PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/20789
C12N 9/06, C12Q 1/32 C12N 1/20	A1	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. November 1992 (26.11.92)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE92/00371

(22) Internationales Anmeldedatum: 6. Mai 1992 (06.05.92)

(30) Prioritätsdaten:
P 41 15 340.5 10. Mai 1991 (10.05.91) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US):* FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Straße, D-5170 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US) :* HUMMEL, Werner [DE/DE]; Claudiusstraße 11, D-5177 Titz (DE). WENDEL, Udo [DE/DE]; Wohlauerstraße 14, D-4010 Hilden (DE). STING, Susanne [DE/DE]; Am Rethert 48, D-4000 Düsseldorf 13 (DE). KRIX, Georg [DE/DE]; Deutzkalkerstraße 28b, D-5000 Köln 21 (DE).

(74) Anwalt: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, Postfach 1913, D-5170 Jülich (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, KR, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), US.

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PROCESS FOR OBTAINING DIMETHYL AMINE OR TRIMETHYL AMINE DEHYDROGENASES, DEHYDROGENASES OBTAINED THEREBY AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON DIMETHYLAMIN- BZW. TRIMETHYLAMIN-DEHYDROGENASE, DANACH ERHALTENE DEHYDROGENASEN UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract

Paracoccus strains from ground samples, after culture on dimethyl amine or trimethyl amine-containing nutrients, yield a highly selective dimethyl amine dehydrogenase or trimethyl amine dehydrogenase, two enzymes which are eminently suitable for assessing the freshness of fresh or frozen fish. The reaction takes place in the presence of phenazinetho or methosulphate as the electron acceptor and can be performed and photometrically monitored in the presence of dichlorophenolindophenol. The selective DMA or TMA dosage is suitable for analysis in the field of foodstuffs and diagnosis. A particularly effective Paracoccus strain was deposited under number DSM 6512.

(57) Zusammenfassung

Paracoccus Stämme aus Bodenproben liefern nach Züchtung auf dimethylamin- bzw. trimethylaminhaltigem Nährmedium eine hoch selektive Dimethylamin-Dehydrogenase bzw. Trimethylamin-Dehydrogenase, zwei Enzyme, die für die Bewertung der Fischfrische von frischen bzw. gefrorenem Fisch hervorragend geeignet sind. Die Umsetzung erfolgt in Gegenwart von Phenazinetho- oder -methosulfat als Elektronenakzeptor und kann in Gegenwart von Dichlorphenolindophenol durchgeführt und photometrisch verfolgt werden. Die selektive DMA bzw. TMA Bestimmung ist für die Analytik im Lebensmittel- und Diagnosebereich geeignet. Ein besonders effektiver Paracoccus-Stamm wurde unter der Nummer DSM 6512 hinterlegt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur Gewinnung von Dimethylamin- bzw. Trimethylamin-Dehydrogenase, danach erhaltene Dehydrogenasen und ihre Verwendung

---

Die Erfindung bezieht sich auf die Gewinnung von analytisch nützlicher Dimethylamin- bzw. Trimethylamin-Dehydrogenase (DMA- bzw. TMA-Dehydrogenase) und sie umfaßt die danach erhaltenen Enzyme und deren Verwendung.

DMA- bzw. TMA-Dehydrogenase sind für den selektiven Nachweis von Dimethylamin bzw. Trimethylamin geeignete Enzyme.

Der selektive Nachweis von Dimethylamin bzw. Trimethylamin ist von Bedeutung im Lebensmittelbereich (z.B. Fischverderb) und in der klinischen Diagnostik (Trimethylaminurie, Betain-Analytik).

Im Lebensmittelbereich hat der Trimethylamin-Nachweis vor allem für die Bestimmung der Fisch-Frische bei frischem Fisch Bedeutung. Der Fischmuskel enthält hohe Gehalte an Trimethylamin-N-Oxid, das postmortal durch bakterielle Zersetzung zu Trimethylamin (TMA) abgebaut wird. Der auffallend stechende Geruch von verderbendem Meeresfisch wird in der Hauptsache durch TMA verursacht.

Zur Bestimmung der Fischfrische sind in der analytischen Literatur bereits eine Reihe verschiedener, eher unspezifischer Parameter vorgeschlagen worden, z.B. der Nucleotid-Gehalt, die Ammoniak-Konzentration, flüchtige Säuren, Katalase-Aktivität oder der pH-Wert. Als primäres Abbauprodukt ist aber TMA von besonderem diagnostischem Wert. In die Praxis Eingang gefunden hat eine chemische TMA-Bestimmungsmethode mittels Pikrinsäure (Dyer, W.J., J. Fish Res. Bd. Can. 6 (1945) 351; überarbeitet von: Tozawa, H. et al., In: Fish Inspection and Quality Control (1971) p. 187, Fishing News (Books) Ltd., London). Diese Methode hat aber den Nachteil, daß viele primäre, sekundäre und tertiäre Amine auch reagieren; zudem ist Pikrinsäure eine hochexplosive Verbindung.
Bei der Trimethylaminurie handelt es sich um eine Störung des Cholin-Stoffwechsels. Das defekte Enzym ist die Trimethylamin-N-Oxidase, das die Bildung von Trimethylamin-N-oxid katalysiert. Für die Diagnostik ist ein spezifischer Trimethylamin-Nachweis erforderlich. In aktuellen Veröffentlichungen zur Trimethylamin-Analytik werden im Klinik-Bereich Massenspektrometrie (King G.S. et al. Biomed. Mass Spectrom. 11 (1984) 1), Gas-Chromatographie (Dorland, L. et al. J. Inher. Metab. Dis. 10 (1987) 401) oder auch Headspace Gas-Liquid-Chromatographie (Al-Waiz, M. et al. J. Inher. Metab. Dis. 12 (1989) 80) eingesetzt. Die gaschromatographische Methode (Dorland et al.) wird von den strukturanalogen Verbindungen Betain, Carnitin und Cholin gestört. Insgesamt sind diese Methoden nicht für die Routineanalytik geeignet.
Eine Betain-Analytik wird bei der Behandlung der verschiedenen Formen der Homocystinurie (Störung im Metabolismus von L-Methionin) benötigt. Betain ist z. Zt. mit den üblichen Methoden der Laboranalytik nicht erfaßbar. In Verbindung mit einem Betain-spaltenden Enzym, das Betain in Trimethylamin und Essigsäure

spaltet, kann diese Verbindung aber in einem gekoppelten Enzymtest über Trimethylamin quantifiziert werden.

Die selektive Bestimmung von Dimethylamin ist insbesondere für die Erfassung des Frische-Zustandes von gefrorenem Fisch geeignet, bei dem andere Abbau-Wege vorherrschen, weshalb hier der DMA-Gehalt Auskunft über ein Verzehr-Limit liefern kann.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein für den spezifischen DMA- bzw. TMA-Nachweis geeignetes Enzym bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß im wesentlichen dadurch gelöst, daß man einen Paracoccus-Stamm auf einem Dimethylamin bzw. Trimethylamin enthaltenden Kulturmedium vermehrt, erntet und die geernteten Zellen zur Enzymfreisetzung mechanisch aufschließt, die erhaltene Flüssigkeit von Zellfragmenten befreit und das im Rohextrakt enthaltene Enzym ggf. aufreinigt.

Es wurde nämlich überraschenderweise gefunden, daß aus von Bodenproben isolierten Paracoccus Stämmen abhängig von der Nährstoffzusammensetzung zwei an sich ähnliche Dehydrogenasen gewonnen werden können, die entweder - gezüchtet auf DMA-haltigem Medium - zur selektiven DMA-Umsetzung oder - gezüchtet auf TMA-haltigem Medium - zur selektiven TMA-Umsetzung befähigt sind.

Die neuen Enzyme sind zusammen mit dem künstlichen Elektronenakzeptor Phenazinmethosulfat (PMS) oder Phenazinethosulfat (PES) zur analytisch-brauchbar selektiven Umsetzung von Dimethylamin (DMA-DH) bzw. Trimethylamin (TMA-DH) befähigt.

Die enzymatische Umsetzung von DMA bzw. TMA erfolgt nach den Gleichungen

$$TMA + PES_{ox.} \xrightarrow{\text{TMA-Dehydrogenase}} \text{Dimethylamin} + HCHO + PES_{red.}$$

$$DMA + PES_{ox.} \xrightarrow{\text{DMA-Dehydrogenase}} \text{Methylamin} + HCHO + PES_{red.}$$

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der TMA- bzw. DMA-Dehydrogenase bildenden Mikroorganismen sind Bodenproben geeignet, aus denen insbesondere Mikroorganismen der Gattung Paracoccus isoliert werden, die bei Wachstum auf DMA- bzw. TMA-haltigem Nährmedium eine geeignete DMA- bzw. TMA-Dehydrogenase bilden und speziell der Paracoccus-Stamm DSM 6512.

Die aus diesem Paracoccus-Stamm isolierte TMA-Dehydrogenase zeigt in gereinigter Form die folgenden wesentlichen Parameter:

- Reaktivität mit Trimethylamin in Gegenwart von Phenazinmetho- oder -ethosulfat ;
- Substratspezifität ausschließlich für TMA;
- ein K_M-Wert für TMA von $6{,}6 \cdot 10^{-7}$ M;
- spezifische Aktivität (hochgereinigt) von 4 U/mg;
- Molekulargewicht von 140.000 Dalton (bestimmt mittels Gelfiltration);
- Molekulargewicht in der SDS-Elektrophorese: 70.000 Dalton ± 5.000 ;
- pH-Optimum für die Reduktionsreaktion bei pH 9,0;
- Temperatur-Optimum der Aktivität bei 45°C;
- pH-Stabilität: kein Aktivitätsverlust nach 24 h bei 4°C und pH 9,0;

- Temperatur-Stabilität: 65% Restaktivität nach 30 min bei 30°C (pH 9,0);
- Lagerfähigkeit der Enzymlösung: nach einer Woche bei 4°C mit einer Restaktivität von 80 %; nach vier Wochen bei - 20°C in 50 % Glycerin mit einer Restaktivität von 70 %;
- starke Inhibierung durch $MnCl_2$ in 1 mM Konzentration, Erhöhung der Aktivität durch PMSF (auf 187 %);
- keine Hemmung der TMA-Umsatzrate durch die strukturanalogen Verbindungen Betain, Cholin, Carnitin, Trimethylaminoxid und Dimethylamin (jeweils 1 mM Konzentration).

Die aus diesem Paracoccus-Stamm isolierte DMA-Dehydrogenase zeigt in gereinigter Form die folgenden wesentlichen Parameter:

- Reaktivität mit Dimethylamin in Gegenwart von Phenazinmetho- oder -ethosulfat ;
- hohe Substratspezifität für DMA;
- ein K_M-Wert für DMA von $2,6 \cdot 10^{-5}$ M;
- spezifische Aktivität (hochgereinigt) von 2,3 U/mg;
- Molekulargewicht von 140.000 Dalton (bestimmt mittels Gelfiltration);
- aus zwei Untereinheiten mit jeweils 77.000 besteht (bestimmt mittels SDS-Elektrophorese);
- pH-Optimum für die Reduktionsreaktion bei pH 8,6;
- Temperatur-Optimum der Aktivität bei 40-45°C;
- ein Optimum der pH-Stabilität bei pH 8,6;
- Temperatur-Stabilität: 65% Restaktivität nach 30 min bei 30°C (pH 9.0);
- starke Inhibierung der photometrischen Reaktion durch $MnCl_2$ in 1 mM Konzentration;

- kein Umsatz mit Methylamin, 2-Dimethylaminoethylamin, Dimethylformamid, Formaldehyd und Methanol, schwache Reaktivität mit Trimethylamin (ca. 6% bezogen auf den Dimethylamin-Umsatz).

Die erfindungsgemäßen Dehydrogenasen zeigen eine hohe Spezifität bezüglich der Umsetzung von DMA bzw. TMA in Gegenwart anderer Alkylamine, so daß sie für die analytische Bestimmung von Dimethylamin (DMA-Dehydrogenase) bzw. Trimethylamin (TMA-Dehydrogenase) in Gemischen mit anderen Alkylaminen insbesondere im Lebensmittel und diagnostischen Bereich geeignet sind.

Sie können speziell dort eingesetzt werden, wo Dimethylamin oder Trimethylamin als Abbauprodukte einer chemischen oder enzymatischen Reaktion entstehen, wie insbesondere zur Ermittlung des Frischezustandes von frischen (mit TMA-DH) bzw. gefrorenem (mit DMA-DH) Fisch.

Von weiterem Interesse ist die Bestimmung von Betain in klinischen Proben nach dessen Umsetzung mit Lyase unter Abspaltung von Trimethylamin, das mit TMA-DH in Gegenwart von Phenazinethosulfat oder Phenazinmethosulfat sowie Dichlorphenolindophenol umgesetzt und photometrisch ausgewertet wird.

Weitere Eigenschaften der Enzyme werden u. a. anhand der beigefügten Zeichnungen erläutert. Es zeigen:

Fig. 1: Wachstum und TMA-DH Bildung von Paracoccus DSM 6512 in Abhängigkeit von der Zeit;
Fig. 2: Abhängigkeit der TMA-DH Aktivität vom pH-Wert;
Fig. 3: Eichkurve für TMA im enzymatischen Test; und
FIg. 4: Abhängigkeit der DMA-DH Aktivität vom pH-Wert.

Die Erfindung wird in nachfolgenden Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1: Isolierung von Mikroorganismen, die das Enzym TMA-Dehydrogenase enthalten

A. Isolierung aus Bodenproben:

Ein Bioreaktor enthält 1 L Medium A mit folgender Zusammensetzung:

Trimethylamin	5,0 g/L
Hefeextrakt	0,2 g/L
Ammoniumsulfat	0,5 g/L
Spurensalz-Lösung	20 ml/L
KH_2PO_4	1,5 g/L
K_2HPO_4	4,0 g/L

Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt, die Lösung wird 30 min bei 121°C sterilisiert. Der Bioreaktor wird mit ca. 5 g einer Bodenprobe (Kompost) beimpft. Im geschlossenen Gefäß wachsen geeignete Mikroorganismen der Bodenprobe heran, die Temperatur wird dabei auf 22°C gehalten. Durch Zufuhr sterilfiltrierter Luft wachsen die Organismen weitgehend unter Sauerstoffsättigungs-Bedingungen heran. Nach 1 Tag Wachstum im geschlossenen Gefäß wird aus einer Vorratsflasche sterilisiertes Medium A zugepumpt (0,1 L/Std.), gleichzeitig mit derselben Flußrate Reaktorinhalt abgeführt. Täglich wird eine Probe entnommen und auf TMA-Dehydrogenase Aktivität getestet. In den ersten 5 Tagen war keine Aktivität nachweisbar, ab dem 6. Tag konnte ein von Tag zu Tag regelmäßig zunehmender Aktivitäts-Anstieg gemessen werden. Anscheinend hat sich unter den Bedingungen des kontinuierlichen Wachstums ein geeigneter Mikroorganismus durchgesetzt. Ab dem 10. Tag hatte die Aktivität einen maximalen Wert erreicht, nach 12 Tagen wurde die Kultivierung abgebrochen. Mikroorganismen aus Reaktorproben ab dem 6. Tag, die auf durch Agar (18 g/L) verfestigtes Medium A ausgestrichen wurden, wurden als Reinkultur auf TMA-Dehydrogenase Aktivität getestet. Hieraus konnte ein Stamm mit der gewünschten Enzymaktivität isoliert werden (Isolat TMA-1).

B. Taxonomische Bestimmung des Isolats TMA-1:
Die mikrobiologische Charakterisierung ergab, daß der Stamm TMA-1 der Gattung Paracoccus zuzuordnen ist. Im einzelnen wurden folgende Eigenschaften festgestellt: Gram-negative Kokken, unbeweglich, strikt aerob, keine Säurebildung, nicht chemolithoautotroph. Gute Verwertung von Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, Trimethylamin-N-Oxid, N-Methylformamid, N,N-Dimethylformamid; schwaches Wachstum auf Formamid. Von den beiden Paracoccus-Arten denitrificans und halodenitrificans unterscheidet sich der Stamm TMA-1 dadurch, daß er nicht chemolithoautotroph ist. Der Stamm wurde am 2.5.1991 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, unter der Nummer DSM 6512 hinterlegt.

Beispiel 2: Gewinnung der TMA-Dehydrogenase

A. Vermehrung von Paracoccus sp. TMA-1

Zur Enzymgewinnung wurde der Stamm TMA-1 in folgendem Medium B angezogen (pro 1 l):

Trimethylamin	5,0 g/L
Hefeextrakt	5,0 g/L
Ammoniumsulfat	1,0 g/L
Spurensalz-Lösung	20 ml/L
KH_2PO_4	1,5 g/L
K_2HPO_4	4,0 g/L
End-pH 7,0	

Im 8 l-Maßstab wurde das Medium nach Erreichen der Bruttemperatur von 30 °C mit 300 ml einer 24 Stunden alten Vorkultur beimpft. In einem solchen 8 l-Ansatz konnte gut der Verlauf der Enzymaktivität über die Zeit bestimmt werden, indem Proben zu verschiedenen Zeiten entnommen wurden und die Aktivität der TMA-Dehydrogenase nach Aufschluß der Zellen im zellfreien

Überstand bestimmt wurde. In Fig. 1 ist ein solcher Verlauf dargestellt; er verdeutlicht, daß man eine maximale Enzymaktivität nur innerhalb eines enges Zeitraums gegen Ende der Wachstumsphase erhält. Der 8 l-Fermenter wurde nach 21 Stunden bei einer OD_{660} von 4.35 mittels einer Zentrifuge geerntet, man erhielt 160 g Biofeuchtmasse. Die Biomasse kann bei -20°C eingefroren gelagert werden, wobei über mehrere Monate kein Aktivitätsverlust erkennbar ist.

B. Zellaufschluß

Die Enzymfreisetzung aus den Zellen kann durch an sich bekannte Methoden (Ultraschall, Hochdruck-Homogenisation, Naßvermahlung u. a.) geschehen. Hier wurden die Zellen durch Naßvermahlung mit Glasperlen aufgeschlossen. Dazu wurde die Biomasse in 0.1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.0) suspendiert, so daß die Konzentration der Zellfeuchtmasse 40 %ig war. Die Zellinhaltsstoffe wurden aus der Suspension durch einen mechanischen Aufschluß mittels einer Schwingmühle (Typ MM2; Fa. Retsch, Haan, FRG) gewonnen. Der Aufschluß erfolgte in 1.5 ml Eppendorfgefäßen. Die Eppendorfgefäße wurden mit 1.2 g Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) und 0.6 ml 40 %iger Zellsuspension gefüllt und für 15 min bei einer Frequenz von 1800/sec geschüttelt. Nach Zentrifugation (3 min bei 12000 Upm) in einer Tischzentrifuge erhielt man einen viskosen Überstand, der für die weitere Enzymgewinnung verwendet wurde.

C. Grobreinigung

Zur Grobreinigung wurden 0.5 ml des Rohextraktes in 1.5 ml Eppendorfgefäße gegeben und dort mit 0.025 ml

einer 5 %igen Polyethylenimin-Lösung (PEI) versetzt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurden die Proben 5 min in einer Tischzentrifuge bei 12000 Upm zentrifugiert und der fast klare Überstand für die weitere Enzymreinigung eingesetzt.

D. Feinreinigung

Zur Feinreinigung des Enzyms wurde der Überstand nach PEI-Fällung einer Ionenaustauschchromatographie an einer Mono-Q Säule (Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC); Fa. Pharmacia, Freiburg FRG) unterzogen. 10 ml des mit einem 0,2 µm-Filter filtrierten Rohextraktes wurden in 2 ml Portionen auf die Säule aufgegeben und mit einem Konzentrationsgradienten von 0.05 M - 0.2 M Natriumpyrophosphat-Puffer pH 9,0 eluiert. Das Enzym wurde bei einer Pufferkonzentration von ca. 0,09 M von der Säule abgelöst. Anschließend wurden die das Enzym enthaltenden Fraktionen zusammengegeben und 1:2 mit 0.05 M Natriumpyrophosphat-Puffer verdünnt. Für den letzten Reinigungsschritt wurde nun wiederum die Lösung in 2 ml Portionen auf die Mono-Q Säule aufgegeben und mit einem NaCl-Gradienten (0-1 M) eluiert; das Enzym wurde bei einer NaCl-Konzentration von 400 mM abgelöst.
In Fraktionen mit hoher Enzymaktivität wurde eine spezifische Aktivität von 4 U/mg gemessen. Ein mit diesen Fraktionen angefertigtes SDS-Gel ergab auf Grund der Proteinfärbung, daß die TMA-Dehydrogenase hier zu mindestens 90 % aufgereinigt vorlag.

Die Anreicherung des Enzyms im Verlauf der Reinigung ist in Tab. 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Reinigung der TMA-Dehydrogenase

Reinigungs-schritt	spezif. Aktivität (U/mg)	Anreicherung (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	0,12	1	100
PEI-Fällung	0,17	1,4	89
MonoQ (Pyrophosphat)	2,51	21	85
MonoQ (NaCl)	4,15	35	79

Die Aktivität der TMA-Dehydrogenase wurde dabei mit folgenden Testansatz (C) bestimmt:

780 µl Puffer (0,1 M Natriumpyrophosphat plus 0,05 M NH_4Cl; pH 9,0)
20 µl einer 150 mM Trimethylamin-Lösung (in Puffer) (Endkonz. im Test: 3 mM)
50 µl Dichlorphenolindophenol (DCPIP; Endkonz. im Test: 0,08 mM),
50 µl Phenanzinethosulfat (PES; Endkonz. im Test 2mM)
100 µl Enzymlösung

Die Anfangs-Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei 595 nm an einem Spektralphotometer bei 30°C gemessen. Eine Enzymeinheit entspricht dem Umsatz von 1 µMol TMA pro 1 min, gemessen über den Umsatz von 1 µMol Dichlorphenolindophenol pro 1 min (ϵ=7,0 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Beispiel 3: Charakterisierung der TMA-Dehydrogenase

A. pH-Abhängigkeit der Umsetzung

Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert wurde bestimmt, indem der pH-Wert des in Beispiel 2.D. aufgeführten Pyrophosphat-Puffers auf verschiedene Werte zwischen 7,0 und 11,0 eingestellt wurde und damit die

Aktivität der TMA-Dehydrogenase wie unter 2.D. beschrieben gemessen wurde. Fig. 2 zeigt das pH-Profil dieser Umsetzung, man erhält eine maximale Aktivität bei einem pH-Wert von 9.

B. Einfluß des pH-Wertes auf die Lagerstabilität

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Lagerung wurde getestet, indem 100 µl der Enzymlösung in 780 µl 0.1 M Puffer des entsprechenden pH-Wertes für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert wurden.
Die TMA-Dehydrogenase hat ihr Stabilitätsmaximum bei pH 9,0. Die reine Enzymlösung hat nach 6 Tagen bei 4°C eine Restaktivität von 80 %. Unter Zusatz von 50 % Glycerin ließ sich nach 4 Wochen bei - 20 °C noch eine Restaktivität von 70 % messen.

C. Temperatur-Abhängigkeit der Aktivität

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Nach ausreichender Vortemperierung der Testkomponenten ohne Enzym wurde die Reaktion durch Zugabe von Enzymlösung gestartet.
Die TMA-Dehydrogenase zeigt maximale Aktivität bei 45°C, bei 60°C ist keine Aktivität mehr meßbar.

D. Temperatur-Stabilität

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der TMA-Dehydrogenase wurden 100 µl Enzymlösung für 30 min in einem Wasserbad bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die Enzymlösung kurz abgekühlt, mit den restlichen Testkomponenten versetzt und die verbleibende Aktivität durch Messung bei 30°C bestimmt. Man erhält nach Vorinkubation bei 30°C noch 65% Restaktivität, bei 37°C noch 50%.

E. Einfluß verschiedener Metallkationen und Inhibitoren

Um das Verhalten der TMA-Dehydrogenase-Aktivität in Gegenwart von Metallkationen und Hemmstoffen zu bestimmen, wurden die entsprechenden Substanzen in einer Konzentration von 1 mM dem Test zugesetzt und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 30 °C die Aktivität bestimmt. Tabelle 2 faßt die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 2: Einfluß verschiedener Metallkationen und Inhibitoren. Zur Kontrolle wurden die Verbindungen in parallelen Tests ohne TMA eingesetzt, um einen möglichen Einfluß der Verbindungen auf den Enzymtest aufzuzeigen.

Verbindung	Restaktivität (%)
Metallionen:	
$MgCl_2$	91
$MnCl_2$	7
$CaCl_2$	90
$ZnSO_4$	136
$CuSO_4$	119
Inhibitoren:	
EDTA	118
1,10-Phenantrolin	90
Jodacetamid	94
p-Hydroxymercuribenzoat	81
N-Ethylmaleimid	107
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	187
Triton X-100	68

Auffällig ist die starke Inhibierung des Enzyms durch $MnCl_2$ und die Erhöhung der Aktivität durch PMSF. Beide Komponenten zeigten keine Aktivität im Enzymtest ohne TMA.

F. Substratspektrum der TMA-Dehydrogenase

Zur Erstellung eines Substrat-Spektrums wurde im Test (siehe Beispiel 2.D.) einerseits TMA durch eine Reihe anderer Methylamin-Verbindungen (1 mM), andererseits der Elektronenakzeptor Phenazinethosulfat (einschl. des Redoxfarbstoffes Dichlorphenolindophenol) durch andere Elektronenakzeptoren ersetzt und anschließend die Enzymaktivität bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, daß bezüglich der Aminkomponente anscheinend nur TMA umgesetzt wird, inaktiv waren: Dimethylamin, Methylamin, Dimethylethylamin, Trimethylamin-N-oxid, Cholinchlorid, Betain, Carnitin und D,L-Carnitinamid. Auch bezüglich des Elektronenakzeptors ist das Enzym anscheinend hochspezifisch, TMA wird nicht umgesetzt, wenn PES/DCPIP durch folgende Verbindungen ersetzt wird: Methylenblau, $K_3(Fe(CN)_6)$, Wurster's Blau, PES, DCPIP, NAD^+ oder $NADP^+$; lediglich mit der strukturanalogen Verbindung Phenazinmethosulfat findet eine Reaktion statt (98%iger Umsatz im Vergleich zu PES). Daneben wurden einige der oben erwähnten Amin-Verbindungen getestet, ob sie den Umsatz von TMA inhibieren. Folgende Verbindungen wurden in jeweils äquimolarer Konzentration zu TMA dem kompletten Enzymtest zugesetzt (in Klammern sind als Ergebnis die jeweiligen Enzymaktivitäten angegeben): Dimethylamin (96%), Cholin (102%), Betain (90%) oder Carnitin (110%). Werden dem kompletten Testansatz mit PES,DCPIP und TMA noch das Coenzym NAD^+ oder $NADP^+$ zugesetzt, ist keine Steigerung des Umsatzes nachweisbar.
Die Reaktion von TMA in Gegenwart von PES/DCPIP ist O_2-unabhängig; wird ein Test unter anaeroben Bedingungen (Puffer und Testkomponenten für 15 min mit Argon begast) durchgeführt, erhält man eine identische Umsatzrate wie im Test mit O_2-begasten Puffer.

Damit unterscheidet sich das Enzym von solchen der Gruppe der Oxidasen, bei denen O_2 Co-Substrat der Reaktion ist. Biochemisch gehört das Enzym damit zu der Gruppe der Dehydrogenasen.

G. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration (Bestimmung des K_M-Wertes)

Zur Bestimmung des K_M-Wertes wurde die Aktivität der TMA-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen. Die Auswertung nach Lineweaver-Burke ergibt einen K_M-Wert von $6,6 \cdot 10^{-7}$ M. Substratsättigung tritt oberhalb von 0.03 mM auf.

H. Bestimmung des Molekulargewichtes

In der SDS-Elektrophorese wurde eine Molmasse von 70.000 ±5.000 bestimmt (Vergleich mit Proteinstandards im Molmassenbereich von 20000 bis 97000).

Beispiel 4: Verwendung des Enzyms für die Bestimmung der TMA-Konzentration

Im Bereich von 2,0 bis $8,0 \cdot 10^{-7}$ M an TMA ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Konzentration an TMA (siehe Fig. 3). Man kann somit diese photometrsiche Reaktion verwenden, um TMA unbekannter Konzentration in Proben zu bestimmen.
Mit dieser Nachweismethode sind auch andere TMA-haltige Verbindungen nachweisbar, sofern in einer chemischen oder enzymatischen Vorbehandlung diese Verbindungen derart abgebaut werden, daß TMA freigesetzt und dieses dann enzymatisch mittels TMA-Dehydrogenase bestimmt wird.

Beispiel 5: Gewinnung der Dimethylamin(DMA-)-Dehydrogenase

A. Vermehrung von Paracoccus DSM 6512 zur Gewinnung von DMA-Dehydrogenase

Zur Enzymgewinnung wurde der Stamm DSM 6512 in folgendem Medium B angezogen (pro 1 l):

Dimethylamin	5,0 g/L
Hefeextrakt	5,0 g/L
Ammoniumsulfat	1,0 g/L
Spurensalz-Lösung	20 ml/L
KH_2PO_4	1,5 g/L
K_2HPO_4	4,0 g/L

End-pH 7,0

Im 8 l-Maßstab wurde das Medium nach Erreichen der Bruttemperatur von 30 °C mit 300 ml einer 24 Stunden alten Vorkultur beimpft und nach ca. 21 Stunden bei einer OD_{660} von >4 mittels einer Zentrifuge geerntet. Die Biomasse kann bei -20°C eingefroren gelagert werden, wobei über mehrere Monate kein Aktivitätsverlust erkennbar ist.

B. Zellaufschluß

Die Enzymfreisetzung aus den Zellen kann wie in Beispiel 2 B erfolgen. Hier wirden die Zellen in 0,1 M Tris-HCl- Puffer (pH 7,0) unter Zusatz eines Proteaseinhibitors (Pefabloc; Fa. Pentapharm, Basel, Schweiz) suspendiert und durch Naßvermahlung mit Glasperlen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (15 Min. bei 16000 UpM) wurde der Überstand filtriert (0,45 µm Poren) und dann einer weiteren chromatographischen Auftrennung unterzogen.

C. Reinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie

Zur Reinigung des Enzyms wurde der Überstand einer Ionenaustauschchromatographie an einer Q-Sepharose (Fa. Pharmacia, Freiburg FRG) unterzogen. Die Säule wurde mit 50 mM $Na_4P_2O_7$-Puffer pH 9 equilibriert. Nach Auftragen des filtrierten Rohextraktes wurde erst mit zwei Bettvolumina des gleichen Puffers eluiert, dem 200 mM NaCl zugesetzt wurden und anschließend mit einem linearen Gradienten von 200 bis 500 mM NaCl (gelöst in obigem Natriumphosphat-puffer). Die aktiven Fraktionen werden vereinigt und mit einer Ultrafiltationsmembran (Ausschlußgrenze 30 kDalton; Fa. Amicon) eingeengt.

D. Reinigung mittels Gelfiltration

Die eingeengten aktiven Fraktionen nach der Ionenaus-tausch-Chromatographie wurden einer Gelfiltration unterworfen. Die Trennung erfolgt über ein Sephadex G-200 Gel (Pharmacia), das mit 50 mM KPi Puffer, pH 8 mit 150 mM NaCl equilibriert wurde. Mit dem gleichen Puffer wird auch eluiert. Die aktiven Fraktionen können bei -20°C mit 50% Glycerin versetzt aufbewahrt werden.

Die Anreicherung des Enzyms im Verlauf der Reinigung ist in Tab. 3 zusammengestellt.

Tab. 3: Reinigung der DMA-Dehydrogenase

Reinigungs-schritt	spezif. Aktivität (U/mg)	Anreicherung (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	0,6	1	100
Q-Sepharose	0,8	1,3	16
Gelfiltration	2,34	4	14

Die Aktivität der DMA-Dehydrogenase wurde analog zur TMA-Dehydrogenase mit einem Testansatz wie für die TMA-Dehydrogenase bestimmt, nur daß hier an Stelle der TMA-Lösung 50 µl einer 100 mM Dimethylamin-Lösung (in Puffer) vorgesehen wurden.

Beispiel 6: Charakterisierung der DMA-Dehydrogenase

A. pH-Abhängigkeit der Umsetzung

Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert wurde analog zu Beispiel 3 A bestimmt. Fig. 4 zeigt das pH-Profil dieser Umsetzung, man erhält eine maximale Aktivität bei einem pH-Wert von 8,6.

B. Einfluß des pH-Wertes auf die Lagerstabilität

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Lagerung wurde getestet, indem 100 µl der Enzymlösung in 780 µl 0.1 M Puffer des entsprechenden pH-Wertes (zwischen 7,1 und 10,0) für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert wurden. Nach Zugabe der restlichen Testkomponenten wurde dann die Restaktivität bei 30°C gemessen. Die DMA-Dehydrogenase hat ihr Stabilitätsmaximum bei pH 8,6 (gemessene Aktivität: 0,31 U/ml). Bei pH 9,9 wurden noch 0,13 und bei pH 7,6 noch 0,2 U/ml gemessen.

C. Temperatur-Abhängigkeit der Aktivität

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Temperaturen (25 - 60°C) gemessen. Nach ausreichender Vortemperierung der Testkomponenten ohne Enzym wurde die Reaktion durch Zugabe von Enzymlösung gestartet. Die DMA-Dehydrogenase zeigt maximale Aktivität bei 40-45°C, bei 60°C ist keine Aktivität mehr meßbar.

D. Temperatur-Stabilität

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der TMA-Dehydrogenase wurden 100 µl Enzymlösung für 30 min in einem Wasserbad bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die Enzymlösung kurz abgekühlt, mit den restlichen Testkomponenten versetzt und die verbleibende Aktivität durch Messung bei 30°C bestimmt. Man erhält nach Vorinkubation bei 30°C noch 63% Restaktivität, bei 37°C noch 45%, bei 56°C war keine Aktivität mehr feststellbar.

E. Einfluß verschiedener Metallkationen und Inhibitoren

Um das Verhalten der DMA-Dehydrogenase-Aktivität in Gegenwart von Metallkationen und Hemmstoffen zu bestimmen, wurden die entsprechenden Substanzen in einer Konzentration von 1 mM dem Test zugesetzt und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 30 °C die Aktivität bestimmt. Tabelle 4 faßt die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 4: Einfluß verschiedener Metallkationen und Inhibitoren. Zur Kontrolle wurden die Verbindungen in parallelen Tests ohne TMA eingesetzt, um einen möglichen Einfluß der Verbindungen auf den Enzymtest aufzuzeigen.

Verbindung	Restaktivität (%)
Metallionen:	
$MgCl_2$	120
$MnCl_2$	0
$ZnSO_4$	60
$CuSO_4$	85
$CoCl_2$	115
$NiCl_2$	80
Inhibitoren:	
EDTA	115
1,10-Phenantrolin	95
Jodacetamid	90
p-Hydroxymercuribenzoat	95
N-Ethylmaleimid	100

Auffällig ist die starke Inhibierung des Enzyms durch $MnCl_2$.

F. Substratspektrum der TMA-Dehydrogenase

Das Substrat-Spektrum wurde wie in Beispiel 3 F angegeben ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, daß bezüglich der Aminkomponente das Enzym eine hohe Spezifität für DMA zeigt, Trimethylamin wird noch mit 6% Nebenaktivität umgesetzt, inaktiv waren: Methylamin, 2-Dimethylaminoethylamin, Dimethylformamid, Formaldehyd und Methanol. Auch bezüglich des Elektronenakzeptors ist das Enzym anscheinend hochspezifisch, TMA wird nicht umgesetzt, wenn PES/DCPIP durch

folgende Verbindungen ersetzt wird: Methylenblau, $K_3(Fe(CN)_6)$, DCPIP, NAD^+ oder $NADP^+$, Cytochrom C (Pferd), Brillant Blue R; lediglich mit der strukturanalogen Verbindung Phenazinmethosulfat findet eine vergleichbar hohe Reaktion statt (98%iger Umsatz im Vergleich zu PES). Meldolablau wird mit einer Aktivität von 15% und die Kombination PES/Cytochrom C (Pferd) mit 30% umgesetzt.

Die Reaktion von DMA in Gegenwart von PES/DCPIP ist O_2-unabhängig; wird ein Test unter anaeroben Bedingungen (Puffer und Testkomponenten für 15 min mit Argon begast) durchgeführt, erhält man eine identische Umsatzrate wie im Test mit O_2-begasten Puffer. Damit unterscheidet sich das Enzym von solchen der Gruppe der Oxidasen, bei denen O_2 Co-Substrat der Reaktion ist. Biochemisch gehört das Enzym damit zu der Gruppe der Dehydrogenasen.

G. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration (Bestimmung des K_M-Wertes)

Zur Bestimmung des K_M-Wertes wurde die Aktivität der DMA-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen. Die Auswertung nach Lineweaver-Burke ergibt einen K_M-Wert von $2{,}6 \cdot 10^{-5}$ M.

H. Bestimmung des Molekulargewichtes

Mittels Gelfiltration konnte gezeigt werden, daß das Enzym eine Masse von ca. 140.000 Dalton besitzt. In der SDS-Elektrophorese wurde eine Molmasse von 77.000 ±5.000 bestimmt (Vergleich mit Proteinstandards im Molmassenbereich von 20000 bis 97000). Diese Daten zeigen, daß die DMA-Dehydrogenase aus zwei anscheinend identischen Untereinheiten aufgebaut ist.

I. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Der isoelektrische Punkt der DMA-Dehydrogenase liegt bei 4,7 (gemessen mittels isoelektrischer Fokussierung (Pharmacia, Freiburg)).

K. Bestimmung der N-terminalen Proteinsequenz

Die Sequenz der ersten Aminosäuren des N-Terminus wurden mit einem Proteinsequenator (Fa. Applied Biosystems) bestimmt:
(Val)-Lys-(Pro)-Xaa-Tyr-(Ile)-Ile-Leu-Phe-Thr-(Pro)-Ile-Gln-Ile-Xaa-Xaa-Lys-Thr-Leu
Dabei sind Aminosäuren, die in Klammern gesetzt sind, unsicher, Xaa bezeichnet eine unbekannte Aminosäure.

Die Dimethylamin-Dehydrogenase kann analog zur Trimethylamin-Dehydrogenase speziell dort eingesetzt werden, wo Dimethylamin Produkt einer chemischen oder enzymatischen Reaktion ist. So kann für die DMA-Bestimmung die in Beispiel 4 beschriebene Bestimmungsmethode für TMA in einfacher Weise abgeändert werden, indem die Trimethylamin-Dehydrogenase durch Dimethylamin-Dehydrogenase ersetzt wird. Ein solcher Test ist beispielsweise nützlich zur Bestimmung des Frischezustands von Gefrierfisch, da hier mit zunehmender Lagerung der DMA-Gehalt ansteigt.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Gewinnung von analytisch nützlicher Dimethylamin- bzw. Trimethylamin-Dehydrogenase, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man einen Paracoccus Stamm auf einem Dimethylamin bzw. Trimethylamin enthaltenden Kulturmedium vermehrt, erntet und die geernteten Zellen zur Enzymfreisetzung mechanisch aufschließt, die erhaltene Flüssigkeit von Zellfragmenten befreit und das im Rohextrakt enthaltene Enzym ggf. aufreinigt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Aufreinigung eine Ionenaustauschchromatographie, sowie eine Gelfiltration und ggf. beiden voran eine Polyethylenimin-Fällung umfaßt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß als Paracoccus-Stamm der Stamm mit der Hinterlegungs-Nr. DSM 6512 bzw. eine seiner Mutanten verwendet wird.

4. Dimethylamin-Dehydrogenase, erhalten nach einem der vorangehenden Ansprüche.

5. Trimethylamin-Dehydrogenase, erhalten nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

6. Verwendung von DMA-Dehydrogenase bzw. TMA-Dehydrogenase nach einem der Ansprüche 4 oder 5 zur selektiven analytischen Bestimmung von Dimethylamin bzw. Trimethylamin in wäßrigen Flüssigkeiten durch enzymatische Umsetzung.

7. Verwendung nach Anspruch 6,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Umsetzung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Phenazinethosulfat oder Phenazinmethosulfat sowie Dichlorphenolindophenol durchgeführt und photometrisch verfolgt wird.

8. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß als wäßrige Flüssigkeit Flüssigkeiten oder Extrakte von Proteinproben aus dem Lebensmittelbereich oder von Diagnostikproben dienen.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 8 für den DMA- bzw. TMA-Nachweis in Flüssigkeiten, in denen das Trimethylamin oder Dimethylamin als Abbauprodukt einer chemischen oder enzymatischen Vorbehandlung enthalten ist.

10. Verwendung nach Anspruch 9 für die Bestimmung des Betaingehalts klinischer Proben nach dessen Umsetzung mit Lyase durch photometrische Bestimmung des abgespalteten Trimethylamins.

11. Verwendung nach Anspruch 6 von DMA-Dehydrogenase zur Bewertung der Fischfrische von gefrorenem Fisch.

12. Verwendung nach Anspruch 6 von TMA-Dehydrogenase zur Bewertung der Fischfrische von frischem Fisch.

13. Paracoccus-Stamm der Hinterlegungs-Nr. DSM 6512 für die Gewinnung von DMA- bzw. TMA-Dehydrogenase nach Anspruch 1.

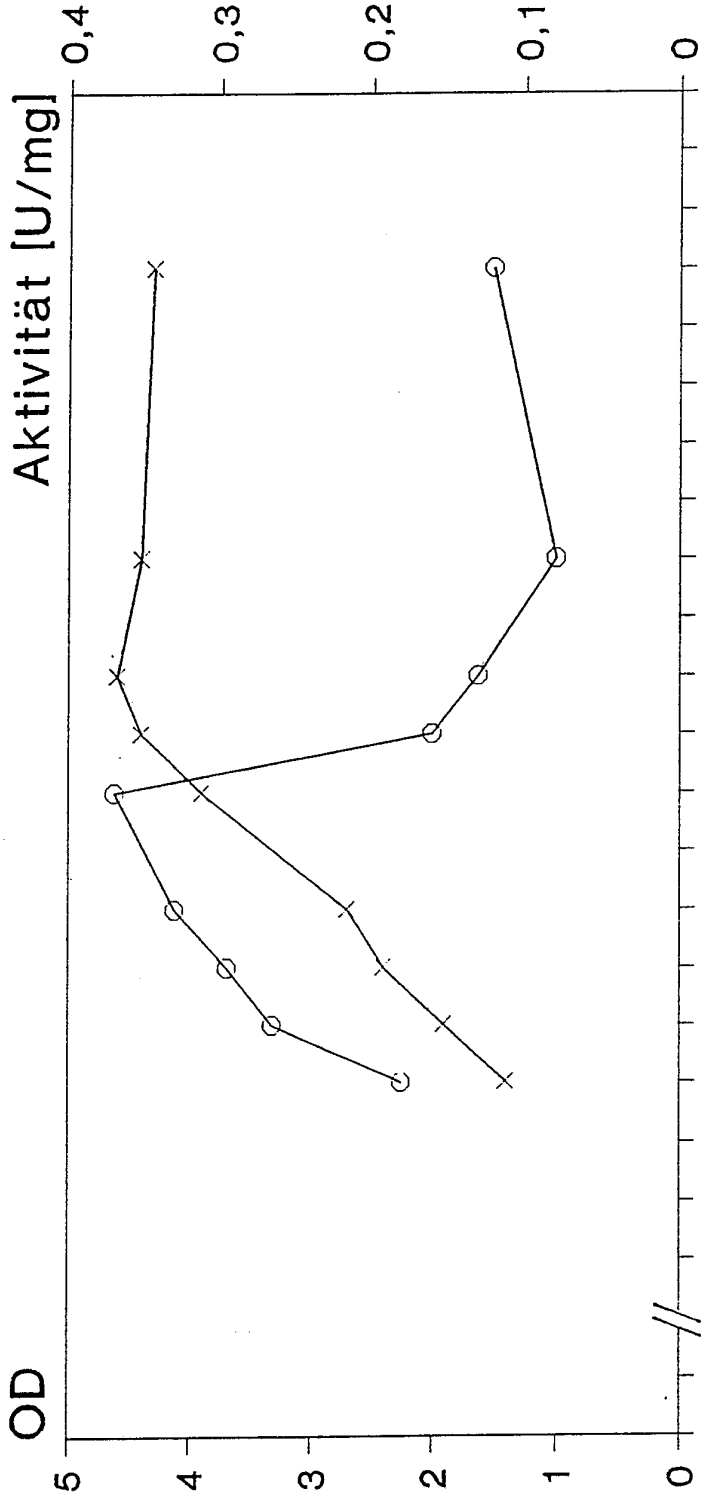

OD
Aktivität [U/mg]
0,4
0,3
0,2
0,1
0
5
4
3
2
1
0
15
20
25
30
Fermentationsdauer [h]
OD (660 nm)
Aktivität

Fig. 1

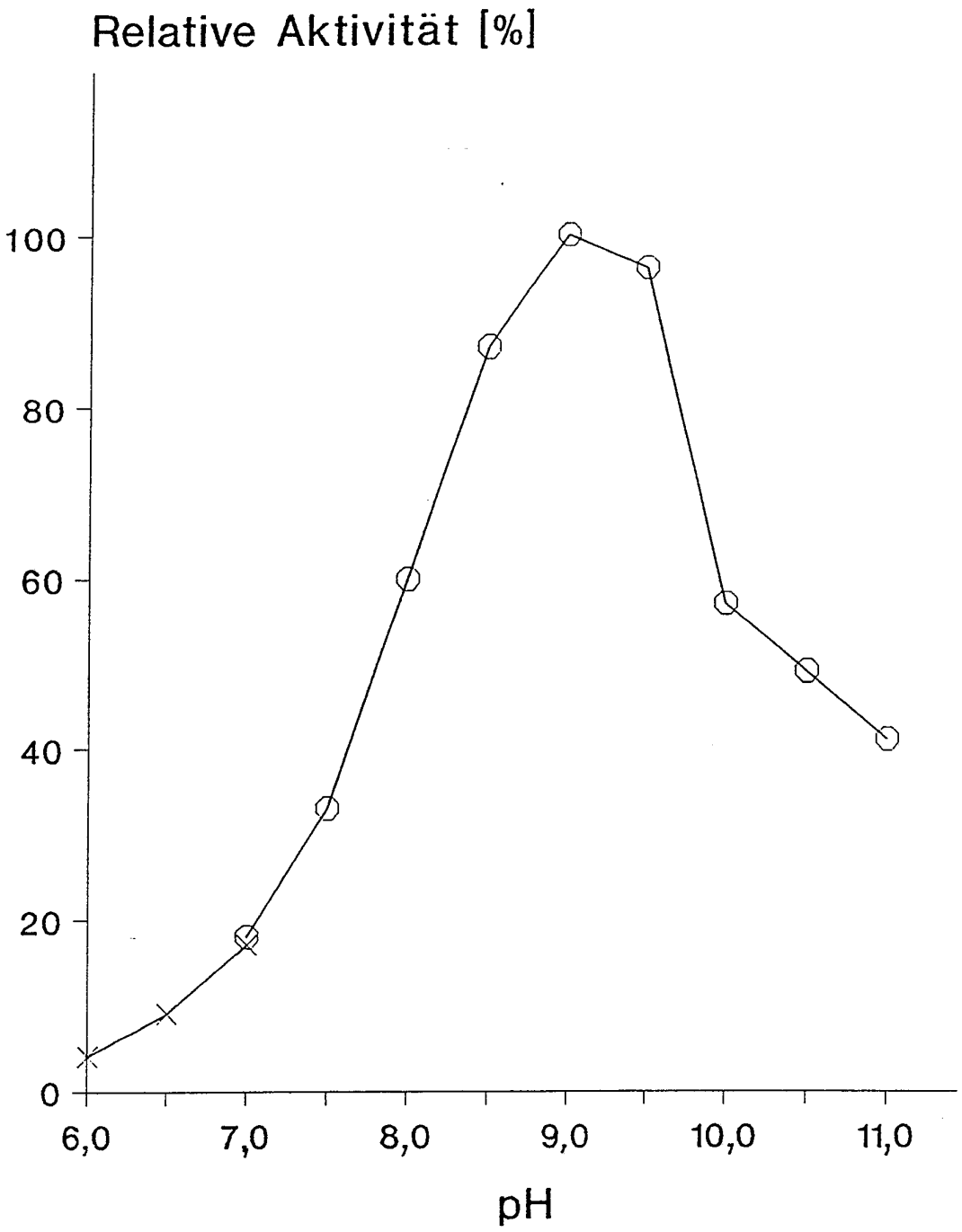


Fig. 2

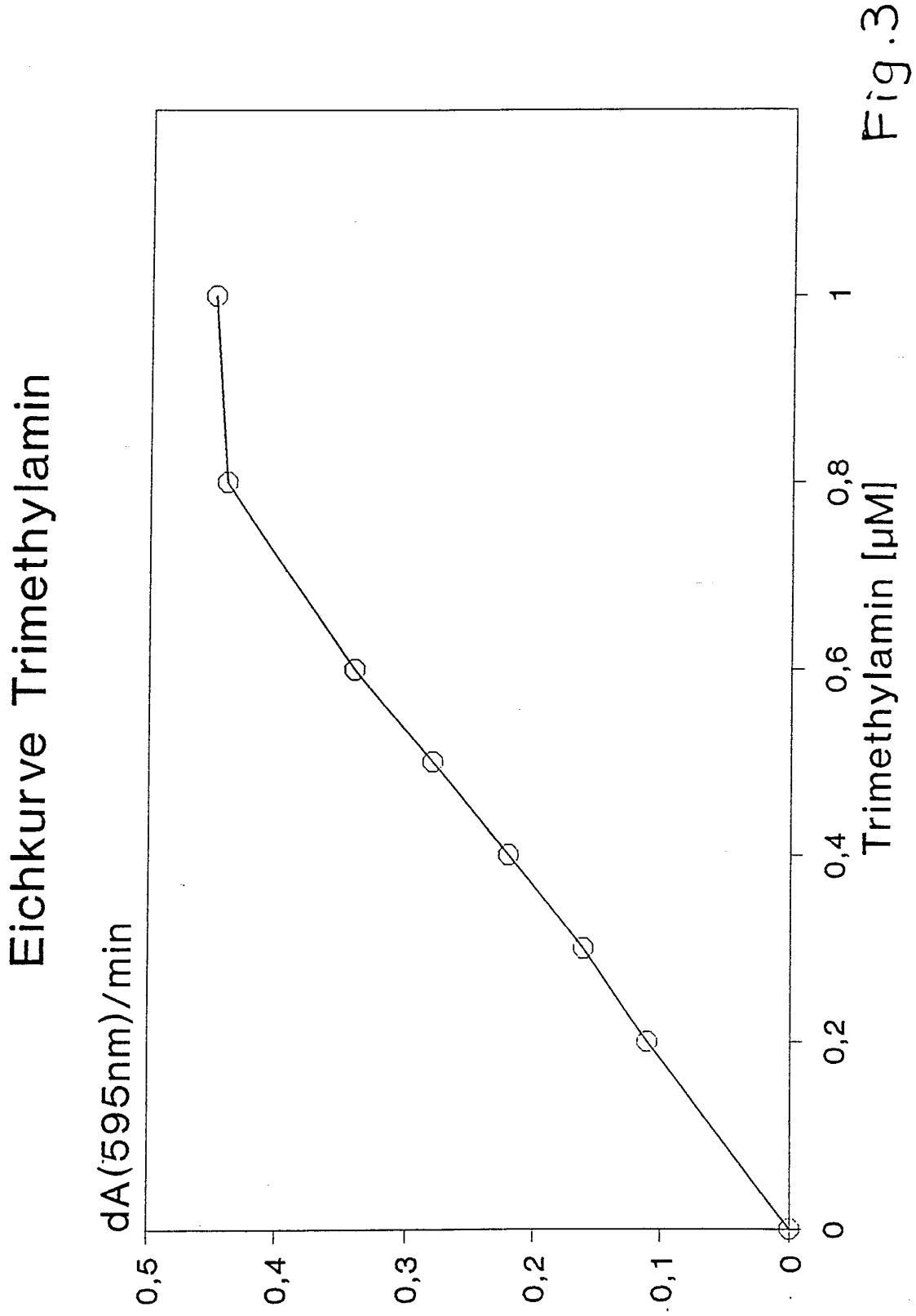

Eichkurve Trimethylamin
dA(595nm)/min
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
Trimethylamin [µM]

Fig.3

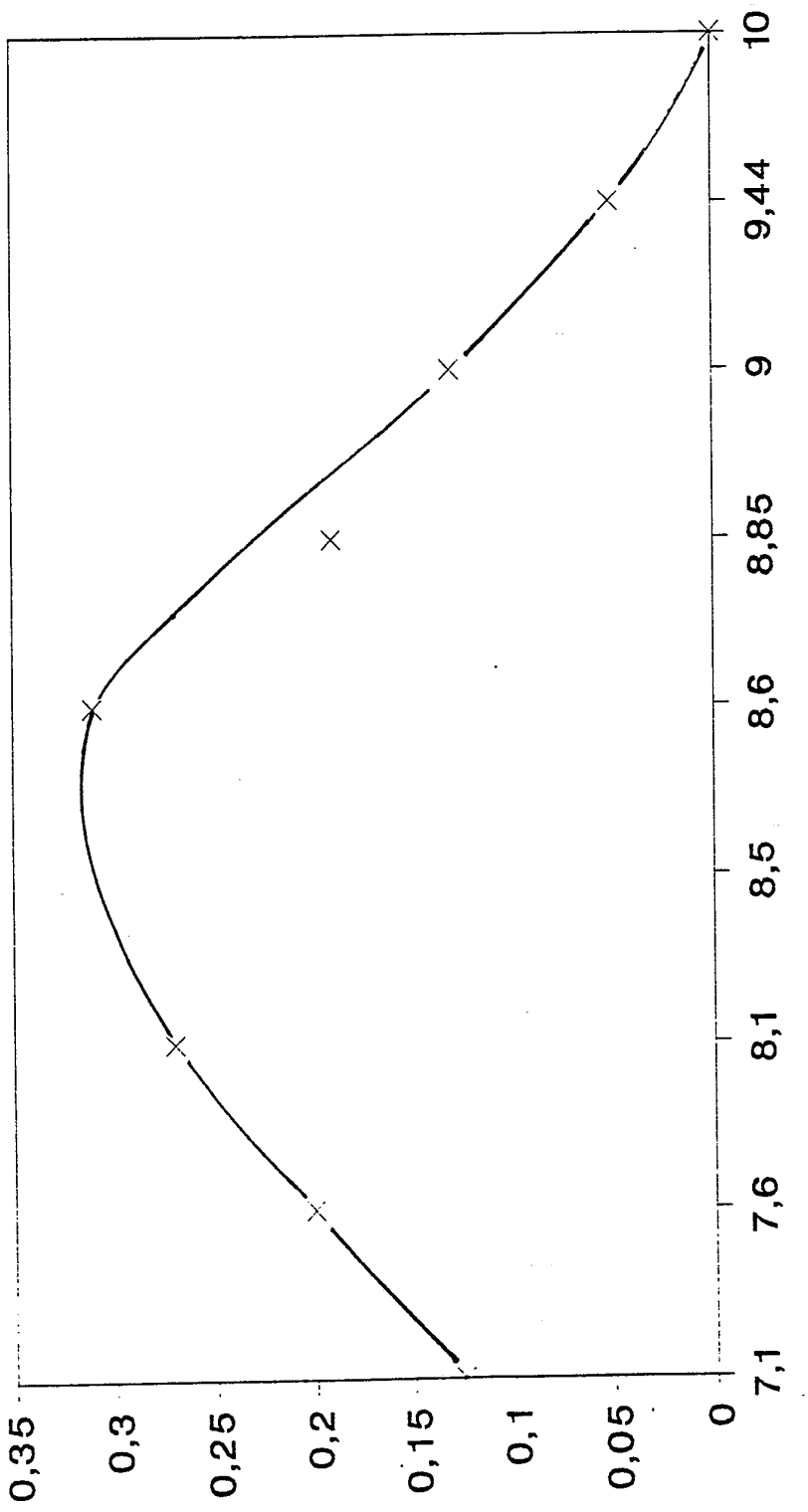


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 92/00371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.[5]: C 12 N 9/06; C 12 Q 1/32; C 12 N 1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.[5]: C 12 N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA vol. 1016, No: 3, 1990, pages 339 - 343; V. DAVIDSON AND M. KUMAR: 'Inhibition by trimetylamine of methylamine oxidation by Paracoccus denitrificans and bacterium W3A1' see page 339, right hand column, line 8 - line 11 see page 342, right hand column, line 9 - line 10 -.-	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol.74, No: 25, 21 June 1971, Columbus, Ohio, US; abstract No: 135482, J. COLBY AND L. ZATMAN: 'Purification and properties of a bacterial trimethylamine dehydrogenase' page 50; see abstract & BIOCHEMICAL JOURNAL vol. 121, No: 1, 1971, pages 9 - 10; -.-	1

./.

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 July 1992 (29.07.92)	3 August 1992 (03.08.92)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 92/00371

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 92, No: 13, 31 March 1980, Columbus, Ohio, US; abstract No: 106280, J. MEIBERGER AND W. HARDER: 'Dimethylamine dehydrogenase from Hyphomicrobium X: purification and some properties of a new enzyme that oxydizes secondary amines' page 254; see abstract & J. OF GENERAL MICROBIOLOGY vol. 115, No: 1, 1979, pages 49 - 58; -.-	1-5
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS. - MICROFILMS. vol. 64, No: 11, 1977, PHILADELPHIA, PA US page 6334; C. BOULTON AND P. LARGE: 'Synthesis of certain assimilatory and dissimilatory enzymes during bacterial adaptation of growth on trimethylamine' abstract No: 64694 & J. GENERAL MICROBIOLOGY vol. 101, No: 1, 1977, pages 151 - 156; see abstract -.-	1-5
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, No: 19, 12 May 1975, Columbus, Ohio, US; abstract No: 121208 P. LARGE AND H. MCDOUGALL: 'Enzymic method for the microestimation of trimethylamine' page 230; see abstract & ANALYTICAL BIOCHEMISTRY vol. 64, No: 1, 1975, pages 304 - 310 -.-	6,7
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS.- MICROFILMS. vol. 86, No: 9, 1988, PHILADELPHIA, PA US E. LEBLANC AND R. LEBLANC: 'Effect of frozen storage temperature on free and bound formaldehyde content of cod fillets' & J. FOOD PROCESS PRESERV vol. 12, No: 2, 1988, pages 95 - 114; see abstract -.-	8,11
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS. - MICROFILMS. vol. 83, No: 10, 1987, PHILADELPHIA, PA US K. WONG AND T. GILL: 'Enzymatic determination of trimethylamine and its relationship to fish quality' & J. FOOD SCI. vol. 52, No: 1, 1987, pages 1 - 3 ----------	8,12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 92/00371

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)[6]

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12N9/06; C12Q1/32; C12N1/20

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff [7]

Klassifikationssytem	Klassifikationssymbole
Int.Kl. 5	C12N

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen [8]

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN [9]

Art.°	Kennzeichnung der Veröffentlichung[11], soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile[12]	Betr. Anspruch Nr.[13]
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA Bd. 1016, Nr. 3, 1990, Seiten 339 - 343; V. DAVIDSON AND M. KUMAR: 'Inhibition by trimetylamine of methylamine oxidation by Paracoccus denitrificans and bacterium W3A1' siehe Seite 339, rechte Spalte, Zeile 8 - Zeile 11 siehe Seite 342, rechte Spalte, Zeile 9 - Zeile 10 --- -/--	1

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen [10] :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgefuhrt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder menreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
29.JULI 1992	03. 08. 92
Internationale Recherchenbehörde	**Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten**
EUROPAISCHES PATENTAMT	VAN DER SCHAAL C.A.

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 74, no. 25, 21. Juni 1971, Columbus, Ohio, US; abstract no. 135482, J. COLBY AND L. ZATMAN: 'Purification and properties of a bacterial trimethylamine dehydrogenase' Seite 50 ; siehe Zusammenfassung & BIOCHEMICAL JOURNAL Bd. 121, Nr. 1, 1971, Seiten 9 - 10; ---	1-5
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 92, no. 13, 31. März 1980, Columbus, Ohio, US; abstract no. 106280, J. MEIBERGER AND W. HARDER: 'Dimethylamine dehydrogenase from Hyphomicrobium X: purification and some properties of a new enzyme that oxidizes secondary amines' Seite 254 ; siehe Zusammenfassung & J. OF GENERAL MICROBIOLOGY Bd. 115, Nr. 1, 1979, Seiten 49 - 58; ---	1-5
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS. - MICROFILMS. Bd. 64, Nr. 11, 1977, PHILADELPHIA, PA US Seite 6334; C. BOULTON AND P. LARGE: 'Synthesis of certain assimilatory and dissimilatory enzymes during bacterial adaptation of growth on trimethylamine' Zusammenfassung Nr. 64694 & J. GENERAL MICROBIOLOGY Bd. 101, Nr. 1, 1977, Seiten 151 - 156; siehe Zusammenfassung ---	1-5
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, no. 19, 12. Mai 1975, Columbus, Ohio, US; abstract no. 121208, P. LARGE AND H. MCDOUGALL: 'Enzymic method for the microestimation of trimethylamine' Seite 230 ; siehe Zusammenfassung & ANALYTICAL BIOCHEMISTRY Bd. 64, Nr. 1, 1975, Seiten 304 - 310; --- -/--	6,7

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS. - MICROFILMS. Bd. 86, Nr. 9, 1988, PHILADELPHIA, PA US E. LEBLANC AND R. LEBLANC: 'Effect of frozen storage temperature on free and bound formaldehyde content of cod fillets' & J. FOOD PROCESS PRESERV Bd. 12, Nr. 2, 1988, Seiten 95 - 114; siehe Zusammenfassung ---	8,11
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS. - MICROFILMS. Bd. 83, Nr. 10, 1987, PHILADELPHIA, PA US K. WONG AND T. GILL: 'Enzymatic determination of trimethylamine and its relationship to fish quality' & J. FOOD SCI. Bd. 52, Nr. 1, 1987, Seiten 1 - 3; ---	8,12