

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143811 B

- (21) Ansøgning nr. 5465/73 (51) Int.Cl.³ C 12 N 9/92
(22) Indleveringsdag 9. okt. 1973
(24) Løbedag 9. okt. 1973
(41) Alm. tilgængelig 11. apr. 1974
(44) Fremlagt 12. okt. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 10. okt. 1972, 296000, US
- (71) Ansøger ANHEUSER-BUSCH INCORPORATED, St. Louis, US.
- (72) Opfinder Kenneth K. Shieh, US: Howard A. Lee, US: Brendan J. Donnelly, US.
- (74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.
-
- (54) Fremgangsmåde til fremstilling af
glucoseisomerase.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af glucoseisomerase under anvendelse af mikroorganismer.

Fructose anses generelt for at være væsentligt sødere end glucose. Imidlertid er glucose nemt tilgængeligt fra billige råstofkilder. En praktisk og økonomisk fremgangsmåde til omdannelse af glucose til fructose er derfor ønskværdig. Alkaliisomerisering af glucose til fructose giver enten lave udbytter eller har tendens til at producere uønskede biprodukter i udbytter større end 30%. Et alternativ til anvendelse af alkaliisomerisering har været anvendelsen af enzymer til udvirkning af denne omdannelse, og der har været udvist betragtelige anstrengelser for at opnå dette på

DK 143811 B

en økonomisk og effektiv måde.

Der findes adskillige enzymer, der omdanner D-glucose til D-fructose, og som involverer et eller flere kemiske mellemprodukter (f.eks. D-glucose-6-phosphat), men disse synes ikke at være praktiske på nuværende tidspunkt. Mere lovende er enzymer, der omdanner D-glucose til D-fructose direkte. Et antal af disse enzymer har været fremstillet fra mikroorganismer af slægterne *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Leuconostoc*, *Streptomyces* og *Aerobacter* (se *Biochim. Biophys. Acta* 154, 670-680 [1968]). For at danne en betydelig mængde glucoseisomerase ved hjælp af de førnævnte mikroorganismer må xylose eller xylan være til stede i vækstmedium for at inducere enzymet. Ren xylose er relativt dyr, og når xylan anvendes i vækstmediet, skal mikroorganismene også danne enzymer, der kan hydrolysere xylanen.

For at komme over den udgift, det er at dyrke mikroorganismer i et xylose- eller xylanholdigt medium, har der været udvist anstrengelser for at opnå en mikroorganisme, der kan frembringe det afgørende enzym. I U.S.A.-patentskrift nr. 3.645.848 er der opdaget, at visse stammer af mikroorganismene hørende til slægten *Arthrobacter* kan producere enzymer, der direkte omdanner glucose eller xylose til den tilsvarende ketose, når de dyrkes i et medium, hvori xylose eller xylan ikke er til stede. Uheldigvis dannes der kun relativt små mængder af isomerase, og vækstmediet kræver relativt dyre nitrogenkilder, såsom gærekstrakt og kødprotein.

Det har nu overraskende vist sig, at en mikroorganisme hørende til slægten *Actinoplanes* er i stand til at producere glucoseisomerase, når den dyrkes i et medium i komplet fravær af xylose eller xylan. Dertil kommer, at relativt store mængder glucoseisomerase kan fremstilles ved hjælp af *Actinoplanes*-stammen i et medium bestående af majsstøbevand, salte og vand. Enzymet viser en høj temperaturstabilitet, idet der kan anvendes temperaturer så høje som 80 - 85° C ved isomeriseringen uden nogen væsentlig nedgang i aktiviteten. Enten kan der anvendes hele celler eller cellefrie ekstrakter til at udføre isomeriseringen.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som er af den i krav 1's indledning anførte art, er overensstemmende hermed ejendommelig ved at

der ved dyrkningen anvendes mikroorganismen *Actinoplanes missouriensis* NRRL B-3342.

Basiskulturer dyrkes normalt i et medium indeholdende carbonkilder, nitrogenkilder (sædvanligvis majsstøbevand) og uorganiske salte. Podningsmediet kan fremstilles ved at dyrke organismen i dette medium på en roterende rystemaskine ved 25 - 30° C i nærværelse af luft i 1 - 2 dage. Podningsmediet, der udgør 3 - 10 % af det endelige volumen af fermenteringsmediet, overføres til det sterile medium i en egnet fermenteringsbeholder. Det podede medium inkuberes ved omrøring ved 16 - 40° C, fortrinsvis 25 - 30° C, hvorunder der blæses luft igennem med en hastighed på 1 volumen pr. minut i 1 - 7 dage. Luftgennemstrømningen kan være på 0,3 - 1,5 volumen pr. minut. Det maksimale udbytte af enzym opnås, når pH af fermenteringsmediet holdes på 6,0 - 8,5, fortrinsvis 5,4 - 7,5. Maksimal isomeraseaktivitet opnås under disse betingelser på 3 - 5 dage. De hele celler udvindes og anvendes som sådan, eller alternativt kan enzymet ekstraheres fra cellerne under anvendelse af velkendt teknik.

Aktivitetsniveau på op til 30 enheder pr. ml kulturmedium kan opnås på tre dage. En aktivitetseenhed defineres som den mængde enzym, der kan producere 1 mikromol fructose fra glucose på 1 minut ved 75° C i en opløsning af 1,5 molær glucose, 0,03 molær fosfatbuffer ved pH 7,0, 0,003 molær magnesiumsulfat og 0,0003 molær cobaltsulfat.

De opnåede isomeraseaktiviteter ved udførelsen af den foreliggende opfindelse varierer afhængigt af det anvendte vækstmedium. Aktivitetsniveauer på 50 enheder pr. ml. kulturmedium er observeret, når *Actinoplanes missouriensis* NRRL B-3342 dyrkes i majsstøbevand.

Følgende eksempler illustrerer nærmere fremgangsmåden ifølge opfindelsen. I eksempel 10 er der undersøgt tre mutanter af NRRL B-3342.

EKSEMPEL 1

Dette eksempel sammenligner fremstilling af glucoseisomerase ud fra et antal *Actinoplanes*-arter, nemlig *Actinoplanes missouriensis* NRRL B-3342, *Actinoplanes philippinensis* ATCC

12427, *Actinoplanes armeniacus* ATCC 15676 og *Actinoplanes missouriensis* ATCC 23342.

Disse mikroorganismer opbevares separat i basis-skråkulturer bestående af 1,7 % Trypton, 0,3 % Soyton, 0,25 % glucose og 2,0 % agar. Podningsmediet fremstilles ved at overføre mikroorganismerne fra basiskulturen til en prøvekolbe indeholdende 8 ml sterilt medium, bestående af 1,7 % Trypton, 0,3 % Soyton, 0,25 % dikaliiumhydrogenphosphat og 0,25 % glucose. Podningsmediet dyrkes i prøvekolben ved 28° C i 2 - 3 dage under omrystning. Podningsmediet podes herefter over i et af følgende vækstmedier til frembringelse af det glucoseisomeriserende enzym:

MEDIUM NR. II

Trypton	1,7 %
Soyton	0,3
K ₂ HPO ₄	0,25
D-xylose	1,0

og fyldes op til volumenet med ledningsvand.

pH af kulturmediet indstilles til ca. 7,0. Sukker og andre næringsmidler steriliseredes separat og iblandedes derefter.

MEDIUM NR. I

Mediet fremstilles som medium nr. II, men der anvendtes 0,25 % D-glucose i stedet for D-xylose.

MEDIUM NR. III

Majsstøbevand	3 %
CoSO ₄	0,1 mM
CuSO ₄	0,05 mM

Fremstillingen af vækstmediet fra majsstøbevand er anført i eksempel 2 nedenfor.

pH af kulturmediet var 7,0 i alle tilfælde.

Andre anvendelige medier er f.eks. distiller's solubles, pepton-gær-

ekstrakt, kaseinhydrolysat, sojabønnehydrolysat og fiskeproteinhydrolysat eller blandinger af de beskrevne medier.

Væksten startes ved at sætte 5 ml af det omhandlede podningsmedium til 75 ml Trypton-Soyton-medium eller 95 ml majsstøbevand i en 250 ml Erlenmeyer-kolbe. Cellerne inkuberedes i 96 timer ved 28° C under omrystning på en G-25 New Brunswick Scientific Gyrotary Shaker ved 280 omdrejninger pr. minut.

Cellerne opsamledes ved centrifugering af 30 ml kultur ved 15.000 omdrejninger pr. minut i 10 minutter. Cellerne vaskedes én gang med ledningsvand og suspenderedes i 14 ml 0,12 M fosfatbuffer (pH 7,0). Cellesuspensionen sonificeredes ved 4° C i 4 minutter i en Branson Sonifier J-17A og centrifugeredes ved 15.000 omdrejninger pr. minut i 15 minutter. Den ovenstående væske anvendtes som rå glucoseisomerasekilde. Aktiviteten af glucoseisomerasen bestemtes som følger: Til 3,0 ml af en opløsning af 2,0 M glucose, 0,04 molær magnesiumsulfat og 0,004 molær cobaltsulfat, sættes en rå enzymopløsning i 0,12 molær fosfatbuffer (pH 7,0) til et slutvolumen på 4,0 ml. Reaktionen gennemførtes ved 75° C, der udtoges prøver efter 10, 15, 20 og 25 minutter, og disse fortyndedes i 0,02 molær saltsyre.

Fructoseindholdet i prøverne analyseredes på en automatisk analysator ved at anvende skatol-HCl-metoden beskrevet i J. Biol. Chem. 211:143 (1954). Farveudviklingen gennemførtes ved 52° C i modsætning til 37° C. Aktiviteten af glucoseisomerasen beregnedes ud fra hældningen og udtryktes i enheder (U). En aktivitetseenhed er defineret som den mængde glucoseisomerase, der kan frembringe et mikromol fructose fra glucose på 1 minut ved 75° C under de betingelser, der anføres ovenfor.

Produktion af glucoseisomerase ved hjælp af forskellige arter af Actinoplanes mikroorganismer efter dyrkning i Trypton-Soyton-medium eller majsstøbevand er vist i tabel I. Alle disse mikroorganismer er i stand til at frembringe glucoseisomerase i nærværelse eller fravær af D-xylose i vækstmediet. Imidlertid forøger nærværelsen af D-xylose signifikant produktionen af dette enzym.

TABEL IProduktion af glucoseisomerase ved hjælp af forskellige arter af Actinoplanes

Mikroorganisme	<u>Specifik aktivitet U/mg protein</u>		
	Medium nr. I (ingen xylose)	<u>V Æ K S T</u> Medium nr. II (D-xylose)	Medium nr. III (majsstøbevand)
Actinoplanes missouriensis NRRL B-3342	15,2	20,6	17,8
Actinoplanes philippinensis ATCC 12427	0,87	2,0	0,29
Actinoplanes armeniacus ATCC 15676	0,10	0,82	0,24
Actinoplanes missouriensis ATCC 23342	0,48	1,70	0,41

Majsstøbevand kan anvendes som vækstmedium til frembringelse af glucoseisomerase i fravær af D-xylose. Den største produktion af glucoseisomerase opnåedes, når der anvendtes arten Actinoplanes missouriensis NRRL B-3342. Alle de følgende eksempler udførtes under anvendelse af denne mikroorganisme.

EKSEMPEL 2

Fremstillingsmetoden for det anvendte majsstøbevand har en betydelig virkning på enzymproduktionen fra Actinoplanes missouriensis. Forskellige metoder til neutralisation af majsstøbevandet undersøgte. Efter neutralisation til pH 7,0 med base filtreredes majsstøbevandet for at fjerne slammet, der for store dele bestod af phytater, og anvendtes dernæst som vækstmedium ifølge metoden i eksempel 1 under tilsætning af CoSO_4 og CuSO_4 i en koncentration på henholdsvis 0,1 mM og 0,05 mM.

Anvendelsen af natriumhydroxid sammenlignet med calcium- og ammoniumhydroxid giver de resultater, der er anført i tabel II. Kaliumhydroxid er også en egnet base.

TABEL IIVirkningen af neutralisationsmidler til majsstøbevand på produktionen af glucoseisomerase

<u>Neutralisationsmiddel</u>	<u>Produktion af enzym U/ml kulturmedium</u>
Calciumhydroxid	17,2
NH ₄ OH	23,3
NaOH	27,8

Fjernelsen af slammet efter neutralisation er væsentlig som det ses af tabel III. Majsstøbevandet neutraliseredes til pH 7,0 og fyldtes op til 500 ml i en 1 liter Erlenmeyer-kolbe svarende til 3 % fast stof. Udregningen af procent fast stof er baseret på den oprindelige mængde fast stof angivet af firmaet, der fremstillede produktet. Ethvert fast stof, der kan fjernes ved filtrering, er ikke taget med i beregningen, når det endelige faststofindhold er beregnet. CoSO₄ og CuSO₄ tilsattes som ovenfor. Cellerne dyrkedes ved stuetemperatur i 4 dage på en New Brunswick G-50 Shaker ved 280 omdrejninger pr. minut.

TABEL IIIVirkning af fjernelse af slammet fra majsstøbevand på produktionen af glucoseisomerase fra Actinoplanes missouriensis

<u>Vækstmedium</u>	<u>Produktion af enzym U/ml kulturmedium</u>
Slam ikke fjernet	2,5
Slam fjernet	23,2

EKSEMPEL 3

Mængden af glucoseisomerase produceret af mikroorganismen påvirkes også af den organiske nitrogenkilde, der er til stede i mediet som vist i tabel IV. Tallene i tabel IV opnåedes ved at dyrke mikroorganismen i 100 ml medium i en 250 ml Erlenmeyer-kolbe i 3 dage på en G-25 New Brunswick Shaker ved 28° C og 280 omdrejninger pr. minut. Koncentrationen af organisk nitrogen indstilledes til 2 %, der neutraliseredes og filtreredes, og der tilsattes 250 mg glucose, 22 mg K₂HPO₄ og 11

mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, og der fyldtes op til 250 ml med ledningsvand. Mediet steriliseredes i 15 minutter ved 121°C . Cellerne udvandedes, sonificeredes, og aktiviteten af enzymet blev målt. Resultaterne er udtrykt som U/ml kulturmedium.

Majsstøbevand viste den største aktivitet og foretrækkes som organisk nitrogenkilde.

TABEL IV

Virkning af det organiske nitrogens oprindelse på produktionen af glucoseisomerase

Organisk nitrogen fra	Oprindelse	Aktivitet U/ml kulturmedium	%
Majsstøbevand	Anheuser-Busch	17,8	100
"O.M." pepton	Amber Lab.	13,4	75
Caseinhvdrolysat	Amber Lab.	13,0	73
("Amber EHC")			
("BYF - 100")	Difco Lab.	11,8	66
Gærekstrakt			
("BYF - 300")	Amber Lab.	10,3	58
Distiller's dried solubles	National Distil- ler's Products	7,9	44
Gærekstrakt			
("BYF 50 X")	Amber Lab.	5,8	33
Bactopepton	Difco Lab.	5,2	29
Gærekstrakt			
("BYF 50 X")	Amber Lab.	4,3	24
Maltekstrakt	Difco Lab.	2,5	14
"Atlantic Menhaden" pepton	Haynie products	1,1	6

EKSEMPEL 4

Den optimale koncentration af neutraliseret majsstøbevand, og hvorfra slammet var fjernet, til produktion af enzymet blev fundet til 3% som vist i tabel V. Koncentrationen kan variere fra 0,5 til 7 vægtprocent i mediet. Vækstbetingelserne var som anført i eksempel 3, dog indeholdt vækstmediet ikke glucose, og der tilsattes 2,5 mg $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cellerne dyrkedes i 4 dage, indsamledes og afprøvedes efter metoden i eksempel 1.

TABEL VVirksomheden af majsstøbevandskoncentrationen på enzymproduktionen

<u>% Majsstøbevand</u>	<u>Produktion af enzym U/ml kulturmedium</u>
0,5	9,6
1,0	22,3
2,0	23,6
3,0	29,4
4,0	23,4
5,0	23,4
6,0	21,8

EKSEMPEL 5

Virksomheden af forskellige carbonhydratkilder på produktionen af glucoseisomerase ud fra *A. missouriensis* NRRL 3342 undersøgtes. En moderat stimulerende effekt noteredes, når det drejede sig om fructose. Den foretrukne mængde fructose ligger på 0,1 - 2 vægtprocent af mediet. Tallene i tabel VI opnåedes ved at tilføje 0,25 % vægt/volumen carbonhydrat til vækstmediet indeholdende 3 % majsstøbevand og andre næringsstoffer, og betingelserne var ellers som i eksempel I.

TABEL VIVirksomheden af carbonhydrater på produktionen af enzym

<u>Carbonhydratkilde</u>	<u>Enzymaktivitet U/ml kulturmedium</u>
Ingen	28,0
D-xylose	30,0
D-fructose	35,2
D-galactose	31,5

Som det ses af tabel VI, er D-xylose ikke nødvendig for produktion af glucoseisomerase, og dens moderate stimulerende effekt vil sandsynligvis ikke retfærdiggøre dens anvendelse kommercielt.

EKSEMPEL 6

Tilsætning af forskellige metalioner til vækstmediet fandtes at

påvirke produktionen af glucoseisomerase. Cellerne dyrkedes efter metoden beskrevet i eksempel 4 i 3 % majsstøbevand, dog tilsattes kun de salte, der er anført i tabel VII.

TABEL VII

Virkning af metalioner på produktionen af glucoseisomerase
fra Actinoplanes missouriensis NRRL 3342

<u>Tilsætning</u>	<u>Enzymproduktion</u> <u>U/ml kulturmedium</u>
Ingen	22,8
Co ⁺⁺ (0,1 mM)	27,3
Co ⁺⁺ (0,1 mM) Mg ⁺⁺ (0,45 mM)	27,0
Co ⁺⁺ (0,1 mM) Cu ⁺⁺ (0,05 mM)	30,0

0,05 - 0,5 mM cobaltioner og 0,01 - 0,1 mM kobberioner kan tilsættes.

EKSEMPEL 7

Produktionen af glucoseisomerase fandtes at blive påvirket af vækstmediets begyndelses-pH. Det optimale begyndelses-pH fandtes at være 7,0 som vist i tabel VIII. Vækstmediet fremstilledes ved neutralisering af majsstøbevand med natriumhydroxid, filtrering og derefter indstilling til det ønskede pH, og dette medium anvendtes efter betingelserne beskrevet i eksempel 4.

TABEL VIII

Virkning af begyndelses-pH af vækstmediet på vækst og produktion af enzym

<u>Begyndelses-pH</u>	<u>Produktion af enzym</u> <u>U/ml kulturmedium</u>	<u>Vækst</u> <u>mg opløseligt protein/ml</u> <u>kulturmedium</u>
8,5	2,4	0,20
8,0	2,4	0,17
7,5	18,3	1,14
7,0	27,8	1,80
6,5	18,7	1,35
6,0	11,0	0,95
5,5	----	Ingen vækst
5,0	----	Ingen vækst

Proteinbestemmelserne udførtes ved hjælp af metoden beskrevet i J. Biol. Chem. 193:265 (1951) på enzymekstrakter.

EKSEMPEL 8

Actinoplanes missouriensis NRRL 3342 producerer glucoseisomerase over et bredt temperaturområde. Den optimale væksttemperatur er som vist i tabel IX 28° C. Tallene i tabel IX opnåedes ved at dyrke mikroorganismen i 2 - 4 dage ved 16 - 45° C i majsstøbevand-mediet beskrevet i eksempel 1.

TABEL IX

Virkning af væksttemperaturen på enzymproduktionen

Væksttemp. °C	Vækstperiode dage	Produktion af enzym U/ml kulturmedium	Vækst i opløseligt protein/ml kultur- medium
16	4	5,2	0,92
20	4	18,4	1,68
24	4	24,4	2,04
28	4	29,4	2,40
32	4	21,4	1,83
36	2	16,0	1,66
40	2	6,6	0,47
45	3	---	Ingen vækst

EKSEMPEL 9

Produktion af enzymet ud fra *Actinoplanes missouriensis* NRRL B-3342 udføres i en New Brunswick MF 114-fermenteringsbeholder med automatisk pH- og skumkontrol. Ti liter medium fremstilledes under anvendelse af majsstøbevand, hvor pH var indstillet til 7,0 med natriumhydroxid, mediet var filtreret, og der fyldtes op med ledningsvand. Der anvendtes tilstrækkelige mængder majsstøbevand (50 % fast stof) til at give en slutkoncentration på 4 %. Tab af fast stof ved neutralisation og filtrering er ikke taget med i beregningen, ved udregningen af det sluttelige faststofindhold. Mediet tilsattes 0,1 mM cobaltsulfat og 0,05 mM cuprisulfat og steriliseredes i 30 minutter ved 121° C. Væksten udførtes i 5 dage ved 30° C med pH på 7,0 ved automatisk tilsætning af 2 M svovlsyre. Omrøringen var 200 omdrejninger pr. minut, og beluftningen var 1 volumen pr. minut. Fermenteringen startedes ved

tilsætning af 10 % af et 24 timers podningsmedium lavet ud fra samme medium. Ved slutningen af vækstperioden indeholdt kulturmediet 56 aktivitetseenheder pr. ml.

Isomeriseringen af glucose til fructose kan udføres under anvendelse af enten hele celler eller cellefri ekstrakter. pH ved isomeriseringen kan variere mellem 5,5 og 9, men det optimale pH fandtes til 7,0 som vist i tabel X. Enzymet er bemærkelsesværdigt temperaturstabilt, og der er en stor del aktivitet tilbage ved 90° C. Enzymet anvendt ved disse eksperimenter var afledt af *Actinoplanes missouriensis* dyrket i Trypton-Soyton-medium uden D-xylose beskrevet i eksempel 1.

Enzymaktiviteten udtryktes som enheder pr. milliliter rå enzymopløsning fremstillet efter metoden beskrevet i eksempel 1. Betingelserne ved eksperimentet var de samme som ved aktivitetsmålingen, dog anvendtes en egnet phosphatpuffer for at opnå det ønskede pH som anført i tabel X, eller temperaturen varieredes som i tabel 11. Tallene i tabel X er korrigeret for ikke-enzymatisk omdannelse. Glucose-koncentrationen er større end ca. 0,1 M.

TABEL X

Virkning af pH på aktiviteten af glucoseisomerase

pH:	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Aktivitet U/ml:	6,5	16,1	28,0	45,0	50,5	45,0	39,4

TABEL XI

Glucoseisomerase-aktiviteten som funktion af temperaturen:

<u>Temperatur ° C</u>	<u>Aktivitet U/ml</u>
40	4,5
50	9,1
60	20,7
70	43,5
75	57,5
80	74,5
85	127,0
90	158,4

Divalente kationer har en betydelig virkning på aktiviteten af glucoseisomerase fremstillet som i de foregående eksempler. Den mest markante virkning er fundet med magnesium og cobalt. Tabel XII og XIII beskriver resultaterne af tilsætning af magnesium til en cellefri enzymekstrakt og den yderligere forhøjelse af aktiviteten ved tilsætning af cobalt. Betingelserne under forsøgene med undtagelse af koncentrationerne af divalente kationer er de samme som ved aktivitetsforsøgene.

Der tilsættes magnesiumioner i en koncentration på 0,1 - 9 mM, fortrinsvis 0,3 mM. Cobaltioner tilsættes i en koncentration på 0,5 - 0,6, fortrinsvis 0,1 - 0,3 mM Co^{++} .

TABEL XII

Virkning af Mg^{++} på aktiviteten af glucoseisomerase

<u>Koncentration af MgSO_4 (mM)</u>	<u>Enzymaktivitet U/ml</u>
0	4,8
0,5	25,0
1,0	41,2
2,0	44,3
3,0	43,5
4,0	43,5

TABEL XIII

Aktivitet af glucoseisomerase som funktion af Co^{++} -koncentrationen i nærværelse af 3,0 mM MgSO_4

<u>Koncentration af CoSO_4 (mM)</u>	<u>Enzymaktivitet U/ml</u>
0	44,0
0,2	49,0
0,3	54,0
0,4	54,0

Hele celler (1,8 g våde celler fra en rysteflaskekultur af *Actinoplanes missouriensis*) suspenderes i 100 ml 60 % vægt/volumen gluco-

se, 2 ml 18 mM CoSO₄, 2 ml 0,2 M magnesiumsulfat og 10 ml 0,32 M phosphat (K)-buffer (pH 7,5) og inkuberedes i et vandbad ved 75^o C i 4 timer. Cellerne fjernedes ved vakuumfiltrering igennem et Whatman nr. 1 filterpapir. 50 % af glucosen var omdannet til fructose. Identifikation af produkterne udførtes ved tyndtlagskromatografi (J. Chromatog, 34, 26-34 [1968]). Identifikation og kvantificering af sammenlignelige omdannelser er bekræftet ved gaskromatografi af trimethylsilylderivater (R.L. Whistler og J.N. BeMiller, Methods in Carbohydrate Chemistry, bind VI, s. 2, Academic Press, New York, 1972).

EKSEMPEL 10

Anvendelse af mutanter af A. Missouriensis NRRL 3342

Ved bestråling af A. Missouriensis NRRL 3342 med ultraviolet lys med en intensitet på 3240 erg/cm²/sek i 2-6 minutter har man fremstillet mutanter med følgende karakteristika:

<u>Mutant</u>	<u>Karakteristika</u>
AB white	kolonier mister det orange pigment ved dyrkning på trypton-soyton-agar
AB orange	kolonier danner mere orange farve end moderstammen NRRL 3342 ved dyrkning på trypton-soyton-agar
Isolat nr. 1676	producerer mørkebrunt pigment og udskiller dette ved dyrkning på trypton-soyton næringsvæske

Ovennævnte tre mutanter dyrkes på medium nr. I under de i eksempel 1 angivne betingelser, hvormed der opnåedes følgende glucoseisomeraseudbytte:

	isomerase U/ml kulturmedium
AB white	32
AB orange	40
Isolat nr. 1676	39
B-3342	35

Det ses, at de opnåede mutanter danner større eller samme mængder glucoseisomerase som moderstammen.

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af glucose-isomerase ved dyrkning af en mikroorganisme i et vandigt næringsmedium og udvinding af enzymet derfra, k e n d e t e g n e t ved, at man som mikroorganisme anvender *Actinoplanes missouriensis* NRRL B-3342.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at kulturmediet er majsstøbevand, hvorfra en væsentlig del af slammet er fjernet efter neutralisation med base.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at det anvendte majsstøbevand er behandlet med natriumhydroxid, calciumhydroxid, ammoniumhydroxid eller kaliumhydroxid til neutralisation af mediet.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at majsstøbevandskoncentrationen er 0,5-7% fast stof, pH er 6,0-8,5, og temperaturen er 16-40°C.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at kulturmediet indeholder 0,05 mM - 0,5 mM cobalt (II) ioner og 0,01-0,1 mM kobber (II) ioner.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der fermenteres i 24-168 timer.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der tilsættes D-xylose til kulturmediet i en mængde på 0,5-1 vægtprocent af mediet.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der tilsættes D-fructose til kulturmediet i en mængde på 0,1-2,0 vægtprocent af mediet.

Fremdragne publikationer:

Dansk patentansøgning nr. 3678/69 (patent nr. 128250).