



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

245290

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 9/02

- (22) Přihlášeno 28 12 82
(21) 9879-82
(32) (31)(33) Právo přednosti od 24 02 82
(WP C 12 D/237 648) DD
(89) 211 933, DD
(40) Zveřejněno 22 08 85
(45) Vydáno 15 06 87

(75)
Autor vynálezu

SCHÖPP WULFDIETER dr., HALLE; TAUCHERT HERMANN dr.;
GRUNOW MARLIS dr., LEIPZIG (DD)

(54) Způsob výroby izocitrátdehydrogenázy

Řešení se týká získávání izocitrátdehydrogenáz, přičemž aktivity izocitrátdehydrogenázy 1-EIE/mg se dosahuje již v hrubém extraktu.

Pomocí použitého mikrobiálního zdroje fermentu sloučením s jednou z nových technologií byl získán žádaný ferment vysoké aktivity, přičemž se vychází z kmene *Pseudomonas putida* ATCC 17633.

Область применения изобретения

Изобретение касается способа получения изоцитратдегидрогеназы, которая находит применение в клиничко-химической диагностике и в аналитике продуктов питания для количественного определения изоцитрата.

Характеристика известных технических решений

Способ получения изоцитратдегидрогеназы уже известен. Наиболее распространенным методом является получение фермента из свиного сердца (S. Ochoa in Methods in enzymology Hrsg. S.P. Colowick und N.D. Kaplan, Vol., S. 699-704, Academic Press New York 1955; W.W. Cleland, V.W. Thompson und R.E. Barden in Methode in Enzymology, Hrsg. J.M. Lowenstein, Vol. XIII, S. 30-33, Academic Press New York (1969).

При получении изоцитратдегидрогеназы в основном поступают так, что исходный материал свиное сердце сначала механически размельчается. Отсюда получают бесклеточный белковый экстракт, например, с помощью центрифугирования. При ускорении в 40 000 активность полученного фермента составляет до 0,4 ИЕ/мг, при более низких оборотах она ниже. Если экстракт готовится из высушенного ацетоном порошка, то начальная активность достигает 0,7 ИЕ/мг. Посредством многократного переосаждения сульфатом аммония или этанолом фермент удается обогатить до специфической активности в 2-4 ИЕ/мг, а после последующей хроматографии, например, на Сефадексе Г 25 и КМ-целлюлозе - до значений в 10-20 ИЕ/мг. Продажные препараты имеют обычно активность в 2-4 ИЕ/мг (МДГ меньше 3 %).

До сих пор не известен способ получения фермента изоцитратдегидрогеназы микробиологическим путем.

Цель изобретения

Изобретение имеет целью предложить такой способ получения фермента, при осуществлении которого активность изоцитратдегидрогеназы уже в грубом белковом экстракте имеет значение в 1-3 ИЕ/мг, так что получение требует значительно меньших затрат, чем по известным до сих пор методам.

Изложение сущности изобретения

Задачей изобретения является получение посредством применения микробиологического источника фермента при совместном применении новой технологии желаемого фермента с высокой специфической активностью.

Согласно изобретению задача решается таким образом, что фермент изоцитратдегидрогеназа (НАДН-зависимый) готовится из штамма *Pseudomonas putida* ATCC 17633. Культивирование штамма осуществляется преимущественно на 2 % агаре при

при 4° С в темноте при применении декана как источника углерода и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ как источника азота.

Культивирование *Pseudomonas putida* осуществляется после заражения полной культуры при температуре от 20 до 40° С (преимущественно при 30° С) в субмерсионной культуре на жидкой минимальной среде.

Выращивание проводится в условиях такого газового состава воздуха, при котором образование изоцитратдегидрогеназы не подавляется избытком внутриклеточного НАДН. Так как это, по-видимому, характерно, как в случае начального роста, так и при достижении стационарной фазы, активность фермента показывает острый максимум, который достигается в конце логарифмической фазы роста. Такое развитие имеет место в принципе при применении всех источников углерода, которые штамм в состоянии использовать. Абсолютные значения, которые могут быть достигнуты в максимуме для активности фермента, находятся, однако, в зависимости как от газовых условий, так и от источника углерода. Особенно приемлемыми оказываются такие вещества, у которых в процессе окисления возникает большое число таких промежуточных продуктов (например, ацетоацетат), которые при ограниченном снабжении кислородом в их дальнейших реакциях потребляют НАДН и тем самым регенерируют НАД^+ . Пример таких видов представлен в таблице I.

В качестве источников азота применение находили NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и т.п. По истечении времени роста от 5 до 40 часов в зависимости от физиологического состояния и количества заражаемого материала — бактерии собираются, например, центрифугированием, промываются фосфатным буфером и превращаются в заключение в бесклеточный экстракт, что, например, может осуществляться обработкой ультразвуком при температурах вблизи точки заморозания с последующим центрифугированием.

Содержащийся в бесклеточном грубом экстракте фермент показывает в зависимости от источника углерода представленные в таблице I специфические активности. Речь идет при этом об эмер-

сионном культивировании на 2 % агаре. При субмерсионных условиях культивирования такие значения активности достигаются после соответствующего оптимизирования газового состава и скорости перемешивания в зависимости от конструктивных параметров ферментационного сосуда. Особенно выгодные результаты достигались в случае, если культивирование проводилось при применении углеводов в качестве источников углерода, которые подводились к ферментационному сосуду в газообразном состоянии. Из бесклеточного грубого белкового экстракта изоцитратдегидрогеназа может быть обогащена с помощью фракционированного осаждения солями или экстракцией, например, с сульфатом аммония, в 5-10 раз. Для этого к грубому белковому экстракту добавляется твердый сульфат аммония до конечной концентрации в 70 % насыщения, причем вся активность переходит в осадок. Для дальнейшего обогащения изоцитратдегидрогеназы остаток перемешивается каждые 5 минут с раствором сульфата аммония, содержащего 0,05 моль/л NaH_2PO_4 при 0° С и снижающихся концентрациях сульфата аммония. Фермент растворяется при этом в возрастающей степени. Основное количество растворяется при этом в промежуточной концентрации сульфата аммония между 40 и 50 % насыщения. Фермент снова осаждается добавлением сульфата аммония до конечной концентрации в 70 %.

Приготовленный согласно изобретению фермент хорошо сохраним. При специфической активности 5-10 ммоль/мин/мг белка установлено не более следующих чужеродных активностей:

алкоголь-, малат- и лактат-дегидрогеназы, каждая менее 1 %.

Изоцитратдегидрогеназа при применении гидрофобной хроматографии, например, на 10-карбоксицеллосефарозе, может быть обогащена до специфической активности в 50 ИЕ/мг.

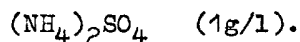
Изобретение поясняется на следующем примере осуществления.

Пример осуществления изобретения

Культивирование *Pseudomonas putida* ATCC 17633 проводилось в среде, содержащей на л следующие составные части:

K_2HPO_4 , 7,46g; NaH_2PO_4 , 0,54 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 20 mg;
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 20 mg; $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg;

В качестве источника азота служил;



Для эмерсионного культивирования штамма в пробирке с косым 2 % агаром (Дифко-агар) агар приготавливался на основе выше-описанной среды. На пробирку применялось 6 мл раствора агара. Затвердевание агара должно осуществляться в максимально возможном горизонтальном положении пробирок. Для поддержания штамма пробирки после пересева на поверхность, например, с помощью петли, ставятся вертикально. В заключение добавляют 0,1 мл декана, причем поверхность геля только в основании сосуда приходит в соприкосновение с источником углерода.

После инкубации при 25°C в течение приблизительно 60 час. бактерии смываются с поверхности агара двумя мл 0,05 моль/л фосфатного буфера pH 7,5 ($E_{600}^{\text{I CM}} \sim 2,5$) и применяются для заражения субмерсионной культуры. Плотность посевного материала $E_{600}^{\text{I CM}} \sim 0,05$. При культивировании на углеводородах, например, на гексане, источник углерода подается через газовую среду. Так, в 10 литровом ферментативном сосуде с наполнением до 7 л поступление газовой смеси (2-10 л/час) осуществляется через содержащую гексан промывную склянку при 30°C . Среднее поступление гексана в ферментационный сосуд при этих условиях составляет около 5-10 мл/час. Культуральная среда интенсивно перемешивается (800 об/мин). После культивирования в течение 20-30 час при 30°C - мутность среды составляет после этого $E_{600}^{\text{I CM}} \sim 2-4$ - бактерии собираются посредством центрифугирования, промываются фосфатным буфером (0,05 моль/л, pH 7,5) и разрушаются в заключение с помощью ультразвука при 4°C . Бесклеточный грубый экстракт получается центрифугированием. Специфическая активность изоцитратдегидрогеназы при этих условиях достигает значений 1-2 ИЕ/мг. Этот белковый грубый экстракт разводится 0,05 моль/л фосфатным буфером (pH 8) до достижения содержания белка 5-20 мг/мл. Из этого раствора при 4°C путем добавления сульфата аммония до конечной концентрации до 70 % насыщения осаждается подавляющая часть белка.

Общая активность изоцитратдегидрогеназы находится при этом в осадке. После центрифугирования осадок суспендируется при 0°C в растворе сульфата аммония (40 % насыщения в 0,05 моль/л Na_2HPO_4) и в заключение снова центрифугируется. После повторения процедуры, как правило, свыше 80 % общей активности изоцитратдегидрогеназы находятся в супернатанте (см. таблицу 2).

Фермент снова осаждается путем добавления сульфата аммония до конечной концентрации в 70 % насыщения. Если полученный посредством экстракции сульфата аммония супернатант (2. супернатант 40 %) в количестве 15 мл с содержанием балка в 130 мг наносится на колонку, которая содержит 80 мл 10-карбоксидецилсефарозы и элгируется при 22°C 100-200 мл раствора сульфата аммония (насыщение в 40 %), то изоцитратдегидрогеназа обогащается до специфической активности в 50 ИЕ/мг.

Таблица I

Специфическая активность изоцитратдегидрогеназы в грубом экстракте из *Pseudomonas putida* ATCC 17633 после роста на различных источниках углерода

Культивирование проводилось на косом агаре, причем источники углерода добавлялись в концентрации по 0,5 % каждый. После инкубации в 24 часа при 30° С бактерии смывались. Активность определялась после замораживания-оттаивания клеток в присутствии 0,1 % Тритона X 100.

Источник углерода	Оптическая плотность $E_{600}^{1\%}$	Активность фермента (ммоль/мин/мг)
цитрат	1,2	0,8
изоцитрат	1,0	0,7
α-кетоглутарат	3,0	1,5
фумарат	2,5	1,2
сукцинат	3,8	0,7
пируват	3,4	1,4
D,L-малат	1,9	2,0
лейцин	1,5	1,4
глутарат	2,9	3,0
гексан	1,4	2,0
декан	1,5	1,1

Таблица 2

Обогащение изоцитратдегидрогеназы из *Pseudomonas putida*
 посредством экстракции сульфатом аммония

	Общий белок (мг)	Общая актив- ность (ммоль/мин)	Специфи- ческая ак- тивность (ммоль/мин/ мг)	Выход (%)
Грубый экстракт или осадок 70 %	5800	6060	1,04	
1. супернатант 40 %	1050	1650	1,5	27
2. супернатант 40 %	550	4040	7,3	67

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения изоцитратдегидрогеназы отличающийся тем, что изоцитратдегидрогеназа выделяется из штамма *Pseudomonas putida* ATCC 17633, культивируемого в субмерсионной культуре на жидкой минимальной среде.

2. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что *Pseudomonas putida* ATCC 17633 культивируется при температурах 20-40° C в субмерсионной культуре на жидкой минимальной среде, и по истечении времени роста от 5 до 40 час. бактерии собираются, промываются фосфатным буфером и переводятся в бесклеточный экстракт, из которого фермент обогащается посредством фракционированного солевого осаждения, причем 70%-ное насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ведет к полному осаждению фермента, тогда как 40-50%-ное насыщение почти растворяет.

3. Способ по пункту 2, отличающийся тем, что в качестве источников углерода применение находят цитрат, изоцитрат, α-кетоглутарат, фумарат, сукцинат, пируват, D,L -малат, лейцин, глутарат, гексан, декан и т.д. в отдельности или в произвольных комбинациях.

4. Способ по пунктам от 1 до 3, отличающийся тем, что подводится 0,3-1,5 л воздуха/гл питательной среды.

5. Способ по пунктам от 1 до 4, отличающийся тем, что в качестве источников углерода применяются углеводороды гексан, декан и т.п., подводимые в газообразном состоянии.

6. Способ по пунктам от 1 до 6, отличающийся тем, что изоцитратдегидрогеназа обогащается с помощью гидрофобной хроматографии на 10-карбоксидецилсефарозе до 50 ммоль/мин/мг.

АННОТАЦИЯ

Изобретение касается способа получения изоцитратдегидрогеназы. Оно имеет целью предложить способ продукции этого фермента, в процессе которого активность изоцитратдегидрогеназы в I до 3 IE/мг достигается уже в грубом экстракте.

Задача состоит в том, чтобы посредством применения микробialного источника фермента в сочетании с одной из новых технологий получить желаемый фермент с высокой активностью.

Задача решается путем получения из штамма *Pseudomonas putida* ATCC 17633, фермента.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby izocitrátdehydrogenázy, vyznačující se tím, že izocitrátdehydrogenáza se získává z kmene *Pseudomonas putida* ATCC 17633, pěstovaného submerzně na tekutém minimálním médiu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že *Pseudomonas putida* ATCC 17633 se pěstuje při teplotách 20 až 40 °C na tekuté minimální půdě, a po uplynutí doby růstu od 5 do 40 hodin se bakterie oddělí, proplachují fosfátovým tlumičem a převádí se na bezbuněčný extrakt, z něhož se ferment obohacuje pomocí frakcionovaného vysolování přičemž 70% nasycení $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vede k úplnému vysolení fermentu a při 40 až 50% nasycení se ferment téměř rozpouští.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se jako zdroje uhlíku použije citrát, izocitrát, ketoglutarát, fumarát, sukcinát, pyruvát, D, L-malát, leucin, glutarát, hexan nebo dekan samostatně nebo v libovolných kombinacích.

4. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že se přivádí 0,3 až 1,5 l vzduchu/hl kultivačního média.

5. Způsob podle bodů 1 až 4, vyznačující se tím, že jako zdroje uhlíku se používají uhlovodíky jako hexan a dekan, přiváděné v plynném stavu.

6. Způsob podle bodů 1 až 5, vyznačující se tím, že izocitrátdehydrogenáza se obohacuje pomocí hydrofobní chromatografie na 10-karboxydecylsefaroze do 50 mmol/min/mg.

Uznáno vynálezem na základě výsledků expertizy, provedené Úřadem pro vynálezectví a patentnictví, Berlín, DD.