

42. Reinigung der D-Oxynitrilase aus Mandeln mit Hilfe der Affinitäts-Chromatographie

von Erich Hochuli

Zentrale Forschungseinheiten der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, CH-4002 Basel

(7.1.83)

A Rapid Purification of D-Oxynitrilase from Almond Meal by Affinity Chromatography

Summary

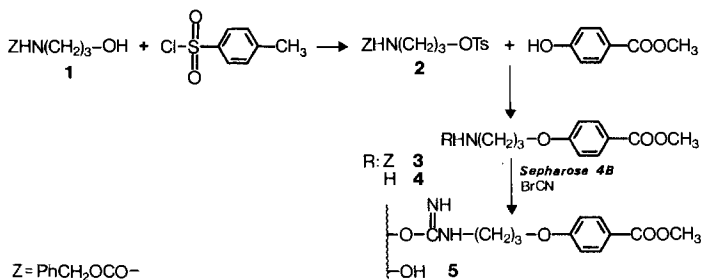
Oxynitrilase from almond meal is capable of catalyzing the stereospecific addition of cyanide to a variety of aldehydes. Thus, the enzyme is potentially useful in the synthesis of optically active cyanohydrins on a preparative scale [1]. As the currently available purification procedures for this enzyme [2] are rather tedious, we have elaborated a simple and rapid procedure based on affinity chromatography. An inhibitor for the enzyme, methyl *p*-(3-aminopropoxy)benzoate (4), has been synthesized and attached covalently to *Sepharose 4B* as a solid matrix (5). With this affinity gel it was possible to prepare the D-oxynitrilase in a simple procedure with high yields.

Einleitung. – In Gegenwart des Enzyms D-Oxynitrilase entstehen aus Aldehyden und Blausäure Cyanhydrine in ausgezeichneter Ausbeute und in hoher optischer Reinheit. Mit Hilfe dieses Enzyms wurden bereits mehrere optisch reine Cyanhydrine in präparativem Maßstab hergestellt [1].

Eine praktikable Methode zur Isolierung und Reinigung des Enzyms wurde von *Becker & Pfeil* [2] ausgearbeitet. Dieses Verfahren ist jedoch kompliziert und für die Herstellung grösserer Mengen ungeeignet. Im Zusammenhang mit Arbeiten über optisch aktive Cyanhydrine war ein besseres Reinigungsverfahren für die D-Oxynitrilase zu finden. Aus den Arbeiten von *Becker & Pfeil* geht hervor, dass Benzoesäure ein Inhibitor des Enzyms ist. Es schien deshalb interessant, ein Affinitäts-Harz mit einem Benzoesäurederivat als spezifische Gruppe für die Reinigung des Enzyms zu verwenden.

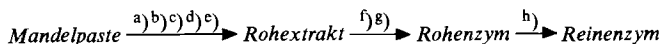
Resultate. – *Synthese des Affinitäts-Harzes* (5). Als wasserunlöslicher Träger des Inhibitors wurde *Sepharose 4B* verwendet, welche nach der Bromcyanmethode [3] aktiviert wurde. Um die sterische Behinderung der Komplexbildung zwischen Inhibitor (Benzoesäuremethylester) und dem Enzym möglichst klein zu halten, erfolgte die Bindung an den Träger über eine Propoxykette.

Reinigung der Oxynitrilase mit dem Affinitäts-Harz. Der Rohextrakt wurde nach dem Verfahren von *Becker & Pfeil* [2] gewonnen. Als Ausgangsmaterial diente eine



Mandelpaste, welche im Bäckereigewerbe verwendet wird. Nach dem Entfetten der Paste mit Hexan, erfolgte die Extraktion des Enzyms aus dem Mandelmehl mit verdünntem Ammoniak. Dieser Extrakt wurde dann am Affinitäts-Harz chromatographiert, indem er auf die Säule aufgeladen und das Enzym mit 0,5 M NaCl-Lösung eluiert wurde (Fig. 1). Anschliessend musste zum Entsalzen des Produktes an *Sephadex G-100* chromatographiert werden (Fig. 2). Das Adsorptionsspektrum des mit diesem Verfahren erhaltenen Reinenzyms ist identisch mit dem von *Becker & Pfeil* [2] veröffentlichten Spektrum¹⁾. Die Enzymlösung kann im Kühlschrank während mehreren Tagen ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. Wird das Enzym in Gegenwart von Lactose lyophilisiert, wird ein Produkt erhalten, welches mehrere Monate haltbar bleibt.

Reinigungsschema



a) Entfetten mit Hexan. b) Wässrige Extraktion. c) Zentrifugation. d) Säurefällung. e) Zentrifugation. f) Adsorption am Affinitäts-Harz. g) Eluierung des Enzyms mit einer 0,5 M NaCl-Lösung. h) Gelfiltration an *Sephadex G-100*.

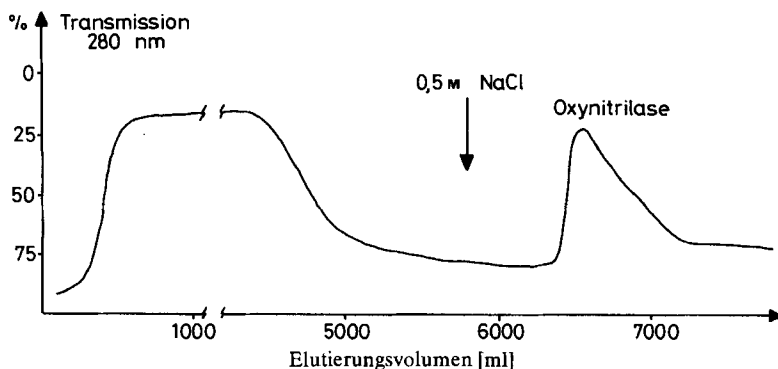


Fig. 1. Adsorption und Eluierung (Pfeil) der Oxynitrilase am Affinitäts-Harz

¹⁾ Die Oxynitrilase gehört zur Gruppe der Flavoproteine (λ_{max} (nm): 459, 388, 275). Pro Proteinmolekel ist eine Molekel FAD, Flavin-adenin-dinucleotid, gebunden.

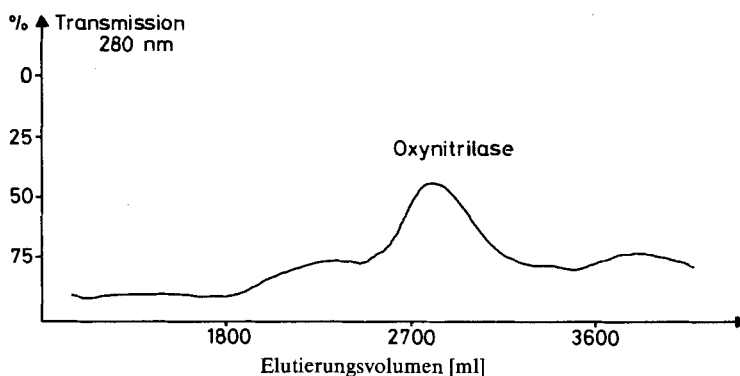


Fig. 2. Gelfiltration des Rohenzym an Sephadex G-100

Tabelle. Isolierung und Reinigung des Enzyms aus 500 g Mandelmehl

	Protein mg	Totale Aktivität E ^{a)}	Spezif. Aktivität E/mg	Ausbeute %
Rohextrakt	21000	65000	3	100
Rohenzym	1700	57000	34	87
Reinenzym	480	54000	112	84

a) Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wird der Drehwinkel des aus Benzaldehyd und Blausäure gebildeten optisch aktiven Cyanhydrins gemessen [2]. Eine Enzymatische Einheit E ist diejenige Menge Enzym, welche in 5 Min. ein Produkt mit $\alpha_D = 0,01^\circ$ bildet (siehe *Exper. Teil*).

Diskussion. – Das Affinitäts-Harz wurde bis heute sechsmal wiederverwendet, ohne dass eine Abnahme der Aktivität beobachtet werden konnte. Über die Lebensdauer können aber zur Zeit keine genauen Aussagen gemacht werden. Die Frage nach der Kapazität des Harzes ist nicht leicht zu beantworten. Die Qualität der Mandeln spielt sicher eine wesentliche Rolle. Die spezifische Aktivität des mit Affinitätschromatographie gereinigten Enzyms ist grösser (112 E/mg) als die Aktivität der von *Becker & Pfeil* [2] beschriebenen Präparate (~ 60 E/mg).

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. – Die Schmelzpunkte (Smp.) wurden in einer offenen Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden bei 60 MHz aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm gegenüber Tetramethylsilan als internem Standard angegeben. Für die Multiplizität der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *m* = Multiplett, *br.* = breit. Die Kopplungskonstanten (*J*) sind in Hz angegeben.

Herstellung des Affinitäts-Harzes. – *p*-Toluolsulfonsäure-(3-[benzyloxyformamido]-propyl)ester (2). Die Lösung von 104,5 g (0,5 mol) geschütztem Aminopropanol (1) in 400 ml Chloroform/Pyridin 4:1 wurden auf 0° abgekühlt und dann mit der Lösung von 114 g (0,6 mol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in 200 ml CHCl_3 so versetzt, dass die Temp. nicht über 10° stieg. Nach 10 Std. Weiterrühren wurde das Gemisch auf ca. 2 kg Eis und 250 ml konz. Salzsäure gegossen, mit CHCl_3 extrahiert und die organische

Phase neutral gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Es resultierte ein gelbliches Harz, welches an Kieselgel (fein) chromatographiert werden musste. Mit Essigester/Hexan 6:4 wurden 131 g (72%) eines farblosen Harzes eluiert, welches sofort in der nächsten Stufe eingesetzt wurde. – $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): 1,6–2,2 (*m*, 2 H); 2,4 (*s*, 3 H); 3,0–3,4 (*m*, 2 H); 4,1 (*t*, $J=6$, 2 H); 4,9 (*br. s*, 1 H); 5,1 (*s*, 2 H); 7,3 und 7,8 (*m*, 9 H).

p-(3-[1-Benzoyloxy]formamido)-propoxy)benzoesäuremethylester (3). Eine 50proz. Dispersion von 16,7 g Natriumhydrid wurde unter Stickstoff 2mal mit Benzol gewaschen und anschliessend in 250 ml abs. DMF vorgelegt. Dazu wurde die Lösung von 48 g (0,5 mol) *p*-Hydroxybenzoesäuremethylester in 100 ml abs. DMF getropft und nach 1 Std. Rühren die Lösung von 181 g (0,5 mol) *p*-Toluolsulfonsäureester (2) in 150 ml abs. DMF gegeben. Über Nacht wurde bei RT. gerührt und dann das DMF im Rollverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde mit Eis und Wasser versetzt und mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde mit NaOH- und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester/Äther gelöst, mit ca. 3 g Aktivkohle versetzt und aufgekocht. Nach dem Filtrieren wurde das Produkt im Eisschrank über Nacht auskristallisieren gelassen. Ausbeute: 130 g (76%) weisse Kristalle, Smp. 86–88°. – $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): 1,8–2,2 (*m*, 2 H); 3,2–3,6 (*m*, 2 H); 3,9 (*s*, 3 H); 4,1 (*t*, $J=6$, 2 H); 4,9 (*br. s*, 1 H); 5,1 (*s*, 2 H); 6,9 und 7,9 (*m*, 4 H); 7,3 (*s*, 5 H).

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ Ber. C 66,46 H 6,16 N 4,08% Gef. C 66,12 H 6,08 N 4,11%

p-(3-Aminopropoxy)benzoesäuremethylester (4). Die Lösung von 103 g (0,3 mol) Methylbenzoat 3 in 2,5 Liter CH_3OH wurde mit 8 g 5proz. Pd/C und Wasserstoff bei RT. und Normaldruck behandelt. Der Katalysator wurde abgesaugt und das Filtrat eingedampft: es resultierten 62 g farbloses Öl, welches direkt an Sepharose 4B gebunden wurde.

Für die Charakterisierung von 4 wurde das Hydrochlorid hergestellt, das aus Äthanol umkristallisiert wurde, Smp. 231–233°. – $^1\text{H-NMR}$. (DMSO): 2,0–2,5 (*m*, 2 H); 3,1 (*t*, $J=7$, 2 H); 3,9 (*s*, 3 H); 4,2 (*t*, $J=6$, 2 H); 7,2 und 8,0 (*m*, 4 H); 8,45 (*br. s*, 3 H).

$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ Ber. C 53,77 H 6,56 N 5,70 Cl 14,43%
Gef. „ 53,63 „ 6,64 „ 5,53 „ 14,20%

Bindung von *p*-(3-Aminopropoxy)benzoesäuremethylester (4) an Sepharose 4B. Auf einer Glassinternutsche (P 2) wurden 700 ml Sepharose 4B (Pharmacia) mit 1000 ml Wasser gewaschen. Dann wurde das Gel in einem 2-Liter-4-Halskolben, versehen mit Rührer, Thermometer, pH-Elektrode und 2 Tropftrichtern, eingefüllt. Mit 2N NaOH wurde das pH auf 11 gebracht. Anschliessend wurde die Apparatur auf 10° abgekühlt und bei dieser Temperatur eine Lösung von 20 g BrCN in 20 ml *N*-Methyl-2-pyrrolidon (Fluka AG) innert 15 Min. zugetropft. Durch gleichzeitige Zugabe von 2N NaOH wurde das pH bei 11 gehalten. Nach 35 Min. wurde das Gel unter leichtem Vakuum durch eine P2-Nutsche abgesaugt und mit 1000 ml 0,1M NaHCO_3 -Lösung gewaschen.

Das aktivierte Gel wurde nun in einen 3-Liter-Kolben gebracht und eine Lösung von 42 g (0,2 mol) 4 in 2,1 Liter 0,1M NaHCO_3 -Lösung zugegeben. Nach 4 Std. schonendem Rühren wurde das Gemisch auf einer P2-Nutsche filtriert und der Rückstand nacheinander mit 1 Liter H_2O , 1 Liter 0,10M HCl, 1 Liter 0,5M NaCl und mit 1 Liter 0,025M NaCl gewaschen. Das Waschwasser wurde basisch gestellt und 3mal mit Essigester extrahiert. Es konnten 13 g 4 zurückgewonnen werden. Damit ergibt sich eine Beladung des Gels von 29 g Inhibitor/700 ml.

Das Affinitäts-Harz wurde in eine Chromatographiesäule mit 5 cm Durchmesser eingefüllt.

Isolierung und Reinigung des Enzyms. Aktivitäts-Test nach Becker & Pfeil [2]. – Gemessen wird die Drehung des gebildeten optisch aktiven (+)-D-Mandelsäurenitrils als Funktion der Reaktionsdauer.

In ein 25-ml-Messkölbchen wurden 22 ml 0,05M Acetat-Puffer (in Äthanol/Wasser 1:1 gegeben, pH 5,4), mit 1 ml Benzaldehyd (3fach unter N_2 destilliert), unterschichtet und mit 1 ml Enzymlösung versetzt. Danach wird mit 1 ml HCN/Äthanol 1:1 bis zur Marke aufgefüllt und geschüttelt. Das Gemisch wird sofort in ein 1-dm-Polarimeterrohr gegeben und die Zunahme des Drehwinkels verfolgt. Mit dem kräftigen Durchschütteln ist der Start der Reaktion gegeben. Eine Oxynitrilaseeinheit (1 E) erzeugt bei diesen Bedingungen nach 5 Min. ein Nitrilmisch von der Drehung $\alpha_D = 0,01^\circ$.

Zur Bestimmung des Oxynitrilasegehalts im Rohextrakt wird dieser Test dahingehend abgewandelt, dass die Reaktion nach 5 Min. durch Zugabe von Aktivkohle abgestoppt wird, das Gemisch filtriert und anschliessend der Drehwinkel des Filtrats im 1-dm-Drehrohr gemessen.

Bei der Aktivitätsbestimmung des Rohextraktes muss auch die spezifische Drehung des Extraktes allein in Betracht gezogen werden.

Proteinbestimmung. – Die Proteinkonzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Absorptionsspektrum des reinen Enzyms in Wasser: λ_{\max} : 459 nm, ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1,16$), 388 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1,36$) und 275 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 11,8$).

Rohextrakt. – Das Ausgangsmaterial «Bittermandelpasta» wurde bezogen von *Nobs & Cie. AG*, Münchenbuchsee. Der Rohextrakt wurde nach dem Verfahren von *Becker & Pfeil* [2] hergestellt. Es wurden 1,2 kg Bittermandelpasta 3mal mit je 1 Liter eiskaltem Hexan entfettet und das auf diese Art erhaltene Mandelmehl 24 Std. i.V. getrocknet. Es resultieren 500 g Material, welches in 4000 ml sehr verdünntem Ammoniak (pH 7,5) während 20 Std. extrahiert wurde. Das pH muss während der Extraktion dauernd mit 1N Ammoniak nachgestellt werden. Anschliessend wurde das Gemisch während 1 Std. bei 300 g zentrifugiert (*IV KS Heraeus*). Der Überstand wurde auf 4° abgekühlt und unter Rühren mit 6N Essigsäure auf pH 5,4 angesäuert. Nach 24 Std. wurde der Niederschlag abzentrifugiert (60 Min., 300 g, 4°) und verworfen. Der klare Überstand 3600 ml \equiv Rohextrakt wurde sofort weiterverarbeitet. Aktivität: 18 E/ml; ca. 65000 E.

Adsorption am Affinitäts-Harz. – Im Kühlraum wurde der Rohextrakt (3600 ml) mit 200 ml/Std. (10,5 ml/Std./cm²) auf das Affinitäts-Harz aufgetragen. Der Verlauf der Chromatographie wurde mit einem *LKB 8300 Uvicord II* bei 280 nm verfolgt und aufgezeichnet (*Fig. 1*). Nachdem der Rohextrakt vollständig aufgetragen war, wurde die Säule mit 0,025M NaCl gewaschen bis das Eluat keine UV.-Absorption mehr zeigte. Dann wurde das Enzym mit 0,5M NaCl-Lösung eluiert. Es resultieren 500 ml Enzymlösung. Aktivität: 32 E/mg; 57000 E; Ausbeute: 87%.

Das Affinitäts-Harz muss noch ca. 8 Std. mit 0,025M NaCl gewaschen werden und kann dann für den nächsten Ansatz wieder verwendet werden.

Gelfiltration. – Es wurden 250 g *Sephadex G-100* (*Pharmacia*) in 10 Liter 0,025M NaCl-Lösung gequollen und anschliessend in ein Chromatographie-Rohr (\varnothing : 10 cm, h: 80 cm) eingefüllt. Das Gel wurde mit 4 Liter 0,025M NaCl-Lösung gewaschen und in den Kühlraum gestellt. Die Enzymlösung aus der Affinitätschromatographie (500 ml) wurde in einer *Amicon-Zelle* (*M-2000*, Filter *PM 30*) auf ca. 60 ml konzentriert und auf die *Sephadex G-100*-Säule aufgetragen. Bei 150 ml/Std. (1,9 ml/Std./cm²) wurde das Enzym in ca. 500 ml 0,025M NaCl-Lösung eluiert. Der Verlauf der Gelfiltration wurde mit dem *Uvicord II* verfolgt und aufgezeichnet (*Fig. 2*). Aktivität: 112 E/mg; 488 mg.

Die *Sephadex G-100*-Säule wird mit 0,025M NaCl gut gewaschen und ist damit für den nächsten Ansatz bereit.

Das reine Enzym kann in Lösung im Kühlschrank einige Tage ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. Wird die Enzymlösung nach Zugabe von Milchzucker (20 g Milchzucker pro g Enzym) lyophilisiert, ist das Produkt mehrere Monate haltbar.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *W. Becker, H. Freund & E. Pfeil*, *Angew. Chem.* 77, 1139 (1965).
- [2] *W. Becker, U. Benthin, E. Eschenhof & E. Pfeil*, *Biochem. Z.* 337, 156 (1963); *W. Becker & E. Pfeil*, *Naturwissenschaften* 51, 193 (1964); *W. Becker & E. Pfeil*, *Biochem. Z.* 346, 301 (1966); *E. Gerstner & E. Pfeil*, *Z. physiol. Chem.* 353, 271 (1972).
- [3] *R. Axen & S. Emback*, *Europ. J. Biochem.* 18, 351 (1971).