

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 972773 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **972773**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁶)
C12N 9/08
C12N 1/14

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **28.12.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **27.06.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.06.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **28.12.1995 PCT/FR1995/001746**
Internationell ansökan - International
application

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

02.01.1995 FR 9500002

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Institut National De La Recherche Agronomique, 147, rue de l'Universite, 75341 Paris Cedex 07, RANSKA, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Moukha, Serge, France, RANSKA, (FR)
2 •Sigoillot, Jean-Claude, France, RANSKA, (FR)
3 •Frasses, Pierre, France, RANSKA, (FR)
4 •Asther, Marcel, France, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Seppo Laine Oy, PL 339, 00181 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä ligniiniperoksidaasin ja mangaaniperoksidaasin tuottamiseksi Phanerochaete chrysosporium -viljelmällä

Förfarande för framställning av ligninperoxidas eller manganperoxidas medelst en Phanerochaete chrysosporium -odling

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

I-1511 CNCM

I-1512 CNCM

I-1513 CNCM

Menetelmä ligniiniperoksidaasin ja mangaaniperoksidaasin tuottamiseksi *Phanerochaete chrysosporium* -viljemällä

- 5 Esillä oleva keksintö koskee menetelmää peroksidaasien tuottamiseksi *Phanerochaete chrysosporium* -sienestä.

Phanerochaete chrysosporium on sieni, joka liittyy "puun valkolahoon". Se on hymenomykeetti, joka kuuluu Aphyllophorales-lahkoon ja Corticaceae-heimoon. Sillä on kyky hajottaa ligniiniä mineralisoitumisprosessiin (lopputuotteet: CO₂ + H₂O).

Tämä sieni tuottaa solun ulkoisia peroksidaaseja: jälkimmäinen käsittää erityisesti mangaaniperoksidaasin (MnPs) isotsyymit [Kuwahara et al., FEBS Lett., 169, ss. 247-250, (1984)] ja ligniiniperoksidaasin (LiPs) isotsyymit [Tien M. ja Kirk T.K., Science, 221, ss. 661-663, (1983); Glenn et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 114, ss. 1077-1083].
15 Nämä entsyymit ovat glykosyloituja hemoproteiineja, joiden keskimääräinen molekyyli-massa on 40 kDa [Leisola et al., J. Biol. Chem., 262 ss. 419-424, (1984)].

Mangaaniperoksidaasit ja ligniiniperoksidaasit kykenevät katalysoimaan lukuisten aromaattisten aineiden hapetusta, erityisesti ligniinin, käyttämällä vetyperoksidia apuaineena.
20 Näiden ominaisuuksien pääsovellutukset ovat paperinvalmistuksen alalla ja jäteveden käsittelyn alalla.

Tähän asti ligniiniperoksidaasit ovat niitä, joita on pääasiassa käytetty tämän tyyppisessä sovelluksessa.
25

Esimerkiksi ranskalaisessa patentissa 2 574 427 kuvataan kaksi *Phanerochaete chrysosporium* -kantaa, joilla on erityisen suuri ligniiniperoksidaasiaktiivisuus, sekä niiden viljelmä elatusaineessa, joka sisältää assimiloituvan typpilähteen samoin kuin assimiloituvan hiili-lähteen ja assimiloituvien epäorgaanisten suolojen lähteen.
30

On tehty myös ehdotus (ranskalainen patentti 2 600 077) viljellä *Phanerochaete chrysosporiumia* perusviljelyelatusaineessa, jota on täydennetty tyydyttymättömillä rasvahapoilla

ja/tai luonnollisilla aminohapoilla. Muut ryhmät ovat ehdottaneen Tween-tyyppisen detergentin lisäämistä [Faison ja Kirk, Appl. Environ. Microbiol. (1985), 49, ss. 299-304], tai vaihtoehtoisesti veratryylialkoholin lisäämistä [Leisola et al., J. Biotechnol. (1985), 3, ss. 97-107] ligniiniperoksidaasin synteesin lisäämiseksi.

5

Keksijöiden ryhmä on myös aikaisemmissa tutkimuksissaan osoittanut erilaisia parametrejä, joiden optimoinnilla kyetään lisäämään ligniiniperoksidaasin tuottamista: oleiinihapon ja/tai eksogeenisten fosfolipidien lisääminen, viljelylämpötilan säätely, ja vastaavat. Nämä tutkimukset johtivat ligniiniperoksidaasin valmistusmenetelmän kehittämiseen, joka menetelmä muodostaa eurooppalaisen patenttijulkaisun 0 437 500 aiheen.

10

Tämä menetelmä käsittää lukusia peräkkäisiä vaihteita, joista kukin suoritetaan erilaisissa viljelyolosuhteissa; ensimmäinen vaihe suoritetaan synteettisessä elatusaineessa, joka sisältää epäorgaanisia suoloja, hiililähteen ja typpilähteen, hiivauutteen läsnäollessa, fosfolipidien lähteen ja emulgoituja rasvahappoja; sitten muodostunutta sienirihmasto kasvatetaan osittain uusitus viljelyelatusaineessa, jota on täydennetty veratryylialkoholilla, mutta joka ei sisällä emulgoituja rasvahappoja, ja jonka fosfolipidisältö edustaa vain 1/7 - 1/8 ensimmäisessä vaiheessa käytetystä viljelyelatusaineen määrästä; kolmannessa vaiheessa elatusaine korvataan täysin uudelle elatusaineella, joka käsittää samat osuudet fosfolipidejä ja veratryylialkoholia kuin toisessa vaiheessa, ja hiililähteen, typpilähteen ja hiivauutteen 1/4 niiden sisällöstä ensimmäisessä vaiheessa; viimeksi neljäs viljelyvaihe suoritetaan elatusaineessa, josta puuttuu hiivauute, hiililähde ja emulgoidut rasvahapot, mutta joka sisältää saman osuuden fosfolipidejä ja veratryylialkoholia kuin edeltävät vaiheet.

15

20

25

Sitten ligniiniperoksidaasi voidaan ottaa talteen viljelyelatusaineesta. Tämän menetelmän käyttö sallii entsyymisisällön kasvattamisen huomattavasti; ligniiniperoksidaasiaktiivisuus elatusaineessa on noin 240 yksikköä (U) litraa ja päivää kohti.

30

Tähän saakka suoritettut tutkimukset ovat keskittyneet kasvattamaan ligniiniperoksidaasin aktiivisuutta. Kuitenkin mangaaniperoksidaasien nähdään yhä enenevässä määrin olevan kykeneviä suorittamaan pääosan ligniinityypin polymeeristen aromaattisten yhdisteiden biokonversaatiossa. Itse asiassa, päin vastoin kuin ligniiniperoksidaasit, joiden aktiivisuutta

rajoittaa entsyymien vähäinen tunkeutuminen lignifioituihin seinämiin, mangaaniperoksidaasit toimivat pienimolekyyli- ja massastaisten yhdisteiden kautta, jotka leviävät helposti. Lyhyesti esitettynä mangaaniperoksidaasin katalyyttiseen kiertoon kuuluu Mn(II):n hapettuminen Mn(III):ksi, mikä orgaanisten happojen kanssa kompleksoitumisen jälkeen kehittää le-
 5 viäviä hapettavia hiukkasia, jotka kykenevät depolymeroimaan luonnollisen ligniinin [Wariishi K., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 176, ss. 269-276, (1991)].

Bonnarme ja Jeffries [J. Ferment. Bioeng. 70:158-163 (1990)] tutkivat *Phanerochaete chrysosporiumin* ligniiniperoksidaasin ja mangaaniperoksidaasin tuottamisen säätelyä
 10 erilaisissa viljelyolosuhteissa; he havaitsivat tällä tavalla, että näiden entsyymien määrä vaihteli erityisesti Mn(II)-pitoisuuden mukana: pienissä pitoisuuksissa ligniiniperoksidaasia tuotetaan ensisijaisesti (760 nmol/ml·min optimiolosuhteissa), kun taas suurissa pitoisuuksissa mangaaniperoksidaasin tuotto (950 nmol/ml·min optimiolosuhteissa) on se, jota suositaan.

15 Keksijöiden kohteena oli kasvattaa *Phanerochaete chrysosporiumin* solunulkoisten peroksidaasien tuottoa tämän sienen viljelmissä ja myös suurentaa MnP/LiP-suhdetta.

Tätä tarkoitusta varten keksijät onnistuivat saamaan uusia kantoja (tämän jälkeen niitä nimitetään lyhenteillä MIC 390, MIC 249 ja MIC 396), jotka ylierittävät solun ulkoisia
 20 peroksidaaseja ligniiniperoksidaasia ja mangaaniperoksidaasia. Lisäksi he keksivät spesifiset viljelyolosuhteet, joita voidaan käyttää joko vapaiden solujen tai kantajaan immobilisoidujen solujen kanssa. Tällä kyetään kasvattamaan ligniiniperoksidaasin ja mangaaniperoksidaasin saantoa hyvin merkittävästi suhteessa siihen, mitä saadaan tekniikan tason
 25 viljelmistä: esimerkiksi keksinnön mukaisesti saduilla viljelmillä voidaan tuottaa arviolta kaksi kertaa niin paljon ligniiniperoksidaasia kuin patentin EP 0 437 500 mukaisilla kannoilla, ja 10 kertaa niin paljon mangaaniperoksidaasia kuin mitä Bonnarme ja Jeffries ovat aikaisemmin saaneet.

30 Esillä olevan keksinnön toteutus mahdollistaa lisäksi mangaaniperoksidaasi/ligniiniperoksidaasi-suhteen säätö- ja muuntelemisen tarpeiden mukaisesti.

Esillä olevan keksinnön kohteena on *Phanerochaete chrysosporium* -kannat MIC 249, MIC 390 ja MIC 396, jotka on talletettu 20. joulukuuta 1994 talletuslaitokseen CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes [National Collection of Microorganism Cultures]), jota ylläpitää Pasteur Institute, 26 rue du Docteur Roux, Pariisissa, vastaavilla numeroilla I-1511, I-1512 ja I-1513.

Esillä oleva keksinnön kohteena on myös menetelmä ligniiniperoksidaasin ja/tai mangaaniperoksidaasin valmistamiseksi *Phanerochaete chrysosporium* -viljelmästä, jolle menetelmälle on tunnusomaista se että viljellään ainakin yhtä *Phanerochaete chrysosporium* -kantaa, valittuna ryhmästä, joka käsittää edellä mainitut kannat MIC 249, MIC 390 ja MIC 396.

Nämä viljelmät tuotetaan, sinänsä tunnetuilla, standardeilla *Phanerochaete chrysosporium* -viljelytekniikoilla, ympistä, joka muodostuu sienirihmastopalasista, jotka on saatu esiviljelystä tai itiöistä (arviolta 2×10^5 itiötä/ml).

Viljelyelatusaine käsittää ainakin yhden hiililähteen, ainakin yhden typpilähteen, epäorgaanisia suoloja, hivenaineita ja vitamiineja, ja sitä täydennetään hiivauutteella.

Hiililähteen pitoisuus on edullisesti välillä 5 ja 20 g/l.

Ensi sijassa käytettävä hiililähde käsittää glyserolin, mutta muita hiililähteitä, jotka ovat assimiloituvissa hitaammin tai nopeammin, voidaan käyttää, yksin tai seoksena; esimerkiksi sellaisista hiililähteistä kuuluvat maltoosi, raffinoosi, tärkkelys, ksyloosi, ramnoosi, arabinoosi, fruktoosi, sorbitoli, mannoosi, sellobioosi ja selluloosa.

Keksinnön mukaisen menetelmän edullisen toteutusmuodon mukaisesti hiililähde käsittää ainakin yhden fosfolipidin valittuna joukosta, johon kuuluu fosfatidyylikoliini (PC), lysofosfatidyylikoliini (LPC), fosfatidyylietanoliamiini (PE), asyylifosfatidyylietanoliamiini (APE), fosfatidyyli-inositoli (PI) ja fosfatidihappo (PA), tai mainittujen fosfolipidien seos; seos voi tässä tapauksessa koostua fosfolipidien seoksesta, joka on peräisin luonnollisista

lähteistä, esimerkiksi soijafosfolipidit. Edullisesti jos käytetään fosfolipidien seosta, se käsittää enemmän kuin 25 % fosfatidyyli-inositolia ja vähemmän kuin 15 % PC:tä.

5 Edullisesti fosfolipidin tai fosfolipidien seoksen (uudelleen muodostettu tai soijasta peräisin oleva) pitoisuus on välillä 0,1 ja 10 g/litra.

10 Tyypilähde voi koostua esimerkiksi aminohapoista, natriumnitraatista tai näiden erilaisten tyypilähteiden seoksesta yhdessä hiivauutteen kanssa. Tyypilähteen pitoisuus on edullisesti välillä 0,5 ja 20 g/l.

Assimiloituvat epäorgaaniset suolat käsittävät kalium-, kalsium- ja magnesiumsuolat ja niitä käytetään pitoisuuksissa välillä 0,5 ja 100 mM.

15 Hivenaineet koostuvat pääasiassa rautasulfaatista, sinkkisulfaatista, mangaanisulfaatista ja kuparisulfaatista. Rauta-, sinkki- ja kuparisulfaattien pitoisuudet ovat sellaisia pitoisuuksia, joita tavanomaisesti käytetään viljeltäessä *Phanerochaete chrysosporiumia* (katso esimerkiksi EP-0 437 500). Mn^{2+} -pitoisuudella ei ole vaikutusta mangaaniperoksidaasin tuottoon keksinnön mukaisissa viljelyolosuhteissa ja se voi vaihdella suhteellisen laajalla alueella; se on edullisesti välillä 1 ja 600 mM.

20 Elatusainetta täydennetään myös vitamiinien lähteellä; on mahdollista esimerkiksi käyttää vitamiinien seosta, joiden koostumus vahvistaa sen, mitä viitteessä Tatum et al. on esitetty [Am. J. Bot., 37:38-46 (1950)]. Vitamiinien seosta käytetään pitoisuuksissa välillä 0,001 g ja 1 g litraa kohti.

25 Lisäksi veratryylialkoholin (noin 0,4 mM) lisääminen auttaa tuotetun entsyymin stabiiliisuuden säilyttämistä.

30 Esillä olevan keksinnön edullisen toteutusmuodon mukaisesti viljelyelatusainetta täydennetään viljelyn aikana lisäämällä annos, 0,001 - 10 grammaa litraa kohti, ainakin yhtä komponenttia, joka aktivoi entsyymien tuotantoa ja/tai suojaaa jälkimmäistä; tämä aktivoiva

ja/tai suojaava komponentti voi koostua mistä tahansa alkuelatusaineen komponenteista tai useiden niiden seoksesta.

Edullisesti tämä aktivoiva ja/tai suojaava komponentti käsittää veratryylialkoholin, jota
 5 tässä tapauksessa käytetään pitoisuuksissa välillä 0,1 ja 1 grammaa litraa kohti. On myös mahdollista lisätä fosfolipidilähteen täydennys, jossa on paljon fosfatidyyli-inositolia, jota tässä tapauksessa käytetään annoksena 0,1 - 3 grammaa litraa kohti.

Tämä lisääminen voidaan suorittaa liuoksen, emulsion tai liposomien muodossa lisäämällä
 10 pinta-aktiivisen aineen (esimerkiksi Tween 80) seosta rasvahappojen (C18:12, C18:2) ja paljon fosfatidyyli-inositolia sisältävien fosfolipidien kanssa.

Elatusaineen täydentäminen voidaan suorittaa jatkuvatoimisesti (pumpulla) tai jaksoittain.

15 Täydennys aktivoivalla ja/tai suojaavalla komponentilla (komponenteilla) suoritetaan, kun viljelmä on saavuttanut sellaisen kasvuvaiheen, jossa peroksidaaseja koodaavien geenien ilmentäminen alkaa tapahtua (syntyy lähetti-RNAita, jotka koodaavat mangaaniperoksidaaseja ja ligniiniperoksidaaseja). Tämä vaihe, joka on määritetty kokeellisesti, saavutetaan tietyn ajanjakson jälkeen, joka voi vaihdella kantojen ja viljelyolosuhteiden mukaan, mutta
 20 yleensä on noin 2 päivää viljelyä lämpötilassa välillä 28 °C ja 40 °C.

Keksinnön mukaisen menetelmän suorittamiseksi viljely voidaan suorittaa sinänsä tunnetulla tavalla, joko soluissa, jotka on immobilisoitu kantajaan, tai vapailla soluilla.

25 Immobilisoitujen solujen tapauksessa ne kytketään tai adsorboidaan yhteen tai useampaan hydrofobiseen, hydrofiiliseen tai neutraaliin kantajaan tai tukeen, jonka pinta on edullisesti karkea ja joka sisältää esimerkiksi koloja, seulan (harsokangas tai verkko), aukkoja tai reikiä. Nämä tuet, ontot tai muunlaiset, asetetaan järjestykseen tai muulla tavalla, kiinteiksi tai liikkuviksi nestefaasissa, joka sisältää sopivan ravinne-elatusaineen, ja sillä voi olla
 30 erilaisia muotoja (sylinterimäinen tai kuutiomainen, yhdessä tai useammassa osassa). Nämä kantajat eli tuet, samoin kuin elatusaine, voidaan korvata ja/tai uudistaa jatkuvatoimisesti tai jaksoittain viljelyn aikana.

Järjestämättömien kiinteiden tukien rajoittamattomina esimerkkeinä voidaan mainita sylinterimäiset Raschig-renkaat, jotka on tehty kivitavarasta, lasista, metallista tai muovista; polyuretaani-, polyesteri- ja polyamidivaahdot; metalli- tai muovitäytteet ja muovilangat.

5

Rajoittamattomina esimerkkeinä järjestetyistä kiinteistä tuista voidaan mainita harsokangas tai -verkko; ruostumaton teräs, lasi, muovi, polyuretaani, polyesteri, nailon, polyakrylaatti, polyamidi ja vastaavat.

10

Rajoittamattomina esimerkkeinä tuista, jotka ovat liikkuvia nestefaasissa, voidaan mainita polyuretaani, polyesteri, polyamidi ja suulakepuristetut muovituot.

15

Vapaiden solujen tapauksessa sienirihmasto on pallojen muodossa, jotka pallot voivat olla halkaisijaltaan 0,5 - 5 mm. Käytetyt bioreaktorit ovat kuplakolonne- tai ilmakuljetustyyppiä (halkaisija/korkeus-suhde $d/h = \text{noin } 1/4 - 1/6$) tai tavanomaisen tyyppisiä ($d/h = \text{noin } 1 - 1/2$), ja niillä on spesifinen tai epäspesifinen sekoitusyksikkö, esimerkiksi Rushton, merityyppinen propelli, MIG tai yksinkertainen tai kaksoiskierteinen nauha.

20

Edullisesti viljely suoritetaan ilmastamalla tai sekoittamalla elatusainetta.

25

Elatusaineen ilmastus suoritetaan viemällä ilmaa, puhdasta happea tai mitä tahansa muuta kaasujen seosta, edellyttäen, että tarjotaan riittävästi happea mikro-organismille, sellaisen laitteen avulla, joka sallii tämän kaasun homogeenisen hajaantumisen (lasisintteri, sauva).

30

Elatusaineen sekoittaminen voidaan suorittaa myös mekaanisesti. Se voidaan saada aikaan myös pneumaattisesti ilmastussysteemin suoralla toiminnalla tai samanaikaisesti käytettävällä ekvivalentilla systeemillä.

Sekoittamisen ja/tai ilmastuksen määrä valitaan siten, että sallitaan tuen homogeeninen alkumiehitys immobilisoitujen solujen kyseessä ollessa, ja sienirihmastopallojen, joiden keskimääräinen halkaisija on 0,5 - 5 mm, muodostuminen vapaiden solujen tapauksessa,

samalla kun rajoitetaan leikkausjännityksiä, joita kohdistuu sienihyfeihin. Tämä määrä voi olla vaihteleva kasvatusaikana.

5 Edullisesti alkuajassa (noin 2 päivää) inkubointi tapahtuu noin 37 °C:een lämpötilassa ja sitä voi seurata lämpötilan muutos, joka suosii peroksidaasien tuottamista, kuten on kuvattu esimerkiksi EP-patentissa 0 437 500.

10 Mangaaniperoksidin ja/tai ligniiniperoksidaasin tuottaminen ja sen seurauksena MnP/LiP-suhdetta voidaan säädellä viljelmän iän ja/tai aktivaattoreiden läsnäolon mukaisesti samoin kuin käytettyjen kantojen mukaisesti. Siten on mahdollista saada entsyymiseos, jossa on pääasiassa joko mangaaniperoksidia tai ligniiniperoksidia (aktiivisuus suurempi tai yhtä suuri kuin 60 % mangaaniperoksidaasi- ja ligniiniperoksidaasiaktiivisuuksista yhteensä).

15 Keksinnön mukaisen menetelmän muunnelman mukaisesti on mahdollista lisäksi säädellä MnP/LiP-suhdetta ja kasvattaa edullisesti joko mangaaniperoksidaasin tai ligniiniperoksidaasin tuottamista. Tälle muunnelmalle on tunnusomaista se, että:

20 - MnP/LiP-suhteen muuttamiseksi mangaaniperoksidaasin tuottoa suosivaksi *Phanerochaete chrysosporiumin* kasvattaminen suoritetaan ajassa, joka on enemmän kuin 24 tuntia ja vähemmän kuin 90 tuntia, fosfatidyyli-inositolia paljon sisältävän fosfolipidien seoksen läsnäollessa, kuten edellä on määritetty, pitoisuudessa välillä 0,5 ja 5 g/l, edullisesti suuruusluokassa 1,5 g/l.

25 - MnP/LiP-suhteen muuttamiseksi ligniiniperoksidaasin tuottoa suosivaksi *Phanerochaete chrysosporiumin* kasvattaminen suoritetaan ajassa, joka on enemmän kuin 90 tuntia ja vähemmän kuin 350 tuntia, fosfolipidien seoksen läsnäollessa, kuten edellä on määritetty, pitoisuudessa välillä 0,5 ja 5 g/l.

30 Sovelluksesta riippuen viljelyliemet koostuvat siten entsyymiseoksesta, jossa on enemmän tai vähemmän runsaasti mangaaniperoksidaasia tai ligniiniperoksidaasia, jotka voidaan käyttää suoraan tai sen jälkeen, kun ne on konsentroitunut esimerkiksi ultrasuodattamalla.

Milloin sopivaa puhdistus voidaan suorittaa MONO-Q-tyypin kolonnilla (Pharmacia Biotech S.A.; Ranska).

5 Esillä oleva keksintö ymmärretään paremmin seuraavana olevasta selitysosasta, jossa on esimerkkejä keksinnön mukaisen menetelmän toteutusmuodosta.

Pitäisi kuitenkin selvästi ymmärtää, että nämä esimerkit on annettu vain keksintöä valaiseviksi, ilman että ne rajoittavat keksintöä millään tavalla.

10 I - Ylierittävien kantojen käyttö

Kannat, jotka valitaan keksinnön mukaisesti, olivat *Phanerochaete chrysosporium* -kannat MIC 249 (CNCM I-1511), MIC 390 (CNCM I-1512) ja MIC 396 (CNCM I-1513).

15 Esimerkki 1: Erilaisten kantojen ligniiniperoksidaasien ja mangaaniperoksidaasien tuoton vertailu

20 Keksinnön mukaisten ylierittävien kantojen MIC 249, MIC 390 ja MIC 396 tuottokapasiteettia suhteessa vertailukantaan BKM-F-1767 (ATCC 24725) vertailtiin viljelmissä, jotka laitetaan 250 ml:n Erlenmeyer-pulloihin seuraavissa olosuhteissa:

Elatusaineen koostumus:

25	Glyseroli	10	g/l
	Dinatriumtartraatti	2,3	g/l
30	Diammoniumtartraatti	1,842	g/l
	KH ₂ PO ₄	2	g/l
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,14	g/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,70	g/l
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,07	g/l
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,046	g/l
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,035	g/l

CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,007	g/l
Hiivaluute	1	g/l
Nat89	0,5	g/l
Veratryylialkoholi	0,42	g/l

5

Kasvatusolosuhteet:

• Elatusainetta jaetaan steriileissä olosuhteissa 100 ml:n annoksina Erlenmeyer-pulloihin; kukin Erlenmeyer-pullo sisältää polyuretaanivaahtkuutioita.

10

• Siirrostaminen suoritetaan käyttämällä esikasvatuksesta peräisin olevia sienirihmastopallasia.

15

• Erlenmeyer-pullojen hapetus suoritetaan kasvatuksen alussa (T₀) ja sitten inkubointi suoritetaan 37 °C:ssa sekoittamalla nopeudella 90 tai 120 rpm.

• 48 h kasvatuksen alkamisesta suoritetaan Erlenmeyer-pullojen päivittäinen hapetus ja inkubointia jatketaan 37 °C:ssa sekoittamalla nopeudella 90 tai 120 rpm.

20

Ligniini-peroksidaasi- ja mangaani-peroksidaasiaktiivisuudet mitataan 4 päivää kasvatuksen jälkeen seuraavan menettelyn mukaisesti:

- a) ligniini-peroksidaasiaktiivisuuden määrittäminen: tämä aktiivisuus määritetään mittaamalla veratryylialkoholin hapettumisen nopeus vastaavaksi aldehydiksi vetyperoksidin läsnäollessa [Tien ja Kirk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2280-2284 (1984)]. Reaktiota seurataan 30 °C:ssa spektrofotometrillä 310 nm:ssä. Veratraldehydin molaarinen ekstinktiokerroin tällä aallonpituudella on 9300 M⁻¹·cm⁻¹.

25

30

Elatusaineen aktiivisuus ilmaistaan nkatal·ml⁻¹:na tai vaihtoehtoisesti yksikköinä/litra (U/l): yksi ligniini-peroksidaasiyksikkö vastaa minuuttia kohti muodostunutta yhtä mikromoolia veratraldehydiä.

- b) mangaaniperoksidiaktiivisuuden määrittäminen: tämä aktiivisuus määritetään mittaamalla vanillyyliasetonin happettumisnopeutta MnSO_4 :n läsnäollessa [Paszczynski et al. FEMS Microbiol. Lett., 29:37-41 (1985)]. Reaktiota seurataan 30 °C:ssa spektrofotometrillä 334 nm:ssä. Vanillyyliasetonin molaarinen ekstinktiokerroin tässä aallonpituudessa on 18300 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Elatusaineen aktiivisuus ilmaistaan $\text{nkatal}\cdot\text{ml}^{-1}$:na tai vaihtoehtoisesti yksikköinä/litra (U/l): yksi mangaaniperoksidaasiyksikkö vastaa minuuttia kohti muodostunutta yhtä mikromoolia vanillyyliasetonia.

Tuloksista on esitetty yhteenveto alla olevassa taulukossa I:

Taulukko I

Kanta	MnP-aktiivisuus (U/l)	LiP-aktiivisuus (U/l)
ATCC 24725	1200	900
MIC 249	4800	4200
MIC 390	5520	2040
MIC 396	3500	3150

Nämä tulokset osoittavat, että näissä olosuhteissa kanta I-1511 (MIC 249) tuottaa 4 kertaa niin paljon mangaaniperoksidaasia ja ligniiniperoksidaasia kuin vertailukanta BKM-F-1767; kanta I-1512 (MIC 390) tuottaa noin 5 kertaa niin paljon mangaaniperoksidaasia ja kaksi kertaa niin paljon ligniiniperoksidaasia kuin kanta BKM-F-1767; ja kanta I-1513 (MIC 396) tuottaa kaksi kertaa niin paljon mangaaniperoksidaasia ja ligniiniperoksidaasia kuin kanta BKM-F-1767.

II- Elatusaineen koostumuksen ja viljelyolosuhteiden vaikutus ligniiniperoksidaasien ja mangaaniperoksidaasien tuottoon

Esimerkki 2: Viljelmän iän vaikutus

Kantaa MIC 249 kasvatetaan samanlaisissa olosuhteissa kuin esimerkissä 1 on kuvattu.

Inkubointi suoritetaan 37 °C:ssa sekoittamalla nopeudella 90 rpm.

5

Ligniini-peroksidaasi- ja mangaani-peroksidaasi-aktiivisuudet mitataan erilaisilla kasvatusajoilla ja MnP/LiP-suhde lasketaan. Tuloksista on esitetty yhteenveto alla olevassa taulukossa II.

10 Taulukko II

Viljelmän ikä (h)	MnP-aktiivisuus (U/l)	LiP-aktiivisuus (U/l)	MnP/LiP-suhde
63	3270	1746	1,87
109,5	2694	2634	1,02
229	2346	4290	0,55

15

Esimerkki 3: Fosfolipidipitoisuuden vaikutus

Kantaa MIC 390 kasvatetaan seuraavissa olosuhteissa, peruselatusaineessa, jonka koostumus on seuraava:

20

Glyseroli	10	g/l
Dinatriumtartraatti	2,3	g/l
Diammoniumtartraatti	1,842	g/l
KH ₂ PO ₄	2	g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,14	g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,70	g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,07	g/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,046	g/l
MnSO ₄ · H ₂ O	0,035	g/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,007	g/l
Hiivauute	1	g/l

30

Tätä peruselatusainetta täydennetään fosfolipidien seoksella, NAT89, pitoisuuksissa välillä 0,5 g/l ja 1,89 g/l.

NAT 89:ta toimittaa yhtiö Natterman Phospholipid GmbH (Köln, Saksa), ja sen koostumus on seuraava:

- 12 % fosfatidyylikoliinia ja lysofosfatidyylikoliinia;
- 31 % fosfatidyylietanoliamiinia ja asyylifosfatidyylietanoliamiinia;
- 27 % fosfatidyyli-inositolia;
- 30 % fosfatidihappoa.

Kasvatus suoritetaan kuten on kuvattu esimerkissä 1. Inkubointi suoritetaan 37 °C:ssa sekoittaen samalla 120 rpm.

Ligniini-peroksidaasi- ja mangaaniperoksidaasiaktiivisuudet mitataan optimituotossa viljelyelatusaineessa, nimittäin 4,5 päivän kasvatuksen jälkeen.

MnP/LiP-suhde lasketaan. Tulokset esitetään alla olevassa taulukossa III.

Taulukko III

NAT89-konsentraatio (g/l)	MnP-aktiivisuus (U/l)	LiP-aktiivisuus (U/l)	MnP/LiP- suhde
0,5	6564	1932	3,4
0,98	6780	1920	3,53
1,44	8664	1056	8,21
1,89	6474	384	16,86

III - Ligniini-peroksidaasien ja mangaaniperoksidaasien tuottaminen reaktorissa

Esimerkki 4: Viljelmä reaktorissa, joka sisältää tukeen immobilisoituja soluja

- 5 Bioreaktorin runko sisältää immobilisointituen, joka koostuu tässä tapauksessa 2 saman-
keskisestä sylinteristä, jotka on tehty metallilankaverkosta (lanka 0,15 mm halkaisijaltaan),
jossa on 0,5 mm seula, vastaavat halkaisijat 70 mm (ulompi sylinteri) ja 30 mm (sisempi
sylinteri) 290 mm:n korkeudelta.

- 10 Peruselatusaineen koostumus on seuraava:

	Glyseroli	12,5	g/l
	Dinatriumtartraatti	2,875	g/l
	Diammoniumtartraatti	2,302	g/l
	KH_2PO_4	2,5	g/l
15	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,175	g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,875	g/l
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0875	g/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0575	g/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0437	g/l
20	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0087	g/l
	Hiivauute	1,25	g/l
	NAT89	0,625	g/l

- 25 2,5 litraa tätä elatusainetta lisätään bioreaktoriin ja sen sisältö steriloidaan autoklaavissa 30
minuuttia 120 °C:ssa.

- Sitten bioreaktoria lämmitetään 37 °C:ssa ja ilmastetaan suodatetulla ilmavehän ilmalla,
jota syötetään virtausnopeudella 40 l/h kieroilmastustangon tai sintterin avulla, joka sijait-
see metallisylinterien pohjalla, jolloin muodostuu vakaa kuplien virta, tarjoten sekä sekoit-
uksen että homogeenisen ilmastuksen, joka tarvitaan sienirihmastokalvon tyydyttävään
muodostumiseen.

Siirrostaminen suoritetaan käyttämällä sienirihmastopalasiasia esikasvatuksesta.

48 tunnin kasvatuksen jälkeen:

- 5 A) elatusainetta täydennetään steriileissä olosuhteissa fosfolipidiseoksella (NAT89), johon on lisätty veratryylialkoholia (VeA).

Seoksen koostumus:

	- VeA	1,25 g
10	- NAT89	0,30 g

B) Ilmakuplien virta korvataan puhtaan hapen kuplien virralla virtausnopeudella 20 l/h.

- 15 Näissä olosuhteissa kannalla MIC 390 saadut mangaaniperoksidaasi- ja ligniiniperoksidaasiaktiivisuudet ovat:

- maksimi MnP-aktiivisuus:	10000 U/l
- maksimi LiP-aktiivisuus:	2400 U/l.

- 20 **Esimerkki 5: Mikro-organismin viljelmä kuplakolonnityyppisessä reaktorissa, joka sisältää vapaita soluja**

Peruselatusaineen koostumus on seuraava:

	Glyseroli	6,8	g/l
	Dinatriumtartraatti	1,565	g/l
25	Diammoniumtartraatti	1,252	g/l
	KH_2PO_4	1,334	g/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,094	g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,467	g/l
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0461	g/l
30	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0310	g/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0232	g/l
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0046	g/l

Hiivauute	0,680	g/l
NAT89	0,5	g/l

5 2,5 litraa tätä elatusainetta lisätään bioreaktoriin ja sen sisältä steriloidaan autoklaavissa 30 minuuttia 120 °C:ssa.

10 Sitten bioreaktoria lämmitetään 37 °C:ssa ja ilmastetaan suodatetulla ilmakehän ilmalla, jota syötetään virtausnopeudella 40 l/h kieroilmastustangon tai sintterin avulla, jolloin muodostuu vakaa kuplien virta, tarjoten sekä sekoituksen että homogeenisen ilmastuksen, joka tarvitaan sienisolujen muodostumiseen.

Siirrostaminen suoritetaan käyttämällä sienirihmastopalasiasia esikasvatuksesta tai itiöliuoksesta, joka sisältää 2×10^5 itiötä/ml.

15 24 tunnin jälkeen muodostuu sienirihmastopalloja arviolta 0,5 - 1 mm halkaisijaltaan ja ilmvirran nopeus pienennetään arvoon 20 l/h.

48 tunnin jälkeen:

20 A) Elatusainetta täydennetään steriileissä olosuhteissa fosfolipidiseoksella, joka sisältää veratryylialkoholia (VeA).

Seoksen koostumus:

- VeA	1,05 g
- fosfolipidilähde	0,25 g

25

B) Ilmakuplien virta korvataan puhtaan hapen kuplilla virtausnopeudella 20 l/h.

Näissä olosuhteissa kannalla MIC 390 saadut tulokset ovat:

30 - maksimi MnP-aktiivisuus:	3600 U/l.
- maksimi LiP-aktiivisuus:	162 U/l.

Patenttivaatimukset:

1. *Phanerochaete chrysosporium* -kannat merkinnältään MIC 249, MIC 390 ja MIC 396, talletettu 20. joulukuuta 1994 talletuslaitokseen CNCM vastaavilla numeroilla I-1511, I-1512 ja I-1513.

2. Menetelmä ligniiniperoksidaasin ja/tai mangaaniperoksidaasin tuottamiseksi *Phanerochaete chrysosporium* -viljelmällä, **tunnettu** siitä, että kasvatetaan ainakin yhtä *Phanerochaete chrysosporium* -kantaa valittuna joukosta, johon kuuluvat patenttivaatimuksen 1 mukaiset kannat MIC 249, MIC 390 ja MIC 396.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että *Phanerochaete chrysosporiumin* viljelyelatusainetta täydennetään kasvatuksen aikana lisäämällä veratryylialkoholia pitoisuudessa välillä 0,1 ja 1 grammaa litraa kohti, ja/tai fosfolipidilähdettä, jossa on paljon fosfatidyyli-inositolia annoksena 0,1 - 3 grammaa litraa kohti.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että täydentäminen fosfolipideillä ja/tai veratryylialkoholilla suoritetaan noin 2 päivän kasvatuksen jälkeen lämpötilassa 28...40 °C.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 2-4 mukainen menetelmä, jossa sallitaan lisäksi joko mangaaniperoksidaasin tai ligniiniperoksidaasin tuotannon valikoiva kasvu, **tunnettu** siitä, että:

- MnP/LiP-suhteen muuttamiseksi mangaaniperoksidaasin tuottoa suosivaksi *Phanerochaete chrysosporiumin* kasvattaminen suoritetaan ajassa, joka on enemmän kuin 24 tuntia ja vähemmän kuin 90 tuntia, fosfatidyyli-inositolia paljon sisältävän fosfolipidien seoksen läsnäollessa pitoisuudessa välillä 0,5 ja 5 g/l; ja

- MnP/LiP-suhteen muuttamiseksi ligniiniperoksidaasin tuottoa suosivaksi *Phanerochaete chrysosporiumin* kasvattaminen suoritetaan ajassa, joka on enemmän kuin 90 tuntia ja vähemmän kuin 350 tuntia, fosfolipidien seoksen läsnäollessa pitoisuudessa välillä 0,5 ja 5 g/l.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 2-5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään kantajaan immobilisoitua soluviljelmää.

5 7. Jonkin patenttivaatimuksen 2-5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetään vapaiden solujen viljelmää.

RE
RE
RE
RE
RE
RE
RE

RE
RE
RE
RE
RE
RE
RE