



SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

- C (45) Patenti myönnetty
Patent meddelat 24 03 1986
(51) Kv.lk./Int.Cl. C 12 N 9/06 // C 12 R 1:265
- | | |
|---|----------|
| (21) Patentihakemus — Patentansökning | 812868 |
| (22) Hakemispäivä — Ansökningsdag | 15.09.81 |
| (23) Alkupäivä — Giltighetsdag | 15.09.81 |
| (41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig | 20.03.82 |
| (44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. —
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad | 06.06.86 |
| (86) Kv. hakemus — Int. ansökan | |
| (32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet | 19.09.80 |
| Italia-Italien(IT) 24757 A/80 | |
| Toteennäytetty-Styrkt | |

- (71) ENI - Ente Nazionale Idrocarburi, Piazzale E.Mattei 1, Rooma, Italia-
Italien(IT)
- (72) Roberto Olivieri, Rooma, Eugenio Fascetti, Rooma,
Pierluigi Ciuffolotti, Rooma, Ludwig Degen, Rooma, Italia-Italien(IT)
- (74) Antti Impola
- (54) Urikaasin valmistusmenetelmä - Förfarande för framställning av uricase

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää aktiivisen urikaasin valmistami-
seksi fermentoimalla mikro-organismeja Micrococcus roseus
NRRL B-12196.

Tämän mikro-organismin tuottaman entsyymin optimaalinen
aktiivisuus esiintyy pH-arvoissa, jotka ovat lähellä fysio-
logisten liuosten pH-arvoja. Näin tuotettua urikaasia voi-
daan käyttää hyväksi kliinisessä diagnostiikassa virtsahappo-
määrityksissä.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av aktiv
uricase genom fermentation av mikroorganismen Micrococcus
roseus NRRL B-12196.

Den optimala aktiviteten av det av denna mikroorganism pro-
ducerade enzymet ligger nära fysiologiska vätskors pH-värden.
Den på detta sätt framställda uricasen kan användas i den
kliniska diagnostiken för bestämning av urinsyra.

Urikaasin valmistusmenetelmä

Förfarande för framställning av uricase

Tämä keksintö koskee menetelmää, jolla voidaan valmistaa hyvin aktiivista urikaasientsyymiä (EC 1.7.3.3.), jota voidaan käyttää kliinisessä diagnostiikassa virtsahapon määrittämiseen veriseerumista tai virtsasta.

5 Urikaasi on entsyymi, joka katalysoi virtsahapon hapettumista allantoiiniksi, ja sitä ei ole läsnä korkeampien nisäkkäiden kuten ihmisen kudoksissa, mutta sen sijaan sitä on alempien nisäkkäiden kudoksissa, varsinkin sisäelimissä, ja myös enemmän ja vähemmän eräissä mikro-
10 organismeissa. Uusi havainto, joka onkin tämän keksinnön ensimmäisenä kohteena, on se, että urikaasia voidaan tuottaa Micrococcus roseus -mikro-organismilla, jonka ei ole aikasemmin tiedetty voivan tuottaa mainittua entsyymiä, ja lisäksi sillä on muihin tunnetun tyyppisiin mikro-organis-
15 meihin verrattuna se etu, että se tuottaa suuria urikaasimääriä elatusaineissa, jotka sisältävät virtsahappoa pieninä väkevyyksinä. Edelleen on yllättäen havaittu, että Micrococcus roseus NRRL B 12196 -kannalla tuotetun urikaasin optimaalinen aktiivisuusalue eroaa muilla bakteereilla tuotetun urikaasin vastaavasta ollen lähellä fysiologisten nesteiden pH-arvoja, ja tämä onkin edullista, koska näin ollen pH:ta ei tarvitse säätää niissä biologisissa näytteissä, joista virtsahappo halutaan määrittää, ja täten välttää säädön näytteeseen mahdollisesti aiheuttamilta kemialli-
20 silta muutoksilta. Kyseinen mikro-organismi on eristetty viljelysmaasta Monterotondosta (Rooma) ja sillä on seuraavat morfologiset ominaisuudet:

Mikroskooppinen morfologia

30 Palloja, joiden halkaisija on 1-2,5 mikronia, ja jotka ovat liikkumattomia ja Gram-positiivisia, jakautuvat useammassa kuin yhdessä tasossa ja esiintyvät kuutiomaisissa paakuissa tai epäsäännöllisissä ryhmissä ja joskus pareina tai yksinään.

Makroskooppinen morfologia

35 Pesäkkeet ravintoagarilla: kohonnut, yhtenäinen reuna, ruusunhohtoinen väri, pehmeä pinta, halkaisija 1-2 mm.

Vinopinta-agar: vaalea ruusunhohtoinen ihonväri, sileä ja kiiltävä.

Biologiset ominaisuudet

Kasvu glukoosiliemessä: vähäistä sameutta, jossa limaista sakkaa, väri hieman vaaleanpunainen, pH = 6,5.

Kasvu tapahtuu paremmin 10 °C kuin 45 °C:ssa optimaalisen alueen ollessa välillä 25-35 °C.

Mikro-organismi kasvaa glukoosiliuoksessa, joiden natriumkloridipitoisuudet ovat 5% ja 10%, mutta ei liuoksessa, jonka natriumkloridipitoisuus on 15%.

Ei kasva Simmons sin sitraattiagarissa.

Aerobinen happamuudenmuodostus sokereista "Purple Broth" -alustassa (DIFCO): ksyloosi, glyseroli, mannitoli, laktoosi, maltoosi, sorboosi, riboosi, arabinoosi, raffinoosi, sellobioosi negatiivisia; glukoosi, sakkaroosi ja fruktoosi aiheuttivat hieman viivästyneen happamuuden (7-10 vuorokautta).

Arginiinin hydrolyysi: negatiivinen

Tärkkelyksen hydrolyysi: positiivinen

Gelatiinin hydrolyysi: negatiivinen

Ureaasi: positiivinen

H₂S: negatiivinen

Katalaasi: positiivinen

Nitrataasi: positiivinen

Indoli: negatiivinen

Asetoiini: negatiivinen

Metyyliipuna: negatiivinen

Lesitinaasi: negatiivinen

Lipaasi (voi ja oliiviöljy): negatiivinen

Kun näitä tietoja verrattiin teoksessa Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, VIII painos, esitettyihin tietoihin, voitiin todeta, että tämän keksinnön sisältämä mikro-organismi kuuluu Micrococcaceae-heimoon, Micrococcus-sukuun ja roseus-lajiin. Se on taltioitu Northern Regional Research Centeriin, Peoria, Ill., U.S.A., jossa sille on annettu tunnus NRRL B-12196.

Micrococcus roseus NRRL B-12196 -kantaa voidaan viljellä millä tahansa tavanomaisella aerobisella menetelmällä kuten pintaviljelmänä tai mieluummin pinnanalaisviljelmänä

käyttämällä sekoitettuja fermentoreita. Elatusalusta, joka voi olla joko kiinteä tai nestemäinen, sisältää assimiloituvan hiili- ja typpilähteen, fosforilähteen ja kivennäis-suoloja ja vitamiineja.

5 Viljely voidaan suorittaa lämpötila-alueella 10 - 40 °C, mielellään alueella 25-35 °C, kasvatusajan ollessa 10-48 tuntia, mielellään 20-30 tuntia ja pH:n ollessa alueella 6-9, mielellään välillä 7-8.

10 Sopivia hiililähteitä ovat esim. glukoosi, laktaatti, asetaatti, sakkaroosi, fumaraatti, virtsahappo, maissi-liotusvesi, glyseroli.

Sopivia typpilähteitä ovat esim. lihahydrolysaatit, kaseiini, soijahydrolysaatit, ammoniakkisuolat, virtsa-aine, nitraatit tai virtsahappo.

15 Urikaasin uuttaminen bakteerimassasta ja mahdollinen puhdistus voidaan suorittaa tavanomaisilla entsymologiassa tunnetuilla menetelmillä. *Micrococcus roseus* NRRL B-12196 -kannasta uutettu urikaasi voidaan immobilisoida polymeerimatriiseihin kemiallisilla sidoksilla tai ionisidoksilla
20 tai pelkästään fysikaalisella tavalla.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä:

Esimerkki 1

Elatusalustan koostumus oli seuraava:

25 Hiivauute 15 g/l
virtsahappo 2 g/l

pH säädettiin natriumhydroksilla arvoon 7,2 ja jaettiin 200 ml:n erissä 500 ml:n pulloihin. Liuokset steriloidittiin (116 °C, 30 min) ja pulloihin siirrostettiin NRRL B-12196 -kantaa agarvinopinnoilta, joissa oli samaa elatus-
30 ainetta 2% agarissa, ja pulloja inkuboitiin 24 tuntia 30 °C:ssa orbitaalisekoituksessa nopeudella 200 r/min. Sen jälkeen solut sentrifugoitiin talteen ja saatiin 3 g massaa (märkäpaino) 200 ml:sta elatusliuosta. Saatu solumassa suspendoitiin 60 ml:aan fosfaattipuskuria (0,1 M; pH=8,5)
35 ja solut rikottiin täydellisesti käsittelemällä suspensio French Pressure Cell Press -laitteessa. Saadun uutteen entsyymiaktiivisuus osoitti, että 1 g märkää solumassaa sisälsi 100 urikaasiyksikköä.

Urikaasiaktiivisuus määriteltiin spektrofotometri-
sesti seuraamalla virtsahapon hajoamista 283 nm:ssa menetel-
mällä Mahler et al., J. Biol. Chem. (1955), 216, 625, jota
oli modifioitu seuraavassa kuvatulla tavalla. 7 ml liuosta,
5 joka sisälsi 20 mg virtsahappoa 100 ml:ssa fosfaattipuskuria
(0,1 M, pH=8,5), laitettiin 50 ml pulloon 30 °C:ssa sekoit-
etulle vesihauteelle. Reaktio käynnistettiin lisäämällä
pieni määrä entsyymiuutetta. Heti uutelisäyksen jälkeen ja
vielä 10 minuutin reaktioajan kuluttua reaktioseoksesta otet-
10 tiin 0,5 ml näytteet, jotka lisättiin 4 ml:aan 0,1 M HCl.
Näin saatujen liuosten absorbanssit luettiin arvossa 283 nm.

Urikaasiyksikkö määriteltiin siksi määräksi entsyym-
miä, joka kykenee hajottamaan 1 mikromoolin virtsahappoa
minuutissa edellä kuvatuissa olosuhteissa.

15 Esimerkki 2

Micrococcus roseus NRRL B-12196 -solu-uute valmis-
tettiin esimerkin mukaisesti.

Raakauute sentrifugoitiin ja emäliuoksen sisältämä
urikaasiaktiivisuus määriteltiin edellä kuvatulla tavalla
20 käyttämällä reaktioliuosta, joissa virtsahappo oli liuo-
tettu 0,1 M fosfaattipuskuriin, ja jotka oli säädetty eri
pH-arvoihin. Samanaikaisesti määritettiin sellaisten ent-
syymiuutteen aktiivisuudet, jotka oli saatu *Bacillus*
fastidiosus -viljelmistä, samoissa kasvatusolosuhteissa.
25 kuin *Micrococcus roseus* -kanta viljeltiin. Saadut tulok-
set on esitetty taulukossa 1, jossa kummankin mikro-orga-
nismin vertailuarvoksi pH-arvossa 9 on merkitty 100.

Taulukko 1

Urikaasiaktiivisuus pH:n funktiona *B.fastidiosus*-
30 ja *M. roseus* -uutteissa.

Reaktioseoksen pH	Uutettu mikro-organismi	
	<i>M.roseus</i>	<i>B.fastidiosus</i>
6,5	71	13,5
7,0	94	35
35 7,5	103	57
8,0	106	85
8,5	103	95
9,0	100	100

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä urikaasin valmistamiseksi mikro-organismin avulla aerobisissa olosuhteissa elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvan hiili-, typpi- ja fosforilähteen sekä kivennäissuoloja, t u n n e t t u s i i t ä , että mikro-organismi on Micrococcus roseus NRRLB-12196.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä urikaasin valmistamiseksi, t u n n e t t u s i i t ä , että viljelylämpötila on välillä 10 - 40 °C.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä urikaasin valmistamiseksi, t u n n e t t u s i i t ä , että viljelylämpötila on välillä 25 - 35 °C.

4. Edellä olevien patenttivaatimusten mukainen menetelmä urikaasin valmistamiseksi, t u n n e t t u s i i t ä , että elatusaineen pH on välillä 6 - 9.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä urikaasin valmistamiseksi, t u n n e t t u s i i t ä , että elatusaineen pH on välillä 7 - 8.

PATENTKRAV

1. Förfarande för framställning av uricase med till-
hjälp av en mikroorganism i aerobiska förhållanden, i ett
odlingsämne som innehåller en kol-, kväve- och fosfor-
källa som assimileras, samt mineralsalter, k ä n n e -
5 t e c k n a t d ä r a v , att mikroorganismen är
Micrococcus roseus NRRLB-12196.

2. Förfarande för framställning av uricase, k ä n n e -
t e c k n a t d ä r a v , att odlingstemperaturen är
mellan 10 °C och 40 °C.

10 3. Förfarande för framställning av uricase,
k ä n n e t e c k n a t d ä r a v , att odlingstempera-
turen är mellan 25 °C och 35 °C.

4. Förfarande för framställning av uricase,
k ä n n e t e c k n a t d ä r a v , att pH- värdet
15 av odlingsämnet är mellan 6 och 9.

5. Förfarande för framställning av uricase,
k ä n n e t e c k n a t d ä r a v , att pH -värdet
av odlingsämnet är mellan 7 och 8.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan liittotasavalta-För-
bundsrepubliken Tyskland(DE) 2 164 018 (C 12 d 13/10, p. 1, rivit 9-11
ja p. 2, rivit 1-10). Iso-Britannia-Storbritannien(GB) 1 198 764
(C 12 d 13/10, p. 1, rivit 47-49).
Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 4 062 731 (C 12 D 13/10,
tiivistelmä).