



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **NR. 155296**

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl.⁴ **C 12 N 9/24,**
// (C 12 R 1/645)

(83)

(21) Patentsøknad nr. **844455**
(22) Inngivelsesdag **08.11.84**
(24) Lopedag **08.11.84**
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.
(71)(73) Søker/Patenthaver **NORSK HYDRO A.S.,**
Bygdøy Allé 2,
0257 Oslo 2.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreforingsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra **09.05.86**
(44) Utlegningsdag **01.12.86**
(72) Oppfinner **BERNT AUGUST NISSEN, Stathelle,**
JON HOVLAND, Porsgrunn.

(74) Fullmektig **Siv.ing. Bjørn J. Rosenberger,**
Norsk Hydro a.s, Oslo.

(30) Prioritet begjært **Ingen.**

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMANGSMÅTE TIL FREMSTILLING**
AV BETA-GLUKANASE.

(57) Sammendrag **β-glukanase fremstilles under submerse, aerobe og termofile**
betingelser, ved dyrking av mikroorganismen Rhizomucor
pusillus (Lindt) Schipper, fortrinnsvis av den deponerte
stammen av samme, CBS 551.82. Selve fermenteringen skjer etter
en "fed-batch"-metode, hvor det som C-kilde først tilsettes
f.eks. byggmel, og når dette er oppbrukt, tilsettes en
sukkerforbindelse, fortrinnsvis laktose, hvorefter
fermenteringen fortsetter inntil C-kilden er helt eller delvis
oppbrukt.

(56) Anførte publikasjoner **Ingen.**

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for fremstilling av Beta-glukanase under submerse, aerobe og termofile forhold, ved dyrking av en mikroorganisme i et næringssubstrat hvor den anvendte mikroorganisme er en sopp av stammen Rhizomucor pusillus (Lindt) Schipper, fortrinnsvis den deponerte stamme av samme sopp CBS 551.82, karakterisert ved at et inokulum av nevnte soppstamme tilsettes en fermentor inneholdende næringssubstratet og hvor fermenteringen skjer etter en "fed-batch"-metode hvor det som C-kilde først tilsettes et stivelsesholdig plantemel, fortrinnsvis byggmel, og når dette er helt eller delvis oppbrukt, tilsettes deretter en sukkerforbindelse som C-kilde, hvorefter fermenteringen fortsetter inntil C-kilden er helt eller delvis oppbrukt.

Det vises til norsk patentsøknad nr. 82 4321 vedrørende bruken av mikroorganismer av arten Rhizomucor pusillus (Lindt) Schipper som egnet for ovennevnte fremgangsmåte, samt at en isolert og deponert stamme av nevnte mikroorganisme CBS 551.82 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nederland) er spesielt velegnet for fremstilling av enzymet Beta-glukanase.

Formålet for foreliggende oppfinnelse er å optimalisere fermenteringen slik at det oppnås et maksimalt enzymutbytte innenfor kortest mulig tid, men ellers under de samme forutsetninger som er nevnt i norsk patentsøknad nr. 82 4321, dvs. å foreta fermenteringen under termofile forhold og at mikroorganismen er termostabil under de nevnte forhold. I tillegg til nevnte mikroorganismes (Rhizomucor pusillus (Lindt))

Schipper CBS 551.82) betydning for det gode resultat, skal det også nevnes at næringssubstratets sammensetning, lufttilførselen og apparatutformingen er viktige faktorer for å oppnå optimale forhold under fermenteringen.

Det er vanlig å benytte plantemel, stivelsesholdige materialer samt sukkerarter som karbonkilde under fermenteringen. Det viser seg imidlertid at ikke alle karbonkilder er egnet for formålet. Hva dette skyldes er ikke nøyaktig fastlagt, men det synes som om forskjellige faktorer har innvirkning på transformasjonen av sukker til energi. Skal karbonkilden kunne benyttes som energikilde, synes i hvert fall følgende faktorer å være av betydning: Karbonkildens oppløselighet og dens diffusjonsevne gjennom det foreliggende celleveggsystem.

Nå viser det seg på forbausende måte at hvis man benytter en to-trinns fermentering samt laktose som karbonkilde i en fermenteringsprosess hvor forannevnte mikroorganisme benyttes, vil enzymutbyttet flerdobles når alle forhold er lagt til rette.

Selve fermenteringen under batch-forhold viser det tradisjonelle mønster med lagfase, eksponensiell vekst og stasjonær fase hvor produksjonen av enzym er størst i den stasjonære fase. Det er viktig at fermenteringen utføres under aerobe forhold. Dette stiller store krav til røreverket og rørehastigheten. Blir røringen for kraftig, knuses soppmassen (mikroorganismene) og blir den for svak, vil ikke oksygenet bli tilstrekkelig fordelt i fermentoren. Begge faktorer svekker enzymdannelsen. Dessuten vil en for kraftig røring samt et for lavt oksygeninnhold fremelske en trådformig struktur i soppmassen, mens det er ønskelig at soppmassen opptrer mer "pellets"-aktig.

For bedre forståelse av oppfinnelsen henvises det til Eksempel 1-8.

Eksempel 1 (Sammenligningseksempel)

- a) 300 ml av et inokulum av Rhizomucor pusillus (Lindt) Schipper CBS 551.82 ble tilsatt en 14 l fermentor med 10 l saltmedium av følgende sammensetning:

KH_2PO_4	2,00 g/l	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,75 "	
CaCl_2	0,20 "	
Sporstoffløsning	2,5 ml/l	
Vann	1,0 l	

Sporstoffløsningen har følgende sammensetning:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,0 g/l	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	15,0 "	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	6,2 "	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,5 "	
Kons. H_2SO_4	1,5 ml/l	

Fermenteringen ble utført med 40 g/l byggmel som C-kilde og 13,4 g/l NH_4Cl som N-kilde. Som skumdemper ble benyttet "Berol 374". Rørehastigheten var 600 rpm, temperaturen 40°C og pH 4,5. Lufttilførselen til fermentoren ble regulert til 3 vvm, dvs. 30 l luft/min. (1 vvm er 1 l luft pr. 1. dyrkingsmedium pr. min.). Fermenteringens varighet var 45 h.

- b) Et inokulum av ovennevnte 10 l dyrkingsmedium ble tilsatt en 300 l fermentor med 200 l saltmedium, som ovenfor beskrevet.

Fermenteringen ble utført etter batch-metoden med tilsats av 40 g/l byggmel og 13,4 g/l NH_4Cl ved pH 4,5 og en temperatur på 40°C med en rørehastighet på 410 rpm. Lufttilførselen var

155296

4

0,2 vvm, dvs. 40 l luft/min. til fermentoren.
Enzymaktiviteten var 2,5 EU/ml etter 79 h og
2,7 EU/ml etter 92 h med Dygerts metode (Analytical
Biochemistry, vol. 13 (1965) s. 367-374).

Eksempel 2 (Sammenligningseksempel)

Et inokulum fra en 14 l fermentor hvor dyrkingsbetingelsene var som beskrevet i Eksempel 1, ble tilsatt en 300 l fermentor i en mengde av 9 l og dyrket etter batch-metoden med 20, 30, 40 og 50 g/l byggmel og deretter fermentert etter Eksempel 1b.

Som tabellen viser endret enzymaktiviteten seg med endrede byggmelskonsentrasjoner:

20 g byggmel/l	2,00 IRV/ml
30 g " "	6,50 " "
40 g " "	7,50 " "
50 g " "	1,50 " "

IRV er "Increase in Resiproke Viscosity". Denne blir sammenlignbar med enzymaktiviteten (EU/ml) målt etter Dygerts metode ved følgende relasjon:

$$\text{IRV/ml} = \text{EU/ml} \times 2,5$$

For øvrig henvises til J. Inst. Brewing, Vol. 85 (1979), side 92-94 der den kapillar-viskosimetriske metode, hvor måleresultatet fremkommer i IRV-enheten, er beskrevet.

Eksempel 3 (Sammenligningseksempel)

Et inokulum fra en 14 l fermentor hvor dyrkingsbetingelsene var som beskrevet i Eksempel 1a, ble tilsatt en 300 l fermentor i en mengde av 9 l og dyrket etter "fed batch"-metoden, hvor det ble benyttet 15 g/l byggmel i innledningsfasen og en NH_4Cl -konsentrasjon på 1,38 g/l. Når byggmelet

var oppbrukt, ble det tilsatt glukose med en doserings-
hastighet på 1,5 g/min. med et totalforbruk av C-kilden på
40 g/l. pH ble justert til 4,5 med en ekvivalent blanding av
 NH_3 og NH_4Cl og fermenteringen kjørt under jevne
temperaturforhold ved 40°C . Rørehastigheten var 410 rpm og
lufttilførselen til fermentoren 40 l/min. "Berol 374" ble
benyttet som skumdempningsmiddel. Fermenteringstid: 110 h.
Enzymaktivitet etter kapillar-viskosimetrisk metode var:
11,1 IRV/ml.

Eksempel 4

Et inokulum fra en 14 l fermentor hvor dyrkingsbetingelsene
var som beskrevet i Eksempel 1a, ble tilsatt en 300 l
fermentor i en mengde av 9 l og dyrket etter "fed
batch"-metoden, som beskrevet i Eksempel 3 med den forskjell
at det ble benyttet 25 g laktose/l istedenfor glukose.
Fermenteringstid: 95 h.
Enzymaktivitet etter kapillar-viskosimetrisk metode var:
30,4 IRV/ml.

Eksempel 5

Fremgangsmåten er den samme som i Eksempel 4, bortsett fra at
laktosemengden ble økt til 35 g laktose/l. Fermenteringstid:
95 h.
Enzymaktivitet etter kapillar-viskosimetrisk metode var:
38,0 IRV/ml.

Eksempel 6 (Sammenligningseksempel)

Fremgangsmåten er den samme som i Eksempel 4, bortsett fra at
det ble benyttet sukrose som karbonkilde.
Enzymaktiviteten ble målt til 2,6 IRV/ml.

155296

6

Eksempel 7

Det ble kun benyttet laktose som karbonkilde under fermenteringen. Ellers ble fermenteringen utført som beskrevet i Eksempel 1. Enzymaktiviteten ble målt til 8,2 IRV/ml.

Eksempel 8 (Sammenligningseksempel)

Fremgangsmåten er den samme som i Eksempel 4, men det ble benyttet raffinose som karbonkilde. Enzymaktiviteten ble målt til 6,7 IRV/ml.

I de nevnte eksempler er det benyttet både en ren "batch"-metode og en "fed-batch"-metode, som beskrevet i eksemplene 1, 2 og 3, 4, 5, 6 og 7 henholdsvis. "Batch"-metoden gir som oftest en trådformet struktur av soppmassen, hvilket vanskeliggjør blant annet filtreringen. "Fed-batch"-metoden derimot gir en finkornet og homogen "pellets" av soppmassen, hvilket er å foretrekke av prosessekniske grunner.

Årsaken til nevnte fordelaktige driftsresultat synes å ligge i at soppmassen ved "fed-batch"-metoden blir karbohydrat-begrenset og ikke som i den rene "batch"-metode, oksygen-begrenset.

For øvrig henvises til Figur 1 som viser stigning i enzymaktiviteten avhengig av fermenteringstiden.

Kurvene D, E og F viser enzymaktivitetsstigningen når fermenteringen er utført som i Eksempel 1, 3 og 4 henholdsvis.

Patentkrav

Fremgangsmåte for fremstilling av Beta-glukanase under submerse, aerobe og termofile forhold, ved dyrking av en mikroorganisme i et næringssubstrat hvor den anvendte mikroorganisme er en sopp av stammen Rhizomucor pusillus (Lindt) Schipper, fortrinnsvis den deponerte stamme av samme sopp CBS 551.82,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t

et inokulum av nevnte soppstamme tilsettes en fermentor inneholdende næringssubstratet og hvor fermenteringen skjer etter en "fed-batch"-metode hvor det som C-kilde først tilsettes et stivelsesholdig plantemel, fortrinnsvis byggmel, og når dette er helt eller delvis oppbrukt, tilsettes deretter laktose som C-kilde, hvorefter fermenteringen fortsetter inntil C-kilden er helt eller delvis oppbrukt.

155296

