

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGESESSKRIFT** (11) **147202 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **3598/78**

(22) Indleveringsdag: **15 aug 1978**

(41) Alm. tilgængelig: **27 apr 1979**

(44) Fremlagt: **14 maj 1984**

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: **26 okt 1977 DE 2748036**

(51) Int.Cl.³: **C 12 N 9/10**

C 12 N 9/90

C 12 Q 1/48

(71) Ansøger: ***BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; D-6800 Mannheim-Waldhof, DE.**

(72) Opfinder: **Helmgard *Gauhl; DE, Hans *Seidel; DE.**

(74) Fuldmægtig: **Firmaet Chas. Hude**

(54) **Fremgangsmåde til udvinding af maltose-phosphorylase og beta-phosphoglucosemutase som rækstrakt eller i beriget form og anvendelse af den fremstillede ekstrakt**

DK 147202 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til udvinding af maltosephosphorylase og β -phosphoglucosemutase som rækstrakt eller i beriget form af mikroorganismer og anvendelsen af de således fremstillede ekstrakter.

Det er kendt, at maltosephosphorylase forekommer i *Neisseria meningitidis* (J. Biol. Chem. 199, 153 (1952)), i ikke identificerede *Øllactobaciller* (Biochem. J. 78, 204 (1961)) og i *Lactobacillus brevis* IFO 3345 = ATCC 8287 (Agr. Biol. Chem. 37, 2813 (1973)) og kan udvindes heraf.

Forekomst af β -phosphoglucosemutase er kendt i kaninmuskler, i gær og *Neisseria meningitidis* (J. Biol. Chem. 236, 2186 (1961)), samt *Lactobacillus brevis* ATCC 8287.

De to nævnte enzymer er teknisk af interesse, da de sammen kan anvendes til bestemmelse af α -amylase, et diagnostisk meget vigtigt enzym. Denne bestemmelse er baseret på hydrolyse af stivelse med α -amylasen under dannelse af maltose. Den således dannede maltose bliver af maltosephosphorylase (MP) i nærværelse af phosphat spaltet i glucose og β -glucose-1-phosphat, og sidstnævnte omdannes af β -phosphoglucosemutasen (β PGM) til α -glucose-6-phosphat, som så på kendt måde i nærværelse af glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PGH) reducerer NAD til NADH og derved selv overgår til 6-phosphogluconat. Det således dannede NADH er dermed et mål for α -amylaseaktiviteten.

Til kliniske prøver med kombinerede enzymatiske reaktioner, hvori der således skal anvendes flere enzymer, spiller det en afgørende rolle, om de nødvendige enzymer er let tilgængelige og uden stort besvær kan bringes i en til analysen egnet form. For prisen for sådanne enzymatiske bestemmelser afgøres i det væsentlige af prisen på de hertil anvendte enzymer. Det er særlig gunstigt, hvis der af et enkelt udgangsmateriale kan opnås flere til en bestemt prøve anvendte enzymer samtidig.

Blandt de hidtil kendte udgangsmaterialer forekommer de to ovennævnte enzymer ganske vist i *Neisseria meningitidis* sammen i en form, som muliggør deres anvendelse til en α -amylaseprøve uden forudgående adskillelse. Det er dog en betydelig ulempe, at det drejer sig om en yderst farlig og virulent mikroorganisme, som kun under største forsigtighedsforanstaltninger kan anvendes som kilde til industrielt anvendte enzymer. Desuden er de fundne aktiviteter af de nævnte enzymer utilfredsstillende i denne mikroorganisme. *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 indeholder desuden α -glucosidase, et ved anvendelsen forstyrrende enzym, således at en oprensning her er uomgængelig.

Det er derfor den foreliggende opfindelses opgave at skaffe en fremgangsmåde til samtidig udvinding af MP og β -PMG, som undgår anvendelse af den farlige *Neisseria meningitidis*, og som muliggør en simpel udvinding af enzymerne ud fra let tilgængelige, uskadelige udgangsmaterialer.

Frengangsmåden ifølge opfindelsen til udvinding af maltosephosphorylase og β -phosphoglucosemutase som råekstakt eller i beriget form uden adskillelse af mikroorganismer, er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved, at ekstrakten udvindes af *Lactobacillus brevis* NCIB 8836, 8561, 8562, DSM 20054, *Lactobacillus plantarum* DSM 20174 og DSM 43, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052, *Streptococcus spec.* DSM 1118, DSM 1119, DSM 1120 og/eller DSM 1121.

Overraskende har det vist sig, at de to nævnte enzymer er indeholdt sammen i de ovenfor anførte mikroorganismer i høj aktivitet og let kan udvindes deraf.

Til anvendelsen til α -amylasebestemmelsen kan råekstrakten af de nævnte mikroorganismer anvendes direkte. Til dette formål bliver mikroorganismerne oplukket ved sædvanlige fysiske metoder, f.eks. med ultralyd, ved højtryksdispersion, udrivning eller lignende, uopløselige fragmenter fraskilles, og den klare overliggende væske anvendes som sådan eller i frysetørret form til bestemmelsen af α -amylase. Eventuelt kan disse råekstrakter også underkastes en yderligere rensning. Da en adskillelse af de to enzymer skal undgås til anvendelsen til α -amylasebestemmelsen, sker den videre rensning fortrinsvis under anvendelse af en prøve, ved hvilken den samlede aktivitet af de to enzymer bestemmes efter hvert rensningstrin, idet man tilsætter en egnet stødpude såsom maltose, NADP og G6PDH og måler dannelsen af NADPH. Fortrinsvis aktiveres herved enzymerne MP og β -PMG ved tilsætning af α -glukose-1,6-diphosphat og Mn^{2+} -ioner, f.eks. i form af mangansulfat eller et andet organisk eller uorganisk mangansalt.

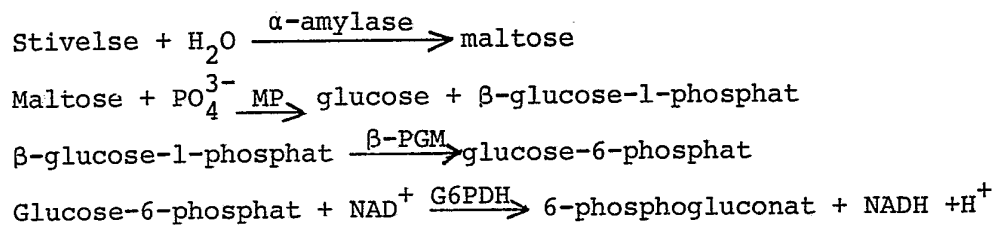
Opfindelsen angår endvidere anvendelsen af maltosephosphorylase og β -phosphoglucosemutase, som fås ved frengangsmåden ifølge opfindelsen, som råekstrakt eller i beriget form til bestemmelse af α -amylase, eventuelt under tilsætning af α -glucose-1,6-diphosphat og/eller Mn^{2+} -ioner.

Opfindelsen gør det muligt at udvinde de to nævnte enzymer på væsentligt simplere og billigere måde og i en form, hvori de kan anvendes direkte uden forudgående adskillelse til bestemmelse af α -amylase. Udførelsen af en sådan bestemmelse forenkles og lettes derved væsentligt.

Opfindelsen belyses nærmere af følgende eksempler.

Eksempel 1

De i følgende tabel anførte mikroorganismer dyrkes på et medium indeholdende 1% maltose ifølge Kamogawa (Agr. Biol. Chem. 37, 2813 (1973)) og oplukkes derefter ved højtryksdispersion. Efter fracentrifugering af de uopløselige dele blev den fremkomne rækstrakt undersøgt direkte for sin egnethed til α -amylasebestemmelse efter følgende skema:



Til konstatering af egnetheden af rækstrakten blev anvendt følgende forsøgssats:

3,4 ml 0,1 M fosfatstødpude + α -glucose-1,6-diphosphat ($c = 0,05$),
pH 6,5

0,1 ml MnSO_4 1%

1,0 ml 0,2 M Maltose(Merck, til biokemiske formål)

0,5 ml rækstrakt

Inkubation: 1 time ved 37°C

Stop: 1 ml prøve - 3 minutter/ 100°C , derefter centrifugering og
anvendelse af 0,25 ml overstående væske til følgende bestemmelse:

modificeret α -glucose-6-phosphatprøve:

2,54 ml 0,3 M TRA-stødpude, pH 7,6

0,1 ml 0,1 M MgCl_2

0,1 ml NADP ($c = 10$)

0,25 ml overstående væske.

Start:

0,01 ml G6PDH ($c = 1$)

$T = 25^\circ$, måling af ΔE_{366} .

Følgende tabel viser de opnåede resultater:

Stamme		ΔE (NADPH) ¹
Lactob. brevis	NCIB 8836	0,850
Lactob. plantarum	DSM 20174	0,675
Lactob. reuteri	DSM 20016	0,252
Lactob. brevis	NCIB 8561	0,150
Lactob. brevis	NCIB 8562	0,100
Lactob. plantarum	DSM 43	0,090
Streptococcus spec.	DSM 1118	0,115
Streptococcus spec.	DSM 1119	0,125
Streptococcus spec.	DSM 1120	0,210
Streptococcus spec.	DSM 1121	0,110

¹ ΔE korrelerer direkte med MP/ β -PGM-aktiviteten

Eksempel 2

Der blev anvendt et reagens, som havde følgende sammensætning:

Phosphatstødpude	20 mM; pH 6,5
NAD	2 mM
Maltotetraose	10 mM
Opløselig stivelse	-
Glucose-1,6-diphosphat	spor
Råekstrakt af lactob. plantarum DSM 20174 indeholdende maltosephosphorylase	3 U/ml
og	
β -phosphoglucomutase	1 U/ml
G6PDH (Leuconostoc mesent.)	9 U/ml
opløst i vand	

Den fremkomne opløsning blev inkuberet ved 30°C, og prøveopløsningen blev tilsat, og efter 5 minutters forinkubering blev i et fotometer målt extinktionsdifferencen ved Hg 334 nm i 5 minutter. For 2,0 ml reagens og 0,10 ml prøve fås følgende beregningsformel for aktiviteten af α -amylase i prøven:

$$U/l = \Delta E/\text{min} \times \frac{2,1 \times 1000}{6,18 \times 0,1 \times 2} = \Delta E/\text{min} \times 1699$$

Ved anvendelse af fem forskellige humansera blev der fundet følgende værdier med ovenstående reagens:

Serum	α -amylase
1	23,5 U/l
2	88 U/l
3	100 U/l
4	120 U/l
5	146 U/l

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til udvinding af maltosephosphorylase og β -phosphoglucomutase som råekstrakt eller i beriget form uden adskillelse af mikroorganismer, k e n d e t e g n e t ved, at ekstrakten udvindes af *Lactobacillus brevis* DSM 20054, NCIB 8836, 8561, 8562, *Lactobacillus plantarum* DSM 20174 og DSM 43, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus fermentum* DSM 20052, *Streptococcus specis* DSM 1118, DSM 1119, DSM 1120 og/eller DSM 1121.

2. Anvendelse af ifølge krav 1 fremstillet ekstrakt til bestemmelse af α -amylase, eventuelt under tilsætning af α -glucose-1,6-diphosphat og/eller mangan²⁺ ioner.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 610/77.