



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENT-SCHRIFT 149 874

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

Int. Cl.³

(11) 149 874 (45) 05.08.81 3(51) C 12 N 9/04
(21) WP C 12 D / 220 060 (22) 31.03.80

-
- (71) siehe (72)
(72) Schöpp, Wulfdieter, Dr.sc.; Kleber, Hans-Peter, Prof.
Dr.sc.med., DD
(73) Schöpp, Wulfdieter, Dr.sc.; Kleber, Hans-Peter, Prof.
Dr.sc.med.; Tauchert, Hermann, Dr.; Grunow, Marlis, Dr.;
Stolarski, Kristina; Schäfer, Angelika; Harnisch, Heimo;
Rüde, Waltraud; Trobisch, Elke, DD
(74) Dr. Peter Nenning, Karl-Marx-Universität, BfN, 7010 Leipzig,
Goethestraße 3-5
-

(54) Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxybutyratdehydrogenase

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxybutyratdehydrogenase. Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein kostengünstiges Verfahren anzugeben, das ein Enzym hoher spezifischer Aktivität liefert. Die Aufgabe wird darin gesehen, durch Züchtung eines neuen Stammes auf bisher nicht verwendeten Kultursubstraten das gewünschte Enzym herzustellen. Das Wesen der Erfindung besteht darin, den Stamm *Pseudomonas putida* entweder auf Kultursubstraten zu züchten, bei deren Abbau Acetoacetat oder Hydroxybutyrat entsteht oder auf Substraten, die aus geradkettigen Kohlenwasserstoffen C₆ bis C₁₀ bestehen.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxybutyratdehydrogenase

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxybutyratdehydrogenase, die in der klinisch-chemischen Diagnostik zur quantitativen Bestimmung von Ketonkörpern eingesetzt wird.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bereits bekannt, 3-Hydroxybutyratdehydrogenase herzustellen. Zu diesem Zweck ist es üblich, den Bakterienstamm *Rhodopseudomonas spheroides* auf 3-Hydroxybutyrat als Kohlenstoffquelle zu züchten, die Bakterien durch Zentrifugieren zu separieren, aufzuschließen und den zellfreien Proteinextrakt, der eine Ausgangsaktivität von ca. 0,1 $\mu\text{mol/min/mg}$ Protein besitzt, einer Protaminsulfatfällung zwecks Entfernung der Nucleinsäuren zu unterwerfen. Nach fraktionierter Ammonsulfatfällung wird die entsprechende Fraktion abgetrennt, gewaschen, in Puffer gelöst und mehrfach chromatografisch bis zu einer Aktivität von ca. 17 $\mu\text{mol/min/mg}$ Protein gereinigt bzw. angereichert (Literatur z. B. H. U. Bergmeyer et al., *Biochem. J.* (1967), 102, 423). Das geschilderte Verfahren hat den Nachteil, daß das Endprodukt sehr teuer ist, insbesondere wenn es sich um stark angereicherte 3-Hydroxybutyratdehydrogenase handelt. Die Ursache liegt nicht nur in den aufwendigen Reinigungsoperationen begründet, sondern auch im hohen Preis des Kultursubstrats. Ein weiterer Nachteil ist darin zu sehen, daß die Aktivität des her-

gestellten Enzyms einen Wert von 17 - 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein nicht übersteigt. Die Ursache liegt darin begründet, daß der verwendete Stamm *Rhodopseudomonas spheroides* nicht in der Lage ist, ein Enzym mit höherer Ausgangsaktivität als oben beschrieben zu produzieren.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Enzymproduktion anzugeben, das wesentlich kostengünstiger ist als bisher bekannte und das darüberhinaus gestattet, ein Enzym mit wesentlich höherer spezifischer Aktivität herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Erfindung hat die Aufgabe, wesentliche Merkmale der bisher bekannten Verfahrensweise zu verändern und durch den Einsatz eines anderen Stammes sowie anderer Kultursubstrate im Zusammenwirken mit einer neuen Technologie das gewünschte Enzym günstig und mit hoher spezifischer Aktivität zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß das Enzym 3-Hydroxybutyratdehydrogenase aus dem Stamm *Pseudomonas putida* hergestellt wird. Die Stammhaltung geschieht bevorzugt auf 2 %igem Bouillon-Agar bei 4 °C im Dunkeln. Die Kultivierung von *Pseudomonas putida* erfolgt nach Beimpfen aus einer Vorkultur bei Temperaturen von 20 - 40 °C, vorzugsweise bei 30 °C, in Submerskultur in einem flüssigen Minimalmedium.

Die Züchtung wird erfindungsgemäß auf C-Quellen durchgeführt, bei deren Abbau Acetoacetat oder Hydroxybutyrat gebildet wird. Solche C-Quellen sind z. B. D,L-Lysin, D,L-Leucin, D,L-Carnitin u. a., darüberhinaus geradkettige Kohlenwasserstoffe mit einer Kettenlänge C_6 bis C_{10} oder Fettsäuren von C_4 bis C_{16} . Als N-Quelle wird in den Fällen NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o. dgl. verwendet, in denen die C-Quelle nicht gleichzeitig als C- und N-Quelle verwertet werden kann. Nach einer Wachstumszeit von 5 - 40 Stunden - je nach physiologischem Zustand und Menge des Impf-

materials - werden die Bakterien geerntet (z. B. durch Zentrifugation), mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in zellfreien Rohextrakt verwandelt, was z. B. durch Ultraschallbehandlung bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt mit nachfolgendem Zentrifugieren erfolgen kann. Das im zellfreien Rohextrakt enthaltene Enzym weist in Abhängigkeit von der C-Quelle die in Tabelle 1 dargestellten spezifischen Aktivitäten auf.

Durch fraktionierte Salzfällung bzw. -extraktion, z. B. mit Ammoniumsulfat, wird das Enzym auf das 10 - 15fache angereichert. Dazu wird zweckmäßigerweise der Proteinrohextrakt verdünnt und mit 70 % gesättigtem Ammoniumsulfat der überwiegende Teil des Proteins gefällt. Die gesamte Aktivität verbleibt dabei im Sediment. Zur weiteren Anreicherung der 3-Hydroxybutyratdehydrogenase wird der Rückstand nacheinander mit Ammoniumsulfatlösung, die jeweils 0,05 mol/l Tris enthält, bei 4 °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 35 % und 20 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Das Enzym wird durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis auf eine Endkonzentration von 50 % wieder ausgefällt.

Eine weitere Anreicherung des Enzyms ist an einem hydrophoben Trägermaterial wie z. B. 10-Carboxydecyl-Sepharose wie folgt möglich. Auf eine mit 10-Carboxydecyl-Sepharose gefüllte Säule wird Enzym in 20 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung gegeben. Nach Waschen mit Ammoniumsulfatlösung dieser Konzentration wird mit 17 % gesättigtem Ammoniumsulfat fraktioniert eluiert. In der ersten Fraktion ist die spezifische Aktivität auf das 4fache, in der zweiten auf das 7fache gestiegen. Die Adsorption wird durch strukturformierende Ionen wie Phosphat, Citrat, Sulfat begünstigt.

Das erfindungsgemäß hergestellte Enzym ist gut lagerfähig. Bei spezifischen Aktivitäten von 10 - 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein sind maximal folgende Fremdaktivitäten nachweisbar:

Alkoholdehydrogenase	< 1	%
Malatdehydrogenase	< 0,02	%
Lactatdehydrogenase	< 0,001	%

Es ist vorteilhaft, im Verfahrensschritt der Bakterienzüchtung mit einem abgestuften Sauerstoffdefizit zu arbeiten.

Die Erfindung soll nachstehend an 1 Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

Pseudomonas putida (PpG 6) wird bei 30 °C in Submerskultur in einem flüssigen Minimalmedium gezüchtet. Das Medium enthält pro Liter: 6,97 g K_2HPO_4 , 1,5 g NaH_2PO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 7,5 mg $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,75 mg $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$, 0,75 mg $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,15 mg $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 0,15 mg $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ und 0,15 mg Borsäure. Als Impfsuspensionen dienen Vorkulturen, bei denen dem flüssigen Minimalmedium Hefeextrakt (0,4 g/l) und Glucose (10 g/l) zugesetzt wurden. Bei Kultivierung auf D,L-Carnitin wird dieses in einer Konzentration von 2 g/l als einzige C- und N-Quelle eingesetzt. Bei Kultivierung auf anderen C-Quellen (10 g/l) wird NH_4Cl (3 g/l) als N-Quelle verwendet. Nach einer Wachstumszeit von 15 Stunden werden die Bakterien durch Zentrifugieren geerntet, mehrfach mit Phosphatpuffer (0,067 mol/l, pH 7,5) gewaschen und anschließend durch Ultraschallbehandlung bei 4 °C zerstört. Der zellfreie Rohextrakt wird durch Zentrifugieren gewonnen.

Dieser Proteinrohextrakt wird mit 0,067 mol/l Phosphatpuffer (pH 8) verdünnt, bis ein Proteingehalt von 5 - 20 mg/ml erreicht ist. 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 3-Hydroxybutyratdehydrogenase befindet sich im Präzipitat. Nach Zentrifugieren wird das Sediment in Ammoniumsulfatlösung (45 % Sättigung in 0,05 mol/l Tris) bei 0 °C suspendiert und anschließend erneut zentrifugiert. Die gesamte

Aktivität verbleibt im Sediment. Der Rückstand wird zur weiteren Anreicherung mit Ammoniumsulfatlösungen (jeweils 0,05 mol/l Tris/HCl, pH 8, enthaltend) sinkender Konzentration bei 4 °C für jeweils 5 min gerührt. Das Enzym wird dabei in zunehmendem Maße gelöst, bevorzugt im Konzentrationsbereich zwischen 35 % und 20 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung (siehe Tabelle 2). Das Enzym wird durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis auf eine Endkonzentration von 50 % Sättigung wieder ausgefällt. Nach Zentrifugieren wird das Enzym in 3,2 mol/l Ammoniumsulfatlösung, pH 7, suspendiert und bei 4 °C gelagert.

Zu weiterer Anreicherung werden auf eine 2 ml-Säule mit 10-Carboxydecyl-Sepharose bei 25 °C 1 ml der Enzymlösung in 20 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung aufgetragen. Die spezifische Aktivität beträgt 11 μ mol/min/mg Protein; Gesamtprotein 1,5 mg. Die gesamte Aktivität verbleibt am Träger. Nach Waschen mit 10 ml Ammoniumsulfatlösung (20 % Sättigung) werden nacheinander jeweils 2 ml Ammoniumsulfatlösung (17 % Sättigung) auf die Säule gegeben. In den erhaltenen 2 Fraktionen befindet sich die gesamte Aktivität, jedoch nur 25 % des Proteins. Die spezifische Aktivität beträgt in der 1. Fraktion 41 μ mol/min/mg Protein (0,3 mg Protein), in der 2. Fraktion 80 μ mol/min/mg Protein (0,1 mg Protein).

Die Enzymsuspensionen sind in gesättigter Ammoniumsulfatlösung lagerfähig. Nach 6 Monaten ist bei Aufbewahrung nahe 4 °C kein Aktivitätsverlust an 3-Hydroxybutyratdehydrogenase feststellbar.

Tab. 1

Spezifische Aktivität der 3-Hydroxybutyratdehydrogenase im Rohextrakt aus *Pseudomonas putida* nach Wachstum auf Acetoacetat-bildenden Kultursubstanzen .

C-Quelle	3-Hydroxybutyratdehydrogenase ($\mu\text{mol/min/mg Protein}$)
D,L-Hydroxybutyrat	3,5
D,L-Carnitin	2,0
D,L-Leucin	3,6
D,L-Lysin	0,8

Reinigung der 3-Hydroxybutyratdehydrogenase (Kultursubstrat D,L-Carnitin) aus *Pseudomonas putida*

Zur Präparation wurden 17 ml Rohextrakt (7,5 mg/ml Protein) eingesetzt. Das Sediment, das nach Behandlung mit 45 %iger Ammoniumsulfatlösung verblieb, wurde mit jeweils 5 ml Ammoniumsulfatlösung sinkender Konzentration behandelt.

S = Sediment ; U = Überstand

	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (μ mol/min)	Spezifische Aktivität (μ mol/min/mg)	Reinigung (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	228	470	2,06		
S 70 %	202	490	2,3	1,1	
Ü 45 % (1.)		2,6			
Ü 45 % (2.)		3,2			
Ü 35 %		2,6			
Ü 33 %		4,2			
Ü 30 %		58			
Ü 27 %	7	136	19	9,2	29
Ü 25 %	8	160	20	9,7	34
Ü 22 %	7,5	102	14	6,8	22
Ü 19 %		34			

85

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxybutyratdehydrogenase, dadurch gekennzeichnet, daß der Stamm *Pseudomonas putida* gezüchtet wird und dabei C-Quellen eingesetzt werden, bei deren Abbau Acetoacetat oder Hydroxybutyrat gebildet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Stamm *Pseudomonas putida* bei Temperaturen von 20 - 40 °C in Submerskultur in einem flüssigen Minimalmedium gezüchtet wird, nach einer Wachstumszeit von 5 - 40 Stunden die Bakterien separiert werden, in zellfreien Proteinextrakt überführt werden, aus dem das Enzym durch fraktionierte Ammonsulfatfällung abgetrennt wird und gegebenenfalls einer Reinigung und/oder Anreicherung unterzogen wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als C-Quellen, bei deren Abbau Acetoacetat oder Hydroxybutyrat entstehen, D,L-Leucin, D,L-Lysin, D,L-Carnitin, geradkettige Kohlenwasserstoffe der Kettenlänge C₆ bis C₁₀, Fettsäuren von C₄ bis C₁₆ eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß aus zellfreiem Rohextrakt allein durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung ein Enzym der spezifischen Aktivität 10 - 20 $\mu\text{mol/min/mg}$ Protein hergestellt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine Anreicherung des Enzyms chromatografisch an einem hydrophoben Trägermaterial wie 10-Carboxydecyl-Sepharose o. dgl. erfolgt.
6. Verfahren nach Punkt 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym bei hohen Konzentrationen von Sulfat, Phosphat oder Citrat adsorbiert, bei abnehmender Konzentration dieser Ionen eluiert wird.
7. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß im Verfahrensschritt der Bakterienzüchtung mit einem abgestuften Sauerstoffdefizit gearbeitet wird.