

(12) **Ausschließungspatent**

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **281 919 A7**5(51) **C 12 N 9/88****PATENTAMT der DDR**(21) **AP C 12 N / 308 242 8**(22) **26.10.87**(45) **29.08.90**(71) **siehe (73)**(72) **Jung, Heinrich, Dipl.-Biochem.; Jung, Kirsten, Dipl.-Biochem.; Kleber, Hans-Peter, Prof. Dr. sc., DD**(73) **Karl-Marx-Universität Leipzig, Karl-Marx-Platz, Leipzig, 7010, DD**(54) **Verfahren zur Herstellung eines Enzyms**

(55) Carnitin; Crotonobetain; γ -Butyrobetain; Escherichia coli, Enterobacteriaceae, Enzymherstellung; Carnitinhydrolyse; Crotonobetainreduktase; Zellaufschluß; Säulenchromatographie

(57) Die Erfindung betrifft die Herstellung von Carnitinhydrolyase. Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein von Seim et al. postuliertes Enzym aufzufinden, zu isolieren und zu charakterisieren. Die Aufgabe wird darin gesehen, durch Einsatz einer mikrobiellen Enzymquelle in Zusammenarbeit mit einer effektiven Reinigungstechnologie das gewünschte Enzym mit hoher spezifischer Aktivität und frei von störenden Fremdaktivitäten zur Verfügung zu stellen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß das als Carnitinhydrolyase bezeichnete Enzym aus Stämmen der Familie der Enterobacteriaceae nach anaerober Kultivierung in Gegenwart von Carnitin sowie Zellaufschluß aus der Rohenzymlösung in hoher Reinheit hergestellt wird.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Enzyms, das im folgenden als Carnitinhydrolyase bezeichnet wird, und seiner Aktivierung, **dadurch gekennzeichnet**, daß Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae als mikrobielle Enzymquelle auf einem kompletten Nährmedium, das D,L-Carnitin und/oder Crotonobetain enthält, unter anaeroben Bedingungen in an sich bekannter Weise kultiviert wird, das gebildete Enzym mittels Chromatographie an z.B. Phenylsepharose isoliert wird, aus der nahezu carnitinhydrolyasefreien Lösung durch z.B. Ultrafiltration der enzymaktivierende Effektor F gewonnen wird, das gebundene Enzym durch Einsatz von Hydroxylapatit, DEAE-Sephadex bzw. DEAE-Zellulose sowie Gelfiltration angereichert wird und das an ein Trägermaterial gebundene Enzym durch Zugabe des bei seiner Herstellung anfallenden oder gesondert gewonnenen Effektors F aktiviert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Stamm *Escherichia coli*, insbesondere *E. coli* 044 K74, *E. coli* 055 K59, *E. coli* 0111 K58, *E. coli* 0114 K90 eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Stamm *Citrobacter*, bevorzugt *Citrobacter freundii*, eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Stamm *Salmonella*, insbesondere *Salmonella typhimurium*, *Salmonella anatum* oder *Salmonella cottbus* eingesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Stamm *Proteus* eingesetzt wird, bevorzugt *Proteus vulgaris* oder *Proteus mirabilis*.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Enzyms, das im folgenden als Carnitinhydrolyase bezeichnet wird. Dieses Enzym kann zur Synthese von L(–)-Carnitin aus dem optisch inaktiven Crotonobetain eingesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Verschiedene Mikroorganismen aus der Familie der Enterobacteriaceae sind unter anaeroben Bedingungen in der Lage, Carnitin zu γ -Butyrobetain umzusetzen, wobei Crotonobetain als Intermediat auftritt (Z. allg. Mikrobiol. **20** [1980] 591–594). Dabei werden die genannten Betaine weder als C- noch als N-Quelle genutzt. Für die beschriebene Metabolisierung von Carnitin wird die Existenz zweier Enzyme postuliert (Acta biol. med. germ. **41** [1982] 1009–1018). Danach ist die erste Teilreaktion, die Dehydratisierung von L(–)-Carnitin zu Crotonobetain, vermutlich an die Existenz einer Lyase gebunden. Für die Reduktion von Crotonobetain zu γ -Butyrobetain wird eine Reduktase verantwortlich gemacht. Die Carnitinmetabolisierung durch Enterobacteriaceae ist bisher nur mit ganzen Zellen untersucht worden (FEMS Microbiol. Lett. **13** [1982] 201–205, Arch. Microbiol. **132** [1982] 91–95, J. Basic Microbiol. **27** [1987] 131–137). Arbeiten zur Reinigung und Charakterisierung der postulierten Lyase liegen bisher nicht vor.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, das von Seim et al. postulierte Enzym aufzufinden, zu isolieren und zu charakterisieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, durch Einsatz einer mikrobiellen Enzymquelle in Zusammenwirken mit einer effektiven Reinigungstechnologie das gewünschte Enzym mit hoher spezifischer Aktivität und frei von störenden Fremdaktivitäten zur Verfügung zu stellen. Dabei soll nach einem einfachen Aufschlußverfahren eine Aktivität des Enzyms im Proteinrohextrakt von mindestens 0,05 U/mg erzielt werden und eine Anreicherung mit Hilfe von in der Proteinreinigung üblichen Methoden auf Werte bis zu 5 U/mg möglich sein.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß das im folgenden als Carnitinhydrolyase bezeichnete Enzym aus Enterobacteriaceae wie

Escherichia, zum Beispiel	<i>E. coli</i> 044 K74
	<i>E. coli</i> 055 K59
	<i>E. coli</i> 0111 K58
	<i>E. coli</i> 0114 K90
Proteus, zum Beispiel	<i>P. vulgaris</i>
	<i>P. mirabilis</i>
Citrobacter, zum Beispiel	<i>C. freundii</i>
Salmonella, zum Beispiel	<i>S. typhimurium</i> LT ₂
	<i>S. anatum</i>
	<i>S. cottbus</i>

hergestellt wird. Überraschenderweise sind diese Stämme in der Lage, Carnitinhydrolyase bei Einhaltung bestimmter Kultivierungsbedingungen in annehmbaren Ausbeuten zu produzieren. Die Stammhaltung geschieht bevorzugt auf Nährbouillon-II-Agar (20 g/l). Die Agarröhrchen werden 8 h bei 37°C inkubiert und bei 4°C gelagert. Die Kultivierung der Stämme erfolgt submers in Komplex- oder Minimalmedium unter Zusatz von Glycerol (1–50 mmol/l), vorzugsweise 20 mmol/l), Fumarsäure (1–50 mmol/l, vorzugsweise 20 mmol/l) und D,L-Carnitin (1–100 mmol/l, vorzugsweise 20 mmol/l) oder Crotonobetain (1–100 mmol/l, vorzugsweise 10 mmol/l) oder eines ihrer Salze, wobei die Carnitinhydrolyase in ausreichendem Maße induziert wird. Nach einer Inkubationszeit von 6–24 h (vorzugsweise 8–15 h) unter anaeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 20–45°C (vorzugsweise 37°C) werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Nach Waschen mit Phosphatpuffer werden die Zellen durch Reiben in Gegenwart von Alcoa aufgeschlossen. Der Proteinrohextrakt wird in Phosphatpuffer aufgenommen und durch Zentrifugation von Alcoa und noch vorhandenen ganzen Zellen getrennt. Danach wird dem Proteinrohextrakt Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 25 % zugesetzt. Nach Zentrifugation wird das Enzym aus dem Überstand mittels Chromatographie an Phenylsepharose, Hydroxylapatit, DEAE-Sephadex oder DEAE-Zellulose sowie Gelfiltration über Sephadex G 100 isoliert. Das gewonnene Enzym ist inaktiv. Für seine Reaktivierung ist ein Effektor (F) notwendig, der während der Präparation der Carnitinhydrolyase gewonnen wird. Er wird auf der Stufe der Chromatographie an Phenylsepharose vom Enzym getrennt und mittels Ultrafiltration (Amiconultrafiltrationszelle, Membran YM 5) von Protein befreit. Die Zugabe von F zum isolierten Enzym führt sofort zur Aktivierung der Carnitinhydrolyase. Unter den genannten Bedingungen wird eine Anreicherung des Enzyms bis auf eine spezifische Aktivität von etwa 5 U/mg erreicht. Das erfindungsgemäß hergestellte Enzym ist bei 4°C mehrere Monate lagerfähig. Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel 1

Die Kultivierung von *Escherichia coli* 044 K 74 erfolgt submers in einem 10-l-Gefäß, welches bis zum Rand mit einem Carnitinhaltigen Medium (Pankreatisches Pepton 20 g/l, NaCl 5 g/l, Glycerol 10 ml/l, Fumarsäure 2 g/l, D,L-Carnitin · HCl 3 g/l) gefüllt ist. Es wird mit NaOH ein pH von 7,5 eingestellt. Beimpft wird mit 500 ml einer aeroben Vorkultur in Komplexmedium (Pankreatisches Pepton 20 g/l, NaCl 5 g/l) aus der exponentiellen Wachstumsphase. Die Animpfdichte liegt bei $\Delta E_{600\text{ nm}}^{1,0\text{ cm}} \sim 0,08$. Das Kulturgefäß wird luftdicht verschlossen und für 8 h bei 37°C stehen gelassen. Zur Isolierung des Enzyms werden die Bakterien nach beendeter Inkubation durch Zentrifugation für 15 min bei $6000 \times g$ und 4°C geerntet und zweimal mit 0,067 M Phosphatpuffer pH 7,5 gewaschen. Die Zellen werden mit Alcoa (10 min Reiben bei 4°C) aufgeschlossen. Das Protein wird mit 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5) extrahiert und durch Zentrifugation für 30 min bei $15000 \times g$ und 4°C von Alcoa und nicht aufgeschlossenen Zellen getrennt. Dem so gewonnenen Proteinrohextrakt wird Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigungskonzentration von 25 % zugesetzt. Nach 30 min Rühren bei 4°C wird der Proteinrohextrakt bei $15000 \times g$ für 30 min zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wird auf eine Phenylsepharosesäule (2 × 15 cm) aufgetragen, die mit einer 25%igen Ammoniumsulfatlösung in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5) äquilibriert ist. Danach wird die Säule mit 150 ml der 25%igen Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Alle hierbei gewonnenen Fraktionen, die ein $\Delta E_{280\text{ nm}}^{1,0\text{ cm}} > 30$ aufweisen, werden vereinigt und die Lösung mittels Ultrafiltration (Amiconultrafiltrationszelle, Membran YM 5) von Protein befreit. Die gewonnene Lösung wird im folgenden als Lösung F bezeichnet. Die Carnitinhydrolyase wird mit einer 15%igen Ammoniumsulfatlösung von der Phenylsepharosesäule eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 50 ml/h. Es werden 3,5 ml Fraktionen gesammelt. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt und 12 h gegen 5 l 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,5) dialysiert. Die dialysierte Proteinlösung wird auf eine mit 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,5) äquilibrierte Hydroxylapatitsäule (1,5 × 10 cm) aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit Phosphatpuffer wird das Enzym mit 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,5, von der Säule eluiert und die aktiven Fraktionen vereinigt. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 20 ml/h. Es werden 3 ml Fraktionen gesammelt. Die gewonnene Enzymlösung wird auf eine Säule (0,9 cm × 10 cm) aufgetragen, die mit DEAE-Sephadex CL 6B gefüllt ist. Diese Säule ist mit 0,03 M Phosphatpuffer, pH 7,5, äquilibriert und wird nach dem Auftragen der Proteinlösung auch mit 50 ml dieses Puffers gewaschen. Die Elution des Enzyms erfolgt mittels eines 200-ml-Gradienten von 0,03 M–0,30 M Phosphatpuffer pH 7,5. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 20 ml/h. Es werden 2,5-ml-Fraktionen gesammelt. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt und mittels Ultrafiltration (Amiconultrafiltrationszelle, Membran YM 5) auf 2 ml eingeeengt. Die konzentrierte Proteinlösung wird auf eine Sephadex G 100 Säule (1,5 cm × 45 cm) aufgetragen, die mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5 äquilibriert ist. Die Elution des Enzyms erfolgt mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 12 ml/h. Es werden 2-ml-Fraktionen gesammelt. Die vereinigten aktiven Fraktionen werden mittels Ultrafiltration (Amiconultrafiltrationszelle, Membran YM 5) auf 5 ml eingeeengt. Zur Aktivierung des präparierten Enzyms wird dem jeweiligen Reaktionsansatz 50 % (v/v) Lösung F zugesetzt. Die so gewonnene Carnitinhydrolyase ist bis zu einer spezifischen Aktivität von 4,95 U/mg angereichert. Die Präparationsschritte sind in Tabell 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1
Reinigung der Carnitinhydrolyase aus *Escherichia coli* 044 K74

Reinigungs- stufe	Gesamt- protein (mg)	spez. Ak- tivität (U/mg)	Gesamtak- tivität (U)	Ausbeute (%)	Anrei- cherung
Rohextrakt	4 140	0,050	207	100	–
Überstand nach Sätti- gung mit 25% (NH ₄) ₂ SO ₄	3 957	0,047	186	90	1
Phenyl- sepharose	1 010	0,100	101	49	2
Hydroxyl- apatit	162	0,450	73	35	9
DEAE-Sepha- rose	46	1,250	58	29	25
Gelfiltration	11	4,75	52	25	95

Ausführungsbeispiel 2

Man verfährt wie in Beispiel 1 beschrieben, kultiviert jedoch den Stamm *Proteus vulgaris*. Nach Isolierung und Anreicherung des Enzyms erhält man Carnitinhydrolyase mit einer spezifischen Aktivität von 5,2 U/mg.

Ausführungsbeispiel 3

Man verfährt wie in Beispiel 1 beschrieben, kultiviert jedoch den Stamm *Citrobacter freundii*. Nach Isolierung und Anreicherung des Enzyms erhält man Carnitinhydrolyase mit einer spezifischen Aktivität von 4,3 U/mg.