



Patentdirektoratet

TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4834/87

(22) Indleveringsdag: 15 sep 1987

(41) Alm. tilgængelig: 18 mar 1988

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 15 apr 1996

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 17 sep 1986 GB 8622389, 27 sep 1986 GB 8623306

(73) Patenthaver: *Beecham Group p.l.c.; Great West Road; Brentford; Middlesex TW8 9BD, GB

(72) Opfinder: Lawson William *Powell; GB, John Anthony *Power; GB

(51) Int.Cl.6

C 12 N 11/02
 C 12 N 11/08
 C 12 P 13/04
 //(C 12 N 11/02,
 C 12 R 1:07)
 (C 12 N 11/02,
 C 12 R 1:08)
 (C 12 N 11/02,
 C 12 R 1:38)

(74) Fuldmægtig: Plougmann, Vingtoft & Partners A/S

(54) Immobiliserede enzymer samt fremstilling og anvendelse heraf

(56) Fremdragne publikationer

GB offentl.skr.nr. 2122621

GB patent nr. 1554211, 1564982

4834-87

(57) Sammendrag:

Et stabiliseret enzympræparat, der omfatter en immobiliseret hydantoinase, anvendes til fremstilling af en D(-)(eventuelt substitueret phenyl)glycin eller et N-carbamoyl derivat deraf ved hydrolyse af en 5-(eventuelt substitueret phenyl)hydantoin.

Enzympræparatet omfatter celler eller behandlede celler af en hydantoinaseproducerende organisme, hvilke celler eller behandlede celler er immobiliseret i eller på en hensigtsmæssig fast bærer, eller et enzym, som stammer fra organismen, og som er adsorberet på eller bundet til en polymerbærer, sammen med divalente metalioner, som stabiliserer præparatet og gør det muligt at genbruge dette.

Enzympræparatet fremstilles ved, at cellerne eller de behandlede celler immobiliseres på den faste bærer, eller ved at enzymet adsorberes til polymerbæreren. Et eksempel på et kommercielt vigtigt slutprodukt, der fremstilles ved brug af enzympræparatet, er D(-)(4-hydroxyphenyl)glycin.

Den foreliggende opfindelse angår et immobiliseret præparat til brug i fremstillingen af D(-) α -aminosyrer via en enzymatisk rute og angår især et præparat til brug i en fremgangsmåde til fremstilling af D(-)(substitueret phenyl)glyciner, såsom D(-)(p-hydroxyphenyl)glycin, som anvendes som udgangsmateriale til fremstilling af antibiotikalt amoxycillin.

Det er kendt, for eksempel fra GB 1452591 og 1506067, at der findes mange enzymer, som er i stand til at omdanne 5-(substitueret phenyl)hydantoiner til D- α -aminosyrer. De mest hensigtsmæssige enzymer fremstilles af bakterielle organismer, og GB 1534426 og 1564982 omhandler hydantoinase-producerende organismer, som kan hydrolysere 5-(substitueret phenyl)hydantoiner til D(-)N-carbamoyl-(substitueret phenyl)glyciner. Derudover omhandler GB 1587116 en enzymatisk fremgangsmåde til fremstilling af D- α -aminosyre ud fra 5-(substitueret phenyl)hydantoin.

Indenfor teknikken stode er det velkendt, at immobiliseringen af en enzymproducerende celle eller af enzymet medfører en renere enzymbehandlingsvæske, og at dette er fordelagtigt for efterfølgende ekstraktionsprocesser. GB 1564982 redegør for, at celler eller behandlede celler af hydantoinase-producerende organismer kan immobiliseres ved hjælp af almindelige metoder. I praksis er de immobiliserede systemer, der er fremstillet på denne måde, imidlertid ikke tilstrækkeligt stabile til at give en kommerciel holdbar fremgangsmåde. Et kommercielt holdbart system skal kunne genbruges i et tilstrækkeligt antal enzymbehandlinger for at kunne dække omkostningerne ved dets fremstilling. Dette vil typisk være ca. 15 gange.

Det har overraskende vist sig, at tilstedeværelsen af en divalent metalion i sådant et immobiliseret enzymesystem giver stabilitet til præparatet, så det kan genanvendes.

I overensstemmelse hermed angår den foreliggende opfindelse et immobiliseret enzympræparat til brug i fremstillingen af

en D(-) (eventuelt substitueret phenyl)glycin eller et N-carbamoyl derivat deraf ud fra 5- (eventuelt substitueret phenyl)hydantoin, hvilket enzympræparat omfatter celler eller behandlede celler af en organisme, som producerer et hydantoinaseenzym, der er i stand til at hydrolysere 5- (eventuelt substitueret phenyl)hydantoin, hvilke celler eller behandlede celler er immobiliseret i eller på en hensigtsmæssig bærer, eller et enzym, som stammer fra organismen, og som er adsorberet på en positivt ladet polymerbærer eller kovalent bundet til en funktionaliseret polymerbærer, sammen med en effektiv mængde af en stabiliserende divalent metalion valgt fra gruppen bestående af Mn^{++} , Co^{++} og Ni^{++} .

Den effektive mængde stabiliserende divalent metalion som beskrevet heri afhænger af den anvendte ion og kan variere fra en spormængde, dvs. det som forbliver bundet til enzympræparatet, efter at et overskud af tilsat divalent metalion er blevet fjernet, til et niveau på, for eksempel, 2 mM, når enzympræparatet er suspenderet i et vandigt medium.

En særligt foretrukken divalent metalion er Mn^{++} .

Ved udtrykket D(-) (eventuelt substitueret phenyl)glycin forstås i nærværende beskrivelse og krav D(-)phenylglycin og D(-) (mono-, di- eller tri-substitueret phenyl)glyciner. Hensigtsmæssige substituenten omfatter hydroxy, $C_{(1-6)}$ alkyl, $C_{(1-6)}$ alkoxy og halogen. Foretrukne D(-) (substitueret phenyl)glyciner er D(-) (p-hydroxyphenyl)glycin og D(-) (3,4-dihydroxyphenyl)glycin.

Udtrykket 5- (eventuelt substitueret phenyl)hydantoin betegner i nærværende beskrivelse og krav 5-phenylhydantoin eller 5- (substitueret phenyl)hydantoin, hvori phenyl er substitueret med op til tre grupper omfattende hydroxy, $C_{(1-6)}$ alkyl, $C_{(1-6)}$ alkoxy og halogen. Typiske eksempler er 5- (4-hydroxyphenyl)hydantoin og 5- (3,4-dihydroxyphenyl)hydantoin.

Udtrykket "immobiliseret enzympræparat" omfatter i nærværende beskrivelse og krav immobiliserede præparater af hele celler, sprængte celler eller cellefrit enzym. Enzymet kan være rått, delvist oprenset, eller oprenset. Fortrinsvis er det immobiliserede enzympræparat et immobiliseret cellefrit enzympræparat.

Det foretrækkes, at organismen, fra hvilken hydantoinaseenzymet vindes, er en mikroorganisme såsom en Bacillusstamme, Pseudomonasstamme, etc., der er kendt fra GB 1564982, 1587116 og 1534426, eller en anden hensigtsmæssig organisme såsom en Mycoplana-art.

Hensigtsmæssige bærere til immobilisering af celler eller behandlede celler er de, der traditionelt anvendes i den kendte teknik, såsom polymermatricer omfattende polyacrylamid, polyurethan eller calciumalginat eller porøse organiske eller uorganiske materialer såsom pimpsten, aluminiumoxid og metalfolier.

Hensigtsmæssige positivt ladede polymerbærere til immobilisering af cellefri enzymer omfatter anionbytterharpikser og polymerbærere såsom DEAE cellulose. Hensigtsmæssige funktionaliserede polymerbærere omfatter substitueret polymethacrylsyrepolymer, der er funktionaliseret med aldehyd, og materialer såsom aluminiumoxid med høj massefylde, der er belagt med et polyethylenimin/glutaraldehydkompleks.

Hensigtsmæssige anionbytterharpikser omfatter stærke eller svage anionbytterharpikser, dog foretrækkes de sidste. Foretrukne anionbytterharpikser omfatter phenol-formaldehyd-anionbytterharpikserne Duolite A568 eller Duolite DS 17183 (fra Rohm og Haas Company), som er funktionaliseret med sekundære aminer, polystyrenharpikser, som er funktionaliseret med tertiære aminer såsom Amberlite IRA 935, og Amberlite IRA 945 (fra Rohm og Haas Company) og Purolit Al00. Andre hensigtsmæssige harpikser omfatter Amberlite IRA 901, som er polystyren funktionaliseret med kvaternære ammoniumioner, og

Lewatit OC 1037 (fra Bayer AG), som er polystyren funktionaliseret med primære aminer. Polystyrenharpikser med funktionelle grupper af di-ethanoltypen, såsom Diaion EX-05 (fra Mitsubishi Chemical Industries), kan også anvendes.

- 5 Stabiliteten kan yderligere forbedres ved at krydsbinde præparatet in situ, for eksempel med en vandopløselig dialdehyd. Et foretrukket krydsbindingsmiddel er glutaraldehyd. I tilfælde af immobiliserede cellefri enzymer kan krydsbindingsmidlet med fordel anvendes i et niveau på under ca. 1%,
10 fortrinsvis på ca. 0,2%.

- I et yderligere aspekt angår den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til fremstilling af en D(-) (eventuelt substitueret phenyl)glycin eller et N-carbamoyl derivat deraf ved hydrolyse af 5- (eventuelt substitueret phenyl)hydantoin ved
15 hjælp af et hensigtsmæssigt hydantoinaseenzym under udelukkelse af luft, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at enzymet er givet i form af et immobiliseret enzympræparat indeholdende celler eller behandlede celler af en organisme, der fremstiller enzymet, hvilke celler eller behandlede
20 celler er immobiliseret i eller på en hensigtsmæssig bærer, eller et enzym, som stammer fra organismen, og som er adsorberet på en positivt ladet polymerbærer eller kovalent bundet til en funktionaliseret polymerbærer, sammen med en effektiv mængde af en stabiliserende divalent metalion valgt fra
25 gruppen bestående af Mn^{++} , Co^{++} og Ni^{++} .

- Det er væsentligt, at luft udelukkes under hydrolyseprocessen, og derefter mens det immobiliserede cellepræparat genvindes og genbruges. Det har vist sig, at indtrængning af luft fører til enzyminhibering, sandsynligvis pga oxidative
30 nedbrydelsesprodukter fra hydantoinen. Reaktionen udføres fortrinsvis i en atmosfære af nitrogen eller andre inerte gasser. Det foretrækkes, at nitrogen eller inert gas også bobles gennem reaktionsblandingen.

I en foretrukken fremgangsmåde ifølge opfindelsen tilsættes yderligere mængder stabiliserende divalent metalion, fx i et niveau på 0,2-2 mM, fortrinsvis i et niveau på 0,5-1,0 mM, til reaktionsblandingen. Dette har til formål at minimere en-
5 zymaktivitetsreduktionen under reaktionen.

Hydrolysereaktionen udføres fortrinsvis ved en pH på mindst pH 8, og især i området 8,5 til 9,5. En pH på ca. 9,0 foretrækkes. Dette kontrolleres under reaktionsforløbet, for eksempel ved tilsætning af alkali eller ved anvendelse af en
10 passende buffer. Reaktionen udføres normalt ved en temperatur i området fra 30 til 60°C, fortrinsvis 40 til 50°C i en periode på fra 6 til 48 timer, typisk 12 til 24 timer.

Det er hensigtsmæssigt, at det immobiliserede enzympræparat bringes i kontakt med en vandig opslæmning af ca. 5 til 25%
15 (vægt/volumen) af den 5-(eventuelt substitueret phenyl)hydantoin, fortrinsvis 10 til 20% (vægt/volumen), især ca. 15% (vægt/volumen), sammen med 0,2 til 2, fortrinsvis ca. 0,5, mM, divalent metalion. Hydrolysereaktionen kan udføres i en omrørt tankreaktor eller i en søjlereaktor under udelukkelse
20 af luft.

Visse immobiliserede enzympræparater ifølge opfindelsen er i stand til at hydrolysere 5-(eventuelt substitueret phenyl)-hydantoin direkte til D(-)(eventuelt substitueret phenyl)-glycin. Sådanne enzympræparater kan typisk afledes fra mikro-
25 organismer beskrevet i GB 1587116, især de, der tilhører slægten Pseudomonas.

Sædvanligvis vil de immobiliserede enzympræparater ifølge den foreliggende opfindelse imidlertid hydrolysere 5-(eventuelt substitueret phenyl)hydantoin til et mellemprodukt D(-)N-carbamoyl(eventuelt substitueret phenyl)glycin, som derefter
30 kan hydrolyseres, hvis det ønskes, ved hjælp af kemiske eller enzymatiske metoder, til opnåelse af den tilsvarende D(-)-(eventuelt substitueret phenyl)glycin.

Når det er ønskeligt at hydrolysere mellemproduktet D(-)N-carbamoyl (eventuelt substitueret phenyl)glycin ved hjælp af en kemisk metode, kan reaktionen praktisk udføres med salpetersyre som beskrevet af T. Ohashi et al. i Agric. Biol. Chem., 1981, 45(4), 831-838.

Hensigtsmæssige enzymatiske metoder til hydrolyse af D(-)N-carbamoyl (eventuelt substitueret phenyl)glyciner til D(-)-(eventuelt substitueret phenyl)glyciner omfatter carbamoylaser, som beskrevet, for eksempel, i GB 2022581.

- 10 De immobiliserede enzympræparater ifølge den foreliggende opfindelse kan lagres fugtige inden brug, fortrinsvis ved lave temperaturer såsom ca. 4°C og kan genbruges. Immobiliserede enzympræparater ifølge opfindelsen er med succes blevet anvendt mere end femten gange, og visse foretrukne
- 15 immobiliserede cellefri enzympræparater er blevet genbrugt fyrre gange eller mere.

- I et yderligere aspekt angår den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzympræparat til brug i fremstillingen af en D(-) (eventuelt substitueret phenyl)glycin eller et N-carbamoyl derivat deraf,
- 20 hvilken fremgangsmåde omfatter, at behandle eller ubehandlede celler af en organisme, som producer en hydantoinase, der er i stand til at hydrolysere en 5-(eventuelt substitueret phenyl)hydantoin immobiliseres i eller på en hensigts-
- 25 mæssig bærer, eller at et enzym, der stammer fra cellerne, bringes i kontakt med positivt ladet eller funktionaliseret polymerbærer i nærværelse af en effektiv mængde stabiliserende divalent metalion valgt fra gruppen bestående af Mn^{++} , Co^{++} og Ni^{++} .

- 30 Metoder til immobilisering af de behandlede eller ubehandlede celler i eller på en hensigtsmæssig bærer i nærværelse af en effektiv mængde stabiliserende divalent metalion er analoge med de metoder, der normalt anvendes i den kendte teknik. Således kan de behandlede celler indlejres i hensigtsmæssige

bærere såsom polymermatricer omfattende polyacrylamid og polyurethan eller calciumalginat, eller de kan bindes kemisk til hensigtsmæssige bærere såsom porøse organiske eller uorganiske materialer omfattende pimpsten, alumini-umoxid og
5 metalfolier.

I et yderligere aspekt angår den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret cellefri enzympreparat til brug i fremstillingen af en D(-) (eventuelt substitueret phenyl)glycin eller et N-carbamoyl derivat
10 deraf, hvilken fremgangsmåde omfatter, at et hydantoinase-enzym, der er i stand til at hydrolysere en 5- (eventuelt substitueret phenyl)hydantoin, fremstilles, at en opløsning af enzymet bringes i kontakt med en positivt ladet eller funktionaliseret polymerbærer i nærværelse af en effektiv
15 mængde af en stabiliserende divalent metalion valgt fra gruppen bestående af Mn^{++} , Co^{++} og Ni^{++} , hvorved et immobiliseret enzympreparat fremstilles, og at det immobiliserede enzympreparat skilles fra en vandig suspension af dette.

Hydantoinaseenzymet fremstilles fortrinsvis ved gæring af en
20 passende mikroorganisme i et hensigtsmæssigt gæringsmedium. Hensigtsmæssige mikroorganismer og dyrkningsmedier er de, der er velkendte af fagmanden, og eksempler herpå gives i GB 1564982, 1534426 og 1587116.

En foretrukken mikroorganisme er Bacillus brevis IFO 12333, som kan dyrkes i det dyrkningsmedium, der er beskrevet i GB 1587116 eller i tilsvarende medier. Sådanne medier kan med fordel omfatte en enzyminducer såsom hydantoin eller DL-5-methyl-hydantoin og divalent metalioner omfattende Mn^{++} , Mg^{++} , Co^{++} og Fe^{++} , som er angivet at stimulere hydantoinase-
30 produktion. I en foretrukken fremgangsmåde dyrkes Bacillus brevis i et næringspodningsmedium i en passende periode såsom 44 timer og dyrkes derefter i et gæringsmedium indeholdende det inducerende middel og hensigtsmæssige divalente metalioner ved ca. 25°C, idet en pH på 7 til 8 opretholdes i den
35 tidlige vækstfase. Gæringen er afsluttet efter ca. 44 timer.

Cellerne høstes derefter, for eksempel ved centrifugering, og ødelægges derefter ved sonikering eller ved andre for fagmanden kendte teknikker for at frigive hydantoinasen. For delvis at oprense enzymet foretrækkes det at fælde nukleinsyrerne, 5 for eksempel ved tilsætningen af manganosulfat til en koncentration på 20mM. For at fælde de thermolabile proteiner opvarmes enzymet til en temperatur i området 50 til 65°C, fortrinsvis 55 til 60°C, i ca. 30 minutter efterfulgt af afkøling til 4°C. Enzymopløsningen kan derefter centrifugeres 10 for at fjerne celledetrit og udfældet nukleinsyre og proteiner. Det foretrækkes, at enzymopløsningen ikke dialyseres før adsorptionen for at bevare den divalente metalion. I dette tilfælde er det ikke nødvendigt at tilføre yderligere divalent metalion til fremstilling af det immobiliserede 15 enzympræparat.

Til fremstilling af det immobiliserede cellefri enzympræparat blandes den delvist oprensede enzymopløsning med polymerbæreren i nærværelse af hensigtsmæssige divalente metalioner. Enzymblandingen skal optimeres for hver type polymerbærer og 20 er typisk 3 til 7 enheder pr. gram bærer. Blandingen rystes ved ca. 25°C, indtil adsorption har fundet sted, for eksempel ca. 24 timer.

Polymerbæreren forberedes fortrinsvis til adsorption ved at blive vasket i saltopløsning og indstillet til ca. pH 8 til 25 9.

For at krydsbinde det immobiliserede cellefri enzympræparat er det ønskeligt at filtrere præparatet fra adsorptionopløsningen og at behandle den med en opløsning af krydsbindingsmidlet ved en pH i området 8 til 9. Det krydsbundne præparat 30 kan derefter vaskes med destilleret vand og yderligere buffer, fortrinsvis indeholdende en hensigtsmæssig divalent metalion, inden fugtig opbevaring i forseglede beholdere, fortrinsvis ved lave temperatur såsom ca. 4°C.

Nogle eksempler er beskrevet i det følgende:

EKSEMPEL 1

Hydantoinaseenzym blev fremstillet ved bakterielle gæringer på følgende måde. 9 l gæringsmedium indeholdende følgende komponenter blev fremstillet og indstillet til pH 7,0.

5	Gærekstrakt	200 g
	KH_2PO_4	10 g
	K_2HPO_4	10 g
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50 g
	MgSO_4	5 g
10	FeSO_4	0,1 g
	MnSO_4	0,1 g
	CaCl_2	0,8 g
	Antiskum	15 g

Mediet blev anbragt i en 12 liters fermentor og autoklaveret i 60 minutter ved 121°C. Opløsninger af 20% (vægt/volumen) glucose og 2% DL 5-methylhydantoin blev steriliseret separat, og 500 ml af hver blev under sterile forhold sat til fermentoren.

Fermentoren blev podet med 300 ml af en podningskultur af Bacillus brevis IFO 12333, der var dyrket på Tryptone Soya Broth i 44 timer ved 25°C. Gæringen blev holdt på 25°C og beluftet med 6 l/min. pH blev kontrolleret og holdt på 7,0 i 24 timer med HCl. Ammoniumhydroxid blev derefter anvendt til at hæve pH til 7,5. Efter 28 timer blev pH hævet til 8,0 og fik derefter lov til at stige frit.

Gæringen fik lov til at fortsætte i 46 timer, hvorefter cellerne blev høstet ved centrifugering. Cellepellet blev resuspenderet i 1,25 l 0,2 M Tris/HCl buffer, pH 8,5. Cellerne blev derefter sonikeret for at frigive hydantoinasen til opløsningen.

Delvis oprensning af enzymet blev udført som følger: nukleinsyrer blev udfældet ved tilsætningen af 20 mM MnSO_4 , enzym-

- opløsningen blev varmebehandlet ved 58°C i 30 minutter og derefter afkølet til 4°C. Efter opbevaring ved 4°C i 18 timer blev præparatet centrifugeret for at fjerne celledetbris og udfældede nukleinsyre og proteiner. Præparatet blev analyseret for at bestemme hydantoinaseaktivitet. En suspension af 1% DL-5-(4-hydroxyphenyl)hydantoin i 0,2 M Tris/HCl buffer, pH 8,5 blev rystet ved 42°C, til mætning indtraf. En aliquot af enzympræparatet blev derefter tilsat, og dannelsen af D(-)N-carbamoyl(4-hydroxyphenyl)glycin blev fulgt ved HPLC.
- 10 En enhed hydantoinase er defineret som den mængde enzym, der kan omdanne 1 mM DL-5-(4-hydroxyphenyl)hydantoin til D(-)N-carbamoyl-(4-hydroxyphenyl)glycin på 1 time.

EKSEMPEL 2

- Prøver af anionbytterharpiks, der var tilvejebragt fra kommercielle kilder, blev vasket i 1 time i 1 M NaCl og derefter ækvilibreret natten over i 0,2 M Tris HCl buffer, pH 8,5. De ækvilibrerede harpikser blev isoleret ved filtrering og lagret, indtil de skulle bruges. Det delvist oprensede enzym, der var fremstillet som beskrevet i eksempel 1, blev anvendt i immobiliseringsproceduren. Enzymet fik, ved at blande 10 ml enzymopløsning pr. gram (fugtig vægt) harpiks (3,5 -7,0 enheder/gram harpiks), lov til at adsorbere til harpikserne i 24 timer ved 25°C. Enzymharpikskomplekserne blev frafiltreret og behandlet med 1% glutaraldehyd ved pH 8,5. Efter 1 time blev harpiksprøverne igen filtreret fra og vasket tre gange med destilleret vand. Til slut blev enzymharpikserne vasket med 0,2 M Tris/HCl buffer, pH 8,5 og lagret fugtige i forseglede beholdere ved 4°C.

- Hvert enzymharpikskompleks, der var fremstillet på denne måde, blev analyseret for at bestemme dets specifikke aktivitet som beskrevet i eksempel 1. Tabel 1 viser de specifikke aktiviteter, der blev opnået for en række kommercielle ionbytterharpikser, der var behandlet på denne måde.

TABEL 1

Specifikke aktiviteter der er opnået for kommercielt tilgængelige anionbytterharpikser

Nr.	Harpiks	Bærematrix	Funktionelle grupper	Enzym-inducer enhed/g	Specifik aktivitet enhed/g
1	DUOLITE DS17183	Phenol-formaldehyd	2° Amin	6,5	2,6
2	DUOLITE A568	Phenol-formaldehyd	2° Amin	6,5	2,51
3	PUROLIT A100	Polystyren	3° Amin	5,27	1,42
4	AMBERLITE IRA935P	Polystyren	3° Amin	5,15	1,89
5	AMBERLITE IRA945	Polystyren	3° Amin	5,15	2,06
6	AMBERLITE IRA901	Polystyren	4° Ammonium	3,63	0,65
7	LEWATIT OC1037	Polystyren	1° Amin	4,4	1,31
8	DIAION EX-05	Polystyren	Di-ethanol type	6,0	3,3

Duolite og Amberlite harpikserne er kommercielle produkter fra Rohm and Haas Company, Philadelphia, U.S.A. Ordene Duolite og Amberlite er registrerede varemærker.

Lewatit harpiksen er et kommercielt produkt fra Bayer AG, BRD. Ordet Lewatit er et registreret varemærke.

Diaion harpiks er et produkt fra Mitsubishi Chemical Industries, Japan. Ordet Diaion er et registreret varemærke.

EKSEMPEL 3

440 ml delvist oprenset enzymopløsning (aktivitet = 0,59 enheder/ml) som fremstillet i eksempel 1 blev sat til 40 g Duolite A568 harpiks. Blandingen blev rystet forsigtigt ved
5 25°C i 24 timer for at lade hydantoinasen adsorbere til bæreren. Enzymharpikskomplekset blev derefter udskilt ved filtrering og vasket tre gange med destilleret vand og til slut med 0,2 M Tris/HCl buffer, pH 8,5. Enzymharpiksen blev lagret fugtig i en forseglede beholder ved 4°C. Det immobili-
10 serede enzym blev analyseret som beskrevet i eksempel 1, og dets specifikke aktivitet blev fundet at være 3,9 enheder/g.

200 g DL-5-(4-hydroxyphenyl)hydantoin og 0,23 g MnSO₄ blev sat til 1,8 l destilleret vand i en beholder udstyret med en kappe. Nitrogengas blev boblet gennem blandingen. Suspensio-
15 nen blev rystet, temperaturen holdt på 40°C og pH indstillet til 8,7 med ammoniumhydroxid. Da systemet var ækvilibreret, blev 150 enheder (38,5 g enzymharpikskompleks) hydantoinase tilsat. Reaktionen fik lov til at fortsætte i 24 timer, og pH blev holdt på 8,7 med ammoniumhydroxid under hele processen.
20 Efter 24 timer blev udbyttet af D(-)N-carbamoyl-(4-hydroxyphenyl)glycin bestemt ved HPLC til at være 97%. Det ved denne proces dannede produkt blev isoleret ved almindelige metoder og fundet at være af høj optisk renhed.

Enzymharpiksen, der blev anvendt i denne proces, blev gen-
25 brugt 50 gange ved at dekantere D(-)N-carbamoyl(4-hydroxyphenyl)glycinopløsningen i slutningen af reaktionen, idet man sørgede for, at enzymet forblev i en nitrogenatmosfære, og erstatte den med en frisk forudækvilibreret substratsuspension. Under disse enzymharpiksgenbrug gav omdannelsen til
30 D(-)N-carbamoyl(4-hydroxyphenyl)glycin udbytter på 95% eller mere.

EKSEMPEL 4

Hydantoinaseenzymet blev også immobiliseret på UOP IPS - 100, en aluminiumoxidbaseret bærer, der er imprægneret med et høj molekylvægts poletylenimin-glutaraldehydkompleks. UOP IPS -
5 100 er et kommercielt produkt fra UOP Inc, Des Plaines, Illinois. 250 ml delvist oprenset enzymopløsning fremstillet som beskrevet i eksempel 1 (aktivitet = 0,23 enheder/ml) blev sat til 7,5 g UOP-bærer. Blandingen blev rystet forsigtigt ved 25°C i 18 timer. Det således dannede enzym-bærerkompleks blev
10 udskilt ved *filtrering* og blev derefter vasket med destilleret vand efterfulgt af 0,2M Tris/HCl buffer, pH 8,5. Det immobiliserede enzym blev analyseret under anvendelse af den i eksempel 1 beskrevne standardmetode og blev fundet at have en specifik aktivitet på 4,68 enheder/g. Det ikke-opløselig-
15 gjorte enzym blev lagret fugtig i en forseglet beholder ved 4°C.

EKSEMPEL 5

800 liter hydantoinase-indeholdende celler af Bacillus brevis IFO 12333 blev dyrket under anvendelse af mediet beskrevet i
20 eksempel 1. Induceren, 5-methyl hydantoin, blev steriliseret i mediet, og metalionerne blev opløst i deioniseret vand og sat til mediet lige inden sterilisering. Glucose blev tilsat som en steril 40% (vægt/volumen) opløsning til opnåelse af en slutkoncentration på 1% (vægt/volumen). Mediet blev podet med
25 celler, der var dyrket i 36 timer ved 25°C i 12 rystede kolber, der hver indeholdt 400 ml Tryptone Soya Broth. Gæringen foregik ved 25°C under et tryk på 1,0 bar og en luftstrøm på 0,3 beholdervolumen/minut. pH blev holdt under 7,0 i de første 36 timer, hvorefter pH efter 36 timer og indtil høsten
30 efter 48 timer blev hævet til 7,5. Det endelige celleudbytte var 6,0% med en specifik aktivitet på 1,8 enheder/g.

Cellerne blev høstet under anvendelse af en afvandende centrifuge af typen Westphalia ("Westphalia desludging centrifuge"), og pH af den resulterende celleopslæmning (100 l) blev

hævet til pH 8,5 med ammoniakopløsning inden homogenisering i en APV Manton-Gaulin (K6) maskine. Homogenatet blev derefter fortyndet til 270 l med blødgjort vand efterfulgt af tilsætning af $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ til 20 mM, idet pH blev holdt på 8,5-8,6 med ammoniakopløsning. Dette blev efterfulgt af varmebehandling ved 60°C i 1 time. Det flokkulerede homogenat blev derefter afkølet til 30°C og klaret ved passage gennem en afvandede centrifuge.

8,2 kg anionbytterharpiks Duolite A568, som var blevet vasket med 1 M NaCl og indstillet til pH 8,5 med NH_4OH i løbet af 1 time, blev sat til 130 liter klaret enzymopløsning med en aktivitet på 189 enheder/liter. Adsorption af enzymet til harpiksen fik lov til at foregå i løbet af 20 timer med omrystning, pH blev holdt på 8,5 med NH_4OH . Harpiksen blev derefter isoleret ved filtrering og sat til 100 liter 0,2% (vægt/volumen) glutaraldehydopløsning ved pH 8,5. Krydsbindingsprocessen foregik i løbet af 1 time med omrystning. Enzymharpiksen blev derefter isoleret ved filtrering og vasket med 0,05 M Tris/HCl buffer pH 8,5, der indeholdt 1 mM MnSO_4 , i løbet af 30 minutter. Der blev isoleret 8,6 kg enzymharpiks med en specifik aktivitet på 1,7 enheder/g.

EKSEMPEL 6

6,65 kg enzymharpiks med en aktivitet på 1,1 enheder/g, der var fremstillet ifølge metoden beskrevet i eksempel 5, blev anvendt til at hydrolysere 9,75 kg DL-5-(4-hydroxyphenyl)-hydantoin i 65 liter blødgjort vand indeholdende 11 g MnSO_4 . Hydrolysereaktionen blev udført i løbet af 23 timer ved 40°C og pH 9,3-9,5, og N_2 blev boblet gennem blandingen for at udelukke ilt. Ved slutningen af reaktionen blev der målt et udbytte af D(-)N-carbamoyl(4-hydroxyphenyl)glycin på 96,4%.

EKSEMPEL 7

Enzymharpiksen i eksempel 6 blev anvendt til at udføre 12 hydrolyser af 10% DL-5-(4-hydroxyphenyl)hydantoin med et

gennemsnitligt udbytte på 96,4% og yderligere 11 reaktioner med 15% substrat med et gennemsnitligt udbytte på 95,6%.

EKSEMPEL 8

5 Celler af Bacillus brevis IFO 12333 dyrket under anvendelse af mediet beskrevet i eksempel 1 blev høstet fra seks liter gæringsmedium ved centrifugering. Cellerne blev resuspenderet til 500 ml i 0.1M Tris buffer, pH 9,0, og blev derefter blandet med 500 ml eller 6% (vægt/volumen) Protanal LP/10/60 (Protan, Drammen, Norway). Cellesuspensionen blev derefter
10 pumpet gennem en sprøjtenål ned i et bad af 0.1M calciumchloridopløsning, hvor celler, der var immobiliseret i calcium-alginat, blev udfældet og genvundet som en tråd på en spole. De immobiliserede cellers slutvægt var 787,4g.

En portion af de immobiliserede celler (330g) blev anvendt
15 til at hydrolysere 100 g DL-5-(4-hydroxyphenyl)hydantoin i én liter vand indeholdende 0,44 g MnSO_4 . Hydrolysereaktionen blev udført i løbet af 23 timer ved 50°C og pH 9,1, idet N_2 blev boblet gennem blandingen for at udelukke ilt. pH blev kontrolleret ved tilsætningen af 5M NaOH. Ved slutningen af
20 reaktionen blev et 40% udbytte af D(-)N-carbamoyl(4-hydroxyphenyl)glycin målt.

PATENTKRAV

1. Immobiliseret enzympræparat til brug i fremstillingen af et D(-) (eventuelt substitueret phenyl)glycin eller et N-carbamoylderivat deraf ud fra 5-(eventuelt substitueret phenyl)hydantoin,
25 k e n d e t e g n e t ved, at enzympræparatet omfatter celler eller behandlede celler af en organisme, som producerer et hydantoinaseenzym, der er i stand til at hydrolysere 5-(eventuelt substitueret phenyl)hydantoin, hvilke celler eller
30 behandlede celler er immobiliseret i eller på en hensigtsmæssig bærer, eller et enzym, som stammer fra organismen, og som

er adsorberet på en positivt ladet polymerbærer, eller kovalent bundet til en funktionaliseret polymerbærer, sammen med en effektiv mængde af en stabiliserende divalent metalion valgt fra gruppen bestående af Mn^{++} , Co^{++} og Ni^{++} .

- 5 2. Præparat ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det immobiliserede enzym er cellefrit.
3. Præparat ifølge krav 1 eller 2,
k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er opnået fra en Bacillusstamme, Pseudomonasstamme eller Mycoplanastamme.
- 10 4. Præparat ifølge krav 3,
k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er opnået fra Bacillus brevis IFO 12333.
5. Præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 4,
15 k e n d e t e g n e t ved, at den divalente metalion er Mn^{++} .
6. Præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 5,
k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er bundet til bærereren ved krydsbinding.
7. Fremgangsmåde til fremstilling af en D(-) (eventuelt substitueret phenyl)glycin eller et N-carbamoyl derivat deraf
20 ved hydrolyse af 5- (eventuelt substitueret phenyl)hydantoin ved hjælp af et hensigtsmæssigt hydantoinaseenzym under udelukkelse af luft,
k e n d e t e g n e t ved, at enzymet er givet i form af et
25 immobiliseret enzympræparat indeholdende celler eller behandlede celler af en organisme, der fremstiller enzymet, hvilke celler eller behandlede celler er immobiliseret i eller på en hensigtsmæssig bærer, eller et enzym, som stammer fra organismen, og som er adsorberet på en positivt ladet polymer-
30 bærer eller kovalent bundet til en funktionaliseret polymerbærer, sammen med en effektiv mængde af en stabiliserende

divalent metalion valgt fra gruppen bestående af Mn^{++} , Co^{++} og Ni^{++} .

8. Fremgangsmåde ifølge krav 7,
k e n d e t e g n e t ved, at det immobiliserede enzympræ-
5 parat er et enzympræparat ifølge et hvilket som helst af
kravene 2 til 6.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 7 eller krav 8 til fremstilling
af D(-) (4-hydroxyphenyl)glycin eller D(-)N-carbamoyl(4-hy-
droxyphenyl)glycin.

10 10. Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzym-
præparat til brug i fremstillingen af et D(-) (eventuelt sub-
stitueret phenyl)glycin eller et N-carbamoyl derivat deraf,
k e n d e t e g n e t ved, at behandle eller ubehandlede
celler af en organisme, som producerer en hydantoinase, der
15 er i stand til at hydrolysere en 5- (eventuelt substitueret
phenyl)hydantoin immobiliseres i eller på en hensigtsmæssig
bærer, eller at et enzym, der stammer fra cellerne, bringes i
kontakt med en positivt ladet eller funktionaliseret polymer-
bærer i nærværelse af en effektiv mængde af en stabiliserende
20 divalent metalion valgt fra gruppen bestående af Mn^{++} , Co^{++}
og Ni^{++} .

11. Fremgangsmåde ifølge krav 10,
k e n d e t e g n e t ved, at det immobiliserede enzympræpa-
rat er cellefrit, hvilken fremgangsmåde yderligere omfatter,
25 at det immobiliserede enzympræparat skilles fra en vandig
suspension af dette.