



ESPAÑA

(10) ES	(11) NÚMERO 450.823	(16) A1
(12)	FECHA DE PRESENTACIÓN 19-8-76	

PATENTE DE INVENCION

(13) PRIORIDADES: (14) NÚMERO 103473/75 109452/75			(15) FECHA 28-8-75 11-9-75	(17) PAIS Japón Japón
(18) FECHA DE PUBLICIDAD	(19) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	(20) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA		
(21) TITULO DE LA INVENCION UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE CREATININA-DESIMIDASA				
(22) SOLICITANTE (S) KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD				
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Ohtemachi Bldg., Ohtemachi Chiyoda-ku, Tokyo, Japón				
(23) INVENTOR (ES) Osamu Terada y Takayuki Uwajima, los cuales han cedido sus derechos a la entidad solicitante.				
(24) TITULAR (ES)				
(25) REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU				

POOR
QUALITY

RESUMEN DE LA INVENCION

1 La creatinina-desimidasa es producida por fermentación de microorganismos pertenecientes a los géneros Brevibacterium, Corynebacterium, Pseudomonas y Arthrobacter. El
5 enzima es recuperado de las células microbianas y del líquido de cultivo. El enzima se utiliza para la determinación cuantitativa de la creatinina en una muestra.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Esta invención se refiere en general a la creatinina-desimidasa, a un método para su producción y al uso de la misma para la determinación cuantitativa de la creatinina.

15 La creatinina es un producto de desecho metabólico formada por deshidratación no enzimática de la creatina que se produce a partir de ácido creatinfosfórico, una de las fuentes de la energía contráctil muscular. La creatinina no es utilizada in vivo y es excretada como metabolito terminal por la orina. La creatinina también existe en la sangre a una concentración normal de alrededor de 0,7-1,5 mg/100 ml de suero. La determinación de la cantidad de creatinina en la
20 sangre y en la orina, por lo tanto, es muy útil para fines de diagnóstico en la determinación de enfermedades del riñón tales como nefritis aguda y nefritis crónica y de trastornos como uretrofraxis, mercurialismo, nefrosis, etc.

25 Hasta ahora, la determinación cuantitativa de la creatinina se ha realizado mediante el método colorimétrico utilizando la reacción de Jaffé que comprende una reacción coloreada con un picrato alcalino. Aunque la determinación colorimétrica de la creatinina utilizando un picrato alcalino resulta práctica porque la operación es sencilla y estable, este método implica ciertos defectos. Debido a su esca-
30

1 sa sensibilidad, es necesario utilizar una gran cantidad
de suero; la reacción no es específica; y la reacción está
sometida a la ingerencia de sustancias de la sangre tales
como compuestos metilénicos activos, proteínas, antibió-
5 ticos, etc. Para superar estos defectos, es necesario sepa-
rar las sustancias de la muestra o extraer la creatinina.
Sin embargo, estas operaciones complican el procedimiento
y, por lo tanto, constituyen un inconveniente para la ope-
ración automática.

10 Ahora se ha encontrado que la cantidad de creatinina
en una muestra puede ser determinada con mayor sencillez,
más correctamente y más rápidamente en comparación con el
método hasta ahora conocido, descomponiendo la creatinina
mediante un enzima que cataliza una reacción donde la crea-
15 tinina es hidrolizada a N-metil-hidantoína y amoniaco y
después midiendo la cantidad de N-metil-hidantoína o amonia-
co formados.

El enzima catalítico empleado en el procedimiento de
esta invención es la creatinina-desimidasa.

20 La creatinina-desimidasa (EC 3.5.4.21) ha sido re-
gistrada por J. Szulmajster (*J. Bacteriology* 75, 633, 1958
y *Biochimica et Biophysica Acta* 30, 154, 1958) en las célu-
las microbianas de Clostridium paraputrificum en 1958. El
enzima participa en la descomposición de la creatinina y
25 cataliza una reacción que hidroliza la creatinina para for-
mar N-metil-hidantoína y amoniaco.

Sin embargo, los microorganismos del género Clostri-
dium son anaerobios y cuando se utilizan para la producción
del enzima se requiere un largo periodo de tiempo para la
30 fermentación, el crecimiento microbiano es escaso y el ren-

1 dimiento del enzima es bajo. Por lo tanto, no ha sido posible producir creatinina-desimidasa a escala industrial.

5 Otros investigadores han registrado hallazgos de cepas de organismos aerobios pertenecientes al género Pseudomonas que pueden descomponer a la creatinina. Sin embargo, ninguno de estos investigadores ha registrado un microorganismo que produzca un enzima capaz de catalizar una reaccion de hidrólisis donde la creatinina sea descompuesta para formar N-metil-hidantoína y amoniaco. Además, 10 estos investigadores han sido incapaces, de acuerdo con los informes publicados, de aislar un enzima particular capaz de catalizar la reaccion antes mencionada.

15 Ahora se ha encontrado que cuando los microorganismos de los géneros Brevibacterium, Corynebacterium, Pseudomonas y Arthrobacter, se cultivan en un medio nutritivo, producen cantidades notables de creatinina-desimidasa en el líquido de cultivo y/o dentro de las células microbianas.

20 La creatinina-desimidasa obtenida mediante esta invención puede ser utilizada fácilmente para la determinación cuantitativa de la cantidad de creatinina en una muestra en una operación automática hasta ahora no conseguida. Más específicamente, la cantidad de creatinina en una muestra puede ser determinada sencilla y rápidamente midiendo la cantidad de N-metil-hidantoína o amoniaco formados mediante 25 la acción catalítica del enzima.

COMPENDIO DE LA INVENCION

30 De acuerdo con esta invención, se produce creatinina-desimidasa cultivando un microorganismo perteneciente al género Brevibacterium, Corynebacterium, Pseudomonas o Arthrobacter y capaz de producir creatinina-desimidasa en un me-

1 dio de cultivo nutriente, hasta que se forma creatinina-
desimidasa en el líquido de cultivo y/o dentro de las cé-
lulas microbianas y después recuperar la creatinina-desimi-
dasa.

5 La cantidad de creatinina se determina haciendo
reaccionar la creatinina-desimidasa así producida con una
muestra que contiene creatinina para catalizar la reacción
e hidrolizar la creatinina a N-metil-hidantoína y amonia-
co, midiendo la cantidad de por lo menos uno de los compues-
10 tos N-metil-hidantoína o amoniaco producidos y después cal-
culando la cantidad de creatinina en la muestra.

DESCRIPCION DEL INVENTO

15 De acuerdo con esta invención, cuando se cultiva
un microorganismo perteneciente al género Brevibacterium,
Corynebacterium, Pseudomonas o Arthrobacter y con capacidad
de producción de creatinina-desimidasa en un medio nutritivo,
que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno,
materias inorgánicas y otros nutrientes apropiados, se forma
20 creatinina-desimidasa en el caldo de cultivo y/o dentro de
las células microbianas, que después se recupera.

En esta invención, puede utilizarse cualquier mi-
croorganismo que pertenezca a los géneros Brevibacterium,
Corynebacterium, Pseudomonas o Arthrobacter que tenga la ca-
25 pacidad de producir creatinina-desimidasa. Son ejemplos
de las cepas actualmente preferidas los siguientes:

- (1) Brevibacterium ammoniagenes KY 3462
- (2) Brevibacterium divaricatum KY 3810
- (3) Corynebacterium lilium KY 3509
- (4) Corynebacterium glutamicum KY 3801
- 30 (5) Pseudomonas ovalis KY 4651

- 1 (6) Pseudomonas cruciviae KY 3961
(7) Arthrobacter ureafaciens KY 3152
(8) Arthrobacter histidinovorans KY 3158.

5 Las propiedades microbiológicas de las especies de los microorganismos (1), (6) y (7) están descritos en el Manual of Determinative Bacteriology de Bergey, 7ª edición, páginas 499, 114 y 610, respectivamente. Las propiedades microbiológicas de las especies de los microorganismos (2) anteriores están descritas en la patente japonesa publicada
10 nº 20.294/63 y las de las especies de microorganismos (3) están descritas en la patente estadounidense nº 3.087.863. Además, las propiedades microbiológicas de las especies de microorganismos (4) están descritas en J. Gen. Appl. Microbiol., 13, 279-301, 1967; las de las especies (5) en
15 el Manual of Determinative Bacteriology de Bergey, 8ª edición, página 222 y las de las especies (8) en J. Biol. Chem. 209, 829 (1954).

20 Las cepas antes citadas han sido depositadas en el Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Tecnology, Tokyo, Japon, bajo los números de accesión FERM-P 3207, 3208, 3209, 3210, 3211, 3212, 3213 y 3214, respectivamente.

25 Estas cepas también han sido depositadas en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos y han recibido los números de accesión ATCC 31169, ATCC 14020, ATCC 15990, ATCC 31170, ATCC 31171, ATCC 31172, ATCC 7562 y ATCC 11.442, respectivamente.

30 Puede utilizarse un medio natural o sintético para cultivar los microorganismos de esta invención siempre que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno,

1 materias inorgánicas y otros nutrientes que sean asimila-
bles por la cepa particular utilizada.

5 Como fuente de carbono pueden utilizarse diversos
hidratos de carbono como glucosa, fructosa, sacarosa, malto-
sa, manosa, almidón, líquido hidrolizado de almidón, mela-
zas, etc., diversos alcoholes azucarados como glicerol, sor-
bitol, manitol, etc., ácidos orgánicos como ácido acético,
10 ácido láctico, ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido cítri-
co, etc., alcoholes como metanol, etanol, etc., glicoles co-
mo etilenglicol, propilenglicol, etc., aminoácidos e hidro-
carburos como n-hexadecano.

15 Como fuente de nitrógeno, puede utilizarse amonia-
co, sales amónicas orgánicas e inorgánicas como cloruro amó-
nico, carbonato amónico, fosfato amónico, nitrato amónico,
acetato amónico, etc., urea, aminoácidos y otros compuestos
nitrogenados así como materiales orgánicos nitrogenados como
peptona, NZ-amina, extracto de carne, caldo de infusión de
maíz, hidrolizado de caseína, hidrolizado de crisálida, ma-
rina de pescado, su producto digerido, soja desengrasada,
20 su producto digerido, etc.

25 Como materias inorgánicas son apropiadas el dihi-
drógeno-fosfato potásico, hidrógeno-fosfato dipotásico, clo-
ruro potásico, sulfato magnésico, sulfato de manganeso, sul-
fato ferroso, cloruro sódico, carbonato cálcico, etc.

30 Se ha encontrado que la creatinina-desimidasa es
un enzima adaptativo. Por consiguiente, en el procedimiento
de esta invención, puede aumentarse considerablemente el ren-
dimiento de creatinina-desimidasa agregando creatinina o una
sustancia natural que la contenga, tal como extracto de
carne de pescado y extracto de buey, al medio como inductor

1 enzimático.

Se obtienen resultados especialmente buenos agregando creatinina en una proporción de 0,05 a 2 % en peso/volumen al medio.

5 Generalmente el cultivo se realiza a una temperatura de 15 a 40°C, preferiblemente, 28-33°C. Durante el cultivo, el pH se mantiene a 6,0-8,5, preferiblemente a 6,5-8,5. El cultivo se prosigue hasta que se forma el enzima y es detectado en el caldo de cultivo, generalmente al ca-
10 bo de 20-30 horas. Bajo estas condiciones, se forma una cantidad considerable de creatinina-desimidasa en el caldo de cultivo y/o dentro de las células microbianas.

15 Para recuperar el enzima, las células microbianas se rompen por cualquiera de los métodos convencionales tales como desintegración ultrasónica, molienda, presión mecánica, autólisis, etc., para obtener un extracto celular. La extracción de la creatinina-desimidasa del caldo de cultivo y del extracto celular se realiza de la siguiente forma.
20 Primero se obtiene un precipitado utilizando sales como sulfato amónico, sulfato sódico, etc. o disolventes como acetona, metanol, etanol, etc. Cuando se utiliza sulfato amónico, se recupera la fracción que se disuelve en sulfato amónico a una concentración del 40 % de la saturación y que precipita en sulfato amónico a una concentración del 70 % de la saturación. Cuando se emplea acetona, se recupera la fracción que precipita en acetona a una concentración del 60 %.

25 El precipitado así obtenido se somete después a diálisis o filtración de gel para separar la sal o el disolvente contenidos en el precipitado. Para la diálisis son
30 apropiadas las membranas dialíticas, como celofán, membrana

1 de vejiga, membrana de colodión, etc. El disolvente dialítico
co preferido es solución reguladora de fosfato 0,01 M
(pH 7,0). Para la filtración de gel, se prefiere utilizar
5 Sephadex G-25 o G-50 junto con solución reguladora de fos-
fato 0,01 M (pH 7,0).

Para separar el ácido nucleico de la membrana,
se agrega gota a gota y agitando una solución acuosa de pro-
teína (conteniendo una cantidad de proteína correspondien-
te a un décimo del contenido en proteína del líquido dentro
10 de la membrana) y la mezcla resultante se deja en reposo
a 0-4°C durante unos 30 minutos para formar un precipi-
tado. El precipitado formado se separa por centrifugación
(10.000 x G, 20 minutos) y se recupera el líquido que sobre-
nada.

15 Este último se pasa por una columna de DEAE-celu-
losa previamente tratada con solución reguladora de fosfato
0,01 M (pH 7,0). Después se pasa solución reguladora de fos-
fato 0,01 M a través de la columna para eluir la proteína
impura. Después se realiza la elución por el método de
20 elución con gradiente, empezando con solución reguladora de
fosfato 0,01 M (pH 7,0) y terminando con solución regulado-
ra de fosfato 0,1 M conteniendo NaCl 0,3 M (pH 7,0). El
eluito se recupera en fracciones. La actividad de creati-
nina-desimidasa contenida en cada una de las fracciones se
25 mide por el método descrito más adelante, se combinan las
fracciones activas y a las mismas se agregan dos volúmenes
de acetona para formar un precipitado. El precipitado se re-
coge por centrifugación y se somete a diálisis. El líquido
dentro de la membrana se liofiliza después para obtener
30 creatinina-desimidasa purificada en forma de polvo.

1 La actividad enzimática de la creatinina-desimi-
dasa se calcula determinando la cantidad de amoníaco forma-
da cuando se utiliza creatinina como substrato de acuerdo
con el método del indofenol. Más específicamente, se mez-
5 clan 0,5 ml de solución acuosa al 1 % de hidrocloreuro de
creatinina, 0,5 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M
(pH 7,5), 0,4 ml de agua y 0,1 ml de una solución de en-
zima y se incuba a 37°C durante 10 minutos. A la mezcla se
10 agrega 1 ml de solución fenólica (preparada disolviendo
5,0 g de fenol y 25 mg de nitroprusiato sódico en agua su-
ficiente para llegar a un volumen de 500 ml) y se agita la
mezcla resultante. A esta mezcla se agrega 1 ml de solu-
ción alcalina de hipoclorito sódico (preparada disolviendo
15 2,5 g de hidróxido sódico en unos 300 ml de agua, aña-
diendo 1,25 ml de hipoclorito sódico (conteniendo 10 % de
cloro efectivo) y después diluyendo la mezcla con agua pa-
ra llegar a un volumen de 500 ml) y la mezcla se agita y se
deja en reposo a la temperatura ambiente durante 20 minutos.
20 Se mide la absorbancia a 630 m μ mediante un colorímetro fo-
toeléctrico. Para controlar, se repite la misma operación
empleando una solución de enzima previamente calentada a
100°C durante 5 minutos. La absorbancia a 630 m μ de la so-
lución de control se resta de la de la solución de ensayo
25 a 630 m μ . Independientemente se obtiene la curva de calibra-
ción de la concentración de amoníaco y de la absorbancia
a 630 m μ . A partir del valor obtenido por la subtracción
de las absorbancias, se obtiene la cantidad de amoníaco for-
mado. Basándose en este valor, se calcula la actividad en-
30 zimática contenida en la muestra.

La actividad enzimática es expresada en unidades,

1 siendo definida una unidad como la cantidad de enzima que des-
compone a un micromol de creatinina a 37°C y a pH 7,5 en
1 minuto.

5 La creatinina-desimidasa obtenida mediante el
procedimiento anterior actúa característicamente sobre la
creatinina y cataliza la reacción de descomposición de la crea-
tinina en N-metil-hidantoína y amoníaco. El enzima no actúa
sobre la creatina, ni sobre el ácido creatinilfosfórico,
urea, arginina, ácido glutámico, canavanina, glutamina, ci-
10 tosina, guanina, etc.

Determinado por el método de filtración de gel
descrito en Biochemical Journal 96, 595, 1965, empleando
Sephadex G-200, el peso molecular de la creatinina-desimida-
sa es alrededor de 200.000.

15 El pH óptimo del enzima cuando se trata a 37°C
durante 10 minutos es próximo a 8 y el intervalo del pH de
estabilidad cuando se trata a 30°C durante 30 minutos es de
4,0 a 9,0. La temperatura óptima del enzima en la reacción a
pH 8,0 durante 10 minutos es próxima a 50°C. Cuando se
20 trata a pH 7,0 durante 30 minutos, el enzima es estable has-
ta 50°C y pierde alrededor del 20 % de su actividad a 55°C.

La acción de este enzima es inhibida por 1 mM de
iones de metales pesados, tales como Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , etc. y
el ácido p-cloromercuribenzoico. Por lo tanto, se cree que
25 en la acción del enzima participa un grupo SH.

La creatinina-desimidasa obtenida en la forma des-
crita es especialmente adecuada para el otro aspecto de es-
ta invención, a saber, la determinación cuantitativa de la
cantidad de creatinina en una muestra. Por ejemplo, ésta se
30 realiza fácilmente haciendo reaccionar una muestra que con-

1 tiene creatinina con una solución reguladora de fosfato que
contiene de 0,1 a 1,0 mg/ml de creatinina-desimidasa a una
temperatura de 30-50°C durante unos 10-30 minutos para hi-
5 drolizar la creatinina a N-metil-hidantoina y amoniaco y
después midiendo la cantidad de N-metil-hidantoina formada
o la de amoniaco formado.

El método de esta invención es aplicable a la
determinación de la cantidad de creatinina en cualquier muss-
tra que contenga creatinina y el método puede ser aplicado
10 preferiblemente en particular a la determinación de la can-
tidad de creatinina en la sangre y en la orina. Al realizar
la determinación de la cantidad de creatinina en la san-
gre, una muestra de sangre se somete a centrifugación a
2500-3000 rpm durante unos 5 minutos y el suero obtenido se
15 utiliza para la reacción. En el caso de la orina la muestra
puede ser una muestra de orina tal como está o diluida a
una concentración apropiada generalmente de 2 a 5 veces, con
agua.

La determinación de la cantidad de N-metil-hidan-
20 toina formada en la reacción puede efectuarse de acuerdo
con el método de Kirby y Berry descrito en Paper and Papere-
lectrophoresis, Academic Press, New York, pág. 348, 1958. En
pocas palabras, el método consiste en añadir un reactivo de
ferricianuro-nitroprusiato alcalino (preparado mezclando can-
25 tidades iguales de hidróxido sódico al 10 %, nitroprusiato
sódico al 10 % y ferricianuro potásico al 10 % y diluyendo
la mezcla hasta tres veces con agua) a una muestra que con-
tiene N-metil-hidantoina. La mezcla se deja en reposo a la
30 temperatura ambiente durante un cierto periodo de tiempo, ge-
neralmente durante 15 a 30 minutos, para permitir la forma-

1 ción del color y después se calcula la cantidad de N-metil-
hidantoina midiendo la densidad óptica a 500 m μ .

5 La determinación de la cantidad de amoniaco for-
mada en la reacción puede llevarse a cabo por cualquiera de
los métodos fisicoquímicos o enzimáticos conocidos. Los méto-
dos fisicoquímicos adecuados son el método de valoración, el
ensayo de Nessler, el ensayo con ninhidrina, la reacción de
Berthelot y la reacción con fenosafranina.

10 Mediante el método de valoración, se determina
la cantidad de amoniaco en la muestra por neutralización de
la solución de la muestra con una solución patrón de un ácido
o por retrovaloración de la muestra en la que el amoniaco
formado ha sido absorbido por una cierta cantidad de ácido
(Biochem. Z. 152, 1, 1924).

15 De acuerdo con el método de Nessler, la muestra
que contiene amoniaco se trata con el reactivo de Nessler
para formar un color y la cantidad de amoniaco se deter-
mina colorimétricamente (Standard Methods of Clinical Chemis-
try, Vol. 2, pág. 186, Academic Press, N.Y., 1958).

20 El ensayo con ninhidrina es un método según el
cual el amoniaco formado se hace reaccionar con ninhidrina
y la cantidad de producto de reacción se determina colorí-
métricamente (J. Lab. Clin. Med., 49, 779, 1957).

25 Según el método de reacción de Berthelot, el amo-
niaco de la muestra se hace reaccionar con un reactivo fe-
nólico y un reactivo alcalino de hipoclorito sódico para
formar el color y la cantidad de amoniaco en la muestra se
determina colorimétricamente (Clin. Chimica Acta, 8, 5,
1963).

30 En la reacción con fenosafranina se utiliza el

1 fenómeno de que la fenosafranina (de color rojo) es deco-
lòrada en proporción con la cantidad de hipoclorito. De
acuerdo con este método, la mezcla que contiene amoniaco se
5 hace reaccionar con hipoclorito; después se agrega a la mez-
cla una solución de safranina para que se decolore en pro-
porción con la concentración de hipoclorito residual y se
calcula la cantidad de amoniaco después de medir la ab-
sorbancia de la solución de safranina residual (Proc. Soc.
Exptl. Biol. Med., 93, 589, 1956).

10 Un método enzimático adecuado para la determina-
ción de la cantidad de amoniaco utiliza la L-glutamato-des-
hidrogenasa (EC 1.4.1.2, denominada en lo que sigue GLDH)
que es una óxido-reductasa NAD (nicotinamido-adenin -dinú-
cleótido). La GLDH es un enzima que cataliza la reacción
15 para formar ácido L-glutámico a partir de 2-oxoglutarato y
amoniaco. En el espectro de absorción del NAD que actúa
como un co-enzima en esta reacción, el NAD del tipo oxidado
o del tipo reducido presenta un máximo de absorción a 260 m μ .
El NAD del tipo reducido presenta otro máximo de absorción
20 a 340 m μ pero el tipo oxidado de NAD no lo presenta. Por
lo tanto, puede utilizarse la absorbancia a 340 m μ para
la determinación cuantitativa del tipo reducido de NAD
(NADH₂). Aplicando esta medida, puede determinarse la can-
tidad de amoniaco efectuando una reacción enzimática del
25 amoniaco de la muestra con 2-oxoglutarato, utilizando GLDH
como enzima y NAD como co-enzima y midiendo la reducción
de la absorbancia de la mezcla de reacción a 340 m μ .

30 La cantidad de creatinina en el suero de san-
gre humana se mide por el método de esta invención y tam-
bién por el método convencional. Los resultados se encuen-

1 tran en la siguiente Tabla I.

5 En la Tabla I, el método convencional está basado en el método descrito por Kitamura, Genshi; Jissen Rinsho Kagaku (Practice of Therapeutic Chemistry), Ishiyaku Shuppan Kabushiki Kaisha, págs. 243-255, 1974.

10 Asimismo en la Tabla I, para la determinación del amoniaco formado, el método de esta invención utiliza como método fisicoquímico típico el método modificado de Okuda y Fujii (Saishin Igaku, 21, 622, 1966), empleando la reacción de Berthelot y, como método enzimático que utiliza GIDH, el método de A. Levitzki (Anal. Biochem. 33, 335, 1970). Para la determinación de la cantidad de N-metilhidantoína formada utilizando el método de esta invención, se emplea el método de Kirby y Berry (Paper and Paperlectrophoresis, pág. 348).

15

20

25

30

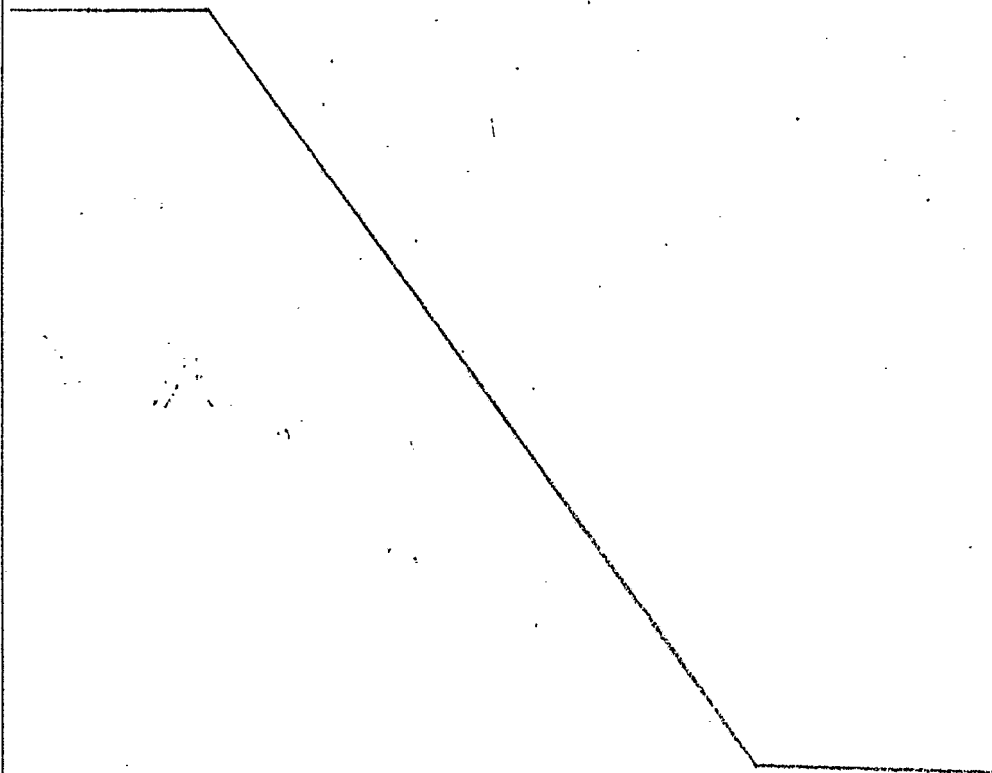


TABLA I

Determinación comparativa de la cantidad de creatinina

Método	Valor medio de la cantidad determinada en el mismo suero	Reproducibilidad simultánea (Desviación estándar)	Nombre del aparato utilizado
Método convencional	Método descrito en Jissen Rinsho Kagaku, pág. 243-255, 1974 4,82	0,13	2,66
Método de esta invención	Método modificado de Okuda y Fujii 3,60 Método que mide la cantidad de amoniaco formado usando el enzima GITH 3,71	0,16 0,11 0,10	3,83 1,20 1,05
	Método que mide la cantidad de N-metil-hidantoína formada 3,43	0,28	3,60

* Preparación del reactivo: Se prepara mezclando cantidades iguales de hidróxido sódico al 10 %, nitroprusiato sódico al 10 % y ferricianuro potásico al 10 % y diluyendo la mezcla tres veces con agua.

** Valor medio cuando la cantidad de creatinina en suero se determina veinte veces.

TABLA I

Determinación comparativa de la cantidad de

5	Método	Valor medio de la cantidad determinada de creatinina en el mismo suero
Método convencional	Método descrito en Jissen Rinsho Kagaku, pág. 243-255, 1974	4,82
		4,65
10	
	Método modificado de Okuda y Fujii	3,60
Método de esta invención	Método que mide la cantidad de amoniaco formado	3,3
	Método utilizando el enzima GLDH	3,71
15	
	Método que mide la cantidad de N-metil-hidantoína formada	3,43

* Preparación del reactivo: Se prepara mezclando cantidades iguales
 20 sódico al 10 % y ferricianuro potásico al 10 % y diluyendo la mezc

** Valor medio cuando la cantidad de creatinina en suero se determina

25

30

TABLA I

Comparación comparativa de la cantidad de creatinina

	Valor medio de la cantidad determinada de creatinina en el mismo suero	Reproducibilidad simultánea		Nombre del aparato utilizado
		Desviación típica	Coefficiente de variación	
Hissen Rinsho 5, 1974	4,82	0,13	2,66	Reactivo de creatinina Kyokuto (producto de Kyokuto Shiyaku Kabushiki Kaisha)
	4,65	0,16	3,83	Ensayo de creatinina de Wako (producto de Wako Junyaku Kabushiki Kaisha)
...:.				
étodo modificado de Okuda Fujii	3,60	0,11	1,20	Ensayo del amoniaco Wako (producto de Wako Junyaku Kabushiki Kaisha)
...:.				
étodo utilizando el enzima GLDH	3,71	0,10	1,05	El enzima GLDH es un producto de Oriental Chemicals Co.
...:.				
cantidad de formada	3,43	0,28	3,60	Preparación del reactivo

Prepara mezclando cantidades iguales de hidróxido sódico al 10 %, nitroprusiato potásico al 10 % y diluyendo la mezcla tres veces con agua.

de creatinina en suero se determina veinte veces.

1 De los resultados ilustrados en la Tabla I anterior,
los expertos en la técnica deducirán rápidamente que el método de determinación de la creatinina de acuerdo con esta invención proporciona resultados superiores con una mayor reproducibilidad simultánea.

5 Ciertas realizaciones específicas de esta invención son ilustradas mediante los siguientes ejemplos representativos.

EJEMPLO I

10 En este ejemplo, se inocula un cultivo de Brevibacterium ammoniagenes KY 3462, FERM-P nº 3207, ATCC 31169 en 10 litros de un medio de cultivo que contiene 2 g/dl de glucosa, 0,5 g/dl de hidrocloreuro de creatinina, 0,1 g/dl de K_2HPO_4 , 0,05 g/dl de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 g/dl de KCl y
15 0,1 g/dl de extracto de levadura (pH 7,5) en un fermentador vibratorio de 30 litros y se cultiva con aireación y agitación a 30°C durante 24 horas. Después se tratan 10 litros del caldo de cultivo en una centrífuga continua y se recogen alrededor de 100 g de las células microbianas. Las células
20 se lavan con 5 litros de solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0) y se suspenden en 2 litros de solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0). La suspensión se somete a tratamiento empleando DYNOMILL (producto de Willy A. Bachofen, Suiza) para moler las células. Después de la mo-
25 lienda, el producto se somete a centrifugación (20.000 x G, 20 minutos) empleando una centrífuga refrigerada y se recupera el líquido que sobrenada. Se obtienen alrededor de 30 g de un precipitado tratando el líquido que sobrenada con sulfato amónico al 40-70 % de saturación. El rendimiento en forma de actividad de creatinina-desimidasa contenida
30

1 en el precipitado es del 80 % y la actividad específica
se eleva al triple. Después se disuelve el precipitado en
500 ml de solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0)
5 y la solución se dializa durante 48 horas en un dializador
de tubo de celofán frente a 20 litros de solución regulado-
ra de fosfato 0,01 M (pH 7,0), mientras se cambia el di-
solvente cada 12 horas. A continuación, para separar el áci-
do nucleico, se agregan gradualmente 100 ml de una solución
acuosa de protamina al 3 % (producto de Nakarai Kagaku
10 Yakuhin Kabushiki Kaisha) a 1 litro de dializado, con agi-
tación y la mezcla resultante se deja en reposo a 0-4°C du-
rante unos 30 minutos para formar un precipitado. El preci-
pitado así formado se separa por centrifugación (10.000 x
G, 20 minutos). El rendimiento en forma de actividad de crea-
15 tinina-desimidasa contenida en el líquido que sobrenada es
del 90 % y la actividad específica se eleva al triple. El
líquido que sobrenada se pasa por una columna de 1 kg de
DEAE-celulosa (producto de Pharmacia Fine Chemicals, Sue-
cia) previamente tratada con solución reguladora de fosfa-
20 to 0,01 M (pH 7,0) para efectuar la adsorción de la creati-
nina-desimidasa. Después la columna se lava con solución
reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0) para separar las pro-
teínas impuras. A continuación se prepara un gradiente de
concentración desde solución reguladora de fosfato 0,01 M
25 (pH 7,0) hasta solución reguladora de fosfato 0,1 M
(pH 7,0) conteniendo NaCl 0,3 M y se pasa por la columna.
Se eluyen las fracciones activas de creatinina-desimidasa
formando un solo pico. Se combinan las fracciones activas y
se añaden dos volúmenes de acetona para obtener un precipi-
30 tado. El precipitado se recoge por centrifugación (10.000 x G,

1 20 minutos) y se disuelve en 100 ml de agua que ha sido des-
mineralizada por tratamiento de intercambio de ión. La so-
lución es dializada en un dializador de tubo de celofán
5 frente a solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0) y
el dializado es liofilizado con lo que se obtiene alrede-
dor de 1 g de creatinina-desimidasa purificada que presen-
ta una actividad específica de 2,5 unidades/mg. El rendi-
miento total en forma de actividad de creatinina-desimidasa
es del 56 % y la actividad específica es alrededor de 60
10 veces.

EJEMPLO 2

En este ejemplo, se utiliza Corynebacterium
lilium KY 3509, FERM-P nº 3209, ATCC 15990 como cepa de cul-
15 tivo y un medio constituido por 3 ml/dl de extracto de
carne de bonito (conteniendo alrededor de 3,3 g/dl de
creatinina; 0,5 g/dl de peptona y 0,5 g/dl de glucosa (pH
7,5). El cultivo se realiza en la forma descrita en el
Ejemplo 1. Se obtienen alrededor de 150 g de las células
microbianas. Las células se someten al procedimiento de ex-
20 tracción y purificación descrito en el Ejemplo 1 para ob-
tener alrededor de 1,5 g de creatinina-desimidasa purifi-
cada que presenta una actividad específica de 1,5 unida-
des/mg. El rendimiento es del 55 %.

EJEMPLO 3

En este ejemplo, se cultiva Pseudomonas ovalis KY
4651, FERM-P nº 3211, ATCC 31171 en un medio constituido
por 3 g/dl de extracto de buey, 0,5 g/dl de peptona y
0,3 g/dl de glucosa (pH 7,5). El cultivo se realiza de la
30 forma descrita en el Ejemplo 1 para obtener alrededor de
180 g de células microbianas. Las células se someten al

1 procedimiento de extracción y purificación descrito en el
Ejemplo 1 para obtener alrededor de 2 g de creatinina-desi-
midasa purificada que presenta una actividad específica de
1,0 unidades/mg. El rendimiento es del 57 %.

5

EJEMPLO 4

En este ejemplo, se cultiva Arthrobacter ureafa-
ciens KY 3152, FERM-P nº 3213, ATCC 7562 en la forma descrita
en el Ejemplo 1. Se obtienen alrededor de 150 g de células
microbianas. Las células se someten al procedimiento de ex-
10 tracción y purificación descrito en el Ejemplo 1 para obtener
alrededor de 0,5 g de creatinina-desimidasa purificada
que presenta una actividad específica de 2,0 unidades/mg.
El rendimiento es del 57 %.

10

EJEMPLO 5

15

En este ejemplo se someten a centrifugación con-
tinua 10 litros de un caldo de cultivo obtenido cultivando
de la forma descrita en el Ejemplo 1 para obtener 9,5 litros
de un líquido que sobrenada. Este último se trata con sulfa-
to amónico al 40-70 % de la saturación para obtener alrede-
20 dor de 5 g de un precipitado. El rendimiento en forma de ac-
tividad de creatinina-desimidasa contenida en el precipitado
es del 80 % y la actividad específica se eleva al triple. El
precipitado se disuelve en 100 ml de solución reguladora
de fosfato 0,01 M (pH 7,0) y la solución se dializa durante
25 48 horas en un dializador de tubo de celofán frente a 20 li-
tros de solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0) mien-
tras se cambia el disolvente cada 12 horas. Después se some-
ten 200 ml del dializado a separación del ácido nucleico,
30 cromatografía en columna de DEAE-celulosa, precipitación con
acetona y liofilización en la forma descrita en el Ejemplo 1.

25

30

1 Se obtienen alrededor de 120 mg de creatinina-desimidasa
purificada que presenta una actividad específica de 2,0 uni-
dades/mg. El rendimiento es del 52 %.

EJEMPLO 6

5 En este ejemplo, unos cultivos de las cepas identifi-
cadas en la siguiente Tabla II se inoculan en 50 ml de un
medio con la misma composición que en el Ejemplo 1 conteni-
do en matraces Sakaguchi de 500 ml, respectivamente y se
cultivan a 30°C durante 24 horas con sacudidas. Los caldos
10 de cultivo se tratan en una centrifuga refrigerada (10.000 x G,
20 minutos) y se recogen las células microbianas. Después se
lavan 0,5 g de las células con 50 ml de solución reguladora
de fosfato 0,01 M (pH 7,0) y se suspenden en 10 ml de so-
lución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0). Las suspensio-
15 nes se someten a tratamiento ultrasónico durante 20 min-
tos utilizando un desintegrador ultrasónico (producto de
Kaijo Denki Kabushiki Kaisha) y después a centrifugación
refrigerada (20.000 x G, 20 minutos). Se recuperan los lí-
quidos que sobrenadan así obtenidos y se miden la activi-
20 dad de creatinina-desimidasa y las concentraciones de pro-
teína. Los resultados se encuentran en la siguiente Ta-
bla II.

25

30

TABLA II

Cepas	Actividad de creatinina-desi- midasa	
	Unidades/mg de protcina	Unidades/mg de masa cultivada*
5 <u>Brevibacterium ammoniagenes</u> KY 3462	0,042	0,185
<u>Brevibacterium divaricatum</u> KY 3810	0,012	0,093
<u>Corynebacterium lilium</u> KY 3509	0,040	0,175
10 <u>Corynebacterium glutamicum</u> KY 3801	0,010	0,073
<u>Pseudomonas ovalis</u> KY 4651	0,016	0,112
<u>Pseudomonas cruciviae</u> KY 3961	0,011	0,062
15 <u>Arthrobacter ureafaciens</u> KY 3152	0,025	0,120
<u>Arthrobacter histidinolorans</u> KY 3158	0,020	0,060

20 * En términos de actividad/ml de masa cultivada (caldo de cultivo y las células)

EJEMPLO 7

25 En este ejemplo, se añaden respectivamente 20 micro-
litros de suero (producto de American Hospital Supply Cor-
poration, Dade Division, Estados Unidos, vendido bajo el nom-
bre comercial de : Moni-trol I, conteniendo 1,1 mg/dl de
creatinina) y 20 microlitros de una solución patrón de crea-
30 tinina (solución acuosa que contiene 400 µg/dl de creatinina)
respectivamente a una solución constituida por 1,0 ml de una
solución de enzima (solución reguladora de fosfato 0,01 M a

1 pH 7,5 conteniendo 0,1 mg de creatinina-desimidasa con una actividad específica de 0,1 unidades/mg) y 1,0 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M (pH 7,5) y las mezclas resultantes se incuban respectivamente a 37°C durante 10 minutos.

5 Transcurrido el periodo de reacción, se añade a las mezclas 1 ml de reactivo fenólico (preparado disolviendo 5,0 g de fenol y 25 mg de nitroprusiato sódico en agua hasta un volumen total de 500 ml) y 1 ml de reactivo alcalino hipoclorito sódico (preparado disolviendo 2,5 g de hidróxi-
10 do sódico en unos 300 ml de agua, agregando 1,25 ml de hipoclorito sódico a la solución y suplementando la mezcla con agua hasta un volumen de 500 ml) y después se dejan en reposo a 37°C durante 20 minutos para formar el color y se utilizan como soluciones de ensayo.

15 Independientemente, se añaden 20 microlitros de suero y 20 microlitros de la solución patrón de creatinina respectivamente a una solución constituida por 1,0 ml de la solución de enzima y 1,0 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M (pH 7,5). Al mismo tiempo se añade 1 ml de reactivo
20 fenólico y 1 ml de reactivo alcalino de hipoclorito sódico y las mezclas resultantes se utilizan como soluciones comparativas.

25 Se mide la densidad óptica de las soluciones de ensayo a 640 mμ frente a las soluciones comparativas. A partir de la medida de la solución patrón de creatinina se obtiene la curva de calibración de la densidad óptica a 640 mμ y la concentración de creatinina. Basándose en estos datos, se calcula la concentración de creatinina en el suero a partir de la medida de la densidad óptica del suero a 640 mμ.
30

1 Los resultados se encuentran en las siguientes ta-
blas III y IV. La Tabla III contiene los valores cuando la
cantidad de creatinina en el suero patrón se determina su-
cesivamente durante 10 veces y la desviación típica y el coe-
5 ficiente de variación son calculados a partir de estos valo-
res.

La Tabla IV contiene los resultados obtenidos cuan-
do la cantidad de creatinina se determina en 20 muestras de
suero por el método de esta invención y por el método cono-
10 cido.

TABLA III

<u>Ensayo número</u>	<u>Cantidad determinada de crea- tinina (mg/dl)</u>
1	1,00
15 2	1,07
3	1,01
4	1,09
5	1,00
6	0,98
20 7	1,02
8	1,00
9	1,05
10	1,02
<hr/>	
25 valor medio	1,02
desviación típica	0,03
coeficiente de variación	2,94

1

TABLA IV

Cantidad determinada de creatinina (mg/dl)

	<u>Muestra</u>	<u>Método de esta inven ción</u> (Yi)	<u>Método de Jaffé</u> (Xi)
5	suero 1	1,09	1,50
	2	0,85	1,30
	3	1,21	1,76
	4	0,51	0,73
	5	1,52	1,91
10	6	0,59	0,93
	7	1,10	1,43
	8	1,17	1,63
	9	1,09	1,42
	10	0,85	1,12
15	11	1,03	1,25
	12	0,41	0,63
	13	0,66	0,92
	14	0,51	0,71
	15	0,21	0,33
20	16	0,57	0,88
	17	0,58	0,79
	18	1,60	2,01
	19	1,55	2,03
	20	1,46	1,85
25	valor medio	$\bar{Y} = 0,93$	$\bar{X} = 1,26$
	coeficiente de co rrrelación	$r = \frac{\sum (Xi - \bar{X})(Yi - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (Xi - \bar{X})^2 \sum (Yi - \bar{Y})^2}} = 0,99$	
	Regresión	$Y = 0,81 X - 0,09$	

30

EJEMPLO 8

1

En este ejemplo se añaden 20 microlitros de suero (Moni-trol I) y 20 microlitros de una solución patrón de creatinina (solución acuosa que contiene 400 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de creatinina) a 1,0 ml de una solución de creatinina-desimidasa (solución reguladora de fosfato 0,01 M a pH 7,5 conteniendo 0,1 mg de creatinina-desimidasa con una actividad específica de 0,1 unidades/mg) y 1,0 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M (pH 7,5) y las mezclas resultantes se incuban a 37°C durante 10 minutos.

5

10

A las mezclas de reacción se añade 1 ml de NADH 4 mM (producto de Merck and Co.), 40 mM de 2-oxoglutarato y 1 ml de una solución de L-glutamato-deshidrogenasa {conteniendo 0,1 mg de L-glutamato-deshidrogenasa (producto de Oriental Yeast Kabushiki Kaisha) con una actividad específica de 90 unidades/mg o más}, respectivamente, y las mezclas resultantes se incuban a 37°C durante 10 minutos. Se mide la reducción de absorción de las mezclas de reacción a 340 m μ .

15

Los resultados se encuentran en las Tablas V y VI.

20

La Tabla V muestra los valores obtenidos cuando se determina la cantidad de creatinina en el suero patrón sucesivamente durante 10 veces y se calculan la desviación típica y el coeficiente de variación a partir de los valores obtenidos.

25

La Tabla VI contiene los resultados obtenidos cuando se determina la cantidad de creatinina en 20 muestras de suero por el método de esta invención y el método conocido.

30

1

TABLA V

<u>Ensayo nº</u>	<u>Cantidad determinada de creatinina (mg/dl)</u>
1	1,07
2	1,04
3	1,15
4	1,05
5	1,08
6	1,11
7	1,16
8	1,09
9	1,12
10	1,03
valor medio	1,09
desviación típica	0,04
coeficiente de variación	3,67

5

10

15

TABLA VI

Cantidad determinada de creatinina (mg/dl)

Muestra	<u>Método de esta invención</u>		<u>Método de Jaffé</u>
	(Yi)	(Xi)	(Xi)
suero 1	1,12	1,50	1,50
2	0,89	1,30	1,30
3	1,32	1,76	1,76
4	0,59	0,73	0,73
5	1,55	1,91	1,91
6	0,62	0,93	0,93
7	1,15	1,43	1,43
8	1,21	1,63	1,63
9	1,13	1,42	1,42

25

30

1

TABLA VI (continuación)

Cantidad determinada de creatinina
(mg/dl)

	<u>Muestra</u>	<u>Método de esta invencción</u> (Yi)	<u>Método de Jaffé</u> (Xi)
5	10	0,88	1,12
	11	1,18	1,25
	12	0,43	0,63
	13	0,63	0,92
10	14	0,53	0,71
	15	0,22	0,33
	16	0,61	0,88
	17	0,60	0,79
	18	1,62	2,01
15	19	1,60	2,03
	20	1,48	1,85

valor medio $\bar{Y} = 0,97$ $\bar{X} = 1,26$

coeficiente de co-
rrelación $r = 0,99$

regresión $Y = 0,83 X - 0,08$

20

EJEMPLO 9

25

En este ejemplo, se añaden 20 microlitros de suero (Moni-trol I) y 20 microlitros de una solución patrón de creatinina (solución acuosa conteniendo 400 µg/dl de creatinina) a una solución formada por 1,0 ml de una solución de enzima (solución reguladora de fosfato 0,01 M a pH 7,5 conteniendo 0,1 mg de creatinina-desimidasa con una actividad específica de 0,1 unidades/mg) y 1,0 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M (pH 7,5) respectivamente y las mezclas resultantes se incuban a 37°C durante 10 minutos.

30

1 A las mezclas de reacción se añade después 1 ml
de reactivo de ferricianuro-nitroprusiato alcalino (prepa-
rado mezclando cantidades iguales de hidróxido sódico al 10 %
5 nitroprusiato sódico al 10 % y ferricianuro potásico al 10 %
y diluyendo la mezcla tres veces con agua) y las mezclas re-
sultantes se dejan en reposo a la temperatura ambiente duran-
te 20 minutos para formar el color y se utilizan como solu-
ciones de ensayo.

10 Independientemente, se agregan 20 microlitros de
suero y 20 microlitros de la solución patrón de creatinina
a una solución constituida por 1,0 ml de la solución de enzima
y 1,0 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M (pH 7,0)
a la que se añade, al mismo tiempo, 1 ml de reactivo de ferri-
cianuro-nitroprusiato alcalino. Las mezclas resultantes se
15 utilizan como soluciones de comparación.

Se mide la densidad óptica de las soluciones de
ensayo a 500 m μ frente a las soluciones de comparación. A
partir de la medida de la solución patrón de creatinina, se
obtiene la curva de calibración de la densidad óptica a
20 500 m μ y la concentración de creatinina. Basándose en este
dato, se calcula la concentración de creatinina en el suero
a partir de la medida de la densidad óptica del suero a
500 m μ .

25 Los resultados se encuentran en las Tablas VII y
VIII.

La Tabla VII muestra los valores obtenidos cuando
se determina la cantidad de creatinina en el suero patrón su-
cesivamente durante 10 veces y la desviación típica y el coe-
ficiente de variación se calculan a partir de los valores
30 obtenidos.

1

La Tabla VIII muestra los resultados obtenidos cuando se determina la cantidad de creatinina en 20 muestras de suero por el método de esta invención y por el método conocido.

5

TABLA VII

<u>Ensayo nº</u>	<u>Cantidad determinada de creatinina (mg/dl)</u>
1	1,10
2	1,09
10 3	1,16
4	1,13
5	1,17
6	1,15
7	1,09
15 8	1,11
9	1,13
10	1,12
<hr/>	
valor medio	1,12
desviación típica	0,02
20 coeficiente de variación	1,78

25

30

1

TABLA VIII

Cantidad determinada de creatinina
(mg/dl)

	<u>Muestra</u>	<u>Método de esta invención</u> (Yi)	<u>Método de Jaffé</u> (Xi)
5	suero 1	1,20	1,50
	2	1,00	1,30
	3	1,39	1,76
	4	0,61	0,73
	5	1,62	1,91
10	6	0,65	0,93
	7	1,21	1,43
	8	1,31	1,63
	9	1,18	1,42
	10	0,90	1,12
15	11	1,00	1,25
	12	0,48	0,63
	13	0,71	0,92
	14	0,57	0,71
	15	0,27	0,33
20	16	0,59	0,88
	17	0,63	0,79
	18	1,68	2,01
	19	1,62	2,03
25	20	1,51	1,85
	valor medio	$\bar{Y} = 1,07$	$\bar{X} = 1,26$
	coeficiente de correlación	$\gamma = 0,99$	
	regresión	$Y = 0,84 X - 0,05$	

30

1 En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la producción de creati-
nina-desimidasa que consiste en cultivar un microorganismo
productor de creatinina-desimidasa perteneciente al género
Brevibacterium, Corynebacterium, Pseudomonas o Arthrobacter,
en un medio nutritivo hasta que se detecta creatinina-desi-
midasa en el cultivo y después aislar dicha creatinina-desi-
midasa.

10 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
donde se agrega creatinina a dicho medio nutritivo.

15 3. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
donde la etapa de cultivo se lleva a cabo a una temperatura
comprendida entre 28°C y 33°C y a un pH de 6,5 a 8,5 duran-
te 20 a 30 horas.

20 4. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
donde dicho microorganismo está seleccionado entre el grupo
formado por Brevibacterium ammoniacum, Brevibacterium
divaricatum, Corynebacterium lilium, Corynebacterium gluta-
micum, Pseudomonas ovalis, Pseudomonas cruciviae, Arthrobac-
ter ureafaciens y Arthrobacter histidinovorans.

25 5. Un procedimiento según la Reivindicación 4,
donde dicho microorganismo está seleccionado entre el grupo
formado por Brevibacterium ammoniacum ATCC 31169, Brevi-
bacterium divaricatum ATCC 14020, Corynebacterium lilium
ATCC 15990, Corynebacterium glutamicum ATCC 31170, Pseudomo-
nas ovalis ATCC 31171, Pseudomonas cruciviae ATCC 31172,
30 Arthrobacter ureafaciens ATCC 7562 y Arthrobacter histidino-
ovorans ATCC 11442.

1 6. Un procedimiento según la reivindicación 1,
donde la creatinina-desimidasa es aislada rompiendo las
celulas microbianas para formar un extracto celular y so-
5 metiendo dicho extracto celular a precipitación y adsor-
ción y desorción para obtener un enzima purificado.

 7. Un procedimiento según la reivindicación 1,
donde la creatinina-desimidasa es aislada del caldo de
cultivo , del cual se separan las células microbianas, por
precipitación y adsorción y desorción para obtener un enzi-
10 ma purificado

 8. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE CREATININA-DESIMIDA-
15 SA.

 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente memoria descriptiva que consta de treinta y
tres páginas mecanografiadas.

Madrid, 19 agosto 1.976

BERNARDO UNGRIA

P. U.



20

25

30