



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 217 822 A5

4(51) C 12 P 13/22
C 07 C 101/08

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 P / 255 308 1
(31) 432,182(22) 30.09.83
(32) 01.10.82(44) 23.01.85
(33) US

(71) siehe (73)

(72) Wayne, Elliott S., US

(73) Genex Corporation, 6110 Executive Boulevard, Rockville, Maryland 20852, US,

(54) Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin durch Wiederverwendung von Phenylalanin-Ammoniaklyase

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin durch Reagieren von t-Zimtsäure mit einer Ammoniumionenquelle zwecks Bildung einer Substratlösung, Einstellen des pH-Wertes der Substratlösung und Kontaktieren der Substratlösung mit Phenylalanin-Ammoniaklyase als Katalysator. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens, mit dem L-Phenylalanin in hoher Ausbeute hergestellt werden kann, wobei ein hoher Grad der Aktivität der Phenylalanin-Ammoniaklyase aufrechterhalten wird und der Katalysator wiederverwendet werden kann. Erfindungsgemäß werden im wesentlichen halogenfreie Ammoniumsalze, beispielsweise Ammonium-sulfat, als Ammoniumionenquelle verwendet. Zum Einstellen des pH-Wertes der Substratlösung wird erfindungsgemäß eine im wesentlichen halogenfreie Säure, beispielsweise Schwefelsäure, verwendet.

Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Phenylalanin aus einer durch Phenylalanin-Ammoniaklyase (PAL) katalysierten Reaktion von t-Zimtsäure und Ammoniak. Speziell bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein solches Verfahren zur Herstellung von Phenylalanin, bei dem ein hoher Grad der Aktivität des PAL-Katalysators erhalten bleibt und der Katalysator wiederverwendet werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

L-Phenylalanin ist eine essentielle Aminosäure mit Bedeutung auf dem Gebiet der Ernährung sowie anderen Gebieten der Lebensmittelherzeugung und Medizin. Es ist aus einer Reihe von Proteinen einschließlich Ovalbumin und Lactalbumin industriell isoliert worden. Ein im Fachgebiet weithin bekanntes Laborverfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin verwendet das Enzym Phenylalanin-Ammoniaklyase (im folgenden PAL), um die reversible Reaktion zu katalysieren:

L-Phenylalanin \rightarrow trans-Zimtsäure + Ammoniak

Siehe GB-PS 1 489 468 (19. Oktober 1977).

Das Gleichgewicht dieser Reaktion beträgt normalerweise 80:20 zugunsten der t-Zimtsäure, wobei verschiedenartige Mittel erprobt worden sind, um einen hohen Umwandlungsgrad in Richtung auf L-Phenylalanin zu erzielen. Das GB-PS 1 489 468 offenbart, daß eine an die theoretischen 20% L-Phenylalanin angenäherte Ausbeute erzielt werden kann, indem eine große Masse den PAL-Katalysator enthaltender Zellen sowie ein Überschuß an Ammonium-Ionen angewandt wird. Entsprechend dem Verfahren jenes Patents handelt es sich bei der Ammoniumionen-Quelle vorzugsweise um Ammoniumchlorid, wobei die Reaktion vorzugsweise bei einem pH-Wert zwischen 8,5 und 9,7 vorgenommen wird.

Yamada, S. et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 42:773-78 (1981) berichteten, daß die Umwandlungs-Ausbeute auf mehr als 70% gesteigert werden konnte, indem der pH-Wert der Substratlösung mit Salzsäure auf 10,0 eingestellt wurde. Diese Bedingungen sind allerdings so scharf, daß die PAL-Aktivität der wiedergewonnenen Zellen in starkem Maße reduziert ist, dies in einem Ausmaß, daß eine Wiederverwendung des Enzyms nicht realisierbar ist. Darüber hinaus stellen Yamada et al. fest, daß die Immobilisierung des zellulären Enzyms gegenüber dem Einsatz intakter Zellen keinen Vorteil bietet. Obwohl somit bei Anwendung dieses Verfahrens eine anfänglich hohe Konzentration an L-Phenylalanin möglich ist, macht die fehlende Fähigkeit zur Wiederverwendung des katalytischen Enzyms dieses Verfahren für eine großindustrielle Anwendung unwirtschaftlich. Mithin besteht ein anhaltender Bedarf an einem Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin aus t-Zimtsäure und Ammoniak, bei dem sowohl eine hohe Ausbeute an L-Phenylalanin erzielt wird, bei dem aber auch die PAL genügend katalytische Aktivität zurückbehält, daß sie erneut eingesetzt werden kann.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Erzeugung von L-Phenylalanin aus t-Zimtsäure, bei dem das Produkt in hohen Konzentrationen erzeugt wird und bei dem das PAL-Enzym wiederholt verwendet werden kann. Desgleichen ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine solche Vorrichtung zur Erzeugung von L-Phenylalanin zu vermitteln, in welcher die Reaktion entweder in einem Chargensystem freier Zellen oder in einem System immobilisierter Zellen bzw. in einem Enzymsystem gefahren werden kann.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Schaffung einer wirtschaftlich einsetzbaren Vorrichtung zur Verwendung von PAL in der Produktion von L-Phenylalanin.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, geeignete Reaktionsbedingungen für die Herstellung von L-Phenylalanin aufzufinden.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin durch Reagieren von t-Zimtsäure und Ammoniak in Anwesenheit von Phenylalanin-Ammoniaklyase derart verbessert, daß hohe Ausbeuten an L-Phenylalanin erzielt werden und ein hohes Maß an katalytischer Aktivität der PAL beibehalten wird. Unter kontrollierten Reaktionsbedingungen wird die Stabilität der PAL derart gesteigert, daß sie wiederholt zur Erzeugung von L-Phenylalanin mit hohen Konzentrationen verwendet werden kann.

Zwecks Erzielung dieses erwünschten Resultats wird durch Reagieren von Säure mit einer Ammoniumionenquelle eine Substratlösung hergestellt. Bei der Ammoniumionenquelle kann es sich um irgendein Nithalogen-Ammoniumsalz handeln. Unter Verwendung einer halogenfreien Säure wird der pH-Wert der Substratlösung auf einen Wert im Bereich von etwa 8,0 bis 10,0 eingestellt, sodann wird die Lösung einer PAL-Quelle wie etwa einem System freier intakter Zellen oder aber einem PAL-haltigen System immobilisierter Zellen bzw. einem entsprechenden Enzym-System zugesetzt.

Entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren wird mit t-Zimtsäure und einer Ammoniumionenquelle eine Substratlösung hergestellt. Die Ammoniumionenquelle kann eingeführt werden, indem der t-Zimtsäure ein Ammoniumsalz entweder einer organischen Säure oder aber einer mineralischen Säure entweder direkt zugesetzt wird, oder aber indem sie in die Substratlösung eingearbeitet wird, so etwa durch Vermischen von Ammoniumhydroxid und einer Nithalogensäure.

Wie das GB-PS 1 489 468 lehrt, besteht eine bevorzugte Ammoniumionenquelle in einem Gemisch aus Ammoniumchlorid und Ammoniumhydroxid (Seite 3, Zeilen 25 bis 26). Das Verfahren nach Yamada et al. benutzt ebenfalls Ammoniumchlorid. Im Gegensatz zu diesen Lehren im Rahmen des bisherigen Standes der Technik ist herausgefunden worden, daß es vorteilhaft ist, wenn das Ammoniumsalz keine Halogenionen enthält. Es hat sich gezeigt, daß das Vorhandensein von Halogen in den Substratlösungen die katalytische Aktivität der PAL hemmt. Folglich gehören zu den bevorzugten Ammoniumsalzen Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat, Ammoniumzitrat, Ammoniumacetat und Ammoniumphosphat. Ein insbesondere bevorzugtes Ammoniumsalz ist Ammoniumsulfat.

Desgleichen ist wünschenswert, daß das Ammoniumsalz der Substratlösung in hohen Konzentrationen zugesetzt wird. Die Konzentration an Ammoniumionen reicht im allgemeinen von etwa 0,1 bis zu 7,5 M, vorzugsweise von etwa 1 bis 5 M. Die hohe Ammoniumsalzkonzentration steigert die Ammoniakkonzentration im System und wirkt darüber hinaus als Puffer, so daß die pH-Einstellung der Reaktion leichter gesteuert werden kann.

Bewegt sich die Ammoniumionenkonzentration innerhalb dieser angegebenen Bereiche, so beläuft sich die Konzentration an t-Zimtsäure in der Lösung im allgemeinen zwischen etwa 30 bis etwa 200 mM, vorzugsweise liegt sie zwischen etwa 60 und etwa 150 mM.

Yamada et al. lehren, daß die Substratlösung auf einen pH-Wert von 10,0 eingestellt werden sollte. Im Verfahren der vorliegenden Erfindung hingegen kann der pH-Wert auf einen Bereich von etwa 8 bis etwa 10, vorzugsweise von etwa 8,5 bis etwa 9,5 eingestellt werden. Die Quelle nach Yamada lehrt desweiteren das Einstellen des pH-Wertes der Substratlösung mit Salzsäure. Dies kann dem Substrat eine beträchtliche Menge an Chlorid zuführen. Im vorliegenden Verfahren dagegen ist es — wie bereits erwähnt — vorteilhaft, den pH-Wert der Substratlösung mit einer halogenfreien Säure einzustellen. Bevorzugte Säuren für das Einstellen des pH-Wertes sind Schwefelsäure, Phosphorsäure und Essigsäure, wiewohl auch anderweitige halogenfreie Säuren verwendet werden können. Eine, insbesondere bevorzugte Säure ist Schwefelsäure, zumal sie beim Zusetzen zu einer Ammoniumhydroxid enthaltenden Substratlösung unter Bildung von Ammoniumsulfat reagiert, welches wiederum ein bekanntes enzymstabilisierendes Agens ist.

Die Substratlösung wird einer PAL enthaltenden Nährbrühe, den daraus separierten Zellen oder dem isolierten Enzym zugesetzt. Die PAL wird unter Anwendung herkömmlicher Methoden erzeugt, wie sie der gegenwärtige Stand der Technik lehrt. Die PAL-katalysierte Reaktion verläuft unter L-Phenylalanin produzierenden Bedingungen, welche vorzugsweise eine Reaktionstemperatur von etwa 10°C bis etwa 45°C einschließen. Unter den Bedingungen des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Stabilität der PAL derart gesteigert, daß sie wiederholt eingesetzt werden kann, um L-Phenylalanin in hohen Konzentrationen zu produzieren.

Das vorliegende Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin kann entweder in einem Chargensystem freier Zellen oder in einem System immobilisierter Zellen bzw. einem Enzymsystem angewendet werden. Bei dem Chargensystem kann es sich entweder um ein einfaches Chargensystem oder um ein kontinuierlich gespeistes Chargensystem handeln. Wird die PAL in einer Säule immobilisiert, dann kann die Säule als Durchlaufsystem, als Wiedereinsatzsystem oder als kontinuierlich gespeistes Wiedereinsatzsystem betrieben werden. Ein bevorzugtes Verfahren zur Immobilisierung des PAL-Enzyms oder der das Enzym enthaltenden Zellen wird in der US-Patentanmeldung der Seriennummer 400 141 vom 20. Juli 1982 offengelegt. Werden die PAL-Enzyme oder die das Enzym enthaltenden Zellen auf einer Säule immobilisiert, dann kann die Säule auf einer Temperatur von etwa 10°C bis etwa 40°C und vorzugsweise von etwa 18°C bis etwa 30°C gehalten werden, wenn die Substratlösung durch die Säule gepumpt wird.

Das Reaktionsgemisch wird mittels herkömmlicher Methoden hinsichtlich seiner L-Phenylalanin-Produktion analysiert. Wird Schwefelsäure anstelle von Salzsäure in der Substratlösung verwendet, dann wird etwa 8- bis 10mal mehr L-Phenylalanin produziert. Wenn das PAL-Enzym immobilisiert worden ist, dann zeigt es nach 41 Tagen Reaktionszeit eine annähernd 50%ige Retention der Aktivität. Dies steht im Gegensatz zu den 20% Retention nach 24 Stunden, wie sie von Yamada et al. berichtet werden.

Das L-Phenylalanin kann mittels konventioneller Verfahren aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Ausführungsbeispiele sollen dazu dienen, daß erfindungsgemäße Verfahren zu illustrieren und deutlicher zu definieren, nicht jedoch als begrenzend ausgelegt werden.

Ausführungsbeispiel 1

Ein Kulturmedium wurde mittels der folgenden allgemeinen Vorgehensweise zubereitet:

Einem Liter deionisiertem Wasser wurden 10g Pepton, 10g Hefeextrakt, 0,5g D,L-Phenylalanin, 5g Natriumchlorid und 5g L-Isolucin zugesetzt. Mittels Schwefelsäure wird der pH-Wert auf 6,0 eingestellt, worauf 10 min lang bei 120°C und 15 psi im Autoklaven behandelt wird. Dies ist das Standard-Anregungsmedium für die Kulturröhrchen und Schüttelgefäße.

Ausführungsbeispiel 2

Die allgemeine Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 1 wurde wiederholt, wobei dem Medium allerdings außerdem noch 100mM Kaliumiodid (KI) zugesetzt wurden. Dies ist das hochinduzierende Selektionsmedium.

Ausführungsbeispiel 3

Die allgemeine Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 1 wurde mit der Ausnahme wiederholt, daß dem Medium 200mM KI zugesetzt wurden. Dies ist ebenfalls ein hochinduzierendes Selektionsmedium.

Ausführungsbeispiel 4

Die allgemeine Vorgehensweise nach Ausführungsbeispiel 1 wurde mit der Ausnahme wiederholt, daß Pepton weggelassen und 15g Hefeextrakt eingesetzt wurden. Desweiteren wurden 200mM KI zugesetzt. Dies ist das hochinduzierende Schüttelgefäß-Produktionsmedium.

Ausführungsbeispiel 5

Unter Anwendung der allgemeinen Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 4 wurde ein Fermentierungsmedium zubereitet, wobei allerdings Natriumchlorid und L-Isoleucin weggelassen wurden. Dies ist das hochinduzierende Fermentations-Produktionsmedium.

Ausführungsbeispiel 6

Gemäß den Ausführungsbeispielen 1, 2 und 3 wurden drei Kulturmedien hergestellt. Ein PAL produzierender Stamm von *Rhodospirillum rubra* (ATCC 4056), welcher auf Schrägagarkulturen gehalten worden war, wurde dazu verwendet, 4,5 cm³ jeder der Reagenzglaskulturen zu beimpfen. Die Röhrchen wurden sodann bei 30°C und 250 U/min auf einen Schüttler gestellt. Bei 24h oder 48h wurden 7 Überführungen (0,2 cm³) von jedem Reagenzglas in 4,5 ml frisches Kulturmedium vorgenommen. Die Kulturröhrchen wurden dazu verwendet, 200 cm³ Medium in 1000-ml-Schüttelflaschen zu beimpfen. Ein Gefäß von jedem Medium wurde bei 30 Stunden und bei 54 Stunden geerntet. Die Zellausbeute nach 30 Stunden betrug im Mittel 14g Paste/Liter; nach 54h betrug sie im Mittel 29g Paste/Liter. Die PAL-Aktivität von 100mM KI war um 31% höher als die Kontrolle. Die PAL-Aktivität von 200mM KI war um 39% höher als die Kontrolle.

Ausführungsbeispiel 7

Die allgemeine Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 6 zum Anbau von *R. rubra*-Zellen in 200mM KI hochinduzierendem Medium wurde mit der Ausnahme nachvollzogen, daß 25 Selektionsübertragungen der 200-mM-KI-Kultur vorgenommen wurden.

Darüber hinaus wurden 24 h nachdem die Schüttelflasche inokuliert worden war 2,5% des Mediums dazu verwendet, 15 frische (Finalbehälter) Schüttelbehälter zu beimpfen; nach 24stündiger Kulturzeit wurden diese Behälter geerntet. Die Zellausbeuten sowie die PAL-Aktivität wurden anhand einiger weniger Behälter sowie anhand des finalen zusammengefaßten Zellpastenproduktes bestimmt. Die höchste PAL-Aktivität bei 28,7 g Paste/Liter Medium betrug 18,4 U/g Paste (528 U PAL/Liter). (1 Einheit = 1 Mol L-Phenylalanin konvertierten zu t-Zimtsäure und Ammoniak/min bei 30°C.) Die Aktivität wurde vermittelt einer Modifikation der von Kalghatgi und Subba Rao, Biochem. J. 149: 65-72, 1975 angegebenen Methode bestimmt. Das abschließend zusammengefaßte Zellprodukt zeigte 15,0 Einheiten PAL/g Paste bei 27 g Paste/Liter mittlerer Zellausbeute (405 U PAL/Liter).

Ausführungsbeispiel 8

Ammoniumzinnamat-Substratlösung wurde mittels der folgenden allgemeinen Vorgehensweise hergestellt. Zimtsäure wurde zu Ammoniumhydroxid (28%) bis zum Auflösen zugesetzt. Sodann wurden Wasser und Säure zugesetzt, um das Substratvolumen bzw. den pH-Wert einzustellen. In den nachstehenden Ausführungsbeispielen werden die Zimtsäurekonzentration, die Ammoniakkonzentration und der pH-Wert (Menge der zugesetzten Säure) variieren; daher werden die Mengen produzierten Ammoniumsalzes ebenfalls variieren.

Ausführungsbeispiel 9

Die Wirkung hoher Halogenkonzentrationen auf PAL wurde durch Verwendung verschiedener Säuren beim Absenken des pH-Wertes von Substratlösungen untersucht. Unter Anwendung der allgemeinen Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 8 wurden zwei Substrate zubereitet (60 mM CA; 7,5 M NH₃; pH 10,0). Lösung A wurde unter Einsatz von Salzsäure pH-eingestellt, während Lösung LB unter Verwendung von Schwefelsäure pH-eingestellt wurde. Wie in Ausführungsbeispiel 4 angebaute *R.-rubra*-Zellen wurden bei 30°C in mit verrührtem Wasser ummantelte Becher eingebracht. Zeitlich geordnete Proben wurden entnommen und hinsichtlich L-Phenylalanin sowohl mittels Dünnschichtchromatografie als auch mittels einer enzymatischen L-Aminosäure-Oxidase-Untersuchung analysiert. Es zeigte sich, daß die Substratlösung A (Ammoniumchlorid enthaltend) PAL-Enzym inhibiert. Zellen der Substratlösung B erzeugten zehnmal mehr L-Phenylalanin (nach 24 Stunden Reaktionszeit) als Zellen der Substratlösung A.

Ausführungsbeispiel 10

Die allgemeine Vorgehensweise des Ausführungsbeispiels 9 wurde wiederholt, um Phosphorsäure mit Schwefelsäure zu vergleichen. Die *R.-rubra*-Zellen in dem mit Phosphorsäure pH-eingestellten Substrat produzierten 90% des L-Phenylalanins, wie es vom mit Schwefelsäure pH-eingestellten Substrat erzeugt wurde.

Ausführungsbeispiel 11

Die allgemeine Vorgehensweise des Ausführungsbeispiels 9 wurde wiederholt, um Essigsäure mit Schwefelsäure zu vergleichen. Die in den Reaktoren erzeugte Menge an L-Phenylalanin war die gleiche.

Ausführungsbeispiel 12

Nach der allgemeinen Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 6 wurden Zellen angebaut. Diese Zellen wurden dazu verwendet, die Wiederverwendbarkeit (Stabilität) der ganzen Zellen zu untersuchen. Es wurden drei Substrate hergestellt, 60 mM t-Zimtsäure, 7,5 M Ammoniak, deren pH-Wert mit Schwefelsäure auf 10,0, 9,0 bzw. 8,0 gesenkt wurde. Zellen (4,5 g Zellpaste) wurden 16 h lang bei 30°C in jedes der Substrate (45 cm³) eingebracht. Die L-Phenylalanin-Konzentration wurde mittels L-Aminosäure-Oxidase-Untersuchung sowie mittels Dünnschichtchromatografie bestimmt. Die Zellen wurden zentrifugiert, gewaschen und für 16 Stunden in frisches Substrat eingebracht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

pH	Lauf I mg/ml L-Phe	Lauf II mg/ml L-Phe	% Aktivitäts- retention
8	0,22	0,12	55
9	0,95	0,78	82
10	2,02	0,43	21

Die Ergebnisse zeigen, daß selbst bei doppelter Anfangsaktivität von pH 10,0 gegenüber pH 9,0 die pH-9,0-Zellen nach einem Lauf eine gegenüber pH 10,0 mit 163% höhere Aktivität aufweisen.

Ausführungsbeispiel 13

Gemäß Ausführungsbeispiel 12 wurde eine zweiwöchige Stabilitätsstudie vorgenommen. Die Reaktor-pH-Werte betrugen allerdings 8,75, 9,00 und 9,25, und die Ammoniak-Konzentration betrug 5,5 M. Der 14-Tage-Test wurde mit 6 aufeinanderfolgenden Chargenuntersuchungen freier *R.-rubra*-Zellen vorgenommen. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tage bei angegebenem pH-Wert	produzierte mg L-Phenylalanin/Stunde/g Zell- Trockenmasse (% erhaltene anfängliche Aktivität)		
	Reaktions-pH		
	8,75	9,00	9,25
1	5,9	5,7	5,7
7	3,6 (61)	3,8 (67)	4,2 (74)
14	3,5 (59)	3,5 (61)	4,0 (70)

Die Ergebnisse zeigen, daß geeignete Bedingungen eine Wiederverwendung von PAL zur Erzeugung von L-Phenylalanin gestatten und daß die Retentionspegel der Aktivität für freie Zellen hoch sind.

Ausführungsbeispiel 14

Die Zellpaste aus Ausführungsbeispiel 7 wurde unter Anwendung der allgemeinen Vorgehensweise immobilisiert, wie sie vom US-Patent der Seriennummer 400 141 vermittelt wird. Das Substrat (80 mM; 4,8 M NH_3 ; pH 9,23) wurde aufwärts durch eine Säule gepumpt, welche mit immobilisierten *R. rubra*-Zellen gepackt war. Die Durchflußraten variierten mit 0,10, 0,25 und 0,50 $\text{SV}^{\text{h}^{-1}}$ bei 22°C sowie mit 0,25 und 0,50 $\text{SV}^{\text{h}^{-1}}$ bei 28°C. Das abfließende Medium wurde hinsichtlich L-Phenylalanin geprüft. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Temp. (°C)	Durchfluß ($\text{SV}^{\text{h}^{-1}}$)	erzeugtes L-PHE	Produktivität (g/l/h)
22	0,10	5,4	0,54
	0,25	2,7	0,68
	0,50	2,1	1,05
	0,25	3,8	0,95
28	0,50	2,8	1,40

Bei 0,1 $\text{SV}^{\text{h}^{-1}}$ wurde eine 40%ige Substratkonversion beobachtet, was einer Produktion von 5,4 g L-Phenylalanin/Liter bei 22°C entsprach.

Ausführungsbeispiel 15

Die Kultur- und Immobilisationsbedingungen von Ausführungsbeispiel 14 wurden eingehalten. Zur Bestimmung der Halbwertsproduktivität der Säule unter bestimmten Bedingungen wurde eine PAL enthaltende Säule mit immobilisierten *R. rubra*-Zellen einer Durchlaufbehandlung unterzogen. Bei dem Substrat handelte es sich um 75 mM CA; 4,5 M NH_3 ; pH 9,25, und es wurde bei 23°C bei einer Durchflußmenge von 0,25 $\text{SV}^{\text{h}^{-1}}$ kontinuierlich durchlaufen gelassen. Es ergab sich eine Halbwerts-Produktivität von 41 Tagen (siehe Abbildung 1). Dieser Test zeigt, daß immobilisierte PAL über eine lange Zeitspanne hinweg zur kontinuierlichen Erzeugung von L-Phenylalanin verwendet werden kann.

Ausführungsbeispiel 16A

Gemäß Ausführungsbeispiel 5 wurde ein Fermentationsmedium zubereitet und dazu verwendet, *R. rubra* in einem 10-Liter-Fermentationstank anzubauen. Der Fermentationssamen wurde wie in Ausführungsbeispiel 3 hergestellt. Periodisch wurden Zellproben aus dem Fermentationsbehälter geerntet. Die Zellen wurden hinsichtlich ihrer PAL-Aktivität untersucht, um die optimale Erntezeit zu ermitteln. Es zeigte sich, daß innerhalb von 6 Stunden nach dem Auftreten der Gipfelaktivität weniger als 50% der Spitzenaktivität verblieben. Desgleichen wurde festgestellt, daß vor der Gipfelaktivität das gesamte D,L-Phenylalanin erschöpft worden war.

Ausführungsbeispiel 16B

Es wurde eine Wiederholung von Ausführungsbeispiel 16A vorgenommen. Dabei wurde allerdings unmittelbar nach dem Auftreten der Gipfelaktivität D,L-Phenylalanin (5g/10 Liter) in den Fermentationsbehälter eingespeist. In der ersten Stunde kam es zu einem Abfall der PAL-Aktivität wie in Ausführungsbeispiel 16A. Für die nächsten drei Stunden stabilisierte sich jedoch die PAL-Aktivität, bevor geerntet wurde (siehe Abbildung 2).

Ausführungsbeispiel 17

Entsprechend der Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 14 wurden Zellen zubereitet und immobilisiert. Bei dem verwendeten Substrat handelte es sich allerdings um 75 mM CA; 4,5 M NH_3 ; pH 9,43 bei 23°C und einer Durchflußmenge von $\text{SV}^{\text{h}^{-1}} = 0,50$. Es zeigte sich, daß die Säule 1,9 g L-Phenylalanin/Liter Bettvolumenträger/Stunde produzierte. Die L-Phenylalanin-Konzentration im abfließenden Medium betrug 3,8 g/l.

Ausführungsbeispiel 18

Entsprechend der Vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 14 wurden Zellen zubereitet und immobilisiert. Die immobilisierten Zellen wurden in eine Säule gepackt, worauf 352 cm^3 Substrat (75 mM CA; 4,5 M NH_3 ; pH 9,4) bei 1,0 $\text{SV}^{\text{h}^{-1}}$ durch die Säule rezirkuliert wurden. In Zeitabständen wurden Proben des Substrat-Pools entnommen, worauf die L-Phenylalanin-Konzentration mittels enzymatischer L-Aminosäureoxidase-Untersuchung und Dünnschichtchromatografie bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Kreislaufzeit (h)	L-Phenylalanin (Gramm/Liter)	% Umwandlung
7	2,8	23
21,5	4,6	37
24	5,0	40
44,5	6,8	55

Dieses Ausführungsbeispiel demonstriert, daß unter den genannten Reaktionsbedingungen bei Verwendung von PAL enthaltenden immobilisierten Zellen L-Phenylalanin in hohen Konzentrationen sowie mit hoher Umwandlungsrate hergestellt werden kann.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von L-Phenylalanin durch
 - a) Umsetzen von **trans**-Zimtsäure mit einer Ammoniumionenquelle zwecks Bildung einer Substratlösung,
 - b) Einstellen des pH-Wertes der genannten Substratlösung und
 - c) In-Kontakt-bringen der genannten Substratlösung mit Phenylalanin-Ammoniaklyase unter L-Phenylalanin produzierenden Bedingungen zwecks Bildung von L-Phenylalanin,**gekennzeichnet dadurch**, daß ein im wesentlichen halogenfreies Ammoniumsalz als Ammoniumionenquelle verwendet wird und der pH-Wert der Substratlösung durch Zusetzen einer im wesentlichen halogenfreien Säure eingestellt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der pH-Wert der Substratlösung auf einen Bereich zwischen etwa 8 und etwa 10 eingestellt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß der pH-Wert der Substratlösung auf einen Bereich zwischen etwa 8,5 und etwa 9,5 eingestellt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Ammoniumionenquelle aus jener Gruppe ausgewählt wird, die sich aus Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Ammoniumcitrat und Ammoniumacetat zusammensetzt.
5. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß es sich bei der Ammoniumionenquelle um Ammoniumsulfat handelt.
6. Verfahren nach Punkt 1, 2 oder 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß der pH-Wert der Substratlösung mit einer Säure eingestellt wird, die aus jener Gruppe ausgewählt wird, welche sich aus Schwefelsäure, Phosphorsäure und Essigsäure zusammensetzt.
7. Verfahren nach Punkt 1, 2 oder 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß der pH-Wert der Substratlösung mit Schwefelsäure eingestellt wird.
8. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Ammoniumionenkonzentration im Bereich von etwa 0,1 M bis etwa 7,5 M liegt.
9. Verfahren nach Punkt 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Ammoniumionenkonzentration im Bereich von etwa 1 M bis etwa 5 M liegt.
10. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konzentration von **t**-Zimtsäure in der Lösung von etwa 30 mM bis zu etwa 200 mM reicht.
11. Verfahren nach Punkt 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Konzentration von **t**-Zimtsäure in der Lösung von etwa 60 mM bis zu etwa 150 mM reicht.
12. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Phenylalanin-Ammoniaklyase wiederverwendet werden kann.
13. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das L-Phenylalanin hergestellt wird, indem Phenylalanin-Ammoniaklyase enthaltende intakte Zellen der Substratlösung in einem Chargenreaktor zugesetzt werden.
14. Verfahren nach Punkt 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß es sich bei dem Chargensystem um ein einfaches Chargensystem handelt.
15. Verfahren nach Punkt 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß es sich bei dem Chargensystem um ein kontinuierlich gespeistes Chargensystem handelt.
16. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Phenylalanin-Ammoniaklyase immobilisiert ist oder sich in einem wiederverwendbaren Trägerstoff befindet.
17. Verfahren nach Punkt 1 oder 16, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Phenylalanin-Ammoniaklyase in einer Säule immobilisiert vorliegt.
18. Verfahren nach Punkt 17, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Säule bei einer Temperatur von etwa 10° bis etwa 40°C gehalten wird, während das Hindurchpumpen der Substratlösung durch die Säule erfolgt.
19. Verfahren nach Punkt 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Säule bei einer Temperatur von etwa 18° bis etwa 30°C gehalten wird, während das Hindurchpumpen der Substratlösung durch die Säule erfolgt.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

FIG. 1

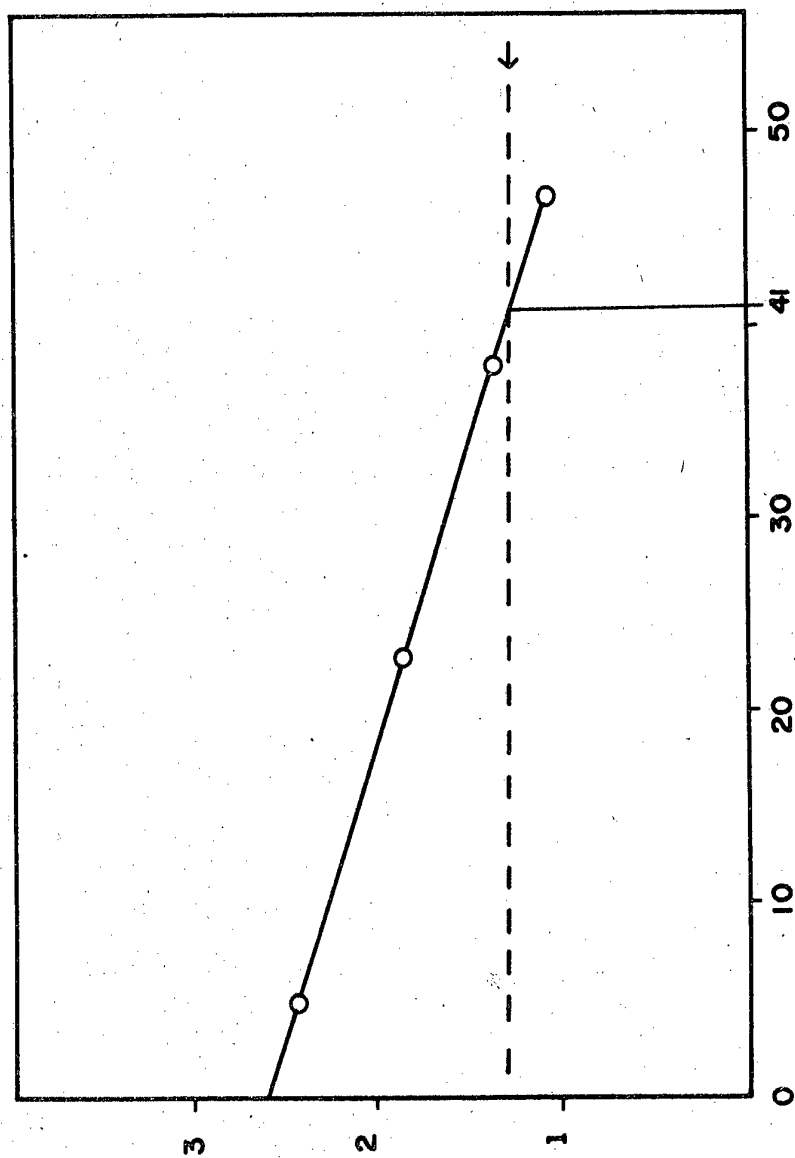


FIG.2

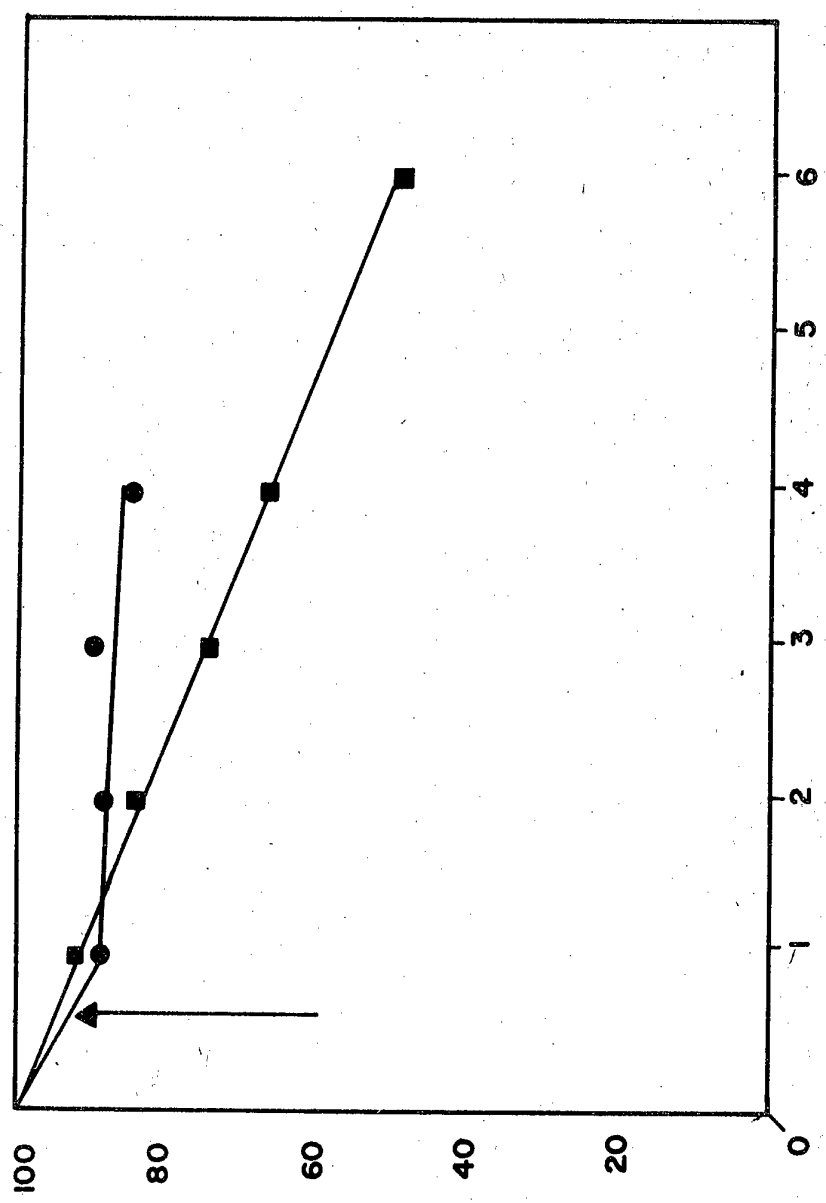


FIGURE 4
% Retention of PAL Activity in *R. rubra* fermentation
with and without D, L-Phenylalanine Feed

