



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGESESSKRIFT** (11) **150549 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

- (21) Patentansøgning nr.: 1829/81 (51) Int.Cl.⁴: **C 12 N 11/18**
(22) Indleveringsdag: 23 apr 1981
(24) Løbedag: 22 aug 1980
(41) Alm. tilgængelig: 23 apr 1981
(44) Fremlagt: 23 mar 1987
(86) International ansøgning nr.: PCT/SE80/00216
(86) International indleveringsdag: 22 aug 1980
(85) Videreførelsesdag: 23 apr 1981
(30) Prioritet: 23 aug 1979 SE 7907035

(71) Ansøger: **BAERBEL *HAEGERDAL; Mætaregraenden 10, S-222 47 Lund, SE, KLAUS *MOSBACH; Lacka-
laenga 31-38, S-244 02 Furulund, SE.**
(72) Opfinder: **Samme.**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree**

- (54) **Katalysator til biokemiske omdannelsesreaktioner
med samtidigt immobiliserede enzymer og mikro-
organismer samt fremgangsmåde til fremstilling
heraf**
(57) Sammen drag:

1829-81

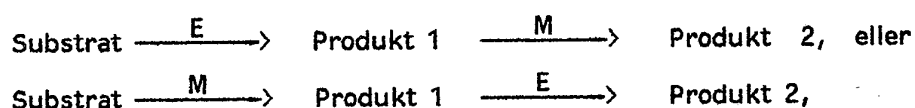
Katalysator, som i ét og samme reaktionsområde kan anvendes til
kontinuerlig og samtidig udførelse af to eller flere trin af en biokemisk
omdannelsesreaktion, som er af den type, der til visse reaktionstrin
kræver tilstedeværelsen af et enzym og til andre reaktionstrin kræver
tilstedeværelsen af en mikroorganisme. Katalysatoren omfatter faste
legemer af én eller flere polymerer, hvoraf mindst én er en tværbunden
polymer. Mindst ét enzym bindes til de faste legemers polymermateriale
ved covalente bindinger, og mindst én mikroorganisme indesluttet
fysisk i den tværbundne polymers tredimensionale struktur i de faste
legemer.

DK 150549 B

Den foreliggende opfindelse angår en katalysator til biokemiske omdannelsesreaktioner af den slags, som forløber i to eller flere trin fra et substrat eller en substratblanding til et ønsket slutprodukt via én eller flere mellemprodukter, hvor der ved visse af omdannelses-trinnene kræves tilstedeværelse af ét eller flere enzymer, medens andre af trinnene kræver tilstedeværelse af én eller flere mikroorganismer.

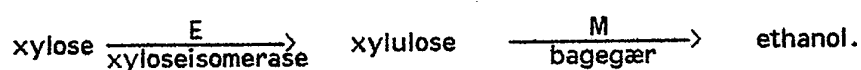
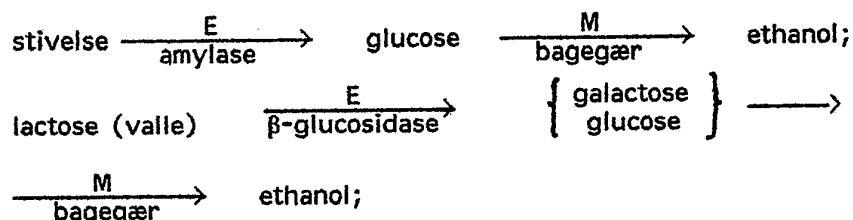
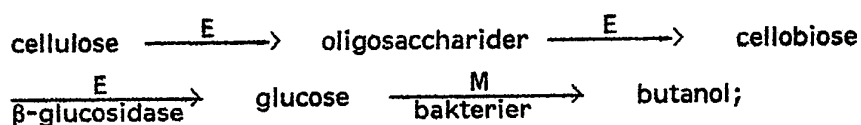
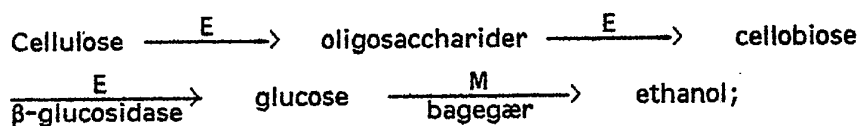
Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af en sådan katalysator.

Der kendes et meget stort antal forskellige biokemiske omdannelsesreaktioner, som i princippet forløber i form af en kæde af en flerhed af sekventielle reaktionstrin, og som kræver tilstedeværelsen af enzymer i visse af disse reaktionstrin og tilstedeværelsen af mikroorganismer i andre trin. Disse biokemiske omdannelsesreaktioner er således i princippet følgende

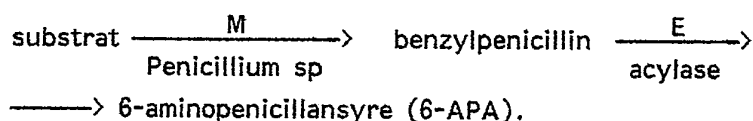


hvor E betegner ét eller flere enzymer, og M betegner én eller flere mikroorganismer. Som det vil forstås, vil reaktionskæden ofte omfatte mere end to trin.

Eksempler på omdannelsesreaktioner af den første slags indbefatter:



Et eksempel på den anden type omdannelsesreaktion er



Disse er kun nogle få eksempler på det store antal kendte biokemiske omdannelsesreaktioner.

Et kendetegn for disse biokemiske reaktioner er, at reaktionshastigheden ved tilstedeværelsen af det dannede produkt påvirkes på en sådan måde, at reaktionen forløber gradvis langsommere og tilsidst stopper helt, når indholdet af det dannede produkt stiger. Når de forskellige reaktionstrin i processen udføres batchvis, vil reaktionen således automatisk stoppe ved et relativt lavt udbytte, hvorefter det er nødvendigt at separere det dannede produkt fra substratet og den anvendte katalysator, dvs. det anvendte enzym eller den anvendte mikroorganisme, således at katalysatoren, som ofte er dyr, kan anvendes igen. Katalysatoren bør ej heller være tilstede i det fjernede slutprodukt, eftersom en sådan tilstedeværelse også er uønsket. Disse separationsoperationer er imidlertid ofte komblicerede og dyre at udføre. Som følge heraf er det ønskeligt, at de forskellige trin i en sådan fremgangsmåde kan udføres ved hjælp af en kontinuert metode, i hvilken reaktionsprodukterne kontinuerligt fjernes fra reaktionsstedet, således at reaktionen får lov til at forløbe uden forhindring, hvorved der tilvejebringes et højt udbytte. En sådan kontinuert proces kræver imidlertid, at den anvendte katalysator, dvs. det anvendte enzym eller den anvendte mikroorganisme, skal immobiliseres på en eller anden måde, således at katalysatoren ikke følger den kontinuerte strøm af reaktionsprodukter fra reaktionsstedet, men forbliver på samme sted. Ydermere vil det være en stor fordel, både økonomisk og praktisk, hvis det var muligt at udføre to eller flere trin i en biokemisk omdannelsesreaktion af den pågældende slags i ét og samme reaktionskammer, f.eks. i én og samme søjle. Dette kræver imidlertid, at de til de forskellige trin nødvendige enzymer og mikroorganismer er tilstede samtidig i reaktionskammeret, og at enzymerne og mikroorganismerne er i en immobiliseret tilstand i reaktionskammeret. Der har været foreslået forskellige processer, i hvilke både et enzym og en mikroorganisme er tilstede i reaktionskammeret på samme tid til samtidig udførelse af to indbyrdes forskellige trin i en biokemisk omdannelsesreaktion. Eftersom

man i disse tilfælde kun har beskæftiget sig med batch-processer, er der kun opnået et lavt udbytte, og det har efter afslutning af reaktionen været nødvendigt at prøve at separere det anvendte enzym og den anvendte mikroorganisme fra reaktionsprodukterne. Til udførelse af de forskellige reaktionstrin på kontinuert måde har metoder til immobilisering af hver af enzymerne og mikroorganismene per se i indbyrdes forskellige bærertyper også været foreslået. Et alvorligt problem man støder på, når enzymer immobiliseres, er, at enzymerne har en relativ lille molekylstørrelse, og de kan derfor ikke let immobiliseres ved ren fysisk adsorption eller indeslutning i en bærer. Dette resulterer i et betragteligt tab eller "udsivning" af enzymet fra bæreren, hvorved aktiviteten hurtigt falder, og enzymkatalysatoren taber sin effekt, hvorefter katalysatoren må udskiftes. For at adskille, indbyrdes forskellige reaktionstrin i en biokemisk omdannelsesproces ydermere kan udføres effektivt på samme tid i ét og samme reaktionsrum, er det nødvendigt, at det produkt, der dannes i et forudgående reaktionstrin, f.eks. under indvirkning af et enzym, så hurtigt og så effektivt som muligt bringes i kontakt med det enzym eller den mikroorganisme, der kræves til det efterfølgende reaktionstrin. Dette synes vanskeligt at opnå, hvis de krævede enzymer og mikroorganismer immobiliseres per se i indbyrdes forskellige bærere.

Formålet med opfindelsen er derfor at tilvejebringe en ny og effektiv katalysator, som i ét og samme reaktionsrum kan anvendes til kontinuert udførelse af to eller flere forskellige trin i en biokemisk omdannelsesreaktion, som til visse reaktionstrin kræver tilstedeværelsen af mindst ét enzym og for andre reaktionstrin tilstedeværelsen af mindst én mikroorganisme.

Dette formål opnås med katalysatoren ifølge opfindelsen, der er ejendommelig ved, at katalysatoren omfatter faste bærerlegemer af én eller flere polymerer, hvoraf mindst én er en tværbunden polymer, hvor mindst ét enzym er bundet til bærerlegemets polymermateriale med covalente bindinger, og mindst én mikroorganisme fysisk er indesluttet i legemets tredimensionale rumnetværk.

Da enzymet er bundet til bærerlegemernes polymermateriale ved covalente bindinger er tabet eller "udsivningen" af enzymet fra legemerne under reaktionsforløbet meget lille, hvorved katalysatoren får en lang brugbar funktionstid. Mikroorganismene har en sådan molekylstørrelse, at det gør dem i stand til at blive holdt effektivt til bærerlegemerne uden vanskelighed på grund af, at de er fysisk indesluttet i det tredimensionale gitter, der dannes af bærerlegemernes

tværbundne polymer. Da både enzymet og mikroorganismen bindes i ét og samme bærerlegeme, vil enzymet og mikroorganismen være meget tæt ved hinanden rumligt, hvilket gør det muligt, at de forskellige trin i omdannelsesreaktionsprocessen forløber meget hurtigt, den ene efter den anden, hvilket er konstateret at give et højt udbytte.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at der til en polymer eller en monomer i opløsning eller suspension tilsættes mindst ét enzym efter tidligere aktivering af egnede molekyler i enzymet eller på polymeren eller monomeren, således, at når polymeren eller monomeren og enzymet bringes sammen, bindes enzymet til polymerens eller monomerens molekyler ved covalente bindinger, hvorefter polymeren eller monomeren med det covalent bundne enzym blandes i opløsning eller suspension med mindst én mikroorganisme og en polymer eller monomer, der er i stand til at blive tværbundet, hvorefter den således opnåede blanding udsættes for en tværbindingspolymeriseringsproces.

To muligheder er tænkelige ved en sådan fremstilling af en katalysator ifølge opfindelsen. Én mulighed er, at enzymets "tilsyneladende" molekylstørrelse, som et resultat af at være bundet til den første polymer med covalente bindinger, er "forstørret" således, at disse polymer-enzymaggregater let kan indfanges og holdes i det tredimensionelle netværk af den dernæst dannede tværbundne polymer på samme måde som mikroorganismen. Den anden mulighed er, at polymeren eller monomeren med enzymet covalent bundet dertil inkorporeres som en integreret del af strukturen af den dernæst fremstillede tværbundne polymer.

Der kan anvendes adskillige forskellige kemiske grupper i enzymets eller polymerens eller monomerens molekyler til at etablere de covalente bindinger mellem enzymet og polymeren eller monomeren. Disse grupper indbefatter f.eks. hydroxylgrupper, carboxylgrupper, phenylgrupper, tyrosingrupper, aminogrupper og thiolgrupper. Alle disse grupper, der kan aktiveres, findes normalt i enzymet, medens polymeren eller monomeren normalt har én eller to molekylergrupper, der kan aktiveres. Aktiveringen af de anvendte bindingsgrupper kan enten finde sted på enzymet eller på polymeren eller monomeren. Fortrinsvis er det polymeren eller monomeren, som aktiveres, eftersom enzymet i mange tilfælde er af en slags, som kan påvirkes på skadelig vis af aktiveringsreaktionen. De covalente bindinger mellem enzymet og polymeren eller monomeren kan være reversible eller irreversible.

Der kan anvendes adskillige forskellige aktiveringsreaktioner til aktivering af de førnævnte grupper, der kan aktiveres. Eksempler på sådanne reaktioner indbefatter acylering, arylering, alkylering, cyanogenbromidaktivering, carbamylering, thiocarbamylering, amidinering, reaktioner med polyvalente aldehyder, glutaraldehydreaktioner, diazotisering, thiol-disulphidudvekslingsreaktioner og 4-komponent kondenseringsreaktioner. Sådanne aktiveringsreaktioner til frembringelse af covalente bindinger mellem forskellige molekyler er velkendte.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan udføres under anvendelse af mange forskellige polymerer. Eksempler på anvendelige polymerer, indbefatter polysaccharider, såsom cellulose, stivelse, agarose, dextran (opløselig eller uopløselig), carrageenin, alginat og chitin, vinylpolymerer, polyaminer, proteiner, polyamider og polyurethan.

Den tværbindingspolymeriseringsproces, der kræves til indeslutning af det først fremstillede enzym-polymer-kompleks eller enzym-monomer-kompleks og mikroorganismen, kan udføres på forskellige måder afhængig af den anvendte polymer, f.eks. ved temperaturændringer (f.eks. med hensyn til carrageenin), ved at ændre ionsammensætningen i mediet (f.eks. i tilfælde med alginat), ved fotometriske processer (f.eks. i tilfældet med urethan) og ved at tilsætte en egnet polymerisationskatalysator (f.eks. i tilfældet med polyacrylamid). De fremstillede polymerlegemer med det covalent bundne enzym og den fysiske indesluttede mikroorganisme har hensigtsmæssigt form af små perler med en diameter fra nogle tiendedele millimeter til nogle få millimeter. Det vil forstås, at selvfølgelig kan legemer med andre forme og/eller størrelser anvendes.

Praktisk taget alle typer mikroorganismer kan anvendes ifølge opfindelsen, såsom alger, bakterier, bakteriofager, svampe, virus, protozoer og gær. Eksempler på sådanne mikroorganismer findes i følgende publikationer: The American Type Culture Collection, Catalogue of Strains I, 1978, Stainer, R.Y., Adelberg, E.A. og Ingraham, J.L. og "General Microbiology", 4. udg., 1979, The Macmillan Press Ltd.

Opfindelsen kan også udføres med praktisk talt alle typer enzymer, såsom oxidoreduktaser, transferaser, hydrolaser, lyaser, isomeraser og ligaser. Enzymer tilhørende disse 6 grupper findes anført i publikationen med navnet Enzyme Nomenclature, Recommendations (1978) af The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, publiceret for International Union of Biochemistry af Academic Press (AP), Inc.

Opfindelsen er primært blevet afprøvet for fremstillingen af katalysatorer til omdannelsen af cellobiose til ethanol via glucose i overensstemmelse med de reaktionssekvenser, der gives i indledningen, i hvilken katalysator det covalent bundne enzym var β -glucosidase, og den fysisk indesluttede mikroorganisme var bagegær (*Saccharomyces cerevisiae*), og polymermaterialet var alginat.

Denne afprøvning vil nu blive beskrevet ved hjælp af et efterfølgende arbejds eksempel.

EKSEMPEL 1

100 mg natriumalginat suspenderedes i 2 ml destilleret vand. 32 mg N-hydroxysuccinimid og 28 mg EDC [1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-HCl] opløst i 1 ml destilleret vand tilsattes til aktivering af alginatet. Aktiveringen af alginatet fandt sted i 15 minutter ved stuetemperatur. 15 mg β -glucosidase opløst i 1 ml vand tilsattes derefter. Kobling mellem alginat og enzym fik lov til at fortsætte natten over i et koldt miljø. På den efterfølgende dag blandedes en suspension af yderligere 200 mg alginat i 6 ml destilleret vand med det opnåede alginat- β -glucosidase-kompleks til opnåelse af et slutvolumen på 10 ml. 500 mg bagegær suspenderet i 5 ml 0,1 M acetatbuffer, pH = 4,9, tilsattes derefter til opløsningen, således at der opnåedes et suspensionsvolumen på ca. 15 ml. Ved hjælp af denne suspension fremstilledes en calciumalginatgel ved, at suspensionen langsomt dryppedes ned i en opløsning af 0,1 M CaCl_2 i en 0,1 M acetatbuffer, pH = 4,9, hvorved der opnåedes små perler af alginatgel med en gennemsnitsdiameter på ca. 2 mm. Gelperne blev holdt i calciumchloridopløsningen i mindst 3 timer, i hvilket tidsrum tværbindingen af alginatgelen fandt sted, hvorefter perlerne fjernedes og opbevarede i en acetatbuffer indeholdende 0,01 M CaCl_2 . Der opnåedes ca. 7,4 g (vådvægt) gel ud fra en suspension af ca. 15 ml alginatsol.

Alginatperler frembragt på denne måde og indeholdende covalent bundet β -glucosidase og fysisk indesluttet bagegær anvendtes til fremstillingen af ethanol med 5% cellobiose som udgangsmateriale. Alginatperlerne anbragtes i en søjle. Søjleens volumen var 7,5 ml, og søjlen indeholdt 5,25 g (vådvægt) alginatperler og fungerede ved en temperatur på 22°C. Omdannelsen af cellobiose til ethanol nærmede sig tæt til den teoretiske værdi efter 3 dage, hvorefter ethanolproduktionen nåede en ligevægtstilstand på 1,5% (vægt/volumen) svarende til ca. 60% af det teoretiske udbytte. Aktiviteten af alginatperlerne fandtes at være stabil

i mindst 4 uger ved driftstemperaturen. Processens forløb illustreres ved den nedre kurve på den tilhørende tegning.

Alginatperler, der er fremstillet på den beskrevne måde, men som indeholder 3 gange så meget enzym, undersøgtes på lignende måde, idet det opnåede resultat illustreres ved den øvre kurve på tegningen. Med alginatperlerne med højere enzymaktivitet hævedes udbyttet således fra 60% til 80% af den teoretiske værdi. Katalysatoraktiviteten, der frembringes af alginatperlerne, blev også i dette tilfælde fundet at være stabil i mindst 4 uger.

På en lignende måde som i eksempel 1 fremstilledes også katalysatorer omfattende perler af calciumalginatgel, i hvilke det covalent bundne enzym var β -galactosidase, amylase, en blanding af hver og exoglucanaser henholdsvis β -glucosidase. β -Galactosidase nedbryder lactosen i f.eks. valle til glucose, og således kan de alginatperler, der indeholder dette enzym, anvendes til fremstilling af ethanol fra valle. Enzymet amylase nedbryder stivelse til glucose, og alginatperler, der indeholder dette enzym, kan derfor anvendes til fremstillingen af ethanol ud fra stivelse. De cellulolytiske enzymer endoglucanaser, exoglucanaser og β -glucosidaser nedbryder tilsammen cellulose til glucose i overensstemmelse med de i indledningen anførte reaktionsprocesser, og alginatperler, der indeholder en blanding af disse enzymer, kan derfor anvendes til fremstillingen af ethanol ud fra cellulosehydrolysat.

Når det enzym, der er bundet til alginatperlerne fremstillet på den i eksempel 1 beskrevne måde, er xyloseisomerase, opnås en katalysator, som kan anvendes til fremstillingen af ethanol ud fra xylose, via xylulose som et mellemprodukt.

Ved at anvende Penicillium sp. som mikroorganisme og acylase som enzym er det muligt ved den i eksempel 1 beskrevne måde at fremstille en katalysator, som kan anvendes til fremstilling af 6-APA i overensstemmelse med den i indledningen angivne reaktionsformel.

P a t e n t k r a v .

1. Katalysator til biokemiske omdannelsesreaktioner, som kræver tilstedeværelsen af mindst ét enzym og mindst én mikroorganisme, *k e n d e t e g n e t* ved, at katalysatoren omfatter faste legemer af én eller flere polymerer, hvoraf mindst én er en tværbunden polymer, hvorhos mindst ét enzym er bundet til legemernes polymermateriale med covalente bindinger, og mindst én mikroorganisme er fysisk indesluttet i den tværbundne polymers tredimensionale struktur.
2. Katalysator ifølge krav 1, *k e n d e t e g n e t* ved, at enzymet er covalent bundet ved hjælp af polymerens eller enzymets carboxylgrupper, hydroxylgrupper, phenylgrupper, tyrosingrupper, amino-grupper eller thiolgrupper.
3. Katalysator ifølge krav 1 eller 2, *k e n d e t e g n e t* ved, at de faste legemer har form af perler med en diameter i størrelsesordenen fra nogle tiendedele millimeter til nogle få millimeter.
4. Katalysator ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 3, *k e n d e t e g n e t* ved, at polymermaterialet i de faste legemer er et polysaccharid, eller en vinylpolymer, en polyaminosyre, et protein, et polyamid eller polyurethan.
5. Katalysator ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 4, *k e n d e t e g n e t* ved, at enzymet er en oxidoreduktase, en transferase, hydrolase, lyase, isomerase eller ligase.
6. Katalysator ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 5, *k e n d e t e g n e t* ved, at mikroorganismen omfatter alger, bakterier, bakteriofager, svampe, virus, protozoer eller gær.
7. Katalysator ifølge krav 1 til fremstilling af ethanol, *k e n d e t e g n e t* ved, at den udgøres af perler af tværbundet calciumalginat indeholdende fysisk indesluttet bagegær og ét eller flere covalent bundne enzymer bestående af β -glucosidase eller β -galactosidase eller amylase eller en blanding af endoglucanaser, exoglucanaser og β -glucosidase eller xyloseisomerase.

8. Fremgangsmåde til fremstilling af en katalysator ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der til en polymer eller en monomer i opløsning eller suspension tilsættes mindst ét enzym efter tidligere aktivering af egnede molekyler i enzymet eller på polymeren eller monomeren, således, at når polymeren eller monomeren og enzymet bringes sammen, bindes enzymet til polymerens eller monomerens molekyler ved covalente bindinger, hvorefter polymeren eller monomeren med det covalent bundne enzym blandes i opløsning eller suspension med mindst én mikroorganisme og en polymer eller monomer, der er i stand til at blive tværbundet, hvorefter den således opnåede blanding udsættes for en tværbindingspolymeriseringsproces.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at der til etablering af de covalente bindinger mellem enzymet og polymeren eller monomeren anvendes hydroxylgrupper, carboxylgrupper, phenylgrupper, tyrosingrupper, aminogrupper eller thiolgrupper på enzymet eller på polymeren eller monomeren.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 8 eller 9, k e n d e t e g n e t ved, at de covalente bindinger etableres ved at aktivere udvalgte molekyler på polymeren eller monomeren.

11. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 8 til 10, k e n d e t e g n e t ved, at den polymer eller monomer, der anvendes til opnåelse af den endelige tværbundne polymeriserede tredimensionale struktur, er af den samme type, som den polymer eller monomer, der anvendes til den covalente binding af enzymet.

Fremdragne publikationer:

150549

