

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 146224 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 4369/78

(51) Int.Cl.³: C 12 N 9/06

(22) Indleveringsdag: 03 okt 1978

(41) Alm. tilgængelig: 05 apr 1979

(44) Fremlagt: 01 aug 1983

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 04 okt 1977 JP 119776/52

(71) Ansøger: *TOYO JOZO KABUSHIKI KAISHA; Tagata-gun, JP.

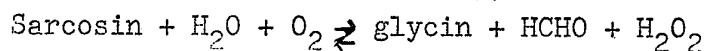
(72) Opfinder: Shigeru *Ikuta; JP, Kazuo *Matsuura; JP, Yoshifumi *Horiuti; JP.

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Magnus Jensens Eftf.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af sarcosinoxidase

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af sarcosinoxidase.

Sarcosinoxidase (EC. 1.5.3.1 sarcosin: oxygen-oxidoreductase (demetylerende)) er et kendt enzym, som virker efter ligningen:



Enzymet er blevet fremstillet ud fra lever eller nyrer fra mus eller en dyrkningsmasse af mikroorganismer af slægten *Corynebacterium*.

Det har nu vist sig, at et enzym, som katalyserer den ovenfor illustrerede reaktion, produceres i bakteriestammen B-0618 hørende til slægten *Bacillus*, som er isoleret fra en jordprøve fra Sasaki, Fukuchiyama, Kyoto, Japan, og man har isoleret et rensset enzym.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

DK 146224 B

Stammen B-0618 har følgende taxonomiske egenskaber:

A. Macroskopisk iagttagelse på forskellige medier ved dyrkning ved 30°C i 18-24 timer.

(1) Bouillonagarskråflade:

Vækst: god, filamenteret.

Farve af koloni: grålighvid til blegbrun,
næsten intet diffusibelt pigment.

(2) Glukosebouillonagarskråflade:

Vækst: god, filamenteret.

Farve af koloni: grålighvid til blegbrun,
mindre diffusibelt pigment.

(3) Bouillonvæske:

Dyrket væske: uklar og med sediment, ingen filmdannelse.

(4) Lakmusmælk:

Alkalisering i løbet af 1-2 uger.

(5) Bouillongelatineplade:

Vækst: vækst på overfladen, svag, men tragtformet forflydning.

B. Mikroskopiske iagttagelser:

(1) Form og størrelse af celler: store og retlinede stave, 1.0 - 1.5 x 2.0 - 5 μ , rund kant, enkelt eller dobbelt sammenbinding, undertiden korte kæder.

(2) Polymorfisme: ingen.

(3) Motilitet: peritrisk bevægelse (iagttaget på bouillonagarskråflademedium ved 26°C, 18 timers dyrkning).

(4) Spore: cylindrisk eller oosferisk (elliptisk) ved center eller nær kant af celle. Ingen kvældning ved spore.
0.8 - 1.0 x 1.2 - 1.6 μ .

(5) Gram-farvning: positiv.

(6) Syrefast farve: negativ.

C. Fysiologiske egenskaber:

Nitratreduktion: negativ.

Denitrifikationsreaktion: negativ.

MR-test: negativ.

VP-test: negativ.

Indoldannelse: negativ.

Hydrogensulfatdannelse: positiv.

Stivelseshydrolyse: negativ.

Gelatinehydrolyse: positiv.

Caseinhydrolyse: negativ.
Esculinhydrolyse: negativ.
Cellulosehydrolyse: negativ.
Citratudnyttelse, Simons-medium: negativ.
Christensen-medium: positiv.
Nitratudnyttelse: positiv.
Ammoniumudnyttelse: negativ.
Dannelse af ammonium fra nitrat: positiv.
Vækst-pH: 6.4 - 9.6.
Væksttemperatur: 10 - 42°C.
Halogentolerance: NaCl 6.0%.
Opførsel i oxygen: aerob.
O-F-test (Hugh Leifson-medium): NT.
O-F-test x: 0 (oxidativ dekomposition).
x O-F-testmedium: modificeret medium.

Som følge af, at der ikke er nogen syredannelse fra glukose og ikke er nogen eller kun svag dannelse af syre fra andet saccharid, benyttes glycerol som sukker. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1.0 g, KCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, gærekstraktpulver 1.0 g, agarpulver 3.0 g, bromthymolblåt (10%'s vandig opløsning) 10 ml, destilleret vand 1000 ml, pH-værdi 7.2 - 7.4.

Syre- og gasdannelse fra sukker: xx (ingen gasdannelse iagt-
tages).

L-arabinose: -	cellobiose: -	dulcitol: -
erythritol: -	fructose: + (syre)	galactose: -
glukose: -	glycerol: + (syre)	inositol: -
lactose: -	maltose: -	mannitol: + (syre)
mannose: -	melezitose: -	melibiose: -
raffinose: -	L-rhamnose: -	salicin: -
L-sorbose: -	sorbitol: -	stivelse: -
saccharose: -	trehalose: -	xylose: -

xxx Basismedium: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1.0 g, KCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, gærekstraktpulver 1.0 g, agarpulver 3.0 g, bromthymolblåt (10%’s vandig opløsning) 10 ml, destilleret vand 1000 ml, pH-værdi 7.2 - 7.4.

Der tilsættes 10 g sukker.

Under henvisning til Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. udgave, 1974, **bestemmes** stammen B-0618 med de ovenfor angivne taxonomiske egenskaber - især Gram-positiv, sporedannende

stor bacillus, peritrisk bevægelse, aerobbakterier og syredannelse fra glukose - som hørende til slægten *Bacillus*.

Sammenligning af stammen B-0618 med andre lignende bakterier, *Bacillus badius*, *Bacillus freudenreichii* og *Bacillus macroides*, udføres som følger:

Bacillus badius ATCC-14574 (typekultur).

Bacillus freudenreichii ATCC-7053 (ikke-typekultur, ikke-original stamme).

Bacillus macroides ATCC-12905 (typekultur).

	Stamme B-0618	<i>Bacillus</i> <i>badius</i> ATCC-14574	<i>Bacillus</i> <i>freuden-</i> <i>reichii</i> ATCC-7053	<i>Bacillus</i> <i>macroides</i> ATCC-12905	Bemærkninger
O-F-test	ingen syre- dan- nelse	ingen syre- dan- nelse	ingen syre- dan- nelse	ingen syre- dan- nelse	Hugh-Leifson- medium
O-F-test	0	0	ingen syre- dan- nelse	ingen syre- dan- nelse	O-F-test, beskrevet ovenfor
catalase	+	+	+	+	
oxidase	+	+	+	÷	
urease	+	÷	+	÷	
gelatine- forflyd- ning	+	+	(+)	÷	
stivelses- hydrolyse	÷	÷	÷	÷	
esculin- hydrolyse	(+)	÷	÷	÷	
indol- dannelse	÷	÷	÷	÷	
H ₂ S- dannelse	+	÷	÷	÷	
acetone- dannelse	÷	÷	÷	÷	
MR-test	÷	÷	÷	÷	

Tabel fortsat:

nitrat-reduktion	÷	÷	÷	÷	
citrat-udnyttelse	+	+	+	+	
dannelse af syre fra sukker:					
arabinose	÷	÷	÷	÷	
fructose	+	÷	÷	÷	
galactose	÷	÷	÷	÷	
glucose	÷	÷	÷	÷	
glycerol	+	+ x	÷	÷	x senere alkalisering
inositol	÷	÷	÷	÷	
lactose	÷	÷	÷	÷	
maltose	÷	÷	÷	÷	
mannitol	+	÷	÷	÷	
mannose	÷	÷	÷	÷	
sorbitol	÷	÷	÷	÷	
saccharose	÷	÷	÷	÷	
trehalose	÷	÷	÷	÷	
xylose	÷	÷	÷	÷	

Egenskaberne på bouillonmedium er som følger:

Stammen B-0618: svag vækst, uldagtigt sediment.

ATCC-14574: ensartet uklar, partielt sediment.

ATCC-7053: svag vækst, uldagtigt sediment.

ATCC-12905: svag vækst, ensartet uklar, partielt sediment.

Følgelig afviger de taxonomiske egenskaber af stammen B-0618 på flere punkter fra sammenligningsstammerne, nemlig som følger:

Bacillus badius ATCC-14574: dannelse af urease, syredannelse fra glycerol (syredannelse og senere alkalisering) og mannitol.

Bacillus freudenreichii ATCC-7053: vækst på flydende kultur og ureasedannelse (svag lighed). Esculinhydrolyse, syredannelse fra fructose, glycerol og mannose. ATCC-7053-stammen er hverken typekultur eller original stamme.

Således kan stammen ikke tilhøre en ny art.

Stammen B-0618 omtales som *Bacillus* sp. og betegnes som *Bacillus* sp. B-0618. Denne stamme er deponeret i Institute for Microbial Industry and Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, under deponeringsnr. FERM-P nr. 4049. Stammen er også deponeret i ARS, U.S.A. som NRRL nr. B-11380 samt i Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen, Vesttyskland, som nr. DSM 1383.

Opfindelsen skal forklares nærmere i forbindelse med tegningen, hvor

- fig. 1 viser optimal pH-værdi for sarcosinoxidasen, der fås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen,
- fig. 2 optimal temperatur for sarcosinoxidasen,
- fig. 3 pH-stabilitet af sarcosinoxidasen,
- fig. 4 varmostabiliteten af sarcosinoxidasen,
- fig. 5 resultatet af kvantitativ analyse af sarcosin ved bestemmelse af formaldehyd, og
- fig. 6 resultatet af kvantitativ analyse af sarcosin ved bestemmelse af hydrogenperoxid.

Bacillus sp. B-0618 FERM-P nr. 4049 dyrkes i et konventionelt medium til antibioticum- eller enzymfremstilling. Luftet submersdyrkning foretrækkes til industriel produktion.

Der benyttes fortrinsvis et konventionelt medium til mikroorganismer. Med hensyn til nitrogenkilder kan der benyttes assimilerbare nitrogenkilder såsom majsstøbevæske, sojabønnepulver, pepton, kødekstrakter, gærekstrakter, ammoniumsulfat, ammoniumklorid eller lignende. Der benyttes assimilerbare carbonkilder såsom glucose, melasse, stivelseshydrolysater og lignende. Der kan valgfrit benyttes forskellige uorganiske salte såsom natriumklorid, kaliumklorid, magnesiumsulfat, kaliumhydrogenfosfat eller kaliumdihydrogenfosfat. Tilsætning af creatin til mediet, fortrinsvis 0,5-1%, stimulerer dannelsen af sarcosinoxidase.

Dyrkningstemperaturen kan variere inden for området for vækst af de mikrobielle celler og produktion af enzym og er fortrinsvis 26-33°C. Dyrkningstiden kan ændres afhængende af be-

tingelserne og er normalt 15-25 timer. Dyrkningen bør naturligvis afsluttes, når dannelsen af sarcosinoxidase i hovedsagen er fuldstændig.

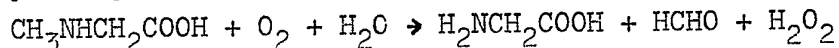
Sarcosinoxidase eksisterer i mikroorganismecellerne.

En udførelsesform for ekstraktion af sarcosinoxidase fra dyrkningsmassen er som følger: Den dyrkede masse centrifugeres, og de våde celler suspenderes i en stødpudeopløsning såsom tris-HCl-stødpude og iturives ved behandling med lysozym, ultralydbehandling eller presning. Det således opnåede rå sarcosinoxidase renses ved gængse isolations- og rensningsmetoder for proteiner og enzymer. F.eks. kan der om fornødent efter fjernelsen af nucleinsyre ved tilsætning af protaminsulfat benyttes fraktioneret udfældning med acetone, methanol, ethanol eller isopropanol og udsaltning med ammoniumsulfat. Yderligere rensning kan opnås ved f.eks. chromatografi, hvor den rå sarcosinoxidase opløses i tris-HCl-stødpude og chromatograferes under anvendelse af anionbyttere såsom diethylaminoethylcellulose- eller -dextrangel og gelfiltreringsmidler såsom dextrangel eller polyacrylamidgel. Den rensede sarcosinoxidase kan opbevares som et lyophiliseret pulver.

Sarcosinoxidase ifølge opfindelsen har følgende fysisk-kemiske egenskaber:

(1) Enzymvirkning:

Et mol sarcosin forbruger et mol H_2O og et mol oxygen og frembringer et mol glycin, et mol formaldehyd og et mol hydrogenperoxid. Enzymet katalyserer oxidationen af sarcosin til dannelse af glycin og formaldehyd:



Enzymbestemmelsen udføres som følger:

Til en reaktionsblanding (0.5 ml) bestående af 0.2 mol tris-HCl-stødpude (pH-værdi 8.0, 0.05 ml), 4-aminoantipyrin (3 mg/ml, 0.05 ml), 0.2% phenol (0.05 ml), peroxidase (0.5 mg/ml, 0.05 ml), 1 mol sarcosin (0.1 ml) og destilleret vand (0.2 ml) sættes enzympopløsningen (10 μ l), og man inkuberer ved 37°C i 5 min. Ethanol (2.5 ml) tilsættes til standsning af reaktionen. Dannelsen af hydrogenperoxid måles ved colorimetri igennem absorptions- evne ved 480 nm.

En enhed (1 enh.) enzymaktivitet defineres som den mængde enzym, som frembringer 1 μ mol hydrogenperoxid pr. min.

(2) Substratspecificitet:

Til en reaktionsblanding (0.5 ml) bestående af 0.2 mol tris-HCl-stødpude (pH-værdi 8.0, 0.05 ml), 4-aminoantipyrin (3 mg/ml, 0.05 ml), 0.2% phenol (0.05 ml), peroxidase (0.5 mg/ml, 0.05 ml), destilleret vand (0.2 ml) og følgende substrat (0.5 mol, 0.20 ml) sættes sarcosinoxidase (0.5 enheder), og man inkuberer ved 37°C i 5 min. Der tilsættes ethanol (2.5 ml) til standsning af reaktionen, og man bestemmer colorimetrisk ved 480 nm.

Den relative aktivitet på forskellige substrater er som følger:

<u>Substrat</u>	<u>Relativ aktivitet</u>
Sarcosin	100.0
Cholin	0
Betain	0.03
Dimethylglycin	0.01
Glycin	0.06
Serin	0
Threonin	0
Alanin	0
Valin	0
Lysin	0.09
N-methylethanolamin	0
N-dimethylethanolamin	0

(3) Optimal pH-værdi:

Til undgåelse af en virkning af 4-aminoantipyrin, phenol og peroxidase på chromogen bestemmes dannelsen af aldehyd ved acetyl-acetonemetoden. Resultatet er vist i fig. 1, hvor den optimale pH-værdi er 8.0 - 9.5.

De benyttede stødpudeopløsninger er: pH-værdi 4 - 7: dimethylglutaratstødpude, pH-værdi 6 - 8: fosfatstødpude, pH-værdi 7.5 - 9: tris-HCl-stødpude, pH-værdi 9 - 10: glycin - NaOH-stødpude og pH-værdi 10 - 11: natriumcarbonat-borat-stødpude.

(4) Optimal temperatur:

Ca. 50°C som vist i fig. 2. Substrat: sarcosin.

(5) pH-stabilitet:

Dimethylglutaratstødpude for pH-værdi 5 - 7, fosfatstødpude for pH-værdi 6 - 8, tris-HCl-stødpude for pH-værdi 7.5 - 9, glycin-NaOH-stødpude for pH-værdi 9 - 10 og natriumcarbonat-boratstødpude for pH-værdi 10 - 11 benyttes. Til 0.1 ml af hver stød-

pude sættes 100 μ l enzymopløsning (protein 100 μ g/ml), og man lader henstå i 60 min. ved 37°C. Efter indstilling af pH-værdien ved tilsætning af 1.0 mol tris-HCl-stødpude (pH-værdi 8.0, 0.3 ml) udtages en prøve på 20 μ l, og enzymaktiviteten bestemmes. Sarcosin benyttes som substrat, og som vist i fig. 3 er den stabile pH-værdi 6.0 - 10.0.

(6) Varmestabilitet:

Varmestabiliteten af enzymet bestemmes ved inkubering af 10 mmol tris-HCl-stødpude (0.5 ml, pH-værdi 8.0) indeholdende enzym (protein 20 μ g/ml) med forskellige temperaturer i 10 min. under anvendelse af sarcosin som substrat. Som det fremgår af fig. 4, er enzymet stabilt under 40°C.

(7) Molekylvægt:

40.000, målt ved gelfiltreringsmetoden.

(8) Isoelektrisk punkt:

4.7 ved elektroforese under anvendelse af ampholyt af bærrertype.

(9) Identifikation og bestemmelse af reaktionsprodukter:

I) Identifikation af glycin:

Reaktionsblanding:

0.2 mol tris-HCl-stødpude (pH-værdi 8.0)	1.0 ml
1 mmol sarcosin	1.0 ml
catalase	200 enh.
sarcosinoxidase	5 enh.
destilleret vand	8.0 ml
total	10.0 ml

Ovenstående reaktionsblanding (10 ml) inkuberes ved 37°C i 60 min., hvorefter reaktionen standses ved opvarmning til 100°C i 5 min. De dannede udfældninger fjernes ved centrifugering, og den overliggende væske inddampes 10 gange og anbringes pletvis på filterpapir. Der udvikles et chromatogram med vandmættet phenol natten over, og man farver ved opvarmning efter sprøjtning med ninhydrinopløsning. Den iagttagne Rf-værdi er 0.26.

Autentiske prøver af sarcosin og glycin har Rf-værdier på henholdsvis 0.66 og 0.26, så at pletten med ovennævnte Rf-værdi identificeres som glycin.

II) Bestemmelse af formaldehyd:

Reaktionsblanding:

0.2 mol tris-HCl-stødpude (pH-værdi 8.0)	0.05 ml
sarcosin med alikvot koncentration	0.10 ml

catalase	200 enh.
sarcosinoxidase	3.0 enh.
destilleret vand	<u>0.35 ml</u>
total	0.50 ml

Reaktionsblandingen inkuberes ved 37°C i 20 min. Reaktionen standses ved opvarmning i 5 min., og efter afkøling tilsættes der acetatstødpude (pH-værdi 5.5, 1,5 ml) samt den nedenfor angivne chromogenopløsning (20 ml). Efter 50 minutters inkubation ved 37°C måles opløsningen colorimetrisk ved 412 nm. Resultatet fremgår af fig. 5, hvor dannelsen af formaldehyd svarer til koncentrationen af sarcosin.

Chromogen:

ammoniumacetat	15 g
eddikesyre	0.3 ml
acetylacetone	0.2 ml
vand	ad 100 ml

III) Bestemmelse af hydrogenperoxid:

Hydrogenperoxid bestemmes kvantitativt ved kombination af 4-aminoantipyrin, phenol og peroxidase.

Reaktionsblanding:

0.2 mol tris-HCl-stødpude (pH-værdi 8.0)	0.05 ml
3 mg/ml 4-aminoantipyrin	0.05 ml
0.2% phenol	0.05 ml
0.5 mg/ml peroxidase	0.05 ml
sarcosin af alikvot koncentration	0.10 ml
sarcosinoxidase	3.0 enh.
destilleret vand	<u>0.2 ml</u>
total	0.5 ml

Reaktionsblandingen inkuberes ved 37°C i 20 min. Efter tilsætning af ethanol (2.5 ml) måles blandingen colorimetrisk ved 480 nm. Som vist i fig. 6 svarer dannelsen af hydrogenperoxid til koncentrationen af sarcosin.

Som forklaret ovenfor katalyserer enzymet sarcosinoxidase oxidationsreaktionen, hvor sarcosin omsættes med oxygen (idet der forbruges 1 mol vand for hvert mol sarcosin), og der dannes glycin, formaldehyd og hydrogenperoxid. Derfor bekræftes enzymet som værende enzymet for EC.1.5.3.1 sarcosin: oxygen oxidoreductase (demetylerende).

Sarcosinoxidase kan benyttes som enzymatisk diagnostisk reagens såsom til bestemmelse af creatinin i blod eller urin ved kombination med creatinase og creatininase. Endvidere kan sarcosinoxidase benyttes til bestemmelse af aktiviteten af creatininase.

Nedenstående eksempel illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Eksempel 1

Et medium (100 ml) indeholdende creatin (0.5%), opløselig fiskeekstrakt (0.5 %), gærekstrakt (0.2%), KCl (0.3%), K_2HPO_4 (0.1%) og $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.05%) i en 500 ml Erlenmeyerkolbe steriliseres ved 120°C i 20 min. Man poder *Bacillus* sp. B-0618 FERM-P nr. 4049 deri og dyrker den ved 30°C i 1 dag som en podekultur, som overføres til samme steriliserede medium (20 l) i en 30-liter forgæringsbeholder, hvor man dyrker ved 30°C i 20 timer ved 200 omdrejninger pr. min. og under luftning med 20 l/min. Ved centrifugering samlede bakterieceller (12 g) vaskes med 10 mmol fosfatstødpude (pH-værdi 7.0), og man suspenderer i samme stødpudeopløsning, og der tilsættes lysozym (slutkoncentration 0.2 mg/ml), og man omrører ved 37°C i 30 min. Den ved centrifugering ved 5000 omdrejninger pr. min. i 15 min. opnåede overliggende væske samles (sarcosinoxidaseaktivitet: 1400 enh.). Til den således opnåede overliggende væske sættes 2% protaminsulfatopløsning (2.5 ml), og nucleinsyreudfældningen skilles fra.

Til den overliggende væske sættes mættet ammoniumsulfat, og man samler udfældningen af fraktionerne af 50% - 70% ammoniumsulfatkoncentration.

Udfældningen opløses i 10 mM tris-HCl-stødpude (pH-værdi 8.0, 20 ml) og afsaltes gennem en Sephadex G-25-søjle (indregistreret varemærke) (3.5 x 30 cm). Den afsaltede opløsning anbringes på en DEAE-cellulosesøjle (2.0 x 18cm), 10 mM tris-HCl-stødpude, pH-værdi 7.0) til adsorption af enzymet, og man vasker med samme stødpudeopløsning indeholdende 0.1 mol KCl og eluerer ved en gradient af 0.1 M - 0.5 M KCl-opløsning.

Den aktive fraktion, som elueres med 0.36 M KCl, samles og dialyseres i 10 timer mod opløsningen af 10 mM tris-HCl-stødpude (pH-værdi 8.0), hvorpå man frysetørrer til opnåelse af et pulver af sarcosinoxidase.

Total aktivitet: 540 enheder, protein: 43 mg, specifik aktivitet: 12.7 enh./mg, udbytte 38.6%.

P a t e n t k r a v.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af sarcosinoxidase, k e n d e t e g n e t ved, at man dyrker stammen Bacillus sp. B-0618, FERM-P nr. 4049 i et næringsmedium, og at man isolerer den således dannede sarcosinoxidase fra dyrkningsmassen.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningsmediet indeholder creatin.

Fremdragne publikationer:

FIG. 1

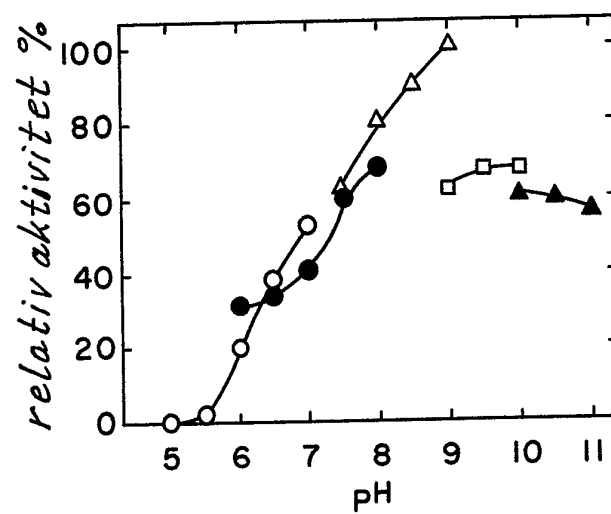


FIG. 2

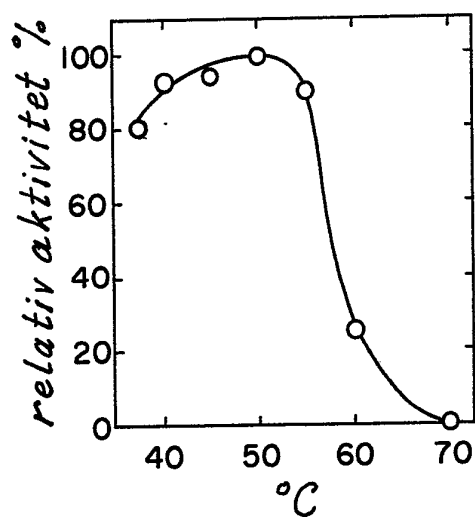


FIG. 3

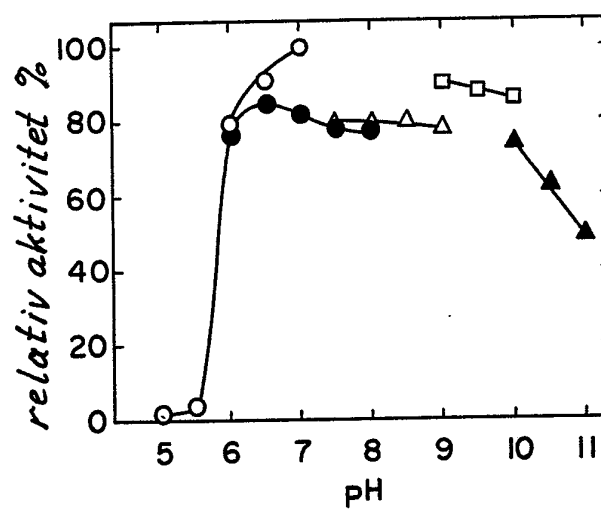


FIG. 4

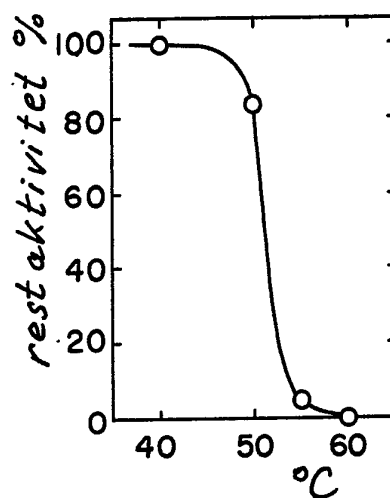


FIG. 5

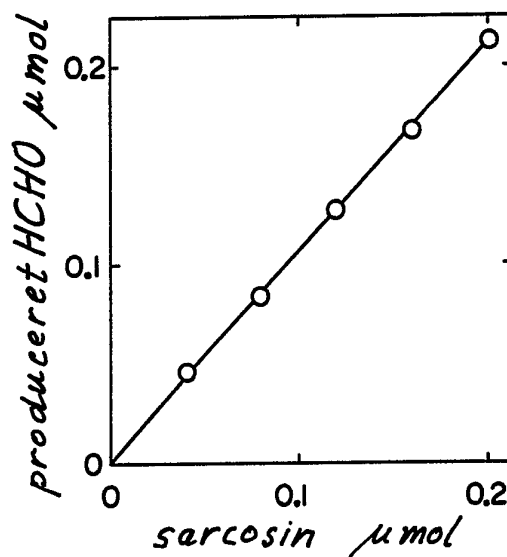


FIG. 6

