

Immobilisierung und Stabilisierung der Hydantoinase und L-N-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von Kerstin Ragnitz
aus Brake (Unterweser)

Hauptberichter: Prof. Dr. Christoph Syldatk
Mitberichter: Prof. Dr. Rolf Schmid
Tag der mündlichen Prüfung: 8.12.2000

Institut für Bioverfahrenstechnik
Universität Stuttgart

2000

Diese Arbeit wurde zu Teilen durch die Landesgraduiertenförderung und ein Wiedereinstiegsstipendium des Hochschulsonderprogramms III finanziert.

Für Julian und Jana

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

dem Land Baden-Württemberg für die Gewährung eines Stipendiums der Landesgraduier-
tenförderung und ein Wiedereinstiegsstipendiums im Rahmen des Hochschulprogramms III,

Herrn Prof. Dr. C. Syldatk für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Freiheit
bei der Durchführung der Arbeit, sowie die Durchsicht des Manuskriptes,

Herrn Prof. Dr. R. Schmid für das entgegengebrachte Interesse und die Übernahme des Co-
Referates,

Herrn PD Dr. M. Pietzsch für die Betreuung, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung beim
Bändigen der Hydantoinase und Carbamoylase,

allen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen des Institutes für Bioverfahrenstechnik für die
gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft,

Miriam Richter für ihren Beitrag durch eine Studienarbeit und die Hiwi-Tätigkeit,

meiner Laborfamilie - Harald, Olli und Tomi - für die tolle Zeit innerhalb und außerhalb des
Labors,

meinen Kindern, die meinen Blick für das Wesentliche geschärft haben,

meinem Mann Karsten, der Freud und Leid dieser Arbeit mit mir geteilt hat und mich immer
in meinem Tun bestärkt hat,

und ganz besonders meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung, ohne die diese Ar-
beit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Bedeutung und Herstellung von Aminosäuren	3
1.2 Hydantoinase Verfahren – Prinzip, Vor- und Nachteile.....	4
Zielsetzungen der Arbeit.....	8
2 Bereitstellung und Anreicherung der Wildtyp-Hydantoinase und L-N-Carbamoylase aus <i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3747	9
2.1 Fermentation.....	9
2.2 Zellaufschluß	10
2.3 Anreicherung	10
2.3.1 Polimin-Fällung	11
2.3.2 Mangansulfat-Fällung	11
2.3.3 Ammoniumsulfat-Fällung	11
2.4 Bereitstellung und Aufreinigung der rekombinanten Hydantoinase und L-N-Carbamoylase aus <i>Escherichia coli</i>	12
2.4.1 Hydantoinase.....	13
2.4.2 L-N-Carbamoylase.....	14
3 Immobilisierung	15
3.1 Immobilisierung mittels Oxiran-Methode	16
3.2 Immobilisierung mittels Carbodiimid-Methode.....	17
3.3 Immobilisierung der Wildtyp-Hydantoinase und L-N-Carbamoylase aus <i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3747.....	17
3.4 Immobilisierung der rekombinanten Hydantoinase und L-N-Carbamoylase	19
3.4.1 Immobilisierung der L-N-Carbamoylase mittels Glutaraldehyd bzw. Divinylsulfon	20
3.4.2 Copolymerisierung	22
3.4.3 Immobilisierung der L-N-Carbamoylase mittels Carbodiimid.....	23
3.4.4 Immobilisierung der rekombinanten Hexahistidin-Hydantoinase mittels Metallaffinitätschromatographie	25

3.5	Immobilisierung der Hydantoinase in Anwesenheit von Inhibitoren	25
3.6	Bewertung der Immobilisierung – Charakterisierung der Immobilisate	26
3.6.1	Einfluss von $MnCl_2$ auf die Hydantoinase-Aktivität	27
4	Einsatz von Lösungsvermittlern zur Erhöhung der Substratlöslichkeit	29
5	Schlußwort und Ausblick	31
6	Gesamtliteraturverzeichnis	32

Veröffentlichungen

I	Markus Pietzsch, Helene Oberreuter, Blagica Petrovska, Kerstin Ragnitz, Christoph Syldatk: Immobilization of hydantoin cleaving enzymes from <i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3747 – Effect of the coupling method on the stability of the L-N-carbamoylase	44
II	Markus Pietzsch, Anja Wiese, Kerstin Ragnitz, Burkhard Wilms, Josef Altenbuchner, Ralf Mattes, Christoph Syldatk: Purification of recombinant hydantoinase and L-N-carbamoylase from <i>Arthrobacter aurescens</i> expressed in <i>Escherichia coli</i> : comparison of wild-type and genetically modified proteins	56
III	Kerstin Ragnitz, Markus Pietzsch, Christoph Syldatk: Immobilization of hydantoin cleaving enzymes from <i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 3747	70
IV	Kerstin Ragnitz, Markus Pietzsch, Christoph Syldatk: Optimization of the immobilization parameters and operational stability of immobilized hydantoinase and L-N-carbamoylase from <i>Arthrobacter aurescens</i> for the production of optically pure L-amino acids	84

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Immobilisierungsprozedur für eine Hydantoinase und eine L-N-Carbamoylase entwickelt werden. Ausgehend von den Wildtypenzymen aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 wurden dazu unterschiedlichste und im wesentlichen kovalente Methoden zur Kopplung und Copolymerisierung untersucht. Um im Hinblick auf eine industrielle Anwendung eine kostenintensive Aufreinigung der Enzyme zu vermeiden, wurden diese nach dem Zellaufschluß dafür lediglich durch Ammoniumsulfat-Fällung angereichert und nach Resuspendierung im geeigneten Reaktionssystem direkt immobilisiert. Hierfür schien zunächst die Kopplung an die Acryl-Polymere Eupergit C und C 250 L mittels der Oxiran-Methode geeignet. Allerdings konnten, insbesondere für die L-N-Carbamoylase (< 10%), damit nur geringe Aktivitätsausbeuten erzielt werden, die sowohl für die Hydantoinase als auch für die L-N-Carbamoylase zu niedrig waren, um industriellen Anforderungen gerecht zu werden. Positiver Effekt der Immobilisierung war jedoch, daß die Stabilität beider Enzyme deutlich zunahm (siehe Paper 1 und 3).

Mit der Bereitstellung der rekombinanten Enzyme war es möglich diese getrennt voneinander aufzureinigen und den Einfluß unterschiedlicher Parameter wie Protein-Träger-Verhältnis, Kopplungsmethode und Art des Trägermaterials systematisch und ohne Einfluß von Fremdprotein zu untersuchen. Es zeigte sich, daß für die Immobilisierung der L-N-Carbamoylase lediglich die Kopplung über die Carboxylgruppen des Enzyms möglich ist, während die Oxiran-Methode zu einer Inaktivierung führte. Unter Verwendung eines hydrophilen Trägermaterials wie EAH Sepharose 4B konnte die Aktivitätsausbeute von 4 auf 100% gesteigert werden. Es wurden spezifische Aktivitäten des Immobilisates von bis zu 11 U/g_{feuchtem Träger} (siehe Paper 4) erzielt. Der Einsatz einer genetisch modifizierten L-N-Carbamoylase mit einem C-terminalem Asp₆-tag hatte keinen negativen Einfluß auf die Stabilität der Bindung zwischen den primären Aminogruppen des Trägers und den Carboxylgruppen des Enzyms.

Die Immobilisierung der Hydantoinase war sowohl mittels der Oxiran- als auch der Carbodiimid-Methode möglich. Für das rekombinante Enzym konnten spezifische Aktivitäten von bis zu 3 U/g_{feuchtem Träger} erhalten werden. Durch Lagerung in manganhaltigem Puffer war darüberhinaus eine Hyperaktivierung des Immobilisates um das 5-fache möglich.

Alternativ zur kovalenten Kopplung der Enzyme wurde die Metallaffinitätschromatographie auf ihre Eignung für die spezifische Bindung rekombinanter His₆-tag Proteine direkt aus dem Rohextrakt untersucht. Allerdings konnten so nur weniger als 10% der Hydantoinase und L-N-Carbamoylase aktiv an die Affinitätsmatrix gebunden werden, wobei die verbleibende Restaktivität im Falle der L-N-Carbamoylase über einen Zeitraum von 15 Tagen erhalten blieb.

Die Ermittlung der Prozeßstabilität („Operational Stability“) und die biochemische Charakterisierung der optimalen Immobilisate erbrachte zufriedenstellende Ergebnisse. Die Halbwertszeiten lagen bei 14000 h (Hydantoinase) bzw. 1000 h (L-N-Carbamoylase). Die pH- und Temperaturoptima waren für die immobilisierte Hydantoinase und L-N-Carbamoylase vergleichbar und lagen zwischen 8,5 - 10 bzw. bei pH 9,5 und zwischen 45 – 60°C bzw. 60°C, so daß ein Einsatz unter denselben Reaktionsbedingungen möglich ist.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Herstellung von Aminosäuren

Neben ihrer Funktion als Bausteine von Proteinen haben Aminosäuren auch wichtige biologische Funktionen, z.B. als Neurotransmitter, Vorstufen davon oder als Bausteine von Peptidantibiotika (z.B. Aktinomycin, Gramicidin) und -hormonen (z.B. Insulin, LHR Hormon). Unnatürliche Aminosäuren gewinnen zunehmend an Bedeutung als Intermediate für neue Pharmazeutika, Lebensmittelzusätze und Agrochemikalien. 1995 wurde der Anteil am Weltmarkt auf 3 Milliarden US \$ geschätzt [Leuchtenberger, 1996], die sich im wesentlichen auf die Bereiche Lebensmittel (38%), Futtermittel (54%), Medizin und Kosmetik (8%) verteilen (siehe Abbildung 1-1).

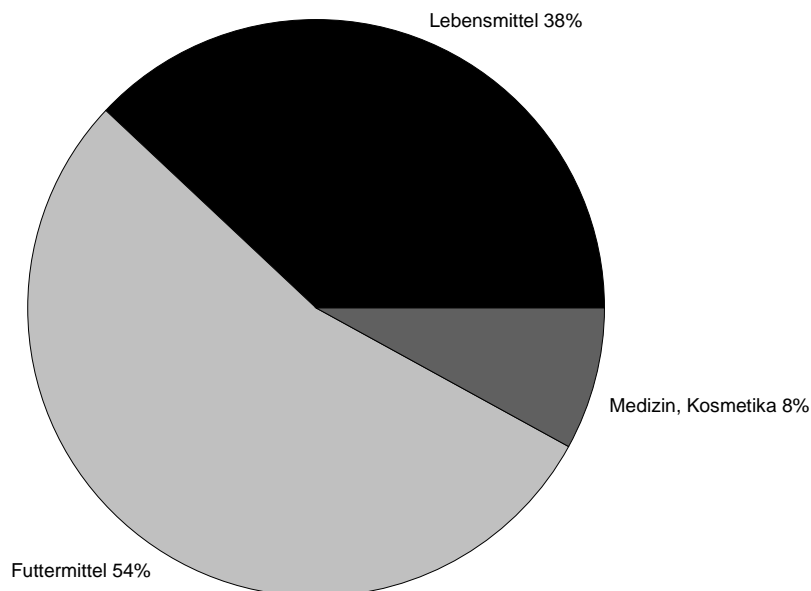


Abbildung 1-1: Bedeutung von Aminosäuren in verschiedenen Bereichen

Die industrielle Herstellung von Aminosäuren erfolgt auf unterschiedliche Weise, abhängig von der Natur und dem Bedarf der jeweiligen Aminosäure. Die Anwendung von Extraktions- und Fermentationsverfahren beschränkt sich auf proteinogene Aminosäuren, wohingegen chemische und enzymatische Synthesemethoden [Yamada et al., 1988] vor allem für die Bereitstellung unnatürlicher Aminosäuren geeignet sind. In der Literatur sind eine Reihe von chemo-enzymatischen Verfahren beschrieben [Schmidt-Kastner und Egerer, 1984; Bommarius, 1996; Esaki et al., 1996].

Hierbei kommen im wesentlichen Aminopeptidasen, Aminotransferasen, Aminoacylasen, Lipasen und Hydantoinasen zum Einsatz. Eine Übersicht über die industrielle Produktion von Aminosäuren findet sich in Tabelle 1-1.

Letztere sind aufgrund ihrer breiten Substratspezifität und der Möglichkeit, damit auch unnatürliche D- und L-Aminosäuren, z.B. als Bausteine von Antibiotika und pharmazeutisch relevanten Peptiden herzustellen besonders attraktiv für eine industrielle Anwendung.

1.2 Hydantoinase Verfahren-Prinzip, Vor- und Nachteile

Hydantoine sind stabile Verbindungen, die sich chemisch einfach herstellen lassen und können daher leichter eingesetzt werden als z.B. α -Aminonitrile, Intermediate der Strecker-Aminosäuresynthese aus Aldehyden. Allerdings führt diese große Stabilität dazu, daß die chemische Hydrolyse zu α -Aminosäuren drastische Reaktionsbedingungen, wie z.B. 60%ige Schwefelsäure und Temperaturen von 120-130°C erfordert, was wiederum zu Racemisierungen führt. Das gesamte Potential der Hydantoine als Vorstufen für die Herstellung von Aminosäuren konnte daher erst mit der stereoselektiven mikrobiellen bzw. enzymatischen Spaltung zu optisch aktiven Aminosäuren genutzt werden [Syldatk et al., 1992; Syldatk et al., 1995]. Eine wichtige industrielle Anwendung findet dieses Verfahren bereits in der Herstellung von D-p-Hydroxyphenylglycin, einem Intermediat bei der Synthese semisynthetischer Antibiotika [Syldatk et al., 1999].

Ein großer Vorteil des Hydantoinase-Verfahrens im Vergleich zu anderen enzymatischen Methoden ist die Möglichkeit, ausgehend von einem Racemat enantiomerenreine Aminosäuren mit einer Ausbeute von theoretisch bis zu 100% herzustellen.

Der Prozess gliedert sich dabei in drei Reaktionsschritte (siehe Abbildung 1-2):

- 1) Spaltung des Hydantoins zur Carbamoylaminosäure durch eine Hydantoinase
- 2) Hydrolyse der N-Carbamoylaminosäure zur korrespondierenden enantiomerenreinen Aminosäure durch die Carbamoylase
- 3) Chemische oder enzymatische Racemisierung des nicht umgesetzten Hydantoinenantiomers

Tabelle 1-1: Industrielle Produktion von Aminosäuren – Verwendung und Herstellungsmethode [Leuchtenberger, 1996]

Aminosäure	Verwendung	Herstellung	Marktanteil [t/Jahr]
L-Alanin	Enterale und parenterale Ernährung	Enzymkatalyse	100-1000
L-Asparagin	Lebensmittelzusatz	Extraktion	100-1000
L-Glutamin	Lebensmittelzusatz	Fermentation, Extraktion	100-1000
L-Histidin	Infusionslösungen	Fermentation, Extraktion	100-1000
L-Isoleucin	Infusionslösungen	Fermentation, Extraktion	100-1000
L-Leucin	Infusionslösungen, Feinchemikalien	Fermentation, Extraktion	100-1000
L-Prolin	ACE Inhibitoren, Infusionslösungen	Fermentation, Extraktion	100-1000
L-Serin	Infusionslösungen	Fermentation, Extraktion	100-1000
L-Tyrosin	L-DOPA	Extraktion	100-1000
L-Valin	Infusionslösungen	Enzymkatalyse, Fermentation	100-1000
L-Arginin	Infusionslösungen	Fermentation, Extraktion	1000-8000
L-Cystein	Antioxidationsmittel	Reduktion von Cystin (Extraktion)	1000-8000
L-Tryptophan	Antidepressivum	Fermentation	1000-8000
Glycin	Lebensmittelzusatz, Antioxidans in Emulgatoren, Bakteriostatikum	Chemische Synthese	8000-100 000
L-Aspartat	Süßstoff Aspartam	Enzymkatalyse	8000-100 000
L-Phenylalanin	Süßstoff Aspartam	Fermentation	8000-100 000
L-Threonin	Futtermittelzusatz	Fermentation	8000-100 000
D,L-Methionin	Futtermittelzusatz	Chemische Synthese	100 000-800 000
L-Glutamat	Geschmacksverstärker	Fermentation	100 000-800 000
L-Lysin	Futtermittelzusatz	Fermentation	100 000-800 000

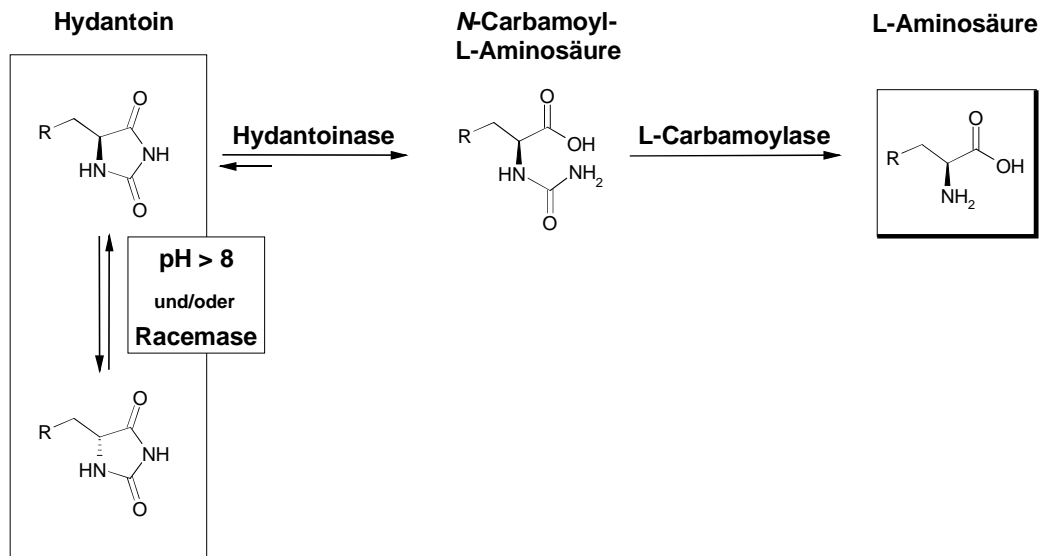


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Hydantoinaseverfahrens zur Herstellung von L-Aminosäuren

Die bisher in der Literatur beschriebenen Verfahren wurden mit freien ruhenden Zellen ohne Wiederverwendung durchgeführt, da die Carbamoylasereaktion bereits nach wenigen Zyklen durch einen hohen Aktivitätsverlust zum limitierenden Schritt werden würde. Die D-Hydantoinasereaktion wird daher häufig nur als „Einschrittverfahren“ mit anschließender chemischer Decarbamylierung des Zwischenproduktes zur D-Aminosäure durchgeführt.

Weitere Nachteile von Ganzzellverfahren sind:

1. Hohe Aufarbeitungskosten, da während der Biotransformation auch Zellinhaltsstoffe freigesetzt werden, die vor allem für Anwendungen im Pharmabereich abgetrennt werden müssen.
2. Transportprobleme, wodurch die Aufnahme der Substrate in die Zelle erschwert wird und es zu einer Begrenzung der Produktivität kommt.
3. Die Wiederverwendung der Zellen ist aufgrund der Stabilitäts- und Aktivitätsprobleme vor allem auf der Ebene der N-Carbamoylasen nicht möglich.
4. Geringe Produktivitäten durch niedrige Enzymkonzentrationen in den Zellen.

Arthrobacter aurescens DSM 3747 und DSM 3745 sind zwei der wenigen Organismen, die isoliert werden konnten und in der Lage sind, 5-monosubstituierte Hydantoine zu L-Aminosäuren umzusetzen [Syldatk et al., 1992]. Während die D-Hydantoinasen strikt D-spezifisch erscheinen, weist die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 eine substratabhängige Enantioselektivität auf [May et al., 1998; Waniek, 1999]. So wird z.B. Benzylhydantoin durch die Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 L-selektiv umgesetzt wohingegen der Einsatz von (Phenylethyl-)hydantoin oder (Methylthioethyl-)hydantoin zu einer D-selektiven Spaltung führt. Damit wird für die Herstellung enantiomerenreiner L-Aminosäuren das nachfolgende Enzym, die L-N-Carbamoylase, unerlässlich.

Zielsetzungen der Arbeit

Aus den zuvor in Kapitel 1 dargelegten Gründen ergaben sich folgende Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit:

Es sollten zunächst, ausgehend von aktuellen Vorarbeiten, die am Institut für Bioverfahrenstechnik im Rahmen von Studien- und Diplomarbeiten durchgeführt wurden, die Immobilisierung und Stabilisierung der hydantoinspaltenden Enzyme Hydantoinase und L-N-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 untersucht und optimiert werden. Die Eigenschaften der Enzyme sollten dadurch so verbessert werden, daß diese für ein industrielles Verfahren prozeßtauglich werden. Voraussetzung für die Experimente war die Bereitstellung der Enzyme im großen Maßstab im Bioreaktor, die Freisetzung mittels Zellaufschluß und die Aufbereitung der Enzymlösung durch Fällungen und verschiedene Chromatographieverfahren für die sich anschließende Immobilisierung. Die Kopplung an diverse Trägermaterialien unter Anwendung unterschiedlicher Immobilisierungsmethoden und Trägermaterialien sollte mit möglichst hoher Ausbeute unter Erhalt der Aktivität erfolgen. Nach Bereitstellung der rekombinant exprimierten Wildtyp- und genetisch modifizierter Enzyme (Asp-, His-tag) in parallel laufenden Arbeiten [Wiese, 2000; Wilms, 2000] sollten diese ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen werden.

Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse sollten Eingang finden in das ZSP-Projekt „Enzymkaskade“ und dort sowohl die Simulation als auch den Betrieb einer Gesamtanlage zur Herstellung von enantiomerenreinen unnatürlichen Aminosäuren aus D,L-5-monosubstituierten Hydantoinderivaten im Mini-Plant-Maßstab ermöglichen [Teves, 2000].

2 Bereitstellung und Anreicherung der Wildtyp-Hydantoinase und L-N-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747

2.1 Fermentation

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Bereitstellung der Wildtypenzyme aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 im Bioreaktor. Zunächst wurde eine Fermentation im großen Maßstab (300 l) zur Herstellung ausreichender Enzymmengen für die Immobilisierungsexperimente unter den in Tabelle 2-1 und 2-2 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Dadurch wurden ca. 11 kg Biomasse mit einer L-N-Carbamoylase-Aktivität von etwa 0,22 mmol/h·g Biotrockenmasse (3,7 U/g TS) und Hydantoinase-Aktivität von etwa 0,23 mmol/h·g Biotrockenmasse (3,8 U/g TS) erhalten, deren Aufarbeitung wie im folgenden beschrieben erfolgte.

Tabelle 2-1: Medium für Kultivierung von *Arthrobacter aurescens* DSM 3747

11 g/l (bzw. 22 g/l für Bioreaktor) Glukose
3,40 g/l KH ₂ PO ₄
4,42 g/l K ₂ HPO ₄
0,62 g/l Citronensäure·H ₂ O
0,04 g/l MnCl ₂ ·4 H ₂ O
0,04 g/l lFeSO ₄ ·7 H ₂ O
0,04 g/l CaCl ₂ ·2 H ₂ O
0,40 g/l MgSO ₄ ·7 H ₂ O
6,50 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄
0,30 g/l N ₃ -Indolylmethylhydantoin
1,00 g/l Hefeextrakt

Tabelle 2-2: Kultivierungsbedingungen bei der Anzucht von *Arthrobacter aurescens* DSM 3747

Medium	200 l
Induktor	N ₃ -Indolylmethylhydantoin
Animpfvolumen	5 l
Temperatur	30°C
Soll-pH-Wert	6,8
Belüftungsrate	40-50 NI/min
Drehzahl	150-400 rpm
Titration	25% NaOH; 10% H ₃ PO ₄

2.2 Zellaufschluß

Zur Isolierung der Wildtypenzyme aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 wurde ein Zellaufschluß mittels Rührwerkskugelmühle des Typs Dyno-Mill KDL durchgeführt. Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß sich vor allem die Hydantoinase durch ihre Metallabhängigkeit auszeichnet. Daher wurden für den Zellaufschluß zwei unterschiedliche Puffersysteme in ihrer Wirkung auf die Enzymaktivitäten untersucht. Zusätzlich zu einem üblicherweise für den Aufschluß von *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 verwendeten Phosphatpuffer wurde 0,2 M Tris-Puffer mit 1 mM Manganchlorid, pH 7,0 eingesetzt. Dem Phosphatpuffer konnte kein Manganchlorid in entsprechender Menge zugesetzt werden, da dieses sonst als unlösliches Manganphosphat ausgefallen wäre. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten aus beiden Aufschlüssen zeigte, daß bei Verwendung von Tris-Puffer sowohl die Hydantoinase- als auch die L-N-Carbamoylase-Aktivität deutlich gesteigert werden konnten (Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3: Einfluß des Puffersystems auf die Enzymaktivitäten

Puffersystem	Hydantoinaseaktivität [U/ml]	L-N-Carbamoylaseaktivität [U/ml]
0,3 M Phosphatpuffer, pH 6,5	2,4	2,6
0,2 M Tris, pH 7,0	4,9	4,2

2.3 Anreicherung

In früheren Arbeiten wurden bereits diverse Methoden zur Anreicherung der Enzyme Hydantoinase und L-N-Carbamoylase untersucht [Dombach, 1988; Kölle, 1991; Wohlfahrt, 1991; Petrovska, 1995]. Dazu gehörten **Fällung**, **Extraktion** und **Chromatographie**. Alle Methoden erwiesen sich jedoch als mehr oder weniger ungeeignet, um die beiden Enzyme vollständig voneinander zu trennen. Die besten Ergebnisse wurden diesbezüglich noch mit einer Flüssig-Flüssig-Extraktion erzielt. In diesem Fall konnte sowohl eine Phase erhalten werden, die fast ausschließlich Hydantoinase- als auch eine Phase, die eine wesentlich höhere spezifische L-N-Carbamoylase- als Hydantoinase-Aktivität enthielt [May, 1995].

Im Hinblick auf eine industrielle Anwendung stellt jedoch eine Fällung die einfachste Methode zur Anreicherung von Enzymen dar. Daher wurden verschiedene Fällungen auf ihre Eignung und Praktikabilität untersucht und Optimierungen durchgeführt.

2.3.1 Polimin-Fällung

Die Polimin-Fällung ist vergleichbar mit einer Protaminsulfat-Fällung und dient vor allem der Abtrennung von Zelltrümmern und Nucleinsäuren. Dieser Effekt beruht auf der Fähigkeit von Polykationen sich an negativ geladene Verbindungen zu binden und einen Großteil ihrer Ladungen zu neutralisieren [Cooper, 1980]. Die Entfernung von Nucleinsäuren ist in einem frühen Stadium der Reinigung empfehlenswert, da sie größere Mengen Proteine binden.

Mit dieser Fällung konnte eine Klärung des Zellextraktes ohne nennenswerten Aktivitätsverlust der Enzyme erzielt werden.

2.3.2 Mangansulfat-Fällung

In Anlehnung an frühere Arbeiten [Müller, 1990] wurde für die Fällung der Enzyme eine Endkonzentration an Mangansulfat von 20 mM gewählt. Im Gegensatz zur Polimin-Fällung konnte hierbei sowohl für die Hydantoinase als auch für die Carbamoylase eine Aktivitätssteigerung erreicht werden (Tabelle 2-4). Auch für diesen Fällungsschritt ergab sich, wie im Falle der Polimin-Fällung, jedoch keine Anreicherung der Enzyme.

Tabelle 2-4: Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen nach Polimin- und Mangansulfat-Fällung

Fällung	Proteinkonzentration [g/l]	Hydantoinaseaktivität [U/ml]	Carbamoylaseaktivität [U/ml]
Zellaufschluß in 0,3 M Phosphatpuffer, pH 6,5	16	2,6	2,4
Polimin-Fällung	17	2,2	2,4
Mangansulfat-Fällung	17	7,5	3,0

2.3.3 Ammoniumsulfat-Fällung

Unterschiedliche Angaben aus früheren Arbeiten bezüglich des Fällungsverhaltens der Hydantoinase und der Carbamoylase ließen darauf schließen, daß Art und Dauer der Salzzugabe das Fällungsverhalten der Enzyme und die Enzymaktivitäten beeinflussen. Die Ammoniumsulfatzugabe erfolgte daher sowohl in Form eines kristallinen Salzes und als auch als gesättigte Lösung [Scopes, 1987], wodurch lokale Konzentrationsgradienten vermieden werden sollten. Desweiteren wurde der Einfluß der Dauer der Salzzugabe untersucht.

Unabhängig von der Vorbehandlung der Enzymlösung und der Art der Salzzugabe ergab sich, daß eine vollständige Trennung der beiden Enzyme nicht möglich war. Sowohl die Hydantoinase als auch die Carbamoylase wurden ab einer Ammoniumsulfat-Sättigung von 40% gefällt. Bis zu einer Sättigung von 50% - 60% lagen dann beide Enzyme vollständig im Pellet vor. Die besten Ergebnisse bezüglich der Aktivitätsausbeute konnten für die flüssige

Zudosierung des Salzes in Form einer 100% gesättigten Lösung über einen Zeitraum von 5 Stunden erzielt werden. Hierbei wurden bei 60% Sättigung Ausbeuten von 96% für die Hydantoinase und von 91% für die Carbamoylase erhalten. Somit wurde die Ammoniumsulfatfällung zu einem reproduzierbaren, scale-up fähigen Verfahren zur Probenvorbereitung für anschließende Immobilisierungsexperimente etabliert. Je nach Erfordernissen konnten die Enzyme dann in dem für die jeweilige Methode entsprechenden Puffersystem resuspendiert werden.

2.4 Bereitstellung und Aufreinigung der rekombinanten Hydantoinase und L-N-Carbamoylase

Mit der Klonierung der Gene der am Hydantoinabbau beteiligten Enzyme aus *Arthrobacter aurescens* [Wiese, 2000; Wilms, 2000] war erstmals die Möglichkeit gegeben, Hydantoinase und L-N-Carbamoylase rekombinant in *Escherichia coli* zu exprimieren und getrennt voneinander aufzureinigen. In Abbildung 2-1 ist exemplarisch der Verlauf einer absatzweisen Fermentation von *Escherichia coli* zur Bereitstellung rekombinanter Carbamoylase dargestellt. Das Gen war in einem mit L-Rhamnose induzierbaren Expressionsvektor inseriert worden [Wiese, 2000], damit konnte die L-N-Carbamoylase in einer Menge von bis zu 20% des Gesamtzellproteins produziert werden.

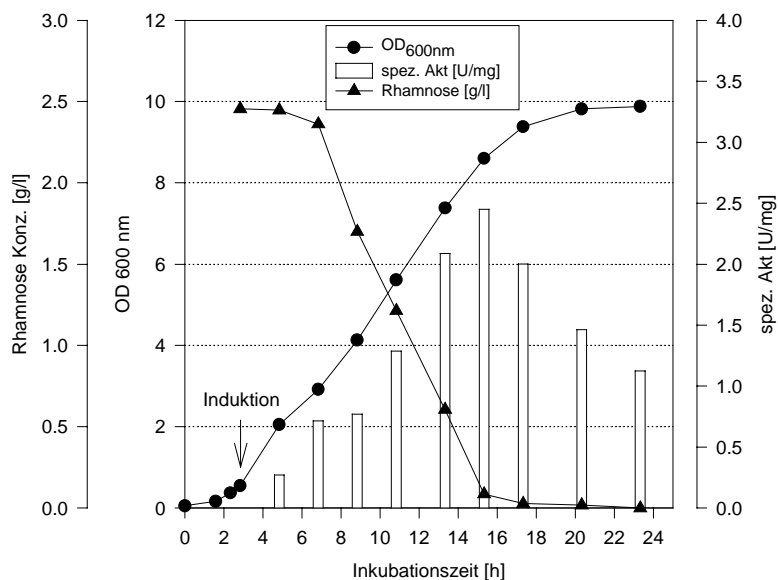


Abbildung 2-1: Verlauf einer Batch-Kultivierung von *Escherichia coli* W3110 im Schüttelkolben ohne Schikanen

Sowohl für die rekombinanten Wildtypenzyme als auch für die genetisch modifizierten Hydantoinasen und L-N-Carbamoylasen wurden unterschiedliche Reinigungsstrategien entwickelt (Veröffentlichung 2). Vor allem die Einführung von sechs Histidinresten am C-Terminus sollte eine einfache „Einschritt“-Aufreinigung mittels Metallaffinitätschromatographie ermöglichen. Für die L-N-Carbamoylase konnte eine 11,3-fache Anreicherung aus dem Rohextrakt mit einer Ausbeute von 55% erreicht werden. Die entsprechend modifizierte Hydantoinase konnte ebenfalls effizient an die Affinitätsmatrix gebunden werden. Allerdings führte die Elution sowohl über einen pH-Gradienten als auch in Gegenwart von Imidazol zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms.

Im Falle der L-N-Carbamoylase sollte das Anfügen von sechs Asparaginsäureresten eine integrierte Reinigungs- und Immobilisierungsprozedur erlauben, da eine Immobilisierung dieses Enzyms nur über Carboxylgruppen möglich ist (siehe Kapitel 3). Im Vergleich mit dem Wildtypenzym zeigte die Asp₆-Carbamoylase aufgrund der zusätzlichen negativen Ladung eine stärkere Wechselwirkung mit dem Anionenaustauscher, so daß eine Elution erst bei höherer Salzkonzentration (0,5-0,6 M gegenüber 0,3-0,4 M) erfolgte.

2.4.1 Hydantoinase

Die Aufreinigung der rekombinanten Hydantoinase erfolgte nach einem von O. May [1998] entwickelten Reinigungsprotokoll. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Form einer Reinigungstabelle (Tabelle 2-5) dargestellt.

Tabelle 2-5 : Aufreinigung der rekombinanten Hydantoinase aus *Escherichia coli* W3110 pBW 31

Reinigungsschritt	Proteinmenge [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aktivität [U]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Zellaufschluß	2175	0,16	353	100	1,0
Streamline QXL	534	0,27	129	37	1,7
Phenylsepharose Highload	100	0,98	98	28	6,1
Mono Q	12	2,2	15	4	13,8

2.4.2 Carbamoylase

Um für die Immobilisierungsexperimente eine ausreichende Menge gereinigter L-N-Carbamoylase zur Verfügung zu haben, wurde ein Reinigungsprotokoll bestehend aus den zwei Schritten

- Streamline DEAE Säule („capture“)
- Mono Q („polishing“)

durchgeführt. Eine genaue Beschreibung der Aufreinigung sowohl für das Wildtypenzym als auch für die genetisch modifizierte L-N-Carbamoylase findet sich in Veröffentlichung 2.

3 Immobilisierung

Der Einsatz immobilisierter Enzyme hat aufgrund ihrer Wiederverwendbarkeit ökonomische Vorteile gegenüber freien Enzymen [Kennedy and White, 1985; Kennedy and Cabral, 1987]. Bei der Immobilisierung können vier grundsätzliche Methoden unterschieden werden. Dazu gehören Adsorption, kovalente Bindung, Kopolymerisierung und Einschlußverfahren [Fágáin, 1997]. Eine beträchtliche Anzahl industrieller Prozesse machen sich bereits den Einsatz immobilisierter Enzyme zunutze. Als wichtige Beispiele wären hier unter anderem die Umsetzung von Glucose zu Fructose mit der Glucoseisomerase und die Hydrolyse von Penicillin durch die Penicillinacylase zu nennen [Buchholz et al., 1987] zu nennen. Die vielversprechendsten Anwendungen liegen allerdings in der Herstellung von Feinchemikalien, vor allem in der Synthese von optisch aktiven und enantiomerenreinen Komponenten [Stinson, 1992; Tischer et al., 1992]. In diesem Bereich haben vor allem die Wiederverwendbarkeit und die Rückhaltung der Enzyme im Hinblick auf die Enzymkosten und die Produktreinheit große Bedeutung.

Ein Hauptpunkt bei der Beurteilung der Machbarkeit eines biotechnologischen Prozesses ist die Kombination von Effizienz und Stabilität des verwendeten Biokatalysators [Monsan et al., 1988]. Eine Immobilisierung führt oftmals zu einer erhöhten Stabilität und Toleranz gegenüber denaturierenden Faktoren wie z.B. extremen pH-Werten und Temperaturen, Lösungsmitteln und Proteaseaktivität. Allerdings kann durch die Immobilisierung die Aktivität im Vergleich zum freien Enzym abnehmen. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war daher die Stabilität der Hydantoinase und L-N-Carbamoylase im Vergleich zu den freien Enzymen unter Erhalt ihrer Aktivität zu verbessern.

Bei der Wahl der Immobilisierungsmethode und geeigneter Trägermaterialien spielen prozesstechnische Gesichtspunkte eine Rolle, wie z.B. physikalische Eigenschaften der verwendeten Matrices, die einen großen Einfluß auf das Reaktionssystem haben. Der Einsatz in Rührkesselreaktoren, Fließ- oder Festbettreaktoren hängt im wesentlichen von der Partikelgröße und -verteilung, der mechanischen Festigkeit und der Druckbeständigkeit ab. So wird z.B. der Druckabfall im Festbett und die Sedimentationsgeschwindigkeit im Fließbett vom Partikeldurchmesser bestimmt [Buchholz et al., 1987].

Bei **adsorptiv gebundenen Enzymen** durch hydrophobe, ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken ist die Bindungsstärke zwischen Protein und Matrix relativ schwach und reagiert daher sensitiv auf Veränderungen in der Umgebung (pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur). Dies erfordert eine strenge Kontrolle der Prozessbedingungen, um ein „Ausbluten“

des Immobilisates zu verhindern. Vorteilhaft ist bedingt durch die Reversibilität der Bindung jedoch die einfache Regenerierbarkeit des Immobilisates im Falle einer Inaktivierung.

Bei einer **kovalenten Kopplung** eines Proteins an einen festen Träger werden eine oder mehrere Aminosäureseitenketten modifiziert. Die meisten Kopplungsreaktionen beruhen auf nukleophilen Angriffen durch Amino-, Thiol-, Hydroxyl- und Phenolgruppen und können einer der folgenden Klassen zugeordnet werden

1. Peptidbindung
2. Alkylierung
3. Diazobindung
4. Aldiminbindung

Die große Vielfalt an Kopplungsreaktionen und die weite Verfügbarkeit von bereits funktionalisierten Matrices wie z.B. Eupergit, CNBr Sepharose, EAH Sepharose etc. erleichtern die Anwendbarkeit der kovalenten Immobilisierung.

Die **intramolekulare Quervernetzung** von Enzymen durch bi- oder multifunktionale Reagenzien (im allgemeinen Glutaraldehyd) stellt zwar eine verhältnismässig einfache Methode dar, kommt allerdings aufgrund der Schwierigkeiten bei der Kontrolle der Größe und der mechanischen Eigenschaften der Aggregate nur selten zur Anwendung. Eine neuere Entwicklung bzw. Erweiterung dieser Immobilisierungsmethode stellen sogenannte „Cross-Linked Enzyme Crystals“ (CLEC) dar [Margolin, 1996]. Hierbei werden die typischen Enzymeigenschaften wie hohe Aktivität und Selektivität, Einsatz unter milden Reaktionsbedingungen mit denen eines heterogenen Katalysators (Stabilität in unterschiedlichen Umgebungen, Wiederverwendbarkeit) kombiniert.

3.1 Immobilisierung mittels Oxiranmethode

Trägermaterialien, die Epoxid-Gruppen an ihrer Oberfläche tragen, zeichnen sich durch einige Vorteile aus: einfache Kopplungsreaktionen, Stabilität der Bindung und keine Ladungsbildung an der Trägeroberfläche. Außerdem können die Epoxid-Gruppen mit zahlreichen Gruppen in Proteinen reagieren (Amino-, Carboxyl-, Sulfhydryl-, Hydroxyl-Gruppen) [Zemanova et al, 1981]. Das Reaktionsschema einer solchen Kopplung ist in Abbildung 3-1 dargestellt. In der neueren Literatur gibt es viele Hinweise darauf, daß eine Immobilisierung an Eupergit zu einer Stabilisierung des gebundenen Enzyms führt [Mateo et al., 2000; Hernaiz

et al., 2000]. Darüberhinaus wurden bereits diverse Anwendungen in der Biokatalyse für unterschiedlichste immobilisierte Enzyme (Penicillin Amidase, Penicillin G Acylase, Proteasen/Hydrolasen, Esterasen/Lipasen, Oxidoreduktasen) beschrieben [Eupergit®, Röhm, 1994].

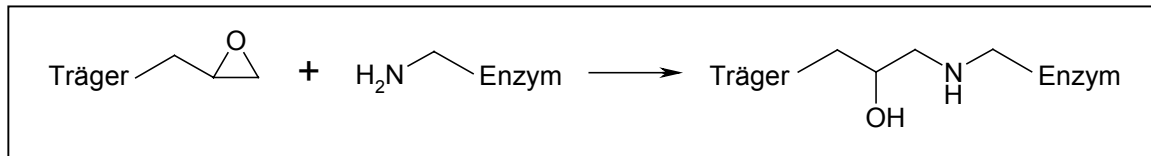


Abbildung 3-1: Reaktionsschema der Enzym-Immobilisierung mittels Oxiran-Methode

3.2 Immobilisierung mittels Carbodiimid-Methode

Da der Anteil von Asparaginsäure- und Glutaminsäureresten an der Oberfläche von Proteinen im allgemeinen verhältnismässig groß ist, stellt eine Immobilisierung über ihre Carboxylgruppen an Trägermaterialien mit primären Aminogruppen eine alternative Kopplungsmethode zur Oxiran-Methode dar. Hierbei erfolgt unter leicht sauren Reaktionsbedingungen (pH 5-6) eine Aktivierung der Carboxylgruppen durch ein Carbodiimid. Allerdings kann die Zugabe von Carbodiimid auch zu einer Abnahme der Enzymaktivität führen, was hauptsächlich auf Modifikationen des Proteins durch überschüssiges Protein zurückgeführt werden kann.

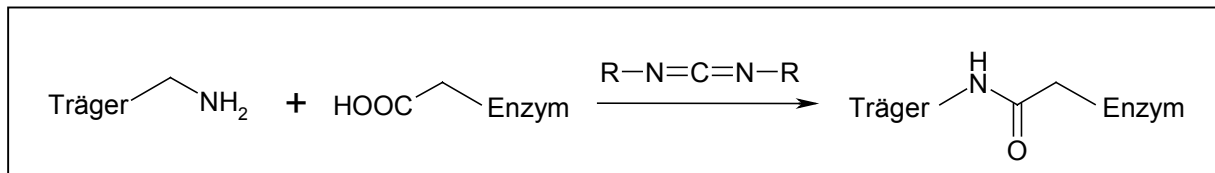


Abbildung 3-2: Reaktionsschema der Enzym-Immobilisierung mittels Carbodiimid-Methode

3.3 Immobilisierung der Wildtyp Hydantoinase und L-N-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747

Die Ergebnisse früherer Arbeiten zeigten, daß die Stabilität der beiden genannten Enzyme durch Immobilisierung deutlich gegenüber den freien Enzymen erhöht werden konnte. Ausgehend von den Wildtyp-Enzymen aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 wurden in dieser Arbeit zunächst adsorptive und kovalente Immobilisierungsmethoden untersucht und miteinander verglichen. Wie bereits in Kapitel 3 zur Immobilisierung beschrieben, liegt der Vorteil einer kovalenten Kopplung gegenüber einer ionischen Wechselwirkung in der Stabilität der Bindung, wohingegen die Adsorption an einen Träger reversibel ist und eine Regeneration des Immobilisates ermöglicht.

Für die Immobilisierung der L-N-Carbamoylase wurden drei unterschiedliche Reaktionsmechanismen und Trägermaterialien gewählt (Veröffentlichung 1):

1. Nukleophiler Angriff durch Hydroxyl-, Thiol- und Aminogruppen des Proteins an epoxid-aktiviertes Trägermaterial (Eupergit C)
2. Ausbildung einer Amidbindung zwischen Aminogruppen des Trägers (EAH Sepharose 4B) und mittels Carbodiimid aktivierten Carboxylgruppen des Proteins
3. Adsorption aufgrund ionischer Wechselwirkungen an Q-Sepharose.

Ein Vergleich der resultierenden Immobilisate ergab in dieser Arbeit in allen drei Fällen eine deutlich Stabilisierung unter Reaktionsbedingungen gegenüber dem freien Enzym. Bei absatzweisen Umsetzungen im Rührkesselreaktor trat für das Eupergit-Immobilisat jedoch ein deutlicher Aktivitätsverlust innerhalb der ersten drei Reaktionszyklen auf. Dieser wurde auf Konformationsänderungen oder auch eine Dissoziation der Enzymuntereinheiten aufgrund abnehmender Salzkonzentration zurückgeführt. Allerdings blieb die Restaktivität über die Dauer der folgenden Umsetzungen erhalten. Im Falle der Immobilisierung mittels Carbodiimid-Methode war der Aktivitätsverlust über die Dauer der Umsetzungen geringer. Parallel zu absatzweisen Umsetzungen erfolgte die Ermittlung der Prozeßstabilität („Operational Stability“) im kontinuierlichen Einsatz in Festbettreaktoren. Dabei ergaben sich die besten Werte für das über eine größere Anzahl an kovalenten Bindungen an Eupergit immobilisierte Enzym.

Die spezifische Aktivität der Immobilisate war für alle drei Immobilisate sehr gering, so daß in weitergehenden Untersuchungen die Immobilisierungsprozeduren hinsichtlich der Ausbeute und der spezifischen Aktivität optimiert werden sollten. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf den bereits beschriebenen kovalenten Kopplungsmethoden, wobei eine Immobilisierung via Epoxid-Gruppen an Eupergit aufgrund der einfachen Durchführung und wegen der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Trägermaterials als Ausgangspunkt gewählt wurde. Für die Hydantoinase konnten bei Verwendung von Eupergit C und C 250 L 20% beziehungsweise 90% der Aktivität gekoppelt werden, wohingegen für die L-N-Carbamoylase lediglich geringe Aktivitätsausbeuten erzielt wurden.

Daher wurde alternativ die Carbodiimid-Methode eingesetzt, deren Vorteil gegenüber der Oxiran-Methode unter anderem in der kürzeren Dauer und den für die Enzyme günstigeren Bedingungen im leicht sauren pH-Bereich liegt. Die hierbei zu variierenden Parameter sind die Proteinkonzentration in der Enzymlösung, die Konzentration von Carbodiimid und die Anzahl der am jeweiligen Träger zur Verfügung stehenden reaktiven Gruppen. Für die Immobilisierung wurden drei unterschiedliche Trägertypen eingesetzt:

- EAH-Sepharose 4B
- modifiziertes Eupergit C (-NH₂) (erhalten durch Aminolyse mit NH₃)
- modifiziertes Eupergit C 250 L (-NH₂) (erhalten durch Aminolyse mit NH₃).

In Vorversuchen wurde zunächst der Einfluß sowohl von unterschiedlichen Carbodiimid- als auch Proteinkonzentrationen auf die Aktivitäten der freien Enzyme untersucht. Hierbei zeigten sich zwei gegenläufige Effekte, nämlich (1) war für die Hydantoinase mit zunehmender Carbodiimid-Konzentration im Bereich von 1 bis 100 mM eine Aktivitätssteigerung zu beobachten während (2) für die L-N-Carbamoylase gleichzeitig eine deutliche Aktivitätsabnahme im selben Konzentrationsbereich verzeichnet werden konnte. Zum anderen nahm die L-N-Carbamoylase-Aktivität mit steigender Proteinkonzentration ab, wohingegen dies keinen Einfluß auf die Hydantoinase hatte. Die Optimierung der Versuchsparameter ermöglichte die Immobilisierung der Hydantoinase an modifiziertes Eupergit C 250 L (-NH₂) nach der Carbodiimid-Methode mit einer Aktivitätsausbeute von 60%. Demgegenüber resultierten alle Versuche zur Kopplung der L-N-Carbamoylase in geringen Ausbeuten.

3.4 Immobilisierung der rekombinanten Hydantoinase und L-N-Carbamoylase

Mit der Bereitstellung der rekombinant in *Escherichia coli* exprimierten Enzyme war es möglich, Hydantoinase und L-N-Carbamoylase getrennt voneinander zu untersuchen [Wilms et al., 1999]. Beide Enzyme konnten über einfache Reinigungsprotokolle in reiner Form erhalten werden [May et al., 1998; Pietzsch et al., 2000].

Zusätzlich zu den bereits zur Immobilisierung der Wildtyp-Enzyme aus *Arthrobacter aureus* eingesetzten Methoden wurden für die gereinigten Enzyme folgende Techniken untersucht:

Wildtyp-L-N-Carbamoylase:

- Reaktion von Trägern nach vorheriger Modifizierung durch Glutaraldehyd bzw. Divinylsulfon mit Amino-, Carboxyl-, Sulfhydryl-, Hydroxyl-Gruppen des Enzyms
- Kopolymerisierung mit Polyethylenimin und Glutaraldehyd

Hexahistidin-Hydantoinase (His₆-tag):

- Spezifische Kopplung über Histidinreste an Metallaffinitätsmatrix

3.4.1 Immobilisierung der L-N-Carbamoylase mittels Glutardialdehyd bzw. Divinylsulfon

Kolarz et al. [1992, 1993] konnten diverse Kopolymere herstellen, die für eine Kopplung nach der Glutaraldehyd-Methode geeignet sind. Dabei hatte das Quellverhalten der untersuchten Acryl-Polymere einen Einfluß auf das Immobilisierungsverhalten von Enzymen [Kolarz et al., 1995]. Bryjak et al. [1993] fanden einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Quervernetzung und Menge bzw. Aktivität des gebundenen Proteins.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die rekombinante L-N-Carbamoylase sowohl an unterschiedlichen Polyacryl-Trägern, die sich in ihren monomeren Bestandteilen, der Menge an Amino- bzw. Carboxylgruppen und der Porosität unterschieden (Tabelle 3-1), als auch an einem Träger auf Cellulose-Basis immobilisiert. Zur Aktivierung der Träger wurden sowohl Glutardialdehyd als auch Divinylsulfon [Pepper, 1992] eingesetzt. Die Reaktionen sind in Abbildung 3-3 und 3-4 schematisch dargestellt.

Die Immobilisierung führte zu großen Aktivitätsverlusten der L-N-Carbamoylase, so daß die Kopplungsausbeute lediglich zwischen 0,2 und 5% lag, wohingegen die Ausbeute für das gekoppelte Protein 6 bis 88% betrug.

Tabelle 3-1: Charakterisierung der für die Immobilisierung mittels Glutaraldehyd und Divinylsulfon verwendeten Trägermaterialien (PENTA – Pentaerithritoltriacrylat, BA – Butylacrylat, TMPMA - Trimethylolpropantrimethacrylat, EDMGA – Ethylenodimethacrylat)

Träger	Monomere	Wassergehalt [g/g]	NH ₂ -Gruppen [mmol/g]	COOH-Gruppen [mmol/g]	Porosität
12	PENTA BA	1,9	2,7	2,0	0,6
28	TMPMA BA	1,7	0,56	1,35	0,63
818	EDMGA BA	1,4	0,67	n. d.	0,39

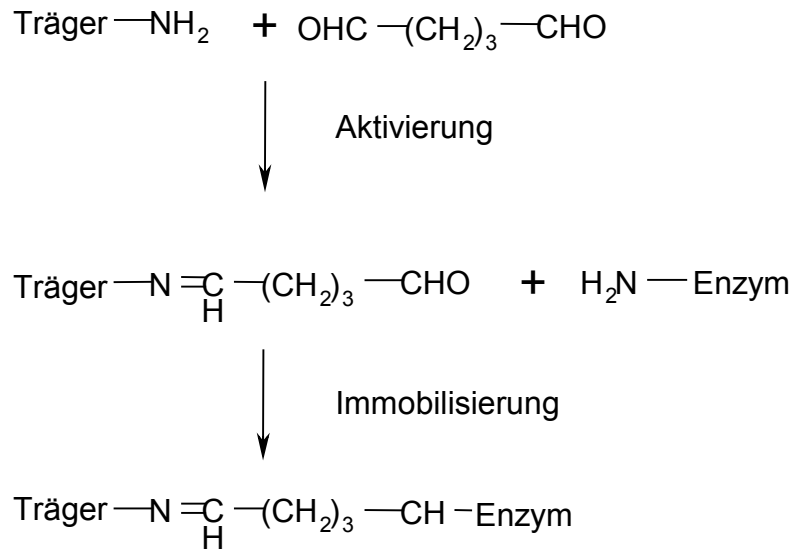


Abbildung 3-3: Aktivierung von Trägern mittels Glutaraldehyd und anschließende Immobilisierung

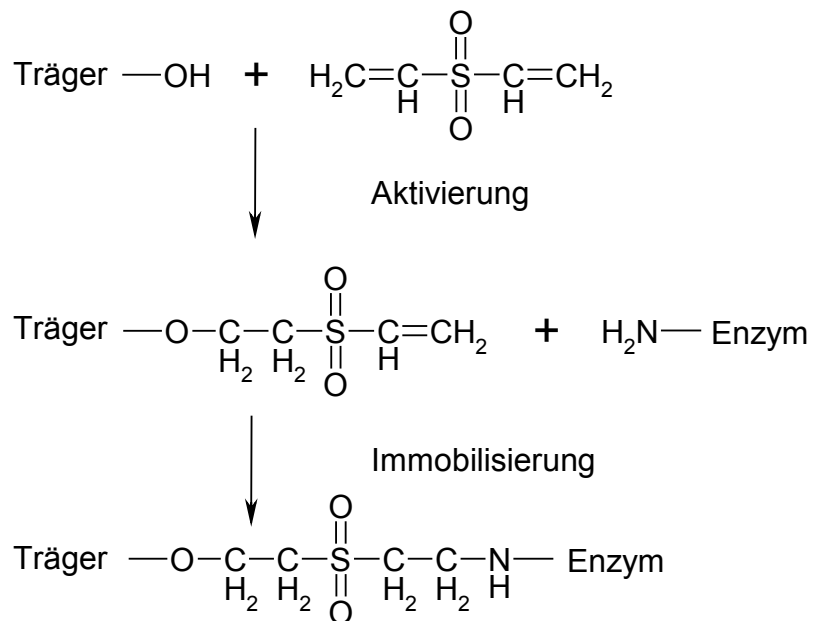


Abbildung 3-4: Aktivierung von Trägern mittels Divinylsulfon und anschließende Immobilisierung

3.4.2 Copolymerisierung

Zur Copolymerisierung der L-N-Carbamoylase wurde Polyethylenimin (PEI) als Polymer und Glutardialdehyd als Quervernetzer eingesetzt. Konsistenz und Volumen des Kopolymerisates waren hierbei von Menge und Verhältnis an Polyethylenimin, Glutardialdehyd bzw. der Proteinkonzentration abhängig. Je höher der Anteil an PEI, desto fester wird das Kopolymerisat, wohingegen die Erhöhung von Glutaraldehyd zu einer Reduzierung des Volumens führt. Es wurden daher bei gleicher Proteinkonzentration PEI und Glutardialdehyd in unterschiedlichen Mengen und Verhältnissen den Reaktionsansätzen zugesetzt (Tabelle 3-1). Als Puffersystem wurde 1 ml 0,1 M Phosphat, pH 7,0 vorgelegt, das mit 1 ml der entsprechenden PEI-Lösung versetzt wurde. Nach Zugabe von 1 ml der Enzymlösung erfolgte die Copolymerisierung mittels entsprechender Glutardialdehyd-Lösung unter Rühren. Sobald keine Farbänderung (Schiff'sche Base) mehr eintrat wurde die Reaktion mit 0,5 M Tris, pH 8 abgestoppt. Zur Ermittlung der Aktivitäten bzw. Stabilitäten wurden Batch-Umsetzungen mit den Kopolymerisaten durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 3-3 aufgeführt sind. Unabhängig von den variierten Versuchsparametern lag die Aktivitätsausbeute unter 1%, so daß diese Methode als ungeeignet für die Immobilisierung der Carbamoylase bewertet wurde.

Tabelle 3-2: Bedingungen für die Copolymerisierung der L-N-Carbamoylase mit PEI

Ansatz	Proteinkonzentration [mg/ml]	Verwendete PEI-Lösung	Verwendete Glutardialdehyd-Lösung
A	2,9	20%	12,5%
B	2,9	20%	5%
C	2,9	6,7%	12,5%
D	2,9	6,7%	5%

Tabelle 3-3: Ergebnisse für die Copolymerisierung der L-N-Carbamoylase mit PEI

Probe	Ausbeute [%]
Copolymer A	0,5
Copolymer B	0,5
Copolymer C	0,7
Copolymer D	0,5

3.4.3 Immobilisierung der L-N-Carbamoylase mittels Carbodiimid

Die Ergebnisse aus den bis dahin durchgeführten Experimenten deuteten darauf hin, daß eine Immobilisierung insbesondere der L-N-Carbamoylase nur mit der Carbodiimid-Methode möglich war. In Vorversuchen war bereits der Einfluß von unterschiedlichen Carbodiimid- und Proteinkonzentrationen auf die Enzymaktivität untersucht worden (siehe Abschnitt 3.3). Allerdings waren diese Versuche mit dem freien Enzym ohne Träger durchgeführt worden, so daß eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse nicht einfach war.

Es wurde daher in weiteren Experimenten mit der rekombinanten L-N-Carbamoylase nochmals der Einfluß der Carbodiimid-Konzentration im Bereich zwischen 1 und 100 mM unter Immobilisierungsbedingungen, d.h. in Anwesenheit von Trägermaterial, untersucht. In Abbildung 3-5 ist die Aktivitätsausbeute in Abhängigkeit von der EDC-Konzentration bei konstanter Proteinkonzentration dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß bis zu einer EDC-Konzentration bis 50 mM die Aktivitätsausbeute am Träger zunimmt. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch von Fernandez-Lafuente et al. [1993] beschrieben und damit erklärt, daß bis zu einer bestimmten Konzentration die Aktivierungskapazität nicht für alle Enzymmoleküle ausreicht, so daß ein Teil des Proteins nur adsorptiv gebunden wird und daher in den an die Immobilisierung anschließenden Waschschritten wieder ausgewaschen wird.

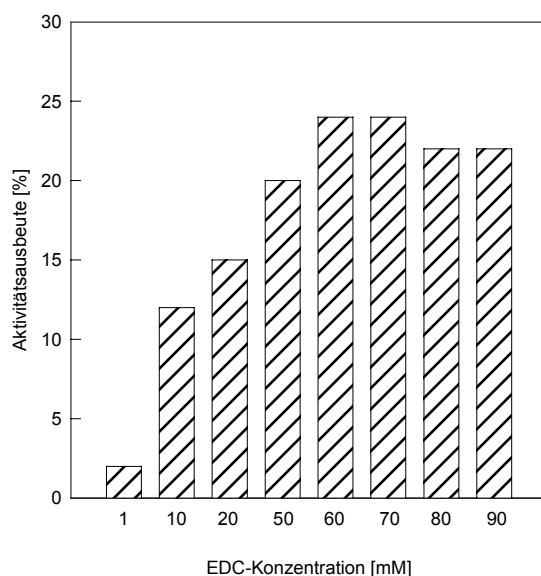


Abbildung 3-5: Einfluß der EDC-Konzentration auf die Aktivitätsausbeute der L-N-Carbamoylase an Eupergit C 250 L (-NH₂)

Die Aktivitätsausbeute am Träger konnte ferner durch Variation des Protein-Träger-Verhältnisses gesteigert werden. Eine systematische Untersuchung dieser Einflußgröße ergab, daß mit steigender Proteinkonzentration die spezifische Aktivität des Immobilisates

zwar erhöht werden konnte, dabei allerdings die Aktivitätsausbeute sank, ohne daß die Bindungskapazität des Trägers überschritten wurde. Ursache hierfür könnte die Bildung von sogenannten „Multilayers“ sein, die ab einer bestimmten Proteinkonzentration zu dem beobachteten Aktivitätsverlust führen könnten (Veröffentlichung 4).

Tabelle 3-4: Einfluß von Trägermaterialien auf die Kopplungsausbeute der L-N-Carbamoylase

Trägermaterial	Aktivitätssausbeute	Kopplungsausbeute
Eupergit C (-NH ₂)	8-18%	99%
Eupergit C 250 L (-NH ₂)	18-54%	98%
Deloxan	13-44%	99%
EAH-Sepharose 4B	80-100%	99%
Eupergit C (Spacer-NH ₂)	34%	79%
Eupergit C 250 L (Spacer-NH ₂)	15%	81%
Fractogel (Spacer-NH ₂)	11%	98%

In Tabelle 3-4 sind die Ergebnisse der Immobilisierung an unterschiedliche Trägermaterialien, die primäre Aminogruppen an ihrer Oberfläche tragen, zusammengefasst. Daraus geht deutlich hervor, daß EAH Sepharose 4B der am besten geeignete Träger ist und damit eine Aktivitätsausbeute von bis zu 100% erzielt werden kann. Die Hypothese, daß für den Erhalt der Aktivität und die hohen Aktivitätsausbeuten in diesem Fall ein „Spacer“ auf der Trägeroberfläche verantwortlich ist, konnte durch die Ergebnisse bei Verwendung von Spacer-modifiziertem Eupergit C, Eupergit C 250 L und Fractogel, einem kommerziell erhältlichen, voraktivierten Träger, nicht bestätigt werden.

Bei Verwendung des modifizierten Eupergit C (-NH₂) und C 250 L (-NH₂) war ebenfalls eine signifikante Steigerung möglich: Für das Wildtyp-Enzym lag die Ausbeute bisher bei etwa 4-8%. Hier konnte eine Erhöhung in Abhängigkeit des verwendeten Trägermaterials auf bis zu 20 bis 50% verzeichnet werden. Da das rekombinante Enzym mit einer höheren spezifischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym vorlag, konnte auch die spezifische Aktivität auf dem Träger erhöht werden.

3.4.4 Immobilisierung der rekombinanten Hexahistidin-Hydantoinase mittels Metallaffinitätschromatographie

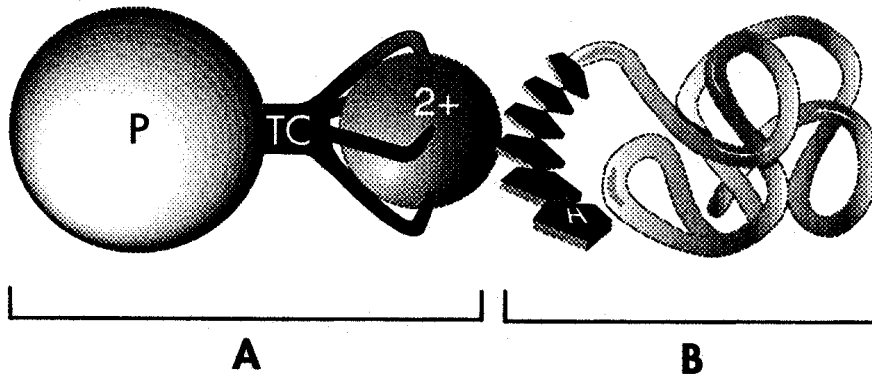


Abbildung 3-6: Schematische Darstellung der Wechselwirkung einer TALON[®] Säule mit den Histidinresten eines rekombinanten Hexahistidin-Proteins

Die Fusion von 6 Histidincodons an das Hydantoinase-Gen sollte wie in Abschnitt 2.4 beschrieben eine einfache Aufreinigung mittels Metallaffinitätschromatographie ermöglichen [Clemnit et al., 2000]. Dieses Prinzip der Wechselwirkung von Träger und Enzym (siehe Abbildung 3-3) sollte darüberhinaus direkt für eine Immobilisierung eingesetzt werden.

Allerdings führte dieses Verfahren zu einem Aktivitätsverlust von über 80% und spezifischen Aktivitäten von lediglich 0,2 U/g_{Träger}.

3.5 Immobilisierung der Hydantoinase in Anwesenheit von Inhibitoren

Ein stabilisierender Effekt von Substraten oder Inhibitoren auf die dreidimensionale Struktur von Proteinen [Blanco, 1988; Alvaro, 1991] und ihr Einsatz als „Schutzschild“ des Enzymmoleküls während des Immobilisierungsprozesses wurde mehrfach beschrieben [Rosell et al., 1995]. Aufgrund früherer Arbeiten gab es Hinweise, daß die Hydantoinase sowohl durch PEG [May, 1995] als auch durch Benzylbernsteinsäurehalbamid (BnBHA; Inhibitionskonstante $K_i=0,35$ mM) [Waniek, 1999] gehemmt wird. Es wurden daher vergleichsweise Standardimmobilisierungen mit und ohne Zugabe dieser Inhibitoren durchgeführt, um den Einfluß auf die Menge an aktiv gebundenem Protein zu untersuchen. In Abbildung 3-5 sind die Versuchsergebnisse graphisch dargestellt.

Der Zusatz von PEG führte gegenüber dem Kontrollansatz ohne PEG zu geringeren Aktivitätsausbeuten, was möglicherweise auf eine Denaturierung durch das Detergens zurückzuführen ist. Demgegenüber hatte die Anwesenheit von Benzylbernsteinsäurehalbamid während der Immobilisierung einen leicht positiven Effekt auf die Menge an aktiv gekoppeltem Enzym.

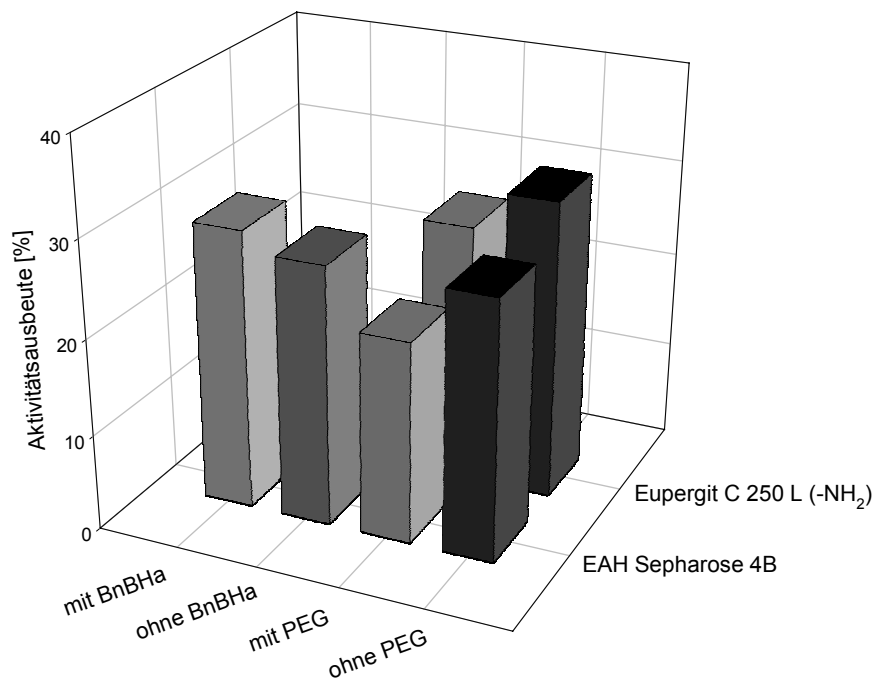


Abbildung 3-7: Immobilisierung der Hydantoinase in Anwesenheit von verschiedenen Inhibitoren (10% PEG bzw. 1,3 mg/ml BnBHA) – Einfluß auf die Aktivitätsausbeute

3.6 Bewertung der Immobilisierung – Charakterisierung der Immobilisate

Zur Beurteilung der Güte der Immobilisierung dienten zunächst die Parameter Aktivitätsausbeute, d.h. die Menge an aktiv am Träger gebundenem Protein in Relation zur Ausgangsaktivität, und spezifische Aktivität des Immobilisates. Für die Prozeßtauglichkeit ist die Prozeßstabilität, d.h. die Stabilität des Immobilisates unter Reaktionsbedingungen, von großer Bedeutung. Eine erhöhte Stabilität reduziert nicht nur die durch das Enzym verursachten Prozeßkosten, sondern auch die Betriebskosten. Die Prozeßstabilität wird in der Regel als Halbwertszeit, d.h. die Zeit, innerhalb derer ein Aktivitätsverlust von 50% der Ausgangsaktivität auftritt, ausgedrückt [Brodelius, 1978]. Diese wurde in dieser Arbeit sowohl im Rührkesselreaktor als auch im Festbettreaktor im kontinuierlichen Betrieb ermittelt (siehe Veröffentli-

chung 4). Hierbei ergaben sich für beide Reaktortypen Werte von etwa 1000 h für die L-N-Carbamoylase und 14000 h für die Hydantoinase. Die immobilisierte Hydantoinase erwies sich dabei selbst in einem ungepufferten System als stabil.

Sobald das Immobilisat nur zeitweise eingesetzt oder über einen längeren Zeitraum nicht benötigt wird, ist die Lagerstabilität von Bedeutung. Im Falle einer guten Lagerstabilität können nämlich große Chargen an immobilisierten Enzym hergestellt und so die Produktionskosten gesenkt werden. Für die immobilisierte Hydantoinase ergaben sich bei Lagerung bei 4°C in Mangan-haltigem Puffer über einen Zeitraum von bis zu 3 Monaten keine Aktivitätsverluste (siehe 3.6.1). Die Aktivität der immobilisierten L-N-Carbamoylase, sowohl lyophilisiert als auch nicht, erwies sich bei Lagerung bei 4°C und bei 20°C über einen Zeitraum von 180 bis zu 850 h als stabil. Lagerung bei Raumtemperatur führte bereits nach 10 h zu einem Aktivitätsverlust von 10% nach 180 h von 60%.

3.6.1 Einfluss von $MnCl_2$ auf die Hydantoinase-Aktivität

Die Metallabhängigkeit der Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 ist in der Literatur detailliert beschrieben [May et al., 1998]. Eine durch Metallchelatoren hervorgerufene Inaktivierung des Enzyms begleitet von einer Dissoziation in dessen Untereinheiten kann durch die Zugabe von Kobalt-, Mangan- oder Zink-Ionen rückgängig gemacht werden. Dieser positive Einfluß einiger zweiwertiger Metallionen auf die Stabilität und Aktivität der Hydantoinase sollte in dieser Arbeit für das immobilisierte Enzym untersucht werden. Daher wurden verschiedene Immobilisate über einen längeren Zeitraum in manganhaltigem Puffer gelagert. Als Referenz dienten die entsprechenden Ansätze ohne Mangan.

Aus Abbildung 3-8 ist ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität in den Ansätzen mit Manganchlorid gegenüber den Referenzen zu erkennen. Allerdings ist dieser Effekt bei den Immobilisaten, die nach der Carbodiimid-Methode hergestellt wurden, stärker als bei denen, die mittels der Oxiran-Methode gekoppelt wurden. Dieser Effekt könnte auf die für die beiden Methoden unterschiedlichen an der Kopplungsreaktion beteiligten Gruppen bzw. Regionen zurückzuführen sein. Falls die an der Kopplungsreaktion beteiligte Region auch die ist, die mit dem Mangan wechselwirkt, wäre es denkbar, dass die Zugänglichkeit für Mangan erschwert ist und es so zu einer geringeren Aktivitätssteigerung kommt.

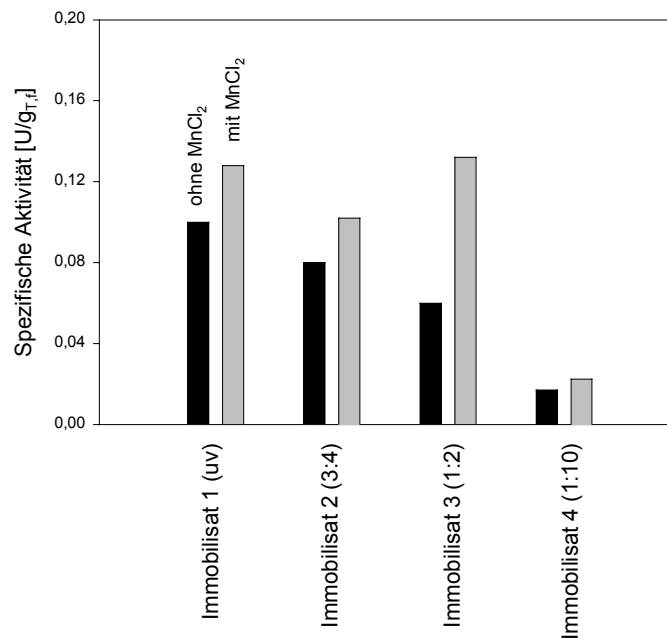
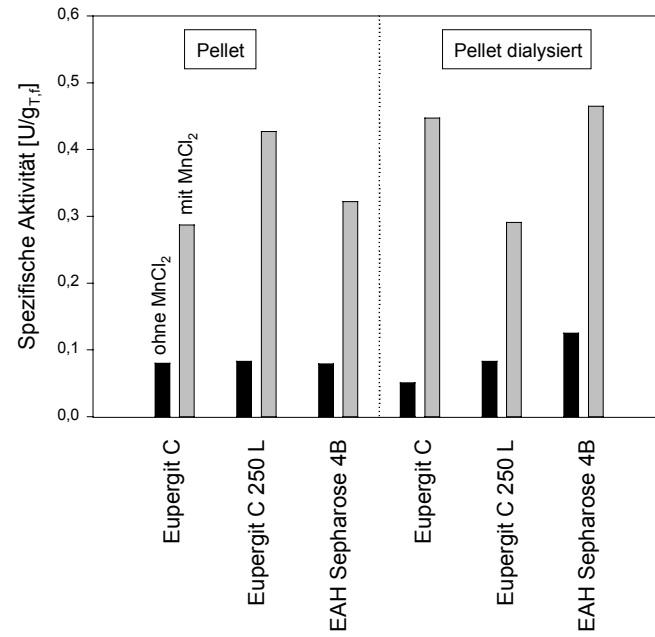


Abbildung 3-8: Einfluss von Manganchlorid auf die Hydantoinase; links: immobilisiert mit Carbodiimid-Methode; rechts: immobilisiert nach Oxiran-Methode

4 Einsatz von Lösungsvermittlern zur Erhöhung der Substratlöslichkeit

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt des Hydantoinaseverfahrens ist die schlechte Löslichkeit vieler Hydantoin-Substrate, wodurch die Enzyme nicht unter Substratsättigung und damit nicht mit maximaler Reaktionsgeschwindigkeit arbeiten können. Der Einsatz von Lösungsvermittlern sollte daher die absolut gelöste Menge Substrat erhöhen und somit zu einer erhöhten Aktivität des Immobilisates führen. Allerdings ist dabei eine Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität durch die verwendeten Substanzen möglich.

Es wurden in dieser Arbeit verschiedene Polymere und Polymerlösungen im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Erhöhung der Löslichkeit des Modellsubstrates Indolylmethylhydantoin (IMH) und ihren Einfluß auf die Hydantoinaseaktivität untersucht (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Einfluß von Lösungsvermittlern auf die Hydantoinase-Aktivität

Polymer	Max. Löslichkeit (IMH) [g/l]	Substratkonz. Aktivitätstest (IMH) [g/l]	Spez. Aktivität [U/g _{Träger}]	Relative Aktivität [%]
Standardtest	0,4	0,4	0,34	100
90% Tween 80	30	0,4	0	0
90% Tween 80	30	30	0	0
10 % Brij 35	4,0	0,4	0,16	47
10 % Brij 35	4,0	4,0	0,71	209
1% Serdox	n.b.	0,4	0,35	103
33% Serdox	12,0	12,0	0,77	226
13% P 1,2-B-G-allylether	2,5	0,4	0,15	44
13% P 1,2-B-G-allylether	2,5	2,5	0,74	218
Standardtest	0,4	0,4	0,21	100
Dex 10 PPO	1,5	0,4	0,34	162
Dex 10 PPO	1,5	1,5	0,86	410
Dex 70 PPO	1,3	0,4	0,43	205
Dex 70 PPO	1,3	1,3	0,68	324

Aus Tabelle 4-1 wird ersichtlich, daß alle untersuchten Polymerlösungen eine Erhöhung der Löslichkeit des Modellsubstrates IMH bewirkten. Die höchsten Werte mit 30 g/l konnten beim Einsatz von Tween 80 in einer Konzentration von 90% erzielt werden, allerdings auf Kosten der Aktivität des Immobilisates. In diesem Fall hatte die hohe Konzentration des Detergens vermutlich eine Denaturierung des Enzyms zu Folge. Allerdings wurden andere Konzentrationen nicht untersucht, was jedoch von Interesse sein könnte. Alle weiteren Polymere ermöglichten eine Löslichkeit des IMH zwischen 1,3 und 12 g/l. Allerdings erreichte die Enzymaktivität unabhängig von der Substratkonzentration und dem Lösungsvermittler maximal einen Wert von etwa 0,7 - 0,8 U/g_{Träger}.

5 Schlußwort und Ausblick

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, erfolgten die Arbeiten zur Immobilisierung der beiden Enzyme Hydantoinase und Carbamoylase im Rahmen eines Projekts, dessen Ziel die Entwicklung eines Prozesses zur Synthese enantiomerenreiner Aminosäuren ist. Durch Optimierung verschiedener Versuchsparameter konnte ein scale-up-fähiges Verfahren, einschließlich der Aufreinigung, etabliert werden, das zu einer Stabilisierung der beiden Enzyme gegenüber den freien führt.

Die verfahrenstechnische Seite der Prozeßentwicklung [Teves, 2000] soll die reaktionstechnische Untersuchung der Enzyme, die Auswahl und detaillierte mathematische Beschreibung geeigneter Reaktoren und den Betrieb des Prozesses in einer Miniplant umfassen. Dabei beinhaltet die reaktionstechnische Untersuchung neben den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Größen wie Temperatur- und pH-Optimum insbesondere eine kinetische Modellierung der immobilisierten Enzyme. Vorab muß dazu die Frage geklärt werden, ob die beobachteten Umsetzungen diffusions- oder reaktionskontrolliert sind. Der nächste Schritt besteht in der Formulierung eines kinetischen Modells und der Identifizierung der kinetischen Parameter mit Hilfe experimentell bestimmter Konzentrations-Zeit-Verläufe. Auf Grundlage dieser Analyse können Prozeßparameter wie Temperatur und pH-Wert, die Anzahl und der Typ der Reaktoren (Rührkessel, Festbettreaktor) und die optimale Konzentrationsführung unter Berücksichtigung eventuell bestehender Inaktivierungen oder Inhibierungen festgelegt werden. Außerdem bildet sie einen Teil des Gesamtmodells, das eine Simulation des vollständigen Prozesses ermöglichen soll.

6 Gesamtliteraturverzeichnis

Alvaro, G., Fernandez-Lafuente, R., Blanco, R. M., Guisan, J. M. (1991) Stabilising effect of penicillin G sulfoxide, a competitive inhibitor of penicillin G acylase: its practical applications. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 210-214.

Blanco, R. M., Guisan, J. M. (1988) Protecting effect of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme/activated support multipoint attachments: trypsin (amine)-agarose (aldehyde) system. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 227-232.

Bommarius, A. S. (1996) Biotransformations and Enzyme Reactors, in: *Biotechnology* (Rehm, H.-J. and Reed, G., eds.), 430-467, VCH, Weinheim.

Bommarius, A. S., Drauz, K., Groeger, U. and Wandrey, C. (1992) Membrane bioreactors for the production of enantiomerically pure alpha-amino acids, in: *Chirality in Industry: The commercial manufacture and application of optically active compounds* (Collins, A. N., Shel-drake, G. N. and Crosby, J., eds.), 372-395, John Wiley & Sons Ltd., New York.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brodelius, P. (1978) Industrial applications of immobilized biocatalysts, in: *Advances in Biochemical Engineering*, vol. 10 (Ghose, T. K., Fiechter, A., Blakebrough, N., eds.), 76-124, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Bryjak, J., Trochimczuk, A. and Noworyta, A. (1993) Effect of polymer matrix on penicillin acylase immobilization on copolymers of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57, 73-78.

Bryjak, J. (1995) Storage stabilization of enzyme activity by poly(ethyleneimine). *Bioproc. Eng.* 13, 177-181.

Bryjak, J. and Noworyta, A. (1994) Storage stabilization and purification of enzyme by water-soluble synthetic polymers. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 616-621.

Bucherer, H. T. and Lieb, V. A. (1934) Über die Bildung substituierter Hydantoine aus Aldehyden und Ketonen. J. Prak. Chem. 141, 5-37.

Buchholz, K., Klein, J. (1987) Characterization of immobilized biocatalysts, in: Methods in Enzymology 135 (S.P. Colowick, N. O. Kaplan, K. Mosbach, eds.), 3-29, Academic Press. Inc., New York.

Bunge, F., Pietzsch, M., Müller, R. and Syldatk, C. (1992) Mechanical disruption of *Arthrobacter* sp. DSM 3747 in stirred ball mills for the release of hydantoin-cleaving enzymes. Chem. Eng. Sci. 47, 225-232.

Calton, J. C. (1992) The enzymatic production of L-aspartic acid, in: Biocatalytic production of Amino Acids and Derivatives (Rozell, J. D. and Wagner, F., eds.), 3-21, Hanser Publishers, New York.

Chevalier, P., Roy, D. and Morin, A. (1989) Hydantoinase activity of immobilized non-growing *Pseudomonas putida* cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 482-486.

Clemmitt, R. H. and Chase, H. A. (2000) Facilitated downstream processing of a histidine-tagged protein from unclarified *E. coli* homogenates using immobilized metal affinity expanded-bed adsorption. Biotechnol Bioeng. 67, 206-216.

Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (1976) Methods in Enzymology, 44, Immobilized Enzymes (Mosbach, K., ed.), Academic Press, New York, San Francisco, London.

Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (1987) Methods in Enzymology, 135, Immobilized Enzymes and Cells (Mosbach, K., ed.), Academic Press Inc.

Cooper, T.G. (1980) Biochemische Arbeitsmethoden. De Gruyter, Berlin, New York.

Cotoras, D. (1985) Mikrobielle, enantioselektive Hydrolyse von D,L-5-substituierten Hydantoinen und N-Carbamoyl-D,L-Aminosäuren. Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig.

Crump, S. P. and Rozzell, J. D. (1992) Biocatalytic production of amino acids by transamination, in Biocatalytic production of amino acids and derivatives (Rozzell, J. D. and Wagner, F., eds.), 43-58, Hanser Publishers, New York.

Dinelli, D., Marconi, W., Cecere, F., Galli, G. and Morisi, F. (1978) A new method for the production of optically active amino acids, in: Enzyme Engineering 3 (Pye, E. K. and Weetall, H. H., eds.), 477-481, Plenum, New York.

Dombach, G. (1989) Isolierung und Charakterisierung einer Hydantoinase aus *Arthrobacter spec.* DSM 3747. Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig.

Drauz, K. (1997) Chiral amino acids: A versatile tool in the synthesis of pharmaceuticals and fine chemicals. *Chimia* 51, 310-314.

Enzyme engineering. Immobilized Biosystems (Gmeiner, P., ed.), Ellis Horwood.

Erck, C. (1993) Enzymatische und immunologische Untersuchungen einer L-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. Diplomarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig.

Esaki, N., Nakamori, S., Kurihara, T., Furuyoshi, S., Soda, K. (1996) Enzymology of amino acid production, in: *Biotechnology*, 6 (Rehm, H. J. and Reed, G., eds.), 503-560, VCH-Verlag, Weinheim.

Fágáin, C. O. (1997) Immobilization, in: *Stabilizing Protein Function*, Springer-Verlag and Landes Bioscience.

Faurie, W. R., Willke, B. (1999) Biotechnological manufacture of L-tryptophan in industrial scale, in: *DECHEMA Jahrestagungen 1999-1, Kurzfassungen* (Kreysa, G. and Nick, L., eds.), pp. 283-286, DECHEMA, Frankfurt.

Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A. and Guisan, J. M. (1993) Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 546-550.

Flores-Gallardo, H. and Pollard, C. B. (1947) Epoxy ethers and ether amino alcohols. *J. Org. Chem.* 12, 831-833.

Groß, C., Syldatk, C. and Wagner, F. (1987) Screening method for microorganisms producing L-amino acids from D,L-5-monosubstituted hydantoins. *Biotechnol. Techniques* 1, 85-90.

Guidelines for the characterization of immobilized biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 304-307.

Halling, P. J. and Dunhill, P. (1979) Improved nonporous magnetic supports for immobilized enzymes. *Biotech. Bioeng.* 21, 393-416.

Hernaiz, M. J., Crout, D. H. G. (2000) Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *Bacillus circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 26-32.

Hils, M. (1995) Untersuchungen zur Reindarstellung der an der Hydantoinspaltung beteiligten Enzyme aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3745 für die Prozeßentwicklung mit immobilisierten Biokatalysatoren. Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart.

Höke, H. (1992) Production of non-proteinogenic L-amino acids by microbial enantioselective hydrolysis of D,L-monosubstituted hydantoins, in: *Chiral 92 (Manchester)*, Conference proceedings, 57-61.

Höke, H., Höltnann, W., Wagner, F., Cotoras, D., Syldatk, C., Dombach, G., Groß, C. and Wagner, T. (1988) Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-alpha-Aminosäuren. Deutsches Patent 3712539 A1, Rütgerswerke AG.

Hoppe, B., Martens, J. (1984) Aminosäuren – Herstellung und Gewinnung. *Chemie in unserer Zeit* 18, 73-86.

Ishikawa, T., Watabe, K., Mukohara, Y., Kobayashi, S. and Nakamura, H. (1993) Microbial conversion of D,L-5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids by *Pseudomonas sp.* strain NS671. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 982-986.

Ishikawa, T., Watabe, K., Mukohara, Y., Kobayashi, S. and Nakamura, H. (1994) Microbial conversion of D,L-5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids by *Bacillus stearothermophilus* NS1122A. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 265-270.

Ishikawa, T., Watabe, K., Mukohara, Y. and Nakamura, H. (1996) N-Carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase of *Pseudomonas sp.* strain NS671: Purification and some properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 612-615.

Ishikawa, T., Watabe, K., Mukohara, Y. and Nakamura, H. (1997) Mechanism of stereospecific conversion of D,L-5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids by *Pseudomonas sp.* strain NS671. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 185-187.

Kamphius, J., Meijer, E. M., Boesten, W. H. L., Broxterman, Q. B., Kaptein, B., Hermes, H. F. M. and Schoemaker, H. E. (1992) Production of natural and synthetic L- and D-amino acids by aminopeptidases and amino amidases, in biocatalytic production of amino acids and derivatives (Rozell, J. D. and Wagner, F., eds.), 177-206, Hanser Publishers, New York.

Katchalski-Katzir, E. (1993) Immobilized enzymes learning from past successes and failures. *Tibtech* 11, 471-478.

Kennedy, J. F. and Cabral, J. M. S. (1987) Enzyme immobilization, in: *Biotechnology*, 7a (Rehm, H. J. and Reed, G., eds.), VCH Verlag, Weinheim.

Kennedy, J. F., White, C. A. (1985) Principles of immobilization of enzymes, in: *Handbook of Enzyme Biotechnology* (Wiseman, A., ed.), 2nd ed., 147-207, New York.

Klages, U., Weber, A. and Wilschowitz, L. (1988) Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren. Deutsches Patent 3702384 A1, Schering AG.

Kobayashi, M., Yanagihara, S., Kitae, T. and Ichishima, E. (1989) Use of water-soluble carbodiimide (EDC) for immobilization of EDC-sensitive dextranase. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2211-2216.

Kolarz, B. N., Trochimczuk, A., Bryjak, J., Wojaczynska, M., Dziegielewski, K. and Noworyta, A. (1990) A search for optimal acrylic carriers for immobilization of penicillin acylase. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 179: 173-183.

Kolarz, B. N., Wojaczynska, M., Bryjak, J., Lobarzewski, J., Pawlow, B. (1995) Influence of pentaerythritol triacrylate acrylic carrier swelling on immobilization of enzymes. *J. Appl. Polymer Sci.* 58, 1317-1323.

Kolarz, B.N., Trochimczuk, A., Wojaczynska, M., Lesienne, J., Lobarzewski, J., Gorbunov, A. A., Bryjak, J. (1992) Synthesis and properties of acrylic carriers from acrylonitrile, vinyl acetate and divinylbenzene terpolymers. *Reactive Polymers* 17, 51-59.

Kolarz, B.N., Wojaczynska, M., Bryjak, J., Lobarzewski, J. (1993) Synthesis and properties of porous carriers from acrylonitrile and trimethylolpropane triacrylate. *Macromolecular Reports A30*, 201-209.

Kölle, R. (1991) Aufreinigung und vergleichende Charakterisierung zweier L-Hydantoinasen aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 und DSM 3747. Diplomarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig.

Lee, D.-C., Lee, S.-G., Kim, H.-S. (1996) Production of D-p-hydroxyphenylglycine from D,L-5-(4-hydroxyphenyl)hydantoin using immobilized thermostable D-hydantoinase from *Bacillus stearothermophilus* SD-1. *Enzyme Microb. Technol.* 18, 35-40.

Lee, P. M. (1993) Covalent immobilization of aminoacylase to alginate for L-phenylalanine production. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 58, 65-70.

Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids – Technical production and use, in: *Biotechnology*, 6 (Rehm, H. J. and Reed, G., eds.), 466-502, VCH-Verlag, Weinheim.

Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. (2000) Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 509-515.

May, O. (1995) Immobilisierung und Charakterisierung einer L-Hydantoinase und einer L-N-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens*. Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart.

May, O., Siemann, M., Pietzsch, M., Kiess, M., Mattes, R., Syldatk, C. (1998) Substrate-dependent enantioselectivity of a novel hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745: Purification and characterization as a new member of cyclic amidases. J. Biotechnol. 26, 61 (1), 1-13.

May, O., Siemann, M., and Syldatk, C. (1998) Catalytic and structural function of zinc for the hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745. J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 4, 211-218.

Miyoshi, T., Kitagawa, H., Kato, M. and Chiba, S. (1985) Process for production of L-amino acids. Eurpäisches Patent 0159866, DENKI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI.

Monsan, P., Combes, D. (1988) Enzyme stabilization by immobilization, in: Methods in Enzymology 137 (S.P. Colowick, N. O. Kaplan, K. Mosbach, eds.), 584-598, Academic Press. Inc., New York.

Müller, R. (1987) Anreicherung und Charakterisierung einer L-N-Carbamoylase. Diplomarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig.

Nanba, H., Ikenaka, Y., Yamada, Y., Yajima, K., Takano, M., Ohkubo, K., Hiraishi, Y., Yamada, K., and Takahashi, S. (1999) Immobilization of thermotolerant *N*-carbamyI-D-amino acid amidohydrolase. J. Molec. Catal. B: Enzymatic 6, 257-263.

Nishida, Y., Nakamichi, K., Nabe, K. and Tosa, T. (1987) Enzymatic production of L-tryptophan from D,L-5-indolylmethylhydantoin by *Flavobacterium* sp.. Enzyme Microb. Technol. 9, 721-725.

Nöthe, C., Millies, M., Mewes, D., Syldatk, C., Wagner, F. (1993) Kontinuierliche Umwandlung von 5-monosubstituierten Hydantoinen in einem Zell-Membran-Reaktor und Abtrennung der Reaktionsprodukte durch Elektrodialyse. Chem.-Ing.-Tech. 65, 1224-1228.

Oberreuter, H. (1995) Immobilisierung und Charakterisierung einer L-N-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747. Studienarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart.

Pepper, D. S. (1992) Some alternative coupling chemistries for affinity chromatography. In: *Methods in Molecular Biology* 11 (Kenney, A., Fowell, S., eds.), 173-196, The Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Pietzsch, M., Oberreuter, H., Petrovska, B., Ragnitz, K., and Syldatk, C. (1998). Immobilization of hydantoin cleaving enzymes from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 - Effect of the coupling method on the stability of the L-N-carbamoylase. In: *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (Ballesteros, A., Plou, F. J., Iborra, J. L., and Halling, P., eds.), Elsevier Science, Amsterdam, 517-522.

Pietzsch, M., Wiese, A., Ragnitz, K., Wilms, B., Altenbuchner, J., Mattes, R., and Syldatk, C. (2000) Purification of recombinant hydantoinase and L-N-carbamoylase from *Arthrobacter aurescens* expressed in *Escherichia coli*: Comparison of wild-type and genetically modified proteins. *J. Chromatogr. B* 737, 179-186.

Plainer, H. and Sprössler, B. G. (1987) Einfluß von Diffusionsphänomenen bei der technischen Verwendung von immobilisierten Enzymen. *Forum Mikrobiologie* 5, 161-164.

Rauls, D. O. and Baker, J. K. (1978) Relationship of nonspecific antiarrhythmic and negative inotropic activity with physicochemical parameters of propranolol analogues. *J. Med. Chem.* 22, 81-86.

Röhm (1994) Literaturliste Eupergit®

Rosell, C. M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. (1995) Modification of enzyme properties by the use of inhibitors during their stabilisation by multipoint covalent attachment. *Bio-cat. Biotrans.* 12, 67-76.

Sano, K., Yokozeki, K., Eguchi, C., Kagawa, T., Noda, I. and Mitsugi, K. (1977) Enzymatic production of L-tryptophan from L- and D,L-5-indolylmethylhydantoin by newly isolated bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 41, 819-825.

Schaich, D. (1995) Enzymatische Produktion enantiomerenreiner Aminosäuren durch stereoselektive Hydantoinspaltung. Studienarbeit, Universität Stuttgart, Stuttgart.

Schmidt-Kastner, G. and Egerer, P. (1984) Amino Acids and Peptides, in: Biotransformations, Biotechnology (Kieslich, K., Rehm, H. J., Reed, G., eds.), 387-419, Verlag Chemie, Weinheim.

Scopes, R. K. (1987) Protein Purification, 2nd edition, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

Siemann, M. (1992) Molekular- und immunologische Untersuchungen zum L-selektiven Abbau von Hydantoinen bei *Arthrobacter sp.* DSM 3745 und DSM 3747. Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig.

Siemann, M., Syldatk, C., and Wagner, F. (1993) Detection and comparison of strains with selective L-hydantoin cleaving activity using polyclonal antibodies. Biotechnol. Tech. 7, 361-366.

Soda, K., Tanaka, H. and Esaki, N. (1983) Amino acids, in: Biotechnology, 3 (Rehm, H. J. and Reed, G., eds.), 479-530, Verlag Chemie, Weinheim.

Soderquist, M. E., and Walton, A. G. (1980) Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces. J. Colloid Interface Sci. 75, 386-397.

Stinson, S. C. (1992) Chem. Eng. News, 46-79.

Syldatk, C., Müller, R., Siemann, M., and Wagner, F. (1992) Microbial and enzymatic production of D-amino acids from D,L-monosubstituted hydantoins. In: *Biocatalytic Production of Amino Acids & Derivatives* (Rozzell, D., and Wagner, F., eds.), Hanser Publishers, München, 75-128.

Syldatk, C. and Pietzsch, M. (1995) Hydrolysis and formation of hydantoins (Kapitel B 2.4), in: Enzyme catalysis in organic synthesis (Drauz, K. and Waldmann, H., eds.), 409-431, VCH-Verlag, Weinheim.

Syldatk, C., Cotoras, D., Dombach, G., Groß, C., Kallwaß, H. and Wagner, F. (1987) Substrate- and stereospecificity, induction and metal dependence of a microbial hydantoinase. Biotechnol. Lett. 9,25-30.

Syldatk, C., Mackowiak, V., Hoeke, H., Gross, C., Dombach, G. and Wagner, F. (1990) Cell growth and enzyme synthesis of a mutant of *Arthrobacter sp.* (DSM 3747) used for the production of L-amino acids from D,L-5-monosubstituted hydantoins. *J. Biotechnol.* 14, 345-362.

Syldatk, C., May, O., Altenbuchner, J., Mattes, R., Siemann, M. (1999) Microbial hydantoinases – industrial enzymes from the origin of life? *Appl. Microb. Biotechnol.* 51, 293-309.

Syldatk, C., Müller, R., Pietzsch, M. and Wagner, F. (1992b) Microbial and enzymatic production of L-amino acids from D,L-5-monosubstituted hydantoins, in: *Biocatalytic Production of Amino Acids and Derivatives* (Rozell, J. D. and Wagner, F., eds.), 131-176, Hanser Publishers, New York.

Takahashi, S., Ohashi, T., Kii, Y., Kumagai, H., and Yamada, H. (1979) Microbial Transformation of Hydantoins to N-Carbamyl-D-Amino Acids. *J. Ferment. Technol.* 57, 328-332.

Terentev, A. P., Volodina, M. A., Volodkin, A. A. (1963) Aminopropanediol derivatives III. Reaction of bis-2,3-epoxypropoxybenzene with ethylenediamine and with 1,6-hexandiamine. *J. Gen. Chem. USSR* 33, 3653-3654.

Teves, H. (2000), Dissertation, Universität Stuttgart, Stuttgart, in Vorbereitung.

Tischer, W., Giesecke, K., Lang, G., Röder, A., Wedekind, F. (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 672, 502-509

Tischer, W. (1995) Immobilization of enzymes. In: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Drauz, K., and Waldmann, H., eds.), VCH-Verlag, Weinheim, 73-87.

Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. and Chibata, I. (1967) Studies on continuous enzyme reaction. IV. Preparation of a DEAE-Sephadex-aminoacylase column and continuous optical resolution of acyl-D,L-amino acids. *Biotechnol. Bioeng.* 9, 603-615.

Verhoeven, M. et al (1994) Europäisches Patent EP 0 608 095 A1.

Völkel, D. (1993) Produktion von L-Methionin mit neuen Mikroorganismen nach dem Hydantoinase-Verfahren und Aufklärung des enzymatischen Mechanismus. Dissertation, TU Braunschweig, Braunschweig.

Völkel, D. and Wagner, F. (1995) Reaction mechanism for the conversion of 5-monosubstituted hydantoins to enantiomerically pure L-amino acids. *Ann. NY. Acad. Sci.* 750, 1-9.

Wagner, T., Hantke, B., Wagner, F. (1996) Production of L-methionine from D,L-5-(2-methylthioethyl)hydantoin by resting cells of a new mutant strain of *Arthrobacter aurescens* DSM 7330. *J. Biotechnol.* 46, 63-68.

Waniek, T. (1999) Untersuchungen zur Substratspezifität und Enantioselektivität mikrobieller Hydantoinasen, Dissertation, Universität Stuttgart, Stuttgart.

Wehtje, E., Adlerkreutz, P., Mattiasson, B. (1993) Improved activity retention of enzymes deposited on solid supports. *Biotech. Bioeng.* 41, 171-178.

Wiese, A. (2000) Molekulargenetische und funktionelle Charakterisierung des Hydantoin-Operons aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747, Dissertation, Universität Stuttgart, Stuttgart.

Williams, R. M. (1989) Synthesis of optically active α -amino acids. (Baldwin, J. E., ed.) Pergamon Press, Oxford.

Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Sylatak, C., Mattes, R., Siemann, M., and Altenbuchner, J. (2000) High cell density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *E. coli* rhaBAD-promoter. *Enzyme Microb. Technol.*, accepted.

Wilms, B., Wiese, A., Sylatak, C., Mattes, R., Altenbuchner, J., Pietzsch, M. (1999) Cloning, nucleotide sequence and expression of a new L-N-carbamoylase gene from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 in *E. coli*. *J. Biotechnol.* 68, 101-113.

Wohlfahrt, G., Müller, R. and Sylatak, C. (1992) Immobilization of hydantoin cleaving enzymes, in: DECHEMA Biotechnology Conferences 5, 45-48.

Xu, Z., de Windt, F. E., van der Drift, C. (1995) Purification and Characterization of Allantoate Amidohydrolase from *Bacillus fastidiosus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 324 (1), 99-104.

Yagasaki, M., and Ozaki, A. (1998) Industrial biotransformation for the production of D-amino acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4, 1-11.

Yamada, H. and Shimizu, S. (1988) Mikrobielle Verfahren zur Produktion biologisch und chemisch wertvoller Verbindungen. *Angew. Chem.* 100, 640-661.

Yongli, C., Xiufang, Z., Yandao, G., Nanming, Z., Tingying, Z., and Xinqi, S. (1999) Conformational changes of fibrinogen adsorption onto hydroxyapatite and titanium nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 214, 38-45.

Zemanova, I., Turkova, J., Capka, M., Nakhapetyan, L. A., Svec, F., Kalal, J. (1981) Effect of the nature of proteins on their coupling to different epoxide-containing supports. *Enzyme Microb. Technol.* 3, 229-232.

Publikation I

Markus Pietzsch, Helene Oberreuter, Blagica Petrovska, Kerstin Ragnitz and Christoph Syldatk (1998) Immobilization of A L-N-Carbamoylase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 - Effect of The Coupling Method on the Stability of the Biocatalyst. In: Stability and Stabilization of Biocatalysts, Elsevier Science.

**Immobilization of A L-N-Carbamoylase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747
- Effect of The Coupling Method on the Stability of the Biocatalyst**

Markus Pietzsch, Helene Oberreuter, Blagica Petrovska, Kerstin Ragnitz and Christoph Syldatk

Institute of Biochemical Engineering, University of Stuttgart, Allmandring 31, D-70569 Stuttgart, Germany

Dedicated in memory to Fritz Wagner

Summary

Different coupling methods were tested for the immobilization of the N-carbamoyl-L-aminoacid amidohydrolase (L-N-carbamoylase) partially purified from *Arthrobacter aureescens* DSM 3747. The operational stability of the immobilized biocatalyst was measured using both consecutive batch reactions and continuously operated fixed bed reactors. The stability of the free L-N-Carbamoylase was investigated using an enzyme membrane reactor. The long term stability of the enzyme was markedly enhanced by all immobilization methods and carriers tested. While consecutive batch reactions revealed no significant differences in biocatalysts stability, there were significant differences when the biotransformation was carried out using fixed bed reactors. Covalent coupling to Eupergit C via oxirane groups resulted in an half life time of about 3000 hours while the biocatalyst obtained by covalent coupling to EAH-Sepharose via watersoluble carbodiimide was less stable by a factor of 40. Adsorption to ion-exchangers as Q-Sepharose resulted in an medium half life time of about 570 hours.

KEYWORDS L-N-carbamoylase, immobilization, oxirane, carbodiimide, ionic interactions, stabilization

Introduction

Optically pure D- and L-amino acids can be produced with a theoretical yield of 100% and with high enantioselectivities using the „hydantoinase method“ [Pietzsch and Syldatk, 1995]. The instability of most of the enzymes involved in the hydrolysis of D,L-5-monosubstituted hydantoins and N-carbamoylamino acids is the major hindrance for an economical industrial process. Even in resting cell biotransformations the L-hydantoinase and especially N-carbamoylase are inactivated under reaction conditions and the biocatalysts are therefore not reusable.

L-Hydantoinase and L-N-carbamoylase from *Arthrobacter aurescens* have been already purified to homogeneity by chromatographic methods and further characterized [Syldatk et al., 1992]. The free enzymes are inactivated significantly faster than the whole cells. On the other hand it is not possible to use only the L-hydantoinase in combination with a chemical decarbamylation step as reported for the D-hydantoinase-process [Takahashi et al., 1979], because the L-hydantoinase is not absolutely stereospecific for a range of interesting products. Therefore the L-N-carbamoylase is essential for the production of enantiomerically pure L-amino acids.

In previous experiments we reported on a stabilization of both enzymes by immobilization [Wohlfahrt *et al.*, 1992], but with respect to the L-N-carbamoylase the immobilization yield remained relatively low. Here we report on new results on the covalent immobilization of the „bottle-neck-enzyme“ L-N-carbamoylase using watersoluble carbodiimide [Verhoeven et al., 1994] and on investigations on the long term stability of the immobilized biocatalyst in a fixed bed reactor with both covalently and adsorptively bound enzyme.

Because consecutive batch reactions are often used for a first characterization of an immobilized biocatalyst we compare the half life time obtained by these batch reactions with these of continuously operated fixed bed reactors.

Materials and Methods

Chemicals

All chemicals were of analytical grade and were purchased from Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland. Immobilization media were purchased from Röhm GmbH, Darmstadt, FRG (Eupergit C) and Pharmacia Biotech, Freiburg, FRG (Q-Sepharose FF, EAH-Sepharose).

Enzyme Preparation

Arthrobacter aurescens DSM 3747 was cultivated in a 300-L-bioreactor under conditions as reported previously using 0.3 g/l N-3-methylene-D,L-indolylmethylenhydantoin as inducer [Syldatk et al., 1990].

Cell disruption was carried out continuously under optimized conditions according to the results presented elsewhere [Bunge et al., 1992] using a cooled (-20°C) 600 ml cell and the Dyno-Mill KDL (Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland). Unleaded glass beads (480 ml, diameter 0.3 mm) were agitated at an agitator speed of 2500 rpm. An icecooled suspension of 738 g bio-wet-mass (BWM) suspended in 1722 ml of 0.3 M phosphate-buffer, containing 2.5 mM MnCl₂, pH 6.5 (30% BWM (w/v)) was pumped four times through the cell with a flow rate of 80 ml/min.

The enzyme fraction used for the immobilization experiments was obtained by expanded bed chromatography of the crude extract. For that the crude extract (2320 ml) was diluted with 6000 ml 0.05 M K₂HPO₄-solution, 960 ml of 0.05 M phosphate buffer, and finally the pH was adjusted to pH 8.0 by adding carefully about 80 ml 12% NaOH. The diluted crude extract (8600 ml) was pumped through an Streamline 50 column containing 600 ml of Streamline-DEAE in the expanded bed modus (100 ml/min, Biopilot-System, Pharmacia, Freiburg, FRG), previously equilibrated with 0.05 M phosphate buffer, pH 8.0 (buffer A). The column was washed with 4000 ml buffer A in the expanded bed modus and subsequently in the fixed bed modus with additionally 3000 ml until the baseline was constant. The protein was eluted by applying a linear gradient between buffer A and buffer B (0.05 M phosphate-buffer, 1.0 M NaCl, pH 8.0) within 6000 ml.

50% (6000U) of the initial L-N-carbamoylase- and 87% (3800 U) of the initial L-hydantoinase-activity were bound to and eluted from the column. 31% of the L-N-carbamoylase- and 7% of the L-hydantoinase-activity were not bound, but found in the washing buffer. 19% of the L-N-carbamoylase- and 6% of the L-hydantoinase-activity were lost. The purification factors were 1.3 and 2.1, respectively. The specific activity of the L-N-carbamoylase was 0.5 U/mg protein and the protein concentration was 3.5 mg/ml The active fractions (1900 ml) were collected and stored at -20°C (50 ml portions, Streamline-fraction).

Immobilization of the L-N-Carbamoylase to Eupergit C

3.45 g solid phosphate buffer (lyophilized 0.05 M phosphate buffer, pH 8.5) were added to 20 ml of the thawed streamline fraction under stirring and the pH was adjusted to pH 8.5 by adding 5 ml of a 1.0 M K₂HPO₄-solution. Precipitated protein was removed by centrifugation (15 min) at 15.000 rpm. 5 g of dry Eupergit C were suspended in the supernatant and the suspension was gently shaken for 24 h at 4°C.

The immobilized L-N-carbamoylase was filtered off and washed with 250 ml of 0,1 M Tris-Puffer, pH 8.5, using a glas funnel, before using it for bioconversion experiments.

Immobilization of the L-N-Carbamoylase to EAH-Sepharose 4B

14 ml 0,05 M Tris-buffer, pH 6,0, (buffer C) were added to 1 ml of the thawed streamline fraction and the pH was adjusted to pH 6.0 by carefully adding 1% HCl. 11 ml of EAH-Sepharose 4B were washed with buffer C and added to the diluted enzyme solution. A solution of 0.3076 g EDC in 1 ml distilled water (1.6 M, pH 6.0, adjusted with 1% HCl) was added to this suspension and shaken at 4°C for 4 h. To hydrolyze excess activated esters, the immobilisate was filtered off and washed with 100 ml 0,2 M Tris-buffer, pH 8.5.

Immobilization of the L-N-Carbamoylase to Q-Sepharose Fast Flow

80 ml of the thawed streamline fraction were diluted with 160 ml 0,05 M Tris-buffer, pH 8.5. After addition of 16 ml Q-Sepharose FF (equilibrated with the same buffer), this suspension was shaken for 20 min at 4°C. The immobilisate was filtered off and washed with 200 ml of 0.05 M Tris-buffer, pH 8.5. The immobilisate was stored in buffer at 4°C.

Determination of the Protein Concentration

The protein concentration was determined according to the method of Bradford [Bradford, 1976]. The test-kit was purchased from Biorad, Munich, FRG.

Determination of Substrate- and Product Concentration

The concentrations of indolylmethylenhydantoin, N-carbamoyl-L-tryptophan and tryptophan were determined using an HPLC-system (Thermoseparation Products, Darmstadt, FRG) equipped with a Gromsil ODS 1 PE column (5 µm, 250x4,6 mm, Grom, Herrenberg, FRG). UV-Absorption was measured at 280 nm. The mobile phase (0.3% phosphoric acid (80%) and methanol (20%) (v/v) was pumped with a flow rate of 1.0 ml/min.

Retention times: Tryptophan 17.77 min, indolylmethylenhydantoin 20.69 min, N-carbamoyl-L-tryptophan 23.11 min.

Determination of the Activity of free Enzymes

50 µL of the enzyme solution were added to 800 µL of the preincubated (37°C) substrate solution (0.4 g/L N-carbamoyl-L-tryptophan or 0.4 g/L D,L-indolylmethylenhydantoin in 0.05 M Tris-buffer, pH 8.5). The reactions were stopped by adding of 450 µL trichloroacetic acid (TCA, 12%), and analyzed by HPLC after centrifugation.

Determination of the Stability of the free Enzyme using an Enzyme Membrane Reactor

13 ml of prewarmed substrate solution were filled into an ultrafiltration cell (Omegacell, Filtron, Northborough, MA, USA) equipped with an 30 kDa ultrafiltration membrane. and 350 μ l (0.61 U) of the thawed streamline fraction were added. The ultrafiltration cell was fixed in a water bath (37°C). Using an hose pump the substrate solution was pumped through the stirred cell with a flow rate of 1.64 ml/min equivalent to a mean residence time of 8.5 min. Samples were taken and directly analyzed by HPLC.

Dermination of the Activity of Immobilized Enzymes in Batch Experiments

800 μ L of the preincubated substrate solution (see above) were added to 100 mg of wet immobilisate and shaken for 10 min at 37°C. The reaction was stopped by adding of 400 μ L TCA and analyzed by HPLC after centrifugation.

Determination of Operational Stability

The operational stability of the immobilized L-N-carbamoylase-fractions was determined by repeated batch experiments as well as continuous reactions in fixed bed reactors. For repeated batch experiments approximately 2.5 g of the wet immobilisate were added to 40 ml substrate solution (see above) and shaken for 90 min at 37°C. The immobilisate was filtered off, washed with 50 ml 0,05 M Tris-buffer, pH 8.5, and reused after weighting.

For continuous reactions the immobilized L-N-carbamoylase-fractions were packed into XK 16/10 columns (Pharmacia, Freiburg, FRG). Substrate solution (see above) was pumped through the column at 37°C at different flow rates (see results). Samples were taken and directly analyzed by HPLC.

Results and Discussion

For the immobilization of proteins different adsorptive, covalent and inclusion techniques have already been investigated and published [Tischer, 1995]. The covalent immobilization is of major interest because the bonds obtained between the protein and the carrier are much more stable than ionic interactions. On the other hand adsorptive immobilization, e. g. to ion exchangers, sometimes is favourable even if the half life time of the biocatalyst is lower, because the support can be reused after regeneration [Ruttloff, 1994].

Depending on the nature of the amino acid side chains accessible for a reaction, covalent bonding is theoretically possible to hydroxyl-, amino-, thiol-, and carboxyl groups of proteins. If a side chain of a protein is involved in enzyme stabilization or even in the catalytic mechanism, a modification will cause partial or total inactivation.

Coupling to oxirane-activated supports (e. g. Eupergit C) is done via nucleophilic attack at an activated carbon atom. Therefore only three of the residues mentioned before, i. e. hydroxyl-, amino-, and thiol-groups, may be involved in the coupling reaction. Coupling via carboxyl-groups is possible after activation of these with watersoluble carbodiimide. Using a support material carrying amino groups (e.g. EAH-Sepharose) coupling via stable amide bonds is possible.

For a rapid comparison of two covalent (oxirane, carbodiimide) and one electrostatic immobilization procedures consecutive batch reactions have been carried out with the immobilisates. Figures 1 and 3 show the specific activity of the L-N-carbamoylase of *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 covalently bound to Eupergit C via oxirane coupling and to EAH-Sepharose by watersoluble carbodiimide respectively. The last batch was run until complete conversion of the substrate (see figures 2 and 4).

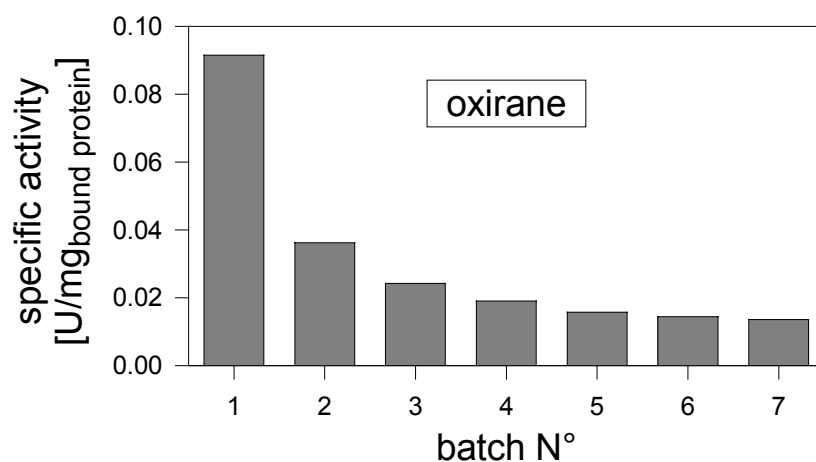


Figure 1: Operational stability of L-N-carbamoylase after immobilization to Eupergit C (repeated batch conversions with reuse of the biocatalyst, initial activity was calculated from concentrations determined after 15 min)

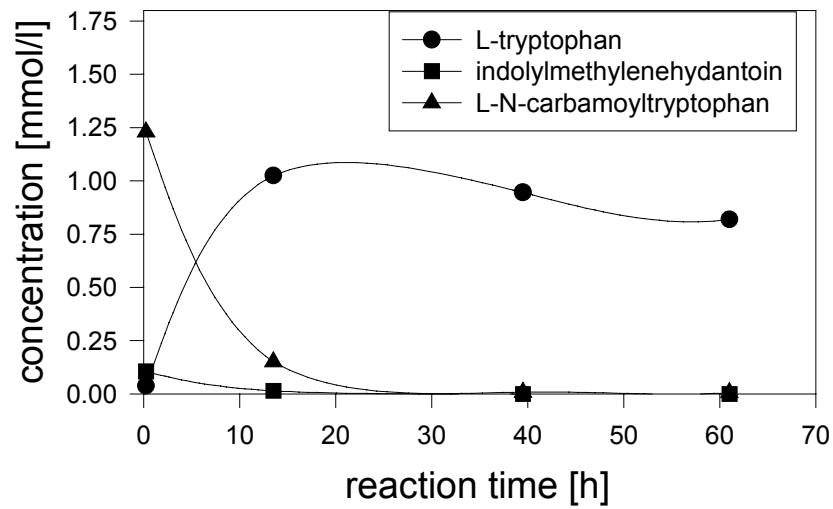


Figure 2: Conversion of IMH (Eupergit C immobilized L-N-carbamoylase of batch No. 7, 0.1 M Tris/HCl, pH 8.5)

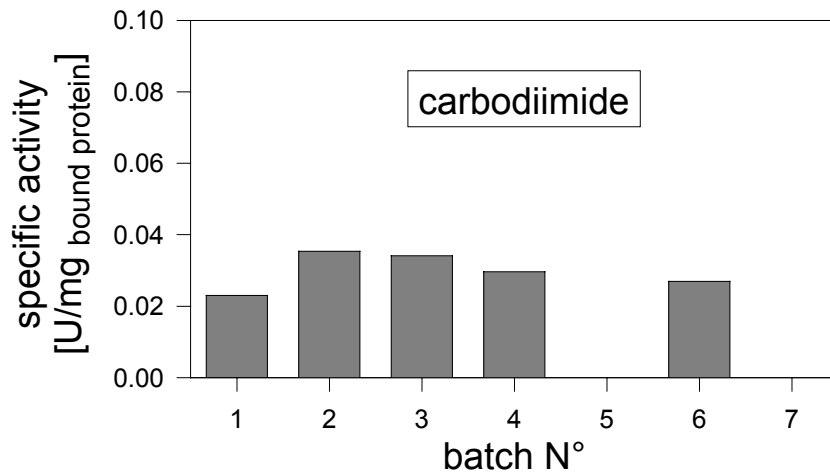


Figure 3: Operational stability of L-N-carbamoylase immobilized on EAH-Sepharose using carbodiimide (repeated batch conversions with reuse of the biocatalyst, initial activity was calculated from concentrations determined after 15 min)

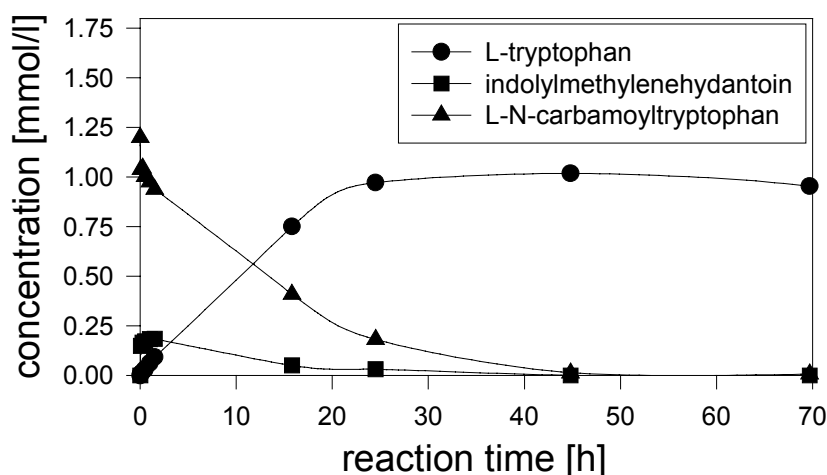


Figure 4: Conversion of IMH (Eupergit C immobilized L-N-carbamoylase of batch No. 6, 0.1 M Tris/HCl, pH 8.5)

The immobilization via oxirane coupling resulted in a dramatic loss of activity in the first 3 cycles when reusing the biocatalyst (see figure 1: Batch 1 to 4), whereas the remaining activity was almost maintained (figure 1: Batch 5 to 7). The reason for the decrease may be a slow conformational change or even a dissociation of the covalently bound subunits of the L-N-carbamoylase due to the decrease of salt concentration (no protein could be determined in the supernatant; the immobilization to Eupergit C was done in 1.0 M phosphate buffer, while the reaction was carried out in 0.1 M Tris/HCl-buffer). A strong hint for this hypothesis is the observation that the free L-N-carbamoylase is stabilized by high salt concentrations during purification and is immediately inactivated, if the salt concentration is reduced (results not shown).

The initial activity obtained after immobilization via carbodiimide (figure 3) was reduced at almost the same rate as obtained for adsorption via electrostatic interactions (see table 1). The operational stability was only slightly higher than in the coupling via oxirane groups.

Table 1: Half Life Times of Free and Immobilized L-N-Carbamoylase

Biocatalyst	Immobilization method	Half life time [h]	Half life time [h]
		batch	continuous
Free Enzyme		0.5	2.7 ^{a)}
Q-Sepharose FF	electrostatic interactions	14.7 ^{c)}	570 ^{b)}
EAH-Sepharose	carbodiimide coupling	14.5 ^{d)}	73 ^{b)}
Eupergit C	oxirane coupling	9.4 ^{e)}	3000 ^{b)}

^{a)} Enzyme membrane reactor
^{b)} Fixed bed reactor
^{c)} (batch 2-5)
^{d)} (batch 2-6)
^{e)} (batch 4-7)

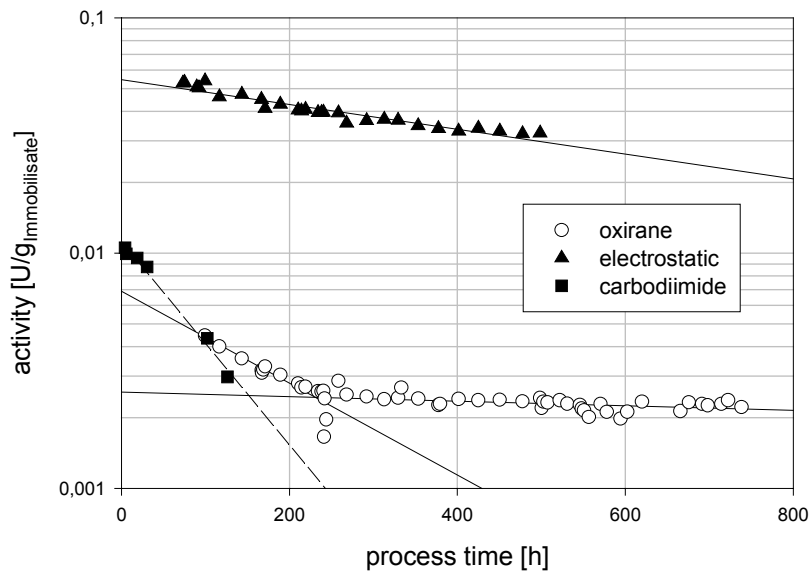


Figure 5: Operational stability of L-N-carbamoylase after immobilization to different supports (continuous operation in a fixed bed reactor, 0.4 g/l L-N-carbamoyltryptophan in 0.1 M Tris/HCL, pH 8.5).

The operational stabilities of the L-N-carbamoylase immobilized to different supports were also determined in continuous processes using fixed bed reactors. For a comparison electrostatic (Q-Sepharose) and covalently bound enzyme (Eupergit C, EAH-Sepharose) were run for several hundred hours in fixed bed reactors. As can be seen from figure 6 and table 1 the operational stability of the oxirane immobilized enzyme is significantly higher than the carbodiimide coupled enzyme. Eupergit C contains about 160 μmol oxirane groups per g wet carrier while EAH-Sepharose contains only 17 $\mu\text{mol/g}$. The higher stability of the oxirane coupled enzyme therefore may be explained by a higher extent of covalent bonds formed between the carrier and the enzyme.

The differences in the stability observed using consecutive batch reactions and fixed bed reactors may be explained by the different handling of the biocatalysts. In consecutive batch reactions the immobilisate is filtered off from the substrate solution after each batch and washed with buffer without substrate. Afterwards the weight was measured and the humid biocatalyst was reused. In contrast the catalyst in fixed bed reactions was neither in contact to air nor to substrateless buffer. From the characterization of the enzyme it is known that the enzyme is sensitive against oxidation and requires metal ions, which can be removed by addition of EDTA [Syldatk et al., 1992]. On the other hand the free enzyme was stabilized by the substrate when the reaction was carried out using an enzyme membrane reactor as can

be seen from table 1. Therefore it is not astonishing that the operational stability measured in fixed bed reactors is higher than in batch experiments. On the other hand there is a fast deactivation followed by a slower deactivation kinetic as can be seen in figure 6 for the oxirane coupling method. This behaviour is the result of different deactivation reactions with different rate constants and can be explained as done for the batch reactions (see above). It is obvious, that the interpretation of the results of the batch reactions is highly dependent on the number of batch reactions after which the half life time is calculated and is therefore not sufficient for a comparison of different coupling methods and supports.

Conclusions

It was shown that the immobilization of the L-N-carbamoylase from *Arthrobacter aureescens* DSM 3747 resulted in a significant increase of operational stability. Although the absolute specific activities obtained so far are too low to fulfill the requirements of an industrial biocatalyst, it could be shown that covalent coupling by oxirane groups resulted in a highly stable biocatalyst. For economical reasons an adsorptive binding to a reusable anion exchange support may be favorable and has therefore to be calculated with respect of the lower operational stability.

The operational stability measured in continuous operation using fixed bed reactors was markedly higher than in batch reactions which can be explained by the sensitivity of the enzyme against oxidation. For instable enzymes as the L-N-carbamoylase used in these investigations batch reactions are not sufficient for a comparison of different coupling methods. If batch reactions have to be used for the characterization one should avoid washing with substrateless buffers and exposition to air (e. g. by nitrogen atmosphere).

Because of the relatively low activity of the immobilized L-N-carbamoylase further experiments have to be carried out with the enriched enzyme and the influence of the density of the coupling groups of the support as well as the protein concentration has to be investigated.

References

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bunge, F., Pietzsch, M., Müller, R., and Syldatk, C. (1992) Mechanical Disruption of *Arthrobacter sp.* DSM 3747 in Stirred Ball Mills for the Release of Hydantoin-Cleaving Enzymes. *Chemical Engineering Science*, **47**, 225-232.
- Pietzsch, M., and Syldatk, C. (1995) Hydrolysis and Formation of Hydantoins. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* edited by K. Drauz and H. Waldmann, pp. 409-431, VCH-Verlag, Weinheim, Germany.
- Ruttloff, H. (1994) *Industrielle Enzyme*, Behr's Verlag, Hamburg, Germany.
- Syldatk, C., Mackowiak, V., Höke, H., Gross, C., Dombach, G., and Wagner, F. (1990), Cell Growth and Enzyme Synthesis of a Mutant of *Arthrobacter spec.* (DSM 3747) Used for the Production of L-Amino Acids from D,L-5-Monosubstituted Hydantoins. *J. Biotechnol.*, **14**, 345-362.
- Syldatk, C., Müller, R., Pietzsch, M., and Wagner, F. (1992) Microbial and Enzymatic Production of L-Amino Acids from D,L-Monosubstituted Hydantoins. In *Biocatalytic Production of Amino Acids & Derivatives* edited by D. Rozzell and F. Wagner, pp. 131-176, Hanser Publishers, Munich, Germany.
- Takahashi, S., Ohashi, T., Kii, Y., Kumagai, H., and Yamada, H. (1979) Microbial Transformation of Hydantoins to N-Carbamyl-D-Amino Acids. *J. Ferment. Technol.*, **57**, 328-332.
- Tischer, W., (1995) Immobilization of Enzymes. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* edited by K. Drauz and H. Waldmann, pp. 73-87, VCH-Verlag, Weinheim, Germany.
- Verhoeven, M., Cahalan, P., Chahalan, L., Hendriks, M., and Foache, B. (1994) Biomolecule Attachment, *European Patent Application*, EP 0 608 095 A1.
- Wohlfahrt, G., Müller, R., and Syldatk, C. (1992) Immobilization of Hydantoin Cleaving Enzymes. In *Dechema Biotechnology Conferences 5*, pp. 45-48, VCH-Verlag, Weinheim, Germany.