



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900342012
Data Deposito	14/01/1994
Data Pubblicazione	14/07/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	K		

Titolo

PROCESSO PER LA PRODUZIONE DELL'ENZIMA ACIDO 7BETA- (4-CARBOSSIBUTANAMIDO)- CEFALOSPORANICO ACILASI
--

* * * * *

MI94A/000311

DESCRIZIONE

14 GEN. 1994

La presente invenzione si riferisce ad un processo per la produzione di elevate quantità dell'enzima "acido 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico acilasi" (GA) che consiste nella coltivazione, in adatte condizioni colturali, di un ceppo ricombinante di *Escherichia coli* K12 e nella successiva estrazione dell'enzima dalla coltura ottenuta.

La produzione dell'enzima è posta sotto il controllo di un particolare sistema di espressione che può essere indotto dal Corn Steep Liquor, un componente del terreno di coltura a bassissimo costo. Inoltre, viene utilizzato in particolare un derivato di E.coli K12 che la normativa CEE considera "sicuro".

L'enzima può essere impiegato nella preparazione enzimatica dell'acido 7-amminoccefalosporanico a partire dall'acido 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico

In particolare, la realizzazione dell'invenzione ha comportato:

- l'isolamento di un gene che codifica per l'enzima 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico acilasi da Pseudomonas sp. 146H9 (NCIMB40474) e SY77-1 (FERM2410) mediante le tecniche del DNA ricombinante.
- il clonaggio di detto gene in un microorganismo del genere *Escherichia coli* K12 classificato come microorganismo "si-

my

curo" (classe P1).

- l'elevata produzione dell'enzima mediante fermentazione del suddetto ceppo di E.coli.
- l'estrazione e l'immobilizzazione dell'enzima per la preparazione enzimatica dell'acido 7-amminocefalosporanico a partire dall'acido 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico.

In natura, esistono diversi microorganismi capaci di produrre l'enzima 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico acilasi (GA). E' stato osservato che tale capacità è diffusa, in particolare nel genere Pseudomonas (Shibuya Y. et al (1981) Agr. Biol. Chem. 45, 1561; Matsuda A. et al (1985) J. Bacteriol. 163, 1222; Matsuda A. et al (1987) J. Bacteriol. 169, 5815; Aramori I. et al J. Ferm. & Bioeng. 72, 227 (1991)). La realizzazione di un qualsiasi procedimento industriale per la produzione dell'enzima GA è, comunque, ostacolata dai bassi livelli di produttività dei suddetti microorganismi (3-4 U/l).

Una via che è stata sperimentata con successo per ottenere significativi aumenti di produzione dell'enzima GA, consiste nell'impiegare le tecniche del DNA ricombinante. In pratica, questa tecnologia, consente di isolare il gene che codifica per l'enzima GA da un microorganismo produttore e trasferirlo in un ceppo di E.coli dove la sua espressione viene posta sotto la regolazione di un forte promotore.

Mediante questa tecnologia, Croux et al. (EP 0469919 A2)

hanno modificato un ceppo di E.coli K12 e, dopo coltivazione in un adatto terreno, hanno ottenuto un significativo aumento delle rese raggiungendo livelli di produzione di enzima pari a 3000 U/l. Il microorganismo utilizzato, però, è un wild type privo di repressori e, di conseguenza, la produzione dell'enzima non può essere regolata e controllata attraverso l'uso di induttori. Per le suddette ragioni, la normativa CEE fa rientrare tale microorganismo nella classe P 3 per la quale sono previste notevoli restrizioni.

Un altro esempio di miglioramento della capacità produttiva dei microorganismi attraverso le tecniche del DNA ricombinante è riportato nel brevetto EP 0504798 A1 (10000 U/l).

In questo caso viene utilizzato un derivato di E.coli K12 classificato come microorganismo "sicuro" appartenente alla classe P2, non soggetto quindi alle restrizioni di cui sopra. Il derivato di E.coli, contiene repressori che impediscono la produzione di attività enzimatiche se non in presenza di un opportuno induttore. Tuttavia, l'unico esempio di induttore riportato in letteratura è l'lPTG (isopropil BD-tiogalattopiranoside) sostanza avente costo elevato.

Ora, la Richiedente è riuscita sorprendentemente a trovare un sistema d'espressione del gene GA che può essere indotto da una sostanza a bassissimo costo quale il Corn Steep Liquor che è anche un componente del terreno di coltura.

Il sistema consente di produrre elevate quantità di enzima

anche quando, come ospite del sistema d'espressione, viene utilizzato un particolare derivato di E.coli K12, considerato molto sicuro (classe P1) dalle normative CEE.

Pertanto, la nostra invenzione si riferisce ad processo per la produzione di elevate quantità di 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico acilasi (GA) che comprende la coltivazione e l'induzione in un adatto terreno colturale di un ceppo di E.coli contenente la sequenza dell'acilasi e la successiva estrazione dell'enzima dalla coltura, caratterizzato dal fatto che come induttore viene utilizzato il Corn Steep Liquor e come microorganismo produttore un ceppo di E.coli scelto tra NCIMB40560, NCIMB40559, NCIMB40592 e NCIMB40593.

L'ottenimento del derivato alto produttore di E.coli ha comportato lo sviluppo di un procedimento che comprende i seguenti passaggi:

- a) digestione del DNA totale di un microorganismo che contiene la sequenza codificante l'enzima GA e costruzione di una libreria di DNA con batteriofagi;
- b) infezione di E.coli con i batteriofagi della libreria;
- c) riconoscimento dei cloni ospiti di E.coli contenenti una parte della sequenza acilasica mediante uso di antisiero purificato e specifico per l'acilasi in questione;
- d) screening dei cloni di E.coli contenenti la sequenza acilasica completa mediante ibridazione con una sonda costituita da una sequenze parziale del gene dell'acilasi e

- 
- determinazione dell'attività enzimatica degli stessi;
- e) isolamento del plasmide, caratterizzazione della regione di DNA necessaria alla sintesi del GA e inserimento della stessa in un vettore di forte espressione di E.coli;
 - f) modificazione del vettore a forte espressione al fine di eliminare la produzione di β -lattamasi di origine plasmidica da parte del ceppo ospite;
 - g) ottimizzazione della crescita di E.coli contenente il plasmide di espressione mediante fermentazioni discontinue (batch) e discontinue-alimentate (fed-batch) usando differenti fonti di carbonio e azoto;

Come donatori di DNA sono stati utilizzati i ceppi di Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474) e SY 77-1 (Ferm. 2410), capaci di produrre solo basse quantità dell'enzima GA (rispettivamente 3U/l e 4U/l).

Il DNA cromosomale è stato estratto, purificato e digerito parzialmente con enzimi di restrizione. I frammenti di DNA così ottenuti sono stati trattati alle loro terminazioni e quindi inseriti in un vettore batteriofago λ ZAP II (Stratagene). I batteriofagi ricombinanti sono stati piastrati con cellule di E.coli per formare una genoteca batteriofago lambda λ ZAP II di Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474) e SY77-1 (Ferm 2410).

Per lo screening della librerie costruite con il DNA genomico dei ceppi di Pseudomonas, sono stati preparati anticorpi in grado di riconoscere l'enzima GA secondo la seguente proce-

dura.

L'enzima GA, prodotto dal ceppo Pseudomonas 146H9, è stato prima purificato e poi iniettato in conigli. Si è quindi ottenuto l'antisiero GA- specifico la cui sensibilità si è dimostrata ottimale per lo screening della libreria (diluito 200-1000 volte è ancora in grado di riconoscere specificatamente 10-100 Pg di enzima GA depositato su carta da filtro di nitrocellulosa). La reazione positiva tra l'anticorpo e l'enzima non è stata alterata dall'aggiunta di lisato cellulare di E.coli al campione in esame. L'antisiero diretto contro il GA del ceppo di Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474) è anche in grado di riconoscere il GA purificato del ceppo di Pseudomonas SY77-1 (Ferm 2410).

Sono state così isolate sequenze parziali di DNA di GA.

Queste ultime, dopo essere state marcate e usate come sonde per saggiare le stesse genoteche, hanno permesso di isolare sequenze complete di GA.

Una ulteriore conferma della presenza dei geni dell'acilasi nelle librerie costruite con il DNA del ceppo di Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474 ed SY 77-1 (Ferm 2410) è avvenuta seguendo due diverse metodologie:

- 1) misura dell'attività acilasica delle colonie trasformate mediante HPLC o tecnica colorimetrica (Matsuda A. et al (1985) J. Bacteriol. 163, 1222; Matsuda A. et al (1987) J. Bacteriol 169; Aramori I. et al J. Ferm. & Bioeng. 72, 232

(1991)).

- 2) ibridazione con sonde di oligonucleotidi omologhe a sequenze già note del gene dell'acilasi e quindi in grado di riconoscere plasmidi contenenti i geni di interesse (EPO504798A1).

Le cellule di E.coli contenenti i plasmidi con le sequenze identificate hanno mostrato attività acilasica.

I frammenti di DNA contenenti il gene per GA sono stati inoltre ridotti eliminando il DNA adiacente non necessario per la codificazione dell'enzima.

I frammenti così ottenuti sono stati infine clonati in un vettore di espressione di E.coli e posti sotto la regolazione di un forte promotore inducibile.

L'induzione del promotore ha consentito di ottenere una attività acilasica, sia volumetrica che specifica, molto più alta rispetto ai ceppi donatori Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474) e SY77-1 (Ferm 2410).

Per l'isolamento del gene di GA in E.coli sono stati usati i vettori λ ZAP II e pBluescript SK+/- (Stratagene).

Per esprimere la proteina di fusione β /galattosidasi-GA in una genoteca sia di batteriofago che di colonie con plasmidi, possono comunque essere usati anche vettori come λ gt11, λ gt22 o plasmidi come la serie pUC o altri vettori aventi moduli di espressione per proteine di fusione.

In dettaglio il clonaggio dei geni dell'acilasi si è svol-

to come segue.

Il DNA cromosomale dei ceppi donatori è stato parzialmente digerito con un enzima di restrizione a taglio frequente e sono stati selezionati i frammenti risultanti in base alla loro grandezza; i frammenti appartenenti ad un range di grandezza desiderato sono stati trattati con enzimi che modificano il DNA come, ad esempio, la nucleasi (Bal31), per generare terminazioni casuali, e la DNA polimerasi (Klenow frammento), per riparare le suddette terminazioni. In seguito a questi frammenti sono stati legati dei linkers costituiti da oligonucleotidi fosforilati mediante T4 DNA ligasi. I frammenti trattati sono stati poi tagliati con un enzima di restrizione (che taglia la sequenza del linker) e quindi separati dai linker non legati mediante gel filtrazione. Il vettore di DNA (un batteriofago nel caso di una genoteca di fagi o un plasmide nel caso di una genoteca plasmidica) è stato anch'esso digerito con un enzima di restrizione che genera, sulle terminazioni del DNA, sequenze complementari a quelle presenti sui termini del DNA donatore modificato. Il vettore e i frammenti così ottenuti sono stati legati con T4 DNA ligasi. I vettori ricombinanti, risultanti dall'inserimento di uno o più frammenti di DNA del microrganismo donatore nel vettore, possono essere introdotti in un appropriato microorganismo quale E.coli XL1-Blue per via infettiva (genoteca di batteriofago) o con tecniche di trasformazione convenzionale come descritto in Mania-

tis, T et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor , New York, U.S.A. (genoteca plasmidica).

La genoteca viene seminata su piastre e indotta ad esprimere le proteine di fusione. Sulle piastre vengono, successivamente, poste delle membrane di Nitrocellulosa per legare le proteine prodotte. Le membrane vengono poi saggiate mediante test immunologico esponendole all'antisiero specifico per GA (ad opportuna diluizione) che rivela quale placca o colonia contiene una parziale sequenza di GA. Una volta individuato il vettore di interesse, viene fatta una mappa di restrizione dell'inserto.

Sempre utilizzando la genoteca sopra descritta, viene analizzato il suo DNA dopo averlo trasferito su membrana di Nitrocellulosa con la tecnica di "plaque o colony lifting" (Maniatis, T et al (1989)). Si utilizza quindi la tecnica di ibridazione DNA-DNA: la sonda marcata (con tecniche convenzionale usando il "Boehringer non radioactive labelling kit") costituita da un frammento vicino alla parte β -galattosidasica della proteina di fusione, è in grado di evidenziare la presenza del gene corrispondente all'enzima GA nella genoteca. In appropriate condizioni di ibridazione DNA-DNA, la sonda specifica per GA si lega solo ai vettori ricombinanti che contengono una parte o l'intero gene per il GA.

Le placche o le colonie così individuate, sono state poi

my

valutate per la capacità di produrre GA e, dell'inserto, è stata fatta la mappa di restrizione. Il frammento di DNA è stato poi ridotto alla lunghezza minima necessaria per la sintesi dell'attività acilasica e quindi trasferito alla cellula ospite E.coli. Definita la mappa di restrizione dell'inserto, si possono fare delle delezioni sul frammento di DNA con enzimi di restrizione o DNA nucleasi così da definire più precisamente la posizione del gene GA.

La mappa di restrizione è stata determinata mediante l'impiego di vari enzimi di restrizione mentre la quantificazione dell'attività acilasica è stata fatta con tecniche convenzionali di spettrofotometria o mediante uso di HPLC.

Il livello di espressione di GA in E.coli è stato incrementato mediante tecniche convenzionali di ingegneria genetica già note. Una di queste, prevede di porre il gene di interesse sotto il controllo di sequenze promotrici di E.coli come P_{lacUV5} , P_{tac} , P_{trc} , P_{trp} , P_{phoA} , P_{lpp} , P_L , P_R , $P_{\lambda 10}$ o altri promotori usati per l'espressione di geni in E.coli.

Nel nostro caso, il vettore ricombinante contenente il gene GA è stato digerito con vari enzimi di restrizione. I frammenti di DNA, così ottenuti, sono stati legati con l'uso di T4 DNA ligasi, a plasmidi come pBR322, pBluescript, pUC18, pACYC184 o altri plasmidi digeriti con enzimi di restrizione aventi siti compatibili con i frammenti che dovranno contenere. I vettori ricombinanti ottenuti sono stati poi introdot-

11/1

ti, mediante trasformazione, in un ceppo di E.coli come XL1 Blue. I trasformanti produttori di GA possono essere riconosciuti misurando l'attività acilasica dei loro estratti cellulari. La posizione del gene GA, sul frammento di DNA, è stata determinata mediante la mappa di restrizione del vettore ricombinante. Il frammento contenente il gene, viene ridotto in modo opportuno e viene quindi posto in un plasmide contenente una sequenza promotrice P_{tac} (de Boer, H. et al (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA80:21) per esempio pKK223-3 o pDR540, o una sequenza promotrice P_{trc} come pKK233-2 e pTrc99A (Pharmacia). Un vettore ricombinante, contenente il gene GA sotto il controllo del promotore P_{tac} , è usato per trasformare cellule di E.coli XL1 Blue, e l'attività GA dei trasformanti è saggiata come descritto sopra.

In questo modo sono stati ottenuti dei ceppi di E.coli in grado di produrre molta più GA di quanto siano capaci di fare ceppi di E.coli contenenti i soli geni GA derivati da Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474) e SY77-1 (Ferm 2410). L'alta resa produttiva, ottenuta in questa fase, deriva dall'impiego di sequenze promotrici specifiche per E.coli che determinano un'elevata espressione del gene. Il gene GA ha, infatti, un proprio promotore che funziona bene in Pseudomonas ma non in E.coli per cui il gene posto in quest'ultimo ospite si esprime poco. Il cambiamento del promotore comporta un sostanziale miglioramento del processo di questo brevetto.

I ceppi di E.coli usati per l'alta espressione dei geni di GA di Pseudomonas 146H9 (NCIMB 40474) e SY 77-1 (Ferm 2410) possono essere per esempio XL1 Blue, JM105, W3110, DH1, ecc.

Il gene per la resistenza all'ampicillina del vettore pKK223-3 (responsabile della produzione di β lattamasi di origine plasmidica) può essere sostituito dai geni per la resistenza alla tetraciclina, cloramfenicolo, canamicina, streptomicina o altri geni noti per la resistenza agli antibiotici.

La produzione di GA avviene facendo crescere i ceppi di E.coli ricombinanti in beute agitate o fermentatori contenenti un adatto terreno colturale.

La fermentazione può durare dalle 12 alle 90 ore.

Il terreno è composto da una fonte di carbonio quale ad esempio glucosio, lattosio, saccarosio, glicerolo, fruttosio, melasse, olii vegetali, ecc.; una fonte di azoto/vitamine quale ad esempio estratto di lievito, estratto di carne, farina di soia, farina di arachidi, Corn Steep Liquor etc. e sali minerali.

La temperatura di crescita è di 18-37°C e il pH 5-9.

La stabilità dei plasmidi durante le fermentazioni che richiedono un certo numero di generazioni può essere mantenuta mediante l'aggiunta di antibiotici.

E' stato osservato che la produzione di GA può essere migliorata con la tecnica di "fed-batch".

Tale tecnica consiste nel far crescere il ceppo ricombi-

nante di E.coli in un terreno a base di Corn Steep Liquor sino a uno stadio di equilibrio a cui corrisponde una crescita scarsa e poi raggiungere una crescita abbondante mediante l'aggiunta di una fonte di carbonio come glucosio o glicerolo.

La produzione di GA con i ceppi di E.coli con genotipo $lacI^q$ come JM105 o XL1 Blue o con $lacI^q$ presente sullo stesso plasmide di espressione, viene indotta mediante l'aggiunta di sostanze costose al brodo di fermentazione come, ad esempio, IPTG (isopropil β D-tiogalattopiranoside; EPO504798A1). L'IPTG provoca la derepressione dei promotori di E.coli derivati dal gene Lac (P_{lacUV5} , P_{tac} , P_{trc}).

Questa induzione necessaria e costosa può essere evitata usando Corn Steep Liquor nel brodo di fermentazione alla concentrazione di 1-20% v/v.

Quindi un risultato sorprendente della presente invenzione consiste nella possibilità di indurre il gene di GA, sotto il controllo del promotore P_{tac} in un ceppo di E.coli $lacI^q$, mediante l'uso di un componente del terreno a basso costo.

Inoltre, la presenza del Corn Steep, mantiene la stabilità del plasmide e l'espressione dell'enzima GA nel corso della fermentazione.

Il Corn Steep funge da induttore anche quando il plasmide ad alta espressione contenente il promotore di E.coli derivante dal gene Lac (per esempio P_{lacUV5} , P_{tac} , P_{trc}) si trova in ceppi di E.coli con genotipo Lac quali W3110 (ATCC27325) o DH1.

In questi casi, però, sono stati osservati problemi di stabilità del plasmide e, conseguentemente, di espressione del gene GA.

La produzione dell'enzima GA mediante un processo fermentativo che implica l'uso di un microorganismo ricombinante è soggetta alle normative CEE.

Questa classifica il microorganismo ospite secondo tre parametri: fattore di danno, fattore di espressione e fattore di accesso.

Il fattore di danno considera la natura del prodotto ottenuto con il microorganismo ricombinante: ad esempio, a GA viene attribuito un valore di 10^{-9} dato che questo enzima è costituito da una molecola chimicamente attiva ma non dannosa per gli esseri viventi.

Il fattore di espressione è 1, quando l'espressione per produrre il GA ricombinante è massima.

Il fattore di accesso infine dipende dal ceppo di E.coli e dal tipo di plasmide usato.

Ai ceppi wild type di E.coli che possiedono la capacità di svilupparsi nel colon umano, viene attribuito fattore di accesso 1; agli E.coli derivati dal ceppo K12 (esempio W3110) che non portano mutazioni debilitanti, viene attribuito fattore di accesso 10^{-3} ; mentre ceppi quali E.coli K12-derivati ma debilitati come XL1 Blue, JM105, DHI, etc. sono classificati con un fattore di accesso 10^{-6} .

msf

Il prodotto di questi tre fattori viene usato per classificare il microorganismo geneticamente modificato nelle cosiddette "containment categories". Nel nostro caso, la produzione di GA con un plasmide a forte espressione nei tre tipi di E.coli sopra menzionati, è rispettivamente di 10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} a cui corrispondono "containment category" rispettivamente pari a 0,1 e 2 (0 vuol dire che non è necessaria alcuna restrizione per l'impiego di questi microorganismi nei processi fermentativi su scala industriale; viceversa il valore 2 vuol dire obbligo di severe restrizioni).

Il GA prodotto dal microorganismo ricombinante può essere recuperato dopo aver separate le cellule dal terreno colturale mediante centrifugazione.

Si procede quindi alla rottura delle cellule con metodi convenzionali quali sonicazione, shock osmotico, pressione, lisi enzimatica (lisozima), ecc. e alla purificazione dell'enzima GA dall'estratto cellulare mediante precipitazione, tecniche cromatografiche e uso di membrane.

E' stato trovato che, con un semplice gradiente di solfato di ammonio (30-55%) ed una cromatografia a scambio anionico debole (DEAE-Sephacel, Pharmacia), enzimi quali esterasi o β -lattamasi (che possono distruggere o modificare il substrato e il prodotto della reazione catalizzato dal GA) possono essere eliminati completamente dalle frazioni contenenti GA.

Il vantaggio che ne deriva è di ottenere l'enzima suffi-

cientemente purificato per poter essere immobilizzato, senza dover utilizzare ceppi di E.coli incapaci di produrre esterasi o β -lattamasi o di dover sostituire la loro resistenza all'ampicillina con la resistenza ad altri antibiotici.

Gli estratti enzimatici parzialmente purificati e concentrati possono essere immobilizzati per reazione con supporti inerti appropriati (come per esempio Eupergit C).

L'enzima immobilizzato è usato ciclicamente per la trasformazione di soluzioni di GL-7ACA e per l'isolamento di 7ACA con tecniche note.

Gli esempi che seguono servono ad illustrare ulteriormente il procedimento secondo la presente invenzione e non devono essere intesi come limitazioni della portata della stessa quale è indicata nelle rivendicazioni allegate.

ESEMPIO 1

Preparazione dell'anticorpo.

L'enzima GA di cellule di Pseudomonas 146H9 (NCIMB 40474) è stata purificato con metodi convenzionali, sino a omogeneità. La preparazione e il saggio dell'anticorpo è una tecnica immunologica convenzionale. Tutte le operazioni di purificazione sono state condotte al di sotto di 5°C se non diversamente specificato. L'attività di GA è stata misurata secondo il metodo di Balasingham modificato per 7ACA invece di 6APA (Balasingham, K. et al Biochim. Biophys. Acta (1972), 276:250); 1U è la quantità di enzima richiesto per liberare 1 μ mol di acido

7-ammino-cefalosporanico in 1 minuto a 37°C e a pH ottimale 7-11.

ESEMPIO 2

1. Purificazione dell'enzima GA derivato dal Pseudomonas sp 146H9 (NCIMB 40474)

a. Le cellule sono raccolte dal brodo di fermentazione mediante centrifugazione in continuo a 12000 g. Le cellule sedimentate sono conservate a -20°C; 100 g di pellet cellulare congelato è sospeso in 300 ml di tampone start (50mM Tris.Cl, 0.1M NaCl pH8.0) e sottoposto a sonicazione (sei trattamenti di 5 minuti a 200 W con raffreddamento negli intervalli) sino a rottura completa delle cellule. Il pellet non lisato e il "debris" vengono rimossi mediante centrifugazione a 25000 g per 45 min.

b. Gradiente di Solfato di Ammonio 30-55%.

Il solfato d'ammonio solido viene aggiunto all'estratto cellulare (cell-free extract, c.f.e.) mantenuto sotto agitazione con agitatore magnetico e a 0°C. Il pH è mantenuto a 8.0 con NH₄OH.

Il precipitato formatosi dopo un'ora dall'aggiunta della frazione di sale che determina una soluzione al 30% saturazione è centrifugato a 4000 g per 45 min. a 0°C. Vengono quindi aggiunte al surnatante altre porzioni di solfato d'ammonio solido, come descritto sopra, sino ad ottenere una soluzione al

55% di saturazione. Dopo agitazione per un'ora a 0°C il precipitato è raccolto mediante centrifugazione (come sopra), sciolto in start buffer fresco e dializzato contro lo stesso tampone.

c. Cromatografia su Colonna DEAE-Sephacel.

Il dializzato contenente l'enzima GA ottenuto come descritto al punto b è stato caricato su una colonna (500x32mm diametro interno (d.i.) V=200ml) di DEAE-Sephacel precedentemente equilibrata con start buffer. Dopo lavaggio della colonna con 100ml start buffer, l'enzima GA è stato eluito con un gradiente lineare di NaCl (0.1→35M, 400ml in ciascun contenitore) in 50mM Tris.Cl pH 8.0.; la colonna è stata alimentata in tutte le fasi della purificazione con un flusso pari a 40ml/ora e le frazioni raccolte sono di 20ml. Le frazioni contenenti GA sono state riunite, concentrate mediante ultrafiltrazione a 100ml e dializzate contro 50mM Tris.Cl 0.1M NaCl pH 8.8 (Q-start buffer).

d. Cromatografia su Colonna Q-Sepharose fast flow.

Il dializzato contenente l'enzima GA ottenuto al punto c è stato caricato su una colonna (500x32mm diametro interno (d.i.) V=200ml) di Q-Sepharose fast flow precedentemente equilibrata con Q-start buffer. Dopo lavaggio della colonna con 100ml Q-start buffer, l'enzima GA è stato eluito con un gradiente lineare di NaCl (0.1→0.35M, 400ml in ciascun contenitore) in 50mM Tris.Cl pH 8.8; la colonna è stata alimentata in

tutte le fasi della purificazione con un flusso pari a 20ml/ora e le frazioni raccolte sono di 10ml ciascuna. Le frazioni contenenti GA sono state riunite, concentrate per ultrafiltrazione a 15ml e dializzate contro 10mM sodio fosfato pH7, solfato d'ammonio al 30% saturazione (HIC start buffer).

e. Cromatografia su Colonna Octyl-Sepharose CL4B .

La soluzione dell'enzima GA ottenuta nel passaggio precedente è stata caricata su colonna (500x16mm d.i.; V=30ml) di Octyl-Sepharose CL4B precedentemente equilibrata con HIC start buffer. Dopo lavaggio della colonna con 30ml HIC start buffer, l'enzima GA è stato eluito simultaneamente con gradienti lineari di solfato d'ammonio a saturazione (30%→0%) e glicol etilenico (0→40%) 250ml in ciascun contenitore in 10mM Sodio Fosfato pH 7.0; la colonna è stata alimentata, durante tutte le fasi della purificazione con un flusso pari a 10ml/ora e sono state raccolte frazioni di 10ml. Le frazioni contenenti GA sono state riunite e concentrate per ultrafiltrazione a 4ml.

f. Gel Filtrazione con Sephacryl S200HR.

La soluzione dell'enzima GA ottenuta nel passaggio e. è stata caricata ed eluita in una colonna (100x16mm i.d, V=160ml) di Sephacryl S200HR precedentemente equilibrata con 50mMTris.Cl 0.2M NaCl pH8.0; la colonna è stata alimentata in tutte le fasi della purificazione con un flusso di 4ml/ora e sono state raccolte frazioni di 2ml. Le frazioni contenenti l'enzima GA

sono state conservate.

Tabella 1.

Purificazione di GA da Pseudomonas 146H9 usando un gradiente di Solfato di Ammonio, cromatografia a scambio ionico, cromatografia ad interazione idrofobica e gel filtrazione.

passaggio/ frazione	frazioni combinare [ml]	proteine totali [mg]	attività GA [U]	resa [%]	attività specifica [U/mg]
a/c.f.e	300	6500	65	100	0.01
b/30-55% am.solf.	110	2500	52	80	0.02
c/DEAE	120	656	49	75	0.07
d/Q-Seph.	100	208	45	69	0.22
e/Octyl	150	22.6	37	57	1.63
f/S200HR	14	14.5	28.3	44	1.95

g. PAAGE Non-denaturante.

La frazione del picco della gel filtrazione è stata ulteriormente purificata mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide (PAAGE) non-denaturante. Dopo colorazione di un segmento del gel, sono state osservate una banda maggiore e quattro bande minori. Il segmento colorato è stato quindi allineato con il resto del gel ed è stata tagliata la parte corrispondente non colorata.

Si è quindi valutata l'attività enzimatica di GA contenuta nel gel così isolato dimostrando che essa è solo nel segmento del gel corrispondente alla banda proteica maggiore.

L'acilasi è stata allora elettroeluita dal gel posto all'interno di una membrana da dialisi (con taglio di 12kD) e quindi

in tampone 37.6mM Tris.Cl 40mM Glycine pH8.48, per 6 ore a 100 Volt e 5°C. Il tampone è stato quindi eliminato tranne gli ultimi 200ml utilizzati per risospendere il GA presente sulla membrana; la sospensione così ottenuta è sottoposta a PAAGE denaturante.

h. PAAGE denaturante.

L'acilasi recuperata con l'elettroeluizione è stata sottoposta a denaturazione (bollitura per 5 min in 0.1% Sodio dodecilsolfato (SDS) e β -mercaptoetanololo e elettroforesi su gel 0.1% SDS PAAGE con standard di peso molecolare noto. La colorazione con Coomassie Brilliant Blue o Silver staining ha evidenziato due bande di peso molecolare 18 kD e 50 kD; queste corrispondono rispettivamente alla α -subunità e alla β -subunità dell'enzima. Alcune frazioni del picco della gel filtrazione sottoposte a SDS-denaturante PAAGE e, successivamente elettroeluite, hanno consentito di ottenere alcuni milligrammi di enzima GA denaturato puro.

i. Il GA denaturato puro del passaggio h. è stato miscelato con "complete Freund's adjuvant (Sigma)" e la miscela ottenuta è stata iniettata in conigli bianchi maschi Neo-zelandesi per tre volte ad una dose di 2mg/iniezione al fine di produrre anticorpi. Sono stati quindi raccolti campioni di sangue dai quali è stato separato il siero. Questo è stato trattato a 56°C per 30 min. e quindi precipitato con solfato d'ammonio al 35% di saturazione. Il precipitato è stato purificato con pro-

teina-Sepharose CL-4B (Pharmacia) per ottenere gli anticorpi. Il Dot blot testing ha confermato che gli enzimi GA dei ceppi di Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474) and SY77-1 (Ferm2410) e l'antisiero purificato come descritto sopra reagiscono tra loro dando un immunoprecipitato. La frazione IgG (immunoglobulin G) ottenuta da un coniglio di controllo, a cui non era stato iniettato GA, non ha mostrato nessuna immunoprecipitazione con gli enzimi GA.

2. Formazione di una genoteca con il DNA dei ceppi Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474) e SY77-1 (Ferm2410).

Sono state costruite genoteche con il DNA dei ceppi di Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474) e SY77-1 (Ferm2410) in λ ZAPII mediante le tecniche convenzionali del DNA ricombinante, come descritto in Maniatis, T. et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.(1989)). Gli enzimi sono stati impiegati nel modo indicato dai rispettivi fornitori. Il DNA genomico è stato estratto da Pseudomonas sp. 146H9 e SY77-1 col metodo descritto in Silvahy T. et al (Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A. (1984)). Il DNA genomico (25 μ g) è stato digerito parzialmente con Sau3AI (2U) a 37°C per un'ora e il digerito è stato sottoposto ad elettroforesi su un gel di agarosio (0.4%, 16 ore, 15 V) al fine di ottenere una frazione di DNA purificata di grandezza media pari a 4-10 kb. Il DNA di grandezza

MJ

desiderata è stato modificato con Bal31 nucleasi (10U, 37°C, 30 min.); la reazione è stata bloccata mediante estrazione con fenolo/cloroformio e precipitazione con etanolo. Le terminazioni dei frammenti casuali di DNA così ottenuti, sono stati riparati con Klenow DNA polimerasi (10U), dNTP's in nick-translation buffer (1 ora, 22°C) e legati con T4 DNA ligasi (tutta la notte a 16°C) a 5µg EcoRI-linkers fosforilati e quindi digeriti con 200U EcoRI (4 ore, 37°C). Il DNA è stato separato dall'eccesso di EcoRI linkers con cromatografia su colonna di Sepharose CL4B (Sigma) per ottenere frammenti EcoRI di grandezza media compatibile pari a ca. 5kbp. 0.1 µg di questo DNA è stato legato a 1µg di batterofago ZAPII, tagliato precedentemente con EcoRI e defosforilato (Stratagene), mediante T4 DNA ligasi (volume totale della reazione 5 µl) a temperatura ambiente (t.a.) per 1 ora e a 4°C per tutta la notte.

La miscela ottenuta è stata sottoposta a "in vitro packaging" usando "Gigapack Gold estratti di packaging" (Stratagene). La formazione di placche usando E.coli XL1 Blue come ospite, ha originato ca 100.000 placche. In presenza di X-gal e IPTG, sono state osservate ca. il 95% di placche bianche e il rimanente blu. Si è così costruita una genoteca di DNA genomica costituita da circa 100.000 cloni.

Una miscela di coltura (0.2ml) di E.coli XL I-Blue, la genoteca λZAPII: Pseudomonas146H9 o SY77-1 (ca 30.000 cloni) sopra descritta e 7ml di top agar sono stati versati su una

Mf

piastra di LB agar (140mm) incubata poi a 42°C per 4 ore. Sulla piastra è stata quindi deposta una membrana di nitrocellulosa (134mm di diametro; Millipore), dopo essere stata immersa per un'ora in una soluzione 10 mM di IPTG e successivamente asciugata a temperatura ambiente sempre per un'ora. Il tutto viene incubato per 3.5 ore a 37°C al fine di consentire ai geni di essere espressi ed ai loro prodotti di essere trasferiti sulla membrana. Questa tecnica, considerata molto efficace, richiede però una giusta preparazione dei frammenti di DNA della genoteca: l'inizio di qualsiasi gene di Pseudomonas che viene inserito, deve porsi in modo tale da consentire ai 39 aminoacidi NH₂ terminali della β-galattosidasi del gene lacZ' di trovarsi in "reading frame" rispetto ad esso (questo è il motivo per cui le terminazioni del DNA di 146H9 and SY77-1 sono state modificate).

Delle circa 30.000 placche saggiate con il "blotting" usando un "picoBlue immunodetection kit" (Stratagene) e l'antisiero specifico per il GA, è stata trovata una placca positiva. Il saggio è stato eseguito secondo la metodica descritta dalla casa produttrice del kit. Dopo l'espressione delle proteine di fusione queste sono state fissate su membrana con gelatina. La membrana è stata incubata con l'antisiero specifico per l'enzima GA, neutralizzata con lisato di E.coli (incluso nel kit) e poi con IgG specifico per gli anticorpi del coniglio e coniugata con la fosfatasi alcalina (incluso nel kit).

Mj

Nella successiva reazione cromogena, il clone positivo ha dato delle macchie blu-violetto, mentre i cloni negativi e l'antiserio di controllo del coniglio non hanno dato alcuna macchia.

La placca risultata positiva è stata quindi sottoposta al protocollo in vivo excision (Stratagene λ ZAPII cloning kit); il plasmide pWE56.4, recuperato con questa metodica, contiene nel gene di lacZ' un pezzo interno del gene per GA di Pseudomonas 146H9 (NCIMB40474) e il plasmide pZAP1.1 contiene quello di Pseudomonas SY77-1 (Ferm2410). L'orientamento del gene è da P_{lac} in poi.

3. Clonaggio dei geni GA dei ceppi Pseudomonas sp. 146H9 e SY77-1.

Il plasmide pWE56.4 contiene un frammento di Pseudomonas 146H9 DNA di ca 2.5 kbp, con almeno una parte del DNA che codifica per GA avendo formato una proteina di fusione che risponde positivamente al test di antigenicità per lo stesso enzima. Per definizione, questo frammento non può avere l'intero gene per GA. Un frammento SacII-SalI di ca 1.2 kbp è stato isolato dal plasmide pWE56.4 e marcato con digoxigenin-dUTP (Boehringer non radioactive labelling kit) per utilizzarlo come sonda di DNA. La stessa genoteca λ ZAPII Pseudomonas 146H9 è stata saggiata per trovare placche contenenti DNA che ibridizza con questa sonda. E' stata evidenziata una placca positiva tra 10.000 placche esaminate.

I plasmidi corrispondenti sono stati estratti seguendo il



protocollo in vivo excision e cellule di E.coli, trasformate con lo stesso plasmide chiamato pWE3.1 (fig. 1), sono state saggiate per la capacità di idrolizzare GL-7ACA a 7ACA. E' stato trovato che il plasmide pWE3, contiene un frammento di 10 kbp di Pseudomonas sp. 146H9 DNA ed è capace di trasferire a E.coli l'attività acilasica (tabella 2). Non sono stati trovati siti per EcoRI, HindIII, BamHI, BclI, KpnI, ScaI, HpaI, MluI, PvuI, PvuII, Asp718, DraI, SmaI su questo frammento. La posizione dei siti per SacII, PstI, XbaI, EcoRV, BglII sono descritti in fig.1.

Il plasmide pZAP1.1 porta un frammento di Pseudomonas SY77-1 DNA di 3kbp, contenente almeno una parte del DNA codificante per GA perchè in grado di codificare una proteina di fusione che risponde positivamente al test di antigenicità contro l'enzima GA. Per definizione, questo frammento non può contenere l'intero gene per GA. Da questo plasmide pZAP1.1 è stato isolato un frammento EcoRI-PstI di 0.6 kbp ed è stato marcato con digoxigenin-dUTP (Boehringer non radioactive labelling kit) per poterlo usare come sonda di DNA.

Con la sonda è stata saggiata anche la genoteca λ ZAPII di Pseudomonas SY77-1 ed è stata individuata una placca, tra 7000 esaminate, capace di ibridizzare con la sonda stessa.

I plasmidi corrispondenti sono stati estratti secondo la procedura in vivo excision, ed utilizzati per trasformare cellule di E.coli; le cellule contenenti il plasmide, chiamato



pWG2, sono state poi valutate per la capacità di idrolizzare GL-7ACA a 7ACA.

Il Plasmide pWG2 contiene un frammento di 3 kbp Pseudomonas sp. SY77-1DNA capace di trasformare E.coli in un ceppo acilasi-positivo (tabella2).

4. Riduzione del DNA per trovare la zona essenziale per GA.

Il plasmide pWE3.1(1 μ g) è stato tagliato con XbaI ed è stato isolato mediante elettroeluzione, un frammento di 7kbp richiuso poi nuovamente con con T4 DNA-ligasi. Cellule di E.coli XL1Blue sono state trasformate con la stessa miscela e il plasmide risultante, pWE2.20, è stato isolato. La delezione di un frammento XbaI di 6kbp da pWE3.1 ha generato pWE2.20 con un'attività enzimatica simile (tabella 2). Il gene che codifica per GA di Pseudomonas 146H9 deve essere localizzato su un frammento di DNA 4 kbp tra i siti EcoRI e XbaI .

Si considera che l'inserto di 3 kbp di pWG2, avente il GA gene di SY77-1, sia già abbastanza ridotto per essere trasferito ad un vettore di espressione.

5. Clonaggio dei geni per il GA in un vettore di espressione procariotico.

Il frammento di 4 kbp EcoRI-XbaI di pWE3.1, contenente il gene di GA di Pseudomonas 146H9, è stato clonato in pKK223-3 (Pharmacia) che utilizza il promotore ibrido triptofano/lattosio (P_{lac}) come segnale di espressione forte e inducibile. Il frammento di EcoRI-XbaI (1 g) è stato soltanto modificato al

sito di XbaI con Klenow DNA polimerasi (2U) riempiendo (parzialmente) il sito con 0.2mM dCTP e dTTP in "nick-translation buffer" (1 ora t.a.), in modo da avere un frammento da poter clonare in pKK223-3 digerito EcoRI-HindIII.

Il risultante plasmide pWE4.3.1 (fig.2) è usato per trasformare E.coli XL1Blue in cellule GA-positive; le cellule trasformate hanno mostrato un'attività acilasica pari a 60U/l, che è 30 volte superiore all'attività trovata con pWE3.1 e circa 20 volte superiore a quella del ceppo di Pseudomonas originale.

Il ceppo XL1Blue (pWE4.3.1) è stato depositato con numero di collezione NCIMB40560.

Il frammento di 3 kbp di EcoRI del plasmide pWG2, contenente il gene dell'enzima GA di Pseudomonas SY77-1, è stato clonato nel sito EcoRI di pKK223-3 e, con la miscela di ligazione, è stato trasformato E.coli XL1Blue.

Dai trasformanti ottenuti, è stato isolato il plasmide pCS19.1 (fig.3), sovraproduttore di GA.

Il ceppo XL1Blue (pCS19.1) è stato depositato con il numero di collezione NCIMB40559.

Il plasmide pCS19.1 è stato anche usato per trasformare W3110 (ATCC27325) e DH1. Questi ceppi hanno entrambi un genotipo Lac⁺.

Il vettore pKK223-3 è stato inoltre modificato inserendo al posto della resistenza all'Ampicillina quella alla Tetraci-

clina ed eliminando così le β -lattamasi derivanti dal plasmide. A tale scopo è stato isolato dal plasmide pBR322 il frammento di DNA *Ava*I-*Hind*III di circa 1,4 Kb che contiene il gene per la resistenza alla Tetraciclina. Questo frammento di DNA è stato trattato con l'enzima Klenow DNA polimerasi in modo da formare terminazioni del tipo "blunt". Il vettore pKK 223-3 è stato invece tagliato nel sito *Sca*I interno al gene per la resistenza all'Ampicillina e poi defosforilato. Il frammento ed il vettore così ottenuti sono stati legati con T4 DNA ligasi a 16°C per una notte e la miscela ottenuta è stata utilizzata per trasfermare E.coli JM105. Le colonie resistenti alla Tetraciclina (50µg/ml) contengono il plasmide pTet tac (fig. 4).

Questo plasmide è stato poi isolato (10µg) e incubato a 37°C per 1 ora con 100 U di enzima *Eco*RI e quindi defosforilato; è stato inoltre tagliato dal plasmide pWG2, con l'enzima *Eco*RI, il frammento di 3Kb, contenente il gene GA di SY77-1. Il vettore linearizzato ed il frammento così ottenuti sono quindi stati legati con T4 DNA ligasi. Si è così ottenuto il plasmide pWB14 (fig. 5), nel caso in cui il gene GA sia orientato nella stessa direzione del promotore P_{tac} , e il plasmide pWB1 (fig. 6) nel caso in cui il gene GA sia orientato nella direzione opposta al promotore P_{tac} (la sua espressione è così indipendente dal P_{tac}).

Sia il plasmide pWB14 che pWB1 consentono di ottenere

l'enzima GA come pCS19.1 ma non le β lattamasi sostituite dalla resistenza alla Tetraciclina; inoltre l'enzima GA non risulta, in pWB1, sotto il controllo del promotore P_{tac} .

Tabella 2.

Attività acilasica dei ceppi citati nel brevetto.

ceppo	plasmide	brodo	attività U/l	attività specifica U/g proteine totale
		NB	3	4
<u>E.coli</u> XL1-Blue	pWE3.1	LB/Tc+Ap	2	4
<u>E.coli</u> XL1-Blue	pWE2.20	LB/Tc+Ap	3	5
<u>E.coli</u> XL1-Blue	pWE4.3.1	LB/Tc+Ap	10	23
<u>E.coli</u> XL1-Blue	pWE4.3.1	LB/Tc+Ap+IPTG	60	134
<u>E.coli</u> XL1-Blue	pWE4.3.1	CSL/Tc+Ap	55	121
<u>E.coli</u> XL1-Blue	pWE4.3.1	CSL/ fedbatch+ +glucosio	6000	125
<u>Pseudomonas</u> SY77-1		NB	4	5
<u>E.coli</u> XL1Blue	pWG2	LB/Tc+Ap	3	6
<u>E.coli</u> XL1Blue	pCS19.1	LB/Tc+Ap	22	48
<u>E.coli</u> XL1Blue	pCS19.1	LB/Tc+Ap+IPTG	140	279
<u>E.coli</u> W3110	pCS19.1	LB/Tc+Ap	136	269
<u>E.coli</u> DHI	pCS19.1	LB/Tc+Ap	135	284
<u>E.coli</u> XL1Blue	pCS19.1	CSL/Tc+Ap	307	410
<u>E.coli</u> XL1Blue	pCS19.1	CSL/fedbat-ch +glucosio	9780	849
<u>E.coli</u> JM 105	pWB14	LB/Sm+Tc+IPTG	135	250
<u>E.coli</u> JM 105	pWB14	CSL/Sm+Tc	330	355
<u>E.coli</u> JM 105	pWB1	LB/Sm+Tc	140	100
		LB/Sm+Tc+IPTG	130	195
		CSL/Sm+Tc	787	280

ESEMPIO 2.

Questo esempio considera la produzione dell'enzima GA del ceppo di E.coli XL1Blue (pWE4.3.1) ottenuto come descritto nell'esempio 1.

- Il ceppo è conservato a -40°C in terreno YT-glicerolo

(composizione: glicerolo 15%, bacto-estratto di lievito 0.7%, bacto-triptone 0.4%, NaCl 0.4%, Tetraciclina 10µg/ml, Ampicillina 50µg/ml).

- Un'ansata del ceppo conservato su terreno YT-glicerolo è stata strisciata su una piastra petri con LB Agar (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Agar 1.5%, Tetraciclina 10µg/ml, Ampicillina 50µg/ml) e la piastra è stata incubata per una notte a 37°C.
- Una provetta sterile con 2 ml di terreno LB+Tc+Ap (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Tetraciclina 10µg/ml, Ampicillina 50µg/ml) è stata inoculata con una colonia singola della piastra di LB Agar e incubata per 16 ore a 30°C e posta in agitazione a 200 rpm.
- Una beuta di 500ml con 100ml di terreno LB+Tc+Ap+IPTG (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Tetraciclina 10µg/ml, Ampicillina 50µg/ml, IPTG 1mM) è stata inoculata con 100µl di coltura LB, incubata per 24 ore a 30°C e posta in agitazione a 300 rpm.

L' OD550 della coltura era 6.0.

- Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min e succesivamente risospese, nello stesso volume originale, in 0.1M Tris.Cl 0.05M NaCl pH8.0. Sono state, poi, rotte

per sonicazione e si è valutata l'attività dell'enzima GA nell'estratto cellulare mediante tecnica colorimetrica.

L'attività di GA era 60 U/l, che risulta essere 20 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp. 146H9.

ESEMPIO 3

Questo esempio si riferisce alla fermentazione di E.coli XL1Blue (pWE4.3.1) in un terreno di fermentazione nuovo per la produzione dell'enzima GA.

L'inoculo è stato preparato come descritto nell'esempio 2.

Una beuta di 500ml con 100 ml di terreno CSL (composizione: Corn-Steep Liquor della Società Piemontese Amido Derivati- 14%, Tetraciclina 10µg/ml, Ampicillina 50µg/ml, pH7.5) è stata inoculata con 100µl di coltura LB e incubata per 24 ore a 30°C in agitazione a 300 rpm. L'OD550 della coltura era 6.5.

Le cellule sono state centrifugate a 5000rpm per 10 min e successivamente risospese, nello stesso volume originale, in 0.1M Tris.Cl 0.05M NaCl pH 8.0. Le cellule sono state rotte per sonicazione e l'attività dell'enzima GA dell'estratto cellulare è stata titolata con metodo colorimetrico.

E' stata riscontrata un'attività di 55 U/l che è circa 18 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp. 146H9.

ESEMPIO 4

Questo esempio si riferisce ad un nuovo tipo di fermentazione

di E.coli XL1Blue (pWE4.3.1) per la produzione dell'enzima GA.

L'inoculo è stato preparato come descritto nell'Esempio 2.

Una beuta da 500ml con 100ml di terreno LB+Tc+Ap (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Tetraciclina 10µg/ml, Ampicillina 50µg/ml) è stata inoculata con 100µl di coltura in LB e incubata per 24 ore a 30°C e a 300rpm. L'OD550 della coltura era 6.0.

- Un fermentatore (2 l, INFORS HG) con 1.5 l di CSL (composizione: Corn Steep Liquor 14%, pH 7.5) è stato inoculato con 100 ml della coltura in LB. I parametri della fermentazione erano: T 30°C, agitazione 1300 rpm, flusso d'aria 1 vvm per 20 ore sino a OD550 = 6.0. Per le successive 10 ore alla coltura è stata aggiunta una soluzione di glucosio o glicerolo (50% w/v) con un flusso continuo prima di 1,5 ml/l.hr e poi 6 ml/l.hr per ca 15 ore mantenendo il pH a 7.5 (con 5M NaOH) e l'ossigeno disciolto tale da avere pO₂=10%. La crescita finale osservata era OD550 pari a 90. Alla fine della coltura la biomassa accumulata era di 89 g/l (peso secco 18 g/l).

Il plasmide pWE4.3.1 era ancora presente nel 70% delle cellule dopo 54 ore di fermentazione in corrispondenza della massima produzione.

Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min e successivamente risospese, nello stesso volume originale, in

0.1M Tris.Cl 0.05M NaCl pH 8.0. Le cellule sono state rotte per sonicazione e nell'estratto cellulare è stata titolata colorimetricamente l'attività di GA. E' stata trovata un'attività GA pari a 6000 U/l che è 2000 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas 146H9.

ESEMPIO 5.

Questo esempio considera la produzione dell'enzima GA di E.coli XL1Blue (pCS19.1) ottenuto come descritto nell'esempio 1.

L'inoculo è stato preparato come descritto nell'esempio 2.

Una beuta di 500ml con 100ml di terreno LB+Tc+Ap+IPTG (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Tetraciclina 10µg/ml, Ampicillina 50µg/ml, IPTG 1mM) è stata inoculata con 100 µl della coltura in LB e incubata per 24 ore a 30°C e a 300rpm. L'OD550 della coltura era 6.0.

Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min e successivamente risospese, nello stesso volume originale, in 0.1M Tris.Cl 0.05M NaCl pH8.0. Le cellule sono state rotte per sonicazione e nell'estratto cellulare è stata titolata l'attività enzimatica di GA. E' stata trovata un'attività di GA pari a 140 U/l che è 35 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp. SY77-1.

ESEMPIO 6.

Questo esempio considera la produzione di enzima GA da

parte di E.coli W3110 trasformato con pCS19.1.

Il ceppo è conservato a -40°C in terreno YT-glicerolo (composizione: glicerolo 15%, bacto-estratto di lievito 0.7%, bacto-triptone 0.4%, NaCl 0.4%, Ampicillina 50 $\mu\text{g/ml}$).

Il ceppo, cresciuto su terreno YT-glicerolo, è stato seminato con un'ansa, su una piastra Petri contenente LB Agar+Ap (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Agar 1.5%, Ampicillina 50 $\mu\text{g/ml}$) e la piastra è stata posta ad incubare per una notte a 37°C .

Una provetta sterile con 2 ml di terreno LB+Ap (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Ampicillina 50 $\mu\text{g/ml}$) è stata inoculata con una colonia singola della piastra di LB Agar ed incubata per 16 ore a 30°C e a 200 rpm.

Una beuta da 500ml con 100 ml di terreno LB+Ap (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Ampicillina 50 $\mu\text{g/ml}$) è stata inoculata con 100 μl della coltura in LB ed incubata per 24 ore a 30°C e a 300 rpm. L'OD550 della coltura era 6.0.

Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min e successivamente risospese, nello stesso volume originale, in 0.1M Tris.Cl 0.05M NaCl pH8.0. Le cellule sono state, poi, rotte per sonicazione e nell'estratto cellulare è stata titolata l'attività enzimatica di GA con metodo colorimetrico. È stata trovata un'attività GA pari a 136U/l che è 34 volte su-

periore a quella del ceppo originale Pseudomonas SY77-1.

ESEMPIO 7.

Questo esempio considera la produzione dell'enzima GA da parte di E.coli DHI trasformato con pCS19.1 .

L'inoculo è stato preparato come descritto nell'Esempio 6.

Una provetta sterile con 2ml di terreno LB+Ap (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Ampicillina 50 µg/ml) è stata inoculata con una colonia singola della piastra di LB Agar e incubata per 16 ore a 30°C e a 200rpm.

Una beuta da 500 ml con 100 ml di terreno LB+Ap (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Ampicillina 50 µg/ml) è stata inoculata con 100 µl della coltura di LB e incubata per 24 ore a 30°C e a 300 rpm. L'OD550 della coltura era 6.0.

Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min e successivamente risospese, nello stesso volume originale, in 0.1M Tris.Cl 0.05M NaCl pH8.0. Le cellule sono state, poi, rotte per sonicazione e nell'estratto cellulare è stata titolata l'attività enzimatica GA con metodo colorimetrico. L'attività GA trovata era pari a 135U/l che è 34 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas SY77-1.

ESEMPIO 8.

Questo esempio si riferisce alla fermentazione di E.coli XL1Blue (pCS19.1) in un terreno di fermentazione nuovo per la

produzione dell'enzima GA.

Un'inoculo è stato preparato come descritto in Esempio 2.

Una beuta di 500ml con 100ml di terreno CSL (composizione: Corn-Steep Liquor prodotto dalla Società Piemontese Amido Derivati- 14%, Tetraciclina 10 µg/ml, Ampicillina 50 µg/ml, pH 7.5) è stata inoculata con 100 µl della coltura in LB e incubata per 24 ore a 30°C e a 300 rpm. L' OD550 della coltura era 6.7.

Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min e poi risospese, nello stesso volume originale, in 1M Tris.HCl 0.05M NaCl pH 8.0. Le cellule sono state rotte per sonicazione e nell'estratto cellulare è stata titolata l'attività enzimatica di GA con metodo colorimetrico. E' stata trovata un'attività di GA pari a 307 U/l che è 77 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp. SY77-1.

ESEMPIO 9

Questo esempio si riferisce un nuovo tipo di fermentazione di E.coli XL1Blue (pCS19.1) per la produzione dell'enzima GA.

Un'inoculo è stato preparato come descritto nell'esempio 2.

Una beuta da 500 ml con 100 ml di terreno LB+Tc+Ap (composizione: bacto-estratto di lievito 0.5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Tetraciclina 10 µg/ml, Ampicillina 50 µg/ml) è stata inoculata con 100 µl della coltura di LB e incubata per 24 ore a 30°C e a 300rpm. L'OD550 della coltura era 6.0

Un fermentatore (2 l, INFORS HG) con 1.5 L di CSL (composizione: Corn-Steep Liquor 14%, pH7.5) è stato inoculato con 100ml della coltura di LB. I parametri della fermentazione erano: T 30°C, agitazione 1300rpm, flusso d'aria 1vvm per 20 ore sino a OD550=6.0. Per le successive 10 ore alla coltura è stata aggiunta una soluzione di glucosio o glicerolo (50%w/v) con un flusso continuo prima di 1,5ml/l ora e poi per ca. 16 ore 6ml/l ora mantenendo il pH a 7.5 (con 5M NaOH) e l'ossigeno disciolto tale da avere pO2=10%. La crescita finale osservata era OD550=90. Al termine della fermentazione la biomassa accumulata era di 87 g/l (peso secco 18g/l).

Il plasmide pCS19.1 era ancora presente nell'84% delle cellule dopo 54 ore di fermentazione tempo in cui veniva raggiunto il massimo della produzione.

Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min e successivamente risospese, nello stesso volume originale, in 0.1M Tris.Cl 0.05M NaCl pH 8.0. Le cellule sono state rotte per sonicazione e nell'estratto cellulare è stato titolata con metodo colorimetrico l'attività di GA. L'attività di GA era 9780 U/l.

E' stata trovata un'attività di GA pari a 9780 U/l che è 2445 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp. SY77-1.

ESEMPIO 10

Questo esempio considera la produzione dell'enzima GA di

E.coli JM 105 (pWB14) ottenuto come descritto nell'esempio 1.

- Il ceppo è conservato a -40°C in terreno YT-glicerolo (composizione: glicerolo 15%, bacto-estratto di lievito 0,7%, bacto-triptone 0,4%, NaCl 0,4%, tetraciclina 25 $\mu\text{g/ml}$, streptomicina 125 $\mu\text{g/ml}$).
- Un'ansata del ceppo conservato su terreno YT-glicerolo è stata strisciata su una piastra petri con LB Agar (composizione: bacto-estratto di lievito 0,5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, tetraciclina 25 $\mu\text{g/ml}$, streptomicina 125 $\mu\text{g/ml}$) e la piastra è stata incubata per una notte a 37°C .
- Una provetta sterile con 2 ml di terreno LB+Sm+Tc (composizione: bacto-estratto di lievito 0,5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, tetraciclina 25 $\mu\text{g/ml}$, streptomicina 125 $\mu\text{g/ml}$) è stata inoculata con una colonia singola della piastra di LB Agar e incubata per 16 ore a 30°C e 200rpm.
- Una beuta di 500 ml con 100 ml di terreno LB+Tc+Sm+IPTG (bacto-estratto di lievito 0,5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, tetraciclina 25 $\mu\text{g/ml}$, streptomicina 125 $\mu\text{g/ml}$, IPTG 1mM) è stata inoculata con 100 μl di coltura LB, incubata per 24 ore a 30°C e posta in agitazione a 300rpm.
L'OD 550 della coltura era 5.
- Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 minuti e successivamente risospese nello stesso volume originale in 0.1M Tris.Cl 0.05M NaCl pH8.0. Sono state, poi, rotte per sonicazione e si è valutata l'attività dell'en-

zima GA nell'estratto cellulare mediante tecnica colorimetrica.

L'attività di GA era 135 U/l, che risulta essere 34 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp.SY77-1.

ESEMPIO 11

Questo esempio si riferisce alla fermentazione di E.coli JM105 (pWB14) in un terreno di fermentazione nuovo per la produzione dell'enzima GA.

Un inoculo è stato preparato come in esempio 10.

Una beuta di 500ml con 100ml di terreno CSL (composizione: Corn Steep Liquor prodotto dalla Società Piemontese Amido Derivati 14%, Tetraciclina 25µg/ml, Streptomicina 125µg/ml, pH 7,5) è stata inoculata con 100µl della coltura in LB e incubata per 24 ore a 30°C e a 300rpm. L'OD550 della coltura era 8.

Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 minuti e successivamente risospese nello stesso volume originale in 0,1M Tris.Cl 0,05M NaCl pH 8,0. Le cellule sono state, poi, rotte per sonicazione e si è valutata l'attività dell'enzima GA nell'estratto cellulare mediante tecnica colorimetrica.

L'attività di GA era 330 U/l, che risulta essere 83 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp. SY77-1.

ESEMPIO 12

Questo esempio considera la produzione dell'enzima GA di E.coli JM105 (pWB1) ottenuto come descritto nell'esempio 1.

- 
- Il ceppo è conservato a -40°C in terreno YT-glicerolo (composizione: glicerolo 15%, bacto-estratto di lievito 0,7%, bacto-triptone 0,4%, NaCl 0,4%, Tetraciclina 25 $\mu\text{g/ml}$, Streptomicina 125 $\mu\text{g/ml}$).
 - Un'ansata del ceppo conservato su terreno YT-glicerolo è stata strisciata su una piastra petri con LB Agar (composizione: bacto-estratto di lievito 0,5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Tetraciclina 25 $\mu\text{g/ml}$, Streptomicina 125 $\mu\text{g/ml}$) e la piastra è stata incubata per una notte a 37°C .
 - Una provetta sterile con 2 ml di terreno LB+Sm+Tc (composizione: bacto-estratto di lievito 0,5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Tetraciclina 25 $\mu\text{g/ml}$, Streptomicina 125 $\mu\text{g/ml}$) è stata inoculata con una colonia singola della piastra di LB Agar e incubata per 15 ore a 30°C e 200 rpm.
 - Una beuta di 500 ml con 100 ml di terreno LB+Tc+Sm (composizione: bacto-estratto di lievito 0,5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Tetraciclina 25 $\mu\text{g/ml}$, Streptomicina 125 $\mu\text{g/ml}$) è stata inoculata con 100 μl di coltura LB, incubata per 24 ore a 30°C e posta in agitazione a 300 rpm.
L'OD550 della coltura era 5.
 - Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 minuti e successivamente risospese nello stesso volume originale in 0,1M Tris.Cl 0,05M NaCl pH8,0. Sono state, poi, rotte per sonicazione e si è valutata l'attività dell'estratto cellulare mediante tecnica colorimetrica.

11/1

L'attività di GA era 140 che risulta essere 35 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp. SY77-1.

ESEMPIO 13

Questo esempio considera la produzione dell'enzima GA di E.coli JM195 (pWB1) ottenuto come descritto nell'esempio 1.

L'inoculo è stato preparato come descritto nell'esempio 12.

Una beuta di 500 ml con 100 ml di terreno LB+Tc+Sm+IPTG (composizione: bacto-estratto di lievito 0,5%, bacto-triptone 1%, NaCl 1%, Tetraciclina 25µg/ml, Streptomicina 125 µg/ml, IPTG 1 mM) è stata inoculata con 100 µl di coltura LB, incubata per 24 ore a 30°C e posta in agitazione a 300 rpm.

L'OD550 della coltura era 5.

- Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 minuti e successivamente risospese nello stesso volume originale in 0,1 M Tris.Cl 0.05M NaCl pH 8,0. Sono state, poi, rotte per sonicazione e si è valutata l'attività dell'enzima GA nell'estratto cellulare mediante tecnica colorimetrica.

L'attività di GA era 130, che risulta essere 33 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp. SY77-1.

ESEMPIO 14

Questo esempio si riferisce alla fermentazione de E.coli JM105 (pWB1) in un terreno di fermentazione nuovo per la produzione dell'enzima GA.

M

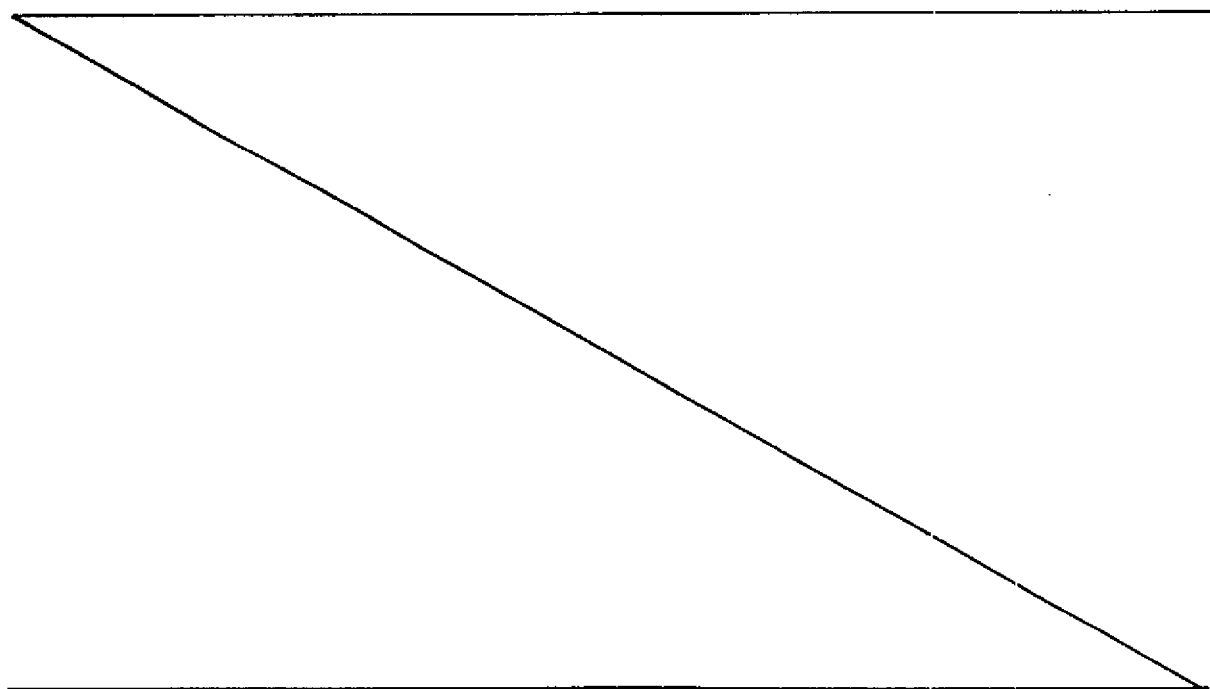
Un inoculo è stato preparato come in esempio 12.

Una beuta di 500 ml con 100 ml di terreno CSL (Composizione: Corn Steep Liquor prodotto dalla Società Piemontese Amido Derivati 14%, Tetraciclina 25 µg/ml, Streptomicina 125 µg/ml pH 7,5) è stata inoculata con 100 µl della coltura in LB e incubata per 24 ore a 30°C e a 300 rpm.

L'OD550 della coltura era 8,5.

Le cellule sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 minuti e successivamente risospese nello stesso volume originale in 0,1 M Tris.Cl 0,05M NaCl pH8,0. Le cellule sono state, poi, rotte per sonicazione e si è valutata l'attività dell'enzima GA nell'estratto cellulare mediante tecnica colorimetrica.

L'attività di GA era di 78 U/l, che risulta essere 197 volte superiore a quella del ceppo originale Pseudomonas sp. SY77-1.



RIVENDICAZIONI

- 1 Processo per la produzione di elevate quantità di 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico acilasi (GA) che comprende la coltivazione e l'induzione in un adatto terreno colturale di un ceppo di E.coli contenente la sequenza dell'acilasi e la successiva estrazione dell'enzima dalla coltura, caratterizzato dal fatto che come induttore viene utilizzato il Corn Steep Liquor e come microorganismo produttore un ceppo di E.coli scelto tra NCIMB40560, NCIMB40559, NCIMB40592 e NCIMB40593.
- 2 Processo secondo la rivendicazione 1 in cui l'attività della cefalosporina acilasi ottenuta è di almeno 9700 U/l.
- 3 Processo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni in cui la fermentazione è condotta a temperatura compresa tra 18-38°C e il pH tra 5-9.
- 4 Processo secondo la rivendicazione 3 in cui la fermentazione è condotta alla temperatura di 30°C e il pH 7,5.
- 5 Processo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni in cui il raggiungimento di rese elevate viene ottenuto mediante arricchimento del terreno colturale nel corso della fermentazione.
- 6 Processo secondo la rivendicazione 5 in cui l'arricchimento viene effettuato aggiungendo alla coltura, nel corso delle 24 ore successive all'inoculo, una soluzione di glucosio o glicerolo (50% w/v) con un flusso continuo di 1,5

- 
- ml/l ora per un certo intervallo e poi 6ml/l.ora per il resto del tempo della fermentazione mantenendo il pH a 7.5 (con 5M NaOH) e l'ossigeno disciolto costante ($pO_2=10\%$).
- 7 Processo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni in cui la concentrazione del Corn Steep Liquor nel terreno di coltura è compresa tra di 1-20 % v/v.
 - 8 Processo secondo la rivendicazione 5 in cui la concentrazione del Corn Steep Liquor nel terreno di coltura è il 14% v/v.
 - 9 Processo per la purificazione della 7-(4-carbossi-butanamido)-cefalo-sporanico acilasi in cui l'eliminazione degli enzimi quali esterasi o β -lattamasi dalle frazioni contenenti l'enzima GA avviene mediante gradiente di solfato di ammonio (30-55%) ed una cromatografia a scambio anionico debole.
 - 10 Ceppo di E.coli XL1Blue (pWE4.3.1) depositato presso NCIMB a cui è stato attribuito il numero di collezione NCIMB40560, capace di produrre elevate quantità dell'enzima 7-(4-carbossi- butanamido)-cefalosporanico acilasi.
 - 11 Plasmide pWE4.3.1 contenente Il frammento EcoRI-XbaI di 4 kb corrispondente al gene GA di Pseudomonas 146H9 e ospitato nel ceppo della rivendicazione 10.
 - 12 Ceppo di E.coli XL1Blue (pCS19.1) depositato presso NCIMB a cui è stato attribuito il numero di collezione NCIMB 40559, capace di produrre elevate quantità dell'enzima

- Mj
- 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico acilasi.
- 13 Plasmide pCS19.1 contenente il frammento EcoRI di 3Kb corrispondente al gene GA di Pseudomonas SY77-1 e ospitato nel ceppo della rivendicazione 12.
- 14 Plasmide vettore pTet tac, ottenuto dal vettore pKK223-3 per sostituzione della resistenza all'Ampicillina con quella alla Tetraciclina.
- 15 Plasmide vettore pTet tac della rivendicazione 14 comprendente il gene GA di Pseudomonas SY77-1.
- 16 Microorganismo ospite trasformato con il plasmide vettore della rivendicazione 15.
- 17 Ceppo di E.coli JM105 (pWB14) depositato presso NCIMB a cui è stato attribuito il numero di collezione NCIMB40593 capace di produrre elevate quantità dell'enzima 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico acilasi.
- 18 Plasmide pWB14 costituito dal vettore pTet tac contenente il frammento EcoRI-EcoRI di 3Kb con il gene GA di Pseudomonas SY77-1 e ospitato nel ceppo della rivendicazione 15.
- 19 Ceppo di E.coli JM105 (pWB1) depositato presso NCIMB a cui è stato attribuito il numero di collezione NCIMB40592 capace di produrre elevate quantità dell'enzima 7-(4-carbossibutanamido)-cefalosporanico acilasi.
-

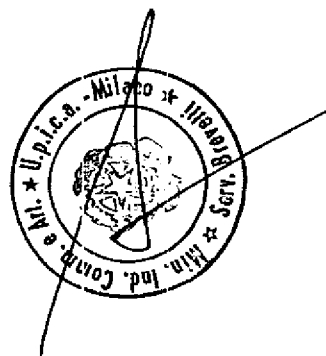
18 Plasmide pWB1 costituito dal vettore pTet tac contenente il frammento EcoRI-EcoRI di 3 kb con il gene GA di Pseudo-monas SY77-1 orientato in modo opposto al promotore P_{tac} e ospitato nel ceppo della rivendicazione 17.

Milano, 13 GEN.1994

GZ.lca

il mandatario


(Marco Gennari)



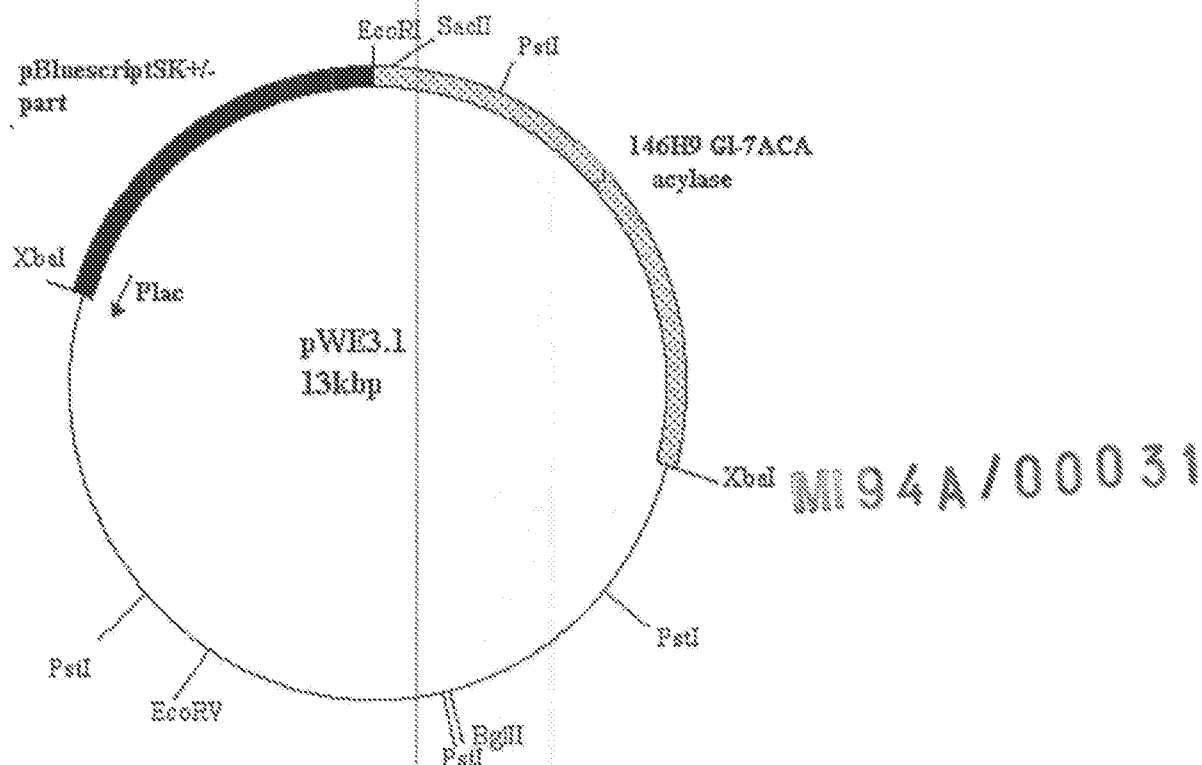


fig.1 Mappa fisica del plasmide pWE3.1. L'area ombreggiata contiene il gene GA di *Pseudomonas* 146H9 (NCIMB40474). La regione in nero appartiene al plasmide pBluescriptSK+/−

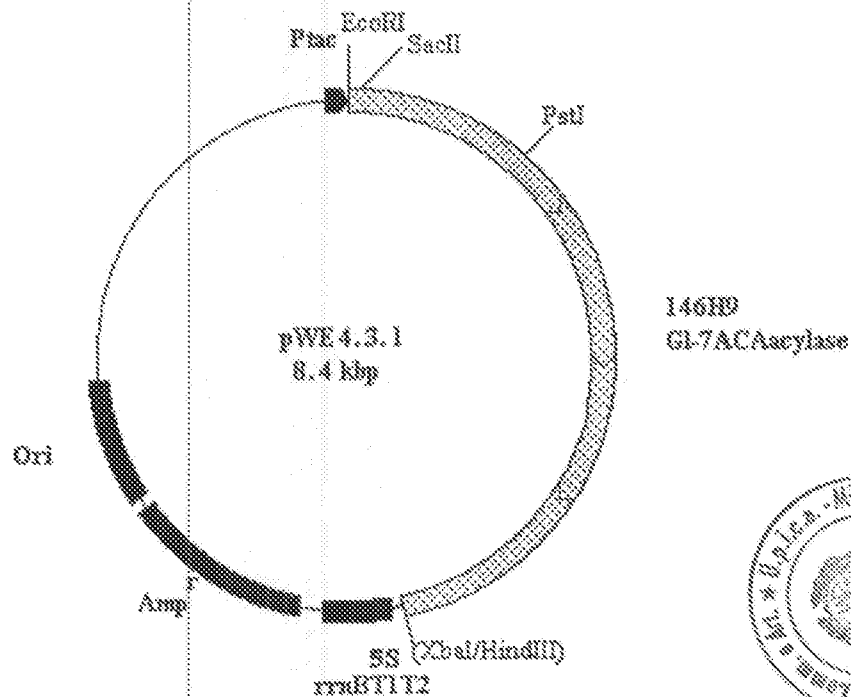
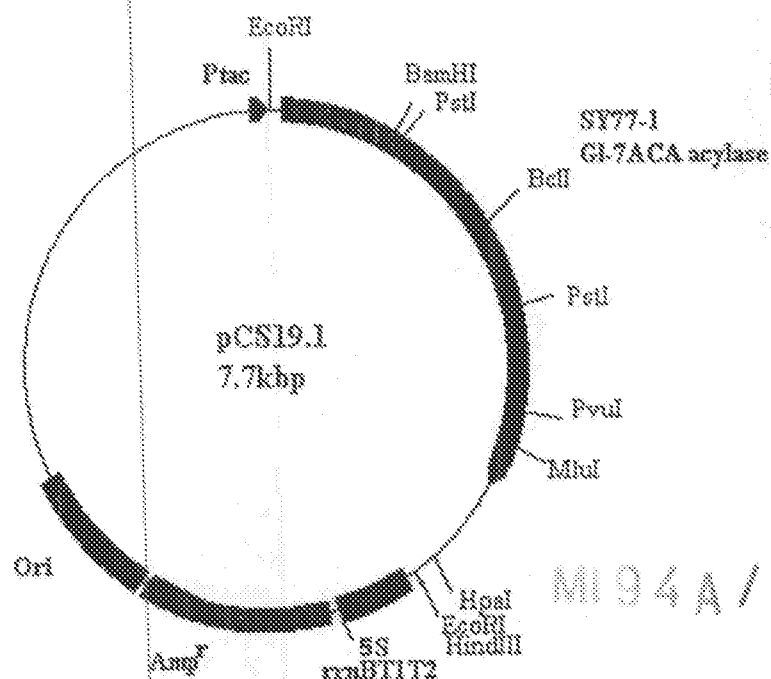


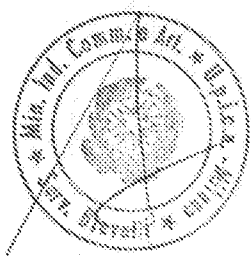
fig.2. Mappa fisica del plasmide pWE4.3.1. L'area ombreggiata contiene il gene GA di *Pseudomonas* 146H9 (NCIMB40474).



M194A/000311

Fig.3. Mappa fisica del plasmide pCS19.1. Il gene GA di SY77-1 è nella regione indicata dalla freccia nera

Handwritten signature



MI94A/00031

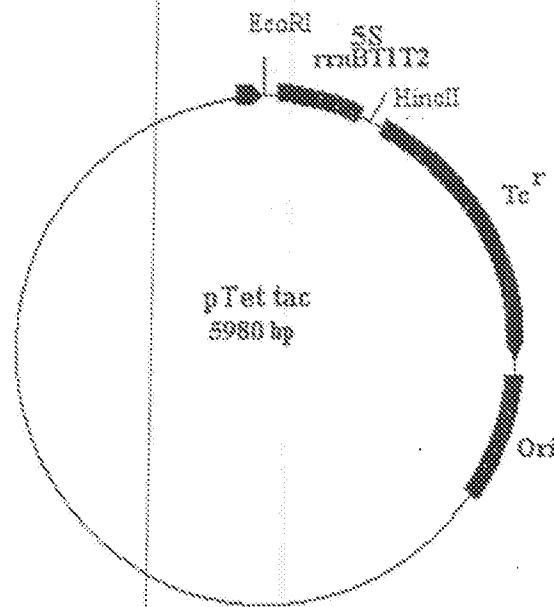


Figura 4

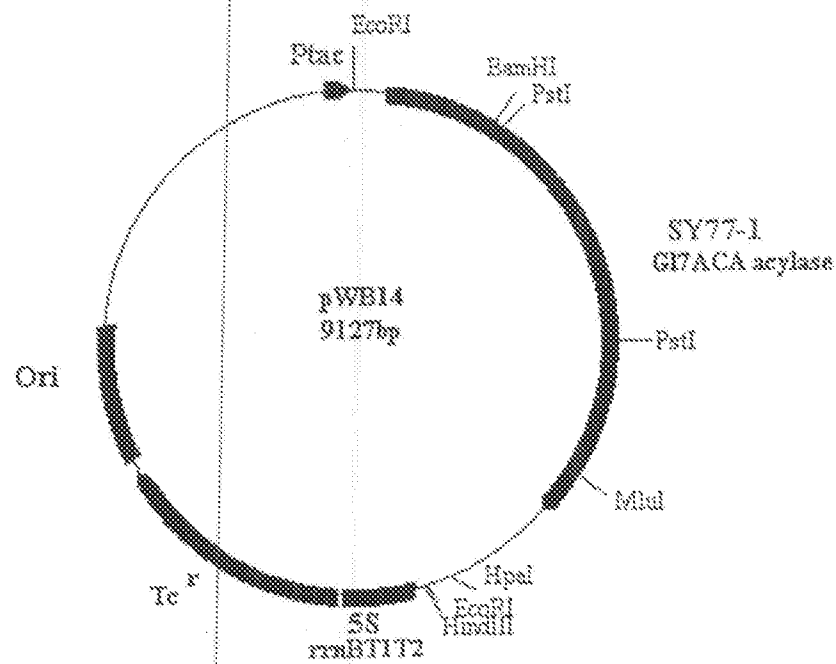
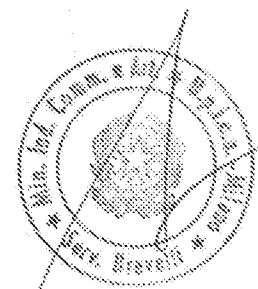


Figura 5

Handwritten signature



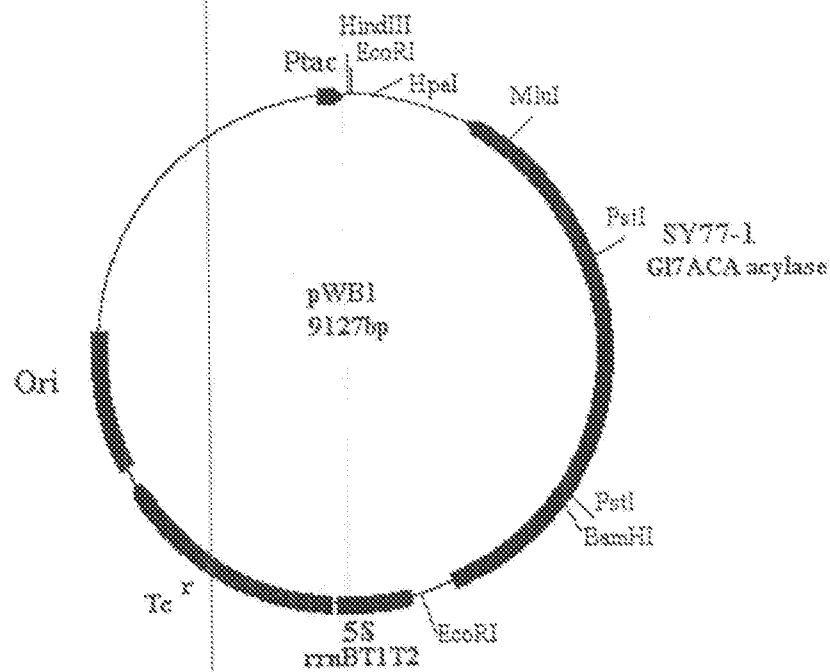


Figura 6

MI94A/00031

Handwritten signature

