



Nederland

⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8601454**

⑲ NL

- ⑤4 **Werkwijze voor het bereiden van een catalase-vrij oxidoreductase en van een catalase-vrije oxidoreductase bevattende gist, en gebruik daarvan.**
- ⑤1 Int.Cl⁴.: C12N 9/02.
- ⑦1 Aanvrager: Unilever N.V. te Rotterdam.
- ⑦4 Gem.: A.J.M. Dries c.s.
Postbus 137
3130 AC Vlaardingen.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8601454.
- ②2 Ingediend 5 juni 1986.
- ③2 --
- ③3 --
- ③1 --
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 4 januari 1988.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Titel:

Werkwijze voor het bereiden van een catalase-vrij oxidoreductase en van een catalase-vrije oxidoreductase bevattende gist, en gebruik daarvan.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het bereiden van een oxidoreductase door aerobe fermentatie van een gist onder condities waarbij de gist oxidoreductase produceert, en desgewenst isolatie
5 van het geproduceerde oxidoreductase uit de gistcellen.

Oxidoreductases zijn enzymen, die specifieke oxydatiereacties van bepaalde substraten katalyseren. Een voorbeeld van een oxidoreductase is methanol oxidase (MOX) dat methylotrofe gisten zoals Hansenula polymorpha,
10 Candida boidinii, Pichia pastoris e.d. in staat stelt op methanol te leven. Het MOX katalyseert de oxydatie van methanol tot formaldehyde en waterstofperoxyde, waarbij moleculaire zuurstof als electronenacceptor optreedt. Het gevormde formaldehyde wordt voor assimilatie
15 (anabolisme) gebruikt, waarbij via de xylulose-monofosfaat route celmateriaal wordt geproduceerd, of voor dissimilatie (katabolisme) gebruikt, waarbij het in mierzuur en uiteindelijk koolstofdioxyde wordt omgezet. Bij deze verdere processen spelen andere enzymen een belangrijke
20 rol : bij het assimilatieproces is dihydroxyaceton synthetase belangrijk, bij het dissimilatieproces zijn formaldehyde dehydrogenase en formiaat dehydrogenase sleutelenzymen. Het gevormde waterstofperoxyde is uiterst toxisch voor deze organismen en wordt direkt onschadelijk gemaakt
25 door een ander enzym, te weten catalase.

Andere voorbeelden van oxidoreductases zijn glucose oxidase, glycerol oxidase, D-aminozuur oxidase, aldehyde oxidase, amine oxidase, arylalkohol oxidase, galactose oxidase, sorbose oxidase, urinezuur oxidase, chloroperoxidase en xanthine oxidase.

30 Oxidoreductases kunnen voor verschillende doelein-

den worden toegepast. Een belangrijke toepassing ligt op het gebied van was- en bleekmiddelen, waarbij de aanwezigheid van oxidoreductase tijdens het was- of bleekproces tot de in situ vorming van waterstofperoxyde kan leiden, indien tevens een geschikt substraat voor
5 het oxidoreductase aanwezig is. Het waterstofperoxyde vertoont een bleekmiddelwerking, of kan in samenwerking met bleekmiddelvoorlopers zoals TAED leiden tot de vorming van bij lage temperaturen actieve bleekmiddelen zoals perzuren. Een belangrijk voordeel van dit systeem, waarbij
10 het was- of bleekmiddel zelf geen waterstofperoxyde bevat doch slechts het enzym dat tijdens het was- of bleekproces de vorming van waterstofperoxyde in situ katalyseert, is dat inactivering van wasmiddelcomponenten zoals proteases, lipases, e.d. tijdens opslag en transport
15 wordt voorkomen. Deze toepassing van oxidoreductases is beschreven in de Britse octrooipublikatie 1.225.713 en 2.101.167 en in de Duitse octrooipublikatie 2.557.623.

Een andere toepassing van oxidoreductases ligt op het gebied van de kwalitatieve en/of kwantitatieve
20 analyse, bijv. voor het bepalen van het alcoholgehalte van te onderzoeken systemen zoals fermentatievloeistoffen. De analyse berust op een meting van het gevormde waterstofperoxyde via een door peroxidase gekatalyseerde oxydatie van kleurstoffen.

25 Ook kunnen oxidoreductases worden gebruikt in het kader van chemische syntheses of van afvalzuiveringsprocessen om oxydatie van substraten te katalyseren.

Voor de meeste van deze toepassingen, en zeker voor die als component van was- of bleekmiddelen en
30 voor die als analysehulpmiddel, is van groot belang dat het oxidoreductase vrij is van catalase, dat het gevormde waterstofperoxyde zou afbreken. Een probleem van de microbiologisch geproduceerde oxidoreductases zoals methanol oxidase (EC 1.1.3.13) door batch of continue

8601454

fermentatie van methylotrofe gisten zoals Hansenula polymorpha, Candida boidinii, Pichia pastoris e.d. op methanol, is echter dat ze steeds vergezeld gaan van het natuurlijke catalase enzym dat het gevormde peroxyde vrijwel direkt afbreekt zodat geen effectieve bleekmiddel-
5 werking of nauwkeurige analyse van de substraatconcentratie mogelijk is. Weliswaar zijn methoden bekend om het catalase grotendeels uit het produkt te verwijderen of te inactiveren en aldus een nagenoeg werkzaam catalase-vrij oxidoreductase te verkrijgen, maar voor technische
10 toepassing zijn deze methoden (zoals catalase-verwijdering door ionuitwisselingschromatografie of gelfiltratie, en catalase-inactivering door behandeling met natrium dodecylsulfaat (SDS) of natriumazide, e.d.) veel te duur en omslachtig en in veel gevallen ontoereikend.
15 Er bestaat derhalve behoefte aan een methode waarmee catalase-vrij oxidoreductase kan worden verkregen op een technisch en economisch verantwoorde wijze. Een microbiologische produktie, waarbij catalase-negatieve mutanten worden gebruikt, zou in deze behoefte kunnen
20 voorzien, maar lijkt onuitvoerbaar omdat de organismen, indien gekweekt in een voedingsmedium waaraan ten behoeve van een sterke expressie van het oxidoreductase-gen substraat voor het oxidoreductase is toegevoegd, zonder catalase ten dode zijn opgeschreven. Men zou de organismen
25 wel kunnen kweken in een voedingsmedium, dat geen substraat voor het oxidoreductase bevat, maar men mag dan verwachten dat de organismen geen of ten hoogste een zeer geringe hoeveelheid oxidoreductase produceren.

Zo is in het geval van methanol oxidase (MOX)
30 bekend dat de expressie van MOX, formiaat dehydrogenase, formaldehyde dehydrogenase, dihydroxyaceton synthetase en catalase onderhevig is aan glucose repressie, evenals aan glycerol en mannitol repressie. Derepressie van MOX synthese treedt op indien de organismen bij zeer

8601454

lage glucose, glycerol of mannitol concentraties worden gekweekt, maar de MOX productie is dan relatief nog zeer gering. Volledige inductie van de MOX synthese vindt pas plaats wanneer de organismen worden gekweekt op methanol als enige koolstofbron of op specifieke
5 mengsels van methanol met glucose, glycerol of mannitol : zie Eggeling en Sahm, Arch. Microbiol. 127, 119-124 (1980) en Arch. Microbiol. 130, 362 - 365 (1981). Deze auteurs concluderen uit hun experimenten aan de gist Hansenula polymorpha, dat methanol zelf, en niet een
10 metaboliet daarvan, voor inductie van MOX synthese verantwoordelijk is. Het expressieniveau is in de toestand van repressie of derepressie laag in vergelijking tot het expressie-niveau in de toestand van inductie: in de orde van grootte van 1 - 2 % onder volledige glucose
15 repressie, en ongeveer 10% onder glucose of glycerol derepressie bij lage groeisnelheden in continue cultures. Overigens wordt in een van deze publikaties (Arch. Microbiol. 127, 119 - 124 (1980)) een catalase-negatieve mutant van Hansenula polymorpha beschreven, aangeduid als de
20 mutant 55/11. Deze mutant kan niet op methanol leven, maar produceert methanol oxidase bij groei op glycerol onder condities van derepressie. In batch cultures bedraagt de MOX-produktie ongeveer 50% van de hoeveelheid die door de wild-type stam op glycerol wordt geproduceerd,
25 of ongeveer 17% van de MOX-produktie van de wild-type stam op methanol. Een dergelijke relatief geringe produktie van oxidoreductase is voor produktie op technische schaal ontoereikend.

Thans is verrassenderwijze gevonden dat een
30 microbiologische produktie van oxidoreductases, die vrij zijn van catalase activiteit, op technische schaal kan worden gerealiseerd met een werkwijze van de in de aanhef vermelde soort, welke gekenmerkt wordt doordat een catalase-negatieve mutant wordt gegroeid in een

8601454

voor de gist geschikt voedingsmedium in tegenwoordigheid van ten minste één stof, die expressie van het oxidoreductase-gen induceert maar geen substraat voor het oxidoreductase is.

5 Het heeft volgens de uitvinding de voorkeur dat een catalase-negatieve mutant van een gist van het genus Hansenula of van het genus Pichia, in het bijzonder van het species Hansenula polymorpha of van het species Pichia pastoris wordt gebruikt, zoals de catalase-negatieve
10 mutant Hansenula polymorpha 55/11, ATCC 46059. De uitvinding is echter niet tot het gebruik van deze ene mutant beperkt. Andere catalase-negatieve mutanten kunnen door het introduceren van willekeurige mutaties en het daaropvolgend selecteren
15 methoden, bijvoorbeeld door deleties van of in het catalase-gen of andere catalase-expressie verhinderende modificaties van het catalase-gen, worden verkregen.

 Het heeft volgens de uitvinding verder de voorkeur dat een gist wordt gebruikt waarin de genetische informa-
20 tie voor het oxidoreductase onder controle van de methanol oxidase (MOX) promoter staat, bijvoorbeeld de MOX promoter van Hansenula polymorpha CBS 4732. De MOX promoter is een sterke promoter, waardoor een grote opbrengst aan oxidoreductase realiseerbaar wordt. De sterkte van de
25 promoter blijkt uit het feit dat het MOX gehalte van de op methanol gekweekte wild-type stam van Hansenula polymorpha in de orde van grootte van 20% van het cellulaire eiwit bedraagt. Een voorbeeld van een andere sterke promoter is de dihydroxyaceton synthetase (DAS) promoter.

30 Als oxidoreductase wordt bij voorkeur methanol oxidase geproduceerd, bijvoorbeeld het MOX van Hansenula polymorpha CBS 4732. Het MOX-enzym blijkt voor verschillende andere substraten dan methanol werkzaam te zijn, zoals voor ethanol, n-propanol, n-butanol, n-amylalkohol,
35 en zelfs, zij het in geringe mate, voor stoffen zoals methylcellosolve, ethyleenglycol, benzylalkohol, isopropanol,

isoamylalkohol en propyleenglycol. Sommige van deze stoffen, zoals ethanol, zijn bij uitstek geschikt om bij het gebruik van het methanol oxidase in was- en bleekmiddelen als substraat dienst te doen, doordat
5 ze relatief goedkoop en toxicologisch aanvaardbaar zijn.

De uitvinding is echter niet tot de produktie van methanol oxidase beperkt. Met behulp van genetic engineering technieken kunnen gisten, in het bijzonder Hansenula en Pichia gisten worden verkregen, die een
10 ander oxidoreductase-gen bevatten, bij voorkeur onder controle van de sterke MOX-promoter. Afhankelijk van de beoogde toepassing kan aan een dergelijk ander oxidoreductase, zoals D-aminozuur oxidase, e.d., behoefte bestaan.

Het heeft volgens de uitvinding de voorkeur
15 dat als stof, die expressie van het oxidoreductase-gen induceert maar geen substraat voor het oxidoreductase is, formiaat en/of formaldehyde wordt gebruikt.

Met formiaat worden zowel mierzuurzouten, in het bijzonder alkalimetaal- en ammoniumzouten alsmede
20 aardalkalimetaalzouten, als mierzuur zelf bedoeld.

Anders dan men op grond van de literatuur zou verwachten, blijken deze metaboliëten van methanol in gist van het genus Hansenula inductie te kunnen geven van de expressie van het onder controle van de MOX-
25 promoter staande gen. Een dergelijke inductie van methanol-oxidase door formiaat en formaldehyde is wel eerder waargenomen bij batch fermentatie van gist van het species Candida boidinii (Eggeling et al, FEMS Microbiol. Letters 1 (1977), 205 - 210), alsmede inductie van methanol
30 oxidase door formiaat bij batch fermentatie van de gist Kloeckera sp. No. 2201 (Shimizu et al, Agric. Biol. Chem. 41 (11), 1977, 2215 - 2220), maar volgens Eggeling en Sahm, Arch. Microbiol. 127 (1980), 119 - 124 zou bij Hansenula polymorpha alleen methanol tot inductie in
35 staat zijn.

8601454

In verband met produktie op technische schaal heeft het volgens de uitvinding de voorkeur dat de gist in een continue fermentatie wordt gekweekt. Batch fermentatie is echter niet uitgesloten.

- 5 Bij de fermentatie wordt een voor de gist, zoals Hansenula of Pichia geschikt voedingsmedium gebruikt, dat een voor dit organisme geschikte koolstofbron moet bevatten. Geschikte koolstofbronnen zijn aan de deskundige bekend of kunnen eenvoudig proefondervindelijk worden
- 10 vastgesteld. Geschikt is bijvoorbeeld glucose, maar ook andere suikers, zoals sorbose, xylose, sorbitol, en andere stoffen zoals glycerol, citroenzuur e.d. kunnen als koolstofbron worden gebruikt. Een geschikt voedingsmedium is bekend uit Egli et al, Arch. Microbiol. 124 (1980),
- 15 115 - 121.

Het is volgens de uitvinding van belang dat tijdens de fermentatie een geschikte verhouding tussen de hoeveelheid koolstofbron en de hoeveelheid formiaat of formaldehyde wordt ingesteld.

- 20 Een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding wordt gekenmerkt doordat de gist wordt gekweekt in tegenwoordigheid van een voor de gekozen gist species geschikte koolstofbron en een formiaat, waarbij de molverhouding formiaat : koolstofbron 0,5 : 1 tot 4,5 : 1 bedraagt.
- 25 Bij voorkeur wordt een molverhouding formiaat : koolstofbron van 2 : 1 tot 3,5 : 1 gebruikt, liefst 2,5 : 1 tot 3,2 : 1.

- Een andere voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding wordt gekenmerkt doordat de gist wordt gekweekt
- 30 in tegenwoordigheid van een voor de gekozen gist species geschikte koolstofbron en formaldehyde, waarbij de molverhouding formaldehyde : koolstofbron 0,1 : 1 tot 3 : 1 bedraagt.
- Bij voorkeur wordt een molverhouding formaldehyde : koolstofbron van 0,5 : 1 tot 2,5 : 1 gebruikt, liefst 1 : 1 tot
- 35 2 : 1.

Bij experimenten met dergelijke formiaat/glucose

8601454

en formaldehyde/glucose mengsels in continue fermentaties met een verdunningssnelheid D van 0,05 tot 0,1 uur⁻¹ van de catalasenegatieve mutant Hansenula polymorpha 55/11 zijn MOX opbrengsten gerealiseerd welke in de 5 orde van grootte van 30% resp. 60% van de MOX opbrengst van de op methanol gekweekte wild-type stam bedragen. Dit zijn opbrengsten die, mede gezien de afwezigheid van catalase, voor toepassing op technische schaal in aanmerking komen.

- 10 Wanneer men te hoge concentraties formiaat of formaldehyde toepast, krijgt men een lagere cellenopbrengst en kan zelfs de cultuur worden gedood. Te lage concentraties formiaat of formaldehyde geven onvoldoende inductie zodat een lage opbrengst aan oxidoreductase het gevolg 15 is. Bij groei van de mutant op glucose alleen, zonder formiaat of formaldehyde, worden dezelfde lage MOX activiteiten verkregen als in het geval van de wild-type stam.

Indien men voor de beoogde toepassing niet de gekweekte gistcellen als zodanig wil of kan gebruiken, 20 dient men het in de gistcellen en vooral in de peroxisomen opgehoopte oxidoreductase uit de cellen te isoleren. Daarvoor kunnen gebruikelijke methoden van cel lysis worden toegepast, zoals het fysiek breken van de cellen met behulp van glasbolletjes, behandeling in een zg. 25 French press, ultrasone behandeling, en enzymatische methoden, bijv. met zymolyase.

Volgens de uitvinding is gevonden dat het aanbeve- ling verdient om hierbij onder zuurstofvrije condities te werken, bijvoorbeeld door onder een stikstofatmosfeer 30 te werken. Wanneer men de cellen in tegenwoordigheid van zuurstof openbreekt zouden mogelijke substraten van het oxidoreductase enzym, welke zich in het celplasma of compartimenten van de gistcellen kunnen bevinden, in tegenwoordigheid van het uit de peroxisomen bevrijde 35 oxidoreductase kunnen worden geoxydeerd, waarna het daarbij gevormde waterstofperoxyde onder andere het

oxidoreductase afbreekt.

De uitvinding wordt in het hiernavolgende experimentele gedeelte nader toegelicht.

Fermentatiecondities en media

5

Hansenula polymorpha werd gebruikt als een catalase negatieve kolonie uit gist peptone dextrose agar en gedurende een dag bij 37°C voorgekweekt in een medium volgens Egli et al, Arch. Microbiol. 124, 115 - 121
10 (1980) met glucose als enige koolstofbron.

Er werd continu gekweekt in een 3-liter fermenter die 2 liter medium bevatte. De beluchting, pH en agitatie werden geregeld, waarbij erop werd toegezien dat de opgeloste zuurstofspanning nooit beneden 25 % verzadiging
15 kwam. De pH en schuimvorming werden gecontroleerd met behulp van een geconcentreerde ammoniakoplossing die een op siliconenolie gebaseerde anti-schuimstof (Rhodorsil R 425 R van Rhone Poulenc) bevatte in een verhouding van 4 : 1 tot 1 : 1. De pH werd ingesteld op $5,0 \pm 0,05$
20 pH eenheden. De temperatuur werd gehouden op $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$. De binnentredende en uittredende stromen medium werden gemeten en ingesteld op een gewenste stroomsnelheid met behulp van een peristaltische pomp. Stabiele toestanden van de fermentatie werden getest door de ademhalingspara-
25 meters (het ademhalingsquotiënt, de snelheid van koolstofdioxydeontwikkeling en de snelheid van zuurstofopname) te meten, en door de MOX gehalten in celsuspensies en cellysaten te testen.

30 Analyses

Bepaling van MOX en catalase

De MOX activiteit in celsuspensies, celvrije extracten en de catalase activiteit werden bepaald volgens

8601454

Van Dijken et al, Arch. Microbiol. 111, 137 - 144 (1976).
1 Eenheid correspondeert met 1 micromol methanol, verbruikt
per minuut bij 37°C in een met lucht verzadigde 0,1
M fosfaatbuffer met een pH van 7,5.

Eiwit

- 5 Eiwit werd bepaald volgens de methode van Lowry
et al, J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951). Als standaard
werd runderserumalbumine gebruikt.

Biomassa

- 10 Het droge gewicht van de biomassa werd bepaald
door gewassen celsuspensies bij 100°C te drogen tot
konstant gewicht.

Glucose, methanol, mierzuur en formaldehyde
werden bepaald met behulp van HPLC en standaard enzymatische
analyses.

15

Openbreken van cellen

 Cellysaten werden verkregen door ultrasone behan-
deling of door incubatie met zymolyase.

20

Ultrasone behandeling

- Ultrasone behandeling werd uitgevoerd bij 0°C
met behulp van een 0,1 M kaliumfosfaatoplossing met
25 een pH van 7,5 die 5 ml gewassen celsuspensie bevatte,
met 3 g glaskorrels (gemiddelde diameter 100 μ m). De
celsuspensie werd 5 keer gedurende 1 minuut behandeld
met een Branson cel verbreker type B-12 (Branson sonic
power company). Tussen de behandelingen werd een koelperiode
30 van 1 minuut in acht genomen. Er werd een vermogen inge-
voerd van 70 Watts per 5 ml oplossing, waarbij een microtip
werd gebruikt.

 Onder anaerobe condities werd 15 minuten voor
en tijdens de ultrasone behandelingen stikstof door

8601454

de suspensie gevoerd.

Lysis procedure

200 ml Van celsuspensies met een optische dichtheid
5 bij 610 nm van OD 15 tot 18 in 0,1 M natriumfosfaatbuffer
met een pH van 8,5, die 5 mM EDTA, 1 mM dithiotreitol
en 10 mg Zymolyase 100T ex *Arthrobacter luteus* (Seikagaku
Kogyo Co) bevatte, werd zachtjes geroerd bij 37°C in
een flesje in een thermostaat. Na regelmatige tussenpozen
10 van 10 of 15 minuten werden monsters genomen en geanalyseerd
op MOX activiteit, eiwitgehalte en optische dichtheid
bij 610 nm.

Voorbeeld 1

15

Productie van MOX op mierzuur/glucosemengsels

Hansenula polymorpha ATCC 46059 werd gegroeid
op medium I, beschreven in tabel A, welk medium verschil-
20 lende verhoudingen mierzuur tot glucose bevatte.

De figuren 1 en 2 en de tabellen C en D tonen
de specifieke MOX activiteit in de lysaten. Bij een
konstante verdunningssnelheid van 0,1 l/uur werd een
optimale verhouding van 2,9 mol mierzuur op 1 mol glucose
25 gevonden.

Bij een verhouding van 3,6 mol mierzuur per
mol glucose werd een optimale verdunningssnelheid van
0,05 tot 0,15 l/uur gevonden (figuur 2). Boven de optimale
verhoudingen (boven 2,9) en de optimale verdunningssnelheden
30 (boven 0,2) werd een significant gehalte aan overblijvend
mierzuur gevonden, dat voor de cultuur toxisch is.

In de cellysaten, verkregen uit de bovenstaand
vermelde culturen, kon geen catalase activiteit worden
gedetecteerd.

8601454

Voorbeeld 2

Produktie van MOX op formaldehyde/glucosemengsels

5 Hansenula polymorpha ATCC 46059 werd gegroeid
op medium I met verschillende formaldehyde/glucosemengsels
bij een verdunningssnelheid van 0,1 l/uur. De waarden
in stabiele toestand van specifieke MOX produktie en
biomassaopbrengst op glucose staan vermeld in tabel
10 B en figuur 3.

Bij een molverhouding van ongeveer 1,8 werd
een optimale specifieke aktiviteit van MOX van 6 tot
7 MOX eenheden/mg eiwit gevonden.

15 In de cellysaten, verkregen uit de bovenstaand
vermelde culturen, kon geen catalase aktiviteit worden
gedetecteerd.

Voorbeeld 3

20 Isolatie van MOX

Hansenula polymorpha ATCC 46059 werd gegroeid
op medium II (tabel A) bij een verdunningssnelheid van
0,078 l/uur. De verhouding van mierzuur tot glucose
25 bedroeg 2,65. De celdichtheid bedroeg 39,9 gram biomassa
(droog gewicht)/liter.

Lysis van de cellen met behulp van de zymolyase
methode met een incubatietijd van 1 tot 3 uur bij 37 °C
in een geroerde celsuspensie, leverde geen MOX aktiviteit
30 op.

Ultrasone behandeling van de cellen gaf een
variabele absolute opbrengst van MOX en een laag eiwitge-
halte vergeleken met waarden van 40 tot 50% eiwit/droog
gewicht van de cellen, die normaal in de wild-type stam
35 CBS 4732 worden gevonden.

Verrassenderwijze werd vastgesteld dat de aanwezig-

8601454

heid van zuurstof en de reactieprodukten van MOX met onbekende celcomponenten onder aerobe condities de hoofdoorzaak voor de MOX inactivering vormen. Het gebruik van celsuspensies die met stikstofgas zijn gespoeld, of de aanwezigheid van overmaat catalase (meer dan 10 eenheden/5 ml) in de celsuspensies tijdens de ultrasone behandeling leidde tot een verbetering van de absolute opbrengst van MOX. Zie tabel E.

Het effect van de toevoeging van catalase of van het doorspoelen van stikstofgas is groter bij een mierzuur/glucoseverhouding van 3,6.

Een celvrij lysaat werd verkregen door 15 minuten centrifugeren bij 12.000 g.

De MOX activiteit in het celvrije lysaat kon worden neergeslagen met een 65%-ige verzadigde ammoniumsulfaat oplossing. Het aldus verkregen neerslag was bij kamertemperatuur stabiel. In het neerslag kon geen catalase activiteit worden gedetecteerd.

Het met ammoniumsulfaat verkregen neerslag kan voor de in de inleiding beschreven toepassingen worden gebruikt.

Voorbeeld 4

Hansenula polymorpha ATCC 46059 werd gegroeid op medium II (pH 5,0; 37°C; $pO_2 > 25\%$ verzadiging) bij een verdunningssnelheid van 0,078 l/uur in een 13 l fermenter met een werkvolume van 9 liter medium. De in stabiele toestanden verkregen celdichtheid bedroeg 39,9 g biomassa (droog gewicht)/liter. De specifieke activiteit van het MOX, geïsoleerd met behulp van de in voorbeeld 3 beschreven methode, bedroeg 2,1 MOX eenheden/mg eiwit of 0,60 MOX eenheden, gewonnen per gram biomassa (gebaseerd op het droge gewicht).

De cellen werden gedurende twee dagen bij 15°C onder verminderde druk gevriesdroogd. De activiteit

8601454

na opnieuw suspenderen van het gevriesdroogde monster in 0,05 M kaliumfosfaat buffer met een pH van 7,5 en ultrasone behandeling onder aerobe condities zonder catalase, bedroeg 0,6 MOX eenheden per gram biomassa
5 (droog gewicht). Na vriesdrogen waren de cellen bij kamertemperatuur gedurende ten minste één week stabiel.

De MOX activiteit werd uit de gevriesdroogde cellen geïsoleerd door de cellen in een molen met glaskorrels open te breken. De celsuspensies werden in een
10 zuurstofvrije, met stikstof gespoelde 0,05 M kaliumfosfaat buffer bereid en onder stikstof bewaard. De suspensie van gelyseerde cellen werd gecentrifugeerd. De heldere supernatant werd neergeslagen door ammoniumsulfaat toe te voegen tot een concentratie van 65% verzadiging.
15 De oplossing werd gecentrifugeerd. Het verkregen sediment bevatte alle MOX activiteit. Het preparaat was bij kamertemperatuur stabiel en bevatte geen catalase activiteit.

Tabel A: Gebruikte media

	Medium I, gebaseerd op Egli medium g l ⁻¹	Medium II, Medium voor hoge cel-dichtheden g l ⁻¹
Glucose	9	90
Formaldehyde of mierzuur	1 - 7 ml	50 ml
NH ₄ Cl	7,63	-
KH ₂ PO ₄	2,81	6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,59	4,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,055	0,6
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0375	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,014	0,01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022	0,022
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,004	0,004
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0045	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0026	0,0026
H ₃ BO ₃	0,004	0,004
KJ	0,0026	0,0026
EDTA	0,45	-
Biotine	0,00005	0,00005
Thiamine HCl	0,005	0,005
Meso-inositol	0,047	0,047
Pyridoxine	0,0012	0,0012
D-Pantotheenzuur	0,023	0,023
NaCl		0,3
FeCl ₃ ·6H ₂ O		0,035
KCl		3
H ₂ SO ₄ (conc)		0,03 ml

8601454

Tabel B

MOX produktie in cultures van H. polymorpha ATCC 46059,
gegroeid op mengsels van formaldehyde / glucose bij een ver-
dunningssnelheid van 0,1 l/uur

Molverhouding formaldehyde / glucose	MOX activiteit MOX eenheden / mg eiwit
0,07	1,0
0,36	4,0
1,0	
1,8	6-7

Tabel C

MOX produktie in cultures van H. polymorpha ATCC 46059, ge-
groeid op mengsels van mierzuur / glucose bij een verdun-
ningssnelheid van 0,1 l/uur

Molverhouding mierzuur / glucose	MOX activiteit MOX eenheden / mg eiwit
0,0	0,05
0,52	0,025
1,6	1,5
2,6	2,7
2,9	3,5
3,6	2,5

8601454

Tabel D

 MOX produktie in cultures van H. polymorpha ATCC 46059, ge-
 groeid op een mengsel met een mierzuur / glucose verhouding
 van 3,6 bij verschillende verdunningssnelheden

Verdunningssnelheid l/uur	MOX activiteit MOX eenheden / mg eiwit
0,047	3,03
0,049	2,92
0,1	2,48
0,115	2,26
0,144	2,1
0,158	3,0
0,24	1,1

Tabel E

 Effect van spoelen met stikstof en aanwezigheid van catalase
 tijdens ultrasone behandeling van cel suspensies op MOX
 opbrengst

Behandeling			MOX activiteit MOX eenheden / ml cultuur	specifieke acti- viteit MOX eenheden / mg eiwit
Partij	N ₂ gespoeld	catalase tijdens behandeling		
1	-	-	15,8	1,78
1	-	+	21,5	2,07
1	+	-	20,0	1,92
2	-	-	0,47	2,2
2	-	+	2,95	2,2

8601454

Opmerking:

Partij 1 = celdichtheid 39,9 g biomassa / liter, $D=0,078$
l/uur, verhouding mierzuur / glucose : 2,6.

- 5 Partij 2 = celdichtheid 5,08 g biomassa / liter, $D=0,1$ l/uur,
verhouding mierzuur / glucose : 3,7.

In de figuren 1 - 3 staat de afkorting RQ voor ademhalings-
10 quotiënt.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor het bereiden van een oxidoreductase of een oxidoreductase bevattend mengsel of preparaat door aerobe fermentatie van een gist onder condities waarbij de gist oxidoreductase produceert, en desgewenst
5 isolatie van het geproduceerde oxidoreductase uit de gistcellen, met het kenmerk, dat een catalasenegatieve mutant wordt gegroeid in een voor de gist geschikt voedingsmedium in tegenwoordigheid van ten minste één stof, die expressie van het oxidoreductasegen induceert maar geen substraat
10 voor het oxidoreductase is.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat een catalasenegatieve mutant van een gist van het genus Hansenula of van het genus Pichia wordt gebruikt.
3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk,
15 dat een catalase-negatieve mutant van een gist van het species Hansenula polymorpha of van het species Pichia pastoris wordt gebruikt.
4. Werkwijze volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat de catalase-negatieve mutant Hansenula polymorpha
20 55/11, ATCC 46059, wordt gebruikt.
5. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-4, met het kenmerk, dat een gist wordt gebruikt waarin de genetische informatie voor het oxidoreductase onder controle van de methanol oxidase (MOX) promoter staat.
- 25 6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat een gist wordt gebruikt waarin de genetische informatie voor het oxidoreductase onder controle van de MOX promoter van Hansenula polymorpha CBS 4732 staat.
7. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-6,
30 met het kenmerk, dat als oxidoreductase methanol oxidase wordt geproduceerd.
8. Werkwijze volgens conclusie 7, met het kenmerk,

8601454

dat het methanol oxidase van Hansenula polymorpha CBS 4732 wordt geproduceerd.

9. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-8, met het kenmerk, dat als stof, die expressie van het
5 oxidoreductase-gen induceert maar geen substraat voor het oxidoreductase is, formiaat en/of formaldehyde wordt gebruikt.
10. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-9, met het kenmerk, dat de gist in een continue fermentatie
10 wordt gekweekt.
11. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-10, met het kenmerk, dat de gist wordt gekweekt in tegenwoordigheid van een voor de gekozen gist species geschikte koolstofbron en een formiaat, waarbij de molverhouding
15 formiaat : koolstofbron 0,5 : 1 tot 4,5 : 1 bedraagt.
12. Werkwijze volgens conclusie 11, met het kenmerk, dat een molverhouding formiaat : koolstofbron van 2 : 1 tot 3,5 : 1 wordt gebruikt.
13. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-10,
20 met het kenmerk, dat de gist wordt gekweekt in tegenwoordigheid van een voor de gekozen gist species geschikte koolstofbron en formaldehyde, waarbij de molverhouding formaldehyde : koolstofbron 0,1 : 1 tot 3 : 1 bedraagt.
14. Werkwijze volgens conclusie 13, met het kenmerk,
25 dat een molverhouding formaldehyde : koolstofbron van 0,5 : 1 tot 2,5 : 1 wordt gebruikt.
15. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-14, met het kenmerk, dat de gist wordt gekweekt in een voedingsmedium dat als koolstofbron glucose bevat.
- 30 16. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-15, met het kenmerk, dat het geproduceerde oxidoreductase onder zuurstofvrije condities uit de gistcellen wordt geïsoleerd.
17. Oxidoreductase bevattende, catalase-negatieve
35 mutant van een gist, verkegen door de werkwijze volgens een van de conclusies 1-15.

8601454

18. Oxidoreductase, verkregen door de werkwijze volgens conclusie 16.
19. Gebruik van een oxidoreductase bevattende, catalase-negatieve mutant volgens conclusie 17 of van een oxidoreductase volgens conclusie 18, samen met een substraat voor het oxidoreductase, voor het in situ produceren van waterstofperoxyde in een was- of bleekproces.
20. Gebruik volgens conclusie 19, waarbij als substraat ethanol wordt toegepast.
- 10 21. Was- of bleekmiddel, met het kenmerk, dat het een oxidoreductase bevattende, catalase-negatieve mutant volgens conclusie 17 of een oxidoreductase volgens conclusie 18 bevat.
- 15 22. Gebruik van een oxidoreductase bevattende, catalase-negatieve mutant volgens conclusie 17 of van een oxidoreductase volgens conclusie 18, voor het kwalita- tief en/of kwantitatief bepalen van een substraat voor het oxidoreductase.
- 20 23. Gebruik van een oxidoreductase bevattende, catalase-negatieve mutant volgens conclusie 17 of van een oxidoreductase volgens conclusie 18, als katalysator voor de oxydatie van een substraat van het oxidoreductase in het kader van een chemische synthese of van een afvalzuiveringsproces.

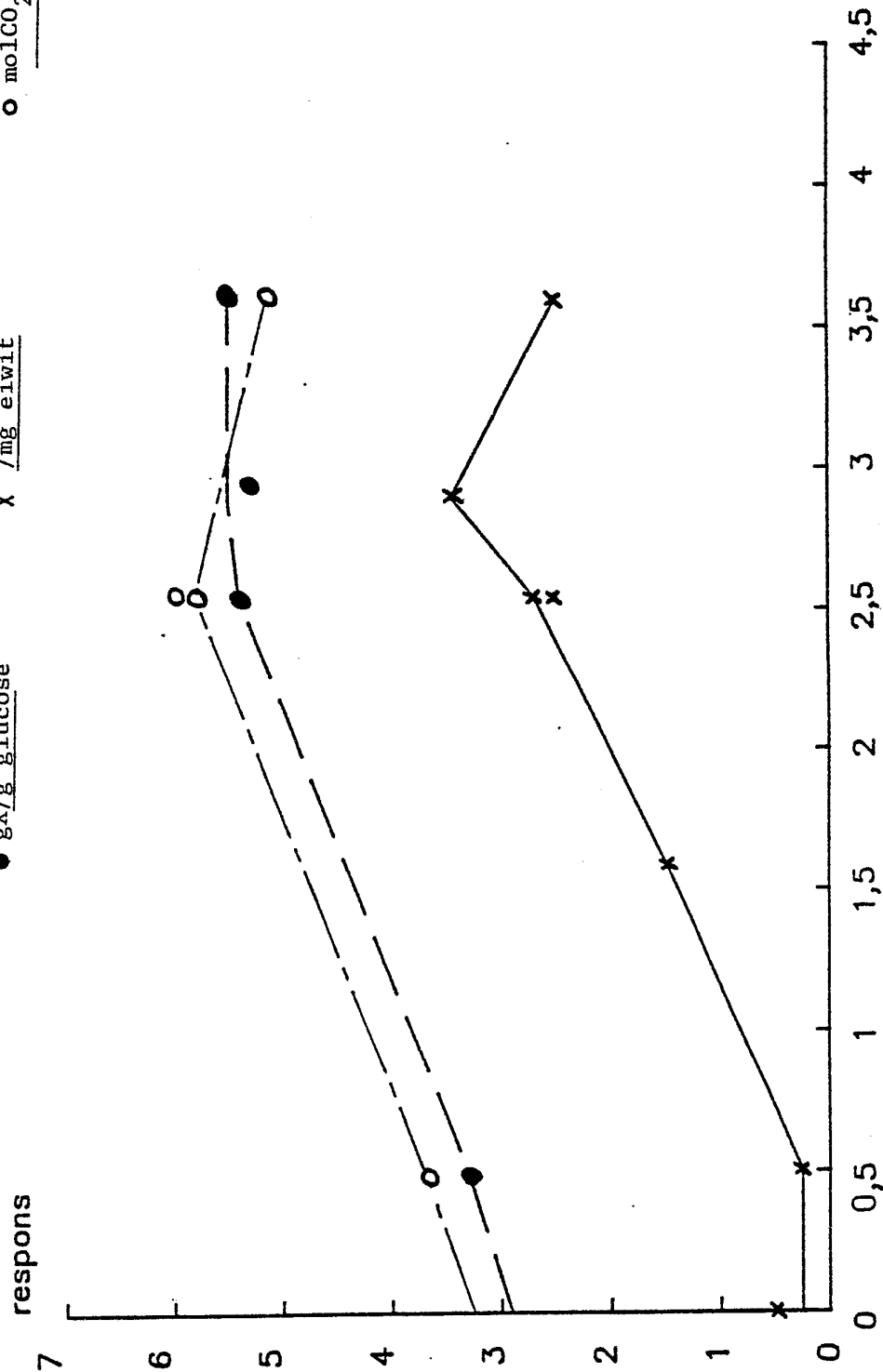
FIG.1

H. POLYMORPHA ATCC 46059, GEGROEID IN CONTINU

CULTURES OP MIEREZUUR / GLUCOSE MENGSELS

celopbrengst* 0,1 opbrengst van MOX eenheden
 ● gX/g glucose X /mg eiwit

RQ* 5
 ○ molCO₂/molO₂



molverhouding mierzuur / glucose

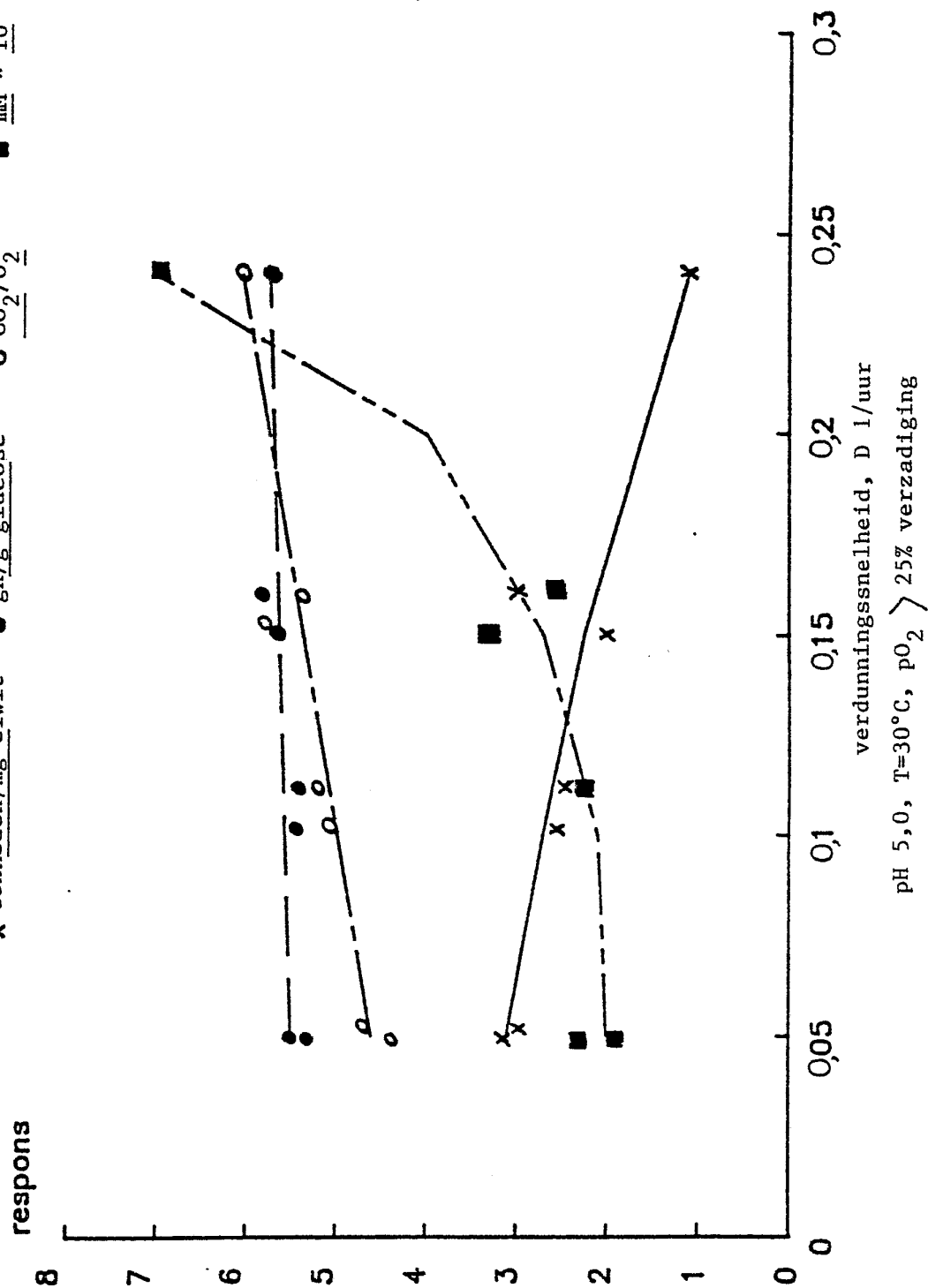
pH 5,0, pO₂ > 25%, D=0,1 l/u, glucose inlaat = 5 g/l, T=37°C

30
29
28
27
26
25
24

FIG. 2

H. PLYMORPHA ATCC 46059, GEGROEID OP EEN MENGSEL MET EEN
MIEREZUUR / GLUCOSE VERHOUDING 3,6

MOX activiteit opbrengst* 10 RQ* 5 mierzuur
X eenheden/mg eiwit ● gX/g glucose ○ CO₂/O₂ mM * 10



8601454

FIG.3

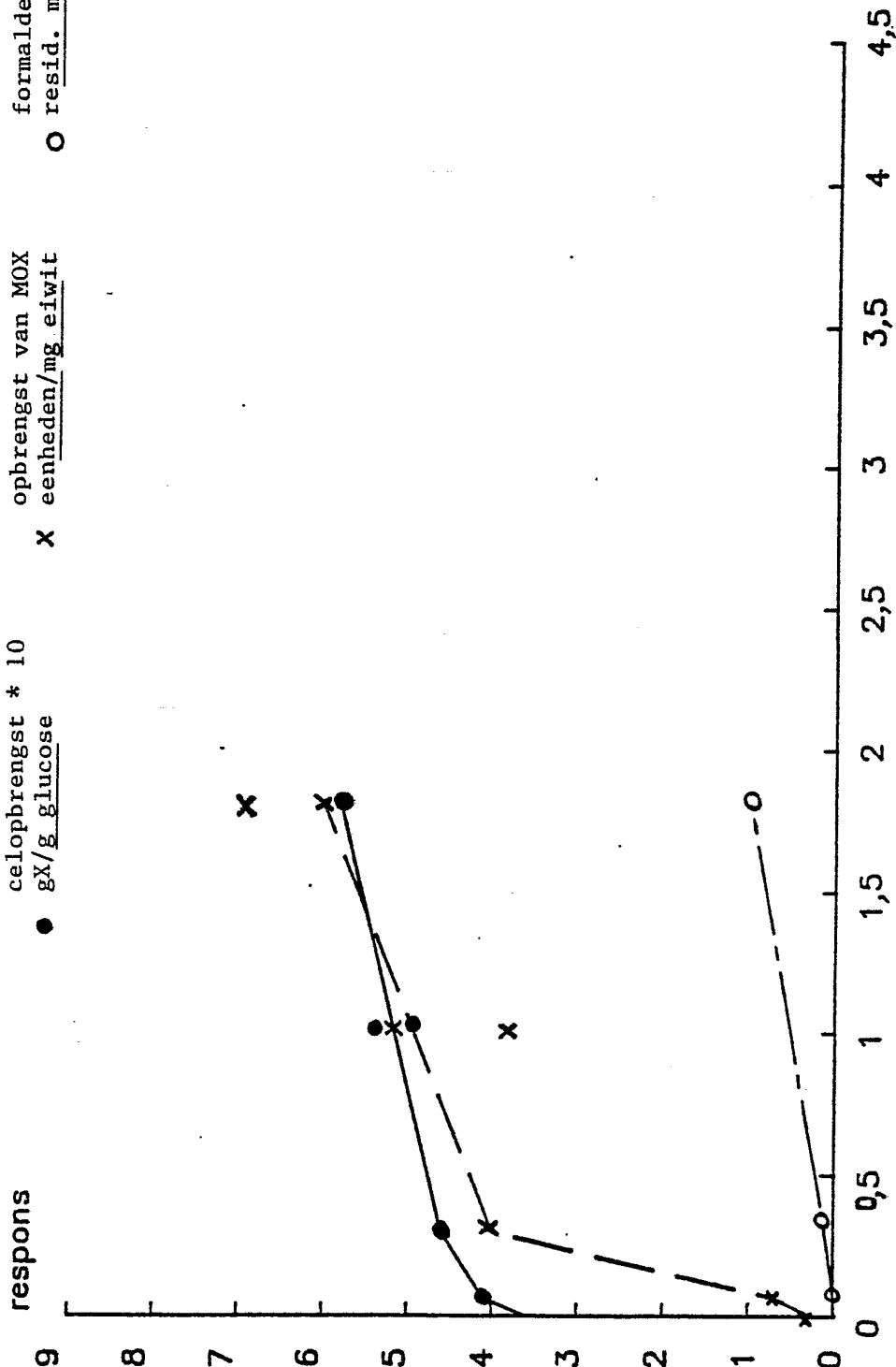
H. POLYMORPHA ATCC 46059 GEGROEID IN CONTINU CULTURES

OP FORMALDEHYDE / GLUCOSE MENGSELS

• celopbrengst * 10
gX/g glucose

X opbrengst van MOX
eenheden/mg eiwit

formaldehyde
resid. mM * 0,1



molverhouding formaldehyde/glucose

pH 5,0, pO₂ > 25%, D=0,10 1/uur, glucose inlaat= 5 g/l