

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS  
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN  
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 833552 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS  
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG  
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE  
PUBLIC**

(21)	Patentihakemus - Patentansökan - Patent application	833552
(51)	Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification <b>C12P</b>	
(22)	Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date	<b>30.09.1983</b>
(23)	Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date	<b>30.09.1983</b>
(41)	Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public	<b>02.04.1984</b>
(43)	Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date	<b>12.06.2019</b>
(32) (33) (31)	Etuoikeus - Prioritet - Priority	
	01.10.1982 US 432,182	

(71) Hakija - Sökande - Applicant

**1 • Genex Corporation**, 6110 Executive Boulevard, Rockville, Maryland, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 • Swann, Wayne Elliott**, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Berggren Oy Ab**, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**Menetelmä L-fenyylialaniinin valmistamiseksi kierrättämällä fenyylialaniiniammoniakkilyaasia.**

**Förfarande för framställning av L- fenylalanin genom återanvändning av fenylalaninammonialyas.**

Menetelmä L-fenyylialaniinin valmistamiseksi kierrättämällä fenyylialaniiniammoniakkilyaasia

Tämä keksintö kohdistuu menetelmään fenyylialaniinin valmistamiseksi fenyylialaniiniammoniakkilyaasi-(PAL)-katalysoidulla t-kanelihapon ja ammoniakkin reaktiolla. Erityisesti tämä keksintö kohdistuu sellaisen fenyylialaniinin valmistusmenetelmään, jossa PAL-katalyytin suuri aktiivisuus säilyy ja katalyytti voidaan käyttää uudelleen.

L-fenyylialaniini on oleellinen aminohappo, joka on tärkeä ravinnollisesti sekä lääketieteellisillä alueilla. Sitä on eristetty kaupallisesti useista proteiineista, kuten ovalbumiinista ja laktalbumiinista. Alan tekniikassa tunnetussa laboratoriomenetelmässä L-fenyylialaniinin valmistamiseksi käytetään fenyylialaniiniammoniakkilyaasientsyymiä (myöhemmin PAL) katalysoimaan reversiibelireaktio:

L-fenyylialaniini  $\longrightarrow$  trans-kanelihappo + ammoniakki, ks. GB-patentti 1 489 468.

Tämän reaktion tasapaino on normaalisti 80:20 t-kanelihapon eduksi, ja useita keinoja on koetettu suuremman L-fenyylialaniinikonversion saamiseksi. GB-patentissa 1 489 468 on esitetty, että L-fenyylialaniinin teoreettinen saanto, 20 prosenttia lähentelevä saanto saadaan käyttämällä suurta määrää PAL-katalyyttiä sisältäviä soluja ja ammoniumionien ylimäärää. Tämän patentin mukaisen prosessin yhteydessä ammoniumionilähde on edullisesti ammoniumkloridi, ja reaktio suoritetaan edullisesti pH-alueella 8,5-9,7.

Yamada, S., et al., Appl. Environ. Microbiol. 42:773-78 (1981), ovat esittäneet, että konversiota voitaisiin lisätä yli 70 prosenttiin säätämällä substraattiliuoksen pH arvoon 10,0 suolahapolla. Nämä olosuhteet ovat kuitenkin niin ankarat,

että käytettyjen solujen PAL-aktiivisuus heikkenee huomattavasti, ts. niin paljon, että entsyymien uudelleenkäyttö on epäedullista. Lisäksi Yamada et al. toteavat, että soluentsyymien immobilisoinnilla ei saavuteta etua eheidän solujen käyttöön nähden. Vaikka tällä menetelmällä on alunperin mahdollista saada suuri L-fenyylialaniinin konsentraatio, katalyyttisen entsyymien uudelleenkäytön mahdottomuus tekee tästä menetelmästä epätaloudellisen suuressa mittakaavassa sovellettuna.

Siten on jatkuvasti olemassa tarve menetelmään L-fenyylialaniinin valmistamiseksi t-kanelihaposta ja ammoniakista, jossa saadaan suuri L-fenyylialaniinin saanto ja jossa PAL jää katalyyttisesti riittävän aktiiviseksi niin, että se voidaan käyttää uudelleen.

Siksi tämän keksinnön kohteena on aikaansaada menetelmä L-fenyylialaniinin valmistamiseksi t-kanelihaposta, jolloin tuotteelle saadaan suuri konversio ja PAL-entsyymi voidaan käyttää toistuvasti uudelleen.

Keksinnön kohteena on myöskin sellainen laitteisto L-fenyylialaniinin valmistamiseksi, jossa reaktio voidaan ajaa joko vapaa solu-panossysteeminä tai immobilisoitu solu- tai entsyymisysteeminä.

Tämän keksinnön tarkoituksena on edelleen aikaansaada taloudellinen laitteisto PAL:n käyttämiseksi L-fenyylialaniinin valmistuksessa.

L-fenyylialaniinin valmistusprosessia antamalla t-kanelihapon ja ammoniakin reagoida fenyylialaniini-ammoniakkilyaasin läsnäollessa on parannettu siten, että saadaan suuria L-fenyylialaniinisaantoja ja PAL:n hyvä katalyyttinen aktiivisuus säilyy. Säädellyissä reaktio-olosuhteissa PAL:n stabiilisuus lisääntyy siten, että PAL voidaan käyttää uudelleen L-fenyylialaniinin tuottamiseksi suurina pitoisuuksina.

Näiden haluttujen tulosten saavuttamiseksi substraattiliuos valmistetaan reagoittamalla happo ammoniumionilähteen kanssa. Ammoniumionilähde voi olla mikä tahansa halogeeniton ammoniumsuola. Substraattiliuoksen pH säädetään alueelle 8,0-10,0 käyttäen halogeenitonta happoa, sen jälkeen liuos lisätään PAL-lähteeseen, kuten vapaiden, ehyiden solujen tai immobilisoitujen solujen systeemiin tai entsyymisysteemiin, joka sisältää PAL-entsyymiä.

Tämän keksinnön mukaisen prosessin yhteydessä substraattiliuos valmistetaan t-kanelihaposta ja ammoniumionilähteestä. Ammoniumionit voidaan joko lisätä suoraan orgaanisen hapon tai mineraalihapon ammoniumsuolana t-kanelihapon liuokseen, tai tehdä suola substraattiliuoksessa kuten sekoittamalla ammoniumhydroksidi ja halogeeniton happo.

GB-patentissa 1 489 469 on esitetty, että edullinen ammoniumionilähde on ammoniumkloridin ja ammoniumhydroksidin seos (s. 3, rivit 25-26). Menetelmässä, jonka Yamada et al. ovat esittäneet käytetään myöskin ammoniumkloridia. Päinvastoin mitä aikaisemmin on esitetty, nyt on havaittu, että on edullista käyttää ammoniumsuolaa, joka ei sisällä halogeenioneja. Halogeenien läsnäolon substraattiliuoksessa on havaittu estävän PAL:n katalyyttistä aktiivisuutta. Tämän vuoksi edullisiin ammoniumsuoloihin kuuluvat ammoniumsulfaatti, ammoniumnitraatti, ammoniumsitraatti, ammoniumasettaatti ja ammoniumfosfaatti. Erittäin edullinen ammoniumsuola on ammoniumsulfaatti.

On myöskin toivottavaa, että ammoniumsuola lisätään substraattiliuokseen suurina pitoisuuksina. Ammoniumionien konsentraatio on tavallisesti n. 0,1-7,5 M, edullisesti n. 1-5 M. Ammoniumsuolan suuri pitoisuus lisää systeemin ammoniakkipitoisuutta ja toimii myös puskurina siten, että reaktion pH:n säätöä voidaan helpommin kontrolloida.

Kun ammoniumionien konsentraatio on näillä osoitetuilla alueilla, t-kanelihapon pitoisuus liuoksessa on tavallisesti n. 30-200 nM ja edullisesti n. 60-150 nM.

Yamada et al. esittävät, että substraattiliuos tulisi säätää pH-arvoon 10,0. Tämän keksinnön mukaisessa prosessissa pH voidaan kuitenkin säätää alueelle n. 8,5-9,5. Yamadan viittauksen mukaisesti pH säädetään suolahapolla. Tämä voi lisätä merkittävästi substraatin kloridipitoisuutta. Tässä prosessissa on kuitenkin edullista, kuten yllä on todettu, säätää substraattiliuoksen pH halogeenittomalla hapolla. Edullisia happoja pH:n säätämiseen ovat rikkihappo, fosforihappo ja etikkahappo vaikkakin myös muita halogeenittomia happoja voidaan käyttää. Erityisen edullinen happo on rikkihappo, sillä lisättynä ammoniumhydroksidia sisältävään substraattiliuokseen se reagoi muodostaen ammoniumsulfaattia, mikä on tunnettu entsyymejä stabilisoiva aine.

Substraattiliuos lisätään PAL-entsyymiä sisältävään lihaliemi-alustaan, siitä erotettuihin soluihin tai eristettyyn entsyymiin. PAL tuotetaan perinteisillä menetelmillä. PAL-katalysoitu reaktio etenee L-fenyylialaniinia tuottavissa olosuhteissa, jolloin reaktiolämpötila on edullisesti n. 10-45°C. Tämän keksinnön mukaisen menetelmän mukaisissa olosuhteissa PAL-stabiilisuus lisääntyy niin paljon, että PAL voidaan käyttää uudelleen L-fenyylialaniinin valmistamiseksi suurina pitoisuuksina.

Esillä oleva L-fenyylialaniinin valmistusprosessi voidaan toteuttaa joko vapaasolu-panossysteeminä tai immobilisoitu solutai entsyymisysteeminä. Panossysteemi voi olla joko yksinkertainen panos tai jatkuvasyöttöinen panossysteemi. Jos PAL on immobilisoitu kolonnissa, kolonni voidaan ajaa yksinkertaisena läpivirtaussysteeminä, kierrätyssysteeminä tai jatkuvasyöttöisenä kierrätyssysteeminä. Edullinen prosessi PAL-entsyymien tai sitä sisältävien solujen immobilisoimiseksi on esitetty FI-patenttihakemuksessa 832633. Kun PAL-entsyymit tai entsyymiä sisältävät solut immobilisoidaan kolonnissa, kolonnin lämpötila voidaan pitää n. 10-40°C:ssa ja edullisesti

n. 18-30°C:ssa kun substraattiliuos pumpataan kolonnin läpi.

Reaktioseos analysoidaan tavanomaisilla L-fenyylialaniinin valmistuksessa käytetyillä menetelmillä. Kun rikkihappoa käytetään suolahapon asemesta substraattiliuoksessa, L-fenyylialaniinia on n. 8-10-kertainen määrä kuin suolahappoa käytettäessä. Kun PAL-entsyymi on immobilisoitu sen aktiivisuus säilyy n. 50 prosenttisenä 41 päivän reaktioajan jälkeen. Sitä vastoin Yamada et al. ovat raportoineet 20 prosenttisenä säilymisestä 24 tunnin jälkeen.

L-fenyylialaniini voidaan eristää reaktioseoksesta perinteisin prosessein.

Seuraavat esimerkit on tarkoitettu kuvaamaan ja edelleen määrittelemään keksinnön mukaista menetelmää sitä kuitenkaan rajoittamatta.

#### Esimerkki 1

Kasvualusta valmistettiin seuraavalla yleisellä menetelmällä: Litraan deionisoitua vettä lisättiin 10 g peptonia, 10 g hiiva-utetta, 0,5 g D,L-fenyylialaniinia, 5 g natriumkloridia ja 5 g L-isolesiiniä. pH säädettiin arvoon 6,0 käyttäen rikkihappoa ja käsiteltiin autoklaavissa 120°C lämpötilassa 10 min ajan 1,05 kp/cm<sup>2</sup> paineessa. Tämä on standardikasvualusta viljelyputkille ja ravistuspulluille.

#### Esimerkki 2

Esimerkin 1 yleinen menetelmä toistettiin, paitsi että 100 mM kaliumjodidia (KJ) lisättiin kasvualustaan. Tämä on tehokas valikoitu kasvualusta.

#### Esimerkki 3

Esimerkin 1 mukainen yleinen menetelmä toistettiin paitsi että 200 mM lisättiin kasvualustaan. Tämä on myöskin tehokas valikoitu kasvualusta.

Esimerkki 4

Esimerkin 1 mukainen yleinen menetelmä toistettiin paitsi että käytettiin 15 g hiivauutetta ja että peptoni poistettiin. Lisättiin myöskin 200 mM KJ. Tämä on tehokas ravistuspullo-kasvualusta.

Esimerkki 5

Fermentointikasvualusta valmistettiin esimerkin 4 mukaisella yleisellä menetelmällä paitsi että natriumkloridia ja L-iso-leusiinia ei lisätty. Tämä on tehokas fermentointikasvualusta.

Esimerkki 6

Kolme kasvualustaa valmistettiin esimerkkien 1, 2 ja 3 mukaisesti. PAL-entsyymiä tuottavaa sukua *Rhodotorula rubra* (ATCC # 4056), jota on pidetty agar-ravintoalustalla, siirrettiin 4,5 ml:an jokaisen putken kasvualustaa. Putket asetettiin sen jälkeen ravistimeen 30°C lämpötilaan nopeuden ollessa 250 rpm. Jokaisesta putkesta tehtiin seitsemän siirrosta (0,2 ml) 24 tai 48 tunnin kuluttua 4,5 ml:an tuoretta kasvualustaa. Viljelyputket siirrettiin 200 ml:an kasvualustaa 1000 ml:n ravistelupulloon. Yksi pullo jokaisesta kasvualustasta otettiin talteen 30 ja 54 tunnin kuluttua. Solusaanto 30 tunnin kuluttua oli keskimäärin 14 g pastaa/l ja 54 tunnin kuluttua keskimäärin 29 g pastaa/l. "100 mM KJ"-näytteen PAL-aktiivisuus oli 31 % suurempi kuin vertailunäytteen. "200 mM KJ"-näytteen PAL-aktiivisuus oli 39 % suurempi kuin vertailunäytteen.

Esimerkki 7

Esimerkin 6 yleinen menetelmä *R. rubra*-solujen kasvattamiseksi 200 mM KJ sisältävässä kasvualustassa toistettiin paitsi että tehtiin 25 valikoitua siirrosta 200 mM KJ sisältävästä viljelmästä. Myöskin 24 tuntia siirrostamisen jälkeen 2,5 % kasvualustasta käytettiin siirrettäväksi viiteentoista tuoreeseen ravistelupulloon (lopulliset pullot) ja 24 t kasvatusajan kuluttua nämä pullot otettiin talteen. Solusaannot ja PAL-

aktiivisuus otettiin muutamista pulloista ja lopullisesta yhdistetystä solupastatuotteesta. Suurin PAL-aktiivisuus 28,7 g pastaa/litra kasvatusalustaa oli 18,4 U/g pastaa (528 U PAL/l). (1 yksikkö = 1 mol L-fenyylialaniinia muutettuna t-kanelihapoksi ja ammoniakiksi/min 30°C:ssa). Aktiivisuus määritettiin modifioiden menetelmää, jonka Kalghatgi ja Subba Rao ovat esittäneet, Biochem. J. 149: 65-72, 1975. Lopullisessa yhdistetyssä solupastatuotteessa oli 15,0 yksikköä PAL/g pastaa keskimääräisen solusaannon ollessa 27 g pastaa/l. (405 U PAL/l).

#### Esimerkki 8

Kanelihapon ammoniumsuolasubstraattiliuos tehtiin seuraavalla yleisellä menetelmällä. Kanelihappoa lisättiin ammoniumhydroksidiin (28 %) kyllästymispisteeseen asti. Vesi ja happo lisättiin sen jälkeen substraattitilavuuden ja vastaavasti pH:n säätämiseksi. Kanelihappopitoisuus-ammoniakkikonsentraatio ja pH (lisätyn hapon määrä) vaihtelevat seuraavissa esimerkeissä; tämän vuoksi valmistetun ammoniumsuolan määrät myöskin vaihtelevat.

#### Esimerkki 9

Suurten halogeenipitoisuuksien vaikutus PAL-entsyymiin tutkittiin käyttämällä useita happoja pH-arvon alentamiseksi substraattiliuoksessa. Kaksi substraattia valmistettiin esimerkin 8 yleisellä menetelmällä (60 mM CA; 7,5 M NH<sub>3</sub>; pH 10,0). Liuoksessa A pH säädettiin suolahapolla ja liuos LB säädettiin rikkihapolla. R. rubra-solut, jotka oli kasvatettu esimerkin 4 tavalla, pantiin sekoitetulla vesivaipalla varustettuun dekantteriin 30°C:ssa. Näytteet otettiin määrääjän kuluttua ja niistä tutkittiin L-fenyylialaniini käyttäen sekä ohutkerroskromatografiaa että L-aminohappo-oksidaasientsyymikokeella. Substraattiliuoksen A (sisälsi ammoniumkloridia) havaittiin estävän PAL-entsyymien kehittymistä. Substraattiliuoksen B solut tuottivat 10 kertaa enemmän L-fenyylialaniinia (24 tunnin reaktioajan jälkeen) kuin substraattiliuoksen A solut.

Esimerkki 10

Esimerkin 9 yleinen menetelmä toistettiin verraten fosforihappoa rikkihappoon. *R. rubra*-solut tuottivat fosforihapolla säädetyssä substraatissa 90 % siitä L-fenyylialaniinimäärästä kuin mitä ne tuottivat rikkihapolla säädetyssä substraatissa.

Esimerkki 11

Esimerkin 9 yleinen menetelmä toistettiin verraten etikkahappoa rikkihappoon. Tuotetun L-fenyylialaniinin määrä oli reaktoreissa sama.

Esimerkki 12

Solut valmistettiin esimerkin 6 yleisellä menetelmällä. Nämä solut käytettiin kokonaisten solujen uudelleenkäyttämisen (stabiilisuus) tutkimiseen. Valmistettiin kolme substraattia, 60 mM t-kanelihappoa, 7,5 M ammoniakkia, pH säädettiin arvoon 10,0, 9,0 ja 8,0 vastaavasti rikkihapolla. Solut (4,5 g solupastaa) pantiin kuhunkin substraattiin (45 ml) 16 tunnin ajaksi 30°C:ssa. L-fenyylialaniinipitoisuus määritettiin L-aminohappo-oksidaasikokeella ja ohutkerroskromatografialla. Solut sentrifugoitiin, pestiin ja pantiin tuoreeseen substraattiin 16 tunniksi. Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa.

pH	Ajo I mg/ml L-PHE	Ajo II mg/ml L-PHE	Jäljellä oleva aktiivisuus, %
8	0,22	0,12	55
9	0,95	0,78	82
10	2,02	0,43	21

Tulokset osoittavat, että vaikkakin pH-arvossa 10,0 alkuaktiivisuus on kaksi kertaa niin suuri kuin pH-arvossa 9,0, yhden ajon jälkeen "pH 9,0"-soluilla on 163 % suurempi aktiivisuus kuin "pH 10,0"-soluilla.

Esimerkki 13

Kahden viikon stabiilisuuskoe tehtiin esimerkin 12 mukaisesti.

Kuitenkin reaktorin pH-arvot olivat 8,75, 9,00 ja 9,25 ja ammoniakkikonsentraatio oli 5,5 M. 14 päivän koe suoritettiin kuudella perättäisellä panoskokeella vapailta R. rubra-soluilla. Tulokset ovat seuraavassa taulukossa.

Päiviä osoitettussa pH-arvossa	mg tuotettua L-fenyylialaniinia/h/g... kuivia soluja (alkuaktiivisuudesta jäljellä %)		
	Reaktion 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)

Tulokset osoittavat, että sopivat olosuhteet mahdollistavat PAL-entsyymien uudelleenkäytön L-fenyylialaniinin valmistuksessa ja että vapaiden solujen aktiivisuudet säilyvät korkealla tasolla.

#### Esimerkki 14

Esimerkin 7 solupasta immobilisoitiin yleisellä menetelmällä, joka on esitetty FI-patenttihakemuksessa 832633. Substraatti (80 mM; 4,8 M  $\text{NH}_3$ ; pH 9,23) pumpattiin vastavirtaan kolonnin läpi, joka oli pakattu immobilisoiduilla R. rubra-soluilla. Virtausnopeudet vaihtelivat ollen 0,10, 0,25 ja 0,50  $\text{sv}^{\text{h}^{-1}}$  22°C:ssa ja 0,25 ja 0,50  $\text{sv}^{\text{h}^{-1}}$  28°C:ssa. Effluentista tutkittiin L-fenyylialaniini. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa.

Lämpötila °C	Virtaus ( $\text{sv}^{\text{h}^{-1}}$ )	Tuotettu L-PHE	Tuottavuus (g/l/h)
22	0,10	5,4	0,54
	0,25	2,7	0,68
	0,50	2,1	1,05
28	0,25	3,8	0,95
	0,50	2,8	1,40

Virtausnopeudella  $0,1 \text{ SV}^{\text{h}^{-1}}$  havaittiin 40 prosentin substraattikonsentraatio tuottaen  $5,4 \text{ g L-fenyylialaniinia/l}$   $22^{\circ}\text{C}$ :ssa.

#### Esimerkki 15

Esimerkin 14 viljely ja immobilisointiolosuhteet toistettiin. PAL-entsyymiä sisältävien immobilisoitujen *R. rubra*-solujen kolonni ajettiin kolonnin tuottavuus puoliajan määrittämiseksi tietyissä olosuhteissa. Substraatti oli  $75 \text{ mM CA}$ ;  $4,5 \text{ M NH}_3$ ;  $\text{pH } 9,25$  ja ajo tapahtui  $25^{\circ}\text{C}$ :ssa jatkuvalla virtausnopeudella  $0,25 \text{ SV}^{\text{h}^{-1}}$ . Tuottavuus puoliaika näytti olevan 41 päivää (ks. kuva 1). Tämä koe osoittaa, että immobilisoitua PAL-entsyymiä voidaan käyttää jatkuvasti pitkän ajan L-fenyylialaniinin valmistuksessa.

#### Esimerkki 16A

Fermentointikasvatusalusta valmistettiin kuten esimerkissä 5 ja se käytettiin *R. rubra* kasvatamiseen 10 litran fermenttorissa. Fermentointisiemen tehtiin kuten esimerkissä 3. Solunäytteet kerättiin tietyin aikaväleihin fermenttorista. Soluista tutkittiin PAL-aktiivisuus optimikasvatusajan määrittämiseksi. On havaittu, että kuuden tunnin aikana huippuaktiivisuuden jälkeen alle 50 % huippuaktiivisuudesta oli jäljellä. Havaittiin myöskin että koko D,L-fenyylialaniini oli käytetty kasvualustasta ennen huippuaktiivisuutta.

#### Esimerkki 16B

Toistettiin esimerkki 16A. Kuitenkin juuri huippuaktiivisuuden jälkeen D,L-fenyylialaniini syötettiin ( $5 \text{ g/10 l}$ ) fermenttoriin. Ensimmäisenä tuntina tapahtui putous PAL-aktiivisuudessa kuten esimerkissä 16A. Kuitenkin PAL-aktiivisuus stabiloitui seuraavaksi kolmeksi tunniksi ennen solupastan talteenottoa (ks. kuva 2).

#### Esimerkki 17

Solut valmistettiin ja immobilisoitiin esimerkin 14 menetelmän mukaisesti. Kuitenkin käytetty substraatti oli  $75 \text{ mM CA}$ ;  $4,5 \text{ M NH}_3$ ;  $\text{pH } 9,43$   $23^{\circ}\text{C}$ :ssa ja virtausnopeus  $\text{SV}^{\text{h}^{-1}} = 0,50$ .

Kolonnin havaittiin tuottavan 1,9 g L-fenyylialaniinia/l pedin kantoainetta/h. L-fenyylialaniinin pitoisuus effluentissa oli 3,8 g/l.

#### Esimerkki 18

Solut valmistettiin ja immobilisoitiin esimerkin 14 yleisellä menetelmällä. Immobilisoidut solut pakattiin kolonniin ja 352 ml substraattia (75 mM CA; 4,5 M NH<sub>3</sub>; pH 9,4) kierrätettiin kolonnin läpi nopeudella 1,0 SV<sup>h-1</sup>. Substraattikokoomasta otettiin näytteet tietyin aikaväleihin ja L-fenyylialaniinikonsentraatio määritettiin L-aminohappo-oksidaasientsyymikokeella ja ohutkerroskromatografialla. Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa.

<u>Kierrätysaika</u> <u>(h)</u>	<u>L-fenyylialaniini</u> <u>(g/l)</u>	<u>Konversio, %</u>
7	2,8	23
21,5	4,6	37
24	5,0	40
44,5	6,8	55

Tämä esimerkki osoittaa, että reaktion olosuhteissa L-fenyylialaniinia voidaan valmistaa suurina pitoisuuksina ja suurilla konversionopeuksilla käyttäen PAL-entsyymiä sisältäviä immobilisoituja soluja.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä L-fenyylialaniinin valmistamiseksi, jossa
  - a) trans-kanelihappo saatetaan reagoimaan ammoniumionilähteen kanssa substraattiliuoksen muodostamiseksi,
  - b) substraattiliuoksen pH-arvoa säädetään ja
  - c) substraattiliuos saatetaan kosketuksiin fenyylialaniini-ammoniakkilyaasin kanssa L-fenyylialaniinia tuottavissa olosuhteissa L-fenyylialaniinin muodostamiseksi,t u n n e t t u siitä, että:
  - i) oleellisesti halogeenitonta ammoniumsuolaa käytetään ammoniumionilähteenä ja
  - (ii) substraattiliuoksen pH-arvoa säädetään lisäämällä oleellisesti halogeenitonta happoa.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että substraattiliuoksen pH säädetään alueelle 8-10.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että substraattiliuoksen pH säädetään alueelle 8,5-9,5.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ammoniumionilähde valitaan ryhmästä, joka muodostuu ammoniumsulfaattista, ammoniumfosfaattista, ammoniumnitraatista, ammoniumsitraatista ja ammoniumasetaatista.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ammoniumionilähde on ammoniumsulfaatti.
6. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että substraattiliuoksen pH säädetään hapolla, joka on valittu ryhmästä, joka muodostuu rikkihaposta, fosforihaposta ja etikkahaposta.
7. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että substraattiliuoksen pH säädetään rikkihapolla.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että ammoniumionien konsentraatio on alueella n.  
0,1 M - 7,5 M.
9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että ammoniumionien konsentraatio on alueella  
n. 1 M - 5 M.
10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että liuoksessa olevan t-kanelihapon konsentraatio  
on alueella n. 30 mM - 200 mM.
11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että liuoksessa olevan t-kanelihapon konsentraatio  
on alueella n. 60 mM - 150 mM.
12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että fenyylialaniini-ammoniakkilyaasi voidaan käyt-  
tää uudelleen.
13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että L-fenyylialaniini valmistetaan lisäämällä  
fenyylialaniini-ammonialyaasia sisältäviä ehjiä soluja substraat-  
tiliuokseen panosreaktoriin.
14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että panossysteemi on yksinkertainen panossysteemi.
15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t-  
t u siitä, että panossysteemi on jatkuvasyöttöinen panos.
16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u  
siitä, että fenyylialaniini-ammonialyaasi on immobilisoitu  
uudelleen käytettävään alustaan.
17. Patenttivaatimuksen 1 tai 16 mukainen menetelmä, t u n-  
n e t t u siitä, että fenyylialaniini-ammoniakkilyaasi on  
immobilisoitu kolonnissa.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n-  
n e t t u siitä, että kolonnin lämpötila pidetään n.  
10-40°C:ssa pumpattaessa substraattiliuosta sen läpi.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n-  
n e t t u siitä, että kolonnin lämpötila pidetään n.  
18-30°C:ssa pumpattaessa substraattiliuosta sen läpi.

**FIG. 1**

PAL-COL-4 puoliaika 23°C:ssa, pH 9,25

t-kanelihappo = 75 mM    NH<sub>3</sub> = 4,5 M    Virtaus = SV<sup>h-1</sup> = 0,25



