

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 941786 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **941786**

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.10.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **18.04.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **16.06.1994**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **19.10.1992 PCT/EP1992/002398**
Internationell ansökan - International
application

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

21.10.1991 DE 4134716

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Lignozym Gesellschaft zur Herstellung, Arnold-Sommerfeld-Ring 28 52499 Baesweiler, BRD, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Call, Hans-Peter, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Menetelmä lignolyttisten entsyymien valmistamiseksi valkolahosientien avulla

Förfarande för framställning av lignolytiska enzymer med vitrötsvampar

Menetelmä lignolyyttisten entsyymien valmistamiseksi val- kolahosientien avulla

5 Tämä keksintö koskee menetelmä lignolyyttisten entsyymien valmistamiseksi alaluokkaan *Aphyllophorales* kuuluvien valkolahosientien avulla.

Viimeisten kymmenen vuoden aikana on monesti kehitetty valkolahosientien käyttämistä teollisessa mitassa lignolyyttisten entsyymien tuottamiseen. Keskeisenä kiinnostuksen kohteena on tässä yhteydessä ollut *Phanerochaete chrysosporium*.

Niinpä on tehty kokeita sekoituksella varustetussa fermentorissa [H. Janshekar ja A. Fiechter, Journal of Biotechnology 8 (1988) 97 - 112]. Näiden kokeiden tulok-
15 sellisuus on kuitenkin ollut vähäistä, koska *Phanerochaete chrysosporiumista* muodostetut pelletit rikkoutuvat jatku-
vasti sekoituksella varustetussa fermentorissa. Koska *Pha-
nerochaete chrysosporium* kuitenkin tuottaa entsyymejä vain
ollessaan pellettien muodossa tai immobilisaattina, ei se-
20 koituksella varustetussa fermentorissa voida tavanomaisin
menetelmin saavuttaa optimaalista entsyymituotantoa.

Biotekniikan alalla on lisäksi kehitetty reaktoreja erityisesti herkkiä soluja varten. Niinpä on kehitetty niin kutsuttu tärysekoitin, joka soveltuu jopa herkille eläin- ja kasvisoluille [Einsele, Finn ja Samhaber, Mikrobiologische on biochemische Verfahrenstechnik, Weinheim 1985, s. 150; Einsele, Chem. Ing. Tech. 45 (1973) 1368; Rehm, Chem. Ing. Tech. 42 (1970) 583]. Tärysekoittimen vaikutus perustuu Bernoullin ilmiöön. Sekoittimen sijasta astian sisällä on pystyakselilla oleva vaakasuora levy, joka sisältää alaspäin suippenevia aukkoja. Sitä liikutetaan akselin avulla ylös- ja alaspäin. Tällöin aukoissa muodostuu paine-eroja, koska neste virtaa aukoissa suuren läpimitan alueelta pienen läpimitan alueelle. Solut tulevat tällä tavalla kyllä hyvin liikutetuiksi, mutta vau-

rioita tapahtuu edelleen paljon. Mainitunlaisen tärysekoittimen haittapuolena on kuitenkin, ettei se edelleenkaan toimi riittävän hellävaraisesti. Mainitunlaisia tärysekoittimia ei lisäksi ole tähän mennessä voitu käyttää teollisessa mitassa.

Mikro-organismipellettien muodostukseen soveltuvat myös lasiastiat, joita liikutellaan ravistuskoneilla (H. J. Rehm, Einführung in die industrielle Mikrobiologie, Berliini, Heidelberg, New York 1971). Tähän tarkoitukseen koneisiin kiinnitetään astioita (etupäässä pulloja tai erlenmeyerkolveja) useaan päällekkäiseen kerrokseen. Astioiden ravistusliikkeen vaikutuksesta työntyy liuokseen ilmaa pinnasta käsin. Ravisteluun käytetään heilutus-, pyöritys- ja tärytyskoneita, joiden liikenopeutta voidaan normaalisti vaihdella. Astiat voidaan varustaa tasomaisilla ulkonemilla, niin kutsutuilla sikaaneilla. Näiden järjestelmien haittana on, että ne soveltuvat vain laboratoriomittakaavaan. Teollisessa käytössä tarvittaisiin tuhansia pulloja tai erlenmeyerkolevia, joten mainitunlaisten laitteiden käyttö ei ole taloudellisesti järkevää.

Edellä mainittujen sekoituksella varustettujen reaktorien käyttöön liittyvien ongelmien ratkaisemiseksi on pyritty voimakkaasti käyttämään immobilisoituja soluja [S. Linko, Journal of Biotechnology 8 (1988) 163 - 170; H. Willerhausen, A. Jäger ja H. Graf, Journal of Biotechnology 6 (1987) 239 - 243; Y. Linko, M. Leisola, N. Lindholm, J. Troller, P. Linko ja A. Fiechter, Journal of Biotechnology 4 (1986) 283 - 291]. Nämäkin kokeet ovat kuitenkin epäonnistuneet suurempien tilavuuksien ollessa kyseessä. Nämä menetelmät eivät yleensä ole olleet enää toteutettavissa fermentorin tilavuuden ollessa yli 40 l. Olennaisena syynä on pidettävä sitä, että *Phanerochaete chrysosporium* on pellettimuodossa optimaalinen pinta-ala ja siitä syystä se tuottaa parhaiten entsyymiä tässä tilassa.

Mainittujen ongelmien ratkaisemiseksi, joita esiin-
 tyy käytettäessä *Phanerochaete chrysosporium* lignolyyt-
 tisten entsyymien tuotantoon, on kehitetty erityisesti
 uudenlainen reaktori. Tätä koskee DE-patenttihakemus
 5 P 4 012 743, josta on jätetty ennakkoilmoitus, mutta jota
 ei ole julkaistu. Sen yhteydessä on kyse sekoittimettomas-
 ta, suljetusta käymisastiasta, joka on ripustettu vapaasti
 pyörivästi kardaaniripustuslaitteeseen. Astian alle asen-
 netaan käyttömoottori, jonka käyttöakseli kytketään astian
 10 pohjaan epäkeskon välityksellä. Epäkeskon avulla voidaan
 säätää astian kallistuskulmaa ja heilahdusamplitudia. Por-
 taattomasti säädettävissä olevan moottorin avulla voidaan
 saada aikaan sekä astian pyörimis- että heilumisliikkeitä.

Tällä tavalla liikuteltavasssa fermentorissa *Phane-
 15 rochaete chrysosporium* muodostaa pellettejä niiden hajoa-
 matta yhä uudelleen mekaanisten tekijöiden vuoksi. Tästä
 on seurauksena, että pelletit saavuttavat entsyymituotan-
 non kannalta optimaalisen muodon. Koska reaktorin heilah-
 teluliikkeeltään vähäinen kardaaniripustus toisaalta mah-
 20 dollistaa myös reaktorien valmistuksen, joiden tilavuus on
 1 - 3 m³, voidaan kuvatulla laitteella saavuttaa lignolyyt-
 tisten entsyymien teollinen tuotanto saannoilla, joita ei
 ole aiemmin pidetty mahdollisina.

Tällä fermentorilla saadut tuotantotulokset eivät
 25 kuitenkaan ole vielääkään tyydyttäviä. Vieläkään ei ole
 saavutettu niin suuria saantoja, että ne olisivat kannat-
 tavia teollisen tuotannon kannalta.

Tämän keksinnön päämääränä on siksi tarjota käyt-
 töön parannettu menetelmä lignolyyttisten entsyymien val-
 30 mistamiseksi valkolahosienten avulla, jossa alaluokan
Aphyllophorales sienistä koostuva viljelmä laitetaan ra-
 vintoliuoksella täytettyyn suljettuun fermentointiastiaan
 ja liikutellaan suspensiota siinä *Aphyllophorales*-pellet-
 tien aikaansaamiseksi niin varovasti, ettei pääse synty-
 35 mään pellettejä rikkovia leikkausvoimia, ja joka menetelmä

on toteutettavissa myös fermentointiastioissa, joiden tilavuus on yli 40 l, ja takaa tekniikan nykytasoon nähden merkittävästi suurempia entsyymisaantoja.

Tähän tavoitteeseen päästään tuottamalla entsyymejä
 5 lisäten hiivoja tai bentsaldehydejä, klooribentsaldehydejä, nitrobentsaldehydejä, hydroksibentsaldehydejä, aminobentsaldehydejä, metyylibentsaldehydejä, diaryyli- tai triaryyliyhdisteitä, dialkyylialkaaneja, trialkyylialkaaneja, asyklisiä tai syklisiä imiinejä tai mainittujen yhdisteiden johdannaisia induktiivisiksi yhdisteiksi, jolloin induktio voidaan tehdä kerran tai useampia kertoja, ja otetaan entsyymit sen jälkeen talteen.

Käyttämällä *Aphyllorphorales*-sienistä ja hiivoista koostuvaa sekaviljelmää saavutetaan entsyymituotannon huomattava lisääntyminen tekniikan tasoon verrattuna. *Aphyllorphorales*-sienet hajottavat prosessin edetessä viljelmään lisätyt hiivat lähes täydellisesti. Huomattavilla määrillä vapautuvia hiivojen aineosia, esimerkiksi soluseinämien aineosia ja hiivagluukaaneja, on todennäköisesti suojakoloidiluonne, ja ne saavat siten aikaan entsyymituotannon kasvun.

Tekniikan tason mukaisesti on tunnettua, että erilaiset kemialliset aineet voivat vaikuttaa induktoreina fermentointiliuoksissa. Niinpä esimerkiksi laksaasisaanto-
 25 ja voidaan parantaa esimerkiksi lisäämällä ksylidiiniä. Nämä ja vastaavat aineet ovat kuitenkin suuren myrkyllisyytensä vuoksi tuskin käyttökelpoisia teollisesti, niin että tätä mahdollisuutta entsyymimäärien lisäämiseksi ei ole tähän mennessä hyödynnetty. Keksinnön mukaisesti on
 30 kuitenkin nyt löydetty uusi ryhmä indusoivia aineita, joilla ei ole näitä haittapuolia. Tässä yhteydessä on kyse bentsaldehydeistä, klooribentsaldehydeistä, nitrobentsaldehydeistä, hydroksibentsaldehydeistä, aminobentsaldehydeistä, metyylibentsaldehydeistä, diaryyli- tai triaryyliyhdisteistä, dialkyylialkaaneista, trialkyylialkaaneista
 35

ja asyklisistä tai syklisistä imiineistä. Mainittujen yhdisteiden johdannaisia voidaan samoin käyttää. Yllättävää kyllä, näillä aineilla ei ole mainittuja haittapuolia. Ne soveltuvat erityisesti myös käytettäväksi teollisessa mittassa. Erityisen yllättävää on, että käyttämällä mainittuja induktoreja voidaan saavuttaa sangen korkeita entsyymisaantoja (noin 2 000 ky entsyymiä/ml). Kuvattuja yllättävästi parantuneita entsyymisaantoja voidaan havaita jo käytettäessä *Aphyllophorales*-sienten seoksia hiivojen tai mainittujen induktorien kanssa tavanomaisissa sekoitusfermentoreissa. Ne tulee kuitenkin varustaa erityissekoittimella, jonka lapoja voidaan säätää, niin ettei sekoituksen yhteydessä muodostu leikkausvoimia, jotka voivat johtaa muodostuneiden pellettien rikkoutumiseen. Keksinnön mukaisesti on siksi tärkeää toisaalta sekoittimen rakenne ja toisaalta lapojen säätömahdollisuus.

Entsyymisaannot ovat kuitenkin erityisen hyviä, jos käytetään edellä kuvattua DE-patenttihakemuksen P 4 012 743 mukaista reaktoria. Tätä fermentoria käyttämällä jo merkittävästi suurennettuja entsyymisaantoja voidaan yllättävästi suurentaa vielä lisää käyttämällä *Aphyllophorales*-sienten ja hiivojen tai erityisten induktiivisesti vaikuttavien yhdisteiden seoksia, jolloin induktio voidaan tehdä karran tai useampia kertoja.

Tämän menetelmän yhdessä muunnelmassa voidaan menettellä siten, että muodostetaan ensin ravistusfermentorissa pelletit lisäten hiivaa tai bentsaldehydejä ja siirretään sen jälkeen pelletit sisältävä suspensio sekoittimella varustettuun fermentoriin. Entsyymejä tuotetaan sitten siinä pellettien avulla. Edullisena on lisäksi pidettävä sitä, että ravistus- tai sekoitusfermentorissa tapahtuneen entsyymituotannon päätyttyä voidaan erotettuja *Aphyllophorales*-pellettejä käyttää välittömästi uudelleen entsyymituotantoon. Tämän tekemiseksi on tarkoituksenmukaista erottaa pelletit suspensiosta ja johtaa ne entsyymin ero-

tuksen jälkeen takaisin fermentoriin. Erotus voidaan tehdä keksinnön mukaisesti ultrasuodattamalla. Yhdessä keksinnön mukaisesti edullisessa suoritusmuodossa käytetään *Phanerochaete chrysosporiumia* seoksena hiivojen kanssa. Käytettäessä tätä seosta sekoitusfermentorissa voidaan saavuttaa huippuarvoja noin 1 000 ky/l viljelmää. Käytettäessä sitä ravistusfermentorissa ovat nämä arvot noin 1 500 - 2 000 ky/l (1 ky = entsyymimäärä, joka muuttaa 1 mikromoolin veratryylialkoholia minuutissa veratryylialdehidiksi).

Keksinnön mukaisen menetelmän toteuttamiseksi voidaan *Phanerochaete chrysosporiumia* kasvattaa tarkoituksen mukaisesti petrimaljoissa ja sitten sekoittamattomina viljelminä. Muodostuneet myseelit rikotaan tämän jälkeen ja käytetään keksinnön mukaisessa menetelmässä. *Phanerochaete chrysosporiumin* kasvatus tapahtuu tunnetuissa olosuhteissa. Tämä tarkoittaa, että tavallisesti toimitaan lämpötilassa 37 - 40 °C ja pH-arvon 4,5 - 5 vallitessa. pH on edullisesti 5. Kasvatustilapöytä on edullisesti 37 °C.

Phanerochaete chrysosporiumin ja hiivojen seoksen kasvatukseen on substraattina osoittautunut hyväksi seuraava koostumus:

Esiviljelyalusta:

1) Mineraalisuolaliuos (ME) (litraa kohden): 10,5 g nitrotriasetaattia; 21 g $MgSO_4$:a; 3,5 g $MnSO_4$:a; 7 g NaCl:a, 0,7 g $FeSO_4$:a; 0,7 g $CoCl_2$:a; 0,7 g $CaCl_2$:a; 0,7 g $ZnSO_4$:a; 0,07 g $CuSO_4$:a; 0,07 g $CuSO_4$:a; 0,07 g AlK_2SO_4 :a; 0,07 g H_3BO_3 :a; 0,07 g $NaMoO_4$:a.

2) Liuos 1 (suolaliuos) (litraa kohden): 20 g KH_2PO_4 :a; 5 g $MgSO_4$:a; 1 g $CaCl_2$:a.

3) Puskuri (pH 4,5 - 5,5): NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 -puskuri, 1 mol/l.

Koostumus 1 litraa kohden alustaa:

0,2 g ammoniumtartraattia

100 ml liuosta 1

1,43 ml ME-liuosta

10 g glukoosia
 10 ml puskuria
 + 0,9 ml tiamiiniliuosta (100 mg/l) (lisätään autoklavoinnin jälkeen steriiliksi suodatettuna).

5 **Pääviljelyalusta:**

Koostumus 1 litraa kohden alustaa:

0,2 g ammoniumtartraattia

100 ml liuosta 1

10 ml ME-liuosta

10 10 g glukoosia

10 ml puskuria

67,3 mg veratryylialkoholia

2 ml Tween 80:ä

+ 0,9 ml tiamiiniliuosta (100 mg/l).

15 Keksinnön yhdessä toisessa edullisessa suoritusmuodossa käytetään *Coriolus versicoloria* yhdessä edellä mainittujen indusointiaineiden, erityisesti bentsaldehydien tai niiden johdannaisten, kanssa. On tekniikan tason mukaisesti tunnettua, että indusointiaineiden, esimerkiksi ksylidiinin, avulla voidaan saavuttaa hyviä laksaasisaantoja. Edellä mainituista syistä nämä indusointiaineet ovat kuitenkin osoittautuneet sopimattomiksi. Käyttämällä keksinnön mukaisia indusointiaineita yhdessä *Coriolus versicolorin* kanssa voidaan nyt yllättävästi saavuttaa entsyymisaantojen kasvu aina 100 %:iin asti. Keksintöä kuvataan seuraavassa lähemmin viitaten kuvioihin.

20

Kuvio 1 esittää keksinnön mukaisesti käytettävää sekoittimetonta fermentoria.

30 Kuvio 2a esittää keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettäväksi sopivaa sekoittimen erityissuoritusmuotoa ylhäältä päin katsottuna.

Kuvio 2b on poikkileikkauskuva sekoittimesta.

Kuvio 2c on sivukuva sekoittimesta.

35 Kuvion 1 esittämässä sekoittimetottomassa reaktorissa tapahtuu ensisijaisesti *Aphylllophorales*-pellettien valmis-

tus ja mahdollisesti entyymien valmistus. Tällöin pellettien muodostus tapahtuu astiassa 1. Astia 1 on suljettu säiliö, jossa on kiinteä pohja 8, sivuseinät, kansi 9 ja seulalevy 7. Sivuilla tai pohjassa on aukkoja erilaisia ilmaisimia (O_2 , pH, vaahtoamisenesto) samoin kuin substraa-
 5 tin ja inokulointiviljelmän sisään tuloa ja ulosmenoa varten. Astia on ripustettu telineeseen 11. Kiinnitys tapahtuu tarttumavarsien 10 välityksellä. Näiden tarttumavarsien 10 avulla astia 1 ripustetaan kardaaniripustuslaitteeseen vapaasti pyöritettävissä ja heilutettavissa olevaksi. Pyörimis- ja heilahdusliikkeet saadaan aikaan moottorilla 6. Se on kytketty käyttöakselin 5 ja epäkeskon 4 kautta astian 1 pohjaan. Epäkeskon 4 avulla säädetään astian 1 kallistusta ja heilahdusamplitudia. Astian 1 pyörimis- ja heilahtelunopeutta voidaan säädellä moottorin pyörimistaajuuden avulla.
 15

Kuvioiden 2a - 2c esittämä sekoitin on varustettu kahdella lavalla 1 ja 2. Kallistuskulmaa voidaan muuttaa säätöruuvien 3 avulla. Tällä tavalla sekoitin voidaan aina
 20 säätää täsmällisesti käytettävien solujen herkkyyttä vastaavalla tavalla, niin ettei pellettejä rikkovia leikkausvoimia pääse esiintymään.

Esimerkki 1

Kannaksi valitaan *Phanerochaete chrysosporium* ATCC
 25 32629. Ensin inokuloidaan mallasagarmaljat ja inkuboidaan niitä noin 10 - 12 vuorokautta lämpötilassa 27 °C. Näiltä maljoilta otetaan puolet kasvustosta ja inokuloidaan 500 ml:n erlenmeyerkolvissa oleva 50 ml:n sekoittamaton viljelmä (inkubointiaika noin 5 vuorokautta lämpötilassa
 30 37 °C). Siten saatu esiviljelmä dekantoidaan, täytetään uudelleen alkuperäiseen tilavuuteen tislattulla vedellä ja hienonnetaan sitten Braun Starmix -laitteella 2 kertaa 30 s säädöllä 3. Ravistusreaktorissa olevaan alustaan lisätään 15 ml esiviljelmää litraa kohden, ts. 75 ml 10 l:n ravistusreaktoriin, jossa on 5 l alustaa. Hiivaa lisätään
 35

(0,5 - 0,8) · (2 - 4) · 10⁵ solua/ml alustaa. Inkubointilämpötila on 38 °C, ravistustaaajuus 90 min⁻¹ ja poikkeama noin 5 cm. O₂:n syötetään joka päivä 30 s:n ajan (100 l/h). Inkubointiaika on 4 - 5 vrk. Entsyymisaannot ovat noin
 5 1 500 - 2 000 ky/l (1 ky = entsyymimäärä, joka muuttaa 1 µmol veratryylialkoholia minuutissa veratryylialdehydiksi).

Alustojen koostumukset ovat seuraavat:

Esiviljelyalusta:

10 1) Mineraalisuolaliuos (ME) (litraa kohden): 10,5 g nitrotriasetaattia; 21 g MgSO₄:a; 3,5 g MnSO₄:a; 7 g NaCl:a, 0,7 g FeSO₄:a; 0,7 g CoCl₂:a; 0,7 g CaCl₂:a; 0,7 g ZnSO₄:a; 0,07 g CuSO₄:a; 0,07 g CuSO₄:a; 0,07 g AlK₂SO₄:a; 0,07 g H₃BO₃:a; 0,07 g NaMoO₄:a.

15 2) Liuos 1 (suolaliuos) (litraa kohden): 20 g KH₂PO₄:a; 5 g MgSO₄:a; 1 g CaCl₂:a.

3) Puskuri (pH 4,5 - 5,5): NaH₂PO₄-Na₂HPO₄-puskuri, 1 mol/l.

Koostumus 1 litraa kohden alustaa:

20 0,2 g ammoniumtartraattia
 100 ml liuosta 1
 1,43 ml ME-liuosta
 10 g glukoosia
 10 ml puskuria
 25 + 0,9 ml tiamiiniliuosta (100 mg/l) (lisätään autoklavoinnin jälkeen suodattamalla steriloituna).

Pääviljelyalusta:

Koostumus 1 litraa kohden alustaa:

30 0,2 g ammoniumtartraattia
 100 ml liuosta 1
 10 ml ME-liuosta
 10 g glukoosia
 10 ml puskuria
 67,3 mg veratryylialkoholia
 35 2 ml Tween 80:ä
 + 0,9 ml tiamiiniliuosta (100 mg/l).

Esimerkki 2

Kannaksi valitaan *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629. Ensin inokuloidaan mallasagarmaljat ja inkuboidaan niitä noin 10 - 12 vuorokautta lämpötilassa 27 °C. Näiltä maljoilta otetaan puolet kasvustosta ja inokuloidaan 500 ml:n erlenmeyerkolvissa oleva 50 ml:n sekoittamaton viljelmä (inkubointiaika noin 5 vuorokautta lämpötilassa 37 °C). Siten saatu esiviljelmä dekantoidaan, täytetään uudelleen alkuperäiseen tilavuuteen tislattulla vedellä ja hienonnetaan sitten Braun Starmix -laitteella 2 kertaa 30 s asetuksella 3. Sekoitusreaktorissa olevaan alustaan lisätään 15 ml esiviljelmää litraa kohden, ts. 75 ml 10 l:n ravistusreaktoriin, jossa on 5 l alustaa. Hiivaa lisätään $(2 - 4) \cdot 10^5$ solua/ml alustaa. Inkubointilämpötila on 38 °C ja sekoittimen pyörimistaajuus 110 min^{-1} .

Hapen osapaine viljelmässä pidetään O_2 -elektrodilla tehtävän O_2 -mittauksen ja ohjauksen avulla alueella 30 - 70 %. Inkubointiaika 4 - 5 vrk. Entsyymisaannot ovat korkeintaan 1 000 ky/l.

Esimerkki 3

Kantana käytetään *Coriolus versicolor* ATCC 34671:ä. Mallasvinopinta-agarputkista siirretään korkkiporan avulla myseeliagarpala, jonka läpimitta on noin 1 cm, mallasagarmaljan keskelle ja inkuboidaan noin 8 vuorokautta (28 °C). Näistä maljoista meistetään aina kolme palaa, joiden läpimitta on 1 cm, ja siirretään ne myseelipuoli ylöspäin 50 ml:n sekoittamattomaan viljelmään (300 ml:n erlenmeyerkolvissa). Inkuboidaan noin 8 vuorokautta lämpötilassa 28 °C. Muodostuneet myseelikasvustot erotetaan sekoittamattomasta viljelynesteestä ja sekoitetaan 2 kertaa 30 s Braun Starmix -laitteessa (asetus 3).

1 litraa kohden alustaa käytetään inokulaattina 30 - 60 ml esiviljelmää. Indusointiaineena käytetään 3 - 4 vuorokauden inkuboinnin jälkeen 10 - 20 ml liuosta, joka

sisältää 1 % 2-aminobentsaldehydiä 50-%:isessa alkoholissa. Inkubointiaika on yhteensä 6 vuorokautta.

Alustana tulee kyseeseen seuraava koostumus:

A. Liuokset

- 5 Liuos 1: 10 g KH_2PO_4 :a
 5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:a
 1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:a
 liuotetaan 1 000 ml:aan tislattua vettä
- Mineraaliliuos: 1 g CaCl_2 :a
- 10 1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:a
 0,2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$:a
 0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:a
 liuotetaan 1 000 ml:aan tislattua vettä
- Tiamiiniliuos: 100 mg tiamiinihydrokloridia
- 15 liuotetaan 1 000 ml:aan tislattua vettä
- Adeniiniliuos: 0,275 g adeniinia
- liuotetaan 1 000 ml:aan tislattua vettä
- Fenyylialaniiniliuos:
- 1,5 g D,L-fenyylialaniinia
- 20 liuotetaan 1 000 ml:aan tislattua vettä
- Indusointiaineliuos:
- 1 g 2-aminobentsaldehydiä
- liuotetaan 100 ml:aan 50-%:ista etanolia

B. Alustat

- 25 Esiviljelyalusta:
- 20 g glukoosia
- 2,5 g L-asparagiinia
- 100 ml liuosta
- 10 ml mineraaliliuosta
- 30 100 ml adeniiniliuosta
- 100 ml fenyylialaniiniliuosta
- Täytetään tislattulla vedellä 1 000 ml:ksi
- ja säädetään pH arvoon 5,0 HCl:lla
- (1 mol/l).

Pääviljelyalusta:

Esiviljelyalusta, johon on lisätty 1 000 ml:aa kohden 10 - 20 ml liuosta, joka sisältää 1 % esimerkiksi 2-aminobentsaldehydiä 50-%:isessä etanolissa.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä lignolyyttisten entsyymien valmistamiseksi valkolahosientien avulla, jossa alaluokan *Aphylllophorales* sienistä koostuva viljelmä laitetaan ravintoliuoksella täytettyyn suljettuun fermentointiastiaan ja liikutellaan suspensiota siinä *Aphylllophorales*-pellettien aikaansaamiseksi niin varovasti, ettei pääse syntymään pellettejä rikkovia leikkausvoimia, t u n n e t t u siitä, että entsyymejä tuotetaan lisäten hiivoja tai bentsaldehydejä, klooribentsaldehydejä, nitrobentsaldehydejä, hydroksibentsaldehydejä, aminobentsaldehydejä, metyylibentsaldehydejä, diaryyli- tai triaryyliyhdisteitä, dialkyylialkaaneja, trialkyylialkaaneja, asyklisiä tai syklisiä imiinejä tai mainittujen yhdisteiden johdannaisia induktiivisiksi yhdisteiksi, jolloin induktio voidaan tehdä kerran tai useampia kertoja, ja otetaan entsyymit sen jälkeen talteen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymituotannon päätyttyä erotetaan pelletit juoksevasta ravintoalustasta ja kierrätetään ne takaisin fermentoriin entsyymien tuotantoa varten.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että viljelmä laitetaan fermentoriin, joka on varustettu sekoittimella, jonka lavat ovat sillä tavalla säädettävissä, ettei synny pellettejä rikkovia leikkausvoimia.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fermentointiastiaan laitetaan *Phanerochaete chrysosporiumia* ja lisätään hiivoja.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymejä tuottaa *Coriolus versicolor* ja viljelmään lisätään bentsaldehyde-

- jä, klooribentsaldehydejä, nitrobentsaldehydejä, hydrok-
sibentsaldehydejä, aminobentsaldehydejä, metyylibentsalde-
hydejä, diaryyli- tai triaryyliyhdisteitä, dialkyylialkaa-
neja, trialkyylialkaaneja, asyklisiä tai syklisiä imiinejä
5 tai mainittujen yhdisteiden johdannaisia induktiivisiksi
yhdisteiksi, jolloin induktio voidaan tehdä kerran tai
useampia kertoja.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av lignolytiska
 5 enzymer medelst vitrötsvampar, varvid en odling av svampar
 av underklassen Aphyllophorales inmatas i ett med närings-
 lösning fyllt, tillslutet jäsningskärl, vari för alstring
 av Aphyllophorales -pelletter suspensionen omrörs försik-
 10 tigt så att det ej uppkommer skärkrafter som kan förstöra
 pelletterna, k ä n n e t e c k n a t därav, att enzymerna
 alstras under tillsättning av jäster eller bensaldehyder,
 klorbensaldehyder, nitrobensaldehyder, hydroxibensaldehy-
 der, aminobensaldehyder, metylbensaldehyder, diaryler,
 triaryler, dialkylalkaner, trialkylalkaner, öppenkedjade
 15 eller cykliska iminer eller derivat av de nämnda ämnena
 som induktiva föreningar, varvid induktionen kan ske en-
 kelt eller flerfaldigt, varefter enzymerna skördas.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
 t e c k n a t därav, att efter avslutandet av enzympro-
 20 duktionen separeras pelletterna från det flytande närings-
 mediet och återförs ånyo för enzymproduktion i jäsnings-
 kärlet.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n -
 n e t e c k n a t därav, att odlingen inmatas i ett jäs-
 25 ningskärl, vilket försetts med en omrörare, vars paddel
 kan inställas så, att det ej uppkommer skärkrafter som kan
 förstöra pelletterna.

4. Förfarande enligt något av patentkrav 1 - 3,
 k ä n n e t e c k n a t därav, att Phanerochaete chrysos-
 30 porium under tillsats av jäster inmatas i jäsningskärlet.

5. Förfarande enligt något av patentkrav 1 - 4,
 k ä n n e t e c k n a t därav, att enzymerna alstras av
Coriolus versicolor under tillsättning av bensaldehyder,
 klorbensaldehyder, nitrobensaldehyder, hydroxibensaldehy-
 35 der, aminobensaldehyder, metylbensaldehyder, diaryler,

triaryler, dialkylalkaner, trialkylalkaner, öppenkedjade eller cykliska iminer eller derivat av de nämnda ämnena som induktiva föreningar, varvid induktionen kan ske enkelt eller flerfaldigt.

Fig.2a

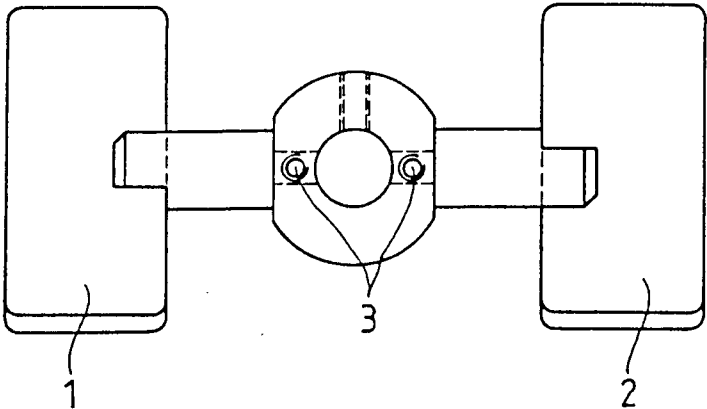


Fig.2b

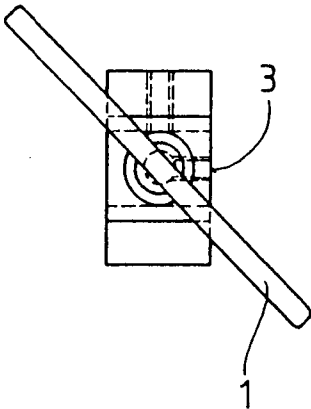


Fig.2c

