



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og  
Varemærkestyrelsen

---

- (51) Int.Cl.®: **C 12 N 9/10 (2006.01)**                      **C 12 N 1/20 (2006.01)**                      **C 12 P 19/18 (2006.01)**
- (21) Patentansøgning nr: **PA 1993 00575**
- (22) Indleveringsdag: **1993-05-17**
- (24) Løbedag: **1993-05-17**
- (41) Alm. tilgængelig: **1993-11-19**
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: **2006-07-17**
- (30) Prioritet: **1992-05-18 US 884183**
- (73) Patenthaver: **Genencor International, Inc. a corporation of the State of Delaware, 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, USA**
- (72) Opfinder: **Robert L. Charles, Centerbury Drive 1632, Elkhart, Indiana 46514, USA**  
**Jayarama K. Shetty, Brooktree Court 2912, Elkhart, Indiana 46514, USA**
- (74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**
- 

- (54) Benævnelse: **Levansaccharase-enzym, fremgangsmåde og mikroorganismer til fremstilling heraf og sammensætninger indeholdende dette**
- (56) Fremdragne publikationer:  
**EP A2 0307158**  
**WO A1 8403518**  
**JP A 52082781**  
**JP A 3198773**

- (57) Sammendrag:

Den foreliggende opfindelse angår et syrestabilt levansaccharase-enzym, der ikke induceres af saccharose.

Den foreliggende opfindelse angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af dette enzym og mikroorganismer til fremstilling af levansaccharase-enzym. Den foreliggende opfindelse angår også sammensætninger, der indeholder dette enzym.

Den foreliggende opfindelse angår et syrestabilt levansaccharase-enzym, mikroorganismer til fremstilling heraf, fremgangsmåde til fremstilling af dette syrestabile levansaccharase-enzym, sammensætninger, der indeholder dette og anvendelse deraf.

5

Levansaccharase-enzymet katalyserer omdannelsen af fructose. Nærmere bestemt katalyserer levansaccharase-enzymet (E.C.2.4.1.10) omdannelse af fructosylrester fra saccharose, raffinose eller stachyose til et passende co-substrat ved dannelse af polymere, der alment betegnes levaner, og som  
10 indeholder forskellige mængder fructosylrester bestående af  $\beta(2 \rightarrow 6)$ -bindinger. Levaner finder udbredt anvendelse inden for den kemiske industri og fødevareindustrien såvel som inden for medicin og forskning.

Levansaccharase-enzymet er blevet isoleret fra et stort antal mikrobielle kil-  
15 der, såsom mikroorganismerne *Acetobacter suboxydans*, *Actinomyces viscosus*, *Aerobacter levanicum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Glucobacter oxydans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptomyces griseus*, *Zymomonas mobilis*.

20

I de fleste tilfælde er enzymet ekstracellulært og varme stabilt. Et af de væsentligste elementer ved fremstillingen af levansaccharase-enzymet er, at der mindst skal tilføres 5% saccharose til vækstmediet for at inducere enzymsyntesen, når der anvendes kendte mikroorganismer til fremstillingen af  
25 levansaccharase-enzymet.

Som følge heraf er det vanskeligt at separere levansaccharase-enzymet fra næringsvæsken, fordi næringsvæskens viskositet forøges, når der fremstilles levan under fermenteringen. Der søges derfor til stadighed efter mikroorga-  
30 nismer, der kræver ingen eller kun små mængder saccharose for at fremstille levansaccharase.

- I den japanske patentansøgning JP-A-52-82781 beskrives en fremgangsmåde til fremstilling af et ekstracellulært levansaccharase-enzym i nærvær af lave saccharosekoncentrationer (0,3 vægt/rumfangs-%) ved anvendelse af *Bacillus licheniformis* stamme AJ 3982 (Institute of Microbial Engineering deponeringsnr. 3373). Dette enzym behøver dog stadig saccharose for at induceres og fremstilles. Endvidere udviser dette levansaccharase-enzym ingen enzymatisk aktivitet ved en pH-værdi på 4,0, når det holdes ved en temperatur på 55 °C. Ved denne temperatur udviser det kun 50% af dets maksimale aktivitet ved en pH-værdi på ca. 5,2 og kun ca. 80% af dets maksimale aktivitet ved pH-værdier i området ca. 6-7,8. Dette snævre pH-interval begrænser anvendelsesmulighederne for dette levansaccharase-enzym. Levansaccharase-enzymets syrestabilitet er meget vigtig, for at enzymet kan opnå udbredt kommerciel anvendelse.
- 15 Den foreliggende opfindelse har det formål at tilvejebringe et levansaccharase-enzym, der udviser enzymatisk aktivitet i et bredere pH-interval end kendte enzymer, og som i modsætning til kendte enzymer er stabilt ved sure pH-værdier.
- 20 Med dette formål tilvejebringer den foreliggende opfindelse et syrestabilt levansaccharase-enzym fremstillet ved hjælp af en mikroorganisme, der tilhører arten *Bacillus*, og som ved en temperatur på ca. 55 °C og en pH-værdi på 4,0 udviser en enzymatisk aktivitet på mindst 50% af den maksimale aktivitet, der er målt ved 55 °C og pH 5,5 – 6,3, og at enzymet kan opnås fra *Bacillus licheniformis*-stammen NRRL-18962.

Levansaccharase-enzymet ifølge den foreliggende opfindelse udviser endvidere en væsentlig enzymatisk aktivitet i et bredt pH-interval i nærvær af et substrat, såsom saccharose. Endvidere udviser det ved pH-værdier i intervallet ca. 5,5-6,3 den maksimale enzymatiske aktivitet målt ved ca. 55 °C.

Mere præcist udviser det ved en temperatur på 55 °C og pH-værdier i intervallet ca. 4,0-8,4 en enzymatisk aktivitet på mindst 50% af den maksimale

aktivitet målt ved 55 °C. Ved en temperatur på 55 °C og pH-værdier i intervallet ca. 4,2-8,0 udviser det en enzymatisk aktivitet på mindst 70% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C. Ved en temperatur på 55 °C og pH-værdier i intervallet ca. 4,5-7,8 udviser det en enzymatisk aktivitet på mindst 80% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C. Ved en temperatur på ca. 55 °C og pH-værdier i intervallet ca. 4,7-7,2 udviser det en aktivitet på mindst 90% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C.

Levansaccharase-enzymet ifølge den foreliggende opfindelse udviser en væsentlig termisk stabilitet i nærvær af et substrat, såsom saccharose. Endvidere udviser det ved temperaturer i intervallet ca. 55-64 °C maksimal enzymatisk aktivitet ved en pH-værdi på 5,5.

Mere præcist udviser det ved en pH-værdi på ca. 5,5 og ved temperaturer i intervallet ca. 35-75 °C en enzymatisk aktivitet på mindst 50% af den maksimale aktivitet ved en pH-værdi på 5,5. Ved en pH-værdi på 5,5 og temperaturer i intervallet ca. 45-68 °C udviser det en enzymatisk aktivitet på mindst 80% af den maksimale aktivitet målt ved en pH-værdi på 5,5. Ved en pH-værdi på ca. 5,5 og temperaturer i intervallet ca. 50-67 °C udviser det en enzymatisk aktivitet på mindst 90% af den maksimale aktivitet målt ved en pH-værdi på 5,5.

Levansaccharase-enzym ifølge den foreliggende opfindelse er et cellebundet enzym. Det besidder fructosyltransferase-aktivitet og er således i stand til at fremstille fructosylpolymere fra saccharose bestående af  $\beta$ -D(2->6)-bundet fructose, der tilhører "levan-familien".

Levansaccharase-enzymet ifølge den foreliggende opfindelse er ikke et saccharoseinducerbart enzym, dvs. at det ikke behøver saccharose for at induceres og fremstilles.

Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af et syrestabilt levansaccharase-enzym ved anvendelse af en mikroorganisme i fravær af tilførsel af saccharose til næringsmediet.

5 Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse til fremstilling af et syrestabilt levansaccharase-enzym omfatter følgende trin:

(i) en mikroorganisme af slægten *Bacillus* dyrkes i et passende næringsmedium ved at danne en fermenteringsvæske, der omfatter  
10 en biomasse, og

(ii) levansaccharase-enzymet indvindes fra fermenteringsvæsken, hvori mikroorganismen er dyrket i fravær af saccharose.

15 Den foreliggende opfindelse har endvidere det formål at tilvejebringe en ny mikroorganisme af slægten *Bacillus*, der kan fremstille et syrestabilt levansaccharase-enzym i fravær af saccharose i næringsmediet.

20 Opfindelsen angår således en ikke tidligere kendt mikroorganisme af arten *Bacillus licheniformis*, nærmere bestemt af arten *Bacillus licheniformis* APMC 84, der kan fremstille et syrestabilt levansaccharase-enzym i fravær af saccharose i næringsmediet. Mikroorganismen er i overensstemmelse med Budapesttraktaten blevet deponeret ved Agricultural Research Culture Collection (NRRL) Peoria, Illinois.

25

Deponeringsnummeret er NRRL B-18962.

30 Levansaccharase-enzymet ifølge den foreliggende opfindelse kan fremstilles ikke alene ved hjælp af stammen *Bacillus licheniformis* NRRL B-18962, men også ved hjælp af naturlige eller kunstige mutanter og andre derivater af denne mikroorganisme. Sådanne mutanter kan opnås ved hjælp af kendte teknikker, såsom røntgenstråling, ultraviolet bestråling, kemiske mutagener og genmanipulation.

Levansaccharase-enzymet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse dannes ved at dyrke mikroorganismen af arten Bacillus i et næringsmedium indeholdende carbon, nitrogen og uorganiske salte under aerobe betingelser i fravær af saccharose, og derefter at indvinde levansaccharase-enzymet derfra.

Dyrkningsbetingelserne for disse mikroorganismer, såsom bestanddelene af næringsmediet og valg af parametre for dette, herunder temperatur, pH, omrøring og gennemluftning, er indlysende for fagmænd.

Egnede carbonkilder omfatter glucose, fructose, maltodextriner, glycerol, majssirup, stivelse, hydrolyseret stivelse og blandinger af to eller flere af disse carbonkilder. Foretrukne carbonkilder er majssirup og hydrolyseret stivelse.

Anvendelige nitrogenkilder omfatter sojabønnemel, majsudvandingsvæske, kartoffelmel, bomuldsfrømel, fiskemel, gær, gærekstrakt eller blandinger af to eller flere af disse nitrogenkilder. Foretrukne nitrogenkilder er sojabønnemel, bomuldsfrømel, gærekstrakt og en blanding af sojabønnemel og gærekstrakt.

Egnede salte omfatter kaliumsulfat, mangansulfat, ammoniumsulfat, ammoniumcitrat, kaliumphosphat, natriummonohydrogenphosphat, natriumdihydrogenphosphat, calciumchlorid, natriumcitrat eller blandinger af to eller flere af disse salte. Foretrukne salte omfatter en blanding af natriummonohydrogenphosphat, natriumdihydrogenphosphat, calciumchlorid og natriumcitrat.

Mediet indeholdende ovennævnte bestanddele steriliseres på konventionel vis og podes med den passende mikroorganismestamme, fortrinsvis med stammen *B. licheniformis*, og især med stammen *B. licheniformis* APMC 84.

Dyrkning udøves aerobt, mens blanding foregår ved omrystning eller gennemluftning, typisk ved en temperatur mellem ca. 25 og 46 °C i ca. 6-40 timer

og ved en pH-værdi mellem ca. 5,0 og 8,5. Dyrkning udøves fortrinsvis ved en temperatur mellem ca. 30 og 42 °C i ca. 12-30 timer og ved en pH-værdi mellem ca. 6,0 og 8,0. Der opnås gode resultater, når dyrkningen udøves ved en temperatur mellem ca. 36 og 40 °C og ved en pH-værdi mellem ca. 6,5 og 8,5.

Efter dyrkningen opnås en fermenteringsvæske indeholdende en biomasse. Denne biomasse, der indeholder celler af mikroorganismene med det cellebundne levansaccharase-enzym, separeres og indvindes fra dyrkningsfiltratet ved anvendelse af konventionelle teknikker, såsom centrifugering, udsaltnings, udfældning, filtrering, ultrafiltrering, mikrofiltrering, centrifugering efterfulgt af ultrafiltrering eller filtrering efterfulgt af mikrofiltrering.

Den separerede og indvundne biomasse bliver derefter vasket, fortrinsvis flere gange med vand, især med afioniseret destilleret vand, og homogeniseret. Den gentagne vaskning af biomassen påvirker ikke aktiviteten af det cellebundne levansaccharase-enzym, hvilken fører til den konklusion, at enzymet er stærkt bundet til cellen. Levansaccharase-enzymet kan, hvis det er nødvendigt, oprenses yderligere, afhængigt af til hvilket formål det skal anvendes. Det cellebundne enzym kan opløses i nærvær af ioniske vaskemidler, såsom natriumcholat eller natriumdodecylsulfat (0,25-2,5%) eller saltopløsninger, såsom opløsninger indeholdende  $Mg^{2+}$ . Enzymet kan også udfældes ved hjælp af ammoniumsulfat i en koncentration svarende til 65-95% mætning ved en temperatur på ca. 0 °C. Såfremt det er nødvendigt, kan der endvidere anvendes en ultralydsteknik til at separere levansaccharase-enzymet og cellerne.

Levansaccharase-enzymet kan tilføres til sammensætninger, der er anvendelige inden for forskellige former for industri, såsom i særdeleshed fødevarereindustrien, den farmaceutiske og den kemiske industri.

Levansaccharase-enzymet formuleres i overensstemmelse med til hvilket formål, det skal anvendes. Normalt tilsættes der endvidere stabilisatorer og

konserveringsmidler til enzymsammensætningerne. F.eks. kan enzymet stabiliseres ved at tilsætte glycerol (50 rumfangs-%), ammoniumsulfat (3,2 mol/l) eller natriumchlorid (3 mol/l) til den vandige enzymopløsning.

- 5 Ved medicinske anvendelser anvendes enzymet fortrinsvis på lyofiliseret form.

Ved anvendelser i fødevarer kan enzymet anvendes på immobiliseret form, hvor enzymet er blevet koblet til i det væsentlige uopløselige inerte bærematerialer, hvilket letter anvendelsen af disse enzymer i gennemstrømningsreaktorer. Normalt er enzymet fastgjort til bærematerialet. Anvendelige bærematerialer omfatter organiske og uorganiske materialer, såsom porøst diatoméjordgranulat behandlet med en opløsning af polyamin og glutaraldehyd, aktivt carbongranulat, overfladeaktive materialer, såsom aluminiumoxid, carbon, ler, zirkoniumoxid, titaniumoxid, ionbytningsharpikser, cellulose eller glas, kemisk aktiverede bærematerialer, såsom cellulose, agarose, syntetiske polymere, geler af f.eks. polyacrylamider, siliciumdioxid og stivelse, hvor enzymet indkapsles i en polymermatrix. Fortrinsvis anvendes hele Bacillus-celler indeholdende levansaccharase-enzym direkte ved immobiliseringen uden forudgående isolation og oprensning af enzymet. Sammensætningerne, der indeholder levansaccharase-enzymet ifølge den foreliggende opfindelse, kan anvendes enten på flydende eller fast form. Disse sammensætninger kan omdannes til et færdigt produkt, der enten er en flydende opløsning, et fast stof, et granulat, et pulver eller en opslæmning.

25 Sammensætningerne ifølge den foreliggende opfindelse kan anvendes til fremstilling af levaner fra sukkerarter indeholdende fructosylrester, såsom saccharose, raffinose eller stachyose. Disse sukkerarter kan indvindes fra råmaterialer, såsom rå sukkerroer, oprenset saft fra knuste eller findelte sukkerroer, melasser, rørsukkerarter, roesukkerarter, plantesukkerarter.

30 De opnåede levaner kan være højmolekylære levaner, lavmolekylære levaner (fructooligosaccharider) og fructosylpolymere.

Den foreliggende opfindelse skal yderligere illustreres ved hjælp af følgende eksempler:

5 EKSEMPEL 1

Et podningsmedium anvendt til podestofudvikling fremstilles ud fra følgende bestanddele (i vægt/rumfangs-%): calciumchlorid 0,02%, natriumcitrat 0,3%, hydrolyseret stivelse forhandlet under varemærket Maltrin 100 (GPC) 2,6%,  
10 bomuldsfrømel forhandlet under varemærket PHARMAMEDIA (Traders Protein) 4,6%, natriummonohydrogenphosphat 0,21% og natriumdihydrogenphosphat 0,54%. Dette podningsmedium steriliseres ved at varmebehandle podningskolber, nærmere betegnet 250 ml Erlenmeyer-kolber forsynet med tre skvulpeplader, indeholdende 50 ml podningsmedium ved 125 °C i 30 mi-  
15 nutter. Derefter blev de podet med en frossen glycerolkultur af stammen B. licheniformis APMC 84.

Podningen af denne stamme udvikles på en roteromryster ved 37 °C i 24 timer før anvendelsen af dette som podestof til produktionskolberne.

20

Mediet, der anvendes ved fremstilling af levansaccharase-enzym, fremstilles ud fra følgende bestanddele (i vægt/rumfangs-%): majssirup forhandlet under varemærket Staley 200 majssirup (A.E. Staley) 10,3%, sojabønneemel forhandlet under varemærket Promosoy 100 (Central Soya) 5,5%, gærekstrakt  
25 (forhandlet af Universal Food Corp.) 0,32%, natriummonohydrogenphosphat 0,7% og natriumdihydrogenphosphat 0,7%.

Dette produktionsmedium steriliseres ved opvarmning af podningskolber, nærmere betegnet 250 ml Erlenmeyer-kolber forsynet med tre skvulpeplader,  
30 indeholdende 50 ml produktionsmedium ved 125 °C i 30 minutter.

Podestofmængden er på 2 rumfang/rumfangs-%. De podede produktionskolber inkuberes på en roteromryster ved en temperatur på 37 °C i 16-20 timer.

Der observeres ingen forøgelse af viskositeten ved dannelse af levan i fermenteringsvæsken.

- 5 Det fremstillede enzym isoleres let, næsten uden problemer som følge af væskens klæbrighed.

Biomassen indeholdt i kolberne separeres fra fermenteringsvæsken ved hjælp af centrifugering, hvorefter cellerne vaskes to gange med afioniseret destilleret vand og homogeniseres.

10

Levansaccharase-enzymet ifølge den foreliggende opfindelse indvindes.

- En levansaccharase-enzym-enhed (LSU) defineres som den enzymaktivitet, der kræves for at fremstille et mikromol glucose pr. minut under analysebetingelser.
- 15

Enzymaktiviteten blev målt ved anvendelse af saccharose som substrat.

- 20 Til en milliliter enzym blev der tilført 7,5 ml 0,01 M citratbuffer, pH 5,5, indeholdende 60 vægt/vægt-% saccharose. Derefter blev rumfanget af reaktionsblandingen justeret til 10 ml ved anvendelse af destilleret vand og inkuberet i 1 time ved 55 °C. Efter det specificerede tidsrum blev den enzymatiske reaktion afbrudt ved at opvarme til 95 °C i 10 minutter. Reaktionsprodukternes glucoseindhold blev bestemt ved HPLC (High Performance Liquid Chromatography)-analyse (K.M. Brobst og H.D. Schobel, 1982, Starch/starke, 34, 117-121).
- 25

- pH-værdiens indflydelse på levansaccharase-enzymets aktivitet blev bestemt ved at udføre den enzymatiske transfructosylationsreaktion, efter inkubation ved 55 °C i 1 time, ved forskellige pH-værdier, dvs. pH = 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 og 8,0, ved anvendelse af en passende fosfatbuffer
- 30

(0,01 M). Den dannede mængde glucose blev bestemt ved HPLC (High Performance Liquid Chromatography)-analyse. Heraf blev aktiviteten beregnet.

Ved 55 °C udvistes der maksimal aktivitet ved pH-værdier i området 5,5-6,0.

5

Fig. 1 illustrerer pH-værdiens indflydelse på enzymaktiviteten ved temperaturen 55 °C. I denne figur repræsenterer abcissen pH-værdien og ordinaten aktiviteten udtrykt i procent af den maksimale aktivitet, der udvises ved pH = 5,5 og en temperatur på 55 °C. Datapunkterne for enzymet ifølge den foreliggende opfindelse er plottet med symbolet 0, og for sammenligningens skyld er datapunkterne fra det japanske patentskrift JP-A-52-82781 plottet med symbolet #. Enzymet ifølge den foreliggende opfindelse er mere stabilt i det sure pH-område end enzymet beskrevet i ovennævnte japanske patentskrift.

10

15 Enzymet ifølge den foreliggende opfindelse udviser ved 55 °C og pH = 4,0 over 50% af dets maksimale aktivitet målt ved 55 °C, hvorimod det kendte enzym ikke udviser nogen aktivitet ved pH = 4,0 og 55 °C.

20 Fig. 1 viser, at levansaccharase-enzymet ifølge den foreliggende opfindelse udviser betydelig enzymatisk aktivitet i et bredt pH-interval i nærvær af saccharose. Det udviser ved pH-værdier i intervallet ca. 5,5-6,3 den maksimale aktivitet ved 55 °C. Mere præcist udviser det ved en temperatur på 55 °C og pH-værdier i intervallet ca. 4,0-8,4 en enzymatisk aktivitet på mindst 50% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C. Ved en temperatur på 55 °C og pH-værdier i intervallet ca. 4,2-8,0 udviser det en enzymatisk aktivitet på mindst 70% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C. Ved en temperatur på 55 °C og pH-værdier i intervallet ca. 4,5-7,8 udviser det en enzymatisk aktivitet på mindst 80% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C. Ved en temperatur på ca. 55 °C og pH-værdier i intervallet ca. 4,7-7,2 udviser det en aktivitet på 25 30 mindst 90% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C.

Temperaturens indflydelse på levansaccharase-enzymets aktivitet blev bestemt ved at udføre den enzymatiske reaktion ved pH = 5,5, efter 1 times

inkubation, ved forskellige temperaturer, dvs. ved temperaturerne 40, 50, 55, 60, 70 og 80 °C.

5 Reaktionsblandingen bestod af 7,5 ml 60 vægt/rumfangs-% saccharoseopløsning i 0,01 M citrat/phosphatbuffer med pH = 5,5 og 1,0 ml vasket biomasse med en enzymaktivitet på 30 LSU/ml.

Ved pH-værdien 5,5 udvistes der maksimal aktivitet ved en temperatur på ca. 60 °C.

10

Temperaturens indflydelse på levansaccharase-enzymaktiviteten vises i fig. 2. I denne figur repræsenterer abcissen reaktionstemperaturen i °C og ordinaten aktiviteten udtrykt i procent af den maksimale aktivitet, der udvises ved 60 °C og pH = 5,5. Datapunkterne for enzymet ifølge den foreliggende opfindelse er plottet med symbolet 0, og for sammenligningens skyld er datapunkterne fra det japanske patentskrift JP-A-52-82781 plottet med symbolet #.

15

Figur 2 viser, at levansaccharase-enzymet ifølge den foreliggende opfindelse har en betydelig termisk stabilitet i nærvær af saccharose.

20

Ved temperaturer i intervallet ca. 55-64 °C opnås der maksimal enzymatisk aktivitet ved en pH-værdi på ca. 5,5.

Mere præcist udviser det ved en pH-værdi på ca. 5,5 og ved temperaturer i intervallet ca. 35-75 °C en enzymatisk aktivitet på mindst 50% af den maksimale aktivitet ved en pH-værdi på 5,5. Ved en pH-værdi på 5,5 og temperaturer i intervallet ca. 45-68 °C udviser det en enzymatisk aktivitet på mindst 80% af den maksimale aktivitet målt ved en pH-værdi på 5,5. Ved en pH-værdi på ca. 5,5 og temperaturer i intervallet ca. 50-67 °C udviser det en enzymatisk aktivitet på mindst 90% af den maksimale aktivitet målt ved en pH-værdi på 5,5.

30

EKSEMPEL 2

Levansaccharase-enzym-koncentrationens (LSU/g saccharose) indflydelse på reaktionsprodukternes sammensætning til forskellige tidspunkter blev målt ved en temperatur på 55 °C og en pH-værdi på 5,5.

I et typisk eksperiment blev 4,5 g saccharose i 9,5 ml vand inkuberet med 0,5 ml biomasse, der indeholdt forskellige mængder levansaccharase-enzym, dvs. 4,5, 9,0 og 22,5 LSU ved en temperatur på 50 °C. Prøver blev udtaget til forskellige tidspunkter og reaktionen blev afbrudt ved at opvarme til 90 °C i 10 minutter.

Produktets bestanddele blev bestemt ved hjælp af High Performance Liquid Chromatography (Tabel 1).

TABEL 1

Levansaccharase-enzym-koncentrationens (LSU/g saccharose) indflydelse på reaktionsprodukternes sammensætning

5

Enzymkoncentration LSU/g saccharose	Tid [timer]	Reaktionsprodukternes sammensætning (%)			
		Fructose	Glucose	Saccharose	Levan
1 LSU/g	2	2,48	4,93	86,82	5,77
	4	4,13	9,63	76,24	10,00
	6	5,50	41,06	66,74	13,70
	8	6,94	18,41	58,54	16,56
	12	7,49	23,60	47,30	21,61
	16	8,60	28,95	37,90	24,55
	24	9,79	36,35	23,14	30,71
	36	10,90	41,57	13,40	34,14
	44	11,24	42,91	10,55	35,29
2 LSU/g	2	3,99	10,10	76,55	9,36
	4	6,41	18,59	58,28	16,72
	6	7,87	26,09	43,09	22,95
	8	9,03	32,33	31,59	27,08
	12	10,22	39,27	17,74	32,77
	16	10,93	42,93	11,11	35,02
	24	11,76	45,25	6,90	36,08
	5 LSU/g	2	7,19	23,94	48,02
4	9,76	38,61	19,23	32,39	
6	10,98	44,28	8,71	36,02	
8	11,41	45,65	6,48	36,46	
12	12,34	45,32	6,43	35,91	
16	13,01	45,46	6,06	35,47	

Hastigheden, hvormed levansaccharase-enzymet danner glucose ud fra saccharose, forøges, når enzymkoncentrationen forøges. I alle tilfælde blev der fremstillet 35% levan og 45% glucose.

### 5 EKSEMPEL 3

Den termiske stabilitet af enzymet i nærvær af substratet er meget vigtig, hvis enzymet skal finde udbredt kommerciel anvendelse. Temperaturen indflydelse på reaktionsprodukternes sammensætning blev bestemt ved temperaturerne 40, 50 og 60 °C. Reaktionsblandingen bestod af 7,5 ml 60 vægt/vægt-% saccharoseopløsning i 0,01 M citrat/phosphat-buffer, pH = 5,5 og 2,5 ml enzymopløsning indeholdende 40 LSU-enheder. Prøver blev udtaget til forskellige tidspunkter, og reaktionen blev afbrudt ved at opvarme til 90 °C i 10 minutter.

15

Produktsammensætningen blev bestemt ved High Performance Liquid Chromatography (Tabel 2).

TABEL 2

Temperaturens indflydelse på reaktionsprodukternes sammensætning

Reaktions- temperatur	Tid [timer]	Reaktionsprodukternes sammensætning (%)			
		Fructose	Glucose	Saccha- rose	Levan
50 °C	4	7,50	23,31	47,33	21,86
	8	9,15	35,54	24,16	31,15
	14	11,28	47,30	7,27	34,15
	24	11,09	43,32	10,58	35,01
55 °C	4	7,92	24,32	45,26	22,50
	8	10,63	35,58	23,39	30,41
	14	13,80	46,07	9,07	30,93
	24	14,43	46,77	6,20	32,61
60 °C	4	8,65	23,66	46,35	21,34
	8	11,51	32,14	29,98	26,36
	14	15,11	42,87	18,09	23,93
	24	14,55	40,36	14,74	30,36

De i tabel 2 angivne data viser, at enzymet ifølge den foreliggende opfindelse har en god termisk stabilitet i nærvær af substrat ved temperaturer mellem 50 og 65 °C og en pH-værdi på 5,5.

EKSEMPEL 4

25

Grundet de store energimæssige omkostninger forbundet med afdampning af reaktionsprodukterne, foretrækkes der altid, for at opnå en kommerciel succes, anvendelse af høje substratkoncentrationer.

30 Saccharosekoncentrationens indflydelse på reaktionsprodukternes sammensætning blev undersøgt til forskellige tidspunkter under den enzymatiske inkubation af saccharose ved en temperatur på 55 °C og ved pH-værdien 5,5.

En acetatbuffer (0,1 M) med en pH-værdi på 5,5 indeholdende forskellige mængder saccharose blev fremstillet. Passende mængder enzym blev tilført, indtil der blev opnået en endelig koncentration på 10 LSU/g saccharose, hvorefter inkubationen blev udøvet ved 55 °C.

5

Prøver blev udtaget til forskellige tidspunkter, og den enzymatiske reaktion blev afbrudt ved at opvarme til 90 °C i 10 minutter.

Reaktionsprodukternes sammensætning blev derefter bestemt ved HPLC (tabel 3).

10

TABEL 3

Saccharosekoncentrationernes indflydelse på reaktionsprodukternes sammensætning

	Saccharosekoncentration g/100 ml	Tid [timer]	Sammensætning (%)				Forholdet mellem Levan og frit fructose
			Fructose	Glucose	Saccharose	Levan	
5	30	5	9,75	25,69	43,88	21,57	2,21
		8	12,47	32,78	30,09	24,67	1,98
		12	16,14	43,04	17,75	23,08	1,43
		24	17,67	45,35	6,66	30,33	1,73
10	45	5	8,99	29,44	36,84	24,72	2,75
		8	10,71	36,40	22,75	30,13	2,81
		12	13,66	44,31	11,03	31,00	2,27
		24	13,56	42,75	10,20	33,46	2,46
15	60	5	6,93	29,47	34,12	29,49	4,26
		8	8,46	39,93	20,55	34,05	4,02
		12	11,12	44,98	8,78	34,12	3,16
		24	14,03	44,98	5,37	35,62	2,54
20	75	5	6,25	29,15	33,34	31,27	5,00
		8	7,57	37,30	19,00	36,12	4,77
		12	9,45	44,26	8,93	37,34	3,95
		24	10,76	43,31	4,96	41,12	3,82

Resultaterne angivet i tabel 3 viser, at transfructosylationen forøgedes, når saccharosekoncentrationen blev forøget. Forholdet mellem mængden af fremstillet levan og frit fructose var til ethvert tidspunkt større ved højere end ved lavere substratkoncentrationer. F.eks. ligger levan/frit fructose-forholdet mellem 1,4 og 2,2 ved en saccharosekoncentration på 30% og forholdet er 4,5-5,0 ved en saccharosekoncentration på 75%. Herved antydes det kraftigt, at lav vandaktivitet begunstiger dannelse af levan.

Patentkrav:

1. Syrestabilt levansaccharase-enzym fremstillet af en mikroorganisme af arten Bacillus, k e n d e t e g n e t ved, at det ved en temperatur på ca. 55  
5 °C og en pH-værdi på 4,0 udviser en enzymatisk aktivitet, der mindst er lig med 50% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C og pH 5,5-6,3, og at enzymet kan opnås fra Bacillus licheniformis-stammen NRRL-18962.
2. Syrestabilt levansaccharase-enzym ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,  
10 at det endvidere ved en pH-værdi i intervallet ca. 5,5-6,3 udviser den maksimale enzymatiske aktivitet ved ca. 55 °C.
3. Levansaccharase-enzym ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at  
15 det endvidere ved ca. 55 °C og en pH-værdi i intervallet ca. 4,0-8,4 udviser en enzymatisk aktivitet, der mindst er lig med 50% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C.
4. Levansaccharase-enzym ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at det  
20 endvidere ved en temperatur på ca. 55 °C og en pH-værdi i intervallet ca. 4,5-7,8 udviser en enzymatisk aktivitet, der mindst er lig med 80% af den maksimale aktivitet målt ved 55 °C.
5. Levansaccharase-enzym ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at  
25 det endvidere ved en pH-værdi på ca. 5,5 og temperaturer i intervallet ca. 35-75 °C udviser en enzymatisk aktivitet, der mindst er lig med 50% af den maksimale aktivitet målt ved en pH-værdi på 5,5.
6. Fremgangsmåde til fremstilling af et syrestabilt levansaccharase-enzym  
30 ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter følgende trin:

- (i) en mikroorganisme af slægten *Bacillus* dyrkes i et passende næringsmedium ved at danne en fermenteringsvæske indeholdende en biomasse, og
- 5 (ii) levansaccharase-enzymet indvindes fra fermenteringsvæsken, hvori mikroorganismen er dyrket i fravær af saccharose.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, *k e n d e t e g n e t* ved, at mikroorganismen er af arten *Bacillus licheniformis*.
- 10 8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, *k e n d e t e g n e t* ved, at mikroorganismen er *Bacillus licheniformis* NRRL B-18962.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 6, *k e n d e t e g n e t* ved, at trinnet (ii)
- 15 endvidere omfatter:
- (a) biomassen indeholdende mikroorganismecellerne med levansaccharase-enzymet separeres fra dyrkningsfiltratet, og
- 20 (b) den derfra separerede biomasse vaskes.
10. *Bacillus licheniformis* APMC 84, der er deponeret under nummeret NRRL B-18962.
- 25 11. *Bacillus licheniformis* ifølge krav 10, *k e n d e t e g n e t* ved, at den fremstiller et syrestabilt levansaccharase-enzym i fravær af saccharose i næringsmediet.
12. Sammensætning til anvendelse i kemisk industri, *k e n d e t e g n e t*
- 30 ved, at den indeholder det syrestabile levansaccharase-enzym ifølge krav 1.
13. Sammensætning ifølge krav 12 i form af en væskeopløsning.

14. Sammensætning ifølge krav 12 i form af et fast stof.

15. Sammensætning ifølge krav 12, k e n d e t e g n e t ved, at levansaccharase-enzymet eller de hele Bacillusceller, som er deponeret under NRLL B-18962, og indeholdende levansaccharase-enzymet er immobiliserede.

16. Sammensætning ifølge krav 12 til fremstilling af levaner.

17. Anvendelse af et enzym ifølge ethvert af kravene 1-5 til fremstilling af levaner.

18. Anvendelse af et enzym ifølge ethvert af kravene 1-5 i den kemiske industri eller i levnedsmiddelindustrien.

FIG. 1

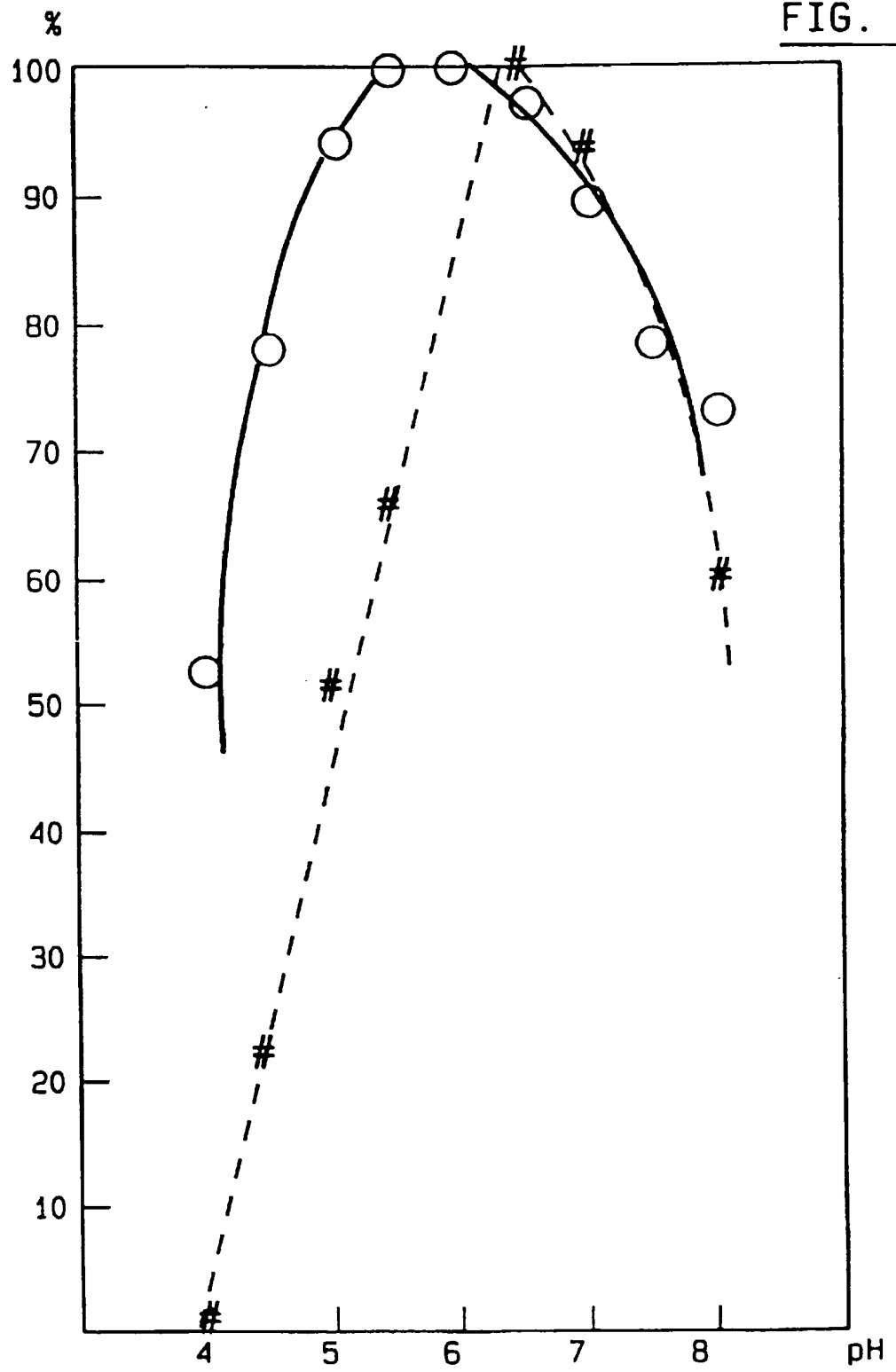


FIG. 2

