



Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

FASCICOLO DEL BREVETTO A5

11

646 994

21 Numero della domanda: 7901/80

22 Data di deposito: 23.10.1980

30 Priorità: 26.10.1979 JP 54-139166

24 Brevetto rilasciato il: 28.12.1984

45 Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 28.12.1984

73 Titolare/Titolari:
Toyo Jozo Kabushiki Kaisha,
Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP)

72 Inventore/Inventori:
Ikuta, Shigeru, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP)
Imamura, Shigeyuki, Tagata-gun/Shizuoka-ken
(JP)
Ishikawa, Hidehiko, Tagata-gun/Shizuoka-ken
(JP)
Matsuura, Kazuo, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP)
Takada, Masaki, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP)
Misaki, Hideo, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP)

74 Mandatario:
Jacobacci-Casetta & Perani S.A., Genève

54 Procedimento per la produzione di acil-CoA ossidasi.

57 Viene descritto un procedimento per la produzione di acil-CoA ossidasi (acil-coenzima A ossidasi) mediante coltura di un microorganismo che produce acil-CoA ossidasi appartenente ai generi: *Macrophomina*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Monascus*, *Saccaromyces* o *Arthrobacter*, in un mezzo nutritivo ed isolamento da detto mezzo di acil-CoA ossidasi.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di acil-CoA ossidasi caratterizzato dal fatto di comprendere il coltivare il microorganismo che produce acil-CoA ossidasi appartenente al genere *Macrophomina*, al genere *Cladosporium*, al genere *Aspergillus*, al genere *Monascus*, al genere *Saccharomyces* ed al genere *Arthrobacter* in un mezzo nutritivo e l'isolare da detto mezzo acil-CoA ossidasi così formato.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il microorganismo che appartiene al genere *Macrophomina* è *Macrophomina phaseoli* ATCC 14383.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il microorganismo che appartiene al genere *Cladosporium* è *Cladosporium resineae* IFO 6367.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il microorganismo appartenente al genere *Aspergillus* è *Aspergillus candidus* M-4815 FERM-P n. 5226.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il microorganismo appartenente a genere *Monascus* è *Monascus* sp. M-4800 FERM-P n. 5225.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il microorganismo appartenente al genere *Saccharomyces* è *Saccharomyces cerevisiae* Y 0036 FERM-P n. 5174.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il microorganismo appartenente al genere *Arthrobacter* è *Arthrobacter* sp. B-0720 FERM-P n. 5224.

La presente invenzione riguarda il procedimento per la produzione di acil-CoA ossidasi (acil-coenzima A ossidasi). Acil-CoA ossidasi è un enzima che catalizza una reazione nella quale una mole di acil-CoA consuma una mole di ossigeno per generare una mole di 2,3-deidroacil-CoA ed una mole di acqua ossigenata.

È nota la *Candida utilis* quale microorganismo che produce acil-CoA ossidasi [Arch. Biochem. Biophys., 176, 591-603 (1976)].

Si è ora trovato che una muffa appartenente al genere *Macrophomina*; ceppo *Macrophomina phaseoli* ATCC 14383 [The American Type Culture Collection Catalogue of Strains I (1978)], genere *Cladosporium*; un ceppo *Cladosporium resinae* IFO 6367 [elenco delle colture dell'Istituto per la Fermentazione di Osaka (1978)], genere *Aspergillus*; un ceppo *Aspergillus candidus* M-4815 e genere *Monascus*; un ceppo *Monascus* sp. M-4800, lievito appartenente al genere *Saccharomyces*; un ceppo *Saccharomyces cerevisiae* Y 0036, ed un batterio appartenente al genere *Arthrobacter*; un ceppo *Arthrobacter* sp. B-0720 producono acil-CoA ossidasi ed è stato isolato detto enzima.

Le caratteristiche tassonomiche di detti microorganismi sono le seguenti.

[1] *Aspergillus candidus* M-4815:

(1) Condizioni di crescita in vari mezzi:

1) agar Czapeck:

Crescita a 26°C: lenta, 15-18 mm dopo coltura per 10 giorni.

Colonie: sottili e piatte. Colore della colonia: bianca al primo stadio, da color crema (hue 1.1/2 Ca) a giallo pallido (hue 1 Ca) nello stadio di maturazione, con abbondante formazione forme conidiali. Nessuna formazione di tipo sclerosi. Parte inversa della colonia: incolore. Nessuna

duzione di pigmento diffusibile e di materiale di essudazione.

2) agar estratto di Malto:

Crescita a 26°C: normale, diametro 42-45 mm dopo 10 giorni di coltura. Colonie: sottili e piatte. Colore della colonia: da bianco al primo stadio, a color crema (hue 1.1/2 Ca) nello stadio di maturazione con abbondante formazione di forme conidiali. Parte inversa della colonia: incolore. Nessuna produzione di pigmento diffusibile e di materiali di essudazione.

(2) Osservazione microscopica:

Testa conidiale: da bianco a color crema, relativamente grande, diametro 500-800 μ , sferica nello stadio iniziale presenta forme radiali distinte in uno stadio avanzato. Substrato conidiale: lunghezza 500-1000 μ , larghezza 8-15 μ , pareti lisce. Vescicola: da sferica a sotto-sferica, diametro 20-40 μ . Sterigma primario: 5,0-12,0 \times 3,0-4,0 μ , sterigma secondario: 5,0-7,0 \times 2,5-3,0 μ . Forme conidiali: sferiche, 2,5-3,5 μ , pareti lisce.

(3) Caratteristiche fisiologiche:

Temperatura di crescita: 15-37°C.

Con riferimento alle caratteristiche tassometriche sopra riportate, il ceppo M 4815, portante vescicole alla sommità delle forme conidiali, molti sterigma sulle vescicole e catene conidiali a cella singola alla sommità delle vescicole, viene confermato appartenere al genere *Aspergillus*. Il ceppo, dotato di una ampia testa conidiale e di abbondanti forme conidiali da color bianco a color crema, viene ascritto a *Aspergillus candidus* [K.B. Raper e D.I. Fennell, *The Genus Aspergillus*, pag. 686 (1965), J.A. von Arx, *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*, pag. 315 (1974)] e viene indicato come *Aspergillus candidus* M-4815. Questo ceppo è stato depositato presso Institute for Industrial Microbial Technology and Science, M.I.T.I., 1-3, Higashi 1-chome, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken, 3-5/ Giappone (di seguito indicato come Istituto per la Fermentazione) nella collezione di coltura permanente FERM-P n. 5226 il 11.10.1979.

[2] *Monascus* sp. M-4800:

(1) Condizioni di crescita in vari mezzi:

1) agar estratto di malto:

Crescita a 26°C: rapida, 60-65 mm dopo 10 giorni di coltura. Colonie: sottili e piatte. Ife aeree: bianche e fioccoso se nello stadio iniziale della coltura, scomparsa dell'aspetto fioccoso in dipendenza del progresso della coltura. Colore: corallo (hue 7 lc). Parte inversa della colonia: rosso mattone (hue 6 ng).

2) agar glucosio patata:

Crescita a 26°C: rapida, 60-63 mm dopo 10 giorni di coltura. Colonia: sottile e piatta, leggermente sollevata al centro. Ife aeree bianche e fioccoso che crescono nello stadio iniziale della coltura, scomparsa dell'aspetto fioccoso in dipendenza del progresso della coltura.

Colore: rosa coloniale (hue 7 ic).

Parte inversa della colonia: rosso mattone (hue 6 ng).

(2) Osservazione microscopica:

Sacco di spore: sferico, diametro 20-45 μ , formato alla sommità di uno stelo di 40-60 \times 3-5 μ . Ascospore: ellittiche, 4,5-5,5 \times 4-4,5 μ incolori, pareti lisce.

Forme conidiali: di tipo Meristema-antospore, conformate a catena alla sommità delle forme conidiali, con forma di tipo a pera, incolori, con diametro 7-10 μ .

Nelle ife vegetative si formava un pigmento bruno rosso.

(3) Caratteristiche fisiologiche:

1) Condizioni ottimali di crescita:

pH ottimale di crescita: 4-9.

Temperatura ottimale di crescita: 22-30°C.

2) Condizioni di crescita: pH di crescita: 3-11.

Temperatura di crescita 15-35°C.

Date le caratteristiche riportate, il ceppo M-4800, che forma sacco di spore alla sommità dello stelo con scomparsa del sacco di spore in uno stadio più avanzato, viene identificato appartenere al genere *Monascus* [The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture, pagg. 315 (1974)] e viene indicato con *Monascus* sp. M-4800. Questo ceppo è stato depositato presso l'Istituto per la Fermentazione nella collezione permanente delle colture con il numero FERM-P 5225 il 11.10.1979.

[3] *Saccharomyces cerevisiae* Y 0036:

(1) Condizioni di crescita in vari mezzi:

1) Mezzo liquido MY:

Crescita buona a 26°C sul fondo del mezzo. Nessuna formazione di corteccia. Leggermente torbido durante la crescita. Nessuna colorazione del mezzo.

2) Mezzo agar MY:

Crescita buona a 26°C. La periferia della colonia gigante è totalmente o parzialmente intrecciata. Superficie: varie pieghe radiali. Lucentezza opaca. Di aspetto burroso. Color crema.

3) Coltura inclinata in mezzo agar estratto di patata:

Celle vegetative: 3,0-8,0 × 2,5-7,0 μ non sferiche, ovoidali o ellittiche.

Crescita per riproduzione per innesto polipolare.

Nessuna formazione di ife e pseudo-ife.

(2) Formazione di ascospore:

Buona formazione di ascospore nel mezzo Gorodkwa.

Sferiche o ovoidali. Superficie liscia. Diametro 2,5-3,0 μ. 1-4 spore in un sacco di spore.

(3) Formazione di spore radiali: nessuna.

(4) Caratteristiche fisiologiche:

1) Condizioni ottimali di crescita:

pH ottimale di crescita: 3-7.

Temperatura ottimale di crescita: 20-30°C.

2) Intervallo di crescita:

pH di crescita: 2-9:

Temperatura di crescita: 10-40°C.

3) Assimilazione di nitrato: —

4) Decomposizione del lipide: —

5) Decomposizione di urea: —

6) Liquefazione della gelatina: —

7) Pressione antiosmotica: limite di crescita in NaCl con concentrazione 12-14%.

8) Formazione di pigmenti del carotene: —

9) Formazione tipica di acido organico: —

10) Formazione di una sostanza simile all'amido: —

11) Richiesta di vitamina: —

12) Fermentazione e assimilazione di zuccheri:

	fermentativo	assimilabile
D-arabinosio	—	—
L-arabinosio	—	—
D-ribosio	—	—
D-xilosio	—	—
D-glucosio	+	+
D-mannosio	+	+
D-galattosio	+	+
D-ramnosio	—	—
D-fruttosio	+	+
L(-)-sorbosio	—	—
Maltosio	+	+
Saccarosio	+	+
Lattosio	—	—

fermentativo

assimilabile

		—
		—
5	Trealosio	—
	Raffinosio	1/3 +
	Melezitosio	+
	Arbutina	—
	Amido solubile	—
10	Inulina	—
	DL-lattato	+
	Succinato	+
	Citrato	+

15 Con riferimento alle caratteristiche tassometriche sopra riportate, il ceppo Y 0036, avente le caratteristiche di un lievito, con forma sferica o ovoidale, con formazione di ascospore lisce con crescita di ife vegetative mediante riproduzione per innesto polipolare, privo di formazione di spore radiali, privo di assimilazione del nitrato e con buona capacità fermentativa per il glucosio, appartiene al genere *Saccharomyces*. Ulteriori dettagli relativamente alla morfologia del ceppo, alla crescita, la fermentazione e la assimilazione di zuccheri ed altre caratteristiche mostrano una
25 identità con la descrizione di *Saccharomyces cerevisiae* [J. Lodder, *The Yeast, uno studio tassonomico*, pag. 1385 (1950)]. Questo ceppo viene riferito alla *Saccharomyces cerevisiae* ed è stato depositato presso l'Istituto per la Fermentazione nella collezione di coltura permanente con il
30 n. FERM-P 5174 il 27.8.1979.

[4] *Arthrobacter* sp. B-0720:

(1) Crescita in vari mezzi:

1) Piatto nutritivo agar:

35 Colonia: circolare, periferia liscia, convessa, da bianco grigiastro a giallo pallido dopo 2-3 giorni di coltura.

2) Slant nutritivo agar:

Crescita buona, crescita filiforme. Produzione di pigmento diffusibile dopo 2-3 giorni di coltura.

40 3) Brodo Bouillon:

Crescita debole, torbido, nessuna formazione di pelli-

cola.

4) Latte BCP:

Debolmente alcalino dopo 5-7 giorni.

45 (2) Osservazione microscopica:

1) Forma e grandezza delle celle:

Celle giovani (6 ore di coltivazione): sottoforma di bastoncini o di aste lineari o leggermente incurvate. Piccola

50 quantità di celle ramificate.

Celle vecchie (20 ore di coltivazione): bastoncini corti o sferici (polimorfismo).

Grandezza: 0,5-0,8 × 1,5-3,0 μ (celle giovani), 0,5-0,8 ×

0,5-1,0 μ (celle vecchie).

Nessuna formazione di spore.

55 2) Capacità di movimento: flagelli subpolari o flagelli polari.

(3) Caratteristiche fisiologiche:

1) Temperatura di crescita:

60 Nessuna crescita a 10°C. Crescita debole a 42°C. Crescita buona a 25-35°C.

2) pH di crescita: nessuna crescita pH 6,0. Crescita a

65 pH 6,5-9,0.

3) Colore: colore di Gram: + Colore provocato dal-

l'acido: —

4) Decomposizione di cellulosa: —

5) Decomposizione di gelatina: +

6) Decomposizione di caseina: +

7) Decomposizione di esculina: +

- 8) Idrolisi di amido: +
- 9) Formazione di catalasi: +
- 10) Formazione di ossidasi: +
- 11) Formazione di ureasi: —
- 12) Formazione di indolo: —
- 13) Formazione di H₂S: —
- 14) Formazione di acetoina: —
- 15) Riduzione del nitrato: +
- 16) Utilizzazione del citrato: +
- 17) Utilizzazione di ammonio: +
- 18) Utilizzazione di nitrato: +
- 19) Saggio O-F[⊕]: O (ossidativo)
- 20) Formazione di acido da zucchero[⊕]

Formazione di acido (nessuna formazione di gas):
L(+)-arabinosio, cellobiosio, D-galattosio, D-glucosio, gli-
cerolo, lattosio, D-mannosio, amido, saccarosio.

Nessuna formazione di acido: adonitolo, dulcitolio, meso-
eritritolo, fucosio, inositolo, inulina, maltosio, mannitolo,
melezitonio, melibiosio, raffiniosio, L(+)-rammosio, salici-
na, L(-)-sorbosio, sorbitolo, trealosio.

⊕ [J. Gen. Microbiol., 30, 400-420 (1963)].

Quale risultato le caratteristiche tassonomiche del cep-
po P-0720 si dimostrarono identiche a quelle del genere
Arthrobacter (Bergey's Manual of Determinative Bacterio-
logy, 7 edizione (1957), Can. J. Microbiol., 20, 1411-1414
(1974)] sulla base della colorazione positiva di Gram, della
resistenza all'acido, dei batteri aerobili polimorfi e della
mancanza di decomposizione della cellulosa. Pertanto il
ceppo P-0720 viene indicato come *Arthrobacter* sp. B-0720
ed è stato depositato presso l'Istituto per la Fermentazione
nella collezione di colture permanente con il n. FERM-P
5224 il 11.10.1979.

Costituisce uno scopo della presente invenzione provve-
dere un procedimento per la produzione di acil-CoA ossi-
dasi che comprende il coltivare i microorganismi che pro-
ducono acil-CoA ossidasi, appartenenti al genere *Macropho-
mina*, al genere *Cladosporium*, al genere *Aspergillus*, al
genere *Monascus*, al genere *Saccharomyces* o al genere *Arth-
robacter* in un mezzo nutritivo ed il separare l'enzima pro-
dotto.

Il ceppo che può essere utilizzato secondo la presente
invenzione è ad esempio: *Macrophomina phaseoli*, ATCC
14383, *Cladosporium resinae* IFO 6367, *Aspergillus candi-
dus* M-4815, *Monascus* sp. M-4800, *Saccharomyces cerevi-
siae* Y 0036 o *Arthrobacter* sp. B-0720. Questi ceppi non
devono considerarsi così limitati e possono essere utilizzati
secondo la presente invenzione altri ceppi appartenenti ai
generi sopra indicati ed i relativi mutanti naturali o artifi-
ciali.

Secondo una attuazione della presente invenzione, il mi-
croorganismo sopra indicato che produce acil-CoA viene col-
tivato in un mezzo convenzionale per la produzione di en-
zima. La coltura del microorganismo può essere condotta
mediante coltura liquida o solida. È preferibile la coltura
ad areazione sommersa per una produzione industriale.

Viene preferibilmente utilizzato un mezzo convenzionale
per i microorganismi. Quali sorgenti di carbonio possono
essere utilizzate sorgenti assimilabili di carbonio, come glu-
cosio, galattosio, melassi, idrolizzato di amido, acidi grassi
superiori come acido oleico, acido palmitico, acido steari-
co, acido palmitoleico o acido miristoleico. Si possono uti-
lizzare sorgenti di azoto assimilabile come peptone, polvere
di soia, idrolizzato di caseina, liquido di macerazione del
grano, estratti di carne, estratto di lievito, sale nitrato o di
ammonio. Possono essere eventualmente utilizzati vari sali
come cloruro sodico, cloruro di potassio, fosfato di potas-
sio o solfato di magnesio. L'aggiunta di acidi grassi supe-

riori, come ad esempio l'acido oleico, quali sorgenti di car-
bonio al mezzo stimola la produzione di acil-CoA ossidasi.
La quantità aggiunta è preferibilmente 0,5-1% peso/peso
nel mezzo.

- 5 La temperatura di coltura può variare entro gli intervalli
di crescita per il microorganismo e per la produzione dell'en-
zima e preferibilmente è 25-30°C per la muffa e di 28-33°C
per il lievito o batterio. La coltura viene ovviamente inter-
rotta quando la produzione di acil-CoA ossidasi è sostan-
zialmente completa. Acil-CoA ossidasi è un endo-enzima
che esiste nelle celle dei microorganismi.

Forme di attuazione per la estrazione di acil-CoA ossi-
dasi dalla massa coltivata sono le seguenti. La massa col-
tivata viene filtrata e le celle bagnate vengono sospese in
15 tampone fosfato oppure in tampone tris-HCl e vengono sot-
toposte a lisi per trattamento con lisozima, sonificazione o
pressa di French. Acil-CoA ossidasi greggio così ottenuto
viene purificato mediante metodi convenzionali di isola-
mento e di purificazione per le proteine e per gli enzimi.
20 Di preferenza si applicano ad esempio la precipitazione fra-
zionata con acetone, etanolo o isopropanolo e spostamento
salino con solfato di ammonio. L'ulteriore purificazione
può essere ottenuta ad esempio mediante elettroforesi o crom-
atografia nelle quali acil-CoA ossidasi greggio viene di-
sciolto in tampone fosfato oppure in tampone tris-HCl e
25 cromatografato utilizzando scambiatori di ioni come ad
esempio dietilamminoetil-cellulosa (DEAE-cellulosa, oppu-
re gel destrano, oppure agenti di filtrazione di gel come gel
destrano o gel poliaccrilammide). Acil-CoA ossidasi purifi-
cato può essere conservato come polvere liofilizzata.

Acil-CoA ossidasi della presente invenzione viene sag-
giato con il metodo che segue e possiede le seguenti carat-
teristiche fisico-chimiche:

- (1) Metodo di saggio:
35 La soluzione dell'enzima (10 µl) viene aggiunta alla mi-
scela di reazione (0,5 ml) consistente di tampone fosfato
0,2 M (pH 7,0) o di tampone tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)
(0,1 ml) 4-amminoantipirina 5 mM (0,05 ml), dietil m-tolui-
dina 3 mM (0,05 ml), per ossidasi (0,5 mg/ml, 0,05 ml),
40 palmitoil-CoA 25 mM (0,02 ml) ed acqua distillata (0,23 ml)
e si sottopone ad incubazione a 37°C per 10 minuti. Viene
aggiunta urea 4 M (0,5 ml) per bloccare la reazione e si ag-
giunge 1% peso/peso di triton X-100 (2 ml) e si misura
l'acqua ossigenata generata mediante colorimetria a 545 nm.
45 Una unità (I unità, I U) di attività dell'enzima, viene
definita come l'attività dell'enzima che genera una micro-
mole di acqua ossigenata per minuto.

- (2) Azione dell'enzima:
L'ossidazione di una mole di acil-CoA ossidasi consu-
50 ma una mole di ossigeno e libera una mole di 2,3-deidro-
acil-CoA ed una mole di acqua ossigenata.

- (3) pH ottimale:
Il pH ottimale viene determinato saggiando l'attività
55 dell'enzima in tampone dimetilglutarile (pH 6,0-7,0), in
tampone fosfato (pH 6,5-7,5) ed in tampone tris-HCl (pH
7,5-9,0). Il pH ottimale dell'enzima è illustrato nella tabella.

In fig. 1: —· : *Arthrobacter* sp. B-0720

○—○ : *Macrophomina phaseoli* ATCC 14383.

- 60 (4) Stabilità al pH:
La soluzione dell'enzima viene aggiunta a vari pH tam-
pone, viene sottoposta ad incubazione a 37°C per 60 mi-
nuti e viene saggiata l'attività residua. Si utilizza il tampo-
65 ne fosfato per il pH di 6,5-7,5, il tampone tris-HCl per il
pH di 7,5-9,0 ed il tampone glicina per il pH di 9,0-10,0.
La stabilità al pH di acil-CoA ossidasi viene illustrata in
tabella.

Nella fig. 2: —•— : *Arthrobacter* sp. B-0720
 ○—○ : *Macrophomina phaseoli* ATCC 14383.

(5) Stabilità al calore:

L'enzima viene trattato a 40°C, 45°C, 50°C, 55°C e 60°C per 10 minuti e viene saggiata l'attività residua dell'enzima. Il risultato viene riportato in tabella.

Nella fig. 3: —•— : *Arthrobacter* sp. B-0720
 ○—○ : *Macrophomina phaseoli* ATCC 14383.

(6) Valore Km: illustrato in tabella.

(7) Punto isoelettrico: illustrato in tabella.

Come sopra indicato l'acil-CoA ossidasi della presente invenzione catalizza l'ossidazione di acil-CoA a lunga catena, come ad esempio palmitoil-CoA, consumando una mole di ossigeno e generando 2,3-deidroacil-CoA e acqua ossigenata.

L'enzima della presente invenzione può essere utilizzato per analisi di acidi grassi, CoA e trigliceridi in un siste-

ma formante acil-CoA nella miscela di reazione consistente di acido a grasso, CoA ed enzima attivante l'acido grasso ed il sistema formante acido grasso consistente di trigliceride e lipasi oppure lipoproteina lipasi. L'enzima può anche essere utilizzato per il saggio dell'attività di enzimi attivanti acido grasso, lipasi o lipoproteina lipasi.

Gli esempi che seguono illustrano la presente invenzione.

Esempio 1

10 Un mezzo (10 ml) comprendente acido oleico 1% peso/peso, estratto di lievito 0,25% peso/peso, peptone 1% peso/peso, KCl 0,2% peso/peso, K_2HPO_4 0,1% peso/peso, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05% peso/peso e agente anti-schiuma (Disfoam BC-51Y) 0,2% peso/peso fu sterilizzato in un tubo di 15 saggio. Fu inoculato *Arthrobacter* sp. B-0720 e si sottopose a coltura a scosse a 30°C per una notte. Detta coltura di semina fu trasferita nello stesso mezzo sterilizzato (5 l) nella camera di un fermentatore da 8 l e si sottopose a coltura a 30°C per 20 ore a 600 giri/minuto e con aerazione 20 5 l per minuto.

Microorganismo produttore acil-CoA	pH ottimale	stabilità del pH	stabilità al calore	Km	punto isoelettrico
<i>Arthrobacter</i> sp. B-0720	8,0-8,5	6,0-7,5	<45°C	0,13 mM	4,70
<i>Macrophomina phaseoli</i> ATCC 14383	6,5-7,5	6,5-8,5	<40°C	0,087 mM	5,19
<i>Cladosporium resinae</i> IFO 6367	6,5-7,5	6,5-8,0	<40°C	0,12 mM	
<i>Aspergillus candidus</i> M-4815	6,5-7,5	6,5-8,5	<40°C	0,11 mM	
<i>Monascus</i> sp. M-4800	6,5-8,0	6,5-8,0	<40°C	0,15 mM	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	circa 3,0	6,0-10,0	<45°C	0,50 mM	

Le celle batteriche furono raccolte per centrifugazione e furono sospese in una soluzione (1 l) consistente di tampone fosfato 10 mM (pH 7,0), EDTA 2mM e lisozima (0,5 40 mg/ml) e si sottopose ad agitazione a 37°C per 60 minuti. Fu aggiunto deossiribonucleasi (5 mg) e si agitò ulteriormente per 10 minuti. Al supernatante ottenuto centrifugando a 10 000 giri per minuto per 20 minuti fu aggiunto acetone (200 ml) e si sottopose a centrifugazione. Ulteriore acetone (1,8 l) fu aggiunto al supernatante, quindi il precipitato, che fu raccolto per centrifugazione, fu disciolto in tampone fosfato 10 mM (200 ml, pH 7,0). La sostanza insolubile fu allontanata mediante centrifugazione ed il supernatante fu frazionato mediante aggiunta di soluzione saturata 50 di solfato di ammonio con saturazione 30-75%. Il precipitato fu disciolto in tampone fosfato 10 mM (40 ml, pH 7,0) e privato del sale attraverso una colonna di gel di acrilamide (nome commerciale: Biogel P-2, prodotto della Biorad Co.). La soluzione privata del sale fu trattata in colonna di 55 gel a calcio fosfato per assorbire l'enzima e fu lavata ed eluita mediante un gradiente di tampone fosfato 0,05-0,5 M (pH 7,0). La frazione attiva (circa 0,45 M) fu raccolta e sottoposta a dialisi e concentrata mediante ultrafiltrazione (nome commerciale: Membrana Diaflow PM-10, prodotto della Amicon Co.), quindi fu liofilizzata per ottenere acil-CoA ossidasi sotto forma di polvere (attività specifica: 5,5 60 U/mg, attività totale: 850 U, resa: 8,5%).

Esempio 2

65 Un mezzo (10 ml) comprendente acido oleico 1% peso/peso, estratto di lievito 0,25% peso/peso, polvere di soia privata dei grassi (nome commerciale: Protoflower) 1% peso/peso, KCl 0,2% peso/peso, K_2HPO_4 0,1% peso/peso,

CaCO₃ 0,5% peso/peso ed antischiuma BC-51 Y 0,2% peso/peso fu sterilizzato in un tubo di saggio. Fu inoculato *Macrophomina phaseoli* ATCC 14383 e si sottopose a coltura a scosse a 26°C per 4 giorni. La coltura di semina fu trasferita nello stesso mezzo (5 l) nella camera di un fermentatore da 8 l e si sottopose a coltura a 26°C per 45 ore a 700 giri/minuto a razione di 5 l/minuto.

Le celle del fungo ottenuto per filtrazione furono sospese in tampone fosfato 10 mM (pH 7,0, 1,5 l). La sospensione fu omogeneizzata per 15 minuti. Il supernatante ottenuto mediante centrifugazione fu concentrato sottovuoto fino a 1/10 volume per separare le frazioni insolubili. Fu aggiunta soluzione satura di ammonio al supernatante per frazionare con saturazione 30-80%. Il precipitato fu disciolto in tampone fosfato 10 mM (pH 7,0, 75 ml) e ulteriormente frazionato con soluzione di solfato di ammonio 30-80%. Il precipitato ottenuto fu disciolto in tampone fosfato (pH 7,0, 40 ml) ed i materiali insolubili furono allontanati per centrifugazione. La soluzione fu caricata su una colonna di Sephacryl S-300 (nome commerciale: Pharmacia Fine Chem. Co.) e fu eluita per ottenere le frazioni attive. La frazione attiva fu concentrata mediante membrana per ultrafiltrazione (membrana Diaflow XM-50, Amicon Co.) e liofilizzata per ottenere acil-CoA ossidasi in polvere (attività specifica: 1,2 U/mg attività totale: 110 U, resa: 11,0%).

Esempi 3-5

Nell'esempio 2 *Macrophomina phaseoli* ATCC 14383 fu sostituita con *Aspergillus candidus* M-4815, *Cladosporium resinae* IFO 6367 e *Monascus* sp. M-4800, e questi ceppi furono definitivamente inoculati nello stesso mezzo (100 ml) dell'esempio 2 di un pallone da 500 ml di Erlenmeyer e si sottopose a coltura a scosse a 26°C per 4 giorni. Il micelio filtrato fu sospeso in tampone fosfato 10 mM (pH 7,0, 1/5 volume di sospensione) e fu sottoposto a so-

nicazione per 10 minuti. L'attività di acil-CoA ossidasi della soluzione supernatante ottenuta mediante centrifugazione fu saggiata nel modo che segue.

5 Microorganismi:	Enzima (U/ml)
<i>Aspergillus candidus</i> M-4815	0,047
<i>Cladosporium resinae</i> IFO 6367	0,035
<i>Monascus</i> sp. M-4800	0,065

10 Questi furono purificati con lo stesso procedimento dell'esempio 1.

Esempio 6

Un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* Y 0036 fu inoculato in un mezzo (pH 4,2, 100 ml) comprendente acido oleico 1% peso/peso, estratto di lievito 0,25% peso/peso, peptone 0,5% peso/peso KCl 0,2% peso/peso, KH₂PO₄ 0,1% peso/peso e MgSO₄ · 7H₂O 0,05% peso/peso in un pallone da 500 ml di Erlenmeyer e si sottopose a coltura 20 a scosse a 30°C per 3 giorni. Le celle di lievito, che furono raccolte per centrifugazione, furono sospese in tampone fosfato di 10 mM (pH 7,0, 1/5 volume di sospensione) e si sottoposte a sonicazione per 10 minuti. L'attività di acil-CoA 25 nella soluzione supernatante ottenuta mediante centrifugazione fu pari a 0,75 U/ml. Le procedure di purificazione furono quelle dell'esempio 1.

Descrizione delle figure:

Fig. 1: pH ottimale

30 Fig. 2: stabilità al pH

Fig. 3: stabilità al calore

In queste figure:

35 ·—· : acil-CoA ossidasi ottenuto da *Arthrobacter* sp. B-0720.

o—o : acil-CoA ossidasi ottenuto da *Macrophomina phaseoli* ATCC 14383.

FIG. 1

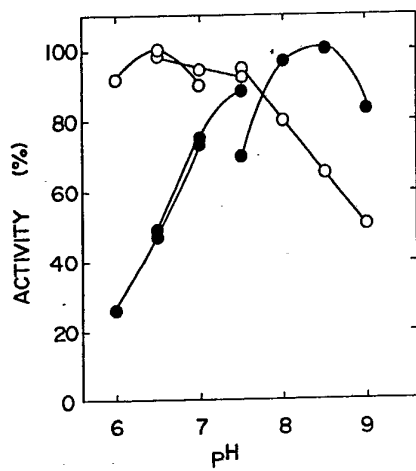


FIG. 2

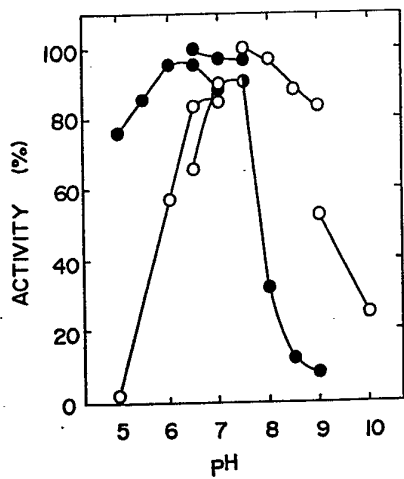


FIG. 3

