

Ausschlusspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

0154 021

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 9/16

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N/ 223 375
(31) P2933646.7

(22) 18.08.80
(32) 20.08.79

(44) 17.02.82
(33) DE

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

(54) **VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON CHOLESTERINESTERASE**

(57) Zur Gewinnung von Cholesterinesterase aus Mikroorganismen, wie z.B. Pseudomonas spec. DSM 1280 oder DSM 1281 zuechtet man einen zur Cholesterinesterase-Bildung befähigten Mikroorganismus in einem geeigneten Nährmedium in Gegenwart von Lecithin als Induktor und gewinnt das Enzym aus der Kulturflüssigkeit oder/und den Zellen.

Berlin, den 9.1.1981

AP C 07 G/223 375

57 777 / 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 Cholesterinoxidase 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 Mikroorganismen 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.

Normalerweise erfolgt bei den bekannten Verfahren die Züchtung in einem Nährmedium, welches einen Induktor ent-

9.1.1981

AP C 07 G/223 3 75

57 777 / 11

enthält. Unter "Induktor" wird hierbei eine Substanz verstanden, welche den Mikroorganismus dazu anregt, das gewünschte Enzym überhaupt oder in größerer Menge zu bilden, als ohne Induktor. Denn normalerweise benötigen Mikroorganismen keine Cholesterinesterase, da ihnen genügend andere Nahrungsquellen zur Verfügung stehen und die Bildung eines nicht benötigten Enzyms für die Zelle unwirtschaftlich ist. Induktoren bestehen daher aus Cholesterinestern oder chemisch ähnlichen Verbindungen.

Ziel der Erfindung

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

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen geeigneten Induktor aufzufinden.

Nunmehr wurde überraschenderweise gefunden, daß bei Verwendung eines bestimmten, den Cholesterinestern chemisch fernstehenden Induktors, um ein Vielfaches höhere Aktivitäten erzielt werden können, als dies bisher möglich war. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von Cholesterinesterase aus Mikroorganismen ist daher dadurch gekennzeichnet, daß man einen zur Cholesterinesterase-Bildung befähigten Mikroorganismus in einem geeigneten Nährmedium in Gegenwart von Lecithin als Induktor züchtet und das Enzym aus der Kulturflüssigkeit oder/und den Zellen gewinnt.

9.1.1981

AP C 07 G/223 375

57 777 / 11

Vorzugsweise wird der erfindungsgemäß eingesetzte Induktor 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 besonders geeignet unter den verschiedenen Lecithinen erwies sich Sojalecithin, aber auch andere Lecithinarten, wie Eilecithin oder Hirnlecithin, ergaben sehr gute Resultate.

Die eingesetzte Lecithinmenge liegt im allgemeinen zwischen etwa 0,1 und 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.

Für die Erfindung geeignet sind im Prinzip alle Mikroorganismen, welche Cholesterinesterase in einer die Aufarbeitung lohnenden Menge zu bilden vermögen. Derartige Mikroorganismen sind in großer Zahl bekannt. So sind beispielsweise geeignet:

<i>Candida rugosa</i>	ATCC 14830
<i>Rhizopus spec.</i>	DSM 695
<i>Aspergillus spec.</i>	DSM 698
<i>Streptomyces aureoverticillium</i>	DSM 40080
<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	DSM 40148
<i>Streptomyces griseomycini</i>	DSM 40159
<i>Streptomyces longisporus-fl.</i>	DSM 40165
<i>Streptomyces malachiticus</i>	DSM 40167

9.1.1980

AP C 07 G/223 375

57 771 / 11

<i>Streptomyces roseolus</i>	DSM 40174
<i>Streptomyces toxytricini</i>	DSM 40178
<i>Streptomyces variabilis</i>	DSM 40179
<i>Streptomyces spec.</i>	DSM 687
<i>Streptomyces autotrophicus</i>	DSM 40011
<i>Streptomyces canescens</i>	DSM 40528
<i>Streptomyces chartreusis</i>	DSM 40085
<i>Streptomyces michiganensis</i>	DSM 40015
<i>Streptomyces murinus</i>	DSM 40091
<i>Streptomyces hachijoensis</i>	DSM 40114
<i>Streptomyces caelestes</i>	DSM 40084
<i>Streptomyces tendae</i>	DSM 40101
<i>Nocardia rubra</i>	DSM 43008
<i>Candida mycoderma</i>	DSM 688
<i>Candida albicans</i>	DSM 689
<i>Candida albicans</i>	DSM 690
<i>Candida albicans</i>	DSM 691
<i>Candida spec.</i>	DSM 692
<i>Cunninghamella elegans</i>	DSM 693
<i>Mucor mucedo</i>	DSM 694
<i>Penicillium spec.</i>	DSM 696
<i>Aspergillus spec.</i>	DSM 697
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 31156
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IAM 1051
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 948
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KY 4032
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IFO 3081
<i>Pseudomonas spec.</i>	IAM 18002 und 18001.

Besonders bevorzugt werden *Pseudomonas spec.* DSM 1280 und 1281.

9.1.1981

AP C 07 G/223 357

57 777 / 11

Ein besonders bevorzugtes Nährmedium, welches besonders für die Pseudomonas-Arten geeignet ist, 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-, 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.

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

5 bis 10 g, vorzugsweise 6 bis 8 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
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 1ml 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 der besonders bevorzugten Mikroorganismen in den obigen Nährmedien wird unter aeroben Bedingungen durch-

9.1.1981

AP C 07 G/223 375

57 777 / 11

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

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

9.1.1981

AP C 07 G/223 375

57 777 / 11

Fraktionierungsmethoden, wie Chromatographie und Fällung, weiter aufreinigen.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

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:

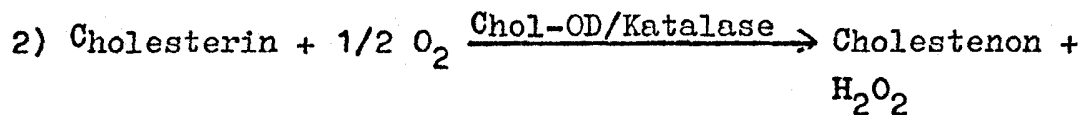
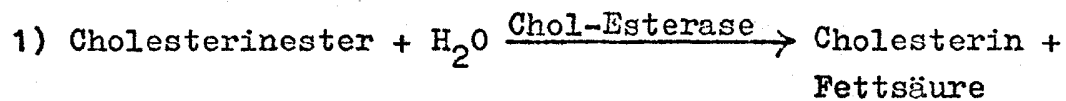
7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
3 g KH_2PO_4
1 g NH_4Cl
0,05 g NaCl
0,1 ml FeCl_3 , 1 %
0,1 ml CuCl_2 , 0,2 %
0,1 ml ZnSO_4 , 1 %
1,0 ml CaCl_2 , 10 %
5,0 ml MgSO_4 , 12 %
1,5 % Soja-Lecithin, pH = 7,0

Die Kultivierung erfolgt bei 30 °C aerob im Schüttelkolben. Nach 1 bis 3 Tagen werden Aktivitäten von etwa 12000 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 Cholesterinester-Bestimmung eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte gemäß folgenden Reaktionsgleichungen:



(Messung der Cholestenonbildung bei 240 nm).

Zur Messung wurden folgende Lösungen verwendet:

- 1) Phosphatpuffer 0,5 M, pH = 7,5, 0,4 % Thesit
- 2) Cholesterinoleat c = 4 in Thesitdioxan (v/v = 1/1)
- 3) H₂O₂ ca. 0,6 M (5 ml Perhydrol/100 ml)
- 4) Katalase (0,01 mg Protein/ml)
- 5) Cholesterinoxidase (mind. 50 U/ml)
- 6) Kulturlösung (bei ca. 5000 U/l, 1 : 5 mit H₂O verdünnt, 0,01 ml → 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

9.1.1981

AP C 07 G/223 375

57 777 / 11

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:

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

Beispiel 3

Candida rugosa ATCC 1430, aus einer Tiefkühlampulle auf Schrägröhrchen gebracht, wird in ein Kulturmedium der nachstehenden Zusammensetzung überimpft und 48 Stunden bei 28 bis 30 °C aerob (Schüttelkolben 20/100) kultiviert. Dann wird mit 10 % Inokulum in ein Medium überimpft, welches folgende Zusammensetzung aufweist (Angaben pro Liter):

20 g Sojamehl GeFu 988 SUP
20 g Stärke, löslich
5 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1,5 % Sojalecithin
pH = 6,6 bis 6,8

Die Kultivierung erfolgt bei ca. 28 °C aerob. Nach 3 bis 4 Tagen werden Aktivitäten von 1500 bis 2000 U/l (Überstand; Testsubstrat: Cholesterin-oleat) erhalten).

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Gewinnung von Cholesterinesterase aus Mikroorganismen, gekennzeichnet dadurch, daß man einen zur Cholesterinesterase-Bildung befähigten Mikroorganismus in einem geeigneten Nährmedium in Gegenwart von Lecithin als Induktor züchtet und das Enzym aus der Kulturflüssigkeit oder/und den Zellen gewinnt.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man Sojalecithin zusetzt.
3. Verfahren nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß man in Gegenwart von 0,5 bis 2 Gew.-% Lecithin züchtet.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß man dem Medium 0,4 bis 2 Gew.-% Phosphat zusetzt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß man als Mikroorganismus *Pseudomonas spec.* DSM 1280 oder DSM 1281 verwendet.