

(11) FREMLÆGGELSESSKRIFT 143234

DANMARK

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/38



(21) Ansøgning nr. 4080/77 (22) Indleveret den 14. sep. 1977

(24) Løbedag 14. sep. 1977

(44) Ansøgningen fremlagt og
fremlæggelsesskriftet offentliggjort den 27. juli 1981

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(30) Prioritet begæret fra den
14. sep. 1976, 38002/76, GB

(41) Alm. tilg. 15. mar. 1978

(71) IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, Thames House North, Millbank, London SW1P 4QG, GB.

(72) Opfinder: Stephen John Bungard, Norton Hall, The Green, Norton, Stockton-on-Tees, Cleveland, GB: David Byrom, Norton Hall, The Green, Norton, Stockton-on-Tees, Cleveland, GB.

(74) Fuldmægtig under sagens behandling:
Firmaet Chas. Hude.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af enzympreparater med beta-galactosidaseaktivitet.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af enzympreparater med β -galactosidaseaktivitet.

β -galactosidase eller lactase er et enzym, som er i stand til at hydrolysere lactose til dannelsen af en blanding af galactose og glucose, der kan koncentreres til en sirup. Lactose betragtes sædvanligvis som et spildprodukt og har et meget begrænset marked. Ved behandling med β -galactosidase kan lactose omdannes til et nyttigt produkt.

De fleste β -galactosidaseenzymer inhiberes af calciumioner, og mange er ikke stabile ved højere temperaturer, dvs. temperaturer på 50°C eller mere.

Ifølge opfindelsen tilvejebringes en fremgangsmåde til fremstilling af et enzympreparat indeholdende β -galactosidaseaktivitet, hvorhos mikroorganismen LT-2 (NCIB nr: 11259) (hvis egenskaber beskrives i det følgende) dyrkes i et medium indeholdende carbon- og nitrogen=

kilder og uorganiske næringsmidler herunder fortrinsvis lactose eller galactose.

Mikroorganismen LT-2 er en grampositiv stavbakterie, som ikke er coryneform og har de i tabel 1 anførte egenskaber. Af velaccepterede slægter, hvori den kan klassificeres, er de nærmeste Bacillus, Kurtia og Lactobacillus. LT-2 har imidlertid vigtige forskelle i sammenligning med egenskaberne, der er beskrevet for disse slægter, f.eks. fraværelse af sporer, forskelligt GC-indhold, således at LT-2 tilhører en ny slægt, som fremover vil blive benævnt som LT-2-slægten.

En kultur af den hidtil ukendte stamme LT-2 er blevet deponeret i National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torry Research Station, Aberdeen, Skotland, Storbritannien og har fået NCIB accessionsnummer: 11259.

Stammen LT-2's mikrobiologiske egenskaber bestemt ved hjælp af standardmikrobiologiske tests er anført i tabel 1.

TABEL 1

Karakteristik-test	Egenskab af LT-2
Kolonibeskrivelse (Basalsalte + 0,1% gærekstrakt + 0,5% pepton + 1,5% oxoid renset agar) 50°C 18 timer	1-2 mm. Uregelmæssigt afgrænset konveks ru/rynket overflade, cremefarvet, tæt, dispergeret let.
Gram stamme (medium som ovenfor) 50°C 18 timer	Medium til lange, pleomorfe stave. Slank/kraftig. Nogle let kurveformede. Gram +ve/-ve. Nogle celler delvis +ve, delvis -ve, incl. nogle med +ve-ender. Enkelte celler og grupper. Nogle kæder, ofte med en blanding af +ve og -ve-celler i en enkelt kæde. Celler har parallelle sider, lige akser og afrundede ender.
*Bevægelighed	-
Anaerob vækst	+
Gelatine hydrolyse (plade)	svagt + (3 dage)
Lakmusmælk	sur + størknet masse (3 dage)
Stivelseshydrolyse	-
NO ₃ ⁻ - NO ₂ ⁻	-
Oxidase	-
*Katalase	+
Lecithinase (æggeblommeplade)	- (vægt +)
*MR	+
*VP	-
Indol	-
Cellulosehydrolyse	-
*Phenylalanindeaminering	-
*Arabinose ^a syre	-
gas	-
*Mannitol ^a syre	-
gas	-
*Xylose ^a syre	-
gas	-
*Glucose ^a syre	+
gas	-
Vækst ved 55°C	+
23°C	+
4°C	-
*Vækst i 5% NaCl	-
*Vækst i 7% NaCl	-
*Vækst i 10% NaCl	-
*Vækst i 0,001% lysozyme	-
*Vækst i Sabouraud dextroseagar	+
*Vækst i Sabouraud dextrosesuppe	+
G + C-indhold - 51,7 mol%	
Patogenicitet	Ikke patogen
Koser's citrat	-
Arginin dihydrolase	-
Møllars	
Vækst ved pH-værdi 8,5	+
9,5	-

*Disse forsøg blev gennemført med kulturer dyrket ved både 37°C og 50°C. Alle andre forsøg blev gennemført med celler dyrket kun ved 50°C. Den eneste konstaterede forskel mellem kulturer dyrket ved de to temperaturer var tykkere vækst i 7% NaCl ved 37°C.

^aPepton -vand-sukker, Andrade's indikator.

Ved fremgangsmåden til fremstilling af et enzympræparat indeholdende β -galactosidase dyrkes stamme LT-2 i et vækstmedium indeholdende en passende carbonkilde og andre passende næringsmedier til således at danne enzymet. Væksten kan ske chargesvis eller ved kontinuerlig dyrkning. Et inoculum indeholdende stamme LT-2 fremstilles f.eks. på en skråagar og anvendes til at pøde et egnet dyrkningsmedium. Her får mikroorganismen lov til at udvikle sig og danne β -galactosidase. Inkubationsperioden kan variere inden for et bredt interval afhængig af dyrkningsmediet. Den er fortrinsvis mellem 4 og 48 timer. En prøve eller hele kulturen anvendes til inoculering af et større volumen næringsmedium. Dette kan gentages en eller flere gange.

Mikrobielle celler indeholdende enzymet kan separeres fra dyrkningsmediet til sidst på enhver kendt måde. Der anvendes fortrinsvis hele celler til gennemførelse af hydrolysen af lactose. Om ønsket kan enzymet imidlertid ekstraheres fra cellerne ved hjælp af enhver egnet metode eller det endelige kulturmedium kan selv anvendes uden separering af cellerne til hydrolyse af lactose.

Dyrkningsmediet eller kulturmediet til dannelse af enzympræparatet indeholder fortrinsvis som carbonkilde et passende carbohydrat, f.eks. lactose eller galactose. Det kan også indeholde komplekse organiske næringsmedier, såsom en vitaminrig suppe omfattende gærekstrakt, kødekstrakt etc.. Nitrogenkilden er hensigtsmæssigt ammoniak, et nitrat eller en aminosyre og phosphorkilden er hensigtsmæssigt en phosphat. Andre bestanddele, som indgår, omfatter fortrinsvis magnesium, kalium og svovl, f.eks. alt tilsat som magnesiumsulfat og kaliumsulfat og sporstoffer, såsom jern, kobolt, zink, kobber, mangan, calcium etc..

De foretrukne mængder, hvori de forskellige næringsmidler indgår i dyrkningsmediet til fremstillingen af enzymet vil i nogen grad variere. Passende mængder i et specielt tilfælde kan let bestemmes af en mikrobiolog.

Ved fremstilling af β -galactosidase holdes dyrkningsmediet fortrinsvis ved en temperatur i intervallet fra 30°C til 60°C , specielt 45°C til 55°C . Mediets pH-værdi holdes fortrinsvis i intervallet fra 4,5 til 8,0, specielt 6,5 til 7,0.

Hydrolysen af lactose til glucose og galactose kan forløbe i alt væsentligt fuldstændigt til dannelse af en 1:1 blanding af glucose og galactose. Under optimale betingelser for en industriel proces får reaktionen ikke lov til at forløbe fuldstændigt, og produktet er en sirup indeholdende lactose, glucose og galactose. Under hydrolysen holdes temperaturen passende i intervallet fra 20°C til 70°C , fortrinsvis 40°C til 60°C , idet temperaturer på ca. 50°C specielt foretrækkes. pH-værdien af det lactoseholdige medium, som hydrolyseres, holdes fortrinsvis i intervallet fra 4,0 til 8,0, specielt 6,0 til 7,5, om nødvendigt under anvendelse af et passende puffersystem, f.eks. phosphatpuffer. Ved processer i stor målestok undgås anvendelse af puffersystemer imidlertid om muligt. Enzymet eller enzympræparatet kan meget passende immobiliseres og anvendes som en del af en kontinuerlig søjleproces, f.eks. under anvendelse af fremgangsmåden ifølge britisk patentskrift nr. 1.368.650.

Lactosen selv kan indgå i mediet til hydrolyseprocessen i mængder i intervallet fra 5 til 40 vægt%. Den kan findes helt eller delvis i valle eller mælk, hvilke begge indeholder lactose. Til hydrolysen af lactose kan enzymet forefindes i hele celler eller i opløselig form, idet mikroorganismecellerne, der er blevet spaltet, åbnes, og nedbrudt materiale, såsom cellevægge, skilles fra.

Det ifølge opfindelsen fremstillede enzympræparat har fordele ved, at det ikke inhiberes af calciumioner og er stabilt ved temperaturer, såsom 50°C . Hydrolyseprocessen kan således gennemføres ved temperaturer, såsom 50°C , ved hvilke højere temperaturer forurening med uønskede mikroorganismer reduceres i høj grad.

Den ved hydrolyse af lactose dannede sirup kan anvendes som et almindeligt sødemiddel. Det er også meget nyttigt i forbindelse med brygning som en erstatning for glucose.

β -galactosidasen, der fås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan undersøges med hensyn til dets lactosehydrolyserende virkning ved hjælp af følgende undersøgelsesmetode:

β -galactosidase-undersøgelsesmetode.

En undersøgelse af aktiviteten af det lactosehydrolyserende enzym blev gennemført i følgende reaktionsblandinger:

0,05 M phosphatpuffer pH-værdi 6,5	0,5 ml
4,7% (vægt/volumen) KF	0,5 ml
5,0% (vægt/volumen) lactose	5,0 ml
Bakteriekultur (tolueniseret i 10 minutter) eller enzymopløsning	1,0 ml

Reaktionsblandingen blev inkuberet ved 50°C i 10 minutter. Reaktionen blev startet ved tilsætning af lactosen og standset ved tilsætning af 5 ml 10% (vægt/volumen) trichloredikesyre. Glucose blev bestemt ved anvendelsen af Beckman Glucose Analyser. En kontrolundersøgelse blev gennemført på reaktionsblandingen.

Enzymmængden, der er nødvendig til at danne 1 mg glucose pr. time ved 50°C under de ovennævnte betingelser, blev defineret som én enzymenhed.

Aktivitetsniveau på over 60 enheder pr. ml kultur er rutinemæssigt blevet bestemt i prøver fra kontinuerlige kulturer af LT-2.

Opfindelsen illustreres ved hjælp af følgende eksempel:

Eksempel

Der blev dannet lactase ved dyrkning af mikroorganismen LT-2 i kontinuerlig kultur ved en fortyndingsrate på 0,2 h⁻¹ i et medium med følgende sammensætning:

MgSO ₄	1,2 g/l
K ₂ SO ₄	0,45 g/l
Na ₂ SO ₄	0,1 g/l
Bacto-pepton	3,0 g/l
"Difco" gærekstrakt	1,0 g/l
Lactose	20 g/l
1,1 M phosphorsyre	24 ml/l
Opløsning af sporstoffer	24 ml/l

Opløsningen af sporstoffer havde følgende sammensætning:

FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,50 g/l
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,01 g/l
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	0,05 g/l
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,05 g/l
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	1,32 g/l
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,01 g/l
H ₃ BO ₃	0,007 g/l
Na ₂ MoO ₄	0,01 g/l
Koncentreret H ₂ SO ₄	0,3 ml/l

Kulturens pH-værdi blev holdt på 6,8 ved styret tilsætning af ammoniak.

En tør cellevægt på 9-10 g/l og en β -galactosidaseaktivitet på 50 til 70 enheder pr. ml blev bevaret i over 5 uger.

En prøve af kulturen, der er beskrevet i eksempel 1, blev behandlet i overensstemmelse med fremgangsmåden fra britisk patentskrift nr. 1.368.650 til fremstilling af piller indeholdende β -galactoseaktivitet.

5 g af disse piller blev kvældet op i 0,05 M phosphatpuffer, pH-værdi 6,5 i 20 minutter, og anbragt i en med kappe forsynet søjle holdt ved 50°C. En 5% (vægt/volumen) laktoseopløsning blev ledt gennem søjlen ved 50°C, pH-værdi 6,5 og 50 ml pr. time. I begyndelsen blev der frembragt 65% hydrolyse af lactosen ved hjælp af denne arbejds måde.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåde til fremstilling af enzympræparater med β -galactosidaseaktivitet, kendet ved, at mikroorganismen LT-2 (NCIB nr. 11259) dyrkes i et medium indeholdende carbon- og nitrogenkilder og uorganiske næringsstoffer herunder fortrinsvis lactose eller galactose.

Fremdragne publikationer:
