



FI000101719B



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 101719 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 14.08.1998

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

C 12N 9/42
// (C 12N 9/42, C 12R 1:885)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 911322

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 19.03.1991

(24) Alkupäivä - Löpdag 19.03.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 20.09.1991

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

19.03.1990 FR 9003599 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Institut Francais du Pétrole, 1 et 4, avenue de Bois-Préau, 92 Rueil Malmaison, France, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Pourquie, Jacques, 51Bd de Palaiseau, 91120 Palaiseau, France, (FR)

2. Warzywoda, Michel, 17, rue de la Mélonière, 92500 Rueil Malmaison, France, (FR)

(74) Asiamies - Ombud: Seppo Laine Oy, Lönnrotinkatu 19 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Lignoselluloosasubstraatin polysakkaridien hydrolysoimiseen soveltuva entsyymikoostumus, sen valmistus ja käyttö
Enzymsammansättning som lämpar sig för hydrolysering av polysackariderna i ett lignocellulosamaterial, dess framställning och användning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 3972775 (C 12D 13/02),
Biotechnology and Bioengineering, vol. 35, 1990, p. 211-216, Chemical Abstracts, vol. 90, 1979, 202197p, Chemical Abstracts, vol. 82, 1975, 169919r, Arja Lappalainen "Cellulolytic and xylanolytic enzymes of Trichoderma reesei, VTT, Espoo, 1988, pp 1-38

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee entsyymikoostumusta, joka soveltuu lignoselluloosasubstraatin polysakkaridien hydrolyysiin, sen valmistusta ja käyttöä. Koostumus saadaan menetelmällä, jossa viedään yhteen vähintään yhtä Trichoderma reesei kantaa hiilipitoisen kasvatusväliaineen kanssa, ja menetelmä käsittää sellaisten vesiliukoisten sokerien lisäyksen, joihin kuuluu ainakin osaksi esikäsittelystä lignoselluloosasubstraattista peräisin olevien vesiliukoisten pentoosien raakauutetta. Käytetään sellaisten substraattien, kuten lehtipuiden, viljakasvien korsien ja maissinvarsien hydrolysoimiseen.

Uppfinningen avser en enzymsammansättning som lämpar sig för hydrolys av polysackarider från ett lignocellulosamaterial, ett förfarande för framställning därav samt dess användning. Sammansättningen erhålls genom ett förfarande där man kontakter åtminstone en Trichoderma reesei stam med ett kolhaltigt näringsmedium innehållande en tillsats av vattenlösliga socker, som omfattar åtminstone delvis ett råextrakt av vattenlösliga pentoser som härstammar för ett förbehandlat lignocellulosamaterial. Används vid hydrolys av material såsom lövträd, strån av sädeslag och blaster av majs.

Lignoselluloosasubstraatin polysakkaridien hydrolysoimiseen soveltuva entsyymikoostumus, sen valmistus ja käyttö

5 Tämä keksintö koskee lignoselluloosasubstraatin polysakkaridien hydrolyysiin soveltuvan entsyymikoostumuksen valmistusmenetelmää, näin saatua koostumusta ja sen käyttöä. Näitä entsyymejä nimitetään lyhyesti sellulaaseiksi tai sellulaasikoostumukseksi.

10

Tämä koostumus soveltuu varsinkin esikäsitellyn lignoselluloosasubstraatin, kuten lehtipuun, viljakasvien korsien ja maissinvarsien, hydrolysointiin.

15 Valmistettaessa korvaavaa polttoainetta lignoselluloosabio-
massasta bioteknisesti, pysyy sellulolyyttisten ja he-
misellulolyyttisten entsyymien valmistus koko prosessin
kriittisenä vaiheena niin teknisistä kuin taloudellisista-
kin syistä. Lukuisista tunnetuista sellulaaseja erittävistä
20 mikro-organismeista on askomykeetti-sienen Trichoderma ree-
sei todettu olevan yksi soveliaimmista entsyymituotannon
teollistamisessa. Mandels (Annual Reports on fermentation
processes vol. 5, G. Tsao Editeur, Academic Press NY 1981,
s. 35 - 78) ja Morikawa ja kumppanit (Agricultural and
25 Biological Chemistry, vol. 49, nro 6, 1985, Tokio, sivut
1869 - 1871) ovat osoittaneet, että voimakkaimpaan entsyymituotantoon päästään antamalla sienelle puhdistettuja
selluloosia pääasialliseksi hiili- ja energialähteeksi
kasvua ja ekstrasellulaaristen proteiinien tuotantoa var-
30 ten, jolloin sellulaasien tuotanto on verrannollinen kasva-
tusalustan selluloosamäärään.

Tunnettu tekniikka (US-A-3 972 775), Biotechnology and Bio-
engineering, vol. 35, tammikuu 1990, sivut 211 - 216 ja
35 vol. 17, nro 3, 1975, sivut 361 - 374)) selostaa lisää
näille kannoille tarkoitettuja substraatteja, ja niihin
kuuluu selluloosan käyttö yksinään tai seoksena ksyloosin

kanssa sellulolyttisten entsyymien tuotannossa.

5 Kaikki nämä julkaisut opettavat siis, että kasvatusväliaineen täytyy sisältää selluloosaa tai sitä sisältävää kiinteää ainetta, ja että osa siitä on mahdollista korvata puhtaalla ksyloosilla, ilman että kuitenkaan ylitetään tiettyä rajaa, jonka yläpuolella tuottavuus heikkenee tai jopa lakkaa.

10 Luonnonvaraisten kantojen parantaminen klassisilla mutaatioerottelutekniikoilla on johtanut sellaisten hypertuottavien Trichoderma reesei-kantojen saamiseen, kuten MCG77 (US 4 275 163), MCG80 (US 4 472 504) tai CL847 (Biotechnol. Lett. 1983, 514 - 243 - 246), mutta niiden merkittävimpien
15 sellulaasien tuottoon liittyy puhdistetun selluloosan läsnäolo viljelyväliaineen tärkeimpänä hiilipitoisena substraattina. Valitettavasti näitä viljelyväliaineita ei voida soveltaa teollisessa mittakaavassa toisaalta puhdistetun
20 selluloosan korkean hinnan vuoksi ja toisaalta niiden suurien energiamäärien vuoksi, joita kuluu suurilla selluloosamääriä sisältävien (70 - 80 g/l) ja siis suuriviskoosisten väliaineiden sekoittamiseen.

25 Juuri siksi nykyään onkin pyrkimyksenä käyttää laktoosia fermentaation pääasiallisena hiilipitoisena substraattina. Itse asiassa laktoosi on sellulaasin biosynteesin hyvä induktori ja sen käyttö fed batch-syötetyn entsyymituotannon puitteissa antaa mielenkiintoiset tulokset.

30 Siitä huolimatta laktoosin käyttö kärsii useista haitoista: laktoosia ei ole helposti saatavilla kaikissa maissa; sitä ei välttämättä tuoteta entsyymien tuotantopaikalla. Sitä paitsi laktoosi liukenee heikosti veteen, mikä merkitsee
muihin sokereihin verrattuna entistä suurempien ja laimennetumpien liuosmäärien käsittelyä ja näinollen kalliita
35 investointeja ja kasvanutta saastumisvaaraa.

Näyttää toisaalta siltä, että laktooseista lähtemällä valmistetut sellulaasit eivät sovellu minkä tahansa lignoselluloosabiomassan hydrolyysiin. Itse asiassa sillä on mielenkiintoinen aktiivisuus vain happamissa olosuhteissa
5 toteutetuista höyryesikäsittelyistä saatuihin tuotteisiin.

Tämä esikäsittely on operaatio, jonka täytyy yleensä tapahtua ennen lignoselluloosabiomassan minkäänlaista entsymaattista sokeriksi muuttumista. Sen tavoitteena on niiden erilaisten anatomisten, fysikaalisten tai kemiallisten rajo-
10 aitojen osittainen tai täydellinen tuhoaminen, jotka estävät entsyymien pääsyn ja vaikutuksen kohteena oleviin polysakkarideihin.

Vaikkakin erilaisia esikäsittelytekniikkoja on ehdotettu, kuten hapanta tai emäksistä keittoa tai keittoa orgaanisten liuotinten läsnäollessa, on nykyään suuntauksena suositella höyryräjähdysten tyyppisiä esikäsittelyjä, joiden aikana lignoselluloosabiomassaa keitetään vesihöyryssä korkeassa
20 lämpötilassa (150 - 250°C) muutamien minuuttien ajan; tätä keittämistä seuraa räjähtävä laajeneminen ilmakehän paineeseen, mikä pysäyttää keittämisen aikana tapahtuneet kemialliset reaktiot ja aiheuttaa räjähdysten vaikutuksesta käsitellyn materiaalin voimakkaan hajoamisen. Esikäsitellyn
25 materiaalin entsymaattisen hydrolyysin tehokkuus on riippuvainen käytettyjen esikäsittelyolosuhteiden (lämpötila ja kesto) kovuudesta, mutta on olemassa raja, jonka yläpuolella sokerien kemialliset hajoamisilmiöt muuttuvat keittämisen aikana liian merkittäviksi, jotta esikäsitellyn materiaalin hyväksikäyttäminen olisi taloudellisesti mielenkiintoista.
30

Toisaalta höyryesikäsittelyn eräs tarkoitus on esikäsitellyn biomassan hemiselluloosafraktion saaminen liukenevaksi
35 ja sen hydrolysoiminen, joka fraktio voidaan siis esikäsittelyn jälkeen ottaa talteen yksinkertaisella vesiuutolla. Sellaisissa höyryesikäsittelyissä, jotka toteutetaan

happamissa olosuhteissa, jotka on aikaansaatu kyllästämällä biomassassa etukäteen yleensä voimakkaalla hapolla, antaa vedellä tapahtuva uutto mahdollisuuden ottaa talteen tavallisesti koko hemiselluloosafraktio monomeereina, pääasiassa ksyloosina; uuttamisjäännös ei siis enää sisällä muuta kuin selluloosaa ja ligniiniä.

Kun on kyse höyryesikäsittelystä ilman edeltävää happokyllästämistä, ei vedellä uuttaminen anna mahdollisuutta saada talteen kuin osan hemiselluloosista, jotka ovat hydrolysoituneet enemmän tai vähemmän kulloinkin käytettyjen olosuhteiden kovuuden mukaan, ja toinen osa jää liukenemattomassa jäännöksessä olevaan selluloosaan ja ligniiniin.

Näitä vesiuutteita, joissa on runsaasti pentooseja tai pentosaaneja, voidaan käyttää hyväksi erityisesti tuottoisina ksylitoli- tai furfurolikohteina. Valitettavasti näiden tuotteiden markkinat ovat liian kapeat niiden pentoosituotteiden absorboimiseksi, jotka saataisiin lignoselluloosabiomassojen suurimittaisesta hyväksikäytöstä.

Lopuksi esikäsiteltyjen, vedellä uutettujen tai uuttamattomien, lignoselluloosabiomassojen entsymaattinen sokeriksi muuttaminen johtaa hydrolysaateiksi nimitettyihin sokeriliuoksiin, joiden koostumus on riippuvainen niistä olosuhteista, joissa nämä biomassat ovat aiemmin olleet, mutta jotka muodostavat hiilipitoisten substraattien potentiaalisia fermentaatiolähteitä.

US-patentin 4 472 505 mukaan tuotetut sellulaasit ovat tunnettuja siitä, että ne on valmistettu puhtaasta selluloosasta, laktoosista ja puhtaan selluloosan entsymaattisista hydrolysaateista lähtemällä, ja ne hydrolysoivat tehokkaasti puhdistettuja selluloosia, mutta eivät pysty tyydyttävästi hydrolysoimaan sellaisia lignoselluloosabiomassoja, jotka saadaan ilman edeltävää happokyllästämistä tehdystä höyryesikäsittelystä.

Eräs keksinnön tavoitteista on siis ylläkuvattujen epäkoh-
tien poistaminen.

5 Tarkemmin sanoen keksinnön eräs tavoite on ehdottaa uutta
hiililähdettä, joka on hyvin helposti saatavilla ja halpa,
ja yleisemmin sanoen uutta fermentaatiomenetelmää sellais-
ten entsyymien tuottamiseen, jotka ovat soveliaita hydro-
lysoimaan esikäsiteltyjä lignoselluloosabiomassoja.

10 Toinen tavoite on käyttää hyväksi ne pentoosi- tai pen-
tosaaniuutteet, jotka on saatu lignoselluloosasubstraattien
höyryesikäsittelyn jälkeen.

15 Eräs lisätavoite koskee entsyymien valmistamista riittä-
vässä määrin ja hydrolyysiaktiivisuudeltaan sellaisina,
että ne soveltuvat esikäsiteltyjen lignoselluloosabiomasso-
jen entsyymaattiseen sokeriksi muuttamiseen.

20 Keksinnön lisätavoite koskee näiden entsyymien käyttöä
esikäsiteltyjen lignoselluloosabiomassojen maksimaaliseen
sokeriksi muuttamiseen. Itse asiassa on yllättäen todettu,
että keksinnön kohteina olevien sellulaasikoostumusten
sokeriksimuuttumisaktiivisuudet olivat paljon suuremmat
kuin se mitä voitiin sellulaasiaktiivisuuksien standar-
25 disoitujen mittauksien (suodatinpaperiaktiivisuuksien)
perusteella odottaa.

Keksintö koskee siis sellaista sellulolyyttistä entsyymi-
koostumusta, joka kykenee katalysoimaan eri tavoin esikäsi-
30 teltyjen lignoselluloosabiomassojen hydrolyysin.

Tämä sellulolyyttinen ja hemisellulolyyttinen entsyymikoos-
tumus on saatu prosessilla, joka käsittää edullisesti ge-
neettisesti parannellun Trichoderma reesei-kannan inoku-
35 loinnin sopivaan fermentaatioväliaineeseen ja näin inoku-
loidun väliaineen inkuboinnin olosuhteissa, jotka sallivat
mainitun kannan lisääntymisen ja sen ekstrasellulaaristen

proteiinien erittämisen. Tarkemmin sanottuna kasvatusalusta muodostuu olennaisesti epäorgaanisten suolojen vesiliuoksesta, johon on lisätty vesiliukoisia sokereita, joka sokेरillisäys ainakin osittain käsittää lignoselluloosabiomassan esikäsittelystä peräisin olevien vesiliukoisten pentoosien raakauutteen.

Termillä "muodostuu olennaisesti" tarkoitetaan fermentaatioväliainetta, josta selluloosa tai kaikki sitä sisältävä kiinteä aine on jätetty pois.

Keksinnön mukainen sellulaasien valmistusmenetelmä toteutetaan edullisesti fed batch-menetelmällä hakijan US-patentissa 4 762 788 kuvatun tekniikan mukaan.

Saadun sellulaasikoostumuksen ominaisuudet saadaan tavomaisilla analyttisillä määrityksillä, jotka tehdään sieni-biomassasta otetuilla viljelynäytteillä: liukenevat proteiinit mitataan Lowryn ja kumppaneiden menetelmällä (Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ja Randall, R. J. (1951). J. Biol. Chem., 193, 265 - 275); sellulaasi eli ns. suodatinpaperiaktiivisuus mitataan Montenecourtin ja kumppaneiden mukaan (Montenecourt, B. S., Eveleigh, D. E., Elmund, G. K. ja Parcells, J. (1978). Biotechnol. Bioeng., XX, 297 - 300); sellobiaasiaktiivisuus määritetään mittaamalla 10 nM:sta sellobioosia 30 min aikana vapautunut glukoosi.

Pentoosien raakauutteella tarkoitetaan selllaisten puhdistamattomien pentoosien uutetta, jotka voivat sisältää muita sokereita kuten glukoosia, samoin kuin muitakin uutettavia koostumuksia kuin vain sokereita (terpeenejä, fenolikoostumuksia esimerkiksi).

Tämä raakauute voitaisiin puhdistaa tämän keksinnön puitteissa käytettäväksi.

Keksintöön käytettävät pentoosiuutteet voidaan saada lignoselluloosabiomassasta lähtemällä alan ammattimiehen tuntemilla tavoilla. Substraatin esikäsittely voi tapahtua:

- 5 * keittämällä hapossa, esimerkiksi 120 - 150°C:ssa noin 2 - 6 tunnin ajan,
- * höyryräjähdyskeksi nimitetyllä tekniikalla, joka käsittää keittämisen vesihöyryssä korkeassa lämpötilassa joidenkin minuuttien (1 - 10 min) ajan, ja keittämistä seuraavan räjähtävän hajoamisen ilma-
- 10 kehän paineeseen.
- Tämä höyryräjähdys parantaa entsymaattista hydrolyysiherkkyyttä ja liuottaa pentosaanit ainakin osittain.
- Räjähtävää hajoamista edeltävä keittäminen voidaan
- 15 tavallisesti toteuttaa joko voimakkaalla hapolla tapahtuvan kyllästämisen jälkeen 150 - 250°C:ssa 1 - 10 min aikana, mieluummin 180 - 200°C:ssa 2 - 4 min aikana, tai ilman hapanta kyllästämistä, tavallisesti 150 - 250°C:ssa 1 - 10 min aikana ja
- 20 mieluummin 205 - 220°C:ssa 3 - 6 min aikana.

Ensimmäisen sokerien valmistustavan mukaan sokerien syöttämiseksi kantaan voidaan pentoosien raakauutteet uuttaa suspendoimalla esikäsitelty materiaali uudelleen veteen ja

25 suodattamalla saatu suspensio tämän jälkeen.

Toisen tavan mukaan jäljelle jäävä osa, joka on esikäsitelty, osittain depentosoitunut substraatti, voidaan hydrolysoida entsymaattisesti. Tavallisesti järjestetään siten, että

30 esikäsitteily- ja uuttamisolosuhteet ovat sillä tavoin säädetyt, että pentoosi- tai pentosaanipitoisuus on 2 - 30 % kuiva-aineesta ja mieluummin yli 5 %, esimerkiksi 8 - 25 %.

Kolmannen tavan mukaan kertaalleen esikäsitelty substraatti

35 voidaan hydrolysoida entsymaattisesti ja esikäsitellyn substraatin entsymaattinen hydrolysaatti muodostaa kantaan tarvittavan sokerilähteen.

Entsyyattinen hydrolyysi toteutetaan sopivalla kaupallisellessa sellulaasivalmisteella ja/tai keksinnön mukaisesti tuotetulla sellulaasikoostumuksella yleisesti seuraavanlaisissa olosuhteissa: hydrolysoitavaa materiaalia pannaan suspensiona veteen 6 - 20 %:n suhteessa kuiva-aineen määrään, mieluiten 8 - 12 %:n suhteessa, suspension pH säädetään arvoon 4 - 5,5, mieluiten arvoon 4,4 - 4,8, säädetyn lämpötilan arvo on välillä 40 - 60°C, mieluiten 45 - 50°C; hydrolyysireaktio käynnistetään tavallisesti lisäämällä suspensioon yllämainittuja sellulaaseja määrä, joka vastaa yleisesti 5 - 20 suodatinpaperiyksikön annostusta esikäsitellyn, hydrolysoitavan substraatin grammaa kohti, mieluiten 10 yksikköä grammaa kohti; reaktio jatkuu yleensä 15 - 30 tuntia, mieluiten 20 - 24 tuntia; liukenematon ligniini-jäännös erotetaan sitten hydrolysaatista suodattamalla tai sentrifugoimalla.

Mieluummin toimitaan keksinnön mukaisilla sellulaaseilla.

Keksinnön mukaisesti tuotettuja entsyymejä käytetään yleisesti esikäsiteltyjen lignoselluloosabiomassojen entsyymatisissa hydrolyysiprosesseissa, jotka tapahtuvat tavallisesti ylläkuvatulla tavalla; tässä tapauksessa ei yleisesti ole olemassa alarajaa hydrolysoitavan tuotteen pentoosi- tai pentosaanipitoisuudelle. On todettu, että tämä sovellus johti yllättävällä tavalla näiden entsyymien avulla tuotettuun sokerimäärään, joka oli suurempi kuin se jota voitiin odottaa niiden suodatinpaperiaktiivisuudet huomioiden.

Samoin on todettu, että keksinnön mukaiset sellulaasit osoittivat yllättävän ylivoimaisuutensa sellaisten substraattien läsnäollessa, joita ei ollut esikäsitelty happamasti. Näin vältetään kyllästämisen happamassa, kuumassa väliaineessa ja minimoidaan syöpymisilmiöt.

35

Edullisesti käytetyt kannat ovat esimerkiksi hypertuottavat, geneettisesti parannellut kannat kuten MCG 77, jonka

on kuvannut Gallo US-patentissa 4 275 163; MCG 80, jonka on kuvannut Alle, A. L. ja Andreotti, R. E., Biotechnology and Bioengineering symposium nro 12, sivut 451 - 459 (1982); RUT C 30, jonka on kuvannut Montenecourt, B. S. ja Eveleigh, D. E., Applied Environmental Microbiology, volyymi 34, sivu 777 (1977) ja CL 847, kuvannut Warzywoda, M. ja kumppanit Biotechnology letter, volyymi 5, sivu 243 (huhtikuu 1983).

10 Erinomaisia tuloksia on saatu Trichoderma reesei CL 847:llä ja RUT C 30:lla.

Käytettävät lähtömateriaalit voivat olla viljakasvien olkia, maissin varsia ja tähkiä, lehtipuuhaketta tai -jätettä tai kaikenlaista muuta lignoselluloosamateriaalia, jossa on yleisesti ainakin 10 paino-% potentiaalisia pentooseja tai pentosaaneja, esimerkiksi 15 - 35 paino-%.

20 Keksintö selviää paremmin alla olevien ei-rajoittavien esimerkkien valossa.

ESIMERKKI 1 (vertailu)

Valmistetaan mineraalisuola-vesiliuos C1, jonka koostumus on seuraava: 3,32 g/l potaskaa (KOH), 85 %:sta fosforihappoa 4 ml/l, 5,6 g/l ammoniumsulfaattia (NH_4)₂SO₄, 1,2 g/l magnesiumsulfaattia (MgSO₄, 7 H₂O), 1,2 g/l kalsiumkloridia (CaCl₂), 6,4 g/l mangaanisulfaattia (MnSO₄), 5,6 mg/l sinkkisulfaattia (ZnSO₄, 7 H₂O), 8 mg/l kobolttikloridia (CoCl₂), 20 mg/l rautasulfaattia (FeSO₄, 7 H₂).

30 Valmistetaan steriili vesiliuos C2, jossa on 250 g laktoosia yhdessä litrassa. Fermentori, joka sisältää yhden litran liuosta C1, 0,8 l vettä, 2 g/l hiivauutetta, 2 ml vaahdotumisen estoainetta, 2 ml Tween 80:tä ja 7,5 g laktoosia (suunnilleen 4,16 g/l) steriloidaan 120°C:ssa autoklaavissa 20 min ajan.

Jäähtymisen jälkeen väliaineen lämpötila säädetään 27°C:een, väliaineen pH arvoon 5. Fermentoriin istutetaan sitten 0,2 litraa Trichoderma reesei RUT C 30 ATCC 56765 kannan nestemäistä esiviljelmää. Lämpötila säädetään
5 27°C:een viljelyn 24 ensimmäisen tunnin ajaksi ja sitten 25°C:een viljelyn loppuun asti. Ammoniakkiliuosta lisäämällä pidetään pH koko viljelyn ajan arvossa 5; viljelyn liu-koisen hapen konsentraatio pidetään 15 paino-%:n kyllästys-konsentraation yläpuolella sekoitusnopeutta ja ilmastus-as-
10 tetta säätämällä.

Laktoosiannokset reagoivat viljelynäytteisiin ajan mittaan. Kymmenen tunnin kuluttua laktoosikonsentraatio fermentaatiovierteessä on 0,8 g/l. Viljelmään syötetään sitten ste-
15 riilisti jatkuvana C2-liuosta; syöttönopeutta muutetaan sillä tavoin, että sokerikonsentraatio ei koko viljelyn aikana ylitä 2 g/l. Laktoosin keskimääräinen syöttönopeus on 1,9 g tunnissa aina sadanteen tuntiin asti, ja 2,25 g tunnissa viljelyn loppuun asti. Viljelmään injektoidaan 145
20 tunnin kuluttua yksi litra C2 liuosta, syöttö keskeytetään senjälkeen ja fermentaatiovierre korjataan pois.

Fermentaatiovierre selkiytetään sentrifugoimalla. Selkiytetty vierre E1 muodostaa entsyymivalmisteeseen. Tällä
25 valmisteella E1 suoritettut analyttiset määritykset antavat taulukossa 1 esitetyt tulokset.

Saadun entsyymivalmisteeseen sokeriksimuuttumispotentiaali arvioidaan seuraavalla tavalla: valmistetaan kaksi lig-
30 noselluloosasubstraattia P_A ja P_N vehnän korsista lähtemäl-
: lä. Substraattia P_A varten korsia liuotetaan 16 tunnin ajan rikkihappoliuoksessa 0,08 N ja valutetaan senjälkeen; kos-
teaa tuotetta keitetään sitten 3 min 18 bar paineessa vesi-
höyryssä; keittäminen keskeytyy äkillisesti räjähtävään
35 hajoamiseen ilmakehän paineeseen; saatua tuotetta pestään vedellä niin kauan, että pesuveden pH on neutraali, se
: otetaan talteen suodattamalla ja säilytetään alhaisessa

lämpötilassa. Tuotteen P_A jäännöshemiselluloosapitoisuus on alle 3 % kuiva-aineen kokonaismäärästä. Tuote P_N valmistetaan analogisella tavalla, poikkeuksena happoliuotusvaihe, joka jää pois. Tuotteen P_N jäännöshemiselluloosapitoisuus on 23 % kuiva-aineen kokonaismäärästä.

Sokeriksimuuttumiskokeet tehdään inkuboimalla 50°C:ssa inkubaattorissa, jota sekoitetaan, 250 ml:n erlenmayerpulloja, jotka on täytetty 100 g:lla koostumukseltaan seuraavanlaista reaktiomassaa: 10 g (ilmoitettu kuiva-aineena) hydrolysoitavaa substraattia P_A tai P_N , 50 ml natriumaseptaattipuskuria 100 mM pH 4,8, 200 mg tutkittavan entsyymivalmisteen proteiineja ja vettä määrä, joka on riittävä täydentämään määrän 100 g:aan. 24 tunnin kuluttua inkubointi pysäytetään asettamalla yksi osa hydrolysaateista kiehuvaan vesihauteeseen viideksi minuutiksi; näytteet selkiytetään sitten sentrifugoimalla, suodatetaan 0,2 μ kalvon läpi ja niiden sokerisisältö analysoidaan painenestekromatografialla.

20

Entsyymivalmisteeella E1 on voitu saavuttaa seuraavat sokeriksimuuttumistulokset:

Taulukko Ibis

25

	Substraatti P_A (g/l)	Substraatti P_N (g/l)
sellobioosi	9,2	2,7
glukoosi	26,6	17,9
ksyloosi	0,9	12,9
arabinoosi	0,3	1,1
yhteensä g/l	37	34,6

30

ESIMERKKI 2 (vertailu)

35

Tässä esimerkissä liuoksen C2 valmistamiseen käytetty laktoosi korvataan samalla määrällä puhdasta, kaupallista

ksyloosia. Fermentoriin istutetaan 200 ml esiviljeltyä Trichoderma reesei RUT C 30 kantaa. Viljely tapahtuu samoissa olosuhteissa kuin esimerkissä 1. 145 tunnin viljelyn jälkeen saadaan entsyymivalmiste E2. Tällä valmisteella
5 tehdyt analyttiset määritykset on esitetty taulukossa I.

Valmisteen E2 sokeriksimuuttumispotentiaalin arviointi antaa seuraavat tulokset:

10 Taulukko II

	Substraatti P _A (g/l)	Substraatti P _N (g/l)
sellobioosi	7,9	5,6
glukoosi	15,5	22,4
ksyloosi	0,5	15,3
15 arabinoosi	0,1	0,9
yhteensä g/l	24	44,2

ESIMERKKI 3

20 Valmistetaan pentooseista raakauute P1 seuraavalla tavalla:
43 kg vehnän korsia upotetaan rikkihappoliuokseen 0,08 N, valutetaan senjälkeen ja puristetaan. Saatu kostea tuote pannaan autoklaaviin, jossa on varoventtiili. Autoklaavissa tuotetta keitetään 3 min 18 bar paineessa vesihöyryssä, ja
25 lopuksi ilmakehän paineeseen tapahtuvan räjähtävän laajenemisen vuoksi se työntyy autoklaavista ulos sykloniin. Syklonin pohjalta talteen saatava kiinteä tuote uutetaan kaksi kertaa 180 litralla vettä. Suodattamalla talteen otetut
uuttamisvedet konsentroidaan höyrystämällä tyhjässä, kunnes
30 saadaan seuraava koostumus: 315 g/l ksyloosia, 41 g/l arabinoosia, 50 g/l glukoosia.

Valmistetaan steriili vesiliuos C3, jossa on 0,616 l uutet-
ta P1 ja 0,384 l vettä. Tässä esimerkissä esimerkin 1 lak-
35 toosiin pohjautuva valmiste C2 korvataan liuoksella C3;

muut olosuhteet ovat muutoin samat. Fermentoriin istutetaan 200 ml Trichoderma reesei RUT C 30 kannan esiviljelmää.

Viljely tapahtuu samoissa olosuhteissa kuin esimerkissä 1.

145 tunnin viljelyn jälkeen saadaan entsyymivalmiste E3.

5 Tällä valmisteella tehtyt analytyttiset määritykset on esitetty taulukossa I.

Valmisteen E3 sokeriksimuuttumispotentiaalin arviointi antaa seuraavat tulokset:

10

Taulukko III

	Substraatti P _A (g/l)	Substraatti P _N (g/l)
sellobioosi	12,06	11,7
glukoosi	11,03	11,3
15 ksyloosi	0,97	16,3
arabinoosi	0,26	1,7
yhteensä g/l	24,34	41

20 ESIMERKKI 4

Niukasti pentooseja sisältävä hydrolysaatti H1 valmistetaan seuraavalla tavalla: niiden korsien kiinteä jäännös, jotka on käsitelty ja uutettu esimerkin 3 uutteen P1 saamiseksi, pannaan 250 kg:aan vettä. Potaskaa lisäämällä säädetään 25 suspension pH 4,8:aan. Esimerkin 2 mukaan tuotetun entsyymivalmisteen proteiineja lisätään 700 g ja hydrolyysi tapahtuu 50°C:ssa 20 tunnin aikana. Saatu suspensio erotetaan suodattamalla nestefaasiin ja kiinteään faasiin. Nestefaasi konsentroidaan tyhjöissä höyrystämällä kunnes saadaan seuraavanlainen koostumus: 44,4 g/l ksyloosia, 296,1 g/l glukoosia, 14,3 g/l sellobioosia ja 3,2 g/l arabinoosia.

30

Valmistetaan steriili vesiliuos C4, jossa on 0,698 l hydrolysaattia H1 ja 302 ml vettä.

35

:

Tässä esimerkissä esimerkin 1 laktoosiin pohjautuva valmiste C2 korvataan liuoksella C4; muut olosuhteet ovat muutoin samat. Fermentoriin istutetaan 200 ml Trichoderma reesei RUT C 30 kannan esiviljelmää. Viljely tapahtuu samoissa olosuhteissa kuin esimerkissä 1. 145 tunnin viljelyn jälkeen saadaan entsyymivalmiste E4. Tällä valmisteella E4 tehdyt analyttiset määritykset on esitetty taulukossa I.

Valmisteen E4 sokeriksimuuttumispotentiaalin arviointi on esitetty taulukossa IV.

Taulukko IV

	Substraatti P _A (g/l)	Substraatti P _N (g/l)
sellobioosi	7,1	4,4
glukoosi	24,9	15,9
ksyloosi	0,9	16,5
arabinoosi	0,24	1,2
yhteensä g/l	33,1	38

ESIMERKKI 5

Runsaasti pentooseja sisältävä hydrolysaatti H2 valmistetaan seuraavalla tavalla: vehnänkorsia esikäsitellään happamissa olosuhteissa höyryräjähdysmenetelmällä tavalla, joka on analoginen esimerkin 1 substraatin P_A valmistuksen kanssa. 70 kg räjähdykseen jälkeen talteen otettua tuotetta 180 vesikiloa kohti otetaan jatkokäsittelyyn. Suspension pH säädetään 4,8:aan potaskaa lisäämällä. Lisätään 700 g esimerkin 7 mukaan tuotettua entsyymivalmistetta ja hydrolysoidaan 50°C:ssa 20 tunnin ajan. Saatu suspensio erotetaan suodattamalla nestefaasiin ja kiinteään faasiin. Nestefaasi konsentroidaan tyhjiössä höyrystämällä kunnes saadaan seuraavanlainen koostumus: 118 g/l ksyloosia, 42,5 g/l sellobioosia, 197,2 g/l glukoosia ja 14,3 g/l arabinoosia.

Valmistetaan steriili vesiliuos C5, jossa on 0,672 l hydrolyysointia H2 ja 0,328 l vettä.

Tässä esimerkissä esimerkin 1 laktoosiin pohjautuva valmiste C2 korvataan liuoksella C5; muut olosuhteet ovat muutoin samat. Fermentoriin istutetaan 200 ml Trichoderma reesei RUT C 30 kannan esiviljelmää. Viljely tapahtuu samoissa olosuhteissa kuin esimerkissä 1. 145 tunnin viljelyn jälkeen saadaan entsyymivalmiste E5. Tällä valmisteella E5 tehdyt analyttiset määritykset on esitetty taulukossa I.

Valmisteen E5 sokeriksimuuttumispotentiaalin arviointi on esitetty taulukossa V.

15 Taulukko V

	substraatti P _A (g/l)	substraatti P _N (g/l)
sellobioosi	10,2	2,11
glukoosi	16,9	22,7
ksyloosi	0,4	15,23
arabinoosi	0,1	1,18
yhteensä g/l	27,7	41,22

ESIMERKKI 6

25 Trichoderma reesei CL 847 kantaa viljellään esimerkin 1 kanssa identtisisissä olosuhteissa. 145 tunnin viljelyn jälkeen saadaan entsyymivalmiste E6.

Valmisteen E6 sokeriksimuuttumispotentiaalin arviointi on esitetty taulukossa VI.

Taulukko VI

	substraatti P _A (g/l)	substraatti P _N (g/l)
sellobioosi	8,81	1,4
glukoosi	30,39	22,4
ksyloosi	1	14,9
arabinoosi	0,36	1,4
yhteensä g/l	40,56	40

10 ESIMERKKI 7

Trichoderma reesei CL 847 kantaa viljellään esimerkin 2 kanssa identtisisissä olosuhteissa. 145 tunnin viljelyn jälkeen saadaan entsyymivalmiste E7.

15 Valmisteen E7 sokeriksimuuttumispotentiaalin arviointi on esitetty taulukossa VII.

Taulukko VII

	substraatti P _A (g/l)	substraatti P _N (g/l)
sellobioosi	12,5	5
glukoosi	25,7	23,4
ksyloosi	0,7	15,1
arabinoosi	0,3	1,1
yhteensä g/l	39,4	44

20 : ESIMERKKI 8

Trichoderma reesei CL 847 kantaa viljellään esimerkin 3 kanssa identtisisissä olosuhteissa. 145 tunnin viljelyn jälkeen saadaan entsyymivalmiste E8.

25 Valmisteen E8 sokeriksimuuttumispotentiaalin arviointi on

30 :

esitetty taulukossa VIII.

Taulukko VIII

	Substraatti P _A (g/l)	Substraatti P _N (g/l)
5		
	sellobioosi	12,46
	glukoosi	23,71
	ksyloosi	1,1
	arabinoosi	0,3
	yhteensä g/l	37,57
10		
		8,4
		20,5
		18,3
		1,2
		48,4

15

20

25

30

35

Esimerkki		Analyttiset ominaisuudet					Substraatin hydrolyysi- potentiaali (g/l)
Nro	Kanta	Fermentaatio-substraatti	Proteiineja g/l	FPU ml:nä mg:nä	8 glukosidaasi ml:nä mg:nä	P _A	P _N
1	Rut C 30	Laktoosi	18,4	12,8 (0,69)	8,7 (0,45)	37	34,6
2	"	Ksyyloosi	3,7	0,55 (0,15)	0,08 (0,02)	24	44,2
3	"	Pentoosiuute	16,2	3,4 (0,21)	0,02 (0,012)	24,3	41
4	"	Depentosoitu hydrolysaatti	28	17,8 (0,63)	13,5 (0,48)	33,1	38
5	"	Hydrolysaatti, paljon C5	28	13,5 (0,48)	3,9 (0,14)	27,7	41,2
6	CL 847	Laktoosi	31,2	22 (0,70)	24 (0,77)	40,6	40
7	"	Ksyyloosi	4,8	1,4 (0,3)	0,12 (0,025)	39,4	44
8	"	Pentoosiuute	26	10,6 (0,41)	3,8 (0,146)	37,6	48,4

Taulukko I

Patenttivaatimukset:

1. Sellulolytyttinen ja hemisellulolytyttinen entsyymikoostumus, joka on valmistettu menetelmällä, jossa fermentaatio-olosuhteissa viedään yhteen vähintään yhtä *Trichoderma reesei* -kantaa hiilipitoisen fermentaatioväliaineen kanssa, t u n n e t t u siitä, että mainittu fermentaatioväliaine koostuu olennaisesti epäorgaanisten suolojen vesiliuoksesta ja vesiliukoisten sokerien lisäyksestä, joka ainakin osittain käsittää esikäsitellystä lignoselluloosasubstraatista peräisin olevien vesiliukoisten pentoosien raakauutteen, edellyttäen että mainittuun fermentaatioväliaineeseen ei sisälly selluloosaa eikä mitään sitä sisältävää kiinteää ainetta.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että *Trichoderma reesei* -kanta on hypertuottava.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että pentoosiraakauute on mukana esikäsitellyn substraatin entsyymaattisessa hydrolysaatissa.
4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että pentoosiraakauute on mukana esikäsitellyn ja osittain depentosoidun substraatin entsyymaattisessa hydrolysaatissa.
5. Menetelmä sellaisten entsyymien valmistamiseksi, jotka kykenevät katalysoimaan esikäsitellyn lignoselluloosasubstraatin hydrolyysin, jonka menetelmän mukaan
- *Trichoderma reesei* -kanta siirrostetaan sopivaan hiilipitoiseen fermentaatioväliaineeseen, ja
 - näin siirrotettu väliaine inkuboidaan olosuhteissa, jotka mahdollistavat kannan kasvun ja entsyymituotannon,
- t u n n e t t u siitä, että

- fermentaatioväliaine muodostuu olennaisesti epäor-
gaanisten suolojen vesiliuoksesta ja vesiliukoisten
sokerien lisäyksestä, joka ainakin osittain käsittää
esikäsitelystä lignoselluloosasubstraatista peräisin
5 olevan vesiliukoisten pentoosien raakauutteen,
edellyttäen että mainittuun fermentaatioväliaineeseen ei
sisälly selluloosaa eikä mitään sitä sisältävää kiinteää
ainetta.

10 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t-
t u siitä, että syötettävät sokerit ovat peräisin käsitte-
lystä, johon kuuluu lignoselluloosasubstraatin esikäsitte-
lyvaihe ja esikäsitellyn substraatin entsymaattinen hydro-
lyysi.

15 7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t-
t u siitä, että syötettävät sokerit ovat peräisin käsitte-
lystä, johon kuuluu lignoselluloosasubstraatin esikäsitte-
lyvaiheen, esikäsitellyn substraatin osittainen pesu ja
20 esikäsitellyn, mainitussa osittaispesussa osittain depen-
tosoidun substraatin entsymaattinen hydrolyysi.

25 8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t-
t u siitä, että syötettävät sokerit ovat peräisin käsitte-
lystä, johon kuuluu lignoselluloosasubstraatin esikäsitte-
lyvaihe, jota seuraa uuttaminen vedellä pentoosiuutteen
saamiseksi talteen.

30 9. Jonkin patenttivaatimuksen 5 - 8 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että substraatin esikäsitte-
ly tapahtuu keittämällä hapossa, 120 - 150°C:ssa 2 - 6 tunnin
ajan, tai höyryräjähdykseksi nimitetyllä tekniikalla, joka
käsittää substraatin keittämisen 150 - 250°C:ssa 1 - 10 min
ajan ja sitä seuraavan räjähtävän laajenemisen ilmakehän
35 paineeseen.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t-

t u siitä, että keittäminen tapahtuu voimakkaasti happamessa väliaineessa.

5 11. Patenttivaatimuksen 6 tai 7 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että esikäsitellyn substraatin entsymaat-
tinen hydrolyysi ja osittain depentosoidun substraatin
entsymaattinen hydrolyysi tapahtuvat kaupallisen sellulaa-
sin ja/tai jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukaisen sellu-
laasikoostumuksen läsnäollessa, jolloin 5 - 20 suodatinpa-
10 periyksikössä esikäsitellyn substraatin grammaa kohti on 6
- 20 % kuiva-ainetta, 15 - 30 tunnin aikana, 40 - 60°C:ssa,
ja pH on välillä 4 - 5,5.

15 12. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukaisen koostumuksen
tai jonkin patenttivaatimuksen 5 - 11 mukaan saadun koostu-
muksen käyttö esikäsitellyn lignoselluloosasubstraatin
polysakkaridien entsymaattisessa hydrolyysissa.

20 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen käyttö, jossa koostu-
muksen määrä vastaa 5 - 20 suodatinpaperiyksikön annostusta
substraattigrammaa kohti, lämpötila on 40 - 60°C ja hydro-
lyysiaika 15 - 30 tuntia.

Patentkrav:

1. Komposition med cellulosa- och hemicellulosanedbrytande
5 enzymer bildad medelst ett förfarande, vari man under for-
mentationsbetingelser bringar minst en stam av *Trichoderma*
reesei i kontakt med ett kolhaltigt fermentationsmedium,
k ä n n e t e c k n a d av att fermentationsmediet väsent-
ligen utgöres av en vattenhaltig lösning med oorganiska
salter och av en matning med vattenlösliga socker som åt-
10 minstone delvis innefattar ett råextrakt av vattenlösliga
pentoser som härrör från ett förbehandlat substrat av lig-
nocellulosatyp med villkoret att cellulosan eller vilket
fast material som helst, vari den ingår, uteslutes från
fermentationsmediet.
- 15 2. Komposition enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d
av att stammen av *Trichoderma reesei* är hyperproduktiv.
- 20 3. Komposition enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e -
t e c k n a d av att råextraktet av pentoser ingår i ett
enzymatiskt hydrolysat av det förbehållande substratet.
- 25 4. Komposition enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e -
t e c k n a d av att råextraktet av pentoser ingår i ett
enzymatiskt hydrolysat av det förbehandlade substratet från
vilket pentos partiellt borttagits.
- 30 5. Förfarande för framställning av enzymer med förmåga att
katalysera hydrolys av ett förbehandlat substrat av ligno-
cellulosatyp innefattande
- ympning av en stam av *Trichoderma reesei* i ett lämp-
 - ligt kolhaltigt fermentationsmedium och
 - inkubering av det på detta sätt ympade mediet under
 - betingelser som möjliggör tillväxt av stammen och
 - 35 enzymtillverkning,
- k ä n n e t e c k n a t av att

- fermentationsmediet väsentligen utgöres av en vattenhaltig lösning av oorganiska salter och av en matning med vattenlösliga socker som åtminstone delvis innefattar ett råextrakt av pentoser som härrör sig från en förbehandling av ett substrat av lignocellulosatyp med villkoret att cellulosan eller vilket fast material som helst, vari den ingår, uteslutes från fermentationsmediet.

6. Förfarande enligt patentkrav 5, k ä n n e t e c k n a t av att matningen med socker härrör från en behandling innefattande ett steg för förbehandling av substratet av lignocellulosatyp och en enzymatisk hydrolys av det förbehandlade substratet.

7. Förfarande enligt patentkrav 5, k ä n n e t e c k n a t av att matningen med socker härrör från en behandling innefattande ett steg för förbehandling av substratet av lignocellulosatyp, ett steg för partiell tvättning av det förbehandlade substratet och ett steg för enzymatisk hydrolys av det förbehandlade substratet, från vilket pentos partiellt borttagits genom den partiella tvättningen.

8. Förfarande enligt patentkrav 5, k ä n n e t e c k n a t av att matningen med socker härrör från en behandling innefattande ett steg för förbehandling av substratet av lignocellulosatyp följt av ett steg för extraktion med vatten för att tillvarata pentosextraktet.

9. Förfarande enligt något av patentkraven 5-8, k ä n n e t e c k n a t av att förbehandlingen av substratet utföres medelst en värmebehandling med syra, vid 120-150 °C i 2-6 h eller medelst en så kallad ångexplosionsteknik innefattande ett steg för värmebehandling av substratet mellan 150 °C och 250 °C i 1-10 min följt av en explosiv trycksänkning till atmosfäruttryck.

10. Förfarande enligt patentkrav 9, k ä n n e t e c k -
n a t av att värmebehandlingssteget utföres i ett medium
med en stark syra.

5 11. Förfarande enligt patentkrav 6 eller 7, k ä n n e -
t e c k n a t av att den enzymatiska hydrolysen av det
förbehandlade substratet och den enzymatiska hydrolysen av
substratet, från vilket pentos partiellt borttagits, utfö-
res i närvaro av en mängd saluförda cellulaser och/eller
10 cellulaskompositionen enligt något av patentkraven 1-4 av
5-20 filterpappersenheter/g förbehandlat substrat innefat-
tande 6-20 % torrsubstans i 15-30 h vid 40-60 °C och vid
ett pH som ligger mellan 4 och 5,5.

15 12. Användning av en komposition enligt något av patentkra-
ven 1-4 eller av en komposition erhållen enligt något av
patentkraven 5-11 i ett förfarande för enzymatisk hydrolys
av polysackarider i ett förbehandlat substrat av lignocel-
lulosatyp.

20 13. Användning enligt patentkrav 12, k ä n n e t e c k -
n a d av att mängden av kompositionen motsvarar en dosering
av 5-20 filterpappersenheter/g substrat, temperaturen är
40-60 °C och hydrolystiden är 15-30 h.

::

: