



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ **CH 660 199 A5**

⑤① Int. Cl.4: C 12 N 11/10

// (C 12 N 11/10, C 12 R 1:19)
(C 12 N 11/10, C 12 R 1:38)

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer:	1510/83	㉓ Inhaber:	Tanabe Seiyaku Company, Limited, Osaka-shi/Osaka-fu (JP)
㉒ Anmeldungsdatum:	18.03.1983		
㉔ Priorität(en):	19.03.1982 JP 57-45457	㉗ Erfinder:	Chibata, Ichiro, Suita-shi/Osaka-fu (JP) Tosa, Tetsuya, Kyoto-shi/Kyoto-fu (JP) Takamatsu, Satoru, Suita-shi/Osaka-fu (JP)
㉖ Patent erteilt:	31.03.1987		
㉘ Patentschrift veröffentlicht:	31.03.1987	㉙ Vertreter:	Bovard AG, Bern 25

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Mikroorganismen.**

⑤⑦ Ein Mikroorganismus wird in einer Kulturbrühe gezüchtet und nach Abschluss der Züchtung wird die Kulturbrühe mit Glutaraldehyd behandelt. Danach werden aus der Kulturbrühe mikrobielle Zellen abgeschieden und diese dann mit einer wässrigen Lösung eines Polysaccharids, das in seinem Molekül mindestens 10 Gew.-% Sulfatanteil aufweist, behandelt. Danach wird im erhaltenen Gemisch das Polysaccharid geliert, um die mikrobiellen Zellen in der gebildeten Gelmatrix des Polysaccharids einzuschliessen. Das Verfahren ist einfach und in industriellem Massstab ausführbar und ermöglicht eine einheitliche Herstellung von immobilisierten Mikroorganismen. Die erhaltenen immobilisierten Mikroorganismen zeigen hohe enzymatische Aktivität und hohe Stabilität, sodass sie während längerer Zeitdauer in kontinuierlichen enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden können.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismus in einer Kulturbrühe züchtet, nach Abschluss der Züchtung die Kulturbrühe mit Glutaraldehyd behandelt, mikrobielle Zellen aus der Kulturbrühe abscheidet, die abgeschiedenen mikrobiellen Zellen mit einer wässrigen Lösung eines Polysaccharids mit mindestens 10 Gew.-% Sulfatanteil im Molekül vermischt und dann im erhaltenen Gemisch das Polysaccharid geliert, um die mikrobiellen Zellen in der Gelmatrix des Polysaccharids einzuschliessen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Mikroorganismus *Escherichia coli* mit Aspartase-Aktivität oder *Pseudomonas dacunhae* mit L-Aspartate- β -decarboxylase-Aktivität verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Polysaccharid Carrageenan, Furcellaran oder Cellulosesulfat verwendet.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Behandlung mit Glutaraldehyd durch Vermischen des Glutaraldehyds mit der Kulturbrühe unter Rühren oder Schütteln ausführt und Glutaraldehyd in solchem Mengenanteil zugibt, dass dessen Konzentration in der Kulturbrühe 0,1 mmol bis 0,5 mol beträgt.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man eine wässrige Lösung des Polysaccharids einsetzt, die, bezogen auf deren Gesamtgewicht, 0,2–20 Gew.-% Polysaccharid enthält.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die abgeschiedenen mikrobiellen Zellen in Wasser, einer physiologischen Salzlösung oder einer Pufferlösung mit pH-Wert 3–10 suspendiert und die erhaltene Suspension bei 30–60 °C mit der wässrigen Lösung des Polysaccharids vermischt.

Immobilisierte Mikroorganismen, d.h. an Träger gebundene Mikroorganismen, haben in verschiedenen enzymatischen Reaktionen grosse Bedeutung erlangt, und im Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Mikroorganismen bekannt. In der US-PS 4 138 292 ist beispielsweise ein Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Mikroorganismen beschrieben, wobei mikrobielle Zellen mit einer wässrigen Lösung eines 10 Gew.-% oder mehr Sulfatanteil in dessen Molekül aufweisenden Polysaccharids, wie Carrageenan, vermischt und im erhaltenen Gemisch dann das Polysaccharid geliert wird, um die mikrobiellen Zellen in der gebildeten Gelmatrix einzuschliessen und dadurch immobilisierte Mikroorganismen zu erhalten. Im weiteren ist in der genannten Patentschrift auch die Stabilisierung der enzymatischen Aktivität des immobilisierten Mikroorganismus beschrieben, wobei der wie vorstehend beschrieben erhaltene immobilisierte Mikroorganismus mit Glutaraldehyd behandelt wird.

Diese Stabilisierung der enzymatischen Aktivität des immobilisierten Mikroorganismus durch Ausführung der Behandlung mit Glutaraldehyd nach dem Einschluss der mikrobiellen Zellen in das Gel ist jedoch bei Ausführung in industriellem Massstab nicht unbedingt befriedigend. Da das genannte Polysaccharidgel gegen Schwerkrafteinwirkung relativ unbeständig ist, neigt das Gel zu Schädigung der Formerhaltung während der Behandlung mit Glutaraldehyd, und es ist schwierig, diese Behandlung einheitlich auszuführen.

In ausgedehnten Studien zur Behebung dieser Schwierigkeiten wurde herausgefunden, dass immobilisierte Mikroor-

ganismen hoher enzymatischer Aktivität wie auch hoher Stabilität leicht hergestellt werden können, indem man eine Kulturbrühe des Mikroorganismus nach Abschluss der Züchtung mit Glutaraldehyd behandelt, anstatt diese Behandlung mit Glutaraldehyd nach dem Einschluss in das Polysaccharidgel auszuführen.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Verfahren zur Herstellung von immobilisierten Mikroorganismen mit höherer enzymatischer Aktivität und höherer Stabilität zu schaffen, das die Bildung der immobilisierten Mikroorganismen unter Vermeidung der vorstehend genannten Schwierigkeiten in industriellem Massstab ermöglicht.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemässe, im Patentanspruch 1 definierte Verfahren gelöst.

Im erfindungsgemässen Verfahren können beliebige Mikroorganismen, welche die erwünschte enzymatische Aktivität aufweisen, zum Einsatz gelangen. Bevorzugte derartige Mikroorganismen sind beispielsweise *Escherichia coli* ATCC 11303 bzw. IAM 1268, mit Aspartase-Aktivität, *Pseudomonas dacunhae* IAM 1152 mit L-Aspartate- β -decarboxylase-Aktivität und dgl.

Als Kulturbrühe kann jede beliebige konventionelle, für die Züchtung von Mikroorganismen wie die vorstehend genannte geeignete Kulturbrühe verwendet werden, die zweckentsprechende Mengenanteile von konventionellen Komponenten, wie Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, organische Nährstoffe, anorganische Materialien und dgl. enthalten kann.

Für die Ausführung des erfindungsgemässen Verfahrens geeignete Polysaccharide mit mindestens 10 Gew.-% Sulfatanteil in deren Molekül sind beispielsweise Carrageenan, Furcellaran, Cellulosesulfat und dgl. Carrageenan ist ein Polysaccharid mit 20–30 Gew.-% Sulfatanteil im Molekül, das erhältlich ist durch Raffination eines Extraktes von Meeresalgen der Gattung Rhodophyceae, wie Gigartinales und Solieriales. Im erfindungsgemässen Verfahren können im Handel erhältliche Typen von Carrageenan, beispielsweise «GENU GEL WG», «GENU GEL CWG» und «GENU VISCO» der Kopenhagen Pectin Factory Ltd. verwendet werden. Furcellaran ist ein Polysaccharid mit 12–162 Gew.-% Sulfatanteil im Molekül, das erhältlich ist durch Extraktion einer Sorte Meeresalgen der Gattung Rhodophyceae, d.h. *Furcellaria fastigiata*, und es kann beispielsweise das von der Litex Co., Dänemark, hergestellte Furcellaran verwendet werden. Als Cellulosesulfat ist beispielsweise «KELCO SCS» der Kelco Co. geeignet.

Die Züchtung des Mikroorganismus im erfindungsgemässen Verfahren ist nicht auf eine spezifische Methode eingeschränkt und kann nach bekannten Methoden erfolgen. Gegebenenfalls kann nach Abschluss der Züchtung die enzymatische Aktivität für ein Nebenreaktionssystem des Mikroorganismus vor dem nächsten Schritt der Behandlung mit Glutaraldehyd nach einer bekannten Methode aufgehoben werden.

Die Behandlung der Kulturbrühe mit Glutaraldehyd nach Abschluss der Züchtung kann im erfindungsgemässen Verfahren leicht ausgeführt werden durch Vermischen von Glutaraldehyd mit der Kulturbrühe unter Rühren oder Schütteln. Vorzugsweise wird der Glutaraldehyd in solchem Mengenanteil zugesetzt, dass dessen Endkonzentration in der Kulturbrühe 0,1 mmol bis 0,5 mol, insbesondere 1 mmol bis 0,1 mol, beträgt. Vorzugsweise wird diese Behandlung mit Glutaraldehyd im Temperaturbereich von 0–60 °C, insbesondere 0–40 °C, ausgeführt. Die für diese Behandlung benötigte Zeitdauer ist temperaturabhängig, wobei es üblicherweise bevorzugt wird, die Behandlung während 1 min bis 24 h, insbesondere während 5 min bis 5 h, auszuführen. Nach der Behandlung mit Glutaraldehyd werden mikrobielle Zellen abgeschie-

den, beispielsweise durch Zentrifugation der Kulturbrühe.

Die abgeschiedenen mikrobiellen Zellen werden dann mit einer wässrigen Lösung des Polysaccharids mit mindestens 10 Gew.-% Sulfatanteil in dessen Molekül, das im nachstehenden einfach als «Polysaccharid» bezeichnet wird, vermischt. Die wässrige Lösung des Polysaccharids ist leicht erhältlich durch Vermischen mit Wasser von 30–100 °C. Die Konzentration des Polysaccharids in der Lösung beträgt vorzugsweise 0,2–20 Gew.-%, insbesondere 1–10 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Lösung. Das Vermischen der wässrigen Lösung des Polysaccharids mit den abgeschiedenen mikrobiellen Zellen erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens, indem man die mikrobiellen Zellen in Wasser, einer physiologischen Salzlösung oder einer zweckentsprechenden Pufferlösung mit pH-Wert 3–10, vorzugsweise 4–8, suspendiert und die erhaltene Suspension dann bei 30–60 °C mit der wässrigen Lösung des Polysaccharids mischt.

Im erhaltenen Gemisch wird dann das Polysaccharid geliert, um die mikrobiellen Zellen in der Gelmatrix des Polysaccharids einzuschliessen. Die Gelierung des Polysaccharids ist leicht erzielbar durch Abkühlung des Gemischs, beispielsweise durch Stehenlassen des Gemischs bei 0–20 °C während 1 min bis zu 5 h, wobei das Polysaccharid geliert und gleichzeitig die mikrobiellen Zellen in der resultierenden Gelmatrix des Polysaccharids eingeschlossen werden. Das erhaltene Gel kann zu verschiedenen Formen geformt werden.

Die Gelierung kann aber auch nach anderen Methoden als durch Abkühlung des Gemischs ausgeführt werden. Beispielsweise kann das Gemisch mit Ammoniumionen oder einem Metallion mit einem Atomgewicht von mindestens 24, wie das Kalium-, Magnesium-, Calciumion, oder mit einer Verbindung mit 2 oder mehr basischen funktionellen Gruppen im Molekül, wie Methylen-, Ethylen-, p-Phenylendiamin, oder mit einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, wie Aceton, Methanol, Ethanol, Propanol, Dioxan, Tetrahydrofuran, in Berührung gebracht werden.

Der nach dem erfindungsgemässen Verfahren immobilisierte Mikroorganismus kann in verschiedenen enzymatischen Reaktionen nach bekannten Methoden eingesetzt werden.

Im Vergleich zu dem in der bereits erwähnten US-PS 4 138 292 beschriebenen Verfahren, in welchem die Behandlung mit Glutaraldehyd nach dem Einschluss der mikrobiellen Zellen in ein Gel ausgeführt wird, bietet das erfindungsgemässe Verfahren, nach welchem die Behandlung mit Glutaraldehyd in der Kulturbrühe nach Abschluss der Züchtung erfolgt, die nachstehenden Vorteile:

Da nämlich die Behandlung mit Glutaraldehyd nach dem vorstehend genannten Stand der Technik nach dem Geleinschluss erfolgt, besteht die Gefahr der Schädigung des Gels, und es ist schwierig, die Behandlung einheitlich auszuführen. Im Gegensatz dazu werden diese Schwierigkeiten des Standes der Technik im erfindungsgemässen Verfahren vermieden, da die Behandlung mit Glutaraldehyd in der Kulturbrühe nach dem Abschluss der Züchtung erfolgt, so dass die Behandlung einheitlich und auf sehr einfache Art ausgeführt werden kann. Weiterhin zeigen die nach dem erfindungsgemässen Verfahren immobilisierten Mikroorganismen höhere enzymatische Aktivität als die nach dem Stand der Technik immobilisierten Mikroorganismen. Ausserdem behalten die nach dem erfindungsgemässen Verfahren erhaltenen, immobilisierten Mikroorganismen im Vergleich zu solchen, die nach dem Stand der Technik immobilisiert wurden, ihre höhere enzymatische Aktivität in kontinuierlichen enzymatischen Reaktionen während längerer Zeitdauer bei.

Demzufolge bietet die Erfindung ein hervorragendes, industriell ausführbares Verfahren zur Herstellung von immo-

bilisierten Mikroorganismen.

In den nachstehenden Beispielen werden Ausführungsformen der Erfindung detailliert erläutert. Prozentuale Konzentrationsangaben sind gewichtsmässig, wenn nichts anderes angegeben ist.

Beispiel 1

In 10 500 ml Glaskolben wurden je 100 ml einer Kulturbrühe von pH-Wert 7,0, enthaltend 2,0% Maisbrühwasser, 2,0% Hefe, 1,14% Fumarsäure, 0,5% Diammoniumfumarat, 0,2% Kaliumdihydrogenphosphat und 0,05% Magnesiumsulfat, eingefüllt. Der Inhalt jedes Kolbens wurde mit *Escherichia coli* ATCC 11303 bzw. IAM 1268 geimpft. Dann wurden die Kolben unter Schütteln bei 30 °C während 16 h inkubiert und danach zum Abbruch der Züchtung auf 5 °C abgekühlt. In jeden Kolben wurden dann 2 ml einer 25%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd eingefüllt, so dass die Schlusskonzentration an Glutaraldehyd in jedem Kolben 5 mmol betrug, wonach der Kolben während 30 min geschüttelt wurde. Durch Zentrifugation der Kulturbrühe wurden dann mikrobielle Zellen von *Escherichia coli* ATCC 11303 in einem Mengenanteil von 23 g Feuchtgewicht, abgeschieden. Getrennt davon wurden 6 g Carrageenan «GENU GEL WG» der Kopenhagen Pectin Factory Ltd. in 129 ml Wasser von 45 °C unter Bildung einer wässrigen Lösung von Carrageenan gelöst.

23 g der erhaltenen mikrobiellen Zellen, suspendiert in 23 ml einer physiologischen Salzlösung wurden dann bei 40 °C mit der Carrageenanlösung vermischt, und das erhaltene Gemisch wurde zur Gelierung des Carrageenans während 30 min bei 4 °C stehengelassen. Das erhaltene Gel wurde in kubische Form einer Seitenlänge von etwa 3 mm gebracht und dann in 400 ml einer Substratlösung, enthaltend 1 mol Diammoniumfumarat getaucht, während 48 h bei 37 °C stehengelassen und dann mit einer 2%igen wässrigen Lösung von Calciumchlorid gewaschen, wobei 180 g Feuchtgewicht immobilisierte *Escherichia coli* erhalten wurden, die eine Aspartase-Aktivität von 48 680 µmol/h/g Zellen aufwies.

Beispiel 2

In 10 500 ml Glaskolben wurden je 120 ml einer Kulturbrühe von pH-Wert 7,3, enthaltend 3,2% Natriumglutamat, 0,5% Hefe, 0,05% Kaliumdihydrogenphosphat und 0,01% Magnesiumsulfat eingefüllt. Der Inhalt jedes Kolbens wurde mit *Pseudomonas dacunhae* IAM 1152 geimpft, und die Kolben wurden unter Schütteln während 24 h bei 30 °C inkubiert. Nach Abschluss der Züchtung wurde der Inhalt jedes Kolbens durch Zugabe von 26 ml Essigsäure auf pH-Wert 4,75 gestellt, und die Kolben wurden dann während 1 h bei 30 °C stehengelassen. Dann wurde der Inhalt jedes Kolbens durch Zugabe von 86 ml 3N Natronlauge auf pH-Wert 6,0 gestellt und der Kolben auf 10 °C abgekühlt. Dann wurden in jeden Kolben 2,6 ml einer 25%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd gegeben, so dass die Schlusskonzentration an Glutaraldehyd in jedem Kolben 5 mmol betrug, wonach der Kolben während 30 min geschüttelt wurde. Durch Zentrifugation der Kulturbrühe wurden dann 20 g Feuchtgewicht mikrobielle Zellen von *Pseudomonas dacunhae* IAM 1152 abgeschieden.

Separat davon wurde eine wässrige Lösung von Carrageenan hergestellt durch Lösen von 4,03 g Carrageenan «GENU GEL WG» der Kopenhagen Pectin Factory Ltd. in 85 ml Wasser von 50 °C.

Eine Suspension von 20 g der erhaltenen mikrobiellen Zellen in 20 ml einer physiologischen Salzlösung wurde bei 45 °C mit der erhaltenen Carrageenanlösung vermischt und das erhaltene Gemisch zur Gelierung des Carrageenans während 30 min bei 4 °C stehengelassen. Das gebildete Gel wurde in kubische Form einer Seitenlänge von etwa 3 mm gebracht.

Dann wurde das Gel mit einer 2%igen wässrigen Lösung von Calciumchlorid gewaschen, wobei 130 g Feuchtwicht immobilisiertes *Pseudomonas dacunhae* IAM 1152 erhalten wurde, das eine L-Aspartate- β -decarboxylase-Aktivität von 9050 $\mu\text{mol/h/g}$ Zellen aufwies.

Versuch 1

Es wurden mehrere Versuchsreihen der nachstehenden kontinuierlichen enzymatischen Reaktion ausgeführt unter Verwendung der immobilisierten Zubereitung von *Escherichia coli* mit Aspartase-Aktivität, hergestellt gemäss Beispiel 1, somit nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellt, immobilisierter Mikroorganismus, der im nachstehenden als «Zubereitung A» bezeichnet wird, und vergleichsweise unter Verwendung einer immobilisierten Zubereitung von *Escherichia coli*, hergestellt, ohne jegliche Behandlung mit Glutaraldehyd, somit ein immobilisierter Vergleichs-Mikroorganismus, der im nachstehenden als «Zubereitung B» bezeichnet wird, und vergleichsweise unter Verwendung einer Zubereitung von immobilisierten *Escherichia coli*, hergestellt durch Ausführung der Behandlung mit Glutaraldehyd nach Einschliessung der mikrobiellen Zellen in das Gel, somit ein immobilisierter Vergleichs-Mikroorganismus der im nachstehenden als «Zubereitung C» bezeichnet wird. Die Versuchsreihen wurden ausgeführt, um die Stabilität der enzymatischen Aktivität und die Produktionskapazität von L-Asparaginsäure jeder der Zubereitungen darzustellen.

Die für Vergleichszwecke eingesetzten Zubereitungen B und C wurden folgendermassen hergestellt:

Die Zubereitung B wurde nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehen mit der Ausnahme hergestellt, dass die Behandlung mit Glutaraldehyd nicht ausgeführt wurde.

Die Zubereitung C wurde hergestellt, indem 10 g Feuchtwicht der erhaltenen Zubereitung B in 100 ml einer 2%igen wässrigen Lösung von Calciumchlorid, enthaltend 5 mmol Glutaraldehyd, suspendiert, bei 5°C während 15 min geschüttelt und dann mit einer 2%igen wässrigen Lösung von Calciumchlorid gewaschen wurden.

Die kontinuierliche enzymatische Reaktion wurde ausgeführt, indem von der jeweiligen Zubereitung von immobilisierten *Escherichia coli* 4 g in eine Doppelmantelsäule von 1,6 cm lichter Weite und 10,5 cm Länge eingefüllt wurden und eine wässrige Lösung, enthaltend 1 mol Ammoniumformiat und 10^{-3} mol Magnesiumchlorid, deren pH-Wert mittels Ammoniaklösung auf 8,5 gestellt worden war, wurde bei 37°C mit einer Durchflussrate von 40 ml/h kontinuierlich durch die Säule geleitet. Das Eluat aus der Säule wurde in Intervallen gesammelt und darin die Halbwertszeit der Aspartase-Aktivität, d.h. die zur Reduktion der enzymatischen Aktivität auf 50% der ursprünglichen Aktivität benötigte Anzahl Tage, und die Produktionskapazität der jeweiligen immobilisierten Zubereitung für L-Asparaginsäure durch Messung des Mengenanteils L-Asparaginsäure im Eluat bestimmt. Die quantitative Bestimmung von L-Asparaginsäure wurde durch Bioassay unter Verwendung von *Leuconostoc mesenteroides* P-60 ausgeführt.

Die zeitabhängig erhaltenen Resultate sind in Tabelle 1 zusammengefasst, aus welcher hervorgeht, dass der erfindungsgemäss hergestellte Mikroorganismus der Zubereitung A im Vergleich zu den Vergleichszubereitungen B und C höhere enzymatische Aktivität beibehält und hervorragende Produktionskapazität für L-Asparaginsäure aufweist.

Tabelle 1

Zeitdauer der kontinuierlichen Reaktion, d	Aspartase-Aktivität $\mu\text{mol L-Asparaginsäure/h/g Zellen}$		
	Zubereitung A	Zubereitung B	Zubereitung C
5			
1	48 680	56 340	37 460
10	48 000	51 100	36 400
20	47 360	46 030	35 410
30	45 100	41 860	34 260
40	43 880	37 900	33 290
50	42 730	34 450	32 480
80	38 910	25 530	29 710
100	36 700	20 910	28 110
15	150	32 830	12 760
200	27 940	7 730	21 070
250	24 300	4 750	18 120
Halbwertszeit der Aspartase-Aktivität, d	250	70	240
Produktionskapazität L-Asparaginsäure*	309	100	228
25			

* Die Produktionskapazität für L-Asparaginsäure ist ausgedrückt als relativer Wert der gesamten, innert der Halbwertszeit der enzymatischen Aktivität produzierten Menge L-Asparaginsäure, bezogen auf den angenommenen Wert 100 für die bei Verwendung der Vergleichszubereitung B innert dieser Zeitdauer erhaltene Menge L-Asparaginsäure.

Versuch 2

Mehrere Versuchsreihen der nachstehenden kontinuierlichen enzymatischen Reaktion wurden ausgeführt unter Verwendung der immobilisierten Zubereitung von *Pseudomonas dacunhae* IAM 1152 mit L-Aspartate- β -decarboxylase-Aktivität, dem erfindungsgemäss hergestellten immobilisierten Mikroorganismus, nachstehend bezeichnet als «Zubereitung D», einer immobilisierten Zubereitung von *Pseudomonas dacunhae* IAM 1152, hergestellt ohne jegliche Behandlung mit Glutaraldehyd, somit einem immobilisierten Vergleichs-Mikroorganismus, nachstehend bezeichnet als «Zubereitung E», und einer immobilisierten Zubereitung von *Pseudomonas dacunhae* IAM 1152, hergestellt durch Ausführung der Behandlung mit Glutaraldehyd nach Einschliessung der mikrobiellen Zellen in ein Gel, somit einem immobilisierten Vergleichs-Mikroorganismus, nachstehend bezeichnet als «Zubereitung F». Die Versuchsreihen wurden ausgeführt, um die enzymatische Aktivität und die Produktionskapazität für L-Alanin jeder der Zubereitungen darzustellen.

Die Vergleichs-Zubereitungen E und F wurden folgendermassen hergestellt:

Die Zubereitung E wurde nach dem in Beispiel 2 beschriebenen Vorgehen mit der Ausnahme hergestellt, dass die Behandlung mit Glutaraldehyd nicht ausgeführt wurde.

Die Zubereitung F wurde hergestellt durch Zusatz von 20 ml einer 0,2 molaren Phosphatpufferlösung von pH-Wert 7, enthaltend 1,67 mol L-Lysin-hydrochlorid zu 10 g Feuchtwicht der Zubereitung E, Stehenlassen des erhaltenen Gemischs während 10 min bei 10°C, Zusatz von 13,3 ml einer 25%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd, Stehenlassen des erhaltenen Gemischs während 10 min bei 10°C und anschliessendes Waschen mit einer 2%igen wässrigen Lösung von Calciumchlorid.

Die kontinuierliche enzymatische Reaktion wurde ausgeführt, indem 4 g der jeweiligen Zubereitung von immobilisier-

tem *Pseudomonas dacunhae* IAM 1152 in eine Doppelman-
telsäule von 1,6 cm lichter Weite und 10,5 cm Länge eingefüllt
wurden und eine wässrige Lösung, enthaltend 1 mol Ammo-
nium-L-aspartat und 10^{-4} mol Pyridoxalphosphat, deren pH-
Wert mittels Ammoniaklösung auf 5,5 gestellt worden war,
bei 37°C kontinuierlich mit einer Durchflussrate von 18 ml/h
durch die Säule geleitet wurde. Das Eluat aus der Säule
wurde mit Intervallen gesammelt und damit die Halbwertszeit
der L-Aspartate- β -decarboxylase-Aktivität und die Produk-
tionskapazität für L-Alanin der jeweiligen immobilisierten

Zubereitung durch Bestimmung des Gehalts an L-Alanin im
Eluat bestimmt. Die quantitative Bestimmung von L-Alanin
wurde durch Bioassay unter Verwendung von *Leuconostoc*
citrovorum ATCC 8081 ausgeführt.

5 Die erhaltenen, zeitabhängigen Resultate sind in Tabelle 2
zusammengefasst, aus welcher hervorgeht, dass der erfin-
dungsgemäss hergestellte immobilisierte Mikroorganismus
der Zubereitung D im Vergleich zu den Vergleichszubereitun-
gen E und F höhere enzymatische Wirksamkeit beibehält und
10 hervorragende Produktionskapazität für L-Alanin aufweist.

Tabelle 2

Zeitdauer der kontinuierlichen Reaktion, d	L-Aspartate- β -decarboxylase-Aktivität $\mu\text{mol L-Alanin/h/g Zellen}$		
	Zubereitung D	Zubereitung E	Zubereitung F
1	9 050	9 050	4 680
10	8 910	5 520	4 550
20	8 320	3 330	4 400
30	8 000	2 080	4 240
40	7 530	1 210	4 120
50	6 910	750	4 110
70	7 530	280	3 750
100	6 910	—	3 390
150	6 090	—	2 910
200	5 350	—	2 470
250	4 610	—	2 190
300	4 140	—	1 860
350	3 650	—	1 600
Halbwertszeit L-Aspartate- β -decarboxy- lase-Aktivi- tät, d	270	14	225
Produktions- kapazität L-Alanin*	1 929	100	831

* Die Produktionskapazität für L-Alanin ist ausgedrückt
als relativer Wert der innert der Halbwertszeit der enzymati-
schen Aktivität produzierten Gesamtmenge L-Alanin, bezo-
gen auf den als 100 angenommenen Wert der bei Verwendung
der Vergleichszubereitung E innert dieser Halbwertszeit pro-
duzierten Menge L-Alanin.