

4144/89

53934-

Kövérkővel: példány

50.990/DE

USO<sub>5</sub>

C 12N 9/28

### KIVONAT

Eljárás hőstabil alfa-amiláz előállítására

GREAT LAKES CHEMICAL CORPORATION, WEST LAFAYETTE,

INDIANA, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1989. 06. 19.

Elsőbbsége: 1988. 06. 21. /209 426/

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány tárgya eljárás hőstabil alfa-amiláz előállítására, mely szerint B. licheniformis ATCC 53722 törzset olyan tápközegben tenyésztünk, amely elsődleges szénforrásként az alfa-amiláz szintézisét gátló szénhidrátot, mint glukózt, keményítőhidrolizátumot, glicerint, xilózt, mannitot vagy szacharózt tartalmaz; e szénforrást a tenyésztés folyamán adjuk a tápoldathoz; a tenyésztés során fejlődő CO<sub>2</sub> szintjét

az elmenő gázban mintegy 4,5-6,5 % között tartjuk  
0,5-1,0 levegőtérfogat/tápoldattérfogat/perc levegőz-  
tetés mellett, az elsődleges szénforrás adagolási se-  
bességének a szabályozása útján; és a tápoldat pH-ját  
6,5 és 7,0 között tartjuk.

*ábra mellékelt*

*átalagok*

4144/89

5710

A

könnyeltes példány

50.990/DE

S.B.G. & K.  
Budapesti Nemzeti Képvédelmi  
és Szabványügyi Hivatal  
1081 Budapest, Dohány utca 10.  
Telefon: 133-3700, 133-3701

US 89

-53934-

C 12 N 9/28

Eljárás hőstabil alfa-amiláz előállítására

GREAT LAKES CHEMOCAL CORPORATION, WEST LAFAYETTE,  
INDIANA, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók: CHEN James C., ASHLAND

LAMM William R., ASHLAND

RACINE Francis M., ASHLAND

TURNER Hal R., ASHLAND,

OH, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1989. 06. 19.

Elsőbbsége: 1988. 06. 21. /209 426/

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US 89/02683

A nemzetközi közélettel száma: WO 89/12679

A találmány tárgya tökéletesített eljárás az alfa-amiláz enzim előállítására.

Az alfa-amiláz kereskedésbeli tisztítóanyagok, mint mosószerek és edénymosogatók detergenszeiben használatos jól ismert enzim. Alkalmos továbbá keményítőnek viselkedhető szénhidrátokká történő átalakítására, különösen különböző viszkozitású keményítőszörpökké, szőlőcukor- és tömény gyümölcs-cukor-szörpökké való kémiai vagy enzimes átalakítására.

Az alfa-amilázt mikrobiológiai úton állítják elő bizonyos Bacillus licheniformis törzsek tenyésztése útján. Ilyen eljárást és törzsüket ismerteti az 1 296 839 számú brit szabadalmi leírás. Más eljárást és törzsüket írják le a 4 473 645 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban. Az ismert eljárásokkal mintegy 50-2000 likvefon/ml enzimaktivitású fermentlé nyerhető. Ezekben az eljárásokban általában mono-, di- és polissacharidokat, mint piruváttot, glukonáttot, arabinózt, ribózt, galaktózt, maltózt, laktózt, oldható keményítőt vagy mannitot használnak, de előnyben részesített szénferrás a laktóz. Bár viszonylag költséges és nehezen alakul át, mégis előnyben részesítik a laktózt, minthogy nem gátolja az alfa-amiláz szintézisét. Másrészt a glukóz, keményítő, keményítő-hidrolizátum és a glukóz kristályosítása

után visszamaradó különböző termékek, mint a "DL-70" /Staley-Continental Foods termékének márkanéve/ viszonylag olcsók és gyorsan átalakulnak, de mindezekig nem használták őket szénforrásként az alfa-amiláz mikrobiológiai előállításánál, mivel az alfa-amiláz szintézis ismert gátlói /lásd Fukumoto I. és munkatársai, Nature 180, 438 /1957//.

Találmányunk kiküszöböli a korábbi eljárások hátrányait, új eljárást alkalmazva az alfa-amiláz előállítására. A találmány szerint hőstabil alfa-amilázt állítunk elő Bacillus licheniformis ATCC 53722 mikroorganizmust olyan tápközegben tenyésztve, amely elsődleges szénforrásként az alfa-amiláz szintézisét szokásosan visszاسzorító szénhidrátot tartalmaz; az elsődleges szénforrást a tápközeghez a tenyésztés folyamán adjuk hozzá; az elsődleges szénforrás adagolási ütemének szabályozása útján a tápközegből fejlődő CO<sub>2</sub> szintjét az elmenő gáz 4,5-6,5 százaléka között tartjuk a tenyésztés során, amikor a levegő áramlási sebessége 0,5-1,0 levegőtérfogat/tápközeg-térfogat/perc; és a tápközeg pH-ját 6,5-7,0 között tartjuk.

A találmány szerinti eljárással előállí-

tott alfa-amiláz hőstabilitása|azonos rendű a 4 473 645 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás szerint nyert enzimével. A kapott enzim stabil alacsony koncentrációju  $Ca^{2+}$ -ion jelenlétében és működőképes alacsonyabb üzemelési pH-értékeknél /5,2/, mint a kereskedelmi forgalomban levő legszokványosabb alfa-amilázok. A találmány szerinti eljárással előállított alfa-amiláz minden funkcionális előnye azonos a 4 473 645 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban közölt amilázéval, vagy azt felülmulja. A találmány szerint előnyben részesített eljárás segítségével legalább háromszoros mennyiségű alfa-amiláz képződik a tápközeg 1 ml-ére vonatkoztatva, mint összehasonlítható tenyésztési idő alatt a 4 473 645 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban közölt eljárással.

A találmány szerinti eljárást B. liche-  
niformis törzs használata útján hajtjuk végre, melynek életképes kulturáit az "American Type Culture Collection"-nél /ATCC/ az 53772 számon helyezték letétbe.

A találmány szerinti eljárás során a fermentációt 3-6 napon át folytatjuk  $38^{\circ}$ - $44^{\circ}$ C, előnyösen  $42^{\circ}$ C hőmérsékleten. A fermentációt aerob körülmények között hajtjuk végre 0,5-1 levegőtérfogat/tápközegtérfogat/perc levegőztetést alkalmazva.

Az alkalmas primer szénforrások gyorsan átalakulnak és általában gátolják az alfa-amiláz szintézisét; közéjük tartozik a glukóz, xilóz, mannoz, szacharóz, glicerín és keményítőhidrolizátum. A szénhidrát kezdeti mennyisége a tápközeg 0-20 százalékát /tömeg per térfogat/ képezi.

Az elsődleges szénforráson kívül a tápközeg nitrogénforrást és más esszenciális tápanyagokat tartalmaz, amelyek a szakember előtt ismeretesek /lásd például a 4 473 645 számú Amerikai Egyesült Államokbeli szabadalmi leírást/. Az alkalmas nitrogénforrások szervesek lehetnek, mint oldható nitrátok vagy ammóniumsók, vagy szervesek, mint élesztőkivonat, kukoricalékvár, földimogyoródara, mononátrium-glutamát, szójaliszt, gyapotmagdara, gyapotmagliszt és egyéb szokásos, a szakember előtt ismert nitrogénforrások.

A találmány előnyben részesített megvalósításánál a primer szénforrás glukóz, a nitrogénforrás kukoricalékvár és a fermentáció folyamán az elmenő gáz  $CO_2$ -tartalmát 5-6 százalék között tartjuk a glukóz adagolási sebességének szabályozása útján, 0,5-1,0 levegőtérfogat/tápközegtérfogat/perc levegőztetés alkalmazásakor. A pH-t ammónia /vizmentes vagy vizes/ vagy nátrónátron /vizes nátrium-hidroxid-oldat/ hozzáadásával előnyösen 6,7 értéken tartjuk.

Az enzimet a kívánt enzimaktivitási szintek elérése után izoláljuk a tápoldatból. A kinyerési eljárások jól ismertek; ilyen például a kicsapás nátrium-szulfáttal, ammónium-szulfáttal, acetonnal vagy etanolal, amit centrifugálás vagy szűrés, majd a csapadék szárítása követ. A legáltalánosabban kapható kereskedelmi alfa-amiláz készítményeket folyékony termékek formájában izolálják; a B. licheniformis mikroorganizmust a teljes táptalajból szűréssel távolítják el, majd a szűrletet meghatározott alfa-amiláz aktivitás eléréséig koncentrálnak bepárlás vagy ultraszűrés útján.

A következő példák a találmány további bemutatására szolgálnak.

### 1. példa

#### A. Szilárd ferde táptalaj készítése

B. licheniformis ATCC 53772-t tartalmazó friss ferde táptalajt készítünk alkalmas üzemi törzstenyészetből standard mikrobiológiai technikák segítségével. A megfelelő üzemi törzstenyészeteket lefagyasztott állapotban liofilizált kultúrák vagy külön ferde táptalajos kultúra formájában tartjuk fenn. A ferde táptalaj jellemzően 0,5% /tömeg per térfogat/ kukoricakeményítőt tartalmazó "Difco Anti-

biotic Medium No. 3"-ból áll. A friss ferde táptalajt 25-30 órán át 37°C-on tenyésztjük, mielőtt a szaporító fermenter beoltására felhasználnánk.

### B. Szaporító fermenter

A friss ferde táptalaj baktérium-tenyészetét kismennyiségű "Difco Antibiotic Medium No. 3"-ban szuszpendáljuk, majd közvetlenül átvisszük a szaporító fermenterba, amely

2% kukoricakeményítőt,

1,5% glukózt,

8% kukoricalekvárt,

0,1% Masu DF-37C-t és

0,3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ot tartalmaz.

A fermentációt 25-30 órán át 42°C-on hajtjuk végre, 0,6 levegőtérfogat/táptalajtérfogat/perc levegőztetés közben. A keverés sebessége függ a fermenter méretétől, de jellemzően a 150-1000 fordulat per perc tartományba esik. E példában a keverési sebesség 750 fordulat/perc 14 liter tápfolyadékot tartalmazó 20 literes edényben. A pH-t 6,5 értéken vagy e fölé tartjuk, szükség esetén ammóniagáz alkalmazása után.

### C. Termelés

A termelő fermenterhez a kezdeti be-

oltott térfogat 3%-ának megfelelő inokulumot adunk. Ha például a kívánt termelő fermentor térfogata 100 000 liter, úgy 3000 liter oltótanyészetet viszünk be 97 000 liter termelő táptalajba. A termelő táptalaj összetétele:

4% kukoricakeményítő

6% kukoricalekvár

0,03%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,25% Mazu DF-37C

nyomnyi mennyiségű  $\text{MnSO}_4$

0,67%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

0,5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2,4% glukóz.

A kálium-foszfát-sókat külön sterilizáljuk és aszeptikus körülmények között adjuk a steril termelő tápoldat többi alkotórészéhez. Miután a kezdeti szénhidrát teljesen felhasználódott - amit a  $\text{CO}_2$ -fejlődés hirtelen megszűnése és a pH emelkedése jelez - , elkezdjük egy 70%-os glukózoldat /DL-70, keményítő-hidrolizátum vagy ezek kombinációja/ folyamatos hozzáadását. A levegőztetés sebessége 0,6 levegőtérfogat/tápoldattérfogat/perc. A glukózoldatot olyan ütemben adagoljuk, hogy a fejlődő szén-dioxid az elmenő gáz 5-6 százalékát képezze. Általában a glukózsadagolás a táp-

oldat pH-jának esökkenéséhez vezet, ezért a pH-t szükség esetén ammóniagáz bevezetésével 6,7 értéken vagy efölött tartjuk.

A fermentációt 116 órán át folytatjuk. 76 órai fermentálás után a tápoldatban az alfa-amiláz aktivitása 6064 likvifon/ml /a 4 473 645 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban közölt meghatározás alapján/. 116 órai fermentáció után az aktivitás 7965 likvifon/ml.

Az ATCC 53772 mikroorganizmuson kívül a találmány szerint előnyben részesített eljárásban az ATCC 53772 mutánsai és variánsai, valamint a belőle származó genetikailag transzformált mikroorganizmusok is alkalmazhatók.

Noha a fentieket az előnyös megvalósítás és annak alternatívái szempontjából írtuk le, a szakember előtt érthetően a fentebb leírtak módosíthatók és változtathatók a találmány szellemétől és hatókörétől való eltérés nélkül. Minden ilyen módosítás és változtatás a találmány részének tekintendő.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás hőstabil alfa-amiláz előállítására, azzal j e l l e m e z v e , hogy

Bacillus licheniformis ATCC 53772 törzset olyan tápközegben tenyésztünk, amely elsődleges szénforrásként az alfa-amiláz szintézisét szokatlanosan gátló szénhidrátot tartalmaz;

az elsődleges szénforrást a tenyésztés folyamán hozzáadjuk a tápközeghez;

a tápközegből a tenyésztés során fejlődő szén-dioxid szintjét az elmenő gázban 4,5-6,5 százalék között tartjuk 0,5-1,0 levegőtérfogat/táploldattérfogat/perc levegőztetés mellett, az elsődleges szénforrás adagolási sebességének a szabályozása útján; és

a táploldat pH-ját 6,5 és 7,0 között tartjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e , hogy elsődleges szénforrásként glukózt, keményítőhidrolizátumot, glicerint, xilózt, mannitot <sup>vagy</sup> szacharózt használunk, vagy ezek keverékét alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azsal jellemezve, hogy a táptalajban nitrogénforrásként szójalisztet, kukoricaalekvárt, gyapotmaglisztet, élesztőkivonatot, földimogyorólisztet, oldható nitrátokat vagy ammóniumsókat alkalmazunk, vagy ezek keverékeit használjuk.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, azsal jellemezve, hogy a tápközegben nitrogénforrásként szójalisztet, kukoricaalekvárt, gyapotmaglisztet, élesztőkivonatot, földimogyorólisztet, oldható nitrátokat vagy ammóniumsókat használunk, vagy ezek keverékeit alkalmazzuk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azsal jellemezve, hogy a tenyésztést 72-144 óra alatt hajtjuk végre.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azsal jellemezve, hogy a tenyésztést 38°-44°C hőmérsékleten hajtjuk végre.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azsal jellemezve, hogy a tápfolyadék pH-ját ammónia hozzáadása útján 6,5 és 7,0 között tartjuk.

8. A 2. igénypont szerinti eljárás, azsal jellemezve, hogy a tenyésztést 72-144 óra alatt hajtjuk végre.

9. A 2. igénypont szerinti eljárás, az-  
zal j e l l e m e z v e , hogy a tenyésztést  
38°-44°C hőmérsékleten hajtjuk végre.

10. A 2. igénypont szerinti eljárás,  
azzal j e l l e m e z v e , hogy a tápközeg pH-ját  
ammónia hozzáadása útján 6,5 és 7,0 között tartjuk.

12 oldal

Lángfalvi

A meghatalmazott:

S.B.G. & K.  
Budapesti Nemzetközi Vegyvédő  
Kereskedelmi Rt. Rt.  
1081 Budapest, Dalszécheny u. 10.  
Telefon: 153-3724, 151-4200