



(11) FREMLÆGGELSESSKRIFT 143164

DANMARK

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/58



(21) Ansøgning nr. 2470/76 (22) Indleveret den 4. jun. 1976

(24) Løbedag 4. jun. 1976

(44) Ansøgningen fremlagt og
fremlæggelsesskriftet offentliggjort den 6. jul. 1981

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(30) Prioritet begæret fra den
26. jun. 1975, 2528490, DE

(41) Alm. tilg. 27. dec. 1976

(71) HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN, Henkelstrasse 67, 4000
Duesseldorf 1, DE.

(72) Opfinder: Rudolf Lehmann, Froebelstrasse 4a, 4040 Neuss, DE: Hans
F. Pfeiffer, Roetgenstrasse 32, 5657 Haan, DE: Joachim Schindler,
Benrodestrasse 78, 4000 Duesseldorf-Benrath, DE: Wolfgang Schreiber,
Falkenweg 14, 4018 Langenfeld, DE.

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

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af sur protease.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af en protease med særligt bredt pH-virkningsområde i svagt surt område ved dyrkning af en specifik, af jordprøver isoleret mikroorganisme, som er en Rhizopus-art.

Det er almindelig kendt og genstand for mange industrielle fremstillingsmetoder at udvinde proteolytiske enzymer med surt pH-virkningsområde ved dyrkning af mikroorganismer af forskellige slægter, f.eks. stammer af slægten Alternaria, Aspergillus, Fusarium, Paecilomyces, Penicillium, Rhizopus og Trametes. Disse proteaser besidder en optimal virkning ved en almindeligvis som "pH-optimum" betegnet pH-værdi, men deres aktivitet falder dog hurtigt på begge sider af denne pH-værdi. En fornuftig anvendelse af disse proteaser forudsætter derfor et kend-

skab til den ved anvendelsen herskende pH-værdi, som ikke altid er til stede. Desuden er man tvunget til i hvert tilfælde at finde frem til en til den foreliggende pH-værdi egnet protease.

Formålet med opfindelsen består derfor i at finde frem til en sur protease med bredt pH-virkningsområde og høj enzymatisk aktivitet. Denne egenskab er særlig nyttig ved anvendelsen af denne protease i næringsmiddel- og foderstofindustrien, da man netop her må regne med pH-svingninger af ubekendt størrelse hver gang.

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til fremstilling af en sur protease med bredt pH-virkningsområde og er ejendommelig ved, at en stamme af arten *Rhizopus rhizopodiformis* dyrkes aerobt i et næringsmedium, som indeholder assimilerbare carbon- og nitrogenkilder, ved pH-værdier mellem 3 og 7 og temperaturer mellem 25°C og 50°C, og det fremstillede enzym isoleres.

Stammen *Rhizopus rhizopodiformis* besidder følgende kendetegn:

Kugleformet sporangium med tydeligt Columella,
sporangium med tydelig apophyse,
ingen indsnøringer mellem sporangium og apophyse,
sporangiumbærer mest sidegrene,
sporangiumdiameter : 88 µm,
Columella: længde 47 µm, bredde 37 µm,
sporediameter: 6 µ.

Den i den foreliggende opfindelse anvendte art *Rhizopus rhizopodiformis* blev deponeret under nr. CBS 227.75 i Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn (Holland) den 23.3.1975.

Denne stamme blev isoleret af jordprøver under specifikke koncentrationsbetingelser ved pH-værdier mellem 3 og 5 og med proteiner som kasein eller gelatine som C- og N-kilde. Den blev klassificeret i Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn (Holland).

Fremgangsmåden til fremstilling af proteasen kan gennemføres i et flydende eller fast næringsmedium, hvorhos det flydende næringsmedium i almindelighed foretrækkes. Ved dyrkning i en næringsopløsning arbejdes der ifølge den sædvanlige aerobe rystekultur- eller fermentationsmetode.

Næringssubstratet, der skal anvendes i forbindelse med opfindelsen, fremstilles på sædvanlig måde og skal indeholde en carbonkilde, en nitrogenkilde og andre for mikroorganismen nødvendige nærings- og vækststoffer. Som egnede carbonkilder skal nævnes stivelse, dextrin, rørsukker, glukose, fruktose, maltose og sukkerholdige affaldsstoffer. Som nitrogenkilder kommer ammoniumsalte, urinstof, kasein, gelatine, majsstøbe vand og sojabønne mel eller -kager på tale. Til næringssubstratet kan desuden tilsættes uorganiske salte som f.eks. natrium-, kalium-, ammoniumhydrogenphosphater, calcium- og magnesiumsalte. Det kan desuden være hensigtsmæssigt til næringssubstratet at tilsætte vækststoffer som f.eks. gærekstrakt og vitaminer.

Fermentationstemperaturen kan bevæge sig i intervallet fra 25°C til 50°C, men vælges imidlertid fortrinsvis mellem 27°C og 32°C. Næringssubstratets pH-værdi kan være 3,0-7,0, fortrinsvis 4,0-6,0. Dyrkningen gennemføres i almindelighed i et tidsrum fra 20 til 96 timer.

Den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede protease kan udfældes af den filtrerede eller centrifugerede næringsopløsning ved hjælp af sædvanlige metoder ved tilsætning af organisk opløsningsmiddel eller ved udsaltning med f.eks. natriumchlorid, natriumsulfat, ammoniumsulfat eller calciumchlorid og koncentrerer. En rensning kan foretages ved dialysemetoden eller ved behandling på ionbytterharpikser.

Den ifølge opfindelsen fremstillede protease besidder et særligt bredt virkningsspektrum i svagt surt område mellem pH-værdi 2,5 og pH-værdi 6,5. Virkningsoptimumet ligger ved pH-værdi 4,5, området for 80%ig maksimalaktivitet ved pH-værdi 3,3-5,9, området for 60%ig maksimalaktivitet ved pH-værdi 3,0-6,4. Proteasen egner sig i særlig grad som tilsætningsstof til foderstoffer, specielt til forbedring af resultatet ved opdræt og opfodning af fjerkræ, svin, kalve og nyttefisk. Den kan dog desuden også anvendes til andre formål, hvor der kan anvendes sure proteaser, som f.eks. i levnedsmiddelforarbejdende virksomheder, i sure vaske- og rengøringsmidler, specielt rengøringsmidler til fliser, gulve og borde i sygehuse og i husholdningen, som læderhjælpemidler i garverier, desuden i meget rensset form i det medicinske anvendelsesområde som digestivum.

Bestemmelsen af den proteolytiske aktivitet af den foreliggende protease sker efter det kendte bestemmelsesprincip ifølge Anson: en egnet fortyndet mængde enzymopløsning inkuberes ved 40°C i 20 minutter med et tilsvarende volumen af en 1,2%ig kaseinopløsning, hvorhos denne indeholder 0,6% mælkesyre, 6 mol urinstof og 0,1 mol citron- eller eddikesyre. Kaseinopløsningens pH-værdi indstilles på 4,5 ved tilsætning af 2N natriumhydroxid. Efter inkubationen behandles i volumenforholdet 1:1 med 0,4N trichloreddikesyre, det dannede bundfald filtreres fra ufordøjet kasein, og ifølge en vilkårlig æggehvidebestemmelsesmetode bestemmes de ved nedbrydningen dannede proteinspalteprodukter i filtratet. Hertil egner sig f.eks. den af Layne i Methods of Enzymology 3 (1957) side 448 ff. beskrevne metode.

Til hver måleprøve skal der udarbejdes en blindværdi, ved hvilken der først tilsættes trichloreddikesyre og derpå kaseinopløsning. Denne blindværdi giver foruden reagens-tomværdien mængden af lavmolekulære peptider, som allerede er til stede før fordøjelsen i enzymopløsningen. Forskellen mellem hoved- og blindværdi bliver ved den angivne metode så sammenlignet med ekstinktionen, som giver en bestemt mængde tyrosin ved denne bestemmelse. Denne mængde tyrosin er så et mål for den proteolytiske aktivitet af det foreliggende enzym: en enzymenhed (TU) er den mængde enzym, som forårsager den samme ekstinktionsforskel mellem hoved- og blindværdi pr. minut som en 1M tyrosinopløsning, som tilsættes i stedet for enzymopløsningen.

Målingen af den proteolytiske aktivitet ved højere og lavere pH-værdier end 4,5 er uden videre mulig ved passende indstilling af kaseinopløsningen, hvorhos man dog bedst erstatter eddikesyretilsætningen med citronsyre.

Eksempel 1

Til fremstilling af næringsmediet opløses eller dispergeres i 1 liter vand 3 g sojamel, 3 g majsstøbevand, 15 g kasein, 7 g gelatine, 2,4 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 20 g majsstivelse. Næringsopløsningens pH-værdi er 5,3. Majsstivelsen blev nedbrudt kraftigt ved hjælp af amylase. I den steriliserede næringsopløsning blev der ipodet sporer af stammen *Rhizopus rhizopodiformis* og kulturen dyrket under optimal aeration ved 30°C i ca. 50 timer. Efter dette tidsrum filtreres svampemyceliet fra, og den mycel-

frie kulturgrød blev anvendt til bestemmelse af proteaseaktiviteten ved hjælp af den ovennævnte metode. Det viste sig herved, at kulturopløsningen opnåede en enzymatisk aktivitet indtil 18 m TU/ml.

Eksempel 2

Til fremstilling af næringsmediet blev der i 1 liter ledningsvand opløst, henholdsvis dispergeret, 10 g sojamel (uden olie), 5 g majsstøbe- vand, 12 g kasein, 5 g gelatine, 5 g tørbarne af korn, 2,4 g KH_2PO_4 , 1 g NaNO_3 , 1 g NH_4Cl , 0,01 g FeSO_4 og 30 g naturlig majsstivelse. Næringsopløsningens pH-værdi blev efter autoklaveringen indstillet på 5,3. En med denne næringsopløsning forsynet 10 liter fermenterings- beholder blev behandlet med 100 ml af en Czapek-Dox-forkultur (med 5% stivelse og 0,5% gærsekstrakt), som var blevet podet med sporer af svampestammen *Rhizopus rhizopodiformis* og omrystet i 24 timer ved 30°C , og holdt under aeration ved 30°C i ca. 50 timer, indtil pH-værdien var steget til 6,8-7,0. Myceliet blev derpå filtreret fra, og den klare kultursuppe anvendt til bestemmelse af proteaseaktiviteten ifølge den førnævnte metode. Det viste sig derved, at kulturopløsningen opnåede en enzymatisk aktivitet indtil 20 m TU/ml.

Proteasen blev isoleret ved klarfiltrering af suppen under tilsætning af 5 g Filter Cel og 5 g Standard Super Cel fra firmaet Mansville, inddampning ved 50 mm Hg til en tredjedel af udgangsvolumenet og udfældning under tilsætning af 39% vandfrit natriumsulfat under omrøring, hvorved temperaturen blev indstillet på $38-40^\circ\text{C}$. Alternativt kan proteasen imidlertid også udfældes ved tildrypning af 2 volumener ethanol, methanol, acetone eller andre med vand blandbare opløsningsmidler ved en temperatur på -3 til 5°C . Bundfaldet suges fra og tørres i vakuum.

Under anvendelse af den ovenfor beskrevne bestemmelsesmetode bestemtes aktiviteten af den ifølge eksempel 1 og 2 isolerede protease i afhængighed af pH-værdien. I tabellen er angivet pH-værdierne, ved hvilken den optimale eller 50% af den ved optimal pH-værdi målte aktivitet foreligger. Som det fremgår af de ligeledes i denne tabel indeholdte værdier for i litteraturen kendte sure proteaser, besidder den nu fundne protease et bredere og for de nævnte anvendelsesområder gunstigere virkningsområde udtrykt i pH-enheder end de kendte enzymer.

Tabel

<u>Enzym</u>	<u>pH-optimum</u>	<u>50%-værdi</u>
Takamine [®] (acid fungal protease)	2,5 - 3,0	1,5 - 4,0
Denapsin [®]	3,0	1,5 - 4,5
Aspergillus acid protease	2,5	1,5 - 4,0
Proctase [®]	2,0 - 3,0	1,5 - 4,5
Samprose [®]	2,5	2,0 - 4,5
Protease af Rhizopus rhizopodiformis	4,0 - 4,5	2,5 - 6,5

De første fire af de i tabellen nævnte proteaser fremstilles af henholdsvis

Miles, Lab. Inc. Elkhart,
Indiana, USA

Nagase & Co. Ltd., Osaka

Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo

Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokyo.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåde til fremstilling af en sur protease med et bredt pH-virkningsområde, k e n d e t e g n e t ved, at en stamme af arten Rhizopus rhizopodiformis dyrkes aerobt i et næringsmedium, som indeholder assimilerbare carbon- og nitrogenkilder, ved pH-værdier mellem 3 og 7 og temperaturer mellem 25 og 50°C, og det fremstillede enzym isoleres.

Fremdragne publikationer:
