polymeer of monomeer gebruikt worden.

10. Werkwijze volgens conclusie 8 of 9, waarbij genoemde covalente bindingen ingesteld worden door bepaalde molecuulgroepen van het polymeer of monomeer te activeren.

11. Werkwijze volgens een der conclusies 8 t/m 10, waarbij het polymeer of monomeer dat voor de uiteindelijke verknoopte, driedimensionele structuur gebruikt wordt, van hetzelfde soort is als het polymeer of monomeer dat voor het covalent binden van het enzym gebruikt werd.



Bärbel Hägerdal en Klaus Mosbach
Lund Furulund
Zweden Zweden

8020306