



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **228 974 A3**

4(51) C 12 N 9/04

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP C 12 D / 249 090 0	(22)	23.03.83	(45)	23.10.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Karl-Marx-Universität Leipzig, 7010 Leipzig, Goethestraße 3-5, DD

(72) Schöpp, Wulfdieter, Dr. sc.; Schäfer, Angelika, DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Carnitindehydrogenase

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Carnitindehydrogenase. Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung von Carnitindehydrogenase anzugeben, in dessen Verlauf nach einem einfachen Zellaufschlußverfahren eine Aktivität des Enzyms bereits im Proteinrohextrakt von mindestens 3 U/mg erzielt wird. Die Erfindung hat die Aufgabe, durch Einsatz einer mikrobiellen Enzymquelle im Zusammenwirken mit einer effektiven Reinigungstechnologie das gewünschte Enzym mit hoher spezifischer Aktivität zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß das Enzym Carnitindehydrogenase aus dem Stamm *Pseudomonas putida* ATCC 17633 hergestellt wird.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Carnitindehydrogenase durch Kultivieren von *Pseudomonas putida* in Submerskultur und flüssigem Minimalmedium, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Stamm ATCC 17633 bei eingeschränkter Sauerstoffversorgung gezüchtet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß 0,3 bis 1,5 l Luft pro Stunde und Liter Nährmedium eingeleitet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Zellaufschluß durch Einfrieren und Wiederauftauen erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Carnitindehydrogenase, die in der klinisch-chemischen Diagnostik zur Bestimmung von L-Carnitin eingesetzt werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Carnitindehydrogenase wird kommerziell bisher nicht hergestellt. Untersuchungen bezüglich eines Einsatzes zur quantitativen Carnitinbestimmung liegen nicht vor. L-Carnitin wird quantitativ auf enzymatischem Wege z. Z. mit Hilfe von Carnitin-Acetyltransferase (EC 2.3.1.7.) in Kombination mit Acyl-CoA Synthetase (EC 6.2.1.2.) oder DTNB bestimmt (Pearson, D. J., Tubbs, P. K. and Chase, J. F. A. in Methoden der enzymatischen Analyse [H. U. Bergmeyer, Hrsg.] Akademie-Verlag Berlin 1970, S. 1710–1723). Beide Methoden weisen eine Reihe von Nachteilen auf, von denen neben den erheblichen Kosten die relativ komplizierte Handhabung und eine hohe Störanfälligkeit genannt werden müssen. Nachdem Möglichkeiten für die quantitative Bestimmung von L-Carnitin mit Hilfe des optischen Testes geschaffen wurden (Schöpp, W., *Analyt. Biochem.*, in Vorbereitung), ist auch mit dem breiten Einsatz von Carnitindehydrogenase zu rechnen. Das Enzym wird von verschiedenen *Pseudomonas*-Spezies gebildet (Aurich, H., Kleber, H.-P., und Schöpp, W., *Biochem. Biophys. Acta*, 139, 505 (1976); Kleber, H.-P., Seim, H., Aurich, H. und Strack, E., *Arch. Microbiol.* 116, 213 [1978]). Die ermittelten spezifischen Aktivitäten liegen in den zellfreien Extrakten zwischen 1 und 1,5 U/mg.

Die US-PS 4 221 869 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Carnitindehydrogenase durch Kultivieren des *Pseudomonas*-Stammes CIP 52 191 unter üblichen Züchtungsbedingungen bei 30°C über 24 Stunden. Es wird Enzym mit einer Aktivität von 0,55 U/mg erhalten. Es ist ersichtlich, daß ein Produkt derart geringer Aktivität kommerziell nicht interessant ist. Ein wirksames Anreicherungsverfahren für das Enzym wird in der zitierten Patentschrift nicht angegeben.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Herstellung von Carnitindehydrogenase anzugeben, in dessen Verlauf nach einem einfachen Zellaufschlußverfahren eine Aktivität des Enzyms bereits im Proteinrohextrakt von mindestens 3 U/mg erzielt wird und eine Anreicherung mit Hilfe weniger, jedoch effektiv wirkender Trenntechniken auf Werte bis zu 25 U/mg kostengünstig möglich ist.

Darüber hinaus soll ein Präparat gewonnen werden, das praktisch frei von Malat- und Laktatdehydrogenase ist. Das ist von wesentlicher Bedeutung, weil dadurch die erheblichen Vorteile der L-Carnitinbestimmung mit Carnitindehydrogenase nach dem optischen Test von W. Schöpp voll zur Geltung kommen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, durch Auswahl einer mikrobiellen Enzymquelle sowie durch Anwenden neuer Kultivierungsbedingungen im Zusammenwirken mit einer effektiven Reinigungstechnologie das gewünschte Enzym mit hoher spezifischer Aktivität, frei von störenden Fremdaktivitäten, zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß das Enzym Carnitindehydrogenase durch Kultivieren des Stammes *Pseudomonas putida* ATCC 17633 hergestellt wird. Dieser Stamm, der auch in der Sammlung des Jenaer Zentralen Instituts für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie hinterlegt worden ist und dort die Bezeichnung ZIMET 10947 erhalten hat, wird erfindungsgemäß bei eingeschränkter Sauerstoffversorgung kultiviert. Im einzelnen werden folgende Verfahrensschritte absolviert.

Die Stammhaltung geschieht bevorzugt auf 2%igem Agar bei 4°C im Dunkeln unter Verwendung von Decan als C-Quelle und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-Quelle. Die Kultivierung von *Pseudomonas putida* auf Carnitin erfolgt durch Beimpfen aus einer Vorkultur, die unter Verwendung von z. B. gasförmigem Hexan gewonnen wurde. Kultiviert wird bei 20–40°C, in Submerskultur in einem flüssigen Minimalmedium. Die Züchtung wird erfindungsgemäß unter Belüftungsbedingungen durchgeführt, die einer stark eingeschränkten Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen entsprechen. Unter diesen Bedingungen erreicht auch die Aktivität der Carnitindehydrogenase maximale Werte. Als N-Quelle werden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl oder dgl. verwendet. Nach einer Wachstumszeit von 5–40 h – je nach physiologischem Zustand und Menge des Impfmateri als – werden die Bakterien geerntet (z. B. durch Zentrifugation) und anschließend ohne Zwischenschaltung eines Waschprozesses in Phosphatpuffer resuspendiert. Die Gewinnung des zellfreien Rohextraktes erfolgt vorzugsweise durch Einfrieren der Suspension und Wiederauftauen sowie anschließender Zentrifugation. Die hohe Leistungsfähigkeit dieses einfachen Aufschlußverfahrens kann besonders bei Vergleich mit einer Ultraschallbehandlung demonstriert werden (Tab. 1).

Aus den zellfreien Proteinextrakten kann Carnitindehydrogenase durch fraktionierte Salzfällung bzw. -extraktion, z. B. mit Ammoniumsulfat auf das 3- bis 5fache angereichert werden. Hierzu wird dem Proteinrohextrakt festes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 70% Sättigung zugesetzt, wobei die gesamte Aktivität in das Sediment gelangt. Zur weiteren Anreicherung der Carnitindehydrogenase wird der Rückstand mit Ammoniumsulfatlösung, die jeweils 0,05 mol/l Na_2HPO_4 enthält, bei 0°C und sinkender Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ für jeweils 5 min gerührt. Das Enzym wird dabei in zunehmendem Maße gelöst. Die Hauptmenge löst sich im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 45% gesättigter Ammoniumsulfatlösung, Carnitindehydrogenase kann direkt aus diesen Lösungen durch Anwendung der hydrophoben Chromatographie z. B. an 10-Carboxydecyl-Sepharose bis auf spezifische Aktivitäten von etwa 25 U/mg angereichert werden.

Die technisch-ökonomischen Vorteile der vorgeschlagenen Verfahrensweise bestehen darin, daß der Stamm *Pseudomonas putida* ATCC 17633 bereits primär im Vergleich zu bekannten Stämmen ein Vielfaches an Enzymaktivität produziert. Das ist sowohl der Eigenheit des eingesetzten Stammes geschuldet, der sich darin von allen anderen untersuchten *Pseudomonas putida*-Stämmen unterscheidet, als auch den speziellen Belüftungsbedingungen, d. h. der eingeschränkten Sauerstoffversorgung. Weitere Vorteile bringen das Aufschlußverfahren durch Einfrieren und die Anreicherung des Enzyms an 10-Carboxydecyl-Sepharose. Das

erfindungsgemäß hergestellte Enzym ist gut lagerfähig. Bei spezifischen Aktivitäten von 10–20 U/mg sind maximal folgende Fremdaktivitäten nachweisbar:

MDH, LDH jeweils < 0,1 %

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

Die Kultivierung von *Pseudomonas putida* ATCC 17633 wird in einem Medium durchgeführt, das pro 1 folgende Bestandteile enthält:

- K₂HPO₄, 7,46 g; NaH₂PO₄, 0,54 g; MgSO₄ · 7H₂O, 20 mg;
- CaCl₂ · 2H₂O, 20 mg; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O, 10 mg;
- Als N-Quelle dient (NH₄)₂SO₄ (1 g/l), als C-Quelle D, L-Carnitin · HCl (5 g/l).

Die Bakterien werden auf dem gleichen Medium unter Verwendung von gasförmigem Hexan als C-Quelle (0,015% in der zugeführten Luft) vorkultiviert. Das Überimpfen erfolgt im Verlaufe der logarithmischen Wachstumsphase, die Animpfdichten liegen bei E₆₀₀^{1,5m} ~ 0,1. Die Kultivierung erfolgt in einem 10 l-Fermentationsgefäß mit einem Füllinhalt von 7 l unter intensivem Rühren und einem Lufteintrag von 2–10 l/h. Nach einer Kultivierungszeit von 20–30 h bei 30 °C – die Trübung der Kultur beträgt danach E₆₀₀^{1,5m} = 1,5–2,5 – werden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet und anschließend in 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 8 resuspendiert (E₆₀₀^{1,5m} ~ 20).

100 ml-Portionen dieser Suspension werden bei –80 °C eingefroren und 60 min bei dieser Temperatur belassen. Anschließend werden die Proben für 4 h bei 30 °C gehalten. Nach Zentrifugation bei 10000 xg für 30 min befinden sich mindestens 75 % der Aktivität an Carnitindehydrogenase im zellfreien Überstand. Die spezifische Aktivität des Enzyms liegt unter diesen Bedingungen bei Werten zwischen 2–4 U/mg, der Proteingehalt beträgt etwa 5 mg/ml.

Aus dieser Lösung wird bei 4 °C durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 70 % Sättigung der überwiegende Teil des Proteins gefällt. Die gesamte Aktivität der Carnitindehydrogenase befindet sich im Präzipitat. Nach Zentrifugieren wird das Sediment in Ammoniumsulfatlösungen (abnehmende Konzentrationen in jeweils 0,05 mol/l Na₂HPO₄) bei 0 °C resuspendiert und erneut zentrifugiert. Auf diese Weise lassen sich im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 45 % Sättigung 90 % der Gesamtaktivität an Carnitindehydrogenase im Überstand nachweisen (siehe Tabelle 2). Das Enzym (spezifische Aktivität 5–10 U/mg) kann durch Zugabe von Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 70 % Sättigung wieder ausgefällt werden. Trägt man den durch Ammoniumsulfatextraktion gewonnenen Überstand (Ü 45) auf eine Säule, die 10-Carboxy-decylsepharose enthält, auf und eluiert bei 22 °C mit Ammoniumsulfatlösungen (Sättigung 40, 35, 30 %), wird die Carnitindehydrogenase bis zu einer spezifischen Aktivität von etwa 25 U/mg angereichert (Tabelle 3).

Tabelle 1

Gewinnung von Carnitindehydrogenase aus *Ps putida* bei Anwendung verschiedener Aufschlußverfahren

Die Bakterien werden nach Kultivierung auf D, L-Carnitin durch Zentrifugation geerntet, in 0,05 mol/l Phosphatpuffer pH 8 resuspendiert (E₆₀₀^{1,5m} ~ 20) und jeweils 20 ml davon anschließend durch Ultraschallbehandlung (4min bei 50 W/cm²) bzw. Einfrieren (30 min; –80 °C)/Wiederauftauen (1 h; 30 °C) aufgeschlossen.

Aufschlußverfahren	Gesamtaktivität nach Zellaufschluß (U)	Gesamtaktivität im Überstand nach Aufschluß und Zentrifugation bei 15 000 xg (U)	Gesamtprotein im Überstand (mg)	spez. Akt. Überstand (U/mg)
Ultraschall	180	177	120	1,5
Einfrieren/Wiederauftauen	177	183	80	2,3

Tabelle 2

Fraktionierte Ammoniumsulfatextraktion der Carnitindehydrogenase

Die Angaben beziehen sich auf 320 ml eines Proteinextraktes (4,5 mg Protein/ml), der durch Einfrieren/Wiederauftauen gewonnen wurde.

(NH ₄) ₂ SO ₄ (%-Sättigung)	Volumen (ml)	Aktivität (U)	Protein (mg)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)
60 (Sediment)		3 950	1 700	2,3	
60 (Überstand)	50				
55 (Ü 1)	57	35			0,8
55 (Ü 2)	50	105			2,6
55 (Ü 3)	50	40	120	0,3	1,0
45 (Ü 1)	54	1 144	178	6,4	29
45 (Ü 2)	52	1 548	210	7,4	39
45 (Ü 3)	42	670	110	6,1	17
35 (Ü 1)	48	220	585	0,4	5,5

Tabelle 3

Reinigung der Carnitindehydrogenase an 10-Carboxydecylsepharose

Auf eine Säule, die 18 ml 10-Carboxydecyl-Sepharose enthält und mit einer (NH₄)₂SO₄-Lösung (45% Sättigung) äquilibriert ist, werden 106 ml einer Carnitindehydrogenase-Lösung in 45% gesättigter Ammoniumsulfatlösung aufgetragen. Die Lösung enthält 2 080 U des Enzyms und 329 mg Protein. Die Elution wird bei 22 °C durchgeführt.

Fraktion (Nr.)	ml	(NH ₄) ₂ SO ₄ (% Sättigung)	Aktivität (U)	Protein (mg)	spez. Akt. (U/mg)	Aus- beute (%)
1.	106	45	22			
2.	25	45	2,2			
3.	25	45	0,6			
4.	25	40	1,3			
5.	25	40	1,9			
6.	25	35	43			
7.	25	35	177	25	7	8,5
8.	25	35	225	18	12,5	11
9.	25	35	167	17,5	9,5	8
10.	25	30	386	19	20	18,5
11.	20	30	546	22	25	26
12.	25	30	520	46	11	25