Patentbibliothek
des AfEP

(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

Ausschliessungspatent

ISSN 0433-6461 (11) **0152 942**

Erteilt gemaeß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes zum Patentgesetz

Int.Cl.³ 3(51) C 12 N 9/16

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 N/ 223 376 (22) 18.08.80 (44) 16.12.81
(31) P2933648.9 (32) 20.08.79 (33) DE

(71) BOEHRINGER MANNHEIM GMBH;DE;
(72) BEOUCAMP, KLAUS,DR.;NELBOECK, MICHAEL,DR.;GAUHL, HELMGARD;SEIDEL, HANS,DR.;DE;
GRUBER, WOLFGANG,DR.;BRUNNER, HERWIG,DR.;DE;
(73) BOEHRINGER MANNHEIM GMBH;DE;
(74) INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN, 1020 BERLIN, WALLSTR. 23/24

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON CHOLESTERINESTERASE

(57) Zur Gewinnung von Cholesterinesterase aus Mikroorganismen der Gattung Pseudomonas zuechtet man Pseudomonas sp-DSM 1280 oder DSM 1281 in einem geeigneten Naehrmedium in Gegenwart eines Induktors und gewinnt das Enzym aus der Kulturfluessigkeit oder/und den Zellen.

Berlin, den 9.1.1981
AP C 07 C/223 376
57 778 / 11

Verfahren zur Gewinnung von Cholesterinesterase

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Cholesterinesterase aus Mikroorganismen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Cholesterinesterase spielt eine wichtige Rolle in der klinischen und biochemischen Analytik seit Verfahren zur enzymatischen Bestimmung von Cholesterin entwickelt wurden. Da ein großer Teil des Cholesterins in biologischem Material in Form von Estern vorliegt, ermöglicht die gemeinsame Verwendung von Cholesterinesterase und Cholesterin oxydierenden Enzymen, wie Cholesterinoxydase oder Cholesterinedehydrogenase, eine vollenzymatische Bestimmung auch von Cholesterinestern. Dies ist bekannt aus der DE-PS 2 264 847. Als besonders geeignet hat sich im Rahmen der Cholesterinesterase-Bestimmung dabei das Enzym aus Mikroorgansmen erwiesen (DE-OS 25 06 712.3). Ein Nachteil der bisher aufgefundenen Mikroorganismen mit einem die Aufarbeitung lohnenden Gehalt an Cholesterinesterase besteht jedoch in den relativ geringen Ausbeuten an Enzymaktivität, die dabei erhalten werden.

9.1.1981
AP C 07 C/223 376
57 778 / 11

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung von Cholesterinesterasen mit höherer Aktivität.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, geeignete Mikroorganismen aufzufinden.

Nunmehr wurde überraschenderweise gefunden, daß bei Verwendung bestimmter Mikroorganismen um ein Vielfaches höhere Aktivitäten erzielt werden können, als dies bisher möglich war. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von Cholesterinesterase aus Mikroorganismen der Gattung Pseudomonas ist daher dadurch gekennzeichnet, daß man Pseudomonas spec. DSM 1280 oder DSM 1281 in einem geeigneten Nährmedium in Gegenwart eines Induktors züchtet und das Enzym aus der Kulturflüssigkeit oder/und den Zellen gewinnt.

Aus der DE-OS 2 527 068 sind zwar bereits Stämme der Gattung Pseudomonas fluorescens bekannt, welche ebenfalls einen zur Aufarbeitung lohnenden Gehalt an Cholesterinesterase besitzen. Aber auch in diesen Fällen sind die erhältlichen Aktivitätseinheiten gering und liegen vielfach nur bei wenigen Einheiten/Liter. Demgegenüber werden mit den erfindungsgemäß verwendeten Mikroorganismen Aktivitäten von 15000 und mehr Einheiten/Liter erzielt.

9.1.1981
AP C 07 C/223 376
57 778 / 11

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Züchtung in einem Nährmedium, welches einen Induktor enthält. Unter "Induktor" wird hierbei eine Substanz verstanden, welche den Mikroorganismus dazu anregt, das gewünschte Enzym in größerer Menge zu bilden als ohne Induktor. Vorzugsweise wird der eingesetzte Induktor dabei auch als Kohlenstoffquelle, insbesondere als alleinige Kohlenstoffquelle, verwendet. Es ist jedoch auch möglich, gesonderte Kohlenstoffquellen zuzusetzen, beispielsweise Maisquellwasser, Peptone, Hefeextrakte sowie, weniger geeignet, Zucker oder Polyalkohole, wie Glycerin. Als Induktoren erwiesen sich die Palmitinester gut geeignet, insbesondere das Tripalmitin. Die besten Ergebnisse wurden jedoch unter Verwendung von Lecithin als Induktor erzielt. Als besonders geeignet unter den verschiedenen Lecithinen erwies sich Sojalecithin, aber auch andere Lecithinarten, wie Eilecithin oder Hirnlecithin, ergaben sehr gute Resultate.

Die eingesetzte Induktormenge ist bis zu einem gewissen Grad abhängig von der Art des verwendeten Induktors. Sie liegt im allgemeinen zwischen etwa 0,1 bis 5 Gew.-%, bezogen auf das Volumen des Nährmediums. Bei Verwendung von Lecithin als Induktor und alleinige Kohlenstoffquelle wurden besonders gute Ergebnisse bei einer Menge von 0,5 bis 2 Gew.-% erhalten.

Das Nährmedium enthält darüber hinaus noch üblicherweise zugesetzte Salze und Spurenelemente und sollte durch Zugabe eines geeigneten Puffers auf einen pH-Wert zwischen etwa 5 und 9, vorzugsweise 6 und 8, eingestellt werden. Als Puffer wird Phosphatpuffer bevorzugt. Darüber hinaus enthält das Nährmedium zweckmäßig noch Ammonium-, Chlor-, Fe-, Cu-,

9.1.1981
AP C 07 C/223 376
57 778 / 11

Zn-, Mg- und Ca-Ionen, abgesehen von den Alkaliionen des Phosphatpuffers. Phosphat liegt dabei zweckmäßig in einer Konzentration zwischen 0,4 und 2 Gew.-% vor, jedoch können auch größere oder kleinere Konzentrationen eingesetzt werden.

Tierische Fette und überraschenderweise auch Cholesterinester erwiesen sich im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens als Induktoren wenig vorteilhaft.

Ein im Rahmen der Erfindung bevorzugtes Nährmedium besitzt etwa folgende Zusammensetzung, jeweils bezogen auf 1 l Flüssigkeit:

5 bis 10 g, vorzugsweise 6 bis 8 g, $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
1 bis 5 g, vorzugsweise 2 bis 4 g, KH_2PO_4
0,2 bis 2 g, vorzugsweise 0,8 bis 1,2 g, NH_4Cl
0,01 bis 0,1 g, vorzugsweise 0,3 bis 0,7 g, NaCl
0,01 bis 1 ml 1%ige $FeCl_3$-Lösung
0,01 bis 1 ml 0,2%ige $CuCl_2$-Lösung
0,01 bis 1 ml 1%ige Zinksulfat-Lösung
0,1 bis 10 ml 10%ige $CaCl_2$-Lösung
1 bis 20 ml, vorzugsweise 3 bis 10 ml, 12%ige $MgSO_4$-Lösung
0,1 bis 5 Gew.-%, vorzugsweise 0,5 bis 2 Gew.-%, Sojalecithin

Die Züchtung wird unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Es eignen sich sowohl Schüttelkultur als auch belüftete Submerskultur. Die Temperatur kann zwischen etwa 15 und etwa 45 °C liegen, bevorzugt werden 25 bis 35 °C. Maximale Enzymausbeuten erhält man im allgemeinen bereits nach 1 bis 2tätiger Kulturdauer.

9.1.1981
AP C 07 C/223 376
57 778 / 11

Die erfindungsgemäß verwendeten Mikroorganismen sind sich sehr ähnlich und weisen nachstehende Merkmale auf:

Gram-negativ
Obligat aerob
Gelbliche Kolonien auf Fleischpeptonagar
Wachstum bei 25, 30 und 37 °C
Kein Wachstum bei 10 °C, mehr als 41 °C
Zellgröße 0,8 bis 1 µ . 2 bis 4 µ
Motil, lophotrich begeißelt
Neigt zur Kettenbildung
Keine Sporen oder Dauerstadien

Cytochrom-oxydase +
Katalase (+)
Indol -
Nitrit -
Voges-Proskauer -
Gelatine -

Monosubstrat-Abbau:
Adonit +
Citrat +
Galactose +
Glucose +
Inosit +
Lactose +
Mannit +
Mannose +
Salicin +
Sorbit +

9.1.1981
AP C 07 C/223 376
57 778 / 11

Die Cholesterinesterase tritt sowohl im Kulturmedium als auch in den Zellen auf. Durch Zusatz von oberflächenaktiven Mitteln, insbesondere von nichtionogenen Mitteln, die vorzugsweise dem Typus der Polyoxyethylenester und -ether mit Alkyl- und Aralkylresten angehören, läßt sich das Verteilungsmuster zwischen Kulturbrühe und Zellen beeinflussen im Sinne einer Erhöhung der extrazellulären Aktivität auf Kosten der intrazellulären Aktivität, bei ionogenen oberflächenaktiven Mitteln verläuft die Änderung der Verteilung in umgekehrter Richtung.

Nach beendeter Züchtung wird die Cholesterinesterase aus der Zellmasse und/oder dem Kulturfiltrat nach üblichen Methoden isoliert und gegebenenfalls gereinigt. Für viele Zwecke eignet sich jedoch bereits ein ungereinigtes Rohprodukt, welches im wesentlichen nur aus aufgeschlossener Zellmasse besteht. Zum Aufschließen eignen sich die dem Fachmann hierfür bekannten Methoden, die hier keiner näheren Erläuterung bedürfen. Sowohl aus dem Kulturfiltrat als auch aus der aufgeschlossenen Zellmasse läßt sich nach Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen das Enzym durch Fällung mit üblichen Fällungsmitteln, beispielsweise Salzen, wie Ammoniumsulfat, oder organischen Lösungsmitteln, wie Aceton oder Alkohol, fällen und dann unter Anwendung der üblichen Fraktionierungsmethoden, wie Chromatographie und Fällung, weiter aufreinigen.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

9.1.1981
AP C 07 C/223 376
57 778 / 11

Beispiel 1

Pseudomonas spec. DSM 1280. aus der Tiefkühlampulle auf Schrägröhrchen gebracht, wird im Hauptkulturmedium zwei Tage bei 30 °C aerob (Schüttelkolben) vorkultiviert und dann zu 10 % in ein Medium überimpft, welches pro Liter folgende Zusammensetzung aufweist:

7 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$
3 g KH_2PO_4
1 g NH_4Cl
0,05 g NaCl
0,1 ml $FeCl_3$, 1 %
0,1 ml $CuCl_2$, 0,2 %
0,1 ml $ZnSO_4$, 1 %
1,0 ml $CaCl_2$, 10 %
5,0 ml $MgSO_4$, 12 %
1,5 % Soja-Lecithin, pH = 7,0

Die Kultivierung erfolgt bei 30 °C aerob im Schüttelkolben. Nach 1 bis 3 Tagen werden Aktivitäten von etwa 15000 U/l (Überstand und Biomasse; Substrat: Cholesteryl-oleat) erhalten.

Etwa gleiche Ausbeuten werden erhalten, wenn unter gleichen Bedingungen anstelle von Pseudomonas spec. DSM 1280 Pseudomonas spec. DSM 1281 verwendet wird.

Beispiel 2

Aus einer nach Beispiel 1 erhaltenen Kulturlösung wurde die unlösliche Zellmasse abzentrifugiert und zur Chole-

sterinester-Bestimmung eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte gemäß folgenden Reaktionsgleichungen:

1) Cholesterinester + H_2O $\xrightarrow{\text{Chol-Esterase}}$ Cholesterin + Fettsäure

2) Cholesterin + 1/2 O_2 $\xrightarrow{\text{Chol-OD/Katalase}}$ Cholestenon + H_2O_2

(Messung der Cholestenonbildung bei 240 nm).

Zur Messung wurden folgende Lösungen verwendet:

1) Phospahtpuffer 0,5 m, pH = 7,5, 0,4 % Thesit
2) Cholesterinoleat c = 4 in Thesitdioxan (v/v = 1/1)
3) H_2O_2 ca. 0,6 m (5 ml Perhydrol/100 ml)
4) Katalase (0,01 mg Protein/ml)
5) Cholesterinoxydase (mind. 50 U/ml)
6) Kulturlösung (bei ca. 5000 U/l, 1 : 5 mit H_2O verdünnt, 0,01 ml $\longrightarrow$ Test)

Zur Messung wurden 2,95 ml Lösung 1) mit 0,02 ml Lösung 3) gemischt. Nach 5 Minuten wurden 0,01 ml Lösung 6) und 0,02 ml Lösung 5) zugesetzt und nach 1 Minute die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml Lösung 2) gestartet.

Die Berechnung wird wie folgt durchgeführt:

$$\frac{3,12 \cdot 5 \cdot 1000}{15,5 \cdot 0,01} \cdot \Delta \text{ E/min} = \text{U/l Kulturlösung}$$

9.1.1981
AP C 07 C/223 376
57 778 / 11

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von Cholesterinesterase aus Mikroorganismen der Gattung Pseudomonas, gekennzeichnet dadurch, daß man Pseudomonas spec. DSM 1280 oder DSM 1281 in einem geeigneten Nährmedium in Gegenwart eines Induktors züchtet und das Enzym aus der Kulturflüssigkeit oder/und den Zellen gewinnt.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man in Gegenwart von Lecithin als Induktor züchtet.

3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß man Sojalecithin zusetzt.

4. Verfahren nach Punkt 2 oder 3, gekennzeichnet dadurch, daß man in Gegenwart von 0,5 bis 2 Gew.-% Lecithin züchtet.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß man dem Medium 0,4 bis 2 Gew.-% Phosphat zusetzt.