



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 12 N 11/12

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

634 349

⑲ Gesuchsnummer: 937/78

⑲ Inhaber:
Dynamit Nobel Aktiengesellschaft, Troisdorf
(DE)

⑳ Anmeldungsdatum: 27.01.1978

㉑ Priorität(en): 29.01.1977 DE 2703703

㉑ Erfinder:
Hans-Leo Hülsmann, Wetter 4 (DE)
Gustav Renckhoff, Witten (DE)

㉒ Patent erteilt: 31.01.1983

㉓ Patentschrift
veröffentlicht: 31.01.1983

㉒ Vertreter:
Patentanwaltsbureau Isler & Schmid, Zürich

⑤④ **Verfahren zur Herstellung trägergebundener Acylasen.**

⑤⑦ Trägergebundene Acylasen werden durch Umsetzung einer löslichen Acylase mit chemisch gebundenen reaktiven Gruppen von Cellulosederivaten erhalten. Diese Cellulosederivate sind solche, die durch Reaktion von Cellulose in deren Lösungen in Polyoxymethylen enthaltendem Dimethylsulfoxid mit bi- oder mehrfunktionellen Reagentien erhalten worden sind.

Die Produkte eignen sich zur enzymatischen Racemattrennung von N-Acylaminosäuren.

PATENTANSPRUCH

Verfahren zur Herstellung trägergebundener Acylase, dadurch gekennzeichnet, dass eine lösliche Acylase mit chemisch gebundenen reaktiven Gruppen von Cellulosederivaten umgesetzt wird, welche durch Umsetzung von Cellulose in deren Lösungen in Polyoxymethylen enthaltendem Dimethylsulfoxid mit bi- oder multifunktionellen Reagentien hergestellt worden sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung sogenannter Acylase-Immobilisate, d. h. trägergebundene Acylasen, auf der Basis chemisch funktionalisierter Cellulosen.

Als Acylasen werden abgekürzt N-Acyl-L-aminosäuren-amidohydrolasen bezeichnet. Es sind wasserlösliche Proteine verschiedener Provenienz. Bevorzugte Quellen für ihre Gewinnung sind entweder tierische Organe, wie beispielsweise Nieren von Schweinen und Bauchspeicheldrüsen von Rindern, oder spezielle Stämme von Mikroorganismen, wie z. B. *Aspergillus oryzae*. Je nach ihrer Herkunft weisen die Acylasen differenzierte Substratspezifikationen auf, indem eine bestimmte Spezies eine bestimmte Acylgruppe, beispielsweise die Acetylgruppe, besonders leicht abspaltet. Allen Acylasen gemeinsam ist jedoch ihre Fähigkeit, N-Acyl-L-aminosäuren selektiv zu entacetylieren.

Die stereospezifische enzymatische Hydrolyse der Bindung zwischen Aminogruppe und Acylrest kann zur Gewinnung von L-Aminosäuren in der Weise technisch genutzt werden, dass die bei der asymmetrischen Hydrolyse in Freiheit gesetzte L-Aminosäure abgeschieden, die intakt gebliebene N-Acyl-D-Form racemisiert, der N-Acyl-L-Anteil des Racemates erneut enzymatisch gespalten und der Prozess bis zum Aufbrauch der N-Acyl-Form betrieben wird. Auf diese Weise ist eine vollständige Überführung des N-Acyl-Racemates der betreffenden Aminosäure in die gewünschte L-Form möglich. Die Spaltung vollzieht sich unter sehr schonenden und hinsichtlich der aufzubringenden Energien unter wenig aufwendigen Bedingungen: so liegen die pH-Werte der zu spaltenden Substrate meist nahe dem Neutralpunkt. Die Spaltung vollzieht sich im Regelfall bei Temperaturen im oder nahe dem physiologischen Bereich. Wegen dieser vorteilhaften Eigenschaften der Acylasen ist der Anreiz, sie zu einer besonders wirtschaftlichen und kostengünstigen technischen Trennung der optischen Antipoden von Aminosäuren zu nutzen, gross.

Die Löslichkeit der Acylasen ist jedoch für eine technische Anwendung nachteilig. Die bereits in sehr geringen Konzentrationen wirkenden Enzyme müssen aus grossen Substratvolumina möglichst quantitativ zurückgewonnen werden, da sie teuer sind und deshalb so oft wieder verwendet werden müssen, bis ihre enzymatische Aktivität erschöpft ist.

Die Entfernung der Acylasen aus den Spaltlösungen ist auch deshalb notwendig, um diese von den Proteinen und deren löslichen Neben- und Abbauprodukten zu befreien.

Löslichkeit, hohe Verdünnung und chemische Ähnlichkeit der Acylasen mit ihren Begleitstoffen sind jedoch Hindernisse einer wirtschaftlich tragbaren Wiedergewinnung und erschweren jede Handhabung der Acylasen erheblich.

Von unlöslich gemachten Acylasen konnten daher Vorteile für eine Biotechnologie z. B. der enzymatischen Racemat-trennung erwartet werden: die Immobilisate können durch einfache physikalische Trennverfahren, wie Filtration und Zentrifugieren, aus den Spaltlösungen abgeschieden und für einen Wiedereinsatz zurückgewonnen werden. Sie können als feste stationäre Phasen in Reaktoren, beispielsweise in Reak-

tionssäulen, angeordnet werden, eine für kontinuierliche Durchführung der optischen Spaltung besonders günstige Anordnung. Häufig sind ferner die an Träger fixierten Enzyme thermisch beständiger als die löslichen Formen, 5 erlauben in einigen Fällen ein Arbeiten bei höheren Temperaturen, wodurch die Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses steigt, und sind gegen denaturierende Einflüsse oft weniger empfindlich.

Es wurden daher bereits unlöslich gemachte Enzyme durch 10 Aufbringen auf Trägermaterialien vorgeschlagen.

Die für eine Insolubilisierung spaltaktiver biogener Proteine bereits vorgeschlagenen Träger genügen jedoch den Anforderungen, die ein industrieller Prozess an die Immobilisate stellen muss, nicht im gewünschten Masse. Als Gründe 15 dafür sind anzuführen:

Anorganische Träger mit überwiegend hydrophobem Charakter, wie z. B. poröse Gläser, haben zwar bessere mechanische Eigenschaften als viele hydrophyle organische 20 Träger. Die Bindungskapazität anorganischer Träger für die bioaktiven Proteine ist jedoch sehr begrenzt. Im Kontakt mit den neutralen bis schwach alkalischen Substratlösungen nimmt die Enzymaktivität so stark ab, dass diese Immobilisate für einen technischen Einsatz ungeeignet sind. Auch weisen solche Trägermaterialien oft zu hohe Löslichkeiten in den Substratlösungen auf; schlechte Beständigkeit der Trägerenzyme und Verunreinigungen der Spaltlösungen sind die Folge.

Hydrophile Träger, z. B. modifizierte Polysaccharide oder 30 Polyacrylamidgele, zeigen sehr ungünstige, teilweise irreversible Quellungserscheinungen und weisen oft Quellungsporosität auf, wodurch ein rascher Umsatz der Substrate infolge einer Behinderung der Diffusion nicht möglich ist. Besonders nachteilig wirken sich die Quellungserscheinungen beim Einsatz der gelartigen Immobilisate in Festbett-Reaktoren aus. An DEAE-Sephadex, einen mit Diäthylaminoäthylgruppen versehenen Dextran oder DEAE-Cellulose adsorptiv fixierte Acylase haftet nicht fest genug, um voll ausreichende Halb- 35 wertszeiten der hydrolytischen Aktivität zu erzielen. Der Anteil an polaren Bindungen, welcher bei der Bildung solcher Immobilisate zustande kommt, erreicht nicht die Festigkeit und Unempfindlichkeit gegen Milieu-Faktoren, z. B. Innenkonzentration und -ladung, wie sie kovalent gebundene Enzyme aufweisen.

Der Verwendung von Cellulose bzw. Cellulosederivaten 45 als Träger stand die generelle Hinderung entgegen, dass Cellulose ohne chemische Veränderung unlöslich ist und die durchgeführten Reaktionen in suspendierter Phase drastische Reaktionsbedingungen erfordern und wegen der Knäuelung der Cellulose-Ketten nur zu Teilumsetzungen führen.

Chemisch modifizierte Cellulose, wie Alkalicellulosen können nur mit wenigen Reagentien funktionalisiert werden und sind schwer von den schädlichen Alkalien zu befreien. Immobilisate auf Basis der bekannten modifizierten Cellu- 55 losen sind zudem leicht oxydabel und müssen unter Luftabschluss gehandhabt werden.

Es bestand demnach die Aufgabe, Acylase-Immobilisate herzustellen, in welchen das Enzym überwiegend kovalent gebunden ist. Die Trägeracylasen sollen genügende Aktivität 60 und Beständigkeit der Aktivität aufweisen, verbesserte mechanische und hydrodynamische Eigenschaften haben und ein leicht verfügbares Ausgangsmaterial für den Träger benötigen.

Erfindungsgemäss wurde diese Aufgabe dadurch gelöst, 65 dass Acylasen mit chemisch gebundenen reaktiven Gruppen von solchen Cellulosederivaten umgesetzt werden, welche durch Umsetzung von Cellulose in deren Lösungen in Polyoxymethylen enthaltendem Dimethylsulfoxid mit bi- oder

mehrfunktionellen Reagentien hergestellt worden sind. Diese Funktionalisierung der Cellulose ist in der DE-OS 26 44 678 beschrieben.

Zum Unterscheid von der bekannten chemischen Modifizierung der Cellulose durch Reaktionen in heterogener Phase, z. B. nach Art einer Grenzflächenreaktion, gestattet die Funktionalisierung der im inerten Lösungsmittel homogen gelösten Cellulosen nach der DE-OS 26 44 678, unter anhydriischen Bedingungen die Einführung zahlreicher und verschiedenartiger reaktiver Gruppen, die nach herkömmlichen Verfahren nicht oder nur schwierig einzuführen sind und den Substitutionsgrad der Cellulose-Hydroxylgruppen zu wählen.

Dies sind zwei wichtige Voraussetzungen für die Herstellung von Enzymträgern auf Cellulosebasis mit optimalen Eigenschaften: die reaktive Gruppe sollte zu einer Bindung führen, die die Enzymaktivität nicht schädigt oder nur möglichst wenig mindert. Gleichzeitig bildet die bei der Funktionalisierung zur Reaktion gebrachte multifunktionelle Gruppe einen geeigneten Spacer, nämlich eine den gewollten Abstand zu den Celluloseketten haltende Atomgruppierung, die eine ungehinderte enzymatische Aktivität der daran gebundenen Acylasen erlaubt. Sodann kann durch Wahl des Molverhältnisses der Reaktanden derjenige Substitutionsgrad der Hydroxylgruppe an den Cellulosestruktureinheiten erzielt werden, welcher den günstigsten Gehalt der Immobilisate an spaltaktivem Protein bewirkt. Die Möglichkeit, durch die Synthese des Celluloseträgers den für die betreffende Acylase unterschiedlicher Herkunft günstigsten Träger herstellen zu können, ist von ausschlaggebender Bedeutung für eine ökonomische Nutzung: enthält der Träger einerseits nur wenige zur Proteinbildung befähigte Gruppen, so ist die spezifische Aktivität der Immobilisate gering. Andererseits bleiben bei Proteingehalten über das Wirkungsoptimum hinaus aktive Zentren des Biokatalysators aus sterischen und anderen Gründen inaktiv.

Die zur Bindung befähigten Gruppen der nach der DE-OS 26 44 678 hergestellten funktionalisierten Cellulosen, beispielsweise Carboalkoxy-, wie Carbomethoxy-, Carboäthoxy-, p-Nitroaryl- oder γ -Aminopropylgruppen, können nach bekannten Reaktionen mit Acylasen gekuppelt werden. Eine Zusammenstellung solcher enzymfreundlichen Umsetzungsmethoden gibt H. H. Weetall unter dem Titel «Immobilized Enzymes» in Analytical Chemistry, Vol. 46, No. 7, S. 602 A ff. (1974). Enthält beispielsweise die funktionalisierte Cellulose Carbomethoxy-Gruppen, so kann die Fixierung der Acylase mittels des entsprechenden Azids, welches aus dem Hydrazid durch Umsetzung mit salpetriger Säure erhältlich ist, erfolgen. Ausgehend von Nitroarylgruppenhaltigen Celluloseträgern können Acylasen in unlösliche Form gebracht werden, indem nach Reduktion der aromatischen Nitro- zu Aminogruppen diese diazotiert werden, worauf die Diazoniumsalze mit dem Protein zur Reaktion gebracht werden können. Aminoarylcellulose kann ferner mittels Phosgen in Isocyanat- oder mittels Thiophosgen in Isothiocyanat-Derivate überführt werden. Beide Cellulose-Derivate können mit Acylase kovalente enzymaktive Verbindungen eingehen. γ -Aminopropylgruppen am Cellulose-träger können u. a. mit Glutardialdehyd umgesetzt oder mit beispielsweise Thiophosgen zum Isothiocyanat acyliert werden, wonach diese Derivate zur Reaktion mit Acylase befähigt sind.

Die chemische Reaktion der Acylasen mit der funktionalisierten Cellulose hat demnach unter den für die Reaktion geeigneten bekannten Bedingungen stattzufinden, welche die Acylase nicht schädigen.

Die Reaktion kann in suspensierter Phase ausgeführt werden. Zur Kupplung können sowohl gereinigte Acylasen

als auch technische Acylase-Konzentrate verschiedenen Reinheitsgrades eingesetzt werden. Die Bindung der Acylasen an die reaktiven Gruppen der Cellulosederivate erfolgt in wässrigen, pH-kontrollierten, vorzugsweise gepufferten Lösungen im neutralen bis schwach alkalischen Bereich, im allgemeinen bei pH 6,5 bis 9,0, bevorzugt bei pH 7,0 bis 8,5.

Die Temperaturen liegen bei der Kupplung im allgemeinen zwischen 0°C und der durch die thermische Stabilität des betreffenden Enzyms vorgegebenen Grenze. Die Reaktionsdauer kann Stunden bis einige Tage betragen.

Im Falle einer Monoaminoalkyl-alkoxysilylgruppe kann die Bindung der Acylase über Bildung von Schiffsbasen oder nach Reaktion mit beispielsweise Thiophosgen zu Isothiocyanat als Thioharnstoff-Derivat erfolgen.

Nach beendeter Kupplung werden die enzymaktiven Feststoffe im allgemeinen zur Entfernung anhaftender oder nur locker gebundenen Proteine gründlich mit Pufferlösungen und/oder Substratlösungen ausgewaschen. Die Pufferlösungen haben im Regelfall pH-Werte zwischen 6,5 und 8,0.

Bis zur Verwendung werden die Immobilisate zweckmässig unter Pufferlösungen bei Temperaturen bevorzugt zwischen 0 und 10°C aufbewahrt.

Beim Einsatz zur Racemattrennung von N-Acyl-D,L-amino-säuren pflegt nur anfänglich die Aktivität der gemäss der Erfindung hergestellten Acylase-Immobilisate um einen geringen Bruchteil – bis zu einigen Prozenten der Ausgangsaktivität – abzunehmen. Danach sind die Acylase-Präparate in ihrer Aktivität praktisch konstant.

Es ist ein besonderer Vorteil der hergestellten trägergebundenen Acylasen neben der vereinfachten Herstellbarkeit und vorteilhaften Abtrennbarkeit von den jeweiligen Substraten, dass der Verlust der Enzymaktivität durch Zersetzung gering ist. Nach Durchführung der Spaltreaktion bleibt daher die Aktivität sehr weitgehend erhalten, so dass eine häufige Wiederholung der Spaltung mit derselben trägergebundenen Acylase möglich ist.

Beispiel 1

10 g durch Reaktion von Linters-Cellulose, die in Dimethylsulfoxid/Paraformaldehyd gelöst war, mit p-Chlormethylbenzoesäuremethylester bei 50°C nach der DE-OS 26 44 678 entsprechend Beispiel 1 hergestellte funktionalisierte Cellulose, welche jedoch einen Gehalt von 4,0 Gew.-% Carbomethoxygruppen hatte, wurden in einer Lösung von 14 g Hydrazinhydrat in 300 ml Methanol 2 Tage bei 30°C unter Rühren suspendiert. Nach Abzentrifugieren des Hydrazids und gründlichem Auswaschen mit Methanol und anschliessend mit Wasser wurde das feuchte Produkt mit einer Lösung aus 10 g Natriumnitrit und 100 cm³ 2 n HCl unter Eiskühlung in der üblichen Weise in das Azid überführt, dieses nach beendeter Umsetzung säurefrei gewaschen und abzentrifugiert. Der feuchte Feststoff wurde in eine Lösung von 1,0 g löslicher Acylase aus *Aspergillus oryzae* (spez. Aktivität 10 U/mg; Substrat: N-Acetyl-D,L-methionin) in 20 ml 0,1 m Phosphatpuffer (NaH₂PO₄ und Na₂HPO₄ von pH 7, bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Nach 3 Tagen wurde der Bodenkörper abzentrifugiert. (Die nach dem Abzentrifugieren der enzymaktiven Feststoffe vorliegende gepufferte Acylaselösung kann mit frischem reaktiven Träger bis zum Verbrauch der Aktivität erneut umgesetzt werden.) Das Immobilisat wurde mit 0,1 m Phosphatpuffer bei pH 7 so lange gewaschen, bis im Eluat keine Enzymaktivität mehr messbar war, und bis zum Einsatz zur Spaltung unter Phosphatpufferlösung bei 4°C aufbewahrt. Enzymaktivität des Immobilisats (37°C; N-Acetyl-D,L-phenylalanin als Substrat): 80 U/g feuchtes Material.

Beispiel 2

10 g p-Nitrobenzoyl-Cellulose, hergestellt durch Acylierung von in Dimethylsulfoxid/Paraformaldehyd gelöster Cellulose mit p-Nitrobenzoylchlorid bei 70°C nach der DE-OS 26 44 678 entsprechend Beispiel 3, mit einem Stickstoffgehalt von 1,5 Gew.-% wurde mit überschüssiger wässriger 1 Gew.-%iger Natriumdithionit-Lösung bei deren Siedetemperatur 1 Stunde erhitzt. Das abgesaugte, reduzierte Produkt wurde gründlich mit destilliertem Wasser ausgewaschen und ohne Trocknung mit wässriger 10%iger Natriumnitritlösung von 2 n HCl unter Eiskühlung in der üblichen Weise diazotiert. Die säurefreie feuchte Diazoniumverbindung wurde in eine Lösung von 1,0 g löslicher Acylase aus *Aspergillus oryzae* (spez. Aktivität 15 U/mg; Substrat: N-Acetyl-D,L-methionin) in 50 ml 1,0 m Phosphatpuffer vom pH 7 gegeben und 3 Tage bei 4°C aufbewahrt. Nach Auswaschen aller löslichen Anteile betrug die Enzymaktivität des feuchten Immobilisats 102 U/G (37°C; N-Acetyl-D,L-phenylalanin als Substrat).

Beispiel 3

10 g durch γ -Aminopropylsilylgruppen funktionalisierte Linters-Cellulose, hergestellt durch Umsetzen von in Dimethylsulfoxid/Paraformaldehyd gelöster Cellulose mit γ -Aminopropyltriäthoxysilan bei 80°C nach der genannten DE-OS 26 44 678 mit einem Stickstoffgehalt von 1,4 Gew.-% wurden mit einer am Rückfluss siedenden Lösung von 2 g p-Nitrobenzylchlorid in 100 ml Chloroform unter Zugabe von 1,5 g Triäthylamin acyliert. Das Reaktionsprodukt wurde in der in Beispiel 2 beschriebenen Weise nach gründlichem Auswaschen mit Chloroform, Methanol und Wasser mittels Natriumdithionit reduziert und anschliessend diazotiert. Das feuchte, säurefreie Produkt wurde mit der gleichen Menge Acylaselösung gleicher Konzentration nach dem im Beispiel 15 2 angegebenen Verfahren umgesetzt. Die Enzymaktivität des feuchten Präparats betrug 76 U/g (37°C; N-Acetyl-D,L-phenylalanin als Substrat).

Die Aktivität U in den Beispielen wird in 10^{-6} mol (micromol) gespaltene Substanz pro Minute gemessen.