



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) 324799

(13) B1

**NORGE**

(51) Int Cl.

*C12N 9/14 (2006.01)*

*C02F 3/34 (2006.01)*

*C12N 1/20 (2006.01)*

*B09C 1/10 (2006.01)*

*C12Q 1/00 (2006.01)*

*C12Q 1/34 (2006.01)*

*C12R 1/01 (2006.01)*

**Patentstyret**

---

(21)	Søknadsnr	19990806	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.08.21 PCT/GB97/02242
(22)	Inng.dag	1999.02.19	(85)	Videreføringssdag	1999.02.19
(24)	Løpedag	1997.08.21	(30)	Prioritet	1996.08.21, GB, 9617537
(41)	Alm.tilgj	1999.04.21			
(45)	Meddelt	2007.12.10			
(83)	Biol.mat. dep	NCIMB 40820			
(73)	Innehaver	The Secretary of State for Defence in Her Britannic Majesty's Government of the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, DSTL - Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ, England, GB			
(72)	Oppfinner	Stephen Nicklin, Farnborough, Hampshire, England, GB Emma Rachel Travis, Cambridge, England, GB Amrik Basran, Cambridge, England, GB Neil Charles Bruce, Cambridge, England, GB Christopher Edward French, Cambridge, England, GB			
(74)	Fullmektig	JK Thorsens Patentbureau AS, Postboks 9276 Grønland, 0134 OSLO			

---

(54)	Benevnelse	<b>Biologisk nedbrytning av eksplosiver</b>
(56)	Anførte publikasjoner	A. M. Jones et al., Bioremediation of Recalcitrant Organics, 1995, s. 251-257 US 4745064
(57)	Sammendrag	

Enzymatisk aktivt cellefritt ekstrakt eller membranfraksjon som er i stand til å katalysere fjerning av nitritt fra heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) tilveiebringes. Det cellefrie ekstraktet produseres ved dyrking av en stamme av *Rhodococcus rhodochrous* bakterie fra naturen. Stammen betegnet 11Y er blitt deponert som NCIMB 40820. Fremgangsmåter for biologisk avhjelping under anvendelse av det således fremstilte enzymatisk aktive cellefrie ekstrakt er også tilveiebragt. I tillegg tilveiebringes det en fremgangsmåte for å påvise tilstedeværelse av RDX i en prøve sammen med en biosensor for anvendelse i en slik fremgangsmåte. Nitrittet produsert i den enzymkatalyserte reaksjon med RDX påvises for eksempel kolorimetrisk, eller alternativt påvises et produkt av RDX nedbrytning slik som formaldehyd.

Denne oppfinnelsen vedrører området påvisning og biologisk nedbrytning av eksplosiver og særlig et nytt bakterieisolat og en ny enzymaktivitet, dvs. et enkelt enzym eller gruppe av enzymer, avledet derfra. Denne oppfinnelsen vedrører videre  
5 aerob biologisk nedbrytning av heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (i det etterfølgende referert til ved den alminnelig anvendte forkortelsen RDX) og fremgangsmåter og apparat for påvisning av RDX ved anvendelse av den RDX nedbrytende enzymaktivitet.

10

Den nye enzymaktiviteten er blitt vist å frigi nitritt fra RDX, et heterocyklisk nitramin.

Selv om nitraminer åpenbart er ekstremt sjeldne av natur,  
15 fremstilles de i betydelige mengder av den kjemiske industri og omfatter for eksempel en viktig klasse av energetiske materialer som har anvendelser som eksplosiver og drivmidler. RDX er for tiden det viktigste militære eksplosiv i USA. Fremstilling, håndtering og avhending av RDX kan alle føre  
20 til forurensning av miljøet med RDX. Der er bekymringer vedrørende den miljømessige skjebne til nitraminer på grunn av deres relative gjenstridighet og det foreligger derfor et behov for et middel for å fjerne slike forurensninger fra miljøet uten å frembringe andre uønskede forurensende stof-  
25 fer. Det er også et påtrengende behov for en bedre metode for å påvise RDX siden de for tiden foreslåtte analysesystemer hovedsakelig er avhengig av omfangsrike og sofistikerte utstyrsdeler slik som høytytelses-væskrokromatografi og/eller krever spesielt opplærte laboratorieteknikere for anvendelse  
30 av disse.

A. M. Jones et al., Bioremediation of Recalcitrant Organics, 1995, s. 251-257 "Biodegradability of Selected Highly Energetic Pollutants Under Aerobic Conditions", beskriver  
35 laboratorieforsøk utført for å vurdere det biologiske nedbrytningspotensial for fire energetiske forbindelser - 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacykloheksan (RDX), 2,4,6-trinitrotoluen (TNT), glycidylazidpolymer (GAP) og nitrocellulose (NC) - under aerobe betingelser.

US 4.745.064 vedrører en mikroorganisme av slekten *Rhodococcus corallinus*, og anvendelse av denne ved nedbrytning av s-triazinderivater.

5 Det er et formål for denne oppfinnelsen å tilveiebringe et enzym som er i stand til å katalysere den biologiske nedbrytning av RDX og som kan benyttes i et biologisk avhjelpende system for den miljømessige forurensning av det forurensende stoff RDX. Det er et ytterligere formål for dette prosjektet  
10 å tilveiebringe et enzym som er anvendbart for påvisnings-systemer for RDX.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører således en *Rhodococcus rhodochrous* 11Y bakteriestamme, kjennetegnet ved at den er  
15 betegnet "11Y" og deponert som NCIMB 40820, og mutanter derav, som er i stand til å produsere et celleekstrakt med RDX nedbrytende enzymaktivitet som nedbryter heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX).

20 Den foreliggende oppfinnelse vedrører også et celleekstrakt med RDX nedbrytende enzymaktivitet, kjennetegnet ved at det katalyserer frigivelse av nitritt fra heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) og kan oppnås fra celler av *Rhodococcus rhodochrous* 11Y NCIMB 40820 i henhold til  
25 oppfinnelsen, eller en mutant derav.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører videre en fremgangsmåte for fremstilling av celleekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet i henhold til oppfinnelsen, kjennetegnet ved  
30 at den omfatter å dyrke *Rhodococcus rhodochrous* 11Y sp. NCIMB 40820 i henhold til oppfinnelsen, eller en mutant derav, å bryte cellene og å ekstrahere celleekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet fra de brutte celler.

35 Denne enzymaktiviteten viser mindre aktivitet mot det lignende heterocykliske nitramin oktahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin (HMX) og mindre aktivitet igjen mot nitratesteren pentaerytritoltetranitrat (PETN). Aktiviteten ble funnet å være membranassosiert og kunne oppløseliggjøres

fra membranen med 5 % triton. Der er intet behov for en ko-faktor slik som NADPH, NADH, PES eller FAD for enzymaktivitet og enzymaktiviteten utviser stabilitet overfor nærværet av relativt høye konsentrasjoner av denatureringsmidler og aktiviteten øker i nærvær av urea. Enzymaktiviteten er også relativt stabil overfor varmedenaturering. Videre forblir en stor del av enzymaktiviteten oppløselig når pH reduseres til 3,5 med iseddik.

- 10 Bakteriestammen som enzymaktiviteten i den foreliggende oppfinnelse er oppnådd fra ble isolert fra naturen og er en stamme av *Rhodococcus rhodochrous* betegnet 11Y heri. En prøve av det nye isolatet er blitt deponert under vilkårene ifølge Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for patentprosedyreformål hos UK National Collection of Industrial and Marine Bacteria, 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB2 1RY, Skottland, 7. august 1996 under deponeringsnummer NCIMB 40820.
- 15
- 20 Ytterligere egenskaper av den deponerte bakterie 11Y er angitt nedenfor:

	Gram-farge	+ve
	Sporer	-ve
25	Motilitet	-ve
	Vekst 37°C	+ve
	41°C	+ve
	45°C	-ve
	Katalase	+ve
30	Oksydase	-ve
	Fermentativ i glukose OF	ingen endring

En cellevegg- og fettsyreanalyse ga den følgende informasjon.

- 35 Mykolsyrer er tilstede.  
 Cellevegg-diaminosyren er mesoDAP.  
 Fettsyreprofilen viser at de betydeligste syrer som er tilstede er mettede og umettede syrer med rett kjede

sammen med en liten mengde av en 10-metyl forgrenet syre, dvs. tuberkulostearinsyre.

Enzymaktiviteten kan frembringes ved dyrking av *R. rhodochrous* på RDX eller  $\text{NH}_4\text{Cl}$  som en nitrogenkilde. For å oppnå enzymaktiviteten kan cellene brytes på en hvilken som helst alminnelig måte. Hensiktsmessig fremstilles et cellefritt ekstrakt. Ekstraktet kan deretter fraksjoneres ved ultrasentrifugering og pelleten tas for å tilveiebringe aktiv membranfraksjon.

Alternativt tilveiebringer supernatanten fra ultrasentrifugering aktivt oppløselig protein. Det oppløselige protein kan delvis renses ved anvendelse av ionebyttekromatografi og elueres med en lineær saltgradient fra 0-2 M natriumklorid. Proteinet eluerer som en enkelt topp ved omtrent 350 mM natriumklorid.

Enzymaktiviteten oppnådd som celleekstrakt krever nærvar av ditiotreitotol (DTT) for RDX nedbrytende enzymaktivitet.

I stedet for den nøyaktige deponerte utgangsorganisme kan det anvendes en mutant derav, for eksempel avledet ved gammastråling eller anvendelse av en kjemisk mutant, induksjon av kultur på et annet medium etc. eller et transkonjugeringsmiddel derav med en annen bakterie. Evnen til en hvilken som helst slik organisme til å gi enzymaktiviteten kan lett bestemmes av den fagkyndige.

Evnen til den nye enzymaktiviteten til å katalysere fjerningen av nitritt fra RDX tillater at enzymaktiviteten anvendes i påvisningen av RDX.

Fjerningen av nitritt fra RDX kan danne et ustabil mellomprodukt som deretter spontant nedbrytes til å gi et område av mindre molekyler omfattende formaldehyd og ammoniakk.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører således også en fremgangsmåte for påvisning av heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-

triazin (RDX) i en prøve, kjennetegnet ved at den omfatter å eksponere prøven for celleekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet i henhold til oppfinnelsen og å påvise ethvert nitritt eller ethvert formaldehyd som er produsert fra nevnte  
5 prøve.

En slik påvisning kan være ved hjelp av en kolorimetrisk metode som er kjent på området.

10 Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en biosensor for påvisning av heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) i en prøve, kjennetegnet ved at den omfatter midler for å bringe prøven i kontakt med cellestraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet i henhold til oppfinnelsen og å opprettholde  
15 prøven under betingelser som er passende for nedbrytning av det forurensende stoff ved hjelp av celleekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet og midler for å påvise forekomsten av en reaksjon, katalysert ved hjelp av celleekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet, av heksahydro-1,3,5-trinitro-  
20 1,3,5-triazin (RDX) når heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) er tilstede i prøven.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører videre en biosensor for påvisning av heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) i  
25 en prøve, kjennetegnet ved at den omfatter midler for å inokulere prøven med en kultur av bakterieisolatet av *Rhodococcus rhodochrous* i henhold til oppfinnelsen og å opprettholde prøven under betingelser som er passende for nedbrytning av det forurensende stoff ved hjelp av isolatet  
30 og midler for å påvise forekomsten av en reaksjon, katalysert ved hjelp av isolatet, av heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) når heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) er tilstede i prøven.

35 Midlene for påvisning av forekomsten av en reaksjon kan hensiktsmessig omfatte en kolorimetrisk transducer. Slike sensorer kan anvendes som basis for høybevegelige detektorer for analysering av forurensingsomfanget av det forurensende stoff RDX i miljøet.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører ytterligere en fremgangsmåte for biologisk avhjulpet behandling av et miljø som er forurenset av heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX), kjennetegnet ved at den omfatter trinnene med å tilsette til miljøet en mengde av cellestraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet i henhold til oppfinnelsen og å opprettholde blandingen under betingelser som er passende for nedbrytning av det forurensende stoff ved hjelp av celleekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet for å tillate at det heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) som er tilstede i materialet forbrukes.

Materialet som forbrukes kan for eksempel være en avfallsstrøm av material som inneholder RDX som stammer fra destruksjon av en eksplosivladning inneholdende RDX eller en prøve av RDX-forurenset jord eller annet material. I det førstnevnte tilfelle kan biologisk avhjulpet behandling hensiktsmessig utføres i en reaktorbeholder, mens i det sistnevnte tilfelle kan enzymaktiviteten innføres direkte i materialet. Andre passende metoder for å utføre behandling vil være klart åpenbare for de fagkyndige på området.

Evnen til enzymaktiviteten til å nedbryte RDX som beskrevet i det foregående tilveiebringer en alternativ metode for den biologisk avhjulpede behandling av et RDX-forurenset miljø. Denne metoden omfatter trinnet med inokulering av miljøet med en prøve av bakterieisolatet av *Rhodococcus rhodochrous* betegnet 11Y og å la isolatet forbruke det RDX som er tilstede i miljøet. Miljøet kan for eksempel være en avfallsstrøm av material som inneholder RDX eller en prøve av RDX-forurenset jord eller annet material. I det førstnevnte tilfelle kan biologisk avhjulpet behandling hensiktsmessig utføres i en reaktorbeholder, mens i det sistnevnte tilfelle kan isolatet innføres direkte i miljøet ved inokulering av den forurensede jord med dette. Andre passende metoder for å utføre behandling vil være klart åpenbare for de fagkyndige på området.

Oppfinnelsen vil nå beskrives ytterligere, kun som eksempel, med referanse til de etterfølgende tegninger hvori

- fig. 1 viser nitrittet produsert under inkubasjon av celle-  
ekstrakt fra *Rhodococcus rhodochrous* 11Y med RDX,
- fig. 2 viser nitrittet og formaldehydet som er produsert  
under helcelleinkubasjon av RDX med celler av *Rhodo-*  
coccus rhodochrous 11Y,
- 5 fig. 3 viser variasjonen av nitritt som er produsert i  
inkubasjoner av delvis rensset ekstrakt fra *Rhodococcus*  
rhodochrous 11Y med konsentrasjonen av ditiotreitol,
- fig. 4 viser det frigjorte nitritt fra inkubasjon av RDX med  
10 delvis rensset ekstrakt med varierende konsentrasjon av  
denatureringsmidler,
- fig. 5 viser frigjort nitritt mot koketid for inkubasjoner av  
varmebehandlet delvis rensset ekstrakt med RDX,
- fig. 6 viser pH-profilen for frigjørelse av nitritt fra  
15 inkubasjoner av delvis rensset ekstrakt med RDX og den  
spontane hydrolyse av RDX,
- fig. 7 viser nitrittet og formaldehydet frigitt under for-  
løpet av inkubasjoner av delvis rensset ekstrakt med  
RDX,
- 20 fig. 8 viser nitrittet frigjort fra inkubasjoner av delvis  
renset ekstrakt med forskjellige nitrittholdige  
eksplosiver.

#### EKSEMPEL 1

25

#### 1. Fremstilling av enzymaktiviteten fra bakteriestammen *Rhodococcus rhodochrous* 11Y

*Rhodococcus rhodochrous* 11Y ble isolert under anvendelse av  
teknikker som er standard på området, fra prøver samlet fra  
30 en naturlig kilde ved anriking med RDX som nitrogenkilde.

*R. rhodochrous* 11Y ble dyrket i 1 liter av definerte medier  
bestående av 2,17 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  og 1,325 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0,  
inneholdende 0,4 % glukose (vekt/volum), sporelementer (som  
35 beskrevet av Pfennig og Lippert, Arch. Microbiology, 1966,  
55, 726-739) og enten 1 mM RDX eller 6 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Kolber ble  
inkubert ved 180 opm i en risteinkubator ved 30°C.

Cellefrie ekstrakter ble oppnådd fra celler dyrket på den ovennevnte måte. Celler ble formet til pelleter ved spinning ved 10 000 g i 15 min. ved 4°C i en Sorval RC-5C sentrifuge utstyrt med en GS-3 rotor. Disse cellene ble suspendert på  
5 ny i 2 ml av 50 mM Tricine-buffer (pH 8,0) pr. gram våt cellevekt. Cellene ble brutt ved ultralydbehandling i en MSE Soniprep (Fisons, Instruments, FSA Ltd.) ved anvendelse av 6 x 12 µm brudd i 15 sekunder, alternerende med 30 sekunder avkjøling i smeltet is. Celleavfall og ubrutte celler ble  
10 fjernet ved sentrifugering ved 13 000 g i 1 min. ved 4°C i en mikrosentrifuge (Sigma). Denne supernatanten ble anvendt som cellefritt ekstrakt. Membranfraksjonen ble oppnådd fra det cellefrie ekstrakt ved ultrasentrifugering ved 109 000 g i 1  
15 time ved 4°C (Beckman Optima TLX Ultrasentrifuge TLA 45 rotor), og pelleten ble vasket og suspendert på ny i 50 mM Tricine-buffer (pH 8,0) til en konsentrasjon på 2 mg/ml protein.

## 2. Kjemikalier

20 RDX hadde høyeste renhet og andre kjemikalier var av analysekvalitet, og var, med mindre annet er angitt, anskaffet fra BDH Ltd. (Poole, UK), Sigma Chemical Company Ltd. (Poole, UK) eller Aldrich (Gillingham, UK).

## 25 3. Analyser

### RDX nedbrytning

RDX nedbrytning ble bestemt ved å overvåke forsvinningen av RDX ved hjelp av HPLC i 50 mM Tricine (pH 8,0), inneholdende RDX (50 µM sluttkonsentrasjon), 5 mM DTT og 40 µl cellefritt  
30 ekstrakt eller membranfraksjon i et sluttvolum på 1 ml.

Alternativt ble RDX nedbrytning etterfulgt av overvåkning av frigivelsen av nitritt under anvendelse av Griess-reagent (Rosenblatt, Burrows, Mitchell og Partner, 1991: "Organic  
35 Explosives and Related Compounds" i Handbook of Environmental Chemistry 3 (G), redigert av O. Hutzinger, Springer-Verlag). Analysen ble utført som beskrevet i det foregående. Sulfanilsyre (0,6 mM sluttkonsentrasjon) ble tilsatt og det hele fikk stå i 15 min., N-1-naftyletylendiamin (0,4 mM slutt-

konsentrasjon) ble deretter tilsatt og etter 5 min. ble fargen som utviklet seg målt spektrofotometrisk ved 540 nm.

#### Protein

5 Protein ble rutinemessig analysert ved hjelp av Coomassie fargebindingsmetoden til Bradford (Anal. Biochem. (1976) 72, 248-254) under anvendelse av kommersielt tilgjengelig reagens og Bovine Serum Albumin standard (Pierce Ltd. - anskaffet gjennom Life Science Labs Ltd., Luton). En delmengde (20  $\mu$ l)  
10 av en prøve inneholdende 0,2-1 mg protein/ml ble tilsatt til 1 ml reagens og reaksjonen fikk lov til å utvikles i 5 min. ved romtemperatur før avlesning av absorbansen ved 595 nm mot en blindprøve av buffer (20  $\mu$ l) pluss reagens (1 ml). Sammenligning med en standardkurve for standardverdier (0-  
15 1 mg/ml) tillot beregning av proteinkonsentrasjonen i prøven.

#### 4. Resultater

##### RDX nedbrytning

Rått ekstrakt ble inkubert ved 30°C med 50 mM Tricine inneholdende 50  $\mu$ M RDX og 5 mM DTT i et tidsområde fra 0 til 60  
20 min. Konsentrasjonen av RDX ble bestemt ved anvendelse av HPLC. Konsentrasjonen av RDX ble iaktatt å avta.

Membranfraksjonen ble inkubert ved 30°C med 50 mM Tricine inneholdende 50  $\mu$ M RDX og 5 mM DTT i et tidsområde fra 0 til  
25 60 min. Konsentrasjonen av RDX ble fastlagt ved anvendelse av HPLC. Konsentrasjonen av RDX ble iaktatt å avta med forløpt tid.

##### 30 Nitrittdannelse

Rått ekstrakt ble inkubert ved 30°C med 50 mM Tricine inneholdende 50  $\mu$ M RDX og 5 mM DTT i et tidsområde fra 0 til  
60 min. Konsentrasjonen av nitritt ble deretter målt ved anvendelse av Griess-reagens. Konsentrasjonen av nitritt ble  
35 iaktatt å øke som vist i fig. 1.

Tilsetning av en hvilken som helst av ko-faktorene NADH, NADPH, PES eller FAD påvirket ikke hastigheten for dannelse

av nitritt, hvilket indikerer nedsettbar ko-faktor-uavhengig enzymaktivitet.

Membranfraksjon inkubert med 50  $\mu\text{M}$  RDX ved 30°C dannet også  
5 nitritt. Oppløseliggjøring av denne aktiviteten var mulig med 5 % triton.

#### EKSEMPEL 2

10 Celler av *R. rhodochrous* stamme 11Y ble dyrket i et medium bestående av 2,17 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  og 1,325 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, med 0,4 % (vekt/volum) glukose, 6 mM nitrogenatomer og sporelementer (Pfennig & Lippert, supra). Kulturene ble inkubert ved 30°C på en roterende risteinnretning ved 170 opm.

15 Hele celler av 11Y ble høstet ved sentrifugering av kulturer i sen eksponensiell fase ved 7000 g i 10 min. i en Sorvall RC5C sentrifuge under anvendelse av en GS3 rotor. Cellene ble vasket og suspendert i 50 mM Tricine pH 8,0 til en  
20 konsentrasjon på 0,5 g/ml våt vekt av celler.

Nedbrytningen av RDX i helcelleinkubasjoner av 11 Y ble analysert i 50 mM Tricine pH 8,0 inneholdende RDX (300  $\mu\text{M}$  sluttkonsentrasjon) og 10  $\mu\text{l}$  hele celler i et sluttvolum på  
25 1 ml. Forsvinningen av RDX ble overvåket under anvendelse av tynnsjiktskromatografi (TLC) med påvisning ved anvendelse av Griess-reagens (Rosenblatt et al, supra). Alternativt ble dannelsen av formaldehyd overvåket under anvendelse av standard Hantzsch spektrofotometrisk analyse; 500  $\mu\text{l}$  prøve  
30 ble blandet med 500  $\mu\text{l}$  formaldehydreagens (20 mM acetylaceton, 2 mM ammoniumacetat og 50 mM eddiksyre) (Nash, 1953, Biochemical Journal, vol. 55, s. 416). Prøven ble deretter inkubert ved 58°C i 10 min. og den gule fargedannelsen målt ved 418 nm under anvendelse av et spektrofotometer med diod-  
35 oppstilling. Kjente konsentrasjoner av formaldehyd (fra 1 til 500  $\mu\text{M}$ ) ble anvendt til å fremstille en kalibreringskurve.

Helcelleprøvene ble inkubert ved 30°C i en periode på 12 timer. Konsentrasjonen av nitritt ble iaktatt å øke som vist i fig. 2. Fig. 2 viser også at konsentrasjonen av formaldehyd også økte.

5

Hele celler ble brutt med en trykkcellepresse under anvendelse av minicellen ved et trykk på 11 000 psi. Celleavfall og ubrutte celler ble fjernet ved sentrifugering ved 13 000 opm i 1 min. ved 4°C i en mikrosentrifuge, idet supernatanten

10

anvendes som rått celleekstrakt.

Råekstraktets aktivitet med hensyn til RDX nedbrytning og nitrittdannelse ble analysert som følger; analyser ble utført i 50 mM Tricine-buffer pH 8,0 inneholdende RDX (50 µM

15

20

25

30

sluttkonsentrasjon), 5 mM DTT og 40 µl råekstrakt i et sluttvolum på 1 ml. RDX nedbrytning ble bestemt ved å overvåke forsvinningen av RDX ved hjelp av TLC med påvisning under anvendelse av Griess-reagens. For å måle det dannede nitritt ble proteiner utfelt ved tilsetning av 2 µl iseddik og deretter fjernet ved sentrifugering i en mikrosentrifuge (5 min., 13 000 opm). Standard Griess-reaksjon for nitritt ble utført. RDX nedbrytning og ledsagende nitrittdannelse ble iaktatt.

Subcellulær fraksjonering ble oppnådd ved ultrasentrifugering av råekstraktet ved 109 000 g i 1 time ved 4°C (Beckman Optima TLX Ultrasentrifuge TLA 45 rotor), idet supernatanten representerer de oppløselige proteiner og pelleten membranfraksjonen. Pelleten ble vasket og suspendert på ny i 50 mM

Tricine-buffer pH 8,0 til en konsentrasjon på 2 mg/ml protein før undersøkelser av aktivitet.

RDX nedbrytningsevne ble iaktatt i begge fraksjoner idet storparten er i membranfraksjonen.

35

Den RDX nedbrytende enzymaktivitet i det oppløselige protein ble delvis rensert ved hjelp av en Q-sefarosekolonne under anvendelse av 50 mM Tris-buffer pH 8,5 og en saltgradient på 0-2 M NaCl. Proteinet eluerte som en enkelt topp ved rundt

350 mM natriumklorid. Det delvis rensede protein ble iakt-tatt å være varmestabilt og ble denaturert i 6 M urea men foldes på ny når fortynnet til 2 M urea.

5 EKSEMPEL 3

1. Vekst av R.rhodochrous og delvis rensing av enzymet

16 L R.Rhodochrous 11Y ble dyrket i 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 % glukose (vekt/vekt), 2 ml sporelementer (Pfennig & Lippert, 10 supra) og 1 mM RDX som eneste nitrogenkilde ved 30°C. Cellene ble dyrket i 2 l kolber og ble høstet ved sentrifugering så snart de hadde nådd stasjonær vekstfase i en Sorvall RC5C sentrifuge under anvendelse av en GS3 rotor ved 10 000 g i 15 min. ved 4°C. Cellepelleten (57 g våt vekt av 15 celler) ble suspendert på ny i 120 ml av 50 mM Tris pH 8,0. Suspensjonen ble homogenisert ved anvendelse av en trykkcelle ved 35 000 psi (tre passeringer) etterfulgt av sentrifugering (Sorvall RC5C sentrifuge under anvendelse av en SS-34 rotor ved 30 000 g i 30 min. ved 4°C) for å pelletisere eventuelt 20 cellulært avfall. Supernatanten ble fjernet og sentrifugert igjen (Beckman XL-90 ultrasentrifuge under anvendelse av en Ti-70 rotor ved 25 000 g i 2 timer ved 4°C) for å pelletere bakteriemembranene. Både supernatanter og pelleter ble funnet å ha evnen til å nedbryte RDX med frigivelse av nitritt 25 som bestemt ved Griess-analysen. Supernatanten fra høyhastighets-sentrifugeringstrinnet ble anvendt for ytterligere rensing.

pH av supernatantprøven ble redusert til 3,5 med iseddik og 30 prøven ble inkubert på is i 30 min. Det ble funnet at ~60 % av proteinet fra høyhastighets-supernatanten aggregerte og ble fjernet ved ytterligere sentrifugering (Sorvall RC5C sentrifuge under anvendelse av en SS-34 rotor ved 30 000 g i 30 min. ved 4°C). pH av supernatanten ble deretter for- 35 skjøvet til 8,0 ved anvendelse av 1 M natriumhydroksyd og ekstraktet ble analysert med hensyn på frigivelse av RDX-bundet nitritt som beskrevet i eksempel 1. Det ble funnet at storparten av aktiviteten forble oppløselig etter behandling

med iseddik (-75 %). Denne prøven ble anvendt i alle etterfølgende analyser.

## 2. Betingelser for substrat

5 Ved anvendelse av det delvis rensede protein ble betingelsene for ko-faktorer undersøkt. Det ble ikke funnet å være noe behov for en ko-faktor slik som NADPH og NADH. Avhengigheten av RDX nedbrytning med konsentrasjonen av ditiotreitol (DTT) ble analysert som følger: 26 µg delvis rensed protein ble  
10 inkubert i nærvær av 4M urea, 0,3 mM RDX og 50 mM Tricine pH 8,5 ved 37°C i 10 min. Konsentrasjonen av DTT ble variert og sluttvolumet opprettholdt ved 200 µl. Den frigitte mengde nitritt ble målt ved anvendelse av en spektrofotometrisk analyse som beskrevet i eksempel 1. Mengden av nitritt fri-  
15 gitt med konsentrasjon av DTT er vist i fig. 3. Dette viser en preferanse for nærværet av DTT idet ~3 mM DTT er påkrevet for å oppnå maksimal aktivitet. DTT anvendes til å opprettholde et reduserende miljø så snart cellene er blitt brutt.

## 20 3. Oppløselighet og stabilitet

Konsentrering av den delvis rensede enzymoppløsning under anvendelse av en Amicon ultrafiltreringsenhet (membran med 3 kDa avskjæring, 70 psi ved 4°C) fører til proteinaggregering og en reduksjon av aktivitet. Det ble funnet at det  
25 aggregerte protein kunne oppløseliggjøres på ny i 8 M urea, 5 mM DTT og 50 mM Tris pH 8,0 og aktivitet gjenopprettes.

Stabiliteten av enzymaktiviteten i nærvær av sterke denatureringsmidler ble målt ved analysering med hensyn på frigivelsen av nitritt fra RDX i nærvær av proteinprøven med urea  
30 eller guanidinhydroklorid. Analysebetingelsene var 50 mM Tricine pH 8,5, 0,3 mM RDX, 5 mM DTT ved 37°C i 10 min. med 26 µg protein idet frigivelsen av nitritt måles ved hjelp av den spektrofotometriske analysen beskrevet i eksempel 1.  
35 Avhengigheten av RDX aktivitet på konsentrasjonen av denatureringsmiddel er vist i fig. 4.

Det kan sees at enzymet viser en uvanlig høy stabilitet overfor nærværet av høye konsentrasjoner av denaturerings-

midler. Forskjellen i aktivitet iaktatt med urea, som hovedsakelig virker ved å bryte hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner innen proteiner, og guanidinhydroklorid, som hovedsakelig bryter ioniske interaksjoner og i mindre grad hydrofob interaksjon, antyder at ioniske interaksjoner kan spille en større rolle i stabiliteten av enzymaktiviteten.

Når den RDX nedbrytende aktivitet ble økt ved nærværet av urea, ble alle etterfølgende analyser utført med 4 M urea tilstede.

For å bestemme varmestabiliteten av enzymaktiviteten, ble den delvis rensede proteinprøve oppvarmet ved 100°C og prøver ble tatt ved forskjellige intervaller og analysert i 10 min. med 20 µl kokt prøve, 50 mM Tricine pH 8,5, 4 M urea, 5 mM DTT og 0,3 mM RDX ved 37°C. Frigivelsen av nitritt ble målt spektrofotometrisk og resultatene er gitt i fig. 5.

Det kan sees at enzymaktiviteten er relativt stabil overfor varme, idet kun ~20 % aktivitet tapes etter 10 min. ved 100°C.

#### 4. pH-profil

pH-profilen til det delvis rensede ekstrakt ble undersøkt. Analysebetingelsene var 50 mM av den passende buffer, 4 M urea, 0,3 mM RDX og 5 mM DTT. Prøvene ble inkubert ved 37°C i 10 min. med 26 µg delvis rensed protein. Den alkaliske hydrolyse av 0,3 mM RDX ble også målt under identiske betingelser og resultatene er vist i fig. 6. Det kan sees at enzymaktiviteten i betydelig grad øker frigivelsen av nitritt fra RDX sammenlignet med spontan nedbrytning over pH-området.

#### 5. Dannelse av nitritt og formaldehyd

Dannelsen av nitritt og formaldehyd fra den enzymatiske nedbrytning av RDX ble analysert i 50 mM Tricine pH 8,5, 4 M urea, 0,15 mM RDX og 5 mM DTT ved 37°C med 26 µg delvis rensed ekstrakt og mengden frigitt nitritt og dannet for-

maldehyd ble målt over tid ved anvendelse av de standard spektrofotometriske analyser beskrevet i eksempel 1.

Resultatene er vist i fig. 7. Mengdene av formaldehyd og nitritt frigitt fra RDX var lignende, hvilket antyder at mekanismen for enzymatisk nedbrytning av RDX kan ligne på den som er foreslått for den alkaliske hydrolyse av RDX (Croce og Okamoto, 1978, Journal of Organic Chemistry, vol. 44, s. 2100-2103; Heilman et al, 1996, Environmental Science Technology, vol. 30, No. 5, s. 1485-1492) hvor fjerning av en nitrittgruppe fra RDX danner et ustabilt mellomprodukt som spontant nedbrytes til å gi et område av mindre molekyler omfattende formaldehyd.

#### 15 6. Spesifisitet av substrat

Substratspesifisiteten ble undersøkt ved å teste om enzymaktiviteten nedbrøt HMX eller PETN, begge nitrittholdige eksplosiver. Analysene ble utført i 50 mM Tricine, 4 M urea, 0,3 mM av det passende eksplosiv og 5 mM DTT ved 37°C i 20 min. med 26 µg delvis rensset ekstrakt og resultatene ble sammenlignet med RDX. Resultatene er vist i fig. 8. Det kan sees at enzymaktiviteten var aktiv mot alle de testede eksplosiver men det var en klar preferanse (dvs. større aktivitet) for RDX.

**PATENTKRAV**

1. Rhodococcus rhodochrous 11Y bakteriestamme,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er betegnet "11Y" og  
5 deponert som NCIMB 40820, og mutanter derav, som er i stand  
til å produsere et celleekstrakt med RDX nedbrytende enzym-  
aktivitet som nedbryter heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-  
triazin (RDX).
- 10 2. Celleekstrakt med RDX nedbrytende enzymaktivitet,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at det katalyserer frigiv-  
else av nitritt fra heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin  
(RDX) og kan oppnås fra celler av Rhodococcus rhodochrous 11Y  
NCIMB 40820 som angitt i krav 1, eller en mutant derav.
- 15 3. Fremgangsmåte for fremstilling av celleekstraktet med RDX  
nedbrytende enzymaktivitet som angitt i krav 2,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å dyrke  
Rhodococcus rhodochrous 11Y sp. NCIMB 40820 som angitt i krav  
20 1, eller en mutant derav, å bryte cellene og å ekstrahere  
celleekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet fra de  
brutte celler.
4. Fremgangsmåte for påvisning av heksahydro-1,3,5-trinitro-  
25 1,3,5-triazin (RDX) i en prøve,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å eksponere  
prøven for celleekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet  
som angitt i krav 2 og å påvise ethvert nitritt eller ethvert  
formaldehyd som er produsert fra nevnte prøve.
- 30 5. Fremgangsmåte som angitt i krav 4,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at ethvert nitritt eller  
formaldehyd som er produsert påvises kolorimetrisk.
- 35 6. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene  
4 - 5,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at celleekstraktet med RDX  
nedbrytende enzymaktivitet produseres i samsvar med frem-

gangsmåten i henhold til krav 3 og at fremgangsmåten omfatter trinnet med tilsetning av ditiotreitol til prøven.

7. Biosensor for påvisning av heksahydro-1,3,5-trinitro-  
5 1,3,5-triazin (RDX) i en prøve,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter midler for  
å bringe prøven i kontakt med cellestraktet med RDX ned-  
brytende enzymaktivitet som angitt krav 2 og å opprettholde  
prøven under betingelser som er passende for nedbrytning av  
10 det forurensende stoff ved hjelp av celleekstraktet med RDX  
nedbrytende enzymaktivitet og midler for å påvise forekomsten  
av en reaksjon, katalysert ved hjelp av celleekstraktet med  
RDX nedbrytende enzymaktivitet, av heksahydro-1,3,5-trinitro-  
1,3,5-triazin (RDX) når heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-  
15 triazin (RDX) er tilstede i prøven.

8. Biosensor for påvisning av heksahydro-1,3,5-trinitro-  
1,3,5-triazin (RDX) i en prøve,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter midler for  
20 å inokulere prøven med en kultur av bakterieisolatet av  
Rhodococcus rhodochrous som angitt i krav 1 og å opprettholde  
prøven under betingelser som er passende for nedbrytning av  
det forurensende stoff ved hjelp av isolatet og midler for å  
påvise forekomsten av en reaksjon, katalysert ved hjelp av  
25 isolatet, av heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX)  
når heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) er tilstede  
i prøven.

9. Biosensor som angitt i krav 7 eller 8,  
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at midlene for å påvise  
forekomsten av en reaksjon er en kolorimetrisk endring.

10. Fremgangsmåte for biologisk avhjulpet behandling av et  
miljø som er forurensset av heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-  
35 triazin (RDX),  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene  
med å tilsette til miljøet en mengde av cellestraktet med RDX  
nedbrytende enzymaktivitet i henhold til krav 2 og å opp-  
rettholde blandingen under betingelser som er passende for

nedbrytning av det forurensende stoff ved hjelp av celle-  
ekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet for å tillate  
at det heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) som er  
tilstede i materialet forbrukes.

5

11. Fremgangsmåte som angitt i krav 10,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at trinnet med å opprett-  
holde blandingen under betingelser som er passende for ned-  
brytning av det forurensende stoff ved hjelp av celle-  
10 ekstraktet med RDX nedbrytende enzymaktivitet omfatter å  
tilsette ditiotreitol til blandingen.

Fig.1.

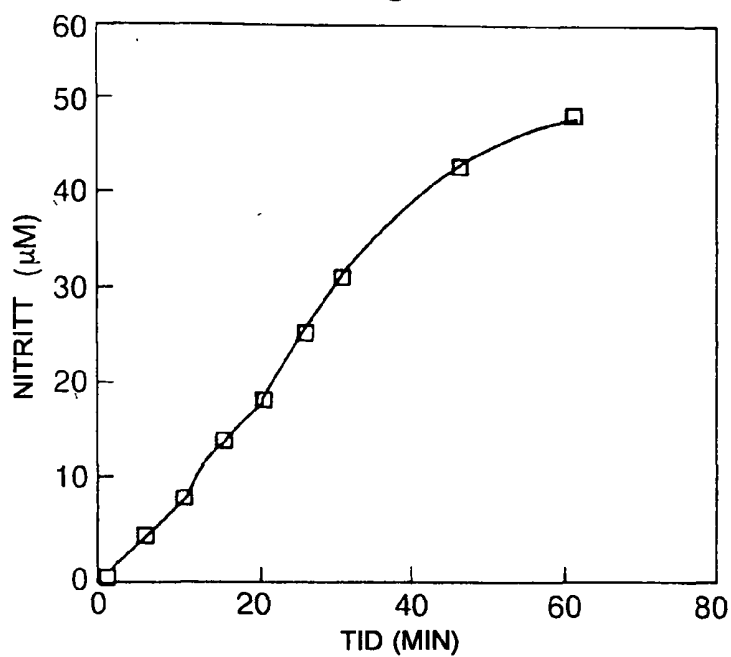


Fig.2.

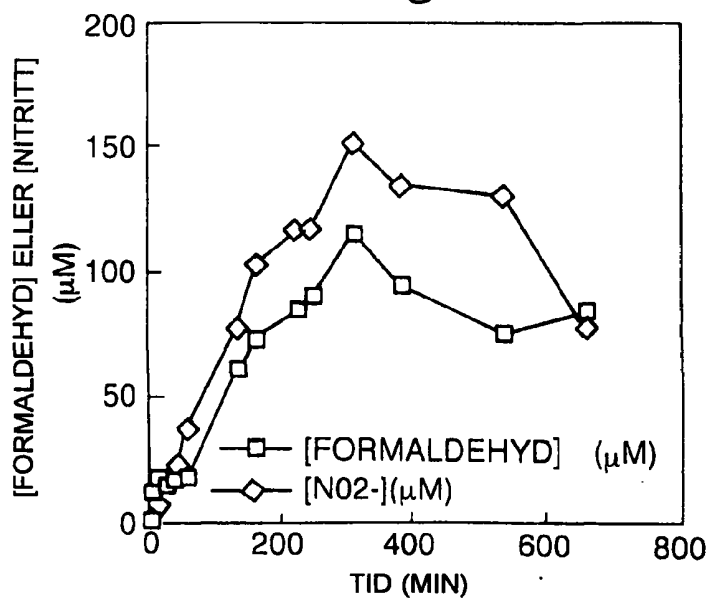


Fig.3.

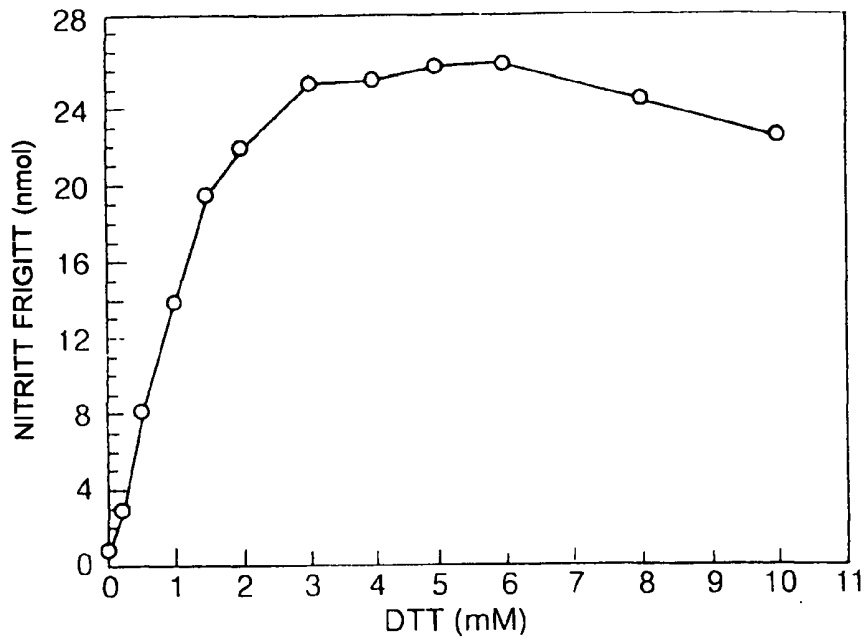


Fig.4.

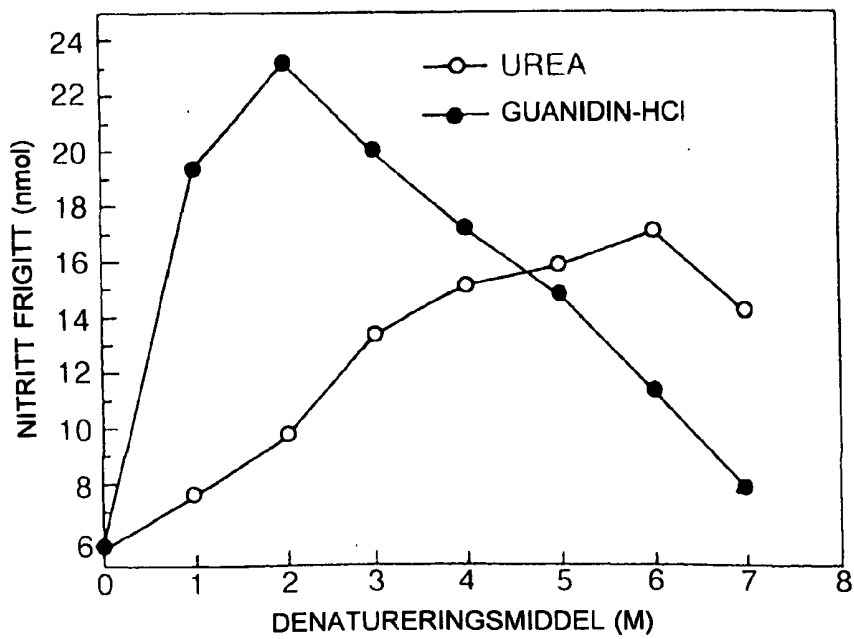


Fig.5.

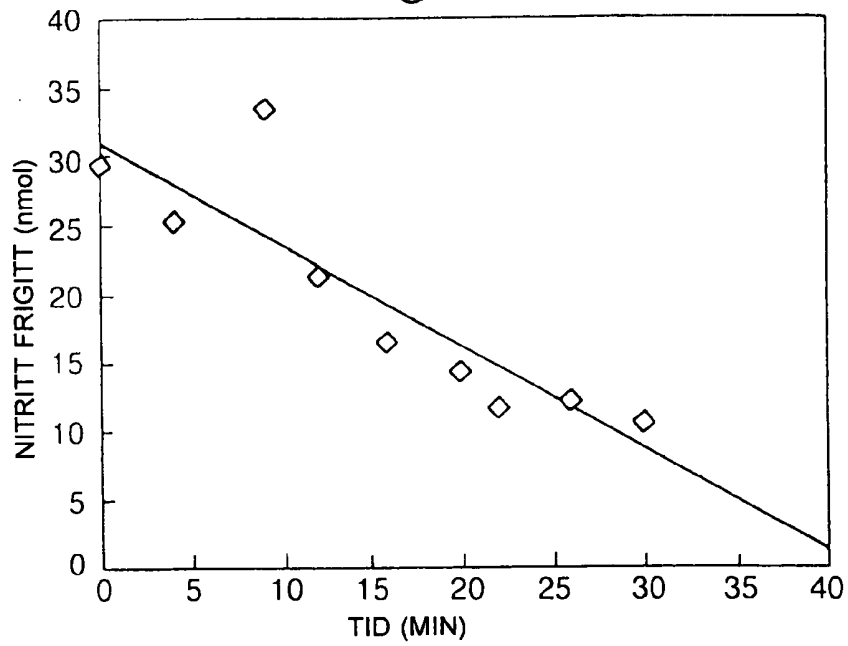


Fig.6.

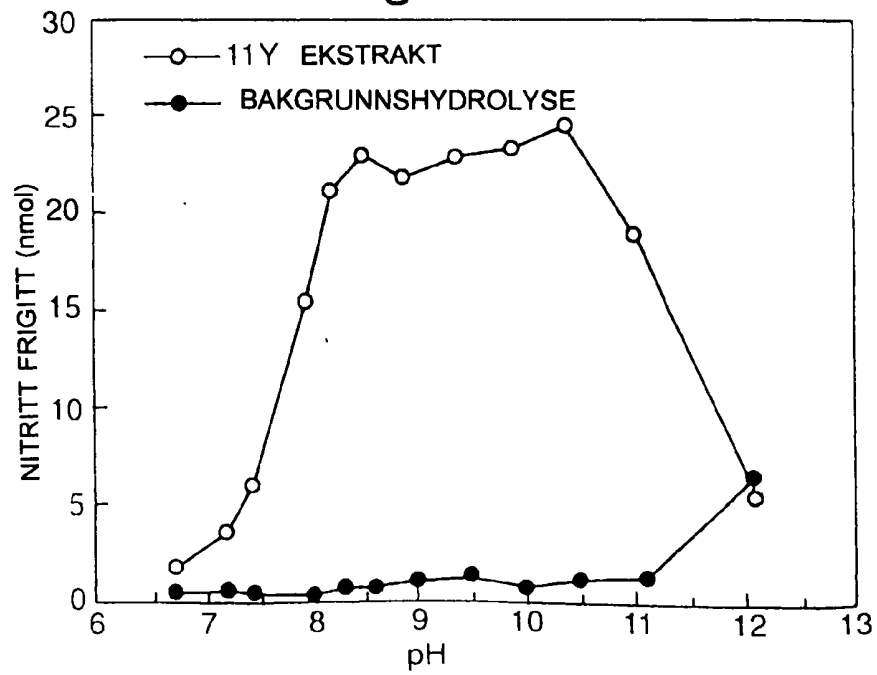


Fig.7.

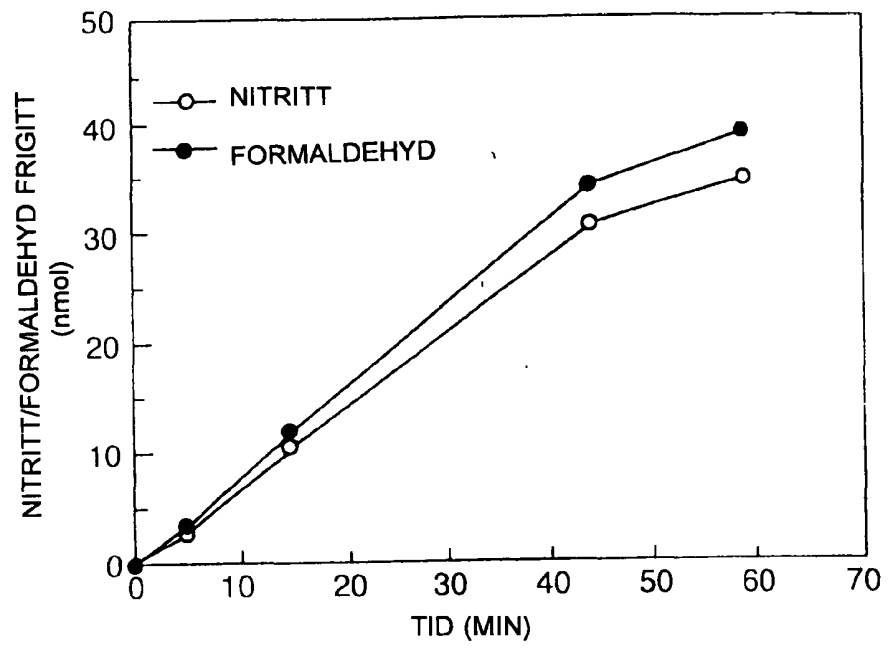


Fig.8.

