

(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 278 478 A3

5(51) C 12 N 11/00

PATENTAMT

(21) WP C 12 N / 317 055 7

(22) 23.06.88

(45) 09.05.90

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

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

(54) Verfahren zur biokatalytischen Herstellung schlecht wasserlöslicher Substanzen mit integrierter extraktiver Aufarbeitung

(55) Biokatalyse, Extraktion, Tensidphase, Mikroemulsion, hydrophobe Substanzen, organische Lösungsmittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur biokatalytischen Herstellung schlecht wasserlöslicher Substanzen mit integrierter extraktiver Aufarbeitung. Die Erfindung beinhaltet ein biokatalytisches Verfahren, mit dem organische Substanzen umgesetzt und hydrophobe Produkte hergestellt werden können, wobei in einem System gearbeitet wird, welches organische Lösungsmittel enthält. Typische Beispiele für Substanzen, die mit dem Verfahren umgesetzt bzw. hergestellt werden können, sind: Triglyceride, Steroide, Kohlenwasserstoffe, langkettige aliphatische und aromatische Alkohole, Aldehyde, Carbonsäuren, Ester, aromatische Aminosäuren, Peptide. Die Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß Enzyme, pro- und eukariotische Zellen oder Kombinationen von Enzymen und Zellen in Tensidphasen (= Mittelphasenmikroemulsionen = surfactant phase) solubilisiert werden, wobei ihre biokatalytischen Eigenschaften erhalten bleiben und über eine organische Lösungsmittelphase, die sich im thermodynamischen Gleichgewicht mit dieser Phase befindet, die Substratzuführung und Produktabführung realisiert wird. Da die Tensidphase ein sehr gutes und komplexes Lösungsvermögen besitzt, können mit dem Verfahren sowohl hydrophile und/oder hydrophobe Substrate umgesetzt werden. Die Herstellung des flüssigen Zweiphasensystems erfolgt auf der Basis von ternären Gemischen bestehend aus Tensidkomponente, organischem Lösungsmittel und Wasser. Dabei kann das Substrat auch in fester Form zugeführt und direkt in der Tensidphase gelöst werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur biokatalytischen Herstellung schlecht wasserlöslicher Substanzen mit integrierter extraktiver Aufarbeitung, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine den Biokatalysator enthaltende, aus Wasser, Tensid und organischem Lösungsmittel gebildete Tensid- oder Mittelphase im Kontakt mit der koexistierenden organischen Lösungsmittelphase, die als Extraktionsmittel für ein entstehendes hydrophobes Produkt dient, eingesetzt wird.
2. Verfahren gemäß Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine Tensidphase eingesetzt wird, die im ternären Zustandsdiagramm Tensid/Wasser/organisches Lösungsmittel mit der reversmizellaren oder mizellaren Phase ein einheitliches Zustandsgebiet ausbildet.
3. Verfahren gemäß Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Biokatalysatoren Enzyme, pro- und eukariotische Zellen und Enzyme in Kombination mit Zellen eingesetzt werden.
4. Verfahren gemäß Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Substrate, die nicht in der organischen Lösungsmittelphase löslich sind, in fester Form zugegeben, direkt in der Tensidphase gelöst werden.

Anwendungsgebiet des Verfahrens

Die Erfindung betrifft ein biokatalytisches Verfahren mit integrierter extraktiver Produktaufbereitung. Das Verfahren ist geeignet für den Umsatz hydrophober und/oder hydrophiler Substrate und die Herstellung von hydrophoben Produkten, die in organischen Lösungsmitteln löslich sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Biokatalytische Verfahren, die mit einer Produktextraktion gekoppelt sind, besitzen den prinzipiellen Vorteil, daß eine Produktinhibierung umgangen werden kann. Darüber hinaus kann eine hohe Raum-Zeitausbeute durch kontinuierliche und halbkontinuierliche Prozeßführung erreicht werden. Für wäßrige Zweiphasensysteme sind derartige Verfahren gut bekannt./1, 2/. Diese Verfahren sind jedoch nur dann praktikabel, wenn die eingesetzten Substrate und Produkte ausreichend wasserlöslich sind.

Zur Extraktion hydrophober Produkte sind zweiphasige flüssige Systeme, bestehend aus organischem Lösungsmittel und einer den Biokatalysator enthaltenden wäßrigen Phase vorgeschlagen worden/3/. Diese Verfahrensweise ist problematisch, da es an der Grenzschicht zwischen organischem Lösungsmittel und Wasser zur Enzymdenaturierung und zur Schädigung der eingesetzten Mikroorganismen und Zellen kommt. Weisen darüber hinaus auch die eingesetzten Substrate nur eine geringe Wasserlöslichkeit auf, lassen sich mit dem Verfahren nur sehr geringe Umsatzraten erzielen.

Für den Umsatz hydrophober Substrate besitzen reversmizellare Phasen sehr günstige Eigenschaften/4, 5/. Ein flüssiges Zweiphasensystem, das eine Extraktion ermöglicht, ist hier jedoch nur in der Form bekannt, daß eine reversmizellare Phase mit reinem Wasser koexistiert. Damit ist prinzipiell die Möglichkeit eines Umsatzes hydrophober Substrate und der Extraktion hydrophiler Produkte gegeben.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Kopplung einer Biokatalyse, bei der hydrophile oder hydrophobe Substrate umgesetzt werden, mit einer Extraktion, bei der hydrophobe Produkte durch ein organisches Lösungsmittel kontinuierlich extrahiert werden können, wobei durch die Extraktion keine übermäßige Desaktivierung des Biokatalysators verursacht wird.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe besteht in der Nutzung der biokatalytischen Eigenschaften von isolierten Enzymen sowie von Enzymsystemen pro- und eukariotischer Zellen in einem flüssigen System, welches für die kontinuierliche Produktextraktion eine organische Lösungsmittelphase enthält.

Erfindungsgemäß werden in Tensidphasen solubilisierter Biokatalysatoren in einem Zweiphasengebiet eines Dreikomponentengemisches, bestehend aus Wasser, organischem Lösungsmittel und Tensid, eingesetzt. In diesem Zweiphasengebiet koexistiert die biokatalysatorhaltige Tensidphase mit reinem organischem Lösungsmittel. Die Substratzuführung kann entweder über die organische Lösungsmittelphase erfolgen, oder das Substrat wird in fester Form zugeführt und direkt in der Tensidphase gelöst. Dabei wird das gute und sehr komplexe Lösungsvermögen der Tensidphase sowohl für hydrophile als auch für hydrophobe Substanzen genutzt. Die entstehenden hydrophoben Produkte werden von der koexistierenden organischen Lösungsmittelphase extrahiert und können in einem Folgeschritt aufgearbeitet werden. Als organische Lösungsmittel können unpolare Lösungsmittel wie z. B. Hexan, Heptan, Octan, Cyclohexan, Benzen oder polare Lösungsmittel wie z. B. Dioxan, Aceton, Azetessigester oder Lösungsmittelgemische eingesetzt werden. Als Tenside können anionische Amphiphile wie z. B. Alkalialkylsulfate, Alkalialkylsulfonate, Alkalialkylcarboxylate, Alkaliarylsulfonate, Alkalidialkylsulfosuccinate, Erdalkalidialkylsulfosuccinate oder ein kationisches Amphiphil wie Alkylammoniumsalze, Alkylpyridiniumsalze, Alkyltrimethylammoniumsalze oder ein zwitterionisches Amphiphil wie z. B. ein

Phospholipid, Sulfobetain, Carbobetain oder ein nichtionisches Amphiphil wie z. B. Polyoxyethylenether, Polyoxyethylenester, Polyoxyethylensorbitanester, Alkylphenolpolyethylenglykolester oder entsprechende Tensidgemische verwendet werden. Als Biokatalysatoren können neben isolierten Enzymen wie z. B. Alkoholdehydrogenase, Chymotrypsin, Lipase, auch pro- und eukariotische Zellen beispielsweise von *E. coli* oder *Saccaromyces cerevisiae* auch Enzyme und Zellen gleichzeitig eingesetzt werden.

Die Tensidphase, die in der kolloidchemischen Literatur/6/ auch als Mittelphase bezeichnet wird, ist flüssig und niedrigviskos. In einigen Fällen bilden Tensidphase und reversmizellare bzw. mizellare Phase makroskopisch ein einheitliches Zustandsgebiet aus/6, 7/. Auch in dieser Phase kann der Biokatalysator solubilisiert werden. Biokatalysatoren, d. h. isolierte Enzyme oder ganze Zellen, zeigen in diesen Phasen eine bemerkenswert hohe biokatalytische Aktivität, die auch nach längerer Lagerzeit erhalten bleibt. Eine Zellvermehrung findet unter diesen Umständen in der Regel nicht oder nur in sehr eingeschränktem Maße statt. Bei Verwendung des zweiphasigen Reaktionssystems, bestehend aus biokatalysatorhaltigen Tensidphase und organischer Lösungsmittelphase, werden die praktischen Möglichkeiten für die biokatalytische Synthese von schlecht wasserlöslichen Substanzen wie Steroiden, Lipiden, langkettigen aliphatischen und aromatischen Alkoholen, Aldehyden, Carbonsäuren und Estern wesentlich erweitert. Darüber hinaus ergibt sich auch die Möglichkeit einer Phasentransferkatalyse bei der Peptidsynthese.

Die Biokatalyse ist in jedem Falle vom Verteilungsgleichgewicht der Substrate und Produkte zwischen den koexistierenden Phasen bzw. vom Lösungsverhalten der Substrate in der Tensidphase beeinflusst.

Technische Synthesen auf Basis des vorgeschlagenen Verfahrens können in einfachen Reaktions- und Extraktionsapparaten wie z. B. Rührkesseln, Extraktionskolonnen, Mixer-Settler-Einheiten ausgeführt werden. Dabei ist auch die kontinuierliche Prozeßführung möglich.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Ein zweiphasiges flüssiges System kann auf folgende Weise hergestellt werden:

Eine 8 gew.-%ige Lösung von Polyoxyethylen (9,7) nonylphenylether in Cyclohexan wird hergestellt. 114 ml dieser Lösung werden mit 20 ml Wasser versetzt. Nach dem Schütteln und Zentrifugieren bilden sich zwei klare flüssige Phasen – die obere besteht aus nahezu reinem Hexan, die untere ist die Tensidphase.

Beispiele 2

Es wird eine 10 gew.-%ige Lösung von Polyoxyethylen (9) heptylphenylether in Hexan hergestellt. Zu 1 l dieser Lösung werden 10 ml einer 21 mM wäßrigen NAD^+ -Lösung gegeben. Dann werden weitere 5 ml einer wäßrigen Lösung von Hefe-Alkoholdehydrogenase eingespritzt. Die Enzymkonzentration beträgt dabei 10 g/l.

Nach kurzem Schütteln entsteht daraus ein zweiphasiges flüssiges System, wobei der Absetzvorgang durch Zentrifugation beschleunigt werden kann.

Werden in die Hexanphase etwa 10 ml Decanol eingespritzt, so ist nach etwa 2 min die Bildung von NADH gemäß der Reaktionsgleichung



spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 339 nm in der Tensidphase nachweisbar. Nach etwa 1 h ist auch das gebildete Decanal in der Hexanphase gut gaschromatographisch nachweisbar.

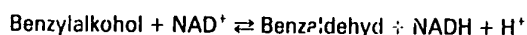
Beispiel 3

Es wird in gleicher Weise verfahren, wie in Beispiel 2. An Stelle der 5 ml wäßrigen Enzymlösung wird dem System eine Suspension von *Saccharomyces cerevisiae* der Konzentration 10 g/l (bezogen auf Trockenmasse) zugesetzt. Bei Zugabe von 15 ml Propanol in die Hexanphase ist, entsprechend Beispiel 1, die Bildung von NADH in der Tensidphase und von Propanol in der Hexanphase nachweisbar.

Beispiel 4

Es wird eine 10 gew.-%ige Lösung von Tetraethylglykoldodecylether in einem organischen Lösungsmittelgemisch, bestehend aus 90 Vol.-% Hexan und 10 Vol.-% Aceton, hergestellt. Zu 143 ml dieser Stammlösung werden 6 ml einer 21 mM wäßrigen NAD^+ -Lösung gegeben. Anschließend werden 3 ml einer wäßrigen Lösung von Hefe-Alkoholdehydrogenase der Konzentration 10 g/l zugespritzt.

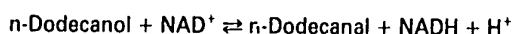
Nach kurzem Schütteln und anschließender Zentrifugation entsteht ein zweiphasiges flüssiges System. Werden in die Hexanphase 200 µl Benzylalkohol eingespritzt, so ist nach etwa 3 min die Bildung von NADH gemäß der Reaktionsgleichung



spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm in der unteren Phase, der Tensidphase, nachweisbar. Die Zunahme der Benzaldehydkonzentration in der Hexanphase kann ebenfalls spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 325 nm verfolgt werden.

Beispiel 5

Es wird eine 10 gew.-%ige Lösung von Heptaoxyethylentetradecylether in Benzin ($K_p = 42$ bis 80°C) hergestellt. In 1 l dieser Lösung werden zuerst 10 ml einer 21 mM wäßrigen NAD^+ -Lösung und danach 10 ml einer wäßrigen Hefe-Alkoholdehydrogenase-Lösung der Konzentration 10 g/l gegeben. Nach kurzem Schütteln und Stehenlassen entsteht ein zweiphasiges flüssiges System. Werden in die Benzinphase 10 ml n-Dodecanol gegeben, ist nach etwa 5 min die Bildung von NADH gemäß der Reaktionsgleichung



in der Tensidphase spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 339 nm nachweisbar. Nach etwa 10 min lässt sich ebenfalls das entstehende n-Dodecanal in der Hexanphase gaschromatographisch gut nachweisen.

Beispiel 6

Es wird eine 10 gew.-%ige Lösung von Polyoxyethylen (7) nonylphenylether in Hexan hergestellt. Zu 1 l dieser Lösung werden zunächst 9 ml einer 21 mM wässrigen NAD^+ -Lösung und anschließend 4 ml einer wässrigen Hefe-Alkoholdehydrogenaselösung mit einer Enzymkonzentration von 10 g/l gegeben. Nach kurzem Schütteln und Zentrifugation entsteht ein zweiphasiges flüssiges System. Gibt man 10 ml Zimtalkohol zu diesem System, so lässt sich die Bildung von NADH in der Tensidphase innerhalb von etwa 10 min gut nachweisen. Der gebildete Zimtaldehyd kann ebenfalls nach etwa 10 min in der Hexanphase spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 325 nm nachgewiesen werden.

Beispiel 7

Es wird eine 10 gew.-%ige Lösung von Tetraethylglykoldodecylether in Hexan hergestellt. In einer Lösung von 20 Vol.-% Methylglykol in Wasser werden 10 g/l NAD^+ und 10 g/l Hefe-Alkoholdehydrogenase gelöst. Zu 1,36 l Tensidlösung werden 100 ml der NAD^+ - und 50 ml der Hefe-Alkoholdehydrogenaselösung gegeben. Nach leichtem Schütteln entsteht ein zweiphasiges flüssiges System, das sich nach kurzem Stehen gut absetzt. Gibt man in die Hexanphase etwa 10 ml Butanol, lässt sich das entstehende NADH in der Tensidphase nach etwa 5 min gut nachweisen. Das entstehende Butanol lässt sich in der Hexanphase nach etwa 10 min gaschromatographisch nachweisen.

Beispiel 8

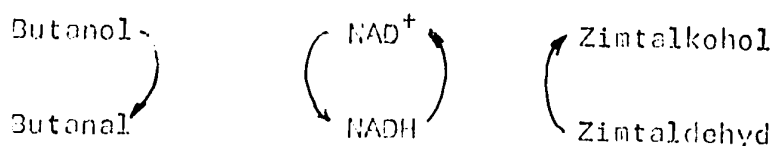
Es wird eine Lösung von 10 Vol.-% Aceton in Hexan hergestellt. Damit wird eine 10 gew.-%ige Lösung von Tetraethylglykoldodecylether hergestellt. Zu 1 l dieser Lösung werden zuerst 20 ml einer 21 mM wässrigen NAD^+ -Lösung und dann 20 ml einer wässrigen Hefe-Alkoholdehydrogenaselösung mit einer Enzymkonzentration von 10 g/l gegeben. Nach leichtem Schütteln entsteht ein zweiphasiges flüssiges System.

Werden in die Hexan-Aceton-Phase 10 ml Butanol gegeben, ist nach etwa 5 min die Bildung von NADH in der Tensidphase nachweisbar. Das entstehende Butanal lässt sich nach etwa 10 min in der Hexan-Aceton-Phase gaschromatographisch nachweisen.

In gleicher Weise reagieren Ethanol, Hexanol, Heptanol und Decanol.

Gibt man nach dieser Reaktion 10 ml Zimtaldehyd zu, wird in der Tensidphase das entstehende NADH wieder zu NAD^+ zurückgebildet. Die Abnahme des Zimtaldehyds lässt sich in beiden Phasen spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 325 nm nachweisen.

Das Schema veranschaulicht das Gesamtsystem.

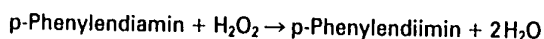


Der entstehende Zimtalkohol kann in einfacher Weise z. B. mit Wasser, aus der abgetrennten Hexanphase extrahiert werden.

Beispiel 9

Es wird eine Tensidlösung entsprechend Beispiel 6 hergestellt. Zu 1 l dieser Lösung werden 20 ml einer Natriumphosphatpufferlösung (5 mM; pH 7,5), die 1,0 Gew.-% Meerrettich-Peroxidase und $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ Wasserstoffperoxid enthält, gegeben. Nach Schütteln entsteht ein zweiphasiges flüssiges System.

Werden dem System 10 g p-Phenylendiamin zugegeben, so lässt sich das nach der Reaktionsgleichung



entstehende Diimin spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 485 nm nach etwa 5 min in der Tensidphase und nach etwa 10 min auch in der Hexanphase nachweisen.

Beispiel 10

In 2 ml einer 10 gew.-%igen Lösung von Tetraethylglykoldodecylether werden 150 μl Methylglykol eingespritzt. Anschließend werden 100 μl einer wässrigen Lösung von Dipeptidyl Peptidase IV (E.C. 3.4.14.5.) in Natriumphosphatpufferlösung (5 mM; pH 7,5) zugegeben. Die Enzymkonzentration beträgt dabei $0,4 \text{ g/l}$. Nach Schütteln und Stehenlassen (3 min) entsteht ein zweiphasiges flüssiges System. Werden zu diesem System etwa 3 mg Glycyl-Prolin-4-Nitroanilid in fester Form als Substrat zugegeben, so ist nach 2 min die Bildung von gelb gefärbtem p-Nitroanilin in der Tensidphase zu erkennen. Nach etwa 7 min erscheint das Reaktionsprodukt auch in der überstehenden Hexanphase. Ein quantitativer Nachweis kann spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 390 nm erfolgen.

Literaturanhang

- 1 H. Hustedt, U. Menge, K. H. Kroner, N. Papamichael:
Bio Engineering 1 (1987) 12-29.
- 2 H. Hustedt, K. H. Kroner, H. Schütte, U. Menge, N. Papamichael:
Bio Engineering 1 (1986) 12-27.
- 3 USA Patent Nr. 3926726.
- 4 P. L. Luisi:
Angew. Chem. 97 (1986) 449-460.
- 5 K. Martinek, A. V. Levashov, N. K'ichko, Y. L. Khmelnitzki, I. V. Berezin:
Eur. J. Biochem. 155 (1986) 453-468.
- 6 K. Shinoda, S. Friberg:
„Emulsion and Solubilization“, Willy Intersci. Publication, New York, Chinchester, Brisbane, Toronto, Singapore (1986).
- 7 M. H. Boyle, M. P. McDonald, P. Rossi, R. M. Wood: in „Microemulsions“ ed. by I. D. Robb, S. 103-114, Plenum Press, New York (1982).